

Universidade Federal de São Carlos UFSCar
Departamento de Química
Programa de pós-graduação em Química

Estudo químico de *Erythricium salmonicolor*, sua interação com a bactéria *Xanthomonas citri* e síntese de complexos antimicrobianos.

Luciano da Silva Pinto

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), Universidade Federal de São Carlos, para Obtenção do título de Doutor em Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fátima G. F. da Silva

Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2022

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Luciano da Silva Pinto, realizada em 28/06/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos (FCFRP/USP)

Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira (UFGD)

Profa. Dra. Lourdes Cardoso de Souza Neta (UNEB)

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais,
que mesmo diante de tudo na vida,
nunca deixaram de incentivar que eu
lutasse pelos meus sonhos

Nunca se pensou em viajar através do tempo, ainda não se sabe ao certo quem fez o tempo e porque para o tempo realizamos ações... Ações, percepções, preâmbulos de uma vida, uma jornada, uma gota d'água em meio ao mar... Indubitável forma de fazer afago ao nosso íntimo, nosso ser, nossa história!

Quem nunca? Quem nunca!

(autor da tese)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por todas as bênçãos.

A Prof.^a Dr.^a Maria Fátima G. F. da Silva pela oportunidade, ensinamentos, confiança, e por acima de tudo ter sido um exemplo de pessoa e profissional na área da Química.

Agradeço aos meus amigos do laboratório, corpo docente, técnicos, e funcionários do departamento por todo o apoio, companheirismo, e comprometimento que tiveram todo o tempo para que esse trabalho pudesse ser realizado da melhor forma possível.

A Renata Doricci, por sempre ajudar nas articulações administrativas

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPESP e CAPES

O presente trabalho foi realizado com apoio da FAPESP processo nº 2015/26320-7 e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CC - Cromatografia em coluna

COSY - Correlated spectroscopy

d - dubleto

Da - Dalton

DAD - Detectro de arranjo de diodo

dd - duplo dubleto

DDA - Data-dependent aquisition

HMBC - Heteronuclear multiple quantum correlation

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

HRMS - High Resolution Mass Spectrometry

HSQC - Heteronuclear single quantum correlation

Hz - Hertz

J - Constante de acoplamento

m - multiplete

nm - Nanômetro

NOESY-2D - Nuclear Overhauser Spectroscopy

ppm - partes por milhão

RMN - Ressonância magnética nuclear

s - singleto

sl - singleto largo

SPE - Solid Phase Extraction

t - tripleto

tap - Tripleto aparente

UV - Ultra-violeta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1 - Nicho ecológico da interação dos organismos vivos no ecossistema [adaptado de Beck et al., 2019].	6
FIGURA 1. 2 – Workflow para processamento e dereplicação de dados adquiridos por espectrometria de massas de alta resolução.	9
FIGURA 2. 1 - Cromatograma com as regiões de corte para transposição de método em HPLC-DAD para fracionamento em extração em fase sólida (C18).	15
FIGURA 2. 2 – Esquema do experimento de biotransformação de rutina por <i>E. salmonicolor</i> .	20
FIGURA 2. 3 – Estrutura química do substrato, rutina	21
FIGURA 2. 4 - Ilustração de uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.	27
FIGURA 3. 1 – Comparação dos cromatogramas do extrato da cultura do microrganismo com o branco do meio de cultura.	34
FIGURA 3. 2 - Plotagem dos scores da PC1 x PC2 que representaram quase 90% dos dados analisados.	35
FIGURA 3. 3 - Estrutura do ácido fusárico (1)	36
FIGURA 3. 4 - Proposta de fragmentação para o ácido fusárico (1)	37
FIGURA 3. 5 - Proposta de íons fragmentos para o ácido fusárico (1) e para o ácido 9,10-dehidrofusárico (2)	38
FIGURA 3. 6 - Estrutura da substância 21 .	39
FIGURA 3. 7 - Espectro de RMN de ¹ H de 21 .	40
FIGURA 3. 8 - Estrutura do 4-metoxibenzaldeído (31)	40
FIGURA 3. 9 - Estrutura do ácido 3-hidroxifenilacético (32)	41
FIGURA 3. 10 – Estrutura da [Cyclo(phenylalanylprolyl)] (30)	42

FIGURA 3. 11 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a substância [Cyclo(phenylalanylprolyl)] (30).....	43
FIGURA 3. 12 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a substância fusarina (18).....	45
FIGURA 3. 13 – Estrutura da bikaverina (15).....	46
FIGURA 3. 14 – Proposta de mecanismo de fragmentação para bikaverina (15)	47
FIGURA 3. 15 – Rede molecular no modo positivo do branco do solvente e controle do meio de cultura (BDA) em preto, fração F50 ACN em azul e F100 ACN em vermelho.	52
FIGURA 3. 16 – Expansão do cluster dos ácidos fusárico (1) e 9,10-dehidro fusárico (2).....	54
FIGURA 3. 17 – Expansão do cluster da bikaverina (15).....	55
FIGURA 3. 18 – Estrutura da 6-Deoxibikaverina (16) e me-oxo-pre-bikaverina (17).....	55
FIGURA 3. 19 – Expansão do cluster da Beauvericina (19).....	56
FIGURA 3. 20 - Proposta de fragmentação para beauvericina (19).....	56
FIGURA 3. 21 - Expansão do cluster da 6-Deoxyoxysporidinone (28).....	57
FIGURA 3. 22 – Rede molecular no modo negativo do branco do solvente e controle do meio de cultura (BDA) em preto, fração F50 ACN em azul e F100 ACN em vermelho.	58
FIGURA 3. 23 - Proposta de mecanismo de fragmentação para as antraquinonas 24-27	59
FIGURA 3. 24 - Rede molecular no modo negativo de ionização da interação fungo/bactéria em meio batata dextrose ágar.....	62
FIGURA 3. 25 - Rede molecular no modo positivo de ionização da interação fungo/bactéria em meio batata dextrose ágar.....	63

FIGURA 3. 26 – Cluster do ácido fusárico demonstrando o aumento da concentração (azul) dos derivados dessa classe quando comparado com outras moléculas de m/z maiores que diminuíram em concentração (rosa).....	64
FIGURA 3. 27 – Expansão da região de nodos da rede molecular no modo negativo com a porcentagem de aumento da concentração relativa dos íons de moléculas já caracterizadas e de outras ainda não relatadas em experimentos anteriores.	65
FIGURA 3. 28 - Molecular networking dos extratos a partir da biotransformação analisados por UPLC-HRMS MS/MS no modo positivo	67
FIGURA 3. 29 - Molecular networking dos extratos a partir da biotransformação analisados por UPLC-HRMS MS/MS no modo negativo.	68
FIGURA 3. 30 - Expansão da rede molecular no modo negativo do experimento de biotransformação	69
FIGURA 3. 31 – Comparação dos espectros da rutina (A), com os produtos de biotransformação $[M-H]^- = 701.1394$ e $[M-H]^- = 715.1542$	70
FIGURA 3. 32 – Biossíntese para o ácido fusárico (1)	72
FIGURA 3. 33 - Proposta de biogênese para bikaverina e seus derivados. ..	73
FIGURA 3. 34 - Proposta de biogênese para os derivados de antraquinonas 22-27	73
FIGURA 3. 35 - Proposta de biogênese para a fusarina C	74
FIGURA 3. 36 - Proposta de biogênese para 4,6'-Anhydrooxysporidinone .	75
FIGURA 3. 37 - Estrutura do complexo 35 da rutina com cobre.....	78
FIGURA 3. 38 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de rutina com cobre (35)	80
FIGURA 3. 39 - Estrutura do complexo 36 da rutina com zinco.	80
FIGURA 3. 40 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de rutina com zinco (36).....	81

FIGURA 3. 41 - Estrutura do complexo 37 da rutina com ferro.....	82
FIGURA 3. 42 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de rutina com ferro (37)	83
FIGURA 3. 43 - Estrutura do complexo 38 da naringina com cobre.....	83
FIGURA 3. 44 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de naringina com cobre (38).....	84
FIGURA 3. 45 - Estrutura do complexo 39 da naringina com zinco.	85
FIGURA 3. 46 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de naringina com zinco (39).....	86
FIGURA 3. 47 - Estrutura do complexo 40 da naringina com ferro.	86
FIGURA 3. 48 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de naringina com ferro (40).....	87
FIGURA 3. 49 - Estrutura do complexo 41 da ácido vanílico com cobre. ...	89
FIGURA 3. 50 Expansão do mapa de contornos HSQC do complexo 41 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4T).....	89
FIGURA 3. 51 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de ácido vanílico com o íon cobre (41).....	90
FIGURA 3. 52 - Estrutura do complexo 41 da ácido vanílico com zinco.....	91
FIGURA 3. 53 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de ácido vanílico com zinco (42).	92
FIGURA 3. 54 - Estrutura do complexo 41 do ácido vanílico com ferro.	92
FIGURA 3. 55 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo do ácido vanílico com ferro (43).	94
FIGURA 3. 56 - Mapa de contornos HSQC do complexo 35 Rutina com cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	128

LISTA DE MATERIAL SUPLEMNETAR

Figura S 1 - Espetro de RMN de ^1H de 1 (CD_3OD , 9.4 T).....	102
Figura S 2 - Espetro de RMN de ^{13}C de 1 (CD_3OD , 9.4 T).....	102
Figura S 3 – Espetro de massas de alta resolução HRMS de 1	103
Figura S 4 – Espetro de massas HRMS MS/MS de 1 (energia de colisão: 27.1 ev).....	103
Figura S 5 - Espetro de RMN de ^1H de 2 (CD_3OD , 9.4 T).....	104
Figura S 6 - Espetro de RMN de ^{13}C de 2 (CD_3OD , 9.4 T).....	104
Figura S 7 – Espetro de RMN de ^{13}C de 21 (D_2O , 14.1 T).....	105
Figura S 8 - Mapa de contornos NOESY-2D de 21 (D_2O , 14.1 T)	106
Figura S 9 - Mapa de contornos COSY de 21 (D_2O , 14.1 T)	107
Figura S 10 - Mapa de contornos HSQC de 21 (D_2O , 14.1 T).....	107
Figura S 11 - Mapa de contornos HMBC de 21 (D_2O , 14.1 T).....	108
Figura S 12 - Espetro de RMN de ^1H de 31 (CD_3OD , 9.4 T).....	108
Figura S 13 - Espetro de RMN de ^{13}C de 31 (CD_3OD , 9.4 T).....	109
Figura S 14 - Espetro de RMN de ^1H de 32 (CD_3OD , 9.4 T).....	109
Figura S 15 - Espetro de RMN de ^{13}C de 32 (CD_3OD , 9.4 T).....	110
Figura S 16 - Espetro de RMN de ^1H de 30 (CD_3OD , 9.4 T).....	110
Figura S 17 - Espetro de RMN de ^{13}C de 30 (CD_3OD , 9.4 T).....	111
Figura S 18 - Espetro de MS^1 de 30 (erro de 0.4 ppm).....	111
Figura S 19 - Espetro de MS^2 de 30 (energia de colisão 15ev)	112
Figura S 20 - Espetro de RMN de ^1H de 18 (CD_3OD , 9.4 T).....	112
Figura S 21 - Espetro de RMN de ^{13}C de 18 (CD_3OD , 9.4 T).....	113
Figura S 22 - Mapa de contornos COSY de 18 (CD_3OD , 9.4 T)	113
Figura S 23 - Mapa de contornos HSQC de 18 (CD_3OD , 9.4 T)	114
Figura S 24 - Espetro de MS^1 de 18 (erro de 0.5 ppm).....	114

Figura S 25 - Espectro de MS ² de 18 , [M-H] ⁻ = 430.1874, usando energia de colisão de 0 eV (A), 15 eV (B), e 30 eV (C).....	115
Figura S 29 - Espectro de RMN de ¹ H de 15 (CDCl ₃ , 9.4 T).....	115
Figura S 30 - Espectro de RMN de ¹³ C de 15 (CDCl ₃ , 9.4 T).....	116
Figura S 31 - Mapa de contornos HSQC de 15 (CDCl ₃ , 9.4 T)	116
Figura S 32 - Mapa de contornos HMBC de 15 (CDCl ₃ , 9.4 T).	117
Figura S 33 – Espectro de massas HRMS da substância 15 (erro: 1.0 ppm)	118
Figura S 34 – Espectro de MS ² de 15 , [M+H] ⁺ = 383.0756, usando energia de colisão de 15 eV (A), 25 eV (B), 40 eV (C) e 60 eV (D).	118
Figura S 35 - Espectro de massas MS ¹ de beauvericina (19) (erro: 0.8 ppm)	118
Figura S 36 - Espectro de massas MS ² de beauvericina (19) (energia de colisão: 35.8 eV)	119
Figura S 37 - Espectro de massas MS ¹ de (22) (erro: 1.2 ppm)	119
Figura S 38 - Espectro de massas MS ² de (22) (energia de colisão: 30.9 eV)	120
Figura S 39 - Espectro de massas MS ¹ de (23) (erro: -1.2 ppm)	120
Figura S 40 - Espectro de massas MS ² de (23) (energia de colisão: 31.3 eV)	121
Figura S 41 - Espectro de massas MS ¹ de (24) (erro: 2.8 ppm)	121
Figura S 42 - Espectro de massas MS ² de (24) (energia de colisão: 29.8 eV)	122
Figura S 43 - Espectro de massas MS ¹ de (25) (erro: -0.3 ppm)	122
Figura S 44 - Espectro de massas MS ² de (25) (energia de colisão: 30.5 eV)	123
Figura S 45 - Espectro de massas MS ¹ de (26) (erro: 1.8 ppm)	123

Figura S 46 - Espectro de massas MS ² de (26) (energia de colisão: 26.2 eV)	124
Figura S 47 - Espectro de massas MS ¹ de (27) (erro: -1.6 ppm)	124
Figura S 48 - Espectro de massas MS ² de (27) (energia de colisão: 32.0 eV)	125
Figura S 49 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 35 Rutina com cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T)	125
Figura S 50 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 35 Rutina com cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T)	126
Figura S 51 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 35 Rutina com cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T)	127
Figura S 52 - Mapa de contornos COSY do complexo 35 Rutina com cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T)	127
Figura S 53 - Espectro de HRMS de 35 [M+H] ⁺ =1282.2281	128
Figura S 54 - Espectro de MS ² do complexo 35 [M+H] ⁺ =1282.2281	129
Figura S 55 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 36 Rutina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T)	129
Figura S 56 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 36 de Rutina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4T)	130
Figura S 57 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 36 de Rutina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4T)	130
Figura S 58 – Mapa de contornos COSY do complexo 36 de Rutina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4T)	131
Figura S 59 – Mapa de contornos HSQC do complexo 36 de Rutina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4T)	132
Figura S 60 – Mapa de contornos HMBC do complexo 36 de Rutina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4T)	133

Figura S 61 - Espectro de HRMS de 36 [M+H] ⁺ =1283.2285	133
Figura S 62 - Espectro de MS ² de 36 [M+H] ⁺ =1283.2285.....	134
Figura S 63 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 37 Rutina e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	134
Figura S 64 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 37 Rutina e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).	135
Figura S 65 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 37 Rutina e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	136
Figura S 66 - Espectro de HRMS do complexo 37 [M+H] ⁺ =1274.2275	136
Figura S 67 - Espectro de MS ² do complexo 37 [M+H] ⁺ =1274.2275.....	136
Figura S 68 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 38 Naringina e cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	137
Figura S 69 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 38 Naringina e cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	138
Figura S 70 - Espectro de HRMS de 38 [M+H] ⁺ =1222.2803	138
Figura S 71 - Espectro de MS ² de 38 [M+H] ⁺ =1222.2803.....	138
Figura S 72 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 39 Naringina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	139
Figura S 73 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 39 Naringina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	140
Figura S 74 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 39 Naringina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).	140
Figura S 75 – Mapa de contornos HSQC do complexo 39 Naringina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	141
Figura S 76 – Mapa de contornos HMBC do complexo 39 Naringina e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	142
Figura S 77 - Espectro de HRMS de 39 [M+H] ⁺ =1223.2791	142

Figura S 78 - Espectro de MS ² de 39 [M+H] ⁺ =1223.2791.....	142
Figura S 79 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 40 Naringina e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	143
Figura S 80 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 40 Naringina e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	144
Figura S 81 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 40 Naringina e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	144
Figura S 82 - Espectro de HRMS de 40 [M+H] ⁺ =1214.2782	144
Figura S 83 - Espectro de MS ² de 40 [M+H] ⁺ =1214.2782.....	145
Figura S 84 - Espectro de RMN de ¹ H do complexo 41 ácido vanílico e cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	145
Figura S 85 - Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 41 ácido vanílico e cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	146
Figura S 86 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 41 ácido vanílico e cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	147
Figura S 87 – Mapa de contornos COSY do complexo 41 ácido vanílico e cobre (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	148
Figura S 88 - Espectro de MS ¹ de 41 [M-H] ⁻ =398.0063	148
Figura S 89 - Espectro de MS ² de 41 [M-H] ⁻ =398.0063.....	149
Figura S 90 – Espectro de RMN de ¹ H do complexo 42 ácido vanílico e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	149
Figura S 91 – Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 42 ácido vanílico e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	150
Figura S 92 – Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 42 ácido vanílico e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).	151
Figura S 93 – Mapa de contornos HSQC do complexo 42 ácido vanílico e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).	152

Figura S 94 – Mapa de contornos HMBC do complexo 42 ácido vanílico e zinco (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	153
Figura S 95 - Espectro de MS ¹ de 42 [M-H] ⁻ =397.0052	153
Figura S 96 - Espectro de MS ² de 42 [M-H] ⁻ =397.0052	154
Figura S 97 – Espectro de RMN de ¹ H do complexo 43 ácido vanílico e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	154
Figura S 98 – Espectro de RMN de ¹³ C do complexo 43 ácido vanílico e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	155
Figura S 99 – Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo 43 ácido vanílico e ferro (DMSO- <i>d</i> ₆ , 9.4 T).....	156
Figura S 100 - Espectro de MS ¹ de 43 [M+]=390.0034	156
Figura S 101 - Espectro de MS ² de 43 [M+]=390.0034	157

LISTA DE TABELAS

TABELA 3. 1 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de 15 com os dados descritos na literatura.	48
TABELA 3. 2 – Relação de moléculas identificadas e/ou anotadas por UPLC-HRMS MS/MS junto com as bases de dados.....	50
TABELA 3. 3 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da rutina (padrão) com o complexo de rutina com cobre (35).....	79
TABELA 3. 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) da bact.....	95

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO DE *Erythricium salmonicolor*, SUA INTERAÇÃO COM A BACTÉRIA *Xanthomonas citri* E SÍNTESE DE COMPLEXOS ANTIMICROBIANOS. A busca de produtos naturais bioativos tem sido cada vez mais importante diante do cenário mundial de controle de doenças, sejam elas ocasionadas por patógenos ou fitopatógenos. Os microrganismos que assolam as culturas brasileiras têm desenvolvido mecanismos de resistência diante de muitos controles químicos, sendo necessária a busca constante de alternativas para superar esses desafios. Assim, entender como esses organismos se desenvolvem na natureza, em seu processo de patogenicidade com suas plantas hospedeiras, tem sido uma abordagem de sucesso no desenvolvimento de protótipos de novos antimicrobianos. Neste trabalho foi realizado o estudo químico do fungo *Erythricium salmonicolor* por técnicas como CC, HPLC-DAD, HPLC-UV e a caracterização da composição química utilizando as técnicas UPLC-HRMS MS/MS e RMN-1D e 2D que resultaram na identificação das substâncias **1-34**. Além disso, foi realizado o estudo da curva de crescimento deste fungo em meio BDA analisando os extratos por GC-MS e organizando as informações com o auxílio de análise de PCA (Análise de Componente Principal) e pode-se verificar que o período ideal para a cultura do microrganismo foi de nove dias e as substâncias provenientes destes extratos **44-60** foram identificadas em comparação com os espectros depositados na biblioteca NIST com o livro Adams. Ainda, para determinar o potencial biotecnológico do fungo, este foi submetido ao estudo de biotransformação do composto rutina em meio Czapek que rendeu o produto de biotransformação **21**. E por fim foi realizado a complexação dos ligantes rutina, naringina e ácido vanílico com os metais cobre II, zinco II e ferro II, sendo estes caracterizados por RMN-1D, 2D e espectrometria de massas, além de serem submetidos ao teste de concentração inibitória mínima (CIM) frente a bactéria

Xanthomonas citri, onde verificou-se que o complexo de naringina com zinco foi o mais ativo tendo CIM de $\sim 200 \mu\text{M}$.

ABSTRACT,

CHEMICAL STUDY OF *Erythricium salmonicolor*, ITS INTERACTION WITH THE BACTERIA *Xanthomonas citri* AND SYNTHESIS OF ANTIMICROBIAL COMPLEXES. The search for bioactive natural products has been increasingly important in the world scenario of disease control, whether pathogens or phytopathogens. The microorganisms that plague Brazilian cultures have developed resistance mechanisms in the face of many chemical controls, requiring a constant search for alternatives to overcome these challenges. Thus, understanding how these organisms develop in nature in their pathogenicity process with their host plants has been a successful approach in the development of prototypes of new antimicrobials. In this work, the chemical study of the fungus *Erythricium salmonicolor* was carried out by techniques such as CC, HPLC-DAD, HPLC-UV and the characterization of the chemical composition using the UPLC-HRMS MS/MS and RMN-1D and 2D techniques that resulted in substances 1- 34. In addition, the study of the growth curve of this fungus in PDA medium was carried out, analyzing the extracts by GC-MS and organizing the information with the aid of PCA analysis (Principal Component Analysis) and it was possible to verify that the ideal period for the microorganism was cultured for nine days and substances from these extracts 44-60 were identified in comparison with the spectra deposited in the NIST library with the book Adams. Also, to determine the biotechnological potential of the fungus, it was submitted to the study of biotransformation of the substrate rutin in a poor medium (Czapek) which yielded the biotransformation product 21. Finally, the complexation of the ligands rutin, naringin and vanillic acid with metals copper II, zinc II and iron II, which are characterized by NMR-1D, 2D and mass spectrometry, in addition to being subjected to the inhibitory concentration test (MIC) against the bacterium *Xanthomonas citri* where it was found that the complex of naringin with zinc was the most active having a MIC of ~200 μ M.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Produtos naturais como fonte de moléculas para o mundo	1
1.2.	Rubelose e Melanose, doenças de Citros causadas por fungos	2
1.3.	Etiologia.....	3
1.4.	A ecologia química como ferramenta para busca de novas moléculas bioativas	5
1.5.	Estudos de metabolização de substâncias por fungos	7
1.6.	Metabolômica e processamento de dados	8
1.7.	Estudos metabolômicos da interação patógeno/hospedeiro	9
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1.	Materiais e equipamentos	11
2.2.	Estudo da curva de crescimento do fungo <i>E. salmonicolor</i> (ES).....	13
2.3.	Modelagem quimiométrica	14
2.4.	Fracionamento e isolamento dos constituintes do extrato de <i>E. salmonicolor</i>	14
2.5.	Estudo do perfil químico da cultura de <i>E. salmonicolor</i> por UPLC-HRMS MS/MS	15
2.6.	Estudo da interação do fungo <i>E. salmonicolor</i> com a bactéria <i>X. citri</i>	17
2.7.	Estudo da bioconversão/biotransformação de rutina pelo fungo <i>E. salmonicolor</i>	19
2.8.	Síntese de complexos com os metais cobre, zinco e ferro	24
2.9.	Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) em <i>Xanthomonas citri</i>	24
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1.	Overview dos estudos químicos realizados	29

MS	3.2. Identificação dos compostos apolares da cultura de <i>E. salmonicolor</i> por GC-	33
	3.3. Fracionamento e isolamento dos constituintes do extrato da cultura de <i>E. salmonicolor</i>	35
MS/MS	3.4. Estudo do perfil químico da cultura de <i>E. salmonicolor</i> por UPLC-HRMS	48
	3.5. Estudo da interação do fungo <i>E. salmonicolor</i> com a bactéria <i>X. citri</i>	60
	3.6. Estudo da biotransformação de rutina por <i>E. salmonicolor</i> em meio líquido	66
	3.7. Proposta de biogênese dos principais compostos caracterizados.....	70
	3.8. Complexos com os metais Cu(II), Zn(II) e Fe(II) e os ligantes rutina, naringina e ácido vanílico.....	77
	3.9. Estudo da atividade inibitória em <i>X. citri</i>	94
4.	CONCLUSÃO	96
5.	Referências	97
6.	Material Suplementar	102
7.	INFORMAÇÕES TÉCNICAS DOS DISPOSITIVOS DE PROCESSAMENTO DE DADOS	158

1.INTRODUÇÃO

1.1.Produtos naturais como fonte de moléculas para o mundo

A química orgânica de produtos naturais tem sofrido várias transformações através dos anos, com a modernização das técnicas, desenvolvimento de experimentos e aumento da sensibilidade de vários tipos de equipamentos, possibilitando o trabalho em escalas de amostras cada vez menores¹.

O avanço das abordagens e técnicas possibilitou aos pesquisadores o trabalho com um número bem maior de amostras tornando viável o estudo de ambientes e interações mais complexas através de interações bióticas e abióticas².

O uso de grande quantidade de dados e informações hoje chamados de “*bigdata*”, tem sido utilizado juntamente com ferramentas estatísticas e de quimioinformática que possibilitam o agrupamento e análise da variação das respostas experimentais medidas e tornando viável, a partir de um estudo “*untargeted*” com resultados de análises semiquantitativas para um estudo direcionado “*targeted*” para a quantificação dessas respostas³.

Diante disso, a busca por moléculas bioativas e novas moléculas têm sido acelerada, contribuindo também para a área de síntese orgânica para realizar modificações direcionadas em potenciais moléculas provenientes desses estudos para aumentar a eficácia delas e reduzir efeitos negativos como a citotoxicidade⁴.

A busca por novas moléculas tem sido um trabalho milenar, usando como fontes as plantas, microrganismos e suas interações ecológicas. O controle de patógenos geralmente é realizado estudando o nicho ecológico que eles estão inseridos para entender como acontece a rede de comunicação entre eles e, a partir disso, formular hipóteses de como a comunicação acontece, seja ela química ou não⁵.

A ecologia química, por anos, tem sido objeto de estudo para entender ambientes simples e complexos de interações microbianas com seus hospedeiros, que

são mediadas pelos mais diversos tipos de interações como simbiote, parasitária, comensalismo, mutualista, predatismo etc^{6,7}.

Esses tipos de interações muitas vezes são respostas químicas que mediam a produção de metabólitos específicos para proteção, manutenção da vida, regeneração de tecidos, dentre outros mecanismos⁶.

1.2. Rubelose e Melanose, doenças de Citros causadas por fungos

Citros tem sido objeto de estudo por vários grupos de pesquisa em todo o mundo. Trabalhos têm sido realizado mostrando a importância/aplicação da ecologia química no desenvolvimento de novos controles químicos e/ou biológicos de doenças/pragas que assolam a produção de laranja pelo mundo⁸.

O Brasil é um dos maiores produtores de citros no mundo, contudo também um dos maiores importadores de defensivos, desde inseticidas a fungicidas e bactericidas. As principais doenças bióticas em citros incluem a clorose variegada dos citros (CVC), cancro cítrico, leprose, tristeza, mancha preta, mancha marrom, morte súbita, melanose, rubelose, e, mais recentemente, Huanglongbing (ex-greening), além de muitas outras pragas.

Uma alternativa para inibir o desenvolvimento de um fungo ou bactéria seria entender os eventos metabólicos relacionados à comunicação entre estes e sua planta hospedeira. Estes estudos podem levar a novos fungicidas e bactericidas menos danosos ao meio ambiente. Contudo, o problema a ser enunciado para estudo refere-se à Rubelose e Melanose.

A Rubelose dos citros tem causado danos significativos à citricultura paulista nos últimos anos. A doença atinge todas as culturas cítricas, ela concentra-se nos galhos e ramos, sendo mais severa em árvores vigorosas e em pomares adensados. Os sintomas iniciais consistem em lesões com desprendimento da casca e exsudação de goma. Posteriormente, observam-se cordões miceliais e crescimento

micelial róseo sobre os ramos afetados⁹. Devido a essa observação a doença é também conhecida como mal rosado. Internamente, nesses ramos, observa-se descoloração dos tecidos. Quando essas lesões atingem a base dos galhos, pode ocorrer a morte de toda a copa da planta.

A Melanose causa danos nos órgãos verdes da planta no início do seu desenvolvimento. Ela também afeta os frutos em vias de maturação ou após a colheita causando a podridão peduncular¹⁰. Em condições favoráveis e pomares malcuidados, a Melanose pode acarretar prejuízos, principalmente devido ao aspecto dos frutos que são destinados ao mercado de fruta fresca. A doença pode ser confundida com a mancha na casca dos frutos causada pelo ácaro da ferrugem, porém no caso da Melanose as lesões são ásperas¹¹.

1.3.Etiologia

A rubelose tem como agente etiológico o fungo *Erythricium salmonicolor* (Berk. & Broome) Burds. (*Corticium salmonicolor*), pertencente ao grupo Eukaryota, reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Homobasidiomycetes, ordem Aphylophorales, família Corticiaceae^{12,13}. *E. salmonicolor* cresce moderadamente em BDA, onde apresenta crescimento máximo na faixa de 24-28 °C, apresentando a fase sexuada, quando produz basidiósporos, ou fase assexuada, produzindo conídios formados em esporodóquios^{9,14}. A observação deste fungo por microscopia mostra um sistema de hifas monomítico e ausência de grampos de conexão. As hifas apresentam-se pequenas e alongadas com 10-15 µm no subhímênio, aquelas basais possuem paredes finas com 6-8 µm de diâmetro. Os basídios são sinuosos e longos de 40-50 x 8-12 µm, e os basidiósporos mostram-se longamente elipsoidais⁹. Os basidiósporos apresentam-se hialinos, lisos, piriformes

e elipsoides, e medem 8-11 x 8-9,8 μm . Eles são formados a partir de basídios subclavados com 2 a 4 esterigmas cada¹⁴.

A Melanose é uma doença de citros causada pelo fungo *Diaporthe citri* (Wolf.), cuja fase anamorfa corresponde a *Phomopsis citri* Fawcet¹⁵. Todas as espécies de citros são suscetíveis ao fungo, sendo que, pomelos (*Citrus paradisi* Macf) e limões (*Citrus limon* Burmann) tendem a ser mais afetados que outras^{16,17}. A incidência, assim como a severidade, vem aumentando ano a ano no país, sendo que a ocorrência da doença é maior em pomares velhos e malconduzidos. Os sintomas aparecem uma semana após a infecção em forma de pequenos pontos unidos, pardos e discretos ou confluentes. As folhas são suscetíveis quando estão em crescimento, tornando-se resistentes após atingirem seu tamanho final. Os frutos são suscetíveis quando jovens, tornando-se resistentes com cerca de 10 semanas de idade, a contar da data de queda das pétalas. Em folhas e ramos novos, os sintomas iniciam-se na forma de pequenas anasarcas (edema generalizado devido à infiltração de líquido soroso no tecido celular subcutâneo em todo o organismo), de menos de 1 mm de diâmetro, deprimidas no centro com um halo amarelado ao seu redor, que com o tempo desaparece. Com o rompimento da cutícula, uma substância gomosa é exsudada na região afetada, que depois adquire uma consistência firme e de coloração marrom, fazendo com que as lesões se tornem salientes e ásperas ao tato. Essas manchas nada mais são do que as secreções dos tecidos afetados em reação à ação do fungo, que fica assim impedido de se desenvolver¹⁴.

O fungo sobrevive como saprófita de um ano para outro nos ramos cortados durante a poda e deixados no campo e nas pústulas das folhas caídas, onde forma grande número de picnídios. Seu ataque é mais frequente quando há altos níveis de umidade nos primeiros meses após a frutificação, quando os conídios produzidos dentro dos picnídios se entumecem e saem através dos ostíolos formando massas filamentosas. Em temperatura entre 25-30°C, ramos infectados nas árvores

ou no solo aumenta a concentração de esporos no ar, água livre na superfície das folhas ou frutos durante 8-10 horas, favorecem o desenvolvimento da doença¹⁵.

Estudos tem demonstrado que o uso de sprays químico e aplicação direta da calda bordalesa para controle dessas doenças não têm sido uma alternativa eficiente no controle dessas doenças. Diante disso, diversos estudos para controle dessas doenças, ex.: desenvolvimento de nanomateriais contendo cobre tem resultado em resposta eficaz quando comparado unicamente ao sal de cobre¹⁸. Conhecer o mecanismo de defesa das plantas (muitas vezes tendo os flavonoides como mais representativos) tem sido uma forma de desenvolver novas metodologias para controle dessas doenças, uma vez que o efeito quelante das hidroxilas livres para com metais (que já possui atividade fungicida) pode representar uma forma de melhorar a resistência das plantas frente aos patógenos¹⁹.

Até o presente momento, não há métodos 100% eficazes para controle da Melanose e Rubelose descrito na literatura e não existem estudos da composição química acerca destes microrganismos, o que torna essencialmente especial a busca pelo maior número de informações a partir de estudo químico e ecológico destes patógenos para entender os aspectos envolvidos na interação planta/patógeno.

1.4.A ecologia química como ferramenta para busca de novas moléculas bioativas

O mundo sofre constantes transformações dos mais diferentes tipos, desde inovações tecnológicas, revoluções na pesquisa de medicamentos, modernização dos mecanismos de cultura de alimentos, inovações na engenharia de espécies de cultivares adaptáveis aos mais diferentes campos da agricultura, etc²⁰.

Diante disso, o meio ambiente ao que “serve” ao ser humano, também realiza suas transformações, ao ponto que muitas destas mudanças são recebidas pelo

ecossistema como uma alteração no processo natural da cadeia alimentar macro e micromolecular²¹.

Assim, todo o processo bioquímico deste intrigante nicho ecológico ou deste imenso ecossistema, ativa/produz mecanismos ainda desconhecidos ao homem na busca de contrabalancear todas essas alterações, de modo que os organismos participem de um desequilíbrio ambiental (aumento ou redução de suas populações) resultando em problemas de saúde pública, assim como fitossanitários²².

Para tanto, o conhecimento das interações macro e micromoleculares entre os organismos neste sistema ecológico/biológico tem sido uma vertente extremamente promissora. Diante disso, entender essas relações podem trazer à luz mecanismos mais “friendly” para o controle destes desequilíbrios no ecossistema²³.

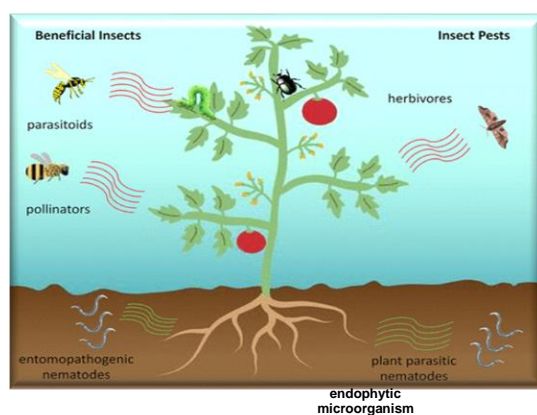


FIGURA 1. 1 - Nicho ecológico da interação dos organismos vivos no ecossistema [adaptado de Beck et al., 2019].

A interação de todo o ecossistema (insetos e microrganismos) além de ser extremamente complexa (FIGURA 1. 1), ainda resulta de uma imensurável comunicação a partir de processos enzimáticos que ativam vias de metabólitos secundários a partir de sinalizações emitidas pelos organismos no ecossistema²³⁻²⁵.

Essas interações podem ocorrer desde as interações com a morfologia da planta, liberando sinalizadores voláteis, assim como o stress diretamente no tecido da planta (ex.: herbivoria, necrose, interação química direta e indireta, etc.), que pode acionar sistemas enzimáticos complexos, assim como uma pequena glicosilação de um metabólito para levá-lo das raízes para as partes aéreas²⁶.

Portanto, ao ponto que se induz o stress na planta, pode-se verificar a variação na composição/variedade de metabólitos secundários desta, possibilitando o estudo dos mecanismos de defesa da planta. Tais mecanismos podem ser provenientes de stress biótico e abiótico resultando em mudanças químicas e até morfológicas²⁷⁻²⁹.

Diante do exposto, é notória a importância de um estudo racional de doenças/pragas da agricultura, visualizando o potencial dos microrganismos em inibir/combater o desenvolvimento de outros e até mesmo utilizá-los como maquinarias genéticas de alto potencial para a modificação estrutural de moléculas melhorando suas atividades biológicas.

1.5. Estudos de metabolização de substâncias por fungos

O estudo da biotransformação por microrganismos tem sido prática primordial para entender os mecanismos atrelados às transformações que muitas moléculas apresentam em suas estruturas. Processos oxidativos e redutores tem sido observado em muitos casos demonstrando assim que tal modificação estrutural justificam uma resposta importante à translocação de substâncias para os mais diversos objetivos³⁰⁻³².

Além disso, vários estudos genéticos têm sido empregados para caracterizar as enzimas responsáveis por essas modificações estruturais nas moléculas metabolizadas por microrganismos, levando assim a compreender estes processos, alcançando a possibilidade da sua expressão por exemplo em bactéria³³.

Diante disso, é importante estudar o potencial de microrganismos para a síntese e semi-síntese de novas moléculas com potencial de aplicação biológica, utilizando assim o conhecimento da maquinaria genética de fungos para o combate de doenças/pragas da agricultura.

Além disso, conhecer as transformações que um microrganismo pode realizar em classes direcionadas de metabólitos, torna-se uma incomparável fonte de informações quando este, inoculado em uma planta hospedeira, possa interagir até quimicamente e justificar possíveis interações ecológicas.

1.6. Metabolômica e processamento de dados

Os organismos vivos de uma forma geral têm sua sobrevivência provenientes de um metabolismo primário (essencial para a sobrevivência, desde o crescimento e replicação) até a manutenção primordial para a vida. Além disso, existe o metabolismo especializado/secundário que leva à produção dos produtos naturais, que são moléculas empregadas desde a mecanismos de defesa, até mesmo como curativos contra-ataques de predadores.

Os organismos são especializados na produção de alguns genes que codificam a biossíntese de metabólitos especiais empregados nos mecanismos de sobrevivência quando dos organismos estão em seus nichos ecológicos. A relação direta do genoma com a produção dos metabólitos tem sido estudada de forma complementar, guiando assim para entendimentos mais globais a respeito da ecologia envolvida na expressão e desenvolvimento desse metabolismo³⁴.

O estudo do metabolismo especializado tem sido cada vez mais empregado em pesquisas sobre ecologia química, mecanismos de resistência e mais recentemente o uso do perfil químico juntamente com informações genômicas para estudos alinhados para auxiliar na identificação de rotas biossintéticas³⁴.

Diante disso, o uso de ferramentas de quimioinformática como MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>), MS-FINDER (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>), GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/>) e as bases de dados tem possibilitado a busca racional e direcionada pelos metabólitos responsáveis pelas interações ecológicas (FIGURA 1. 2).

Workflow

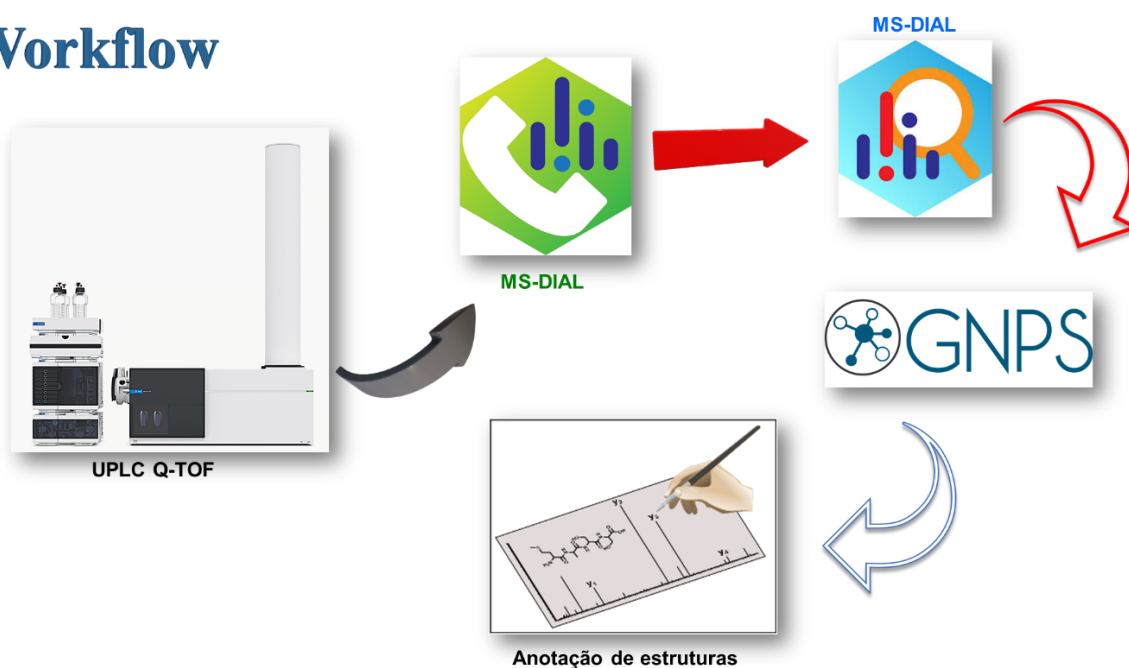


FIGURA 1. 2 – Workflow para processamento e dereplicação de dados adquiridos por espectrometria de massas de alta resolução.

1.7. Estudos metabolômicos da interação patógeno/hospedeiro

As interações entre planta-hospedeiro é uma desafiadora abordagem, levando em consideração a complexidade estrutural destas inter-relações presentes no nicho ecológico de um micro ecossistema. As relações entre um microrganismo e seu hospedeiro variam em simbiote, mutualística, patogênica, associativa, harmoniosa, benéfica, etc³⁵.

Diante disso, estudar essa interação utilizando técnicas em seu estado da arte associada a tratamentos estatísticos e quimiométricos, tem se mostrado uma

abordagem promissora no campo da ecologia química para busca de fitoanticipinas e fitoalexinas em plantas³⁶. A quantificação da variação da concentração desses metabólitos traz à luz a resposta que plantas tem demonstrado aos ataques possivelmente desencadeando um desequilíbrio na cascata enzimática.

A partir de estudos envolvendo ferramentas quimiométricas com a abordagem estatística multivariada criando modelos representativos, tem sido possível demonstrar como a planta tem-se comportado nas interações ecológicas e assim analisar *in silico* a variação e identificação de tais biomarcadores³⁶.

Portanto, as tendências atuais acerca destes estudos buscam basicamente demonstrar a partir de modelos representativos as respostas químicas, para determinar as moléculas responsáveis pelo mecanismo de defesa. Isto permite desenvolver novos protótipos para o controle/combate de doenças que têm afetado a agricultura uma vez que estes organismos adquiram resistência frente aos defensivos atualmente disponibilizados.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Materiais e equipamentos

Os materiais e equipamentos que foram utilizados são:

- Solventes destilados no DQ-UFSCar para preparo das amostras vegetais e para uso em cromatografia em coluna;
- Solventes grau HPLC (Merck, HoneyWell, J. T. Baker, Panreac, Tedia);
- Solventes Deuterados (Merck e Aldrich);
- Água ultrapura: Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka);
- Sílica C-18 (40-60 mesh) da Merck®;
- Micropipetas Eppendorf 1-10µL; 20-200 µL e 200-1000 µL;
- Filtro de seringa (PTFE), não estéril, 25 mm x 0,45 µm (Millipore)
- Papel de filtro INLAB Tipo, 3,0 µm de porosidade;
- Coluna cromatográfica analítica Gemini C 18 Phenomenex (250 x 4,60mm, partículas de 10µm);
- Rotaevaporador BUCHI, R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Rotaevaporador BUCHI, R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C;
- Balança analítica Shimadzu Corporation modelo AUW220D
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies modelo 1200, equipado com bomba quaternária G1329A, detector de UV-Vis (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A e amostrador automático G1329B; Detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AV;

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies modelo 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, e detector de UV-Vis (VWD) G1314B, forno de coluna G1316A; Detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AV;
- Detector Agilent G1315D DAD;
- Espectrômetro de massas Synapt G2-S (water Technologies), fonte de ionização: ESI, analisador híbrido Q-TOF (Quadrupole – Time Of Fligth);
- RMN Brucker DRX – 9,8 Tesla, equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (smart probe com ATMA®);
- RMN Brucker Avance III – 14,1 Tesla, equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI de 5 mm (ATMA®), sonda de 5mm BBI (ATMA®);
- UPLC Acquity com coluna UPLC-HSS-C18 (1,8 μ m, 2,1 x 100 mm), acoplado a espectrômetro de massas da marca Waters® Xevo G2-XS QTof.

2.2. Estudo da curva de crescimento do fungo *E. salmonicolor* (ES)

O fungo *E. salmonicolor* (ES) foi crescido em placa de petri estéril usando meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar, 39 g/L de H₂O) e mantidas em BOD durante 9 dias para o seu desenvolvimento.

Assim, foram preparadas 162 placas de petri com meio BDA para compor o experimento, destas 81 placas destinadas a inoculação do fungo e a mesma quantidade como placas controle (branco). O experimento foi realizado com três réplicas autênticas (utilizando três placas para cada, tanto inoculado quanto as controle).

Todos os dias, no período de nove dias foram retiradas placas inoculadas e controle para serem extraídas utilizando acetato de etila (AcOEt destilado) e concentrados os extratos utilizando evaporador rotativo à 30 °C. Assim, soluções dos extratos foram preparados na concentração de 1,5 mg/mL foram analisados em GC-MS, avaliando a variação do perfil de produção metabólica e evidenciando tais alterações utilizando PCA.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GCMS – TQ8040, Shimadzu, Tóquio, Japão) com coluna capilar de sílica fundida RTX-5ms (Restek Corporation, Pensilvania-EUA) (fase estacionária difenil-dimetilpolisiloxano) com 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de fase. As condições cromatográficas foram: temperatura inicial do forno 60°C mantida por 2 min, com programação de temperatura de 60 °C a 200 °C a uma faixa de 4 °C.min⁻¹, seguido de uma programação de 200 °C a 280 °C a uma faixa de 10 °C.min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 250 °C, com fluxo de gás de arraste ajustado para 1.11 mL.min⁻¹, com utilização de Hélio (99% de pureza) como gás de arraste e razão de divisão no injetor de 1:10. O volume de injeção foi de 1 µL e o tempo total de análise foi 55 minutos. A temperatura da fonte de íons foi 280°C e da interface foi 290°C, com taxa de aquisição de 5 Hz para o espectrômetro de massas (MS). O modo

SCAN (varredura) foi utilizado com faixa de m/z 40 a 550 Da e ionização feita por impacto de elétrons a 70 eV. A aquisição dos dados foi realizada em software GCMS solution (Shimadzu).

2.3. Modelagem quimiométrica

Os cromatogramas brutos obtidos por GC/MS (TIC) foram convertidos para arquivos .txt e explorados no Matlab Matlab® (Matworks, Natick – MA, USA, versão R2014a) como uma matriz X (N , TR), onde N é o número de amostras e TR é o tempo de retenção. Os picos cromatográficos foram alinhados pico a pico através do algoritmo COW (*correlation optimised warping*).

A análise de componentes principais (do inglês Principal Component Analysis, PCA) foi realizada utilizando os dados centrados na média através do software Pls_Toolbox® 7.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee – WA, USA).

2.4. Fracionamento e isolamento dos constituintes do extrato de *E. salmonicolor*

O extrato bruto (1,2g) do fungo *E. salmonicolor* (crescido em meio BDA - Batata Dextrose Ágar), foi submetido ao fracionamento utilizando metodologia de extração em fase sólida - EFS ($3 \times$ volume morto da coluna para cada fração). Para determinar esse método de EFS, foi utilizado uma análise em HPLC-DAD (C-18, $5\mu\text{m}$ de partícula, $250 \times 4,6$ mm) em modo gradiente, ACN:H₂O (3 até 100% em 30 min, mantendo em isocrático desta condição até 40 min) com fluxo de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, volume de injeção de $40\mu\text{L}$ e concentração de amostra de $7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ monitorando em 215 nm. A partir disso, foi determinado a coleta de seis frações, loading (22%), F1 (37%), F2 (50%), F3 (67%), F4 (76%) e a limpeza (100%) em acetonitrila (ACN),

de acordo com o gradiente utilizado para a transposição do método em modo analítico para a Extração em Fase Sólida (EFS)

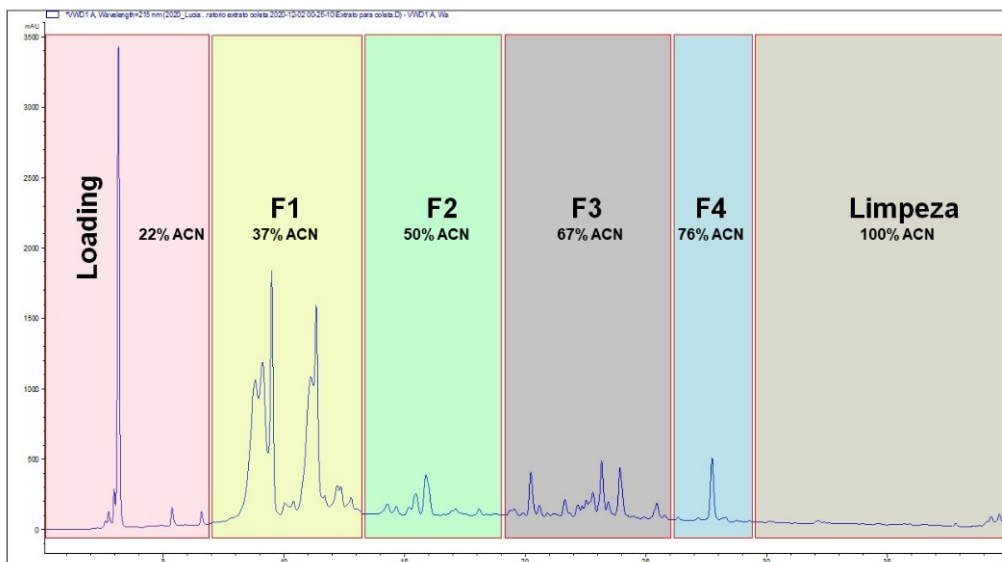


FIGURA 2. 1 - Cromatograma com as regiões de corte para transposição de método em HPLC-DAD para fracionamento em extração em fase sólida (C18).

Desta forma, as frações coletadas no procedimento de EFS foram submetidas para análise comparativa por HPLC-DAD e RMN de ^1H e assim otimizado, individualmente, a condição cromatográfica seja ela isocrática e/ou gradiente para análise na escala semipreparativa. Das frações **F1-F4** foram coletadas nas análises cromatográficas semipreparativas um total de **47** subfrações, que foram submetidas a análises por RMN-1D e 2D e UPLC-HRMS MS/MS.

2.5. Estudo do perfil químico da cultura de *E. salmonicolor* por UPLC-HRMS MS/MS

O extrato bruto da cultura de *E. salmonicolor* (10 mg) foi submetido a fracionamento por SPE-C18 (500 mg de fase estacionária) e coletou-se frações **F50**

e **F100** com 50 e 100% de acetonitrila respectivamente. Estas frações foram filtradas em filtro PTFE 0.22 μm , secas e ressuspensas na concentração de 100 ppm.

Assim, essas amostras foram injetadas em UPLC-HRMS MS/MS para aquisição dos espectros de MS^1 e MS^2 utilizando um espectrômetro Agilent Q-TOF (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipado com uma fonte de íons eletrospray (ESI) e os dados adquiridos foram processados com o software MassHunter® (version B.08.00). Enquanto as separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna SB-C18 Zorbax (3.0 \times 50 mm) no modo gradiente com uma rampa de 5-100% ACN em 12 min, mantido em isocrático até 13 min e retornado para a condição inicial para condicionamento até 15 min utilizando acetonitrila-água com 0.1% de ácido fórmico (grau LC-MS) com fluxo de 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume de injeção de 5 μL . Os dados foram adquiridos no modo positivo (+) e negativo (-) de ionização com uma fonte ESI e os íons-precursores (150-1500 Da) foram selecionados automaticamente, os 12 íons mais intensos no modo Auto-MS/MS para a aquisição dos espectros de segunda ordem (70-1500 Da). Os parâmetros do TOF-MS foram: voltagem do capilar, 2500 V; voltagem do *skimmer*, 70 V; voltagem do *fragmentor*, 110 V, pressão do gás de nebulização, 28 psi; fluxo de gás secante, 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura da fonte, 320 $^{\circ}\text{C}$; fluxo do gás de dessolvatação, 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura do gás de dessolvatação, 350 $^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquisição de 5 íons mais intenso por ciclo e resolução de 32000.

Os dados foram então convertidos utilizando o software MSConvert GUI (<https://proteowizard.sourceforge.io/download.html>) para serem pré-processados no software MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) quando foi realizado o alinhamento dos dados e a diferenciação entre os íons da amostra e aqueles presentes no solvente e no meio de cultura, resultando assim na construção de uma única matriz de dados.

A rede molecular foi criada a partir dos dados da matriz pré-processada no software MS-DIAL para submissão do projeto na plataforma GNPS - The Global Natural Product Social Molecular Networking (<https://gnps.ucsd.edu/>) utilizando como fator de agrupamento de espectros de MS¹, 0.02 Da e para MS², 0.06 Da, enquanto o match espectral levou em consideração a similaridade de quatro íons-fragmentos. Além disso, a matriz de dados geradas pelo MS-DIAL foi exportada no formato .msp para realizar a busca nas bibliotecas experimentais e *in silico* (**HMDB** – Human, Serum – Human, **YMDB** – Yeast, **FoodDB** – Food, **STOFF** – Environment, **NANPDB** – Natural product, **KNAPSAcK** – Natural product, **Urine** – Human, **CSF** – Human, **ECMDB** – *E. coli*, **PlantCyc** – Plant, **BLEXP** – Bood exponsome, **COCNUT** – Natural product, **PubChem** – Biomolecules, **Saliva** – Human, **SMPDB** – Human, **BMDB** – Bovine, **ChEBI** – Biomolecules, **NPA** – Natural Product Atlas, **UNPD** – Natural product, **Feces** – Human, **LipidMAPS** – Lipids, **DrugBank** – Drug e **T3DB** – Toxin) disponíveis no software MS-FINDER (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>)

2.6. Estudo da interação do fungo *E. salmonicolor* com a bactéria *X. citri*

O estudo da interação entre o fungo *E. salmonicolor* com a bactéria *X. citri* foi realizado em placas de petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar. Para isso, foi utilizado discos de culturas de fungo e inoculadas no centro da placa e deixadas em crescimento por três dias até atingirem cerca de 40% da região de cultura. Logo em seguida foi estriada a bactéria ao redor do inóculo fúngico e mantido por mais cinco dias.

Essas placas foram preparadas em triplicatas e as réplicas foram extraídas separadamente com acetato de etila (grau P.A) e concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Cada réplica das amostras controle (meio

de cultura), cultura do fungo isolado e cultura do fungo com a bactéria foram preparadas na concentração de 100 ppm utilizando ACN-H₂O (1:1), grau LC-MS, e filtradas em filtro 0.22 µm de PVDF.

As amostras foram separadas em grupos **BDA** para o controle do meio de cultura, **ES** para as amostras para as culturas do isolado de fungo e **ES-XC** para a interação do fungo com a bactéria.

Assim, essas amostras foram injetadas em UPLC-HRMS MS/MS para aquisição dos espectros de MS¹ e MS² utilizando um espectrômetro Agilent Q-TOF (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipado com uma fonte de íons eletrospray (ESI) e os dados adquiridos foram processados com o software MassHunter® (version B.08.00). Enquanto as separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna SB-C18 Zorbax (3.0 × 50 mm) no modo gradiente com uma rampa de 5-100% ACN em 20 min, mantido em isocrático até 25 min e retornado para a condição inicial para condicionamento até 30 min utilizando acetonitrila-água com 0.1% de ácido fórmico (grau LC-MS) com fluxo de 0.3 mL•min⁻¹ e volume de injeção de 5 µL. Os dados foram adquiridos no modo positivo (+) e negativo (-) de ionização com uma fonte ESI e os íons-precursores (150-1500 Da) foram selecionados automaticamente os 12 íons mais intensos no modo Auto-MS/MS para a aquisição dos espectros de segunda ordem (70-1500 Da). Os parâmetros do TOF-MS foram: voltagem do capilar, 2500 V; voltagem do *skimmer*, 65 V; voltagem do *fragmentor*, 110 V, pressão do gás de nebulização, 35 psi; fluxo de gás secante, 12 L•min⁻¹; temperatura da fonte, 300 °C; fluxo do gás de dessolvatação, 11 L•min⁻¹; temperatura do gás de dessolvatação, 320 °C, com taxa de aquisição de 12 íons mais intenso por ciclo e resolução de 32000.

Os dados foram então convertidos utilizando o software MSConvert GUI (<https://proteowizard.sourceforge.io/download.html>) para serem pré-processados no software MS-DIAL

(<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) quando foi realizado o alinhamento dos dados e a diferenciação entre os íons da amostra e aqueles presentes no solvente e no meio de cultura, resultando assim na construção de uma única matriz de dados.

A rede molecular foi criada a partir dos dados da matriz pré-processada no software MS-DIAL para submissão do projeto na plataforma GNPS - The Global Natural Product Social Molecular Networking (<https://gnps.ucsd.edu/>), utilizando como fator de agrupamento de espectros de MS¹, 0.02 Da e para MS², 0.06 Da, enquanto o match espectral levou em consideração a similaridade de quatro íons-fragmento. Além disso, a matriz de dados geradas pelo MS-DIAL foi exportada no formato .msp para realizar a busca nas bibliotecas experimentais e *in silico* (**HMDB** – Human, Serum – Human, **YMDB** – Yeast, **FoodDB** – Food, **STOFF** – Environment, **NANPDB** – Natural product, **KNAPSAcK** – Natural product, **Urine** – Human, **CSF** – Human, **ECMDB** – *E. coli*, **PlantCyc** – Plant, **BLEXP** – Food exposome, **COCNUT** – Natural product, **PubChem** – Biomolecules, **Saliva** – Human, **SMPDB** – Human, **BMDB** – Bovine, **ChEBI** – Biomolecules, **NPA** – Natural Product Atlas, **UNPD** – Natural product, **Feces** – Human, **LipidMAPS** – Lipids, **DrugBank** – Drug e **T3DB** – Toxin) disponíveis no software MS-FINDER (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>)

2.7. Estudo da bioconversão/biotransformação de rutina pelo fungo *E. salmonicolor*

Para este estudo, foram preparados frascos contendo meio de cultura CEZAPEK (Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura). A solução do meio de cultura seguiu a orientação do fabricante, 40,0 g/L sendo preparados com água destilada e autoclavados durante 15 min à 120°C. Após este procedimento, os

frascos foram mantidos sob observação durante sete dias para verificar se não houve contaminação.

A partir disso, foi inoculado o fungo ao meio de cultura e mantidos por 72 horas para garantir que *E. salmonicolor* produzisse seu sistema enzimático para a biotransformação. Assim, foi possível iniciar o experimento de biotransformação como está apresentado na FIGURA 2. 2. Portanto, foi adicionado rutina (padrão Sigma-Aldrich®) ao meio de cultura (50,0 mg/mL de DMSO).

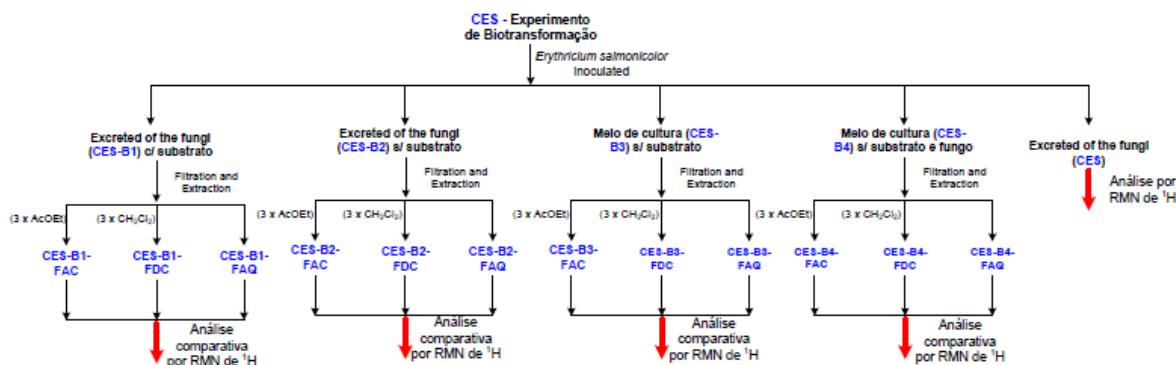


FIGURA 2. 2 – Esquema do experimento de biotransformação de rutina por *E. salmonicolor*

Assim que completou 13 dias de experimento com o substrato, os experimentos foram filtrados individualmente e extraídos com acetato de etila e diclorometano P.A. conforme descrito acima. Os extratos resultantes desse procedimento de partição líquido-líquido foram então analisados comparativamente com RMN de ¹H.

A partir dessas informações, optou-se por realizar um pré-fracionamento do extrato bruto por coluna de fase reversa em microescala. O extrato bruto foi então aplicado em coluna C-18 40 a 63 μm (Φ = 0,60 cm, h = 4,0 cm e m = 3,0 g). Um total de 11 sub-frações (CES_Bruto-a até k) de 8 mL (~ 3 × V_m) foi obtido.

Todas as frações obtidas do fracionamento acima descrito foram analisadas comparativamente por RMN de ¹H e subsequentemente selecionado a

amostra de F5% ACN para aquisição do espectro de RMN de ^{13}C e bidimensionais para sua respectiva caracterização estrutural.

Para isso, os experimentos foram preparados em tubos Falcon de 50 mL contendo 20 mL meio de cultura Czapek, e estabelecido aqueles que seriam o “branco”, ou seja, sem a inoculação do fungo, aqueles que foram adicionados o inóculo do fungo, e por fim aqueles que após 72h de crescimento do inóculo no meio de cultura foi adicionado o substrato rutina (FIGURA 2. 3), 10mg em cada tudo (rutina – padrão Sigma-Aldrich[®]), vide esquema 1.

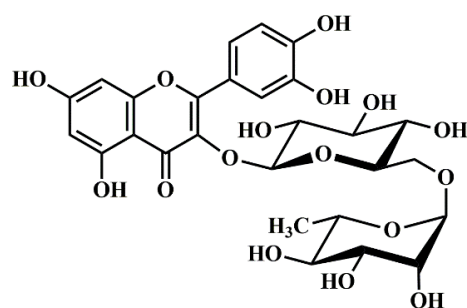


FIGURA 2. 3 – Estrutura química do substrato, rutina

As amostras foram mantidas durante 72h após a inoculação do fungo e adicionado o padrão de rutina e mantido por mais 72h para os processos de biotransformação/bioconversão do substrato.

Após o período do experimento, as amostras foram separadamente filtradas e concentradas para dar os extratos brutos, e nenhum processo de partição líquido-líquido foi realizado para que o experimento de análise metabolômica pudesse ser conduzido. Assim, amostras foram preparadas da mesma forma, diluídas para uma solução estoque usando acetonitrila (ACN), água (H_2O) na proporção 7:3, protocolo que permitiu amostras globais dos metabólitos e com a menor quantidades de interferentes possíveis (açúcares livres e sais minerais provenientes do meio de cultura). Esta solução estoque foi diluída igualmente entre as amostras e réplicas autênticas para que pudessem ser analisadas por UPLC-QTOF.

A partir disso, as amostras foram analisadas nos modos positivo (+) e negativo (-) de ionização em um equipamento de UPLC-DAD-Qtof utilizando as condições da fonte de ionização, voltagem do capilar 2.5 KV, voltagem do nozzle 500V, fragmentor 110V, skimmer 65V, octopole RF peak 750 V, temperatura do gás 300°C, fluxo de gás 12 L•min⁻¹, pressão nebulizador 35 psi, temperatura do gás de aquecimento 320°C e fluxo do gás de aquecimento 11 L•min⁻¹.

Para obtenção dos espectros de primeira ordem (MS¹) e conseqüentemente realizada a seleção automática dos 12 maiores sinais (m/z), o envio para a câmara de colisão e assim a detecção dos íons fragmentos para cada molécula em espectros de segunda ordem (MS²). Para aquisição dos espectros de MS² pelo modo de AutoMS, foi automaticamente adquirido os espectros de segunda ordem dos 12 íons mais intensos em cada *scan*, e um bloqueio de aquisição foi inserido para após a aquisição de três espectros com a mesma m/z , ficaria bloqueada essa massa por 0.33 min. Assim, os espectros de MS² foram inicialmente adquiridos em níveis (High, Medium, e Low energy) de energias de colisão, EC (TABELA 2. 1), para que pudesse ser avaliado, os espectros de tendencia (espectros adquiridos em mais de uma energia de colisão), e subsequente estudo das propostas de mecanismos de fragmentação para cada íon de interesse.

TABELA 2. 1 – Energias de colisão para aquisição dos espectros de MS²

<i>Massa</i> (Da)	High energy	Medium energy	Low energy
	<i>Energias de colisão (eV)</i>		
100	25	15	5
500	35	25	15
1000	50	35	25
1500	60	50	40

Assim, com os espectros de mais alta energia de colisão, foram construídas as respectivas redes moleculares usando Feature Based Molecular Networking (FBMN Workflow). Para pré-processamento dos dados, foi utilizado o software MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>), o qual é utilizado para delimitar o corte de intensidade de seleção do MS¹ (*minimum peak height*), e para o alinhamento dos espectros, levando em consideração a contribuição isotópica de cada sinal, foi utilizado a acurácia de massa (Da) para o MS¹ de 0.02 e para o MS² de 0.06, lembrando que esse é um parâmetro global de alinhamento dos espectros afetando de forma diferente entre as relações de *m/z*. Para o *gap filling*, termo do inglês que se refere a diminuir a linha de corte (neste caso foi de 30, ou seja, diminui-se 30% da seleção *minimum peak height*), daquela utilizada para detecção dos sinais do MS¹ para corrigir possíveis falhas na não detecção de íons que estejam perto da linha de corte dos espectros. Para a predição dos íons adultos, foram selecionados os mais comuns, e por fim o alinhamento dos espectros anteriormente detectados e deconvoluídos, foi realizado o alinhamento utilizando $\Delta = \pm 0.5$ min para alinhamento nos tempos de retenção e uma tolerância no precursor, MS¹ de ± 0.02 Da como janela de massa, levando em consideração a contribuição isotópica de cada íon.

Com o processamento acima realizado, foi possível construir um arquivo de .mgf contendo todos os precursores detectados (MS¹) com as respectivas informações de MS², juntamente com a tabela de quantificação relativa das intensidades desses íons discriminados em cada amostra. Essas informações foram utilizadas para construir a rede molecular na plataforma Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu/>). Para isso, foram utilizados a mesma janela de acuraria de massa no pré-processamento dos dados brutos e uma quantidade de 4 íons pareados para formar uma conexão entre nodos e para uma anotação na biblioteca da plataforma, com cosine mínimo de 0.7.

2.8. Síntese de complexos com os metais cobre, zinco e ferro

Para a síntese dos complexos, foram utilizados três precursores, rutina, narigina e ácido vanílico, substâncias encontradas em espécies de *Citrus* que poderiam estar quelando o cobre (Cu^{2+} ou Zn^{2+}) da calda bordalesa e mesmo assim sendo metabolizado pela maquinaria enzimática dos microrganismos. Portanto, entender como desenvolve estes mecanismos seria um grande passo para a busca de novos mecanismos de controle destas pragas.

Foi preparada uma solução do ligante (0,50 mmol) em 10 mL de metanol num sistema Schlenk, posteriormente foi adicionada uma solução do sal metálico (0,25 mmol) em 2 mL de metanol para as reações com o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 2 mL de água para as reações com o $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. A mistura foi mantida em agitação durante 24 horas, finalmente foi eliminado o solvente e secou-se sob vácuo.

2.9. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Xanthomonas citri*

A CIM foi avaliada através do método de microdiluição em microplaca (NCCLS, 2003). A técnica do CIM foi realizada segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Foram utilizadas microplacas para cultura celular com 96 orifícios estéreis. Utilizou-se um protocolo de diluição seriada iniciando-se em $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ à $0,195 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os ensaios antimicrobianos foram feitos em triplicata ($n=3$) com os 15 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

Preparo da Solução Mãe (SM) que são as amostras a serem testadas:

As amostras preparadas foram: os complexos, os flavonoides e os fenóis livres, todos chamamos de Solução Mãe (S.M). Pesou-se 1 mg de amostra que foi dissolvida em 125 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), ficando essa solução com a concentração de $8.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Nesta acrescentou-se 500 μL de caldo nutriente, ajustando a concentração da solução para $1.600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo esta classificada como Solução Mãe (SM).

Montagem da placa estéril de 96 orifícios e realização da diluição seriada:

Inicialmente preencheu-se os poços da placa estéril de 96 orifícios com caldo nutriente: 50 μL em todos os poços onde a SM seria testada; 59 μL em todos os poços onde se testou o controle positivo (Streptomicina); 80 μL em 3 poços para testar a viabilidade do inóculo; 90 μL em 3 poços para testar o controle de assepsia da SM ; 75 μL , 76 μL , 77 μL , 78 μL e 79 μL , em poços subseqüentes para testar a atividade antiséptica do DMSO. Após preenchimento da placa com o caldo, pipetou-se 50 μL da SM nos primeiros poços onde as amostras seriam testadas, como a SM estava com $1.600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, esta foi ajustada a $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ao ser colocada no poço que continha 50 μL de caldo. Realizou-se uma diluição seriada do poço número 1 até o poço número 12, (FIGURA 3.2). O mesmo procedimento de diluição seriada foi feito para o controle positivo, porém pipetando no primeiro poço 59 μL de solução de streptomicina. Nos poços com caldo nutriente para o controle da SM pipetou-se 10 μL da mesma, para confirmar se não havia o crescimento de outros microrganismos. Nos poços onde continham caldo nutriente 75 μL , 76 μL , 77 μL , 78 μL e 79 μL , para o controle do DMSO, deste pipetou-se doses consecutivas de 5, 4, 3, 2 e 1 μL . Depois desta etapa, completaram-se os poços testes da SM com 30 μL de caldo nutriente e os da streptomicina com 21 μL do caldo.

