



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Aspergillus*
ISOLADOS DA ESPÉCIE *Annona jahnii* Saff. (ANNONACEAE)**

LUCIANA ARAÚJO XAVIER

Boa Vista - RR

2023

LUCIANA ARAÚJO XAVIER

**ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Aspergillus*
ISOLADOS DA ESPÉCIE *Annona jahnii* Saff. (ANNONACEAE)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa.

Boa Vista - RR

FEVEREIRO/2023

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

X3e Xavier, Luciana Araújo.
Estudo do perfil químico e atividades biológicas de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* E *Aspergillus* isolados da espécie *Annona jahnii* Saff. (Annonaceae) / Luciana Araújo Xavier. – Boa Vista, 2023.
149 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE.

1 – Fungo endofítico. 2 – A. jahnii. 3 – Molecular networking. 4 – GNPS. I – Título. II – Costa, Luiz Antonio Mendonça Alves da (orientador).

CDU – 632.4

LUCIANA ARAÚJO XAVIER

ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Aspergillus* ISOLADOS DA ESPÉCIE *Annona jahnii* Saff. (ANNONACEAE)

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em 16/02/2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 LUIZ ANTONIO MENDONCA ALVES DA COSTA
Data: 17/02/2023 14:20:26-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa (Orientador)
Universidade Federal de Roraima

Documento assinado digitalmente
 AFONSO DUARTE LEAO DE SOUZA
Data: 01/03/2023 13:09:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Universidade Federal de Amazonas

Documento assinado digitalmente
 ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA
Data: 27/02/2023 16:44:13-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza
Universidade Federal de Amazonas

Documento assinado digitalmente
 NEUSA FERNANDES DE MOURA
Data: 17/02/2023 16:32:10-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dra. Neusa Fernandes de Moura
Universidade Federal do Rio Grande

Documento assinado digitalmente
 ANDREY MOACIR DO ROSARIO MARINHO
Data: 17/02/2023 16:06:45-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosario Marinho
Universidade Federal de Pará

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família pelo apoio ao longo destes anos.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa, por ter aceitado me orientar e ter aberto novamente as portas dos laboratórios.

À Profa. Dra. Adriana Flach, pelo apoio, disponibilidade e pelos conselhos dados durante a minha caminhada pelo doutorado.

À Edineide colega de doutorado, que não hesitou em me ajudar quando precisei e com quem pude contar em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo financiamento (CAPES - PRÓ-AMAZÔNIA - Código Financeiro 3260/2013; Processo 23038.000726/2013-43).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ MCTIC/CNPq nº 428988/ 2018-0).

Ao Complexo de Núcleos de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (COMCAP-UEM) e aos professores doutores Eduardo Jorge Pilau e Carla Porto, que possibilitaram as análises dos extratos no cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência.

Aos professores doutores Antônia Queiroz Lima de Souza e Afonso Duarte Leão de Souza da Universidade Federal do Amazonas, pelo auxílio na identificação das linhagens fúngicas e correções do artigo submetido à revista Rapid Communications in Mass Spectrometry.

Enfim agradeço a todos que ajudaram direta ou indiretamente na conquista deste doutorado.

XAVIER, Luciana Araújo. **Estudo do perfil químico e atividades biológicas de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* isolados da espécie *Annona jahnii* Saff. (ANNONACEAE)**. 2023. 149 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, RR-Brasil, 2023.

RESUMO

O estudo de extratos de fungos endofíticos isolados de plantas com conhecido potencial biológico, aumenta a possibilidade de obtenção de metabólitos inéditos e/ou bioativos. A *Annona jahnii* Saff. é uma planta pertencente ao gênero *Annona*, que já está estabelecido como fonte promissora de metabólitos secundários com atividades biológicas. Os fungos endofíticos obtidos desta espécie de planta são fonte inédita de estudo. Desta forma, este trabalho tem por objetivos: a análise metabolômica exploratória de extratos de linhagens fúngicas isoladas de *A. jahnii*, obtidos do meio de crescimento e do micélio de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*; avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante destas linhagens fúngicas; estudar a abordagem de Molecular Networking (MN) para identificação de fungos capazes de biossintetizar metabólitos iguais e análogos aos produzidos pela planta hospedeira; e realizar a triagem de trinta linhagens fúngicas, usando a técnica clássica de cromatografia em camada delgada (CCD) e dados MS/MS organizados em rede molecular, visando a seleção da linhagem mais promissora na obtenção de produtos bioativos. Para a identificação dos compostos, foram realizadas análises por UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS e o uso da ferramenta Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) e fragmentação “*in silico*” utilizando o banco de dados da plataforma Metfrag. O rastreamento qualitativo de metabólitos bioativos de extratos de micélios e meio de crescimento dos trinta fungos *Penicillium* foi realizado a partir da análise por CCD. Este rastreamento por CCD aliado ao MN permitiu a seleção adequada da linhagem que se apresenta com maior potencial para obtenção de metabólitos inéditos e bioativos. Atividade antioxidante por DPPH e antimicrobiana para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) também foram realizadas em alguns extratos. Para a atividade antimicrobiana as linhagens mais promissoras foram F11, F54, F241, F398, F403, F407, F475 e F506 apresentando CIM de 1mg. mL^{-1} frente a maioria dos patógenos testados. Para a atividade antioxidante os extratos obtidos das linhagens fúngicas F54, F398, F403, F407, F475 e F506 foram os que requereram as menores concentrações de extrato $\text{IC}_{50} \leq 10\mu\text{g. mL}^{-1}$ para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. O processamento de dados espectrais no GNPS possibilitou a identificação putativa de 115 compostos de diferentes classes metabólicas, em diferentes extratos das linhagens fúngicas. A abordagem de MN apresentou-se como uma ferramenta eficiente e rápida na identificação de fungos produtores de metabólitos iguais e similares ao da planta hospedeira. Ainda permitiu verificar esta capacidade biossintética em fungos cultivados em laboratório, sem associação com a planta hospedeira. Os resultados obtidos apontam os fungos isolados de *A. jahnii* como recurso inédito e promissor na obtenção de metabólitos bioativos.

Palavras-chave: Fungo endofítico; *A. jahnii*; Molecular Networking; GNPS.

XAVIER, Luciana Araújo. **Study of the chemical profile and biological activities of endophytic fungi of the genera *Penicillium* and *Aspergillus* isolated from the species *Annona jahnii* Saff. (ANNONACEAE).** 2023. 149 f. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Roraima, Boa Vista, RR- Brazil, 2023.

ASBTRACT

The study of extracts of endophytic fungi isolated from plants with known biological potential increases the possibility of obtaining novel and/or bioactive metabolites. *Annona jahnii* Saff. is a plant belonging to the genus *Annona*, which is already established as a promising source of secondary metabolites with biological activities. The endophytic fungi obtained from this plant species are an unprecedented source of study. Thus, this work has the following objectives: the exploratory metabolomic analysis of extracts of isolated fungal strains of *A. jahnii*, obtained from the growth medium and mycelium of fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*; evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of these fungal strains; study the Molecular Networking (MN) approach to identify fungi capable of biosynthesizing metabolites equal to and analogous to those produced by the host plant; and perform the screening of thirty fungal strains, using the classical technique of thin layer chromatography (TLC) and MS/MS data organized in a MN, aiming at selecting the most promising strain in obtaining bioactive products. For the identification of compounds, analyzes were carried out by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS and the use of the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) tool and "in silico" fragmentation using the database of the Metfrag platform. The qualitative screening of bioactive metabolites from extracts of mycelia and growth medium of the thirty *Penicillium* fungi was carried out based on TLC analysis. This screening by TLC combined with MN, allowed the proper selection of the strain that presents the greatest potential to obtain unprecedented and bioactive metabolites. Antioxidant activity by DPPH and antimicrobial activity for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) were also performed in some extracts. For antimicrobial activity the most promising fungal strains were F11, F54, F241, F398, F403, F407, F475 and F506 showing MIC of 1mg.mL^{-1} against most tested pathogens. Antioxidant activity extracts obtained from fungal strains F54, F398, F403, F407, F475 and F506 required the lowest concentrations of extract $\text{IC}_{50} \leq 10\mu\text{g.mL}^{-1}$ to reduce the initial concentration of DPPH by 50%. The processing of spectral data in GNPS, allowed the putative identification of 115 compounds of different metabolic classes, in different extracts of fungal strains. The MN approach proved to be an efficient and fast tool for identifying fungi that produce metabolites that are the same and similar to those of the host plant. It also allowed verifying this biosynthetic capacity in fungi cultivated in the laboratory, without association with the host plant. The results obtained point to fungi isolated from *A. jahnii* as an unprecedented and promising resource for obtaining bioactive metabolites.

Keywords: Endophytic fungus; *A. jahnii*; Molecular Networking; GNPS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
ChEBI	Chemical Entities of Biological Interest
CIM	Concentração inibitória mínima
DHTD	Dehidrohistidilriptofanildiceto-piperazina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
HTD	Histidilriptofanildicetopiperazina
<i>ITS</i>	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
MN	Molecular Networking
MoNA	MassBank of North America
NP-PEG	Difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol
UFC	Unidade Formadora de Colónias
UHPLC/ESI-MS/MS	Ultra-high-performance liquid chromatography/ electrospray ionization/tandem mass spectrometry
UV	Ultravioleta
VAS	Vanilina sulfúrica ácida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO GERAL.....	10
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>Annona jahnii</i> Saff.....	11
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	12
2.2.1 Gênero <i>Penicillium</i>	13
2.2.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	15
2.3 GLOBAL NATURAL PRODUCTS SOCIAL MOLECULAR NETWORKING.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO I	24
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 COLEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E MICROCULTIVO EM TUBOS DE ENSAIO.....	27
2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS.....	28
2.3 PROSPECÇÃO PRELIMINAR POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CDD)	28
2.4 ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
2.5 PERFIL DE ELUIÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DOS 60 EXTRATOS EM CCD.....	28
2.6 ANÁLISES DOS EXTRATOS FÚNGICOS POR UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.....	29
2.7 MOLECULAR NETWORKING (MN) E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
3.1 RENDIMENTO EM MASSA DOS EXTRATOS OBTIDOS DOS FUNGOS APÓS O MICROCULTIVO.....	30
3.2 DETECÇÃO QUALITATIVA DE METABÓLITOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CCD.....	31

3.2.1 Cumarinas e Flavonóides.....	31
3.2.2 Terpenos e Alcalóides.....	33
3.2.3 Atividade antioxidante qualitativa.....	34
3.2.4 Análise comparativa dos resultados da triagem por CCD.....	35
3.3 PERFIL DE ELUIÇÃO EM CCD DOS 60 EXTRATOS FÚNGICOS PARA IMPRESSÃO DIGITAL COMPARATIVA.....	36
3.4 MOLECULAR NETWORKING.....	39
4 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO I	49
CAPÍTULO II	61
1 INTRODUÇÃO	63
2 EXPERIMENTAL	63
2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	63
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS.....	64
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	64
2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	65
2.5 ANÁLISES DOS EXTRATOS FÚNGICOS POR UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.....	65
2.6 MOLECULAR NETWORKING (MN) E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS.....	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
3.1 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDÓFITOS POR SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	66
3.2 MOLECULAR NETWORKING E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS.....	66
3.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE.....	74
4 CONCLUSÕES	76

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO II	82
CAPÍTULO III	100
1 INTRODUÇÃO	102
2 MATERIAIS E MÉTODOS	103
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	103
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	104
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS.....	104
2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	104
2.4.1 Análise da atividade antioxidante	104
2.4.2 Análise da atividade antimicrobiana	104
2.5 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS E MOLECULAR NETWORKING.....	105
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	106
3.1 PERFIL METABOLÔMICO DOS EXTRATO.....	106
3.1.1 Perfil metabolômico dos extratos da <i>A. jahnii</i>	106
3.1.2 Perfil metabolômico dos extratos fúngicos	107
3.2 MOLECULAR NETWORKING PARA ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS FÚNGICOS E DA PLANTA HOSPEDEIRA.....	108
3.3 DESREPLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO FUNGO E PELA PLANTA HOSPEDEIRA E DE COMPOSTOS ANÁLOGOS.....	111
3.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	116
4 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO III	125
CONCLUSÕES FINAIS	148

1 INTRODUÇÃO

A *Annona jahnii* Saff. é uma espécie de planta do gênero *Annona* (Annonaceae), que é caracterizado pela presença de diversas moléculas biologicamente ativas, destacando-se as moléculas das classes das acetogeninas que tem potencial anticâncer, anti-infecciosas e pesticidas naturais (OBERLIES et al., 1995; ZENG et al., 1996; COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1998). Apesar de se encontrar na literatura vários estudos promissores relacionados ao caráter químico e biológico de diferentes espécies do gênero *Annona*, como *A. senegalensis*, *A. squamosa*, *A. sylvatica*, *A. muricata* (AJBOYE, et al., 2010; DANG, et al., 2011; GAVAMUKULYA, et al., 2014; KALIDINDI, et al., 2015), são poucos os estudos sobre perfil químico e biológico da espécie *A. jahnii*.

Além das plantas, outros organismos apresentam-se como matéria-prima para obtenção de metabólitos bioativos, dentre os quais, podem-se citar os fungos endofíticos. Estes microrganismos habitam e colonizam os tecidos internos de diferentes partes da planta sem causar-lhe prejuízos (BACON e WHITE, 2000). Os fungos endofíticos são organismos extremamente diversificados, podem ser encontrados nos mais variados ambientes, em comunidades naturais, colonizando plantas de mangues, florestas, ambientes dos árticos dentre outros (ARNOLD, 2007). De uma única planta é possível isolar centenas de fungos, essa grande diversidade, os tornam fonte rica de novos e bioativos compostos (TAN e ZOU, 2001). Assim, estes microrganismos têm despertado o interesse da comunidade científica, pois se mostram como fonte promissora de metabólitos secundários, enzimas, além de participarem de reações biocatalíticas (CAO et al., 2011; BORGES et al. 2009).

O grupo de pesquisa de biotecnologia e química fina (GBQF) vem realizando estudos sobre perfil químico, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais da espécie *A. jahnii* (SOUSA, 2016). Estes estudos evidenciaram excelente atividade antioxidante e ação bacteriostática do extrato de galhos de *A. jahnii* frente ao patógeno *Pseudomonas aeruginosa*. O grupo de pesquisa também isolou aproximadamente 600 fungos endofíticos de fragmentos de folhas, galhos, caules e raízes sendo agrupados em cerca de 140 morfos de tipos distintos que integram a primeira coleção de fungos endofíticos do grupo de pesquisa de biotecnologia e química fina (GBQF). Estudos prévios com três fungos endofíticos dessa coleção indicaram a presença de flavonoides, terpenos e alcalóides nos seus extratos fúngicos (SOUSA, 2018). Estes fungos apresentam-se como fonte ainda inexplorada de obtenção de metabólitos secundários inéditos e bioativos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química de extratos de linhagens endofíticas de fungos isoladas da *A. jahnii*, avaliar o potencial biológico destes fungos e a capacidade de biossíntese de metabólitos iguais ou análogos aos da planta hospedeira.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil químico dos extratos fúngicos utilizando ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry (UHPLC/ESI-MS/MS).
- Fazer a desreplicação de compostos a partir das plataformas do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) e fragmentação “*in silico*” e banco de dados públicos;
- Avaliar o potencial da abordagem de Molecular Networking (MN) para detecção de fungos produtores de compostos iguais e análogos aos biossintetizados pela planta hospedeira;
- Analisar comparativamente por cromatografia em camada delgada (CCD) e MN os extratos obtidos em microescala de trinta linhagens fúngicas, com o intuito de selecionar a linhagem mais promissora em diversidade de metabólitos e atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos pelo método de microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM);
- Determinar a atividade antioxidante quantitativa e qualitativa por 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) dos extratos fúngicos.

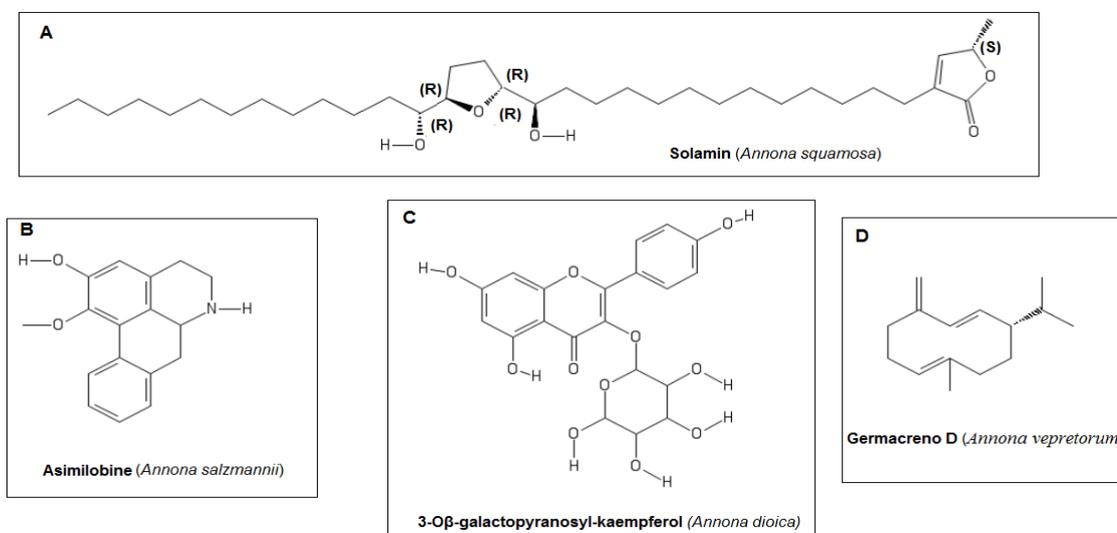
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE *Annona jahnii* Saff.

O uso de diferentes plantas no tratamento de doenças, como resfriados, infecções, inflamações, dentre outros, faz parte da cultura popular, tornando-as fonte amplamente estudada, visando à obtenção de compostos biologicamente ativos. A maioria dos produtos farmacologicamente ativos é encontrada em organismos específicos ou em grupo de organismos, sendo em sua maioria compostos do metabolismo secundário (DEWICK, 2009). Apesar dos diversos métodos disponíveis para a sintetização e descoberta de fármacos, definitivamente a química de produtos naturais é uma das alternativas de grande sucesso (MANN, 1992 apud BARREIRO e BOLZANI, 2009).

As plantas do gênero *Annona* (família *Annonaceae*) se apresentam como matéria-prima promissora na obtenção de metabólitos secundários que exibem importantes atividades biológicas. Alguns exemplos de metabólitos obtidos de espécies de *Annona* são apresentados na Figura 1, destacando a diversidade e o potencial deste gênero na obtenção de compostos bioativos.

Figura 1: Exemplos de moléculas identificadas em espécies do gênero *Annona*. A) Acetogenina (DANG et al., 2011) ; B) Alcalóide (CRUZ, et al. 2011); C) Flavonóide (VEGA, et al. 2007); D) Terpenóide (COSTA et al., 2012).



Outros trabalhos na literatura comprovam o potencial dos metabólitos deste gênero. Ajoboye et al. (2010) mostraram o potencial de desintoxicação antioxidante de extrato aquoso de folhas de *A. senegalensis*. Díaz-de-Cerio et al. (2018), fizeram um estudo do perfil de extratos polares das folhas da *A. cherimola*, caracterizando compostos como, ácidos fenólicos e derivados, flavonóides, fenilpropanóide dentre outros. Outros estudos com espécies deste gênero, abordaram o potencial antioxidante e anticâncer (GAVAMUKULYA et al., 2014), atividade anti-inflamatória (FORMAGIO et al., 2013), atividade antifúngica (KALIDINDI et al., 2015).

Estudos com 3.500 espécies de plantas, das quais 14 foram de espécie *Annonaceae* incluindo a *A. jahnii*, foram realizados na Universidade de Purdue. Estes estudos resultaram no isolamento e identificação de novas acetogeninas que apresentaram potencial para diferentes atividades biológicas (McLAUGHLIN, 2008).

Na literatura é possível encontrar três artigos sobre o estudo químico de *A. jahnii*, todos relacionados ao isolamento de acetogeninas encontradas nos galhos. As acetogeninas Annojahnina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al, 1998), Annodienina e jahnonacina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al, 1999), e Jahonina e Asimicina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al, 2008) apresentaram atividade citotóxica seletiva frente a linhagens de células tumorais humanas.

Os resultados promissores dos estudos direcionados à obtenção de compostos biologicamente ativos a partir de plantas, despertaram o interesse por estudos sobre fungos endofíticos. Esse interesse surgiu a partir da percepção de que estes microrganismos ocupam o mesmo ambiente ecológico dos vegetais e desta forma, apresentam grande potencial para uso no controle biológico (BANHOS, et al., 2014).

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos colonizam os tecidos internos das plantas vasculares (ZHANG, WENDEL E CLARK, 1997) sem causar danos e/ou sintomas ao seu hospedeiro (BACON e WHITE, 2000). A associação dos endofíticos à planta pode ser benéfica, pois estes se adaptam por variação genética, sendo capazes de biossintetizar e secretar compostos que podem auxiliar, por exemplo, na resistência da planta a adversidades (GE et al., 2008). As pesquisas sobre estes microrganismos se deve a capacidade destes, em produzir metabólitos secundários bioativos, que são biossintetizados pela necessidade de sobrevivência destes microrganismos em seu ambiente natural (BRACARENSE e TAKAHASHI, 2014). As pesquisas são realizadas nas mais diferentes áreas e são relacionadas à produção de

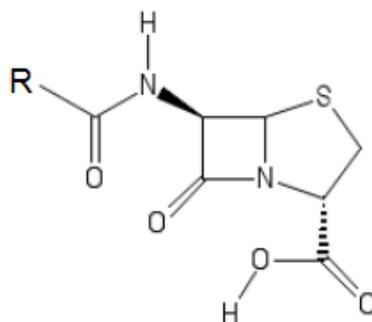
metabólitos secundários (FRISVAD, ANDERSEN e THRANE, 2008; BALLESTER et al., 2015), no emprego em reações químicas (HOLLAND, 1999; AQUINO, OLIVEIRA e DIDONET, 2012), na remediação de ambientes degradados (BAKO, CHUKWUNONSO e ADAMU, 2008; BHARGAVI e SAVITHA, 2014; ZENG et al., 2014).

2.2.1 Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* compreende mais de 200 espécies, distribuídas pelo mundo inteiro, nos mais diferentes ambientes (KOOLEN et al., 2012). Este gênero desperta grande interesse nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e ambientais, sendo estudado nos mais variados campos de pesquisa. Estes fungos apresentam características vantajosas, como a baixa sensibilidade a condições como, temperatura, pH, variações de nutrientes, aeração, além de várias cepas de *Penicillium* serem halotolerantes, ou seja, são capazes de crescer e viver em ambientes salinos ou na ausência de sal, característica esta benéfica na biorremediação (LEITÃO, 2009). O potencial biocatalítico também vem sendo investigado, Ferreira et al. (2015) estudaram a hidroxilação de enonas bis- α,β -insaturadas mediadas por fungos filamentosos, incluindo *P. citrinum* CBMA1186. As duas cetonas bis- α,β -insaturadas estudadas neste trabalho, são análogas à curcumina, sendo seus derivados sintéticos reportados com atividade biológica (WEBER et al., 2005). A desacetilação biocatalítica por elicitação do *P. canescens* imobilizado, também foi estudado por Gai et al. (2017). Estas reações foram propostas para elevar a produção de astragalosídeo IV que apresenta diferentes atividades farmacológicas (REN et al., 2013). Mao et al. (2012) estudaram a aplicação de *P. raistrickii* na 15 α -hidroxilação do 13-etil-gon-4-en-3,17-diona que é um intermediário importante na produção de gestodeno, um esteróide sexual feminino com potentes propriedades contraceptivas orais e poucos efeitos colaterais.

Além dos estudos nas áreas da biorremediação e biocatálise, os fungos *Penicillium* têm principalmente alavancado pesquisas na investigação metabolômica para obtenção de compostos biologicamente ativos. Uma das descobertas de maior representatividade para compostos obtidos de fungos deste gênero foi o isolamento da penicilina (Figura 2). Este metabólito tem ação bacteriostática e bactericida e foi obtido a partir do fungo *P. notatum* (LIGON, 2004). Esta descoberta motivou uma variedade de trabalhos de pesquisa na busca de novos fármacos obtidos a partir deste e de outros fungos endofíticos.

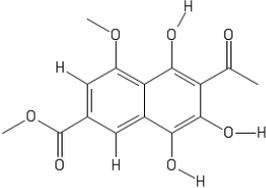
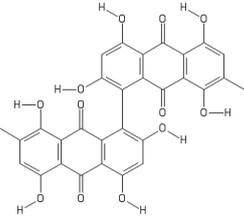
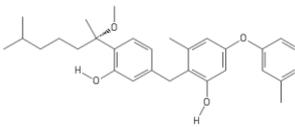
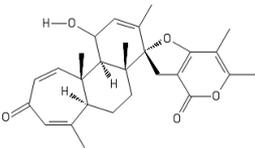
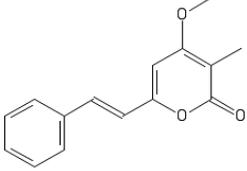
Figura 2: Fórmula estrutural geral da Penicilina.



Pesquisas recentes de compostos bioativos obtidos de fungos do gênero *Penicillium*, comprovam a importância destes microrganismos. Um estudo sobre 4 dicetopiperazinas isoladas de extratos de *P. brocae*, constatou que um destes compostos possui uma potente atividade citotóxica contra células de câncer de ovário humano e forte atividade antimicrobiana (MENG et al. 2016). Uma variedade de metabólitos secundários obtidos do fungo *P. chrysogenum* SCSIO 41001, sendo cinco inéditos, dos quais alguns apresentaram eficientes atividades biológicas, tais como, antiviral e citotóxica frente a células tumorais humanas (CHEN et al., 2017). Extrato metanólico de micélios de *Penicillium* sp, isolado de um indivíduo de *Mauritia flexuosa* L. f. demonstrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, bem como o alcalóide glandicolina B que apresentou atividade contra *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli* (KOOLEN et al. 2012). Na Tabela 1 são apresentados outros metabólitos biologicamente ativos que foram descobertos a partir de fungos de espécies de *Penicillium* obtidos das mais diferentes fontes.

A intensificação destas pesquisas se deve aos avanços das técnicas de isolamento e identificação de metabólitos secundários, que permitem obtenção e investigação de atividades biológicas em um menor espaço de tempo.

Tabela 1: Metabólitos secundários isolados de fungos do gênero *Penicillium* com diferentes tipos de atividades biológicas.

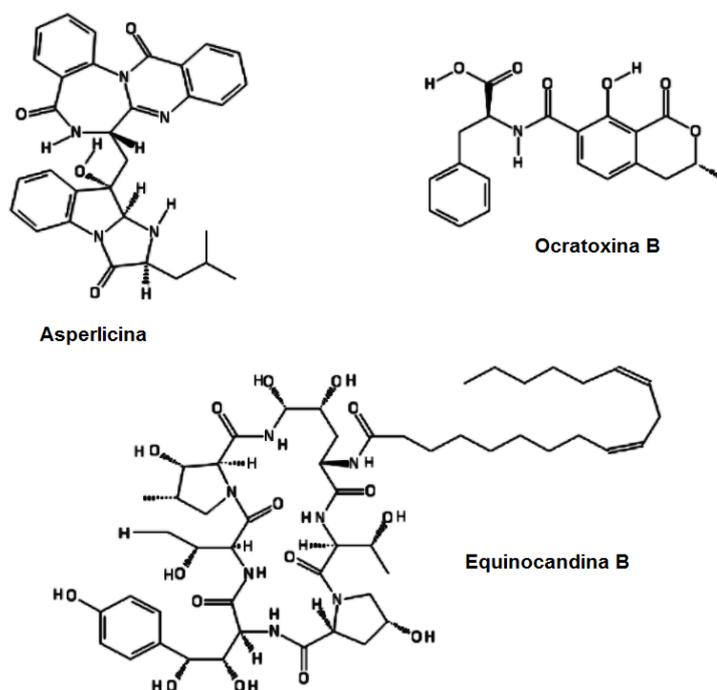
Metabólito	Classe	Fungo	Atividade biológica	Referência
	naftalenóides	<i>Penicillium sp.</i>	Ação antimicrobiana contra <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	Petit et al., 2009
	antraquinona	<i>P. pinophilum</i>	Atividade contra células do câncer pancreático (MIA PaCa-2)	Koul et al., 2016
	Polifenol	<i>P. expansum</i>	Atividade citotóxica contra células de leucemia (HL-60)	Lu et al., 2010
	diterpenóides	<i>Penicillium sp.</i>	Efeito inibitório contra HIV-1	Li et al., 2009
	estirilpirona	<i>Penicillium sp.</i>	Anti-inflamatório	Lee et al., 2013

2.2.2 Gênero *Aspergillus*

As espécies de *Aspergillus* são usualmente encontradas em solo e em biomassas decompostas (PARK e MEHRAD, 2009), no entanto este gênero também é encontrado em águas profundas (LUO et al., 2017), em lama (LIU et al., 2018), mangues (CHEN et al., 2011) e plantas (SOUZA et al., 2004). Os diferentes locais dos quais se obtém estes microrganismos, possibilitam a produção de uma grande variedade de metabólitos, que são uma resposta a estes diversos ambientes de crescimento, que alteram os perfis químicos e consequentemente as suas propriedades biológicas (BRACARENSE e TAKAHASHI, 2014).

Aspergillus podem ser encontrados como endófitos, saprófitas, parasitas e também como patógenos humanos (VADLAPUDI et al., 2017). O estudo de variadas espécies deste gênero de fungo resultou na obtenção de compostos com relevantes atividades biológicas. Frank et al., 2019 isolaram 19 metabólitos do fungo *A. ochraceus*, dos quais 3 compostos inéditos, nomeados de waspergilamida B e dois ácidos ocraspergílicos A e B. Dentre os compostos isolados a viomelina e ocratoxina B, apresentaram forte citotoxicidade contra células do carcinoma ovariano humano. Em um estudo conduzido por Du et al., 2018, 20 derivados policetídeos foram obtidos de *A. europaeus* WZXY-SX-4-1, e apresentaram fraca a moderada atividade de inibição de óxido nítrico (NO) produzido em células BV2 induzido por lipopolissacarídeos (LPS). Dos metabólitos estudados, três benzenofenonas também exibiram uma potente atividade antioxidante. Um promissor potencial antioxidante também foi obtido de um exopolissacarídeo produzido por fungo *Aspergillus* isolado de manguezais (CHEN et al., 2011). A Figura 3 apresenta outros compostos de relevantes atividades biológicas, dentre eles: A asperlicina isolada *A. alliaceus* um antagonista da colecistoquinina (CCK), que atua na inibição da ligação CCK no tecido pancreático (CHANG et al., 1985); a ocratoxina B que apresenta potente citotoxicidade contra carcinoma de células do ovário humano (FRANK et al., 2019); e a Equinocandina B um lipopoliéptido com ação antifúngica (DENNING, 1997). Estes trabalhos ressaltam a importância do estudo químico e biológico de compostos obtidos de espécies de *Aspergillus*.

Figura 3: Metabólitos com potencial biológico isolados de espécies do gênero *Aspergillus*.



2.3 GLOBAL NATURAL PRODUCTS SOCIAL MOLECULAR NETWORKING

A plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) permite o armazenamento, análise e propagação de dados de espectros MS/MS conhecidos (WANG et al., 2016). Assim, é capaz de realizar a desreplicação online, a partir de uma análise automatizada e correlação cruzada baseada em espectrometria de massas (WANG et al., 2016). Para a anotação das moléculas, o GNPS realiza automaticamente busca na própria biblioteca da plataforma, além de busca em bibliotecas espectrais de MS/MS públicas como ReSpect, Massbank, NIST14 e HMDB.

As correlações de espectros de massa a partir da sua similaridade espectral são representadas visualmente pelo chamado Molecular Networking (MN) (YANG et al., 2013). Para a geração do MN, são combinados os espectros MS/MS idênticos e calculados a média para formar os chamados espectros de "consenso". Cada um desses espectros de consenso é representado graficamente na rede como um 'nó' circular.

Estes são então comparados aos pares, e seus nós correspondentes na rede são ligados a arestas com base em sua semelhança espectral. (WINNIKOFF et al., 2014). A conexão de diferentes nós conduz a formação das famílias moleculares, pois representam grupos de compostos com similaridades estruturais, que dentro do MN são denominados clusters (NGUYEN et al., 2013).

Os estudos a partir do uso de MN mostram sua eficácia e vantagem na rápida comparação de perfis de linhagens fúngicas diferentes, na anotação de moléculas conhecidas em extratos de misturas complexas e na captura de análogos relacionados (YANG et al., 2013).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJBOYE, T. O.; YAKUBU, M. T.; SALAU, A. K.; OLADIJI, A. T.; AKANJI, M. A.; OKOGUN, J. I. Antioxidant and drug detoxification potential of aqueous extract of *Annona senegalensis* leaves in carbon tetrachloride-induced hepatocellular damage. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 12, p. 1361–1370, 2010.

AQUINO, G. L. B.; OLIVEIRA, B.; DIDONET, C. C. Biocatalytic reduction of (+)-carvone and (–)-carvone in submerged cultures of the fungi *Penicillium citrinum* and *Fusarium oxysporium*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, n. 5-6, p. 455-458, 2012.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51 – 66, 2007.

BACON C. W.; WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**, Marcel Dekker, New York, USA, 2000, p. 500.

BAKO, S.P.; CHUKWUNONSO, D.; ADAMU, A. K. Bio-remediation of Refinery Effluents by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* And *Penicillium janthinellum*. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 6, n. 3, p. 49-60, 2008.

BALLESTER, A. R.; MARCET-HOUBEN, M.; LEVIN, E.; SELA, N.; SELMA-LÁZARO, C.; CARMONA, L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; GABALDÓN, T. Genome, Transcriptome, and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insight Into Secondary Metabolism and Pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 28, n. 3, p. 232–248, 2015.

BANHOS, E. F. SOUZA, A. Q. L.; ANDRADE, J. C.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; ALBUQUERQUE, P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, n. 1, p. 153-161, 2014.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BHARGAVI, S. D.; SAVITHA, J. Arsenate Resistant *Penicillium coffeae*: A Potential Fungus for Soil Bioremediation. **The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 92, n. 3, p. 369–373, 2014.

BORGES, K.B; BORGES, W. S.; DURÁN-PATRÓN, R.; PUPO, M. T.; BONATO, P. S.; COLLADO, I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 4, p. 385–397, 2009.

BRACARENSE, A. A. P.; TAKAHASHI, J. A. Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 313-321, 2014.

CAO, Y. X.; QIAO, BIN.; LU, H.; CHEN, Y.; YUAN, Y. J. Comparison of the secondary metabolites in *Penicillium chrysogenum* between pilot and industrial penicillin G fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1193–1202, 2011.

CARY, J. W.; GILBERT, M. K.; LEBAR, M. D.; MAJUMDAR, R.; CALVO, A. M. *Aspergillus flavus* Secondary Metabolites: More than Just Aflatoxins. **Food Safety**, v. 6, n. 1, p. 7–32, 2018.

CHAI, Y. J.; CUI, C. B.; LI, C. W.; WU, C. J.; TIAN, C. K.; HUA, W. Activation of the Dormant Secondary Metabolite Production by Introducing Gentamicin-Resistance in a Marine-Derived *Penicillium purpurogenum* G59. **Marine Drugs**, v. 10, n. 3, p. 559-582, 2012.

CHANG, R. S. L.; LOTTI, V. J.; MONAGHAN, R. L.; BIRNBAUM, J.; STAPLEY, E. O.; GOETZ, M. A.; ALBERS-SCHÖNBERG, G.; PATCHETT, A. A.; LIESCH, J. M.; HENSENS, O. D.; SPRINGER, J. P. A Potent Nonpeptide Cholecystokinin Antagonist Selective for Peripheral Tissues Isolated from *Aspergillus alliaceus*. **Science, New Series**, v. 230, n. 4722, p. 177-179, 1985.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

CHEN, S.; WANG, J.; WANG, Z.; LIN, X.; ZHAO, B.; KALIAPERUMAL, K.; LIAO, X.; TU, Z.; LI, J.; XU, C.; LIU, Y. Structurally diverse secondary metabolites from a deep-sea-derived fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 41001 and their biological evaluation. **Fitoterapia**, v. 117, p. 71–78, 2017.

CHEN, Y.; MAO, W.; TAO, H.; ZHU, W.; QI, X.; CHEN, Y.; LI, H.; ZHAO, C.; YANG, Y.; HOU, Y.; WANG, C.; LI, N. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8179–8184, 2011.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; JOHNSON, H. A.; ALALI, F. Q.; HOPP, D. C.; ROGERS, L. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annojahnin from *Annona jahnii*: A Possible Precursor of Mono-tetrahydrofuran Acetogenins. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1609-1616, 1998.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; LIU, X.; HOPP, D. C.; JOHNSON, H. A.; ALALI, F. Q.; ROGERS, L. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annodienin and Jahnonacin: New Bioactive Nontetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Twigs of *Annona jahnii*. **Natural Product Letters**, v. 14, n. 1, p. 65-75, 1999.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; AMESTY, A.; AMARO, M. I.; CORDERO, M. I.; BAHASAS, A. Jahonin and asimicin acetogenins from *Annona jahnii* (Annonaceae) Jahonin y Asimicin Acetogenins de *Annona jahnii* (Annonaceae). **Revista Facultad de Farmacia**, v. 71, n. 1, p. 48-52, 2008.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R. Essential Oil from the Leaves of *Annona vepretorum*: Chemical Composition and Bioactivity. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 2, p. 265- 266, 2012.

CRUZ, P. E. O.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; PRATA, A. P. N. Chemical constituents from the

- bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 872–875, 2011.
- DANG, Q. L.; KIM, W. K.; NGUYEN, C. M.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; PARK, M. S.; LIM, C. H.; LUU, N. H.; KIM, J. Nematicidal and Antifungal Activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* against Various Plant Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11160–11167, 2011.
- DENNING, D. W. Echinocandins and pneumocandins—a new antifungal class with a novel mode of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 611–614, 1997.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 3 ed., Jhon Wiley e Sons, Ltda, cap. 2, 2009, p. 539.
- DÍAZ-DE-CERIO, E.; AGUILERA-SAEZ, L. M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; FERNÁNDEZ, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D. Characterization of bioactive compounds of *Annona cherimola* L. leaves using a combined approach based on HPLC-ESI-TOF-MS and NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3607–3619, 2018.
- DU, X.; LIU, D.; HUANG, J.; ZHANG, C.; PROKSCH, P.; LIN, W. Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities. **Fitoterapia**, v. 130, p. 190–197, 2018.
- FERREIRA, I. M.; VASCONCELLOS, S. P.; CRUZ, J. B.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. M.; ROCHA, L. C. Hydrogenation of bis- α,β -unsaturated enones mediated by filamentous fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p.144–149, 2015.
- FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M.C.; SANTOS, L. A. C.; CARDOSO, C. A. L.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; ANDRADE-SILVA, M.; KASSUYA, C. A. L. Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 1, p. 20-25, 2013.
- FRANK, M.; ÖZKAYA, F. C.; MÜLLER, W. E. G.; HAMACHER, A.; KASSACK, M. U.; LIN, W.; LIU, Z.; PROKSCH, P. Cryptic Secondary Metabolites from the Sponge-Associated Fungus *Aspergillus ochraceus*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 2, p. 99, 2019.
- FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 231 – 240, 2008.
- GAI, Q. Y.; JIAO, J.; LUO, M.; WANG, W.; YAO, L. P.; FU, Y. J. Deacetylation biocatalysis and elicitation by immobilized *Penicillium canescens* in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures: towards the enhanced and sustainable production of astragaloside IV. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 3, p. 297–305, 2017.
- GAO, S. S.; LI, X. M.; DU, F. Y. LI, C. S.; PROKSCH, P.; WANG, B. G. Secondary Metabolites from a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 59-70, 2011.

GAVAMUKULYA, Y.; ABOU-ELELLA, F.; WAMUNYOKOLI, F.; AEL-SHEMY, H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 1, p. 355-363, 2014.

GE, H. M.; SHEN, Y.; ZHU, C. H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Penicidones A–C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 571–576, 2008.

HOLLAND, H. L. Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts. **Steroids**, v. 64, n. 3, p. 178–186, 1999.

KALIDINDI, N.; THIMMAIAH, N. V.; JAGADEESH, N. V.; NANDEEP, R.; SWETHA, S.; KALIDINDI, B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 795 - 802, 2015.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; MEDEIROS, L. S.; RODRIGUES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* l. f. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 771-774, 2012.

KOUL, M.; MEENA, S.; KUMAR, A.; SHARMA, P. R.; SINGAMANANI, V.; RIYAZ-UL-HASSAN, S.; HAMID, A.; CHAUBEY, A.; PRABHAKAR, A.; GUPTA, P.; SINGH, S. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial Pathway in Pancreatic Cancer Cells. **Planta Medicine**, v. 82, n. 4, p. 344–355, 2016.

LEE, D. S.; JANG, J. H.; KO, W.; KIM, K. S.; SOHN, J. H.; KANG, M. S.; AHN, J. S.; KIM, Y. C. OH, H. PTP1B Inhibitory and Anti-Inflammatory Effects of Secondary Metabolites Isolated from the Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. JF-55. **Marine Drugs**, v. 11, n. 4, p. 1409-1426, 2013.

LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, n. 4, p. 1393-1417, 2009.

LI, Y.; YE, D.; CHEN, X.; LU, X.; SHAO, Z.; ZHANG, H.; CHE, Y. Breviane Spiroditerpenoids from an Extreme-Tolerant *Penicillium* sp. Isolated from a Deep Sea Sediment Sample. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 912–916, 2009.

LIGON, B. L. Penicillin: Its Discovery and Early Development. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 52-57, 2004.

LIU, F.; CHEN, G.; ZHANG, L. H.; LIU, B.; CHEN, S.; HUA, H.; BAI, J.; WANG, H. F.; PEI, Y. H. Isolation and structure elucidation of a new compound from the fungus *Aspergillus flavipes* PJ03-11. **Natural Product Research**, v. 32, n. 1, p. 30–35, 2018.

LU, Z.; ZHU, H.; FU, P.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; LIN, H.; LIU, P.; ZHUANG, Y.; HONG, K.; ZHU, W. Cytotoxic Polyphenols from the Marine-Derived Fungus *Penicillium expansum*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 5, p. 911–914, 2010.

LUO, X.; ZHOU, X.; LIN, X.; QIN, X.; ZHANG, T.; WANG, J.; TU, Z.; YANG, B.; LIAO, S.; TIAN, Y.; PANG, X.; KALIYAPERUMAL, K.; LI, J. L.; TAO, H.; LIU, Y. Antituberculosis compounds from a deep-seaderived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. **Natural Product Research**, v. 31, n.16, p. 1958-1962, 2017.

MANN, J. **Murder, Magic, and Medicine**, Oxford University Press: Oxford, 1992, p.16.

MAO, S.; HU, X.; HUA, B.; WANG, N.; LIU, X.; LU, F. 15 α -Hydroxylation of a steroid (13-ethyl-gon-4-en-3,17-dione) by *Penicillium raistrickii* in an ionic liquid/aqueous biphasic system. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 11, p. 2113–2117, 2012.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes Químicos de *Penicillium* sp, um Fungo Endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, p. 190-199, 2007

McLAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1311–1321, 2008.

MENG, L. H.; WANG, C. Y.; MÁNDI, A.; LI, X. M.; HU, X. Y.; KASSACK, M. U.; KURTÁN, T.; WANG, B. G. Three Diketopiperazine Alkaloids with Spirocyclic Skeletons and One Bisthiodiketopiperazine Derivative from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Penicillium brocae* MA-231. **Organic Letters**, v.18, n. 20, p. 5304–5307, 2016.

NIELSEN, K. F.; MOGENSEN, J. M.; JOHANSEN, M.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 5, p. 1225–1242, 2009.

NGUYEN, D. D.; WUA, C. H.; MOREEB, W. J.; LAMSAC, A.; MEDEMAD, M. H.; ZHAOA, X. et al. MS/MS networking guided analysis of molecule and gene cluster families. **PNAS**, v. 110, n. 28, p. 2611-2620, 2013.

OBERLIES, N. H.; JONES, J. L.; CORBETT, T. H.; FOTOPOULOS, S. S.; McLAUGHLIN, J. L. Tumor cell growth inhibition by several Annonaceous acetogenins in an in vitro disk diffusion assay. **Cancer Letters**, v. 96, n. 1, p. 55-62, 1995.

PARK, S. J.; MEHRAD, B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 535–551, 2009.

PETIT, P.; ABREU, L. M.; PFENNING, L. H.; TAKAHASHI, A. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 8-9, 2009.

REN, S.; ZHANG, H.; MU, Y.; SUN, M.; LIU, P. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 33, n. 3, p. 413-416, 2013.

SOUSA, G., P. **Estudo químico e atividade antioxidante e antimicrobiana de *Annona jahnii* Saff. (Annonaceae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

SOUSA, G., P. **Produção de metabólitos e atividades biológicas de fungos endofíticos associados à *Annona jahnii* Saff. do lavrado de Roraima**. 2018. Dissertação (Mestrado em

- Recursos Naturais) – Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2018.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185 - 195, 2004.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448–459, 2001.
- VADLAPUDI, V.; BORAH, N.; YELLUSANI, K. R.; GADE, S.; REDDY, P.; RAJAMANIKYAM, M.; VEMPATI, L. N. S.; GUBBALA, S. P.; CHOPRA, P.; UPADHYAYULA, S. M.; AMANCHY, R. *Aspergillus* Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of *Aspergillus* genus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7325, 2017.
- VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A. VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **The Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.
- WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828 - 837, 2016.
- WEBER, W. M.; HUNSAKER, L. A.; ABCOUWER, S. F.; DECK, L. M.; JAGT, D. L. V. Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3811 - 3820, 2005.
- WINNIKOFF, J. R.; GLUKHOV, E.; WATROUS, J.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H.; Quantitative molecular networking to profile marine cyanobacterial metabolomes. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 1, p. 105–112, 2014.
- YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N. et al. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.
- ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. Recent Advances in Phytochemistry. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 249-310, 1996.
- ZENG, W. L.; LI, W. K.; HAN, H.; TAO, Y. Y.; YANG, L. WANG, Z. T.; CHENA, K. X. Microbial Biotransformation of Gentiopicroside by the Endophytic Fungus *Penicillium crustosum* 2T01Y01. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n.1, p. 184–192, 2014.
- ZHANG, W.; WENDEL, J. F.; CLARK, L. G. Bamboozled Again! Inadvertent Isolation of Fungal rDNA Sequences from Bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 8, n. 2, p. 205–217, 1997.

CAPÍTULO I

Cromatografia em camada delgada e molecular networking para triagem de fungos endofíticos com potencial para produção de metabólitos bioativos: Análise exploratória de extratos de 30 linhagens fúngicas de *Penicillium sp.* isoladas de *Annona jahnii* Saff. (*Annonaceae*)

Cromatografia em camada delgada e molecular networking para triagem de fungos endofíticos com potencial para produção de metabólitos bioativos: Análise exploratória de extratos de 30 linhagens fúngicas de *Penicillium sp.* isoladas de *Annona jahnii* Saff. (*Annonaceae*)

Luciana Araújo Xavier¹, Eduardo Jorge Pilau², Carla Porto³, Antônia Queiroz Lima de Souza⁴, Adriana Flach¹, Luiz Antonio M. A. da Costa^{1*}

¹ Universidade Federal de Roraima- Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Boa Vista, RR, Brazil.

² Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Química, Maringá, PR, Brazil.

³ MS Bioscience - Incubadora Tecnológica de Maringá - Complexo UEM, Maringá, PR, Brazil.

⁴ Universidade Federal do Amazonas - Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Manaus, AM, Brazil.

RESUMO

JUSTIFICATIVA: O elevado número de fungos endofíticos que podem ser isolados de uma única planta hospedeira torna desafiador o estudo destes microrganismos. Diante disso, é necessário propor fluxos de trabalho que possibilitem a rápida caracterização metabólica destas coleções fúngicas. Estes estudos podem auxiliar nos avanços de descobertas de metabólitos de importância biotecnológica.

MÉTODOS: O extratos obtidos dos microcultivos foram submetidos a detecção das classes metabólicas e análise qualitativa da atividade antimicrobiana, feitas a partir de análises por cromatografia em camada delgada (CCD), usando reveladores específicos para cada teste. A CCD também foi usada para análise do perfil de separação destes extratos, usando como eluente tolueno/ acetato de etila/ ácido fórmico (6:3:1). Análise do perfil metabólico e a desreplicação de compostos dos extratos fúngicos foram desenvolvidas usando UHPLC/ESI-MS/MS aliada ao Molecular Networking (MN).

RESULTADOS: A triagem por CCD indicou os extratos do micélio como os mais promissores, pois apresentaram resultado positivo para a atividade antioxidante e maior número de classes de metabólitos detectadas. Além disso, os extratos do micélio apresentaram ótimo perfil de separação em CCD, indicando esta técnica como promissora para um fracionamento preliminar destes extratos. Diante destes resultados, os extratos do micélio foram analisados por MN, que apresentou uma alta similaridade entre os extratos e permitiu a identificação putativa de 24 compostos, com predominância de alcalóides.

CONCLUSÃO: O fluxo de trabalho proposto se mostrou eficaz no processo de triagem das linhagens fúngicas, possibilitou determinar qual linhagem apresenta-se mais promissora na obtenção de metabólitos bioativos, destacando a com maior probabilidade de produção de compostos antioxidantes. Além de apresentar resultados inéditos sobre o perfil metabólico destes microrganismos.

Palavras-chaves: Triagem fúngica; Molecular Networking; GNPS; *Annona jahnii*.

1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies de *Annona* apresentam-se como importantes produtoras de metabólitos biologicamente ativos (DANG et al., 2011; CRUZ, et al. 2011; COSTA et al., 2012), no entanto, poucos trabalhos envolvem o estudo químico de *A. jahnii*. Estudos este que se concentraram no isolamento de acetogeninas encontradas nos galhos. As acetogeninas Annojahnina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al, 1998), Annodienina e jahnonacina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 1999), e Jahonina e Asimicina (COLMAN-SAIZARBITORIA et al., 2008) apresentaram atividade citotóxica seletiva frente a linhagens de células tumorais humanas.

Na década de 1970, o Instituto Nacional do Câncer apresentou estudos realizados com espécies de *Annonaceae* incluindo *A. jahnii*, obtendo-se a produção de substâncias com potencial anticancerígeno (McLAUGHLIN, 2008). Estes dados mostram que apesar de *A. jahnii* não ser uma espécie endêmica do Brasil, sua baixa ocorrência e distribuição geográfica, pode ser fator determinante para esse limitado número de pesquisas sobre esta espécie. Apesar disso, as pesquisas desenvolvidas até o momento denotam significativo valor biotecnológico na exploração de *A. jahnii*, com ênfase na obtenção de produtos químicos de elevado interesse para a sociedade.

Os microrganismos endofíticos colonizam o interior das plantas, apresentando uma relação mútua, contribuindo para várias funções de seu hospedeiro, como absorção de nutrientes e proteção contra patógenos. Os benefícios decorrem pela produção de metabólitos secundários produzidos por estes microrganismos (ADHIKARI e PANDEY, 2019), que apresentam um valor biotecnológico significativo, por exemplo, nas indústrias farmacêuticas e de alimentos (CHAI et al., 2012). Uma única planta armazena uma alta diversidade de fungos endofíticos, abrigando facilmente um reservatório ainda não descoberto destes microrganismos (STONE et al., 2004). Este elevado número de endofíticos que podem ser isolados de um único hospedeiro, torna desafiador o rastreamento de microrganismos com maior potencial de produção de metabólitos bioativos. Assim, é imprescindíveis ampliar os estudos de bioprospecção, visando um rápido rastreamento de fungos com maior capacidade de biossintetizar substâncias biologicamente ativas.

Diante do exposto, considerando que a planta *A. jahnii* apresenta-se como espécie promissora na obtenção de metabólitos bioativos e que os fungos endofíticos podem mimetizar alguns metabólitos de seu hospedeiro e/ou produzir substâncias com maior potencial biológico. E considerando o fato de que estes microrganismos podem representar um recurso mais acessível e importante para a exploração destes metabólitos, este estudo tem

por objetivo: avaliar a produção de metabólitos de trinta linhagens fúngicas do gênero *Penicillium* isoladas a partir da espécie *A. jahnii*; utilizar a técnica clássica de cromatografia em camada delgada (CCD) aliada à análise por Molecular Networking (MN), como ferramentas para um eficiente rastreamento da linhagem com maior potencial para produzir compostos inéditos e bioativos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E MICROCULTIVO EM TUBOS DE ENSAIO

As trinta linhagens fúngicas de *A. jahnii* usadas neste estudo foram previamente isoladas pelo grupo de pesquisa e identificadas preliminarmente como pertencentes ao gênero *Penicillium*, a partir da observação dos aspectos macro e micromorfológicos (SOUZA et al., 2004). Os códigos atribuídos às linhagens foram: F5, F11, F13, F14, F19, F22, F48, F54, F76, F78, F82, F141, F142, F167, F168, F169, F187, F241, F347, F370, F387, F391, F412, F534, F563, F564, F570, F573, F577 e F329.

Para a inoculação de cada linhagem fúngica, preparou-se padrões de inóculo, que consistem em uma suspensão de esporos de fungos na concentração de 15×10^{-8} unidades formadoras de colônia por mililitros, correspondente a escala nefelométrica de McFarland nº 5, em uma solução de 1% de Tween 80. Foram adicionados 30µL de cada suspensão do inóculo, em triplicata, em tubos de ensaio (20 mL) contendo 10 mL dos meios. Os fungos F78, F82, F168, F169, F534, F573 e F577 foram cultivados em meio líquido de batata dextrose, suplementada com 0,2% de extrato de levedura (BDL). Os fungos F11, F13, F14, F19, F48, F76, F142, F167, F187, F241, F329, F412, F563, F564 e F570 foram cultivados em meio líquido, contendo 1% de aveia e extrato de malte, 0,4% de dextrose e extrato de levedura. O meio ISP2 contendo 1% de amido e extrato de malte, 0,4% de dextrose e extrato de levedura, foi usado como meio de cultivo para as linhagens F5, F22, F54, F141, F347, F370, F387 e F391. Os tubos de ensaio foram incubados em condições estéreis, a uma temperatura de 27°C durante 20 dias. Como controle negativo, tubos de ensaio contendo apenas os meios de cultura, foram incubados sob as mesmas condições.

2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Após o período de cultivo, o micélio foi separado do meio líquido. Os meios líquidos foram extraídos três vezes com igual volume de acetato de etila e os micélios foram extraídos três vezes com igual volume de álcool etílico. Após secos, os extratos acetato de etila e os extratos etanólicos foram pesados, para a obtenção do rendimento em massa.

2.3 PROSPECÇÃO PRELIMINAR POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CDD)

Análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas com os extratos fúngicos para a caracterização preliminar das classes de compostos presentes. Cada extrato fúngico do meio foi dissolvido em acetato de etila e cada extrato do micélio foi dissolvido com álcool etílico, as amostras foram aplicadas nas placas cromatográficas contendo sílica gel F254 e comparados aos padrões das classes depois de revelados. A solução reveladora difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol (NP-PEG) foi usada para investigar a ocorrência de flavonóides e solução etanólica de hidróxido de sódio para revelar a presença de cumarinas nos extratos fúngicos, às placas foram reveladas sob luz UV nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm. Para determinar a presença de alcalóides o reagente de revelação foi Dragendorff. A presença de terpenos nos extratos foi analisada após revelação com vanilina sulfúrica ácida (VAS), seguida de tratamento térmico da placa cromatográfica.

2.4 ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Uma análise qualitativa da atividade antioxidante dos extratos foi realizada usando a cromatografia em camada delgada. Cada extrato fúngico foi dissolvido no respectivo solvente de extração, sendo acetato de etila para os extratos do meio e álcool etílico para os extratos do micélio. As amostras foram aplicadas nas placas cromatográficas contendo sílica gel F254, usando-se como revelador o reativo 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

2.5 PERFIL DE ELUIÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DOS 60 EXTRATOS EM CCD.

Os extratos fúngicos foram dissolvidos em solventes apropriados e aplicados em placas cromatográficas contendo sílica gel F254, eluídos com tolueno/ acetato de etila/ ácido

fórmico (6:3:1). Realizou-se a visualização da placa em luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e revelado com ácido sulfúrico em etanol a 10%.

2.6 ANÁLISES DOS EXTRATOS FÚNGICOS POR UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência UHPLC (Shimadzu, Nexera X2, Japão). A separação dos componentes foi realizada em uma coluna Acquity UPLC CHS C18, com dimensões 1.7 μm , 2.1 \times 100 mm (Waters, USA) com vazão de 0.200 mL min^{-1} . A eluição foi realizada com um sistema gradiente de solventes, onde a composição da fase móvel consistiu em: solvente A (água com ácido fórmico 0,1 % v/v) e solvente B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico). O fluxo de eluição seguiu os seguintes parâmetros: 2% B 0-1 min, 30% B 1-3 min, 80% B 3-20 min, 98% B 20-32 min, mantido a 2% B 32- 38 minutos a uma temperatura de 40 °C, realizando a regeneração da coluna nos seis últimos minutos para as próximas análises. O espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Germany) com geometria Q-TOF, equipado com fonte de ionização electrospray. O instrumento foi calibrado usando uma solução de formiato de sódio (10 mmol L^{-1} ; isopropanol; água 1:1 v/v) contendo 50 μL ácido fórmico. A fonte de ionização foi operada em modo positivo e ajustado para 4500V, com potencial de end plate offset -500 V. Os parâmetros do gás secante foram de 8 L min^{-1} a 180 °C com 4 bar de pressão de gás nebulizante. Os dados adquiridos na faixa de m/z 50 a 1200 com uma taxa de aquisição de 5Hz. Os cinco íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto MS/MS). O software usado para a captura de dados foi Hystar Aplicacion versão 3.2 e OtofControl (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

2.7 MOLECULAR NETWORKING (MN) E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS

Os dados de espectrometria de massa foram convertidos em arquivos no formato mzXML e transferidos para o servidor do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para gerar o mapa químico (ID=b04481afeb264c3c996af4568913a5bd), de acordo com a documentação GNPS (WANG et al., 2016). O mapa químico foi gerado após a subtração do solvente e dos brancos, referentes aos extratos dos meios não inoculados. Os valores dos parâmetros utilizados para a obtenção da rede molecular foram: 0,02 Da para a tolerância de massa dos íons precursores e para a tolerância de massa dos fragmentos dos íons; a conexão entre os nós formados apenas com o valor do cosseno maior ou igual a 0,70 e a correspondência mínima de quatro íons fragmentos entre os espectros de MS/MS. O MN foi visualizado usando o software Cytoscape (SHANNON et al., 2003). Para a anotação dos

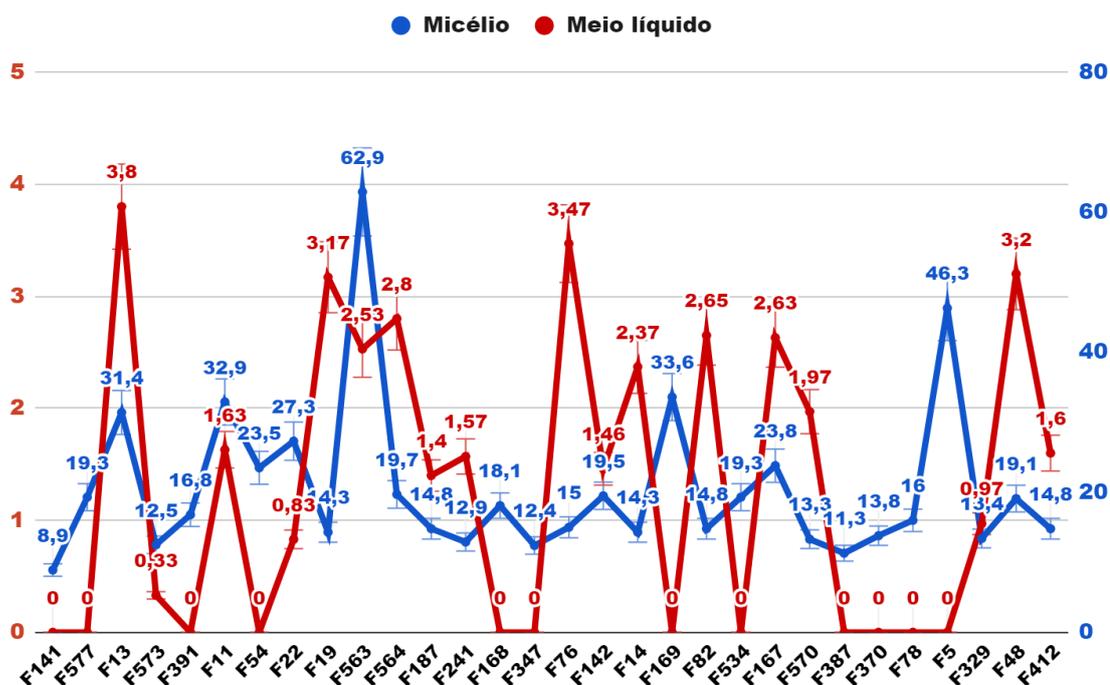
metabólitos, os espectros MN foram comparados com os espectros das bibliotecas do GNPS e os metabólitos com correspondência positiva com a biblioteca tinham íons precursores e fragmentos manualmente comparados com a biblioteca espectral GNPS e dados publicamente disponíveis. O algoritmo SmartFormula® (DataAnalysis versão 4.2, Bruker Daltonics, Alemanha) foi utilizado para a atribuição da fórmula molecular dos íons detectados e o erro de massa foi calculado, levando em conta a diferença das massas monoisotópicas teórica e experimental, considerando uma tolerância de erro de massa abaixo de 10 ppm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 RENDIMENTO EM MASSA DOS EXTRATOS OBTIDOS DOS FUNGOS APÓS O MICROCULTIVO

O microcultivo em tubos de ensaio das 30 linhagens fúngicas foi desenvolvido em triplicata, para obtenção do rendimento médio em massa dos extratos (Figura 1). Os extratos do micélio obtiveram rendimentos entre 8,9 mg e 62,9 mg, resultado bem superior aos obtidos para os extratos do meio líquido, que apresentaram rendimentos que não ultrapassaram 3,8 mg. Além dos baixos rendimentos em massa dos extratos do meio líquido, algumas massas apresentaram diferenças apenas na última casa decimal da balança, fato que resultou na ocorrência de alguns rendimentos desprezíveis. Assim, não foi possível calcular o rendimento em massa para esses extratos, atribuindo-se o valor zero (Figura 1). Apesar deste inconveniente, a metodologia aplicada proporcionou a obtenção de quantidades de extratos suficientes para o desenvolvimento das análises posteriores. Demonstrando que a metodologia desenvolvida apresenta-se eficiente para o fluxo de trabalho proposto. E possibilitou definir os extratos do micélio como os mais favoráveis para cultivo em larga escala. Pois, os altos rendimentos destes extratos podem impactar positivamente na produção dos metabólitos de interesse, em quantidades significativas.

