



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICA E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO QUÍMICA

Isabela Rodrigues Molina

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DO
COGUMELO *PHLEBOPUS BENIENSIS***

Florianópolis - SC

Isabela Rodrigues Molina

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DO
COGUMELO *PHLEBOPUS BENIENSIS*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo
Coorientador: Me. Lucas Pradi

Florianópolis - SC

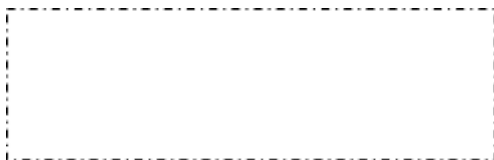
2023

Isabela Rodrigues Molina

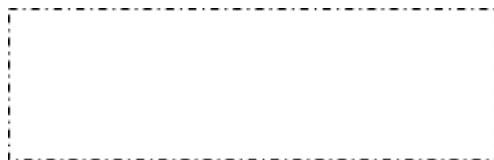
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL METABOLÔMICO DO COGUMELO *PHLEBOPUS*
BENIENSIS

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em química e aprovado em sua forma final pelo Curso de química.

Florianópolis, 28 de Novembro de 2023.



Coordenação do Curso



Msc. Lucas Pradi
Coorientador

Banca examinadora



Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo
Orientador



Prof. Dr. Luiz Pollo
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Eduard Westphal
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rodrigues Molina, Isabela
Caracterização do perfil metabolômico do cogumelo
Phlebopus beniensis / Isabela Rodrigues Molina ;
orientador, Louis P. Sandjo, coorientador, Lucas Pradi,
2023.
73 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado,
Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. Phlebopus beniensis;
Macrofungos; Técnicas espectrométricas; Atividade
biológica. . I. P. Sandjo, Louis. II. Pradi, Lucas. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química
- Bacharelado. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, primeiramente, aos meus pais e irmã, Jane Rodrigues, Fabricio William Molina e Giovanna Rodrigues Molina, por todo o apoio, incentivo e carinho que me proporcionaram ao longo de todas as minhas escolhas e jornada até este momento. Admiro-os e me inspiro imensamente em cada um de vocês. Sou eternamente grata por tudo que fazem por mim.

Além disso, gostaria de expressar gratidão aos meus avós, familiares e amigos de Bauru-SP, que sempre me apoiaram com palavras, gestos e carinho, mesmo estando distante. Ao longo desses anos, embora não tenha estado presente fisicamente, em celebrações, momentos difíceis e ocasiões especiais de suas vidas, quero que saibam que estou com vocês em pensamento todos os dias. Quero dedicar também um agradecimento especial à Ana Vitória Vicente Pereira, que esteve presente em todos os momentos em que mais precisei.

Aos amigos que tive a honra de conhecer em Florianópolis-SC, meu sincero obrigado por toda a experiência e convivência que pude compartilhar com vocês. Esses anos foram cheios de aprendizados, tanto acadêmicos quanto para a vida. Quero destacar as duas primeiras pessoas com quem tive mais contato e mantenho um forte vínculo até hoje, Wilson Clemente dos Passos (Wilson Wilson) e Larissa Inacio (Larichutz). Só tenho que agradecer por nos aturarmos diariamente, pelas conversas descontraídas, pelos apoios pré e pós-provas, e pelas lanchotas ao fim da tarde. Wilson, (o que seria de mim sem você!?) você é uma pessoa incrível que merece o mundo todo, saiba que te admiro e te agradeço por toda companhia que vai além da faculdade, durante todos esse tempo. A você e a Julia, obrigada por ouvirem todas as minhas reclamações e desabafos ao longo deste último ano de conclusão de curso.

Aos colegas e amigos do laboratório proporcionado pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), minha sincera gratidão por todo o acolhimento, ensinamento, e aprendizado que recebi. Agradeço pelas conversas, fofocas e apoio compartilhados na salinha de estudo. Cada um de vocês foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Agradeço ao Octo pelas gambiarras ensinadas, à Jhuly pela paciência em ouvir todas as minhas histórias, à Ana e Mona pelos conselhos, e a todos que fazem parte do meu dia a dia no laboratório - Chantal, Otilia, Geovanna, Nathalia, Raphael, Gabriella, Cassia, Bella, Igor, Manu.

Gostaria também de agradecer ao Louis P. Sandjo pela oportunidade de entrar no LQPN, pela confiança e pelos ensinamentos ao longo dos trabalhos realizados. E um agradecimento especial ao Lucas Pradi por ter me apresentado ao incrível mundo dos fungos,

despertando meu interesse por cada nova espécie que conheço. Lucas, este trabalho talvez nunca sairia do papel se não fosse por você, agradeço imensamente por todos os conhecimentos passados a mim e por dar início a essa incrível linha de pesquisa no laboratório.

Agradeço ainda a Universidade Federal de Santa Catarina por oferecer um ensino de qualidade, uma ótima infraestrutura e a todos os funcionários que, por meio de diversas formas, possibilitaram minha jornada até a conclusão deste curso. Um agradecimento especial ao Restaurante Universitário (RU) por fornecer refeições de qualidade durante todos os dias da semana.

Por fim, agradeço a Deus e a todos que fazem parte da minha vida e trajetória. Mesmo aqueles que não foram mencionados aqui, recebam meu sincero agradecimento pelo apoio!

RESUMO

Os fungos representam uma das fontes mais abundantes de produtos naturais, destacando-se pela produção de metabólitos secundários que resultaram no desenvolvimento de medicamentos e fungicidas de sucesso no mercado. Cogumelos, dos filos Basidiomycota e Ascomycota, têm sido tradicionalmente reconhecidos como fontes terapêuticas para diversas doenças, destacando-se pela produção de diversos metabólitos bioativos. No entanto, muitos desses macrofungos permanecem pouco explorados e até mesmo desconhecidos na literatura científica. Recentemente, compostos produzidos por cogumelos pertencentes ao filo Basidiomycota receberam destaque na literatura devido ao seu potencial medicinal. Dentre estes, atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica. Considerando a variedade de cogumelos ainda não caracterizados quimicamente e avaliados biologicamente, se estabelece a oportunidade da investigação destes como fonte de produtos naturais com potencial bioativo. Sendo assim, este trabalho visa uma investigação nos metabólitos secundários e no perfil metabolômico nas frações pertencentes a espécie de cogumelo *Phlebopus beniensis*, com crescimento natural em solo brasileiro e pouco difundido na literatura em termos de composição química e aplicações biológicas. Através da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-ESI-MS/MS), cromatografia gasosa (GC-MS) e ferramentas computacionais de estudo metabolômico, extratos de *P. beniensis* foram caracterizados e diferentes classes de compostos foram identificados, dentre eles os polióis, fenólicos, lipídios, ácidos graxos, alcalóides indólicos e ácidos orgânicos. Avaliou-se o potencial de frações obtidas por fracionamento líquido-líquido contra a enzima tripanotona redutase, enzima encontrada em parasitas protozoários da ordem Kinetoplastida, associados à doenças tropicais negligenciadas. A fração butanólica apresentou resultado promissor com 99% de inibição em uma concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: *Phlebopus beniensis*; Macrofungos; Técnicas espectrométricas; Atividade biológica.

ABSTRACT

Fungi represent one of the most abundant sources of natural products, standing out for the production of secondary metabolites that have led to the development of successful drugs and fungicides in the market. Mushroom-derived fungi, belonging to the phyla Basidiomycota and Ascomycota, have been traditionally recognized as therapeutic sources for various diseases, showcasing the production of diverse bioactive metabolites. However, many of these macrofungi remain poorly explored and even unknown in the scientific literature. Recently, compounds from biogenetic origins of Basidiomycota have been isolated and reported in the literature due to their medicinal potential, including antibacterial, antiviral, and antifungal activities. Considering the variety of mushrooms not yet chemically characterized and biologically evaluated, there is an opportunity to investigate them as a source of natural products with bioactive potential. Therefore, this study aims to investigate the secondary metabolites and the metabolic profile in fractions belonging to the species of the mushroom *Phlebopus beniensis*, which grows naturally in Brazilian soil and is poorly documented in the literature in terms of chemical composition and biological applications. Using high-resolution mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS), gas chromatography (GC-MS), and computational tools for metabolomic studies, extracts from *P. beniensis* were characterized, and different classes of compounds were identified, including polyols, phenolics, lipids, fatty acids, indolic alkaloids, and organic acids. The potential of fractions obtained by liquid-liquid fractionation against the enzyme trypanothione reductase was evaluated, an enzyme found in protozoan parasites of the order Kinetoplastida, associated with neglected tropical diseases. The butanolic fraction showed promising results with 99% inhibition at a concentration of 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Keywords: *Phlebopus beniensis*; Macrofungi; Spectrometric techniques; Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas reprodutivas de fungos micro e macroscópicos.	18
Figura 2 - Moléculas isoladas de fungos com atividades biológicas.	20
Figura 3 - Corpo somático subterrâneo.	21
Figura 4 - Metabólitos de cogumelos com atividades biológicas.	23
Figura 5 - <i>Phlebopus beniensis</i>.	25
Figura 6 - Compostos pertencentes aos <i>Phlebopus</i> sp.	26
Figura 7 - Estados brasileiros com presença do <i>Phlebopus beniensis</i>.	27
Figura 9 - Reação de oxidação do ácido variegático.	40
Figura 10 - Perfil de fragmentação da variegatorubina para o modo negativo.	41
Figura 11 - Perfil de fragmentação da variegatorubina para o modo positivo.	42
Figura 12 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de Aspulvinona E.	43
Figura 13 - Perfil de fragmentação do Aspulvinona E no modo negativo.	44
Figura 14 - Perfil de fragmentação do Aspulvinona E no modo positivo.	45
Figura 15- Ácido linoleico como precursor de voláteis em fungos.	47
Figura 16 - Ácidos graxos identificados.	48
Figura 17 - Perfil de fragmentação do ácido cítrico.	49
Figura 22 - Partes do cogumelos	65
Figura 23 - Cromatogramas referente ao branco do cogumelo <i>Phlebopus beniensis</i>, nos modos negativos e positivos, respectivamente.	65
Figura 24 - Cromatogramas referente ao extrato Bruto do cogumelo <i>Phlebopus beniensis</i>, nos modos negativos e positivos, respectivamente.	66
Figura 25 - Cromatogramas referente a fração de diclorometano do cogumelos <i>Phlebopus beniensis</i>, nos modos negativos e positivos, respectivamente.	67
Figura 26 - Cromatogramas referente a fração de acetato de etila do cogumelos <i>Phlebopus beniensis</i>, nos modos negativos e positivos, respectivamente	67
Figura 27 - Cromatogramas referente a fração de Butanol do cogumelos <i>Phlebopus beniensis</i>, nos modos negativos e positivos, respectivamente.	68
Figura 28 - Cromatogramas referente a fração aquosa do cogumelos <i>Phlebopus</i>	

beniensis, nos modos negativos e positivos, respectivamente. 68

Figura 29 - Cromatogramas referente a subfração butanólica (20% ACN/H₂O) do cogumelos *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente. 69

Figura 30 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidilcolina. 70

Figura 31 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidiletanolamina. 70

Figura 32 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidiletanolamina. 71

Figura 33 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidiletanolamina. 71

Figura 34 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de ceramida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos caracterizados das frações Butanólica, Acetato de Etila e DCM	38
Tabela 3 - Teste de inibição em enzima de tripanotona redutase.	54
Tabela 4 - Subfração da fração butanólica.	55
Tabela 5 - Compostos identificados na fração de 20%	55
Tabela 6 - IC50 da fração butanólica.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

P. beniensis: *Phlebopus beniensis*

PNs: Produtos Naturais

P.A: Pureza Analítica

LQPN: Laboratório de Química de Produtos Naturais

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

AcOEt: Acetato de Etila

ButOH: Butanol

DCM: Diclorometano

MeOH: Metanol

ACN: Acetonitrila

CL-EM: Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CLUE-EMAR: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução

GNPS: do inglês *Global Natural Products Social Molecular Networking*

m/z: razão massa/carga

DDA: do inglês *Data-Dependent Acquisition*

DIA: do inglês *Data-Independent Acquisition*

ESI: do inglês *Electrospray Ionization*, Ionização por Electrospray

ESI+: Ionização por Electrospray modo positivo

ESI-: Ionização por Electrospray modo negativo

DP: Desvio padrão

C18: Coluna de fase reversa

TR: Tripanotiona redutase

DTNs: Doenças tropicais negligenciadas

Acil-CoA: acil-coenzima A

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Fungos	17
2.2. Metabólitos secundários de fungos	19
2.3. Cogumelos e suas propriedades	21
2.4. <i>Phlebopus beniensis</i>	23
2.5. Estudo metabolômico	27
4.7. <i>Tripanotiona</i> redutase	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. METODOLOGIA	32
4.1. Materiais e equipamentos	32
4.2. Material caracterizado	32
4.3. Preparação do extrato bruto e fracionamento do <i>Phlebopus beniensis</i>	33
4.4. Preparação das amostras e análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada com Espectroscopia de Massas a alta resolução (CLUE-EMAR)	33
4.5. Preparação das amostras e análise por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectroscopia de Massas (CG-EM)	34
4.6. Processamento dos dados utilizando softwares	35
4.7. Avaliação da atividade inibitória de extratos a enzima de <i>tripanotiona</i> redutase	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Caracterização química do extrato bruto e do fracionamento do cogumelo <i>Phlebopus beniensis</i>	37
5.2. Polióis	39
5.3. Compostos fenólicos (pigmentos naturais)	39

5.4. Lipídios	45
5.6. Ácidos orgânicos	48
5.8. Caracterização química da fração hexânica do cogumelo <i>Phlebopus beniensis</i> pelo CG-MS	49
5.9. Rede molecular gerada pela plataforma GNPS	52
5.10. Testes in vitro da atividade inibitória da enzima de tripanotiona redutase	54
6. CONCLUSÃO	57
7. REFERÊNCIAS	58
8. APÊNDICE	65

1. INTRODUÇÃO

A exploração de fontes naturais de agentes bioativos inovadores pode fornecer pistas para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, sendo os produtos naturais envolvidos em muitos medicamentos já desenvolvidos e comercializados no mercado (Debbab et al. 2011, 2012; Aly et al. 2011; Pan et al. 2010, Newman, 2010). Um exemplo notável é a descoberta da penicilina derivada do *Penicillium notatum*, em 1928 por Fleming, que revolucionou a medicina ao incluir os fungos como uma fonte rica de produtos naturais (Blackwell 2011; Dai 2010). Contudo, o conhecimento sobre essa diversidade fúngica ainda é limitado. Segundo David L. Hawksworth (2017), estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos na terra (de um ponto de vista conservador), das quais apenas cerca de 120.000 são atualmente reconhecidas. Desta vasta diversidade, um número menor foi explorado para a produção de metabólitos farmacologicamente importantes (Silva, 2013).

Muitos medicamentos e fungicidas bem-sucedidos do mercado foram desenvolvidos a partir de metabólitos secundários fúngicos, incluindo antibióticos (Penicillina), redutores de colesterol (estatinas), imunossupressores (ciclosporina), entre outros (Aly, 2011; Kozlovskii, 2013). Os fungos formadores de cogumelos, pertencentes ao filo Basidiomycota e Ascomycota, são fonte de diferentes metabólitos bioativos e tradicionalmente acreditados como remédios para muitas doenças (Sullivan, 2006; Aly, 2011; Kawagishi, 2010). Como exemplo o continente asiático, há séculos, faz uso de uma variedade de cogumelos medicinais para a prevenção e tratamento de doenças (Lindequist, 2010; Poucheret, 2006).

Nas últimas décadas, compostos com potencial bioativo foram isolados de diferentes origens biogenéticas de Basidiomycota, como coprinol, ganodermadiol, lucidiol, udasterpureol A, entre outras, apresentando atividades biológicas como, antibacterianas, antivirais e antifúngicas. No entanto, apesar da promissora atividade biológica desses macrofungos muitos deles permanecem pouco investigados (Silva, 2013).

Muitos basidiomycotas ainda necessitam de estudos químicos ou farmacológicos, como no caso do cogumelo *Phlebopus beniensis*, que é de crescimento natural em solo brasileiro, pertencente a uma pequena família *Boletiniaceae*, que compreende apenas dois gêneros: *Boletinus Murril spp.* e *Phlebopus spp.* (Raghoonundon, 2021). Sua distribuição se concentra nos biomas da Amazônia e da Mata Atlântica, podendo ser encontrado em

vários estados brasileiros, predominantemente de áreas tropicais e subtropicais. Apesar de sua ampla distribuição geográfica, este fungo foi registrado pela primeira vez na literatura na cidade de Florianópolis-SC e não apresenta relatos com sua caracterização química e aplicação biológica.

Doenças associadas à pobreza são comumente referidas como doenças tropicais negligenciadas (DTNs), impactando cerca de 1,7 bilhão de pessoas que vivem em condições mais pobres do mundo. O termo “negligenciadas” é atribuído porque essas enfermidades não apenas afetam de forma desproporcional comunidades empobrecidas, mas também recebem menos atenção em comparação com outras doenças. A falta de incentivo econômico para as indústrias farmacêuticas desenvolverem medicamentos destinados a essas doenças deixa a responsabilidade da pesquisa voltada para doenças negligenciadas nas mãos de universidades e institutos de pesquisa governamentais.

Essas doenças são causadas por patógenos, da família de vírus, bactérias, parasitas e fungos. Algumas dessas doenças, compostas em parte por Leishmaniose, doença de Chagas, filariose linfática, micetoma e oncocercose, são responsáveis por aproximadamente, 500 mil a 1 milhão de óbitos por ano. Para essas doenças geralmente não se tem tratamento ou mesmo agentes químicos que sejam eficientes e não apresentam efeitos colaterais severos. Isso faz com que a demanda por descoberta ou desenvolvimento de novos fármacos seja permanente (Mitra, 2017).

Dito isto, este trabalho visa estudar o perfil metabolômico do cogumelo *Phlebopus beniensis* através de diferentes técnicas espectrométricas, assim como realizar um estudo bioguiado de seus extratos quanto à atividade biológica em trypanosoma cruzi em estudo enzimático para a avaliação de seu potencial contra doenças tropicais negligenciadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fungos

Os fungos, são fundamentais para o funcionamento dos ecossistemas, atuando como decompositores primários de matéria orgânica, onde são responsáveis pela reciclagem de nutrientes, sendo organismos capazes de decompor a lignina (polímero de parede vegetal mais resistente), além de outras funções. Como osmotróficos, esses organismos ingerem nutrientes por meio de absorção, produzindo uma ampla variedade de ácidos orgânicos e enzimas que podem dissolver e reciclar materiais artificiais e recalcitrantes (Cosgrove, 2007). Além das espécies saprobiontes (decompositores de matéria orgânica), os fungos podem estabelecer associações mutualísticas com outros organismos (simbióticas, parasitismo, entre outros) exercendo um papel de extrema importância nos ecossistemas. Segundo Santos (2015), mais de 90% das plantas dependem dessas associações mutualísticas com fungos para sua sobrevivência.

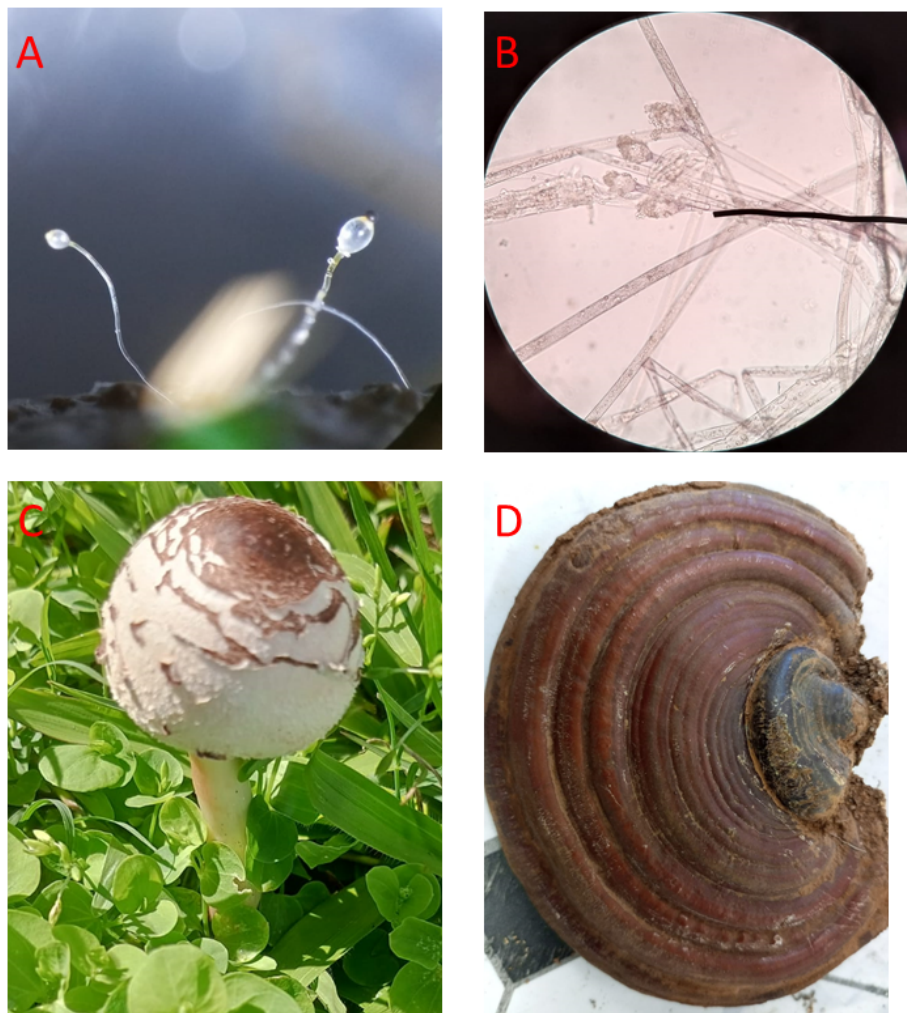
Apesar de geralmente associados a ecossistemas terrestres, os fungos podem ser encontrados crescendo em diversos substratos na terra, desde sedimentos oceânicos até o couro cabeludo humano. Embora a maioria das espécies fúngicas sejam saprófitas (alimentam-se a partir de matéria orgânica em decomposição), algumas espécies podem variar consideravelmente tanto nos substratos que decompõem quanto nas vias enzimáticas que utilizam (Peay, 2016).

