

UFG  
IQ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA

M  
I  
R  
I  
A  
  
D  
E  
  
A  
L  
M  
E  
I  
D  
A  
  
S  
O  
U  
Z  
A

METABOLÔMICA DE  
MACROFUNGOS CULTIVADOS  
EM TORTA DO CAROÇO DE  
ALGODÃO POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS

MIRIA DE ALMEIDA SOUZA

ORIENTADORA: PROF. DR. PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2020

GOIÂNIA- 2020

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

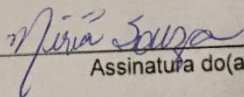
Nome completo do autor: Miria de Almeida Souza

Título do trabalho: Metabolômica de macrofungos cultivados em torta do caroço de algodão por espectrometria de massas

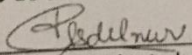
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO<sup>1</sup>

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 17/03/2020

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas serão aceitas.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**METABOLÔMICA DE MACROFUNGOS CULTIVADOS EM TORTA DO  
CAROÇO DE ALGODÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Miria de Almeida Souza

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás como exigência parcial, para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur

Goiânia  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Souza, Miria de Almeida

Metabolômica de macrofungos cultivados em torta do caroço de algodão por espectrometria de massas [manuscrito] / Miria de Almeida Souza. - 2020. xv, 110 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Patricia Verardi Abdelnur.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Basideomicetos. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Metabólitos bioativos.
4. Espectrometria de Massas. 5. ESI. I. Abdelnur, Patricia Verardi, orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **329** da sessão da Defesa de Mestrado de **Miria de Almeida Souza**, que confere o título de **Mestra em Química**, na área de concentração em **Química**.

Aos **19 (dezenove) dias do mês de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte)**, a partir das **13h30m**, no **Anfiteatro do IQ II**, realizou-se a sessão pública da Defesa de Mestrado intitulada "**Prospecção de metabólitos após bioprocessamento fúngico de resíduos da cadeia de biodiesel (do inglês, SMS Spent Mushroom Substrate) por espectrometria de massas**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Profª. Drª. Patrícia Verardi Abdelnur**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Dr. Caio de Oliveira Gorgulho Silva (UnB)** e **Profª. Drª. Lucília Kato (UFG)**. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela **Profª. Drª. Patrícia Verardi Abdelnur**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) **19 (dezenove) dias do mês de fevereiro de 2020 (dois mil e vinte)**.

#### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Metabolômica de macrofungos cultivados em torta do caroço de algodão por espectrometria de massas



Documento assinado eletronicamente por **Lucilia Kato, Professora do Magistério Superior**, em 19/02/2020, às 17:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Caio de Oliveira Gorgulho Silva, Usuário Externo**, em 19/02/2020, às 23:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia Verardi Abdelnur, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1176465** e o código CRC **8CF99CDF**.



Dedico esse trabalho à minha mãe Alice,  
meu esposo Matheus, minhas irmãs Quézia e  
Ester e a minha querida avó Nadir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar-me e fortalecer em cada momento, proporcionar sabedoria e aprendizagem. Toda hora e toda glória sejam dadas a Ele.

Ao meu esposo Matheus por todo amor, carinho, paciência e incentivo. Seu apoio foi essencial para me manter de pé. Te amo!

Aos meus pais Alice e José Edmar que desde cedo me ensinaram a valorizar as oportunidades. Vocês foram meu suporte até aqui. Em especial a garra da minha mãe, que não abaixou a cabeça nos momentos de dificuldades.

Agradeço as minhas irmãs Quézia e Ester que sempre tão alegres me apoiaram e acreditaram nas minhas escolhas.

Agradeço ao nosso grupo de trabalho de espectrometria de massas. As habilidades intelectuais e comprometimento de vocês são louváveis. Sinto-me honrada em fazer parte desse grupo.

Agradeço em especial a minha orientadora Patricia Abdelnur. Você foi a peça chave do meu crescimento profissional. Obrigada por cada conhecimento compartilhado e conselhos.

À Embrapa Agroenergia, pelo apoio institucional, em especial aos analistas José Antônio e Raquel Campanha pelos ensinamentos no uso dos equipamentos de laboratório.

Aos amigos do LQB Tallyta, Jorge, Christiane, Elias, Vivianny, Mariana, Samira e Caio pela colaboração, conhecimento e amizades. Em especial a amiga Tallyta, obrigada por cada conselho e ajuda. Os nossos momentos de descontração tornaram tudo mais fácil.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Química pelas oportunidades oferecidas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho.

## Sumário

|                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                        | viii      |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....                                                                                                                   | xii       |
| RESUMO .....                                                                                                                                  | xiv       |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                | xv        |
| <b>1. Introdução.....</b>                                                                                                                     | <b>2</b>  |
| <b>1.1. Importância socioeconômica do Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L) .....</b>                                                         | <b>4</b>  |
| <b>1.2. Pré-tramentos biológicos e melhoria nutricional em tortas de sementes oleaginosas, como TCA.....</b>                                  | <b>7</b>  |
| <b>1.3. Macrofungos como agentes biológicos no pré-tratamento de compostos antinutricionais-tóxicos e fontes de compostos bioativos .....</b> | <b>10</b> |
| <b>1.4. Metabolômica de fungos .....</b>                                                                                                      | <b>13</b> |
| <b>1.4.1. Técnicas analíticas avançadas para análise metabolômica.....</b>                                                                    | <b>15</b> |
| <b>2. Objetivos gerais .....</b>                                                                                                              | <b>21</b> |
| <b>2.1. Objetivos específicos .....</b>                                                                                                       | <b>21</b> |
| <b>3. Procedimento experimental.....</b>                                                                                                      | <b>23</b> |
| <b>3.1. Reagentes e soluções.....</b>                                                                                                         | <b>23</b> |
| <b>3.2. Material biológico.....</b>                                                                                                           | <b>23</b> |
| <b>3.3. Processo de Extração dos metabólitos secundários TCA-fermentado .....</b>                                                             | <b>24</b> |
| <b>3.4. Análises dos metabólitos por UHPLC-ESI-MS/MS.....</b>                                                                                 | <b>25</b> |
| <b>3.5. Processamento de dados dos metabólitos – TCA-fermentados.....</b>                                                                     | <b>27</b> |
| <b>4. Resultados e discussão .....</b>                                                                                                        | <b>30</b> |
| <b>4.1. Otimização do protocolo experimental para análise metabolômica.....</b>                                                               | <b>30</b> |
| <b>4.1.1. Otimização da concentração do extrato etanólico de TCA-fermentado dos macrofungos.....</b>                                          | <b>30</b> |
| <b>4.1.2. Otimização da eluição da fase móvel .....</b>                                                                                       | <b>33</b> |
| <b>4.2. Análise metabolômica de TCA-fermentados dos macrofungos .....</b>                                                                     | <b>35</b> |
| <b>4.2.1. UHPLC-ESI(+)-MS/MS .....</b>                                                                                                        | <b>35</b> |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.1.1. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117 vs TCA-Controle.....   | 41 |
| 4.2.1.2. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88 vs TCA-Controle..... | 45 |
| 4.2.1.3. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>F. hepatica</i> CC102 vs TCA-Controle.....   | 50 |
| 4.2.1.4. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC102 vs TCA-Controle.....   | 54 |
| 4.2.1.5. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351 vs TCA-Controle.....    | 59 |
| 4.2.2. UHPLC-ESI(-)-MS/MS.....                                                             | 63 |
| 4.2.2.1. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117 vs TCA-Controle.....   | 68 |
| 4.2.2.2. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88 vs TCA-Controle..... | 71 |
| 4.2.2.3. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>F. hepatica</i> CC102 vs TCA-Controle.....   | 75 |
| 4.2.2.4. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40 vs TCA-Controle.....    | 79 |
| 4.2.2.5. Metabolômica do TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351 vs TCA-Controle.....    | 83 |
| 4.3. Atividades biológicas dos metabólitos identificados .....                             | 87 |
| 5. Conclusão .....                                                                         | 94 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Flor (A) e fruto (B) de <i>Gossypium hirsutum</i> (fonte Wunderlin et al., 2018 <sup>9</sup> ). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 4  |
| <b>Figura 2:</b> Principais produtores mundiais de algodão. Ano de referência: 2017 a 2018 <sup>11,12</sup> . .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 5  |
| <b>Figura 3:</b> Produtos e coprodutos do beneficiamento do algodão. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 6  |
| <b>Figura 4:</b> Fórmula estrutural do Gossipol. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 7  |
| <b>Figura 5:</b> Representação esquemática da ação do pré-tratamento na desconstrução da biomassa lignocelulósica (adaptado de Shirkavand <i>et al.</i> (2016) <sup>31</sup> ). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 8  |
| <b>Figura 6:</b> Comparação entre estudos metabolômicos <i>untargeted</i> e <i>targeted</i> (adaptado de Schrimpe-Rutledge <i>et al.</i> , 2016) <sup>118</sup> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 14 |
| <b>Figura 7:</b> Fluxo de trabalho das etapas do preparo de amostra. As amostras de TCA-fermentado foram extraídas com etanol 50% em banho ultrassom por 10 minutos. Posteriormente foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para as análises UHPLC-ESI-MS/MS. Oito diluições do sobrenadante em 1 mL de solvente foram testadas. Os dados brutos foram tabelados e os principais íons identificados. ....                                                                                   | 25 |
| <b>Figura 8:</b> Gradientes de eluição testados para a separação dos metabólitos presentes nos extratos de TCA-fermentados pelo modo reverso, tendo como eluente A: água + ácido fórmico 0,1% e eluente B: acetonitrila + ácido fórmico 0,1%, a 30 °C. No gradiente (A) o eluente B inicia-se em 25%, com 10 minutos chega a 100% e volta na condição inicial da análise. No gradiente (B) o inicia em 0%, em 14 minutos atinge 100% e posteriormente retorna à condição inicial da análise. .... | 26 |
| <b>Figura 9:</b> Modelo de apresentação de dados UHPLC-ESI(+)-MS utilizando o TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88 sem escalonamento e submetidas a escalonamento Pareto. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 28 |
| <b>Figura 10:</b> Dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras oriundas do TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117 A. Estas amostras foram submetidas à extração com etanol 50% e diluídas em A) 3:200, B) 1:20, C) 1:10, e D) 3:20 (continua). ....                                                                                                                                                                                                                          | 31 |
| <b>Figura 11:</b> UHPLC-ESI(+)-MS de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117, submetidas a extração com etanol 50%, diluídas na proporção de 500 µL de extrato etanólico em 1000 µL de solvente tendo como eluente A: água + ácido fórmico 0,1% e eluente B: acetonitrila + ácido fórmico 0, 0,1%, a 30°C, analisada em dois gradientes. A linha vermelha é representada pelo gradiente 1, onde o eluente B inicia em 0%, em 14 minutos atinge 100% e retorna à condição inicial. O segundo    |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| gradiente, representado pela linha azul, inicia com 25% de eluente B, com 10 minutos atinge 100% de eluente B e volta na condição inicial.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figura 12:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras a de TCA-fermetado dos macrofungos extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras de TCA-fermentados (A) <i>S. commune</i> FPB117, (B) <i>P. pulmonarius</i> EF88, (C) <i>F. hepatica</i> CC102 e (D) <i>Panus lecomtei</i> CC40 (continua).                                                                                                                                                                                         | 36 |
| <b>Figura 12:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras a de TCA-fermetado dos macrofungos extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras de TCA-fermentados (A) <i>G. lucidum</i> CC 351 e (B) TCA-controle.....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 37 |
| <b>Figura 13:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados nos TCA-fermentados dos macrofungos <i>S. commune</i> FPB117, <i>P. pulmonarius</i> EF88, <i>F. hepatica</i> CC102, <i>P. lecomtei</i> CC40, <i>G. lucidum</i> CC351 e controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. Estes gráficos são obtidos por PCA. Já a (C) projeção dos íons com maior distinção entre as condições de extração (VIP) é obtido por PLD-DA..... | 39 |
| <b>Figura 14:</b> Comparação das intensidades dos picos de massas de quatro íons mais importantes na separação do PCA de dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados nos TCA-fermentados de (A) <i>F. hepatica</i> CC102: <i>m/z</i> 328,3229, (B) CC102: <i>m/z</i> 354,3377, (C) CC102: <i>m/z</i> 230,2488 e (D) <i>S. commune</i> FPB117: <i>m/z</i> 520,3400.....                                                                                                                                                                                                                                     | 41 |
| <b>Figura 15:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). TCA-fermentado (A) <i>S. commune</i> FPB177 e (B) TCA-controle (sem presença do macrofungo).....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 42 |
| <b>Figura 16:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado <i>S. commune</i> FPB 117 e TCA-controle submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 43 |
| <b>Figura 17:</b> Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 45 |
| <b>Figura 18:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado <i>P. pulmonarius</i> EF88 e (B) TCA-controle.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 46 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados no TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88 e TCA-controle, submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. .... | 47 |
| <b>Figura 20:</b> Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88. ....                                                                                                                                                                                                                 | 50 |
| <b>Figura 21:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras após de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado <i>F. hepatica</i> CC102 e (B) TCA-controle. ....                                         | 51 |
| <b>Figura 22:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de <i>F. hepatica</i> CC102 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. ....  | 52 |
| <b>Figura 23:</b> Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de <i>F. hepática</i> CC102. ....                                                                                                                                                                                                                   | 54 |
| <b>Figura 24:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras a de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado <i>P. lecomtei</i> CC40 e (B) TCA-controle. ....                                             | 55 |
| <b>Figura 25:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados em TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. ....   | 56 |
| <b>Figura 26:</b> Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40 ....                                                                                                                                                                                                                     | 59 |
| <b>Figura 27:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado <i>G. lucidum</i> CC351 e (B) TCA-controle. ....                                               | 60 |
| <b>Figura 28:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado <i>G. lucidum</i> CC351 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. ....      | 61 |
| <b>Figura 29:</b> Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351. ....                                                                                                                                                                                                                    | 63 |
| <b>Figura 30:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2                                                                                                                                                                                   |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras dos TCA-fermentados dos macrofungos: (A) <i>S. commune</i> FPB117, (B) <i>P. pulmonarius</i> EF88 e (C) <i>F. hepatica</i> CC102 (continua).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 64 |
| <b>Figura 30:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras dos TCA-fermentados dos macrofungos: (A) <i>P. lecomtei</i> CC40 (B) <i>G. lucidum</i> CC351 e (C) TCA-controle.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 65 |
| <b>Figura 31:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados dos TCA-fermentados dos macrofungos <i>S. commune</i> FPB117, <i>P. pulmonarius</i> EF88, <i>F. hepatica</i> CC102, <i>P. lecomtei</i> CC40, <i>G. lucidum</i> CC351 e TCA controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. Estes gráficos são obtidos por PCA. Já a (C) projeção dos íons com maior distinção entre as condições de extração (VIP) é obtido por PLD-DA..... | 66 |
| <b>Figura 32:</b> Comparação das intensidades dos picos de massas de quatro íons mais importantes na separação do PCA de dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados nos TCA-fermentados de (A) <i>F. hepatica</i> CC102: <i>m/z</i> 357,1038, (B) EF 88: <i>m/z</i> 167,0214, (C) CC 351: <i>m/z</i> 606,0752 e (D) TCA-controle: <i>m/z</i> 549,1690.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 67 |
| <b>Figura 33:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) <i>S. commune</i> FPB117 e (B) TCA-controle.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 68 |
| <b>Figura 34:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.....                                                                                                                                                                                                                                                                     | 69 |
| <b>Figura 35:</b> Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 71 |
| <b>Figura 36:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras após a fermentação fúngica de TCA extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). Amostra fermentada pelo fungo A) <i>P. pulmonarius</i> EF88 e B) ausente de fermentação.....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 72 |
| <b>Figura 37:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 73 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 38:</b> Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88.....                                                                                                                                                                                                                                      | 75 |
| <b>Figura 39:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) <i>F. hepática</i> CC102 e (B) TCA-controle.....                                                          | 76 |
| <b>Figura 40:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC102 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo..... | 77 |
| <b>Figura 41:</b> Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de <i>F. hepática</i> CC102. ....                                                                                                                                                                                                                                       | 79 |
| <b>Figura 42:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) <i>P. lecomtei</i> CC40 e (B) TCA-controle.....                                                           | 80 |
| <b>Figura 43:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo..... | 81 |
| <b>Figura 44:</b> Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40. ....                                                                                                                                                                                                                                        | 83 |
| <b>Figura 45:</b> Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) <i>G. lucidum</i> CC351 e (B) TCA-controle.....                                                           | 84 |
| <b>Figura 46:</b> PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de <i>scores</i> relativo à separação de grupos. (B) Gráfico <i>loadings</i> com projeção com íons com maior influência na separação do modelo..... | 85 |
| <b>Figura 47:</b> Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351. ....                                                                                                                                                                                                                                        | 87 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Classes de compostos químicos degradados por macrofungos ou fungos de podridão branca – agentes biológicos biorremediadores (adaptado de Phan <i>et al.</i> , 2012 <sup>59</sup> ).....                         | 11 |
| <b>Tabela 2:</b> Principais vantagens e desvantagens de ferramentas analíticas utilizadas em análises metabolômicas (adaptado de Razzaq <i>et al.</i> , 2019) <sup>132</sup> . ....                                              | 17 |
| <b>Tabela 3:</b> Quantidades de picos obtidos para os gradientes representados pelas linhas azul e vermelho em UHPLC-ESI(+)-MS de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117.....                                                | 34 |
| <b>Tabela 4:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. ....                                                                           | 44 |
| <b>Tabela 5:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.....                                                                          | 49 |
| <b>Tabela 6:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado <i>F. hepática</i> CC102, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. ....                                                                              | 53 |
| <b>Tabela 7:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.....                                                                             | 57 |
| <b>Tabela 8:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. ....                                                                            | 62 |
| <b>Tabela 9:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>S. commune</i> FPB117, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. ....                                                                           | 70 |
| <b>Tabela 10:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>P. pulmonarius</i> EF88, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.....                                                                         | 74 |
| <b>Tabela 11:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>F. hepática</i> CC102, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. ....                                                                          | 78 |
| <b>Tabela 12:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>P. lecomtei</i> CC40, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.....                                                                            | 82 |
| <b>Tabela 13:</b> Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de <i>G. lucidum</i> CC351, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS. ....                                                                           | 86 |
| <b>Tabela 14:</b> Nucleosídeos e nucleotídeos presentes em TCA-fermentados de macrofungos <i>S. commune</i> FPB117, <i>P. pulmonarius</i> EF88, <i>G. lucidum</i> CC351, <i>F. hepática</i> CC102 e <i>P. lecomtei</i> CC40..... | 89 |
| <b>Tabela 15:</b> Aminoácidos presentes em TCA-fermentado dos macrofungos <i>S. commune</i> FPB117, <i>P. pulmonarius</i> EF88, <i>G. lucidum</i> CC351, <i>F. hepática</i> CC102 e <i>P. lecomtei</i> CC40. ....                | 90 |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 16:</b> Apêndice A: Metabólitos identificados em extrato etanólico do TCA-Controle, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS..... | 109 |
| <b>Tabela 17:</b> Apêndice B: Metabólitos identificados em extrato etanólico do TCA-Controle, analisadas por UHPLC(-)-ESI-MS/MS..... | 110 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

µL – Microlitros

AF - ácido fórmico

CC 102 - *Fistulina hepática*

CC 351 - *Ganoderma lucidum*

CC 40 - *Pannus sp*

ChEBI - Entidades Químicas de Interesse Biológico (do inglês *Chemical Entities of Biological Interest*).

Da – Dalton

EF88 - *Pleurotus pulmonarius*

ESI - Ionização por *Electrospray* (do inglês, *Electrospray ionization*)

FE - Fase Estacionária

FM - Fase Móvel

FES - Fermentação em Estado Sólido

FPB117 - *Schizophyllum commune*

GC - Cromatografia Gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*)

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*)

KEGG- Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

LC - Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*)

LPB - Laboratório de Processos Bioquímicos

*m/z* - Razão massa/carga

mg – Miligramas

mL – Mililitros

MS - Espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry*).

NMR - espectroscopia de ressonância magnética nuclear (do inglês *nuclear magnetic resonance*)

PCA - Análise de Componente Principal (do inglês, *Principal Component Analysis*)

rT - Tempo de Retenção (do inglês, *Retention Time*)

SMS – Biomassa pós-cultivo de cogumelos (do inglês, *Spent mushroom substrate*)

TCA - Torta de Caroco de Algodão

TOF - Tempo de Voo (do inglês, *Time of Flight*)

UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (do inglês, *Ultra High Performance Liquid Chromatography*)

UHPLC-MS - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *Ultra high Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

## RESUMO

A grande produção de resíduos agroindustriais desperta a busca por alternativas sustentáveis. Estes resíduos são grande fonte de energia e biomassa, podendo ser usado para geração de energia, biocombustíveis e químicos. O algodão é uma cultura que possui grande importância comercial. Além da produção de fibras usada na fabricação de têxtil, a semente é usada para produzir óleo (fração líquida) e torta/farelo (fração sólida). A torta/farelo de semente de algodão (TCA) possui uma quantidade significativa de proteína e carboidratos, o qual pode ser usada para nutrição animal. Entretanto, a TCA possui alguns compostos antinutricionais ou tóxicos para nutrição de animais, como o gossipol. O uso de microrganismos, entre estes, os macrofungos tem sido uma estratégia para degradar/destoxificar tais compostos químicos e assim viabilizar sua utilização na nutrição de mono ou poli-gástricos. Contudo é necessário identificar os compostos químicos bioativos produzidos pelos macrofungos, e neste caso, a metabolômica baseada na espectrometria de massas pode ser uma ferramenta aplicada para caracterizar os metabólitos fúngicos de baixo peso molecular. Dessa maneira, esse trabalho caracterizou os metabólitos presentes em torta de caroço de algodão após a fermentação estado sólido de macrofungos, utilizando metabolômica *untargeted* por cromatografia de ultra alta eficiência, acoplado a espectrometria de massas *tandem* (UHPLC-ESI-MS/MS, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*). Os dados resultantes foram submetidos a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e comparados ao banco de dados Entidades Químicas de Interesse Biológico e Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas. Os PCAs dos macrofungos *Schizophyllum commune* (FPB 117) e *Fistulina hepatica* (CC102) apresentaram alterações significativas no perfil de compostos químicos da torta de caroço de algodão (in natura) após a fermentação fungica. Nos fermentados (TCA+macrofungo) foi possível identificar compostos químicos das classes dos lipídeos, aminoácidos, oligossacarídeos, nucleosídeos e nucleotídeos. O fermentado com *Pleurotus pulmonarius* EF88 apresentou um perfil cromatográfico muito próximo ao controle, indicando o processo de cultivo microbiano nas condições testadas não apresentou crescimento significativo do macrofungo. A ferramenta de metabolômica *untargeted* aplicada neste trabalho mostrou-se eficiente para identificação e caracterização de metabólitos de processos fermentativos microbianos em biomassas vegetais. Tais informações contribuem para trabalhos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica e indústria de nutrição animal.

Palavras-chave: Basidiomicetos; Fermentação em estado sólido; Metabólitos bioativos; Insumo animal

## ABSTRACT

The large production of agro-industrial waste arouses the search for sustainable alternatives. These residues are a great source of energy and biomass, and can be used for energy generation, biofuels and chemicals. Cotton is a crop that has great commercial importance. In addition to the production of fibers used in the manufacture of textiles, the seed is used to produce oil (liquid fraction) and cake/bran (solid fraction). Cotton seed cake/bran (TCA) has a significant amount of protein and carbohydrates, which can be used for animal nutrition. However, TCA has some antinutritional or toxic compounds for animal nutrition, such as gossypol. The use of microorganisms, among them, macrofungi has been a strategy to degrade/detoxify such chemical compounds and thus facilitate their use in mono or poly-gastric nutrition. However, it is necessary to identify the bioactive chemical compounds produced by the macrofungi, and in this case, the metabolomics based on mass spectrometry can be an applied tool to characterize the low molecular weight fungal metabolites. Thus, this work characterized the metabolites present in cottonseed cake after solid state fermentation of macrofungi, using untargeted metabolomics by Ultra-High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-MS / MS). The resulting data were submitted to Principal Component Analysis (PCA) and compared to the database of Chemical Entities of Biological Interest and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. The PCAs of the macrofungi *Schizophyllum commune* (FPB 117) and *Fistulina hepatica* (CC102) showed significant changes in the profile of chemical compounds in cottonseed cake (in natura) after fungal fermentation. In the fermented (TCA + macrofungus) it was possible to identify chemical compounds of the classes of lipids, amino acids, oligosaccharides, nucleosides and nucleotides. The fermented with *Pleurotus pulmonarius* EF88 showed a chromatographic profile very close to the control, indicating the microbial cultivation process under the tested conditions did not show significant growth of the macrofungus. The untargeted metabolomics tool applied in this work proved to be efficient for the identification and characterization of metabolites from microbial fermentative processes in plant biomass. Such information contributes to studies involving the deconstruction of lignocellulosic biomass and the animal nutrition industry.

Keywords: Basidiomycetes; Solid state fermentation; Bioactive metabolites; Animal input

---

## 1. INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

Os resíduos agroindustriais são potenciais matéria-prima renováveis que estão ganhando força no setor energético e em modelos de biorrefinarias. As biomassas sólidas ou líquidas que compõe tais resíduos de processamento possuem características químicas que podem ser aplicadas a outros setores, tais como carboidratos, proteínas, lipídeos, entre outras que podem ser gerar produtos para nutrição animal, por exemplo<sup>1</sup>.

Neste cenário, encontra-se a cultura agrícola do algodão, que tem como principal produto a pluma (indústria têxtil). A semente após a retirada da pluma é o segundo produto, que processada gerará dois novos produtos, óleo e torta/farelo. Ressalta-se que em cada uma das etapas de processamento destes principais produtos (pluma e semente) são gerados resíduos de processamento desde a produção agrícola até agroindustriais de processamento de semente ou indústrias de fiação do algodão.

A agroindústria de processamento/esmagamento das sementes de algodão tem dois ativos financeiros principais, óleo bruto e torta/farelo de algodão. O óleo tem aplicações para produção de biodiesel, lubrificantes ou alimentos. A torta/farelo, classificados de acordo com sistema de esmagamento químico (farelo) ou físico (torta) tem sua principal aplicação a nutrição de ruminantes, teores de proteínas e carboidratos. A torta de caroço/semente de algodão (TCA) para aplicação na nutrição animal tem limitações, principalmente a monogátricos. Sendo a principal limitação a presença do gossipol, o qual é uma substância antinutricional e tóxica, interferindo na digestibilidade e absorção dos nutrientes. Este afeta o crescimento e ganho de peso e pode levar o animal à infertilidade<sup>2,3</sup>. A recalcitrância, principalmente em função da lignina, também limita o uso para monogátricos. Por isso, faz-se necessário o uso de pré-tratamento para viabilizar o uso de TCA em nutrição animal.

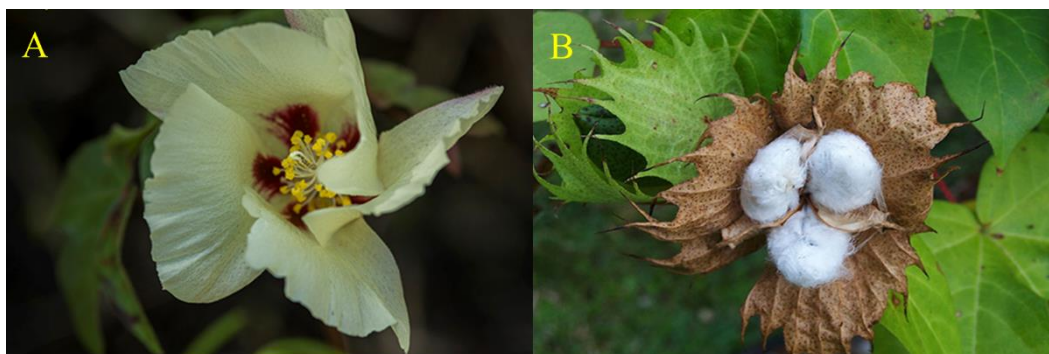
Os métodos de pré-tratamento mais utilizados são químicos e/ou físicos. Estes usam altas temperaturas, irradiação ou adição de substâncias ácidas (ácido sulfúrico ou ácido nítrico) ou básicas (hidróxido de sódio)<sup>4,5</sup>. Estes métodos possuem altos custos e podem formar subprodutos que inibem os biocatalisadores microbianos

e enzimáticos. Já os métodos de pré-tratamento biológicos, envolvendo os fungos de podridão branca (inglês, *White – rot fungi*), se destacam por degradarem os materiais lignocelulósicos e o gossipol<sup>6</sup>. Os fungos são cultivados em sistema de fermentação em estado sólido (FES) na TCA podem degradar/destoxificar além produzir diversas substâncias bioativas, enriquecendo a biomassa para formulações de dietas nutricionais do animal, podendo ainda melhorar a saúde animal, ou seja, agregando valores a TCA pré-tratada biologicamente pelos macrofungos.

Contudo, fazem-se necessários estudos mais detalhados de todos os metabólitos produzidos após a FES-TCA pelos macrofungos. Permitindo assim conhecer e caracterizar quais metabólitos presentes para poder atribuir agregação de valor da FES-TCA, isto é, prospectando compostos químicos com atividades bioativas que podem trazer benefícios para a saúde animal. Para isso, o uso de ferramentas como a metabolômica por espectrometria de massas torna-se uma excelente opção para este tipo de abordagem.

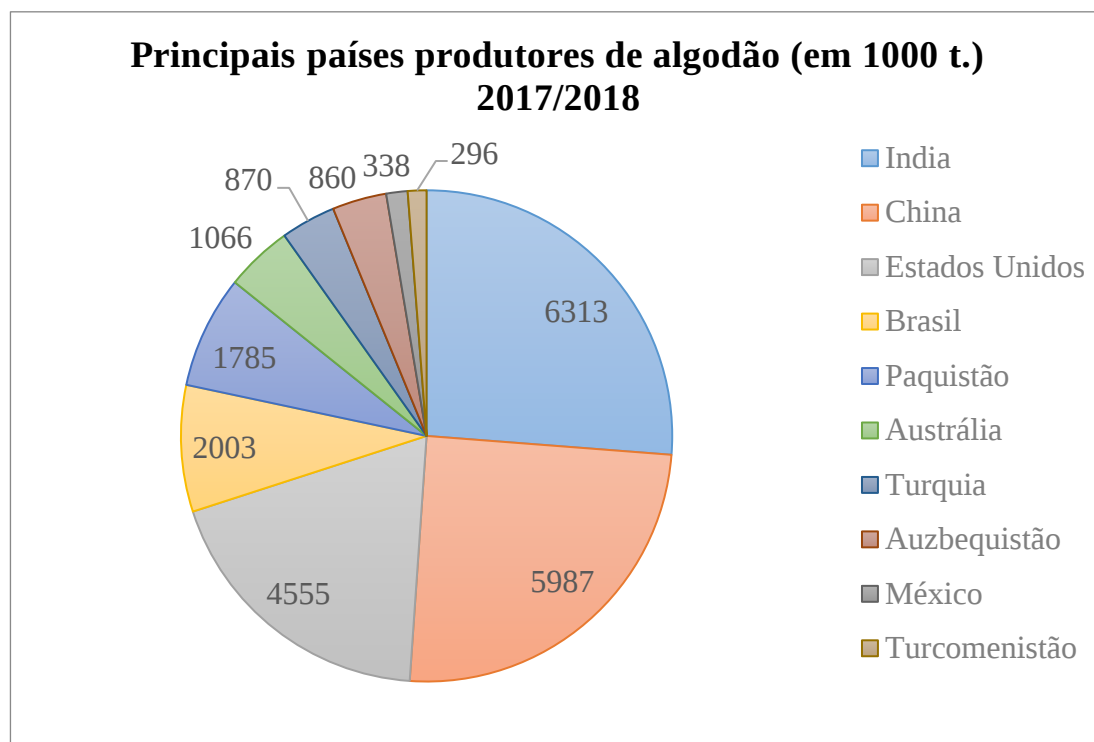
### 1.1. Importância socioeconômica do Algodão (*Gossypium hirsutum* L)

O algodão é umas das culturas mais importantes na agricultura mundial. Pertencentes à família Malvaceae e gênero *Gossypium*, as espécies *Gossypium hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L e *G. herbaceum* L., são cultivadas para a produzirem algodão (Figura 1). A espécie *G. hirsutum* é a principal espécie cultivada que dá origem à fibra de algodão no Brasil e no mundo, alcançando 90% da produção mundial<sup>7,8</sup>.



