UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MIRELLE TAKAKI

**Estudo metabolômico de fungos do gênero *Colletotrichum* e de
organismos marinhos produtores de tambjamins**

São Carlos
2020

MIRELLE TAKAKI

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**Estudo metabolômico de fungos do gênero *Colletotrichum* e de organismos
marinhos produtores de tambjamins**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2020

Dedico este trabalho aos meus pais, Cássio e Devanir (*in memoriam*),
que são os meus exemplos e os principais responsáveis pelo meu desejo
de ser, a cada dia, uma pessoa melhor, em todos os aspectos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Berlinck, pela oportunidade de fazer o doutorado sob sua orientação, por todo conhecimento compartilhado, as discussões, conversas e por ter contribuído muito para o meu crescimento profissional;

Ao meu supervisor no exterior, Prof. Dr. Roger Linington, por ter aceito me receber em seu laboratório por um ano, por toda atenção, preocupação, discussões e conversas enriquecedoras e por todos os ensinamentos;

À Prof. Dra. Simone Possedente de Lira, da ESALQ-USP, e seus alunos, pelo isolamento e identificação das linhagens de *Colletotrichum* endofíticas estudadas neste trabalho. Agradeço também ao Laboratório de Fungos Fitopatogênicos, ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo e à Dra. Liliane de Diana Teixeira (ESALQ-USP), por cederem as cepas de *Colletotrichum* fitopatogênicas;

Ao Dr. Vinicius Padula pela coleta e identificação dos organismos marinhos estudados neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Richmong Sarpong (University of California Berkeley) e seu aluno Nozomu Nakashima pela síntese das tambjamins;

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira pela realização das análises de RMN e por gentilmente ceder o equipamento de LC-SPE-UV-RMN. Agradeço também à aluna Jéssica Amaral pela grande ajuda nas análises de LC-SPE-UV-RMN;

À Prof. Dra. Janete Harumi Yariwake por gentilmente ceder o equipamento de HPLC com detector de fluorescência (Proc. FAPESP 2002/00943-2 e 2006/59457-6). Agradeço também ao técnico Benedito Manoel dos Santos por todo auxílio;

Ao Me. André Luiz Tognon e à Dra. Sylvana Cardoso Miguel Agostinho pela realização das análises de RMN na CAQI (USP);

A Dra. Fabiana Tessari Martinelli, por toda ajuda, disponibilidade e amizade. Agradeço também à Dra. Karin Bandeira de Camargo por todo auxílio;

Aos colegas do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos pela ajuda e amizade;

Aos meus grandes amigos Laura Lôca, Vítor Freire, Juliano Slivinski e Jairo Quintana por toda amizade, carinho, preocupação, discussões e ideias e por tornarem os dias de trabalho mais leves e divertidos;

Aos ex-integrantes do QOSBio por quem tenho um carinho imenso Karen Nicácio, Ariane Bertonha, Everton Ferreira, Camila Crnkovic, Julie Paulin e Raquel Urano por toda ajuda e amizade;

Aos meus queridos amigos do Linington Lab Julianne Coloma, Trevor Clark, Clair Fergusson, Cat McCaughey, Nicole LeGrow, Dasha Iskakova, Mercia Valentine, Dennis Liu, Jeff van Santen, Sanghoon Lee e Joe Egan por toda ajuda e por terem sido tão receptivos, gentis e carinhosos comigo;

Ao meu grande amigo Jake Haeckl por toda ajuda desde o meu primeiro dia na SFU, amizade, carinho, preocupação e pelas incontáveis e profundas discussões e conversas sobre metabolômica;

Aos meus pais, Cássio e Devanir (*in memoriam*), pelo amor incondicional, por todo apoio, por sempre acreditarem na minha capacidade e por nunca terem medido esforços para que eu realizasse os meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão Alexandre e à minha cunhada Glaucia pelo amor, preocupação, por toda ajuda e apoio.

Ao Leandro, por todo amor, carinho, companheirismo, apoio e incentivo.

Agradeço imensamente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela Bolsa de Doutorado no País (Proc. FAPESP 2015/14114-3) e pela Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (Proc. FAPESP 2018/03679-8), que possibilitaram a aquisição de materiais, a realização do meu estágio no exterior, a participação em eventos científicos e que foram de extrema importância para o meu crescimento profissional.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro (Código de Financiamento 001) e pela bolsa concedida no início do meu doutorado (Proc. 1480655);

À Seção de Pós-Graduação do IQSC, por toda ajuda e atenção;

Por fim, agradeço à todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho.

MUITÍSSIMO OBRIGADA!

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

RESUMO

TAKAKI, M. **Estudo metabolômico de fungos do gênero *Colletotrichum* e de organismos marinhos produtores de tambjamins.** 2020. 248 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

O presente trabalho descreve o estudo metabolômico de fungos do gênero *Colletotrichum* e de organismos marinhos produtores de tambjamins *Virididentula dentata*, *Tambja stegosauriformis*, *Tambja brasiliensis* e *Roboastra ernsti*. Fungos do gênero *Colletotrichum* causam doenças em uma grande variedade de plantas de diversas famílias. Metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos podem constituir parte do processo de virulência associada à sua fitopatogenicidade. Apesar de muitos metabólitos de linhagens de *Colletotrichum* já terem sido isolados e identificados, a fitopatogenicidade associada a fungos deste gênero ainda não está bem estabelecida. Com o intuito de se investigar a diferença no metabolismo de linhagens endofíticas e fitopatogênica de *Colletotrichum* spp., 25 isolados de *Colletotrichum* foram investigados, dentro os quais 16 eram endofíticos e 9 fitopatogênicos. Os extratos dos meios de cultivo foram fracionados e analisados por UPLC-IMS-QToF-HRMS. Os dados brutos foram processados empregando-se ferramentas *in-house* e *molecular networking*. A avaliação dos resultados permitiu concluir que linhagens endofíticas e fitopatogênicas de *Colletotrichum* spp. possuem metabolismo consideravelmente diferente. Linhagens endofíticas produzem compostos que são comuns a varias linhagens do grupo; já linhagens fitopatogênicas produzem compostos mais específicos a cada um dos isolados. O processo de desreplicação dos resultados de *molecular networking* utilizando-se uma biblioteca *in-house* de compostos isolados de *Colletotrichum* spp. permitiu a identificação de 5 compostos que apresentam atividade fitotóxica nas amostras relacionadas às linhagens fitopatogênicas. Tais resultados são forte indicativo de que a fitopatogenicidade de linhagens de *Colletotrichum* podem estar associada à produção de compostos fitotóxicos.

Tambjamins são um grupo de alcalóides quimicamente relacionados à prodigiosina e prodigionina, isoladas de bactérias e organismos marinhos como ascídias, briozoários e nudibrânquios. Além de apresentarem atividades biológicas

diversificadas, as tambjamins estão possivelmente relacionadas a mecanismos de defesa dos organismos a partir dos quais são isoladas. Diversos estudos de organismos marinhos produtores de tambjamins envolvidos em relações presa-predador demonstraram que estes alcalóides foram detectados nos extratos tanto das presas quanto dos predadores. Nesse sentido, foram obtidos os extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*. A partir da análise dos extratos orgânicos e aquosos dos organismos marinhos por HPLC-UV-ELSD-MS e UPLC-QToF-MS/MS, foi possível confirmar a presença de 6 tambjamins conhecidas: tambjamins A, C, D e K e os aldeídos das tambjamins A e B. A quantificação do conteúdo de tambjamins nas amostras de diferentes invertebrados por HPLC com detector de fluorescência demonstrou que *T. stegosauriformis* e *T. brasiliensis* possuem conteúdo de tambjamins de 8 e 14 vezes superiores à sua presa *V. dentata*, enquanto que *R. ernsti* possui concentração de tambjamins entre 3 e 5 vezes superiores à suas presas *T. brasiliensis* e *T. stegosauriformis*. Adicionalmente, análises metabolômicas não-direcionadas do extrato do manto de *R. ernsti* permitiram verificar a presença de 6 novas tambjamins. A síntese, purificação e caracterização das novas tambjamins permitiu confirmar a estrutura de uma das tambjamins inéditas.

Palavras-chave: metabolômica, *Colletotrichum*, fungos endofíticos, fungos fitopatogênicos, tambjamins, organismos marinhos.

ABSTRACT

TAKAKI, M. **Metabolomic study of fungi of the genus *Colletotrichum* and tambjamines-producing marine organisms**. 2020. 248 p. Thesis (PhD) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

The present study describes the metabolomic investigation of fungi of the genus *Colletotrichum* and tambjamine-producing marine organisms *Virididentula dentata*, *Tambja stegosauriformis*, *Tambja brasiliensis* and *Roboastra ernsti*. Fungi belonging to the genus *Colletotrichum* cause disease in a wide variety of plants from different families. Secondary metabolites produced by these microorganisms can be part of the virulence process associated with their phytopathogenicity. Although many metabolites of *Colletotrichum* spp. have already been isolated and identified, the phytopathogenicity associated with fungi of this genus is not yet well established. In order to investigate the metabolic differences between endophytic and phytopathogenic strains of *Colletotrichum* spp., culture media produced by twenty-five isolates of *Colletotrichum* spp. were investigated, 16 of which were endophytic and 9 were phytopathogenic. The culture media were fractionated and analyzed by UPLC-IMS-QToF-HRMS. The raw data were processed using in-house tools and molecular networking. The evaluation of the results allowed us to conclude that endophytic and phytopathogenic strains of *Colletotrichum* spp. have considerably different metabolism. Endophytic strains produce compounds that are common to several strains in the group; phytopathogenic strains produce compounds more specific to each isolate. Dereplication of the GNPS exported results using an in-house library of compounds isolated from *Colletotrichum* fungi combined with *in-silico* fragmentation tools allowed the identification of 5 compounds in samples related to phytopathogenic strains. Those compounds display phytotoxic activity. Such results are a strong indication that the phytopathogenicity of *Colletotrichum* fungi may be associated with the production of phytotoxic compounds.

Tambjamines are a group of alkaloids chemically related to prodigiosin and prodiginine, isolated from bacteria and marine organisms such as ascidians, bryozoans and nudibranchs. In addition to presenting diversified biological activities, tambjamins are possibly related to the defense mechanisms of the organisms from which they are isolated. Several studies of tambjamine-producing marine organisms

involved in prey-predator relationships have shown that these alkaloids were detected in extracts from both prey and predators. In this sense, extracts of *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* and *R. ernsti* were obtained. The analysis of organic and aqueous extracts from marine organisms by HPLC-UV-ELSD-MS and UPLC-QToF-MS/MS allowed us to confirm the presence of 6 known tambjamines: tambjamines A, C, D and K, and the aldehydes of the tambjamines A and B. The quantification of tambjamine content in samples from different invertebrates performed by HPLC with a fluorescence detector demonstrated that *T. stegosauriformis* and *T. brasiliensis* have tambjamines content 8 and 14 times higher than their prey *V. dentata*, while *R. ernsti* has tambjamines concentration between 3 and 5 times higher than their prey *T. brasiliensis* and *T. stegosauriformis*. Additionally, non-targeted metabolomic analyses of the extract from the mantle of *R. ernsti* allowed to verify the presence of 6 new tambjamines. The synthesis, purification and characterization of the new tambjamines allowed to confirm the structure of one of the unprecedented tambjamines.

Keywords: metabolomics, *Colletotrichum*, endophytic fungi, phytopathogenic fungi, tambjamines, marine organisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Criação das redes moleculares na plataforma GNPS: <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>	35
Figura 2 - Sintomas de antracnose causados por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (A e B) e <i>C. acutatum</i> (C): (A) amêndoas – frutos não-maduros; (B) abacate – fruto maduro; e (C) morangos – frutos maduros e não-maduros.	42
Figura 3 - Sintomas da podridão vermelha causada por <i>Colletotrichum falcatum</i> em cana-de-açúcar.	43
Figura 4 - Cromatogramas da fração 100% CH ₂ Cl ₂ dos experimentos de crescimento e produção de metabólitos pela linhagem endofítica de <i>Colletotrichum</i> L3 durante 7, 14, 21 e 28 dias de crescimento, em modo estático a 25 °C (condições 5 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D), respectivamente).	63
Figura 5 - Cromatogramas da fração AcOEt/MeOH (1:1) dos experimentos de crescimento e produção de metabólitos pela linhagem endofítica de <i>Colletotrichum</i> L6 empregando as condições de crescimento 2 (A – agitação a 150 rpm, temperatura de 25°C, 10 dias de incubação) e 5 (B – modo estático, temperatura de 25°C, 7 dias de incubação).	64
Figura 6 - Distribuição fatorial de Comp[1] versus Comp[2] para os dados obtidos a partir dos cromatogramas das amostras que foram extraídas e fracionadas utilizando-se a metodologia 1.	66
Figura 7 - Cromatogramas da fração 100% CH ₂ Cl ₂ oriundas do fracionamento do extrato da linhagem endofítica de <i>Colletotrichum</i> L3 empregando-se a metodologia 1: (A) replicata 1, (B) replicata 2 e (C) replicata 3.	67
Figura 8 - Distribuição fatorial de Comp[1] versus Comp[2] para os dados obtidos a partir dos cromatogramas das amostras que foram extraídas e fracionadas utilizando-se a metodologia 2.	68
Figura 9 - Cromatogramas da fração 100% iPrOH oriundas do fracionamento do extrato da linhagem endofítica de <i>Colletotrichum</i> L3 empregando-se a metodologia 2 e extraída com a mistura de solventes B (iPrOH/EtOH/MeCN (1:1:1) + TFA 1%): (A) replicata 1, (B) replicata 2 e (C) replicata 3.	69

Figura 10 - Gráficos de scores de Comp[1] <i>versus</i> Comp[2] para a fração A (100% CH ₂ Cl ₂) dos extratos de meio de cultivo das linhagens L1, L4, L7, L10, L13, L16, L17, L19, L21, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br).	71
Figura 11 - Gráficos de scores de Comp[1] <i>versus</i> Comp[2] para a fração D (AcOEt/MeOH (1:1)) dos extratos de meio de cultivo das linhagens L1, L4, L7, L10, L13, L16, L17, L19, L21, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br).....	72
Figura 12- Gráficos de scores de Comp[1] <i>versus</i> Comp[2] de todas as frações dos extratos de meio de cultivo das linhagens L1, L5, L10, L15, L17, L20, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br).	73
Figura 13 - Rede molecular contendo as frações de <i>Colletotrichum</i> endofíticas e fitopatogênicas e os brancos analíticos e do meio de cultivo.	76
Figura 14 - Gráficos de scores de Comp[1] <i>versus</i> Comp[2] para o experimento 1 - fração B (CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 1:1) dos extratos de meio de cultivo das linhagens de <i>Colletotrichum</i> e dos brancos dos meios de cultivo, além dos brancos analíticos.....	79
Figura 15 - Gráficos de scores de Comp[1] <i>versus</i> Comp[2] para o experimento 2 - extratos de meio de cultivo das linhagens de <i>Colletotrichum</i> , brancos dos meios de cultivo e brancos analíticos.	80
Figura 16 - Gráficos de scores de Comp[1] <i>versus</i> Comp[2] para o experimento 3 - extratos de meio de cultivo das linhagens de <i>Colletotrichum</i> , brancos dos meios de cultivo e brancos analíticos.	81
Figura 17 - Gráfico PLS-DA do Comp[4] <i>versus</i> Comp[5] para o experimento 3 - extratos de meio de cultivo das linhagens de <i>Colletotrichum</i> , brancos dos meios de cultivo e brancos analíticos.	84
Figura 18 - Gráfico de coeficiente de regressão obtido a partir da análise de PLS-DA para o experimento 3.	85
Figura 19 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> para o experimento 3 após remoção dos brancos.	86
Figura 20 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas do experimento 3, após remoção dos brancos.	87

Figura 21 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras fitopatogênicas do experimento 3, após remoção dos brancos.	87
Figura 22 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas do experimento 3, após remoção dos brancos.	88
Figura 23 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> para o experimento 2 após remoção dos brancos.	89
Figura 24 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> para o experimento 1 após remoção dos brancos.	90
Figura 25 - Rede molecular do experimento 3 visualizada empregando-se o software <i>Cytoscape</i>	92
Figura 26 - Rede molecular do experimento 3 empregando-se arquivo <i>metadata</i>	95
Figura 27 - Rede molecular do experimento 2 empregando-se arquivo <i>metadata</i> visualizada empregando-se o software <i>Cytoscape</i>	96
Figura 28 - Subrede molecular do experimento 1 empregando-se arquivo <i>metadata</i> e visualizada no software <i>Cytoscape</i>	98
Figura 29 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de separação cromatográfica da amostra EE, cromatograma de UV da fração de interesse EE7B no comprimento de onda de 254 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas de baixa resolução do composto <i>m/z</i> 568, cujo pico está destacado em vermelho.	106
Figura 30 - Espectro de massas de alta resolução da do composto <i>m/z</i> 568, detectado na fração EE7B.	107
Figura 31 - Espectros de absorção na região do UV-Vis e de massas de baixa resolução da tambjamina A, detectada na fração 1R-1C do extrato do manto de <i>R. ernsti</i>	120
Figura 32 - Espectros de absorção na região do UV-Vis e de massas de baixa resolução da tambjamina C, detectada na fração 1R-5 do extrato do manto de <i>R. ernsti</i>	120
Figura 33 - Espectros de absorção na região do UV-Vis e de massas de baixa resolução da tambjamina 2, detectada na fração 1R-1E do extrato do manto de <i>R. ernsti</i>	123
Figura 34 - Rota de fragmentação da tambjamina C.	124

Figura 35 - Rota de fragmentação da tambjamina K.....	125
Figura 36 - Espectros de massas MS/MS de alta resolução para o padrão da tambjamina C (A) e para o composto detectado na fração 1R-1E (B) do extrato do manto de <i>R. ernsti</i>	126
Figura 37 - Espectros de massas MS/MS de alta resolução para o padrão da tambjamina D (A) para o composto detectado na fração 1R-1E (B) do extrato do manto de <i>R. ernsti</i>	126
Figura 38 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 4, m/z 290,1496, detectado na fração 1R-2.....	129
Figura 39 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 4, m/z 290,1496, detectada na fração 1R-2.	129
Figura 40 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de separação cromatográfica da amostra NN120, cromatograma de UV da fração de interesse NN120A no comprimento de onda de 370 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas de baixa resolução da tambjamina 1, cujo pico está destacado em vermelho.	131
Figura 41 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 1 na fração 1R-1E do extrato de <i>R. ernsti</i> e na fração resultante da purificação da amostra NN120A.	133
Figura 42 - Cromatograma de UV da amostra NN89 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 2.	135
Figura 43 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 2.	137
Figura 44 - Cromatograma de UV no comprimento de onda de 404 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da amostra NN35 antes da etapa de purificação. O pico cromatográfico da tambjamina 3 está destacado em vermelho.	139
Figura 45 - Fluxograma com o rendimento em massa e cromatograma de UV das frações resultantes da separação de NN35 (A) no comprimento de onda de 404 nm (B).	140
Figura 46 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra NN75 por HPLC-UV (A), cromatograma de UV da fração de interesse NN75A no comprimento de onda de 370 nm (B), o	

espectro de absorção no UV (C) e o espectro de massas (D) da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	142
Figura 47 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 4.	144
Figura 48 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 4 detectada na fração 1R-1E do extrato de <i>R. ernsti</i> e na amostra NN75A....	145
Figura 49 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de separação cromatográfica da amostra NN140 (A), cromatograma de UV da fração de interesse NN140A no comprimento de onda de 370 nm (B), o espectro de absorção no UV (C) e o espectro de massas (D) da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	147
Figura 50 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 4 detectada nas frações NN75A e NN140A3.....	149
Figura 51 - Cromatogramas (A) e espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 4 na fração 1R-2 do extrato de <i>R. ernsti</i> e nas frações sintéticas NN75A e NN140A3.	151
Figura 52 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra NN132 por HPLC-UV.....	152
Figura 53 - Cromatogramas de UV da amostra NN132C no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 5. O pico cromatográfico que corresponde ao composto de interesse está destacado em vermelho.	153
Figura 54 - Cromatogramas de UV da amostra NN132C2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 5, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.	154
Figura 55 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 5.	156
Figura 56: Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 5 na fração 1R-4 do extrato de <i>R. ernsti</i> e na fração NN132C. O pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha na análise da amostra 1R-4.....	157
Figura 57 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra AB33 por HPLC-UV.	158

Figura 58 - Cromatograma de UV da amostra AB33 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6. O pico cromatográfico que corresponde ao composto de interesse está destacado em vermelho.	159
Figura 59 - Cromatograma no UV da fração AB33C2 nos comprimentos de onda de 280 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.	160
Figura 60 - Cromatograma no UV da fração AB33D2 no comprimento de onda de 280 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.	161
Figura 61 - Cromatograma no UV da fração AB33E2 nos comprimentos de onda de 280 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.	162
Figura 62 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 6.....	164
Figura 63 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) das análises por UPLC-ESI-QToF-MS/MS da tambjamina 6 detectada na fração 1R-4 do extrato de <i>R. ernsti</i> e na amostra AB33E. O pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha na análise da amostra 1R-4.	165
Figura 64 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da fração 1R-4 do extrato de <i>R. ernsti</i> e das frações sintéticas NN132C e AB33E. Na análise da amostra 1R-4, o pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha,	167
Figura 65 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra NN126 por HPLC-UV.....	169
Figura 66 - Cromatograma de UV da amostra NN126A8 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico está destacado em vermelho.	170
Figura 67 - Cromatograma de UV da amostra NN126A9 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico está destacado em vermelho.	171

Figura 68 - Cromatograma de UV da amostra NN126A10 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico está destacado em vermelho.	172
Figura 69 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da análise por UPLC-QToF-MS/MS da tambjamina 7 na fração 1R-1C do extrato de <i>R. ernsti</i> e na fração sintética NN126A10.	173
Figura 70 - Distribuição das tambjamins nas amostras de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i> visualizada empregando-se o software Gephi.....	175
Figura 71 - Cromatograma de fluorescência do mix de padrões no $\lambda_{\text{emissão}}$ de 440 nm.....	178
Figura 72 - Curva analítica por padrão externo da tambjamina C.	179
Figura 73 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas, experimento 2, após remoção dos brancos.	191
Figura 74 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras fitopatogênicas, experimento 2, após remoção dos brancos.	192
Figura 75 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas, experimento 2, após remoção dos brancos.	192
Figura 76 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas, nas diferentes frações do experimento 1, após remoção dos brancos.....	193
Figura 77 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras fitopatogênicas, nas diferentes frações do experimento 1, após remoção dos brancos.	193
Figura 78 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas, nas diferentes frações do experimento 1, após remoção dos brancos.....	194
Figura 79 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente na fração A do experimento 1, após remoção dos brancos.....	194

Figura 80 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente na fração B do experimento 1, após remoção dos brancos.....	195
Figura 81 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente na fração C do experimento 1, após remoção dos brancos.....	195
Figura 82 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente na fração D do experimento 1, após remoção dos brancos.....	196
Figura 83 - Gráfico <i>Sample processing order versus Experimental analyte id</i> contendo os analitos detectados exclusivamente na fração E do experimento 1, após remoção dos brancos.....	196
Figura 84 - Rede molecular completa do experimento 1 empregando-se arquivo <i>metadata</i> e visualizada no software <i>Cytoscape</i>	197
Figura 85 - Cromatograma de UV da fração 1R-13 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina A, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	198
Figura 86 - Cromatograma de UV da fração 1R-5 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina C, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	199
Figura 87 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina D, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	200
Figura 88 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina K, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	201
Figura 89 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) do aldeído da tambjamina A, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	202
Figura 90 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas 9C) do aldeído da tambjamina B, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.	203

Figura 91 - Cromatograma de UV da fração 1R-15 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 1, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.....	204
Figura 92 - Cromatograma de UV da fração 1R-1C no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 2, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.....	205
Figura 93 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 3, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.....	206
Figura 94 - Cromatograma de UV da fração 1R-1E no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.....	207
Figura 95 - Cromatograma de UV da fração 1R-4 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 5/6, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.....	208
Figura 96 - Cromatograma de UV da fração 1R-1C no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.....	209
Figura 97 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 1, m/z 312, detectado na fração 1R-1E.	210
Figura 98 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 1, m/z 312, detectada na fração 1R-1E.....	210
Figura 99 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 2, m/z 298, detectado na fração 1R-1B.	211
Figura 100 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 2, m/z 298, detectada na fração 1R-1B.	211
Figura 101 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 3, m/z 340, detectado na fração 1R-2.....	212
Figura 102 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 3, m/z 340, detectada na fração 1R-2.	212
Figura 103 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 5, m/z 304, detectado na fração 1R-2.....	213
Figura 104 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 5, m/z 304, detectadas nas frações 1R-4.	213

Figura 105 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 6, m/z 304, detectado na fração 1R-2.....	214
Figura 106 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 6, m/z 304, detectadas nas frações 1R-4.	214
Figura 107 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 7, m/z 333, detectado na fração 1R-1C.....	215
Figura 108 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 7, m/z 333, detectada na fração 1R-1C.....	215
Figura 109 - Espectro de RMN de ^1H da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz).....	216
Figura 110 - Espectro de RMN de ^{13}C da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz).....	217
Figura 111 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz).....	218
Figura 112 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz:600MHz).....	219
Figura 114 - Cromatograma (106A) e espectro MS^E (106B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 30V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.....	220
Figura 113 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz:600MHz).....	220
Figura 115 - Cromatograma (107A) e espectro MS^E (107B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 100 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.....	222
Figura 116 - Cromatograma (108A) e o espectro MS^E (108B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.....	223
Figura 117 - Cromatograma (109A) e o espectro MS^E (109B) da tambjamina 2 utilizando-se 0,1% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 100 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.....	224

Figura 118 - Cromatograma (110A) e o espectro MS ^E (110B) da tambjamina 2 utilizando-se 0,1% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.....	225
Figura 119 - Cromatograma (111A) e o espectro MS ^E (111B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 30V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo negativo.	226
Figura 120 - Espectro de RMN de ¹ H da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz).	227
Figura 121 - Espectro de RMN de ¹³ C da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz).	228
Figura 122 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz).	229
Figura 123 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz:600MHz).	230
Figura 124 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz:600MHz).	231
Figura 125 - Espectro de RMN de ¹ H da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz).	232
Figura 126 - Espectro de RMN de ¹³ C da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz).	233
Figura 127 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz).	234
Figura 128 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz:600MHz).	235
Figura 129 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz:600MHz).	236
Figura 130 - Espectro de RMN de ¹ H da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz).	237
Figura 131 - Espectro de RMN de ¹³ C da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz).	238
Figura 132 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz).	239

Figura 133 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).....	240
Figura 134 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).....	241
Figura 135 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina A na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	242
Figura 136 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina A-aldeído na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	242
Figura 137 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina B-aldeído na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	243
Figura 138 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina C na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	243
Figura 139 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina D na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	244
Figura 140 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina I na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	244
Figura 141 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina K na concentração de 1,0 mg mL ⁻¹	245
Figura 142 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina A.	245
Figura 143 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina A-aldeído.	246
Figura 144 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina B-aldeído.	246
Figura 145 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina D.....	247
Figura 146 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina I.	247
Figura 147 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina K.	248

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens do gênero <i>Colletotrichum</i> endofíticas do <i>Anthurium alcatrazense</i> P7.	46
Tabela 2 - Linhagens fitopatogênicas de <i>Colletotrichum</i> e cultura a partir da qual foram isoladas.....	47
Tabela 3 - Condições de crescimento para linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i> L3 e L6.....	49
Tabela 4 - Legenda de cores atribuídas a cada uma das linhagens de <i>Colletotrichum</i> , aos brancos analíticos e de meio de cultura na visualização das redes moleculares no <i>Cytoscape</i> utilizando arquivo <i>metadata</i>	94
Tabela 5 - Dados de massa exata, massa acurada, formula molecular e estrutura dos compostos resultantes do processo de desreplicação do experimento 3 utilizando a biblioteca <i>in house</i> de compostos de <i>Colletotrichum</i>	101
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) para o radicicol segundo Wicklow, Jordan e Gloer (2009) e dados experimentais do composto presente na amostra L23T3R2.	103
Tabela 7 - Dados de HPLC-UV-ELSD-MS das tambjamins inéditas detectada na fração do extrato do manto de <i>R. ernsti</i>	122
Tabela 8 - Dados de UPLC-ESI-QToF-MS das novas tambjamins detectadas nas frações de <i>R. ernsti</i>	127
Tabela 9 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para a tambjamina 2, presente na amostra NN89.	136
Tabela 10 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para a tambjamina 4, presente na amostra NN75A.	143
Tabela 11 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para a tambjamina 5, presente na amostra NN132C.	155
Tabela 12 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para a tambjamina 6, presente na amostra AB33E.	163
Tabela 13 - Tempo de retenção (t_R), $\lambda_{\text{emissão}}$ e concentrações utilizadas na construção das curvas de analíticas das tambjamins avaliadas.	178
Tabela 14 - Parâmetros das curvas analíticas utilizadas para a quantificação das tambjamins nos extratos de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i>	180

Tabela 15 - Concentrações totais (mg mL ⁻¹) de tambjamins nos extratos aquosos e orgânicos de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i>	180
Tabela 16 - Quantidade de material de partida (em g), concentração total (em mg mL ⁻¹) e concentração total normalizada (mg de tambjamins g ⁻¹ de organismo) de tambjamins nos extratos de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i>	181
Tabela 17 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do briozoário <i>Virididentula dentata</i>	189
Tabela 18 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i>	189
Tabela 19 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do nudibrânquio <i>Tambja brasiliensis</i>	190
Tabela 20 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do nudibrânquio <i>Roboastra ernsti</i>	190

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

[M+H] ⁺	Molécula protonada
[M+Na] ⁺	Molécula sodiada
AcOEt	Acetato de etila
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Comp	Componente
DDA	Aquisição dependente de dados
ELSD	Detector de espalhamento de luz dinâmico
ESI	Ionização por electrospray
EtOH	Etanol
Flu	Detector de fluorescência
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
GNPS	<i>Global Natural Products Social molecular networking</i>
H ₂ O	Água
HDDDA	Aquisição dependente de dados empregando-se separação por mobilidade iônica
HDMS ^E	Aquisição independente de dados empregando-se separação por mobilidade iônica
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IMS	Separação por mobilidade iônica
iPrOH	Isopropanol
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MS	Espectrometria de massas
MS ^E	Aquisição independente de dados
MVA	Análises multivariadas
PCA	Análise dos componentes principais

PDA	Detector de arranjo de diodos
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
QToF-MS	Espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio/carbono
rpm	Rotações por minuto
SPE	Extração em fase sólida
TFA	Ácido trifluoroacético
t_R	Tempo de retenção
TWIM	<i>Traveling wave ion mobility</i>
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV	Detector na região do ultravioleta
VIP	Importância da variável na projeção
δ	Deslocamento químico
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	31
1.1 METABOLÔMICA E SUA IMPORTÂNCIA	31
1.2 A FERRAMENTA DE <i>MOLECULAR NETWORKING</i>	33
1.3 JUSTIFICATIVA	35
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....	38
CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS.....	39
3.1 CONDIÇÕES GERAIS DE ANÁLISE – WATERS ALLIANCE HPLC-UV-ELSD-MS.....	39
3.2 CONDIÇÕES GERAIS DE ANÁLISE – WATERS XEVO G2-XS UPLC-ESI-QToF-MS.....	39
3.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	40
CAPÍTULO 4 – ESTUDO METABOLÔMICO DE FUNGOS DO GÊNERO <i>Colletotrichum</i>.....	41
4.1 FUNGOS DO GÊNERO <i>Colletotrichum</i>	41
4.1.1 Metabolismo secundário de <i>Colletotrichum</i> spp.....	43
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.2.1 Linhagens fúngicas.....	45
4.2.1.1 Linhagens endofíticas do gênero <i>Colletotrichum</i> isoladas de <i>Anthurium alcatrazense</i>	45
4.2.1.2 Linhagens de <i>Colletotrichum</i> isoladas de plantas com sintomas da doença antracnose.....	46
4.2.2 Meios de cultura	47
4.2.2.1 Meio líquido	47
4.2.2.2 Meio sólido para placas.....	48
4.2.3 Experimentos de avaliação do tempo e condições de crescimento.....	48
4.2.4 Metodologias de extração e fracionamento dos extratos de <i>Colletotrichum</i>.....	49
4.2.4.1 Metodologia 1 de extração dos meios de cultivo e fracionamento dos extratos de <i>Colletotrichum</i> spp.	50
4.2.4.2 Metodologia 2 de extração dos meios de cultivo e fracionamento dos extratos de <i>Colletotrichum</i> spp.	51

