

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**LEANDRO DA SILVA OLIVEIRA**

**Diversificação e Incremento da Produção de Fomactinas pelo Fungo**  
***Biatrispora* sp.**

São Carlos

2022

Leandro da Silva Oliveira

**Diversificação e Incremento da Produção de Fomactinas pelo Fungo  
*Biatrispora* sp.**

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

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Assinatura:** *Leandro da Silva Oliveira*  
**Data:** *26/07/22*

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Oliveira, Leandro da Silva

Diversificação e Incremento da produção de fomactinas pelo fungo  
biatriospora sp / Leandro da Silva Oliveira. — São Carlos, 2022.  
116 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de  
Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

1. Produtos naturais. 2. Metabólitos secundários. 3. Metabolômica. 4.  
Fungos. I. Título.

*Wilneide do C. Marchi Maiorano - CRB: 3978/8*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Berlinck, pela oportunidade de desenvolver uma pesquisa de mestrado sob sua orientação, pelos ensinamentos, e por toda a contribuição para minha formação pessoal e profissional.

À Prof. Dra Camila Crnkovic e à Dra. Karen Nicácio pelos ensinamentos e acompanhamento durante o início do trabalho;

Ao Dr. Marcelo R. Amorim por todo o auxílio e contribuição no isolamento da fomactina inédita.

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira e Prof. Dr. Tiago Venâncio pela realização das análises de RMN.

Ao Prof. Tiago A. Paz pela realização dos estudos para determinação da configuração absoluta da fomactina inédita.

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

A Dra. Fabiana Tessari Martinelli, pelo auxílio e amizade e à Dra. Karin Bandeira de Camargo por toda ajuda;

À Seção de Pós-Graduação do IQSC por todo o auxílio ao longo desses anos.

Aos integrantes atuais e ex-integrantes do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos por todo o auxílio.

Aos meus grandes amigos Vítor Freire, Laura Lôca, Marcelo Amorim, Jairo Quintana, Fabiana Rodrigues por toda contribuição para minha formação e amizade ao longo de todo esse mestrado.

Aos meus pais, Salvador e Neuza, aos meus irmão Daniel e Reinaldo, por todo o apoio incondicional em todas as fases da minha vida para que fosse possível chegar a esse momento.

À Mirelle Takaki por todo o amor, compreensão, companheirismo, auxílio e incentivo em todos os momentos deste mestrado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida (Processo 88887.372014/2019-00)

Muito Obrigado!

## RESUMO

Fomactinas são produtos naturais diterpênicos que apresentam atividade inibidora do receptor do fator de ativação de plaquetas. São também capazes de reduzir a repopulação de células tumorais após radiação com raios- $\gamma$ , atividade esta que pode ser explorada como adjuvante no tratamento de cânceres. Em estudo recente, demonstrou-se a produção de fomactinas pela linhagem fúngica *Biatriospora* sp. CBMAI 1333. O presente projeto objetiva a avaliação de diferentes meios de cultura e condições de cultivo para o fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333, de maneira a alcançar maior diversidade na produção de fomactinas e maior rendimento em massa para a obtenção destes compostos. Em uma segunda etapa, foi realizado o isolamento e identificação de fomactinas ou análogos potencialmente inéditos. Extratos de diferentes meios de cultivo de *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 foram analisados por UPLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram avaliados empregando-se a criação de redes moleculares e comparações estatísticas por meio da plataforma XCMS. Uma vez selecionado o meio de cultura mais promissor para o crescimento do fungo e produção de fomactinas, realizou-se o cultivo da linhagem fúngica em escala ampliada. Após a obtenção do extrato do meio de cultivo em condições melhoradas, este foi fracionado utilizando-se técnicas cromatográficas diversas. As fomactinas V e I foram isoladas e completamente caracterizadas por técnicas de RMN e espectrometria de massas. De modo a se incrementar ainda mais o rendimento da produção de fomactinas, foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionado (PFF), que resultou em uma condição de crescimento otimizada. Após um novo crescimento otimizada do fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 e avaliação dos dados empregando-se a ferramenta *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN), observou-se um *feature* cujo íon protonado indicava a presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura. Este composto foi isolado e caracterizado utilizando-se técnicas espectroscópicas e espectrometria de massas, confirmando a estrutura de uma fomactina nitrogenada inédita. A utilização de diversas ferramentas de metabolômica possibilitou incrementar e diversificar a produção de fomactinas pelo fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333, resultando na descoberta da primeira fomactina nitrogenada.

## ABSTRACT

Phomactins are diterpenic natural products which display platelet activating factor receptor inhibitory activity. They are also capable of reducing the repopulation of tumor cells after  $\gamma$ -ray radiation, activity that can be explored as an adjuvant in the treatment of cancers. A recent study demonstrated the production of phomactins by the fungal strain *Biatriospora* sp. CBMAI 1333. This project aims to evaluate different culture media and cultivation conditions for the fungus *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 in order to achieve greater diversity and mass yield in the production of phomactins. In a second step, the isolation and identification of novel phomactins or analogues will be carried out. Extracts from different culture media of *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 were analyzed by UPLC-MS/MS. The results obtained were evaluated using molecular networks and statistical comparisons through the XCMS platform. Once the most promising culture medium was selected for fungal growth and phomactin production, the fungal strain was cultivated on a larger scale. The culture medium was extracted and then fractionated using chromatographic techniques. Phomactins V and I were isolated and fully characterized by NMR and mass spectrometry. In order to further increase the yield of phomactins, the Design of Experiments (DoE) method was used, which resulted in an optimized growth condition. After a new optimized growth of the fungus *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 and data evaluation using the Feature-Based Molecular Networking (FBMN) tool, it was observed a feature whose protonated ion indicated the presence of a nitrogen in its structure. This compound was isolated and characterized using spectroscopic and mass spectrometry techniques, confirming the structure of an unprecedented nitrogenous phomactin. The use of several metabolomics approaches allowed us to increase and diversify the production of phomactins produced by the fungus *Biatriospora* sp. CBMAI 1333, resulting in the discovery of the first nitrogenous phomactin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classes químicas de compostos de fungos marinhos (Adaptado de SHABANA, LAKSHMI, SATYA, 2020). .....	13
Figura 2 – Compostos isolados de fungos marinhos, dividido por suas fontes (Adaptado de RATEB, EBEL, 2011). .....	14
Figura 3 – Estrutura da plinabulina (1). .....	15
Figura 4 – Estrutura das fomactinas I, F, P – (5-7) Q – V (8-13) isoladas de meios de cultivo do fungo <i>Biatriospora</i> sp. (D8). .....	16
Figura 5 – Relação biossintética entre fomactinas e taxanos (adaptado de PALFRAMAN e PATTENDEN, 2018 e GOLDRING e PATTENDEN, 2006).....	17
Figura 6 – Fluxo de trabalho geral para análises metabolômicas (Adaptado de BROWN <i>et al.</i> , 2005). .....	19
Figura 7 – Esquema das etapas que podem ser trabalhadas no pré-processamento dos dados no software MZmine. (Adaptado de WANG <i>et al.</i> , 2016).....	20
Figura 8 - Cluster com alguns derivados do depsipeptídeo e a estrutura de um derivado isolado.....	21
Figura 9 – Frascos do tipo Schott contendo meios de cultura e a linhagem fúngica <i>Biatriospora</i> sp. (D8). .....	26
Figura 10 – Rede molecular construída a partir de dados UPLC-HRMS dos íons MS/MS produzidos nas frações de todos os meios de cultura, padrões de fomactinas e brancos de solvente.....	35
Figura 11 – Cluster expandido das fomactinas apresentando a diversidade de fomactinas nos diferentes meios de cultivo.....	36
Figura 12 – Redes de associação de metabólitos de características com semelhança espectral com as fomactinas.....	37
Figura 13 – Análise por componentes principais considerando-se os 5 meios de cultivo investigados. Intervalo de massa: $m/z$ 200-400 Da. <i>Centered, log-scale</i> . .....	39
Figura 14 – Diagrama de Venn, exemplificando número de <i>features</i> específicos e compartilhados de cada meio de cultivo. <i>Fold-change</i> : 10, <i>p-value</i> : <0.05.....	40
Figura 15 – Gráfico de nuvens comparando os perfis metabolômicos dos meios de cultivo com inóculo.....	42

Figura 16 – Expansão do gráfico de nuvens, comparando os meios de cultivo MM e M2.....	43
Figura 17 – Fluxograma da separação da fração D8 por coluna empacotada com fase estacionária Sephadex LH-20.....	44
Figura 18 – Fluxograma da separação da fração D8-F por coluna empacotada com fase estacionária diol. ....	45
Figura 19 – Fluxograma da separação da fração D8-F234 por coluna empacotada com fase estacionária C18. ....	46
Figura 20 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$ nm) (superior) e MS (inferior) da fração D8-F234-E após a separação por coluna empacotada com fase estacionária C18.....	47
Figura 21 – Cromatogramas de separação da fração D8-F234-E por HPLC-UV.....	48
Figura 22 – Fluxograma das frações originadas da separação da fração D8-F234-E. ....	48
Figura 23 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$ nm) e MS da fração D8-F234-E3, após a separação por HPLC-UV. ....	49
Figura 24 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$ nm) e MS da fração D8-F234-E3-B, após a separação por HPLC-UV. ....	50
Figura 25 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$ nm) e MS da fração D8-F234-E3-B, após a análise por HPLC-UV-MS empregando-se a coluna analítica Kinetex® PFP. .	51
Figura 26 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$ nm) (superior), detectado por MS (intermediário) e espectro de massas da fração D8-F234-E3-B1, após a separação por HPLC-UV. ....	52
Figura 27 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$ nm) (superior), MS (intermediário) e espectro de massas (inferior) da fração D8-F234-E3-B2, após a separação por HPLC-UV. ....	53
Figura 28 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ do composto D8-F234-E3-B1 e fomactina S ambos em $\text{MeOH-}d_4$ (150 MHz) (NICACIO, 2017).....	55
Figura 29 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ do composto D8-F234-E3-B1 ( $\text{MeOH-}d_4$ ) e fomactina Q ( $\text{DMSO-}d_6$ ) (150 MHz). (NICACIO, 2017).....	56

Figura 30 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ do composto D8-F234-E3-B1 (MeOH- $d_4$ ) e fomactina V (DMSO- $d_6$ ) (150 MHz).(NICACIO, 2017). .....	57
Figura 31 – Correlações COSY e HMBC para a amostra D8-F234-E3-B1. ....	58
Figura 32 - Estrutura da fomactina V.....	59
Figura 33 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ do composto D8-F234-E3-B1 (MeOH- $d_4$ ) e fomactina epi-I (CDCl $_3$ ) (150 MHz) (ISHINO <i>et al.</i> , 2010). ....	60
Figura 34 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ do composto D8-F234-E3-B2 (MeOH- $d_4$ ) e fomactina I (CDCl $_3$ ) (150 MHz). (ISHINO <i>et al.</i> , 2010).....	61
Figura 35 - Correlações COSY e HMBC para a amostra D8-F234-E3-B2. ....	63
Figura 36 – Estrutura da fomactina I. ....	63
Figura 37 – Gráficos de efeitos principais obtidos para variável resposta “área do pico cromatográfico”. Gráfico de linha sobre os parâmetros de maneira individual (superior), gráfico de pareto sobre os parâmetros de maneira individual (esquerda) e gráfico da interação entre dois parâmetros (direita).....	66
Figura 38 - Gráficos de efeitos principais obtidos para variável resposta “número de picos cromatográficos”. Gráfico de linha sobre os parâmetros de maneira individual (superior), gráfico de pareto sobre os parâmetros de maneira individual (esquerda) e gráfico da interação entre dois parâmetros (direita). ....	67
Figura 39 - Gráficos de efeitos principais obtidos para variável resposta “massa do extrato obtida”. Gráfico de linha sobre os parâmetros de maneira individual (superior), gráfico de pareto sobre os parâmetros de maneira individual (esquerda) e gráfico da interação entre dois parâmetros (direita).....	68
Figura 40 – Gráfico das desejabilidades individuais e global para o experimento otimizado.....	69
Figura 41 – Gráfico de cubo representando uma predição estatística para todos os experimentos de PFF realizados com a linhagem <i>Biatrispora</i> sp. CBMAI 1333, tendo como resposta a área total dos picos cromatográficos de fomactinas observados por UPLC-HRMS. ....	70
Figura 42 – Fluxograma completo do crescimento e separação da fração MeOH (PFF) por coluna pré-empacotada com fase estacionária C18 (SPE-C18).....	71

Figura 43 – Rede molecular total obtida do crescimento otimizado de <i>Biatriospora</i> sp. CBMAI 1333.....	72
Figura 44 – Zoom de dois clusters destacados da rede molecular completa.....	73
Figura 45 – Espectro de massas do composto $m/z$ 332,2229 $[M+H]^+$ , detectado na fração PFF-6.....	74
Figura 46 - Cromatograma de separação da fração PFF-6, monitorado nos comprimentos de onda de 254 nm (azul) e 287 nm (preto). ....	75
Figura 47 – Fluxograma de separação da fração PFF-6 por HPLC-UV.....	75
Figura 48 – Cromatograma e espectro de massas da fração PFF-6G1 após a separação por HPLC-UV. ....	76
Figura 49 – Estrutura e tabela com os deslocamentos químicos $^1H$ e $^{13}C$ da fomactina C isolada pela linhagem fúngica <i>Biatriospora</i> sp. ....	77
Figura 50 – Cromatograma da sub-fração PFF-6C por HPLC-UV. ....	78
Figura 51 – Cromatograma da sub-fração PFF-6C1a por HPLC-UV. ....	79
Figura 52 – Correlações COSY e HMBC, e interações NOESY para a fomactina inédita isolada da fração PFF-6C1, designada fomactinina (PFF-6C1a).....	80
Figura 53 – Comparações entre o espectro experimental da ECD e espectros calculados para PFF-6C1a. ....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados para avaliação da variação metabólica da linhagem fúngica <i>Biatrispora</i> sp. (D8). Composição por litro de meio de cultivo.....	25
Tabela 2 - Parâmetros utilizados para cada variável nos experimentos do PFF para o fungo <i>Biatrispora</i> sp. CBMAI 1333 (D8).....	30
Tabela 3 - Níveis das variáveis para os experimentos realizados para o PFF com a linhagem fúngica <i>Biatrispora</i> sp. CBMAI 1333 (D8).....	30
Tabela 4 – Dados de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $^1\text{H}$ 600 MHz, $^{13}\text{C}$ 150 MHz, MeOH- $d_4$ ) da amostra D8-F234-E3-B1.....	59
Tabela 5 - Dados de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $^1\text{H}$ 600 MHz, $^{13}\text{C}$ 150 MHz, MeOH, $d_4$ ) da amostra D8-F234-E3-B2.....	64
Tabela 6 – Deslocamentos químicos $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a fomactina inédita isolada.....	81

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 FUNGOS MARINHOS.....	13
1.2 LINHAGEM FÚNGICA <i>Biatrispora</i> sp. CBMAI 1333 .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS .....	23
3.1.1 Condições gerais de análise – Waters Alliance HPLC-UV-ELSD-MS .....	23
3.1.2 Condições gerais de análise – WATERS XEVO G2-XS UPLC-ESI-QToF-MS .....	23
3.1.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	24
3.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE <i>Biatrispora</i> sp. (D8) .....	24
3.2.1 Crescimento de linhagem fúngica e obtenção dos extratos .....	24
3.2.2 Avaliação dos metabólitos empregando-se redes moleculares.....	27
3.3 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE METABÓLICA DE <i>Biatrispora</i> sp. (D8) EMPREGANDO-SE ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
3.3.1 Crescimento da linhagem fúngica e obtenção dos extratos em quadruplicata.....	28
3.3.2 Avaliação dos resultados empregando-se análises estatísticas - XCMS Online.....	28
3.4 CULTIVO DA LINHAGEM FÚNGICA <i>Biatrispora</i> sp. (D8) EM ESCALA AMPLIADA .....	29
3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO (PFF) .....	29
3.6 AVALIAÇÃO METABÓLICA DO CRESCIMENTO OTIMIZADO DE <i>Biatrispora</i> sp. CBMAI 1333 (d8) EM ESCALA AMPLIADA .....	31
3.6.1 Crescimento otimizado da linhagem fúngica e obtenção dos extratos.....	31
3.6.2 Avaliação das frações empregando-se <i>Feature-Based Molecular Networking</i> (FBMN).....	31
3.6.3 Purificação e isolamento da fomactina nitrogenada .....	32

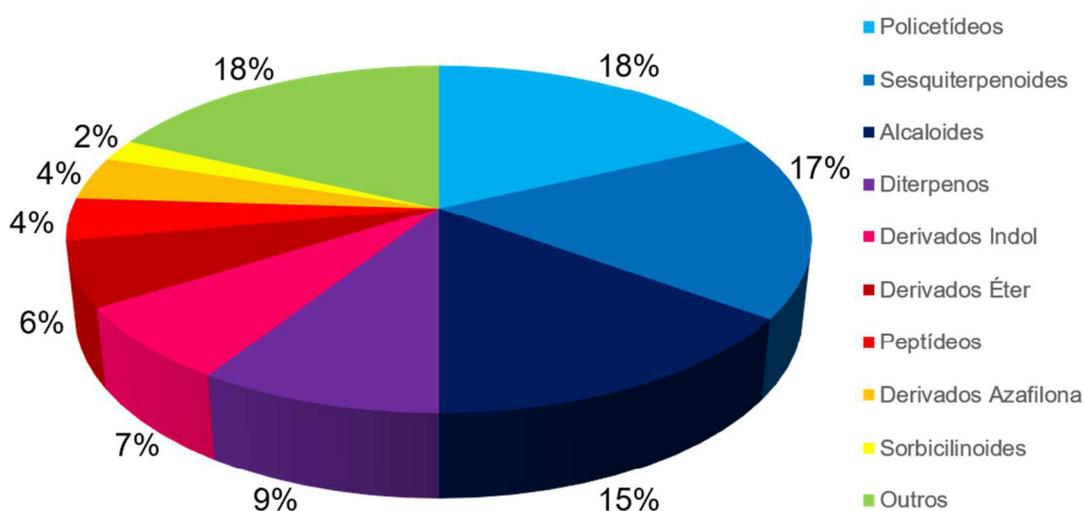
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
4.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE <i>Biatrispora</i> sp. (D8) .....	34
4.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE FOMACTINAS EMPREGANDO-SE ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	38
4.3 CULTIVO DA LINHAGEM FÚNGICA <i>Biatrispora</i> sp. (D8) EM ESCALA AMPLIADA EM MEIO MÍNIMO (MM) .....	44
4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO (PFF) .....	65
4.5 CULTIVO OTIMIZADO DA LINHAGEM FÚNGICA <i>Biatrispora</i> sp. E AVALIAÇÃO METABÓLICA EMPREGANDO-SE FBMN .....	70
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 FUNGOS MARINHOS

Os fungos marinhos apresentam uma grande diversidade de novos metabólitos secundários, os quais podem ser úteis para fins medicinais, indústria de alimentos e de cosméticos. A produção de metabólitos secundários por fungos em geral resulta da depleção de nutrientes, competição ou outro tipo de estresse metabólico ou ambiental. Os metabólitos secundários são produzidos por diferentes vias de biossíntese e podem apresentar diferentes atividades biológicas, como antibiótica, citotóxica, anti-inflamatória, dentre outras. Levantamento recente sobre produtos naturais isolados de culturas de fungos marinhos indicou a predominância de policetídeos, sesquiterpenoides e alcaloides (SHABANA, LAKSHMI, SATYA, 2020).

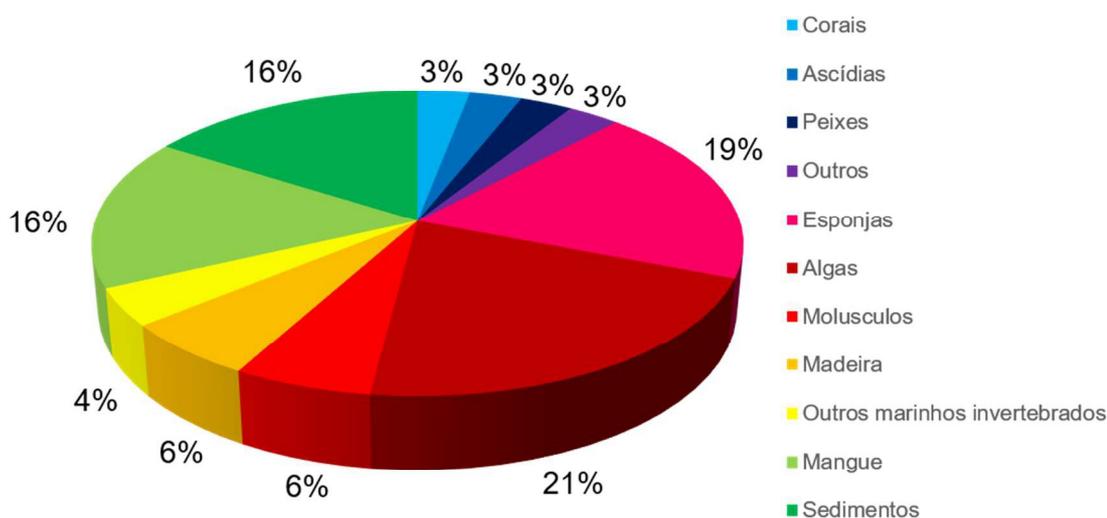
Figura 1 – Classes químicas de compostos de fungos marinhos (Adaptado de SHABANA, LAKSHMI, SATYA, 2020).



Os fungos marinhos podem ser divididos em dois grupos, segundo sua forma de crescimento: obrigatórios e facultativos. Fungos marinhos obrigatórios são aqueles que se desenvolvem e esporulam apenas em habitat marinho, enquanto que os facultativos são aqueles que podem ser provenientes de ambientes terrestres, mas

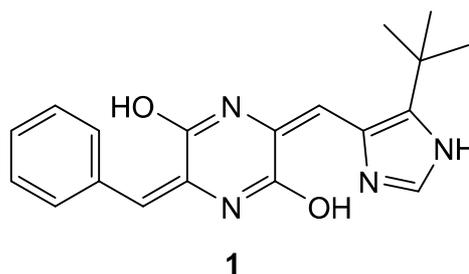
se adaptaram a crescer e esporular em ambientes marinhos (AGRAWAL *et al.*, 2018). Habitualmente os fungos verdadeiramente marinhos, podem ser obtidos de diversas fontes como corais, peixes e sedimentos marinhos. Análises indicam que fungos verdadeiramente marinhos correspondem a 30% das linhagens fúngicas isoladas em ambiente marinho, conforme indicado na figura 2 (RATEB, EBEL, 2011).

Figura 2 – Compostos isolados de fungos marinhos, dividido por suas fontes (Adaptado de RATEB, EBEL, 2011).



Apesar da grande diversidade de metabólitos secundários isolados de culturas de fungos marinhos, seja quanto a classe química ou suas diferentes origens, apenas um composto encontra-se em estágio avançado de testes clínicos: a plinabulina (**1**), uma dicetopiperazina sintética desenvolvida a partir da halimida, isolada de culturas de *Aspergillus* sp. de origem marinha (LUO *et al.*, 2016). Este composto encontra-se em fase III de testes clínicos. Outros compostos de origem marinha também estão avançados em fase de testes clínicos ou até já aprovados, porém nenhum produzido por linhagens fúngicas.

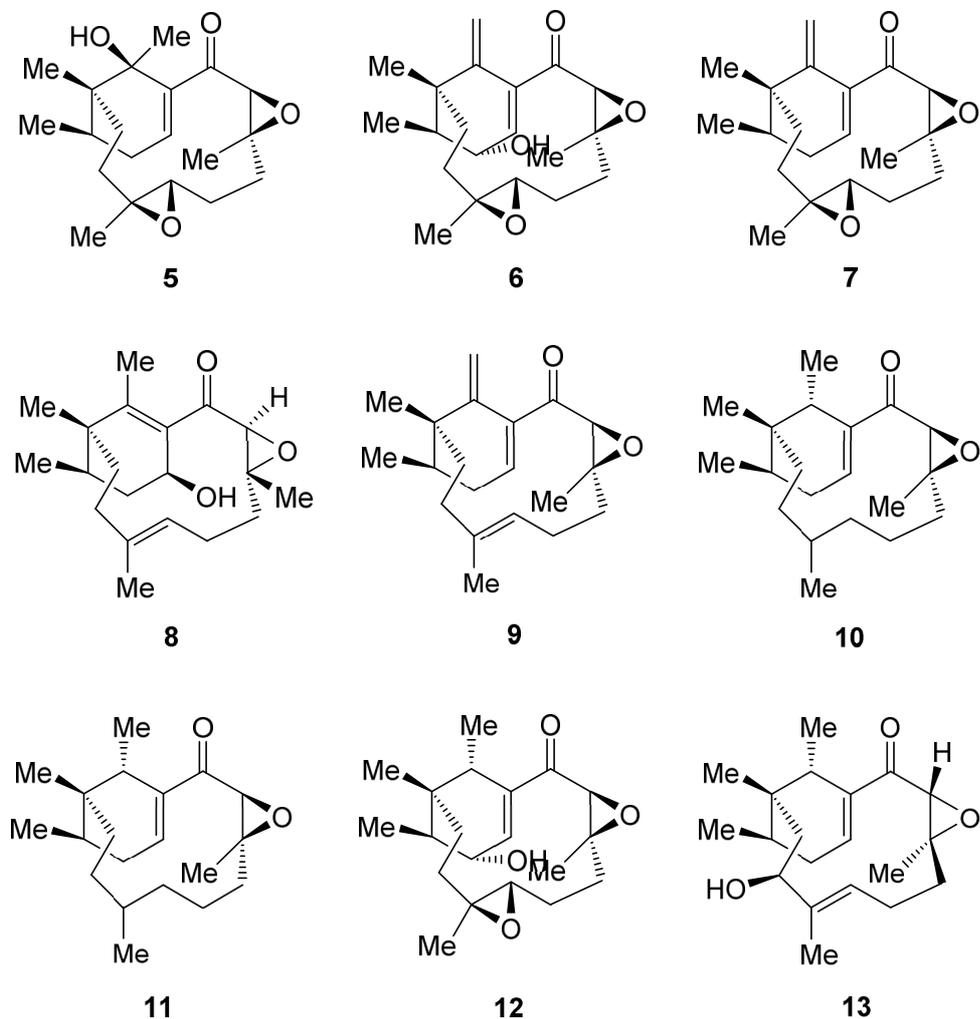
Figura 3 – Estrutura da plinabulina (1).



## 1.2 LINHAGEM FÚNGICA *Biatriospora* sp. CBMAI 1333

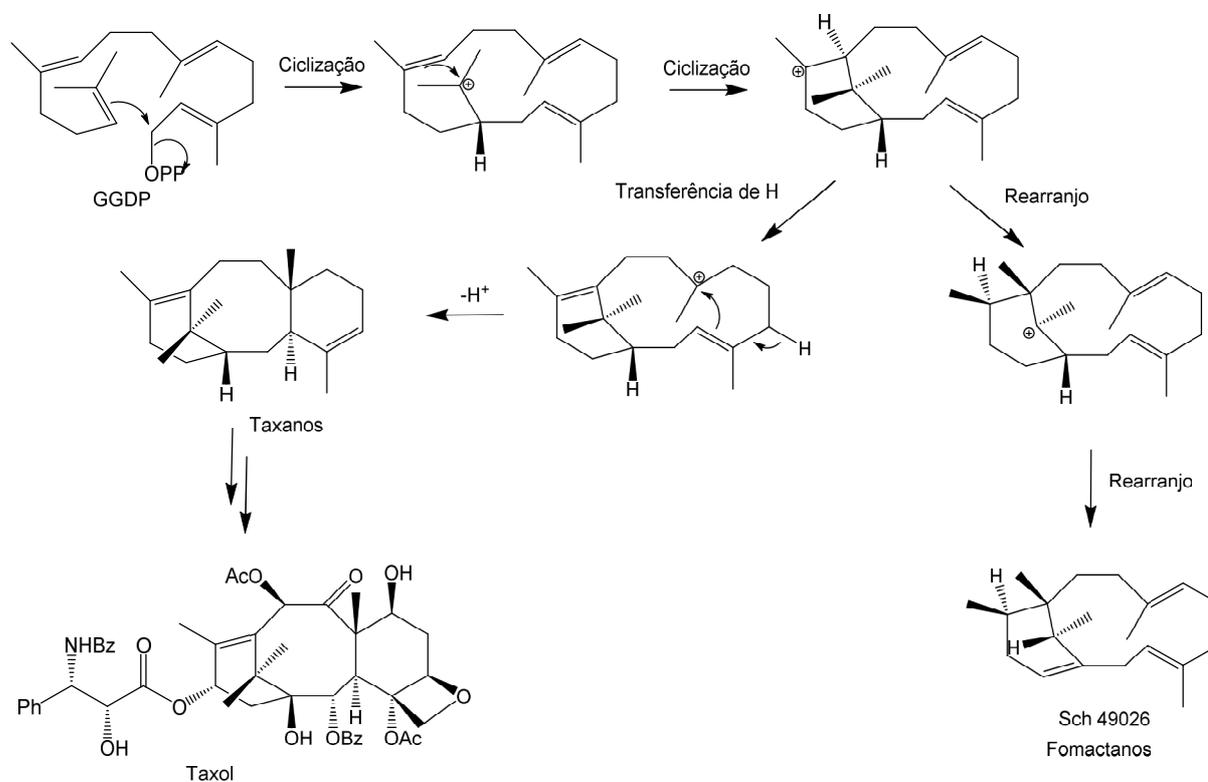
A linhagem fúngica *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 (D8) foi obtida a partir da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*, cujo habitat são os ambientes rochosos e recifes do Atlântico Ocidental tropical e subtropical. O fungo *Biatriospora* sp. (D8) produz compostos da classe das fomactinas (figura 4), as quais possuem atividade inibidora do receptor do fator de ativação de plaquetas. Estes compostos são também capazes de reduzir a repopulação de células tumorais após irradiação com raios- $\gamma$ , atividade que pode ser explorada como adjuvante no tratamento de cânceres. Diversas fomactinas foram isoladas de meios de cultivo produzidos por esta linhagem fúngica pela Dra. Karen J. Nicácio durante seu doutorado no grupo do Prof. Dr. Roberto Berlinck. (SUGANO *et al.*, 1994) (KURODA *et al.*, 2018)

Figura 4 – Estrutura das fomactinas I, F, P – (5-7) Q – V (8-13) isoladas de meios de cultivo do fungo *Biatrospora* sp. (D8).



As fomactinas compartilham relação estrutural e biossintética com os taxanos (figura 5). A biossintese de ambos grupos de diterpenóides se origina com o geranylgeranyl difosfato (GGDP), o qual, após duas ciclizações, forma um intermediário com estrutura relacionada com os taxanos e as fomactinas (PALFRAMAN, PATTENDEN, 2019, GOLDRING, PATTENDEN, 2006).

Figura 5 – Relação biossintética entre fomactinas e taxanos (adaptado de PALFRAMAN e PATTENDEN, 2018 e GOLDRING e PATTENDEN, 2006).



O paclitaxel (Taxol) é um dos produtos naturais mais conhecidos e estudados para o tratamento de diferentes tipos de câncer (ovário, mama e pulmão). Contudo a produção do paclitaxel é onerosa, pois envolve semi-síntese a partir de um precursor derivado de *Taxus baccata*. Todavia, o processo apresenta baixo rendimento. Na década de 90, cerca de 38 mil árvores de *Taxus brevifolia* foram utilizadas para produção de 25 kg de paclitaxel para o tratamento de cerca de 12 mil pacientes e a espécie foi ameaçada de extinção. Dessa forma, é de suma importância a busca de alternativas para a produção de paclitaxel. A investigação da biossíntese de fomactinas pode ser uma alternativa neste sentido. (LIU, GONG, ZHU, 2016).

A abordagem clássica na descoberta de produtos naturais inclui a triagem de extratos brutos, etapas de fracionamento por cromatografia, isolamento e identificação de compostos bioativos. Este método pode ser muitas vezes lento e ineficiente, seja pelo isolamento de substâncias conhecidas, sem atividade biológica ou diversos compostos podem passar despercebidos. Com o intuito de aliar novas técnicas de alta resolução e uma visão mais abrangente seja no início com o

planejamento de experimentos, até na etapa final, com o isolamento dos compostos, a metabolômica pode ser uma ferramenta muito útil na descoberta de novos produtos naturais (DEMARQUE *et al.*, 2020).

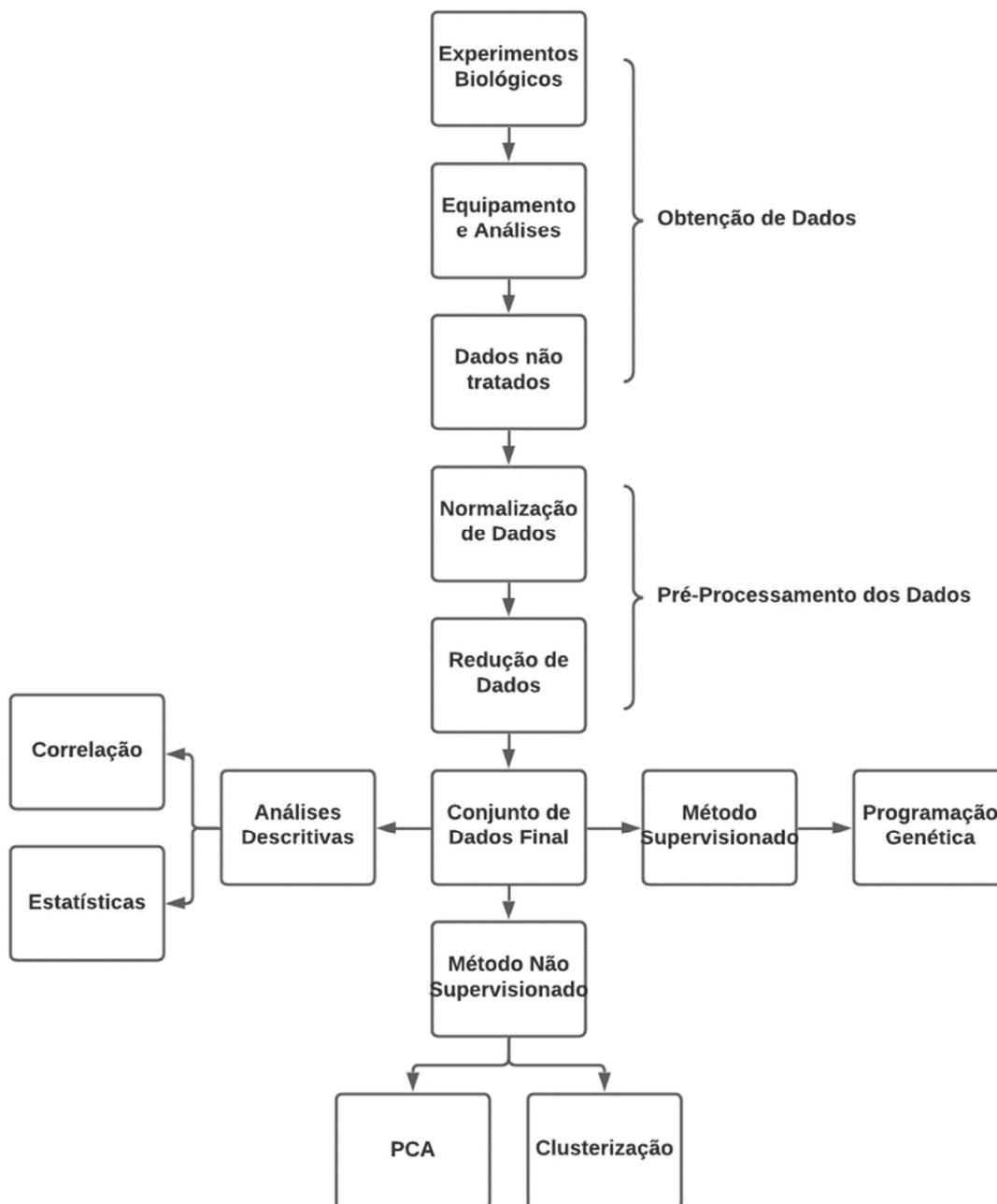
A metabolômica estuda a composição de todas as pequenas moléculas presentes de um tipo de célula, tecido, órgão ou organismo. É possível avaliar simultaneamente vários tipos de moléculas de baixo peso molecular como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos ou outras substâncias relacionadas a funções metabólicas celulares. A metabolômica faz uso de diferentes técnicas analíticas de alta resolução sendo as mais comuns a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (MS) (ZHAO, ZHANG, LI, 2018, TURI *et al.*, 2018). O planejamento de experimentos de metabolômica segue um fluxo de trabalho, que pode ser específico para cada amostra e finalidade (figura 6), e pode incluir métodos químicos, analíticos, estatísticos, biológicos e bioinformáticos (BROWN *et al.*, 2005).

A metabolômica também pode ser utilizada sob duas estratégias:

1. Metabolômica não-direcionada, que objetiva a análise abrangente de todos os analitos detectáveis nas amostras sob investigação ou no sistema biológico, incluindo metabólitos inexplorados. Esta estratégia é adequada para, por exemplo, investigar rotas bioquímicas desconhecidas (ROBERTS *et al.*, 2012),

2. Metabolômica direcionada, que propõe a busca ou quantificação de metabólitos já pré-selecionados. É utilizada na análise de uma ou mais vias metabólicas de interesse ou no isolamento de uma substância quimicamente caracterizada (ROBERTS *et al.*, 2012).

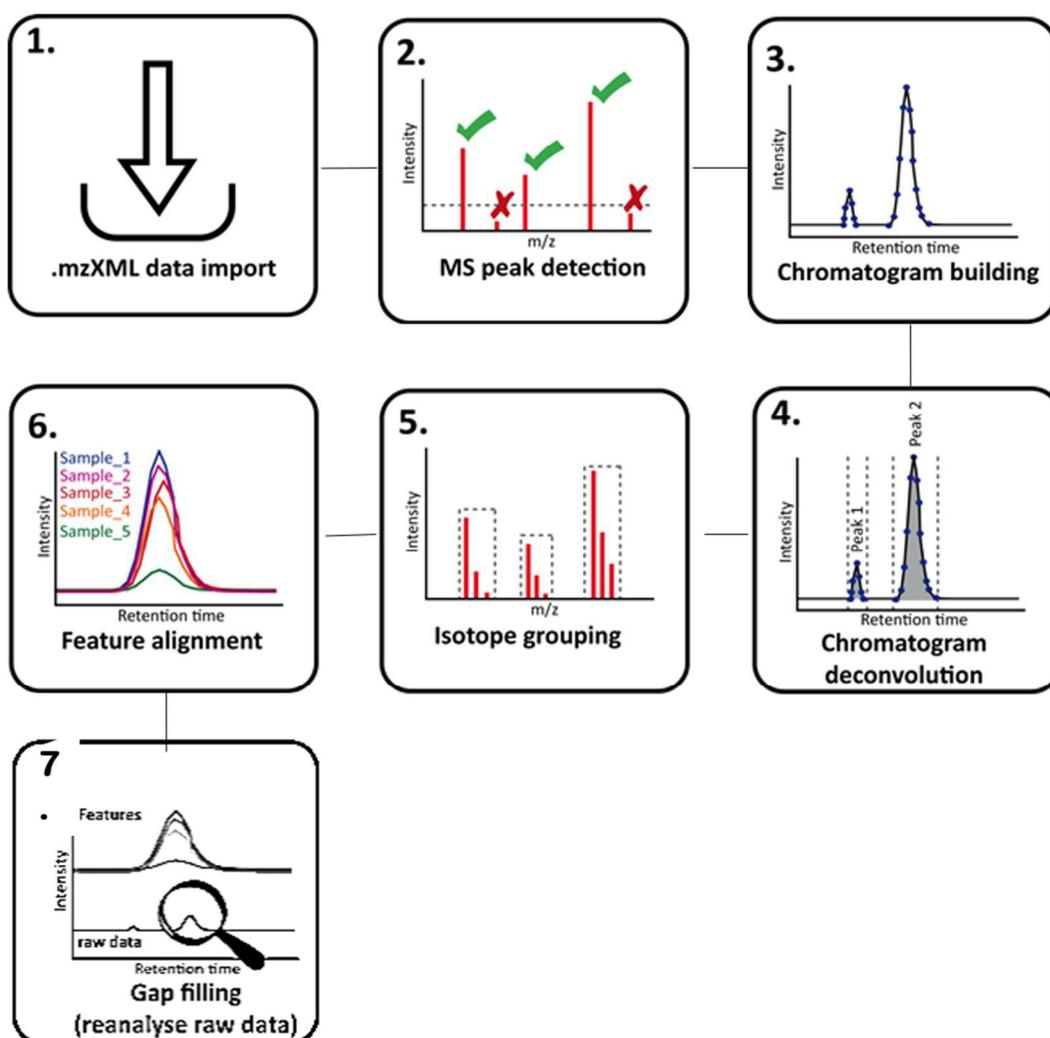
Figura 6 – Fluxo de trabalho geral para análises metabolômicas (Adaptado de BROWN *et al.*, 2005).