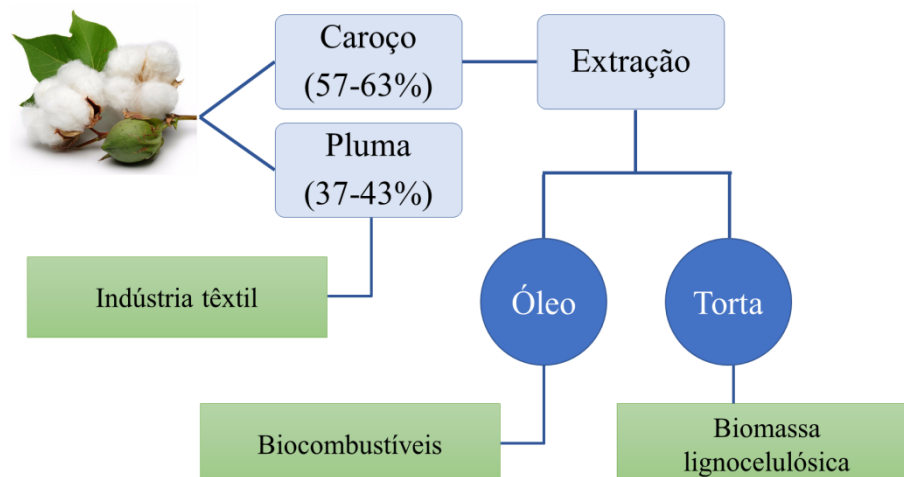
**Figura 1:** Flor (A) e fruto (B) de *Gossypium hirsutum* (fonte Wunderlin et al., 2018<sup>9</sup>).

O algodão é cultivado em inúmeros países, incluindo China, Índia, Estados Unidos e Brasil, movimentando cerca US\$ 12 bilhões por ano<sup>10</sup> (Figura 2). O Brasil ocupa a quarta posição em produção mundial, sendo as regiões Centro-Oeste e Nordeste responsáveis por 89,3% da produção total do país<sup>11</sup>.



**Figura 2:** Principais produtores mundiais de algodão. Ano de referência: 2017 a 2018<sup>11,12</sup>.

O produto colhido a partir do campo de algodão é separado em moinho de descaroçamento em fibra e caroço de algodão, de onde são obtidos de 37 a 43% de fibra e 57 a 63% de caroço<sup>13</sup> (Figura 3). A fibra é o principal produto do algodão, se caracterizando por ser uma celulose na sua forma quase pura e está presente na indústria têxtil (fiação e tecelagem), em móveis, colchões, veículo, dentre outros<sup>14</sup>. O caroço/semente de algodão é rico em óleo, cuja amêndoa possui cerca de 30-35% do seu peso, sendo importantes para a indústria alimentícia<sup>1,15</sup>. O subproduto da extração do óleo contido no caroço de algodão, TCA, possui teores significativos de proteína, de lipídeos e de carboidratos, podendo também ser aproveitado para a alimentação animal<sup>16,17</sup>.

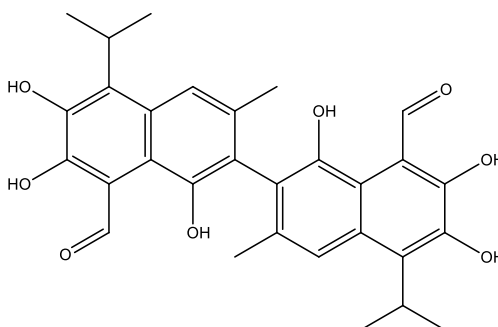


**Figura 3:** Produtos e coprodutos do beneficiamento do algodão.

A cultura do algodão é importante no setor de nutrição animal, em função do coproduto torta/farelo. Em um trabalho realizado no sul dos EUA, Poore *et al.* (2006)<sup>18</sup> suplementou a dieta de novilhas com caroço de algodão durante o período do inverno por dois anos. Ao fim do experimento, observou-se um aumento no ganho de peso individual de 100 g/animal/dia no primeiro ano e 230 g/animal/dia no segundo ano. Souza e seus colaboradores (2018)<sup>19</sup> também notaram aumento do peso corporal dos animais, do rendimento da gordura do leite e o particionamento de energia em relação às reservas corporais. Rogers *et al.*, (2002)<sup>20</sup> afirmam que a gordura presente no caroço de algodão melhora o desempenho reprodutivo nos animais, especialmente em vacas magras, o qual aumenta a circulação de triglicerídeos e colesterol auxiliando na esteroidogênese<sup>21</sup>. Para Absalan *et al.* (2011)<sup>22</sup>, uma dieta suplementada com caroço de algodão aumenta o ganho de peso médio diário e a morfologia e criptas do intestino delgado de cordeiros. Entretanto, recomenda-se que a suplementação seja limitada a 0,33% do peso corporal da novilha, ou seja, 15% da ração<sup>23,24</sup>.

Essa limitação se dá pela presença alguns fatores antinutricionais, o qual quando consumidos, reduzem o valor nutricional de TCA, podendo interferir na absorção ou digestibilidade de nutrientes e, se ingeridos em altas concentrações,

podem acarretar danos à saúde animal<sup>25</sup>. A presença de gossipol é um fator antinutricional que limita o uso de TCA em dietas de não-ruminantes (Figura 4). Esta substância torna-se uma toxina potente em se tratando da nutrição animal, formando complexos estáveis com cátions como o ferro, podendo ocasionar anemia<sup>25</sup>. O gossipol é produzido por glândulas encontradas nas raízes, partes aéreas e caroço do algodoeiro (planta), principalmente nas glândulas de óleo existentes no caroço de algodão<sup>25,26</sup>.



**Figura 4:** Fórmula estrutural do Gossipol.

## **1.2. Pré-tratamentos biológicos e melhoria nutricional em tortas de sementes oleaginosas, como TCA**

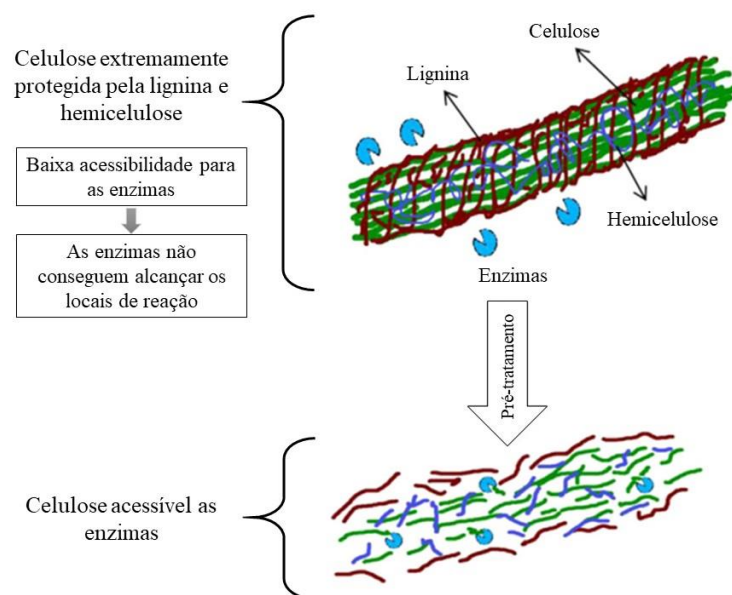
A TCA é utilizada nas formulações de dietas para na nutrição animal, principalmente poligástricos (ruminantes). Este coproduto da cadeia do algodão possui altos teores de celulose (35 a 50%), hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 20%), que também limitam a aplicação em monogástricos (aves e suínos), requerendo assim pré-tratamentos para desconstrução da parede celular vegetal – lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina) que melhorariam o seu valor nutricional<sup>1,17,27</sup>.

Nos métodos de pré-tratamento físico e químico biomassas vegetais, tais como TCA, é usada uma força mecânica, térmica ou química externa para desconstruir a estrutura compacta da lignocelulose. Entretanto, o alto custo, problemas de corrosão, altas demandas de energia e impacto no meio ambiente são

fatores negativos<sup>28-31</sup>. O pré-tratamento biológico com fungos vem se destacando devido a baixas demandas de energia, degradação seletiva da lignina e hemicelulose e menor impacto ambiental<sup>30,32,33</sup>.

Essa capacidade microbiana de desconstrução esta ancorada na versatilidade de sistemas enzimáticos exclusivos, enzimas ligninolíticas (peroxidase de lignina, peroxidase de manganês, lacases e LPMOs) e celulolíticas (celulases e xilanses, outras) presentes nos fungos. Os macrofungos (fungos de podridão branca ou marrom) são uma alternativa biologica em potencial aos métodos que envolvem produtos químicos potencialmente tóxicos e equipamentos caros<sup>33-35</sup>.

Os macrofungos (fungos de podridão branca ou WRF) degradam tem mais seletivamente a lignina, especialmente durante a fase inicial da colonização<sup>36</sup>. A lignina é degradada enzimaticamente para atingir os polissacarídeos – celululose e hemicelulose (Figura 5).<sup>31,37</sup>.



**Figura 5:** Representação esquemática da ação do pré-tratamento na desconstrução da biomassa lignocelulósica (adaptado de Shirkavand *et al.* (2016)<sup>31</sup>).

Na natureza, é possível encontrar cerca de 150.000 espécies de macrofungos formadores de cogumelos (corpos de frutificação), que se dividem podem ser classificados em espécies de cogumelos comestíveis ou não-comestíveis e/ou tóxicos, quando observado do interesse nutricional humano<sup>38-41</sup>. Muitos cogumelos

são utilizados para fins culinários incluindo *Lentinula edodes* (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Hiratake ou Shimeji-Brasil), *Flammulina velutipes* (enoki) e *Agaricus bisporus* (champignon de Paris); e, para fins medicinais como o *Ganoderma lucidum* (Reishi) e *Agaricus blazei* (cogumelo do Piedade)<sup>42,43</sup>. Os cogumelos comestíveis e comerciais possuem alto valor nutricional e funcional com propriedades medicinais e terapêuticas, alguns dos quais também são de importância econômica<sup>44-47</sup>.

Pesquisadores da Embrapa Agroenergia (DF) identificaram espécies de macrofungos capazes de crescer em substratos a base TCA (fonte nutritiva). Enquanto crescem, eliminam ou reduzem as substâncias tóxicas desses materiais, tais como gossipol, tornando assim a TCA-fermentada em condições de uso na nutrição animal – destoxificada. Em 35 espécies testadas de macrofungos cinco mostraram-se eficazes quanto ao crescimento microbiano e capacidade de reduzir em 99% do gossipol. O TCA-fermentado de macrofungos apresentou também potencial para gerar metabólitos microbianos com atividades bioativas<sup>48</sup>.

Os fungos *Schizophyllum commune*, *Pleurotus pulmonarius*, *Fistulina hepatica*, *Panus lecomtei* e *Ganoderma lucidum* estão se destacando nos trabalhos usando TCA como substrato de cultivo por fermentação estado sólido<sup>48,49</sup>. Espécies do gênero *Ganoderma* foram cultivadas em seis tipos biomassas lignocelulósicas agroindústrias, tais como palha de milho, bagaço de cana e caule de algodão. O algodão demonstrou ser o melhor substrato para crescimento micelial<sup>50</sup>. Já a espécie *G. lucidum* secretou várias isozimas de lacase sob diversas condições de crescimento. As isozimas da lacase apresentam um papel antioxidante, sendo capazes de eliminar os radicais livres durante a calogênese<sup>51</sup>. Alterações na composição química de caules de algodoeiro foram estudadas após o uso como substrato para o cultivo em fase sólida de fungos do gênero *Panus*, onde se mostrou eficiente no consumo de celulose, degradando os resíduos de algodoeiro<sup>52</sup>.

*Schizophyllum commune* é um macrofungo que possui eficiente sistema enzimático celulolítico capaz de crescer em madeiras em decomposição. Este fungo hidrolisou várias biomassas agrícolas com a conversão máxima de celulose em glicose de 98,0%<sup>53</sup>. Espécies do gênero *Pleurotus* possui alto crescimento em caroço de algodão, viabilizando o seu cultivo neste resíduo, favorecendo a economia da fungicultura de cogumelos comestíveis, por exemplo<sup>54</sup>. A TCA-fermentada

apresentou alto teor de proteínas e redução do teor de ligno-celulose, tornando-se um possível alimento para ruminantes<sup>55</sup>.

Diante do exposto, os resíduos ou coprodutos de algodão, como a TCA, demonstram ser excelentes fonte de carbono para o cultivo de macrofungos<sup>56</sup>. A TCA-fermentada por macrofungos pode ser aproveitada composição nutricional de dietas para animais e o corpo frutífero (cogumelos) na alimentação humana, além de ser fonte de metabólitos bioativos.

### **1.3. Macrofungos como agentes biológicos no pré-tratamento de compostos antinutricionais-tóxicos e fontes de compostos bioativos**

Os macrofungos utilizando as macromoléculas da madeira como fonte nutricional, inclusive a lignina-polímero estrutural das plantas <sup>57-59</sup>. Os sistemas enzimáticos dos fungos catalisam e metabolizam não apenas a lignina, mas também hidrocarbonetos policíclicos, compostos fenólicos, petróleo, metal pesado e corante sintético e têxtil (Tabela 1), sendo conhecido como agentes biológicos bioremediadores.

**Tabela 1:** Classes de compostos químicos degradados por macrofungos ou fungos de podridão branca – agentes biológicos biorremediadores (adaptado de Phan *et al.*, 2012<sup>59</sup>).

| Classe de compostos                     | Fungos                                                                                                        | Referência |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos | <i>Agaricus bisporus</i><br><i>Pleurotus eryngii</i><br><i>Pleurotus ostreatus</i><br><i>Coprinus comatus</i> | 60         |
|                                         | <i>Pleurotus pulmonarius</i>                                                                                  | 61         |
|                                         | <i>Pleurotus ostreatus</i>                                                                                    | 62,63      |
| Compostos fenólicos                     | <i>Agaricus bisporus</i>                                                                                      | 64         |
| Petróleo                                | <i>Pleurotus pulmonarius</i>                                                                                  | 65         |
| Metal pesado                            | <i>Lentinula edodes</i>                                                                                       | 66         |
| Corante sintético e têxtil              | <i>Pleurotus sajor-caju</i>                                                                                   | 67,68      |
|                                         | <i>Pycnoporus sanguineus</i>                                                                                  | 69         |
|                                         | <i>Lentinus polychrous</i>                                                                                    | 70         |
|                                         | <i>Pleurotus ostreatus</i>                                                                                    | 71,72      |
|                                         | <i>Cyathus bulleri</i>                                                                                        | 73         |
|                                         | <i>Ganoderma sp.</i>                                                                                          | 74         |
| Compostos clorados                      | <i>Pleurotus ostreatus</i>                                                                                    | 75         |
| Pesticidas                              | <i>Pleurotus pulmonarius</i>                                                                                  | 76         |
|                                         | <i>Agaricus bisporus</i>                                                                                      | 77         |

As principais enzimas do sistema de degradação da lignina são extracelulares, permitindo a oxidação do substrato de baixa solubilidade<sup>57</sup>. Adicionalmente, estes macrofungos possuem a capacidade de tolerarem uma concentração maior de poluentes tóxicos<sup>57</sup>.

Além de serem agentes biorremediadores ambientais, os macrofungos, tem a capacidade da destoxificação compostos químicos presentes em biomassas lignocelulósicas agroindústrias, que podem favorecer a alimentação de ruminantes.

Estes microrganismos produzem metabólitos que podem ser moléculas bioativas, agregando valor à biomassa-fermentada com possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica, agroquímica e alimentícia. Eles degradam moléculas de alto peso molecular (carboidratos, proteínas, lipídeos, lignina, entre outros) e as convertem em aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos<sup>78</sup>.

Os macrofungos, na sua maioria basidiomicetos, tem sido fontes importantes de novos metabólitos biologicamente ativos com propriedades antibióticas ou farmacológicas. Onde, pressupõe-se que mais de 40% dos fungos filamentosos produzem antibióticos sob condições naturais de crescimento<sup>79,80</sup>.

As primeiras investigações de metabólitos bioativos microbianos originaram com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1929, onde foi observado que o fungo *Penicillium notatum* matou as culturas da bactéria *Staphylococcus aureus*<sup>81</sup>. A lovastatina foi identificada nos fungos *Aspergillus terreus*<sup>82</sup> e *Penicillium citrinum*<sup>83</sup>; e, o composto compactina no fungo *Penicillium citrinum*<sup>84</sup>.

Os metabólitos ativos do gênero *Ganoderma*, são constantemente explorados devidos os efeitos farmacológicos na proteção antitumoral, hepática e no aumento da imunidade, especialmente na neuroproteção<sup>85</sup>. Este gênero também tem sido utilizado no tratamento de doença de Alzheimer, doença cerebrovascular e doença de Parkinson.

Os macrofungos-basidiomicetos são produtores prolíficos de terpenóides, policetídeos, derivados de ácidos graxos e derivados de aminoácidos<sup>86</sup>. Os terpenóides possuem atividades antibiótica, citotóxica, antifúngica e antibacteriana. Eles também atuam contra o *Plasmodium falciparum* (parasita da malária) e contra linhagens celulares de câncer<sup>87-89</sup>. Os policetídeos e derivados de ácidos graxos podem exibir atividade antibiótica e citotóxica e induz diferenciação morfológica e fisiológica de células tumorais em concentrações nanomolares<sup>86,90</sup>. Os compostos derivados de aminoácidos e dos peptídeos não-ribossômico podem apresentar atividade inibitória contra peroxidação lipídica. O ácido telefórico, por exemplo, um pigmento característico de muitas *Thelephoraceae*, é considerado antitumoral e agente antialérgico<sup>91,92</sup>.

Da mesma forma, muitos compostos fúngicos também são utilizados como imunossuppressores (ciclosporina e ácido micofenólico), vasoconstritores (ergometrina)<sup>79</sup>, alucinógenos<sup>86,93</sup> e pigmentos<sup>86,94</sup>. Essas propriedades são importantes para as indústrias biotecnológicas (especialmente farmacêutica, cosmética e indústrias de alimentos) que podem comercializar o derivado diretamente das moléculas de fungos.

Entretanto, a elucidação estrutural de metabólitos secundários fúngicos desconhecidos é difícil, pois muitos desses compostos químicos naturais são sintetizados em pequenas quantidades e em matrizes muito complexas. Cada metabólito secundário é secretado em condições ambientais específicas, resultando na produção de apenas uma pequena proporção do total de compostos em condições normais de crescimento laboratorial<sup>95</sup>.

#### **1.4. Metabolômica de fungos**

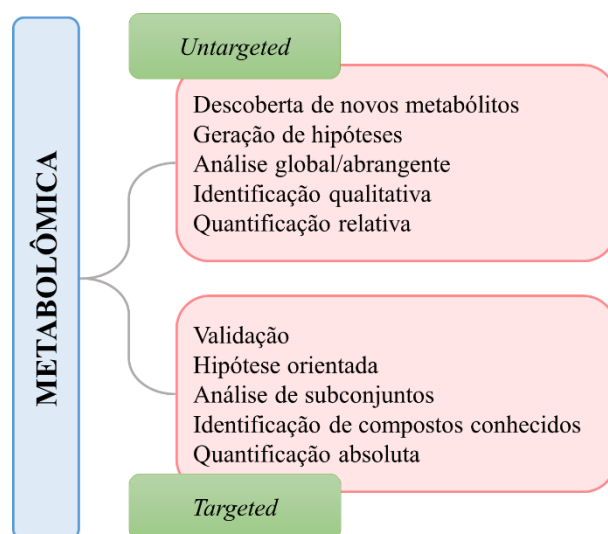
Os metabólitos primários estão envolvidos no crescimento, manutenção ou reprodução normal de organismos, como os aminoácidos, lipídeos e carboidratos. Os metabólitos secundários são pequenas moléculas (<1000 Da) que refletem o estado celular dos sistemas biológicos e modificações genéticas e/ou ambientais<sup>96,97</sup>. Tais metabólitos são, em sua maioria, compostos bioativos envolvidos na sinalização, comunicação e defesa química dos organismos. Destacam-se os alcaloides, terpenos, policetídeos e ácidos orgânicos que são metabólitos secundários bioativos<sup>98,99</sup>.

Entretanto, a identificação desses metabólitos continua sendo o aspecto mais desafiador<sup>100</sup>. O metabolismo fúngico, por exemplo, é complexo com enorme diversidade química, necessitando de estudos detalhados e criteriosos<sup>101,102</sup>.

A abordagem metabolômica é uma ferramenta eficiente que investiga, de maneira global e imparcial, metabólitos em um sistema biológico, identificando e quantificando as moléculas envolvidas em rotas metabólicas<sup>103-106</sup>. Os experimentos metabolômicos oferecem uma rota acelerada e melhorada para a descoberta de medicamentos derivados de produtos naturais e seus efeitos biológicos<sup>100,107,108</sup>.

Além disso, a metabolômica permite decifrar redes metabólicas<sup>109</sup>, interações ambiente-gene<sup>110</sup> e identificação de biomarcadores<sup>111,112</sup>.

A metabolômica possui duas principais abordagens: análise direcionada (*targeted*) e análise não direcionada (*untargeted*) (Figura 6). A metabolômica *targeted* é restrita à identificação e quantificação de um ou alguns metabólitos específicos de uma via metabólica conhecida<sup>113-116</sup>. Já a metabolômica *untargeted* é usada para detectar e identificar todos, ou quase todos, os metabólitos conhecidos e desconhecidos em uma amostra<sup>114,117</sup>. Estes dados podem ser usados para a quantificação relativa e para informar alterações metabólicas que podem ser estudadas com a abordagem *targeted*<sup>118</sup>.



**Figura 6:** Comparação entre estudos metabolômicos *untargeted* e *targeted* (adaptado de Schrimpe-Rutledge *et al.*, 2016)<sup>118</sup>.

Os avanços na metabolômica só foram possíveis devido ao desenvolvimento de ferramentas analíticas avançadas, onde as plataformas são reprodutíveis e sensíveis. Estas permitem a análise de moléculas em baixas concentrações e em misturas complexas, como em extratos fúngicos<sup>119</sup>.

### 1.4.1. Técnicas analíticas avançadas para análise metabolômica

As estratégias metabolômicas dependem de duas ferramentas analíticas cujo objetivo é realizar uma análise química abrangente do sistema biológico em estudo: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance*) e espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*). A NMR e MS levaram à caracterização de muitos novos compostos químicos fúngicos, por exemplo.

A NMR é uma análise de alta eficiência, reprodução e rapidez. É uma ferramenta de análise não destrutiva, de modo que as amostras podem ser recuperadas para pesquisas subsequentes<sup>120</sup>. No entanto, a NMR possui menor sensibilidade quando comparada a MS e a análise dos espectros de misturas complexas são mais difíceis<sup>121,122</sup>.

A abordagem MS é importante para a análise química abrangente (quali e quantitativa) e simultânea de todos (ou quase todos) os metabólitos em um sistema celular, oferecendo ótima seletividade e sensibilidade<sup>113</sup>. É uma análise baseada na relação massa/carga ( $m/z$ ) e possibilita a elucidação estrutural por padrões de fragmentação, garantindo um *screening* com alta rapidez e especificidade<sup>123</sup>.

A separação cromatográfica acoplada ao MS oferece grandes vantagens, dentre elas a redução do efeito da matriz, supressão iônica e a separação dos isômeros<sup>124</sup>. Dois métodos de separação são comumente utilizados: cromatografia gasosa (do inglês, *Gas Chromatography* - GC) e cromatografia líquida (do inglês, *Liquid Chromatography* - LC).

A GC-MS é comumente utilizada no estudo metabolômico de metabólitos primários voláteis e semi-voláteis<sup>100,125</sup>. Possui alta capacidade de detecção, estabilidade, alta reprodutibilidade do tempo de retenção e dos espectros de massa e amplas bibliotecas de compostos<sup>125,126</sup>. Contudo, as amostras precisam ser aquecidas e os picos se sobrepõem no cromatograma bruto, dificultando a identificação<sup>120,127,128</sup>.

A cromatografia líquida (LC-MS) é comumente usada para a análise de metabólitos secundários<sup>116,129</sup>. Ela é capaz de medir uma ampla faixa de diferentes

metabólitos em baixa concentração, devido à alta sensibilidade e seletividade do equipamento<sup>130,131</sup>. A maioria das análises não requer derivatização<sup>120</sup>. No entanto, as amostras são destruídas durante a análise e a matriz pode causar supressão dos íons<sup>132</sup>.

O resumo das vantagens e desvantagens das principais ferramentas analíticas utilizadas em metabolômica pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Principais vantagens e desvantagens de ferramentas analíticas utilizadas em análises metabolômicas (adaptado de Razzaq *et al.*, 2019)<sup>132</sup>.

| Ferramentas analítica | Vantagens                                                                                                                                         | Desvantagens                                                                                                          | Propriedades                                                                                        |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NMR                   | Altamente reprodutível<br>Quantificação precisa<br>Análise robusta<br>Facilidade de preparação da amostra;<br>Não é necessário etapa de separação | Alto custo do instrumento<br>Baixa sensibilidade<br>Grande volume de amostra<br>Análise espectral demorada e complexa | Faixa de massa:<br>< ~50 kDa;<br>Sensibilidade:<br>Baixa ( $10^{-6}$ M)                             |
| LC-MS                 | Alta sensibilidade<br>Boa seletividade<br>Pouco volume de amostra<br>Não é necessário derivatizar<br>Abrange uma variedade de amostras            | Destrutivo;<br>Quantificação reduzida;<br>Supressão de íons;<br>Preparação de amostra trabalhosa                      | Faixa de massa:<br>< 1500 Da;<br>Precisão:<br>50-100 ppm;<br>Sensibilidade:<br>Alta ( $10^{-15}$ M) |

|       |                                                                                                                                                |                                                                                                          |                                                                                                                                  |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GC-MS | <p>Precisão</p> <p>Alto poder de resolução</p> <p>Adequado para análise de compostos voláteis</p> <p>Boa sensibilidade</p> <p>Reprodutível</p> | <p>Necessário derivatização</p> <p>Análise destrutiva;</p> <p>Inadequado para compostos não voláteis</p> | <p>Faixa de massa:<br/>&lt;350 Da;</p> <p>Precisão:<br/>&lt;50 ppm;</p> <p>Sensibilidade:<br/>Alta (<math>10^{-12}</math> M)</p> |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Entretanto estes equipamentos geram muitos dados complexos, necessitando-a de processamento de dados. A quimiometria é uma ferramenta importante para organizar e facilitar o entendimento dos processos que ocorrem quando uma grande quantidade de dados é gerada. Esta organização é feita através da representação visual da informação, facilitando o estudo de uma grande quantidade de réplicas. Antes das análises multivariadas, é necessário um pré-processamento dos dados. Nesta etapa é gerada uma tabela, com as variáveis de interesse (como tempo de retenção, intensidade das massas e  $m/z$ )<sup>123</sup>.

Dentre as ferramentas quimiométricas, tem-se a análise de componentes principais (PCA) que apresenta um modelo de separação não-supervisionado, onde os grupos são projetados no espaço devido a diferença de intensidade das variáveis. Este modelo também apresenta a projeção das variáveis responsáveis por tal separação e o nível de importância nessa separação de grupos<sup>133</sup>. Assim o PCA se mostra útil na avaliação de duas classes (como fermentado com fungo e não fermentado utilizado neste estudo).

Nesse contexto, as abordagens metabolômicas podem auxiliar na compreensão de processos biotecnológicos, no sentido de otimizá-los ou na prospecção de novos compostos químicos de interesse industrial. Assim, neste trabalho visando-se prospectar metabólitos secundários dos TCA-fermentados por macrofungos optou-se em usar LC-MS como ferramenta analítica.

---

## **OBJETIVOS**

## 2. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo prospectar os metabólitos secundários presentes em torta de caroço de algodão fermentada por macrofungos utilizando metabolômica *untargeted* por cromatografia de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas tandem (UHPLC-ESI-MS/MS, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*).

### 2.1. Objetivos específicos

Quatro objetivos específicos delinearão este trabalho:

- Otimizar um protocolo para análise metabolômica de TCA fermentada por macrofungos utilizando UHPLC-ESI-MS/MS.
- Avaliar os metabólitos produzidos por cinco espécies de macrofungos: *Schizophyllum commune* FPB117, *Pleurotus pulmonarius* EF88, *Fistulina hepatica* CC102, *Panus lecomtei* CC40 e *Ganoderma lucidum* CC351 cultivados em TCA.
- Processar os dados obtidos utilizando análises quimiométricas.
- Identificar os compostos químicos majoritários produzidos por macrofungos após a fermentação de TCA utilizando estratégia metabolômica *untargeted*.

---

## **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### 3. Procedimento experimental

#### 3.1. Reagentes e soluções

Os solventes etanol e acetonitrila foram adquiridos da Bio-Grade (San Francisco) com pureza  $\geq 99\%$  e grau LC-MS. O ácido fórmico foi adquirido da Merck KGeA (Germania) com pureza de 98-100% e grau LC-MS.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (18,2 M $\Omega$ ) obtidas através do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

#### 3.2. Material biológico

Os macrofungos utilizados neste trabalho fazem parte da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Biorrefinaria da Embrapa Agrogenia (CMMABio), Brasília, Distrito Federal. Os macrofungos *Schizophylum commune* FPB117, *Pleurotus pulmonarius* EF88, *Fistulina hepatica* CC102, *Panus lecomtei* CC40 e *Ganoderma lucidium* CC351 foram escolhidos para esse estudo por se destacarem em trabalhos anteriores realizados na Embrapa Agroenergia (Brasília DF) utilizando biomassas vegetais agroindustriais como fonte de nutrição para cultivo fermentação estado sólido<sup>134-136</sup>.

Os macrofungos foram cultivados em sistema de fermentação em estado sólido (FES) em torta de caroço de algodão (TCA), fornecida pela empresa Farmotec, localizada em Buritis – MG. O preparo do material biológico foi realizado no laboratório de processos bioquímicos (LPB) da Embrapa Agroenergia pelo grupo de pesquisa coordenado pela pesquisadora Dr. Simone Mendça, tendo a colaboração de Msc. Marina Borges. O cultivo foi feito utilizando 30 g (massa seca) TCA com 65% de umidade. Os frascos (tipo *erlenmeyers*) com o TCA foi autoclavado por 15 minutos a 121°C. Após o resfriamento os frascos contendo os TCA foram inoculados com os micélios dos macrofungos. Sendo inoculados quatro discos de 8 mm de diâmetro de cada fungo. Também foram preparados frascos

contendo apenas as TCA-autoclavado, sem inóculo, considerados como controles. Os frascos foram incubados em estufa incubadora de bancada (Quimis Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil) a 28°C por 15 dias. Todas as amostras foram preparadas em triplicatas biológicas.

O TCA-fermentado, ou seja, biomassa TCA mais biomassa fungica foram secos em estufa a 40°C durante 48h e triturados em moinho manual (Basic Analytical Mill, IKA®, Staufen, Alemanha). Em seguida, as amostras dos TCA-fermentados com os macrofungos foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento dos processos de extração de metabolitos e análises químicas.

### **3.3. Processo de Extração dos metabólitos secundários TCA-fermentado**

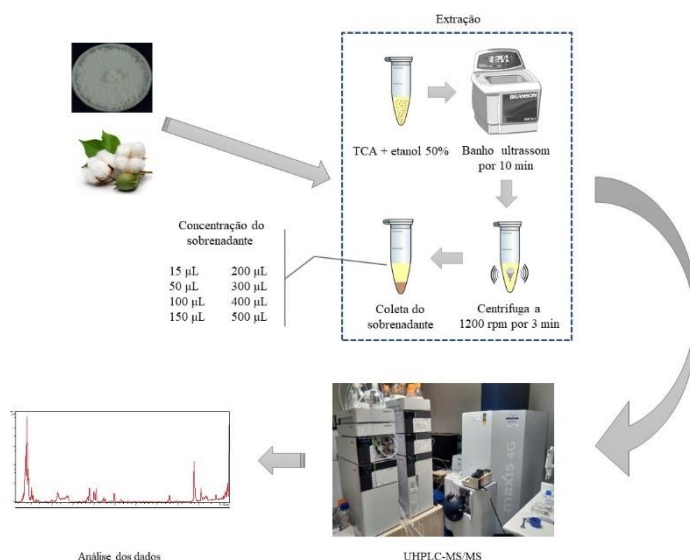
Inicialmente as amostras de TCA-fermentado foram retiradas do ultrafreezer (-80 °C) e colocadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Pesou-se aproximadamente 10 mg da TCA-fermentado e respectivo controle (previamente moída e seca) em microtubo de 2 mL. Com o auxílio de uma micropipeta, foram adicionados 1000 µL de etanol 50% diretamente no microtubo contendo a amostras. As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex (Vortex Lab Dancer Ika - Ika Best Selle) e levadas para o banho ultrassônico por 10 minutos a 30°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas em uma microcentrífuga de bancada (MiniSpin®, Eppendorf AG, Germania) por 3 minutos e 1200 rpm.