Figura 1: Rendimento em mg dos 60 extratos fúngicos elaborados a partir do micélio e meio líquido, após 20 dias de microcultivo das trinta linhagens.



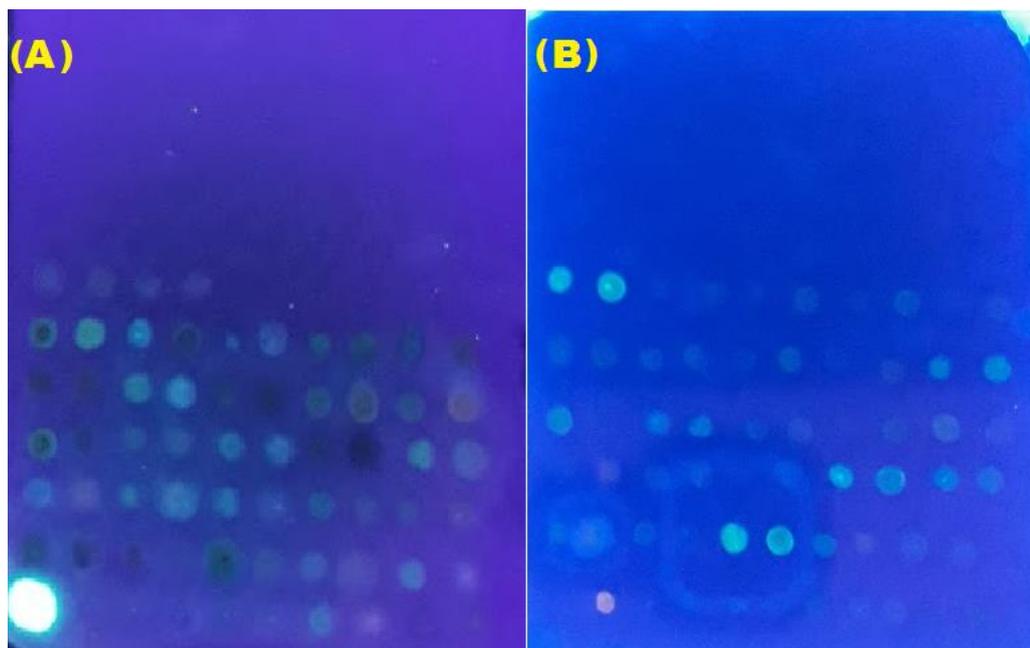
3.2 DETECÇÃO QUALITATIVA DE METABÓLITOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR CCD

A triagem dos 30 fungos do gênero *Penicillium* foi realizada com o intuito de selecionar a linhagem fúngica mais promissora e consistiu na investigação da presença de classes de metabólitos que constantemente apresentam propriedades biológicas.

3.2.1 Cumarinas e Flavonóides

A ocorrência de cumarinas foi investigada a partir da detecção na luz ultravioleta (UV) em comprimento de onda de 365 nm, onde apresentam fluorescência de azul, verde, amarelo e marrom dependendo do tipo de cumarina (WAGNER e BLADT, 1996). As cumarinas apresentam alto potencial biológico, como por exemplo, ação antiprotozoária, que foi observado em cumarinas isoladas da *Kielmeyera albopunctata*, que apresenta atividade “in vitro” contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SCIO et al., 2003). Outras atividades desta classe são: ação anti-inflamatória, vasodilatadora, antiviral e também antitrombótica, sendo compostos derivados do benzo-alfa-pirona (DOMINGO e LÓPEZ-BREA, 2003). Na Figura 2A, é possível observar que a maioria dos extratos apresentou detecção de cumarinas, sendo com algumas pequenas variações na coloração, constatando a presença de cumarinas simples, piranocumarinas e furanocumarinas.

Figura 2: Placas cromatográficas representativas da observação em luz UV 365nm de duas classes de metabólitos. A) Cumarinas e B) Flavonóides

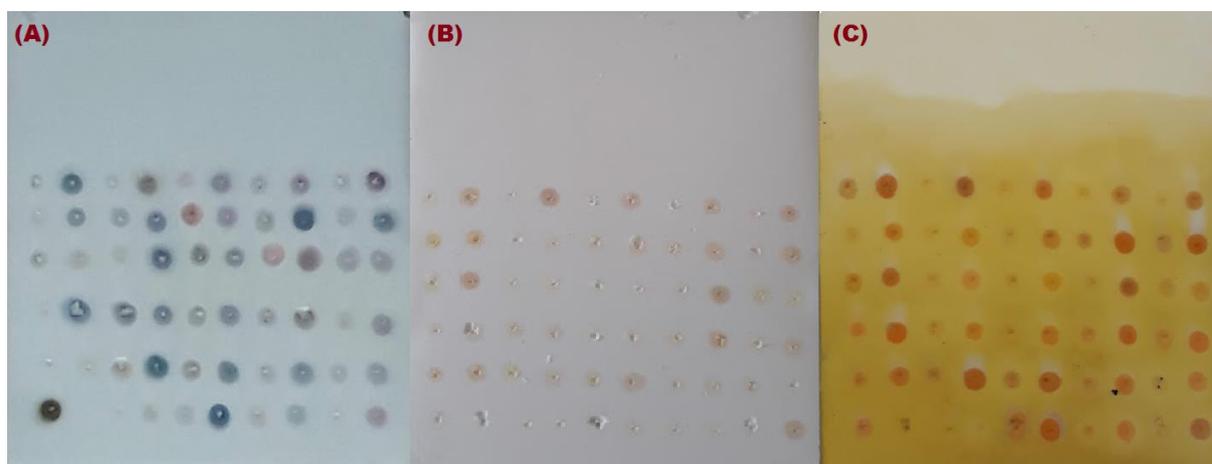


A presença de flavonóides (Figura 2B) também foi investigada sob luz UV 365nm com reagente NP-PEG, que indica presença desta classe a partir da apresentação de manchas nas cores laranja e amarelo esverdeado (WAGNER e BLADT, 1996). Observasse a presença de poucas manchas com características de flavonóides, indicando que esta não é uma classe com quantidades representativas nos extratos das linhagens fúngicas estudadas. A detecção desta classe mesmo em um número baixo de extratos é bastante significativa, considerando que plantas do mesmo gênero da planta hospedeira, apresentam flavonóides de importante interesse biológico. Flavonóides isolados de espécies como *A. dioica*, *A. glabra*, *A. Squamosa* apresentaram ações contra células do carcinoma de Ehrlich, atividade antimicrobiana, atividade pesticida dentre outros (KOTKAR et al., 2001; VEGA et al., 2007; GALVÃO et al., 2016). Nos fungos do gênero *Penicillium* os estudos são mais direcionados a biotransformação de flavonóides para obtenção de diferentes compostos utilizados nas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Silva e Rodriguez-Fo (2010), estudaram a produção de um flavonóide benzilado a partir do crescimento do fungo *P. griseoroseum* em meio suplementado com 5,7,3,4,5 pentamethoxyflavanona. Ciegler et al. (1971), também estudaram a transformação microbiana de flavonóides por fungos do gênero *Penicillium*.

3.2.2 Terpenos e Alcalóides

Os terpenos (Figura 3A) foram revelados com ácido sulfúrico-vanilina (VAS), apresentando manchas, violetas, azuis, marrom avermelhada (WAGNER E BLADT, 1996). Esta classe foi detectada na maioria dos extratos fúngicos analisados. Terpenos é uma classe que contém representantes isolados dos fungos *Penicillium* (MUNDAY-FINCH et al., 1996; MOUSA e RAIZADA, 2013). Os terpenos são compostos naturais que apresentam amplas propriedades biológicas que incluem atividades antifúngicas, antivirais, antiparasitárias, além de efeitos quimiopreventivos de câncer dentre outros (PADUCH et al., 2007).

Figura 3: Placas cromatográficas representativas de diferentes classes de metabólitos. A) Terpeno revelado com ácido sulfúrico-vanilina (VAS). B) Placa contendo os extratos antes da revelação. C) Alcalóides após a revelação com reagente Dragendorff.



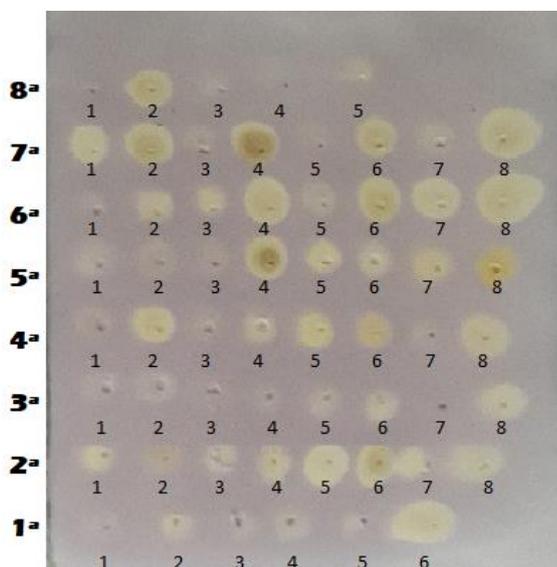
A última classe de metabólitos secundários investigada foi a pertencente aos alcalóides que são em sua grande maioria derivados de aminas terciárias (WAGNER E BLADT, 1996). O reagente usado para revelar esta classe, foi o Dragendorff que exibe a classe em manchas de tom marrom alaranjado (WAGNER E BLADT, 1996). A Figura 3B apresenta o resultado obtido antes da revelação e a Figura 3C após a revelação das placas cromatográficas. A comparação destas placas se faz necessária devido a muitos extratos já apresentarem coloração marrom alaranjado, o que poderia acarretar num falso positivo para a detecção desta classe. É possível observar que a maioria dos extratos apresentam manchas com coloração intensa indicando que principalmente os extratos oriundos do micélio contém esta classe de metabólitos. Em *Penicillium* os alcalóides são uma classe bem representativa, já tendo sido isolados compostos como: roquefortina, isofumigaclavinas A and B (SCOTT e KENNEDY, 1976); marcfortinas B e C (PRANGÉ et al., 1981); dicetopiperazinas

(KOZLOVSKY et al, 2000), quinolina (KOZLOVSKY, et al., 2003); penicidonas (GE et al., 2008).

3.2.3 Atividade antioxidante qualitativa

Análises por cromatografia em camada delgada também foram feitas para avaliar qualitativamente a atividade antioxidante dos extratos fúngicos (Figura 4). O reagente DPPH foi usado para detectar a atividade, indicada pelo aparecimento de manchas amareladas. Os extratos do micélio apresentaram uma forte atividade antioxidante em comparação aos extratos obtidos do meio de cultivo. Na Figura 4, observa-se que as manchas amareladas mais intensas são obtidas principalmente nos *spots* contendo extratos fúngicos obtidos do micélio, que estão com destaque branco.

Figura 4: Placa cromatográfica borrifada com DPPH para a detecção qualitativa da atividade antioxidante. Os códigos com a letra “M” correspondem a extratos do micélio e os com as letras “L” correspondente aos extratos do meio líquido.



1ª Linha: Spots- 1- F78L; 2- F78M; 3- F370L; 4- F370M; 5- F168L; 6- F168M.

2ª Linha: Spots- 1- F391L, 2- F391M; 3- F577L; 4- F577M; 5- F563L; 6- F563M; 7- F573L; 8- F573M.

3ª Linha: Spots- 1- F167L; 2- F167M; 3- F347L, 4- F347M; 5- F19L; 6- F19M; 7- F570L; 8- F570M.

4ª Linha: Spots- 1- F142L; 2- F142M; 3- F141L; 4- F141M; 5- F48L, 6- F48M; 7- F5L; 8- F5M.

5ª Linha: Spots- 1- F329L; 2- F329M; 3- F534L; 4- F534M; 5- F187L; 6- F187M; 7- F82L, 8- F82M.

6ª Linha: Spots- 1- F241L; 2- F241M; 3- F169L; 4- F169M; 5- F412L; 6- F412M; 7- F54L; 8- F54M.

7ª Linha: Spots- 1- F13L, 2- F13M; 3- F387L; 4- F387M; 5- F22L; 6- F22M; 7- F14L; 8- F14M.

8ª linha: Spots- 1- F11L; 2- F11M; 3- extrato meio ISP2; 4- extrato meio BDL; 5- extrato meio

AVEIA.

Apesar do teste positivo para atividade antioxidante ser predominante nos extratos do micélio, alguns extratos do meio também apresentaram atividade antioxidante. Estes compostos que podem retardar, inibir ou prevenir a oxidação de matérias (CARBOUÉ et al.,

2019), que são potencialmente prejudiciais à saúde, despertando grande interesse na indústria alimentícia (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) e podendo fornecer proteção contra o câncer (SARDAS, 2003). Os resultados aqui apresentados comprovam a diversidade metabólica dos extratos fúngicos obtidos do micélio e meio líquido de um mesmo fungo. Além de destacar a importância do rastreamento inicial para identificação de linhagens fúngicas mais promissoras para obtenção de compostos biologicamente ativos.

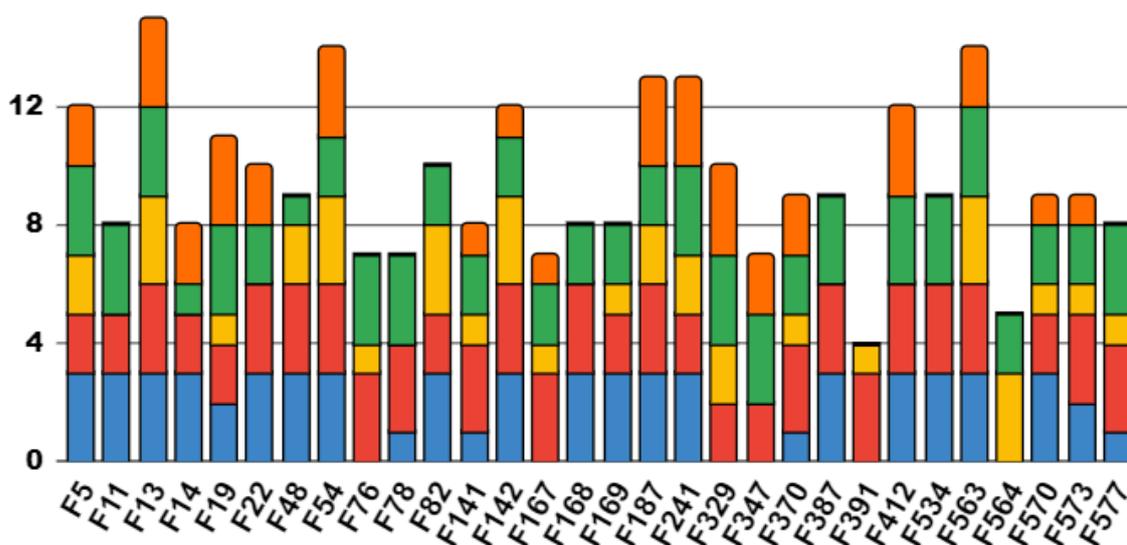
3.2.4 Análise comparativa dos resultados da triagem por CCD

Na Figura 5 são apresentados os resultados obtidos para todas as análises cromatográficas feitas para a detecção das diferentes classes de metabólitos e para a avaliação qualitativa de atividade antioxidante. O gráfico apresentado (Figura 5) foi construído a partir da atribuição dos seguintes valores para a percepção visual da intensidade das manchas de cada metabólito ou atividade: valor zero, para indicar ausência; valor um indicando leve presença; dois para presença moderada; e três para forte presença detectada. Observa-se no gráfico que apenas seis extratos do micélio não foram eficientes para a atividade antioxidante, contra 17 extratos do meio líquido. Para o meio líquido destacou-se os fungos F13, F48, F54 e F563 que apresentaram detecção de um maior número de classes metabólicas e atividade antioxidante positiva. Dentre estes, o extrato do F54 apresentou rendimento em massa desprezível, assim este resultado positivo para a análise da presença de metabólitos, indica que a massa do extrato, não é fator determinante para essa análise qualitativa. Outros extratos obtidos de F141 e F577 que também resultaram em massas desprezíveis, apresentaram resultados promissores para a exploração de quatro classes aqui testadas.

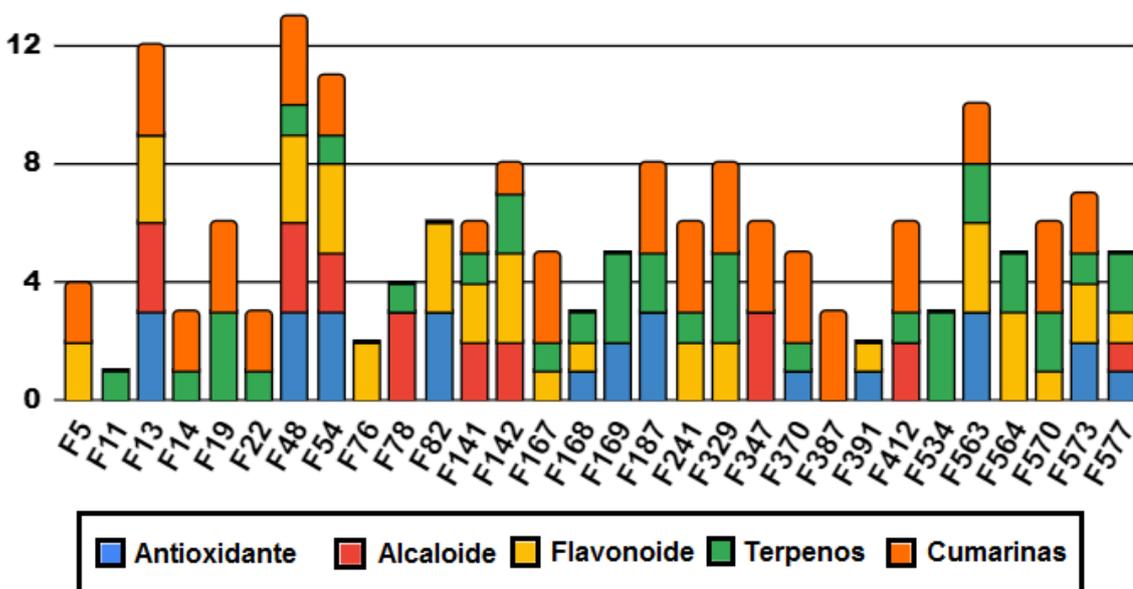
Os extratos do micélio apresentaram resultados significativos também para os fungos F13, F563 e o F54, além dos F5, F187 e F241. É importante destacar o extrato do F241, que apresentou o quinto menor rendimento em massa entre os extratos do micélio, no entanto, figurasse entre os extratos mais promissores na exploração de metabólitos das classes terpenos e cumarinas com forte detecção, alcalóides e flavonóides com moderada detecção. Além de apresentar expressiva atividade antioxidante. A análise comparativa dos testes para detecção de metabólitos e atividade antioxidante permitiu destacar os extratos F5, F13, F54, F187, F241 e F563 do micélio, como aqueles que apresentaram resultados mais positivos para o maior número dos testes realizados.

Figura 5: Resultados da detecção qualitativa das classes metabólicas e atividade antioxidante dos 60 extratos. Os valores atribuídos para a percepção visual da intensidade das manchas na CCD foram: valor zero, para indicar ausência; valor um indicando leve presença; dois para presença moderada; e três para forte presença detectada. Esses valores foram usados para a construção do gráfico de barras.

A) Extratos do micélio



B) Extratos do meio líquido



3.3 PERFIL DE ELUIÇÃO EM CCD DOS 60 EXTRATOS FÚNGICOS PARA IMPRESSÃO DIGITAL COMPARATIVA

Após o rastreamento de classes de metabólitos feitas nos extratos fúngicos obtidos, realizou-se a análise do perfil de eluição de cada um dos 60 extratos (Figura S1). Esta análise

foi feita em CCD, usando como eluente tolueno/ acetato de etila/ ácido fórmico (6:3:1). Esta fase móvel apresentou uma boa separação em termos de número de pontos e formas, para a maioria dos extratos (Figura 6). As placas foram visualizadas em UV nos comprimentos de onda de 365 nm e 254 nm, sendo possível apenas a visualização de manchas em 365 nm (Figura 6A). As placas foram reveladas com ácido sulfúrico em etanol a 10% (Figura 6B).

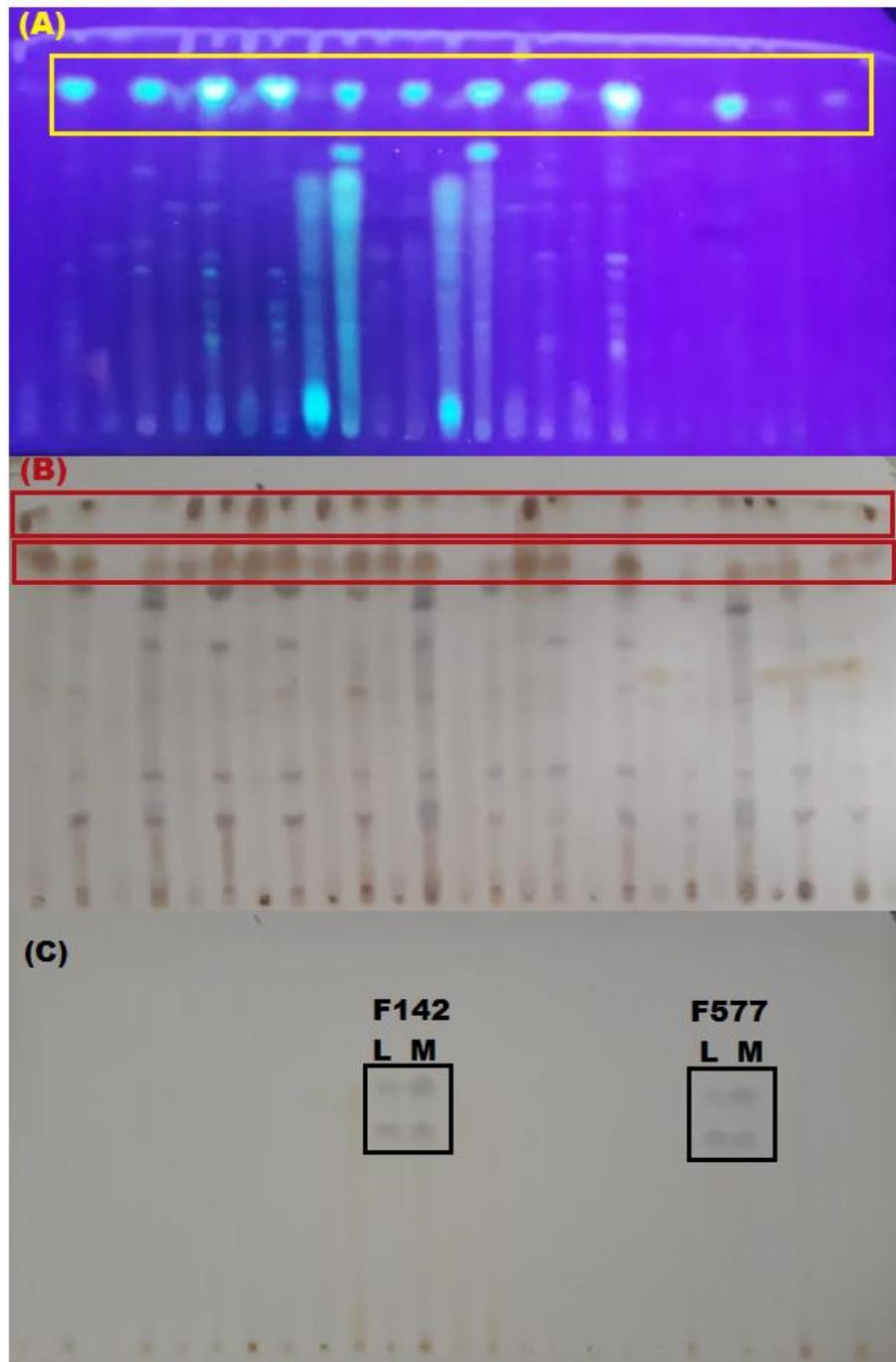
A revelação com ácido sulfúrico mostra uma similaridade entre os extratos fúngicos analisados. Duas manchas bem definidas, com tonalidades marrons intensas, estão presentes no topo das placas, estes pontos foram observados em aproximadamente 68% dos extratos. Apresentando maior predominância e melhor separação nos extratos do micélio F167, F570, F142, F241, F187, F329, F14, F13, F82, F 563, F5, e nos do meio líquido F570, F14, F13, F563 (Figura S1). Estes resultados apontam a técnica de CCD como uma alternativa fácil e viável, para o fracionamento destes extratos, visando à separação destas duas bandas bem definidas.

A visualização em UV 365nm mostrou que a maioria dos extratos fúngicos obtidos dos micélios apresentaram uma mancha fluorescente azul-esverdeada no topo da placa, mostrando uma similaridade entre os extratos. Os extratos obtidos do F142 e F141 foram os únicos extratos que apresentaram uma mancha arrastada na visualização pelo UV, resultado da presença de outros compostos fluorescentes que não foram separados de forma definida pela fase móvel aplicada. Outros pontos fluorescentes também são observados em outros extratos de forma mais definida, no entanto, devido à proximidade destas manchas, a CCD com esta fase móvel não seria a técnica mais indicada para separação destes pontos.

A Figura 6 C apresenta uma placa representativa da análise por CCD visualizada a olho nu. Os extratos F78, F13, F54, F563, F412, F577 micélios e meios líquidos apresentam duas bandas bem definidas e separadas, únicas destes extratos, mostrando que estas seis linhagens produzem compostos exclusivos, diferentes das demais linhagens.

A análise por CCD desenvolvida com a fase móvel proposta, apresentou um excelente fingerprint do perfil dos 60 extratos. É uma técnica simples e de baixo custo, que possibilitou a comparação simultânea de vários extratos em uma mesma placa, auxiliando a detectar as semelhanças e exclusividades de cada. Permitiu verificar o comportamento desses extratos em relação à facilidade na separação de frações, pois é uma técnica eficientemente usada na bioprospecção e que possibilita um preliminar fracionamento de extratos complexos (HAZAA et al., 2022).

Figura 6: Placas representativas da análise comparativa por CCD dos 60 extratos fúngicos eluídos com tolueno/ acetato de etila/ ácido fórmico (6:3:1). A) Visualizada em luz UV 365nm, B) Revelada com ácido sulfúrico em etanol a 10% e C) Placa não revelada, contendo manchas exclusivas visíveis a olho nu.



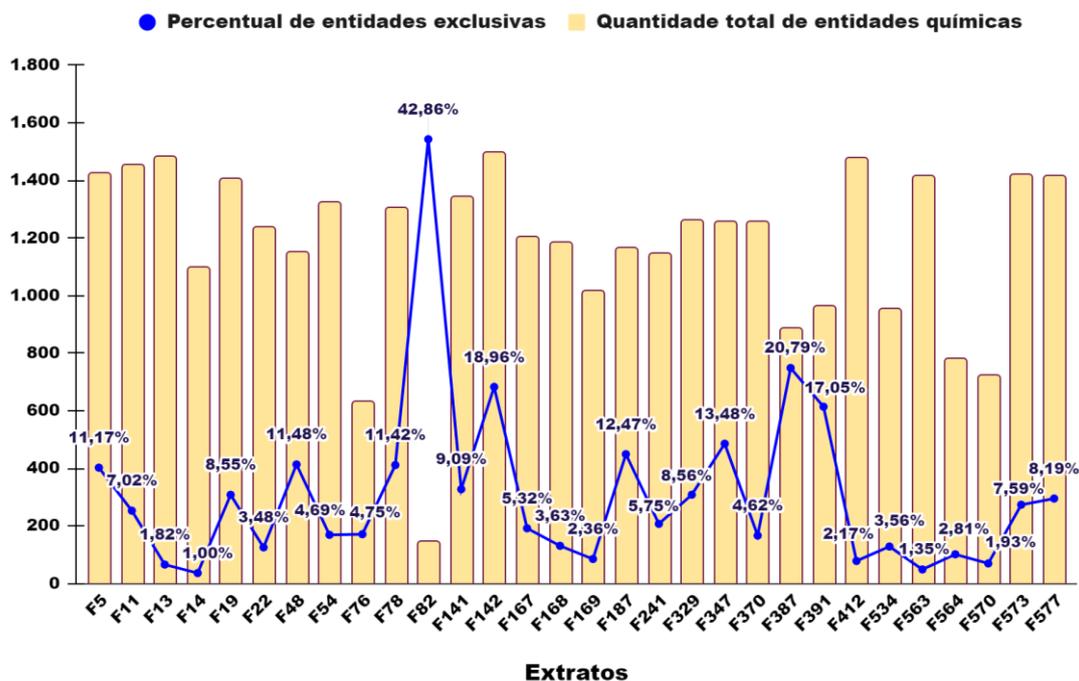
3.4 MOLECULAR NETWORKING

As análises por CCD apontaram os extratos do micélio, como os mais promissores para a atividade antioxidante, presença de uma maior variedade de classes metabólicas, além de apresentar um fingerprint mais atrativo. Estes resultados levaram a seleção destes extratos para análises por UHPLC-ESI-Q-TOF para obtenção de dados MS/MS que foram organizados pela ferramenta Molecular Networking (MN). A organização destes dados das trinta linhagens fúngicas foi feita através da plataforma do GNPS e visualizados usando o software Cytoscape.

A partir da análise exploratória das 9.018 entidades químicas geradas no MN, elaborou-se um gráfico comparativo dos extratos fúngicos (Figura 7), que permitiu verificar e quantificar com maior confiabilidade o grau de similaridade entre os extratos. Observou-se que 24 extratos apresentaram mais de mil entidades químicas detectadas, resultado que destaca o etanol como um eficiente solvente, pois favoreceu a extração de uma abundante diversidade de metabólitos dos micélios. É importante destacar que esses fungos, podem se apresentar como microrganismos altamente produtores de metabólitos secundários, o que influencia também no elevado número de entidades detectadas. Esta elevada abundância permite, uma exploração mais conveniente destas matrizes biológicas ainda não estudadas, aumentando a probabilidade de obtenção de compostos inéditos e bioativos.

Do total de entidades químicas detectadas, menos de 20% foram exclusivas de cada extrato (Figura 7). O F82 apresentou o menor número de entidades químicas, no entanto, se destaca com o maior percentual (42,86%) de entidades exclusivas, apontando este fungo como o mais distinto dentre todas as linhagens. A análise exploratória permitiu observar que na maioria dos extratos, mais de 80% dos possíveis metabólitos são produzidos por dois ou mais extratos. Destes, cerca de 8% são encontrados em 10 ou mais extratos. Estes percentuais mostram a similaridade no perfil químico destes extratos, informações estas já observadas anteriormente de forma qualitativa nas análises por CCD desenvolvidas com a fase móvel. Os resultados apontam que o estudo metabolômico de um único fungo, possibilita obter informações importantes sobre as demais linhagens. Isto é possível, pelo uso da ferramenta Molecular Networking, que permite a identificação de diferentes metabólitos em um mesmo cluster, a partir da desrepliação de um único metabólito pelo GNPS e bibliotecas de acesso aberto (SILVA et al., 2020).

Figura 7: Gráfico do quantitativo de entidades químicas totais detectadas em cada extrato em comparação ao percentual de entidades exclusivas detectadas nos extratos. Dados obtidos do MN elaborado com os dados espectrais de extrato.

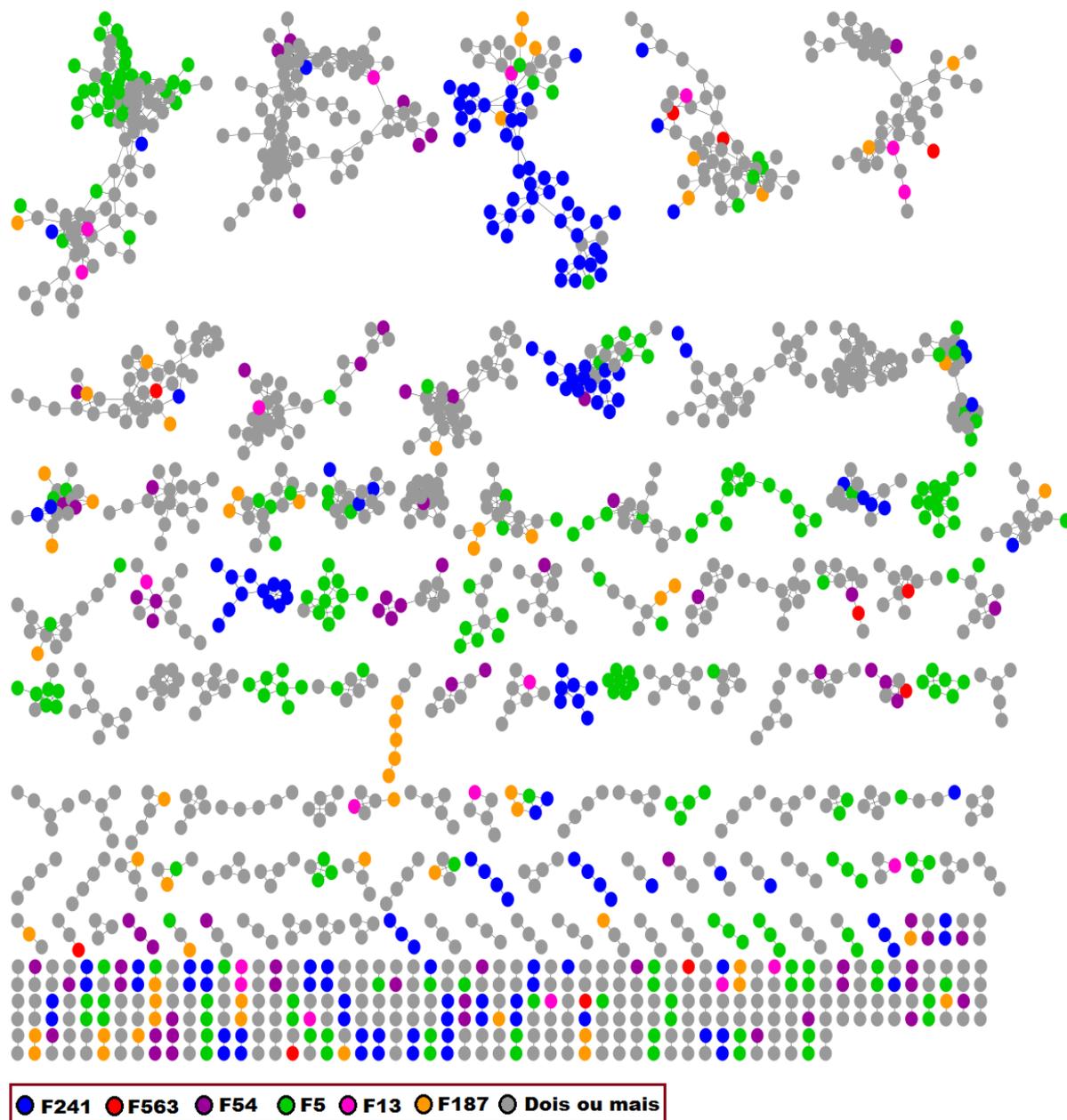


Após as análises qualitativas por CCD e MN dos trinta extratos, foram seleccionados os seis mais promissores. A seleção destes obedeceu alguns critérios, como: uma acentuada atividade antioxidante, maior variedade de classes metabólicas, bom rendimento em massa, elevada diversidade de entidades químicas apresentadas no MN, além de uma conveniente separação por CCD. Desta forma, organizaram-se os dados espectrais dos extratos F5, F13, F54, F187, F241 e F563, em uma nova rede molecular (Figura 8).

Os nodes com cores azul, vermelho, roxo, verde, rosa e laranja são F241, F563, F54, F5, F13 e F187 respectivamente. Os nodes em cinza representam as entidades químicas detectadas em mais de um extrato e apresentam-se visualmente com maior abundância no mapa químico gerado. Este resultado confirma a alta similaridade desses extratos, destacando-se os extratos do F5 e F241 como aqueles que apresentaram o maior número de entidades exclusivas.

A análise exploratória permitiu a identificação putativa de 24 compostos (Tabela S1), que obtiveram acertos na biblioteca do GNPS. Estes compostos tiveram seus espectros de fragmentação (Figuras S2-S25) verificados, além do cálculo de erro em massa, com tolerância inferior a 10 ppm.

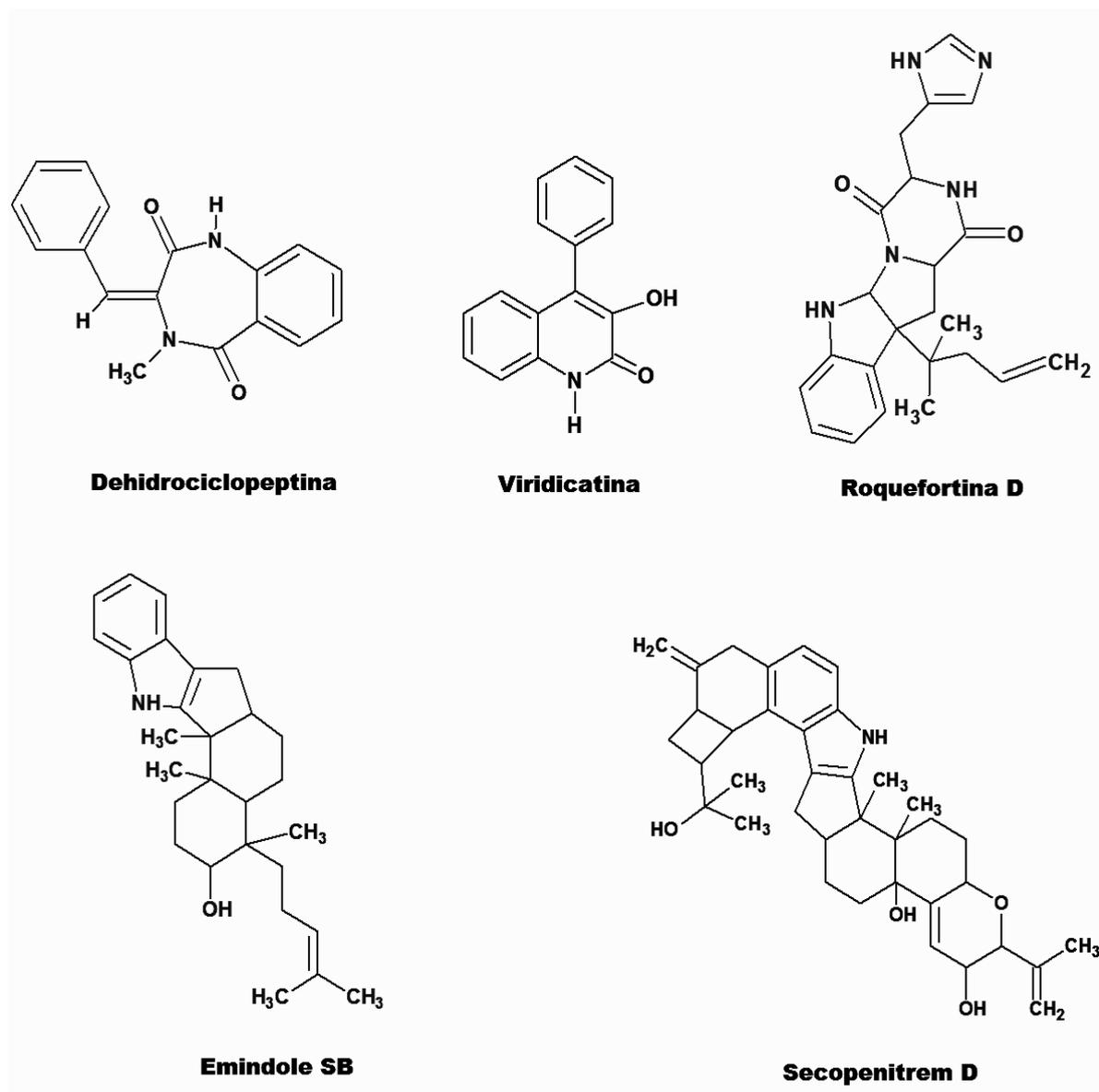
Figura 8: Rede molecular visualizada no Cytoscape dos dados MS/MS dos 6 extratos fúngicos selecionados. Apresentação do mapa contendo as entidades químicas presentes em clusters, após a subtração dos controles de meio de cultivo e branco da coluna.



Das classes químicas putativamente identificadas, a classe alcalóide foi a predominante, com 13 compostos desreplcados. Alguns dos alcalóides sugeridos encontram-se em clusters contendo vários nodes, ou seja, são entidades químicas que apresentam características estruturais similares, e podem representar outros metabólitos da classe dos alcalóides. Podem ser citados, por exemplo, a roquefortina D e a emindole SB (Figura: 9) que se apresentaram dentro de clusters maiores, com 78 e 31 nodes respectivamente. Metabólitos da rota biossintética da roquefortina já foram identificados em cepas de fungos *Penicillium* (OVERY et al., 2005; ALI et al., 2013). Atividade antiproliferativa contra células de

carcinoma hepatocelular (HepG2), já foi relatado para alguns análogos da roquefortina (NIU et al., 2018).

Figura 9: Alguns alcalóides identificados putativamente nos extratos fúngicos.



O alcalóide emindole SB um alcalóide indólico-diterpenico já foi isolado de micélio de *Emericella striata* (NOZAWA et al., 1988). Alguns representantes desta classe segundo Clark 2003, possuem bioatividades significativas, sendo alguns, agentes que causam distúrbios neurológicos. A viridicatina apresenta atividades como a inibição da metástase de células cancerosas (LIANG et al., 2019). Análogos a dehidrociclopeptina, apresentam-se como agentes anti-inflamatórios, no tratamento de doenças neurodegenerativas (WANG et al., 2020). Já o secopenitrem D, possui potente atividade contra praga agrícola *Helicoverpa zea* (LAAKSO et al., 1992), praga de culturas como milho, algodão e tomateiro. Compostos de

outras classes como terpenóides, cumarinas, ácidos graxos, policetídeos dentre outros, também foram identificados putativamente.

A análise por Molecular Networking destacou os fungos F5 e F241, como maiores produtores de metabólitos exclusivos destes extratos. Que apresentaram elevada conexão com metabólitos de outros extratos. É importante destacar que o F241 apresentou estes resultados significativos, mesmo apresentando o menor rendimento entre os extratos selecionados. Assim, o fungo F241 apresenta-se como a linhagem mais promissora, dentre as estudadas neste trabalho, considerando as análises aqui desenvolvidas. Desta forma, o fluxo de trabalho aqui proposto mostrou-se eficiente na triagem de linhagens fúngicas, pois possibilitou determinar qual linhagem é mais oportuna na obtenção de produtos biotecnológicos com alto valor agregado.

4 CONCLUSÕES

A triagem dos 30 fungos usando as técnicas de CCD e UHPLC aliado a Molecular Networking apresentou resultados satisfatórios, pois possibilitou rastrear e identificar metabólitos que apresentam diversas e potentes atividades biológicas. Permitiu ainda, selecionar a linhagem mais promissora, que contribuirá para estudos futuros destas matrizes biológicas. Os extratos do micélio se apresentaram como a matriz mais significativa, em relação ao potencial antioxidante e obtenção de uma maior diversidade metabólica, destacando-se a classe dos alcalóides.

Estudos de caracterização metabolômica de linhagens fúngicas inéditas, como as deste trabalho, são importantes para avanços na descoberta de compostos com potencial biotecnológico. A rápida exploração de variadas e complexas matrizes biológicas são fundamentais para destacar produtores de metabólitos exclusivos, para priorizar e focar em matrizes biológicas que realmente representam um novo e poderoso recurso para a obtenção de produtos químicos especializados.

Nossas descobertas devem ser seguidas por mais estudos detalhados, pois revelam os fungos endofíticos isolados da planta *A. jahnii* como um promissor recurso para obtenção de metabólitos bioativos, com alta variabilidade e complexidade na composição microbiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, P.; PANDEY, A. Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. **Rhizosphere**, v. 9, p. 2–9, 2019.

ALI, H.; RIES, M. I.; NIJLAND, J. G.; LANKHORST, P. P.; HANKEMEIER, T.; BOVENBERG, R. A. L. A. Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

BALLESTER, A. R.; MARCET-HOUBEN, M.; LEVIN, E.; SELA, N.; SELMA-LÁZARO, C.; CARMONA, L.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; GABALDÓN, T. Genome, Transcriptome, and Functional Analyses of *Penicillium expansum* Provide New Insight Into Secondary Metabolism and Pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 3, p. 232–248, 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

CARBOUÉ Q.; MARESCA M.; HERBETTE G.; ROUSSOS S.; HAMROUNI R.; BOMBARDA I. Naphtho-Gamma-Pyrones Produced by *Aspergillus tubingensis* G131: New Source of Natural Nontoxic Antioxidants. **Biomolecules**, v. 10, n. 29, p. 2-15, 2019.

CHAI, Y. J.; CUI, C. B.; LI, C. W.; WU, C. J.; TIAN, C. K.; HUA, W. Activation of the Dormant Secondary Metabolite Production by Introducing Gentamicin-Resistance in a Marine-Derived *Penicillium purpurogenum* G59. **Marine Drugs**, v. 10, n. 3, p. 559-582, 2012.

CHEN, S.; WANG, J.; WANG, Z.; LIN, X.; ZHAO, B.; KALIAPERUMAL, K.; LIAO, X.; TU, Z.; LI, J.; XU, C.; LIU, Y. Structurally diverse secondary metabolites from a deep-sea-derived fungus *Penicillium chrysogenum* SCSIO 41001 and their biological evaluation. **Fitoterapia**, v. 117, p. 71–78, 2017.

CIEGLER, A.; LINDENFELSER, L. A.; NELSON, G. E. N. Microbial Transformation of Flavonoids. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 974 - 979, 1971.

CLARK, J. S.; MYATT, J.; WILSON, C.; ROBERTS, L.; WALSH, N. Exploration of the biomimetic synthesis of indole-diterpene mycotoxins: an unexpected cascade reaction during the attempted synthesis of emindole SB. **Chemical Communications**, v. 7, n. 13, p. 1546–1547, 2003.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; JOHNSON, H. A.; ALALI, F. Q.; HOPP, D. C.; ROGERS, L. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annojahnin from *Annona jahnii*: A Possible Precursor of Mono-tetrahydrofuran Acetogenins. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1609-1616, 1998.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; LIU, X.; HOPP, D. C.; JOHNSON, H. A.; ALALI, F. Q.; ROGERS, L. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annodienin and Jahnonacin: New Bioactive

- Nontetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Twigs of *Annona jahnii*. **Natural Product Letters**, v. 14, n. 1, p. 65-75, 1999.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; AMESTY, A.; AMARO, M. I.; CORDERO, M. I.; BAHASAS, A. Jahonin and asimicin acetogenins from *Annona jahnii* (Annonaceae) Jahonin y Asimicin Acetogenins de *Annona jahnii* (Annonaceae). **Revista Facultad de Farmacia**, v. 71, n. 1, p. 48-52, 2008.
- COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R. Essential Oil from the Leaves of *Annona vepretorum*: Chemical Composition and Bioactivity. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 2, p. 265-266, 2012.
- CRUZ, P. E. O.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; PRATA, A. P. N. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 872-875, 2011.
- DANG, Q. L.; KIM, W. K.; NGUYEN, C. M.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; PARK, M. S.; LIM, C. H.; LUU, N. H.; KIM, J. Nematicidal and Antifungal Activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* against Various Plant Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11160-11167, 2011.
- DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista Española de Quimioterapia**, v.16, n. 4, p. 385-393, 2003.
- GALVÃO, S. S. L.; MONTEIRO, A. S.; SIQUEIRA, E. P.; BOMFIM, M. R. Q.; DIAS-SOUZA, M. V.; FERREIRA, G. F.; DENADAI, A. M. L.; SANTOS, A. R. C.; SANTOS, V. L.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; FERNANDES, E. S.; MONTEIRO-NETO, V. *Annona glabra* Flavonoids Act As Antimicrobials by Binding to *Pseudomonas aeruginosa* Cell Walls. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2053, 2016.
- GE, H. M.; SHEN, Y.; ZHU, C. H.; TAN, S. H.; DING, H.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium* sp. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 571-576, 2008.
- HAZAA, M. A.; SHEBL, M. M.; EL-SAYED, E. R.; MAHMOUD, S. R.; KHATTAB, A. A.; AMER, M. M. Bioprospecting endophytic fungi for antifeedants and larvicides and their enhancement by gamma irradiation. **AMB Express**, v. 12, n. 120, p. 1-12, 2022.
- KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; MEDEIROS, L. S.; RODRIGUES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. an endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* l. f. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 771-774, 2012.
- KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; SADAN, S. V.; JHA, S. R.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 1, p. 33-37, 2001.
- KOZLOVSKY, A. G.; VINOKUROVA, N. G.; ADANIN, V. M.; BURKHARDT, G.; DAHSE, H. M.; GRAFE, U. New Diketopiperazine Alkaloids from *Penicillium fellutanum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 698-700, 2000.

KOZLOVSKY, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V.; ADANIN, V. M.; OZERSKAYA, S. M.; KOCHKIN, G. A. Quinocitrinines A and B, New Quinoline Alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a Permafrost Fungus. **The Journal of Antibiotics**, v. 56, n. 5, p. 488-491, 2003.

LAAKSO, J. A.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Sulpinines A-C and Secopenitrem B: New Antiinsectan Metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus sulphureus*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 57, p. 2066-2071, 1992.

LIANG, P.; ZHANG, Y.Y.; YANG, P.; GROND, S.; ZHANG, Y.; QIAN, Z. Viridicatol and viridicatin isolated from a shark-gill-derived fungus *Penicillium polonicum* AP2T1 as MMP-2 and MMP-9 inhibitors in HT1080 cells by MAPKs signaling pathway and docking studies. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, p. 1039–1048, 2019.

McLAUGHLIN, J. L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1311–1321, 2008.

MENG, L. H.; WANG, C. Y.; MÁNDI, A.; LI, X. M.; HU, X. Y.; KASSACK, M. U.; KURTÁN, T.; WANG, B. G. Three Diketopiperazine Alkaloids with Spirocyclic Skeletons and One Bisthiodiketopiperazine Derivative from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Penicillium brocae* MA-231. **Organic Letters**, v.18, n. 20, p. 5304–5307, 2016.

MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 65, 2013.

MUNDAY-FINCH, S. C.; WILKINS, A. L.; MILES, C. O. Isolation of Paspaline B, an Indole-diterpenoid from *Penicillium Paxilli*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 327-332, 1996.

NIU, S.; WANG, N.; XIE, C.; FAN, Z.; LUO, Z.; CHEN, H.; YANG, X. Roquefortine J, a novel roquefortine alkaloid, from the deep-seaderived fungus *Penicillium granulatum* MCCC 3A00475. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, p. 658 – 661, 2018.

NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K. I.; UDAGAWA, S. I. Isolation and structures of indoloditerpenes, possible biosynthetic intermediates to the tremorgenic mycotoxin, paxilline, from *Emericella striata*. **Journal of the Chemical Society**, v. 1, p. 2607-2610, 1988.

OVERY, D. P.; NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Roquefortine/Oxaline Biosynthesis Pathway Metabolites In *Penicillium* Ser. *Corymbifera*: In *Planta Production And Implications For Competitive Fitness*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 10, p. 2373 - 2390, 2005.

PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 315–327, 2007.

PRANGÉ, T.; BILLION, M. A.; VUILHORGNE, M.; PASCARD, C.; POLONSKY, J.; MOREAU, S. Structures of Marcfortine B and C (X-ray Analysis), Alkaloids from *Penicillium Roqueforti*. **Tetrahedron Letters**, v.22, n. 21, p. 1977 - 1980, 1981.

- SARDAS, S. The Role of Antioxidants in Cancer Prevention and Treatment. **Indoor and Built Environment**, v. 12, n. 860479, p. 401–404, 2003.
- SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T. M. A.; ROMANHA, A. J.; SHIN, Y. G.; CORDELL, G. A.; ZANI, C. L. New Bioactive Coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 634-637, 2003.
- SCOTT, P. M.; KENNEDY, P. C. Analysis of Blue Cheese for Roquefortine and Other Alkaloids from *Penicillium roqueforti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 865 – 868, 1976.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498-504, 2003.
- SILVA, B. F.; RODRIGUEZ-FO, E. Production of a benzylated flavonoid from 5,7,3,4,5-pentamethoxyflavanone by *Penicillium griseoroseum*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 3-4, p. 184–188, 2010.
- SILVA E, GRAÇA J. P, PORTO C, PRADO, R. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MEYER, M. C.; NUNES, E. O.; PILAU, E. D. Unraveling Asian Soybean Rust metabolomics using mass spectrometry and Molecular Networking approach. **Scientific Reports**, v. 10, n. 138, 2020.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185 - 195, 2004.
- STONE, J. K., POLISHOOK, J. D., & WHITE, J. F. Endophytic Fungi. *In*: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**, Academic Press, 2004, p. 241-270.
- VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A. VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **The Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554-1559, 2007.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. ed. 2, editora Springer, 1996, p. 354.
- WANG, L., LI, M., LIN, Y., DU, S., LIU, Z., JU, J., SUZUKI, H., SAWADA, M., UMEZAWA, K. Inhibition of cellular inflammatory mediator production and amelioration of learning deficit in flies by deep sea *Aspergillus* derived cyclopenin. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 9, p. 622 – 629, 2020.
- WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828 - 837, 2016.

MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO I

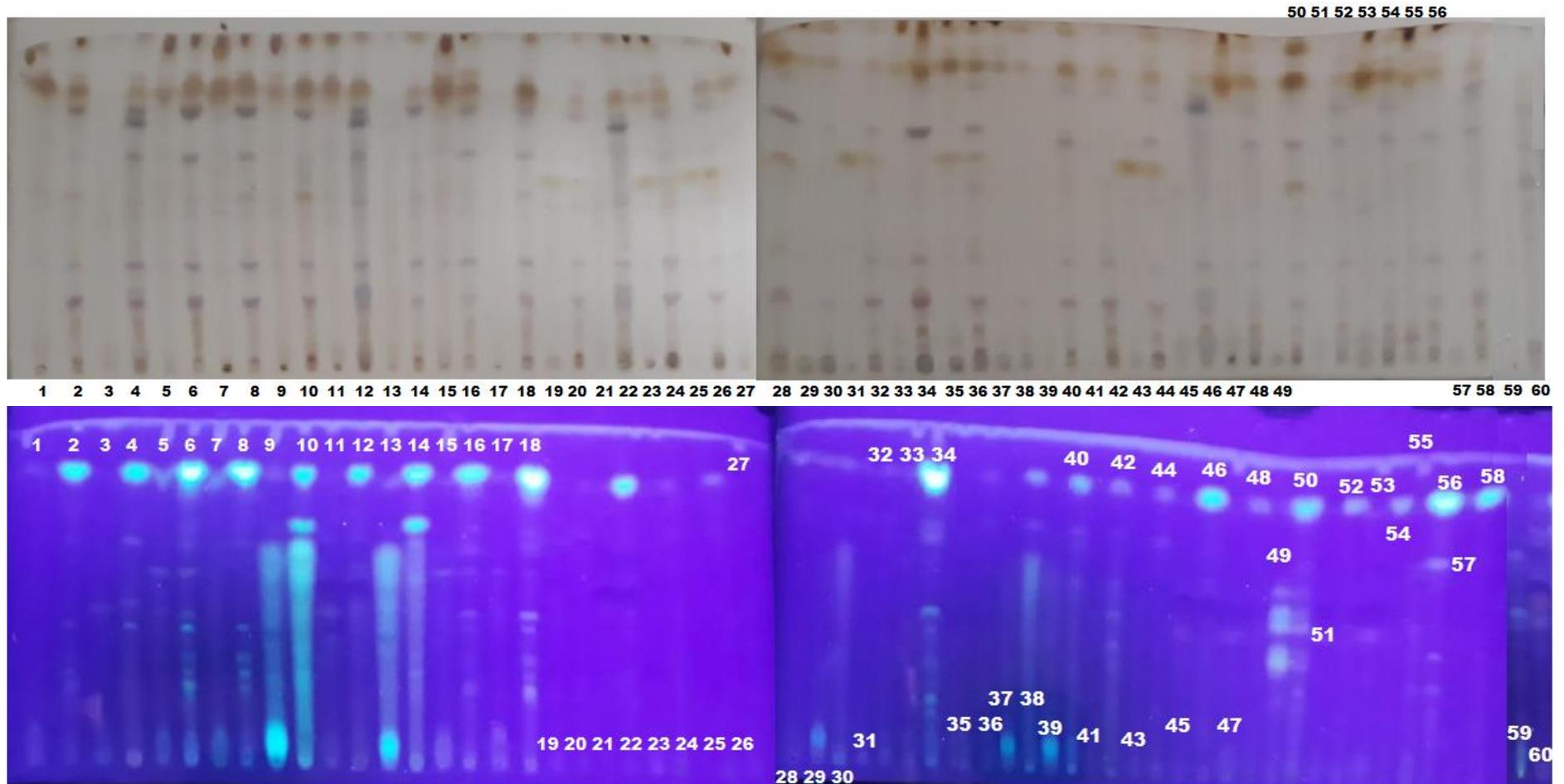
Tabela S1: Compostos identificados putativamente nos extratos obtidos das diferentes linhagens de fungos *Penicillium*.

	Metabólito proposto	Fórmula molecular	Aduto	Massa experimental	Massa teórica	Erro em ppm	Extrato	Classe
1	Viridicatina	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	238,0859	238,0862	-1,3	F13, F563, F241 e F54	Alcalóide
2	(3E)-3-benzilidene-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-dione	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	279,1124	279,1128	-1,4	F13, F563, F54	Alcaloide
3	ciclopeptina	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	281,1282	281,1284	-0,71	F13, F563, F54	Alcalóide
4	(E)-1-[2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]-2-metildec-8-en-1,3-dione	C ₁₆ H ₂₇ NO ₃	[M+H] ⁺	282,2054	282,2063	-3,18	F5	Alcalóide
5	Ciclopenina	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	295,1056	295,1077	-7,1	F13, F563, F241 e F54	Alcalóide
6	Ciclopenol	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	311,1026	311,1026	0,0	F13, F563 e F54	Alcalóide
7	Dehidrohistidil-triptofanil-dicetopiperazina (e)-3-(1H-imidazol-4-ilmetilene)-6-(1H-indol-3-ilmetil)-2,5-piperazinedione	C ₁₇ H ₁₅ N ₅ O ₂	[M+H] ⁺	322,1288	322,1298	-3,1	F13, F563	Alcalóide

8	Fusaperazina	$C_{19}H_{24}N_2O_3S$	[M+H] ⁺	361,1577	361,1580	-0,8	F13, F563 e F54	Alcalóide
9	Roquefortina C	$C_{22}H_{23}N_5O_2$	[M+H] ⁺	390,1926	390,1924	0,51	F13	Alcalóide
10	Roquefortina D	$C_{22}H_{25}N_5O_2$	[M+H] ⁺	392,2065	392,2081	-4,1	F13, F563 e F54	Alcalóide
11	Emindole SB	$C_{28}H_{39}NO$	[M+H] ⁺	406,3108	406,3110	-0,5	F13, F563	Alcalóide
12	Pistilarina	$C_{21}H_{27}N_3O_6$	[M+H] ⁺	418,1957	418,1972	-3,6	F13, F563	Alcalóide
13	Secopenitrem D	$C_{37}H_{47}NO_4$	[M+H] ⁺	570,3562	570,3577	-2,6	F13, F563, F241 e F54	Alcalóide
14	Kaurane	$C_{20}H_{34}$	[M+H] ⁺	273,2579	273,2576	1,1	F13, F563, F54	Diterpenoide
15	Andrastina A	$C_{28}H_{38}O_7$	[M+H] ⁺	487,2681	487,2690	-1,8	F13, F563, F241, F54	Terpenóide
16	Ácido linoleico (10E,12Z)	$C_{18}H_{32}O_2$	[M+H] ⁺	281,2475	281,2475	0,0	F5, F13, F563, F241	Ácido graxo
17	Curvularina	$C_{16}H_{20}O_5$	[M+H] ⁺	293,1362	293,1383	-7,2	F241	Policetídeo
18	(2E,4E)-1-(2,4-dihidroxi-3,5-dimetifenil)hexa-2,4-dien-1-one	$C_{14}H_{16}O_3$	[M+H] ⁺	233,1167	233,1172	-2,1	F5	Policetídeos
19	Ácido linolênico etil éster	$C_{20}H_{34}O_2$	[M+H] ⁺	307,2617	307,2631	-4,5	F5, F13	Ácido graxo
20	Ácido linoleico etil éster	$C_{20}H_{36}O_2$	[M+H] ⁺	309,2790	309,2788	0,6	F5, F13, F563	Ácido graxo

21	Monoelaidina	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	[M+H] ⁺	357,2998	357,2999	-0,3	F5, F13, F563 e F241	Éster
22	Ácido cis-7-Hexadecenoico metil éster	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	[M+H] ⁺	269,2460	269,2475	-3,7	F5, F563, F187 e F54	Éster de ácido graxo
23	4-metoxi-6-[(E)-2- feniletetil]piran-2-one	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	[M+H] ⁺	229,0842	229,0859	-7,4	F187	Estirilpirona
24	7- Ácido (3R,4S)-6,8- dihidroxi-3,4,5-trimetil-1-oxo- 3,4-dihidroisocomene	C ₁₃ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	267,0861	267,0863	-0,7	F5	Cumarina

Figura S1: Placas cromatográficas contendo os 60 extratos fúngicos, eluídas com tolueno/ acetato de etila/ ácido fórmico (6:3:1), visualizadas na luz UV 365nm e reveladas com ácido sulfúrico em etanol a 10%. A letra “M” nos códigos é referente ao extrato do micélio e a letra “L” nos códigos é referente ao extrato do meio líquido.