Preparo do inóculo:

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento de 72 horas em solução salina 0,9% e a padronização foi feita através do Densimat®, um densitômetro que mede a densidade óptica de um inóculo microbiano. A leitura no Densimat® foi feita no comprimento de onda de 550 nm e a densidade óptica correspondente a 0,5 da escala McFarland, que equivale a 10^8 UFC.mL⁻¹. Em seguida foram realizadas diluições para a concentração final de 10^5 UFC.mL⁻¹ de onde destes 3 mL do inóculo em solução salina transferiu-se 500 µL para um tubo de 4,5 mL de solução salina e deste tubo transferiu 2000 µL para um outro tubo contendo 10 mL de caldo de nutriente, ficando o inóculo com 5×10^5 UFC.

Em seguida pipetou-se 20 µL do inóculo em cada poço com SM, streptomina e naqueles de controle do teste de atividade do inóculo. A FIGURA 2. 4 representa uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.

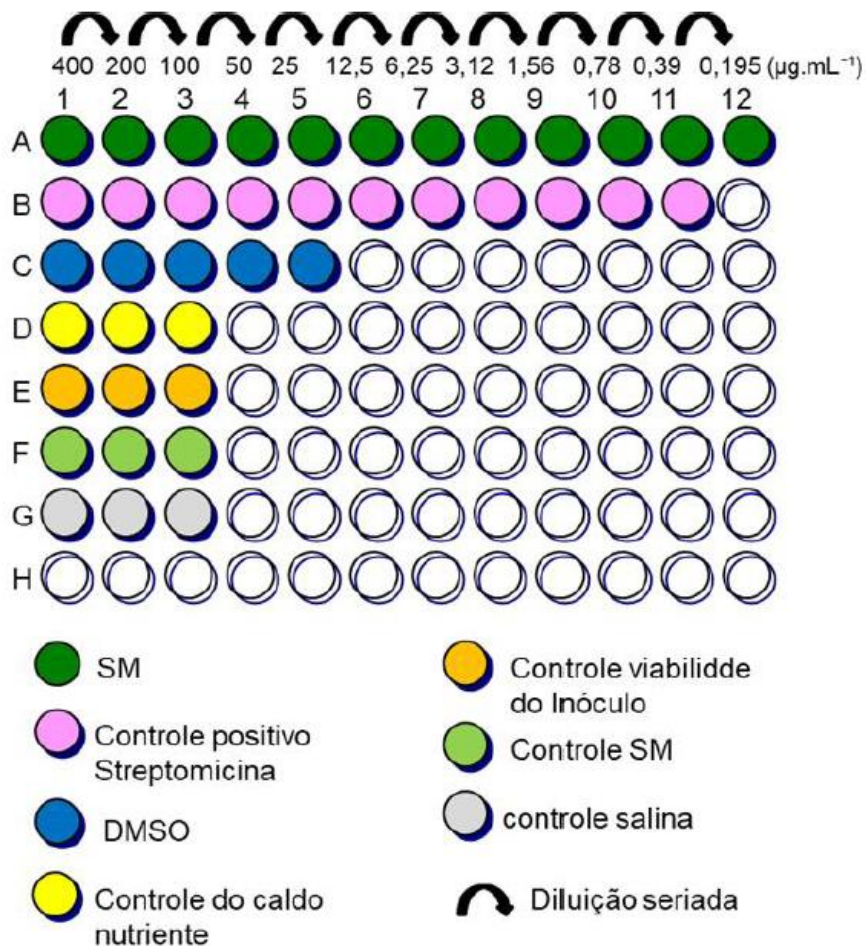


FIGURA 2. 4 - Ilustração de uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.

Após a realização da metodologia do CIM, as placas Elisa® foram guardadas em Câmara Incubadora BOD a temperatura de 28°C onde permaneceram por 72 horas.

Leitura da Concentração Inibitória Mínima das amostras nas placas:

Após o período de incubação, a análise do CIM foi realizada pipetando-se em cada poço 30 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma) 0,02% (m/v) (PALOMINO, et. al., 2002), como revelador do crescimento microbiano. A

resazurina na presença de células bacterianas viáveis sofre uma reação de redução transformando-se em resofurina e mudando sua coloração de azul para rosa intenso.

Após adicionar a resazurina, as placas foram levadas à BOD novamente e, após 12 horas, realizou-se a leitura da CIM dos compostos frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Os poços que apresentaram coloração rosa foram os que ocorreram crescimento bacteriano e os que permaneceram em azul onde indica que houve inibição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Visão global dos estudos químicos realizados

Neste trabalho foram realizados vários estudos visando trazer à luz informações sobre a ecologia química do fungo patógeno de Citros *Erythricium salmonicolor* (*Corticium salmonicolor*).

Inicialmente, foi estabelecido o melhor meio e forma de cultura para este microrganismo, estabelecendo-se como meio sólido em placas contendo batata dextrose ágar (BDA). A partir disso, foi realizado o experimento de curva de crescimento do microrganismo para ser analisado por GC-MS e PCA. Durante nove dias foi analisado os extratos dessa cultura e por meio de análise de componente principal (PCA), e discriminando os metabólitos do meio de cultura (controle) foi determinando que o melhor tempo para a cultura deste fungo seria no 9º dia. Os metabólitos provenientes desse experimento foram caracterizados e identificados como as substâncias **44-60**.

Seguindo para os estudos da composição química dos metabólitos secundários de *E. salmonicolor*, foi realizado o crescimento do mesmo em meio BDA e o extrato resultante foi submetido a CC (SPE-C18) do qual rendeu seis frações e que dessas a **F1-F4** foram submetidas a refração utilizando HPLC-UV semipreparativo para dar 47 subfrações que foram analisadas por RMN-1D e 2D e UPLC-HRMS MS/MS, levando à identificação/anotação dos metabólitos presentes. Esse estudo também foi ancorado pela análise do extrato bruto de *E. salmonicolor* por HPLC-HRMS MS/MS buscando os intermediários biossintéticos e derivados das substâncias já caracterizadas. Assim, usando ferramentas como MS-DIAL, MS-FINDER e Molecular Networking (MN), e com o advento da abordagem de organização dos dados de MS² a partir da similaridade de seus íons-fragmento foi possível realizar o mapeamento do perfil químico resultando nas substâncias **1-20** e **22-32**.

Além disso, foi realizado o estudo de interação de *E. salmonicolor* com a bactéria *Xanthomonas citri* para entender como esse microrganismo sobrevive no nicho ecológico ao qual está inserido. Para isso, foi realizado o crescimento do fungo por três dias e logo em seguida foi estriada as colônias bacterianas ao redor do micélio. O experimento foi realizado em triplicata de réplicas autênticas e analisado por UPLC-HRMS MS/MS e submetido para pré-tratamento de dados e realizada a busca nas bibliotecas do software MS-FINDER. Os dados foram organizados em MN e processados no Cytoscape 3.80 para a quantificação relativa dos íons quando comparado ao crescimento do fungo isolado e discriminado os íons referentes àqueles do meio de cultura. Foram verificados íons aumentando em concentração como derivados do ácido fusárico (**1**), bikaverina (**15**), fusarina C (**18**), dentre outros, e alguns íons que diminuiu sua concentração relativa quando comparado ao crescimento isolado dele.

Para entender como o fungo interage com a sua planta hospedeira e se é possível a interação química fungo-planta, uma vez que o fungo pode depositar na região da infecção micotoxinas ou até mesmo bioconverter/biotransformar substâncias que a planta envia para a região como sinalizadores de mecanismo de defesa. Para isso, foi inoculado o microrganismo em meio de cultura Czapek (meio pobre), deixado o meio de cultura para controle, adicionado o flavonoide rutina ao meio de cultura (substrato) e realizado o experimento de biotransformação com o inóculo no meio contendo a rutina. Esse experimento foi submetido à cromatografia em coluna (CC, C-18) para isolamento da substância **21** e os demais experimentos em triplicata foram submetidos a análise por UPLC-HRMS MS/MS e após pré-tratamento dos dados e organizados em rede molecular, esses dados foram analisados buscando novas substâncias não expressas anteriormente.

Assim, o estudo auxiliado por ferramentas de quimioinformática como GNPS, MS-DIAL, MS-DIAL, dentre outras resultou na anotação e/ou identificação

por priorização das substâncias **1-32** de *E. salmonicolor*, enquanto o estudo químico do fungo *D. citri*, levou à identificação das substâncias **33** e **34**. Já o estudo da complexação de metais com moléculas provenientes do metabolismo secundário de *Citrus* levou à produção das substâncias **35-43** que foram caracterizadas por UPLC-HRMS MS/MS e RMN-1D e 2D, e por fim, o estudo da curva de crescimento de *E. salmonicolor* levou à caracterização das substâncias **44-60** por GC-MS, usando a biblioteca da NIST, bem como a comparação do índice de retenção de Kovats de padrões relatados no livro Adams.

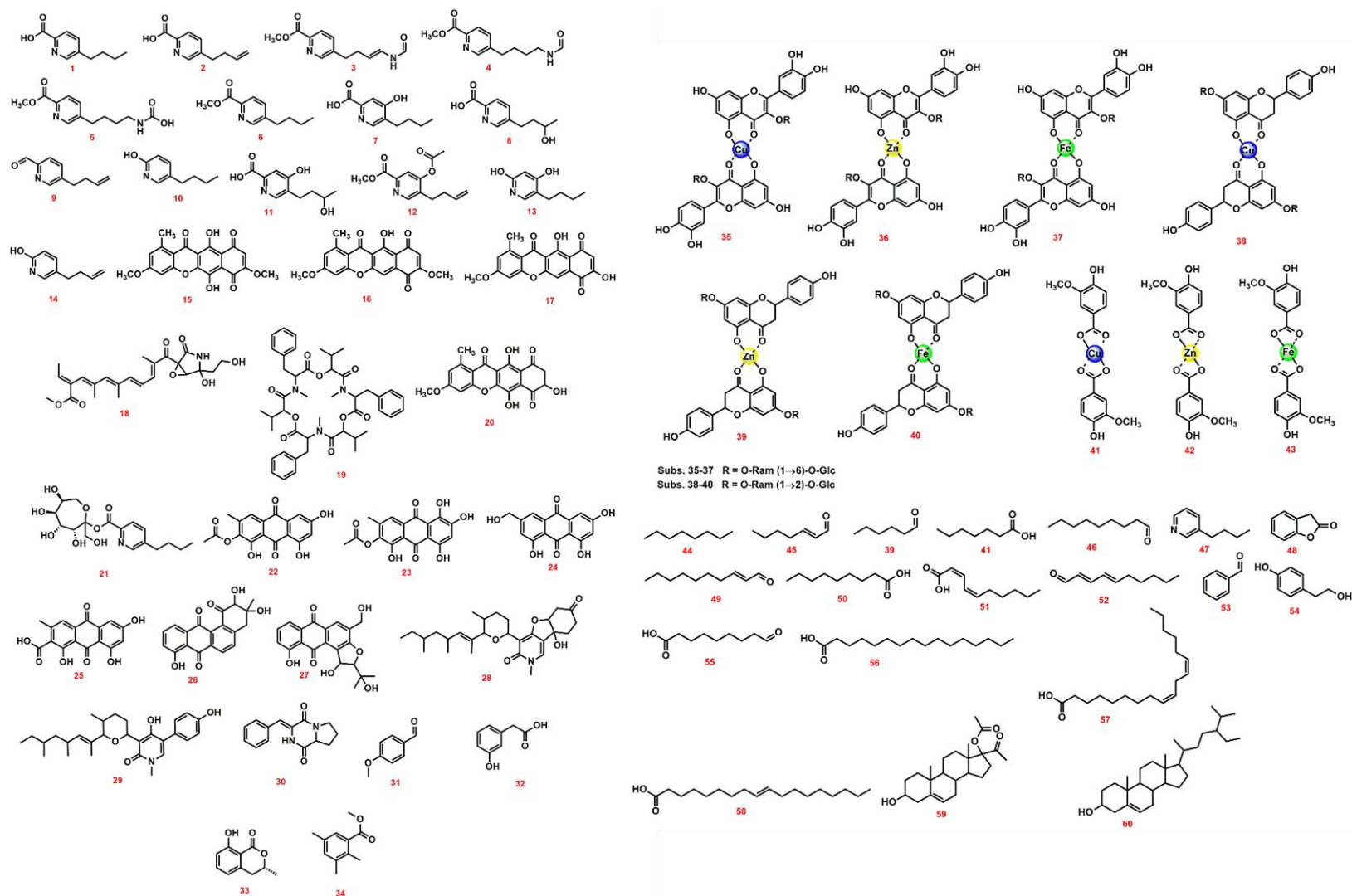


FIGURA 3 1 - Quadro de todas as substâncias identificadas e/ou anotadas neste trabalho

3.2. Identificação dos compostos apolares da cultura de *E. salmonicolor* por GC-MS

A partir dos extratos da cultura de *E. salmonicolor* e dos dados analisados por GC-MS, os resultados adquiridos foram comparados com aqueles descritos na biblioteca NIST e com os índices espectros de Kovats do livro Adams, sendo possível identificar as substâncias de 38-57 (Tabela 1).

Tabela 1 - Substâncias caracterizadas no extrato de *E. salmonicolor* (AcOEt) por GC-MS

Nº	Ret. Time (min)	Area	Compound name
38	2.98	93855	octane
39	3.01	211793	n-hexanal
40	6.14	41997	hept-(2E)-enal
41	6.76	80426	heptanoic acid
42	10.27	401712	4-nonenal
43	10.59	630796	n-nonenal
44	11.8	1572641	3-n-buthylpyrudine
45	15.03	83369	2-coumaranone
46	15.9	40422	<i>trans</i> -2-decenal
47	16.22	43120	n-nonanoic acid
48	17	83858	2,4-decadienal, (2Z, 4Z)
49	17.73	12374	deca-(2E, 4E)-dienal
50	19.55	74117	Benzaldehyde
51	21.4	40875	Tyrosol
52	23.03	498969	9-Oxononanoic acid
53	26.67	6131468	Fusaric acid
54	36.02	17502252	hexadecanoic acid
55	39.49	44768128	linoleic acid

56	39.55	15495475	<i>trans</i> -oleic acid
57	53.5	1478105	17- α - acetoxypregnenolone
58	54.43	333097	sitosterol

A análise dos dados por GC-MS foram discriminados quando comparados com aqueles que estavam presentes no branco do meio de cultura, que pode ser diferenciado com um diagrama de loading versus scores para a construção da PCA (*Principal Component Analysis*), e com isso foi possível verificar que a produção de metabólitos pelo fungo foi possível ser detectados a partir do 4º dia de cultura do microrganismo (FIGURA 3. 1).

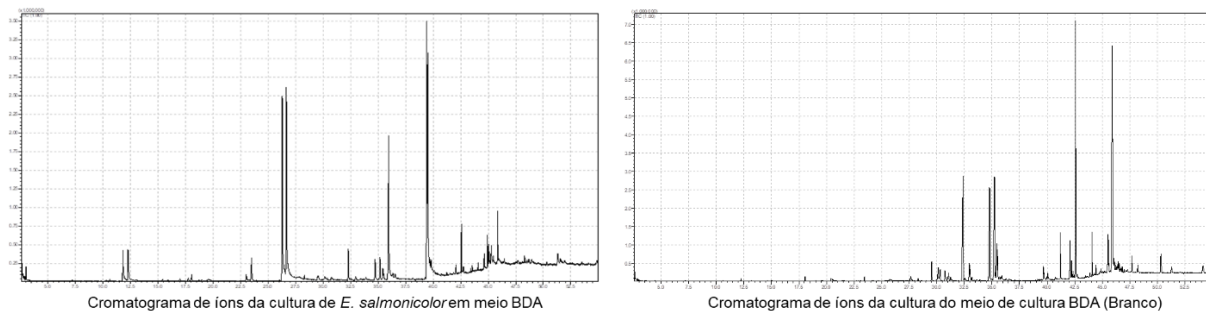


FIGURA 3. 1 – Comparação dos cromatogramas do extrato da cultura do microrganismo com o branco do meio de cultura.

Assim, com a modelagem quimiométrica utilizando o software MATLAB, foi possível verificar que o dia de maior produção de metabólitos secundários pelo fungo *E. salmonicolor* foi no 9º dia, como pode ser verificado na (FIGURA 3. 2) onde vemos o símbolo estrela do dia 9 mais distante daquele que se refere ao branco do meio de cultura.

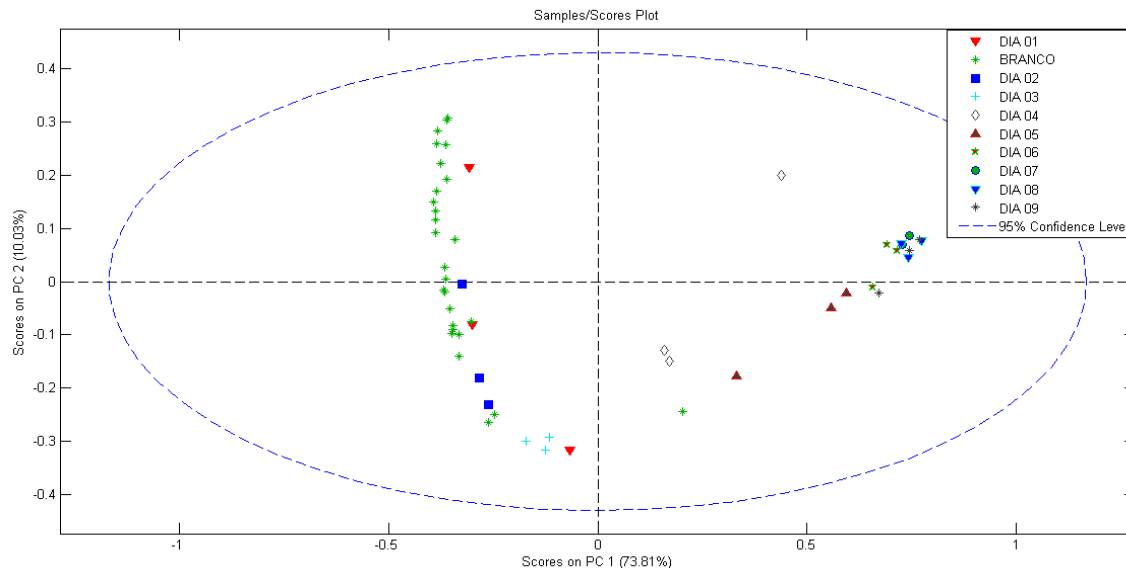


FIGURA 3. 2 - Plotagem dos scores da PC1 x PC2 que representaram quase 90% dos dados analisados.

3.3. Fracionamento e isolamento dos constituintes do extrato da cultura de *E. salmonicolor*

As substâncias que se encontravam em quantidades suficientes para adquirir os espectros de RMN 1D e 2D foram caracterizadas, para auxiliar na busca de outros derivados e intermediários biossintéticos por análises de UPLC-HRMS MS/MS.

Assim, a substância **1** (FIGURA 3. 3) foi identificada como ácido fusárico (ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico). A partir do espectro de RMN de ^1H (Figura S 1) observou-se sinais em δ 8.51 (s_{ap} , 1H), 8.10 (d , $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.90 (dd , $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H) referentes ao sistema piridínico dissubstituído, além de sinais referente à cadeia alifática em δ 2.76 (t , $J = 7.8$ Hz, 2H), 1.66 (q , $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.39 (m , 2H), 0.96 (t , $J = 7.4$ Hz, 3H). Enquanto no espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 2) foi possível observar nove carbonos sendo um carbono carboxílico em δ 167.4 (**C11**), cinco carbonos aromáticos em δ 149.3 (**C6**), 147.1 (**C2**), 144.2 (**C5**)

e 126.1 (C3), enquanto os carbonos alifáticos foram δ 34.2 (C7), 33.5 (C8), 23.3 (C9) e 14.1 (C10)^{37,38}.

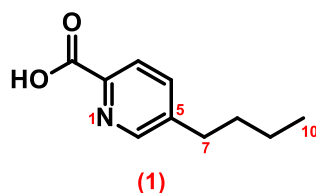


FIGURA 3. 3 - Estrutura do ácido fusárico (1)

Quando comparado os espectros de RMN de ^1H de **1** e **2** (Figura S 1 e Figura S 5) verificou-se o desaparecimento dos CH_2 e CH_3 (C9 e 10, respectivamente) sendo observado um sinal em δ 5.85 (*ddt*, $J=17.0$, 10.2 e 6.7 Hz, 1H) e 5.00 (*m*, 2H) atribuindo-se uma insaturação nessas posições. Isso é confirmado quando analisado o espectro de RMN de ^{13}C , (Figura S 6) δ 138.1 (C9), 116.5 (C10) confirmando assim a substância **2** como ácido 9,10-dehidro fusárico³⁸.

Enquanto a partir do espectro de massas, MS^1 (Figura S 3) foi possível calcular a fórmula para a substância **1**, $[\text{M}+\text{H}]^+=180.1023$ (massa calc.: 180.1025, $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$, erro: -1.1 ppm). A partir do espectro de MS^2 (Figura S 4), foi possível propor um caminho de fragmentação racional iniciando com a perda de 46.01 Da ($\text{M}-\text{CH}_2\text{O}_2$) para dar o íon-fragmento m/z 134.10, que pode ser explicada pela migração de um hidreto da posição C7 da cadeia lateral para o carbono aromático da posição C6 delocalizando assim a ligação dupla e devolvendo o par de elétrons ao nitrogênio protonado, favorecendo um estado de transição com anel de cinco membros e o grupo carboxila sendo eliminado na forma de CO_2 , seguido de uma perda de H_2 , retornando a aromaticidade do fragmento na forma de cátion benzila, que por sua vez rearranja para a forma mais estável como cátion azotropílio (FIGURA 3. 4).

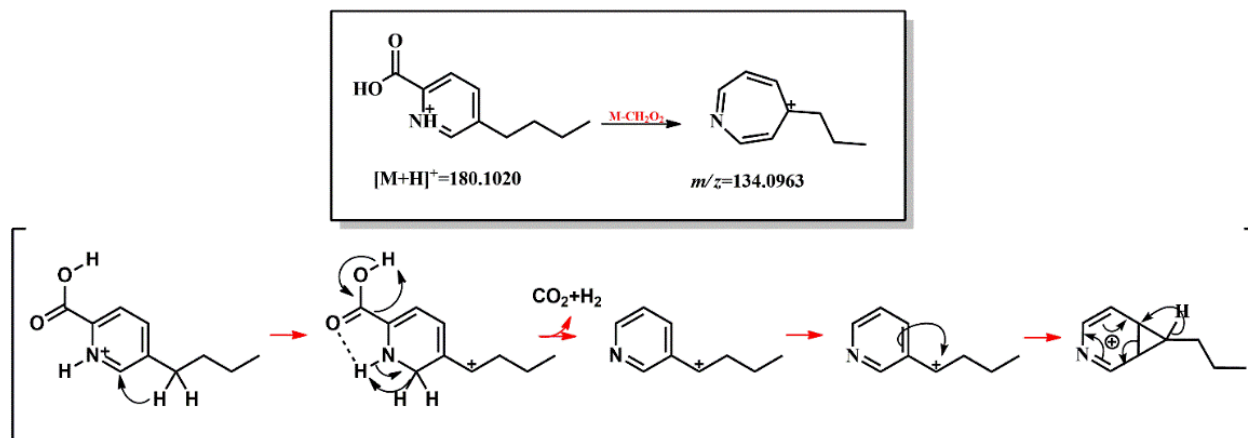


FIGURA 3. 4 - Proposta de fragmentação para o ácido fusárico (1)

Alguns outros íons fragmentos mais clássicos são apresentados na FIGURA 3. 5, tanto para o ácido fusárico, quanto para o ácido 9,10-dehidrofusárico. Transições como a perda neutra de CO (M-27.99), metila radicalar (M-15.02) e a perda de toda a cadeia lateral para restar o íon m/z . 79.05 representam essa classe de substâncias.

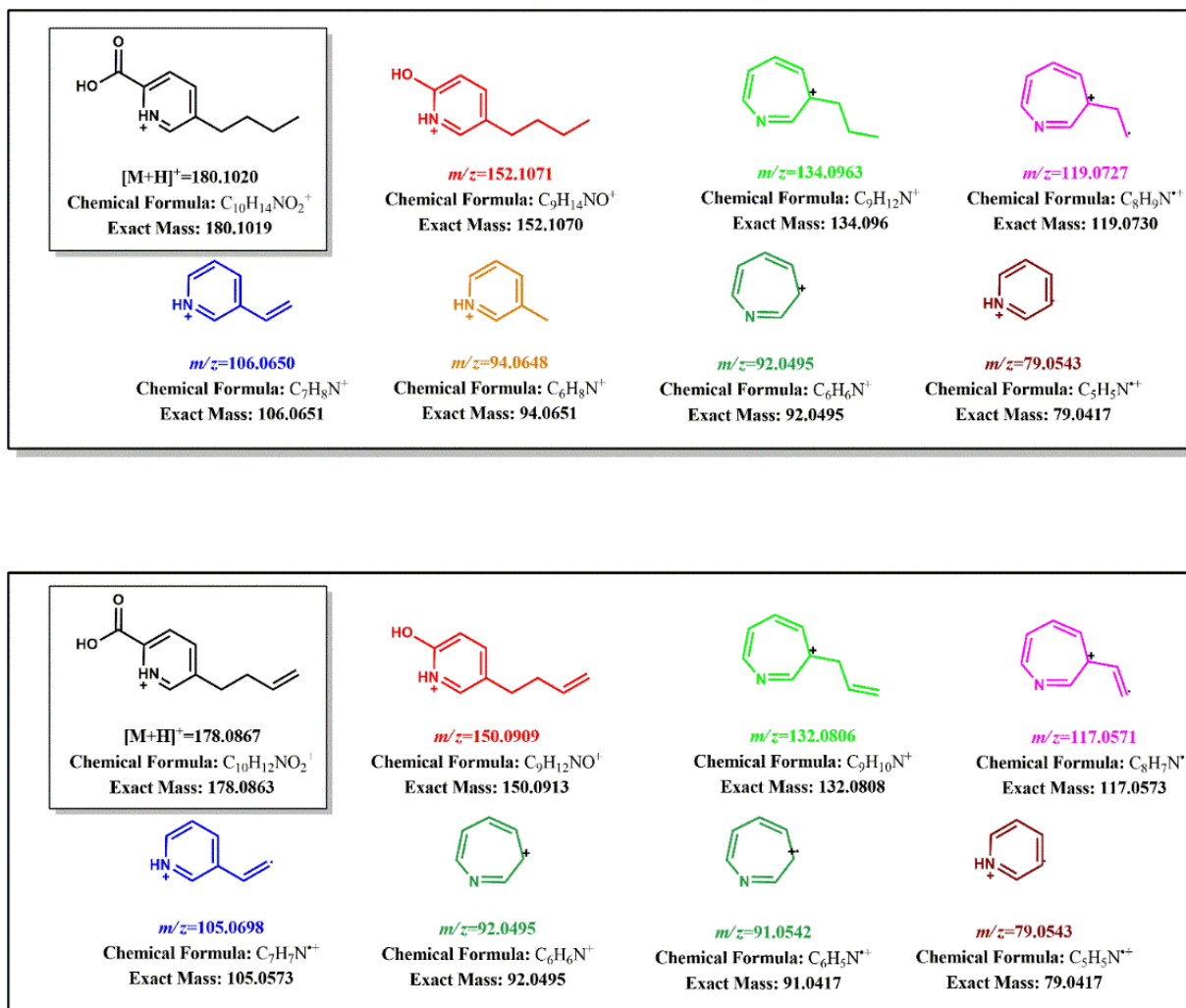


FIGURA 3. 5 - Proposta de íons fragmentos para o ácido fusárico (1) e para o ácido 9,10-dehidrofusárico (2)

Estudos da biossíntese do ácido fusárico (1) mostram que o precursor de todos os derivados é o ácido 9,10-dehidro fusárico (2) tendo as posições C9 e C10 reativas para diversas reações pelo sistema enzimático³⁹.

Essa classe de substâncias é conhecida pelo potencial de inibição do *quorum sensing* na comunicação entre bactérias gram-negativas, além de redução da produção de ATP sintase, de polifenol oxidase e peroxidases, além de muitos outros efeitos⁴⁰.

A substância **21** (FIGURA 3. 6) foi produto da biotransformação de rutina pelo fungo *E. salmonicolor* em meio Czapek.

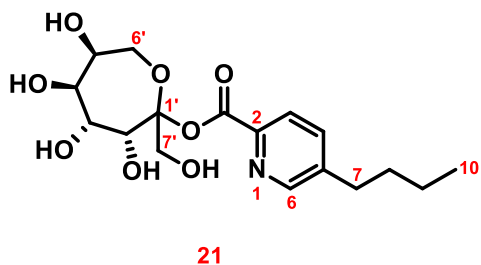


FIGURA 3. 6 - Estrutura da substância **21**.

A análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3. 7) revelou a presença de sinais provenientes do ácido fusárico (**1**) já caracterizado acima, contudo com outros sinais de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos em δ 8.43 (s, 1H), 7.86 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.11 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.02 (dd, $J = 12.9, 1.3$ Hz, 1H), 3.99 (dd, $J = 3.5, 1.7$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H), 3.79 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 3.74 – 3.68 (m, 2H), 3.59 – 3.54 (m, 1H), 2.76 – 2.70 (m, 2H), 1.63 (p, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.33 (h, $J = 7.5$ Hz, 2H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). Enquanto, na análise do espectro de ^{13}C foi possível verificar sinais em δ 172.3 (C-11), 149.7 (C-6), 147.7 (C-2), 141.5 (C-4), 138.7 (C-5), 123.8 (C-3), 80.6 (C-1'), 75.3 (C-2'), 69.7 (C-4'), 69.2 (C-3'), 67.5 (C-5'), 63.9 (C-7'), 63.3 (C-6'), 32.3 (C-7), 31.7 (C-8), 21.4 (C-9), 13.1 (C-10).

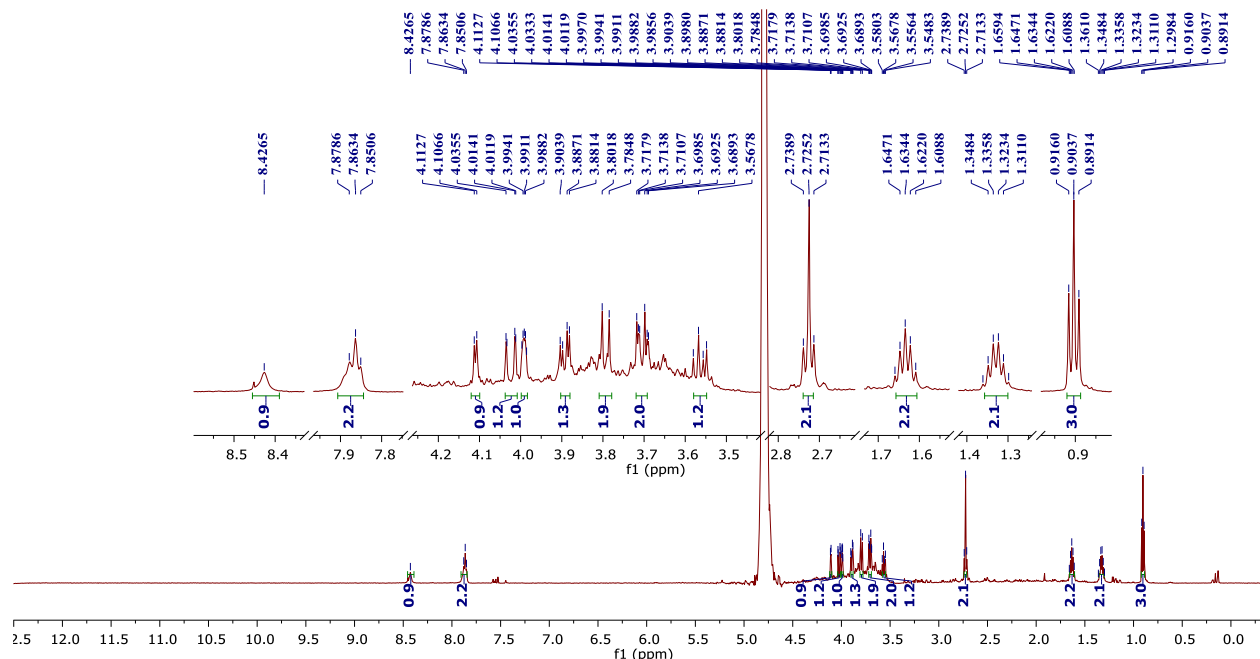


FIGURA 3. 7 - Espectro de RMN de ^1H de **21**.

Esses dados foram confirmados com o auxílio dos experimentos de RMN de ^{13}C . COSY, NOESY-2D, HSQC e HMBC (Figura S 7 a Figura S 11).

A substância **31** (FIGURA 3. 8) teve em seu espectro de RMN de ^1H (Figura S 12) quatro sinais δ 9.77 (*s*, 1H), 7.78 (*d*, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.92 (*d*, $J=8.6$ Hz, 2H) para um sistema aromático do tipo AA'BB' (parassubstituído) e 4.58 (*s*, 3H) atribuído a uma metoxila.

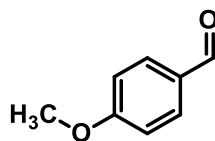
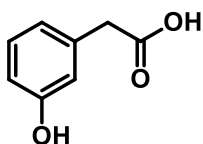


FIGURA 3. 8 - Estrutura do 4-metoxibenzaldeído (**31**)

Enquanto a partir do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 13) foi possível observar os sinais δ 192.84, 133.45, 116.88.

O 4-metoxibenzaldeído tem apresentado potencial antivirulência contra *Staphylococcus aureus* e seus isolados clínicos, uma opção frente ao problema de resistência de microrganismos⁴¹.

A substância **32** (FIGURA 3. 9) foi identificada como ácido 3-hidroxifenilacético, o qual em seu espectro de RMN de ¹H (Figura S 14) mostrou dois sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ 7.10-7.04 (*m*) e 6.79-6.74 (*m*) que integram para dois hidrogênios, que foram atribuídos a um sistema dissubstituído em *meta*, e devido à similaridade de ambientes químicos, os sinais de ¹H coalesceram, além do sinal do metileno benzílico em δ 3.57 (*s*, 2H). Essa informação foi confirmada quando analisado o espectro de RMN de ¹³C (Figura S 15), onde foi observado os sinais referentes ao carbono carboxílico da cadeia lateral em δ 176.9 e o carbono fenólico em δ 156.9, além dos sinais de carbonos ligados a hidrogênios do anel aromático em δ 132.0, 129.2, 120.5 e 116.2, que tiveram sua intensidade maior quando comparado com o sinal em 123.3 ppm, que foi atribuído ao carbono totalmente substituído, ao qual estava ligada a cadeia lateral, a qual apresenta um sinal de CH₂ benzílico em 37.6 ppm.



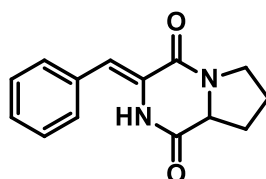
32

FIGURA 3. 9 - Estrutura do ácido 3-hidroxifenilacético (**32**)

O ácido 3-hidroxifenilacético tem apresentado efeito ansiolítico utilizado para depressão.

A substância **30** foi identificada como [Cyclo(phenylalanylprolyl)] que em seu espectro de RMN de ¹H (Figura S 16) foram observados os sinais em δ 7.31-7.21 (*m*), 4.07 (*ddd*, *J*=10.9, 6.4, 1.8 Hz), 3.59-3.50 (*m*), 3.41-3.34 (*m*), 2.13-2.05 (*m*) e 1.85-1.75 (*m*), enquanto no espectro de RMN de ¹³C (Figura S 17) foi observado

os sinais em δ 166.9 e 158.4 para os carbonos acilas, δ 137.3, 131.1, 130.6, 129.5, 128.1, 127.1 e 113.9 para os carbonos aromáticos, além dos sinais em δ 60.1, 46.0, 29.4 e 22.8 para os carbonos metilênicos e metínico, justificando assim, pela comparação de seus dados de RMN de ^1H e ^{13}C com aqueles relatados na literatura a sua identificação⁴².



30

FIGURA 3. 10 – Estrutura da [Cyclo(phenylalanylprolyl)] (**30**)

A partir do espectro de massas, MS^1 (Figura S 18) foi possível calcular a fórmula molecular para a substância **30**, $[\text{M}+\text{H}]^+=243.1129$ (massa calc.: 243.1128, $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$, erro: 0.4 ppm). O mecanismo de fragmentação para confirmar a identificação realizada foi proposto (FIGURA 3. 11) com base em seu espectro de MS^2 (Figura S 19), iniciando pela perda de 27.99 Da (M-CO) para dar o íon-fragmento em m/z 215.12, e subsequente perda de outra molécula de CO para resultar em m/z 187.12, que por sua vez pode fragmentar com perda de amônia para dar o íon-fragmento m/z 170.10 ou perder 27.01 Da (M-CHN) para dar o íon-fragmento m/z 160.11, que pode fragmentar nas rotas com perda de 90.05 Da (M- C_7H_6) para o íon fragmento m/z 70.07 ou perder 42.05 Da (M- C_3H_6) para dar o íon m/z 118.07, que pode perder 27.01 Da (M-CHN) para dar o íon-fragmento tropílio em m/z 91.05.

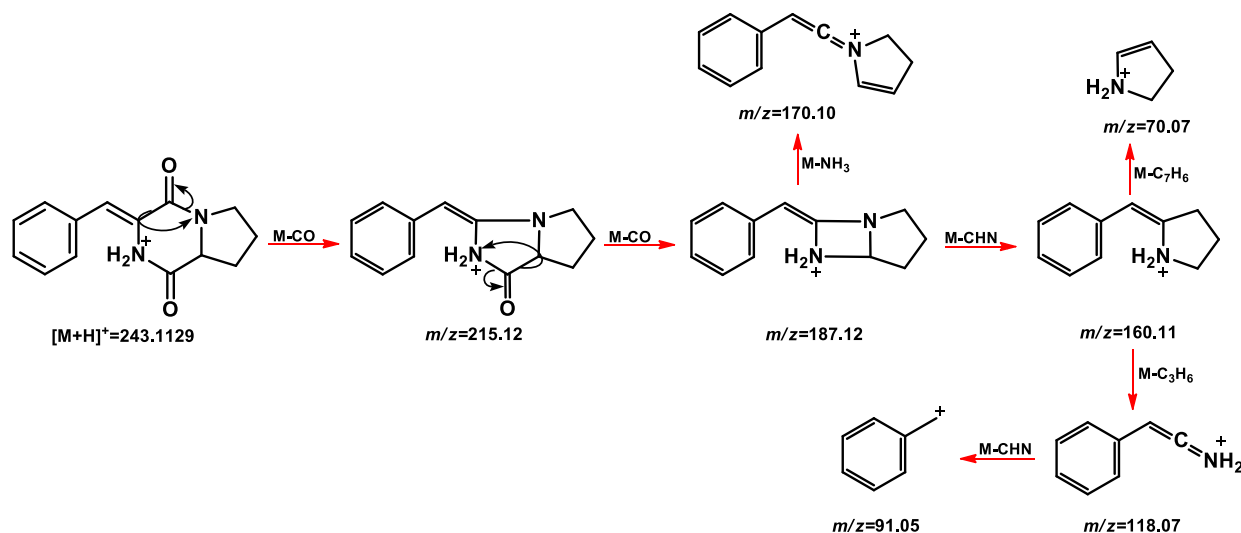


FIGURA 3. 11 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a substância [Cyclo(phenylalanylprolyl)] (**30**).

A substância **18** foi identificada como fusarina C, e em seu espectro de RMN de 1H (Figura S 20) foi possível observar os sinais referente a grupos metílicos em δ 1.67 (*s*), 1.62 (*s*), 1.22 (*s*), 1.13 (*s*), além de um tripleto em δ 5.11 (*t*, $J = 7.3$ Hz), enquanto no espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 21) foi possível observar os carbonos em δ 166.9, 125.9, 82.1, 75.6, 55.4, 45.5, 42.1, 41.4, 26.1, 25.9, 25.1, 24.7, 23.7, 17.7 e 15.4, e que pela quantidade de metilas, inicialmente sugeriu-se que a estrutura se tratava de um núcleo terpênico, contudo a dificuldade na aquisição de bons espectros dificultou a caracterização total pela análise dos dados de ressonância magnética nuclear 1D e 2D (Figura S 22 e Figura S 23).

Assim, com a aquisição do espectro de MS^1 (Figura S 24) de **18**, foi possível calcular a fórmula para essa substância, $[M-H]^- = 430.1873$ (massa calc.: 430.1866, $C_{23}H_{29}NO_7$, erro: 0.5 ppm) e os espectros de MS^2 (Figura S 25) foram adquiridos para realizar uma proposta de mecanismo de fragmentação (FIGURA 3. 12) que ajudasse a corroborar a sua identificação. Inicialmente observa-se o íon fragmento m/z 412.18 que é resultado da desidratação ($M-H_2O$) a partir o íon precursor, que sofre uma perda de formaldeído ($M-CH_2O$) para dar o íon m/z 382.17,

que ainda sofre um mecanismo de perda radicalar de $M-C_2H_3O\cdot$, para explicar o íon-fragmento m/z 339.16. Outra rota foi a perda direta de formaldeído ($M-CH_2O$) a partir do íon precursor, para dar o íon-fragmento m/z 400.18, que pode fragmentar perdendo $C_4H_5O_2\cdot$ para dar o íon m/z 315.16 ou perder C_2H_3O para dar o íon-fragmento m/z 357.16, que por sua vez, pode fragmentar perdendo CHO para dar o íon-fragmento m/z 328.16. Uma terceira via para explicar os íons-fragmentos é a perda de toda a cadeia olefínica perdendo $C_{16}H_{21}O_2\cdot$, para dar o íon-fragmento m/z 185.03, que pode fragmentar para dar o íon-fragmento m/z 139.03 pela perda consecutiva de CO e H_2O , ou apenas pela perda de CO para dar o íon-fragmento m/z 158.05, que sofre uma nova perda de CHO para dar o íon-fragmento m/z 128.04. Os espectros de MS^2 apresentam muitos íons-fragmentos devido ao sistema olefínicos conjugado que faz com que os íons-fragmentos por vias radicalares sejam mais estáveis. Contudo, as propostas aqui apresentadas trazem à luz informações a respeito de ambas as partes da molécula, confirmando assim a estrutura da fusarina.

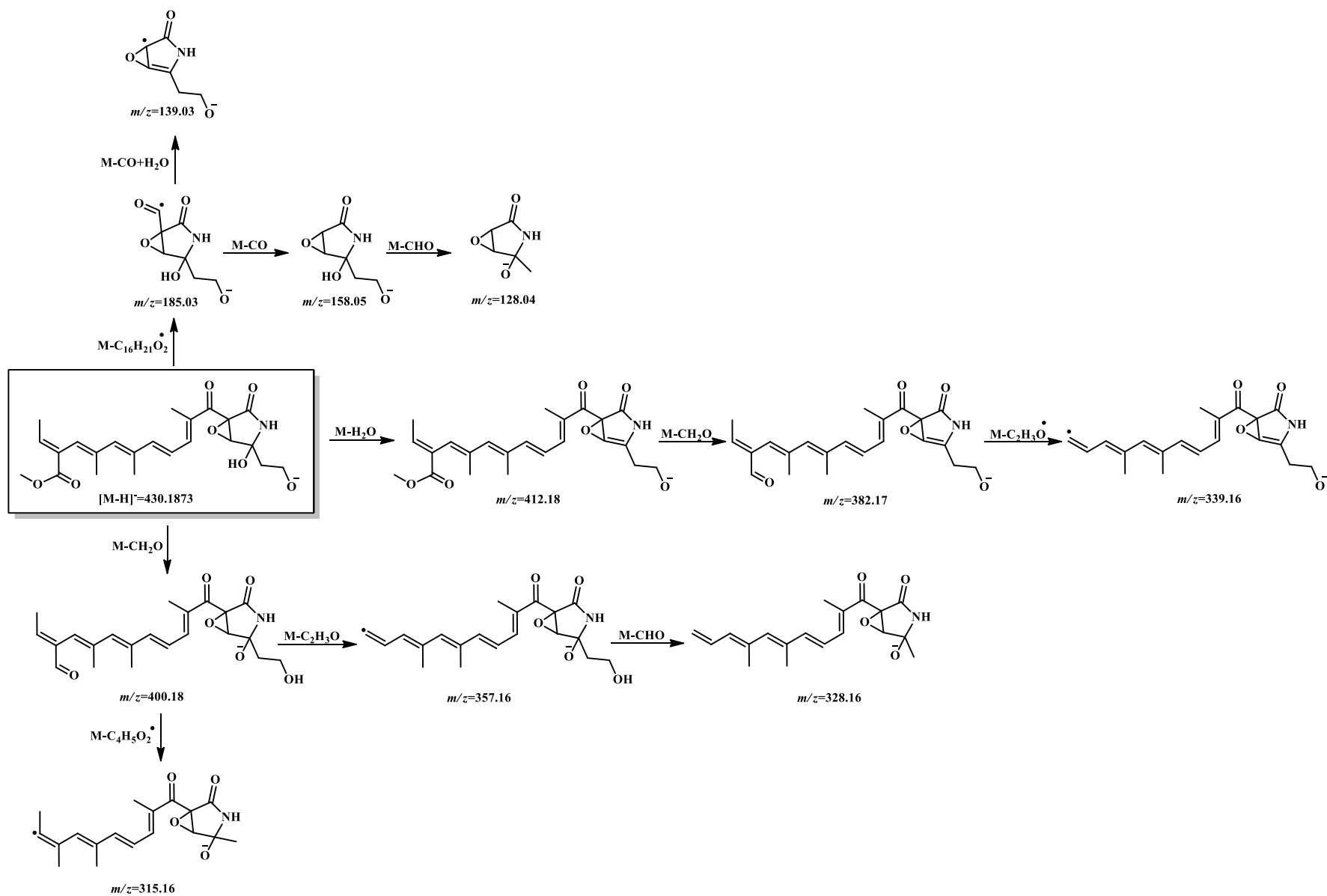


FIGURA 3. 12 - Proposta de mecanismo de fragmentação para a substância fusarina (18)

A substância **15** foi identificada como bikaverina (FIGURA 3. 13), e em seu espectro de RMN de ^1H (Figura S 26) foi possível observar os sinais em δ 14.31 e 12.79 relativos aos hidrogênios (**C6** e **C11**), além dos sinais em δ 6.80 (*d*, $J=2.0$ Hz, H-2) e 6.93 (*d*, $J=2.0$ Hz, H-4) e um sinal em 6.35 (*s*, H-9) atribuído aos hidrogênios da região aromática, enquanto na região alifática foi observado sinais de metoxilas em δ 3.96 (*s*, 8-OMe) e 3.93 (*s*, 3-OMe) e uma metila em 2.97 (*s*, 1-Me). Enquanto no espectro de ^{13}C (Figura S 27), não foi possível observar todos os carbonos devido aos núcleos que relaxam em tempos diferentes dificultando a detecção deles, e que a atribuição foi corroborada pelos experimentos de HMBC e HSQC (Figura S 28 e Figura S 29).

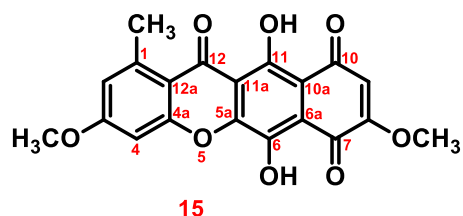


FIGURA 3. 13 – Estrutura da bikaverina (15)

A atribuição dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram comparados com aqueles descritos na literatura^{43,44}.

Além disso, com a aquisição do espectro de MS^1 (Figura S 28 e Figura S 29) de **15**, foi possível calcular a fórmula molecular para essa substância, $[\text{M}+\text{H}]^+=383$ (massa calc.: 383.0761, $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_8$, erro: 0.5 ppm) e os espectros de MS^2 em 15, 25, 40 e 60 eV foram adquiridos para que fosse proposto um mecanismo de fragmentação que explicasse as transições de massa pelas quebras da molécula (Figura S 31). Inicialmente observou-se transições, a partir do íon precursor clássicas, como a perda de CO para dar o íon-fragmento em m/z 355.08 que por sua vez sofreu a perda de uma molécula de metanol ($\text{M}-\text{CH}_4\text{O}$) para o íon em m/z 323.06, e ainda como acontece em compostos aromáticos altamente conjugados, observou-se a perda

de uma metila radicalar ($M\text{-CH}_3\bullet$) para dar o íon fragmento m/z 340.06, além de outras perdas de monóxido de carbono, do radical $\text{CH}_3\text{O}\bullet$, dentre outras possíveis.

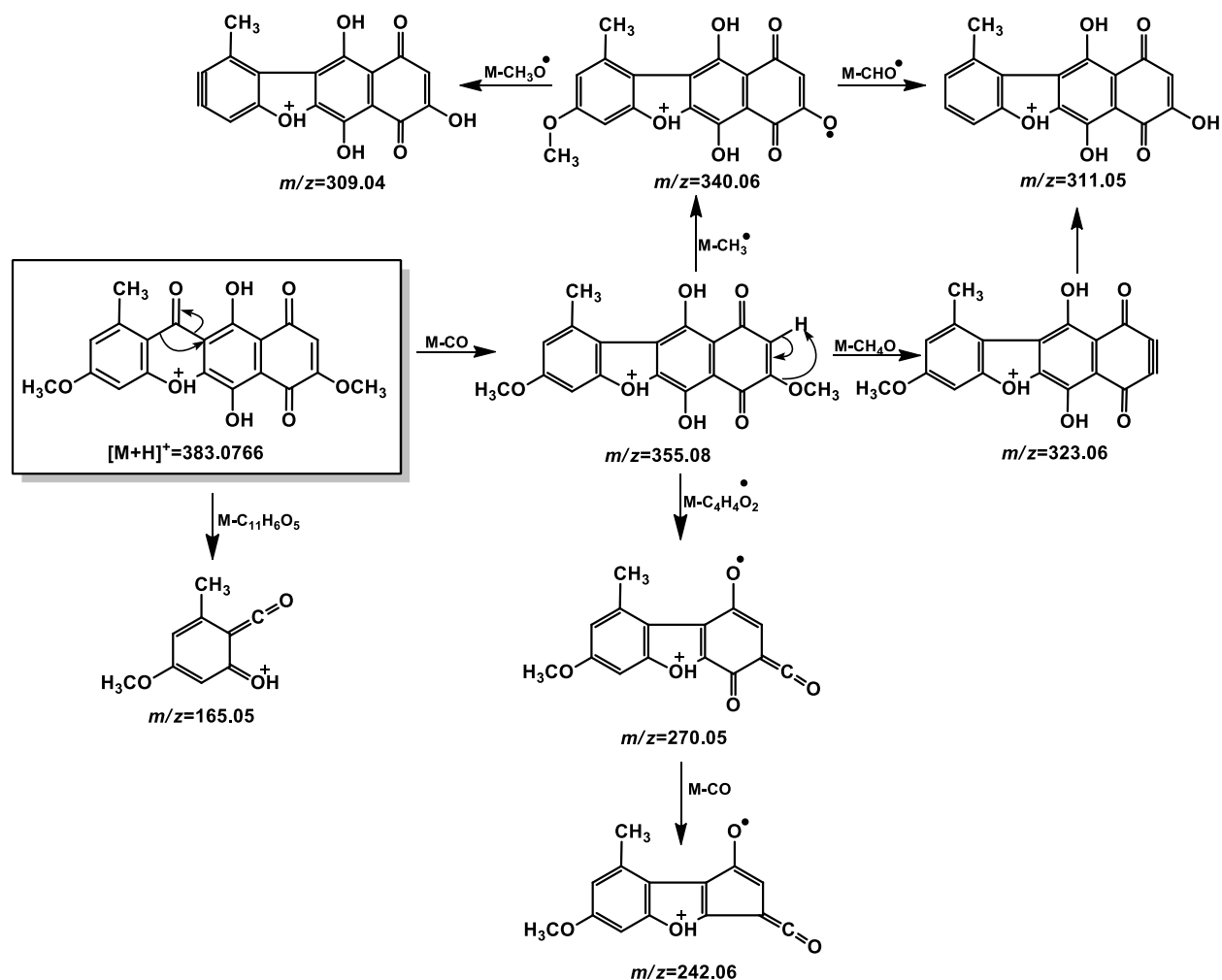


FIGURA 3. 14 – Proposta de mecanismo de fragmentação para bikaverina (15)

TABELA 3. 1 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **15** com os dados descritos na literatura.

Position	δ ^1H of	δ ^1H of bikaverin	δ ^{13}C of	δ ^{13}C of bikaverin
1	-	-	144.3	146.3
2	6.80 (<i>d</i> , $J=2.0$ Hz, H-2)	6.80 (<i>s</i> , H-2)	117.9	123.8
3	-	-	175.8	171.8
4	6.93 (<i>d</i> , $J=2.0$ Hz, H-4)	6.93 (<i>s</i> , H-4)	98.9	101.1
4a	-	-	164.3	163.0
5a	-	-	152.2	157.0
6	-	-	158.9	165.7
6a	-	-	114.0	113.9
7	-	-	158.3	167.7
8	-	-	159.1	163.3
9	6.35 (<i>s</i> , H-9)	6.36 (<i>s</i> , H-9)	112.4	109.3
10	-	-	151.3*	173.2
10a	-	-	106.2	103.8
11	-	-	158.3*	177.5
11a	-	-	114.0	113.1
12	-	-	180.5	179.9
12a	-	-	117.2	111.6
1-CH ₃	2.97 (<i>s</i> , 1-Me)	2.87 (<i>s</i> , 1-Me)	23.5	23.4
3-OCH ₃	3.93 (<i>s</i> , 3-OMe)	3.94 (<i>s</i> , 3- OMe)	56.1	57.5
8-OCH ₃	3.96 (<i>s</i> , 8-OMe)	3.96 (<i>s</i> , 8- OMe)	56.9	58.0

*tentativa de atribuição

3.4. Estudo do perfil químico da cultura de *E. salmonicolor* por UPLC-HRMS MS/MS

O perfil químico da cultura desse fungo também foi avaliado por UPLC-HRMS MS/MS associado a ferramentas de quimioinformática para processar a grande quantidade de dados, diferenciando os metabólitos produzidos e excretados pelo microrganismo, daqueles que estavam presentes no meio de cultura (BDA).

O primeiro cluster trabalhado foi aquele que continha os padrões isolados de ácido fusárico (**1**) e ácido 9,10-dehidrofusárico (**2**).

TABELA 3. 2 – Relação de moléculas identificadas e/ou anotadas por UPLC-HRMS MS/MS junto com as bases de dados.

Nº	RT	Fórmula molecular	Massa calc.	[M+H] ⁺	Erro (ppm)	íons fragmentos	Anotação/Identificação
1	5.63	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180.1025	180.1023	-1.1	152.11; 134.10; 119.07;106.07; 94.07; 92.05; 79.05	Ácido fusárico
2	4.56	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	178.0868	178.0867	-0.5	150.09; 132.08; 117.06; 105.07; 92.05; 91.05; 79.05	Ácido 9,10-dehidrofusárico
3	8.71	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃	235.1083	235.1078	-2.1	207.12; 162.09; 134.10; 120.08; 103.06; 91.06;	10-Formamido-9,10-dehidrofusarato de metila
4	9.8	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	237.1239	237.1238	-0.4	191.12; 162.09; 134.10; 106.07; 92.05; 79.05	10-Formamido-fusarato de metila
5	5.75	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄	253.1188	253.118	-3.2	207.11; 178.09; 168.10; 150.09; 132.08; 117.06; 108.04; 80.05	10-Carboxiamino-fusarato de metila
6	0.92	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	194.0817	194.0815	-1	176.11; 166.09; 148.08; 130.07; 120.08; 105.06; 91.05; 77.04	Fusarato de metila
7	0.92	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	196.0974	196.0971	-1.5	166.09; 148.08; 130.07; 120.08; 103.05; 93.07; 77.04	Ácido 4-hidroxi-fusárico
8	1.86	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	196.0974	196.097	-2	179.10; 148.08; 130.07; 120.08; 105.06; 93.07; 77.04	Ácido 9-hidroxi-fusárico
9	5.63	C ₁₀ H ₁₁ NO	162.0919	162.0917	-1.2	132.08; 118.07; 106.07; 92.05; 79.05	9,10-dehidrofusaraldeído
10	8.71	C ₉ H ₁₃ NO	152.1075	152.107	-3.3	134.10; 119.07; 109.05; 92.05	5-Butilpiridin-2-ol
11	0.92	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄	212.0923	212.0924	0.5	194.12; 184.10; 166.09; 148.08; 130.07; 120.08; 103.05; 93.07; 79.05	Ácido 4,9-dihidroxi-fusárico

12	4.25	C ₁₃ H ₁₅ NO ₄	250.1079	250.1073	-2.4	209.07; 191.13; 145.07; 132.08; 115.05; 91.05	4-Acetoxi-9,10-dehidrofusarato de metila
13	3.73	C ₉ H ₁₃ NO ₂	168.1025	168.102	-3	150.09; 117.06; 108.04; 80.05	5-Butilpiridino-2-diol
14	1.86	C ₉ H ₁₁ NO	150.0919	150.0917	-1.3	130.07; 117.06; 109.05; 90.05; 80.05; 77.04	5-(But-3-en-1-il)piridin-2-ol

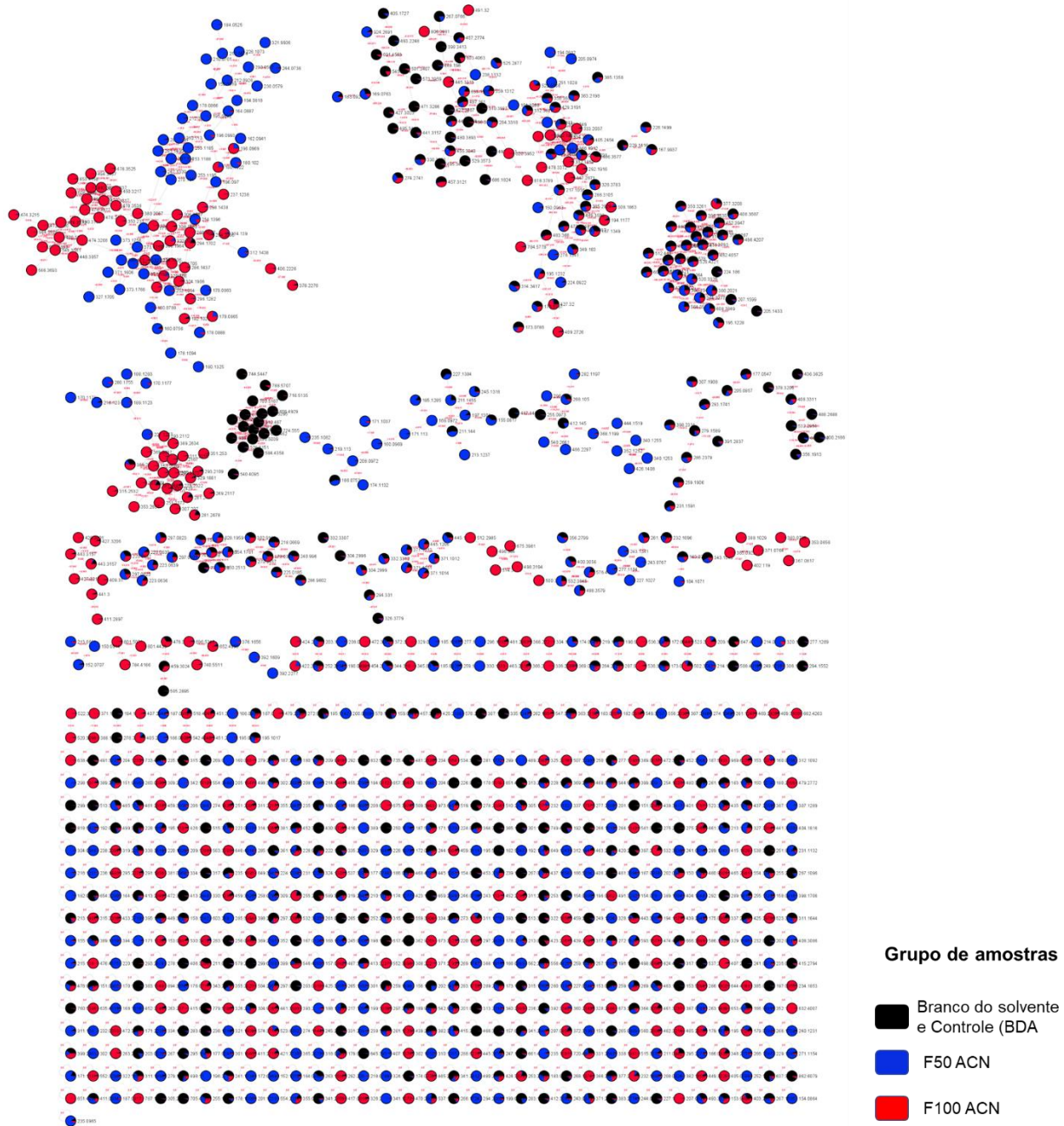


FIGURA 3. 15 – Rede molecular no modo positivo do branco do solvente e controle do meio de cultura (BDA) em preto, fração F50 ACN em azul e F100 ACN em vermelho.

Como pode ser observado na FIGURA 3. 15, a rede molecular do extrato da cultura do fungo *E. salmonicolor* em meio de batata dextrose ágar resultou em uma rede molecular com alguns agrupamentos de íons-precusores. Contudo, neste momento optou-se por trabalhar com a expansão do cluster que continha os padrões

de ácido fusárico e 9,10 dehidro fusárico (FIGURA 3. 16), para a tentativa de identificação/anotação de outras substâncias que fossem advindas da mesma rota biossintética, dentre outros derivados.

Como já caracterizado anteriormente (item 3.3, pag. 35) essa classe de substância apresenta íons-fragmento diagnósticos, 152.09/150.11, 119.07/117.06, 134.10/132.08, 105.06/103.05 e 92.05 os quais formaram essa clusterização. A identificação/anotação das substâncias apresentadas na TABELA 3. 2 foram amparadas por propostas de mecanismos de fragmentação considerando a m/z dos íons-fragmento até a segunda casa decimal, além de comparação com alguns dados da literatura, uma vez que muitas dessas substâncias estão tendo seus dados de MS^2 apresentados pela primeira vez.

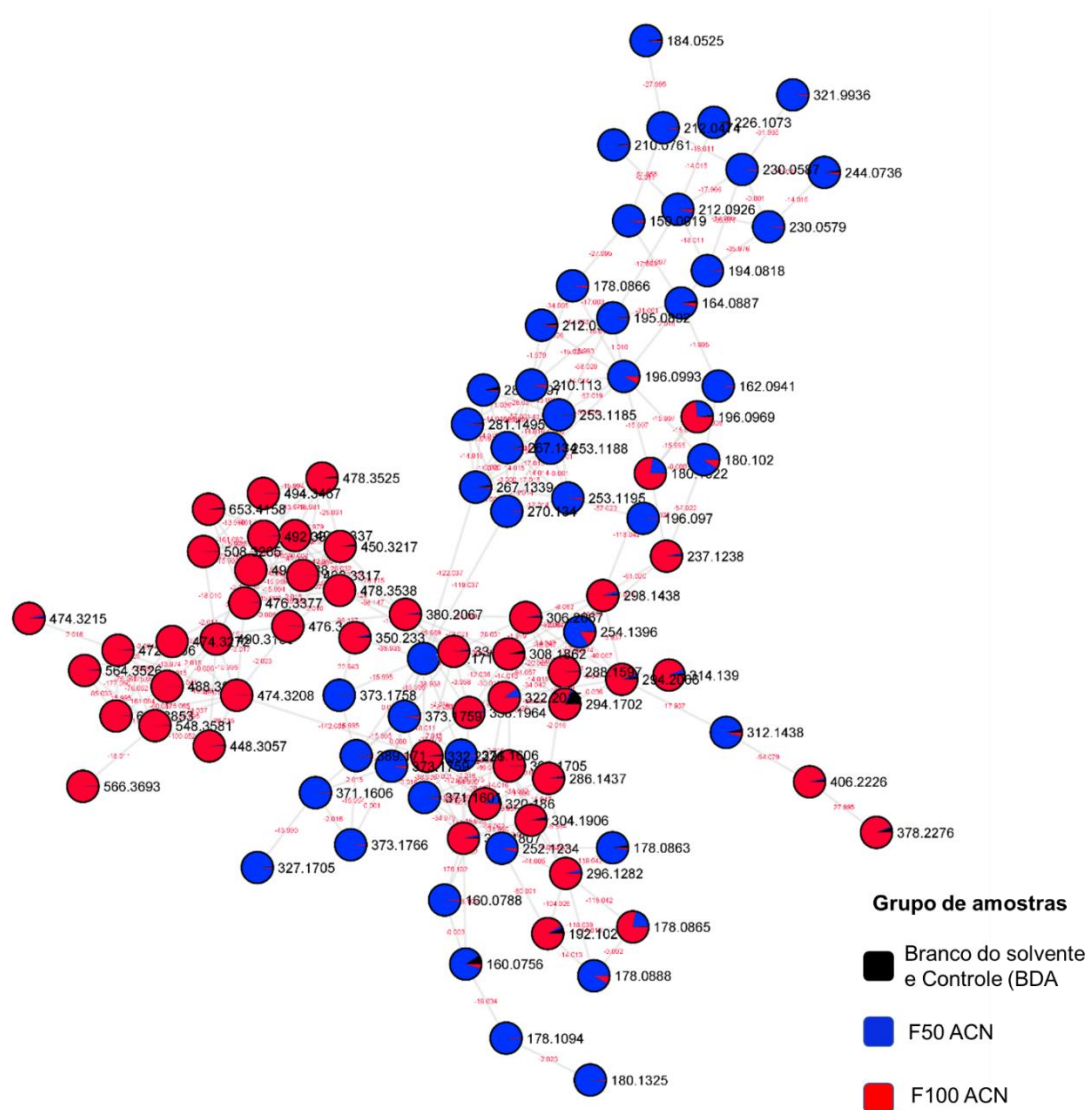


FIGURA 3. 16 – Expansão do cluster dos ácidos fusárico (1) e 9,10-dehidro fusárico (2).

Outro cluster que foi selecionado para estudo foi da bikaverina (15) (FIGURA 3. 17) que foi caracterizada anteriormente por RMN-1D, 2D e espectrometria de massas.

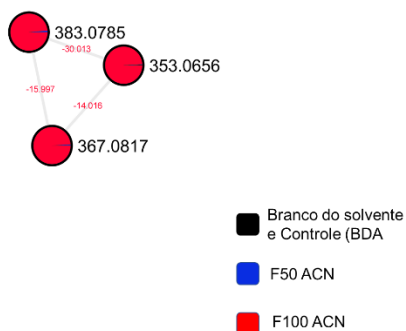


FIGURA 3. 17 – Expansão do cluster da bikaverina (**15**).

Os outros nodos 367.0817 e 353.0656 são moléculas que diferem da bikaverina em um grupo hidroxila (6-Deoxibikaverina) a menos e uma metoxila (me-oxo-pre-bikaverina) a menos, respectivamente.

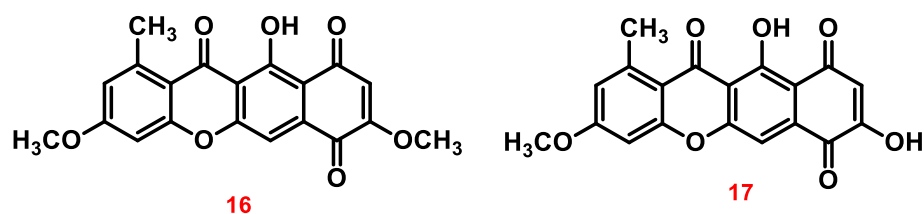


FIGURA 3. 18 – Estrutura da 6-Deoxibikaverina (**16**) e me-oxo-pre-bikaverina (**17**)

Outra substância anotada foi a Beauvericina (**19**) (FIGURA 3. 19) de íon precursor $[M+NH_4]^+=801.4433$ (massa calc.: 801.4439, erro: -0.8 ppm) que tem como íons-fragmento diagnósticos m/z 623.33, 523.28, 362.20, 262.14, 244.13, 134.10 (FIGURA 3. 20). Os dados do espectro de segunda ordem (MS^2) foram comparados com aqueles já descritos na literatura⁴⁵.

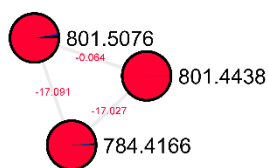


FIGURA 3. 19 – Expansão do cluster da Beauvericina (**19**)

Enquanto o outro nodo 784.4166 é referente à molécula protonada, que não foi utilizada para fins de caracterização da proposta de mecanismo de fragmentação devido à baixa intensidade de seu espectro de MS¹.