Após a extração, otimizou-se a melhor diluição, ou seja, proporção do extrato da amostra em 1000 µL de solvente. Oito diluições foram testadas em triplicata:

- 15 µL de extrato etanólico da amostra (3:200)
- 50 µL de extrato etanólico da amostra (1:20)
- 100 µL de extrato etanólico da amostra (1:10)
- 150 µL de extrato etanólico da amostra (3:20)
- 200 µL de extrato etanólico da amostra (1:5)
- 300 µL de extrato etanólico da amostra (3:10)
- 400 µL de extrato etanólico da amostra (2:5)

- 500 µL de extrato etanólico da amostra (1:2)

A Figura 7 apresenta um resumo das etapas do preparo de amostra e extração utilizada na metabolômica de fungos.



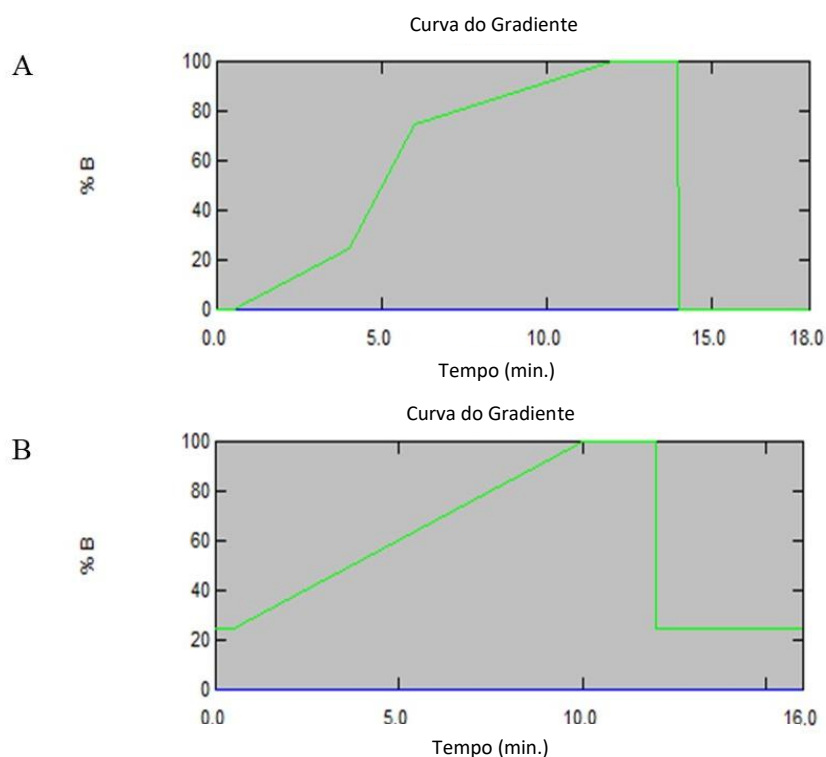
**Figura 7:** Fluxo de trabalho das etapas do preparo de amostra. As amostras de TCA-fermentado foram extraídas com etanol 50% em banho ultrassom por 10 minutos. Posteriormente foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para as análises UHPLC-ESI-MS/MS. Oito diluições do sobrenadante em 1 mL de solvente foram testadas. Os dados brutos foram tabelados e os principais íons identificados.

### 3.4. Análises dos metabolitos por UHPLC-ESI-MS/MS

Finalizado o processo de extração de metabolitos dos TCA-fermentados, as amostras foram analisadas em sistema constituído por UHPLC (Modelo Prominence LC30AD, *Shimadzu*) acoplado a um espectrômetro de massas modelo Maxis 4G (*Bruker Daltonics*, Alemanha) equipado com fonte por *electrospray* (ESI) e

analisador de massas de alta resolução tipo tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*).

Para separação dos analitos, empregou-se a cromatografia líquida em fase reversa, através do emprego da coluna Acquity UPLC HSS T3(2,1 x 100 mm x 1,8  $\mu\text{m}$ , Waters) a 35 °C. Os gradientes de eluição são apresentados na Figura 8, onde o solvente A foi ácido fórmico (AF) 0,1% em água (v/v) e o solvente B ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (v/v). Utilizou-se o fluxo de 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . As corridas cromatográficas foram de 18 minutos, sendo os 4 minutos finais para reconstituição da fase móvel para a próxima análise.



**Figura 8:** Gradientes de eluição testados para a separação dos metabólitos presentes nos extratos de TCA-fermentados pelo modo reverso, tendo como eluente A: água + ácido fórmico 0,1% e eluente B: acetonitrila + ácido fórmico 0,1%, a 30 °C. No gradiente (A) o eluente B inicia-se em 25%, com 10 minutos chega a 100% e volta na condição inicial da análise. No gradiente (B) o inicia em 0%, em 14 minutos atinge 100% e posteriormente retorna à condição inicial da análise.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo (ESI(+)-MS) e negativo (ESI(-)-MS), configurado numa voltagem do capilar de 3800 V, pressão do

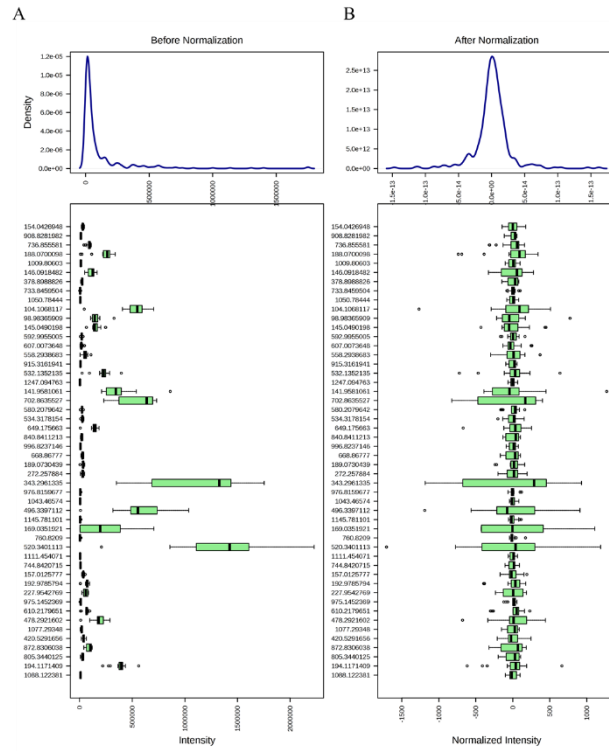
nebulizador 4,0 Bar, gás de secagem a 9,0 L/min a 200 °C, temperatura do cone 200 °C; temperatura da coluna 40 °C; taxa de aquisição de espectros 3 Hz e faixa de massas monitorada  $m/z$  80-1200 Da. O equipamento foi calibrado com cluster de formiato de sódio (1 mM, solução de NaOH 10 mM em solução isopropanol:água 1:1 (v/v) contendo 0,2% de ácido fórmico), inserido diretamente no início de cada corrida.

### 3.5. Processamento de dados dos metabolitos – TCA-fermentados

Os dados obtidos das análises dos metabolitos dos extratos de TCA-fermentados foram processados por meio dos softwares *otof Control* (Bruker), acoplado ao *HyStar* (Shimadzu). A fórmula molecular dos íons foi atribuída com o auxílio do algoritmo *SmartFormula* (*DataAnalysis* versão 4.2, Bruker Daltonics). Os metabolitos foram identificados a partir da comparação entre a fórmula molecular e a massa exata, o qual foi atribuído com o auxílio do software *Compound Crawler* (*DataAnalysis* versão 4.2, Bruker Daltonics). Este software possui interface com bancos de dados em metabolômica públicos Enciclopédia Kyoto de Genes e Genomas (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e/ou Entidades Químicas de Interesse Biológico (ChEBI, do inglês *Chemical Entities of Biological Interest*).

Os dados de  $m/z$ , tempo de retenção (rt) e intensidade foram processados e tabelados através do software XCMS Online, versão 3.7 ([xcmsonline.scripps.edu](http://xcmsonline.scripps.edu)). Uma matriz de variáveis (*bucket table*) foi elaborada, constando as intensidades dos sinais em uma janela de 0,5-10 minutos, na faixa de  $m/z$  80 a 1200. Nesta janela estavam os principais picos de interesse.

Utilizou-se o software *MetaboAnalyst*, versão 4.0 (Xia Lab, Montreal) no tratamento estatístico. Os dados não foram normalizados, entretanto, fez-se o escalonamento com escala de Pareto para corrigir variâncias de sinais não constantes. Esta escala usa a raiz quadrada do desvio padrão como o fator de escala, mantendo a estrutura dos dados parcialmente intacta<sup>137</sup>. Na Figura 9 representa a comparação de dados de TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 escalonadas com Pareto e não escalonadas.



**Figura 9:** Modelo de apresentação de dados UHPLC-ESI(+)-MS utilizando o TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 sem escalonamento e submetidas a escalonamento Pareto.

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **4. Resultados e discussão**

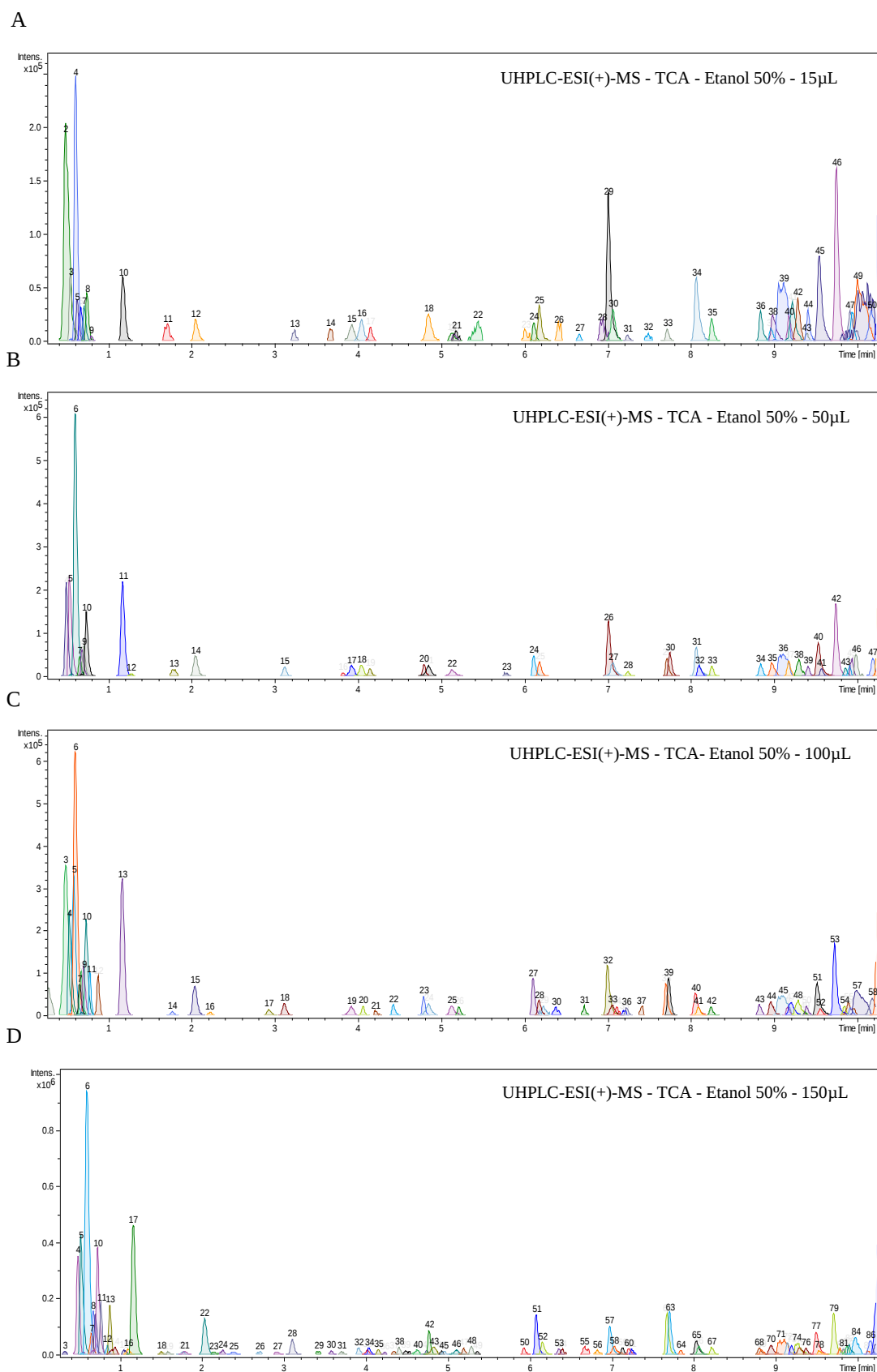
### **4.1. Otimização do protocolo experimental para análise metabolômica**

#### **4.1.1. Otimização da concentração do extrato etanólico de TCA-fermentado dos macrofungos**

As análises metabolômicas dos metabólitos secundários produzidos nos cinco TCA-fermentados dos macrofungos (FPB117, EF88, CC102, CC40 e CC351) foram realizadas utilizando os métodos por UHPLC-ESI-MS/MS descritos no item 3.4.

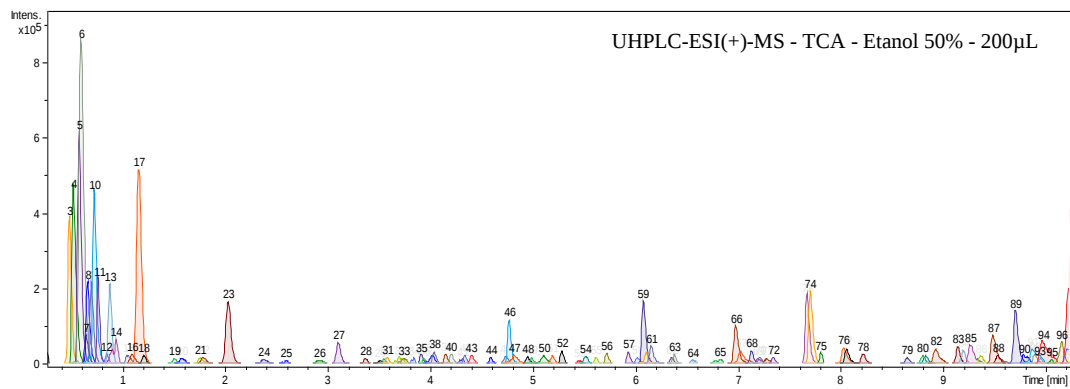
As análises preliminares dos TCA-fermentados detectaram altas concentrações nos extratos brutos sendo assim, foi necessário realizar diluições das amostras antes de injetá-las. Selecionou-se o TCA-fermentado de *S. commune* FPB117 como modelo para o desenvolvimento do protocolo experimental. Realizou-se as análises em UHPLC-ESI(+)-MS e UHPLC-ESI(-)-MS, como ambas apresentaram o mesmo comportamento, só será apresentado as análises referentes ao modo UHPLC-ESI(+)-MS.

O teste de diluição como TCA-fermentado modelo foi realizado para verificar a melhor proporção de sobrenadante coletado da amostra e solvente. No total, oito diluições foram testadas: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 referentes respectivamente a 15 µL, 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL e 500 µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente. O resultado pode ser observado na Figura 10.

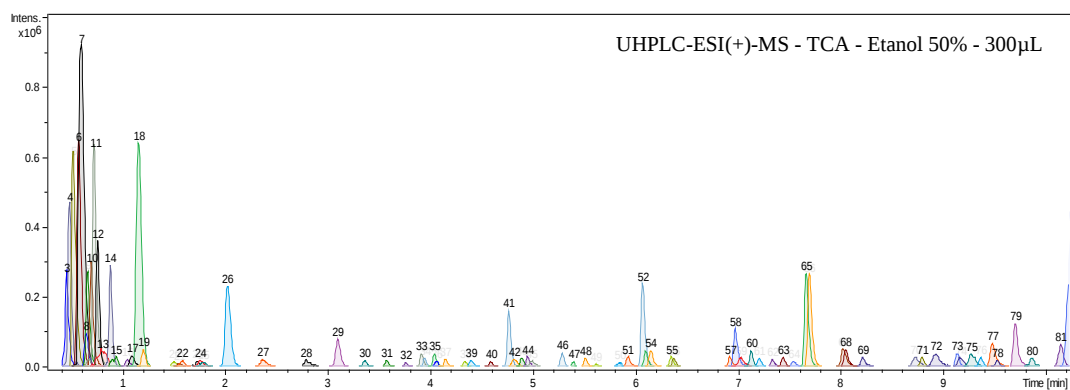


**Figura 10:** Dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras oriundas do TCA-fermentado de *S. commune* FPB117. A. Estas amostras foram submetidas à extração com etanol 50% e diluídas em A) 3:200, B) 1:20, C) 1:10, e D) 3:20 (continua).

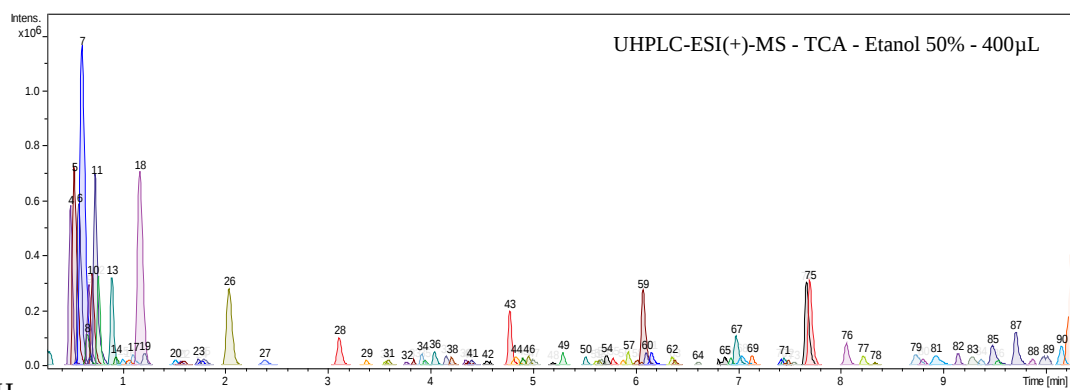
E



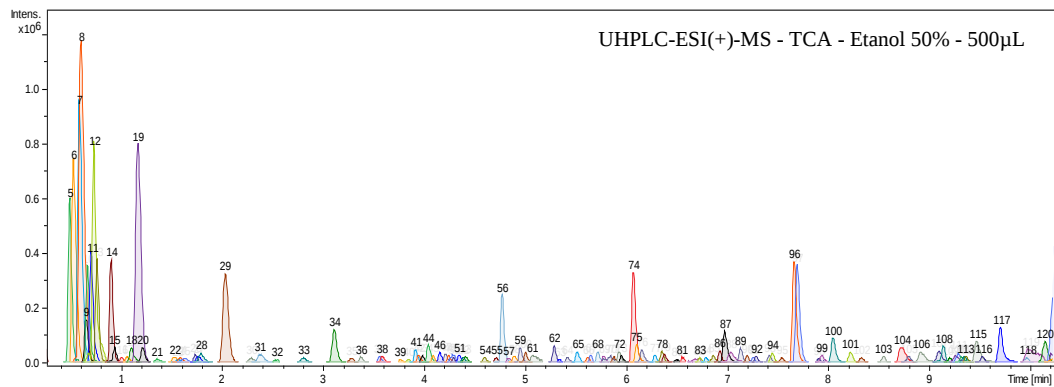
F



G



H

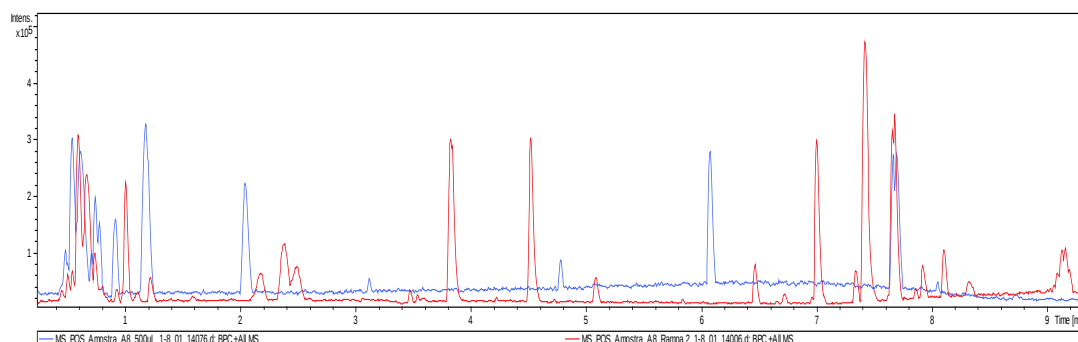


**Figura 10:** Dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras oriundas do TCA-fermentado de *S. commune* FPB117. Estas amostras foram submetidas à extração com etanol 50% e diluídas em E) 1:5, F) 3:10, G) 2:5, e H) 1:2.

Com o objetivo de obter picos com maior intensidade, a diluição de 1:5 (500 µL de extrato de SMS em 1000 µL de solvente) foi selecionada para as próximas análises. Nesta proporção obteve-se um número maior de picos, e com maior intensidade.

#### **4.1.2. Otimização da eluição da fase móvel**

Após a otimização da concentração da amostra a ser injetada, dois gradientes foram testados com o objetivo de melhorar a separação e intensidade dos picos. O primeiro gradiente, representado pela linha vermelha, inicia-se com 0% de eluente B. Aos 14 minutos, este atinge a proporção de 100% na corrida, e posteriormente volta para as condições iniciais da corrida. Já o segundo gradiente, representado pela linha azul, iniciou-se com 25% do eluente B (acetonitrila + ácido fórmico 0,1%,) e 75% do eluente A (água + ácido fórmico 0,1%). Aos 10 minutos, a porcentagem do eluente B aumenta, atingindo 100% durante a corrida e posteriormente volta as condições iniciais da análise. Os cromatogramas dessas análises podem ser observados na Figura 11.



**Figura 11:** UHPLC-ESI(+)-MS de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117, submetidas a extração com etanol 50%, diluídas na proporção de 500 µL de extrato etanólico em 1000 µL de solvente tendo como eluente A: água + ácido fórmico 0,1% e eluente B: acetonitrila + ácido fórmico 0, 0,1%, a 30°C, analisada em dois gradientes. A linha vermelha é representada pelo gradiente 1, onde o eluente B inicia em 0%, em 14 minutos atinge 100% e retorna à condição inicial. O segundo gradiente, representado pela linha azul, inicia com 25% de eluente B, com 10 minutos atinge 100% de eluente B e volta na condição inicial.

O melhor gradiente foi selecionado ao comparar a altura dos picos, o qual favorece a identificação, e melhor separação entre os picos, sem que ocorra alargamento dos picos. Na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos para os gradientes testados, onde uma média de 91 e 120 picos cromatográficos foram atribuídos aos gradientes representados pela linha azul e vermelha, respectivamente. O gradiente representado pela linha vermelha apresentou melhores resultados de altura e quantidade de picos, por isso, sendo assim selecionado para as posteriores análises.

**Tabela 3:** Quantidades de picos obtidos para os gradientes representados pelas linhas azul e vermelho em UHPLC-ESI(+)-MS de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117.

| Gradiente      | Quantidade de picos |
|----------------|---------------------|
| Linha azul     | 91 picos            |
| Linha vermelha | 120 picos           |

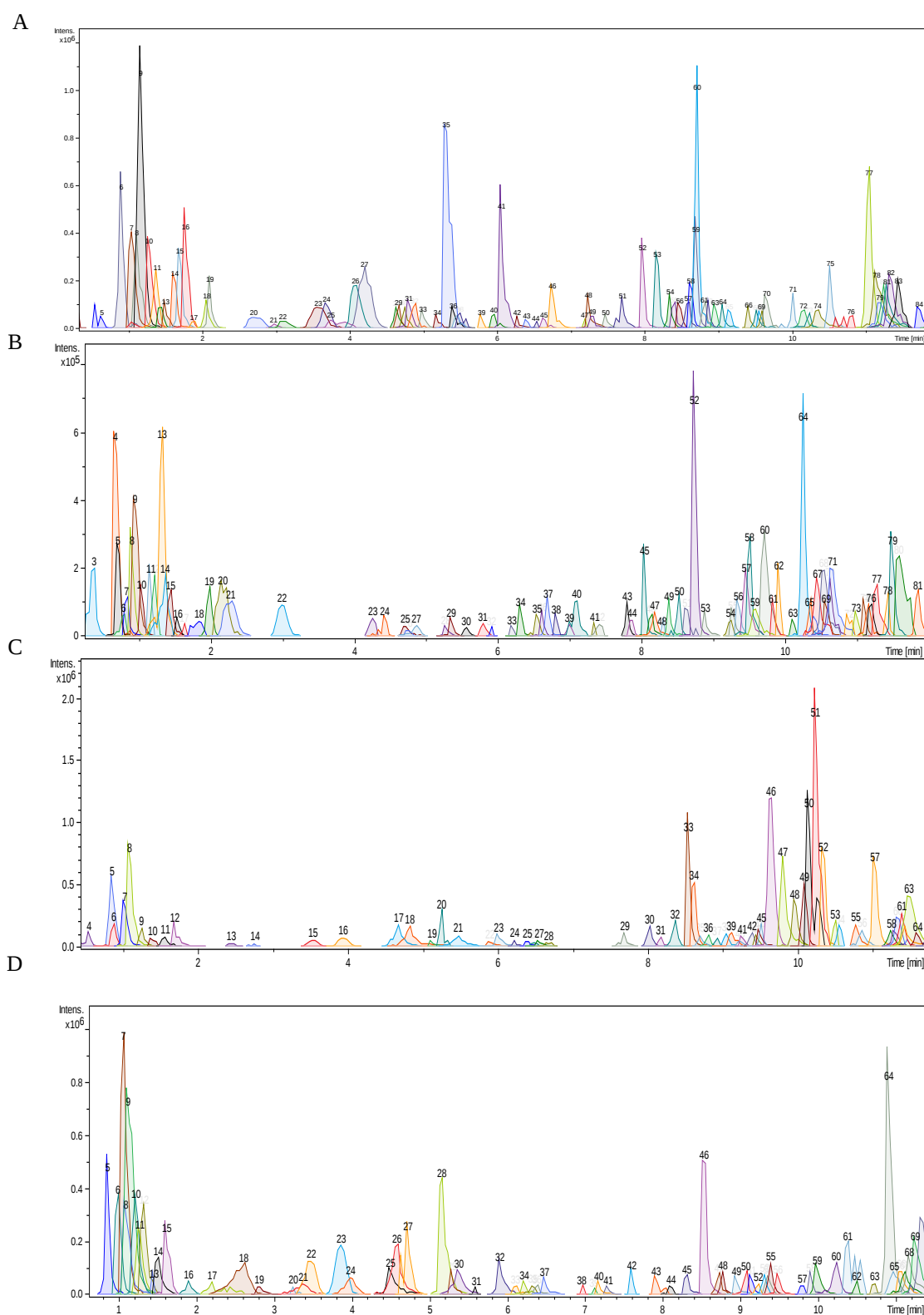
## 4.2. Análise metabolômica de TCA-fermentados dos macrofungos

Assim foi desenvolvido um método rápido e robusto, capaz de extrair muitos metabólitos em TCA-fermentado com os macrofungos avaliados. O uso do UHPLC favoreceu um menor tempo de corrida cromatográfica (11 minutos ESI(+)-MS e 8 minutos ESI(-)-MS) e melhor resolução<sup>138</sup>.

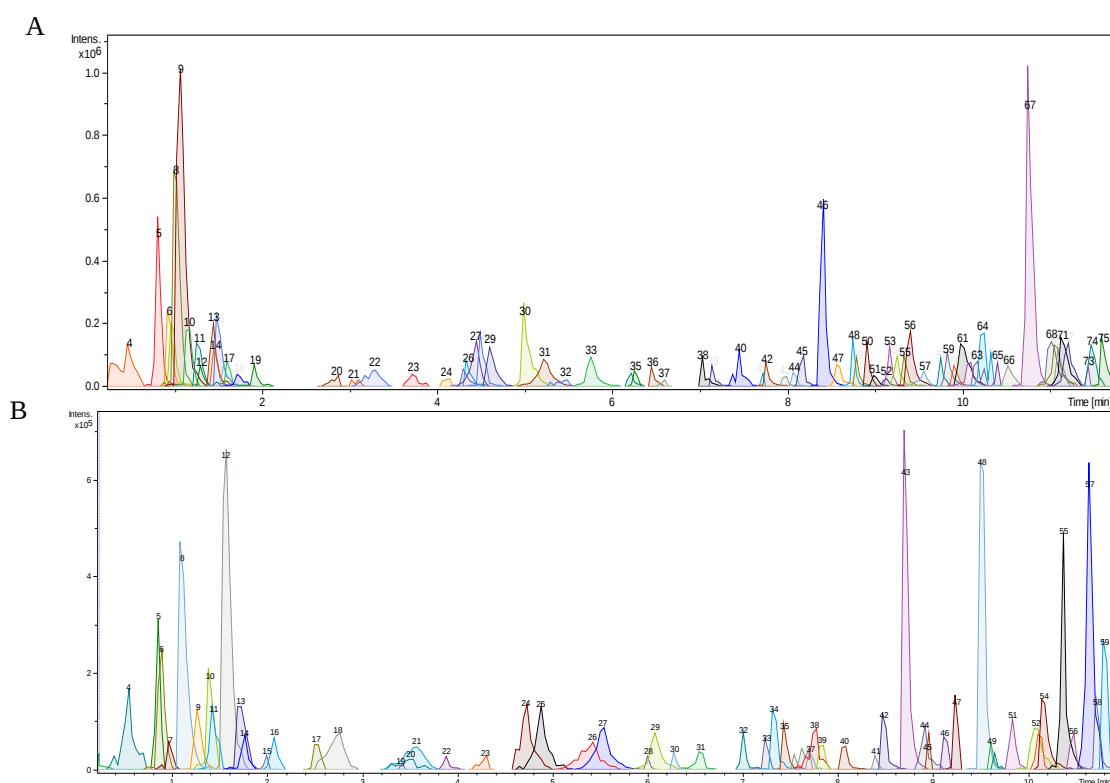
A seguir serão mostrados os resultados obtidos em UHPLC-ESI(+)-MS e posteriormente os resultados obtidos em UHPLC-ESI(-)-MS. Amostras contendo somente o TCA, sem fungo, foram utilizadas como amostras controle (TCA-controle).

### 4.2.1. UHPLC-ESI(+)-MS/MS

As amostras de TCA-fermentados dos macrofungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *F. hepática* CC102, *P. lecomtei* CC40 e *G. lucidium* CC351 geraram 54 amostras o qual foram avaliadas no UHPLC-ESI(+)-MS/MS, incluindo triplicata biológica e triplicata de extração. Os cromatogramas dos TCA-fermentados estão apresentados na Figura 12A-E. A quantidade de picos, na análise por UHPLC-ESI(+)-MS/MS, foram de 71, 62, 48, 59 e 61 para os TCA-fermentados com *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *F. hepática* CC102, *P. lecomtei* CC40 e *G. lucidium* CC351, respectivamente. O TCA-controle é mostrado na Figura 12F, o qual se atribui uma média de 51 picos.