4.2.4.3	Metodologia 3 de extração dos meios de cultivo e fracionamento dos extratos de <i>Colletotrichum</i> spp.	51
4.2.5	Análise das frações dos meios de cultivo de <i>Colletotrichum</i> spp. por UPLC-ESI-QToF-MS	52
4.2.6	Avaliação da reprodutibilidade das metodologias de extração e fracionamento empregando-se ferramentas estatísticas	52
4.2.7	Obtenção, extração e fracionamento dos extratos do meio de cultivo de <i>Colletotrichum</i> spp. – Experimento 1	53
4.2.8	Análise das amostras do Experimento 1 por UPLC-ESI-QToF-MS	53
4.2.9	Avaliação dos resultados das análises do Experimento 1 empregando-se ferramentas estatísticas	54
4.2.10	Processamento dos dados de UPLC-ESI-QToF-MS e avaliação dos resultados empregando-se <i>molecular networking</i>	55
4.2.11	Obtenção e extração do meio de cultivo de <i>Colletotrichum</i> spp. – Experimentos 2 e 3.....	55
4.2.12	Análise das amostras de <i>Colletotrichum</i> por UPLC-IMS-QToF-HRMS	56
4.2.13	Processamento dos dados de UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se MZmine 2 e análises estatísticas.	57
4.2.14	Processamento dos dados de UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se a plataforma MSeXpress.....	58
4.2.15	Processamento dos dados de UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se a plataforma MS2Analyte.....	59
4.2.16	Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se <i>molecular networking</i>	59
4.2.17	Análise da amostra L23T3R2 por HPLC-SPE-UV-NMR	60
4.2.18	Isolamento e identificação de metabólito detectado nas amostras de linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i>	61
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.3.1	Experimentos para avaliação do tempo e condições de crescimento das linhagens de <i>Colletotrichum</i>	62
4.3.2	Metodologias de extração e fracionamento dos extratos de <i>Colletotrichum</i>	64
4.3.2.1	Metodologia 1 de extração e fracionamento dos extratos	65
4.3.2.2	Metodologia 2 de extração e fracionamento dos extratos	67

4.3.2.3 Metodologia 3 de extração e fracionamento dos extratos	69
4.3.3. Avaliação dos resultados das análises por UPLC-ESI-QToF-MS do experimento 1 empregando-se ferramentas estatísticas.....	70
4.3.4 Avaliação dos resultados das análises do experimento 1 por UPLC-ESI-QToF-MS empregando-se <i>molecular networking</i>	74
4.3.5 Análise das amostras de <i>Colletotrichum</i> por UPLC-IMS-QToF-HRMS e processamento dos dados brutos	78
4.3.6 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se análises estatísticas	78
4.3.7 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se MS2Analyte	85
4.3.8 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se <i>molecular networking</i>	91
4.3.9 Dereplicação dos resultados do GNPS utilizando a plataforma NPAtlas e biblioteca de compostos de <i>Colletotrichum</i>	100
4.3.10 Identificação do metabólito presente na amostra L23T3R2	102
4.3.11 Isolamento e identificação do metabólito detectado nas amostras de linhagens endofíticas de <i>Colletotrichum</i>	104
CAPÍTULO 5 – ESTUDO METABOLÔMICO DE ORGANISMOS MARINHOS PRODUTORES DE TAMBJAMINAS.....	108
5.1 TAMBJAMINAS E SEU PAPEL ECOLÓGICO	108
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	111
5.2.1 Obtenção e separação cromatográfica do extrato de <i>R. ernsti</i> (1R).....	111
5.2.2 Análise das frações de <i>R. ernsti</i> por HPLC-UV-ELSD-MS	112
5.2.3 Análises das frações de <i>R. ernsti</i> por UPLC-ESI-QToF-MS/MS e elucidação estrutural de novas tambjamins	112
5.2.4 Síntese, purificação e caracterização das novas tambjamins por HPLC-UV-ELSD-MS, UPLC-ESI-QToF-MS e RMN	113
5.2.5 Obtenção e análise dos extratos de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i>	116
5.2.6 Processamento e avaliação dos resultados das análises por UPLC-ESI-QToF-MS por <i>molecular networking</i>	117
5.2.7 Quantificação das tambjamins nas amostras de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i> por HPLC-Flu	118

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
5.3.1 Separação cromatográfica do extrato de <i>R. ernsti</i> (1R) e análise das frações por HPLC-UV-ELSD-MS.....	118
5.3.2 Análise das frações de <i>R. ernsti</i> por UPLC-ESI-QToF-MS/MS	123
5.3.3 Purificação e caracterização das tambjamins sintéticas por HPLC-UV-ELSD-MS, UPLC-ESI-QToF-MS e RMN	130
5.3.4 Análise dos extratos de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i> por HPLC-UV-ELSD-MS e por UPLC-ESI-QToF-MS.....	174
5.3.5 Quantificação de tambjamins nos extratos de <i>V. dentata</i> , <i>T. stegosauriformis</i> , <i>T. brasiliensis</i> e <i>R. ernsti</i> por HPLC-Flu	177
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO	183
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185
APÊNDICE A - Tabelas.....	189
APÊNDICE B - Figuras	191

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 METABOLÔMICA E SUA IMPORTÂNCIA

As abordagens de metabolômica surgiram e se desenvolveram ao longo dos anos 90 devido à impossibilidade de se investigar o metabolismo completo de organismos vivos utilizando-se somente de técnicas de isolamento e determinação estrutural. A metabolômica faz uso de técnicas analíticas de alta resolução combinadas com análises estatísticas, ferramentas de *data mining* e conhecimentos químicos e biológicos para a realização de análises quali- e quantitativamente abrangentes, visando compreender processos biológicos de caráter multifatorial, estabelecer o fenótipo de uma célula em resposta a mudanças genéticas e ambientais e realizar o mapeamento químico de um determinado organismo (DUNN; ELLIS, 2005; FUNARI *et al.*, 2013; HUBERT, NUZILLARD e RENAULT, 2015; KUHLSCH e POHNERT, 2015; NIELSEN, 2007).

Estudos de metabolômica são realizados, em sua grande maioria, utilizando-se análises comparativas entre perfis metabólicos individuais obtidos de diferentes amostras, geradas a partir de condições diferenciais que permitam uma análise de um processo biológico. Ou ainda, nos casos mais simples, analisando-se o perfil bioquímico de um sistema biológico. A partir da interpretação deste conjunto de informações é possível se conhecer o conjunto de metabólitos presentes nos meios intra e extracelular de um determinado organismo/sistema biológico e, conseqüentemente, compreender processos biológicos de caráter multifatorial, detectar metabólitos que são relevantes do ponto de vista bioquímico e fisiológico, bem como avaliar a expressão de um sistema metabólico sob uma condição particular, seja ambiental, de stress, de interação biótica ou abiótica ou ainda fisiológica (DUNN e ELLIS, 2005; FUNARI *et al.*, 2013; KUHLSCH e POHNERT, 2015; NIELSEN, 2007).

A análise completa de um metaboloma abrange substâncias com grande diversidade de propriedades químicas (massa molecular, polaridade, solubilidade). Outros desafios associados às análises metabolômicas incluem: (i) os metabólitos são gerados, consumidos e/ou convertidos em outros produtos muito rapidamente; (ii) o nível (concentração) de cada metabólito depende do estado fisiológico, de desenvolvimento e patológico de uma célula, tecido ou organismo; e (iii) um mesmo

metabólito pode participar em muitas vias metabólicas diferentes. Além disso, uma vez que o metaboloma é constituído por um número muito grande de moléculas com diversidade estrutural e propriedades químicas muito distintas, a escolha das metodologias de extração, fracionamento e análise dos metabólitos que serão utilizadas influenciam diretamente nos resultados obtidos (NIELSEN, 2007; YANES *et al.*, 2011).

De forma geral, duas estratégias principais são utilizadas em estudos de metabolômica:

I. Metabolômica direcionada: análise quali- e quantitativa de um metabólito específico ou alguns metabólitos previamente selecionados. É utilizada, por exemplo, na análise de uma ou mais vias metabólicas de interesse ou para avaliar diretamente o efeito de uma alteração genética em vias metabólicas. Análises de metabolômica direcionada são geralmente empregadas quando se tem uma questão bioquímica específica a ser respondida ou uma hipótese que motiva o estudo de uma rota bioquímica específica (DUNN e ELLIS, 2005; ERNST *et al.*, 2014; FIEHN, 2002; PATTI, YANES e SIUZDAK, 2012).

II. Metabolômica não-direcionada: análise quantitativa (principalmente relativa) e qualitativa de todos os metabólitos detectáveis presentes em um sistema biológico (células, fluidos corporais, tecidos), em um determinado momento e sob condições específicas. Esta ferramenta permite explorar vias bioquímicas ainda desconhecidas ou pouco estudadas (ERNST *et al.*, 2014; NIELSEN, 2007).

Nos últimos anos, a metabolômica passou a ser amplamente utilizada na área de química de produtos naturais. Os conceitos de metabolômica podem ser usados, por exemplo, para monitorar a manifestação de diferentes perfis metabólicos entre indivíduos, avaliar o efeito de mudanças ambientais durante o crescimento e de tratamentos pré e pós-colheita, bem como monitorar a produção de compostos específicos sob diferentes condições. Podem também ser empregados para se definir quais são as melhores condições para o desenvolvimento de plantas e micro-organismos e na avaliação do uso de diferentes métodos de extração e isolamento (TAWFIKE, VIEGELMANN e EDRADA-EBEL, 2013; YULIANA *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de técnicas analíticas cada vez mais modernas e sensíveis visando os estudos de metabolômica também contribuiu de forma expressiva na confiabilidade do processo de desreplicação, que é definida como a

rápida identificação de compostos conhecidos. Esse processo faz uso de dados espectroscópicos e espectrométricos obtidos durante as análises de metabolômica. Tais dados são confrontados com bases de dados, com o objetivo de se evitar o re-isolamento de moléculas já conhecidas, reduzindo, assim, o desperdício de tempo e esforços durante o processo de descoberta e isolamento de produtos naturais relevantes (ALLARD *et al.*, 2016; HUBERT, NUZILLARD e RENAULT, 2015; MACINTYRE *et al.*, 2014).

Em combinação com técnicas genômicas, a metabolômica também pode ser empregada para incrementar a produção de metabólitos secundários, manipular uma determinada via biossintética de interesse, compreender interações do organismo com o ambiente através de mediadores químicos, confirmar a presença de gene clusters envolvidos na produção dos componentes biologicamente ativos, (KUHLISCH e POHNERT, 2015; MOLDENHAUER *et al.*, 2007; PANAGIOTOU, CHRISTAKOPOULOS e OLSSON, 2005; SELIM *et al.*, 2014; TAWFIKE, VIEGELMANN e EDRADA-EBEL, 2013).

Apesar da importância e perspectivas da metabolômica em todos os ramos na qual é utilizada, é um campo de pesquisa ainda em franco desenvolvimento. Ainda não é possível quantificar todos os metabólitos de um dado organismo, pois o desenvolvimento de todas as técnicas “ômicas” ainda depende de avanços de instrumentação de cromatografia e eletroforese, de técnicas analíticas altamente sensíveis e específicas como espectrometria de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), bem como de metodologias de análise estatísticas, quimiométricas e de simulação computacional (ERNST *et al.*, 2014).

1.2 A FERRAMENTA DE MOLECULAR NETWORKING

Estudos de metabolômica não-direcionados, especialmente empregando-se técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) resultam em um grande volume de dados e em uma grande quantidade de *features* presentes nesses dados, que podem variar de 500 a 5000 por análise. Em experimentos de metabolômica baseados em LC-MS, *features* são definidos com padrões de sinais que apresentam um tempo de retenção e uma razão massa-carga (m/z) únicos. A grande dificuldade de se empregar este tipo de abordagem de

metabolômica é conseguir atribuir uma estrutura química a cada um desses *features* (DIAS *et al.*, 2016; LIU e LOCASALE, 2017; QUINN *et al.*, 2017).

Com o objetivo de se contornar esse problema, ainda que em partes, foi desenvolvida a ferramenta de análise GNPS: *Global Natural Products Social molecular networking*. Esta passou a ser amplamente utilizada nas áreas de metabolômica, médica e na descoberta de novos fármacos. A GNPS é uma ferramenta baseada em espectrometria de massas, que fornece uma visão global de todos os compostos detectados e fragmentados durante uma análise e as relações espectrais entre eles. Associa os espectros de massas MS/MS de acordo com padrões de fragmentação de massa semelhantes, baseando-se no conceito de que moléculas estruturalmente relacionadas serão fragmentadas de forma semelhante, resultando em padrões análogos. Essas associações podem ser visualizadas como gráficos de similaridade espectral, chamadas de redes espectrais. Nestas redes, moléculas que são quimicamente relacionadas de acordo com seus espectros MS/MS são apresentadas como nodos e a espessura das conexões entre os nodos indica o grau de similaridade entre duas moléculas. Ao se construir a rede molecular, moléculas desconhecidas que estão relacionadas com substâncias conhecidas podem ser rapidamente atribuídas a famílias estruturais específicas, o que acelera o processo de descoberta e caracterização das mesmas (DIAS *et al.*, 2016; NAMAN, *et al.*, 2017; QUINN *et al.*, 2017; WANG, M. *et al.*, 2016).

Na figura 1, é apresentado um esquema da criação de redes moleculares. Após a aquisição dos espectros de massas MS/MS, estes são alinhados entre si e, então, dão origem às redes moleculares. Cada *feature* detectado nas análises é representado como um nodo. Compostos que apresentam similaridade química (possuem padrões de fragmentação semelhantes) são conectadas entre si. A espessura dessas conexões indica o grau de similaridade entre as moléculas, podendo variar de 0 (totalmente dissimilar) a 1 (completamente idêntico). Adicionalmente, os espectros de massas MS/MS também podem ser comparados à bibliotecas espectrais disponíveis na plataforma GNPS.

Figura 1 - Criação das redes moleculares na plataforma GNPS: *Global Natural Products Social Molecular Networking*.

Fonte: Adaptado de WANG, M. *et al.*, 2016, p. 832.

Apesar de representar um grande avanço nas etapas de desreplicação e entendimento químico das amostras sob estudo, a anotação de compostos empregando-se redes moleculares ainda é limitada pela qualidade de dados disponíveis nos bancos de dados, pela quantidade de bancos de dados acessíveis e pela quantidade de compostos compreendidos. Os bancos de dados que incluem dados de fragmentação, como MassBank, GNPS, NIST, Metlin e ReSpec, compreendem apenas cerca de 10% dos produtos naturais já descritos. Além disso, os dados de fragmentação dependem fortemente das condições de análise e dos equipamentos utilizados na aquisição dos mesmos, o que faz com que a anotação dos compostos seja um processo minucioso (ALLARD *et al.*, 2016).

1.3 JUSTIFICATIVA

As abordagens de metabolômica surgiram devido à impossibilidade de se investigar o metabolismo de organismos vivos utilizando-se somente técnicas de isolamento e determinação estrutural. A metabolômica objetiva analisar o conjunto completo de metabólitos presentes nos meios intra e extracelular de um determinado organismo ou sistema biológico, além de ser a técnica mais funcional e abrangente no monitoramento e entendimento das funções dos genes e na identificação do estado bioquímico de um organismo.

Fungos do gênero *Colletotrichum* são comumente considerados fitopatógenos. Muitos estudos objetivam entender a fisiologia e o metabolismo destes fungos para se buscar formas para o controle desta praga. Contudo, ainda não existem formas totalmente eficazes para se evitar a infecção e danos causados por *Colletotrichum* spp. Coletas de plantas realizadas na Ilha de Alcatrazes para o isolamento de micro-organismos endofíticos levaram ao isolamento de uma grande variedade de linhagens de fungos do gênero *Colletotrichum*, endofíticas de plantas dos gêneros *Anthurium* e *Begonia*. Nenhuma das plantas que apresentaram linhagens endofíticas de *Colletotrichum* apresentou sinais de doença em suas folhas, como comumente observado em outras espécies vegetais. Este fato nos levou a considerar que tais linhagens de *Colletotrichum* endofíticas poderiam encontrar-se em um estado particular de expressão fisiológica e metabólica. Estas observações recentes nos levaram aos seguintes questionamentos: a) Metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Colletotrichum* são em geral responsáveis pela ação fitotóxica destes?; b) Se sim, quais?; c) É possível se estabelecer metabólitos secundários biomarcadores de fitotoxicidade para diferentes linhagens de *Colletotrichum*?; d) Por que, no caso de fungos *Colletotrichum* endofíticos de *Anthurium*, estas plantas não apresentam sinais de doença? Seriam estes fungos endofíticos não produtores de metabólitos fitotóxicos? Ou será que estas plantas desenvolveram resistência aos metabólitos produzidos por estes fungos? Este projeto constitui ponto de partida para a investigação do fenômeno de expressão de fitotoxicidade de *Colletotrichum* spp.

Tambjamins constituem um grupo de alcalóides bis-pirrólicos isolados de bactérias e organismos marinhos como ascídias, briozoários e nudibrânquios. Além de apresentarem propriedades farmacológicas, as tambjamins também estão relacionadas à mecanismos de defesa dos organismos a partir dos quais são isoladas. A investigação química de ascídias, briozoários e nudibrânquios produtores de tambjamins indicou que estes produtos naturais eram observados em organismos envolvidos em estabelecidas relações presa-predador (CARBONE *et al.*, 2010; CARTÉ e FAULKNER, 1986; LINDQUIST e FENICAL, 1991; DEAN e PRINSEP, 2017; PAWLIK, 1993). Entretanto, os relatos envolvendo organismos marinhos produtores de tambjamins encontrados na costa brasileira é praticamente inexistente. Um dos poucos estudos realizados com organismos encontrados na

costa do Brasil é justamente do nosso grupo de pesquisa, no qual foram estudados o nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* e sua presa, o briozoário *Bugula dentata* (PEREIRA *et al.*, 2012). Em uma coleta realizada em Cabo Frio, RJ, em fevereiro de 2019, foram coletados espécimes dos moluscos *Tambja brasiliensis*, *Tambja stegosauriformis*, *Roboastra ernsti* e o briozoário *Virididentula dentata*. Moluscos do gênero *Tambja* se alimentam do briozoário *V. dentata* e, por outro lado, são predados por *R. ernsti*. Não há relatos na literatura de estudos de ecologia química deste tipo envolvendo os nudibrânquios *R. ernsti*, bem como *T. brasiliensis*, espécie endêmica do Brasil. Nesse sentido, o estudo químico destes organismos marinhos é de grande relevância para se entender melhor a ecologia e a bioacumulação de compostos biologicamente ativos ao longo dos níveis tróficos. Pelo fato de nudibrânquios serem organismos pequenos e de difícil coleta, o estudo químicos destes moluscos como os nudibrânquios empregando técnicas tradicionais de isolamento e determinação estrutural é dificultado, sendo necessário o emprego de abordagens de metabolômica.

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

O Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (IQSC-USP), coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck, dedica-se ao estudo do metabolismo de micro-organismos e organismos marinhos, bem como ao isolamento e identificação de produtos naturais de interesse farmacológico. No âmbito do projeto temático “Componentes da biodiversidade, e seus caracteres metabólicos, de ilhas do Brasil - uma abordagem integrada”, o presente projeto tem como objetivos:

- Fungos do gênero *Colletotrichum*

- I. Estabelecer condições de crescimento, extração, fracionamento e análise metabolômica de linhagens de *Colletotrichum* spp.;

- II. Realizar experimentos de crescimento de diferentes linhagens de fungos do gênero *Colletotrichum* reconhecidamente fitopatógenos e não-fitopatógenos

- III. Analisar o metaboloma destas linhagens empregando-se técnicas de UPLC-MS/MS, análises estatísticas e redes moleculares;

- IV. Utilizar os dados obtidos para avaliar se: (a) metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Colletotrichum* são em geral responsáveis pela ação fitotóxica destes; e (b) é possível estabelecer metabólitos secundários biomarcadores de fitotoxicidade para diferentes linhagens de *Colletotrichum*.

- Organismos produtores de tambjamins

- I. Obter o extrato dos organismos marinhos *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*

- II. Investigar o metaboloma de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* utilizando combinação de técnicas de análise espectroscópicas e análises por UPLC-MS/MS;

- III. Avaliar a distribuição de tambjamins conhecidas nos extratos/frações dos organismos estudados por HPLC com detector de fluorescência.

- IV. Avaliar a presença de novas tambjamins e, se possível, realizar seu isolamento.

CAPÍTULO 3 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

3.1 CONDIÇÕES GERAIS DE ANÁLISE – WATERS ALLIANCE HPLC-UV-ELSD-MS

As análises por HPLC-UV-ELSD-MS foram realizadas em equipamento contendo um cromatógrafo líquido Waters Alliance 2695 (HPLC) acoplado a um detector espectrofotômetro UV-Vis com arranjo de fotodiodos Waters 2996 (PDA), PDA acoplado sequencialmente a um detector de espalhamento de luz evaporativo Waters 2424 (ELSD) e a um espectrômetro de massas Micromass ZQ2000 (MS), com interface electrospray e analisador de massas quadrupolo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ XTerra® RP18 (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN/MeOH (1:1) + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição empregado foi de 10 a 100% de B em 22 min, manteve-se em 100% de B de 22 min a 30 min, de 100% de B para 10% de B de 30 a 31 min e manteve-se em 10% de B de 31 min a 40 min. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹. No detector de PDA, as amostras foram monitoradas em um intervalo de λ_{max} de 200 a 800 nm. O ELSD operou com ganho de 100, nebulizador em modo aquecimento em nível 60%, drift tube com temperatura 80 ± 5 °C, pressão do gás N₂ de 50 psi e com output full scale de 2000 mV. No espectrômetro de massas foram utilizadas as seguintes condições: fonte ESI, voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, vazão do gás no cone de 50 L h⁻¹, vazão do gás de dessolvatação de 350 L h⁻¹ e intervalo de detecção de 100 a 1000 Da.

3.2 CONDIÇÕES GERAIS DE ANÁLISE – WATERS XEVO G2-XS UPLC-ESI-QToF-MS

As análises por UPLC-ESI-QToF-MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters Acquity UPLC H-class acoplado com um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS QToF com interface eletrospray (ESI). As condições do ESI foram: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão do gás no cone

de 50 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para calibração interna, utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma) 20 µg mL⁻¹, infundida pela sonda do lockmass com vazão de 10 µL min⁻¹. Durante as análises, a coluna foi mantida a 40 °C e as amostras no amostrador automático foram mantidas a 15 °C. As condições cromatográficas empregadas, bem como o modo de aquisição no espectrômetro de massas foram escolhidos individualmente para cada um dos projetos, de acordo com a composição das amostras e o intuito das análises, e são descritas detalhadamente na seção de “Materiais e métodos” de cada um dos projetos.

3.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ – UFSCar) em um espectrômetro Bruker AVANCE III (9,4 T), operando em 600 MHz (¹H) ou 150 MHz (¹³C). As amostras foram preparadas em solventes deuterados (Cambridge Isotopes Laboratories Inc.).

CAPÍTULO 4 – ESTUDO METABOLÔMICO DE FUNGOS DO GÊNERO *Colletotrichum*

4.1 FUNGOS DO GÊNERO *Colletotrichum*

Fungos do gênero *Colletotrichum* são conhecidos por provocar doenças em uma grande variedade de plantas, incluindo cereais, leguminosas, árvores frutíferas e plantas ornamentais, das mais diversas famílias. Estes fitopatógenos se desenvolvem em condições de clima quente e úmido. Podem afetar plantas tanto na época de desenvolvimento no campo, quanto na época de pós-colheita, levando a perdas econômicas significativas em culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (FREEMAN, KATAN e SHABI, 1998; GARCÍA-PAJÓN e COLLADO, 2003).

Fungos pertencentes a este gênero penetram nos tecidos de plantas hospedeiras utilizando estruturas especializadas chamadas apressórios. Após a penetração, o fungo inicia a síntese e secreção de compostos que diminuem a imunidade da planta, mas garantem a viabilidade dos tecidos do hospedeiro. O fungo, então, inicia um estágio necrotrófico, com a produção de toxinas, enzimas líticas e outros compostos que promovem a morte das células do hospedeiro (IRIEDA e TAKANO, 2016).

A doença mais comumente associada a fungos do gênero *Colletotrichum* é a antracnose, caracterizada por causar lesões necróticas negras circulares ou alongadas, visíveis na superfície de folhas, inflorescências e frutos (GARCÍA-PAJÓN e COLLADO, 2003; KIM *et al.*, 2016). Apesar de acometer uma imensa variedade de plantas pertencentes às mais diversas famílias, os sintomas da antracnose, os órgãos afetados pela doença e o estágio de desenvolvimento da planta no qual a doença se desenvolve varia de cultura para cultura (FREEMAN, KATAN e SHABI, 1998).

No caso da amêndoa (figura 2A), por exemplo, o fitopatógeno infecta o fruto nas fases iniciais de frutificação, não atacando o fruto maduro ou outros órgãos da planta. No abacate (figura 2B), o desenvolvimento da doença e deterioração dos frutos ocorre no período pós-colheita. Já no caso do morango (figura 2C), a infecção por *Colletotrichum* causa danos sérios nas folhas e nos frutos. A necrose na raiz da

planta pode acontecer em qualquer período do desenvolvimento e frutificação da planta (FREEMAN, KATAN e SHABI, 1998).

Figura 2 - Sintomas de antracnose causados por *Colletotrichum gloeosporioides* (A e B) e *C. acutatum* (C): (A) amêndoas – frutos não-maduros; (B) abacate – fruto maduro; e (C) morangos – frutos maduros e não-maduros.

Fonte: Adaptado de FREEMAN, KATAN e SHABI, 1998.

A transmissão da doença de uma planta doente para uma planta sadia ocorre por meio da dispersão de conídios do fungo patogênico. A doença também pode ser transmitida principalmente por sementes contaminadas. Assim, uma forma de controle da antracnose é o uso de sementes sadias (GARCÍA-PAJÓN e COLLADO, 2003).

Outra doença associada a fungos do gênero *Colletotrichum* é a doença conhecida como podridão vermelha, que acomete plantas de cana-de-açúcar. É causada pela espécie *Colletotrichum falcatum*, sendo o sintoma mais comum a degradação dos colmos. Após a infecção, o fitopatógeno causa uma podridão vermelha opaca na polpa da cana-de-açúcar (figura 3), visível somente após o corte longitudinal da mesma. Além disso, o fungo produz e secreta uma grande quantidade de enzima invertase, que provoca a inversão da sacarose armazenada em glicose e frutose, reduzindo significativamente o teor de sacarose nas plantas infectadas (SATHYABHAMA *et al.*, 2015).

Figura 3 - Sintomas da podridão vermelha causada por *Colletotrichum falcatum* em cana-de-açúcar.

(Fonte: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_79_22122006154841.html - acessado em 21/01/2020).

Apesar do emprego de técnicas de controle das doenças, bem como a utilização de cultivares que apresentem resistência estável a doença, não é possível garantir que a cultura não será acometida pela doença, o que demonstra a necessidade de pesquisas que busquem novas opções de controle da antracnose.

4.1.1 Metabolismo secundário de *Colletotrichum* spp.

Fungos do gênero *Colletotrichum* produzem metabólitos secundários fitotóxicos, que demonstram ter um papel significativo na patogênese destes microorganismos. São exemplos de compostos que apresentam atividade fitotóxica a micosporina alanina **(1)**, produzida pelo fungo *C. graminicola*, as dicetopiperazinas **(2–6)**, produzidas por *C. gloeosporioides*, as colletotrichinas A, B e C **(7–9)** e colletopirona **(10)**, isolados de *C. nicotianae*. À ferricrocina **(11)** foi atribuída a atividade fitotóxica do fungo *C. gloeosporioides* em plântulas de *Vigna unguiculata* (popularmente conhecido como feijão-fradinho) em concentrações entre 0,1 e 10 mmol L⁻¹. As colletoclorinas A–D **(12–15)**, produzidas por *C. nicotianae*, também possuem atividade fitotóxica, inibindo a germinação de sementes e o desenvolvimento de plantas (GARCÍA-PAJÓN e COLLADO, 2003; OHRA *et al.*, 1995).

Além de compostos fitotóxicos, também é relatado na literatura o isolamento de compostos com atividade biológica produzidos por linhagens de *Colletotrichum*. Dentre estes compostos, tem-se o ácido colletotrico (**16**), produzido por *C. gloeosporioides*, que possui atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lutea* nas concentrações de 25, 50 e 50 µg mL⁻¹, respectivamente, além de atividade antifúngica contra *Helminthosporium sativum* na concentração de 50 µg mL⁻¹. O ácido colletonóico (**17**), produzido por *Colletotrichum* sp., apresentou atividades antifúngica, antibacteriana e algicida moderadas contra *Microbotryum violaceum*, *Bacillus megaterium* e *Chlorella fusca*, respectivamente (GARCÍA-PAJÓN e COLLADO, 2003; HUSSAIN *et al.*, 2014).

A colletotrichona A (**18**), produzida por *Colletotrichum* sp., apresentou atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*. Já o acetato de 2-fenetil-1H-indol-3-ila (**19**), produzido por *C. gloeosporioides*, apresentou atividades antifúngica contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, além de atividade

anti-colinesterase e anticâncer consideráveis. Outro composto isolado de *C. gloeosporioides* foi a huperzina A (**20**), inicialmente isolado da planta *Huperzia serrata*. Este composto possui atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase, sendo utilizado no tratamento da doença de Alzheimer (CHAPLA *et al.*, 2014; SHU *et al.*, 2014; WANG, W. *et al.*, 2016).

Ainda que o metabolismo secundário de fungos do gênero *Colletotrichum* já tenha sido consideravelmente estudado, ainda não se sabe se metabólitos secundários produzidos por estas linhagens estão relacionados com a antracnose.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Linhagens fúngicas

Dois conjuntos de linhagens fúngicas foram obtidos: (1) linhagens de *Colletotrichum* endofíticas isoladas de *Anthurium alcatrazense* e (2) linhagens de *Colletotrichum* isoladas de plantas que apresentavam sinais da doença antracnose.

4.2.1.1 Linhagens endofíticas do gênero *Colletotrichum* isoladas de *Anthurium alcatrazense*

As linhagens endofíticas de *Anthurium alcatrazense* identificadas como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* foram isoladas e cedidas pelo grupo de

pesquisa da Prof^a. Dr^a. Simone Possedente de Lira, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP – Campus de Piracicaba). As linhagens endofíticas estudadas neste trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens do gênero *Colletotrichum* endofíticas do *Anthurium alcatrazense* P7.

Código	Linhagem
L1	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MAC1F1
L2	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MAC3F1
L3	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MAC3F2
L4	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MSF1F1
L5	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MSF3F1
L6	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MSF3F2
L7	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MS1F3
L8	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MS1F1
L9	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MS3F1
L10	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AM1F1
L11	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AM2F2
L12	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AM3F2
L13	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF1F1
L14	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF2F1
L15	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF2F2
L16	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF3F2

Fonte: Autoria própria.

4.3.1.2 Linhagens de *Colletotrichum* isoladas de plantas com sintomas da doença antracnose

As linhagens de *Colletotrichum* isoladas de plantas com sintomas de antracnose estudadas neste trabalho são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens fitopatogênicas de *Colletotrichum* e cultura a partir da qual foram isoladas.