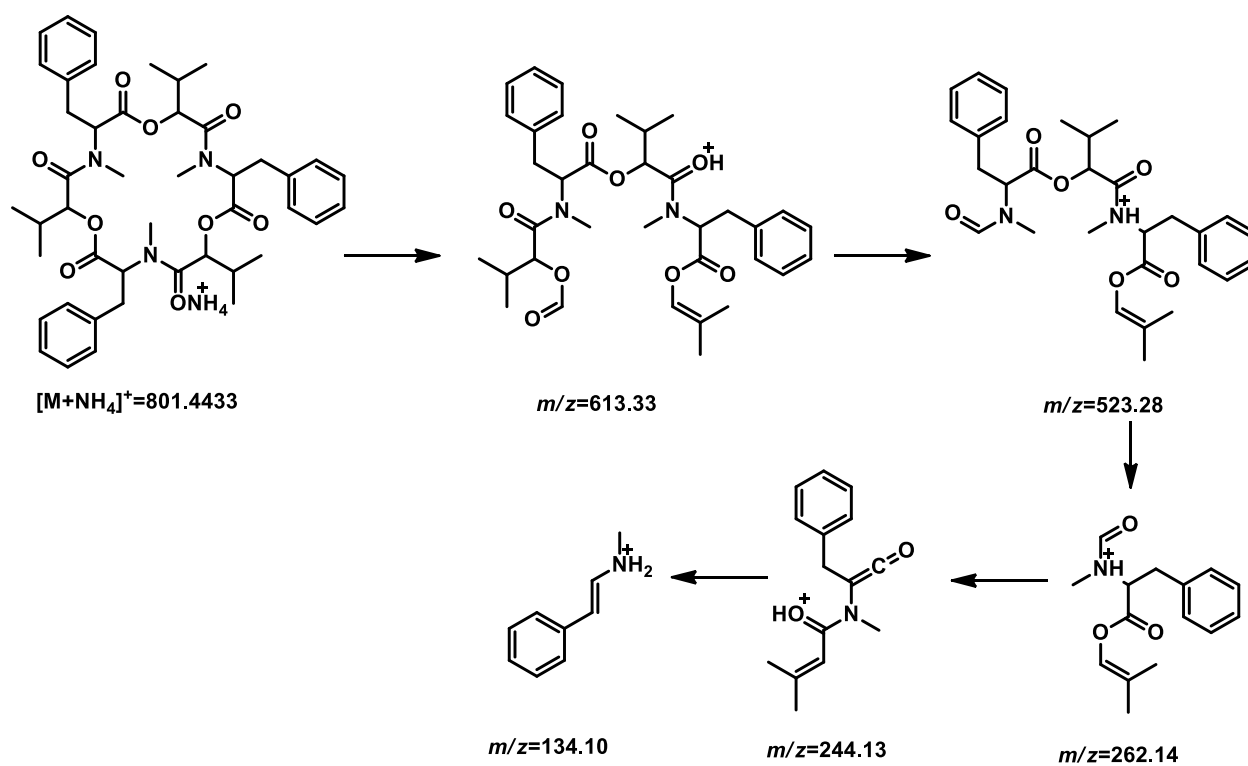


FIGURA 3. 20 - Proposta de fragmentação para beauvericina (**19**)

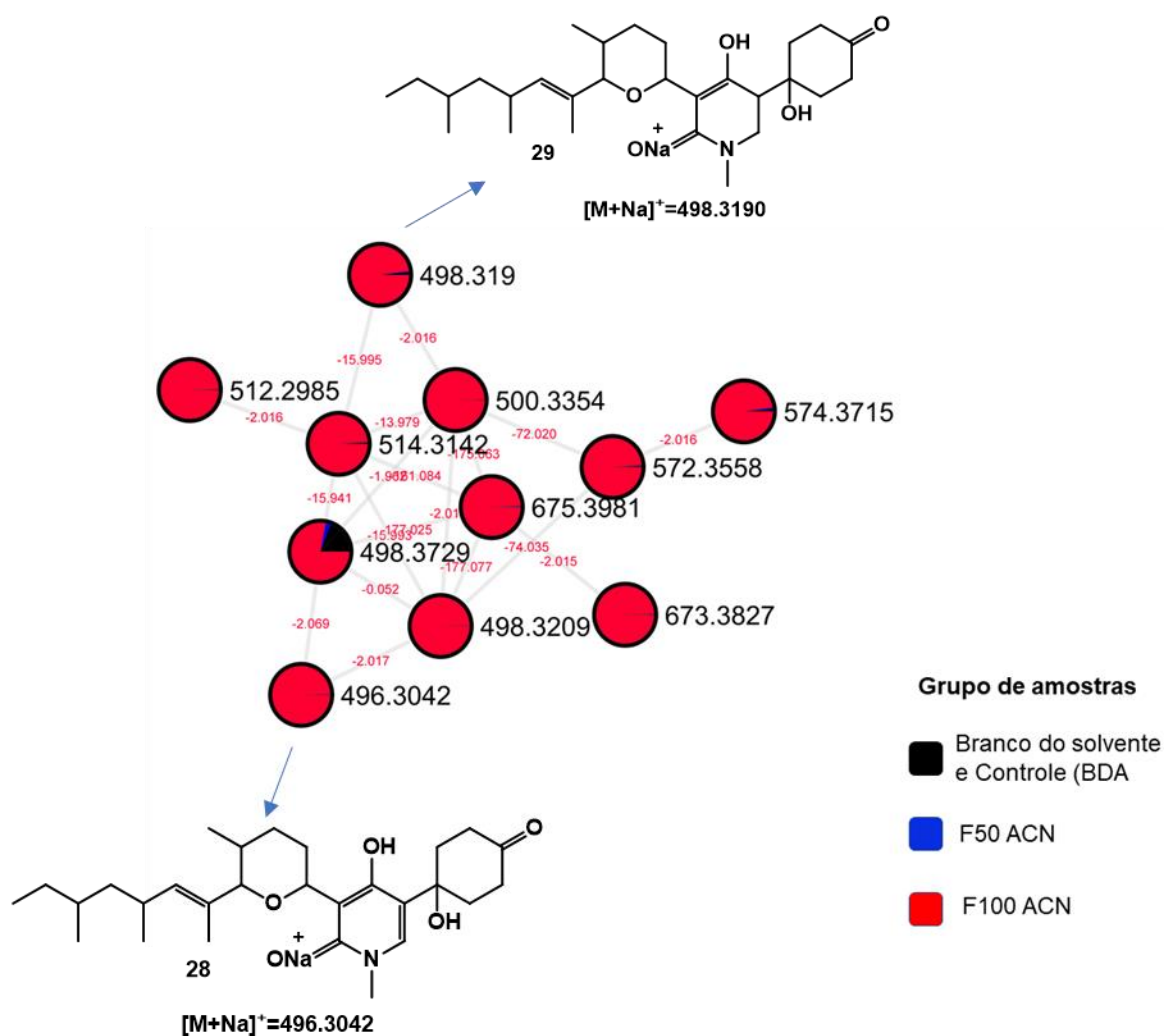


FIGURA 3. 21 - Expansão do cluster da 6-Deoxyoxysporidinone (**28**)

A 6-deoxi oxisporidinona (**28**) é conhecida da cultura de vários microrganismos do sendo conhecida como uma micotoxina utilizada a defesa em seu habitat natural.

Enquanto, a análise da rede molecular dos extratos de ES no modo negativo (FIGURA 3. 22) revelou a presença principalmente de antraquinonas **24-27** que estão sendo descritas pela primeira vez nesta espécie de fungo fitopatológico.

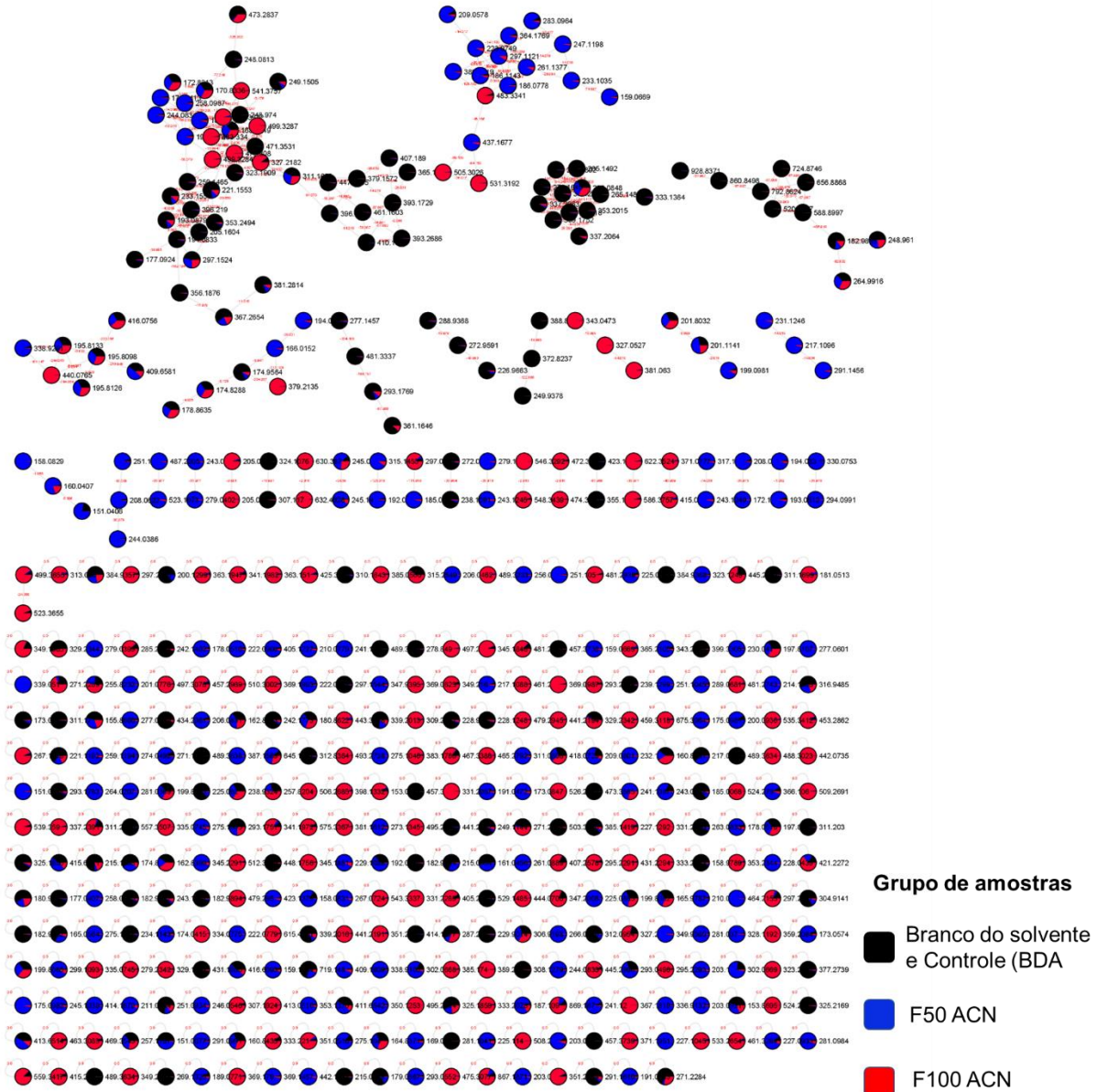


FIGURA 3. 22 – Rede molecular no modo negativo do branco do solvente e controle do meio de cultura (BDA) em preto, fração F50 ACN em azul e F100 ACN em vermelho.

A proposta de mecanismo de fragmentação para elas está apresentada na FIGURA 3. 23.

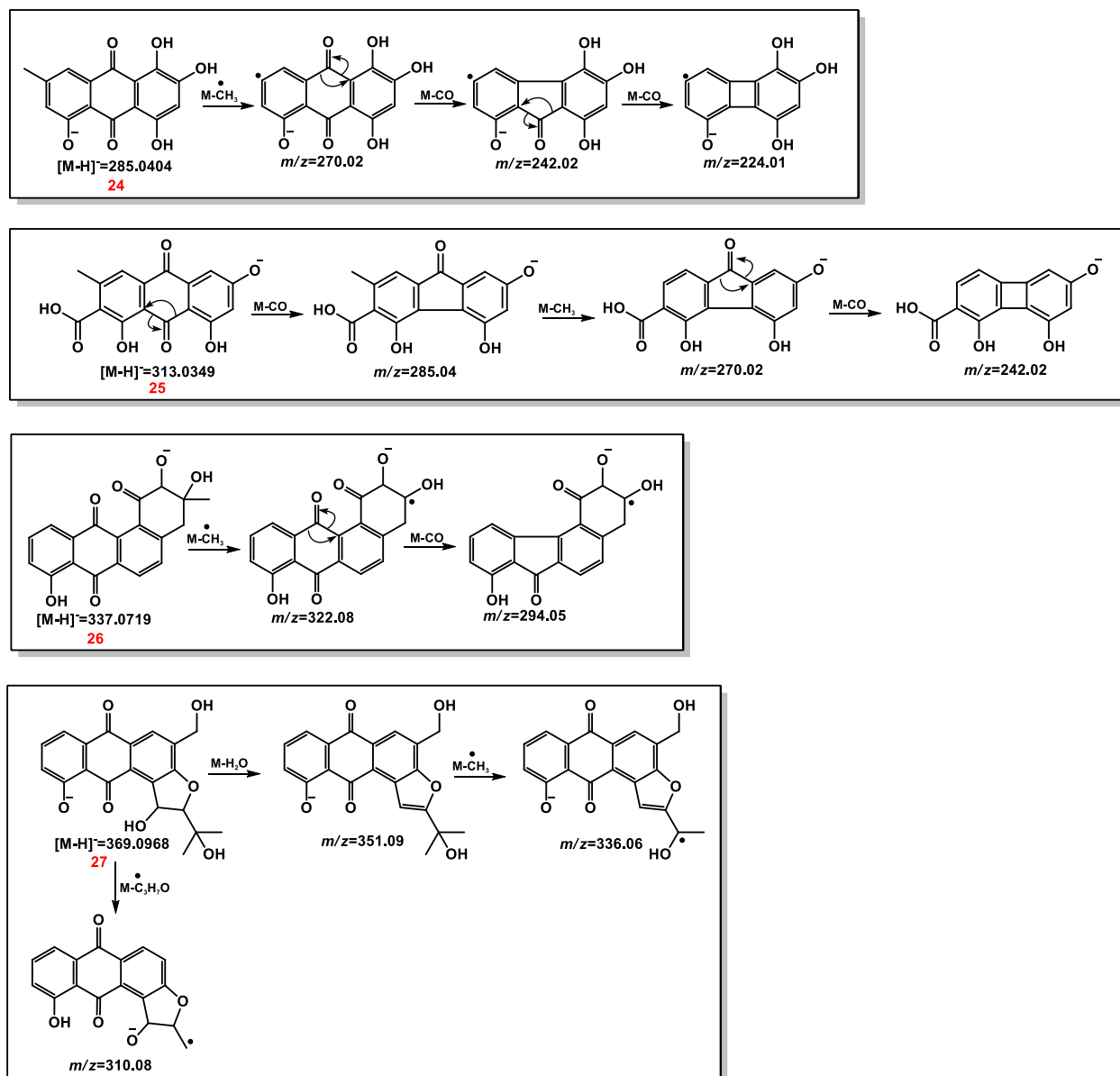


FIGURA 3. 23 - Proposta de mecanismo de fragmentação para as antraquinonas **24-27**.

É possível verificar como perdas características nesta classe de metabólitos secundários a saída de metila radicalar, além de perdas sucessivas de moléculas de monóxido de carbono. Essas anotações foram amparadas pelas bibliotecas constantes no software MS-FINDER.

3.5. Estudo da interação do fungo *E. salmonicolor* com a bactéria *X. citri*

O fungo inicialmente inoculado na placa contendo meio de batata dextrose ágar, foi crescido por quatro dias e a bactéria (*X. citri*) foi inoculada ao redor da região que o fungo cresceu por estriamento e mantido até completar nove dias de crescimento.

Após esse período e da extração dessas placas utilizando acetato de etila, foi obtido o extrato bruto, para dar os extratos Branco BDA (Extrato do meio de cultura, branco) e ESBDA (Extrato do fungo), que por sua vez foi submetido à análise por HPLC-HRMS MS/MS para obtenção dos espectros de massas de primeira (MS^1) e segunda ordem (MS^2).

A aquisição desses dados foi realizada no modo *prifile*, ambos os modos positivos e negativos para seleção de íon precursor. Assim, esses dados foram convertidos para o formato .mzml utilizando o software MSCoverterGUI (<https://proteowizard.sourceforge.io/download.html>) fazendo-se a detecção dos espectros de MS^1 e MS^2 . Desta forma, os arquivos convertidos foram submetidos para processamento no software MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) no qual é possível determinar um limite de seleção de íons, *threshold*, para que assim os íons selecionados sejam alinhados levando em consideração a contribuição isotópica da relação de massa/carga com tempo de retenção similar e quando possível os íons presentes em mais de uma amostra possam ser agrupados e discriminados a partir de concentrações relativas às intensidades de ionização desses íons.

Uma vez realizado esse processamento de dados, pode-se extrair uma tabela de íons totais e um arquivo no formato .mgf para que fosse submetido à plataforma GNPS - *The Global Natural Product Social Molecular Networking* (<https://gnps.ucsd.edu/>), para que fosse realizada a organização desses íons

fragmentos (em nodos) de acordo com a similaridade de seus íons-fragmentos e o $\Delta m/z$ entre cada íon precursor, MS¹ resultou no agrupamento desses nodos formando as redes moleculares. Essa abordagem é essencialmente importante por auxiliar a busca de substâncias com perfil de fragmentação em seus espectros de MS², quando comparadas com aquelas já identificadas e caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear, RMN.

Os nodos dessas redes moleculares foram coloridos em azul para as réplicas autênticas do crescimento do fungo com a bactéria, rosa para aqueles referentes apenas ao crescimento do fungo e em preto para aqueles referentes ao branco do solvente e do meio de cultura.

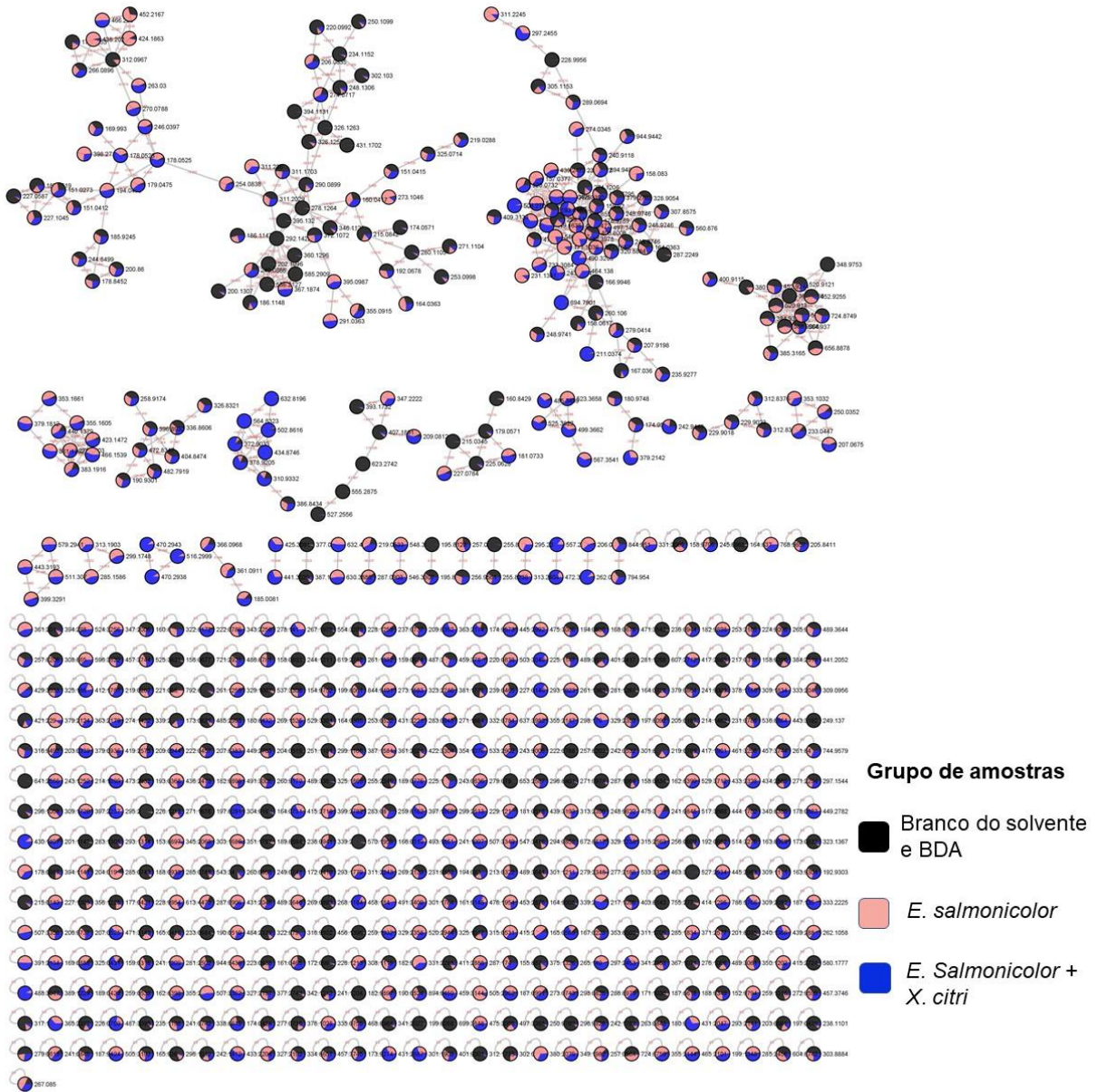


FIGURA 3. 24 - Rede molecular no modo negativo de ionização da interação fungo/bactéria em meio batata dextrose ágar.

Com os mesmos parâmetros de agrupamento, foi realizada a rede molecular dos íons no modo positivo, a qual foi colorida com aquelas cores da rede anterior.

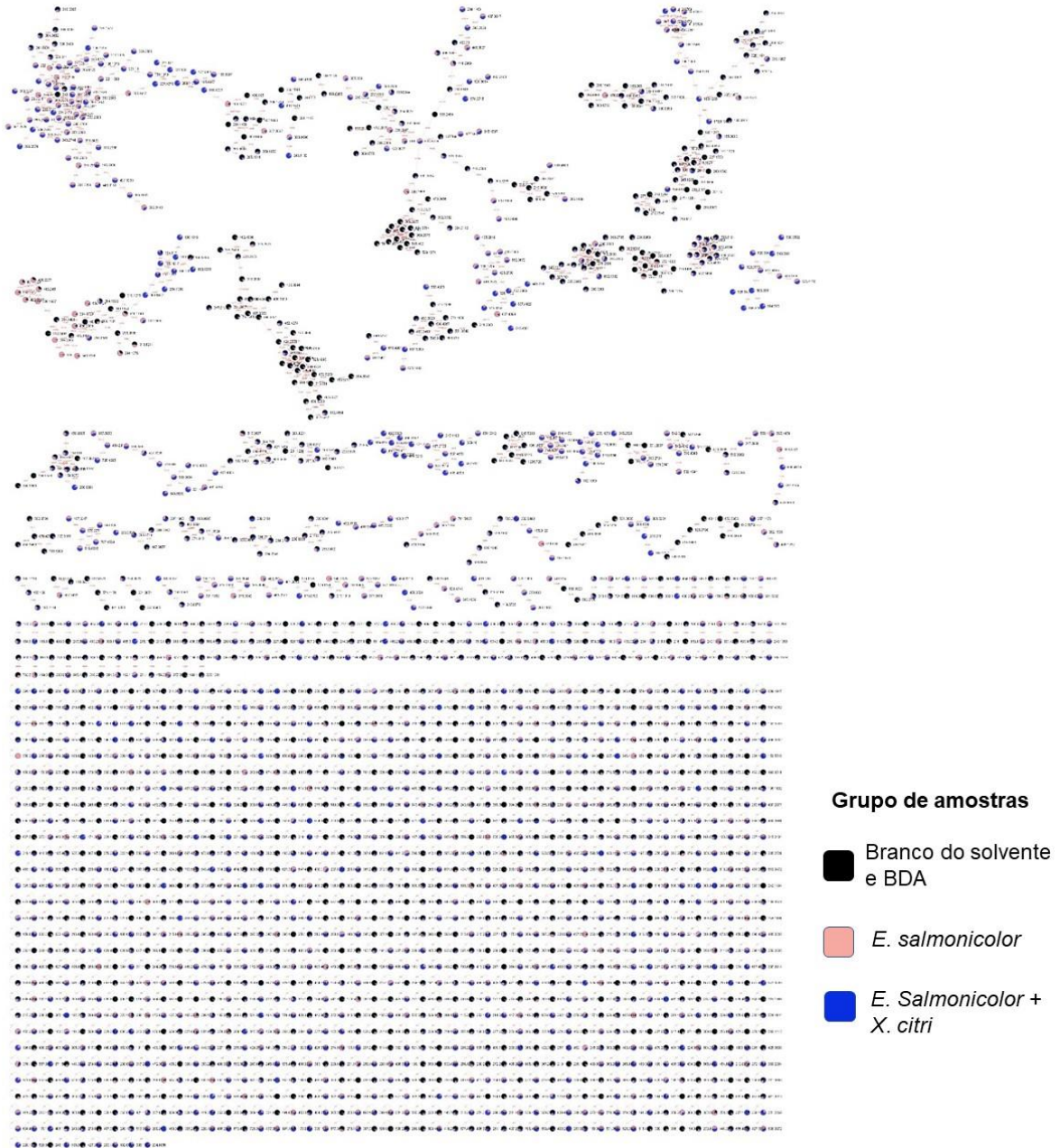


FIGURA 3. 25 - Rede molecular no modo positivo de ionização da interação fungo/bactéria em meio batata dextrose ágar.

As amostras foram comparadas com 5 réplicas autênticas, tendo assim maior controle sobre a variação entre os tratamentos, para que as variáveis fossem atenuadas, e a comparação das áreas relativas desses íons foi representada em forma de gráfico e demonstrado o aumento relativo quando comparado ao controle do experimento de interação.

oxisporidinona (**28**) como $[M-H]^- = 470.2938$ (90.3 %) e a fusarina C (**18**) $[M-H]^- = 430.1897$ (87.2 %) e seus derivados que compartilharam a mesma rede molecular, indicando ser da mesma classe por apresentarem perfil de fragmentação similares (FIGURA 3. 27).

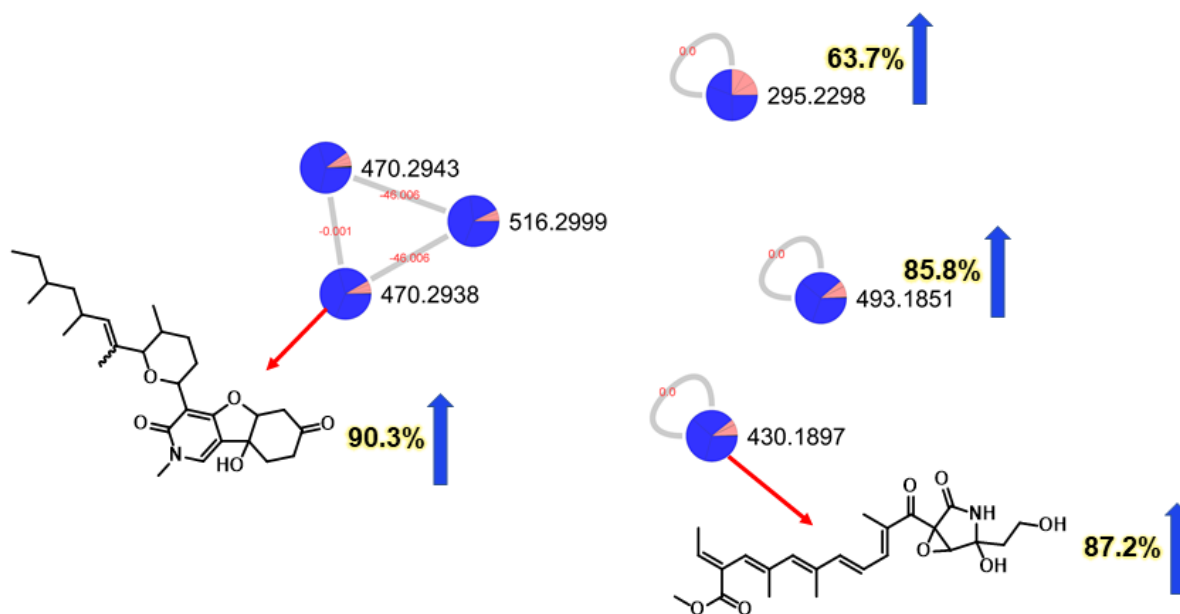


FIGURA 3. 27 – Expansão da região de nodos da rede molecular no modo negativo com a porcentagem de aumento da concentração relativa dos íons de moléculas já caracterizadas e de outras ainda não relatadas em experimentos anteriores.

Depois de analisar todos os dados tabelados das áreas relativas de cada íon foi possível verificar que 260 íons aumentaram a sua concentração em mais de 50% indicando que a abordagem da interação entre *E. salmonicolor* e *X. citri* foram eficientes quanto à resposta de defesa deles.

3.6. Estudo da biotransformação de rutina por *E. salmonicolor* em meio líquido

O fungo *E. salmonicolor* foi utilizado como agente de biotransformação/bioconversão do flavonoide rutina em meio de cultura “pobre” Czapek (que contém apenas açúcar e sais minerais essenciais). Os mecanismos de biotransformar, isto é transformar completamente ou quase que completamente de um substrato de biotransformação, ou a bioconversão, transformação essa que é realizada quando o substrato é ex.: metilado, oxidado (na maior parte das vezes) ou, em alguns casos mais limitados acarretar a redução de grupos funcionais presentes na molécula de partida.

Diante disso, as amostras provenientes do experimento foram submetidas a análises por UPLC-HRMS MS/MS e que os dados adquiridos foram então organizados utilizando *molecular networking* (GNPS) verificando que no modo positivo não foi observar nodos na rede molecular de moléculas sendo produzidas exclusivamente a partir do experimento de biotransformação (FIGURA 3. 28).

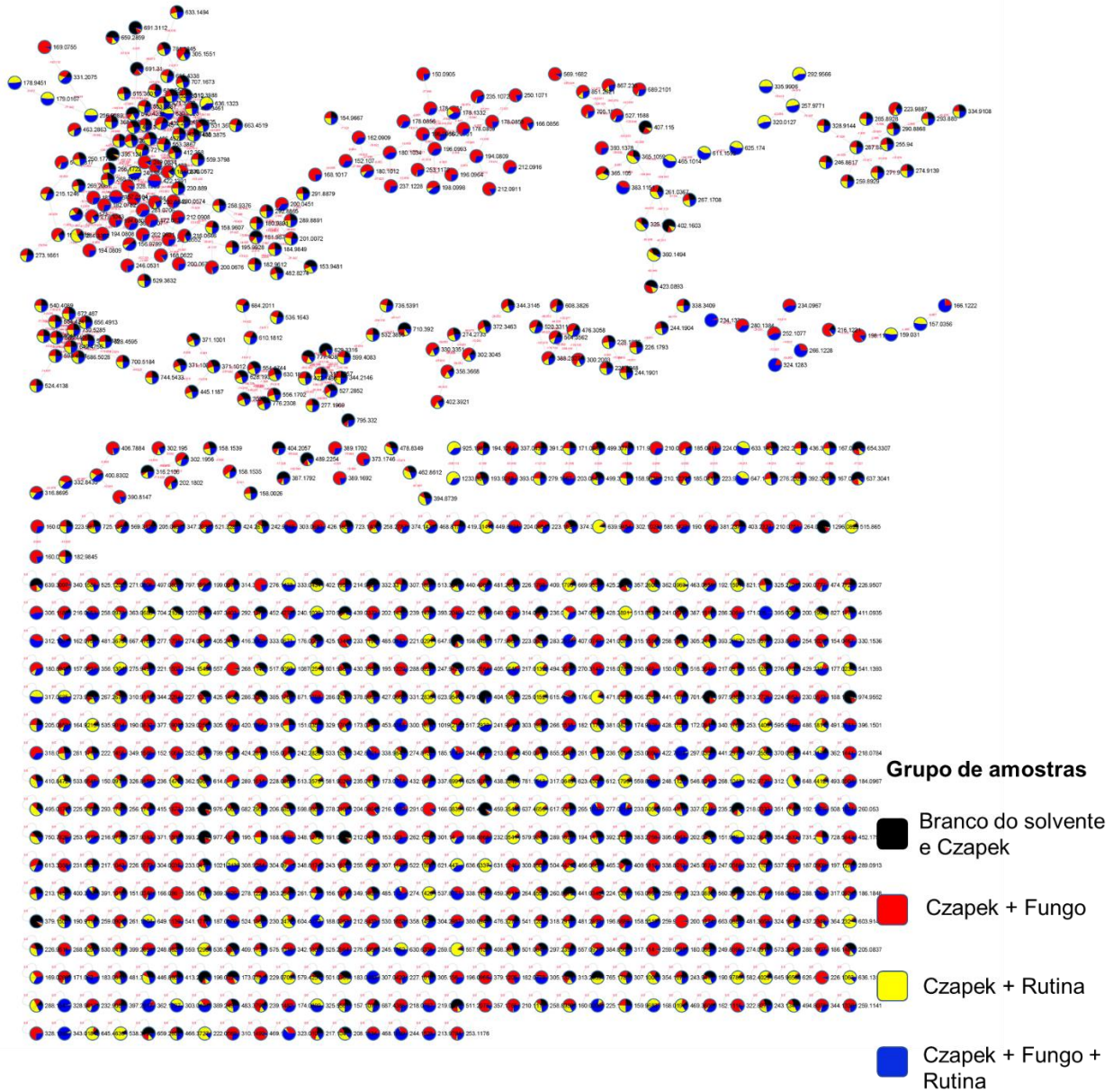


FIGURA 3. 28 - Molecular networking dos extratos a partir da biotransformação analisados por UPLC-HRMS MS/MS no modo positivo

Enquanto a análise da rede molecular no modo negativo foi inicialmente auxiliada pela comparação do espectro de MS² da rotina [M-H]⁻=609.1480 com os possíveis íons-precusores que estavam quase que exclusivamente presentes unicamente na distribuição de cores da rede molecular com a cor azul, o que indica a produção pelo processo de biotransformação, conforme FIGURA 3. 29.

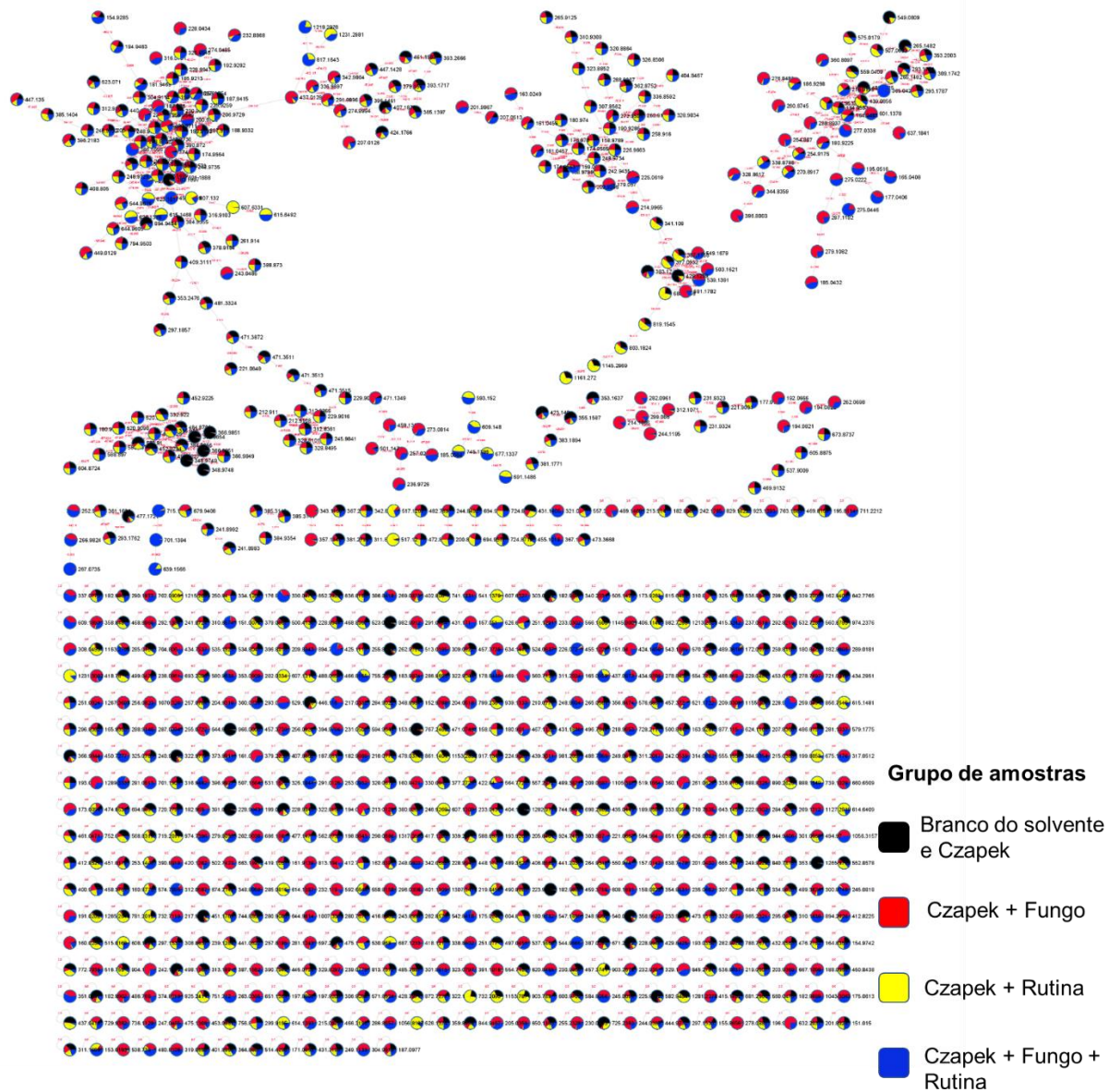


FIGURA 3. 29 - Molecular networking dos extratos a partir da biotransformação analisados por UPLC-HRMS MS/MS no modo negativo.

A partir dessa análise da rede molecular selecionou-se a expansão dela (FIGURA 3. 30) onde podemos observar a prevalescência da cor azul que representa íons sendo produzidos no experimento de biotransformação, que não estavam presentes nem no padrão do flavonoide e muito menos como metabólito excretado pelo fungo (FIGURA 3. 30).



FIGURA 3. 30 - Expansão da rede molecular no modo negativo do experimento de biotransformação

Quando comparado os espectros do padrão de rutina com os íons apresentados na FIGURA 3. 30 podemos observar que o padrão de perda das unidades de açúcares (glicose e ramnose) se mantêm e que o que possivelmente tem-se alterado é apenas a aglicona.

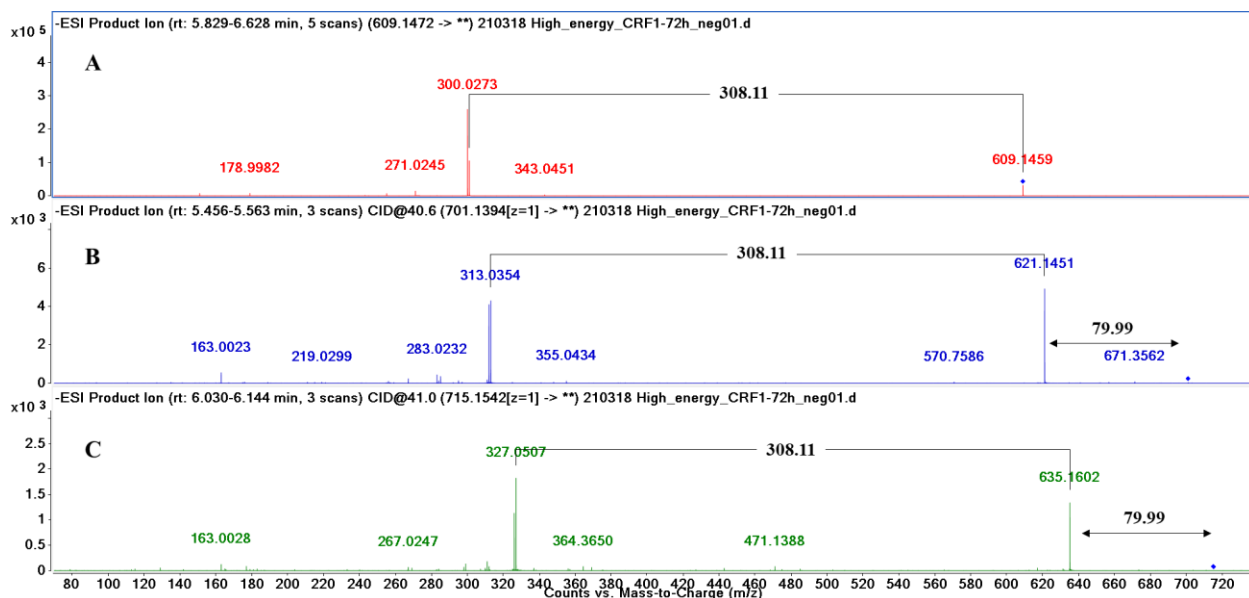


FIGURA 3. 31 – Comparação dos espectros da rutina (A), com os produtos de biotransformação $[M-H]^- = 701.1394$ e $[M-H]^- = 715.1542$

Após a perda das moléculas de açúcares pelo processo de eliminação, observa-se que no caso da rutina a aglicona tem m/z 300.03 enquanto para o espectro do produto em (B) foi m/z 313.04 e que o espectro do produto (C) foi m/z 327.05. Essas diferenças de massa entre os produtos já indica um processo de metilação em algum grupo hidroxila da molécula e que estudos posteriores de MS^n serão essenciais para corroborar com essas propostas e também a realização do isolamento e caracterização dessas moléculas por RMN-1D e 2D.

3.7. Proposta de biogênese dos principais compostos caracterizados

Conhecer o caminho de biossíntese de um metabólito com marcação isotópica, ou uma proposta de biogênese para este, pode ajudar na mineração de possíveis compostos em estudo envolvendo redes metabólicas como nos nesses acima. Muitos intermediários de uma rota biossintética não são isolados muitas vezes por estarem presentes em quantidades muito pequenas. Porém, esses podem ser detectados em experimentos usando redes metabólicas, ou seja, conhecer possíveis intermediários de uma rota biossintética ajuda nas identificações de novos

compostos, os quais seriam intermediários na biossíntese de outros conhecidos, ou seus derivados. Por exemplo o caminho de biossíntese que leva à fusarina C possui vários intermediários que poderiam ser detectados nos estudos anteriores, usando as redes metabólicas. Com isso, discutimos resumidamente as biossínteses e/ou biogêneses dos principais metabólitos obtidos no presente trabalho.

A primeira classe com diversos derivados foram as dos ácidos fusático (1) e 9,10-dehidro fusárico (2) que advém de uma rota mista inicialmente pelo L-aspartato até a homoserina que sofre uma acetilação no grupo hidroxila ligada ao C-4, para sofrer uma condensação com uma unidade de *trans*-2-hexanal que é proveniente de um domínio de ACP (*Acyl Carrier Protein*), para que a partir disso sofra uma eliminação de ácido acético e isomerização das ligações duplas para favorecer o arranjo tridimensional da cicloadição, que por sucessivas reações de oxirredução forme o ácido fusárico (FIGURA 3. 32)³⁹.

Em alguns artigos é discutido que o primeiro produto formado é o ácido 9,10-dehidrofusárico, que por sua vez sofre diversas reações para dar os diversos derivados discutidos neste trabalho. A presença dessa insaturação nas posições C9 e C10 torna essa posição ativa para diversas reações, sejam elas esterificações, oxidações, adições nucleofílicas e muitas outras^{39,46}.

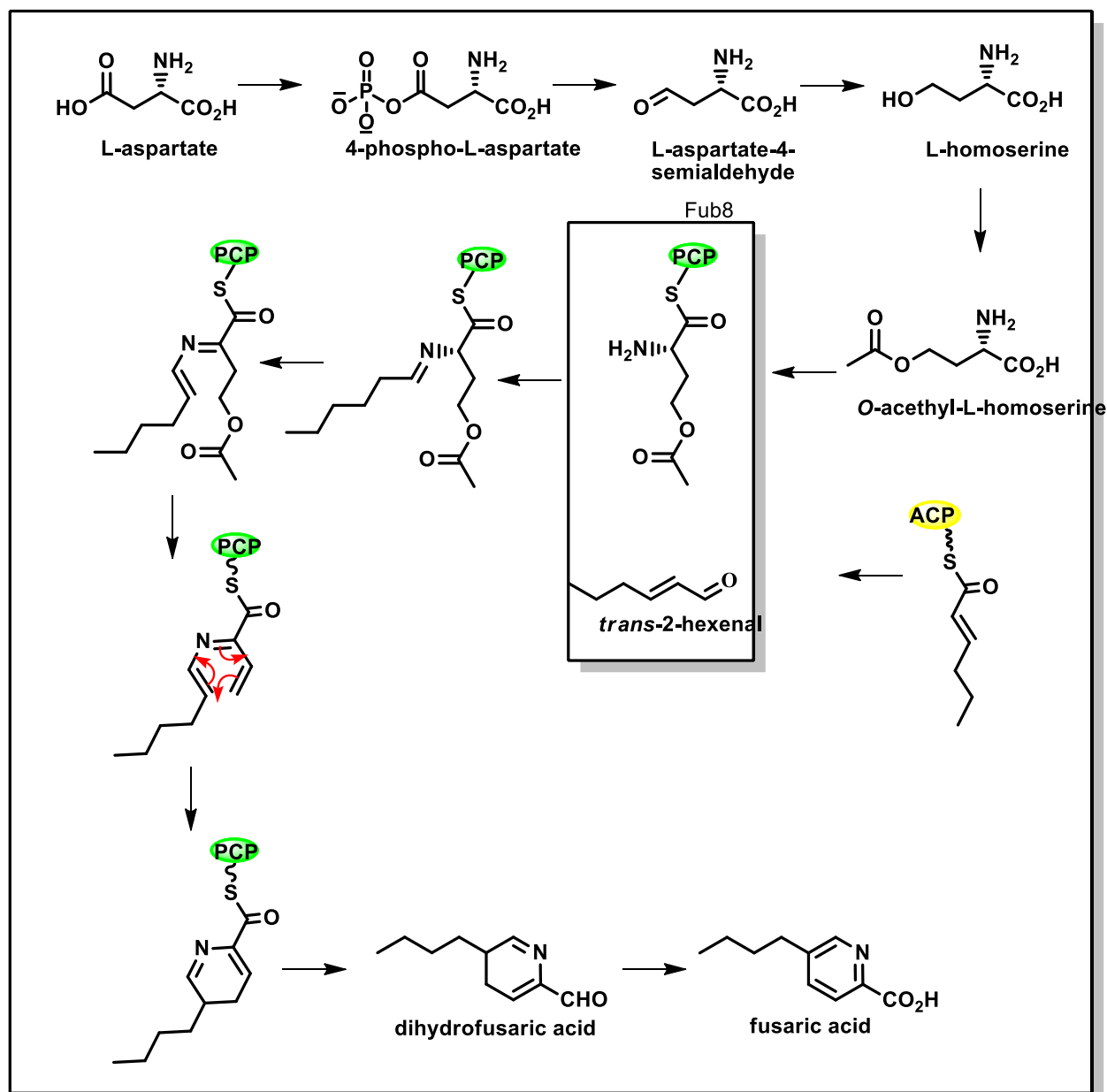


FIGURA 3. 32 – Biossíntese para o ácido fusárico (1)

Observa-se que esses derivados poder ser responsáveis por diversas atividades biológicas e/ou sinalização nessa rede de comunicação no nicho ecológico.

Uma outra classe que foi apresentada aqui é da bikaverina, uma benzoxantona cuja estrutura indica derivar do caminho acetato⁴⁷.

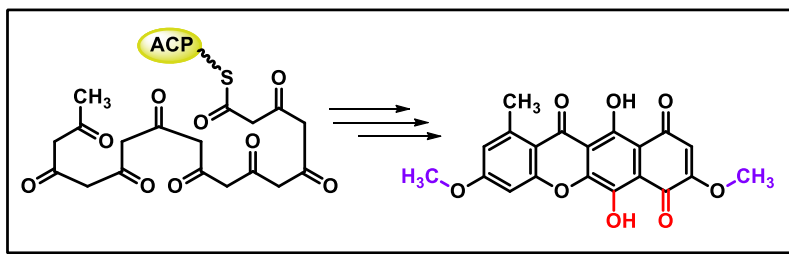


FIGURA 3. 33 - Proposta de biogênese para bikaverina e seus derivados.

Os derivados de antraquinonas também derivam de rotas biossintéticas provenientes do caminho acetato, alguns bem conhecidos⁴⁸.

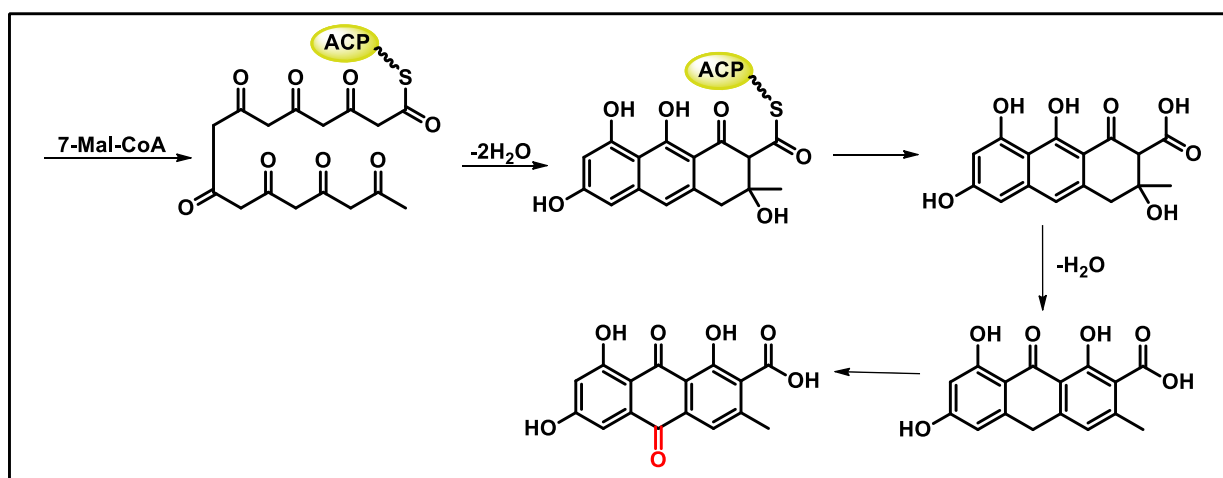


FIGURA 3. 34 - Proposta de biogênese para os derivados de antraquinonas **22-27**

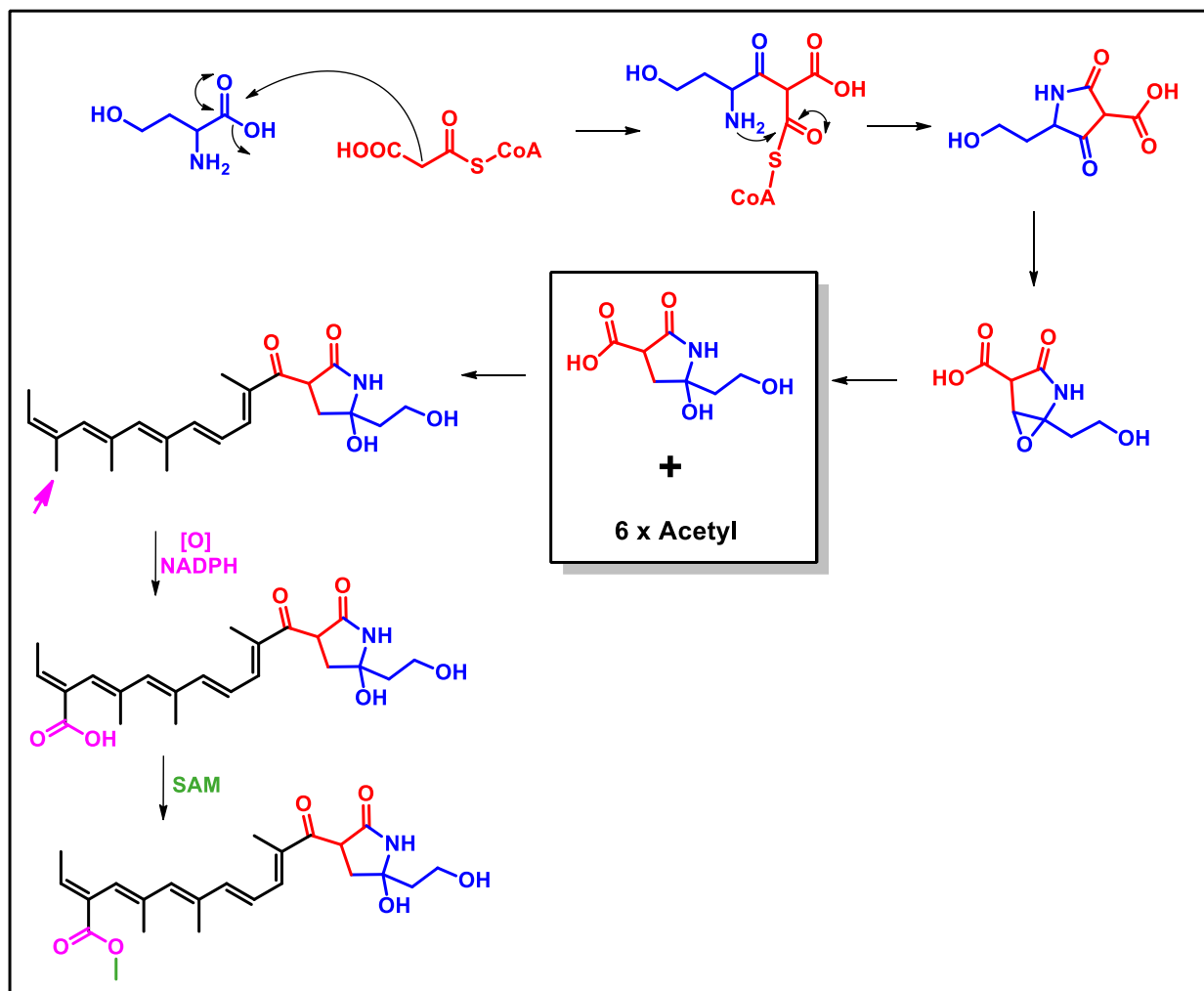


FIGURA 3. 35 - Proposta de biogênese para a fusarina C

A proposta de biogênese para a fusarina C inicia-se com o aminoácido homoserina e uma cadeia policetídic ramificada com grupos metilas, sugerindo derivar de propionil- e metilmalonil-CoA e posteriores ciclizações levando ao produto final⁴⁹.

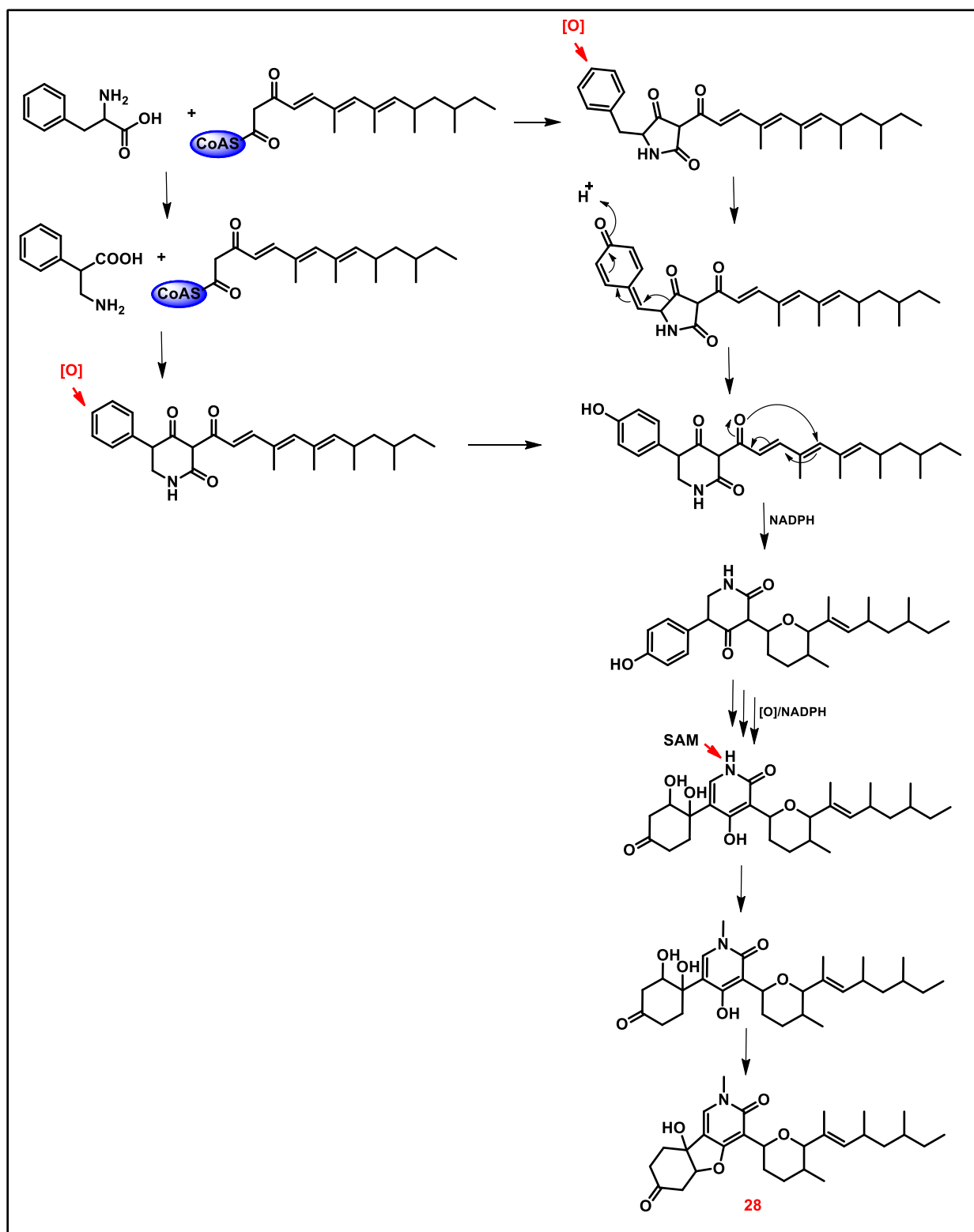


FIGURA 3. 36 - Proposta de biogênese para 4,6'-Anhydrooxysporidinone

A formação da 4,6'-Anhydrooxysporidinone acontece inicialmente pela condensação de uma unidade de fenilalanina com propionil- e metilmalonil-CoA, similar à fusarina C, levando aos compostos **28** e **29**⁵⁰.

A biogênese desses metabólitos auxilia no processo de mineração de metabólitos da rota biossintética, corroborando para as propostas de mecanismo de fragmentação e para a busca racional de intermediários ainda não detectados e isolados.

3.8. Complexos com os metais Cu(II), Zn(II) e Fe(II) e os ligantes rutina, naringina e ácido vanílico

Os ligantes naturais rutina, naringina e ácido vanílico foram escolhidos para a sua síntese com os metais cobre II, zinco II e ferro II devido ao seu potencial já conhecido em diversas atividades biológicas e como marcadores de mecanismo de defesa em plantas de *Citrus*.

O complexo dos ligantes com os metais Cu(II), Zn (II) e Fe(II) foram sintetizados na proporção 2:1 ligante/metálico, uma vez que o produto da síntese teria como sinalizadores os metais essenciais ao metabolismo de plantas e uma quantidade duplicada de metabolitos ativos nos locais de aplicação.

Assim, a caracterização desses produtos semissintéticos foi realizada por RMN-1D e 2D, Espectroscopia na Região do Ultravioleta (UV) e Espectroscopia de Massas de Alta Resolução (HRMS) acoplada a analisador de tempo de voo (Q-TOF).

O complexo de rutina com cobre (**35**) é resultado da síntese de duas moléculas de rutina com um íon cobre II. A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura S 46) de **35** revelou sinais alargados em todo o espectro, podendo-se determinar aqueles em δ 12.58 (*s*, 1H), 10.83 (*s*, 1H), 9.66 (*s*, 1H), 9.16 (*s*, 1H), 7.52 (*d*, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.82 (*d*, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.36 (*s*, 1H), 6.17 (*s*, 1H), 5.32 (*d*, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.36 (*s*, 1H), 3.68 (*d*, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.10 – 2.88 (*m*, 2H), 1.10 (*d*, $J = 6.0$ Hz, 1H), 0.97 (*d*, $J = 6.0$ Hz, 3H).

Enquanto, a análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 47) revelou a presença dos sinais em δ 176.9, 163.6, 160.8, 156.2, 156.0, 148.0, 144.3, 132.8, 121.1, 120.7, 115.8, 114.8, 103.5, 100.7, 100.3, 98.2, 93.1, 76.0, 75.5, 73.6, 71.4, 70.1, 69.9, 69.5, 67.8, 66.5, 17.5. Na análise do espectro de DEPT-135 (Figura S 48) foi possível verificar a presença de carbonos metilênico (CH_2), carbonos metílicos (CH_3) e metínicos aromáticos (CH).

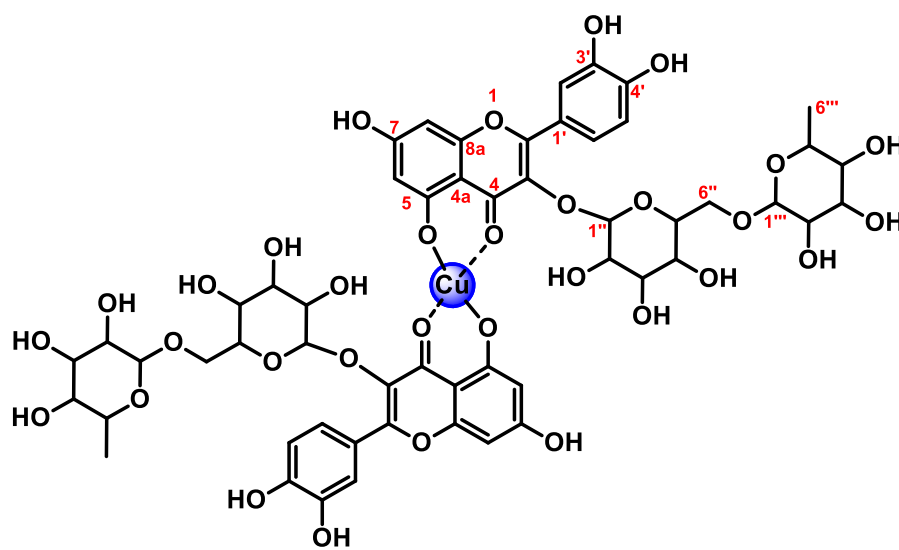


FIGURA 3. 37 - Estrutura do complexo **35** da rutina com cobre.

A estrutura base do complexo é apresentada na FIGURA 3. 37, e pode-se avaliar que a complexação foi efetiva pela presença dos sinais alargados no espectro de RMN de ^1H e no espectro de ^{13}C observa-se a duplicidade dos sinais de carbono com deslocamentos químicos distintos.

Ainda foi realizada a comparação dos deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C com relação aos Δ/Δ entre eles onde pode-se observar a variação dos deslocamentos químicos e as posições mais afetadas pelo metal que foi complexado com o ligante (TABELA 3. 3).

TABELA 3. 3 - Comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da rutina (padrão) com o complexo de rutina com cobre (**35**).

Position	δ ^1H of 35	δ ^1H of Rutin	δ ^{13}C of 35	δ ^{13}C of Rutin	$ \Delta/\Delta $
2		-	156.2	156.6	0.40
3		-	132.8	133.3	0.50
4		-	176.9	177.4	0.50
5		12.69 (<i>s</i>) OH	160.8	161.2	0.40
6		6.20 (<i>d</i> , 2.0)	98.2	98.7	0.50
7		10.77 (<i>s</i>) OH	163.6	164.1	0.50
8		6.40 (<i>d</i> , 2.0)	93.1	93.6	0.50
9		-	156	156.4	0.40
10		-	103.5	104	0.50
1'		-	121.1	121.6	0.50
2'		7.61 (<i>d</i> , 2.0)	114.8	115.3	0.50
3'		9.62 (<i>s</i>) OH	144.3	144.8	0.50
4'		9.13 (<i>s</i>) OH	148	148.4	0.40
5'		6.83 (<i>d</i> , 8.5)	115.8	116.3	0.50
6'	7.54 (<i>m</i>)	7.59 (<i>dd</i> , 2.0 and 8.5)	120.7	121.2	0.50
1''		-	100.7	101.2	0.50
2''		-	73.6	74.1	0.50
3''		-	76	76.5	0.50
4''		-	69.5	70	0.50
5''		-	75.5	75.9	0.40
6''		-	66.5	67	0.50
1'''		-	100.3	100.8	0.50
2'''		-	69.9	70.4	0.50
3'''		-	70.1	70.6	0.50
4'''		-	71.4	71.9	0.50
5'''		-	67.8	68.3	0.50
6'''		-	17.5	17.8	0.30

Obs.: Todos os dados foram adquiridos em DMSO- d_6

O complexo de rutina com cobre (**35**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 50) $\text{C}_{54}\text{H}_{58}\text{O}_{32}\text{Cu}$ (massa calc.: 1282.229, massa exp.: 1282.2281, erro: -0.7 ppm). A análise do espectro de MS^2 foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 308.11 para dar o

íon-fragmento 974.11 e a perda de m/z 308.11 a partir do íon-fragmento 970.18 para o íon-fragmento 672.07 (FIGURA 3. 38).

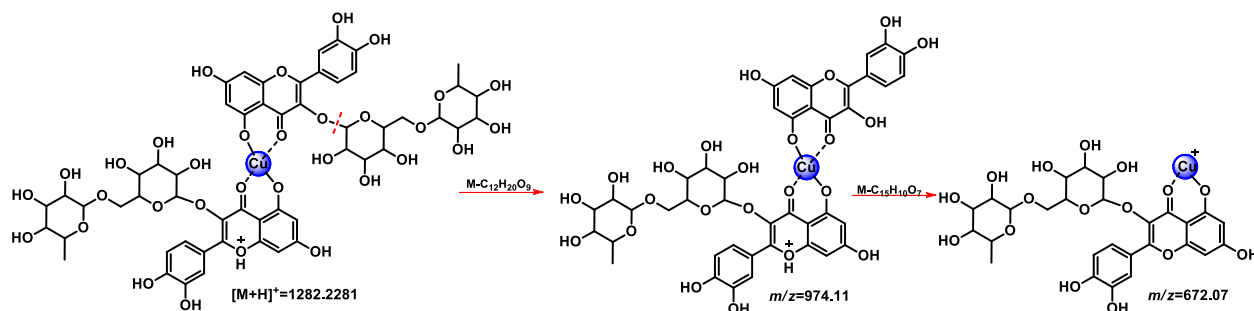


FIGURA 3. 38 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de rutina com cobre (**35**)

O complexo **36** foi resultado da síntese de duas moléculas de rutina com o íon zinco (II) (FIGURA 3. 39).

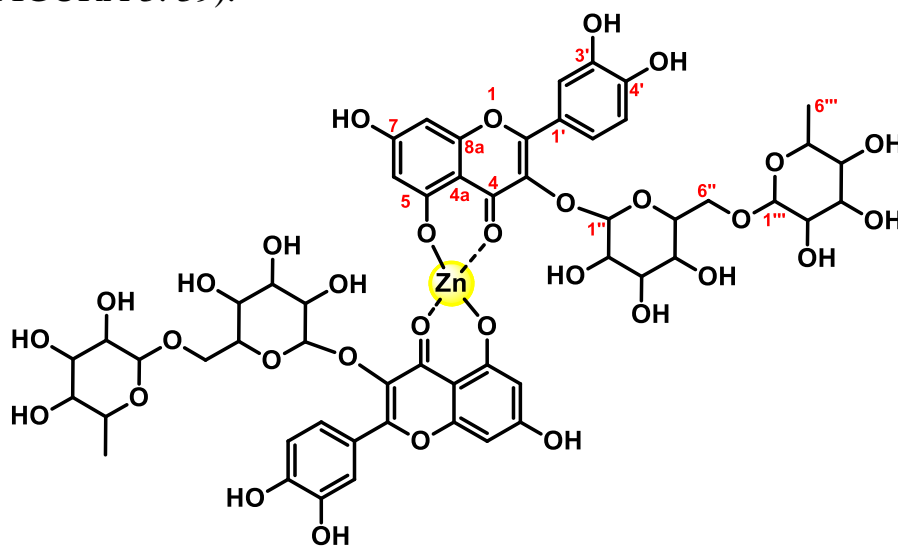


FIGURA 3. 39 - Estrutura do complexo **36** da rutina com zinco.

A análise do espectro de RMN de 1H (Figura S 52) revelou a presença dos seguintes sinais em δ 12.62 (*s*, 1H), 7.68 – 7.37 (*m*, 2H), 6.80 (*s*, 1H), 6.37 (*s*, 1H), 6.18 (*s*, 1H), 5.33 (*d*, $J = 6.0$ Hz, 2H), 5.09 (*s*, 2H), 4.38 (*s*, 1H), 3.70 (*d*, $J = 10.7$ Hz, 1H), 3.31 – 3.19 (*m*, 4H), 3.07 (*t*, $J = 9.1$ Hz, 2H), 1.89 (*s*, 3H), 0.99 (*d*, $J = 6.1$ Hz, 3H) tendo a mesma aparência de sinais alargados que aqueles do complexo de rutina com cobre (**35**). Enquanto, na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura

S 53) foi possível observar os sinais em δ 177.3 (C-4), 164.3 (C-7), 161.2 (C-5), 156.5 (C-2), 148.7 (C-9), 144.9 (C-4'), 144.6 (C-3'), 133.2 (C-3), 121.6 (C-1'), 120.8 (C-6'), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-2'), 103.9 (C-10), 101.3 (C-1''), 100.8 (C-1'''), 98.8 (C-6), 93.7 (C-8), 76.5 (C-3''), 75.9 (C-5''), 74.2 (C-2''), 71.9 (C-4'''), 70.6 (C-3'''), 70.4 (C-2'''), 70.0 (C-4''), 68.3 (C-5'''), 67.0 (C-6''), 17.8 (C-6''') (Figura S 53).

A análise do espectro de RMN de DEPT (Figura S 54) revelou a presença de carbonos metilênico (CH₂), carbonos metílicos (CH₃) e metínicos (CH). Além disso, na análise do mapa de contornos COSY (Figura S 55) foi possível verificar a interação entre os hidrogênios.

O complexo de rutina com zinco (**36**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 58) C₅₄H₅₈O₃₂Zn (massa calc.: 1283.2280, massa exp.: 1283.2285, erro: 0.4 ppm). A análise do espectro de MS² foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 308.11 para dar o íon-fragmento 975.12, o qual perde a aglicona (M-302.04) levando ao íon-fragmento 673.08, que finalmente sofre a eliminação de uma unidade de rarnnose (M-146.06) levando ao íon-fragmento 527.02 (FIGURA 3. 40).