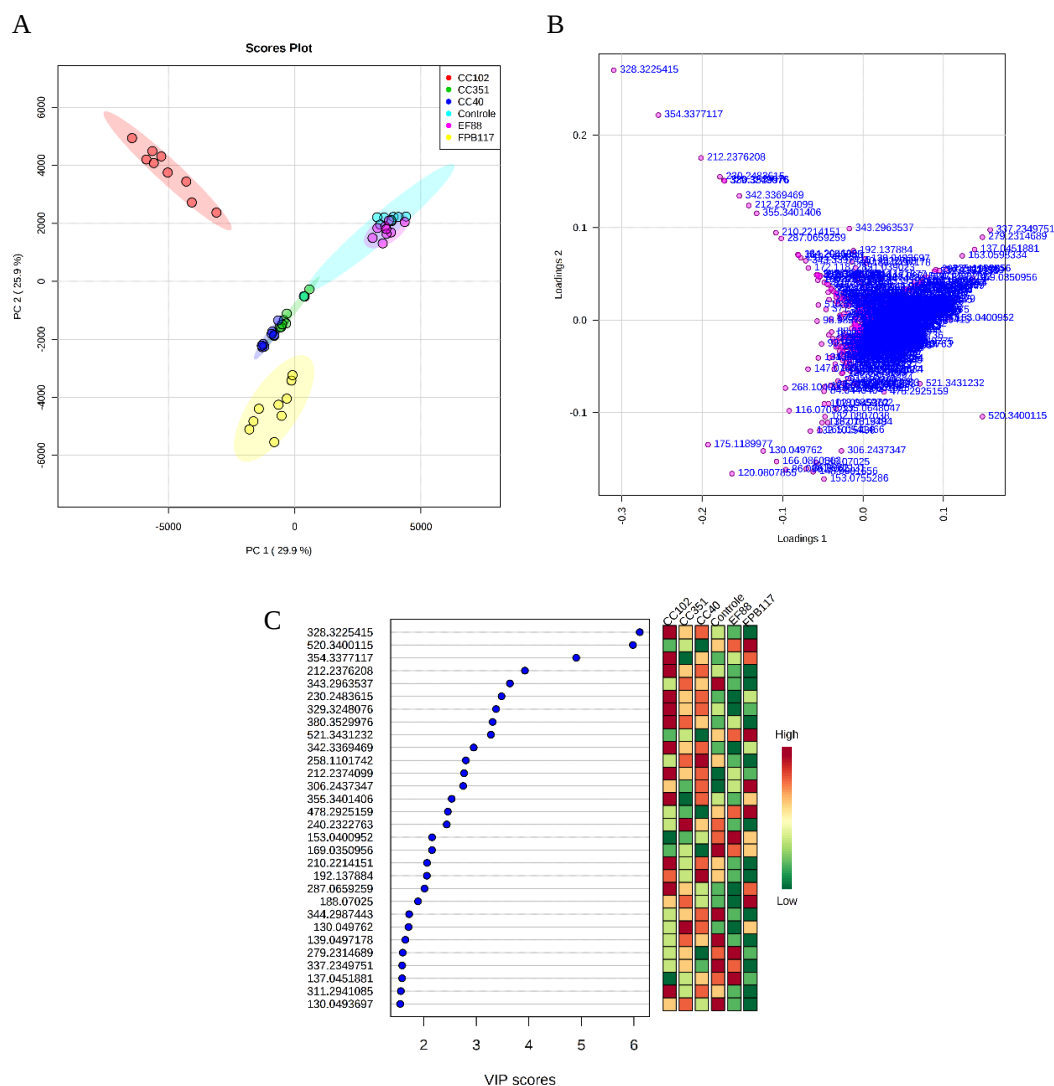
**Figura 12:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras a de TCA-fermentado dos macrofungos extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras de TCA-fermentados (A) *S. commune* FPB117, (B) *P. pulmonarius* EF88, (C) *F. hepatica* CC102 e (D) *Panus lecomtei* CC40 (continua).



**Figura 13:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras a de TCA-fermetado dos macrofungos extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras de TCA-fermentados (A) *G. lucidum* CC 351 e (B) TCA-control.

Os cromatogramas dos TCA-fermentados dos macrofungos apresentaram perfil de picos semelhantes, tornando interpretação visual das alterações metabólicas nas amostras dispendiosa devido a grande quantidade de variáveis presentes. Para investigar essas alterações, os dados espectrais de UHPLC-ESI(+)-MS foram combinados com a análise quimiométrica. A análise não-supervisionada de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizada para verificar as tendências de agrupamento de recursos pela redução da dimensionalidade.

Os recursos extraídos do pré-processamento de dados pelo XCMS Online, foram analisados pelo PCA. A partir do gráfico de pontuação do PCA, cada uma das amostras tendeu a se reunir de acordo com a similaridade com o controle (Figura 13A e 13B). Além disso, um modelo supervisionado de análise discriminante de mínimos quadrados parciais com base nas variáveis importantes na projeção (VIP, do inglês *Variable Importance in Projection*) (Figura 13C) foi usado para revelar os metabólitos responsáveis pela separação dos grupos. A identificação dos metabólitos foi examinada com base nos tempos de retenção e nos padrões de fragmentação obtidos pelo espectrômetro de massas, com referência à biblioteca dos bancos de dados KEGG e ChEBI.



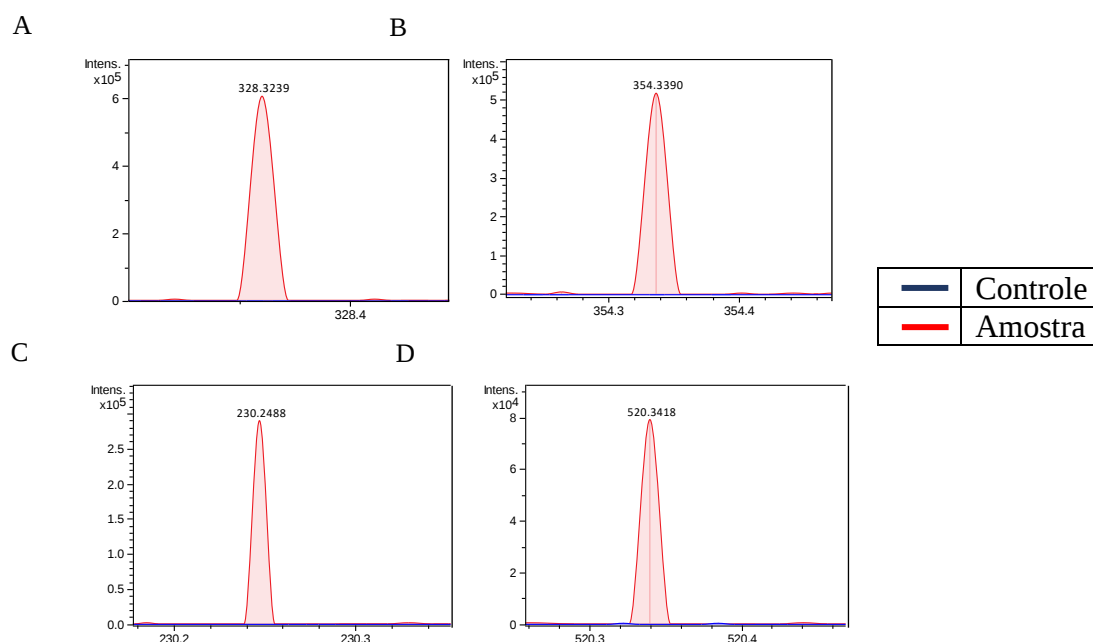
**Figura 14:** PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados nos TCA-fermentados dos macrofungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *F. hepatica* CC102, *P. lecomtei* CC40, *G. lucidum* CC351 e controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. Estes gráficos são obtidos por PCA. Já a (C) projeção dos íons com maior distinção entre as condições de extração (VIP) é obtido por PLD-DA.

As amostras do TCA-fermetado de *P. pulmonarius* EF88 se mostraram muito similares ao controle. As amostras do TCA-fermentados de *P. lecomtei* CC40 e *G. lucidum* CC351 apresentaram um perfil similar entre si, e apresentaram poucos íons distintos do TCA-controle e TCA-EF88. Já os fungos TCA-fermentados de *F. hepática* CC102 e *S. commune* FPB117 apresentaram um perfil distinto, e íons

específicos foram identificados majoritariamente em cada condição, como os íons com  $m/z$  328,3225 e  $m/z$  354,3377 presentes em TCA-CC102 e  $m/z$  520,3400 em TCA-FPB117. Tal comportamento dos macrofungos *S. commune* FPB117 e *F. hepática* CC102 sugerem que houve diferenças bioquímicas significativas entre eles e o TCA-controle nas condições de cultivo microbiano testadas.

A utilização da espectrometria de massas de alta resolução é capaz de prever a fórmula molecular dos compostos relacionando o valor  $m/z$ , massa teórica, erro (ppm) em relação a massa obtida e mSigma. Assim, foi possível prever as fórmulas moleculares dos íons mais importantes e correlacioná-las a possíveis compostos, a partir do uso de banco de dados de metabólitos (KEGG e CheBI) e padrão de fragmentação dos íons precursores. O íon precursor de interesse foi fragmentado, e os dados analisados pelo software MetFrag, uma ferramenta importante para o mapeamento dos fragmentos para os picos de massa auxiliando na elucidação estrutural. Ele faz a comparação do espectro de fragmentação obtido no experimento com o espectro de fragmentação teórica dos compostos.

Assim, alguns íons foram selecionados da análise VIP scores (Figura 9C). Os íons  $m/z$  328,3229: rt 9,5 min ( $C_{20}H_{42}NO_2$ ),  $m/z$  354,3377: rt 9,8 min ( $C_{22}H_{44}NO_2$ ) e 230,2488: rt 8,5 min ( $C_{14}H_{32}NO$ ) foram detectados majoritariamente nos TCA-fermentado de *F. hepática* CC102, enquanto que os metabólitos  $m/z$  520,3400: rt 9,4 min ( $C_{34}H_{42}N_5$ ) foi detectado nos TCA-fermentado de *S. commune* FPB117 (Figura 14).

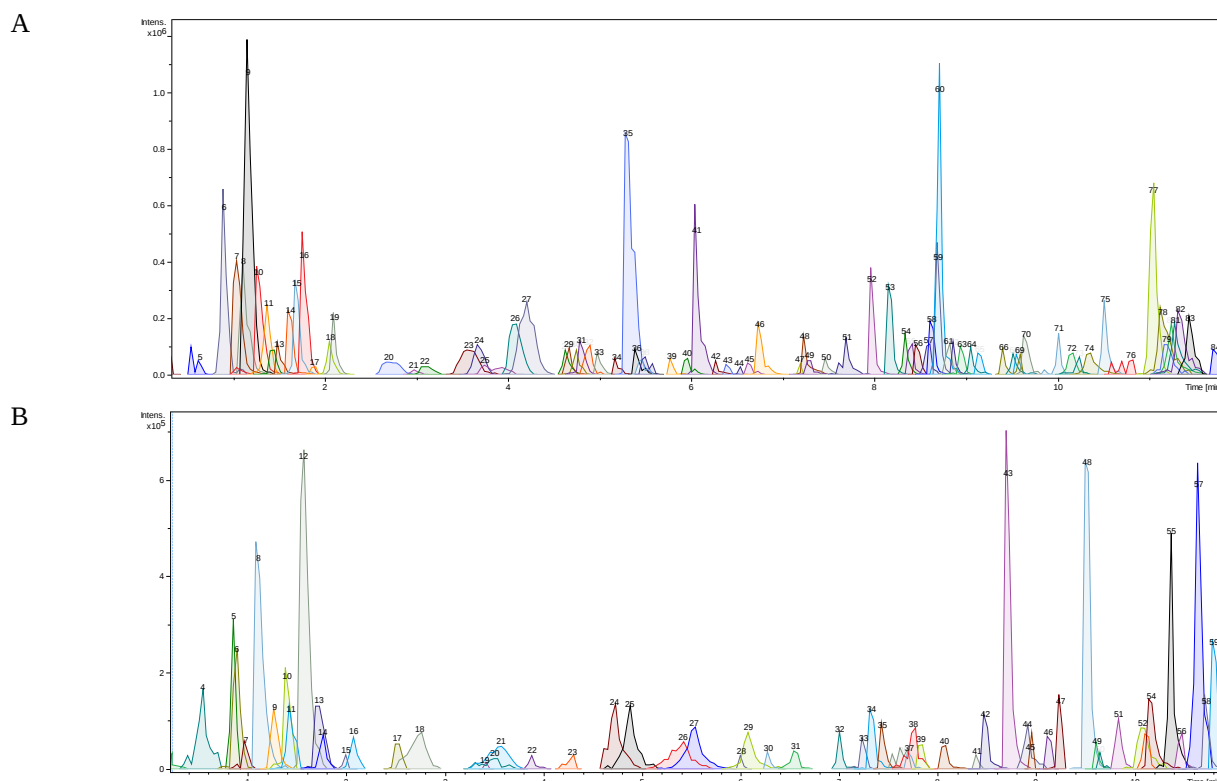


**Figura 15:** Comparação das intensidades dos picos de massas de quatro íons mais importantes na separação do PCA de dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados nos TCA-fermentados de (A) *F. hepatica* CC102:  $m/z$  328,3229, (B) CC102:  $m/z$  354,3377, (C) CC102:  $m/z$  230,2488 e (D) *S. commune* FPB117:  $m/z$  520,3400.

Por se tratar de uma análise não supervisionada, a criação de um modelo do PCA utilizando todos os TCA-fermentados dos macrofungos pode gerar interferência nas variáveis mais importantes, portanto, foram feitas análises individuais das amostras *versus* controle.

#### 4.2.1.1. Metabolômica do TCA-fermentado de *S. commune* FPB117 vs TCA-Controle

A TCA-fermentado de *S. commune* FPB117 foi analisado usando UHPLC-ESI(+)-MS. Um total de 9 réplicas foram avaliadas. Em 11 minutos detectou-se 76 picos com boa intensidade, o qual podem ser observados na Figura 15A. O perfil cromatográfico do TCA-controle é apresentado na Figura 15B.



**Figura 16:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). TCA-fermentado (A) *S. commune* FPB117 e (B) TCA-controle (sem presença do macrofungo).

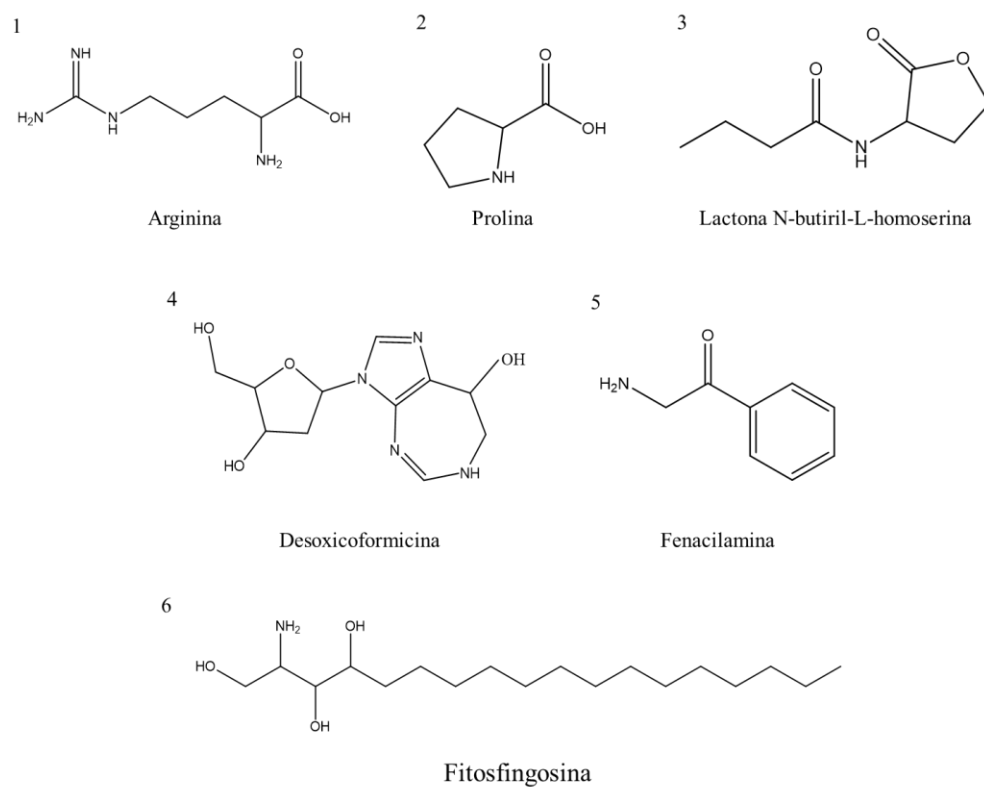
As amostras foram avaliadas por modelos de PCA e apresentadas na Figura 16. Houve uma discriminação de dois grupos referentes às amostras TCA-fermentado FPB117 e TCA-controle. Os íons que mais influenciaram nessa separação estão apresentados na Figura 16B.



**Tabela 4:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto                             | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Compostos químicos                      |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1,1                      | 7    | 175,1196   | C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>                | -3,6       | 175,1189    | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | Arginina                                |
| 1,2                      | 9    | 118,0875   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | -10,7      | 118,0863    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Valina + 9 isômeros                     |
| 1,3                      | 10   | 118,0864   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | -1,2       | 118,0863    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Valina + 9 isômeros                     |
| 1,4                      | 11   | 116,0702   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | 3,2        | 116,0706    | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | Proline                                 |
| 1,4                      | 11   | 153,0754   | C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>                | 2          | 153,0757    | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>                 | Xilitol, Ribitol ou Arabitol            |
| 1,7                      | 15   | 225,0966   | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,3        | 225,0969    | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>                 | n.i.                                    |
| 1,8                      | 16   | 189,1239   | C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -2,6       | 189,1234    | C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>                | Lactona N-butiril-L-homoserina          |
| 2,1                      | 19   | 286,1512   | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -0,8       | 286,1509    | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> | Desoxicoformicina                       |
| 4,2                      | 27   | 136,0755   | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO                             | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,4        | 136,0757    | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO                              | Fenacilamina                            |
| 4,3                      | 28   | 165,0545   | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>                  | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,8        | 165,0546    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                  | Fenilpiruvato + 8 isômeros              |
| 5,5                      | 35   | 227,1025   | C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 0,7        | 227,1026    | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>               | N-Benziloxicarbonilglicina + 2 isômeros |
| 8,3                      | 52   | 352,2485   | C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>4</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -0,7       | 352,2496    | C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>                | Resolvina E2 + 13 isômeros              |
| 8,4                      | 53   | 226,1804   | C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | -1         | 226,1802    | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>               | n.i.                                    |
| 8,9                      | 60   | 318,3013   | C <sub>18</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>3</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | -3,2       | 318,3003    | C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub>               | Fitosfingosina                          |
| 9,2                      | 62   | 158,1541   | C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO                             | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,9       | 158,1539    | C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> NO                             | n.i.                                    |

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

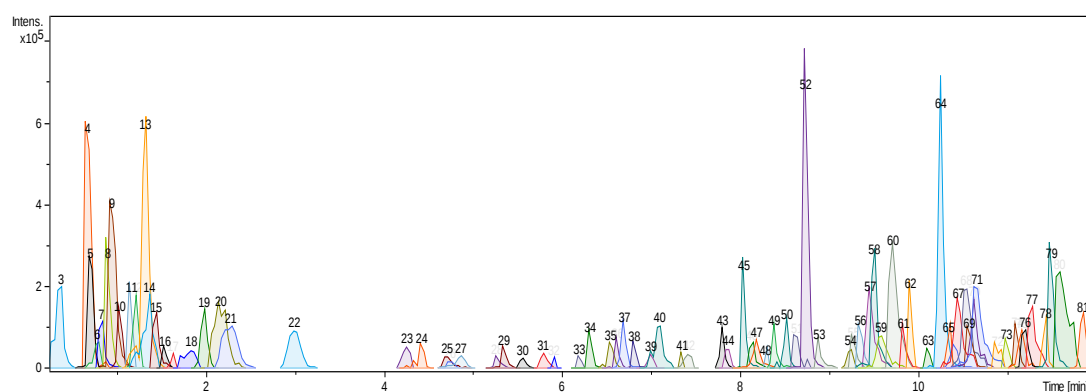


**Figura 18:** Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117.

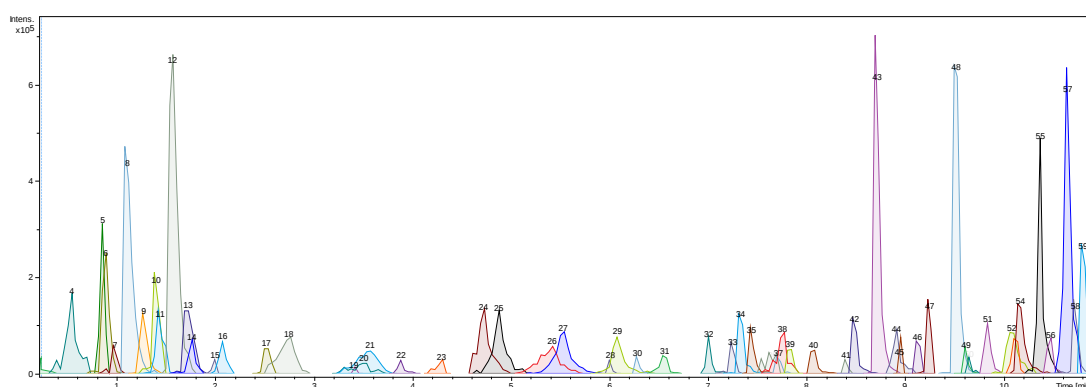
#### 4.2.1.2. Metabolômica do TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 vs TCA-Controle

O TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 apresentou 79 picos com boa intensidade e separação (Figura 18A). Na Figura 18B está expresso o perfil cromatográfico do TCA-controle.

A

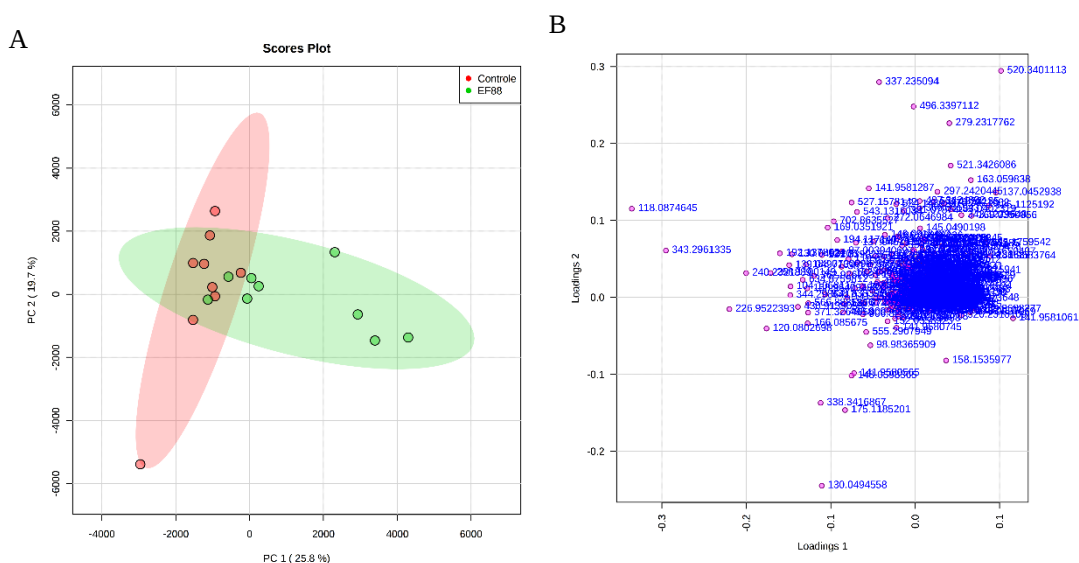


B



**Figura 19:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado *P. pulmonarius* EF88 e (B) TCA-controle.

Os dados adquiridos da análise quimiométrica podem ser observados nas Figuras 19A e 19B. Os dois grupos, TCA-EF88 e TCA-controle, não tiveram uma boa separação. Somente algumas réplicas resultantes TCA-EF88 apresentaram perfil pouco diferente do perfil das amostras TCA-controle. Esse resultado demonstra que poucos íons se diferiram após o tratamento fúngico em TCA. Assim, pode-se admitir que a condição de cultivo testada não favoreceu o crescimento microbiano do *P. pulmonarius* em TCA. Assim, outras condições de cultivo, variando fatores como temperatura, tempo de cultivo, entre outras possam apresentar maiores diferenças de metabolitos oriundos do processo fermentativo do TCA.



**Figura 20:** PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados no TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 e TCA-controle, submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.

Os íons foram comparados com o peso molecular e padrão de fragmentação e correlacionados com compostos presentes nos bancos de dados e literatura. Foram atribuídas 15 fórmulas moleculares aos principais íons, onde seis (6) íons foram relacionados a compostos químicos diferentes entre as amostras. Identificou-se os íons  $m/z$  258,1101, 169,0353, 137,0455, 153,0406, 743,2026, 277,2164 referentes aos compostos glicerofosfocololina, urato, hipoxantina, xantina, quercetina 3- (2G-xilosilrutinosídeo) e ácido estearidônico, respectivamente. Os compostos dos íons  $m/z$  343,2966, 371,3279, 366,3371 e 149,0237 não foram identificados. Os íons  $m/z$

118,0863, 325,1127, 194,1173, 279,2324 e 279,2323 são provenientes de isômeros, sendo indispensável o uso de técnicas que caracterizam as estruturas dos compostos. O  $m/z$  medido, tempo de retenção, adulto e erro podem ser observados na Tabela 5.

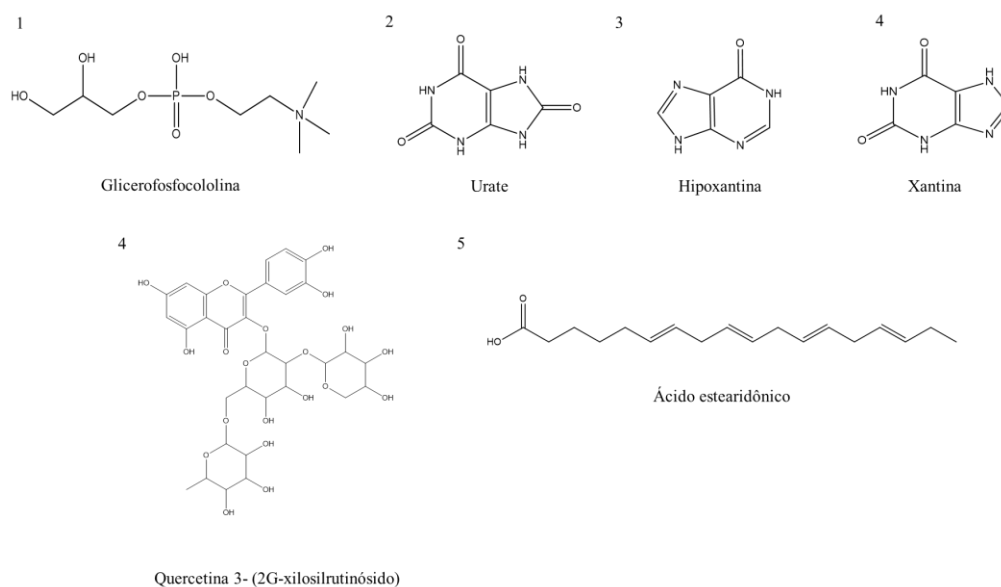
Dos íons identificados no TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88, os destacados em vermelho estão presentes no controle, são eles  $m/z$  118,0863, 194,1173, 343,2966, 279,2323, 277,2164.

**Tabela 5:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto              | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Composto                             |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 0,9                      | 8    | 258,1101   | C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub> P              | [M+H] <sup>+</sup> | -0,2       | 258,1101    | C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>6</sub> P              | Glicerofosfocolina                   |
| 1,0                      | 9    | 118,0863   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | -11,0      | 118,0863    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Valine + 8 compostos                 |
| 1,3                      | 13   | 325,1127   | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>               | [M+H] <sup>+</sup> | 0,7        | 325,1129    | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>               | Bis-D-fructose 2",1:2,1"-dianhydride |
| 2,0                      | 19   | 169,0353   | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | [M+H] <sup>+</sup> | 2,1        | 169,0356    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | Urate                                |
| 2,3                      | 21   | 137,0455   | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O                | [M+H] <sup>+</sup> | 1,9        | 137,0458    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O                | Hipoxantina                          |
| 3,0                      | 22   | 153,0406   | C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | [M+H] <sup>+</sup> | 0,6        | 153,0407    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | Xantina                              |
| 4,3                      | 23   | 194,1173   | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup> | 1,3        | 194,1176    | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>               | Heliamina + 5 isômeros               |
| 6,3                      | 34   | 743,2026   | C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> O <sub>20</sub>               | [M+H] <sup>+</sup> | 0,5        | 743,2029    | C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>               | Quercetina 3- (2G-xilosilrutinosido) |
| 8,0                      | 45   | 343,2966   | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup> | -3,1       | 343,2955    | C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>3</sub>               | n.i.                                 |
| 8,5                      | 50   | 371,3279   | C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup> | -2,9       | 371,3268    | C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | n.i.                                 |
| 8,7                      | 52   | 279,2324   | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | -2,1       | 279,2319    | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                | Crepeninato + 6 Isômeros             |
| 9,4                      | 56   | 366,3371   | C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup> | -1,1       | 366,3367    | C <sub>23</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>               | n.i.                                 |
| 9,5                      | 58   | 279,2323   | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | -1,5       | 279,2319    | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                | Crepeninato + 6 Isômeros             |
| 9,7                      | 60   | 277,2164   | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup> | -0,6       | 277,2162    | C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>                | Ácido estearidônico                  |
| 10,3                     | 64   | 149,0237   | C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>                  | [M+H] <sup>+</sup> | -2,5       | 149,0233    | C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>                  | n.i.                                 |

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

Os compostos detectados estão representados na Figura 20.

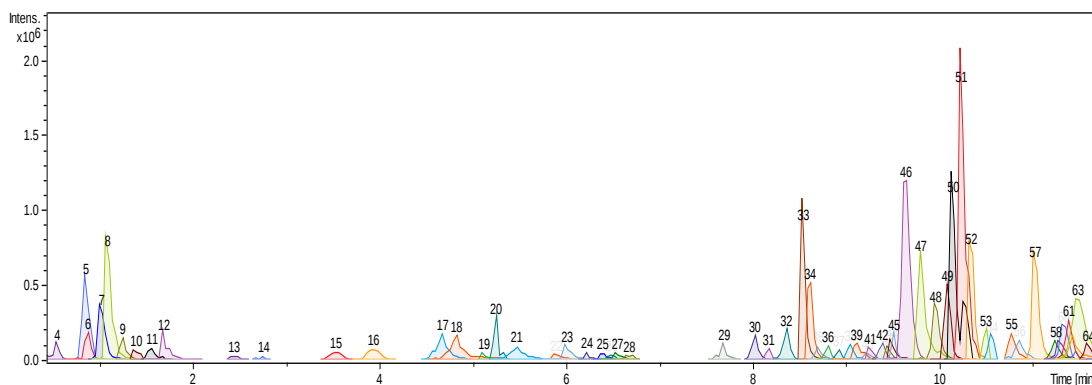


**Figura 21:** Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88.

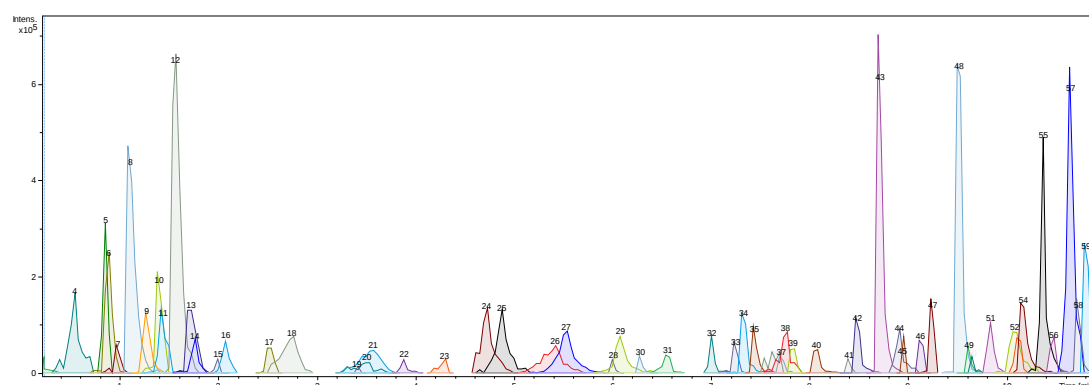
#### 4.2.1.3. Metabolômica do TCA-fermentado de *F. hepatica* CC102 vs TCA-Controle

Nas amostras TCA-fermentado *F. hepatica* CC102, detectou-se 57 picos cromatográficos com boa intensidade. Estes podem ser vistos na Figura 21A e o TCA-controle na Figura 21B

A



B



**Figura 22:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras após de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado *F. hepatica* CC102 e (B) TCA-control.