1, 2- F570M e L; 3, 4- F347M e L; 5, 6- F19M e L; 7, 8- F167M e L; 9,10 - F142M e L; 11, 12- F412M e L; 13, 14- F141M e L; 15, 16- F241M e L; 17, 18- F370M e L; 19, 20- F168M e L; 21, 22- F577 M e L; 23, 24- F11M e L; 25, 26- F534M e L; 27, 28- F187M e L; 29, 30- F76; 31, 32- F22 M e L; 33, 34- F329M e L; 35, 36- F14M e L; 37, 38- F564M e L; 39, 40- F5M e L; 41, 42- F387M e L; 43, 44- F169M e L; 45, 46- F78M e L; 47, 48- F13M e L; 49, 50- F82M e L; 51, 52- F54M e L; 53, 54- F563M e L; 55, 56- F48M e L; 57, 58- F573M e L; 59, 60- F391M e L.

Figura S2: Espectro MS/MS atribuído ao composto viridicatina identificado putativamente.

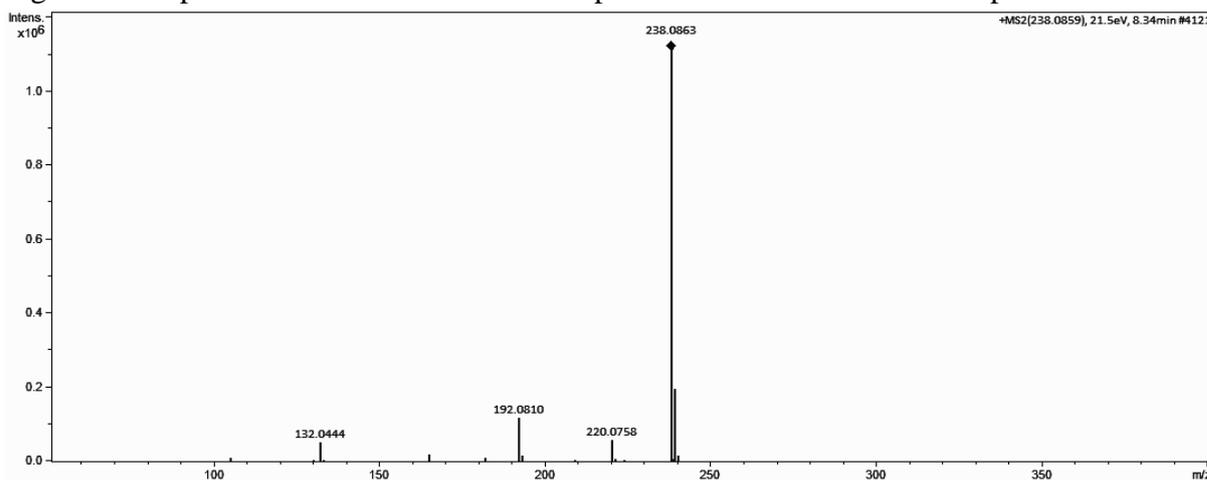


Figura S3: Espectro MS/MS atribuído ao composto (3E)-3-benzilidene-4-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2,5-dione identificado putativamente.

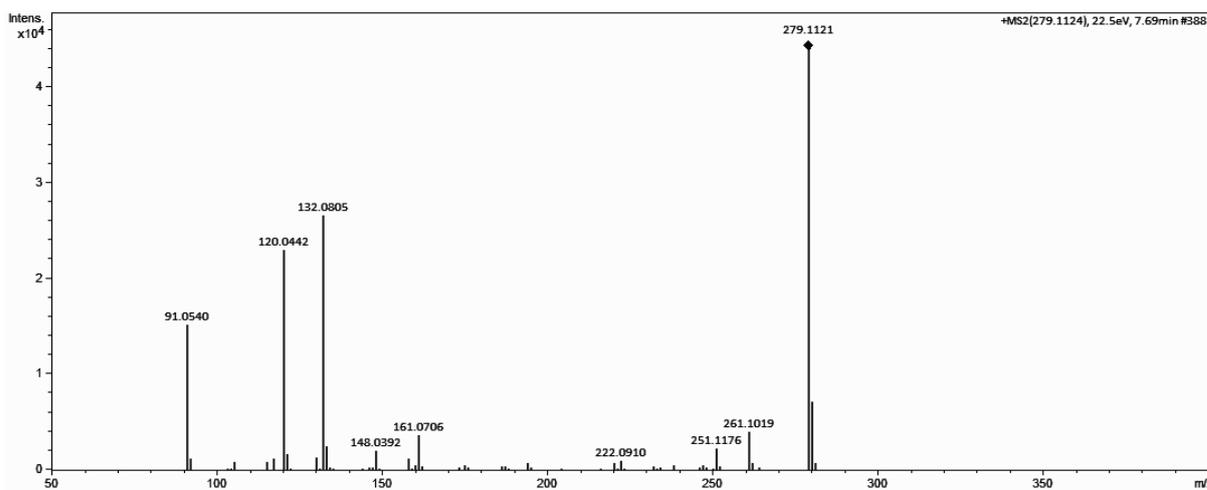


Figura S4: Espectro MS/MS atribuído ao composto ciclopeptina identificado putativamente.

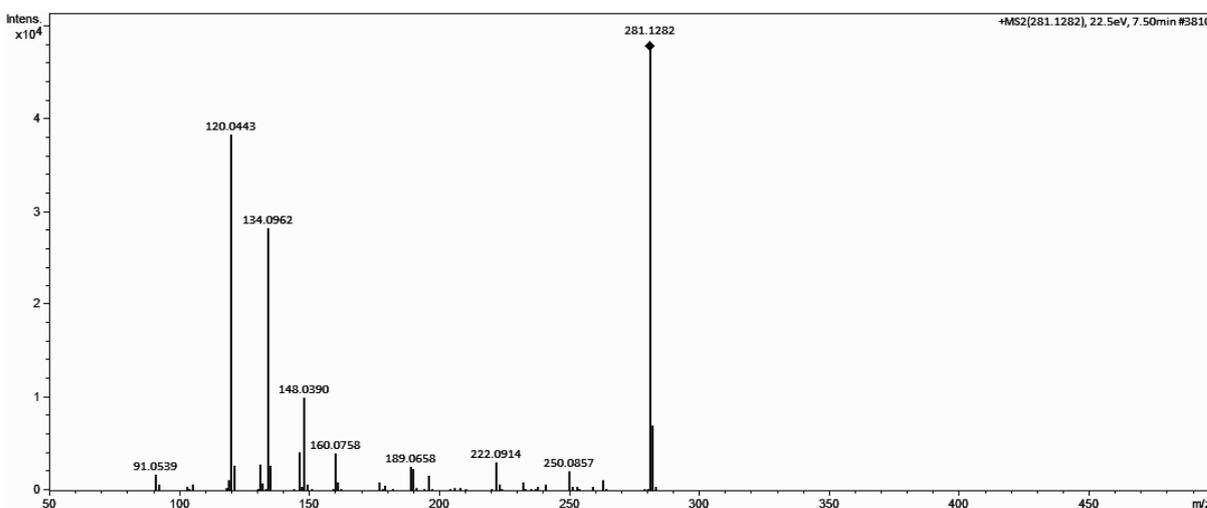


Figura S5: Espectro MS/MS atribuído ao composto (E)-1-[2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]-2-metildec-8-en-1,3-dione identificado putativamente.

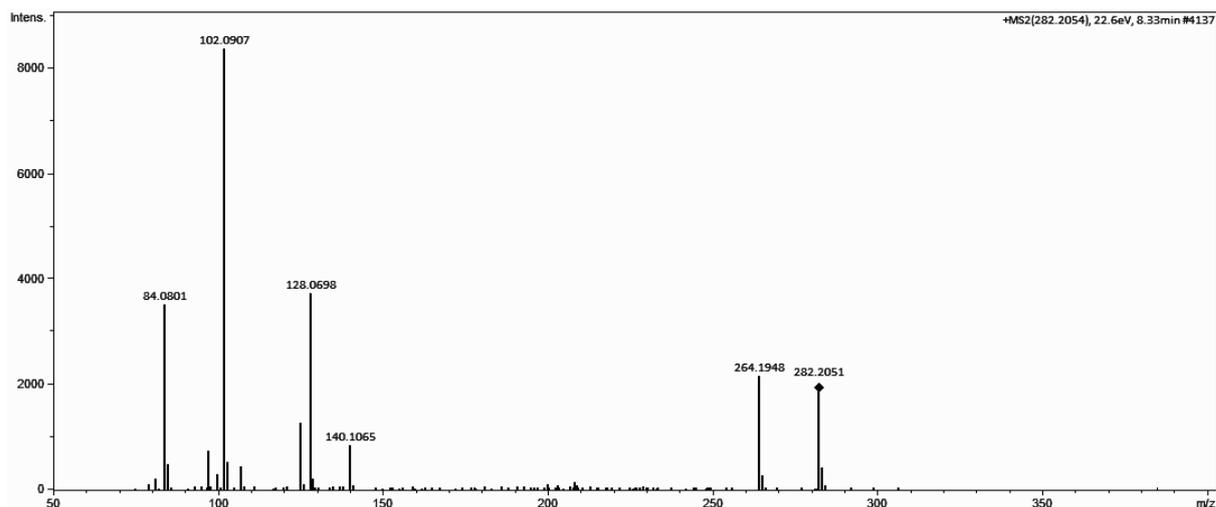


Figura S6: Espectro MS/MS atribuído ao composto ciclopenina identificado putativamente.

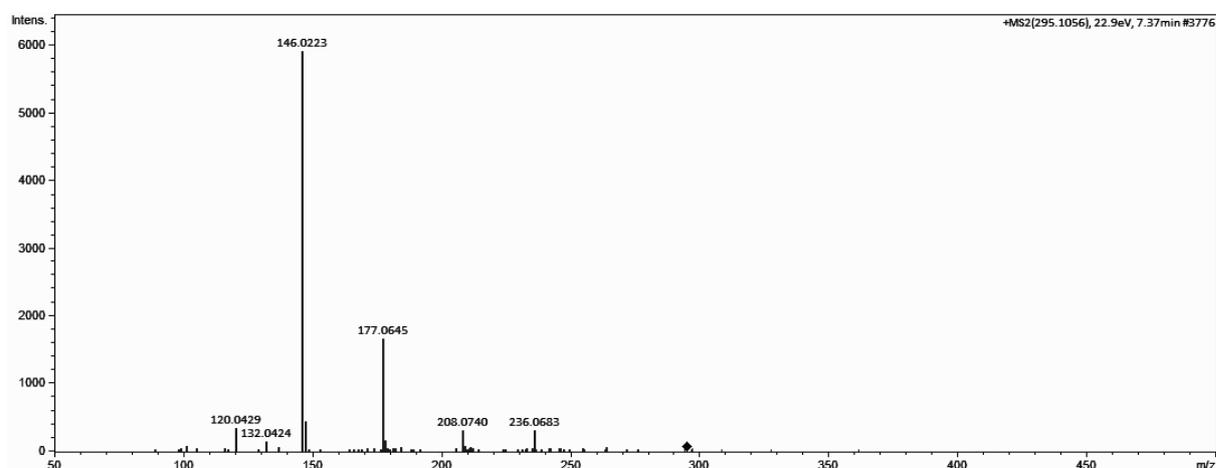


Figura S7: Espectro MS/MS atribuído ao composto ciclofenol identificado putativamente.

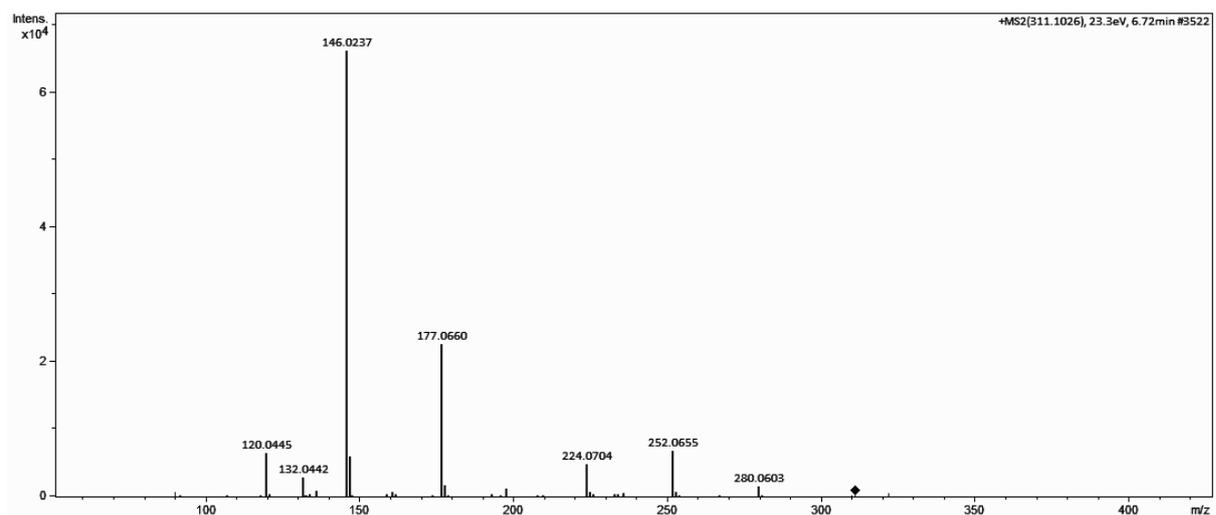


Figura S8: Espectro MS/MS atribuído ao composto dehidrohistidil-triptofanil-dicetopiperazina|(e)-3-(1h-imidazol-4-ilmetilene)-6-(1h-indol-3-ilmethyl)-2,5-piperazinedione identificado putativamente.

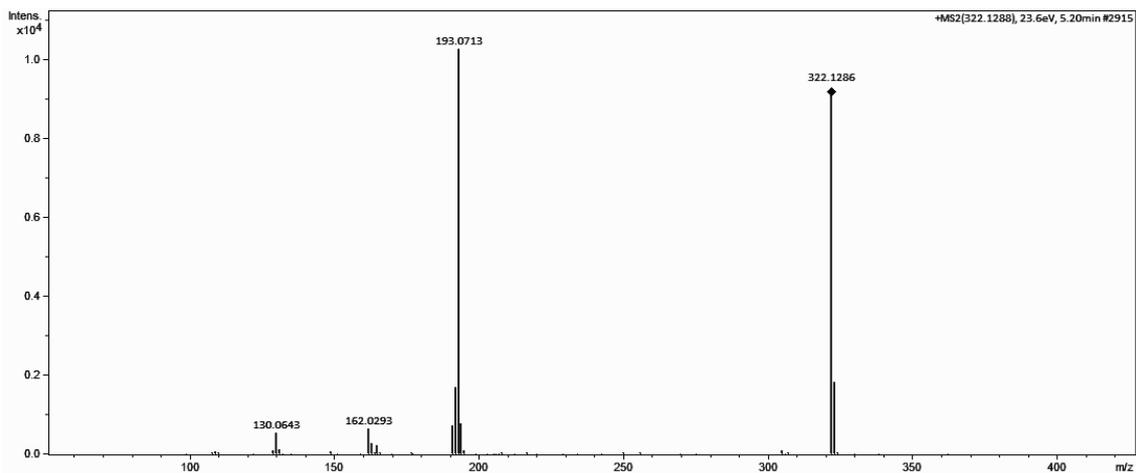


Figura S9: Espectro MS/MS atribuído ao composto fusaperazina identificado putativamente.

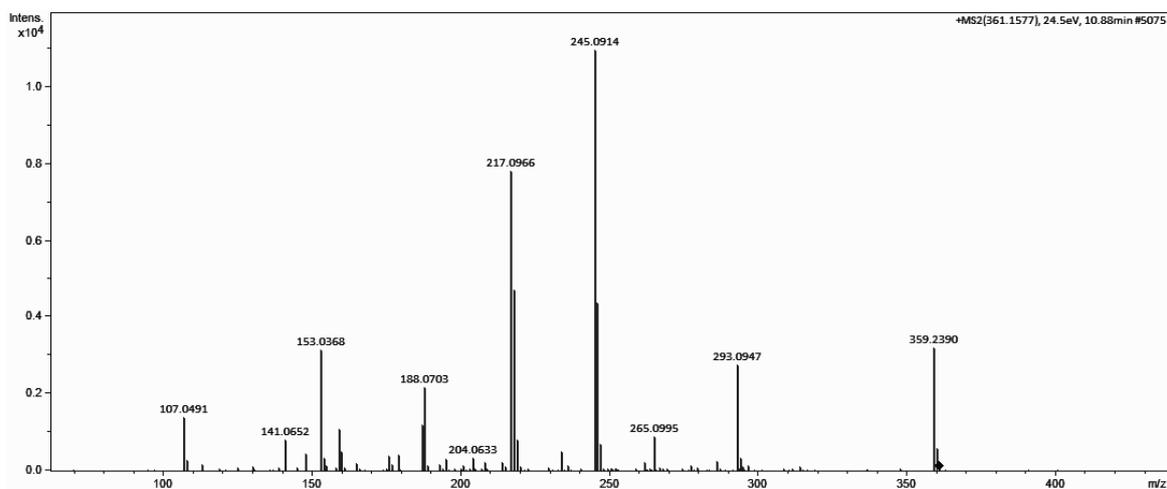


Figura S10: Espectro MS/MS atribuído ao composto roquefortina C identificado putativamente.

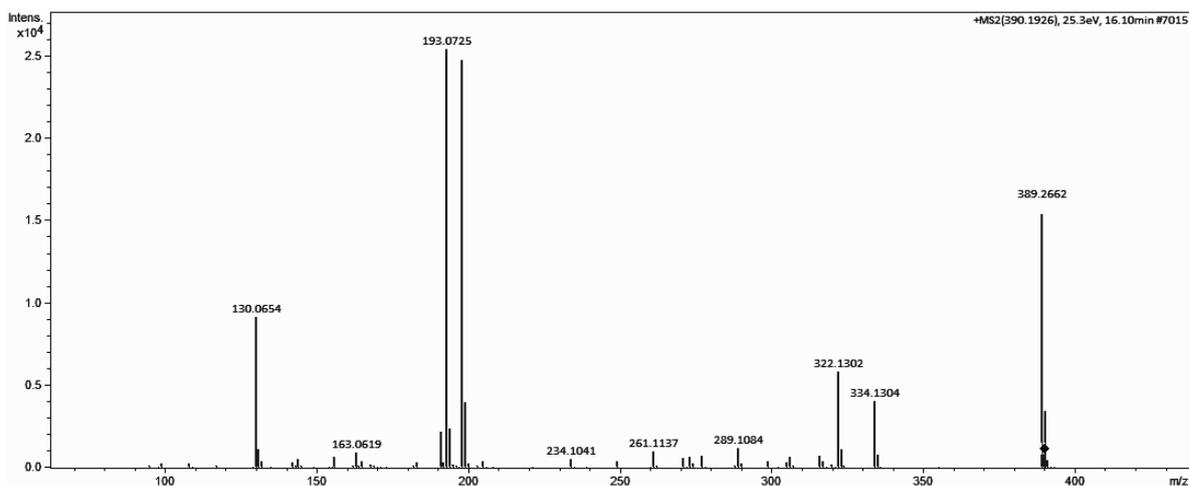


Figura S11: Espectro MS/MS atribuído ao composto roquefortina D identificado putativamente.

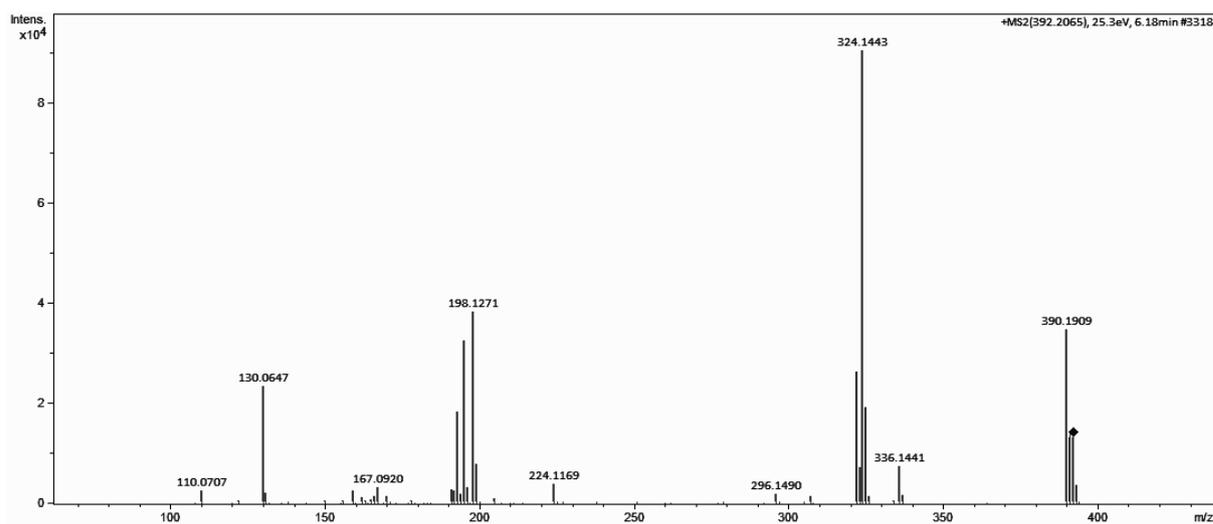


Figura S12: Espectro MS/MS atribuído ao composto emindole SB identificado putativamente.

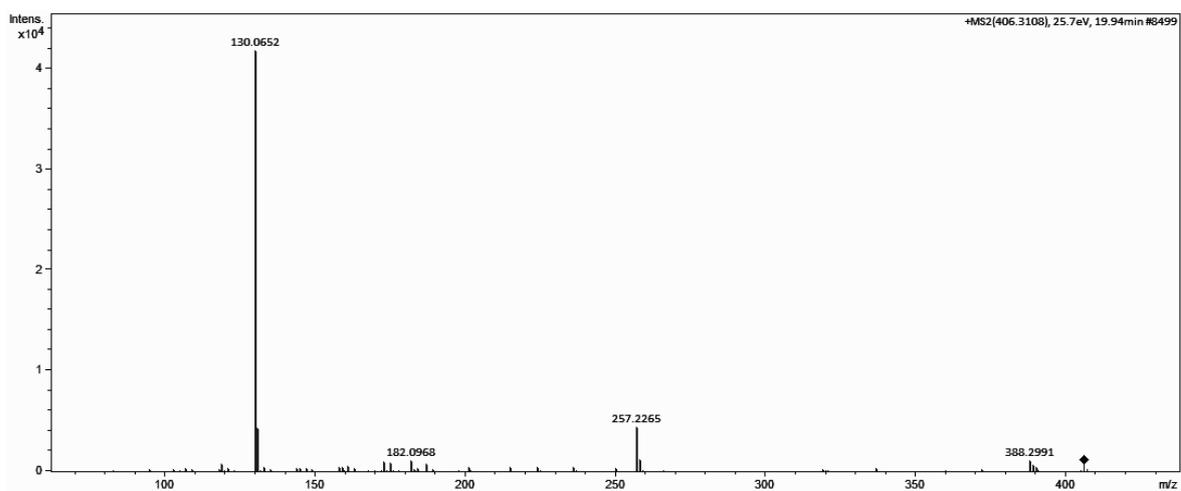


Figura S13: Espectro MS/MS atribuído ao composto pistilarina identificado putativamente.

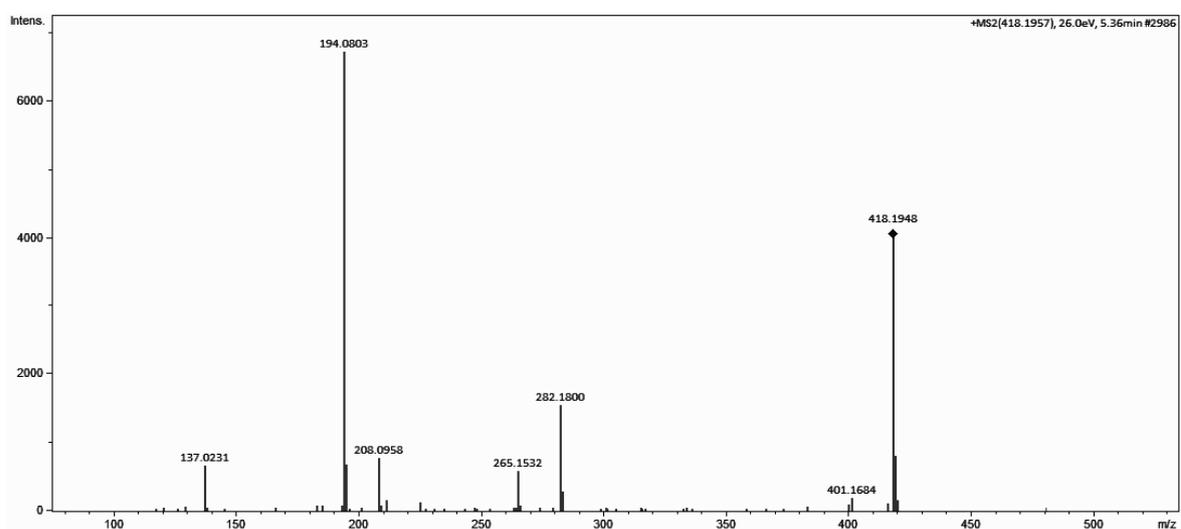


Figura S14: Espectro MS/MS atribuído ao composto secopenitrem D identificado putativamente.

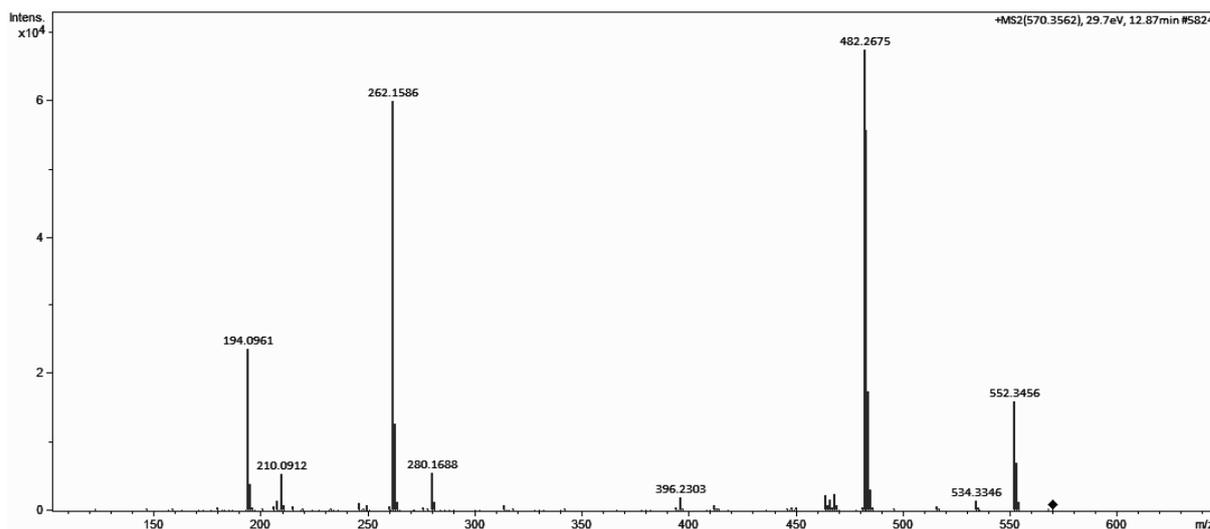


Figura S15: Espectro MS/MS atribuído ao composto kaurane identificado putativamente.

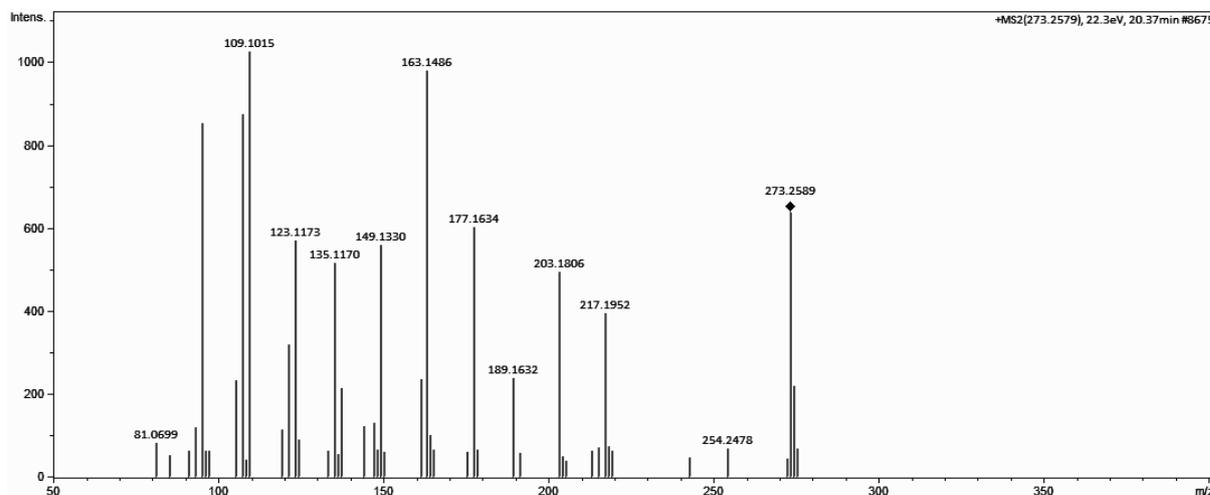


Figura S16: Espectro MS/MS atribuído ao composto andrastina A identificado putativamente.

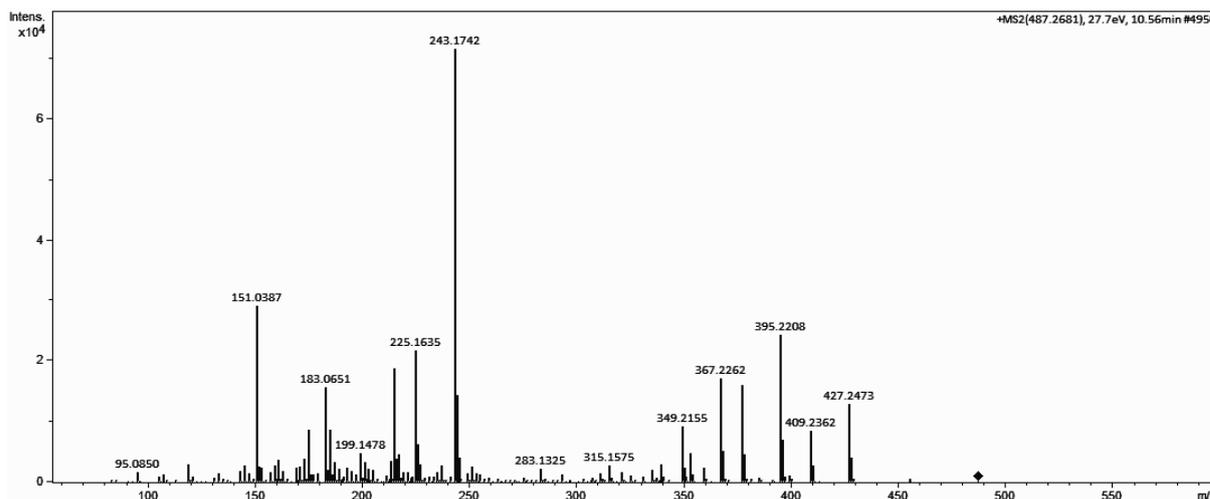


Figura S17: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido linoleico (10E,12Z) identificado putativamente.

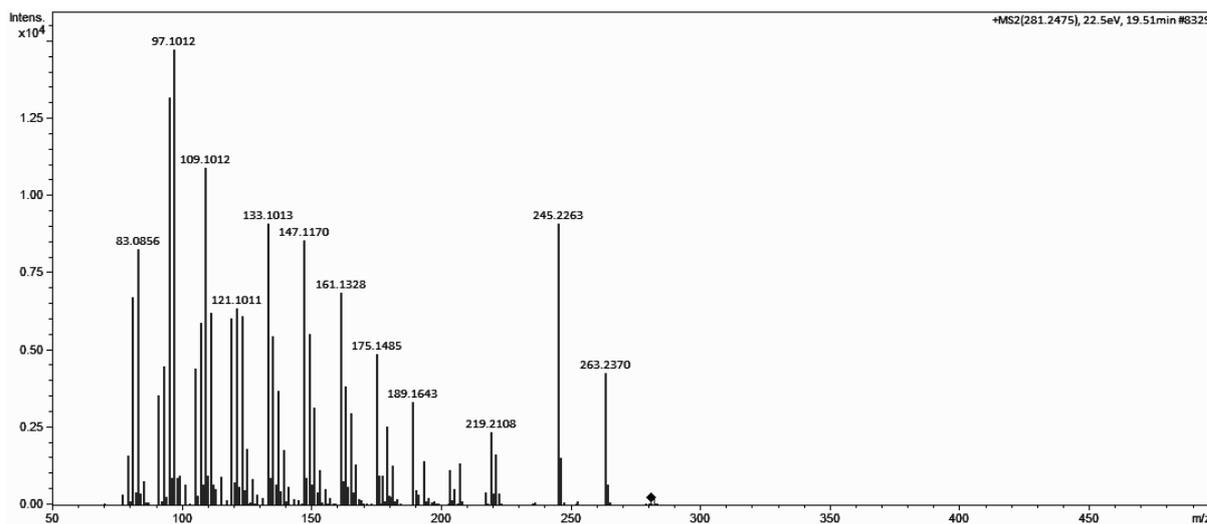


Figura S18: Espectro MS/MS atribuído ao composto curvularina identificado putativamente.

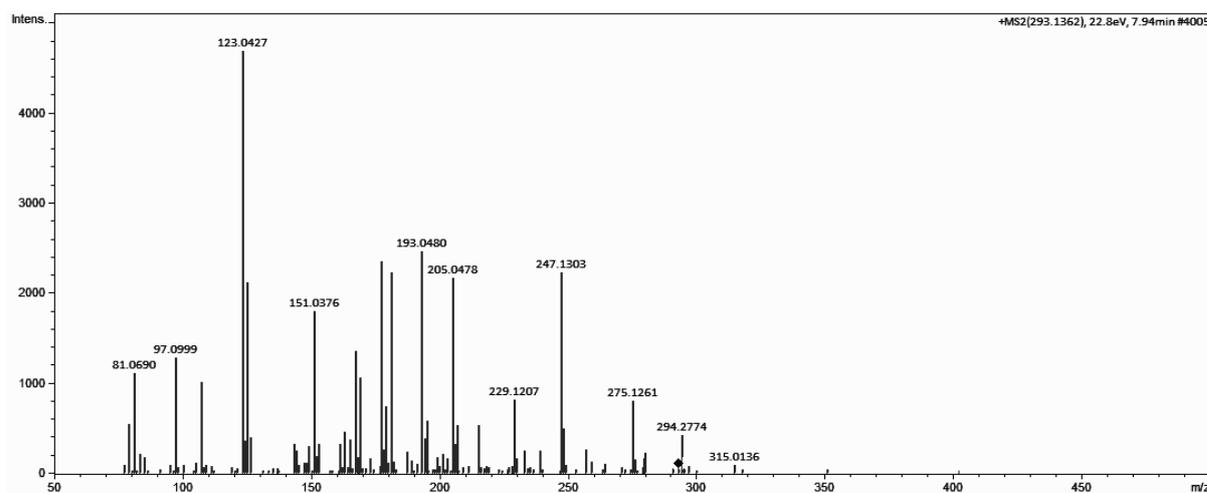


Figura S19: Espectro MS/MS atribuído ao composto (2E,4E)-1-(2,4-dihidroxi-3,5-dimetilfenil)hexa-2,4-dien-1-one identificado putativamente.

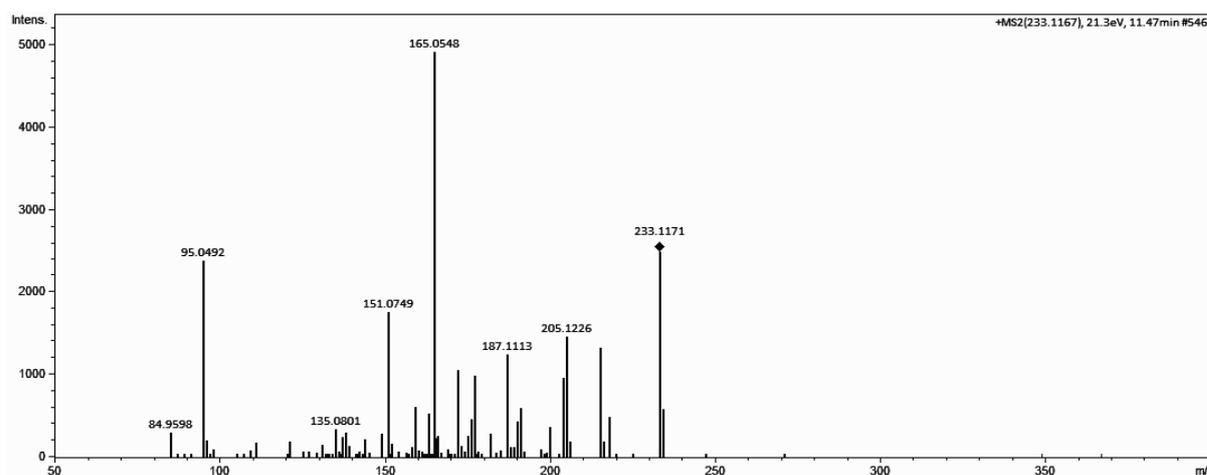


Figura S20: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido linolênico etil éster identificado putativamente.

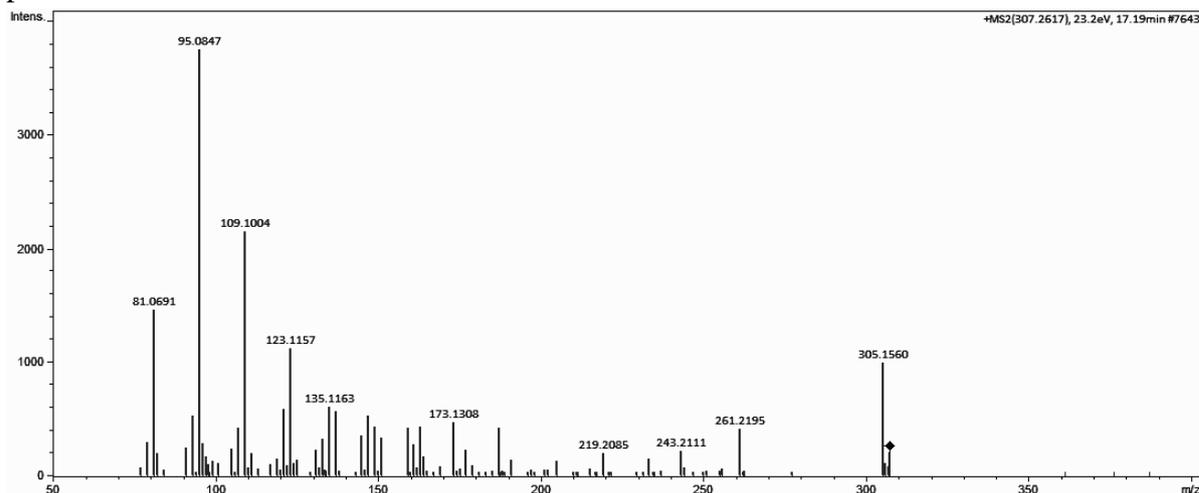


Figura S21: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido linoleico etil éster identificado putativamente.

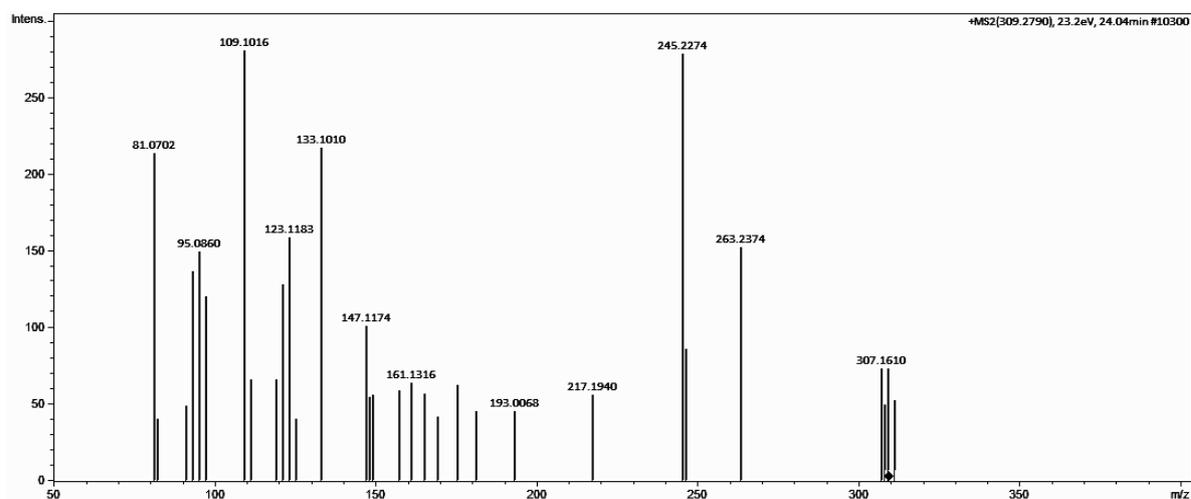


Figura S22: Espectro MS/MS atribuído ao composto monoelaidina identificado putativamente.

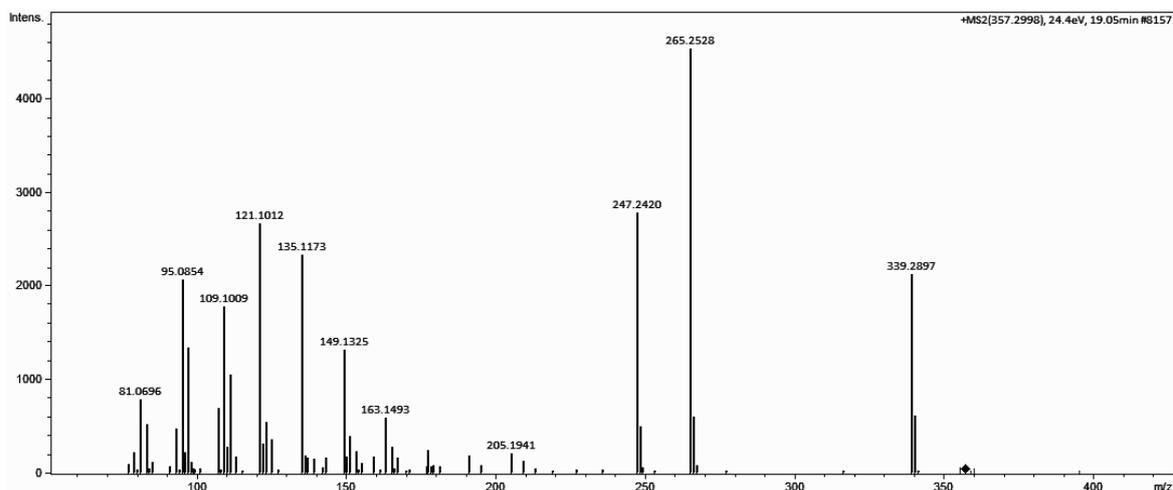


Figura S23: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido cis-7-Hexadecenoico metil éster identificado putativamente.

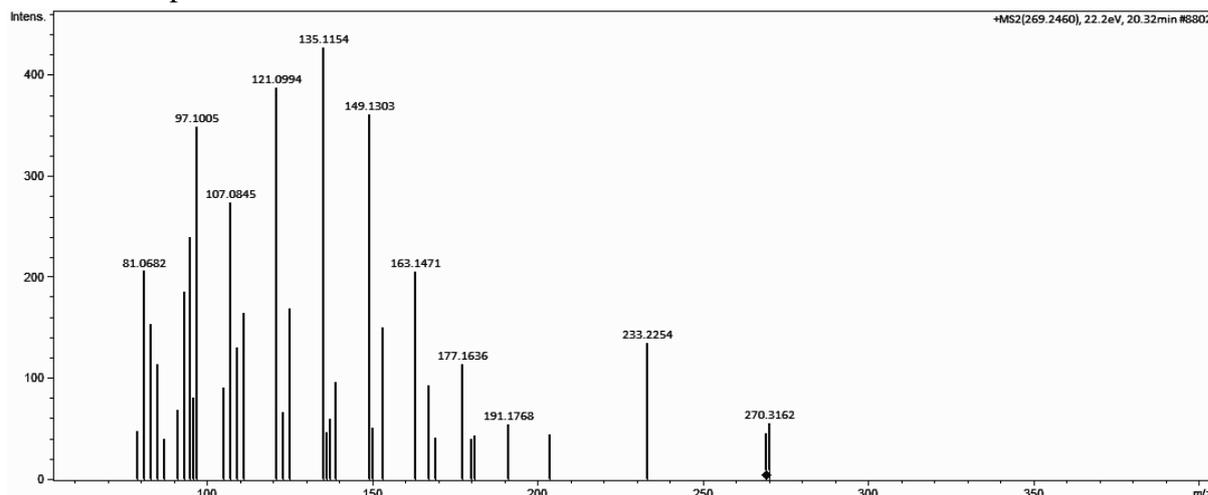


Figura S24: Espectro MS/MS atribuído ao composto 4-metoxi-6-[(E)-2-feniletetil]piran-2-one identificado putativamente.

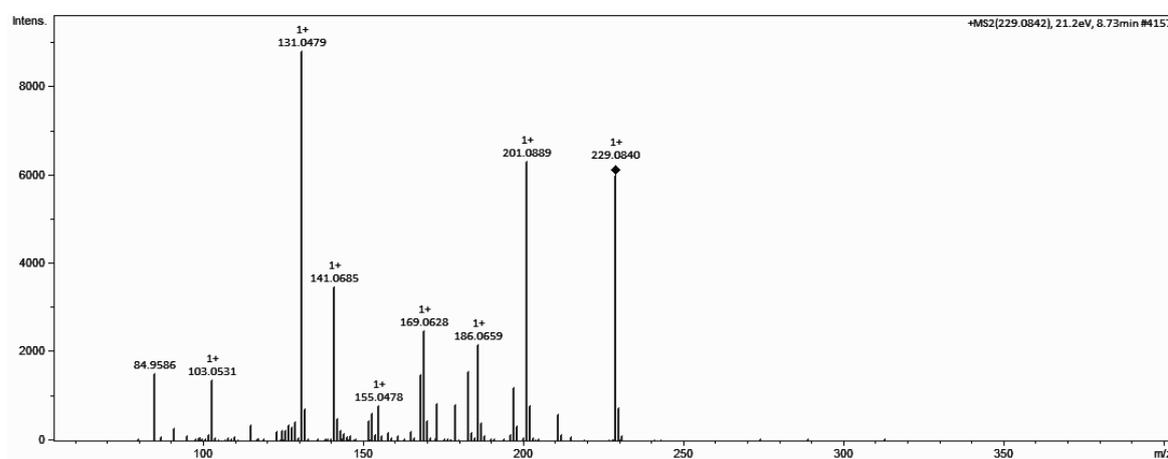
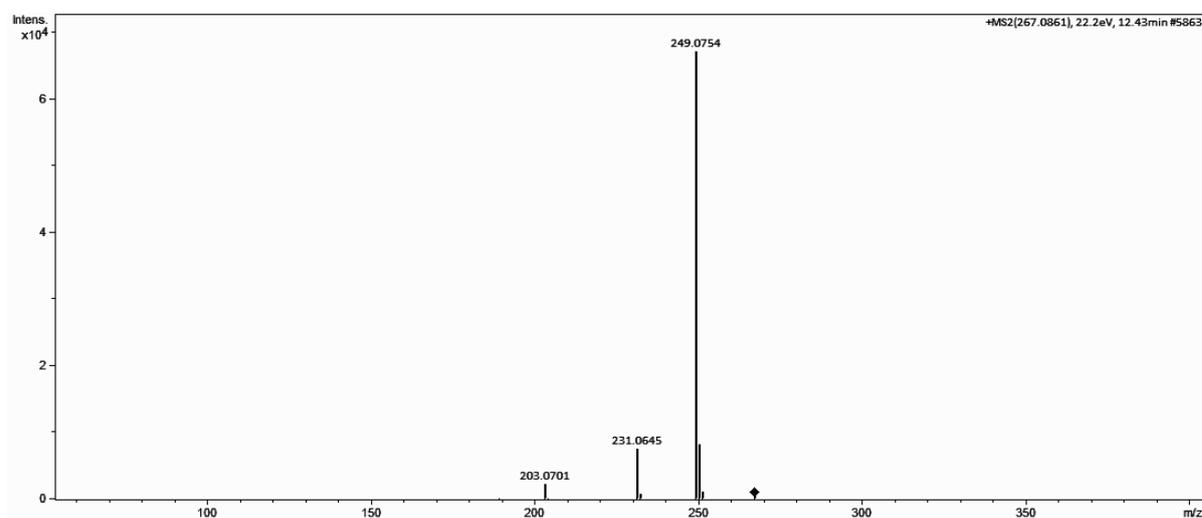


Figura S25: Espectro MS/MS atribuído ao composto 7- Ácido (3R,4S)-6,8-dihidroxi-3,4,5-trimetil-1-oxo-3,4-dihidroisocome ne identificado putativamente.



CAPÍTULO II

UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS e Molecular Networking para investigação da quimiodiversidade de extratos bioativos de fungos de *Annona jahnii* Saff. da Amazônia Brasileira

Publicado na revista: **Rapid Communications in Mass Spectrometry**

UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS e Molecular Networking para investigação da quimiodiversidade de extratos bioativos de fungos de *Annona jahnii* Saff. da Amazônia Brasileira

Luciana Araújo Xavier¹, Letícia Maciel do Nascimento Odilair², Gilmar Prado de Sousa³, Edineide Cristina A. Souza¹, Eduardo Jorge Pilau⁴, Carla Porto⁵, Antônia Queiroz Lima de Souza⁶, Afonso Duarte Leão de Souza⁶, Adriana Flach¹, Luiz Antonio M. A. da Costa^{1*}

¹ Universidade Federal de Roraima- Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Boa Vista, RR, Brazil.

² Universidade Federal de Roraima- Programa de Graduação em Ciências Biológicas, Boa Vista, RR, Brazil.

³ Universidade Federal de Roraima- Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Boa Vista, RR, Brazil.

⁴ Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Química, Maringá, PR, Brazil.

⁵ MS Bioscience - Incubadora Tecnológica de Maringá - Complexo UEM, Maringá, PR, Brazil.

⁶ Universidade Federal do Amazonas - Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Manaus, AM, Brazil.

RESUMO

JUSTIFICATIVA: Espécies de *Annona* são promissoras no isolamento de moléculas bioativas, porém estudos com *Annona jahnii* saff. são escassos. A exploração de metabólitos bioativos de endófitos isolados desta espécie é inédita e possibilita a preservação da planta hospedeira, além de possibilitar a descoberta de compostos com promissoras atividades biológicas.

METODOLOGIA: Extratos acetato de etila dos meios cultivados de cinco fungos foram obtidos. Os extratos tiveram sua capacidade antioxidante medida usando o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. A exploração do perfil metabólico dos extratos e desreplicação dos compostos foram realizados usando ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry (UHPLC/ESI-MS/MS) combinado com análise por Molecular Networking.

RESULTADOS: Foram detectadas 1.818 entidades químicas nos cinco extratos selecionados, desses um total de 39 compostos foram identificados putativamente. As classes com maior abundância identificadas foram alcaloides, naftopironas e citocalasinas. Outras classes incluem fumonisinas, cumarina, meroterpenóide, dentre outros. A maioria destes compostos está relacionado a propriedades biológicas específicas. Os extratos apresentaram atividade inibitória para ao menos três dos patógenos testados, além de possuírem potente atividade antioxidante, com valores da IC₅₀ abaixo de 10 µg/mL.

CONCLUSÃO: O uso dos dados UHPLC/ESI-MS/MS aliados ao Molecular Networking, se mostraram úteis na desreplicação de moléculas bioativas de extratos complexos ainda inexplorados. Estas investigações iniciais devem auxiliar significativamente em pesquisas posteriores, aumentando a eficiência e rapidez na descoberta de novas fontes e novos produtos naturais.

Palavras-chave: Molecular Network, *Annona*, Fungo endofítico, Metabólitos.

1 INTRODUÇÃO

As espécies de plantas do gênero *Annona* (família *Annonaceae*) se apresentam como promissoras no isolamento de metabólitos que exibem importantes e diversificadas propriedades biológicas. Estudos relataram o potencial antioxidante e anticâncer de extratos da *A. muricata*,¹ atividade anti-inflamatória do óleo de *A. sylvatica*² e atividade antifúngica do extrato de *A. squamosa* Linn.³ Apesar dos diversos estudos com diferentes espécies de *Annona*, pesquisas sobre o perfil químico e potencial biológico de *Annona jahnii* Saff, 1914, são escassas. Destacam-se alguns poucos estudos sobre esta espécie que reportaram o isolamento de moléculas das classes das acetogeninas. Estes compostos apresentaram potente atividade anticâncer.^{4,5}

A investigação de produtos naturais está cada vez mais associada à preservação dos seus recursos, assim a busca por fontes sustentáveis de obtenção produtos bioativos se intensificam. Neste contexto, encontram-se os fungos associados ao interior das plantas, denominados endofíticos, que são capazes de produzir moléculas com propriedades biológicas notáveis.⁶ Extratos de *Phomopsis* sp. isolados de *A. muricata*, apresentaram significativa atividade anticâncer frente às células de câncer de mama.⁷ Fungos de diferentes gêneros isolados de *A. squamosa*, demonstraram resultados positivos para atividades anti-oxidante, antimicrobiana e antitumoral contra células Raji e células HEP-G2.⁸ Análise da atividade antimicrobiana de extratos de fungo *A. niger*, isolado de semente de *A. muricata*, destacou a maior ação inibitória destes extratos em relação ao extrato da semente.⁹ Resultados como esse podem indicar que o microrganismo endofítico pode ser a fonte da ação biológica anteriormente associada à planta ou a intensificação desta atividade.⁹

A análise do perfil metabólico da microbiota associada às espécies vegetais da flora brasileira é desafiadora, devido à diversidade de classes químicas em sistemas inexplorados ou ainda pouco investigados. Desta forma, é necessária a aplicação de estratégias que permitam análise metabolômica destas matrizes de forma acelerada, visando principalmente a descoberta de compostos de interesse biológico. Na última década, a estratégia de associação da espectrometria de massas com a poderosa tecnologia molecular virtual do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), tem se mostrado útil para a anotação molecular.¹⁰⁻¹² O Molecular Networking baseado em MS obtido pelo GNPS permite uma avaliação visual e estrutural dos metabólitos com similares padrões de fragmentação.^{13,14} O agrupamento das famílias moleculares facilita a interpretação de grandes conjuntos de dados metabolômicos.¹⁴

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi utilizar a estratégia do GNPS aliada a ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry (UHPLC/ESI-MS/MS), para avaliar e discriminar o perfil metabólico de 5 extratos de fungos isolados de *A. jahnii* da Amazônia brasileira, além da desreplicação de compostos e a avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana desses extratos.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos

As cinco culturas fúngicas estudadas foram previamente isoladas como endofíticas de *A. jahnii* Saff. de acordo com Souza et al., 2004¹⁵, coletadas em pontos georreferenciados (N 03° 06'43.2''/ W 060° 52'04.1''). As linhagens codificadas como F398, F407, F506 foram isoladas da raiz da planta, F475 isolada do caule e F403 isolada do galho e tiveram sua macro e micromorfologia registradas. A identificação dos isolados fúngicos foi realizada pelo método de Sequenciamento Sange *Internal Transcribed Spacer (ITS)* do *rDNA*. O DNA total dos isolados fúngicos foi extraído com o kit de extração Purelink Genomic DNA (Thermo Fisher), de acordo com as recomendações do fabricante.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada por reação em cadeia polimerase (PCR), usando os primers ITS5F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Um-décimo (1/10) do volume dos amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com Red Gel em transluminador de U.V. após a eletroforese, para a confirmação da presença de fragmentos com cerca de 600 kb. Os amplicons foram purificados com o reagente ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) e quantificados no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). O sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar, usando o sequenciador automático AB 3500 (Applied Biosystems). Os amplicons foram sequenciados em ambas as direções, sendo a PCR de sequenciamento marcada utilizando-se 2,5 pmol do primer ITS5F e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. Um termociclador LGC XP Cyler foi usado para as reações de marcação, além de uma etapa de desnaturação inicial à 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. As amostras marcadas foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavadas com etanol a 60%. Os produtos resultantes foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletro-injetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 3 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz".

A sequência final foi comparada com outras de um banco de dados de ITS com qualidade controlada no UNITE. Uma árvore filogenética foi reconstruída utilizando as sequências de *ITS1-5.8S ITS2* do *rDNA* obtidas.

2.2 Condições de cultivo e preparação dos extratos fúngicos

Padrões de inóculo foram preparados a partir da suspensão de conídios de fungos na concentração de $7,5 \times 10^{-9}$ UFC mL⁻¹, correspondente a escala nefelométrica de McFarland nº 5, em uma solução de 1% de Tween 80. Foram adicionados 600 µL de cada suspensão do inóculo, em triplicata, em frascos de erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL dos meios os quais foram isolados as linhagens fúngicas. Os fungos F398, F403, F407, F475 foram cultivados em meio líquido batata dextrose, suplementada com 0,2% de extrato de levedura (BDL)¹⁵. O fungo F506 foi cultivado em meio líquido, contendo 1% de aveia e extrato de malte, 0,4% de dextrose e extrato de levedura. Os frascos foram incubados em condições estéreis, a uma temperatura de 27°C durante 20 dias. Como controle negativo, frascos contendo apenas os meios de cultura, foram incubados sob as mesmas condições. Após o período de cultivo, o micélio foi separado do meio líquido por filtração a vácuo. Os meios líquidos foram submetidos a extração líquido-líquido, a partir da adição de três vezes com igual volume de acetato de etila. As frações orgânicas foram reunidas e secas com sulfato de sódio anidro. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida a 40°C, usando um evaporador rotativo.

2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos fúngicos foi medida usando o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com o método descrito por Mensor et al.¹⁶ Soluções metanólicas dos extratos a 1mg/mL foram preparadas. A partir destas, foram retiradas alíquotas crescentes, as quais foram adicionadas a 1,5 mL do reativo DPPH (0,1mM), completando-se o volume com metanol até 5 mL. O branco foi preparado com a substituição de DPPH por metanol e o controle negativo contendo reativo e metanol. Todos foram deixados para reagir à temperatura de 24°C ao abrigo de luz. Após 30 min, os valores das

absorbâncias foram medidos a 517nm em um espectrofotômetro UV-Visível, marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240. Todo o ensaio foi feito em triplicata e os valores da concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH (IC₅₀), foram calculados usando regressão linear de gráficos (software Origin 6.0) onde a abscissa representa a concentração dos extratos em solução e a ordenada o percentual de atividade antioxidante, obtido pela fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(Ab_{S_{sample}} - Ab_{S_{blank}}) \times 100]/Ab_{S_{control}}\}$$

2.4 Atividade antimicrobiana

Os extratos fúngicos foram testados contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* INCQS 0057 (ATCC 43300), as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442) e *Escherichia coli* INCQS 00051 (ATCC 13863) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 90028). As cepas foram fornecidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para a determinação dos valores mínimos de concentração inibitória (CIM), foi utilizado o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, conforme estabelecido pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI). As bactérias foram cultivadas em meio de infusão cérebro-coração (BHI) a 36±1°C por 24h e as leveduras foram cultivadas em Sabouraud a 36±1°C por 36 h. Para os testes, as culturas foram ajustadas para 0,5 equivalentes da escala de turbidez padrão de McFarland (105 UFC mL⁻¹). As concentrações de extrato testadas foram de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 e 7,8 µg.mL⁻¹. Os testes foram realizados em triplicata, usando como controles positivos, soluções de ampicilina para as bactérias e fluconazol para as leveduras. O controle negativo foi realizado com a substituição das amostras pela mesma solução de DMSO 10%.