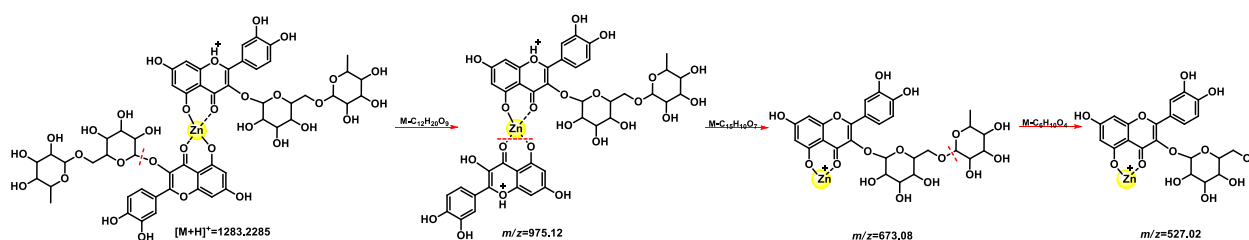


FIGURA 3. 40 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de rutina com zinco (**36**)

O complexo **37** foi resultado da síntese de duas moléculas de rutina e um íon ferro (II) (FIGURA 3. 41).

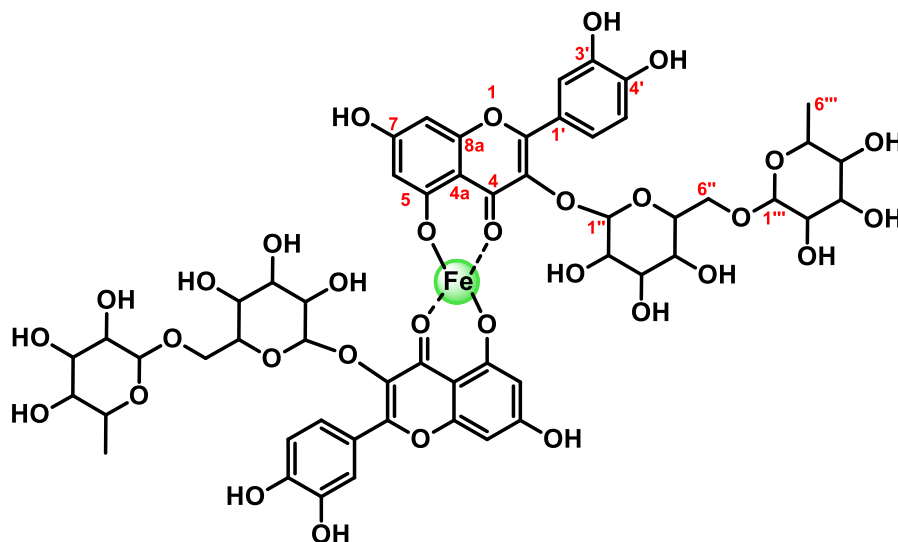


FIGURA 3. 41 - Estrutura do complexo **37** da rutina com ferro.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura S 60) revelou a presença dos seguintes sinais em δ 12.55 (*s*, 1H), 10.79 (*s*, 1H), 7.48 (*d*, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.78 (*d*, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.33 (*s*, 1H), 6.14 (*s*, 1H), 5.28 (*s*, 1H), 4.33 (*s*, 1H), 3.34 (*s*, 1H), 3.37 – 3.05 (*m*, 6H), 3.00 (*d*, $J = 8.9$ Hz, 2H), 0.93 (*s*, 2H).

Enquanto, a análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 61) revelou a presença de 27 sinais em δ 175.9 (C-4), 162.6 (C-7), 159.7 (C-5), 155.1 (C-2), 154.94 (C-9), 146.9 (C-4'), 143.3 (C-3'), 131.8 (C-3), 120.1 (C-1'), 119.7 (C-6'), 114.8 (C-5'), 113.8 (C-2'), 102.5 (C-10), 99.7 (C-1''), 99.3 (C-1'''), 97.2 (C-6), 92.1 (C-8), 75.0 (C-3''), 74.4 (C-5''), 72.6 (C-2''), 70.4 (C-4'''), 69.1 (C-3'''), 68.9 (C-2'''), 68.5 (C-4''), 66.8 (C-5'''), 65.5 (C-6''), 16.3 (C-6''').

O complexo de rutina com ferro (**37**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 63) $\text{C}_{54}\text{H}_{58}\text{O}_{32}\text{Zn}$ (massa calc.: 1274.2260, massa exp.: 1274.2267, erro: 0.5 ppm). A análise do espectro de MS^2 foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 308.11 para dar o íon-fragmento 966.12, o qual perde mais duas unidades de açúcares (M-308.11) restando apenas as duas agliconas ligadas ao ferro e levando ao íon m/z 658.01 (FIGURA 3. 42).

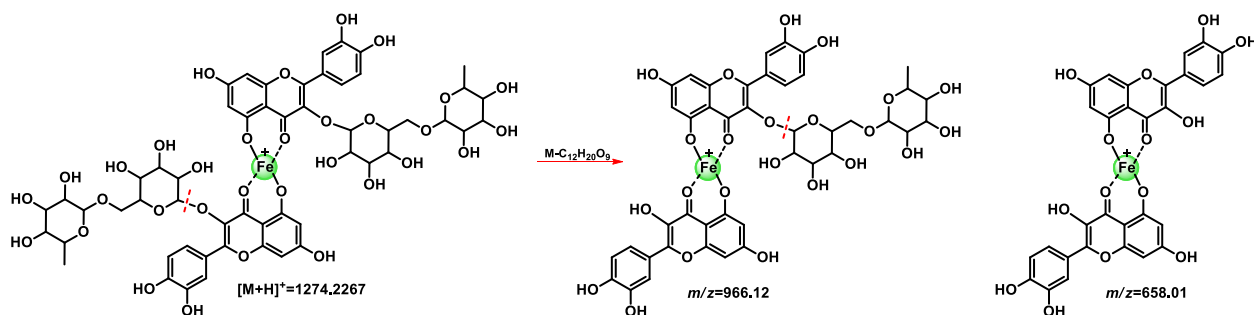


FIGURA 3. 42 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de rutina com ferro (**37**)

O complexo **38** foi o resultado da síntese de duas moléculas de naringina com o íon cobre (II) (FIGURA 3. 43).

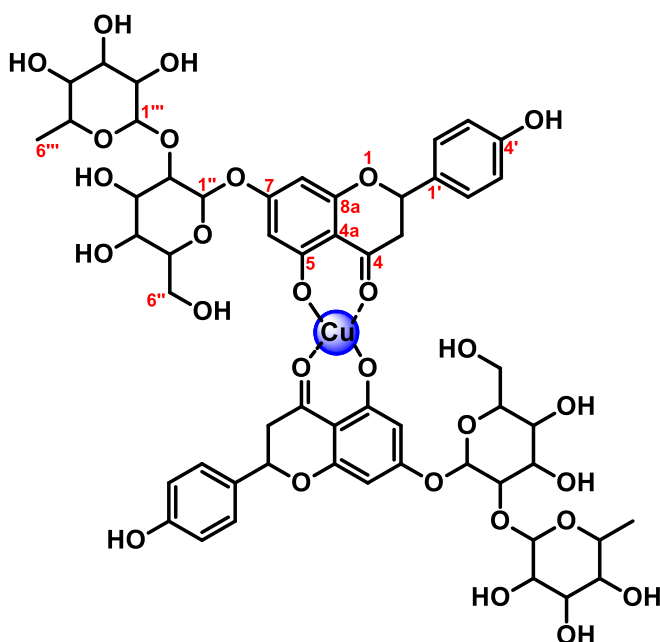


FIGURA 3. 43 - Estrutura do complexo **38** da naringina com cobre.

A análise do espectro de RMN de 1H (Figura S 65) revelou sinais em δ 12.02 (*s*, 1H), 9.57 (*s*, 1H), 7.29 (*d*, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.77 (*d*, $J = 7.3$ Hz, 2H), 6.07 (*d*, $J = 10.7$ Hz, 2H), 5.45 (*d*, $J = 13.5$ Hz, 1H), 5.24 – 4.96 (*m*, 2H), 3.19 – 3.10 (*m*, 3H), 2.68 (*d*, $J = 16.0$ Hz, 1H), 1.12 (*d*, $J = 5.8$ Hz, 3H).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 66) revelou a presença de sinais em δ 196.4 (C-4), 163.9 (C-5), 163.4 (C-7), 162.0 (C-9), 156.9 (C-4'), 127.6 (C-2' e C-6'), 127.5, (C-1'), 114.3 (C-3' e C-5'), 102.4 (C-10), 99.5 (C-1''), 96.4 (C-

1'''), 95.4 (C-6), 94.2 (C-8), 77.9 (C-2), 76.2 (C-2''), 76.0 (C-3''), 75.3 (C-5''), 70.9 (C-4'''), 69.6 (C-3'''), 69.5 (C-2'''), 68.7 (C-4''), 67.3 (C-5'''), 59.5 (C-6''), 41.1 (C-3), 17.1 (C-6'''). Os dados foram comparados com o padrão de naringina (Sigma Aldrich) e com os dados da literatura⁵¹.

A estrutura química do complexo de naringina com cobre revelou dificuldade para estabelecer a multiplicidade dos sinais devido ao alargamento deles. Assim, foi tentado estabelecer uma possível integral nos sinais de ^1H e confirmando o seu real deslocamento químico usando os experimentos de RMN de ^{13}C (Figura S 66), correlacionando com o padrão de naringina utilizado na síntese do complexo.

O complexo de rutina com ferro (**38**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 63) $\text{C}_{54}\text{H}_{64}\text{O}_{56}\text{Cu}$ (massa calc.: 1222.2800, massa exp.: 1222.2803, erro: 0.2 ppm). A análise do espectro de MS^2 foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 146.06 (M- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$) para dar o íon-fragmento 1076.22, que perde uma unidade de glicose de m/z 162.05 (M- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$), e o mesmo aconteceu com os outros açúcares restando apenas as agliconas com o íon Cu II de m/z 606 (FIGURA 3. 44).

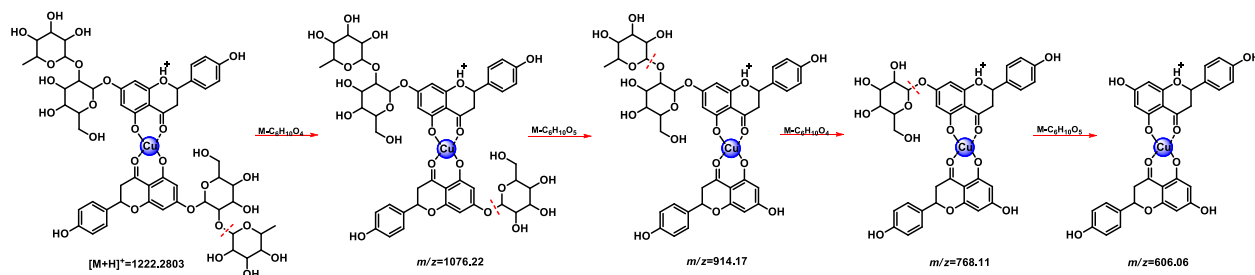


FIGURA 3. 44 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de naringina com cobre (**38**)

O complexo **39** foi resultado da síntese de duas moléculas de naringina com o íon zinco (II) (FIGURA 3. 45).

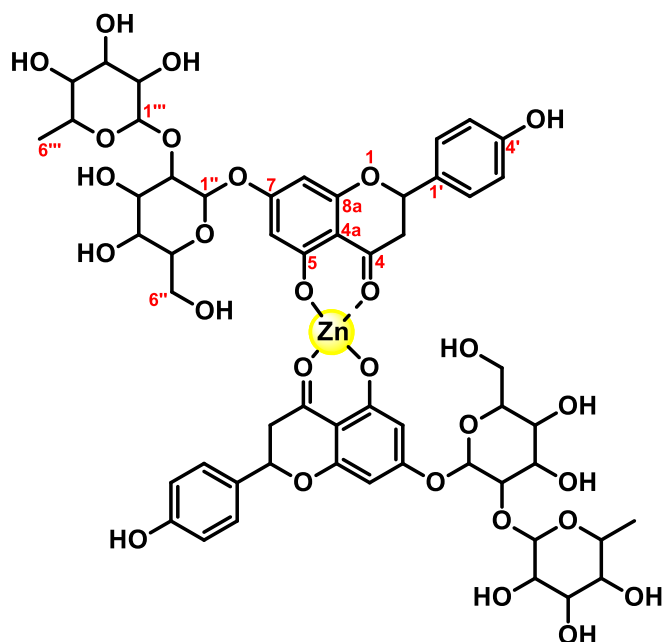


FIGURA 3. 45 - Estrutura do complexo **39** da naringina com zinco.

A análise do espectro de RMN de ^1H de **39** revelou a presença de sinais em δ 12.06 (*s*, 1H), 9.67 (*s*, 1H), 7.32 (*dd*, $J = 8.5, 3.7$ Hz, H-2' e H-6'), 6.79 (*d*, $J = 8.1$ Hz, H-3' e H-5'), 6.10 (*d*, $J = 10.7$ Hz, H-6), 5.34 (*s*, 1H), 5.10 (*d*, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.76 (*s*, 1H), 4.70 (*s*, 1H), 4.61 (*s*, 1H), 3.67 (*s*, 2H), 3.64 (*s*, 1H), 3.32 (*d*, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.19 (*t*, $J = 9.9$ Hz, 1H), 1.84 (*s*, 2H), 1.15 (*d*, $J = 6.1$ Hz, 2H). Houve a mesma dificuldade para estabelecer a multiplicidade dos sinais devido ao efeito do metal na molécula.

Enquanto a análise do espectro de RMN de ^{13}C de **39** revelou a presença de sinais em δ 197.3 (C-4), 164.9, 163.03 (C-5), 157.9 (C-7), 128.6 (C-2' e C-6'), 128.5 (C-1'), 115.3 (C-3' e C-5'), 103.4 (C-10), 100.6 (C-1''), 100.5 (C-1'''), 97.4 (C-8), 96.4 (C-6), 95.3 (C-8), 78.9 (C-2), 77.3 (C-2''), 76.9 (C-3''), 76.3 (C-5''), 76.2 (C-4'''), 71.9 (C-3'''), 70.6 (C-2'''), 70.5 (C-4''), 69.7 (C-5'''), 68.4 (C-6''), 42.2 (C-3), 18.2 (C-6''').

O complexo de rutina com ferro (**39**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 63) $\text{C}_{54}\text{H}_{64}\text{O}_{28}\text{Zn}$ (massa calc.: 1223.2800, massa exp.: 1223.2791, erro: -0.7 ppm). A análise do espectro de MS^2

foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 146.06 ($M-C_6H_{10}O_4$) para dar o íon-fragmento 1077.22, o qual perde uma unidade de glicose de m/z 162.05 ($M-C_6H_{10}O_5$), e o mesmo acontecendo com os outros açúcares restando apenas as agliconas com o íon de m/z 607.07 (

FIGURA 3. 46).

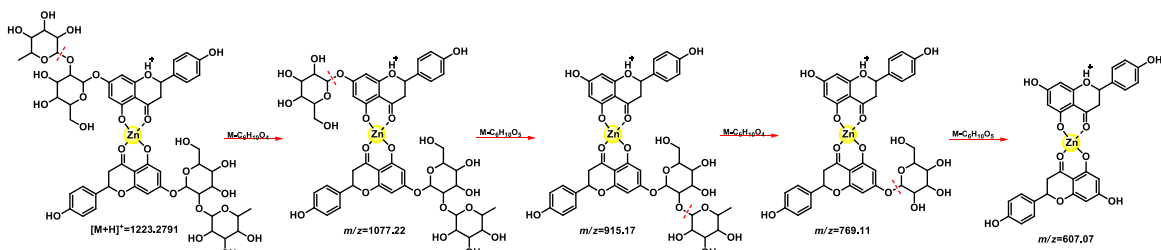


FIGURA 3. 46 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de naringina com zinco (**39**).

O complexo **39** foi resultado da síntese de duas moléculas de naringina com o íon ferro (II) (FIGURA 3. 47).

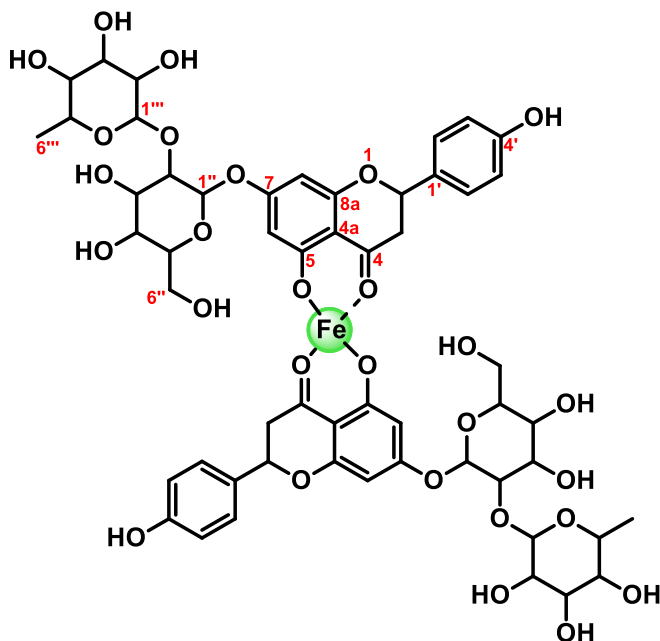


FIGURA 3. 47 - Estrutura do complexo **40** da naringina com ferro.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura S 76) revelou a presença dos seguintes sinais em δ 11.99 (*s*, 1H), 9.54 (*s*, 1H), 7.27 (*d*, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.74 (*d*, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.07 (*dd*, $J = 17.2, 9.4$ Hz, 2H), 5.45 (*t*, $J = 12.7$ Hz, 1H), 5.07 (*dd*, $J = 16.0, 6.4$ Hz, 1H), 3.61 (*d*, $J = 12.8$ Hz, 2H), 3.38 (*q*, $J = 8.4, 6.4$ Hz, 3H), 3.29 (*d*, $J = 14.4$ Hz, 1H), 3.14 (*dd*, $J = 12.5, 8.5$ Hz, 2H), 2.67 (*dd*, $J = 16.5, 9.3$ Hz, 1H), 1.10 (*d*, $J = 6.1$ Hz, 3H).

Enquanto a análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 77) revelou a presença dos sinais em δ 195.7 (C-4), 163.2 (C-5), 161.3 (C-7), 161.2 (C-9), 156.2 (C-4'), 127.0 (C-2' e C-6'), 126.8, (C-1'), 113.6 (C-3' e C-5'), 101.7 (C-10), 98.9 (C-1''), 95.7 (C-1'''), 94.7 (C-6), 93.6 (C-8), 77.2 (C-2), 75.5 (C-2''), 75.3 (C-3''), 74.6 (C-5''), 70.3 (C-4'''), 68.9 (C-3'''), 68.8 (C-2'''), 68.0 (C-4''), 66.7 (C-5'''), 58.9 (C-6''), 40.4 (C-3), 16.5 (C-6'').

O complexo de rutina com ferro (**40**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 63) $\text{C}_{54}\text{H}_{62}\text{O}_{28}\text{Fe}$ (massa calc.: 1214.2780, massa exp.: 1214.2782, erro: 0.2 ppm). A análise do espectro de MS^2 foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 146.06 (M- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$) para dar o íon-fragmento 1068.23, o qual perde uma unidade de glicose de m/z 162.05 (M- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) e o mesmo aconteceu com os outros açúcares restando apenas as agliconas com o íon de m/z 598.06 (FIGURA 3. 48).

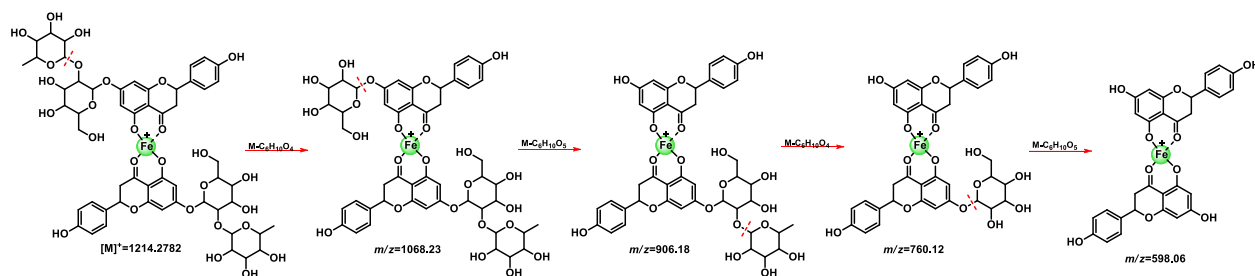


FIGURA 3. 48 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de naringina com ferro (**40**).

Caracterização do padrão de ácido vanílico

A análise do espectro de RMN de ^1H do padrão de ácido vanílico revelou a presença de um sistema aromático trissubstituído com os sinais dos hidrogênios das posições 2 e 6 coalescendo e dificultando assim atribuir a multiplicidade ao sinal. Contudo, tendo a constante de acoplamento de H-5 com H-6 sabe-se que em H-6 teríamos um dubleto *orto* de 8.4 Hz que se desdobrou em um duplo-dubleto de 2.0 Hz resultante do acoplamento de H-6 com H-2.

Enquanto, a análise do espectro de RMN de ^{13}C revelou a presença de seis sinais que absorvem na região de carbonos aromáticos em δ 151.1 (C-3), 147.2 (C-4), 123.5 (C-6), 121.6 (C-1), 115.1 (C-2), 112.7 (C-5), além de um sinal do carbono carboxílico em 167.2 (C-7) e um sinal na região de carbonos oxigenados atribuído à metoxila ligada ao C-3 em 55.6 ppm.

Esperava-se que a complexação acontecesse entre os grupos carboxílicos, contudo viu-se que o complexo se formou pela interação dos orbitais vazios do metal com os pares de elétrons não ligantes dos grupos hidroxila e metoxila.

A informação que confirmou essa hipótese do sítio de complexação se deu pela análise do espectro de MS^2 dos complexos formados pela eliminação de CO_2 (M-44) e pelas diferenças de Δ/Δ dos deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^{13}C .

A estrutura química do complexo **41**, cobre com ácido vanílico (FIGURA 3. 49) foi caracterizado por RMN-1D, 2D, espectroscopia na região do ultravioleta (UV) e espectrometria de massas de alta resolução com proposta de mecanismo de fragmentação para o espectro de MS^2 de acordo com a estrutura proposta.

A análise do espectro de RMN de ^1H , (Figura S 81) revelou a presença de sinais alargados em toda a região do espectro destacando os sinais em δ 9.74 (s, 1H), 7.34 (s, H-2 e H-6), 6.76 (s, H-5), 3.71 (s, OCH_3). δ 9.69 (s, OH). Enquanto a

análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 82) revelou a presença de seis sinais de ^{13}C e a tentativa de atribuição do sinal do carbono carboxílico em δ 164.8 e de sinais sendo δ 148.4 (C-4), 145.1 (C-3), 121.9 (C-6 e C-1), 112.8 (C-2), 111.2 (C-5) e 53.0 (OCH_3), e essas informações foram confirmadas pelas correlações do mapa de contornos HSQC (FIGURA 3. 50).

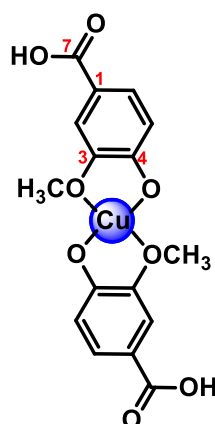


FIGURA 3. 49 - Estrutura do complexo **41** da ácido vanílico com cobre.

Os dados de RMN-1D e 2D (Figura S 83 e Figura S 84) foram comparados com aqueles já descritos na literatura⁵².

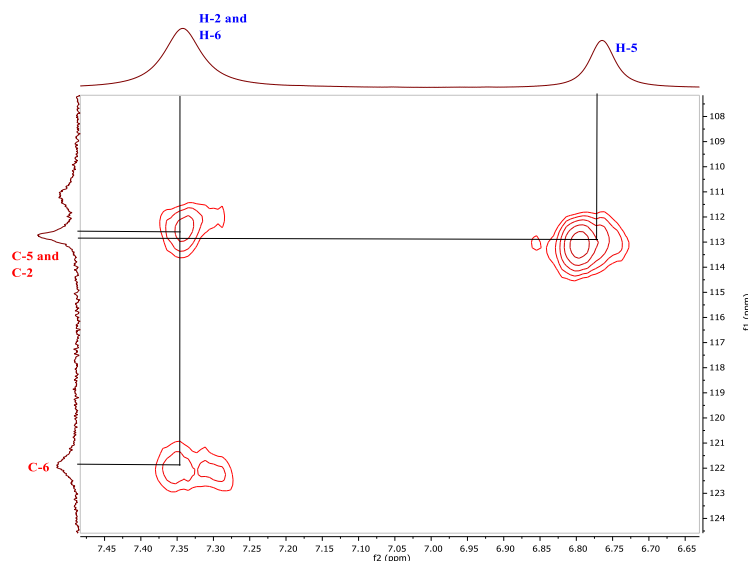


FIGURA 3. 50 Expansão do mapa de contornos HSQC do complexo **41** ($\text{DMSO-}d_6$, 9.4T)

O complexo de ácido vanílico com cobre (**41**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 85) $C_{16}H_{16}CuO_8$ (massa calc.: 398.0068, massa exp.: 398.0063, erro: -1.3 ppm).

A análise do espectro de MS^2 foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor a perda de m/z 43.99 ($M-CO_2$) para dar o íon-fragmento 354.02 que sofre uma perda de H_2O para dar o íons-fragmento 336.01, que sofre mais uma perda de CO_2 ($M-43.99$) resultando no íon-fragmento m/z 290.02, que por fim sofre a perda de 106.04 ($M-C_7H_6O$) para dar o íon-fragmento m/z 185.98 (FIGURA 3. 51).

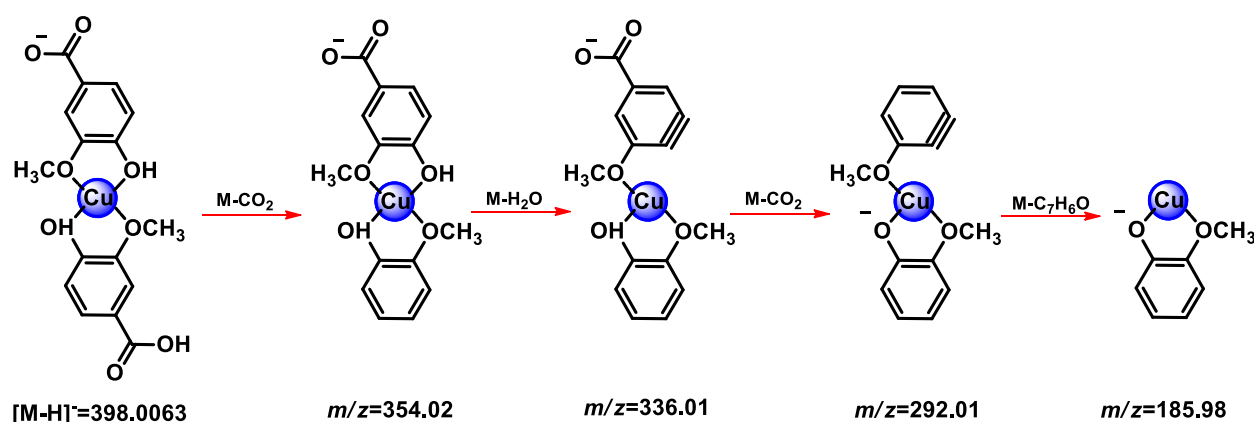


FIGURA 3. 51 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de ácido vanílico com o íon cobre (**41**).

A substância **41** ainda não foi descrita na literatura como produto de síntese e os dados adquiridos até aqui servirão como base para os demais produtos de síntese.

Enquanto, as estruturas dos outros dois complexos com ligante de ácido vanílico com zinco (**42**) e outro com ferro (**43**) foram caracterizados de forma similar com a aquisição dos espectros de RMN-1D e 2D contudo, priorizando a comparação dos dados de RMN-1D e analisando os dados de espectrometria de massas com os de **41**.

A análise do espectro de RMN de 1H de **42** (Figura S 87) revelou a presença de quatro sinais em δ 7.44 (*sl*, 1H), 7.41 (*d*, $J = 8.1$ e 1.9 Hz, 1H), 6.78 (*d*,

$J = 8.1$ Hz, 1H), 3.78 (*s*, 3H). Enquanto, na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 88) foram observados oito carbonos em δ 170.2 (C-7), 150.3 (C-4), 146.9 (C-3), 124.0 (C-6), 123.4 (C-1), 114.8 (C-2), 113.1 (C-5), 55.5 (OCH_3).

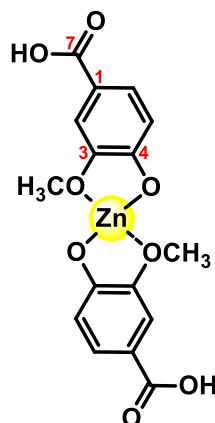


FIGURA 3. 52 - Estrutura do complexo 41 da ácido vanílico com zinco.

As atribuições dos carbonos com seis respectivos hidrogênios e as posições foram determinadas com o auxílio dos experimentos de RMN-2D (Figura S 89 a Figura S 91).

O complexo do ácido vanílico com o íon zinco II (**42**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 92) $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ZnO}_8$ (massa calc.: 399.0058, massa exp.: 398.0065, erro: 1.8 ppm).

A análise do espectro de MS^2 foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor duas perdas de m/z 43.99 ($\text{M}-\text{CO}_2$) inicialmente para dar o íon-fragmento m/z 355.02 e subsequentemente m/z 311.01, e a partir o íon-precursor, observou-se a perda de uma unidade do complexo ($\text{M}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4\text{Zn}$) deixando apenas o núcleo do ácido vanílico de m/z 167.03 (Figura S 93).

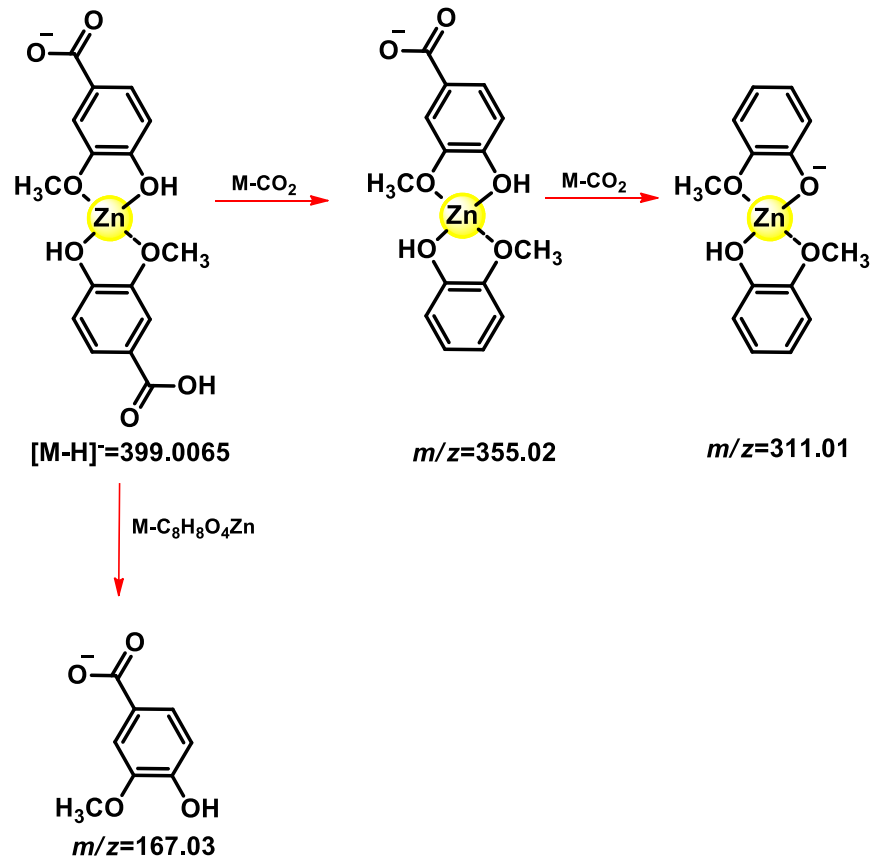


FIGURA 3. 53 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo de ácido vanílico com zinco (**42**).

A atribuição do complexo do ácido vanílico com o íon ferro II (**43**) se deu pelos experimentos de RMN-1D, 2D e análise dos espectros de massas de alta resolução.

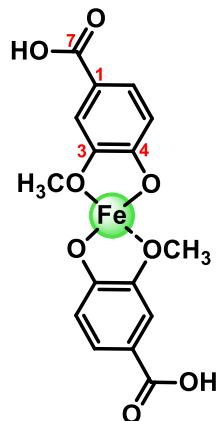


FIGURA 3. 54 - Estrutura do complexo 41 do ácido vanílico com ferro.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura S 94) revelou a presença seis sinais com um deles integrando para dois hidrogênios na região aromática pois apresentam o mesmo deslocamento químico, sendo eles δ 9.81 (*s*, 1H), 7.41 (*s*, 2H), 6.81 (*s*, 1H), 3.78 (*s*, 3H). Enquanto, na análise do espectro de RMN de ^{13}C (Figura S 95) observou-se oito sinais de carbonos, sendo δ 166.6 (C-7), 150.4 (C-4), 146.6 (C-3), 122.8 (C-6), 121.0 (C-1), 114.4 (C-2), 112.1 (C-5), 55.0 (OCH_3).

O complexo de ácido vanílico com o íon ferro II (**43**) teve sua fórmula molecular calculada a partir do espectro de HRMS (Figura S 97) $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FeO}_8$ (massa calc.: 390.0038, massa exp.: 390.0034, erro: -1.0 ppm).

A análise do espectro de MS^2 (Figura S 98) foi realizada e determinou-se, a partir do íon-precursor duas perdas de m/z 32.02 ($\text{M-CH}_3\text{O}\cdot$) inicialmente para dar o íon-fragmento m/z 358.98 e subsequentemente perda de $\text{M-C}_8\text{H}_7\text{O}_5\text{Fe}$ para dar o íon-fragmento m/z 151.04 (FIGURA 3. 55).

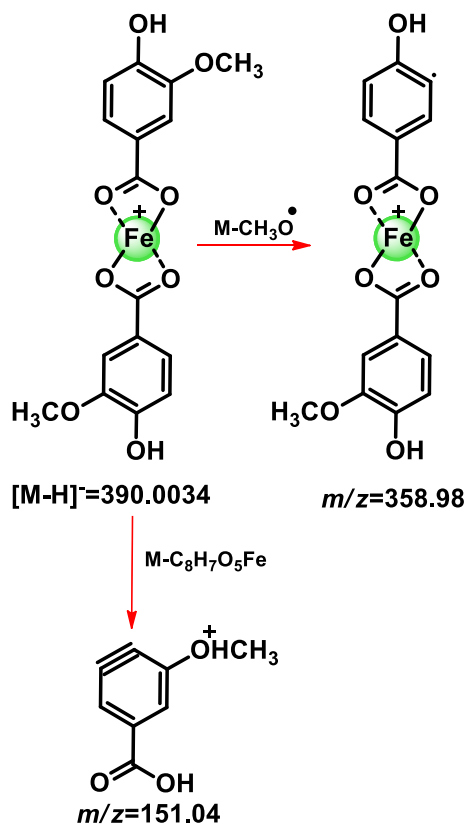


FIGURA 3. 55 - Proposta de mecanismo de fragmentação para o complexo do ácido vanílico com ferro (43).

3.9. Estudo da atividade inibitória em *X. citri*

O teste de inibição bacteriana de *Xanthomonas citri* foi realizado em microplaca de diluição seriada de 96 poços, quando foi avaliado o controle positivo, o solvente utilizado para diluir as amostras, o controle do meio de cultura e aos complexos **35-43** sintetizados com os ligantes rutina, naringina e ácido vanílico complexados com os íons cobre II, zinco II e ferro II. Na tabela 3.4 podemos verificar a comparação dos resultados de inibição do crescimento da bactéria nos testes de microdiluição.

TABELA 3. 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) da bactéria *X. citri*

Compound formula	Compound molar mass (g.mol ⁻¹)	µg.mL ⁻¹	µg.mL ⁻¹ to g.L ⁻¹	µM
Cu(naringin) ₂	1222.60	500	0.001	408.96
Cu(rutin) ₂	1282.57	500	0.001	389.84
Cu(vanillic acid) ₂	399.84	500	0.001	1250.50
Zn(naringin) ₂	1224.43	250	0.001	204.18
Zn(rutin) ₂	1284.40	500	0.001	389.29
Zn(vanillic acid) ₂	401.67	125	0.001	311.20
Fe(naringin) ₂	1214.90	500	0.001	411.56
Fe(rutin) ₂	1284.40	500	0.001	389.29
Fe(vanillic acid) ₂	392.140	500	0.001	1275.05

O complexo de naringina com o íon zinco II foi o mais efetivo na inibição do crescimento da bactéria *X. citri*, com CIM de 204 µM e pode ser utilizado para translocação sistêmica pela planta melhorando seu mecanismo de defesa³⁶.

Já tem sido reportado pelo nosso grupo de pesquisa a translocação de metais quelados com flavonoides da raiz até as partes aéreas como resultado do mecanismo de proteção da planta contra patógenos⁵³.

4. CONCLUSÃO

O estudo da composição química dos extratos do fungo *E. salmonicolor* rendeu 51 substâncias, dessas **1-34** foram caracterizadas por RMN-1D e 2D e/ou UPLC-HRMS MS/MS utilizando técnicas de CC e HPLC para fracionamento e isolamento deles. Todo esse trabalho foi auxiliado por ferramentas de quimioinformática como os softwares MS-DIAL, MS-FINDER e GNPS. Enquanto, a substância **21** foi produto da biotransformação/bioconversão da rutina no meio de cultura Czapek.

Na síntese dos complexos utilizando os ligantes rutina, naringina e ácido vanílico com os íons cobre II, zinco II e ferro II foram obtidos os complexos **35-43**, os quais foram caracterizados por técnicas como RMN-1D e 2D, além de espectrometria de massas de alta resolução (HRMS MS/MS), estes também foram testados contra a bactéria *Xanthomonas citri* pelo teste de CIM, tendo o complexo de naringina com zinco a melhor atividade, ~200µM.

A curva de crescimento do fungo *E. salmonicolor* foi determinada e mostrou que a expressão dos metabólitos secundários é melhor no 9º dia, sendo este o ideal para a cultura do microrganismo em meio BDA – batata dextrose ágar, o qual foi analisado por GC-MS e identificados os metabólitos de **44-60** em comparação com as bibliotecas NIST.

5. Referências

1. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461–477 (2007).
2. Singh, B. K., Dawson, L. A., Macdonald, C. A. & Buckland, S. M. Impact of biotic and abiotic interaction on soil microbial communities and functions: A field study. *Appl. Soil Ecol.* **41**, 239–248 (2009).
3. Jiang, X. & Hu, X. Microbiome Data Mining for Microbial Interactions and Relationships BT - Big Data Analytics: Methods and Applications. in (eds. Pyne, S., Rao, B. L. S. P. & Rao, S. B.) 221–235 (Springer India, 2016). doi:10.1007/978-81-322-3628-3_12.
4. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **83**, 770–803 (2020).
5. Kombrink, E. & Somssich, I. E. Defense Responses of Plants to Pathogens. *Adv. Bot. Res.* **21**, 1–34 (1995).
6. Wingreen, N. S. & Levin, S. A. Cooperation among Microorganisms. *PLOS Biol.* **4**, e299 (2006).
7. Cervantes, C. *et al.* Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 335–347 (2001).
8. Costa, J. H., Bazioli, J. M., de Moraes Pontes, J. G. & Fill, T. P. *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: What do we know so far? *Fungal Biol.* **123**, 584–593 (2019).
9. Moraes, S. R. G., Furtado, G. Q., Scaloppi, É. A. G., Barreto, M. & Júnior, N. S. M. Sporulation of both *Erythricium salmonicolor* and its anamorphic stage *Necator decretus*, causal agent of citrus pink disease in Brazil. *Fitopatol. Bras.* **31**, 519 (2006).
10. Kimati, H., Galli, F. *Doenças dos citros*. In: GALLI, F. *et al.* *Manual de fitopatologia*. (1980).
11. Gopal, K. *et al.* Citrus Melanose (*Diaporthe citri* Wolf): A Review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* **3**, 113–124 (2014).
12. Nomi, C., Sato, H., Kobayashi, T. Occurrence and life-history of pink disease

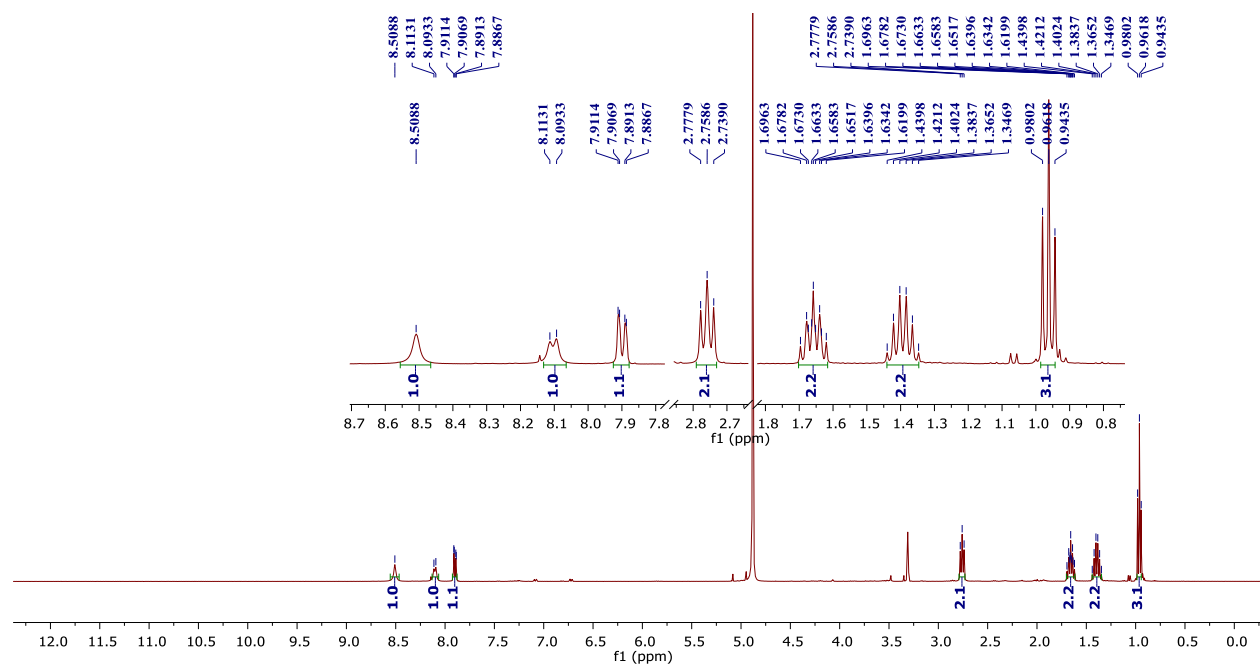
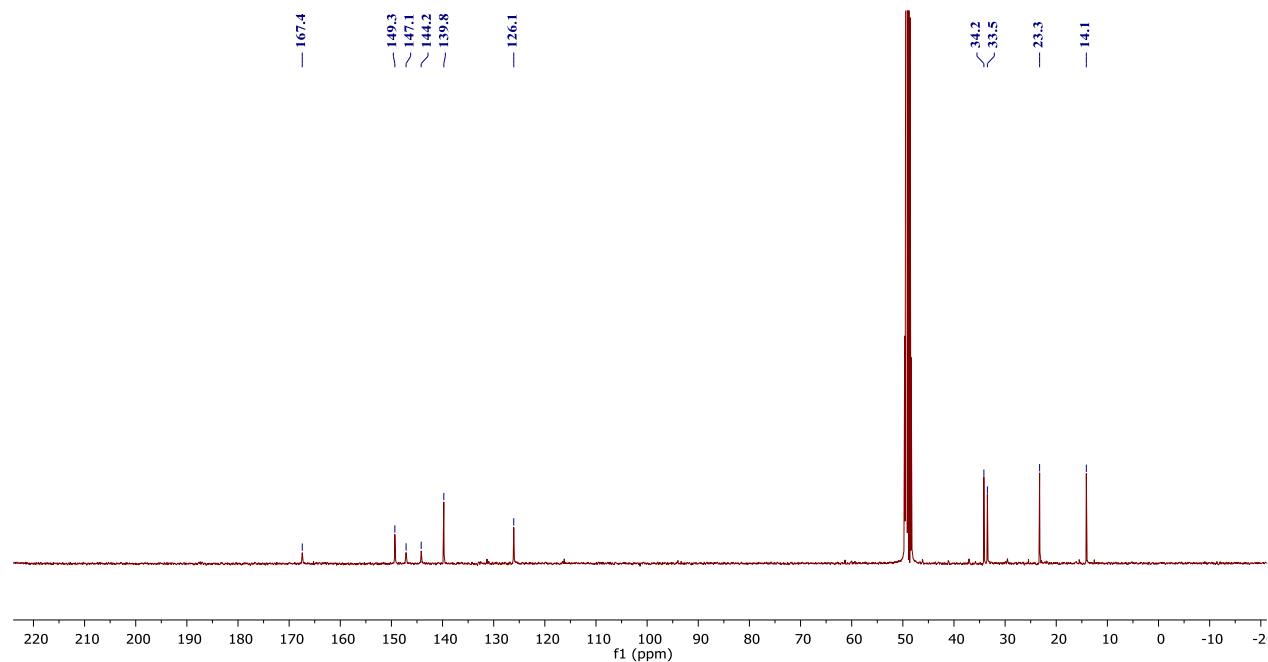
- caused by *Erythricium salmonicolor* in northern kanto, honshu, Japan. *J. Agric. Sci.* **44**, 252–262 (2000).
13. Gezahgne, A., Roux, J. & Wingfield, M. J. Diseases of exotic Eucalyptus and Pinus species in Ethiopian plantations. *S. Afr. J. Sci.* **99**, 29–33 (2003).
 14. Feichtenberger, E., Müller, G.W., Guirado, N. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. (Editora Agronômica Ceres Ltda., 1997).
 15. Nozaki, M. de H., Camargo, M. & Barreto, M. Caracterização de Diaporthe citri em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. *Fitopatol. Bras.* **29**, 429–432 (2004).
 16. Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., Timmer, L. W. *Compendium of Citrus Diseases*. (1993).
 17. Bushong, P. M. & Timmer, L. W. Evaluation of postinfection control of citrus scab and melanose with benomyl, fenbuconazole, and azoxystrobin. *Plant Dis.* **84**, 1246–1249 (2000).
 18. Van Cao, D. *et al.* Ultrafine copper nanoparticles exhibiting a powerful antifungal/killing activity against *Corticium salmonicolor*. *Bull. Korean Chem. Soc.* **35**, 2645–2648 (2014).
 19. Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D. & Singla, A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phyther. Res.* **15**, 655–669 (2001).
 20. Yan, L. *et al.* Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 6279–6298 (2018).
 21. Stelinski, L. L., Willett, D., Rivera, M. J. & Ali, J. G. ‘Tuning’ communication among four trophic levels of the root biome to facilitate biological control. *Biol. Control* **131**, 49–53 (2019).
 22. Levine, S. L. & Borgert, C. J. Review and recommendations on criteria to evaluate the relevance of pesticide interaction data for ecological risk assessments. *Chemosphere* **209**, 124–136 (2018).
 23. Beck, J. J. *et al.* Interactions among Plants, Insects, and Microbes: Elucidation of Inter-Organismal Chemical Communications in Agricultural Ecology. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 6663–6674 (2018).

24. Casacci, L. P. *et al.* Host specificity pattern and chemical deception in a social parasite of ants. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
25. Sedio, B. E. Recent advances in understanding the role of secondary metabolites in species-rich multitrophic networks. *Curr. Opin. Insect Sci.* **32**, 124–130 (2019).
26. Kessler, A. & Kalske, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* vol. 49 115–138 (2018).
27. Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K. & Puri, S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **12**, 1–12 (2019).
28. Nadarajah, K. K. In silico identification of plant-derived secondary metabolites in defense. in *In Silico Approach for Sustainable Agriculture* 275–293 (Springer Singapore, 2018).
29. Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P. & Kachroo, A. Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Sci.* **279**, 81–86 (2019).
30. Monteiro, A. F., Seidl, C., Severino, V. G. P., Cardoso, C. L. & Castro-Gamboa, I. Biotransformation of labdane and halimane diterpenoids by two filamentous fungi strains. *R. Soc. Open Sci.* **4**, (2017).
31. Aldemir, O., Yildirim, H. K. & Soezmen, E. Y. Antioxidant and anti-inflammatory effects of biotechnologically transformed propolis. *J. Food Process. Preserv.* **42**, n/a (2018).
32. Ruviaro, A. R., Barbosa, P. de P. M. & Macedo, G. A. Enzyme-assisted biotransformation increases hesperetin content in citrus juice by-products. *Food Res. Int.* Ahead of Print (2018) doi:10.1016/j.foodres.2018.05.004.
33. Niu, Y.-W., Li, H.-J., Dong, Y.-C., Xu, D.-Q. & Chen, Q.-H. Improved gastrodin production of biotransformation conditions by cultured cells *Armillaria luteo-virens* Sacc and the anti-inflammatory activity in vivo. *Med. Chem. (Los Angeles, CA, United States)* **6**, 348/1-348/7 (2016).
34. Schorn, M. A. *et al.* A community resource for paired genomic and metabolomic data mining. *Nat. Chem. Biol.* **17**, 363–368 (2021).
35. Zeilinger, S. *et al.* Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions

- with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 182–207 (2016).
36. Soares, M. S. *et al.* Quantification and localization of hesperidin and rutin in *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* after *Xylella fastidiosa* infection by HPLC-UV and MALDI imaging mass spectrometry. *Phytochemistry* **115**, 161–170 (2015).
 37. Stipanovic, R. D. *et al.* Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Studies on the Biosynthesis of Fusaric Acid from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5351–5356 (2011).
 38. Capasso, R. *et al.* Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids and their methyl esters from *Fusarium nygamai*. *Phytochemistry* **41**, 1035–1039 (1996).
 39. Hai, Y., Chen, M., Huang, A. & Tang, Y. Biosynthesis of Mycotoxin Fusaric Acid and Application of a PLP-Dependent Enzyme for Chemoenzymatic Synthesis of Substituted 1-Pipecolic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 19668–19677 (2020).
 40. Tung, T. T. *et al.* Fusaric acid and analogues as Gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **126**, 1011–1020 (2017).
 41. Kannappan, A. *et al.* Anti-virulence potential of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its clinical isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 6747–6758 (2019).
 42. Xi, Y.-K. *et al.* Total Synthesis of Spirotryprostatins through Organomediated Intramolecular Umpolung Cyclization. *Chem. – A Eur. J.* **25**, 3005–3009 (2019).
 43. Zhan, J., Burns, A. M., Liu, M. X., Faeth, S. H. & Gunatilaka, A. A. L. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *J. Nat. Prod.* **70**, 227–232 (2007).
 44. Busman, M., Butchko, R. A. E. & Proctor, R. H. LC-MS/MS method for the determination of the fungal pigment bikaverin in maize kernels as an indicator of ear rot. *Food Addit. Contam. Part A* **29**, 1736–1742 (2012).
 45. Selegato, D. M., Freire, R. T., Tannüs, A. & Castro-Gamboa, I. New dereplication method applied to NMR-based metabolomics on different fusarium species isolated from Rhizosphere of *Senna spectabilis*. *J. Braz. Chem. Soc.* **27**, 1421–1431 (2016).

46. Stipanovic, R. D. *et al.* Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Studies on the Biosynthesis of Fusaric Acid from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *J. Agric. Food Chem* **59**, 5351–5356 (2011).
47. Lebeau, J., Petit, T., Dufossé, L. & Caro, Y. Putative metabolic pathway for the bioproduction of bikaverin and intermediates thereof in the wild *Fusarium oxysporum* LCP531 strain. *AMB Express* **9**, (2019).
48. Sun, L. *et al.* Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of endocrocin and emodin. *Metab. Eng.* **54**, 212–221 (2019).
49. Niehaus, E. M. *et al.* Genetic Manipulation of the *Fusarium fujikuroi* Fusarin Gene Cluster Yields Insight into the Complex Regulation and Fusarin Biosynthetic Pathway. *Chem. Biol.* **20**, 1055–1066 (2013).
50. Wijeratne, E. M. K. & Gunatilaka, A. A. L. Biomimetic conversion of (-)-fusoxyppyridone and (-)-oxysporidinone to (-)-sambutoxin: Further evidence for the structure of the tricyclic pyridone alkaloid, (-)-fusoxyppyridone. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 2327–2329 (2011).
51. Lee, S. J. *et al.* Transglycosylation of Naringin by *Bacillus stearothermophilus* Maltogenic Amylase To Give Glycosylated Naringin. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3669–3674 (1999).
52. Shi, G. *et al.* Chemical constituents from *trichosanthis pericarpium*. *Asian J. Chem.* **26**, 4626–4630 (2014).
53. Oliveira, R. M. M. *et al.* Structural effects on the hesperidin properties obtained by chelation to magnesium complexes. *J. Inorg. Biochem.* **129**, 35–42 (2013).

6. Material Suplementar

Figura S 1 - Espectro de RMN de ¹H de **1** (CD₃OD, 9.4 T)Figura S 2 - Espectro de RMN de ¹³C de **1** (CD₃OD, 9.4 T).

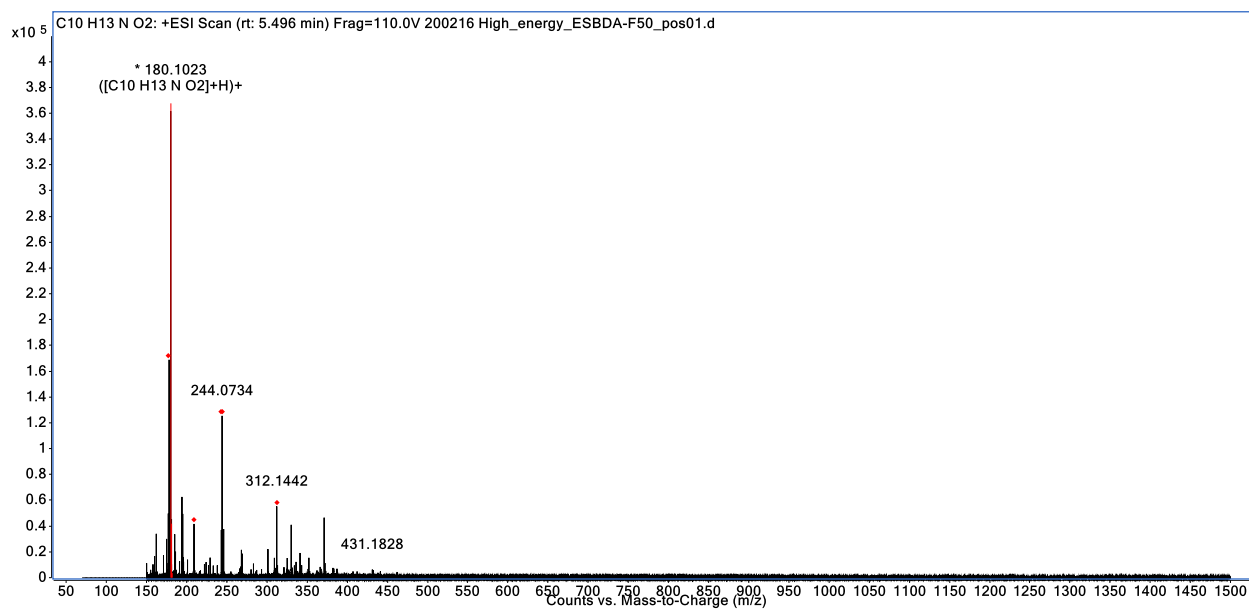


Figura S 3 – Espectro de massas de alta resolução HRMS de **1**.

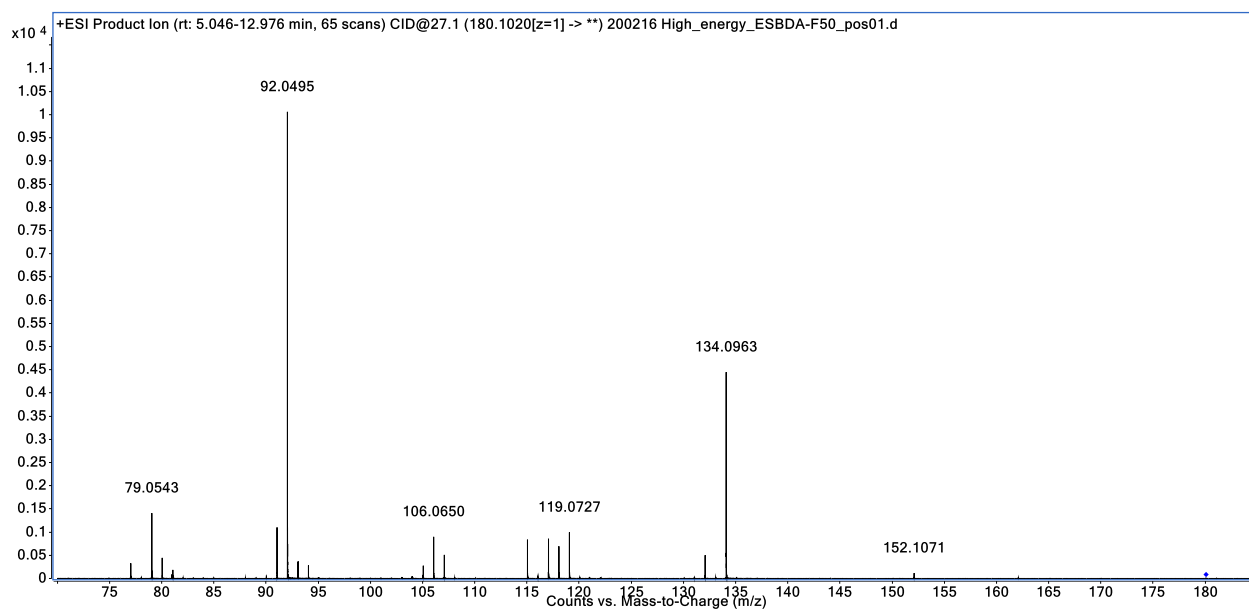


Figura S 4 – Espectro de massas HRMS MS/MS de **1** (energia de colisão: 27.1 ev).

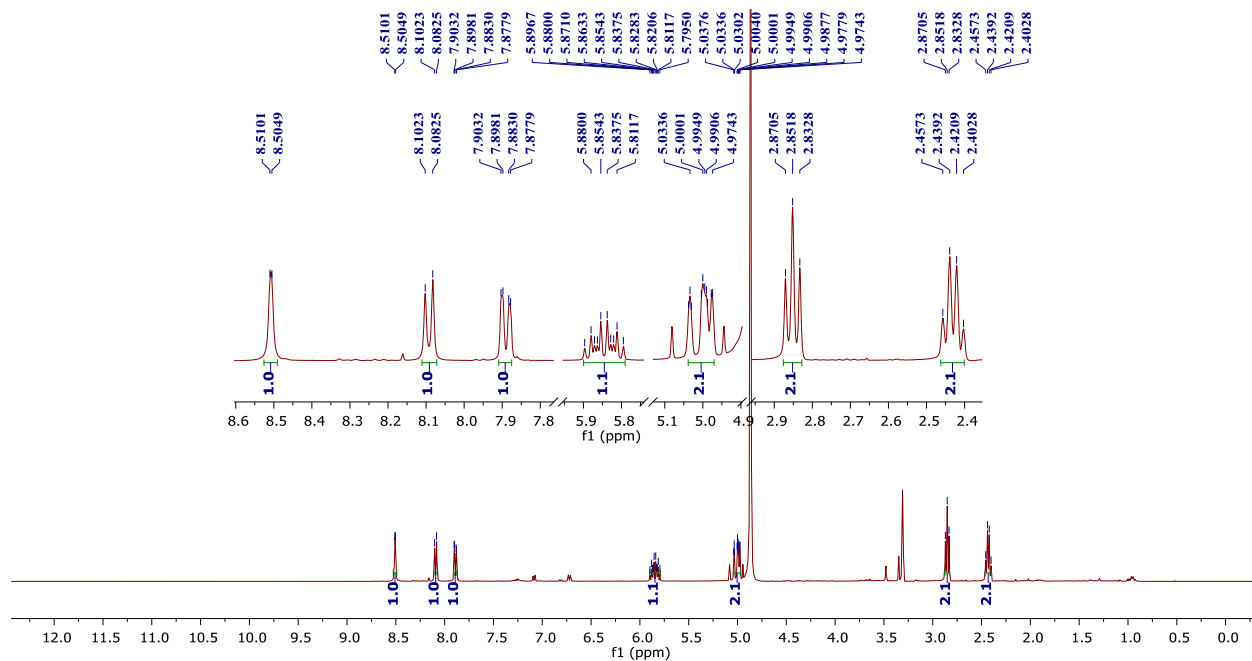


Figura S 5 - Espetro de RMN de ^1H de **2** (CD_3OD , 9.4 T)

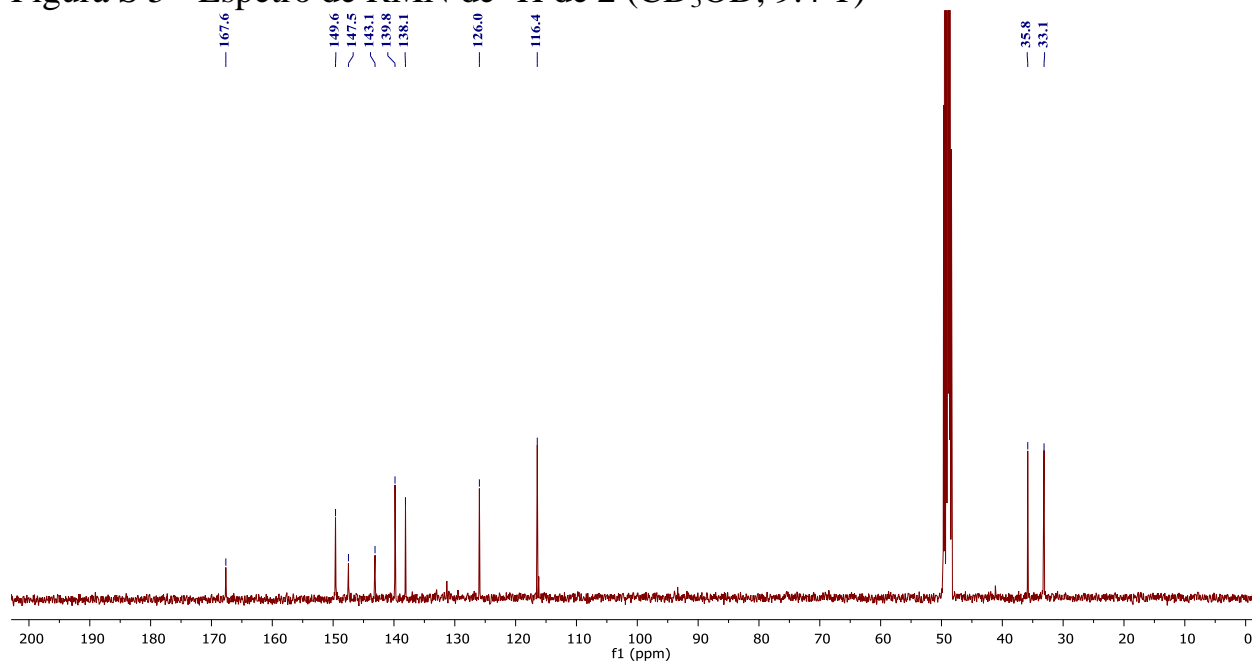


Figura S 6 - Espetro de RMN de ^{13}C de **2** (CD_3OD , 9.4 T).