Como um exemplo de método não supervisionado e relacionado a clusterização, temos uma ferramenta chamada de *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN), que é uma ferramenta presente na plataforma do GNPS que possibilita um pré-processamento refinado dos dados utilizando softwares para essa finalidade e assim, podendo ter controle total da rede molecular que será gerada no GNPS. Com a utilização de softwares de pré-processamento como MZmine pode-se processar dados de forma criteriosa e com diversas etapas como mostrado na figura

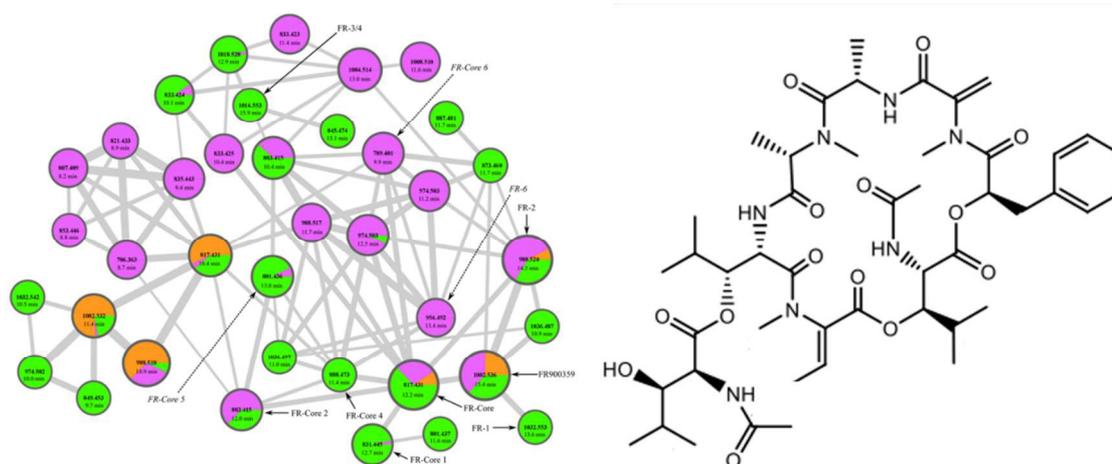
7. Assim, a ferramenta FBMN pode trabalhar com informações de MS<sup>1</sup> como padrão isotópico e tempo de retenção. Além disso, com relação a informação espectral processada, redes moleculares geradas por FBMN, podem ter inúmeras vantagens como distinguir isômeros que produzem espectros MS<sup>2</sup> similares, anotação espectral facilitada devido a se ter controle total do pré-processamento dos dados e por fim, incorporação da informação de quantidade relativa, tornando análises estatísticas mais robustas. Enquanto para análises utilizando-se redes moleculares no modo clássico temos algumas desvantagens com relação a análise da rede molecular que deve ser feita separada da análise dos espectros MS<sup>1</sup>, enquanto FBMN aceita um *output* de ferramentas de detecção de *features* e alinhamento, tornando-os dados diretamente compatíveis com ferramentas de anotação. (NOTHIAS *et al.*, 2020)

Figura 7 – Esquema das etapas que podem ser trabalhadas no pré-processamento dos dados no software MZmine. (Adaptado de WANG *et al.*, 2016)



Com todos estes prós, a ferramenta FBMN atualmente tem se mostrado excelente para a identificação de compostos inéditos de uma maneira eficiente e fundamentada. Um estudo sobre duas bactérias distintas, a bactéria de solo *Chromobacterium vaccinii* e a bactéria *Candidatus Burkholderia crenata*, originada de uma planta, são produtoras de um depsipeptídeo que é um potente e seletivo inibidor da proteína G<sub>q</sub>. No seguinte estudo, estudou-se os metabolomas de ambas bactérias, as quais foram comparados usando-se FBMN e como resultado, foram identificados cerca de 30 derivados deste depsipeptídeo anteriormente desconhecidos, na figura 8 temos um cluster com alguns destes derivados e a estrutura de um dos compostos isolados. Portanto, podemos ver a grande relevância da ferramenta, podendo ainda ser mais valiosa se aplicada em conjunto com análises estatísticas. (HANKE *et al.*, 2021)

Figura 8 - Cluster com alguns derivados do depsipeptídeo e a estrutura de um derivado isolado.



## 2 OBJETIVOS

O presente projeto de mestrado tem como objetivos gerais:

- I. A exploração das condições de cultivo do fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 para diversificação e incremento na produção de fomactinas, e;
- II. O isolamento e identificação de fomactinas inéditas produzidas pela linhagem fúngica *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 (D8), após se encontrar condição de crescimento que apresente uma maior diversificação química na produção de fomactinas.

Os objetivos específicos são:

- i. Utilização de análises de metabolômica para se determinar condições de crescimento do fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 que possibilitem uma maior diversificação na produção de fomactinas,
- ii. Uma vez estabelecida a condição de crescimento para produção de maior diversidade de fomactinas, realizar o crescimento do fungo em larga escala e fracionamento dos extratos para o isolamento de novas fomactinas,
- iii. Análise das frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-HRMS),
- iv. Isolamento de potenciais novas fomactinas por cromatografia líquida,
- v. Elucidação estrutural completa das fomactinas isoladas por técnicas espectroscópicas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

##### 3.1.1 Condições gerais de análise – Waters Alliance HPLC-UV-ELSD-MS

As análises por HPLC-UV-ELSD-MS foram realizadas em cromatógrafo líquido Waters Alliance 2695 (HPLC) acoplado sequencialmente a um detector de arranjo de fotodiodos Waters 2696 (PDA), um detector de espalhamento de luz evaporativo Waters 2424 (ELSD) e espectrômetro de massas Micromass ZA2000 (MS), com interface eletrospray e analisador de massas quadrupolo. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 Waters XTerra® RP18 (4,6 x 250 mm, id. 5 µm) e fase móvel composta por (A) H<sub>2</sub>O + 0.1% de ácido fórmico e (B) MeCN/MeOH (1:1) + 0.1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição utilizado foi de 10 a 100% de B em 30 minutos, de 100% a 10% de B de 30 a 31 minutos e manteve-se em 10% de B de 31 minutos a 40 minutos, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. No detector de PDA, o monitoramento foi realizado em  $\lambda_{\max}$  de 200 - 800 nm. O ELSD operou com ganho de 100, nebulizador em modo aquecimento em nível de 60%, drift tube com temperatura 80 ± 5 °C, pressão do gás N<sub>2</sub> de 50 psi e com *output full scale* de 2000 mV. No espectrômetro de massas, utilizou-se as seguintes condições: fonte = ESI, temperatura da fonte = 100 °C, voltagem de capilar = 3,0 kV, vazão do gás no cone = 50 L h<sup>-1</sup>, temperatura de dessolvatação = 350 °C, vazão do gás de dessolvatação = 350 L h<sup>-1</sup> e intervalo de detecção = 100 - 1000 Da.

##### 3.1.2 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 a um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS Q-ToF com interface eletrospray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters BEH C18 (2,1 x 100 mm, id. 1,7 µm) e fase móvel composta por (A) H<sub>2</sub>O Milli-Q + 0,1% de ácido fórmico e (B) MeCN

+ 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição utilizado foi de 10 a 50% de B em 6 minutos, de 50 a 98% de B de 6,0 a 9,0 min, 98 a 10% de 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<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e volume de injeção de 5 µL.

Os espectros de massas foram adquiridos em modo DDA, modo positivo e resolução, fonte ESI, tempo de aquisição = 10 minutos, intervalo de massa = 100 - 1500 Da; scan time = 0,2 s, número de íons selecionados a partir de cada MS survey = 3, exclusão dinâmica de picos = 2s ou 10 mDa, taxa de scan MS/MS = 0,2 s, energia de colisão MS/MS: LM CE = 6 - 9 V e HM CE = 60 - 80 V. As condições da fonte ESI foram: voltagem do capilar = 1,2 kV, temperatura da fonte = 100 °C, voltagem do cone = 30 V, vazão do gás no cone = 50 L h<sup>-1</sup>, temperatura de dessolvatação = 450 °C, vazão do gás de dessolvatação = 750 L h<sup>-1</sup>. Para calibração interna, foi utilizada uma solução de leucina-encefalina (Sigma) 20 µg mL<sup>-1</sup>, infundida pela sonda do lockmass a 10 µL min<sup>-1</sup>.

### 3.1.3 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 (14.1 T), operando em 600 MHz (<sup>1</sup>H) ou 150 MHz (<sup>13</sup>C). As amostras foram preparadas em solventes deuterados (Cambridge Isotope Laboratories Inc.).

## 3.2 AVALIAÇÃO PRELIMINAR PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *Biatrispora* sp. (D8)

### 3.2.1 Crescimento de linhagem fúngica e obtenção dos extratos

A linhagem fúngica *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8) foi isolada a partir da esponja *Dragmacidon reticulatum* coletada na ilha de Búzios – RJ. (NICACIO, 2017) Inicialmente, investigou-se a produção de fomactinas com relação à diversidade química e rendimento dos extratos produzidos pelo fungo *Biatrispora* sp. (D8). A linhagem fúngica foi cultivada em meio de cultura sólido (meio de cultivo e ágar). Após

7 dias discos de micélio foram transferidos para frascos do tipo Schott de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultivo líquido (Tabela 1). Meios de cultura líquidos foram preparados com água destilada (MilliQ) e água do mar artificial (ASW), totalizando 14 diferentes meios de cultivo. Culturas foram mantidas a temperatura de 25 °C por 15 dias.

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados para avaliação da variação metabólica da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8). Composição por litro de meio de cultivo

<b>Meios de cultura</b>	<b>Ingredientes</b>
Malte 2% (M2)	20 g de malte
Malte 3% (M3)	30 g de malte
Glicose, Peptona e Extrato de Levedura (GPY).	1 g de glicose, 0,5 g de peptona de soja e 0,1 g de extrato de levedura
Caldo Batata Dextrose (PDB)	24 g de caldo de batata dextrose ( <i>potato dextrose broth</i> )
Meio Mínimo (MM)	10 g de glicose e 5 g de extrato de levedura
Sabouraud Dextrose (SBD)	40 g de glicose e 10 g de peptona de carne
Sabouraud Dextrose e Extrato de Levedura (SDB + YE)	40 g de glicose, 10 g de peptona de carne, 5 g de extrato de levedura

Figura 9 – Frascos do tipo Schott contendo meios de cultura e a linhagem fúngica *Biatriospora* sp. (D8).



Após o período de cultivo, foram adicionados 250 mL de acetato de etila (AcOEt) a cada frasco do tipo Schott contendo 250 mL do respectivo meio de cultivo. Em seguida, foi filtrada em funil de Büchner através de papel de filtro analítico e a fase AcOEt foi separada em funil de separação. A fração AcOEt foi evaporada em evaporador rotativo até secura, ressuspensa em MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5) e particionada com hexano (3x). A fração MeOH foi seca e pesada.

A fração aquosa remanescente foi evaporada até completa remoção do AcOEt residual. A fração H<sub>2</sub>O livre de AcOEt adicionou-se 25 g da mistura de resinas XAD -2, -4 e -7, na proporção de 1:1:1. A mistura de resinas + meio de cultura foi mantida sob agitação a 160 RPM durante dois dias. Depois deste período, a mistura de resinas foi filtrada em funil de Büchner através de papel de filtro analítico. A mistura de resinas foi recuperada e extraída com MeOH e MeOH:acetona 1:1 (2 x volume da resina). As frações orgânicas obtidas da extração das resinas separadamente para cada um dos crescimentos em diferentes meios de cultivo foram reunidas, secas e pesadas.

A fração AcOEt de cada experimento de crescimento foi submetida a uma separação por extração em fase sólida (SPE) com sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila utilizando-se o seguinte gradiente de eluição: (F1) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%, (F2)

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt (1:1), (F3) AcOEt 100%, (F4) AcOEt: MeOH (1:1) e (F5) MeOH 100%, resultando em 5 sub-frações.

O extrato obtido a partir da mistura de resinas foi submetido à outra extração em fase sólida (SPE) com cartuchos de sílica gel derivatizada com grupos C18, eluídos com uma mistura de solventes H<sub>2</sub>O/MeOH nas proporções de 75:25 (F1), 50:50 (F2), 25:75 (F3) e 0:1 (F4) para obtenção de 4 sub-frações.

Todas as frações obtidas foram analisadas por UPLC-HRMS, conforme descrito no item 3.1.2.

### 3.2.2 Avaliação dos metabólitos empregando-se redes moleculares

Para a construção das redes moleculares, utilizou-se a plataforma online GNPS: *Global Natural Products Social Molecular Networking* (WANG *et al.*, 2016). Os dados de UPLC-HRMS adquiridos em modo DDA (*Data-dependent acquisition*) foram convertidos do formato .raw (Waters) para o formato .mzXML utilizando-se o software Proteowizard MSConvert (versão 3.0.11392). Para a conversão dos dados, empregou-se os seguintes parâmetros: *output format* = mzXML, *binary encoding* = 32 bits, *write index* = on, *use zlib compression* = off, *TPP compatibility* = off, *package in gzip* = off, *filters* = pick picking, *algorithm* = vendor, *MS levels* = 1-2. Os dados .mzXML foram carregados na plataforma online GNPS fazendo uso do servidor MassIVE (massive.ucsd.edu). Na plataforma GNPS, os dados foram subdivididos da seguinte forma: G1 (grupo 1) = branco de solvente, G2 (grupo 2) = metabólitos produzidos pela linhagem fúngica, G3 (grupo 3) = padrões das fomactinas. Os espectros consenso foram criados, considerando-se os seguintes critérios: tolerância de massa para o íon precursor de 0,02 Da; tolerância de massa para o íon fragmento de 0,02 Da. Espectros 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 0,7 e pelo menos 6 fragmentos comuns. Os arquivos resultantes foram visualizados empregando-se os softwares off-line Cytoscape (versão 3.6.1) e Gephi (versão 0.9.2) (BASTIAN, HEYMANN, JACOMY, 2009).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE METABÓLICA DE *Biatriospora* sp. (D8) EMPREGANDO-SE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

#### 3.3.1 Crescimento da linhagem fúngica e obtenção dos extratos em quadruplicata

A partir das análises qualitativas das redes moleculares, meios de cultura foram pré-selecionados para a avaliação da diversidade de produção de fomactinas empregando-se análises estatísticas, de modo a ser obter um maior grau de fidedignidade. Desse modo, para os extratos de meio de cultura foram realizadas análises de replicatas biológicas, incluindo-se brancos de meios de cultura.

Os meios de cultivo escolhidos para crescimento foram: malte 2% (M2), malte 3% (M3), meio mínimo (MM), caldo batata dextrose (PDB) e glicose, peptona e extrato de levedura (GPY), preparados como descrito na tabela 1, porém apenas com água destilada (sem água do mar artificial). Além disso, foram avaliadas somente as frações AcOEt de cada experimento de crescimento.

O crescimento foi realizado exatamente como descrito no item 3.2.1, empregando-se quadruplicatas de cada meio de cultura, brancos de meio de cultura mantendo um frasco do tipo Schott de cada meio de cultura sem inóculo. Somente as frações AcOEt foram investigadas, aplicando-se o mesmo método já mencionado.

Todas as frações obtidas foram analisadas por UPLC-HRMS, conforme descrito no item 3.1.2 e os resultados foram avaliados empregando-se a plataforma XCMS Online.

#### 3.3.2 Avaliação dos resultados empregando-se análises estatísticas - XCMS Online

Para o processamento e carregamento na plataforma XCMS Online (TAUTENHAHN *et al.*, 2012), os dados de UPLC-MS foram adquiridos em modo DDA (*Data-dependent acquisition*) e convertidos do formato .raw (Waters) para o formato .mzXML empregando-se o software Proteowizard MSConvert (versão 3.0.11392). Para a conversão dos dados, empregou-se os seguintes parâmetros: *output format* = mzXML, *binary encoding* = 32 bits, *write index* = on, *use zlib compression* = off, *TPP*

*compatibility* = off, *package in gzip* = off, *filters* = Subset, *scan Event* = 1-1. Os dados .mzXML foram carregados diretamente na plataforma XCMS Online.

### 3.4 CULTIVO DA LINHAGEM FÚNGICA *Biatrispora* sp. (D8) EM ESCALA AMPLIADA

Após a avaliação conjunta dos resultados de redes moleculares e análises estatísticas, o meio de cultivo escolhido para o crescimento em escala ampliada foi o meio de cultura mínimo (MM) pelo fato de que neste meio a produção de fomactinas foi consideravelmente mais diversa, indicando a produção de fomactinas potencialmente novas.

A linhagem fúngica *Biatrispora* sp. (D8) foi então cultivada em maior escala, em 30 L do meio de cultura MM em água destilada sem sais. Após 23 dias, o extrato AcOEt do meio de cultivo foi obtido de acordo com o descrito no item 3.2.1.

O extrato AcOEt foi evaporado e desengordurado por uma partição entre hexano e MeOH/H<sub>2</sub>O 95:5. A fração MeOH resultante foi fracionada e purificada utilizando-se diversas etapas cromatográficas, descritas no item 4.3.

### 3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO (PFF)

Com o objetivo de incrementar o rendimento da produção de fomactinas e análogos, foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) (CASTRO *et al.*, 2016). Neste Planejamento Fatorial Fracionado foram avaliadas quatro variáveis (Tabela 2): temperatura de incubação, tempo de incubação, modo (com agitação ou em modo estático) e concentração dos componentes do meio de cultura considerando-se o meio de cultura mínimo (MM), uma vez que este foi previamente indicado como sendo o meio de cultura mais adequado para crescimento da linhagem fúngica *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 no que se refere à produção de fomactinas.

Tabela 2 - Parâmetros utilizados para cada variável nos experimentos do PFF para o fungo *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8).

	Variáveis	t (dias)	T (°C)	RPM	[MM]
Níveis	-1	14	15	0	20%
	+1	28	30	160	80%

Foram realizados 8 experimentos distintos, todos em triplicata, totalizando 24 experimentos. Na tabela 3, são descritos os níveis das variáveis adotados para cada um destes experimentos, considerando-se que cada variável pode ser utilizada em dois níveis: (+) como valor máximo do parâmetro e (-) como valor mínimo do mesmo. A primeira coluna corresponde à numeração de todos experimentos realizados; na segunda coluna (T), intercala-se um valor de máximo e mínimo para a temperatura dos experimentos de crescimento; na terceira coluna varia-se o tempo de incubação (dias), intercalando-se valores de máximo e dois de mínimo; na quarta coluna varia-se o modo de crescimento, se estático ou com agitação (RPM) em quatro máximos e quatro mínimos. A quinta coluna, concentração do meio de cultura ([MM]), é obtida pela multiplicação dos valores de máximo e mínimo dos parâmetros anteriores. Ou seja, para o experimento 1, [MM] será utilizado em nível máximo (+1), pois  $T \times t \times RPM = (+1) \times (+1) \times (+1) = +1$ .

Tabela 3 - Níveis das variáveis para os experimentos realizados para o PFF com a linhagem fúngica *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8).

Experimentos	VARIÁVEIS			
	T	Tempo de incubação	Modo	Composição do meio de cultura
1	+	+	+	+
2	-	+	+	-
3	+	-	+	-
4	-	-	+	+
5	+	+	-	-
6	-	+	-	+
7	+	-	-	+
8	-	-	-	-

Após a obtenção dos extratos AcOEt dos meios de cultura de cada experimento, os mesmos foram submetidos ao seguinte procedimento: (1) evaporação; (2) solubilização dos extratos em MeOH; e (3) filtração de material particulado com filtros PTFE 13 mm de diâmetro 0,45 µm. Posteriormente, as frações foram analisadas por UPLC-HRMS e os resultados foram avaliados empregando-se ferramentas estatísticas, de maneira a se estabelecer a melhor condição possível de crescimento para a produção otimizada de fomactinas.

### 3.6 AVALIAÇÃO METABÓLICA DO CRESCIMENTO OTIMIZADO DE *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 (D8) EM ESCALA AMPLIADA

#### 3.6.1 Crescimento otimizado da linhagem fúngica e obtenção dos extratos

Uma vez que a condição de crescimento otimizada foi determinada (temperatura: 30 °C; tempo de cultivo: 28 dias em meio líquido; crescimento em agitação a 160 rpm; e 20% da concentração total do meio de cultivo mínimo), realizou-se o cultivo do fungo em escala ampliada (26 L), seguindo-se os mesmos procedimentos de extração descritos no item 3.2.1.

O extrato MeOH resultante foi fracionado e purificado utilizando-se uma coluna cromatográfica pré-empacotada com fase estacionária C18 (SPE-C18) e eluição com um gradiente de 10% MeOH:H<sub>2</sub>O, conforme descrito no item 4.5. As frações obtidas foram avaliadas empregando-se a *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN).

#### 3.6.2 Avaliação das frações empregando-se *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN)

Para a construção da rede molecular, utilizou-se a plataforma online GNPS: *Global Natural Products Social Molecular Networking* (WANG *et al.*, 2016). Os dados de UPLC-HRMS adquiridos em modo DDA (*Data-Dependent Acquisition*) foram convertidos do formato .raw (Waters) para o formato .mzXML utilizando-se o software Proteowizard MSConvert (versão 3.0.11392), seguindo os mesmos parâmetros

descritos na seção 3.2.2. Os dados .mzXML foram processados empregando-se o software MZmine (versão 2.51). No processamento via MZmine, a detecção de massa foi realizada para as funções MS<sup>1</sup> e MS<sup>2</sup>. Para a construção dos cromatogramas, aplicou-se os seguintes parâmetros, tempo mínimo de 0,01 min., altura mínima 3.0E3 e tolerância de massa de 0,0 *m/z* ou 20,0 ppm. Em seguida, procedeu-se com a deconvolução dos dados empregando-se o algoritmo *Baseline cut-off*, altura mínima 1.5E3, intervalo de duração mínima do pico 0,01 a 3,00 min. e nível da linha de base de 1.0E3. Além disso, realizou-se 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<sup>+</sup>). Posteriormente, os dados foram reunidos utilizando a função de alinhamento com os seguintes parâmetros: *m/z tolerance* 0.0 *m/z* or 20.0 ppm; *weight for m/z*: 75; *RT tolerance*: 0.1; *weight for RT*: 25). Em seguida, os dados foram filtrados utilizando-se o intervalo de *m/z* 100-1000. A partir dos dados filtrados, gerou-se a *feature list*, a qual foi exportada usando a função *Export for/Submit to GNPS*, gerando um arquivo .mgf para os espectros MS<sup>2</sup> e um arquivo .csv para dos dados quantitativos. Os arquivos resultantes da plataforma GNPS foram visualizados empregando-se o software off-line Cytoscape (versão 3.6.1).

### 3.6.3 Purificação e isolamento da fomactina nitrogenada

Após avaliação conjunta dos resultados do processamento e das redes moleculares, verificou-se a presença de um metabólito de *m/z* 332,2225 produzido por *Biatriospora* sp. e encontrado na fração PFF-6, sendo uma possível fomactina inédita. Esta fração foi submetida a algumas etapas de purificação e isolamento por HPLC-UV. Na primeira etapa, utilizou-se uma coluna semipreparativa InertSil Phenyl (10 x 250 mm, id. 5 µm), eluída com (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH e (C) MeCN, vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição empregado foi de 50 a 20% de A, 30 a 60% de B e 20% de C em 40 minutos, monitoramento em λ<sub>max</sub> = 254 nm e 287 nm. Foram obtidas 8 frações, designadas PFF-6A – PFF-6H. Na segunda etapa, selecionou-se a fração PFF-6C, a qual foi fracionada por HPLC-UV em coluna semipreparativa Waters XTerra C18 (7,8 x 150 mm, id. 5 µm), eluída com (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH e (C) MeCN, vazão de 2,5 mL min<sup>-1</sup>. Empregou-se uma eluição em modo isocrático de 20% de A, 20% de B e 60% de C durante 28 minutos, monitoramento em λ<sub>max</sub> = 254 nm. Após este primeiro

fracionamento, realizou-se uma segunda etapa de purificação da amostra PFF-6C por HPLC- UV utilizando uma coluna Waters XTerra C18 (7,8 x 150 mm, id. 5  $\mu\text{m}$ ), eluída com (A)  $\text{H}_2\text{O}$  e (B) MeCN, vazão de  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Empregou-se uma eluição em modo isocrático de 63% de A e 37% de B por 30 minutos, monitoramento em  $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ , obtendo-se assim de forma pura a fomactina de interesse PFF-6C1a (3,0 mg, RT = 6,4 min.)

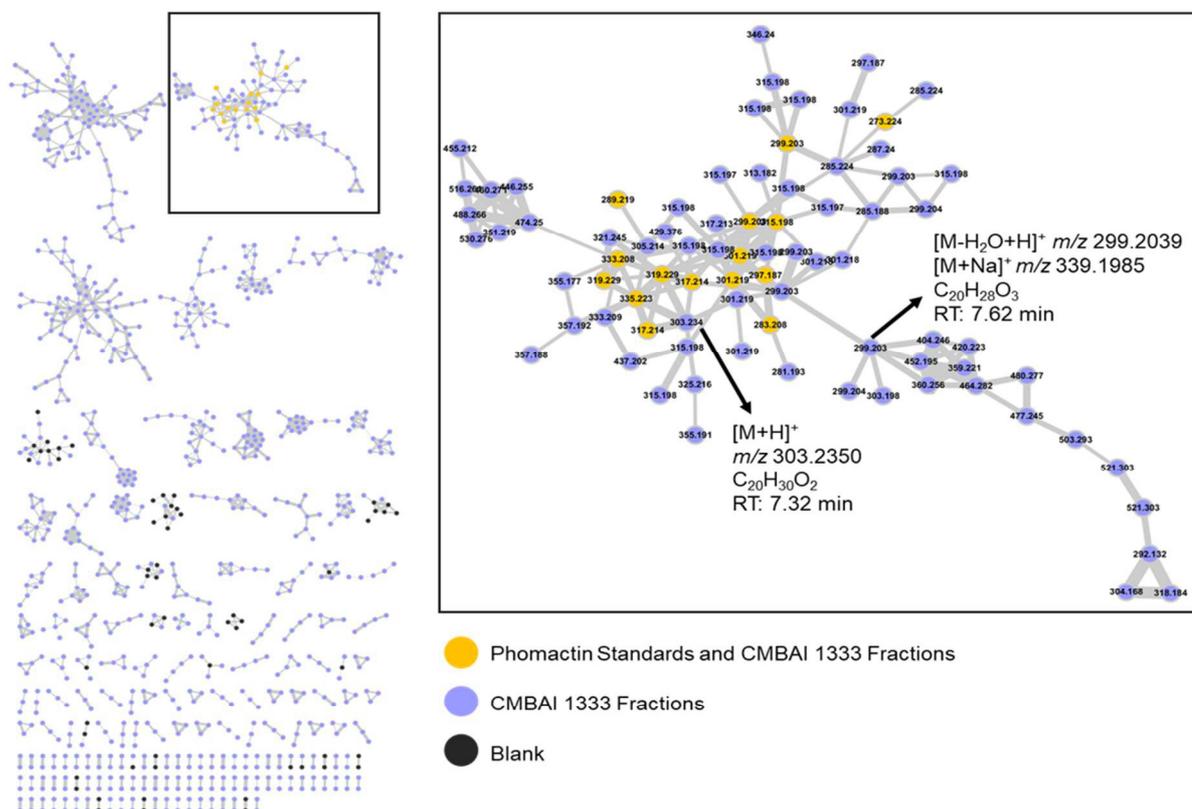
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO PRELIMINAR PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE *Biatriospora* sp. (D8)

As frações obtidas a partir do experimento descrito item 3.2.1 foram analisadas por UPLC-HRMS e os resultados foram avaliados por meio de redes moleculares.

A partir dos resultados obtidos, apresentados na figura 10, verifica-se que além das fomactinas já existentes e seus isômeros, foram detectadas fomactinas potencialmente novas ou análogos das fomactinas ainda não detectados anteriormente em extratos de meios de cultivo desta linhagem fúngica (correspondente aos nodos de coloração roxa na expansão). Duas destas potenciais novas fomactinas são indicadas na figura 10. Considerando-se que, dentre as fomactinas conhecidas, nenhuma apresenta íon  $[M+H]^+$  em  $m/z$  303,2350 (fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_2$ ) e tempo de retenção 7,32 min, este composto foi anotado como sendo uma fomactina potencialmente nova. Já com relação ao *feature*  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  339,1985 (fórmula molecular  $C_{20}H_{28}O_3$ ) e tempo de retenção 7,62 min, este apresenta o mesmo valor de  $m/z$  das fomactinas B2, C, N, O e P (SUGANO *et al.*, 1994)(ISHINO *et al.*, 2016). Destas, apenas a fomactina P foi previamente isolada do meio de cultivo de *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 (D8). A análise por UPLC-HRMS/MS do padrão da fomactina P mostrou um tempo de retenção de 7,32 min. Logo, o *feature* destacado na rede molecular poderia ser uma fomactina conhecida não detectada anteriormente em extratos do fungo *Biatriospora* sp. (D8), ou uma variante inédita das fomactinas.

Figura 10 – Rede molecular construída a partir de dados UPLC-HRMS dos íons MS/MS produzidos nas frações de todos os meios de cultura, padrões de fomactinas e brancos de solvente.



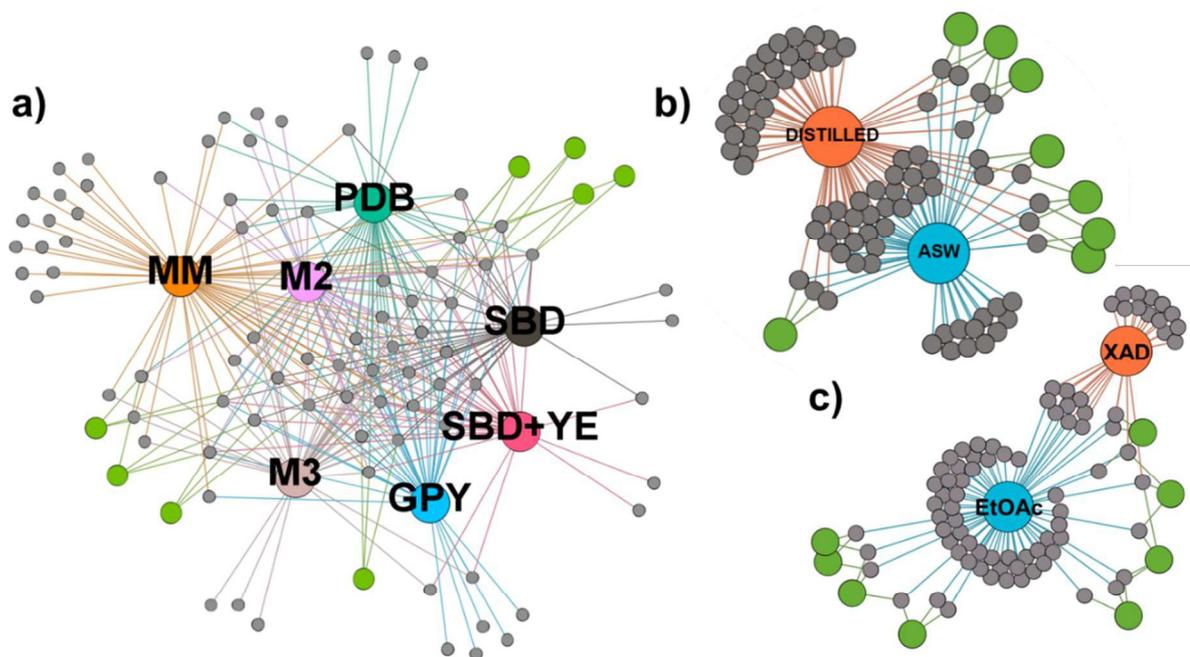
O cluster expandido mostra a alta similaridade entre os padrões de fomactinas e os metabólitos presentes nos meios de cultura. A cada nodo se encontra o valor de  $m/z$  e a espessura das conexões entre dois nodos mostram o quão semelhante baseado em fragmentos MS/MS são os compostos (*cosine score* de 0.7 a 1). Os compostos potencialmente novos estão com informações detalhadas.

Com a identificação do cluster das fomactinas na rede molecular da plataforma GNPS, seguiu-se com a avaliação da diversidade dos meios de cultivo perante a produção de fomactinas, ou seja, quais condições de crescimento levaram à maior diversidade de fomactinas já conhecidas e de possíveis análogos inéditos. Na figura 11 é destacado o cluster das fomactinas e a distribuição dos  $m/z$  *features* em cada um dos meios de cultivo avaliados. Essa forma de visualização dos dados mostrou-se de difícil interpretação não sendo possível verificar visualmente quais *features* estão presentes nos meios de cultivo e quais seriam os meios de cultivo mais diversos.



*features* cinza ou verde claro únicos, foram consideradas com maior diversidade de fomactinas.

Figura 12 – Redes de associação de metabólitos de características com semelhança espectral com as fomactinas.



a) Comparação da diversidade de produção de fomactinas por *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8) em diferentes meios de cultura, combinando-se água destilada e água do mar artificial (ASW); b) Comparação da diversidade de produção de fomactinas por *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8) utilizando-se água destilada ou ASW, para todos os meios de cultura utilizados; c) Comparação da composição em fomactinas de extratos de AcOEt e XAD (meio aquoso) de todos os meios de cultura empregados no crescimento do fungo *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8). Nodos pequenos e cinza são *features* da rede molecular GNPS; nodos médios verdes são os padrões de fomactinas, e; nodos grandes coloridos correspondem aos diferentes meios de cultura, água e extratos.

A partir da figura 12a, verifica-se que o meio de cultura MM é o que apresenta o maior número de *features* exclusivos. Já o meio de cultura SBD e SBD + YE apresentam o menor número de *features* exclusivos. Portanto, o meio de cultura MM foi considerado o meio de cultivo no qual uma maior diversidade de fomactinas foi observada nas condições de cultivo realizada para o fungo *Biatrispora* sp. CBMAI 1333 (D8). Já os meios de cultura SBD e SBD + YE foram os meios de cultivo nos quais observou-se uma menor diversidade de fomactinas. Ao se comparar a utilização de ASW e água destilada (Figura 12b), o meio de cultivo preparado com água destilada mostrou conter mais *features* exclusivos de fomactinas do que o meio de

cultura preparado com ASW. Por fim, o extrato de AcOEt apresentou uma maior concentração de fomactinas e análogos (como seria de se esperar), enquanto que no extrato oriundo da mistura de resinas XAD foram detectadas menos *features* (Figura 12c).

Estes resultados fornecem uma perspectiva bem clara da diversidade de fomactinas produzidas pelo fungo *Biatriospora* sp (D8). Com o objetivo de descobrir novos compostos, a melhor condição de crescimento do fungo seria realizar crescimento em larga escala em meio de cultura mínimo (MM) em água destilada, investigando-se a fração AcOEt. Para isso, foi realizada uma segunda análise, mais refinada, incluindo-se replicatas biológicas bem como amostras dos brancos de meios de cultura. Foram escolhidos cinco meios de cultivo (M2, M3, MM, PDB e GPY), todos preparados em água destilada (sem sais de água do mar artificial).

#### 4.2 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE FOMACTINAS EMPREGANDO-SE ANÁLISES ESTATÍSTICAS

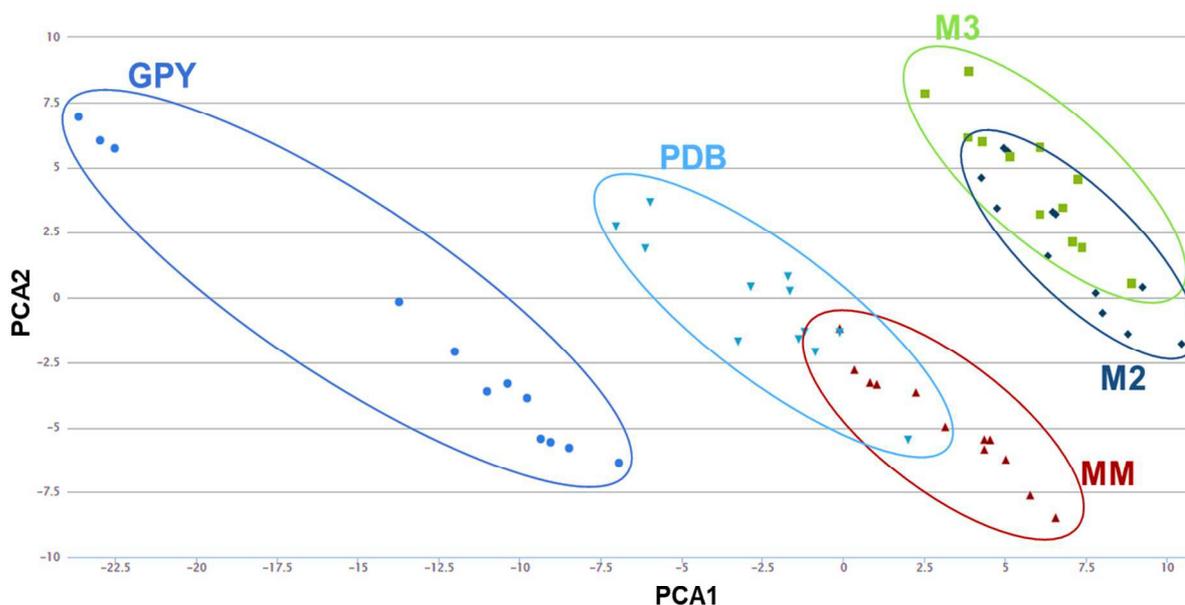
Para avaliação da diversidade de fomactinas produzidas pelo fungo *Biatriospora* sp. (D8) utilizando-se análises estatísticas, os meios de cultivo escolhidos (M2, M3, MM, PDB e GPY) foram preparados utilizando-se água destilada. Os experimentos de crescimento e produção de fomactinas foram realizados em quadruplicata (replicatas biológicas). Após 15 dias de incubação, os extratos do meio de cultura foram obtidos conforme descrito no item 3.3.1.

Os extratos de AcOEt foram em seguida analisados por UPLC-HRMS em triplicata (replicatas técnicas), seguindo-se por avaliação metabolômica comparativa na plataforma XCMS Online.

XCMS Online é uma plataforma de processamento de dados LC-MS com capacidade para análise estatística. Estas análises são feitas baseadas em picos cromatográficos definidos por um valor de  $m/z$ , tempo de retenção e intensidade. Com isso, realizam-se comparações estatísticas entre dois grupos e grupos múltiplos, além de meta-análises. Uma vez que as fomactinas possuem valores de massa molecular entre  $m/z$  200 e 400, este intervalo foi selecionado para todas as análises realizadas na plataforma XCMS.

Primeiramente, avaliaram-se diferenças e semelhanças nos perfis metabômicos entre todos os meios de cultivo investigados, empregando-se análise de componentes principais (PCA), cujos resultados são apresentados na figura 13.