Código	Fitopatógeno	Cultura da qual o patógeno foi isolado
L17	<i>Colletotrichum nymphae</i>	macieira
L18	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	goiabeira
L19	<i>Colletotrichum fruticola</i>	macieira
L20	<i>Colletotrichum asianum</i>	macieira
L21	<i>Colletotrichum siamense</i>	abacateiro
L22	<i>Colletotrichum truncatum</i>	soja
L23	<i>Colletotrichum graminicola</i>	sorgo
L24	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	guaranazeiro
L25	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	feijão

Fonte: Autoria própria.

As linhagens de *C. gloeosporioides* L18 e L24 foram cedidas pelo grupo da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, do Departamento de Genética da ESALQ-USP. A linhagem de *C. lindemuthianum* L25 foi cedida pela Dra. Liliane de Diana Teixeira, da Clínica Fitopatológica "Prof. Hiroshi Kimati" (ESALQ-USP). As demais linhagens foram cedidas pelo Laboratório de Fungos Fitopatogênicos da ESALQ-USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nelson Sidnei Massola Júnior.

4.2.2 Meios de cultura

4.2.2.1 Meio líquido

O meio de cultura líquido utilizado em todos os experimentos de crescimento de *Colletotrichum* spp. foi malte 2%. Para o preparo de 1 litro deste meio de cultura, 20 g de extrato de malte (Hymedia) foram solubilizados em 1 litro de água deionizada. Após a homogeneização completa da solução, o pH foi corrigido para 6,65 e a leitura foi realizada empregando-se um pHmetro ION pHB 500. O meio de cultura foi, então, transferido para frascos de vidro com tampa do tipo *Schott* e esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min.

4.3.2.2 Meio sólido para placas

Nas placas de Petri utilizadas nos experimentos de extração utilizando a metodologia 2 (item 4.2.4.2), empregou-se o meio de cultura malte 2% + ágar 2%. Para o preparo de 1 litro deste meio de cultura, 20 g de extrato de malte (Hymedia) e 20 g de ágar bacteriológico (Hymedia) foram solubilizados em 1 litro de água deionizada. A solução foi submetida a agitação magnética e, em seguida, aquecida em forno de micro-ondas para completa solubilização do ágar. O meio de cultura foi transferido para frascos de vidro com tampa do tipo *Schott* e esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 min. Após esterilização, o meio de cultura foi transferido para placas de Petri de plástico de 9 cm de diâmetro (25 mL por placa de Petri) e deixadas em repouso em cabine de fluxo laminar até sua completa solidificação.

4.2.3 Experimentos de avaliação do tempo e condições de crescimento

Uma vez que as linhagens a serem estudadas neste projeto ainda não tinham condições ótimas de crescimento pré-definidas, foram realizados experimentos de avaliação do tempo e condições de crescimento das linhagens de *Colletotrichum*. Para estes experimentos, foram escolhidas as linhagens endofíticas L3 e L6. Após crescimento em placa de Petri, discos de micélio das linhagens foram transferidos para frascos de vidro do tipo *Schott*, contendo 200 mL de meio de cultura líquido. Foram avaliadas 8 condições de crescimento, de acordo com as variáveis modo de crescimento (agitação a 150 rpm ou estático) e tempo de crescimento (5, 10, 15 e 20 dias para o modo agitação e 7, 14, 21 e 28 dias para o modo estático). Os experimentos que necessitavam de agitação foram incubados em uma incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal). As condições de crescimento avaliadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições de crescimento para linhagens endofíticas de *Colletotrichum* L3 e L6.

Condição	Modo	Temperatura	Tempo de crescimento
1	Agitação (150 rpm)	25 °C	5 dias
2	Agitação (150 rpm)	25 °C	10 dias
3	Agitação (150 rpm)	25 °C	15 dias
4	Agitação (150 rpm)	25 °C	20 dias
5	Estático	25 °C	7 dias
6	Estático	25 °C	14 dias
7	Estático	25 °C	21 dias
8	Estático	25 °C	28 dias

Fonte: Autoria própria.

Depois de atingido o tempo de crescimento, a extração e fracionamento dos extratos foram realizados segundo a metodologia 1 de extração, descrita posteriormente no item 4.3.4.1. Os experimentos foram realizados em uniplicata. As frações obtidas foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS utilizando-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 20 a 50% de B em 6 min, de 50 a 98% de B de 6,0 a 8,5 min, manteve-se em 98% de B de 8,5 a 9,0 min, 98 a 20% B de 9,0 a 9,1 min e 20% de B de 9,1 a 10,0 min. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹, volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos em modo MS^E *Continuum*, modo positivo e resolução, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, intervalo de massa de *m/z* 150 a 1000, *scan time* de 0,2 s, energia de colisão de 0 eV para a função 1 e rampa de 20 - 30 eV para a função 2. Após as análises, os cromatogramas foram comparados com o objetivo de se avaliar em qual condição de crescimento havia maior diversidade química de compostos produzidos pelas linhagens em meio de cultura.

4.2.4 Metodologias de extração e fracionamento dos extratos de *Colletotrichum*

Objetivando escolher uma metodologia de extração e fracionamento reprodutível e que proporcionasse o melhor fracionamento dos extratos de *Colletotrichum*, foram testados três procedimentos. As linhagens escolhidas para os

testes foram L3 e L24, linhagens endofítica e fitopatogênica, respectivamente. Para avaliação da reprodutibilidade das metodologias de extração e fracionamento testadas, todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4.1 Metodologia 1 de extração dos meios de cultivo e fracionamento dos extratos de *Colletotrichum* spp.

A metodologia 1 de extração e fracionamento dos extratos de meios de cultivo de *Colletotrichum* spp. foi desenvolvida com base no procedimento descrito por Wagenaar (2008). Em frascos do tipo *Schott* contendo 200 mL de meio de cultura líquido, foram adicionados 8 discos de micélio. Após 7 dias de crescimento, foram adicionados 100 mL de AcOEt a cada frasco *Schott* e estes foram deixados em repouso durante a noite. Após o repouso, os frascos foram levados ao banho de ultrassom por 10 min. Em seguida, a mistura meio de cultivo + AcOEt foi filtrada à vácuo para remoção do material biológico e submetida a uma extração líquido-líquido. A fração AcOEt foi coletada e a fração de meio de cultura foi particionada novamente com 100 mL de AcOEt. As frações AcOEt foram reunidas, secas em rotaevaporador e ressuspensa em MeOH/H₂O (95:5). A ressuspensão em MeOH foi particionada com hexano para o desengorduramento do extrato. Esse procedimento foi realizado 3 vezes e a fração hexânica foi descartada. A fração metanólica foi seca e fracionada por extração em fase sólida (SPE) em colunas pré-empacotadas de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (CN, 2 g, Waters). Como gradiente de eluição, utilizou-se: (a) CH₂Cl₂ 100%, (b) CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), (c) AcOEt 100%, (d) AcOEt/MeOH (1:1) e (e) MeOH 100%.

A fração aquosa resultante da extração líquido-líquido entre meio de cultura e AcOEt foi extraída com uma mistura de resinas poliméricas XAD-2, XAD-4 e XAD-7 na proporção de 1:1:1. Após a evaporação do resíduo de AcOEt ainda presente na fração aquosa, foram adicionados a cada frasco *Schott* 20 g da mistura de resinas. Os frascos foram submetidos a agitação orbital de 160 rpm por 1 noite a 25 °C. A mistura de resinas foi separada da fração aquosa por filtração à vácuo e lavada com água, que foi descartada. Em seguida, foi realizada a dessorção do material orgânico adsorvido nas resinas utilizando-se MeOH e MeOH/acetona (1:1). Os extratos MeOH e MeOH/acetona foram reunidos e secos. O extrato resultante foi fracionado por SPE em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com

grupos octadecilsilano (C₁₈, 2 g, Phenomenex), utilizando-se o seguinte gradiente de eluição: (a) H₂O/MeOH (3:1), (b) H₂O//MeOH (1:1), (c) MeOH/ H₂O (3:1) e (d) MeOH 100%.

4.2.4.2 Metodologia 2 de extração dos meios de cultivo e fracionamento dos extratos de *Colletotrichum* spp.

A metodologia 2 foi desenvolvida com base no procedimento descrito por Sica e colaboradores (2015). As linhagens fúngicas selecionadas foram inoculadas para placas de Petri contendo o meio de cultura malte 2% + ágar 2%. Após atingido o tempo de crescimento de 7 dias, foram transferidos 40 discos de micélio para tubos de ensaio. Para cortar os discos de micélio, empregou-se um furador de rolha metálico de 9 mm de diâmetro. Depois de transferidos, os discos de micélio foram fragmentados com um bastão de vidro. Posteriormente, adicionou-se uma das seguintes misturas de solventes de extração: (A) iPrOH/EtOH/MeOH (1:1:1) + TFA 1% e (B) iPrOH/EtOH/MeCN (1:1:1) + TFA 1%. Os extratos foram levados ao banho de ultrassom por 15 min e, então, filtrados em algodão para remoção do material biológico e meio de cultura. O solvente foi evaporado em speedvacs e os extratos resultantes foram fracionados por SPE em colunas pré-empacotadas de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (CN, 2 g, Waters). Como gradiente de eluição, utilizou-se: (a) iPrOH 100%, (b) iPrOH/MeOH (1:1) e (c) MeOH 100%.

4.2.4.3 Metodologia 3 de extração dos meios de cultivo e fracionamento dos extratos de *Colletotrichum* spp.

Em frascos do tipo *Schott* contendo 50, 100 e 200 mL de meio de cultura, foram adicionados 2, 4 e 8 discos de micélio, respectivamente. Após atingido o tempo de crescimento de 7 dias, o meio de cultura juntamente com o micélio fúngico foram transferidos para frascos de liofilizador, congelados com nitrogênio líquido (procedimento conhecido com *quenching*) e liofilizados. Após a secagem completa das amostras, adicionou-se MeOH ao frasco, que foi levado ao banho de ultrassom por 20 min e, em seguida, filtrado sob vácuo. O procedimento de extração foi realizado 3 vezes. O extrato MeOH foi seco e fracionado por extração em fase sólida (SPE) em colunas pré-empacotadas de sílica-gel derivatizada com grupos

cianopropila (CN, Waters). Como gradiente de eluição, utilizou-se: (a) CH₂Cl₂ 100%, (b) CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), (c) AcOEt 100%, (d) AcOEt/MeOH (1:1) e (e) MeOH 100%.

4.2.5 Análise das frações dos meios de cultivo de *Colletotrichum* spp. por UPLC-ESI-QToF-MS

Todas as frações de meio de cultura de *Colletotrichum* spp. obtidas a partir do emprego das metodologias 1, 2 e 3 foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS. Utilizou-se uma coluna ACQUITY BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 20 a 50% de B em 6 min, de 50 a 98% de B de 6,0 a 8,5 min, manteve-se em 98% de B de 8,5 a 9,0 min, 98 a 20% B de 9,0 a 9,1 min e 20% de B de 9,1 a 10,0 min. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹, volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos em modo MS^E *Continuum*, em modo positivo e resolução, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, intervalo de massa de *m/z* 150 a 1000, *scan time* de 0,2 s, energia de colisão de 0 eV para a função 1 e rampa de 20 - 30 eV para a função 2.

4.2.6 Avaliação da reprodutibilidade das metodologias de extração e fracionamento empregando-se ferramentas estatísticas

Após as análises por UPLC-ESI-QToF-MS em modo MS^E *Continuum*, os dados brutos foram processados empregando-se o software UNIFI Scientific Information System versão 1.8 (Waters Corporation). Aplicou-se a subtração automática de background e suavização e redução de ruído. O filtro de subtração de background e ruído foi definido como "alto"; "intensity threshold" para a remoção de *features* foi definido como 6000 counts para a função 1 (baixa energia) e 3000 counts para a função 2 (alta energia); número total de picos extraídos por canal = 100000; componentização dos picos detectados foi baseada na carga máxima de um cluster de 2 e o número máximo de isótopos foi definido como 5. A versão atual do software não permite realizar subtração dos brancos analíticos. Após processamento, análises estatísticas, como análises multivariadas (MVA) e a análise dos componentes principais (PCA) foram realizadas empregando-se o software

EZInfo (Waters Corporation). As análises de PCA foram realizadas com o intuito de se avaliar a reprodutibilidade das metodologias de extração e fracionamento, requisitos necessários para estudos de metabolômica.

4.2.7 Obtenção, extração e fracionamento dos extratos do meio de cultivo de *Colletotrichum* spp. – Experimento 1

Após a escolha da metodologia de extração e fracionamento mais adequada para a obtenção das amostras de *Colletotrichum*, procedeu-se com o crescimento, extração e fracionamento do meio de cultura de todas as 25 linhagens fúngicas. Após a reativação das linhagens em placas de Petri, 8 discos de micélio foram transferidos para frascos de vidro do tipo *Schott*, contendo 200 mL de meio de cultura líquido, preparado segundo o procedimento descrito no item 4.2.2.1. Após a inoculação, os frascos foram acondicionados em incubadora do tipo BOD por 7 dias, temperatura de 25 °C, em modo estático. Decorrido o tempo de incubação, os extratos de meio de cultura foram obtidos e fracionados de acordo com a metodologia 1, descrita previamente no item 4.2.4.1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Além dos meios de cultura inoculados com cada uma das linhagens de *Colletotrichum*, também foi realizada a extração e fracionamento de experimentos chamados de “brancos”. Estes experimentos eram constituídos apenas do meio de cultura, sem a presença do fungo, e também foram realizados em triplicata. O procedimento de extração e fracionamento dessas amostras foi realizado de forma idêntica aos experimentos contendo os fungos. Os experimentos nos quais as linhagens de *Colletotrichum* permaneceram incubadas por 7 dias foram chamados de “Experimento 1”.

4.2.8 Análise das amostras do Experimento 1 por UPLC-ESI-QToF-MS

As amostras obtidas no Experimento 1 foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS, segundo as condições descritas na seção 3.2. Utilizou-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 20 a 50% de B em 6 min, de 50 a 98% de B de 6,0 a 8,5 min, manteve-se em 98% de B de 8,5 a 9,0 min, 98 a 20% B de 9,0 a

9,1 min e 20% de B de 9,1 a 10,0 min. As amostras foram preparadas na concentração de 2 mg mL⁻¹, volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos nos modos DDA (*Data Dependent Acquisition*), para avaliação dos resultados empregando-se a ferramenta *molecular networking* e MS^E *Continuum* para avaliação dos resultados empregando-se ferramentas estatísticas no software UNIFI (Waters Corporation).

A aquisição dos espectros de massas em modo DDA foi realizada em modo positivo e resolução, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, intervalo de massa de *m/z* 100 a 1500, *scan time* de 0,2 s, 5 íons selecionados a partir de cada MS *survey*, taxa de scan MS/MS de 0,2 s, exclusão dinâmica de picos de 5 s ou 10 mDa, energia de colisão MS/MS com rampa LM CE de 6-9 V e rampa HM CE 60-80 V. Já a aquisição dos espectros de massas em modo MS^E *Continuum* foi realizada em modo positivo e resolução, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, intervalo de massa de *m/z* de 150 a 1000, *scan time* de 0,2 s, energia de colisão de 0 eV para a função 1 e rampa de 20 - 30 eV para a função 2.

4.2.9 Avaliação dos resultados das análises do Experimento 1 empregando-se ferramentas estatísticas

Após as análises por UPLC-ESI-QToF-MS, em modo MS^e *Continuum*, os dados brutos foram processados empregando-se o software UNIFI Scientific Information System versão 1.8 (Waters Corporation), utilizando o modo de extração e processamento de dados *Accurate Mass Screening on MS^e Data*. Aplicou-se a subtração automática de background e suavização e redução de ruído. O filtro de subtração de background e ruído foi definido como "alto"; "intensity threshold" para a remoção de features foi definido como 6000 counts para a função 1 (baixa energia) e 3000 counts para a função 2 (alta energia); número total de picos extraídos por canal = 100000; componentização dos picos detectados foi baseada na carga máxima de um cluster de 2 e o número máximo de isótopos foi definido como 5. A versão atual do software não permite realizar subtração dos brancos analíticos. Após processamento. As análises estatísticas, como análises multivariadas (MVA) e a análise dos componentes principais (PCA) foram realizadas empregando-se o software EZInfo (Waters Corporation).

4.2.10 Processamento dos dados de UPLC-ESI-QToF-MS e avaliação dos resultados empregando-se *molecular networking*

As redes moleculares foram criadas na plataforma online *GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking* (<https://gnps.ucsd.edu>), empregando-se METABOLOMICS-SNETS workflow. Os dados brutos adquiridos em modo DDA foram convertidos do formato .raw (Waters) para o formato universal .mzXML empregando-se o software *Proteowizard MSConvert* (versão 3.0.11392). Foram utilizados os seguintes parâmetros: output format = mzXML; binary encoding = 32 bits; Write index = checked, filter = pick picking; algorithm = vendor; MS levels = 1-2. Os dados .mzXML foram carregados na plataforma GNPS utilizando-se o servidor FTP *Filezilla*. Para a criação da rede molecular, as amostras do Experimento 1 foram organizados da seguinte forma: G1 (grupo 1) = brancos analíticos, G2 (grupo 2) = frações A-E dos brancos de meio de cultura, G3 (grupo 3) = frações A-E das linhagens endofíticas L1 a L16, e G4 (grupo 4) = frações A-E das linhagens fitopatogênicas L17 a L25. Os dados foram então agrupados com MS-Cluster considerando uma tolerância de massa para o íon precursor de 0,02 Da e uma tolerância de massa para o íon fragmento de 0,02 Da na criação dos espectros de consenso. Espectros de consenso que continham menos de 2 espectros MS/MS foram descartados. A rede molecular foi criada de modo que as conexões entre dois nodos tivessem *cosine score* acima de 0,6 e pelo menos 4 fragmentos comuns. Após a criação da rede molecular na plataforma GNPS, a rede molecular resultante foi carregada no programa de visualização *off-line Cytoscape* (versão 3.7.1).

4.2.11 Obtenção e extração do meio de cultivo de *Colletotrichum* spp. – Experimentos 2 e 3

Para a realização do Estágio de Pesquisa no Exterior (Simon Fraser University, Canadá), as 25 linhagens de *Colletotrichum* foram crescidas novamente, empregando-se diferentes tempos de incubação. O intuito destes experimentos adicionais era avaliar se a composição química dos extratos de meio de cultivo de *Colletotrichum* era influenciada pelo tempo de crescimento das linhagens. Em tais experimentos, frascos de vidro do tipo *Schott* contendo 200 mL de meio de cultura líquido e inoculados com 8 discos de micélio das linhagens fúngicas foram

acondicionados em incubadora do tipo BOD temperatura de 25 °C, em modo estático, por 14 e 21 dias. Os extratos de meio de cultura foram obtidos utilizando-se uma adaptação da metodologia 1, descrita no item 4.2.4.1. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 100 mL de AcOEt a cada frasco *Schott* e estes foram deixados em repouso durante a noite. Após o repouso, os frascos foram levados ao banho de ultrassom por 10 min e, então, filtrados à vácuo. Com a porção líquida, foi realizada uma extração líquido-líquido, a fração AcOEt foi coletada e a fração de meio de cultura foi particionada novamente com 100 mL de AcOEt. As frações AcOEt foram reunidas, secas em rotaevaporador e ressuspensa em MeOH/H₂O 95:5. A fração MeOH foi particionada com hexano para o desengorduramento do extrato. Esse procedimento foi realizado 3 vezes. A fração metanólica foi seca em rotaevaporador e a fração hexânica foi descartada. Os brancos de meio de cultura (meio de cultura sem a presença do fungo) para cada um dos tempos de incubação foram extraídos de forma idêntica aos experimentos contendo os fungos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os experimentos nos quais as linhagens de *Colletotrichum* permaneceram incubadas por 14 e 21 dias foram chamadas de “Experimento 2” e “Experimento 3”, respectivamente.

4.2.12 Análise das amostras de *Colletotrichum* por UPLC-IMS-QToF-HRMS

As análises das amostras de *Colletotrichum* obtidas a partir dos Experimentos 1, 2 e 3 foram realizadas no laboratório do Prof. Roger Linington (Departamento de Química, Simon Fraser University, Canada) em um cromatógrafo líquido Waters ACQUITY UPLC I-Class acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Waters SYNAPT G2-Si com analisador de massas híbrido quadrupolo - *time-of-flight* (QToF), interface eletrospray (ESI) e cela de mobilidade iônica *traveling wave ion mobility* (TWIM). Foi utilizada uma coluna C₁₈ HSS T3 (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,8 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico (B). Utilizou-se o seguinte gradiente de eluição: a condição inicial de 10% de B foi mantido até 0,3 min, seguida de um gradiente linear de 10 a 90% de B de 0,3 a 4,7 min, de 90 a 98% de B de 4,7 a 5,5 min, manteve-se em 98% de B de 5,5 a 6,3 min, 98 a 10% B de 6,3 a 6,31 min e 10% de B de 6,31 a 8,1 min. As amostras foram preparadas na

concentração de 0,4 mg mL⁻¹, volume de injeção de 5 µL e vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos em modo HDMS^E *Continuum*, em modo positivo e resolução, tempo de aquisição de 8,1 min, fonte ESI, intervalo de massa de m/z 50 a 1500, *scan time* de 0,25 s, seleção automática de íon precursor (TIC Intensity threshold) = 5, intervalo de detecção de íons produtos = 100 mDa e 10 s, *auto trap MS Collision Energy* = 4 eV, *auto transfer MS Collision Energy* = 2 eV para função 1 e *transfer MS Collision Energy* = 30-30 eV para a função 2. As condições do ESI foram: voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de 20 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, vazão do gás no cone de 30 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação de 600 L h⁻¹. A cela de mobilidade iônica foi preenchida com gás hélio, vazão de 180 mL min⁻¹, velocidade de onda de 1200 m s⁻¹ e altura de ondas de 40 V. Para calibração interna, utilizou-se uma solução de leucina-encefalina 2 µg mL⁻¹, infundida pela sonda do lockmass com vazão de 10 µL min⁻¹ em intervalos de 10 s, *scan time* de 0,25 s. Durante as análises, a coluna foi mantida a 40 °C e as amostras no amostrador automático foram mantidas a temperatura ambiente. Cada uma das amostras, bem como os brancos de meio de cultura e brancos analíticos foram preparados em triplicata e analisados de forma independente, como replicatas técnicas. Além disso, todas as amostras, incluindo as replicatas técnicas, foram analisadas de forma aleatória.

4.2.13 Processamento dos dados de UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se MZmine 2 e análises estatísticas.

Com o intuito de se avaliar estatisticamente os resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS, os dados brutos HDMS^E foram processados empregando-se o programa MZmine (versão 2.33) e a plataforma *online* Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). No processamento via MZmine, a detecção de massa foi realizada somente para a função MS¹ (scans 1 a 877) utilizando-se o algoritmo *Recursive threshold*, nível de ruído definido em 1000 e largura de pico de 0,03 m/z . Para a construção do cromatograma, considerou-se somente a função MS¹ (scans 1 a 877), tempo mínimo de 0,1 min, altura mínima de 2000 e tolerância de massa de 0,05 m/z ou 10,0 ppm. Em seguida, procedeu-se com a deconvolução dos dados empregando-se o algoritmo *Baseline cut-off*, altura mínima do pico de 2000, intervalo de duração mínima do pico de 0,01 a 3,00 min e

nível da linha base de 1000. Também foram realizadas as etapas de agrupamento de isótopos (tolerância de massa de 20 ppm, tolerância de tempo de retenção de 0,1 min e carga mínima de 3⁺), normalização do tempo de retenção (tolerância de massa de 0,05 m/z ou 10,0 ppm, tolerância de tempo de retenção de 0,1 min e intensidade padrão mínima do pico de 2000) e alinhamento dos dados (tolerância de massa de 0,05 m/z ou 10,0 ppm e tolerância de tempo de retenção 0,1 min). Possíveis ruídos e picos não comuns entre duplicatas da mesma amostra foram eliminados. A lista de *features* resultantes foi exportada em formato csv e, então, carregada na plataforma Metaboanalyst. Para o processamento dos dados, foram utilizados os seguintes parâmetros: tipo de dados = tabelas de intensidade de picos; formato = amostras em colunas (não-pareadas); normalização das amostras = normalização por mediana; transformação dos dados = transformação por log; e escala dos dados = escala de Pareto.

4.2.14 Processamento dos dados de UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se a plataforma MSeXpress

MSeXpress é uma plataforma de processamento de dados brutos adquiridos em equipamentos de UPLC-MS Waters desenvolvida a partir de uma parceria entre o grupo do prof. Roger Linington (Simon Fraser University, Canada) e a empresa Waters Corporation. Essa plataforma consiste em três scripts codificados em linguagem de programação Python, nos quais são realizados as seguintes etapas de processamento: deconvolução dos dados brutos, *pick picking*, alinhamento, comparação entre diferentes replicatas e *basketing*. Os dados brutos .raw são processados utilizando-se os três scripts que compõem MSeXpress, de forma sequencial, e ao final do processamento obtém-se para cada amostra uma lista dos íons precursores, (“arquivos func001”, que abrangem somente os dados de MS¹), bem como uma lista de íons fragmento (“arquivos func002”, que contém as informações de MS²). Além disso, obtém-se também arquivos resultantes das etapas de comparação entre replicatas (“arquivos CPPIS”), que são empregados na plataforma GNPS.

4.2.15 Processamento dos dados de UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se a plataforma MS2Analyte

MS2Analyte é uma plataforma de processamento dos arquivos func001, resultantes da etapa de processamento via MSeXpress, que tem como objetivo principal agrupar todos os picos referentes a um único composto (diferentes adutos e fragmentos originados na fonte de ionização), reduzindo consideravelmente o volume de informações resultantes das análises de metabolômica não-direcionada. Esta ferramenta, que é composta por 3 scripts codificados em linguagem de programação Python, está sendo desenvolvida pelo prof. Roger Linington e surgiu devido a inexistência de softwares de processamento de acesso livre que fornecessem uma lista de compostos/analitos presentes nas amostras ao invés de lista de *features*. No processamento empregando-se MS2Analyte, picos com a mesma massa acurada e o mesmo tempo de retenção (dentro de um intervalo) são considerados um único analito. Além disso, picos que não apresentam distribuição isotópica são eliminados. Após a obtenção da lista de analitos presentes nas amostras, é realizada a comparação entre replicatas e, em seguida, a comparação entre diferentes amostras. Uma vez que as etapas de processamento são realizadas para as amostras e os brancos, ao final, é possível identificar quais compostos estão presentes nos brancos analíticos e de meio de cultura. Para visualização dos resultados, os arquivos .csv resultantes do processamento via MS2Analyte foram carregados no software Tableau Desktop versão 2018.3 (Tableau Software).

4.2.16 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se *molecular networking*

Após as análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS, os arquivos CPPIS resultantes do processamento das amostras de *Colletotrichum* via MSeXpress foram carregadas na plataforma GNPS utilizando-se o servidor *FTP Filezilla*. Os experimentos 1, 2 e 3 foram avaliados separadamente. Para a criação das redes moleculares, as amostras foram agrupadas da seguinte forma: G1 (grupo 1) = brancos analíticos, G2 (grupo 2) = brancos de meio de cultura, G3 (grupo 3) = amostras referentes às linhagens endofíticas L1 a L16, e G4 (grupo 4) = amostras relacionadas às linhagens fitopatogênicas L17 a L25. Os dados foram agrupados

com MS-Cluster considerando uma tolerância de massa para o íon precursor de 0,02 Da e uma tolerância de massa para o íons fragmentos de 0,02 Da para a criação de espectros de consenso. Espectros de consenso que continham menos de 2 espectros MS/MS foram descartados. A rede molecular foi criada de modo que as conexões entre dois nodos tivessem *cosine score* acima de 0,6 e pelo menos 4 fragmentos correspondentes. Os espectros MS/MS foram pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS, com parâmetros idênticos aos da criação da rede molecular.

4.2.17 Análise da amostra L23T3R2 por HPLC-SPE-UV-NMR

As análises da amostra L23T3R2 por HPLC-SPE-UV-RMN foram realizadas objetivando-se o isolamento do composto radicicol. A identificação deste composto, detectado nas amostras da linhagem fitopatogênica *C. graminicola* L23, foi realizada a partir do processo de desreplicação empregando-se a biblioteca de compostos de *Colletorichum* e a base de dados ANTIBASE (versão 2012), bem como estudos de fragmentação comparativos utilizando-se um padrão comercial do composto. Uma vez que o metabólito presente na amostra L23T3R2 apresentava uma forte absorção na região do UV, resolveu-se proceder com o isolamento e identificação inequívoca do composto empregando-se técnicas de RMN. As análises por HPLC-SPE-UV-RMN foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar), utilizando um cromatógrafo Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A, detector de ultravioleta G1314B e forno de coluna G1316A. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa Kinetex® PFP (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; Phenomenex) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeOH (1:1) + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição empregado foi de 10 a 100% de B em 20 min, manteve-se em 100% de B de 20 min a 26 min, de 100% a 10% de B de 26 a 27 min e manteve-se em 10% de B de 27 min a 35 min. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹. A amostra L23T3R2 foi preparada a uma concentração de 5,0 mg mL⁻¹ e o volume de injeção de 50 µL. Foram realizadas um total de 30 injeções. No detector de UV, as análises foram monitoradas no comprimento de onda de 254 nm.

Após a etapa de separação cromatográfica, o composto de interesse foi trapeado em cartucho SPE de polidivinilbenzeno do tipo HySphere C₁₈ *end-capped* sílica (2 mm i.d., 10 µm) previamente condicionados com MeCN. Após trapeamento, os cartuchos SPE foram secos com N₂ por 30 min e eluídos com MeOH em vial previamente pesado. A análise de RMN de ¹H foram realizadas em modo off-line em um equipamento Bruker AVANCE III (9,4 T), de acordo com o procedimento descrito no item 3.3.

4.2.18 Isolamento e identificação de metabólito detectado nas amostras de linhagens endofíticas de *Colletotrichum*

Após avaliação conjunta dos resultados do processamento via MS2Analyte e das redes moleculares, verificou-se a presença de um metabólito de *m/z* 568 produzido somente pelas linhagens endofíticas de *Colletotrichum*. Realizou-se o processo de desreplicação dos dados de massa acurada nas bases de dados *Dictionary of Natural Products*, *Antibase* 2012 e na biblioteca de compostos de *Colletotrichum*, entretanto não foram obtidos resultados. Com a possibilidade de se tratar de um composto inédito, após análises por HPLC-UV-ELSD-MS, as amostras endofíticas de *Colletotrichum* nas quais observou-se a presença desse composto foram reunidas (amostra EE) e submetidas a duas etapas de separação por HPLC-UV. Na primeira etapa, utilizou-se uma coluna semipreparativa de fase reversa InertSustain C18 (dimensões: 10 x 250 mm, 5 µm; GL Science), fase móvel constituída por H₂O (A) e MeCN (B) e vazão de 4 mL min⁻¹. O gradiente de eluição empregado foi de 10 a 100% de B em 30 min, manteve-se em 100% de B de 30 min a 35 min, de 100% a 10% de B de 35 a 35,1 min e manteve-se em 10% de B de 35,1 min a 40 min. No detector de UV foram monitorados os comprimentos de onda de 280 e 350 nm. Foram obtidas 8 frações, designadas EE1 - EE8. Na segunda etapa, a fração EE7 foi submetida a separação por HPLC-ELSD empregando-se uma coluna analítica XTerra® RP18 (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; Waters Corporation), fase móvel constituída por (A) H₂O e (B) MeCN:MeOH (1:1) e vazão de 1 mL min⁻¹. O gradiente de eluição empregado foi de 70 a 90% de B em 20 min, de 90 a 70% de B de 20 a 21 min e manteve-se em 70% de B de 21 a 30 min. Foram obtidas 2 frações, designadas EE7A e EE7B. As frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS. O composto de interesse foi detectado na fração EE7B,

que apresentou grau de pureza satisfatório e foi, então, submetida a análise por UPLC-ESI-QToF-MS e RMN uni e bidimensionais.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Experimentos para avaliação do tempo e condições de crescimento das linhagens de *Colletotrichum*

Os experimentos de avaliação do tempo e condições de crescimento das linhagens endofíticas L3 e L6 foram realizados com o intuito de verificar em qual modo de crescimento (estático ou com agitação) e tempo de incubação (7, 14, 21 e 28 dias para o modo estático e 5, 10, 15 e 20 dias para o modo agitação) haveria maior diversidade química de compostos produzidos pelos fungos. Após as análises por UPLC-ESI-QToF-MS, os cromatogramas das 144 amostras resultantes destes experimentos foram cuidadosamente analisados e comparados. Observou-se que o perfil químico das mesmas frações varia consideravelmente de uma condição de crescimento para outra. Entretanto, foi possível observar que alguns compostos, mesmo em condições de crescimento diferentes, ainda são detectados. Essa observação fica evidente nos cromatogramas apresentados na figura 4. Os cromatogramas correspondem à fração 100% CH₂Cl₂ dos experimentos de crescimento e produção de metabólitos pela linhagem endofítica de *Colletotrichum* L3 durante 7, 14, 21 e 28 dias de crescimento, em modo estático a 25 °C (condições 5 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D), respectivamente).. É possível observar que os *features* de m/z 211,097 ($t_R \approx 2,75$ min), m/z 195,101 ($t_R \approx 4,10$ min) e m/z 211,085 ($t_R \approx 4,605$ min) foram detectados nas quatro análises, mesmo em condições diferentes de crescimento do fungo.