Os fungos compõem um reino monofilético que se separou dos animais há cerca de 1 bilhão de anos (Taylor, 2006). Esses organismos são divididos entre duas principais características distintas. A primeira é a presença de crescimento hifal com a capacidade de formar uma rede de filamentos interconectados, sendo esses filamentos conhecidos como micélio. A segunda é a capacidade de se apresentarem de maneira leveduriformes, sendo encontrados em ambientes líquidos ou estressantes como no intestino anaeróbico e no néctar floral (Treseder, 2015; Kittelmann, 2013; Herrera, 2009; Peay, 2016). De toda forma, são os fungos hifais que representam a maior diversidade e abundância em sistemas naturais (Talbot, 2014; Tedersoo, 2014).

O estilo de vida hifal, permite aos fungos perceber e responder ao ambiente, compartilhando recursos e coordenando atividade através dos ambientes heterogêneos percorridos por cada micélio (Boddy, 1999). Esses conjuntos hifais podem também

apresentar estruturas reprodutivas microscópicas como os conídios (*Rhizopus sp.*, *Pilobolus tode*, entre outros) e macroscópicas como corpos reprodutivos, observado em cogumelos e em orelhas de pau (Figura 1) (Santos, 2015).

Figura 1 - Estruturas reprodutivas de fungos micro e macroscópicos.



Fonte: Autora, 2023

A: Estrutura reprodutora de *Pilobolus tode*; B: Estrutura reprodutora de *Rhizopus sp.*; C: Estrutura reprodutora de cogumelo; D: Estrutura reprodutora de orelha de pau.

O crescimento dos micélios, contribui para a formação de um microbioma que pode incluir alguns dos maiores e mais antigos organismos individuais na natureza. Há relatos de clones fúngicos (população de fungos geneticamente idênticos) que se estendem por uma área de no mínimo 15 hectares, com mais de 1.500 anos de existência e pesando cerca de 10.000 kg (Silva, 1992). O processo evolutivo e ecológico dos fungos é impulsionado por uma combinação única de características morfológicas e bioquímicas que os diferencia de outros organismos.

Os fungos são organismos versáteis e altamente adaptáveis, capazes de prosperar em uma ampla variedade de habitat. Essa característica e sua complexidade bioquímica são fontes de pesquisas. Grande parte desse sucesso biológico dos fungos filamentosos está ligado à produção de diversos metabólitos secundários em conjunto com suas formas de vida penetrativas e absortivas. A dependência dos fungos em metabólitos secundários é evidenciada pela produção de múltiplos tipos de metabólitos secundários, sendo porções significativas de seus genomas dedicadas a codificar e regular a produção desses compostos (Hautbergue, 2017; Bills, 2016).

2.2. Metabólitos secundários de fungos

Os metabólitos secundários são derivados de vias metabólicas centrais de metabólitos primários, sendo os acil-coenzima A (acil-CoA) os blocos de construções iniciais cruciais que alimentam a síntese desses compostos. Estes metabólitos secundários, frequentemente bioativos, estão presentes em muitos organismos, como moléculas estruturalmente heterogêneas de baixa massa molecular. Ao contrário dos metabólitos primários, esses não são necessários para garantir o crescimento dos organismos produtores, mas possuem um papel essencial para a sobrevivência e adaptação dos seres vivos em diferentes habitats (Keller, 2019). Entre as diversas classes de metabólitos secundários encontram-se os alcalóides, os derivados de ácidos graxos, policetídeos, fenilpropanóides, flavonoides, terpenoides e outros (Bennett, 1989; John 1992).

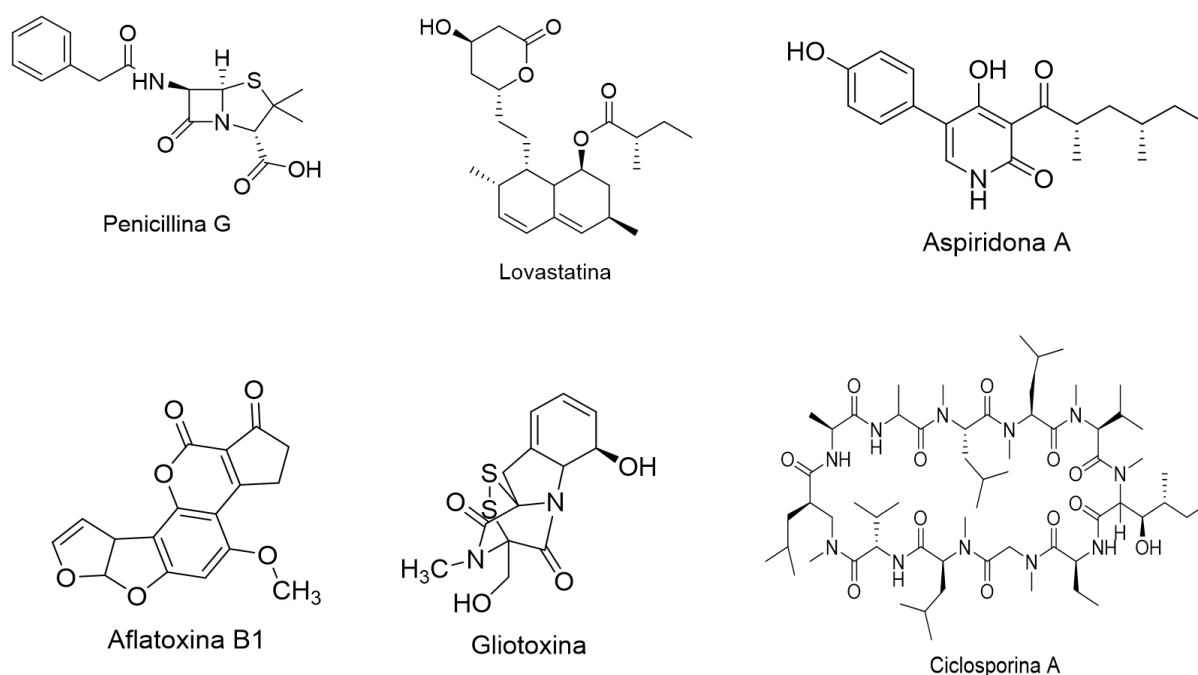
O estudo de metabólitos secundários fúngicos teve início em 1922, sob a liderança de Harold Raistrick, que caracterizou mais de 200 desses compostos provenientes de fungos (Ribeiro, 1950). No entanto, somente alguns anos depois, após a descoberta e o desenvolvimento da penicilina, uma atenção generalizada se voltou para os metabólitos fúngicos. Como resultado, diversas empresas farmacêuticas incentivaram programas de triagem em busca de produtos naturais microbianos com potenciais aplicações farmacêuticas. Essa busca por metabólitos secundários bioativos resultou na descoberta de milhares de compostos com capacidade de inibir o crescimento de bactérias, fungos, protozoários, parasitas, insetos, vírus e até células tumorais humanas (Keller, 2005).

Entre os compostos bioativos isolados de fungos, que possuem um papel fundamental na nossa sociedade, pode-se citar a penicilina e cefalosporina como antibiótico, ciclosporina como imunossupressor, as estatinas como a lovastatina como redutor de colesterol,

griseofulvina, ciclopirox, voriconazol como antifúngico, entre muitos outros (Brakhage, 2013).

Apesar disso, os fungos também possuem importância pelas suas toxinas, as quais podem causar diversos danos aos seres humanos e agriculturas e entre elas encontram-se as aflatoxinas como toxicidade, as patulina, gliotoxina e aspiridonas que exibem atividades citotóxicas, fumonisina, ocratoxina, citrinina como nefrotóxico entre outros (Brakhage, 2013) (**Figura 2**).

Figura 2 - Moléculas isoladas de fungos com atividades biológicas.



Fonte: Autora, 2023

Um estudo abrangente sobre metabólitos fúngicos, que analisou 1.500 compostos isolados e caracterizados entre 1993 e 2001, mostrou que mais da metade dessas moléculas apresentava atividade antibacteriana, antifúngica ou antitumoral, demonstrando assim a grande aplicabilidade desses metabólitos fúngicos em atividades biológicas, podendo a partir disso serem desenvolvidos diversos medicamentos (Pelaez, 2005). Sendo assim, o interesse nesses metabólitos aumenta como consequência de estudos farmacêuticos e médicos, algoritmos de bioinformática, investigação filogenética, entre outros (Schueffler, 2014; Kuck, 2014).

2.3. Cogumelos e suas propriedades

Os cogumelos são considerados macrofungos devido aos seus corpos reprodutivos suficientemente grandes para serem vistos a olho nu e colhidos a mão (Chang e Miles, 1992). Porém, somente o corpo reprodutivo do cogumelo é visível, enquanto o restante do seu corpo somático (micélios) permanece subterrâneo (**Figura 3**).

Figura 3 - Corpo somático subterrâneo.



Fonte: Autora, 2023

Através de registros fósseis encontrados no período cretáceo inferior, foi observado geologicamente que os cogumelos estão presentes na terra muito antes do surgimento do homem. Sendo assim, de um ponto de vista antropológico, existe a possibilidade de que o homem já os utilizava na alimentação e medicina. Até os dias atuais esses macrofungos desempenham papéis significativos na alimentação, na medicina, na ecologia, dentre outros (Bilal, 2010).

A relação dinâmica entre os seres humanos e os macrofungos ao longo do tempo destaca benefícios significativos obtidos a partir de compostos por eles produzidos. Ricos em proteínas, os cogumelos podem ser usados para combater a desnutrição e como suplementos nutricionais para fortalecer a imunidade. Apresentam um baixo teor de amido e colesterol, sendo adequados para diabéticos e cardíacos. Seus polissacarídeos possuem propriedades imunomoduladoras, antitumorais, anticancerígenas (hetero- β -glucanas, glicanos, heteroglicanos e Hetero- β -D-glucanas) e muito mais. Além disso seus metabólitos

secundários possuem diversas propriedades, como antifúngicas, antibacterianas, inseticidas, nematocidas, antivirais, e outros (Bilal, 2010).

A exploração medicinal dos cogumelos teve início há mais de dois milênios. Segundo Paul Stamets (2014), o médico grego Hipócrates classificou o cogumelo *Agaricus* como um anti-inflamatório eficaz. Já no século V, Tão Hongjing descreveu vários cogumelos medicinais como o Ling zhi (*Ganoderma lucidum*) e zhu ling (*Dendropolyporus umbellatus*), destacando-se também a longa tradição de uso medicinal de cogumelos em países asiáticos.

Essas propriedades foram verificadas anos mais tarde, mostrando-se verdadeiras, como o cogumelo *Agaricus*, possuindo uma atividade de capacidade anti-inflamatorias, atividade antiolesterolêmica testada em ratos, biomarcadores de inflamação sendo testado em humanos e muito mais (Bhushan, 2018). Assim como o cogumelo *Ganoderma lucidum*, que apresentou eficiente potência antidiabética, redução da pressão arterial e da concentração de colesterol sérico em ratos, entre outras atividades (Teng, 2012; Kabir, 1988).

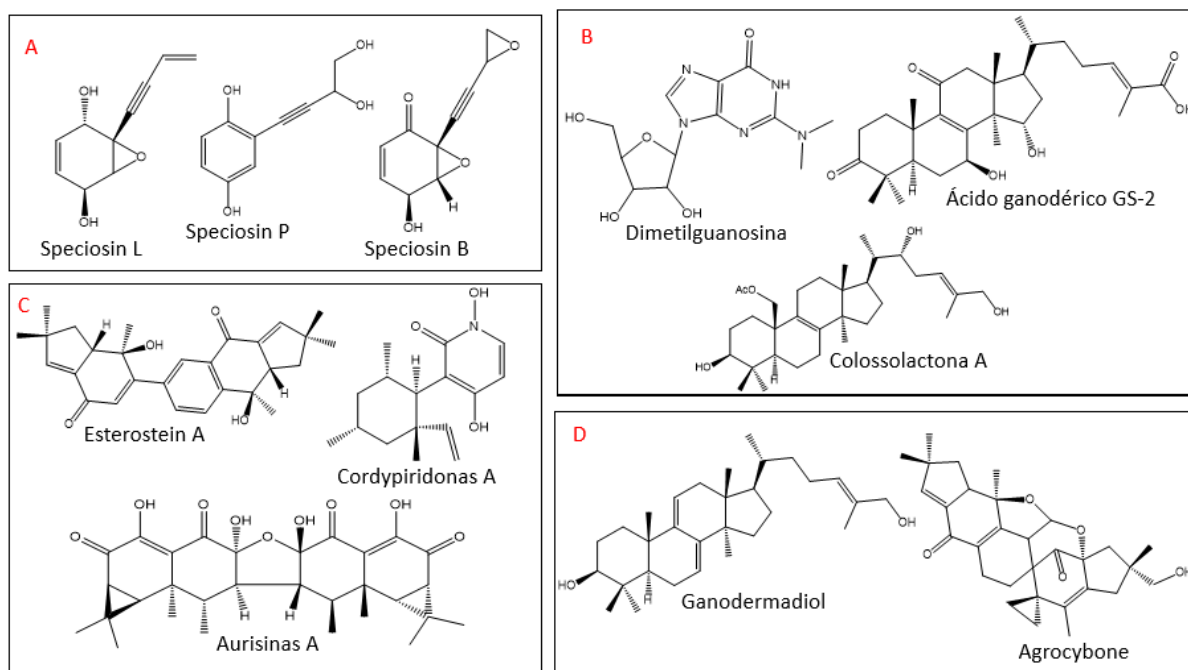
No entanto, os cogumelos representam um dos maiores recursos não explorados do mundo em termos alimentícios e medicinais. Recentemente, diversos cogumelos demonstraram atividades promissoras para o combate eficaz contra diversas doenças, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, obesidade, envelhecimento, Alzheimer, entre outras (CHATURVEDI, 2018). Já é relatado que esses fungos possuem uma série de compostos bioativos de interesse nutracêutico e farmacêutico, como, terpenos, alcalóides, fenólicos, peptídeos, policetídeos, flavonoides, ácidos graxos entre outras classes de moléculas (Venturella, 2021; Chaturvedi, 2018).

Muitos compostos produzidos por esses macrofungos que apresentam bioatividades promissoras, são de alto peso molecular, como os polissacarídeos (β -glucanas), proteínas e complexos proteína-polissacarídeos. Porém, metabólitos secundários de baixo peso molecular presentes nos cogumelos vêm sendo estudados e explorados cada vez mais.

Podemos destacar alguns cogumelos e seus metabólitos já isolados e testados em atividades biológicas como *Hexagonia speciosa*, que possui ciclohexanóides oxigenados e speciosina B que possui citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais. Os cogumelos *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum*, *G. colosso*, *G. sinense*, *Russula paludosa* apresentam compostos como, dimetilguanosina, ácido lucidenico colossolactonas, ácido ganodérico GS-2, peptídeos entre outros compostos que apresentam inibição da protease do HIV-1. *Ganoderma pfeifferi* e *Agrocybe salicacicola* apresentam triterpenos e sesquiterpênico antivirais, contra o vírus influenza tipo A (in vitro) e contra o vírus sincicial respiratório. *Cordyceps nipônica*, *Stereum ostrea*, *Neonothopanus nambi*, apresentam compostos de

atividades antiparasitárias (**Figura 4**). Outros macrofungos dos quais já isolou-se compostos bioativos são *Coprinus sp.*, *Xylaria intracolorata*, *Jahnoporus hirtus*, *Albatrellus flettii*, *Hericium erinaceus*, *Armillaria sp.* e muito mais como relatado por Silva (2013).

Figura 4 - Metabólitos de cogumelos com atividades biológicas.



Fonte: Autora, 2023

A: Citotoxicidade contra linhagens celulares tumorais; B: Inibição da protease do HIV-1; C: Agentes antiparasitários; D: Antivirais.

2.4. *Phlebopus beniensis*

A ordem Boletales, pertencente ao filo Basidiomycota, abrange uma variedade de famílias e gêneros de cogumelos, sendo os cogumelos comestíveis dos gêneros *Boletus* e *Suillus* alguns dos mais conhecidos na Europa e América do Norte. Dentro dessa ordem encontramos uma pequena família de fungos, denominada *Boletinellaceae*, composta por apenas dois gêneros de fungo, sendo eles os *Boletinellus Murril spp.* e *Phlebopus spp.* (Prado-Elias, 2022).

Segundo Raghoonundon (2021) existem 17 espécies de *Phlebopus spp.* distribuídas em áreas tropicais e subtropicais. Esse gênero apresenta características morfológicas distintas, como basidiomas e estipes robustos, uma superfície pileal glabra (lisa/ sem pelos) e não reticulada (sem padrões de linha), além de poros circulares a subangulares pequenos (1-2 por mm) (Barbosa-Silva & Wartchow 2020). Quanto à sua ecologia, os *Phlebopus spp.* são

considerados um gênero saprófito, sendo que as supostas associadas ectomicorrizas (associações com árvores e arbustos) ainda não foram comprovadas (Raghoonundon, 2021).

Alguns trabalhos sugerem a formação de associações micorrizas de algumas espécies de *Phlebopus spp.* com árvores e plantas. Um exemplo disso é no estudo relatado por Kumla (2016), onde se observou uma associação de *P. portentosus* com *Pinus kesiya* em experimentos de estufas. Além disso, Moreira-Rivas e Díaz-Lezcano (2022) também relataram a identificação de uma espécie de *Phlebopus sp.* desconhecida como micorriza com árvores nativas no Paraguai, porém essa afirmação não foi apresentada com uma metodologia adequada. No entanto, Nouhra (2008) conduziu estudos experimentais na América do Sul com a espécie *P. bruchii*, demonstrando assim que não ocorreu uma colonização ectomicorrízica com a espécie nativa *Zanthoxylum coco* (Fagara coco).

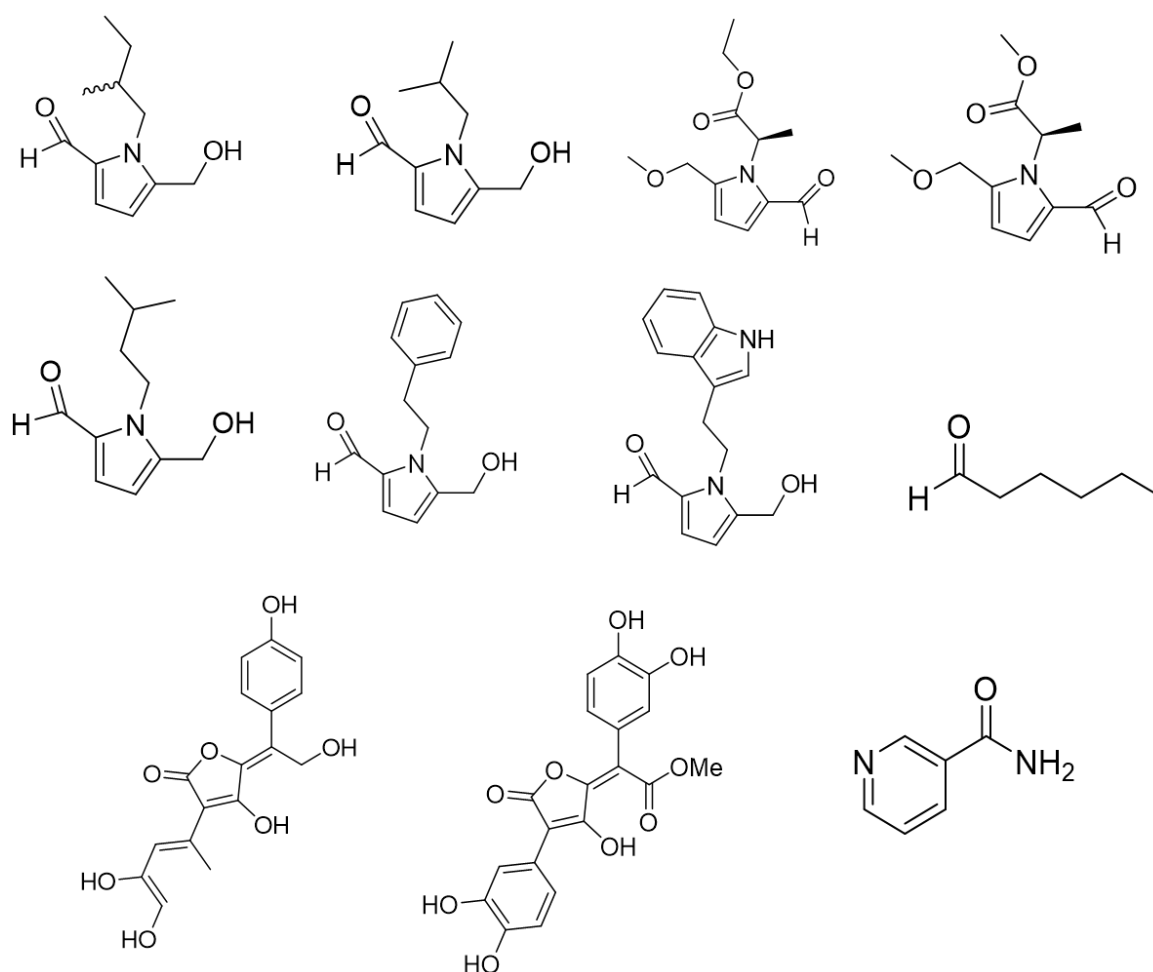
Até o momento, já foram registradas 7 espécies de *Phlebopus sp.* comestíveis em todo o mundo, incluindo os *P. braunii*, *P. bruchii*, *P. marginatus*, *P. spongiosus* e *P. sudanicus*. Recentemente, Prado-Elias et al. (2022) confirmou o consumo do *Phlebopus beniensis* no Brasil (**Figura 5**), sendo essa espécie conhecida como chapéu-de-baiano por fazer alusão ao chapéu feito de couro tradicionalmente utilizado por vaqueiros nordestinos. No entanto, os registros e informações sobre as características bioquímicas e históricas dessas espécies, especialmente na América do Sul, ainda são limitadas.

Figura 5 - *Phlebopus beniensis*.