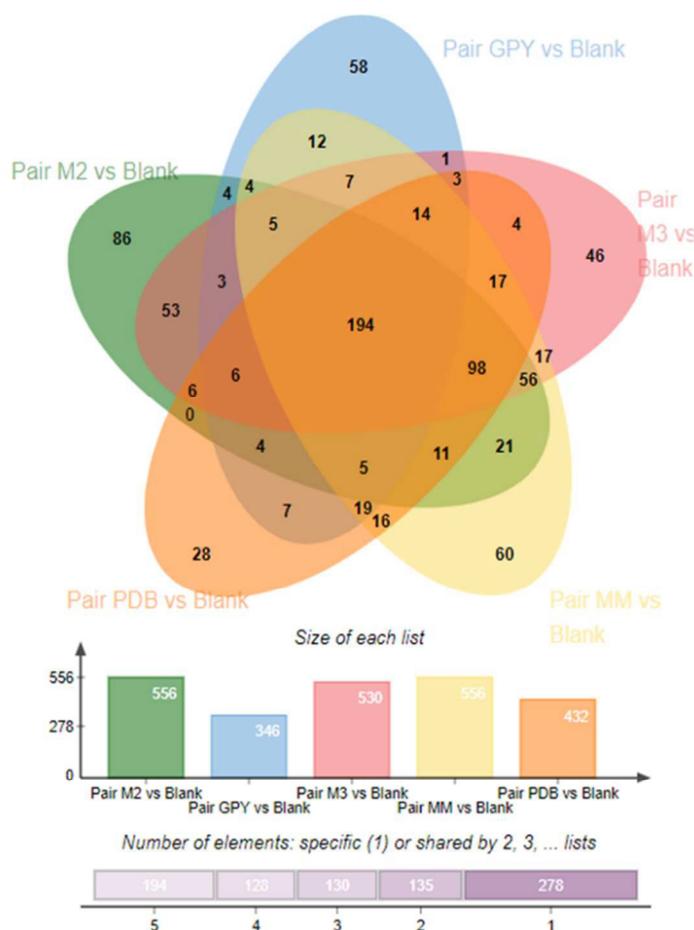
Figura 13 – Análise por componentes principais considerando-se os 5 meios de cultivo investigados. Intervalo de massa:  $m/z$  200-400 Da. *Centered, log-scale*.



A partir da figura 13, observa-se que para cada meio de cultivo existem 12 pontos no gráfico de PCA referentes às quatro replicatas biológicas e três replicatas técnicas, excluindo-se os brancos de meio de cultura. Em termos de composição em fomactinas e derivados, nota-se que os meios de cultura M2 e M3 apresentam perfis semelhantes, enquanto que os meios de cultivo MM e PDB compartilham alguns componentes. Já o meio de cultivo GPY é o mais distinto de todos. Neste tipo de análise, todos os componentes são levados em consideração, sejam metabólitos produzidos ou componentes dos meios de cultivo.

Além disso, foram feitas análises pareadas, comparando-se os metabólitos do meio de cultivo com o inóculo e o meio de cultivo sem a presença do inóculo. Para tal análise, considerou-se apenas os metabólitos 10 vezes mais abundantes no meio de cultura com o inóculo quando comparados ao branco. O resultado desta meta-análise é apresentado na figura 14 e ilustra uma comparação de todos os meios de cultivo com os brancos.

Figura 14 – Diagrama de Venn, exemplificando número de *features* específicos e compartilhados de cada meio de cultivo. *Fold-change*: 10, *p-value*: <0.05

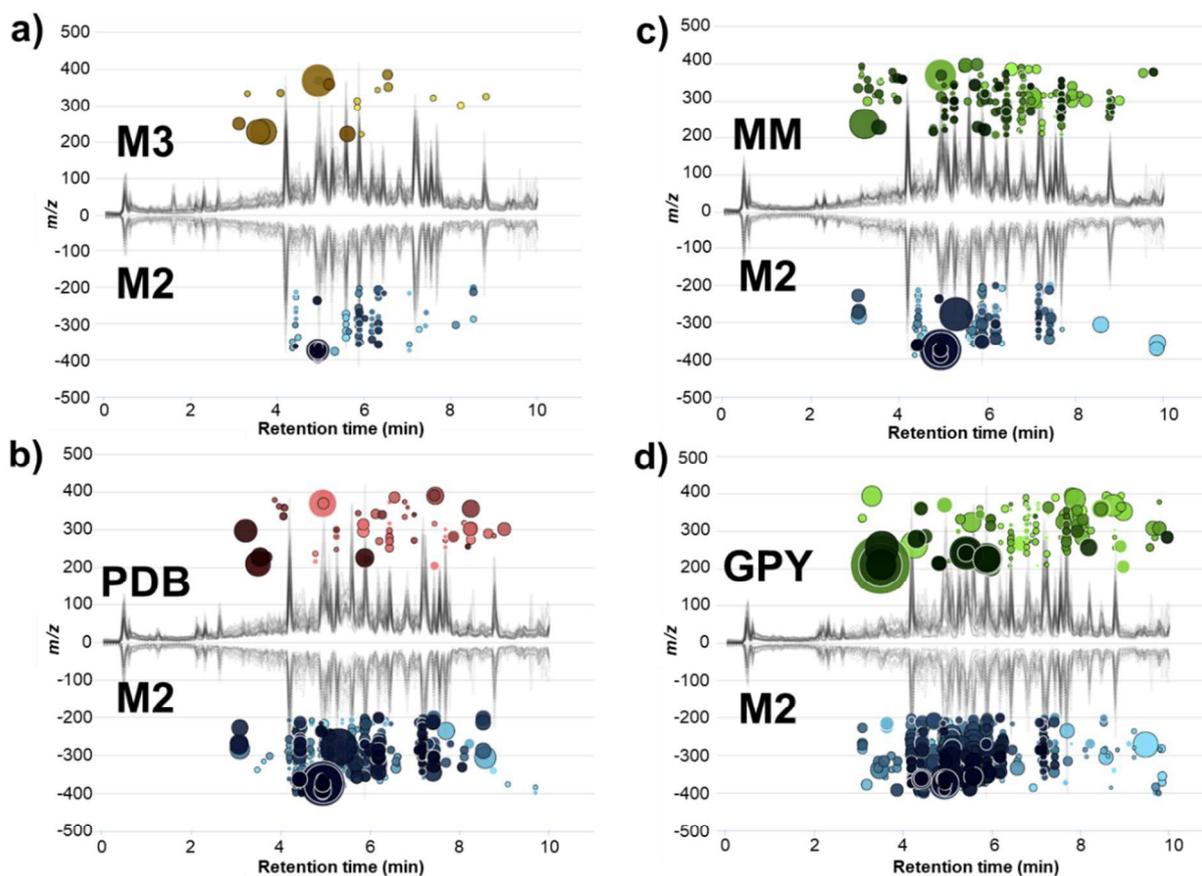


De acordo com a figura 14, considerando-se o número total de *features*, os meios de cultura M2, M3 e MM apresentaram os maiores valores com 556, 530 e 556 *features*, respectivamente. O meio de cultura PDB apresentou 432 *features* enquanto que o meio de cultura GPY apresentou 346 *features*. Além disso, todos os 5 meios de cultura estudados compartilham 194 *features*. Os meios de cultivo M2 e MM tiveram o maior número de *features* únicos (86 e 60, respectivamente). Um ponto interessante, é que os meios de cultura M2 e M3, compartilharam o maior número de *features* quando comparados entre si, um total de 53 *features*, o que evidencia a grande semelhança entre a composição destes meios de crescimento e, conseqüentemente, a produção de fomactinas, estando assim de acordo com os dados de PCA da figura 13.

Em seguida, foi realizada uma análise detalhada dos metabólitos específicos de cada meio de cultura empregando-se a ferramenta de gráficos de nuvens. Nestes gráficos, apresentados na figura 15, os meios de cultivo contendo inóculo foram comparados dois a dois. No primeiro estudo do metabolismo de *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 (D8) realizado em nosso laboratório, que resultou no isolamento de algumas fomactinas, a linhagem fúngica foi cultivada em meio de cultura M2 (KURODA *et al.*, 2018). Por este motivo, utilizou-se a composição em fomactinas do meio de cultivo M2 como controle, comparando-o com todos os outros 4 meios de cultura estudados.

Para cada gráfico de nuvem, os cromatogramas de todas as replicatas são sobrepostos para comparações dois a dois. Quanto maior o círculo, maior será a diferença entre intensidades do mesmo metabólito no respectivo meio de cultura. Já com relação às cores, quanto mais escuro o círculo, mais significativa é a diferença em termos estatísticos de valor de p.

Figura 15 – Gráfico de nuvens comparando os perfis metabolômicos dos meios de cultivo com inóculo.

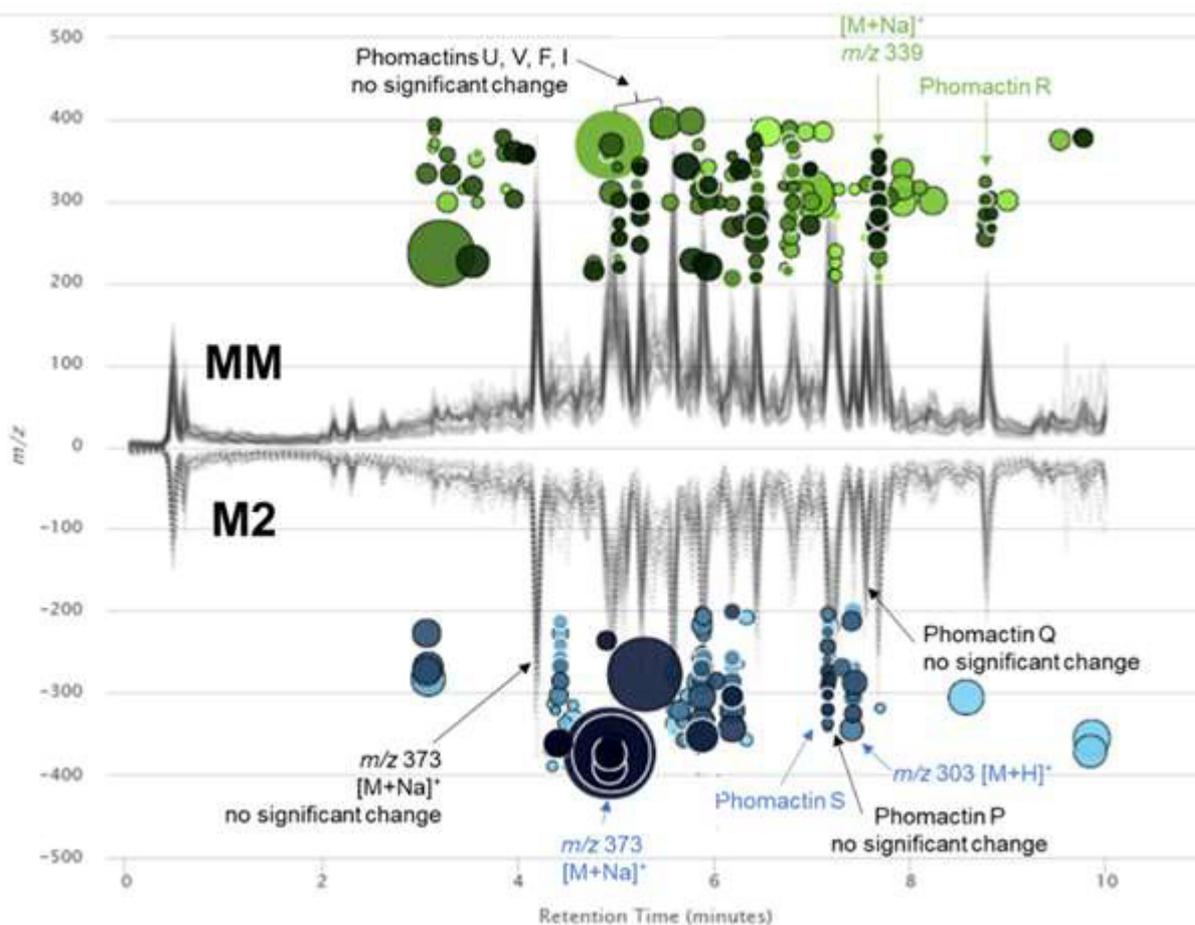


a) Comparação metabolômica entre os meios de cultivo M3 e M2, b) Comparação metabolômica entre os meios de cultivo PDB e M2, c) Comparação metabolômica entre os meios de cultivo MM e M2, d) Comparação metabolômica entre os meios de cultivo GPY e M2. Filtros:  $p$ -value:  $<0.05$ ,  $fold$ -change:  $\geq 1,5$ ,  $m/z$  range: 200-400 Da,  $retention$  time: 3-10 min.

A figura 15a, apresenta a comparação entre os meios de cultura M2 e M3. Um número reduzido de círculos significa que ambos os meios de cultura possuem um número de rendimento dos compostos semelhantes, sendo exibidos apenas os metabólitos com maior diferença de rendimento entre os meios de cultivo. Em oposição, temos as figuras 15b (PDB *versus* M2) e 14d (GPY *versus* M2), as quais apresentam uma alta densidade de círculos na metade inferior dos gráficos, indicando que o meio de cultura M2 possui metabólitos em maior quantidade e intensidade quando comparado aos meios de cultura PDB e GPY. Já a figura 15c (MM *versus* M2) exibe uma densidade de círculos semelhante em ambas metades do gráfico. Dessa forma, os meios de cultura MM e M2 indicam que existem diferentes compostos em

grandes quantidades em cada meio de cultura. Tais resultados podem ser observados mais facilmente na expansão do gráfico de nuvens (figura 16).

Figura 16 – Expansão do gráfico de nuvens, comparando os meios de cultivo MM e M2.



Features indicados com valores de  $m/z$  sugerem novas fomactinas ou análogos desconhecidos de fomactinas conhecidas.

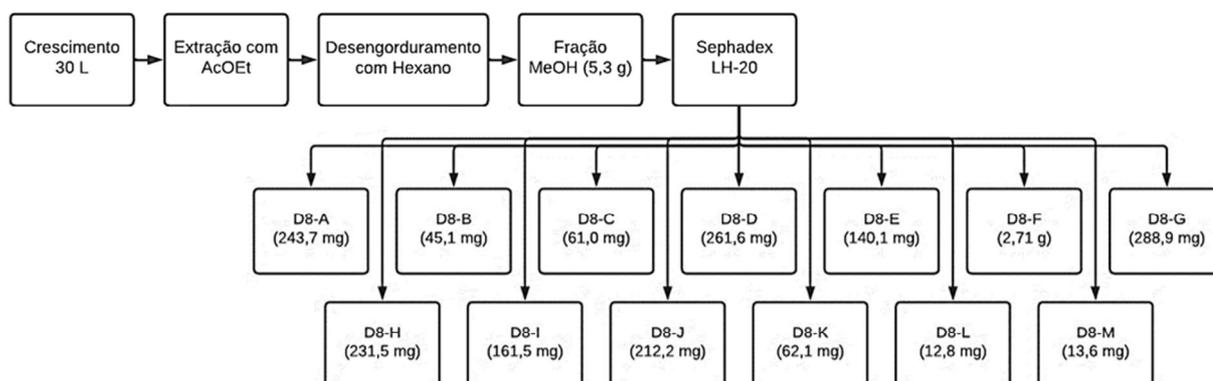
Na figura 16, as fomactinas conhecidas foram identificadas com base na comparação do tempo de retenção, massa acurada e espectros MS/MS com padrões disponíveis no laboratório (previamente isolados e identificados). Os meios de cultura M2 e MM apresentaram diferentes fomactinas produzidas pela linhagem fúngica e análogos em diferentes intensidades. Enquanto a fomactina R foi detectada em maior intensidade no meio de cultura MM ( $m/z$  301,218  $[M+H]^+$ , tempo de retenção: 8,77 min,  $p$ -value: 0,005,  $fold$ -change: 1,65), a fomactina S apresenta maior intensidade no meio de cultura M2 ( $m/z$  301,217  $[M-H_2O+H]^+$ , tempo de retenção: 7,17 min.  $p$ -value: 0,001,  $fold$ -change: 1,53). Dessa forma, observou-se que os meios de cultivo MM e M2 apresentam uma diversidade distinta de fomactinas.

A partir dos resultados das redes moleculares apresentadas no item 4.1 e ferramentas estatísticas como a plataforma XCMS, verificou-se que novo crescimento do fungo em meio de cultivo mínimo (MM) seria promissor, por ser o meio de cultura no qual observou-se uma grande diversidade metabólica e por ter apresentado nova gama de potenciais fomactinas não detectadas anteriormente por métodos tradicionais (isolamento e identificação).

#### 4.3 CULTIVO DA LINHAGEM FÚNGICA *Biatriospora* sp. (D8) EM ESCALA AMPLIADA EM MEIO MÍNIMO (MM)

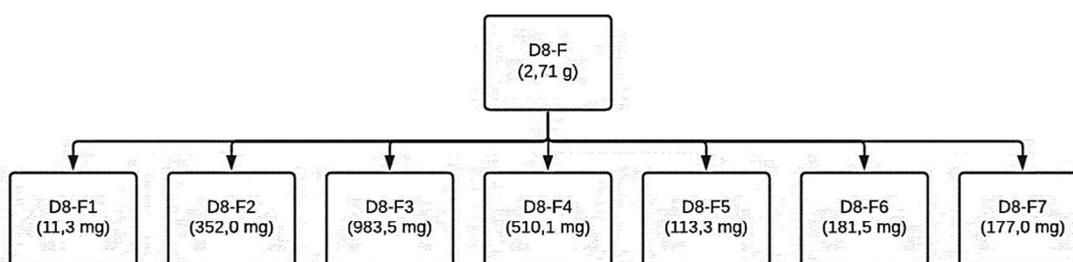
Foi realizado novo crescimento da linhagem *Biatriospora* sp. (D8) em 30 litros do meio de cultivo mínimo (MM). O crescimento e obtenção do extrato do meio de cultura foram realizados conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.4. Foram obtidos 5,3 g da fração MeOH proveniente do extrato AcOEt desengordurado do meio de cultivo. Esta fração MeOH foi submetida a um fracionamento inicial em coluna empacotada com Sephadex LH-20 e eluída com MeOH. Foram coletadas frações de 8 mL, as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se como revelador ácido fosfomolibdico. Após a análise por cromatografia em camada delgada, as frações foram reunidas em 13 subfrações, nomeadas D8-A a D8-M. Na figura 17 são apresentados o rendimento de cada uma das frações obtidas.

Figura 17 – Fluxograma da separação da fração D8 por coluna empacotada com fase estacionária Sephadex LH-20.



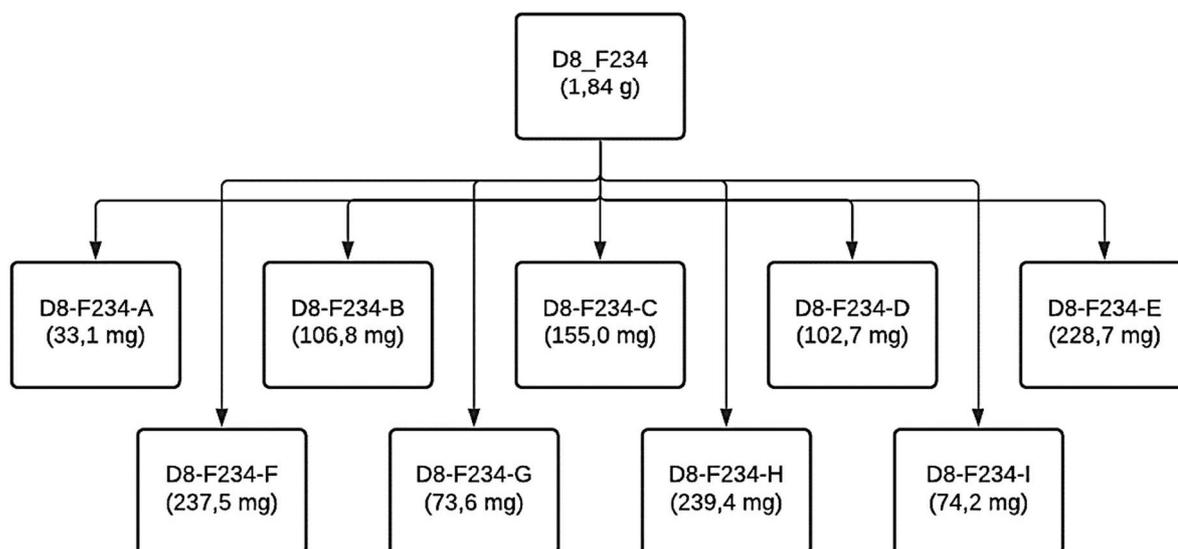
Análises por HPLC-UV-MS indicaram que a fração D8-F (2,71 g) apresentava as fomactinas, e esta foi subsequentemente investigada. Esta foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna empacotada com sílica gel derivatizada com grupos diol, eluída com as seguintes misturas de solvente: hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1, 7:3, 1:1, 0:1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (9:1, 7:3, 1:1, 0:1) e AcOEt/MeOH (1:1, 0:1). Após o fracionamento, as amostras foram analisadas por HPLC-UV-MS e combinadas. Foram obtidas 7 frações, nomeadas D8-F1 a D8-F7, cujos rendimentos em massa são apresentados na figura 18.

Figura 18 – Fluxograma da separação da fração D8-F por coluna empacotada com fase estacionária diol.



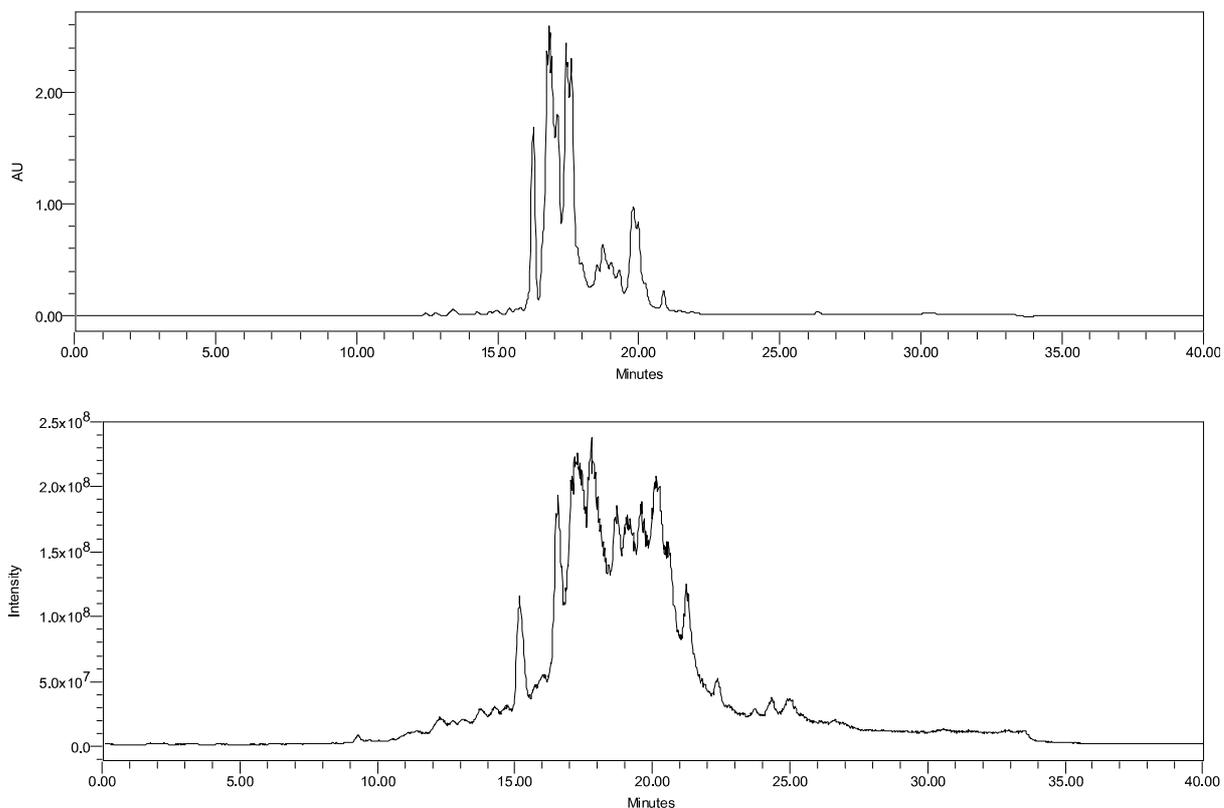
As frações D8-F1 a D8-F7 foram novamente analisadas por HPLC-UV-MS como descrito no item 3.1.1. Por apresentarem perfis químicos semelhantes, as frações D8-F2 (352 mg), D8-F3 (983,5 mg) e D8-F4 (510,1 mg) foram combinadas e a fração resultante D8-F234 foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna com fase estacionária C18. O eluente utilizado foi MeOH/H<sub>2</sub>O (2:8, 3:7, 4:6, 1:1, 1:0). Após análises das frações obtidas por HPLC-UV-MS, as frações semelhantes foram reunidas em 9 frações, denominadas D8-F234-A a D8-F234-I. Na figura 19 são apresentados os rendimentos em massa de cada uma das frações obtidas.

Figura 19 – Fluxograma da separação da fração D8-F234 por coluna empacotada com fase estacionária C18.



Estas 9 frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-MS conforme descrito no item 3.1.1. A fração D8-F234-E (228,7 mg) foi selecionada para purificação por HPLC-UV por apresentar as fomactinas. Na figura 20 são apresentados os cromatogramas no UV e MS da fração D8-F234-E após a separação por coluna empacotada com fase estacionária C18.

Figura 20 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) (superior) e MS (inferior) da fração D8-F234-E após a separação por coluna empacotada com fase estacionária C18.



A fração D8-F234-E foi separada por HPLC-UV (monitoramento em  $\lambda_{\max} = 254$  nm e 290 nm) em coluna semipreparativa InertSustain C8 (10 x 250 mm, id. 5 $\mu$ m), eluída com A – H<sub>2</sub>O e B – MeOH, vazão de 4 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição empregado foi de 50 a 30% de A e 50 a 70% de B em 40 minutos, obtendo-se as frações D8-F234-E1 a D8-F234-E8. Na figura 21 são apresentados os cromatogramas de separação da fração D8-F234-E, monitorando-se nos comprimentos de onda de 254 nm e 290 nm, indicados em preto e azul, respectivamente.

Figura 21 – Cromatogramas de separação da fração D8-F234-E por HPLC-UV.

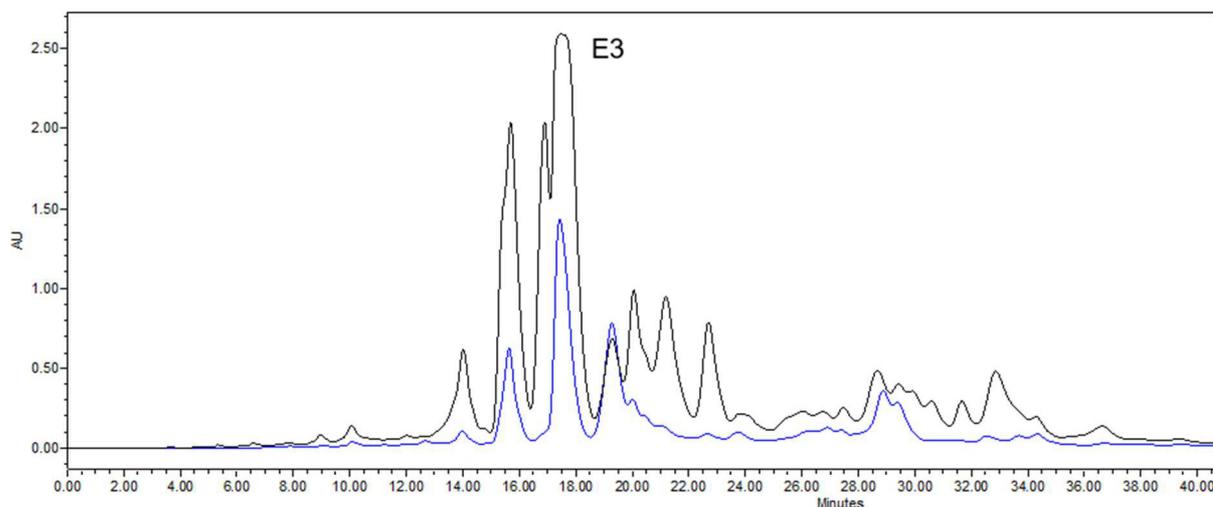
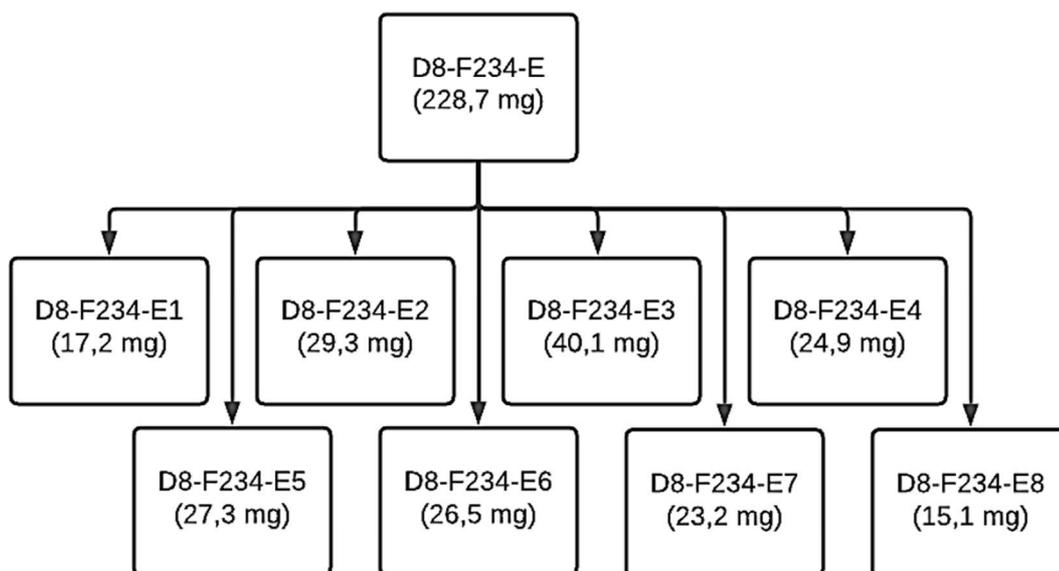
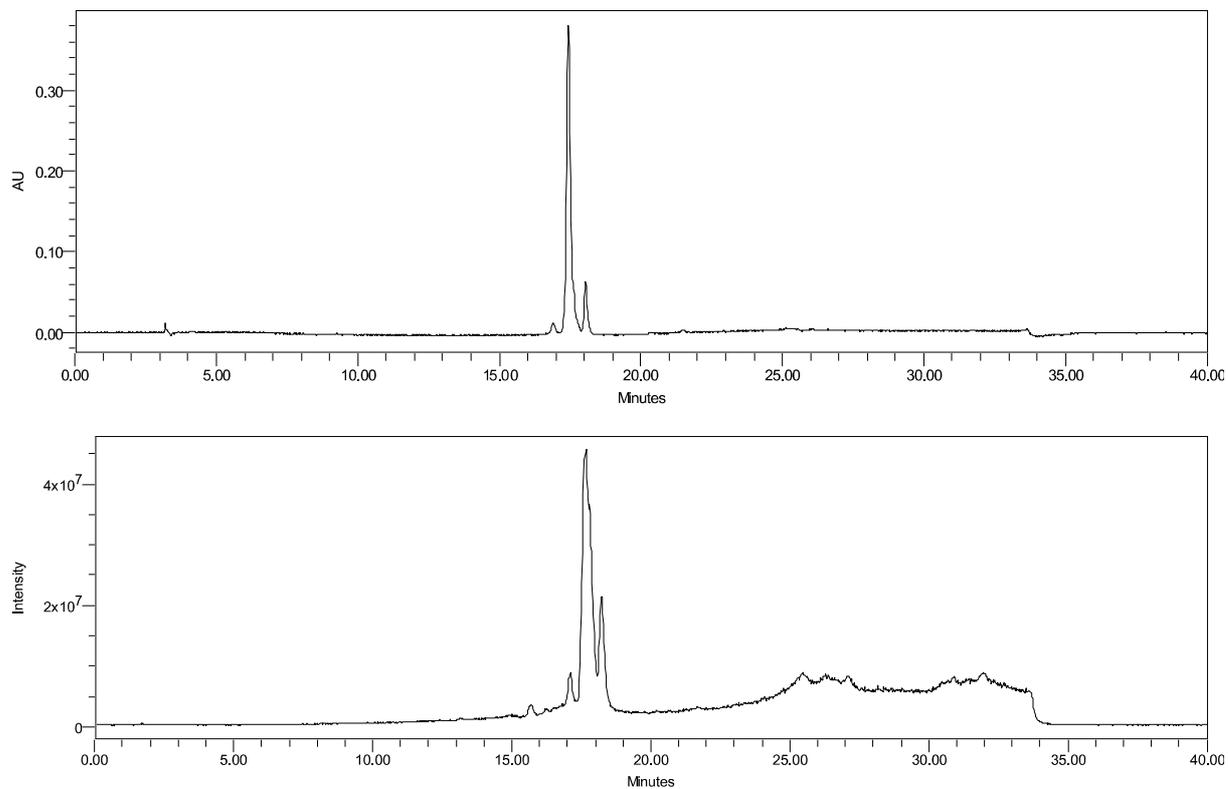


Figura 22 – Fluxograma das frações originadas da separação da fração D8-F234-E.



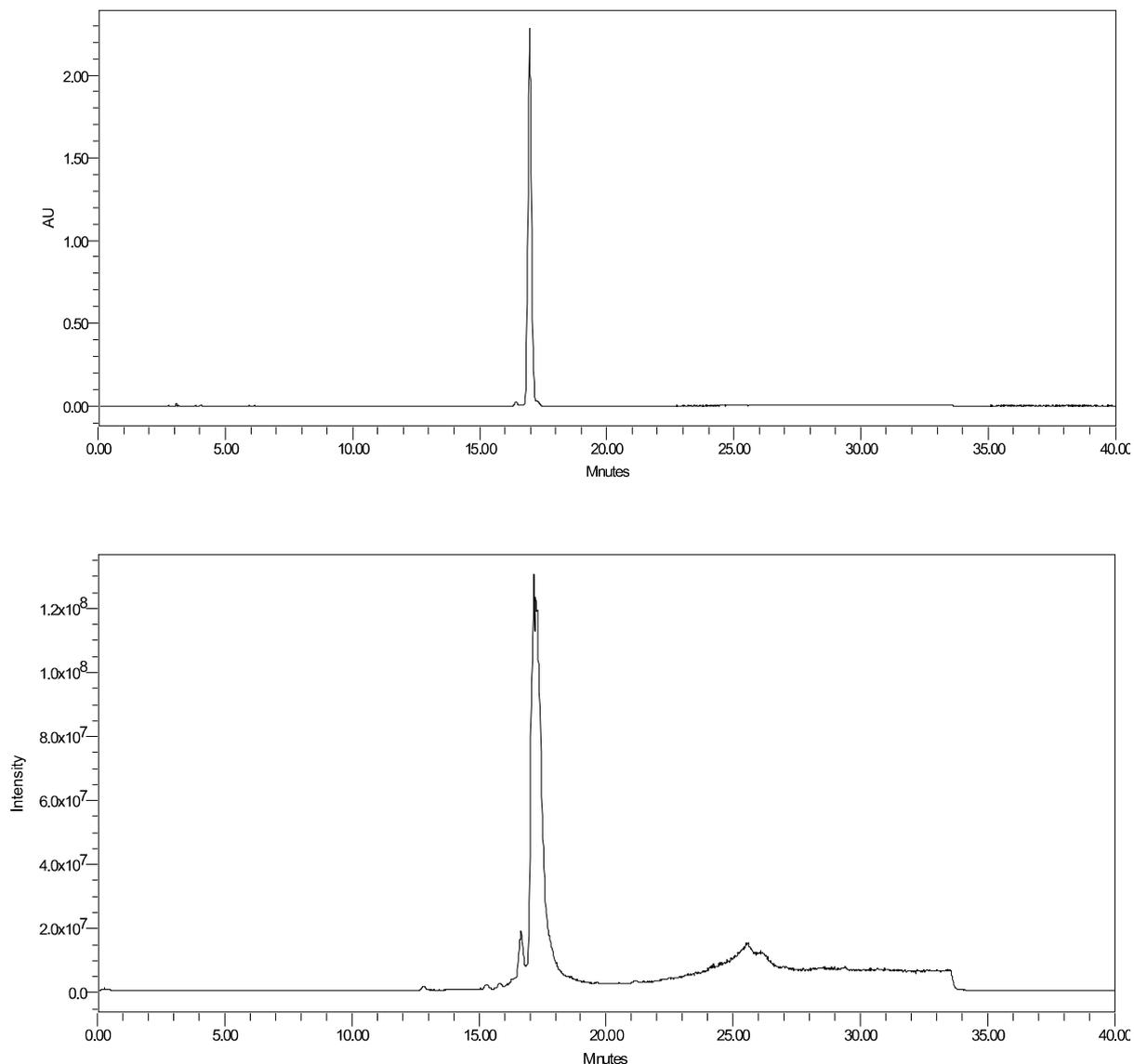
A fração D8-F234-E3 (40,1 mg) foi, então, analisada por HPLC-UV-MS conforme descrito no item 3.1.1. Na figura 23 são apresentados os cromatogramas no UV ( $\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$ ) e MS da fração D8-F234-E3.

Figura 23 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) e MS da fração D8-F234-E3, após a separação por HPLC-UV.



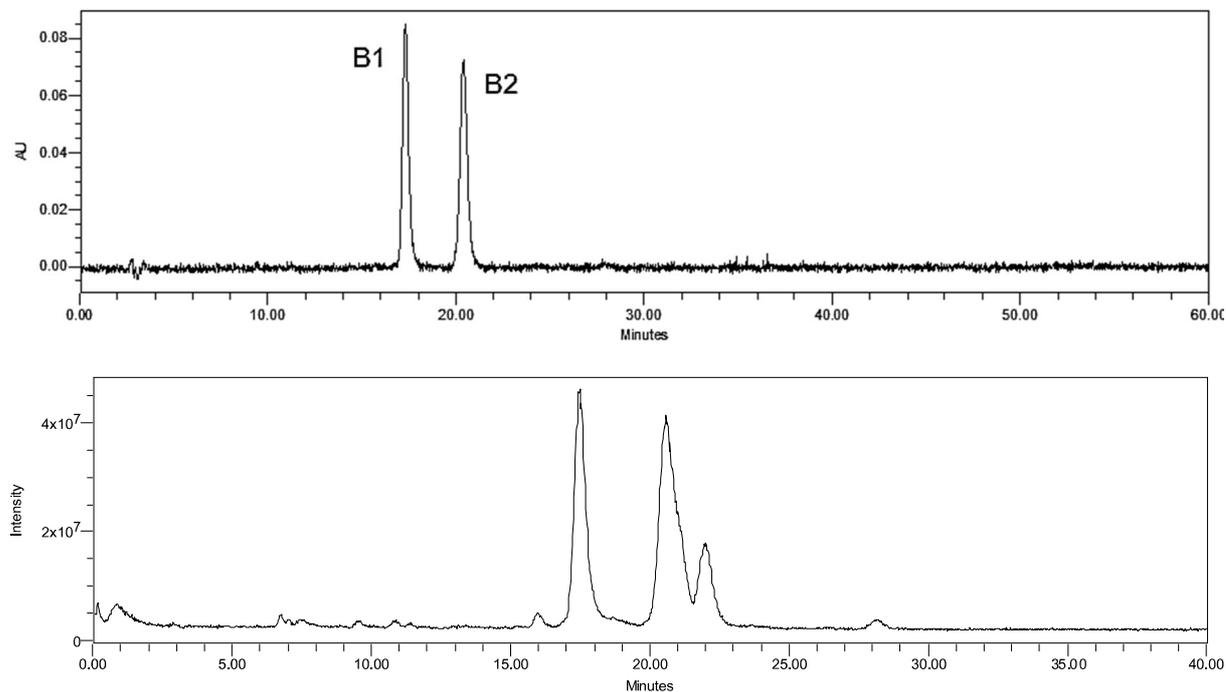
A fração D8-F234-E3 (40,1 mg) foi submetida a mais uma etapa de purificação por HPLC-UV (monitoramento em  $\lambda = 254$  nm e 290 nm) em uma coluna analítica de sílica-gel derivatizada com grupos fenila Inertsil Ph (4,6 x 250 mm, id.  $5\mu\text{m}$ ), eluída com 7:3  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ , com vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , durante 30 minutos. Desta separação foi obtida a fração D8-F234-E3-B (14,9 mg) como majoritária. Na figura 24 são apresentados os cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) e MS da fração D8-F234-E3-B, após a separação por HPLC-UV.

Figura 24 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) e MS da fração D8-F234-E3-B, após a separação por HPLC-UV.



