



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Lucas Pradi

Estudo metabolômico da cocultura líquida de *Saccharomyces cerevisiae* e  
*Aspergillus niger*.

Florianópolis

2023

Lucas Pradi

Estudo metabolômico da cocultura líquida de *Saccharomyces cerevisiae* e  
*Aspergillus niger*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador(a): Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo  
Coorientador(a): Prof. Dr. Tiago Tizziani

Florianópolis  
2023

Pradi, Lucas

Estudo metabolômico da cocultura líquida de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger* / Lucas Pradi ; orientador, Louis Pergaud Sandjo, coorientador, Tiago Tizziani, 2023.  
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. *Aspergillus niger*. 3. Cocultura. 4. metabolômica. 5. LC-MS. I. Sandjo, Louis Pergaud. II. Tizziani, Tiago. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Lucas Pradi

Estudo metabolômico da cocultura líquida de *Saccharomyces cerevisiae* e  
*Aspergillus niger*

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

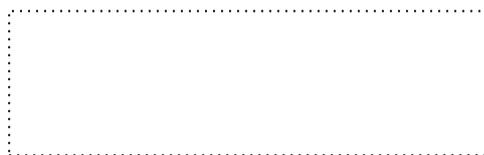
Prof. Luiz Antonio Escorteganha Pollo, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Tatiane de Andrade Maranhão, Dra.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof.(a) Louis Pergaud Sandjo, Dr.(a)  
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sálvio Pradi e Rosiné Pradi, por serem meus maiores exemplos de força e dedicação

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Sálvio Pradi e Rosiné Pradi os quais sempre me apoiaram incondicionalmente em meus estudos e tornaram possível minha dedicação para os estudos do Mestrado em Química.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo pela oportunidade acadêmica e orientação na realização deste trabalho, pela paciência em momentos de dificuldade e pela abertura da possibilidade de explorar meus próprios caminhos dentro do mundo do conhecimento acadêmico, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Tiago Tizziani, de papel imprescindível na elaboração do projeto.

Agradeço a minha amiga de longa data e colega de mestrado, Carolina S. Francener, e ao meu amigo e colega de mestrado Samuel B. Paim, que me apoiaram e auxiliaram no processo de entrada do mestrado

Agradeço a todos que fizeram, de uma maneira ou outra, parte da realização do trabalho, seja por auxílio na utilização de equipamentos, ensino e acompanhamento de técnicas, ou discussão de ideias e ferramentas: Geovanna O. Costa, Jhully Wellen, Isabela R. Molina e Amanda Athayde

Agradeço também aos meus colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN/UFSC) por todo companheirismo e amizade, sem os quais os dias teriam sido muito menos divertidos, sendo os ainda não citados: Otília H. Guarnier, Chantal D. Jacomelli, Ana Caroline da Silva, Isabel C. Möller, Gabriella B. Souza, Monalisa A. Moreira, Emanoele Lindenberg e Natalia Lioi

Agradeço ao Prof. Diogo Robl por ceder o espaço de trabalho do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos e à colega Sabrina B. Cavalcante pelo ensino das técnicas e troca de conhecimento realizada.

Agradeço ao departamento de Química da UFSC por proporcionar o ambiente de pesquisa e a CAPES pelo suporte financeiro.

E ultimamente agradeço a todos amigos, amigas e família, os(as) quais não estão relacionados a este trabalho acadêmico, mas de suma importância na minha vida.

A todos e todas, meu mais sincero obrigado.

## RESUMO

Fungos são uma das principais fontes de moléculas bioativas já estudadas. Apesar disso, a grande taxa de redescoberta de moléculas tem desencorajado o estudo de produtos naturais fúngicos. A cocultura é uma metodologia baseada na ecologia química e nas interações entre seres que visa causar uma mudança no perfil metabólico dos organismos envolvidos visando a produção de novos compostos. O fungo *Aspergillus niger* possui uma grande capacidade de produção de metabólitos secundários e já é utilizado na indústria para tal. O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura amplamente utilizada na indústria e facilmente disponível. A metabolômica por LC-MS tem se mostrado como uma boa ferramenta de estudo de produtos naturais devido à agilidade e capacidade de analisar uma grande gama de moléculas. O uso de técnicas computacionais para desreplicação de cromatogramas acelera a identificação de moléculas em extratos e está se tornando cada vez mais confiável. Uma cepa ambiental do fungo *A. niger* foi identificada através de micromorfologia e técnicas moleculares. Verificou-se, através de técnicas de LC-MS e metabolômica auxiliada por software a mudança no perfil metabólico do *A. niger* em cocultura. A utilização de técnicas computacionais permitiu a desreplicação rápida dos extratos e identificação de mais de cem compostos presentes no extrato entre eles dipeptídeos, dicetopiperazinas, derivados de ácido itacônico, bis- $\gamma$ -naftopironas,  $\gamma$ -naftopironas, bicumarinas, alcaloides, piridonas, piranonigrinas, ciclopeptídeos, esteróides, pigmentos, ácidos graxos hidroxilados, esfingolipídeos e micotoxinas. A análise por rede molecular correlacionou a mudança no perfil com as moléculas identificadas. Assim, a através da utilização de técnicas de metabolômica por UPLC-MS auxiliada por *softwares*, concluiu-se que a cocultura entre *A. niger* e *S. cerevisiae* causou grande mudança no perfil de produção de compostos, principalmente de piridonas, nitrogenados diversos,  $\gamma$ -naftopironas e ácidos graxos hidroxilados.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*; Cocultura; Metabolômica; LC-MS.

## ABSTRACT

Fungi are one of the main studied sources of bioactive molecules. Despite this, the high rate of rediscovery of molecules has discouraged the study of fungal natural products. Coculture is a methodology based on chemical ecology and chemical interactions between beings that aims to cause a change in the metabolic profile of the organisms involved, aiming at the production of new compounds. The fungus *Aspergillus niger* has a large capacity to produce secondary metabolites and is already used in industry for this purpose. *Saccharomyces cerevisiae* is a yeast widely used in industry and is easily available. Metabolomics by LC-MS has proven to be a good tool for the study of natural products due to its agility and ability to analyze a wide range of molecules. The use of computational techniques for dereplication of chromatograms accelerates the identification of molecules in extracts and is becoming more and more reliable. An environment strain of *A. niger* strain was identified through micromorphology and by molecular techniques. It was verified, through LC-MS techniques and metabolomics aided by software, the change in the metabolic profile of *A. niger* in coculture. The use of computational techniques allowed the rapid dereplication of the extracts and the identification of more than one hundred compounds in the extract, including dipeptides, diketopiperazines, itaconic acid derivatives, bis- $\gamma$ -naphthopyrones,  $\gamma$ -naphthopyrones, bicoumarins, alkaloids, pyridones, pyranonigrines, cyclopeptides, steroids, pigments, hydroxylated fatty acids, sphingolipids and mycotoxins. Molecular network analysis correlated the change in profile with the identified molecules. Thus, through the use of UPLC-MS metabolomics techniques aided by software, it was concluded that the coculture between *A. niger* and *S. cerevisiae* caused a great change in the production profile of compounds, mainly pyridones, various nitrogenous compounds,  $\gamma$ -naphthopyrones and hydroxylated fatty acids.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; Coculture; Metabolomics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns fármacos desenvolvidos a partir de moléculas produzidas por fungos.....	19
Figura 2 – Exemplos de compostos produzidos por <i>Aspergillus niger</i> .....	21
Figura 3 – Exemplos de compostos isolados de coculturas. ....	23
Figura 4 – Exemplos de compostos isolados de cocultura de <i>Aspergillus niger</i> . .....	24
Figura 5 – Esquematização do procedimento de extração dos meios de cultura .....	37
Figura 6 - Esquematização do processo de análise dos extratos.....	38
Figura 7 - Aspecto micromorfológico do fungo avaliado em 7 e 14 dias de cultivo (microcultivo).....	44
Figura 8 - Aspecto micromorfológico do fungo avaliado em 7 e 14 dias de cultivo (microcultivo).....	45
Figura 9 – Cultivo do <i>A. niger</i> em diferentes meios de cultura após 28 dias	47
Figura 10 – Comparação visual de cromatogramas .....	49
Figura 11 – Representação das <i>features</i> antes e depois da aplicação dos filtros de branco e de fragmentação no software MS-DIAL no modo positivo e negativo .....	50
Figura 12 – Exemplo de fragmentação <i>in-silico</i> realizada pelo software MS-FINDER.....	51
Figura 13 – Exemplo de comparação espectral realizada pela plataforma GNPS .....	53
Figura 14 – Exemplo de utilização da Rede Molecular para auxílio da correta identificação de compostos químicos .....	55
Figura 15 – Tensidol A e B, Carbonarone A, B e Pestalamida A.....	56
Figura 16 – Exemplo de diferentes estruturas de bis- $\gamma$ -naftopironas encontradas no gênero <i>Aspergillus</i> . ....	57
Figura 17 – Exemplo de fragmentação na fonte entre Aurasperonas .....	60
Figura 18 – Atromentina, terfenilas e derivados .....	61
Figura 19 – Recorte da rede molecular formada pela plataforma GNPS.....	70
Figura 20 – Gráfico de PCA para os extratos de diferentes cultivos de <i>A. niger</i> .....	74

Figura 21 – Gráfico de PLS-DA para os extratos de diferentes cultivos de <i>A. niger</i> .....	75
Figura 22 – <i>Features</i> de importância na diferenciação dos grupos na análise de PLS-DA através da utilização do VIP score no componente 2.....	77
Figura 23 – Mapa de calor das <i>features</i> detectadas extratos de diferentes cultivos de <i>A. niger</i> realizado através do software Metaboanalyst 5.0 .....	79
Figura 24 – <i>Features</i> presentes em maior intensidade na cocultura em comparação com os outros meios de cultivo.....	80

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Concatenação dos Compostos sugeridos através da análise de extratos de <i>Aspergillus niger</i> por UPLC-ESI-QToF-DDA pelos software MS-FINDER v 3.5.2, SIRIUS v5.8.1 e pela plataforma GNPS .....	65
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de picos referentes a bis- $\gamma$ -naftopironas no modo de ionização positivo .....	58
Tabela 2 – Valores de $R^2$ , $Q^2$ , e Acurácia para a análise de PLS-DA .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
AcOEt	Acetato de Etila
BGC	<i>Biosynthetic Gene Cluster</i> , Grupo de genes biossintéticos
ButOH	Butanol
DCM	Diclorometano
DDA	<i>Data-Dependent Acquisition</i> , Aquisição Dependente de Dado
DIA	<i>Data-Independent Analysis</i> , Aquisição Independente de Dado
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> , Ionização por Electrospray
ESI+	Ionização por Electrospray com carga positiva
ESI-	Ionização por Electrospray com carga negativa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Space</i> , Espaçador interno transcrito
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i> , Geralmente considerado como seguro
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
MS/MS	<i>Tandem Mass spectrometry</i> , Espectometria de massas em tandem
MS2	Perfil de fragmentação de Massas
N.I.	Não Identificado
nrPKS	Non-reducing <i>polyketide synthase</i> , sintase de policetídeo não redutora
NRPS	<i>Non ribosomal peptide synthase</i> , sintase de peptídeo não-ribossomal
NRPS-like	<i>Non ribosomal peptide synthase like</i> , similar à sintase de peptídeo não-ribossomal
PCA	<i>Principal component analysis</i> , Análise por Componentes Principais
PKS	<i>Polyketide synthase</i> , sintase de policetídeo
PLS-DA	<i>Partial least squares-discriminant analysis</i> , Análise discriminante com calibração multivariada por mínimos quadrados parciais
PN	Produtos Naturais
qTOF	<i>Quadrupole Time of Flight</i> , Quadrupolo-Tempo de Voo
UPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Performance

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>18</b>
2.1	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	18
<b>2.1.1</b>	<b>Metabólitos secundários</b> .....	<b>18</b>
2.1.1.1	<i>Aspergillus niger</i> .....	19
2.1.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
<b>2.1.2</b>	<b>Cocultura como meio de exploração química</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Metabolômica no estudo de produtos naturais</b> .....	<b>26</b>
2.1.3.1	<i>Desreplicação auxiliada por software</i> .....	27
2.1.3.2	<i>Pontos de atenção na desreplicação auxiliada por software</i> .....	30
2.2	OBJETIVOS .....	33
<b>2.2.1</b>	<b>Objetivos Gerais</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>33</b>
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
<b>2.3.1</b>	<b>Caracterização do <i>Aspergillus niger</i></b> .....	<b>34</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Realização dos cultivos</b> .....	<b>35</b>
2.3.2.1	<i>Composição dos meios de cultura</i> .....	35
2.3.2.2	<i>Preparo da solução de esporos</i> .....	35
2.3.2.3	<i>Inoculação e cultivo dos meios de cultura</i> .....	36
<b>2.3.3</b>	<b>Produção dos extratos</b> .....	<b>36</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Análise dos extratos</b> .....	<b>38</b>
2.3.4.1	<i>Preparo das amostras</i> .....	38
2.3.4.2	<i>Análise das amostras por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS</i> .....	38
2.3.4.3	<i>Transformação dos dados para mzML</i> .....	39
2.3.4.4	<i>Análise pelo Metaboanalyst 5.0</i> .....	42
2.3.4.5	<i>Análise dos dados com MS-DIAL</i> .....	40
2.3.4.6	<i>Análise dos dados com MS-FINDER</i> .....	40
2.3.4.7	<i>Análise dos dados com SIRIUS</i> .....	41
2.3.4.8	<i>Análise dos dados com GNPS</i> .....	42
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
<b>2.4.1</b>	<b>Caracterização do fungo <i>Aspergillus niger</i></b> .....	<b>44</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Composição dos meios de cultura e cultivo dos fungos</b> .....	<b>46</b>

<b>2.4.3</b>	<b>Análises estatísticas do perfil metabolômico das culturas</b>	Erro! Indicador não definido.
<b>2.4.4</b>	<b>Identificação dos metabólitos</b>	<b>49</b>
2.4.4.1	<i>Resultado da comparação estrutural pelo GNPS e identificação molecular pelo DEREPLICATOR+</i>	52
2.4.4.2	<i>Tensidol e Carbonarones</i>	55
2.4.4.3	<i>Bis-<math>\gamma</math>-naftopironas</i>	56
2.4.4.4	<i>Atromentina, ácido telefórico e possíveis derivados</i>	61
2.4.4.5	<i>Lipídeos e derivados de terpenos</i>	62
2.4.4.6	<i>Metabólitos Não Identificados (N.I.)</i>	63
2.4.4.7	<i>Considerações sobre as moléculas identificadas e a espécie</i>	64
2.4.4.8	<i>Moléculas identificadas</i>	65
<b>2.4.5</b>	<b>Perfil metabólico entre coculturas e a Rede Molecular como forma de comparação de extratos e visualização de dados</b>	<b>69</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Produtos Naturais (PNs) são uma fonte rica de compostos bioativos. Em geral, produtos naturais possuem ampla diversidade estrutural, muitas das quais são quimicamente complexas e pouco exploradas na química medicinal (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Entre os fármacos aprovados pelo órgão estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) até 2019, 66,6% eram PNs diretos ou derivados semissintéticos de produtos naturais, excluindo-se vacinas e medicamentos biológicos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Dentre estes, exemplos de fármacos já comercializados derivados de metabólitos secundários de fungos incluem os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e cefalosporinas (como a penicilina), o antifúngico griseofulvina, o imunossupressor ciclosporina, o antilipêmico lovastatina e uma série de outros compostos utilizados tanto na medicina quanto na agricultura, movimentando mais de 30 bilhões de dólares somente na área farmacêutica até a data do estudo (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011)

Fungos mostram-se uma fonte interessante de compostos naturais devido a sua onipresença, extensa biodiversidade e pela alta quimiodiversidade que podem apresentar dentro da mesma espécie. Não obstante, outros fatores de grande importância são a capacidade de serem cultivados em laboratório, da produção de seus metabólitos serem otimizadas, assim como a possibilidade de serem escalonadas (BERTRAND et al., 2014).

Entretanto, uma das grandes dificuldades no estudo de PNs de fungos, assim como de outros microorganismos, é a grande quantidade de isolamento de estruturas já descobertas. Uma das metodologias utilizadas para contornar este problema e favorecer a produção de novas estruturas químicas é baseada na ecologia química: o cocultivo. (ARORA et al., 2020; BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014). No meio ambiente, por necessitar interagir com uma gama de outros organismos e com o estresse biótico e abiótico, o fungo utiliza uma grande variedade de metabólitos secundários, servindo para múltiplos propósitos nas interações entre estes organismos. São os metabólitos secundários que servem como comunicação, mecanismo de defesa, mediações simbióticas, ataques diretos à competidores ou desarmamento de mecanismos de defesa (SPITELLER, 2015)

Levando em conta a ecologia química e a interação forçada entre os microrganismos nesta metodologia, a adaptação dos microrganismos à cocultura pode levar a modulação do genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma dos microrganismos utilizados no estudo, sendo, portanto, uma maneira de induzir a produção e diversidade de metabólitos secundários, podendo resultar na descoberta de novas moléculas (BERTRAND et al., 2014). Apesar disso, pouco se sabe sobre como esta metodologia afetará o perfil metabólico dos fungos, ou que classe ou modificação de moléculas serão resultantes de cada interação. (ARORA et al., 2020)

O *Aspergillus niger* é um fungo ambiental com um longo histórico de utilização na biotecnologia, com mais de 250 metabólitos secundários com ampla diversidade química já terem sido obtidos através do *A. niger*. (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018; LIMA et al., 2019) Apesar da cocultura entre *A. niger* e outros microorganismos já ser relatada na literatura, há um grande potencial biossintético ainda a ser explorado com esta metodologia visto a grande quantidade de genes crípticos neste fungo (LIMA et al., 2019; YU et al., 2021). O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura altamente distribuída na natureza, sendo encontrada naturalmente em frutas, grãos, insetos e outros. Sua utilização industrial principal é para a fermentação de açúcares em etanol e gás carbônico, sendo utilizada principalmente na indústria de bebidas alcoólicas, panificação e bioetanol (PARAPOULI et al., 2020). Apesar do pequeno metaboloma, esta levedura é capaz de mediar complexos mecanismos em cocultura (BRANCO et al., 2014; CONTRERAS-RUIZ et al., 2023; PARAMITHIOTIS; KATIDI; DROSINOS, 2021).

Apesar da cocultura entre *A. niger* e *S. cerevisiae* já ter sido estudada anteriormente para a produção de bioetanol por diversos autores, não há nenhuma publicação visando o estudo dos metabólitos secundários advindos desta combinação.

Este trabalho, portanto, visa estudar o perfil metabólico advindo da cocultura do *Saccharomyces cerevisiae* e do *Aspergillus niger*. Tendo em vista que a cocultura pode induzir a produção e/ou mudança do perfil metabólico através da interação entre dois microrganismos; E que os metabólitos secundários possuem papel central na adaptação e interações entre os microrganismos, pretende-se verificar de que forma a cocultura destes dois microrganismos em diferentes meios de cultura afetará o perfil de metabólitos secundários produzidos por eles.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

#### 2.1.1 Metabólitos secundários

Compostos químicos de baixo peso molecular presentes nos produtos naturais (PNs) que possuem atividade biológica são, em geral, compostos produzidos através do metabolismo secundário de plantas, fungos, bactérias, algas, esponjas marinhas e outros seres vivos. Enquanto o metabolismo primário engloba, em termos amplos, a bioquímica de estruturas essenciais à vida, como a biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos, gorduras e carboidratos, o metabolismo secundário – que produz os metabólitos secundários – é tido em linhas gerais como um metabolismo adaptativo que auxilia na sobrevivência do organismo (DEWICK, 2009)

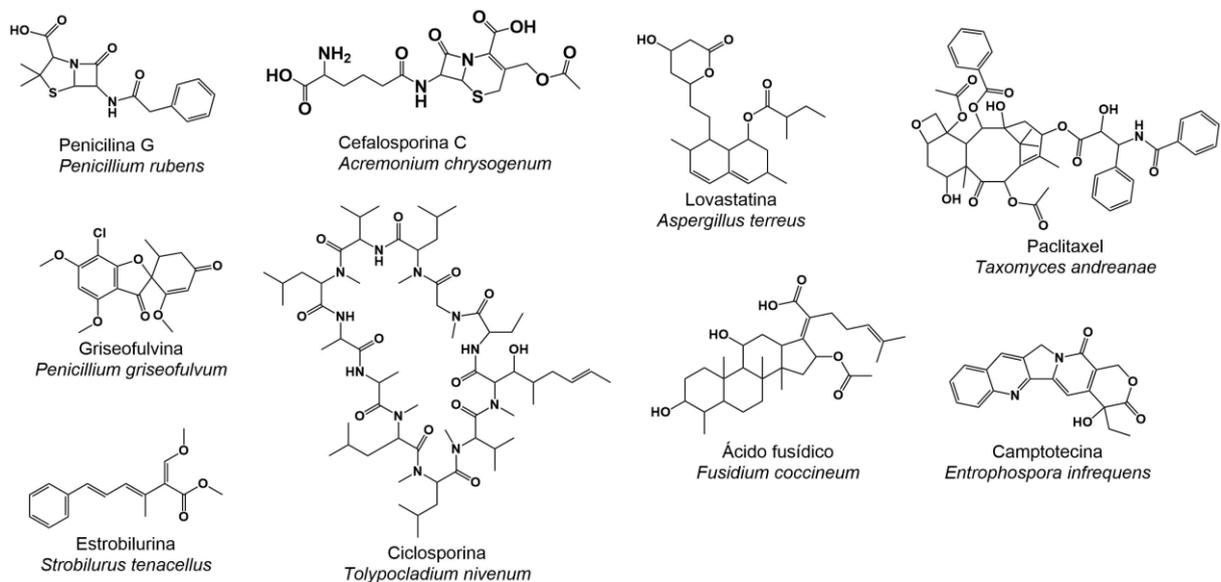
Os metabólitos secundários são produzidos através de processos alternativos aos processos fundamentais da bioquímica dos seres vivos, como da fotossíntese, da glicólise e do ciclo de Krebs. Apesar de serem produzidos a partir de uma quantidade limitada de derivados do metabolismo primário, podendo-se citar a acetil coenzima A, ácido chiquimico, lisina, histidina, fenilalanina, tirosina, mevalonato e o metileritrol, a diversidade estrutural dos metabólitos secundários tende ao infinito. Isto devido às complexas e diversas rotas biossintéticas utilizadas na produção dos metabólitos secundários. (DEWICK, 2009). Entre as classes de metabólitos secundários encontram-se os alcalóides, os derivados de ácidos graxos, policetídeos, fenilpropanoides, flavonoides, terpenoides e outros.

Os PNs, além de apresentarem estruturas químicas únicas, diversas e complexas, altamente funcionalizadas e comumente contendo sistemas policíclicos, estes ocupam regiões pouco exploradas dentro do espaço químico (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). A exploração de PNs, portanto, pode levar a descoberta de novas estruturas de interesse farmacêutico.

Dentro dos organismos explorados para obtenção de PNs, fungos são uma fonte reconhecida de metabólitos secundários com potencial atividade farmacológica. Entre os compostos já obtidos de fungos, podem ser citados o antibacteriano penicilina (*Penicillium rubens*), cefalosporina (*Acremonium chrysogenum*) e ácido fusídico (*Fusidium coccineum*), os antitumorais paclitaxel (*Taxomyces andreanae*) e

camptotecina (*Entrophospora infrequens* e diversos outros endofíticos), o imunossupressor ciclosporina A (*Tolypocladium nivenum*), o antifúngico griseofulvina (*Penicillium griseofulvum*), o antilipêmico Lovastatina (*Aspergillus terreus* e outros diversos fungos) e o fungicida agrícola estrobilurina (*Strobilus tenacellus*), compostos revolucionários e de importância ímpar na medicina e agricultura atual. (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; SANCHEZ; DEMAIN, 2017). A comercialização destes medicamentos movimentou mais de 30 bilhões de dólares somente na área farmacêutica até 2004, podendo ser ainda maior quando levado em conta as moléculas fúngicas utilizadas na agricultura. (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011)

Figura 1 – Estrutura química de alguns fármacos desenvolvidos a partir de moléculas produzidas por fungos.



Fonte: adaptado de SANCHEZ; DEMAIN, 2017

### 2.1.1.1 *Aspergillus niger*

O *Aspergillus niger* é um fungo ambiental, amplamente disperso e de extrema adaptabilidade, sendo encontrado no solo, oceano, ártico, e até no espaço. Ele também é encontrado habitando diversos animais e plantas como ervas, arbustos, árvores, líquens, camarões, e esponjas marinhas, além disso é considerado um fungo endofítico. Apesar de crescer bem em diferentes meios de cultura e condições de cultivos, seu metabolismo é altamente adaptável e é afetado por diversos fatores, sendo entre eles, a composição do meio de cultura (YU et al., 2021).

Este fungo é amplamente utilizado na indústria biotecnológica, sendo a principal fonte de ácido cítrico bioproduzido, um dos principais produtores de diversos outros ácidos orgânicos e fonte de uma grande diversidade de enzimas e metabólitos secundários com aplicações diversas (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018). Além disso, o *A. niger* possui o status de GRAS (do inglês *Generally Regarded As Safe*, ou comumente reconhecido como seguro em tradução livre) para a produção de compostos, sendo os produtos biotecnológicos dele não sendo considerado um risco à saúde desde que cepas adequadas sejam utilizadas e se siga as boas práticas na fabricação de seus produtos; Isto se deve ao fato de que este micro-organismo não apresenta grandes problemas quanto à sua alergenicidade e não é patogênico *per se*, sendo considerado um patógeno oportunista. (SCHUSTER et al., 2002) Apesar de poucas espécies de *Aspergillus niger* serem produtoras de Ochratoxina (entre 3-10% das cepas), o *A. niger* pode também produzir Fumosininas B2 e B4, pontos a serem levados com atenção quanto à programas de testagem. (NIELSEN et al., 2009; SCHUSTER et al., 2002).

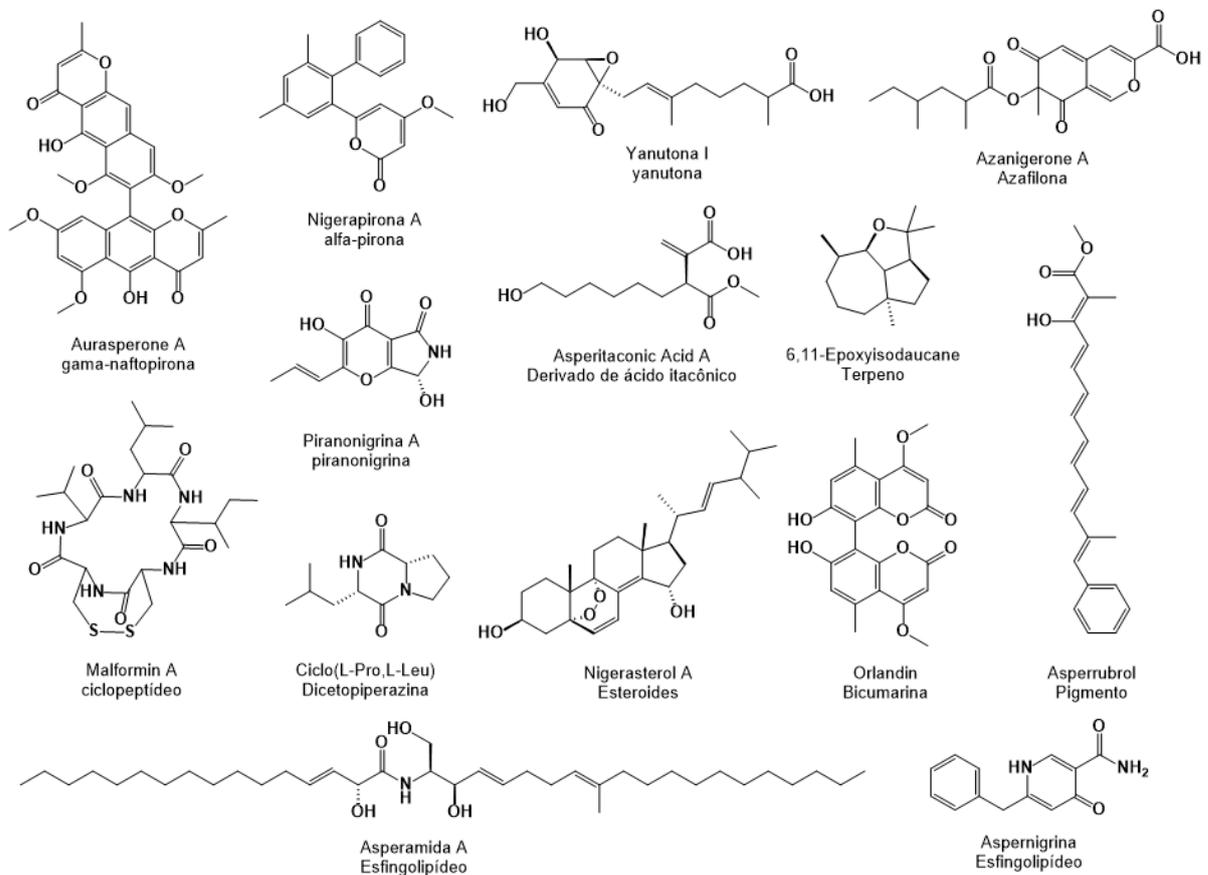
O *A. niger* também tem sido estudado para a produção de metabólitos secundários devido à grande diversidade estrutural que estes possuem (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018; LIMA et al., 2019). Foram reportados, até então, metabólitos secundários que podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em treze diferentes grupos: Nafto- $\gamma$ -pironas,  $\alpha$ -pironas, yanutonas, ciclopeptídeos, piranonigrinas, dicetopiperazinas, derivadas do ácido itacônico, terpenos, esteroides, azafilonas, bicumarinas, pigmentos diversos e esfingolipídeos.

Ademais, uma série de compostos miscelâneos e biotransformados foram reportados, totalizando 265 metabólitos secundários ligados ao *A. niger*. Para as moléculas isoladas foram relatadas uma gama de atividades como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiparasitária, fibrinolítica, proteolítica, anticolagenase, antiviral e antiproliferativa contra uma gama de linhagens celulares, além de uma outra miscelânea de atividades (LIMA et al., 2019).

Apesar disso, um estudo genético apontou que entre as cepas de *A. niger* testadas, todas elas possuíam ao menos 20 BGCs (do inglês *Biosynthetic gene cluster* ou grupos de genes biossintéticos) crípticos (não expressos em condições normais de cultivo) envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários. Entre os principais BGCs crípticos encontram-se os PKS (do inglês *polyketide synthase*, ou sintase de policetídeos), NRPS (do inglês *nonribosomal peptide synthetase* ou sintase

de peptídeos não-ribossomais) e NRPS-like (do inglês *nonribosomal peptide synthetase-like* ou similar à sintase de peptídeos não-ribossomais), *Terpene synthase*, e clusteres híbridos, sendo eles envolvidos na síntese de compostos indólicos, terpênicos, policetídeos e seus híbridos, classes as quais possuem potencial para aplicações farmacológicas (YU et al., 2021). Ressalta-se, ainda, a falta de estudos para ativação de genes críticos em *A. niger*, assim como estudos na metodologia de cocultura. (LIMA et al., 2019).

Figura 2 – Exemplos de compostos produzidos por *Aspergillus niger*



Fonte: Adaptado de LIMA et al., 2019

### 2.1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura amplamente distribuída na natureza. Ela é encontrada naturalmente em frutas, solo, troncos de árvores, diversas plantas e em insetos. Seu uso na indústria já é consagrado devido suas capacidades fermentativas, sendo utilizado na indústria de vinhos, cervejas e bebidas alcólicas

num geral, na indústria de panificação e na produção do bioetanol (PARAPOULI et al., 2020). Esta levedura teve seu genoma sequenciado em 1996 (GOFFEAU et al., 1996), sendo um dos seres vivo mais extensivamente estudado no planeta. O *S. cerevisiae* mostra-se de interesse na pesquisa devido ao fato de possuir um status GRAS, ser de baixo custo e fácil acesso, ser amplamente estudado e possuir uma ampla maquinaria de biotransformação, realizando reações de redução, hidrólise e oxidação (KHOR; UZIR, 2011).

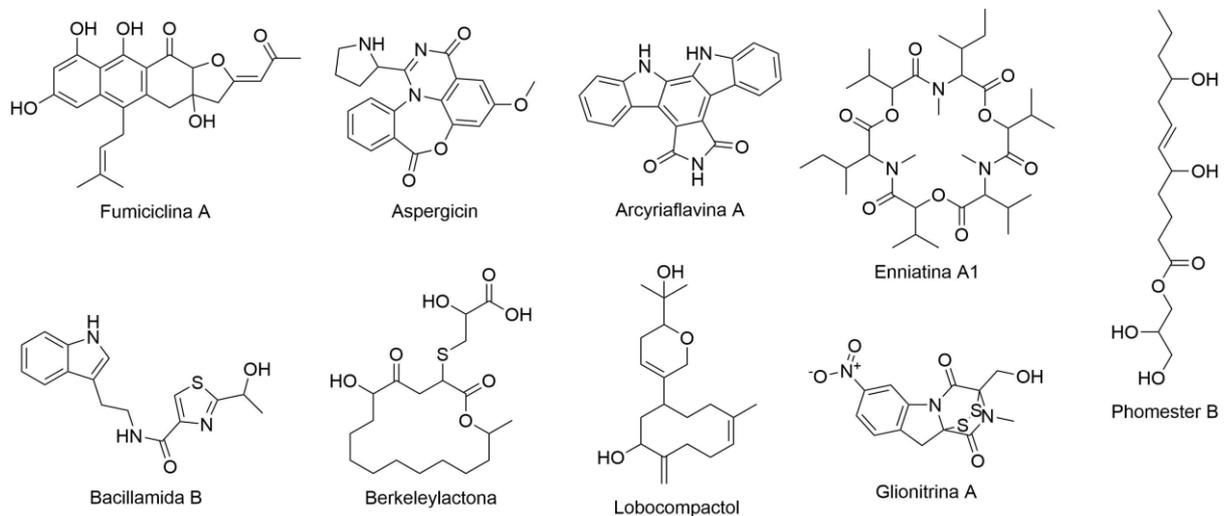
### **2.1.2 Cocultura como meio de exploração química**

A metodologia tradicional de obtenção de metabólitos secundários de microrganismos, que se apoia na extração e isolamento destes compostos em meios de culturas tradicionais, está se tornando ineficiente devido à grande quantidade de isolamento de compostos já descobertos (BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014) Isso se deve, em parte, a uma grande quantidade de grupos de genes crípticos estarem silenciados em condições tradicionais de cultivos ((SCHERLACH; HERTWECK, 2009)). Devido a isso, somente uma fração do amplo potencial biossintético de micro-organismos foi descoberta (MARMANN et al., 2014).

Entre as metodologias que são utilizadas para a exploração do potencial biossintético dos micro-organismos, a cocultura baseia-se na premissa que o ambiente natural é repleto de interações bióticas-abióticas e bióticas-bióticas, entre quais podem ser citadas a comunicação, simbiose e competição, interações as quais promovem a expressão de diversos genes biossintéticos. Ao contrário da metodologia tradicional da cultura de uma única espécie no meio de cultura, o cocultivo força a interação entre os micro-organismos, favorecendo a produção de metabólitos secundários (BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014; SPITELLER, 2015). A interação entre estes micro-organismos é uma provocação deliberada para ativação e expressão de genes crípticos que se encontram silenciados em condições de cultivo comuns e ativam-se em situações de estresse. Apesar da cocultura poder atuar tanto a nível de genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma, ainda são desconhecidos os mecanismos exatos por trás das mudanças causadas no metabolismo, ainda mais visto que tais mecanismos podem ser espécie dependentes (BERTRAND et al., 2014; MARMANN et al., 2014)

Esta metodologia já é bem sucedida na exploração do diverso potencial biossintético de microrganismos para a produção de metabólitos secundários, resultando tanto no aumento da produção de alguns metabólitos, na indução de novos compostos ou na fusão de mecanismos biossintéticos (ARORA et al., 2020). Uma série de compostos já foram produzidos segundo esta metodologia, entre eles policetídeos, macrolídeos, diterpenoides, oxylipinas, ácidos graxos, ciclopeptídeos, dicepiperazinas, nitrogenados miscelâneos e uma série de alcalóides, entre eles benzilaminicos, fenazínicos e pirrólicos. (ARORA et al., 2020)

Figura 3 – Exemplos de compostos isolados de coculturas.



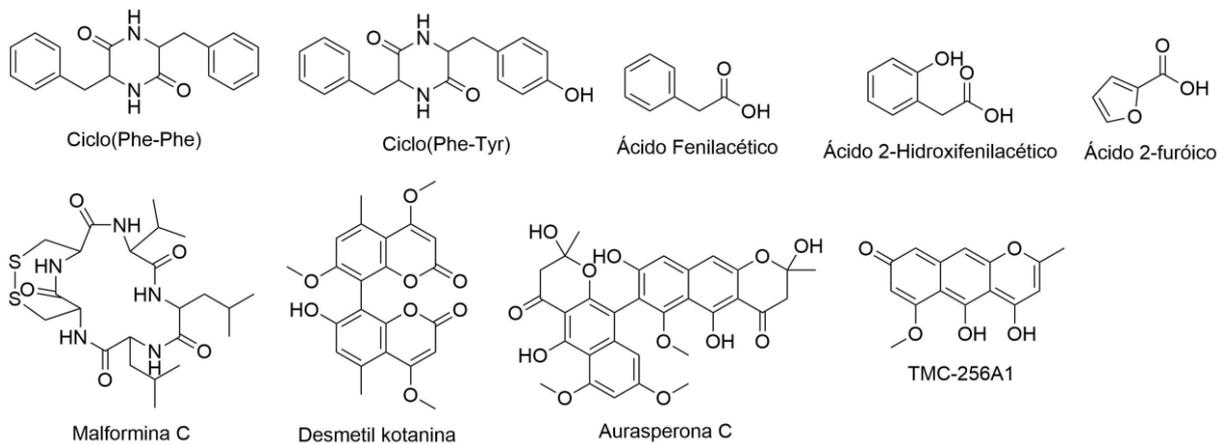
Fonte: Adaptado de Arora et al., 2020

Legenda: Fumicinina A, da cocultura de *Aspergillus fumigatus* e *Streptomyces rapamycinicus*; Enniatina A1, da cocultura *Fusarium tricinctum* e *Sreptomyces lividans*; Phomester B, da cocultura de *Phoma* sp. e *Armillaria* sp.; Aspergicin, da cocultura de duas espécies de *Aspergillus* sp.; Bacillamide B, da cocultura líquida de *Streptomyces* sp e *Bacillus mycoides*; Arcyriaflavin A, da cocultura de *Streptomyces cinnamoneus* e *Tsukamurella pulmonis*; Glionitrina A, da cocultura líquida de *A. fumigatus* e *Sphingomonas* sp.; Lobocompactol, da cocultura de *Streptomyces cinnabarius* e *Alteromonas* sp.; Berkeleylactona, da cocultura de *Penicillium fuscum* e *Penicillium camembertii*;

Concomitantemente, a cocultura de *S. cerevisiae* com outros microrganismos ou de *S. cerevisiae* e *A. niger* já são extensivamente estudadas na literatura científica, mas até a data da escrita desta dissertação, os estudos focaram na verificação da produção de etanol, enzimas, proteínas de interesse tecnológico e melhoramento de processos alimentícios e biotecnológicos. Faltam, portanto, estudos que foquem na verificação de metabólitos secundários advindo da cocultura de ambos.