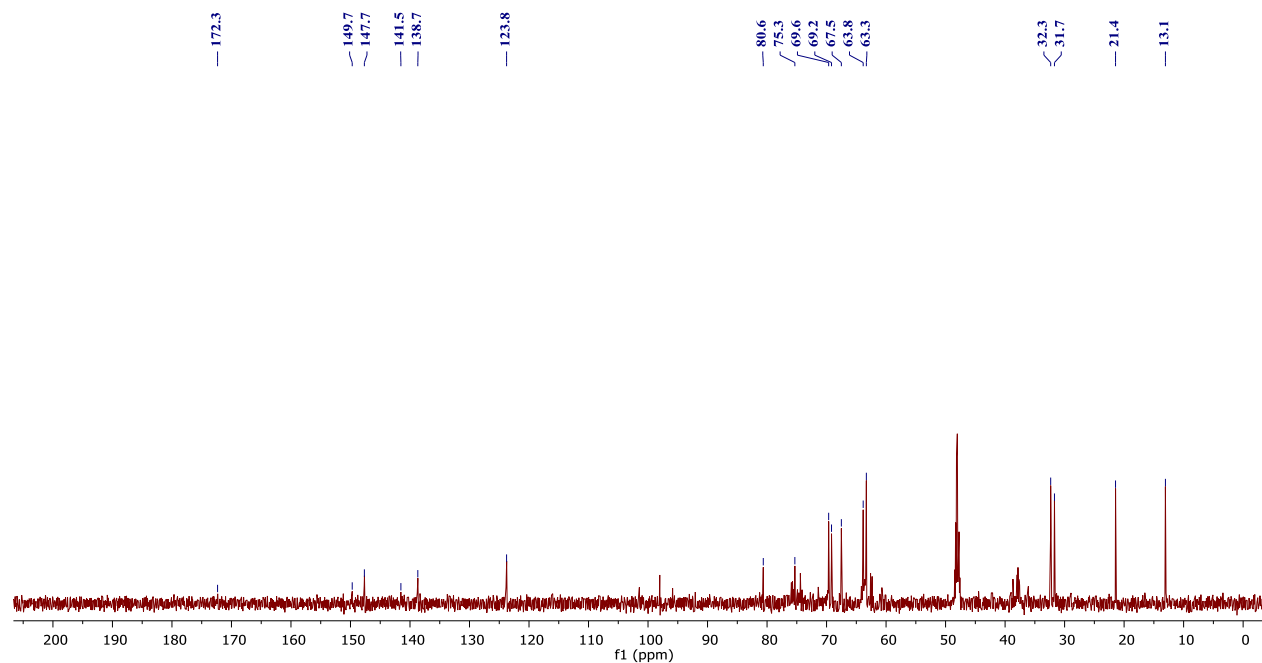


Figura S 7 – Espectro de RMN de ^{13}C de **21** (D_2O , 14.1 T)

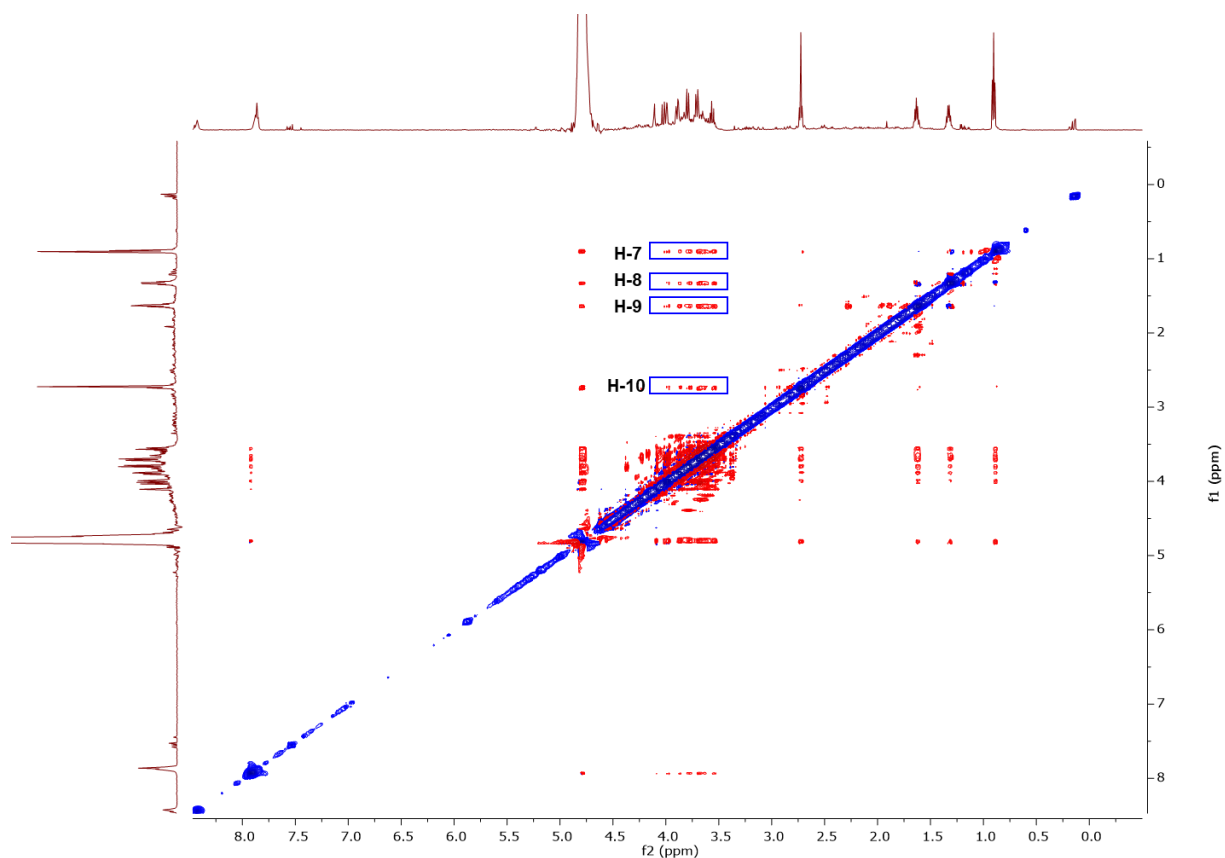


Figura S 8 - Mapa de contornos NOESY-2D de **21** (D₂O, 14.1 T)

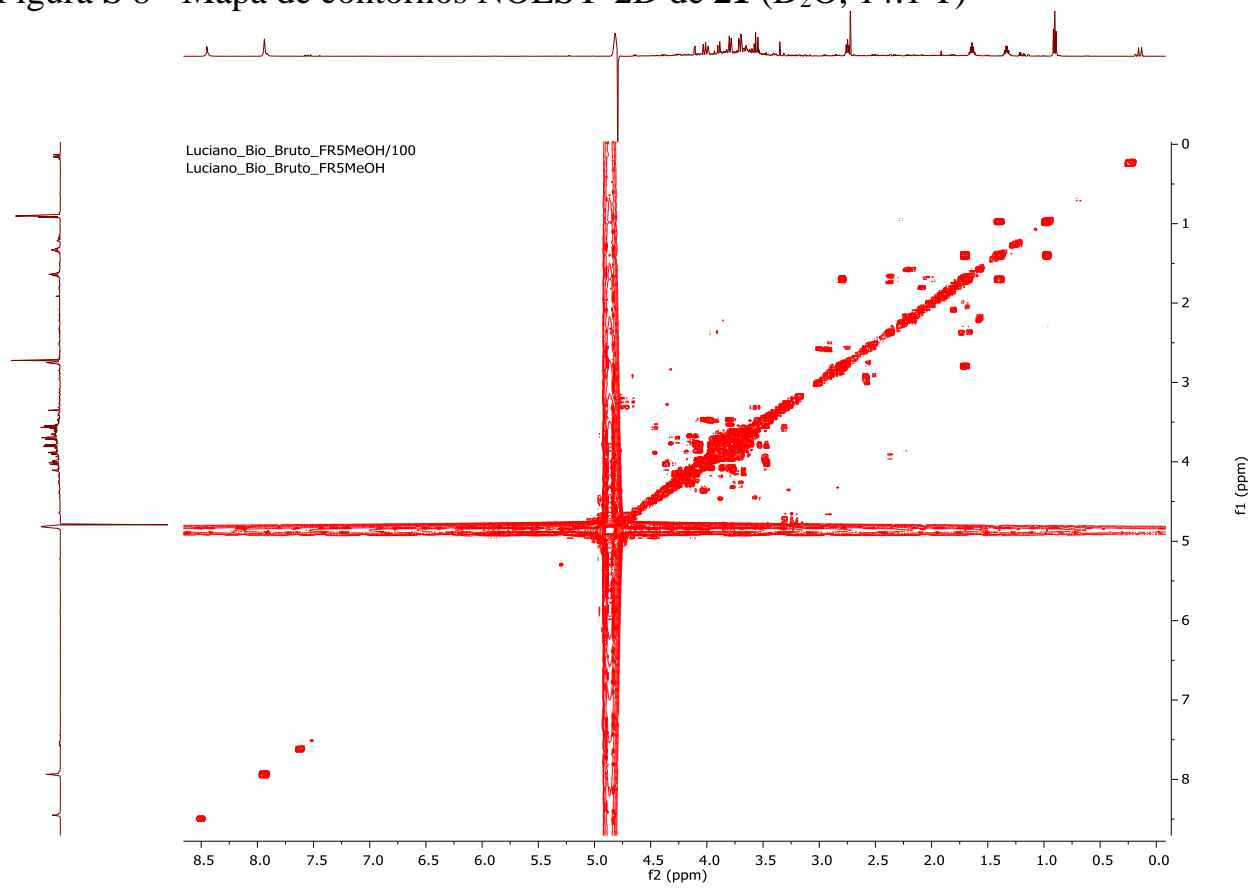
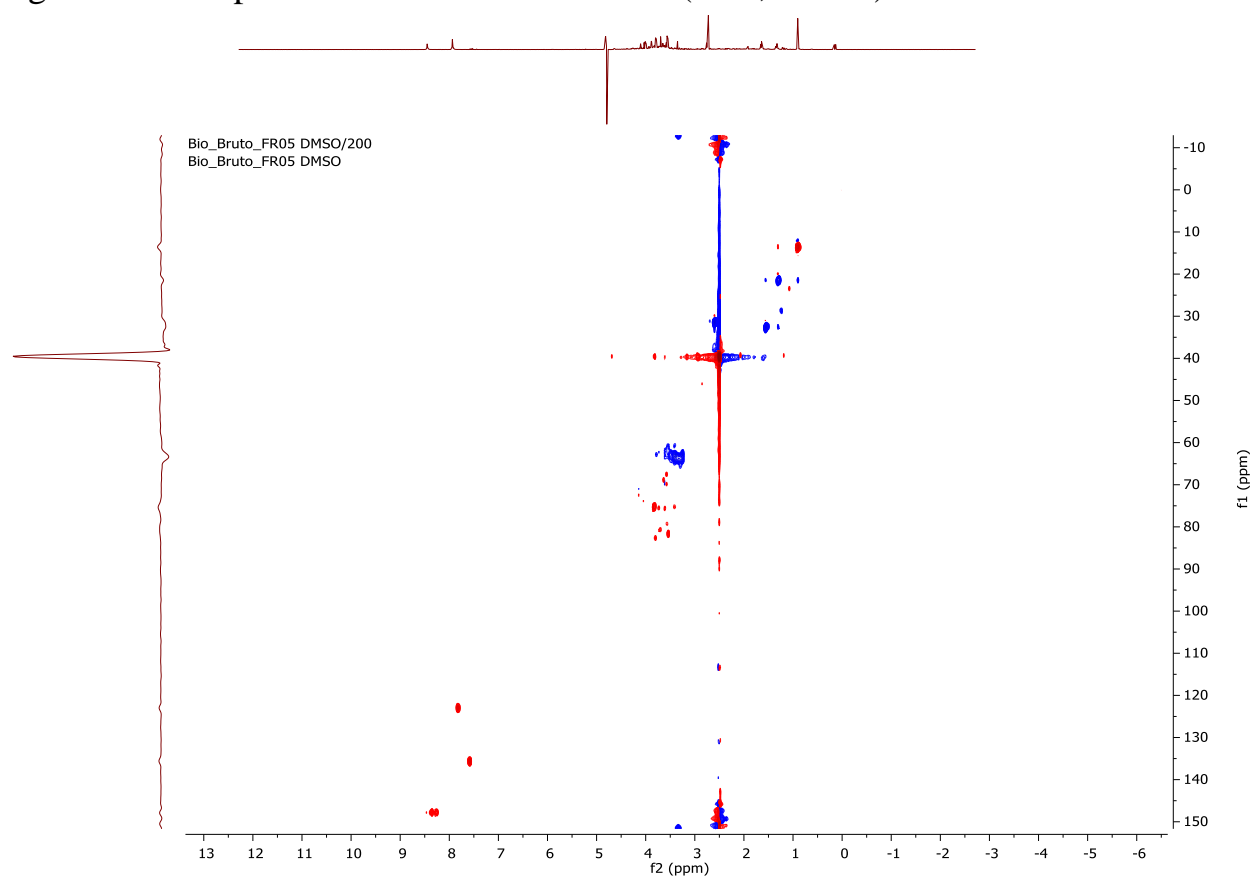


Figura S 9 - Mapa de contornos COSY de **21** (D₂O, 14.1 T)Figura S 10 - Mapa de contornos HSQC de **21** (D₂O, 14.1 T)

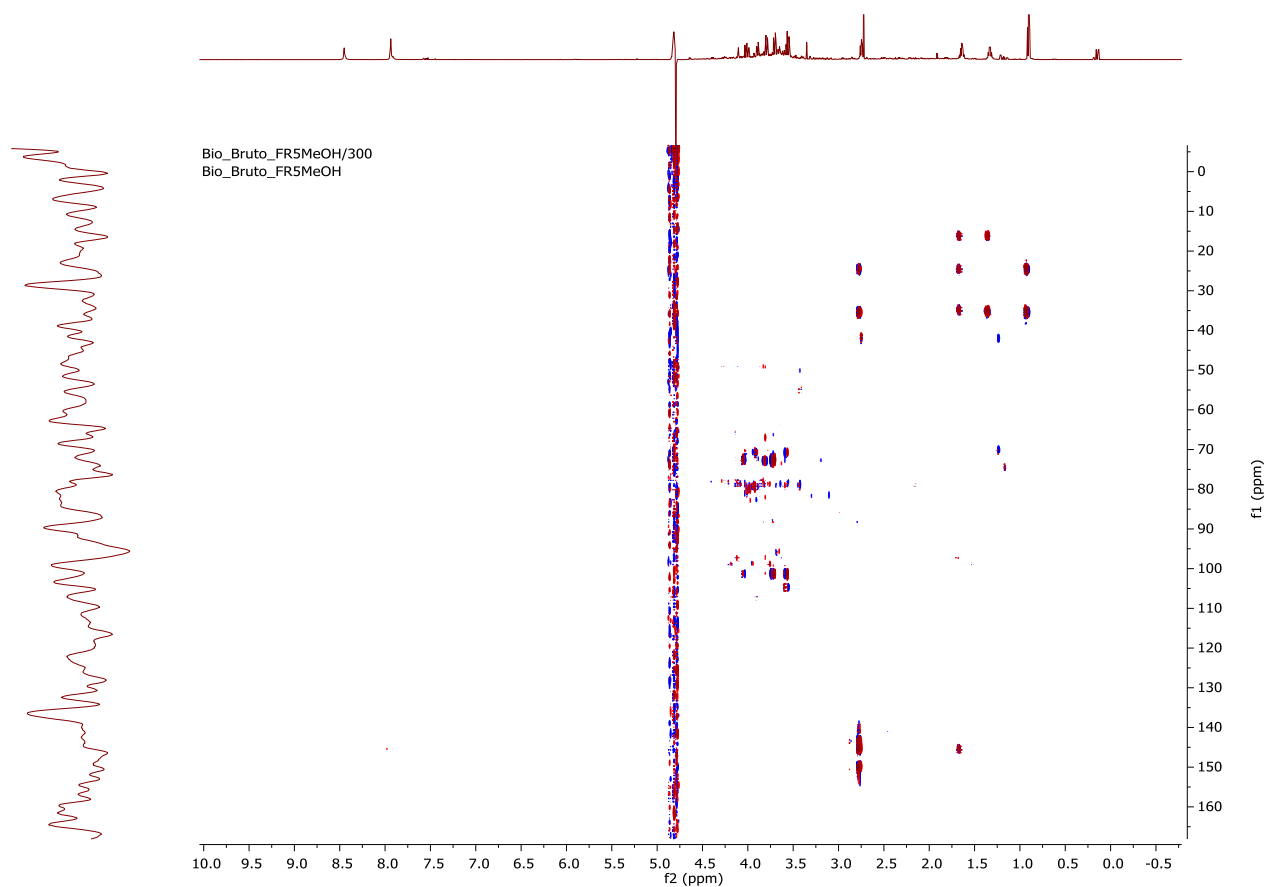


Figura S 11 - Mapa de contornos HMBC de **21** (D₂O, 14.1 T)

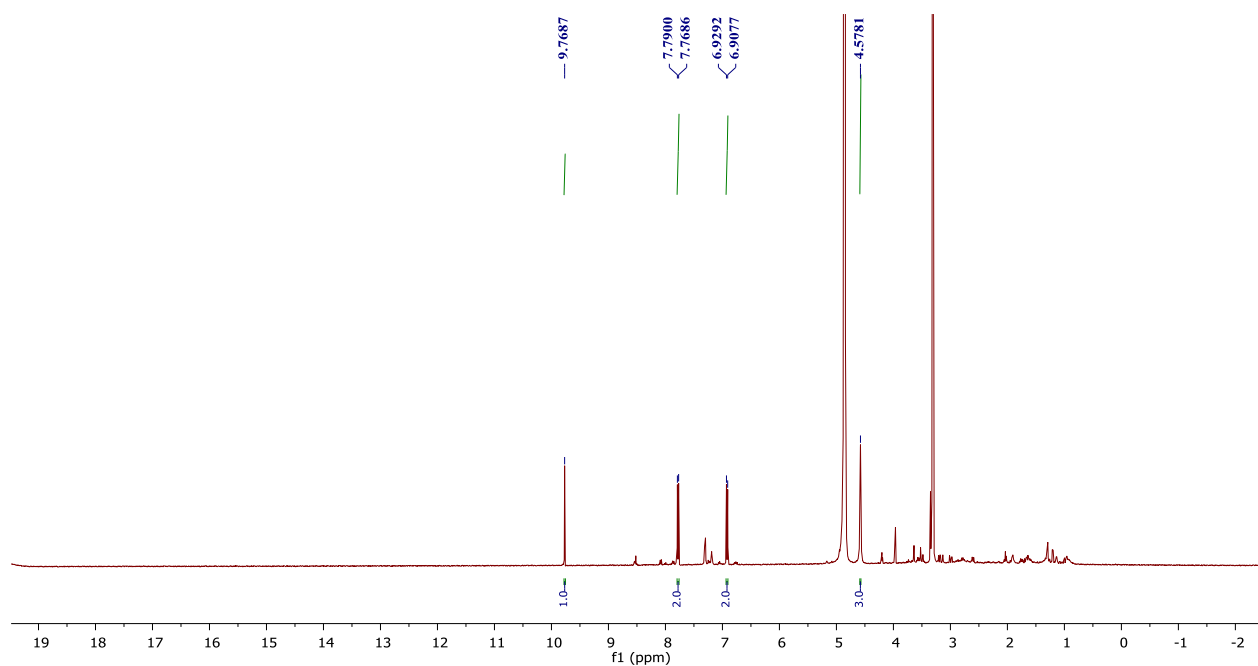
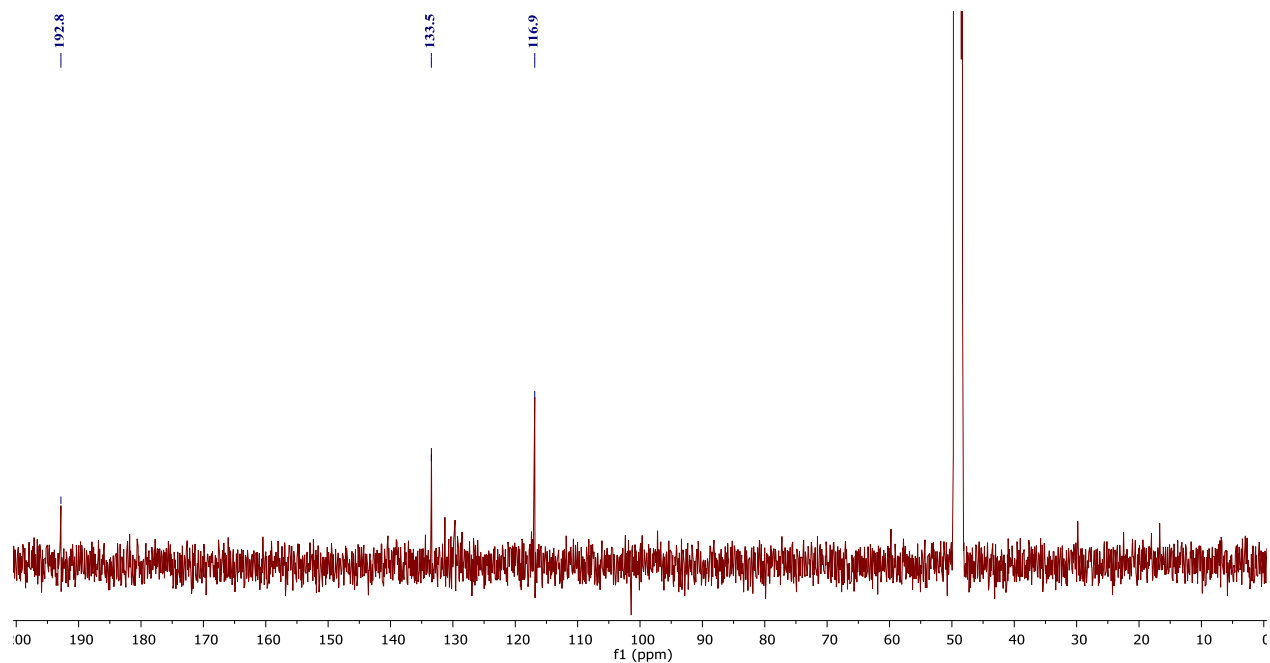
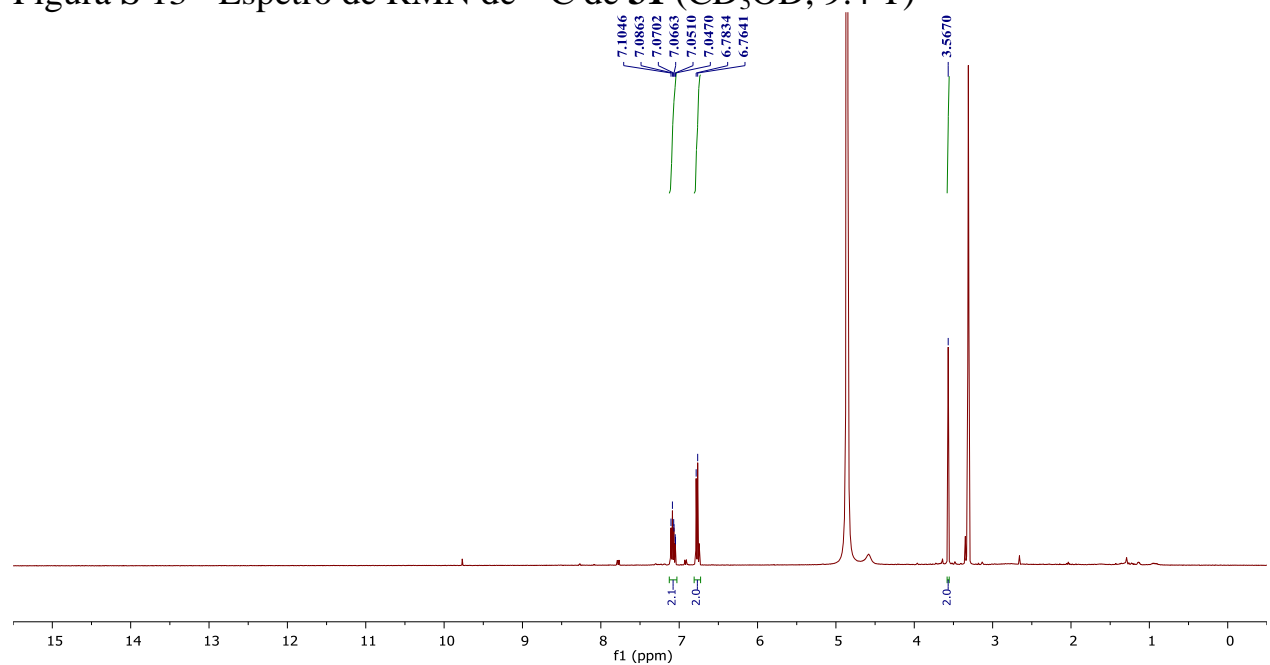


Figura S 12 - Espectro de RMN de ¹H de **31** (CD₃OD, 9.4 T)

Figura S 13 - Espetro de RMN de ^{13}C de **31** (CD_3OD , 9.4 T)Figura S 14 - Espetro de RMN de ^1H de **32** (CD_3OD , 9.4 T)

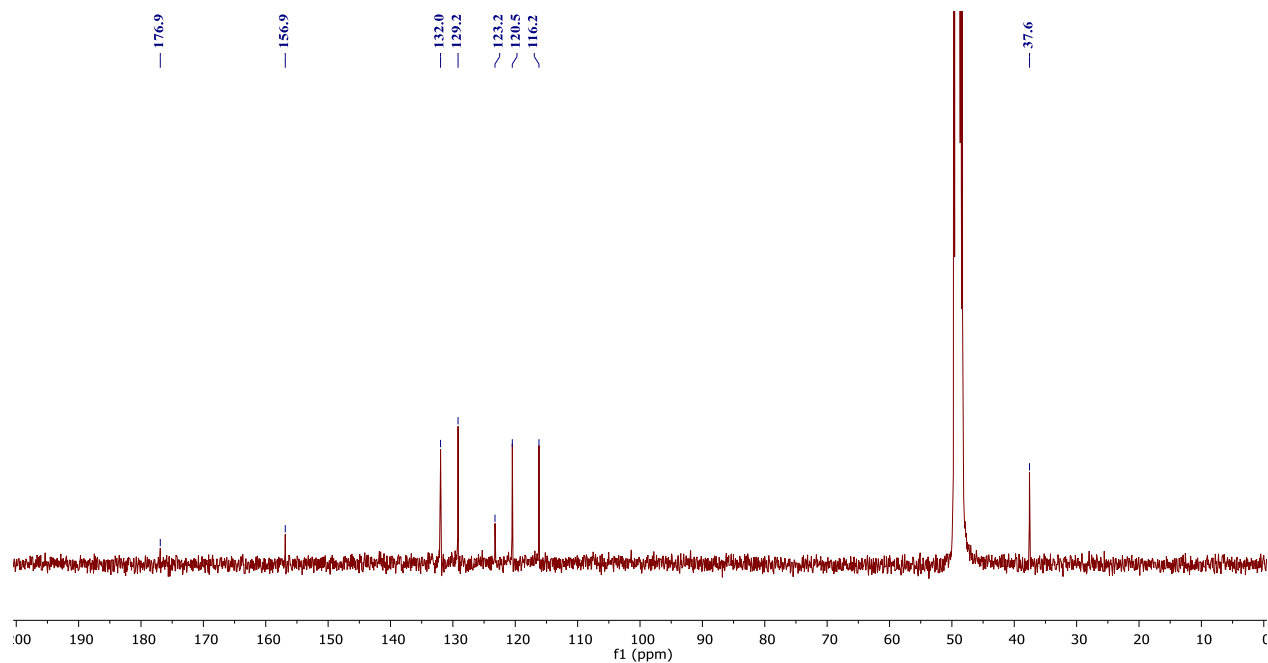


Figura S 15 - Espetro de RMN de ^{13}C de **32** (CD_3OD , 9.4 T)

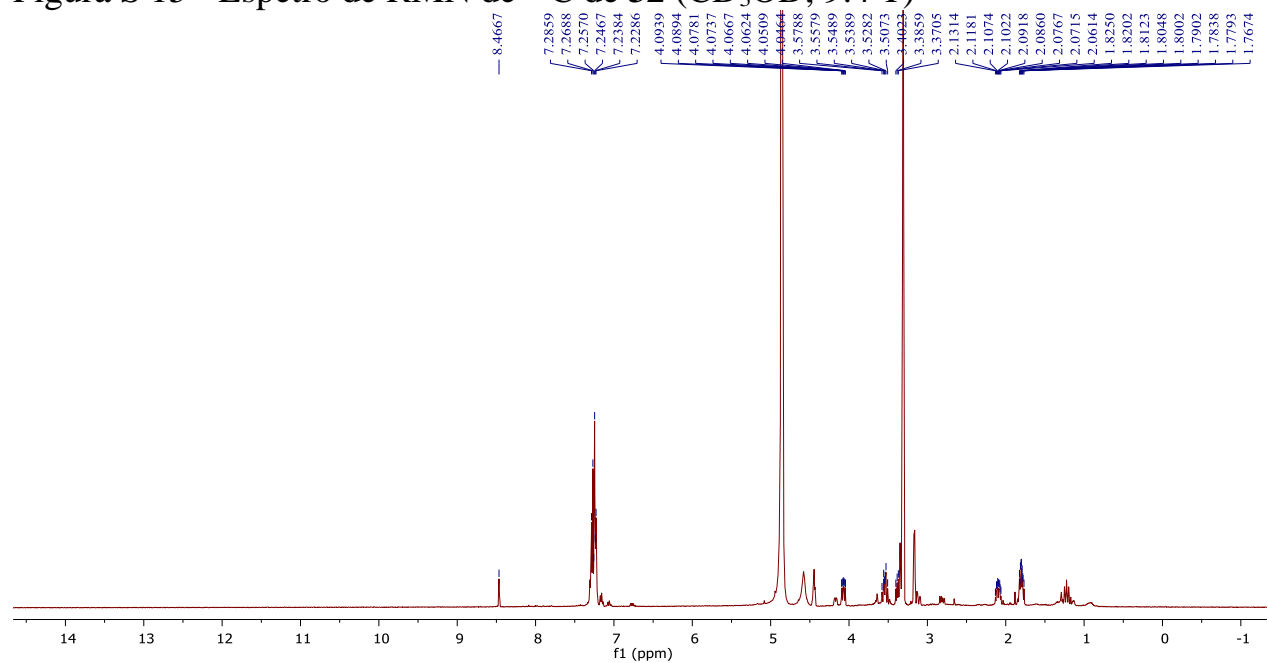


Figura S 16 - Espetro de RMN de ^1H de **30** (CD_3OD , 9.4 T)

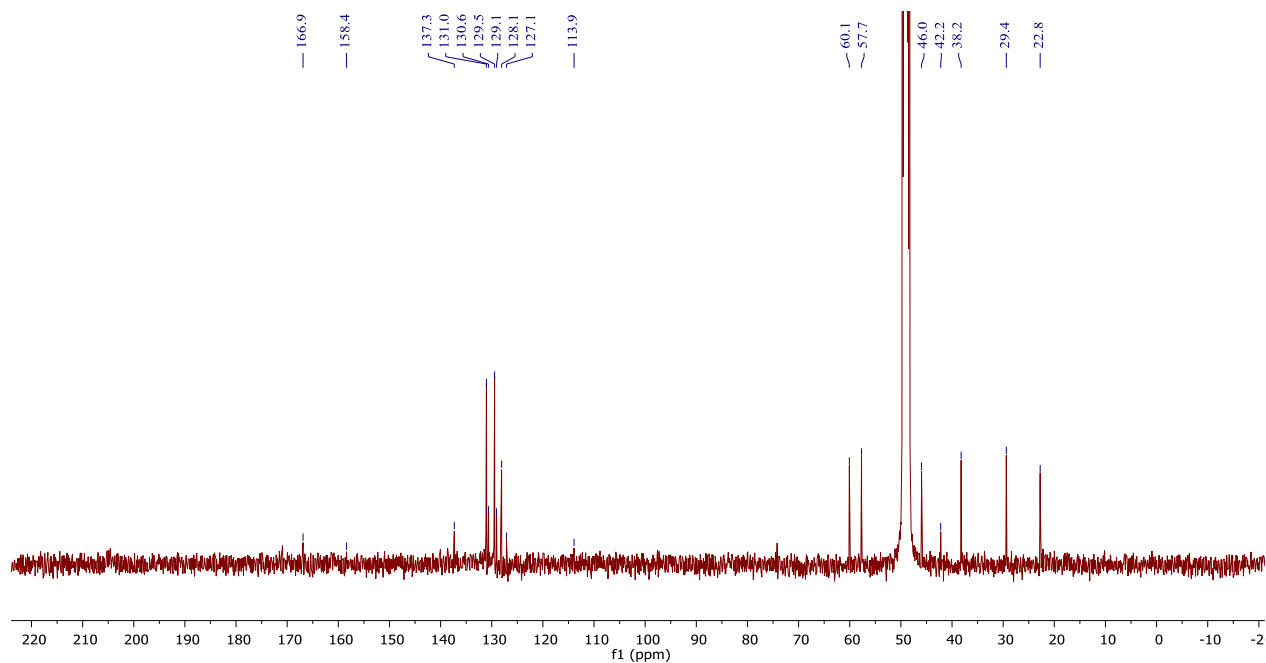


Figura S 17 - Espectro de RMN de ^{13}C de **30** (CD_3OD , 9.4 T)

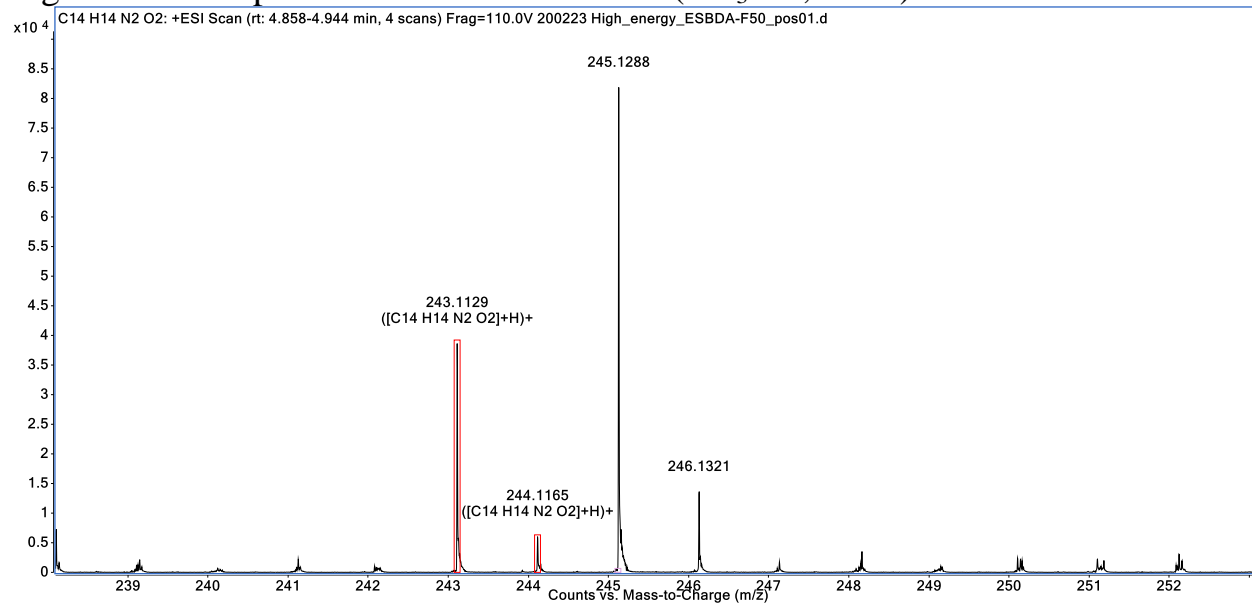
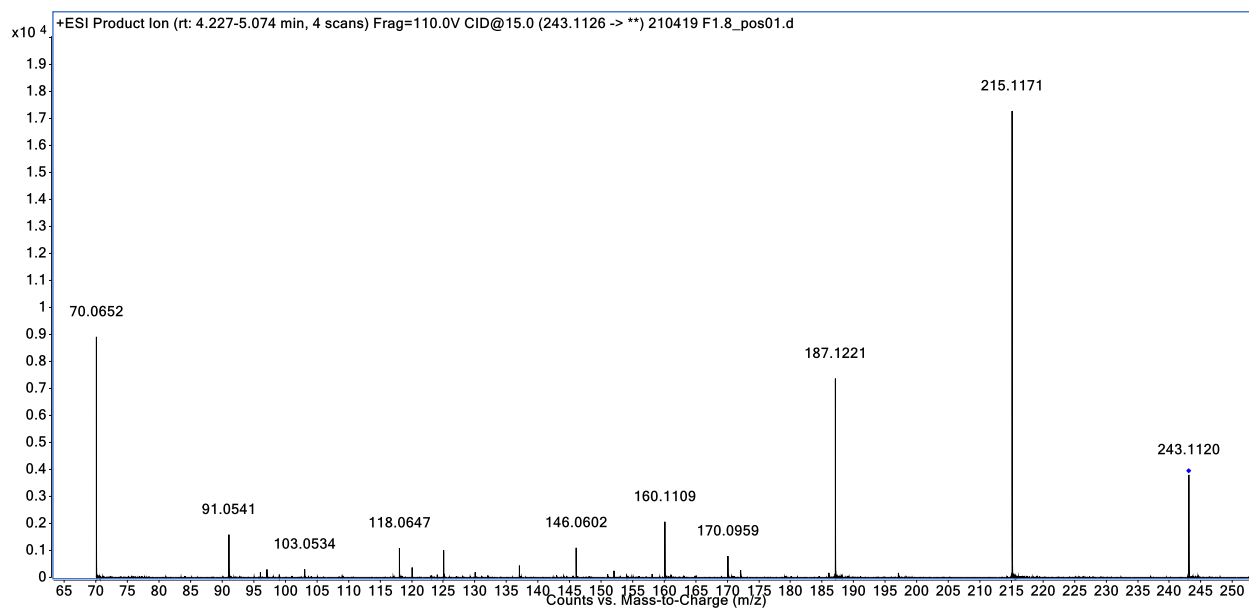
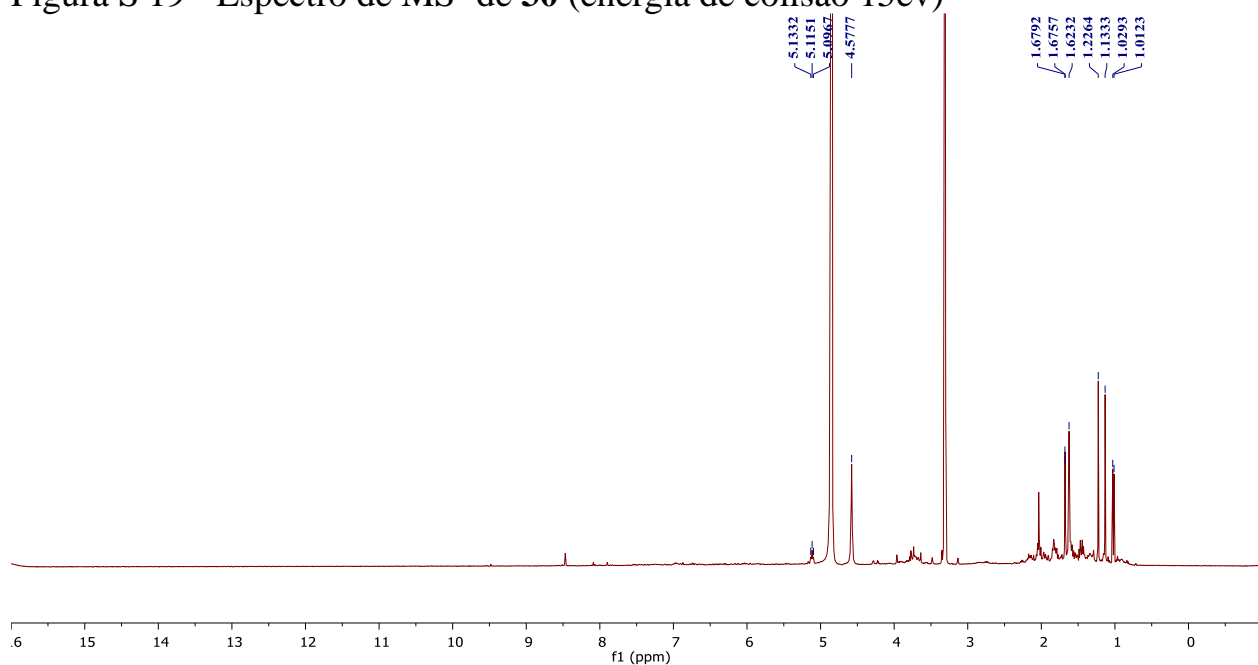


Figura S 18 - Espectro de MS^1 de **30** (erro de 0.4 ppm)

Figura S 19 - Espectro de MS² de **30** (energia de colisão 15ev)Figura S 20 - Espectro de RMN de ¹H de **18** (CD₃OD, 9.4 T)

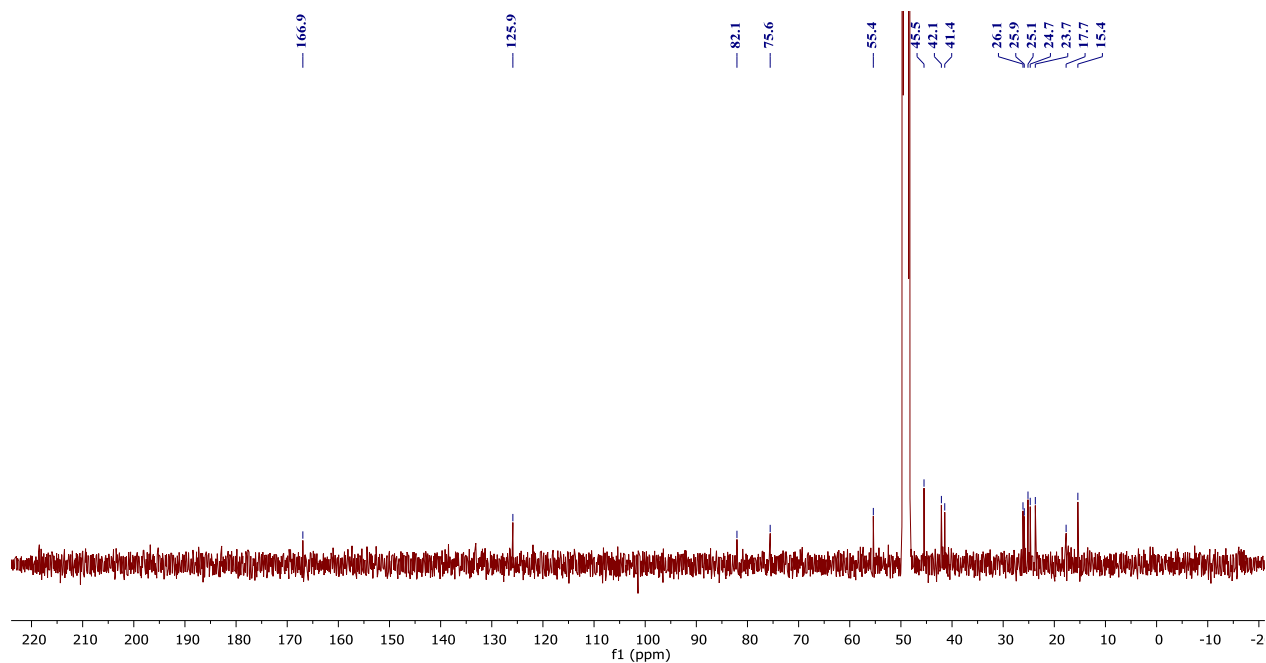


Figura S 21 - Espectro de RMN de ^{13}C de **18** (CD_3OD , 9.4 T)

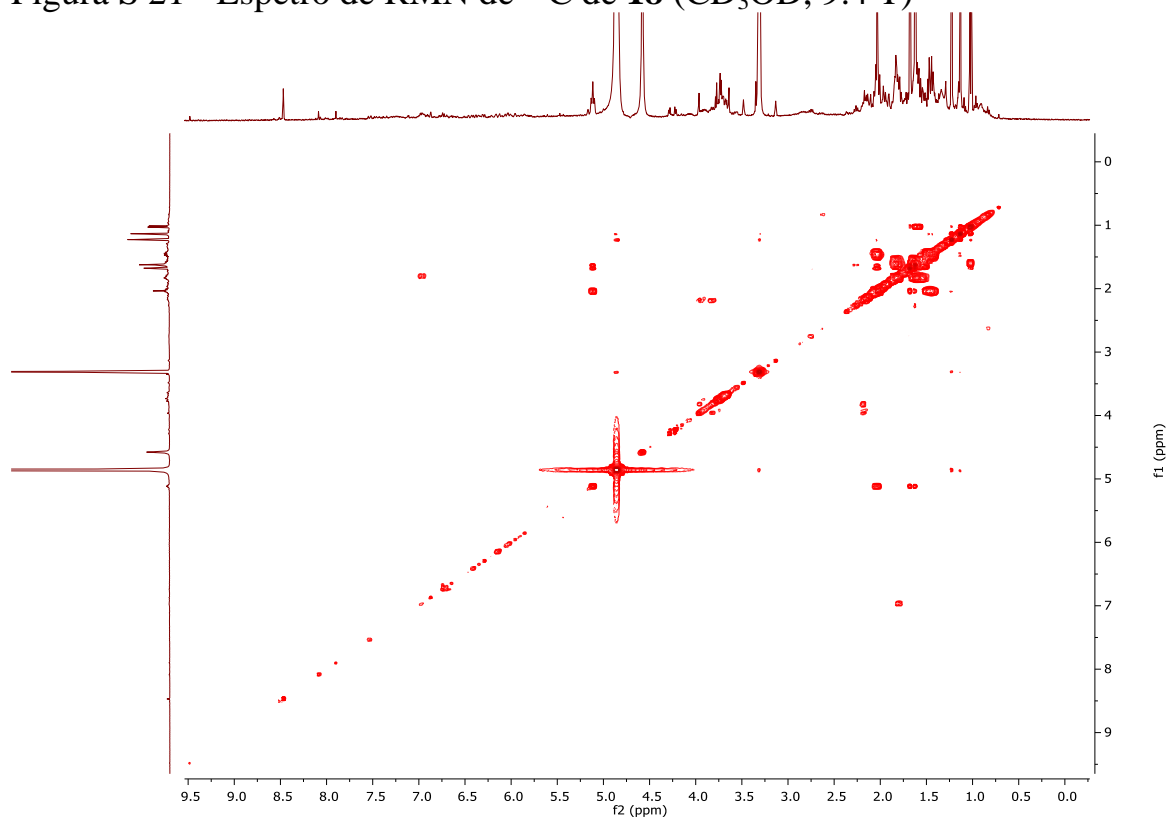


Figura S 22 - Mapa de contornos COSY de **18** (CD_3OD , 9.4 T)

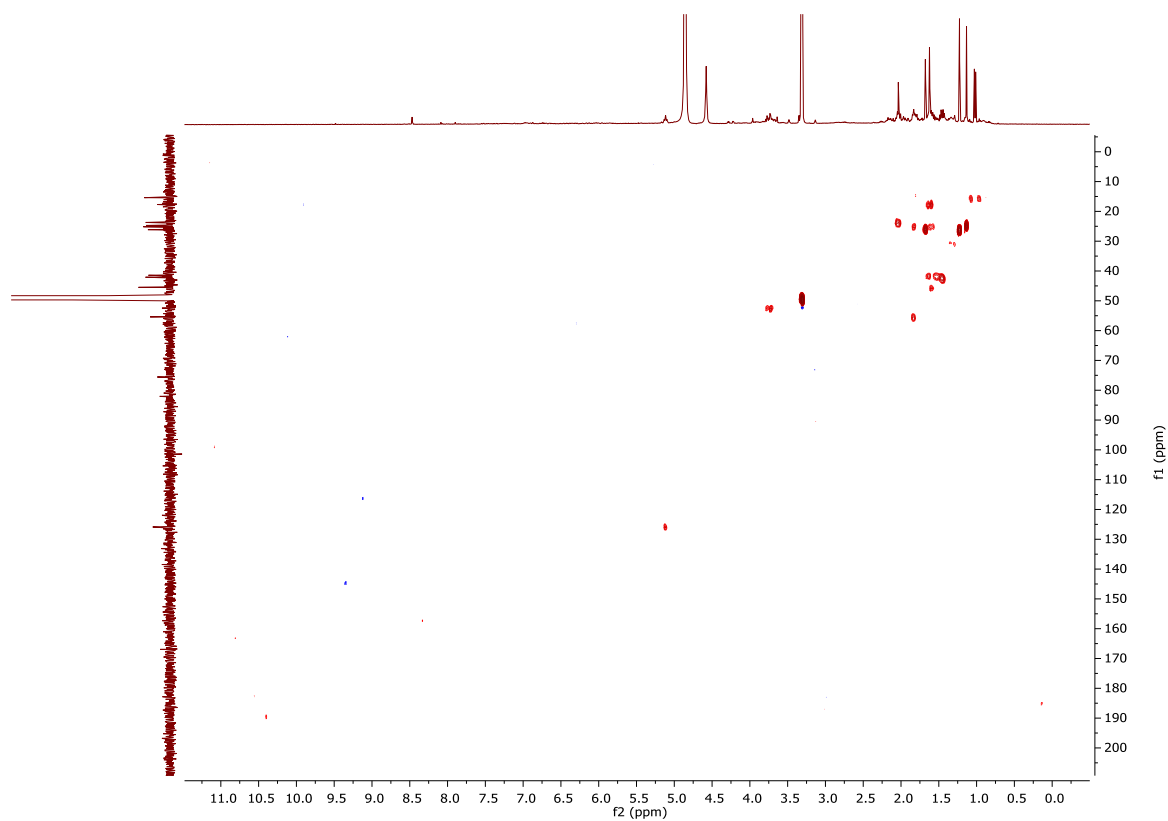


Figura S 23 - Mapa de contornos HSQC de **18** (CD₃OD, 9.4 T)

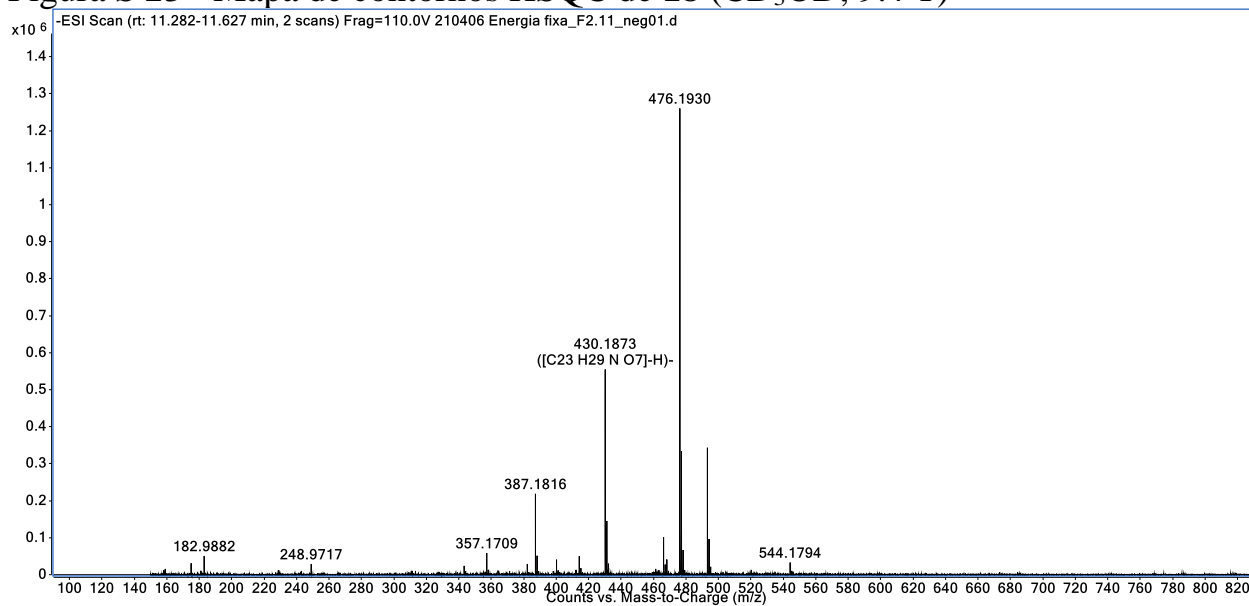


Figura S 24 - Espectro de MS¹ de **18** (erro de 0.5 ppm)

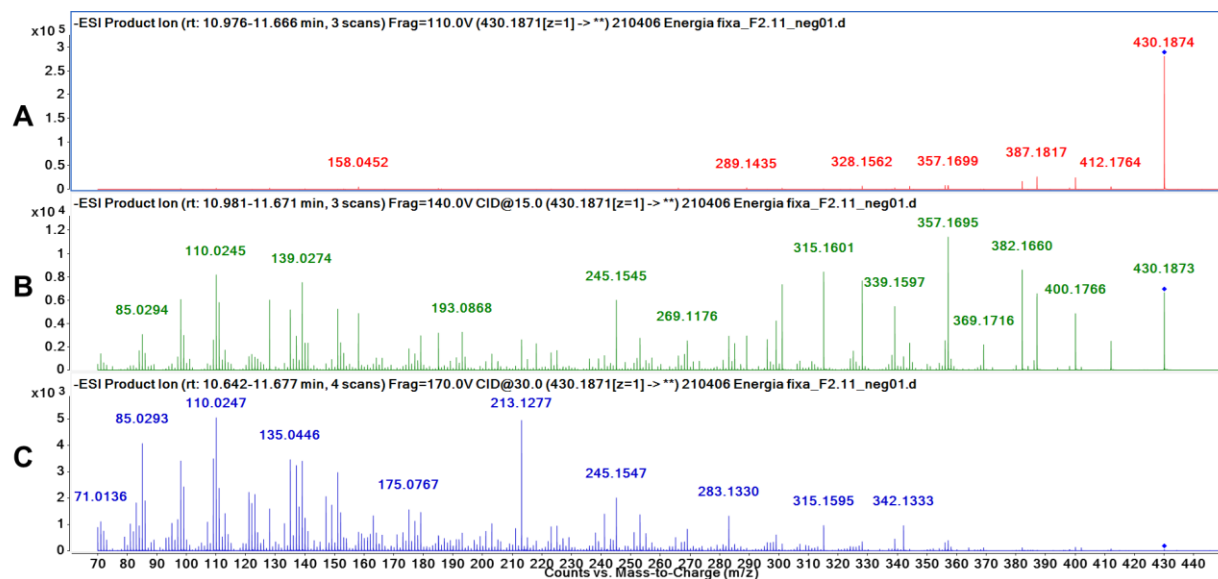


Figura S 25 - Espero de MS² de **18**, [M-H]⁻ = 430.1874, usando energia de colisão de 0 eV (A), 15 eV (B), e 30 eV (C).

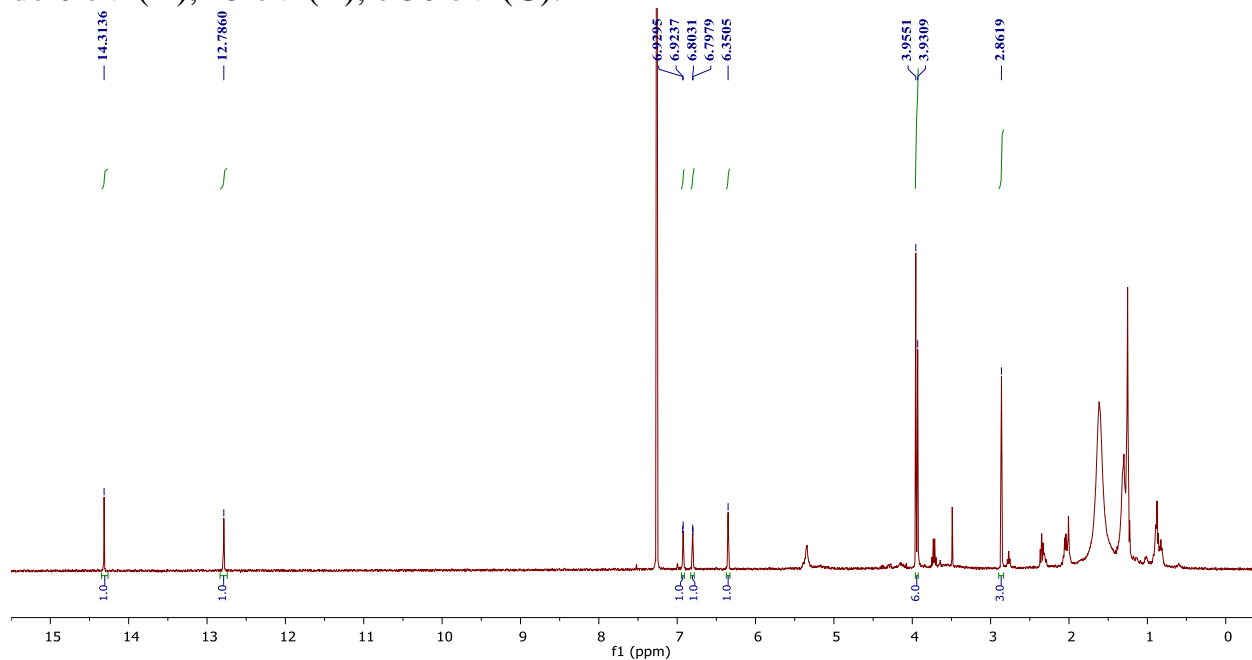


Figura S 26 - Espectro de RMN de ¹H de **15** (CDCl₃, 9.4 T)

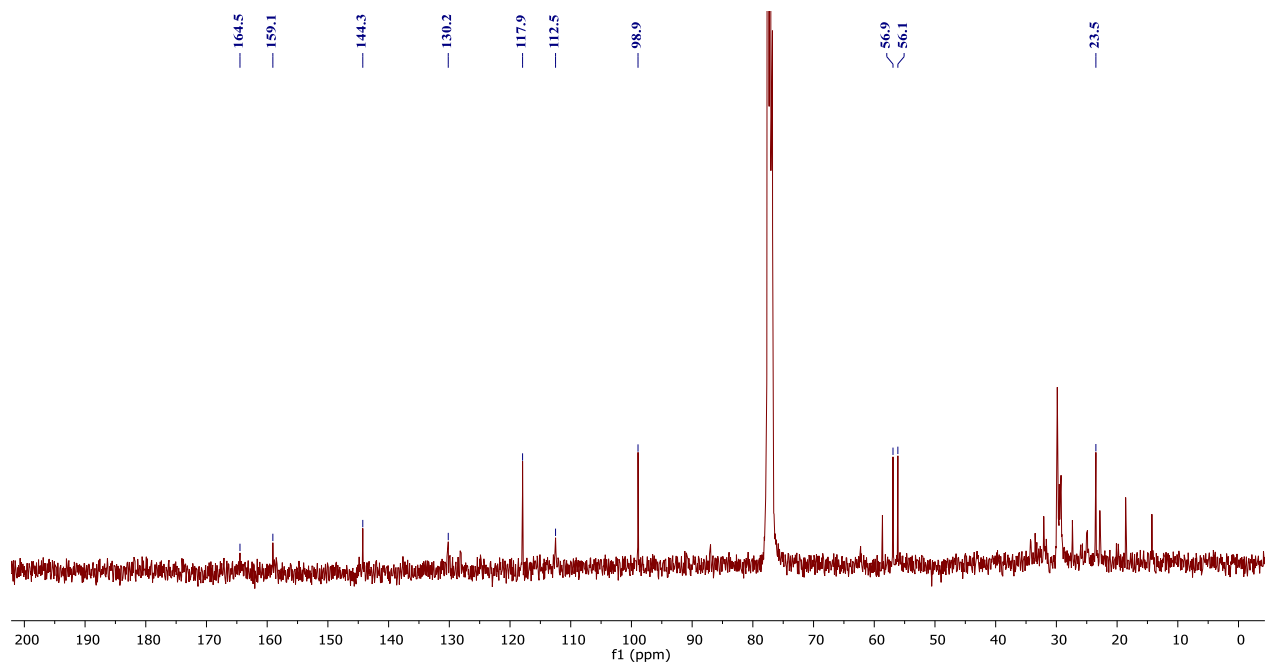


Figura S 27 - Espectro de RMN de ^{13}C de **15** (CDCl_3 , 9.4 T)

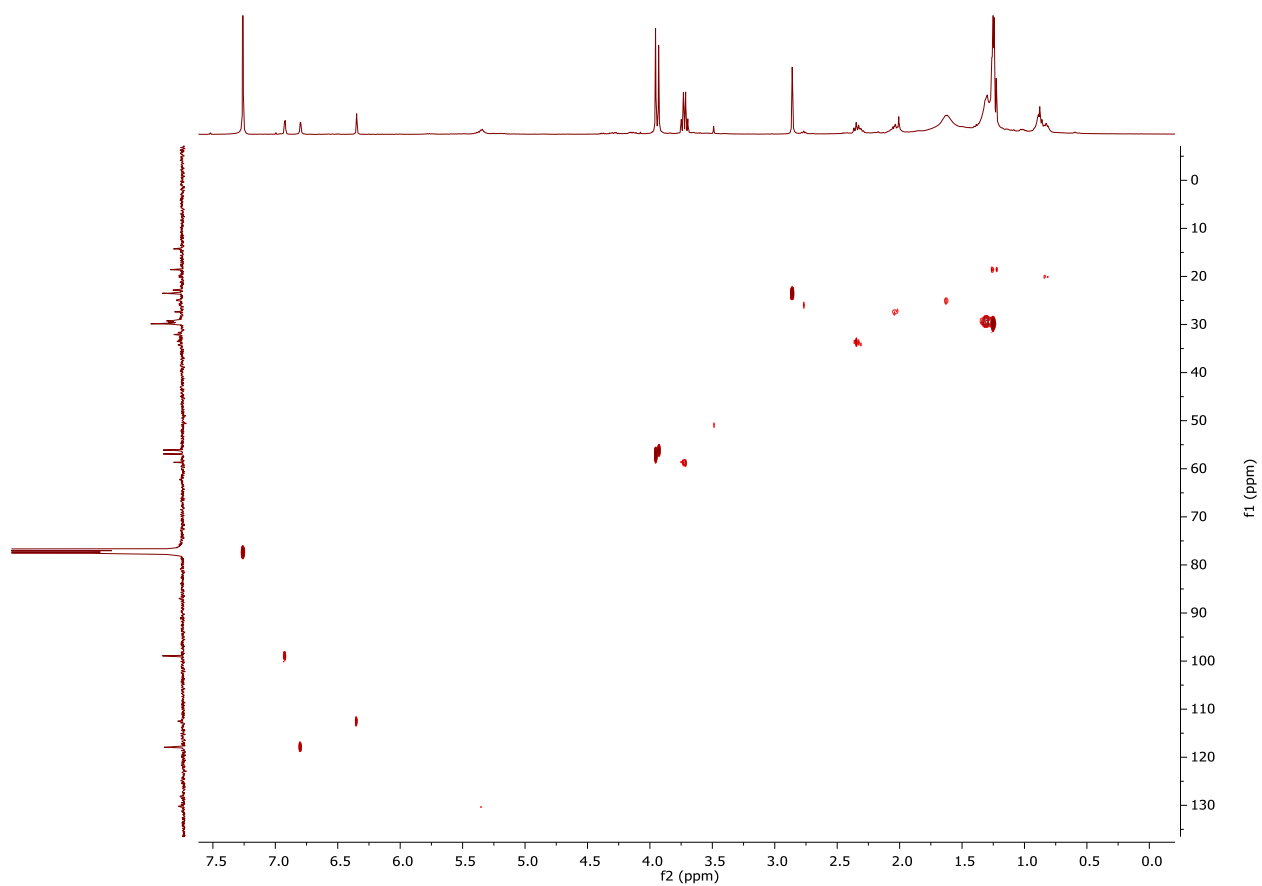


Figura S 28 - Mapa de contornos HSQC de **15** (CDCl_3 , 9.4 T)

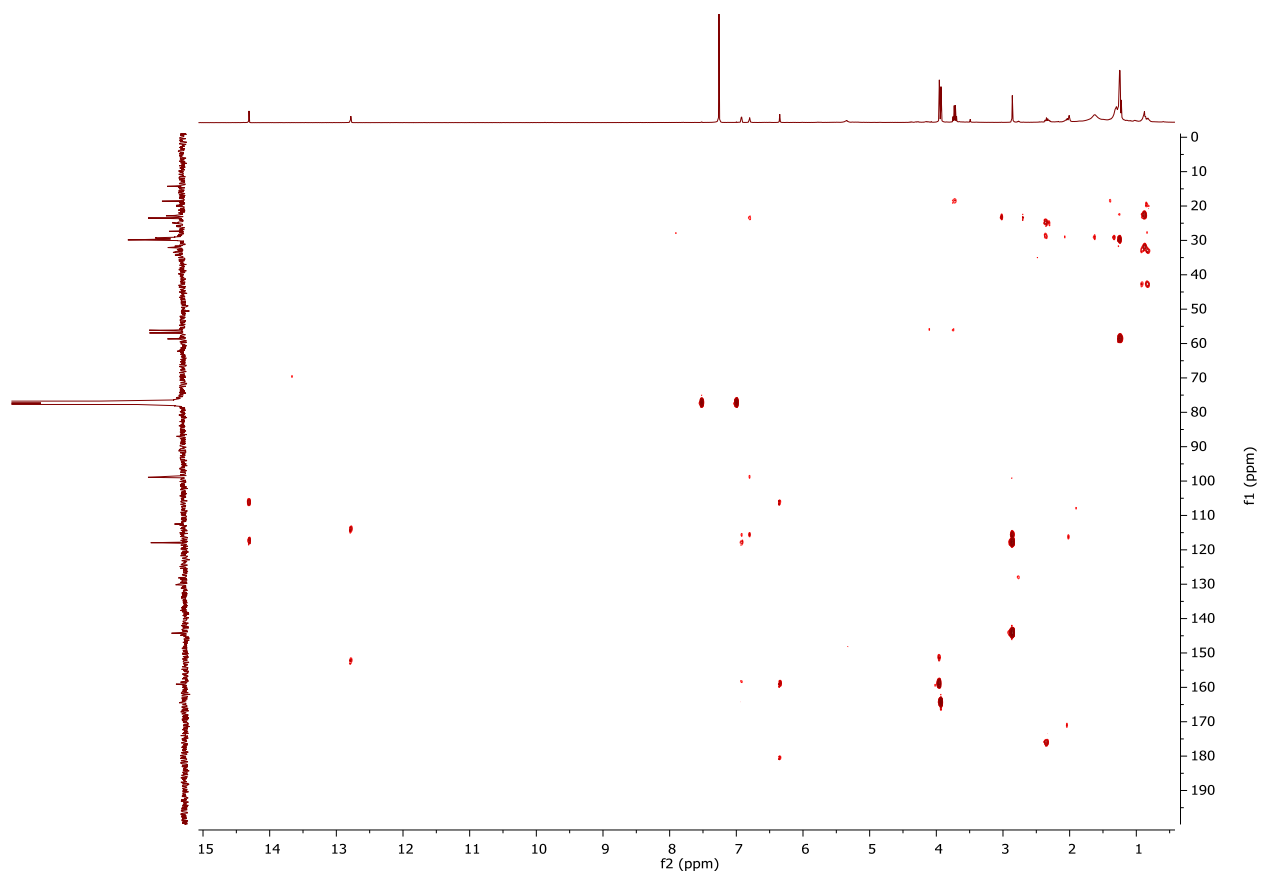


Figura S 29 - Mapa de contornos HMBC de **15** (CDCl₃, 9.4 T).