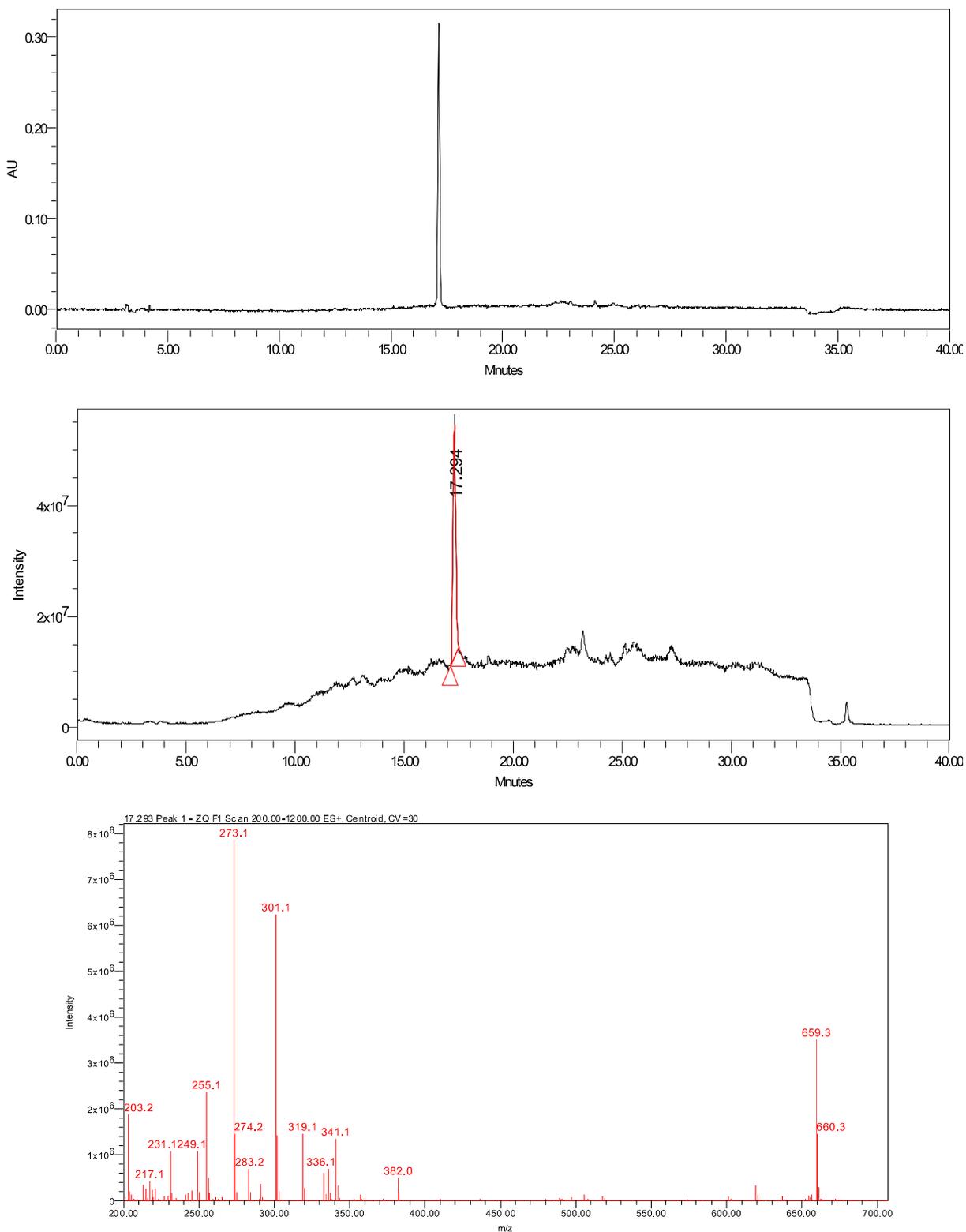
As análises indicaram que a fração D8-F234-E3-B ainda não se encontrava pura, sendo uma mistura de dois compostos. Esta fração foi analisada por HPLC-UV-MS utilizando o mesmo procedimento descrito no item 3.1.1, empregando-se uma coluna analítica de fase estacionária pentafluorofenil Kinetex® PFP (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m), eluída com uma mistura 65:18:17 de H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN, vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, durante 30 minutos. Na figura 25 são apresentados os cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) e MS da fração D8-F234-E3-B, após a análise por HPLC-UV-MS empregando-se a coluna analítica Kinetex® PFP e a mesma condição cromatográfica anterior.

Figura 25 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) e MS da fração D8-F234-E3-B, após a análise por HPLC-UV-MS empregando-se a coluna analítica Kinetex® PFP.



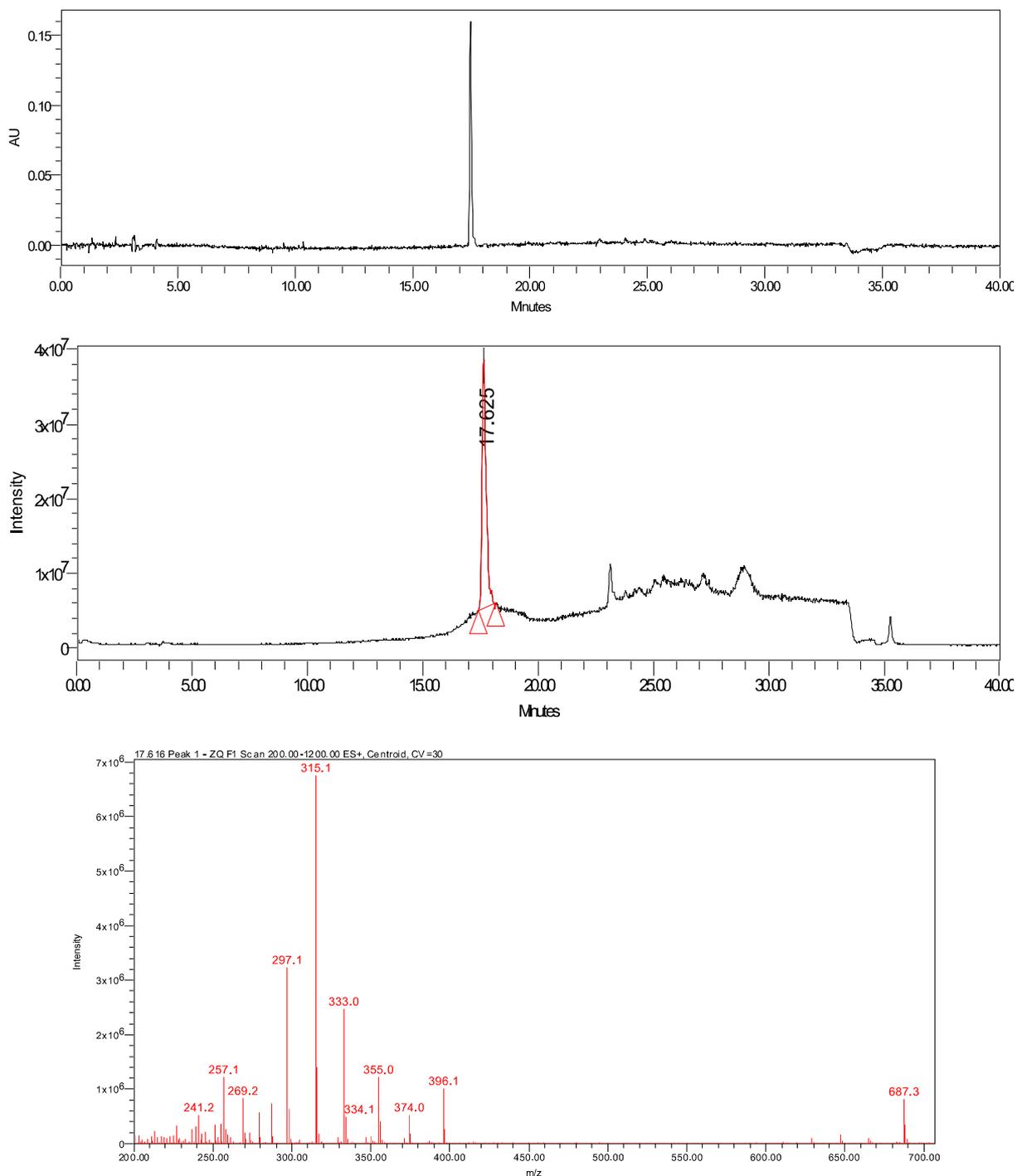
Após análise por HPLC-UV-MS, a fração D8-F234-E3-B foi submetida a mais uma etapa de fracionamento por HPLC-UV empregando-se a coluna analítica Kinetex® PFP (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). O modo de eluição foi isocrático com uma mistura de H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN (65:18:17), vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, durante 30 minutos. Foram obtidas 3 frações, nomeadas D8-F234-E3-B1 (3,3 mg), D8-F234-E3-B2 (2,5 mg) e D8-F234-E3-B3 (3,0 mg) e analisadas por HPLC-UV-MS, utilizando o mesmo procedimento descrito no item 3.1.1 e condição cromatográfica a mesma anteriormente aplicada com a coluna analítica Kinetex® PFP (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). As duas primeiras frações apresentaram grau de pureza satisfatório (Figura 26 e 27) e foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Os cromatogramas e espectros MS de alta resolução das amostras D8-F234-E3-B1 e D8-F234-E3-B2, bem como espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C encontram-se no apêndice.

Figura 26 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) (superior), detectado por MS (intermediário) e espectro de massas da fração D8-F234-E3-B1, após a separação por HPLC-UV.



No espectro de massas do pico detectado em  $t_R$  17.294 observam-se íons característicos de fomactinas observados em  $m/z$  301,1  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  319,1  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  341,1  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  659,3  $[2M+Na]^+$ .

Figura 27 – Cromatogramas no UV ( $\lambda = 254$  nm) (superior), MS (intermediário) e espectro de massas (inferior) da fração D8-F234-E3-B2, após a separação por HPLC-UV.

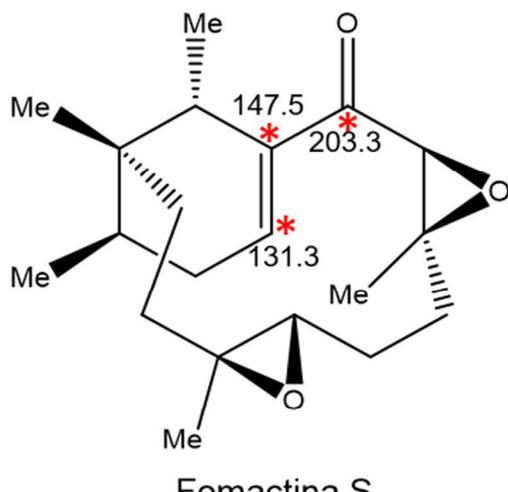


No espectro de massas do pico detectado em  $t_R$  17.616 observam-se íons característicos de fomactinas observados em  $m/z$  315,1  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  333,0  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  355,0  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  687,3  $[2M+Na]^+$ .

Uma vez que os compostos D8-F234-E3-B1 e D8-F234-E3-B2 apresentam massa acurada e fórmula molecular correspondentes à fomactinas conhecidas, os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN destes compostos foram comparados com os dados das fomactinas já relatadas na literatura. Para o primeiro composto, D8-F234-E3-B1, que possui  $m/z$  319,2269  $[M+H]^+$ , os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN foram comparados aos descritos na literatura para as fomactinas D, E, G, Q, S e V ( $C_{20}H_{30}O_3$ ). As fomactinas D, E e G, apresentam estruturas bem distintas das correspondentes aos sinais de  $^{13}C$  apresentados pelo composto D8-F234-E3-B1. Por isso, foram investigados apenas os isômeros de fomactinas Q, S e V.

Verificou-se na literatura que a fomactina S apresenta três sinais no espectro de RMN de  $^{13}C$  acima de 100 ppm, indicados na figura 28. (NICACIO, 2017) Esta informação é relevante, pois, conforme ilustrado na figura 28, o composto D8-F234-B1 apresenta cinco sinais na região de  $\delta$  100 ppm. Dessa forma, podemos descartar que a substância discutida seja a fomactina S.

Figura 28 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  do composto D8-F234-E3-B1 e fomactina S ambos em  $\text{MeOH-}d_4$  (150 MHz) (NICACIO, 2017).



D8-F234-E3-B1	Fomactina S
$\delta_c$	$\delta_c$
13.1	15.0
15.7	16.6
16.8	18.1
17.8	19.5
22.6	22.9
24.8	25.5
33.1	29.4
35.7	31.1
39.1	33.1
41.8	36.0
45.1	36.2
64.4	38.9
69.2	41.0
74.5	58.7
→ 124.6	62.5
→ 134.1	64.2
→ 141.4	68.6
→ 147.2	→ 131.3
→ 203.3	→ 147.5
	→ 203.3

Apesar das fomactinas Q e V nas figuras 29 e 30, apresentaram dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  semelhantes aos do composto D8-F234-E3-B1, observamos um sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  74,5 atribuído ao carbono ligado a hidroxila na fomactina Q e na fomactina V. Nestas duas substâncias os sinais destes carbonos são observados em  $\delta$  66,3 e em  $\delta$  71,7, respectivamente. Esta diferença de deslocamento químico para carbonos correlatos destas 3 fomactinas não é conclusiva para se estabelecer a identidade do composto D8-F234-E3-B1.

Figura 29 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  do composto D8-F234-E3-B1 (MeOH- $d_4$ ) e fomactina Q (DMSO- $d_6$ ) (150 MHz). (NICACIO, 2017).

	<b>D8-F234-E3-B1</b>	<b>Fomactina Q</b>
	$\delta_c$	$\delta_c$
	13.1	15.4
	15.7	16.6
	16.8	16.7
	17.8	20.0
	22.6	21.3
	24.8	22.7
	33.1	29.9
	35.7	30.1
	39.1	32.9
	41.8	34.3
	45.1	36.4
	64.4	40.8
	69.2	62.4
	→ 74.5	64.8
	124.6	→ 66.3
	134.1	127.7
	141.4	134.2
	147.2	137.6
	203.3	141.5
		202.0

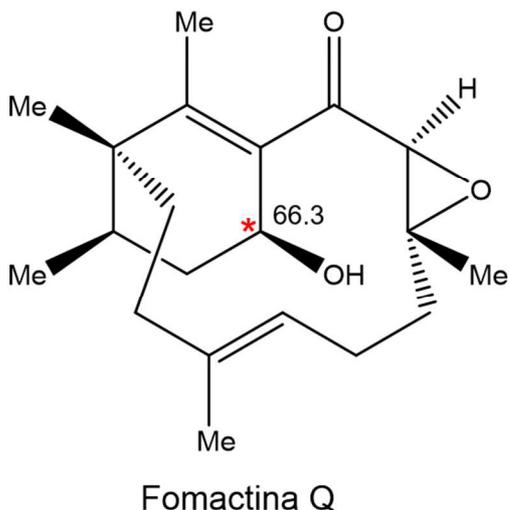
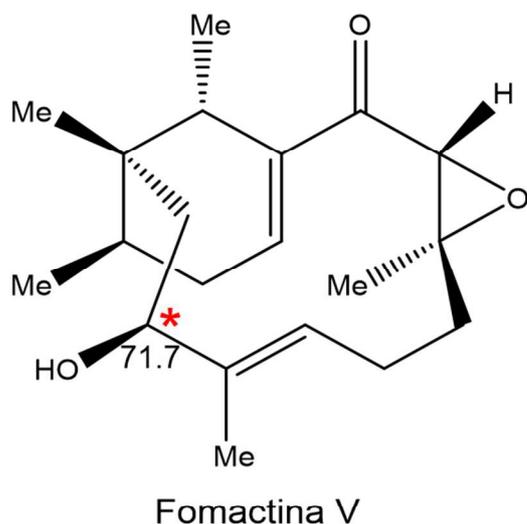


Figura 30 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  do composto D8-F234-E3-B1 (MeOH- $d_4$ ) e fomactina V (DMSO- $d_6$ ) (150 MHz). (NICACIO, 2017).

	D8-F234-E3-B1	Fomactina V
	$\delta_c$	$\delta_c$
	13.1	12.4
	15.7	15.0
	16.8	15.7
	17.8	17.0
	22.6	21.7
	24.8	23.1
	33.1	31.2
	35.7	33.8
	39.1	37.1
	41.8	37.2
	45.1	39.7
	64.4	43.9
	69.2	61.9
	→ 74.5	66.8
	124.6	→ 71.7
	134.1	121.5
	141.4	130.8
	147.2	140.4
	203.3	145.5
		200.1



Ademais, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra D8-F234-E3-B1 apresenta 19 sinais de carbono, enquanto que as fomactinas apresentam sinais de 20 carbonos. Possivelmente o sinal não observado está sobreposto pelo sinal do solvente (MeOH- $d_4$ ), que encontra-se entre  $\delta$  48,7 e 49,6 ppm.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra D8-F234-E3-B1, analisado em conjunto com o espectro bidimensional HSQC, apresentou sete sinais metilênicos com deslocamentos químicos em  $\delta$  1,17, 1,37, 1,90, 2,20, 2,32, 2,44 e 2,60, dois sinais atribuídos a hidrogênios metínicos em  $\delta$  1,48 e 2,58, dois sinais atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio em  $\delta$  3,90 e 4,44, dois sinais atribuídos a hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,89 e 6,85, cinco sinais atribuídos a hidrogênios de metilas em  $\delta$  0,96, 1,14, 1,20, 1,44 e 1,76. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra D8-F234-E3-B1 apresentou cinco sinais atribuídos a carbonos de metilas em  $\delta$  13,1, 15,6, 16,6,

17,8 e 22,6, quatro sinais atribuídos aos carbonos metilênicos em  $\delta$  24,8, 33,1, 39,1 e 45,1, dois sinais atribuídos aos carbonos metínicos em  $\delta$  35,7 e 41,8, dois sinais atribuídos aos carbonos metínicos substituído por oxigênio em  $\delta$  69,2 e 74,5, um sinal atribuído a carbono quaternário substituído por oxigênio em  $\delta$  64,4, um sinal atribuído a carbono quaternário em  $\delta$  39,1, quatro sinais atribuídos a carbonos vinílicos em  $\delta$  124,6, 134,1, 141,5 e 147,2 e por fim, um sinal atribuído a carbono de carbonila de cetona em  $\delta$  203,3.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais HSQC, COSY e HMBC permitiram atribuir a estrutura da fomactina V para o composto presente na amostra D8-F234-E3-B1. A figura 31 apresenta as correlações COSY e HMBC para a amostra D8-F234-E3-B1. O sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  39,1 foi atribuído a dois carbonos diferentes. A tabela 4 sumariza todos os valores de deslocamento químico observados nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para a amostra D8-F234-E3-B1.

Figura 31 – Correlações COSY e HMBC para a amostra D8-F234-E3-B1.

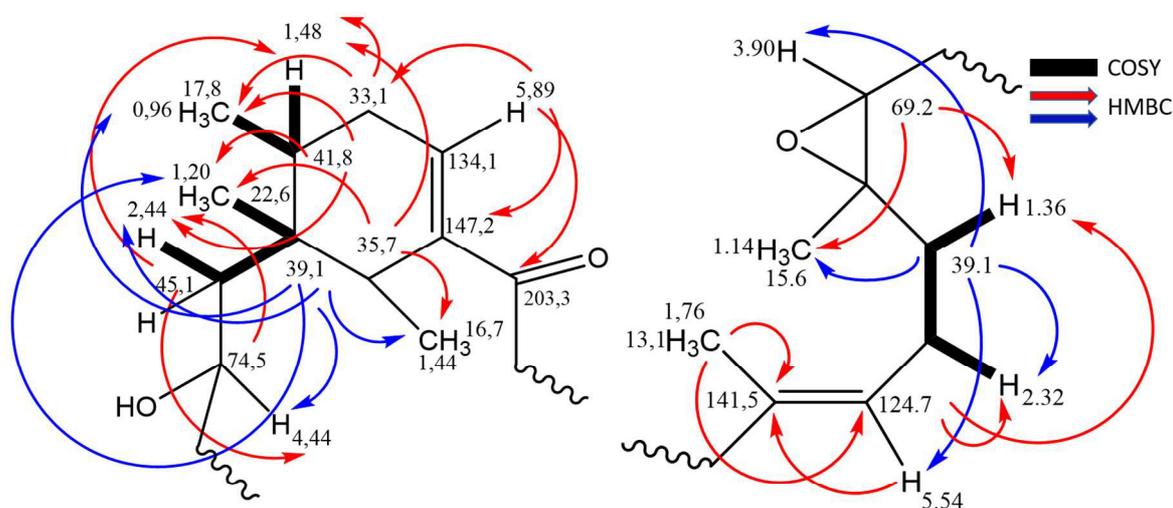
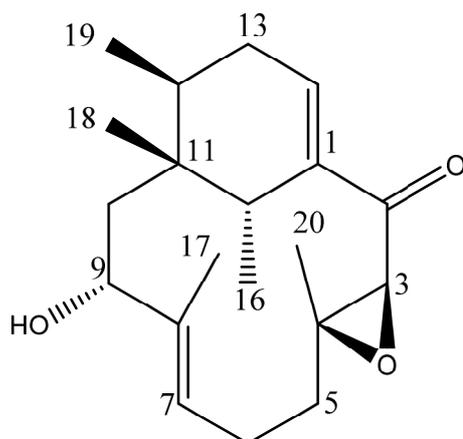


Figura 32 - Estrutura da fomactina V.

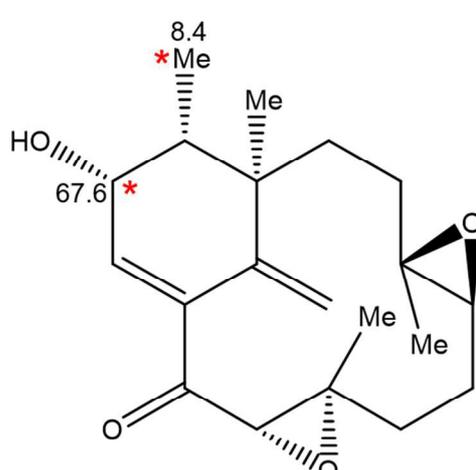
Tabela 4 – Dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $^1\text{H}$  600 MHz,  $^{13}\text{C}$  150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ) da amostra D8-F234-E3-B1.

<b>D8-F234-E3-B1</b>		
Posição	$\delta_{\text{C}}$ , tipo	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)
1	147,2, C	
2	203,3, C	
3	69,2, CH	3,90, s
4	64,4, C	
5	39,1, $\text{CH}_2$	1,37, m, 2,20, ddd (13,3, 13,4, 3,5)
6	24,8, $\text{CH}_2$	2,32, m
7	124,6, CH	6,85, dd (8,3, 6,9)
8	141,5, C	
9	74,5, CH	4,44, dd (4,4, 3,4)
10	45,1, $\text{CH}_2$	1,17, d (3,0), 2,44, q (15,3, 4,6)
11	39,1, C	
12	41,8, CH	1,48, t (6,8)
13	33,1, $\text{CH}_2$	1,90, dt (4,1, 2,7), 2,60, m
14	134,1, CH	5,89, dd (8,3, 6,9)
15	35,7, CH	2,58, m
16	16,6, $\text{CH}_3$	1,44, d (7,7)
17	13,1, $\text{CH}_3$	1,76, s
18	22,6, $\text{CH}_3$	1,20, s
19	17,8, $\text{CH}_3$	0,96, d (7,15)
20	15,6, $\text{CH}_3$	1,14, s

O composto D8-F234-E3-B2 apresentou íon protonado  $[M+H]^+$  em  $m/z$  333,2062. Seus dados de RMN de  $^1H$  e RMN de  $^{13}C$  foram analisados em comparação com os dados das fomactinas já relatadas na literatura de mesma fórmula molecular ( $C_{20}H_{28}O_4$ ), as fomactinas I, epi-I e L. A fomactina L apresentou sinais de  $^{13}C$  distintos dos apresentados pelo composto D8-F234-E3-B2. Por isso, foram comparados os dados de RMN- $^{13}C$  da amostra D8-F234-E3-B2 apenas com os dados dos isômeros I e epi-I.

Quando comparados com os dados de RMN de  $^{13}C$  da fomactina epi-I, os deslocamentos químicos da amostra D8-F234-E3-B2 apresentam diferença considerável em relação aos sinais de um dos grupos metila e um dos átomos de carbono substituído por oxigênio, conforme ilustrado na figura 33.

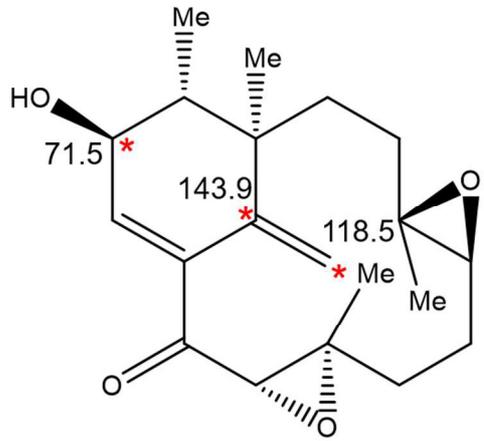
Figura 33 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de  $^{13}C$  do composto D8-F234-E3-B1 ( $MeOH-d_4$ ) e fomactina epi-I ( $CDCl_3$ ) (150 MHz) (ISHINO *et al.*, 2010).

	D8-F234-E3-B2	Fomactina epi-I
	$\delta_C$	$\delta_C$
 <p>Fomactina epi-I</p>	→ 14.2	→ 8.4
	16.0	13.6
	19.3	18.9
	22.3	22.1
	25.5	24.2
	29.5	26.3
	31.3	28.8
	36.6	35.5
	42.8	44.3
	46.8	45.8
	57.6	55.5
	61.0	59.1
	64.5	62.9
	66.0	64.7
	→ 72.2	→ 67.6
	119.1	117.5
	131.1	132.0
	143.1	142.7
	145.6	143.7
	201.9	198.2

Portanto, considerou-se que o composto D8-F234-E3-B2 não fosse a fomactina epi-I.

Por outro lado, os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra D8-F234-E3-B2 são bastante similares aos da fomactina I (Figura 34).

Figura 34 – Estrutura e tabela demonstrando os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  do composto D8-F234-E3-B2 (MeOH- $d_4$ ) e fomactina I (CDCl $_3$ ) (150 MHz). (ISHINO *et al.*, 2010)



D8-F234-E3-B2	Fomactina I
$\delta_c$	$\delta_c$
14.2	13.8
16.0	15.5
19.3	19.1
22.3	21.5
25.5	24.4
29.5	28.3
31.3	30.3
36.6	35.7
42.8	41.5
46.8	46.1
57.6	55.7
61.0	58.9
64.5	63.2
66.0	64.4
→ 72.2	→ 71.5
→ 119.1	→ 118.5
131.1	129.5
143.1	141.8
→ 145.6	→ 143.9
201.9	199.5

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra D8-F234-E3-B2 foi analisado em conjunto com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e HSQC. Verificou-se a presença de oito grupos metilênicos em  $\delta$  1,12, 1,17, 1,52, 1,67, 1,87, 2,07, 2,20 e 2,24, um sinal atribuído a hidrogênio metínico em  $\delta$  1,75, três sinais atribuídos a hidrogênios metínicos próximos a oxigênio em  $\delta$  4,04, 3,97 e 3,03, três sinais atribuídos a hidrogênios vinílicos em  $\delta$  5,88, 5,36 e 5,29 e quatro sinais atribuídos a hidrogênios

de metilas em  $\delta$  0,83, 1,12, 1,30 e 1,33 e um sinal atribuído a hidrogênio de hidroxila em  $\delta$  4,90.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da amostra D8-F234-E3-B2 apresentou sinais de carbonos de metilas em  $\delta$  14,2, 16,3, 19,5,5 e 22,5, sinais de carbonos metilênicos em  $\delta$  25,6, 29,4, 31,5 e 36,7, um sinal de carbono metínico em  $\delta$  46,8, três sinais de carbonos metínicos substituídos por oxigênio em  $\delta$  72,4, 66,1 e 57,8, dois sinais de carbonos quaternários substituídos por oxigênio em  $\delta$  64,6 e 61,1, um sinal atribuído a carbono quaternário em  $\delta$  43,0, quatro sinais de carbonos vinílicos em  $\delta$  119,3, 131,2, 143,3 e 145,8 e um sinal de carbono de carbonila de cetona em  $\delta$  202,1.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais HSQC, COSY e HMBC permitiram identificar a amostra D8-F234-E3-B2 como sendo a fomactina I. A figura 35 apresenta correlações COSY e HMBC observadas nos espectros deste composto. A tabela 5 sumariza os valores de deslocamento químico da amostra D8-F234-E3-B2.



Tabela 5 - Dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $^1\text{H}$  600 MHz,  $^{13}\text{C}$  150 MHz, MeOH,  $d_4$ ) da amostra D8-F234-E3-B2.

<b>D8-F234-E3-B2</b>		
Posição	$\delta_{\text{C}}$ , tipo	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)
1	145,8, C	
2	202,1, C	
3	66,1, CH	3,97, s
4	64,6, C	
5	36,7, CH <sub>2</sub>	1,17, m, 2,24, m
6	25,6, CH <sub>2</sub>	1,52, m, 2,20 m
7	57,8, CH	3,03, dd (6,8, 10,8)
8	61,1, C	
9	31,5, CH <sub>2</sub>	1,67, q (7,5), 2,07, m
10	29,4, CH <sub>2</sub>	1,12, m, 1,87, q (7,4)
11	43,0, C	
12	46,8, CH	1,75, dd (14,5, 7,4)
13	72,4, CH	4,04, d (4,4)
14	131,2, CH	5,88, m
15	143,3, C	
16	119,3, CH <sub>2</sub>	5,29, s, 5,36, d (1,6)
17	19,5, CH <sub>3</sub>	1,30, s
18	22,5, CH <sub>3</sub>	1,12, s
19	16,3, CH <sub>3</sub>	0,83, d (7,4)
20	14,2, CH <sub>3</sub>	1,33, s
13-OH		4,90, s

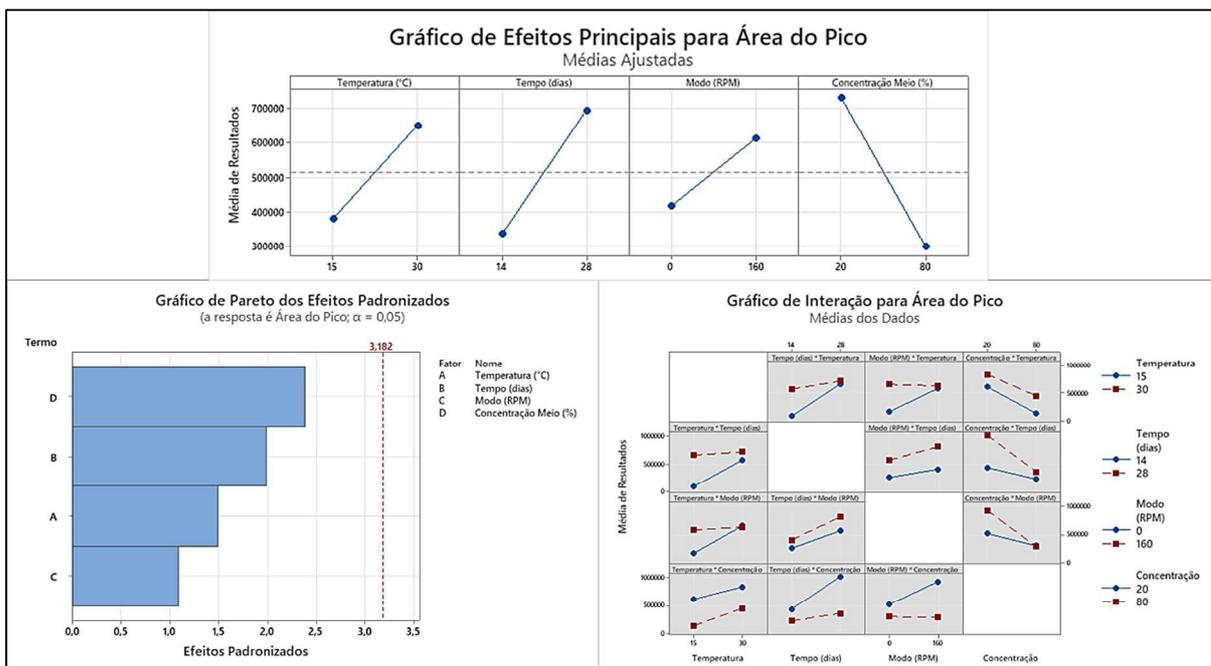
#### 4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO (PFF)

A avaliação do planejamento fatorial fracionário com a finalidade de incrementar a produção de fomactinas pelo fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 foi realizada segundo as condições experimentais descritas na seção 3.5. Todos os experimentos foram realizados em replicatas técnicas e biológicas. Foram também realizados experimentos com brancos do meio de cultivo. Todas as replicatas foram analisadas por UPLC-HRMS de forma aleatória para minimizar possíveis erros amostrais.

Para o planejamento fatorial fracionário foi utilizado o software Minitab Statistical. Foram aplicados critérios específicos (intervalo de tempo de retenção e massa) para a classe de fomactinas analisadas dos extratos dos meios de cultivo dos diferentes experimentos, utilizando-se como variáveis resposta as áreas dos picos cromatográficos, o número de picos cromatográficos e massa dos extratos para cada experimento realizado.

A figura 37 mostra a obtenção de três gráficos para a variável “área do pico cromatográfico”, sendo o primeiro o gráfico de efeito principais para a área do pico cromatográfico, com o qual analisam-se as variáveis testadas de forma independente. A partir da figura 37, observa-se que os melhores parâmetros individuais para a resposta área do pico cromatográfico seriam temperatura de crescimento a 30 °C, o tempo de crescimento 28 dias, modo de crescimento com agitação e concentração do meio de cultivo 20%. Com o gráfico de Pareto, podemos observar quais efeitos de forma individual são mais relevantes para a resposta máxima área do pico cromatográfico para um intervalo de confiança de 95%. Verificou-se que, para um intervalo de confiança de 95%, nenhum dos parâmetros tem maior relevância para a obtenção da resposta máxima. Já com relação às outras variáveis, a variável “concentração de nutrientes do meio de cultivo” é a mais significativa. Para o terceiro gráfico, foram observadas todas as interações entre as variáveis temperatura, tempo de crescimento, modo e concentração do meio. Analisando-se o gráfico, não foi observada nenhuma interação entre as variáveis, ou seja, nenhuma variável tem influência estatística sobre outra.

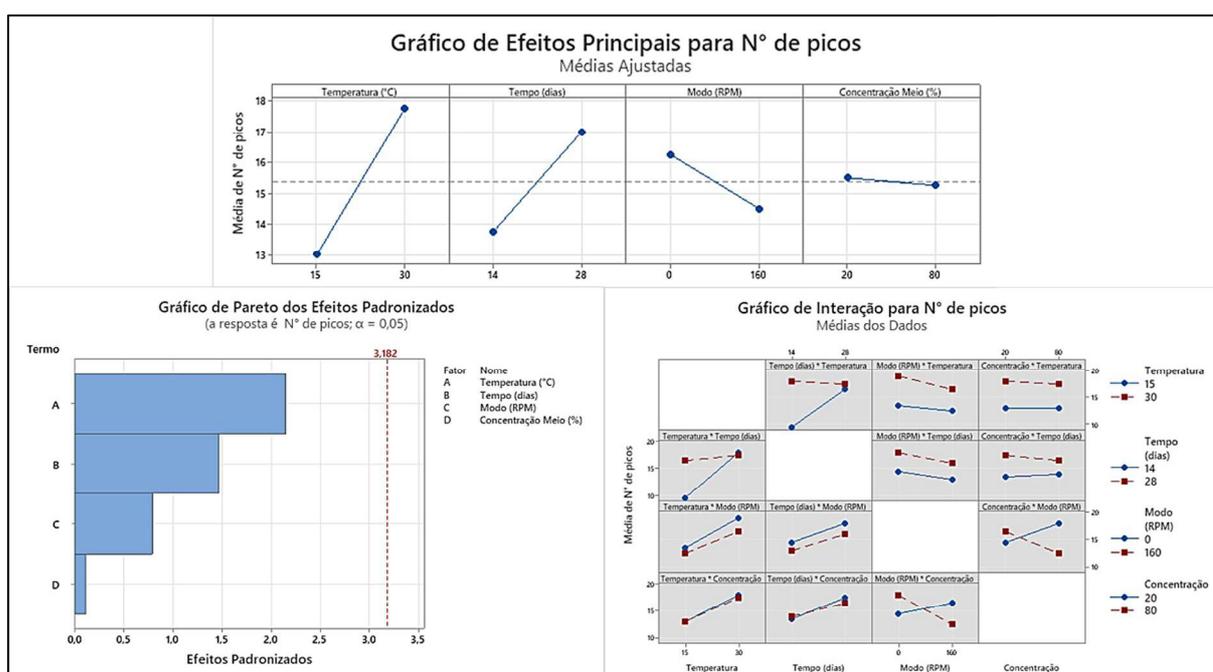
Figura 37 – Gráficos de efeitos principais obtidos para variável resposta “área do pico cromatográfico”. Gráfico de linha sobre os parâmetros de maneira individual (superior), gráfico de pareto sobre os parâmetros de maneira individual (esquerda) e gráfico da interação entre dois parâmetros (direita).



A segunda variável resposta avaliada, ilustrada na figura 38, foi “número de picos cromatográficos”. Para o primeiro gráfico de efeitos principais, verificou-se para obtenção de resposta máxima (maior número de picos cromatográficos) os parâmetros: temperatura de 30 °C, tempo de crescimento de 28 dias, sem agitação e concentração de 20% do meio de cultivo, este último sendo uma diferença mínima entre os meios. Já para o gráfico de Pareto, para um intervalo de confiança de 95%, nenhum dos parâmetros influencia diretamente na resposta número de picos cromatográficos. Porém, novamente o fator “concentração dos nutrientes do meio de cultivo” mostra-se significativo quando comparado aos outros parâmetros. Para o último gráfico, observamos que os fatores “modo de crescimento” (com ou sem agitação) *versus* “concentração do meio de cultivo” influenciam entre si para a obtenção da resposta número de picos. Quando o experimento é realizado com os parâmetros “concentração dos nutrientes do meio de cultivo” a 20% e com agitação, observamos um maior número de picos cromatográficos, da mesma forma quando o experimento foi realizado com “concentração dos nutrientes do meio de cultivo” a 80%

e modo estático. Desta forma, os parâmetros “modo de crescimento” e “concentração dos nutrientes do meio de cultivo” são dependentes entre si, levando-se em consideração como resposta o número de picos cromatográficos observados nas análises por UPLC-HRMS das frações AcOEt dos experimentos de PFF realizados com a linhagem *Biatriospora* sp. CBMAI 1333.

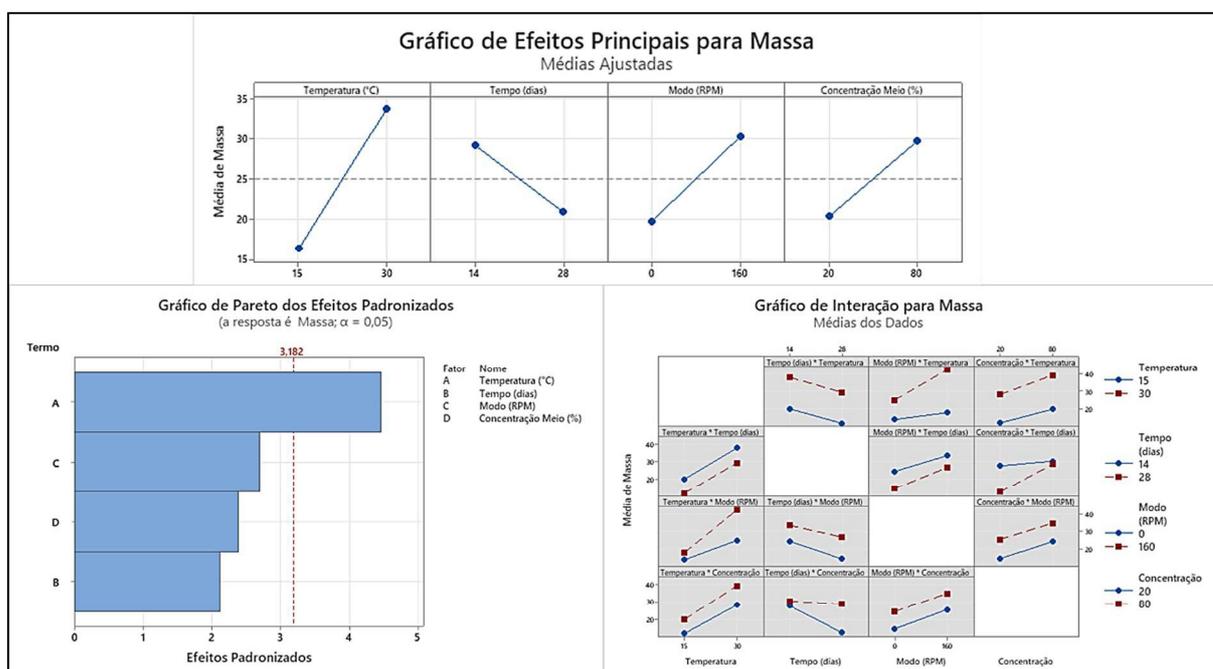
Figura 38 - Gráficos de efeitos principais obtidos para variável resposta “número de picos cromatográficos”. Gráfico de linha sobre os parâmetros de maneira individual (superior), gráfico de pareto sobre os parâmetros de maneira individual (esquerda) e gráfico da interação entre dois parâmetros (direita).