Até 2023, foram relatados 155 estudos envolvendo diferentes espécies de *Aspergillus spp.* em diferentes condições de cocultura, resultando em cerca de 30 metabólitos novos, super-expressos ou sub-expressos (ALANZI et al., 2023). Tratando-se do *Aspergillus niger*, verificou-se que a cocultura de *Bacillus subtilis* provocou mudanças metabólicas em ambos microorganismos (BENOIT et al., 2015), aumentou a produção dos compostos ácido 2-fenilacético, ácido 2-hidroxiacético e derivado de dicetopiperazina com duas unidades de Phe-Phe quando cultivado com *Streptomyces coelicolor*, (WU et al., 2015), causou a produção de um novo metabólito secundário quando cultivado com *Monascus spp.* (YUAN; CHEN, 2021) e resultou na produção dos metabólitos malformina C, TMC-265A1, demetil kotatina e aurasperona C quando cultivado com *Mycobacterium smegmatis* (JOMORI et al., 2020).

Figura 4 – Exemplos de compostos isolados de cocultura de *Aspergillus niger*.



Fonte: Adaptado de Alanzi et al, 2023

Legenda: Ciclo(Phe-Phe), Ciclo(Phe-Tyr), Ácido Fenilacético, Ácido 2-hidroxifenilacético e Ácido 2-furóico resultantes da cocultura de *A. niger* com *Streptomyces coelicolor*. Malformina C, Desmetil kotantina, Aurasperona C e TMC-256A1 resultantes da cocultura de *A. niger* e *Mycobacterium smegmatis*.

Já para o *S. cerevisiae*, apesar deste possuir um perfil metabólico secundário pequeno (BOND; TANG; LI, 2016), as coculturas entre microorganismos e o *S. cerevisiae* são complexas e envolvem regulação do consumo de nutrientes e proteínas, assim como a produção de peptídeos antimicrobianos (BRANCO et al., 2014; PARAMITHIOTIS, KATIDIS, DROSINOS, 2021; CONTRERAS-RUIZ et al., 2023).

Apesar de ser esperado mudanças no perfil metabólico como aumento de produção de metabólitos, indução da produção de novos metabólitos ou da fusão de mecanismos bioquímicos entre os microorganismos, há dificuldade tanto na predição do tipo de perfil metabólico resultante da cocultura, quanto na predição das estruturas dos novos metabólitos gerados, ou ainda mesmo se haverá a formação de algum metabólito nunca reportado nas espécies, assim como se será realizada a produção de estruturas químicas nunca relatadas (ARORA et al., 2020; BERTRAND et al., 2014). Não obstante, até o momento, não há nenhum tipo de correlação entre o de meio de cultura utilizado, os tipos de interações entre os microrganismos, os tipos de microrganismos utilizados e as moléculas produzidas por eles (ARORA et al., 2020).

Ainda assim, percebe-se uma tendência quantos às propriedades físico-químicas e biológicas dos compostos produzidos através da cocultura. Compostos produzidos através de cocultura são majoritariamente antibacterianos, citotóxicos, antifúngicos ou antiparasitário, assim como possuem baixo peso molecular e baixa hidrofobicidade, suficiente para o composto ser excretado no meio de cultura. Estes dados corroboram com a hipótese de os compostos produzidos através de cocultura são utilizados para interações ecológicas entre os micro-organismos, visto que é necessário o metabólito estar disponível no meio para poder interagir com o outro organismo. (MARMANN et al., 2014; BERTRAND et al, 2014; ARORA et al., 2020).

Além disso, outros pontos de atenção devem ser levados em consideração, visto que a metodologia de cocultura possui seus próprios fatores limitantes. Entre eles estão a dificuldade de reprodutibilidade e de escalonamento dos experimentos, pois os mecanismos que levam a formação de novos metabólitos são desconhecidos, estando muitas vezes fora de controle, e a dificuldade de obtenção de quantidade suficientes de metabólitos secundários para isolamento e determinação estrutural, sendo comum produção de metabólitos novos em quantidades ínfimas (ARORA, 2020).

Tendo em vista as dificuldades apresentadas pelo método de cocultura, são propostas algumas maneiras de atenuar os fatores limitantes da técnica. É proposto, portanto, que uma comparação direta com o perfil químico das monoculturas de cada fungo no mesmo meio de cultura possa evidenciar os mecanismos biossintéticos envolvidos, e que a realização de replicatas auxilie na verificação da consistência de produção dos compostos e do perfil químico resultante (ARORA et al., 2020).

### 2.1.3 Metabolômica no estudo de produtos naturais

A metabolômica é uma técnica que visa estudar o perfil global de metabólitos em uma amostra. A técnica tem origem aproximada nos anos de 1950, mas desenvolveu-se rapidamente a partir dos anos 2000 devido a avanços nas tecnologias utilizadas. As técnicas de metabolômica vêm sendo utilizada amplamente no estudo de produtos naturais, seja para identificação de moléculas, auxílio na procura por novas estruturas ou comparação de perfis químicos. (ALLARD et al., 2016; ALLARD; GENTA-JOUVE; WOLFENDER, 2017; SALEM et al., 2020; WANG et al., 2016)

Uma das metodologias de estudo de metabolômica, devido à complexidade dos extratos, é através do uso da cromatografia-líquida acoplada à um espectrômetro de massas em *tandem*, ou LC-MS/MS. (BLAŽENOVÍČ et al., 2018) Nesta técnica, a amostra é injetada através de uma coluna cromatográfica e submetida à passagem de uma fase móvel, seus compostos separados de acordo com suas características físico-químicas e direcionados a um espectrômetro de massas para serem ionizados e fragmentados. O LC-MS/MS possui uma série de vantagens que o tornam eficiente para uso em análises de extratos complexos, como a capacidade de analisar uma ampla gama de polaridade; alta sensibilidade, conseguindo detectar metabólitos em pequenas quantidades; e a velocidade, podendo ser utilizada para uma grande quantidade de amostras. (BLAŽENOVÍČ et al., 2018; SALEM et al., 2020).

Dentro das metodologias de aquisição de dados de massas, duas são as mais utilizadas pela metabolômica: *Data Dependent Acquisition* (DDA) e *Data Independent Acquisition* (DIA). No modo DIA, o perfil de fragmentação é obtido de modo contínuo, fragmentando a totalidade do que é eluído da separação cromatográfica em cada *scan*, gerando um único perfil de fragmentação (MS<sup>2</sup>) da amostra inteira, separado unicamente pelo tempo de retenção. Apesar do modo DIA gerar um perfil de fragmentação mais representativo da amostra total, as técnicas de processamento disponíveis não geram resultados de MS<sup>2</sup> confiáveis devido às dificuldades de desconvolução dos espectro de massas. Já no modo DDA, somente os íons mais intensos são filtrados e seguem para serem fragmentados após a separação cromatográfica. Apesar de não ser representativo da amostra toda e ser enviesado para os íons presentes em maior quantidade na amostra, os dados gerados por este modo de aquisição podem ser diretamente submetidos aos fluxos automatizados de análise de dados. (TEN-DOMÉNECH et al., 2020)

Os dados gerados através das análises por LC-MS/MS são presentes em grande quantidade, altamente complexos e muitas vezes de difícil análise e interpretação. Sendo assim, análises estatísticas se mostram de grande importância para validar e interpretar as diferentes questões biológicas e químicas levantadas. (BARTEL; KRUMSIEK; THEIS, 2013). O MetaboAnalyst5.0 é uma plataforma online de processamento e análise de dados de LC-MS que permite a realização de diferentes análises estatísticas, como análises multivariadas supervisionadas e não supervisionadas, de maneira rápida e automatizada (PANG et al., 2022). Entre as principais análises multivariadas realizadas pela plataforma, encontram-se o PCA, PLS, PLS-DA, HCA e k-cluster (PANG et al., 2022), podendo ser utilizadas para verificar diferenças e similaridades entre amostras complexas.

#### 2.1.3.1 *Desreplicação auxiliada por software*

A identificação estrutural dos compostos químicos contidos nos extratos é de suma importância para a metabolômica, principalmente quando utilizada para a área de produtos naturais. Apesar da possibilidade de identificação das moléculas presentes através de análise manual do perfil de fragmentação, é comum o uso de softwares e plataformas que automatizam o processo de interpretação dos dados (BLAŽENOVIC et al., 2018), sendo citados aqui MS-DIAL, MS-FINDER, SIRIUS e GNPS.

A anotação de compostos por software utiliza uma gama de abordagens, como comparação com banco de dados experimentais de espectros de fragmentação e predição de fragmentação *in-silico*. Recentemente, a eficiência da identificação de moléculas aumentou significativamente tanto devido à avanços nos algoritmos de predição de perfil de fragmentação (SINGH, 2023) quanto devido à avanços em aprendizado de máquina (DÜHRKOP et al., 2021; HOFFMANN et al., 2022), mostrando que a anotação de estruturas químicas por software através de dados de MS2 vem sendo empregada com maior confiabilidade. (BLAŽENOVIC et al., 2018).

A comparação espectral, uma das técnicas de elucidação estrutural, é realizada utilizando o espectro de fragmentação obtido no experimento com um banco de dados de espectros de fragmentação experimentais. Este banco de dados utilizado pode ser tanto *in-house*, quanto um banco de dados de terceiros, sendo eles públicos ou privados. A comparação é feita através do alinhamento dos picos de fragmentação e

posterior quantificação dos resultados, que é realizada através de índices de similaridade espectral, os quais pode ser obtido por algoritmos como o Produto Escalar (do inglês *Dot Product*), o índice de Jaccard ou o rank X, os quais levam em consideração outras métricas além da  $m/z$  dos fragmentos e suas ausências ou presenças. (SCHEUBERT; HUFISKY; BÖCKER, 2013; SCHOLLÉE et al., 2017). Deve-se atentar, porém, ao fato de que os parâmetros de aquisição dos espectros de fragmentação por ESI normalmente não são padronizados e que o perfil de fragmentos tende a mudar dependendo das condições cromatográficas e do tipo de equipamento e energia de colisão utilizada. Além do mais, poucos compostos possuem perfil de fragmentação obtido para estas bibliotecas, sendo as bibliotecas espectrais normalmente restritas aos compostos de fácil aquisição. Assim, a comparação estrutural, apesar de ser uma das melhores técnicas para anotação de compostos em metabolômica, possui um grande viés e limitações em seu uso. (SCHEUBERT; HUFISKY; BÖCKER, 2013; SCHOLLÉE et al., 2017).

A predição *in-silico*, por outro lado, é um processo computacionalmente complexo, envolvendo a utilização de algoritmos sofisticados para química computacional e análise de dados espectrais. O objetivo da predição *in-silico* é a reconstrução da estrutura da molécula através da interpretação das informações contidas nos picos gerados durante a ionização e fragmentação. Esta interpretação envolve inicialmente o cálculo das fórmulas moleculares mais prováveis para cada  $m/z$  dos íons precursores, normalmente através da verificação do padrão isotópico e da abundância relativa de cada íon. Os algoritmos de predição, então, utilizam-se de regras de fragmentação pré-definidas para gerar uma biblioteca teórica de possíveis fragmentos para as estruturas condizentes às fórmulas moleculares apontadas para os íons precursores, para então comparar os fragmentos teóricos com os obtidos experimentalmente. Esta comparação é então submetida a uma série de verificações, como cálculo de índices de similaridade espectral, de impressões digitais moleculares ou de seguimento e quebra de regras específicas, que visam fornecer as estruturas plausíveis para as informações fornecidas (DÜHRKOP et al., 2021; HOFFMANN et al., 2022; SINGH, 2023). Apesar de ser uma técnica abrangente que visa solucionar o limite de disponibilidade experimental dos espectros de fragmentação, necessitando – em teoria – somente da estrutura da molécula, esta técnica possui vieses importantes de serem levados em consideração, discutidos em maior profundidade no item **2.1.3.2**

O MS-DIAL é um software que realiza a desconvolução de espectros de massas para análise de dados de LC-MS, permitindo a análise de grandes volumes de dados simultaneamente. Baseando-se em algoritmos de agrupamento hierárquico, que agrupam os dados de massas de acordo com o padrão isotópico, relação massa/carga ( $m/z$ ) e tempo de retenção, o software gera uma série de *features*. Cada *feature* corresponde a um conjunto de dados que caracterizam um pico detectado pelo massas e interpretado pelo software, contendo informações sobre a  $m/z$ , tempo de retenção, intensidade, área sobre a curva, perfil de fragmentação e outros dados. Ademais, é possível realizar automaticamente a exclusão de ruídos, artefatos e informações contidas nos brancos amostrais. (TSUGAWA et al., 2015, 2020)

Após a desconvolução dos dados, através das informações contidas em cada *feature*, é possível realizar a elucidação estrutural dos compostos presentes nas amostras através dos seus dados de fragmentação. Utilizado para tal, o MS-FINDER é um software de elucidação estrutural que utiliza uma abordagem computacional envolvendo o cálculo da fórmula molecular através da  $m/z$  do íon e da abundância dos isótopos detectados para o íon precursor, seguido da comparação dos espectros de massas obtidos experimentalmente (*feature*) com uma biblioteca de fragmentos teóricos gerados pelo software. Estes fragmentos teóricos são obtidos *in-silico* a partir das estruturas de moléculas presentes em diversos bancos de dados submetidas à *Regras de Rearranjo de Hidrogênio*. As Regras de Rearranjo de Hidrogênio são uma série de “regras” que levam em conta os tipos de ligações químicas presentes na molécula e a probabilidade da clivagem de cada ligação, assim como a estabilidade relativa de cada fragmento calculado visando a possibilidade de geração de subfragmentos. A comparação entre os dados experimentais de cada *feature* e dos fragmentos preditos são classificados de acordo com uma pontuação que leva em conta a semelhança dos espectros de massas experimental e teórico, valores de erro de massa predita e experimental, correlação entre fragmentos detectados e as próprias regras de rearranjo de hidrogênio. (TSUGAWA et al., 2016)

Outra metodologia de elucidação estrutural é o SIRIUS. Este software utiliza os dados o  $m/z$  experimental das fragmentações para gerar uma árvore de fragmentação teórica baseada nos dados experimentais de cada *feature*. Esta árvore de fragmentação é realizada para cada fórmula molecular predita de ser possível para o íon molecular da *feature* e leva em conta não só os dados experimentais: ela é gerada utilizando uma biblioteca de fragmentos possíveis e perdas baseadas em regras

químicas para poder então correlacionar os sinais detectados experimentalmente. (DÜHRKOP; BÖCKER, 2015). Através da árvore de fragmentação, é gerado um *fingerprint* de cada *feature* com base nos fragmentos e correlações detectadas (CSI:FingerID). Este *fingerprint* é então utilizado juntamente com a fórmula molecular para a procura e validação das moléculas.

O GNPS é uma iniciativa global de análise, comparação e distribuição de dados de LC-MS voltado para metabolômica. (WANG et al., 2016) Através do Molecular Networking Classico, é possível agrupar em *clusters* os compostos de acordo com a similaridade entre os espectros, formando uma rede relacional entre eles. Esta metodologia é uma representação visual das relações entre os compostos, que ajuda a detectar padrões estruturais, analisar famílias químicas e compreender a diversidade química presente nas amostras. O agrupamento e a formação da rede molecular são realizados de acordo o valor de cosseno para cada íon, que é calculado através da vetorização dos valores de MS<sub>2</sub>, levando em conta a quantidade de fragmentos, suas relações massa/carga e a intensidade deles. Cada nó em um cluster representa uma molécula em potencial, e relação entre os nós representa a similaridade entre as moléculas.(RAMOS et al., 2019).

Além da formação da rede molecular, o GNPS também oferece diferentes opções de análises dos dados contidos, como comparação direta com espectros de massas experimentais e busca por análogos. Outras opções de análises avançadas também são possíveis dentro da plataforma, como por exemplo o *DEREPLICATOR+*, focado na identificação de diversas classes de compostos, o qual utiliza a abordagem de predição de fragmentação *in-silico* para sugestão de moléculas. (MOHIMANI et al., 2018).

### 2.1.3.2 Pontos de atenção na desreplicação auxiliada por software

Devido a falhas inerentes dentro do *workflow* metabolômico automatizado, como a alta taxa de falsos positivos e negativos, aumentar o nível de confiabilidade é essencial para uma melhor interpretação dos dados obtidos por LC-MS. Para tal, é de suma importância a meta-integração de diferentes softwares e metodologias de análise de dados, assim como a sobreposição de informações e comparação com a literatura (ALLARD et al., 2016; ALLARD; GENTA-JOUVE; WOLFENDER, 2017; DE JONGE et al., 2022a). Ainda assim, as estruturas anotadas por softwares de

elucidação estrutural baseados em predições são suposições, mesmo com metascoring altos.

Apesar do grande aumento da velocidade na anotação de moléculas, a maior parte dos softwares baseados em fragmentações *in-silico* visa identificar moléculas já identificadas, porém sem perfil de fragmentação adquiridos, através de regras de fragmentação e imposição de scores de confiabilidade, falhando em identificar estruturalmente moléculas sem registros na literatura. (BLAŽENOVIC et al., 2018). É possível, porém, utilizar ferramentas como o *molecular networking* para correlacionar uma *feature* de estrutura desconhecida com moléculas já conhecidas com base em seu perfil de fragmentação, ou pela integração de bibliotecas preditivas como o MINEs. (ERNST et al., 2019; HOFFMANN et al., 2022; JEFFRYES et al., 2015).

Concomitantemente, existe um *viés de sobrevivência* dentro das metodologias de aprendizado de máquina, visto que os algoritmos utilizados são treinados com base nos compostos já conhecidos, fazendo com que compostos desconhecidos similares aos conhecidos sejam mais facilmente identificados. (DE JONGE et al., 2022a). É demonstrado, por exemplo, que uma grande parcela de estruturas químicas não é representada dentro dos modelos utilizados para treinamento dos softwares para tal fim, portanto, limitando as capacidades preditivas destes softwares, além de possivelmente aumentar a taxa de falsos positivos e negativos e tornar os resultados enviesados caso não exista uma boa representatividade de estruturas moleculares. (KRETSCHMER et al., 2023)

Ainda, os metascoring (pontuações geradas pelos próprios softwares) utilizados para avaliar a veracidade de uma predição *in-silico* podem mostrar-se inutilizáveis e não-confiáveis em diversos casos, como por exemplo, onde as regras de avaliação são muito abrangentes ou os critérios de avaliação da predição dos compostos é baseado nos modelos utilizados para treinamento. Ainda, modelos de treinamento *in-silico* ainda baseiam-se em dados experimentais, tornando a utilização de metascoring ainda mais imprevisível e menos importante. (HOFFMANN et al., 2023)

Portanto, apesar de ter a capacidade de identificar uma grande quantidade de compostos de maneira rápida e efetiva, o uso da metabolômica por LC-MS associado às metodologias computacionais traz grandes pontos de atenção que devem ser levados em consideração e discutidos igualmente. Entre eles, atentar-se às limitações das técnicas analíticas, como a co-eluição de compostos, a isomeria, o limite de detecção, aos adutos formados, fragmentação na fonte, e outros; assim como as

limitações das metodologias computacionais como dificuldade e erros de desconvolução dos dados, geração de *features* biologicamente não relevantes advindas de sujeiras, dados reduntantes – devido tanto à problemas de processamento de dados como da própria técnica de LC-MS como adutos e fragmentações na fonte – de falsos positivos como resultado dos processos de elucidação estrutural e de falsos negativos.

Sendo assim, a transparência nos diferentes parâmetros de processamentos, resultados obtidos e padronização das informações químicas reportadas ajudam na interpretação dos dados, na verificação da veracidade dos dados obtidos e na comparação com a literatura (ALSEEKH et al., 2021; DE JONGE et al., 2022a).

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivos Gerais

Identificar os metabólitos secundários produzidos pela cocultura dos fungos *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*.

### 2.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar molecular e morfológicamente o fungo *Aspergillus niger*;
- Realizar o cultivo do *Aspergillus niger* em diferentes monoculturas e em cocultura com *S. cerevisiae*;
- Extrair o meio de cultura com diferentes solventes;
- Analisar os extratos através de UPLC-ESI-qTOF-MS/MS;
- Anotar os metabólitos secundários detectados através de técnicas de desreplicação auxiliada por software;
- Comparar e discutir os resultados obtidos pela desreplicação por diferentes softwares entre si;
- Construir a rede molecular através da plataforma GNPS;
- Realizar análises estatísticas e quimiométricas sobre a cocultura;
- Verificar através das redes moleculares e análises quimiométricas e estatísticas a diferença no metabolismo causada pela cocultura;
- Utilizar os metabólitos anotados como inferência na ativação de vias metabólicas;
- Discutir e comparar dados sobre com a literatura.

## 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1 Adaptação do separador decimal

Para garantir integridade dos dados e correto funcionamento dos softwares utilizados neste trabalho, anteriormente à qualquer tratamento de dado, foi realizado a adaptação do formato decimal do computador. Esta adaptação do formato decimal se deve devido ao Brasil, local onde foi realizado este trabalho, utilizar vírgula como separador decimal e ponto como separador de agrupamento de dígitos, enquanto o Estados Unidos e Japão, locais onde foram desenvolvidos os softwares utilizado neste trabalho para as análises utilizam ponto como separador decimal.

Nas configurações do computador, com sistema operacional Windows, o separador decimal foi definido como o símbolo “.” (ponto), enquanto o separador de agrupamentos de dígitos foi definido com o símbolo “,” (vírgula).

Sendo assim, para manter o mesmo valor de dado, neste trabalho os valores serão descritos utilizando ponto como separador decimal.

### 2.3.2 Caracterização do *Aspergillus niger*

A espécie de *Aspergillus niger* utilizada neste trabalho foi isolada do ambiente previamente à realização deste trabalho. A caracterização do fungo foi realizada através de técnicas morfológicas e moleculares.

Para a identificação micromorfológica do fungo foi utilizada a técnica de Riddell (1950) adaptada. Assim, foi realizado o microcultivo em meio batata dextrose ágar (BDA). Em fluxo vertical, foi transferido para cada lâmina um cubo de ágar BDA (1 x 1 cm) no qual fragmentos das colônias do fungo foram semeadas nos quatro cantos do cubo de ágar e na sequencia cobertos com lamínula. Por fim o papel filtro foi umedecido com água estéril e a câmara foi fechada e incubada a temperatura de 25 °C por 7 e 14 dias. Após, cada lamínula foi retirada com auxílio de pinça e depositada sobre uma lâmina limpa contendo uma gota de lactofenol. Esperou-se a secagem das lâminas em temperatura ambiente e na sequencia as bordas das lamínulas foram vedadas com esmalte incolor e observadas ao microscópio (aumento de 20 e 40x).

A caracterização por técnica moléculas foi realizada através da amplificação e sequenciamento do gene ITS através de parceria com a empresa Neopropecta. Para análise de BLASTn, foi utilizado o banco de dados de região ITS para fungos de referência utilizando o modo megablast para procura de sequências altamente similares. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

### 2.3.3 Realização dos cultivos

Os procedimentos envolvendo a o preparo dos meios de cultura e inoculação dos fungos foram realizados no Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB). Todos materiais utilizados foram autoclavados a 121 °C por 20 min previamente à inoculação. Todos os procedimentos envolvendo os fungos foram realizados em capela de fluxo laminar equipada com lâmpada UV e filtro HEPA e bico de Bunsen. Para cada autoclavagem realizada, reservou-se um meio de cultura não inoculado para garantir a eficiência da esterilização.

#### 2.3.3.1 Composição dos meios de cultura

O meio de cultura para crescimento do *Aspergillus niger* em placa foi adaptado de (PATHMANATHAN, 2014) e constitui-se de 20 g/L de ágar, 10 g/L de proteína de soja hidrolisada e 40 g/L de sacarose. Este ágar foi denominado como ágar-soja

O caldo Saboraud-Dextrose utilizado foi obtido por doação do Laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos (LAMPB).

O meio de cultura utilizado para cocultura (Caldo cocultura) constituiu-se dos seguintes componentes: Sacarose 2 g/L, Bicarbonato de Sódio 2 g/L, Cloreto de Potássio 2 g/L, Fosfato de sódio dibásico 2 g/L e Amido de mandioca 50 g/L e *Saccharomyces cerevisiae* (Fleishmann) 10 g/L (para o meio SA)

#### 2.3.3.2 Preparo da solução de esporos

O preparo da suspensão de esporos de *A. niger* foi realizado utilizando culturas crescidas em placas de ágar-soja por 14 dias, acrescentando-se de 20 mL de água deionizada e raspadas com auxílio de alça de Drigalsky. A suspensão foi coletada em

um tubo Falcon e a contagem de esporos foi realizada em câmara de Newbauer com auxílio de um microscópio ótico e posterior ajuste da concentração para  $1 \times 10^6$  esporos/mL

### 2.3.3.3 *Inoculação e cultivo dos meios de cultura*

Para validação do crescimento do fungo no meio de cultura proposto, foram realizados três diferentes tipos de cultivo variando-se o meio utilizado, aqui denominados SD, SA e CC. A cultura denominada SD foi obtida a partir da inoculação de *A. niger* (1 mL da solução de esporos/100mL) em 200 mL de caldo Sabraud-Dextrose; O meio SA foi obtido a partir da inoculação do *A. niger* (1mL da solução de esporos/100 mL) 200 mL de Caldo Cocultura com o *S. cerevisiae* adicionado juntamente com os outros ingredientes do meio de cultura, sendo assim autoclavado juntamente com o caldo, servindo apenas de nutriente; Enquanto para a cocultura *per se*, denominada CC, inoculou-se ambos o *A. niger* (1 mL da solução de esporos/100 mL) e o *S. cerevisiae* (Fleishmann, 10 g/L) em 200 mL de meio de cocultura autoclavado.

Cada meio de cultura foi cultivado utilizando Erlenmeyers de 500 mL. Para cada meio de cultura utilizado realizou-se uma duplicata.

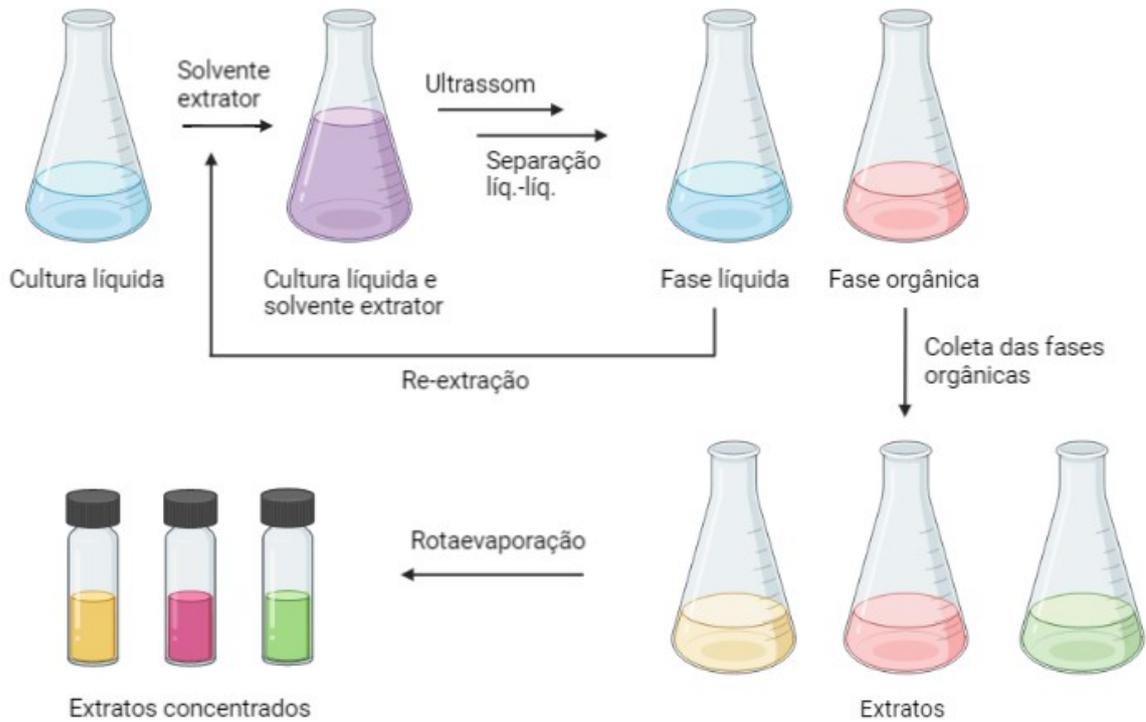
Após a inoculação dos fungos, os meios de cultura foram encubados por 28 dias sem agitação em estufa com temperatura controlada a 28 °C

### 2.3.4 **Produção dos extratos**

Para a extração dos metabólitos das culturas, realizou-se uma extração sequencial da totalidade do meio de cultura (micélio flutuante e meio de cultura) com 100 mL de butanol (ButOH), seguido de 100mL de acetato de etila (AcOEt) e posteriormente com 100 mL de diclorometano (DCM). Para cada solvente de extração utilizado, deixou-se o meio de cultura com o solvente extrator em ultrassonicador por 2h. Após o ultrassom, o meio de cultura com o solvente extrator foi levado a um funil de separação líquido-líquido e separados em fase aquosa (contendo o cultivo) e a fase orgânica (contendo os metabólitos extraídos). A fase orgânica foi seca através

de rota-evaporação em atmosfera reduzida e a fase aquosa re-extraída com o solvente subsequente.

Figura 5 – Esquematização do procedimento de extração dos meios de cultura

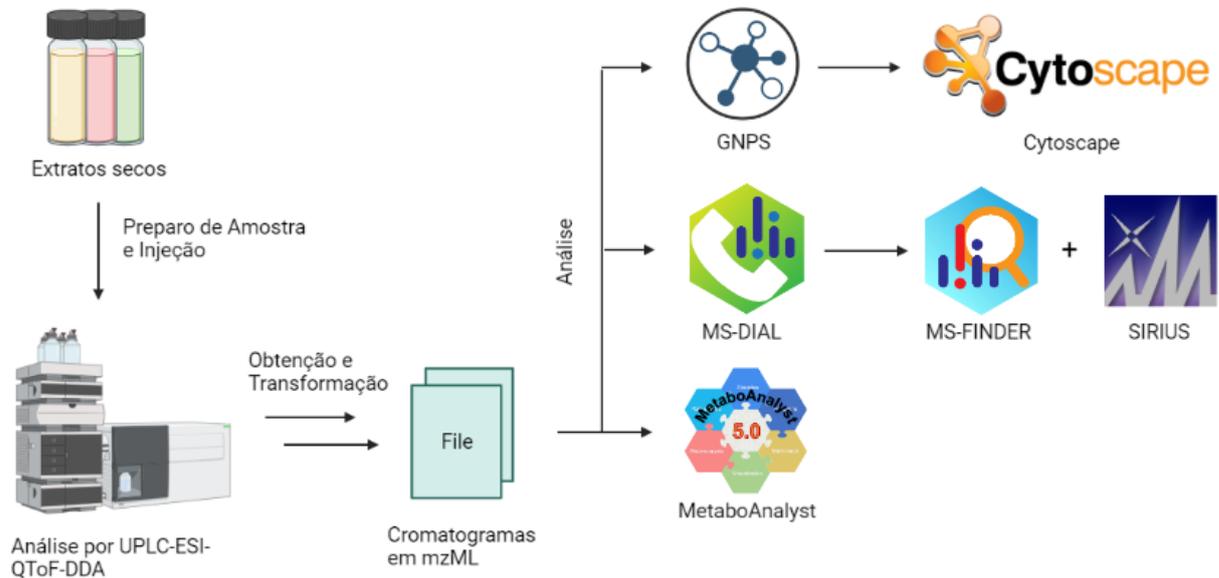


Fonte: O autor, 2023

Para extração dos brancos do meio de cultura, realizou-se a extração de 200mL do meio de cultura SA sem inoculação do fungo *A. niger*, assim como de 20 g do *S. cerevisiae* hidratado em 200 mL de água deionizada segundo a mesma metodologia de extração apresentada.

### 2.3.5 Análise dos extratos

Figura 6 - Esquematização do processo de análise dos extratos



Fonte: O autor, 2023

#### 2.3.5.1 Preparo das amostras

Para a análise no UPLC-ESI-MS/MS, uma massa de 1.6 mg de cada extrato foi solubilizada em 2 mL com MeOH de grau MS atingindo uma concentração de extrato de  $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Com auxílio de uma seringa de vidro de 5mL, todas amostras foram submetidos a filtração em membrana de PVDF de  $0.22 \mu\text{m}$  para remoção de partículas. As amostras foram preparadas em no máximo 24 horas prévias à análise e, quando necessário, mantidas em refrigerador.

#### 2.3.5.2 Análise das amostras por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS

Foi realizada a determinação do perfil químico de cada cultivo através da análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, através do equipamento Xevo G2S QTOF da WATERS São Paulo. Um sistema Acquity UPLC classe H (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com uma matriz de fotodiodo (PDA) detector, trocador de amostras, forno de coluna e uma bomba de solvente quaternário,

bem como uma coluna BEH C18 (50 mm, 1.0 mm, tamanho de partícula 1.7  $\mu\text{m}$  (Waters)) foi utilizado para separação. As amostras foram mantidas a temperatura de 20 °C até o momento da injeção. O sistema de eluição gradiente foi composto de H<sub>2</sub>O acidificada à 0.1% com ácido fórmico (pH 3.0) (A), acetonitrila (ACN - B) em um fluxo de 0.3 mL min<sup>-1</sup>. As condições de eluição seguem como: 0 min 80% (A), 20% (B), 0-1 min 80% (A), 20% (B); 1-12 min 10% (A), 90% (B), 12-14 min 10% (A), 90% (B), 14-15 min 10% (A), 90% (B) e 5 min para reequilibrar a coluna para 80% (A), 20% (B). O volume de injeção da amostra foi de 2  $\mu\text{L}$ .

Um Xevo G2-S QTof (Waters) com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) foi utilizado acoplado ao UPLC para detectar os componentes de cada extrato. Os dados de massas foram coletados no formato DDA (Data Dependent Acquisition), no modo Resolução, com formato de dados no modo centroide, com tempo de scan de 1s, coletados no MS1 em uma faixa de massa de 100-1,500 Da. A coleta de dados de fragmentação (MS2) foi definida para ser ativada quando a intensidade do íon supera o valor de 30,000 e desligada quando abaixo de 30,000 de intensidade. O MS2 foi coletado em uma faixa de massa de 100-1,000 Da, com formato de dados no modo centroide. A energia de colisão foi 6 eV na função MS1, e 30 eV, na função 2. A exatidão de massa foi assegurada durante a aquisição utilizando correção por infusão de um padrão de referência externo (LockSpray™) através da infusão constante de uma solução de leucina-encefalina (1 ng mL<sup>-1</sup>, a 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ ).

O modo de ionização positivo utilizou uma voltagem de capilar de 3 kV, voltagem de cone amostral de 40 V, voltagem *offset* de 80 V, temperatura de dessolvatação de 300 °C, temperatura da fonte de 120 °C, fluxo de gás no cone 100 L h<sup>-1</sup> e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L h<sup>-1</sup>.

O modo de ionização negativo utilizou uma voltagem de capilar de 3 kV, voltagem de cone amostral de 40 V, voltagem *offset* de 80 V, temperatura de dessolvatação de 300 °C, temperatura da fonte de 120 °C, fluxo de gás no cone 100 L h<sup>-1</sup> e fluxo de gás de dessolvatação de 900 L h<sup>-1</sup>.

Os cromatogramas adquiridos estão disponíveis nos apêndices A-F.

### 2.3.5.3 *Transformação dos dados para mzML*

Os dados gerados a partir da leitura do espectrômetro de massas foram convertidos do formato nativo *.raw*, formato proprietário da Waters, para o formato *open source* mzML para posterior uso nos softwares de processamento de dados. A conversão de formato foi realizada utilizando o software Waters2mzML 1.2.0 disponível em < <https://github.com/AnP311/Waters2mzML> >

#### 2.3.5.4 *Análise dos dados com MS-DIAL*

Os dados em formato mzML foram submetidos ao processamento com o software MS-DIAL v 4.92. As informações referentes às análises cromatográficas, como o tipo de ionização, de separação, método LC-MS e modo de ionização foram definidas no início da análise. Posteriormente, foram informados os parâmetros para a coleta, processamento e alinhamento dos dados. A coleta de dados foi realizada com tolerância de 0.015 Da para MS1 e 0.03 Da MS2, respectivamente. Foi selecionada a opção de considerar os elementos cloro e bromo. A detecção de pico foi aplicada com amplitude de 20,000 para a altura mínima do pico e 0.05 Da para a largura do corte de massa. Nos parâmetros de deconvolução foram utilizado valor da janela sigma de 0.5 e 50 de intensidade para o ponto de corte para as informações de MS2. Para o alinhamento foi utilizado um pool de amostras como referência. A tolerância no tempo de retenção do alinhamento foi definida para 0.3 min e 0.015 Da para tolerância do MS1. Foi selecionado a opção de remover *features* com base em informações dos arquivos definidos como branco. Para o modo positivo foram selecionados os adutos como  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[2M+H]^+$ ,  $[2M+Na]^+$  e  $[2M+K]^+$ . Para o modo negativo, os adutos considerados foram  $[M-H]^-$ ,  $[M+Cl-H]^-$ ,  $[M+FA-H]^-$  e  $[2M-H]^-$ .

As *features* contendo informação de MS2 resultantes do processamento e alinhamento foram exportadas no formato *.mgf* para utilização do MS-FINDER e SIRIUS, sendo habilitado o filtro para exportação somente das *features* que não estão contidas no branco amostral e que possuem informação de MS2.

#### 2.3.5.5 *Análise dos dados com MS-FINDER*

A lista de *features* obtidas através do MS-DIAL foi submetida ao software MS-FINDER v 3.52 para cálculo de fórmula molecular e sugestão de moléculas para cada *feature*. Os parâmetros de cálculo de fórmula molecular foram definidos como  $\pm 8$  ppm de tolerância para dados de MS1 e  $\pm 15$  ppm de tolerância para MS2 e os elementos C, H, O, N, S, P, e Cl foram considerados. Para predição de estrutura, foi marcada a opção de utilização da ferramenta de predição de fragmentação *in-silico*, sendo a busca por estruturas realizadas a partir dos dados do íon precursor, com o número de fragmentações subseqüentes calculadas pelo software definido como 3. Os bancos de dados internos utilizados foram o LipidMAPS, YMDB, ChEBI, NPA, NANPDB, COCONUT, KNApSAcK, PubChem e UNPD. A opção de *Metabolic In-silico Network Expansion (MINEs)* e a procura online habilitada para somente casos onde não houvesse dados nos bancos de dados locais. A opção de filtragem ou procura por tempo de retenção não foram habilitadas. Todas as fórmulas moleculares e estruturas sugeridas foram manualmente verificadas levando em consideração o score obtido no programa, a comparação entre a fragmentação real e *in-silico* obtida, assim como a literatura disponível sobre as moléculas produzidas pelos fungos trabalhados

#### 2.3.5.6 Análise dos dados com SIRIUS

As *features* obtidas através do processamento pelo software MS-DIAL descrito no item 4.4.4 foram importada no software SIRIUS v.5.6.3 e processada através das opções: SIRIUS – *Molecular Formula Identification*; ZODIAC – *Network based improvement of SIRIUS molecular formula ranking*; CSI:FingerID – *Fingerprint prediction* e CSI:FingerID – *Structural Database Search*; e CANOPUS – *Compound Class Prediction*.