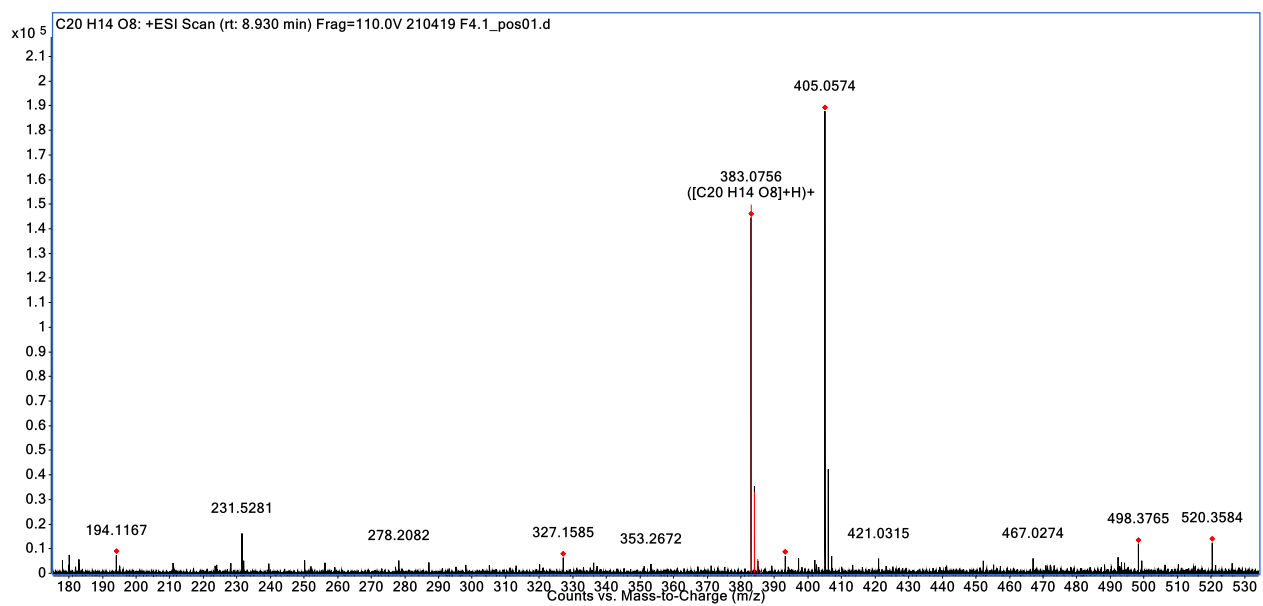
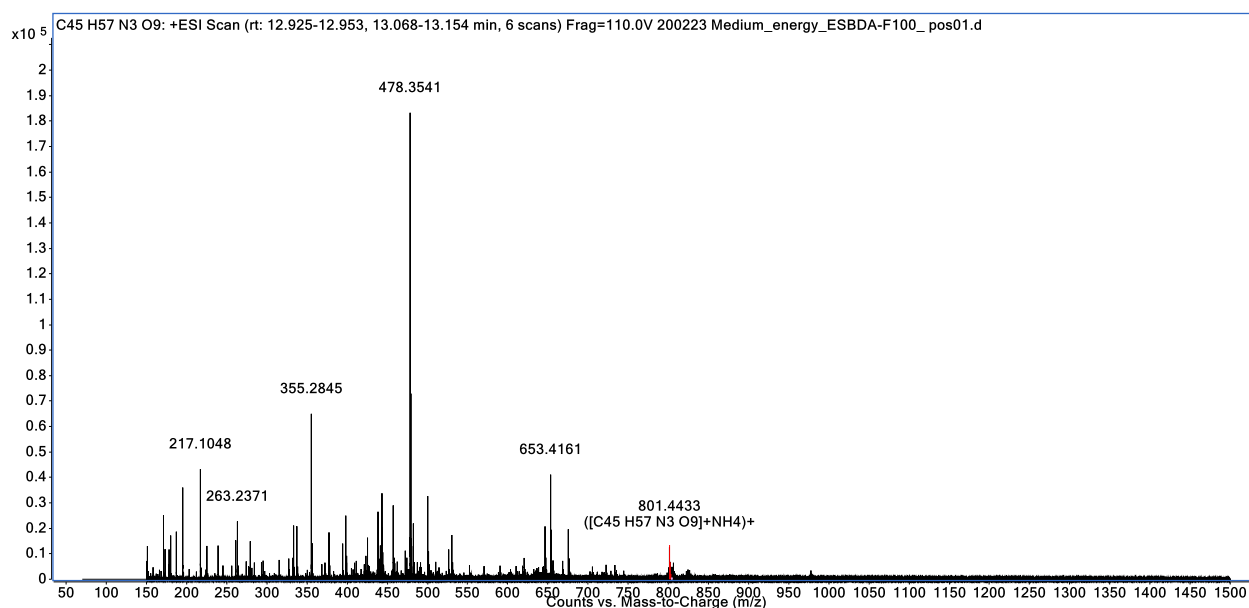


Figura S 30 – Espectro de massas HRMS da substância **15** (erro: 1.0 ppm)Figura S 31 – Espectro de MS^2 de **15**, $[M+H]^+ = 383.0756$, usando energia de colisão de 15 eV (A), 25 eV (B), 40 eV (C) e 60 eV (D).Figura S 32 - Espectro de massas MS^1 de beauvericina (**19**) (erro: 0.8 ppm)

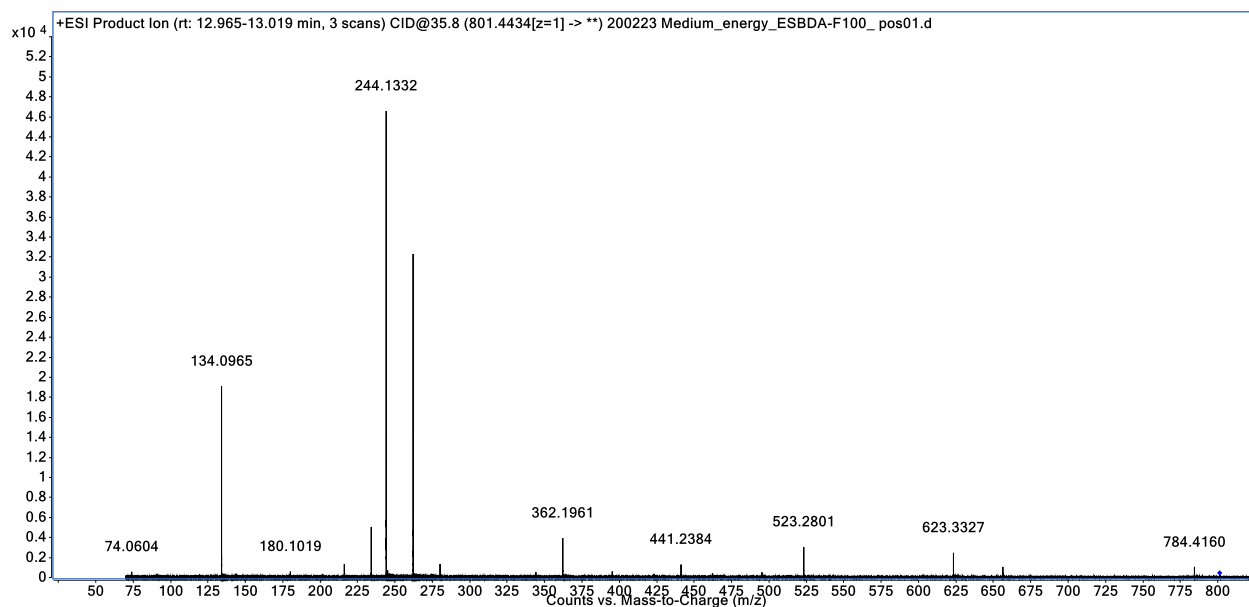


Figura S 33 - Espectro de massas MS² de beauvericina (**19**) (energia de colisão: 35.8 eV)

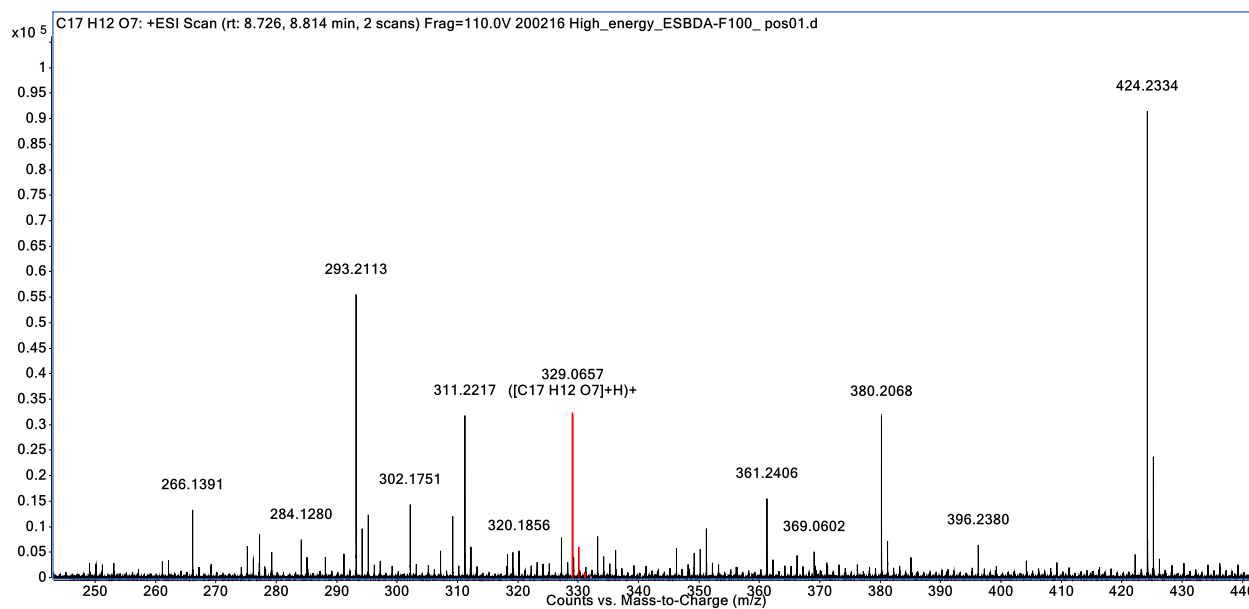


Figura S 34 - Espectro de massas MS¹ de (**22**) (erro: 1.2 ppm)

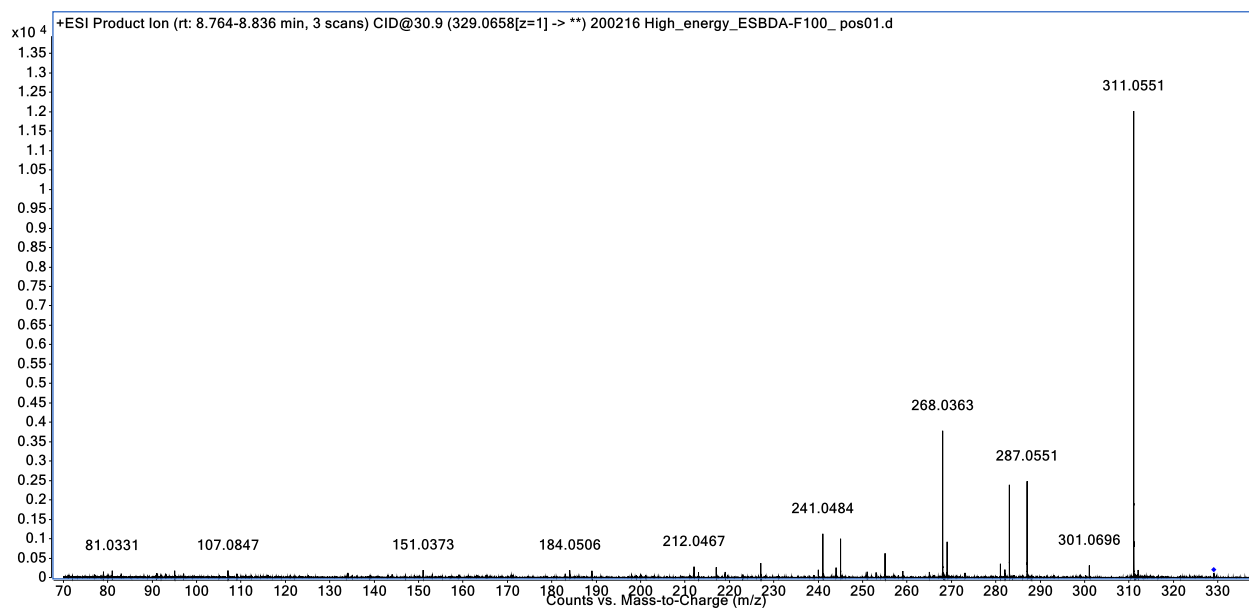


Figura S 35 - Espectro de massas MS^2 de **(22)** (energia de colisão: 30.9 eV)

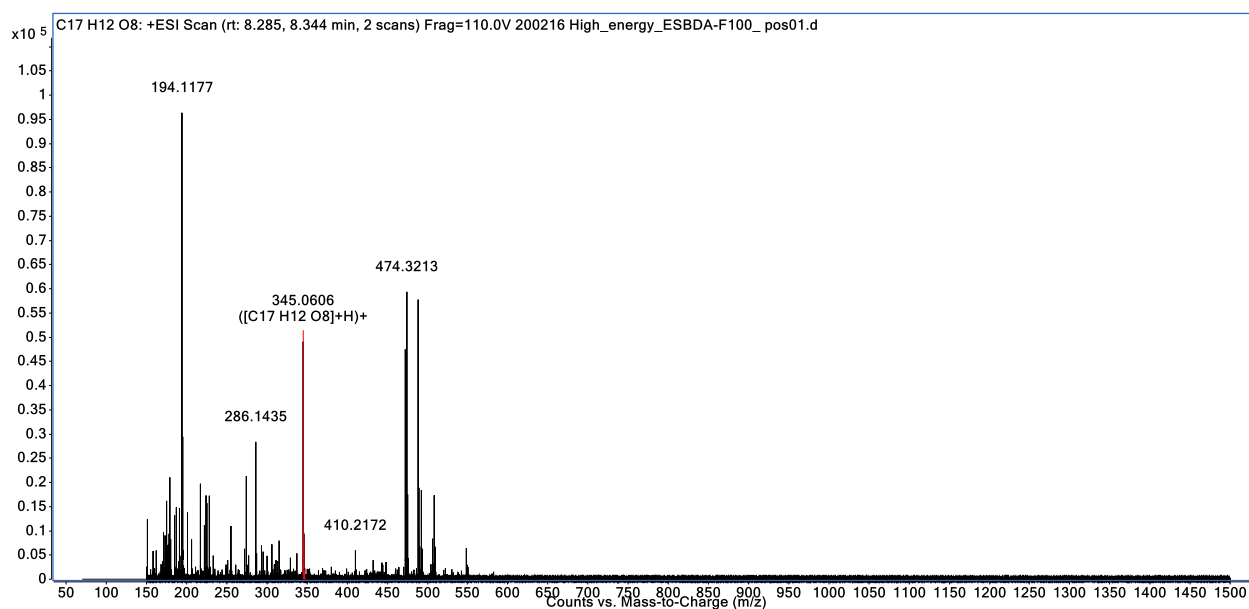


Figura S 36 - Espectro de massas MS^1 de **(23)** (erro: -1.2 ppm)

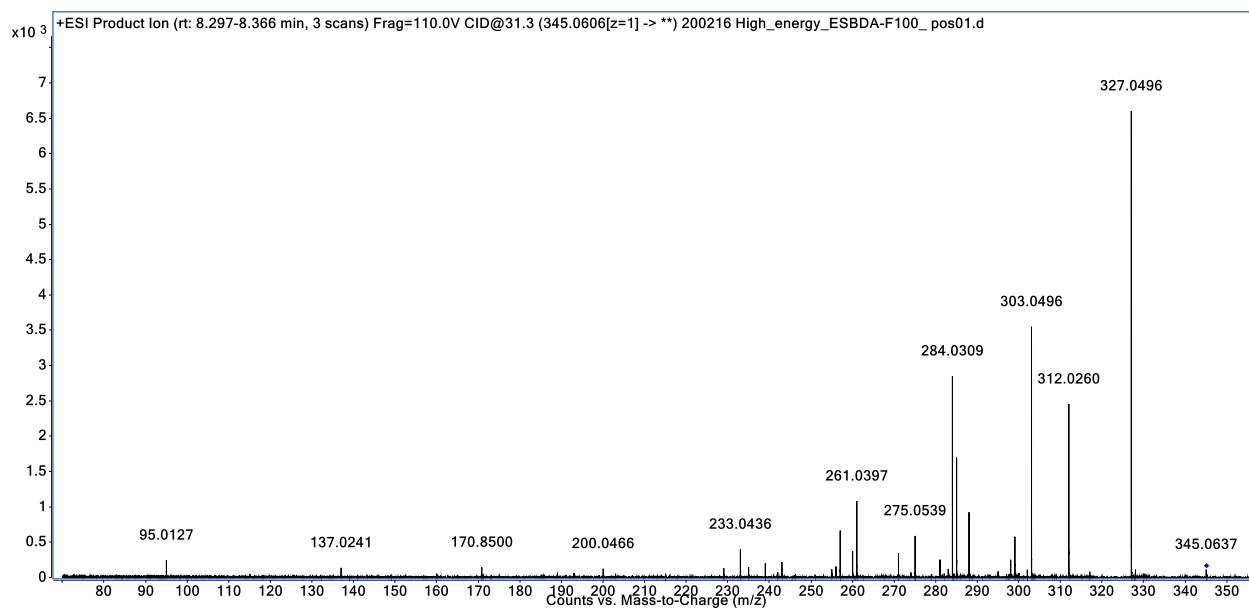


Figura S 37 - Espectro de massas MS² de **(23)** (energia de colisão: 31.3 eV)

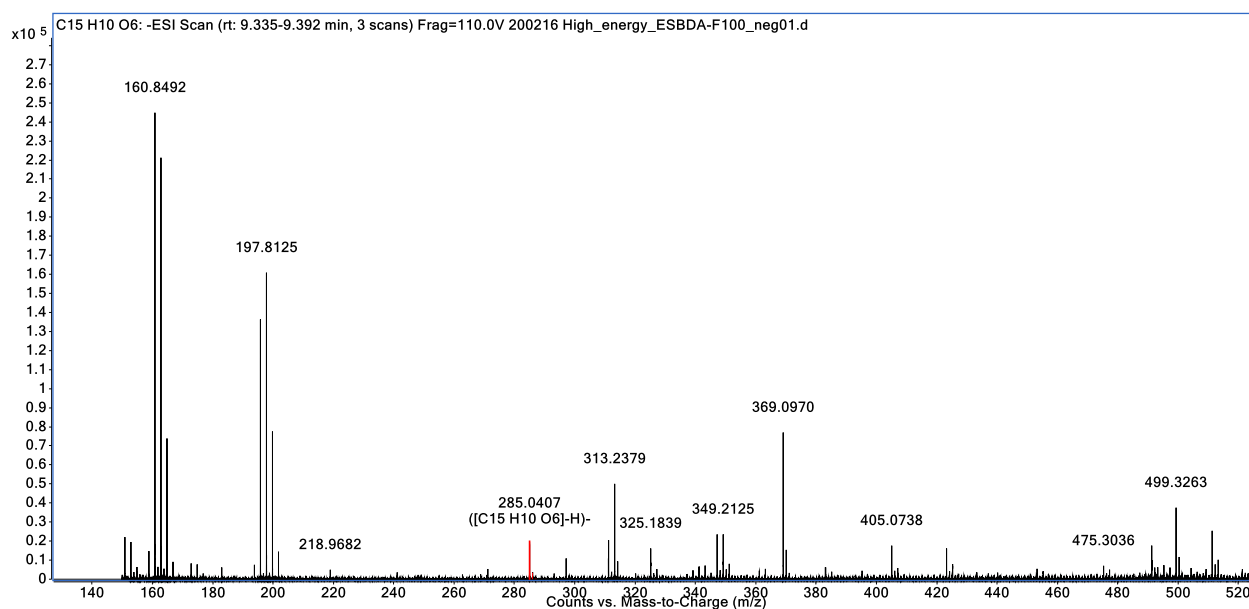


Figura S 38 - Espectro de massas MS¹ de **(24)** (erro: 2.8 ppm)

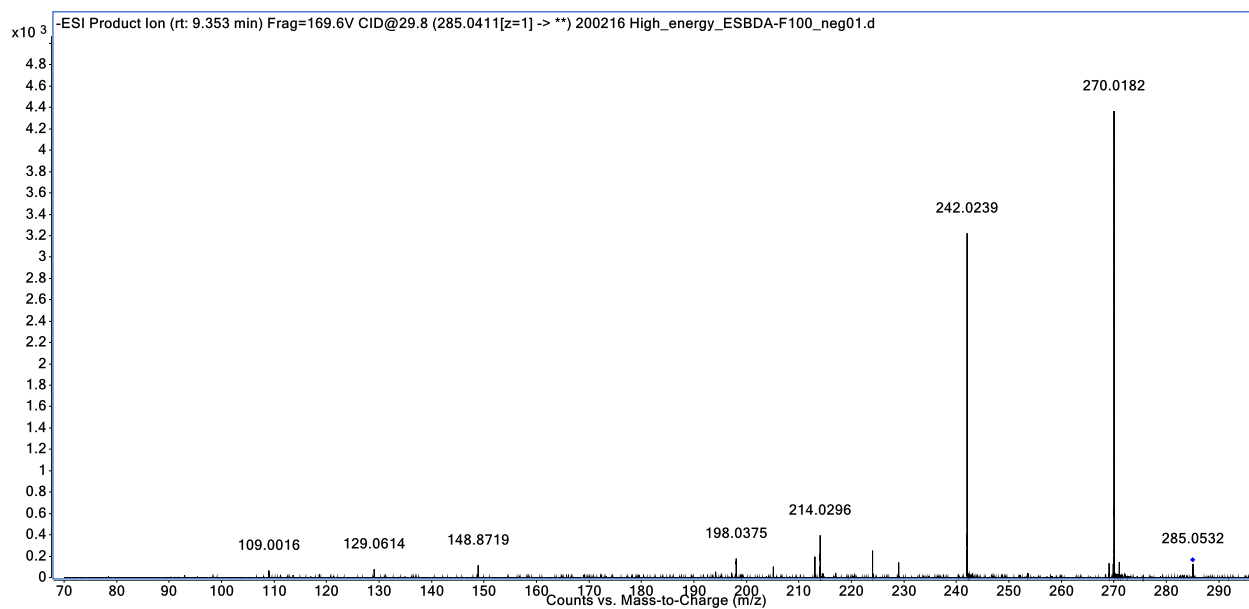


Figura S 39 - Espectro de massas MS² de (**24**) (energia de colisão: 29.8 eV)

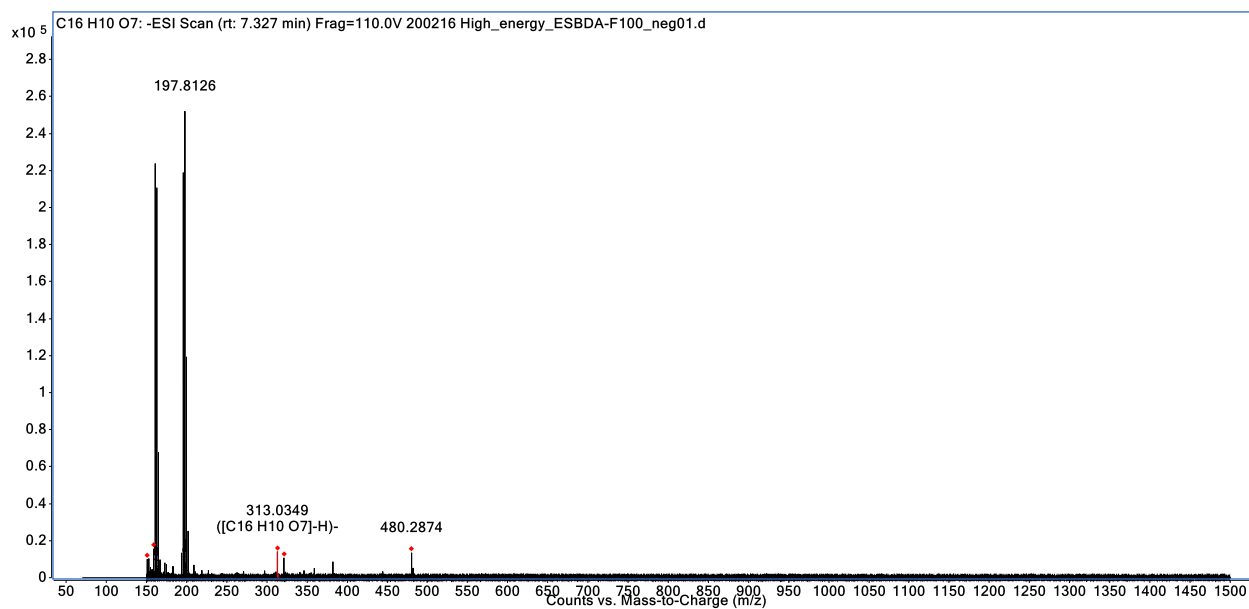


Figura S 40 - Espectro de massas MS¹ de (**25**) (erro: -0.3 ppm)

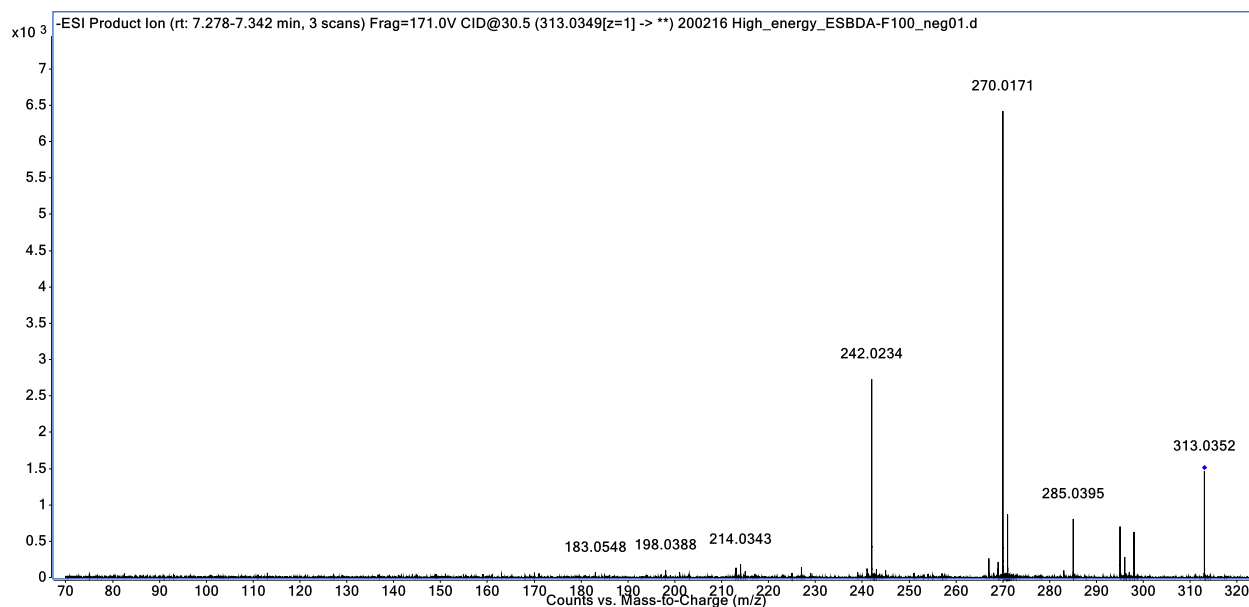


Figura S 41 - Espectro de massas MS² de (25) (energia de colisão: 30.5 eV)

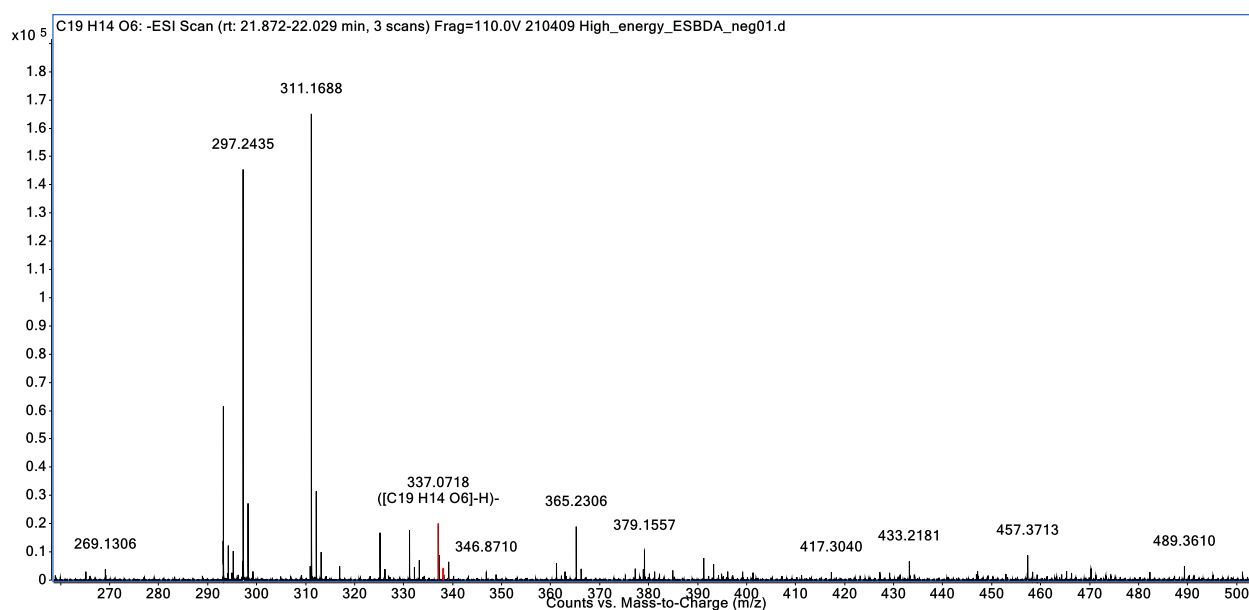


Figura S 42 - Espectro de massas MS¹ de (26) (erro: 1.8 ppm)

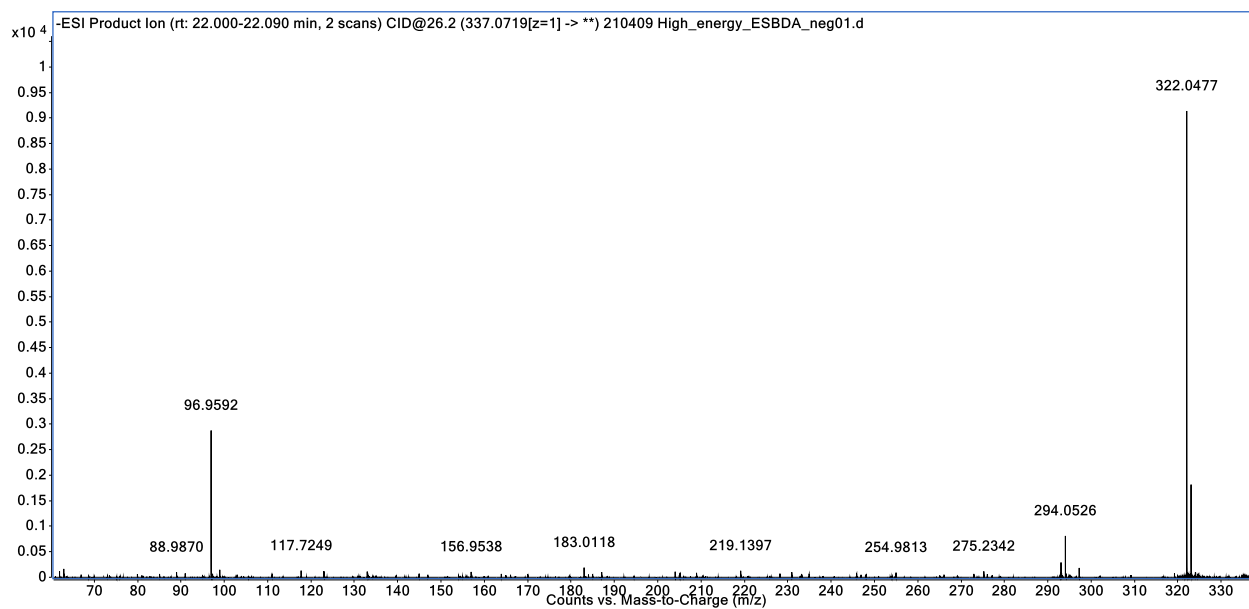


Figura S 43 - Espectro de massas MS^2 de (**26**) (energia de colisão: 26.2 eV)

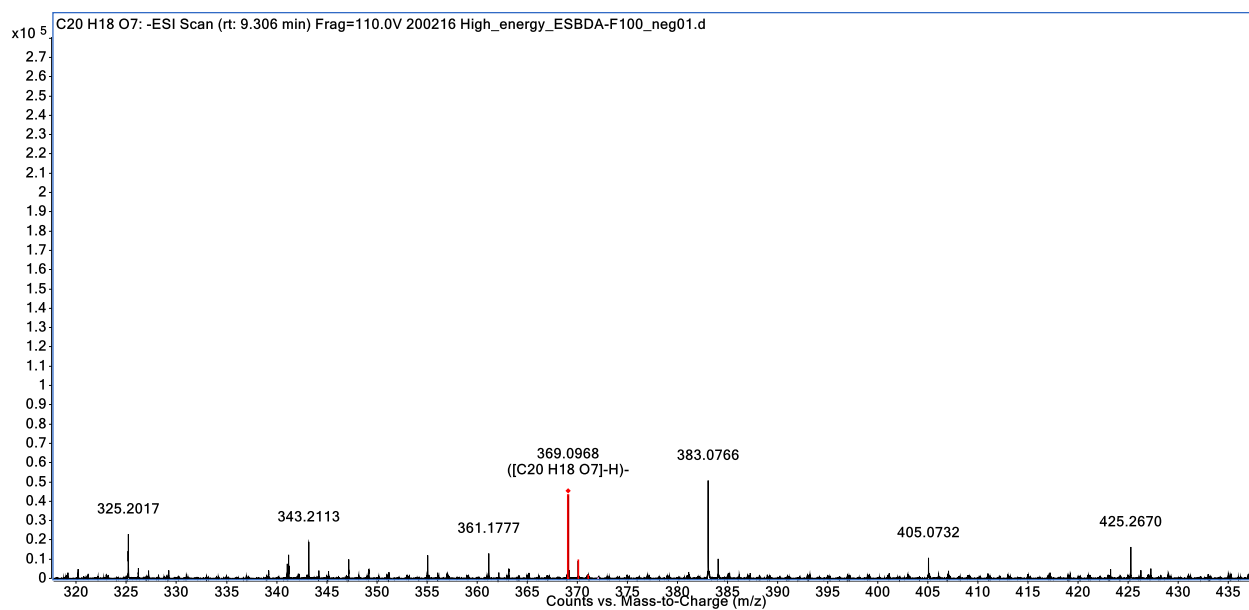


Figura S 44 - Espectro de massas MS^1 de (**27**) (erro: -1.6 ppm)

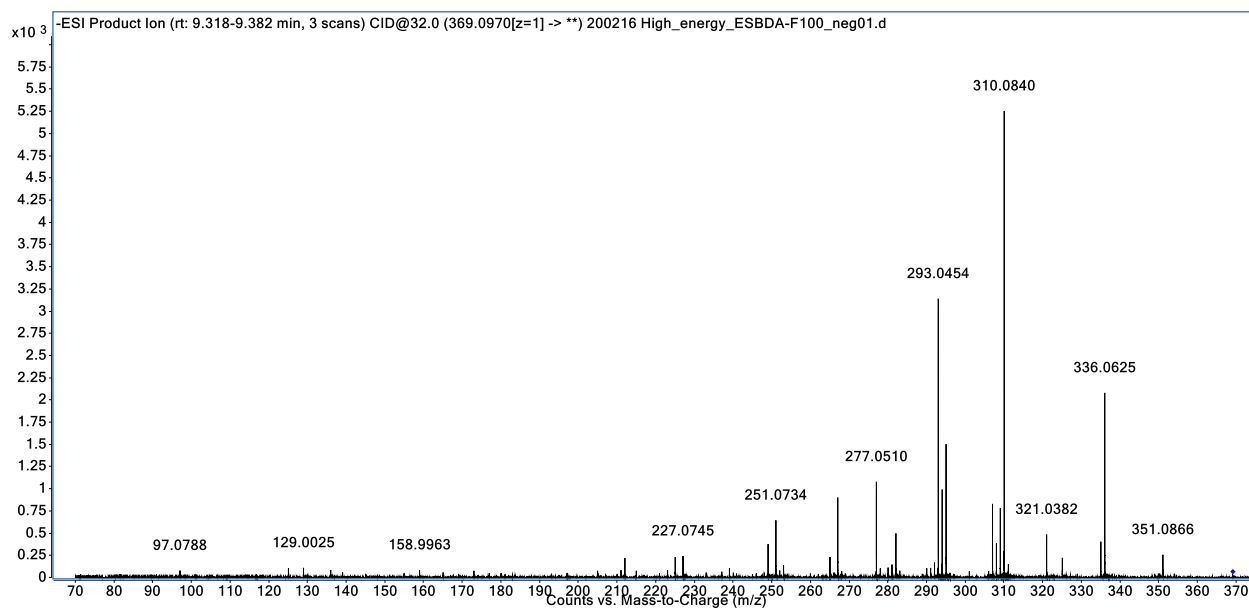


Figura S 45 - Espectro de massas MS² de (**27**) (energia de colisão: 32.0 eV)

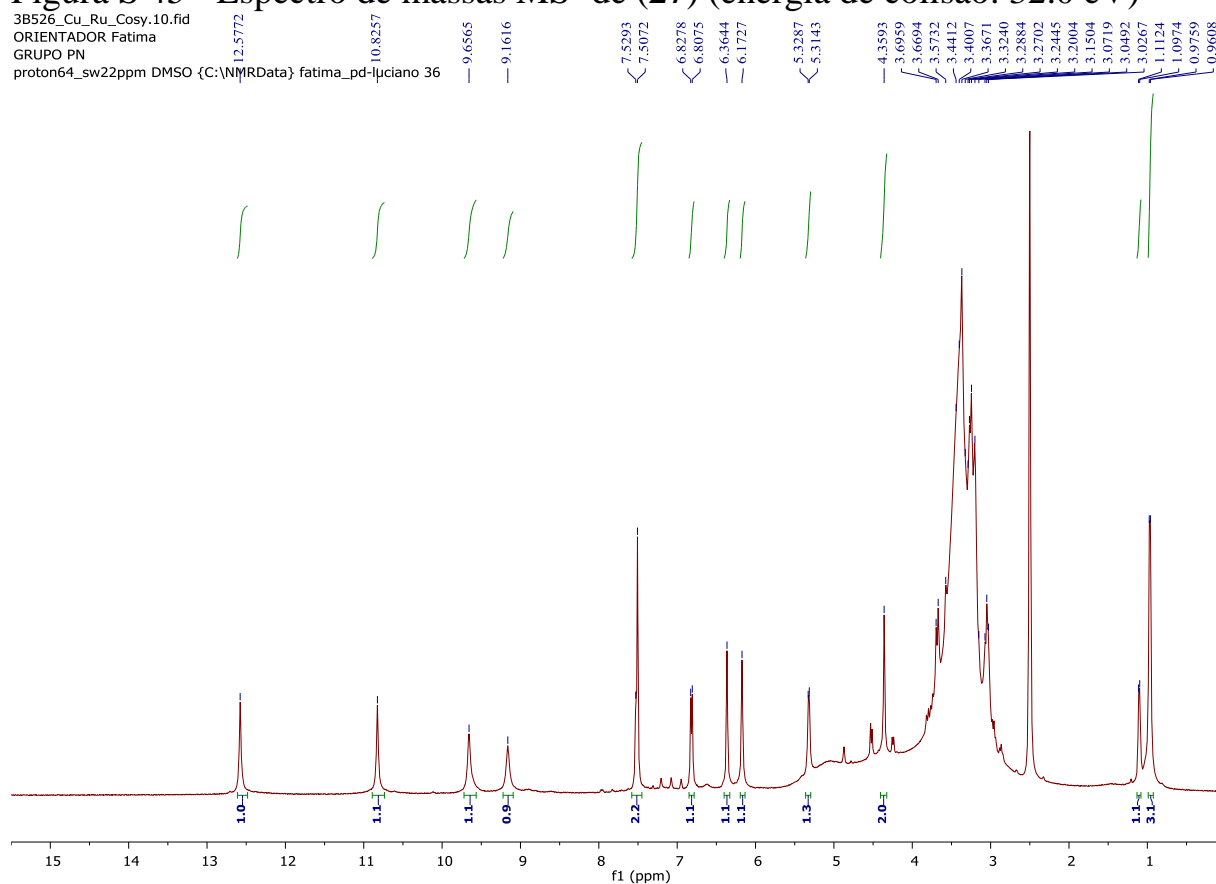


Figura S 46 - Espectro de RMN de ¹H do complexo **35** Rutina com cobre (DMSO-*d*₆, 9.4 T).

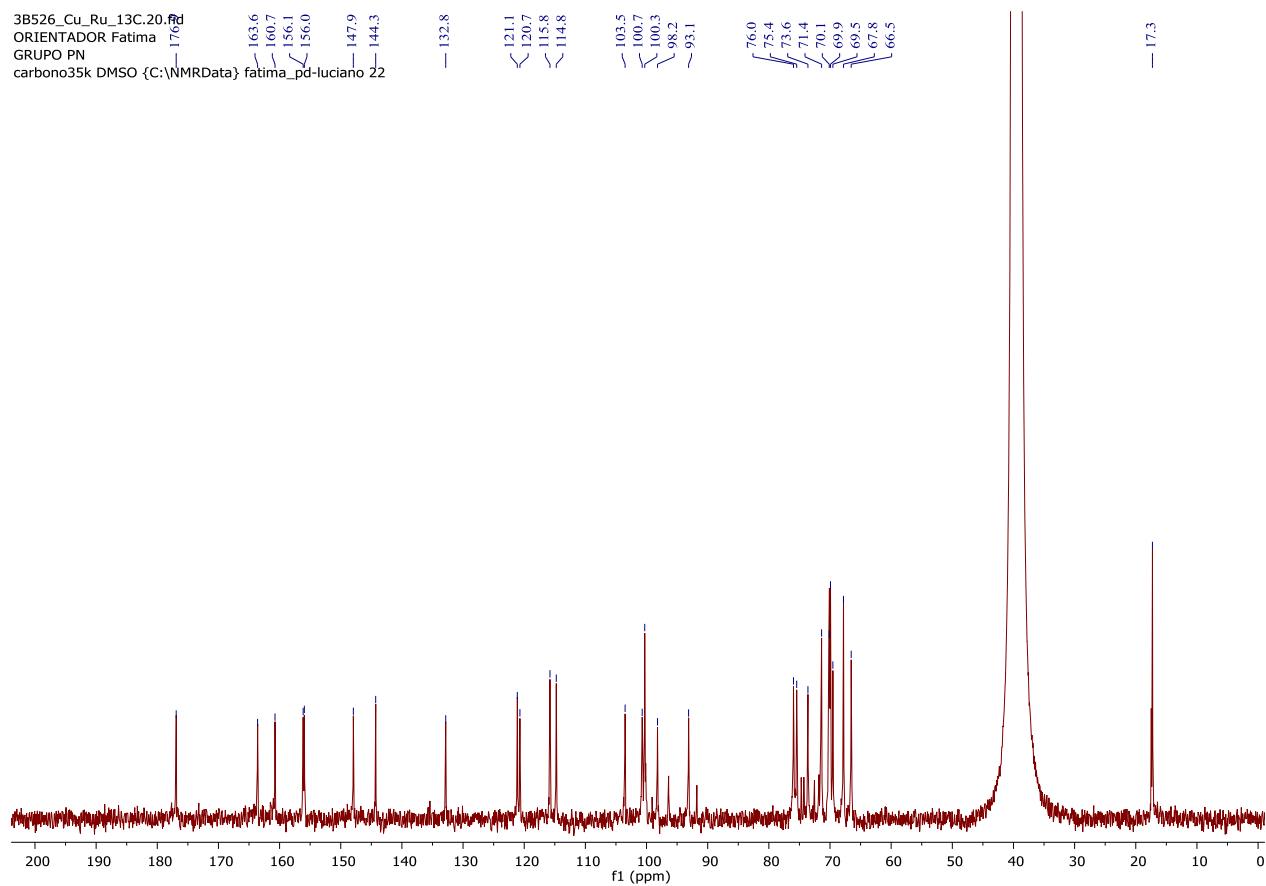


Figura S 47 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **35** Rutina com cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T).

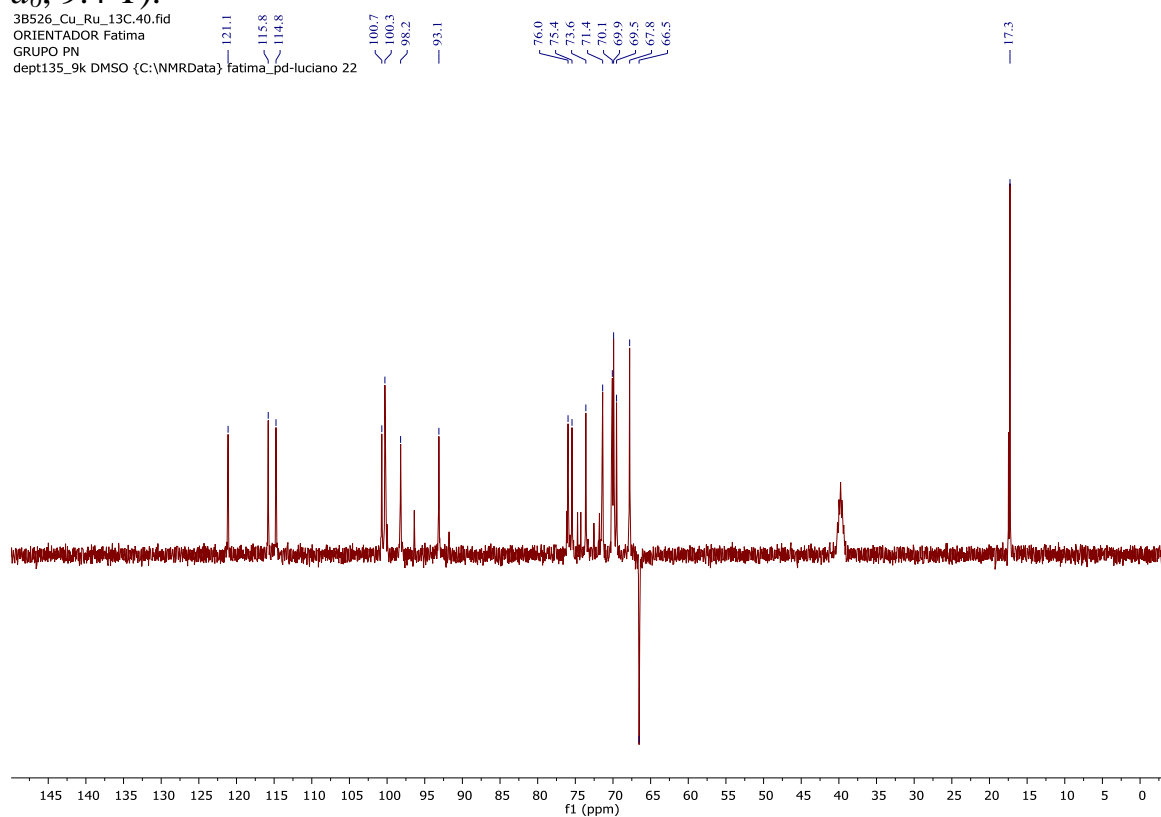


Figura S 48 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **35** Rutina com cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T).

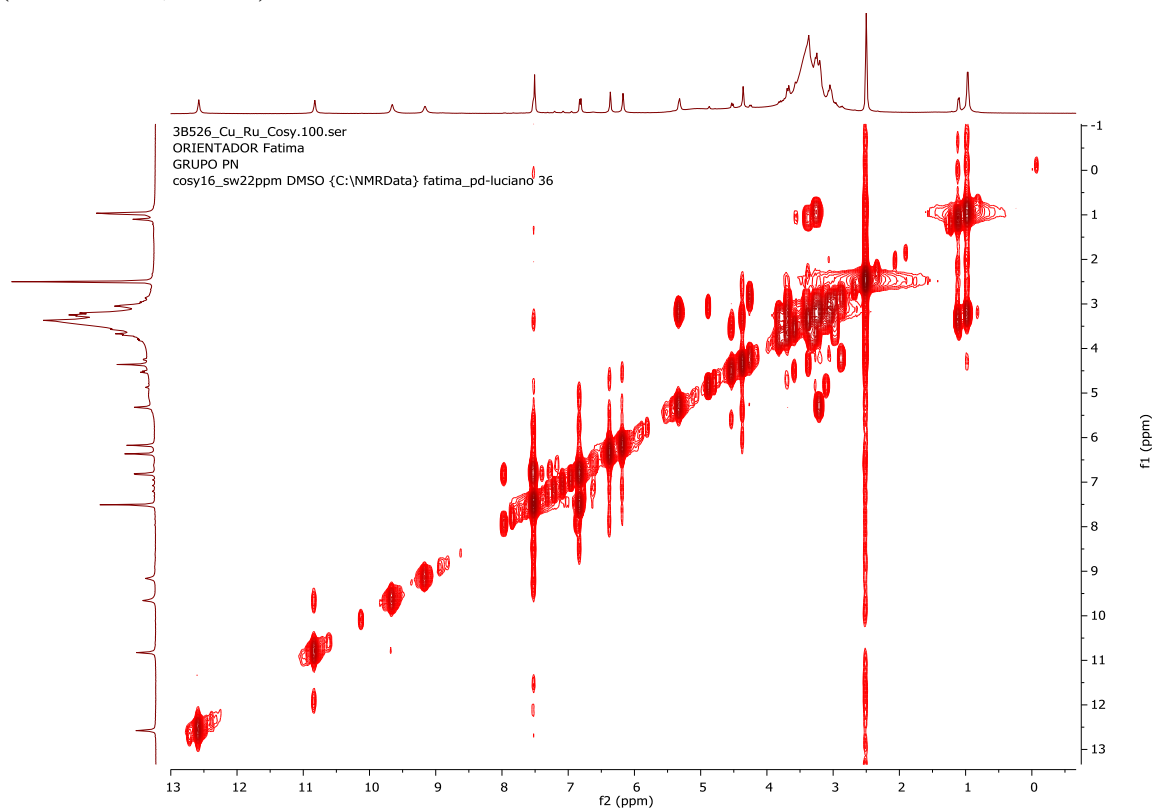


Figura S 49 - Mapa de contornos COSY do complexo **35** Rutina com cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T)

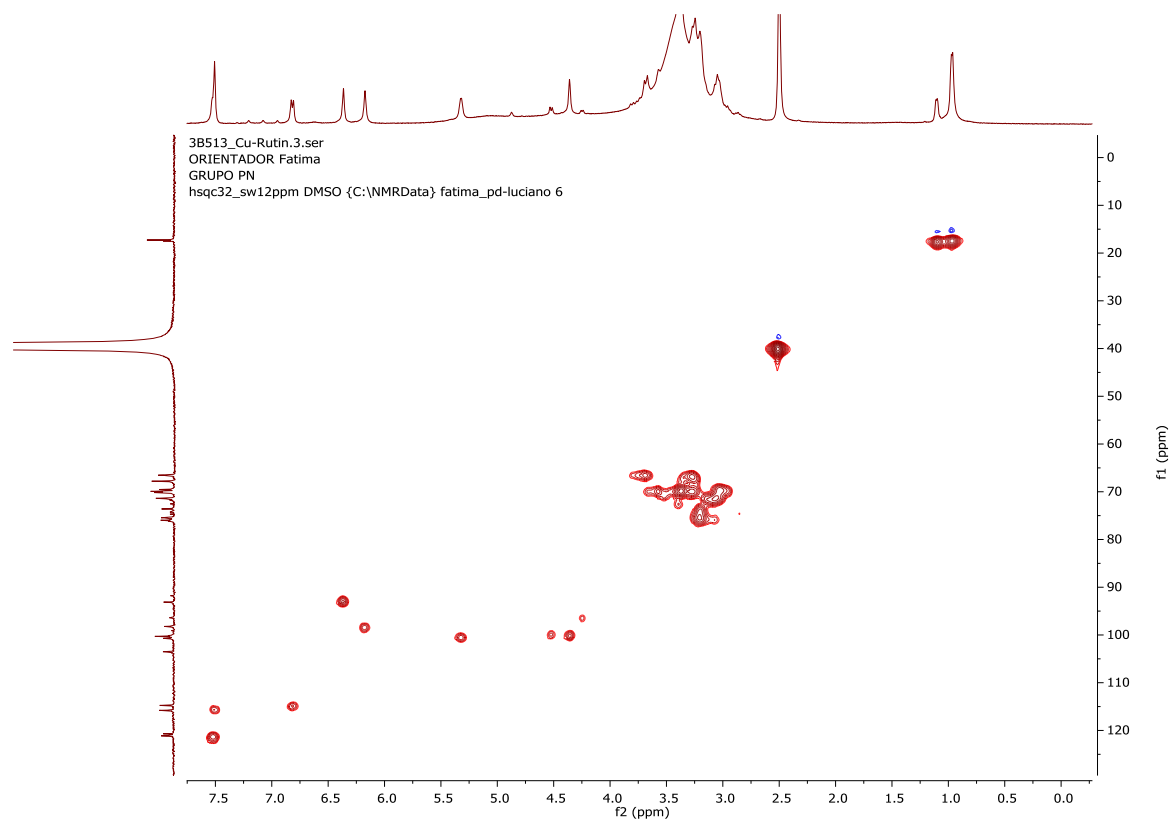


FIGURA 3. 56 - Mapa de contornos HSQC do complexo **35** Rutina com cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T)

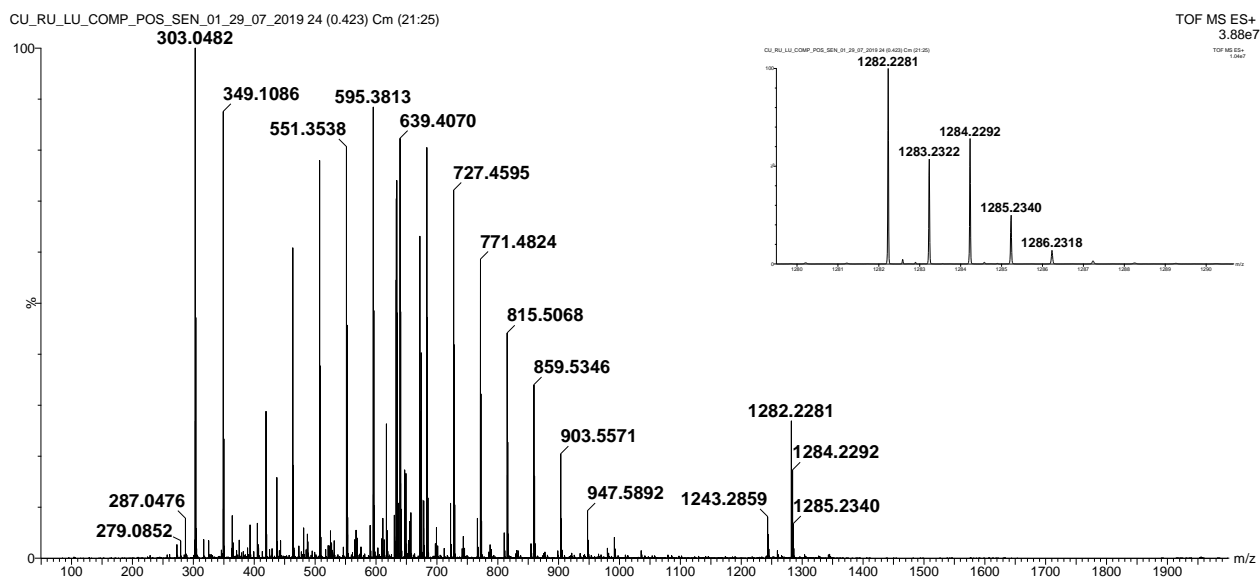


Figura S 50 - Espectro de HRMS de **35** $[M+H]^+=1282.2281$

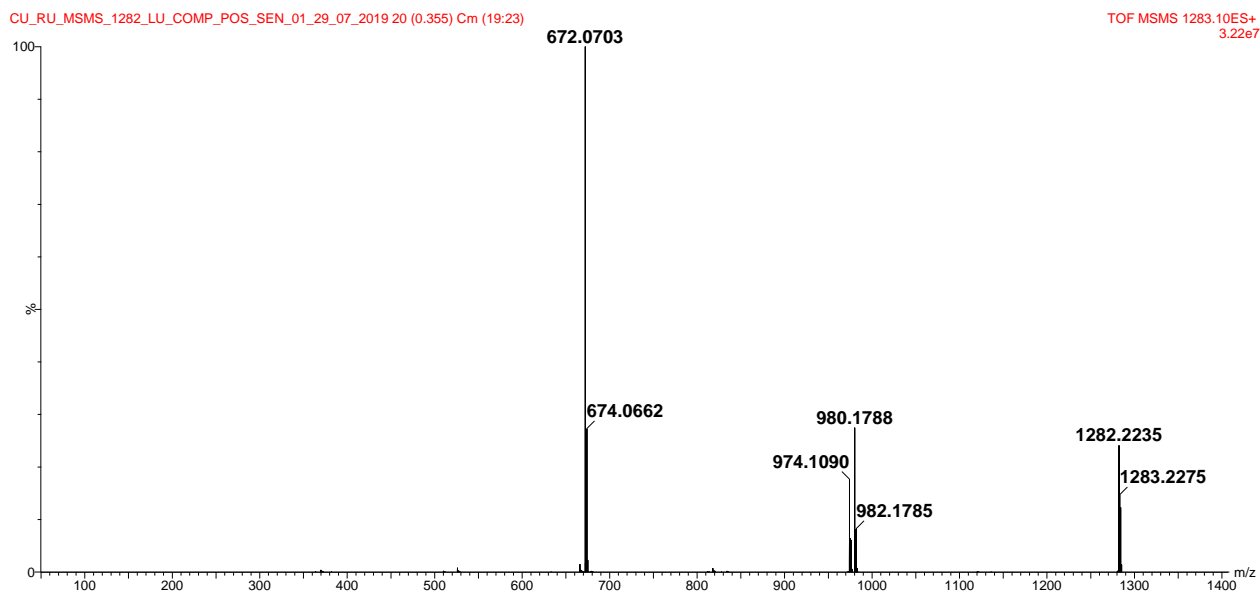


Figura S 51 - Espectro de MS² do complexo **35** $[M+H]^+=1282.2281$.

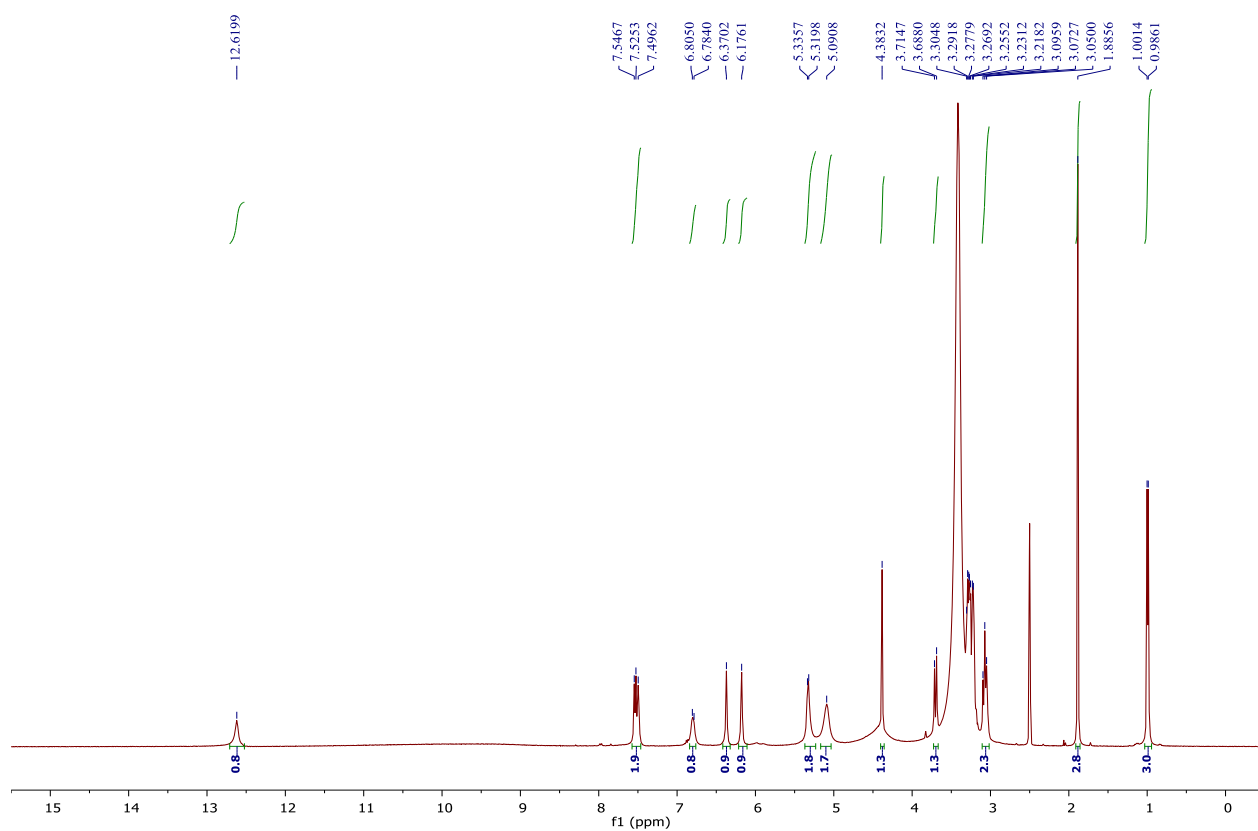


Figura S 52 - Espectro de RMN de ¹H do complexo **36** Rutina e zinco (DMSO-*d*₆, 9.4 T)

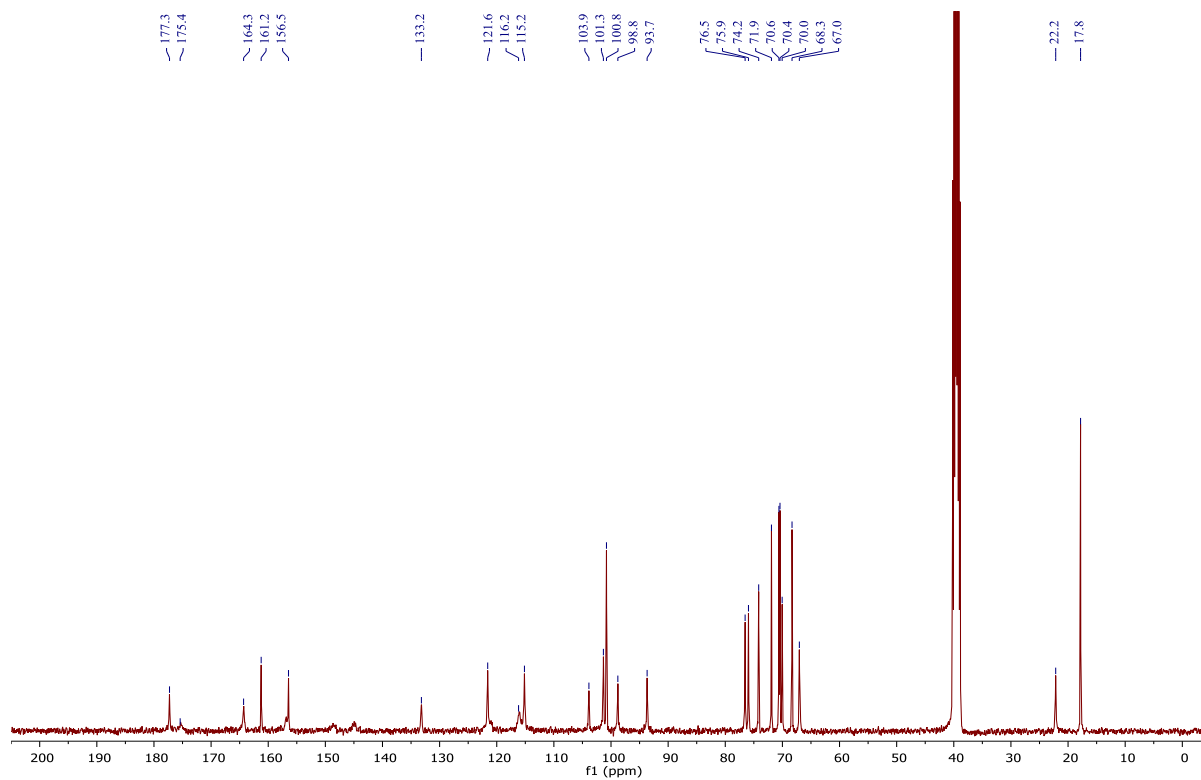


Figura S 53 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **36** de Rutina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4T)

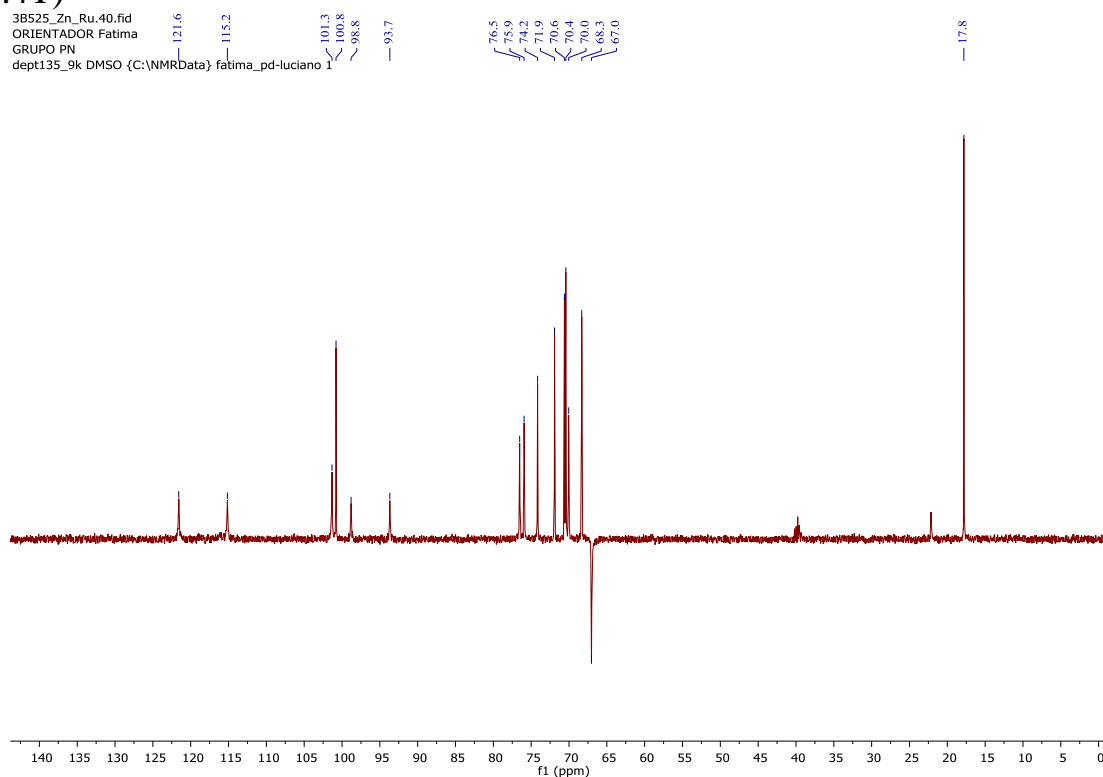


Figura S 54 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **36** de Rutina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4T)

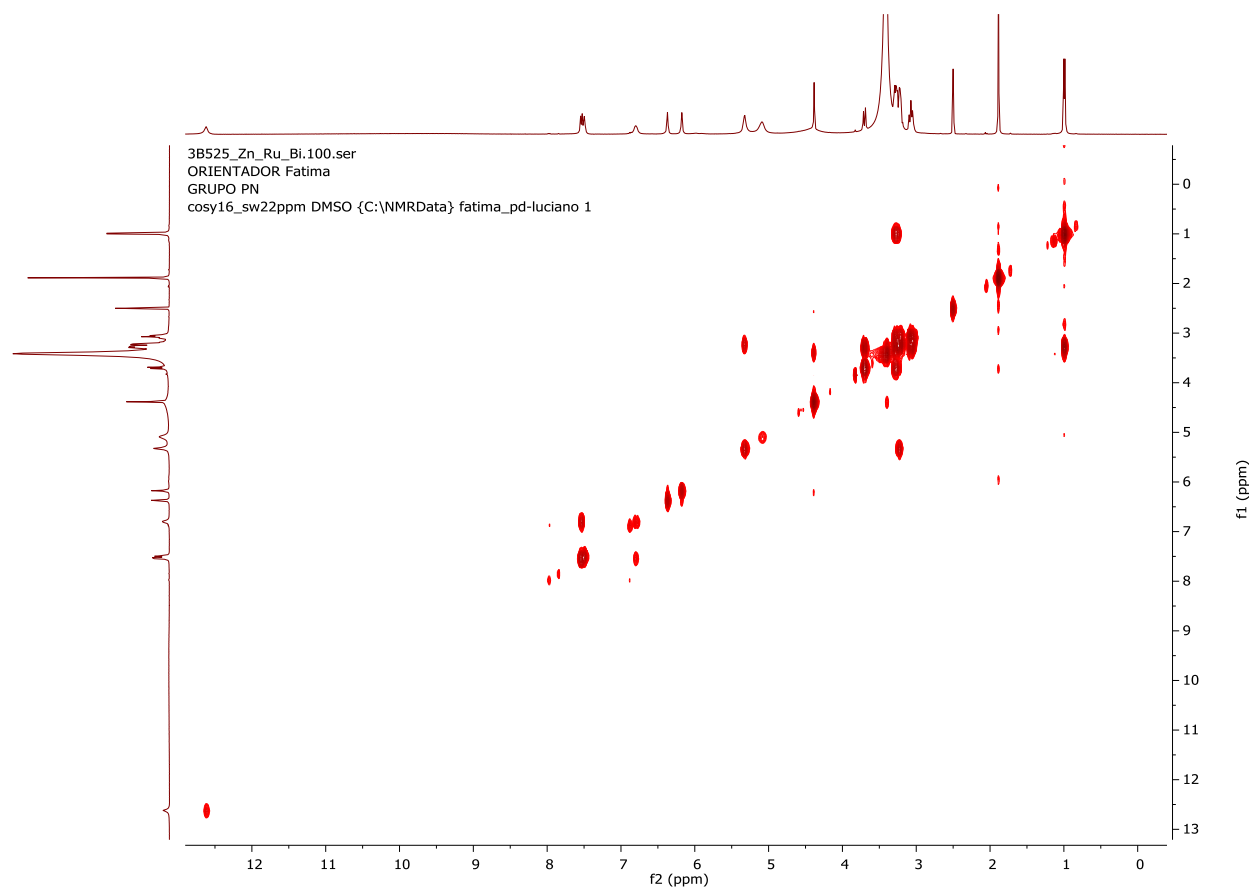


Figura S 55 – Mapa de contornos COSY do complexo **36** de Rutina e zinco (DMSO-d₆, 9.4T)

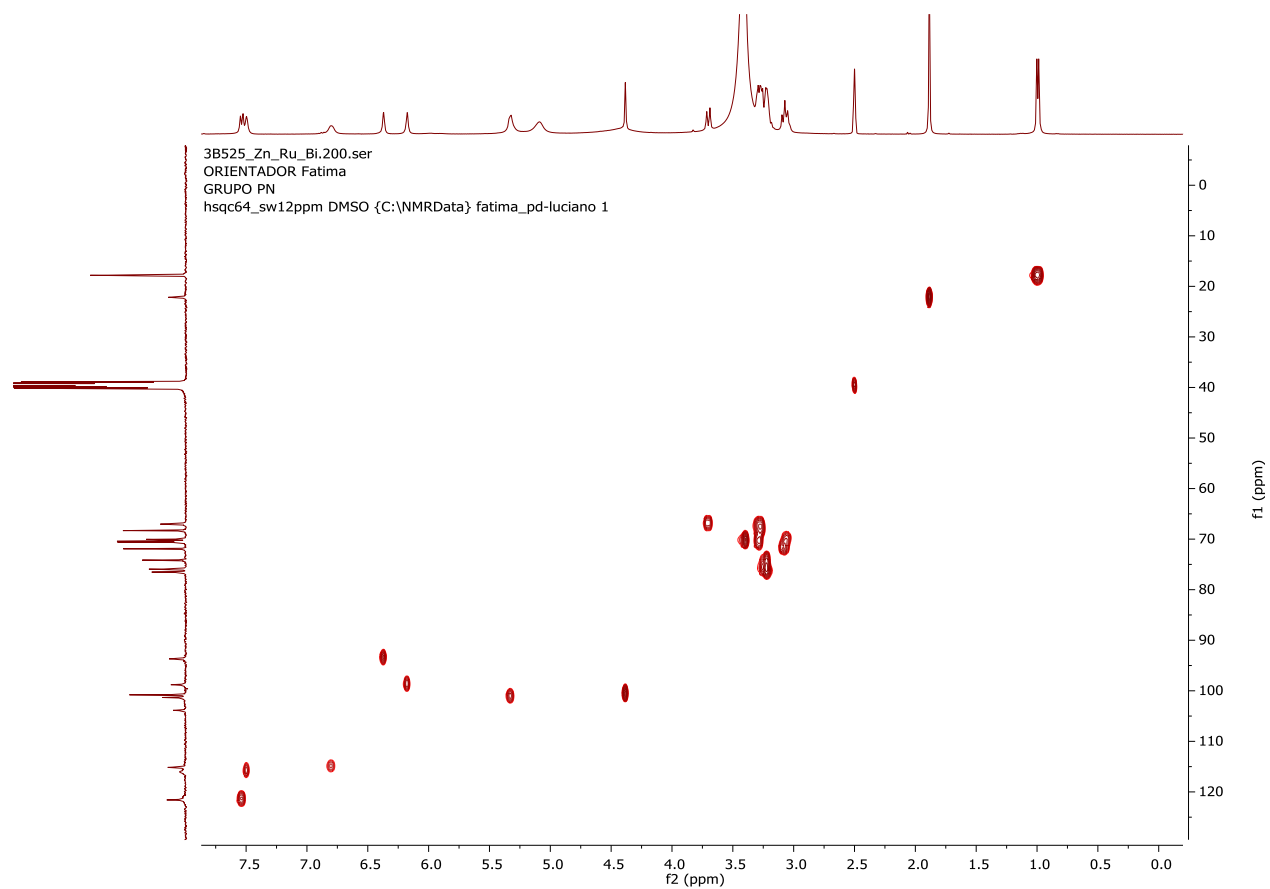


Figura S 56 – Mapa de contornos HSQC do complexo **36** de Rutina e zinco (DMSO-*d*₆, 9.4T)

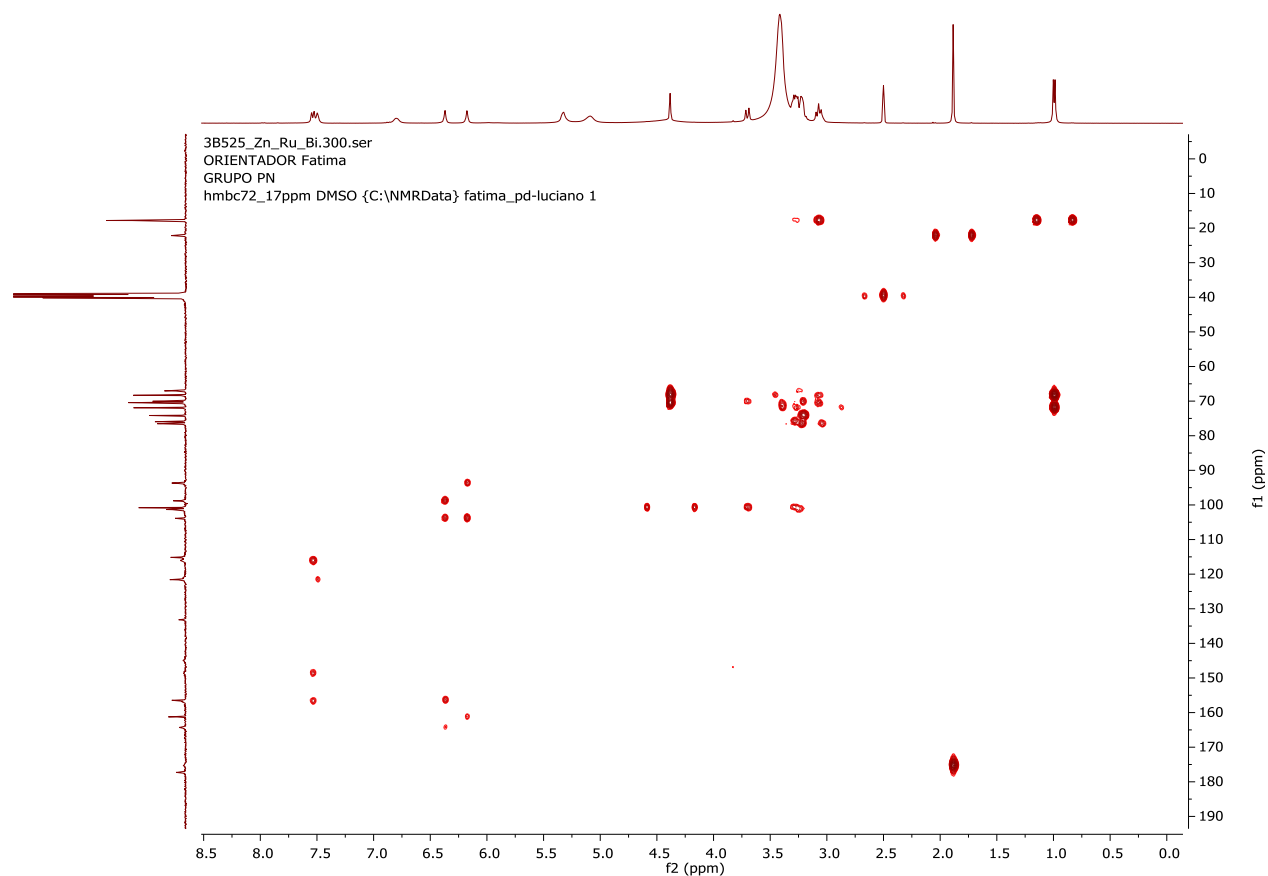


Figura S 57 – Mapa de contornos HMBC do complexo **36** de Rutina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4T)