A última variável resposta a ser analisada foi “massa dos extratos obtida” dos diferentes experimentos de crescimento, conforme indicado na figura 39. Para o gráfico de efeitos principais, obteve-se resposta máxima com os valores de temperatura de 30 °C, tempo de crescimento de 14 dias, modo de crescimento com agitação e concentração dos nutrientes do meio de cultivo de 80%. Já para o gráfico de pareto, observamos uma diferença quanto as respostas anteriores: a temperatura mostrou ser o parâmetro mais importante, em um intervalo de 95% de confiança, na obtenção da resposta máxima para massa do extrato. Para o último gráfico, de

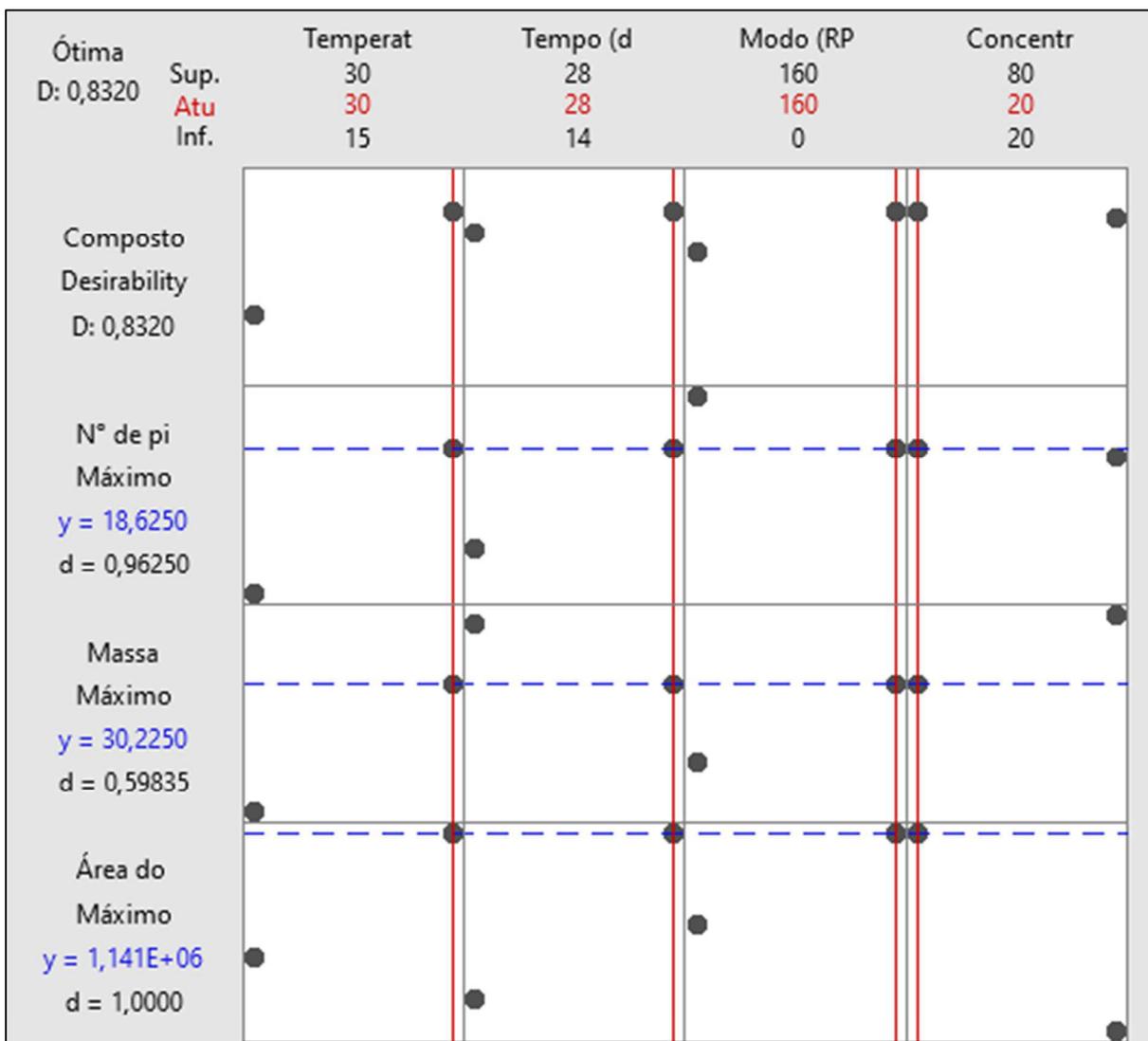
interação entre as variáveis, observamos que nenhuma das variáveis tem influência estatística em outra variável.

Figura 39 - Gráficos de efeitos principais obtidos para variável resposta “massa do extrato obtida”. Gráfico de linha sobre os parâmetros de maneira individual (superior), gráfico de Pareto sobre os parâmetros de maneira individual (esquerda) e gráfico da interação entre dois parâmetros (direita).



As análises indicaram desejabilidades individuais para cada resposta, ou seja, a melhor condição para uma resposta específica. Porém, deve-se trabalhar com o valor de desejabilidade global, o qual leva em consideração todas as desejabilidades individuais para cada resposta, obtendo-se uma resposta global para a melhor condição de crescimento, avaliando-se em conjunto as respostas “área do pico cromatográfico”, “números de picos cromatográficos” e “massa do extrato obtida”. A desejabilidade global (figura 40) teve como valor máximo de 0,8320, para um valor máximo de 1,0000. Este valor levou em consideração todas as desejabilidades individuais otimizadas para cada resposta, tendo como condição de crescimento otimizada os seguintes parâmetros: temperatura de crescimento de 30 °C, tempo de crescimento de 28 dias, modo de crescimento com agitação e concentração dos nutrientes do meio de cultivo de 20%.

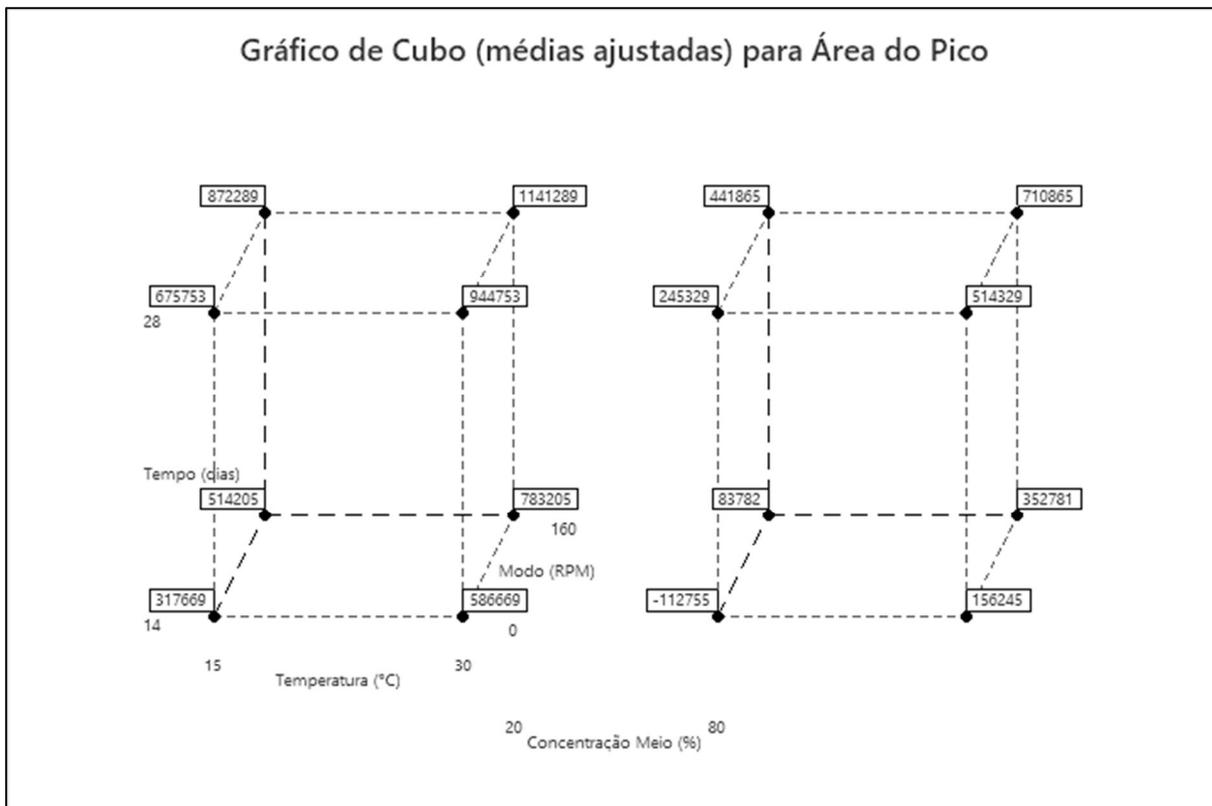
Figura 40 – Gráfico das desejabilidades individuais e global para o experimento otimizado.



A condição de experimento otimizado obtido a partir dos experimentos de PFF e análise dos dados obtidos não foi nenhuma condição dentre os experimentos realizados para o planejamento fatorial fracionário.

Na figura 41 observamos um gráfico de cubo representando uma predição estatística para a variável resposta área do pico. Esta predição leva em consideração todos os 16 experimentos possíveis. Dessa forma, obteve-se o maior valor predito na condição otimizada, sendo temperatura 30 °C, Tempo de crescimento 28 dias, crescimento com agitação a 160 rpm e concentração do meio de cultivo 20%, podendo-se concluir que a condição otimizada é estatisticamente a melhor condição de crescimento para o incremento na produção de fomactinas.

Figura 41 – Gráfico de cubo representando uma predição estatística para todos os experimentos de PFF realizados com a linhagem *Biatriospora* sp. CBMAI 1333, tendo como resposta a área total dos picos cromatográficos de fomactinas observados por UPLC-HRMS.

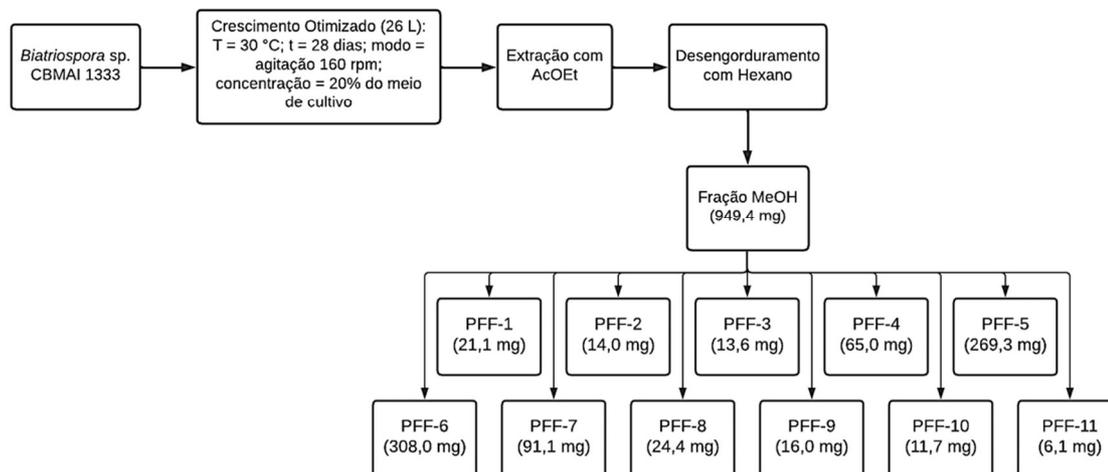


#### 4.5 CULTIVO OTIMIZADO DA LINHAGEM FÚNGICA *Biatriospora* sp. E AVALIAÇÃO METABÓLICA EMPREGANDO-SE FBMN

Uma vez estabelecida a condição otimizada de crescimento da linhagem *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 para a produção de fomactinas, foi realizado um crescimento utilizando esta condição, determinada pelo planejamento fatorial fracionado. O crescimento foi realizado em 26 L do meio de cultivo mínimo (MM) na concentração 20% dos nutrientes com relação à receita original de preparação do meio. O crescimento e obtenção do extrato do meio de cultura foram realizados conforme descrito nos itens 3.2.1 e 3.6.1. Foram obtidos 949,4 mg da fração MeOH do extrato AcEOt desengordurado do meio de cultivo. Esta fração MeOH foi submetida a um fracionamento utilizando-se coluna pré-empacotada com fase estacionária C18 (SPE-C18) e eluída com gradiente de 10% MeOH:H<sub>2</sub>O. Foram coletadas 11 frações,

nomeadas PFF-1 a PFF-11. Na figura 42 são apresentados o rendimento de cada uma das frações obtidas.

Figura 42 – Fluxograma completo do crescimento e separação da fração MeOH (PFF) por coluna pré-empacotada com fase estacionária C18 (SPE-C18).



Após o fracionamento, com o intuito de isolar fomactinas inéditas e já tendo realizado um crescimento totalmente direcionado para este objetivo, foi utilizada a ferramenta *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN), a qual possibilitou realizar o processamento detalhado dos dados etapa a etapa, uma estratégia metabolômica totalmente direcionada desde o crescimento do microrganismo até a análise dos dados e isolamento.

A rede molecular foi construída com os parâmetros descritos na seção 3.6.2 utilizando-se 4 grupos, sendo eles: grupo 1 = frações obtidas do extrato; grupo 2 = padrões das fomactinas R, P, Q, S, V, I, A, F e U; grupo 3 = branco do meio de cultivo; grupo 4 = brancos analíticos. As figuras 43 e 44 destacam a rede molecular completa e dois clusters relevantes para a análise.

Figura 43 – Rede molecular total obtida do crescimento otimizado de *Biatrospora* sp. CBMAI 1333.

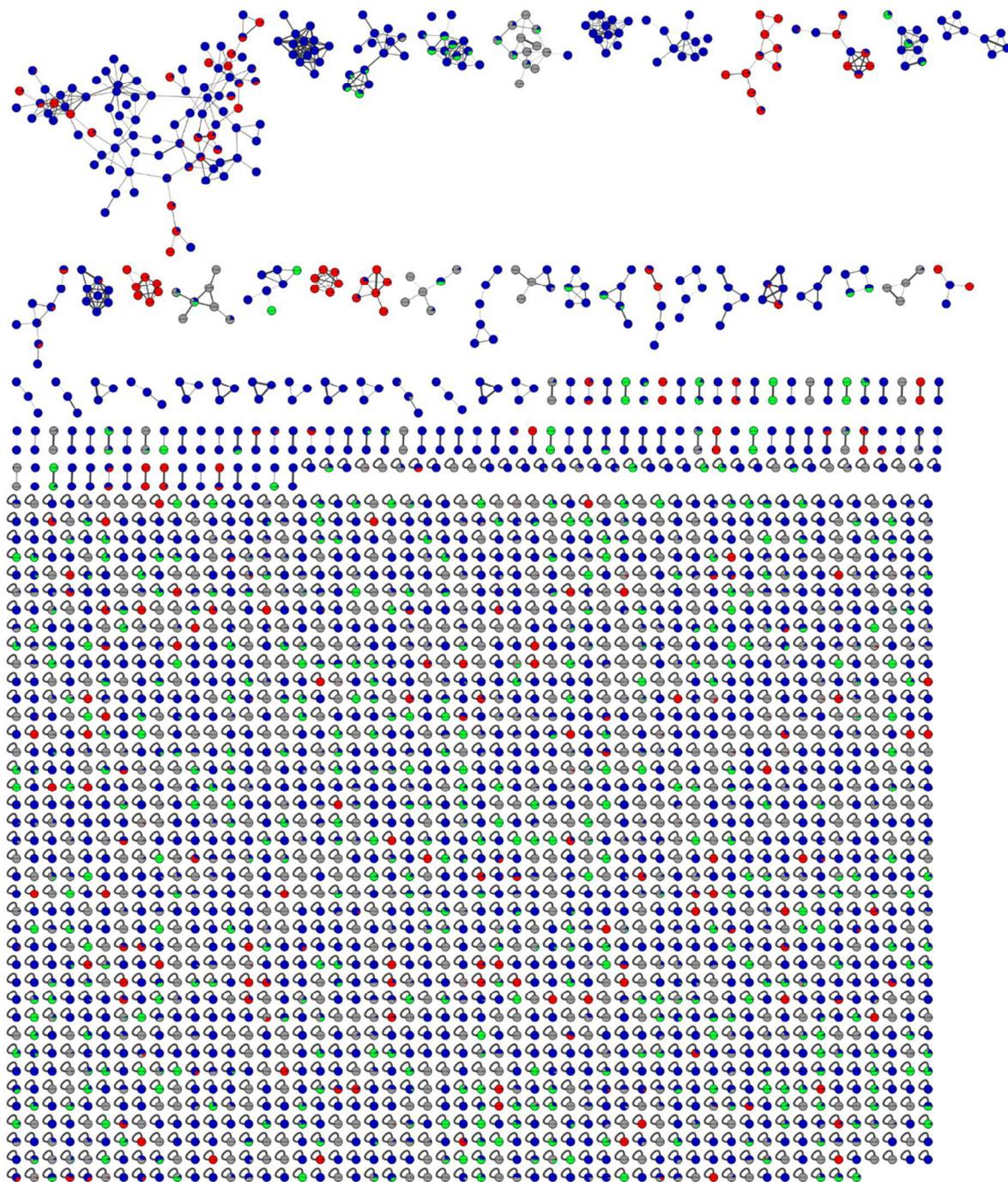
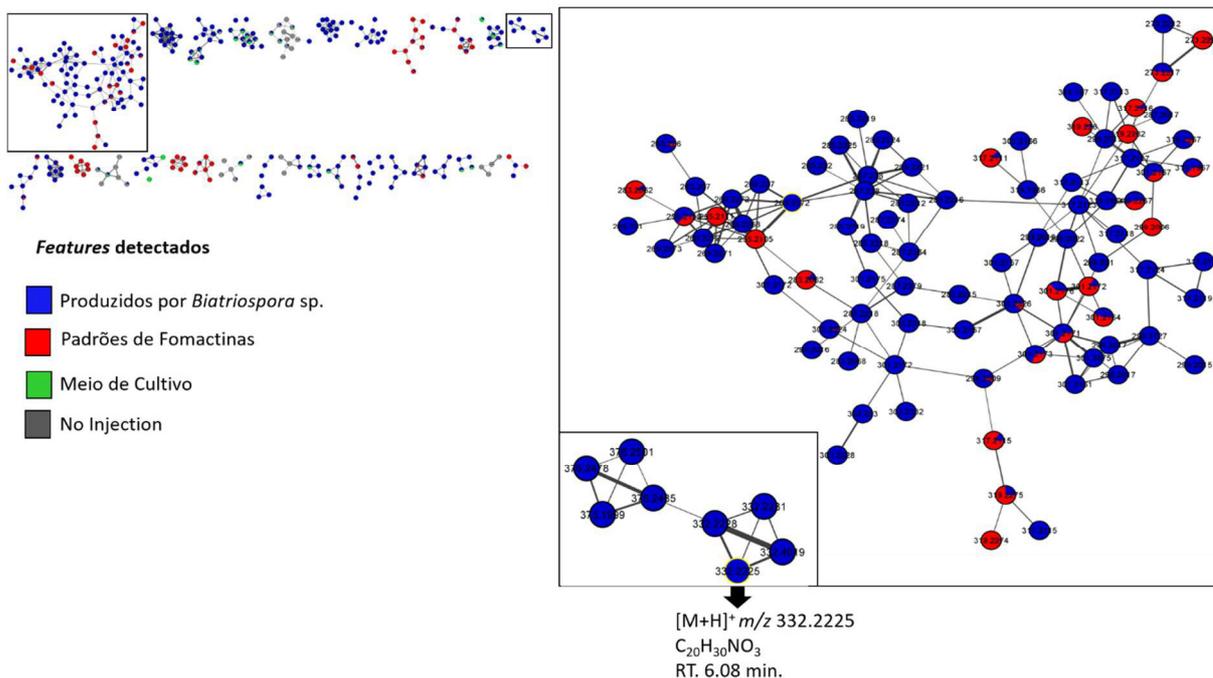
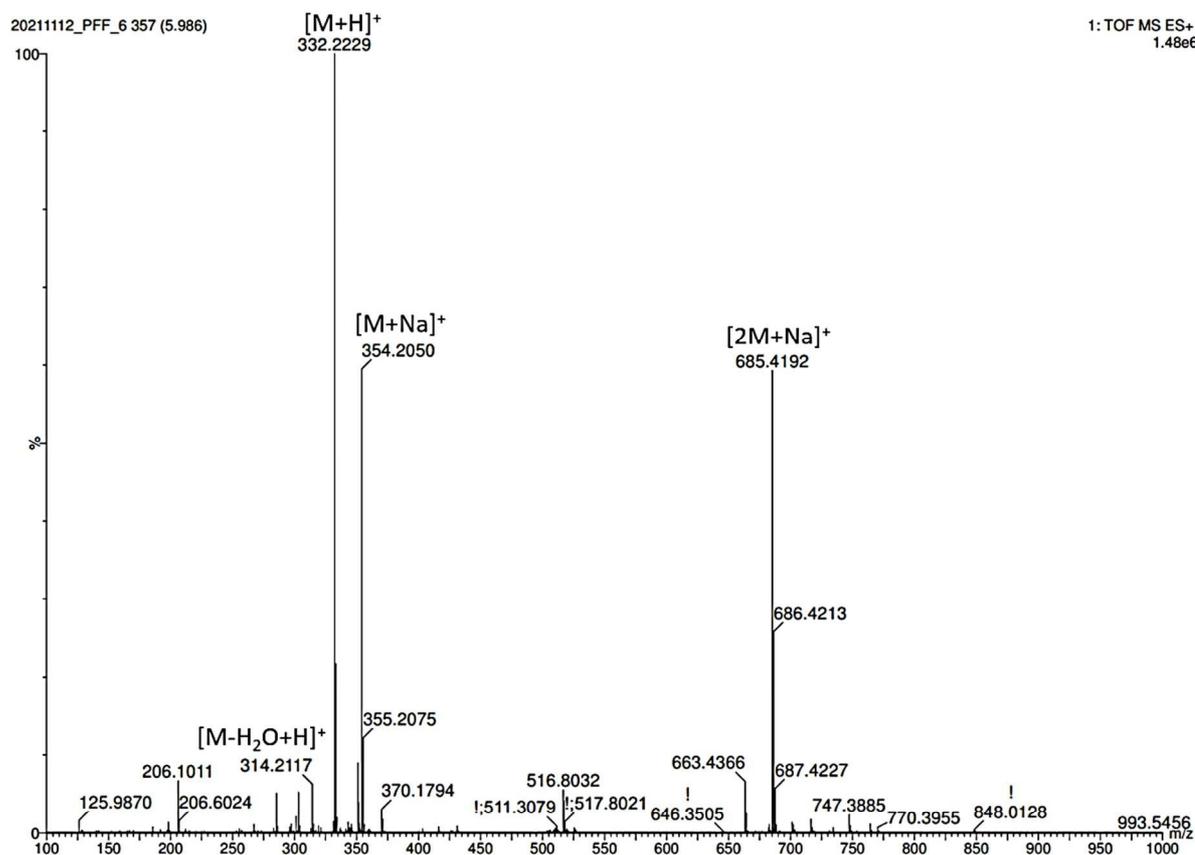


Figura 44 – Zoom de dois clusters destacados da rede molecular completa.



Na figura 44, podemos destacar o *cluster* maior como sendo o principal *cluster* no que se refere à semelhança espectral entre fomactinas produzidas no extrato estudado (nodos azuis) e padrões de fomactinas (nodos vermelhos). Contudo, como existem fomactinas para as quais não existiam padrões, focalizou-se a análise dos *clusters* em que não eram encontrados padrões de fomactinas (*clusters* que não apresentavam nodos na cor vermelha). Esta estratégia nos levou a um pequeno *cluster* de 8 nodos, constituído apenas de *features* provenientes do crescimento do microrganismo. Após a análise deste *cluster*, foram observados alguns pontos importantes, como: a) em qual fração estes *features* foram observados (fração PFF-6); e b) qual o tempo de retenção dos sinais de UPLC-HRMS de fomactinas potencialmente inéditas (aproximadamente 6,0 min.). Analisando-se o espectro de massas da figura 45, constatou-se que as fragmentações observadas eram bem semelhantes à de outras fomactinas, observando-se íons  $[-H_2O+M+H]^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[2M+Na]^+$ . Além disso, destaca-se a observação do íon protonado  $[M+H]^+$  em  $m/z$  332, indicando uma possível presença de nitrogênio na molécula, que seria totalmente inédita.

Figura 45 – Espectro de massas do composto  $m/z$  332,2229  $[M+H]^+$ , detectado na fração PFF-6.



A partir desta análise criteriosa, prosseguiu-se com o isolamento do composto que apresentou o íon  $[M+H]^+$   $m/z$  332, detectado na fração PFF-6 (308,0 mg).

A fração PFF-6 (308,0 mg) foi fracionada por HPLC-UV em coluna semipreparativa InertSil Phenyl (10 x 250 mm, id. 5 $\mu$ m), eluída com (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH e (C) MeCN, vazão de 3 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição empregado foi de 50 a 20% de A, 30 a 60% de B e sempre 20% de C em 40 minutos, monitoramento em  $\lambda_{\max}$  = 254 nm e 287 nm. As figuras 46 e 47 apresentam o cromatograma resultante da análise e Fluxograma de separação da fração PFF-6 por HPLC-UV, respectivamente.

Figura 46 - Cromatograma de separação da fração PFF-6, monitorado nos comprimentos de onda de 254 nm (azul) e 287 nm (preto).

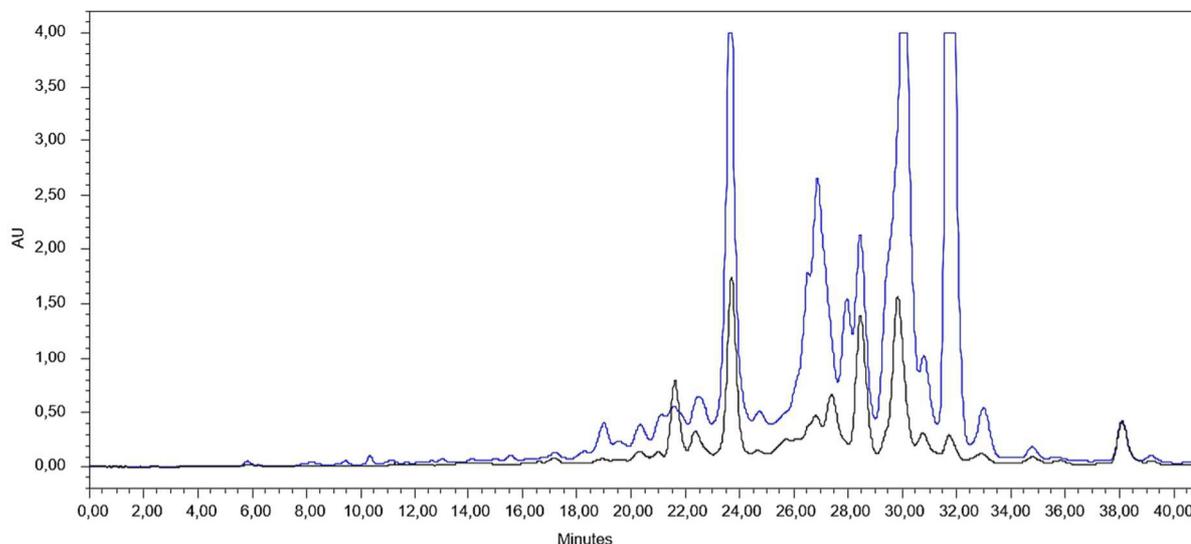
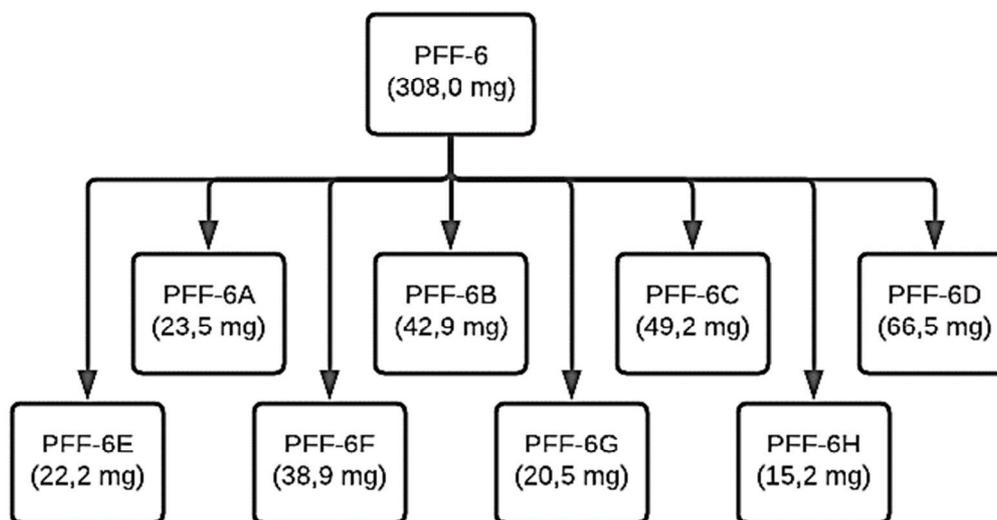
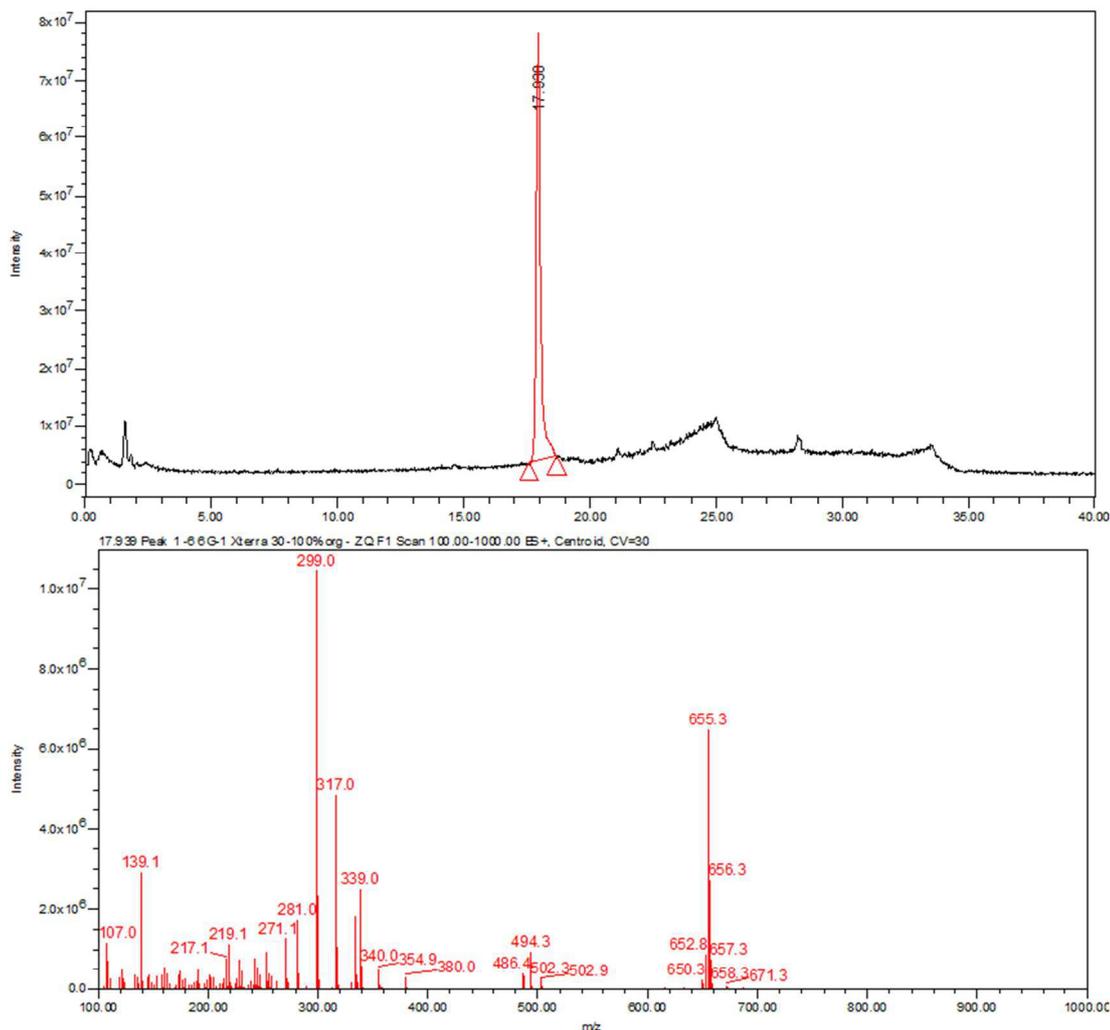


Figura 47 – Fluxograma de separação da fração PFF-6 por HPLC-UV.



A sub-fração PFF-6G (20,5 mg) foi posteriormente fracionada por HPLC-UV em coluna semipreparativa Waters XTerra C18 (10 x 250 mm, id. 5 $\mu$ m), eluída com (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH e (C) MeCN, vazão de 2,5 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição empregado foi de 50 a 0% de A, 25 a 50% de B e C (1:1) em 30 minutos, monitoramento em  $\lambda_{\text{max}} = 254$  nm. A figura 48 representa o cromatograma e espectro de massas de baixa resolução da sub-fração PFF-6G1 (4,0 mg).

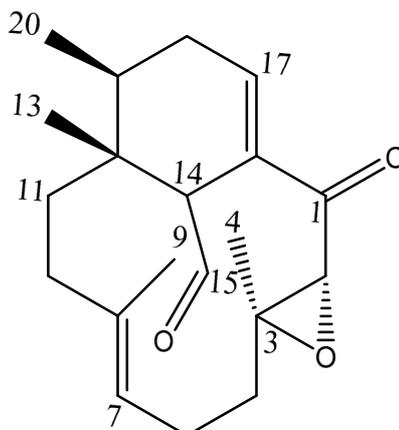
Figura 48 – Cromatograma e espectro de massas da fração PFF-6G1 após a separação por HPLC-UV.



O composto isolado da amostra PFF-6G1 foi submetida a análises de ressonância magnética nuclear (RMN), sendo identificada como a fomactina C (massa molecular 316,2038). Esta é uma fomactina já conhecida na literatura, porém ainda não havia sido reportada como sendo produzida pela linhagem fúngica *Biatrispora* sp., apenas pelo fungo *Phoma* sp. (SUGANO *et al.*, 1994)

Na figura 49, observa-se a tabela com os deslocamentos químicos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, além da estrutura da fomactina C.

Figura 49 – Estrutura e tabela com os deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da fomactina C isolada pela linhagem fúngica *Biatrospora* sp.

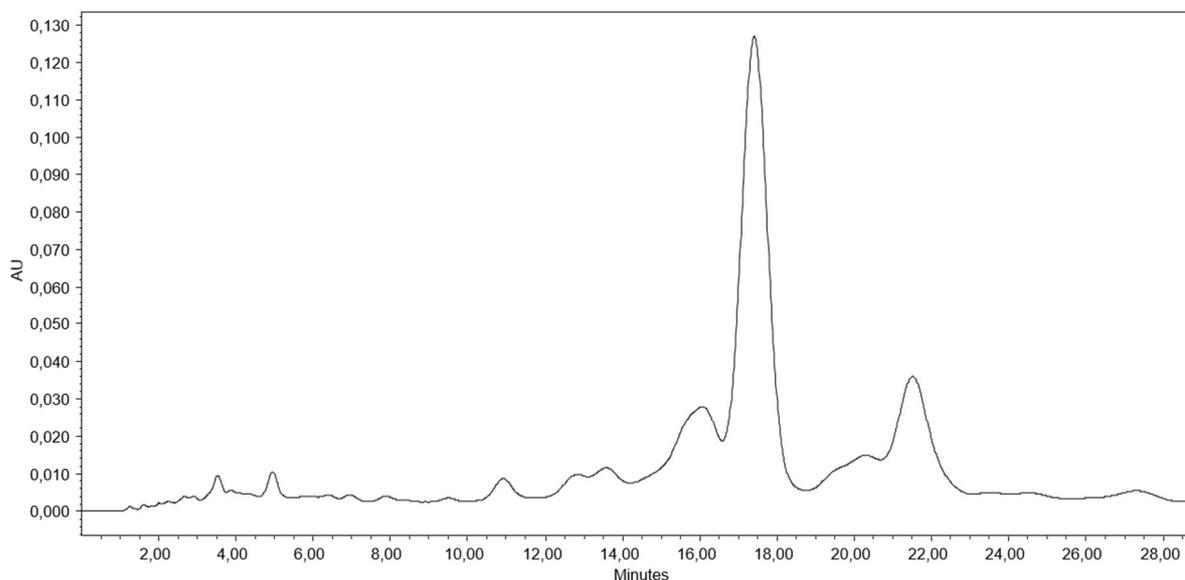


**PFF-6G1**

Posição	$\delta\text{C}$ , tipo	$\delta\text{H}$ (J em Hz)
1	193,5, C	
2	62,6, CH	3,62, s
3	62,5, C	
4	14,0, CH <sub>3</sub>	0,93, s
5	37,2, CH <sub>2</sub>	1,17, m; 2,05, m
6	24,3, CH <sub>2</sub>	2,01, m; 2,25, m
7	124,7, CH	5,45, d (11,4)
8	136,7, C	
9	15,5, CH <sub>3</sub>	1,51, s
10	34,1, CH <sub>2</sub>	1,67, m; 2,39, m
11	34,0, CH <sub>2</sub>	1,14, m; 2,14, m
12	39,5, C	
13	21,2, CH <sub>3</sub>	1,41, s
14	50,9, CH	3,86, s
15	205,7, CH	9,90, s
16	134,2, C	
17	135,1, CH	6,60, m
18	30,4, CH <sub>2</sub>	1,94, m; 2,57, m
19	35,5, CH	1,48, s
20	16,4, CH <sub>3</sub>	0,67, d (6,9)

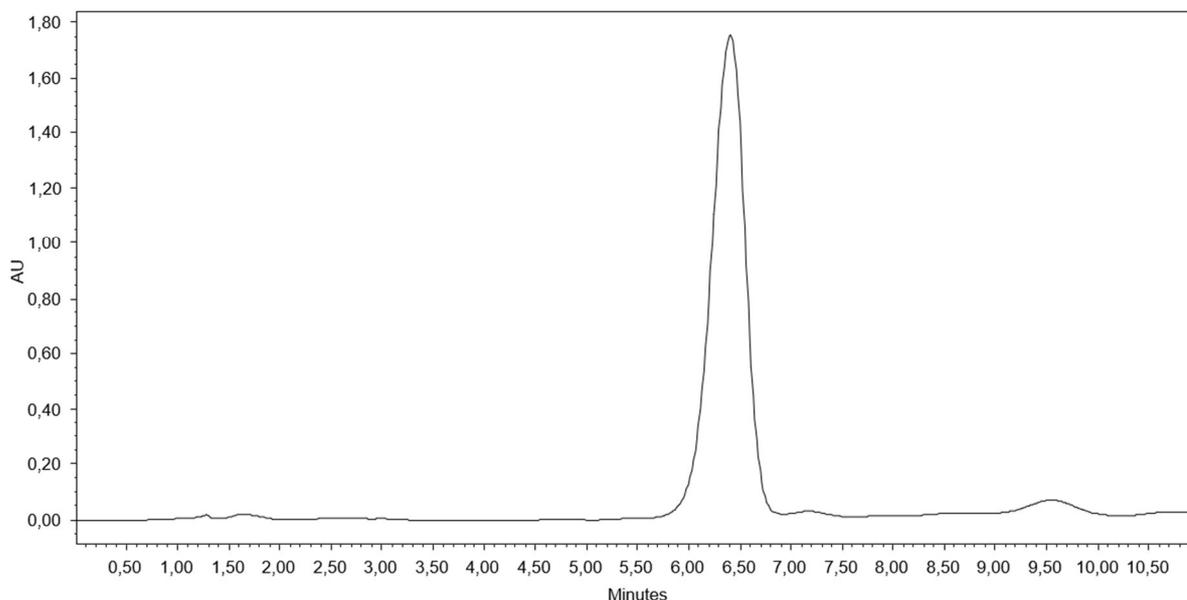
Posteriormente, a sub-fração PFF-6C foi analisada por HPLC-UV-MS, tendo sido selecionada pelo estudo anterior de FBMN para o isolamento da possível fomactina nitrogenada inédita, que apresentou íon  $[M+H]^+$   $m/z$  332. A sub-fração PFF-6C foi fracionada por HPLC-UV em coluna semipreparativa Waters XTerra C18 (7,8 x 150 mm, id. 5 $\mu$ m), eluída com (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeOH e (C) MeCN, vazão de 2,5 mL min<sup>-1</sup>. Empregou-se uma eluição em modo isocrático de 20% de A, 20% de B e 60% de C durante 28 minutos, monitoramento em  $\lambda_{\max}$  = 254 nm. A figura 50 representa o cromatograma da sub-fração PFF-6C (49,2 mg).