Os parâmetros para a predição da fórmula molecular através do SIRIUS foram tolerância do MS2  $\pm 15$ ppm, considerando os elementos C, H, O, N, S, e P, S, Cl e Br com as ionizações  $[M+H]^+$ ,  $[M+K]^+$  e  $[M+Na]^+$  definidas para o modo positivo e  $[M-H]^-$  para o modo negativo.

Para melhoria da predição da fórmula molecular através do ZODIAC, foram definidos um *threshold* de 0.95, mínimo de conexões locais de 10 e para o cálculo de amostra de Gibbs foram definidos o número iterativo de 20 mil, um burn-in de 2 mil e 10 separate runs.

Para a predição de *fingerprint* com o CSI:FingerID foram definidas os adutos  $[M+H]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[2M+H]^+$  para o modo positivo e  $[M-H]^-$  para o modo negativo, para a procura em banco de dados foram definidos os bancos de dados Bio Database, BioCyc, CHEBI, COCONUT, EcoCyc MINE, GNPS, KEGG, KEGG MINE, KNApSAcK, MACONDA, MeSH, NORMAN, Natural Products, YMDB, YMDB Mine e ZINC Bio.

Todas as fórmulas moleculares e estruturas sugeridas foram manualmente verificadas levando em consideração o score obtido no programa, a comparação entre a fragmentação real e *in-silico* obtida, assim como a literatura disponível sobre as moléculas produzidas pelos fungos trabalhados

#### 2.3.5.7 *Análise dos dados com GNPS*

Os dados em formato mzML foram submetidos ao servidor MASSIVE através do software WinSCP, disponível no site < <https://winscp.net/eng/download.php> > para serem utilizados na plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS). A plataforma GNPS pode ser acessada através do site < <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp> > Na plataforma, os dados foram submetidos à análise por *Classical Molecular Networking* (CLMN). Os parâmetros de construção do Molecular Networking foram definidos como 0.015 Da de tolerância de massa do íon precursor, 0.03 Da de tolerância de massa dos íons de fragmentação, 0.7 de valor de coseno e mínimo de 4 picos correspondentes. Para a elucidação estrutural através do CLMN, os parâmetros utilizados foram de 0.7 de valor de coseno e um mínimo de 4 picos correspondentes com aqueles das bibliotecas disponíveis no GNPS, com a opção de procura de análogos habilitada. Os dados obtidos das análises por CLMN foram resubmetidos às análises através da função DEREPlicator+, também disponível na plataforma online GNPS

#### 2.3.5.8 *Análise pelo Metaboanalyst 5.0*

Os dados de alinhamento resultantes da deconvolução dos extratos obtidos em modo positivo pelo MS-DIAL (item 2.3.5.4) foram exportados utilizando a opção de matriz de intensidade por área e utilizando o filtro de presença nas amostras de

branco. A tabela exportada foi então adequada para o formato aceito na plataforma Metaboanalyst 5.0, disponível no site da plataforma. Quando disponível, foi informada a anotação da *feature* (com metodologia de anotação descrita nos itens 2.3.4.5-2.3.4.7). A tabela com o formato adequado foi submetida à análise na plataforma Metaboanalyst 5.0, disponível no site < <https://www.metaboanalyst.ca/> >, através do fluxo de análises estatísticas de um fator.

Para o tratamento de dados, não foi utilizado o filtro estatístico e nem normalização estatística das variáveis. Visando proporcionar peso similar entre as *features*, os dados foram transformados utilizando a função logarítmica e escalonados utilizando o auto escalonamento (também conhecido como Z-score, escore padrão ou pontuação padrão).

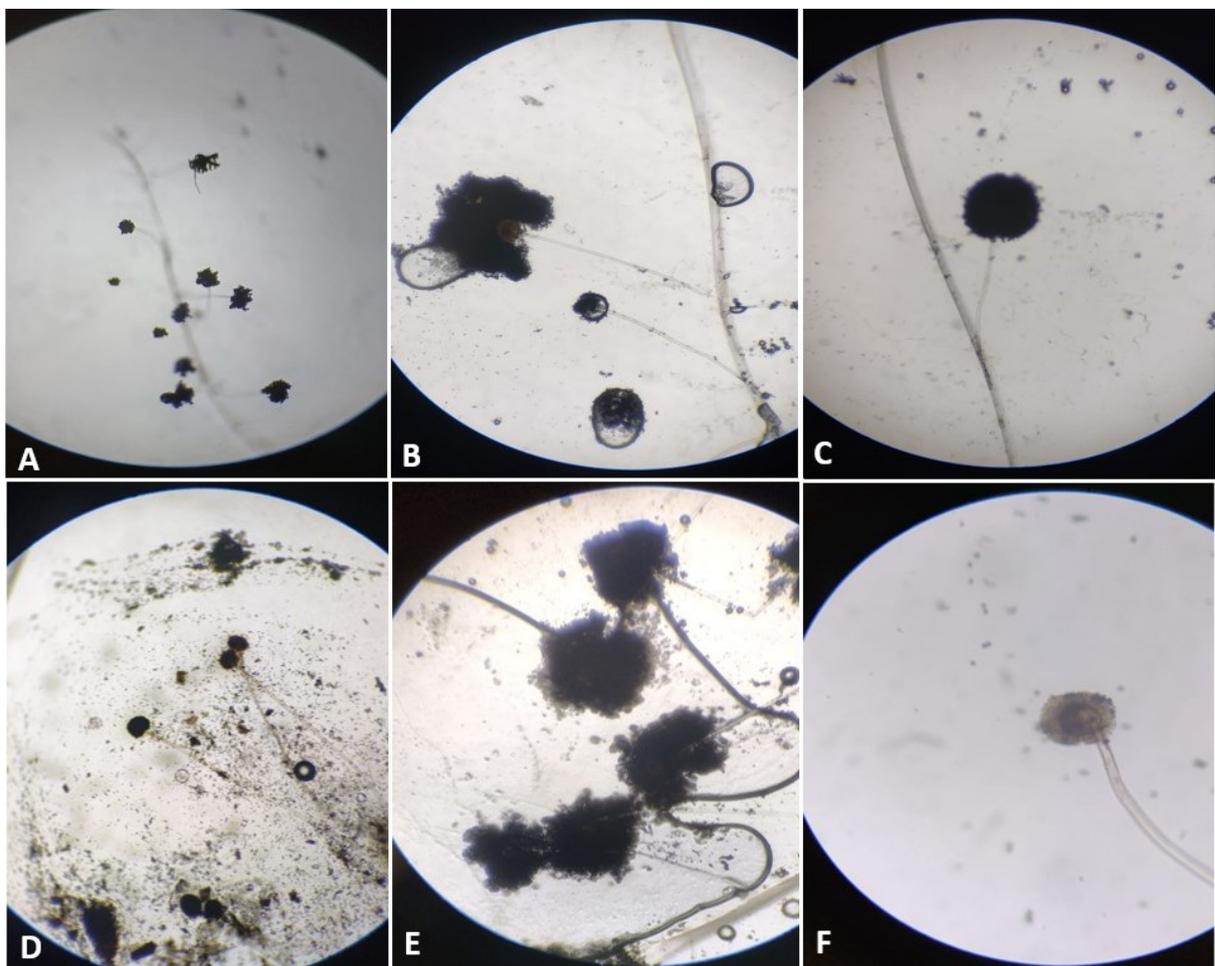
Foram realizadas as análises de PCA, PLS-DA e Mapa de Calor (do inglês *Heatmap*) utilizando as funções estatísticas disponíveis na plataforma para tais. Para a análise de PLS-DA foi realizada a validação cruzada utilizando oito componentes, com método de validação “5-fold CV” e a medida de performance o  $Q^2$ . Para a construção do Heatmap, utilizou-se os dados normalizados, com a *features* auto escalonadas, sendo a medida de distância euclidiana, com o método de agrupamento por Ward, utilizando a opção de mostrar a média da intensidade dos grupos.

## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1 Caracterização do fungo *Aspergillus niger*

Através da técnica de microcultivo em lâminula pôde-se verificar características microscópicas do isolado fúngico em microscópio óptico. Foi observado conidióforos e conídios negros abundantes e parede lisa e hialina, características clássicas do fungo *A. niger*

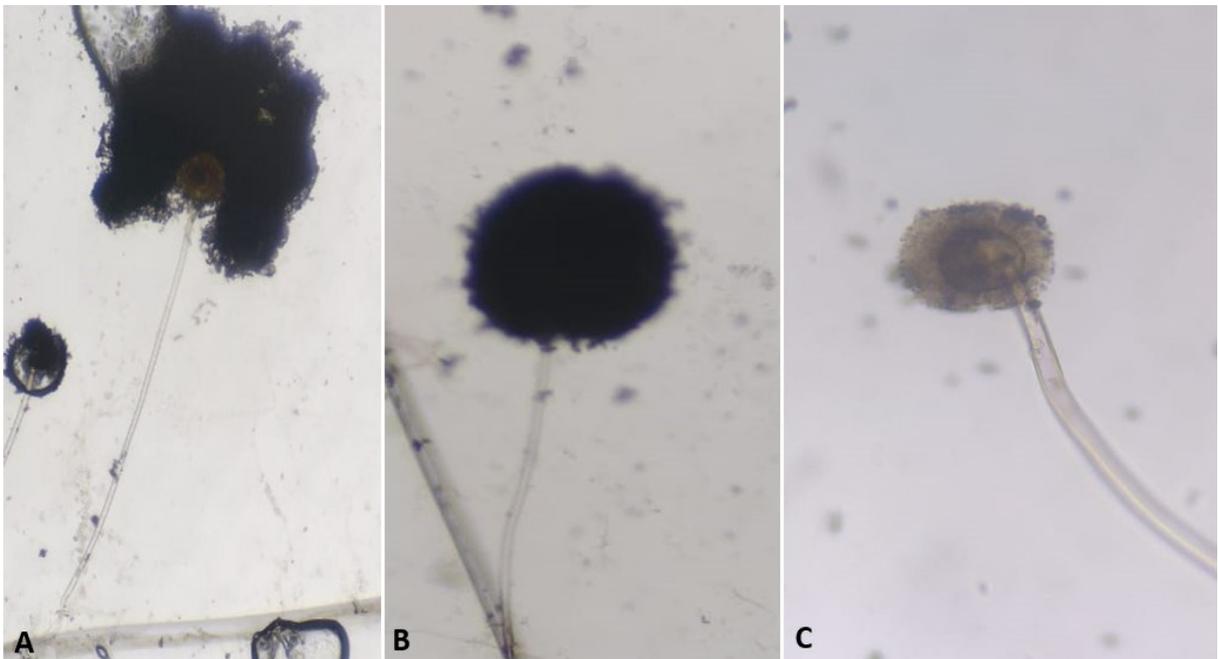
Figura 7 - Aspecto micromorfológico do fungo avaliado em 7 e 14 dias de cultivo (microcultivo)



Legenda: (A-C) 7 dias de microcultivo, (D-F) 14 dias de microcultivo. (A e D) Aumento de 20x, (B-C, E-F) aumento de 40x.

Fonte: Dra. Amanda Athayde, 2022

Figura 8 - Aspecto micromorfológico do fungo avaliado em 7 e 14 dias de cultivo (microcultivo)



Legenda: (A-B) 7 dias de microcultivo, (C) 14 dias de microcultivo

Fonte: Dra. Amanda Athayde

Complementarmente., foi realizado o sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do fungo. O sequenciamento desta região do fungo resultou na sequencia  
 TTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCT  
 GTTGCTTCGGCGGACCCGCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCC  
 CCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTG  
 CAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGG  
 TTCCG. O resultado da procura por BLASTN resultou em quatro espécies com 99.54% de similaridade do código genético do ITS, todas com valor de E de  $2^{-111}$  e 100% de cobertura do gene procurado: *A. foetidus* (CBS 121.28), *A. awamori* ATCC 16877 (CBS 557.65), *A. niger* ATCC 16888 (CBS 554.65) e *A. welwitschiae* (CBS:139.54).

Todas as espécies apontadas pelo BLASTN como mais prováveis são pertencentes à item Nigri do gênero *Aspergillus*. A seção Nigri do gênero *Aspergillus* é uma das mais complexas em relação à classificação e identificação de suas espécies, compreendendo ao menos 27 espécies (VESTH et al., 2018).

Uma das espécies indicadas, o *A. foetidus* é atualmente considerada um sinônimo da espécie *A. niger* com base em dados moleculares e fisiológicos, status que retém até hoje (BIAN et al., 2022; VARGA et al., 2011). A espécie *A. awamori* indicada foi inicialmente reportada como uma espécie críptica dentro da filogenética de cepas de *A. niger* (PERRONE et al., 2011) sendo atualmente um sinônimo da espécie *A. luchuensis* (BIAN et al., 2022). Já a espécie *A. welwitschiae* foi recentemente sinonimizada dentro da espécie *A. niger*. (BIAN et al., 2022).

Sendo assim, através da comparação do gene ITS pela técnica de BLASTn resultam em duas espécies nos termos atuais: *A. luchuensis* (que compreende a *A. awamori* CBS 557.65) e *A. niger* (que compreende o restante das espécies apontadas).

Através do BLASTn não é possível diferenciar ambas as espécies, visto que os valores resultantes da análise foram idênticos. Portanto, outras técnicas são necessárias para uma identificação mais precisa da espécie utilizada neste estudo. Portanto, as análises aqui realizadas e reportadas abaixo podem vir a servir de auxílio na identificação precisa deste fungo.

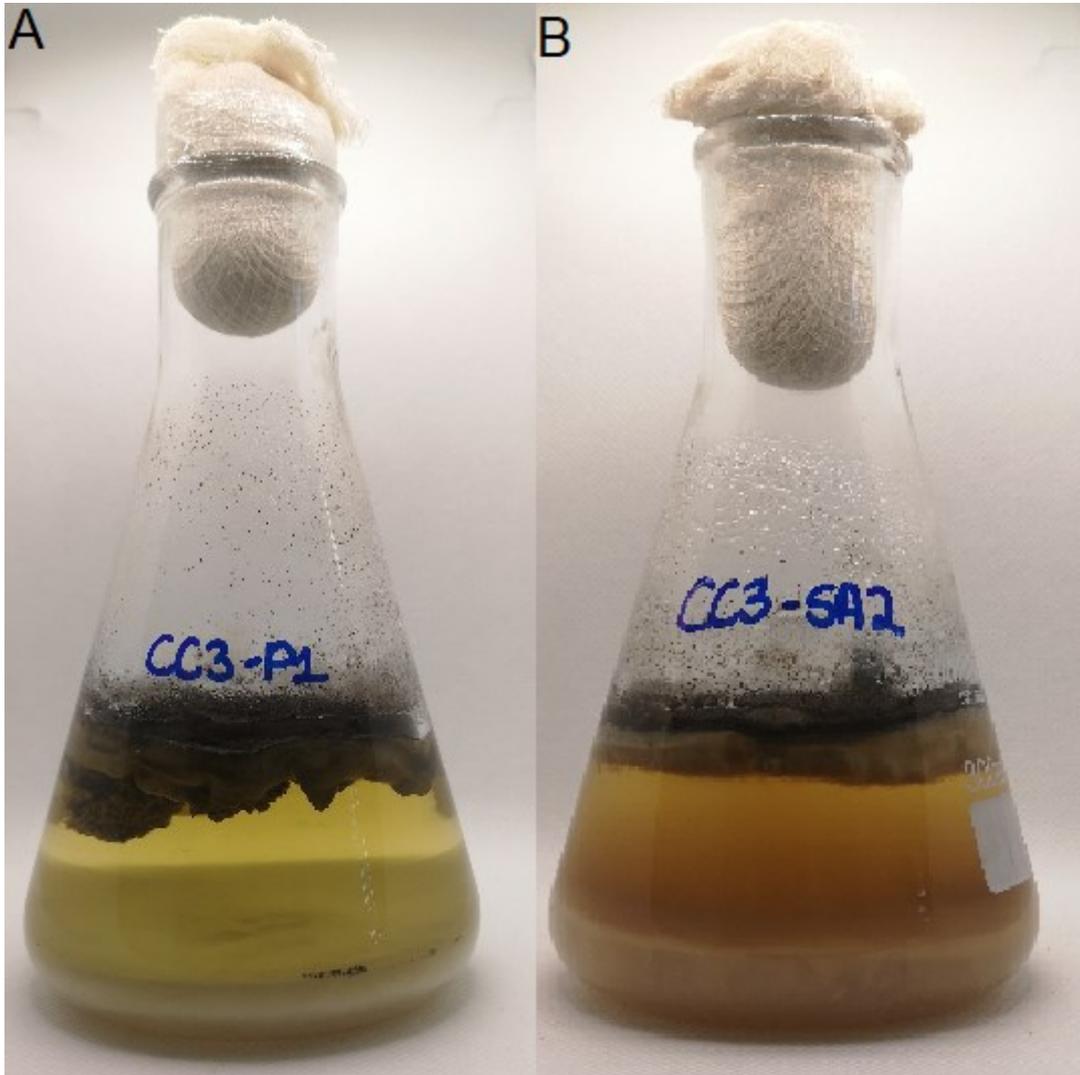
#### **2.4.2 Composição dos meios de cultura e cultivo dos fungos**

Ao total, seis diferentes cultivos foram realizados, uma duplicata de SD, uma duplicata de SA e uma duplicata de CC. O crescimento do *A. niger* em todos os meios de cultura aconteceu de maneira similar verificado por análise visual, com o desenvolvimento de uma biomassa fúngica de *A. niger* no topo do meio líquido (micélio flutuante) e amarelamento do meio líquido abaixo.

A principal diferença a ser citada aqui, além da interação entre as espécies *A. niger* e *S. cerevisiae* é a composição dos meios de cultura utilizado. O meio SD é o caldo padrão Sabraud-Dextrose, composto de 20 g/L de Dextrose (fonte simples de C) e uma mistura 1:1 de Digestivo péptico de tecido animal e digestivo pancreático de caseína 10 g/L (fonte de nitrogênio e micronutrientes), o meio SA utilizado possui 2 g/L de Sacarose, 2 g/L de Bicarbonato de Sódio, 2 g/L de Cloreto de Potássio, 2 g/L de Fosfato de sódio dibásico e 50 g/L Amido de mandioca (fonte complexa de C) e 10 g/L de *S. cerevisiae* autoclavado (fonte de nitrogênio e micronutrientes), enquanto o meio CC possui a mesma composição do meio SA com a exceção de que o fungo *S.*

*cerevisiae* é utilizado vivo, inoculado juntamente com o *A. niger*, possuindo ao mesmo tempo a função de fonte de N e micronutrientes e de microrganismo competidor.

Figura 9 – Cultivo do *A. niger* em diferentes meios de cultura após 28 dias



Fonte: O autor, 2023

Legenda: (A) Meio de cocultura. (B) Meio SA

A composição de macronutrientes do *S. cerevisiae* mostra que esta levedura é composta de entre 30% e 40% de proteínas, fornecendo, na proporção utilizada, aproximadamente 3-4 g/L de proteína (BERTOLO et al., 2019), além de ser uma fonte de lipídeos, minerais, vitaminas e outros compostos. O extrato de *S. cerevisiae* já é utilizado na literatura como fonte de nitrogênio e micronutrientes para meios de cultura (ZAREI; DASTMALCHI; HAMZEH-MIVEHROUD, 2016).

Como o *S. cerevisiae* possui papel duplo no meio de cultura CC – fonte de nitrogênio e micronutrientes e micro-organismo competidor com o *A. niger* – o meio SA foi utilizado como uma aproximação da composição nutricional deste meio para comparação. Sendo assim, meio de cultura SA, o qual utiliza o *S. cerevisiae* autoclavado, serve para verificar a influência de como a composição nutricional do meio de cultura afetará a composição metabólica produzida pelo *A. niger*.

Com exceção da pequena quantidade de sacarose adicionada ao meio de cultura (2 g/L), a principal fonte de carbono do meio de cultura é o amido. O amido de mandioca é uma fonte complexa de carboidrato, sendo formado por amilose e amilopectina em quantidades variáveis. A amilose consiste-se em centenas de unidades d-glicopirranose em ligações  $\alpha$ -(1→4) em cadeia linear enquanto a amilopectina consiste-se em milhares de unidades glicopirranoses em ligações  $\alpha$ -(1→4) em cadeia ramificada com diversas ramificações  $\alpha$ -(1→6) (ZHU, 2015). Por ser uma forma complexa de carboidrato, o *S. cerevisiae* é incapaz de utilizá-la diretamente, pois não é produtora de amilase, enzima capaz de quebrar as ligações  $\alpha$ -(1→4) e  $\alpha$ -(1→6). O *A. niger*, por outro lado, é um ótimo produtor de enzimas, entre elas, as glucoamilases capazes de quebrar o amido presente em sacarídeos menores para poder ser utilizado (CAIRNS; NAI; MEYER, 2018). Forma-se, portanto, uma relação de dependência do *A. niger* para digestão do amido para utilização da fonte de carbono, assim como competição entre os dois fungos para utilização do substrato. A cocultura destes fungos já foi estudada para a produção de bioetanol em matrizes amiloides, com aumento geral da produção de etanol, mostrando a eficiência da digestão do amido pelo *A. niger* e utilização dos sacarídeos mais simples pelo *S. cerevisiae*. (AKBAS; STARK, 2016) Apesar disso, tais estudos foram conduzidos em curtos períodos de tempo e em condições de plenas fontes nutricionais, não representando o ambiente de maior estresse conduzido neste experimento.

Portanto, é esperado do *A. niger* uma maior produção de metabólitos secundários, assim como de enzimas digestivas, visando o ataque ao *S. cerevisiae*, enquanto deste é esperado a utilização de mecanismos bioquímicos que o permitam resistir no ambiente de estresse.

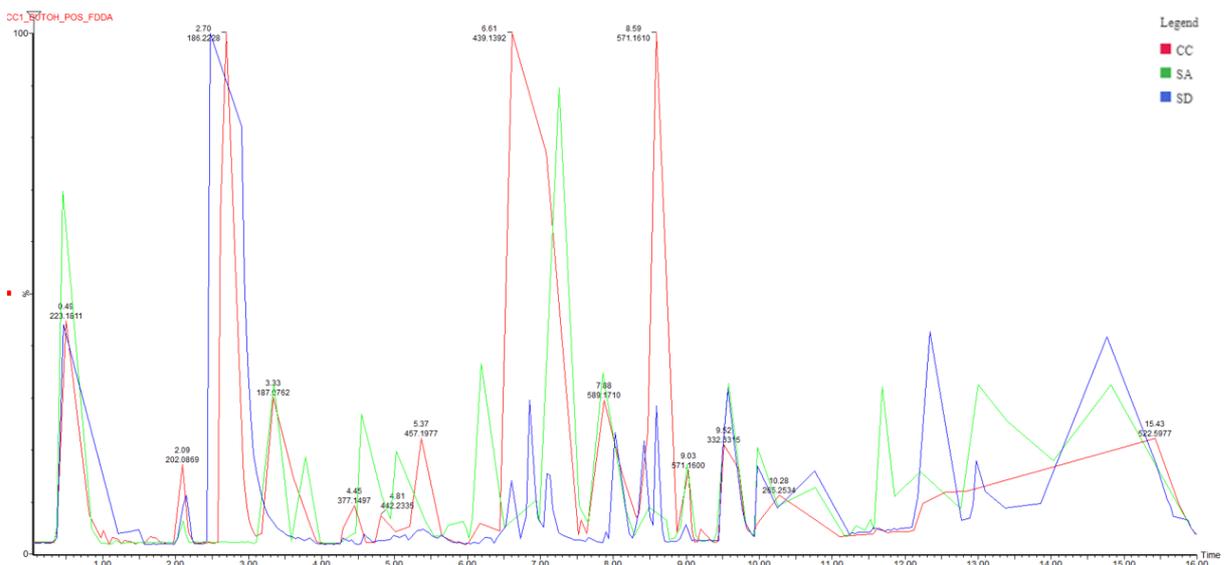
## 2.4.3 Identificação dos metabólitos

### 2.4.3.1 Cromatogramas

Foram obtidos, no total, 36 cromatogramas referentes às diferentes metodologias de cultivo, incluindo a cocultura. Destes, 18 cromatogramas são referentes à aquisição no modo positivo e 18 no modo negativo.

Através de uma rápida análise visual, como representado na Figura 10, já é possível a percepção da diferença entre os cromatogramas, diferenças que serão exploradas e validadas no decorrer deste trabalho.

Figura 10 – Comparação visual de cromatogramas



Fonte: O autor, 2023

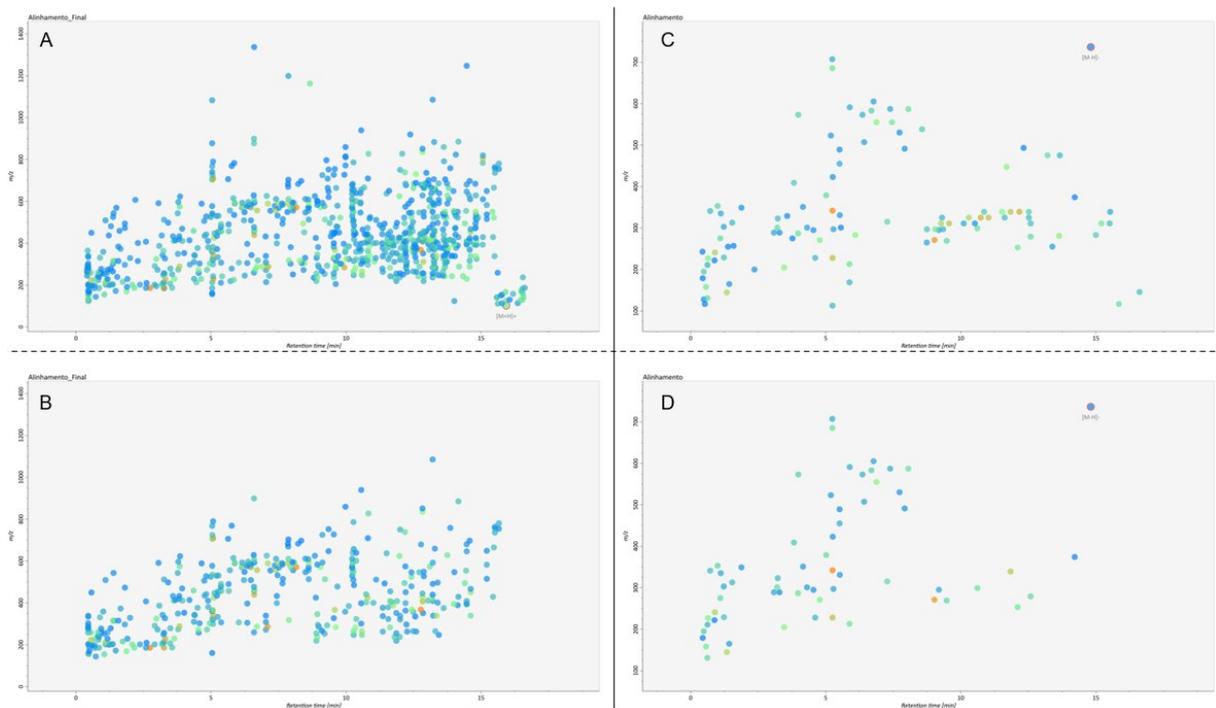
Legenda: Comparação de três cromatogramas, obtidos no modo positivo de ionização, de extratos de meios de cultura, sendo eles: CC, em vermelho; AS, em verde; SD, em azul.

Estes cromatogramas foram convertidos para formato .mzML de acordo com o descrito no item 2.3.5.4 e processamento foi discutido no item 2.4.3.2 abaixo. Os cromatogramas estão disponíveis

### 2.4.3.2 Processamento por softwares

A análise dos dados obtidos do processamento dos espectros em ionização positiva (ESI+) pelo software MS-DIAL resultou em 796 *features* detectadas. Após aplicação de remoção da informação contida nos brancos, restaram 422 *features*, sendo somente 366 *features* que possuíam informação de fragmentação. Já para o modo de ionização negativa (ESI-), foram detectadas 108 *features* totais, das quais 76 não estavam contidas nos brancos. Com a seleção das *features* que possuem informação de MS2, restaram 63 *features*. A lista total de *features* e outras informações de processamento tanto do modo positivo quanto do modo negativo está contida nos arquivos suplementares.

Figura 11 – Representação das *features* antes e depois da aplicação dos filtros de branco e de fragmentação no software MS-DIAL no modo positivo e negativo



Fonte: O autor, 2023

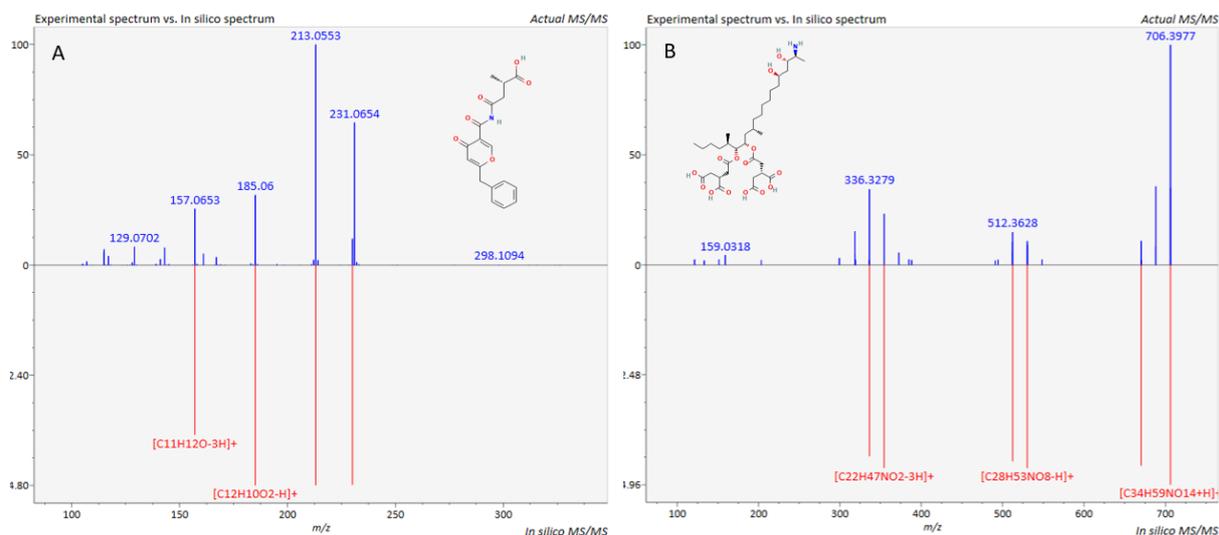
Legenda: Cada ponto representa uma *feature*. As cores de cada ponto representam a intensidade da *feature* que o compõe nos grupos analisados, variando de azul (pouco intenso) a laranja (muito intenso). (A) modo positivo, sem aplicação de filtros; (B) modo positivo, com aplicação de filtros; (C) modo negativo, sem aplicação de filtro; (D), modo negativo, com aplicação de filtro.

Cada *feature* representa um conjunto de dados que pode vir a ser uma molécula. Ressalta-se, porém, que uma *feature* não necessariamente corresponde a uma molécula, podendo ser também sujeiras amostrais, erros de desconvolução,

adutos, oligômeros, polímeros e outros contaminantes artificiais, biológicos ou estruturas redundantes (SINDELAR; PATTI, 2020).

Com o software MS-FINDER foram identificadas 105 moléculas, 81 no modo positivo e 46 no modo negativo, com diversas moléculas sendo detectadas em ambos os modos. A tabela resultante do processamento e verificação estrutural através do software MS-FINDER está disponível no Apêndice G e os dados brutos estão disponíveis nas informações suplementares. Já com o software SIRIUS, foram identificadas 83 moléculas, sendo 56 no modo positivo e 38 no modo negativo. A tabela resultante do processamento através do software SIRIUS está disponível no Apêndice H, com os dados brutos disponíveis nas informações suplementares.

Figura 12 – Exemplo de fragmentação *in-silico* realizada pelo software MS-FINDER



Fonte: O autor, 2023

Legenda: Em azul, o perfil experimental de fragmentação, em vermelho, a fragmentação *in-silico* gerada para a molécula em destaque. (A) Pestalamida A; (B) Fumosinina B2

Entre as moléculas identificadas encontram-se dipeptídeos, dicetopiperazinas, derivados de ácido itacônico, bis- $\gamma$ -naftopironas,  $\gamma$ -naftopironas, bicumarinas, alcaloides,  $\alpha$ -pironas, pyranonigrina, ciclopeptídeos, esteróides, pigmentos, esfingolipídeos e micotoxinas.

O resultado da plataforma GNPS pode ser acessado através dos links: <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=e0948a137adf40a687be11cabb3443de>> para a rede molecular criada para as análises em modo positivo; <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=beaf431b3c9042acbe183762c4f>>

[46bfe](https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=36bb69f8aeb14b03a010be4a862f6449)> para a análise DEREPLICATOR+ realizada nas análises em modo positivo; <[https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=36bb69f8aeb14b03a010be4a862f6449](https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1cbcf2f1ad644c02a4adc477808d9e2d)> para a rede molecular criada para as análises em modo negativo; <<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1cbcf2f1ad644c02a4adc477808d9e2d>> para a análise DEREPLICATOR+ realizada nas análises em modo negativo. Uma versão resumida da identificação realizada pela comparação espectral realizada pelo GNPS e pela utilização da análise pelo DEREPLICATOR+ está contida nos Apêndices I e J.

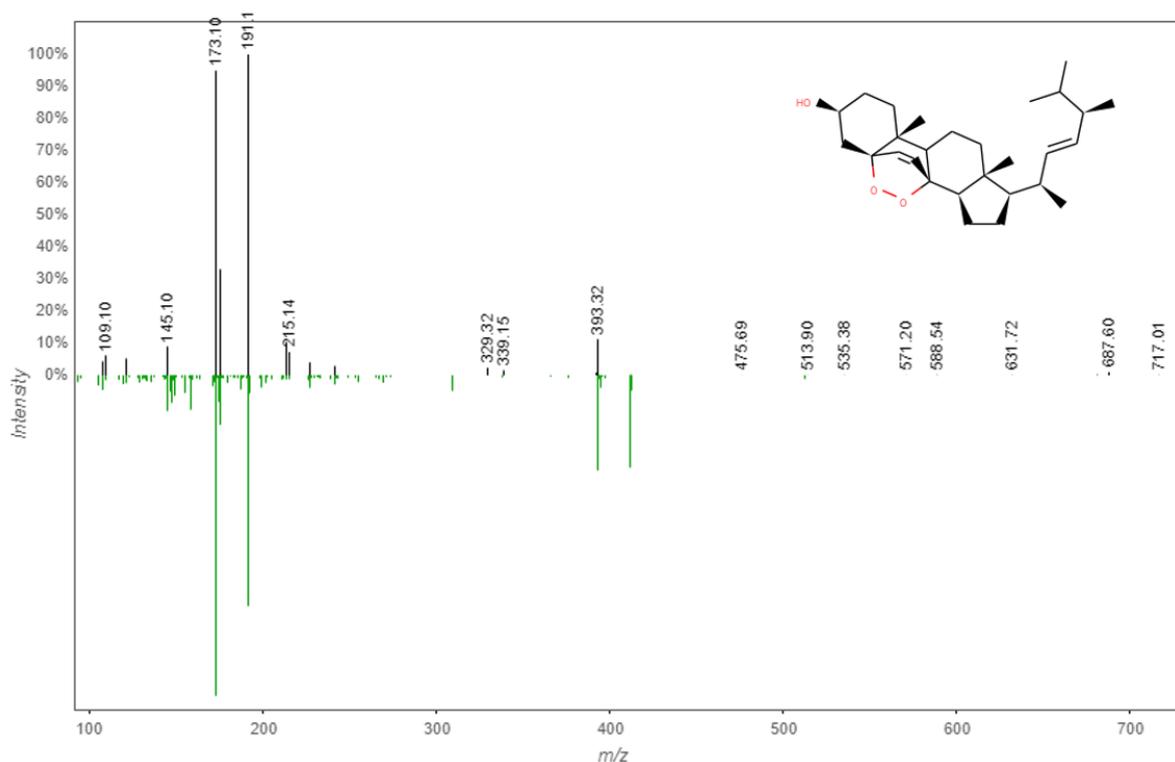
Abaixo, serão discutidos casos específicos encontrados durante a concatenação e interpretação das informações obtidas através da análise dos softwares SIRIUS, MS-FINDER e da plataforma GNPS.

#### 2.4.3.3 *Resultado da comparação estrutural pelo GNPS e identificação molecular pelo DEREPLICATOR+*

Apesar do GNPS realizar a procura direta por comparação do espectro obtido com espectros experimentais em banco de dados, poucas foram as moléculas sugeridas dentro dos erros de massa utilizados para esse trabalho na análise dos espectros no modo positivo de ionização, podendo ser citadas a fonsecina, o peróxido de ergosterol, o emindole DA e diversos lipídeos (majoritariamente fosfocolinas).

Para alguns metabólitos, apesar de ser grande a diferença de massa, devido à procura de análogos, a comparação espectral identificou metabólitos condizentes com os resultados obtidos através do uso do MS-FINDER e SIRIUS, como nos casos da aspernigrina A e da kotanina. Para a kotanina, a diferença de massa foi de 0.13 Da, valor que possa talvez ser atribuído à utilização de um equipamento de baixa resolução na geração do espectro da kotanina presente no GNPS, visto que a massa do banco de dados espectral indicada pelo GNPS é de 439.000 enquanto a real massa experimental é de 439.3195. Já para a molécula aspernigrina A, não foi possível verificar nenhuma correlação para valores presentes no banco de espectros, valores experimentais e valores reportados.

Figura 13 – Exemplo de comparação espectral realizada pela plataforma GNPS



Fonte: O autor, 2023

Legenda: Comparação dos dados de fragmentação da molécula Peróxido de Ergosterol. Em verde, o espectro experimental pertencente à biblioteca do GNPS. Em preto, o espectro obtido durante este estudo

Podem ser citados também a quase-identificação dos compostos similares a kotanina, desmetilkotanina e orlandina, os quais foram todos identificados como kotanina porém com uma diferença de massa de 14 Da e 28 Da respectivamente, equivalendo à diferença de uma e duas metilas da estrutura da Kotanina para gerar os respectivos compostos. Isso se deve ao fato de que, por possuírem estruturas similares, possuem perfil de fragmentação similares.

Diversas estruturas não foram levadas em consideração devido a serem consideradas impurezas, contaminantes, moléculas sintéticas ou biosinteticamente não condizentes.