Fonte: Autora, 2023

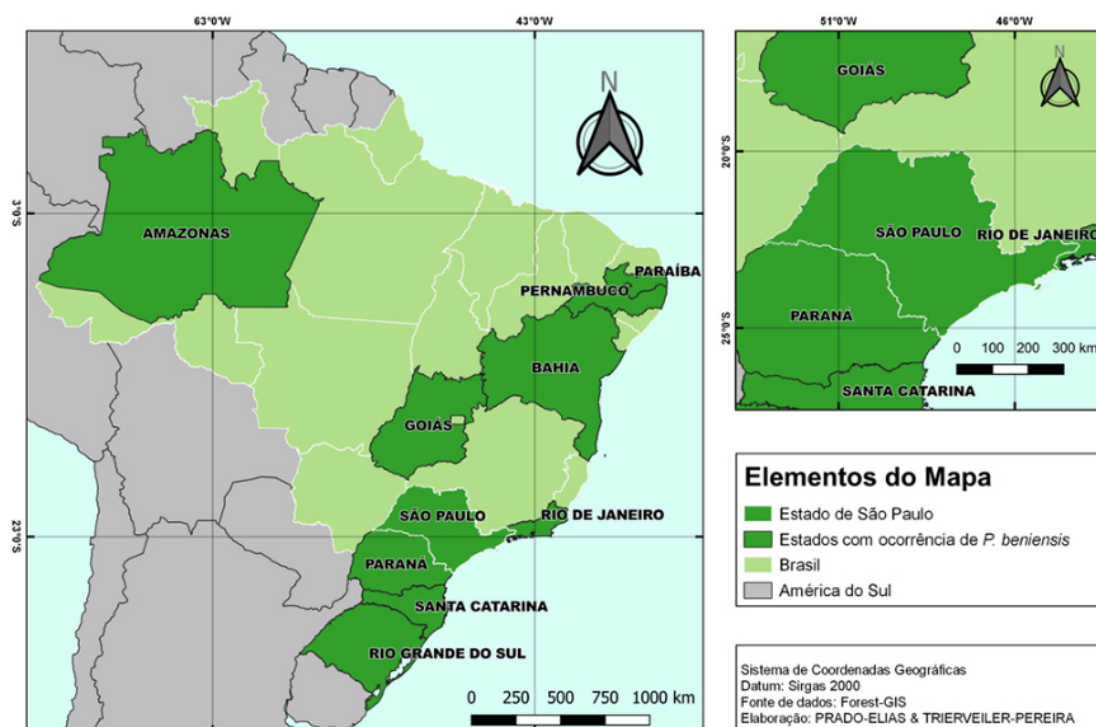
A falta de estudos voltados para a caracterização bioquímica, química, farmacológica e nutricional das espécies de *Phlebopus spp.* prejudica a compreensão desses fungos e suas potenciais aplicações. Além disso, os estudos químicos estão frequentemente concentrados em espécies específicas, como no caso do *P. portentosus* encontrado na China e Tailândia. Sendo algumas espécies ainda negligenciadas. A partir dos artigos publicados para esse gênero de cogumelo, observam-se grupos moleculares (**Figura 6**) com potencial medicinal, culinário e aplicações biológicas como apresentada nos artigos de Zhao et al. (2018), Chuankid, B. (2020) e Run Tian (2022).

Figura 6 - Compostos pertencentes aos *Phlebotopus* sp.

Fonte: Autora, 2023

No Brasil, *P. beniensis* é geralmente encontrado em períodos chuvosos nos meses de novembro, tendo sido relatado a sua presença em alguns estados brasileiros como Paraíba, Paraná, Goiás, São Paulo, Santa Catarina, entre outras regiões como visto na **Figura 7** de Prado-Elias (2022). Apesar dos relatos da presença nestes estados, não há informações sobre o perfil químico e atividades biológicas pertencentes a essa espécie no país.

Figura 7 - Estados brasileiros com presença do *Phlebotopus beniensis*.



Fonte: Prado-Elias, 2022

2.5. Estudo metabolômico

A metabolômica é uma área de investigação que avalia o perfil químico de um sistema biológico, capaz de acelerar a descoberta de metabólitos ativos e inéditos a partir de organismos (Oliveira, 2016). As instrumentações mais utilizadas para metabolômica incluem cromatografia gasosa, cromatógrafo líquido e ressonância magnética nuclear, tendo cada uma dessas plataformas suas vantagens e desvantagens (Patterson, 2010). O preparo de amostras de cada instrumentação acaba por indicar suas vantagens e limitações: na CG-EM a derivatização é frequentemente necessária para tornar os analitos voláteis, possibilitando a identificação de compostos de baixo peso molecular. Já a CL-EM apresenta como vantagem um preparo de amostras simples e a versatilidade de separação em fase reversa. A combinação das plataformas possibilita a identificação de metabólitos em diversas matrizes, sendo as instrumentações mais utilizadas em trabalhos de metabolômica (Zhao, 2018).

Para estudos de metabolômica não direcionada (perfil global de metabólitos conhecidos e desconhecidos) a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR) é atualmente a plataforma analítica mais proeminente, devido a sua sensibilidade e especificidade. Esse método é capaz de separar metabólitos por suas

propriedades químicas para conseguir realizar uma leitura da amostra, fornecendo informações de tempo de retenção, intensidade, MS1 e MS2 sobre metabólitos que são utilizados para a identificação dos picos cromatográficos (Guo, 2020).

Dentro das metodologias existentes, dois modos de aquisição de dados MS são difundidos, sendo eles, *data-dependent acquisition* (DDA) e *data-independent acquisition* (DIA). Para uma abordagem mais eficiente em termos de tempo de aquisição de dados não direcionada, o modo de aquisição de dados acelerado e autônomo é proporcionado pela DDA. Neste modo, o software do equipamento seleciona os íons mais intensos com base em limites definidos e posteriormente, realiza uma fragmentação sequencial (MS2) de íons com base em sua intensidade. É a correlação entre o MS1, íon intenso selecionado, e MS2 que viabiliza a deconvolução¹ dos dados (Guo, 2020).

No modo DIA, o espectrômetro de massas realiza uma leitura em uma ampla faixa de massas, fragmentando simultaneamente tudo o que é ionizado durante aquele scan. O DIA permite a coleta contínua, imparcial de massas e fragmentação para todos os metabólitos. No entanto, a complexidade dos espectros gerados apresenta dificuldades computacionais para a identificação posterior de metabólitos, pois nesse modo não existe uma ligação direta entre quais íons gerou determinados fragmentos, dificultando a interpretação desses dados pelos softwares (Guo, 2020).

Os dados derivados das análises por CL-EM possuem grandes quantidades de espectros, frequentemente complexos e de demorada interpretação. Diversos softwares são utilizados para tratamento e interpretação dos dados, onde utilizam-se uma série diferentes de abordagens, como bancos de dados experimentais alimentados com espectros de fragmentação e algoritmos que realizam predição de fragmentação. Alguns programas de códigos abertos, a ser citado MS-DIAL, MS-FINDER, SIRIUS e GNPS entre diversos outros, oferecem soluções para a leitura e interpretação dos dados gerados pelo equipamento (BLAŽENOVIC, 2018).

O MS-DIAL é uma importante ferramenta para realizar a deconvolução dos dados brutos em espectrometria de massas. Esta ferramenta converte os dados e realiza a identificação dos picos de íons precursores, utilizando informações de tempo de retenção e relação massa carga. Os resultados dessa análise determinam os espectros MS/MS puro, eliminando ruídos de fundo e extraindo espectros dos metabólitos que podem coeluir. Para a identificação dos compostos propostos, o MS-DIAL possui a capacidade de fazer comparação

¹ A deconvolução é um processo automatizado, capaz de detectar diferenças nos espectros de massa através de um pico que pode indicar co-eluições

espectral comparando os espectros experimentais com bancos de dados externos (Tsugawa, 2015).

Após a desconvolução dos dados pelo MS-DIAL, a elucidação estrutural dos compostos nas amostras pode ser realizada por meio da análise de fragmentação in-silico. Esse processo pode ser realizado pelo uso de dois softwares distintos: MS-FINDER e SIRIUS. Ambos desempenham um papel na elucidação estrutural ao empregar abordagens computacionais, como a comparação de espectros de massas obtidos experimentalmente com os gerados computacionalmente, cálculos de fórmulas moleculares utilizando bibliotecas de fragmentos teóricos gerados pelos programas e a utilização de dados experimentais de m/z e de fragmentação para construir uma árvore de fragmentação teórica com base nos resultados experimentais (Mallmann, 2023).

O MS-FINDER possui um algoritmo que simula a clivagem alfa de cadeias lineares, levando em consideração as energias de dissociação e rearranjo de hidrogênio. O *score* sugerido pelo software leva em consideração a precisão (m/z), razão isotópica, atribuição de íons de produto e atribuição de perda neutra. O MS-FINDER tem a capacidade de identificar compostos desconhecidos-conhecidos e os dados de MS podem ser diretamente integrados à plataforma de análise de redes moleculares (Tsugawa et al., 2016, Vaniya et al., 2017, Wang et al., 2022).

O SIRIUS possui um algoritmo que combina a análise de padrões isotópicos em alta resolução nos espectros de MS com a análise de árvores de fragmentação para elucidação estrutural em espectros de MS/MS. O software procura por características associadas aos espectros de fragmentação, como íons precursores, íons adultos e picos de isótopos. Utilizando o CSI:FingerID como um banco de dados, o SIRIUS pesquisa e fornece avaliações de estruturas moleculares com base em dados de MS/MS. Sua abordagem é concentrada na previsão de uma impressão digital molecular a partir dos dados de MS/MS de um composto (Duhrkop, 2019).

Já o GNPS (*Global Natural Products Social Networking*) é uma plataforma online utilizada para análises, comparação e compartilhamento de dados de CL-EM no campo da metabolômica de produtos naturais. Esta plataforma permite o agrupamento dos compostos em cluster com base na similaridade entre os espectros, formando uma rede de relação por meio do molecular networking. Além disso, o GNPS possibilita a organização de cada espectro adquirido na representação de um nodo. A conexão de nodos é feita com base na similaridade dos espectros presentes nas amostras ou nos bancos de dados de referência, esta conexão apresenta um valor de cosseno, que variam de 0 (totalmente distinto) a 1 (idênticos).

Além das redes moleculares geradas pela plataforma, o GNPS oferece outras opções de análise dos dados, como a comparação direta com espectros de massas experimentais e busca por análogos.

Cada plataforma emprega diferentes parâmetros e métodos para sugerir moléculas analisadas por LC-MS/MS, apresentando scores e margens de erro para os possíveis compostos. Essa diversidade possibilita a comparação entre esses softwares, permitindo a análises dos dados. Muitos estudos têm utilizado esses métodos para identificar metabólitos secundários fúngicos. Como exemplo, no artigo de Yu Sol (2021), onde foram utilizados programas computacionais (MS-DIAL, MS-FINDER e GNPS) para analisar e identificar os metabólitos provenientes da co-cultura de *Aspergillus sydowii* e *Bacillus subtilis*. Da mesma forma, o estudo de Ding (2022) utilizou o MS-FINDER para identificar marcadores significativos em *Cordyceps sinensis*.

4.7. Tripanotiona redutase

A tripanotiona redutase (TR) é uma enzima encontrada nos protozoários flagelados sendo ela pertencente à ordem Kinetoplastida, da família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*. As doenças em seres humanos e animais domésticos causadas por esse protozoário incluem a doença do sono (*Trypanosoma rhodesiense*, *T. gambiense*), doença de Chagas (*T. cruzi*), nagana (*T. brucei*, *T. vivax*, *T. congolense*) entre outras (Krauth-Siegel, 1987).

Essa enzima é uma FAD-cisteína oxidoredutase que foi encontrada no parasita de inseto *Crithidia fasciculata*, e na forma cristalina, de *Tripanotiona cruzi*. Todos os *trypanossomas* e *leishmanias* possuem metabolismo único de tiol e ambos dependem do sistema de tripanotiona e da tripanosoma redutase (Spinks, 2009).

A tripanotiona redutase exerce um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo, regenerando o principal antioxidante presente nesses protozoários, a tripanotiona. A ação essencial da TR na redução do substrato dissulfeto de tripanotiona é crucial para a manutenção de um meio intracelular redutor no parasita. Quando a enzima TR apresenta divergências estruturais ou funcionais em comparação com as enzimas do hospedeiro, ela se torna um alvo promissor para investigações sobre seu papel no controle do estresse oxidativo e para o desenvolvimento de agentes quimioterápicos eficazes (RAMU, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo realizar a caracterização do perfil metabolômico da espécie *Phlebopus beniensis* através de técnicas espectrométricas e realizar a avaliação de sua atividade antiparasitária.

3.2. Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto a partir do cogumelo in natura;
- Fracionar o extrato bruto por polaridade crescente utilizando diferentes solventes;
- Realizar a análise de cada fração através de técnicas espectrométricas;
- Identificar os compostos químicos e metabólitos presente em cada fração através de técnicas de desreplicação auxiliada por software;
- Discutir dados obtidos com base na literatura;
- Avaliação de atividade antiparasitária.

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais e equipamentos

Todos os solventes utilizados para os fracionamentos foram de grau P.A. (Pureza Analítica), adquiridos de fontes comerciais e fornecidos pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), sendo eles hexano, diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), n-butanol (BuOH), metanol (MeOH) (LabSynth, São Paulo). Acetonitrila (ACN) (Honeywell) e metanol grau MS foram utilizados para preparo de amostras e análises de massas. Os equipamentos como rotaevaporador acoplado com bomba de vácuo, vidrarias e balança analítica (Shimadzu, AUW220D) também foram utilizados no próprio laboratório de pesquisa.

Análises foram realizadas em um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução com sistema de analisador Quadrupolo-Tempo de Vôo Xevo G2-S QTOF (WATERS, São Paulo). Este equipamento está acoplado a um sistema cromatográfico de ultraeficiência Acquity UPLC classe H (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com uma matriz de fotodiodo (PDA) detector, trocador de amostras, forno de coluna e uma bomba de solvente quaternário, possuindo ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos positivo e negativo, localizado na central de cromatográfica (CentralCROM) no Centro de Ciências da Saúde - UFSC.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas pela central de análise do departamento de química da UFSC em um cromatógrafo a gas modelo GC-2030 de Shimadzu equipado com um injetor split/splitless e acoplado a um espectrômetro quadrupolo seletivo de massa QP2020 NX de Shimadzu (Japão) contendo uma base de dados NIST17s.lib de espectros de massas. O controle dos equipamentos e a aquisição de dados foram realizados por meio do software GCMS solution®.

4.2. Material caracterizado

O cogumelo *Phlebopus beniensis* foi coletado nos arredores da Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis (SC) em Março do ano de 2022 e identificado em parceria com o Laboratório de Micologia - MICOLAB/UFSC sob responsabilidade da Prof. Dra. Maria Alice Neves.

4.3. Preparação do extrato bruto e fracionamento do *Phlebopus beniensis*

O cogumelo (1,352 kg) foi submetido a um processo de maceração por 14 dias, utilizando uma mistura de DCM e MeOH na proporção 1:1 como solventes em um volume total de 2 Litros. Após a primeira extração, a amostra foi submetida a uma nova maceração por 14 dias utilizando a mesma composição e proporção de solventes. Após esse período, a fração orgânica obtida foi então rota-evaporada à pressão reduzida e deixada na capela para obtenção do extrato bruto.

O extrato bruto foi submetido a um fracionamento líquido-líquido utilizando água e uma sequência de solventes orgânicos, 3x 100 mL de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, resultando em cinco frações advindas de cada solvente utilizando.

Cada fração resultante foi concentrada em rotaevaporador à pressão reduzida, e posteriormente, deixada na capela para a secagem e pesagem dos extratos fracionados. Dessa forma, foram obtidas as massas de 3,0147 g para a fração hexano, 0,5917 g para a fração diclorometano, 1,1484 g para acetato de etila, 1,2029 g para butanol e 28,331 g para fração aquosa, respectivamente.

4.4. Preparação das amostras e análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada com Espectroscopia de Massas a alta resolução (CLUE-EMAR)

Todas as amostras, exceto as frações de hexano, foram separadas em uma quantidade de 1 mg em um eppendorf, onde foram solubilizadas em uma mistura de acetonitrila (ACN)/ metanol (MeOH) 40:60 para a preparação das soluções finais com concentração de 800 µg/mL. Filtro da marca filtrilo de 0.22 µm foram utilizados para filtrar as amostras antes das análises, removendo as impurezas e as partículas sólidas.

Cada fração e o extrato bruto foi analisado por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLUE-EMAR). No sistema cromatográfico foi utilizado uma coluna de fase reversa (BEH, C18 de 5x1 cm e 1,7 µm de partículas) para separação dos analitos. Um volume de 2 µL de amostra foi injetada e submetida a um gradiente da fase móvel formado por acetonitrila e água acidificada (0,1% de ácido fórmico), em uma taxa de fluxo constante de 0,3 mL.min⁻¹.

O espectrômetro de massa acoplado ao sistema CLUE, foi operado nos modos de ionização positivo e negativo. As análises foram calibradas utilizando uma amostra padrão de leucina encefalina com massas de referência em m/z 554,2615 (ESI-) e 556,2771 (ESI+). A aquisição dos dados foi realizada no modo *Fast Data Dependent Acquisition* (Fast-DDA),

em um intervalo de razão massa/carga (m/z) de 100-1500 Da, com uma faixa de intensidade de íons variando de um valor mínimo de MS1 de 30.000 e um valor de retorno do MS2 de 40.000, e em um tempo de varredura de 1,0 s em 20 min. O equipamento foi operado com fluxo de gás do cone de 100 L/h; fluxo de gás de dessolvatação de 900 L/h, cone de amostragem 40 V, desvio de fonte 80 V; nitrogênio como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. A dessolvatação e a fonte de ionização foram mantidas durante as análises a 300 °C e 90 °C, respectivamente, enquanto a voltagem capilar usada será de 3 kV. Uma faixa de 25 a 35 eV foi usada como energia de colisão.

4.5. Preparação das amostras e análise por Cromatografia Gasosa acoplada com Espectroscopia de Massas (CG-EM)

Para a preparação da fração de hexano foi seguido a metodologia de referência do artigo de Costa et al (2023), onde foi realizada uma esterificação utilizando 100 mg de amostra. O processo envolveu a adição de soluções de cloreto de sódio saturado, hidróxido de sódio e uma solução de cloreto de amônia. Foi adicionado 2 mL da solução de hidróxido de sódio e deixado durante 5 minutos para a solubilização completa. Em seguida adicionou 2,5 mL da solução de esterificação ($\text{NaOH-H}_2\text{SO}_4\text{-MeOH}$) e o sistema foi mantido por 5 minutos em refluxo, seguido por resfriamento em água corrente. Para a finalização da esterificação foi adicionado 2 mL de cloreto de sódio e em seguida 2,5 mL de hexano, formando assim duas fases no balão. O sobrenadante foi removido e filtrado em filtros de 0.22 μm para remoção de impureza e partículas sólidas. Foi preparado também uma solução diluída em 30 vezes.

As análises de cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo GC-2030 de Shimadzu equipado com um injetor split/splitless e acoplado a um espectrômetro quadrupolo seletivo de massa QP2020 NX de Shimadzu (Japão) contendo uma base de dados NIST de espectros de massas. O controle dos equipamentos e a aquisição de dados foram realizados por meio do software GCMS solution®. Uma coluna capilar SH-Rxi-1ms composta por dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm I.D. x 0,25 μm) de Shimadzu (EUA) foi utilizada para obter a separação cromatográfica. Um amostrador automático modelo AOC-20i de Shimadzu (Japão) foi usado para as análises automatizadas. O gás hélio de alta pureza (99,999 %, White Martins, Brasil) foi usado como gás de arraste a fluxo de 1,16 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O volume de injeção foi de 1 μL por amostra com o split (1:20).

4.6. Processamento dos dados utilizando softwares

Para tornar os dados resultantes da leitura do espectrômetro de massas compatíveis com softwares de processamento de dados, foram convertidos o formato original .raw (formato Waters), para o formato open source mzML. Para realizar essa conversão foi utilizado o software Waters2mzML 1.2.0.

4.6.1 Análise dos dados com MS-DIAL

Após a conversão dos dados para o formato mzML, os mesmos foram submetidos ao processamento com o software MS-DIAL (ver 4.92), onde foram selecionadas informações de acordo com as análises realizadas por CLUE-EMAR, como o tipo de separação, de ionização, método MS e modo de ionização dos arquivos. Posteriormente, foram configurados os parâmetros para o processamento e alinhamento dos dados. Foi selecionada também a opção de remover recursos com base em informações do branco do solvente, e assim garantir que dados informados estejam apenas nas amostras.

Após o processamento, picos de íons precursores foram detectados explorando dois eixos de dados contínuos: tempo de retenção (tR) e razão massa/carga (m/z), onde cada ponto representa um pico detectado, conceituado como *feature*. Além disso uma série de informações foram obtidas, dentre elas uma tabela contendo valores de m/z, tempo de retenção, tipo de aduto, valores estatísticos e um gráfico de barras indicando a abundância de cada íon nas amostras analisadas.

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

4.6.2 Análise dos dados com MS-FINDER

A lista gerada pelo MS-DIAL foi então submetida ao software MS-FINDER (ver. 3.52), para realização do cálculo das fórmulas moleculares e obtenção de sugestão de moléculas para cada *feature* detectado. Os potenciais candidatos para cada metabólito foram obtidos por meio da consulta simultânea de bases de dados, incluindo LipidMAPS, YMDB, ChEBI, NPA, NNPDB, COCONUT, KNApSAcK, PubChem e UNPD. Anotações de moléculas foram posteriormente, classificadas de acordo com seus *scores* de similaridade,

que foram calculados com base na comparação entre os espectros experimentais de MS/MS e os presentes nas bases de dados.

A seleção da estrutura mais provável entre os candidatos, levou em consideração o valor do *score*, os fragmentos obtidos e conhecimento das possíveis classes de compostos que o tipo de amostra é capaz de produzir. Todas as fórmulas moleculares e estruturas sugeridas foram manualmente verificadas.

