

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA

VICTOR DAMASCENO PAVANI

**Co-cultivo de micro-organismos isolados da
rizosfera de *Senna spectabilis***

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara, 2018

VICTOR DAMASCENO PAVANI

**Co-cultivo de micro-organismos isolados da
rizosfera de *Senna spectabilis***

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

FICHA CATALOGRÁFICA

P337c Pavani, Victor Damasceno
Co-cultivo de micro-organismos isolados da rizosfera de
Senna spectabilis / Victor Damasceno Pavani. –
Araraquara : [s.n.], 2018
197 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Micro-organismos. 2. Rizosfera. 3. Cromatografia a
gás. 4. *Fusarium oxysporum*. 5. Cromatografia líquida de
alta eficiência. I. Título.

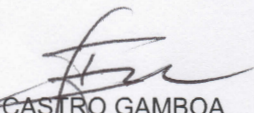
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

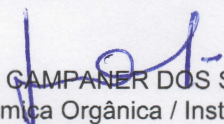
TÍTULO DA TESE: "Co-cultura de micro-organismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*"

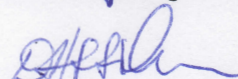
AUTOR: VÍCTOR DAMASCENO PAVANI

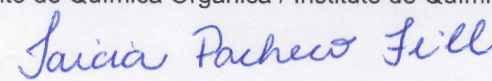
ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

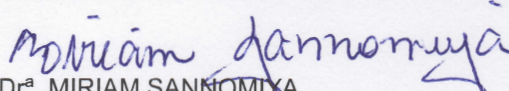
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Profª. Drª. TAÍCIA PACHECO FILL
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas


Profª. Drª. MIRIAM SANNOMIYA
Escola de Artes, Ciências e Humanidades / Universidade de São Paulo - USP - São Paulo

Araraquara, 06 de abril de 2018

Araraquara, 2018

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome: Victor Damasceno Pavani

Filiação: Luiz Carlos Pavani e Maria do Carmo Morelli Damasceno Pavani

Nascimento: 29/09/1987

Endereço profissional

NuBBE– Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.
Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Prof. Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, Araraquara/SP, CEP 14800-900,

Telefone: (16) 997601683 victordpavani951@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2014-2018** Doutorado em andamento em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.
Título: Co-Cultura de microrganismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*.
Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa.
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
- 2012-2014** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, SP - Brasil.
Título: Estudo Metabolômico entre interações da rizosfera de *Senna spectabilis* e rizobactérias associadas.
Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: metabolômica; rizosfera; *senna spectabilis*.

2008-2011 Graduação em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP,
Brasil.
Título: Otimização de método para a determinação de
antimicrobianos em cama de frango por CLAE-FLU.
Orientador: Professora Dra Mary Rosa Rodrigues de Marchi.
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação complementar

2017-2017 X EBEQ – Encontro Brasileiro de Ecologia Química (participação em evento)

6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM (participação em evento)

2016-2017 Supervisão Científica da aluna Laura Vilar Simões, aluna regularmente matriculada no curso de engenharia química no Instituto de Química da Unesp Araraquara.

2016-2016 I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental – CBMAAA. (Participação em evento).

39° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. (Participação em evento).

VIII Simpósio de Microbiologia – IBILCE/UNESP. (Participação em evento).

2015-2015 Realização de estagio docência em Química Orgânica Experimental, sob supervisão da Prof. Dra. Lourdes Campaner dos Santos. (Estagio docência).

2014-2015 Supervisão Científica da aluna Ligia Louro, aluna regularmente matriculada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara.

2014-2014 *Recent Advances in NMR Spectroscopy: A powerful Tool for Fundamental and Applied Ressearch.* (Participação em evento).

2013-2013 *4th Brazilian Conference on Natural Products and the XXX Meeting on Micromolecular, Evolution, Systematic and Ecology (RESEM).* (Participação em evento).

São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry.
(Participação em evento).

2011-2011 HPLC: Aplicações na Área Farmacêutica a Atualidade. (Carga horária: 16h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Congresso de Iniciação Científica da Unesp. (Participação em evento).

2009-2009 Análise e tratamento de águas: princípios, técnica. (Carga horária: 20h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Produções

Artigos completos publicados em periódicos.

SELEGATO, D. M.; MONTEIRO, A. F.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P.; **PAVANI, V. D.**; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. UPDATE: biological and chemical aspects of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** v. 28, p. 415-426, 2017.

PAVANI, V. D.; FERNANDES, R. P.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P. Dereplication of metabolites produced by *Fusarium oxysporum* isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v.8, 2016.

FERNANDES, R. P.; **PAVANI, V. D.**; CARDOSO, P.; PILON, A. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Metabolite induction by co-culture of *the Fusarium oxysporum* and *F. solani* fungi isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, v.8, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

PAVANI, V. D.; FERNANDES, R. P.; CARDOSO, P.; CASTRO-GAMBOA, I. Co-

cultivo em meio solido de *Fusarium solani* e *Shigella sp* visando a identificação de novos compostos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

FERNANDES, R. P.; **PAVANI, V. D.**; CARDOSO, P.; PILON, A. C.; CASTRO-GAMBOA, I. . Indução de metabólitos através da co-cultura de fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PAVANI, V. D.; FERNANDES, R. P.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P.; CASTRO-GAMBOA, I. Desreplicação dos metabólitos produzidos por *Fusarium oxysporum* isolado da rizosfera de *Senna spectabilis*. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SELEGATO, D. M.; VIEIRA, N. C.; FREIRE, R. T.; **PAVANI, V. D.**; CASTRO-GAMBOA, I. 'Metabolomic studies of fungi isolated from the rhizosphere of *Senna spectabilis* by NMR spectroscopy and bioassays: selection of biologically promising extracts for co-culture'. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TRINDADE, R. N.; **PAVANI, V. D.**; CARDOSO, P.; CASTRO-GAMBOA, I. Estudos dos extratos das bactérias *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella sp*. Isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PAVANI, V. D.; CARDOSO, P.; SELEGATO, D. M.; CASTRO-GAMBOA, I. Metabolomic study of rhizobacteria isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

NETTO, P. T.; **PAVANI, V. D.**; ZOCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R. Optimization and validation method for determination of veterinary antimicrobials: occurrence in poultry litter. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PAVANI, V. D.; NETTO, P. T.; ZOCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R. Determinação de antimicrobianos, empregados no manejo avícola, utilizando CLAE-FLU. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

*Dedico esse trabalho aos meus pais Luiz e Maria,
aos meus irmãos Luciana, Claudio e Ismael,
pelo apoio e confiança que
tiveram em mim no decorrer do curso.*

"A natureza cria as doenças. Em algum lugar, ela provém o antídoto".

Florey, H.

AGRADECIMENTOS

A UNESP e ao Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química - Araraquara, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho e por ter sido cenário importante de mais uma etapa importante da minha vida.

Ao prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, pela orientação, dedicação, compreensão, carinho, amizade e paciência

A Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos e a Profa. Dra. Ângela Regina Araújo que participaram do exame de qualificação, e contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos professores, técnicos e alunos do NuBBE e do departamento de Química Orgânica, pelos ensinamentos, discussões, aprendizado e amizade.

A todos os funcionários do IQ da Unesp.

Aos professores membros da banca que gentilmente aceitaram o convite para avaliação desta tese.

Aos moradores e agregados da república Xurupitas, pelos momentos bons, discussões, ensinamentos e bebedeiras.

À CAPES pelas bolsas concedidas e a FAPESP e CNPq pelo financiamento

RESUMO

A busca por agentes terapêuticos derivados de plantas faz parte da história da humanidade. Entretanto, a alta taxa de redescoberta de metabólitos secundários é um problema crônico na química de produtos naturais, evidenciando que novas abordagens são necessárias. Assim, a utilização de culturas microbianas mistas representa uma metodologia alternativa, induzindo a expressão metabólica, aumentando as chances de sucesso na descoberta de novas substâncias bioativas. Para tanto, foram selecionados os fungos *Rhinoctadiella similis* e *Fusarium oxysporum*, micro-organismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*, de acordo com os resultados de viabilidade, e ensaios biológicos (antimicrobiano, anticolinesterásico e citotóxico), e realizados experimentos de co-cultivo e cultivo simples desses fungos. Do cultivo simples de *F. oxysporum* foram identificados por CLAE-EM sete compostos conhecidos pela literatura, pertencentes a classe dos jasmonatos (5 e 6), derivados do ácido picolínico (1 a 4), e a beauvericina (7), que apresentam uma gama de atividade biológica relatadas na literatura, e por CG-EM foram identificados 21 compostos voláteis. Já para o cultivo simples de *R. similis* foi realizado um planejamento experimental variando três condições de cultivo (agitação, luminosidade e tempo de cultivo). As análises revelaram que a ausência de luz e agitação sob incubação em um período de 28 dias, foram as condições de cultivo que resultaram em uma maior variedade de metabólitos, sendo a agitação a variável que mais contribuiu para essa diversidade metabólica. Com isso, foram identificados 13 compostos, sendo três inéditos, e oito compostos voláteis. Já o co-cultivo em meio sólido entre essas duas espécies apresentou interação morfológica do tipo inibição pelo contato. E possibilitou a identificação (proposta) de dois compostos por CLAE-EM e cinco compostos voláteis por CG-EM, todos exclusivos do co-cultivo, como esses compostos são a resposta à algum tipo de interação micróbio-micróbio, possivelmente esses composto apresentam algum tipo de bioatividade, principalmente antimicrobiana.

Palavras-chave: Rizosfera, *Senna spectabilis*, *Rhinoctadiella similis*, *Fusarium oxysporum*, CLAE-EM, CG-EM.

ABSTRACT

The search for therapeutic agents derived from plants is part of the history of humanity. However, the high rate of rediscovery of secondary metabolites is a chronic problem in natural products chemistry, evidencing that new approaches are necessary. Thus, the use of co-culture represents an alternative methodology, inducing metabolic expression, increasing the chances of success in the discovery of new bioactive substances. For this, the fungi *Rhinochadiella similis* and *Fusarium oxysporum* were selected, microorganisms isolated from the *Senna spectabilis*'s rhizosphere, according to the results of viability, and biological assays (antimicrobial, anticholinesterase and cytotoxic), and carried out experiments of co-cultivation and simple cultivation these fungi. From the simple cultivation of *F. oxysporum*, seven well known compounds in the literature were identified by HPLC-MS, belonging to the class of jasmonates (**5 e 6**), picolinic acid derivatives (**1 a 4**), and beauvericin (**7**), which have a range of reported biological activity, and by GC-MS were identified 21 volatile compounds. For the simple cultivation of *R. similis*, an experimental design was carried out, varying three cultivation conditions (agitation, luminosity and incubation days). The analyzes revealed that the absence of light and agitation under incubation in a period of 28 days were the cultivation conditions that resulted in a greater variety of metabolites, with agitation being the variable that contributed most by this metabolic diversity. With this, it was possible to isolate and identify 13 compounds being three unpublished, and eight volatile compounds. The co-cultivation in solid medium among these two species showed morphological interaction of the type "contact inhibition ". It was possible to identify (proposed) two compounds by HPLC-MS and five more volatile compounds by GC-MS, all exclusive to co-cultivation (called de novo-induced metabolites), as these compounds are the answer to some kind of microbe-microbe interaction, possibly these compounds present some kind of bioactivity, especially antimicrobial.

Keywords: Rhizosphere, *Senna spectabilis*, *Rhinochadiella similis*, *Fusarium oxysporum*, HPLC-MS, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura química da brasilina (1) e brasileína (2), corante extraído do pau-brasil.....	29
Figura 02: Estrutura química da: forscolina (3), artemisinina (4) e taxol (5).....	30
Figura 03: Exemplos de compostos bioativos de origem microbiana.....	33
Figura 04: Fonte de compostos até 2013 aprovados pelo FDA.....	34
Figura 05: Interações morfológicas observadas entre dois fungos em uma placa de Petri. a) inibição à distância, b) linhas de confronto, c) inibição pelo contato e d) crescimento excessivo, de acordo com BERTRAND et al. 2013.....	36
Figura 06: Compostos induzidos em co-cultura de micro-organismos.....	38
Figura 07: Metabólitos secundários relatados pela literatura de <i>Rhinoctadiella spp.</i>	41
Figura 08: Alguns metabólitos encontrados em <i>Fusarium oxysporum</i>	43
Figura 09: Estrutura química das principais classes de compostos isolados de <i>S. spectabilis</i> , alcaloide piperidínicos (54-57), triterpenos cíclicos (58, 60 e 69), esteroides (59 e 67), pironas (62 e 66), antraquinonas (61 e 64), flavonoides (63 e 65) e miscellaneous (68 e 70).....	44
Figura 10: Reação de redução do Reagente MTT em Azul de Formazan.....	49
Figura 11: Esquema da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA. As setas (→) indicam os <i>primers</i> utilizados para a amplificação.....	50
Figura 12: Esquema de inoculação dos micro-organismos em placa de Petri.....	52
Figura 13: Cromatograma obtido em CLAE-DAD _{prep} (254 nm) da Fr04Rs, modo de eluição isocrático 50% H ₂ O/ACN.....	58
Figura 14: Cromatograma obtido em CLAE-DAD _{prep} . (254nm) da Fr05Rs, modo de eluição isocrático 65%B (H ₂ O/ACN).....	59

Figura 15: Imagem dos vinte fungos selecionados inicialmente (fotos tiradas com dez dias de crescimento).....	61
Figura 16: Imagem dos vinte extratos obtidos de cada fungo selecionados inicialmente.....	62
Figura 17: Gráfico do resultados obtidos da pesagem dos extratos.....	62
Figura 18: Cromatoplaça obtido dos quatorze extratos, sistema de eluição AcOEt/ACN (90:10 v/v).....	63
Figura 19: Resultados dos ensaios de inibição de acetilcolinesterase e antimicrobiano.....	63
Figura 20: Resultados obtidos das análises de atividade antitumoral, avaliadas em células de câncer colorretal HCT116 após 72 horas de incubação pelo teste de MTT.....	65
Figura 21: Perfil químico obtido pela análise do extrato em meio sólido (placa de Petri) de <i>Fusarium oxysporum</i> em CLAE-EM.....	68
Figura 22: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 196,0965.....	69
Figura 23: Espectro de massas do composto m/z 196,0965, obtido por CLAE-QTOF.....	69
Figura 24: Proposta de fragmentação do derivado do ácido fusárico (Composto 1).....	70
Figura 25: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 178,0860.....	70
Figura 26: Espectro de massas do composto m/z 178,0860, obtido por CLAE-QTOF.....	71
Figura 27: Proposta de fragmentação da sugestão dada pelo banco de dados, para o composto dois.....	71
Figura 28: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 180,1022.....	72
Figura 29: Espectro de massas do composto m/z 180,1022, obtido por CLAE-QTOF.....	72

Figura 30: Proposta de fragmentação do ácido fusárico sugerido pelo banco de dados para o composto três.....	72
Figura 31: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de <i>m/z</i> 194,1166.....	73
Figura 32: Espectro de massas do composto <i>m/z</i> 194,1166, obtido por CLAE-QTOF.....	73
Figura 33: Proposta de fragmentação do composto sugerido pelo banco de dados para o composto quatro.....	74
Figura 34: a) Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de <i>m/z</i> 211,1329; b) espectro de massas do composto cinco, obtido por CLAE-QTOF.....	75
Figura 35: Espectro de MS ² do composto cinco, obtido por CLAE-IONTRAP.....	75
Figura 36: Proposta de fragmentação do composto sugerido pelo banco de dados para o composto seis.....	76
Figura 37: a) Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de <i>m/z</i> 338,2356; b) espectro de massas do composto seis, obtido por CLAE-QTOF.....	76
Figura 38: a) Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de <i>m/z</i> 784,4120; b) espectro de massas do composto sete, obtido por CLAE-QTOF.....	77
Figura 39: Espectro de MS ² do composto sete, obtido por CLAE-IONTRAP.	78
Figura 40: Proposta de fragmentação do composto sugerido pelo banco de dados para o composto sete.....	78
Figura 41: Análise de hidrocarbonetos C8-C40 em CG-EM.....	79
Figura 42: a) perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de <i>F. oxysporum</i> , b) ampliação do perfil cromatográfico (4,0 a 12,5 min); c) ampliação do perfil cromatográfico (12,5 a 25,0 min).....	80
Figura 43: Proposta de fragmentação do propanoato de etila (composto 1)..	82
Figura 44: Proposta de fragmentação do 3-metilbutanol (composto 2).....	82
Figura 45: Proposta de fragmentação do 2-metilbutanol (composto 3).....	83

Figura 46: Proposta de fragmentação do isobutirato de etila (composto 4)....	83
Figura 47: Proposta de fragmentação do etanoato de isobutila (composto 5).....	84
Figura 48: Proposta de fragmentação do etanoato de butila (composto 6)....	85
Figura 49: Proposta de fragmentação do 2-metilbutanoato de etila (composto 7).....	85
Figura 50: Proposta de fragmentação do hexanol (composto 8).....	86
Figura 51: Proposta de fragmentação do etanoato de isopentila (composto 9).....	86
Figura 52: Proposta de fragmentação do etanoato de 2-metilbutila (composto 10).....	87
Figura 53: Proposta de fragmentação do 2-heptanona (composto 11).....	87
Figura 54: Proposta de fragmentação do 5-metil-2-hexanol (composto 12)...	88
Figura 55: Proposta de fragmentação do 3-metil-2-butenato de etila (composto 13).....	89
Figura 56: Proposta de fragmentação do 3-octanona (composto 14).....	90
Figura 57: Proposta de fragmentação de etanoato de hexila (composto 15)..	90
Figura 58: Proposta de fragmentação de 1-metoxi-4-metilbenzeno (composto 16).....	91
Figura 59: Proposta de fragmentação de 1-metoxi-4-etilbenzeno (composto 17).....	92
Figura 60: Proposta de fragmentação de 4-etilfenol (composto 18).....	92
Figura 61: Proposta de fragmentação de etanoato de octila (composto 19)...	93
Figura 62: Proposta de fragmentação do etil fenilacetato (composto 20).....	94
Figura 63: Proposta de fragmentação do etanoato de nonila (composto 21).	94
Figura 64: Compostos de <i>F. oxysporum</i> identificados neste trabalho.....	96
Figura 65: Continuação da Figura 64.....	97
Figura 66: Gráfico dos efeitos de cada variável que influenciam na quantidade de bandas cromatográficas.....	101

Figura 67: Gráficos de contorno das variáveis Dias, Agitação e Luz em relação ao número de picos observados em CLAE-DAD. (A) Dias versus Agitação (B) Luz versus Agitação.....	102
Figura 68: perfil químico obtido pela análise do extrato em meio líquido de <i>R. similis</i> em CLAE-DAD, a 25°C e, estático e vinte e oito dias de crescimento (condições otimizadas).....	104
Figura 69: Percentual de inibição do crescimento celular das frações em linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7) com as concentrações de 5 µg mL ⁻¹ e 50 µg mL ⁻¹	104
Figura 70: Estrutura da substância 1.....	106
Figura 71: Espectro de massas de alta resolução da substância 1.....	106
Figura 72: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância 1.....	107
Figura 73: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a uma ligação (600 MHz, CD ₃ OD) da substância.....	108
Figura 74: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (600 MHz, CD ₃ OD) da substância 1.....	110
Figura 75: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).....	111
Figura 76: Estrutura da substância 2.....	112
Figura 77: Espectro de massas de alta resolução da substância 2 e proposta de formação do íon de <i>m/z</i> 121.....	112
Figura 78: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância 2.....	113
Figura 79: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a uma ligação (600 MHz, CD ₃ OD) da substância 2.....	114
Figura 80: Mapa de correlação ¹ H- ¹³ C a longa distância (600 MHz, CD ₃ OD) da substância 2.....	116
Figura 81: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).....	117
Figura 82: Estrutura da substância 3.....	118
Figura 83: Espectro de massas de alta resolução da substância 3.....	118
Figura 84: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) da substância 3.....	119