A PCA referente à TCA-CC102 pode ser observada na Figura 22A. O gráfico de projeção dos íons com maior influência na separação dos grupos pode ser visualizado na Figura 21B. A amostra TCA-CC102 apresentou perfil de íons diferentes do TCA-control, separando o gráfico em dois grupos referentes à amostra e controle.

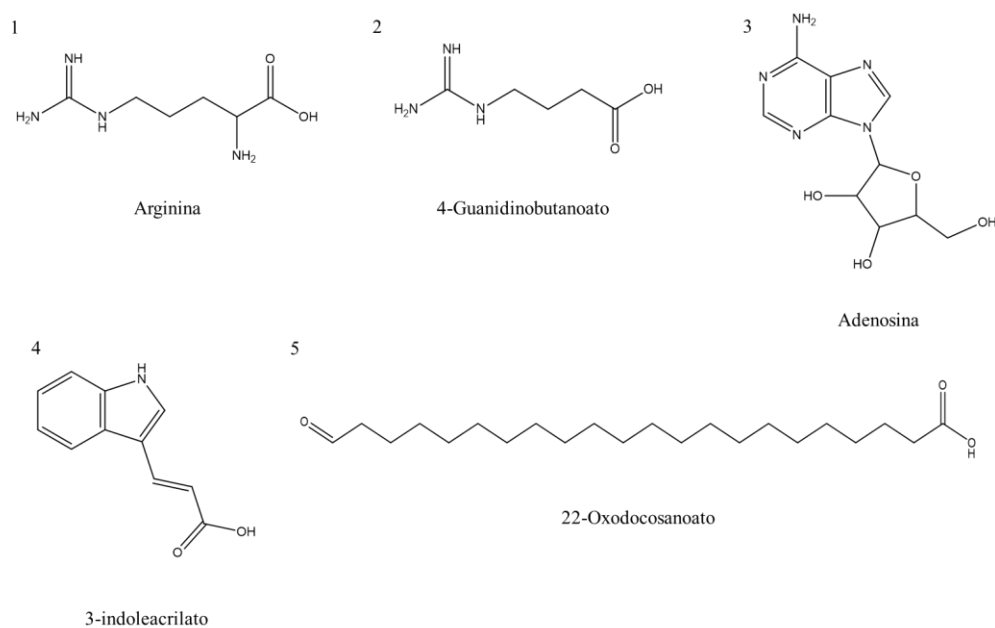


**Tabela 6:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado *F. hepática* CC102, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | PicoPeak | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto                             | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Composto                       |
|--------------------------|----------|------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1,0                      | 7        | 175,1192   | C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>                | -1,4       | 175,1190    | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | Arginina                       |
| 1,1                      | 8        | 104,1070   | C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO                             | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,1        | 104,1070    | C <sub>5</sub> H <sub>13</sub> NO                             | n.i.                           |
| 1,1                      | 8        | 130,0496   | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,8        | 130,0499    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | n.i.                           |
| 1,3                      | 9        | 116,0703   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | 2,6        | 116,0706    | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | 3-Acetamidopropanal ou Prolina |
| 1,7                      | 12       | 146,0916   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>                | 5,3        | 146,0924    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | 4-Guanidinobutanoato           |
| 4,7                      | 23       | 268,1042   | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,6       | 268,1040    | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | Adenosina                      |
| 4,8                      | 24       | 194,1172   | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,8        | 194,1176    | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>               | Heliamina + 5 isômeros         |
| 5,2                      | 26       | 120,0807   | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N                              | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,3        | 120,0808    | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N                               | n.i.                           |
| 6,0                      | 30       | 188,0706   | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,1        | 188,0706    | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                | 3-indoleacrilato               |
| 6,5                      | 33       | 130,1584   | C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> N                              | [M+H] <sup>+</sup>                | 4,5        | 130,1590    | C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N                              | n.i.                           |
| 8,5                      | 46       | 230,2487   | C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> NO                            | [M+H] <sup>+</sup>                | -3,8       | 230,2478    | C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> NO                            | n.i.                           |
| 8,6                      | 47       | 343,2968   | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | -3,8       | 343,2955    | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | n.i.                           |
| 8,8                      | 48       | 372,3471   | C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>3</sub>               | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 0,2        | 372,3472    | C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>                | 22-Oxodocosanoato              |
| 8,9                      | 50       | 376,2846   | C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>3</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | -2,1       | 376,2846    | C <sub>23</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>3</sub>               | n.i.                           |
| 9                        | 51       | 158,1539   | C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO                             | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,2        | 158,1539    | C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> NO                             | n.i.                           |
| 9,1                      | 52       | 371,3271   | C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,7       | 371,3268    | C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | n.i.                           |

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

Os compostos encontrados no extrato de TCA-fermentado de *F. hepatica* CC102 podem ser visualizados na Figura 23.

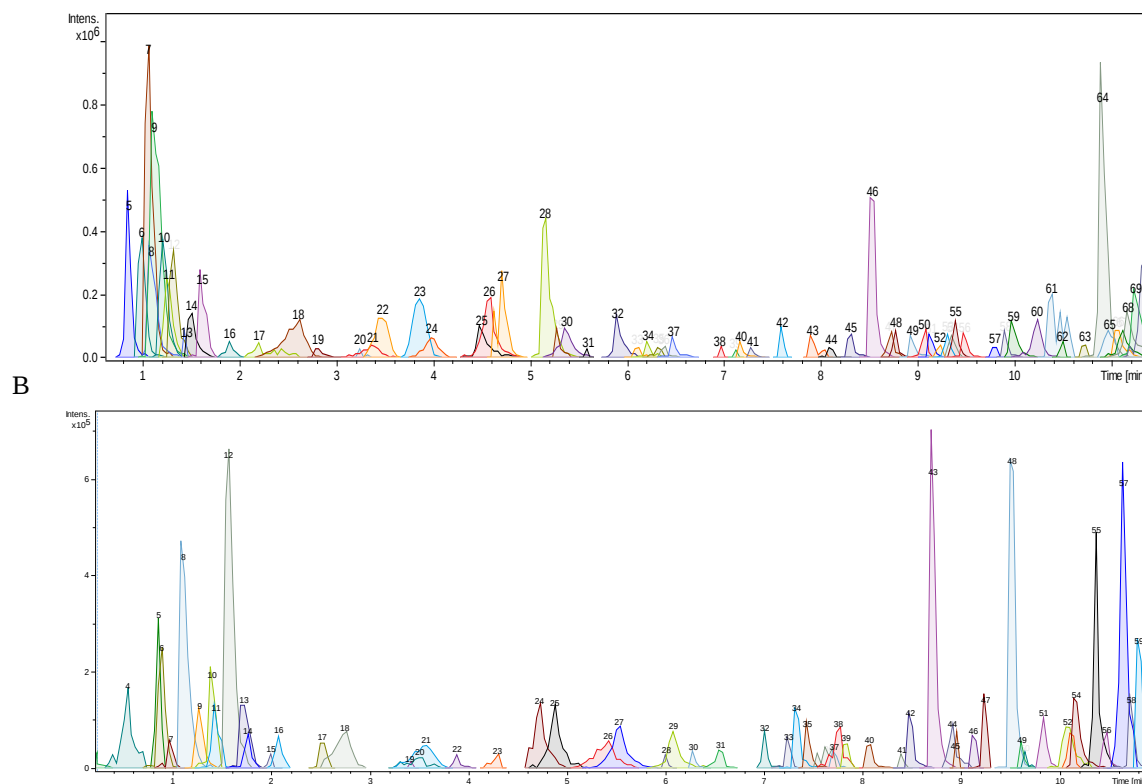


**Figura 24:** Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de *F. hepática* CC102.

#### 4.2.1.4. Metabolômica do TCA-fermentado de *P. lecomtei* CC102 vs TCA-Controle

No extrato de TCA-fermentado de *P. lecomtei* CC40 foi detectado 64 picos com boa intensidade (Figura 24A), o qual apresentou perfil cromatográfico próximo ao perfil do TCA-controle (Figura 24B).

A



**Figura 25:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras a de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) TCA-fermentado *P. lecomtei* CC40 e (B) TCA-controle.

Entretanto ao realizar o PCA, estes grupos se separaram, indicando a presença de íons diferentes que influenciaram na construção do modelo (Figura 25). Estes íons estão dispostos na Figura 25B.



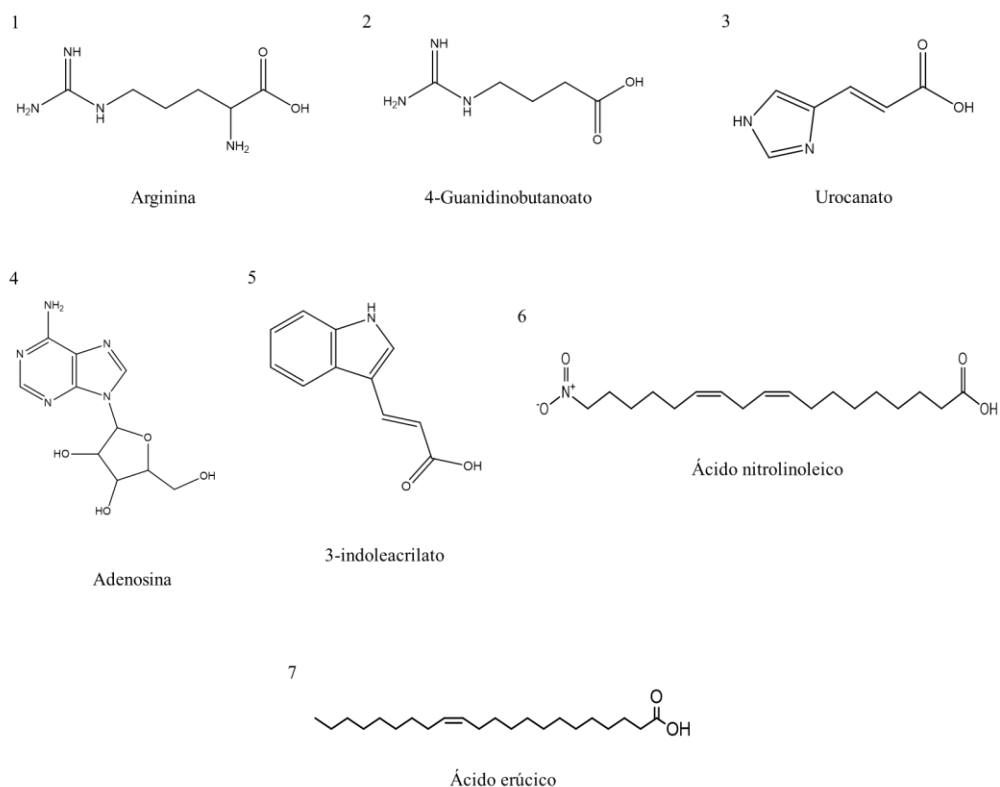
**Tabela 7:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *P. lecomtei* CC40, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto                             | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Compostos                    |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 1,0                      | 6    | 175,1191   | C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,8       | 175,1190    | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | Arginina                     |
| 1,1                      | 7    | 258,1104   | C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub> P              | [M+H] <sup>+</sup>                | -1,1       | 258,1101    | C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>6</sub> P              | n.i.                         |
| 1,2                      | 10   | 118,0865   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | -1,9       | 118,0863    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Valine + 9 isômeros          |
| 1,3                      | 12   | 145,0489   | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>                  | [M+H] <sup>+</sup>                | 4,3        | 145,0495    | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>                  | Triacetato + 6 isômeros      |
| 1,6                      | 15   | 146,0926   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>                | -1,2       | 146,0940    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | 4-Guanidinobutanoato         |
| 3,5                      | 22   | 132,1014   | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | 3,5        | 132,1019    | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                | Leucina + 12 isômeros        |
| 4,0                      | 24   | 165,0539   | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>                  | [M+H] <sup>+</sup>                | 4,4        | 165,0546    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                  | 4-Coumarate + 8 isômeros     |
| 4,0                      | 24   | 182,0804   | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>                | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 4,2        | 182,0812    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>                  | 4-Coumarate + 8 isômeros     |
| 4,5                      | 25   | 139,0497   | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | [M+H] <sup>+</sup>                | 3,8        | 139,0502    | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   | Urocanato                    |
| 4,6                      | 26   | 268,1043   | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | -1,1       | 268,1040    | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | Adenosina                    |
| 4,7                      | 27   | 194,1172   | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 2,1        | 194,1176    | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>               | Butamben + 5 isômeros        |
| 5,2                      | 28   | 120,0811   | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N                              | [M+H] <sup>+</sup>                | -2,9       | 120,0808    | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N                               | n.i.                         |
| 5,4                      | 30   | 192,1379   | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> NO                            | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,9        | 192,1383    | C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO                            | Phendimetrazine + 2 isômeros |
| 5,9                      | 32   | 188,0702   | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 2,3        | 188,0706    | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                | 3-indoleacrilato             |
| 7,6                      | 42   | 326,2318   | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>4</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 2,4        | 326,2326    | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>4</sub>               | Ácido nitrolinoleico         |
| 7,6                      | 42   | 362,2527   | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> NO <sub>6</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 2,8        | 362,2537    | C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>6</sub>               | n.i.                         |
| 8,5                      | 46   | 343,2965   | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | -3         | 343,2955    | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | n.i.                         |

|      |    |          |                                                 |                                   |     |          |                                                |              |
|------|----|----------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|-----|----------|------------------------------------------------|--------------|
| 10,2 | 60 | 356,3519 | C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>2</sub> | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 1,1 | 356,3523 | C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> | Ácido erúico |
|------|----|----------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|-----|----------|------------------------------------------------|--------------|

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

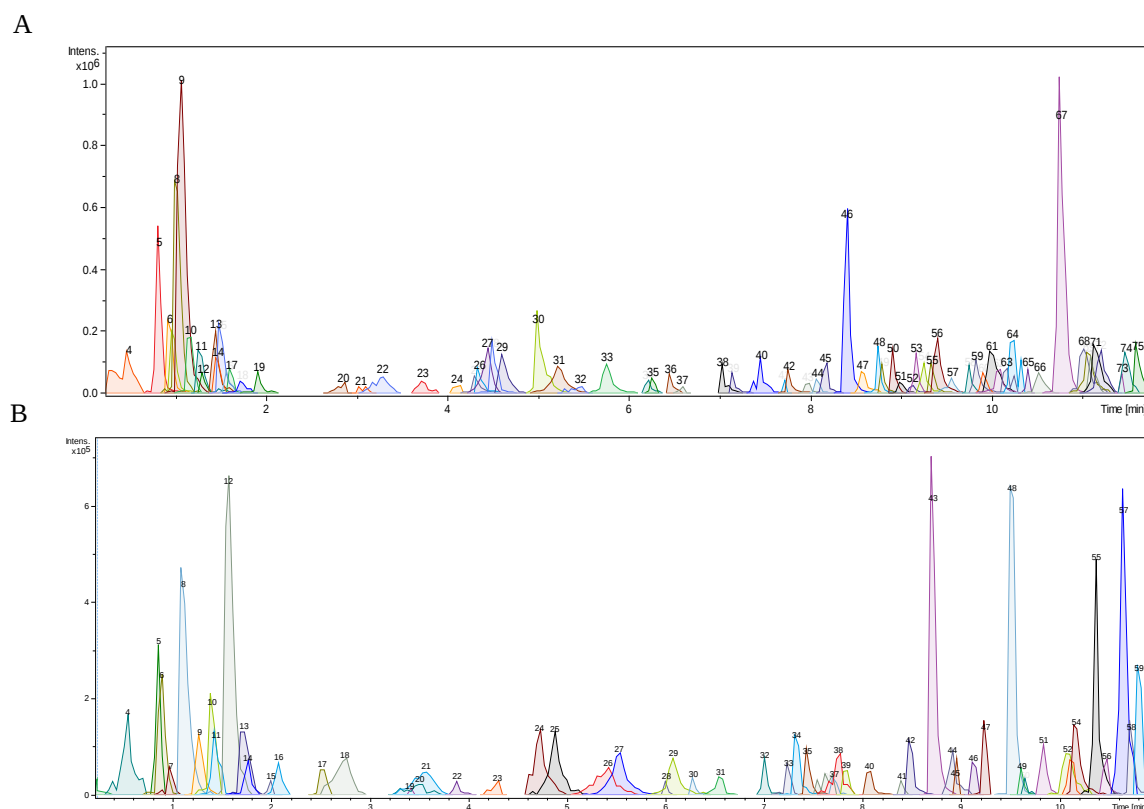
Os compostos identificados nas amostras TCA-fermentado estão apresentados na Figura 26.



**Figura 27:** Compostos químicos identificados nos extratos etanolicos de TCA-fermentado de *P. lecomtei* CC40

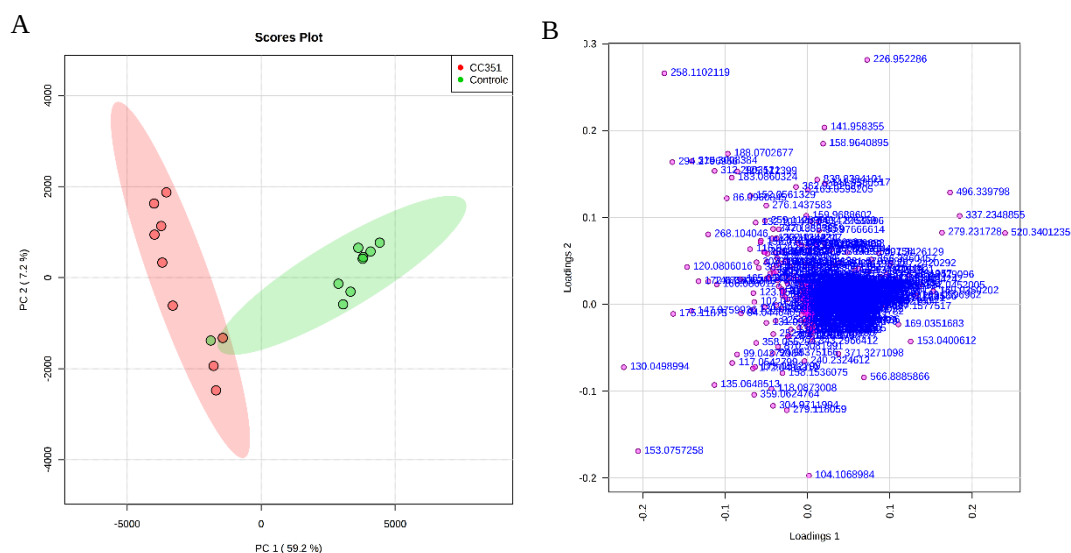
#### 4.2.1.5. Metabolômica do TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351 vs TCA-Controle

As amostras do TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351 foram analisadas por UHPLC-ESI(+)-MS. Detectou-se 67 picos com boa intensidade em 11 minutos. As amostras de TCA-CC351 e TCA-controle podem ser observados na Figura 27.



**Figura 28:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(+)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500 $\mu$ L de extrato etanólico da amostra em 1000  $\mu$ L de solvente). (A) TCA-fermentado *G. lucidum* CC351 e (B) TCA-controle.

As amostras TCA-CC351 e TCA-controle foram submetidas a testes estatísticos (Figura 28). Observa-se uma boa separação entre as amostras, entretanto existem íons comuns entre as amostras TCA-fermentado *G. lucidum* CC351 e TCA-controle.



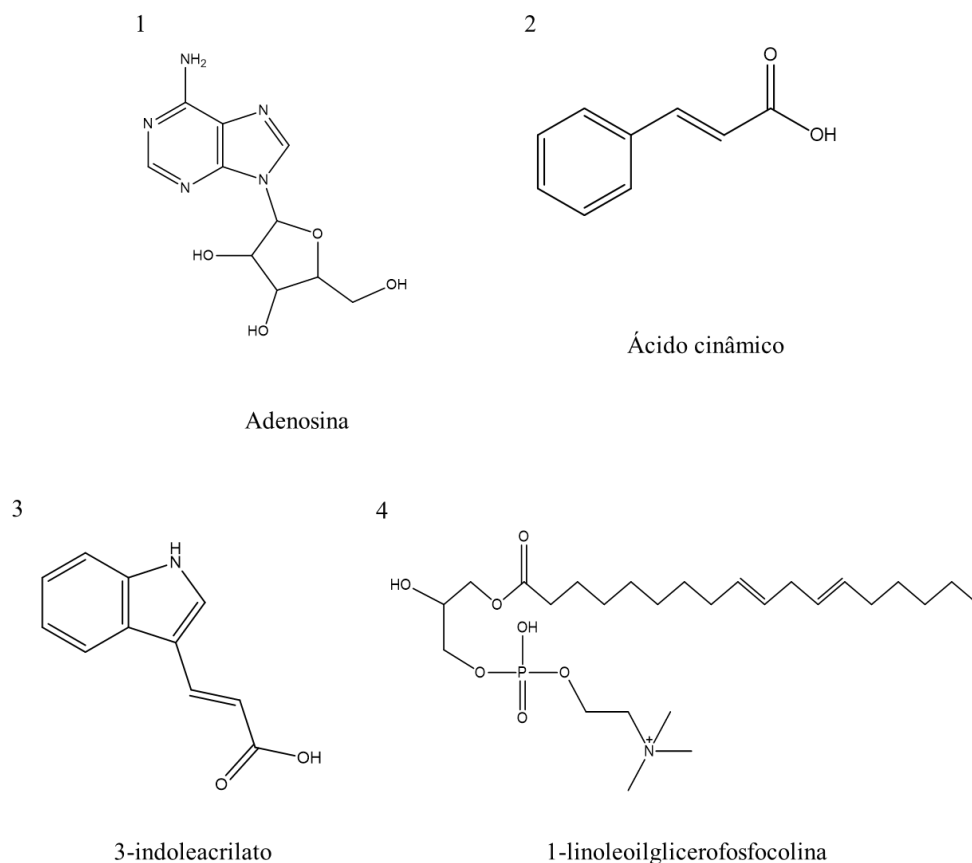
**Figura 29:** PCA dos dados de UHPLC-ESI(+)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado *G. lucidum* CC351 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.

Selecionou-se os 14 íons mais influentes, estes foram relacionados com as fórmulas moleculares (Tabela 8). Após pesquisa nos bancos de dados e literatura, 4 fórmulas moleculares foram atribuídas a compostos: adenosina, ácido cinâmico, 3-indoleacrilato, 1-linoleoilglicerofosfocolina (Figura 29). Cinco íons são referentes a isômeros e 5 íons não foram identificados. Os íons  $m/z$  194,1172, 343,2967, 279,2320 e 279,2315 foram detectados no TCA-controle. Estes estão destacados em vermelho na Tabela 8.

**Tabela 8:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto                             | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Compostos                               |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1,0                      | 8    | 130,0498   | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,7        | 130,0499    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | Oxoprolina + 5 isômeros                 |
| 1,5                      | 13   | 527,1577   | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> NaO <sub>16</sub>             | [M+Na] <sup>+</sup>               | 1,0        | 527,1583    | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>               | Trissacarídeo de hexose                 |
| 4,5                      | 28   | 268,1038   | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,7        | 268,1040    | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> | Adenosina                               |
| 4,6                      | 29   | 194,1172   | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,6        | 194,1176    | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>               | Butamben + 5 isômeros                   |
| 5,0                      | 30   | 120,0807   | C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N                              | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,8        | 120,0808    | C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N                               | n.i.                                    |
| 5,0                      | 30   | 166,0859   | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | 2,3        | 166,0863    | C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>                  | Ácido cinâmico                          |
| 5,8                      | 33   | 188,0702   | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 2,4        | 188,0706    | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                | 3-indoleacrilato                        |
| 8,2                      | 45   | 226,1799   | C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,1        | 226,1802    | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>               | n.i.                                    |
| 8,4                      | 46   | 343,2967   | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | -3,5       | 343,2955    | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | n.i.                                    |
| 8,8                      | 48   | 294,2792   | C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> NO                            | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,3       | 294,2791    | C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> NO                            | n.i.                                    |
| 8,9                      | 50   | 371,3271   | C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,8       | 371,3268    | C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | n.i.                                    |
| 9,2                      | 53   | 279,2320   | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | -0,5       | 279,2319    | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                | Linolenato + 6 isômeros (ácidos graxos) |
| 9,4                      | 56   | 520,3404   | C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P             | [M+H] <sup>+</sup>                | 0,6        | 520,3398    | C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P             | 1-linoleoilglicerofosfocolina           |
| 10,0                     | 61   | 279,2315   | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>                | 1,3        | 279,2310    | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                | Linolenato + 6 isômeros (ácidos graxos) |

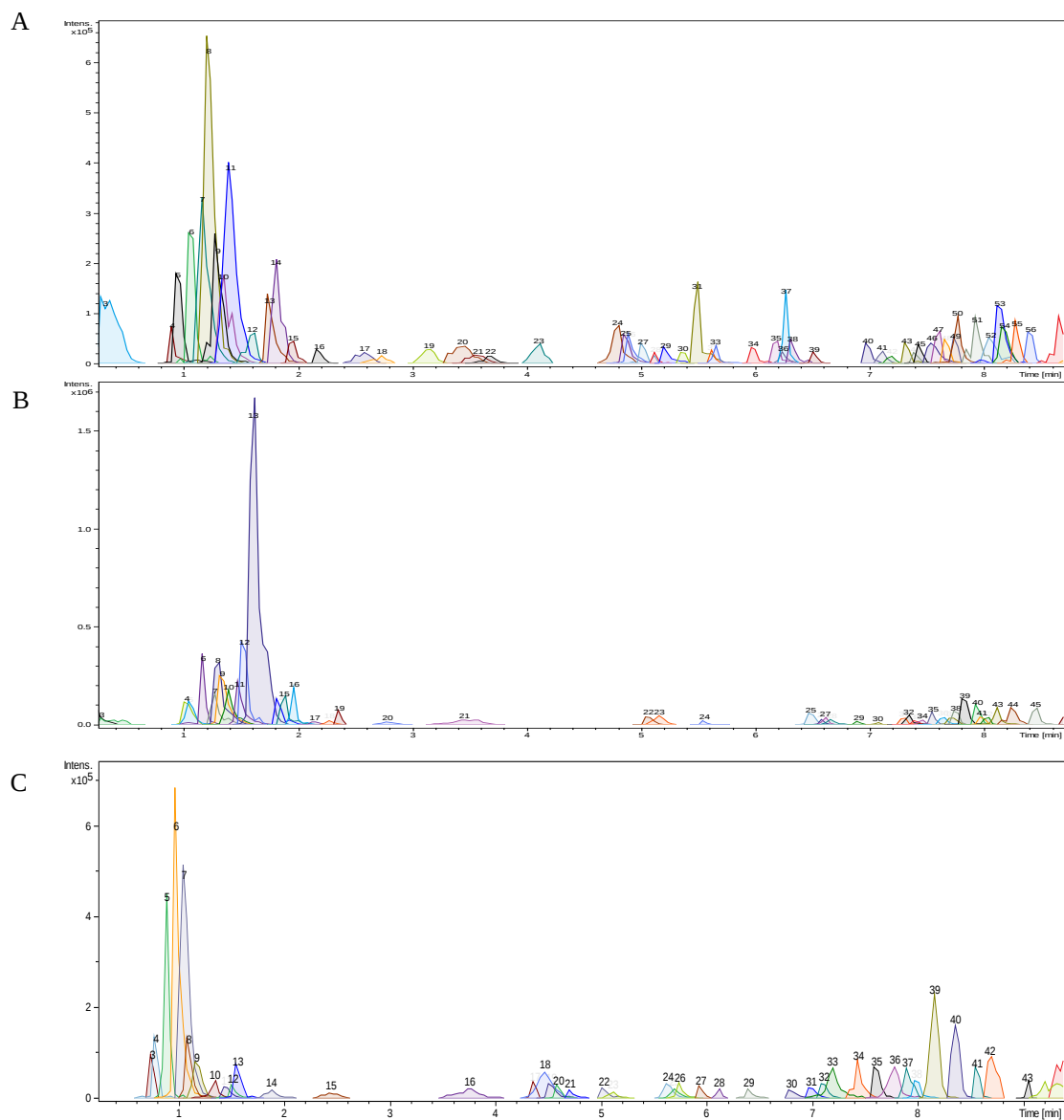
n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados



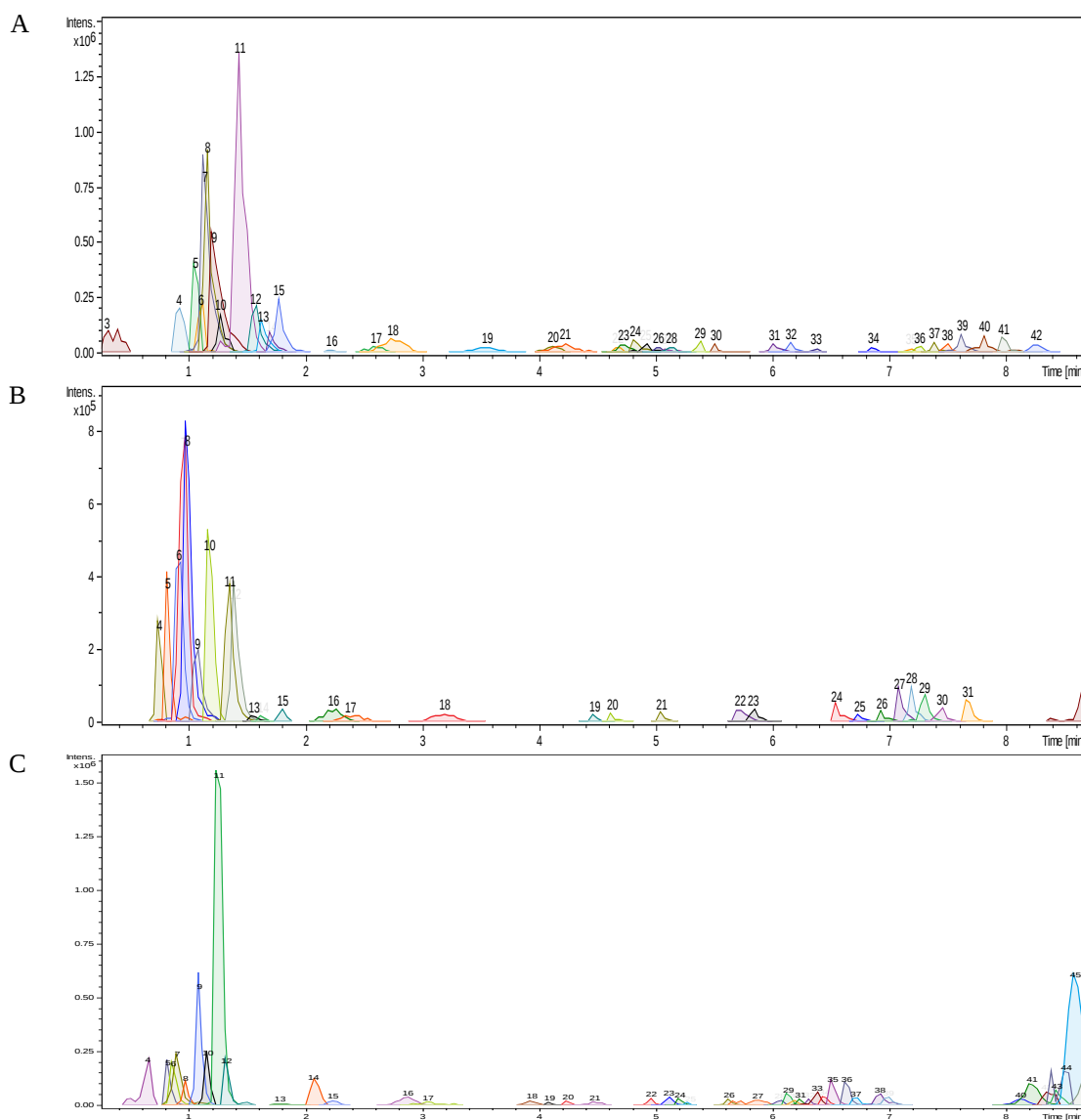
**Figura 30:** Compostos químicos identificados nos extratos etanólicos de TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351.

#### 4.2.2. UHPLC-ESI(-)-MS/MS

A análise UHPLC-ESI(-)-MS foi realizada como análise complementar devido algumas moléculas ionizarem somente no modo negativo. Estas análises foram realizadas após as análises no UHPLC-ESI(+)-MS. Foram analisadas 54 amostras correspondentes as amostras de TCA-fermentado dos cindo macrofungos (*S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *F. hepatica* CC102, *P. lecomtei* CC40, *G. lucidum* CC351), os quais podem ser observadas na Figura 30A, 30B, 30C, 30D e 30E, respectivamente. A amostra do TCA-controle pode ser observada na Figura 30F.