4.6.3 Análise dos dados com SIRIUS

A partir dos dados gerados pelo MS-FINDER, os arquivos foram importados para a plataforma do Sirius e processada pela opções do ZODIAC – Network based improvement of SIRIUS molecular formula ranking; CSI:FingerID – Fingerprint prediction e CSI:FingerID – Structural Database Search; e CANOPUS – Compound Class Prediction.

Para a sugestão das fórmulas moleculares pelo software foram considerando os elementos C, H, O, N, S, e P, S, Cl e Br com as ionizações [M+H], [M+K] e [M+Na] para o modo positivo e [M-H] para o modo negativo.

Para as sugestões de estruturas moleculares com o CSI:FingerID foram utilizados os adutos [M+H], [M+K], [M+Na] e [2M+H]. Na procura em banco de dados foram definidos os bancos de dados Bio Database, BioCyc, CHEBI, COCONUT, EcoCyc MINE, GNPS, KEGG, KEGG MINE, KNApSAcK, MACONDA, MeSH, NORMAN, Natural Products, YMDB, YMDB Mine e ZINC Bio.

4.6.4 Análise dos dados com GNPS

Foi utilizado o software Core FTP LE para importar os dados em formato mzML para a plataforma Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS). Nessa plataforma, os dados foram submetidos à análise por meio da Classical Molecular Networking (CLMN). Os parâmetros para a geração da rede foram definidos como 0.015 Da de tolerância de massa do íon precursor e 0.03 Da de tolerância de massa dos íons de fragmentação. Para a elucidação estrutural através do CLMN usou a configuração 0.7 de valor de cosseno e um mínimo de 4 picos correspondentes com aqueles presentes nas bibliotecas disponíveis no GNPS, com a opção de procura de análogos ativada. Os resultados obtidos das análises por CLMN foram submetidos às análises através da função DEREPLICATOR+, também disponível na plataforma online GNPS.

4.7. Avaliação da atividade inibitória de extratos a enzima de tripanotiona redutase

Para a realização do ensaio de inibição, a enzima tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* foi expressa de forma heteróloga em *Escherichia coli* BL21DE3 e purificada por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel Ni-NTA. Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades de acordo com a metodologia descrita por Hamilton e colaboradores (2003). O princípio do ensaio se baseia na capacidade da tripanotiona redutase de reduzir a tripanotiona $T[S]_2$ em $T[SH]_2$, em uma reação NADPH dependente. A adição do DTNB que regenera a $T[SH]_2$ em $T[S]_2$, formando TNB, um substrato cromógeno que gera a cor amarela o que possibilita a leitura. Primeiramente foram adicionados os compostos (100 μ M) ou extratos (50 μ g/mL) (diluídos em DMSO 25% em tampão do ensaio) em triplicata e um branco da amostra. Em seguida, a mistura reacional foi adicionada, contendo tampão do ensaio (HEPES 40 mM, EDTA 1 mM pH 7.5), NADPH (150 μ M) e tripanotiona $T[S]_2$ (1 μ M). A tripanotiona redutase (0,31 mg/mL / 6 U) foi então adicionada às triplicatas e o ensaio incubado a 27 °C por 30 minutos. O volume final utilizado foi de 250 mL. A leitura foi então realizada em um espectrofotômetro Infinite M200 (TECAN) em 412 nm, onde a absorbância inicial foi medida e então o DTNB (25 μ M) foi adicionado à placa. A absorbância em 412 nm foi acompanhada por 30 minutos para determinar a atividade enzimática, comparando os compostos testados com DMSO 1% (controle negativo) e clomipramina (controle positivo).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química do extrato bruto e do fracionamento do cogumelo *Phlebopus beniensis*

O cogumelo *P. beniensis* foi coletado e, em seu estado natural, foi submetido a uma extração e fracionamento utilizando uma série de solventes. Para analisar a composição química das frações butanólica (ButOH), acetato de etila (AcOEt) e diclorometano (DCM) obtida dos extratos hidroalcóolicos do cogumelo, empregou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa por Electrospray (CLUE-ESI-MS).

Devido ao grande volume de dados gerados, utilizou-se os programas de código aberto como o MS-DIAL, MS-FINDER, SIRIUS e GNPS para auxiliar no processo de identificação dos metabólitos. Para isso, os dados adquiridos das análises de Fast-DDA, já no

formato apropriado (mzML) foram importados para o software do MS-DIAL e GNPS. Após selecionar e aplicar os parâmetros e filtragem recomendados no software MS-DIAL, foram indicados um total de 42 possíveis íons moleculares no modo positivo e 15 no modo negativo. Esse conjunto de dados foi importado para o MS-FINDER e SIRIUS onde foi comparado com bancos de dados espectrais a fim de encontrar padrões de fragmentação MS/MS e íons precursores correspondentes.

Assim, ao analisar os espectros de fragmentação MS/MS obtidos tanto nos modos positivos e negativo, juntamente com o uso de ferramentas computacionais (MS-DIAL, MS-Finder, SIRIUS e GNPS), foi possível anotar 14 metabólitos, os quais pertencem a diferentes classes químicas, como os compostos poliol, fenólicos, lipídios, ácidos graxos, alcalóides indólicos e ácidos orgânicos (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Compostos caracterizados das frações Butanólica, Acetato de Etila e DCM

Pico nº	t _R (min)	Fórmula Molecular (Score)	m/z (erro, ppm)		Fragmentos detectados MS/MS		Identificação proposta (Score)	Scores (MS-FINDER e SIRIUS (%))
			[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	ESI+	ESI-		
1	0.42	C ₆ H ₁₄ O ₆ (3.0160)	-	181.0714 (3.6341)	-	163.0506 217.0478 [M+Cl] ⁻	Hexose	5.35
2	0.49	C ₆ H ₈ O ₇ (4.0560)	-	191.0195 (3.2605)	-	173.0074; 129.0161; 111.0073;	Citric acid	7.56 - 97,52%
3	3.65	C ₁₈ H ₁₀ O ₉ (4.0230)	371.1301	369.0244 (2.1766)	353.1173; 325.0370;	325.0327; 109.0390;	Variegatorubin	6.58
4	4.24	C ₁₇ H ₁₂ O ₅ (4.2900)	297.0763 (-1.8580)	295.0604 (2.6919)	279.2283;	251.0681 ;	Aspulvinone E	7.15
5	8.01	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂ (3.8990)	300.2902 (-1.6509)	-	-	-	Sphingosine	6.92 - 75%
6	8.93	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃ (4.0790)	318.3010 (-1.3533)	-	-	-	Phytosphingosine	7.09 - 96.5%
7	9.45	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P (3.8090)	520.34126 (-0.2580)	-	542.3217 [M+Na] ⁺	-	PC (18:2)	7.24
8	9.52	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P (4.2340)	478.2932 (-0.8050)	476.2778 (0.9699)	-	-	PE (18:2)	7.7 - 100%
9	9.74	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P (4.2950)	480.3085 (0.0711)	-	-	-	PE (18:1)	6.86 - 100%

10	12.68	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281.2477 (-1.4)	279.2328 (2.1)	-	-	Linoleic acid (C 18:2)	8.01
11	13.36	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ (4.2760)	-	255.2327 (0.9905)	-	-	Ácido palmítico (C 16:0)	7.42
12	13.56	C ₁₈ H ₃₄ O ₂ (4.1310)	-	281.2484 (2.4938)	-	-	Vaccenic acid	7.89
13	15.31	C ₄₀ H ₇₈ NO ₈ P (3.9760)	732.5549 (-0.7088)	-	-	-	PC (16:1/16:0)	7.25 - 100%
14	15.31	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P (3.8320)	782.5696 (0.2155)	-	-	-	PC 36:4	7.09 - 99%

Fonte: Autora, 2023

Legenda: [M+H]⁺, íon molecular modo positivo; [M-H]⁻, íon molecular modo negativo; MS/MS, íons fragmentos expressados como massa/carga (m/z); Escala considerada para anotações de metabólitos: MS-FINDER 5-10, Sirius 50-100%.

5.2. Polióis

Conforme sugestões dos programas MS-FINDER e SIRIUS, uma hexose foi proposta como opção para a fórmula molecular de C₆H₁₄O₆, com razão m/z de 181,0714 [M-H]⁻ e um aduto de 217,0478 [M+Cl]⁻. Durante a análise no MS2, foi observado uma perda neutra de água (18 Da), resultando no fragmento [M-H]⁻ 163.0506.

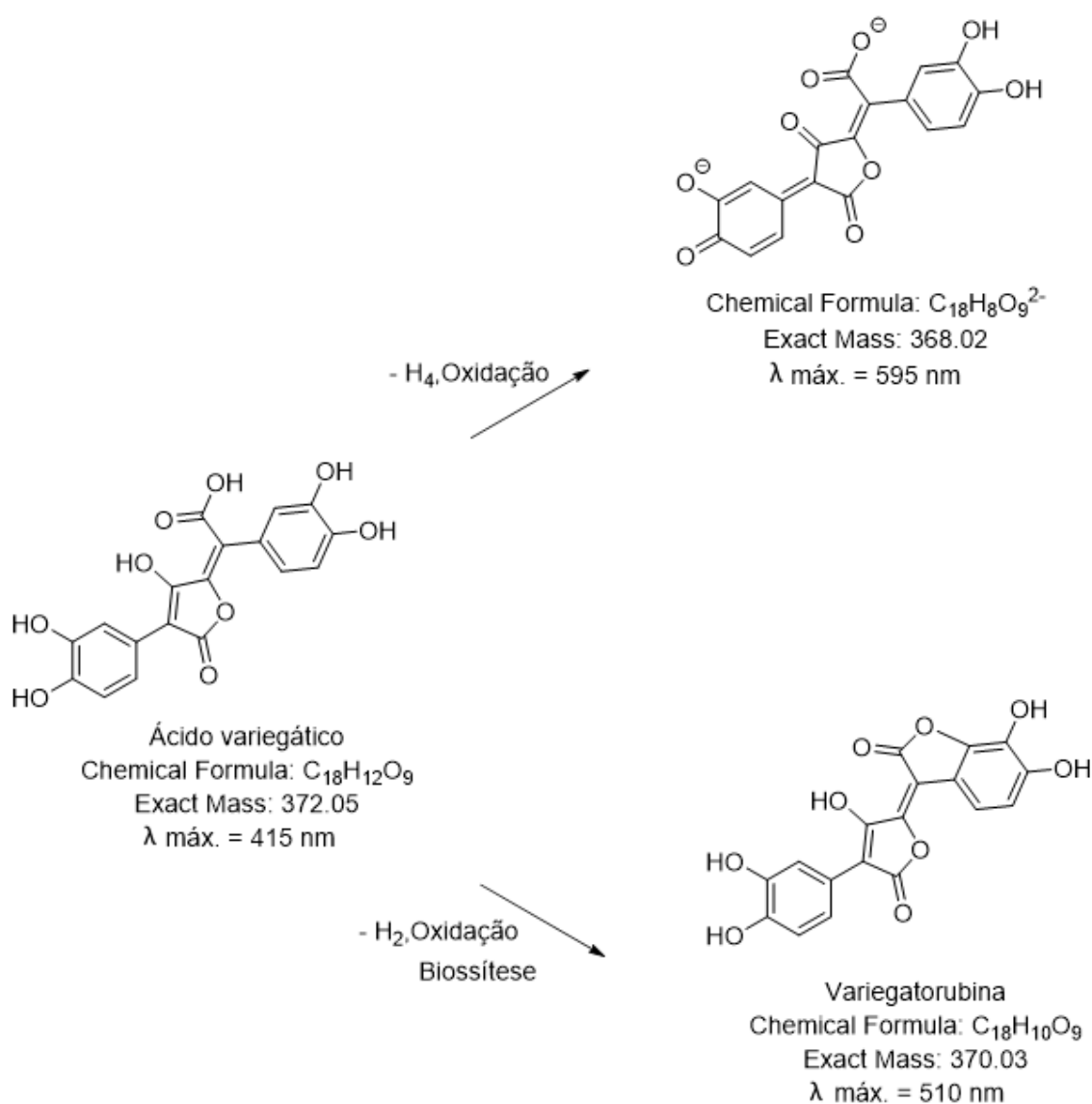
5.3. Compostos fenólicos (pigmentos naturais)

O composto variegatorubina, identificado no corpo reprodutivo do cogumelo *P. beniensis*, foi sugerido apenas pelo software MS-FINDER. O SIRIUS sugeriu algumas moléculas com estruturas semelhantes a variegatorubina, porém, nenhuma das opções coincidia com a mesma. No entanto, a variegatorubina já foi isolado de corpos reprodutivos de *Phlebopus portentosus* e *P. spongiosus* (Chuankid, 2020).

O composto identificado é reconhecido por ser encontrado em muitos outros corpos reprodutivos de diferentes famílias da ordem Boletales, incluindo *Boletus*, *Xerocomus*, *Suillus* e gêneros afins. Esse composto é notório por conferir uma coloração vermelha aos corpos reprodutivos desses fungos, sendo a sua presença observada de duas maneiras: de ocorrência natural nos esporóforos de algumas espécies e através da oxidação do ácido variegático, que representa pigmentos de cor amarelada.

O ácido variegático, apresenta duas rotas de oxidação podendo gerar a variegatorubina e um outro composto que apresenta uma absorção em um comprimento de onda de 595 nm (coloração alaranjada) transmitindo uma coloração azulada (**Figura 9**). Conforme observado por Elias-Prado (2022), ao ser cortado o estipe do cogumelo *Phlebopus beniensis*, regiões azuladas aparecem, sugerindo uma reação de oxidação nos basidiomas frescos. Pode-se correlacionar a presença de variegatorubina no extrato, considerando que as reações azuladas após hematomas feitos nos cogumelos são causados pela oxidação do ácido variegático na espécie, podendo ele ser oxidado e gerar a variegatorubina.

Figura 9 - Reação de oxidação do ácido variegático.

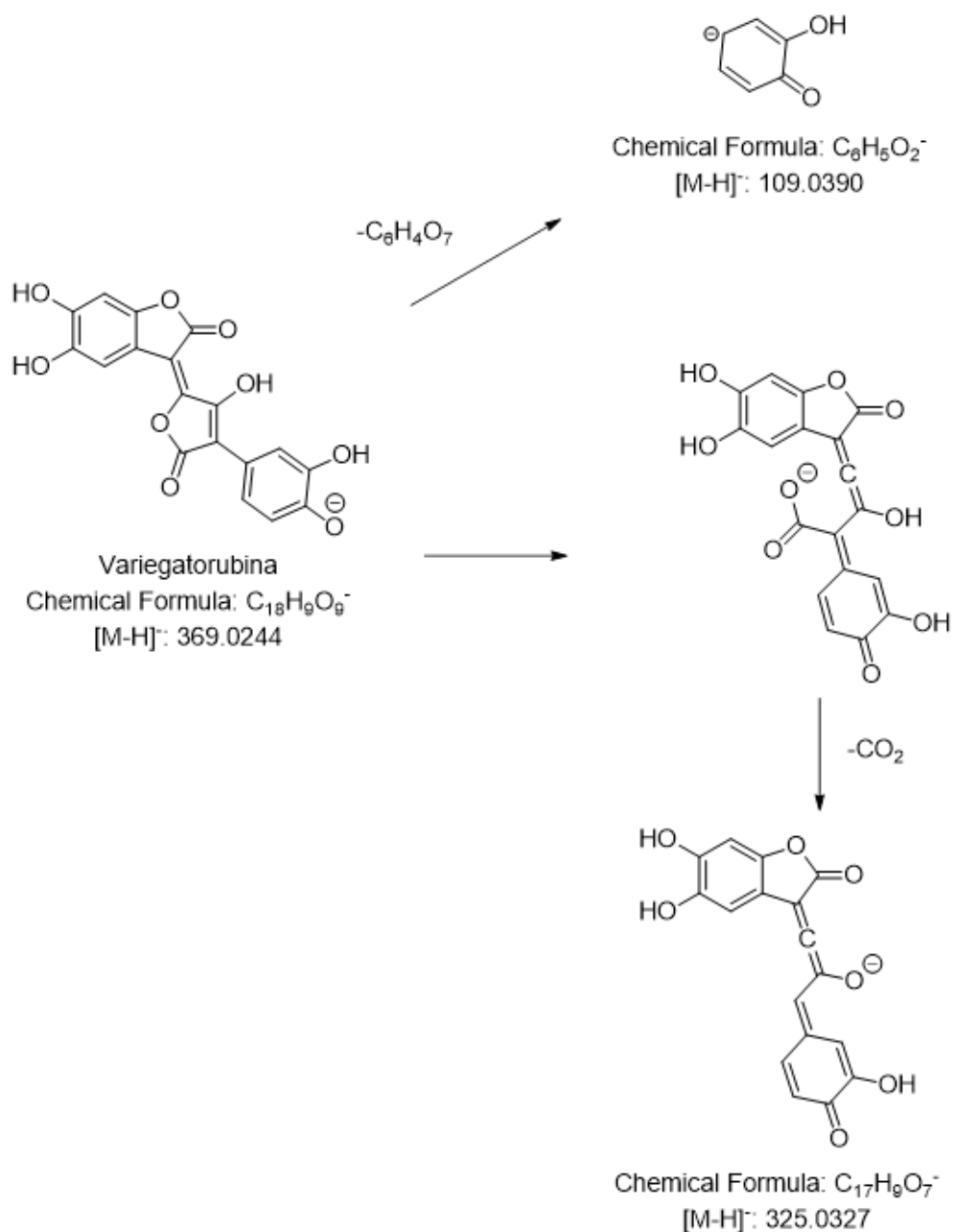


Fonte: Autora, 2023

Ao submeter os cogumelos frescos para extração, parte deles foram quebradas para aumentar a área de contato do solvente com o cogumelo (extração líquido-sólido). Logo, sugere-se a presença do composto variegatorubina nos extratos.

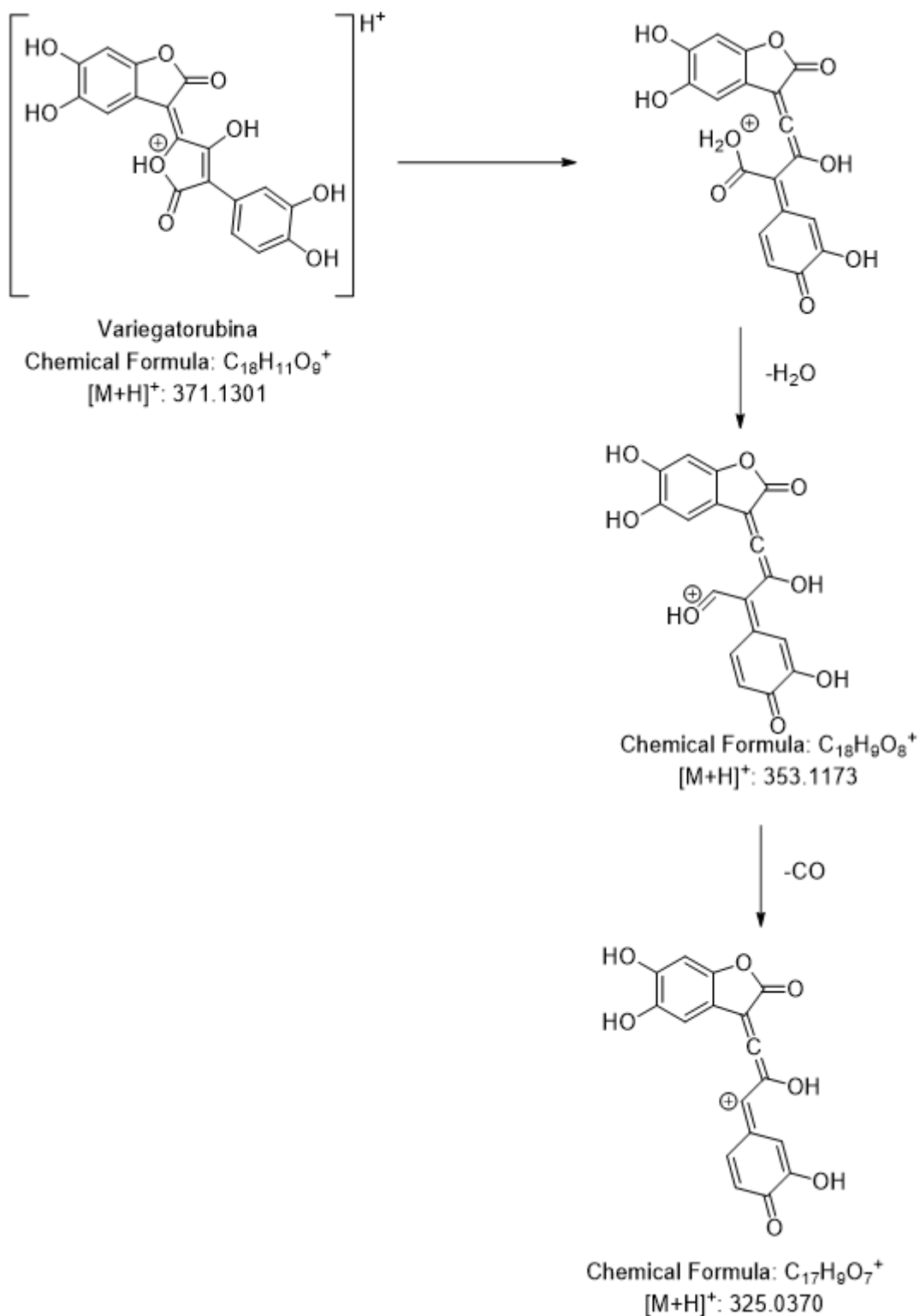
O perfil de fragmentação para a variegatorubina foi proposto para os dois modos de ionização analisados (**Figura 10 e 11**). O modo negativo houve uma perda neutra de CO_2 (44 Da), e uma perda neutra de um anel aromático. Já para o modo positivo observou-se uma perda de neutra de água (18 Da) seguida de monóxido de carbono (28 Da)

Figura 10 - Perfil de fragmentação da variegatorubina para o modo negativo.



Fonte: Autora, 2023.