Figura 85: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da substância 3.....	120
Figura 86: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 3.....	122
Figura 87: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 3.....	123
Figura 88: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}>\text{C}$).....	124
Figura 89: Estrutura da substância 4.....	125
Figura 90: Espectro de massas de alta resolução da substância 4.....	125
Figura 91: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 4.....	126
Figura 92: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 4.....	127
Figura 93: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 4.....	129
Figura 94: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}>\text{C}$).....	130
Figura 95: Estrutura da substância 5.....	131
Figura 96: Espectro de massas de alta resolução da substância 5.....	131
Figura 97: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 5.....	132
Figura 98: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 5.....	133
Figura 99: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 5.....	135
Figura 100: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($\text{H}>\text{C}$).....	136
Figura 101: Estrutura da substância 6.....	137
Figura 102: Espectro de massas de alta resolução da substância 6.....	138
Figura 103: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.....	139
Figura 104: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da substância 6....	140
Figura 105: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.....	142

Figura 106: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.....	143
Figura 107: Mapa de correlação ^1H - ^{15}N a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.....	145
Figura 108: Principais correlações observadas no experimento de A) HMBC (^1H -> ^{13}C) e B) HMBC (^1H -> ^{15}N).....	146
Figura 109: Espectro de infravermelho da substância 6.....	147
Figura 110: Percentual de inibição do crescimento celular da substância 6, frente a linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de $5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$	148
Figura 111: Estrutura da substância 7.....	149
Figura 112: Espectro de massas de alta resolução da substância 7.....	149
Figura 113: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 7.....	150
Figura 114: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da substância 7....	151
Figura 115: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 7.....	153
Figura 116: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 7.....	154
Figura 117: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (^1H -> ^{13}C).....	155
Figura 118: Comparação da formula estrutural do composto 7 com a terezina A.....	156
Figura 119: Estrutura das substâncias 8 e 9.....	157
Figura 120: Espectro de massas de alta da mistura (substâncias 8 e 9).....	157
Figura 121: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).....	158
Figura 122: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).....	159
Figura 123: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).....	161

Figura 124: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).....	162
Figura 125: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (^1H -> ^{13}C).....	163
Figura 126: Espectro de CLAE-autoEM/EM obtido do extrato de <i>R. similis</i>	164
Figura 127: Mapa da rede molecular obtida para os dados EM/EM do extrato de <i>R. similis</i>	165
Figura 128: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 197 e proposta de fragmentação.....	166
Figura 129: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 261 e proposta de fragmentação.....	167
Figura 130: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 211 e proposta de fragmentação.....	168
Figura 131: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 263 e proposta de fragmentação.....	169
Figura 132: a) perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de <i>R. similis</i> , b) ampliação do perfil cromatográfico (0,0 a 17 min); c) ampliação do perfil cromatográfico (17,5 a 40,0 min).....	171
Figura 133: Proposta de fragmentação do ácido acético (composto 1).....	172
Figura 134: Proposta de fragmentação do 3-metilbutanol (composto 2).....	172
Figura 135: Proposta de fragmentação do 2-metilbutanol (composto 3).....	173
Figura 136: Proposta de fragmentação do acetato de isobutila (composto 4).....	174
Figura 137: Proposta de fragmentação do ácido butanoico (composto 5).....	174
Figura 138: Proposta de fragmentação do butanoato de etila (composto 6)..	175
Figura 139: Proposta de fragmentação do ácido 3-metilbutanoico (composto 7).....	175
Figura 140: Proposta de fragmentação do acetato de 3-metilbutila (composto 8).....	176
Figura 141: Compostos de <i>R. similis</i> identificados neste trabalho.....	177

Figura 142: Co-cultivo dos fungos <i>F. oxysporum</i> e <i>R. similis</i> , com 15 dias de crescimento, em meio Czapeck DOX Agar, a 25 °C.....	178
Figura 143: Gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> das variáveis obtidas pela análise de CLAE-EM, do branco, co-cultivo e os respectivos cultivos simples.	179
Figura 144: a) Cromatogramas de íons totais (TICs), b) ampliação dos TICs. <i>F. oxysporum</i> , co-cultivo e <i>R. similis</i>	180
Figura 145: Mapa de íons 2D obtidos a partir do <i>fingerprint</i> de <i>F. oxysporum</i> e <i>R. similis</i>	181
Figura 146: Estrutura química dos compostos sugeridos pela base de dados Metlin e dicionário de produtos naturais (erro ≤ 10 ppm).....	182
Figura 147: Ensaio de co-cultivo permitindo o contato (esquerda) e proibindo o contato (direita).....	183
Figura 148: a) perfil cromatográfico dos constituintes voláteis do co-cultivo, permitindo o contato (preto) e proibindo o contato (rosa), b) ampliação do perfil cromatográfico dos constituintes voláteis do co-cultivo (0,0 a 16 min); c) ampliação do perfil cromatográfico dos constituintes voláteis do co-cultivo (16 a 40,0 min).....	184
Figura 149: Proposta de fragmentação do 2,4-dimetilhexano (composto 1)..	185
Figura 150: Proposta de fragmentação do acetato de butila (composto 2).....	186
Figura 151: Proposta de fragmentação do octanoato de etila (composto 3)...	186
Figura 152: Proposta de fragmentação do acetato de octila (composto 4).....	187
Figura 153: Proposta de fragmentação do decanoato de etila (composto 5).	187

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01: Obtenção dos extratos para análise inicial de bioatividade.....	47
Fluxograma 02: Representação dos experimentos de análises dos constituintes voláteis por CG-EM.....	54
Fluxograma 03: Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt em caldo de batata de <i>R. similis</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Condições utilizadas em cada experimento do planejamento fatorial completo.....	56
Tabela 02: Especificações dos meios de cultivo utilizados neste trabalho...	60
Tabela 03: Resultados obtidos dos testes de inibição de acetilcolinesterase e antimicrobiano.....	64
Tabela 04: Dosagem e análise da pureza das amostras de DNA.....	66
Tabela 05: Dosagem e análise da pureza dos produtos de PCR.....	66
Tabela 06: Identificação dos fungos isolados após sequenciamento de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA.....	67
Tabela 07: Compostos identificados por CLAE-QTOF para o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	79
Tabela 08: Proposta de identificação dos constituintes voláteis de <i>F. oxysporum</i>	81
Tabela 09: Esquematização do planejamento fatorial completo com os resultados, média e variância de cada experimento.....	99

Tabela 10: Valores médios dos picos observados em CLAE-DAD para os níveis superior e inferior, em conjunto com os efeitos estimados e o erro padrão.....	100
Tabela 11: Análise de variância para a o modelo gerado da equação 2.....	103
Tabela 12: Inibição do crescimento celular (%) do L-Extrato Rs e frações L-Rr01Rsa, L-Rr02Rsa, L-Rr03Rs, L-Rr04Rs e L-Rr05Rs em linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2).....	105
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 1.....	111
Tabela 14: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 2.....	117
Tabela 15: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 3.....	124
Tabela 16: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 4.....	130
Tabela 17: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 5.....	137
Tabela 18: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 6.....	147
Tabela 19: Inibição do crescimento celular (%) do composto 6 em linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2).....	148
Tabela 20: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 7.....	156
Tabela 21: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 8.....	163
Tabela 22: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C da substância 9.....	164
Tabela 23: Proposta de identificação dos constituintes voláteis de <i>R. similis</i> .	171
Tabela 24: Proposta de identificação dos constituintes voláteis do co-cultivo entre <i>F. oxysporum</i> e <i>R. similis</i>	185

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
AREM	Espectrometria de massas em alta resolução
BDA	Batata Dextrose Ágar
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
C18	Sílica gel de fase reversa tipo Octadecil Silano
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Espectrometria <i>tandem</i>
ESI-TOF	<i>Electrospray Ionisation – Time of Fly</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fase Móvel
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i>
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
t _r	Tempo de retenção

LISTA DE SÍMBOLOS

d	Dupleto
dd	Duplo-Dupleto
m/z	Razão Massa-Carga
q	Quarteto
s	Simpleto
sp	Septeto
t	Tripleto
δ_H	Deslocamento químico de Hidrogênio
δ_C	Deslocamento químico de carbono treze

SUMÁRIO

1. Introdução	29
1.1. Produtos naturais: uma visão geral.....	29
1.2. Rizosfera.....	31
1.3. Micro-organismo.....	32
1.4. Cultivo misto ou co-cultivo.....	35
1.5. Desrepliação.....	39
1.6. <i>Rhinochadiella similis</i>	40
1.7. <i>Fusarium oxysporum</i>	42
1.8. <i>Senna spectabilis</i>	43
2. Objetivos	45
2.1. Objetivos específicos.....	45
3. Materiais e Métodos	46
3.1. Pré-seleção dos micro-organismos de trabalho.....	46
3.2. Preparo dos extratos (Pré-seleção).....	46
3.3. Avaliação do perfil biológico dos extratos.....	47
3.3.1. Ensaio de atividade antifúngica.....	47
3.3.2. Avaliação da Atividade Anticolinesterásica.....	48
3.3.3. Avaliação da Atividade Antitumoral.....	48
3.4. Identificação dos micro-organismos pré-selecionados.....	49
3.4.1. Extração do DNA dos fungos pré-selecionados.....	50
3.4.2. Ampliação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	50
3.4.3. Sequenciamento dos produtos da PCR.....	51
3.5. Obtenção do perfil químico dos cultivos por CLAE-AREM (Desrepliação).....	52

3.5.1. Preparação dos extratos em meio sólido (placa de Petri), para análises de CLAE-AREM.....	52
3.6. Espectrometria de massas <i>tandem</i> (CLAE-EM/EM).....	53
3.7. Análises em cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM).....	53
3.7.1. Inoculação dos fungos e extração do <i>Headspace</i> por SPME (Micro extração em fase sólida).....	54
3.7.2. Tratamento e análise de dados.....	55
3.8. Planejamento experimental (<i>R. similis</i>).....	55
3.8.1. Inoculação do fungo <i>R. similis</i> e extração líquido-líquido.....	55
3.8.2. Desenho do experimento.....	56
3.8.3. Condições cromatográficas CLAE-DAD.....	57
3.9. Fracionamento do extrato em caldo de batata do fungo <i>R. similis</i> obtidos em escala ampliada.....	57
3.9.1. Purificação das frações Fr4Rs e Fr5Rs.....	58
3.10. Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H e ¹³ C.....	59
3.11. Outros equipamentos utilizados.....	59
3.12. Esterilização dos matérias.....	60
3.13. Manipulação dos micro-organismos.....	60
3.14. Especificações dos meios de cultivos utilizados neste trabalho.....	60
4. Resultados e Discussões.....	61
4.1. Pré-seleção dos micro-organismos isolados da rizosfera de <i>Senna spectabilis</i>	61
4.2. Obtenção dos extratos.....	62
4.3. Avaliação do perfil biológico dos extratos.....	63
4.3.1. Ensaio de atividade Anticolinesterásica e antimicrobiano.....	63
4.3.2. Avaliação da atividade antitumoral.....	65
4.4. Identificação filogenética e ampliação do gene 18S rRNA na região ITS..	66
4.5. Sequenciamento dos produtos da PCR.....	67
4.6. Conhecendo a química desses micro-organismos.....	68

4.6.1. <i>Fusarium oxysporum</i>	68
4.6.1.1. Identificação dos constituintes voláteis por índice de retenção e espectrometria de massas (CG-EM).....	79
4.6.2. <i>Rhinocladiella similis</i>	98
4.6.2.1. Determinação estrutural da substância 1.....	106
4.6.2.2. Determinação estrutural da substância 2.....	112
4.6.2.3. Determinação estrutural da substância 3.....	118
4.6.2.4. Determinação estrutural da substância 4.....	125
4.6.2.5. Determinação estrutural da substância 5.....	131
4.6.2.6. Determinação estrutural da substância 6.....	137
4.6.2.7. Determinação estrutural da substância 7.....	149
4.6.2.8. Determinação estrutural da substância 8 e 9.....	157
4.6.2.9. Identificação dos constituintes voláteis por índice de retenção e espectrometria de massas (CG-EM), de <i>R. similis</i>	170
4.7. Ensaio de co-cultivo em meio sólido.....	178
4.7.1. <i>Fusarium oxysporum</i> VS <i>Rhinocladiella similis</i>	178
5. Conclusão	188
Referências	190

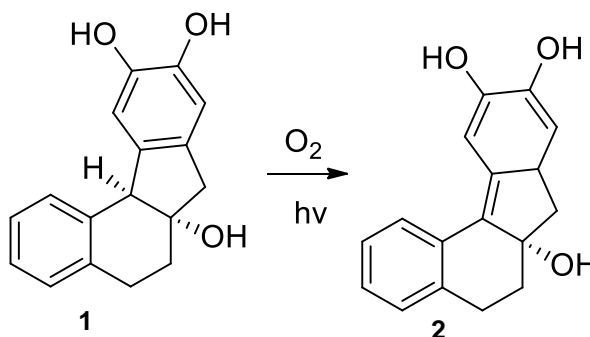
INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Produtos naturais: uma visão geral

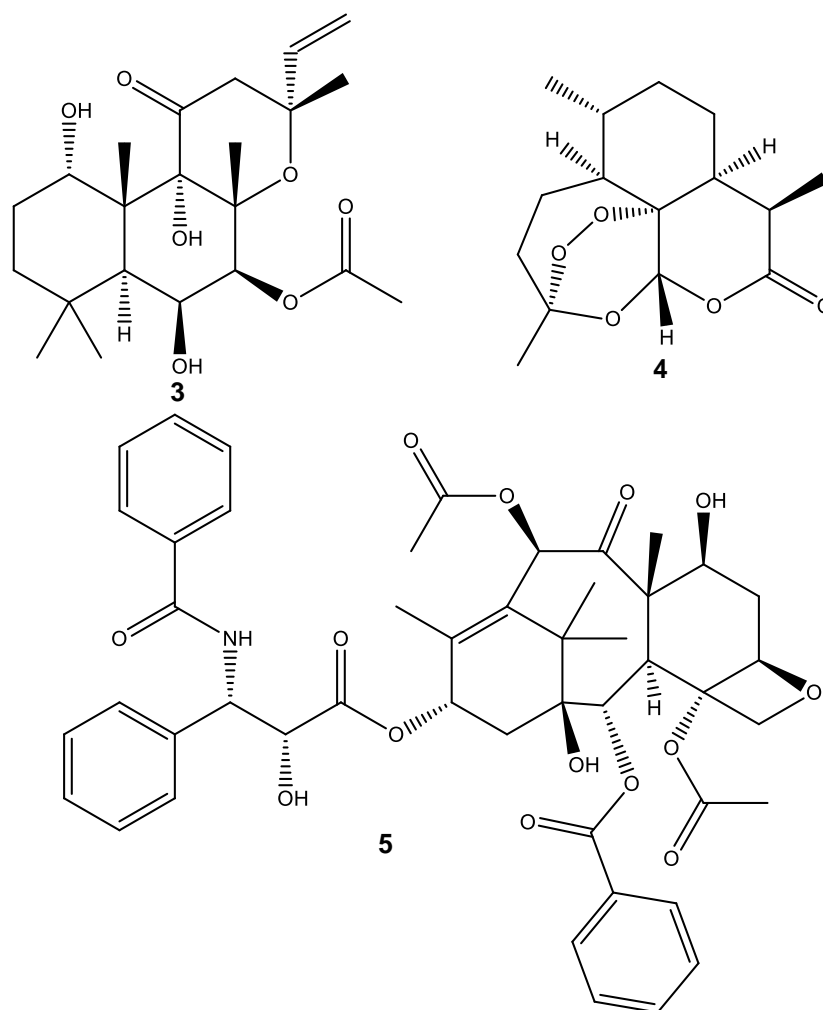
Os produtos naturais como fonte de agentes terapêuticos fazem parte da história da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. No Brasil, inicia-se com a extração de um corante de cor vermelha da árvore do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*). O produto natural incolor brasilina (1), substância da classe dos catecóis, facilmente oxidada em brasileína (2) que apresenta coloração avermelhada, devido a extensão da conjugação do sistema dienólico. Este corante era utilizado no tingimento de roupas e como tinta de escrever, sendo o principal produto de exportação da colônia durante dois séculos (PINTO, 1995). Mais tarde, quando Portugal passou a perder o domínio do comércio da Índia para os ingleses e holandeses, iniciou-se a corrida visando outros produtos naturais, como por exemplo as especiarias do sertão (baunilha, canela, cravo, anil, urucum e etc.) (CARNEIRO, 1956).

Figura 01: Estrutura química da brasilina (1) e brasileína (2), corante extraído do pau-brasil.



Nos tempos modernos, inúmeros são os exemplos de produtos naturais de sucesso, como por exemplo o taxol (5), diterpeno anticancerígeno isolado de plantas do gênero *Taxus* (ZWAWIAK e ZAPRUTKO, 2014), a artemisinina (4) presente em *Artemisia annua* que exerce potente atividade antimalárica (MESA, 2017), a forskolina (3), obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra glaucoma, hipertensão, asma e certo tumores (SOUZA, 1993).

Figura 02: Estrutura química da: forskolina (3), artemisinina (4) e taxol (5).



Atualmente avançadas tecnologias têm sido desenvolvidas para a exploração de fontes exóticas com o objetivo de encontrar novos agentes quimioterapêuticos (MOLINSKI, 2010). Entretanto, a descoberta de novos fármacos tem caído consideravelmente nos últimos anos, talvez devido ao conhecimento dos principais quimiotipos produzidos por plantas e o uso de abordagens reducionistas que estimulam a pesquisa por mecanismos químicos e farmacológicos em nível molecular (VERPOORTE et al., 2005).

Para superar esse problema, a química de produtos naturais tem buscado alternativas por fontes naturais ainda pouco exploradas (exemplo: rizosfera e suas interações microbianas, organismos marinhos, etc.) aliado a novas metodologias. No âmbito da biologia, métodos que estimulam o acesso a genes, que não são expressos em condições de laboratório, como por exemplo, a OSMAC (*One Strain Many Compounds*), modificações epigenéticas, engenharia metabólica, co-cultivo, entre outras, estão sendo aplicadas com sucesso. No âmbito da química, a quimiometria, que permite a análise dos complexos processos multifatoriais e sua interpretação, e a desreplicação que simplifica o processo analítico através da detecção *in silico* de moléculas previamente conhecidas, também vem auxiliando de maneira efetiva na procura por compostos de interesse. (ULRICH-MERZENICH et al., 2007; NICHOLSON; LINDON, 2008; BERTRAND et al., 2014).

1.2. Rizosfera

A rizosfera é um termo que foi introduzido por Hiltner em 1904 e define-se como a parte do solo diretamente influenciado pela raiz. Esta área possui forte atividade biológica e química devido aos exudatos liberados pela raiz e pela intensa atividade microbiana (LINES-KELLY et al., 2005; YATEEM et al., 2007). Alguns fatores podem influenciar essa área do solo, como por exemplo: densidade da raiz, intensidade da luz, profundidade, textura e umidade do solo e esses fatos selecionam os micro-organismos que irão colonizar essa área (BAIS, et al., 2004).

Os exsudatos contêm açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos, enzimas, etc. Estimulam as interações físicas e biológicas entre as raízes e os organismos do solo, contribuindo para o crescimento e sobrevivência da planta, além de fornecer alimento para os micro-organismos que há habitam, o que torna a atividade microbiana neste ambiente muito maior do que qualquer outra parte do solo. A forma como esses processos são feitos é mal compreendida. O que se sabe é que os exsudatos radicais desempenham um papel ativo e crucial na regulação das interações simbióticas com os micróbios (PHELAN et al., 2012). Em outras palavras, essa variedade de metabólitos sugere que as raízes podem regular a

composição do solo e mudar sua microbiota em benefício próprio, especialmente no caso de se proteger (FARRAR et al., 1988).