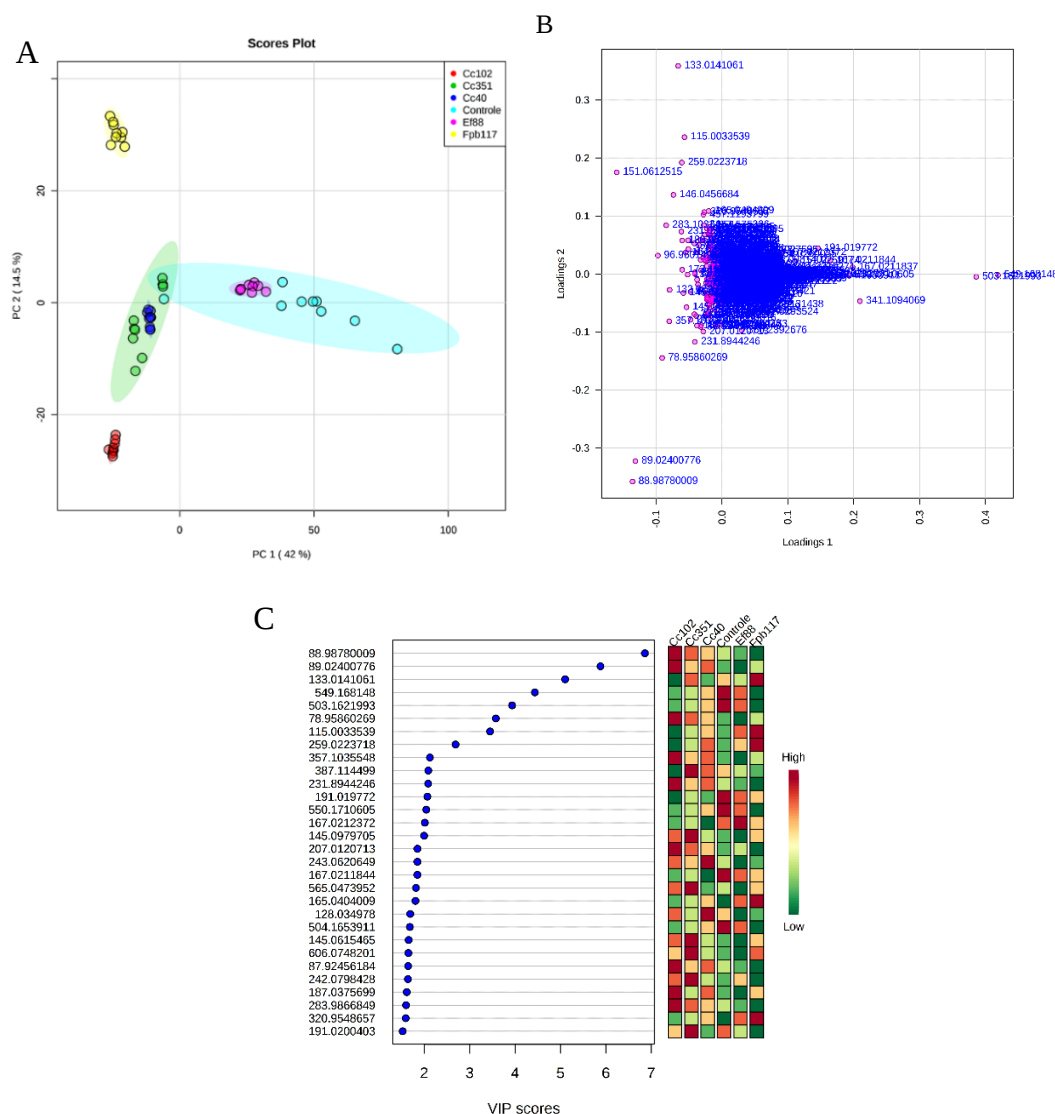


**Figura 31:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras dos TCA-fermentados dos macrofungos: (A) *S. commune* FPB117, (B) *P. pulmonarius* EF88 e (C) *F. hepatica* CC102 (continua).



**Figura 32:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentado extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). As amostras dos TCA-fermentados dos macrofungos: (A) *P. lecontei* CC40 (B) *G. lucidum* CC351 e (C) TCA-controle

A PCA foi gerado objetivando destacar os íons mais influentes das amostras TCA-fermentados e TCA-controle no modo UHPLC-ESI(-)-MS (Figura 31).

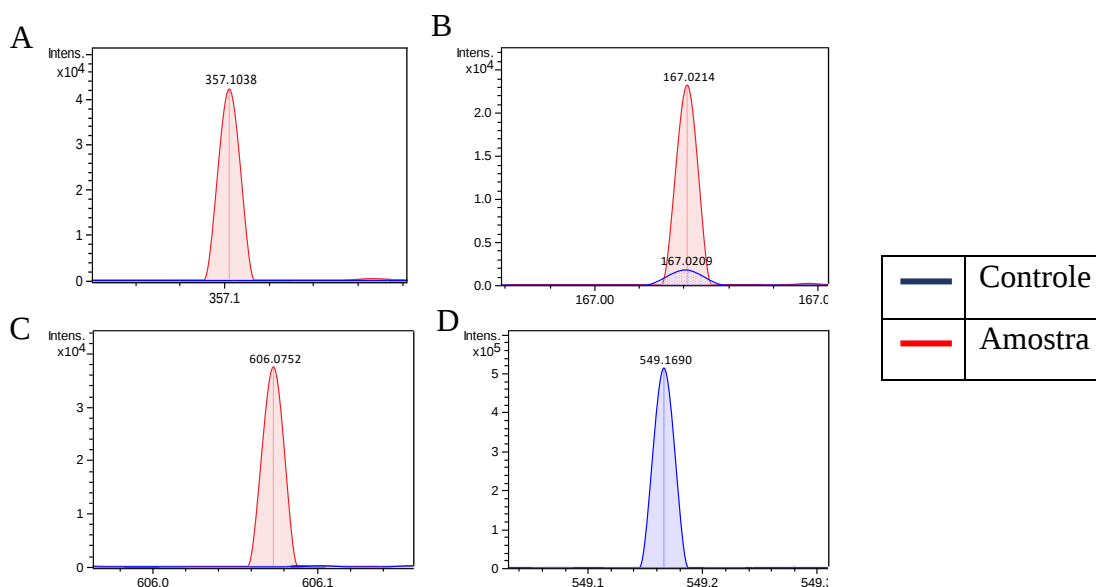


**Figura 33:** PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados dos TCA-fermentados dos macrofungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *F. hepatica* CC102, *P. lecomtei* CC40, *G. lucidum* CC351 e TCA controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo. Estes gráficos são obtidos por PCA. Já a (C) projeção dos íons com maior distinção entre as condições de extração (VIP) é obtido por PLD-DA.

O perfil dos metabólitos encontrados TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 é próximo ao TCA-controle indicando que o tratamento com fungo não foi eficiente para a biotransformação da torta de caroço de algodão. Os macrofungos *G. lucidum* CC351 e *P. lecomtei* CC40 também apresentaram similaridade em relação aos metabolitos detectados. Contudo, os fungos *S. commune* FPB117 e *F. hepática*

CC102 apresentaram perfis bem diferentes, sugerindo diferenças bioquímicas significativas entre TCA-FPB117 e TCA-CC102 e o TCA-controle. Tais resultados confirmam o que foi encontrado no ESI(+)-MS (Figura 13), o qual serão estudados individualmente.

Na análise metabolômica do modo UHPLC-ESI(-)-MS, alguns íons distinguiram-se na separação dos grupos. Os íons  $m/z$  357.1038: rt 1.1 min ( $C_{12}H_{21}O_{12}$ );  $m/z$  167,0214: rt 2.1 min ( $C_5H_3NO_3$ ) e  $m/z$  606,0752: rt 1.1 min ( $C_{13}H_{24}N_3O_4$ ) foram detectados TCA-fermentados de *F. hepatica* CC 102, *P. pulmonarius* EF 88, *G. lucidum* CC 351. O íon  $m/z$  549,1690 rt 1.1 min ( $C_{20}H_{29}N_4O_{14}$ ) foi detectado no TCA-controle (Figura 32).

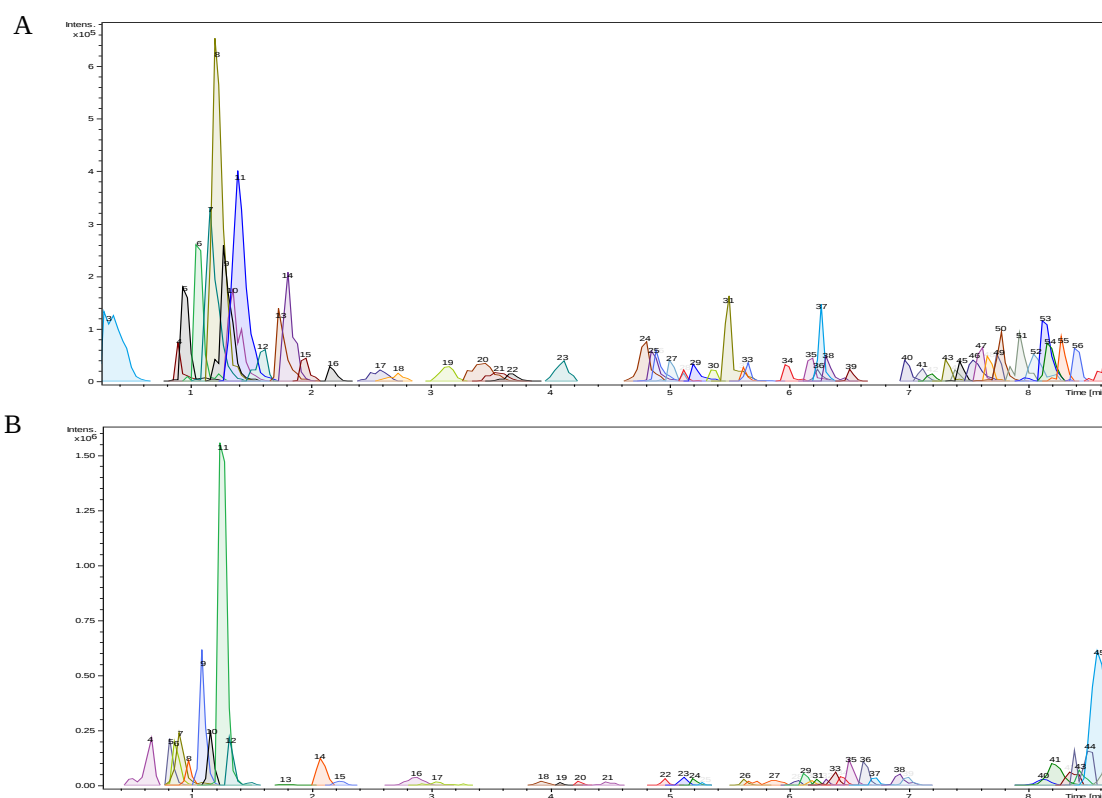


**Figura 34:** Comparação das intensidades dos picos de massas de quatro íons mais importantes na separação do PCA de dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados nos TCA-fermentados de (A) *F. hepatica* CC102:  $m/z$  357,1038, (B) EF 88:  $m/z$  167,0214, (C) CC 351:  $m/z$  606,0752 e (D) TCA-controle:  $m/z$  549,1690.

As amostras de TCA-fermentados dos macrofungos foram analisadas em UHPLC-ESI(-)-MS e estudadas individualmente e comparadas ao TCA-controle. Os resultados são apresentados a seguir.

#### 4.2.2.1. Metabolômica do TCA-fermentado de *S. commune* FPB117 vs TCA-Controle

As amostras de TCA-fermentado de fungos *S. commune* FPB117 foram analisadas pelo modo UHPLC-ESI(-)-MS com tempo de corrida de 8 minutos. Detectou-se 50 picos cromatográficos com boa intensidade (Figura 33A). O cromatograma do TCA-controle está representado na Figura 33B.



**Figura 35:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) *S. commune* FPB117 e (B) TCA-controle.

Realizaram-se os testes estatísticos e o resultado pode ser observado na Figura 34A. Observa-se claramente a separação de dos dois grupos, indicando que os íons das amostras de TCA-fermentado de FPB117 e o TCA-controle.

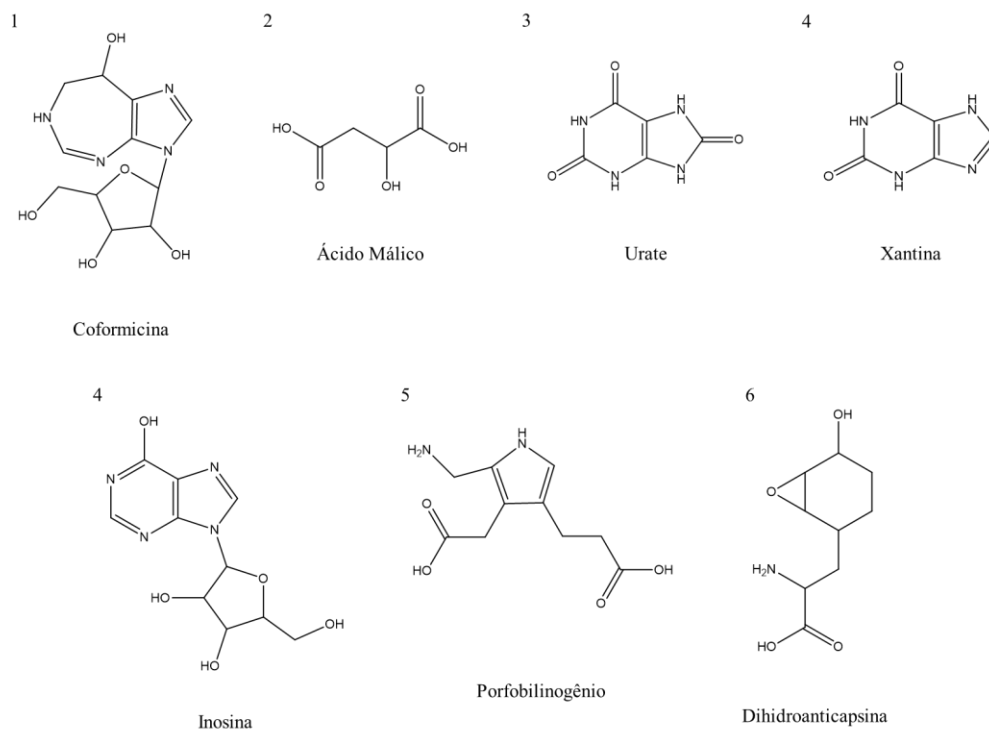


**Tabela 9:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto              | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Compostos                                         |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 1,4                      | 11   | 283,1044   | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -0,5       | 283,1042    | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> | Coformicina                                       |
| 1,8                      | 13   | 133,0137   | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | -5,1       | 133,0137    | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                  | Ácido málico                                      |
| 2,0                      | 15   | 167,0211   | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -3,5       | 167,0205    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | Urate                                             |
| 3,2                      | 19   | 151,0260   | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -2,4       | 151,0256    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | Xantina                                           |
| 4,8                      | 24   | 257,0781   | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -2,9       | 257,0774    | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | Espongotimidina ou (1-ribosilimidazol) -4-acetato |
| 5,0                      | 27   | 267,0725   | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | 1,7        | 267,0729    | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> | Inosina                                           |
| 5,5                      | 31   | 164,0719   | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | -4,6       | 164,0712    | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Fenilalanina + 6 isômeros                         |
| 5,7                      | 33   | 225,0881   | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>6</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | 3,6        | 225,0889    | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | Porfobilinogênio                                  |
| 6,2                      | 35   | 200,0928   | C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>4</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | -2,5       | 200,0923    | C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>                | Dihidroantcapsina                                 |
| 7,3                      | 43   | 241,1192   | C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -1,5       | 241,1188    | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | n.i.                                              |
| 7,6                      | 47   | 275,1032   | C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | 0          | 275,1032    | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | n.i.                                              |

n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados

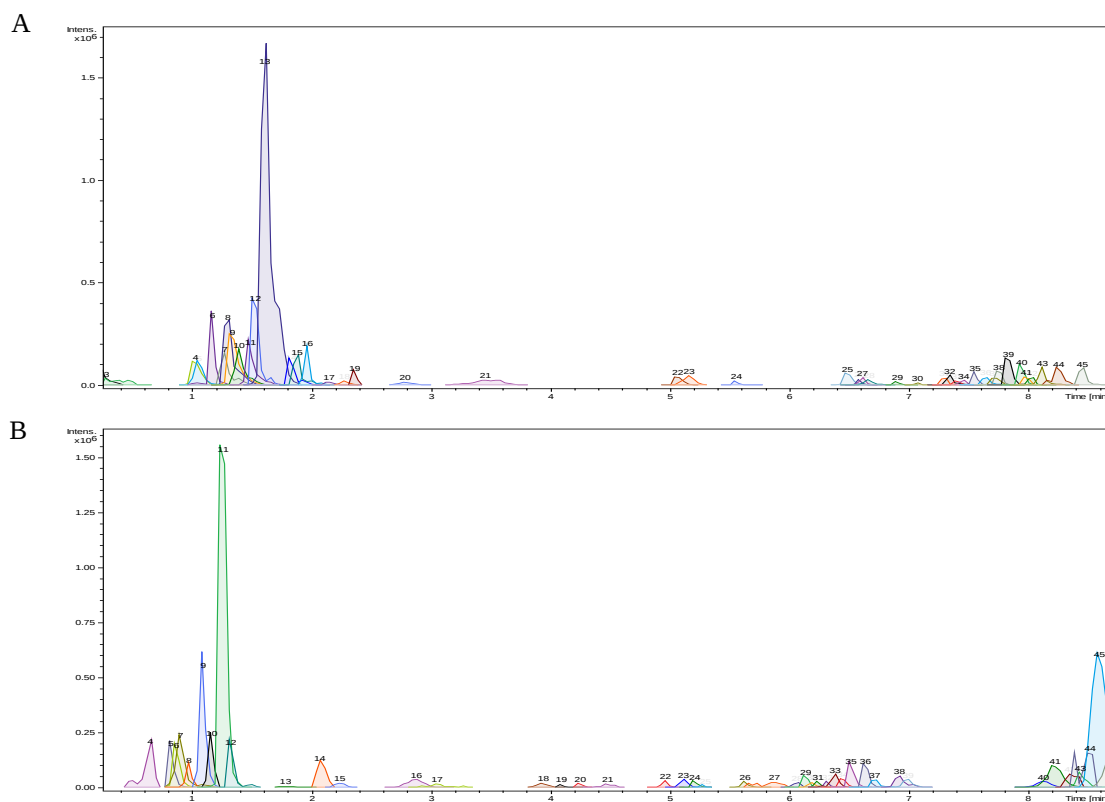
Os íons em vermelho são íons que estavam presentes na TCA-controle. Com o método desenvolvido, não foi possível identificar compostos iguais no modo positivo e negativo. As moléculas identificadas estão expressas na Figura 35.



**Figura 37:** Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de *S. commune* FPB117.

#### 4.2.2.2. Metabolômica do TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88 vs TCA-Controle

As amostras fermentadas com o fungo *P. pulmonarius* EF88 foram analisadas e seu cromatograma pode ser observado na Figura 36A. O perfil cromatográfico das amostras mostrou-se parecido visualmente com o controle, detectando-se aproximadamente 40 picos.



**Figura 38:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras após a fermentação fúngica de TCA extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). Amostra fermentada pelo fungo A) *P. pulmonarius* EF88 e B) ausente de fermentação.

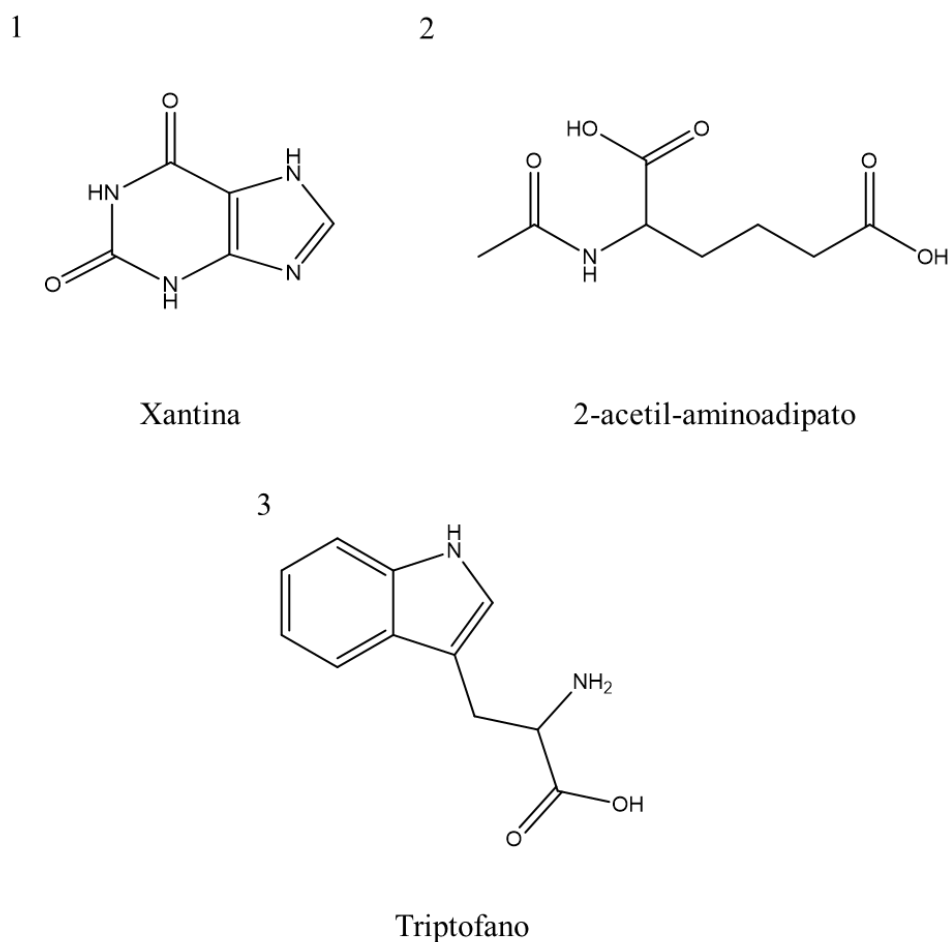
O PCA das amostras é apresentado na Figura 37, o qual se verifica a separação de dois grupos referente às amostras fermentadas com fungos e controle.



**Tabela 10:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto              | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Composto                       |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1,4                      | 10   | 341,1089   | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>               | [M-H] <sup>-</sup> | -1,5       | 341,1084    | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | Melibiulose + 9 isômeros       |
| 1,5                      | 12   | 341,1096   | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>               | [M-H] <sup>-</sup> | -3,4       | 341,1084    | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | Melibiulose + 9 isômeros       |
| 2,8                      | 20   | 128,0347   | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | 0,4        | 128,0348    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | n.i.                           |
| 2,8                      | 20   | 151,0256   | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -2,3       | 151,0256    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | Xantina                        |
| 5,2                      | 23   | 128,0352   | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | -3,2       | 128,0348    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | n.i.                           |
| 5,6                      | 24   | 202,0722   | C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | -3,1       | 202,0715    | C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>                | N2-acetil-L-aminoadipato       |
| 6,5                      | 25   | 153,0193   | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | -3,6       | 153,0188    | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>                  | Di-hidroxibenzoato ou Patulina |
| 6,6                      | 26   | 487,1466   | C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -0,1       | 487,1465    | C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> | n.i.                           |
| 6,7                      | 28   | 203,0824   | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -1,7       | 203,0821    | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Triptofano                     |
| 6,9                      | 29   | 305,0776   | C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -0,8       | 305,0774    | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | n.i.                           |

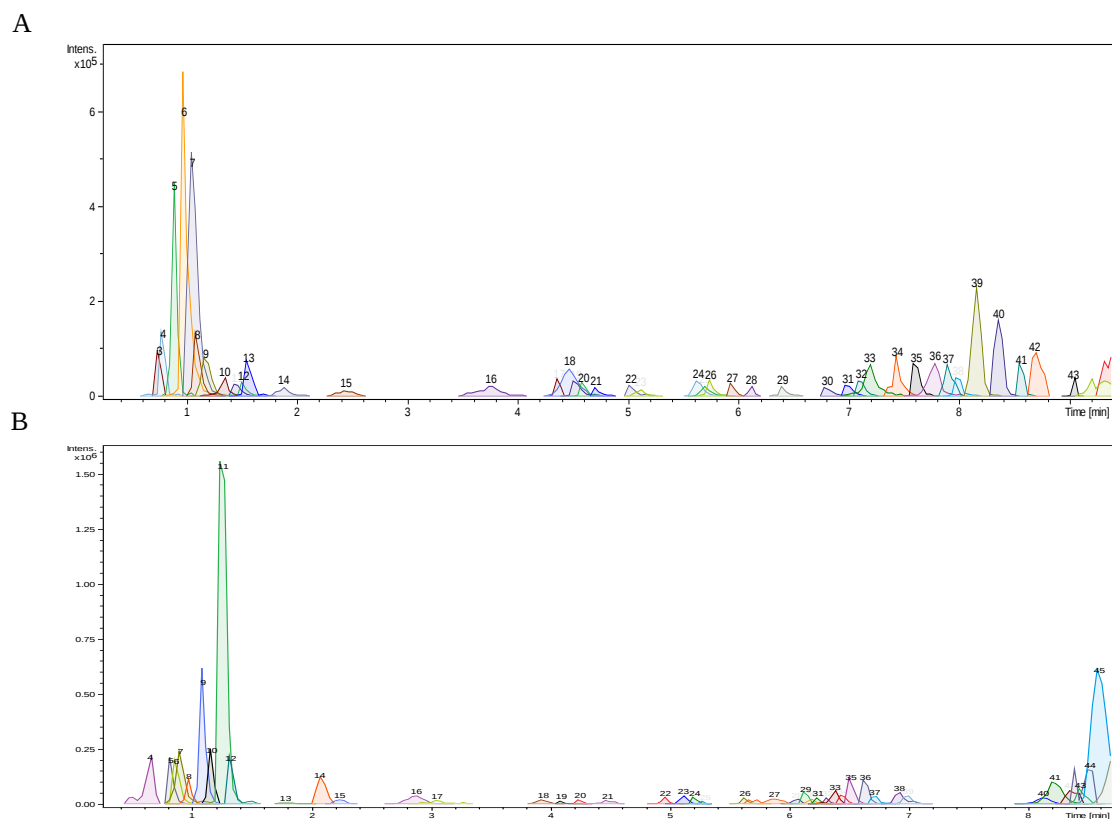
n.i.: não identificado com o auxílio do banco de dados



**Figura 40:** Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de *P. pulmonarius* EF88.

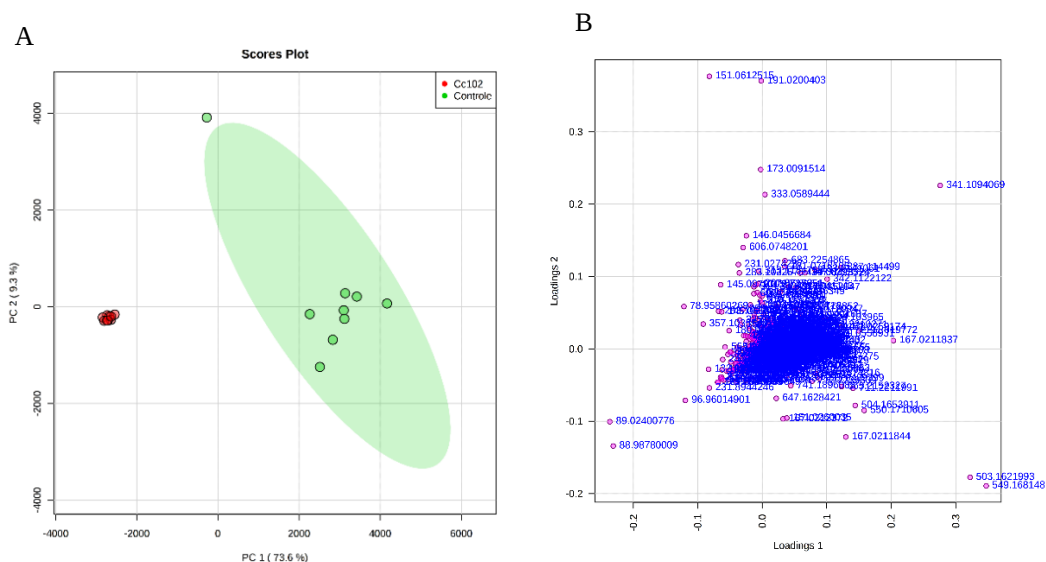
#### 4.2.2.3. Metabolômica do TCA-fermentado de *F. hepatica* CC102 vs TCA-Controle

O fungo *F. hepatica* CC102 foi cultivado em TCA e o seu perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 39A. Detectou-se aproximadamente 39 picos em 8 minutos de corrida. O controle pode ser observado na Figura 39B.



**Figura 41:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) *F. hepática* CC102 e (B) TCA-control.

Na Figura 40 é possível verificar a separação dos grupos referentes à amostra e controle. O qual confirma a diferença visual dos cromatogramas apresentados na Figura 39.



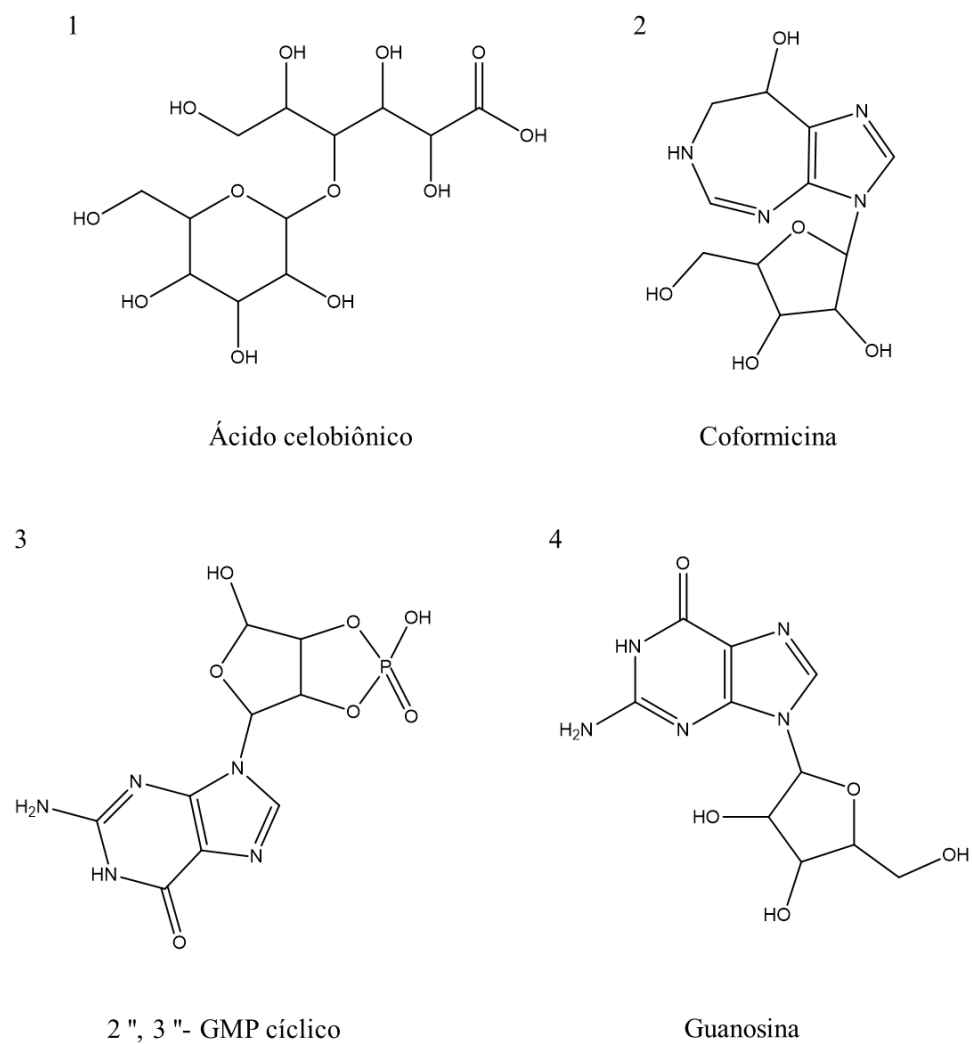
**Figura 42:** PCA dos dados de UHPLC-ESI(-)-MS de metabólitos gerados de TCA-fermentado de *G. lucidum* CC102 e TCA-controle e submetidas a extração com etanol 50%. (A) Gráfico de *scores* relativo à separação de grupos. (B) Gráfico *loadings* com projeção com íons com maior influência na separação do modelo.