O DEREPLICATOR+ realizado nas análises do modo positivo resultou em nove compostos, dos quais levou-se em consideração somente a sugestão da molécula fungisporina ( $m/z$  experimental 493.28,  $m/z$  calculada 984.55, íon  $M+2H$ ) e dos lipídeos. Apesar de estar indicado o composto Fungisporin pelo nome, após a verificação da  $m/z$  e do código SMILES, o que é indicado por essa análise é um

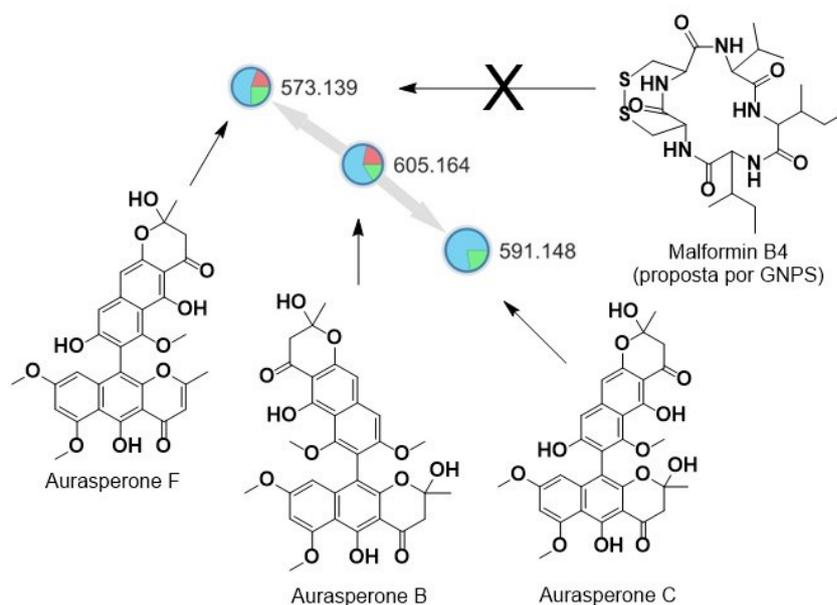
ciclopeptídeo de oito unidades de aminoácido, ciclo[DL-Phe-DL-Phe-DL-Val-DL-Val-DL-Phe-DL-Phe-DL-Val-DL-Val]. Esta *feature* foi identificada pelos softwares MS-FINDER e SIRIUS como um ciclopeptídeo de quatro unidades de aminoácidos, ciclo[DL-Nva-DL-Nva-DL-Phe-DL-Phe]. Nota-se que a composição dos aminoácidos de ambos os compostos é muito similar, sendo a Fungisporina indicada pelo DEREPLICATOR+ constituída de Fenilalanina (Phe) e Valina (Val) e a indicada pelo MS-FINDER e SIRIUS como Fenilalanina (Phe) e Norvalina (Nva). Sendo assim, este composto foi identificado como o composto Fungisporina A ciclo[Val-Val-Phe-Phe], identificado na espécie *A. niger* em 1969. (HAUTBERGUE, 2017)

No modo negativo de ionização, o único composto identificado através da comparação espectral com uma margem de erro aceitável foi o ácido telefórico. Outro composto chama atenção dentro dos compostos indicados é a malformina B4. O *Aspergillus niger* é um reconhecido produtos de malforminas, as quais não haviam sido reportadas até o momento. Este composto foi reportado pela comparação espectral realizada pelo GNPS e foi indicada como [M+FA-H] ( $m/z$  574.237) no banco de dados espectral e  $m/z$  573.139 para o dado experimental, com um erro de 1.09 Da (1912.14 ppm). Apesar disso, o íon de  $m/z$  573.139 foi agrupado com os íons 605.164 e 591.148 no mapa de *networking molecular*, os quais foram previamente identificados como aurasperona B e aurasperona C. Sendo assim, o íon de  $m/z$  573.139 corresponde à aurasperona F, também identificada pelo MS-FINDER e SIRIUS e não a malformina B4 como apontado pela comparação espectral do GNPS.

Tal correlação errônea pode ter sido fato da qualidade dos dados de MS2 serem baixas para este pico, principalmente tendo em vista que o fator de coseno calculado para a comparação espectral é de 0.7, valor mínimo definido nos parâmetros de análise, evidenciando a importância da utilização de diversas técnicas computacionais no trabalho de desreplicação.

Os compostos ácido atomêntico e 4-hidroxianidroflavomannina-9,10-quinona foram sugeridos com a análise através do DEREPLICATOR+ do modo negativo. O ácido atomêntico será discutido com maior profundidade no item 2.4.3.6. Já a 4-Hidroxianidroflavomannin-9,10-quinona é um dímero de naftoquinona similar aos já detectados.

Figura 14 – Exemplo de utilização da Rede Molecular para auxílio da correta identificação de compostos químicos



Fonte: O autor, 2023

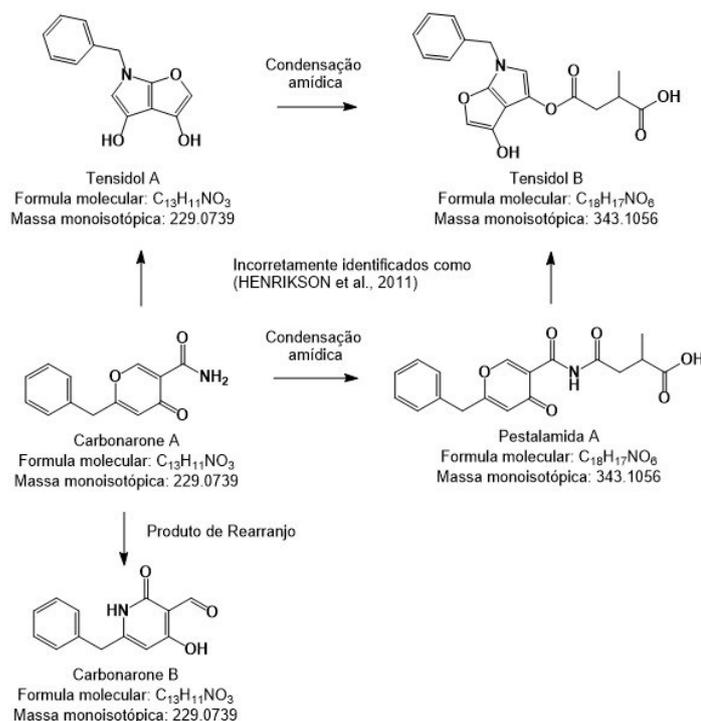
#### 2.4.3.4 Tensidol e Carbonarones

Durante a análise, os picos correspondente a estas moléculas, quando interpretados por ambos os softwares MS-DIAL e SIRIUS mostravam scores melhores para as moléculas carbonarone A e carbonarone B, isoladas e caracterizadas em fungos *Aspergillus carbonarius* (ZHANG et al., 2007a). Em contrapartida, com mesma fórmula molecular, é reportado para o *Aspergillus niger* a molécula tensidol A, presente em diversos estudos de verificação de metabólitos de *A. niger*. Interessantemente, ao interpretar os resultados da análise com os softwares para as *features* supracitadas, os scores gerados para Tensidol A eram muito menores que para os isômeros carbonarones. Através de uma procura na literatura, verificou-se que a estrutura proposta para tensidol A e tensidol B possivelmente foram erroneamente interpretadas e correspondem às moléculas carbonarone A e pestalamida A. (HENRIKSON et al., 2011).

Levando em conta os scores e resultados de análise pelos softwares e concordando com Henrikson et al., 2011, as estruturas correspondentes à fórmula molecular de  $C_{13}H_{11}NO_3$  foram identificadas como carbonarone A / carbonarone B. A distinção entre as moléculas de carbonarone A e carbonarone B, entretanto, é difícil

visto que, apesar de ambas possuírem estruturas diferentes, sua fragmentação produz fragmentação produz alguns picos similares, e dificultando a identificação através da técnica realizada. Ainda, carbonarone B é um produto de rearranjo da molécula carbonarone A, (HENRIKSON et al., 2009), provavelmente também estando presente no extrato.

Figura 15 – Tensidol A e B, Carbonarone A, B e Pestalamida A



Fonte: O autor, 2023

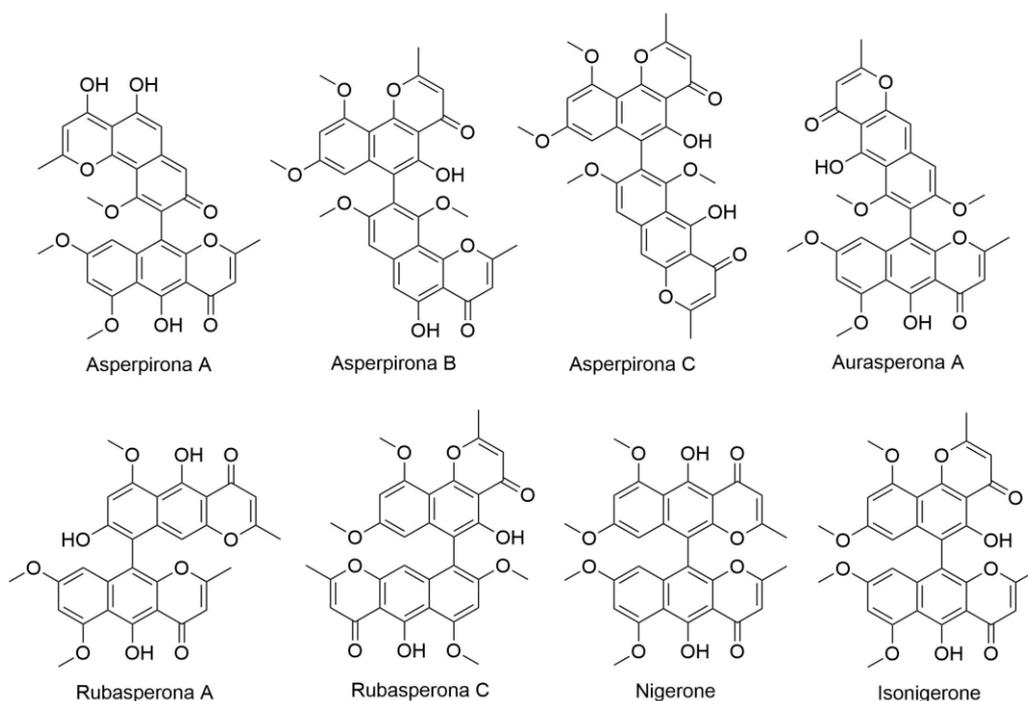
Foi identificado também a  $\gamma$ -naftopirona pestalamida A, o produto de condensação amídica da molécula carbonarone A com o ácido dicarboxílico 2-metilsuccinato, molécula a qual previamente havia sido descrita como Tensidol B.

#### 2.4.3.5 Bis- $\gamma$ -naftopironas

O *Aspergillus niger* produz uma grande diversidade de bis- $\gamma$ -naftopironas, com este grupo de compostos representando o maior grupo de metabólitos secundários produzidos por ele. São cerca de 27 bis- $\gamma$ -naftopironas já registradas somente nesta espécie (LIMA et al., 2019; YU et al., 2021), sendo ser um número muito maior quando considerada outras espécies de *Aspergillus*. Esta classe de composto é produzida

biossinteticamente através de  $\gamma$ -naftopironas monoméricas lineares ou angulares, as quais dimerizam-se através de ligações carbono-carbono, ligações as quais podem acontecer em diferentes posições dos monômeros, gerando uma grande quantidade isômeros estruturais (LU et al., 2014). Ademais, os compostos ainda podem ser metilados em diferentes posições em hidroxilas livres, contribuindo ainda mais para a gama de possíveis compostos desta família.

Figura 16 – Exemplo de diferentes estruturas de bis- $\gamma$ -naftopironas encontradas no gênero *Aspergillus*.



Fonte: Adaptado de Lu et al, 2014.

As bis- $\gamma$ -naftopironas também possuem valor quimiotaxonômico, visto que certos gêneros de fungos produzem tipos específicos destes compostos. No gênero *Aspergillus*, por exemplo, são produzidas bis- $\gamma$ -naftopironas dos tipos nigeronas, asperpironas e aurasperonas, enquanto não são encontradas as pertencentes ao tipo chaetocrominas. (LU et al., 2014)

Entre as bis- $\gamma$ -naftopironas anotadas nos cultivos estão a aurasperona A, aurasperona B, aurasperona C, aurasperona D, aurasperona E e aurasperona F e seus possíveis isômeros. Visto que as este grupo de compostos é complexo de se diferenciar através da técnica de LC-MS/MS, devido as fragmentações produzidas por tais serem muito similares, (NIELSEN et al., 2009), neste trabalho a nomenclatura

aurasperona designa qualquer possível bis- $\gamma$ -naftopironas de mesma fórmula molecular à aquela indicada pelo nome.

Tendo em vista o fato da produção de diversos isômeros com a mesma fórmula molecular, com algumas fórmulas moleculares possuindo até dez diferentes bis-gama-naftopironas (LIMA et al., 2019; NIELSEN et al., 2009), deve-se investigar cuidadosamente o fato de que diversos compostos desta classe apresentaram diferentes tempos de retenção na desreplicação auxiliada por software, como no caso da aurasperona C (Tr 5.88 e 6.15), aurasperona F (Tr 6.16 e 6.44), aurasperona D (Tr 6.70, 7.26, 7.61) aurasperona E, (Tr 7.15 e 7.47) e aurasperona A (Tr 7.96, 8.35, 8.74, 9.26) e todos os possíveis derivados. Os diferentes tempos de retenção obtido para tais moléculas pode ser resultante de dois fatores: o efeito matriz, em que a composição química da amostra injetada exerce influência no tempo de eluição das moléculas (FANG et al., 2015), fazendo com que o mesmo composto possua diferentes tempos de eluição; ou a produção de diversos isômeros com mesma m/z porém, por serem tridimensionalmente diferentes, podem possuir diferentes tempos de retenção.

Para verificar tais hipóteses, os cromatogramas foram verificados manualmente para os valores de m/z obtidos para cada possível bis- $\gamma$ -naftopironas detectada durante a desreplicação, sendo a quantidade de picos detectados nos cromatogramas obtidos em modo positivo de ionização (ESI+) para cada m/z reportados na Tabela 1, a seguir:

Tabela 1 – Quantidade de picos referentes a bis- $\gamma$ -naftopironas no modo de ionização positivo

Amostra \ m/z	Número de picos (Tr) verificados manualmente				
	593.1658 (Aurasperona C e derivados)	575.1551 (Aurasperona F e derivados)	557.1450 (Aurasperona D e derivados)	589.1721 (Aurasperona E e derivados)	571.1598 (Aurasperona A e derivados)
Ext But CC (1)	1 (5.8)	1 (6.2)	3 (7.5, 7.9, 9.0)	2 (7.5, 7.9)	3 (7.9, 8.6, 9.0)
Ext But CC (2)	N.E.	1 (6.3)	3 (6.7, 7.3, 7.7)	2 (7.3, 8.0)	3 (8.0, 8.5, 9.0)
Ext AcEt CC (1)	1 (6.0)	2 (6.1, 6.9)	N.E.	1 (7.0)	2 (8.0, 8.6)
Ext AcEt CC (2)	N.E.	1 (6.3)	2 (6.8, 7.2)	N.E.	3 (7.9, 8.4, 9.0)
Ext DCM CC (1)	N.E.	2 (6.5, 7.0)	2 (7.0, 7.5)	2 (7.5, 8.0)	2 (8.6, 9.3)
Ext DCM CC (2)	1 (6.2)	1 (6.4)	N.E.	1 (7.16)	2 (8.2, 8.6)
Ext But SA (1)	1 (5.9)	2 (6.2, 6.9)	1 (7.3)	2 (7.3, 7.8)	2 (8.5, 9.0)
Ext But SA (2)	1 (6.0)	1 (6.0)	N.E.	1 (7.9)	1 (8.6)
Ext AcEt SA (1)	N.E.	1 (6.1)	1 (7.8)	2 (7.5, 7.8)	2 (8.5, 9.0)
Ext AcEt SA (2)	N.E.	1 (6.1)	1 (7.7)	1 (7.8)	3 (8.0, 8.6, 9.0)
Ex DCM SA (1)	1 (5.9)	1 (6.3)	2 (7.4, 7.8)	2 (7.4, 7.8)	2 (8.6, 9.0)
Ex DCM SA (2)	1 (5.9)	1 (6.3)	2 (7.4, 7.8)	2 (7.4, 7.8)	2 (8.6, 9.0)

Ext But SD (1)	N.E.	N.E.	2 (6.7, 7.2)	N.E.	3 (8.0, 8.6, 9.0)
Ext But SD (2)	N.E.	N.E.	2 (6.7, 7.3)	N.E.	3 (8.0, 8.6, 9.0)
Ext AcEt SD (1)	1 (7.5)	1 (6.3)	1 (6.7)	1 (7.5)	2 (8.0, 9.0)
Ext AcEt SD (2)	1 (6.0)	1 (6.1)	N.E.	1 (7.0)	3 (8.0, 8.5, 9.0)
Ex DCM SD (1)	N.E.	N.E.	2 (6.7, 7.2)	N.E.	3 (8.0, 8.6, 9.0)
Ex DCM SD (2)	N.E.	N.E.	3 (6.7, 7.2, 7.7)	N.E.	3 (8.0, 8.6, 9.0)

Fonte: O autor, 2023

N.E = Não encontrado, sem pico no valor da m/z procurada

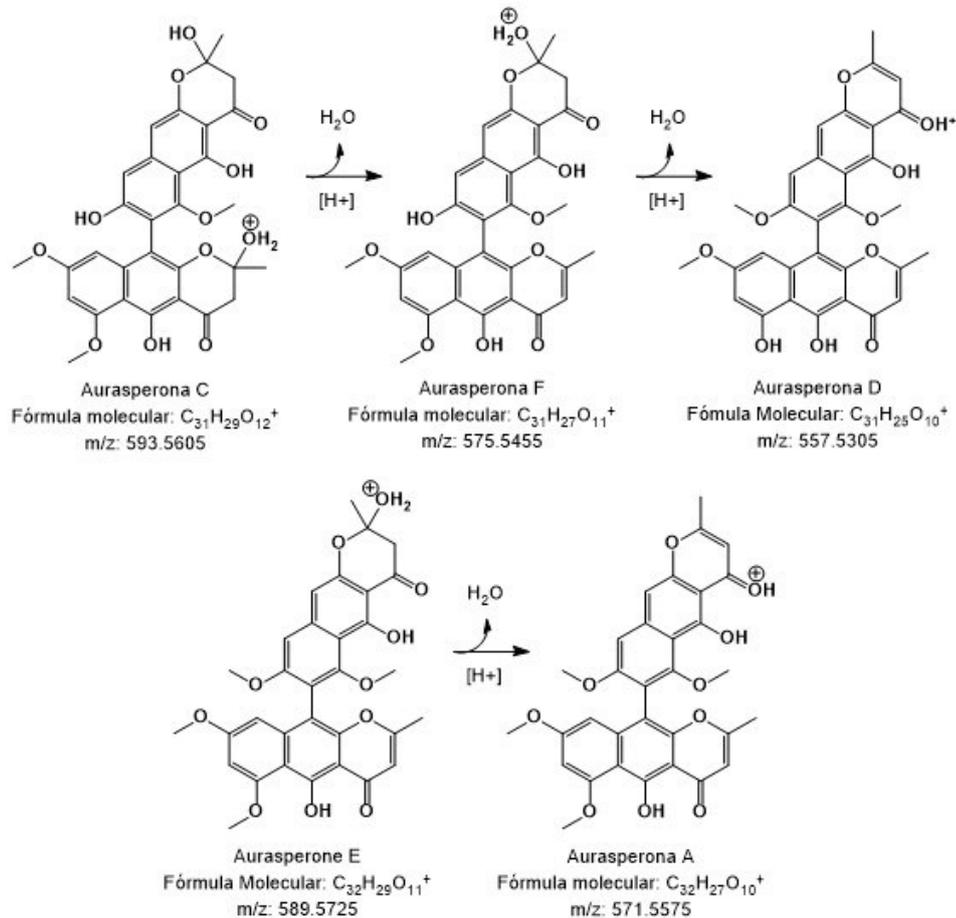
Observa-se, portanto, que para a molécula aurasperona C (m/z 593.1658), somente um isômero foi encontrado manualmente. Já para as moléculas aurasperona F, aurasperona D, aurasperona E e aurasperona A, verificou-se até três picos no mesmo cromatograma contendo o valor de m/z referente a estas moléculas e seus derivados. Visto que muitos destes picos verificados ocorreram em tempos idênticos dentro do cromatograma, deve-se levar em consideração, também, a fragmentação na fonte decorrente da primeira ionização da molécula através do ESI+. Moléculas como a aurasperona C pode fragmentar na fonte, perdendo uma molécula de H<sub>2</sub>O, formando a aurasperona F, assim como a aurasperona E pode sofrer do mesmo processo e transformar-se na aurasperona A, como exemplificado na Figura 17.

Tais eventos podem ser supostos quando o tempo de retenção dos picos de moléculas que possivelmente podem sofrer fragmentação na fonte são similares. Por exemplo, pode ser teorizado que o m/z 575.1551 (equivalente aurasperona F) é na verdade, fragmento gerado na fonte decorrente da ionização do íon de m/z 593.1658 (aurasperona C), quando encontrado no mesmo tempo de retenção do mesmo extrato. Da mesma forma, pode-se teorizar que os diversos picos de m/z 571.1598 (aurasperona A) que se encontram em diferentes tempos de retenção podem ser, na verdade, íons decorrentes da fragmentação da molécula de m/z 589.1721 (aurasperona E). Tal verificação, porém, requereria análise mais aprofundada do perfil de fragmentação através de outros modos de análise mais adequados, como o método de DIA MS<sup>E</sup>, pela utilização de detector de UV ou comparação com o padrão conhecido para cada molécula. (NIELSEN et al., 2009)

Tendo em vista a quantidade de picos verificados manualmente para cada m/z equivalente a uma aurasperona ou isômero, o fato de ocorrer fragmentação na fonte para estes compostos (verificado através do tempo de retenção), e levando em consideração os extratos obtidos do mesmo cultivo e a ocorrência da mesma m/z ocorrer em tempos de retenção diferentes, pode-se concluir que, para este grupo de

compostos, foram produzidos ao menos um isômero de aurasperona C, um isômero de aurasperona F, dois isômeros de aurasperona D, dois isômeros de aurasperona E e dois isômeros de aurasperona A. A confirmação de tais isômeros depende de técnicas já citadas acima, não realizadas neste trabalho.

Figura 17 – Exemplo de fragmentação na fonte entre Aurasperonas



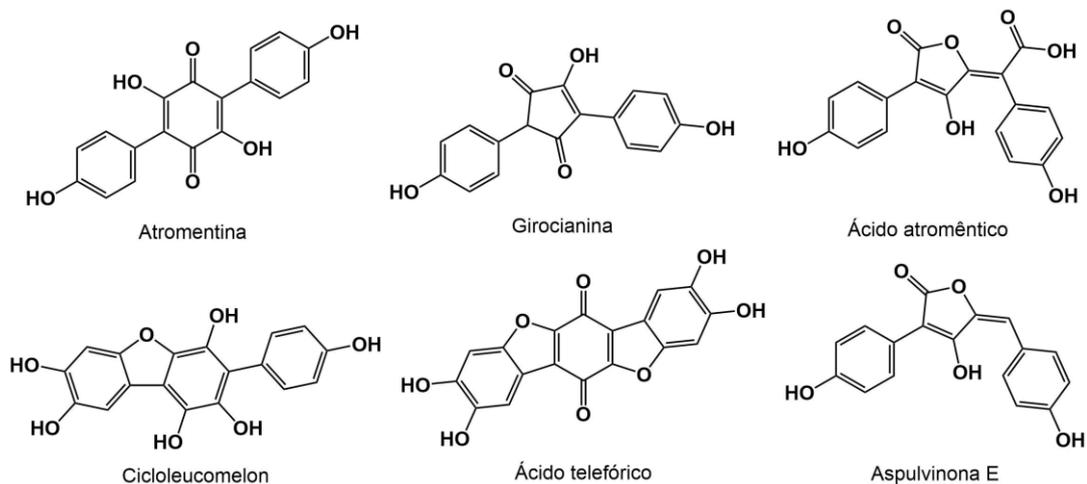
Fonte: O autor, 2023

Outro ponto muito importante é a quantidade e teor de Aurasperonas presentes nos meios de cultura. O meio SD apresentou uma quantidade menor de bis- $\gamma$ -naftopironas, em especial de aurasperona C, aurasperona F e aurasperona E. Estes dados visam corroborar com a ideia de que o meio de cultura CC resultara em uma produção diferente de metabólitos quando comparado com os meios AS e SD, que será discutido em maiores detalhes posteriormente (item 2.4.4). Não obstante, podem ter sido produzidas ainda outras bis- $\gamma$ -naftopironas, em intensidade de ionização menores que o limite de detecção utilizado para a técnica de massas.

### 2.4.3.6 Atromentina, ácido telefórico e possíveis derivados

Foram sugeridos através de todas as análises realizadas a presença da atromentina e derivados. Além da identificação da molécula atromentina, ácido telefórico e ciclolucomelon pelo MSFINDER, SIRIUS e GNPS, através dos softwares MS-FINDER e SIRIUS, foram sugeridas pulvinonas para as moléculas os íons  $m/z$  297.0761 (Tr 1.81, ESI+) e 295.0601 (Tr 4.55, ESI-), ambas inicialmente identificadas girocianina / aspulvinona E. Já o DEREPLICATOR+ da plataforma GNPS apontou a molécula ácido atromêntico para o íon 341.0650 (Tr 0.72, ESI-).

Figura 18 – Atromentina, terfenilas e derivados



Fonte: O autor, 2023

Com exceção do ciclolucomelon (HIORT et al., 2004), da aspulvinona E (AKINFALA et al., 2020) e de uma menção de produção da atromentina (SCHLINGMANN et al., 2007), nenhuma das moléculas citadas acima já foi reportada para o *A. niger*. Um estudo recente concluiu que é improvável que o *A. niger* possua o gene *atromentin synthetase*, responsável pela biossíntese de atromentina, e que utilize a atromentina como precursor biossintético, porém, ele é capaz de produzir giroporina por um mecanismo que envolve uma rota biossintética diferente, regulada um cluster de genes biossintéticos de ação cruzada através de enzimas *NRPS-like* (GEIB et al., 2019), sendo possível de ser oxidada depois para se tornar a molécula girocianina. Em contrapartida, a identificação de diversas moléculas como derivados deste grupo químico foi bastante presente durante a desreplcação dos cromatogramas de extratos de *A. niger*, com diversas plataformas e softwares

apontando para resultados similares. Ainda assim, estas moléculas não foram agrupadas pelo GNPS.

Deve-se levar em conta, também, o fato de que os cultivos realizados aqui visam ativar genes crípticos, normalmente não ativos em condições normais de laboratório (ARORA et al., 2020; BERTRAND et al., 2014), visando a mudança do perfil metabolômico (melhor discutido na item 2.4.4). O *A. niger* possui ao menos 20 clusters de genes crípticos, incluindo os *NRPS-like* (YU et al., 2021), indicados responsáveis pela síntese deste grupo de molécula. (GEIB et al., 2019), O estresse gerado pela cocultura aqui relatada pode ser um fator que leva a maior ativação destes genes e, portanto, a produção destes metabólitos pouco relatados para a espécie.

Tendo em vista isto, apesar da caracterização realizada por este estudo o qual sugere a presença de moléculas como ácido atromêntico, girocianina / aspulvinona E, atromentina, ácido telefórico e ciclolucomelon deve ser realizada com muita parcimônia, visto que a técnica aqui realizada não é confirmativa e sim sugestiva destas moléculas, sendo necessário o isolamento e caracterização por outras técnicas para a confirmação. Não obstante, a presença de tais moléculas em espécies de *A. niger* são escassamente reportadas e, para algumas moléculas, não são reportadas em uma totalidade, sendo recente a discussão sobre a presença ou completa ausência deste grupo de moléculas no gênero *Aspergillus*. (GEIB et al., 2019).

#### 2.4.3.7 Lipídeos e derivados de terpenos

A identificação de lipídeos e derivados de terpenos foi realizada em forma majoritária pela classe dos compostos, com algumas exceções.

O composto peróxido de ergosterol foi identificado em nível de composto visto que é um composto amplamente presente em fungos, seu perfil de fragmentação apresentava boa qualidade e foram apresentadas poucas opções no momento da identificação molecular. O composto emindol DA, alcaloide-diterpênico, foi identificado a nível de composto devido a já ter sido isolado de espécies de *Aspergillus* (KRALJ et al., 2006; NOZAWA et al., 1989) e ter sido identificado por comparação espectral pela plataforma GNPS. A ceramida asperamida A e o cerebrosídeo asperamida B por serem compostos já isolados do fungo *A. niger*. (CHAUDHARY et al., 2013; ZHANG et al., 2007b). E o composto esclerolizine, também já isolado da espécie *Aspergillus sclerotii carbonarius* (PETERSEN et al., 2015).

Os lipídeos foram identificados utilizando a nomenclatura recomendada para análise de massas para lipídeos a fim de evitar erros de identificação (LIEBISCH et al., 2013). Já os derivados de terpenos foram identificados a nível de classe quando possível.

#### 2.4.3.8 Metabólitos Não Identificados (N.I.)

Diversos foram os metabólitos listados Não Identificados (N.I.) durante a análise com os softwares SIRIUS, MS-FINDER e GNPS. Tal listagem como N.I. tem como origem várias ocasiões. Visto que a maior parte das moléculas listadas como N.I. possuíam um bom padrão de fragmentação e os softwares foram capazes de fornecer diversas propostas de estruturas para cada *feature* analisada, a falta de referências bibliográficas é uma das principais causas para a não identificação das moléculas listadas como N.I. trabalho. Isso se deve, principalmente, aos tipos de análises aqui realizadas: todas as sugestões de estruturas dadas pelos softwares foram manualmente verificadas na literatura, dando-se prioridade para moléculas já relatadas na espécie *A. niger*, e em alguns casos, em outras espécies de *Aspergillus*. Quando não possível a identificação a nível estrutural das moléculas, foi dada uma sugestão de classe de composto para qual aquela molécula pode pertencer. A sugestão da classe de composto foi dada levando em consideração as estruturas propostas pelos softwares de análise para tal *feature*, a fórmula molecular, a predição realizada pelo ClassyFire (no caso da análise com o SIRIUS) e o tempo de retenção no qual a molécula se encontra.

Somente uma parcela das *features* obtidas pelo processamento com o MS-DIAL foi identificadas, com a grande maioria (>600) *features* remanescendo sem identificação nem possível sugestão. Destas, como já discutido, uma porção representa sujeiras amostrais, erros de desconvolução., adutos, oligômeros, polímeros e outros contaminantes artificiais, biológicos ou estruturas redundantes (SINDELAR; PATTI, 2020). Ainda assim, parte destas *features* pode representar moléculas ainda a serem descobertas. Apesar dos modelos preditivos e utilização de inteligência artificial para procura de moléculas ser cada dia mais confiáveis, os softwares utilizados para tal função possuem suas próprias limitações como a limitação da identificação de desconhecidos-conhecidos (BLAŽENOVIC et al., 2018) ou da predição de moléculas possuir um viés direcionado para as moléculas utilizadas

no treinamento de inteligências artificiais (DE JONGE et al., 2022b; KRETSCHMER et al., 2023). Isto introduz uma limitação nas capacidades de identificação de softwares. Tendo em vista que a cocultura pode vir a produzir moléculas novas e que os softwares possuem um viés de treinamento para moléculas disponíveis e conhecidas, muitas das *features* não identificadas e não listadas podem vir a representar estruturas diversas com pouca representatividade no espaço químico.

É de se apontar a não detecção e identificação de malforminas neste estudo, assim como da não identificação da micotoxina ochratoxina. As malforminas são ciclo peptídeos que possuem uma ponte dissulfeto, um metabólito comumente identificado em estudos de *Aspergillus niger*. A ochratoxina é uma micotoxina que o *A. niger* possui capacidade de produção, mas que não é produzida por grande parte das cepas deste fungo (NIELSEN et al., 2009; SCHUSTER et al., 2002). Mesmo não estando presente na desreplicação realizada neste estudo, pode vir a estar presente no extrato, visto o fato desta normalmente ser coeluída com as gama-naftopironas e malforminas, as quais são produzidas até 100x em maior quantidade. e impedem a detecção desta toxina pela técnica de LC-MS. (LAMBONI et al., 2016; NIELSEN et al., 2009)

Já ao grupo das malforminas, durante a desreplicação dos extratos através dos softwares aquelas as *features* com massas correspondentes às malforminas ionizadas ou seus produtos de fragmentação, como descrito por NIELSEN et al., 2009, foram verificadas cuidadosamente diversas vezes. O mais próximo deste metabólito que foi encontrado foi a sugestão errônea da plataforma GNPS para uma *feature*, a qual posteriormente foi corretamente identificada como Aurasperona F (ver item 2.4.3.3).

#### 2.4.3.9 Considerações sobre as moléculas identificadas e a espécie

Outro fator importante no melhor discernimento entre as espécies de fungos cogitadas são os metabólitos secundários produzidos.

Em uma série de estudos realizados por diversos autores verificando a diferença na produção de metabólitos secundários por uma gama de espécies do gênero *Aspergillus*, verificou-se que entre a o perfil metabolômico do *A. niger* e do então *A. awamori* (agora *A. luchuensis*) são similares, não havendo nenhum metabólito analisado que fosse único a nenhuma das duas espécies, com quase todas as espécies testadas produzindo piranonigrina A, tensidol B (carbonarone A),

funalenona e  $\gamma$ -naftopironas, sendo a produção de kotanina quase que exclusiva à cepas de *A. niger* testado. (PERRONE et al., 2011). Uma análise genômica concluiu que a única diferença prevista no perfil metabolômico entre *A. niger* e *A. luchuensis*, para os metabólitos testados, é a possível produção de violaceol e derivados pelo *A. luchuensis*, a qual foi prevista por análise de *clusters* de genes biossintéticos (DE VRIES et al., 2017), estudo o qual foi reforçado pela análise recente do genoma de espécies dentro da item Nigri que mostrou que o *A. luchuensis* (CBS 106.7) produz aurasperona B, piranonigrin A, funalenonas e nigragillina, mesmos metabólitos produzidos pelas cepas testadas de *A. niger* (VESTH et al., 2018), porém, não sendo capaz de determinar a produção de kotanina. Por outro lado, um estudo por técnicas cromatográficas para a produção de metabólitos secundários de espécies da secção Nigri verificou que, entre as diferenças em metabólitos secundários do *A. niger* e do *A. luchuensis* (e de todos os outros fungos testados) está a produção de kotanina, orlandina e fumosinina B2, moléculas as quais são sintetizadas somente pelo *A. niger* entre todas as espécies testadas. (LAMBONI et al., 2016).

Sendo assim, levando em consideração os dados de microscopia, a discussão realizada para a comparação do gene ITS para a espécie de fungo utilizada, o perfil de metabólitos secundários relatados e previstos para as diversas espécies de *Aspergillus* e as moléculas aqui encontradas, o fungo utilizado foi confortavelmente identificado como *Aspergillus niger*. Apesar disso, a total confirmação só poderá ser realizada através do sequenciamento de outras regiões do gene.