2.5 Análises dos extratos fúngicos por UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência UHPLC (Shimadzu, Nexera X2, Japão). A separação dos componentes foi realizada em uma coluna Acquity UPLC CHS C18, com dimensões 1.7 µm, 2.1 × 100 mm (Waters, USA) com vazão de 0.200 mL min⁻¹. A eluição foi realizada com um sistema gradiente de solventes, onde a composição da fase móvel consistiu em: solvente A (água com ácido fórmico 0,1 % v/v) e solvente B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico). O fluxo de eluição seguiu os seguintes parâmetros: 2% B 0-1 min, 30% B 1-3 min, 80% B 3-20 min, 98% B 20-32 min, mantido a 2% B 32- 38 minutos a uma temperatura de 40 °C, realizando a regeneração da coluna nos seis últimos minutos para as próximas análises. O espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Germany) com geometria Q-TOF, equipado com fonte de ionização electrospray. O instrumento foi calibrado usando uma solução de formiato de sódio (10 mmol L⁻¹; isopropanol; água 1:1 v/v) contendo 50 µL ácido fórmico. A fonte de ionização foi operada em modo positivo e ajustado para 4500V, com potencial de end plate offset -500 V. Os parâmetros do gás secante foram de 8.000 mL min⁻¹ a 180 °C com 4 bar de pressão de gás nebulizante. Os dados adquiridos na faixa de m/z 50 a 1200 com uma taxa de aquisição de 5Hz. Os cinco íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto MS/MS). O software usado para a captura de dados foi Hystar Application versão 3.2 e OtofControl (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

2.6 Molecular Networking (MN) e anotação de metabólitos

Os dados de espectrometria de massa foram convertidos em arquivos no formato mzXML e transferidos para o servidor do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para gerar o mapa químico (ID=32de3c79edf449e3b9b8e65ff44cb9d2), de acordo com a documentação GNPS.¹³ O mapa químico foi gerado após a subtração do solvente e dos brancos, referentes aos extratos dos meios não inoculados. Os valores dos parâmetros utilizados para a obtenção da rede molecular foram: 0,02 Da para a tolerância de massa dos íons precursores e para a tolerância de massa dos fragmentos dos íons; a conexão entre os nós formados apenas com o valor do cosseno maior ou igual a 0,70 e a correspondência mínima de quatro íons fragmentos entre os espectros de MS/MS. O MN foi visualizado usando o software Cytoscape.¹⁷ Para a anotação dos metabólitos, os espectros MN foram comparados com os espectros das bibliotecas do GNPS e os metabólitos com correspondência positiva com a biblioteca tinham íons precursores e fragmentos manualmente comparados com a biblioteca espectral GNPS e dados publicamente disponíveis. Moléculas candidatas também foram obtidas a partir da fragmentação *in silico* assistida por computador, realizada no MetFrag. O algoritmo SmartFormula® (DataAnalysis versão 4.2, Bruker Daltonics, Alemanha) foi utilizado para a atribuição da fórmula molecular dos íons detectados e o erro de massa foi calculado, levando em conta a diferença das massas monoisotópicas teórica e experimental, considerando uma tolerância de erro de massa abaixo de 10 ppm. Os dados da distribuição das entidades químicas nos extratos foram exportados do GNPS e organizados em um diagrama de Venn construído usando os recursos do site https://www.canva.com/pt_br/graficos/diagrama-venn/.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Identificação dos fungos endófitos por sequenciamento de Sanger

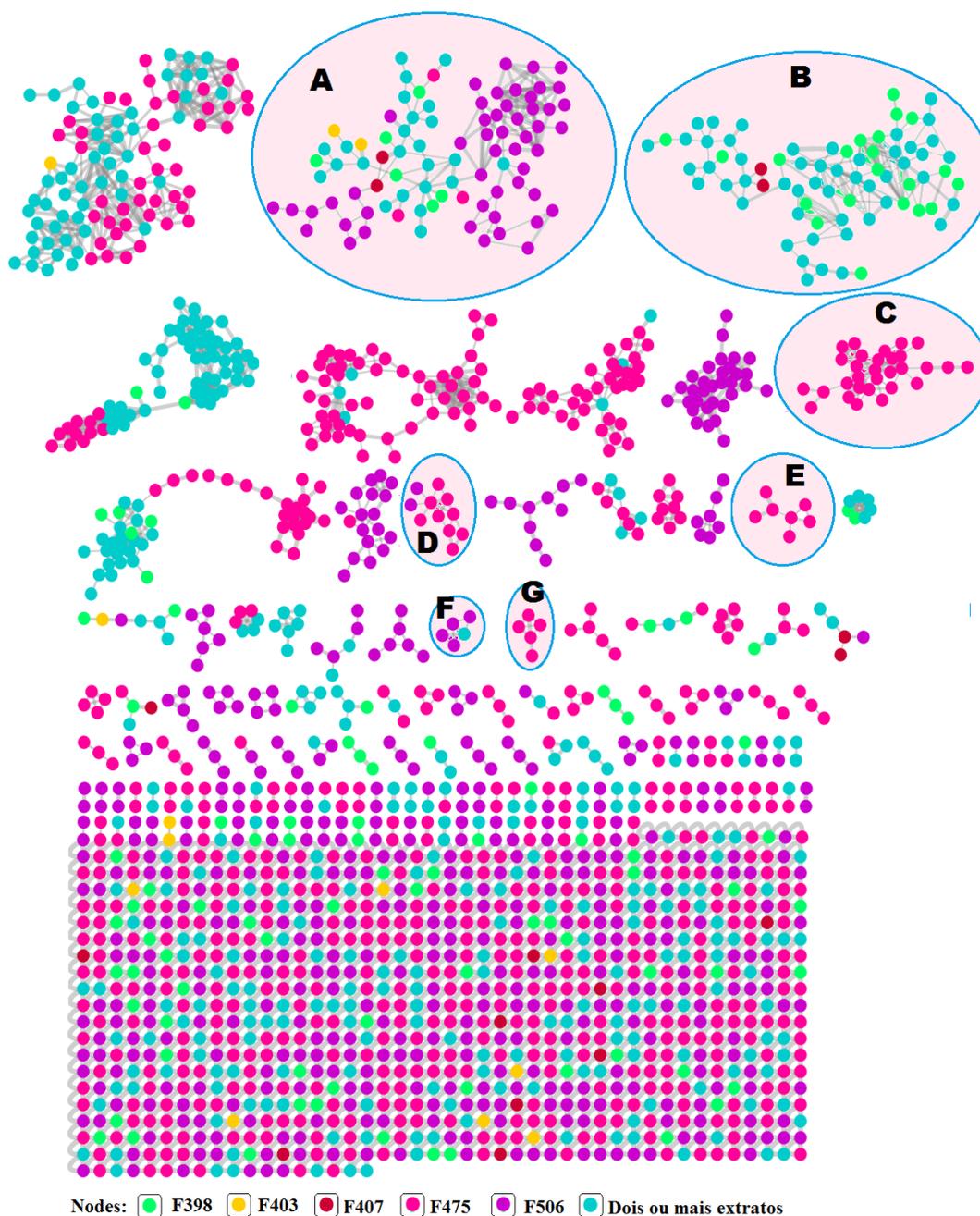
A sequência do *ITS1–5.8S ITS2 rDNA* dos fungos F398, F403 e F407 apresentou maior similaridade (99,8%) com *A. flavipes* e *A. micronesiensis*. Este resultado sugere que ao menos dois destes fungos são da mesma espécie, isolados ou não da mesma parte da planta. Ainda assim, variações observadas na composição química destas três linhagens de *Aspergillus* foram significativas, pois possibilitaram diferenças nos resultados das atividades biológicas testadas.

O fungo F506 apresentou 100% de similaridade com *A. aculeatinus*, *A. aculeatus*, *A. assiutensis* e *A. japonicus*. O fungo F475 apresentou similaridade (100%) com *P. christenseniae*, *P. commune*, *P. expansum* e *P. solitum*. Assim, desses grupos isolados de diferentes partes de *A. jahnii*, quatro (F398, F403, F407 e F506) apresentaram estreita relação filogenética com o gênero *Aspergillus* e apenas o fungo F475 foi considerado como pertencente ao gênero *Penicillium*.

3.2 Molecular Networking e identificação dos metabólitos

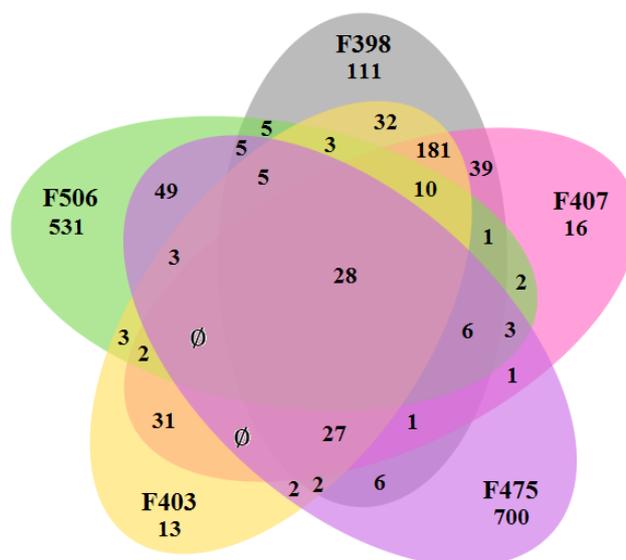
Os dados MS/MS dos cinco extratos fúngicos foram organizados em uma rede molecular (Figura 1), que foi visualizada usando o software cytoscape. O agrupamento dos metabólitos no molecular networking (MN) foi realizado com base na semelhança espectral entre padrões de fragmentações. Uma entidade química é representada por um nó no MN, que pode se conectar a outro nó de acordo com as similaridades no espectro de fragmentação. Estas conexões permitem o agrupamento de moléculas estruturalmente semelhantes, indicando que tais compostos pertencem à mesma classe química.

Figura 1: Rede molecular gerada pelo GNPS a partir da associação dos dados MS/MS dos cinco extratos fúngicos. Apresentação do mapa visualizado no Cytoscape após a subtração dos controles de meio de cultivo e branco da coluna. (A) cumarinas, (B) citocalasinas, (C) Fumonisininas, (D) ácidos graxos, (E) nafto- γ -pironas, (F) alcaloides e (G) malforminas.



A combinação dos dados espectrais dos cinco extratos fúngicos no MN gerou 1.818 nós (entidades químicas). Estes dados compilados foram usados para gerar um diagrama de Venn (Figura 2). Um total de 447 entidades químicas foi compartilhado por mais de um extrato, o que corresponde a 24,6% do total. O extrato obtido da linhagem F475 foi o que apresentou maior quantidade de entidades químicas, cerca de 38%. Os extratos oriundos das linhagens F398, F403 e F407, apresentaram maior similaridade no perfil químico, contendo o maior número de entidades compartilhadas, correspondendo a um total de 181 entidades químicas.

Figura 2: Diagrama de Venn mostrando a distribuição de entidades químicas detectadas por UHPLC-ESI(+)-MS/MS, dos extratos fúngicos com códigos F398, F403, F407, F475 e F506.



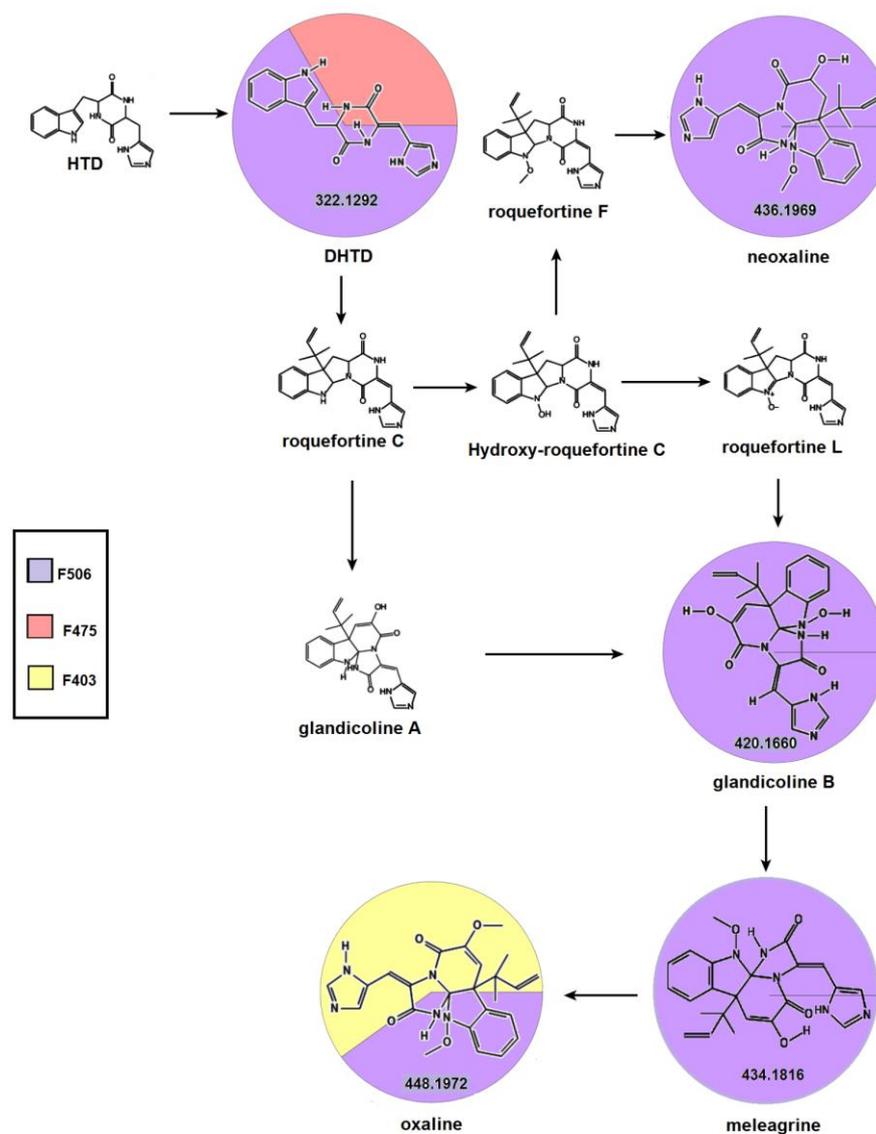
Do total de entidades químicas detectadas, 26 foram anotadas usando o GNPS. A investigação metabolômica também foi auxiliada pela pesquisa em bancos de dados públicos, como MassBank of North America (MoNA) e Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) de moléculas candidatas, que foram obtidas a partir da fragmentação *in silico* assistida por computador, realizada pela plataforma Metfrag. Uma investigação manual, feita por comparação do padrão de fragmentação com dados relatados na literatura, também foi realizada. Além da verificação dos espectros de fragmentação e erro de massa dos compostos. Estas etapas permitiram a anotação de outras moléculas.

Os extratos fúngicos estudados apresentaram uma variedade de compostos anotados, obtendo-se um total de 39 compostos identificados putativamente (Figuras S1-S39). Das moléculas anotadas para a classe dos alcaloides, calculou-se erros de massa variando entre 1.43 a 5.46 ppm. A Figura 3 apresenta alguns alcaloides anotados, com espectros MS/MS de $[M+H^+]$ m/z 322,1292, $[M+H^+]$ m/z 420,1660, $[M+H^+]$ m/z 434,1816, $[M+H^+]$ m/z 436,1969 e $[M+H^+]$ m/z 448,1972, alcaloides putativamente identificados como dehidrohistidilriptofanildiceto-piperazina (DHTD), glandicolina B, meleagrina, neoxalina e oxalina respectivamente. Estes alcaloides participam da mesma rota biossintética (Figura 3).^{18,19} Estes compostos são comumente produzidos em extratos de fungos do gênero *Penicillium*.^{20,21} Meleagrina já foi isolado de fungos do gênero *Penicillium* isolados de *A. squamosa*.²² No entanto, este metabólito pode ser isolado de fungos de diferentes ambientes,^{21,23} não sendo exclusividade de fungos endofíticos de *Annona*, o que sugere ser um metabólito relacionado a filogenia do grupo.

Neoxalina, já foi isolado do caldo de cultivo de *A. japonicus*.²⁴ Segundo Ali et al.²⁵ espécies de *Aspergillus*, como *A. fumigatus* e *A. terreus*, apresentam três genes da rota das roquefortinas, indicando a capacidade de produção destes alcaloides, além de conterem outros genes adicionais, que podem estar envolvidos na modificação destes compostos. Uma vez que ambos os gêneros (*Aspergillus* e *Penicillium*) pertencem à mesma família Trichocomaceae é possível o compartilhamento destes genes originários de um ancestral comum. Além disso, é possível a obtenção de compostos análogos, resultantes da presença de outros genes, dependendo da espécie do fungo.

Os alcaloides da rota biossintética da meleagrina apresentam promissoras propriedades biológicas. Meleagrina é um inibidor da proteína transportadora de enoil-acila redutase, interrompendo o crescimento de bactérias resistentes a antibióticos.^{21,26} Neoxalina e oxalina são compostos que têm atividade antiproliferativa contra células jurkat.²⁷ Outros alcaloides também identificados putativamente são viridicatina e fellutanina B nos extratos F475 e F506, com espectros MS/MS de $[M+H]^+$ m/z 238,0849 e $[M+H]^+$ m/z 441,2272.

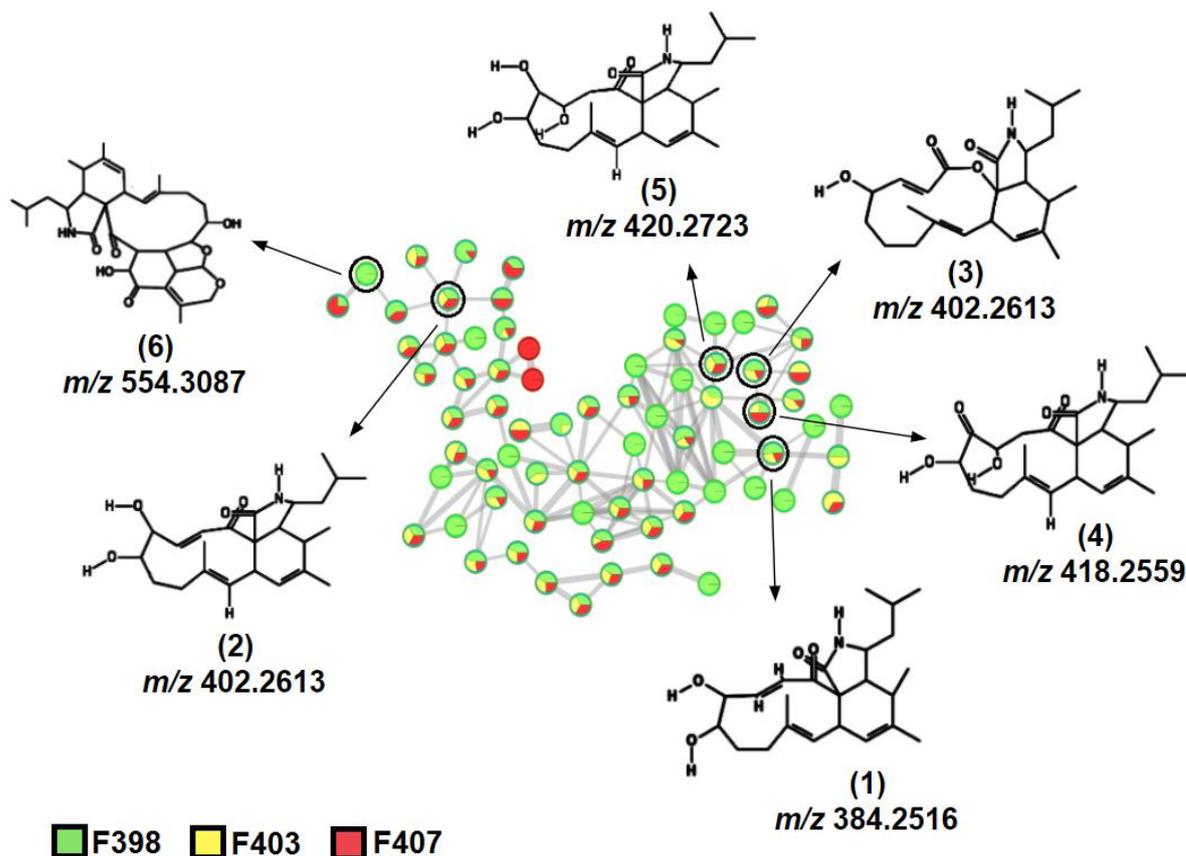
Figura 3: Rota de biossíntese de cinco alcaloides anotados. O gráfico de pizza corresponde a porcentagem relativa do metabólito na amostra. Roxo indica extrato da linhagem F506, rosa de extrato de F475 e amarelo do F403. As moléculas fora dos nós não foram detectadas em nenhuma das amostras.



HTD- histidiltriptofanildicetopiperazina.

Representantes da classe das citocalasinas foram identificados de forma putativa em um cluster contendo 73 nós (Figura 4). As citocalasinas são metabólitos secundários derivados de policetídeos reduzidos e aminoácidos,²⁸ que apresentam uma diversidade estrutural, estimando-se 300 análogos isolados de diversos fungos, incluindo o gênero *Aspergillus*.²⁹

Figura 4: Cluster das citocalasinas caracterizadas pelo MN obtidas dos dados MS/MS dos extratos fúngicos das linhagens fúngicas F398, F403 e F407. Os nós com círculo preto indicam compostos identificados putativamente. O gráfico de pizza dentro de cada nó corresponde à porcentagem relativa do metabólito na amostra, verde extrato F398, amarelo extrato F403 e vermelho extrato F407.



- (1) (3E,9E)-5,6-Dihidroxi-9,13,14-trimetil-16-(2-metilpropil)-17-azatriciclo[9.7.0.01,15]octadeca-3,9,12-triene-2,18-dione;
- (2) H-Cycloundec[d]isoindole-1,15(2H)-dione,3,3a,4,6a,9,10,11,12-octahidro-11,12-dihidroxy-4,5,8-trimetil-3-(2-metilpropil)-,(7E,13E);
- (3) (3E,9E)-5-Hidroxy-14-isobutil-9,12,13-trimetil-6,7,8,10a,13,13a,14,15-octahidro-2H-oxacyclododecino [2,3-d]isoindole-2,16(5H)-dione;
- (4) 1H-Ciclo-undec[d]isoindole-1,12,15-trione,2,3,3a,4,6a,9,10,11,13,14-decahidro-11,13-dihidroxy-4,5,8-trimetil-3-(2-metilpropil)-,(7E)-;
- (5) (7E)-11,12,13-Trihidroxy-3-isobutil-4,5,8-trimetil-3,3a,4,6a,9,10,11,12,13,14-decahidro-1H-cicloundeca [d]isoindole-1,15(2H)-dione;
- (6) tricochalin A.

Os compostos putativamente identificados são da subclasse aspcocalasina (Figura 4), um grupo de citocalasinas que contém o grupo 2-metilpropil, constante no anel isoindolina substituído.³⁰ Os compostos (1) e (5), apresentaram acertos com a biblioteca do GNPS, os compostos (2), (3), (4) foram anotados, a partir da comparação de seus espectros de MS/MS com espectros de bancos de dados públicos. O composto (6), foi proposto a partir da busca por análogos na literatura e erro de massa inferior a 10 ppm. A estrutura da tricochalin A (6), foi proposta no estudo realizado por Li et al.,³¹ que isolaram duas novas aspcocalasinas de uma espécie de fungo *Aspergillus*.

O grande quantitativo de nós conectados dentro do cluster das citocalasinas (Figura 4) sugere que existam outros grupos desta classe obtidos dos extratos oriundos das linhagens F398, F403 e F407. Um total de 52% das entidades apresentadas para a classe das citocalasinas foi detectado nestes três extratos respectivamente. Sendo que 28% foram

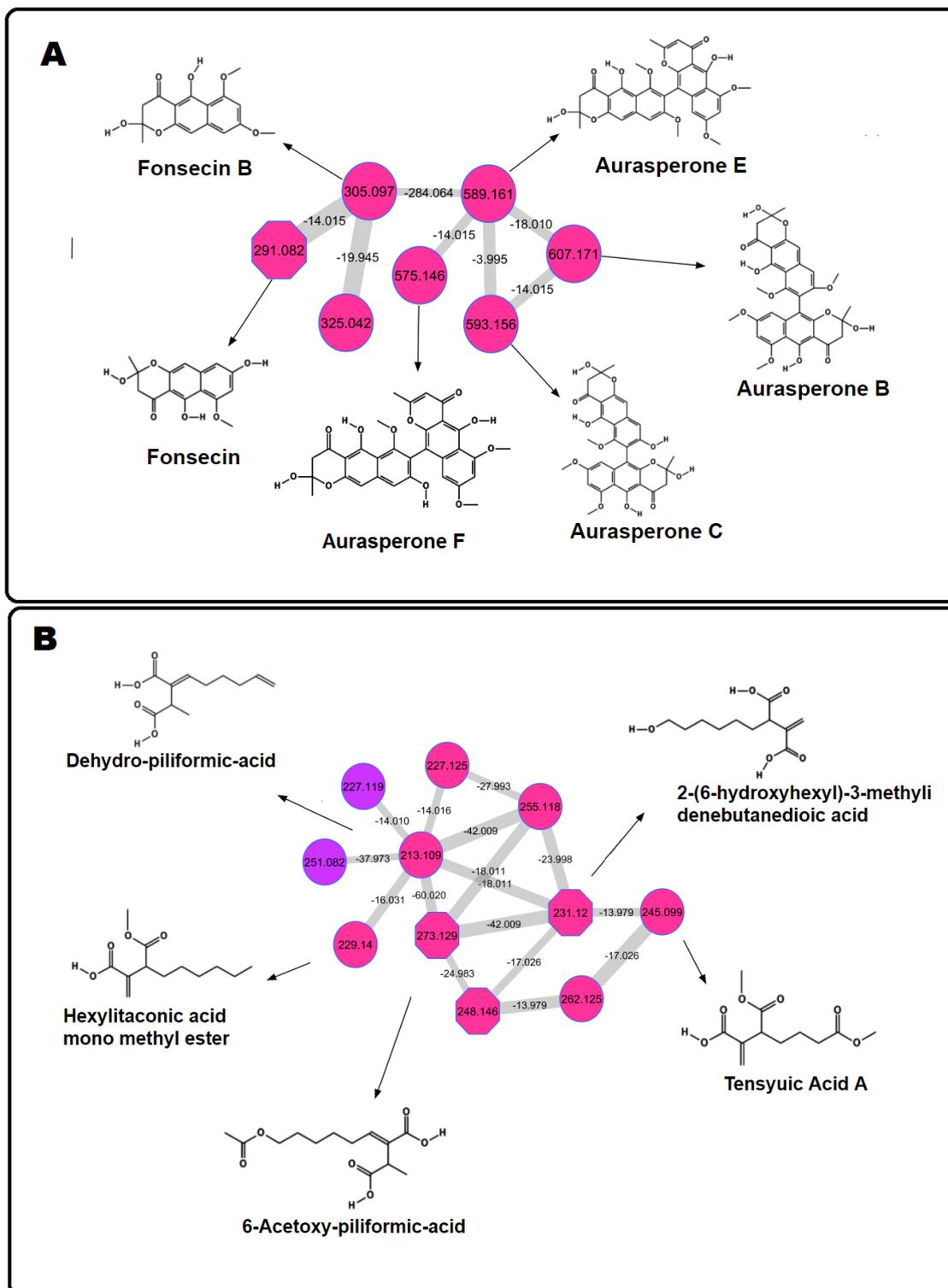
detectados exclusivamente no extrato de F398, aproximadamente 3% encontrados apenas no extrato F407, e não houve entidade detectada unicamente no extrato F403. Assim sendo, o extrato F398 se mostra mais promissor na obtenção de compostos desta classe, tendo 68 íons detectados, o que corresponde a cerca de 15% do total de 462 entidades químicas apontadas no referido extrato. As citocalasinas apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, como: atividade citotóxica contra células do câncer humano, como Jurkat, HL60, NB4, 231, HEP-3B dentre outros;²⁹ propriedades anti-inflamatórias;³² e atividades anti-HIV.³³

A organização dos dados de espectros MS/MS no MN e a identificação putativa pelas moléculas sugeridas pela biblioteca do GNPS permitiu ainda verificar a presença de compostos pertencentes às classes das nafto- γ -pironas (Figura 5: A), ácidos graxos derivados do ácido itacônico (Figura 5: B) e fumonisinas. Estas classes foram observadas exclusivamente no extrato oriundo da linhagem F475 (*Penicillium* sp.), exceto os ácidos graxos que apresentaram dois nós detectados no extrato F506 (*Aspergillus* sp. - único da seção *Circumdati*). A biblioteca do GNPS apresentou anotações para duas fumonisinas e dois ácidos graxos. Para as nafto- γ -pironas, apenas uma anotação com a biblioteca foi possível, o composto fonsecina. Os demais compostos de cada classe foram identificados de forma putativa, pela relação estrutural exibida entre os metabólitos dentro de um cluster, relação esta dada a partir da extrapolação do ganho ou da perda de um grupo químico. Esta ferramenta aliada à verificação na literatura de espectros de fragmentação e/ou busca por moléculas análogas, se mostrou útil na desreplicação dos metabólitos conhecidos. Outros estudos sobre a desreplicação de metabólitos oriundos de extratos complexos mostram uma boa perspectiva na identificação precoce de metabólitos conhecidos. Identificação essa feita utilizando a bioinformática, como por exemplo, o MN^{34,35} e a fragmentação *in silico*.^{36,37}

Em nosso estudo, identificamos putativamente cinco ácidos graxos derivados do ácido itacônico: ácido 2-Metileno-3-(6-hidroxi-hexil)-butanedioico, ácido 6-Acetoxi-piliformico, ácido dehidro-piliformico, ácido mono metil éster hexilitaconico e ácido tensyuoico A. Todos detectados no extrato F475. Destes, os íons $[M+H^+]$ m/z 231,1221 e $[M+H^+]$ m/z 273,1310, foram identificados usando o GNPS. A observação destes permitiu a identificação putativa de outros compostos pertencentes ao mesmo cluster. Membros desta classe de compostos apresentaram atividades antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*³⁸ e *S. aureus*,³⁹ ambas as bactérias Gram-positivas, o que sugere certa especificidade para estes ácidos.

Para as nafto- γ -pironas putativamente verificadas temos: fonsecina com $[M+H^+]$ m/z 291,0850, fonsecina B com $[M+H^+]$ m/z 305,0999, aurasperona B com $[M+H^+]$ m/z 607,1759, aurasperona C com $[M+H^+]$ m/z 593,1598, aurasperone E com $[M+H^+]$ m/z 589,1655, aurasperone F com $[M+H^+]$ m/z 575,1499. As nafto- γ -pironas são compostos encontrados frequentemente em extratos de espécies de *Aspergillus*.^{40,41} As nafto- γ -pironas apresentam diferentes atividades biológicas. Carboué et al.,⁴² estudaram a atividade antioxidante de algumas nafto- γ -pironas incluindo as observadas no nosso estudo, obtendo potente atividade, principalmente para fonsecina. Os resultados mostraram uma linearidade entre a atividade antioxidante com o grau de substituição de grupos hidroxilas. Compostos desta classe também apresentaram outras propriedades biológicas, como: antimicrobiana;⁴³ diminuição da resistência a múltiplas drogas em células carcinoma KB humanas;⁴⁴ citotoxicidade contra células SW116 do câncer de cólon e inibição de xantina oxidase.⁴⁵

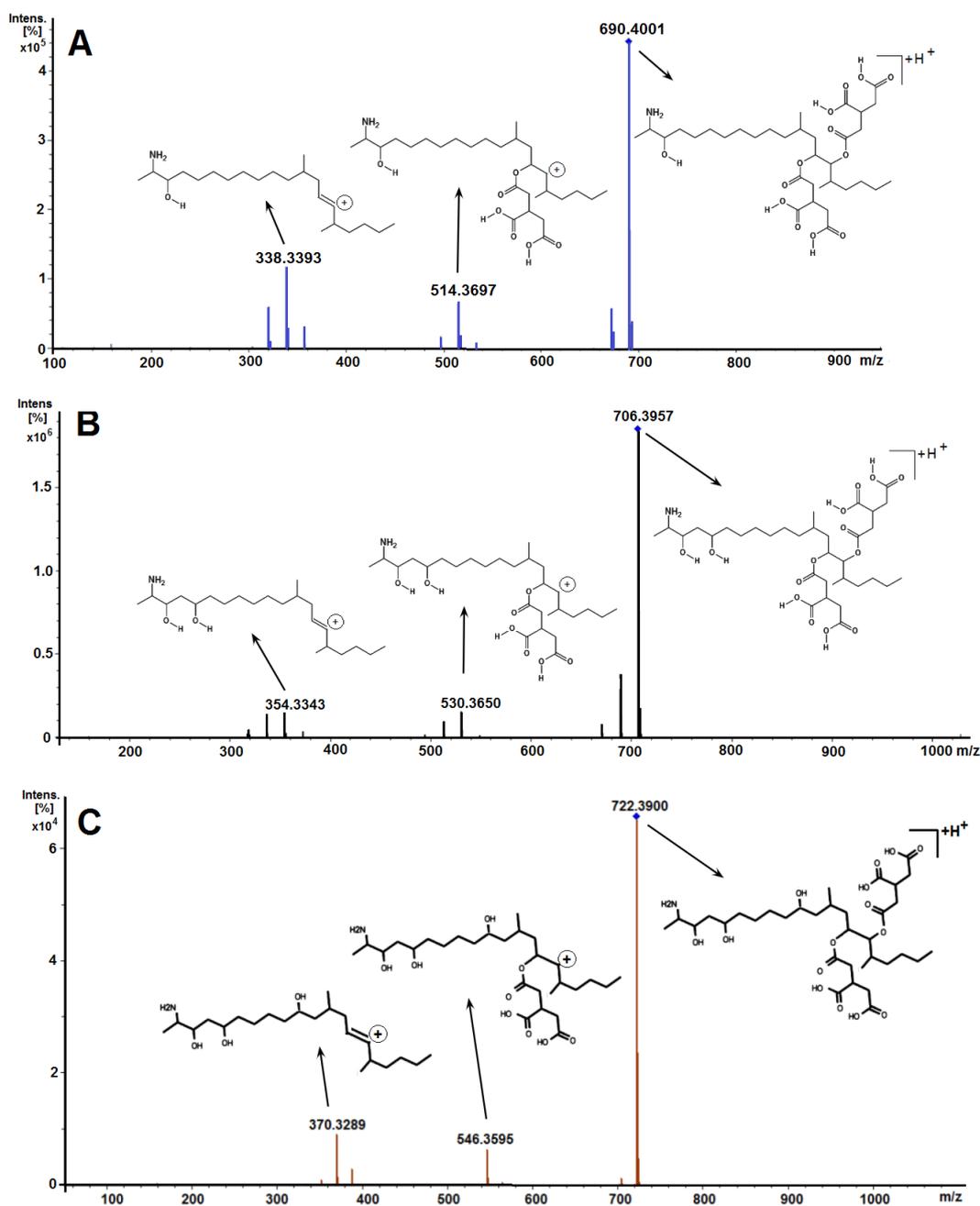
Figura 5: Clusters das classes (A) nafto- γ -pironas e (B) ácidos graxos, caracterizados por molecular network, obtidos dos dados MS/MS do extrato F475. Os nós em forma octogonal apresentaram acertos com a biblioteca do GNPS.



As fumonisinas são um grupo de micotoxinas potencialmente cancerígenas, que podem ser produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, no entanto também já foram relatadas na espécie *A. niger*.⁴⁶ O extrato da linhagem F475 apresentou representantes desta classe de micotoxinas. Destes, três fumonisinas da série B foram identificadas putativamente. Os espectros de fragmentação das fumonisinas B1, B2 e B4 foram comparados com dados

obtidos na literatura. Tamura et al.,⁴⁷ apresentaram propostas de fragmentação para algumas fumonisinas da série B, incluindo as fumonisinas B1 e B2, supostamente identificadas no nosso estudo. Segundo os autores, as fragmentações destes compostos apresentam padrões característicos, exibindo íons de fragmentos pela clivagem de ácidos tricarbálicos e grupos hidroxilas, ou seja, diferentes fragmentos são formados, dependendo da posição das hidroxilas e da formação de ácidos tricarbálicos. A Figura 6 apresenta os espectros de fragmentação das fumonisinas e a proposta de fragmentação para as fumonisinas B1 e B2 de acordo com o sugerido por Tamura et al.⁴⁷

Figura 6: Espectros MS/MS e proposta dos íons de fragmentação resultantes da clivagem dos ácidos tricarbálicos para os compostos anotados (A) fumonisina B4, (B) fumonisina B2 e (C) fumonisina B1.



A Figura 6 também apresenta uma proposta de fragmentação para a fumonisina B4 seguindo os padrões característicos apontados pelos mesmos autores. A proposta de fragmentação e a similaridade dos espectros de fragmentação, tanto comparados com os sugeridos pela biblioteca do GNPS quanto pela literatura, reforça a probabilidade de que os compostos aqui supostamente identificados realmente sejam os indicados.

O estudo permitiu a identificação putativa de outros compostos (Tabela S1), fora os já descritos anteriormente. Metabólitos pertencentes a classes das malforminas, terpenóides, cumarinas, pironas e fenóis. Compostos estes já relatados na literatura, apresentando diferentes propriedades. Um representante da família das andrastinas, a andrastina A $[M+H]^+$ m/z 487,261, compostos desta família são considerados promissores agentes antitumorais.^{48,49} A aspulvinona E, produzida como pigmentos de fungos do gênero *Aspergillus*, apresenta significativa atividade antiviral contra o vírus da influenza A H1N1.⁵⁰ Outro importante composto supostamente identificado é a avenantramida B que é um polifenol com alto potencial antioxidante, além de propriedades anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas.⁵¹ As avenantramidas são bifenólicos encontrados na aveia, sendo este composto detectado no extrato fúngico F506 que foi cultivado em meio de aveia, no entanto, não foi detectado no extrato do meio sem inóculo. Segundo Chu, Johson e O'Shea,⁵¹ as avenantramidas estão frequentemente ligados a macromoléculas que não os tornam biodisponíveis, dos quais podem passar por processos enzimáticos, incluindo com fungos do gênero *Aspergillus*, para a sua liberação. Assim sendo, a presença deste composto no extrato fúngico, pode indicar que a linhagem F506 apresenta enzimas capazes de liberar a avenantramida. Cai et al.,⁵² mostraram o aumento do conteúdo de fenólicos em frações de aveia fermentada com diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, concomitante a este aumento houve também um acréscimo na atividade antioxidante.

3.3 Atividade antimicrobiana e antioxidante

A concentração inibitória mínima (CIM) para todos os extratos brutos de acetato de etila foi determinada (Tabela 1). Os testes realizados resultaram em uma CIM de 1 mg mL^{-1} para todas as amostras testadas, exceto para o fluconazol, que apresentou CIM de $0,25\text{ mg mL}^{-1}$ (Controle positivo). Todos os extratos apresentaram atividade inibitória contra *P. aureuginosa* INCQS 00025 (ATCC 15442) e *C. albicans* (ATCC 90028), sendo, portanto, os patógenos mais sensíveis aos extratos. Os extratos testados mostraram uma ampla gama de inibição, apresentando pelo menos atividade inibitória para três dos patógenos testados. Para a bactéria gram-positiva *S. aureus* INCQS 0057 (ATCC 43300) apenas os extratos F475 e F506 não inibiram o crescimento até a concentração máxima testada ($1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$). O extrato F407 foi o único que não apresentou inibição do crescimento do patógeno *E. coli* INCQS 00051 (ATCC 13863). É importante destacar, que os testes da atividade antimicrobiana foram realizados em extratos brutos que são fonte complexa de metabólitos, sendo possível a obtenção de metabólitos isolados com maior potencial biológico, do que seus extratos brutos. Pinheiro et al.,⁵³ isolaram alcaloides de extratos de *Aspergillus* sp. EJC08 que se apresentaram 10 vezes mais ativos para atividade antibacteriana, em comparação aos respectivos extratos brutos.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana para os extratos brutos das cinco linhagens fúngicas.

Extratos	Concentração inibitória em mg mL ⁻¹			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aureuginosa</i>
F398 e F403	1	1	1	1
F475 e F506	1	NI	1	1
F407	1	1	NI	1
Fluconazol	0,25	NT	NT	NT
Ampicilina	NT	1	1	1

NT- Não testada; NI- Não inibiu

Para a atividade antioxidante os resultados da concentração inibitória média (IC₅₀) são apresentados na Tabela 2. O extrato obtido do fungo F407 apresentou menor valor de IC₅₀ (3,8 µg/mL). Os demais extratos apresentaram valores de IC₅₀ abaixo de 10 µg/mL, estes valores indicam que os extratos fúngicos apresentam potente atividade antioxidante. Du et al.,⁵⁴ realizaram o fracionamento guiado do extrato acetato de etila de *A. europaeus* WZXY-SX-4-1, realizando o isolamento de compostos de uma das frações que apresentou IC₅₀ = 10 µg/mL. O estudo resultou no isolamento de três compostos com potente atividade de eliminação dos radicais DPPH, com IC₅₀ ≤ 5,4 µg/mL.

Tabela 2: Atividade antioxidante dos cinco extratos fúngicos

Extratos fúngico	F398	F403	F407	F475	F506
DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	4,6	5,5	3,8	5,4	8,1

4 CONCLUSÕES

Os resultados das atividades antimicrobiana e antioxidante obtidos pelos extratos fúngicos se mostram promissores para a obtenção de metabólitos com potencial biológico. Os dados do UHPLC-ESI(+)-MS/MS corroboram com os resultados obtidos nas atividades analisadas, pois permitiram a detecção de classes de metabólitos secundários bioativos para variadas propriedades biológicas, incluindo as bioatividades aqui estudadas.

A análise exploratória realizada pela plataforma do GNPS e a abordagem por Molecular Networking, indicou que os extratos apresentam uma rica e diversificada constituição química. Apresentando metabólitos análogos a compostos já conhecidos pelo potencial biológico. O grande quantitativo de íons detectados e não identificados nos extratos, conectada ao fato de serem fontes de estudos ainda inexploradas, indicam que estes fungos podem produzir compostos inéditos. Os fungos endofíticos destacam-se por permitir a preservação da planta hospedeira, uma vez que é possível a manutenção e preservação destes microrganismos. Além da possibilidade de produção de metabólitos em escala industrial por cultivo aeróbico.

O baixo número de dados espectrais MS² encontrados na literatura sobre compostos isolados de fungos endofíticos, aliado aos escassos trabalhos sobre endofíticos da região amazônica, limitam a identificação de um número mais elevado de compostos. O trabalho aqui desenvolvido, além de colaborar na ampliação de publicações sobre essas matrizes biológicas complexas, irá auxiliar em estudos futuros de isolamento de metabólitos alvos, a partir da análise direcionada desses extratos. Assim, estudos futuros são necessários para explorar essa quimiodiversidade obtida dos extratos de endófitos de *A. jahnii*, a fim de estabelecer uma fonte nova de metabólitos bioativos, aliada a preservação da flora amazônica em especial de anonáceas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gavamukulya Y, Abou-Elella F, Wamunyokoli F, Ael-Shemy H. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **2014**; 7(Suppl 1): S355-S363. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60258-3.
2. Formagio ASN, Vieira MC, Santos LAC, et al. Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. *Journal of Medicinal Food*. **2013**; 16(1): 20-25. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0303>.
3. Kalidindi N, Thimmaiah NV, Jagadeesh NV, Nandeep R, Swetha S, Kalidindi B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*. **2015**, 23: 795-802. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.012>.
4. Colman-Saizarbitoria T, Liu X, Hopp DC, et al. Annodienin and Jahnonacin: New Bioactive Nontetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Twigs of *Annona jahnii*. *Natural Product Letters*. **1999**; 14(1):65-75. <https://doi.org/10.1080/10575639908045436>.
5. Colman-Saizarbitoria T, Amesty A, Amaro MI, Cordero MI, Bahsas A. Jahonin and asimicin acetogenins from *Annona jahnii* (*Annonaceae*) Jahonin y Asimicin Acetogenins de *Annona jahnii* (*Annonaceae*). *Revista Facultad de Farmacia*. **2008**; 71 (1): 48-52. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/Revista_Facultad/Vol_71-1_2008.pdf#page=48 Accessed November 12, 2021.
6. Budhiraja A, Nepali K, Sapra S, Gupta S, Kumar S, Dhar KL. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. *Medicinal Chemistry Research*. **2013**; 22: 323–329. DOI:10.1007/s00044-012-0032-z.
7. Minarni, Artika IM, Julistiono H, et al. Anticancer activity test of ethyl acetate extract of endophytic fungi isolated from soursop leaf (*Annona muricata* L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **2017**; 10(6):566-571. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.06.004. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28756920.
8. Lin X, Huang YJ, Zheng ZH, Su WJ, Qian XM, Shen YM. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene. *Fungal Diversity*. **2010**; 41: 41–51. doi 10.1007/s13225-010-0017-5.
9. Abdel-Rahman T, Hussein AS, Beshir S, Hamed AR, Ali E, El-Tanany SS. Antimicrobial Activity of Terpenoids Extracted from *Annona muricata* Seeds and its Endophytic *Aspergillus niger* Strain SH3 Either Singly or in Combination. *Macedonian Journal of Medical Sciences*. **2019**; 7(19): 3127-3131. doi: 10.3889/oamjms.2019.793. PMID: 31949503.
10. Zanzarin DM, Hernandez CP, Leme LM. Metabolomics of soybean green stem and foliar retention (GSFR) disease using mass spectrometry and molecular networking. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2020**; 34(S3): e8655. <https://doi.org/10.1002/rcm.8655>.

11. Wang Y, Fan Q, Xiang J. Structural characterization and discrimination of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by a molecular networking strategy coupled with ultra-high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2020**; 34(11): e8760. doi: 10.1002/rcm.8760.
12. Gao YL, Wang YJ, Chung HH, Chen KC, Shen TL, Hsu CC. Molecular networking as a dereplication strategy for monitoring metabolites of natural product treated cancer cells. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2020**;34(S1):e8549. <https://doi.org/10.1002/rcm.8549>.
13. Wang M, Carver JJ, Phelan VV, et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking". *Nature biotechnology*. **2016**; 34 (8): 828-837. doi:10.1038/nbt.3597.
14. Almeida RTR, Prado RM, Porto C, Santos GT, Huws SA, Pilau EJ. Exploring the rumen fluid metabolome using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and Molecular Networking. *Scientific Reports*. **2018**; 8:17971. DOI:10.1038/s41598-018-36196-4.
15. Souza AQL, Souza, ADL, Astolfi Filho, S, Belém Pinheiro, ML, Sarquis, MIM, Pereira, JO. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. *Acta Amazonica*. **2004**; 34 (2): 185 – 195. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006>.
16. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. *Phytotherapy Research*. **2001**; 15 (2): 127–130. DOI: 10.1002/ptr.687.
17. Shannon P, Markiel A, Ozier, O. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*. **2003**; 13 (11): 2498-504. doi: 10.1101/gr.1239303.
18. Overy DP, Nielsen KF, Smedsgaard J. Roquefortine/Oxaline Biosynthesis Pathway Metabolites In *Penicillium* Ser. Corymbifera: In Planta Production and Implications for Competitive Fitness. *Journal of Chemical Ecology*. **2005**; 31 (10):2373-90. doi: 10.1007/s10886-005-7107-y.
19. Ries MI, Ali H, Lankhorst PP, et al. Novel Key Metabolites Reveal Further Branching of the Roquefortine/Meleagrins Biosynthetic Pathway. *The Journal Of Biological Chemistry*. **2013**; 288 (52): 37289–37295. DOI: 10.1074/jbc.M113.512665.
20. García-Estrada C, Ullán RV, Albillos SM, et al. A Single Cluster of Coregulated Genes Encodes the Biosynthesis of the Mycotoxins Roquefortine C and Meleagrins in *Penicillium chrysogenum*. *Chemistry & Biology*. **2011**; 18 (11): 1499–1512. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.08.012.
21. Kozlovskii AG, Antipova TV, Zhelifonova VP, Baskunov BP, Kochkina GA, Ozerskaya SM. Exometabolites of the Fungal Isolates (Genus *Penicillium*, Section *Chrysogena*) from Low-Temperature Ecotopes. *Microbiology*. **2016**; 85 (2): 157–164. <https://doi.org/10.1134/S0026261716020119>.
22. Yuniyanto P, Rusman Y, Saepudin E, Suwarso WP, Sumaryono W. Alkaloid (Meleagrins and Chrysogins) from endophytic fungi (*Penicillium* sp.) of *Annona squamosa* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **2014**; 17(5):667-74. doi: 10.3923/pjbs.2014.667.674.

23. Pimenta EF, Vita-Marques A, Tininis A, et al. Use of Experimental Design for the Optimization of the Production of New Secondary Metabolites by Two *Penicillium* Species. *Journal of Natural Product*. **2010**; 73 (11): 1821–1832. doi: 10.1021/np100470h.
24. Hirano A, Iwai Y, Masuma R, Tei K, Omura S. Neoxaline, A New Alkaloid Produced By *Aspergillus Japonicus*. Production, isolation and properties. *The Journal of Antibiotics*. **1979**; 32(8):781-5. DOI: 10.7164/antibiotics.32.781.
25. Ali H, Ries MI, Nijland JG, Lankhorst PP, Hankemeier T, Bovenberg RALA. Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS ONE*. **2013**; 8(6): e65328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065328>.
26. Zheng CJ, Sohn MJ, Lee S, Kim WG. Meleagrins, a New FabI Inhibitor from *Penicillium chrysogenum* with at Least One Additional Mode of Action. *PLoS ONE*. **2013**; 8 (11): e78922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078922>.
27. Koizumi Y, Arai M, Tomoda H, Omura S. Oxaline, a fungal alkaloid, arrests the cell cycle in M phase by inhibition of tubulin polymerization. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2004**; 1693 (1): 47– 55. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.013>.
28. Skellam E. The biosynthesis of cytochalasins. *Natural Product Reports*. **2017**; 34 (11): 252–1263. DOI <https://doi.org/10.1039/C7NP00036G>.
29. Wei G, Tan D, Chen, C, et al. Flavichalasin A–M, cytochalasin alkaloids from *Aspergillus flavipes*. *Scientific Reports*. **2017**; 7 (42434): 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep42434>.
30. Bräse S, Gläser F, Kramer CS, et al. Cytochalasins. In: *The Chemistry of Mycotoxins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 1st ed. Springer, Vienna, **2013**. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-7091-1312-7_14.
31. Li, X.; Ding, W.; Wang, P.; Xu, J. Two Novel Aspochalasins from the Gut Fungus *Aspergillus* sp. Z4. *Marine Drug*. **2018**; 16 (10): 343. doi: 10.3390/md16100343.
32. Dou H, Song Y, Liu X, et al. Chaetoglobosin Fex from the Marine-Derived Endophytic Fungus Inhibits Induction of Inflammatory Mediators via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2011**; 34(12): 1864—1873. doi: 10.1248/bpb.34.1864.
33. Chen C, Zhu H, Wang J, et al. Armochaetoglobins K–R, Anti-HIV Pyrrole-Based Cytochalasins from *Chaetomium globosum* TW1-1. *European Journal of Organic Chemistry*. **2015**; 14:3086–3094. DOI:10.1002/ejoc.201403678.
34. Silva E, Graça JP, Porto C, et al. Unraveling Asian Soybean Rust metabolomics using mass spectrometry and Molecular Networking approach. *Scientific Reports*. **2020**; 10:138. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56782-4>.
35. Hegazi NM, Radwan RA, Bakry SM, Saad HH. Molecular networking aided metabolomic profiling of beet leaves using three extraction solvents and in relation to its anti-obesity effects. *Journal of Advanced Research*. **2020**; 24, 545–555. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.06.001>.
36. Allard PM, Péresse T, Bisson J, et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Analytical Chemistry*. **2016**; 88 (6): 3317-3323. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04804>.

37. Ruttkies C, Strehmel N, Scheel D, Neumann S. Annotation of metabolites from gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry data using an in silico generated compound database and MetFrag. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2015**; 29 (16): 1521–1529. doi: 10.1002/rcm.7244.
38. Hasegawa Y, Fukuda T, Hagimori K, Tomoda H, Omura S. Tensyuic Acids, New Antibiotics Produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2002**; 55(9): 1338-1341. doi: 10.1248/cpb.55.1338.
39. Ding L, Li T, Liao X, He S, Xu S. Asperitaconic acids A–C, antibacterial itaconic acid derivatives produced by a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *The Journal of Antibiotics*. **2018**; 71: 902–904.
40. Bouras N, Mathieu F, Coppel Y, Lebrihi A. Aurasperone F – a new member of the naphtho-gamma-pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger* C-433. *Natural Product Research*. **2005**; 19 (7): 653-659. <https://doi.org/10.1080/14786410412331286955>.
41. Zhan J, Gunaherath GMKB, Wijeratne EMK, Gunatilaka AAL. Asperpyrone D and other metabolites of the plant-associated fungal strain *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*. **2007**; 68(3):368–372. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.09.038>.
42. Carboué Q, Maresca M, Herbette G, Roussos S, Hamrouni R, Bombarda I. Naphtho-Gamma-Pyrones Produced by *Aspergillus tubingensis* G131: New Source of Natural Nontoxic Antioxidants. *Biomolecules*. **2019**; 10(1): 29. DOI: 10.3390/biom10010029.
43. Ma YM, Li T, Ma CC. A new pyrone derivative from an endophytic *Aspergillus tubingensis* of *Lycium ruthenicum*. *Natural Product Research*. **2016**; 30(13):1499-503. doi: 10.1080/14786419.2015.1114939.
44. Ikeda S, Sugita M, Yoshimura A, et al. *Aspergillus* species strain M39 produces two naphtho-gamma-pyrones that reverse drug resistance in human KB cells. *International Journal of Cancer*. **1990**; 45(3):508-13. doi: 10.1002/ijc.2910450323.
45. Song YC, Li H, Ye YH, Shan CY, Yang YM, Tan RX. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiology Letters*. **2004**; 241 (1): 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.005>.
46. Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One*. **2011**; 6(8): e23496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023496>.
47. Tamura M, Mochizuki N, Nagatomi Y, Toriba A, Hayakawa K. Characterization of fumonisin A-series by high-resolution liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry. *Toxins (Basel)*. **2014**; 6(8):2580-2593. doi: 10.3390/toxins6082580.
48. Matsuda Y, Awakawa T, Abe I. Reconstituted biosynthesis of fungal meroterpenoid andrastin A. *Tetrahedron*. **2013**; 69 (38): 8199-8204. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.07.029>.
49. Omura S, Inokoshi J, Ushida R, et al. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of Antibiotics*. **1996**; 49 (5): 414-417. DOI: 10.7164/antibiotics.49.414.

50. Gao H, Guo W, Wang Q, et al. Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2013**; 23(6):1776-8. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.01.051.
51. Chu Y, Johnson J, O'Shea M. Oat Fractions with Enhanced Avenanthramide Concentration and Methods of Making. US 2019/0262296 A1, Aug. 29, **2019**. The Quaker Oats Company. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016057632> Accessed November 10, 2021.
52. Cai S, Wang O, Wu W, et al. Comparative study of the effects of solid-state fermentation with three filamentous fungi on the total phenolics content (TPC), flavonoids, and antioxidant activities of subfractions from oats (*Avena sativa L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**; 60(1):507-13. doi: 10.1021/jf204163a.
53. Pinheiro EAA, Carvalho JM, Santos DCP, et al. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Natural Product Research*. **2013**; 27 (18): 1633-1638. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.750316>.
54. Du X, Liu D, Huang J, Zhang C, Proksch P, Lin W. Polyketide derivatives from the sponge associated fungus *Aspergillus europaeus* with antioxidant and NO inhibitory activities. *Fitoterapia*. **2018**; 130:190-197. doi: 10.1016/j.fitote.2018.08.030.

MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO II

Tabela S1: Compostos identificados putativamente nos extratos obtidos das diferentes linhagens de fungos.

	Composto proposto	Fórmula molecular	Aduto	Massa experimental	Massa teórica	Erro em ppm	Extrato	Classe
1	Viridicatina	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂		238,0849	238,0862	-5,46	F475	
2	Dehidrohistidilriptofanildiceto-piperazina	C ₁₇ H ₁₅ N ₅ O ₂		322,1292	322,1298	-1,86	F475 e F506	
3	glandicolina B	C ₂₂ H ₂₁ N ₅ O ₄		420,1660	420,1666	-1,43	F506	
4	Meleagrina	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	434,1816	434,1823	-1,61	F506	alcalóide
5	Neoxalina	C ₂₃ H ₂₅ N ₅ O ₄		436,1969	436,1979	-2,29	F506	
6	Fellutanina B	C ₂₇ H ₂₈ N ₄ O ₂		441,2272	441,2285	-2,95	F506	
7	Oxalina	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O ₄		448,1972	448,1979	-1,56	F506 e F403	
8	Dehydro-piliformic-acid	C ₁₁ H ₁₆ O ₄		213,1116	213,1121	-2,34		
9	hexylitaconic acid mono methyl ester	C ₁₂ H ₂₀ O ₄		229,1423	229,1434	-4,8		
10	Ácido 2-Metileno-3-(6-hidroxi-hexil)-butanedioico	C ₁₁ H ₁₈ O ₅	[M+H] ⁺	231,1221	231,1227	-2,59	F475	ácido graxo
11	Tensyuc acid A	C ₁₁ H ₁₆ O ₆		245,1013	245,1019	-2,5		

12	Ácido 6-Acetoxi-piliformico	C ₁₃ H ₂₀ O ₆		273,1310	273,1332	-8,05		
13	Fonsecina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆		291,0850	291,0863	-4,47		
14	Fonsecina B	C ₁₆ H ₁₆ O ₆		305,0999	305,1019	-6,55		
15	Aurasperone F	C ₃₁ H ₂₆ O ₁₁		575,1499	575,1548	-8,52		
16	Aurasperone E	C ₃₂ H ₂₈ O ₁₁	[M+H] ⁺	589,1655	589,1704	-8,32	F475	naftopirona
17	Aurasperone C	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₂		593,1598	593,1653	-9,27		
18	Aurasperone B	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₂		607,1759	607,181	-8,39		
19	(3E,9E)-5,6-Dihidroxi-9,13,14-trimetil-16-(2-metilpropil)-17-azatriciclo[9.7.0.01,15]octadeca-3,9,12-triene-2,18-dione	C ₂₄ H ₃₅ NO ₄	[M-H ₂ O+H] ⁺	384,2516	384,2533	-4,42		
20	1H-Cycloundec[d]isoindole-1,15(2H)-dione, 3,3a,4,6a,9,10,11,12-octahydro-11,12-dihydroxy-4,5,8-trimethyl-3-(2-methylpropyl)-, (7E,13E)	C ₂₄ H ₃₅ NO ₄		402,2613	402,2638	-6,21		
21	(3E,9E)-5-Hydroxy-14-isobutyl-9,12,13-trimethyl -6,7,8,10a,13,13a, 14,15-octahydro-2H-oxacyclododecino[2,3-d]isoindole-2,16(5H)-dione	C ₂₄ H ₃₅ NO ₄	[M+H] ⁺	402,2614	402,2638	-5,97	F398, F403 e F407	citocalasinas
22	1H-Cyclo- undec[d]isoindole-1,12,15-trione,2,3,3a,4,6a,9,10,11,13,14-decahydro-11,13- dihydroxy-4,5,8-trimethyl-3-(2-methylpropyl)-, (7E)-	C ₂₄ H ₃₅ NO ₅		418,2559	418,2588	-6,93		

23	(7E)-11,12,13-Trihidroxy-3-isobutil-4,5,8-trimetil-3,3a,4,6a,9,10,11,12,13,14-decahidro-1H-cicoundeca[d]isoindole-1,15(2H)-dione	$C_{24}H_{37}NO_5$		420,2723	420,2744	-4,99		
24	tricochalsin A	$C_{32}H_{43}NO_7$		554,3087	554,3112	-4,51	F398	
25	Fumonisina B4	$C_{34}H_{59}NO_{13}$		690,4003	690,4059	-8,11		
26	Fumonisina B2	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	$[M+H]^+$	706,3955	706,4008	-7,5	F475	fumonisinas
27	Fumonisina B1	$C_{34}H_{59}NO_{15}$		722,3895	722,3957	-8,58		
28	Malformina A2	$C_{22}H_{37}N_5O_5S_2$		516,2270	516,2308	-7,36		
29	Malformina B4	$C_{23}H_{39}N_5O_5S_2$	$[M+H]^+$	530,2431	530,2465	-6,41	F475	ciclopeptídeo
30	N-[1-(4-Metoxi-6-oxopiran-2-il)-2-metilbutil]acetamida	$C_{13}H_{19}NO_4$		254,1375	254,1386	-4,33	F475	
31	N-[(1S)-1-(4-metoxi-6-oxopiran-2-il)-2-pheniletil]acetamida	$C_{16}H_{17}NO_4$	$[M+H]^+$	288,1220	288,1230	-3,47	F398, F475 e F506	pirona
32	6-[(1E,3E,5E,7E)-8-[(2R,3S,4S,5S)-3,4-dihidroxi-2,4,5-trimetiloxolan-2-il]octa-1,3,5,7-tetraenil]-4-metoxi-5-metilpiran-2-one	$C_{22}H_{28}O_6$		389,1938	389,1958	-5,14	F398, F403 e F407	
33	N-acetiltiramina	$C_{10}H_{13}NO_2$	$[M+H]^+$	180,1013	180,1019	-3,33	F398, F403 e F475	benzenoides

34	1',5-dimetoxi-3,5'-dimetil-2,3'-oxibifenil-1,2'-diol	C ₁₆ H ₁₈ O ₅		291,1219	291,1227	-2,75	F398, F403, F407 e F506	benzenoides
35	Aspulvinona E	C ₁₇ H ₁₂ O ₅		297,0739	297,0757	-6,06	F398, F403 e F475	
36	4,6-dihidroxi-3-(3-hidroxi-2,5-dimetilphenoxi)-5-metoxi-2,5-dimetilciclohex-2-en-1-one	C ₁₇ H ₂₂ O ₆		323,1465	323,1489	-7,43	F403 e F506	
37	4,6,8-trihidroxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarin-1-ona	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	211,0586	211,0601	-7,11	F403 e F407	cumarina
38	Avenantramida B	C ₁₇ H ₁₅ NO ₆	[M+H] ⁺	330,0968	330,0972	-1,21	F506	fenilpropanoide
39	Andrastina A	C ₂₈ H ₃₈ O ₇	[M+H] ⁺	487,2652	487,2690	-7,80	F475	meroterpenoide

Figura S1: Espectro de MS/MS atribuído a N-acetiltiramina, proveniente dos extratos F398, F403 e F475.