Figura 50 – Cromatograma da sub-fração PFF-6C por HPLC-UV.



Após este primeiro fracionamento, a substância que deu origem ao pico majoritário do cromatograma da figura 50 resultou em uma fração semi-pura codificada como PFF-6C1 (6,7 mg). Esta fração, foi submetida a mais uma etapa de purificação por HPLC-UV utilizando uma coluna semipreparativa Waters XTerra C18 (7,8 x 150 mm, id. 5 $\mu$ m), eluída com (A) H<sub>2</sub>O, (B) MeCN, vazão de 2,5 mL min<sup>-1</sup>. Empregou-se uma eluição em modo isocrático de 63% de A e 37% de B por 30 minutos, monitoramento em  $\lambda_{\max}$  = 254 nm, obtendo-se assim a fomactina de interesse PFF-6C1a (3,0 mg, RT = 6,4 min.) com elevado grau de pureza, conforme figura 51.

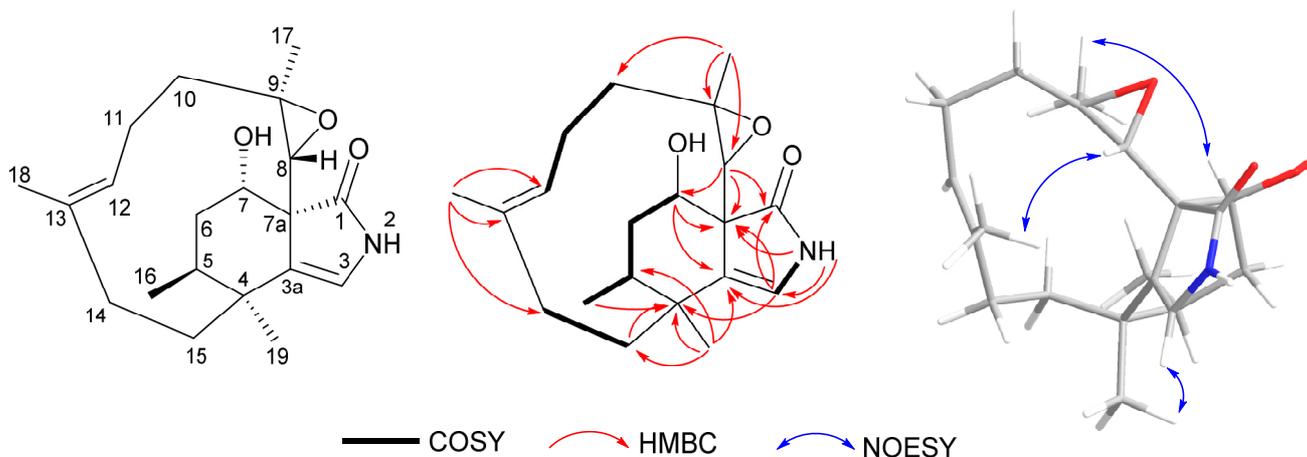
Figura 51 – Cromatograma da sub-fração PFF-6C1a por HPLC-UV.



A fórmula molecular do composto presente na fração PFF-6C1a foi estabelecida por HRMS como sendo  $C_{20}H_{29}NO_3$  ( $m/z$  322,2217  $[M+H]^+$ , calculado para  $C_{20}H_{30}NO_3$ , 322,2220). A análise conjunta com os dados espectroscópicos de RMN indicou sete índices de deficiência de hidrogênio. O espectro no UV da amostra PFF-6C1a apresentou máximos de absorção em  $\lambda_{max}$  213 e 265 nm. O espectro no IV apresentou bandas de absorção em 3329, 3227, 2928, 1697 e 1684  $cm^{-1}$ , indicando a presença de grupos hidroxí, carbonila de amida e dupla ligação (ver espectros no apêndice).

Na figura 52, são evidenciadas correlações importantes segundo a análise dos dados de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e HSQC: um grupo oximetínico em  $\delta_H$  4,75 ( $\delta_C$  62,5), dois hidrogênios metínicos olefínicos em  $\delta_H$  5,05 ( $\delta_C$  127,2) e em  $\delta_H$  6,73 ( $\delta_C$  126,6), e uma metila atribuída a um grupo oxirano em  $\delta_H$  2,78 ( $\delta_C$  68,0). Vários grupos metileno e metila com multiplicidades de segunda ordem foram observados entre  $\delta_H$  1,53 e  $\delta_H$  2,20, além de quatro grupos metila em  $\delta_H$  0,92 ( $\delta_C$  16,0),  $\delta_H$  1,23 ( $\delta_C$  27,1),  $\delta_H$  1,43 ( $\delta_C$  20,1) e  $\delta_H$  1,54 ( $\delta_C$  15,9), bem como um hidrogênio desblindado em  $\delta_H$  10,41 (1H, br s).

Figura 52 – Correlações COSY e HMBC, e interações NOESY para a fomactina inédita isolada da fração PFF-6C1, designada fomactinina (PFF-6C1a).



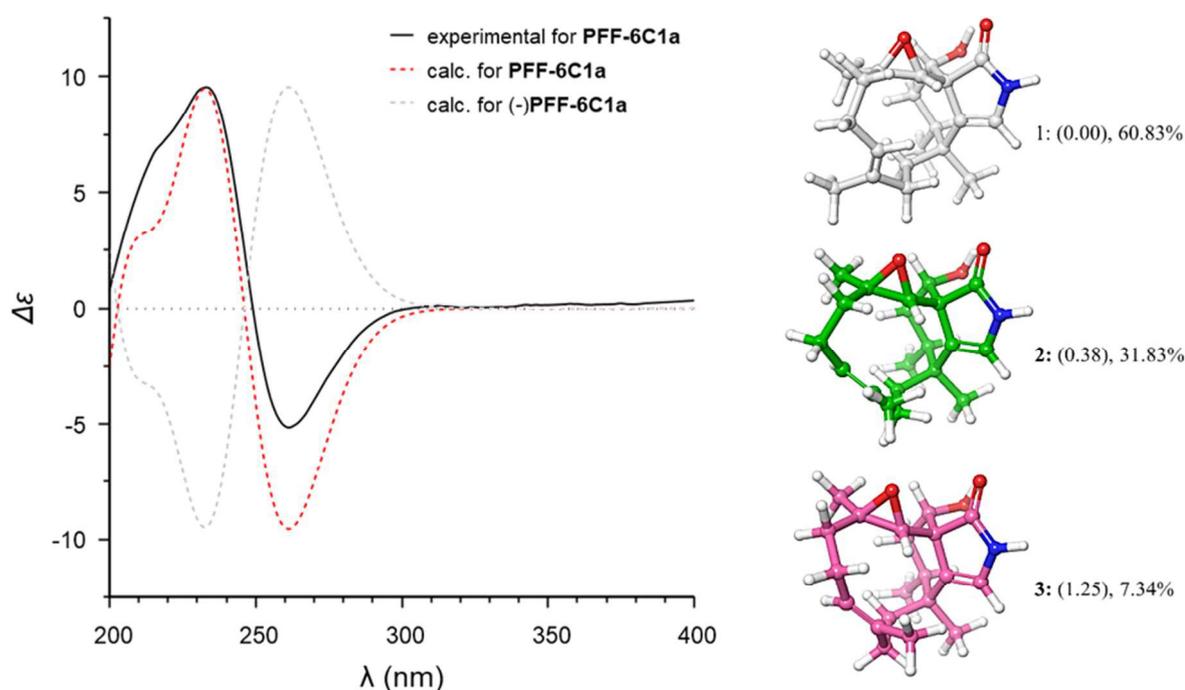
Os espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPT exibiram vinte ressonâncias de carbono, incluindo dois carbonos olefinicos e doze carbonos alifáticos e seis carbonos quaternários, incluindo um grupo carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  182,3. A análise conjunta dos espectros COSY e HMBC indicou correlações entre  $\text{H}_3\text{-16}/\text{H-5}/\text{H}_2\text{-6}/\text{H-7}$  e entre  $\text{H-3}/\text{H-2}$ , juntamente com correlações de HMBC de  $\text{H-7}$  a  $\text{C-7a}$  e  $\text{C-3a}$ , de  $\text{H-3}$  a  $\text{C-7a}$ ,  $\text{C-4}$ ,  $\text{C-1}$ , de  $\text{H}_3\text{-16}$  a  $\text{C-4}$ , de  $\text{H-2}$  a  $\text{C-3a}$ ,  $\text{C-3}$  e  $\text{C-7a}$ , e de  $\text{H}_3\text{-19}$  a  $\text{C-4}$ ,  $\text{C-5}$  e  $\text{C-3a}$ . Estas correlações permitiram estabelecer a estrutura parcial 7-hidroxi-4,5-dimetil-2,4,5,6,7,7a-hexa-hidro-1*H*-isoindol-1-ona. Correlações HMBC adicionais observadas de  $\text{H}_3\text{-18}$  a  $\text{C-12}$ ,  $\text{C-13}$  e  $\text{C-14}$ , de  $\text{H}_3\text{-17}$  a  $\text{C-8}$ ,  $\text{C-9}$  e  $\text{C-10}$ , juntamente com os sistemas spin  $\text{H}_2\text{-14}/\text{H}_2\text{-15}$  e  $\text{H}_2\text{-10}/\text{H}_2\text{-11}/\text{H-12}$  no espectro COSY, demonstraram a presença de uma porção macrocíclica. O macrociclo foi definido observando-se as correlações HMBC de  $\text{H}_2\text{-15}$  para  $\text{C-4}$  e  $\text{C-3a}$ , de  $\text{H}_3\text{-19}$  para  $\text{C-15}$  e de  $\text{H-8}$  para  $\text{C-1}$ ,  $\text{C-7}$  e  $\text{C-7a}$ , estabelecendo-se a conectividade da cadeia macrocíclica com a fração 7-hidroxi-4,5-dimetil-2,4,5,6,7,7a-hexahidro-1*H*-isoindol-1-ona através de  $\text{C-7a}/\text{C-8}$  e  $\text{C-15}/\text{C-4}$  conexões. A configuração relativa da fomactinina nitrogenada foi estabelecida pela análise do seu espectro NOESY. Importantes NOEs foram observados entre  $\text{H}_3\text{-19}$  e  $\text{H-3}$ , entre  $\text{H-8}$  e  $\text{H}_3\text{-18}$ , bem como entre  $\text{H-7}$  e  $\text{H}_3\text{-17}$ , permitindo estabelecer a configuração relativa como  $4\text{S}^*$ ,  $5\text{S}^*$ ,  $7\text{S}^*$ ,  $7\text{aR}^*$ ,  $8\text{R}^*$ ,  $9\text{R}^*$ . Todos os deslocamentos químicos discutidos estão representados na tabela 6.

Tabela 6 – Deslocamentos químicos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a fomactina inédita isolada.

<b>PFF-6C1a</b>		
<b>Posição</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (J em Hz)</b>	<b><math>\delta_{\text{C}}</math></b>
1	-	182.3
3	6.73 (1H, d 2,0)	126.6
3a	-	129.1
4	-	38.8
5	2.03 (1H, m)	32.0
6	1.75 (1H, m)	39.0
	2.19 (1H, m)	
7	4.75 (1H, d 8,0)	62.5
7a	-	59.7
8	2.78 (1H, s)	68.0
9	-	62.0
10	1.53 (1H)	39.7
	1.87 (1H, dt 13,7 e 6,2)	
11	1.94 (2H, m)	23.8
12	5.05 (1H, t 6,9)	127.2
13	-	135.2
14	1.79 (2H, m)	36.8
15	2.14 (1H, m)	37.0
	2.20 (1H, m)	
16	0.92 (3H, d 6,7)	16.0
17	1.43 (3H, s)	20.1
18	1.54 (3H, br s)	15.9
19	1.23 (3H, s)	27.1
2-NH	10.41 (1H, br s)	-

Com a estrutura relativa da fomactina inédita estabelecida devido a análise dos experimentos realizados de ressonância magnética nuclear (RMN), finalizou-se a elucidação com a determinação da configuração absoluta da molécula, conforme figura 53. Com cálculos químicos quânticos utilizando-se gaussiano 09 (FRISCH *et al.*, 2009), sendo estes realizados pelo Prof. Tiago Antunes Paz (Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araraquara).

Figura 53 – Comparações entre o espectro experimental da ECD e espectros calculados para PFF-6C1a.



(Esquerda) Comparação entre o espectro experimental da ECD de PFF-6C1a (100  $\mu\text{g/mL}$ ; MeCN) (linha preta) e os espectros calculados da PFF-6C1a (linha pontilhada vermelha) e (-)-PFF-6C1a (linha pontilhada cinza). (À direita) Estruturas tridimensionais computadas, energias livres de Gibbs relativos (entre parênteses, kcal mol<sup>-1</sup>) e Boltzmann (%) do mais baixo conformador de energia da PFF-6C1a.

Vários alunos do grupo de pesquisa do Prof. Berlinck contribuíram para o entendimento da utilização de técnicas estatísticas como planejamento fatorial, aplicadas à otimização do crescimento de microrganismos buscando incremento na produção de metabólitos secundários. O primeiro estudo do grupo com a aplicação de PFF foi do Dr. Eli F. Pimenta, que buscou a obtenção de condições otimizadas de cultivo para os microrganismos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum*. Neste

estudo, utilizou-se PFF com a realização de 16 experimentos, utilizando-se como parâmetros de crescimento: porcentagem de sal, porcentagem de nutrientes, tempo de incubação, pH e temperatura e como variável resposta obtendo-se a razão entre área do pico cromatográfico e massa da fração, com os cromatogramas adquiridos no HPLC-UV. (PIMENTA *et al.*, 2010)

O Dr. Marcos V. de Castro realizou PFF para a linhagem *Penicillium* sp. para o incremento da produção de compostos da classe das curvularinas, utilizando-se a mesma metodologia do estudo anterior com a mudança de alguns parâmetros no crescimento, porém como variável resposta aplicou-se apenas a área do pico cromatográfico, realizando-se um cálculo de desejabilidade individual e global, que é um valor que vai de 0 (condição indesejada) a 1 (condição ótima) levando em consideração um resultado para todos os parâmetros estudados e calculando uma média final para cada experimento. Com este cálculo, tem-se uma resposta bem significativa em termos estatísticos com relação a condição de crescimento otimizada (CASTRO *et al.*, 2016).

O último estudo realizado no grupo com PFF foi com o Dr. Éverton L. Ferreira, aplicando-se a mesma metodologia e análise de dados citada no trabalho anterior com a Dra. Laura Pavan Lôca. Neste estudo teve-se como objetivo a otimização da produção da linhagem fúngica *Rousoella* sp., finalizando-se com o isolamento do composto inédito roussoellatídeo (FERREIRA *et al.*, 2015).

Por fim, neste estudo com o crescimento otimizado da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. em conjunto com análise de dados utilizando-se a ferramenta FBMN, obteve-se um isolamento totalmente direcionado, com uma metodologia totalmente nova e eficaz para o incremento e isolamento de metabólitos secundários minoritários. Inicialmente, o PFF foi totalmente construído com o auxílio do software *Minitab Statistical*, visando o incremento na produção de fomactinas inéditas e aplicando-se para análise estatísticas: 8 experimentos em triplicata, três variáveis resposta (área do pico cromatográfico, n° de picos cromatográficos e massa do extrato), as quais obtiveram três tipos de gráficos e ainda análises de desejabilidades individuais e globais para cada experimento, sendo a análise instrumental realizada em um UPLC-QToF-MS. Após a obtenção da condição otimizada, realizou-se o crescimento de *Biatriospora* sp. buscando o incremento da produção de fomactinas minoritárias e buscava-se realizar um isolamento totalmente direcionado para uma nova fomactina.

Dessa forma, utilizou-se a ferramenta FBMN, a qual já havia sido empregada no grupo para o isolamento de alcaloides bromopirrólicos da esponja marinha *Agelas dispar* (FREIRE *et al.*, 2022). Com a aplicação desta ferramenta, obteve-se uma rede molecular excelente, sendo possível diferenciar claramente clusters de padrões das fomactinas e clusters os quais apresentavam apenas compostos produzidos pela linhagem fúngica. Além disso, a rede molecular apresentou uma quantidade pequena de compostos oriundos do meio de cultivo, evidenciando que, apesar dos 949,4 mg adquiridos em 26 L de crescimento, grande parte dessa massa era correspondente a compostos produzidos pela linhagem *Biatriospora* sp. e não do meio de cultura. Com a análise detalhada da rede molecular foi possível verificar um *cluster* com apenas *features* produzidos por *Biatriospora* sp. e um íon  $[M+H]^+$  em  $m/z$  332,2225. Após a análise, confirmou-se a fração onde se encontrava, tempo de retenção e se esta substância era conhecida na literatura. O isolamento direcionado da substância com  $[M+H]^+$  em  $m/z$  332,2225 e sua completa elucidação estrutural levou à obtenção da primeira fomactina nitrogenada, concluindo-se o objetivo inicial da metodologia, que foi o incremento da produção de fomactinas minoritárias. O sucesso desta metodologia resulta de ampla utilização de técnicas de quimiometria e metabolômica, obtendo-se um procedimento refinado com base em ferramentas atuais para o incremento de metabólitos secundários minoritários e isolamento direcionado de novos produtos naturais.

## 5 CONCLUSÃO

Neste estudo combinou-se metabolômica ao método clássico de isolamento de produtos naturais para a investigação da produção de fomactinas inéditas e análogos pela linhagem fúngica *Biatriospora* sp. CBMAI 1333. Com o objetivo de se obter uma maior diversidade e rendimento em massa de fomactinas, diversos meios de cultivo e condições de crescimento foram avaliados. As amostras obtidas em testes iniciais foram analisadas por UPLC-HRMS e os resultados foram avaliados empregando-se redes moleculares na plataforma GNPS. A utilização dessa abordagem permitiu a identificação de fomactinas e análogos com base em semelhanças espectrais. Os dados foram visualizados utilizando-se o software Gephi, proporcionando uma fácil avaliação da diversidade de compostos produzidos pela linhagem fúngica nas diferentes condições e meios de cultivo avaliados. Para análise dos rendimentos em massa relativos às fomactinas, empregou-se a plataforma XCMS. A análise de componentes principais (PCA), análises pareadas e meta-análises permitiram a comparação de forma estatística entre 5 meios de cultura: M2, M3, MM, GPY e PDB. Foram observadas semelhanças e diferenças na produção de compostos pela linhagem fúngica entre todos os meios de cultura. Utilizando-se o meio de cultura M2 como controle, comparou-se os meios de cultivo dois a dois, o que permitiu evidenciar que o crescimento do fungo no meio de cultura MM apresentou maior diversidade na produção de fomactinas, além de ser um meio de cultivo de composição bem distinta do meio de cultura M2, empregado anteriormente no isolamento das fomactinas. Dessa forma, o meio de cultivo mínimo (MM) foi selecionado como o meio de cultura mais promissor para o crescimento da linhagem fúngica em escala ampliada. O extrato de meio de cultura foi submetido a diversas etapas de separação cromatográfica e análises por ressonância magnética nuclear (RMN), resultando no isolamento das fomactinas V e I.

Com o intuito de se incrementar o rendimento da produção de fomactinas e análogos, empregou-se um planejamento fatorial fracionado (PFF). Os resultados do PFF foram obtidos através de análises utilizando o software *Minitab Statistical*. Concluiu-se que para as respostas área do pico cromatográfico, números de picos cromatográficos e massa do extrato, a condição otimizada de crescimento para um incremento na produção de fomactinas foi a seguinte: temperatura de 30°C, 28 dias

de crescimento, modo com agitação (160 rpm) e concentração do meio mínimo de cultivo 20%. Um crescimento em condições otimizadas da linhagem fúngica *Biatriospora* sp. foi realizado segundo o planejamento fatorial fracionado. O extrato AcOEt desengordurado (fração MeOH) deste crescimento foi avaliado utilizando-se a estratégia de *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN), a qual permitiu uma análise criteriosa de todas as frações obtidas para o isolamento de duas substâncias, uma delas a fomactina C, já conhecida, porém ainda não havia sido isolada do meio de crescimento do fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333. Utilizando-se as condições otimizadas de crescimento foi possível obter fração apresentando uma fomactina totalmente inédita (PFF-6C1a, designada fomactinina) de massa 332,2217 Da, sendo este composto o primeiro análogo nitrogenado de fomactinas a ser descrito na literatura.

Portanto, a utilização de diversas técnicas e ferramentas para análise de dados como redes moleculares, XCMS, Minitab, passando por diversos cultivos da linhagem e estudos criteriosos para o incremento na produção e isolamento de fomactinas, foi possível se realizar uma investigação detalhada do metaboloma do fungo *Biatriospora* sp. CBMAI 1333 em diferentes condições de cultivo. Esta estratégia permitiu o isolamento da primeira fomactina nitrogenada. Desta forma, foi possível estabelecer uma valiosa estratégia para o incremento da produção e isolamento de novos metabólitos secundários, combinando-se planejamento fatorial e FBMN, sendo possível a aplicação desta metodologia a diversos outros estudos com finalidades semelhantes.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, S. ; ADHOLEYA, A. ; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Marine fungi: an untapped bioresource for future cosmeceuticals. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 23, n. nov. 2017, p. 15–20, 2018. DOI: 10.1016/j.phytol.2017.11.003.
- BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An open source software for exploring and manipulating networks. In **Third International ICWSW Conference**, p. 361–362, 2009.  
Disponível em: <https://ojs.aaai.org/index.php/ICWSM/article/view/13937> Acesso em: 07/07/2022.
- BROWN, M.; DUNN, W. B.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R.; HANDL, J.; KNOWLES, J. D.; O'HAGAN, S.; SPASIĆ, I.; KELL, D. B. A metabolome pipeline: from concept to data to knowledge. **Metabolomics**, New York: v. 1, n. 1, p. 39–51, 2005. DOI: 10.1007/s11306-005-1106-4.
- DE CASTRO, M. V., IOCA, L. P., WILLIAMS, D. E., COSTA, B. Z., MIZUNO, C. M., SANTOS, M. F., BERLINCK, R. G Condensation of macrocyclic polyketides produced by penicillium sp. drf2 with mercaptopyruvate represents a new fungal detoxification pathway. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 79, n. 6, p. 1668–1678, 2016. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00295.
- DEMARQUE, D. P.; DUSI, R. G.; DE SOUSA, F. D. M.; GROSSI, S. M.; SILVÉRIO, M. R. S.; LOPES, N. P.; ESPINDOLA, L. S. Mass spectrometry-based metabolomics approach in the isolation of bioactive natural products. **Scientific Reports**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-58046-y.
- FERREIRA, E. L., WILLIAMS, D. E., IOCA, L. P., MORAIS-URANO, R. P., SANTOS, M. F., PATRICK, B. O., BERLINCK, R. G. Structure and biogenesis of roussoellatide, a dichlorinated polyketide from the marine-derived fungus roussoella sp. dlm33. **Organic Letters**, Washington, v. 17, n. 21, p. 5152–5155, 2015. DOI: 10.1021/acs.orglett.5b02060.
- FREIRE, V. F., GUBIANI, J. R., SPENCER, T. M., HAJDU, E., FERREIRA, A. G., FERREIRA, D. A., BERLINCK, R. G Feature-based molecular networking discovery of bromopyrrole alkaloids from the marine sponge agelas dispar. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 85, n.5, p. , 1340-1350., 2022. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.2c00094.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCHIAN, H. P.; ORTIZ, J. V.; IZMAYLOV, A. F.; SONNENBERG, J. L.; WILLIAMS-YOUNG, D.; DING, F.; LIPPARINI, F.; EGIDI, F.; GOINGS, J.; PENG, B.; PETRONE, A.; HENDERSON, T.; RANASINGHE, D.; ZAKRZEWSKI, V. G.; GAO, J.; REGA, N.; ZHENG, G.; LIANG, W.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; THROSSELL, K.; MONTGOMERY, J. A. PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KEITH, T.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; ADAMO, C.; CAMMI, R.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; FARKAS, O.; FORESMAN, J. B.; FOX, D. J. **Gaussian 09. Revision A.02**. Wallingford: Gaussian, Inc., 2009.

GOLDRING, W. P. D.; PATTENDEN, G. The phomactins. a novel group of terpenoid platelet activating factor antagonists related biogenetically to the taxanes. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 39, n. 5, p. 354–361, 2006. DOI: 10.1021/ar050186c.

HANKE, W., PATT, J., ALENFELDER, J., *et al.* Feature-based molecular networking for the targeted identification of gq-inhibiting fr900359 derivatives. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 84, n. 7, p. 1941–1953, 2021. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.1c00194.

ISHINO, M.; KAMAUCHI, H.; TAKATORI, K.; KINOSHITA, K.; SUGITA, T.; KOYAMA, K.. Three novel phomactin-type diterpenes from a marine-derived fungus. **Tetrahedron Letters**, Kidlington, v. 57, n. 39, p. 4341–4344, 2016. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.08.016.

ISHINO, M.; KIYOMICHI, N.; TAKATORI, K. ; SUGITA, T. ; SHIRO, M.; KINOSHITA, K. ; TAKAHASHI, K. ; KOYAMA, K. . Phomactin i, 13-epi-phomactin i, and phomactin j, three novel diterpenes from a marine-derived fungus. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 66, n. 14, p. 2594–2597, 2010. DOI: 10.1016/j.tet.2010.02.040.

KURODA, Y., NICACIO, K. J., DA SILVA JUNIOR, I. A., LEGER, P. R., CHANG, S., GUBIANI, J. R., SARPONG, R. Isolation, synthesis and bioactivity studies of phomactin terpenoids. **Nature Chemistry**, Berlin, v. 10, n. 9, p. 938–945, 2018. DOI: 10.1038/s41557-018-0084-x.

LIU, W. C.; GONG, T.; ZHU, P. Advances in exploring alternative taxol sources. **RSC Advances** Cambridge, v. 6, n. 54, p. 48800–48809, 2016. doi: 10.1039/c6ra06640b.

Luo, M., Tang, G., Ju, J., Lu, L., Huang, H. A new diketopiperazine derivative from a deep sea-derived *Streptomyces* sp. SCSIO 04496. **Natural Product Research**, Oxon, v. 30, n. 2, p. 138–143, 2016. DOI: 10.1080/14786419.2015.1045509.

NICACIO, K. J. *Isolamento e identificação de metabólitos produzidos por linhagens de microrganismos do ambiente marinho*, Orientador: Roberto Gomes de Souza Berlinck. 2017. 2v. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração: Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2017

NOTHIAS, L. F., PETRAS, D., SCHMID, R., DÜHRKOP, K., RAINER, J., SARVEPALLI, A.; DORRESTEIN, P. C Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, Berlin, v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020. DOI: 10.1038/s41592-020-0933-6.

PALFRAMAN, M. J.; PATTENDEN, G. . The verticillenes. pivotal intermediates in the biosynthesis of the taxanes and the phomactins. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 36, n. 1, p. 108–121, 2019. DOI: 10.1039/c8np00034d.

PIMENTA, E. F., VITA MARQUES, A. M., TININIS, A., SELEGHIM, M. H., SETTE, L. D., VELOSO, K. ; BERLINCK, R. G. Use of experimental design for the optimization of the production of new secondary metabolites by two penicillium species. **Journal of Natural Products**, Cambridge, v. 73, n. 11, p. 1821–1832, 2010. DOI: 10.1021/np100470h.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 28, n. 2, p. 290–344, 2011. DOI: 10.1039/c0np00061b.

ROBERTS, L. D.; SOUZA, A. L.; GERSZTEN, R. E.; CLISH, C. B. Targeted metabolomics. **Current Protocols in Molecular Biology**, New York, v. 1, n. suppl.98, p. 1–24, 2012. DOI: 10.1002/0471142727.mb3002s98.

SHABANA, S.; LAKSHMI, K. R.; SATYA, A. K. . An updated review of secondary metabolites from marine fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Sharjah , v. 21, n. 5, p. 602–642, 2020. DOI: 10.2174/1389557520666200925142514.

SUGANO, Mi.; SATO, A. ; IJIMA, Y. ; FURUYA, K. ; HARUYAMA, H. ; YODA, K. ; HATA, T. . Phomactins, novel paf antagonists from marine fungus phoma sp. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 59, n. 3, p. 564–569, 1994. DOI: 10.1021/jo00082a012.

TAUTENHAHN, R.; PATTI, G. J.; RINEHART, D.; SIUZDAK, G.; . XCMS online: a web-based platform to process untargeted metabolomic data. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 84, n. 11, p. 5035–5039, 2012. DOI: 10.1021/ac300698c.

TURI, K. N.; ROMICK ROSENDALE, L. ; RYCKMAN, K. K.; HARTERT, T. V. A review of metabolomics approaches and their application in identifying causal pathways of childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, New York, v. 141, n. 4, p. 1191–1201, 2018. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.04.021.

Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Bandeira, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. **Nature Biotechnology**, Berlin, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597.

YANAI, T.; TEW, D. P.; HANDY, . C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 393, n. 1–3, p. 51–57, 2004. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.06.011.

ZHAO, Q.; ZHANG, J. L.; LI, F.. Application of metabolomics in the study of natural products. **Natural Products and Bioprospecting**, London, v. 8, n. 4, p. 321–334, 2018. DOI: 10.1007/s13659-018-0175-9.

## APÊNDICE

Figura A1 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra D8-F234-E3-B1 em $\text{MeOH-}d_4$ (600 MHz). .....	92
Figura A2 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra D8-F234-E3-B1 em $\text{MeOH-}d_4$ (150 MHz). .....	93
Figura A3 – Espectro COSY obtido para a amostra D8-F234-E3-B1.....	94
Figura A4 – Espectro COSY obtido para a amostra D8-F234-E3-B1.....	95
Figura A5 – Espectro HMBC obtido para a amostra D8-F234-E3-B1. ....	96
Figura A6 – Espectro NOESY obtido para a amostra D8-F234-E3-B1. ....	97
Figura A7 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra D8-F234-E3-B2 em $\text{MeOH-}d_4$ (600 MHz). .....	98
Figura A8 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da amostra D8-F234-E3-B2 em $\text{MeOH-}d_4$ (150 MHz). .....	99
Figura A9 – Espectro COSY obtido para a amostra D8-F234-E3-B2.....	100
Figura A10 – Espectro HSQC obtido para a amostra D8-F234-E3-B2.....	101
Figura A11 – Espectro HMBC obtido para a amostra D8-F234-E3-B2. ....	102
Figura A12 – Espectro NOESY obtido para a amostra D8-F234-E3-B2. ....	103
Figura A13 – Espectro de massas de alta resolução da amostra D8-F234-E3-B1. ....	104
Figura A14 – Espectro de massas de alta resolução da amostra D8-F234-E3-B2. ....	105
Figura A15 – Espectro de $^1\text{H}$ da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ , 600 MHz).....	106
Figura A16 – Espectro de $^{13}\text{C}$ da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ , 150 MHz) .....	107
Figura A17 – Espectro de DEPT da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ , 150 MHz) .....	108
Figura A18 – Espectro HSQC da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ ).....	109
Figura A19 – Espectro HMBC da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ ). ....	110
Figura A20 – Espectro COSY da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ ).....	111
Figura A21 – Espectro 2D-NOESY da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ ).....	112
Figura A22 – Espectro no infravermelho IV da fração PFF-6C1a (filme em disco de sílica).....	113
Figura A23 – Espectro no ultravioleta UV da fração PFF-6C1a (solução em MeCN, 37 ug/mL).....	114
Figura A24 – Espectro de massas no modo positivo HRESIMS da fração PFF-6C1a. ....	115

Figura A1 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra D8-F234-E3-B1 em  $\text{MeOH-}d_4$  (600 MHz).

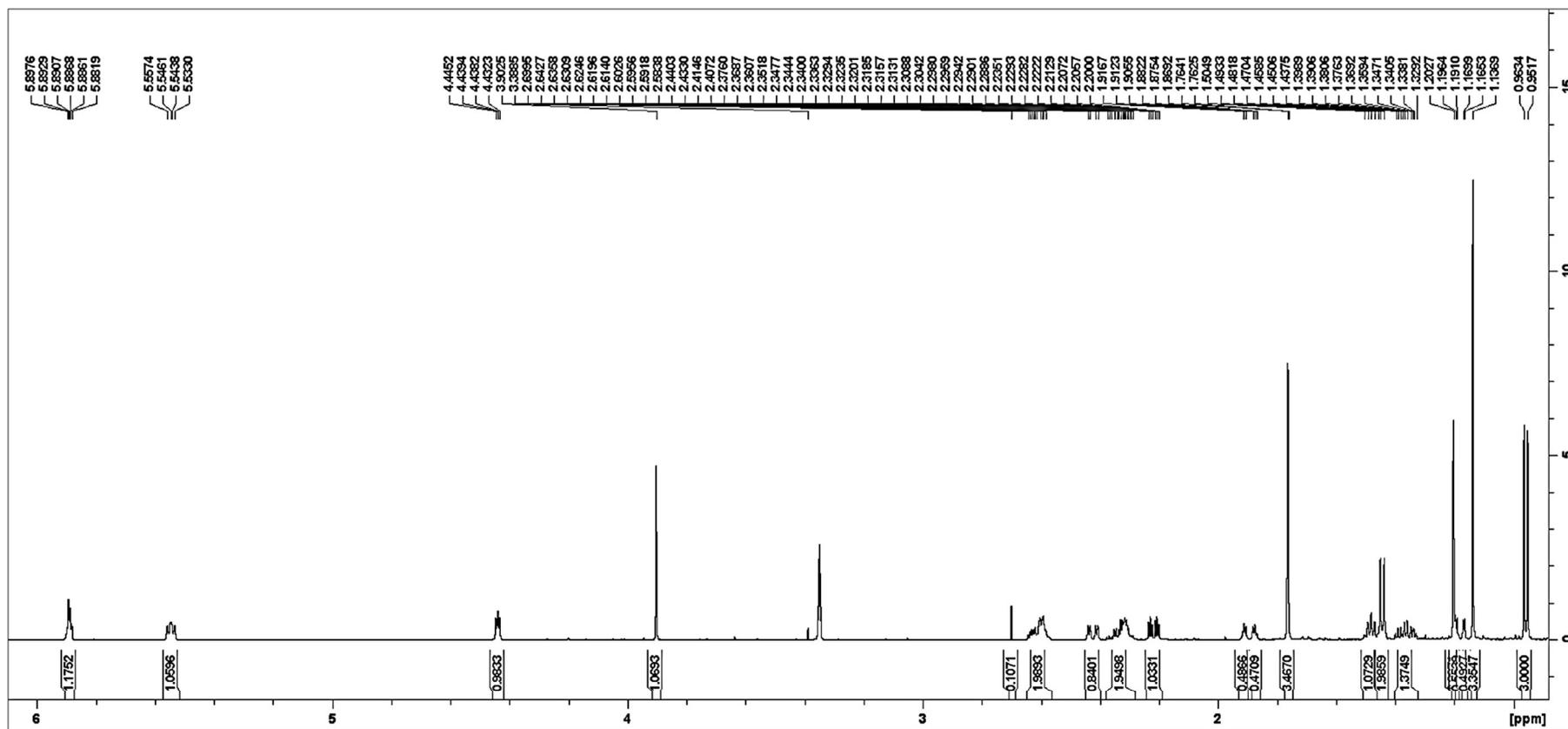


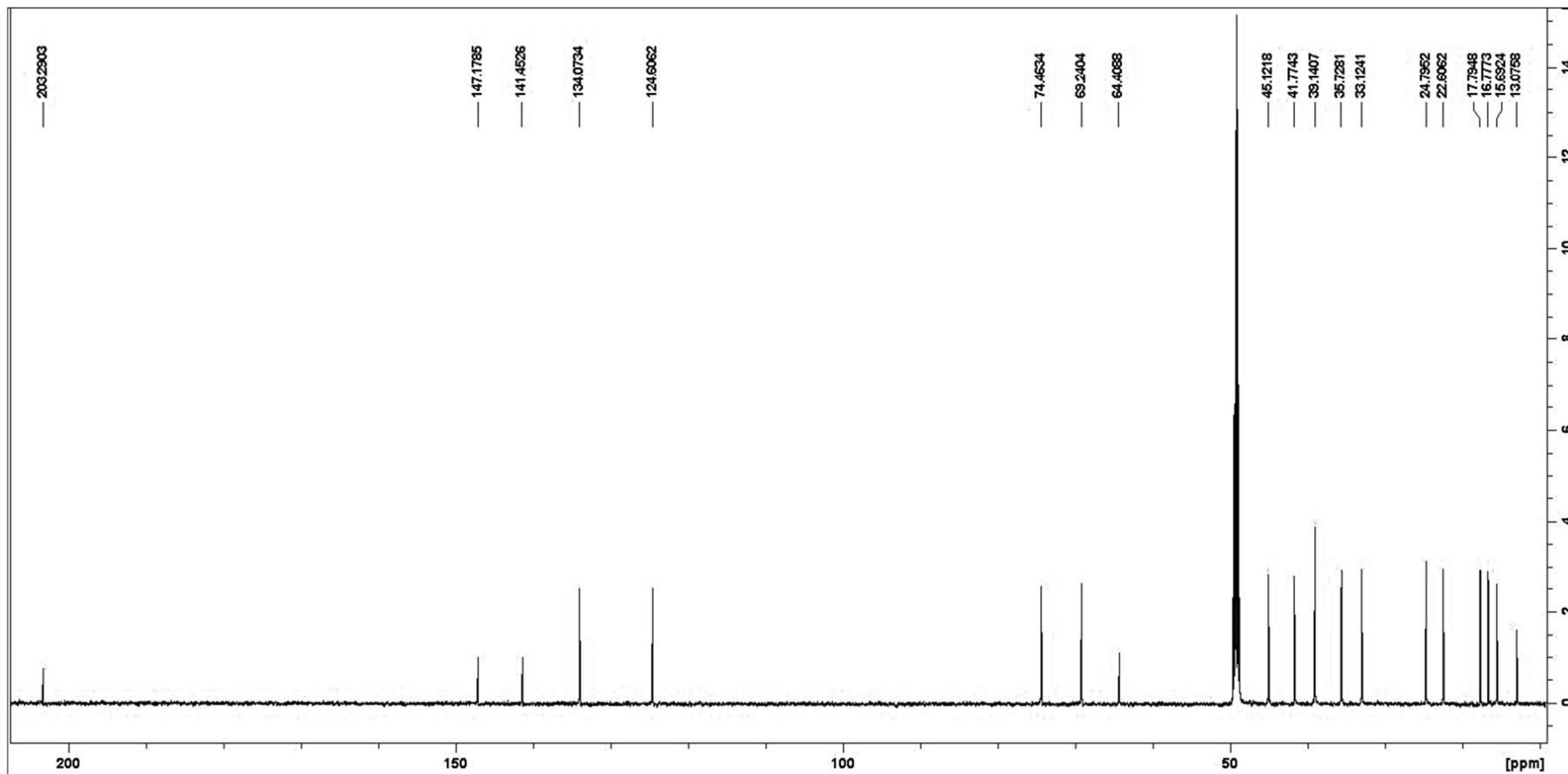
Figura A2 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra D8-F234-E3-B1 em  $\text{MeOH-}d_4$  (150 MHz).