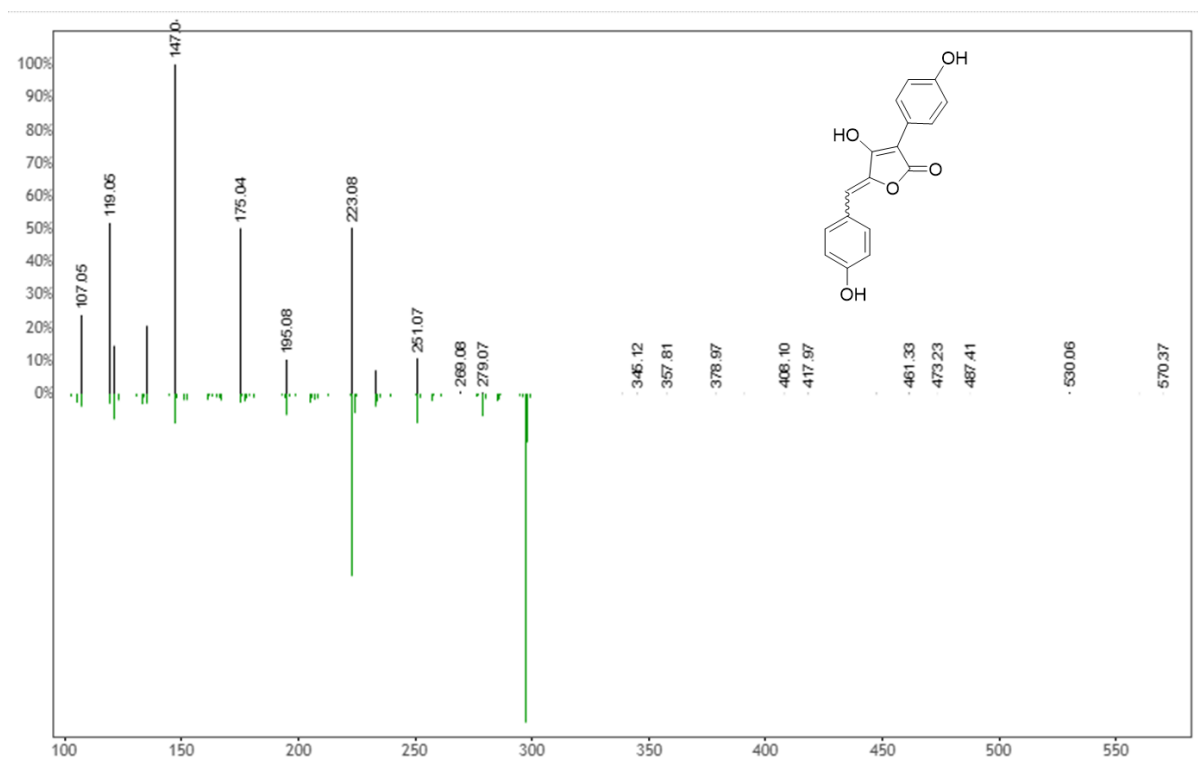
Figura 11 - Perfil de fragmentação da variegatorubina para o modo positivo.



Fonte: Autora, 2023

A presença de aspulvinona E foi anotada nos três softwares empregados na identificação dos compostos, sugerindo assim a sua presença na espécie. Além disso, foi possível fazer uma comparação espectral do composto identificado pela plataforma do GNPS, que pode ser visto na **Figura 12**.

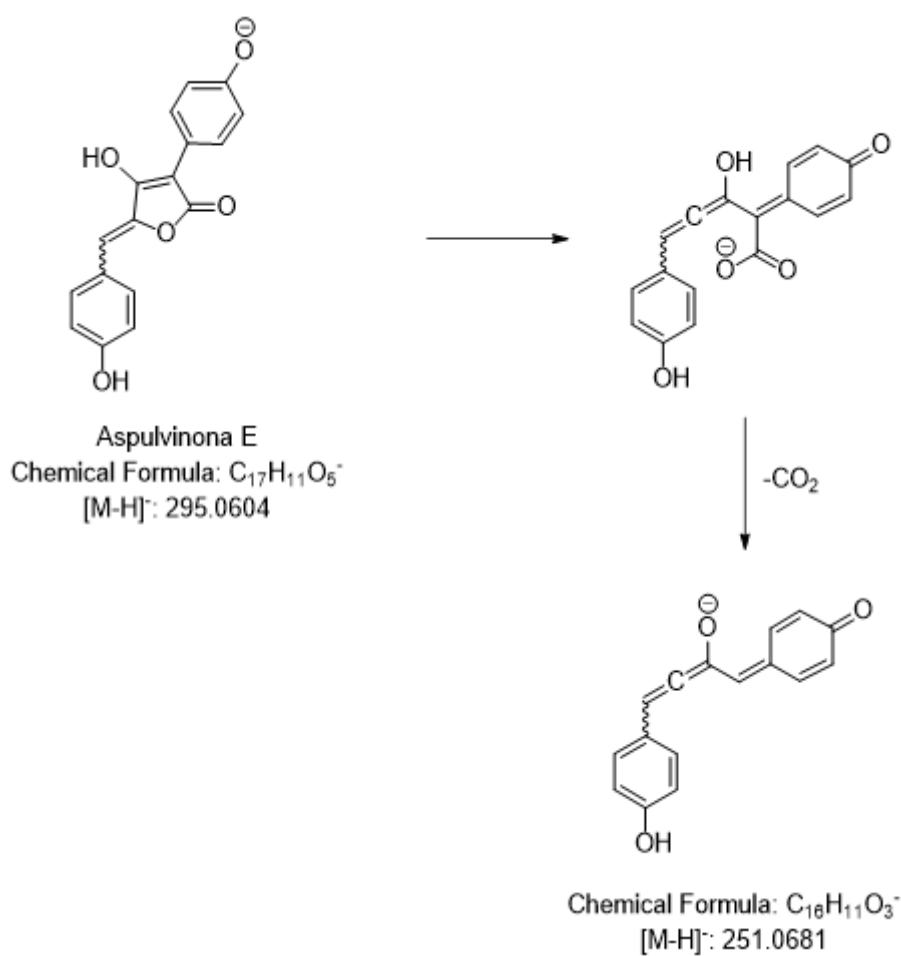
Figura 12 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de Aspulvinona E.



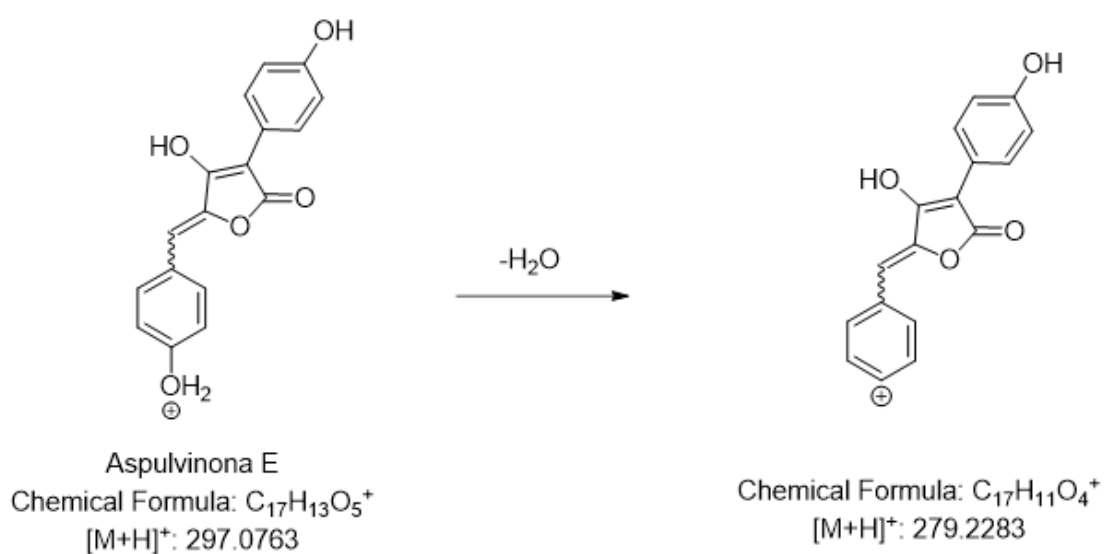
Fonte: Autora 2023

Legenda: Espectros em preto são referentes aos dados experimentais; Espectros em verde são referentes aos bancos de dados do GNPS.

Esse metabólito secundário foi inicialmente isolado do fungo *Aspergillus spp.* sendo encontrado em outros gêneros de fungos filamentosos. Segundo Camara (2022) o Aspulvinona E quanto a Isopulvinona E foram identificados no corpo reprodutivo do cogumelo *Pisolithus tinctorius*, sendo esse fungo pertencente à ordem Boletales. Apesar de sua presença confirmada, há poucos relatos na literatura sobre seu perfil de fragmentação, o qual foi sugerido com base nas análises realizadas (**Figura 13 e 14**).

Figura 13 - Perfil de fragmentação do Aspulvinona E no modo negativo.

Fonte: Autora, 2023

Figura 14 - Perfil de fragmentação do Aspulvinona E no modo positivo.

Fonte: Autora, 2023

Os pigmentos estão sendo cada vez mais estudados em outros gêneros e espécie da ordem Boletales como marcadores quimiotaxonômicos (Davoli, 2002; Steglich, 2014).

5.4. Lipídios²

Os lipídios foram os compostos mais identificados pelos softwares. As fórmulas químicas de todas as moléculas lipídicas propostas foram sugeridas tanto pelo MS-FINDER quanto pelo SIRIUS, sendo algumas delas também anotadas pelo GNPS. Adicionalmente, foi conduzida uma comparação espectral dos compostos lipídicos propostos pelo GNPS, proporcionando uma maior confiabilidade nas identificações desses compostos.

Os lipídios são amplamente encontrados em materiais biológicos, abrangendo plantas, bactérias, protozoários, fungos e entre outros. A estrutura de uma esfingosina foi identificada, pertencente a classe de esfingolipídios, os quais são considerados constituintes ubíquos das membranas celulares podendo servir como marcadores quimiotaxonômicos em fungos (Olsen, 2001). Segundo Weiss (1972) cogumelos como *Amanita muscaria* e *A. rubescens* apresentam uma certa porcentagem de esfingolipídios sendo eles ceramidas. Essas bases, são homólogas de fitoesfingosina em cada espécie de cogumelos, sendo obtidas após a hidrólise das ceramidas e cerebrosídeos hidrogenados. Justificando assim, a presença de esfingolipídios no cogumelo identificado pelos softwares. Segundo a plataforma do GNPS foi identificado uma ceramida cujas comparações espectrais foram similares com os dados dos bancos, possuindo uma fórmula molecular de $C_{18}H_{40}NO_2$ (Cer (18:0) (**Figura 33, Apêndice**).

Outros lipídios também foram identificados, tais como os fosfatidilcolina (PC) e os fosfatidiletanolamina (PE), conforme apresentados na **Tabela 1**. As fosfatidilcolina estão abundantemente presentes nos corpos reprodutivos de diversos cogumelos pertencentes à ordem Boletales, como mostrado por Vaskovsky (1998). Vale ressaltar que em algumas espécies pertencentes ao mesmo gênero pode apresentar ou não PC, sendo encontrado duas vias de biossíntese para o metabólito em cogumelos, sendo pela metilação da fosfatidiletanolamina, onde o PE é convertido em PC por uma reação de metilação dependente de S-adenosilmetionina (doador de grupos metil). A outra é pela presença de colina no meio de crescimento, sendo o PC sintetizado pela via de Kennedy (via da acetilcolina) uma rota metabólica para regulação de fosfolipídios nas membranas celulares.

² As estruturas moleculares para os lipídios não foram propostas tendo em vista que as ligações múltiplas podem variar de lugar dependendo da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingosina e fitoesfingosina. O equipamento de CL-EM não nos fornece esse tipo de informação.

As fosfatidilcolina em cogumelos desempenham papéis cruciais na estrutura e na função das membranas celulares em geral (Kotlova, 2022) .

Para a molécula de fosfatidiletanolamina identificada em ambas plataformas utilizadas, a PE (18:2) $C_{23}H_{44}NO_7P$ e o PE (18:1) $C_{23}H_{46}NO_7P$ na plataforma GNPS demonstrou um perfil espectral combinatório com espectros teóricos para esse composto, conseguindo assim ter uma maior confiabilidade do composto sugerido (**Figura 30 e 31, Apêndice**).

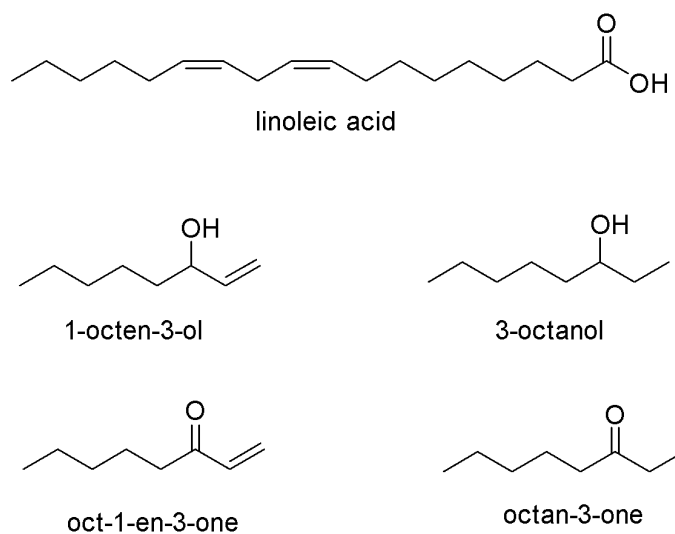
Para as moléculas de fosfatidilcolina, muitas delas foram sugeridas pela plataforma do GNPS, porém a identificação das duplas presente nos compostos sugeridos acabam tendo alguns conflitos de correlação, tendo em vista que os pares de elétrons podem estar deslocalizadas nas moléculas, sendo difícil dar certeza as estruturas propostas. A molécula de PC (36:4) foi sugerida pelo GNPS para o modo negativo, sendo sugerida nos outros softwares para o modo positivo, porém, a molécula demonstrou uma boa comparação dos espectros experimentais com os teóricos (**Figura 29, Apêndice**).

Os ácidos graxos nas amostras foram na grande maioria identificados no modo negativo, com exceção do ácido linoleico que sua massa foi detectada nos dois modos. As estruturas moleculares para os ácidos graxos foram sugeridas somente pelo MS-FINDER, porém, as fórmulas moleculares sugeridas pelo SIRIUS correspondiam às estruturas sugeridas pelo MS-FINDER e com altos *scores*.

Os ácidos graxos estão presentes nos corpos reprodutivos de cogumelos, sendo predominantemente insaturados, embora possam também apresentar características saturadas, como identificado neste trabalho. Nos fungos, como relatado por Suutari (1995) os principais ácidos graxos tipicamente ocorrente são os ácidos palmíticos e esteárico, e seus derivados insaturados, ácidos palmitoléico, oleico, linoléico e linolênico.

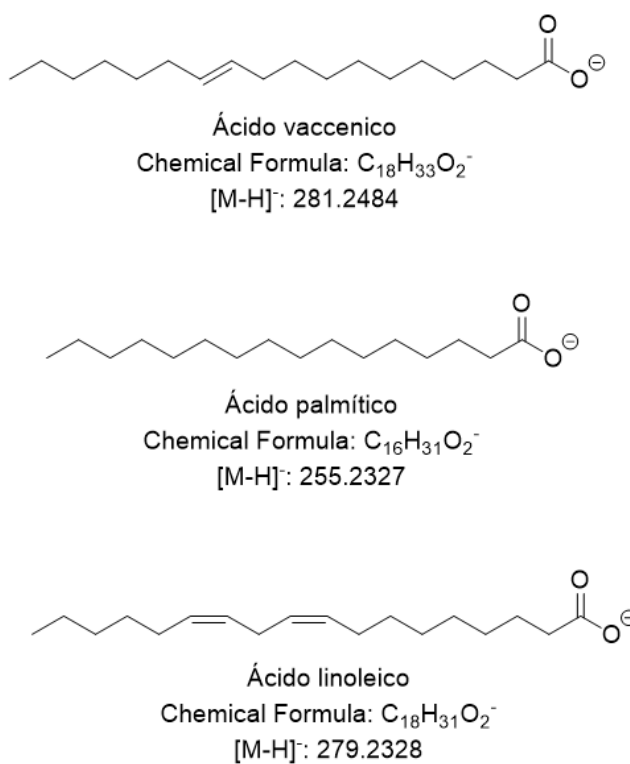
O ácido vaccênico ômega-7 (w-7) foi relatado em várias espécies de cogumelos das ordens Agaricales, Boletales e Polyporales. Esse composto foi relatado no artigo de Campi (2023), que estudou as propriedades bioquímica, nutricional e toxicológica do cogumelos *Phlebopus beniensis* no Paraguai.

Outro ácido graxo identificado foi o Ácido linoléico sendo um dos principais ácidos encontrados nos membros dos Basidiomycetos e em muitos cogumelos pertencentes à ordem Boletales (Weete, 1974). Esse ácido é precursor de voláteis de oito carbonos em fungos, como 1-octen-3-ol, 3-octanol, 1-octen-3-ona e 3-octanona (**Figura 15**), que são os principais compostos aromáticos na maioria das espécies, contribuindo também para o sabor dos cogumelos (Guedes, 2008; Combet, 2006).

Figura 15- Ácido linoleico como precursor de voláteis em fungos.

Fonte: Autora, 2023

Foi possível identificar um ácido graxo saturado, sendo ele o ácido palmítico (C 16:0), que também é encontrado predominantemente em muitos corpos reprodutivos de cogumelos.

Figura 16 - Ácidos graxos identificados.

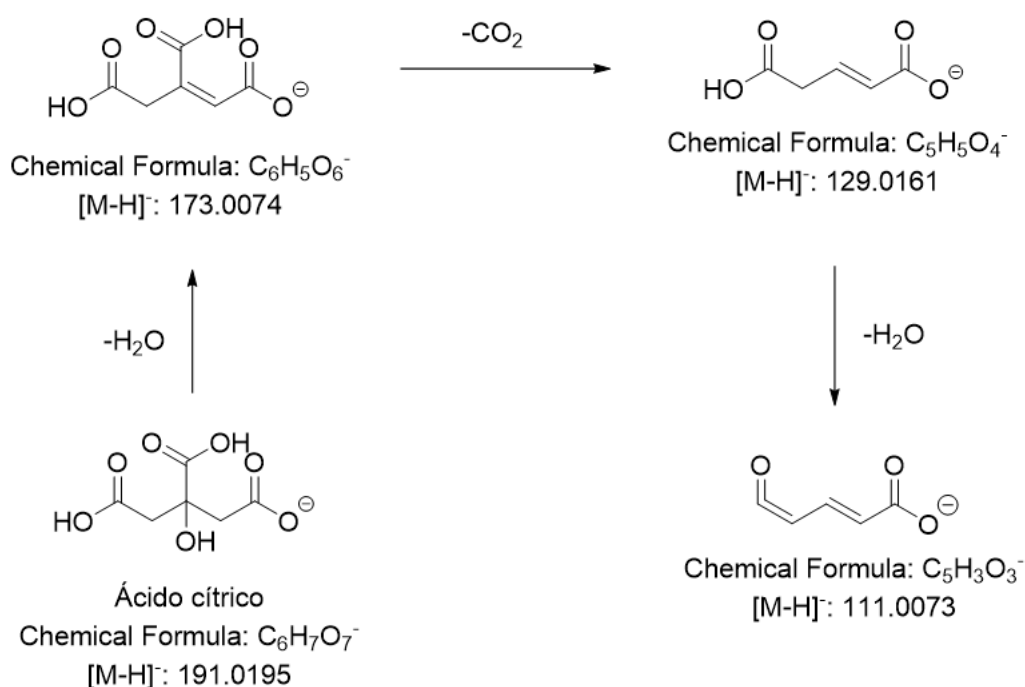
Fonte: Autora, 2023

5.6. Ácidos orgânicos

O ácido cítrico foi surgido pelo MS-FINDER e SIRIUS, sendo esse um metabólito primário. Esse composto já foi relatado na literatura estando presente tanto no píleo quanto no estipe de cogumelos pertencentes à ordem Agaricales (*Amanita rubescens*, *Hygrophorus agathosmus*) e Boletales (*Suillus granulatus*, *Boletus edulis*) (Ribeiro, 2006; Ribeiro, 2008).

O perfil de fragmentação apresentado na **Figura 17** foi comparado com dados identificados na literatura e com as massas de fragmentos obtidos em MS2 pelo equipamento de UPLC.

Figura 17 - Perfil de fragmentação do ácido cítrico.



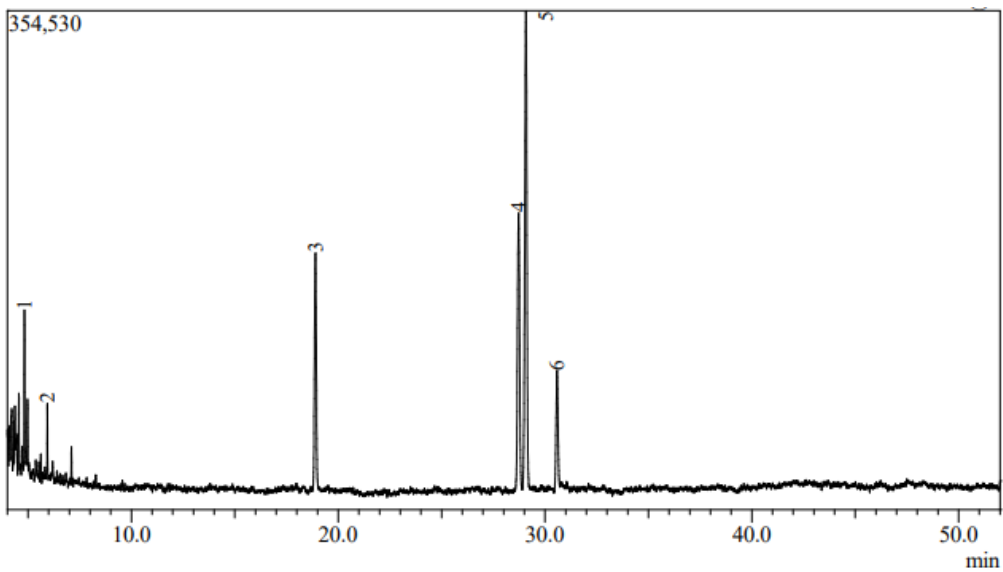
Fonte: Autora, 2023

5.8. Caracterização química da fração hexânica do cogumelo *Phlebopus beniensis* pelo CG-MS

Por meio da esterificação realizada, foi possível injetar a fração hexânica no equipamento de cromatografia gasosa, para uma identificação e comparação dos ácidos graxos identificados e sugeridos pelos softwares usados. Por meio das análises de CG-MS identificou-se dois dos ácidos graxos que também foram encontrados nas análises de CL-EM, sendo eles o ácido palmítico e o ácido linoleico.