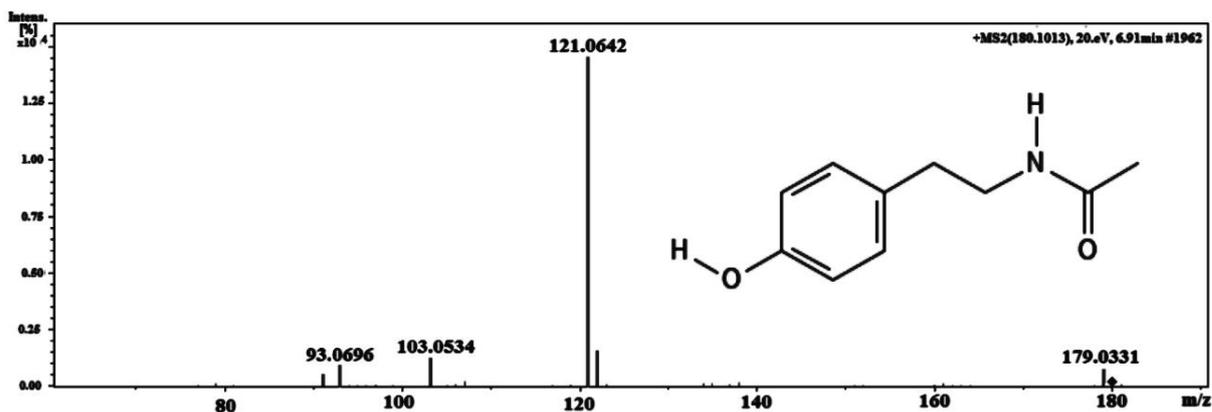


Figura S2: Espectro de MS/MS atribuído a 4,6,8-trihidroxi-3-metil-3,4- dihidroisocumarin-1-ona, proveniente dos extratos F403 e F407.

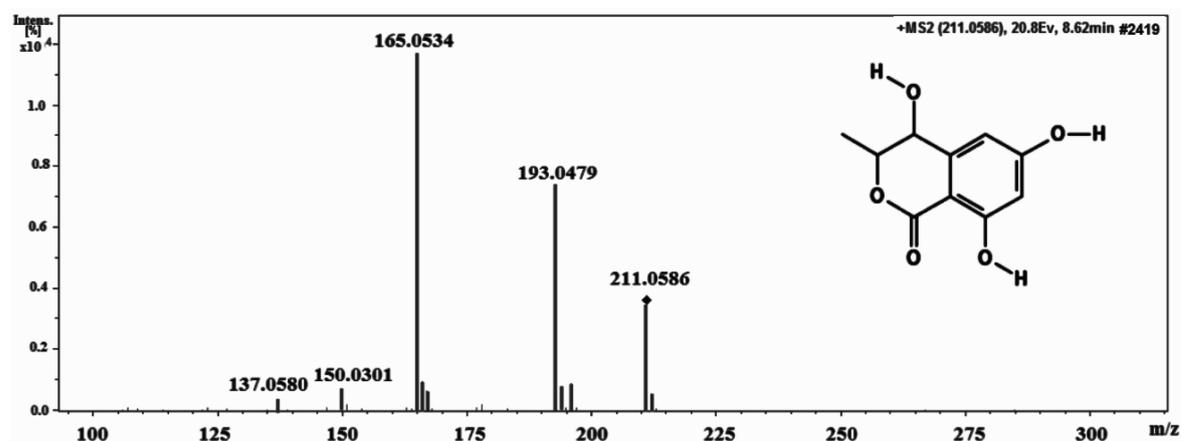


Figura S3: Espectro de MS/MS atribuído ao Dehydro-piliformic-acid, proveniente do extrato F475.

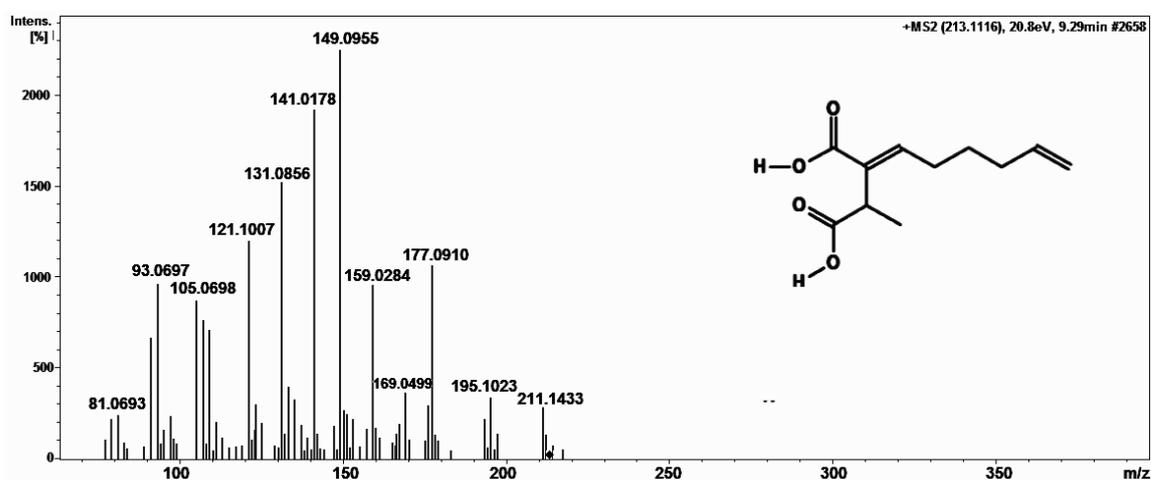


Figura S4: Espectro de MS/MS atribuído ao hexylitaconic acid mono methyl ester, proveniente do extrato F475.

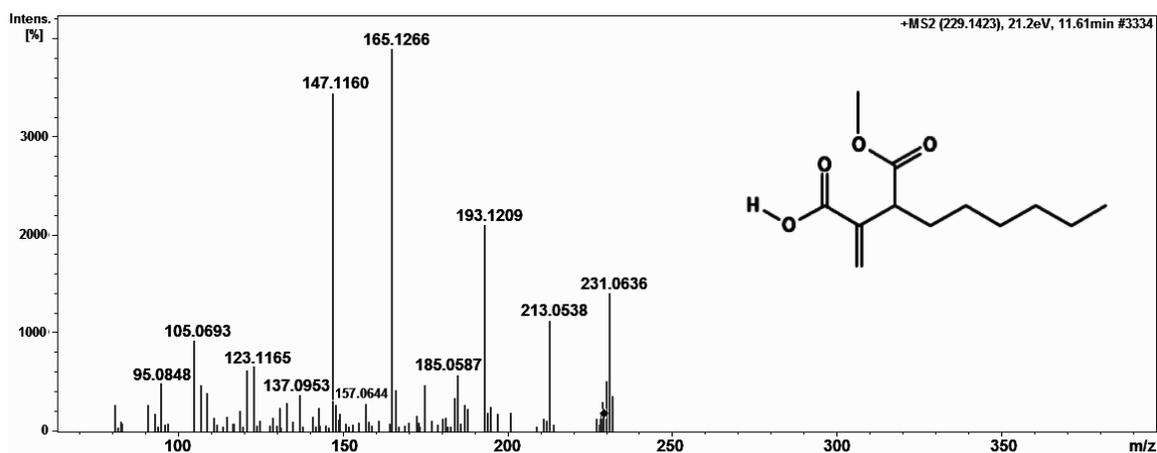


Figura S5: Espectro de MS/MS atribuído ao Ácido 2-Metileno-3-(6-hidroxihexil)-butanedioico, proveniente do extrato F475.

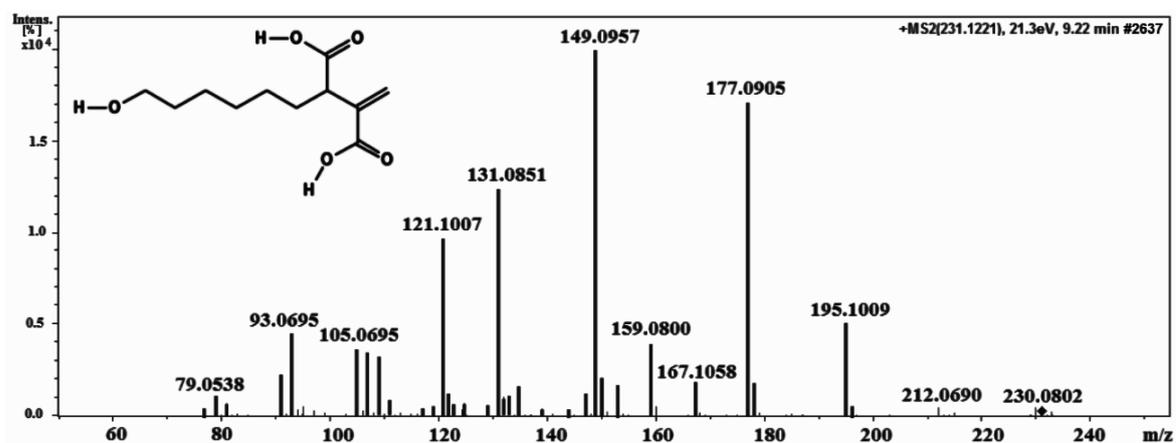


Figura S6: Espectro de MS/MS atribuído a viridicatina, proveniente do extrato F475.

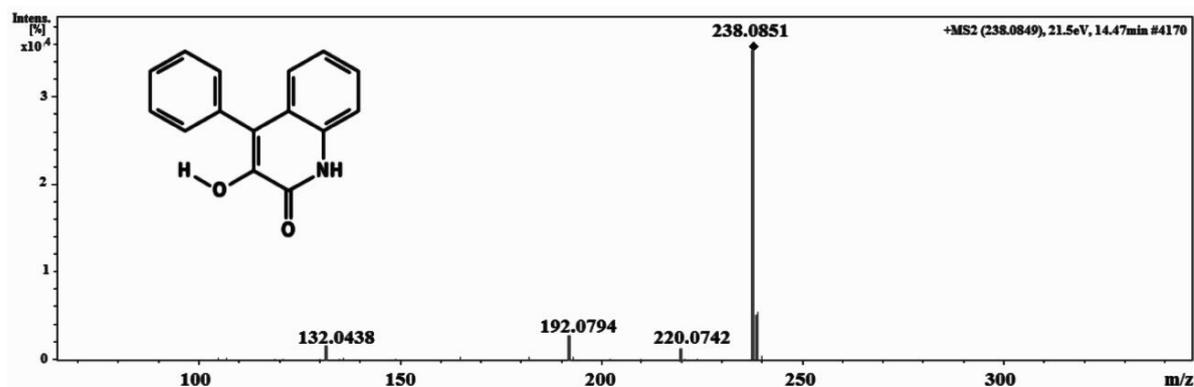


Figura S7: Espectro de MS/MS atribuído a tensyuc acid A, proveniente do extrato F475.

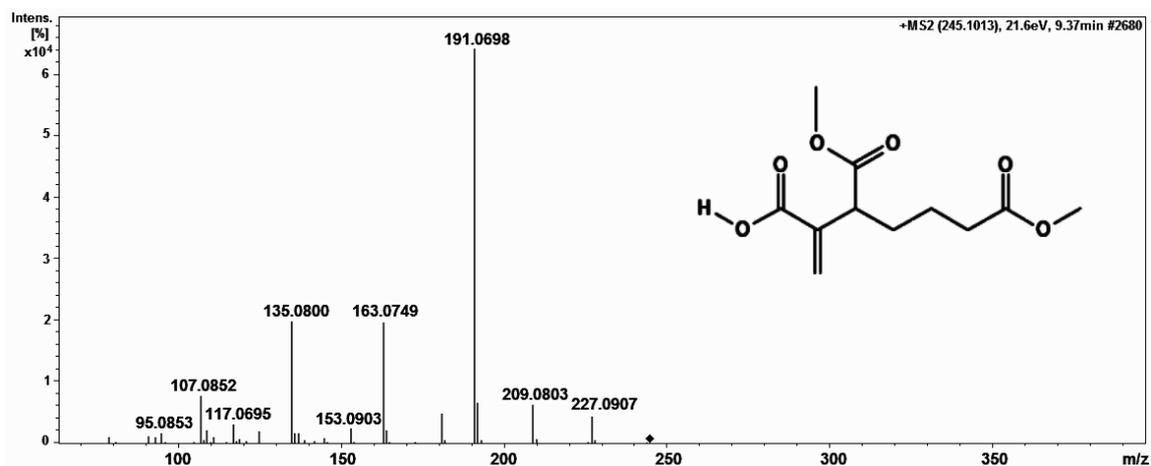


Figura S8: Espectro de MS/MS atribuído a N-[1-(4-Metoxi-6-oxopirran-2-il) -2-metilbutil]acetamida, proveniente do extrato F475.

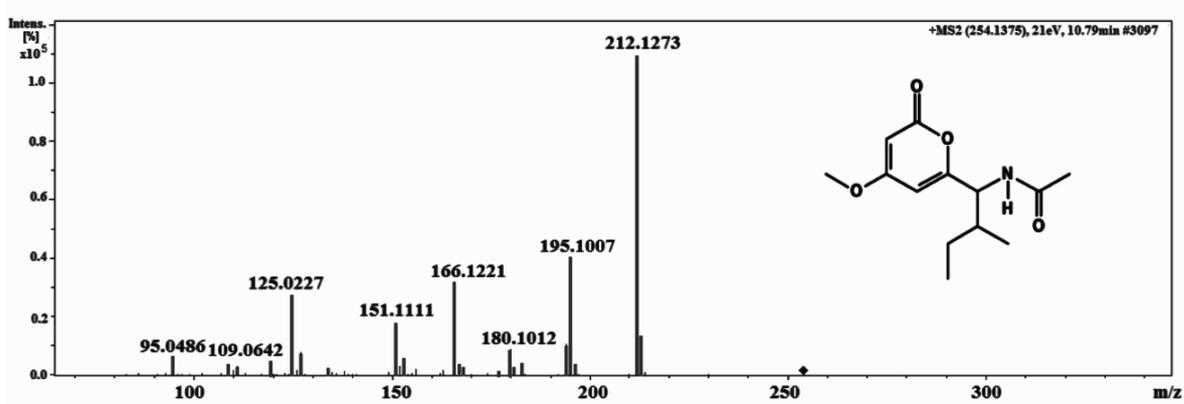


Figura S9: Espectro de MS/MS ao ácido 6-acetoxi-piliformico, proveniente do extrato F475.

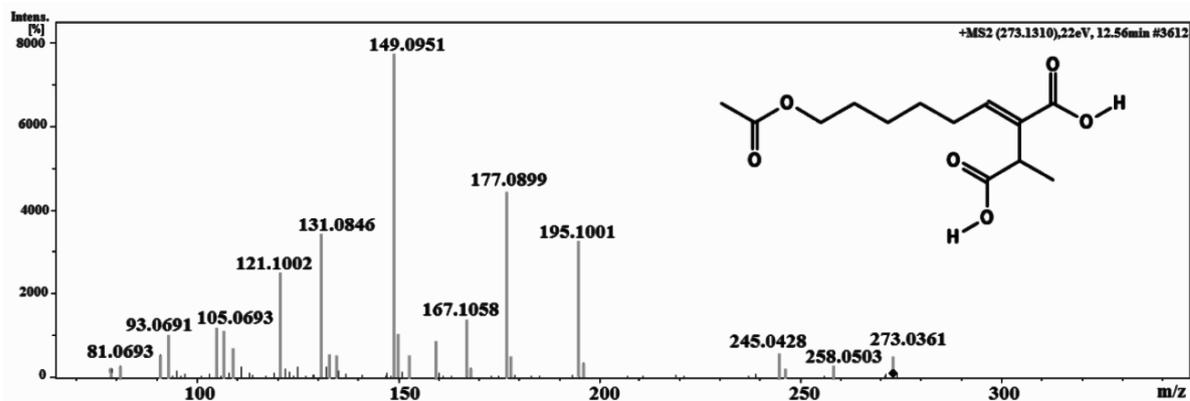


Figura S10: Espectro de MS/MS atribuído ao ácido N-[(1S)-1-(4-metoxi-6-oxopiran-2-il)-2-pheniletil]acetamida, proveniente dos extratos F398, F475 e F506.

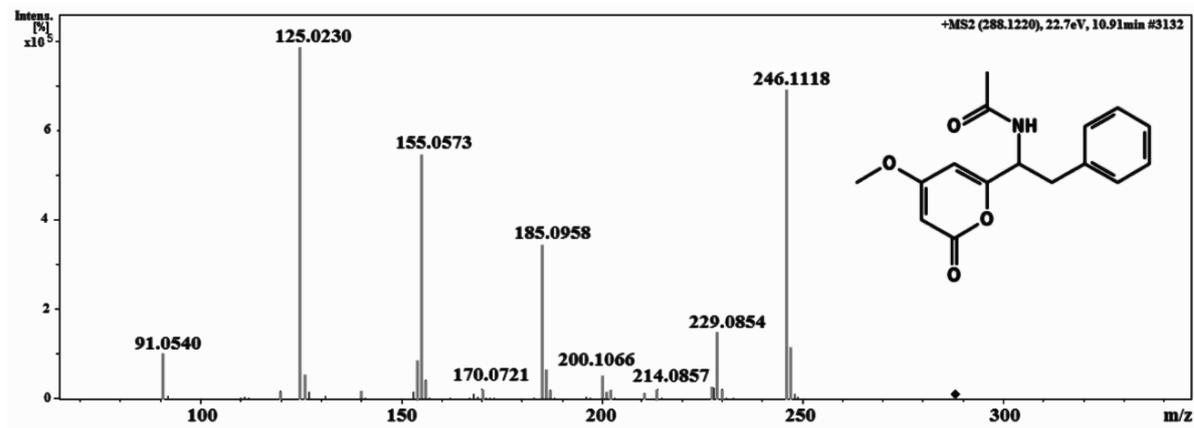


Figura S11: Espectro de MS/MS atribuído a fonsecina, proveniente do extrato F475.

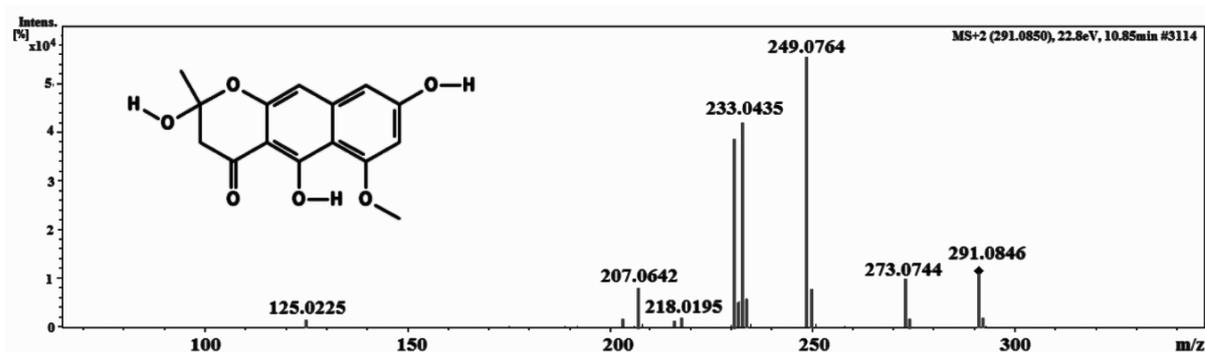


Figura S12: Espectro de MS/MS atribuído ao 1',5-dimetoxi-3,5'-dimetil-2,3'-oxibifenil-1,2'-diol, proveniente dos extratos F398, F403, F407 e F506.

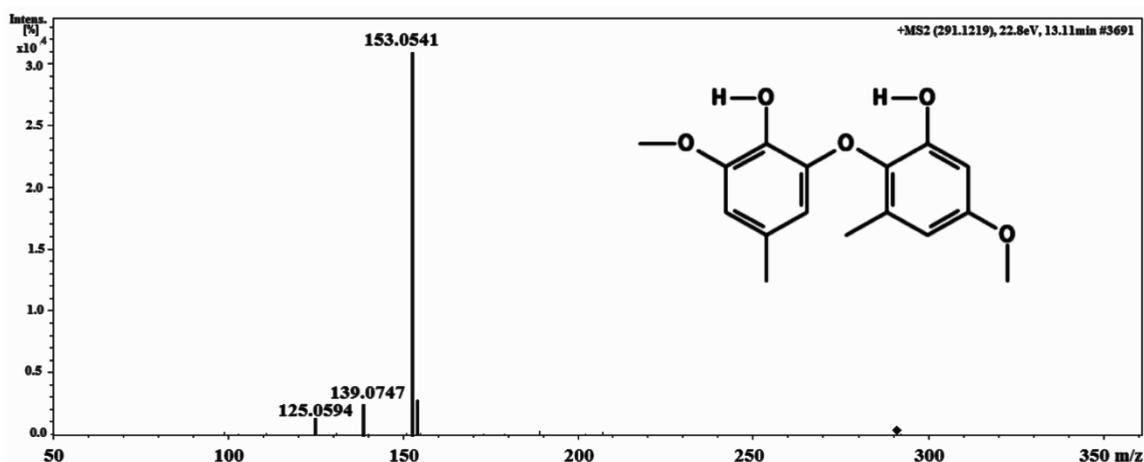


Figura S13: Espectro de MS/MS atribuída a aspulvinona E, proveniente dos extratos F398, F403 e F475.

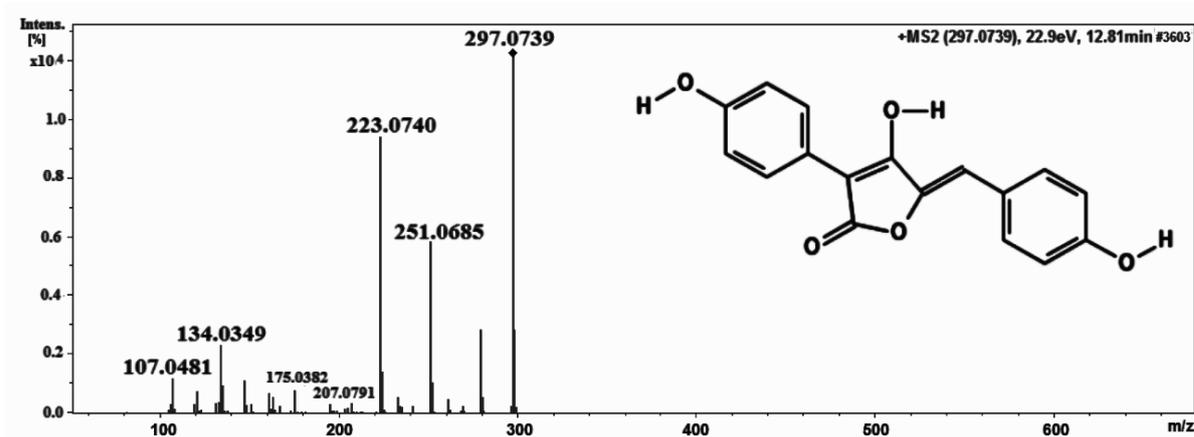


Figura S14: Espectro de MS/MS atribuída a fonsecina B, proveniente dos extratos F398, F403 e F475.

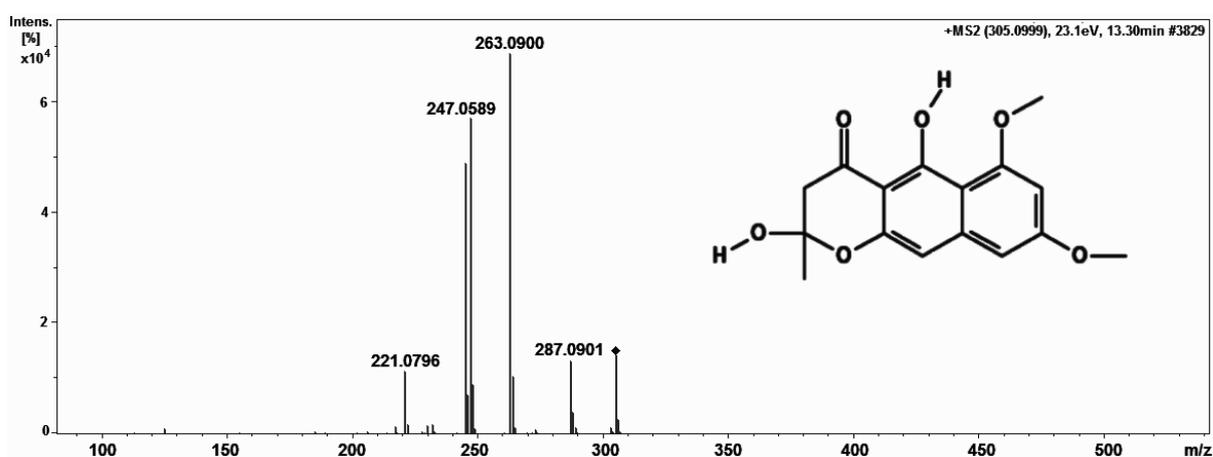


Figura S15: Espectro de MS/MS atribuído a dehidrohistidilriptofanildiceto-piperazina, proveniente dos extratos F475 e F506.

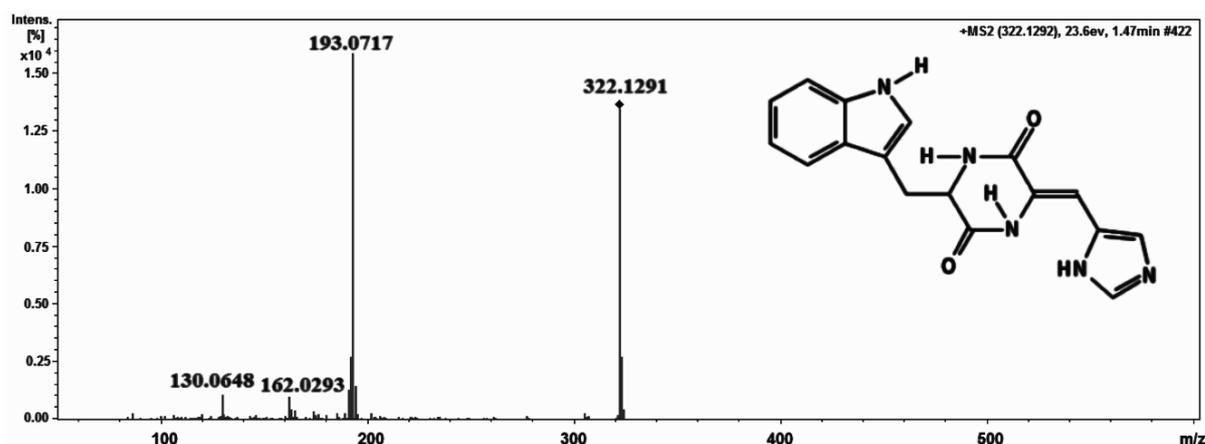


Figura S16: Espectro de MS/MS atribuído a 4,6-dihydroxy -3-(3-hydroxy-2,5-dimethylphenoxy)-5-methoxy-2,5-dimethylcyclohex-2-en-1-one, proveniente dos extratos F403 e F506.

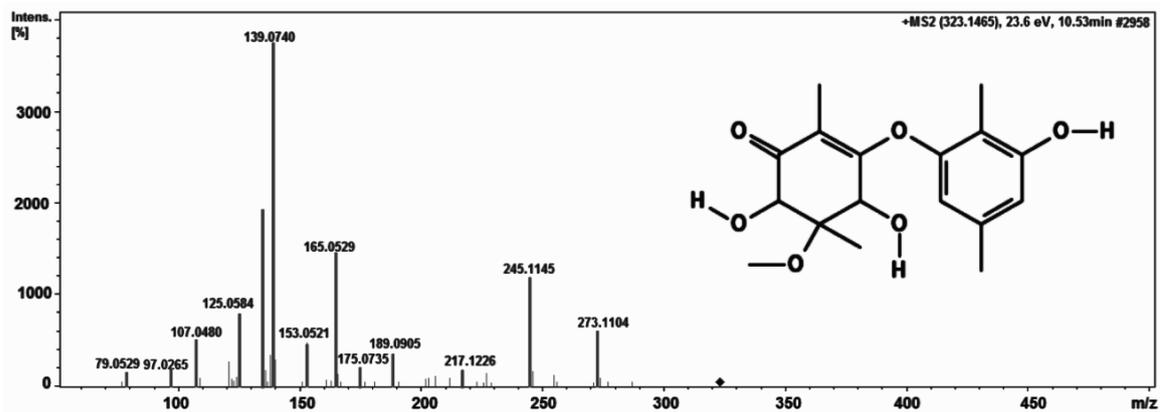


Figura S17: Espectro de MS/MS atribuído a avenantramida B, proveniente do extrato F506.

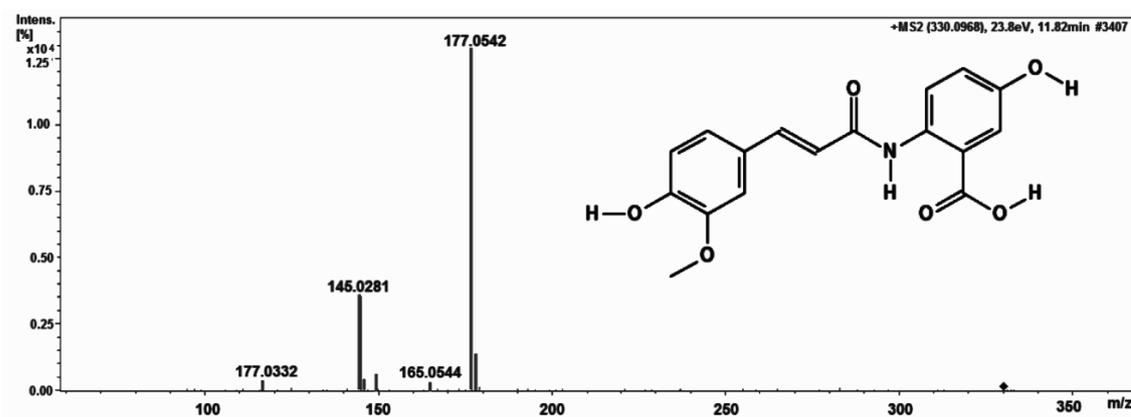


Figura S18: Espectro de MS/MS atribuído a (3E,9E)-5,6-Dihydroxy-9,13,14- trimethyl-16-(2-methylpropyl)-17-azatriciclo[9.7.0.01,15]octadeca-3,9,12-triene-2,18-dione, proveniente dos extratos F403 e F407.

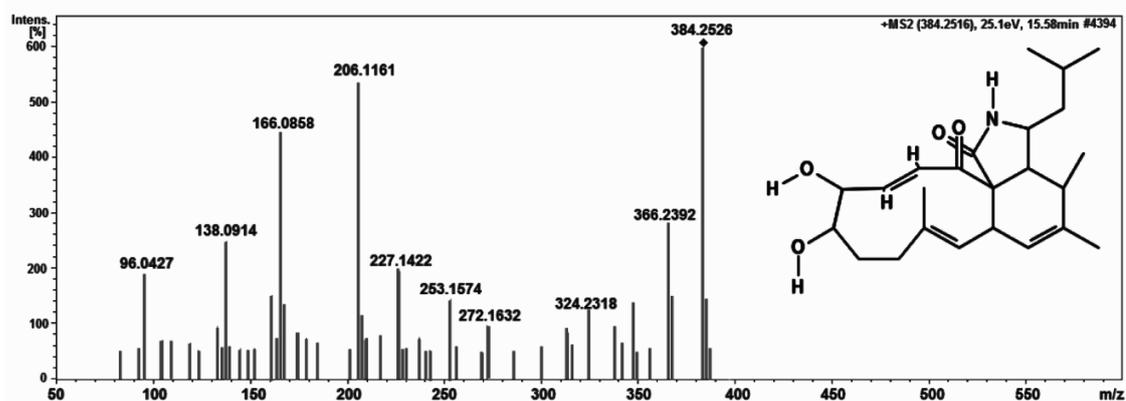


Figura S19: Espectro de MS/MS atribuído a 6-[(1E,3E,5E,7E)-8-[(2R,3S,4S,5S)-3,4-dihidroxi-2,4,5-trimetiloxolan-2-il]octa-1,3,5,7-tetraenil]-4-metoxi-5-metilpiran-2-one, proveniente dos extratos F398, F403 e F407.

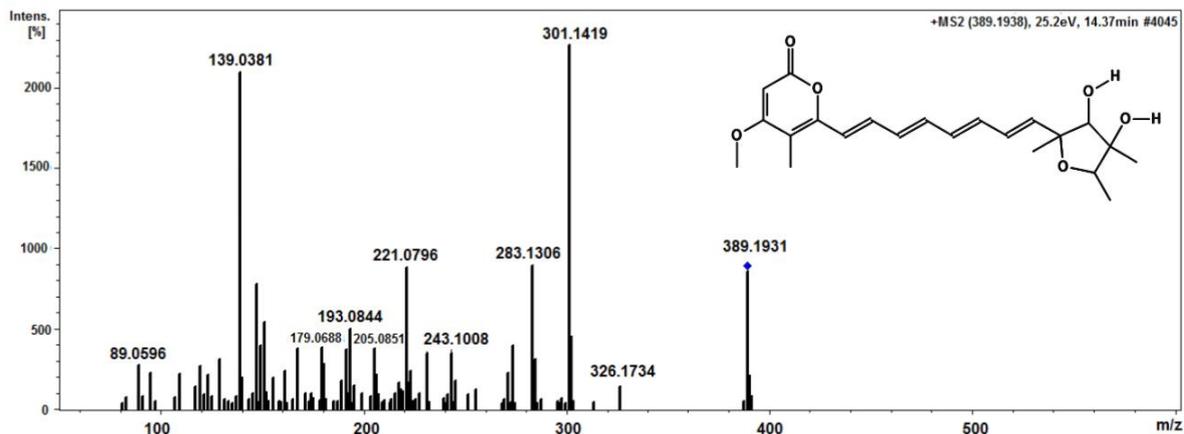


Figura S20: Espectro de MS/MS atribuído a 1H-Cycloundec[d]isoindole-1,15(2H)-dione,3,3a,4,6a,9,10,11,12-octahidro-11,12-dihidroxy-4,5,8-trimetil-3-(2-metilpropyl)-, (7E,13E), proveniente dos extratos F398, F403 e F407.

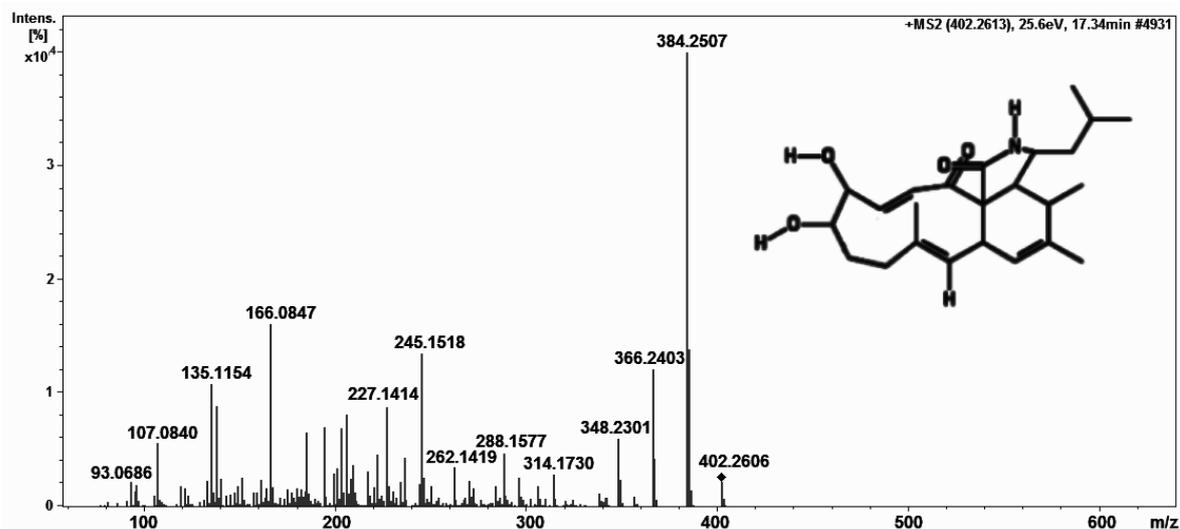


Figura S21: Espectro de MS/MS atribuído a (3E,9E)-5-Hydroxy-14-isobutyl-9,12,13-trimethyl-6,7,8,10a,13,13a,14,15-octahydro-2H-oxacyclododecino[2,3-d]isoindole-2,16(5H)-dione, proveniente dos extratos F398, F403 e F407.

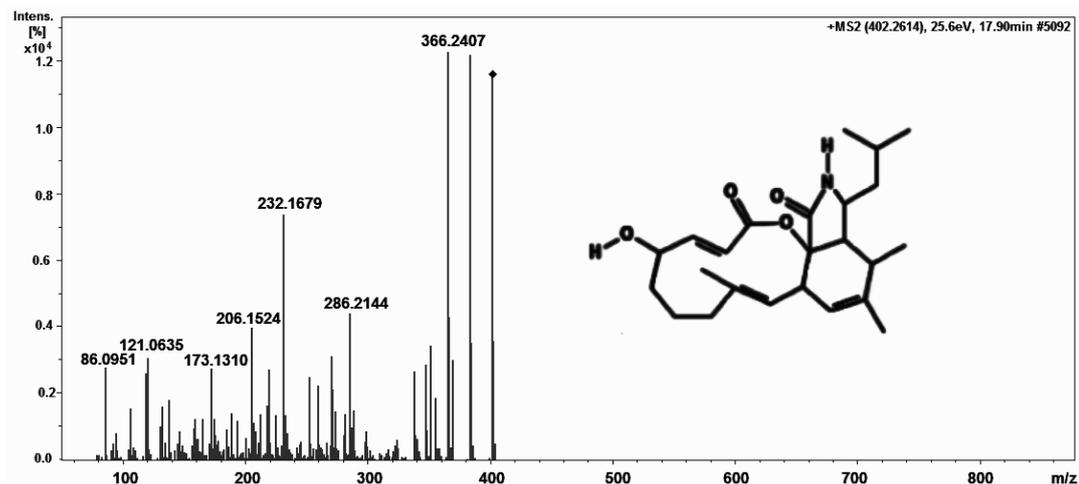


Figura S22: Espectro de MS/MS atribuído a 1H-Cyclo- undec[d]isoindole-1,12,15-trione,2,3,3a,4,6a,9,10,11,13,14-decahydro-11,13-dihydroxy-4,5,8-trimethyl-3-(2-methylpropyl)-, (7E)-, proveniente dos extratos F398, F403 e F407.

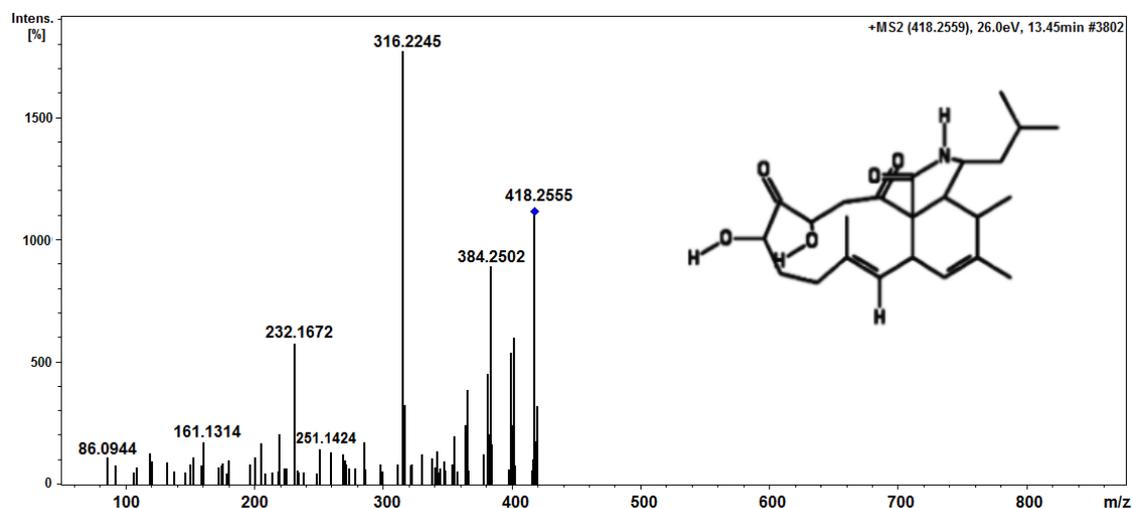


Figura S23: Espectro de MS/MS atribuído a glandicoline B, proveniente do extrato F506.

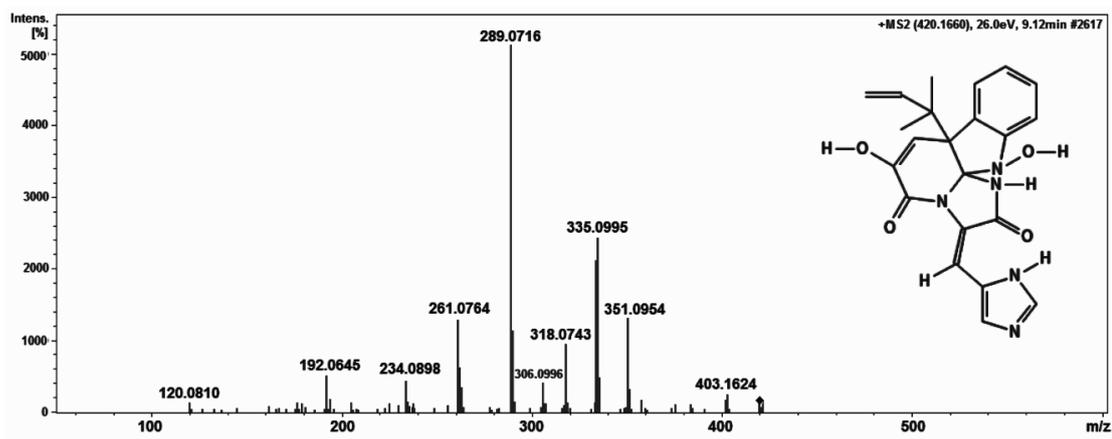


Figura S24: Espectro de MS/MS atribuído a (7E)-11,12,13-Trihidroxi-3-isobutil-4,5,8-trimetil-3,3a,4,6a,9,10,11,12,13,14-decahidro-1H-cicloundeca[d]isoindole-1,15(2H)-dione, proveniente dos extratos F403 e F407.

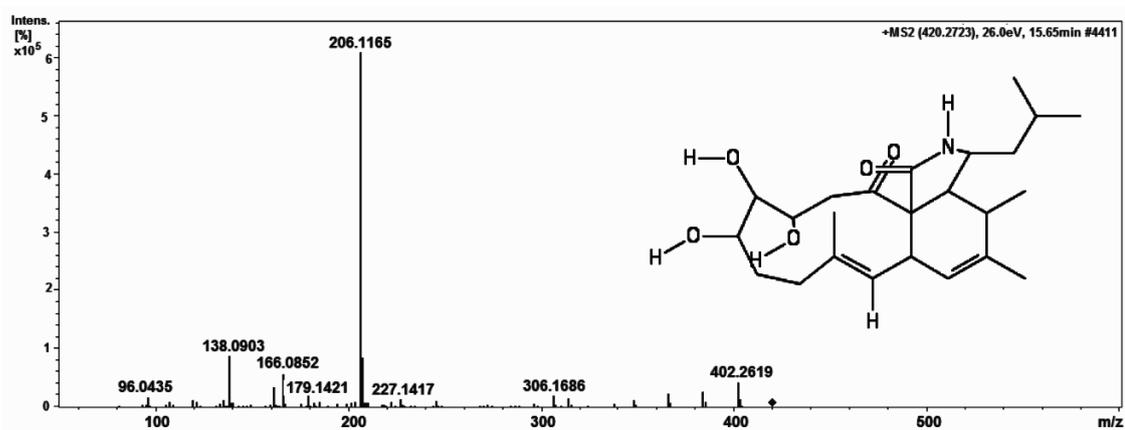


Figura S25: Espectro de MS/MS atribuído a melegrina, proveniente do extrato F506.

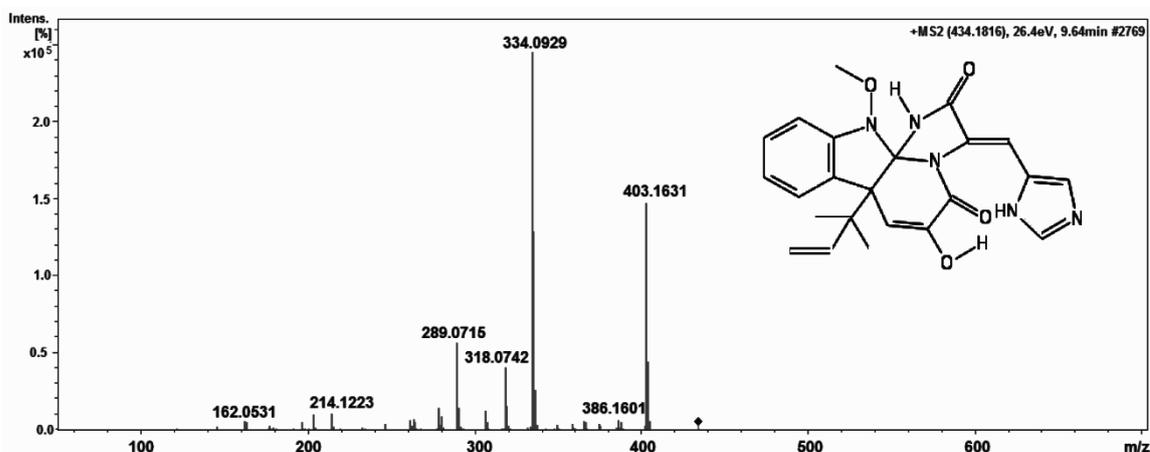


Figura S26: Espectro de MS/MS atribuído a neoxalina, proveniente do extrato F506.

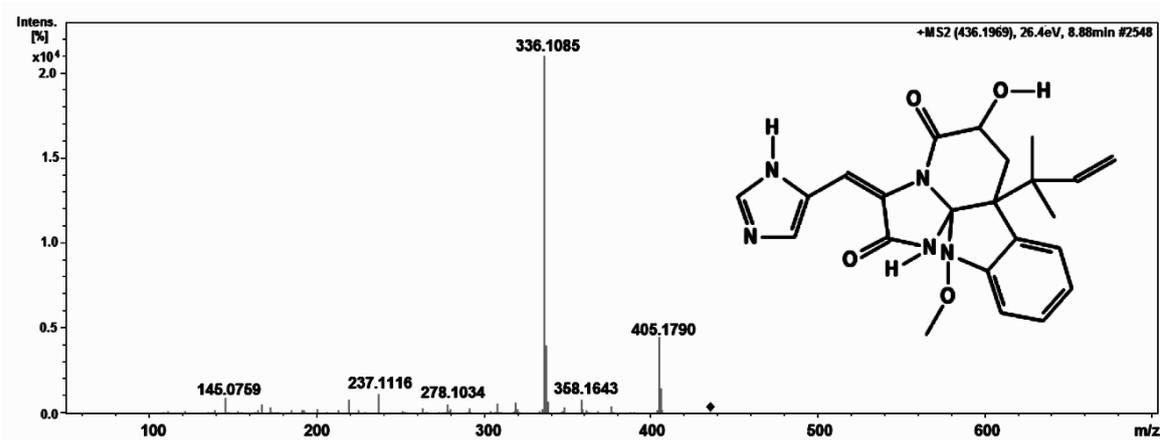


Figura S27: Espectro de MS/MS atribuído a felutanina B, proveniente do extrato F506.

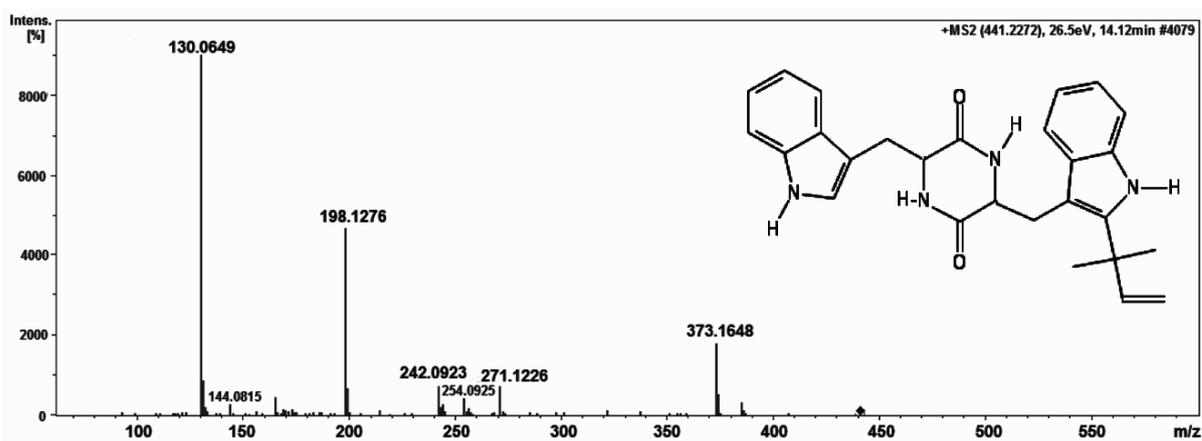


Figura S28: Espectro de MS/MS atribuído a oxalina, proveniente dos extratos F506 e F403.

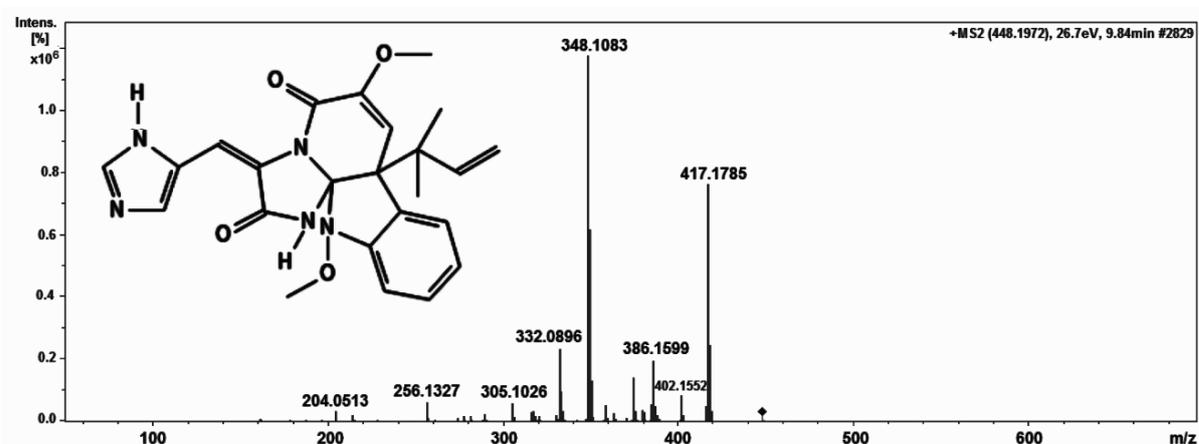


Figura S29: Espectro de MS/MS atribuído a andrastina A, proveniente do extrato F475.

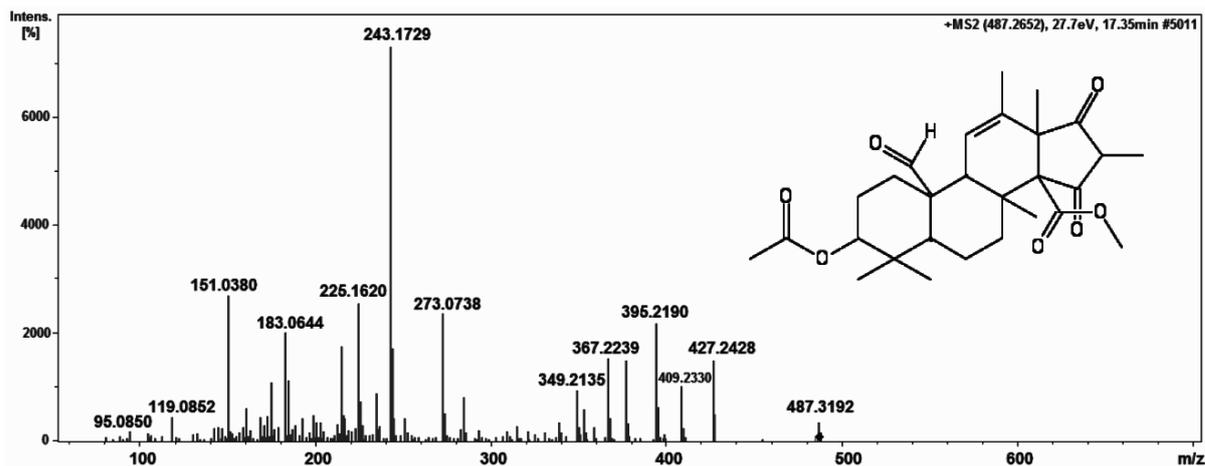


Figura S30: Espectro de MS/MS atribuído a malformina A2, proveniente do extrato F475.

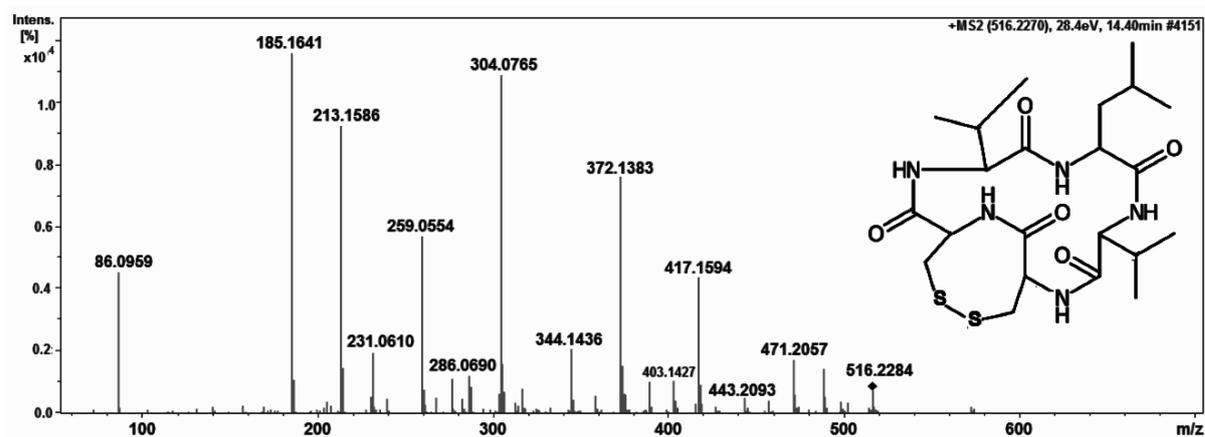


Figura S31: Espectro de MS/MS atribuído a malformina B4, proveniente do extrato F475.

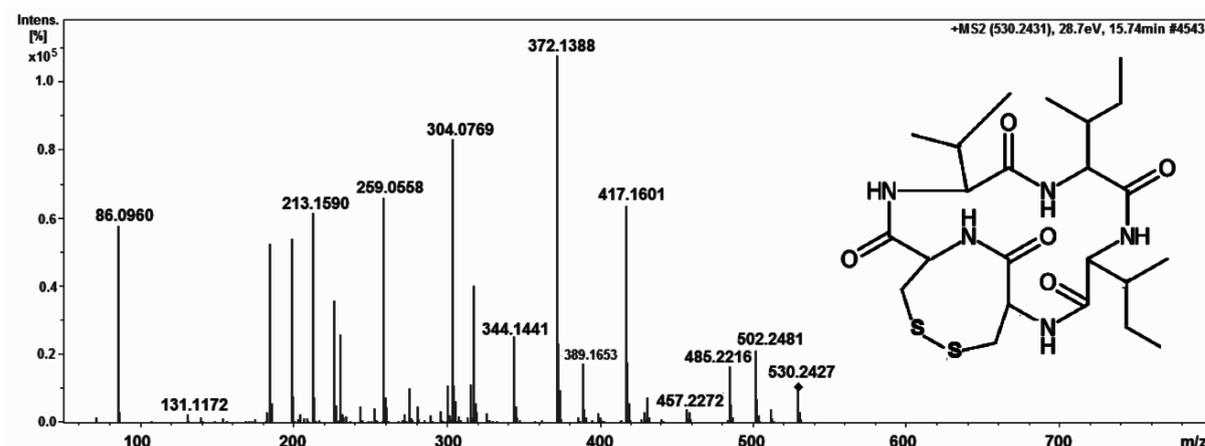


Figura S32: Espectro de MS/MS atribuído a tricochalin A, proveniente do extrato F398.

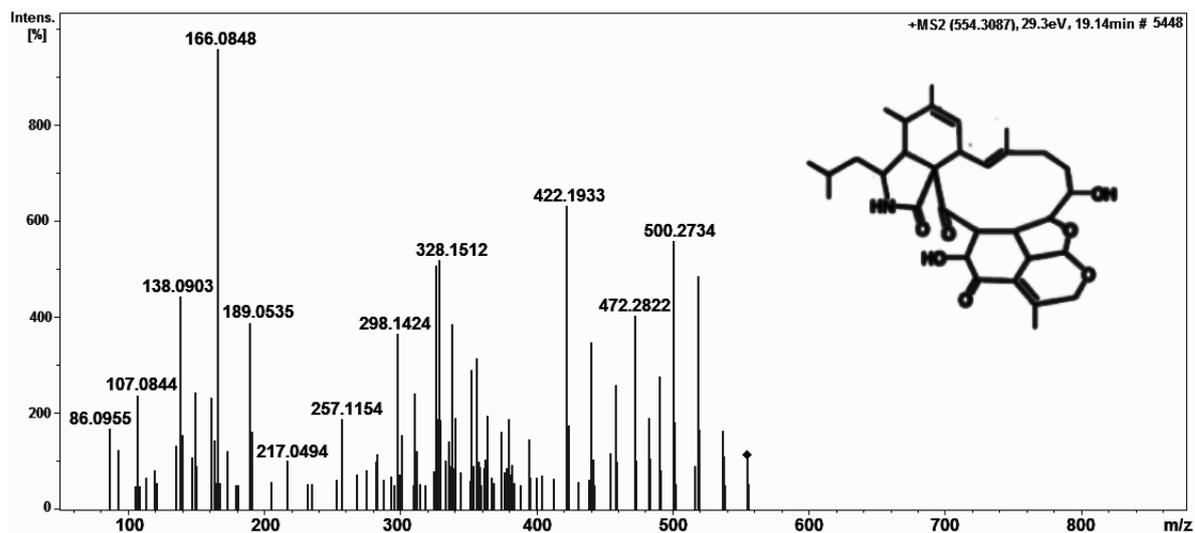


Figura S33: Espectro de MS/MS atribuído a aurasperone F, proveniente do extrato F475.

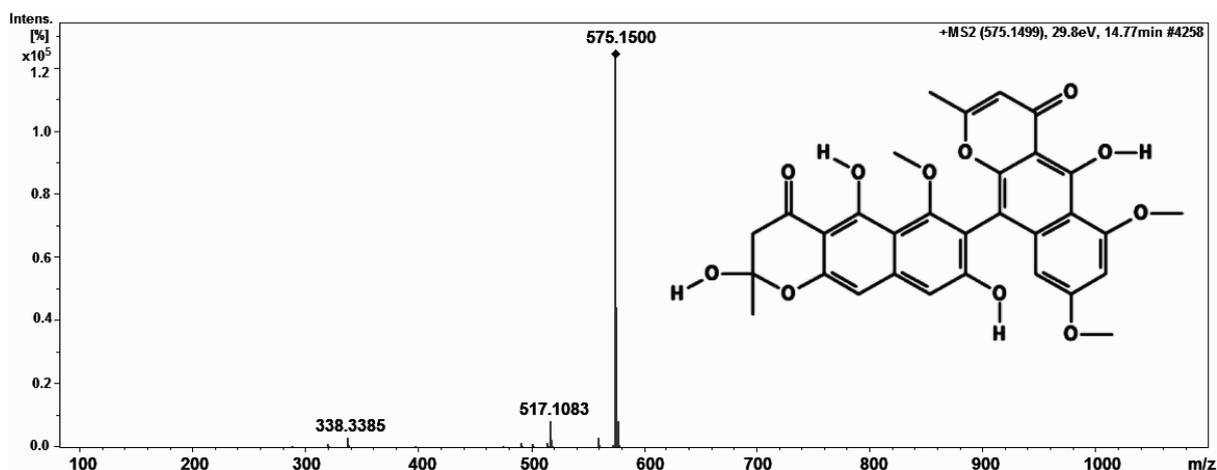


Figura S34: Espectro de MS/MS atribuído a aurasperone E, proveniente do extrato F475.