Figura A3 – Espectro COSY obtido para a amostra D8-F234-E3-B1.

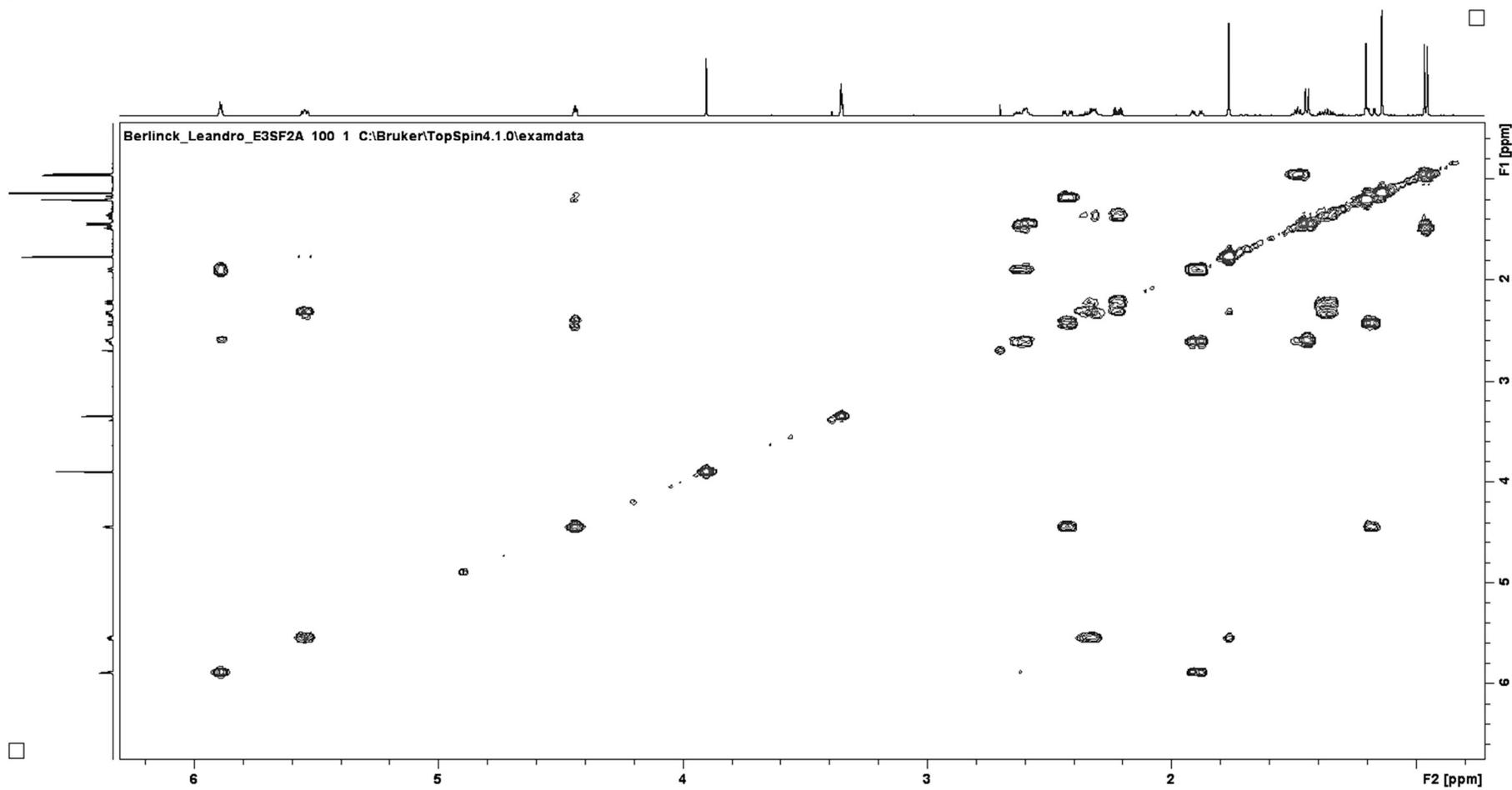


Figura A4 – Espectro COSY obtido para a amostra D8-F234-E3-B1.

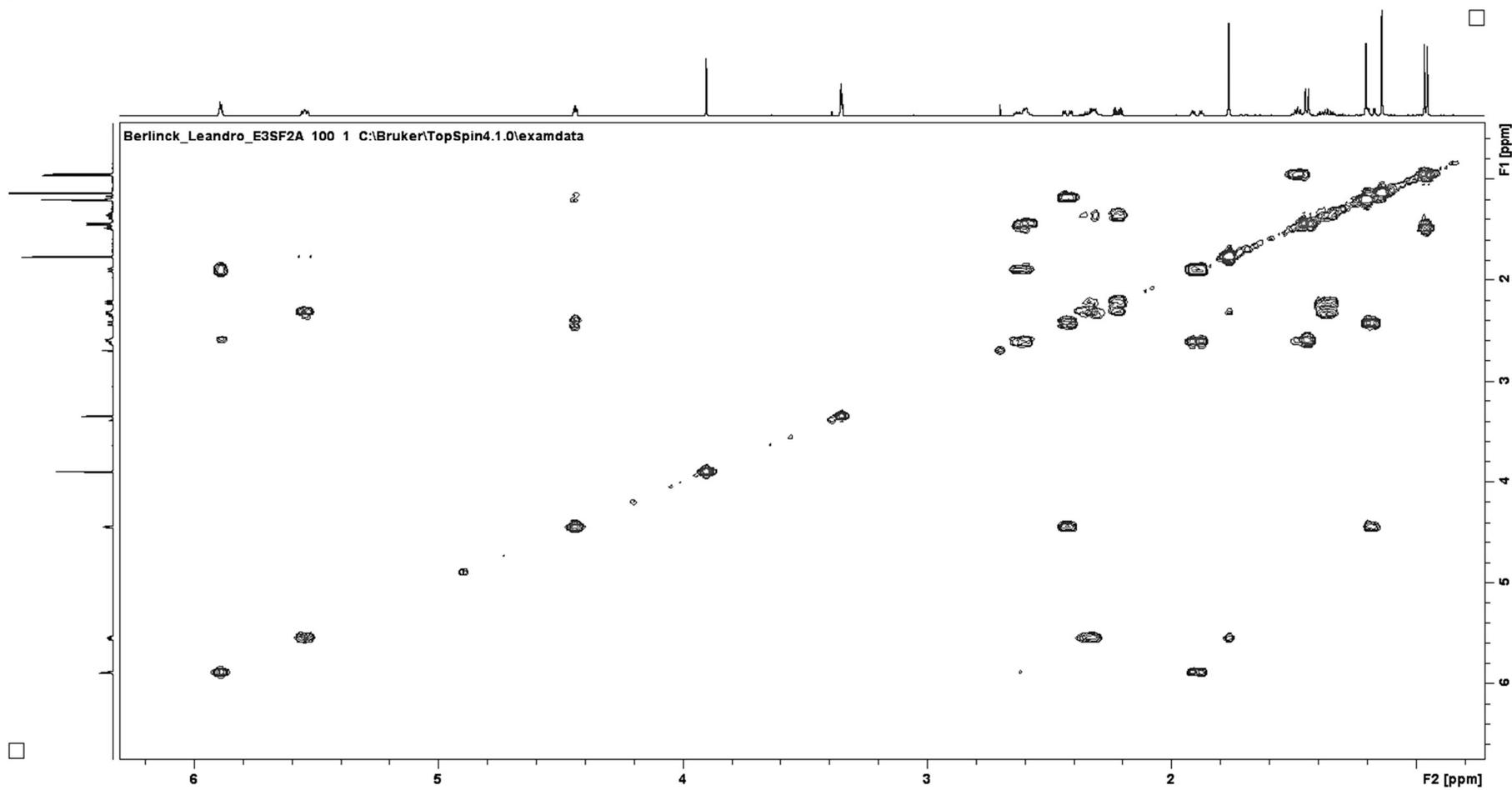


Figura A5 – Espectro HMBC obtido para a amostra D8-F234-E3-B1.

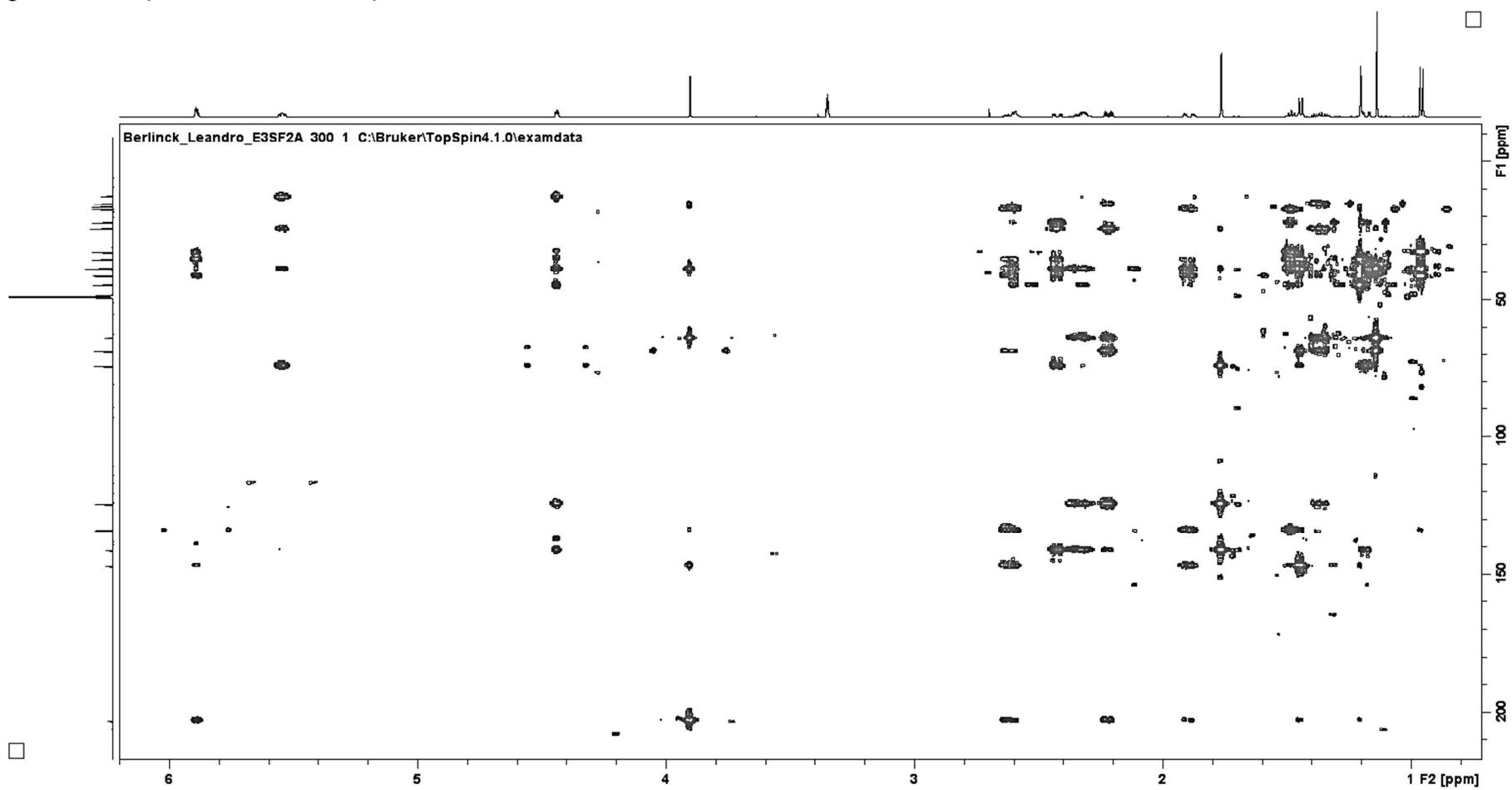


Figura A6 – Espectro NOESY obtido para a amostra D8-F234-E3-B1.

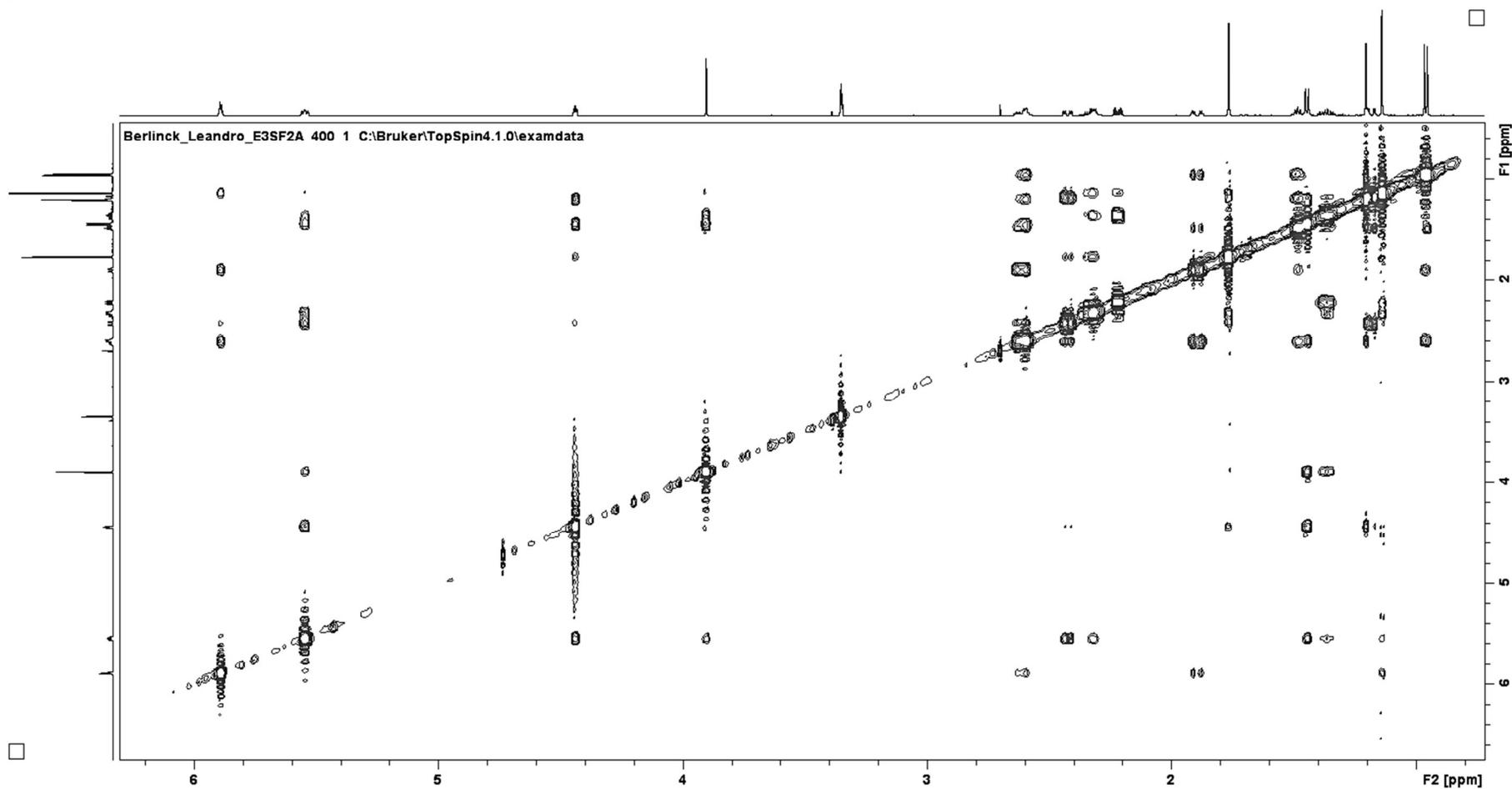


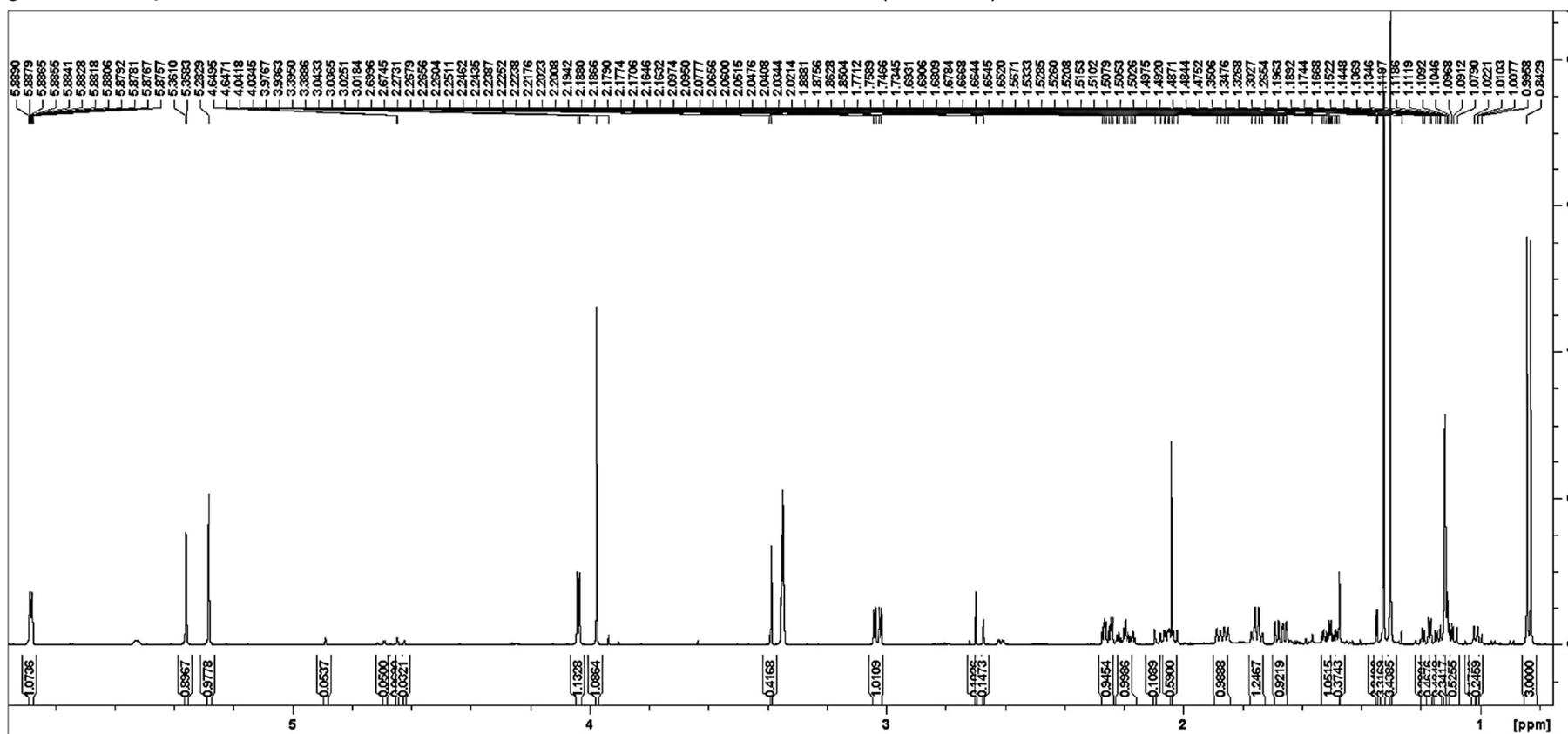
Figura A7 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra D8-F234-E3-B2 em  $\text{MeOH-}d_4$  (600 MHz).

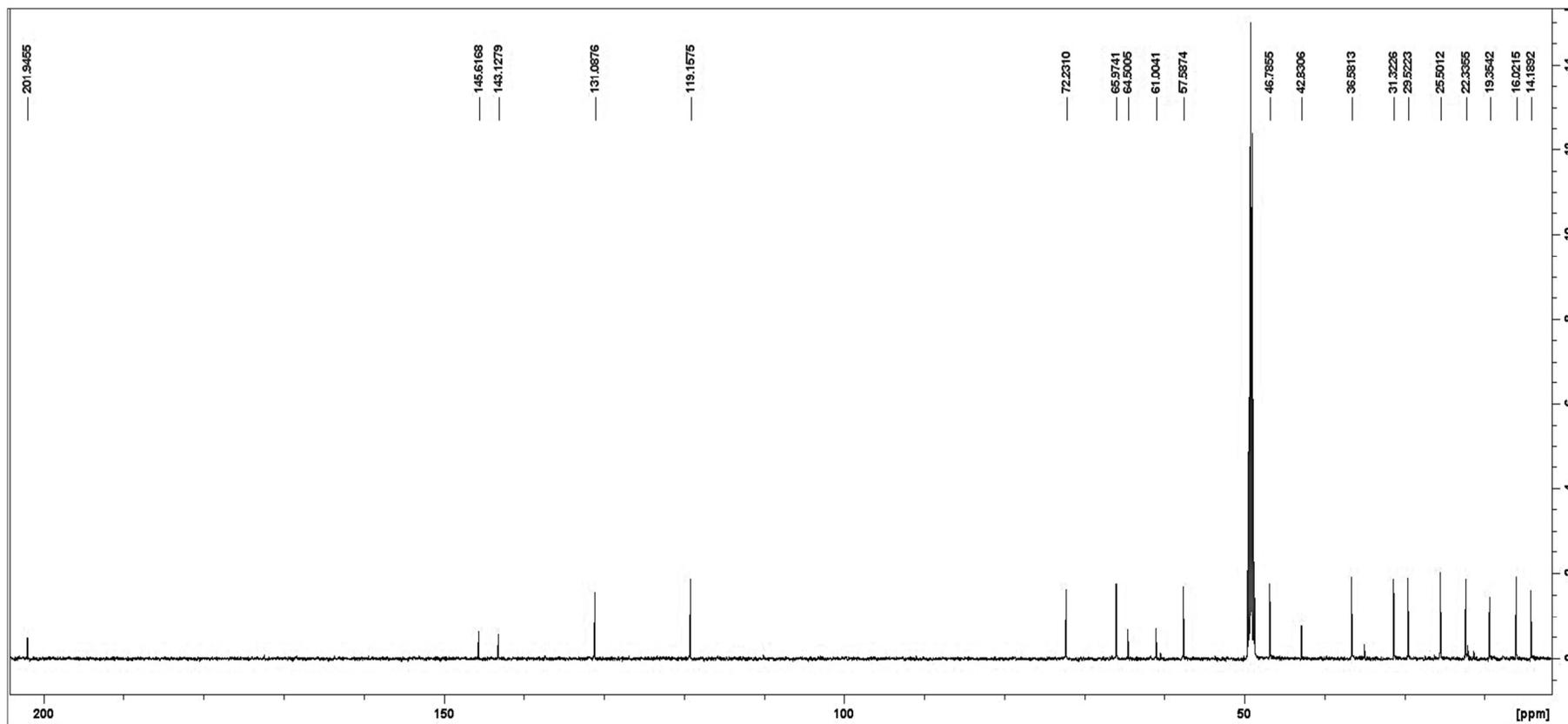
Figura A8 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da amostra D8-F234-E3-B2 em  $\text{MeOH-}d_4$  (150 MHz).

Figura A9 – Espectro COSY obtido para a amostra D8-F234-E3-B2.

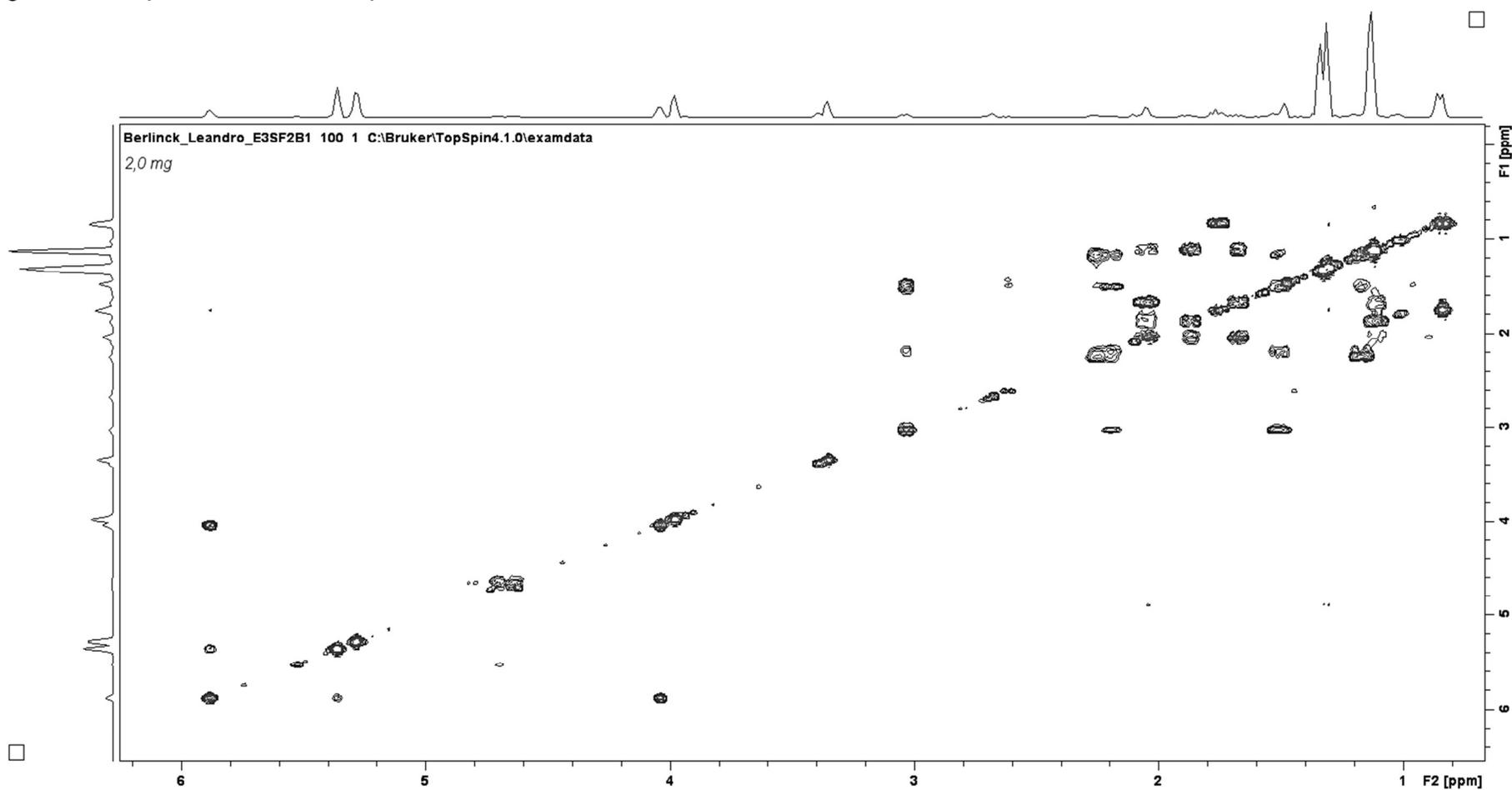


Figura A10 – Espectro HSQC obtido para a amostra D8-F234-E3-B2.

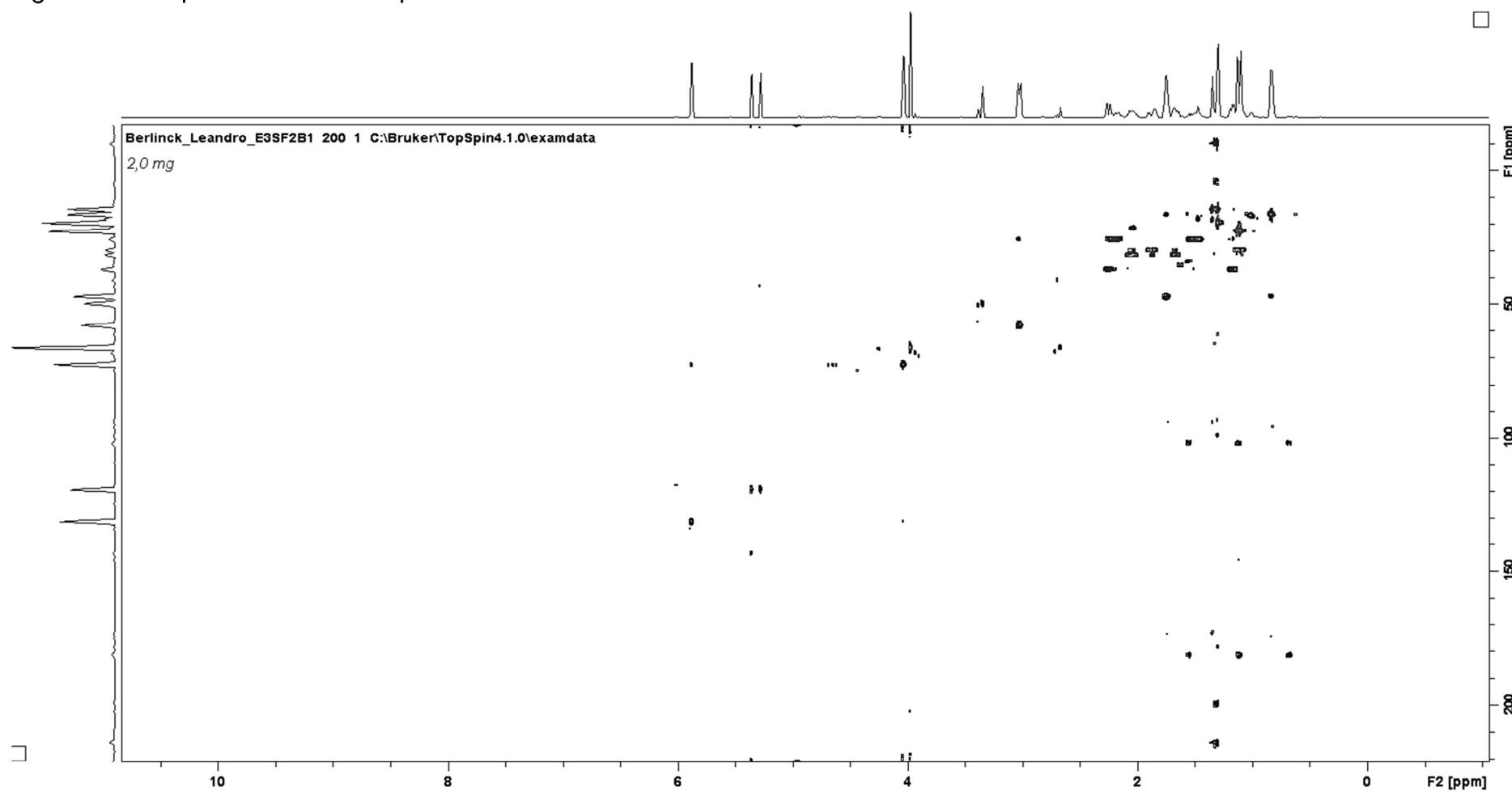


Figura A11 – Espectro HMBC obtido para a amostra D8-F234-E3-B2.

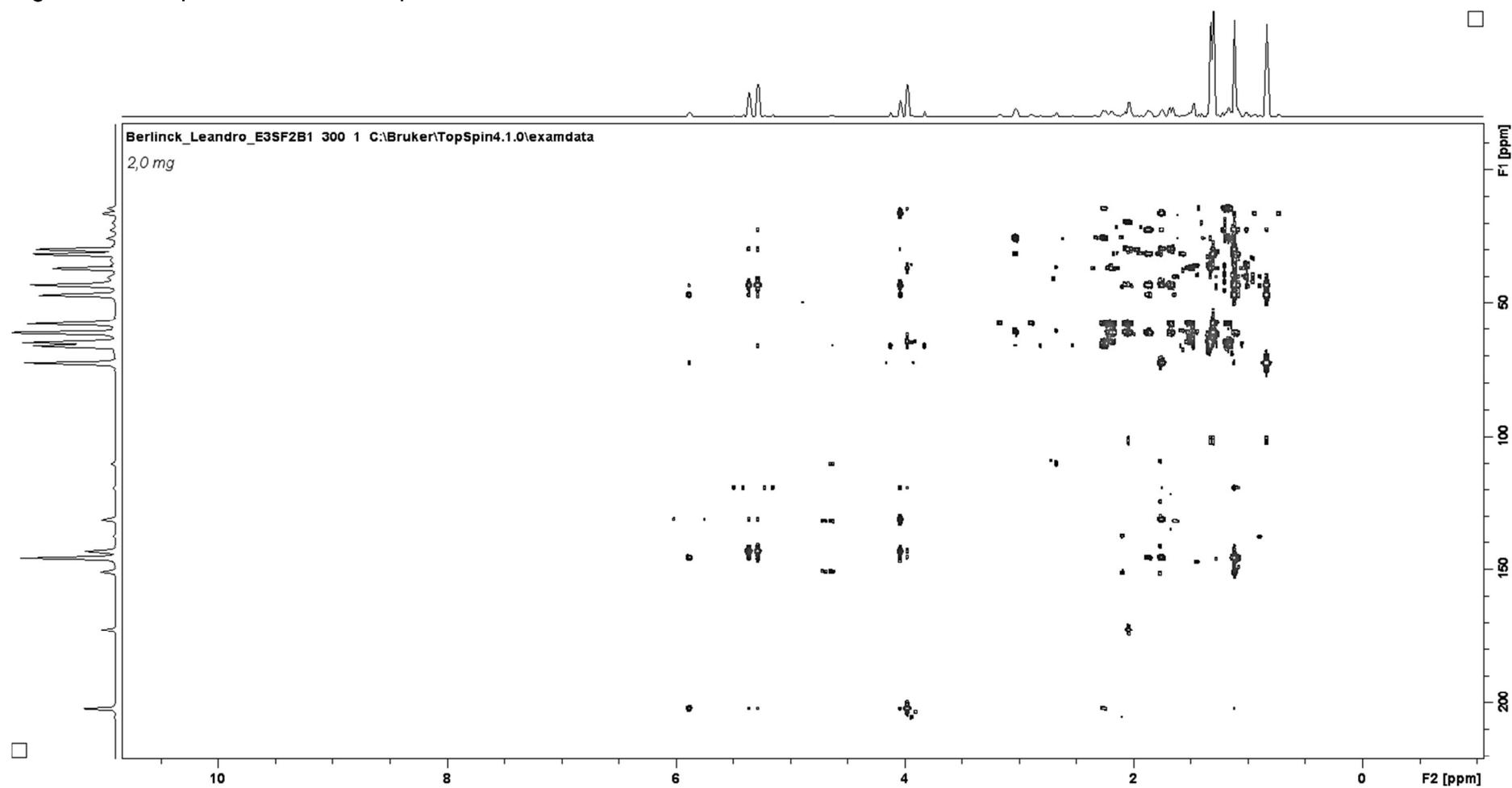


Figura A12 – Espectro NOESY obtido para a amostra D8-F234-E3-B2.

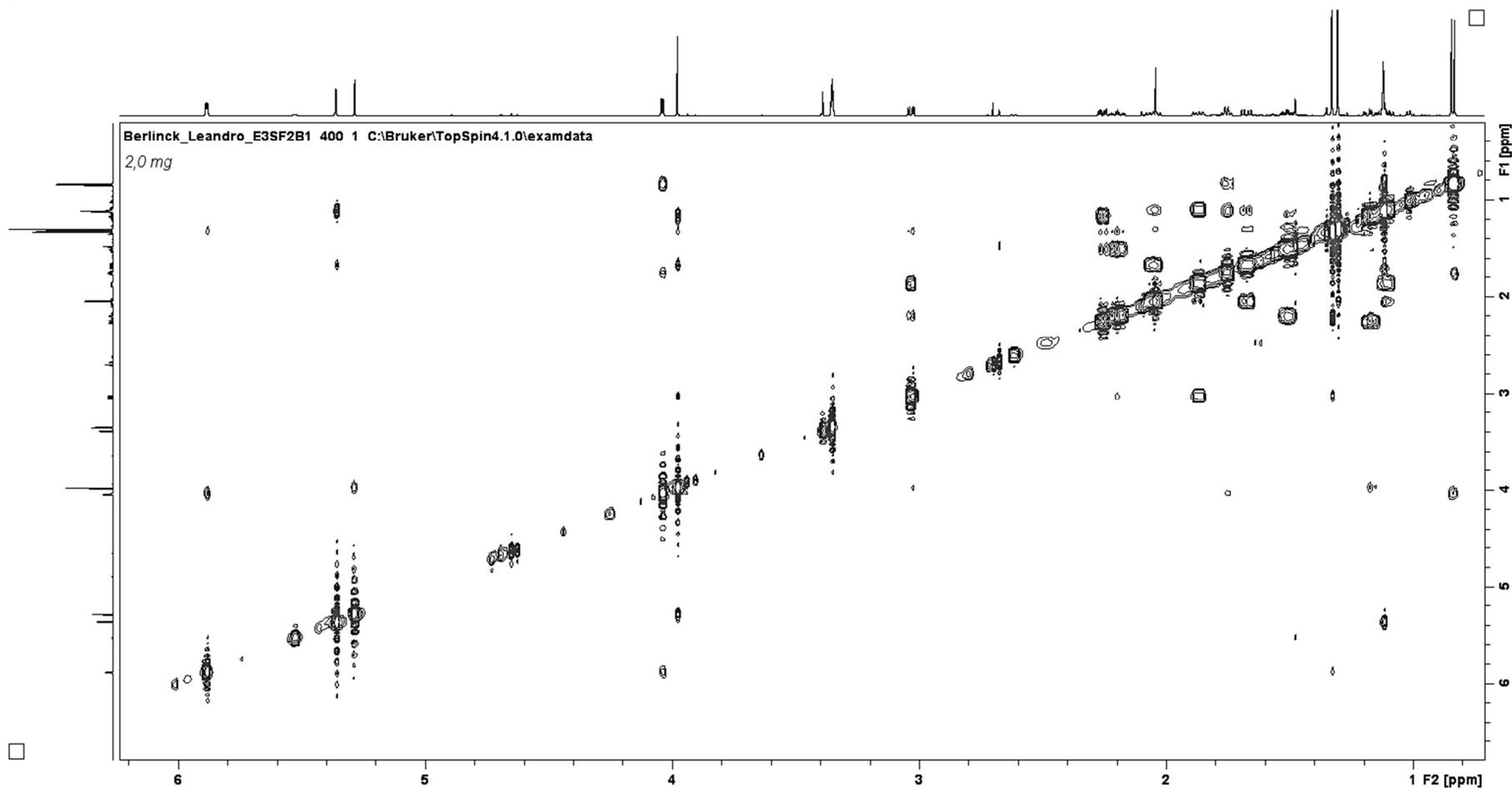


Figura A13 – Espectro de massas de alta resolução da amostra D8-F234-E3-B1.