Figura 4 - Cromatogramas da fração 100% CH₂Cl₂ dos experimentos de crescimento e produção de metabólitos pela linhagem endofítica de *Colletotrichum* L3 durante 7, 14, 21 e 28 dias de crescimento, em modo estático a 25 °C (condições 5 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D), respectivamente).

Fonte: Autoria própria.

Verificou-se também que nas condições com menores tempos de crescimento (5, 7, 10 e 14 dias - condições 1, 5, 2, e 6, respectivamente), observou-se maior diversidade química de compostos em modo estático, enquanto que em condições com maiores tempos de crescimento (15, 20, 21 e 28 dias - condições 3, 4, 7 e 8, respectivamente), foi observado um maior número de compostos nos experimentos que permaneceram sob agitação.

Na figura 5 são apresentados os cromatogramas correspondentes à fração AcOEt/MeOH (1:1) dos experimentos de crescimento da endofítica L6 utilizando as condições 2 e 5. É possível notar que no cromatograma referente ao experimento empregando a condição 5 de crescimento, há maior diversidade de compostos químicos do que no cromatograma cujo experimento foi realizado empregando-se a condição 2.

Figura 5 - Cromatogramas da fração AcOEt/MeOH (1:1) dos experimentos de crescimento e produção de metabólitos pela linhagem endofítica de *Colletotrichum* L6 empregando as condições de crescimento 2 (A – agitação a 150 rpm, temperatura de 25°C, 10 dias de incubação) e 5 (B – modo estático, temperatura de 25°C, 7 dias de incubação).

Fonte: Autoria própria.

Escolheu-se como melhor condição a condição 5 de crescimento (modo estático, temperatura de 25 °C e tempo de crescimento de 7 dias), uma vez que foi uma das condições que apresentou maior diversidade de compostos químicos em todas as frações quando comparadas com as demais. Além disso, o tempo de crescimento é menor e a realização dos experimentos não necessita de uma incubadora com agitação.

4.3.2 Metodologias de extração e fracionamento dos extratos de *Colletotrichum*

Depois de determinada a melhor condição de crescimento, foram realizados experimentos empregando três metodologias diferentes de extração e fracionamento a fim de se avaliar qual destas metodologias apresentava maior reprodutibilidade e promovia um fracionamento satisfatório dos extratos. Após a análise por UPLC-ESI-QToF-MS dos extratos de *Colletotrichum* spp., realizou-se a análise estatística dos resultados obtidos (análise multivariada e PCA). A análise dos componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), é uma

técnica estatística multivariada associada à redução de dimensionalidade, no qual um conjunto de dados com variáveis multidimensionais é transformado em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas “Componentes Principais”. (RENCHE, 2002). A visualização dos resultados empregando-se gráficos de PCA facilita a avaliação do grau de semelhança/diferença entre grupos de amostras, bem como a avaliação da reprodutibilidade de procedimentos utilizados na geração de replicatas.

4.3.2.1 Metodologia 1 de extração e fracionamento dos extratos

O gráfico de PCA dos dados obtidos a partir das análises por UPLC-ESI-QToF-MS das amostras extraídas e fracionadas utilizando-se a metodologia 1 é apresentado na figura 6.

Figura 6 - Distribuição fatorial de Comp[1] versus Comp[2] para os dados obtidos a partir dos cromatogramas das amostras que foram extraídas e fracionadas utilizando-se a metodologia 1.

CG8: linhagem fitopatogênica L24 (*C. gloeosporioides*); **MA:** linhagem endofítica L3 (*Colletotrichum* sp. P7MAC3F2; **E1:** condição de crescimento 5 (modo estático, 7 dias de incubação a 25° C); **1:** fração CH₂Cl₂ 100%; **2:** fração CH₂Cl₂/AcOEt (1:1); **3:** fração AcOEt 100%; **4:** fração AcOEt/MeOH (1:1); e **5:** fração MeOH 100%
Fonte: Autoria própria.

A partir da análise do gráfico de PCA, é possível observar que as replicatas estão relativamente bem agrupadas. A grande maioria dos conjuntos de replicatas encontra-se no mesmo quadrante do gráfico, o que permite concluir que a metodologia de extração e fracionamento utilizada é reprodutível, permitindo a obtenção de replicatas que apresentam perfis químicos semelhantes. Tal observação pode ser confirmada quando os cromatogramas são comparados. Ao se comparar, por exemplo, os cromatogramas das replicatas da fração 100% CH₂Cl₂ obtidas a partir do fracionamento do extrato da linhagem L3 (figura 7), é possível notar que as frações obtidas de extratos iniciais diferentes possuem perfis químicos bastante semelhantes.

Figura 7 - Cromatogramas da fração 100% CH₂Cl₂ oriundas do fracionamento do extrato da linhagem endofítica de *Colletotrichum* L3 empregando-se a metodologia 1: (A) replicata 1, (B) replicata 2 e (C) replicata 3.

Fonte: Autoria própria.

4.3.2.2 Metodologia 2 de extração e fracionamento dos extratos

Na figura 8 é apresentado o gráfico de PCA obtido a partir das análises por UPLC-ESI-QToF-MS das amostras que foram submetidas a extração e fracionamento segundo a metodologia 2.

Figura 8 - Distribuição fatorial de Comp[1] versus Comp[2] para os dados obtidos a partir dos cromatogramas das amostras que foram extraídas e fracionadas utilizando-se a metodologia 2.

CG8: linhagem fitopatogênica L24 (*C. gloeosporioides*); **C1:** linhagem endofítica L3 (*Colletotrichum* sp. P7MAC3F2; **S2:** extração utilizando mistura de solvente iPrOH/EtOH/MeOH (1:1:1) + TFA 1%; **S4:** extração utilizando mistura de solvente iPrOH/EtOH/MeCN (1:1:1) + TFA 1%; **F1:** fração iPrOH 100%; **F2:** fração iPrOH/MeOH (1:1); e **F3:** fração MeOH 100%.

Fonte: autoria própria.

Analisando-se gráfico de PCA apresentado na figura 8, nota-se que as replicatas não apresentam um agrupamento satisfatório, uma vez que estas, por vezes, encontram-se muito distantes em termos de distribuição espacial ou então ocupando quadrantes distintos no gráfico. Estas observações sugerem que a metodologia 2 não é uma metodologia de extração que confere reprodutibilidade à análise, de modo que as replicatas apresentam perfis químicos distintos. Esta informação pode ser confirmada quando se compara os cromatogramas das replicatas da fração 100% iPrOH obtidas a partir do fracionamento do extrato da linhagem endofítica L3 extraída com a mistura de solventes B (iPrOH/EtOH/MeCN (1:1:1) + TFA 1%) (figura 9).

Figura 9 - Cromatogramas da fração 100% iPrOH oriundas do fracionamento do extrato da linhagem endofítica de *Colletotrichum* L3 empregando-se a metodologia 2 e extraída com a mistura de solventes B (iPrOH/EtOH/MeCN (1:1:1) + TFA 1%): (A) replicata 1, (B) replicata 2 e (C) replicata 3.

Fonte: Autoria própria.

4.3.2.3 Metodologia 3 de extração e fracionamento dos extratos

O fracionamento de todos os extratos obtidos utilizando-se a metodologia 3 não foi concluído. Entretanto, mesmo sem o término das análises, avaliou-se que a

metodologia 3 não é uma metodologia viável para experimentos de metabolômica, uma vez que o tempo para obtenção dos extratos brutos é muito longo. Foram necessários cerca de 8 dias para a liofilização completa de cada amostra e por volta de 3 meses para a liofilização completa de todos os experimentos teste, excluindo-se tempo de crescimento, procedimento de extração, fracionamento e análise dos extratos. Além disso, o tempo de necessário para evaporação completa do solvente utilizado na extração também é longo. Algumas amostras permaneceram de 5 a 7 dias em equipamento de speedvac até a evaporação completa do solvente, enquanto que outras, mesmo após esse período, ainda não estavam completamente secas.

Após a análise dos resultados obtidos para as metodologias 1 e 2 de extração e fracionamento e as observações realizadas durante a execução da metodologia 3, elegeu-se a metodologia 1 como a mais eficiente no fracionamento dos extratos, mais reprodutível e mais viável com relação ao tempo necessário para obtenção das amostras de *Colletotrichum*.

4.3.3. Avaliação dos resultados das análises por UPLC-ESI-QToF-MS do experimento 1 empregando-se ferramentas estatísticas

Após o processamento dos dados empregando o software UNIFI, os resultados obtidos a partir das análises das frações do experimento 1 por UPLC-ESI-QToF-MS foram submetidos a análise multivariada (MVA, do inglês *Multivariate Analysis*) e análise dos componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*). A partir da criação e interpretação dos gráficos de PCA, é possível avaliar a eficiência e a reprodutibilidade das metodologias adotadas e das análises realizadas, requisitos essenciais em estudos de metabolômica.

Nas figuras 10 e 11 são apresentados os gráficos de PCA das frações A (100% CH₂Cl₂) e D (AcOEt/MeOH 1:1), respectivamente, das linhagens L1, L4, L7, L10, L13, L16, L17, L19, L21, L23 e L25, além dos brancos do meio de cultivo. Já na figura 12 é apresentado o gráfico de PCA de todas as frações (A – E) das linhagens L1, L5, L10, L15, L17, L20, L23 e L25.

Figura 10 - Gráficos de scores de Comp[1] *versus* Comp[2] para a fração A (100% CH₂Cl₂) dos extratos de meio de cultivo das linhagens L1, L4, L7, L10, L13, L16, L17, L19, L21, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br).

(Linhagens endofíticas: L1, L4, L7, L10, L13, L16; linhagens fitopatogênicas: L17, L19, L21, L23 e L25)

Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Gráficos de scores de Comp[1] versus Comp[2] para a fração D (AcOEt/MeOH (1:1)) dos extratos de meio de cultivo das linhagens L1, L4, L7, L10, L13, L16, L17, L19, L21, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br).

(Linhagens endofíticas: L1, L4, L7, L10, L13, L16; linhagens fitopatogênicas: L17, L19, L21, L23 e L25)
Fonte: Autoria própria.

Figura 12- Gráficos de scores de Comp[1] versus Comp[2] de todas as frações dos extratos de meio de cultivo das linhagens L1, L5, L10, L15, L17, L20, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br).

(Lin/hagens endofíticas: L1, L5, L10 e L15; linhagens fitopatogênicas: L17, L20, L23 e L25. Frações: A = 100% CH₂Cl₂, B = CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), C = 100% AcOEt, D = AcOEt/MeOH (1:1) e E = 100% MeOH).
Fonte: Autoria própria.

A partir da análise dos gráficos de PCA apresentados nas figuras 10 e 11, é possível verificar que, comparando-se as mesmas frações de diferentes extratos, as replicatas encontram-se, em sua grande maioria, bem agrupadas e ocupando o mesmo quadrante nos gráficos de PCA. Tal observação nos confirma mais uma vez que a metodologia utilizada nas etapas de extração e fracionamento dos extratos do meio de cultivo de *Colletotrichum* é uma metodologia reproduzível, permitindo a obtenção de replicatas com composição química semelhante. Além disso, é possível verificar que, em ambos os gráficos, as frações de linhagens endofíticas encontram-se, em sua grande maioria, nos quadrantes do lado esquerdo dos gráficos de PCA, enquanto que as frações de linhagens fitopatogênicas encontram-se, nos quadrantes do lado direito. Assim, pode-se concluir que existe uma diferença na composição química do metaboloma das linhagens endofíticas e fitopatogênicas.

A figura 12, que apresenta todas as frações dos extratos de meio de cultivo das linhagens de *Colletotrichum* L1, L5, L10, L15, L17, L20, L23 e L25 e dos brancos dos meios de cultivo (M2Br) nos confirma novamente a eficiência da metodologia adotada nas etapas de extração e fracionamento dos extratos do meio de cultivo, uma vez que todas as frações encontram-se muito bem agrupadas entre si no gráfico de PCA.

4.3.4 Avaliação dos resultados das análises do experimento 1 por UPLC-ESI-QToF-MS empregando-se *molecular networking*

Após as análises estatísticas, os resultados das análises do experimento 1 por UPLC-ESI-QToF-MS foram avaliados empregando-se *molecular networking*. Na etapa de construção da rede molecular, as frações de *Colletotrichum* foram divididas em quatro grupos (G):

- Grupo 1 (G1): brancos analíticos (solventes utilizados nas etapas cromatográficas);
- Grupo 2 (G2): brancos do meio de cultivo malte 2% (meio de cultivo sem a presença dos micro-organismos, submetido ao mesmo processo de extração e fracionamento) ;
- Grupo 3 (G3): amostras relacionadas às linhagens de *Colletotrichum* endofíticas; e

- Grupo 4 (G4): amostras relacionadas às linhagens de *Colletotrichum* fitopatogênicas.

Na rede molecular, os nodos representam espectros MS/MS consenso (íon precursor + fragmentos) e o tamanho dos nodos é estabelecido pelo número de espectros detectados para cada consenso. As linhas conectando dois nodos indicam que existe similaridade espectral (padrão de fragmentação) significativa entre os dois espectros consenso, enquanto que a espessura da linha representa o grau de semelhança entre os dois nodos conectados (QUINN *et al.*, 2017).

Na figura 13 é apresentada a rede molecular gerada a partir do GNPS para as frações de *Colletotrichum* visualizada no software *Cytoscape*. Os nodos que foram detectados no G1, mas também em outros grupos foram coloridos de cinza, uma vez que muito provavelmente são compostos provenientes das etapas cromatográficas. Nodos detectados nos grupos G2, G3 e G4 foram coloridos de verde e provavelmente são componentes de meio de cultura. Nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul, enquanto que os nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho. Nodos detectados em ambos os grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo.

Figura 13 - Rede molecular contendo as frações de *Colletotrichum* endofíticas e fitopatogênicas e os brancos analíticos e do meio de cultivo.

Nodos relacionados a *features* detectados nas etapas cromatográficas foram coloridos de cinza; nodos do meio de cultivo foram coloridos de verde; nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul; nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho; nodos detectados em ambos grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo. Nodos que não pertencem à clusters foram removidos da rede molecular.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise da figura 13, verifica-se que muitos nodos presentes na rede molecular correspondem a compostos detectados nos brancos analíticos e no meio de cultivo. A rede molecular visualizada no programa *Cytoscape* apresenta, no total, 8831 nodos, dentre os quais 3482 são exclusivos das linhagens endofíticas (indicados em azul), 1230 são exclusivos das linhagens fitopatogênicas (indicados em vermelho), 1366 são espectros MS/MS consenso comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas (indicados em roxo), 1045 correspondem a *features*

oriundos das etapas cromatográficas (indicados em cinza) e 1714 estão relacionados a compostos presentes no meio de cultivo (indicados em verde). A grande quantidade de nodos cinza e verdes presentes na rede molecular evidencia a necessidade de utilizar softwares adequados para processar os dados após a aquisição dos mesmos, para que metabólitos de origem não-biológica não sejam confundidos e não atrapalhem a análise dos metabólitos de fato produzidos pelos micro-organismos. Além disso, 5556 nodos não pertencentes a clusters foram removidos da rede molecular apresentada na figura 13. Para muitos destes nodos únicos, observa-se o mesmo valor de massa do íon precursor. Entretanto, provavelmente por estes *features* não apresentarem o número mínimo de fragmentos comuns (4 fragmentos), são considerados compostos diferentes. O elevado número de nodos únicos na rede molecular, principalmente pelo fato de muitos possuírem o mesmo valor de massa do íon precursor, indica que os dados adquiridos não apresentam informações de MS2 de boa qualidade, de modo que os íons precursores não possuem fragmentos suficientes que atendam os parâmetros empregados na criação da rede molecular. Apesar disso, é possível verificar a presença de *clusters* de compostos detectados exclusivamente nas linhagens de *Colletotrichum* endofíticas, como, por exemplo, o *cluster A*, bem como *clusters* de compostos exclusivos das linhagens fitopatogênicas (*cluster B*) e *clusters* de compostos que são comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas (*cluster C*). A presença de nodos coloridos de azul e vermelho na rede molecular confirma nossa hipótese inicial de que existem compostos exclusivos das linhagens endofíticas e fitopatogênicas. Além disso, existem também compostos comuns, que muito provavelmente são compostos produzidos por fungos pertencentes a este gênero.

Apesar das muitas bibliotecas disponíveis no GNPS, somente 6 compostos foram anotados, todos eles presentes nas frações do branco do meio de cultura. De início, esperava-se que fosse possível identificar compostos a partir das bibliotecas do GNPS, o que facilitaria o processo de anotação e de interpretação química da rede molecular. Embora a ferramenta de *molecular networking* permita visualizar facilmente em quais amostras determinados compostos estão presentes, a não anotação de compostos de origem biológica a partir das bibliotecas não permitiu avaliar mais profundamente a expressão fenotípica de *Colletotrichum* e concluir se compostos produzidos pelos fungos fitopatogênicos são responsáveis pela fitopatogenicidade destas linhagens. A não identificação de compostos a partir das

bibliotecas do GNPS pode ser outro indicativo de que os dados adquiridos não apresentam informações de MS² de boa qualidade e/ou que muitos compostos de fungos ainda não foram incluídos nessas bibliotecas.

4.3.5 Análise das amostras de *Colletotrichum* por UPLC-IMS-QToF-HRMS e processamento dos dados brutos

Antes da aquisição dos dados de todas as amostras de *Colletotrichum* por UPLC-IMS-QToF-HRMS, foram testados diferentes modos de aquisição e diferentes softwares de processamento dos dados brutos disponíveis no laboratório. Dentre os modos de aquisição avaliados estão MS^E, DDA, HDMS^E e HDDDA. Já dentre os diferentes softwares de processamento, testou-se MSeXpress versões 1 e 2, ambos softwares de uso exclusivo do laboratório do professor Roger Linington, bem como o software comercial UNIFI e programas *in house* codificados na linguagem computacional Python como MS2Analyte e Replicate Comparison. Após a avaliação das análises teste, optou-se por adquirir os dados de *Colletotrichum* em modo HDMS^E e utilizar a plataforma MSeXpress versão 2 e MS2Analyte para processamento dos dados brutos. Os procedimentos de aquisição e processamento dos dados são descritos nos itens 4.2.12, 4.2.14 e 4.2.15.

4.3.6 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se análises estatísticas

Após o processamento dos dados brutos das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se o software MZmine, conforme descrito no item 4.2.13, os resultados foram avaliados utilizando-se ferramentas estatísticas, com a Análise dos Componentes Principais (PCA) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*). A partir da análise comparativa dos gráficos de PCA dos três experimentos, verificou-se que nos experimentos como menores tempo de crescimento (7 e 14 dias - experimentos 1 e 2, respectivamente), não há uma diferença significativa na composição química das amostras relacionadas às linhagens endofíticas e fitopatogênicas. Por outro lado, no experimento com maior tempo de crescimento (21 dias - experimento 3), as amostras relacionadas às linhagens endofíticas e fitopatogênicas possuem

composição química consideravelmente diferentes, de modo que ambos os grupos aparecem separados espacialmente nos gráficos de PCA. Tal fato pode ser observado nas figuras 14, 15 e 16, que correspondem aos gráficos de scores de Comp[1] *versus* Comp[2] para os experimentos 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 14 - Gráficos de scores de Comp[1] *versus* Comp[2] para o experimento 1 - fração B ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 1:1) dos extratos de meio de cultivo das linhagens de *Colletotrichum* e dos brancos dos meios de cultivo, além dos brancos analíticos.

△: brancos analíticos; +: brancos dos meios de cultivo; ×: linhagens de *Colletotrichum* endofíticas; ◇: linhagens de *Colletotrichum* fitopatogênicas

Fonte: Autoria própria.

Figura 15 - Gráficos de scores de Comp[1] versus Comp[2] para o experimento 2 - extratos de meio de cultivo das linhagens de *Colletotrichum*, brancos dos meios de cultivo e brancos analíticos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 16 - Gráficos de scores de Comp[1] versus Comp[2] para o experimento 3 - extratos de meio de cultivo das linhagens de *Colletotrichum*, brancos dos meios de cultivo e brancos analíticos.

Δ: brancos analíticos; +: brancos dos meios de cultivo; ×: linhagens de *Colletotrichum* endofíticas; ◇: linhagens de *Colletotrichum* fitopatogênicas

Fonte: Autoria própria

Ao analisar os gráficos de scores apresentados nas figuras 14, 15 e 16, nota-se que nos experimentos 1 e 2, nos quais as linhagens de *Colletotrichum* foram submetidas a menores tempos de incubação (7 e 14 dias, respectivamente), as amostras relacionadas às linhagens endofíticas (símbolos azuis) e fitopatogênicas (símbolos vermelhos) não se encontram separadas espacialmente. Tais observações indicam que, nos tempos de crescimento de 7 e 14 dias, as linhagens

endofíticas e fitopatogênicas produzem compostos bastante similares, talvez talvez metabólitos primários e/ou metabólitos associados ao gênero *Colletotrichum*. Além disso, as amostras de *Colletotrichum* também se encontram agrupadas aos meios de cultura. O agrupamento das amostras com os meios de cultura também indica que as amostras apresentam uma grande quantidade de compostos oriundos do meio de cultivo em sua composição, que talvez pelo tempo reduzido de crescimento, não tenham sido metabolizados e/ou modificados. Diferentemente, no gráfico de scores da figura 16, referente ao experimento 3, observa-se claramente que as amostra endofíticas e fitopatogênicas encontram separadas espacialmente, e, por sua vez, separadas também dos meios de cultura e dos brancos analíticos. Estes resultados sugerem que, em tempos de crescimento maiores, linhagens endofíticas e fitopatogênicas de *Colletotrichum* possuem metabolismo diferente e, consequentemente, produzem compostos diferentes.

Com o intuito de se avaliar os resultados de forma mais aprofundada, análises estatísticas adicionais, como a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês *Partial least squares-discriminant analysis*) foram realizadas. PLS-DA é uma técnica quimiométrica supervisionada que ilustra por meio de gráficos de scores de fácil interpretação, a separação entre os diferentes grupos de amostras. Este tipo de análise multivariada visa maximizar a covariância entre o conjunto de dados de metabolômica (variáveis independentes ou grupo X) e as variáveis dependentes correspondentes (grupo Y; subgrupos ou alvos que desejam ser estudados). Análises de PLS-DA permitem uma avaliação visual mais simplificada de conjuntos de dados complexos, uma vez que promove a redução de dimensões associadas ao conjunto de dados. Além disso, análises estatísticas derivadas das análises de PLS-DA, como gráficos de *loadings*, VIP scores (do inglês, *Variable Importance in the Projection*) e coeficiente de regressão, podem ser empregados para identificar as variáveis mais importantes associadas à separação dos grupos (BARTEL, KRUMSIEK e THEIS, 2013; GROMSKI *et al.*, 2015).

No gráfico de PLS-DA do experimento 3, apresentado na figura 17, é possível verificar que as amostras L17T3, L22T3 e L23T3 são as que possuem composição química mais diferenciada das demais, uma vez que encontram-se mais afastadas espacialmente no gráfico de scores. Dados estatísticos como VIP scores e coeficiente de regressão, ambos obtidos a partir das análises de PLS-DA, foram

utilizados para identificar as variáveis mais importantes para a separação entre diferentes grupos de amostras. Com relação às linhagens fitopatogênicas, não há *features* específicos responsáveis pela separação desse grupo de amostras em particular. Isso porque, muito provavelmente, as diferentes linhagens fitopatogênicas produzem compostos diferentes entre si, não havendo metabólitos comuns à todas as linhagens fitopatogênicas que sejam os responsáveis pelo afastamento espacial deste grupo de amostras das demais. Por outro lado, com relação às linhagens endofíticas, verifica-se que alguns metabólitos produzidos por tais linhagens contribuem de forma significativa para o agrupamento e separação espacial deste grupo de amostra em relação às demais. Na figura 18 é apresentado o gráfico de coeficiente de regressão obtido a partir da análise de PLS-DA para o experimento 3. De acordo com esse gráfico, os metabólitos que apresentam m/z 568,3867, m/z 690,2995, m/z 569,3786 e m/z 128,9615 são os compostos que contribuem de forma mais significativa para o agrupamento e separação espacial das amostras endofíticas em relação às outras amostras.

Figura 17 - Gráfico PLS-DA do Comp[4] versus Comp[5] para o experimento 3 - extratos de meio de cultivo das linhagens de *Colletotrichum*, brancos dos meios de cultivo e brancos analíticos.

△: brancos analíticos; +: brancos dos meios de cultivo; ×: linhagens de *Colletotrichum* endofíticas; ◇: linhagens de *Colletotrichum* fitopatogênicas

Fonte: Autoria própria

Figura 18 - Gráfico de coeficiente de regressão obtido a partir da análise de PLS-DA para o experimento 3.

4.3.7 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se MS2Analyte

Os resultados obtidos a partir do processamento via MS2Analyte versão 10 foram visualizadas empregando-se o programa de visualização Tableau Desktop. Na figura 15 é apresentado o gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* obtido para o experimento 3, após remoção dos brancos.

Figura 19 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* para o experimento 3 após remoção dos brancos.

As formas círculo e quadrado estão relacionadas com o tipo de amostra (círculo = amostras de linhagens endofíticas; quadrado = amostras de linhagens fitopatogênica). O tamanho dos círculos e quadrados está relacionada com a intensidade média de cada analito nas três replicatas analíticas de cada amostra.

Fonte: Autoria própria.

No processamento empregando-se MS2Analyte, o número atribuído a cada analito está relacionado à frequência que este aparece no conjunto de amostras e em quantas amostras cada analito é detectado. Assim, os analitos que recebem número menores tendem a ser os analitos mais comuns no conjunto de amostras. Por outro lado, a ordem de processamento das amostras é aleatória. A partir da análise da figura 19, verifica-se que os compostos mais comumente detectados no conjunto de amostras são comuns aos dois grupos de *Colletotrichum* (analitos de 0 a 50). Além disso, verifica-se que existem analitos que foram exclusivamente detectados em linhagens endofíticas ou fitopatogênicas. Para facilitar essa visualização, foram criados manualmente subgráficos contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas, nas amostras fitopatogênicas e os analitos detectados em ambos os grupos. Tais subgráficos são apresentados nas figuras 20, 21 e 22, respectivamente.

Figura 20 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas do experimento 3, após remoção dos brancos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras fitopatogênicas do experimento 3, após remoção dos brancos.

Fonte: Autoria própria.

Figura 22 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas do experimento 3, após remoção dos brancos.

Fonte: Autoria própria.

A partir da avaliação conjunta dos gráficos apresentados nas figuras 20, 21 e 22, verifica-se que, no experimento 3, há mais analitos comuns aos dois grupos de linhagens do que analitos exclusivamente detectados em um dos grupos. Com relação aos compostos exclusivos das linhagens endofíticas, verifica-se que, de forma geral, os analitos foram detectados em vários isolados, não havendo analitos produzidos somente por uma ou algumas das linhagens endofíticas. Por outro lado, os compostos detectados exclusivamente em linhagens fitopatogênicas são mais comuns a uma ou poucas linhagens. As linhagens L17, L22 e L23 são as linhagens nas quais foram detectados mais analitos exclusivos a estas linhagens fúngicas. Tais observações demonstram que as linhagens de *Colletotrichum* endofíticas possuem metabolismo secundário mais similar entre si, enquanto que as linhagens fitopatogênicas demonstram ter metabolismo secundário mais específico para cada isolado de *Colletotrichum*. Além disso, também é possível verificar que, para a maioria dos analitos, estes foram detectados em pelo menos 2 das 3 replicatas biológicas, confirmando que as etapas de extração dos meios de cultura para obtenção das amostras, aquisição e processamento dos dados são reprodutíveis.

Os mesmos resultados relatados para o experimento 3 foram observados no experimento 2, cujo gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* é apresentado na figura 23. Os subgráficos contendo os analitos exclusivamente endofíticos, exclusivamente fitopatogênicos e os analitos detectados em ambos os grupos para os dois experimentos são apresentados no apêndice (figuras 73, 74 e 75).

Figura 23 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* para o experimento 2 após remoção dos brancos.

As formas círculo e quadrado estão relacionadas com o tipo de amostra (círculo = amostras de linhagens endofíticas; quadrado = amostras de linhagens fitopatogênica). O tamanho dos círculos e quadrados está relacionada com a intensidade média de cada analito nas três replicatas analíticas de cada amostra.

Fonte: Autoria própria.

Com relação ao experimento 1, os extratos de meio de cultura de *Colletotrichum* foram fracionadas e para cada extrato obteve-se 5 frações (total de 375 amostras). Apesar disso, é possível fazer uma análise dos resultados da mesma forma que foi feita para os experimentos 2 e 3. Na figura 24 é apresentado o gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* para o experimento 1. Os subgráficos contendo os analitos exclusivamente endofíticos, exclusivamente fitopatogênicos e os analitos detectados em ambos os grupos para os dois

experimentos, bem como os analitos detectado em cada uma das 5 frações são apresentados no apêndice (figuras 76 a 83).

Figura 24 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* para o experimento 1 após remoção dos brancos.

All analytes (blank removed)

As formas círculo e quadrado estão relacionadas com o tipo de amostra (círculo = amostras de linhagens endofíticas; quadrado = amostras de linhagens fitopatogênica). O tamanho dos círculos e quadrados está relacionada com a intensidade média de cada analito nas três replicatas analíticas de cada amostra.

O retângulo vermelho indica os analitos produzidos, em sua grande maioria, pelas linhagens L23 e L25.

Fonte: Autoria própria.

No gráfico da figura 24, verifica-se que a grande maioria dos analitos foram detectados em muitas linhagens diferentes de *Colletotrichum*, o que sugere que em menores tempos de crescimento, as linhagens de *Colletotrichum* possuem metabolismo secundário muito semelhantes, produzindo os mesmos compostos, independentemente se são linhagens endofíticas ou fitopatogênicas. Os analitos localizados à esquerda do gráfico são os mais comuns, sendo detectados na grande maioria das linhagens fúngicas. Os dois grupos de analitos indicados no retângulo vermelho (*experiment analyte id* 2137 - 2250 e 2319 - 2451) são os analitos produzidos, em sua grande maioria, apenas em uma linhagem de *Colletotrichum* (linhagens L23 e L25, respectivamente).

4.3.8 Avaliação dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se *molecular networking*

Além do emprego do MS2Analyte, os resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS dos três experimentos também foram avaliados empregando-se *molecular networking*. Na etapa de construção da rede molecular, as amostras foram divididas em quatro grupos (G).

- Grupo 1 (G1): brancos analíticos (solventes utilizados nas etapas cromatográficas);
- Grupo 2 (G2): brancos do meio de cultivo malte 2% (meio de cultivo sem a presença dos micro-organismos, submetido ao mesmo processo de extração e fracionamento) ;
- Grupo 3 (G3): amostras relacionadas às linhagens de *Colletotrichum* endofíticas; e
- Grupo 4 (G4): amostras relacionadas às linhagens de *Colletotrichum* fitopatogênicas.