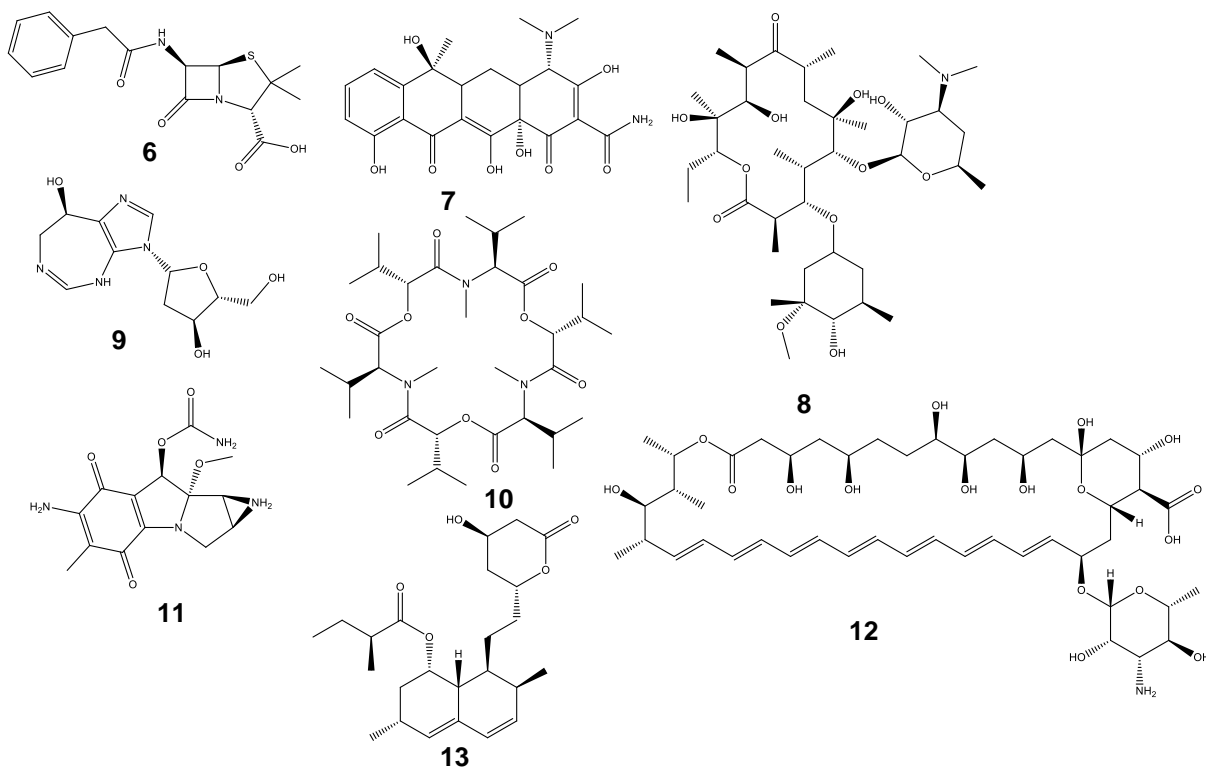
Dentre os organismos encontrados na rizosfera se destacam: bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas, nematoides, vermes enquiteídeos, minhocas, centopeias, lacraias, insetos, ácaros, caracóis, pequenos animais e vírus do solo que competem constantemente por água, nutriente e espaço.

Para que esses micro-organismos possam se estabelecer nesse ambiente tão dinâmico e competitivo, a destreza de multiplicação, diversidade metabólica e a capacidade de produzir compostos antagônicos podem favorecer esses organismos na colonização radicular (ROMEIRO e GARCIA, 2003). No entanto, o destino completo dos exsudatos na rizosfera e a complexa natureza de suas interações no solo permanecem pouco compreendidas e exploradas (LINES-KELLY, 2005; FAURE et al., 2009).

1.3. Micro-organismos

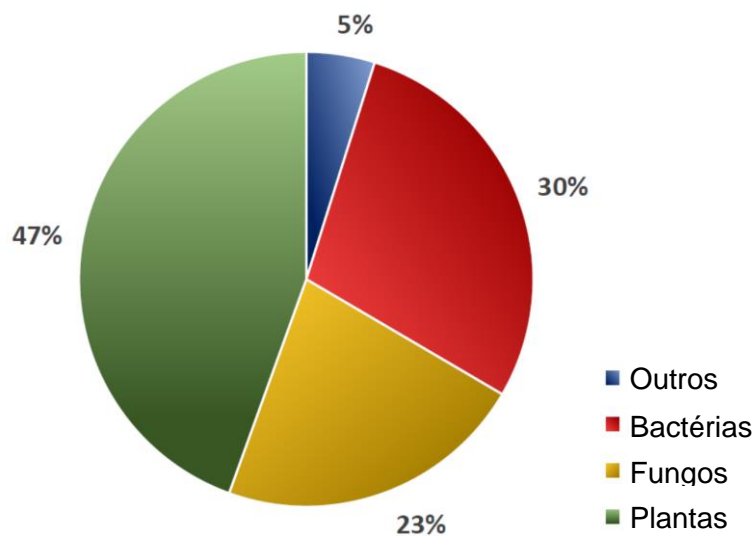
A busca por compostos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. Iniciou-se com a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, fato que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas, levando pesquisadores a procurar intensivamente produtos bioativos derivados desses pequenos organismos, resultando em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas, como por exemplo os antimicrobianos: penicilinas (**6**), tetraciclina (**7**), eritromicina A (**8**), fusafungina (**10**), anfotericina B (**12**), os utilizados na terapia anticâncer, pentostatina (**9**), mitomicina C (**12**), os agentes de redução de colesterol da classe das estatinas, por exemplo a lovastatina (**13**) (GALLO et al., 2008).

Figura 03: Exemplos de compostos bioativos de origem microbiana.



Apesar das importantes substâncias biologicamente ativas descritas pela literatura, os fungos e bactérias constituem um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (STROBEL et al., 1996). Visando melhorar esse panorama, em 2016, Patridge e colaboradores, fizeram uma extensa revisão sobre a origem dos princípios ativos de fármacos comercializados e aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) até 2013, e concluíram que atualmente os micro-organismos igualaram o potencial das plantas na produção de metabólitos com algum interesse farmacológico (Figura 04).

Figura 04: Fonte de compostos até 2013 aprovados pelo FDA.



Fonte: PATRIDGE et al., 2016.

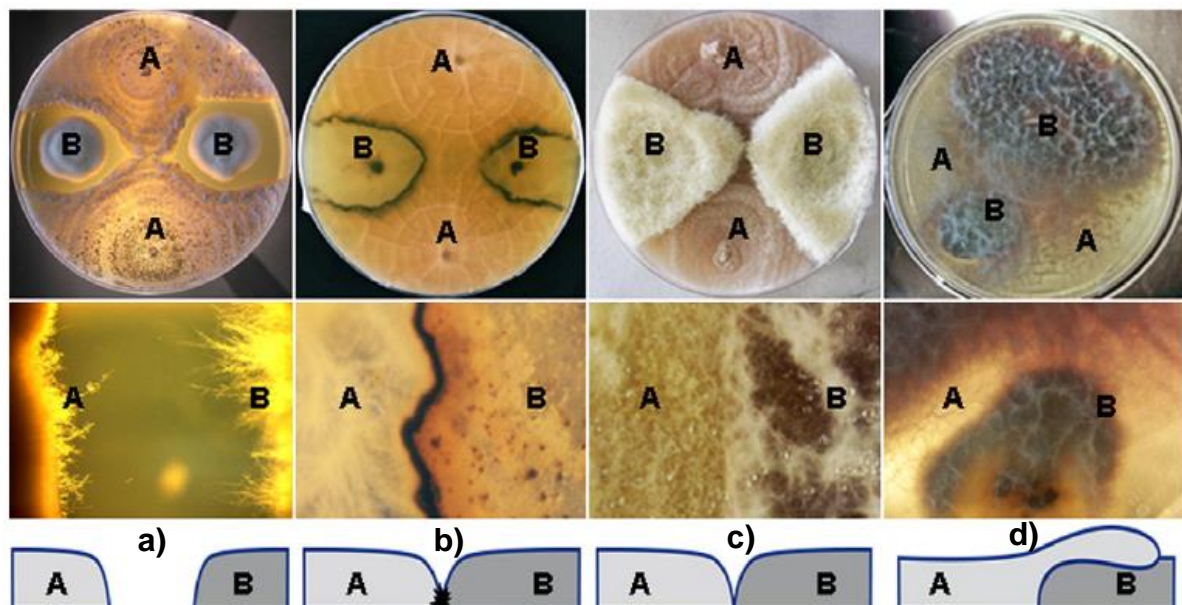
Mesmo sabendo do potencial dos micro-organismos na produção de compostos quimioterapêuticos e, das importantes substâncias biologicamente ativas já relatadas pela literatura proveniente desses organismos, apenas um subconjunto de vias biossintéticas são expressadas em condições normais de cultivo em laboratório, ou seja, tais organismos têm um potencial ainda maior em produzir compostos bioativos. Neste sentido, a utilização de novas metodologias alternativas que visem estimular vias silenciadas estão sendo aplicadas, como por exemplo, a OSMAC (*One Strain MAny Compounds*), epigenética, engenharia metabólica, metagenômica e co-cultivo (GROSS, 2009).

1.4. Cultivo misto ou co-cultivo

Na natureza micro-organismos são frequentemente encontrados em comunidades, onde eles produzem metabólitos secundários relacionados à um tipo de interação, visando principalmente se defender ou competir por nutrientes (BERTRAND et al., 2014). Tais associações podem ser reproduzidas artificialmente em laboratório, cultivando dois ou mais micro-organismo juntos em um mesmo ambiente, essa metodologia é chamada de co-cultivo quando meio sólido é usado (placa de Petri) ou cultivo misto quando meio líquido é envolvido (ROY et al., 2013). Assim grupos de genes potencialmente interessantes podem permanecer ativos, podendo resultar na produção de novos compostos (PARK et al., 2009; CUETO et al., 2001, BERTRAND, 2013), e/ou no aumento da produção de compostos já conhecidos (OH et al., 2007 e SLATTERY et., 2001).

Conforme discutido acima, a metodologia de co-cultivo e/ou cultivo misto de micro-organismos levam à vários padrões de interação morfológica e modificações que podem ocorrer em diferentes níveis. Segundo Bertrand et al. 2013, existem quatro tipos predominantes de interações em co-cultivo e são chamadas de inibição à distância, linha de confronto, inibição pelo contato e crescimento excessivo, como mostra a Figura 05.

Figura 05: Interações morfológicas observadas entre dois fungos em uma placa de Petri. a) inibição à distância, b) linhas de confronto, c) inibição pelo contato e d) crescimento excessivo, de acordo com BERTRAND et al. 2014.



Fonte: BERTRAND et al, 2014

Para destacar mudanças significativas na composição do metaboloma microbiano em culturas sólidas ou em fermentação mista, várias estratégias analíticas, incluindo, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massas (EM), espectrometria de massas tandem (EM/EM, UV), espectrometria de massas por imagem ou ressonância magnética nuclear (RMN) devem ser aplicadas (NGUYEN et al., 2012). No entanto, os métodos EM (espectrometria de massas) são muito mais poderosos devido à sua sensibilidade e poder de resolução, especialmente em alta resolução (HRMS) e podem fornecer informações estruturais fundamentais para a identificação dos metabólitos induzidos em co-cultivo (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013). Além disso, análises diretamente na placa de Petri (com pouco ou nenhum preparo de amostras) podem ser aplicadas, incluindo a ionização por eletrospray de dessorção (nano-DESI-MS) ionização de dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) (TRAXLER et al., 2013). São alguns métodos de dessorção que permitem a ionização de metabólitos diretamente e fornecem espectros que refletem à composição de cepas de fungos ou bactérias em meio sólido.

Uma vez que as cepas microbianas foram analisadas quimicamente usando qualquer um dos métodos analíticos listados acima, a comparação dos perfis cromatográficos pode ser suficiente para atingir esse objetivo, mas para uma melhor visão de todas as mudanças metabólicas que ocorrem no co-cultivo, os dados de impressão digital, especialmente aqueles obtidos através de EM, podem ser analisado e avaliados fazendo uso de ferramentas quimiométricas, e devem ser obtidas em várias réplicas biológicas (WOLFENDER et al., 2013; BERTRAND et al., 2014).

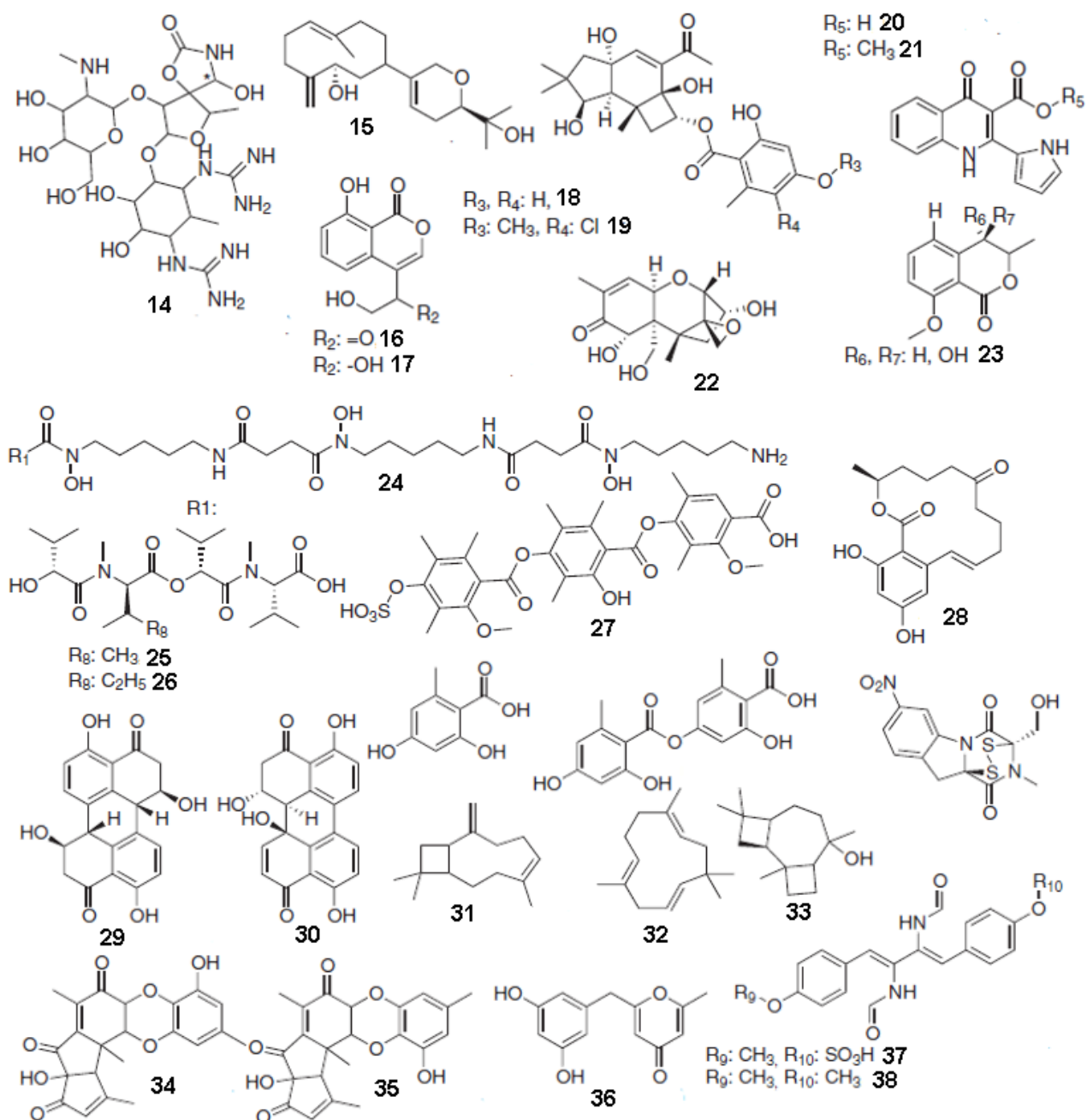
Nessas análises vários métodos estatísticos podem ser empregados, incluindo análise de componentes principais (PCA), análise de variância (ANOVA) e regressão de mínimos quadrados com análise discriminante (PLS-DA) (BERTRAND et al., 2013). PCA e PLS-DA exibem as relações entre as distribuições das amostras, que pode revelar agrupamentos, tendências ou *outliers*, nessas análises três clusters bem diferenciados devem ser observados, confirmando as diferenças na composição dos metabólitos entre os cultivos simples e o co-cultivo (BOCCARD et al, 2010).

Encontrado os metabólitos responsáveis pela diferenciação na co-cultura, o próximo passo é identificar a estrutura desses metabólitos, e isso pode ser conseguido através da desreplicação, que requer comparação com bancos de dados, e em muitos casos a informação para a maioria dos metabólitos microbianos não é acessível ou como novos compostos são esperados, pode ser necessário o isolamento e identificação por RMN, o que pode ser um desafio, apesar da alta sensibilidade dos mais recentes instrumentos de RMN, as diferenças intrínsecas de sensibilidade entre EM e RMN pode levar à identificação malsucedida de alguns metabólitos (BERTRAND et al., 2014). No entanto, o sucesso da desreplicação é altamente dependente do conhecimento dos metabólitos secundários realizadas anteriormente nos micro-organismos estudados (cultivo simples) (BOHNI et al., 2013b).

Quando CG-EM é empregado para perfis químicos, a identificação é baseada na comparação dos espectros EI-EM com compostos de referência listados em banco de dados, com base em espectro de EM e índices de retenção (ZUO et al., 2013).

Com isso diversos compostos exclusivos de co-cultivo foram identificados e listados pela literatura, estão descritos na Figura 06.

Figura 06: Compostos induzidos em co-cultura de micro-organismos.



Fonte: Adaptado de BERTRAND et al, 2014

Os compostos induzidos em co-cultivo descritos pela literatura cobrem quase que todas as classes de metabólitos microbianos, o que demonstra que esse método pode acessar diferentes vias biossintéticas, como por exemplo as vias dos policetídeos, dos terpenóides, dos alcalóides entre outras.

Como esses metabólitos são a resposta a algum tipo de interação, é muito comum que apresentem algum tipo de bioatividade, principalmente atividade antimicrobiana, devido que esse tipo de atividade deve surgir de interações micróbio-

micróbio como mecanismo de defesa direta, sendo então mais comum de encontrar nesses experimentos (BERTRAND et al., 2014). No geral, ainda não foi demonstrada nenhuma tendência clara quanto a classes de compostos particulares são mais propensas a serem induzidas através de co-cultura microbiana.

Neste contexto, os vários artigos recentes descritos na literatura mostraram que os micro-organismos podem ativar eficientemente a produção de novos compostos ou aumentar a produção de uma ampla gama de agentes químicos, com o objetivo de competir com outros micro-organismos por nutrientes e/ou espaço quando cultivados em condições artificiais. Isso requer abordagens analíticas sofisticadas e sensíveis, principalmente com base em espectrometria de massas de alta resolução. Essas investigações são a chave para entender os eventos químicos que regem as interações entre micro-organismos. Considerando o aumento exponencial da quantidade de artigos sobre este tópico publicados nos últimos anos, é seguro concluir que o uso desta abordagem se expandirá rapidamente e produzirá importantes descobertas (BERTRAND et al., 2014).

1.5. Desreplicação

A busca por novas fontes de produtos naturais (rizosfera e organismos marinhos) e novas metodologias empregadas (co-cultura, OSMAC, entre outras), tem sido responsável pelo aumento do uso de ferramentas analíticas de vanguarda que possibilitem uma análise rápida e eficiente das matrizes complexas nos programas de bioprospecção atuais (NG et al., 2009).

A desreplicação é uma abordagem analítica composta por um conjunto de metodologias rápidas de detecção de substâncias presentes em uma matriz bruta, com o objetivo de evitar o re-isolamento de compostos já relatados na literatura. Quando comparado com a abordagem clássica de purificação, isolamento e elucidação estrutural, a desreplicação apresenta diversas vantagens devido à sua versatilidade, rapidez e necessidade de menor quantidade de amostra, provendo uma rápida análise inicial das substâncias conhecidas no extrato estudado evitando o re-isolamento de compostos já conhecidos (WOLFENDER, 2009; NG et al., 2009).