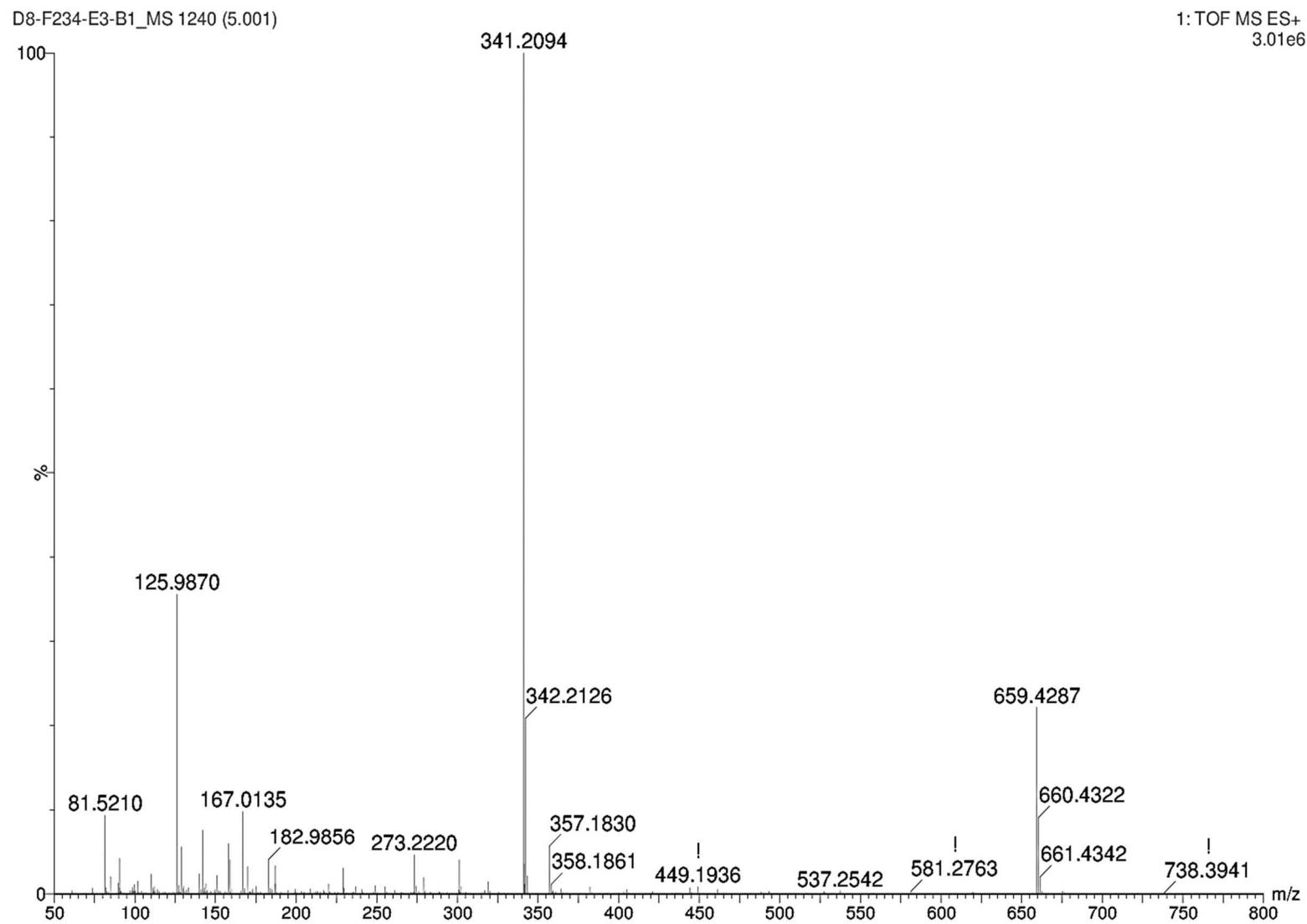


Figura A14 – Espectro de massas de alta resolução da amostra D8-F234-E3-B2.

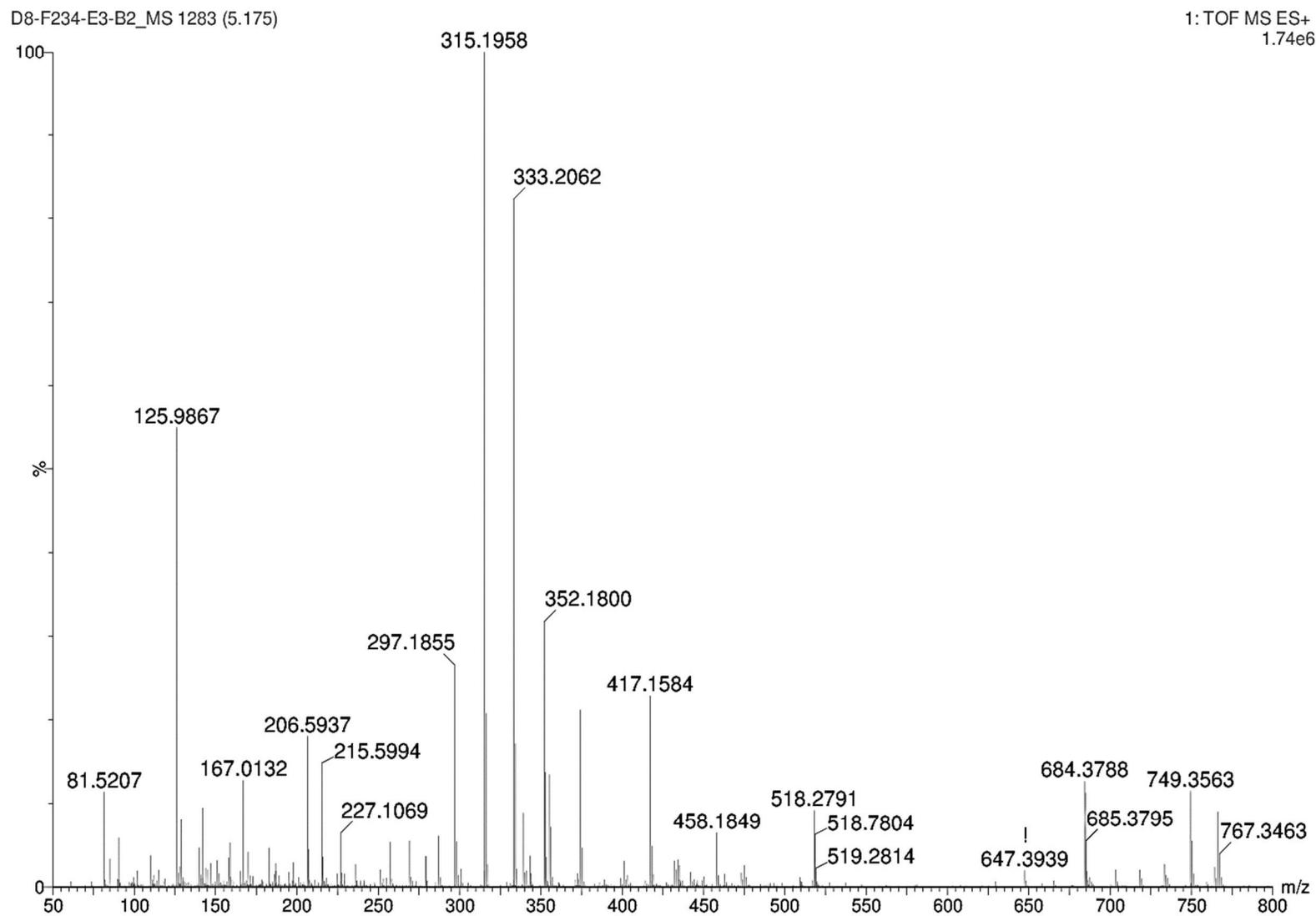


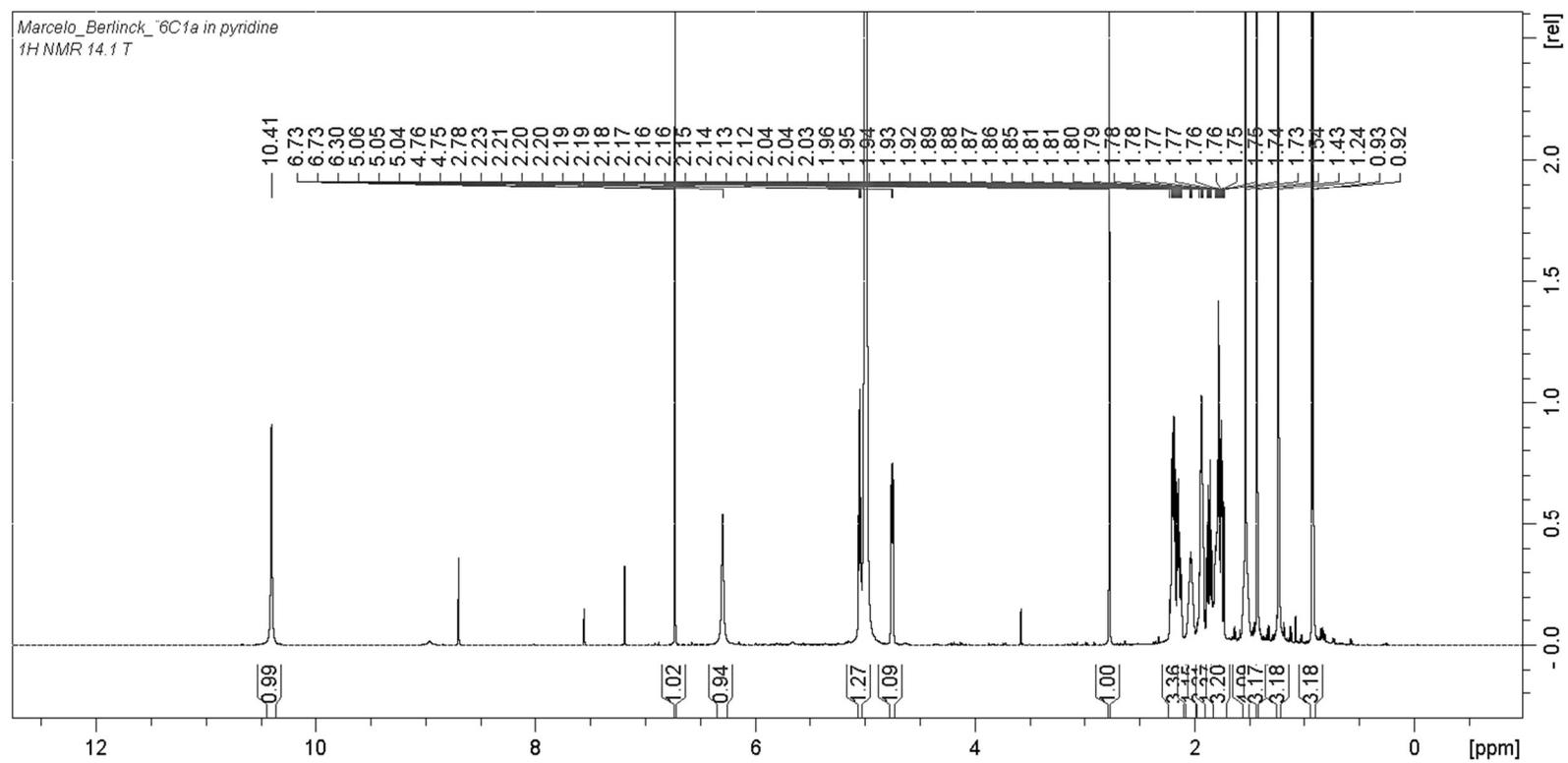
Figura A15 – Espectro de  $^1\text{H}$  da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ , 600 MHz)

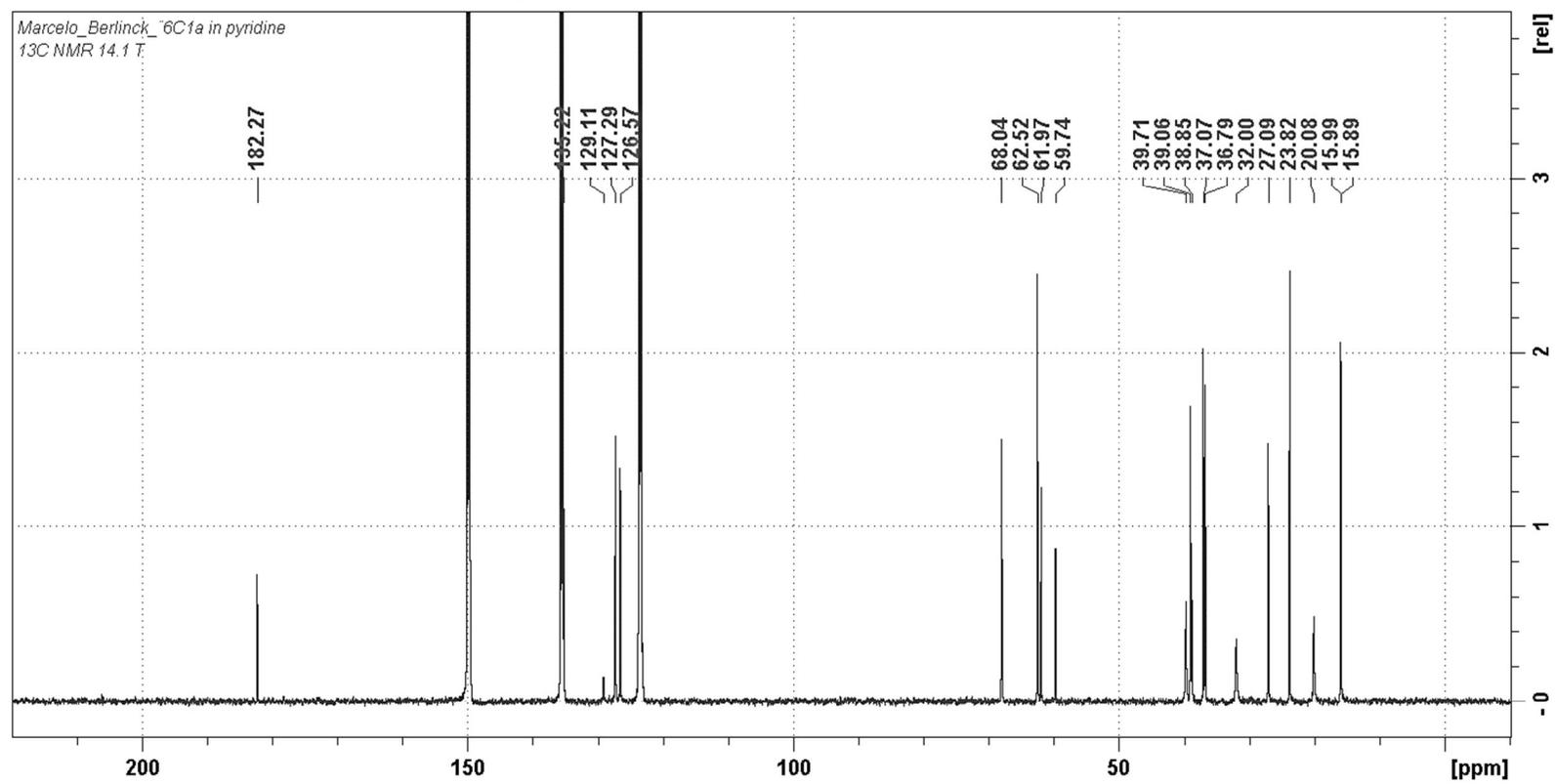
Figura A16 – Espectro de  $^{13}\text{C}$  da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ , 150 MHz)

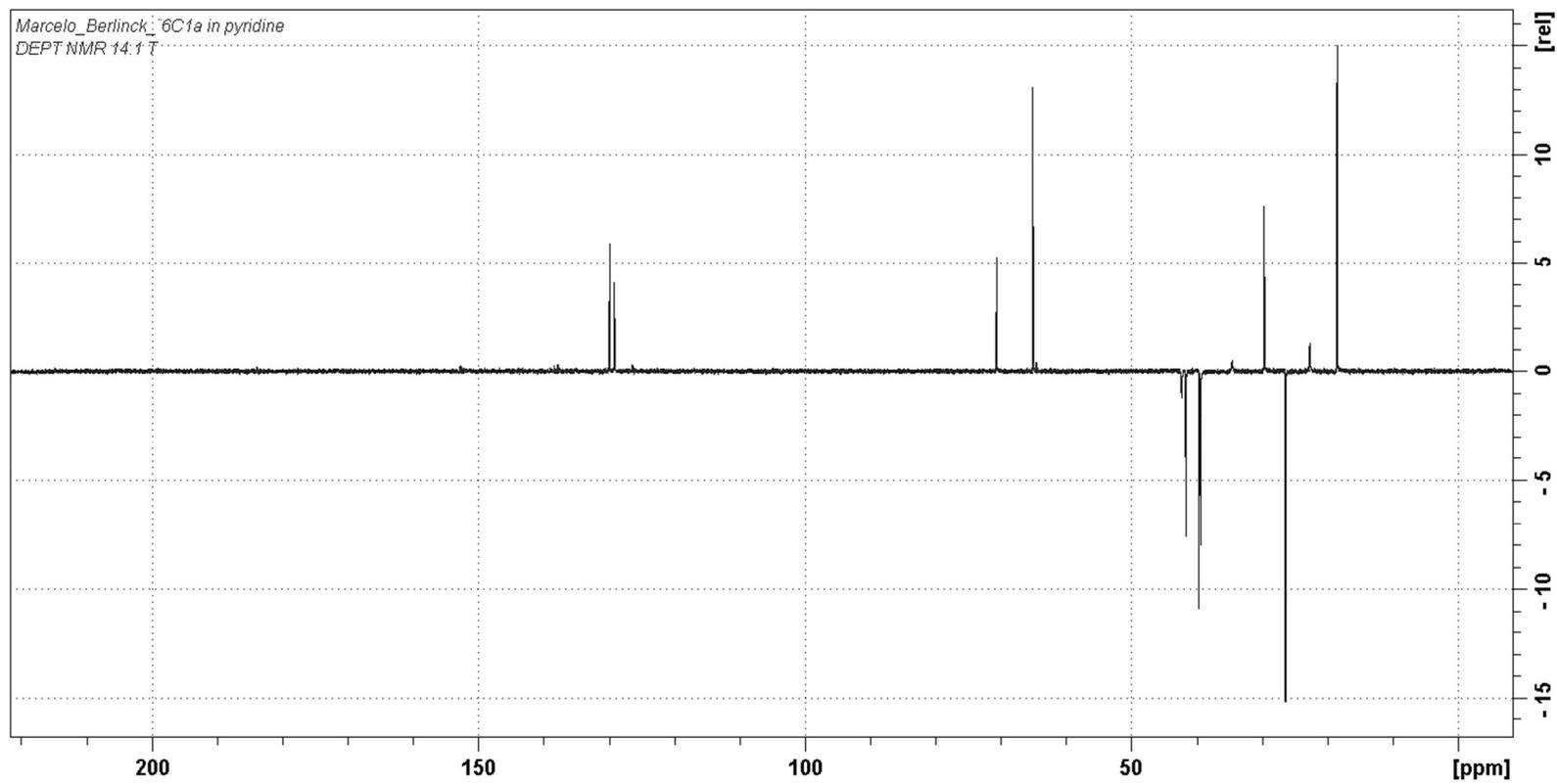
Figura A17 – Espectro de DEPT da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ , 150 MHz)

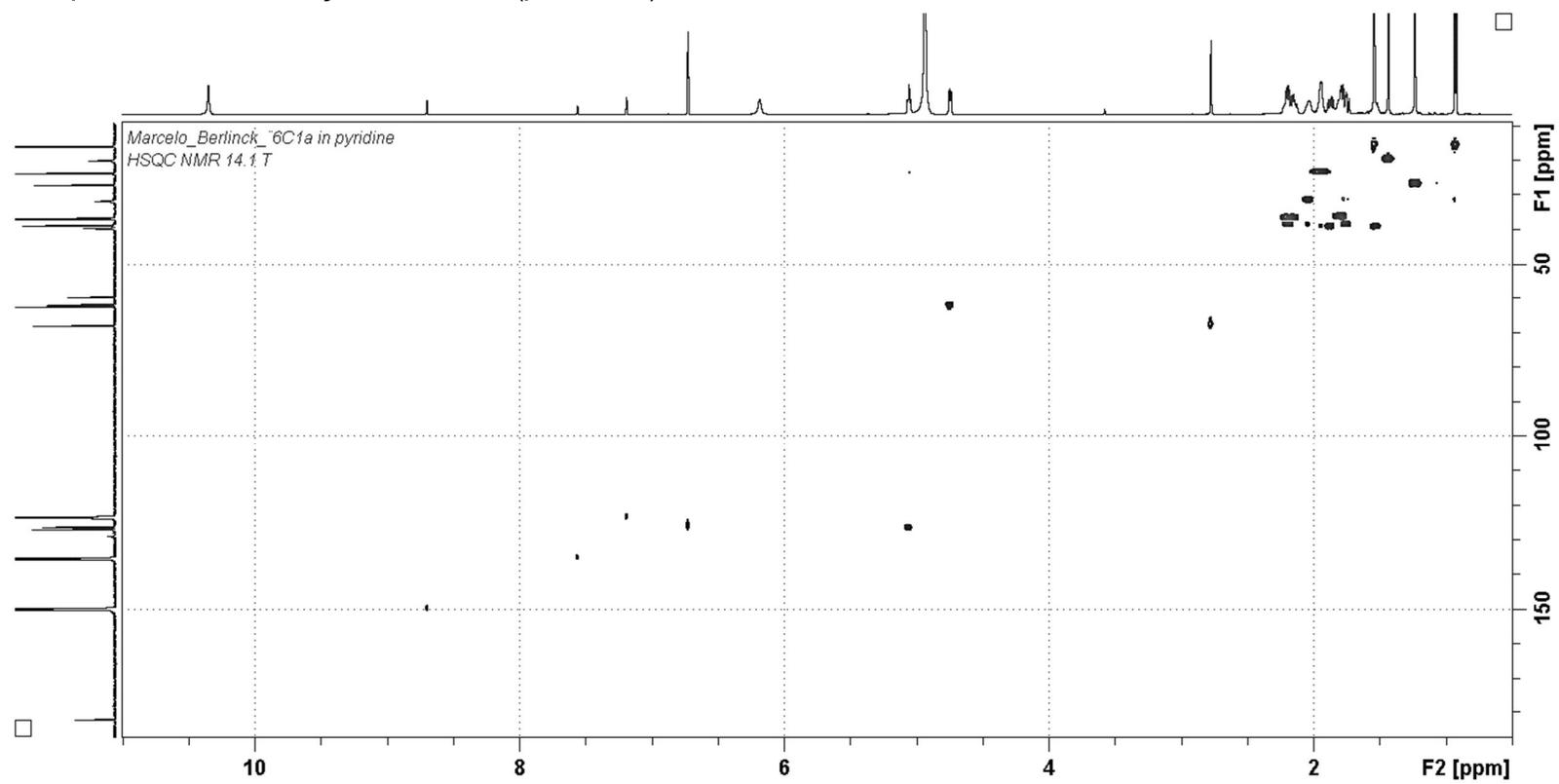
Figura A18 – Espectro HSQC da fração PFF-6C1a (piridina-*d*<sub>5</sub>).

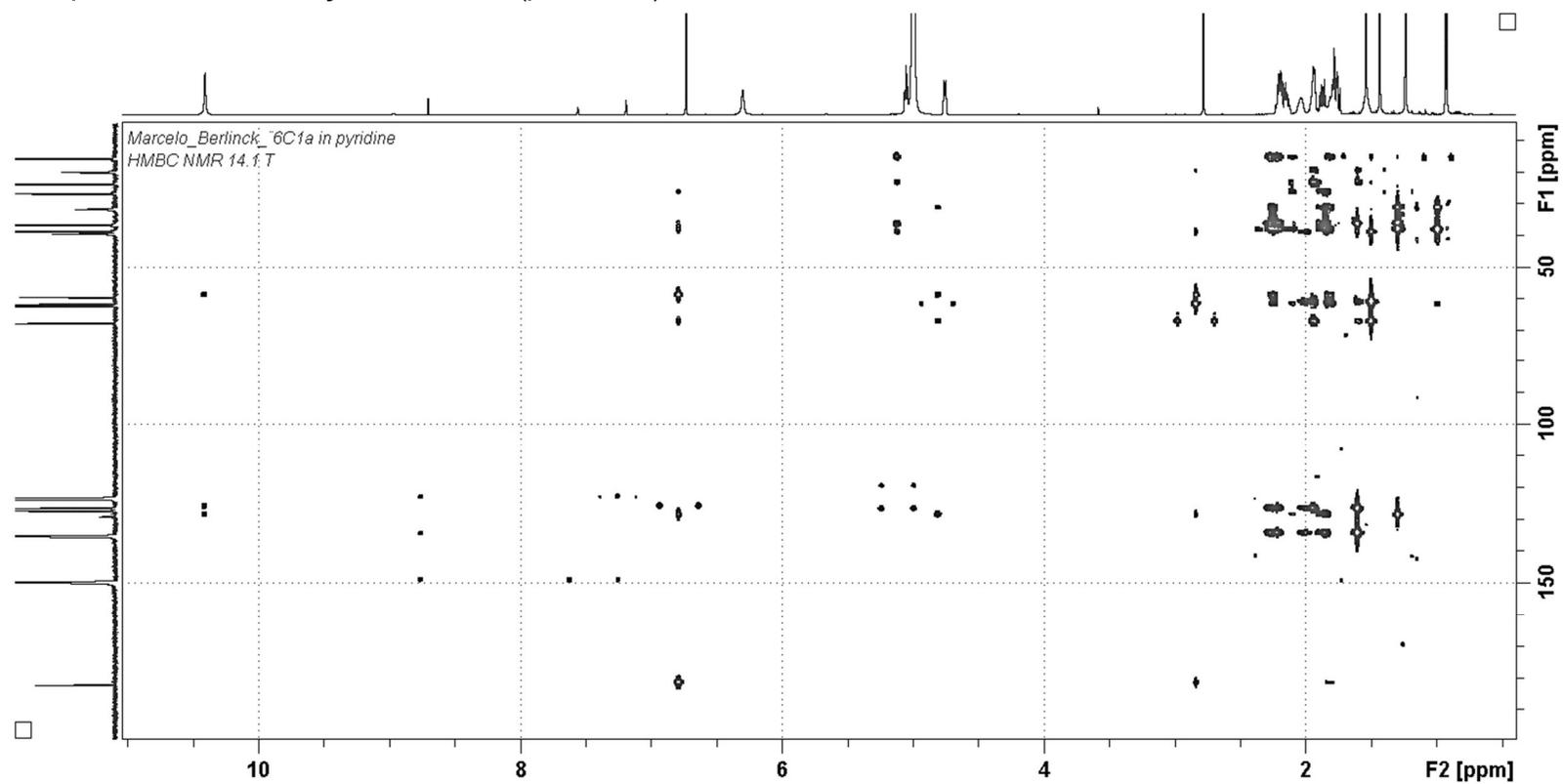
Figura A19 – Espectro HMBC da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ ).

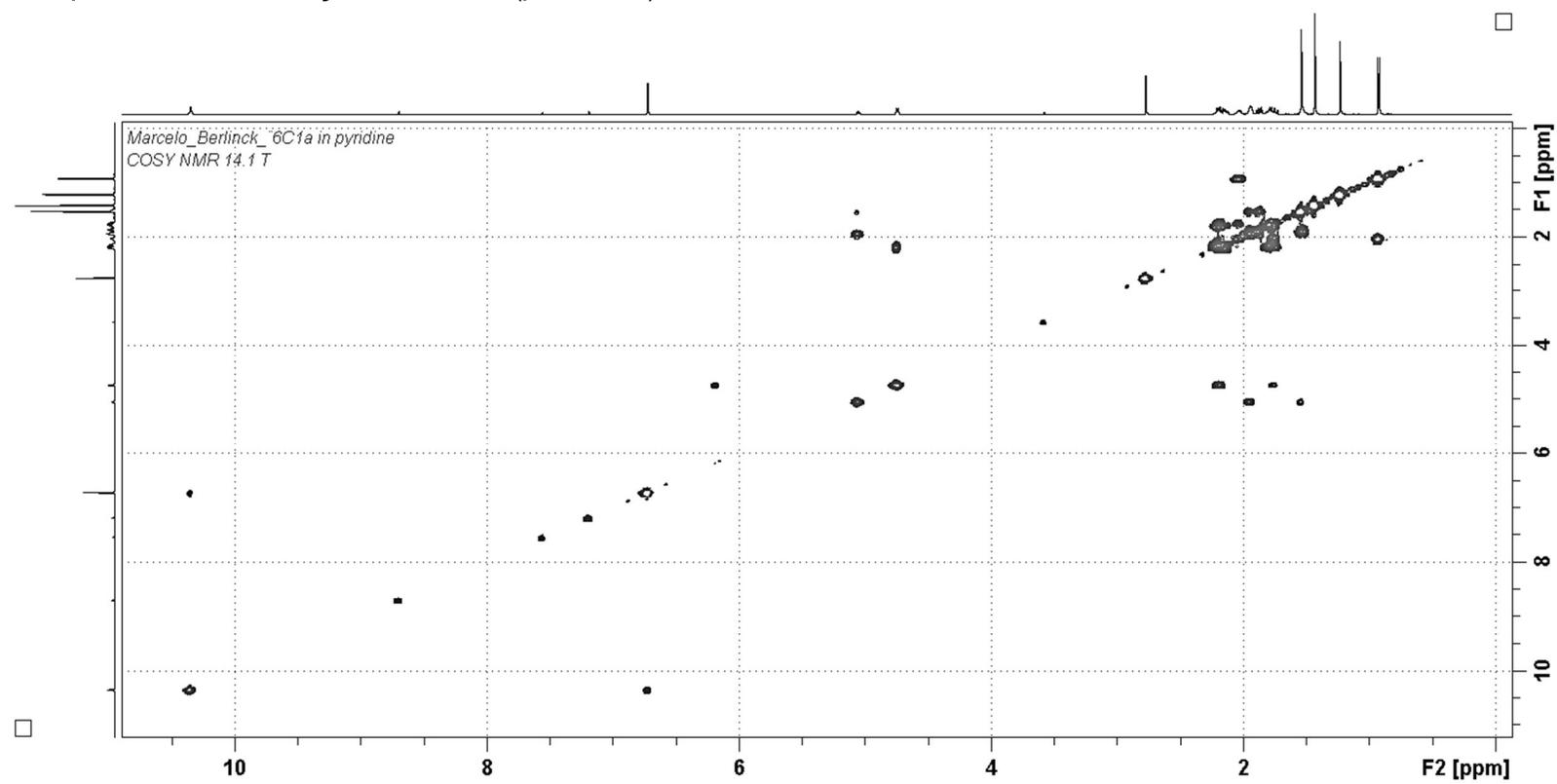
Figura A20 – Espectro COSY da fração PFF-6C1a (piridina-*d*<sub>5</sub>).

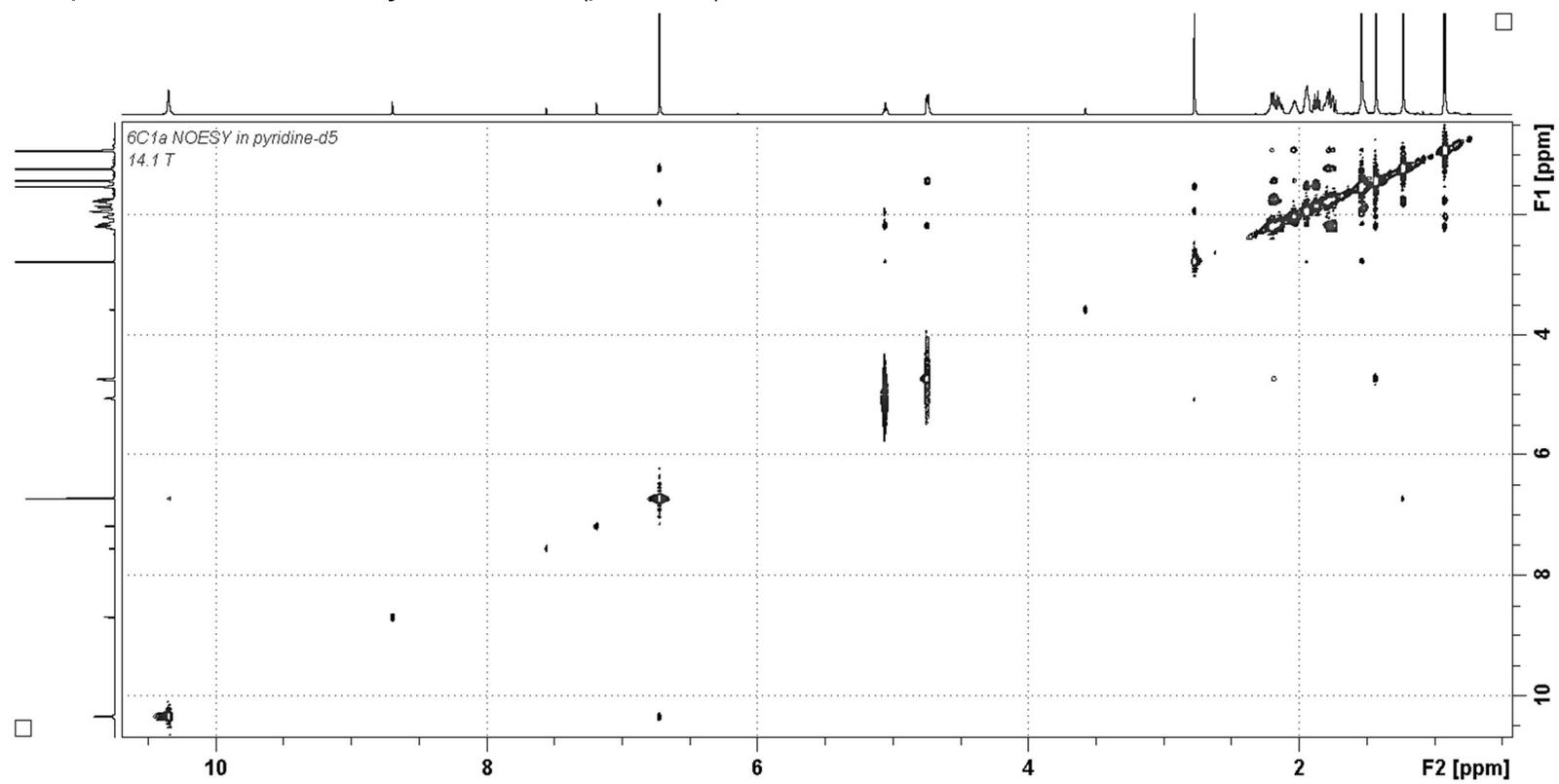
Figura A21 – Espectro 2D-NOESY da fração PFF-6C1a (piridina- $d_5$ ).

Figura A22 – Espectro no infravermelho IV da fração PFF-6C1a (filme em disco de sílica)

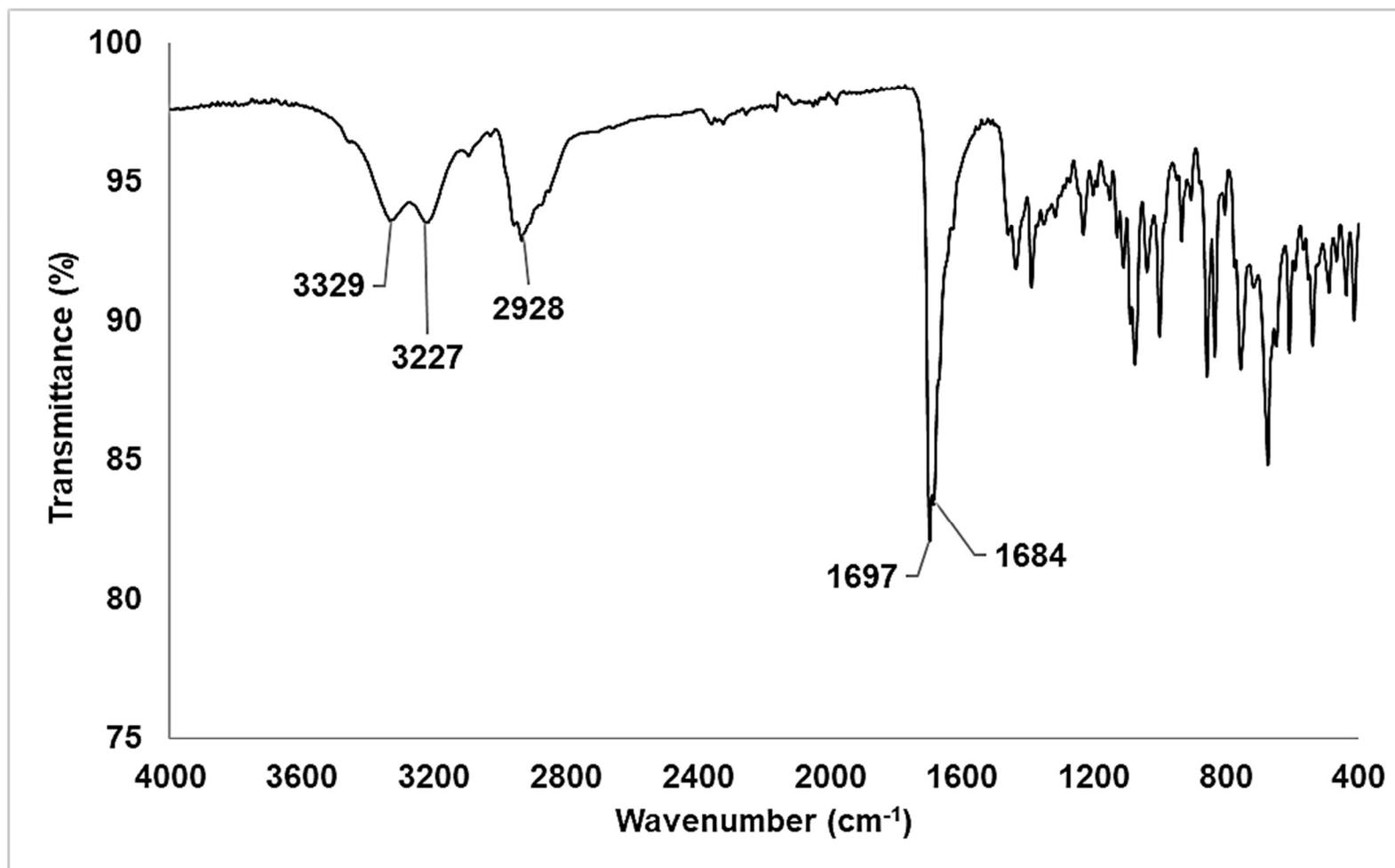


Figura A23 – Espectro no ultravioleta UV da fração PFF-6C1a (solução em MeCN, 37 ug/mL).

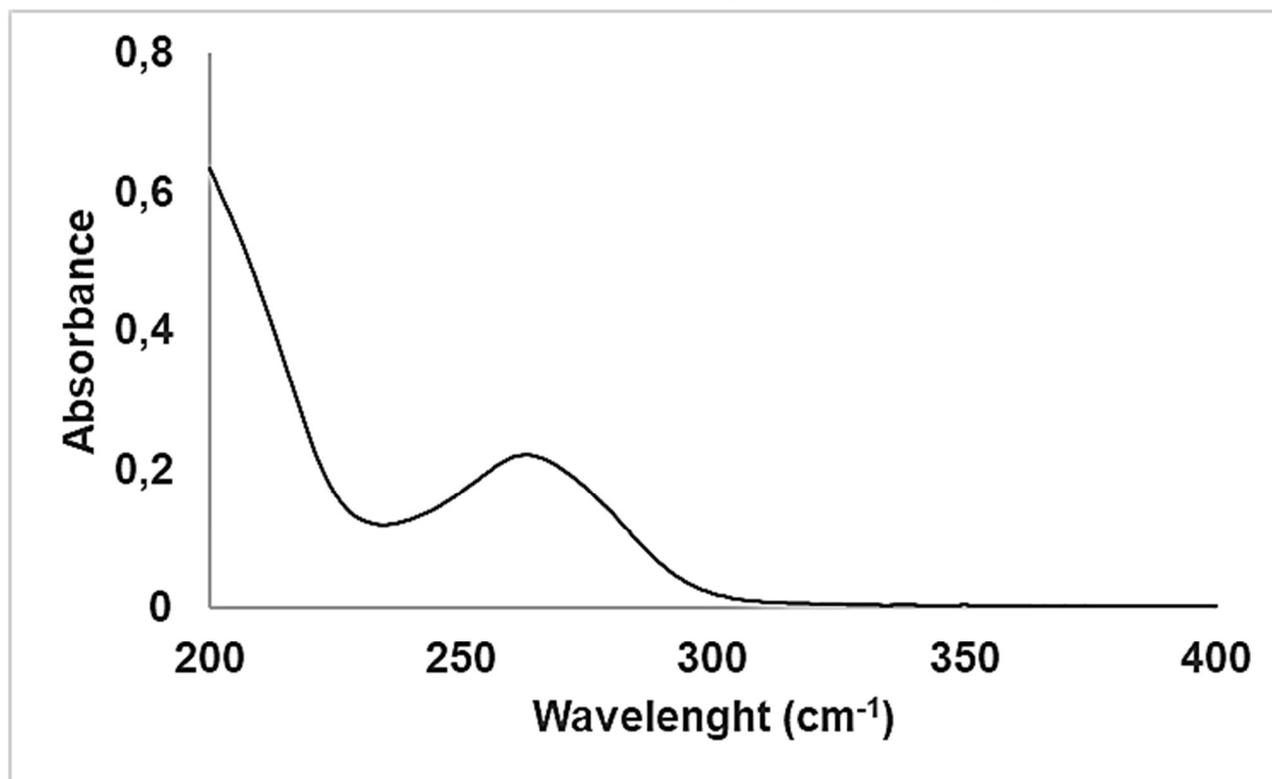


Figura A24 – Espectro de massas no modo positivo HRESIMS da fração PFF-6C1a.

12-05-22 6C1a #52 RT: 0.75 AV: 1 NL: 7.11E6  
T: FTMS + c ESI Full ms [200.00-380.00]