Na figura 25 é apresentada a rede molecular referente ao experimento 3 gerada no software *Cytoscape*. Os nodos que foram detectados nos 4 grupos foram coloridos de cinza, uma vez que muito provavelmente são compostos provenientes das etapas cromatográficas. Nodos detectados nos grupos G2, G3 e G4 foram coloridos de verde e provavelmente são componentes de meio de cultura. Nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul, enquanto que os nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho. Nodos detectados em ambos grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo. Os compostos identificados a partir das bibliotecas do GNPS apresentam formato quadrado. Nodos que não pertencem à clusters foram removidos da rede molecular.

Figura 25 - Rede molecular do experimento 3 visualizada empregando-se o software *Cytoscape*.

Nodos relacionados a *features* detectados nas etapas cromatográficas foram coloridos de cinza; nodos do meio de cultivo foram coloridos de verde; nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul; nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho; nodos detectados em ambos grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo. Nodos com formato quadrado foram identificados a partir das bibliotecas do GNPS. Nodos que não pertencem à clusters foram removidos da rede molecular.

Fonte: Autoria própria.

A rede molecular gerada a partir do programa *Cytoscape* para o experimento 3 apresenta, no total, 1270 nodos, dentre os quais 206 são exclusivos das linhagens endofíticas (indicados em azul), 741 são exclusivos das linhagens fitopatogênicas (indicados em vermelho), 242 são espectros MS/MS consenso comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas (indicados em roxo), 23 correspondem aos brancos analíticos (indicados em cinza) e 58 correspondem a meio de cultivo (indicados em verde).

A partir da rede molecular apresentada na figura 25, verifica-se a presença de muitos clusters formados somente por nodos vermelhos, que correspondem a compostos detectados exclusivamente em amostras de linhagens fitopatogênicas. Tal fato indica que as linhagens fitopatogênicas produzem metabólitos secundários com estruturas mais particularmente relacionadas a esse grupo de linhagens fúngicas. Por outro lado, o fato de não se observar nenhum cluster formado unicamente por compostos detectados em amostras endofíticas (nodos azuis), indica que estas linhagens fúngicas produzem compostos que apresentam esqueletos mais comuns.

O emprego de arquivos *metadata* permite verificar em quais amostras cada um dos *features* foi detectado e sua distribuição dentro do conjunto de amostras. A legenda de cores utilizada para representar cada uma das linhagens de *Colletotrichum* nas análises contendo arquivo *metadata* é apresentada na tabela 4. Na figura 26 é apresentada a rede molecular com os nodos de interesse visualizados empregando-se o arquivo de *metadata*.

Tabela 4 - Legenda de cores atribuídas a cada uma das linhagens de *Colletotrichum*, aos brancos analíticos e de meio de cultura na visualização das redes moleculares no Cytoscape utilizando arquivo *metadata*.

Cor	Código	Linhagem fúngica
	L1	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MAC1F1
	L2	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MAC3F1
	L3	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MAC3F2
	L4	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MSF1F1
	L5	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MSF3F1
	L6	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MSF3F2
	L7	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MS1F3
	L8	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MS1F1
	L9	<i>Colletotrichum</i> sp. P7MS3F1
	L10	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AM1F1
	L11	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AM2F2
	L12	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AM3F2
	L13	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF1F1
	L14	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF2F1
	L15	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF2F2
	L16	<i>Colletotrichum</i> sp. P7AF3F2
	L17	<i>Colletotrichum nympheae</i>
	L18	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	L19	<i>Colletotrichum fruticola</i>
	L20	<i>Colletotrichum asianum</i>
	L21	<i>Colletotrichum siamense</i>
	L22	<i>Colletotrichum truncatum</i>
	L23	<i>Colletotrichum graminicola</i>
	L24	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	L25	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
		Brancos analíticos
		Brancos de meio de cultura

Figura 26 - Rede molecular do experimento 3 empregando-se arquivo *metadata*.

Fonte: Autoria própria.

A avaliação da rede molecular empregando-se arquivo *metadata* (figura 26) nos permite verificar, em primeiro plano, em quais grupos de amostras cada um dos *features* foram detectados (G1, G2, G3, G4 ou em múltiplos grupos) e, em segundo plano, em quais amostras (L1 a L25). O cluster C1, por exemplo, apresenta, em sua grande maioria, *features* detectados exclusivamente em linhagens fitopatogênicas (nodos vermelhos). Com o uso do arquivo *metadata*, verifica-se que muitos destes nodos foram detectados somente na amostra fitopatogênica L22 (cluster C1, nodos coloridos em vermelho escuro), enquanto outros estão presentes somente na amostra fitopatogênica L17 (cluster C1, nodos coloridos em rosa). Os clusters C4, C5, C6, C8 e C9 são compostos por *features* detectados exclusivamente na linhagem fitopatogênica L23 (nodos coloridos em vermelho), enquanto que os clusters C3 e C7 são compostos por *features* detectados exclusivamente nas linhagens fitopatogênicas L22 e L25 (nodos coloridos em vermelho escuro e amarelo, respectivamente). Já no caso do cluster C2, constata-se que os nodos exclusivos de linhagens endofíticas, coloridos em azul na rede molecular principal, foram detectados em muitas das linhagens endofíticas e, por isso, possuem muitas cores que variam do verde ao azul quando visualizados empregando-se arquivo *metadata*. Alguns dos nodos coloridos em azul apresentam íon molecular protonado de m/z 568,3 e possivelmente correspondem ao *feature*

destacado no gráfico de coeficiente de regressão obtido a partir dos gráficos de PLS-DA (figura 18) como um dos metabólitos produzidos pelas linhagens endofíticas que contribuem de forma significativa para o agrupamento e separação espacial deste grupo de amostra em relação às demais.

Com relação às amostras do experimento 2, foram obtidos resultados muito semelhantes aos observados na rede molecular do experimento 3. A rede molecular do experimento 2 é apresentada na figura 27 e foi criada de forma idêntica à rede do experimento 3.

Figura 27 - Rede molecular do experimento 2 empregando-se arquivo *metadata* visualizada empregando-se o software *Cytoscape*.

Nodos relacionados a *features* detectados nas etapas cromatográficas foram coloridos de cinza; nodos do meio de cultivo foram coloridos de verde; nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul; nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho; nodos detectados em ambos grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo. Nodos com formato quadrado foram identificados a partir das bibliotecas do GNPS. Nodos que não pertencem à clusters foram removidos da rede molecular.

Fonte: Autoria própria.

A rede molecular do experimento 2 (figura 27), visualizada no software *Cytoscape*, apresenta, no total, 570 nodos, dentre os quais 101 são exclusivos das linhagens endofíticas (indicados em azul), 287 são exclusivos das linhagens fitopatogênicas (indicados em vermelho), 85 são comuns às linhagens endofíticas e

fitopatogênicas (indicados em roxo), 24 correspondem aos brancos analíticos (indicados em cinza) e 73 correspondem a meio de cultivo (indicados em verde). Verifica-se a presença de muitos clusters compostos somente por nodos vermelhos, que correspondem a compostos detectados exclusivamente em amostras de linhagens fitopatogênicas. Entretanto, diferentemente do experimento 3, existem 2 clusters formados por *features* detectados exclusivamente em linhagens endofíticas (nodos azuis). Assim como no experimento 3, verifica-se poucos nodos referentes aos brancos analíticos e de meio de cultura. A visualização utilizando-se arquivo *metadata* indica que, dentre os clusters formados somente por nodos vermelhos (linhagens fitopatogênicas), os clusters C2 e C3 possuem *features* detectados somente na linhagem fitopatogênica L22 (nodos vermelho escuro), enquanto que os clusters C4, C5, C7 e C8 possuem *features* detectados somente na linhagem fitopatogênica L23 (nodos vermelhos). O cluster C6, é formado por muitos nodos detectados somente nas amostras fitopatogênicas L22 (cluster C6, nodos coloridos em vermelho escuro) e L17 (cluster C6, nodos coloridos em rosa).

Com relação aos clusters formados por somente por nodos detectados nas linhagens endofíticas (nodos azuis), o cluster C1 é formado somente por *features* presentes na amostra L11, enquanto que o cluster C9 é formado por *features* que estão presentes em praticamente todas as linhagens endofíticas. Os nodos pertencentes ao C9 foram também observados no experimento 3 (m/z 568,3), entretanto não foi observado no experimento 3 compostos produzidos unicamente pela linhagem L11. Tal resultado pode indicar que a linhagem L11 produz um conjunto de compostos quando incubada por 14 dias. Após esse período, estes compostos podem sofrer transformações em suas estruturas, resultando em compostos detectados em outras linhagens de *Colletotrichum*.

O experimento 1 também foi avaliado via GNPS e o resultado foi visualizado no software *Cytoscape*. Tanto os parâmetros utilizados na criação da rede, quanto os atributos adotados no *Cytoscape* foram os mesmos dos experimentos 2 e 3. A rede molecular gerada a partir do programa *Cytoscape* para o experimento 1 apresenta, no total, 6670 nodos, dentre os quais 1900 são exclusivos das linhagens endofíticas (indicados em azul), 1286 são exclusivos das linhagens fitopatogênicas (indicados em vermelho), 1728 são comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas (indicados em roxo), 562 correspondem aos brancos analíticos (indicados em cinza) e 1194 correspondem a meio de cultivo (indicados em verde).

Devido ao grande número de features detectados nas análises referentes ao experimento 1, bem como a presença de muitos nodos relacionados aos brancos analíticos e de meio de cultura, foi criada uma subrede na qual foram removidos os clusters constituídos majoritariamente por compostos não produzidos pelas linhagens fúngicas. A subrede resultante é apresentada na figura 28. A rede molecular original contendo todos os features detectados nas amostras referentes ao experimento 1 é apresentada no apêndice (figura 84).

Figura 28 - Subrede molecular do experimento 1 empregando-se arquivo *metadata* e visualizada no software *Cytoscape*.

Nodos relacionados a *features* detectados nas etapas cromatográficas foram coloridos de cinza; nodos do meio de cultivo foram coloridos de verde; nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul; nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho; nodos detectados em ambos grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo. Nodos com formato quadrado foram identificados a partir das bibliotecas do GNPS. Nodos que não pertencem à clusters foram removidos da rede molecular.

Fonte: Autoria própria.

Na subrede do experimento 1 apresentada na figura 24, verifica-se a presença de muitos clusters compostos somente por nodos vermelhos e somente por nodos azuis. Alguns destes clusters, formados exclusivamente por features detectados em um dos grupos de fungos, também foram observados nos experimentos 2 e 3, como é o caso dos clusters C2, C3, C7, C9, C10, C11 e C12. Por outro lado, nota-se alguns clusters que não haviam sido observados nos outros

experimentos, como, por exemplo os clusters C1, C4, C5, C6, C8 , C13 e C14. Os clusters C1 e C4 são formados por *features* detectados nas linhagens L18 e L24, dois isolados diferentes de *C. gloeosporioides*. Uma vez que estes clusters foram observados somente no experimento 1, pode-se sugerir que os dois isolados pertencentes à mesma espécie produzem alguns compostos comuns nos estágios iniciais de desenvolvimento. Com o aumento do tempo de crescimento, estes compostos comuns não são mais observados. Com relação aos clusters C5, C8 e C14, estes são formados por nodos detectados exclusivamente na linhagem endofítica L12. O cluster C6 é composto por *features* detectados em várias linhagens endofíticas diferentes, enquanto que o cluster C13 é formado unicamente por *features* detectados na linhagem fitopatogênica L25.

A presença de muitos nodos relacionados ao meio de cultura no experimento 1 e a diminuição desse número nos experimentos 2 e 3 indica que, em 7 dias de crescimento, os componentes de meio de cultura foram pouco consumidos pelos micro-organismos, e que as linhagens de *Colletotrichum* possivelmente possuem um metabolismo mais lento, necessitando de um tempo maior de crescimento.

De forma geral, verificou-se que a produção de compostos por linhagens de *Colletotrichum* é influenciada grandemente pelo tempo de crescimento das linhagens. Os resultados dos experimentos 2 e 3 são relativamente semelhantes, porém diferem consideravelmente dos resultados do experimento 1. Além disso, os resultados obtidos nas análises de *molecular networking* corroboram com aqueles obtidos nas análises por MS2Analyte. Nos gráficos de MS2Analyte para os experimentos 2 e 3, observou-se que algumas linhagens, como a L22, L23 e L25 produziam muitos compostos detectados unicamente nestas linhagens. O mesmo foi observado nas respectivas redes moleculares, com a presença de clusters formados por *features* detectados somente nas amostras referentes à estas linhagens. Assim, pode-se concluir também que as linhagens de *Colletotrichum* produzem compostos comuns, que podem estar relacionados ao gênero, mas também produzem compostos relacionados somente a uma ou poucas linhagens fúngicas.

4.3.9 Dereplicação dos resultados do GNPS utilizando a plataforma NPAtlas e biblioteca de compostos de *Colletotrichum*

Os resultados obtidos a partir das análises via GNPS foram exportados em formato de planilhas excel e foram desreplicados utilizando a plataforma *open source* NPAtlas (<https://www.npatlas.org/joomla/>) e uma biblioteca *in house* contendo 233 compostos isolados de linhagens de *Colletotrichum*. O processo de desreplicação de forma automatizada (programas codificados na linguagem computacional Python) e utilizou-se erro de massa de 0,05 Da. A partir da comparação das massas exata e acurada dos compostos, foram detectados os seguintes compostos isolados de linhagens de *Colletotrichum*: radicicol (**21**), higginsianina A (**22**), higginsianina B (**23**), colletochina (**24**) e colletotrichina A (**25**) ou B (**26**). Na tabela 5 são apresentados os dados de massa exata, massa acurada, fórmula molecular obtida a partir da massa acurada, bem como a estrutura dos compostos.

Tabela 5 - Dados de massa exata, massa acurada, fórmula molecular e estrutura dos compostos resultantes do processo de desreplicação do experimento 3 utilizando a biblioteca *in house* de compostos de *Colletotrichum*.

Composto	Massa exata*	Massa acurada**	Fórmula molecular***	Erro de massa (ppm)	Amostras
radicicol (21)	364,0714	364,0727	C ₁₈ H ₁₇ ClO ₆	3,664	L23T1R1A L23T1R2A L23T1R3A L23T2R1 L23T2R2 L23T2R3 L23T3R1 L23T3R2 L23T3R3
higginsianina A (22)	426,2770	426,2785	C ₂₇ H ₃₈ O ₄	3,496	L25T1R1A L25T1R2A L25T1R3A L25T1R1B L25T1R2B L25T1R3B L25T1R1C L25T1R2C L25T1R3C L25T2R1 L25T2R2 L25T2R3 L25T3R1 L25T3R2 L25T3R3
higginsianina B (23)	428,2927	428,2929	C ₂₇ H ₄₀ O ₄	0,561	L25T1R1A L25T1R2A L25T1R3A L25T3R1 L25T3R2 L25T3R3
colletochina (24)	442,3083	442,3077	C ₂₈ H ₄₂ O ₄	1,379	L22T1R1A L22T1R2A L22T1R3A L22T1R1B L22T1R2B L22T1R3B L22T1R1C L22T1R2C L22T1R3C L22T2R1 L22T2R2 L22T2R3 L22T3R1 L22T3R2 L22T3R3
colletotrichina B (25) ou C (26)	518,2880	518,2874	C ₂₉ H ₄₂ O ₈	1,097	L25T1R1A L25T1R2A L25T1R3A L25T2R1 L25T2R2 L25T2R3 L25T3R1 L25T3R2 L25T3R3

*Massa exata = valor obtido da literatura

**Massa acurada = valor experimental obtido a partir das análises por UPLC-iMS-QToF-HRMS

***Fórmula molecular = calculada no site ChemCalc (https://www.chemcalc.org/mf_finder) usando-se o dado de massa acurada neutra.

Fonte: Autoria própria.

As fórmulas moleculares obtidas a partir da plataforma online ChemCalc são as mesmas dos compostos presentes na biblioteca de compostos de *Colletotrichum* e os erros associados são inferiores a 4,0 ppm. Além do processo de desreplicação, os dados de fragmentação dos compostos identificados foram avaliados empregando-se ferramentas de fragmentação *in-silico*, como a plataforma Sirius (<https://bio.informatik.uni-jena.de/software/sirius/>). Análises de fragmentação *in-silico* também sugeriram como fórmula molecular dos compostos as fórmulas moleculares apresentadas na tabela 4 (com grau de confiabilidade superior a 98%) e, no caso do radicicol, sugeriu a estrutura do composto com um grau de confiabilidade de 74%. Tais resultados indicam fortemente que os compostos identificados a partir do processo de desreplicação estão presentes nas amostras analisadas.

4.3.10 Identificação do metabólito presente na amostra L23T3R2

Com o intuito de se confirmar a presença de radicicol nas amostras relacionadas à linhagem fitopatogênica L23, a amostra L23T3R2 foi submetida a análises por HPLC-SPE-UV objetivando o isolamento do composto. Em seguida, a amostra contendo o composto de interesse foi submetida a análises de RMN de ^1H

utilizando-se em CDCl_3 como solvente, visando a comparação com dados reportados na literatura (WICKLOW, JORDAN e GLOER, 2009). Os dados de RMN de ^1H do radicicol segundo Wicklow, Jordan e Gloer (2009) e os dados experimentais do composto isolado a partir da amostra L23T3R2 são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) para o radicicol segundo Wicklow, Jordan e Gloer (2009) e dados experimentais do composto presente na amostra L23T3R2.

Literatura (CDCl_3 , 400 MHz)*	Dados experimentais (CDCl_3 , 600 MHz)
δ_{H} (J em Hz)	δ_{H} (J em Hz)
11,08 (1H, br s, 16-OH)	11,10 (1H, br s)
7,44 (1H, dd, $J = 9,2, 16,2$ Hz, H-8)	7,46 (1H, dd, $J = 9,4, 16,0$ Hz)
6,62 (1H, s, H-15)	6,62 (1H, s)
6,16 (1H, dddd, $J = 0,9, 1,7, 9,2, 10,7$ Hz, H-7)	6,17 (1H, m)
6,10 (1H, d, $J = 16,2$ Hz, H-9)	6,09 (1H, d, $J = 16,1$ Hz)
6,05 (1H, s, 14-OH)	
5,83 (1H, dd, $J = 2,8, 10,7$ Hz, H-6)	5,86 (1H, m)
5,49 (1H, m, H-2)	5,49 (1H, m)
4,78 (1H, br d, $J = 16,6$ Hz, H-11a)a	4,76 (1H, br d, $J = 16,8$ Hz)
3,91 (1H, br d, $J = 16,2$ Hz, H-11b)a	3,90 (1H)
3,16 (1H, br s, H-4)	3,15 (1H, br s)
2,92 (1H, br dt, $J = 8,8, 2,8$ Hz, H-5)	2,93 (1H, dt, $J = 9,1, 2,5$ Hz)
2,34 (1H, ddd, $J = 3,2, 3,6, 15,4$ Hz, H-3a)	2,34 (1H, ddd, $J = 3,1, 3,4, 15,3$ Hz)
1,96 (1H, ddd, $J = 3,8, 8,9, 15,4$ Hz, H-3b)	1,94 (1H, m)
1,52 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, CH ₃ -1)	

* WICKLOW, JORDAN and GLOER, 2009.

A comparação dos dados de RMN de ^1H do composto isolado a partir da amostra L23T3R2 com os dados já reportados na literatura confirmam que ambos correspondem ao mesmo composto, o radicicol. Além disso, a partir do isolamento do composto e posterior análise por RMN de ^1H , foi possível comprovar de forma inequívoca que a molécula sob análise correspondia, de fato, ao composto indicado pelas das análises por espectrometria de massas de alta resolução e fragmentação *in-silico*, o que confirma que as análises de espectrometria de massas de alta resolução aliadas a ferramentas de fragmentação *in-silico* podem ser de grande auxílio na anotação de compostos conhecidos.

4.3.11 Isolamento e identificação do metabólito detectado nas amostras de linhagens endofíticas de *Colletotrichum*

Após avaliação conjunta dos resultados do processamento via MS2Analyte e das redes moleculares, verificou-se a presença de um metabólito de m/z 568 produzido somente pelas linhagens endofíticas de *Colletotrichum*. Com a possibilidade de se tratar de um composto inédito após a consulta de seus dados espectroscópicos e espectrométricos em bancos de dados, as amostras endofíticas de *Colletotrichum* nas quais observou-se a presença desse composto foram reunidas (amostra EE) e submetidas a duas etapas de separação por HPLC.

Após a primeira etapa de separação cromatográfica da amostra EE por HPLC-UV, foram obtidas 8 frações, designadas EE1 - EE8. As frações foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS e o composto de interesse m/z 568 foi detectado na fração EE7. Uma vez que esta amostra não apresentava grau de pureza suficiente para a obtenção de espectros de RMN, foi realizada uma segunda etapa de purificação por HPLC-ELSD. Foram obtidas, então, 2 frações, denominadas EE7A e EE7B. As frações foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS e verificou-se que o composto m/z 568 encontrava-se na fração EE7B. A amostra EE7B também foi submetida a análises por UPLC-ESi-QToF-MS e RMN uni e bidimensionais. Na figura 29 são apresentados o fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após as duas etapas de purificação da amostra EE por HPLC, o cromatograma de UV da fração EE7B no comprimento de onda de 254 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas do composto m/z 568. Na

figura 30 é apresentado o espectro de massas de alta resolução do composto m/z 568, detectado na fração EE7B.

Figura 29 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de separação cromatográfica da amostra EE, cromatograma de UV da fração de interesse EE7B no comprimento de onda de 254 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas de baixa resolução do composto m/z 568, cujo pico está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Figura 30 - Espectro de massas de alta resolução da do composto m/z 568, detectado na fração EE7B.

Fonte: Autoria própria.

A partir das análises por HPLC-UV-ELSD-MS, verificou-se que o composto m/z 568 possui λ_{max} em torno de 240 nm e massas acuradas $[M+H]^+$ de m/z 568,1 e $[2M+H]^+$ de m/z 1135,7. Já com relação às análises por UPLC-ESI-QToF-MS, o composto apresentou $[M+H]^+$ com massa acurada de m/z 568,3772 e $[M+Na]^+$ com massa acurada de m/z 590,3557. A massa molecular acurada $[M+H]^+$ foi utilizada no cálculo das possíveis fórmulas moleculares do composto, cujos resultados foram: $C_{34}H_{46}N_7O^+$ (massa exata: m/z 568,3764; erro de massa: 1,4 ppm), $C_{22}H_{50}N_9O_8^+$ (massa exata: m/z 568,3782; erro de massa: 1,8 ppm), $C_{38}H_{50}NO_3^+$ (massa exata: m/z 568,3791; erro de massa: 3,3 ppm) e $C_{33}H_{50}N_3O_5^+$ (massa exata: m/z 568,3750; erro de massa: 3,9 ppm). Em busca realizada nas bases de dados *SciFinder*, *Dictionary of Natural Products* e *Web of Science* utilizando as fórmulas possíveis moleculares para o composto ($C_{34}H_{45}N_7O$, $C_{22}H_{49}N_9O_8$, $C_{38}H_{49}NO_3$ e $C_{33}H_{49}N_3O_5$), não obteve-se nenhum resultado, o que

sugere que se trata de um composto inédito. Os espectros de RMN uni e bidimensionais estão sob análise.

CAPÍTULO 5 – ESTUDO METABOLÔMICO DE ORGANISMOS MARINHOS PRODUTORES DE TAMBJAMINAS

5.1 TAMBJAMINAS E SEU PAPEL ECOLÓGICO

Tambjamins (**27-38**) são um grupo de alcalóides quimicamente relacionados à prodigiosina e prodigionina, isoladas de bactérias e organismos marinhos como ascídias, briozoários e nudibrânquios. As tambjamins apresentam dois anéis pirrólicos ligados nas posições C-2 e C-2', um grupo metoxila na posição C-4 e um grupo enamina na posição C-5, no qual o átomo de nitrogênio é comumente substituído por uma cadeia alquila saturada ou um resíduo de aminoácido descarboxilado (CARBONE *et al.*, 2010; PICOTT *et al.*, 2019).

27 R = H (Tamb A)

28 R = CH₂CH(CH₃)₂ (Tamb C)

29 R = CH₂CH₃ (Tamb E)

30 R = CH₂CH₂CH(CH₃)₂ (Tamb K)

31 R = (CH₂)₂Ph (Tamb F)

32 R = (CH₂)₁₁CH₃ (BE-18591)

33 R₁ = H, R₂ = Br, R₃ = H (Tamb B)

34 R₁ = CH₂CH₃, R₂ = Br, R₃ = H (Tamb G)

35 R₁ = CH₂CH₂CH₃, R₂ = Br, R₃ = H (Tamb H)

36 R₁ = CH₂CH(CH₃)₂, R₂ = Br, R₃ = H (Tamb I)

37 R₁ = CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃, R₂ = Br, R₃ = H (Tamb J)

38 R₁ = CH₂CH(CH₃)₂, R₂ = H, R₃ = Br (Tamb D)

As tambjamins possuem atividades biológicas como atividade antitumoral, antimitótica, antimalária, antimicrobiana, antifúngica e imunossupressiva. As tambjamins A (**27**), B (**33**), C (**28**) e D (**38**) possuem atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio anguillarum*. A tambjamina D apresenta atividade citotóxica contra um grande número de linhagens de células tumorais, atividade antimitótica em ensaios de desenvolvimento de ouriço-do-mar,

atividade antifúngica contra *Candida albicans* e atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*. A tambjamina K **(30)** apresenta atividade citotóxica e antiproliferativa contra linhagens de células tumorais (CaCo-2, HeLa, C6, H9c2 e 3T3-L1) e não tumorais. A tambjamina BE-18591 **(32)** inibe a imunoproliferação e gastrite em coelhos. Algumas tambjamins, como as tambjamins E e D, podem se ligar à fita dupla de DNA e promover a sua clivagem na presença de átomos de Cu II (ALDRICH *et al.*, 2010; PICOTT *et al.*, 2019; PINKERTON *et al.*, 2010; PINKERTON, BANWELL e WILLIS, 2007).

Além de suas propriedades farmacológicas, as tambjamins também estão relacionadas a mecanismos de defesa dos organismos a partir dos quais são isoladas. Muitos dos organismos marinhos produtores de tambjamins são vulneráveis ao ataque de predadores por serem sésseis, como é o caso dos briozoários e ascídias, ou por não possuírem uma barreira física que proteja seus corpos, como é o caso dos nudibrânquios, moluscos gastrópodes deprovidos parcial ou totalmente de conchas. A investigação química de ascídias, briozoários e nudibrânquios produtores de tambjamins indicou que estes produtos naturais eram detectados em organismos envolvidos em estabelecidas relações presa-predador. Nudibrânquios, por exemplo, popularmente conhecidos como lesmas-do-mar, se alimentam de esponjas, ascídias, briozoários, octocorais e outros moluscos menores (DEAN e PRINSEP, 2017; PAWLIK, 1993; PEREIRA *et al.*, 2012).

No trabalho realizado por Carbone e colaboradores (2010), foram avaliados o nudibrânquio *Tambja ceutae* e sua presa, o briozoário *Bugula dentata*. A partir da investigação química de ambos os extratos, verificou-se a presença tambjamins A, B e K e do composto tetrapirrol **(39)**. A tambjamina K era o composto majoritário no extrato de *T. ceutae*, enquanto que no extrato de *B. dentata*, o tetrapirrol era o composto majoritário. Já no trabalho conduzido por Lindquist e Fenical (1991), foram estudadas a ascídia *Atapozoa* sp. e diversas espécies de nudibrânquios do gênero *Nembrotha*, incluindo *N. cristata*, *N. kubaryana* e algumas espécies não identificadas. Moluscos do gênero *Nembrotha* são considerados predadores naturais de ascídias do gênero *Atapozoa*. A investigação dos extratos orgânicos dos organismos marinhos permitiu o isolamento das tambjamins A, C, E, F e do tetrapirrol (CARBONE *et al.*, 2010; LINDQUIST e FENICAL, 1991).

O estudo realizado por Pereira e colaboradores (2012) também demonstrou que nudibrânquios acumulam substâncias químicas encontradas em suas respectivas presas. A análise dos extratos do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* e de sua presa, o briozoário *Bugula dentata*, revelou a presença das tambjaminsas C, D e K nos extratos de ambos os organismos (PEREIRA *et al.*, 2012).

Dentre os estudos reportados na literatura que investigaram organismos produtores de tambjaminsas envolvidos em relações presa-predador, um dos mais importantes foi o estudo desenvolvido por Carté e Faulkner (1986), envolvendo o briozoário *Sessibugula translucens* e os moluscos *Tambja abdere*, *Tambja eliora* e *Roboastra tigris*. O nudibrânquio carnívoro *R. tigris* se alimenta preferencialmente de *T. abdere* e *T. eliora*, que, por sua vez, se alimentam do briozoário *S. translucens*. Os autores confirmaram a presença das tambjaminsas A, B, C e D e dos aldeídos das tambjaminsas A, B e D nos extratos dos quatro organismos estudados. Adicionalmente, Carté e Faulkner (1986) também avaliaram como os nudibrânquios do gênero *Tambja* evitam os ataques do predador *R. tigris*. Em experimentos realizados, os autores observaram que as duas espécies de *Tambja* utilizam-se de mecanismos diferentes de defesa. Enquanto *T. eliora* se defende dos ataques de *R. tigris* se contorcendo e nadando vigorosamente, *T. abdere* excreta uma grande quantidade de muco amarelo, composto por altas concentrações de tambjaminsas. Segundo os autores, os diferentes modos de reação adotados por *T. abdere* e *T. eliora* frente ao ataque do predador são atribuídas às diferentes quantidades de tambjaminsas presentes nos dois organismos: o conteúdo de tambjaminsas presente em *T. eliora* é de aproximadamente 2 mg, enquanto que a em *T. abdere* é de aproximadamente 10 mg (CARTÉ e FAULKNER, 1986).

Todos estes estudos envolvendo a presença de tambjaminsas em invertebrados marinhos filogeneticamente não-relacionados, porém envolvidos em

relações presa-predador, levantou duas hipóteses a respeito da distribuição destes compostos ao longo da cadeia alimentar: (i) moluscos sequestram tambjamins de suas presas para sua própria defesa contra predadores naturais, ou (ii) estes alcalóides biologicamente ativos seriam produzidos por bactérias simbiontes associadas. Apesar dos estudos já realizados nesse sentido, ainda não há evidências concretas se tambjamins ou micro-organismos produtores destes compostos são transferidos verticalmente, ou seja, entre gerações de moluscos, briozoários e ascídias.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção e separação cromatográfica do extrato de *R. ernsti* (1R)

Quatro espécimes do nudibrânquio *R. ernsti* foram removidas do EtOH de preservação e extraídos com MeOH em banho de ultrassom. Os extratos MeOH e EtOH foram reunidos e evaporados. O extrato orgânico resultante (1R) foi suspenso em MeOH/H₂O 95:5 e particionado com hexano. Após a partição, o extrato metanólico foi rotaevaporado até *secura*, ressuspendido em H₂O e particionado com AcOEt. O extrato AcOEt foi evaporado e, então, submetido a duas etapas de fracionamento por HPLC-UV. Inicialmente, foi realizada a separação cromatográfica do extrato bruto de *R. ernsti* (1R) empregando uma coluna semipreparativa de fase reversa Inertsustain® C₁₈ (dimensões: 10 x 250 mm, 5 µm; GL Science), detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 280 e 350 nm, vazão de 3 mL min⁻¹, modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH/MeCN (50:25:25). Foram obtidas 7 frações, designadas 1R-1 a 1R-7. Em seguida, a fração 1R-1 foi submetida a separação por HPLC-UV utilizando-se uma coluna semipreparativa de fase reversa Inertsustain® C₁₈ (dimensões: 10 x 250 mm, 5 µm; GL Science), detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 330 e 360 nm, vazão de 3 mL min⁻¹, em modo gradiente linear de 20 a 80% de solventes orgânicos MeOH/MeCN (1:1) em H₂O durante 30 min. Após esse período, a coluna foi reequilibrada para a condição inicial por 10 min. Foram obtidas 8 frações, nomeadas 1R-1A a 1R-1H.