Esta técnica inclui o acoplamento de técnicas de separação e detecção como CLAE-RMN, CG-EM e CLAE-EM, bem como bioensaios e análises que permitam a comparação dos conjuntos de dados obtidos, através do uso de bibliotecas virtuais

detentoras de dados quimiotaxonômicos, farmacológicos e físico-químicos (CORDELL et al., 1997; LANG et al., 2008). A espectrometria de massas (EM) é a técnica mais utilizada para a detecção da composição metabólica de determinado extrato, respaldado por bases de dados de metabólitos como METLIN, MassBank, dicionário de produtos naturais, entre outros.

Essas bibliotecas não estão disponíveis gratuitamente e não processam dados de espectrometria de massas. Reconhecendo a necessidade de uma plataforma que possibilite o compartilhamento e a análise de dados de EM, foi criado o GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), onde os dados de EM/EM são analisados, combinados e comparados a bancos de dados espectrais disponíveis nessa plataforma (GNPS), os resultados são dados na forma de uma rede molecular (*molécula networking*).

Molecular networking é uma abordagem espectral de correlação e visualização que permite detectar conjuntos de espectros de moléculas relacionadas, representando cada espectro como um nó, e comparação de espectro-para-espectro como hastes entre nós (conexões). Possibilitando a identificação de compostos já conhecidos e seus análogos (por exemplo, diferindo por uma modificação ou substituição de um grupo químico)

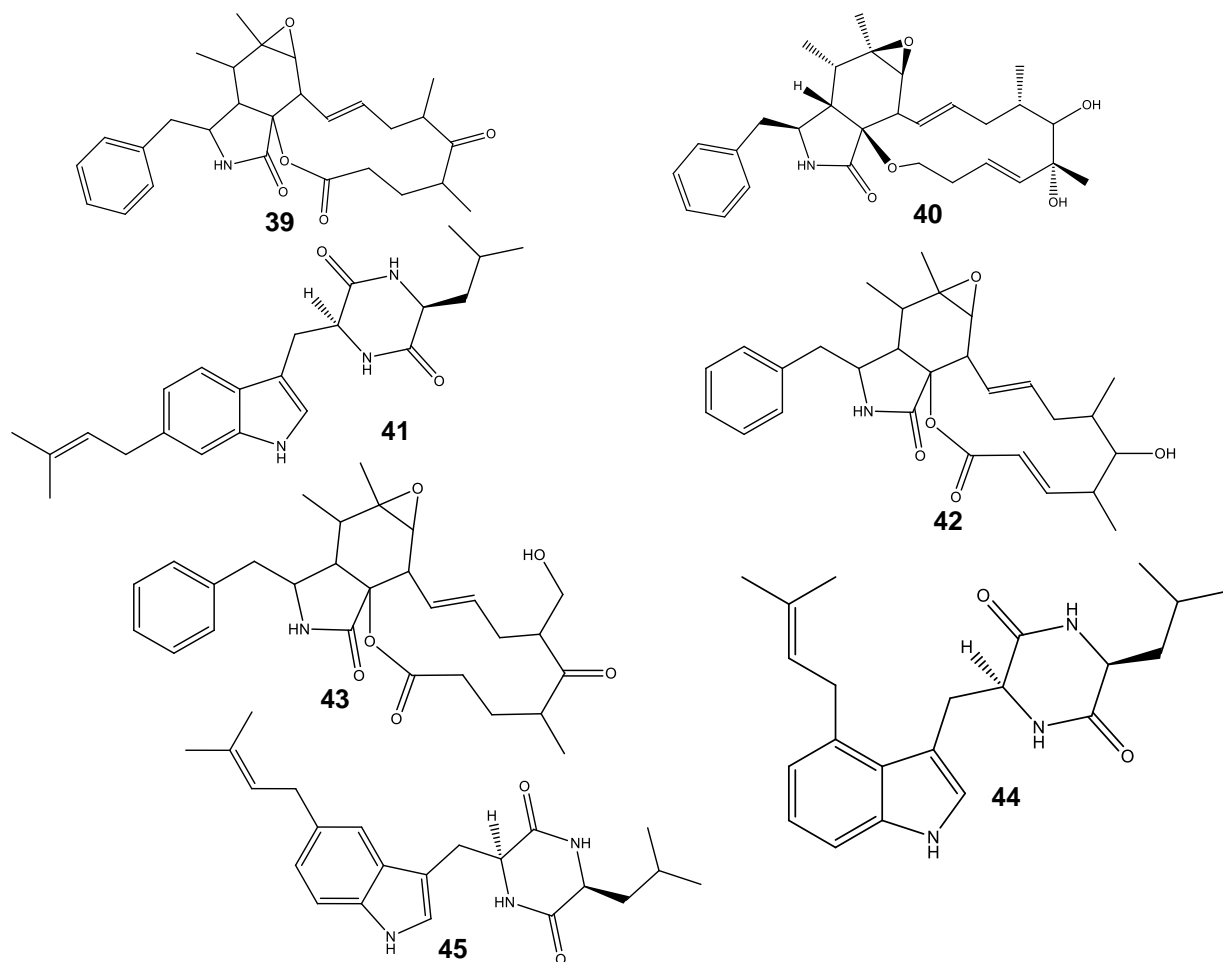
1.6. *Rhinocladiella similis*



Os fungos *Rhinocladiella spp.* pertencem à ordem Chaetothyriales (Ascomycota) e família *Herpotrichiellaceae*, essa família apresenta cinco principais espécies, *R. aquaspersa*, *R. atrovirens*, *R. basitona*, *R. mackenziei* (anteriormente *Ramichloridium mackenziei*) e *R. similis*.

Recente revisão bibliográfica demonstrou que micro-organismos desse gênero produzem citocalasinas e dicetopiperazinas (Figura 07), classe de compostos que exibem um largo espectro de atividade, incluindo antibiótica, antitumoral e fitotóxica (WAGENNAR et al., 2000; ZHANG et al., 2014).

Figura 07: Metabólitos secundários relatados pela literatura de *Rhinocladiella* spp.



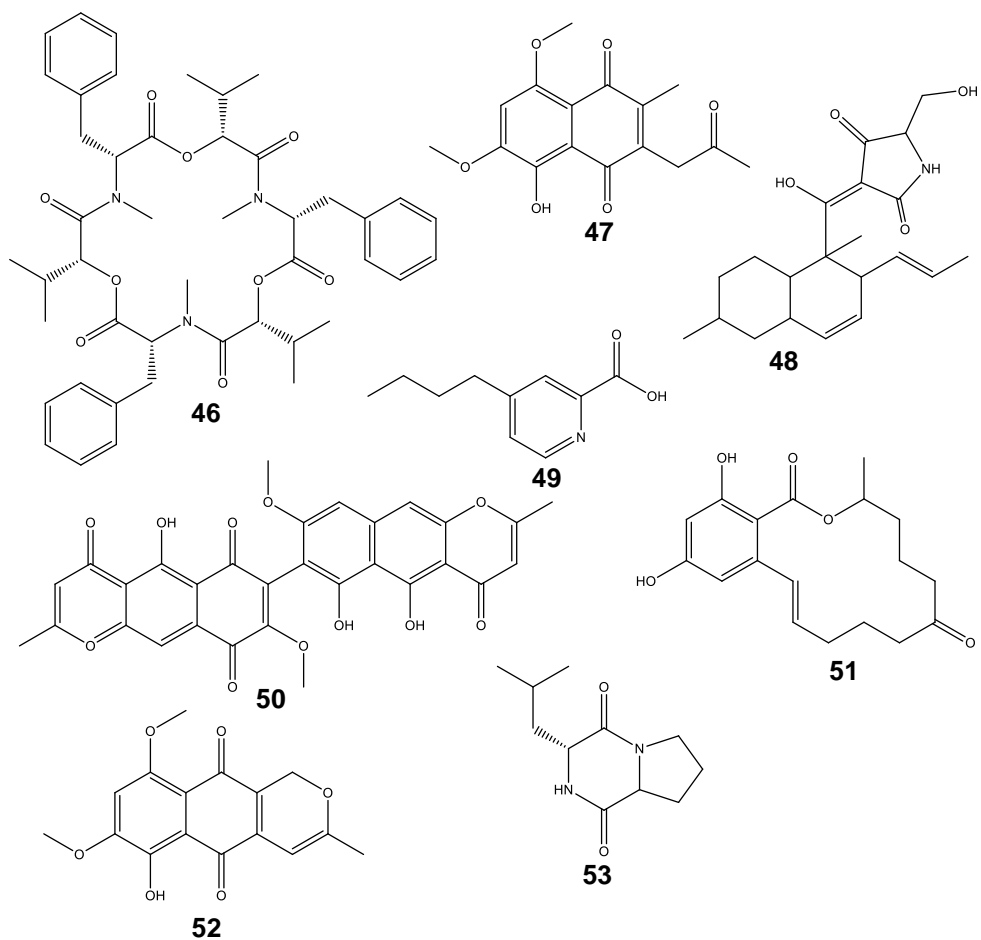
Para o fungo *Rhinocladiella similis* nenhum metabólito secundário foi relatado pela literatura, fato que instigou a busca e identificação de metabólitos desse micro-organismo neste trabalho.

1.7. *Fusarium oxysporum*



Fusarium é um gênero de fungos filamentosos da classe Sordariomycetes, e pertencem a família *Nectriaceae*, geralmente produzem manchas brancas rente ao substrato. A maioria das espécies são saprófitos amplamente distribuídos no solo, e associadas a plantas, podendo infectar plantas, animais e humanos, causando as doenças conhecidas como fusariose, queratite e onicomicose (CARVALHO et al., 2014). São bastante conhecidos pela produção de micotoxinas como fumosinas e tricotecenos. Uma das espécies mais importante e estudada é o *Fusarium oxysporum*, patógeno em importantes culturas como: café, feijão, milho e amendoim, tomate entre outras, causando prejuízos de bilhões de dólares por ano aos agricultores (WANG L. et al., 2015). Esse fungo infecta as plantas através das raízes, causando podridão nas raízes e muitas vezes progride pelo caule, uma vez que o patógeno penetra no sistema vascular, a capacidade da planta para absorver nutrientes é comprometida e a planta eventualmente morre (ICHIKAWA et al., 2003). Apesar da sua patogenicidade essa espécie produz diversos metabólitos de interesse farmacêutico (MAHAPATRA et al., 2012), como mostra a Figura 08.

Figura 08: Alguns metabólitos encontrados em *Fusarium oxysporum*.

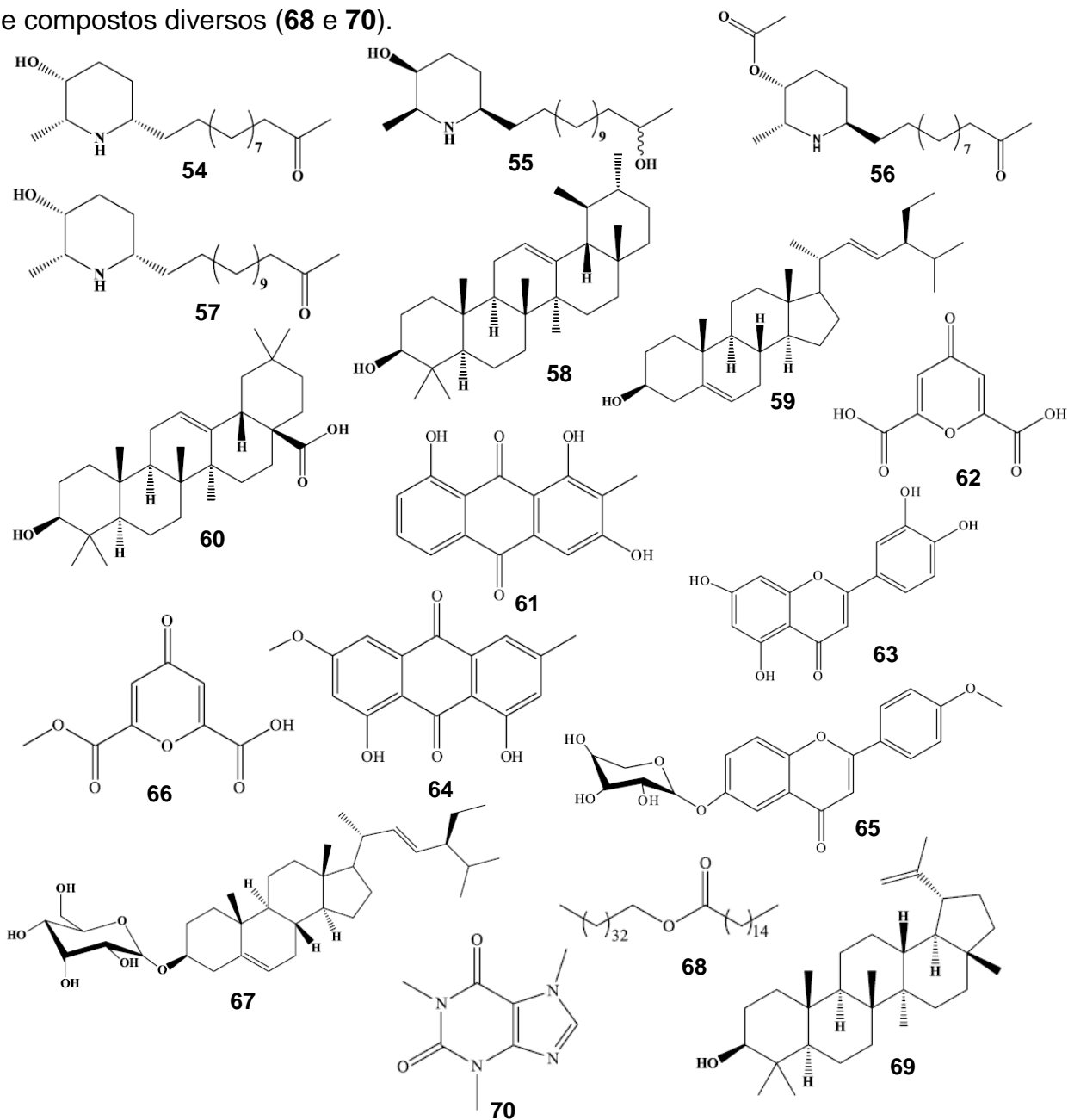


1.8. *Senna spectabilis*

O gênero *Senna* compreende mais de 600 espécies distribuídas amplamente pelo mundo, englobando arbustos, ervas e árvores, podendo alcançar de 4 a 9 metros de altura (JOTHY et al., 2012). A *Senna spectabilis* é uma das mais importantes espécies, nativa da América do Sul, América Central, Ásia e África, é encontrada em diversos biomas brasileiros, incluindo cerrado e floresta tropical, conhecida popularmente como Cássia do nordeste, canafístula-de-besouro, pau-de-ovelha entre outros, apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antiulcerogênica relatada (VIEGAS JÚNIOR et al., 2013).

Estudos fitoquímicos revelaram que mais de 350 moléculas foram isoladas de *Senna*, sendo mais de 40 metabólitos secundários exclusivos de *S. spectabilis*, exibindo diversas atividades biológicas, nos quais alcaloides piperidínicos e triterpenos pentacíclicos são os mais comuns (VIEGAS JÚNIOR et al., 2004 e VIEGAS JÚNIOR et al., 2006).

Figura 09: Estrutura química das principais classes de compostos isolados de *S. spectabilis*, alcaloide piperidínicos (**54-57**), triterpenos pentacíclicos (**58, 60 e 69**), esteroides (**59 e 67**), pironas (**62 e 66**), antraquinonas (**61 e 64**), flavonoides (**63 e 65**) e compostos diversos (**68 e 70**).



Juntamente com pesquisas fitoquímicas e biológicas, estudos recentes também foram realizados entre essa espécie de planta e micro-organismos que coabitam, permitindo a elucidação de importantes metabólitos secundários, como citocalasinas, dibenzopironas, sesquiterpenos, hexadepsipeptídeos e análogos do ácido picolínico (CHAPLA et al., 2014; ZANARDI et al., 2012 e SELEGATO et al., 2016).

OBJETIVOS

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é identificar e, determinar estruturalmente, os compostos bioativos produzidos a partir das culturas simples e mista dos micro-organismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*.

2.1. Objetivos específicos

- Selecionar micro-organismos de trabalho de acordo com sua viabilidade e atividade biológica (antimicrobiana, inibidor de acetilcolinesterase e antitumoral) dos extratos;
- Cultivar os micro-organismos selecionados da rizosfera de *Senna spectabilis* em cultura simples e em cultivo misto (co-cultivo) em meio sólido (placa de Petri);
- Analisar os tipos de interações que ocorrem em co-cultivo em meio sólido;
- Analisar e comparar os perfis químicos dos extratos do co-cultivo e cultivo simples por CLAE-EM utilizando ferramentas quimiométricas.
- Aplicar técnicas de desreplicação e isolamento de metabólitos dos micro-organismos selecionados em cultivo simples e em cultivo misto.
- Análisar e identificar dos componentes voláteis do cultivo simples e do cultivo misto.
- Cultivar em escala ampliada, visando quantidades suficientes de extratos para elucidação estrutural das substâncias de interesse;
- Fornecer subsídios para melhor compreensão da relação ecológica entre os micro-organismos e a rizosfera de *Senna spectabilis*.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

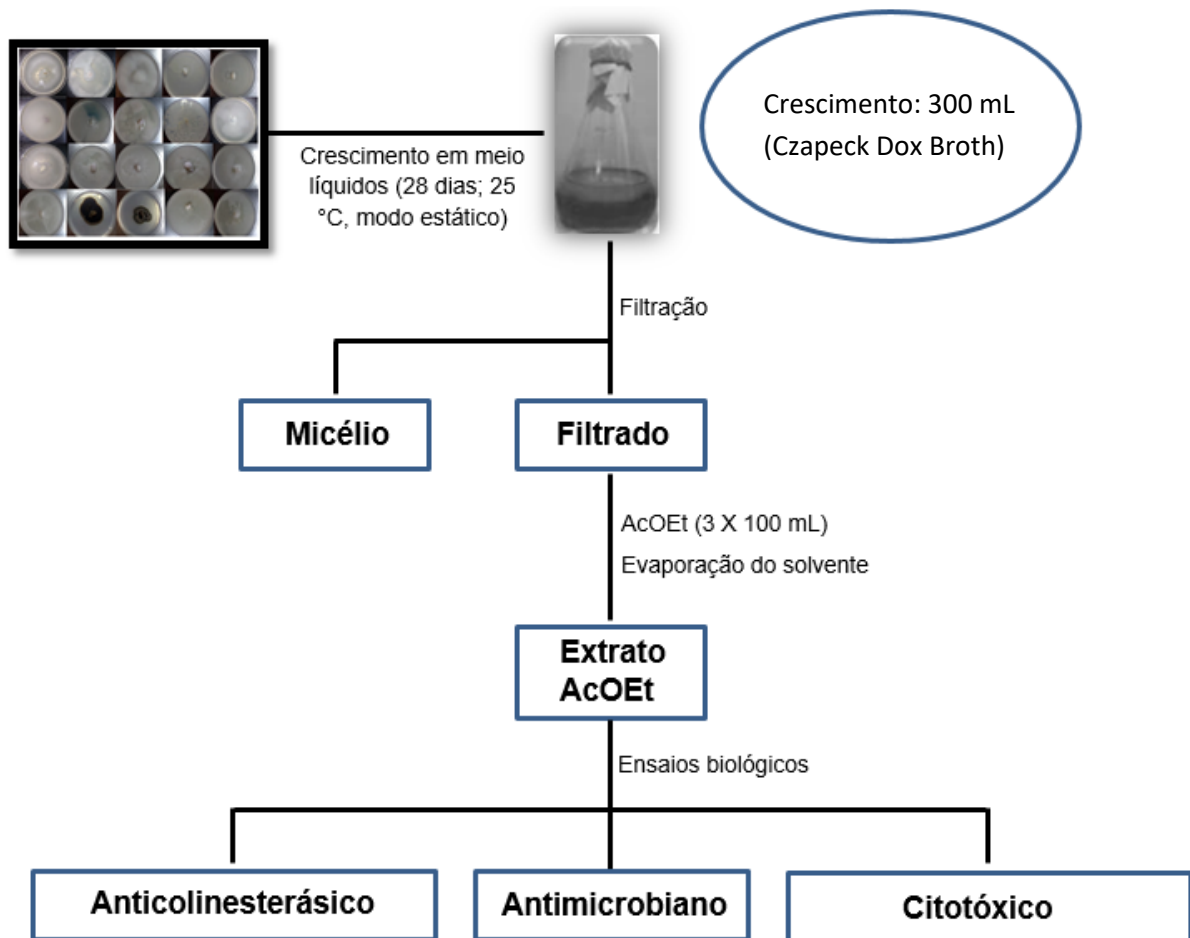
3.1. Pré-seleção dos micro-organismos de trabalho

Para a seleção dos micro-organismos de trabalho, inoculou-se todos os fungos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis* presentes na micoteca do Departamento de Química Orgânica IQ-CAR, em meio Czapeck Dox Agar (tempo de incubação 10 dias, ambiente climatizado a 25 °C) e observou-se o crescimento e a viabilidade dos fungos, posteriormente, inocularam-se os micro-organismos viáveis em meio Czapeck Dox Broth (modo estático, ambiente climatizado a 25 °C e tempo de incubação de 28 dias).