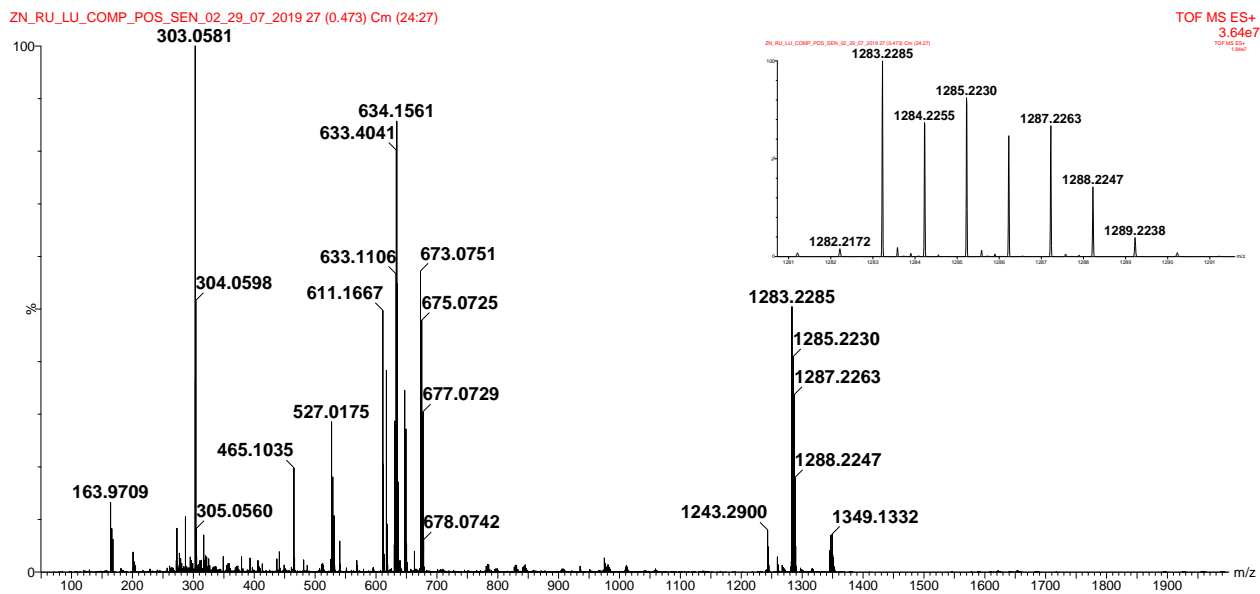


Figura S 58 - Espectro de HRMS de **36** $[M+H]^+=1283.2285$

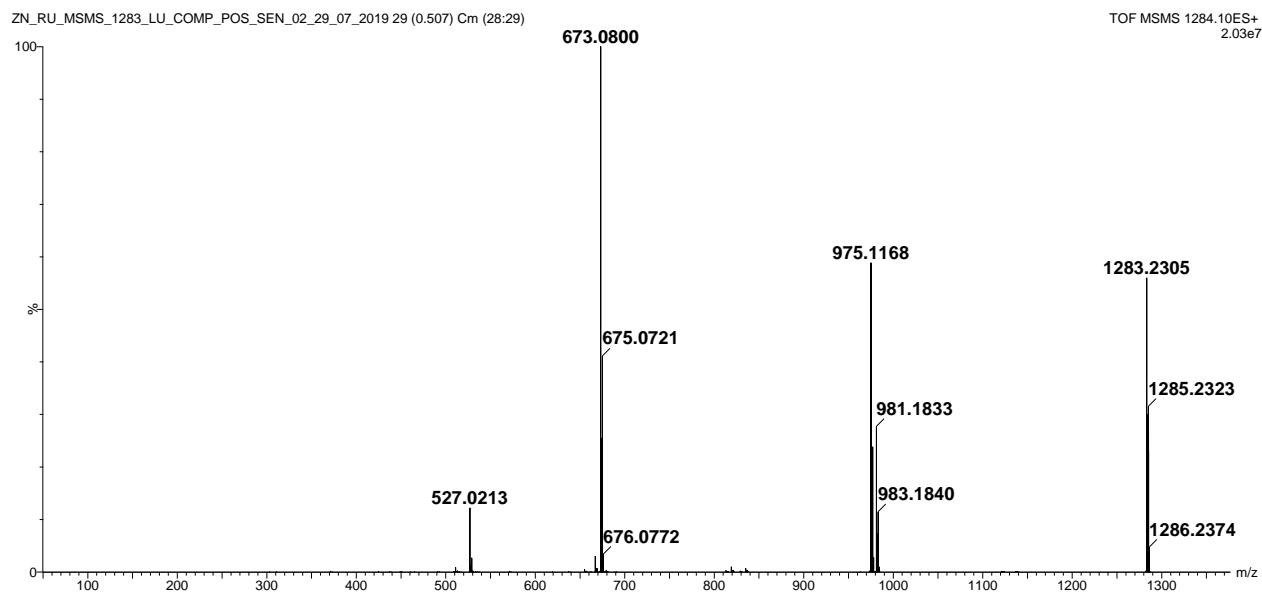


Figura S 59 - Espectro de MS² de **36** [M+H]⁺=1283.2285

3B531_Fe_Ru_13C.10.fid
ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
proton16_sw17ppm DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 38

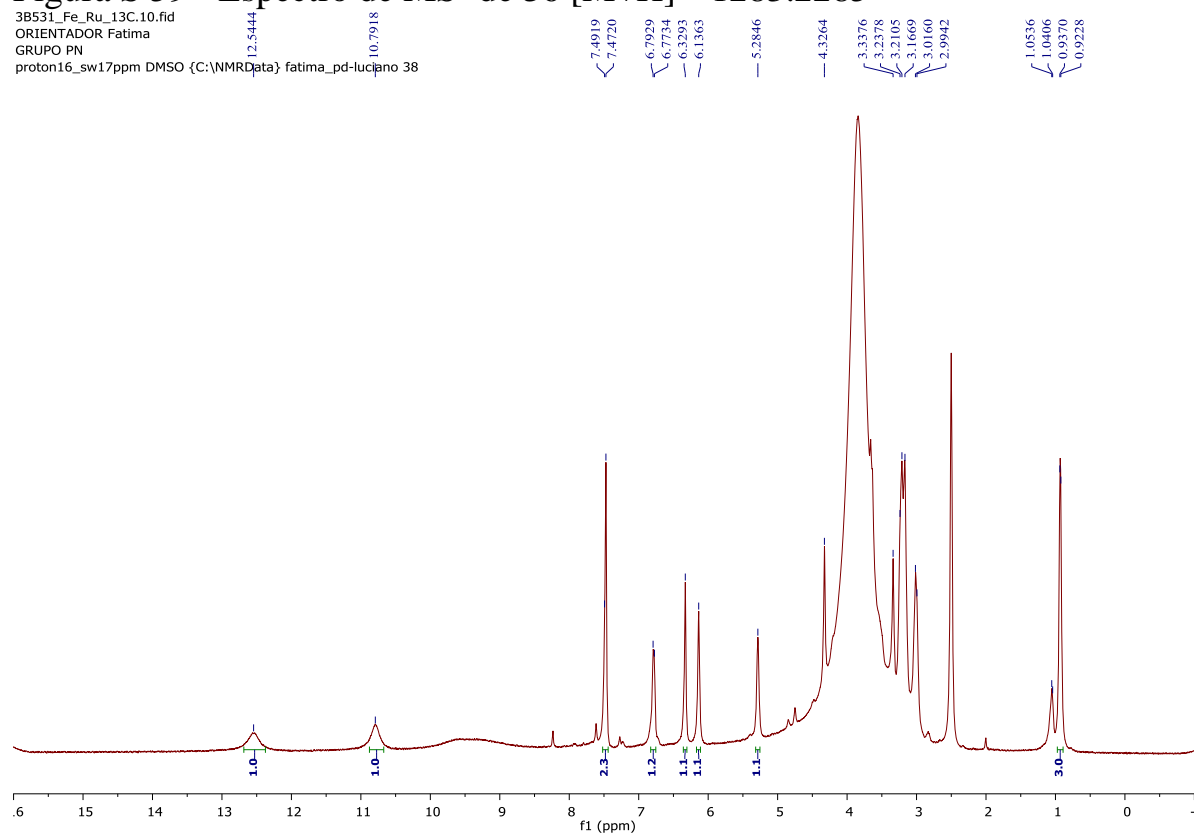


Figura S 60 - Espectro de RMN de ¹H do complexo **37** Rutina e ferro (DMSO-*d*₆, 9.4 T)

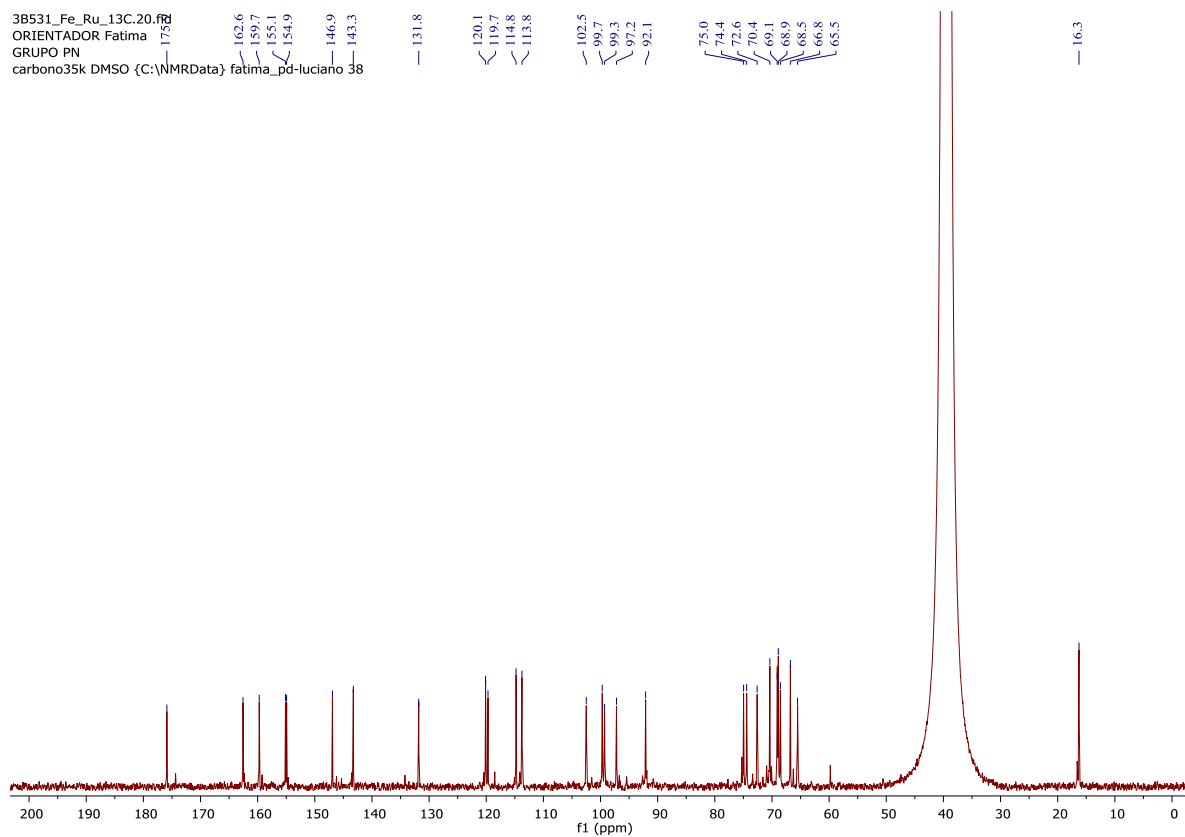


Figura S 61 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **37** Rutina e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

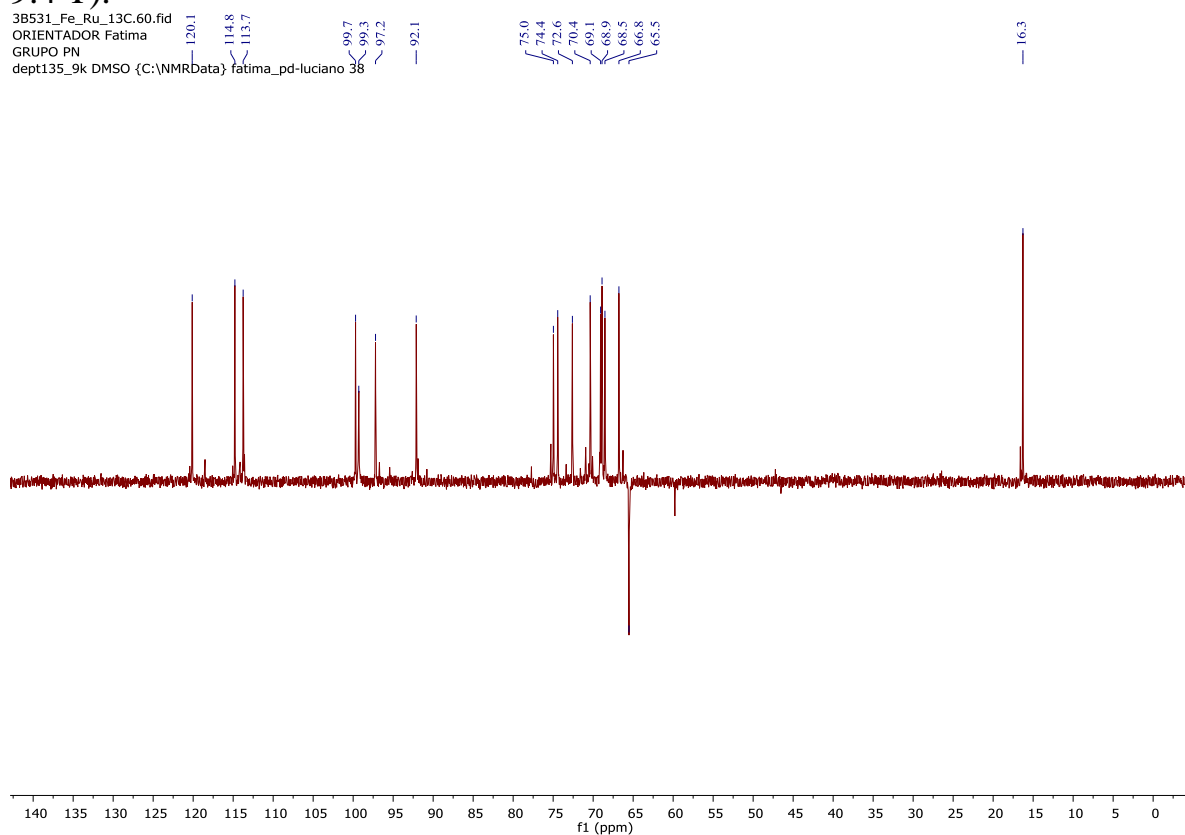


Figura S 62 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **37** Rutina e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

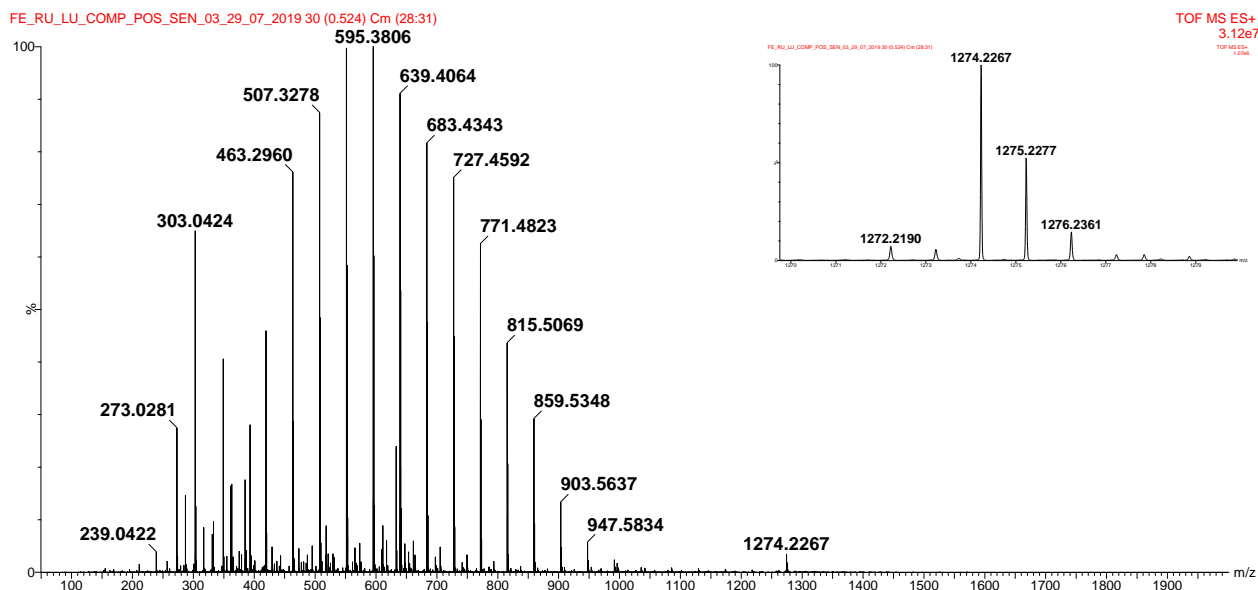


Figura S 63 - Espectro de HRMS do complexo **37** $[M+H]^+=1274.2275$

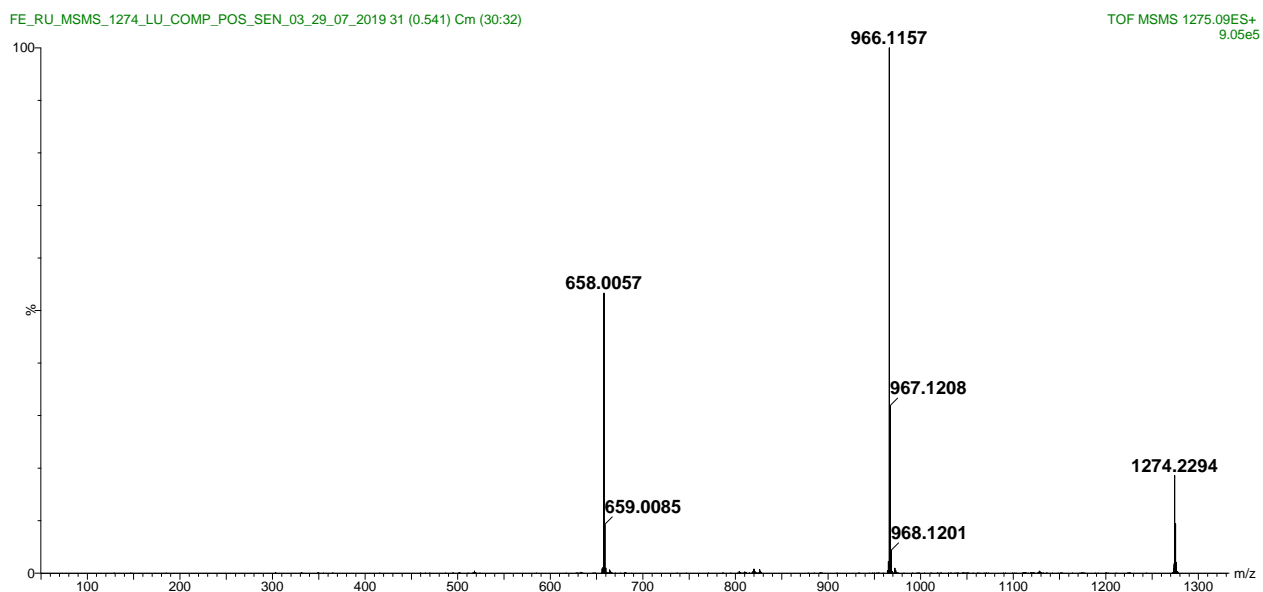


Figura S 64 - Espectro de MS² do complexo **37** $[M+H]^+=1274.2275$

3B531_Cu_NG.10.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 proton64_sw22ppm DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 49

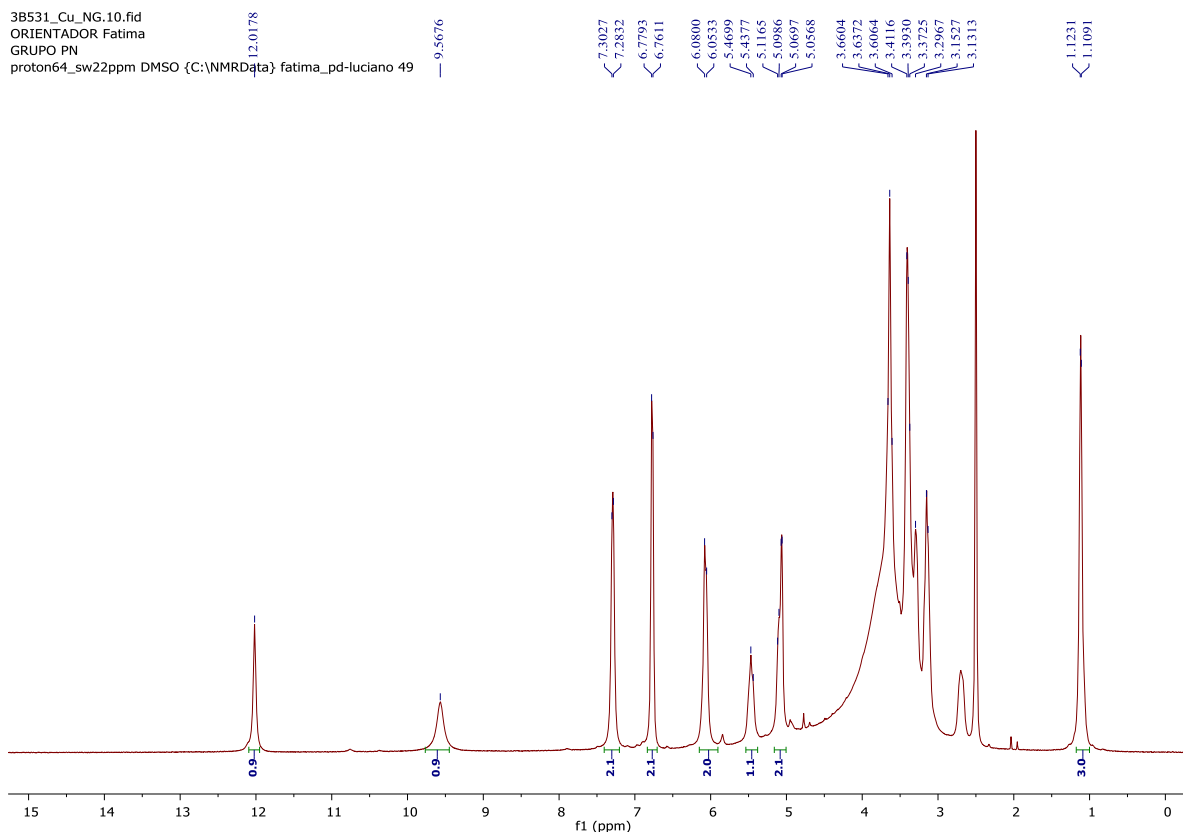
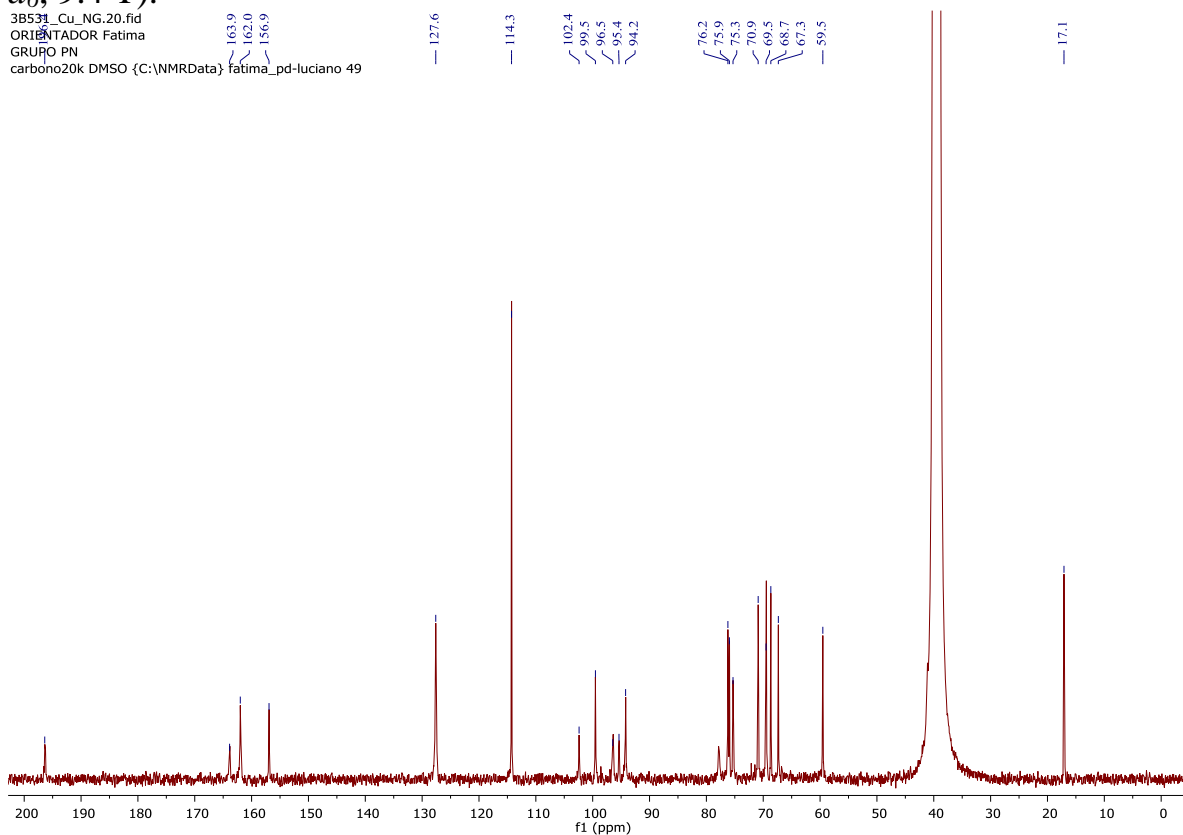


Figura S 65 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **38** Naringina e cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T).

3B531_Cu_NG.20.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 carbono20k DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 49



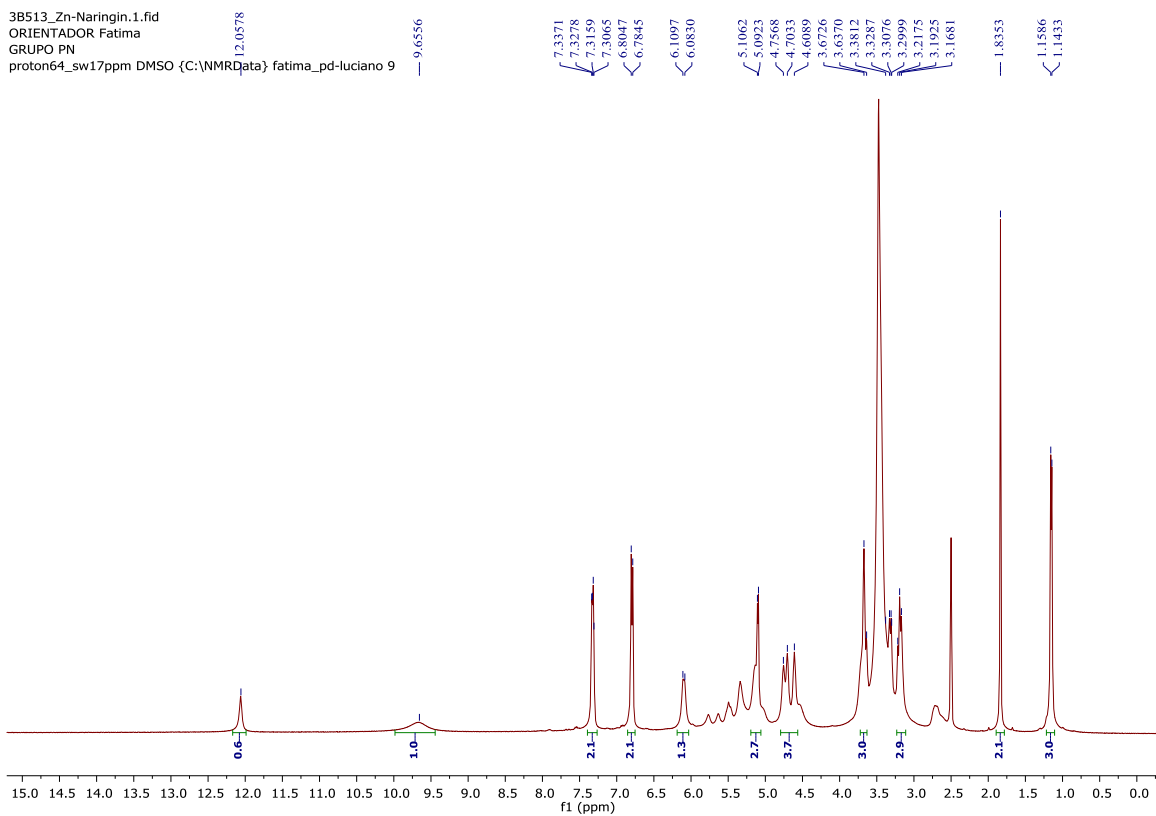


Figura S 69 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **39** Naringina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

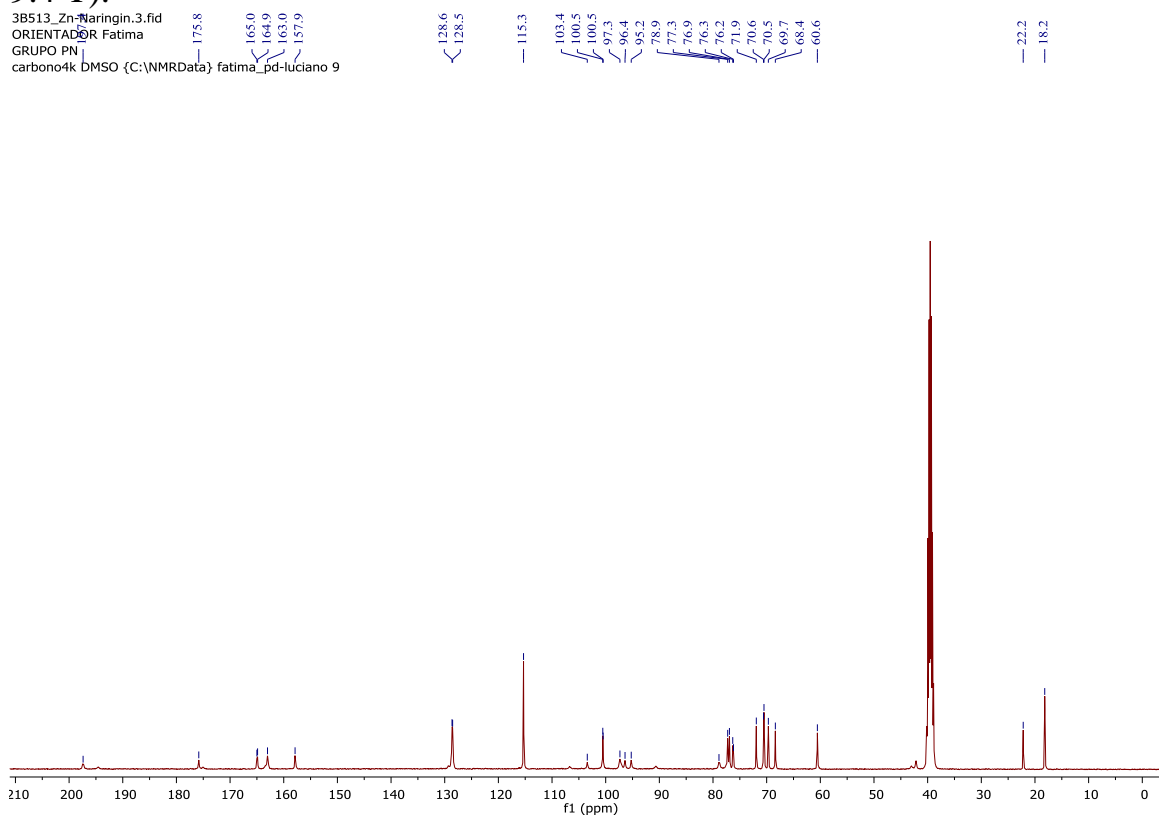


Figura S 70 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **39** Naringina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

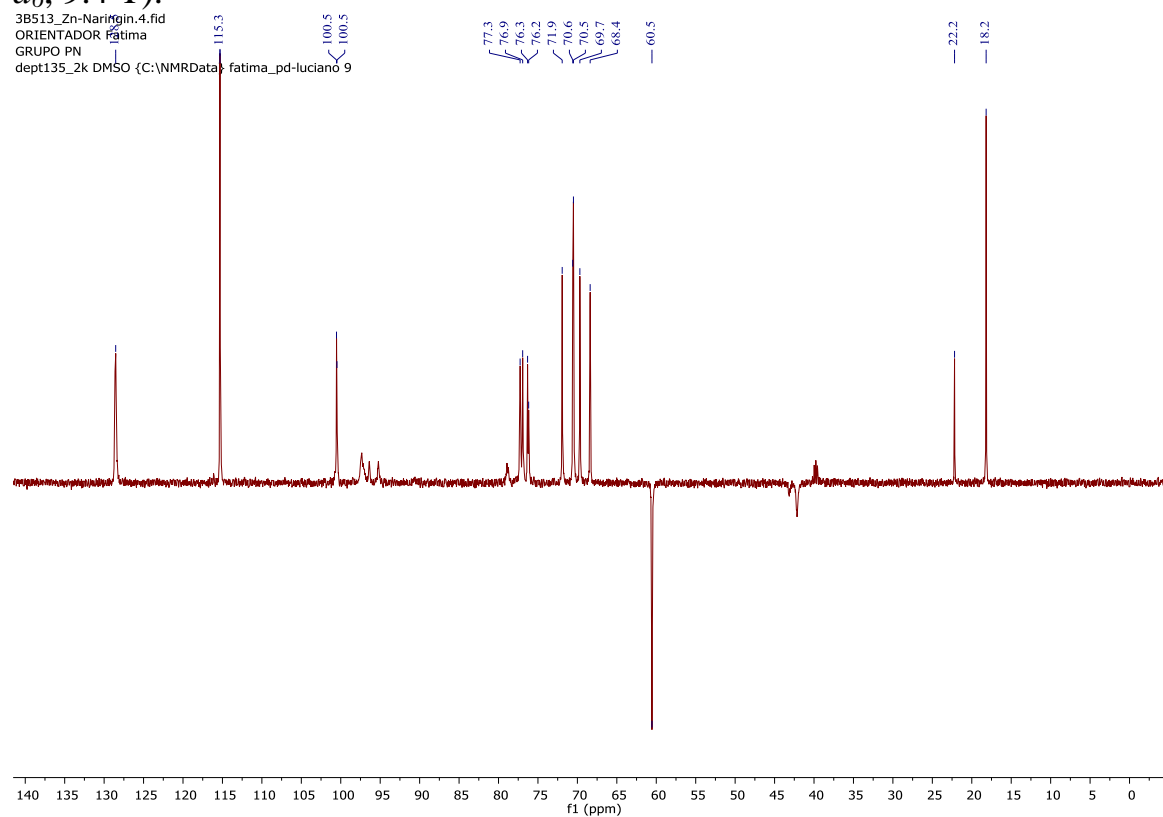


Figura S 71 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **39** Naringina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

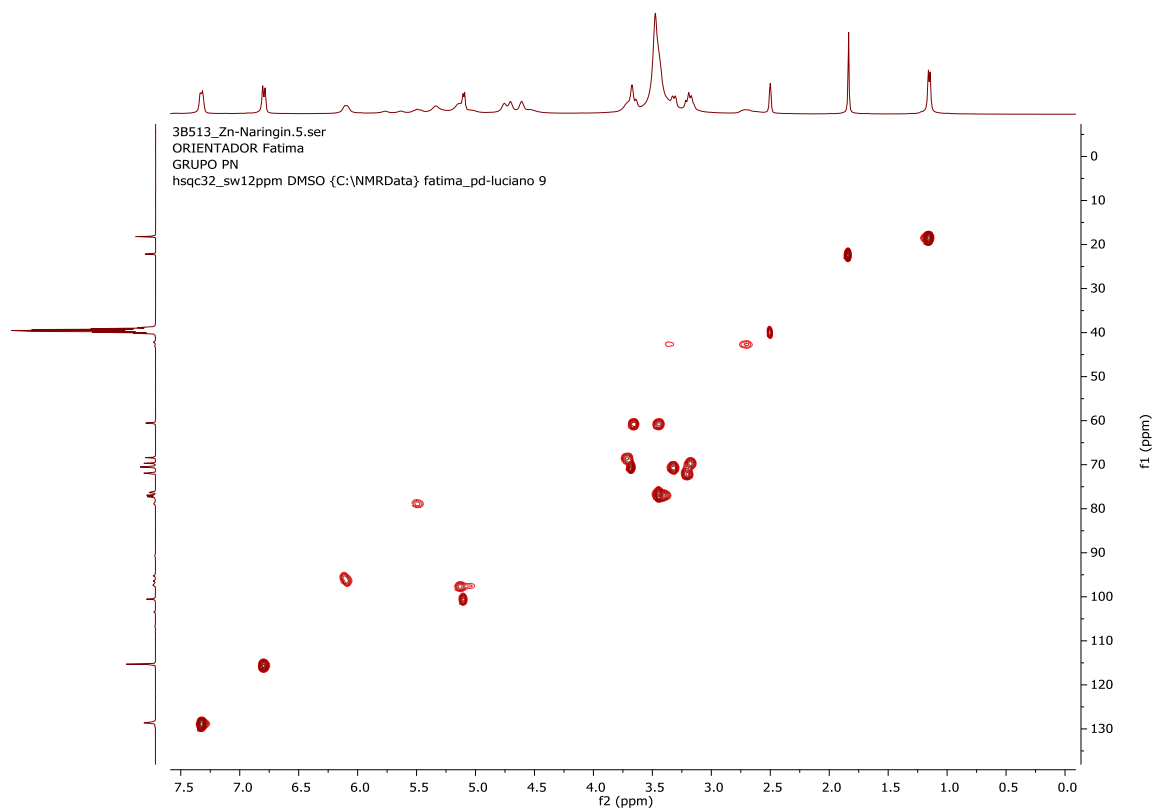


Figura S 72 – Mapa de contornos HSQC do complexo **39** Naringina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

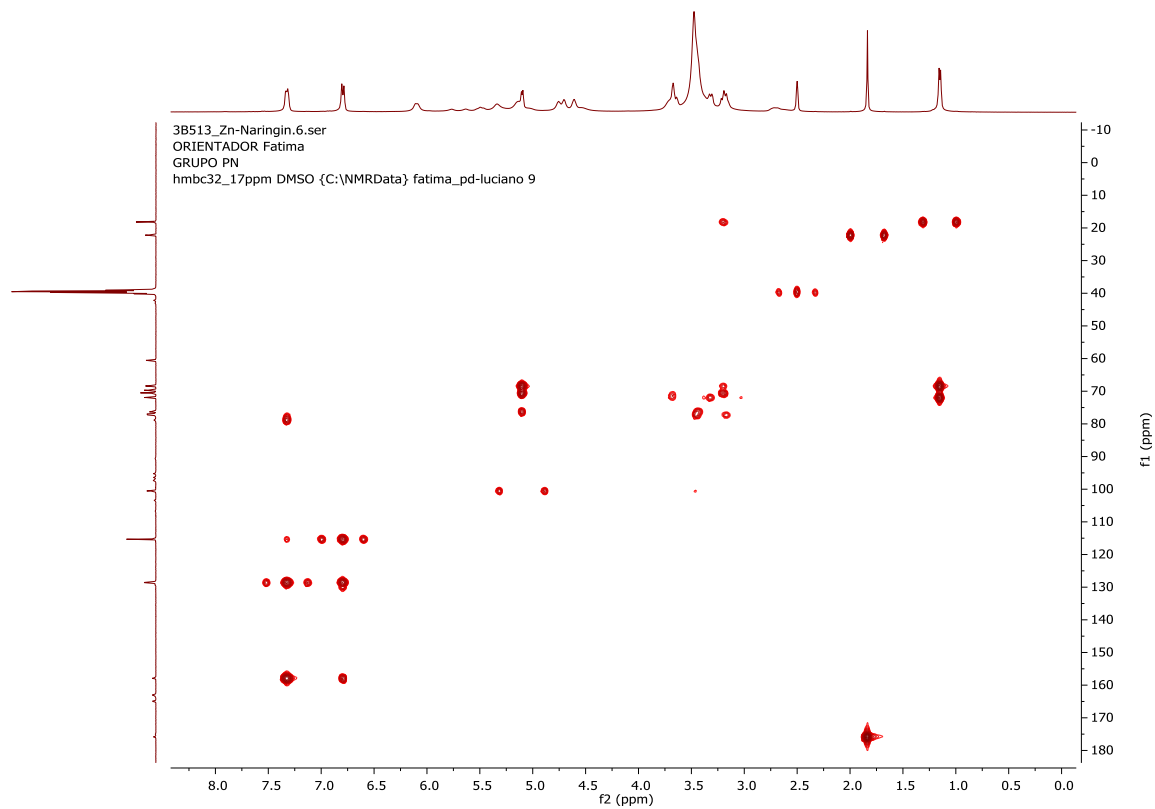


Figura S 73 – Mapa de contornos HMBC do complexo **39** Naringina e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

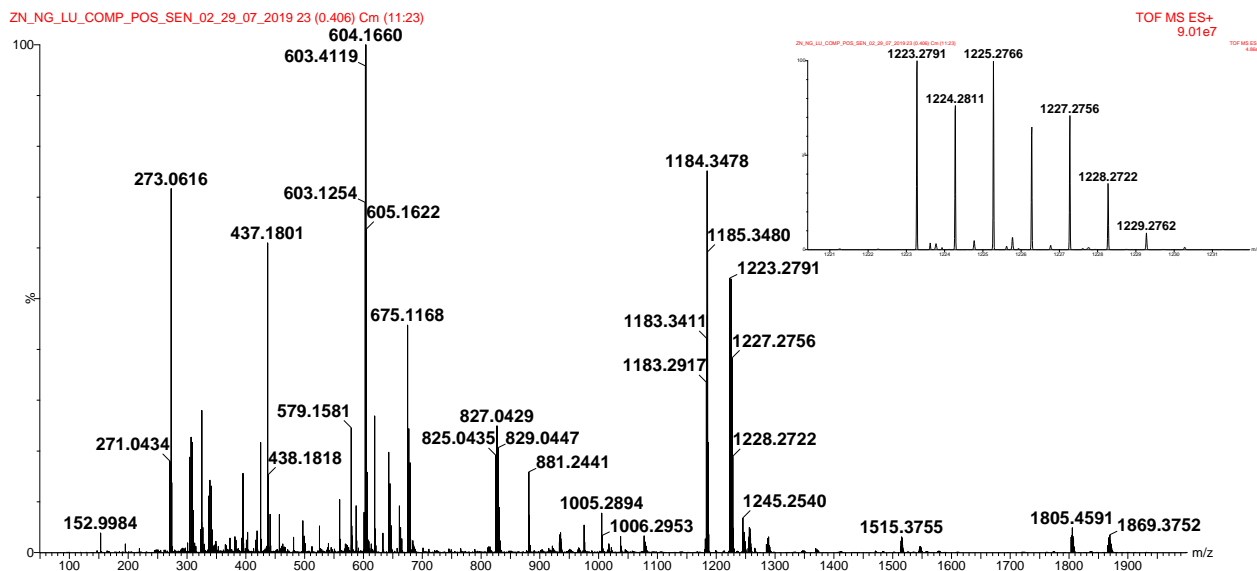


Figura S 74 - Espectro de HRMS de **39** $[M+H]^+=1223.2791$

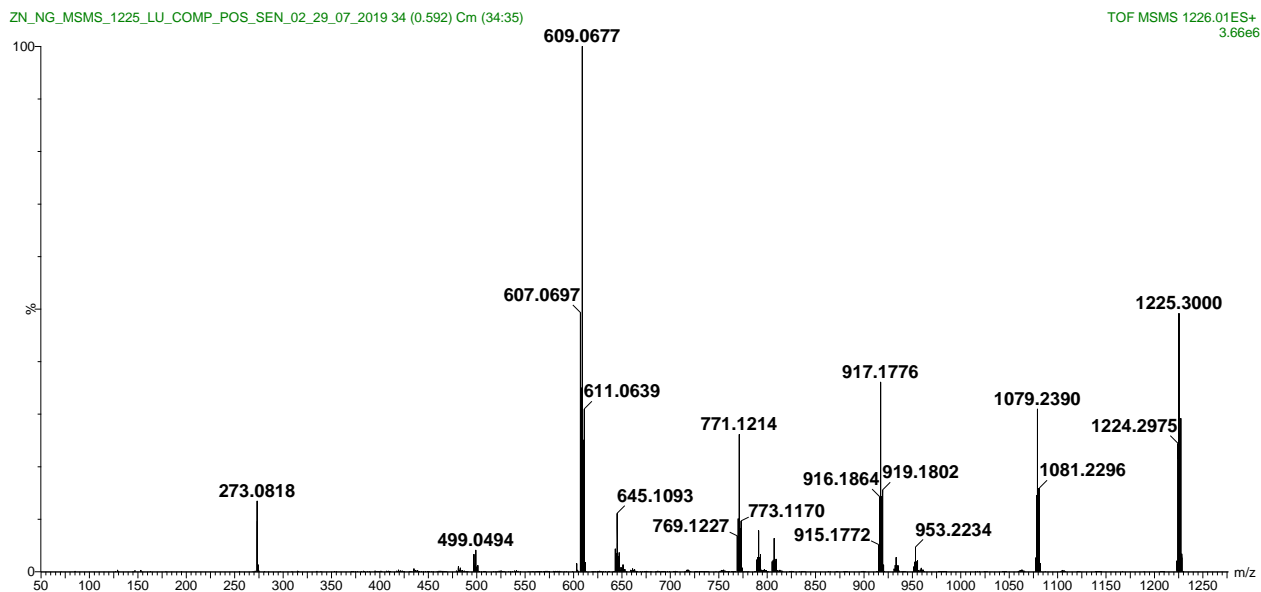


Figura S 75 - Espectro de MS^2 de **39** $[M+H]^+=1223.2791$

3B531_Fe_NG.10.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 proton64_sw22ppm DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 46

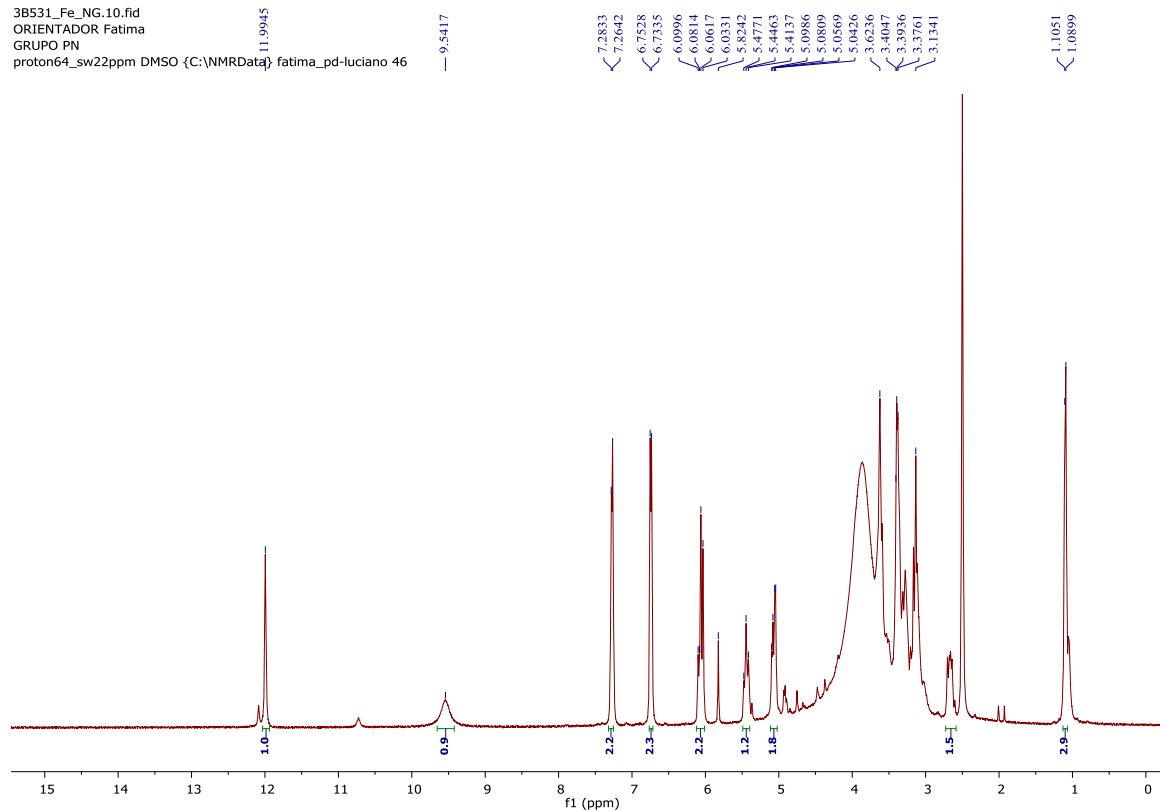


Figura S 76 - Espectro de RMN de ^1H do complexo **40** Naringina e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

3B531_Fe_NG.20.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 carbono20k DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 46

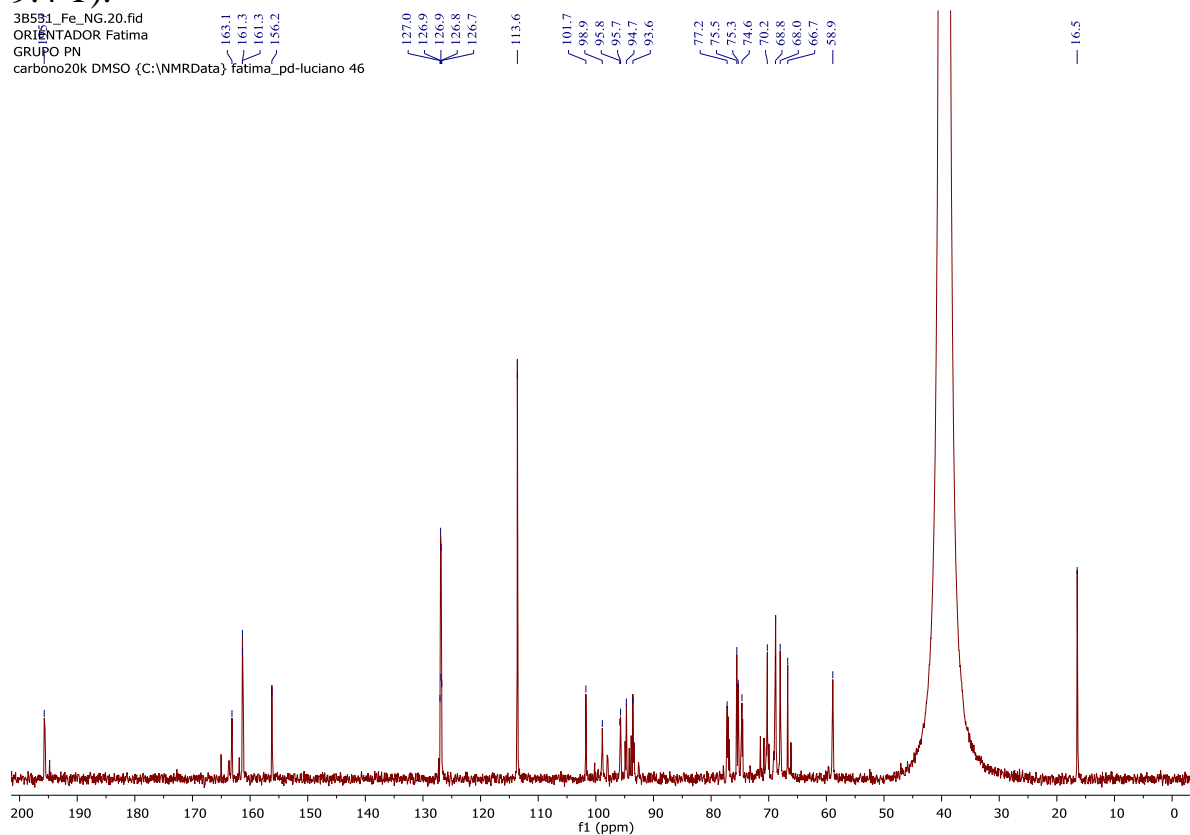


Figura S 77 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **40** Naringina e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

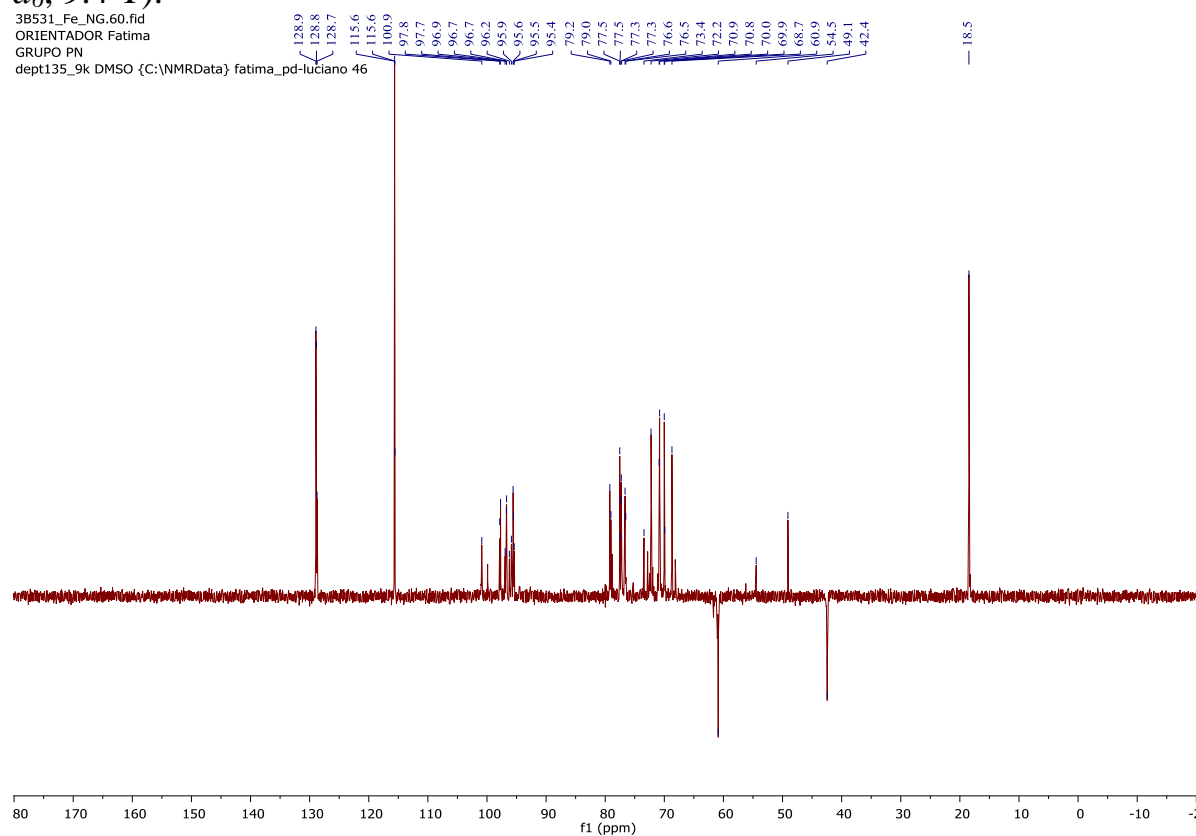


Figura S 78 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **40** Naringina e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

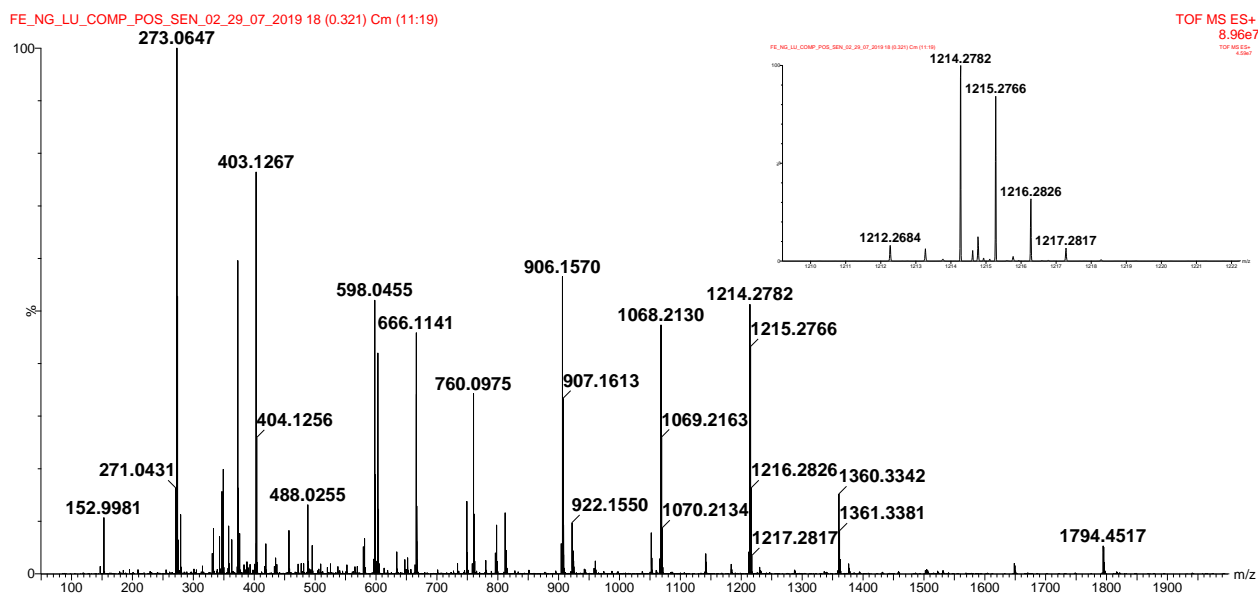


Figura S 79 - Espectro de HRMS de **40** $[\text{M}+\text{H}]^+=1214.2782$

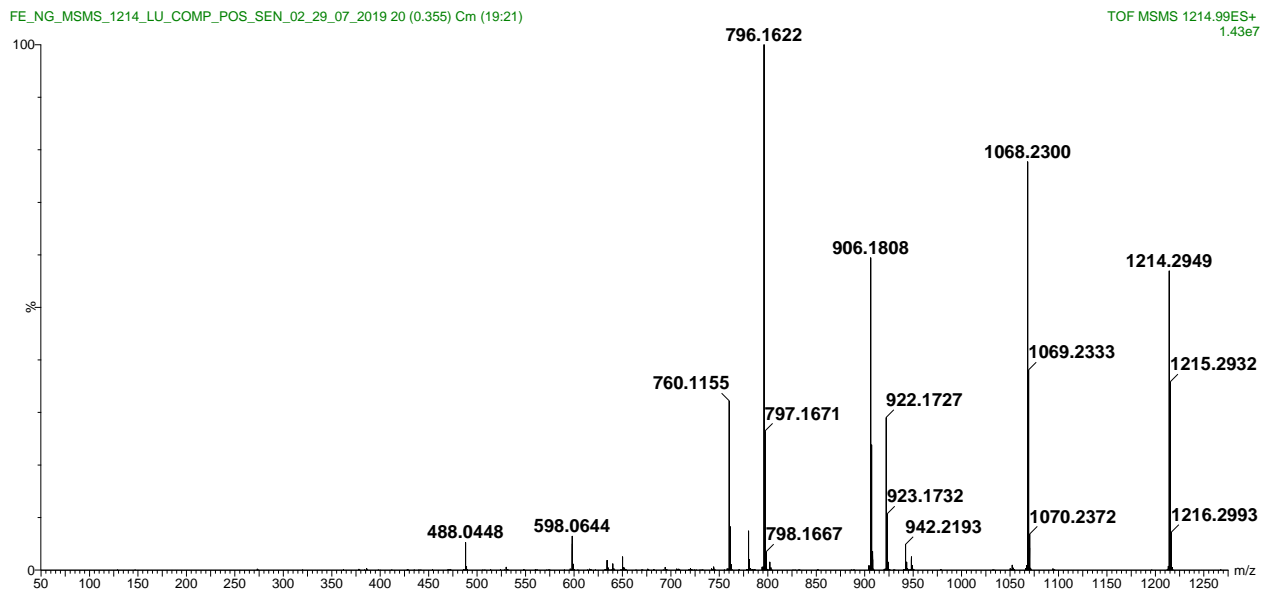


Figura S 80 - Espectro de MS² de **40** [M+H]⁺=1214.2782

3B528_Cu_VA.10.fid
ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
proton128_sw22ppm DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 20

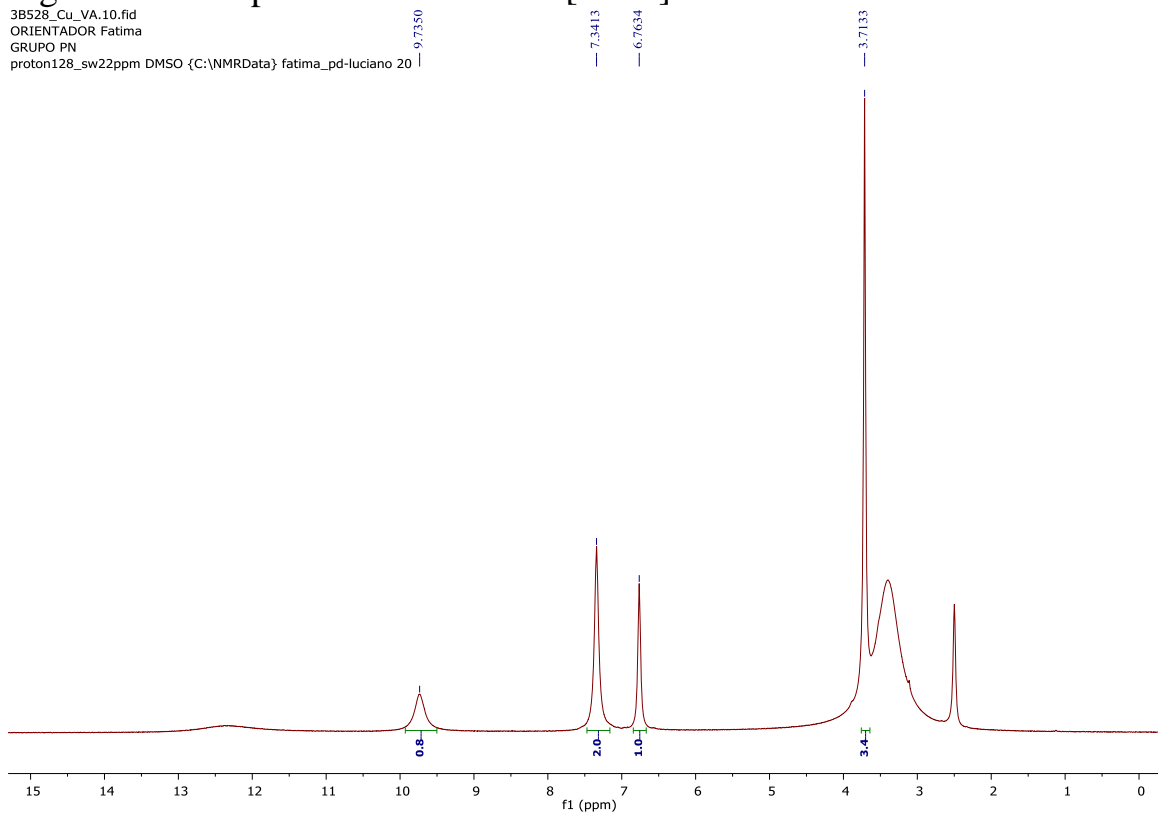


Figura S 81 - Espectro de RMN de ¹H do complexo **41** ácido vanílico e cobre (DMSO-*d*₆, 9.4 T).

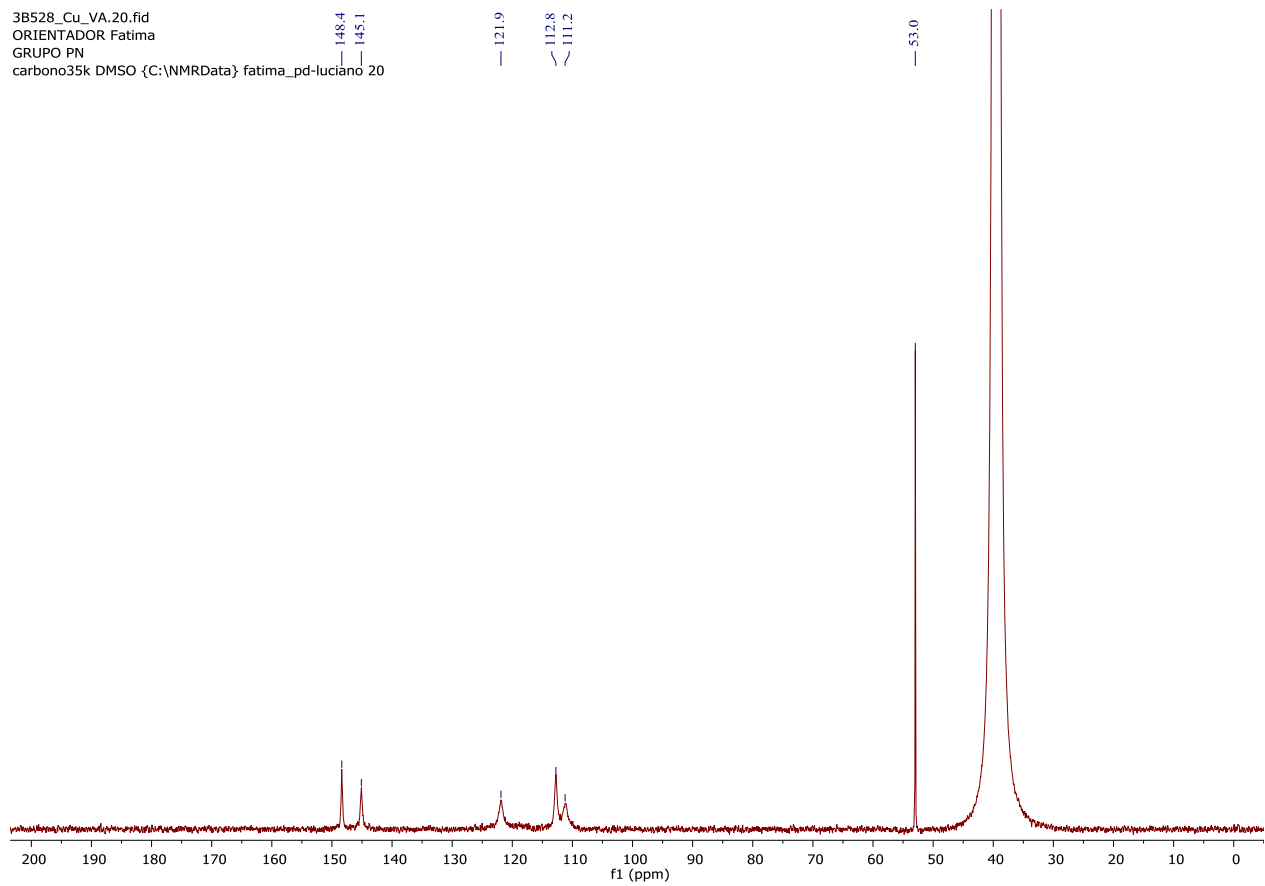


Figura S 82 - Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **41** ácido vanílico e cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T).

3B528_Cu_VA.40.fid
ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
dept135_9k DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 20

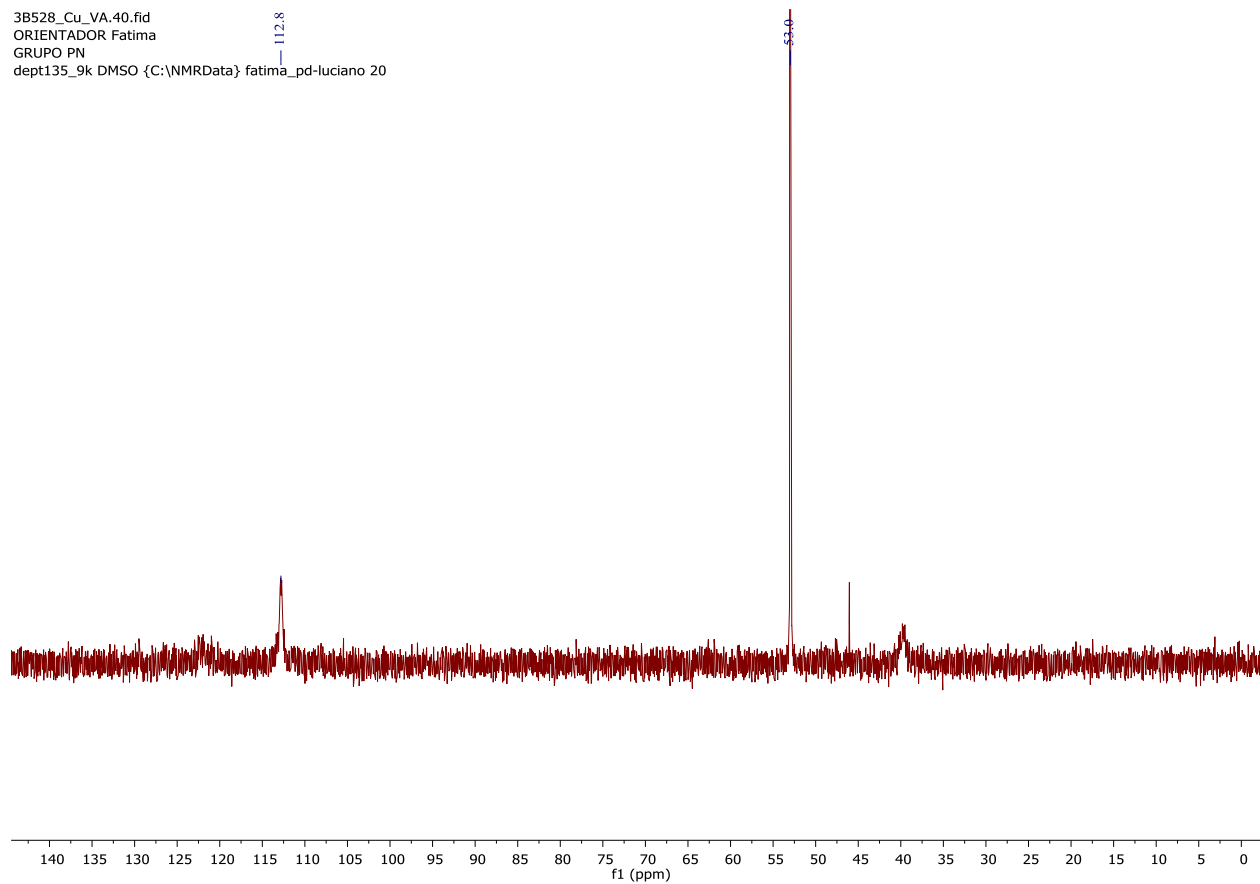


Figura S 83 - Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **41** ácido vanílico e cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T).