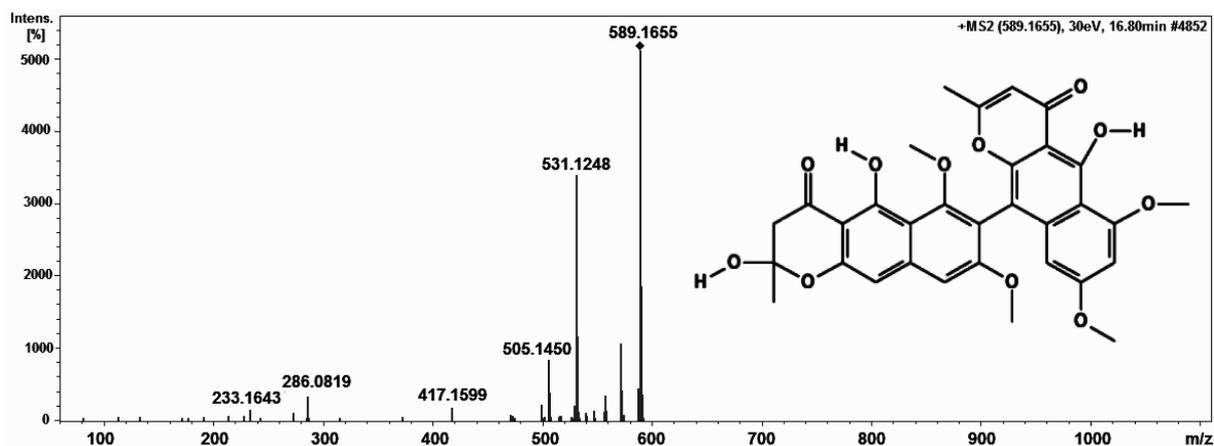


Figura S35: Espectro de MS/MS atribuído a aurasperone C, proveniente do extrato F475.

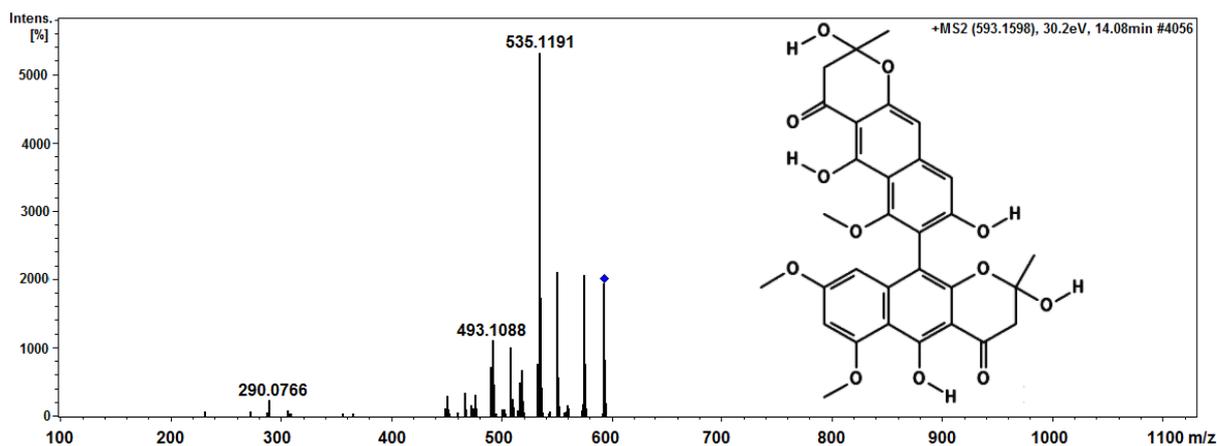


Figura S36: Espectro de MS/MS atribuído a aurasperone B, proveniente do extrato F475.

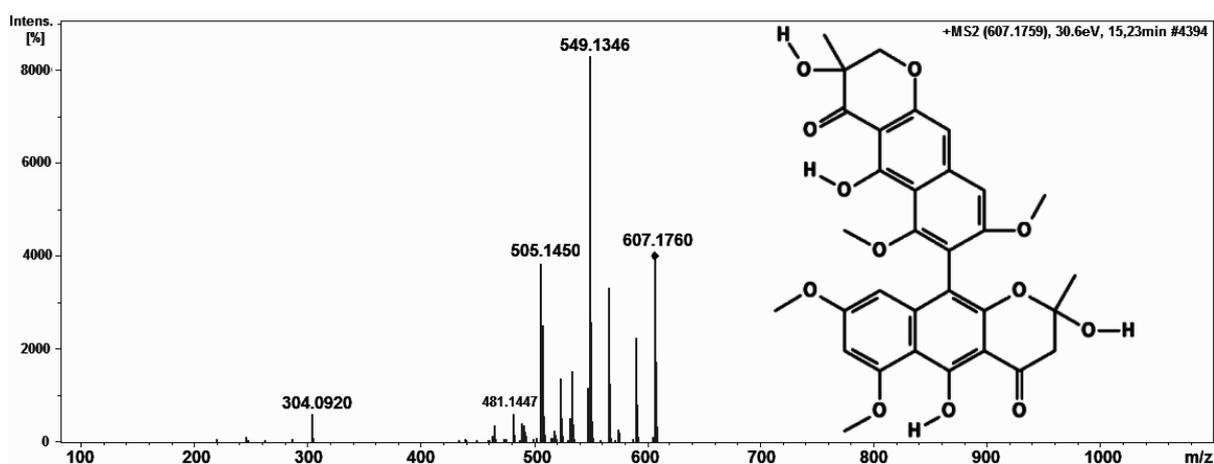


Figura S37: Espectro de MS/MS atribuído a fumonisina B4, proveniente do extrato F475.

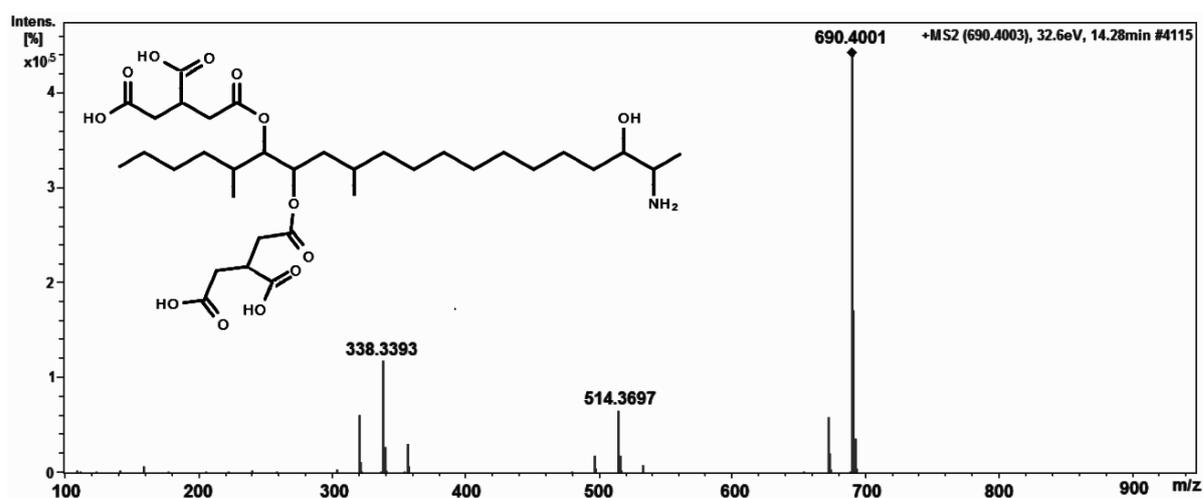


Figura S38: Espectro de MS/MS atribuído a fumonisina B2, proveniente do extrato F475.

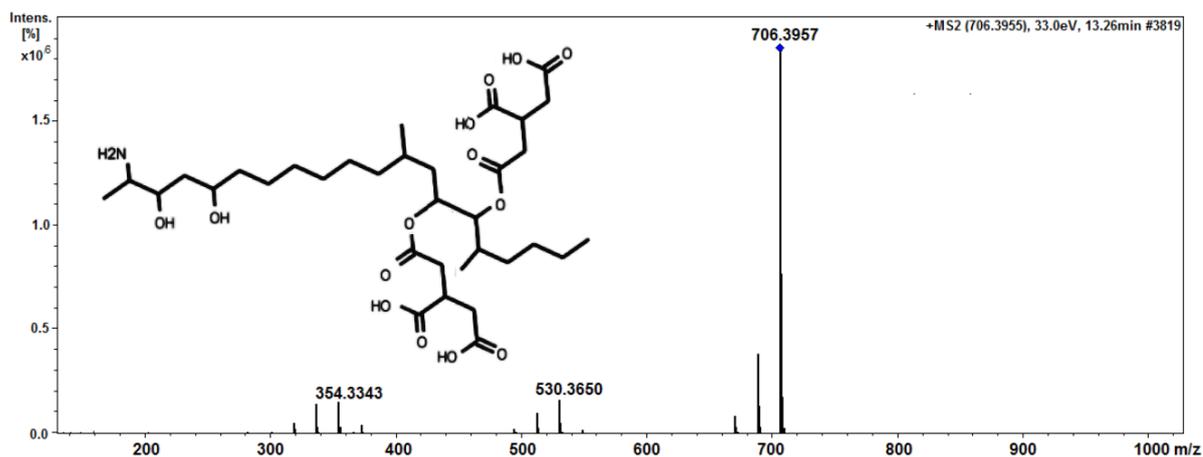
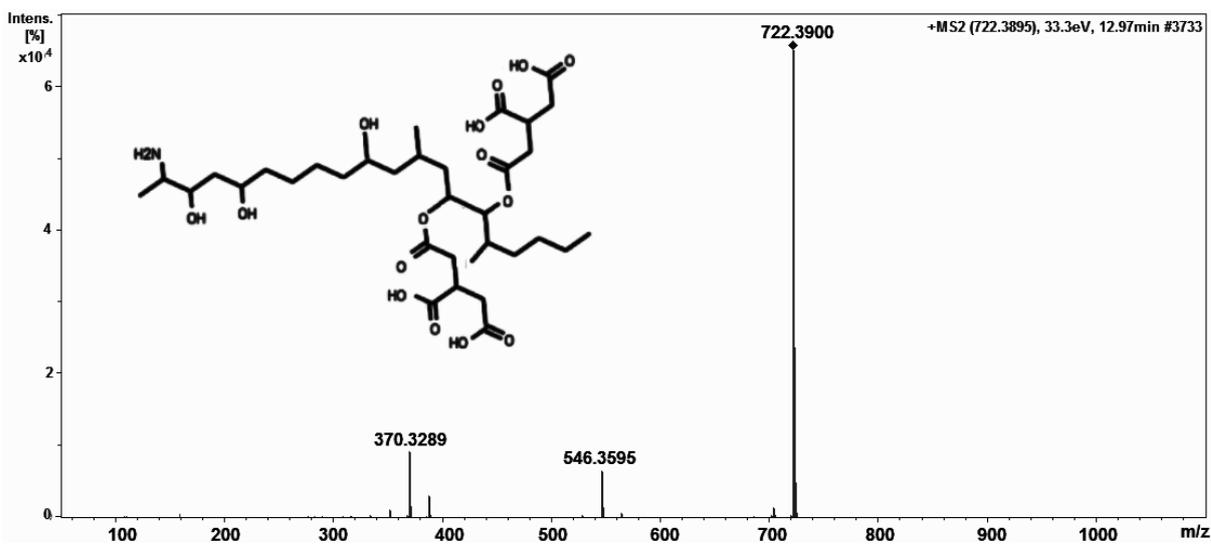


Figura S39: Espectro de MS/MS atribuído a fumonisina B1, proveniente do extrato F475.



CAPÍTULO III

Estudo metabolômico de fungos endofíticos e da planta hospedeira *Annona jahnii* Saff.: Molecular Networking como uma abordagem para direcionar na descoberta de endófitos produtores de compostos derivados de plantas e de compostos análogos.

**Estudo metabolômico de fungos endofíticos e da planta hospedeira *Annona jahnii* Saff.:
Molecular Networking como uma abordagem para direcionar na descoberta de
endófitos produtores de compostos derivados de plantas e de compostos análogos.**

Luciana Araújo Xavier¹, Cecília Maria Bezerra de Araújo², Gilmar Prado de Sousa³, Eduardo Jorge Pilau⁴, Carla Porto⁵, Antônia Queiroz Lima de Souza⁶, Adriana Flach¹, Luiz Antonio M. A. da Costa^{1*}

¹ Universidade Federal de Roraima- Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Boa Vista, RR, Brazil.

² Universidade Federal de Roraima- Programa de Graduação em Química- Departamento de química, Boa Vista, RR, Brazil.

³ Universidade Federal de Roraima- Programa de Pós-graduação em Química, Boa Vista, RR, Brazil.

⁴ Universidade Estadual de Maringá- Departamento de Química, Maringá, PR, Brazil.

⁵ MS Bioscience - Incubadora Tecnológica de Maringá - Complexo UEM, Maringá, PR, Brazil.

⁶ Universidade Federal do Amazonas - Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia, Manaus, AM, Brazil.

RESUMO

JUSTIFICATIVA: Os fungos endofíticos, apresentam-se como alternativa para a produção de metabólitos bioativos inéditos. Além de representarem uma opção viável para a obtenção de metabólitos importantes derivados de seu hospedeiro, podendo auxiliar desta forma na preservação da planta hospedeira. No entanto, pesquisas sobre a capacidade de endófitos biossintetizarem compostos iguais ou similares ao do seu hospedeiro ainda são escassas, porém de suma importância para viabilizar o uso destes microrganismos para esta finalidade.

MÉTODOS: Análises do perfil metabólico e a desreplicação de compostos de extratos de cinco fungos isolados de *Annona jahnii* e dos extratos obtidos do galho e da folha da planta hospedeira foram desenvolvidas usando UHPLC/ESI-MS/MS combinada com análise exploratória por Molecular Networking (MN). Atividades antimicrobianas por microdiluição e antioxidante pelo método do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foram desenvolvidas nos extratos fúngicos.

RESULTADOS: A análise exploratória por MN apresentou 84 entidades químicas que foram detectadas nos fungos e na planta hospedeira, destes quatro compostos foram identificados putativamente. A análise ainda apresentou 303 compostos com semelhança estrutural a ambas as matrizes biológicas. Os extratos fúngicos apresentaram atividades antioxidantes mais promissoras, quando comparadas ao extrato vegetal. E algumas linhagens fúngicas ainda apresentaram significativa atividade contra os patógenos *E. coli* e/ou *S. aureus*.

CONCLUSÃO: O UHPLC aliado ao molecular networking se mostrou uma estratégia poderosa, para guiar na identificação de microrganismos capazes de biossintetizar metabólitos notáveis, anteriormente obtidos apenas da planta hospedeira. A estratégia permitiu uma avaliação precoce e eficiente de extratos brutos e forneceu informações inéditas referentes ao perfil químico da planta *A.jahnii* e de seus fungos endofíticos.

Palavras- chave: *Annona jahnii*; Fungos endofíticos; GNPS; Metabólitos planta/fungo.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são o principal recurso para obtenção de metabólitos bioativos, aplicados em diferentes áreas, principalmente na produção de medicamentos (ATANGWHO et al., 2009; BAHRAMSOLTANI et al., 2014; PERINI et al., 2015). No entanto, segundo Kumar et al., 2013, essa extensa demanda por metabólitos bioativos não pode ser suprida exclusivamente pela exploração das plantas, que são um recurso suscetível à extinção. Neste contexto, os fungos endofíticos representam uma notável alternativa para obtenção de compostos biologicamente ativos (STROBEL et al., 2004; ZHAO et al., 2011). Além da preservação da planta hospedeira, o uso destes microrganismos como fonte de substâncias bioativas apresenta outras vantagens, que incluem: a facilidade de cultivo em tanques fermentadores, que fornece suprimento ilimitado de metabólitos; obtenção de compostos mais potentes derivados de compostos bioativos, pela simples alteração das condições de cultivo; procedimento simples de extração; e menos solvente para purificar o produto final (KUMAR et al., 2013).

Os fungos endofíticos são capazes de se adaptarem a partir da associação prolongada com suas plantas hospedeiras. Esta adaptação provavelmente resultou no amplo potencial biossintético destes microrganismos, apresentando perfil metabólico fortemente influenciado pelo ambiente da planta (CHITHRA et al., 2014). A interação entre hospedeiro-endófito possibilita ainda que os fungos endofíticos biossintetizem metabólitos secundários iguais aos obtidos pelo seu hospedeiro (CHITHRA et al., 2014; KUSARI et al., 2013).

A exploração de endófitos para a produção de metabólitos bioativos encontrados nas plantas é promissora, porém atualmente limitada, principalmente pela atenuação ou neutralização da biossíntese de alguns desses compostos. A degradação dessa capacidade biossintética, é observada em culturas sucessivas de fungos, cultivados de forma isolada em laboratório, e deve ser resultante da falta de estímulos do hospedeiro (DING et al. 2018; KUSARI et al., 2009; VERMA et al. 2011). Para superar este desafio, estudos se concentram no rastreamento de fungos endofíticos com alta capacidade produtiva de metabólitos derivados de plantas. Além do aprimoramento dessa capacidade, a partir de estudos de engenharia genética, identificação de elicitores específicos, dentre outros (SINGH et al., 2021). As pesquisas nesta área abordam principalmente a identificação de um ou alguns poucos compostos conhecidos, isolados inicialmente por plantas (KURIAKOSE et al., 2016; MING et al., 2012; MIR et al., 2015; STIERLE et al., 1993; ZHAO et al., 2012). Esta abordagem é eficaz, mas limita a descoberta de outros compostos derivados de planta/fungo e

de análogos resultantes da biotransformação fúngica e que podem apresentar um maior potencial (TIAN et al., 2014).

Informações mais detalhadas sobre o potencial biossintético de metabólitos de plantas por fungos endofíticos e principalmente compostos análogos, poderiam ser obtidas a partir de estudos comparativos do perfil químico de fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras. Xu et al. (2009), realizaram análises por cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas no extrato fúngico e da planta hospedeira. O estudo possibilitou a descoberta de um atrativo composto bioativo obtido em ambos os extratos, além de apresentar resultados relevantes em relação às atividades biológicas do extrato fúngico, sugerindo o potencial do endófito como recurso alternativo para obtenção de bioativos.

Assim, diante da necessidade de estratégias rápidas e eficazes que contribuam para o desenvolvimento de pesquisas nesta área. Propomos uma análise exploratória do perfil metabolômico total de extratos fúngicos e da planta hospedeira (*A. jahnii*), usando o método de molecular networking (MN) através da plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking). Esta técnica é amplamente utilizada para análises de extratos complexos com grandes volumes de dados (FLOROS et al., 2016), além de permitir a desreplcação de compostos conhecidos, detecção de análogos correspondentes ou compostos pertencentes à mesma classe geral de moléculas (WANG et al., 2016). Portanto, o objetivo do trabalho é fornecer informações inéditas do perfil químico da planta *A. jahnii*, de cinco fungos endofíticos isolados, e comparar o perfil metabolômico desses extratos. Também visa determinar a aplicabilidade do MN no direcionamento das descobertas de endofíticos produtores de compostos derivados de plantas e de compostos análogos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi obtido de trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa e os extratos foram elaborados de acordo com a metodologia descrita por Souza (2016). A espécie *Annona jhanii* Saff. foi coletada em ponto georreferenciado (N 03° 06'43.2'' e W 060° 52'04.1'') em Boa Vista-Roraima. Extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtidos do galho e da folha da planta, foram usados para as análises metabólicas.

2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

As cinco linhagens fúngicas de *A. jhaniai* foram anteriormente isoladas pelo grupo de pesquisa e identificadas preliminarmente como pertencentes ao gênero *Penicillium*, a partir da observação dos aspectos macro e micromorfológicos (SOUZA et al., 2004). Atribuíram-se os seguintes códigos às linhagens fúngicas: F11, F54, F168, F241 e F573. As linhagens codificadas com F11, F573, F241 foram isoladas do caule e as codificadas com F54, F168 isoladas da raiz.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Os meios de cultivo e elaboração dos extratos foram feitos de acordo com Xavier et al. (2022). As linhagens F241, F573 e F11 foram cultivadas em meio líquido de aveia, F54 em meio contendo amido e F168 em batata dextrose. Após o período de cultivo, o micélio foi separado do meio líquido por filtração a vácuo. Os meios líquidos foram extraídos com acetato de etila e as frações orgânicas foram reunidas e secas usando um evaporador rotativo.

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.4.1 Análise da atividade antioxidante

A atividade antioxidante de todos os extratos fúngicos foi medida utilizando uma solução do reativo 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), o método foi desenvolvido de acordo com o descrito em Mensor et al. (2001). Todos os ensaios foram feitos em triplicata, calculando os valores da concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH (IC₅₀), a partir da regressão linear dos gráficos (software Origin 6.0) e da fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(Ab_{\text{sample}} - Ab_{\text{blank}}) \times 100] / Ab_{\text{control}}\}$$

2.4.2 Análise da atividade antimicrobiana

O método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços foi o utilizado para a determinação dos valores mínimos de concentração inibitória (CIM). O método foi realizado conforme descrito em Xavier et al. (2022), que seguiu o estabelecido pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CLSI). Os extratos foram testados contra os patógenos:

Staphylococcus aureus INCQS 0057 (ATCC 43300) bactéria gram-positiva e *Escherichia coli* INCQS 00051 (ATCC 13863) bactéria gram-negativa. As cepas foram fornecidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

2.5 UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS E MOLECULAR NETWORKING

Espectros MS² de todos os extratos fúngicos e vegetais, foram obtidos a partir das análises destes extratos em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência UHPLC (Shimadzu, Nexera X2, Japão), com coluna ACQUITY UPLC CSH C18 (130 Å, 2.1 100 mm, 1.7 µm), acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução (HRMS) Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Germany) com geometria Q-TOF, com fonte de ionização electrospray. As condições de análises estão descritas em Xavier et al, 2022, usando Hystar Application versão 3.2 e OtofControl (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) como software para a captura dos dados.

Para a elaboração do molecular networking (MN), os dados de espectrometria de massas em formato mzXML, foram transferidos para o servidor do Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) (WANG et al., 2016). Os arquivos mzXML de todos os extratos do galho foram reunidos na plataforma do GNPS em um único grupo, da mesma forma, os arquivos mzXML dos extratos da folha também foram reunidos em apenas um grupo. O molecular networking (MN) dos extratos fúngicos e vegetais foi então gerado de acordo com a documentação GNPS (WANG et al., 2016). A tolerância da massa do íon precursor foi ajustada para 0,02 Da e uma tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,02 Da. Aplicou-se a pontuação de cosseno acima de 0,7 e mais de 4 picos correspondentes. A descrição detalhada dos parâmetros usados no MN pode ser acessada através do link: <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=f1c7a6081a3640f1823a4ba02c9664ef>.

A anotação dos metabólitos seguiu o fluxo de trabalho descrito em Xavier et al. (2022). Os espectros das bibliotecas espectrais do GNPS foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Apenas compostos de interesse (anotados ou análogos) foram submetidos à fragmentação *in silico* assistida por computador, realizada no MetFrag web too. A análise foi baseada na massa teórica da estrutura gerada, aduto ($[M+H]^+$) e no valor m/z do pico fragmento adquirido, obtendo-se estruturas de fragmentos atribuídas aos picos do fragmento m/z do espectro MS/MS (RUTTKIES et al., 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PERFIL METABOLÔMICO DOS EXTRATOS

Uma análise exploratória do perfil metabolômico dos extratos brutos, foi realizada através do estudo dos dados espectrais obtidos por UHPLC/ESI-MS/MS e processados na plataforma do GNPS para obtenção do molecular networking (MN). A rede molecular MS/MS dos extratos brutos resultou em 1.407 nodes individuais, ou seja, que não foram agrupados, por não apresentarem semelhança espectral com nenhum outro. Além de 1.589 nodes distribuídos em 242 clusters, que apresentam agrupamento planta-planta, fungo-fungo e planta-fungo. A análise dos dados obtidos por MN combinada à fragmentação in silico pela plataforma Metfrag, permitiram a desreplicação de 52 metabólitos (Figuras S1-S52), anotados a partir da busca nas bibliotecas fornecidas pelas duas plataformas. A seguir estão descritos detalhadamente os resultados obtidos para perfil metabolômico dos extratos da *A. jahnii* e dos extratos fúngicos, além dos resultados obtidos da análise combinatória destas duas matrizes biológicas.

3.1.1 Perfil metabolômico dos extratos da *A. jahnii*

O estudo do perfil químico dos extratos de *A. jahnii* possibilitou a identificação putativa de 33 compostos (Tabela S1). Os compostos anotados pertencem a diferentes classes de metabólitos, sendo alcalóides predominantes, além de terpenoides, flavonoides e fenilpropanóides. Alguns destes compostos já foram relatados anteriormente, ocorrendo na família Annonaceae e apresentando atividades biológicas promissoras. Destacam-se a feruloilitiramina com potente atividade citotóxica contra a linhagem celular P-338 e HL-60 (WU et al., 1995). O alcalóide aporfínico assimilobine com atividades antimicrobiana e antioxidante significativas (COSTA et al., 2013). Naringenine um flavonóide com propriedades anti-glicêmicas que confere proteção contra o diabetes (ANNADURAI et al., 2012).

Estudos químicos sobre a espécie *A. jahnii* são escassos, sendo possível encontrar alguns poucos sobre o isolamento de acetogeninas que apresentaram atividade citotóxica seletiva frente a linhagens de células tumorais humanas (COLMAN-SAZARBITORIA et al., 1998; COLMAN-SAZARBITORIA et al., 1999; COLMAN-SAZARBITORIA et al., 2008). Assim, o estudo metabolômico dos extratos de *A. jahnii* desenvolvido neste trabalho, é inédito e possibilita ampliar o conhecimento químico desta espécie, que se apresentou promissora na

obtenção de compostos bioativos. A exploração do metaboloma dos extratos das folhas e galhos indicou ainda que esta espécie pode apresentar uma expressiva quantidade de metabólitos inéditos, pois apenas 3,17% das 1.038 características moleculares observadas no MN foram identificadas putativamente. Os extratos das folhas mostram-se promissores na obtenção de um maior número de compostos, além de apresentar 360 características moleculares que também foram detectadas nos extratos do galho, assim o estudo das folhas e dos galhos pode gerar informações sobre o perfil químico comum a ambos, um caminho investigativo interessante sobre a dinâmica de produção e distribuição dessas substâncias nos tecidos vegetais.

3.1.2 Perfil metabolômico dos extratos fúngicos

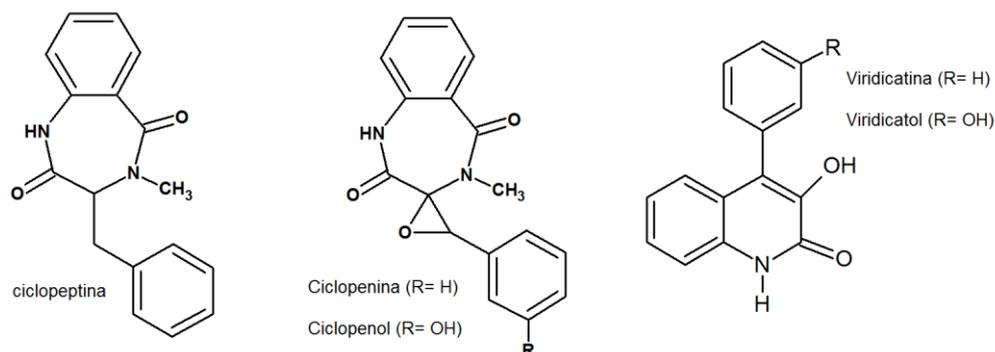
Os cinco extratos fúngicos combinados resultaram em 1.874 características moleculares. Destes, 15 compostos foram identificados putativamente (Tabela S1), anotados nas bibliotecas espectrais públicas do GNPS. Esta baixa desreplicação mostra a necessidade de ampliar a exploração metabolômica da microbiota amazônica, com o intuito de auxiliar pesquisas futuras relacionadas ao potencial biotecnológico destes microrganismos.

A análise espectral e a abordagem de rede molecular apresentaram-se como ferramentas úteis para obter informações importantes desse grande e complexo quantitativo de dados, obtidos dos extratos fúngicos. O fungo codificado como F11, apresentou maior quantidade de entidades químicas exclusivas, aproximadamente 22% do total do conjunto dos extratos fúngicos combinados. As entidades químicas compartilhadas por mais de um extrato, correspondem a mais de 40% do total, sendo o extrato F573 o que apresentou maior número. Todos os extratos, exceto o F11, apresentaram mais de 400 entidades químicas compartilhadas com mais de um extrato. Este resultado aponta a similaridade dos extratos, mesmo para os fungos isolados de partes diferentes da planta e cultivados em meios diferentes.

A análise exploratória permitiu a identificação putativa dos alcalóides viridicatina, viridicatol, ciclopeptina, ciclopenina e ciclopenol (Figura 1) nos extratos F573, F241, F54 e F168. A ciclopenina foi detectada também no extrato F11. Estes alcalóides pertencem à mesma rota biossintética, derivados do ácido antranílico e fenilalanina, e são comumente isolados de extratos fúngicos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (KISHIMOTO et al., 2017; LUCKNER, 1967; NOVER e LUCKNER, 1969; ZHANG et al., 2022). Esses compostos possuem várias atividades biológicas importantes, como a inibição da metástase de células cancerosas, atividade apresentada pela viridicatina e viridicatol (LIANG et al., 2019).

Ciclopenina é apontado como um útil agente anti-inflamatório para doenças neurodegenerativas (WANG et al., 2020). Outros compostos identificados putativamente incluem a dicetopiperazina fusaperazine E, outros alcalóides como a roquefortine C, Roquefortine D e 3,4-dihydroxy-4-phenyl-1,3-dihydroquinolin-2-one.

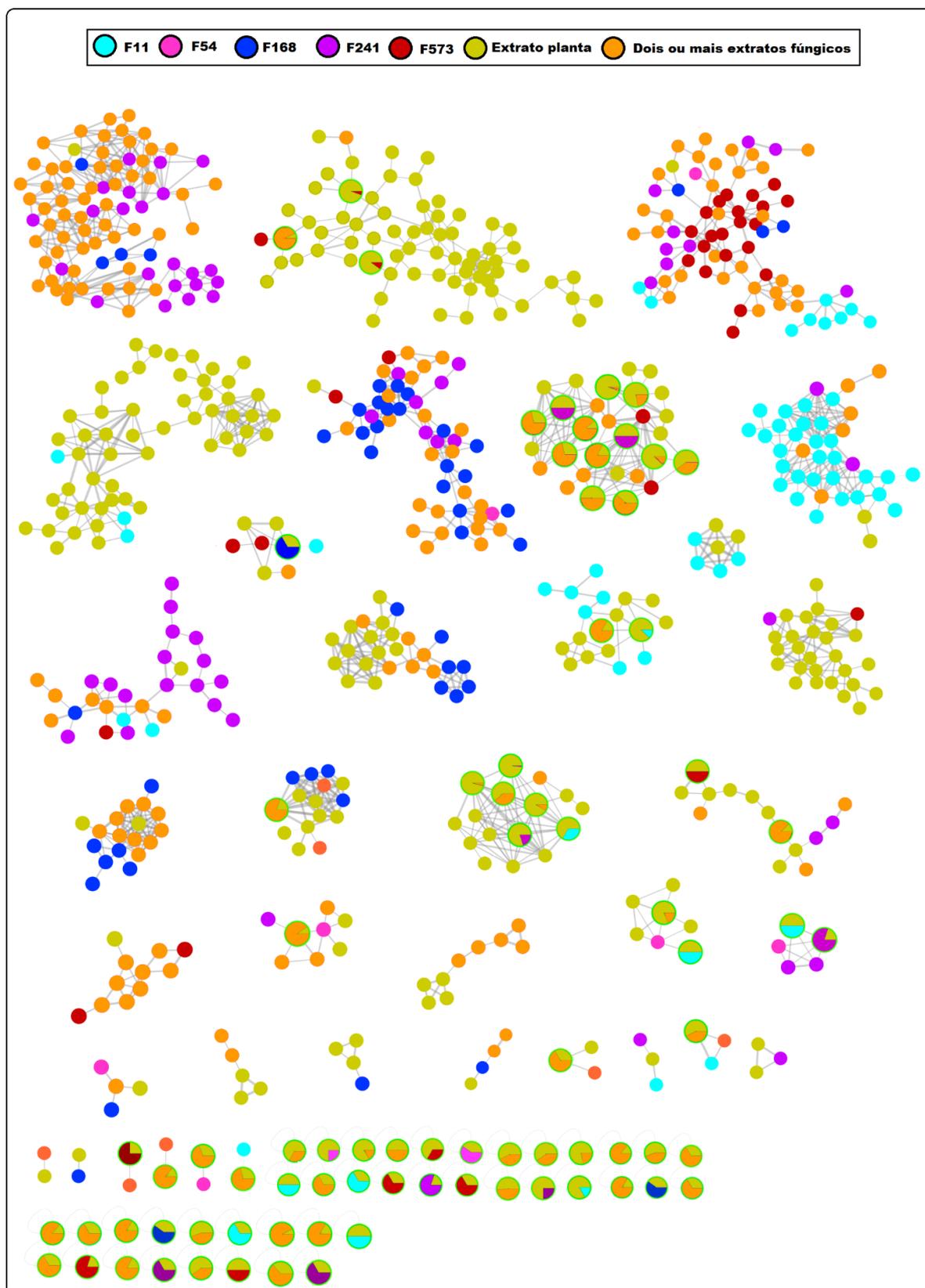
Figura 1: Estrutura molecular dos alcalóides identificados putativamente



3.2 MOLECULAR NETWORKING PARA ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL METABÓLICO DOS EXTRATOS FÚNGICOS E DA PLANTA HOSPEDEIRA

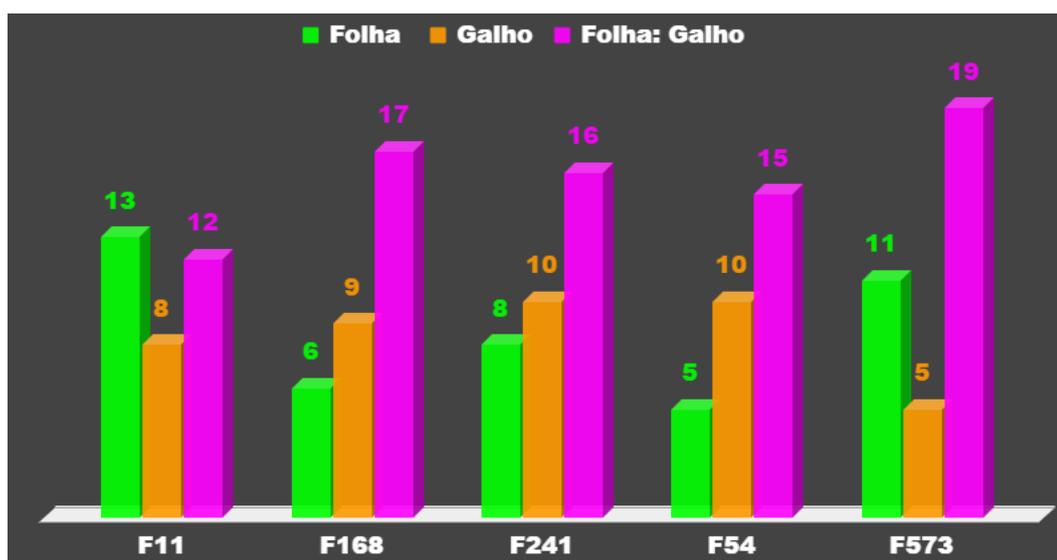
A combinação dos dados espectrais dos extratos fúngicos e extratos vegetais gerou um MN com 2.996 características moleculares, sendo 1.038 são exclusivos dos extratos vegetais e 1.874 dos extratos fúngicos. A Figura 2 apresenta o MN contendo apenas as entidades químicas iguais e estruturalmente relacionadas em ambas as matrizes biológicas, totalizando 387 entidades químicas. Destas, 84 foram detectadas nas matrizes vegetais e fúngicas, representadas pelos nodes maiores no MN. Estes nodes possibilitam a visualização da abundância de íons de cada metabólito em cada extrato correspondente, conforme refletido no gráfico de pizza. 303 são características moleculares que estão relacionadas com entidades químicas de ambas as matrizes e estão distribuídas em 36 clusters (Figura 2).

Figura 2: Molecular networking contendo as entidades químicas iguais e as estruturalmente relacionadas, detectadas nos extratos fúngicos e vegetais.



A análise exploratória do MN, forneceu dados sobre a similaridade do perfil metabolômico dos extratos fúngicos, com os extratos da folha e do galho de *A. jahnii* (Figura 3). Os fungos aqui estudados foram isolados da raiz e caule, apresentando de 30 a 35 características moleculares que também foram detectadas nos extratos da folha e/ou galho. Apenas o extrato F11 apresentou uma maior similaridade com o extrato da folha (13 entidades químicas), os demais extratos fúngicos apresentaram um maior quantitativo de entidades iguais às presentes em ambos os extratos vegetais.

Figura 3: Quantitativo de entidades químicas de cada extrato fúngico que também foram detectadas nos extratos da folha e/ou galho da planta hospedeira.



Os resultados do comparativo do perfil químico dos extratos fúngicos e vegetais indicam a possibilidade destes endófitos produzirem o mesmo metabólito do seu hospedeiro, não se restringindo a produção de compostos específicos do órgão da planta do qual o microrganismo foi isolado. Ainda é importante destacar que este resultado, pode ser atribuído também a similaridade da comunidade de endófitos em diferentes partes da planta, coerente com estudos que demonstram que um microrganismo endofítico pode estar distribuído em diferentes órgãos da planta, através de uma colonização de forma sistêmica (BOYLE et al., 2001; MARTINS et al., 2016). Segundo Ding et al., (2018), os endofíticos podem proporcionar o acúmulo de metabólitos bioativos na planta hospedeira. Esta informação pode apontar, em contrapartida, que alguns dos metabólitos obtidos da planta, na verdade, tenham sido produzidos por seus endofíticos. Independente da origem dos metabólitos bioativos, os dados obtidos com esse estudo, confirmam que a exploração metabolômica fúngica é vantajosa e promissora, na descoberta de fungos endofíticos produtores de metabólitos anteriormente obtidos apenas da planta hospedeira.

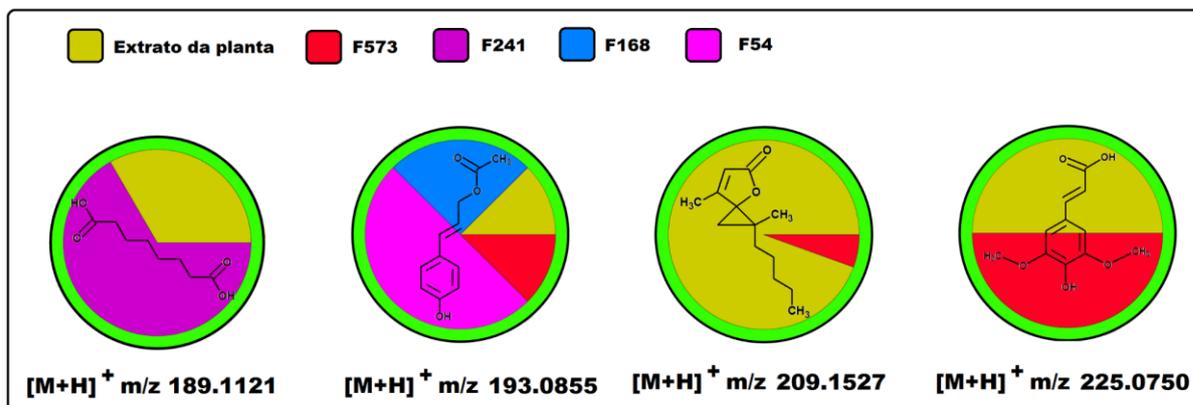
3.3 DESREPLICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO FUNGO E PELA PLANTA HOSPEDEIRA E DE COMPOSTOS ANÁLOGOS

O fluxo de trabalho aqui proposto para análise dos extratos brutos, viabilizou a identificação putativa de quatro metabólitos detectados nos extratos fúngicos e extratos da planta. O íon $[M+H]^+$, m/z 189,1121, ácido azelaico foi detectado no extrato do fungo F241 e no extrato do galho de *A. jahnii*, apresentando maior abundância no extrato fúngico (Figura 4). Este ácido dicarboxílico já foi isolado de fungos endofíticos dos gêneros, *Plectosphaerella* (Gu et al., 2018), *Penicillium* (TEIMOORI-BOGHSANI et al., 2020) e *Aspergillus* (KAMAT et al., 2020). TEIMOORI-BOGHSANI et al. (2020), constataram em seus estudos a presença deste metabólito e outros no extrato fúngico e no da planta hospedeira, indicando a capacidade destes fungos em produzirem metabólitos idênticos ou estruturalmente semelhantes aos do hospedeiro. O ácido azelaico apresenta uma gama de propriedades biológicas que incluem anti-inflamatória, antioxidante e bactericida (SIEBER e HEGEL, 2014). Este composto, ainda possui papel fundamental na defesa das plantas contra patógenos, conferindo resistência local e sistêmica (JUNG et al., 2009).

Um cluster contendo 70 nodes apresentou um metabólito identificado putativamente uma gama-delactona nos extratos fúngicos F11, F54, F168 e F573, anotado através da pontuação de similaridade na biblioteca do GNPS, que é baseada na comparação entre os espectros de MS/MS obtidos experimentalmente com os espectros do banco de dados. Ao mesmo cluster, realizou-se uma análise de propagação de identificação, bastante utilizada na desreplcação por MN (CHERVIN et al., 2017; FLOROS et al., 2016). A análise se baseou na interpretação da diferença de massa, na busca em bancos de dados por compostos com subestruturas comuns e na fragmentação em sílico feita na plataforma do Metfrag. O Metfrag é uma ferramenta muito útil quando não há espectros de referência disponíveis, contribuindo para a escolha de candidatos mais prováveis, além de aumentar a confiabilidade e o número de identificações putativas (RUTTKIES et al., 2015; WOLF et al., 2010). A análise permitiu a anotação 2,7-Dimethyl-2-pentyl-4-oxaspiro[2.4]hept-6-en-5-one ($[M+H]^+$, m/z 209.1527), uma espirolactona detectada no extrato F573 e com maior abundância no extrato da folha (Figura 4). Metabólitos contendo um biciclo espiro, já foram isolados de diferentes gêneros de fungos endofíticos (MO et al., 2021; XU et al., 2017), de plantas (LI et al., 2022) e frutos (LIU et al., 2019). Um potencial efeito neuroprotetor já foi relatado em metabólitos contendo oxaespiros e uma porção glicosídica (LIU et al., 2019).

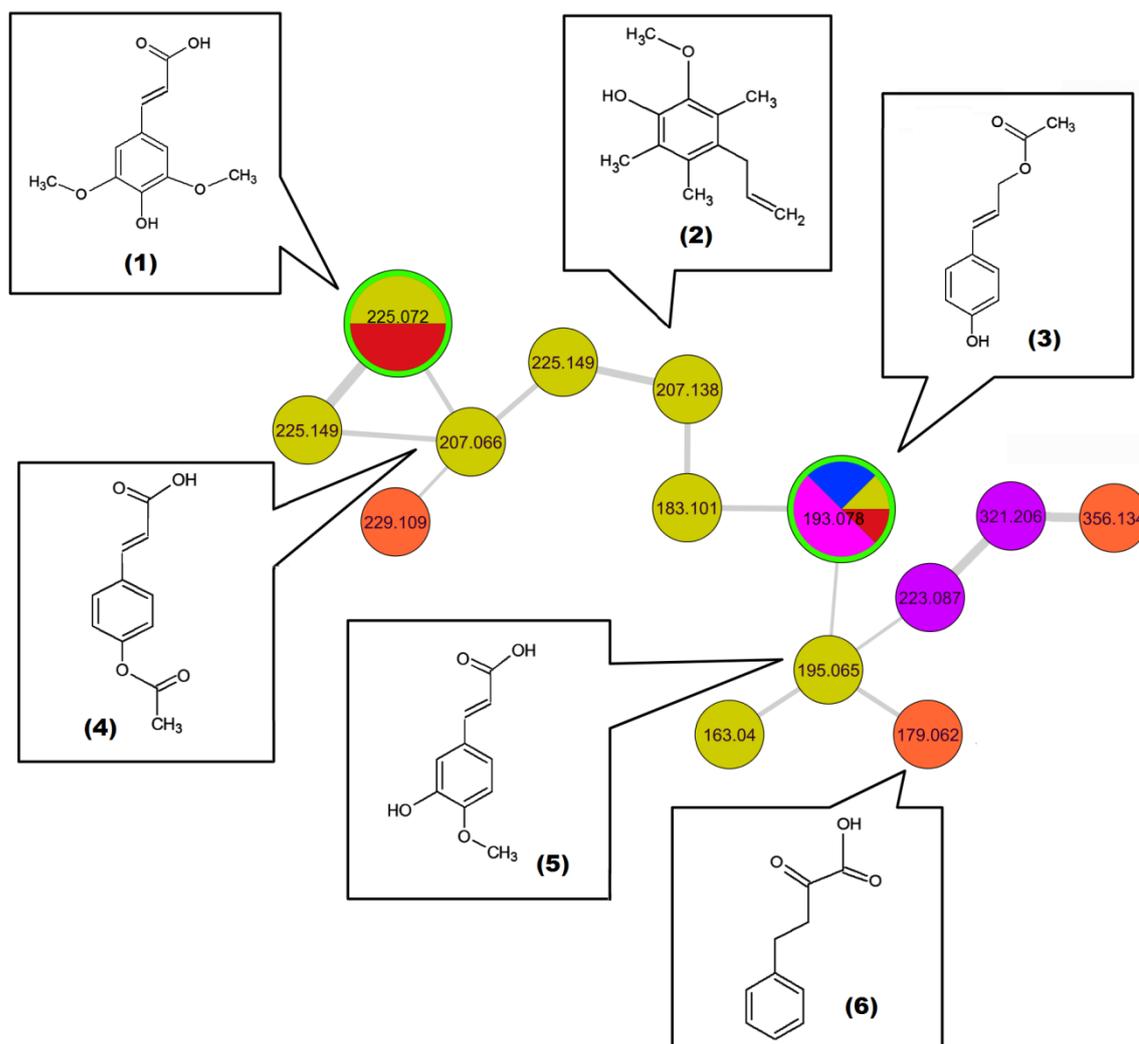
As outras 68 características moleculares pertencentes ao cluster da classe lactonas, não foram identificadas, revelando que o fungo F573 e principalmente a planta *A. jahnii* podem ser fontes promissoras na obtenção de metabólitos desta classe.

Figura 4: Metabólitos identificados putativamente detectados nos extratos fúngicos e nos extratos da planta hospedeira.



Os íons $[M+H]^+$, m/z 193,0855 e $[M+H]^+$, m/z 225,0750 (Figura 4) foram identificados putativamente como os fenilpropanóides acetato de cumarila e ácido sinápico respectivamente. Estes metabólitos compartilham uma subestrutura comum e, portanto estão interligados em um mesmo cluster, que possui ainda cinco entidades químicas detectadas em extratos fúngicos e sete em extratos vegetais (Figura 5). O ácido sinápico anotado na biblioteca do GNPS foi detectado no extrato da folha e no extrato do fungo F573. Este metabólito é largamente distribuído no reino vegetal e apresenta uma ampla gama de atividades biológicas, que incluem antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório, anticancerígeno e ansiolítico (NICIFOROVIC e ABRAMOVIC, 2013). O ácido sinápico já foi identificado em extratos de espécies de *Annona* brasileiras que apresentaram potentes atividades anticolinesterase e antiproliferativa de células tumorais (FORMAGIO et al., 2015). Este é o primeiro relato da produção deste ácido em fungo endofítico e na planta hospedeira, apresentando uma abundância equitativa de íons em ambas as matrizes biológicas, observada no gráfico pizza (Figura 5).

Figura 5: Cluster contendo os fenilpropanóides identificados nos extratos fúngicos e vegetais. Nodes verdes: extratos vegetais; laranjas: mais de um extrato fúngico; roxos: extrato F241; vermelho: extrato F573; rosa: extrato F54; e azul: extrato F168.



- (1) ácido sinápico; (2) 3,5,6-trimetileugenol; (3) acetato de cumarila; (4) ácido 4-acetoxicinamico; (5) ácido isoferulico; (6) ácido 2-oxo-4-fenilbutyrico.

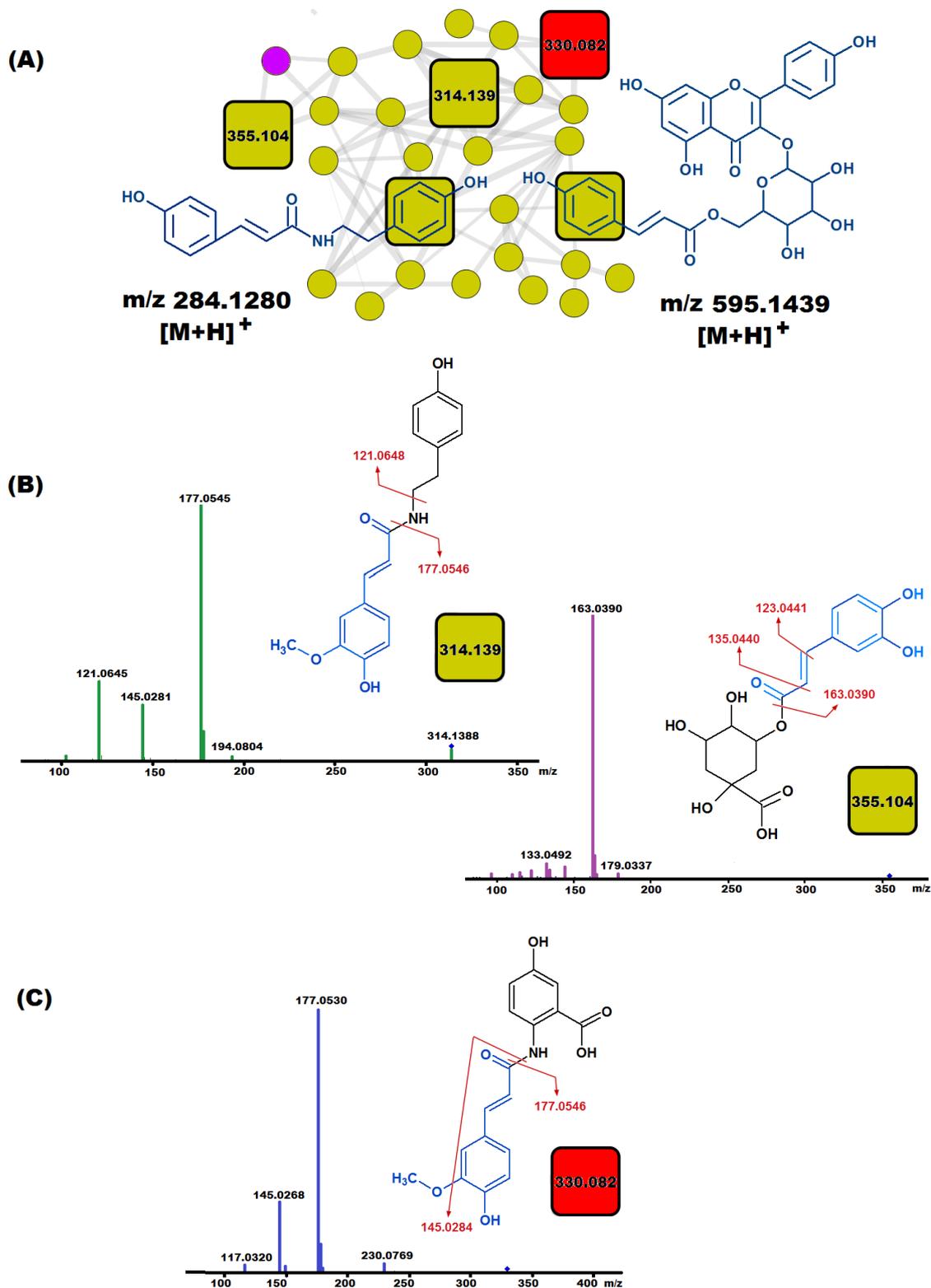
A estratégia de propagação de identificação aplicada ao cluster dos fenilpropanóides permitiu a anotação do acetato de cumarila, produzido em três extratos fúngicos F54, F168 e F573 e em menor abundância no extrato do galho da *A. jahnii*. Este metabólito já foi isolado do rizoma de *Alpinia galanga*, que apresenta como principais constituintes fenilpropanóides e revelou significativa atividade fitotóxica e fitopatogênica (MONGKOL et al., 2015). Estes resultados reforçam que apesar do cultivo sucessivo em laboratório, esses fungos apresentam a capacidade de biossintetizar alguns metabólitos presentes em sua planta hospedeira de forma independente do ambiente único da planta. É importante salientar novamente que a falta de estímulos do hospedeiro pode diminuir essa capacidade biossintética (KUSARI et al., 2009; DING et al. 2018; VERMA et al. 2011). Assim, a estratégia aplicada neste trabalho,

apresenta-se eficaz na identificação e detecção de vários metabólitos fúngicos produzidos independentes da associação com o hospedeiro, além de apontar de forma rápida o fungo com maior potencial para obtenção destes metabólitos. A análise exploratória no cluster dos fenilpropanóides possibilitou ainda a identificação putativa de quatro metabólitos semelhantes, sendo um produzido por fungo e três pela planta hospedeira (Figura 5).

O fluxo de trabalho proposto dentro do MN permitiu a desrepliação de outros metabólitos fúngicos análogos a compostos derivados da planta. Além de outros dez compostos da planta que apresentaram semelhança estrutural com compostos produzidos nos extratos fúngicos. A Figura 6A, apresenta outro cluster onde foi possível identificar compostos de ambas as matrizes biológicas. Os metabólitos paprazina ($[M+H]^+$, m/z 284,1280), feruloiltiramina ($[M+H]^+$, m/z 314,1384), ácido clorogênico ($[M+H]^+$, m/z 355,1019) e tiliroside ($[M+H]^+$, m/z 595,1439) estão presentes nos extratos da planta. O íon $[M+H]^+$, m/z 330,0952 identificado putativamente como avenantramida B detectado no extrato fúngico F573. Os metabólitos propostos pela biblioteca do GNPS para cada íon, também foram os candidatos mais bem classificados na fragmentação em sílico obtida na plataforma do Metfrag. Estes resultados reforçam a probabilidade dos candidatos propostos na identificação putativa, realmente representar os metabólitos presentes em cada matriz biológica.

O íon identificado putativamente como ácido clorogênico, apresentou íon fragmento com m/z 163 correspondente à unidade $[C_9H_7O_3]^+$, destacada em azul (Figura 6B). A avenantramida B (Figura 6C) presente no extrato fúngico é estruturalmente relacionada à feruloiltiramina, as duas compartilham os mesmos íons fragmentos com m/z 177 e m/z 145, correspondente as unidades $[C_{10}H_9O_3]^+$ e $[C_9H_5O_2]^+$ respectivamente. A porção destacada em azul na fórmula estrutural de cada um dos dois metabólitos é idêntica estruturalmente, apresentando a mesma conectividade. A porção fenilpropanóide está também presente nos outros dois íons identificados putativamente neste cluster, a paprazina e o tiliroside, este último contendo uma porção flavonóide glicosilado, sendo o íon com maior massa carga do cluster. Estes compostos identificados apresentam significativas propriedades biológicas. O tiliroside apresenta potencial como agente antioxidante e anti-inflamatório (CORRÊA et al., 2018). Os metabólitos, paprazina apresenta efeito inibidor em acetilcolinesterase (KIM e LEE, 2003) e feruloiltiramina pode apresentar ação de combate ao SARS-CoV-2 (SANKARAN e NAIR, 2022). Ambos já foram detectados em espécies de *Annona* (CHANG et al., 2000; CHEN et al., 1998).

Figura 6: Cinco metabólitos identificados putativamente detectados nos extratos fúngicos e vegetais. A) Cluter com metabólitos fúngicos conectados a metabólitos dos extratos vegetais, devido à similaridade da estrutura molecular. B) Espectros e proposta de fragmentos de dois metabólitos vegetais; C) Espectro e proposta de fragmentos de um dos metabólitos fúngicos. Nodes verdes: extrato da planta; vermelho: extrato F573 e Roxo: extrato F241.



Ácido clorogênico (m/z 355,104 ([M+H]⁺)); avenantramida B (m/z 330,082 ([M+H]⁺)); feruloiltiramina (m/z 314,139 ([M+H]⁺)); paprazina (m/z 284,1280 ([M+H]⁺)); tilirosíde (m/z 595,1439 ([M+H]⁺)).

O estudo metabolômico proporcionou a detecção de um amplo e variado espectro de compostos, fornecendo informações inéditas sobre a *A. jahnii* e seus fungos endofíticos, até então inexplorados. Este estudo apresentou uma estratégia extremamente útil na exploração de microrganismos com capacidade de produção de metabólitos, obtidos anteriormente de forma exclusiva da planta hospedeira. A investigação desta capacidade na maioria dos estudos ocorre de forma direcionada e limitada a identificação um metabólito específico presente na planta e produzido por seu fungo (CHITHRA et al., 2014; LI et al 2016; STIERLE et al., 1993; YIN e SUN, 2011). A estratégia apresentada neste estudo, além de ampliar a descoberta de diversos compostos produzidos por planta/fungo nestas investigações, viabiliza a detecção e desreplicação de compostos fúngicos análogos a metabólitos presentes na planta. O método desenvolvido neste estudo pode ser implementado em outras pesquisas e pode permitir importantes e rápidos avanços, na exploração da composição microbiana e de espécies vegetais pouco ou ainda não exploradas e nos mecanismos de detecção de metabólitos produzidos por planta/fungo.

3.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos para as atividades biológicas testadas. Dos cinco extratos avaliados, os extratos obtidos das linhagens fúngicas F168 e F54 foram os que requereram as menores concentrações para sequestrar 50% dos radicais DPPH (IC₅₀), sendo 12,0 e 9,0 µg.mL⁻¹ respectivamente. As linhagens fúngicas estudadas apresentam extratos com potencial antioxidante superior a outras espécies de *Penicillium* testadas, como *P. funiculosum* e *P. chrysogenum* que apresentaram atividade antioxidante em concentrações de 1000 µg.mL⁻¹ (JAKOVLJEVIĆ et al., 2014). *P. thomii*, com atividade antioxidante de 470 µg.mL⁻¹, que mesmo suplementado com selênio apresentou valores mais elevados para esta propriedade (ZHAO et al., 2020).

Para a atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas, a maioria dos extratos não apresentaram inibição de crescimento em valores menores ou iguais a 1 mg.mL⁻¹. O crescimento da *Staphylococcus aureus* foi inibido na presença dos extratos F11 e F241 em concentrações a partir de 1,0 mg.mL⁻¹, no entanto, o único extrato que inibiu o crescimento de *Escherichia coli* foi o extrato obtido da cepa F11. Teixeira et al. (2012), testaram a atividade antimicrobiana de extrato brutos obtidos de fungos do gênero *Penicillium*, obtendo resultados de inibição de crescimento apenas em concentrações a partir de 2,5 mg.mL⁻¹ para *E. coli* e a partir de 5 mg.mL⁻¹ para *S. aureus*. Extrato de *P. amestolkiae* apresentaram atividade

antimicrobiana de 25 mg.mL^{-1} frente a cepa de *E. coli*, que apresentou compostos isolados com potencial antimicrobiano (ROZMAN et al., 2017).

Tabela 1: Resultados das análises de atividade antioxidante por DPPH e atividade antimicrobiana dos 5 extratos fúngicos.

Extratos	IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Antimicrobiana frente à <i>Escherichia coli</i> (mg.mL^{-1})	Antimicrobiana frente à <i>Staphylococcus aureus</i> (mg.mL^{-1})
F11	80,0	1,0	1,0
F54	9,0	-	-
F168	12,0	-	-
F241	13,0	-	1,0
F573	17,0	-	-

No estudo desenvolvido por Sousa (2016), os extratos acetato de etila e metanol da folha e do galho de *A. jahnii*, apresentaram atividade antioxidante em concentrações entre 11 e $46 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultados estes similares aos apresentados pelos extratos fúngicos F168 e F241. A maioria dos extratos fúngicos aqui estudados também apresentaram melhor atividade antioxidante em comparação aos resultados dos extratos do galho. Comparando a atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos com os da planta hospedeira estudada por Sousa (2016), dois dos extratos fúngicos mostram potencial de inibição contra *E. coli* e/ou *S. aureus* e nenhum dos extratos da planta hospedeira apresentou eficiência na inibição dos mesmos patógenos. Assim, as linhagens fúngicas apresentaram resultados significativamente mais promissores para as atividades biológicas estudadas, mostrando o alto potencial destes endofíticos em comparação à planta hospedeira.

4 CONCLUSÕES

O estudo de fungos endofíticos para obtenção de compostos bioativos se mostra uma promissora alternativa para suprir o aumento da demanda por estes recursos naturais. E as pesquisas, visando à obtenção de compostos fúngicos produzidos originalmente por sua planta hospedeira, pode não apenas impactar na redução da exploração destas plantas, como também facilitar o acesso a esses metabólitos bioativos. Apesar da relevância destas investigações, ainda é desafiador pesquisas que visam identificar de forma eficiente e rápida, os endófitos capazes de biossintetizar substâncias ativas semelhantes ou idênticas aos produzidos pela planta hospedeira. Este trabalho revela o uso do UHPLC aliado ao molecular networking como uma estratégia poderosa, para guiar na identificação destes microrganismos, permitindo uma avaliação precoce e eficiente de extratos brutos, que representam uma mistura complexa.