3.2. Preparo dos extratos (Pré-seleção de micro-organismo)

Após o processo de incubação (28 dias), realizou-se a extração líquido-líquido utilizando três porções de 100 mL de acetato de etila, a fase orgânica foi recolhida para posterior análises. A concentração do extrato foi realizada sob pressão reduzida fornecendo as matrizes da porção de acetato. Nesta fase, todos os extratos obtidos foram submetidos a triagens biológicas, visando selecionar os possíveis micro-organismos de trabalho, como mostra o Fluxograma 01.

Fluxograma 01: Obtenção dos extratos para análise inicial de bioatividade.



3.3. Avaliação do perfil biológico dos extratos

3.3.1. Ensaio de atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos, amostras dos extratos em acetato (400 mg) foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatoplaças de sílica gel F254 (Merck), desenvolvidas com o sistema de eluentes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (95:5) e $\text{AcOEt}:\text{Hex}$ (90:10), e após completa evaporação dos solventes, as placas foram borrifadas com suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries (CCIBt 140) ou *C. sphaerospermum* Penzig (CCIBt 491) em meio líquido de sais minerais e glicose (6:1) e incubadas em câmara úmida a 25° C, no escuro, por 48 horas, segundo método de (HOMANS e FUCHS, 1970). Após o período de incubação, zonas claras de inibição do crescimento dos fungos se formaram em contraste com um fundo de coloração

escura, nas amostras que apresentaram atividade, e o fator de retenção (Rf) dos constituintes ativos foi determinado. Nistatina (5 µg) foi utilizada como controle positivo.

3.3.2. Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

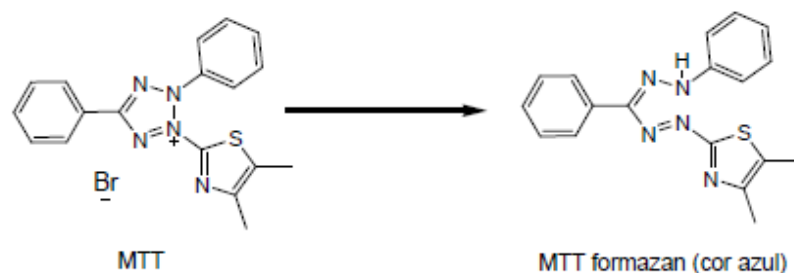
Amostras do extrato em acetato (200 µg), foram analisadas em CCD de sílica gel 60 F254 (Merck). Como controle positivo foi utilizado fisostigmina (0,05 µg). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com uma solução de enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%). Logo após, inoculou-se a placa cromatográfica em uma câmara úmida fechada a 37° C por 20 minutos, e em seguida, borrifou-se uma mistura da solução etanólica de acetato de 1-naftila (5 mL; 0,25%) e aquosa do sal *Fast Blue B* (20 mL; 0,25%) (MARSTON et al. 2002). O aparecimento de mancha branca, sobre o fundo de coloração roxa indica inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

As cromatoplasmas obtidas foram observadas em comprimento de onda 254 nm e 366 nm em equipamento CAMAG ReproStar 3, e fotografados em câmera fotográfica Epson PhotoPC 3000Z. As atividades observadas nesse ensaio são consideradas forte (***), moderada (**) e fraca (*).

3.3.3. Avaliação da Atividade Antitumoral

O estudo citotóxico foi realizado em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (LOE-UFC), sob supervisão do Prof. Dr. Diego Wilke, e seguiu o método de análise colorimétrica baseada na conversão do sal (MTT) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (Figura 10) (MOSMAN et al., 1983).

Figura 10: Reação de redução do Reagente MTT em Azul de Formazan.



Fonte: BERRIDGE et al., 1996.

Plaquearam-se as células na concentração de $0,1 \times 10^6$ cel/mL para a linhagem MDA/MB-435 (células de câncer de mama humano) e SF-295 (células de câncer de cólon humano) e $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HCT-8 (células de câncer no sistema nervoso humano), em seguida, incubou-se as placas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C. Ao término deste, centrifugou-se as placas, e removeu-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e incubou-se as placas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. As amostras foram diluídas em DMSO puro e estéril e testadas em concentração de 50 µg/mL.

3.4. Identificação dos micro-organismos pré-selecionados

A extração do DNA e a identificação pela região ITS dos fungos da rizosfera foram feitos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, CAr, pelo Pós-doutorado Haroldo César de Oliveira e pela doutoranda Patrícia Akemi Assato, sob supervisão das Professoras Doutoras Maria José Soares Mendes Giannini e Ana Marisa Fusco Almeida.

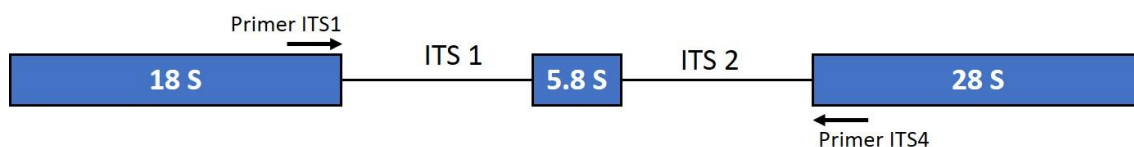
3.4.1. Extração de DNA dos fungos pré-selecionados

Os vinte fungos foram crescidos em caldo de nutriente por 7 dias, e o micélio formado foi filtrado e macerado em nitrogênio líquido. O produto foi submetido a lise celular química utilizando tampão de lise composto por 10 mM Tris/HCl (Cloridrato de Trizma), 1 mM EDTA, 1% SDS e 100 µg de proteinase K. Após a lise celular, o DNA foi precipitado utilizando-se CTAB (brometo de acetiltrimetilamônio), um detergente catiônico que tem propriedade de precipitar ácidos nucléicos e polissacarídeos ácidos em soluções de baixa concentração iônica. Após a precipitação, o DNA foi tratado com RNase (sequenciador) (50 ug/mL) e então seguiu-se com a purificação do DNA utilizando-se Fenol:Clorofórmio:Alcoolisoamílico (25:24:1) (BAEZA et al. 2006). Após a purificação, o DNA foi precipitado utilizando-se NaAc 3M e EtOH absoluto seguido de lavagem com etanol 70% e então ressuspendido em H₂O DEPC (Dicarbonato de dietila). O DNA foi então dosado e teve sua pureza avaliada utilizando-se o aparelho NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Lifescience).

3.4.2. Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A identificação dos fungos isolados da rizosfera foi realizada através da análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) que separa os genes 18S e 28S do RNA ribossomal (Figura 11).

Figura 11: Esquema da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA. As setas (→) indicam os *primers* utilizados para a amplificação.



A região ITS do DNA consiste em sequências altamente conservadas interespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, que permitem a identificação de relações filogenéticas além da distinção de espécies (CHEN et al., 2004; FUNGARO, 2000). A partir da região ITS do DNA através da sequência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA dos fungos isolados da rizosfera de

Senna spectabilis utilizou-se os *primers* ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para identificá-los.

As reações foram realizadas utilizando-se 10 pmol de cada *primer*, 2,5 uL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 uL dNTP (5 mM), 5 uL de tampão da Taq 10 X, 1U unidade de Taq DNA polimerase e 20 ng de DNA em uma reação de volume total de 50 uL. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well *ThermalCycler* (Life Technologies) seguindo o seguinte programa: 95°C 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 15 segundos e 72°C por 65 segundos, após os ciclos, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 72°C seguido de resfriamento a 4°C. A reação foi então verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e amostras coradas com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), sendo as bandas visualizadas com o auxílio de luz UV. Após a verificação da amplificação, os produtos das PCRs foram purificados utilizando o *kit* de purificação QIAquick PCR *Purification Kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram dosados e tiveram a pureza avaliada utilizando-se o aparelho NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Lifescience).

3.4.3. Sequenciamento dos produtos da PCR

O produto da PCR foi utilizado na reação de sequenciamento, baseado no método de SANGER (SANGER, et al., 1977) utilizando dideoxynucleotídeos fluorescentes e sequenciador automático modelo ABI Prism 3130 (*Applied Biosystems*) utilizando-se o *kit* BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*). As reações de sequenciamentos foram realizadas com a adição de 1 µL de *primer* (5 uM), 2 uL de tampão de sequenciamento 2X, 40 ng de produto de PCR e 2 µL do BigDye. As reações foram realizadas em *termociclador* Veriti 96-Well *ThermalCycler* (Life Technologies) seguindo o seguinte programa: 96°C por um 1 minuto, seguido por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a reação, os produtos foram purificados utilizando o mesmo *kit* anterior seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação as amostras foram submetidas ao sequenciador ABI Prism 3130. As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas *Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)* (ALTSCHUL, et al., 1990), disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, e o sequenciamento obtido foi comparado com a base de dados *GenBank*.

3.5. Obtenção do perfil químico dos cultivos por CLAE-AREM (Desreplicação)

As análises por CLAE-EM foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) campus Ribeirão Preto sobre a supervisão do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

O equipamento utilizado foi do modelo: micrOToF II - ESI-ToF Mass Spectrometer, Fabricante: Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA), calibrado com Na-TFA a 10 mg/mL. As condições do experimento foram: Bomba de infusão (COLE PARMER), fluxo 300 µl/h, fase móvel para a solubilização: H₂O:MeOH, modo de detecção foi positivo para as amostras, a faixa de aquisição foi de *m/z* 50-2000. O software Data Analysis Shortcut (Bruker Daltonik®) foi utilizado durante a aquisição dos dados e processamento dos dados espectrométricos. As condições de análise do aparelho (EM) foram: *End Plate*: 500 volts; *Capillary*: 3500 volts; *Dry Gas Temp*: 180 °C; *Dry Gas Flow*: 4 L/min; *Neb Gas Pressure*: 0.4 Bar; Gás: Nitrogênio.

Os parâmetros cromatográficos utilizados nas análises foram: a separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa (Kinetex, Phenomenex) 150 x 4,60 mm (5µm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) e água deionizada (0,1% de ácido fórmico), com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. As amostras foram injetadas em coluna de CLAE e eluídas com o programa de eluição em gradiente: 5% B de 0 a 5 min, 5 até 100% B de 5 a 45 min.

3.5.1. Preparação dos extratos em meio sólido (placa de Petri), para análises de CLAE-AREM

Inoculou-se um disco de 5 mm de diâmetro de *F. oxysporum* e *R. similis* no centro da placa (cultivo simples) ou no canto da placa, em lados opostos (no caso de co-cultura) contendo 20 mL de Czapeck-Dox Agar, (tempo de crescimento de 14 dias em 25° C), como mostra a Figura 12.

Figura 12: Esquema de inoculação dos micro-organismos em placa de Petri.



Após o processo de incubação (14 dias) dos cultivos em cultura simples e mista, realizou-se a liofilização dos cultivos, para posterior extração sólido-líquido utilizando 3 porções de 20 mL da mistura de acetato de etila/diclorometano/metanol (3/2/1 v:v), posteriormente sonicou-se cada extrato por 30 min, realizou-se uma filtração simples e, recolheu-se o sobrenadante para posterior análises, secou-se o solvente à pressão reduzida em evaporador rotativo, ressuspendeu-se o extrato em metanol grau HPLC e filtrou-se os extratos em membrana de 20 µm para análise em CLAE-EM, visando obter o perfil metabólico de cada cultura (mista e simples). Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

3.6. Espectrometria de massas *tandem* (CLAE-EM/EM)

Os estudos de fragmentação foram feitos em um sistema cromatográfico Shimadzu® (Kyoto, Japão) modelo LC-20A acoplado a um detector UV-DAD SPD-M20A, modulo de comunicação CBM-20A, e um espectrômetro de massas Amazon SL Bruker®, modulo de comunicação CBM-20A com fonte de ionização eletrospray (ESI) e analisador do tipo *ion trap*, foi utilizado 15 eV de energia de colisão. O método cromatográfico utilizado foi: coluna C18 de fase reversa (Kinetex, Phenomenex) 150 x 4,60 mm (5µm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) e água deionizada (0,1% de ácido fórmico), com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. As amostras foram injetadas em coluna de HPLC e eluidas com o programa de eluição em gradiente: 5% B de 0 a 5 min, 5 até 100% B de 5 a 45 min.

3.7. Análises em cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM)

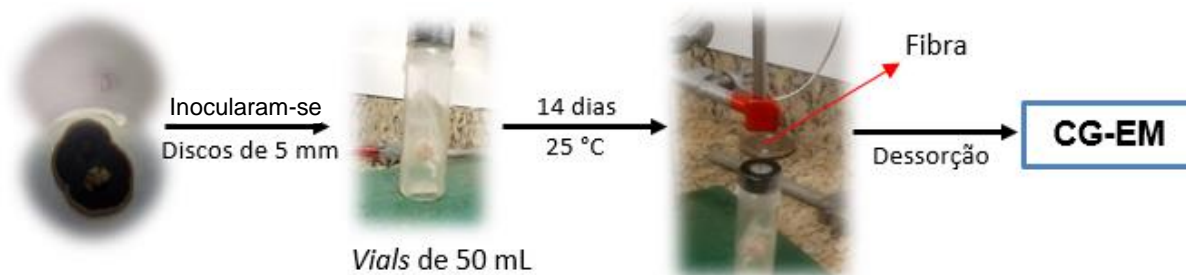
As análises de CG-EM foram realizadas em um sistema cromatográfico Shimadzu® (Kyoto, Japão), modelo QP2020 como fonte de ionização do tipo ionização por elétrons (EI), foi utilizado como gás de arraste hélio, a separação cromatográfica foi realizada em coluna da marca Shimadzu, modelo SH-Rtx-5MS (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) com dimensões de 30 m de comprimento, 25 mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,25 mm. A temperatura do forno foi programada iniciando em 30 °C, permanecendo por 3 minutos e em seguida subindo em uma taxa de 5 °C por minuto até 250 °C, a temperatura de injetor foi de 260 °C, com modo de injeção Split 1/5, gás de arraste hélio a um fluxo constante de 1,0 mL/min, pressão de

45,8 kPa, velocidade linear de 35,9 cm/sec, fluxo total de 9,0 mL/min as condições do espectrômetro foram: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, energia de colisão utilizada foi de 70 eV, faixa de massas de aquisição de m/z de 40-450 Daltons.

3.7.1. Inoculação dos fungos e extração do *Headspace* por SPME (Micro extração em fase sólida)

Para as culturas simples, um disco de 5 mm de diâmetro, contendo os micro-organismos, foram inoculados no centro dos *vials* de 50 mL, contendo 20 mL de Czapeck-Dox Agar (tempo de incubação de 14 dias em 25 °C). Similarmente, experimentos de co-cultura foram inoculados com dois discos de 5 mm de diâmetro dos micro-organismos apropriados em lados opostos dos *vials* (tempo de incubação de 14 dias em 25 °C), para manter a vedação os tubos foram fechados com tampas contendo septos de Teflon[®], evitando vazamento ou contaminações externas, em seguida foram expostos a uma fibra extratora de revestimento triplo DVB/CAR/PMDS (divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano 50/30 μ m, Supelco) por 50 minutos, após o tempo de extração, a fibra foi retraída e levada ao cromatógrafo para dessorção dos voláteis no injetor por 3 minutos, como mostra o Fluxograma 02.

Fluxograma 02: Representação dos experimentos de análises dos constituintes voláteis por CG-EM.



3.7.2. Tratamento e análise de dados

Os cromatogramas obtidos das análises por CG-EM foram integrados e os tR (tempo de retenção) e áreas dos picos tabulados. O cálculo do índice de retenção linear foi calculado utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos C8-C40 (Sigma-Aldrich). O índice de retenção do analito é obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do analito com o tempo de retenção de dois padrões (séries homologas de hidrocarbonetos), sendo esses eluídos antes e após o pico do composto de interesse (VAN DEN DOOL AND KRATZ, 1963). Para o cálculo do índice de retenção linear foi utilizada a equação de Van Den Dool e Kratz:

$$IR = 100.n + 100. \left(\frac{tR_x - tR_n}{tR_{n+1} - tR_n} \right)$$

Onde **n** é o número de carbonos do *n*-alcano anterior ao analito, **tRx** é o tempo de retenção do analito de interesse, **tRn** é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído antes do analito e **tRn+1** é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído após o analito. Os índices de retenção calculados (**IR**) foram comparados com o banco de dados NIST e *Golm Metabolome Database (Max Planck Institute)*.

3.8. Planejamento experimental (*R. similis*)

3.8.1. Inoculação do fungo *R. similis* e extração líquido-líquido

Suspensão da cultura do fungo *R. similis* (*slants*) foi inoculada em placa de Petri contendo 20 mL de batata dextrose ágar (BDA) por 20 dias à 25 °C, inoculou-se um disco de 1 cm (oriundo da placa de Petri) em Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de caldo de batata dextrose (BDB) à 25 °C, variando agitação, luz e dias de crescimento.

Os experimentos com agitação foram realizados em Incubadora Shaker refrigerada SL-223, à 110 rpm. Já os experimentos com luz foram deixados na presença de luz branca (laboratório) por 24 horas, e os experimentos com ausência de luz tiveram seus frascos cobertos com papel alumínio.

Após o processo de incubação, cada experimento foi extraído com três porções de 100 mL de acetato de etila (extração líquido-líquido). O solvente extrator foi evaporado em evaporador rotativo obtendo-se o extrato, que foi ressuspendido em 10

mL de metanol grau HPLC e filtrado em membrana de 20 µm para análise em CLAE-DAD.

3.8.2. Desenho do experimento

Um planejamento fatorial 2^3 foi realizado com três variáveis independentes: agitação (X_1), luz (X_2) e dias de incubação (X_3), apresentando dois níveis: um inferior (-) e um superior (+), com três réplicas para cada experimento, sendo a esquematização do experimento fatorial representada na Tabela 01.

Tabela 01: Condições utilizadas em cada experimento do planejamento fatorial completo.

Parâmetros	Níveis	
	-1	+1
Agitação	Ausente	Presente
Luz	Ausente	Presente
Dias de incubação	21	28

Os efeitos das variáveis selecionadas foram investigados a fim de se observar uma maior variação metabólica, que poderia ser mensurada pelo número de picos em CLAE-DAD (Y). Os resultados foram avaliados usando um modelo, incluindo os efeitos principais e suas interações, sendo obtido uma equação de forma:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

Onde Y é a variável dependente, b_0 a média aritmética das respostas obtidas em todos os experimentos, b_i os coeficientes estimados para os fatores X_i . Os efeitos principais (X_1 , X_2 e X_3) representam a influência da mudança de um fator de forma independente do nível baixo para o alto, enquanto os termos de interação (e.g. X_1X_2 e $X_1X_2X_3$) mostram como a resposta varia quando dois e três termos são modificados simultaneamente.