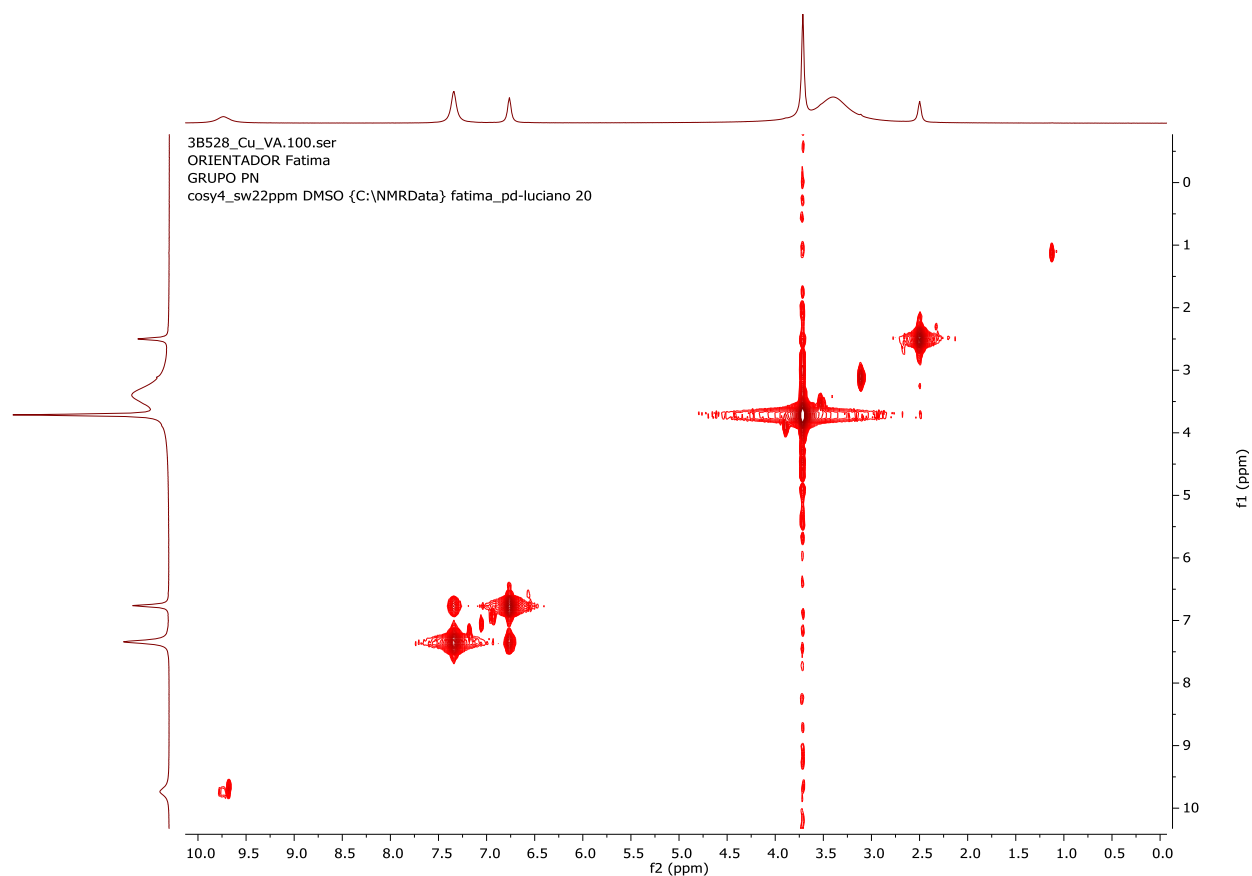


Figura S 84 – Mapa de contornos COSY do complexo **41** ácido vanílico e cobre (DMSO- d_6 , 9.4 T).

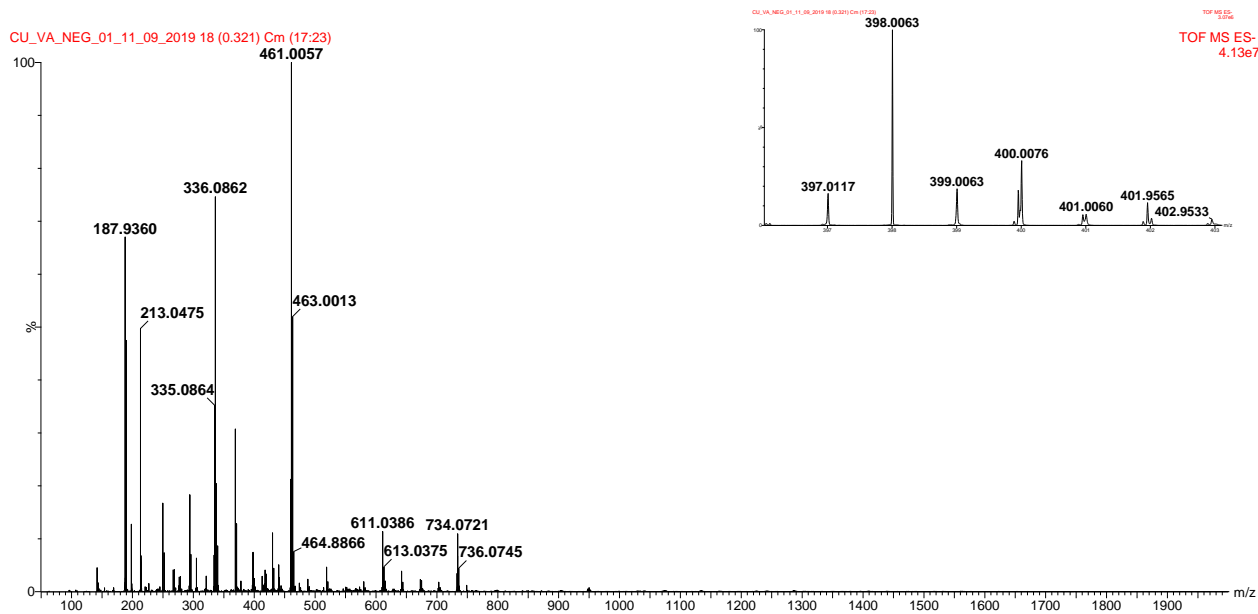


Figura S 85 - Espectro de MS¹ de **41** [M-H]⁻=398.0063

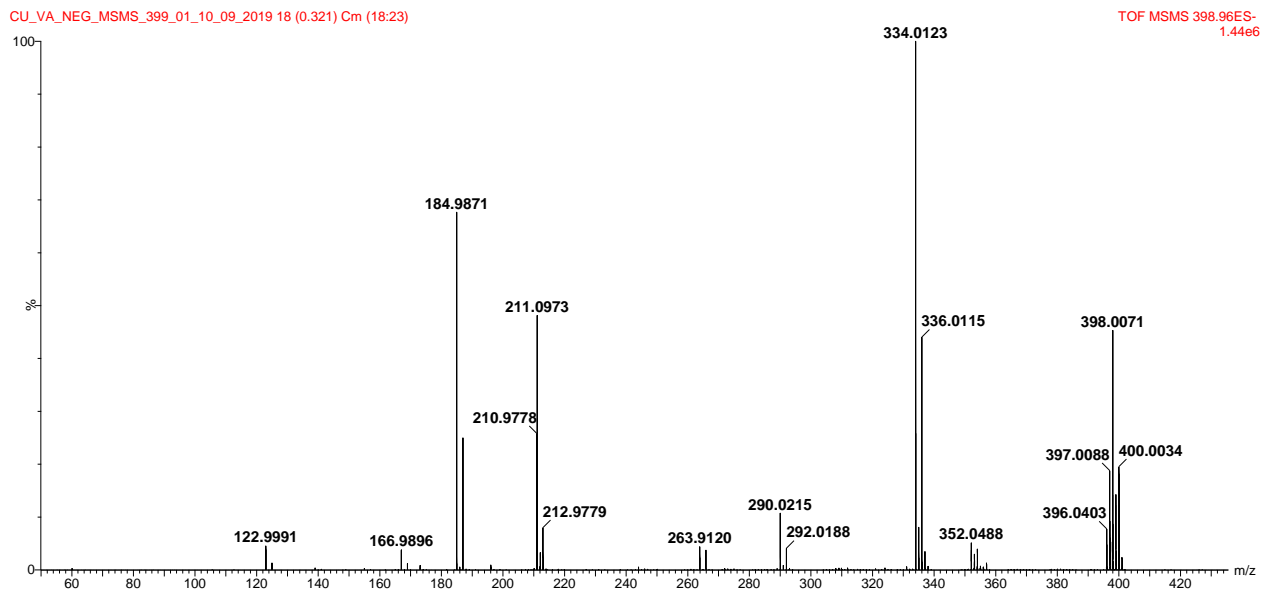


Figura S 86 - Espectro de MS² de **41** [M-H]⁻=398.0063

3B531_Zn_VA.10.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 proton128_sw22ppm DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 53

7.4501
 7.4458
 7.4416
 7.4368
 7.4164
 6.7996
 6.7795
 3.7870

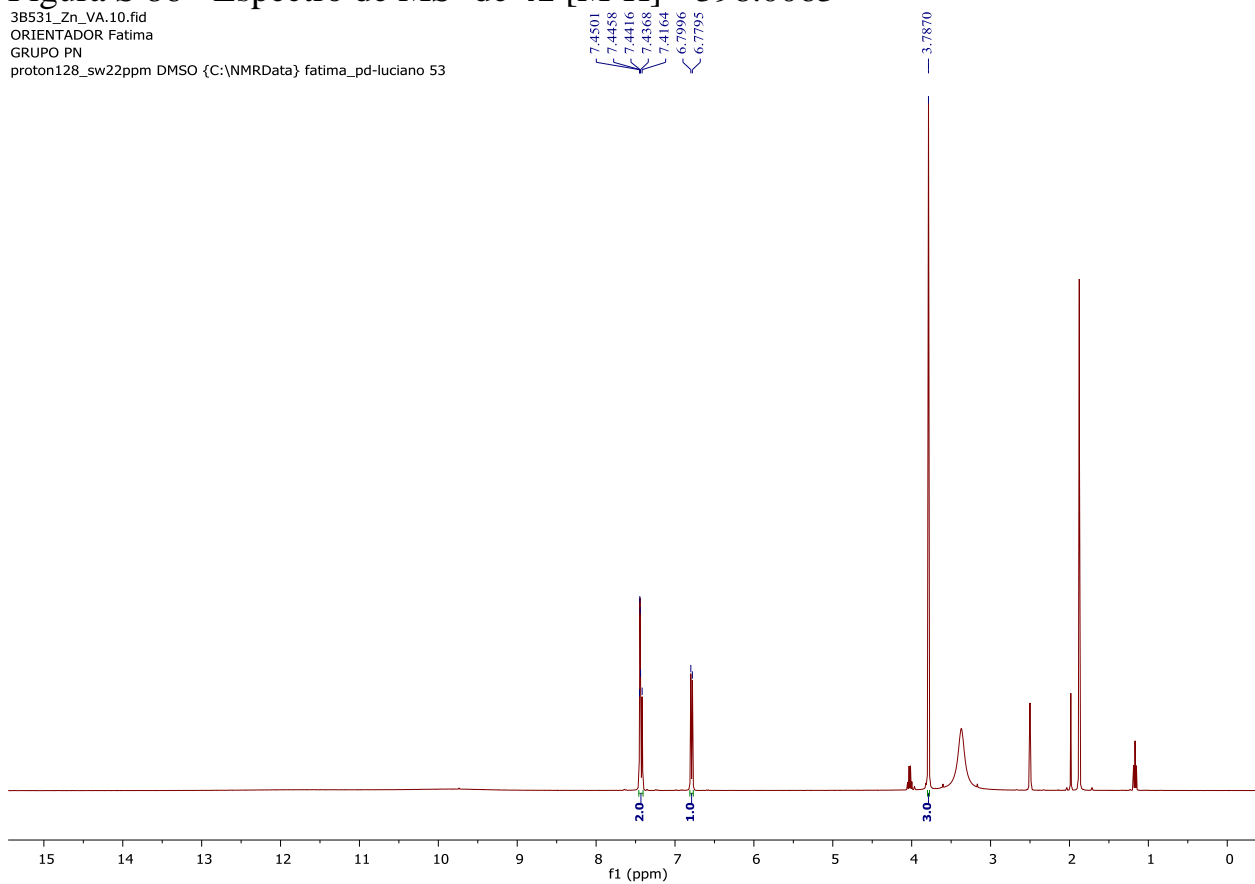


Figura S 87 – Espectro de RMN de ¹H do complexo **42** ácido vanílico e zinco (DMSO-*d*₆, 9.4 T).

3B531_Zn_VA.20.fid
ORIENTADOR Fatima
GRUPO PN
carbono50k DMSO {C:\NMRData\ fatima_pd-luciano 53

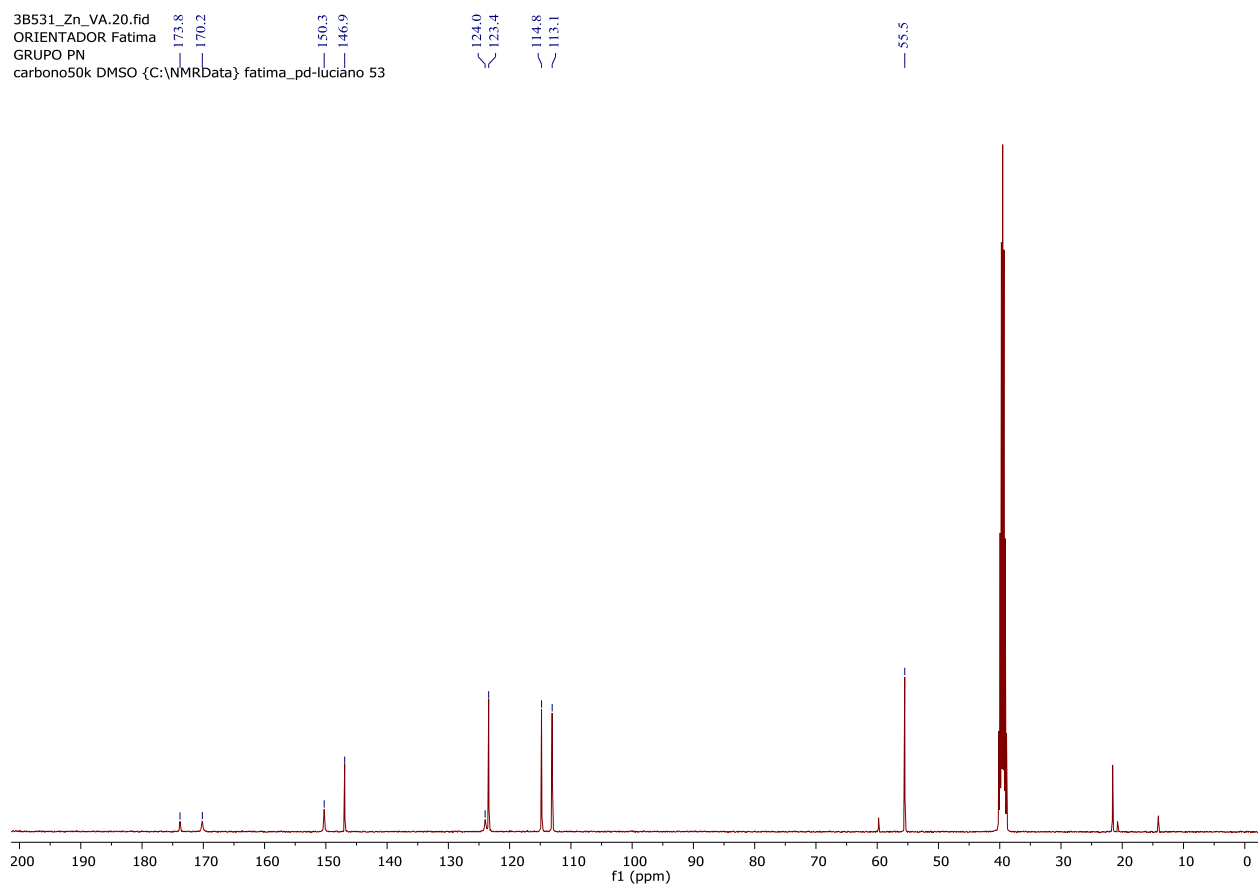


Figura S 88 – Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **42** ácido vanílico e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

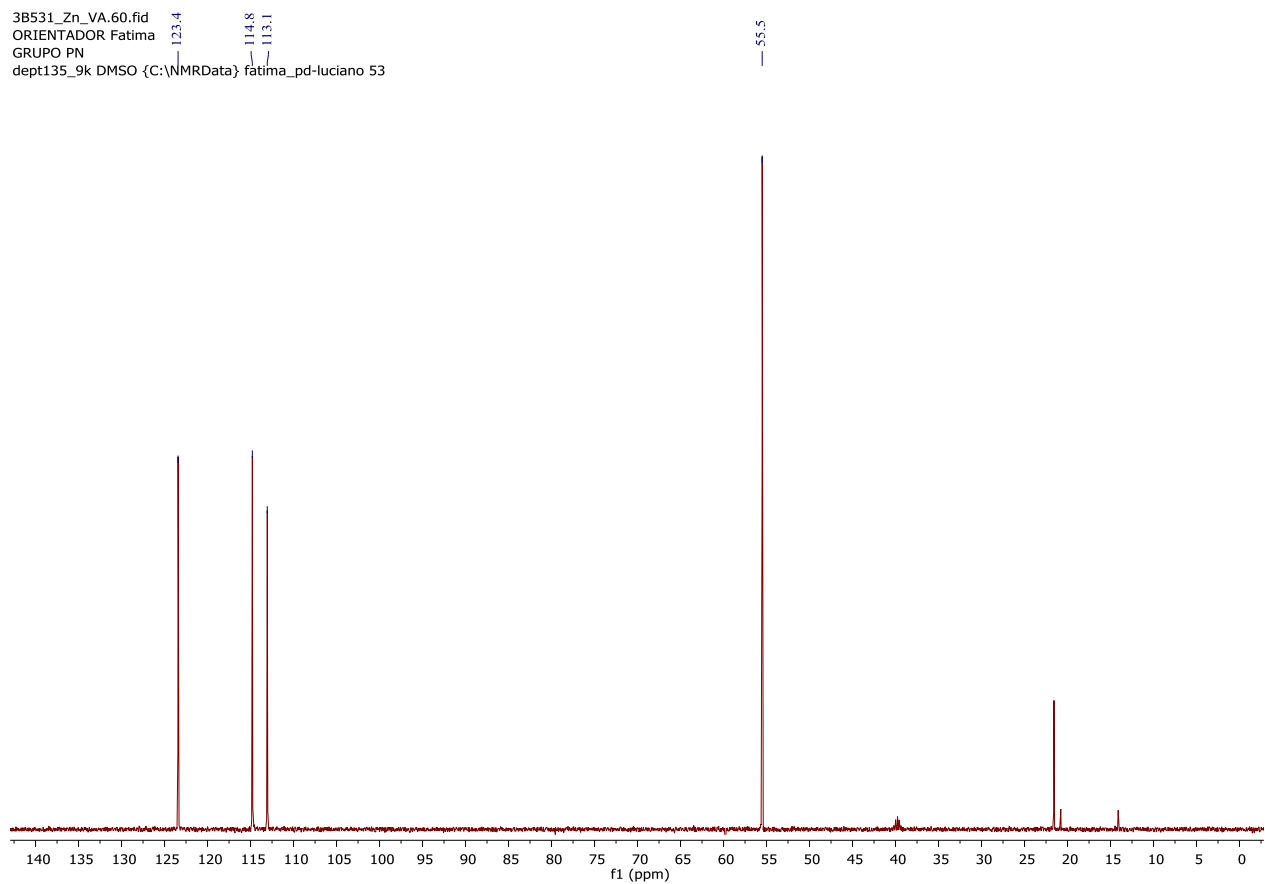


Figura S 89 – Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **42** ácido vanílico e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

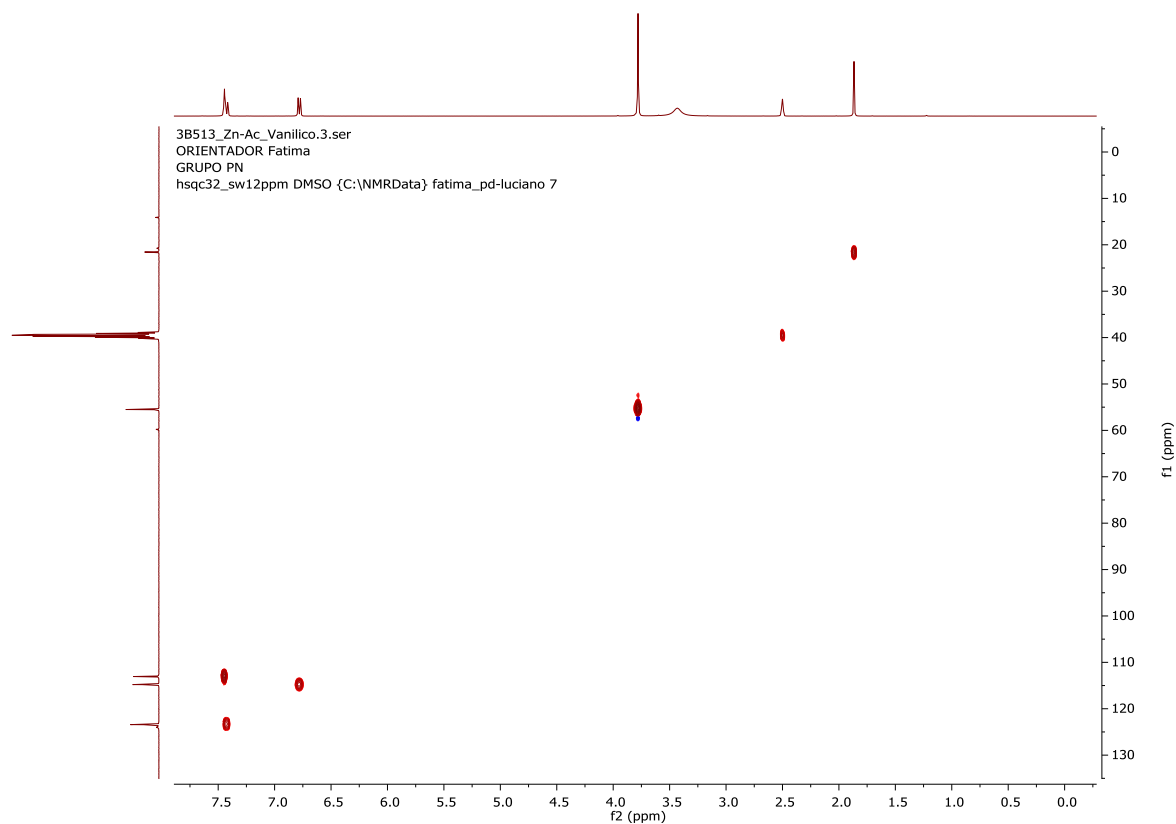


Figura S 90 – Mapa de contornos HSQC do complexo **42** ácido vanílico e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

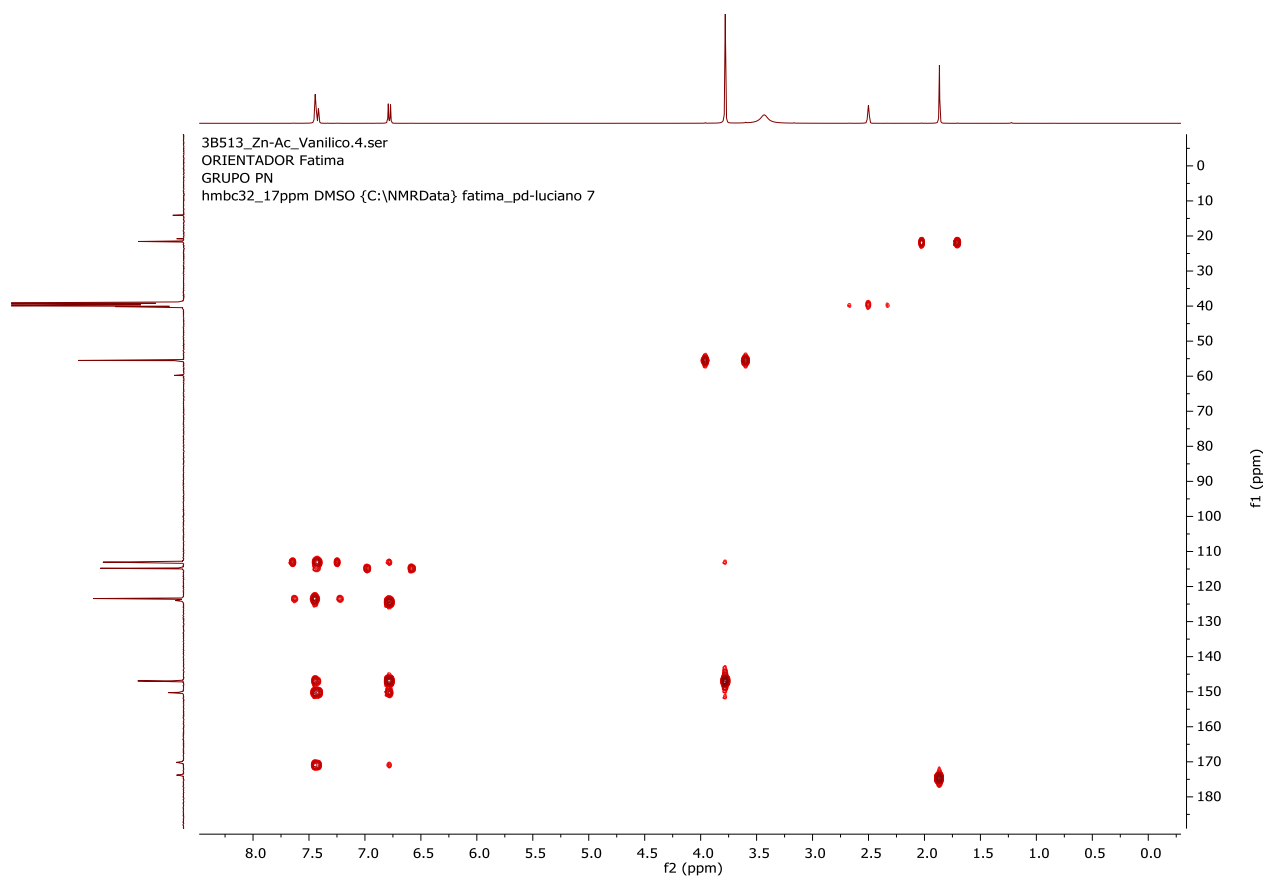


Figura S 91 – Mapa de contornos HMBC do complexo **42** ácido vanílico e zinco (DMSO- d_6 , 9.4 T).

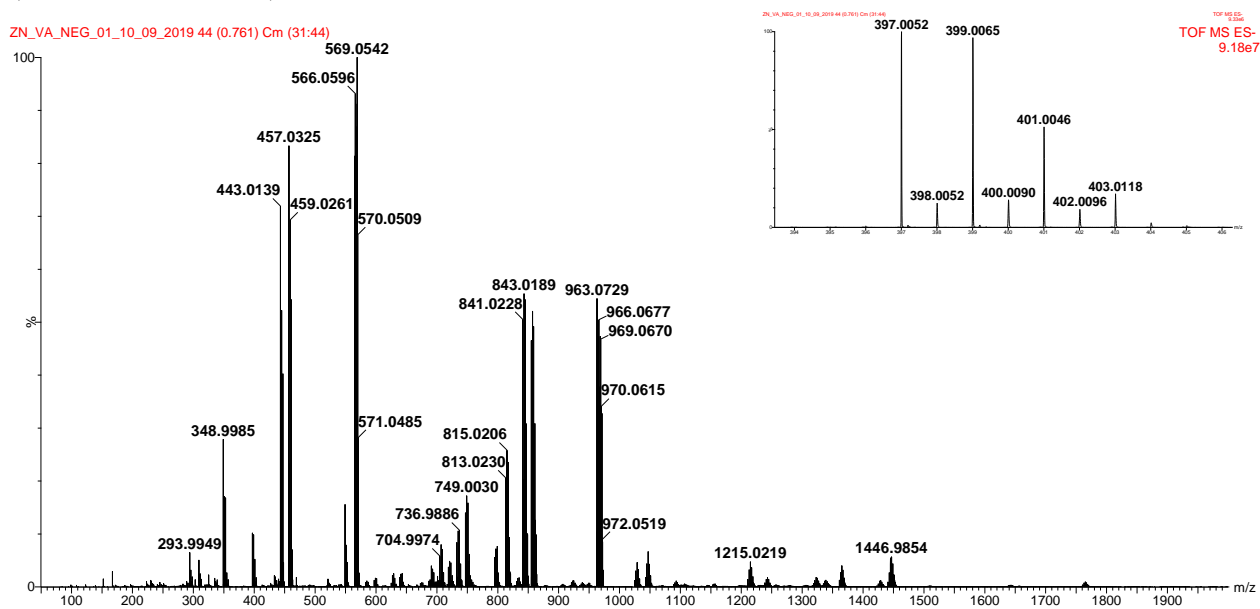


Figura S 92 - Espectro de MS¹ de **42** [M-H]⁻=397.0052

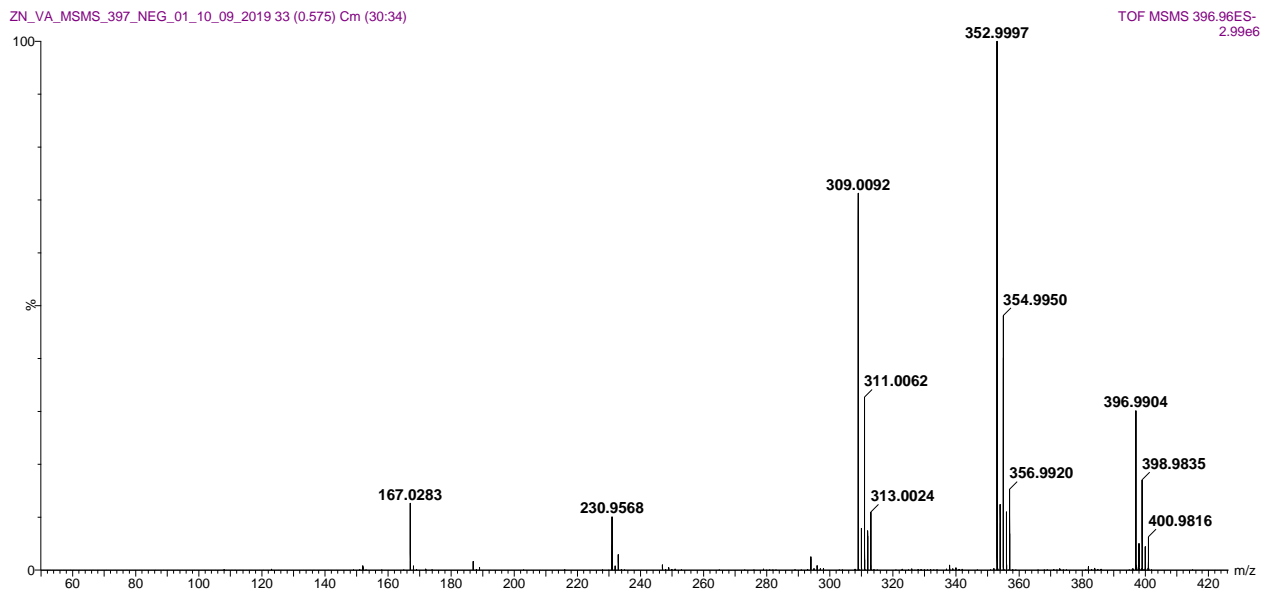


Figura S 93 - Espectro de MS² de **42** [M-H]⁻=397.0052

3B531_Fe_VA.10.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 proton128_sw17ppm DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 41

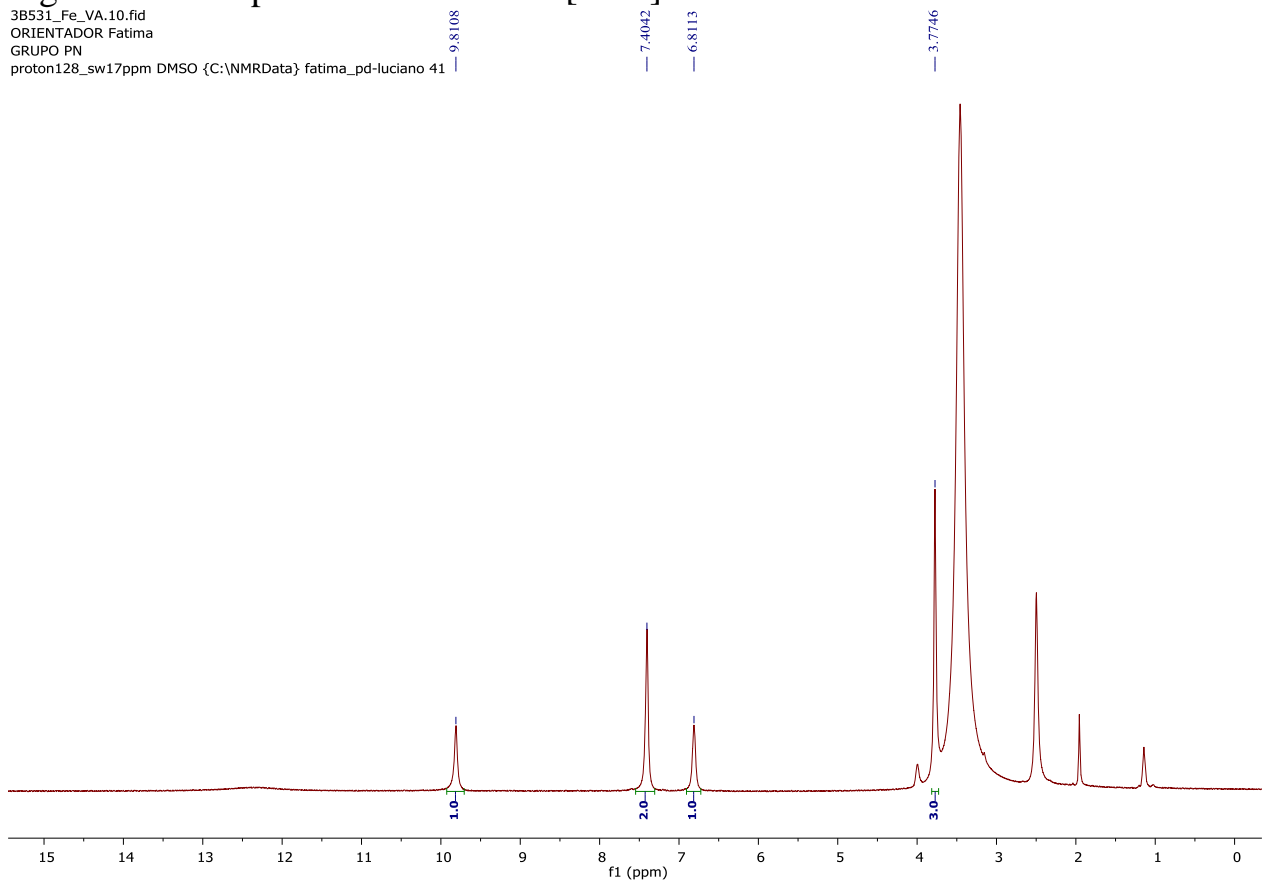


Figura S 94 – Espectro de RMN de ¹H do complexo **43** ácido vanílico e ferro (DMSO-*d*₆, 9.4 T).

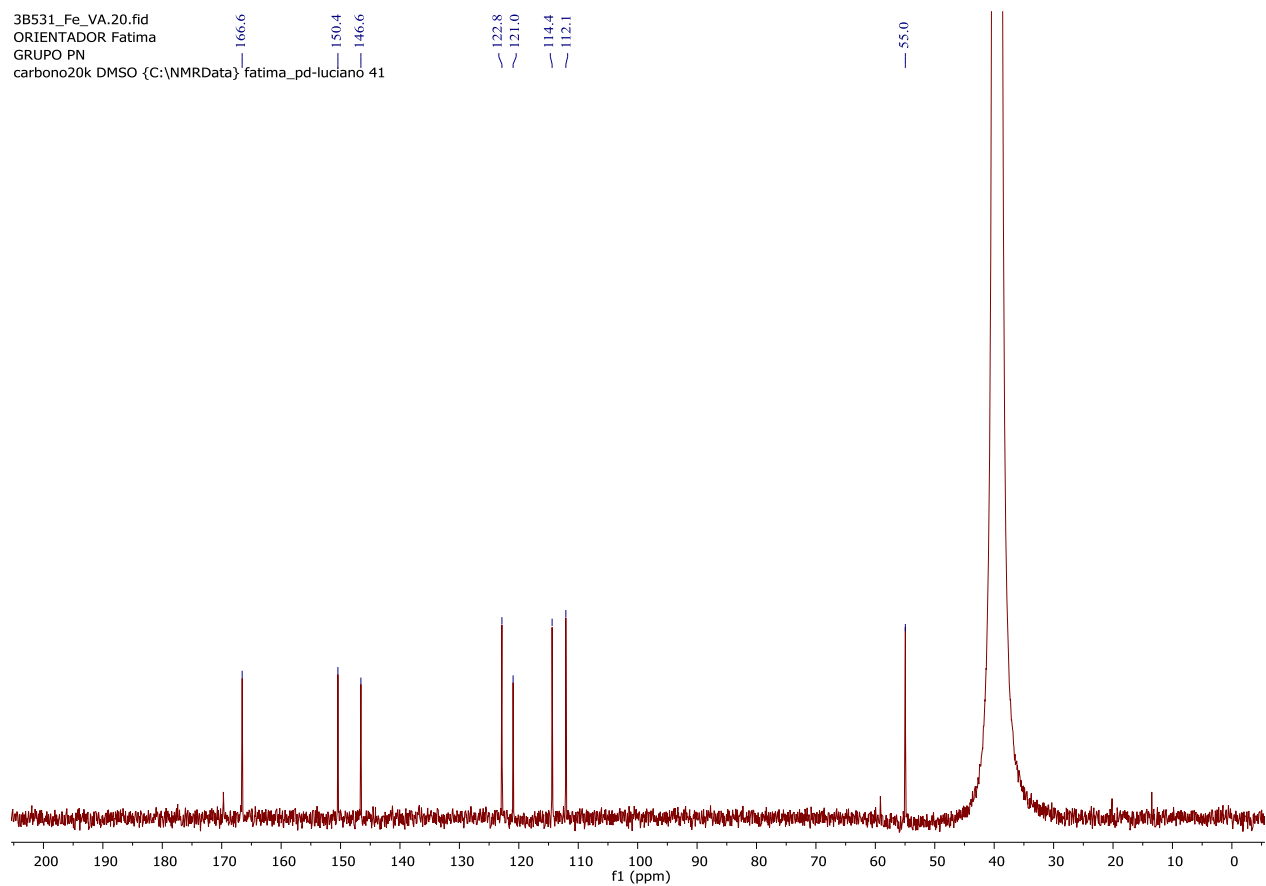


Figura S 95 – Espectro de RMN de ^{13}C do complexo **43** ácido vanílico e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

3B531_Fe_VA_DEPT135_60.fid
 ORIENTADOR Fatima
 GRUPO PN
 dept135_9k DMSO {C:\NMRData} fatima_pd-luciano 51

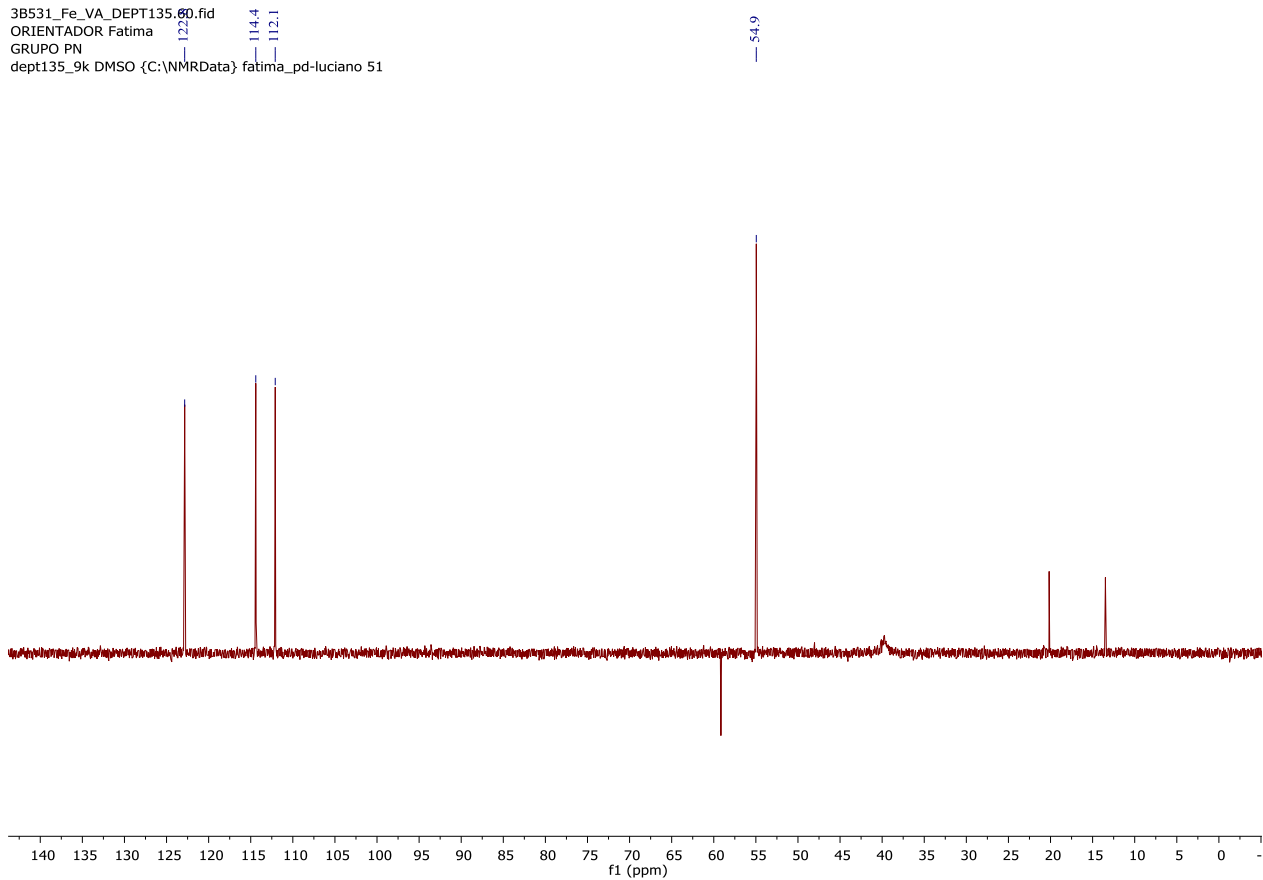


Figura S 96 – Espectro de RMN de DEPT-135 do complexo **43** ácido vanílico e ferro (DMSO- d_6 , 9.4 T).

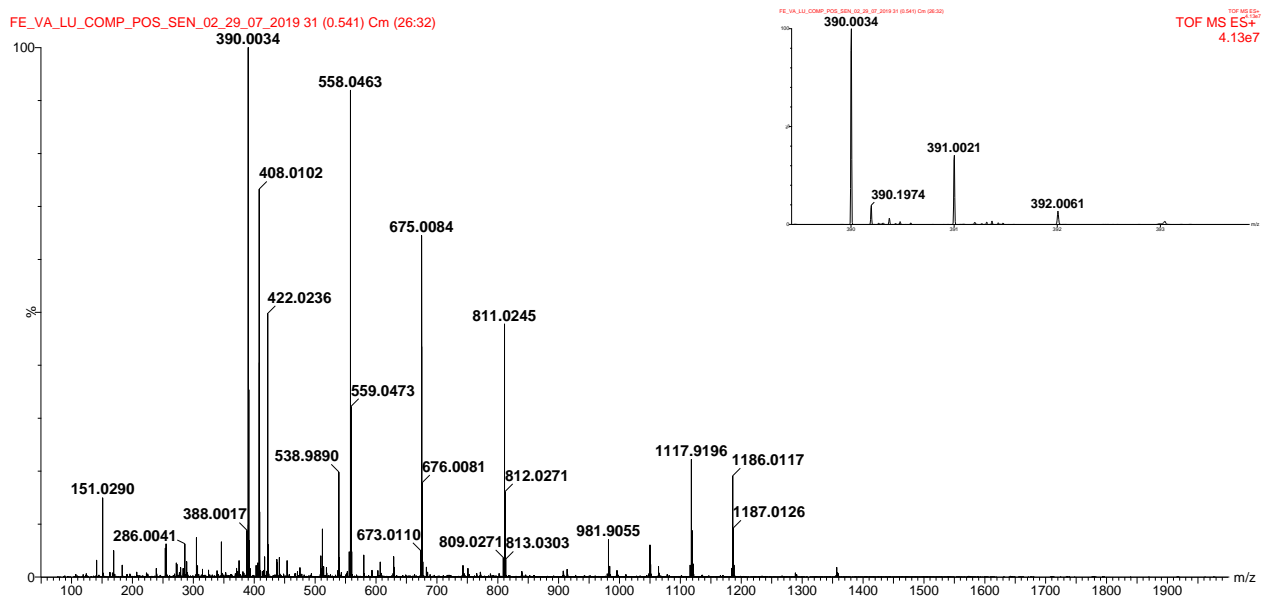


Figura S 97 - Espectro de MS¹ de **43** [M⁺]=390.0034

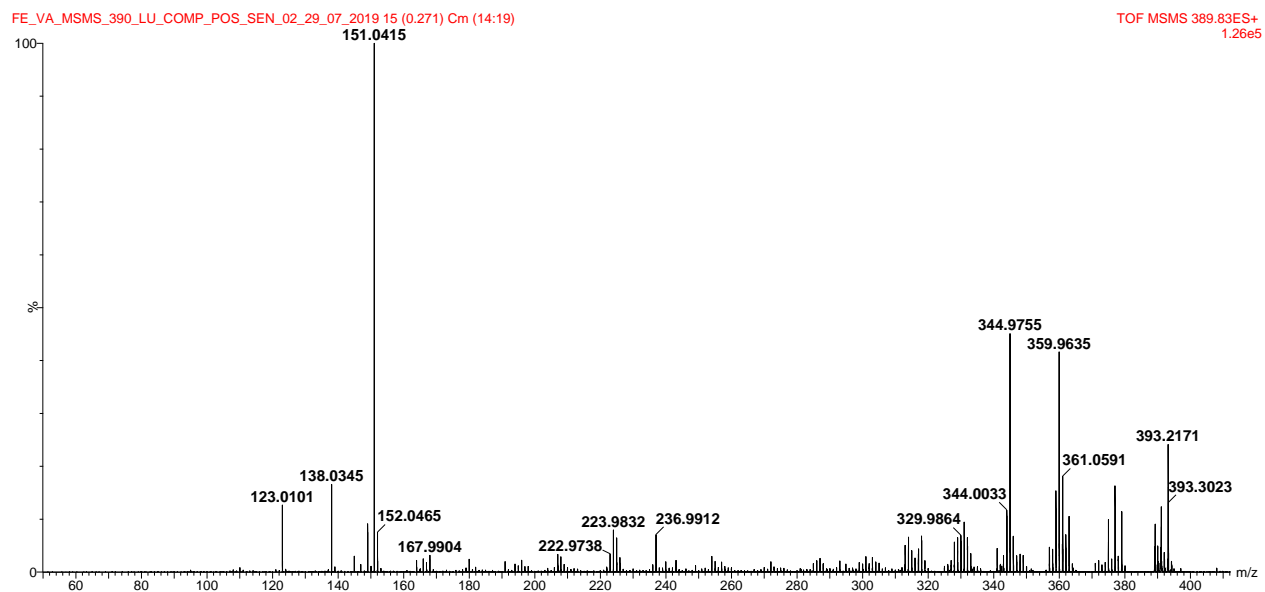


Figura S 98 - Espectro de MS² de **43** [M⁺]=390.0034

7. INFORMAÇÕES TÉCNICAS DOS DISPOSITIVOS DE PROCESSAMENTO DE DADOS

O processamento de dados é parte essencial quando se trabalha com busca e diferenciação de substâncias em matrizes complexas (MC), sejam elas a partir de dados de GC-MS, GC-MS/MS, HPLC-MS/MS, UPLC-HRMS MS/MS, entre outras.

O objetivo principal de pré-processar os dados brutos obtidos de MC inicialmente são corrigir desvios de tempo de retenção (RT), fazer a detecção dos íons precursor, redução do background da análise, fazer a deconvolução dos dados espectrais, agrupar os íons com contribuições isotópicas similares, realizar uma reanálise dos íons que estiveram numa intensidade de detecção abaixo do limitado (gap filling), entre outros.

Contudo, como é sabido que o processamento é realizado a partir de “limites” para detecção e agrupamento dos dados, resultando na “perda” de dados que poderiam ser de interesse do analista de dados. Para tanto, é sempre recomendado que uma análise sem os devidos processamentos seja realizada, possibilitando assim a comparação de dados sem e com pré-processamento, gerando uma visão mais assertiva a respeito da resposta global do experimento desenvolvido.

Para este trabalho, foi usado o software MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) para pré-processamento dos dados, MS-FINDER (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msfinder/main.html>) para a comparação dos espectros adquiridos com aqueles depositados nas bibliotecas, sejam elas experimentais e/ou simulados (*in silico*). Esse processo também foi auxiliado pela organização dos dados de MS² utilizando a plataforma online GNPS - The Global Natural Product Social Molecular Networking (<https://gnps.ucsd.edu/>), que a partir da rede molecular formada neste site, pode-se ajustar e melhor apresentar a rede, utilizando o software Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) para agrupar os

espectros de segunda ordem de acordo com a similaridade de seus íons fragmentos em clusters, que são formados por nodos e se conectam por vetores que são as diferenças de massa (Da) de seus íons precursores. Um esquema geral deste fluxo de processamento de dados foi apresentado na [Figura 1](#).

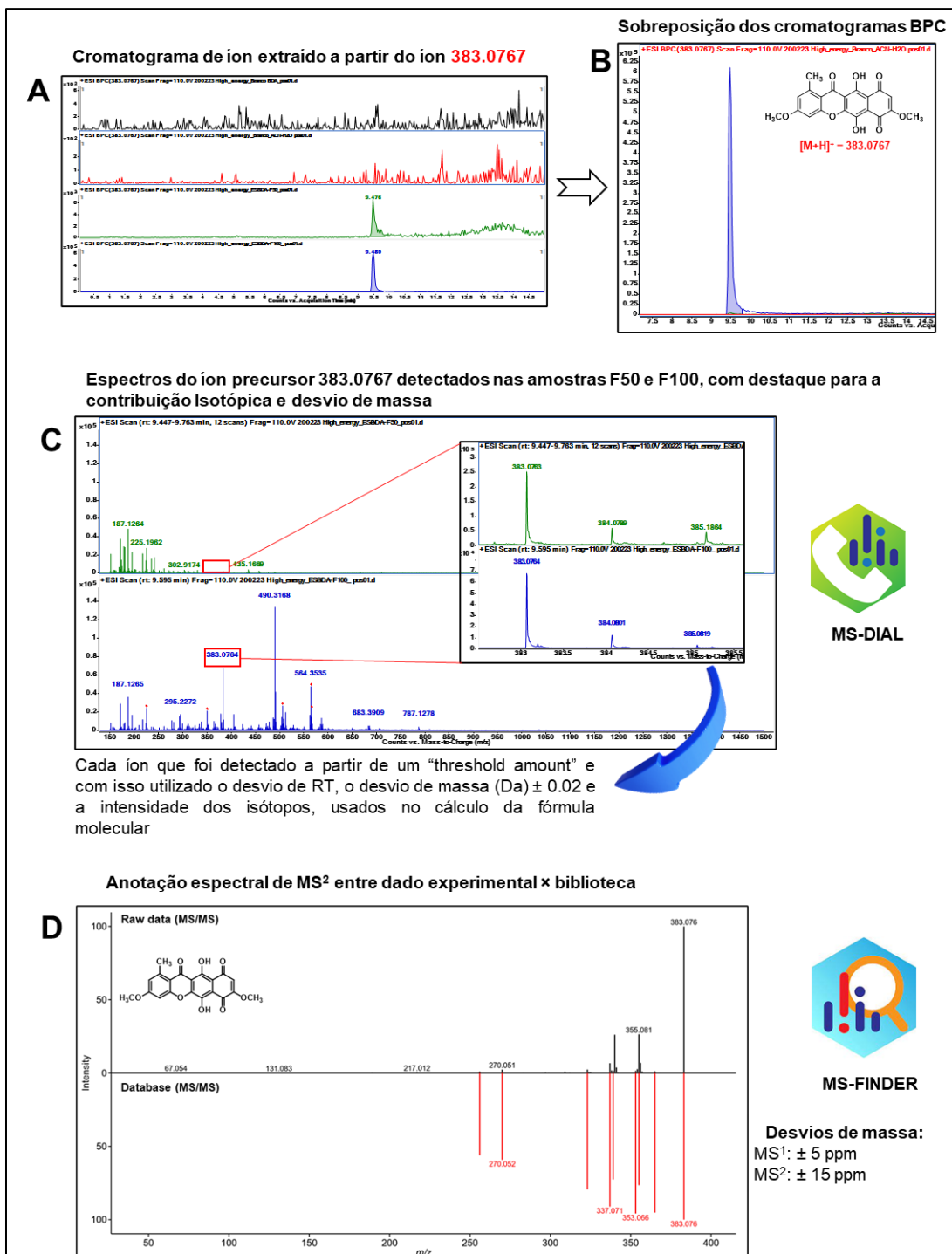


Figura 1 – Fluxo global de processamento de dados (alinhamento e deconvolução de espectros) minerados em processos “automatizados” utilizando os softwares MS-DIAL e MS-FINDER, de modo que em **A**: tem-se a detecção do íon precursor em todas as amostras, utilizando um “threshold amount” de $5.0E3$; **B**: é apresentada a sobreposição dos cromatogramas (BPC) destacando que a correção do tempo de retenção foi alcançada dentro do desvio selecionado, ± 0.5 min; **C**: A partir do espectro de MS¹, pode-se analisar o desvio de massa e a razão de contribuição

isotópica para cálculo da fórmula molecular; **D**: Tem-se demonstrado a anotação do espectro de MS² (MS-FINDER).

Assim, a partir do MS-DIAL software, temos que nos atentar para parâmetros básicos utilizados no momento da aquisição dos dados como duração da análise, sendo esse momento a hora de filtrar o intervalo de condicionamento da coluna cromatográfica (se esse período foi adquirido dados para o MS), além disso deve-se adicionar os intervalos de massa (Da) para o MS¹ e MS², e por sua vez selecionar o número de cargas máximo a partir do tipo de analitos em estudo. Não menos importante, deve-se neste momento selecionar a tolerância de massa (Da) para o MS¹ e MS², mesmo sabendo que essa tolerância afetará mais os íons de m/z menores que os maiores ([Figura 1, A-C](#)). Segue um exemplo:

$$\text{(Equação 1)} \quad \frac{0.02}{151.0273} \times 1.0 \times 10^6 = 132 \text{ ppm}$$

$$\text{(Equação 2)} \quad \frac{0.02}{806.3476} \times 1.0 \times 10^6 = 24 \text{ ppm}$$

Para ambas as **equações 1 e 2** o desvio de massa é constante (0.02 Da), contudo o cálculo de desvio de massa leva em consideração a constante da massa exata, que é específica para cada íon, portanto para considerar o alinhamento espectral, não temos somente esse parâmetro, cita-se o padrão isotópico e o tempo de retenção para os íons precursores como é apresentado na [Figura 1, C](#).

Após essa seleção, temos que determinar o “Minimum peak height” que nada mais é que a intensidade mínima para detecção dos íons nos espectros de MS¹, como se fosse um filtro para reduzir os interferentes de linha de base, e priorizar os íons que realmente representam a análise. E por último, temos a seleção da “MS/MS abundance cutt off” que representa o filtro para detecção de espectros de MS² com maior intensidade, pois as vezes quando vai para a câmara de colisão e conseqüentemente detecção no TOF, a abundância deste fica muito baixa, confundindo com o ruído, e o alinhamento dos espectros usando um fator de retenção e a mesma tolerância para o MS¹, demonstrado na [Figura 1, D](#). Ainda neste momento,

pode-se escolher filtrar amostra(s) que é seu(s) branco(s) e/ou experimento(s) controle.

Enfim, com o processamento realizado temos uma lista de íons, que representa todos os íons de todas as amostras alinhados, e agrupados em uma tabela demonstrando de forma relativa à intensidade e a área referente a cada um deles. Essa lista pode ser exportada para análises de quantificação relativa, análises estatísticas como PCA, HCA, entre outras, além de resultar em um dado pré tratado para a submissão na plataforma GNPS e para o software de busca em bases de dados MS-FINDER.

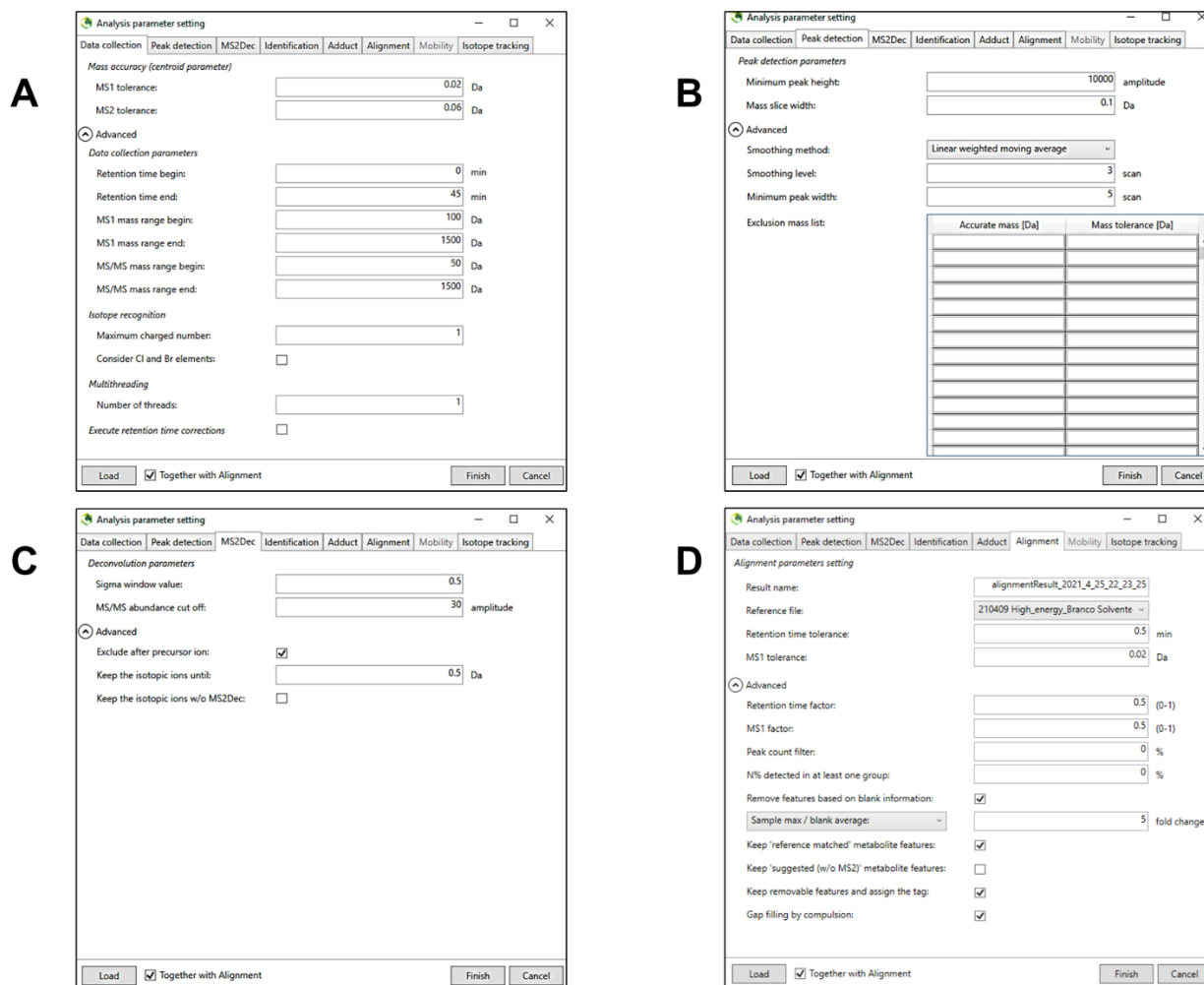


Figura 2 – Passos modulação dos parâmetros para processamentos dos dados em software MS-DIAL, em **A**: “Data collection” parâmetros básicos da aquisição de dados utilizados para o sistema cromatográfico e o espectrômetro de massas, aliado com as faixas de tolerância de massa; **B**: “Peak detection” é o corte pela intensidade selecionada (threshold amount), além de poder selecionar uma lista de exclusão de íons contaminantes; **C**: “MS2Dec” é o campo que selecionamos um “cut off” para filtrar sinais ruído das análises, além de ajustarmos a resolução do sinal detectado e estimar um valor limite para a variação da contribuição isotópica; **D**: “Alignment” é o ponto que estima-se as condições para alinhamento dos dados, com tolerância de RT, tolerância de massa, remoção dos dados referente ao “branco” de amostra, entre outros.

O software MS-FINDER utiliza a lista resultante do pré-processamento realizado no MS-DIAL para fazer a análise de pareamento dos dados com aqueles depositados nas bibliotecas de dados experimentais e *in silico*. Para isso é importante conhecer alguns parâmetros essenciais para o sucesso dessa etapa, como as informações de aquisição dos dados no espectrômetro de massas, (Figura 2, A), e

verificar os átomos que são necessários para calcular as fórmulas moleculares levando em consideração a contribuição isotópica do íon precursor dentro de uma razão de tolerância estipulada (Figura 2, B), com isso selecionar o tipo de dados para parear com as bibliotecas, sejam elas de EI ou CID a partir de um “cut off” mínimo para o score de pareamento com valores 0-10 (Figura 2, C), e por fim a seleção de bases de dados para a busca de similaridade espectral em relação aos íons fragmentos experimental/bibliotecas que hoje já somam mais de 20 bibliotecas (Figura 2, D).

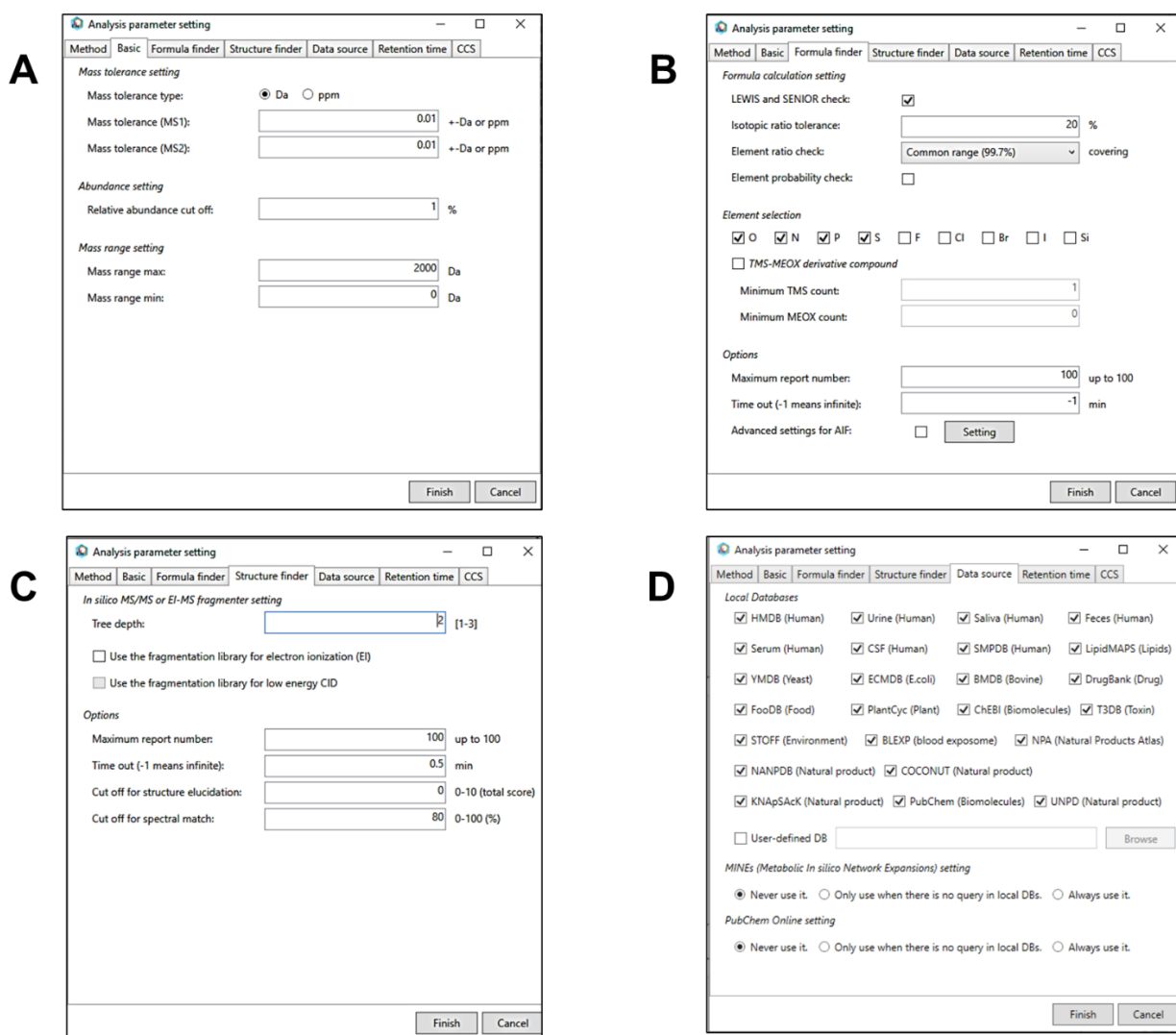


Figura 3 – Passos para a busca de similaridade de dados nas bibliotecas no MS-FINDER, em **A**: “Basic” são inseridos os parâmetros de aquisição para MS1, além de abundância relativa e desvios de massa que podem ser em Da, ou diretamente em ppm; **B**: “Formula finder” são os parâmetros de cálculo da fórmula molecular, análise

da contribuição isotópica do íon precursor, e tolerância dessa contribuição; **C**: “Structure finder” são informações sobre o pareamento com as bibliotecas de dados *in silico* além de seleção do “cut off” para match com a biblioteca; **D**: “Data source” é a seleção das bibliotecas para a busca de similaridade espectral, ou a seleção de uma biblioteca externa.

Assim, com o pré-processamento realizado, tem-se os dados completamente ajustados para submeter à plataforma online GNPS na qual tem alguns parâmetros importantes para se atentar, como a quantidade mínima de íons-fragmento para existir a conexão entre nodos por vetores que nada mais é que a diferença em massa (Da) referente aos íons-precursores dos espectros de segunda ordem que possuem similaridades entre si. Isso funciona como demonstrado na imagem que segue ([Figura 4](#)) onde os íons-precursores diferem apenas em unidades de massa bem características que devem receber especial atenção até mesmo para as casas decimais. Um exemplo claro disso é a relação vetorial entre os íons **353.0656** e **383.0785** que obteve uma diferença de 30.01 Da, e essa massa (em dados de alta resolução) pode significar um substituinte formaldeído (**CH₂O**, 30.0106) ou então dois grupos metilas (**C₂H₆**, 30.0470), o destaque nas duas primeiras casas decimais, que são as que devem ser consideradas, podem distinguir claramente que podem ser os substituintes que representam a diferença em massa dos íons precursores.

Margem de tolerância
 $MS^1 = 0.02$ Da
 $MS^2 = 0.06$ Da
 N° mínimo íons-fragmento
 para agrupar nodos = 3

A comparação dos três espectros de MS/MS conectados a partir de vetores é explicada pela similaridade dos íons-fragmentos assim como rotas de fragmentação similares

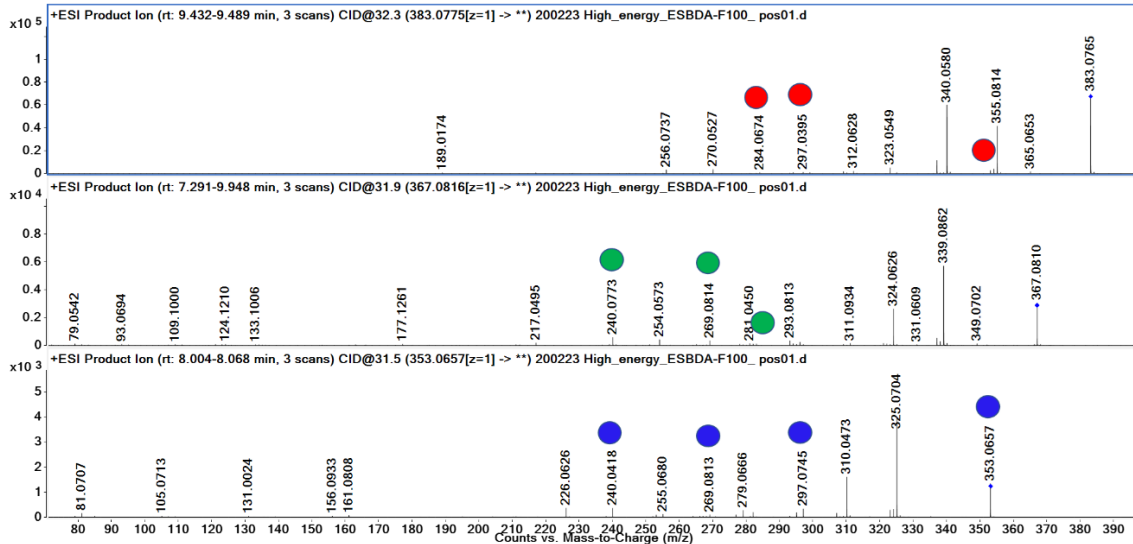
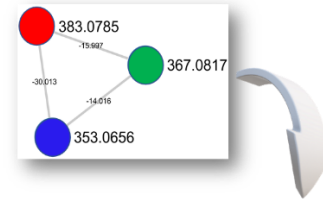


Figura 4 - Comparação dos espectros de MS/MS a partir de seus íons precursoros 383.0765, 367.0810 e 353.0657 e destaque com bolas de cores para os íons fragmentos entre os espectros que justificam as suas conexões por vetores.