5.2.2 Análise das frações de *R. ernsti* por HPLC-UV-ELSD-MS

Uma vez que os compostos da classe das tambjamins apresentam padrão de absorção característico na região do UV-Vis, as 15 frações obtidas na etapa 5.2.1 foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS. Utilizou-se o equipamento e as condições de análise descritas na seção 3.1. As amostras foram preparadas na concentração de 2 mg mL⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 µL.

5.2.3 Análises das frações de *R. ernsti* por UPLC-ESI-QToF-MS/MS e elucidação estrutural de novas tambjamins

Após análise por HPLC-UV-ELSD-MS, as 15 frações de *R. ernsti* foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS, segundo as condições descritas na seção 3.2. Utilizou-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico(B). O gradiente de eluição utilizado foi de 10 a 50% de B em 6 min, de 50 a 98% de B de 6,0 a 9,0 min, 98 a 10% B de 9,0 a 9,1 min e 10% de B de 9,1 a 10,0 min. As amostras foram preparadas na concentração de 0,5 mg mL⁻¹, volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os espectros de massas foram adquiridos em modo MS^E *Continuum*, modo positivo e sensibilidade, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, intervalo de massa de *m/z* 150 a 1000, *scan time* de 0,2 s e energia de colisão de 0 eV para a função 1 e rampa de 20 - 30 eV para a função 2. Após a aquisição dos espectros de massas em modo MS^E *Continuum*, compostos que apresentaram padrão de absorção no UV característico às tambjamins conhecidas nas análises de HPLC-UV-ELSD-MS foram submetidos as análises de MS/MS. Os experimentos de fragmentação foram obtidos visando a elucidação de suas estruturas, uma vez que a quantidade das amostras não era suficiente para se realizar o isolamento dos compostos de interesse. Os espectros de massas MS/MS foram adquiridos em modo positivo e sensibilidade, range dinâmico normal, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, *scan time* de 0,2 s, rampa de voltagem do cone durante o scan de 5 a 35 V e energia de colisão fixa variando de 20 a 30 V de acordo com a amostra.

5.2.4 Síntese, purificação e caracterização das novas tambjamins por HPLC-UV-ELSD-MS, UPLC-ESI-QToF-MS e RMN

A síntese das novas tambjamins, cujas estruturas foram propostas a partir do estudo de fragmentação, foi realizada pelo aluno Nozomu Nagashima, membro do grupo do professor Richmond Sarpong (University of California, Berkeley, EUA) e pela Dra. Ariane Fernandes Bertonha, ex-integrante do nosso grupo de pesquisa. As 7 tambjamins sintéticas foram denominadas tambjamina 1 – NN120, tambjamina 2 – NN89, tambjamina 3 – NN35, tambjamina 4 – NN75 e NN140, tambjamina 5 – NN132, tambjamina 6 – AB33 e tambjamina 7 – NN126. As tambjamins NN75 e NN140 correspondem ao mesmo composto, porém foram empregadas rotas sintéticas diferentes para a obtenção de cada um deles, visando aumentar o rendimento em massa. Somente o composto NN89 apresentou elevado grau de pureza quando recebido. Por isso, as demais amostras foram submetidas a etapas de purificação por HPLC-UV.

- Tambjamina 1 – NN120

A amostra NN120 foi submetida a uma etapa de separação cromatográfica por HPLC-UV empregando-se uma coluna analítica Inertsil C8-4 analítica (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 μ m; GL Science), com detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 260 e 368 nm. Utilizou-se modo de eluição isocrático, com mistura eluente H₂O/MeOH/MeCN (50:25:25) e vazão de 1 mL min⁻¹. Foram obtidas 6 frações, designadas NN120A a NN120F.

- Tambjamina 3 – NN35

A amostra NN35 foi submetida a uma etapa de separação cromatográfica por HPLC-UV empregando-se uma coluna analítica Inertsustain C₁₈ (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 μ m; GL Science), com detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 260 e 368 nm. Foi utilizada mistura eluente H₂O/MeOH/MeCN (50:25:25) em modo isocrático e vazão de 1 mL min⁻¹. A partir desta etapa de fracionamento, obteve-se 8 frações, designadas NN35A a NN35H.

- Tambjamina 4 – NN75

Na separação cromatográfica da amostra NN75 por HPLC-UV, foi utilizada uma coluna InertSustain C₁₈ analítica (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; GL Science), com detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 270 e 350 nm. Empregou-se condição cromatográfica em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN (78:6:16) e a vazão foi de 1 mL min⁻¹. Foram obtidas 2 frações, designadas NN75A a NN75B.

- Tambjamina 4 – NN140

Na separação cromatográfica da amostra NN140 por HPLC-UV, foi utilizada uma coluna analítica Inertsil C8-4 (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; GL Science) e condição cromatográfica inicialmente em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN (50:25:25) de 0 a 20 min, seguido de um gradiente linear até H₂O/MeOH/MeCN (0:50:50) de 20 a 30 min. A condição final foi mantida de 30 a 50 min. A detecção no UV foi realizada nos comprimentos de onda de 220 e 368 nm e a vazão foi de 1 mL min⁻¹. Foram obtidas 5 frações, designadas NN140A a NN140E. Após análises por HPLC-UV-ELSD-MS, verificou-se que o composto de interesse não apresentava grau de pureza satisfatório para a realização de análises de RMN. Foi realizada então uma segunda etapa de purificação da amostra NN140A empregando-se uma coluna InertSustain C₁₈ analítica (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; GL Science), detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 254 e 368 nm. A condição cromatográfica iniciou-se em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN (70:15:15) de 0 a 23 min, seguido de um gradiente linear até H₂O/MeOH/MeCN (0:50:50) de 23 a 33 min, mantendo-se a condição final até 40 min. Foram obtidas 4 frações, designadas NN140A1 a NN140A4.

- Tambjamina 5 – NN132

A amostra NN132 foi submetida a uma etapa de separação cromatográfica por HPLC-UV empregando-se uma coluna analítica InertSustain C₁₈ (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; GL Science), vazão de 1 mL min⁻¹ e detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 220 e 368 nm. A condição cromatográfica iniciou-se em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN (76:5:19) de 0 a 12 min, seguido de um gradiente linear até H₂O/MeOH/MeCN (40:30:30) de 12 a 22 min, mantendo-se a condição final até 40 min. A purificação de NN132 por HPLC-UV

foi realizada em duas etapas empregando-se as mesmas condições cromatográficas, entretanto as 7 frações obtidas em cada etapa foram coletadas e analisadas separadamente. Na primeira etapa as frações foram designadas NN132A, NN132AB, NN132B, NN132C, NN132D, NN132E e NN132F. Já as frações da etapa 2 foram designadas NN132A2, NN132AB2, NN132B2, NN132C2, NN132D2, NN132E2 e NN132F2.

- Tambjamina 6 – AB33

A separação cromatográfica da amostra AB33 por HPLC-UV foi realizada utilizando-se uma coluna semi-preparativa InertSustain C₁₈ (dimensões: 10 x 250 mm, 5 µm; GL Science), vazão de 3 mL min⁻¹ e detector de UV monitorando nos comprimentos de onda de 280 e 350 nm. Foi utilizada uma condição cromatográfica com início em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN (30:35:35) de 0 a 14 min, seguido de um gradiente linear até H₂O/MeOH/MeCN (0:50:50) de 14 a 19 min, mantendo-se a condição final até 26 min. A separação da amostra AB33 por HPLC-UV foi realizada em duas etapas, empregando-se as mesmas condições cromatográficas, entretanto as frações obtidas em cada etapa foram coletadas e analisadas separadamente. Na primeira etapa, foram obtidas 5 frações, designadas AB33A, AB33B, AB33C, AB33D e AB33E. Já na segunda etapa, foram obtidas 6 frações, designadas AB33A2, AB33B2, AB33C2, AB33D2, AB33E2 e AB33F2.

- Tambjamina 7 – NN126

A amostra NN126 foi submetida a separação cromatográfica por HPLC-UV empregando-se uma coluna analítica InertSustain C₁₈ (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; GL Science), detector de UV monitorando os comprimentos de onda de 220 e 368 nm e vazão de 1 mL min⁻¹. A condição cromatográfica utilizada iniciou-se em modo isocrático H₂O/MeOH/MeCN (50:25:25) de 0 a 20 min, seguido de um gradiente linear até H₂O:MeOH:MeCN (0:50:50) de 20 a 30 min, mantendo-se a condição H₂O:MeOH:MeCN (0:50:50) até 40 min. Foram obtidas 6 frações, designadas NN126A a NN126F.

As amostras de tambjamins sintéticas foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS logo que recebidas e após as etapas de purificação, de acordo com o procedimento descrito no item 3.1. Após as etapas de purificação, as amostras

sintéticas e as frações obtidas a partir do fracionamento do extrato de *R. ernsti* 1R foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS para efeito de comparação de tempo de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação entre as tambjaminas sintéticas e aquelas presentes no extrato de *R. ernsti*. As análises por UPLC-ESI-QToF-MS foram realizadas empregando-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 10 a 50% de B em 6 min, de 50 a 98% de B de 6,0 a 9,0 min, 98 a 10% B de 9,0 a 9,1 min e 10% de B de 9,1 a 10,0 min. As amostras foram preparadas na concentração de 0,5 mg mL⁻¹, volume de injeção de 10 µL e vazão de 0,5 mL min⁻¹. Os espectros de massas MS/MS foram adquiridos em modo positivo e sensibilidade, range dinâmico normal, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, *scan time* de 0,2 s, rampa de voltagem do cone durante o scan de 5 a 35 V e energia de colisão fixa variando de 20 a 30 V de acordo com a amostra. As tambjaminas sintéticas que apresentavam elevado grau de pureza foram também caracterizados por RMN uni e bidimensionais, conforme procedimento descrito no item 3.3.

5.2.5 Obtenção e análise dos extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*

O briozoário *V. dentata* (2,4182 g) e os nudibrânquios *T. stegosauriformis* (8 espécimes; 1,4989 g), *T. brasiliensis* (2 espécimes, 0,2819 g) e *R. ernsti* (1 espécime, 0,1421 g) foram coletados em Cabo Frio, RJ, em fevereiro de 2019. Após a coleta, os organismos foram acondicionados em EtOH 95% até o momento da extração. Os extratos foram obtidos empregando-se o mesmo procedimento descrito no item 5.2.1. Os extratos aquosos e AcOEt de cada organismo foram analisados por HPLC-UV-ELDS-MS conforme procedimento descrito previamente no item 3.1. Em seguida, foram realizadas análises por UPLC-ESI-QToF-MS. Utilizou-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 10 a 50% de B em 6 min, de 50 a 98% de B de 6,0 a 9,0 min, 98 a 10% B de 9,0 a 9,1 min e 10% de B de 9,1 a 10,0 min; vazão de 0.5 mL min⁻¹. As amostras dos organismos marinhos foram preparadas na concentração de 1,0 mg mL⁻¹, com volume de injeção de 0,1 µL.

Foram analisados também os padrões das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K. As amostras dos padrões de tambjamins foram preparadas na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, com volumes de injeção variando de 0,4 a 6 μL . Os espectros de massas foram adquiridos em modo MS^E *Continuum*, modo positivo e sensibilidade, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, *scan time* de 0,2 s e energia de colisão de 0 eV para a função 1 e rampa de 20 - 30 eV para a função 2. Após a aquisição dos espectros de massas em modo MS^E *Continuum*, compostos que apresentaram padrão de absorção no UV característico às tambjamins conhecidas nas análises de HPLC-UV-ELSD-MS foram submetidos as análises de MS/MS. Os espectros de massas MS/MS das amostras e dos padrões foram adquiridos em modo positivo e resolução, range dinâmico normal, tempo de aquisição de 10 min, fonte ESI, intervalo de massa de m/z 50 a 600, *scan time* de 0,2 s, rampa de voltagem do cone durante o scan de 5 a 35 V e rampa de energia de colisão de 20 a 30 V.

5.2.6 Processamento e avaliação dos resultados das análises por UPLC-ESI-QToF-MS por *molecular networking*

Após as análises por UPLC-ESI-QToF-MS, os dados brutos MS/MS foram processados empregando-se o software UNIFI Scientific Information System versão 1.8 (Waters Corporation), utilizando o modo de extração e processamento de dados *Metabolite Identification – MS/MS*. Empregou-se “peak detection threshold” = 500 counts. “MS/MS peak intensity threshold” = 300 counts e número total de picos extraídos por canal = 1000. Os dados processados foram exportados em formato mgf e, em seguida, carregados na plataforma online GNPS utilizando-se o servidor *FTP FileZilla*. Para a criação da rede molecular, as amostras foram agrupadas da seguinte forma: G1 (grupo 1) = padrões de tambjamins, e G2 (grupo 2) = extratos aquosos e AcOEt de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*. Os dados foram então agrupados com MS-Cluster considerando uma tolerância de massa para o íon precursor de 0,02 Da e uma tolerância de massa para os íons fragmentos de 0,02 Da para criar espectros de consenso. Espectros de consenso que continham menos de 2 espectros MS/MS foram descartados. A rede molecular foi criada de modo que as conexões entre dois nodos tivessem *cosine score* acima de 0,6 e pelo menos 4 fragmentos correspondentes. A rede molecular resultante foi

visualizada empregando-se os softwares Cytoscape (versão 3.7.1) e Gephi (versão 0.9.2).

5.2.7 Quantificação das tambjaminas nas amostras de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* por HPLC-Flu

Com o intuito de se determinar a concentração de tambjaminas nas amostras, os extratos aquosos e AcOEt de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* foram analisadas por HPLC com detector de fluorescência. Os padrões de tambjaminas avaliados foram tambjaminas A, C, D, I, K e os aldeídos das tambjaminas A e B. As análises por HPLC-Flu foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters Alliance 2695 (HPLC) acoplado a um detector de fluorescência com arranjo de fotodiodos Waters 2475. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa Kinetex® PFP (dimensões: 4,6 x 250 mm, 5 µm; Phenomenex) e fase móvel constituída por H₂O + 0,1% de ácido fórmico (A) e MeCN/MeOH (1:1) + 0,1% de ácido fórmico (B). O gradiente de eluição empregado foi de 30 a 95% de B em 30 min, de 95 a 30% de B de 30 a 31 min e manteve-se em 30% de B de 31 min a 40 min. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção foi de 20 µL min⁻¹ e temperatura da coluna de 25 °C. No detector de fluorescência, utilizou-se $\lambda_{\text{excitação}}$ de 392 nm. Os picos cromatográficos correspondentes aos padrões foram identificados nas amostras sob estudo pela comparação direta dos tempos de retenção e comprimento de onda de emissão com os padrões. A concentração de cada uma das tambjaminas detectadas nas amostras foi determinada pela integração do pico cromatográfico correspondente e comparação com curvas analíticas construídas utilizando-se o método de padrão externo. Todas as amostras, bem como os padrões foram analisados em triplicata.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Separação cromatográfica do extrato de *R. ernsti* (1R) e análise das frações por HPLC-UV-ELSD-MS

Após a separação cromatográfica da amostra 1R por HPLC-UV, foram obtidas 7 frações, denominadas 1R-1 a 1R-7. A fração 1R-1 foi submetida a uma segunda etapa de separação cromatográfica por HPLC-UV, resultando nas frações

1R-1A a 1R-1H. As análises por HPLC-UV-ELSD-MS das frações obtidas do fracionamento do extrato do manto de *R. ernsti* (1R) forneceram a massa acurada dos compostos, além de permitir avaliar o padrão de absorção dos compostos na região do UV-Vis. Segundo Pereira e colaboradores (2012), as tambjamins possuem bandas de absorção no UV-Vis características. Devido à presença do anel bispirrólico, os espectros de UV-Vis de compostos desta classe apresentam uma banda intensa com máximo de absorção entre λ_{max} 390 e 410 nm, que pode variar ligeiramente de acordo com os substituintes presentes no cromóforo. Tambjamins que possuem o grupo enamina não-substituído comumente apresentam duas bandas cujos máximos de absorção encontram-se entre λ_{max} 250-255 nm e λ_{max} próximo a 385 nm. Por outro lado, tambjamins que possuem o grupo enamina substituído apresentam duas bandas com máximos de absorção acima de λ_{max} 255 nm e acima de λ_{max} 398 nm. Tais observações podem ser confirmadas pelos espectros de absorção na região do UV-Vis para a tambjamina A, que não apresenta nenhum substituinte no grupo enamina, e a tambjamina C, que apresenta um substituinte isopentano ligado ao grupo enamina. Nas figuras 31 e 32, são apresentadas as estruturas das tambjamins A e C, bem como seus respectivos espectros de absorção no UV-Vis e os espectros de massas de baixa resolução.

Figura 31 - Espectros de absorção na região do UV-Vis e de massas de baixa resolução da tambjamina A, detectada na fração 1R-1C do extrato do manto de *R. ernsti*.

Fonte: Autoria própria.

Figura 32 - Espectros de absorção na região do UV-Vis e de massas de baixa resolução da tambjamina C, detectada na fração 1R-5 do extrato do manto de *R. ernsti*.

Fonte: Autoria própria.

A partir da avaliação conjunta dos espectros de UV e dos espectros de massas obtidos por HPLC-UV-ELSD-MS das frações do extrato do manto de *R. ernsti*, foi possível verificar a presença das tambjamins A, C, D e K e dos aldeídos das tambjamins A e B, já relatadas na literatura, bem como 6 compostos que apresentam padrões de absorção na região do UV semelhantes aos das tambjamins conhecidas, porém com massa acurada diferente daquelas já descritas. Os dados de HPLC-UV-ELSD-MS de todas as tambjamins conhecidas e também dos compostos possivelmente inéditos (massa acurada, $\lambda_{\max}$, tempo de retenção e as frações nas quais cada composto foi detectado) estão sumarizados na tabela 7. Na figura 33, são apresentados os espectros de absorção na região do UV-Vis e os espectros de massas da tambjamina 4, uma das tambjamins inéditas. Os espectros de absorção na região do UV-Vis e os espectros de massas das demais tambjamins (conhecidas e possivelmente inéditas) são apresentados no apêndice (figuras 85 a 96).

Tabela 7 - Dados de HPLC-UV-ELSD-MS das tambjamins inéditas detectada na fração do extrato do manto de *R. ernsti*.

Composto	Fração	t_R^* (min)	λ_{max}	Massa acurada [M+H] ⁺
Tambjamina A	1R-13	8,2	216,6; 253,1; 389,9	190,1
Tambjamina C	1R-4; 1R-5; 1R-6; 1R-7; 1R-13; 1R-17; 1R-18	10,9	214,2; 402,0	246,1
Tambjamina D	1R-2; 1R-3; 1R-6; 1R-7; 1R-13; 1R-15; 1R-17; 1R-18	12,2	210,7; 256,6; 397,2	323,9
Tambjamina K	1R-2	11,8	216,6; 283,9; 399,6	260,1
Aldeído da tambjamina A	1R-2; 1R-3; 1R-4; 1R-5; 1R-13; 1R-15; 1R-16; 1R-17; 1R-18	13,2	216,6; 367,1	191,1
Aldeído da tambjamina B	1R-2; 1R-3; 1R-4; 1R-5; 1R-6; 1R-7; 1R-13; 1R-14; 1R-15; 1R-16; 1R-18	16,0	218,9; 357,8	268,8
Tambjamina 1	1R-1E	9,7	215,4; 256,6; 394,7	311,9
Tambjamina 2	1R-1B, 1R-1C, 1R-1F	9,1	207,2; 257,8; 399,6	297,9
Tambjamina 3	1R-2	11,4	202,5; 256,5; 398,4	339,8
Tambjamina 4	1R-2, 1R-1C, 1R-1E	10,9	218,9; 257,8; 405,6	290,0
Tambjamina 5 ou 6	1R-4, 1R-1G	11,9	215,4; 406,8	304,0
Tambjamina 7	1R-1C	9,4	207,2; 257,8; 399,6	332,9

Fonte: Autoria própria.

Figura 33 - Espectros de absorção na região do UV-Vis e de massas de baixa resolução da tambjamina 2, detectada na fração 1R-1E do extrato do manto de *R. ernsti*.

Fonte: Autoria própria.

A partir do espectro de absorção na região do UV-Vis para a tambjamina 4, nota-se padrões de absorção semelhantes aos descritos por Pereira e colaboradores (2012) para compostos da classe das tambjamins. A tambjamina 4 apresenta duas bandas intensas de absorção λ_{max} em 219 e 406 nm, e uma banda de absorção de menor intensidade em λ_{max} 258 nm. Segundo descrito na literatura, esta banda intensa de absorção em λ_{max} 406 nm sugere que este composto possui grupo enamina substituído.

5.3.2 Análise das frações de *R. ernsti* por UPLC-ESI-QToF-MS/MS

Após as análises por HPLC-UV-ELSD-MS, as frações de *R. ernsti* foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS/MS com o intuito de se obter os dados de massa acurada de alta resolução, bem como a realização de estudos de fragmentação das tambjamins presentes no molusco. As tambjamins apresentam fragmentos comuns quando submetidas a análises MS/MS. Apesar da fragmentação do grupo R ligado ao grupo enamina e da perda do átomo de bromo presente na estrutura de algumas tambjamins serem específicas, a fragmentação do anel bispirrólico substituído com os grupos metoxila e enamina, comuns na estrutura das tambjamins conhecidas, leva à observação de fragmentos comuns. Pereira (2011) propôs a rota de fragmentação das tambjamins A, C, D e K e dos aldeídos das tambjamins A e B, isoladas dos extratos do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* e do briozoário *Bugula dentata*. Nas figuras 34 e 35 são apresentadas as rotas de

fragmentação para as tambjamins C e K, respectivamente. Os fragmentos de m/z 175, m/z 163, m/z 148 e m/z 131, por exemplo, são observados na rota de fragmentação de ambos os compostos. A presença destes fragmentos nos espectros de massas MS/MS também pode auxiliar na classificação dos compostos como pertencentes à classe das tambjamins.

Figura 34 - Rota de fragmentação da tambjamina C.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2011, p. 82.

Figura 35 - Rota de fragmentação da tambjamina K.

Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2011, p. 88.

A presença de 6 tambjamins conhecidas nas frações de *R. ernsti* foi confirmada a partir da comparação dos tempos de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação dos compostos presentes nas frações do extrato de *R. ernsti* e de padrões de tambjamins disponíveis no laboratório após análise por UPLC-ESI-QToF-MS/MS. Na figura 36 são apresentados os espectros de massas MS/MS de alta resolução para o padrão da tambjamina C (A) e para o composto detectado na fração 1R-5 (B). Já na figura 37, são apresentados os espectros de massas MS/MS de alta resolução para o padrão da tambjamina D (A) e para o composto detectado na fração 1R-1E (B),

Figura 36 - Espectros de massas MS/MS de alta resolução para o padrão da tambjamina C (A) e para o composto detectado na fração 1R-1E (B) do extrato do manto de *R. ernsti*.

Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Espectros de massas MS/MS de alta resolução para o padrão da tambjamina D (A) para o composto detectado na fração 1R-1E (B) do extrato do manto de *R. ernsti*.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise dos espectros de massas MS/MS apresentados nas figuras 36 e 37, verifica-se que, além dos compostos detectados nas frações de *R.*

ernsti e seus respectivos padrões apresentarem valores de $[M+H]^+$ muito próximos (tambjamina C: m/z 246,1823 para o padrão e m/z 246,1787 para o composto presente na fração 1R-1E; tambjamina D: m/z 324,0712 para o padrão e m/z 324,0711 para o composto presente na fração 1R-2), também apresentam padrão de fragmentação e tempo de retenção praticamente idênticos (tambjamina C: t_R = 3,836 min para o padrão e t_R = 3,837 para o composto presente na fração 1R-1E; tambjamina D: t_R = 4,810 min para o padrão e t_R = 4,810 min para o composto presente na fração 1R-2). Os mesmos resultados foram observados para as tambjamins A, K e o aldeído das tambjamins A e B, confirmando a presença destes 6 compostos nas frações de *R. ernsti*.

Além das tambjamins conhecidas, observou-se que outros 6 compostos presentes nas amostras apresentavam padrão de absorção no UV-Vis semelhante e fragmentos também observados nos espectros de massas MS/MS das tambjamins conhecidas. Estes compostos tiveram suas estruturas propostas a partir dos espectros de massas MS/MS de alta resolução. Na tabela 8 são apresentadas informações como a fração na qual os compostos foram detectados, o tempo de retenção, massa exata, massa acurada e a fórmula molecular sugerida a partir dos valores de massa acurada.

Tabela 8 - Dados de UPLC-ESI-QToF-MS das novas tambjamins detectadas nas frações de *R. ernsti*.

Tambjamina	Amostra	t_R^* (min)	Massa exata	Massa acurada $[M+H]^+$	Fórmula molecular sugerida**
1	1R-1E	3,361	311,0264	312,0343 (com 1 Br)	$C_{12}H_{14}BrN_3O_2$
2	1R-1B	1,956	297,0772	298,0851	$C_{12}H_{15}N_3O_4S$
3	1R-2	3,249	339,0196	340,0275 (com 1 Br)	$C_{13}H_{14}BrN_3O_3$
4	1R-2	3,303	289,1417	290,1496	$C_{15}H_{21}N_3O_3$
5 ou 6	1R-4	3,869	303,1578	304,1657	$C_{16}H_{23}N_3O_3$
7	1R-1C	2,454	332,1471	333,1550	$C_{16}H_{22}N_4O_4$

* t_R = tempo de retenção

**Fórmula molecular sugerida a partir dos dados de massa acurada.

Fonte: Autoria própria.

As tambjamins 5 e 6 são isômeros constitucionais, que apresentam a mesma massa exata, mesma fórmula molecular, porém diferem quanto à natureza do substituinte no grupo enamina. A tambjamina sintética 5 apresenta o aminoácido isoleucina como grupo R ligado ao grupo enamina, enquanto a tambjamina sintética 6 apresenta o aminoácido leucina. A partir da interpretação dos espectros de massas MS/MS, não foi possível identificar qual dos dois aminoácidos estaria ligado ao grupo enamina. Por este motivo, as duas tambjamins foram sintetizadas e avaliadas por UPLC-ESI-QToF-MS.

Nas figuras 38 e 39 são apresentados o espectro de massas MS/MS de alta resolução e a rota de fragmentação proposta para a tambjamina 4 (m/z 290,1496), detectado na fração 1R-2. Os espectros de massas MS/MS, bem como as rotas de fragmentação propostas para as demais tambjamins listadas na tabela 6 são apresentados no apêndice (figuras 97 a 106).

Figura 38 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 4, m/z 290,1496, detectado na fração 1R-2.

Fonte: Autoria própria.

Figura 39 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 4, m/z 290,1496, detectada na fração 1R-2.

Fonte: Autoria própria.

A tambjamina 4 pode sofrer protonação em pelo menos três posições: (i) no átomo de nitrogênio do esqueleto bispirrólico, (ii) no átomo de nitrogênio do grupo enamina ligado ao esqueleto bispirrólico e (iii) no oxigênio carboxílico do grupo alquila ligado ao grupo enamina. Ocorrendo a protonação na posição (iii), pode ocorrer a perda do grupo carboxila protonado, formando um carbocátion terciário, bastante estável (fragmento de m/z 244,1443). Se a protonação ocorrer nas posições (i) e (ii), os íons formados podem se interconverter devido ao arranjo espacial da molécula. A perda do grupo R ligado ao grupo enamina dá origem ao fragmento de m/z 190,0966.

O fragmento de m/z 163,0866 é formado a partir do composto **I,1** pela perda do grupo R ligado à enamina e do grupo enamina na forma de HCN. Já o fragmento de m/z 131,0606 é formado a partir de **I,1** pela perda do grupo do grupo R ligado à enamina, do grupo enamina na forma de HCN e de formaldeído (H_2CO).

A perda do grupo R ligado ao grupo enamina e de um radical metila a partir de **I,1** dá origem ao fragmento de m/z 175,0852, Já o fragmento de m/z 148,0636 é formado a partir de **I,1** pela perda do grupo R ligado ao grupo enamina, do grupo enamina na forma de HCN e de um radical metila.

5.3.3 Purificação e caracterização das tambjaminsas sintéticas por HPLC-UV-ELSD-MS, UPLC-ESI-QToF-MS e RMN

- Tambjamina 1 – NN120

Após a separação cromatográfica da amostra NN120 por HPLC-UV, foram obtidas 6 frações, designadas NN120A a NN120F. As amostras foram então analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS e verificou-se que a tambjamina 1 encontrava-se na fração NN120A. Na figura 40 são apresentados o fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a purificação por HPLC-UV da amostra NN120, bem como o cromatograma de UV da fração de interesse NN120A no comprimento de onda de 370 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 1, cujo pico está destacado em vermelho.

Figura 40 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de separação cromatográfica da amostra NN120, cromatograma de UV da fração de interesse NN120A no comprimento de onda de 370 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas de baixa resolução da tambjamina 1, cujo pico está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Após a análise por HPLC-UV-ELSD-MS, verificou-se que a fração de interesse, NN120A, não apresentava grau de pureza satisfatório para a realização de análises de ressonância magnética nuclear. Tentou-se purificar novamente a

fração NN120A empregando-se diferentes tipos de colunas, condições cromatográficas e até mesmo equipamentos de HPLC, entretanto não se obteve uma condição cromatográfica adequada para realizar o isolamento da tambjamina 1, presente na fração NN120A. Mesmo assim, a fração de interesse foi submetida à análise por UPLC-ESI-QToF-MS/MS no intuito de se verificar se a tambjamina 1 sintética possuía a mesma estrutura proposta a partir das análises MS/MS do composto detectado na fração 1R-1E do extrato de *R. ernsti*. Na figura 41 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massa MS/MS da tambjamina 1 detectada na fração 1R-1E do extrato de *R. ernsti* e na fração sintética NN120A.

Figura 41 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 1 na fração 1R-1E do extrato de *R. ernsti* e na fração resultante da purificação da amostra NN120A.

Fonte: Autoria própria.

Após as análises por UPLC-QToF-MS/MS, verificou-se que o composto presente na fração de *R. ernsti* e o composto sintético, apesar de possuírem massas acuradas muito próximas, $[M+H]^+ = 312,0401$ para o composto natural e $[M+H]^+ =$

312,0403 para o composto sintético; erro de massa = 0,2 mDa) e o mesmo padrão de fragmentação, possuem tempos de retenção diferentes (t_R = 3,36 min para o composto natural e t_R = 3,29 min para o composto sintético). Dessa forma, apesar de não ser possível a realização dos experimentos de RMN, verificou-se que o composto natural, detectado na fração 1R-1E do extrato de *R. ernsti*, e o composto sintético não apresentam a mesma estrutura.

- Tambjamina 2 – NN89

A amostra NN89 (3,2 mg) foi analisada por HPLC-UV-ELSD-MS quando recebida e apresentou bom grau de pureza, não sendo necessário nenhuma etapa adicional de purificação. Na figura 42 são apresentados o cromatograma de UV da fração NN89 no comprimento de onda de 370 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 2.

Figura 42 - Cromatograma de UV da amostra NN89 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 2.

Fonte: Autoria própria.

Após as análises por HPLC-UV-ELSD-MS, verificou-se que, apesar do composto apresentar elevado grau de pureza, a massa observada no espectro de massas (m/z 216,1) não correspondia à massa esperada para a tambjamina 2 (m/z 298). Uma possível explicação é que o composto poderia ter sofrido degradação durante a análise, perdendo o grupo H_2SO_3 , conforme indicado a seguir:

No intuito de se confirmar a estrutura do composto e verificar se este estava degradado ou se a degradação estava ocorrendo no momento da análise por

HPLC-UV-ELSD-MS, a amostra NN89 foi submetida a análise por RMN uni e bidimensionais em DMSO- d_6 . Na tabela 9 são apresentados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a tambjamina 2, presente na amostra NN89. Na figura 42 são apresentadas as correlações COSY e HMBC observadas para a tambjamina 2, bem como a estrutura final do composto. Os espectros de RMN encontram-se no apêndice (figuras 109 a 113).