3.8.3. Condições cromatográficas CLAE-DAD

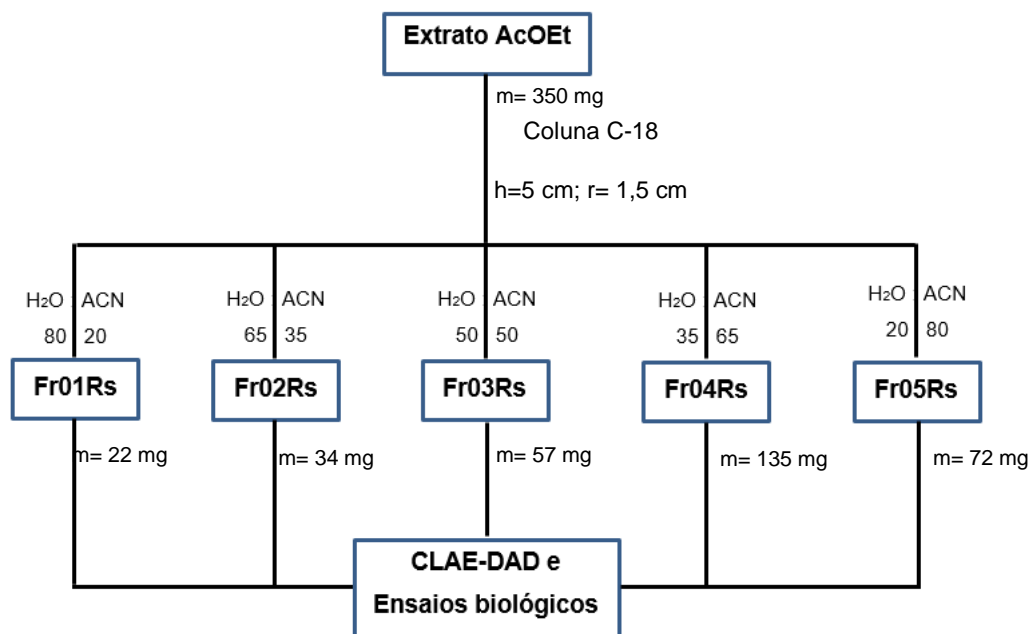
Todos os experimentos foram realizados em cromatógrafo SPD M20A, equipado com detector DAD, detecção em 254 nm, com bomba LC-20A. A separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa (Kinetex, Phenomenex) 150 x 4,60 mm (5µm). A fase móvel foi constituída de acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) e água deionizada (0,1% de ácido fórmico), com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. As amostras foram injetadas em coluna de HPLC e eluídas com o programa de eluição em gradiente: 5% B de 0 a 5 min, 5 até 100% B de 5 a 45 min. O conjunto de dados obtidos foram exportados na forma de arquivos .txt e a contagem de picos realizada no software LC *solution* Versão 1.25 da Shimadzu Corporation. A análise estatística foi efetuada no software libreoffice calc.

3.9. Fracionamento do extrato em caldo de batata do fungo *R. similis* obtidos em escala ampliada

O extrato AcOEt foi submetido à cromatografia em coluna sob pressão, onde foram obtidas cinco frações como visualizado na **Fluxograma 03**, de 300 mL cada (Fr01Rs a Fr05Rs).

O perfil químico destas frações foi avaliado por CLAE-DAD, o perfil biológico de todas também foi avaliado com o envio das frações para os ensaios biológicos já citados.

Fluxograma 03: Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt em caldo de batata de *R. similis*.



3.9.1. Purificação das frações Fr4Rs e Fr5Rs

Após análise dos resultados químicos e biológicos das frações oriundas do extrato de caldo de batata dextrose do fungo *R. similis*, as frações Fr04Rs e Fr05Rs apresentaram uma massa considerável, e apresentaram moderada ação citotóxica contra as duas linhagens tumorais testadas (carcinoma colorretal (HCT-116) e adenocarcinoma mamário (MCF-7)), o que possibilitou a seleção destas frações para separação por CLAE preparativo visando isolar e elucidar os compostos.

As frações foram solubilizadas na FM utilizada, filtradas em membrana (0,22 μ m) e injetadas dez vezes (5 mg/injeção) utilizando um *loop* de 5 mL. (Figuras 13 e 14) Destes fracionamentos, isolou-se as substâncias 1 a 9.

Figura 13: Cromatograma obtido em CLAE-DAD_{prep} (254 nm) da Fr04Rs, modo de eluição isocrático 50% H₂O/ACN.

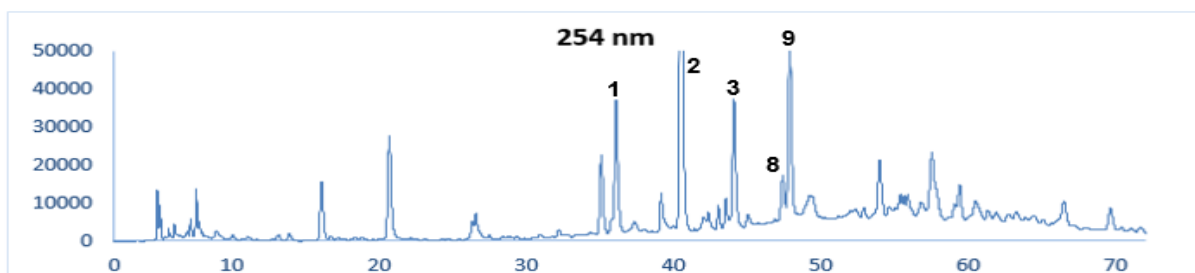
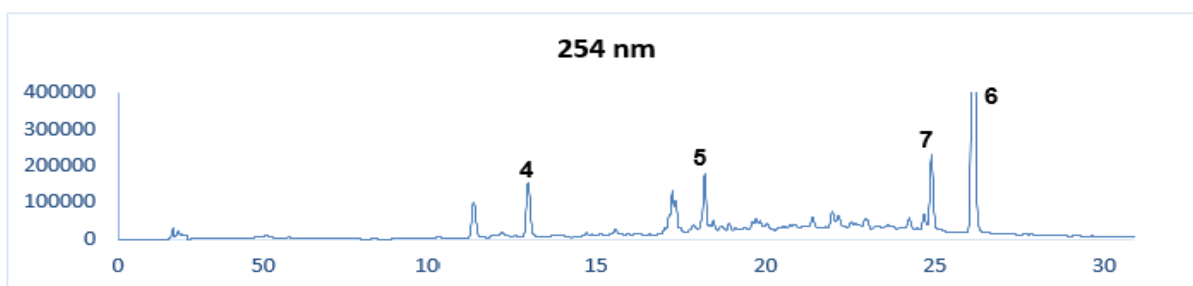


Figura 14: Cromatograma obtido em CLAE-DAD_{prep.} (254nm) da Fr05Rs, modo de eluição isocrático 65%B (H₂O/ACN).



3.10. Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C.

Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C uni e bidimensionais foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III HD 600, usando criosonda de 5 mm (*Triple Inverse Cryo-probehead*), com detecção inversa e três canais (¹H, ¹³C e ¹⁵N), operando em 600 MHz para o núcleo de ¹H e 150 MHz para ¹³C. Todos os espectros foram registrados em MeOD como solventes deuterados, e o solvente residual como padrão de referência nos espectros.

O equipamento foi operado com as seguintes configurações: TD (*time domain*): 57690; DS (*dummy scan*): 4; NS (*number of scans*): 208; SW (*spectral window*): 16.0221; O1P (ponto de irradiação): 4,9 ppm (2940,64 Hz); O2P: 49,497ppm (7469.22 Hz); D1: 2; Temperatura: 22 °C; *Receiver Gain*: 23; *Relaxation Delay*: 2,00; *Pulse Width* 7,00; *Acquisition Time*: 2,9999; *Acquired Size* 28845; *Spectral Size* 65536.

3.11. Outros equipamentos utilizados

Evaporador rotatório – Buchi; Balança analítica – METLER TOLEDO AG 245 e SHIMADZU, Balança semi-analítica – OHAUS, Vortex – VWR *Scientific Products*, incubadora vertical - VWR *Scientific Products* (modelo 1925), Incubadora rotatória (“Shaker”) – *New Brunswick Scientific* (série I26).

3.12. Esterilização dos materiais

A esterilização de todo material utilizado na manipulação do micro-organismo, e também os meios de culturas preparados, foi realizada em autoclaves dos fabricantes QUIMIS® e MARKET FORGE Industries INC, sendo mantidos à temperatura de 121 °C por aproximadamente 20 minutos.

3.13. Manipulação dos micro-organismos

Todos os procedimentos de manipulação dos micro-organismos foram realizados em Capela de Fluxo Laminar Pachame® PA 310-Série 172-99 e SterilGARD® Advance.

3.14. Especificações dos meios de cultivos utilizados neste trabalho

Tabela 02: Especificações dos meios de cultivo utilizados neste trabalho.

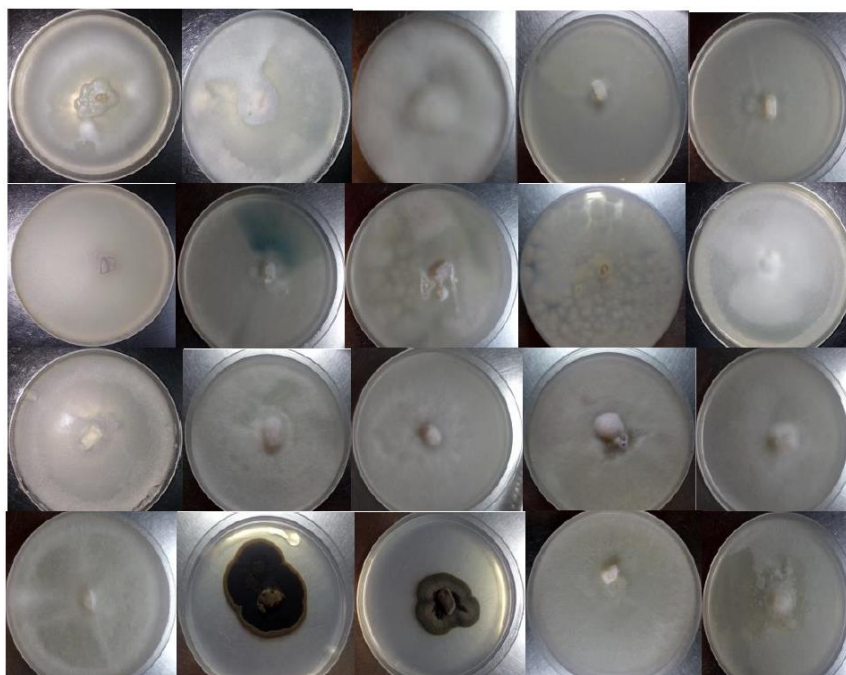
Meios de cultivo	Tipo	Composição	Fabricante
BDA	Sólido	Batata (4 g); Dextrose (20 g); Agar (15 g)	Acumedia
PDB	Líquido	Batata (4 g); Dextrose (20 g)	Acumedia
Czapeck-Dox Broth	Líquido	Sacarose (30 g); NaNO ₃ (2 g); Na ₂ (PO ₄) ₃ (1 g); MgSO ₄ (0,5 g); KCl (0,5 g); FeSO ₄ (0,01 g)	KASVI
Czapeck Dox Agar	Sólido	Sacarose (30 g); NaNO ₃ (2 g); Na ₂ (PO ₄) ₃ (1 g); MgSO ₄ (0,5 g); KCl (0,5 g); FeSO ₄ (0,01 g); Agar (15 g)	KASVI

4. Resultados e Discussões

4.1. Pré-seleção dos micro-organismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*

Foram isolados e preservados em *slants* mais de 100 fungos da rizosfera da *Senna spectabilis* pela Dra. Patrícia Cardoso durante o seu doutorado. Todos esses micro-organismos foram crescidos em placas de Petri contendo Czapeck Dox Agar e inicialmente foram selecionados vinte fungos de acordo com a sua viabilidade, Figura 15.

Figura 15: Imagem dos vinte fungos selecionados inicialmente (fotos tiradas com dez dias de crescimento).



. Os próximos critérios para a seleção dos fungos de trabalho foi, massa de extrato (visando facilitar a etapa de isolamento dos metabólitos secundários) e atividade biológica (antimicrobiano, inibidor de acetilcolinesterase e antitumoral).

4.2. Obtenção dos extratos

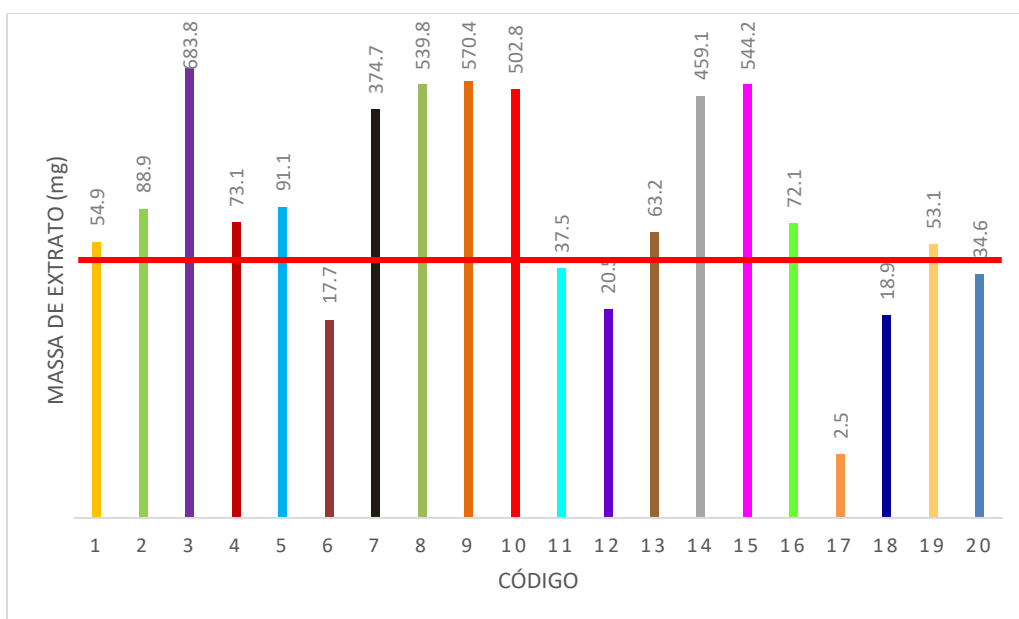
Os vinte micro-organismos inicialmente selecionados foram cultivados em caldo de Czapeck para obtenção dos extratos (**Figura 16**).

Figura 16: Imagem dos vinte extratos obtidos de cada fungo selecionados inicialmente.



Após o preparo, os extratos foram concentrados e pesados, os resultados estão descritos na Figura 17.

Figura 17: Gráfico do resultados obtidos da pesagem dos extratos.



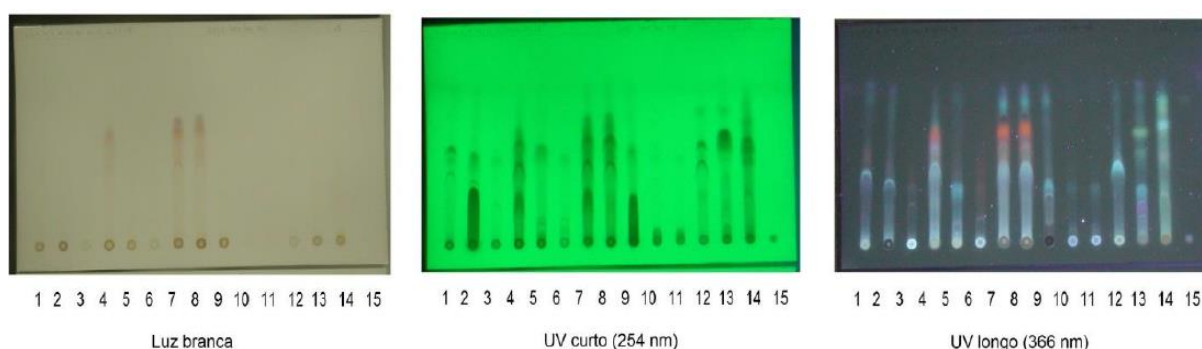
Foi possível observar que alguns micro-organismos não produziram massa de extrato considerada satisfatória (massa de extrato >50 mg (**linha vermelha**)), como por exemplo, os fungos codificados como 6, 11, 12, 17, 18 e 20, portanto, foram inicialmente excluídos neste trabalho.

4.3. Avaliação do perfil biológico dos extratos

4.3.1. Ensaio de atividade anticolinesterásica e antimicrobiano

Antes da realização dos ensaios foi necessário ajustar o método cromatográfico para os quatorze extratos restantes, o melhor método foi AcOEt/ACN (90:10 v/v). A cromatoplaça obtida com esse sistema de eluição está representada na Figura 18.

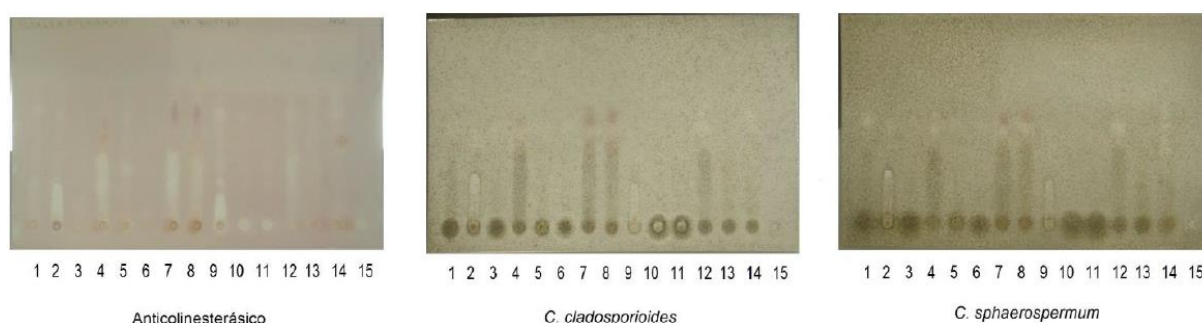
Figura 18: Cromatoplaça obtido dos quatorze extratos, sistema de eluição AcOEt/ACN (90:10 v/v).



Legenda: 1 a 14 → amostras 15 → padrão nistatina 5 µg

O perfil cromatográfico obtido para as amostras apresentou uma variedade interessante de compostos em cada extrato e, também, foi possível observar que existem extratos com perfil cromatográfico muito parecidos, por exemplo, 4, 7 e 8, indicando provavelmente que são fungos da mesma espécie. Escolhido o método de eluição adequado, procedeu-se para os ensaios de inibição de acetilcolinesterase e antimicrobiano, mostrados na Figura 19.

Figura 19: Resultados dos ensaios de inibição de acetilcolinesterase e antimicrobiano.



Legenda: 1 a 14 → amostras 15 → padrão fisostigmina 0,05 µg

Analisando o perfil cromatográfico dos extratos, é possível observar que vários extratos apresentaram atividade inibitória de acetilcolinesterase e antimicrobiano (manchas brancas), esses resultados estão sumarizados na Tabela 03.

Tabela 03: Resultados obtidos dos testes de inibição de acetilcolinesterase e antimicrobiano.