#### 2.4.3.10 Moléculas identificadas

Após realização das análises realizadas pelo software, da interpretação dos dados, comparação com a literatura e da discussão realizada acima, a lista final de moléculas identificadas nos extratos é a apresentada a seguir:

Quadro 1 - Concatenação dos Compostos sugeridos através da análise de extratos de *Aspergillus niger* por UPLC-ESI-QToF-DDA pelos software MS-FINDER v 3.5.2, SIRIUS v5.8.1 e pela plataforma GNPS

ID	T <sub>R</sub>	Fórmula Molecular	Ontologia	Identificação estrutural proposta	Software utilizado	<i>Aspergillus</i> sp. encontrado (Referência)
1	0.46	C8H20NO6P	Glicerofosfocolinas	Gliceril Fosforil Colina	MS-FINDER, SIRIUS	-

2	0.49	C6H12O7	Hidroxiácido de cadeia media	Ácido de açúcar	MS-FINDER, SIRIUS	-
3	0.49	C7H10N2O2	Alfa-aminoácido	Ciclo (Pro-Gly)	MS-FINDER	<i>A. fumigatus</i> (FURTADO et al., 2005)
4	0.57	C7H13NO3	N-acil alfa aminoácidos	N-acetilvalina	MS-FINDER	-
5	0.56	C13H22N2O	N-metil piperazinas	Nigragillina	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
6	0.63	C5H8O4	Ácido dicarboxílico	N.I.	MS-FINDER	-
7	0.64	C10H12O6	Butenolídeos	Ácido Carlósico	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
8	0.69	C10H16N2O4	Dipeptídeos	Piroglutamilvalina	MS-FINDER, SIRIUS	-
9	0.70	C9H16N2O2	Dipeptídeo	Ciclo (Ile-Val)	MS-FINDER, SIRIUS	-
10	0.70	C10H16N2O2	Dipeptídeo	Ciclo (Pro-Val)	MS-FINDER	<i>A. fumigatus</i> (FURTADO et al., 2005)
11	0.70	C11H18N2O8	Dipeptídeo	Ciclo(4-Hidroxi-Pro-Leu)	SIRIUS	<i>A. fumigatus</i> (FURTADO et al., 2005)
12	0.72	C11H18N2O3	Alfa-aminoácido e derivados	N.I.	MS-FINDER	-
13	0.72	C18H14O7	Metoxifenol	Ácido atromêntico ou derivado	DEREPLICATOR +	-
14	0.74	C9H21N	Alquilamine	Tripoplamine	MS-FINDER	-
15	0.81	C10H9NO5	Piranonas e derivados	Piranonigrina A	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
16	0.83	C14H16N2O3	Dipeptídeo	Maculosina	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. versicolor</i> (DONG et al., 2014)
17	0.90	C11H18N2O4	Dipeptídeos	PiroGlu-Ile	MS-FINDER, SIRIUS	-
18	0.94	C14H16N2O4	Dipeptídeos	Piroglutamilfenilalanina	SIRIUS,	-
19	0.94	C12H18O6	Ácido tricarboxílico e derivados	Ácido Tensiuico B	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
20	1.05	C8H10O3	Metoxifenóis e derivados	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
21	1.03	C11H18N2O2	Alfa-aminoácido e derivados	Ciclo (Leu-Pro)	MS-FINDER	<i>A. fumigatus</i> 1
22	1.08	C14H16N2O4	Alfa-aminoácido e derivados	Ciclo(3-Hidroxi-Pro-Tyr)	MS-FINDER	-
23	1.16	C16H22N2O	Ácido cinâmico e derivados	Nigerazina B	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
24	1.17	C13H12N2O2	Nicotinamida	Aspernigrina A	MS-FINDER, SIRIUS, GNPS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
25	1.23	C11H18O5	Hidroxiácidos de cadeia media e derivados	Ácido asperitacônico A	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019; PALYS; PHAM; TSANG, 2020)
26	1.23	C15H12O7	Naftoquinonas	N.I.	MS-FINDER	-
27	1.35	C12H10O3	Cumarinas	N.I.	MS-FINDER	-
28	1.43	C9H10O3	Ácido Fenil Propanoico e derivados	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
29	1.48	C11H25N	Alquilaminas	Iproheptine	MS-FINDER	-
30	1.54	C17H14O6	Derivado de Naftoquinona ou Anthraquinona	N.I.	MS-FINDER	-
31	1.75	C13H13NO2	Alcalóide	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
32	1.81	C17H12O5	Pulvinonas	Aspulvinona E / Girocianina ou derivado	MS-FINDER, SIRIUS	(AKINFALA et al., 2020)
33	1.87	C9H12O3	Policetídeo	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
34	2.09 2.45 2.92	C12H11NO2	Alcalóide.	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
35	2.15 2.74 3.26	C12H27N	Alquilamina	Tributilamina	MS-FINDER, SIRIUS	-
36	3.03	C14H8O6	Hidroxi-antraquinona e derivados	Rheoemodina	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. versicolor</i> (BERGER-

							DEGUEE; BERGER, 1982)
37	2.90	C15H14O6	Naftopiranonas	Foncesina	MS-FINDER, GNPS, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
38	3.11	C20H22N2O6	Isoindolonas	Speradine D	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. oryzae</i> (CHEN et al., 2014)	
39	3.22	C12H27NO	Aminoálcool	2-Aminododecane-3-ol	MS-FINDER, SIRIUS	-	
40	3.21 3.49	C11H10O4	Isocumarina and derivatos	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS		
41	3.23	C18H12O6	P-benzoquinones	Atromentina ou derivado	MS-FINDER, SIRIUS	-	
42	3.29	C14H10O7	Xantonas Ou Naftoquinonas	N.I	MS-FINDER, SIRIUS	-	
43	3.56	C12H10O2	Fenantrenos	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-	
44	3.28	C18H18N2O5	Nicotinamida	Pestalamida B	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
45	3.30 3.57	C13H11NO3	Piranonas e derivados	Carbonarone A / Carbonarone B	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. carbonarius</i> , <i>A.</i> <i>niger</i> (HENRIKSON et al., 2011; ZHANG et al., 2007a), <i>A.</i> <i>niger</i>	
46	3.89 3.61	C22H18O8	Bicumarina	Orlandin	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
47	3.46	C11H10O4	Cumarina e derivados	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS		
48	3.98	C15H12O6	Funalenonas	Funalenona	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
49	3.98	C30H22O12	Isocromanoquinona	Xanthomegnina ou 9- Hidroxi Rubrofusarina Dimérica	MS-FINDER, SIRISU	<i>A. ochraceus</i> (STACK; MISLIVEC, 1978)	
50	4.16	C18H8O8	Benzofuranos	Ácido telefórico ou derivado	MS-FINDER, SIRIUS, GNPS	-	
51	4.31	C15H10O7	Hidroxiantraquinona ou Xantona	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-	
52	4.49	C18H12O7	Benzenoides	Cicloleucomelon ou derivado	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (HIORT et al., 2004)	
53	4.55	C17H12O5	Pulvinonas	Alpulvinone E / Gyrocianin ou derivado	MS-FINDER, SIRIUS	(AKINFALA et al., 2020)	
54	4.53 4.85	C15H12O5	Naftopiranonas	Rubrofusarina / TMC- 256C1 / TMC-256A1	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
55	4.61 5.24	C13H11NO3	Alcalóides indólicos simples	Carbonarona A / Carbonarona B	SIRIUS	<i>A. carbonarius</i> , <i>A.</i> <i>niger</i> (HENRIKSON et al., 2011; ZHANG et al., 2007a)	
56	4.87	C20H12O8	Naftofuranos	Asperlona B	MS-FINDER, SIRIUS		
57	4.96	C16H14O6	Naftopiranonas	Nigerasperona A	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
58	5.05 5.23	C18H17NO6	Piranonas e derivados	Pestalamida A	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
59	5.26	C23H20O8	Hidroxicumarinas	Desmetilkotanina	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
60	5.59	C27H24N2O5	Kavalactonas	Aspernigrina B	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
61	5.64	C34H59NO14	Fumonisinias	Fumonisina B2	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
62	6.15 5.88	C31H28O12	Naftopiranona	Aurasperona C e isómeros	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
63	5.88	C11H18O4	Acido graxo e derivado	Hexil ácido itacônico	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
64	6.16 6.44	C31H26O11	Naftopiranona	Aurasperona F e Isómeros	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
65	6.48	C32H30N2O8	Kavalactona	Aspernigrina C	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
66	6.58	C32H30O12	Naftopiranona	Aurasperona B	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
67	6.60	C20H34O8	Dicumarinas	Kotanina	MS-FINDER, SIRIUS GNPS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	
68	6.84 7.11	C16H14O5	Naftopiranona ou Metilxantonas	Rubrofusarina B ou Asperxantona	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)	

69	6.70 7.26 7.61	C31H25O10	Naftopiranona	Aurasperona D e isômeros	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
70	7.28	C18H36O4	Ácido graxo	FA diOH-C18:0	MS-FINDER, SIRIUS	-
71	7.15 7.47	C32H28O11	Naftopiranona	Aurasperona E e Isômeros	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
72	7.83	C18H39NO3	Aminoálcool	Fitoesfingosina	MS-FINDER, SIRIUS	-
73	7.92	C28H36N4O4	Peptídeo cíclico	Fungisporina A Ciclo [Val-Val-Phe-Phe]	MS-FINDER, SIRIUS, DEREPLICATOR +	<i>A. niger</i> (VESTH et al., 2018)
74	7.96 8.35 8.74 9.26	C32H26O10	Naftopiranona	Aurasperona A e Isômeros	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
75	8.93 11.81	C16H28O	Terpenóide	N.I.	MS-FINDER	-
76	8.96	C16H30O2	Ácido Graxo	FA 16:1	MS-FINDER, SIRIUS	-
77	8.99	C18H39NO	Aminoálcool	Spisulosine 285	MS-FINDER	-
78	9.02	C16H32O2	Ácido Graxo	FA OH-16:0	MS-FINDER, SIRIUS	-
79	9.19	C18H32O3	Ácido Graxo	FA OH-18:2	MS-FINDER, SIRIUS	-
80	9.48	C16H30O3	Ácido Graxo	FA OXO-16:0	MS-FINDER, SIRIUS	-
81	9.97	C22H47NO2	N-acil etanolaminas	Estearil Dietanolamina	SIRIUS	-
82	10.28, 13.32	C18H32O	Terpenóide e Derivados	N.I.	MS-FINDER,	-
83	10.35	C18H34O2	Ácido Graxo	FA 18:1	MS-FINDER, SRIRIUS	-
84	10.65	C18H36O2	Ácido Graxo	FA OH-18:0	MS-FINDER, SIRIUS	-
85	11.02	C24H49NO3	Ceramida	N.I.	MS-FINDER	-
86	11.36	C18H30O	Sesquiterpenoide	N.I.	MS-FINDER	-
87	11.63 11.89 13.22 14.47	C28H40O2	Terpenoide	Derivado de Esterol	MS-FINDER, SRIUS	-
88	11.67	C28H39NO	Diterpenoide	Emindol DA	MS-FINDER, SIRIUS, GNPS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
89	11.84	C16H30O2	Ácido Graxo	FA C16:1	MS-FINDER, SIRIUS	-
90	12.00	C40H80NO9P	Alquil-acil-glicero-fosfoserina	PS(O-18:0/16:0)	MS-FINDER	-
91	12.00	C22H43NO	Amida Graxa	Amida graxa 22:1	MS-FINDER, SIRIUS	-
92	12.20 13.11	C37H67NO3	Ceramida	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
93	12.49	C21H40O4	Monoacilglicerol	MG (18:1)	MS-FINDER	-
94	12.58	C18H32O2	Ácido Graxo	FA 18:2	MS-FINDER	-
95	12.71	C33H65NO3	Ceramida	N.I.	MS-FINDER	-
96	12.83	C28H38O2	Terpenoide	Derivados de ergosterol	MS-FINDER	-
97	13.04	C28H42O2	Tocotrienol	Gamma-Tocotrienol	MS-FINDER, SIRIUS	-
98	13.19	C25H42O5	Diacilglicerol I	N.I.	MS-FINDER	-
99	13.22	C37H69NO4	Ceramida	Asperamida A	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
100	13.99 14.47	C28H42O	Terpenoide	Derivados de ergosterol	MS-FINDER, SIRIUS	-
101	13.86	C42H80NO8P	Fosfatidilcolina	N.I.	MS-FINDER	-
102	14.19	C28H44O3	Derivado de ergosterol	Peroxido de ergosterol	MS-FINDER, GNPS	-
103	14.22	C23H37NO3	Pirrolizidinas	Sclerolizina	MS-FINDER, SIRIUS	<i>A. sclerotiocarbonarius</i> (PETERSEN et al., 2015)
104	14.62	C25H48O5	Diacilglicerol II	N.I.	MS-FINDER	-
105	14.62 13.57	C22H42O2	Monoéster de cera	Ester Etilico de FA 22:1	MS-FINDER	-

106	14.67	C28H38O	Derivado de ergosterol	N.I.	MS-FINDER	-
11	14.81	C28H62NO8P	Glicerofosfoetanolina	Diacilglicerofosocolina PC 30:7	SIRIUS	-
111	15.21	C37H75NO3	Ceramida	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-
112	15.51	C43H79NO9	Cerebrosideo	Asperamida B	MS-FINDER	<i>A. niger</i> (LIMA et al., 2019)
113	15.56	C44H83NO8	Cerebrosideo	N.I.	MS-FINDER, SIRIUS	-

Fonte: O autor, 2023

## 2.4.4 Perfil metabólico entre cultivos

### 2.4.4.1 Rede Molecular

A rede molecular realizada pelo GNPS agrupa as *features* de acordo com a similaridade do perfil de fragmentação, partindo do raciocínio de que moléculas estruturalmente similares produzem fragmentos similares. Assim, aqueles compostos com estruturas químicas similares são agrupados em uma rede, onde cada nó representa uma *feature* (possivelmente um composto) conectada com as *features* com fragmentos similares.

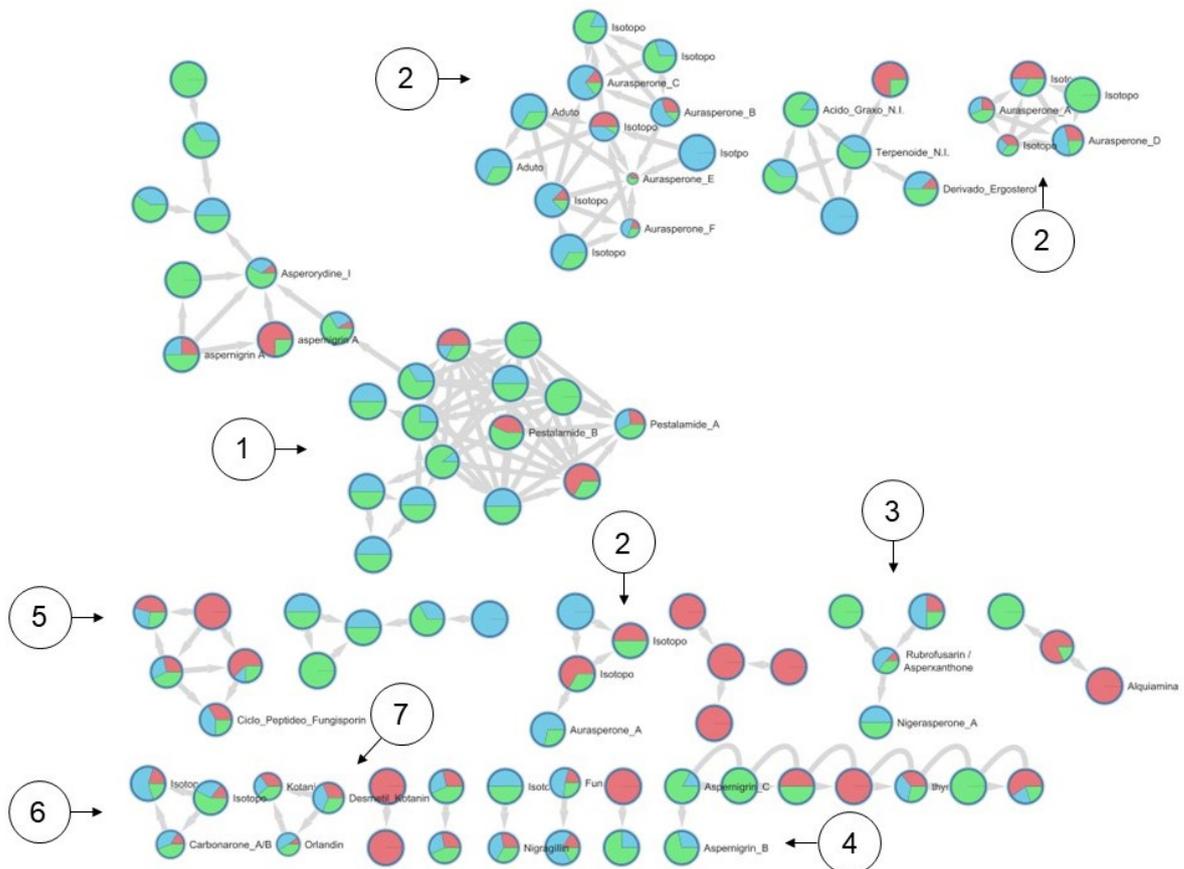
As redes moleculares também permitem a visualização da distribuição destas *features* de acordo com o grupo pertencente. Nas análises realizadas, foram definidos os grupos SD, SA e CC referentes à cada tipo de cultura sendo assim, cada grupo irá possuir uma cor diferente na rede molecular. A intensidade de cada *feature* também é levada em consideração, e foi definida para influenciar no tamanho de cada nodo da rede molecular. Sendo assim, quanto maior o nodo, maior a intensidade média relativa daquela *feature*. Ressalta-se, porém, o caráter qualitativo destas comparações realizadas pela interpretação da rede molecular. O resultado do processamento dos espectros do modo positivo (ESI+) através da análise de *Classical Molecular Networking* está ilustrado na Figura 19

Apesar da Figura 19 mostrar somente parte dos nodos da rede molecular, não mostrando os nodos únicos (sem conexões), percebe-se que a mudança do meio de cultura resultou numa drástica mudança no perfil metabólico do *A. niger*.

Houve um aumento na produção de compostos nitrogenados, dentre os quais estão a aspernigrina A, pestalamida A e pestalamida B, além de outros nodos não identificados pertencentes ao mesmo grupo. A aspernigrina B e a aspernigrina C, derivados da Aspernigrina A que foram agrupados somente entre si, foram encontrados somente nos cultivos SA e CC, estando mais presentes no meio de

cocultura do que no meio SA. As moléculas carbonarone A / carbonarone parecem estar levemente mais presentes nos meios CC e SA, porém ainda presentes no meio SD.

Figura 19 – Recorte da rede molecular formada pela plataforma GNPS



Fonte: O autor, 2023

Legenda: As cores de cada nodo representam a intensidade da *feature* que o compõe nos grupos analisados, sendo verde = CC, azul = SA e vermelho = SD. (1) Compostos nitrogenados incluindo Pestalamida A, Pestalamida B e Aspernigrina A. (2) bis- $\gamma$ -naftopironas, representado pelas aurasperonas. (3)  $\gamma$ -naftopironas monoméricas, Rubrofusarin / Asperxantone e Nigerasperone. (4) Aspernigrin B e Aspernigrin C. (5) Ciclopeptídeos. (6) Carbonarone A / B. (7) Bicumarinas, sendo elas Orlandin, Desmetil Kotanin e Kotanin.

As bis- $\gamma$ -naftopironas Aurasperonas e derivados foram encontrados em maior quantidade no meio SA e CC do que no meio SD, apesar de estarem presentes em todos os meios. O meio SA parece ter mais influência sobre a produção deste grupo de moléculas, visto que a intensidade aparente é maior neste meio que nos outros. A verificação deste fato através da técnica de rede molecular corrobora com a análise

manual realizada no item 2.4.3.5 deste trabalho, onde verificou-se uma maior quantidade de isômeros de bis- $\gamma$ -naftopironas sendo produzidos nos meios CC e SA. Também pode-se evidenciar a maior presença de  $\gamma$ -naftopironas monoméricas nos meios CC e SA, como a Nigerasperone A, a Rubrofusarin, e a Asperxantona (que apesar do nome possuir xantona é uma  $\gamma$ -naftopirona), que são consideradas precursores biossintéticos das bis- $\gamma$ -naftopironas (LIMA et al., 2019; YU et al., 2021).

O grupo dos ciclopeptídeos, incluindo o tetraciclopeptídeo fungisporin e outros não identificados agrupados no mesmo grupo não parecem ter seu metabolismo afetado pelos meios testados. As bicumarinas kotanina, desmetilkotanina e orlandina também não aparentam ter seu metabolismo afetado pela mudança do meio de cultivo ou cocultura.

Já para a análise da rede molecular no modo negativo (ESI-), além dos dados discutidos acima, percebe-se que o ácido telefórico parece ser mais presente na cocultura, com os outros derivados de atromentina estando presente em todos os meios de cultura. Também é possível verificar que os ácidos graxos hidroxilados estão diretamente ligados à cocultura, não aparecendo em nenhum outro cultivo. Os ciclodipeptídeos e cetopiperazinas foram restritos à monocultura no meio SD.

Entre as diversas moléculas identificadas pela utilização de softwares de desreplicação, várias não foram incluídas nas redes moleculares, sendo elas os derivados do ácido itacônico, diversos dipeptídeos, ceramidas e alguns ácidos graxos.

Através da análise da rede molecular evidencia-se o aumento da produção de três classes de compostos quando comparado os meios SD com o meio SA e a CC: bis- $\gamma$ -naftopironas, compostos nitrogenados (incluindo as piridonas derivadas de Aspernigrina A e diversas *features* não identificadas). Além disso, a mudança do meio SD para os outros resultou na não-produção de dicitopeptídeos e diketopiperazinas, sendo estes compostos restritos ao meio de cultura SD.

As bis- $\gamma$ -naftopironas e as  $\gamma$ -naftopironas monoméricas possuem sua biossíntese controlada por genes codificadores de enzimas do tipo sintase de policetídeos não-redutoras (do inglês *nonreducing polyketide synthase* ou *nrPKS*), as quais são reguladas pelo grupo de genes que foram vistos como parte dos BGCs críticos em *A. niger* (YU et al., 2021). A cocultura e o meio SA, portanto, podem ter influenciado para uma maior transcrição dos BGCs envolvidos ou ainda na ativação de BGCs críticos para tais compostos neste fungo, principalmente levando em consideração que o aumento da produção destes compostos se deu não somente por

aumento da quantidade, mas também pela produção de isômeros estruturais deste grupo de compostos. (item 2.4.3.5).

As piridonas (aspernigrina A, pestalamida B, aspernigrina B e aspernigrina C) são um grupo de moléculas normalmente reportados para as espécies de *Aspergillus* da secção Nigri. Apesar da pestalamida B ter sido detectada em todas as cepas testadas (HENRIKSON et al., 2011), a ocorrência dos outros metabólitos não parece ser tão distribuída. A aspernigrina A foi detectada somente em quatro cepas do estudo previamente citado, assim como isolada de uma cepa marinha juntamente com seu derivado aspernigrina B. (HIORT et al., 2004). A aspernigrina C, até a data deste estudo, foi isolada somente de uma cepa marinha de *Aspergillus niger*, (ZHOU et al., 2016). Ambos compostos aspernigrina B e aspernigrina C foram somente relatados na literatura nos dois estudos citados acima, sendo este trabalho o primeiro relato da ocorrência destes compostos fora dos respectivos estudos de seus isolamentos. Apesar de não ter sido possível realizar uma conexão direta com estes metabólitos detectados e o BGCs que controlam sua produção, um review recente mostrou que diversas compostos nitrogenados são produzidos por enzimas biosintéticas alcaloidais, NRPS, e seus híbridos NRPS/PKS e NRPS/Terpenoide. Estas enzimas produtoras de compostos nitrogenados são codificadas por BGCs também vistos como crípticos no *A. niger*. (YU et al., 2021).

Houve também aumento massivo de nodos que representando possíveis compostos nitrogenadas evidenciado pelo mapa molecular, representado pelo indicador (1) na Figura 19, rede a qual possuiu poucos compostos identificados, sendo a maior parte destes compostos presentes em maior quantidade ou somente presentes na cocultura. A baixa identificação destes compostos pode ser reflexo da ativação de genes crípticos ou como participação de modificações nas estruturas químicas de moléculas conhecidamente produzidas por *A. niger* através do metabolismo do *S. cerevisiae*.

Os ácidos graxos hidroxilados representam uma classe de compostos que foram identificados pela rede molecular das análises no modo negativo (ESI-) como presentes somente na cocultura. Pelo menos quatro diferentes ácidos graxos hidroxilados presentes, podendo ser uma quantidade muito maior quando se considera o número de *features* não identificadas e a possibilidade de muitos deles estarem abaixo do limite de detecção. Esta classe de compostos é amplamente dispersa entre os reinos da vida e possui papéis biológicos importantes, como de

sinalização celular, integridade de membrana e estabilização de proteínas (CAO; ZHANG, 2013; VAN DYK; KOCK; BOTHA, 1994). Apesar de não ter sido realizado a identificação a nível molecular, portanto, não sendo possível a correlação direta entre a presença e a atividade esperada, a presença destes compostos na cocultura evidencia, em geral, para a necessidade dos fungos dos papéis associados a estes compostos, como de maior sinalização e integridade de membrana.

#### 2.4.4.2 *Análises quimiométricas e estatísticas*

Após o processamento para anotação in-silico através dos softwares MS-DIAL, MS-FINDER e SIRIUS, assim como pela utilização da plataforma GNPS para criação e discussão das anotações através da rede molecular, realizou-se o procedimento de análises estatística dos extratos dos diferentes meios de cultura e da cocultura.

A preparação adequada de amostras e o processamento correto dos dados são etapas essenciais na metabolômica. A normalização, que costuma ser usada para garantir consistência e minimizar variações entre amostras, não foi necessária, visto que na normalização dos extratos já foi feita previamente à análise, onde todos os extratos analisados foram preparados contendo a mesma concentração de extrato por volume em todos eles (vide item 2.3.5.1), não sendo necessária a aplicação de filtro de normalização no preparo das análises estatísticas. Apesar de mais trabalhosa, a normalização prévia a análise mostra-se melhor para uma série de estudos metabolômicos que normalizações algorítmicas pós análises (WU; LI, 2016), pois reduz as variações que podem surgir nos extratos, garantindo uma maior confiabilidade para os dados analisados.

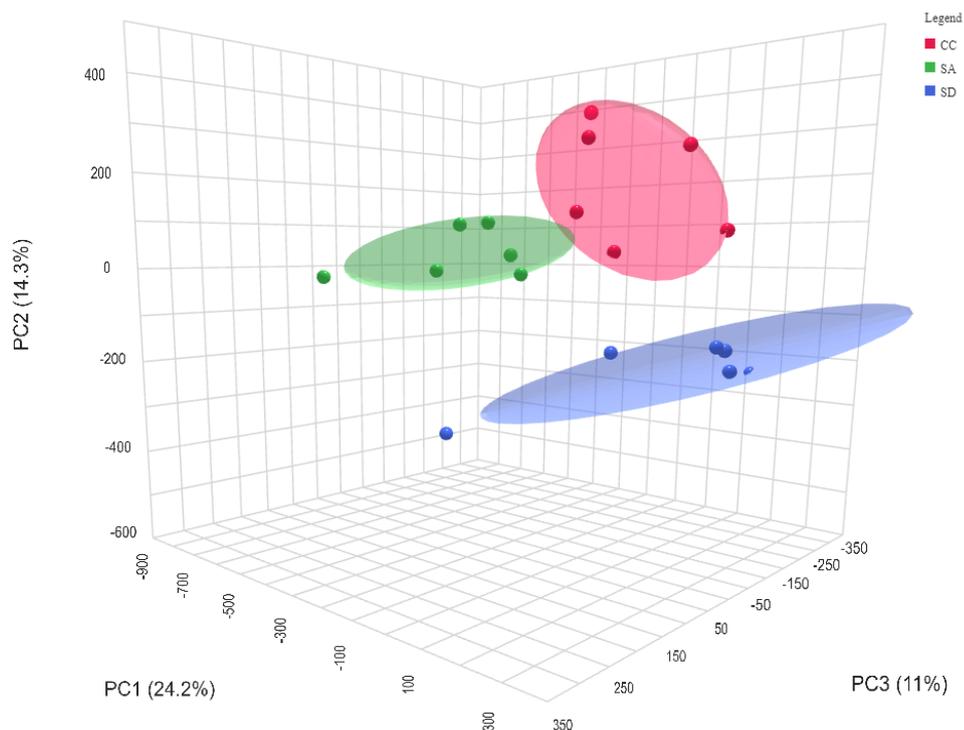
Ainda, nos parâmetros de normalização, foram utilizados a transformação de dados por raiz cúbica e o escalonamento de Pareto. Estas opções de normalização mostram-se adequadas visto que a transformação por raiz cubica minimiza a influência de metabólitos em alta concentração enquanto o escalonamento de Pareto garante uma contribuição mais equalitária de metabólitos em baixa e alta concentração. Ambas as operações visam garantir uma maior equivalência entre as *features* detectadas, evitando o valor absoluto de algumas *features* dominem os modelos gerados e os tornem enviesados para eles, focando, assim, nas variações relativas entre os valores (KARAMAN, 2017). Isso se torna ainda mais importante

levando em consideração que metabólitos produzidos por cocultura são, por vezes, produzidos em baixa quantidade (ARORA et al., 2020).

Entre as análises estatísticas, a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é frequentemente empregada com o objetivo de reduzir a dimensionalidade dos dados, preservando ao máximo a variação contida nos mesmos, agrupando-os de acordo com sua similaridade (REN et al., 2015). Por ser uma técnica não supervisionada, a PCA não faz uso de informações a priori sobre grupos ou classes das amostras em sua realização. A análise de PCA está ilustrada na Figura 20.

Realizada com os extratos dos diferentes meios de cultura, verifica-se que existe diferença entre os extratos, onde cada extrato encontra-se ocupado regiões diferentes do gráfico de componentes principais. Para construção da Figura 20 foram utilizados o PC1, PC2 e PC3, componentes com maior representatividade, sendo 24.2% para PC1, 14.3% para PC2 e 11% para o PC3. Somados, os componentes principais utilizados nesta análise representam cerca de 50% das informações contidas nos cromatogramas. A contribuição completa de cada componente principal para esta análise pode ser verificada no Apêndice K.

Figura 20 – Gráfico de PCA para os extratos de diferentes cultivos de *A. niger*

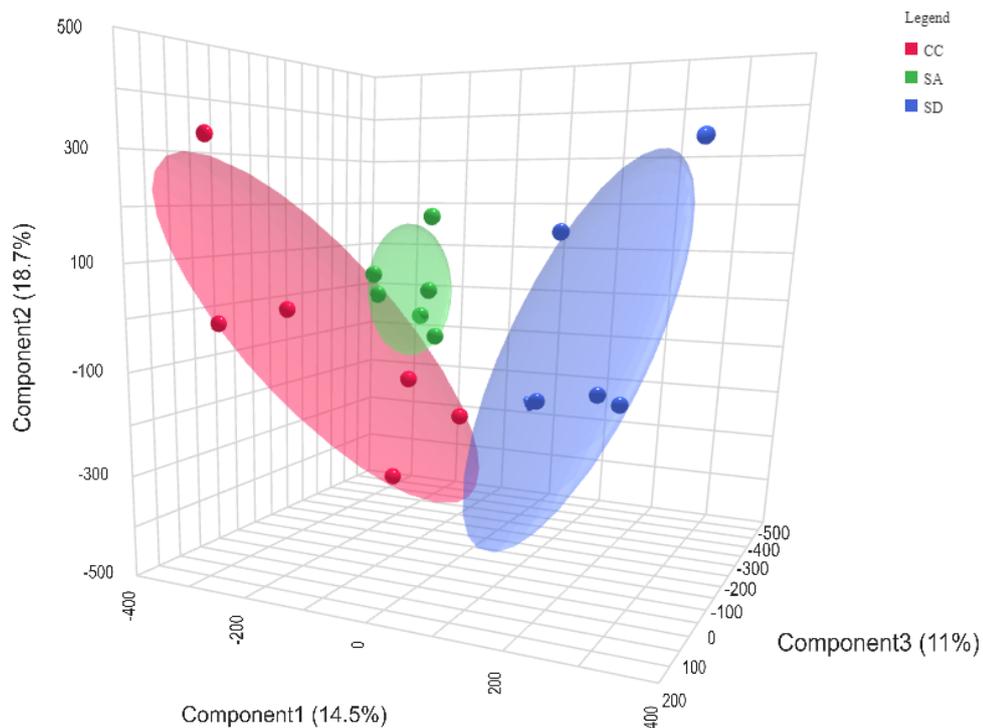


Fonte: O autor, 2023.

Ainda que seja uma ferramenta que auxilie na visualização de padrões, a PCA pode não ser a abordagem mais indicada quando o propósito principal é discernir efetivamente entre diferentes grupos de amostras, especialmente em contextos onde as diferenças são mais sutis, como a mudanças no perfil metabólico de um fungo. (LIU et al., 2022; REN et al., 2015)

Diante disso, a Análise de Discriminantes Parciais de Mínimos Quadrados (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) emerge como uma técnica mais adequada. Ao contrário da PCA, a PLS-DA é uma técnica supervisionada, na qual o modelo é construído com base nas categorias pré-definidas das amostras. A análise através da técnica de PLS-DA é ilustrada na Figura 21.

Figura 21 – Gráfico de PLS-DA para os extratos de diferentes cultivos de *A. niger*



Fonte: o autor, 2023

Esta análise evidencia, através da utilização do PC1, PC2 e PC3, a diferença dos extratos. A participação do componente 1 foi de 14.5%, do componente dois foi de 18.7% e do componente 3 foi de 11%, totalizando, assim, 44.2% de representatividade das informações contidas nas amostras. A contribuição completa de cada componente para esta análise pode ser verificada no Apêndice K. O PLS-DA maximiza a variação entre as classes, possibilitando uma distinção mais robusta entre

diferentes grupos. Com o objetivo deste trabalho sendo a diferenciação entre os extratos, o PLS-DA mostra-se como um instrumento estatístico que permite uma interpretação mais precisa e informativa das diferenças entre as amostras.

Por ser uma análise discriminativa, através do PLS-DA também é possível verificar a capacidade preditiva através de cálculo regressivo do modelo gerado, realizado através da validação cruzada. (SZYMAŃSKA et al., 2012). Os valores obtidos para a validação cruzada da análise de PLS-DA estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de  $R^2$ ,  $Q^2$ , e Acurácia para a análise de PLS-DA

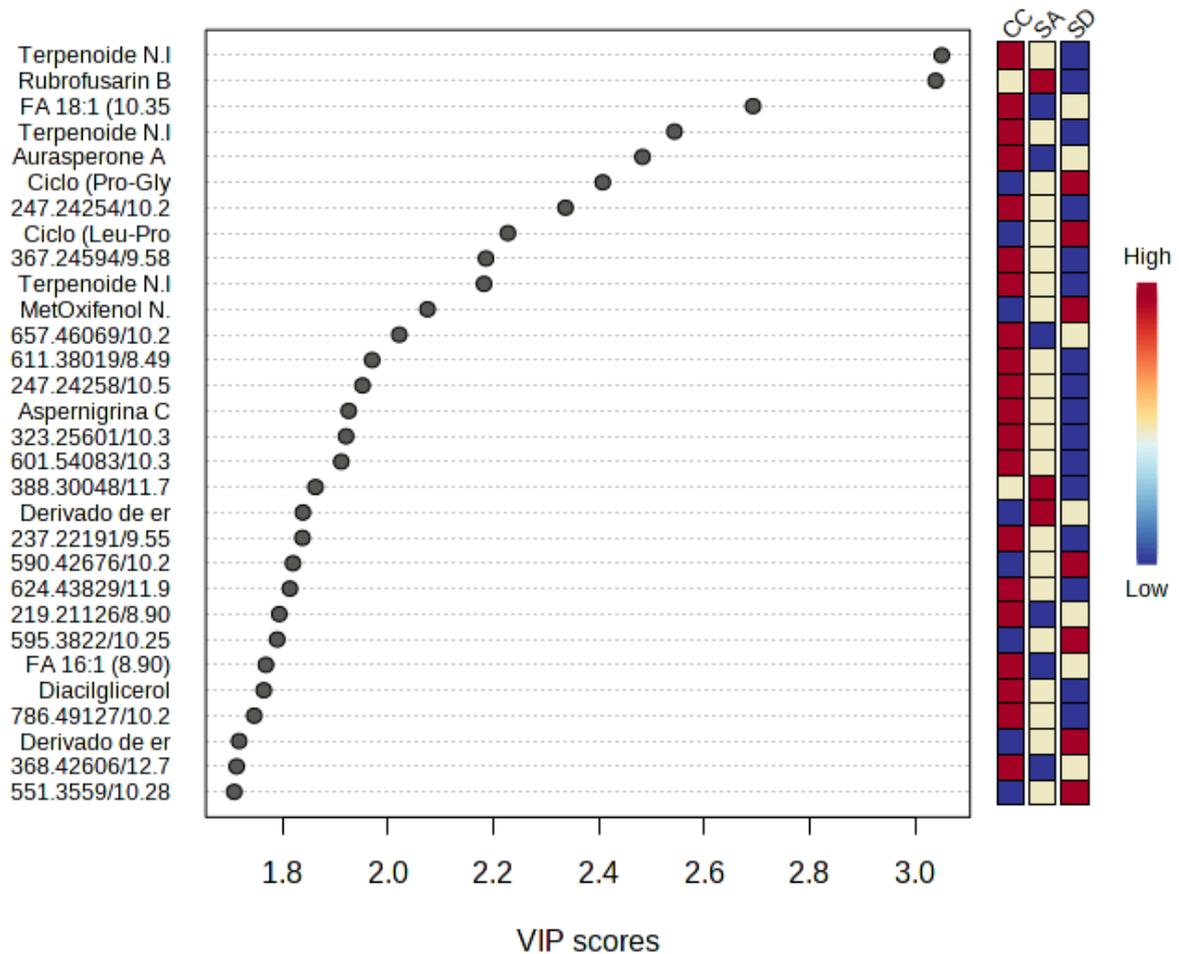
Medida	1 compon.	2 compon.	3 comp.	4 comp.	5 comp.	6 comp.	7 comp.	8 comp.
Acurácia	0.50000	0.88333	0.95	0.95	1.0	1.0	1.0	1.0
$R^2$	0.89740	0.94438	0.98085	0.99517	0.99850	0.99952	0.99981	0.99990
$Q^2$	0.59322	0.76302	0.78055	0.78215	0.78506	0.78483	0.78344	0.78495

Fonte: O autor, 2023

Verifica-se que, para esta análise, o modelo preditivo possui bons valores de  $R^2$ ,  $Q^2$  e acurácia, mostrando a eficácia do modelo gerado para distinguir entre os meios de cultura e a cocultura realizados neste trabalho. Através da utilização cálculos de validação cruzada percebe-se que o modelo gerado consegue distinguir com boa capacidade (Acurácia: 1.000;  $R^2$ : 0.9985;  $Q^2$ : 0.7851) utilizando-se de cinco componentes do modelo, com representatividade de 55.5% das informações contidas nas amostras analisadas.

Ainda, através da análise de PLS-DA é possível verificar as *features* mais importantes para a diferenciação dos extratos tanto pela utilização do *VIP score* (do inglês *Variable Importance in Projection* ou Importância Variável na Projeção em tradução livre). Através da utilização do *VIP score*, é possível verificar quais as *features* mais importantes para diferenciação dos grupos com base nas informações contidas nos componentes das análises. Ou seja, as *features* apontadas aqui são aquelas que possuem maior variação entre os grupos, tornando-se mais úteis na utilização para diferenciação entre eles.

Figura 22 – *Features* de importância na diferenciação dos grupos na análise de PLS-DA através da utilização do VIP score no componente 2



Fonte: O autor, 2023

De acordo com a pontuação exemplificada na Figura 22, são de maior importância para a diferenciação dos grupos os compostos anotados como Rubrofusarina B / Asperxantona A ( $T_R$  7.10), Aurasperona A ou isômero ( $T_R$  9.10, Ciclo(Pro-Gli), Ciclo(Leu-Pro) e Aspernigrina C, assim como três terpenoides ( $T_R$  10.28, 10.59 e 8.93) e um metóxi fenol ( $T_R$  1.05) não identificados, dois derivados de ergosterol ( $T_R$  13.99 e 12.84), dois ácidos graxos insaturados FA 16:1 ( $T_R$  8.90) e FA 18:1 ( $T_R$  10.35), um diacilglicerol ( $T_R$  13.19) e uma série de *features* desconhecidos. Os compostos Ciclo(Pro-Gli), Ciclo(Leu-Pro) e o derivado de ergosterol ( $T_R$  12.84) estão presentes em alta intensidade no meio SD, enquanto o meio SA possui em alta intensidade os compostos Rubrofusarina B / Asperxantona A ( $T_R$  7.10) e o derivado de ergosterol ( $T_R$  13.99). Já a cocultura mostra em maior intensidade os terpenoides não identificados, os ácidos graxos, o diacilglicerol, a aurasperona A e a aspernigrina

C, assim como a maioria das *features* desconhecidas. Tais relações entre presença e ausência destes compostos nos diferentes tipos de cultivo já havia sido discutida no item **2.4.4.1** pela utilização do software GNPS e interpretação pelo autor.

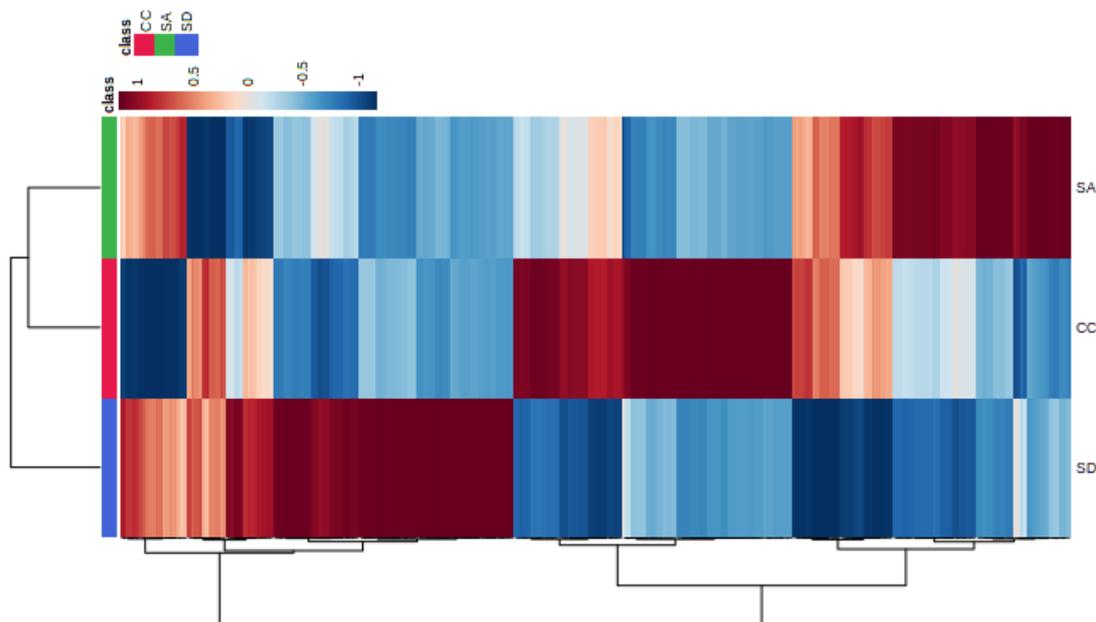
Assim, a utilização da métrica de *features* de importância através do VIP Score para a análise de PLS-DA reforça e adiciona peso estatístico a verificação da produção da piridona Aspernigrina C pela cocultura, sendo um dos compostos diferenciais desta metodologia de cultivo. Diversos outras *features* não identificadas foram verificados também como de importância para a diferenciação dos extratos. Tais *features* não identificadas podem representam compostos com estruturas inovadoras, como discutido no item **2.4.3.6**.

Através das análises estatísticas de PCA e PLS-DA é evidenciado, portanto, a diferença no perfil metabólico das culturas verificadas, onde tanto a cocultura (CC) quanto a mudança nutricional (meio SA) proporcionaram uma mudança no metabolismo do fungo, refletida na mudança do perfil metabólico verificado.