Tabela 9 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) para a tambjamina 2, presente na amostra NN89.

Tambjamina 2 - NN89			
δ_{C} ; tipo	δ_{H} (J em Hz)	COSY	HMBC
40,3; CH ₂	3,78; t; 6 Hz	8,34; 4,32	160,9; 142,2; 111,8; 41,5
41,5; CH ₂	4,32; t; 6 Hz	3,78	160,9; 142,2; 111,8; 40,3
58,7; CH ₃	3,93; s		160,9
95,1; CH	6,61; sl		160,9; 140,2; 120,5; 111,8; 41,5
111,0; CH	6,32; m	11,97; 7,17; 6,73	123,9; 120,5; 113,2
111,8; C			
113,2; CH	6,73; s	11,97; 6,32	123,9; 120,5; 111,0
120,5; C			
123,9; CH	7,17; s	11,97; 6,32	120,5; 113,2; 111,0
140,2; C			
142,2; CH	8,34; s	3,78	160,9; 120,5; 111,8; 40,3
160,9; C			

Fonte: Autoria própria.

Figura 43 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 2.

A tabela 8 apresenta a atribuição dos sinais de RMN de ^1H , ^{13}C e as correlações COSY e HMBC para a tambjamina 2, analisada em $\text{DMSO}-d_6$. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região entre δ 6,30 e 7,20, correspondentes aos hidrogênios pirrólicos, dois sinais na região entre δ 3,70 e 4,30, referentes hidrogênios metilênicos do grupo etanosulfônico, um sinal em δ 3,93 referente aos hidrogênios metílicos do grupo metoxila, além de um sinal em δ 8,32 referente aos hidrogênios metilênicos do grupo enamina, ligado ao esqueleto pirrólico. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 12 sinais, sendo 7 sinais na região entre δ 95,0 e 140,0, que correspondem aos carbonos do esqueleto pirrólico, dois sinais em δ 142,2 e δ 160,9, que correspondem aos carbonos CH ligados à heteroátomos (nitrogênio e oxigênio, respectivamente), dois sinais na região de δ 40,0, que correspondem aos carbonos do grupo etanosulfônico e um sinal em δ 58,7, que corresponde ao carbono do grupo metoxila. A análise dos dados de HSQC permitiu a atribuição dos sinais de ^1H com os respectivos carbonos.

A partir da análise dos resultados de RMN uni e bidimensionais, foi possível confirmar a estrutura da tambjamina 2, apresentada na figura 43B.

Verificou-se que o composto não encontrava-se degradado na amostra original. Na tentativa de verificar a massa exata da tambjamina 2 e o padrão de fragmentação do composto não degradado, foram realizadas análises por UPLC-QToF-MS em condições mais brandas do que as utilizadas comumente em nosso laboratório. Foram feitos vários testes, dentre os quais foram alterados os seguintes parâmetros: concentração de ácido fórmico na fase móvel (0% e 0,1%), voltagem do cone (0V e 30V), temperatura de dessolvatação (100 °C e 450 °C), modo de ionização (APCI) e polaridade (positivo e negativo). A partir dos resultados obtidos, verificou-se que mesmo utilizando condições muito mais brandas de análise, a tambjamina 2 apresentou m/z 216,11 para as análises em modo positivo e m/z 214,09 para a análise em modo negativo, valores de m/z que correspondem ao composto após a perda do grupo H_2SO_3 . Dessa forma, não foi possível verificar se a tambjamina 2 sintética correspondia ao composto detectado na fração 1R-1B do extrato de *R. ernsti* utilizando parâmetros como massa exata, tempo de retenção e padrão de fragmentação. Os cromatogramas e os espectros de massas obtidos para as análises empregando-se condições mais brandas são apresentados no apêndice (figuras 114 a 119).

- Tambjamina 3 – NN35

Após a separação cromatográfica da amostra NN35 por HPLC-UV, foram obtidas 8 frações, designadas NN35A a NN35H. As frações resultantes foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS e a tambjamina 3, que nas análises por HPLC-UV-ELSD-MS antes da etapa de purificação havia sido detectada no tempo de retenção de 11,5 min, não foi observada em nenhuma das frações resultantes. Na figura 44 são apresentados os resultados das análises por HPLC-UV-ELSD-MS da amostra NN35 antes da etapa de purificação. Na figura 45, além dos cromatogramas de UV das frações resultantes da etapa de separação cromatográfica da amostra NN35, também é apresentado o fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas.

Figura 44 - Cromatograma de UV no comprimento de onda de 404 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da amostra NN35 antes da etapa de purificação. O pico cromatográfico da tambjamina 3 está destacado em vermelho.

Figura 45 - Fluxograma com o rendimento em massa e cromatograma de UV das frações resultantes da separação de NN35 (A) no comprimento de onda de 404 nm (B).

Na figura 45B, o cromatograma em preto representa a amostra NN35 antes da etapa de separação por HPLC-UV e o pico cromatográfico indicado pela seta vermelha é o pico correspondente a tambjamina 3. Os demais cromatogramas representam as frações NN35A - NN35H obtidas após a etapa de fracionamento por HPLC-UV. Como é possível observar, o pico correspondente a tambjamina 3 não é observado em nenhuma das frações obtidas após a etapa de purificação, tendo possivelmente sofrido degradação.

- Tambjamina 4 – NN75

A separação cromatográfica da amostra NN75 por HPLC-UV resultou em duas frações, nomeadas NN75A e NN75B. O composto de interesse, a tambjamina 4, foi detectada na fração NN75A. Na figura 46, são apresentados o fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a purificação por HPLC-UV da amostra NN75, o cromatograma no UV da fração NN75A no comprimento de onda de 370 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 4, cujo pico está destacado em vermelho.

Figura 46 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra NN75 por HPLC-UV (A), cromatograma de UV da fração de interesse NN75A no comprimento de onda de 370 nm (B), o espectro de absorção no UV (C) e o espectro de massas (D) da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Após a análise por HPLC-UV-ELSD-MS, a fração NN75A foi submetida a análises por RMN uni e bidimensionais empregando-se DMSO- d_6 como solvente. Na tabela 10, são apresentados os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a tambjamina 4. Na

figura 47, são apresentadas as correlações COSY e HMBC observadas para a tambjamina 4, bem como a estrutura final do composto. Os espectros de RMN são apresentados no apêndice (figuras 120 a 124).

Tabela 10 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) para a tambjamina 4, presente na amostra NN75A.

Tambjamina 4 - NN75A			
δ_{C} ; tipo	δ_{H} (J em Hz)	COSY	HMBC
17,8; CH ₃	0,94; d; 6,6 Hz	2,33	31,9; 42,6
31,9	2,33; m	0,94	17,8
42,6	2,18; sb		17,8; 31,9; 177,5
58,5; CH ₃	3,83; s		158,8
92,3; CH	6,27; s		58,5; 133,3
109,5; CH	6,83; sl	7,01; 6,20	
110,3; CH	6,20; t; 2,8 Hz	7,01; 6,83	112,8
112,8; C			
123,5; CH	7,01; sl	6,83; 6,20	110,3 ; 112,8
133,3; C			
143,0; CH	7,81; s		
158,8; C			
177,5; CO ₂ H			
	9,29; s		

sb = sinal sobreposto

Fonte: Autoria própria.

Figura 47 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 4.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise dos resultados de RMN uni e bidimensionais, foi possível confirmar que o composto sintético correspondia a mesma estrutura proposta para a tambjamina 4 a partir das análises MS/MS do composto detectado na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti*. Em seguida, a amostra NN75A e a fração 1R-2 foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS/MS, em sequência, com o intuito de se comparar os tempos de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação dos compostos presentes em ambas as amostras. Na figura 48 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas MS/MS dos compostos detectados na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti* e na amostra NN75A.

Figura 48 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 4 detectada na fração 1R-1E do extrato de *R. ernsti* e na amostra NN75A.

Fonte: Autoria própria.

Após as análises por UPLC-QToF-MS/MS, verificou-se que o composto presente na fração de *R. ernsti* e o composto sintético possuem massas acuradas muito próximas, ($[M+H]^+ = 290,1544$ para o composto natural e $[M+H]^+ = 290,1579$; erro de massa = 3,5 mDa), porém apresentam padrões de fragmentação e tempos de retenção diferentes ($t_R = 3,49$ min para o composto natural e $t_R = 3,02$ min para o

composto sintético). Dessa forma, conclui-se que o composto natural, detectado na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti* e o composto sintético não possuem a mesma estrutura.

- Tambjamina 4 – NN140

Após a separação cromatográfica da amostra NN140 por HPLC-UV, foram obtidas 5 frações, designadas NN140A - NN140E. Após análises por HPLC-UV-ELSD-MS, detectou-se a tambjamina 4 na fração NN140A. Entretanto, esta não apresentava grau de pureza satisfatório para a obtenção de espectros de RMN, sendo necessária uma etapa adicional de purificação por HPLC-UV. Após esta etapa de purificação de NN140A, as 4 frações obtidas, denominadas NN140A1 - NN140A4 foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS. A tambjamina 4 foi detectada na fração NN140A3. Na figura 49 são apresentados o fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após as duas etapas de purificação por HPLC-UV da amostra NN140, o cromatograma de UV da fração NN140A3 no comprimento de onda de 370 nm, o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 49 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de separação cromatográfica da amostra NN140 (A), cromatograma de UV da fração de interesse NN140A no comprimento de onda de 370 nm (B), o espectro de absorção no UV (C) e o espectro de massas (D) da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Após as etapas de separação cromatográfica e análise por HPLC-UV-ELSD-MS, verificou-se que a fração NN140A3 apresentava elevado grau de pureza, entretanto a quantidade em massa era insuficiente para a realização de análises de RMN. Uma alternativa para confirmar a estrutura da tambjamina 4 presente na fração NN140A3 foi a realização de análises por UPLC-QToF-MS/MS das amostras NN75A e NN140A3 e comparação dos tempos de retenção, massas acuradas e padrões de fragmentação dos compostos presentes nas duas frações. A confirmação da estrutura empregando análises por UPLC-ESi-QToF-MS/MS é uma alternativa plausível, pois os compostos de interesse nas frações NN75A e NN140A3 são produtos de síntese, na qual já se possui um conhecimento prévio da estrutura final do composto produto e a confirmação da estrutura da tambjamina 4 por RMN já havia sido realizada para a amostra NN75A. Na figura 50 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas MS/MS da tambjamina 4 nas frações sintéticas NN75A e NN140A3.

Figura 50 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 4 detectada nas frações NN75A e NN140A3.

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados apresentados na figura 50, concluiu-se que os compostos sintéticos presentes nas frações NN75A e NN140A3 correspondem ao mesmo composto, uma vez que apresentam tempos de retenção praticamente idênticos ($t_R = 2,99$ min para a fração NN75A e $t_R = 3,01$ min para a fração

NN140A3), massa acurada muito próximas ($[M+H]^+ = 290,1561$ para a fração NN75A e $[M+H]^+ = 290,1558$ para a fração NN140A3) e o mesmo padrão de fragmentação.

Uma vez que o composto presentes na amostra NN75A não corresponde ao composto detectado na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti*, conclui-se também que a tambjamina sintética presente na fração NN140A3 também não possui a mesma estrutura da natural. Para efeito de confirmação, as três amostras foram analisadas sequencialmente por UPLC-ESI-QToF-MS/MS a fim de se comparar os tempos de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação do composto de interesse nas três frações. Na figura 51 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas MS/MS da tambjamina 4 na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti* e nas frações sintéticas NN75A e NN140A3.

Figura 51 - Cromatogramas (A) e espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 4 na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti* e nas frações sintéticas NN75A e NN140A3.

A partir dos resultados apresentados na figura 51, conclui-se que a tambjamina 4 presente nas frações NN75A e NN140A3 não possui a mesma estrutura do composto detectada na fração 1R-2 do extrato de *R. ernsti*. Apesar de apresentarem massas acuradas muito próximas ($[M+H]^+ = 290,1556$ para a fração natural 1R-2, $[M+H]^+ = 290,1561$ para a fração sintética NN75A e $[M+H]^+ = 290,1558$

para a fração sintética NN140A3), os compostos natural e sintético possuem tempos de retenção e padrão de fragmentação diferentes.

- Tambjamina 5 – NN132

A separação cromatográfica da amostra NN132 por HPLC-UV foi realizada em duas etapas empregando-se as mesmas condições cromatográficas. As 7 frações obtidas em cada etapa foram coletadas e analisadas separadamente. Na primeira etapa as frações foram designadas NN132A, NN132AB, NN132B, NN132C, NN132D, NN132E e NN132F. Já as frações da etapa 2 foram designadas NN132A2, NN132AB2, NN132B2, NN132C2, NN132D2, NN132E2 e NN132F2. Após análises por HPLC-UV-ELSD-MS, a tambjamina 5 foi detectada nas frações NN132C e NN132C2. O fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após as duas etapas de purificação por HPLC-UV da amostra NN132 é apresentado na figura 52. Na figuras 53 e 54 são apresentados os cromatogramas de UV de NN132C e NN132C2 no comprimento de onda de 370 nm, bem como o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 5.

Figura 52 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra NN132 por HPLC-UV.

Fonte: Autoria própria.

Figura 53 - Cromatogramas de UV da amostra NN132C no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 5. O pico cromatográfico que corresponde ao composto de interesse está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Figura 54 - Cromatogramas de UV da amostra NN132C2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 5, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Após a análise por HPLC-UV-ELSD-MS, a fração NN132C na qual detectou-se a presença da tambjamina 5, foi submetida a análises por RMN uni e bidimensionais, empregando-se DMSO-*d*₆ como solvente. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da amostra NN132C2 também foram adquiridos em DMSO-*d*₆ e comparados aos espectros da amostra NN132C. Na tabela 11 são apresentados os dados de RMN de ¹H e ¹³C para a tambjamina 5, presente na amostra NN132C. Na figura 55 são apresentadas as correlações COSY e HMBC observadas para a tambjamina 5, bem como a estrutura final do composto. Os espectros de RMN são apresentados no apêndice (figuras 125 a 129).

Tabela 11 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) para a tambjamina 5, presente na amostra NN132C.

Tambjamina 5, fração NN132C			
δ_{C} , tipo	δ_{H} (J em Hz)	COSY	HMBC
16,8; CH ₃	0,91; d; 6,5 Hz	1,76	55,5; 33,4; 28,6
28,6; CH ₂	1,63; m; 1,37; m	2,28; 1,76	174,8; 55,5; 33,4; 31,4; 16,8
31,4; CH ₃	2,28; m	1,63; 1,37	174,8; 33,4; 28,6
33,4; CH	1,76; m	3,47; 1,63; 1,37; 0,91	55,5; 31,4; 28,6; 16,8
55,5; CH	3,47; sb	1,76	143,7; 33,4; 28,6; 16,8
58,8; CH ₃	3,94; s		163,9
92,3; CH	6,49; s		110,0
110,0; C			
110,8; CH	6,28; s	7,13; 6,85	123,8; 110,8
110,8; CH	6,85; s	7,13; 6,28	123,8; 122,4; 110,8
122,4; C			
123,8; CH	7,13; s	6,85; 6,28	122,4; 110,8
143,7 CH	7,99; s		110,0
158,8; C			
163,9; C			
174,8; C			

Fonte: Autoria própria.

Figura 55 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 5.

A partir da análise dos resultados de RMN uni e bidimensionais da amostra NN132C, foi possível confirmar a estrutura proposta para a tambjamina 5. A comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C das amostras NN132C e NN132C2 permitiu concluir que os dois compostos são iguais e apresentam a estrutura apresentada na figura 55B.

Além das análises por HPLC-UV-ELSD-MS e RMN de ^1H e ^{13}C , a fração NN132C, juntamente com a fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti*, foi analisada por UPLC-ESI-QToF-MS/MS, a fim de se comparar os tempos de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação dos compostos presentes em ambas as amostras. Na figura 56 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas MS/MS das análises por UPLC-ESI-QToF-MS/MS da tambjamina 5 detectada na fração do extrato de *R. ernsti* e na fração sintética NN132C. O pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha na análise da amostra 1R-4.

Figura 56: Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da tambjamina 5 na fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti* e na fração NN132C. O pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha na análise da amostra 1R-4.

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados apresentados na figura 56, pode-se concluir que o composto sintético presente nas frações NN132C e, por consequência na fração NN132C2, não possui a mesma estrutura da tambjamina detectada na fração 1R-4

do extrato de *R. ernsti*. Apesar de massas acuradas muito próximas ($[M+H]^+ = 304,1657$ para a fração natural 1R-4 e $[M+H]^+ = 304,1663$ para a fração sintética NN132C), os compostos natural e sintético possuem tempos de retenção e padrão de fragmentação diferentes.

- Tambjamina 6 – AB33

A tambjamina 6 foi sintetizada no laboratório do Prof. Roberto Berlinck pela Dra. Ariane Bertonha, empregando-se como reagentes o aldeído precursor, fornecido pelo grupo do Prof. Richmond Sarpong, e o aminoácido leucina. A separação por HPLC-UV de AB33 foi realizada em duas etapas empregando-se as mesmas condições cromatográficas, entretanto as frações obtidas em cada etapa foram coletadas e analisadas separadamente. Na primeira etapa, foram obtidas 5 frações, designadas AB33A, AB33B, ABB33C, AB33D e AB33E. Já na segunda etapa, foram obtidas 6 frações, designadas AB33A2, AB33B2, ABB33C2, AB33D2, AB33E2 e AB33F2. Após análises por HPLC-UV-ELSD-MS, a tambjamina 6 foi detectada na fração AB33E, resultante da primeira etapa de separação cromatográfica, e nas frações AB33C2, AB33D2 e AB33E2, resultantes da segunda etapa de separação cromatográfica. O fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após as duas etapas de purificação por HPLC-UV da amostra AB33 é apresentado na figura 57. Nas figuras 58 a 61 são apresentados os cromatogramas de UV de AB33E e AB33C2, AB33D2 e AB33E2 (280 nm), bem como o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 6.

Figura 57 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra AB33 por HPLC-UV.

Fonte: Autoria própria.

Figura 58 - Cromatograma de UV da amostra AB33 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6. O pico cromatográfico que corresponde ao composto de interesse está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Figura 59 - Cromatograma no UV da fração AB33C2 nos comprimentos de onda de 280 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Figura 60 - Cromatograma no UV da fração AB33D2 no comprimento de onda de 280 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Figura 61 - Cromatograma no UV da fração AB33E2 nos comprimentos de onda de 280 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 6, cujo pico cromatográfico correspondente está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Após análise por HPLC-UV-ELSD-MS, a fração AB33E foi submetida a análises por RMN uni e bidimensionais, empregando-se DMSO-*d*₆ como solvente. Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C da amostra AB33C2 também foram adquiridos em DMSO-*d*₆ e comparados aos espectros da amostra AB33E. Na tabela 12 são apresentados os dados de RMN de ¹H e ¹³C para a tambjamina 6, presente na amostra AB33E. Na figura 62 são apresentadas as correlações COSY e HMBC observadas para a tambjamina 6, bem como a estrutura final do composto. Os espectros de RMN são apresentados no apêndice (figuras 130 a 134).

Tabela 12 - Dados de RMN (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para a tambjamina 6, presente na amostra AB33E.

Tambjamina 6 - Fração AB33E			
δ_{C} ; tipo	δ_{H} (J em Hz)	COSY	HMBC
22,4; CH_3	0,94; t; 6,8 Hz	1,66	23,1; 24,3; 44,5
23,1; CH_3	0,94; t; 6,8 Hz	1,66	22,4; 24,3; 44,5
24,3; CH	1,66; sb	0,94	
44,5; CH_2	1,74; m; 1,68 sb	4,40	22,4; 23,1; 24,3; 63,8; 175,3
58,8; CH_3	3,94; s		164,0
63,8; CH	4,40; s	1,75; 1,68; 9,83	175,3
92,9; CH	6,49; s		110,4; 122,5; 142,1; 164,0
110,4; C			
110,7; CH	6,25; s	6,96; 7,10	114,0; 122,5; 124,2
114,0; CH	6,96; s	6,25	63,8; 122,5
122,5; C			
124,2; CH	7,10; s	6,25	110,7; 114,0; 122,5
140,5 CH	7,96; d; 12,2 Hz	9,83	
142,1 C			
164,0; C			
175,3; C			

sb = sinal sobreposto

Fonte: Autoria própria.

Figura 62 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) e estrutura da tambjamina 6.

A partir da análise dos resultados de RMN uni e bidimensionais da amostra AB33E, foi possível confirmar a estrutura da tambjamina 6, apresentada na figura 62B. As análises dos espectros de ^1H e ^{13}C da amostra AB33C2 também permitiram concluir que os compostos presentes nas frações AB33E e AB33C2 são idênticos. Além das análises por HPLC-UV-ELSD-MS e RMN uni e bidimensionais, a amostra AB33E e a fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti* foram analisadas por UPLC-ESI-QToF-MS/MS, em sequência, com o intuito de confirmar a partir da comparação dos tempos de retenção, massa exata e padrão de fragmentação se a tambjamina 6 sintética correspondia ao mesmo composto presente na fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti*. Na figura 63 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas MS/MS das análises por UPLC-ESI-QToF-MS/MS da tambjamina 6 detectada na fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti* e na fração sintética AB33E.

Figura 63 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) das análises por UPLC-ESI-QToF-MS/MS da tambjamina 6 detectada na fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti* e na amostra AB33E. O pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha na análise da amostra 1R-4.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados apresentados na figura 63 permitem concluir que a tambjamina 6, presente na fração sintética AB33E, é o mesmo composto detectado

na fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti*. Os dois compostos apresentam massa acurada muito próximas ($[M+H]^+ = 304,1713$ para a fração natural 1R-4 e $[M+H]^+ = 304,1718$ para a fração sintética AB33E), tempos de retenção próximos ($t_R = 4,306$ min para a fração de *R. ernsti* 1R-4 e $t_R = 4,310$ para a fração sintética AB33E) e padrões de fragmentação idênticos. Para efeito de comparação, na figura 64 são apresentados os cromatogramas e espectros de massas MS/MS das análises por UPLC-QToF-MS/MS das frações 1R-4, NN132C e AB33E.

Figura 64 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti* e das frações sintéticas NN132C e AB33E. Na análise da amostra 1R-4, o pico cromatográfico correspondente ao composto de interesse está indicado com uma seta vermelha,

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados das análises por UPLC-QToF-MS/MS apresentados na figura 64, é possível observar que os compostos presentes nas três frações possuem massas acuradas muito semelhante ($[M+H]^+ = 304,1713$ para a

fração natural 1R-4, $[M+H]^+ = 304,1714$ para a fração sintética NN132C e $[M+H]^+ = 304,1718$ para a fração sintética AB33E). Verifica-se também que, de fato, a tambjamina 6, presente na fração AB33E e que possui um resíduo de leucina ligado ao esqueleto comum da tambjamina, é o mesmo composto presente na fração 1R-4 do extrato de *R. ernsti*. O tempo de retenção e o padrão de fragmentação das tambjamins 5 e 6, presentes nas frações NN132C e AB33E, respectivamente, são muito diferentes, demonstrando que a mudança de posição de um grupo metila na estrutura do composto influencia e muito nos resultados obtidos nas análises por UPLC-QToF-MS/MS.

- Tambjamina 7 – NN126

Após a separação cromatográfica da amostra NN126 por HPLC-UV, foram obtidas 6 frações, designadas NN126A - NN126F. Após análises por HPLC-UV-ELSD-MS, detectou-se a tambjamina 7 na fração NN126A. Entretanto, esta não apresentava grau de pureza satisfatório para a obtenção de espectros de RMN, sendo necessário uma etapa adicional de purificação por HPLC-UV. Após esta etapa de purificação de NN126A, foram obtidas 12 frações, denominadas NN126A1 a NN126A12. Todas as frações foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS e a tambjamina 7 foi detectada nas frações NN126A8, NN126A9 e NN126A10. O fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após as duas etapas de purificação por HPLC-UV da amostra NN126 é apresentado na figura 65. Nas figuras 66 a 68 são apresentados os cromatogramas de UV das frações NN126A8, NN126A9 e NN126A10 (370 nm), bem como o espectro de absorção no UV e o espectro de massas da tambjamina 7.

Figura 65 - Fluxograma com o rendimento em massa das frações obtidas após a etapa de purificação da amostra NN126 por HPLC-UV.

Figura 66 - Cromatograma de UV da amostra NN126A8 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico está destacado em vermelho.

Figura 67 - Cromatograma de UV da amostra NN126A9 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Figura 68 - Cromatograma de UV da amostra NN126A10 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e o espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico está destacado em vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Após a análise por HPLC-UV-ELSD-MS, a fração NN126A10, que apresentava maior grau de pureza e maior quantidade em massa, foi submetida a análises por RMN de ¹H. No entanto, não foi possível obter espectro de boa qualidade. A fração NN126A10 foi, então, submetida à análise por UPLC-QToF-MS/MS no intuito de se verificar se a tambjamina 7 sintética se tratava do mesmo composto detectado na fração 1R-1C do extrato de *R. ernsti*, pela comparação dos tempos de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação do composto de interesse. Na figura 69 são apresentados os cromatogramas e os espectros de massas MS/MS da análise por UPLC-QToF-MS/MS da tambjamina 7 na fração 1R-1C do extrato de *R. ernsti* e na fração sintética NN126A10.

Figura 69 - Cromatogramas (A) e os espectros de massas MS/MS (B) da análise por UPLC-QToF-MS/MS da tambjamina 7 na fração 1R-1C do extrato de *R. ernsti* e na fração sintética NN126A10.

Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados apresentados na figura 69, concluiu-se que o composto sintético presente na fração NN126A10 não corresponde à tambjamina detectada na fração 1R-1C do extrato de *R. ernsti*, uma vez que os compostos

natural e sintético possuem tempos de retenção e padrões de fragmentação diferentes.

5.3.4 Análise dos extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* por HPLC-UV-ELSD-MS e por UPLC-ESI-QToF-MS

As análises dos extratos aquosos e orgânicos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* por HPLC-UV-ELSD-MS e UPLC-ESI-QToF-MS foram realizados com o intuito de se verificar quais tambjaminsas já conhecidas eram observadas nas amostras. Foram avaliadas as tambjaminsas A, C, D, I, K e os aldeídos das tambjaminsas A e B. A confirmação da presença ou não dos compostos nas amostras foi realizada por comparação dos espectros de absorção no UV, tempo de retenção, massa acurada e padrão de fragmentação dos padrões e dos compostos detectados nas amostras. Após a análise conjunta dos espectros de UV e massas de alta resolução (MS e MS/MS) foi possível confirmar a presença das tambjaminsas A, C, D, K e dos aldeídos das tambjaminsas A e B. A tambjamina I não foi detectada em nenhuma das amostras avaliadas. A distribuição das tambjaminsas nas amostras de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* é apresentada na figura 70, resultante do processamento empregando-se a ferramenta GNPS e visualizada empregando-se o software Gephi.

Figura 70 - Distribuição das tambjaminsas nas amostras de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* visualizada empregando-se o software Gephi.

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise da figura 70, verifica-se que as tambjaminsas estão presentes em ambos os extratos (orgânico e aquoso) dos organismos marinhos. Entretanto, os extratos AcOEt apresentam a maior diversidade de tambjaminsas quando comparados aos extratos aquosos. No extrato aquoso do briozoário *V. dentata*, não foi observada a presença de nenhuma das tambjaminsas estudadas. As tambjaminsas C, D, K e B-aldeído foram detectadas nos extratos orgânicos de todos os organismos marinhos, enquanto que o aldeído da tambjamina A foi detectada somente nos extratos AcOEt de *T. stegosauriformis* e *R. ernsti*. A tambjamina A, por outro lado, foi detectada majoritariamente nos extratos aquosos. Tais resultados evidenciam a importância de se estudar os extratos aquosos e orgânicos dos organismos marinhos. Além disso, também confirmam que organismos marinhos localizados em posições superiores na cadeia alimentar acumulam substâncias química encontradas em suas respectivas presas, conforme já reportado

previamente na literatura (CARBONE *et al.*, 2010; LINDQUIST e FENICAL, 1991; PEREIRA *et al.*, 2012).

Em estudos conduzidos por Carté e Faulkner (1983 e 1986), os autores puderam detectar a presença de diferentes tambjamins em organismos envolvidos em relações presa-predador. Foram investigados extratos do briozoário *Sessibugula translucens* e os moluscos *Tambja abdere*, *Tambja eliora* e *Roboastra tigris*, coletados no golfo da Califórnia (EUA). O briozoário *S. translucens* serve de alimento para *T. abdere* e *T. eliora*, ao passo que estas são predadas pelo nudibrânquio carnívoro *R. tigris*. Os autores comprovaram a presença das tambjamins A, B, C e D e dos aldeídos das tambjamins A, B e D nos extratos dos quatro organismos. Além disso, Carté e Faulkner (1986) também puderam comprovar que as tambjamins possuem um papel crucial como mecanismo de defesa de *T. abdere* e *T. eliora* contra ataques de *R. tigris*. Em seus experimentos de laboratório, cujos resultados foram enriquecidos com observações de campo, os autores verificaram que as duas espécies de *Tambja* utilizam-se de mecanismos de defesa diferentes. *T. eliora* se defende dos ataques de *R. tigris* se contorcendo e nadando vigorosamente, enquanto que *T. abdere*, quando ameaçada, excreta uma grande quantidade de muco amarelo, que apresenta altas concentrações de tambjamins. Segundo os autores, *T. abdere* e *T. eliora* adotam diferentes mecanismos de proteção contra os ataques de *R. tigris* devido às diferentes quantidades de tambjamins presentes nos dois organismos. Enquanto que em *T. abdere* o conteúdo de tambjamins presente é de aproximadamente 10 mg, *T. eliora* apresenta aproximadamente 2 mg de tambjamins, o que corresponde a menos do que a quantidade de tambjamins utilizada por *T. abdere* em um único evento de defesa (cerca de 3 mg) (CARTÉ e FAULKNER, 1983 e 1986).

Além de sua importância em mecanismos de proteção e defesa, Carté e Faulkner (1986) também acreditavam que as tambjamins, de alguma forma, auxiliava *R. tigris* a localizar suas presas. Sabe-se que *R. tigris* se alimenta de uma grande variedade de nudibrânquios menores, entretanto, este, por algum motivo, tem preferência por se alimentar de *T. abdere* e *T. eliora*. Em observações em campo sobre os hábitos alimentares de *R. tigris*, os autores verificaram que o molusco consegue facilmente detectar e seguir os rastros deixados por *T. abdere* e *T. eliora* e alguns outros nudibrânquios e uma vez que a trilha era perturbada, *R. tigris* mudava sua direção. Em laboratório, Carté e Faulkner (1986) analisaram a

composição da trilha deixada por *T. abdere* em uma cama de dolomita e verificaram a presença das tambjamins A, B, C e D, em uma concentração total de 17,7 µg de tambjamins em uma trilha de 50 cm. Segundo os autores, *R. tigris* possui um comportamento semelhante ao descrito por Paine (1963) para o molusco *Navanax inermis*, sendo capaz de “seguir” a trilha de sua presa utilizando um tentáculo cefálico externo (CARTÉ e FAULKNER, 1986; PAINE, 1963).

Em experimentos de *Y-maze* (labirinto em Y), Carté e Faulkner (1986) também observaram que *T. eliora* era atraída por uma mistura de tambjamins A e B (1:1) na concentração de 10^{-10} mol L⁻¹, porém se deslocava em direção contrária quando a concentração da solução de tambjamins A e B (1:1) era de 10^{-8} mol L⁻¹. Tal comportamento sugere que da mesma forma que as tambjamins podem auxiliar na localização de presas, estas também podem indicar a proximidade de um possível predador. Em concentrações mais baixas de tambjamins, *T. eliora* se desloca “de encontro” à solução de tamjamins, enquanto que em concentrações mais altas, o molusco se desloca na direção oposta. Estes resultados também podem sugerir que os níveis inferiores da cadeia alimentar (caso de *S. dentata*) liberam uma quantidade menor de tambjamins no ambiente, possivelmente por possuírem uma menor quantidade destes compostos em seus organismos. Por outro lado, organismos localizados em posições superiores na cadeia alimentar (*R. tigris*, por exemplo) possuem uma quantidade maior de tambjamins e, por isso, liberam maiores quantidades destes compostos no ambiente, o que faz com que *T. eliora* se desloque em direção oposta de seu predador (CARTÉ e FAULKNER, 1986).