Amostras	<i>C.cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>	Anticolinesterásico
1	i	0,52*	i
2	O ^{***} /0,05 a 0,18 ^{**} /0,18 a 0,27 ^{***}	O ^{**} /0,59 a 0,22 [*] /0,25 ^{***}	O a 0,21 ^{***}
✘ 3	i	i	i
4	0,47*	0,47*	0,05 a 0,36 ^{***}
5	O ^{**}	O ^{**}	O a 0,14 ^{***}
6	O [*]	i	0,28*
✘ 7	i	i	i
8	0,45*	0,45*	0,05 a 0,40 ^{***}
9	0,47*	0,47*	0,05 a 0,33 ^{***}
10	O ^{***} /0,11 ^{***} /0,26*	O ^{***} /0,11 ^{***} /0,26*	0 a 0,25 ^{***}
11	O [*] /0,38 ^{***} /0,48 ^{**}	0,47 ^{**}	0,02 a 0,36 ^{***}
12	0,39 [*] /0,49 ^{**}	0,47*	0,04 a 0,34 ^{**}
13	O a 0,21 ^{**}	O a 0,22 [*]	O a 0,15 ^{***} /0,22 [*]
14	O ^{**}	i	O ^{***}
15	O ^{***}	O ^{***}	O ^{***}

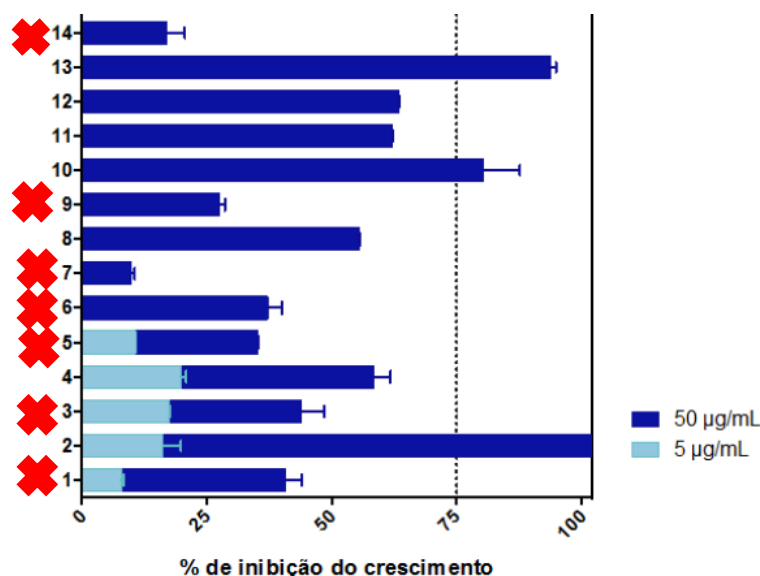
Legenda: *atividade fraca; **atividade moderada; ***atividade forte; i=inativo; O=origem.

Analisando a tabela acima, é possível observar que a maioria dos extratos são promissores, mostrando-se ativos frente as atividades testadas, sendo os únicos extratos que não apresentaram nenhuma atividade testada, as amostras 3 e 7, então foram excluídos.

4.3.2. Avaliação da atividade antitumoral

O ensaio de atividade antitumoral foi realizado para os quatorze extratos fúngicos selecionados, o controle utilizado foi o quimioterápico doxorrubicina, como mostra a Figura 20.

Figura 20: Resultados obtidos das análises de atividade antitumoral, avaliadas em células de câncer colorretal HCT116 após 72 horas de incubação pelo teste de MTT.



Neste ensaio, apenas três extratos (2, 10 e 13) apresentaram atividade forte (inibição > 75%), os extratos 12, 11, 8 e 4 apresentaram atividade moderada (50% < inibição < 75%), e as amostras 14, 9, 7, 6, 5, 3 e 1 apresentam atividade fraca (inibição < 50%), e foram excluídos do trabalho, todos comparadas na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Nota-se que algumas amostras foram testadas já em duas concentrações (5 e 50 µg.mL⁻¹), mas em 5 µg.mL⁻¹ as porcentagens de inibição foram muito baixas (inibição < 25%).

Se analisarmos os resultados obtidos dos três ensaios de atividade (antimicrobiano, inibidor de acetilcolinesterase e citotóxico) e pensarmos conjuntamente com o ambiente em que esses organismos estão inseridos (rizosfera), é desejável que organismos que habitam esse ambiente tão dinâmico e competitivo (alta atividade microbiana e química) produzem compostos em resposta a algum tipo de interação, e normalmente esses compostos apresentam algum tipo de atividade, em sua maioria antagônica (antimicrobiana e/ou citotóxica), o que pode explicar os resultados promissores obtidos.

4.4. Identificação filogenética e ampliação do gene 18S rRNA na região ITS.

Inicialmente foi avaliado o processo de extração através da análise de pureza e dosagem do DNA extraído e dos produtos da PCR, esses resultados estão apresentados nas Tabelas 04 e 05.

Tabela 04: Dosagem e análise da pureza das amostras de DNA.

Amostra	Concentração (ng/uL)	Pureza (OD₂₆₀/OD₂₈₀)
3	430	1.8
4	140	1.8
6	230	1.8
9	88	1.8
10	365	2.0
11	205	1.9
12	125	1.8
13	505	2.0
16	110	2.0
18	100	1.9
19	338	1.9
20	270	2.0

Tabela 05: Dosagem e análise da pureza dos produtos de PCR.

Amostras	Concentração (ng/uL)	Pureza (OD₂₆₀/OD₂₈₀)
3	27,4	1.8
4	71,7	1.8
6	67,8	1.8
9	31,7	1.8
10	32,2	1.8
11	21,8	1.8
12	12,5	1.8
13	50,6	1.9
16	25,1	1.8
18	14,2	1.8
19	21,5	1.8
20	45,1	1.8
21	22,2	1.8

A razão de OD₂₆₀/OD₂₈₀, é a razão da absorção máxima de nucleotídeos (260 nm) e a absorção máxima de proteínas (280 nm), para todas as amostras os valores estão dentro do aceitável (entre 1,8 e 2,0), indicando que o DNA e os produtos da PCR estão puros, caso esse valor seja menor, pode indicar contaminação com proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem no mesmo comprimento de onda.

4.5. Sequenciamento dos produtos da PCR

A Tabela 06, mostra os resultados obtidos pela identificação da região ITS1 5.8S-ITS2 do RNA ribossomal.

Tabela 06: Identificação dos fungos isolados após sequenciamento de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA.

Amostra	Identificação molecular	Identidade (%)	Número de acesso
3	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KF381081.1
4	<i>Fusarium solani</i>	99	JX435189.1
6	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	JX406553.1
9	<i>Fusarium solani</i>	93	JX535014.1
10	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KP230811.1
11	<i>Fusarium solani</i>	98	KC907714.1
12	<i>Fusarium solani</i>	100	KC907714.1
13	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	LC055797.1
16	<i>Fusarium solani</i>	99	KC907714.1
18	<i>Rhinochadiella similis</i>	99	LC018820.1
19	<i>Fusarium solani</i>	99	KJ526172.1
20	<i>Fusarium solani</i>	99	JX406517.1

Observando-se os resultados obtidos na identificação filogenética, foi possível notar a predominância de micro-organismos do gênero *Fusarium*, se mais uma vez pensarmos em conjunto com o ambiente em que esses micro-organismos foram isolados (rizosfera) é interessante que os organismos que à habitam tenham como característica alta capacidade de se multiplicar, já que em seu ambiente natural a competição por espaço e nutriente é intensa, e os micro-organismos desse gênero (*Fusarium*) apresentam essa característica, o que pode explicar a predominância desse gênero.

Como o objetivo é trabalhar em co-cultivo, é interessante que sejam fungos de espécies diferentes, portanto, foi selecionado para prosseguir o trabalho, *Fusarium oxysporum*, o qual a amostra 10 foi escolhida de acordo com a massa de extrato (502 mg) e atividade antifúngica, anticolinesterásica e citotóxica relevantes, e o *Rhinocladiella similis*.

4.6. Conhecendo a química desses micro-organismos

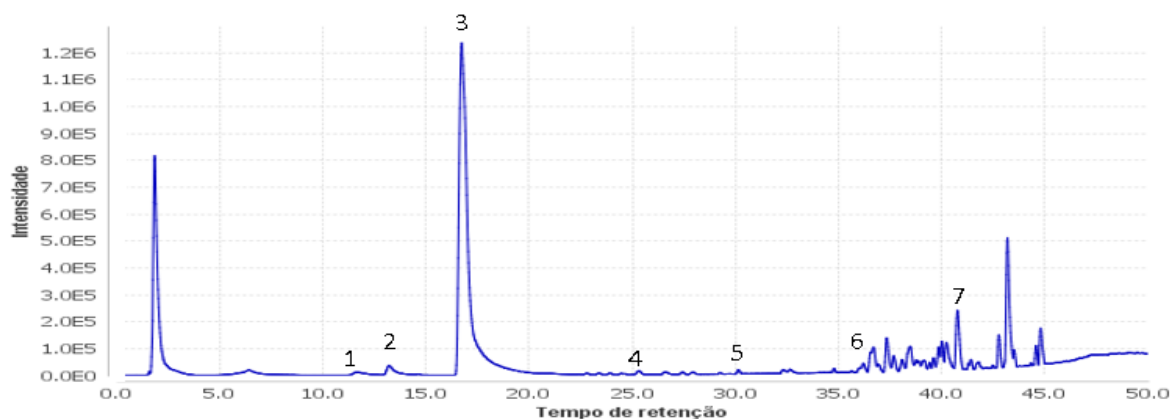
Antes de realizar os ensaios em co-cultivo, realizou-se o estudo dos metabólitos de cada micro-organismo em cultivo simples por CLAE-EM e CG-EM com o objetivo de compreender as interações que possam vir a ocorrer em cultivo misto.

Para o fungo *Fusarium oxysporum* existem diversos estudos na literatura sobre a composição química dos seus metabólitos, portanto, foi elaborado um banco de dados “in house” com todos os compostos identificados desse micro-organismo e a massa em alta resolução, facilitando o processo de desreplicação.

4.6.1. *Fusarium oxysporum*

A identificação dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo identificado como *Fusarium oxysporum* é discutido a seguir, iniciando-se com o perfil químico obtido pela análise do extrato em meio sólido (placa de Petri) em CLAE-EM.

Figura 21: Perfil químico obtido pela análise do extrato em meio sólido (placa de Petri) de *Fusarium oxysporum* em CLAE-EM.

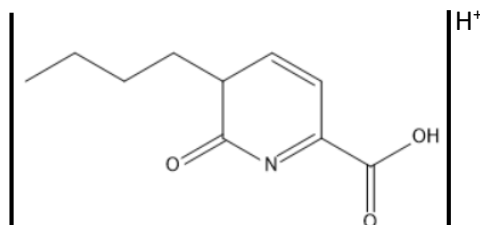


A partir destes dados foram avaliadas as possíveis fórmulas moleculares através dos valores de massa de alta resolução utilizando o aplicativo *SmartFormula XR* (Bruker Daltonics). Neste processo, foram incluídas algumas recomendações desenvolvidas no trabalho por Kind et al. (2007) - **as sete regras de ouro** para identificação de compostos a partir de massas de alta resolução.

Além das regras gerais da proporcionalidade entre o número de carbonos e hidrogênios, foram incluídos filtros que determinam o número de nitrogênios, enxofre e metais (Na e K) no processo de triagem do software *SmartFormula*, a análise do erro em ppm entre os íons observados e as fórmulas moleculares assim como os valores de sigma, relativos ao padrão isotópico, foram incluídos (SigmaFit – Bruker Daltonics). Uma vez reduzido o número de formulas moleculares (FM), estudos mecanísticos de fragmentação baseado em experimentos EM/EM foram propostos visando confirmar a estrutura, sendo possível então identificar sete compostos.

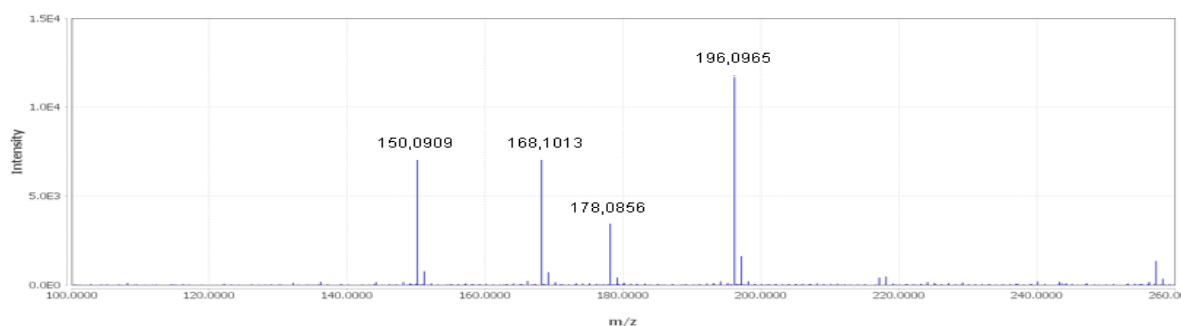
O primeiro apresentou m/z 196,0965 no modo positivo, e foi sugerido pela base como um derivado do ácido fusárico com erro em ppm de 2,56.

Figura 22: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 196,0965.



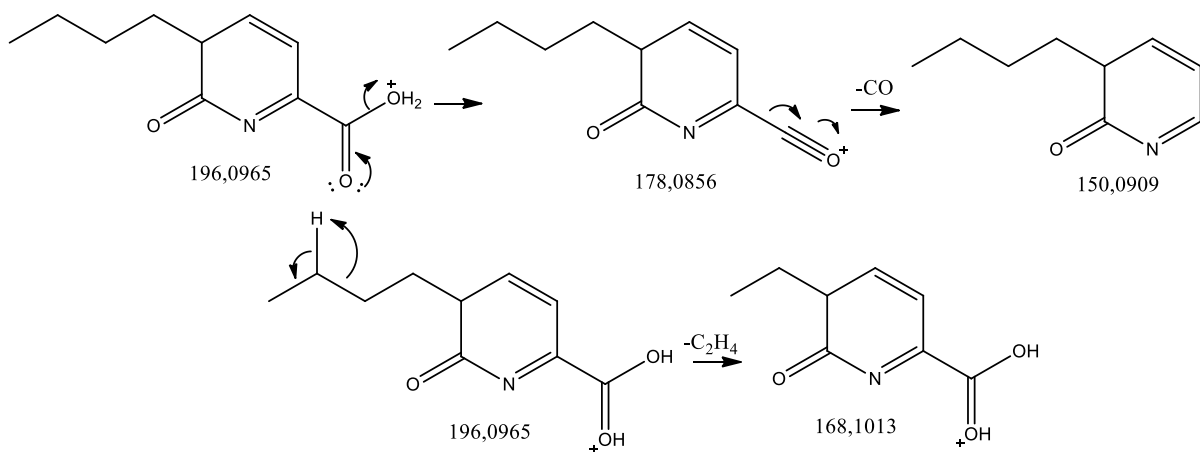
Para comprovar a identidade do composto 1 com a sugestão dada pelo banco de dados, foi analisado o espectro de fragmentação obtido (Figura 23).

Figura 23: Espectro de massas do composto m/z 196,0965, obtido por CLAE-QTOF.



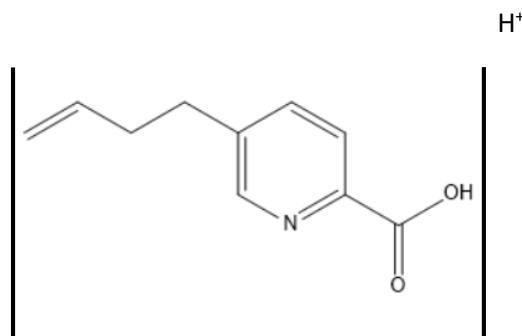
Analisando os fragmentos formados, foi possível identificar uma desidratação formando o íon de m/z 178,0856, subsequente uma perda de monóxido de carbono (m/z 150,0909), e o íon m/z 168,1013 responsáveis pela perda de eteno, fragmentações bem características dessa classe de compostos,

Figura 24: Proposta de fragmentação do derivado do ácido fusárico (Composto 1).



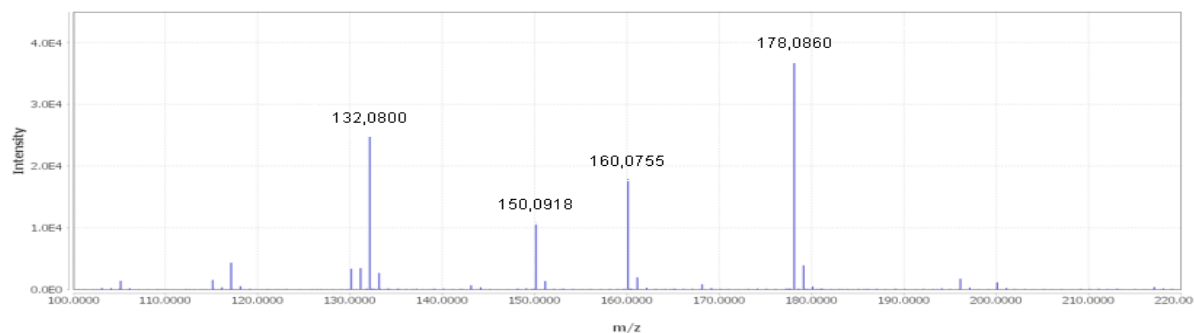
O composto 2 apresentou m/z 178,0860 e foi sugerido pelo banco de dados como outro derivado do ácido fusárico, com erro em ppm de 2,81.

Figura 25: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 178,0860.



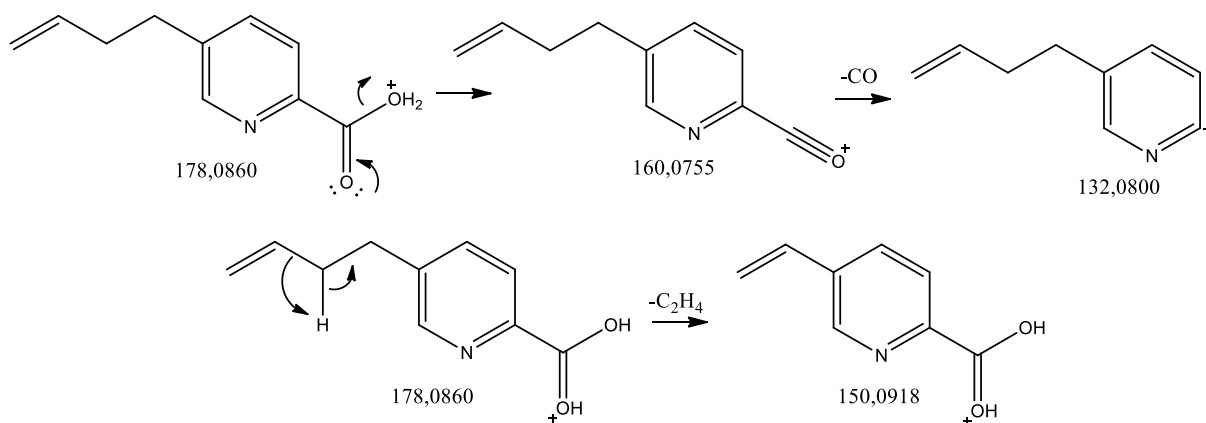
Para confirmar a sugestão encontrada no banco de dados, foi avaliado o perfil de fragmentação do composto 2 e comparado com o sugerido.

Figura 26: Espectro de massas do composto m/z 178,0860, obtido por CLAE-QTOF.



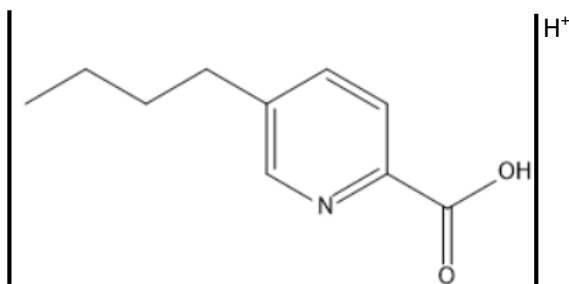
É possível notar o mesmo padrão de fragmentação que o composto 1, o que sugere serem da mesma classe, corroborando a sugestão dada pelo banco de dados.

Figura 27: Proposta de fragmentação da sugestão dada pelo banco de dados, para o composto dois.



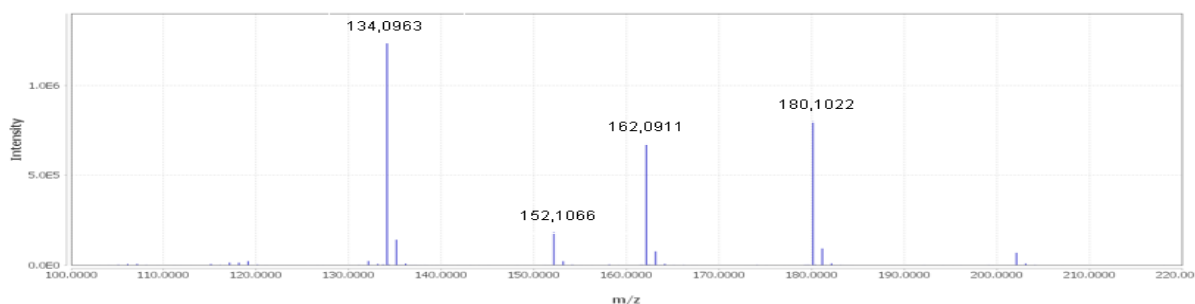
O composto 3 apresentou m/z 180,1022 e foi sugerido pelo banco de dados como o ácido fusárico, com erro em ppm de 0,56.