Os resultados obtidos forneceram informações inéditas referentes ao perfil químico da planta *A. jahnii* e de seus fungos endofíticos. A grande quantidade de compostos de diferentes grupos químicos, presentes nas duas matrizes biológicas, demonstra o potencial dos microrganismos na produção de metabólitos bioativos e derivados da planta. As descobertas aqui apresentadas contribuem para ampliar os conhecimentos do metaboloma de fungos endofíticos do bioma amazônico, que ainda são escassos. A pesquisa desenvolvida fornece novas perspectivas para a exploração desses fungos, que devem ser ampliadas e seguidas por mais estudos, auxiliados pela estratégia aqui apresentada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNADURAI, T.; MURALIDHARAN, A.R.; JOSEPH, T.; HSU, M.J.; THOMAS, P.A.; GERALDINE, P. Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, p. 307–318, 2012.

ATANGWHO, I. J.; EBONG, P. E.; EYONG, E. U.; WILLIAMS, I. O.; ETENG, M.U.; EGBUNG, G. E. Comparative chemical composition of leaves of some antidiabetic medicinal plants: *Azadirachta indica*, *Vernonia amygdalina* and *Gongronema latifolium*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 18, p. 4685-4689, 2009.

BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Archives of Dermatological Research**, v. 306, n. 7, p. 601– 617, 2014.

BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-Host Interactions III. Local vs. Systemic Colonization. **Symbiosis**, v. 31, n. 4, p. 259-281, 2001.

CHANG, F.; CHEN, C.; HSIEH, T.; CHO, C.; WU, Y. Chemical Constituents from *Annona glabra* III. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, p. 913-920, 2000.

CHEN, C.; CHANG, F.; YEN, H.; WU, Y. Amides from Stems Of *Annona Cherimola*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1443- 1447, 1998.

CHERVIN, J.; PERIO, P.; MARTINS-FROMENT, N.; PHARKEOVILAY, C.; REYBIER, K.; NEPVEU, F.; FABRE, N.; TALOU, T.; BONZON-PONNET, V.; MARTI, G. Dereplication of natural products from complex extracts by regression analysis and molecular networking: case study of redox-active compounds from *Viola alba* subsp. *dehnhardtii*. **Metabolomics**, v. 13, n. 96, 2017.

CHITHRA, S.; JASIMA, B.; SACHIDANANDANB, P.; JYOTHISA, M.; RADHAKRISHNANA, E. K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 534–540, 2014.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; AMESTY, A.; AMARO, M. I.; CORDERO, M. I.; BAHASAS, A. Jahonin and asimicin acetogenins from *Annona jahnii* (Annonaceae) Jahonin y Asimicin Acetogenins de *Annona jahnii* (Annonaceae). **Revista Facultad de Farmacia**, v.71, n. 1, p. 48-52, 2008.

COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; LIU, X.; HOPP, D. C.; JOHNSON, H. A.; ALALI, F. Q.; ROGERS, L. L.; MCLAUGHLIN, J. L. Annodienin and Jahnonacin: New Bioactive Nontetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from the Twigs of *Annona jahnii*. **Natural Product Letters**, v. 14, n. 1, p. 65-75, 1999.

CORRÊA, W. R.; SERAIN, A. F.; NETTO, L. A.; MARINHO, J. V. N.; ARENA, A. C.; AQUINO, D. F. S.; KURAOKA-OLIVEIRA, A. M.; JÚNIOR, A. J.; BERNAL, L. P. T.; KASSUYA, C. A. L.; SALVADOR, M. J. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of the Extract, Tiliroside, and Patuletin 3-O- β -D-Glucopyranoside from *Pfaffia townsendii* (Amaranthaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. n. 6057579, 2018.

COSTA, E. V.; CRUZ, P. E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (*Annonaceae*). **Natural Product Research**, v. 27, n. 11, p. 1002–1006, 2013.

DING, C.; WANG, Q.; GUO, S.; WANG, Z. The improvement of bioactive secondary metabolites accumulation in *Rumex gmelini* Turcz through co-culture with endophytic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 362–369, 2018.

FLORES, D. J.; JENSEN, P. R.; DORRESTEIN, P. C.; KOYAMA, N. A metabolomics guided exploration of marine natural product chemical space. **Metabolomics**, v. 12, n. 9, 2016.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308–315, 2015.

GU, X.; REN, K.; YAO, N.; YAN, S.; ZHAO, J.; JIANG, X.; LIAN, Q. Chemical constituents from endophytic fungus *Plectosphaerella cucumerina* YCTA2Z1 of *Cynanchum auriculatum*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 10, n. 1, p. 95–98, 2018.

JAKOVLJEVIĆ, V. D.; MILIĆEVIĆ, J. M.; STOJANOVIĆ, J. D.; SOLUJIĆ, S. R.; VRVIĆ, M. M. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum*. **Hemijska Industrija**, v. 68, n. 1, p. 43–49, 2014.

JUNG, H. W.; TSCHAPLINSKI, T. J.; WANG, L.; GLAZEBROOK, J.; GREENBERG, J. T. Priming in Systemic Plant Immunity. **Priming In Systemic Plant Immunity**, v. 324, n. 5923, p. 89–91, 2009.

KIM, D. K.; LEE, K. Inhibitory Effect of Trans-N-p-Coumaroyl Tryamine from the Twigs of *Celtis chinensis* on the Acetylcholinesterase. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 9, p. 735–738, 2003.

KISHIMOTO, S.; TSUNEMATSU, Y.; SATO, M.; WATANABE, K. Elucidation of biosynthetic pathways of natural products. **Chemical Record**, v. 17, n. 11, p. 1095–1108, 2017.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOCHANAN, P. R.; AHMAD, A. Isolation, Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

KURIAKOSE, G. C.; PALEM, P. P. C.; JAYABASKARA, C. Fungal vincristine from *Eutypella* spp -CrP14 isolated from *Catharanthus roseus* induces apoptosis in human squamous carcinoma cell line -A431. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 302, 2016.

KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81–87, 2013.

KUSARI, S.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* That Produces Camptothecin and Analogues. **Journal Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2–7, 2009.

LIANG, P.; ZHANG, Y.Y.; YANG, P.; GROND, S.; ZHANG, Y.; QIAN, Z. Viridicatol and viridicatin isolated from a shark-gill-derived fungus *Penicillium polonicum* AP2T1 as MMP-2 and MMP-9 inhibitors in HT1080 cells by MAPKs signaling pathway and docking studies. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, p. 1039–1048, 2019.

LI, J.; CHI, J.; TANG, P.; SUN, Y.; LU, W.; XU, W.; WANG, Y.; LUO, J.; KONG, L. Spirolindemers A and B, Lindenane Sesquiterpenoid Oligomers Equipped with Oxaspiro[4.5]decane from *Chloranthus henryi*. **Chinese Journal Chemistry**, v. 40, p. 603–608, 2022.

LI, X.; ZHAI, X.; SHU, Z.; DONG, R.; MING, Q.; QIN, L.; ZHENG, C. Phoma glomerata D14: An Endophytic Fungus from *Salvia miltiorrhiza* That Produces Salvianolic Acid C. **Current Microbiology**, v. 73, n. 1, p.31–37, 2016.

LIU, Y.; WANG, X.; WANG, R.; LI, M.; LI, W.; ZHANG, J.; BAO, X.; ZHANG, D.; MA, S. New hexalactone derivatives and a pair of new oxaspiro-carbon epimeric glycosides from the fruits of *Illicium lanceolatum*. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, n. 103113, 2019.

LUCKNER, M. Zur Bildung von Chinolinalkaloiden in Pflanzen 2. Die fermentative Umwandlung der *Penicillium*-Alkaloide Cyclopenin und Cyclophenol in Viridicatin und Viridicatol. **European journal of biochemistry**, v. 2, p. 74–78, 1967.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MING, Q.; HAN, T.; LI, W.; ZHANG, Q.; ZHANG, H.; ZHENG, C.; HUANG, F.; RAHMAN, K.; QIN, L. Tanshinone IIA and tanshinone I production by *Trichoderma atroviride* D16, an endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3–4, p. 330–333, 2012.

MIR, R. A.; KAUSHIK, P. S.; CHOWDERY, R. A.; ANURADHA, M. Elicitation of Forskolin In Cultures Of *Rhizactonia Bataticola*-A Phytochemical Synthesizing Endophytic Fungi. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 10, p. 185–189, 2015.

MONGKOL, R.; CHAVASIRI, W.; ISHIDA, M.; MATSUDA, K.; MORIMOTO, M. Phytotoxic and antiphytopathogenic compounds from *Thai Alpinia galanga* (L.) Willd. rhizomes. **Weed Biology and Management**, v. 15, n. 2, p. 87–93, 2015.

MO, T.; HUANG, X.; ZHANG, W.; SCHÄBERLE, T. F.; QIN, J.; ZHOU, D.; QIN, X.; XU, Z.; LIA, J.; YANG, R. A series of meroterpenoids with rearranged skeletons from an endophytic fungus *Penicillium* sp. GDGJ-285. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 8, n. 10, p. 2232 - 2241, 2021.

NICIFOROVIC, N.; ABRAMOVIC, H. Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 1, p. 34–51, 2013.

NOVER, L.; LUCKNER, M. On the Biosynthesis of Cyclophenin and Cyclophenol, Benzodiazepine Alkaloids from *Penicillium cyclophenum* Westling. **European journal of biochemistry**, v. 10, n. 2, p. 268-273, 1969.

PERINI, J. A.; ANGELI-GAMBA, T.; ALESSANDRA-PERINI, J.; FERREIRA, L. C.; NASCIUTTI, L. E.; MACHADO, D. E. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 203, p. 1-8, 2015.

ROZMAN, N. A. S. B.; HAMIN, N. S. B. M. N.; RING, L. C.; NEE, T. W.; MUSTAPHA, M. B.; YENN, T. W. Antimicrobial Efficacy of *Penicillium amestolkiae* elv609 Extract Treated Cotton Fabric for Diabetic Wound Care. **Mycobiology**, v. 45, n. 3, p. 178-183, 2017.

RUTTKIES, C.; SCHYMANSKI, E. L.; WOLF, S.; HOLLENDER, J.; NEUMANN, S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 3, 2016.

RUTTKIES, C.; STREHMEL, N.; SCHEEL, D.; NEUMANN, S. Annotation of metabolites from gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry data using an in silico generated compound database and MetFrag. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 16, p. 1521–1529, 2015.

SANKARAN, S. K.; NAIR, A. S. Molecular dynamics and docking studies on potentially active natural phytochemicals for targeting SARS-CoV-2 main protease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-17, 2022.

SIEBER, M. A.; HEGEL, J. K. E. Azelaic Acid: Properties and Mode of Action. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 27, n. 1, p. 9–17, 2014.

SINGH, A.; SINGH, D. K.; KHARWAR, R. N.; WHITE, J. F.; GOND, S. K. Fungal Endophytes as Efficient Sources of Plant-Derived Bioactive Compounds and Their Prospective Applications in Natural Product Drug Discovery: Insights, Avenues, and Challenges. **Microorganisms**, v. 9, n. 197, 2021.

SOUSA, G., P. **Estudo químico e atividade antioxidante e antimicrobiana de *Annona jahnii* Saff. (Annonaceae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2016.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185 - 195, 2004.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

TEIXEIRA, M. F. S.; MARTINS, M. S.; SILVA, J. C.; KIRSCH, L. S.; FERNANDES, O. C. C.; CARNEIRO, A. L. B.; CONTI, R.; DURÁN, N. Amazonian Biodiversity: Pigments from

Aspergillus and *Penicillium*-Characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, n. 3, p. 300-311, 2012.

TEIMOORI-BOGHSANI, Y.; GANJEALI, A.; CERNAVA, T.; MÜLLER, H.; ASILI, J.; BERG, G. Endophytic Fungi of Native *Salvia abrotanoides* Plants Reveal High Taxonomic Diversity and Unique Profiles of Secondary Metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 3013, 2020.

TIAN, Y.; AMAND, S.; BUISSON, D.; KUNZ, C.; HACHETTE, F. DUPONT, J.; NAY, B.; PRADO, S. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit. **Phytochemistry**, v. 108, p. 95–101, 2014.

VERMA, V. C.; LOBKOVSKY, E.; GANGE, A. C.; SINGH, S. K.; PRAKASH, S. Piperine production by endophytic fungus *Periconia sp.* isolated from *Piper longum* L. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 427 – 431, 2011.

WANG, L., LI, M., LIN, Y., DU, S., LIU, Z., JU, J., SUZUKI, H., SAWADA, M., UMEZAWA, K. Inhibition of cellular inflammatory mediator production and amelioration of learning deficit in flies by deep sea *Aspergillus* derived cyclopenin. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 9, p. 622 – 629, 2020.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; et al. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking." **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828 - 837, 2016.

WOLF, S.; SCHMIDT, S.; MÜLLER-HANNEMANN, M.; NEUMANN, S. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 148, 2010.

WU, Y.; CHANG, G.; KO, F.; TENG, C. Bioactive Constituents from the Stems of *Annona montana*. **Planta Medica**, v. 61, n.2, p. 146-149, 1995.

XAVIER, L. A.; ODILAIR, L. M. N.; SOUSA, G. P.; SOUZA, E. C. A.; PILAU, E. J.; PORTO, C.; SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A. Ultra-high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry and molecular networking analysis to investigate the chemodiversity of bioactive extracts of *Annona jahnii* Saff. fungi from the Brazilian Amazon. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 36, n. 9356, 2022.

XU, L., HAN, T.; WU, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, H.; HUANG, B.; RAHMAN, K.; QIN, L. Comparative research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6-7, p. 609–616,

XU, Q.; XIAO, Y.; SHEN, Y.; WU, H.; ZHANG, X.; DENG, X.; WANG, T.; LI, W.; TAN, R.; JIAO, R.; GE, H. Novel chaetospirolactone and orsellide F from an endophytic fungus *Chaetomium sp.*, Journal of Asian Natural Products Research. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 20, n. 3, p. 234-241, 2017.

YIN, H.; SUN, Y. Vincamine-producing endophytic fungus isolated from *Vinca minor*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 8-9, p. 802–805, 2011.

ZHANG, Z.; LI, Z.; YIN, W.; LI, S. Biosynthesis of Viridicatol in *Penicillium palitans* Implies a Cytochrome P450-Mediated meta Hydroxylation at a Monoalkylated Benzene Ring. **Organic Letters**, v. 24, n. 1, p. 262–267, 2022

Zhao, J. T.; Fu, Y.; Luo, M.; Zu, Y.; Wang, W.; Zhao, C.; Gu, C. Endophytic Fungi from Pigeon Pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Produce Antioxidant Cajaninstilbene Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 17, p.4314–4319, 2012

ZHAO, J.; SHAN, T.; MOU, Y.; ZHOU, L. Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 159-168, 2011.

ZHAO, W.; ZHAI, F.; HAN, J. Effects of Selenium on Differentiation and Antioxidant Activity of Sclerotium of *Penicillium thomii* Q1 Strain. **BioMed Research International**, n. 2368245, 2020.

MATERIAL SUPLEMENTAR CAPÍTULO III

Tabela S1: Metabólitos identificados putativamente nos extratos vegetais da folha e galho de *A. jahnii* e nos extratos obtidos das diferentes linhagens de fungos endofíticos.

	Compostos	Fórmula molecular	Massa experimental	Massa teórica	Erro ppm	Aduto	Extrato
1	Ácido 3-Hidroxi-4-metoxicinnamico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	177,0543	177,0552	-5,08	[M-H ₂ O+H] ⁺	Folha e Galho
2	1-metil-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180,1015	180,1019	-2,22	[M+H] ⁺	Folha e Galho
3	Ácido isoferulico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195,0648	195,0652	-2,05	[M+H] ⁺	Folha
4	Alismol	C ₁₅ H ₂₄ O	203,1790	203,1799	-4,43	[M-H ₂ O+H] ⁺	Folha
5	Ácido 4-acetoxicinnamico	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	207,0647	207,0652	-2,41	[M+H] ⁺	Folha e Galho
6	3,5,6-trimetileugenol	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	207,1375	207,1379	-1,93	[M+H] ⁺	Folha e Galho
7	Ácido jasmonico	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	211,1327	211,1328	-0,47	[M+H] ⁺	Folha e Galho
8	3-Heptanoilciclohexanona	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	211,1685	211,1693	-3,79	[M+H] ⁺	Folha e Galho
9	Asimilobina	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	268,1324	268,1332	-2,98	[M+H] ⁺	Folha e Galho
10	Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273,0753	273,0757	-1,46	[M+H] ⁺	Folha e Galho
11	Paprazina	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	284,1280	284,1281	-0,35	[M+H] ⁺	Folha e Galho
12	Coclaurina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286,1434	286,1438	-1,40	[M+H] ⁺	Folha e Galho
13	Eriodictiol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	289,0705	289,0707	-0,69	[M+H] ⁺	Folha e Galho
14	Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291,0861	291,0863	-0,69	[M+H] ⁺	Folha e Galho
15	Stepharine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	298,1435	298,1438	-1,01	[M+H] ⁺	Folha e Galho
16	N-metilcoclaurine	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300,1594	300,1594	0,00	[M+H] ⁺	Folha e Galho

17	5,7,3',4'-Pentahidroxi flavanona	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	305,0652	305,0658	-1,97	[M+H] ⁺	Galho
18	Feruloiltiramine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314,1384	314,1387	-0,95	[M+H] ⁺	Folha
19	Norboldine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314,1382	314,1387	-1,59	[M+H] ⁺	Folha e Galho
20	N,O-dimetilcoclaurine	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	314,1748	314,1751	-0,95	[M+H] ⁺	Folha e Galho
21	Reticulina	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	330,1696	330,1699	-0,91	[M+H] ⁺	Folha
22	Isocoridina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342,1696	342,1699	-0,88	[M+H] ⁺	Folha e Galho
23	Coripalmina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342,1698	342,1699	-0,29	[M+H] ⁺	Folha e Galho
24	Norglaucina	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342,1698	342,1699	-0,29	[M+H] ⁺	Folha e Galho
25	2,3-bis[(4-hidroxi-3-metoxifenil)metil]butan-1,4-diol	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	345,1694	345,1702	-2,32	[M-H ₂ O+H] ⁺	Galho
26	Ácido clorogênico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355,1019	355,1023	-1,13	[M+H] ⁺	Galho
27	Glaucina	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	356,1854	356,1856	-0,56	[M+H] ⁺	Folha e Galho
28	(6aS)-1,2,10-trimetoxi-6-metil-6-oxido-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinolina-6-ium-9-ol	C ₂₀ H ₂₃ NO ₅	358,1644	358,1649	-1,39	[M+H] ⁺	Folha
29	3,5,5-Trimetil-4-[3-(beta-D-glucopiranosiloxi)butil]-2-ciclohexene-1-one	C ₁₉ H ₃₂ O ₇	373,2217	373,2221	-1,07	[M+H] ⁺	Folha e Galho
30	(4S)-4-hydroxy-3,5,5-trimetil-4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-yl]oxibut-1-enil]ciclohex-2-en-1-one	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	387,2004	387,2014	-2,32	[M+H] ⁺	Folha
31	Icariside B5	C ₁₉ H ₃₂ O ₈	389,2153	389,2170	-4,37	[M+H] ⁺	Folha e Galho

32	Procyanidin B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	579,1491	579,1497	-1,04	[M+H] ⁺	Galho
33	Tiliroside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595,1439	595,1446	-1,18	[M+H] ⁺	Folha e Galho
34	Ácido azelaico	C ₉ H ₁₆ O ₄	189,1121	189,1121	0,00	[M+H] ⁺	F241 e Galho
35	Coumaryl acetate	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	193,0855	193,0859	-2,07	[M+H] ⁺	F573, F168, F54 e Galho
36	2,7-Dimethyl-2-pentyl-4-oxaspiro[2.4]hept-6-en-5-one	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	209,1527	209,1536	-4,30	[M+H] ⁺	Folha e F573
37	Ácido sinapico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	225,0750	225,0757	-3,11	[M+H] ⁺	Folha e F573
38	Diphenylamine	C ₁₂ H ₁₁ N	170,0959	170,0964	-2,94	[M+H] ⁺	F168
39	Gamma-Decalactone	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	171,1374	171,1379	-2,92	[M+H] ⁺	F573, F54, F11 e F168
40	Ácido 2-Oxo-4-fenilbutirico	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	179,0699	179,0703	-2,23	[M+H] ⁺	F54 e F168
41	Ácido p-Acetaminobenzoico	C ₉ H ₉ NO ₃	180,0649	180,0655	-3,33	[M+H] ⁺	F573
42	N6-(delta2-isopentenyl)-adenine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅	204,1240	204,1244	-1,96	[M+H] ⁺	F241 e F11
43	Viridicatina	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂	238,0869	238,0863	2,52	[M+H] ⁺	F573, F241, F54 e F168
44	Viridicatol	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	254,0815	254,0812	1,18	[M+H] ⁺	F573, F241, F54 e F168
45	(1H)-Quinolinone, 3,4-dihydro-3,4-dihydroxy-4-phenyl-	C ₁₅ H ₁₃ NO ₃	256,0971	256,0968	1,17	[M+H] ⁺	F573, F54 e F168
46	Ciclopeptina	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂	281,1285	281,1284	0,36	[M+H] ⁺	F573, F241, F54 e F168
47	Cilopenina	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₃	295,1080	295,1077	1,02	[M+H] ⁺	F573, F241, F54, F11 e F168

48	Ciclopenol	$C_{17}H_{14}N_2O_4$	311,1032	311,1026	1,93	$[M+H]^+$	F573, F241, F54 e F168
49	Avenantramida B	$C_{17}H_{15}NO_6$	330,0952	330,0972	-6,05	$[M+H]^+$	F573
50	Fusaperazine E	$C_{19}H_{24}N_2O_3S$	361,1572	361,1572	-2,22	$[M+H]^+$	F573, F241 e F168
51	Roquefortina C	$C_{22}H_{23}N_5O_2$	390,1918	390,1924	-1,54	$[M+H]^+$	F168, F54, F573 e F241
52	Roquefortina D	$C_{22}H_{25}N_5O_2$	392,2081	392,2081	0,00	$[M+H]^+$	F573P, F241, F54 e F168

Figura S1: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido 3-Hidroxi-4-metoxcinamico identificado putativamente.

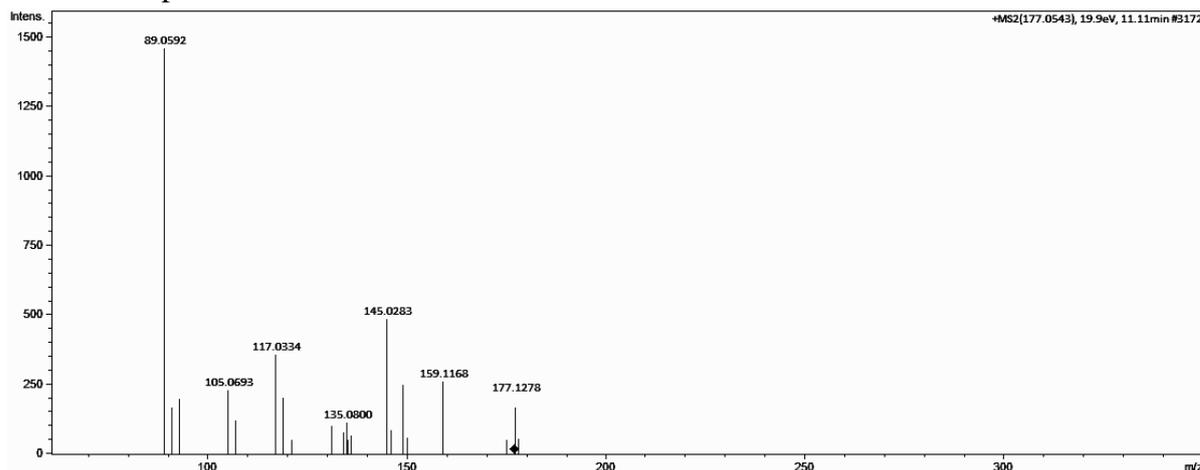


Figura S2: Espectro MS/MS atribuído ao composto 1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline identificado putativamente.

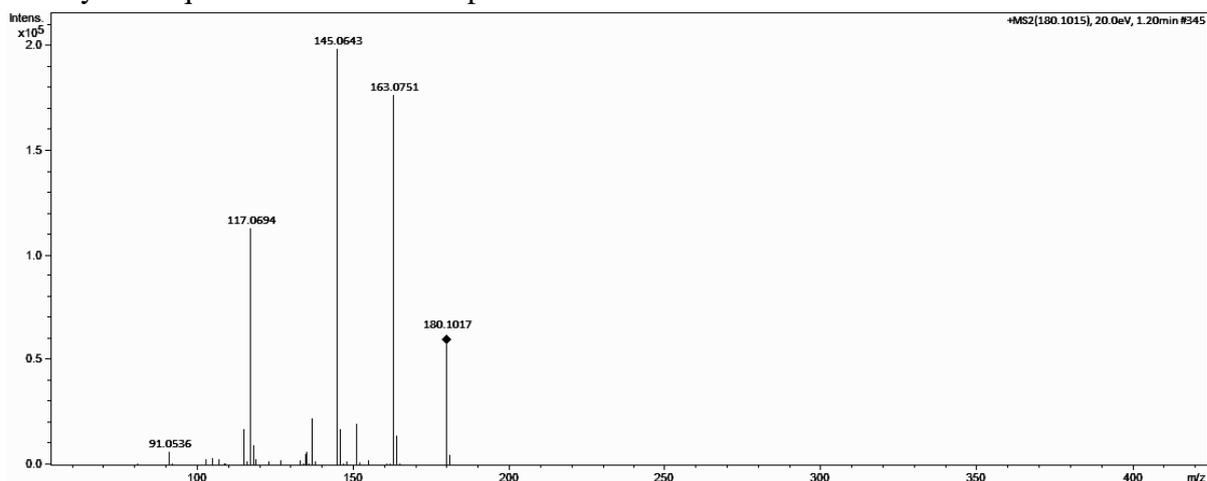


Figura S3: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido isoferúlico identificado putativamente.

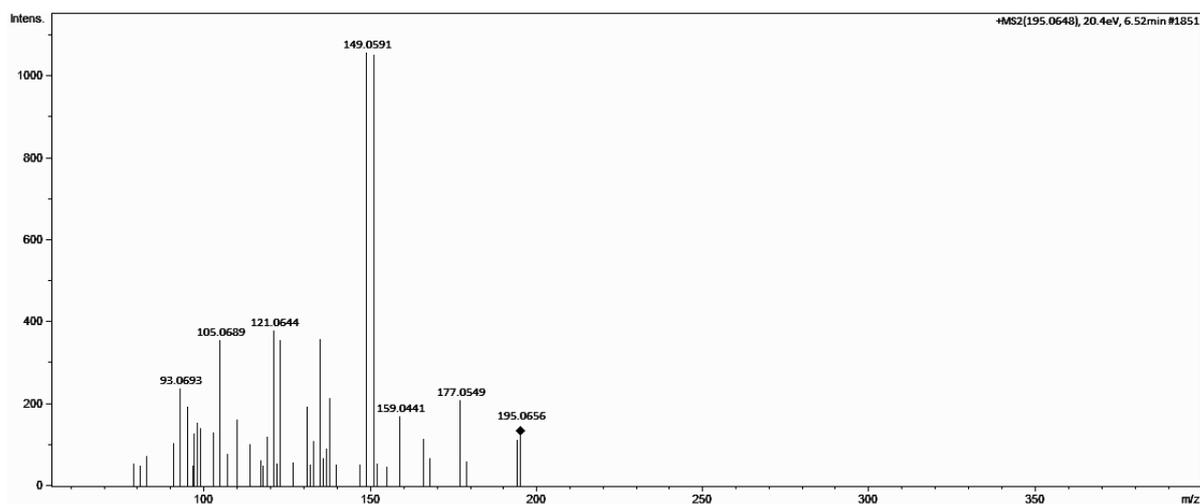


Figura S4: Espectro MS/MS atribuído ao composto Alismol identificado putativamente.

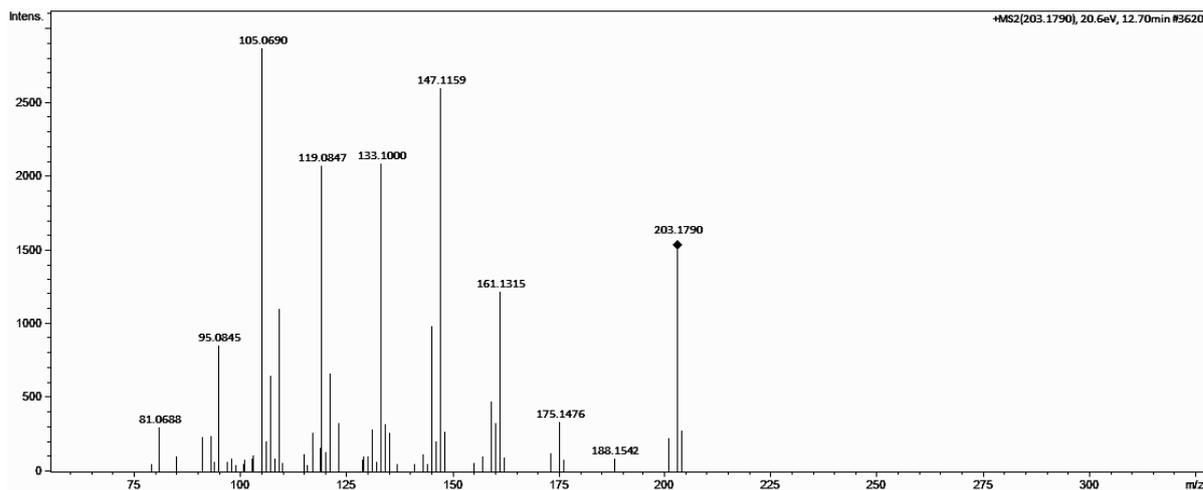


Figura S5: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido 4-acetoxicinâmico identificado putativamente.

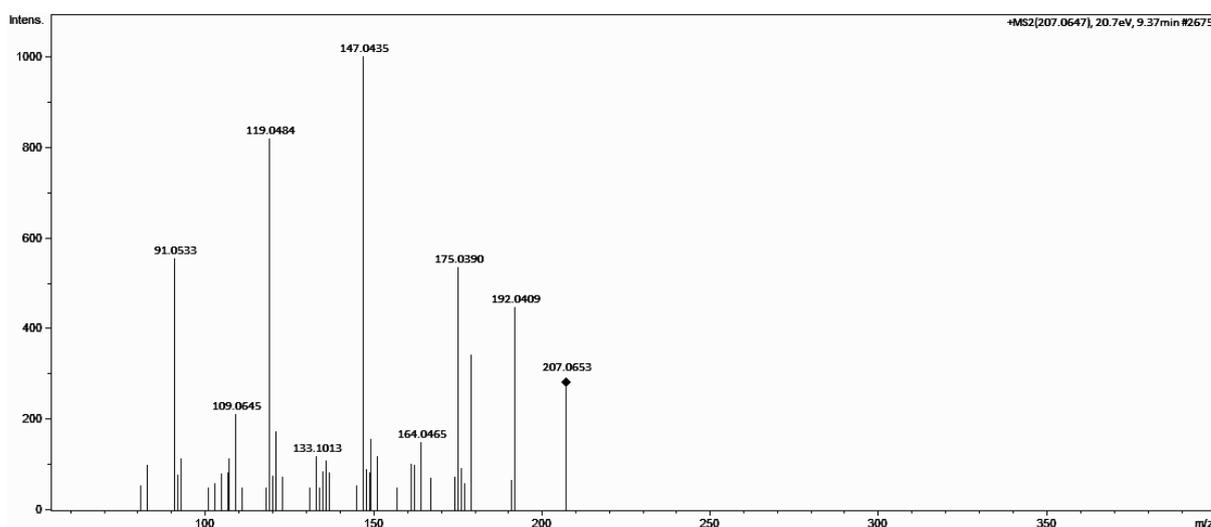


Figura S6: Espectro MS/MS atribuído ao composto 3,5,6-trimethylugenol identificado putativamente.

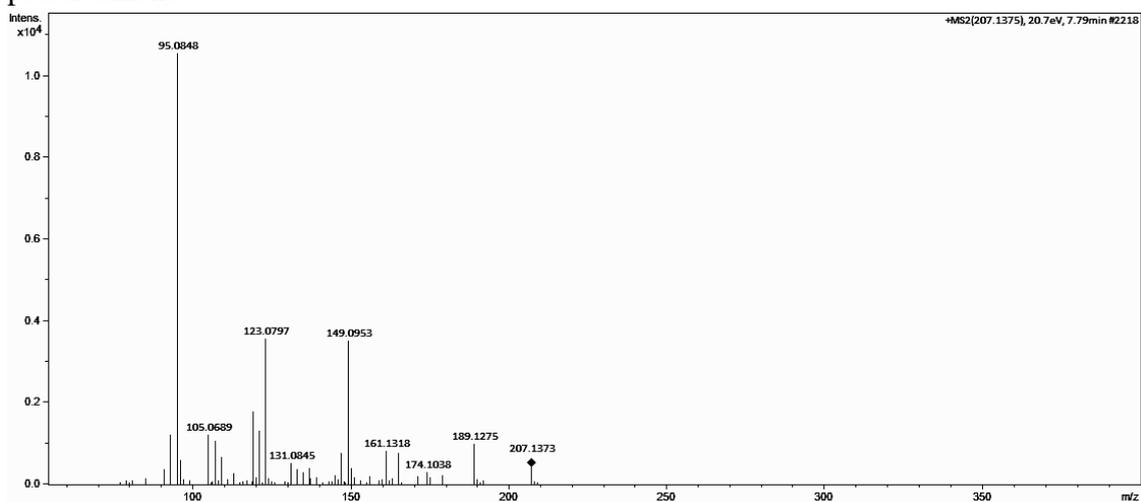


Figura S7: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido jasmônico identificado putativamente.

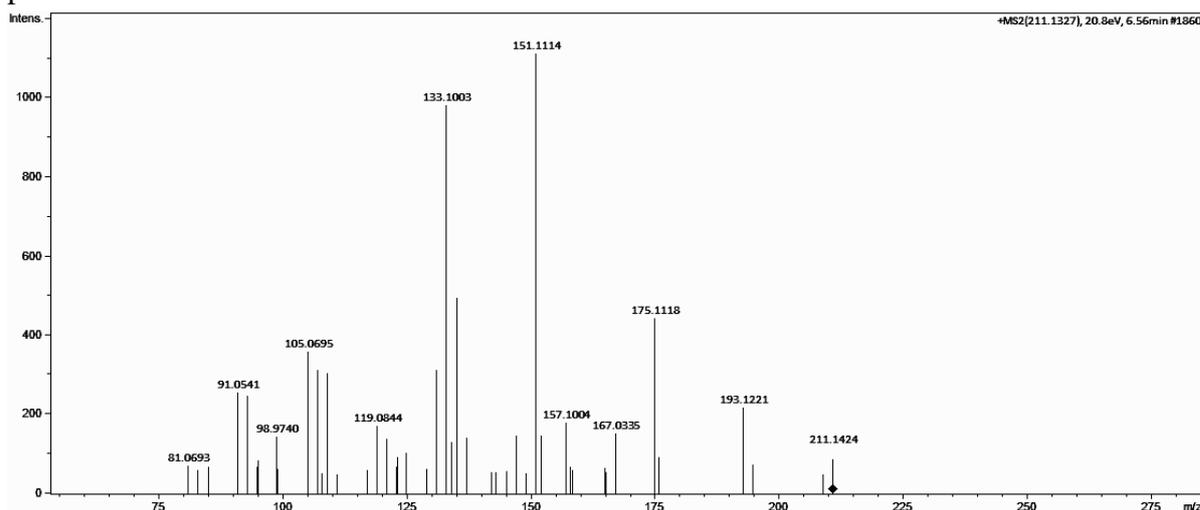


Figura S8: Espectro MS/MS atribuído ao composto 3-Heptanoylcyclohexanone identificado putativamente.

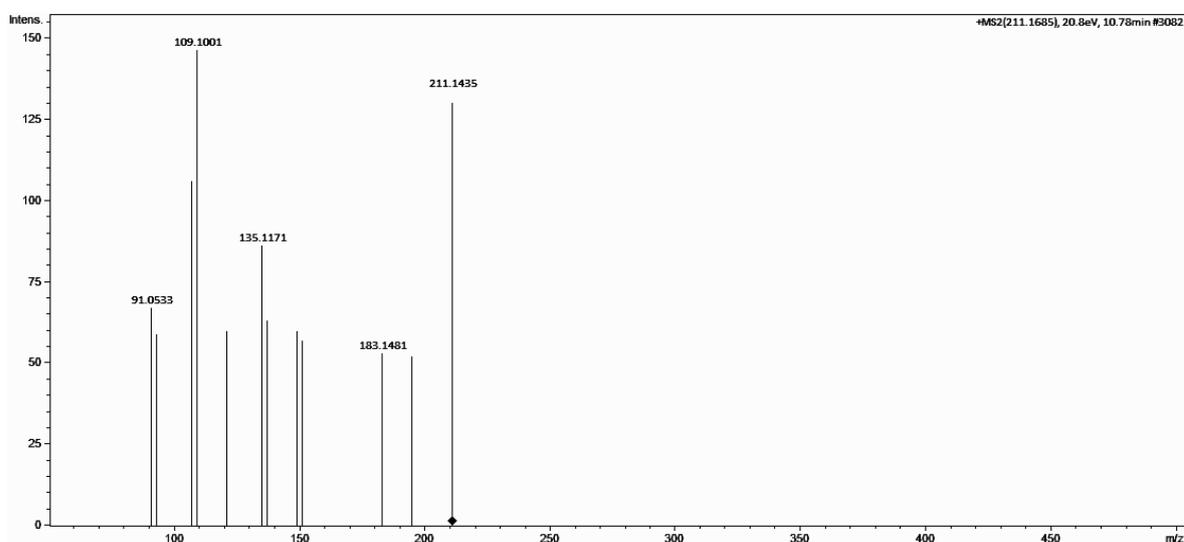


Figura S9: Espectro MS/MS atribuído ao composto asimilobine identificado putativamente.

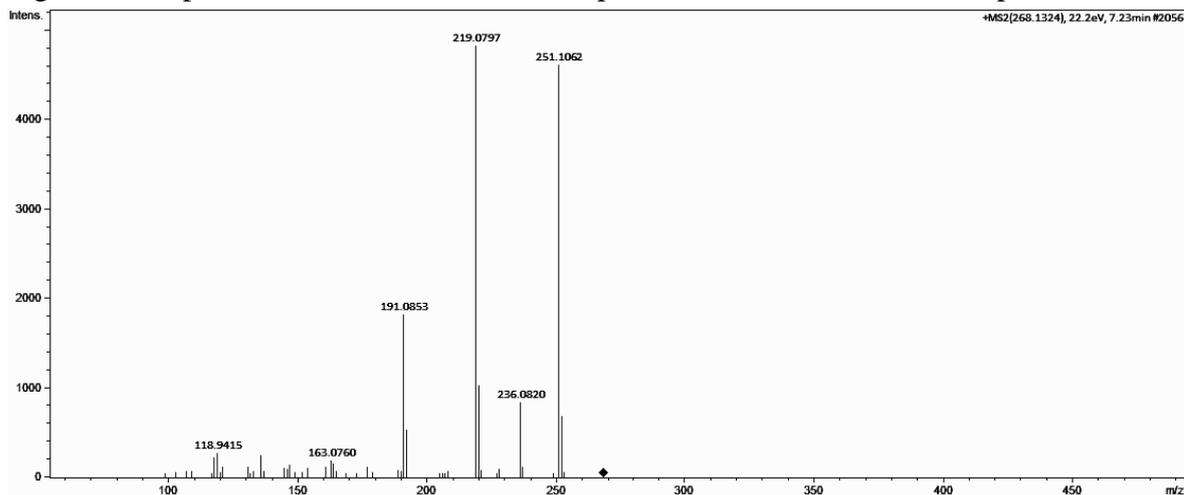


Figura S10: Espectro MS/MS atribuído ao composto naringenina identificado putativamente.

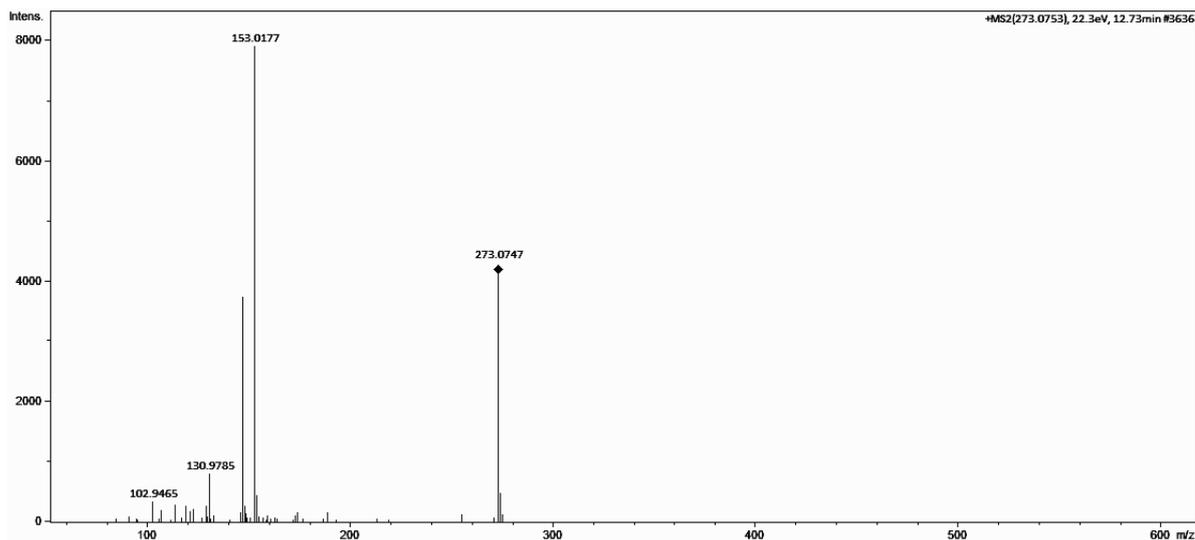


Figura S11: Espectro MS/MS atribuído ao composto paprazina identificado putativamente.

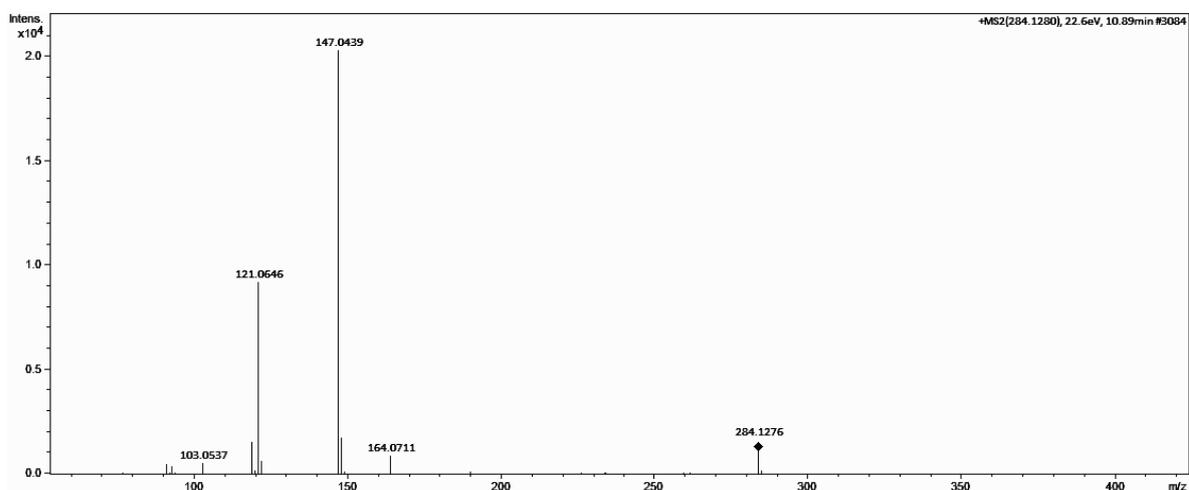


Figura S12: Espectro MS/MS atribuído ao composto Coclaurina identificado putativamente.

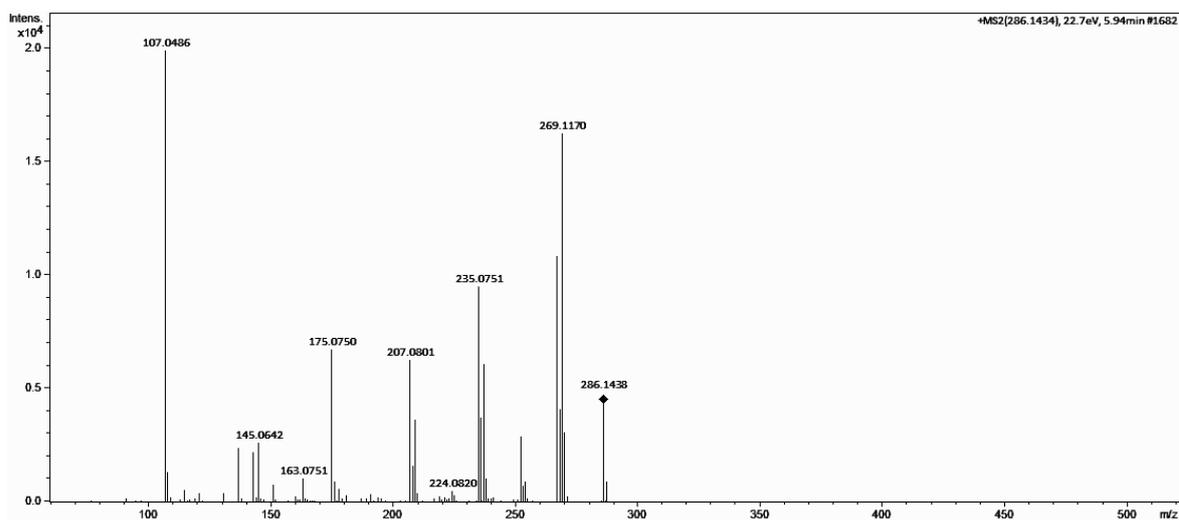


Figura S13: Espectro MS/MS atribuído ao composto Eriodictyol identificado putativamente.

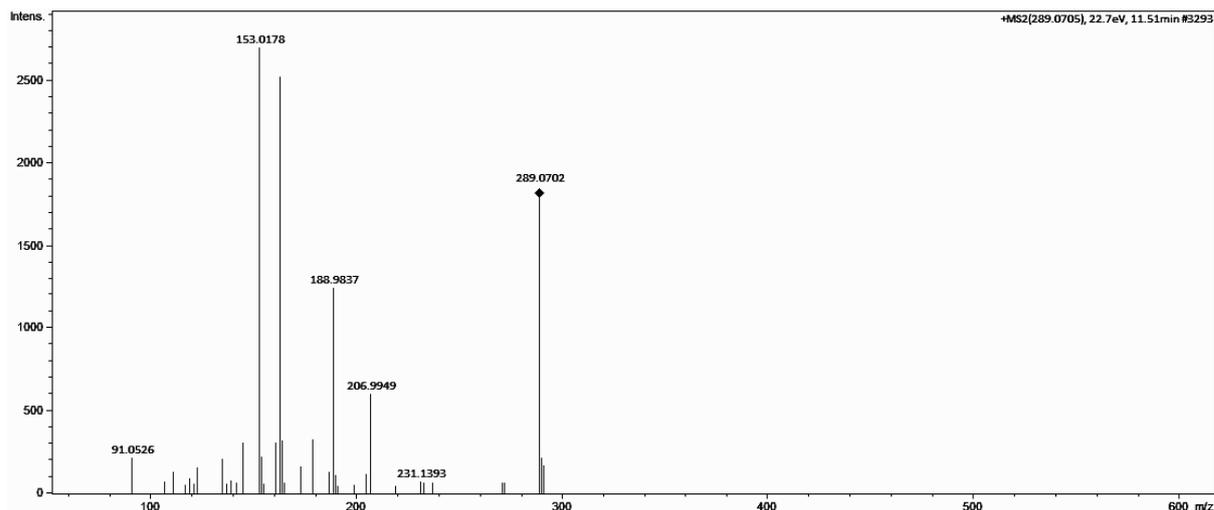


Figura S14: Espectro MS/MS atribuído ao composto Epicatechin identificado putativamente.

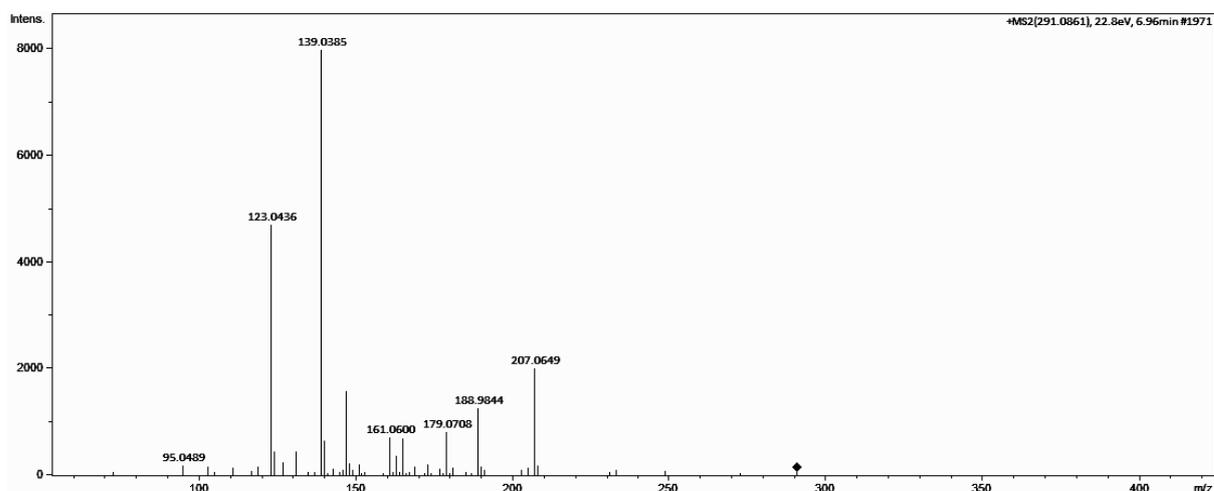


Figura S15: Espectro MS/MS atribuído ao composto Stepharine identificado putativamente.

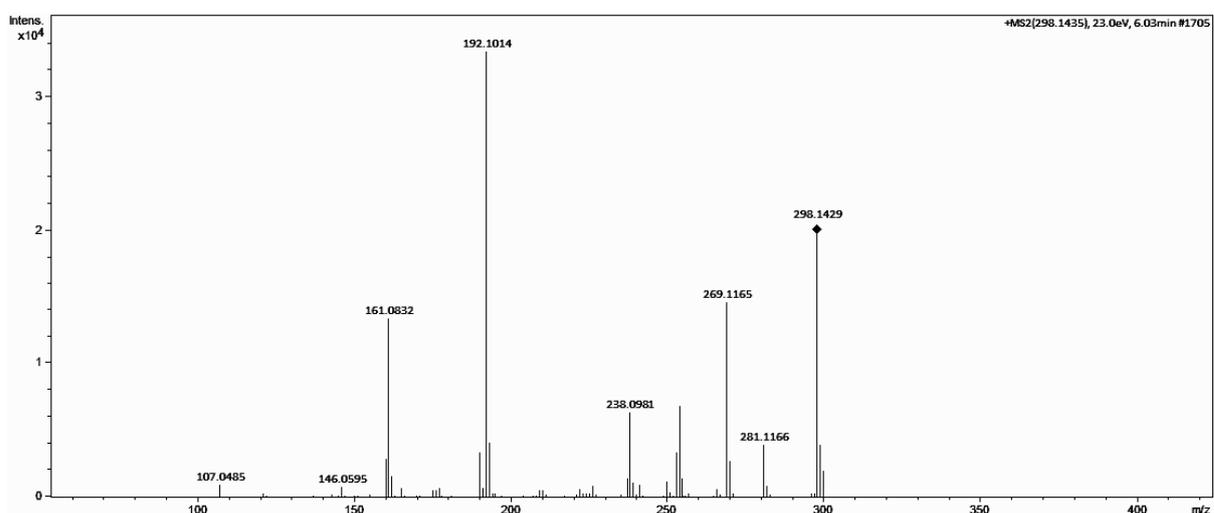


Figura S16: Espectro MS/MS atribuído ao composto N-methylcochlorine identificado putativamente.

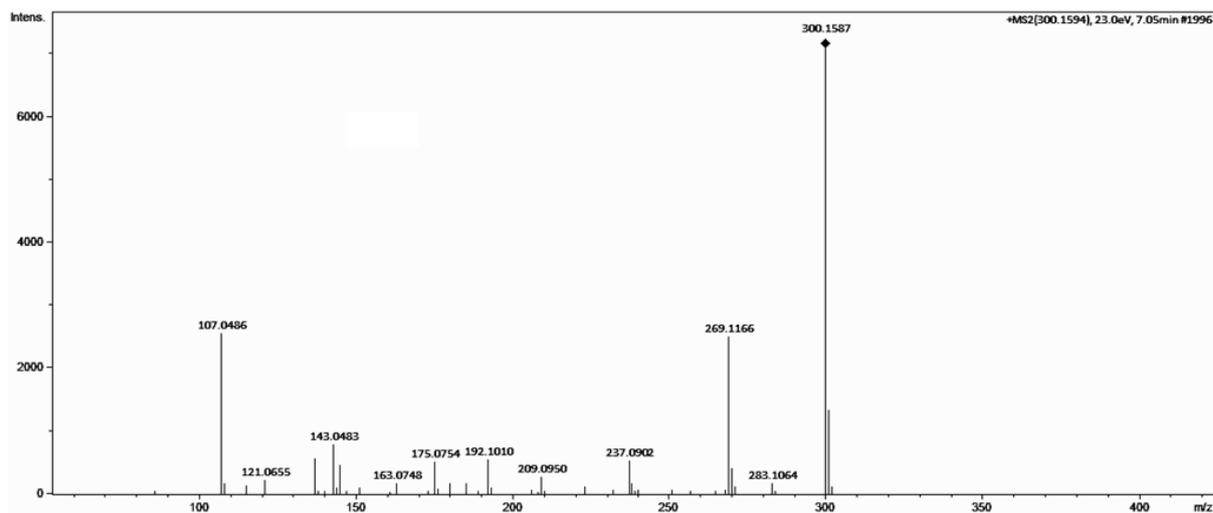


Figura S17: Espectro MS/MS atribuído ao composto 5,7,3',4'-Pentahydroxyflavanone identificado putativamente.

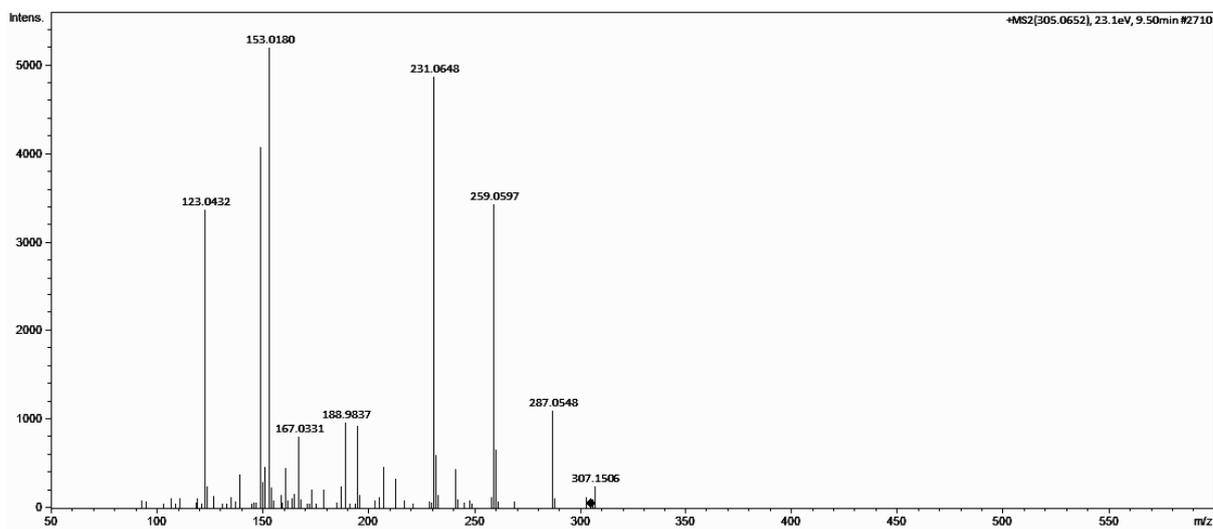


Figura S18: Espectro MS/MS atribuído ao composto feruloyltyramine identificado putativamente.

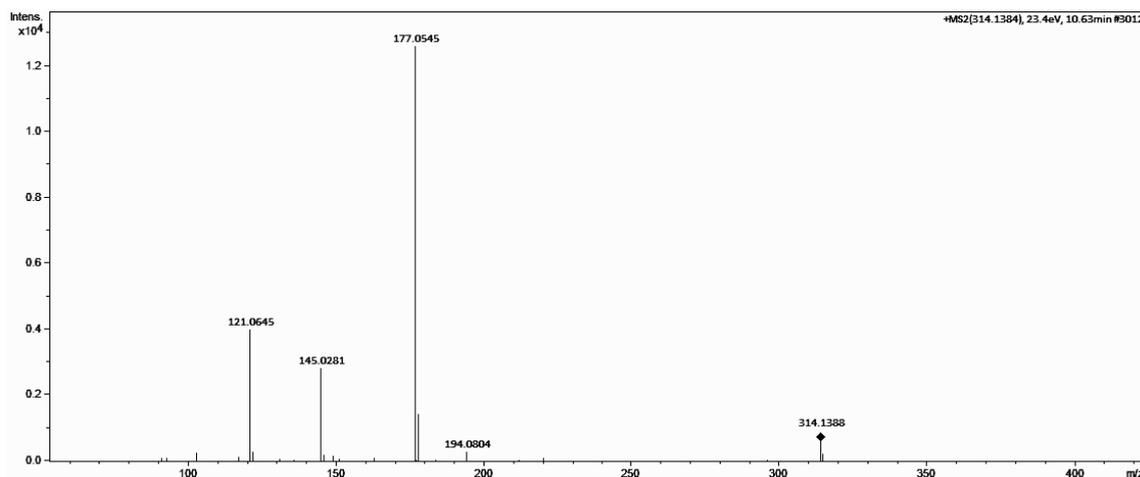


Figura S19: Espectro MS/MS atribuído ao composto Norboldine identificado putativamente.

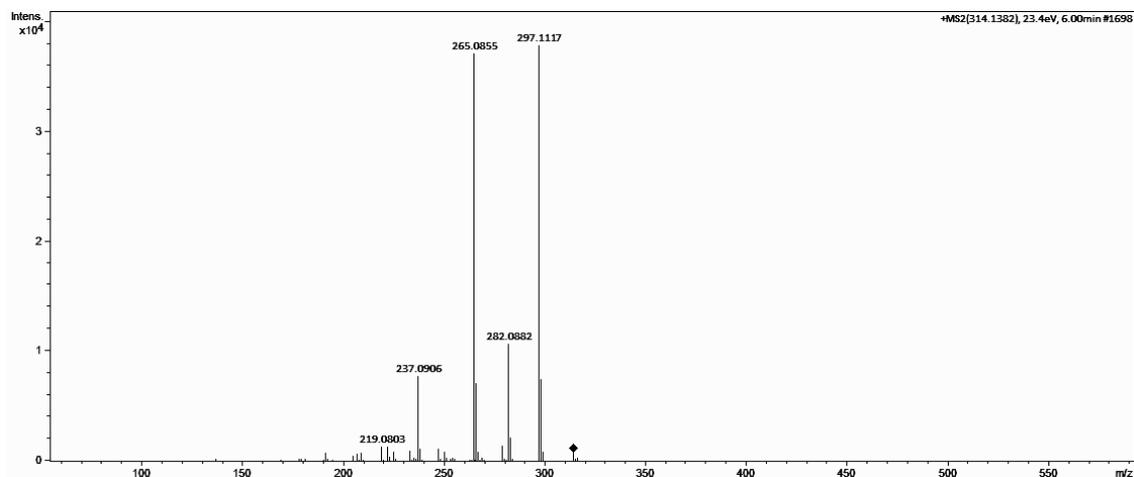


Figura S20: Espectro MS/MS atribuído ao composto N,O-dimethylcoclaurine identificado putativamente.

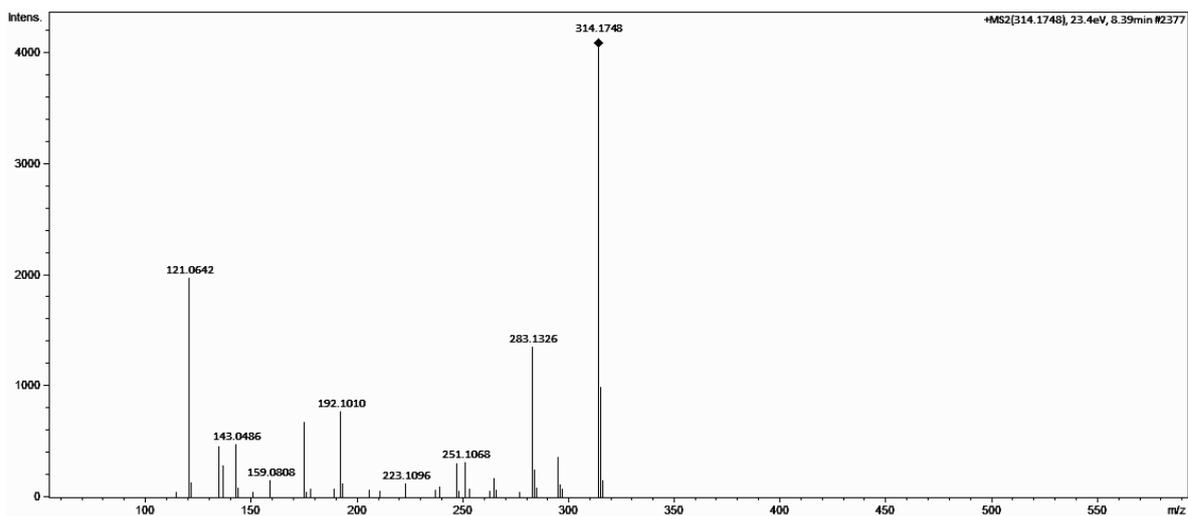


Figura S21: Espectro MS/MS atribuído ao composto reticuline identificado putativamente.