Os dados cromatográficos referentes aos picos dos ácidos graxos observados, estão apresentados na **Figura 18**, assim como a **Tabela 2** que apresenta os dados dessa corrida.

Figura 18 - Dados cromatográficos do equipamento de CG-MS.



Fonte: Autora, 2023

Tabela 2 - Dados da corrida cromatográfica gasosa.

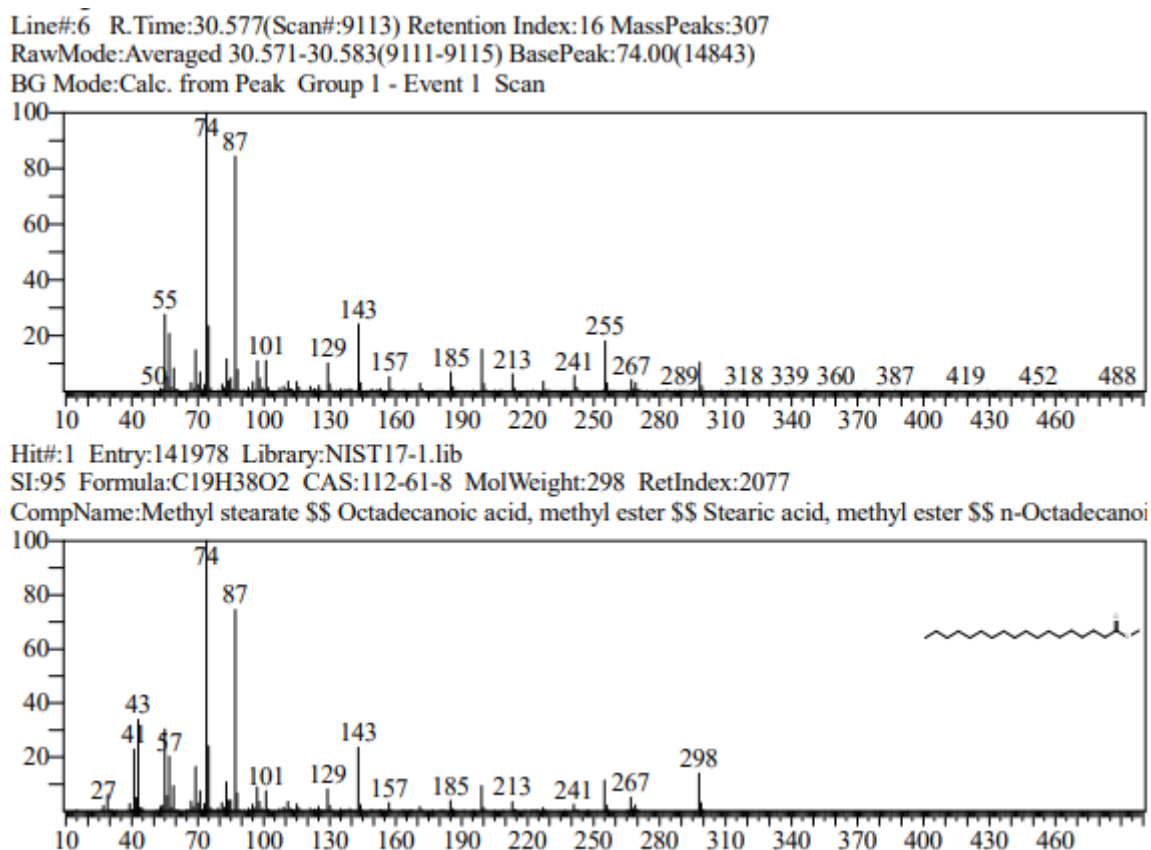
Pico	Tempo de Retenção	Nome	Área %	Similaridade
1	4.833	Dodecano	3.13	98
2	5.938	Tridecano	1.43	97
3	18.903	Éster metílico do ácido palmítico	18.06	96
4	28.727	Éster metílico do ácido linoleico	25.38	95
5	29.081	Éster metílico do ácido oleico	42.96	93
6	30.582	Éster metílico do ácido esteárico	9.05	95
			100.00	

Fonte: Autora, 2023

O equipamento também conseguiu identificar a presença de dodecano, tridecano, ácido esteárico e o ácido oleico onde ambos apresentaram uma alta similaridade entre os fragmentos experimentais com os bancos de dados NIST17. O ácido esteárico está presente

em muitos corpos reprodutivos de diferentes espécies de cogumelos, tendo ele uma boa similaridade com os espectros do banco de dados. O perfil de fragmentação desse ácido se mostra na **Figura 19**.

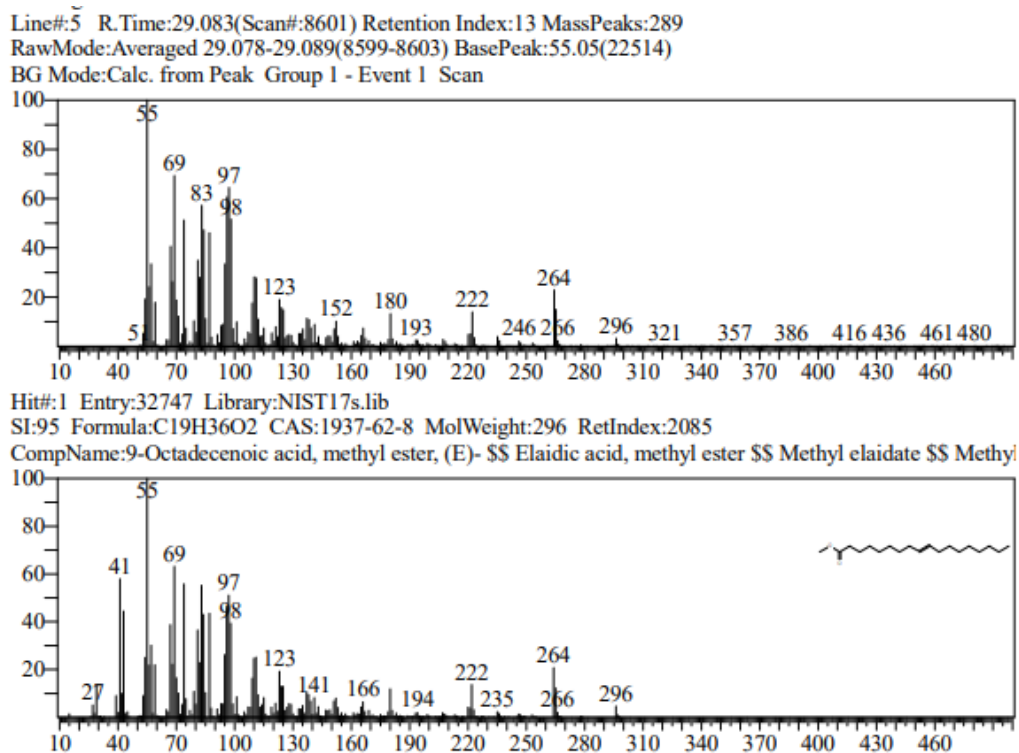
Figura 19 - Perfil de fragmentação do metil esteárico pelo equipamento de CG-MS



Legenda: Primeiro perfil de fragmento referente as análises pelo CG-MS; Segundo perfil referente ao banco de dados NIST17.

O ácido oleico também foi um dos ácidos graxos identificados pelo CG-MS, onde se apresentou uma alta similaridade com o banco de dados do equipamento, e uma boa comparação espectral (**Figura 20**). Esse ácido é um dos principais ácido monoinsaturados encontrado em basidiomicetos (Pedneault, 2006).

Figura 20 - Perfil de fragmentação do ácido 9-octadecenóico pelo equipamento de CG-MS.

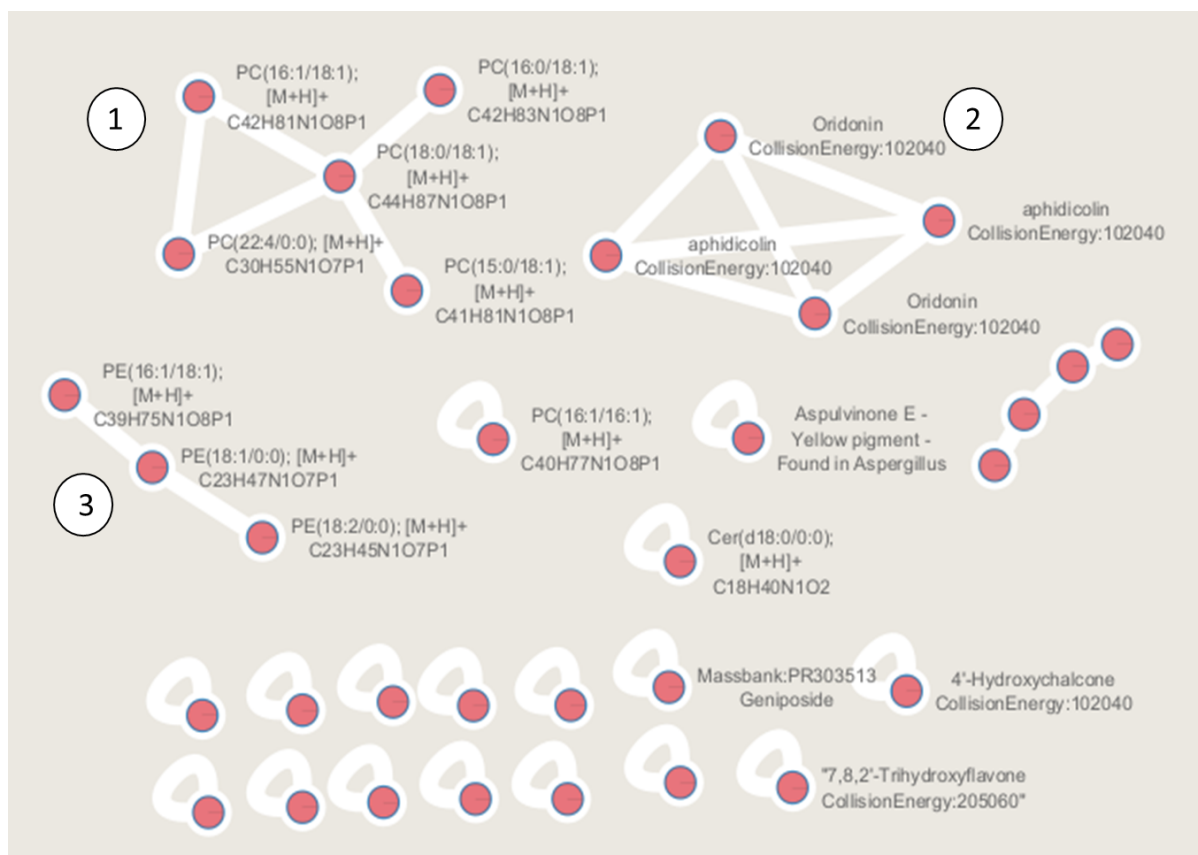


A caracterização dos ácidos graxos em diferentes espécies de fungos possui uma grande importância nutricional e para estudos quimiotaxonômicos, fisiológicos e de diferenciação intragenérica desses organismos (Pedneault, 2008).

5.9. Rede molecular gerada pela plataforma GNPS

As redes moleculares produzidas pela plataforma do GNPS foram exclusivamente obtidas para o modo positivo. O modo negativo teve dificuldades em várias etapas para a criação da mesma, o que impossibilitou a visualização para esse modo. A rede molecular para o modo positivo está ilustrada na **Figura 21**.

Figura 21 - Rede molecular referente ao modo positivo.



Fonte: Autora, 2023

Muitos dos nodos nesta rede molecular, gerada pelo GNPS, não puderam ser associados a massas específicas para uma estrutura predefinida, sendo destacados pela cor amarela. No entanto, foi possível estabelecer correlações entre alguns nodos e os compostos sugeridos pelos softwares utilizados. Conforme ilustrado na **Figura 21**, alguns desses nodos formam redes ligadas a diferentes massas. O nodo associado à massa 297.076 sem ligações com outros nodos refere-se a molécula de aspulvinona E que foi identificada em todas as plataformas utilizadas.

Na rede número 1, foi estabelecida uma conexão entre fosfatidilcolina. Para essa rede molecular nenhum dos PC sugeridos pela plataforma foram sugeridos pelos outros softwares empregados (MS-FINDER e SIRIUS) e nem identificados no Masslynx. A comparação espectral para essas fosfatidilcolinas sugeridas não se mostraram muito semelhantes entre a comparação com os dados do banco do GNPS. Essas macromoléculas, poderiam ser analisadas com mais precisão para a espécie em estudo, tendo em vista que a conexão entre elas se mostra bem elaborada.

Em relação à rede número 2, o GNPS sugeriu uma conexão entre os compostos de afidicolina (que são compostos isolados de cogumelos basidiomicetos, como *Coprinopsis*

cinerea) e Oridonin, sendo esse diterpeno composto relatado isolado de plantas, o que acabou não tendo relação essa comparação entre eles. Além disso, os espectros experimentais foram comparados com os teóricos, mostrando uma grande diferença entre os picos experimentais com os teóricos.

A rede molecular de número 3, referente às massas de 478.293 e 480.308 mostraram-se conectadas referente às moléculas PE (18:1) e PE (18:2), que também foram sugeridas e identificadas pelos outros softwares utilizados neste trabalho. A massa de 716.522 foi sugerida pelo GNPS como sendo PE (16:1/18:1) $C_{39}H_{75}NO_8P$, porém esse composto não foi identificado em análises manuais no Masslynx e nem sugerido pelos softwares. Sendo assim, esse composto pode ser sugerido como presente na espécie, tendo em vista que sua correlação com os outros nodos se apresenta coerente. A comparação entre os espectros para esse composto pode ser visto na **Figura 32 (Apêndice)**.

A interpretação dos compostos diretamente ou indiretamente ligados aos nodos identificados foi de difícil interpretação, deixando em aberto diversas possibilidades de moléculas relacionadas entre si e presentes na espécie em estudo.

5.10. Testes *in vitro* da atividade inibitória da enzima de tripanotiona redutase

Todas as frações e os extratos brutos foram submetidos a testes *in vitro* de tripanotiona redutase, onde os resultados foram expressados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Teste de inibição em enzima de tripanotiona redutase.

Fração	Triagem TcTR (100 µM)	
	% Inibição	Desvio Padrão
Extrato Bruto	4,81*	3,25
Hexano	8,85	3,91
Diclorometano	16,98	15,63
Acetato de etila	16,03	2,54
Butanol	99,0	1,80
Aquoso	0*	3,31

Fonte: Autora, 2023

Legenda: * Não solubilizou totalmente em DMSO 100%

Como podemos observar nos resultados apresentados, é notável que a fração butanólica demonstra uma significativa atividade de inibir a tripanotona redutase, com porcentagens superiores a 50%, apresentando quase 100% de atividade. Diante disso, um estudo bioguiado foi realizado utilizando-se cromatografia em coluna de fase reversa (C18) para obtenção de subfrações, permitindo a avaliação de qual apresenta uma maior atividade biológica. Os dados obtidos após os testes estão detalhados na **Tabela 3**.

Tabela 4 - Subfração da fração butanólica.

Fração	Triagem TcTR (100 μ M)	
	% Inibição	DP
ButOH 20% ACN/H ₂ O	59,87	3,93
ButOH 40% ACN/H ₂ O	26,39	4,71
ButOH 60% ACN/H ₂ O	26,71	4,33
ButOH 80% ACN/H ₂ O	8,82	10,16
ButOH 80% MeOH	0	23,77
ButOH 100% ACN	31,55	5,67

Fonte: Autora, 2023

Analisando a atividade de cada fração, pode-se observar que se trata de uma atividade sinérgica, na qual as atividades de fração integral se distribuem entre suas partes constituintes. No entanto, a fração composta por 20% de ACN/H₂O apresentou uma inibição superior a 50% para a enzima. Essa subfração foi então submetida a análise em UPLC para identificar os compostos presentes (**Tabela 5**) e possivelmente estabelecer uma correlação entre a atividade apresentada e as moléculas identificadas. As demais subfrações não puderam ser analisadas devido a baixa quantidade de massa disponível, dificultando assim a análise por UPLC.

Tabela 5 - Compostos identificados na fração de 20%

Pico n°	t _R (min)	Fórmula Molecular (Score)	m/z (erro, ppm)		Íons de fragmentação MS/MS
			[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	

1	0.42	C ₆ H ₁₄ O ₆ (3.0160)	-	181.0714 (3.6341)	Galactitol
3	3.72	C ₁₈ H ₁₀ O ₉ (4.0230)	371.1301	369.0244 (2.1766)	Variegatorubin
4	4.38	C ₁₇ H ₁₂ O ₅ (4.2900)	297.0763 (-1.8580)	295.0604 (2.6919)	Aspulvinone E

Fonte: Autora, 2023

O cromatograma obtido para a fração de 20% foi de difícil interpretação (**Apêndice, Figura 24**), mesmo transformado para o formato mzML e inserido nos programas para a sugestões de moléculas, nenhum resultado foi apresentado. Possivelmente, o perfil de fragmentação (MS2) para essa fração não tenha sido adquirido adequadamente pelo equipamento, prejudicando a identificação de possíveis moléculas com atividades antiparasitárias já relatadas na literatura. Contudo, uma análise manual das massas e picos no cromatograma foi realizada, onde foram identificados três compostos encontrados nas análises de extrato bruto e da fração butanólica, conforme sugerido na **Tabela 5**.

Após o fracionamento, foi feita então a avaliação do IC₅₀ do extrato butanólico. Isso permitiu a análise de uma quantidade mínima necessária para a inibição *in vitro* da enzima em 50%. Os resultados obtidos se encontram na **Tabela 6**. Contudo, foi notado durante o teste de IC₅₀, que a porcentagem em inibição da fração butanólica caiu de 99,0% para 79,26% com o passar do tempo. Isso sugere que a atividade dessa fração resulta em uma redução da porcentagem de inibição ao longo do processo, podendo ser ocasionado por diferentes fatores como a degradabilidade de alguns compostos, o período de tempo para os testes, a exposição da fração com o ambiente, entre outros.

Tabela 6 - IC₅₀ da fração butanólica.

Fração	IC ₅₀ + DP		
	µg mL ⁻¹	DP	R
ButOH	23,24	7,28	0,9353

Fonte: Autora, 2023

Legenda: uM: Quantidade utilizada para o IC₅₀; DP: Desvio padrão; R: Coeficiente de correlação.

O valor observado nas análises de IC₅₀ para o extrato de butanol foi um pouco mais elevado do que o esperado. Geralmente, um IC₅₀ mais baixo é considerado mais favorável, indicando uma menor concentração do extrato necessária para a inibição da enzima.

6. CONCLUSÃO

A partir do presente trabalho, foi possível proporcionar a caracterização do perfil de metabólitos secundários presentes no cogumelo *Phlebopus beniensis*, utilizando técnicas de metabolômica, associando a espectrometria de massas e softwares, onde são incorporados algoritmos de fragmentação *in silico* e também análise em rede aberta (base de dados alimentados com espectros de massas).

Os resultados obtidos contribuem de maneira significativa para a caracterização do cogumelo *Phlebopus beniensis*, fornecendo informações que podem ser aplicadas como referência em projetos futuros relacionados à mesma espécie e até mesmo ao mesmo gênero. Além disso, os dados podem ser utilizados em abordagens quimiotaxonômicas e taxonômicas, auxiliando na identificação de compostos sugeridos neste estudo, particularmente presentes na espécie *P. beniensis*.

Quanto às metodologias utilizadas, as técnicas analíticas, como CLUE-EMAR e CG-EM, juntamente com ferramentas metabolômicas, mostraram-se eficazes para o perfil do estudo, permitindo a detecção de compostos já documentados na literatura, tanto para a ordem Boletales quanto para o gênero *Phlebopus spp.* As sugestões de fragmentação também foram implementadas para conferir maior confiabilidade às moléculas sugeridas pelos softwares utilizados.

Testes *in vitro* resultaram em uma atividade promissora de inibição da tripanotona redutase na fração butanólica, com uma eficácia de aproximadamente 100% para a concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como perspectiva futura, pode-se efetuar uma investigação refinada dessa fração, identificando e possivelmente isolando metabólitos que podem ser responsáveis pela atividade. Dessa maneira, este trabalho pode ser utilizado como guia para uma nova amostragem de *P. beniensis* que considere replicatas biológicas e análises de UPLC, contribuindo como design experimental para a identificação dos compostos, seguida por procedimentos de isolamento.

7. REFERÊNCIAS

ALY, Amal H.; DEBBAB, Abdessamad; PROKSCH, Peter. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 3-19, 2011.

AN, Zhiqiang (Ed.). Handbook of industrial mycology. CRC Press, 2004.

BARBOSA-SILVA, Anderlechi; WARTCHOW, Felipe. Considerations on the rare species *Phlebopus brasiliensis* (Fungi, Basidiomycota, Boletiniaceae) from Atlantic Forest of Northeast Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 133, n. 1, p. 109-119, 2020

BENNETT, J. W.; BENTLEY, Ronald. What's in a name?—microbial secondary metabolism. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 1989. p. 1-28.

BHUSHAN, Apoorva; KULSHRESHTHA, Mayank. The medicinal mushroom *Agaricus bisporus*: review of phytopharmacology and potential role in the treatment of various diseases. **Journal of Nature and Science of Medicine**, v. 1, n. 1, p. 4-9, 2018.

Bilal, A.W. Nutrição e Importância medicinal dos cogumelos. *J.Med.PlantasRes.* 2010,4,2598–2604. 2010.

BILLS, Gerald F.; GLOER, James B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 6, p. 4.6. 01, 2016.

BLACKWELL, Meredith. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BLAŽENOVIC, Ivana et al. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 2, p. 31, 2018.

DING, Bo et al. Development of a mass spectrometry-based metabolomics workflow for traceability of wild and cultivated *Cordyceps sinensis*. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 39, n. 11, p. 1773-1784, 2022.