Ainda na esfera das análises estatísticas, o mapa de calor é uma abordagem gráfica de clusterização que permite representar, por meio de uma escala de cores, a magnitude de variáveis em relação às amostras examinadas (WILKINSON; FRIENDLY, 2009). Assim, esta análise é uma maneira intuitiva de verificação das variações metabólicas contidas nos extratos. Tonalidades específicas denotam a presença intensificada ou reduzida de determinada *feature* em um grupo, o vermelho (ou intensidade 1) representa a maior intensidade verificada para uma *feature*, enquanto o azul escuro (ou intensidade -1) representa total ausência. A análise de mapa de calor realizada nos extratos de diferentes cultivos de *A. niger* está ilustrada na Figura 23

Através da interpretação do mapa de calor, verifica-se que os diferentes meios de cultura utilizados geraram *features* em diferentes intensidades, ilustrando de maneira intuitiva a mudança no perfil metabólico já discutida anteriormente. O mapa de calor ilustrado mostra a média da intensidade das *features* em cada amostra contida em cada grupo: SD, CC e SA. Percebe-se, também, três grupos de compostos que discernem grandemente entre os cada metodologia de cultivo, incluindo a cocultura.

Figura 23 – Mapa de calor das *features* detectadas extratos de diferentes cultivos de *A. niger* realizado através do software Metaboanalyst 5.0



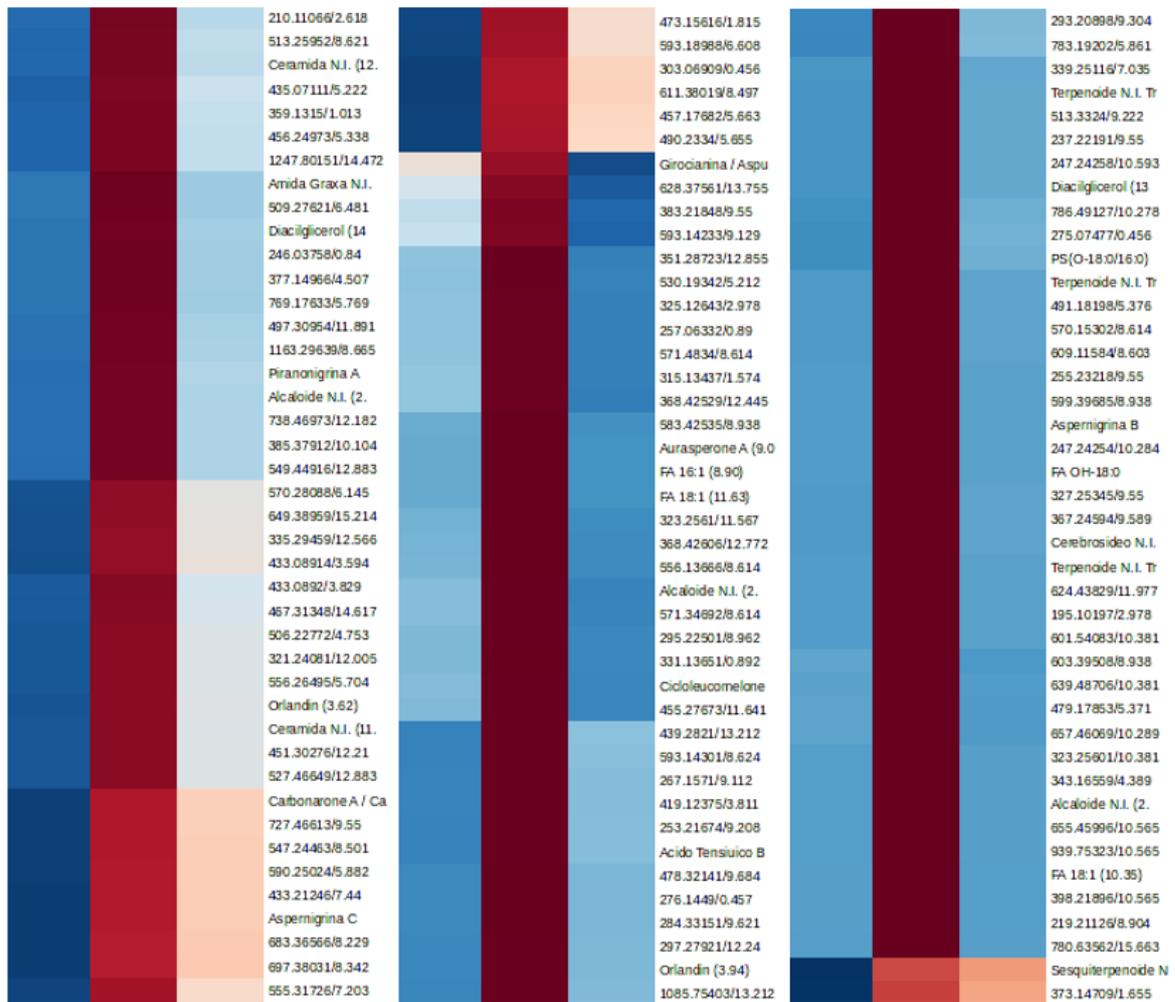
Fonte: O autor, 2023

Tal mapa de calor foi ampliado para verificar quais os grupos de compostos produzidos em maior intensidade pela cocultura em comparação aos meios SD e SA, ou seja, aqueles resultantes do cocultivo. Através da Figura 24, uma amplificação da Figura 23, a qual mostra as *features* produzidas em maior intensidade pela cocultura em comparação aos outros meios de cultura, é possível verificar a presença de alguns compostos anotados entre as diversas *features* resultantes da cocultura, muitas das quais são completamente desconhecidas.

Os compostos Piranonigrina A, Orlandina, Carbonarona A/B, Aspernigrina B e C, Girocianina/Aspulvinona, Aurasperona A e Ácido Tensiuico B foram anotados a nível de estrutura nos compostos mais intensos na cocultura. Também foram anotados terpenoides, dicacilgliceróis, alcaloides, e diversos ácidos graxos e derivados, como ácidos graxos hidroxilados, amins graxa, diacilgliceróis e cerebrosídeos.

Também é perceptível a sobreposição de produção de compostos químicos, com diversas *features* aparecendo intensamente em ao menos duas metodologias. Apesar disso, esta co-ocorrência de compostos não foi aprofundada nesta discussão.

Figura 24 – *Features* presentes em maior intensidade na cocultura em comparação com os outros meios de cultivo.



Fonte: O autor, 2023.

Ao integrar os resultados fornecidos por esta análise com os dados provenientes das análises de PCA e PLS-DA, verifica-se uma robusta constatação sobre as alterações no perfil metabólico induzidas pelas diferenças nos meios de cultura utilizados, assim como a produção de compostos – aqui verificado através das *features* presentes – pela cocultura.

É importante ressaltar o caráter “pseudo-estatístico” do ponto de vista biológico e metabólico destas análises realizadas, visto que foram realizadas somente uma duplicata biológica, que extraídas com três solventes diferentes (vide item 2.3.4), gerando os seis pontos amostrais visto nas análises de PCA e PLS-DA. Portanto, estas análises não podem ser tomadas como um dado de certeza biológico, isto é, que existe certeza da variabilidade metabólica causada pela mudança nestes meios

de cultura, mas sim como uma verificação de que, nos experimentos realizados, houve a variabilidade nos metabólitos presentes nas amostras e uma indicação de tal variabilidade biológica, porém, sem caráter estatístico real.

Ainda tratando da amostragem, é de importância lembrar as diferentes polaridades submetidas para estas análises quimiométricas e estatísticas. Tratando-se de três diferentes solventes extratores com diferentes polaridades (diclorometano, acetato de etila e butanol), cada extrato obtido possuía compostos de diferentes polaridades. Tal detalhe pode ser um dos motivos pelo qual as análises de PCA e PLS-DA mostraram representatividade de cerca de 50 a 60% das informações contidas – simplesmente pela diversidade de *features* presentes em amplas e diferentes concentrações.

Apesar de ser verificado que a composição do meio influencia fortemente a produção dos metabólitos secundários, incluindo o fungo *A. niger* utilizado (YU et al., 2021), o cultivo de microorganismos pode ser muito influenciado por fatores fora do controle, com valores altos de replicatas sendo constantes em estudos de cocultura, como o  $n = 9$  para cada meio de cultura utilizado para a cocultura entre os fungos *Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca* (BERTRAND et al., 2013). O valor alto de replicatas biológicas visa garantir que o perfil metabólico e os compostos químicos verificados na mudança de meio de cultura e/ou cocultura são realmente resultado das mudanças realizadas e mecanismos bioquímicos constantes e não simples fator do acaso. Portanto, é necessário ao menos uma a mais replicata para atingir o valor amostral de  $n = 3$ , o valor mínimo padrão definido para amostras biológicas. (NAEGLE; GOUGH; YAFFE, 2015)

### 3 CONCLUSÃO

Através técnicas de microcultivo, análise do gene ITS sequenciado e análise metabolômica, o fungo filamentoso utilizado neste estudo foi identificado como *Aspergillus niger*.

O fungo *Aspergillus niger* foi cultivado em um meio conhecido e de utilização rotineira em laboratórios, o meio Sabouraud-Dextrose e dois meios de cultivo desenvolvidos para este estudo. Através da técnica de desreplicação auxiliada por *software*, identificou-se mais de cem moléculas produzidas por este fungo nos três tipos de cultivo, entre elas moléculas já sabidamente produzidas pelo fungo, como dicetopiperazinas, dipeptídeos cíclicos, tetrapeptídeos cíclicos, derivados do ácido itacônico, bis- $\gamma$ -naftopironas,  $\gamma$ -naftopironas, bicumarinas ácidos graxos hidroxilados, esfingosinas, ceramidas, derivados de ergosterol e cerebrosídeos, além de uma gama diversa de compostos nitrogenados que incluem mas não se restringem a carbonarone A e B, aspernigrina A, B e C, pestalamida A e B, nigragilina e nigerazina B. Foi sugerido também assim como foi sugerido a produção de uma série de moléculas pouco reportadas para esta espécie, como no caso da atromentina, Ácido telefórico, pulvinonas e seus derivados.

Verificou-se, também, através de técnicas estatísticas, que o perfil metabólico varia de acordo com o meio de cultura utilizado. A verificação da mudança drástica de moléculas produzidas por cada meio de cultura, verificado através da rede molecular gerada pela plataforma GNPS está de acordo com o que é discutido na literatura, onde teoriza-se que a cocultura influencia diretamente no perfil metabolômico (ARORA et al., 2020; BERTRAND et al., 2014). A cocultura foi capaz de induzir uma maior produção de uma gama de moléculas, principalmente de ácidos graxos hidroxilados, derivados de Aspernigina A e de bis bis- $\gamma$ -naftopironas, assim como de uma série de moléculas não identificadas evidenciadas pela rede molecular.

A conexão realizada entre as moléculas produzidas em maior quantidade e seus respectivos BGCs e comparação destes com os achados de genes crípticos descritos por YU et al., 2021 são somente um indicativo de relação. A realização de técnicas de transcriptoma, não realizadas neste estudo, podem vir a comprovar a ligação entre a maior expressão dos genes ligados à produção destas moléculas, principalmente bis- $\gamma$ -naftopironas, derivados de aspernigrin A, assim como de outros compostos nitrogenados. O indicativo de produção de atromentina e derivados foi

discutido com base em estudos recentes, entendo que as técnicas realizadas por este estudo não são capazes de afirmar a produção de tais compostos e sim sugerir a presença deles.

Sendo assim, este trabalho mostra a viabilidade das técnicas metabolômicas e de desreplicação auxiliada por software para o estudo de microrganismos e coculturas, sendo uma ferramenta poderosa e confiável, desde que utilizada com parcimônia sabendo-se das suas limitações.

## REFERÊNCIAS

- AKBAS, Meltem Yesilcimen; STARK, Benjamin C. Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 1593–1609, 2016. DOI: 10.1007/s10295-016-1821-z.
- AKINFALA, Taye O.; HOUBRAKEN, Jos; SULYOK, Michael; ADEDEJI, Abiodun R.; ODEBODE, Adegboyega C.; KRŠKA, Rudolf; EZEKIEL, Chibundu N. Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 316, p. 108490, 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108490.
- ALANZI, Abdullah; ELHAWARY, Esraa A.; ASHOUR, Mohamed L.; MOUSSA, Ashaimaa Y. Aspergillus co-cultures: A recent insight into their secondary metabolites and microbial interactions. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 273–298, 2023. DOI: 10.1007/s12272-023-01442-5.
- ALLARD, Pierre-Marie; GENTA-JOUE, Grégory; WOLFENDER, Jean-Luc. Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. **Current Opinion in Chemical Biology**, Omics. [S. l.], v. 36, Omics, p. 40–49, 2017. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.12.022.
- ALLARD, Pierre-Marie; PÉRESSE, Tiphaine; BISSON, Jonathan; GINDRO, Katia; MARCOURT, Laurence; PHAM, Van Cuong; ROUSSI, Fanny; LITAUDON, Marc; WOLFENDER, Jean-Luc. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 2016. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04804.
- ALSEEKH, Saleh et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. **Nature Methods**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 747–756, 2021. DOI: 10.1038/s41592-021-01197-1.
- ALY, Amal H.; DEBBAB, Abdessamad; PROKSCH, Peter. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 3–19, 2011. DOI: 10.1007/s13225-011-0116-y.
- ARORA, Divya; GUPTA, Praseon; JAGLAN, Sundeep; ROULLIER, Catherine; GROVEL, Olivier; BERTRAND, Samuel. Expanding the chemical diversity through microorganisms co-culture: Current status and outlook. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 40, p. 107521, 2020. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107521.
- BARTEL, Jörg; KRUMSIEK, Jan; THEIS, Fabian J. STATISTICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF HIGH-THROUGHPUT METABOLOMICS DATA. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. e201301009, 2013. DOI: 10.5936/csbj.201301009.
- BENOIT, Isabelle et al. Bacillus subtilis attachment to Aspergillus niger hyphae results in mutually altered metabolism. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 2099–2113, 2015. DOI: 10.1111/1462-2920.12564.

BERGER-DEGUEE, M.; BERGER, Y. Structure of versicolorone isolated from *Aspergillus versicolor*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 1449–1451, 1982. DOI: 10.1016/0031-9422(82)80166-0.

BERTOLO, Angélica Patrícia; BIZ, Ana Paula; KEMPKA, Aniela Pinto; RIGO, Elisandra; CAVALHEIRO, Darlene. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 3697–3706, 2019. DOI: 10.1007/s13197-019-03833-3.

BERTRAND, Samuel; BOHNI, Nadine; SCHNEE, Sylvain; SCHUMPP, Olivier; GINDRO, Katia; WOLFENDER, Jean-Luc. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.03.001.

BERTRAND, Samuel; SCHUMPP, Olivier; BOHNI, Nadine; MONOD, Michel; GINDRO, Katia; WOLFENDER, Jean-Luc. De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 76, n. 6, p. 1157–1165, 2013. DOI: 10.1021/np400258f.

BIAN, C. et al. Reducing the number of accepted species in *Aspergillus* series *Nigri*. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 95–132, 2022. DOI: 10.3114/sim.2022.102.03.

BLAŽENOVIC, Ivana; KIND, Tobias; JI, Jian; FIEHN, Oliver. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. **Metabolites**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 31, 2018. DOI: 10.3390/metabo8020031.

BOND, Carly; TANG, Yi; LI, Li. *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for mining, studying and engineering fungal polyketide synthases. **Fungal Genetics and Biology**, The Era of Synthetic Biology in Yeast and Filamentous Fungi. [S. l.], v. 89, The Era of Synthetic Biology in Yeast and Filamentous Fungi, p. 52–61, 2016. DOI: 10.1016/j.fgb.2016.01.005.

BRANCO, Patrícia; FRANCISCO, Diana; CHAMBON, Christophe; HÉBRAUD, Michel; ARNEBORG, Nils; ALMEIDA, Maria Gabriela; CALDEIRA, Jorge; ALBERGARIA, Helena. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 843–853, 2014. DOI: 10.1007/s00253-013-5411-y.

CAIRNS, Timothy C.; NAI, Corrado; MEYER, Vera. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. **Fungal Biology and Biotechnology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 13, 2018. DOI: 10.1186/s40694-018-0054-5.

CAO, Yujin; ZHANG, Xiao. Production of long-chain hydroxy fatty acids by microbial conversion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 8, p. 3323–3331, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-4815-z.

CHAUDHARY, Vinod; ALBACKER, Lee A.; DENG, Shenglou; CHUANG, Ya-Ting; LI, Yubo; UMETSU, Dale T.; SAVAGE, Paul B. Synthesis of Fungal Glycolipid

Asperamide B and Investigation of Its Ability to Stimulate Natural Killer T Cells. **Organic Letters**, [S. l.], v. 15, n. 20, p. 5242–5245, 2013. DOI: 10.1021/ol4024375.

CHEN, Li; ZHANG, Qi-Qing; HU, Xiao; XIA, Qi-Wen; ZHAO, Yang-Yang; ZHENG, Qiu-Hong; LIU, Qin-Ying. Speradines B-E, Four Novel Tetracyclic Oxindole Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus oryzae*. **HETEROCYCLES**, [S. l.], v. 89, n. 7, p. 1662, 2014. DOI: 10.3987/COM-14-13004.

CONTRERAS-RUIZ, Alba; ALONSO-DEL-REAL, Javier; BARRIO, Eladio; QUEROL, Amparo. *Saccharomyces cerevisiae* wine strains show a wide range of competitive abilities and differential nutrient uptake behavior in co-culture with *S. kudriavzevii*. **Food Microbiology**, [S. l.], v. 114, p. 104276, 2023. DOI: 10.1016/j.fm.2023.104276.

DE JONGE, Niek F.; MILDAU, Kevin; MEIJER, David; LOUWEN, Joris J. R.; BUESCHL, Christoph; HUBER, Florian; VAN DER HOOFT, Justin J. J. Good practices and recommendations for using and benchmarking computational metabolomics metabolite annotation tools. **Metabolomics**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 103, 2022. a. DOI: 10.1007/s11306-022-01963-y.

DE JONGE, Niek F.; MILDAU, Kevin; MEIJER, David; LOUWEN, Joris J. R.; BUESCHL, Christoph; HUBER, Florian; VAN DER HOOFT, Justin J. J. Good practices and recommendations for using and benchmarking computational metabolomics metabolite annotation tools. **Metabolomics**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 103, 2022. b. DOI: 10.1007/s11306-022-01963-y.

DE VRIES, Ronald P. et al. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. **Genome Biology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 28, 2017. DOI: 10.1186/s13059-017-1151-0.

DEWICK, Paul. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Construction Mechanisms. *Em: Medicinal Natural Products*. [s.l.] : John Wiley & Sons, Ltd, 2009. p. 7–38. DOI: 10.1002/9780470742761.ch2. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470742761.ch2>. Acesso em: 10 jul. 2023.

DONG, Yuan; CUI, Cheng-Bin; LI, Chang-Wei; HUA, Wei; WU, Chang-Jing; ZHU, Tian-Jiao; GU, Qian-Qun. Activation of Dormant Secondary Metabolite Production by Introducing Neomycin Resistance into the Deep-Sea Fungus, *Aspergillus versicolor* ZBY-3. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 4326–4352, 2014. DOI: 10.3390/md12084326.

DÜHRKOP, Kai et al. Systematic classification of unknown metabolites using high-resolution fragmentation mass spectra. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 39, n. 4, p. 462–471, 2021. DOI: 10.1038/s41587-020-0740-8.

DÜHRKOP, Kai; BÖCKER, Sebastian. Fragmentation Trees Reloaded. *Em: (Teresa M. Przytycka, Org.)RESEARCH IN COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY 2015*, Cham. **Anais** [...]. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 65–79. DOI: 10.1007/978-3-319-16706-0\_10.

ERNST, Madeleine et al. MolNetEnhancer: Enhanced Molecular Networks by Integrating Metabolome Mining and Annotation Tools. **Metabolites**, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 144, 2019. DOI: 10.3390/metabo9070144.

FANG, Nianbai; YU, Shangong; RONIS, Martin JJ; BADGER, Thomas M. Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples. **Experimental Biology and Medicine**, [S. l.], v. 240, n. 4, p. 488–497, 2015. DOI: 10.1177/1535370214554545.

FURTADO, Niege A. J. C.; PUPO, Mônica T.; CARVALHO, Ivone; CAMPO, Vanessa L.; DUARTE, Marta Cristina T.; BASTOS, Jairo K. Diketopiperazines produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian strain. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 16, p. 1448–1453, 2005. DOI: 10.1590/S0103-50532005000800026.

GEIB, Elena; BALDEWEG, Florian; DOERFER, Maximilian; NETT, Markus; BROCK, Matthias. Cross-Chemistry Leads to Product Diversity from Atromentin Synthetases in *Aspergilli* from Section *Nigri*. **Cell Chemical Biology**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 223–234.e6, 2019. DOI: 10.1016/j.chembiol.2018.10.021.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 274, n. 5287, p. 546, 563–7, 1996. DOI: 10.1126/science.274.5287.546.

HARVEY, Alan L.; EDRADA-EBEL, RuAngelie; QUINN, Ronald J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. DOI: 10.1038/nrd4510.

HAUTBERGUE, Thaïs. **Caractérisation chimique des métabolomes secondaires de *Penicillium* et *Fusarium* par marquage isotopique couplé à la spectrométrie de masse haute résolution**. 2017. phd - [S. l.], 2017. Disponível em: <https://oatao.univ-toulouse.fr/19303/>. Acesso em: 9 ago. 2023.

HENRIKSON, Jon C.; ELLIS, Trevor K.; KING, Jarrod B.; CICHEWICZ, Robert H. Reappraising the Structures and Distribution of Metabolites from Black *Aspergilli* Containing Uncommon 2-Benzyl-4H-pyran-4-one and 2-Benzylpyridin-4(1H)-one Systems. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 74, n. 9, p. 1959–1964, 2011. DOI: 10.1021/np200454z.

HENRIKSON, Jon C.; HOOVER, Ashley R.; JOYNER, P. Matthew; CICHEWICZ, Robert H. A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 435–438, 2009. DOI: 10.1039/B819208A.

HIORT, J. et al. New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 67, n. 9, p. 1532–1543, 2004. DOI: 10.1021/np030551d.

HOFFMANN, Martin A.; KRETSCHMER, Fleming; LUDWIG, Marcus; BÖCKER, Sebastian. MAD HATTER Correctly Annotates 98% of Small Molecule Tandem Mass Spectra Searching in PubChem. **Metabolites**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 314, 2023. DOI: 10.3390/metabo13030314.

HOFFMANN, Martin A.; NOTHIAS, Louis-Félix; LUDWIG, Marcus; FLEISCHAUER, Markus; GENTRY, Emily C.; WITTING, Michael; DORRESTEIN, Pieter C.; DÜHRKOP, Kai; BÖCKER, Sebastian. High-confidence structural annotation of metabolites absent from spectral libraries. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 40, n. 3, p. 411–421, 2022. DOI: 10.1038/s41587-021-01045-9.

JEFFRYES, James G. et al. MINEs: open access databases of computationally predicted enzyme promiscuity products for untargeted metabolomics. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 44, 2015. DOI: 10.1186/s13321-015-0087-1.

JOMORI, Takahiro; HARA, Yasumasa; SASAOKA, Miho; HARADA, Kazuo; SETIAWAN, Andi; HIRATA, Kazumasa; KIMISHIMA, Atsushi; ARAI, Masayoshi. Mycobacterium smegmatis alters the production of secondary metabolites by marine-derived *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Medicines**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 76–82, 2020. DOI: 10.1007/s11418-019-01345-0.

KARAMAN, Ibrahim. Preprocessing and Pretreatment of Metabolomics Data for Statistical Analysis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 965, p. 145–161, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-47656-8\_6.

KHOR, Guat Kheng; UZIR, Mohamad Hekarl. *Saccharomyces cerevisiae*: a potential stereospecific reduction tool for biotransformation of mono- and sesquiterpenoids. **Yeast**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 93–107, 2011. DOI: 10.1002/yea.1827.

KRALJ, Ana; KEHRAUS, Stefan; KRICK, Anja; EGUEREVA, Ekaterina; KELTER, Gerhard; MAURER, Martina; WORTMANN, Andreas; FIEBIG, Heinz-Herbert; KÖNIG, Gabriele M. Arugosins G and H: Prenylated Polyketides from the Marine-Derived Fungus *Emericella nidulans* var. *acristata*. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 69, n. 7, p. 995–1000, 2006. DOI: 10.1021/np050454f.

KRETSCHMER, Fleming; SEIPP, Jan; LUDWIG, Marcus; KLAU, Gunnar W.; BÖCKER, Sebastian. **Small molecule machine learning: All models are wrong, some may not even be useful**. bioRxiv, , 2023. DOI: 10.1101/2023.03.27.534311. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.27.534311v1>. Acesso em: 16 jul. 2023.

LAMBONI, Yendouban et al. Diversity in Secondary Metabolites Including Mycotoxins from Strains of *Aspergillus* Section *Nigri* Isolated from Raw Cashew Nuts from Benin, West Africa. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. e0164310, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0164310.

LIEBISCH, Gerhard; VIZCAÍNO, Juan Antonio; KÖFELER, Harald; TRÖTZMÜLLER, Martin; GRIFFITHS, William J.; SCHMITZ, Gerd; SPENER, Friedrich; WAKELAM, Michael J. O. Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 1523–1530, 2013. DOI: 10.1194/jlr.M033506.

LIMA, Mary Anne S.; OLIVEIRA, Maria da Conceição F. De; PIMENTA, Antônia T. Á.; UCHÔA, Paula K. S. *Aspergillus niger*: A Hundred Years of Contribution to the Natural Products Chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.], v. 30, p. 2029–2059, 2019. DOI: 10.21577/0103-5053.20190080.

LIU, Chenyu; ZHANG, Xinlian; NGUYEN, Tanya T.; LIU, Jinyuan; WU, Tsungchin; LEE, Ellen; TU, Xin M. Partial least squares regression and principal component analysis: similarity and differences between two popular variable reduction approaches. **General Psychiatry**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. e100662, 2022. DOI: 10.1136/gpsych-2021-100662.

LU, Shiqiong et al. Bis-naphtho- $\gamma$ -pyrones from Fungi and Their Bioactivities. **Molecules**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 7169–7188, 2014. DOI: 10.3390/molecules19067169.

MARMANN, Andreas; ALY, Amal H.; LIN, Wenhan; WANG, Bingui; PROKSCH, Peter. Co-Cultivation—A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 1043–1065, 2014. DOI: 10.3390/md12021043.

MOHIMANI, Hosein et al. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. **Nature Communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 4035, 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-06082-8.

NAEGLE, Kristen; GOUGH, Nancy R.; YAFFE, Michael B. Criteria for biological reproducibility: what does “n” mean? **Science Signaling**, [S. l.], v. 8, n. 371, p. fs7, 2015. DOI: 10.1126/scisignal.aab1125.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NIELSEN, Kristian Fog; MOGENSEN, Jesper Mølgaard; JOHANSEN, Maria; LARSEN, Thomas O.; FRISVAD, Jens Christian. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 395, n. 5, p. 1225–1242, 2009. DOI: 10.1007/s00216-009-3081-5.

NOZAWA, Kohei; HORIE, Yoshikazu; UDAGAWA, Shun-ichi; KAWAI, Ken-ichi; YAMAZAKI, Mikio. Isolation of a New Tremorgenic Indologiterpene, 1'-O-Acetylpaxilline, from *Emericella striata* and Distribution of Paxilline in *Emericella* spp. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 1387–1389, 1989. DOI: 10.1248/cpb.37.1387.

PALYS, Sylvester; PHAM, Thi Thanh My; TSANG, Adrian. Biosynthesis of Alkylcitric Acids in *Aspergillus niger* Involves Both Co-localized and Unlinked Genes. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.01378>. Acesso em: 24 jul. 2023.

PANG, Zhiqiang; ZHOU, Guangyan; EWALD, Jessica; CHANG, Le; HACARIZ, Orcun; BASU, Niladri; XIA, Jianguo. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 1735–1761, 2022. DOI: 10.1038/s41596-022-00710-w.

PARAMITHIOTIS, Spiros; KATIDI, Alexandra; DROSINOS, Eleftherios H. Transcriptomic Response of *L. monocytogenes* to Co-Culture with *S. cerevisiae*. **Beverages**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 55, 2021. DOI: 10.3390/beverages7030055.

PARAPOULI, Maria; VASILEIADIS, Anastasios; AFENDRA, Amalia-Sofia; HATZILOUKAS, Efstathios. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–31, 2020. DOI: 10.3934/microbiol.2020001.

PATHMANATHAN, Sevel. Alternative culture media for fungal growth using different formulation of protein sources. [S. l.], 2014.

PERRONE, Giancarlo; STEA, Gaetano; EPIFANI, Filomena; VARGA, János; FRISVAD, Jens C.; SAMSON, Robert A. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. **Fungal Biology**, [S. l.], v. 115, n. 11, p. 1138–1150, 2011. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.07.008.

PETERSEN, Lene M.; FRISVAD, Jens C.; KNUDSEN, Peter B.; ROHLFS, Marko; GOTFREDSEN, Charlotte H.; LARSEN, Thomas O. Induced sclerotium formation exposes new bioactive metabolites from *Aspergillus sclerotii-carbonarius*. **The Journal of Antibiotics**, [S. l.], v. 68, n. 10, p. 603–608, 2015. DOI: 10.1038/ja.2015.40.

RAMOS, Alexander E. Fox; EVANNO, Laurent; POUPON, Erwan; CHAMPY, Pierre; BENIDDIR, Mehdi A. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural Product Reports**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 960–980, 2019. DOI: 10.1039/C9NP00006B.

REN, Sheng; HINZMAN, Anna A.; KANG, Emily L.; SZCZESNIAK, Rhonda D.; LU, Long Jason. Computational and statistical analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1492–1513, 2015. DOI: 10.1007/s11306-015-0823-6.

SALEM, Mohamed A.; PEREZ DE SOUZA, Leonardo; SERAG, Ahmed; FERNIE, Alisdair R.; FARAG, Mohamed A.; EZZAT, Shahira M.; ALSEEKH, Saleh. Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. **Metabolites**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 37, 2020. DOI: 10.3390/metabo10010037.

SANCHEZ, Sergio; DEMAIN, Arnold L. Bioactive Products from Fungi. **Food Bioactives**, [S. l.], p. 59–87, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-51639-4\_3.

SCHERLACH, Kirstin; HERTWECK, Christian. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 1753–1760, 2009. DOI: 10.1039/B821578B.

SCHEUBERT, Kerstin; HUFESKY, Franziska; BÖCKER, Sebastian. Computational mass spectrometry for small molecules. **Journal of Cheminformatics**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 12, 2013. DOI: 10.1186/1758-2946-5-12.

SCHLINGMANN, Gerhard; TANIGUCHI, Tohru; HE, Haiyin; BIGELIS, Ramunas; YANG, Hui Y.; KOEHN, Frank E.; CARTER, Guy T.; BEROVA, Nina. Reassessing the Structure of Pyranonigrin. **Journal of Natural Products**, [S. l.], v. 70, n. 7, p. 1180–1187, 2007. DOI: 10.1021/np070175n.

SCHOLLÉE, Jennifer E.; SCHYMANSKI, Emma L.; STRAVS, Michael A.; GULDE, Rebekka; THOMAIDIS, Nikolaos S.; HOLLENDER, Juliane. Similarity of High-Resolution Tandem Mass Spectrometry Spectra of Structurally Related Micropollutants and Transformation Products. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 28, n. 12, p. 2692–2704, 2017. DOI: 10.1007/s13361-017-1797-6.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J.; VAN DIJCK, P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 426–435, 2002. DOI: 10.1007/s00253-002-1032-6.

SINDELAR, Miriam; PATTI, Gary J. Chemical Discovery in the Era of Metabolomics. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 142, n. 20, p. 9097–9105, 2020. DOI: 10.1021/jacs.9b13198.

SINGH, Arunima. Annotating unknown metabolites. **Nature Methods**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 33–33, 2023. DOI: 10.1038/s41592-022-01735-5.

SPITELLER, Peter. Chemical ecology of fungi. **Natural Product Reports**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 971–993, 2015. DOI: 10.1039/C4NP00166D.

STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B. Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium cyclopium*, and *Penicillium viridicatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 552–554, 1978.

SZYMAŃSKA, Ewa; SACCENTI, Edoardo; SMILDE, Age K.; WESTERHUIS, Johan A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, [S. l.], v. 8, n. Suppl 1, p. 3–16, 2012. DOI: 10.1007/s11306-011-0330-3.

TEN-DOMÉNECH, Isabel; MARTÍNEZ-SENA, Teresa; MORENO-TORRES, Marta; SANJUAN-HERRÁEZ, Juan Daniel; CASTELL, José V.; PARRA-LLORCA, Anna; VENTO, Máximo; QUINTÁS, Guillermo; KULIGOWSKI, Julia. Comparing Targeted vs. Untargeted MS2 Data-Dependent Acquisition for Peak Annotation in LC–MS Metabolomics. **Metabolites**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 126, 2020. DOI: 10.3390/metabo10040126.

TSUGAWA, Hiroshi et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature Methods**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 523–526, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3393.

TSUGAWA, Hiroshi et al. A lipidome atlas in MS-DIAL 4. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 10, p. 1159–1163, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0531-2.

TSUGAWA, Hiroshi; KIND, Tobias; NAKABAYASHI, Ryo; YUKIHIRA, Daichi; TANAKA, Wataru; CAJKA, Tomas; SAITO, Kazuki; FIEHN, Oliver; ARITA, Masanori. Hydrogen Rearrangement Rules: Computational MS/MS Fragmentation and Structure Elucidation Using MS-FINDER Software. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 88, n. 16, p. 7946–7958, 2016. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00770.

VAN DYK, M. S.; KOCK, J. L. F.; BOTHA, A. Hydroxy long-chain fatty acids in fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 495–504, 1994. DOI: 10.1007/BF00367653.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; KOCSUBÉ, S.; BRANKOVICS, B.; TÓTH, B.; SZIGETI, G.; SAMSON, R. A. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 1–17, 2011. DOI: 10.3114/sim.2011.69.01.

VESTH, Tammi C. et al. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*. **Nature Genetics**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 1688–1695, 2018. DOI: 10.1038/s41588-018-0246-1.

WANG, Mingxun et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597.

WILKINSON, Leland; FRIENDLY, Michael. The History of the Cluster Heat Map. **The American Statistician**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 179–184, 2009. DOI: 10.1198/tas.2009.0033.

WU, Changsheng; ZACCHETTI, Boris; RAM, Arthur F. J.; VAN WEZEL, Gilles P.; CLAESSEN, Dennis; HAE CHOI, Young. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus*-*Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 10868, 2015. DOI: 10.1038/srep10868.

WU, Yiman; LI, Liang. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. **Journal of Chromatography A**, Editors' Choice X. [S. l.], v. 1430, Editors' Choice X, p. 80–95, 2016. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.12.007.

YU, Ronglu; LIU, Jia; WANG, Yi; WANG, Hong; ZHANG, Huawei. *Aspergillus niger* as a Secondary Metabolite Factory. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.701022>. Acesso em: 8 jul. 2023.

YUAN, Xi; CHEN, Fusheng. Cocultivation Study of *Monascus* spp. and *Aspergillus niger* Inspired From Black-Skin-Red-Koji by a Double-Sided Petri Dish. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.670684>. Acesso em: 27 maio. 2023.

ZAREI, Omid; DASTMALCHI, Siavoush; HAMZEH-MIVEHROUD, Maryam. A Simple and Rapid Protocol for Producing Yeast Extract from *Saccharomyces cerevisiae* Suitable for Preparing Bacterial Culture Media. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 907–913, 2016.

ZHANG, Yapeng; ZHU, Tianjiao; FANG, Yuchun; LIU, Hongbing; GU, Qianqun; ZHU, Weiming. Carbonarones A and B, New Bioactive  $\gamma$ -Pyrone and  $\alpha$ -Pyridone Derivatives from the Marine-derived Fungus *Aspergillus carbonarius*. **The Journal of Antibiotics**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 153–157, 2007. a. DOI: 10.1038/ja.2007.15.

ZHANG, Yi; WANG, Song; LI, Xiao-Ming; CUI, Chuan-Ming; FENG, Chao; WANG, Bin-Gui. New Sphingolipids with a Previously Unreported 9-Methyl-C20-sphingosine

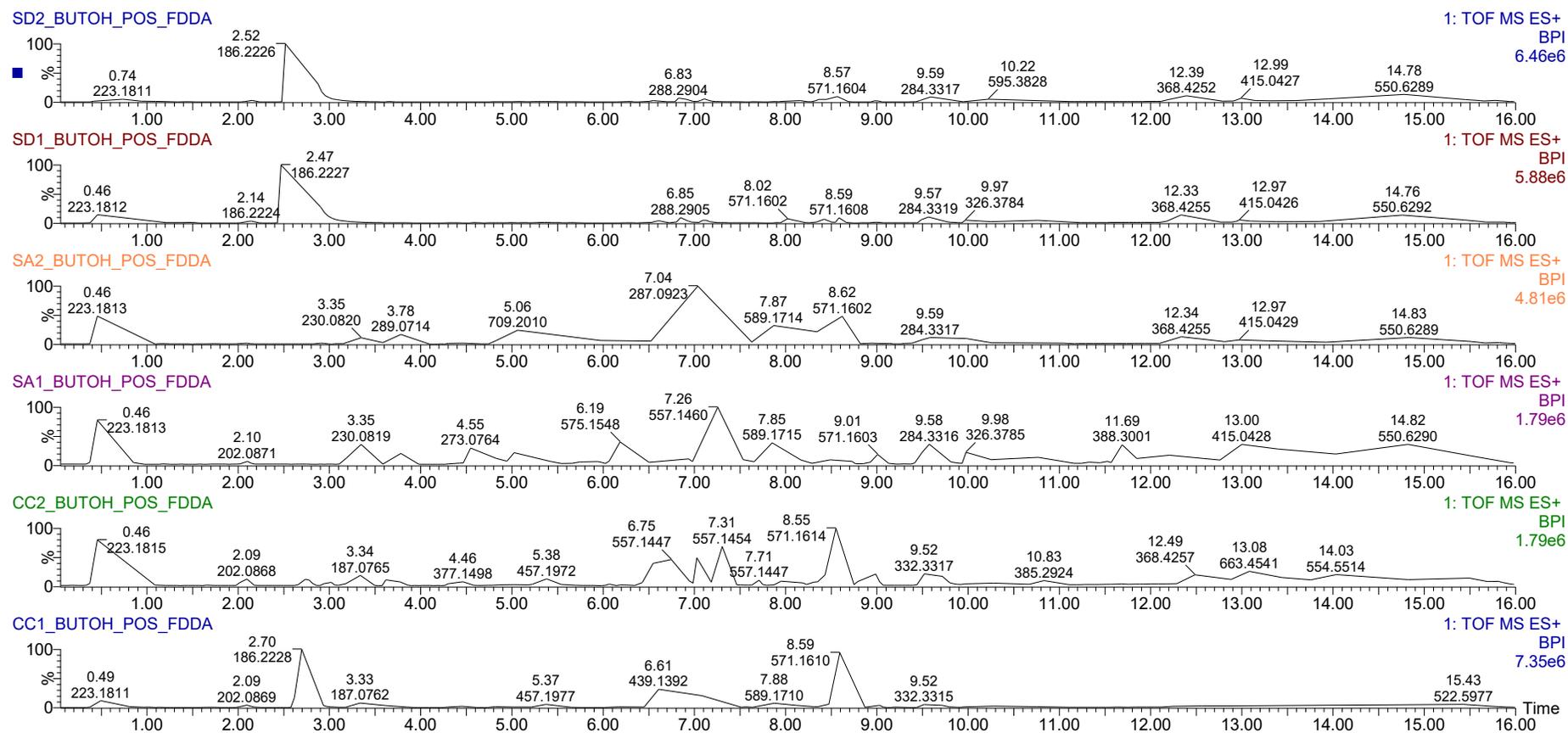
Moiety from a Marine Algous Endophytic Fungus *Aspergillus niger* EN-13. **Lipids**, [S. l.], v. 42, n. 8, p. 759–764, 2007. b. DOI: 10.1007/s11745-007-3079-8.