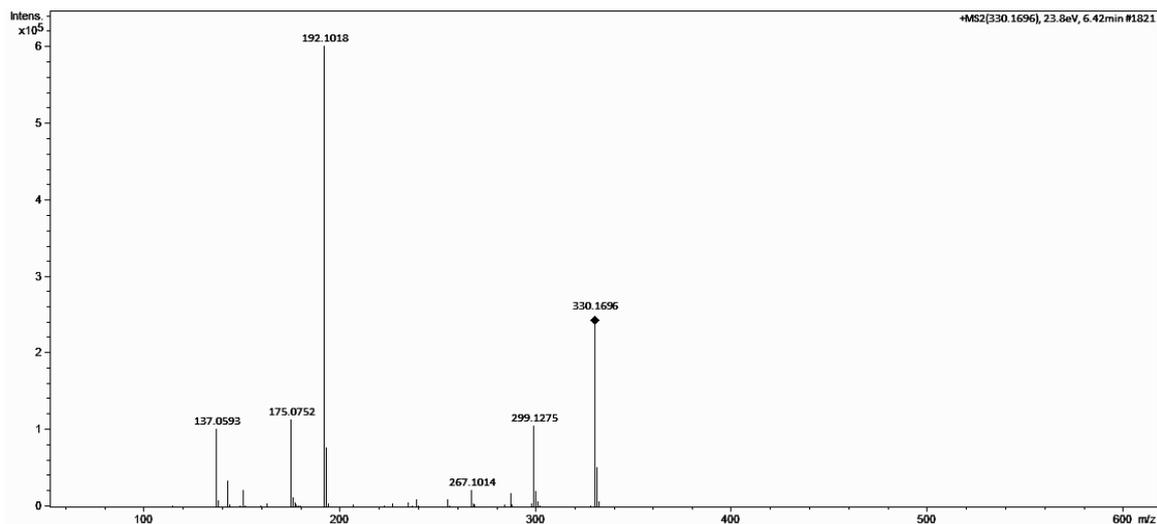


Figura S22: Espectro MS/MS atribuído ao composto isocorydin identificado putativamente.

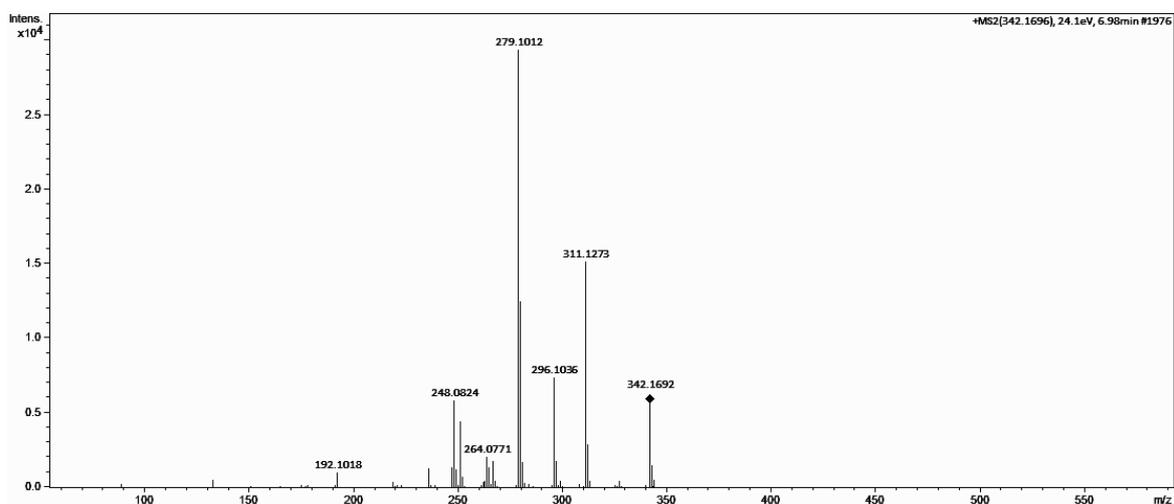


Figura S23: Espectro MS/MS atribuído ao composto corypalmine identificado putativamente.

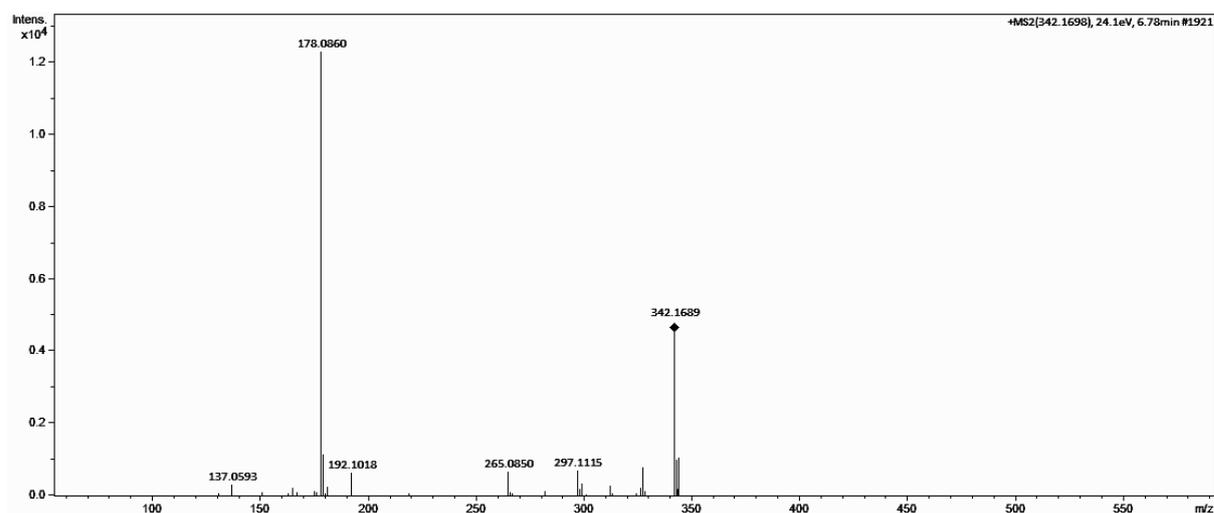


Figura S24: Espectro MS/MS atribuído ao composto norglaucine identificado putativamente.

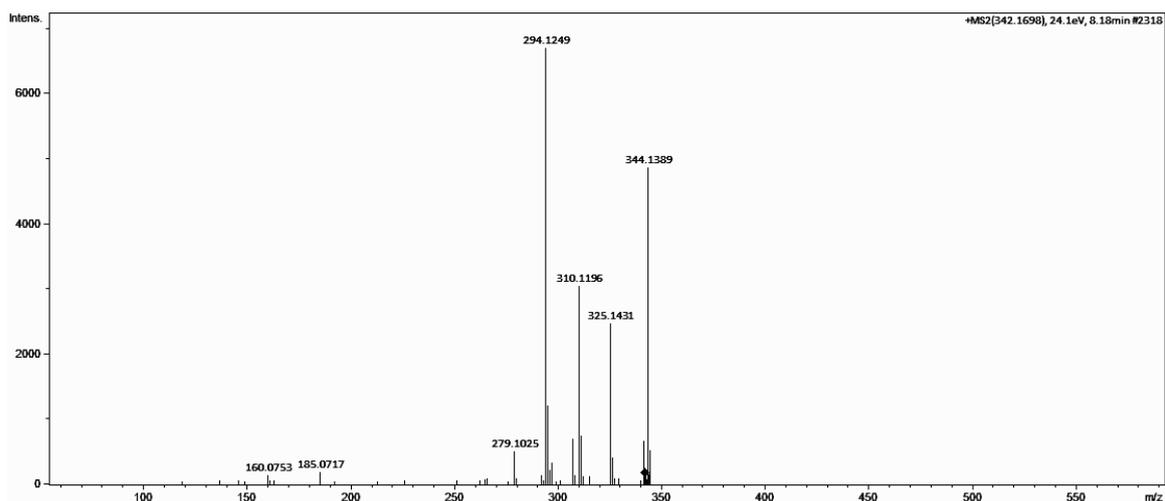


Figura S25: Espectro MS/MS atribuído ao composto 2,3-bis[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]butane-1,4-diol identificado putativamente.

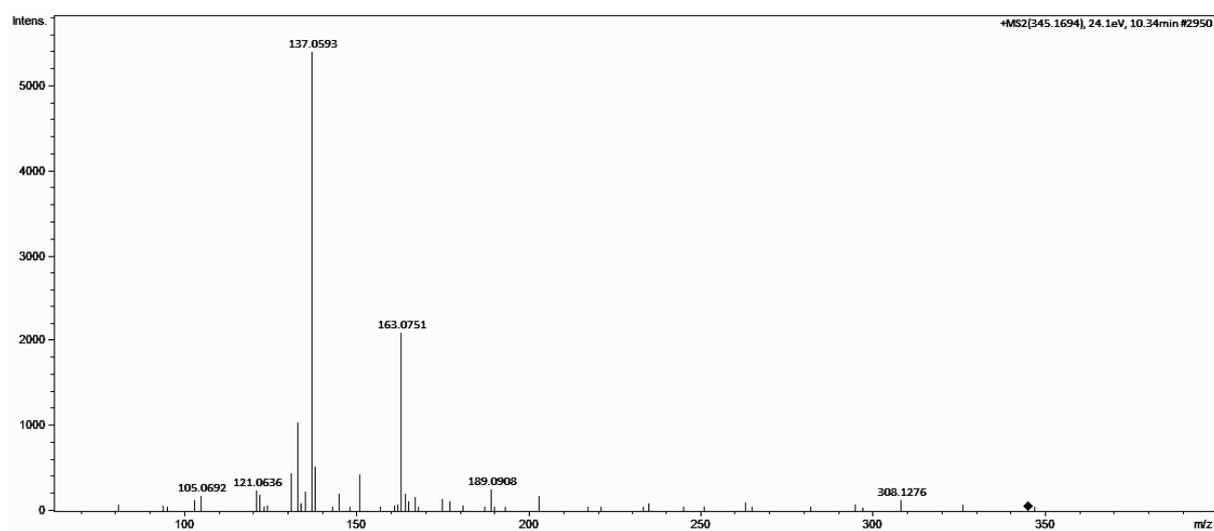


Figura S26: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido clorogênico identificado putativamente.

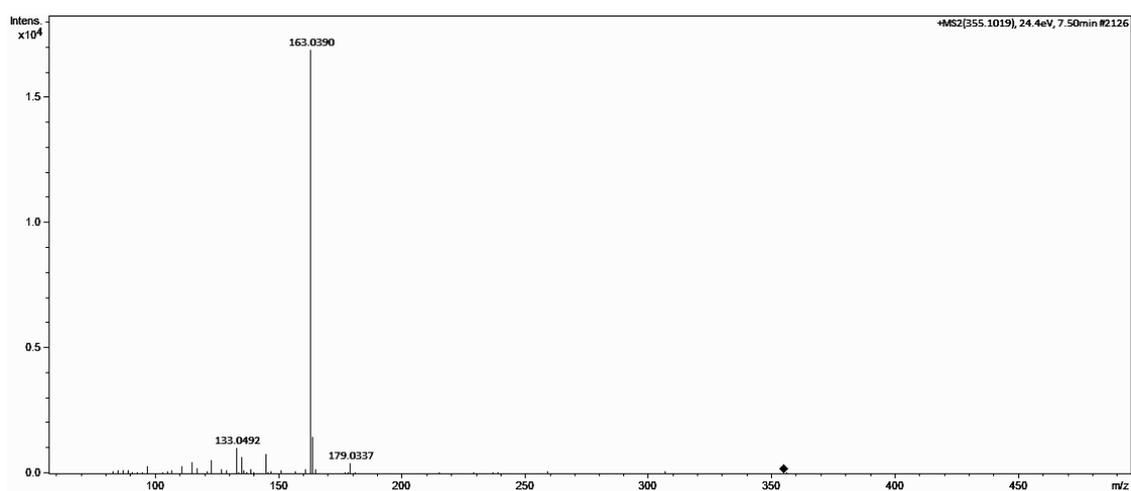


Figura S27: Espectro MS/MS atribuído ao composto Glaucine identificado putativamente.

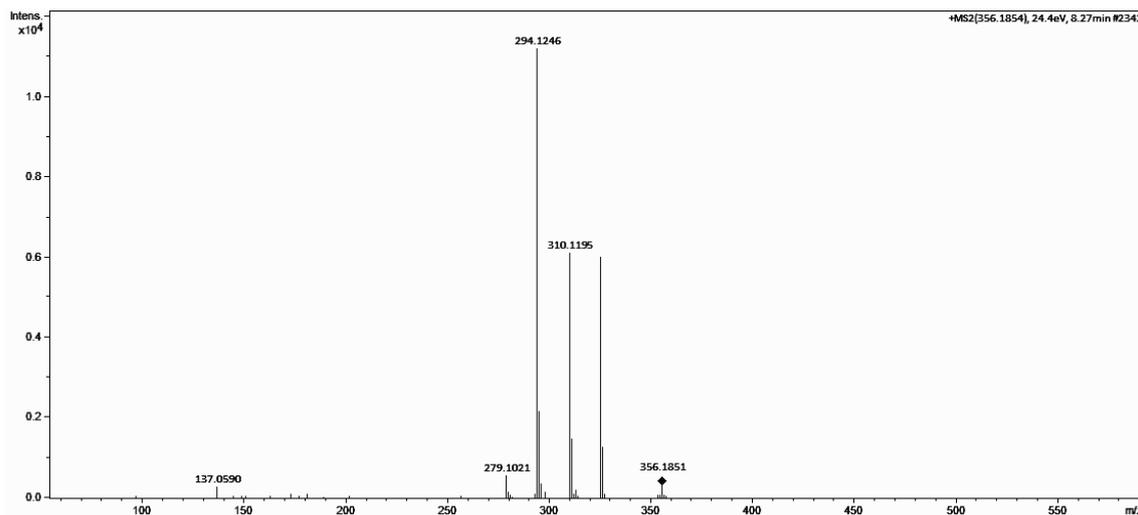


Figura S28: Espectro MS/MS atribuído ao composto (6aS)-1,2,10-trimethoxy-6-methyl-6-oxido-5,6,6a,7-tetrahydro-4H-dibenzo[de,g]quinoline-6-ium-9-ol identificado putativamente.

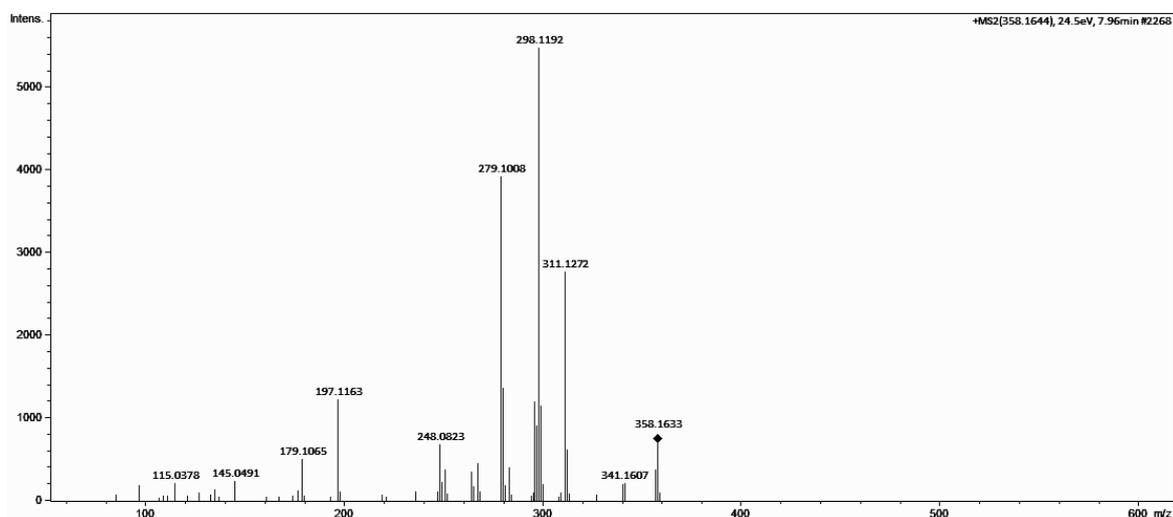


Figura S29: Espectro MS/MS atribuído ao composto 3,5,5-Trimethyl-4-[3-(beta-D-glucopyranosyloxy)butyl]-2-cyclohexene-1-one identificado putativamente.

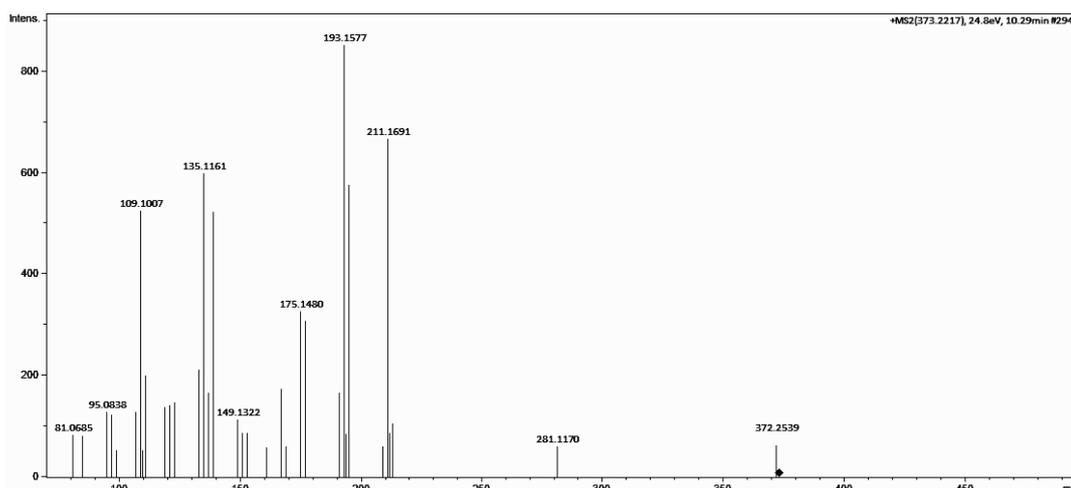


Figura S30: Espectro MS/MS atribuído ao composto (4S)-4-hydroxy-3,5,5-trimethyl-4-[(E)-3-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybut-1-enyl]cyclohex-2-en-1-one identificado putativamente.

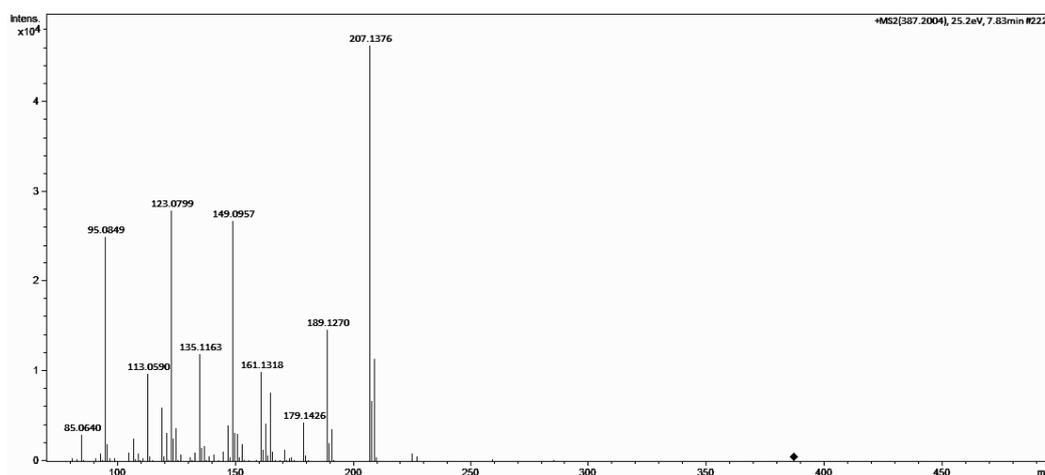


Figura S31: Espectro MS/MS atribuído ao composto icariside B5 identificado putativamente.

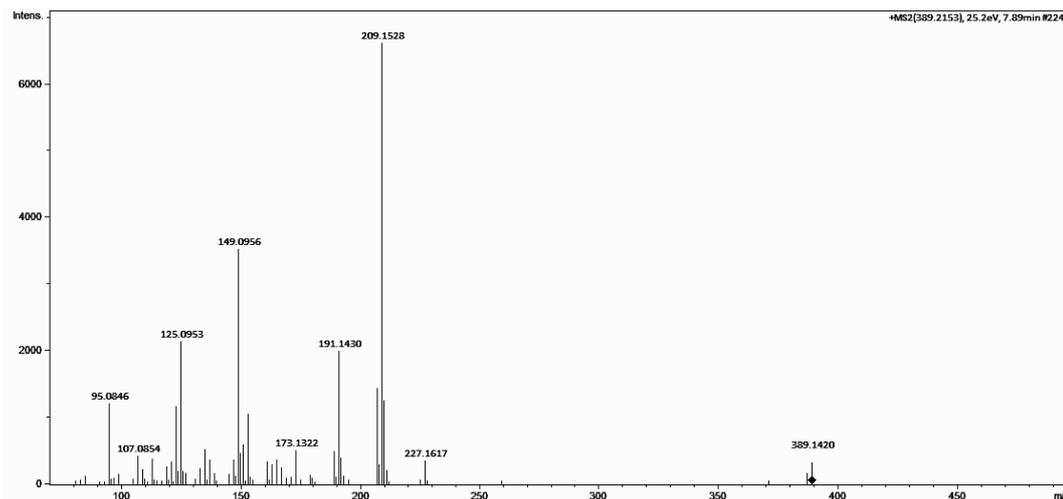


Figura S32: Espectro MS/MS atribuído ao composto procyanidin B2 identificado putativamente.

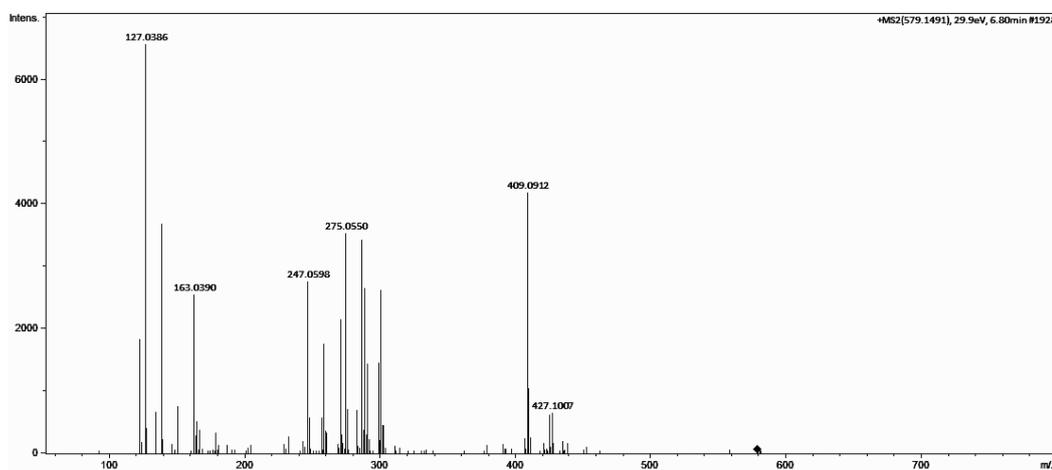


Figura S33: Espectro MS/MS atribuído ao composto tiliroside identificado putativamente.

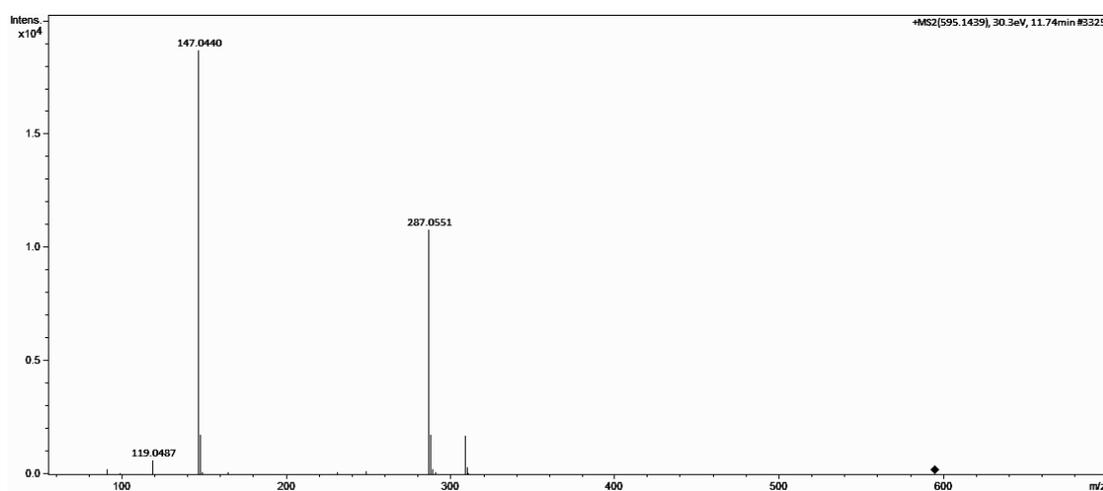


Figura S34: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido azeáico identificado putativamente.

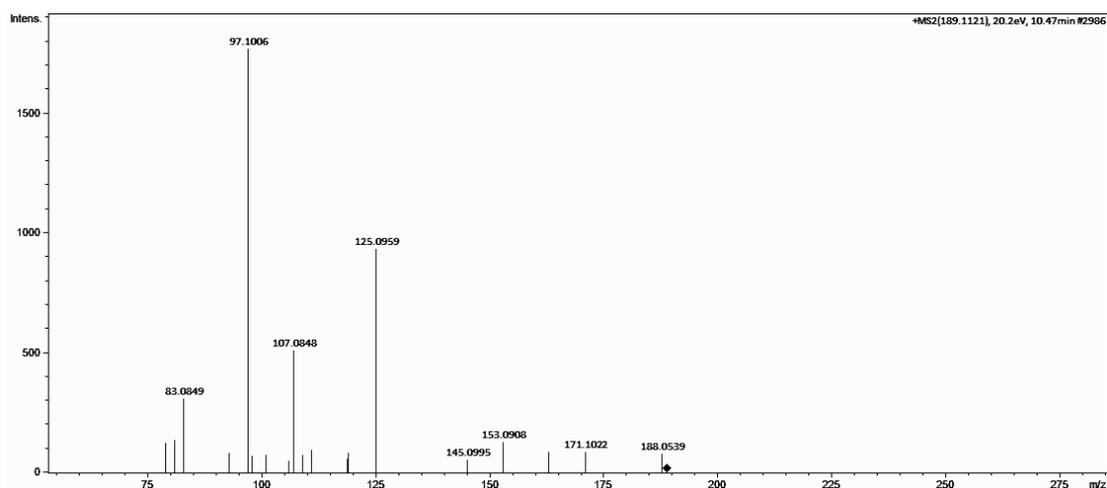


Figura S35: Espectro MS/MS atribuído ao composto coumaryl acetate identificado putativamente.

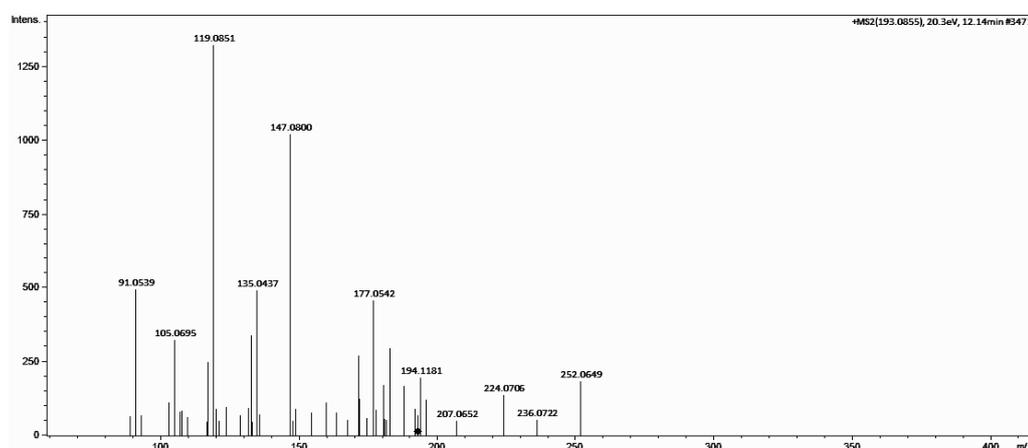


Figura S36: Espectro MS/MS atribuído ao composto 2,7-Dimethyl-2-pentyl-4-oxaspiro[2.4]hept-6-en-5-one identificado putativamente.

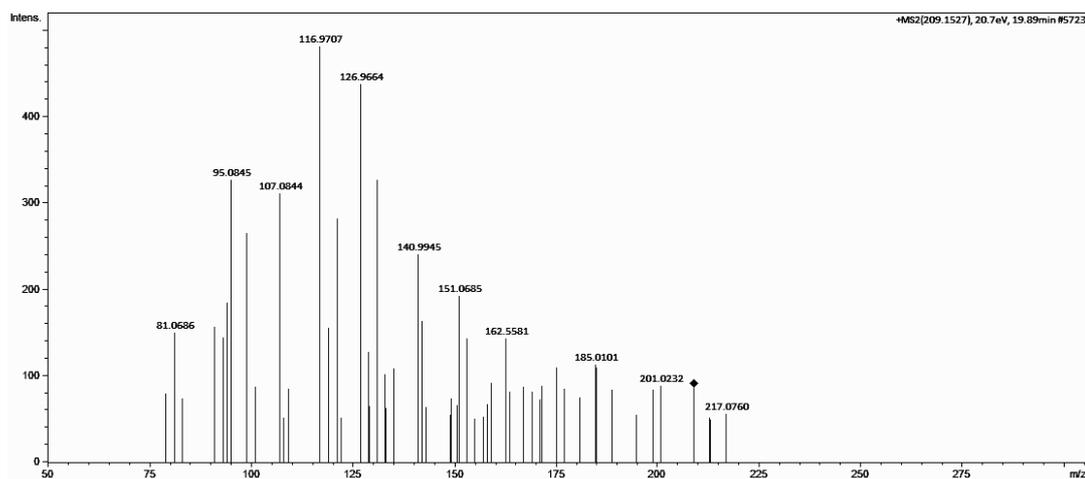


Figura S37: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido sinápico identificado putativamente.

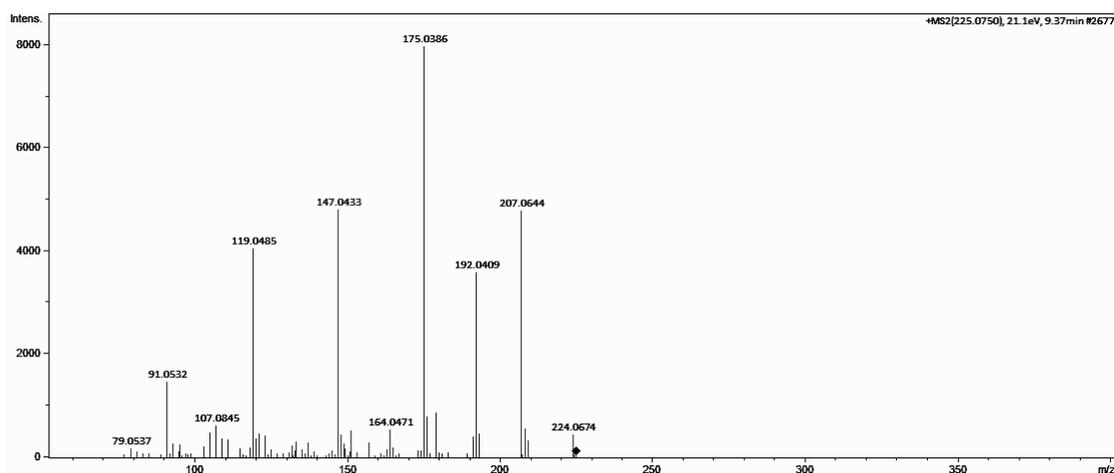


Figura S38: Espectro MS/MS atribuído ao composto diphenylamine identificado putativamente.

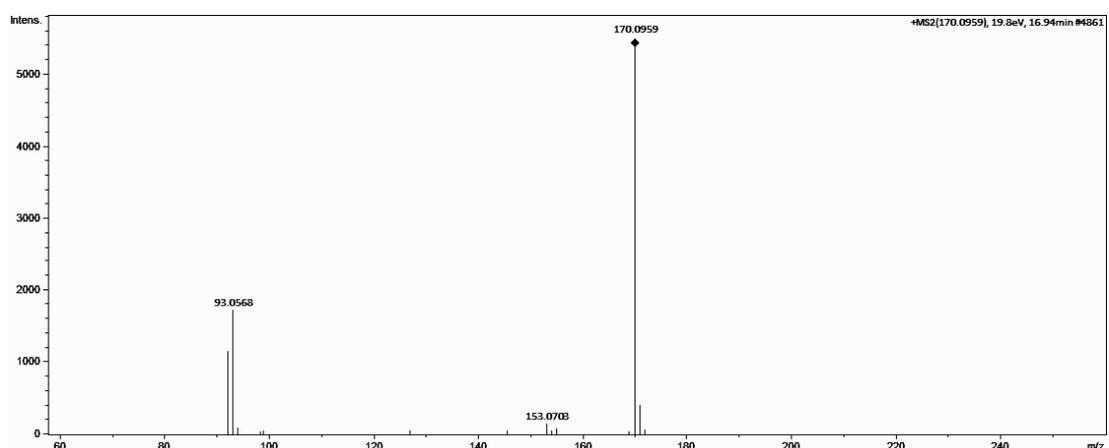


Figura S39: Espectro MS/MS atribuído ao composto gamma-decalactone identificado putativamente.

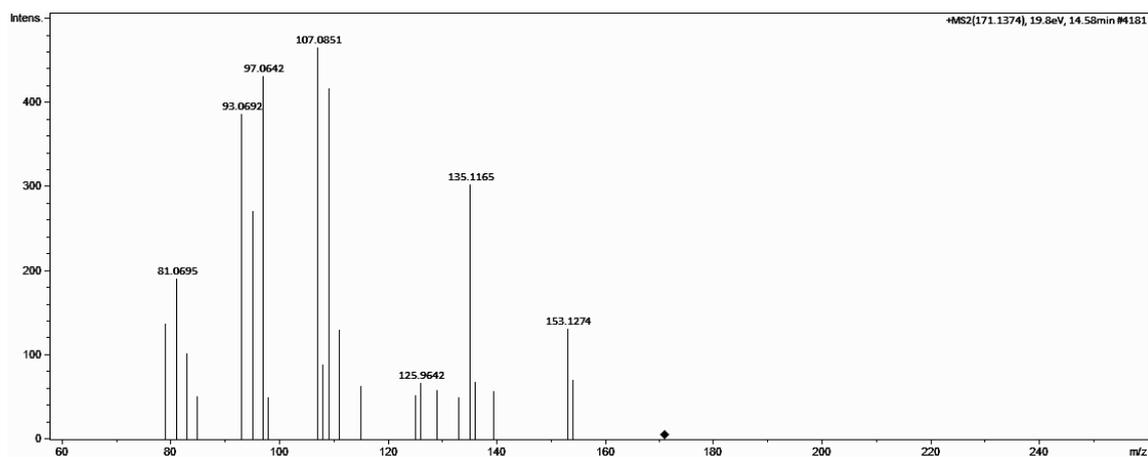


Figura S40: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido 2-Oxo-4-fenilbutírico identificado putativamente.

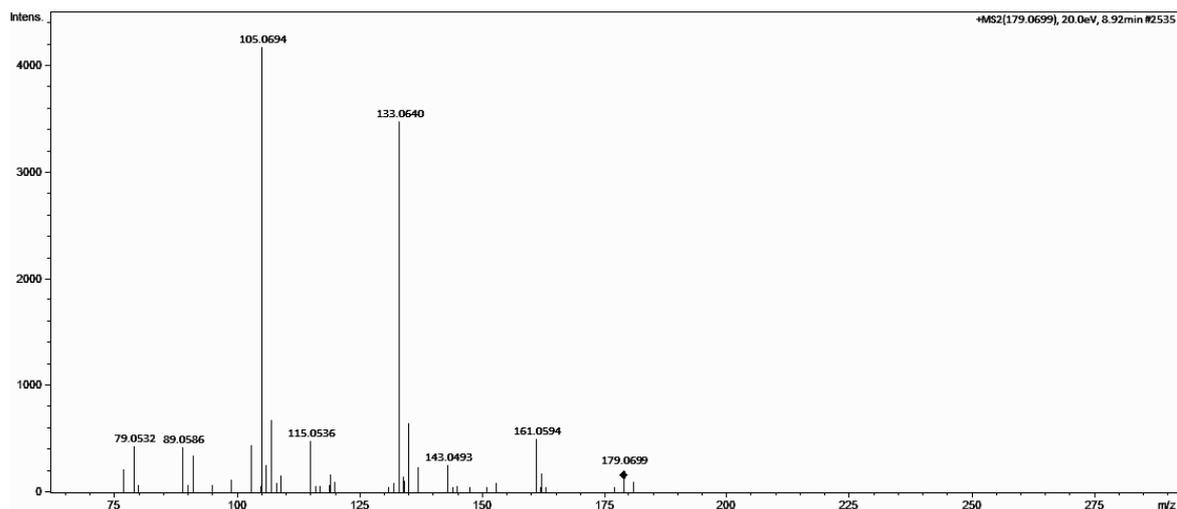


Figura S41: Espectro MS/MS atribuído ao composto ácido p-acetaminobenzoico identificado putativamente.

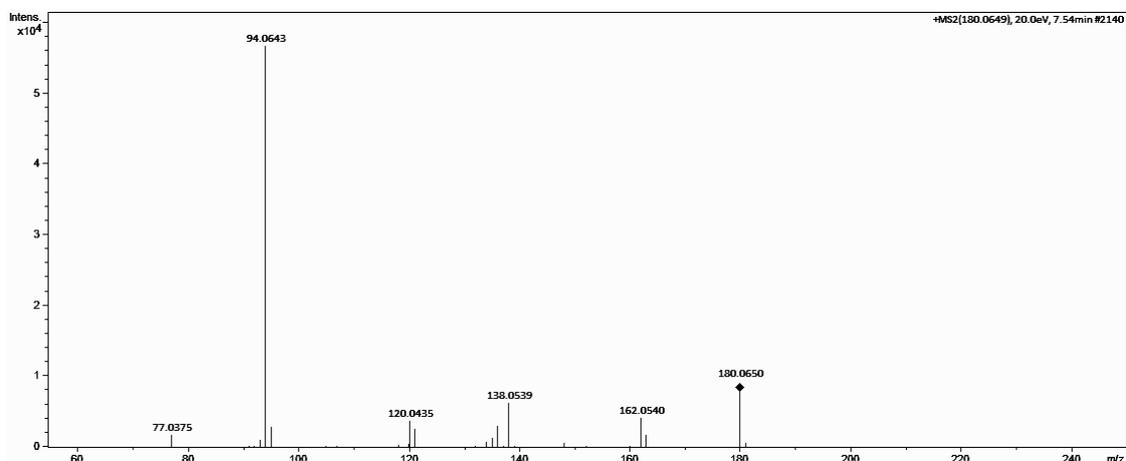


Figura S42: Espectro MS/MS atribuído ao composto N6-(delta2-isopentenyl)-adenine identificado putativamente.

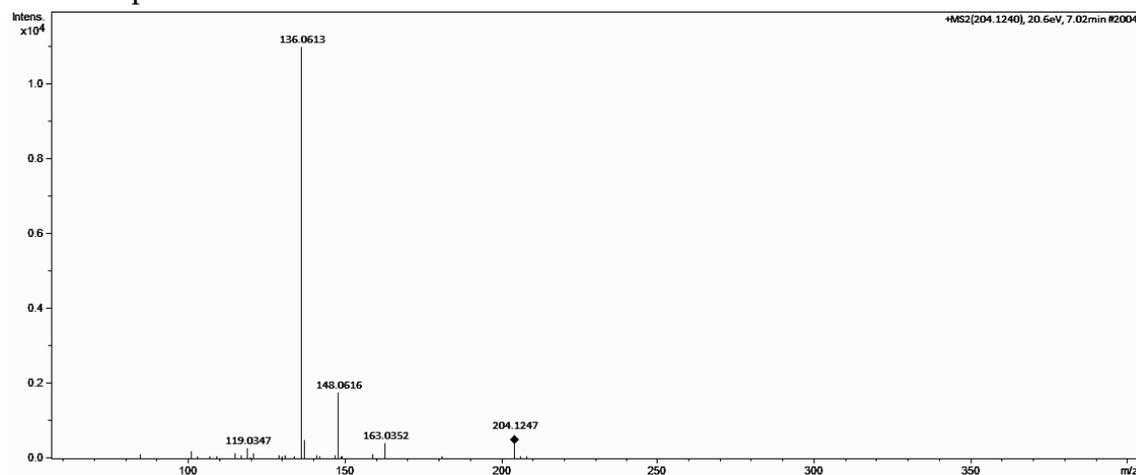


Figura S43: Espectro MS/MS atribuído ao composto viridicatina identificado putativamente.

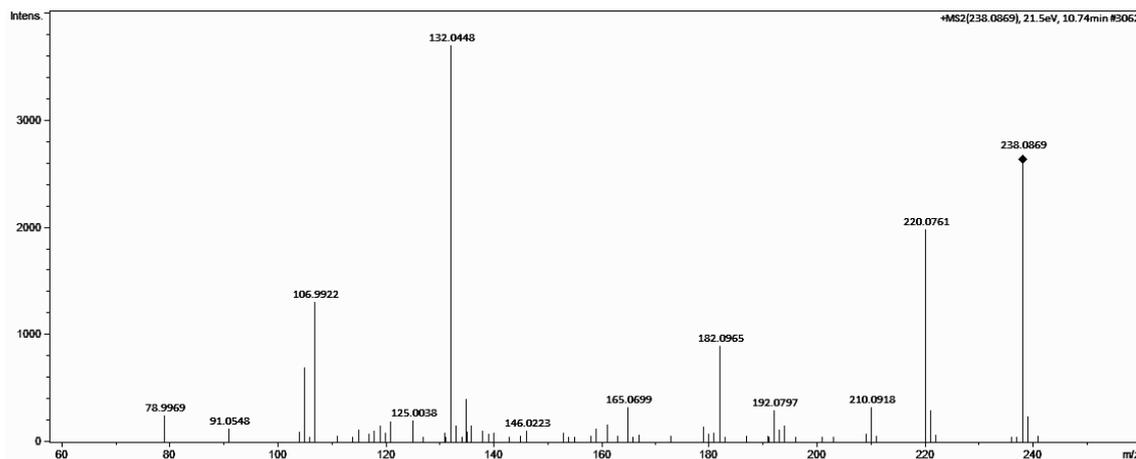


Figura S44: Espectro MS/MS atribuído ao composto viridicatol identificado putativamente.

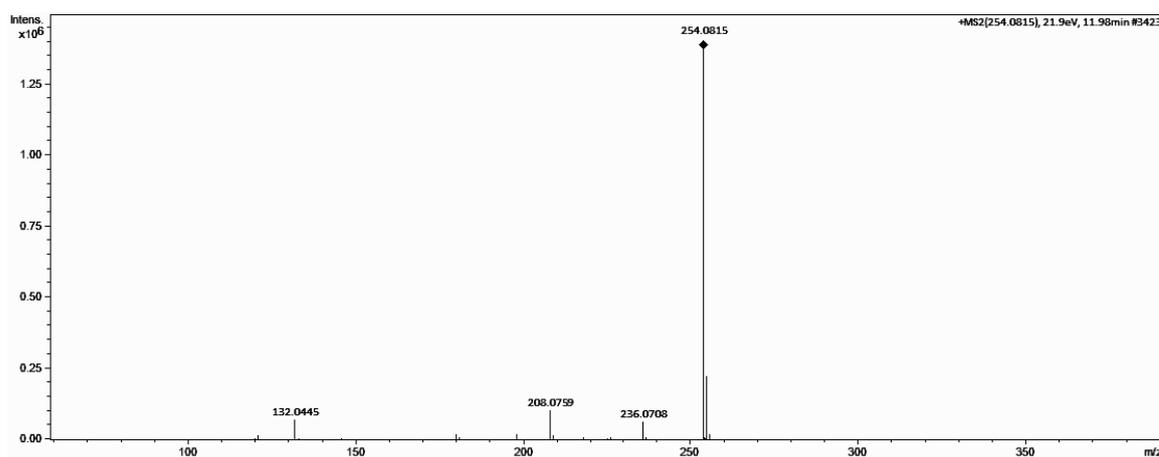


Figura S45: Espectro MS/MS atribuído ao composto (1H)-Quinolinone, 3,4-dihidro-3,4-dihidroxy-4- phenyl- identificado putativamente.

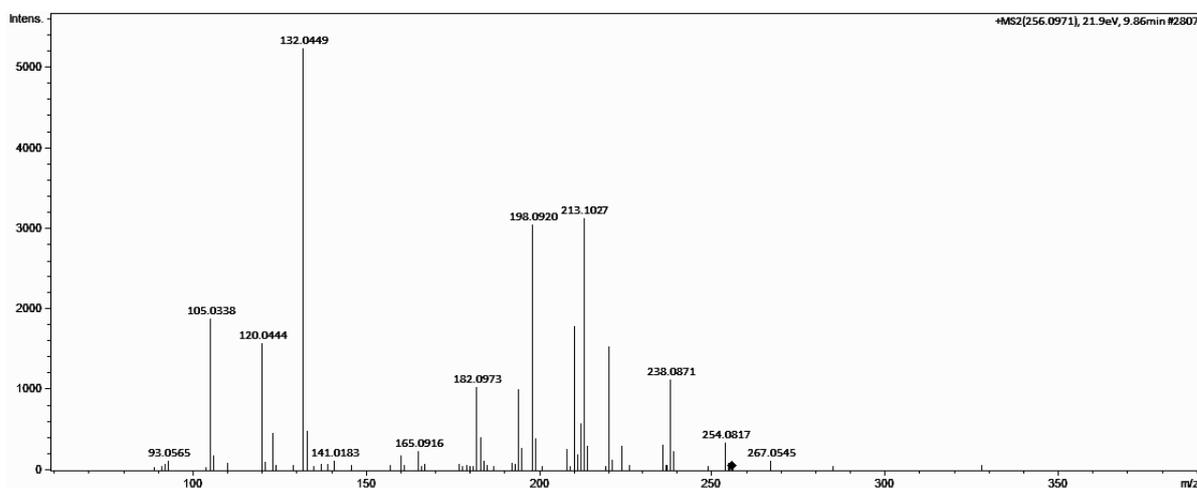


Figura S46: Espectro MS/MS atribuído ao composto ciclopetina identificado putativamente.

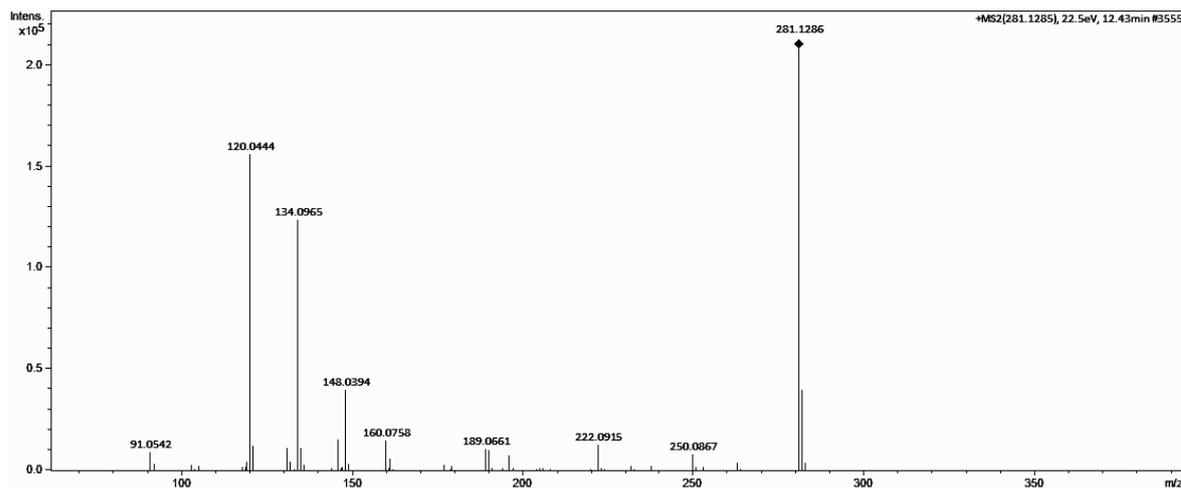


Figura S47: Espectro MS/MS atribuído ao composto ciclopenina identificado putativamente.

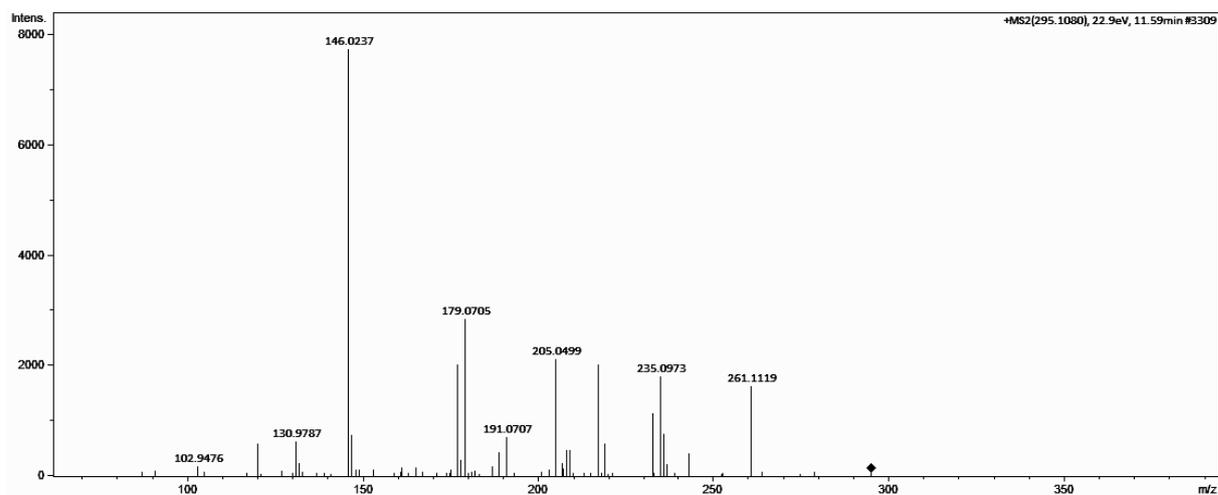


Figura S48: Espectro MS/MS atribuído ao composto ciclopenol identificado putativamente.

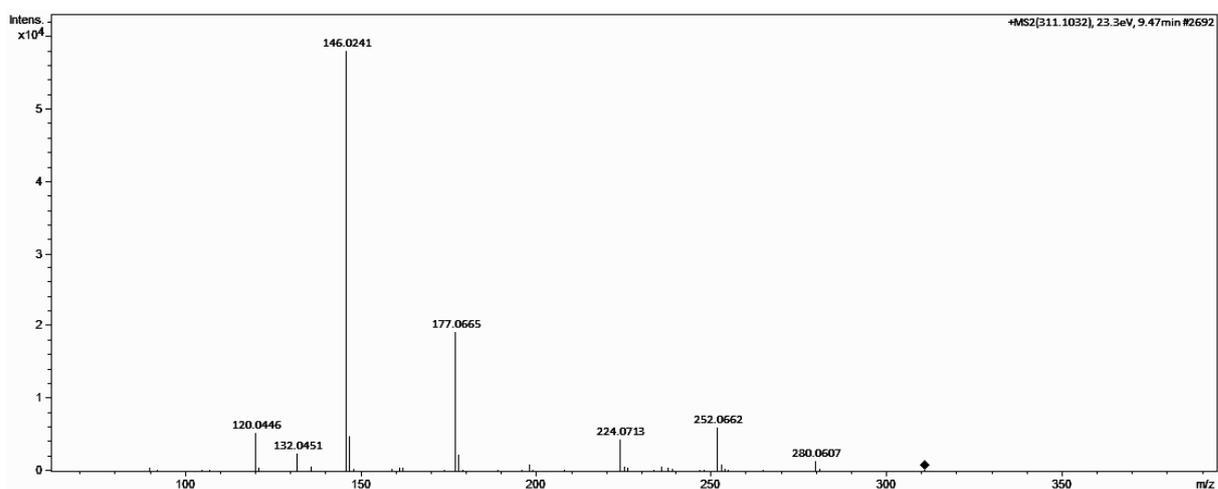


Figura S49: Espectro MS/MS atribuído ao composto avenantramida B identificado putativamente.

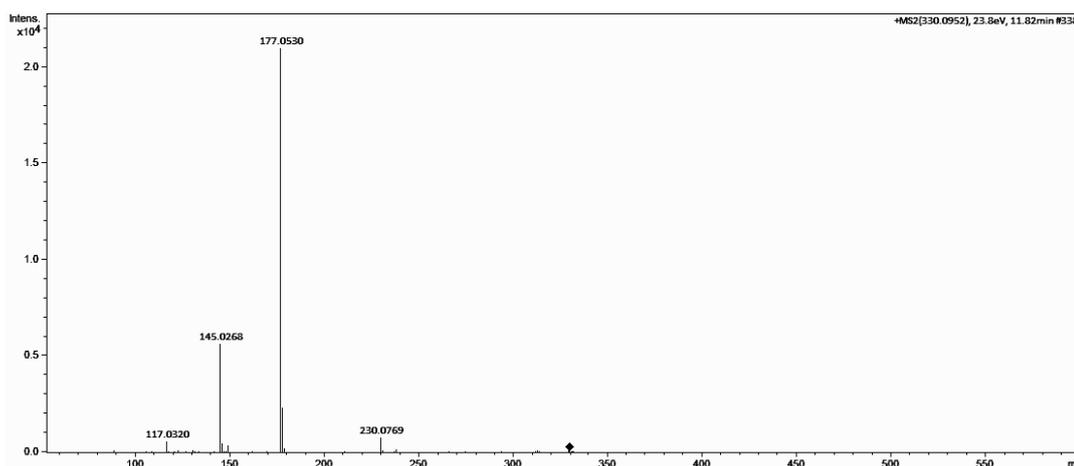


Figura S50: Espectro MS/MS atribuído ao composto Fusaperazine E identificado putativamente.

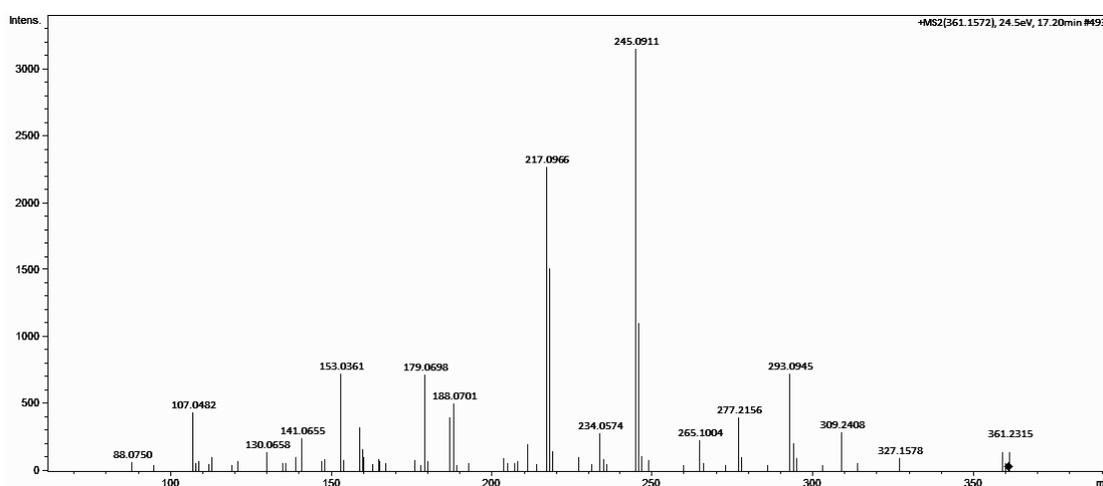


Figura S51: Espectro MS/MS atribuído ao composto roquefortine C identificado putativamente.

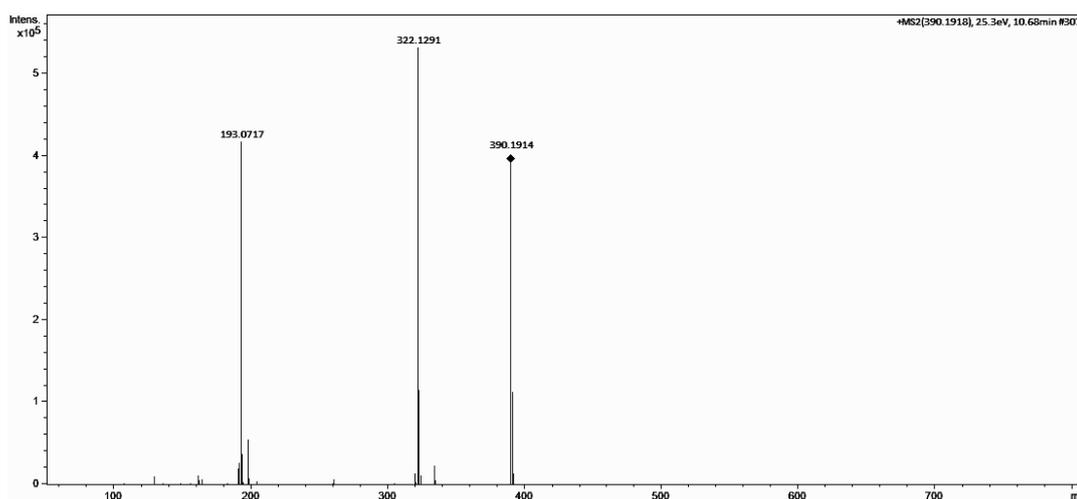
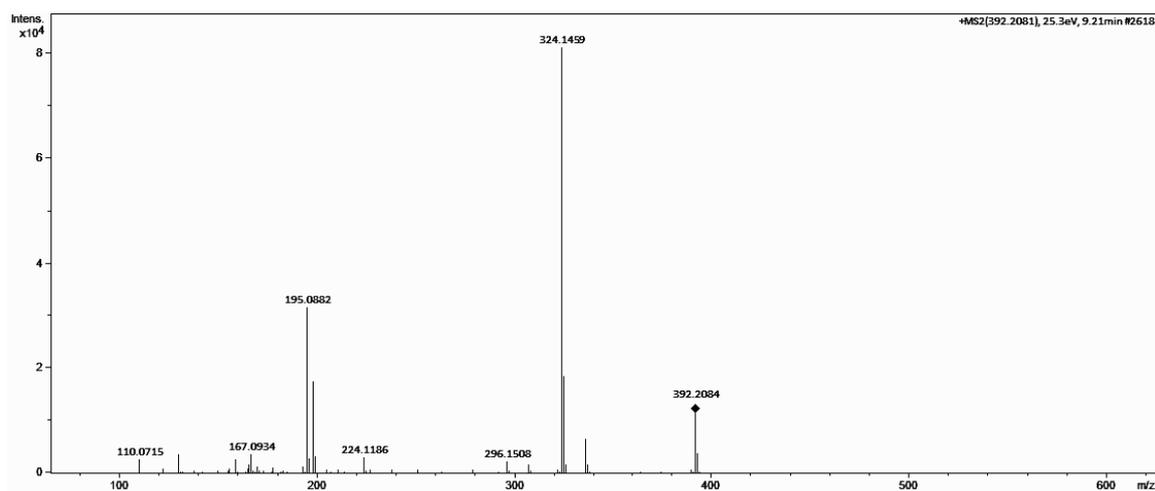


Figura S52: Espectro MS/MS atribuído ao composto roquefortine D identificado putativamente.



CONCLUSÕES FINAIS

O trabalho desenvolvido apresentou os fungos endofíticos isolados de *A. jahnii* como recurso extremamente importante para o segmento biotecnológico. Os extratos oriundos destes endófitos são fonte rica em metabólitos inéditos e/ou biologicamente ativos. Os metabólitos secundários apresentam propriedades com imenso valor agregado, podendo ser aplicado em diferentes áreas, como a farmacológica, de alimentos e ambiental. Além disso, os fungos endofíticos apresentam várias vantagens, abordadas no decorrer do trabalho, que os classificam como fontes com potencial mais significativo, quando comparados a recursos vegetais.

As estratégias de análises do perfil metabolômico das matrizes biológicas, aqui testadas, se mostraram eficientes e rápidas na obtenção dos resultados. Estas metodologias possibilitaram a obtenção de dados nunca antes publicados, além de oferecer novos insights, sobre questões pouco exploradas, como a comparação metabolômica de extratos de endofíticos e de seu hospedeiro.

Por fim, além da riqueza de informações apresentadas, este trabalho abre um caminho para pesquisas futuras com esta coleção de fungos endofíticos, que poderão ser desenvolvidas de forma mais detalhada e conveniente. E proporcionarão com certeza, resultados tão significativos quanto os apresentados, porém de forma mais rápida, a partir da fundamentação com o fluxo de trabalho aqui desenvolvido e com os dados obtidos nesta pesquisa.