BODDY, Lynne. Saprotrophic cord-forming fungi: meeting the challenge of heterogeneous environments. **Mycologia**, v. 91, n. 1, p. 13-32, 1999.

BRAKHAGE, Axel A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

CAMARA, Ana Gabrielle do Nascimento. Pigmentos produzidos pelo fungo basidiomiceto *Pisolithus tinctorius*: desreplicação, isolamento e estudo do potencial biotecnológico. 2023.

Ciba Foundation Symposium 171. *Secondary Metabolites: Their Function and Evolution* (John Wiley & Sons, Chichester, 1992).

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushroom biology—a new discipline. **Mycologist**, v. 6, n. 2, p. 64-65, 1992.

CHATURVEDI, Vivek Kumar et al. Medicinal mushroom: boon for therapeutic applications. **3 Biotech**, v. 8, p. 1-20, 2018.

CHUANKID, Boontiya et al. Secondary metabolites of *Phlebopus* species from Northern Thailand. **Mycological Progress**, v. 19, p. 1525-1536, 2020.

COSGROVE, Lee et al. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 18, p. 5817-5824, 2007.

DAI, Yu-Cheng. Hymenochaetaceae (Basidiomycota) in China. **Fungal diversity**, v. 45, n. 1, p. 131-343, 2010.

DAVOLI, Paolo; WEBER, Roland WS. Simple method for reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of fungal pigments in fruit-bodies of Boletales (Fungi). **Journal of Chromatography A**, v. 964, n. 1-2, p. 129-135, 2002.

DEBBAB, Abdessamad; ALY, Amal H.; PROKSCH, Peter. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. **Fungal Diversity**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2011.

DEBBAB, Abdessamad; ALY, Amal H.; PROKSCH, Peter. Endophytes and associated marine derived fungi—ecological and chemical perspectives. **Fungal Diversity**, v. 57, p. 45-83, 2012.

DE SILVA, Dilani D. et al. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. **Fungal Diversity**, v. 62, p. 1-40, 2013.

DIMITRIJEVIC, Marija V. et al. Comparative study of fatty acids profile in eleven wild mushrooms of Boletacea and Russulaceae families. **Chemistry & Biodiversity**, v. 15, n. 1, p. e1700434, 2018.

DÜHRKOP, Kai et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature methods**, v. 16, n. 4, p. 299-302, 2019.

COMBET, Emilie et al. Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. **Mycoscience**, v. 47, n. 6, p. 317-326, 2006.

COSTA, Geovanna de Oliveira et al. GC-MS comparison of fatty acids profile of oils extracted from viscera of *Tainha* (*Mugil liza*) and *Tambaqui* (*Colossoma macropomum*). **Natural Product Research**, p. 1-6, 2023.

GUO, Jian; HUAN, Tao. Comparison of full-scan, data-dependent, and data-independent acquisition modes in liquid chromatography–mass spectrometry based untargeted metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 12, p. 8072-8080, 2020.

HANUŠ, LUMÍR O.; SHKROB, Ilia; DEMBITSKY, Valery M. Lipids and fatty acids of wild edible mushrooms of the genus *Boletus*. **Journal of Food Lipids**, v. 15, n. 3, p. 370-383, 2008.

HERRERA, Carlos M. et al. Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 277, n. 1682, p. 747-754, 2010.

HAUTBERGUE, Thaïs et al. From genomics to metabolomics, moving toward an integrated strategy for the discovery of fungal secondary metabolites. **Natural product reports**, v. 35, n. 2, p. 147-173, 2018.

JOCKERS-SCHERÜBL, Maria C.; SCHIRMER, R. Heiner; KRAUTH-SIEGEL, R. Luise. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. **European Journal of Biochemistry**, v. 180, n. 2, p. 267-272, 1989.

KABIR, Yearul; KIMURA, Shuichi; TAMURA, Tsutomu. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 34, n. 4, p. 433-438, 1988.

KNIGHTS, B. A. Fungal Lipid Biochemistry. *Phytochemistry*, v. 14, n. 9, p. 2101-2102, 1975.

KAWAGISHI, Hirokazu. Biologically functional molecules from mushrooms. **J Synth Org Chem Jpn**, v. 68, n. 5, p. 514-521, 2010.

KELLER, Nancy P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 167-180, 2019.

KELLER, Nancy P.; TURNER, Geoffrey; BENNETT, Joan W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

KITTELMANN, Sandra et al. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e47879, 2013.

KOTLOVA, Ekaterina R. et al. Diversity of ESI-MS based phosphatidylcholine profiles in basidiomycetes. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 177, 2022.

KOZLOVSKII, A. G.; ZHELIFONOVA, V. P.; ANTIPOVA, T. V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 49, p. 1-10, 2013.

KRAUTH-SIEGEL, R. Luise et al. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: purification and characterization of the crystalline enzyme. **European journal of biochemistry**, v. 164, n. 1, p. 123-128, 1987.

KÜCK, Ulrich; BLOEMENDAL, Sandra; TEICHERT, Ines. Putting fungi to work: harvesting a cornucopia of drugs, toxins, and antibiotics. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. e1003950, 2014.

KUMLA, Jaturong et al. The ectomycorrhizal status of a tropical black bolete, *Phlebopus portentosus*, assessed using mycorrhizal synthesis and isotopic analysis. **Mycorrhiza**, v. 26, p. 333-343, 2016.

LINDEQUIST, Ulrike et al. Higher fungi in traditional and modern medicine. **Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten**, v. 33, n. 2, p. 40-48, 2010.

MALLMANN, Luana P.; RIOS, Alessandro O.; RODRIGUES, Eliseu. MS-FINDER and SIRIUS for phenolic compound identification from high-resolution mass spectrometry data. **Food Research International**, v. 163, p. 112315, 2023.

MEI, Wenli. Composition and cytotoxic activity of the organic acids from *Gracilaria lemaneiformis*. **Chinese Journal of Marine Drugs**, 1994.

MITRA, Amal K.; MAWSON, Anthony R. Neglected tropical diseases: epidemiology and global burden. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 2, n. 3, p. 36, 2017.

MOREIRA-RIVAS, Esteban Israel; DÍAZ-LEZCANO, Maura Isabel. Asociación de *Phlebopus* sp. con especies forestales del arbolado urbano de Asunción, Paraguay. **Revista Cubana de Ciencias Forestales**, v. 10, n. 2, p. 197-214, 2022.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NOUHRA, Eduardo et al. Mycorrhizal status of *Phlebopus bruchii* (Boletaceae). Does it form ectomycorrhizas with *Fagara coco* (Rutaceae)? **Symbiosis**, 2008.

Oliveira, A.; Oliveira, J.; Oliveira, G.; Ribeiro, A.; Oliveira, R.; Oliveira, A.; Oliveira, A.; Schillberg, S. Metabolômica vegetal estruturada para a exploração simultânea de múltiplos fatores. *Rep.* 2016, 6, 37390.

PAN, Si Yuan et al. New perspectives on innovative drug discovery: an overview. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 450-471, 2010.

PATTERSON, Andrew D.; GONZALEZ, Frank J.; IDLE, Jeffrey R. Xenobiotic metabolism: a view through the metabolometer. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 5, p. 851-860, 2010.

PEAY, Kabir G.; KENNEDY, Peter G.; TALBOT, Jennifer M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434-447, 2016.

PEDNEAULT, Karine et al. Fatty acid composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae. **Mycological research**, v. 110, n. 10, p. 1179-1183, 2006.

PINHO, P. Guedes de et al. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1704-1712, 2008.

PRADO-ELIAS, Amanda et al. *Phlebopus beniensis* (Singer & Digilo) Heinem. & Rammeloo (Boletiniellaceae, Basidiomycota, Fungi): novo registro para o Estado de São Paulo, Brasil e notas etnomicológicas. **Hoehnea**, v. 49, 2022.

PUIGGROS, C. et al. Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients. **Clinical Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 79-87, 2002.

RAGHOONUNDON, Bhavesh et al. *Phlebopus* (Boletales, Boletiniellaceae), a peculiar bolete genus with widely consumed edible species and potential for economic development in tropical countries. **Food Bioscience**, v. 41, p. 100962, 2021.

RAMU, Dandugudumula; SINGH, Shailja. Oxidative Stress: A Boon or Bane for Trypanosomatids Diseases?. **Oxidative Stress in Microbial Diseases**, p. 175-183, 2019.

REIGNAULT, Ph; VALETTE-COLLET, O.; BOCCARA, M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. **European journal of plant pathology**, v. 120, p. 1-11, 2008.

RIBEIRO, Bárbara et al. Comparative study of phytochemicals and antioxidant potential of wild edible mushroom caps and stipes. **Food chemistry**, v. 110, n. 1, p. 47-56, 2008.

RIBEIRO, Bárbara et al. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8530-8537, 2006.

SANTOS, Elisandro Ricardo Drechsler dos. Material Complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos. **Florianópolis: Universidade de Santa Catarina**, 2015.

SCHUEFFLER, Anja; ANKE, Timm. Fungal natural products in research and development. **Natural product reports**, v. 31, n. 10, p. 1425-1448, 2014.

SMITH, Myron L.; BRUHN, Johann N.; ANDERSON, James B. The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. **Nature**, v. 356, n. 6368, p. 428-431, 1992.

SPINKS, Daniel et al. Investigation of trypanothione reductase as a drug target in *Trypanosoma brucei*. **ChemMedChem**, v. 4, n. 12, p. 2060-2069, 2009.

STEGLICH, W.; FURTNER, W.; PROX, A. Pilzpigmente, V: Variegatorubin, ein Oxydationsprodukt der Variegatsäure aus *Suillus piperatus* (Bull. ex Fr.) O. Kuntze und anderen Boletaceen. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 25, n. 5, p. 557-558, 1970.

SULLIVAN, Richard; SMITH, John E.; ROWAN, Neil J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine. **Perspectives in biology and medicine**, v. 49, n. 2, p. 159-170, 2006.

SUN, Yu et al. Inducing secondary metabolite production of *Aspergillus sydowii* through microbial co-culture with *Bacillus subtilis*. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2021.

SUN, Zhaocui et al. Pyrrole alkaloids from the edible mushroom *Phlebopus portentosus* with their bioactive activities. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1198, 2018.

SUUTARI, Merja. Effect of growth temperature on lipid fatty acids of four fungi (*Aspergillus niger*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, and *Trichoderma reesei*). **Archives of microbiology**, v. 164, p. 212-216, 1995.

SENIK, Svetlana V. et al. Diacylglyceryltrimethylhomoserine content and gene expression changes triggered by phosphate deprivation in the mycelium of the basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 117, p. 34-42, 2015.

TALBOT, Jennifer M. et al. Endemism and functional convergence across the North American soil mycobiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 17, p. 6341-6346, 2014.

TAYLOR, John W.; BERBEE, Mary L. Dating divergences in the Fungal Tree of Life: review and new analyses. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 838-849, 2006.

TEDERSOO, Leho et al. Global diversity and geography of soil fungi. **science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 2014.

TIAN, Run et al. Analysis of aromatic components of two edible mushrooms, *Phlebopus portentosus* and *Cantharellus yunnanensis* using HS-SPME/GC-MS. *Results in Chemistry*, v. 4, p. 100282, 2022.

TENG, B.-S. et al. Hypoglycemic effect and mechanism of a proteoglycan from *ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 2, 2012.

TRESEDER, Kathleen K.; LENNON, Jay T. Fungal traits that drive ecosystem dynamics on land. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 2, p. 243-262, 2015.

TSUGAWA, Hiroshi et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature methods**, v. 12, n. 6, p. 523-526, 2015.

TSUGAWA, Hiroshi et al. Hydrogen rearrangement rules: computational MS/MS fragmentation and structure elucidation using MS-FINDER software. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 16, p. 7946-7958, 2016.

VANIYA, Arpana et al. Using MS-FINDER for identifying 19 natural products in the CASMI 2016 contest. **Phytochemistry letters**, v. 21, p. 306-312, 2017.

VENTURELLA, Giuseppe et al. Medicinal mushrooms: bioactive compounds, use, and clinical trials. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 2, p. 634, 2021.

VASKOVSKY, Victor E.; KHOTIMCHENKO, Svetlana V.; BOOLUGH, Eugenia M. Distribution of diacylglycerotrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 755-760, 1998.

WANG, Xuan et al. MS-FINDER Assisted in Understanding the Profile of Flavonoids in Temporal Dimension during the Fermentation of Pu-erh Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 7085-7094, 2022.

WEISS, Benjamin; STILLER, Richard L. Sphingolipids of mushrooms. **Biochemistry**, v. 11, n. 24, p. 4552-4557, 1972.

YING, J.; WANG, Y.; TANG, H. Icones of Medicinal Fungi from China. 1987. **Fungi—medicine—Chinese—identification—therapeutic use—pictorial works—China**, p. 572-575.

ZHAO, Qi; ZHANG, Jia-Le; LI, Fei. Application of metabolomics in the study of natural products. **Natural products and bioprospecting**, v. 8, p. 321-334, 2018.

8. APÊNDICE

Figura 22 - Partes do cogumelos

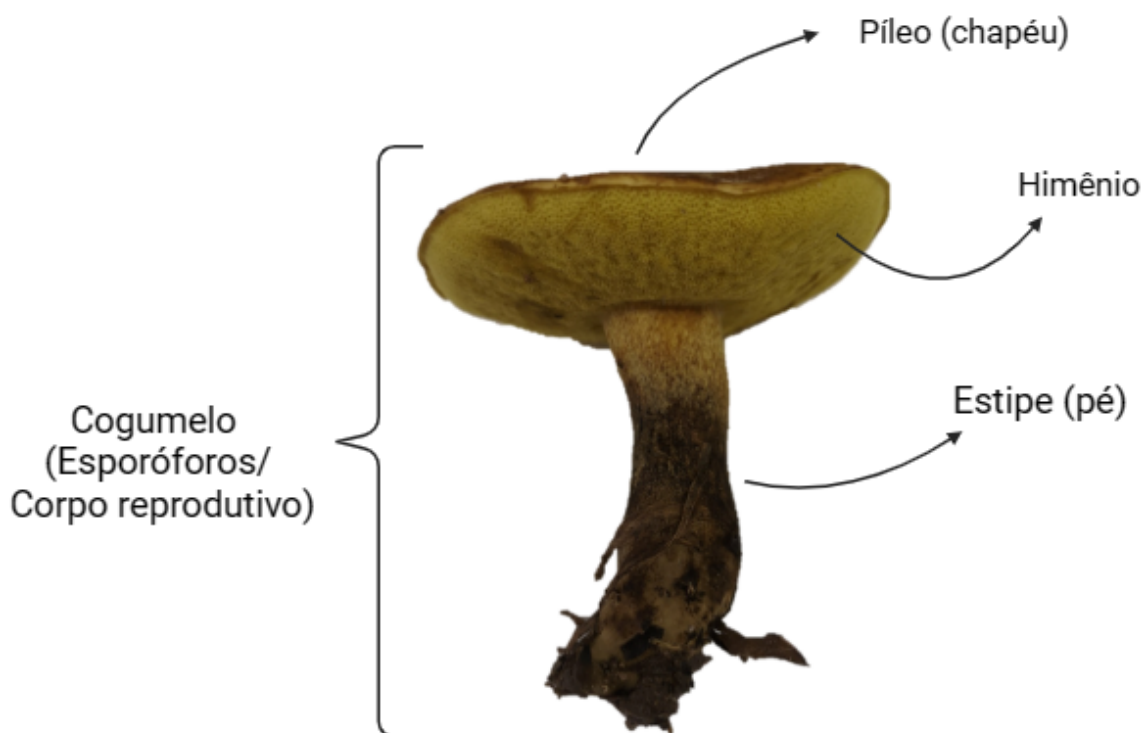


Figura 23 - Cromatogramas referente ao branco do cogumelo *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente.

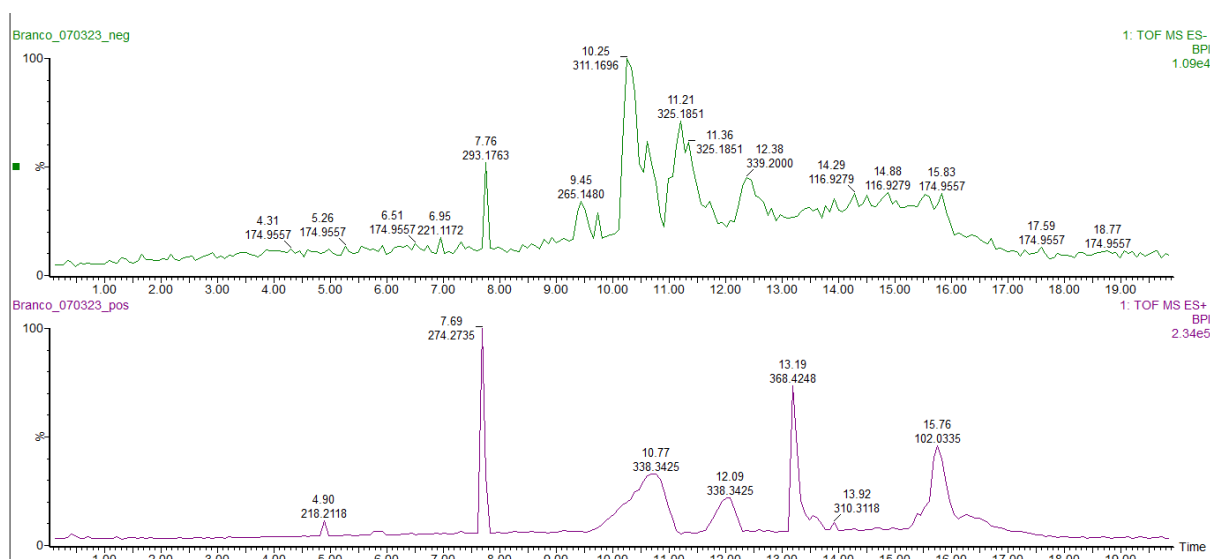
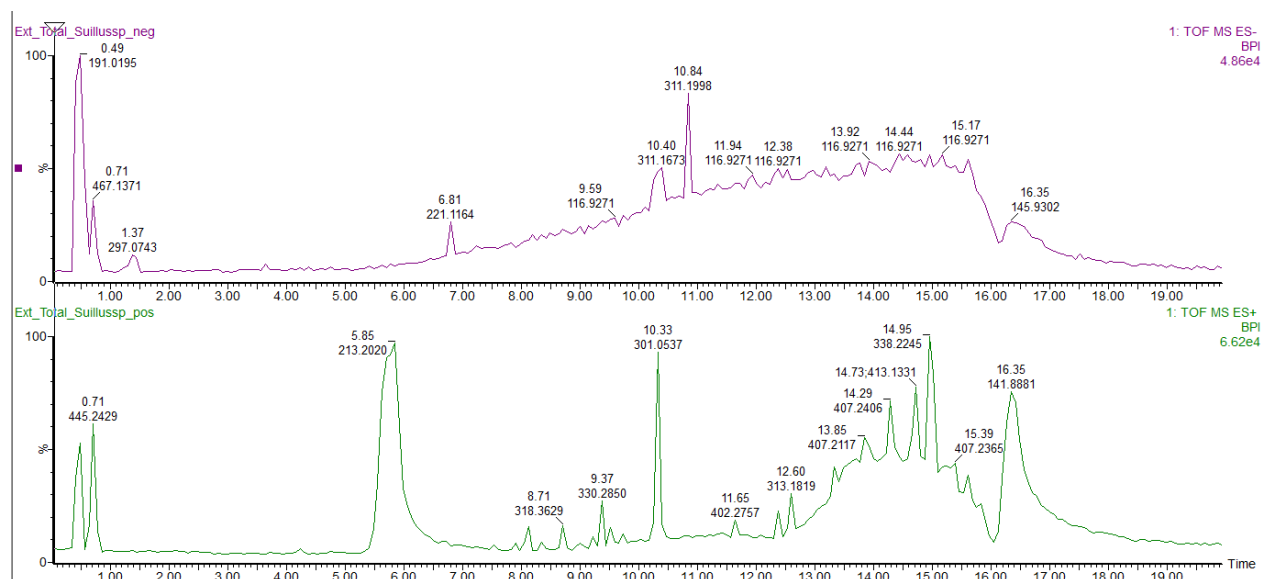


Figura 24 - Cromatogramas referente ao extrato Bruto do cogumelo *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente.



Legenda: Cromatogramas roxos são referentes ao modo negativo; Cromatogramas em verde são referentes ao modo positivo.

Figura 25 - Cromatogramas referente a fração de diclorometano do cogumelos *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente.