ZHOU, Xuefeng; FANG, Wei; TAN, Suiyi; LIN, Xiuping; XUN, Tianrong; YANG, Bingjie; LIU, Shuwen; LIU, Yonghong. Aspernigrins with anti-HIV-1 activities from the marine-derived fungus *Aspergillus niger* SCSIO Jcsw6F30. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 361–365, 2016. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.12.005.

ZHU, Fan. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 122, p. 456–480, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.063.

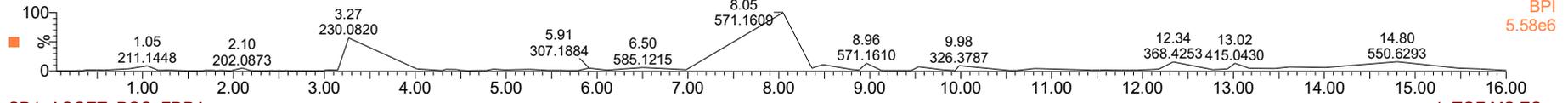
## APÊNDICES

APÊNDICE A – Cromatogramas dos extratos de Butanol dos diferentes meios de cultivo obtidos pela análise por UPLC-ESI-QToF-DDA no modo positivo.

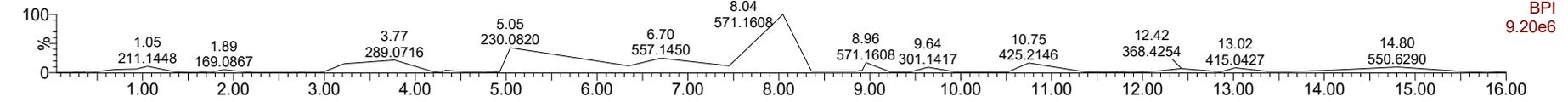


APÊNDICE B – Cromatogramas dos extratos de acetato de etila dos diferentes meios de cultivo obtidos pela análise por UPLC-ESI-QToF-DDA no modo positivo.

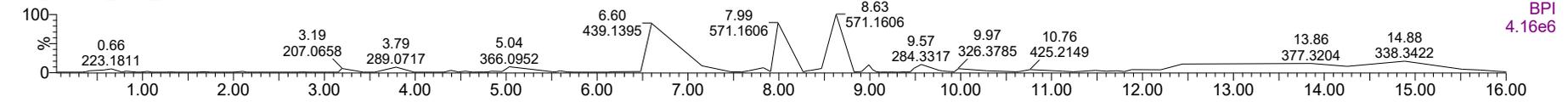
SD2\_ACOET\_POS\_FDDA



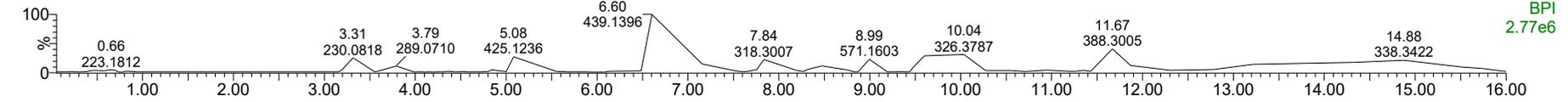
SD1\_ACOET\_POS\_FDDA



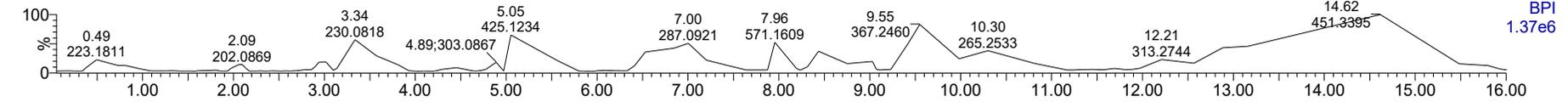
SA2\_ACOET\_POS\_FDDA



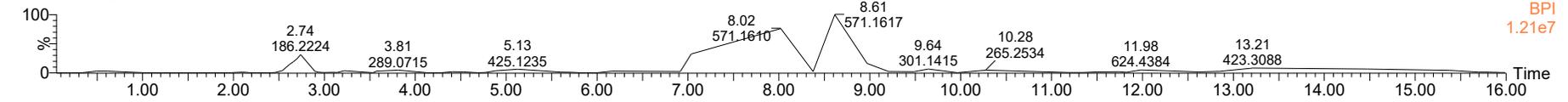
SA1\_ACOET\_POS\_FDDA



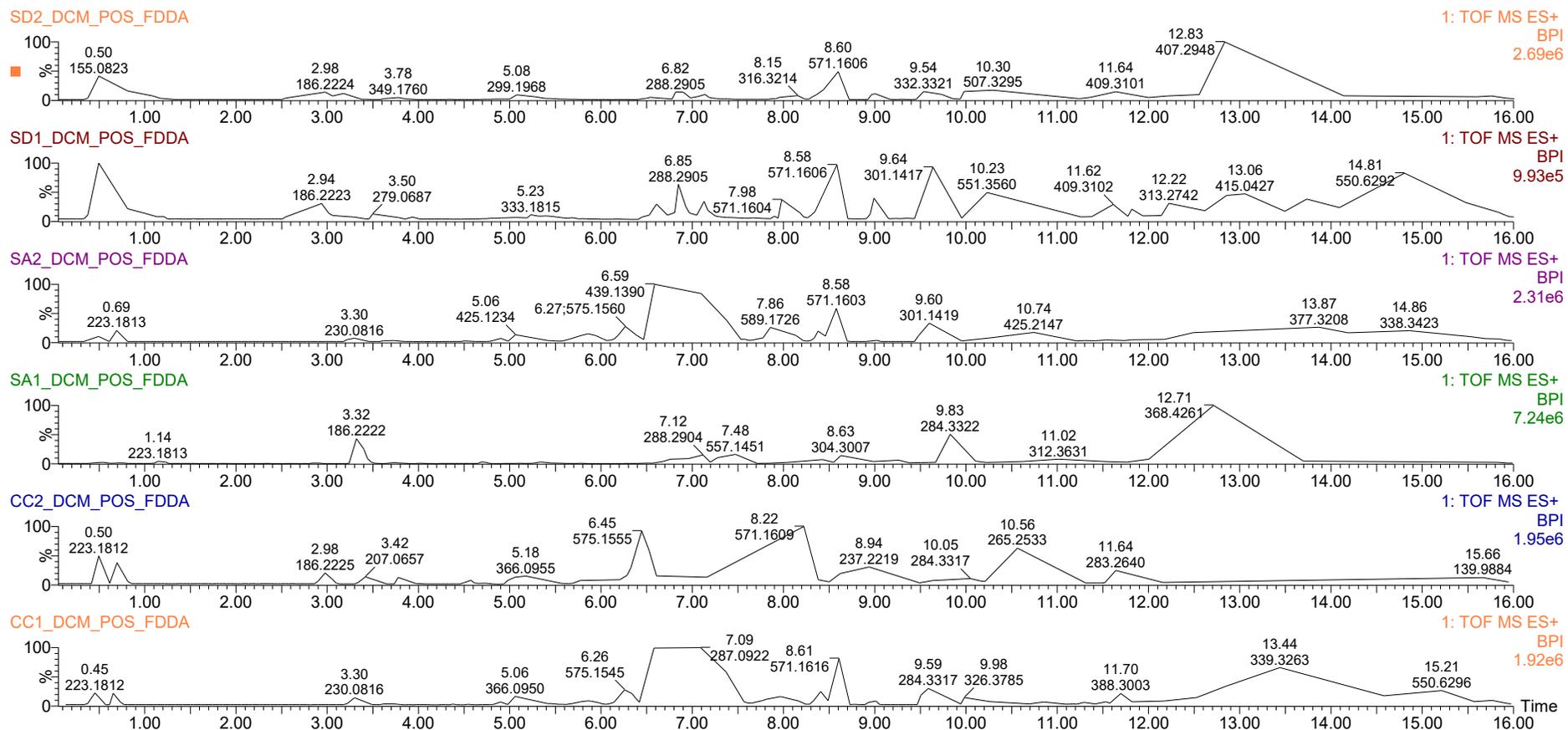
CC2\_ACOET\_POS\_FDDA



CC1\_ACOET\_POS\_FDDA

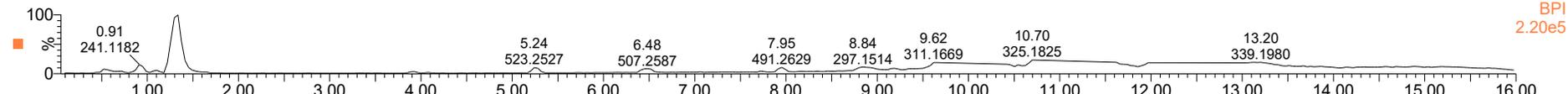


APÊNDICE C – Cromatogramas dos extratos de diclorometano dos diferentes meios de cultivo obtidos pela análise por UPLC-ESI-QToF-DDA no modo positivo.

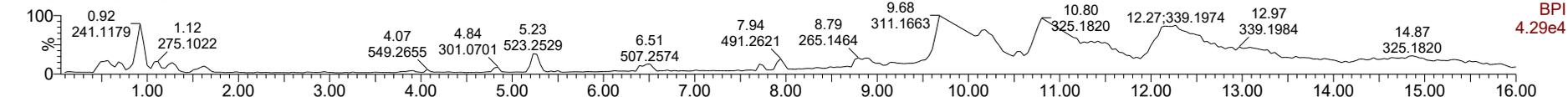


APÊNDICE D – Cromatogramas dos extratos de butanol dos diferentes meios de cultivo obtidos pela análise por UPLC-ESI-QToF-DDA no modo negativo.

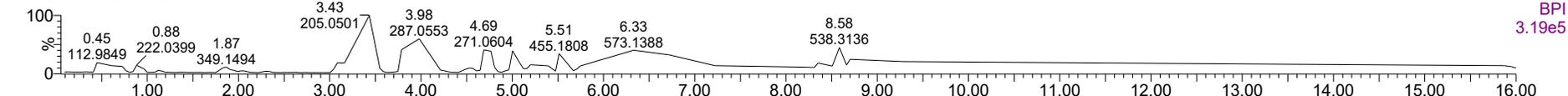
SD2\_BUTOH\_NEG\_FDDA



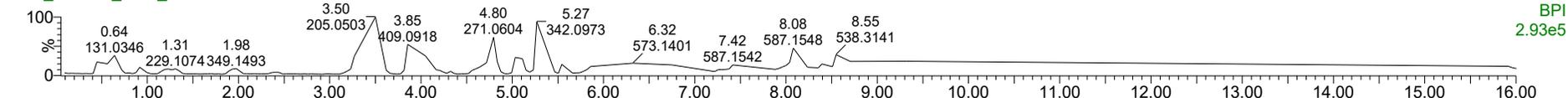
SD1\_BUTOH\_NEG\_FDDA



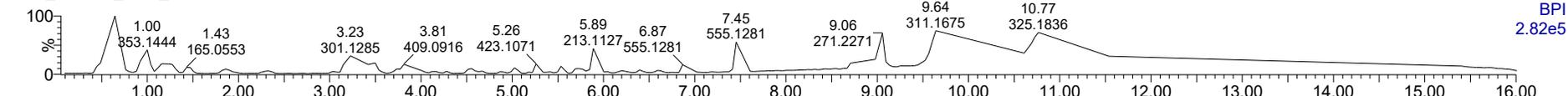
SA2\_BUTOH\_NEG\_FDDA



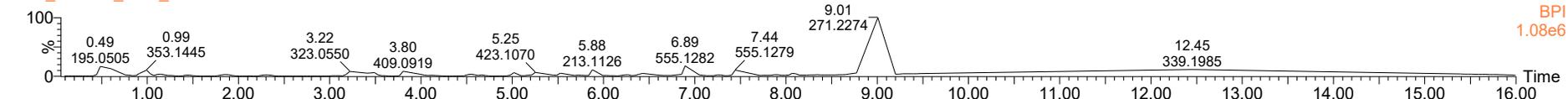
SA1\_BUTOH\_NEG\_FDDA



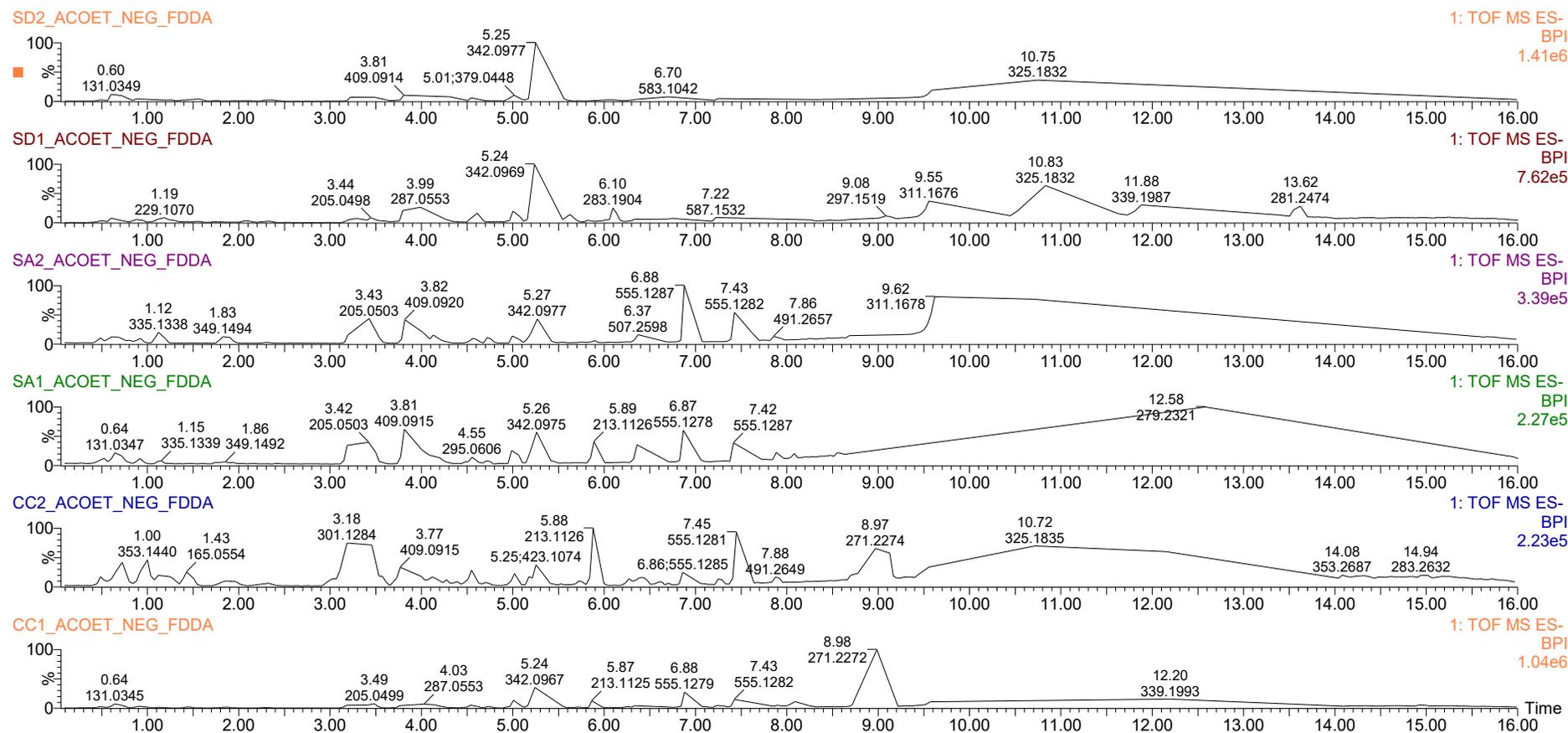
CC2\_BUTOH\_NEG\_FDDA



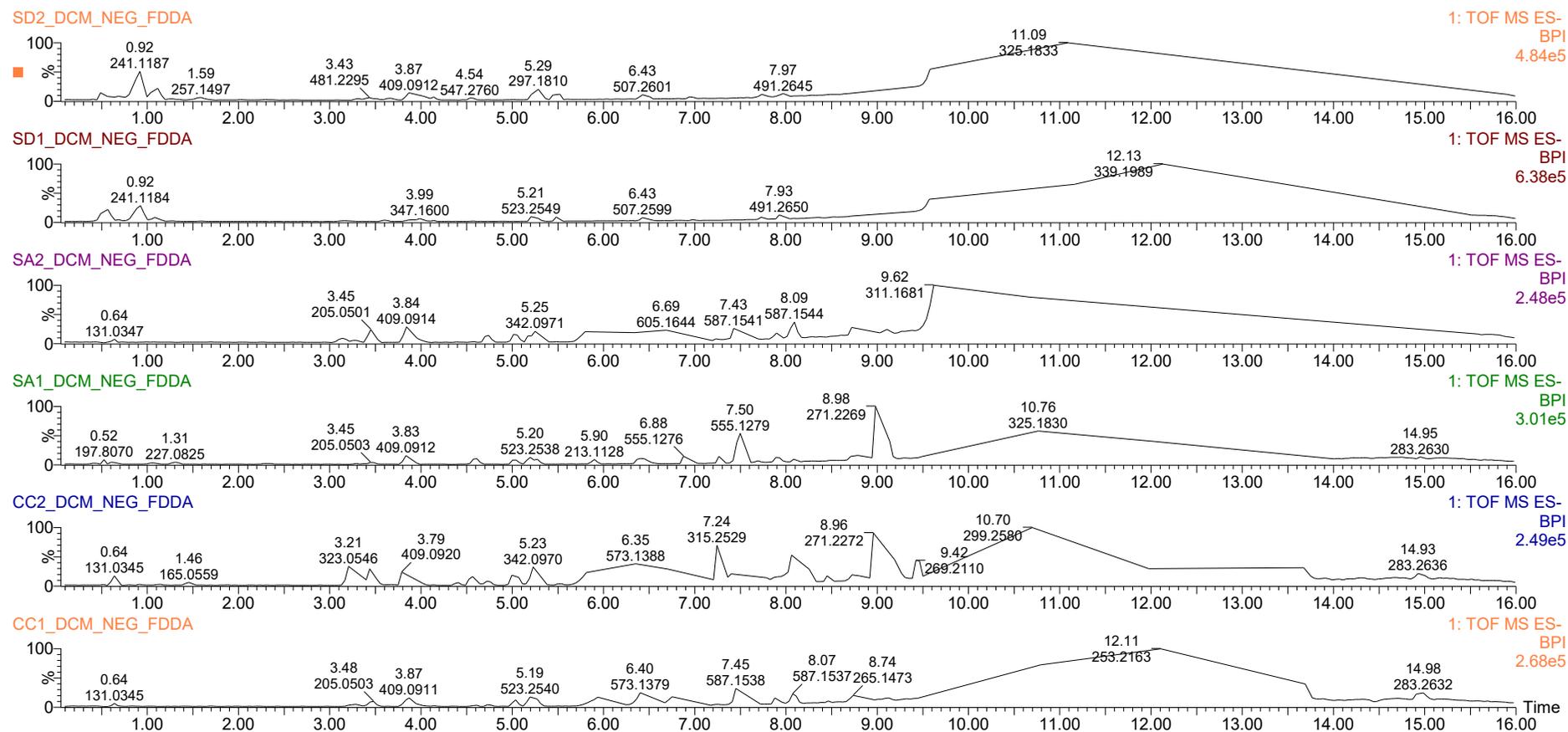
CC1\_BUTOH\_NEG\_FDDA



APÊNDICE E– Cromatogramas dos extratos de acetato de etila dos diferentes meios de cultivo obtidos pela análise por UPLC-ESI-QToF-DDA no modo negativo



APÊNDICE F – Cromatogramas dos extratos de diclorometano dos diferentes meios de cultivo obtidos pela análise por UPLC-ESI-QToF-DDA no modo negativo



APÊNDICE G - Compostos sugeridos através da análise dos extratos dos meios de cultura SD, SA e CC por UPLC-ESI-QToF-DDA com o software MS-FINDER v 3.5.2

T <sub>R</sub>	m/z (erro, ppm)		Fórmula Molecular	Scores de cálculo de Fórmula Molecular		Ontologia	Identificação estrutural proposta	Scores de identificação estrutural	
	ESI+	ESI-		ESI+	ESI-			ESI+	ESI-
0.46	258.1106 (-1.94)	-	C8H20NO6P	3.769	-	Glicerofosfolinas	Glicerilfosforil colina	7.47	-
0.49		195.0505 (2.68)	C6H12O7	-	2.913	Hidroxiácido de cadeia média e derivados	Ácido galactônico	-	5.21
0.49	155.0819 (-2.57)	-	C7H10N2O2	2.908	-	Alfa-aminoácido e derivados	Ciclo (Pro-Gly)	5.51	-
0.57		158.0818 (2.93)	C7H13NO3	-	3.229	N-acil alfa aminoácidos	N-acetilvalina	-	5.27
0.56	223.1811 (-2.74)	-	C13H22N2O	3.196	-	N-metil piperazinas	Nigragillina	5.53	-
0.63		131.0345 (3.65)	C5H8O4	-	3.071	Ácido dicarboxílico e derivados	N.I.	-	-
0.64		227.0556 (2.24)	C10H12O6	-	3.661	Butenolídeos	Ácido carlosico	-	6.45
0.69		227.1028 (4.07)	C10H16N2O4	-	3.018	Dipeptídeos	Piroglutamilvalina	-	4.68
0.70	185.1292 (-4.05)	-	C9H16N2O2	3.132	-	Alfa-aminoácido e derivados	N.I.	-	-
0.70	197.1293 (-4.31)	-	C10H16N2O2	2.237	-	Alfa-aminoácido e derivados	Ciclo (Pro-Val)	4.29	-
0.72	227.1398 (-3.45)	-	C11H18N2O3	3.463	-	Alfa-aminoácido e derivados	N.I.	-	-
0.72		341.0652 (4.31)	C18H14O7	-	3.574	Metoxifenol / Catecol	N.I.	-	-
0.74	144.1752 (-3.65)	-	C9H21N	2.99	-	Alquilamine	Tripropilamina	5.30	-
0.81	224.0560 (-2.91)	222.0399 (4.01)	C10H9NO5	2.739	4.016	Piranonas e derivados	Piranonigrina A	4.80	5.57
0.83	261.1241 (-2.81)	-	C14H16N2O3	3.582	-	Alfa-aminoácido e derivados	Maculosin	6.48	-
0.90		241.1187 (4.04)	C11H18N2O4		3.326	Dipeptídeos	PyroGlu-Ile	-	5.55
0.94	259.1159 (6.64)	-	C12H18O6	2.568	-	Ácido tricarboxílico e derivados	Ácido Tensiuico B	4.24	-
1.05	155.0709 (-4.08)	-	C8H10O3	3.664	-	Metoxifenóis e derivados	N.I.	-	-
1.03	211.1448 (-3.31)	-	C11H18N2O2	3.869	-	Alfa-aminoácido e derivados	Ciclo (Leu-Pro)	6.35	-

1.08		275.1031 (2.28)	C14H16N2O4	3.946		Alfa-aminoácido e derivados	Ciclo (3-Hidroxi-Pro-Tyr)	-	6.99
1.16	259.1808 (1.20)	-	C16H22N2O	3.907	-	Ácido cinâmico e derivados	Nigerazin B	7.16	-
1.17, 1.91	229.0977 (-2.39)	-	C13H12N2O2	3.330	-	Nicotinamida	Aspernigrin A	6.65	-
1.23	-	229.1072 (4.11)	C11H18O5	-	2.890	Hidroxiácidos de cadeia media e derivados	Acido 9-hidroxihexiltaconico	-	4.97
1.23	-	303.0500 (3.37)	C15H12O7	-	4.205	Cumarina, cromona ou Naftoquina	N.I.	-	-
1.35	203.0708 (-2.62)	-	C12H10O3	4.089	-	Cumarinas ou Naftois	N.I.	-	-
1.43		165.0554 (1.91)	C9H10O3	-	3.622	Ácido Fenil Propanoico e derivados	N.I.	-	-
1.48	172.2063 (-1.89)	-	C11H25N	3.597	-	Alquilaminas	Iproheptine	6.33	-
1.54	315.0867 (1.22)	313.0700 (5.60)	C17H14O6	3.328	3.238	Antraquinona ou cumarina	N.I.	-	-
1.81	297.0761 (-1.18)	-	C17H12O5	4.074	-	Benzenoids	Girocianina / Aspulvinone E	7.00	-
1.87	169.0867 (-4.63)	-	C9H12O3	3.496	-	Metoxifenóis	N.I.	-	-
2.09 2.45 2.92	202.0869 (-3.20)	-	C12H11NO2	3.577	-	N.I.	N.I.	-	-
2.15 2.74 3.26	186.2223 (-3.63)	-	C12H27N	4.528	-	Alquilamine	Tributilamina	6.80	
3.03	273.0399 (-1.96)	-	C14H8O6	4.289	-	Hidroxiatraquinonas e derivados	Rheoemodin	6.64	
2.90	291.0866 (-0.98)	289.0707 (3.66)	C15H14O6	3.826	4.195	Naftopirranonas	Foncesin	6.71	7.27
3.11	387.1550 (0.16)	385.1382 (5.98)	C20H22N2O6	4.010	2.852	Isoindolonas	Speradine D	6.88	5.03
3.22	202.2172 (-3.27)	-	C12H27NO	3.813	-	1,2-aminoálcool	2-Aminododecane-3-ol	6.61	-
3.21 3.49	207.0658 (-2.98)	205.0499 (3.55)	C11H10O4	3.697	4.141	Isocumarina and derivatos	N.I.	-	-
3.23	-	323.0550 (3.43)	C18H12O6	-	3.804	P-benzoquinones	Atromentina	-	6.91
3.29	-	289.0341 (4.40)	C14H10O7	-	3.726	Xantonas	N.I.	-	-
3.56	187.0762 (-4.53)	-	C12H10O2	3.231	-	Naftaleno ou Naftoquinona	N.I.	--	-
3.28	343.1293 (-0.44)	-	C18H18N2O5	3.994	-	Nicotinamida	Pestalamida B	7.19	
3.30 3.57	230.0816 (-1.44)	228.0663 (3.56)	C13H11NO3	3.696	3.658	Pirranonas e derivados	Carbonarone A / Carbonarone B	6.66	5.95

3.89 3.61	411.1073 (0.35)	409.0919 (4.08)	C22H18O8	4.369	3.617	Bicumarina	Orlandin	7.92	5.89
3.46		205.0502 (2.09)	C11H10O4	-	4.099	Cumarina, isocumarina ou cromonas e derivados	N.I.	-	6.06
3.98	289.0711 (-1.51)	287.0553 (2.81)	C15H12O6	4.036	3.492	Funalenonas	Funalenone	6.81	6.66
3.98	575.1190 (-1.04)	573.1021 (3.39)	C30H22O12	2.712	3.248	Isochromanequinones	Xanthomegnin	4.92	6.38
4.16	353.0298 (-1.73)	351.0138 (2.38)	C18H8O8	3.071	2.714	Benzofuranos	Ácido telefórico	5.04	5.11
4.31		301.0344 (3.23)	C15H10O7	-	3.351	Hidroxiantraquinona	N.I.	-	-
4.36	343.1656 (-0.19)	-	C19H22N2O4	3.694	-	Isoindolonas	Asperorydine I	5.19	-
4.49	341.0658 (-0.64)	-	C18H12O7	3.319	-	Fenilbenzofurano	Cicloleucomelone	5.72	-
4.55	-	295.0601 (3.70)	C17H12O5	-	3.473	Benzenoides	Gyrocyanin / Aspulvinone	6.36	
4.53 4.85	273.0763 (-2.02)	271.0603 (3.29)	C15H12O5	3.653	4.139	Naftopiranas	Rubrofusarin / TMC-256C1 / TMC-256A1	7.01	7.52
4.87	381.0604 (0.24)	379.0447 (3.52)	C20H12O8	2.842	3.510	Naftofuranos	Asperlone B	4.80	6.24
4.96	303.0866 (-2.93)	-	C16H14O6	4.204	-	Naftopiranas	Nigerasperone A	7.41	-
5.05 5.23	344.1134 (-0.98)	342.0967 (4.69)	C18H17NO6	3.877	3.349	Piranas e derivados	Pestalamide A	7.12	6.44
5.26	425.1230 (-0.95)	423.1074 (3.21)	C23H20O8	2.735	3.215	Hidroxicumarinas	Desmetilkotanin	4.94	5.53
5.59	457.1780 (-4.82)	-	C27H24N2O5	2.66	-	Kavalactonas	Aspernigrina B	5.71	-
5.64	706.4020 (-1.65)	-	C34H59NO14	3.002	-	Fumonisinias	Fumonisina B2	5.76	-
6.15 5.88	593.1658 (-0.35)	591.1489 (4.05)	C31H28O12	3.331	3.905	Naftopirana	Aurasperone C	5.35	6.53
5.88	-	213.1126 (2.94)	C11H18O4	-	4.422	Medium chain fatty acid	Hexil ácido itacônico	-	7.69
6.16 6.44	575.1551 (-0.54)	573.1378 (4.24)	C31H26O11	3.564	2.786	Naftopirana	Aurasperone F	6.79	5.10
6.48	571.2083 (-1.43)	-	C32H30N2O8	2.851	-	Kavalactona	Aspernigrina C	5.82	-
6.58	607.1807 (-0.98)	605.1638 (4.37)	C32H30O12	3.054	3.335	Naftopirana	Aurasperone B	5.33	5.83
6.60	439.1395 (-1.72)	-	C20H34O8	3.657	-	Dicumarinas	Kotanina	6.70	-
6.84 7.11	287.0921 (-2.44)	-	C16H14O5	4.143	-	Naftopirana	Rubrofusarin B / Asperxanthone	7.50	-

6.70 7.26 7.61	557.1450 (-1.57)	555.1281 (2.82)	C31H25O10	3.152	2.216	Naftopiranona	Aurasperone D	6.59	4.17
7.28	-	315.2535 (1.84)	C18H36O4	-	4.077	Ácido graxo	FA diOH-18:0	-	-
7.15 7.47	589.1721 (-1.12)	587.1546 (2.18)	C32H28O11	2.939	3.629	Naftopiranona	Aurasperone E	5.77	6.70
7.83	318.3006 (-1.03)	-	C18H39NO3	2.821	-	Aminoálcool	Fitoesfingosina	5.42	-
7.92	493.2806 (0.67)	491.2649 (3.00)	C28H36N4O4	3.359	3.179	Peptídeo cíclico	ciclo[DL-Nva-DL-Nva-DL-Phe-DL-Phe]	6.14	5.23
7.96 8.35 8.74 9.26	571.1598 (-0.12)	-	C32H26O10	2.587	-	Naftopiranona	Aurasperone A	5.06	-
8.93 11.81	237.2218 (-2.15)	-	C16H28O	3.626	-	Terpenóide	N.I.	-	-
8.96	255.2321 (-0.95)	-	C16H30O2	3.670	-	Ácido Graxo	N.I.	-	-
8.99	286.3106 (-0.55)	-	C18H39NO	2.655	-	Aminoálcool	Spisulosine 285	5.78	-
9.02	-	271.2269 (3.55)	C16H32O2	-	3.880	Ácido Graxo	FA OH-16:0	--	-
9.19	-	295.2270 (2.93)	C18H32O3	-	3.394	Ácido Graxo	FA OH-18:2	-	-
9.48	-	269.2115 (2.65)	C16H30O3	-	3.512	Ácido Graxo	FA OXO-16:0	-	-
10.28 13.32	265.2533 (-2.67)	-	C18H32O	3.103	-	Terpenóide e Derivados	N.I.	-	-
10.35	283.2639 (-2.63)	281.2478 (2.84)	C18H34O2	3.533	2.671	Ácido Graxo	FA 18:1	-	-
10.65	-	299.2583 56(2.89)	C18H36O2	-	3.502	Ácido Graxo	FA OH-18:0	--	-
11.02	400.3784 (0.30)	-	C24H49NO3	3.145	-	Ceramida	N.I.	-	-
11.36	263.2374 (-1.74)	-	C18H30O	2.694	-	Sesquiterpenoide	N.I.	-	-
11.63 11.89 13.22 14.47	409.3103 (-0.47)	-	C28H40O2	2.547	-	Derivado de ergosterol	N.I.	-	-
11.67	406.3103 (0.34)	-	C28H39NO	2.975	-	Diterpenoide	Emindole DA	5.97	-
11.84	255.2324 (-2.13)	253.2163 (3.94)	C16H30O2	2.827	3.589	Ácido Graxo	FA 16:1	-	-
12.00	750.6535 (1.07)	-	C40H80NO9P	2.634	-	Alquil-acil-glicero-fosfoserina	PS(O-18:0/16:0)	-	-

12.00	338.3418 (-1.65)	-	C22H43NO	3.580	-	Amida Graxa	N.I.	-	-
12.20, 13.11	574.5200 (-0.57)	-	C37H67NO3	2.782	-	Ceramida	N.I.	-	-
12.49	357.3000 (-0.17)	-	C21H40O4	2.916	-	Monoacilglicerol	MG 18:1	-	-
12.58	-	279.2321 (3.04)	C18H32O2		3.677	Ácido Graxo	FA 18:2	-	-
12.71	546.4886 (-5.60, Na+)	-	C33H65NO3	2.337	-	Ceramida	N.I.	-	-
12.83	407.2949 (-1.09)	-	C28H38O2	2.441	-	Derivados de ergosterol	N.I.	-	-
13.04	411.3257 (0.13)	-	C28H42O2	3.233	-	Tocotrienol	Gamma-Tocotrienol	6.54	-
13.19	423.3088 (-1.76, Na+)	-	C25H42O5	3.011	-	Diacilglicerol	N.I.	-	--
13.22	592.5303 (-0.61)	-	C37H69NO4	2.715	-	Ceramida	Asperamide A	4.88	-
13.99 14.47	395.3309 (-0.14)	-	C28H42O	2.559	-	Derivados de ergosterol	N.I.	-	-
13.86	758.5693 (0.17)	-	C42H80NO8P	3.185	-	Fosfatidilcolina	N.I.	-	-
14.19	429.3349 (3.31)	-	C28H44O3	2.303	-	Derivado de ergosterol	Ergosterol peroxide	4.18	-
14.22	-	374.2690 (2.84)	C23H37NO3	-	3.608	Pirrolizidinas	Sclerolizine	-	6.57
14.62	451.3395 (-0.24, Na+)	-	C25H48O5	2.432	-	Diacilglicerol	N.I.	-	-
14.62 13.57	339.3262 (-1.94)	-	C22H42O2	3.302	-	Ácido Graxo	FA 22:1	-	-
14.67	391.3000 (-1.17)	-	C28H38O	2.397	-	Derivado de ergosterol	N.I.	4.98	-
15.21	582.5824 (-0.73)	-	C37H75NO3	2.351	-	Ceramida	N.I.	-	-
15.51	754.5829 (-0.18)	-	C43H79NO9	2.630	-	Cerebrosideo	Asperamide B	4.20	-
15.56	754.6192 (-0.07)	-	C44H83NO8	2.198	-	Cerebrosideo	N.I.	-	-

APÊNDICE H - Compostos sugeridos através da análise de extratos do meio de cultura SD, SA E CC por UPLC-ESI-QToF-DDA com o software SIRIUS v5.8.1

T <sub>R</sub>	m/z (erro médio, ppm)		Formula	Score de Calculo de Formula (Zodiac; Sirius; Tree)		Predição de Classe Produto Natural (%)	Identificação estrutural proposta	Scores estruturais (COSMIC, CSI:FingerID, Similarity)	
	ESI+	ESI-		ESI+	ESI-			ESI+	ESI-
0.46	258.1106 (8.35)	-	C8H20NO6P	95.07; 98.14; 24.06;	-	Glicerofosfocolina 99%	Glicerofosfocolina	0.526; -23.19; 99.38%	-
0.49	-	195.0505 (0.59)	C6H12O7	-	88.24; 88.29; 4.06;	Monosacarídeo (81%)	Gulonato	-	0.163; -6.71; 100%
0.68	-	227.1028 (-4.05)	C10H16N2O4	-	100; 99.99; 73.63	Peptídeos pequenos (55%)	Piroglutamilvalina	-	0.126; -237.98; 55.19%
0.70	185.1292 (4.34)	-	C9H16N2O2	100; 100; 44.75	-	Peptídeo pequenos (51%)	Ciclo(Ile-Ala)	0.239; -102.97; 73.01%	-
0.70	227.1398 (3.84)	-	C11H18N2O8	100; 100; 61.50	-	Dipeptídeos (82%)	Ciclo(4-Hidroxi-Pro-Leu)	0.148; -123.023; 67.62%	-
0.72	-	341.0650 (-075)	C18H14O7	-	100; 99.99; 93.21	Policetídeos (52%)	N.I.	-	-
0.81	261.1241 (2.99)	-	C14H16N2O3	100; 100; 29.57	-	Dipeptídeos (95%)	Maculosin	0.296; -227.81; 50.00%	-
0.88	-	241.1187 (3.66)	C11H18N2O4	-	99.84; 98.12; 52.14	Dipeptídeos (99%)	PiroGlu-Ile	-	0.258; -55.60; 85.71%
0.94	277.1184 (-1.85)	275.1031 (-4.61)	C14H16N2O4	98.99; 97.28; 18.71	99.09; 99.16; 32.21	Dipeptídeos (93%)	Piroglutamilfenilalanina	0.895; -26.83; 93.56%	0.881; -54.48; 84.89
1.05	155.0709 (4.12)	-	C8H10O3	99.95; 99.91; 14.63;	-	Policetídeos (59%)	N.I.	-	-
1.05	211.1448 (6.35)	-	C11H18N2O2	100; 99.99; 42.49	-	Dipeptídeos (100%)	Gancidin W	0.579; -23.680; 98.27%	-
1.13	259.1808 (1.95)	-	C16H22N2O	100; 100; 28.15;	-	Alcalóides piperidínicos (62%)	Nigerazina B	0.274; -145.81; 74.78%	-
1.17, 1.91,	229.0976 (3.45)	-	C13H12N2O2	100; 100; 45.29	-	Alcalóides amidícos simples (66%)	Aspernigrina A	0.558; -85.41; 81.06%	-
1.23	-	303.0500 (-3.08)	C15H12O7	-	100; 100; 69.06	Naftoquinonas (59%)	N.I.	-	-
1.23	-	229.1072 (3.30)	C11H10O5	-	100; 99.99; 24.34;	Ácido graxo hidroxilado	2-(6-hydroxyhexyl)-3- methylidenebutanedioic acid	-	0.395; -12.87; 100%
1.43	-	165.0554 (0.32)	C9H10O3	-	100.00; 99.99; 36.84;	Ácido cinâmico e derivados (74%)	N.I.	-	-
1.73	216.1027 (8.70)	-	C13H13NO2	100; 100; 71.15	-	Alcaloides Peptídicos (50%)	N.I.	-	-

1.81	297.0761 (0.43)		C17H12O5	99.84; 99.60; 55.35	-	Pulvinones (68%)	Gyrocianin	0.319; -130.61; 69.47%	
1.89	169.0867 (2.24)	-	C9H12O3	100; 100; 52.34	-	Policetídeos (59%)	N.I.	0.064 -103.97; 62.34%	
2.09; 2.45; 2.92	202.0869 (1.38)	-	C12H11NO2	100; 100; 65.02	-	Alcalóides piridínicos (94%)	N.I.		
2.14, 2.74, 3.23	186.2221 (2.49)	-	C12H27N	100.00; 100.00; 12.66	-	Aminas (99%)	Tributilamina	0.516; -37.17; 83.33%	-
2.90	291.0866 (2.60)	289.0707 (-2.98)	C15H14O6	100; 99.92; 49.96;	99.89; 99.19; 38.45;	Naftalenos e derivados (78%)	Fonsecina	0.148; -84.98; 88.13%	0.168; -47.58; 95.51%
3.03	273.0399 (2.49)	-	C14H8O6	100.00, 99.99; 52.71.	-	N/A	Rheomodina	0.146; -74.45; 72.73%	
3.10	387.1550 (2.62)	-	C20H22N2O6	99.79; 85.76; 37.32	-	Alcalóides (82%)	Speradine D	0.264; -735.39; 43.07%	
3.19	202.2172 (3.84)	-	C12H27NO	100.00, 100.00; 28.57	-	Álcool graxo (59%)	2-aminododecan-3-ol	0.421; -204.91; 39.62%	
3.22	-	323.0550 (-4.41)	C18H12O6	-	100; 99.53; 37.57;	Pulvinones (92%)	Atromentina	-	0.234; -121.71; 58.67%
3.29	-	289.0341 (-1.81)	C14H10O7	-	80.15; 74.27; 58.02	Naftoquinones (56%)	N.I.	-	
3.22, 3.72	230.0816 (3.92)	228.0631 (0.50)	C13H11NO3	100.00, 100.00; 66.01	100; 100; 67.10	Alcalóides isoindólicos (66%)	Carbonarona A / Carbonarona B	0.218; -276.62; 46.59%	0.137; -204.74; 58%
3.56	187.0762 (3.01)	-	C12H10O2	100; 100; 39.71	-	Fenantrenos (71%)	N.I.		
3.14	343.1293 (2.86)	-	C18H18N2O5	100; 97.49; 31.45	-	Alcalóides piridínicos (56%)	Pestalamida B	0.210; -271.22; 57.73%	
3.42	207.0657 (3.11)	205.0498 (-4.13)	C11H10O4	100; 100; 79.29	100; 100; 74.11	Shikamato e Fenilpropanóides (68%)	Cumarina N.I.		
4.00	411.1073 (-0.56)	409.0911 (-0.96)	C22H18O8	0.00; 66.92; 31.01	98.44; 97.18; 31.91	Cumarinas (69%)	Orlandin	0.176; -139.04; 63.44%	0.185; -152.21; 60.40%
3.81	-	287.0553 (-1.73)	C15H12O6	-	100; 99.64; 45.15;	Xantonas (53%)	Funalenone		0.096; -140.25; 63.10%
3.98, 4.50	-	573.1021 (-2.12)	C30H22O12	-	98.34; 97.03; 47.99	Bisnaftalenos (80%)	9-Hidroxiurubrofusarina Dimérica		0.519; -150.88; 71.52%
4.15	-	351.0138 (-0.49)	C18H8O8	-	100; 99.99; 46.53;	Shikamatos e fenilpropanóides (78%)	Ácido Telefórico	-	N/A; -30.49; 94.29%
4.31	-	301.0344 (-3.39)	C15H10O7	-	100; 99.99; 53.71	Xantonas (53%)	N.I.		