5.3.5 Quantificação de tambjamins nos extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* por HPLC-Flu

Anteriormente aos procedimentos de criação das curvas analíticas e de quantificação das tambjamins, uma amostra contendo 1 mg mL⁻¹ de cada um dos 7 padrões de tambjamins avaliados foi preparada e analisada por HPLC com detector de fluorescência. O objetivo foi selecionar o gradiente de eluição mais adequado para as análises por HPLC-Flu, garantindo que não haveria co-eluição de nenhum dos compostos sob estudo. Na figura 71, é apresentado o cromatograma de fluorescência do mix de padrões no $\lambda_{\text{emissão}}$ de 440 nm empregando-se o gradiente de eluição descrito no item 5.2.7.

Figura 71 - Cromatograma de fluorescência do mix de padrões no $\lambda_{\text{emissão}}$ de 440 nm.

Fonte: Autoria própria.

A identificação do pico cromatográfico correspondente a cada uma das tambjamins nas amostras de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* foi feita por comparação entre o tempo de retenção (t_R) no cromatograma e o comprimento de onda de emissão no espectro de fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}}$). A detecção e confirmação da presença dos compostos nas amostras sob estudo já havia sido realizada a partir das análises por HPLC-UV-ELSD-MS e UPLC-ESI-QToF-MS, como apresentado no item 5.3.4. Na tabela 13, são apresentadas as tambjamins avaliadas, bem como os tempos de retenção, $\lambda_{\text{emissão}}$ de cada um dos compostos. Os espectros de fluorescência das tambjamins A, a-aldeído, B-aldeído, C, D, I e K são apresentados no apêndice (figuras 135 a 141).

Tabela 13 - Tempo de retenção (t_R), $\lambda_{\text{emissão}}$ e concentrações utilizadas na construção das curvas de analíticas das tambjamins avaliadas.

Composto	t_R (min)	$\lambda_{\text{emissão}}$
Tambjamina A	11,3	436,3
Tambjamina A-aldeído	9,3	416,7
Tambjamina B-aldeído	15,0	411,8
Tambjamina C	23,6	441,2
Tambjamina D	30,5	436,6
Tambjamina I	28,9	451,0
Tambjamina K	27,6	441,2

Fonte: Autoria própria.

Para a quantificação das tambjamins detectadas nos extratos aquosos e orgânicos dos organismos marinhos (tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K), foram construídas curvas analíticas pelo método do padrão externo. A tambjamina I não foi detectada em nenhuma das amostras. As curvas analíticas foram plotadas com os valores das áreas dos picos referentes às tambjamins *versus* a concentração de composto presente nas amostras de padrão. Na figura 72 é apresentada a curva analítica da tambjamina C. As curvas analíticas dos outros alcalóides são apresentadas no apêndice (figuras 142 a 147). Os parâmetros das curvas analíticas utilizadas na quantificação das tambjamins são apresentados na tabela 14.

Figura 72 - Curva analítica por padrão externo da tambjamina C.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 14 - Parâmetros das curvas analíticas utilizadas para a quantificação das tambjamins nos extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*.

Composto	Concentrações (mg mL ⁻¹)	Equação de regressão	r ²
Tambjamina A-aldeído	1,0000 – 0,0100	$y = 2,18 \times 10^8 x + 1,04 \times 10^7$	0,9909
Tambjamina A	3,0000 – 0,0100	$y = 8,25 \times 10^7 x - 7,86 \times 10^6$	0,9902
Tambjamina B-aldeído	0,7500 – 0,0010	$y = 2,82 \times 10^8 x + 1,00 \times 10^7$	0,9902
Tambjamina C	3,0000 – 0,0100	$y = 9,48 \times 10^7 x + 1,03 \times 10^6$	0,9993
Tambjamina D	1,0000 – 0,0010	$y = 6,00 \times 10^8 x - 1,32 \times 10^7$	0,9944
Tambjamina I	0,0100 – 0,0005	$y = 2,56 \times 10^9 x - 9,63 \times 10^5$	0,9939
Tambjamina K	0,1000 – 0,0010	$y = 4,31 \times 10^8 x - 1,45 \times 10^6$	0,9909

Fonte: Autoria própria.

A concentração das tambjamins nas amostras foi calculada utilizando-se a equação da reta dos padrões, descrita na tabela 14, e a área média do pico cromatográfico correspondente a cada uma das tambjamins detectadas. A extrapolação da reta no eixo das abcissas define a concentração do composto de interesse na amostra sob investigação. Na tabela 15 são apresentadas as concentrações totais de tambjamins, em mg mL⁻¹, nos extratos aquosos e orgânicos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* obtidas a partir da extrapolação da reta no eixo das abcissas. As tabelas detalhadas contendo a concentração de cada uma das tambjamins nos extratos orgânico e aquoso dos organismos estudados são apresentadas no apêndice.

Tabela 15 - Concentrações totais (mg mL⁻¹) de tambjamins nos extratos aquosos e orgânicos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*.

Organismo	Concentração (mg mL ⁻¹)		TOTAL (mg mL ⁻¹)
	Extrato aquoso	Extrato orgânico	
<i>V. dentata</i>	-	0,3622	0,3622
<i>T. stegosauriformis</i>	0,3535	1,4470	1,8007
<i>T. brasiliensis</i>	0,1835	0,4023	0,5858
<i>R. ernsti</i>	0,5782	0,2664	0,8447

Fonte: Autoria própria.

A partir da análise da tabela 15, verificou-se que, para a quantidade de material de partida descrita no item 5.2.5, o briozoário *V. dentata* é o que apresenta menor concentração de tambjamins, enquanto que o nudibrânquio *T. stegosauriformis* apresenta maior concentração de tambjamins. Além disso, verifica-se também que, com exceção de *R. ernsti*, as maiores concentrações de tambjamins são encontradas nos extratos orgânicos dos organismos estudados.

Uma vez que a quantidade de material biológico coletada e utilizada na obtenção dos extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti* é diferente, a avaliação da distribuição de tambjamins nos organismos sob estudo é prejudicada. Nesse sentido, decidiu-se “normalizar” os dados apresentados na tabela 14, dividindo a concentração total de tambjamins pela quantidade de material de partida da qual os extratos foram obtidos. Os dados de concentração total normalizada são apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Quantidade de material de partida (em g), concentração total (em mg mL⁻¹) e concentração total normalizada (mg de tambjamins g⁻¹ de organismo) de tambjamins nos extratos de *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*.

Organismo	Quantidade de material de partida (g)	Concentração total (mg mL ⁻¹)	Concentração total normalizada (mg de tambjamins g ⁻¹ de organismo)
<i>V. dentata</i>	2,4182	0,3622	0,1498
<i>T. stegosauriformis</i>	1,4989	1,8007	1,2013
<i>T. brasiliensis</i>	0,2819	0,5858	2,0780
<i>R. ernsti</i>	0,1421	0,8447	5,9444

Fonte: Autoria própria.

A concentração total normalizada de tambjamins, apesar de ser um valor estimado, nos permite ter uma idéia mais clara da distribuição dos compostos nos organismos sob estudo. Os resultados apresentados na tabela 15 indicam que, organismos que ocupam os níveis tróficos superiores apresentam maiores quantidade de tambjamins, enquanto que organismos que ocupam níveis tróficos inferiores apresentam menores quantidades de tambjamins. Dessa forma, *T. stegosauriformis* e *T. brasiliensis* possuem de concentração de tambjamins de 8 e 14 vezes superiores à sua presa *V. dentata*, respectivamente Já *R. ernsti* possui

concentração de tambjamins entre 3 e 5 vezes superiores a suas presas *T. brasiliensis* e *T. stegosauriformis*.

Tais resultados não nos permitem concluir se os organismos estudados acumulam os compostos produzidos por suas presas ou se os alcalóides são produzidos por bactérias, que são, por sua vez, transferidas de um nível trófico inferior para níveis tróficos superiores, entretanto sustentam nossa ideia inicial de que os níveis superiores da cadeia alimentar apresentam uma quantidade maior de tambjamins em relação aos níveis inferiores.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos para o estudo metabolômico de fungos do gênero *Colletotrichum*, concluiu-se que a metodologia 1 de extração e fracionamento dos meios de cultivo de *Colletotrichum* foi escolhida como sendo a mais adequada, uma vez que esta demonstrou ser a metodologia mais reprodutível e a mais eficiente, de acordo com a avaliação dos resultados empregando-se ferramentas estatísticas. Além disso, nos gráficos de PCA, é possível verificar que as frações relacionadas às linhagens endofíticas encontram-se nos quadrantes do lado esquerdo, enquanto que as frações relacionadas a linhagens fitopatogênicas encontram-se nos quadrantes do lado direito. Esta observação demonstra que existe uma diferença na composição química do metaboloma das linhagens endofíticas e fitopatogênicas. Os resultados do experimento 1 avaliados empregando-se *molecular networking* demonstram que muitos nodos presentes na rede molecular correspondem a compostos detectados nos brancos analíticos e no meio de cultivo, o que evidencia a necessidade de realização de tratamento de dados ainda mais eficiente após a aquisição dos mesmos. As amostras de *Colletotrichum* foram analisadas novamente por UPLC-IMS-QToF-HRMS e após o processamento dos dados empregando-se as ferramentas *in-house* MSeXpress e MS2Analyte, foi possível obter análises de melhor qualidade. A avaliação conjunta dos resultados das análises por UPLC-IMS-QToF-HRMS empregando-se *molecular networking* e MS2Analyte permitiu concluir que linhagens endofíticas e fitopatogênicas possuem metabolismo consideravelmente diferente, de modo que as linhagens endofíticas produzem compostos que foram detectados em várias linhagens fúngicas do grupo, enquanto que as linhagens fitopatogênicas produzem compostos mais específicos a cada um dos isolados. O processo de desreplicação dos resultados do GNPS utilizando-se uma biblioteca *in-house* de compostos isolados de *Colletotrichum* spp., permitiu a identificação de 5 compostos nas amostras relacionadas às linhagens fitopatogênicas, que apresentam atividade fitotóxica. Tais resultados sugerem que a fitopatogenicidade de linhagens de *Colletotrichum* podem estar associada à produção de compostos fitotóxicos. Além disso, foi possível isolar um composto detectado nas amostras endofíticas de *Colletotrichum*, cujos espectros de RMN estão sob análise.

No que se refere às análises metabolômica de frações do extrato 1R do manto de *R. ernsti*, foi possível detectar e confirmar a presença de 6 tambjamins conhecidas: tambjamins A, C, D e K, além dos aldeídos das tambjamins A e B. Além disso, a análise conjunta dos resultados das análises por HPLC-UV-ELSD-MS e UPLC-ESI-QToF-MS/MS permitiu verificar a presença de 6 novas tambjamins. A síntese, purificação e caracterização das novas tambjamins, cujas estruturas foram propostas a partir dos espectros de massas MS/MS, permitiu confirmar a estrutura de um dos compostos. O estudo dos organismos marinhos *V. dentata*, *T. stegosauriformis*, *T. brasiliensis* e *R. ernsti*, ecologicamente envolvidos em relações presa-predador, permitiu detectar a presença das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos dos animais estudados. As tambjamins C, D, K e B-aldeído foram detectadas nos extratos orgânicos de todos os organismos marinhos, enquanto que o aldeído da tambjamina A foi detectada somente nos extratos AcOEt de *T. stegosauriformis* e *R. ernsti*. A tambjamina A, por outro lado, foi detectada majoritariamente nos extratos aquosos. Tais resultados reforçam a importância de se estudar ambos os extratos aquosos e orgânicos dos organismos marinhos. Além disso, também confirmam que organismos marinhos localizados em posições superiores na cadeia alimentar acumulam substâncias químicas encontradas em suas respectivas presas, conforme já reportado previamente na literatura. Os experimentos de quantificação de tambjamins nos extratos dos organismos marinhos estudados demonstraram que *T. stegosauriformis* e *T. brasiliensis* possuem de concentração de tambjamins de 8 e 14 vezes superiores à sua presa *V. dentata*, enquanto que *R. ernsti* possui concentração de tambjamins entre 3 e 5 vezes superiores a suas presas *T. brasiliensis* e *T. stegosauriformis*. Tais resultados não nos permitem concluir se os organismos estudados acumulam os compostos produzidos por suas presas ou se os alcalóides são produzidos por bactérias, que são, por sua vez, transferidas de um nível trófico inferior para níveis tróficos superiores, entretanto sustentam nossa ideia inicial de que os níveis superiores da cadeia alimentar apresentam uma quantidade maior de tambjamins em relação aos níveis inferiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, L. N.; STOOPS, S. L.; CREWS, B. C.; MARNETT, L. J.; LINDSLEY, C. W. Total synthesis and biological evaluation of tambjamine K and a library of unnatural analogs. *Bioorganic; Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5207-5211, 2010.
- ALLARD, P. M.; PÉRESSE, T.; BISSON, J.; GINDRO, K.; MARCOURT, L.; PHAM, V. C.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J. L. Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical Chemistry*, 88, 6, 3317-3323, 2016.
- BARTEL, J.; KRUMSIEK, J.; THEIS F. J. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4, 5, 1-9, 2013.
- CARBONE, M.; IRACE, C.; COSTAGLIOLA, F.; CASTELLUCCIO, F.; VILLANI, G.; CALADO, G.; PADULA, V.; CIMINO, G.; CERVERA, J. L.; SANTAMARIA, R.; GAVAGNIN, M. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*. *Bioorganic; Medicinal Chemistry Letters*, 20, 2668-2670, 2010.
- CARTÉ, B.; FAULKNER, D. J. Defensive metabolites from three nembrothid nudibranchs. *The Journal of Organic Chemistry*, 48, 14, 2314-2318, 1983.
- CARTÉ, B.; FAULKNER, D. J. Role of secondary metabolites in feeding associations between a predatory nudibranch, two grazing nudibranchs, and a bryozoan. *Journal of Chemical Ecology*, 12, 3, 795-804, 1986.
- CHAPLA, V. M.; ZERAIK, M. L.; LEPTOKARYDIS, I. H.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M.; PFENNING, L. H.; ARAÚJO, A. R. Antifungal compounds produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus from *Michelia champaca*. *Molecules*, 19, 11, 19243-19252, 2014.
- DEAN, L. J.; PRINSEP, M. R. The chemistry and chemical ecology of nudibranchs. *Natural Products Report*, 34, 1359-1390, 2017.
- DIAS, D. A.; JONES, O. A. H.; BEALE, D. J.; BOUGHTON, B. A.; BENHEIM, D.; KOUREMENOS, K. A.; WOLFENDER, J. L.; WISHART, D. S. Current and future perspectives on the structural identification of small molecules in biological systems. *Metabolites*, 6, 46, 1-29, 2016.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 4, 285-294, 2005.
- ERNST, M.; SILVA, D. B.; SILVA, R. R.; VÊNCIO, R. Z. N.; LOPES, N. P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Natural Products Report*, 31, 6, 784-806, 2014.
- FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48, 155-171, 2002.
- FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82, 596-605, 1998.

- FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, Uma Abordagem Otimizada para Exploração da Biodiversidade Brasileira: Estado da Arte, Perspectivas e Desafios. *Química Nova*, 36, 10, 1605-1609, 2013.
- GARCÍA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Natural Products Report*, 20, 426-431, 2003.
- GROMSKI, P.S., MUHAMADALI, H., ELLIS, D.I., XU, Y., CORREA, E.S., TURNER, M.L., & GOODACRE, R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10-23, 2015.
- HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M. & RENAULT, J. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews*, 16, 55-95, 2015.
- HUSSAIN, H.; ROOT, N.; JABEEN, F.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI, A.; AHMAD, M.; HASSAN, Z.; ABBAS, G.; MABOOD, F.; SHAH, A.; BADSHAH, A.; KHAN, A.; AHMAD, R.; GREEN, I. R.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; KROHN, K. Seimatic acid and colletonic acid: Two new compounds from the endophytic fungi, *Seimatosporium* sp. and *Colletotrichum* sp. *Chinese Chemical Letters*, 25, 12, 1577-1579, 2014.
- IRIEDA, H.; TAKANO, Y. Identification and characterization of virulence-related effectors in the cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 95, 87-92, 2016.
- KIM, J. D.; JEON, B. J.; HAN, J. W.; PARK, M. Y.; KANG, S. A.; KIM, B. S. Evaluation of the endophytic nature of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GYL4 and its efficacy in the control of anthracnose. *Pest Management Science*, 72, 8, 1529-1536, 2016.
- KUHLISCH, C.; POHNERT, G. Metabolomics in chemical ecology. *Natural Products Report*, 32, 937-955, 2015,
- LINDQUIST, N; FENICAL, W. New tamjamine class alkaloids from the marine ascidian *Atapozoa* sp. and its nudibranch predators. Origin of the tamjamines in *Atapozoa*. *Experientia*, 47, 5, 504-506, 1991.
- LIU, X.; LOCASALE, J. W. Metabolomics - a primer. *Trends In Biochemical Sciences*, 42, 4, 274-284, 2017.
- MACINTYRE, L.; ZHANG, T.; VIEGELMANN, C.; MARTINEZ, I. J.; CHENG, C.; DOWDELLS, C.; ABDELMOHSEN, U. R.; GERNERT, C.; HENTSCHEL, U.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomic tools for secondary metabolite discovery from marine microbial symbionts. *Marine Drugs*, 12, 3416-3448, 2014.
- MOLDENHAUER, J.; CHEN, X. H.; BORRISS, R.; PIEL, J. Biosynthesis of the antibiotic bacillaene, the product of a giant polyketide synthase complex of the trans-AT family. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, 43, 8195-8197, 2007.
- NAMAN, C. B.; RATTAN, R.; NIKOULINA, S. E.; LEE, J.; MILLER, B. W.; MOSS, N. A.; ARMSTRONG, L.; BOUDREAU, P. D.; DEBONSI, H. M.; VALERIOTE, F. A.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Integrating molecular networking and biological assays to target the isolation of a cytotoxic cyclic octapeptide,

- samoamide a, from an american samoan marine cyanobacterium, *Journal of Natural Products*, 80, 625-633, 2017.
- NIELSEN, J. Metabolomics in functional genomics and systems biology, In: VILLAS-BÔAS, S. G.; ROESSNER, U.; HANSEN, M. A. E.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. (Eds.) *Metabolome analysis: an introduction*. Hoboken, New Jersey: John Wiley; Sons, 3-14, 2007.
- OHRA, I.; MORITA, K.; TSUJINO, Y.; TAZAKI, H.; FUJIMORI, T.; GOERING, M.; EVANS, S.; ZORNER, P. Production of the phytotoxic metabolite, ferricrocin, by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59, 113-114, 1995.
- PAINE, R.T. Food recognition and predation on opisthobranchs by *Navanax inermis* (Gastropoda: Opisthobranchia). *Veliger*, 6, 1-9, 1963
- PANAGIOTOU, G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; OLSSON, L. The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology*, 118, 3, 304-315, 2005.
- PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 4, 263-269, 2012.
- PAWLIK, J. R. Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*, 93, 5, 1911-1922, 1993.
- PEREIRA, F. R. *Metabólitos secundários bioativos e mediadores da relação predador/presa de invertebrados marinhos*, 2011. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2011.
- PEREIRA, F. R.; BERLINCK, R. G. S.; RODRIGUES FILHO, E.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; PADULA, V. Metabólitos secundários dos nudibrânquios *Tambja stegosauriformis*, *Hypselodoris lajensis* e *Okenia zoobotryon* e dos briozoários *Zoobotryon verticillatum* e *Bugula dentata* da costa do Brasil. *Química Nova*, 35, 11, 2194-2201, 2012.
- PICOTT, K. J.; DEICHERT, J. A.; DEKEMP, E. M.; SCHATTE, G.; SAURIOL, F.; ROSS, A. C. Isolation and characterization of tambjamine MYP1, a macrocyclic tambjamine analogue from marine bacterium *Pseudoalteromonas citrea*. *Medicinal Chemistry Communications*, 10, 478-483, 2019.
- PINKERTON, D. M.; BANWELL, M. G.; GARSON, M. J.; KUMAR, N.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; PESSOA, C. Antimicrobial and cytotoxic activities of synthetically derived tambjamines C and E-J, BE-18591. And a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Chemistry; Biodiversity*, 7, 1311-1324, 2010.
- PINKERTON, D. M.; BANWELL, M. G.; WILLIS, A. C. Total syntheses of tambjamines C, E, F, G, H, I and J, BE-18591 and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Organic Letters*, 9, 24, 5127-5130, 2007.
- QUINN, R. A.; NOTHIAS, L. F.; VINING, O.; MEEHAN, M.; ESQUENAZI, E.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a drug discovery, drug metabolism and precision medicine strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38, 2, 143-154, 2017.

- RENCHE. A. C. Principal Component Analysis, In: RENCHE. A. C, *Methods of Multivariate Analysis*, New York: John Wiley; Sons, 2nd Ed., p, 380, 2002.
- SATHYABHAMA, M.; VISWANATHAN, R.; NANDAKUMAR, M.; MALATHI, P.; RAMESH-SUNDAR. A. Understanding sugarcane defence responses during the initial phase of *Colletotrichum falcatum* pathogenesis by suppression subtractive hybridization (SSH). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 131-140, 2015.
- SELIM, K. A.; EL-BEIH, A. A.; ABDEL-RAHMAN, T. M.; EL-DIWANY, A. I. Biological evaluation of endophytic fungus, *Chaetomium globosum* JN711454, as potential candidate for improving drug discovery, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 68, 1, 67-82, 2014.
- SHU, S.; ZHAO, X.; WANG, W.; ZHANG, G.; COSOVEANU. A.; AHN, Y.; WANG, M. Identification of a novel endophytic fungus from *Huperzia serrata* which produces huperzine A. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 12, 3101-3109, 2014.
- SICA, V. P.; RAJA H. A.; EL-ELIMAT, T.; KERTESZ, V.; VAN BERKEL, G. J.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Dereplicating and spatial mapping of secondary metabolites from fungal cultures *in situ*. *Journal of Natural Products*, 78, 8, 1926-1936, 2015.
- TAWFIKE. A. F.; VIEGELMANN, C.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics and dereplication strategies in natural products, In: Roessner, U.; Dias, D. A. (Ed,) *Metabolomics tools for natural product discovery*. New York: Springer, 227-244, 2013.
- WAGENAAR, M. M. Pre-fractionated microbial samples - the second generation natural products library at wyeth. *Molecules*, 13, 1406-1426, 2008.
- WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; *et al*, Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. *Nature Biotechnology*, 34, 8, 828-837, 2016.
- WANG, W. X.; KUSARI, S.; LAATSCH, H.; GOLZ, C.; KUSARI, P.; STROHMANN, C.; KAYSER. O.; SPITELLER, M. Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp, BS4. *Journal of Natural Products*, 79, 4, 704-710, 2016.
- WICKLOW, D. T.; JORDAN. A. M.; GLOER, J. B. Antifungal metabolites (monorden, monocillins I, II, III) from *Colletotrichum graminicola*, a systemic vascular pathogen of maize. *Mycological Research*, 113, 12, 1433-1442, 2009.
- YANES. O.; TAUTENHAHN, R.; PATTI, G. J.; SIUZDAK, G. Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Analytical Chemistry*, 83, 6, 2152-2161, 2011.
- YULIANA, N. D.; KHATIB. A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research*, 25, 2, 157-169, 2011.

APÊNDICE A - Tabelas

Tabela 17 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do briozoário *Virididentula dentata*.

Composto	Virididentula dentata			
	Extrato aquoso		Extrato AcOEt	
	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão
Tambjamina A-aldeído	-	-	-	-
Tambjamina A	-	-	-	-
Tambjamina B-aldeído	-	-	0,0050	0,0008
Tambjamina C	-	-	0,2608	0,0299
Tambjamina D	-	-	0,0801	0,0074
Tambjamina I	-	-	-	-
Tambjamina K	-	-	0,0162	0,0009
TOTAL	-		0,3622	
	0,3622			

Tabela 18 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*.

Composto	Tambja stegosauriformis			
	Extrato aquoso		Extrato AcOEt	
	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão
Tambjamina A-aldeído	0,3109	0,0396	0,7326	0,0183
Tambjamina A	0,0426	0,0069	0,0237	0,0006
Tambjamina B-aldeído	-	-	0,0136	0,0003
Tambjamina C	-	-	0,3924	0,0164
Tambjamina D	-	-	0,0264	0,0011
Tambjamina I	-	-	-	-
Tambjamina K	-	-	0,2585	0,0096
TOTAL	0,3535		1,447	
	1,8007			

Tabela 19 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do nudibrânquio *Tambja brasiliensis*.

Composto	Tambja brasiliensis			
	Extrato aquoso		Extrato AcOEt	
	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão
Tambjamina A-aldeído	0,1307	0,0063	-	-
Tambjamina A	-	-	-	-
Tambjamina B-aldeído	0,0288	0,0102	0,0247	0,0037
Tambjamina C	-	-	0,0211	0,0009
Tambjamina D	0,0240	0,0010	0,0356	0,0009
Tambjamina I	-	-	-	-
Tambjamina K	-	-	0,3208	0,0294
TOTAL	0,1835		0,4023	
	0,5858			

Tabela 20 - Distribuição das tambjamins A, A-aldeído, B-aldeído, C, D e K nos extratos aquoso e orgânico do nudibrânquio *Roboastra ernsti*.

Composto	Roboastra ernsti			
	Extrato aquoso		Extrato AcOEt	
	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão	[] (mg mL ⁻¹)	Desvio padrão
Tambjamina A-aldeído	0,4381	0,0242	-	-
Tambjamina A	0,0424	0,0034	0,0453	0,0017
Tambjamina B-aldeído	0,0321	0,0012	0,0238	0,0008
Tambjamina C	0,0376	0,0030	0,0727	0,0019
Tambjamina D	0,0233	0,0011	0,0251	0,0009
Tambjamina I	-	-	-	-
Tambjamina K	0,0047	0,0001	0,0995	0,0050
TOTAL	0,5782		0.2664	
	0,8447			

APÊNDICE B - Figuras

Figura 73 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas, experimento 2, após remoção dos brancos.

Figura 74 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras fitopatogênicas, experimento 2, após remoção dos brancos.

Figura 75 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas, experimento 2, após remoção dos brancos.

Figura 76 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras endofíticas, nas diferentes frações do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 77 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente nas amostras fitopatogênicas, nas diferentes frações do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 78 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos comuns às linhagens endofíticas e fitopatogênicas, nas diferentes frações do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 79 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente na fração A do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 80 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente na fração B do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 81 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente na fração C do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 82 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente na fração D do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 83 - Gráfico *Sample processing order versus Experimental analyte id* contendo os analitos detectados exclusivamente na fração E do experimento 1, após remoção dos brancos.

Figura 84 - Rede molecular completa do experimento 1 empregando-se arquivo *metadata* e visualizada no software *Cytoscape*.

Nodos relacionados a *features* detectados nas etapas cromatográficas foram coloridos de cinza; nodos do meio de cultivo foram coloridos de verde; nodos detectados exclusivamente no G3 foram coloridos de azul; nodos detectados exclusivamente no G4 foram coloridos de vermelho; nodos detectados em ambos grupos 3 e 4 foram coloridos de roxo. Nodos com formato quadrado foram identificados a partir das bibliotecas do GNPS. Nodos que não pertencem à clusters foram removidos da rede molecular.

Figura 85 - Cromatograma de UV da fração 1R-13 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina A, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 86 - Cromatograma de UV da fração 1R-5 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina C, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 87 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina D, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 88 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina K, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 89 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) do aldeído da tambjamina A, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 90 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas 9C) do aldeído da tambjamina B, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 91 - Cromatograma de UV da fração 1R-15 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 1, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 92 - Cromatograma de UV da fração 1R-1C no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 2, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 93 - Cromatograma de UV da fração 1R-2 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 3, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 94 - Cromatograma de UV da fração 1R-1E no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 4, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 95 - Cromatograma de UV da fração 1R-4 no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 5/6, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 96 - Cromatograma de UV da fração 1R-1C no comprimento de onda de 370 nm (A), espectro de absorção no UV (B) e espectro de massas (C) da tambjamina 7, cujo pico cromatográfico está destacado em vermelho.

Figura 97 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 1, m/z 312, detectado na fração 1R-1E.

Figura 98 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 1, m/z 312, detectada na fração 1R-1E.

Figura 99 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 2, m/z 298, detectado na fração 1R-1B.

Figura 100 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 2, m/z 298, detectada na fração 1R-1B.

Figura 101 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 3, m/z 340, detectado na fração 1R-2.

Figura 102 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 3, m/z 340, detectada na fração 1R-2.

Figura 103 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 5, m/z 304, detectado na fração 1R-2.

Figura 104 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 5, m/z 304, detectadas nas frações 1R-4.

Figura 105 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 6, m/z 304, detectado na fração 1R-2.

Figura 106 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 6, m/z 304, detectadas nas frações 1R-4.

Figura 107 - Espectro de massas MS/MS de alta resolução da tambjamina 7, m/z 333, detectado na fração 1R-1C.

Figura 108 - Rota de fragmentação proposta para a tambjamina 7, m/z 333, detectada na fração 1R-1C.

Figura 109 - Espectro de RMN de ^1H da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz).

Figura 110 - Espectro de RMN de ^{13}C da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz).

Figura 111 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 112 - Espectro de RMN de HMBBC da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 113 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 2, presente na amostra NN89, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 114 - Cromatograma (106A) e espectro MS^E (106B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 30V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.

Figura 115 - Cromatograma (107A) e espectro MS^E (107B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 100 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.

Figura 116 - Cromatograma (108A) e o espectro MS^E (108B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.

Figura 117 - Cromatograma (109A) e o espectro MS^E (109B) da tambjamina 2 utilizando-se 0,1% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 100 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.

Figura 118 - Cromatograma (110A) e o espectro MS^E (110B) da tambjamina 2 utilizando-se 0,1% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 0V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo positivo.

Figura 119 - Cromatograma (111A) e o espectro MS^E (111B) da tambjamina 2 utilizando-se 0% de ácido fórmico na fase móvel, voltagem do cone = 30V, temperatura de dessolvatação = 120 °C, modo de ionização APCI, e polaridade = modo negativo.

Figura 120 - Espectro de RMN de ¹H da tamblamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO-*d*₆ (600 MHz).

Figura 121 - Espectro de RMN de ^{13}C da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz).

Figura 122 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 123 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 124 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 4, presente na amostra NN75A, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 125 - Espectro de RMN de ^1H da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz).

Figura 126 - Espectro de RMN de ^{13}C da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz).

Figura 127 - Espectro de RMN de COSY da tamjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 128 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 129 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 5, presente na amostra NN132C, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 130 - Espectro de RMN de ^1H da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz).

Figura 131 - Espectro de RMN de ^{13}C da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em $\text{DMSO}-d_6$ (150 MHz).

Figura 132 - Espectro de RMN de COSY da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- d_6 (600 MHz).

Figura 133 - Espectro de RMN de HMBC da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 134 - Espectro de RMN de HSQC da tambjamina 6, presente na amostra AB33E, em DMSO- d_6 (150 MHz:600MHz).

Figura 135 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina A na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 136 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina A-aldeído na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 137 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina B-aldeído na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 138 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina C na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 139 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina D na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 140 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina I na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 141 - Espectro de fluorescência do padrão da tambjamina K na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

Figura 142 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina A.

Figura 143 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina A-aldeído.

Figura 144 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina B-aldeído.

Figura 145 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina D.

Figura 146 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina I.

Figura 147 - Curva analítica por padrão externo para a tambjamina K.