Os principais íons foram selecionados e identificados. Foi atribuída a fórmula molecular a 11 íons, dos quais 4 íons foram relacionados a compostos, 3 a compostos com isômeros e 4 não foram identificados os compostos (Figura 41 e Tabela 11). Ao atribuir a fórmula molecular aos principais íons, notou-se que não houve semelhança com os íons presentes no controle. O íon  $m/z$  128,0350 foi detectado no UHPLC-ESI(+)-MS e UHPLC-ESI(-)-MS.

**Tabela 11:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *F. hepatica* CC102, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Retention Time (min.) | Peak | Measured <i>m/z</i> | Ion_formula                                                     | Aduct              | Error ppm | Theoric <i>m/z</i> | Neutral formula                                                 | Compound name                             |
|-----------------------|------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1,1                   | 8    | 357,1039            | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | -1,7      | 357,1033           | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>                 | Ácido celobiônico                         |
| 1,2                   | 9    | 283,1036            | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -2,5      | 283,1042           | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>   | Coformicina                               |
| 2,5                   | 15   | 128,0350            | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>                   | [M-H] <sup>-</sup> | -2,1      | 128,0348           | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                   | n.i.                                      |
| 3,8                   | 16   | 180,0667            | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | -3,3      | 180,0661           | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                  | Tirosina + 5 isômeros                     |
| 3,8                   | 16   | 243,0620            | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>    | [M-H] <sup>-</sup> | -1,3      | 243,0617           | C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>    | Spongouridine ou Pseudouridine            |
| 4,5                   | 18   | 128,0349            | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>                   | [M-H] <sup>-</sup> | -0,8      | 128,0348           | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                   | n.i.                                      |
| 4,5                   | 18   | 344,0404            | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P | [M-H] <sup>-</sup> | -2,2      | 344,0396           | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P | 2 ", 3 " - GMP cíclico                    |
| 4,6                   | 20   | 282,0841            | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -1,1      | 282,0838           | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>   | Guanosina                                 |
| 4,7                   | 21   | 309,1181            | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | 1,4       | 309,1186           | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                  | n.i.                                      |
| 5,6                   | 24   | 204,0303            | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | -3,1      | 204,0297           | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>                  | 6-hidroxiquinurenato ou ácido xanturênico |
| 6,1                   | 28   | 305,0779            | C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -1,9      | 305,0774           | C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>   | n.i.                                      |

Os compostos identificados são representados na Figura 41.

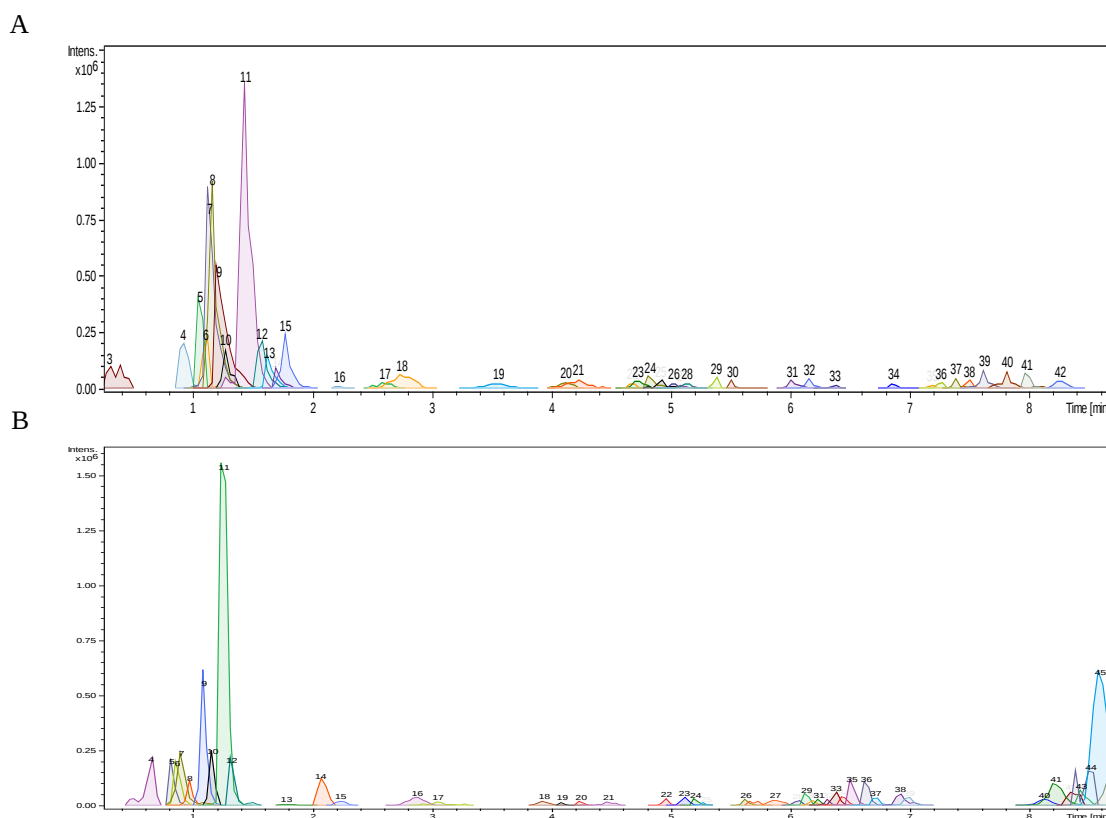


**Figura 43:** Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de *F. hepática* CC102.

#### 4.2.2.4. Metabolômica do TCA-fermentado de *P. lecomtei* CC40 vs TCA-Controle

A amostra fermentada com o fungo *P. lecomtei* CC40 foi submetida à análise UHPLC-ESI(-)-MS e o seu perfil cromatográfico pode ser observado na

Figura 42. O perfil cromatográfico da amostra fermentada com o fungo assemelhou-se ao perfil obtido nas análises do controle.



**Figura 44:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) *P. lecontei* CC40 e (B) TCA-controle.

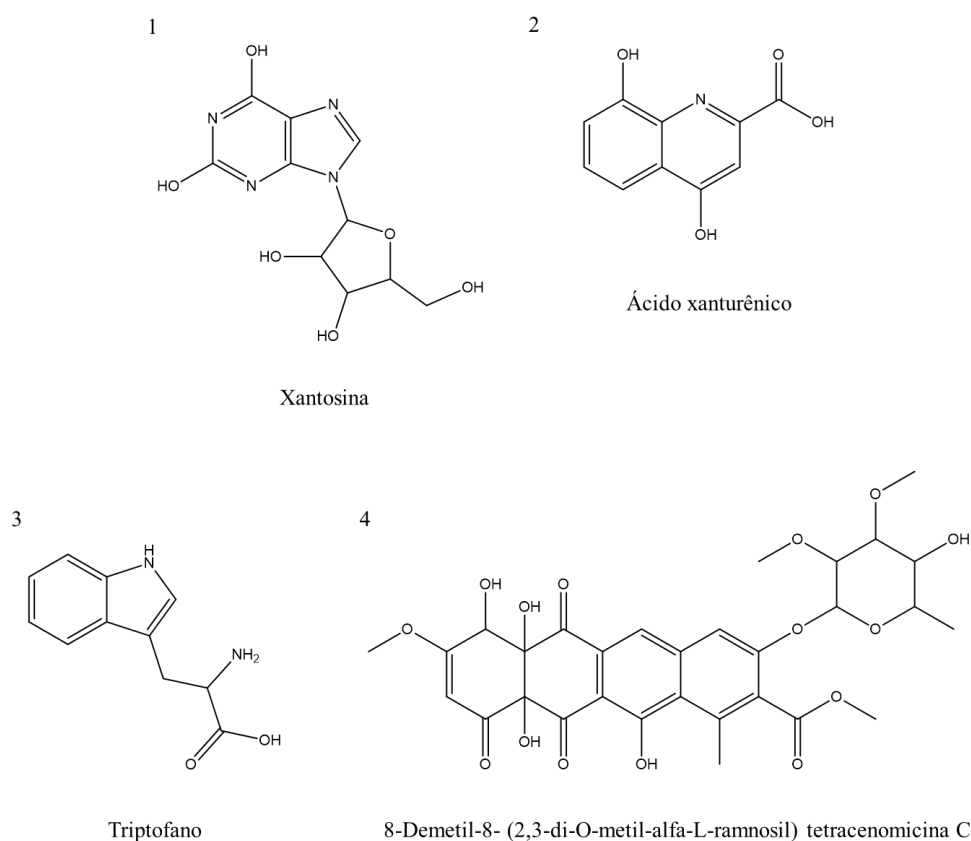
Entretanto ao construir o modelo PCA dos dados, as amostras separaram do controle, indicando a presença de íons distintos nos dois grupos (amostra e controle). Tal informação pode ser visualizada na Figura 43A. Os íons que mais influenciaram nessa separação são observados na Figura 43B.



**Tabela 12:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *P. lecontei* CC40, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto              | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                | Composto                                                        |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1,7                      | 13   | 133,0141   | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | 1,5        | 133,0142    | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                  | Ácido málico ou 3-desidro-L-treonato                            |
| 1,7                      | 13   | 605,1572   | C <sub>21</sub> H <sub>33</sub> O <sub>20</sub>               | [M-H] <sup>-</sup> | -0,3       | 605,1571    | C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>20</sub>               | n.i.                                                            |
| 1,8                      | 15   | 519,1561   | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>17</sub>               | [M-H] <sup>-</sup> | 1,1        | 519,1567    | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>               | n.i.                                                            |
| 2,8                      | 18   | 128,0350   | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | 2,8        | 128,0353    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | Oxoprolina + 3 isômeros                                         |
| 3,6                      | 19   | 151,0258   | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | 2,5        | 151,0261    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | Xantina                                                         |
| 4,2                      | 21   | 180,0664   | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | 1,1        | 180,0666    | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                | Tirosina + 5 isômeros                                           |
| 4,7                      | 23   | 257,0775   | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | 1,6        | 257,0779    | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> | (1-Ribosilimidazol) -4-acetato ou espongotimidina               |
| 4,8                      | 24   | 128,0351   | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | 1,4        | 128,0353    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | Oxoprolina + 3 isômeros                                         |
| 5,0                      | 26   | 309,1182   | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | 3,1        | 309,1191    | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>                | n.i.                                                            |
| 5,1                      | 28   | 283,0675   | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | 3,2        | 283,0684    | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> | Xantosina                                                       |
| 5,4                      | 29   | 164,0716   | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | 0,9        | 164,0717    | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Fenilalanina + 6 isômeros                                       |
| 6,0                      | 31   | 204,0297   | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | 2,9        | 204,0291    | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>                | Ácido xanturênico                                               |
| 6,2                      | 32   | 203,0828   | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -0,8       | 203,0826    | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Triptofano                                                      |
| 6,2                      | 32   | 407,0638   | C <sub>19</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -1,3       | 407,0633    | C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> | n.i.                                                            |
| 7,5                      | 38   | 631,1679   | C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>               | [M-H] <sup>-</sup> | -1,6       | 631,1668    | C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>               | 8-Demetil-8- (2,3-di-O-metil-alfa-L-ramnosil) tetracenomicina C |

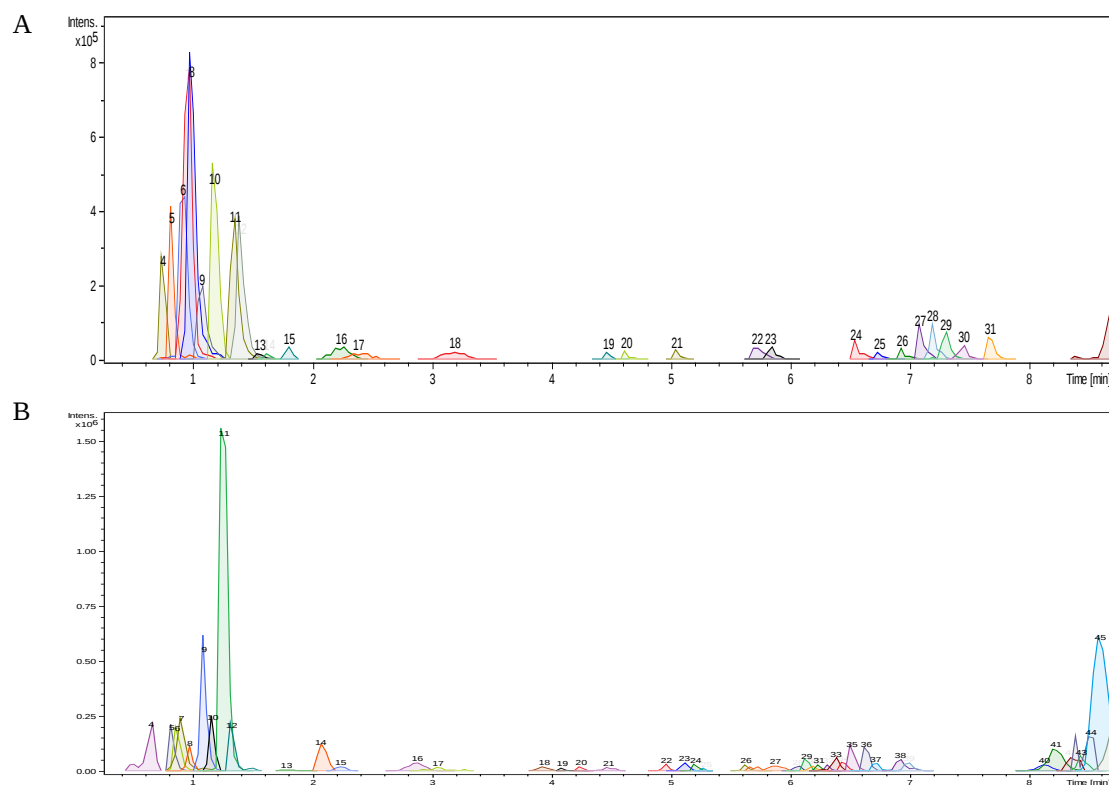
Na Figura 44 estão apresentados os compostos identificados na amostra.



**Figura 46:** Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de *P. lecomtei* CC40.

#### 4.2.2.5. Metabolômica do TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351 vs TCA-Controle

Nas amostras fermentadas pelo fungo *G. lucidum* CC351, detectou-se 31 picos cromatográficos (Figura 45).



**Figura 47:** Perfil dissect do cromatograma gerado em UHPLC-ESI(-)-MS de amostras de TCA-fermentados extraído com etanol 50% e diluído na proporção de 1:2 (500µL de extrato etanólico da amostra em 1000 µL de solvente). (A) *G. lucidum* CC351 e (B) TCA-controle.

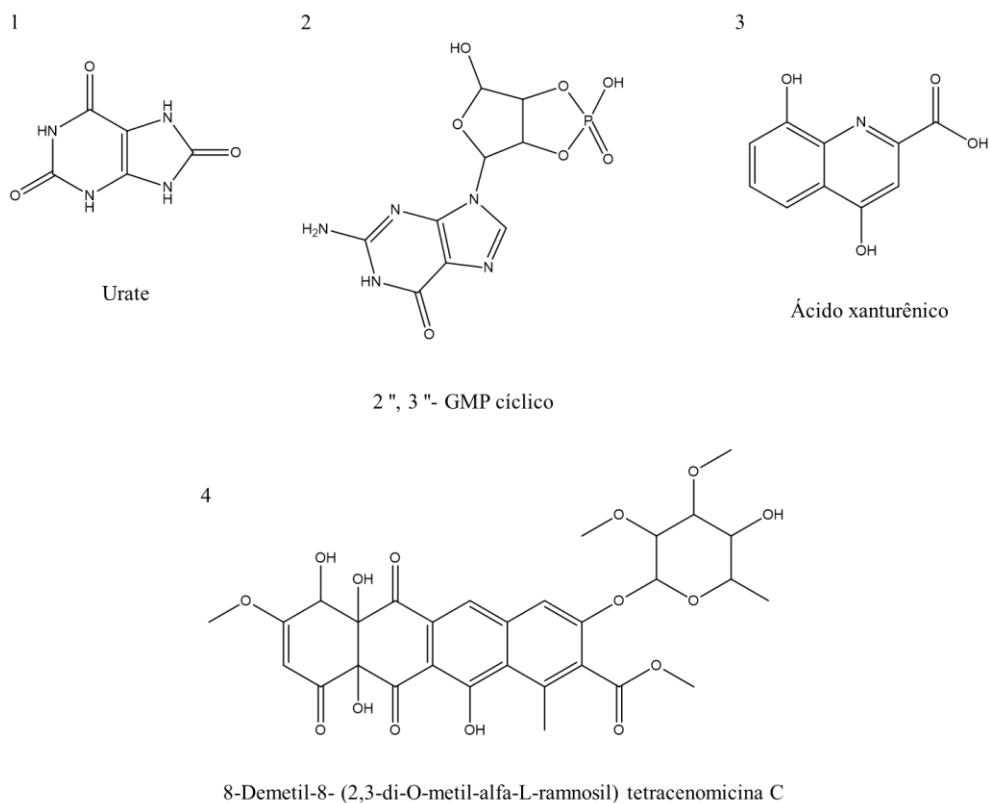
A PCA demonstrou uma leve separação dos grupos, os quais se encontram em um ponto do gráfico (Figura 46A).



**Tabela 13:** Metabólitos identificados em extrato etanólico de TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                  | Aduto              | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                  | Compostos                                                       |
|--------------------------|------|------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|------------|-------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1,2                      | 10   | 341,1096   | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | -3,6       | 341,1084    | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>                 | Melibiulose + 9 isômeros                                        |
| 1,4                      | 11   | 133,0142   | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>                    | [M-H] <sup>-</sup> | -3,7       | 133,0137    | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>                    | Ácido málico ou 3-desidro-L-treonato                            |
| 1,4                      | 12   | 191,0202   | C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>     | [M-H] <sup>-</sup> | 1,6        | 191,0205    | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>                    | Ácido cítrico + 7 isômeros                                      |
| 1,8                      | 15   | 167,0208   | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>     | [M-H] <sup>-</sup> | -1,6       | 167,0205    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>     | Urate                                                           |
| 3,2                      | 18   | 151,0258   | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>     | [M-H] <sup>-</sup> | -1,2       | 151,0256    | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>     | Aloxantina ou Xantina                                           |
| 4,5                      | 19   | 344,0397   | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P | [M-H] <sup>-</sup> | -0,3       | 344,0396    | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P | 2'', 3'' - GMP cíclico                                          |
| 4,6                      | 20   | 282,0849   | C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>9</sub> O                 | [M-H] <sup>-</sup> | 1,1        | 282,0852    | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>   | Guanosina ou Isoguanosina                                       |
| 5,1                      | 21   | 164,0716   | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | -2,4       | 164,0712    | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                  | Fenilalanina + 6 isômeros                                       |
| 5,7                      | 22   | 204,0297   | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>                  | [M-H] <sup>-</sup> | 0,1        | 204,0297    | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>                  | Ácido xanturênico                                               |
| 6,7                      | 25   | 741,1904   | C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> O <sub>20</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | -3,5       | 741,1878    | C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>20</sub>                 | Quercetina 3- (2G-xilosilrutínósido)                            |
| 7,2                      | 28   | 631,1685   | C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | -3,5       | 631,1663    | C <sub>30</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>                 | 8-Demetil-8- (2,3-di-O-metil-alfa-L-ramnosil) tetracenomicina C |

Os compostos identificados na amostra estão representados na Figura 47.



**Figura 49:** Compostos prospectados no extrato de TCA-fermentado de *G. lucidum* CC351.

### 4.3. Atividades biológicas dos metabólitos identificados

A utilização TCA tem sido uma boa alternativa para a suplementação da ração animal. Apesar da quantidade significativa de proteína de boa qualidade (cerca de 30%)<sup>139</sup>, este subproduto apresenta alguns fatores antinutricionais que podem ocasionar problemas na digestibilidade e rendimento animal.

A inclusão do pré-tratamento biológico com macrofungos agregou valor a TCA (TCA-fermentado), sendo observados alguns compostos bioativos diferentes, incluindo olissacarídeos, aminoácidos, esteróides, fenóis, terpenóides e nucleósidos, todos demonstrando exercer vários benefícios à saúde animal. Portanto, nessa etapa discutiremos as principais aplicações e a relação com a literatura do metabólitos identificados neste trabalho.

Os macrofungos apresentam habilidade de despolimerizar a lignina de TCA através de enzimas ligninolíticas (lacases e peroxidases) para acessar a celulose<sup>140</sup>. Ao alcançarem esta última, precisam vencer a cristalinidade da mesma, então se utilizam de enzimas celulolíticas (celulases, xilanases e outras hemicelulases), para obtenção da glicose como fonte de carbono<sup>141</sup>. Como a quebra da celulose é parcial, ocorre a liberação de trissacarídeos, dissacarídeos e monossacarídeos o qual foram detectados na análise. Detectou-se trissacarídeo de hexose no fungo *Ganoderma lucidum* CC351, utilizando ESI(+)-MS. Nas amostras de TCA-fermentado de *F. hepatica* CC102, foi identificado o dissacarídeo ácido celobiônico em ESI(-)-MS. Já o monossacarídeo Bis-D-frutose 2", 1: 2,1 "-dianidreto foi encontrado em amostras de *P. pulmonarius* EF88 em ESI(+)-MS. A presença destes compostos indica que o fungo degradou com efetividade a lignina, composto com fatores antinutricionais.

Os fungos são ricos em nucleosídeos, os quais consistem em uma base nitrogenada e um açúcar de 5 carbonos (ribose ou desoxirribose). Os nucleosídeos e nucleotídeos aumentam a função cerebral, afetam a modulação imune, influenciam o metabolismo dos ácidos graxos, contribuem para a absorção de ferro no intestino e melhoram o reparo do trato intestinal após danos<sup>142-144</sup>. Os nucleosídeos e nucleotídeos prospectados nas amostras e fungos são observados na Tabela 14. Foram identificados compostos esperados do metabolismo primário como guanosina e adenosina e também alguns não relacionados à literatura para os fungos como inosina, xantosina e 2", 3" - GMP cíclico nos fungos estudados neste trabalho. Os compostos adenosina e hipoxantina foram detectados em ESI (+) - MS, os demais foram detectados em ESI (-) - MS.

**Tabela 14:** Nucleosídeos e nucleotídeos presentes em TCA-fermentados de macrofungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *G. lucidum* CC351, *F. hepática* CC102 e *P. lecontei* CC40.

| Compostos              | FPB117 | EF88 | CC351 | CC102 | CC40 |
|------------------------|--------|------|-------|-------|------|
| Adenosina              |        |      | X     | X     | X    |
| Hipoxantina            |        | X    |       |       |      |
| Guanosina              |        |      |       | X     |      |
| Inosina                | X      |      |       |       |      |
| Xantosina              |        |      |       |       | X    |
| 2 ", 3 " - GMP cíclico |        |      | X     | X     |      |

Os aminoácidos são unidades básicas de proteínas e polipeptídeos, desempenham um papel importante em alguns processos metabólicos dos organismos vivos<sup>145-147</sup>. Os aminoácidos presentes em fungos florestais finlandeses foram detectados por Manninen (2018)<sup>148</sup>. Destacam-se prolina, arginina e triptofano. Dong *et al.*, (2018)<sup>147</sup> identificou prolina em *Lentinula edodes* cultivados em várias regiões por LC-MS. Os aminoácidos identificados no presente trabalho são apresentados na Tabela 15.

Os compostos triptofano e dihidroanticapsina foram usados no modo ESI(-)-MS e os demais compostos no modo ESI(+)-MS. Não há estudos mostrando a presença de Dihydroanticapsin no fungo *Schizophyllum commune*, os demais aminoácidos já foram relatados na literatura. Na literatura, o 4-guanidinobutanoato composto foi detectado em *Saccharomyces cerevisiae*<sup>149</sup> e em algumas bactérias, dentre elas, *Lactobacillus paracasei*<sup>150</sup> e *Escherichia coli*<sup>151</sup>.

**Tabela 15:** Aminoácidos presentes em TCA-fermentado dos macrofungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *G. lucidum* CC351, *F. hepática* CC102 e *P. lecomtei* CC40.

| Aminoácidos          | FPB117 | EF88 | CC351 | CC102 | CC40 |
|----------------------|--------|------|-------|-------|------|
| Prolina              | X      |      |       |       |      |
| Arginina             | X      |      |       | X     | X    |
| 3-indoleacrilato     |        |      | X     | X     | X    |
| Triptofano           |        | X    |       |       | X    |
| Dihidroanticapsina   | X      |      |       |       |      |
| 4-Guanidinobutanoato |        |      |       | X     | X    |

Na amostra TCA-fermentado *G. lucidum* CC351 foi identificado o composto ácido cinâmico em ESI(+)-MS. A presença deste composto no fungo já foi identificada em outros trabalhos<sup>152,153</sup>. O ácido cinâmico é um intermediário chave nas vias de shiquimato e fenilpropanóide<sup>154-156</sup>. São frequentemente encontrados em uma forma conjugada, constituindo os principais componentes de polifenóis complexos, como derivados acilados de flavonoides glicosilados<sup>157</sup>. Possuem diversas atividades biológicas como antioxidante, hepatoprotetor, ansiolítico, repelente de insetos, antidiabético e antiolesterolêmico<sup>158,159</sup>.

Os lipídeos desempenham um papel importante como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, pigmentos fotossensíveis, âncoras hidrofóbicas para proteínas, chaperonas para auxiliar no enovelamento de proteínas de membrana. Destacam-se outras atividades biológicas as quais são agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares. Essas propriedades abrangem uma gama de moléculas como ácidos graxos, fosfolipídeos, esteróides, esfingolípticos, terpeno e outros<sup>160</sup>. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos. Nas amostras analisadas neste trabalho por UHPLC-ESI(+)-MS, foi possível identificar os compostos N-Butyryl-L-homoserine lactone, ácido estearidônico e ácido erúcico quando a biomassa foi fermentada com os fungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88 e *P. lecomtei* CC40, respectivamente. A presença destes compostos nos fungos em estudo não foi relatada na literatura.

O composto 22-Oxo-docosanoate foi estudado por Sun e seus colaboradores (2019)<sup>161</sup> em fibras de algodão. Estes foram avaliados em UHPLC-ESI(+)-MS e UHPLC-ESI(-)-MS. Neste trabalho foram encontrados os ácidos graxos 22-oxo-docosanoato, ácido erúico e ácido estearidônico em TCA-fermentado *F. hepática* CC102, *P. lecomtei* CC40 e *P. pulmonarius* EF88, respectivamente. Ambos foram detectados no modo ESI(+)-MS.

O fósfolípídeo 1-linoleoilglicerofosfocolina foi detectado nas amostras TCA-fermentado *G. lucidium* CC351 em ESI(+)-MS. Este já foi relatado no fungo *Aspergillus oryzae* quando fermentou a planta *Astragalus radix*<sup>162</sup>. Mas não há relatos deste composto no fungo *G. lucidium* CC351.

O lipídeo Quercetina-3- (2G-xilosilrutínósido) foi encontrado em TCA-fermentado *P. pulmonarius* EF88 e *G. lucidum* CC351, modo de ionização ESI(+)-MS e ESI(+)-MS, respectivamente. Este é apontado como contribuinte importante para as atividades inibitórias contra a  $\alpha$ -glucosidase e lipase pancreática<sup>163-166</sup>. A presença desse composto foi relatada em plantas<sup>161,164</sup>, entretanto, não se observou relatos em fungos.

Os metabólitos esfingolipídicos desempenham um papel importante nas atividades biológicas. Ajudam na regulação de células fundamentais e diversos processos que incluem sobrevivência, crescimento celular e migração, dentre outros<sup>167-169</sup>. O composto fitosfingosina é um metabólito esfingolipídicos, o qual foi identificado no fungo FPB117, em ESI(+)-MS. A presença desse metabólito já foi relatada na literatura para os fungos *Pseudallescheria boydii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, and *Schizophyllum commune*<sup>170</sup>.

A pentostatina (desoxicoformicina) é um análogo da adenosina, pois imita a adenosina e pode inibir alguns processos dependentes da adenosina<sup>171,172</sup>. A pentostatina apresentou excelente atividade contra linfomas, talvez por causa de sua captação preferencial, ativação e efeitos no tecido linfóide<sup>173</sup>. Ela foi originalmente isolada de culturas de fermentação de *Streptomyces antibioticus*<sup>174,175</sup>. Entretanto este composto foi detectado em TCA-fermentado *S. commune* FPB117, modo de ionização ESI(+)-MS.

O 8-Demetil-8- (2,3-di-O-metil-alfa-L-ramnosil) tetracenomicina C é um composto poliketídico, membro da classe das tetracenomicinas. Essa classe é considerada um antineoplásico, o qual tem sido relatado para o gênero *Streptomyces*<sup>176-178</sup>. Neste trabalho, foram detectados estes compostos em TCA-fermentado *P. lecomtei* CC40 e *G. lucidum* CC351, ambos no modo ESI(-)-MS.

---

## **CONCLUSÃO**

## 5. Conclusão

A abordagem metabolômica aplicada neste trabalho contribuiu grandemente para o entendimento do metabolismo fúngico em torta de caroço de algodão utilizando cromatografia de ultra-alta eficiência acoplado a espectrometria de massas *tandem* (UHPLC-ESI-MS/MS, do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*) como ferramenta analítica.

O protocolo de metabolômica aqui utilizado mostrou-se eficiente para a análise de 54 amostras provenientes de torta de caroço de algodão fermentada com cinco espécies de fungo. Estes fungos são: *Schizophyllum commune* FPB117, *Pleurotus pulmonarius* EF88, *Fistulina hepática* CC102, *Pannus sp.* CC40 e *Ganoderma lucidum* CC351. Já o protocolo de extração demonstrou ser eficiente na extração de compostos com etapas reduzidas de preparo de amostra. Estes foram eficientes na detecção de picos com boa intensidade de forma rápida, sensível e seletiva. Os dados foram tratados quimiometricamente com o uso do XCMS® online e MetaboAnalyst, identificando-se os principais íons.

A TCA-fermentado *Schizophyllum commune* FPB117 e *Fistulina hepática* CC102 apresentaram alterações significativas na composição metabólica de torta de caroço de algodão, demonstrando serem favoráveis para degradar a lignina e produção de novos compostos, agregando valor a torta de caroço de algodão. A TCA-fermentado *Pleurotus pulmonarius* EF88 apresentou um perfil cromatográfico muito próximo ao controle, indicando que ele não foi eficiente para alterar a composição da torta de caroço de algodão.

Os compostos N-butiril-L-homoserina lactona, di-hidroanticapsina e inosina foram identificados em TCA-fermentado *S. commune* FPB117. Os compostos ácido estearidônico e hipoxantina foram detectados em TCA-fermentado *P. pulmonarius* EF88. O ácido erético, a xantosina e a adenosina foram detectados em TCA-fermentado *Pannus lecomtei* CC40. A adenosina, guanosina, 2", 3" - GMP cíclico e ácido celobiônico foram encontrados em TCA-fermentado *F. hepática* CC102. A

adenosina e 2",3"-GMP cíclico foram encontrados em *G. lucidum* CC351. Tais compostos não foram relatados na literatura relacionados com os fungos em estudo.