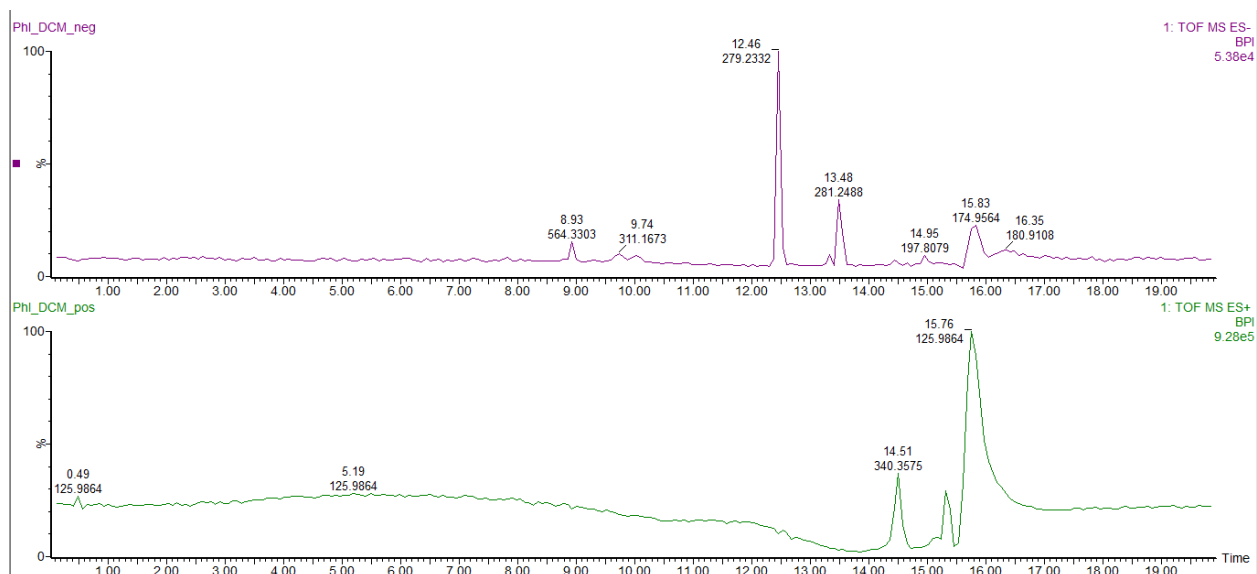


Figura 26 - Cromatogramas referente a fração de acetato de etila do cogumelos *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente

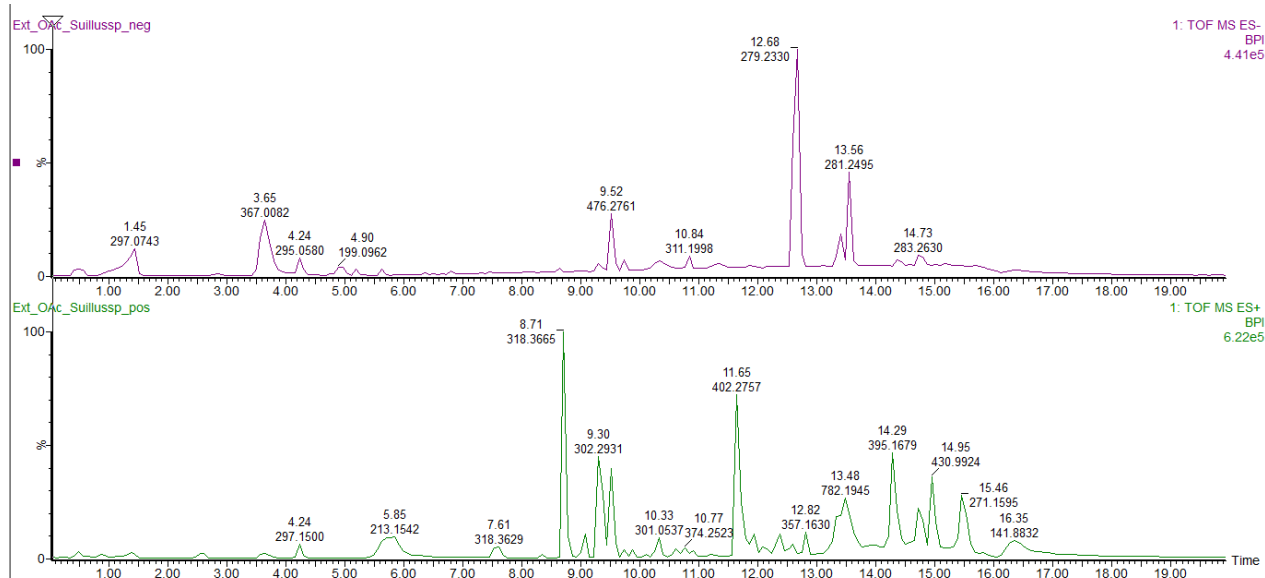


Figura 27 - Cromatogramas referente a fração de Butanol do cogumelos *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente.

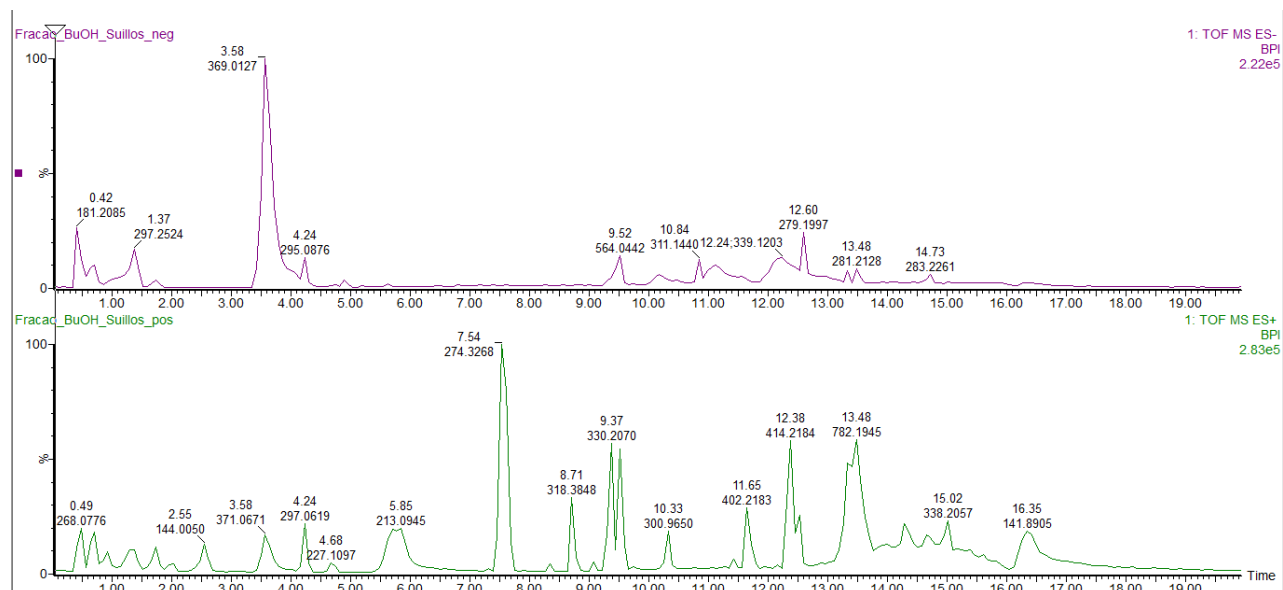


Figura 28 - Cromatogramas referente a fração aquosa do cogumelos *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente.

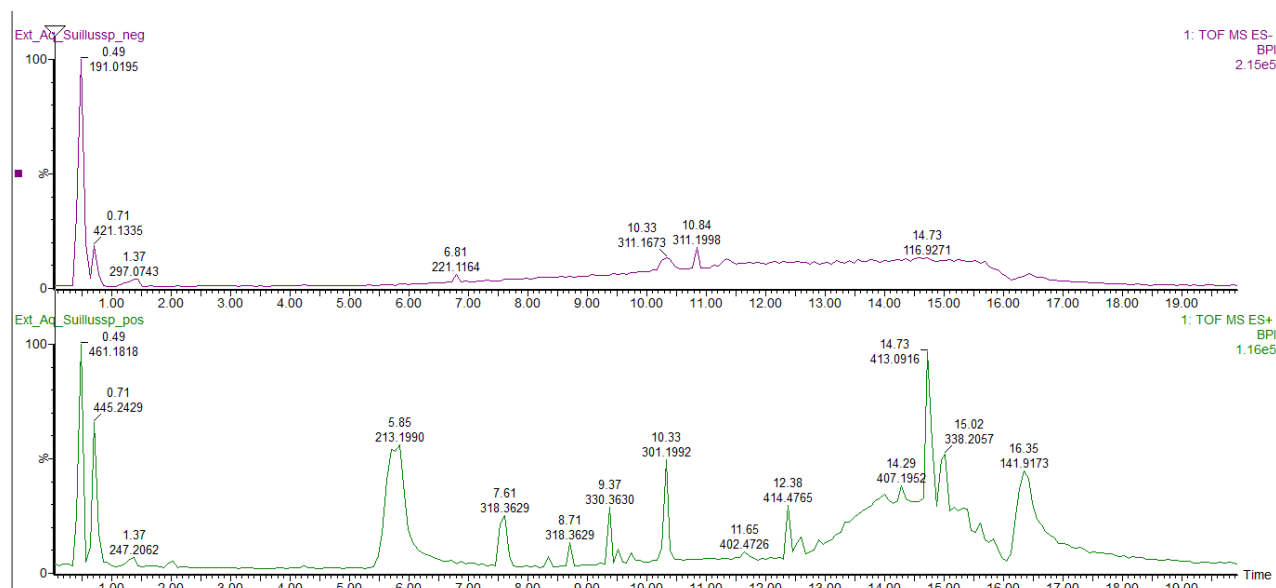


Figura 29 - Cromatogramas referente a subfração butanólica (20% ACN/H₂O) do cogumelos *Phlebopus beniensis*, nos modos negativos e positivos, respectivamente.

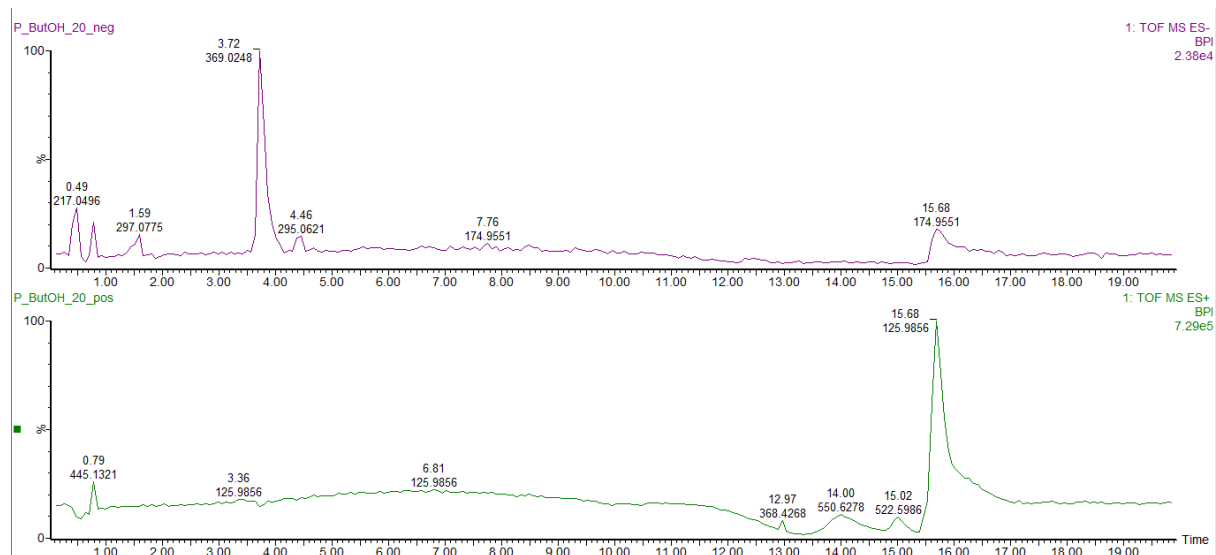


Figura 30 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidilcolina.

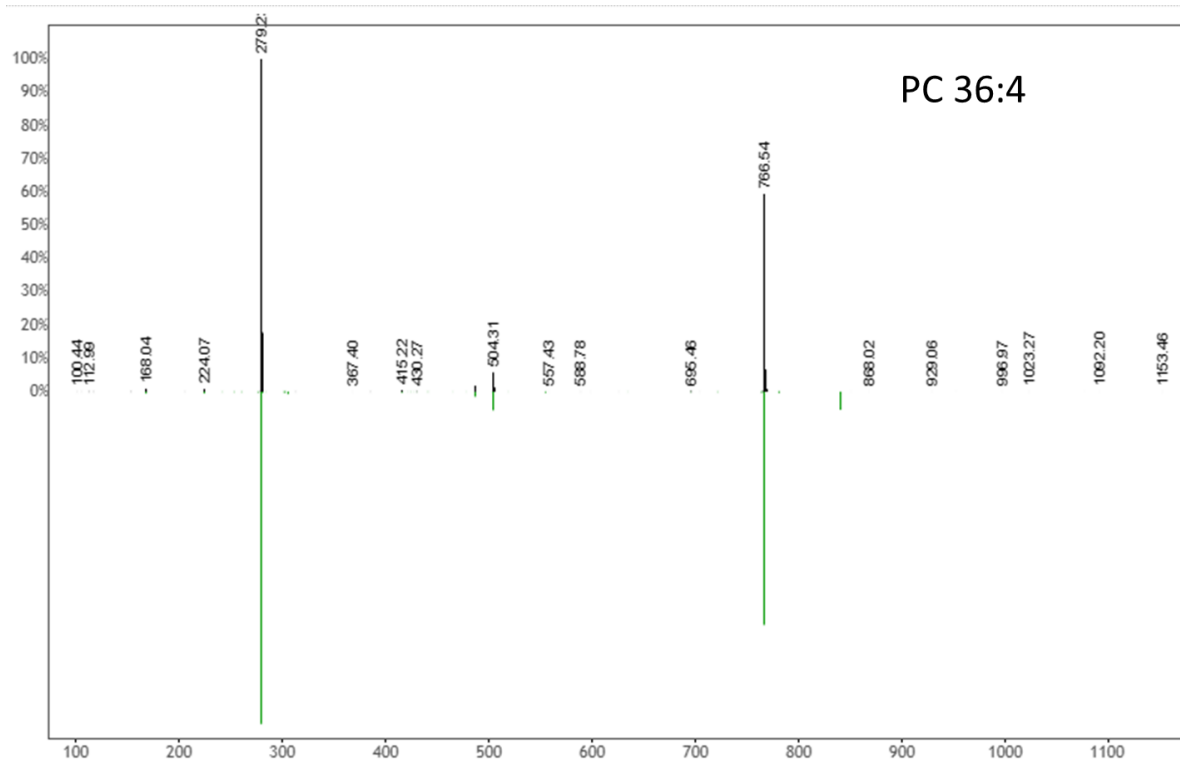


Figura 31 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidiletanolamina.

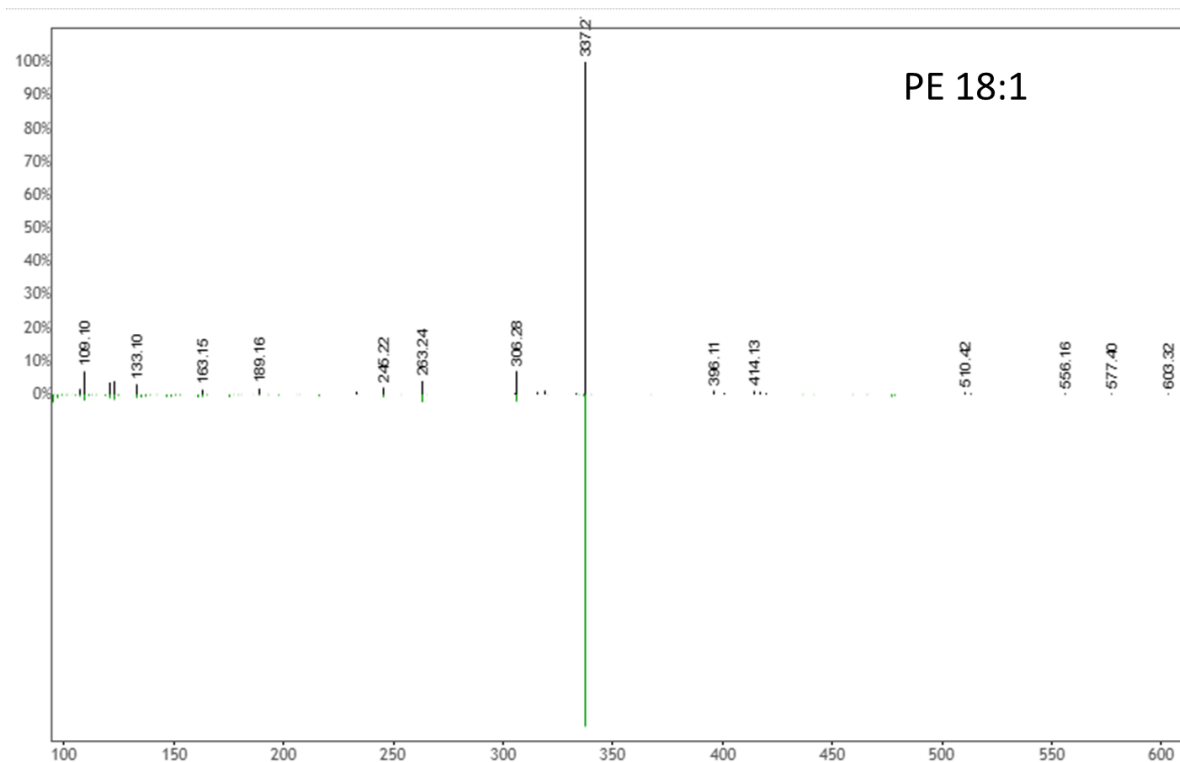


Figura 32 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidiletanolamina.

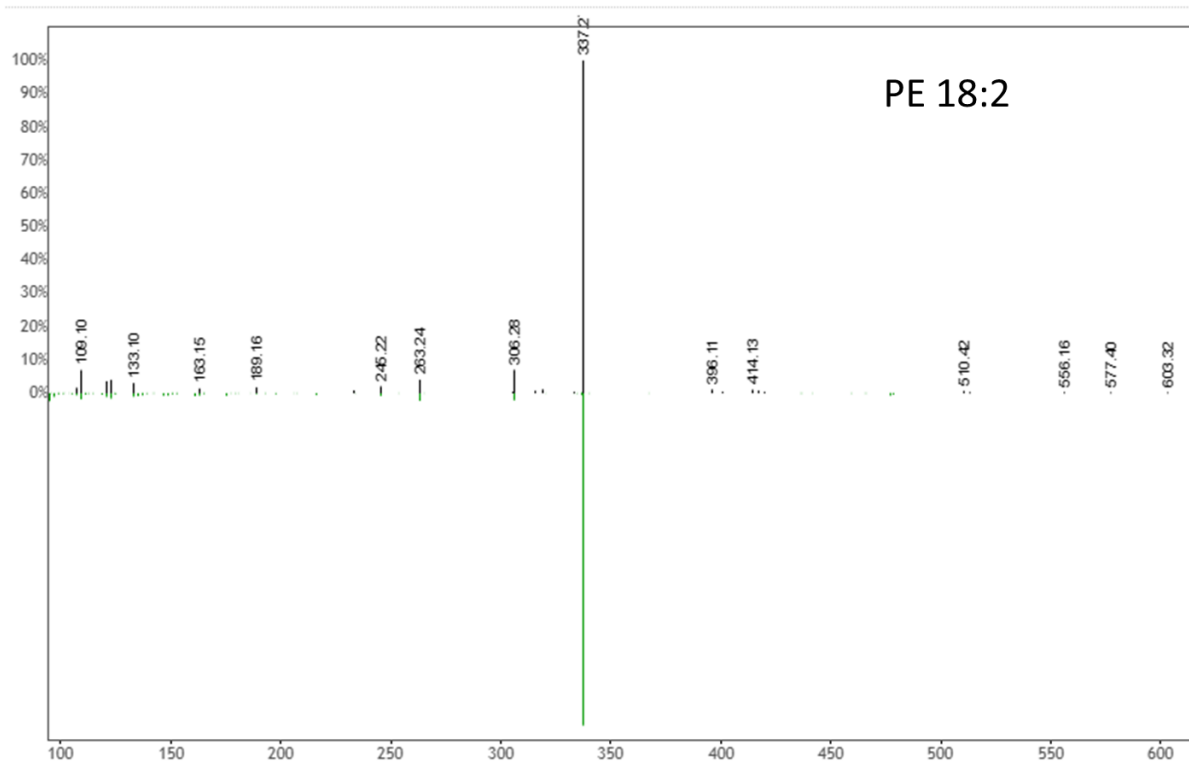


Figura 33 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de fosfatidiletanolamina.

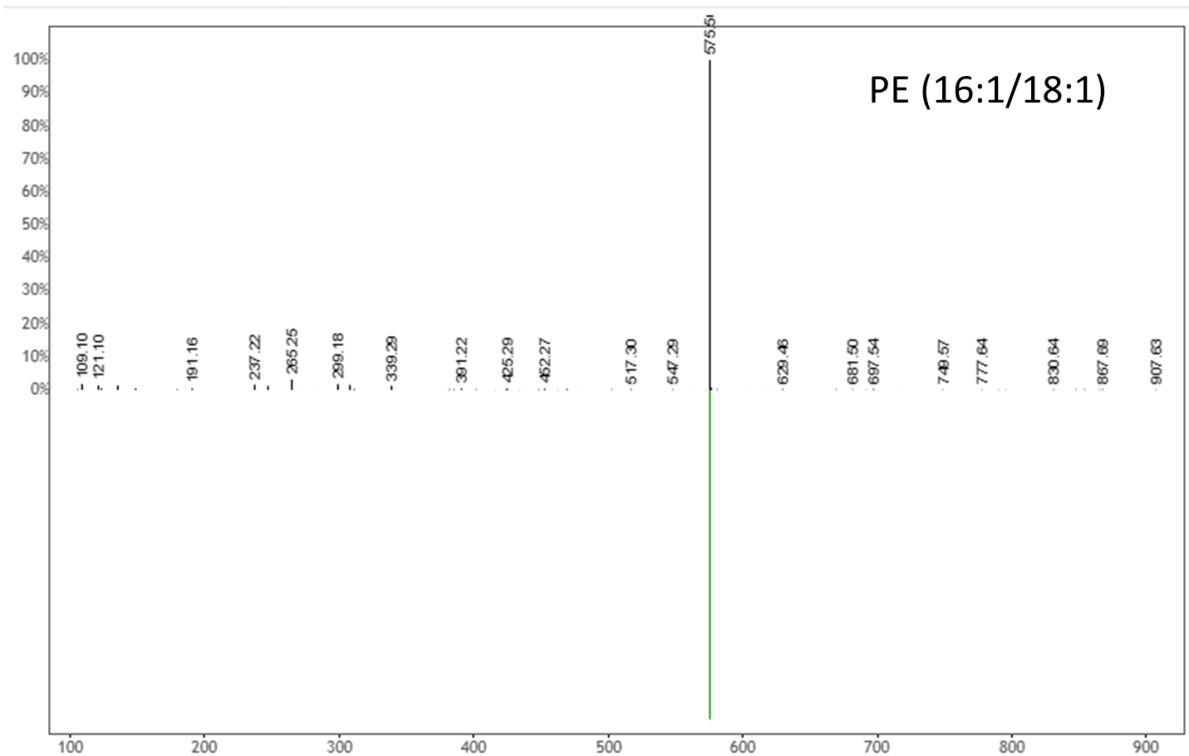


Figura 34 - Comparação espectral da plataforma GNPS para o composto de ceramida.