4.41	341.0658 (4.02)		C18H12O7	50.50; 35.35; 43.79;	100; 99.99; 48.17;	Flavonoides (88%)	Cicloleucomelon	0.216; -163.92; 70.21%	
4.53, 4.79	273.0763 (-0.69)	271.0603 (-0.91)	C15H12O5	100; 99.99; 28.28;	100; 99.12; 36.45	Metil xantonas (51%)	Rubrofusarina	0.136; -54.48; 83.11%	0.125; -72.90; 79.32%
4.55	-	295.0601 (-2.40)	C17H12O5	-	100; 98.32; 50.21	Pulvinonas (53%)	Aspulvinone E	0.095; -187.12; 44.66%	
4.61, 5.24	-	228.0631 (0.50)	C13H11NO3	-	100; 100; 67.10	Alcalóides indólicos simples (62%)	Carbonarona B	-	0.137; -204.74; 58%
4.90	303.0866 (-0.20)		C16H14O6	99.84; 98.66; 39.82		Metil xantonas (70%)	Drimiopsin G	0.201; -59.57; 80.08%	
5.02	-	379.0447 (0.01)	C20H12O8		12.81; 53.18; 66.52	Policetídeos cíclicos aromáticos (85%)	Asperlona B	0.248; -263.43; 53.80%	
5.13, 5.18	344.1132 (2.55)	342.0967 (-4.37)	C18H17NO6	100; 95.65; 39.82	96.68; 91.92; 73.32	Policetídeo (55%)	Pestalamida A	0.131; -306.06; 60.54%	0.276; -304.53; 53.89%
5.25	-	423.1074 (-2.65)	C23H20O8	-	100; 99.82; 34.31	Policetídeos (67%)	Desmetil Kotanina	-	0.167; -113.14; - 70.41%
5.64	706.4020 (5.52)	-	C34H59NO14	22.97; 20.75; 14.53	-	Policetídeo de cadeia aberta (100%)	Fumonisina B2	0.128; -18;39; 99.16%	
5.87	-	213.1125 (2.93)	C11H18O4	-	100; 99.78; 16.18	Ácidos graxos e conjugados (60%)	Ácido Hexil Itacônico	-	0.139; -90.45; 70.63%
5.90	-	591.1488; (-2.24)	C31H28O12		99.95; 98.46; 34.47;	Policetídeos cíclicos aromáticos (51%)	Aurasperona C		0.645; -318.10; 60.96%
6.15, 6.35	575.1551 (0.29)	573.1386 (-4.66)	C31H26O11	83.21;75.43; 28.58;	99.64; 92.53; 29.22	Naftalenos (52%)	Aurasperona F	0.135; -164.51; 73.33%	0.230; -183.37; 71.75%
6.52	439.1395 (1.52)		C24H22O8	100.00; 99.81; 363.84	-	Shikamato e fenilpropanoides (97%)	Kotanina	0.244; -80.13; 73.99%	
6.61	593.1899 (1.24, Na+)	-	C32H30N2O8	9.09; 4.77; 38.81	-	Policetídeos cíclicos aromáticos (66%)	Aspernigrina C	0.107; -556.60; 43.47%	
6.70, 7.20, 7.48	557.1450 (1.55)	555.1281 (-2.89)	C31H24O10	79.17; 55.65; 26.31	96.33; 72.53; 46.51	Bisnaftalenos (96%)	Aurasperona D	0.114; -99.62; 81.68%	0.107; -184.22; 62.93%
6.98, 7.09	287.0922 (2.65)	-	C16H14O5	100; 100; 46.39		Metilxantonas (78%)	Asperxantona	0.175; -85.37; 78.02%	
6.75	629.1633 (6.93, Na+)	605.1638 (-3.72)	C32H30O12	52.90; 33.04; 12.68;	99.64; 94.43; 71.04	Flavonols (71%)	Aurasperona B	0.144; -242.56; 52.20%	0.187; -143.30; 70.92%
7.03, 7.88	611.1525 (-1.80, Na+)	587.1537 (-1.67)	C32H28O11	89.68; 66.29; 17.78	99.19; 85.45; 46.67	Shikamatos e Fenilpropanoides (94%)	Aurasperona E	0.136; -342.02; 57.67%	0.177; -145.85; 73.49%

7.31	-	315.2532 (-1.95)	C18H36O4	-	100; 99.99; 37.54	Ácido graxo hidroxilado (58%)	FA diOH 18:0	
7.65	493.2806 (5.20)	-	C28H36N4O4	95.27; 40.19; 39.32	-	Tripeptídeos (84%)	ciclo[DL-Nva-DL-Nva-DL-Phe-DL-Phe]	0.665; -133.88; 67.83%
7.81	318.3006 (-0.33)		C18H39NO3	100.00; 100.00; 28.23;		Esfingolípídeos (100%)	Fitoesfingosina	0.177; -30.43; 85.91%
8.22, 8.59, 9.26	571.1609 (1.62)		C32H26O10	90.75; 70.55; 40.58;		Bisnftalenos (71%)	Aurasperona A	0.083; -93.57; 72.47%
8.93	346.3318 (0.26)		C20H43NO3	100; 100; 59.11		Esfingolípídeos (100%)	C20-Fitoesfingosina	0.518;; -47.97; 77.64%
8.98		271.2269 (-1.41)	C16H32O3		100; 99.99; 36.57	Ácido graxo hidroxilado (97%)	FA OH-16:0	
8.98	-	295.2267 (1.55)	C18H32O3	-	42.56; 28.80; 14.25	Octadecanoides (56%)	FA OH-18:2	
8.99, 11.87	255.2321 (-4.35)		C16H30O2	100.00; 100.00; 75.12		Terpenoides (60%)	FA 16:1	
9.49	-	269.2115 (10.55)	C16H30O3		100; 100; 20.89	Ácidos graxos insaturados (51%)	FA OXO-16:0	
9.97	358.3681 (0.99)	-	C22H47NO2	99.79; 99.74; 10.28	-	N-acil etanolaminas (51%)	Estearil dietanolamina	0.166; -57.83; 72.64%
10.28, 11.57	283.2637 (1.65)	281.2478 (-2.96)	C18H34O2	100; 100; 84.22;	99.79; 99.89; 8.51	Ácidos graxos e conjugados (80%)	FA C18:1	
10.61		299.2583 (-2.11)	C18H36O3		100; 99.99; 33.01	Ácido graxo hidroxilado (65%)	FA OH-18:0	
11.67	406.3103 (2.04)	-	C28H39NO	97.58; 95.11; 32.30	-	Terpenoides (93%)	Emindole DA	0.425; -165.11; 62.57%
12.00	338.3418 (0.01)	-	C22H43NO	100; 99.98; 55.50		Amidas graxas (87%)	Amida graxa 22:1	-
12.20,	574.5197 (2.58)	-	C37H67NO3	0.00; 98.88; 46.41;	-	Ceramida (75%)	Derivado de Esfingolípídeo	
12.85	407.2947 (6.90)	-	C28H40O2	99.59; 98.95; 53.79		Terpenoides (99%)	Derivado de esterol	
13.02	411.3257 (3.97)	-	C28H42O2	100; 100; 35.35		Meroterpenoide (96%)	Gamma tocotrienol	0.285; -37.29; 92.17%
11.62, 11.92, 13.22,	409.3094 (3.73)	-	C28H40O2	100; 100; 82.23	-	Sesquiterpenoide (72%)	Derivado de ergosterol	
13.22	592.5303 (-1.23)	-	C37H69NO3	100; 100; 5046.47;		Ceramida (100%)	Cer(d19:2_18:1)	

13.23, 14.62	339.3262 (2.35)	-	C22H42O2	100; 100; 72.50		Monoester de cera	Ester etílico do FA 22:1	
14.03	395.3309 (4.22)	-	C28H42O	99.54; 95.41; 99.77	-	Esteróide (76%)	Derivado de Ergosterol	
14.22		374.2690 (-2.47)	C23H37NO3	-	95.93; 95.27; 23.53	N-acil amina (87%)	Sclerolizine	0.685; -367.30; 41.64%
14.47	391.3000 (3.80)	-	C28H38O	100; 99.96; 52.00		Terpenóides (98%)	Derivado de Ergosterol	
14.47	554.5516 (1.24)	-	C35H71NO3	99.84; 98.99; 14.19	-	N-acil amina (82%)	Esfingosina	
14.81	-	736.4196 (3.81)	C38H62NO8P		100; 100; 20.35	Glicerofosfoetanolamina (93%)	Diacilglicerofosfocolina PC 30:7	
15.21	582.5824 (-0.3)		C37H75NO3	91.50; 56.48; 8.64;	-	N-acil amina (62%)	Esfingosina	
15.23	429.3353 (2.48)	-	C28H44O3	0.00; 100; 90.11	-	Triterpenóide (83%)	Derivado de Ergosterol ou de Vit. D	-
15.53	754.5837 (1.42)	-	C43H79NO8	100; 100; 7011.96	-	Glicosfingolípido (100%)	Glicosfingolípido	

APÊNDICE I - Compostos sugeridos através da análise de extratos do meio de cultura SD, SA E CC por UPLC-ESI-QToF-DDA (ESI+) através de comparação espectral pela plataforma GNPS por Classical Molecular Networking

Tr	m/z Experimental	m/z Espectral (Banco de dados)	Formula Molecular	Diferença de massa (Da)	Erro (ppm)	Nome usual	Nome indicado GNPS	Classe / Outras anotações
0.46	465.103	365.106	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	99.997	215000	Spiraeosideo	Spiraeoside	Flavonol
0.54	181.05	155.082	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	25.968	143430	Acido cafeico	Caffeic acid	Ácido cinâmico e derivados
0.54	282.12	268.105	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	14.015	49677.4	1-metil adenosina	1-Methyladenosine	Nucleotídeos/Nucleosídeos de purina
0.58	279.091	186.092	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	92.999	333221	Sulfametazina	Massbank:LU130902 Sulfamethazine 4-amino-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzenesulfonamide	
0.85	250.144	261.124	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	10.98	43894.7	Ácido 2-Pentanamido-3-fenilpropanóico	Phe-C5:0	Dipeptídeo
1.21	132.065	195.102	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	63.0366	477314	Hidroxirolina	L-Hydroxyproline - 40.0 eV	Aminoácido
1.29	254.118	259.181	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>	5.063	19923.8		(2E)-N-(4-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-enamide CollisionEnergy:205060	Amidas de ácido cinâmico
1.29	159.11	203.071	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	43.961	276293	Mirceno	myrcene	Monoterpenoides acíclicos
1.33	229.097	273.124	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	44.027	192176	Aspernigrina A	aspernigrin A	Alcalóides piridínicos
1.37	177.102	229.098	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	51.996	293594	Serotonina	SEROTONIN	Alcalóides indólicos simples
1.45	229.097	301.121	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	72.024	314382	Aspernigrin A	aspernigrin A	Alcaloides piridínicos
1.53	259.133	172.206	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	86.927	335453		2-methoxy-5-methyl-3-(2-methylbut-3-en-2-yl)chromen-4-one	
1.69	226.072	216.102	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	9.97	44101		Massbank:PR311126 HDMBOA (not validated, isomer of 868)	Alcaloides quinolínicos
2.05	156.081	202.087	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N	46.006	294757	o-Fenilpiridina	Massbank:UA007801 2-Phenylpyridine	Alcaloides piridínicos
2.51	276.171	187.226	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	88.945	322065	Fisostigmina	Massbank:PR301420 Physostigmine	Alcaloides indólicos
3.02	313.149	387.155	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> S	74.006	236328	Olanzapina	Olanzapine	Alcaloide tipo Corynanthe
3.15	251.128	202.217	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	48.911	194765	Dipropilftalato	Massbank:RP019701 Dipropylphthalate Dipropyl phthalate dipropyl benzene-1,2-dicarboxylate	Ácido chiquimico e derivados
3.26	324.111	230.082	N/A	94.029	290114	Desidroevodiamina	Dehydroevodiamine	N/A
3.30	173.09	187.076	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	13.986	80801.9	Timol	thymol	Monoterpenoides mentano
3.38	183.065	207.066	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	24.001	131106	Vanilato de metila	METHYL VANILLATE	Ácidos fenólicos simples

3.42	398.198	343.129	N/A	55.069	138296	Apatinib	Apatinib	N/A
3.57	257.12	229.048	C16H16O3	28.072	109179		5-butyl-3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one	Cumarinas simples
3.81	273.08	289.071	C15H12O5	15.991	58558	Éter monometílico de alternariol	Alternariol monomethylether	Isocoumarinas
3.81	330.06	349.176	N/A	19.116	57916.7		Spectral Match to Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate from NIST14	N/A
3.89	251.08	274.048	C13H12N2O2	22.968	91476.8	Aaptamina	Aaptamine	Alcaloides isoquinolinicos
4.09	439.138	411.107	C24H22O8	28.031	63831.9	Kotanina	Massbank:AC000177 Kotanin 8-(4,7-dimethoxy-5-methyl-2-oxochromen-8-yl)-4,7-dimethoxy-5-methylchromen-2-one	Cumarinas simples
4.37	271.096	341.066	C16H14O4	69.97	258100	4-hidroxi-3-metoxiflavanona	4'-Hydroxy-3'-methoxyflavanone CollisionEnergy:102040	Dihidroflavonols
4.58	273.075	273.076	C15H14O6	0.000976562	3.57617	Foncesin	NCGC00169993-02 2,5,8-trihydroxy-6-methoxy-2-methyl-3H-benzo[g]chromen-4-one	Naphtalenos
4.61	254.116	343.166	N/A	89.05	350430	Triamterene	Triamterene	N/A
4.85	242.289	242.285	N/A	0.0039978	16.5001		Spectral Match to Tetrabutylammonium from NIST14	N/A
4.90	339.087	381.061	C19H14O6	41.9744	123787	Rabelomicina	NCGC00347521-02 3,6,8-trihydroxy-3-methyl-2,4-dihydrobenzo[a]anthracene-1,7,12-trione [IIN-based: Match]	Anguciclinas
4.94	289.072	303.087	C15H12O6	14.015	48482.8	3,5-Dimethoxy-1,6-dihydroxyxanthone	1,6-dihydroxy-3,5-dimethoxyxanthone	Xantonas de plantas
5.00	464.082	366.095	C14H18N5O11P	97.987	211142	Adenylosuccinic acid	Spectral Match to Adenylosuccinic acid from NIST14	Nucleotídeos/Nucleosídeos de purina
5.13	291.086	344.113	C15H14O6	53.027	182170		methyl (1S,4S,8R,11E,14S)-11-ethylidene-12-oxo-7,9,13-trioxatetracyclo[6.5.1.0i <sub>1</sub> ½.1i <sub>2</sub> ½?..0?,i <sub>1</sub> ½?]?tetradeca-2,5-diene-5-carboxylate	Iridoides
5.17	257.12	231.071	C16H16O3	26.049	101311		5-butyl-3-methyl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-one	Cumarinas simples
5.20	439.138	425.123	C24H22O8	14.015	31914.8	Kotanina	Massbank:AC000178 Kotanin 8-(4,7-dimethoxy-5-methyl-2-oxochromen-8-yl)-4,7-dimethoxy-5-methylchromen-2-one	Cumarinas simples
5.20	425.123	424.119	C20H24O8S	0.00329	N/A	Ciclotiocurvalina B	Cyclothiocurvalarin_B_methyl_ester	Composto por DEREPLICATOR+
5.21	302.306	246.243	N/A	56.0629	185451		Cer(d18:0/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C18H40N1O2	N/A

5.27	250.144	333.181	C14H19NO3	83.037	331957	2-Pentanamido-3-phenylpropanoic acid	Phe-C5:0	Dipeptides
5.41	213.091	211.087	C14H16O4	2.0042	9405.34		NCGC00168939-02!8-hydroxy-3-(4-oxopentyl)-3,4-dihydroisochromen-1-one [LIN-based on: CCMSLIB00000847794]	Isocoumarinas
5.76	279.093	279.094	C18H15OP	0.00100708	3.6084	Trifenilfosfina	Spectral Match to Triphenylphosphine oxide from NIST14	
6.45	285.29	343.296	C17H36N2O	58.006	203323	Lauramidopropyl dimethylamine	Massbank:LU071402 N-[3-(Dimethylamino)propyl]dodecanamide	N-acil aminos
6.66	302.306	274.275	N/A	28.0309	92723.7		Cer(d18:0/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C18H40N1O2	N/A
6.78	326.342	318.301	C21H43NO	8.04102	24639.8		amyl amine-C16:0	N-acil aminos
6.78	283.1	287.092	C17H14O4	3.992	14101	5,7-Dimethoxyflavone	5,7-dimethoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	Flavonas
6.82	439	439.139	N/A	0.139008	316.646		Kotanin	N/A
6.82	439.139	438.131	C24H22O8	-0.00073	N/A	Propolisbenzofurano B	Propolisbenzofuran_B_Propolisbenzofuran_B	Composto por DEREPLICATOR+
6.86	607.182	606.166	C33H31ClO9	-0.00873	N/A		1-(2,4-Dihydroxy-6-methylphenyl)-5a,6-dihydro-3,8,10,12-tetrahydroxy-6,6-dimethyl-5a-(2-oxopropyl)-5,11-naphthacenedione,_CAS_3'-Chloro,_2',3,4'-tri-Me_ether	Composto por DEREPLICATOR+
7.02	307.09	272.069	C17H16O4	35.021	114041	Flavokawain B	Flavokawain B	Chalconas
7.74	493.281	984.547	C56H72N8O8	-0.00046	N/A	Fungisporin	Fungisporin_Fungisporin	Composto por DEREPLICATOR+
7.85	300.289	318.301	N/A	18.012	59982.2		Spectral Match to D-erythro-C18-Sphingosine from NIST14	N/A
7.99	302.306	302.306	N/A	9.16E-05	0.302848		Cer(d18:0/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C18H40N1O2	N/A
8.37	494.325	494.324	N/A	0.000671387	1.35819		PC(16:1/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C24H49N1O7P1	N/A
8.40	304.29	304.3	N/A	0.00997925	32.7952		Benzalkonium chloride (C12)	N/A
8.44	302.305	316.321	C18H39NO2	14.016	46363.8	Tetradecyldiethanolamine	Massbank:LU100202 2,2'-(Tetradecylimino)diethanol Tetradecyldiethanolamine	N-acil etanolaminas
8.47	480.309	452.278	N/A	28.031	58360.4		PE(18:1/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C23H47N1O7P1	N/A
8.51	522.353	495.328	N/A	27.025	51737.1	LPC 18:1	Spectral Match to 1-(9Z-Octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine from NIST14	N/A
8.90	482.325	520.339	N/A	38.0143	78814.8		PC(15:0/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C23H49N1O7P1	N/A
8.95	302.306	330.337	N/A	28.0311	92724.3		Cer(d18:0/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C18H40N1O2	N/A

8.97	363.181	346.332	C20H28O6	16.849	46392.8	Oridonin	Oridonin CollisionEnergy:102040	Diterpenoides tipo Kaurane e Filocladano
9.09	572.372	508.34	N/A	64.0316	111871		PC(22:4/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C30H55N1O7P1	N/A
9.36	552.403	496.34	N/A	56.0629	101489		PC(20:0/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C28H59N1O7P1	N/A
9.52	304.29	332.331	N/A	28.041	92152.2		Benzalkonium chloride (C12)	N/A
9.73	478.293	480.308	N/A	2.01465	4212.16		PE(18:2/0:0); [M+H] <sup>+</sup> C23H45N1O7P1	N/A
9.80	279.159	279.16	C16H22O4	0.00100708	3.60755	Dibutilftalato	Spectral Match to Dibutyl phthalate from NIST14	Ácidos fenólicos simples
9.84	524.372	523.359	N/A	1.01263	1931.14		PC(0:0/18:0); [M+H] <sup>+</sup> C26H55N1O7P1	N/A
9.92	522.356	522.356	N/A	6.10E-05	0.116846		PC(0:0/18:1); [M+H] <sup>+</sup> C26H53N1O7P1	N/A
10.55	449.287	463.303	N/A	14.016	31196.1		Spectral Match to p-tert-Octylphenol pentaglycol ether from NIST14	N/A
10.72	732.554	666.435	N/A	66.1193	90258.6		PC(16:0/16:1); [M+H] <sup>+</sup> C40H79N1O8P1	N/A
10.79	425.215	424.21	C22H32O8	0.00228	N/A		8,10-Epoxy-3-iridene-1,7,11-triol_1,7-Bis-O-(3-methylbutanoyl)_11-Ac	Composto por DEREPLICATOR+
10.87	403.233	403.233	C20H34O8	0	0	Acetyl tributyl citrate	Massbank:LU052302 Acetyl tributyl citrate tributyl 2-acetyloxypropane-1,2,3-tricarboxylate	Monoesteres de cera
10.97	580.43	524.371	N/A	56.059	96581.9		Spectral Match to 1-Behenoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine from NIST14	N/A
10.99	471.09	473.345	C21H20O11	2.255	4786.78		NCGC00169402-0212-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	Flavonas
10.99	303.303	329.162	N/A	25.859	85257.9		Spectral Match to Monoerucin from NIST14	N/A
11.42	329.27	355.284	N/A	26.014	79005.1		Spectral Match to Monopalmitolein (9c) from NIST14	N/A
11.44	313.118	398.232	C17H16N2O4	85.114	271827	-	"2H-benzo[3,4-d]1,3-dioxolen-5-yl-N-(1-carbamoyl-2-phenylethyl)carboxamide CollisionEnergy:205060"	
11.50	271.243	263.237	N/A	8.00601	29516		Cembrane_Diterpene_minus_Me	N/A
11.66	311.164	311.164	C20H22O3	0	0	Avovenzone	Spectral Match to Avobenzone from NIST14	Chalconas
11.74	388.299	388.3	C28H39NO	0.000976562	2.51498	Emindole DA	NCGC00380796-01_C28H39NO_2-Naphthalenol, decahydro-5-(1H-indol-3-ylmethyl)-1,4a-dimethyl-6-methylene-1-(4-methyl-3-penten-1-yl)-, (1S,2S,4aR,5R,8aR)-	Alcaloides indólicos-diterpenoides

11.86	205.195	237.222	N/A	32.027	156081		B13A01 Faulkner library maybe Tryptophan needs ot be verified	N/A
11.90	377.32	752.632	C49H84O5	0.00654	N/A		DG(24:1(15Z)/22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	Composto por DEREPLICATOR+
11.94	395.331	394.324	C28H42O	0.00029	N/A		Ergosta-5,7,9(11),24(28)-tetraen-3-ol_Ergosta-5,7,9(11),24(28)-tetraen-3-ol	Composto por DEREPLICATOR+
11.97	301.11	352.178	C14H20O5S	51.068	169599	4-Sulfobenzeneoctanoic acid	Massbank:EQ357103 8phiC8SPC Octacarboxy sulfophenyl carboxylic acid 8-(4-sulfophenyl)octanoic acid	
11.98	473.107	415.043	C23H22O12	58.064	122729	Comanthoside B	NCGC00386050-01!(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-[5-hydroxy-6-methoxy-2-(4-methoxyphenyl)-4-oxochromen-7-yl]oxyoxane-2-carboxylic acid	Flavonas
11.99	199.133	255.232	N/A	56.099	281716		B20A07	N/A
12.01	278.118	250.087	N/A	28.031	100788	Etocrilene	Massbank:LU073204 Ethyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate ethyl 2-cyano-3,3-diphenylprop-2-enoate	N/A
12.01	199.133	219.211	N/A	20.078	100827		B20A07	N/A
12.11	730.539	730.538	N/A	0.000671387	0.91903		PC(16:1/16:1); [M+H] <sup>+</sup> C40H77N1O8P1	N/A
12.12	377.32	752.632	C49H84O5	0.00654	N/A		DG(22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/24:1(15Z)/0:0)	Composto por DEREPLICATOR+
12.34	471.09	417.041	C21H20O11	54.049	114732		NCGC00169402-02!2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	Flavonas
12.41	471.105	471.329	C22H24O9	0.223999	475.476	Homonataloin B	NCGC00385660-01!(10R)-2,8-dihydroxy-1-methoxy-6-methyl-10-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-10H-anthracen-9-one	Antraquinonas e antronas
12.41	427.393	369.429	C30H50O	57.964	135622	3-Epilupeol	3-Epilupeol	Triterpenoides lupanicos
12.44	662.574	663.453	N/A	0.879028	1326.69		DG(20:4_18:0)	N/A
12.96	303.303	311.295	N/A	7.992	26349.9		Spectral Match to Monoerucin from NIST14	N/A
13.06	471.09	416.046	C21H20O11	55.044	116844		NCGC00169402-02!2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	Flavonas
13.11	665.317	664.456	C34H48O13	0.861023	1294.15	Sarmentoside B	Sarmentoside B	Cardenolideos

13.14	411.325	411.325	C28H44O3	0	0	Peróxido de ergosterol	NCGC00180497-02!	Esteroides tipo Colestano/Ergostano
13.22	359.294	338.342	C24H40O3	20.952	58314.3	Isoallolitochoolic acid	"(R)-4-((3S,5S,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-hydroxy-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl)pentanoic acid"	Esteroides tipo Colano
13.46	441.299	880.589	C45H80N6O11	0.00554	N/A		Ngercheumicin_H	Composto por DEREPLICATOR+
13.48	303.303	339.326	N/A	36.023	118769		Spectral Match to Monoerucin from NIST14	N/A
13.52	205.195	265.253	N/A	60.058	292687		B13A01 Faulkner library maybe Tryptophan needs ot be verified	N/A
13.63	205.195	283.264	N/A	78.069	380462		Spectral Match to cis-7,10,13,16-Docosatetraenoic acid from NIST14	N/A
13.64	205.195	247.242	N/A	42.047	204912		Spectral Match to cis-7,10,13,16-Docosatetraenoic acid from NIST14	N/A
13.83	663.282	607.393	C25H43NO18	55.889	84261.3	Acarbose	ACARBOSE	Amino ciclitol
13.91	638.572	638.608	N/A	0.0356445	55.8191		DG(18:1/0:0/18:1); [M+NH4]+ C39H76N1O5	N/A
14.01	732.554	758.57	N/A	26.0157	35513.7		PC(16:0/16:1); [M+H]+ C40H79N1O8P1	N/A
14.09	531.409	531.408	N/A	0.000976562	1.83769		B27A19	N/A
14.29	471.105	471.105	C22H24O9	0	0	Homonataloin B	NCGC00385660-01!(10R)-2,8-dihydroxy-1-methoxy-6-methyl-10-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-10H-anthracen-9-one	antraquinonas e antronas
14.78	610.541	610.578	N/A	0.0369263	60.4812		DG(16:0/18:2/0:0); [M+NH4]+ C37H72N1O5	N/A
14.88	413.265	413.266	N/A	0.000976562	2.36304	Bis-2-etilhexil ftalato	Spectral Match to Bis(2-ethylhexyl) phthalate from NIST14	N/A
14.92	331.19	391.285	C20H26O4	60.095	181452	Diciclohexil ftalato	Massbank:AU250605 Dicyclohexylphthalate Dicyclohexyl phthalate dicyclohexyl benzene-1,2-dicarboxylate	
15.08	471.09	414.27	C21H20O11	56.82	120614		NCGC00169402-02!2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]chromen-4-one	Flavonas
15.16	471.105	473.103	C22H24O9	1.99799	4241.06	Homonataloin B	NCGC00385660-01!(10R)-2,8-dihydroxy-1-methoxy-6-methyl-10-[(2S,3R,4R,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]-10H-anthracen-9-one	Antraquinonas e antronas

15.28	285.29	369.384	C17H36N2O	84.094	294767	Lauramidopropyl dimethylamine	Massbank:LU071402 N-[3-(Dimethylamino)propyl]dodecanamide	N-acil aminos
15.39	242.285	243.288	N/A	1.00299	4139.71		Spectral Match to Tetrabutylammonium from NIST14	N/A
16.19	183.065	182.985	C9H10O4	0.080018	437.013	Vanilato de metila	METHYL VANILLATE - 40.0 eV	Ácidos fenólicos simples

APÊNDICE J - Compostos sugeridos através da análise de extratos do meio de cultura SD, SA E CC por UPLC-ESI-QToF-DDA (ESI-) através de comparação espectral pela plataforma GNPS por Classical Molecular Networking

Tr	m/z Experimental	m/z Espectral (Banco de dados)	Formula Molecular	Diferença de massa (Da)	Erro (ppm)	Nome usual	Nome indicado GNPS	Classe / Outras anotações
0.44	387.114	341.109	N/A	46.005	134869		Spectral Match to D-(+)-Trehalose from NIST14	N/A
0.72	227.056	253.035	C11H10O7	25.979	102670	(+/-)-strobide B	3,5-dihydroxy-7-methoxy-6-methyl-1-oxo-3H-2-benzofuran-4-carboxylic acid	derivatives Derivados de Ftalideos
0.91	241.119	191.071	C11H12O3	50.048	261934	5-PhenyllevulinicAcid	4-oxo-5-phenylpentanoic acid	N/A
1.03	303.05	271.024	C14H8O6	32.026	118167	Canarione	Canarione	Naftoquinonas
1.08	275.103	285.112	C17H16O4	10.009	35105.5	Homopterocarpin	Homopterocarpin	Rotenoides
3.25	323.055	253.051	C15H10O4	70.004	276640	3',4'-Dihydroxyflavone	3',4'-Dihydroxyflavone - 20eV	Flavonas
3.33	289.034	289.071	C15H12O6	0.0370178	128.058		2-Hydroxyalternariol-9-methyl ether_120110	Isocoumarinas
3.48	205.05	191.08	C10H10N2O2	13.97	73110.7	Echinosolinone	3-(2-hydroxyethyl)quinazolin-4(3H)-one	Alcaloides Quinazolinicos
3.83	409.091	414.999	C17H14Cl2O8	5.90799	14236.2	Geodin Hydrate	Geodin Hydrate	DPEs Fúngicas
3.95	409.091	414.999	C17H14Cl2O8	5.90799	14236.2	Geodin Hydrate	Geodin Hydrate	DPEs Fúngicas
4.03	287.055	230.081	C13H11NO3	56.9736	247624	gamma-Fagarine	gamma-fagarine	Alcaloides quinolinicos
4.10	272.032	307.09	C17H16O4	35.058	114162	Flavokawain B	Flavokawain B	Chalconas
4.12	351.014	351.014	C18H8O8	0	0	Thelephoric acid	Thelephoric acid	p-Terfenilos
4.76	271.06	267.066	C16H12O4	3.99399	14955.1	7-Hydroxy-3'-methoxyflavone	7-Hydroxy-3'-methoxyflavone - 30eV	Flavonas
5.04	379.045	313	C18H16O5	66.045	211006	Tanshindiol B	ReSpect:PM019005 Tanshindiol B Phenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione, 6,7,8,9-tetrahydro-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-, (6R,7S)-	Naftoquinonas
5.35	423.107	349.092	C17H16O8	74.015	212021		NCGC00381013-0115-hydroxy-2-(3-hydroxy-2-methoxycarbonyl-5-methylphenoxy)-3-methoxybenzoic acid	DPEs Fúngicas
5.58	455.181	462.204	C25H32ClNO5	7.02301	15194.6		"pentyl 4-(3-chloro-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)-2,7,7-trimethyl-5-oxo-1,4,6,7,8-pentahydroquinoline-3-carboxylate CollisionEnergy:205060"	N/A

5.59	489.165	446.217	C24H28O7	42.948	96249.1		[8-(3-methylbutanoyloxy)propan-2-yl]-2-oxo-8,9-dihydrofuro[2,3-h]chromen-9-yl] (Z)-2-methylbut-2-enoate	Furanocumarina
5.68	340.058	341.065	C18H12O7	0.00028	N/A	Ácido Atromentico	Atromentic_acid_Atromentic_acid	DERPLICATOR+
6.37	573.139	574.237	C23H39N5O5S2	1.09802	1912.14	Malformin-B4	NCGC00381451-01!(1S,4S,7R,10S,13S)-7,10-di(butan-2-yl)-4-propan-2-yl-15,16-dithia-3,6,9,12,18-pentazabicyclo[11.4.2]nonadecane-2,5,8,11,19-pentone	Peptídeo cíclico
7.47	556.131	464.274	N/A	91.857	197851		Boc-Pro-DVal(NMe)-Val-OMe	N/A
8.43	569.272	597.3	N/A	28.028	46924.5		Spectral Match to 1-(9Z-Octadecenyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol) from NIST14	N/A
8.59	538.314	564.329	N/A	26.015	46098.9	lysophosphatidylcholine 18:2	1-(9Z,12Z-Octadecadienyl)-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (NMR) - 39.9124eV	N/A
8.70	297.152	297.141	C16H26O3S	0.0110168	37.0762	Decylbenzene sulfonate	Spectral Match to Decylbenzenesulfonic acid from NIST14	Catecóis com cadeia lateral
9.02	271.227	299.259	C18H36O3	28.032	93671.4	12-Hydroxystearic acid	Massbank:LU039853 12-Hydroxyoctadecanoic acid	Octadecanoides
9.04	311.168	297.141	C16H26O3S	14.027	47206.6	Decylbenzene sulfonate	Spectral Match to Decylbenzenesulfonic acid from NIST14	Catecóis com cadeia lateral
9.06	295.227	339.197	C22H28O3	43.97	129630		Massbank:AU239460 Canrenone (9S,14S)-10,13-dimethylspiro[2,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-17,5'-oxolane]-2',3-dione	Esteroides de Androstano
9.36	325.183	325.348	C22H46O	0.164978	507.082	Docosanol	DOCOSANOL	Álcoois graxos
9.59	312.171	339.197	C22H28O3	27.026	79676.4		Massbank:AU239460 Canrenone (9S,14S)-10,13-dimethylspiro[2,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-17,5'-oxolane]-2',3-dione	Esteroides de Androstano
9.65	297.242	366.117	C21H19NO3S	68.875	188123		MMV688798	
9.79	586.148	587.154	C32H26O11	0.00129	N/A	N/A	4-Hydroxyanhydroflavomannin-9,10-quinone	DERPLICATOR+
10.48	339.199	297.141	C16H26O3S	42.058	141542	Decylbenzene sulfonate	Spectral Match to Decylbenzenesulfonic acid from NIST14	Catecóis com cadeia lateral
10.56	311.2	311.15	C16H24O6	0.0500183	160.753		Thymol-beta-D-glucoside	Monoterpenoides de mentano

10.72	465.306	398.328	N/A	66.978	168148	Palmitoylcarnitine	Palmitoylcarnitine	N/A
10.87	326.186	327.254	C19H36O4	1.06799	3263.5	Avocadoene 1-acetate	2,4-dihydroxyheptadec-16-enyl acetate	Álcoois graxos
10.91	293.178	297.141	C16H26O3S	3.96298	13337	Decylbenzene sulfonate	Spectral Match to Decylbenzenesulfonic acid from NIST14	Catecóis com cadeia lateral
11.76	448.298	452.277	C21H44NO7P	3.979	8797.71	1-Palmitoylcephalin	Massbank:PR309148 LPE 16:0	Glicerofosfoetanolamina
11.83	774.529	802.56	N/A	28.031	34927	Lecithin	(2-[[3-(hexadecanoyloxy)-2-[octadeca-9,12-dienoyloxy]propyl phosphono]oxy)ethyl)trimethylazanium	N/A
11.92	340.202	297.141	C16H26O3S	43.061	144918	Decylbenzene sulfonate	Spectral Match to Decylbenzenesulfonic acid from NIST14	Catecóis com cadeia lateral
12.37	493.338	480.309	N/A	13.029	27126.3		PE(18:0/0:0); [M-H]- C23H47N1O7P1	N/A

APÊNDICE K – Gráfico de pontuação aos pares gerados para as análises de PCA (A) e PLS-DA (B) realizados pelo software Metaboanalyst 5.0