Assim, a metabolômica, que ainda é pouco explorada nos fungos *S. commune* FPB117, *P. pulmonarius* EF88, *F. hepática* CC102, *P. lecomtei* CC40. e *G. lucidum* CC351, foi descrita para detectar diversas classes de metabólitos através da técnica avançada UHPLC-MS/MS. Neste estudo, obteve-se um conjunto de informações inéditas sobre esses fungos. Tais informações abrem caminhos para a integração de cadeias produtivas de biodiesel (caroço de algodão), fungicultura (cogumelos comestíveis) e indústria de nutrição animal (insumos). Também contribuem para estudos envolvendo a desconstrução da biomassa lignocelulósica. Por fim o protocolo aqui apresentado poderá ser aplicado a outras espécies de fungos.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1 CHEN, Z. J. *et al.* Toward sequencing cotton (*Gossypium*) genomes. *Plant physiology* **145**, 1303-1310 (2007).
- 2 ELKIN, R. G. Influence of Plant Toxins on Laying Hen Performance and Egg Quality. In: *Egg Innovations and Strategies for Improvements*. Academic Press p. 499-512 (2017).
- 3 ZHANG, W. J. *et al.* Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. *Livestock Science* **111**, 1-9 (2007).
- 4 SINGHANIA, R. R. *et al.* *Waste to wealth*. Springer (2017).
- 5 JÖNSSON, L. J. & MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource technology* **199**, 103-112 (2016).
- 6 ZHU, N. *et al.* Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for biofuels* **9**, 42 (2016).
- 7 LEE, J. A. Cotton as a world crop. *Cotton*, 1-25 (1984).
- 8 MCALINDEN, S. P. *et al.* *The potential effects of the 2017-2025 EPA/NHTSA GHG/fuel economy mandates on the US economy*. Center for Automotive Research Ann Arbor, MI (2016).
- 9 WUNDERLIN, R. *et al.* Atlas of Florida Plants [S. M. Landry and KN Campbell (application development), USF Water Institute.]. *Institute for Systematic Botany, University of South Florida, Tampa* (2018). Disponível em : <<http://florida.plantatlas.usf.edu/>>. Acesso em 27 de janeiro de 2020.
- 10 ABRAPA (Associação Brasileira de Produtores de Algodão) *Algodão no Mundo*. Disponível em: <<https://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>>. Acesso em 15 de dezembro de 2019.
- 11 CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento ). *Indicadores da agropecuária*. Conab (2008).
- 12 USDA. (United States Department of Agriculture) *USDA Agricultural Projections to 2027*. (2018).
- 13 FERREIRA, I. L. F., E.C. . *Industrialização da Pluma*. ABRAPA (2007).
- 14 SILVA, I. *et al.* Estudo das fases fenológicas do algodão (*Gossypium hirsutum* L.). *Revista Científica Eletrônica de Agronomia* **10**, 1-10 (2011).
- 15 BELTRÃO, N. D. M. *et al.* Ecofisiologia do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L. r. latifolium Hutch.). Beltrão, NE de M.; Oliveira, MIP de. *Ecofisiologia das culturas de algodão, amendoim, gergelim, mamona, pinhão-mansão e sisal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica **1**, 65-124 (2011).
- 16 CARVALHO, P. P. *Manual do algodoeiro*. Instituto de Investigação Científica Tropical, (Portugal) (1996).
- 17 TOWNSEND, C. R. *et al.* Utilização de subprodutos e resíduos agrícolas na alimentação de ruminantes. *Embrapa Rondônia-Circular Técnica (INFOTECA-E)* (1997).
- 18 POORE, M., SCOTT, M. & GREEN Jr, J. Performance of beef heifers grazing stockpiled fescue as influenced by supplemental whole cottonseed. *Journal of animal science* **84**, 1613-1625 (2006).
- 19 DE SOUZA, J., PRESEAU, C. & LOCK, A. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed

- affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. *Journal of dairy science* **101**, 172-185 (2018).
- 20 ROGERS, G. M., POORE, M. H. & PASCHAL, J. C. Feeding cotton products to cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice* **18**, 267-294 (2002).
- 21 WILLIAMS, G. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *Journal of Animal Science* **67**, 785-793 (1989).
- 22 ABSALAN, M. *et al.* Feeding of whole cottonseed on performance, carcass characteristics and intestinal morphology of Zandi lambs. *South African Journal of Animal Science* **41**, 309-317 (2011).
- 23 POORE, M. Whole cottonseed in sorghum-silage based diets for developing heifers. *Journal of Animal Science* **72**, 382 (1994).
- 24 PRESTON, R., BARTLE, S. & RULE, D. Effect of whole cottonseeds in cattle finishing diets on growth, efficiency and body fat composition. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **2**, 505-506 (1989).
- 25 BARBOSA, E. N. R. Torta de algodão com suplementação enzimática para frangos de corte. Tese (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (2016).
- 26 CRAVEN, L. *et al.* The Australian wild species of *Gossypium*. In: *Challenging the Future: Proceedings of the World Cotton Research Conference I*. CSIRO 278-281 (1994).
- 27 MOOD, S. H. *et al.* Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **27**, 77-93 (2013).
- 28 DZIONEK, A. *et al.* Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* **19**, 28-36 (2016).
- 29 MOSIER, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology* **96**, 673-686 (2005).
- 30 SALVACHÚA, D. *et al.* Sugar recoveries from wheat straw following treatments with the fungus *Irpex lacteus*. *Bioresource technology* **131**, 218-225 (2013).
- 31 SHIRKAVAND, E. *et al.*, Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **54**, 217-234 (2016).
- 32 TIAN, X. F., FANG, Z. & GUO, F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **6**, 335-350 (2012).
- 33 WAN, C. & LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology advances* **30**, 1447-1457 (2012).
- 34 THIRIBHUVANAMALA, G. *et al.* Induction of lignolytic enzyme activities in different agro residues by the white rot fungi, *Pleurotus sajor-caju*. *International Journal of Chemical Studies* **5**, 89-94 (2017).
- 35 SAHA, B. C. *et al.* Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* **109**, 29-35 (2016).
- 36 VAN KUIJK, S. *et al.* Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: a review. *Biotechnology advances* **33**, 191-202 (2015).

- 37 JALČ, D. Straw enrichment for fodder production by fungi. In *Agricultural Applications*. Springer (2002).
- 38 SULLIVAN, R., SMITH, J. E. & ROWAN, N. J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in biology and medicine* **49**, 159-170 (2006).
- 39 WASSER, S. P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology* **89**, 1323-1332 (2011).
- 40 PATERSON, R. R. M. & LIMA, N. Biomedical effects of mushrooms with emphasis on pure compounds. (2014).
- 41 WHITE, J. *et al.* Reply to Rzymiski and Klimaszyk regarding comment on "Mushroom poisoning: a proposed new clinical classification. *Toxicon: Journal of the International Society on Toxinology* (2019).
- 42 HALL, I. R. *et al.* *Edible and poisonous mushrooms of the world*. Timber Press Portland (2003).
- 43 LIN, H.C. *et al.* Biosynthesis of bioactive natural products from Basidiomycota. *Organic & biomolecular chemistry* **17**, 1027-1036 (2019).
- 44 GUILLAMÓN, E. *et al.* Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* **81**, 715-723 (2010).
- 45 KOZARSKI, M. *et al.* Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules* **20**, 19489-19525 (2015).
- 46 CHATTERJEE, S. *et al.* Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. *Environmental Science and Pollution Research* **24**, 19480-19493 (2017).
- 47 FENG, B. & YANG, Z. Studies on diversity of higher fungi in Yunnan, southwestern China: A review. *Plant diversity* **40**, 165-171 (2018).
- 48 ARAÚJO, A. P. F. Tratamento da torta de semente de algodão por autoclavagem e macrofungos para degradação de gossipol. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, (2018).
- 49 SOARES-NETO, C. Degradação de gossipol por macrofungos e análise do secretoma de *Panus lecomtei* durante crescimento em caroço de algodão. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília-UnB (2019).
- 50 RASHAD, F. M. *et al.* Recycling of agro-wastes for *Ganoderma lucidum* mushroom production and *Ganoderma* post mushroom substrate as soil amendment. *Waste management* **88**, 147-159 (2019).
- 51 KUMAR, A. *et al.* Gel-based purification and biochemical study of laccase isozymes from *Ganoderma sp.* and its role in enhanced cotton callogenesis. *Frontiers in microbiology* **8**, 674 (2017).
- 52 KADIMALIEV, D. *et al.* Use of *Panus tigrinus* fungi for production of pressed materials from cotton plant waste. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* **40**, 57-61 (2004).
- 53 SORNLAKE, W. *et al.* Characterization of cellulolytic enzyme system of *Schizophyllum commune* mutant and evaluation of its efficiency on biomass hydrolysis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **81**, 1289-1299 (2017).
- 54 GIRMAY, Z. *et al.* Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates. *AMB Express* **6**, 87 (2016).

- 55 LI, X., PANG, Y. & ZHANG, R. Compositional changes of cottonseed hull substrate during *P. ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. *Bioresource Technology* **80**, 157-161 (2001).
- 56 PINHEIRO, V. E. *et al.* Trametes versicolor laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and biosystems engineering*, 1-8 (2019).
- 57 GADD, G. M. *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press (2001).
- 58 ADENIPEKUN, C. & LAWAL, R. Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **7**, 62-68 (2012).
- 59 PHAN, C.W. & SABARATNAM, V. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Applied microbiology and biotechnology* **96**, 863-873 (2012).
- 60 LI, X. *et al.* Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by crude extracts from spent mushroom substrate and its possible mechanisms. *Current microbiology* **60**, 336-342 (2010).
- 61 LAU, K. L., TSANG, Y. Y. & CHIU, S. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere* **52**, 1539-1546 (2003).
- 62 EGGEN, T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production-*Pleurotus ostreatus*-for bioremediation of creosote contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **44**, 117-126 (1999).
- 63 AYOTAMUNO, J. M. *et al* PAH removal from Nigerian oil-based drill-cuttings with spent oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrate. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **8**, 914-919 (2010).
- 64 TREJO-HERNANDEZ, M., LOPEZ-MUNGUIA, A. & RAMIREZ, R. Q. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* **36**, 635-639 (2001).
- 65 CHIU, S.W. *et al.* Removal of spilled petroleum in industrial soils by spent compost of mushroom *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere* **75**, 837-842 (2009).
- 66 CHEN, S., GE, W. & BUSWELL, J. A. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry* **271**, 318-328 (2004).
- 67 SINGH, A. D. *et al.* Decolourisation of chemically different dyes by enzymes from spent compost of *Pleurotus sajor-caju* and their kinetics. *African Journal of Biotechnology* **9** (2010).
- 68 VIKINESWARY, S. & ABDULLAH, N. Extraction of enzymes from spent compost of *Pleurotus sajor-caju* and its potential use for decolourisation of synthetic dyes. *MJS* **21**, 9-16 (2002).
- 69 ANNUAR, M. *et al.* Kinetics and energetics of azo dye decolorization by *Pycnoporus sanguineus*. *Water, air, and soil pollution* **202**, 179-188 (2009).
- 70 KHAMMUANG, S. & SARNTHIMA, R. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue R decolourisation. *Biotechnology* **6**, 408-413 (2007).
- 71 PAPINUTTI, L. & FORCHIASSIN, F. Adsorption and decolorization of dyes using solid residues from *Pleurotus ostreatus* mushroom production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **15**, 1102-1109 (2010).

- 72 ZHOU, Q. *et al.* Biosorption of Methylene Blue onto spent corncob substrate: kinetics, equilibrium and thermodynamic studies. *Water Science and Technology* **63**, 2775-2780 (2011).
- 73 VATS, A. & MISHRA, S. Identification and evaluation of bioremediation potential of laccase isoforms produced by *Cyathus bulleri* on wheat bran. *Journal of hazardous materials* **344**, 466-479 (2018).
- 74 MA, L. *et al.* Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. *Biochemical engineering journal* **82**, 1-9 (2014).
- 75 SIRACUSA, G. *et al.* PCB in the environment: bio-based processes for soil decontamination and management of waste from the industrial production of *Pleurotus ostreatus*. *New biotechnology* **39**, 232-239 (2017).
- 76 LAW, W. M. *et al.* Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*. *Chemosphere* **52**, 1531-1537 (2003).
- 77 KARANASIOS, E. *et al.* Degradation and adsorption of pesticides in compost-based biomixtures as potential substrates for biobeds in Southern Europe. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**, 9147-9156 (2010).
- 78 PETTA, T. *Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos*, Universidade de São Paulo, (2008).
- 79 HAUTBERGUE, T., Jamin, E., Debrauwer, L., Puel, O. & Oswald, I. From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. *Natural product reports* **35**, 147-173 (2018).
- 80 DEMAİN, A. L. & Fang, A. The natural functions of secondary metabolites. In: *History of modern biotechnology I*. Springer (2000).
- 81 FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bulletin of the World Health Organization* **79**, 780-790 (2001).
- 82 ALBERTS, A. *et al.* Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**, 3957-3961 (1980).
- 83 ENDO, A., KURODA, M. & TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *The Journal of antibiotics* **29**, 1346-1348 (1976).
- 84 ENDO, A. *et al.* Biosynthesis of ML-236B (compactin) and monacolin K. *The Journal of antibiotics* **38**, 444-448 (1985).
- 85 ZHAO, C. *et al.* Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: a comprehensive review. *International journal of biological macromolecules* **121**, 1160-1178 (2019).
- 86 SCHÜFFLER, A. Secondary metabolites of basidiomycetes. In: *Physiology and genetics*. Springer (2018).
- 87 OPATZ, T., KOLSHORN, H. & ANKE, H. Sterelactones: new isolactarane type sesquiterpenoids with antifungal activity from *Stereum* sp. IBWF 01060. *The Journal of antibiotics* **61**, 563 (2008).

- 88 LIERMANN, J. C. *et al.* Hirsutane-type sesquiterpenes with uncommon modifications from three basidiomycetes. *The Journal of organic chemistry* **75**, 2955-2961 (2010).
- 89 ISAKA, M. *et al.* Sterostreins F–O, illudalanes and norilludalanes from cultures of the Basidiomycete *Stereum ostrea* BCC 22955. *Phytochemistry* **79**, 116-120 (2012).
- 90 GEHRT, A. *et al.* Nitidon, a new bioactive metabolite from the basidiomycete *Junghuhnia nitida* (Pers.: Fr.) Ryv. *Zeitschrift fuer Naturforschung C* **53**, 89-92 (1998).
- 91 KAWAI TAKASHI, M. S. *et al.* Antitumor agent. (2005).
- 92 TATEISHI KOICHI , H. H., Matsunaga Kenichi Antiallergic agent. (2005).
- 93 SCHULTES, R. E. & HOFMANN, A. Pflanzen der Gotter. *Hallwag, Bern, Stuttgart* (1980).
- 94 ZHOU, Z.-Y. & LIU, J.-K. Pigments of fungi (macromycetes). *Natural product reports* **27**, 1531-1570 (2010).
- 95 VINING, L. C. Functions of secondary metabolites. *Annual review of microbiology* **44**, 395-427 (1990).
- 96 TEUSINK, B. *et al.* 17 Metabolic Control Analysis as a Tool in the Elucidation of the Function of Novel Genes. In: *Methods in Microbiology*. Elsevier (1998).
- 97 FIEHN, O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. In: *Functional genomics*. Springer (2002).
- 98 FOX, E. M. & HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current opinion in microbiology* **11**, 481-487 (2008).
- 99 MACHELEIDT, J. *et al.* Regulation and role of fungal secondary metabolites. *Annual review of genetics* **50**, 371-392 (2016).
- 100 SALEM, M. A. *et al.* Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. *Metabolites* **10**, 37 (2020).
- 101 BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* **58**, 1 (2005).
- 102 VILLAS-BÔAS, S. G. & BRUHEIM, P. The potential of metabolomics tools in bioremediation studies. *Omics: a journal of integrative biology* **11**, 305-313 (2007).
- 103 GOODACRE, R. *et al.* Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *TRENDS in Biotechnology* **22**, 245-252 (2004).
- 104 ZHOU, B. *et al.* LC-MS-based metabolomics. *Molecular BioSystems* **8**, 470-481 (2012).
- 105 LUAN, H., WANG, X. & CAI, Z. Mass spectrometry-based metabolomics: Targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders. *Mass spectrometry reviews* **38**, 22-33 (2019).
- 106 WANG, Z. Big data mining powers fungal research: recent advances in fission yeast systems biology approaches. *Current genetics* **63**, 427-433 (2017).
- 107 WANG, M. *et al.* Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **19**, 173-182 (2005).

- 108 SHYUR, L.-F. & YANG, N.-S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Current opinion in chemical biology* **12**, 66-71 (2008).
- 109 LINDO, L. *et al.* Role of *Trichoderma arundinaceum* tri10 in regulation of terpene biosynthetic genes and in control of metabolic flux. *Fungal Genetics and Biology* **122**, 31-46 (2019).
- 110 BAIDOO, E. E. K. Microbial metabolomics: a general overview. In: *Microbial Metabolomics*. Humana Press (2019).
- 111 PHILLIPS, M. *et al.* Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis* **87**, 44-52 (2007).
- 112 LAU, S. K. *et al.* Identification of specific metabolites in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* using metabolomics: exploration of potential biomarkers. *Emerging microbes & infections* **4**, 1-10 (2015).
- 113 DUNN, W. B. & ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**, 285-294 (2005).
- 114 WECKWERTH, W. *Metabolomics: methods and protocols*. Springer Science & Business Media (2007).
- 115 MISHUR, R. J. & REA, S. L. Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: Detection of biomarkers of aging and of age-related diseases. *Mass spectrometry reviews* **31**, 70-95 (2012).
- 116 PUTRI, S. P. & FUKUSAKI, E. *Mass spectrometry-based metabolomics: a practical guide*. CRC Press (2014).
- 117 SENSEN, C. W. *Handbook of genome research: genomics, proteomics, metabolomics, bioinformatics, ethics and legal issues; Vol. 1 und 2*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2005).
- 118 SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C. *et al.* Untargeted metabolomics strategies—challenges and emerging directions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **27**, 1897-1905 (2016).
- 119 SHULAEV, V. *et al.* Metabolomics for plant stress response. *Physiologia plantarum* **132**, 199-208 (2008).
- 120 FENG, Z. *et al.* Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. *Food Chemistry*, 125914 (2019).
- 121 KRISHNAN, P., KRUGER, N. & RATCLIFFE, R. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of experimental botany* **56**, 255-265 (2005).
- 122 EMWAS, A. H. *et al.* NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* **9**, 123 (2019).
- 123 RODRIGUES NETO, J. C. Prospecção de marcadores químicos relacionados ao Amarelecimento Fatal em folhas de *Elaeis guineensis* utilizando abordagem metabolômica. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás (2017).
- 124 CAVALCANTI, C. G. C. Metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose na identificação de alvos metabólicos para aumento da produção de etanol 2G. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás (2019).
- 125 SHRIVER, L. P. *Mass Spectrometry-Based Metabolomics: A Practical Guide*. Springer (2016).

- 126 TSUGAWA, H. *et al.* Practical non-targeted gas chromatography/mass spectrometry-based metabolomics platform for metabolic phenotype analysis. *Journal of bioscience and bioengineering* **112**, 292-298 (2011).
- 127 PUTRI, S. P. *et al.* Current metabolomics: technological advances. *Journal of bioscience and bioengineering* **116**, 9-16 (2013).
- 128 SAITO, K. & MATSUDA, F. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual review of plant biology* **61**, 463-489 (2010).
- 129 SATRIA, D. *et al.* Mass spectrometry-based untargeted metabolomics and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of Lingzhi (*Ganoderma lingzhi*) during the developmental stages. *Molecules* **24**, 2044 (2019).
- 130 KOULMAN, A. *et al.* Semi-quantitative and structural metabolic phenotyping by direct infusion ion trap mass spectrometry and its application in genetical metabolomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry* **23**, 2253-2263 (2009).
- 131 LU, Y. *et al.* Comparative metabolomics in Glycine max and Glycine soja under salt stress to reveal the phenotypes of their offspring. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 8711-8721 (2013).
- 132 RAZZAQ, A. *et al.* Metabolomics: A Way Forward for Crop Improvement. *Metabolites* **9**, 303 (2019).
- 133 TRYGG, J., HOLMES, E. & LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabolomics. *Journal of proteome research* **6**, 469-479 (2007).
- 134 GOMES, T. G. *et al.* Degradação de ésteres de forbol da torta de pinhão-manso por macrofungos e potencial como substrato para produção de cogumelos comestíveis. In: Encontro de pesquisa e inovação da Embrapa Agroenergia. *Embrapa Agroenergia-Resumo em anais de congresso (ALICE)* (2015).
- 135 MACHADO, A. E. V. Casca de coco verde em combinação com outros resíduos agroindustriais para produção de cogumelos comestíveis. *União Pioneira da Integração Social* (2016).
- 136 CUNHA, J. R. B. P. Processo de destoxificação da torta da semente de *Jatropha curcas* L. (pinhão- manso) utilizando enzimas extracelulares de macrofungos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras (2017).
- 137 VAN DEN BERG, R. A. *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics* **7**, 142 (2006).
- 138 GOODPASTER, A. M., RAMADAS, E. H. & KENNEDY, M. A. Potential effect of diaper and cotton ball contamination on NMR-and LC/MS-based metabolomics studies of urine from newborn babies. *Analytical chemistry* **83**, 896-902 (2011).
- 139 NASCIMENTO, C. L. M. M. J. *et al.* Valor nutritivo do farelo de algodão para suínos em crescimento. *Revista Científica de Produção Animal* **20**, 9-14 (2018).
- 140 FERNANDEZ-FUEYO, E. *et al.* Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into

- selective ligninolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 5458-5463 (2012).
- 141 ISROI, I. *et al.* Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot  
fungi and its applications: a review *BioResources* **6**, 5224-5259 (2011).
- 142 YAMAMOTO, S. *et al.* Role of nucleosides and nucleotides in the immune  
system, gut reparation after injury, and brain function. *Nutrition* **13**, 372-374  
(1997).
- 143 SCHLIMME, E., MARTIN, D. & MEISEL, H. Nucleosides and nucleotides:  
natural bioactive substances in milk and colostrum. *British Journal of  
Nutrition* **84**, 59-68 (2000).
- 144 SUN, Y. & LI, W. Activity-guided isolation and structural identification of  
immunomodulating substances from *Pleurotus eryngii* byproducts.  
*International immunopharmacology* **51**, 82-90 (2017).
- 145 NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*.  
Artmed Editora (2018).
- 146 DELGADO-POVEDANO, M. *et al.* Study of sample preparation for  
quantitative analysis of amino acids in human sweat by liquid  
chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **146**, 310-317 (2016).
- 147 DONG, M. *et al.* Simultaneous quantification of free amino acids and 5'-  
nucleotides in shiitake mushrooms by stable isotope labeling-LC-MS/MS  
analysis. *Food chemistry* **268**, 57-65 (2018).
- 148 MANNINEN, H. *et al.* Free amino acids and 5'-nucleotides in Finnish forest  
mushrooms. *Food chemistry* **247**, 23-28 (2018).
- 149 RICHTER, C. L. *et al.* Metabolomic measurements at three time points of a  
chardonnay wine fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *American  
Journal of Enology and Viticulture* **66**, 294-301 (2015).
- 150 NEALON, N., WORCESTER, C. & RYAN, E. *Lactobacillus paracasei*  
metabolism of rice bran reveals metabolome associated with *Salmonella  
Typhimurium* growth reduction. *Journal of applied microbiology* **122**, 1639-  
1656 (2017).
- 151 HONG, H., FILL, T. & LEADLAY, P. F. A common origin for  
guanidinobutanoate starter units in antifungal natural products. *Angewandte  
Chemie International Edition* **52**, 13096-13099 (2013).
- 152 HELENO, S. A. *et al.* Antimicrobial and demelanizing activity of  
*Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their  
synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and chemical toxicology*  
**58**, 95-100 (2013).
- 153 VELJOVIĆ, S. *et al.* Chemical composition, antiproliferative and antioxidant  
activity of differently processed *Ganoderma lucidum* ethanol extracts.  
*Journal of food science and technology* **54**, 1312-1320 (2017).
- 154 SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various  
pharmacological activities. *J. Chem. Pharm. Res* **3**, 403-423 (2011).
- 155 LEE, H. G. *et al.* Optimization of green extraction methods for cinnamic acid  
and cinnamaldehyde from Cinnamon (*Cinnamomum cassia*) by response  
surface methodology. *Food science and biotechnology* **27**, 1607-1617 (2018).
- 156 SILVA, A. T. *et al.* Cinnamic Acid Conjugates in the Rescuing and  
Repurposing of Classical Antimalarial Drugs. *Molecules* **25**, 66 (2020).
- 157 Tian, Y. *et al.* Naturally occurring cinnamic acid sugar ester derivatives.  
*Molecules* **21**, 1402 (2016).

- 158 ADISAKWATTANA, S. Cinnamic acid and its derivatives: Mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. *Nutrients* **9**, 163 (2017).
- 159 BORDES, C. *et al.* Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative structure-activity relationship) models. *Frontiers in microbiology* **10**, 829 (2019).
- 160 CHRISTIE, W. Lipid analysis. *D Bridgwater* (2003).
- 161 SUN, S. *et al.* Transcriptome Sequencing and Metabolome Analysis Reveal Genes Involved in Pigmentation of Green-Colored Cotton Fibers. *International journal of molecular sciences* **20**, 4838 (2019).
- 162 KIM, A. J. *et al.* Metabolomics-based optimal koji fermentation for tyrosinase inhibition supplemented with *Astragalus Radix*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 110171 (2012).
- 163 HONG, C. *et al.* Identification and characterization of polyphenols in different varieties of *Camellia oleifera* seed cakes by UPLC-QTOF-MS. *Food Research International* **126**, 108614 (2019).
- 164 FRANCO, E. P. D. D. *et al.* Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **35**, 42-49 (2020).
- 165 MARTINEZ-GONZALEZ, A. I. *et al.* Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions. *Molecules* **22**, 669 (2017).
- 166 ZHANG, B. *et al.* Phenolic profiles of 20 *Canadian lentil* cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry* **172**, 862-872 (2015).
- 167 LEE, Y. M. *et al.* A practical and cost-effective synthesis of D-erythro-sphingosine from D-ribo-phytosphingosine via a cyclic sulfate intermediate. *Synthesis* **2011**, 867-872 (2011).
- 168 LEE, J.-M., LIM, H.-S. & CHUNG, S.-K. A short and efficient stereoselective synthesis of all four diastereomers of sphingosine. *Tetrahedron: Asymmetry* **13**, 343-347 (2002).
- 169 NAGASAWA, T. *et al.* Phytosphingosine is a novel activator of GPR120. *The Journal of Biochemistry* **164**, 27-32 (2018).
- 170 BARRETO-BERGTER, E., PINTO, M. R. & RODRIGUES, M. L. Structure and biological functions of fungal cerebrosides. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **76**, 67-84 (2004).
- 171 HO, A. D. *et al.* Purine degradative enzymes in circulating malignant cells of patients with chronic B cell neoplasia. *Hematological oncology* **5**, 9-17 (1987).
- 172 KEMPIN, S. *et al.* Pentostatin, Cyclophosphamide, and Rituximab Followed by Alemtuzumab for Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: A Phase 2 Trial of the ECOG-Acrin Cancer Research Group (E2903). *Acta haematologica* **142**, 224-232 (2019).
- 173 DO CARMO, G. M. *et al.* Cordycepin (3'-deoxyadenosine) and pentostatin (deoxycofomycin) against *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology* **199**, 47-51 (2019).
- 174 WOO, P. W. *et al.* A novel adenosine and ara-a deaminase inhibitor,(R)-3-(2-deoxy- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl)-3, 6, 7,

- 8-tetrahydroimidazo [4, 5-d][1, 3] diazepin-8-ol. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **11**, 641-643 (1974).
- 175 AGARWAL, R. P. Inhibitors of adenosine deaminase. *Pharmacology & therapeutics* **17**, 399-429 (1982).
- 176 MENÉNDEZ, N. *et al.* Deoxysugar transfer during chromomycin A3 biosynthesis in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*: new derivatives with antitumor activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 167-177 (2006).
- 177 WU, X. *et al.* Taxonomic study of a chromomycin-producing strain and reclassification of *Streptomyces cavourensis* subsp. *washingtonensis* as a later synonym of *Streptomyces griseus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **58**, 2783-2787 (2008).
- 178 XIONG, Z. Q. *et al.* Characterization of *Streptomyces padanus* JAU4234, a producer of actinomycin X2, fungichromin, and a new polyene macrolide antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 589-592 (2012).

---

## **APÊNDICES**

**Tabela 16:** Apêndice A: Metabólitos identificados em extrato etanólico do TCA-Controle, analisadas por UHPLC(+)-ESI-MS/MS.

| Tempo de retenção (min.) | Pico | m/z medido | Fórmula do íon                                                | Aduto               | Erro (ppm) | m/z teórico | Fórmula neutra                                                 | Composto                                    |
|--------------------------|------|------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|------------|-------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1,1                      | 8    | 118,0873   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>  | -9,3       | 118,0862    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                 | Valina ou Betaína                           |
| 1,3                      | 9    | 138,0546   | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>  | 2,8        | 138,0549    | C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>                  | Antranilato + 4 isômeros                    |
| 1,6                      | 12   | 163,0601   | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>  | 0          | 163,0601    | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                  | Líquenina + 19 isômeros                     |
| 1,7                      | 13   | 146,0916   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | [M+H] <sup>+</sup>  | 5,6        | 146,0924    | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>   | Ácido 4-guanidinobutírico                   |
| 4,7                      | 24   | 130,0493   | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>  | 5,2        | 130,0498    | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                  | 4-Oxoprolina + 5 isômeros                   |
| 4,9                      | 25   | 194,1170   | C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>  | 2,7        | 194,1175    | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>                | Isoprocabe ou 2,3,5-trimetacabe             |
| 6,1                      | 29   | 188,0701   | C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>2</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>  | 2,7        | 188,0706    | C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | 3-indoleacrilato                            |
| 8,5                      | 42   | 244,1899   | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub>               | [M+H] <sup>+</sup>  | 3,5        | 244,1907    | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>                | n.i.                                        |
| 8,7                      | 43   | 343,2965   | C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>  | -3,0       | 343,2955    | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | n.i.                                        |
| 9,5                      | 48   | 337,2352   | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> NaO <sub>4</sub>              | [M+Na] <sup>+</sup> | -0,7       | 337,2349    | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>                 | Ácido di-hidroxi-octadecenóico + 4 isômeros |
| 10,4                     | 55   | 279,2318   | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>  | 0,1        | 279,2319    | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>                 | Linolenato + 6 isômeros (ácidos graxos)     |
| 10,4                     | 55   | 496,3401   | C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P             | [M+H] <sup>+</sup>  | -0,7       | 497,3475    | C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P <sup>+</sup> | 1-Palmitoilglicerofosfocolina               |
| 10,6                     | 57   | 277,2163   | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>                | [M+H] <sup>+</sup>  | -0,3       | 278,2240    | C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>                 | Ácido estearidônico                         |

**Tabela 17:** Apêndice B: Metabólitos identificados em extrato etanólico do TCA-Controle, analisadas por UHPLC(-)-ESI-MS/MS.

| Retention Time (min.) | Peak | Measured <i>m/z</i> | Ion_formula                                                    | Aduct              | Error ppm | Theoric <i>m/z</i> | Neutral formula                                                | Compound name                  |
|-----------------------|------|---------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------|-----------|--------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 0,9                   | 7    | 341,1085            | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | 1,2       | 341,1089           | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>                | Melibiulose + 16 isômeros      |
| 1,1                   | 9    | 341,1094            | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | -1,2      | 341,1089           | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>                | Melibiulose + 16 isômeros      |
| 1,2                   | 10   | 711,2213            | C <sub>26</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>19</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | 0,1       | 711,2214           | C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>19</sub> | n.i.                           |
| 2,1                   | 14   | 191,0199            | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>                   | [M-H] <sup>-</sup> | -1,0      | 191,0197           | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>                   | Citrato + 7 isômeros           |
| 2,9                   | 16   | 151,0261            | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>    | [M-H] <sup>-</sup> | 0,4       | 151,0261           | C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>    | Xantina                        |
| 4,3                   | 20   | 202,0719            | C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub>                 | [M-H] <sup>-</sup> | 1,2       | 202,07121          | C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>                 | N2-acetil-L-aminoadipato       |
| 5,0                   | 22   | 153,0195            | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>                   | [M-H] <sup>-</sup> | -0,9      | 153,0193           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>                   | Di-hidroxibenzoato ou Patulina |
| 5,2                   | 24   | 407,0653            | C <sub>20</sub> H <sub>7</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | [M-H] <sup>-</sup> | -1,5      | 407,0647           | C <sub>20</sub> H <sub>8</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | n.i.                           |
| 5,6                   | 26   | 137,0240            | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>                   | [M-H] <sup>-</sup> | 3,1       | 137,0244           | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>                   | 2-hidroxi-5-metilquinona       |
| 6,1                   | 29   | 741,1902            | C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>16</sub> | [M-H] <sup>-</sup> | -0,7      | 741,1897           | C <sub>33</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>16</sub> | n.i.                           |
| 6,4                   | 34   | 609,1467            | C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | -0,9      | 609,1461           | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>                | Rutin + 4 Isômeros             |
| 6,9                   | 38   | 360,2393            | C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>6</sub>                | [M-H] <sup>-</sup> | -0,5      | 360,2392           | C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>6</sub>                | n.i.                           |