Figura 28: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 180,1022.



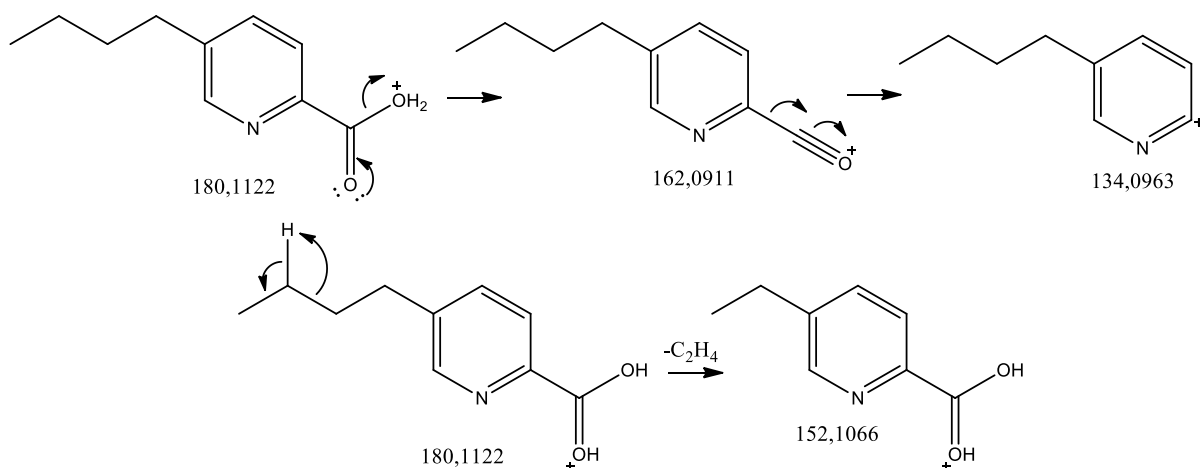
Para confirmar a sugestão encontrada no banco de dados, foi avaliado o perfil de fragmentação do composto 3 e comparado com o sugerido.

Figura 29: Espectro de massas do composto m/z 180,1022, obtido por CLAE-QTOF.



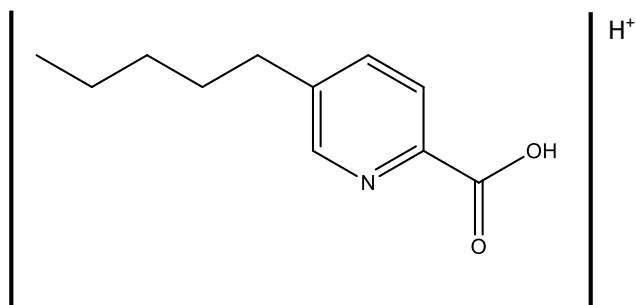
O padrão de fragmentação obtido para o composto 3 é bem característico do ácido fusárico, com uma desidratação (m/z 162,0911) e subsequente perda de monóxido de carbono (m/z 134,0963), e m/z 152,1066 responsável pela perda de eteno, formando o íon piridínio.

Figura 30: Proposta de fragmentação do ácido fusárico sugerido pelo banco de dados para o composto 3.



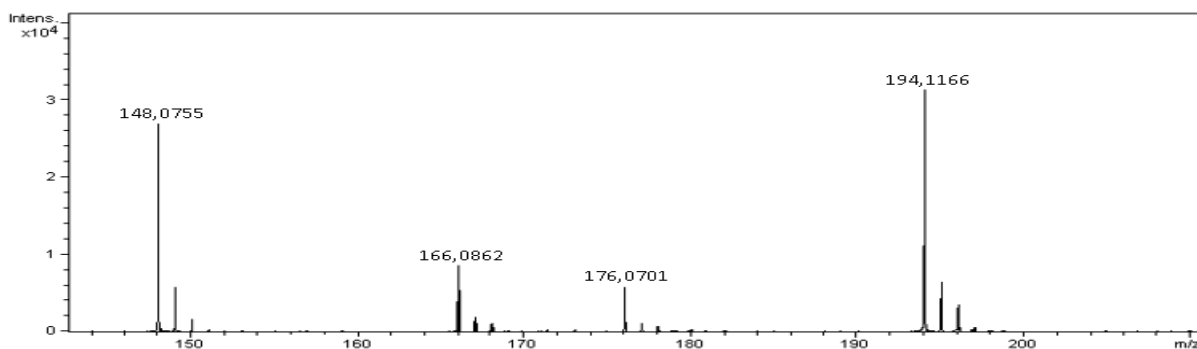
O composto 4 apresentou m/z 194,1166 e foi sugerido como derivado do ácido fusárico, com erro em ppm de 5,67.

Figura 31: Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 194,1166.



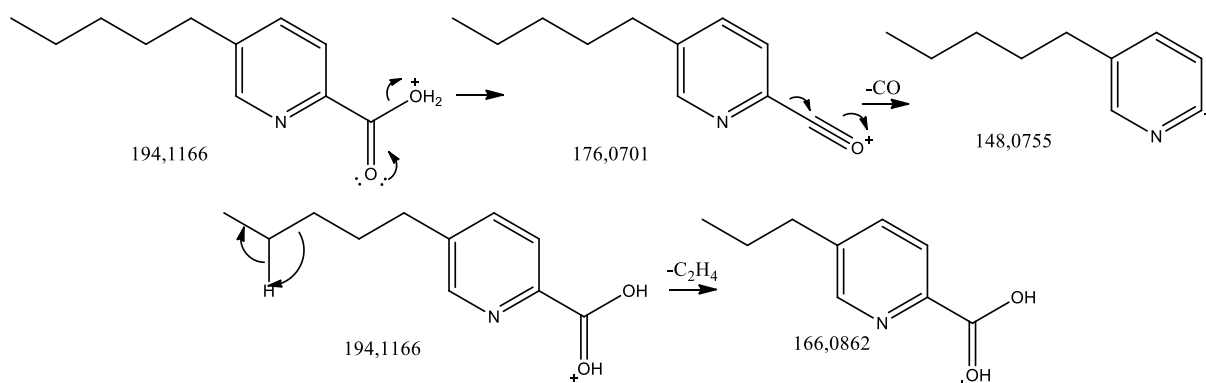
A identidade do composto 4 foi confirmado analisando o perfil de fragmentação.

Figura 32: Espectro de massas do composto m/z 194,1166, obtido por CLAE-QTOF.



É possível notar o mesmo padrão de fragmentação dos compostos anteriores, o que corrobora ao sugerido pela base de dados (mesma classe do que os anteriores). Esses dados foram comparados com o padrão de fragmentação do composto sugerido, confirmando sua estrutura.

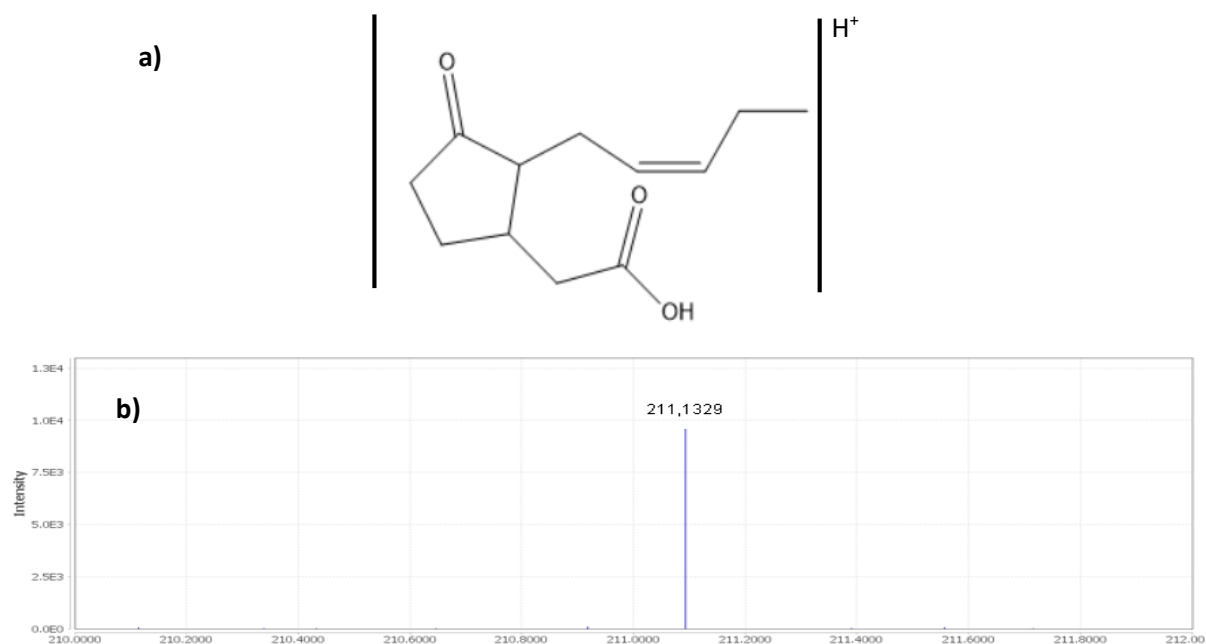
Figura 33: Proposta de fragmentação do composto sugerido pelo banco de dados para o composto 4.



O ácido fusárico e derivados são micotoxinas produzidas pela maioria das espécies de *Fusarium*, comumente encontrados em grãos, podendo causar problemas de saúde em humanos e animais servindo então de indicadores de contaminação em grãos por espécies de *Fusarium* (BACON et al., 1996), são importantes por suas relações sinérgicas podendo aumentar a toxicidade de outras toxinas, como tricotecenos, zearalenonas e etc. É importante considerar que o ácido fusárico é o composto majoritário dessa espécie e possui um valor agregado de R\$ 1633,00 a cada 1 grama de acordo com o site da Sigma Aldrich. Esse composto possui uma série de atividades biológicas relatadas na literatura, como antimicrobiana (HAN et al., 2014), anti-hipertensiva e herbicida (SON et al., 2007).

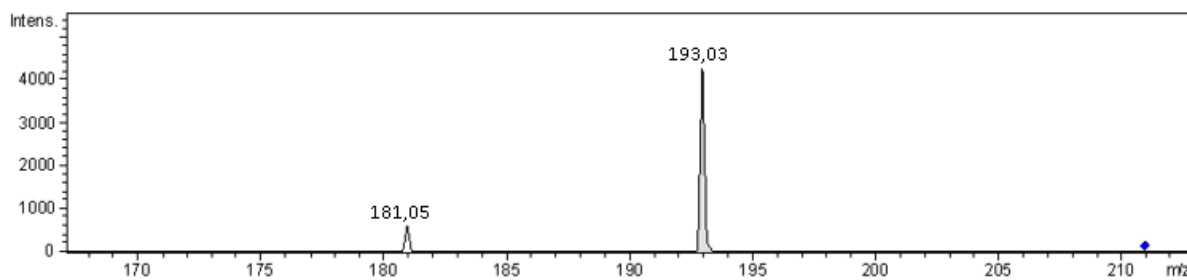
O composto 5 apresentou m/z 211,1329, e foi sugerido pelo banco de dados como o ácido jasmônico, com um erro em ppm de 6,29.

Figura 34: a) Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 211,1329; b) espectro de massas do composto 5, obtido por CLAE-QTOF.



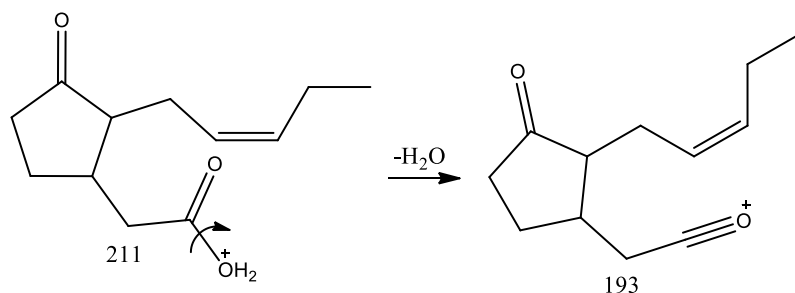
Foi feito o experimento de EM/EM do composto 5, com o objetivo de comparar com a estrutura sugerida pelo banco de dados.

Figura 35: Espectro de MS/MS do composto 5, obtido por CLAE-IONTRAP.



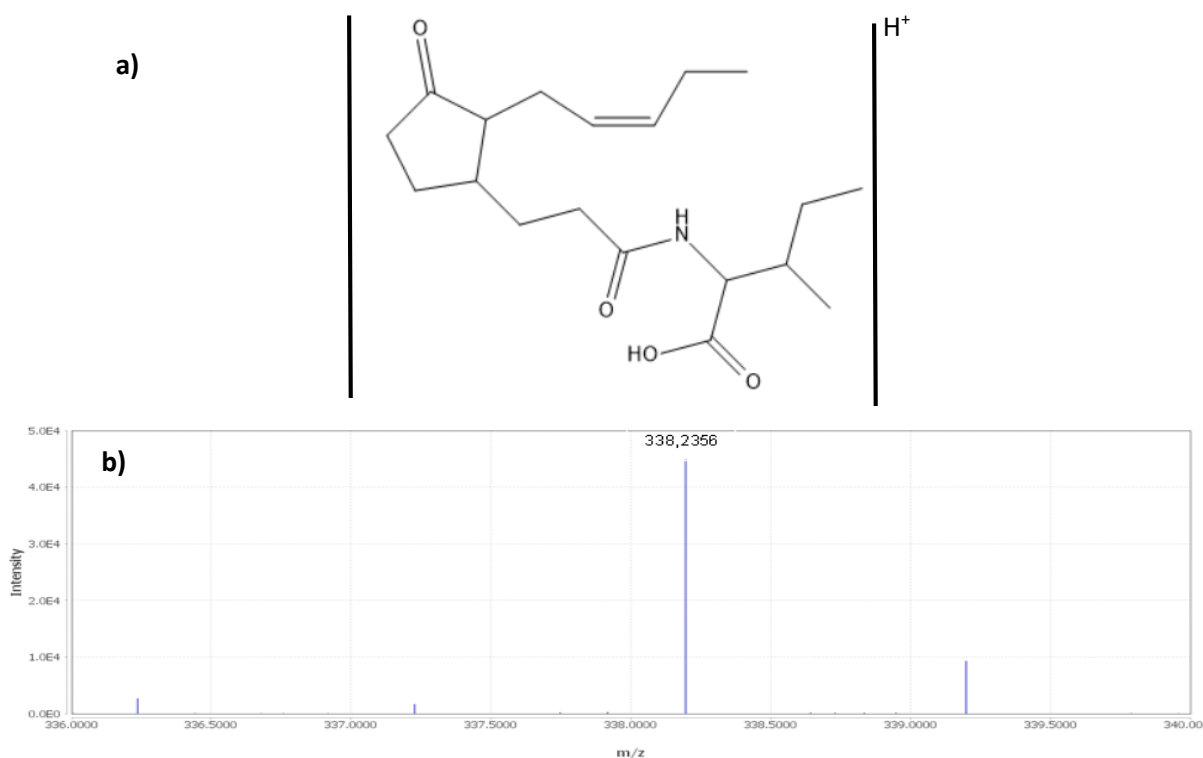
Foi possível observar uma desidratação (m/z 193,03), mostrado na Figura 36.

Figura 36: Proposta de fragmentação do composto sugerido pelo banco de dados para o composto 5.



O composto 6 apresentou m/z 338,2356, e foi encontrado no banco de dados como um derivado do ácido jasmônico, com um erro em ppm de 9,75.

Figura 37: a) Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 338,2356; b) espectro de massas do composto 6, obtido por CLAE-QTOF.

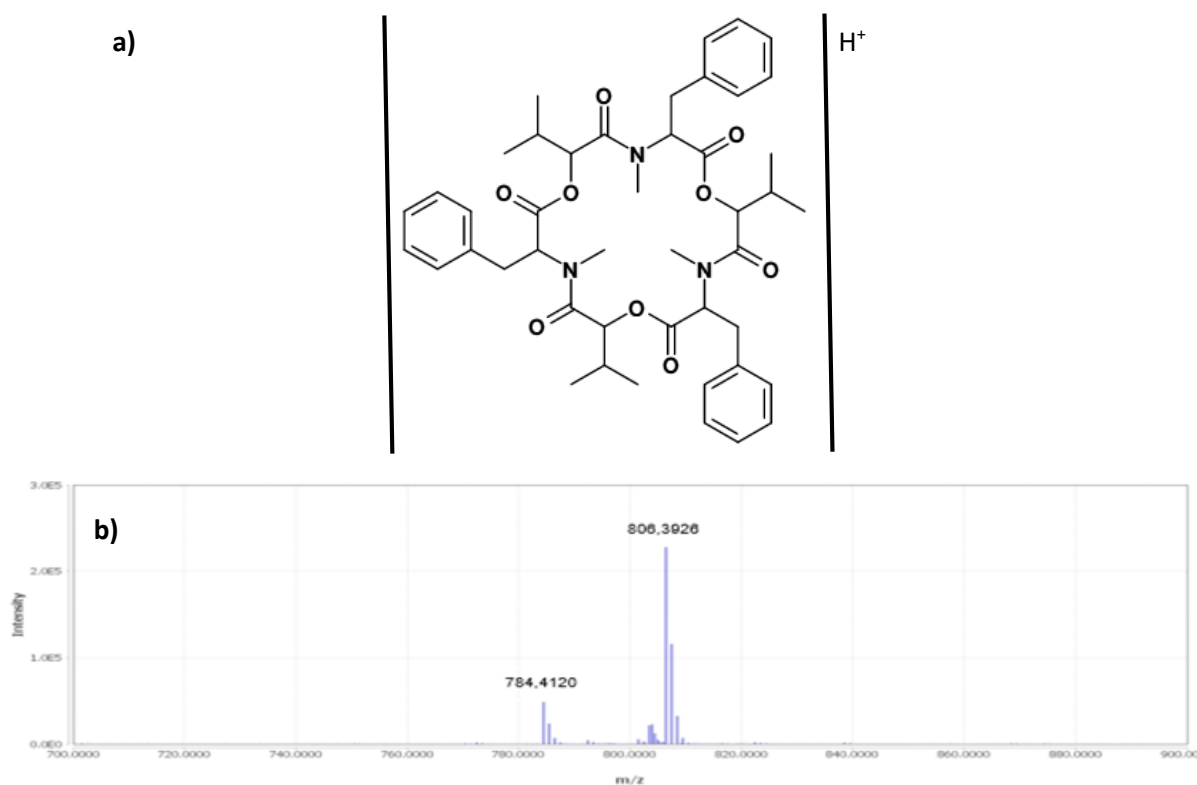


Os jasmonatos, principalmente o ácido jasmônico, são conhecidos como fitohormônios e agem como sinalizadores, induzindo uma resposta sistêmica, à ferimentos causados por herbívoros ou situações de estresse, como por exemplo, o ataque de um parasita e/ou praga em plantas (LÉON et al., 2001), o que pode caracterizar uma interação mutualística entre esse micro-organismo e a planta hospedeira, no caso, a *Senna spectabilis*, onde o fungo se beneficia dos exsudatos

(nutrientes) liberados pela planta, e a planta se beneficia mantendo os genes responsáveis pela produção de compostos de defesa sempre ativos, levando uma resposta mais eficiente e rápida ao ataque de herbívoros e/ou pragas. Além de que, as plantas tem o potencial de esterificar o ácido jasmônico tornando o composto mais volátil. Assim são carregados pelo vento, atingindo outras plantas, que entendem esse sinal e também começam a produzir compostos de defesa, mesmo sem serem atacadas, assim já estão preparadas para responder à algum tipo de estresse, o que pode garantir a sobrevivência da espécie.

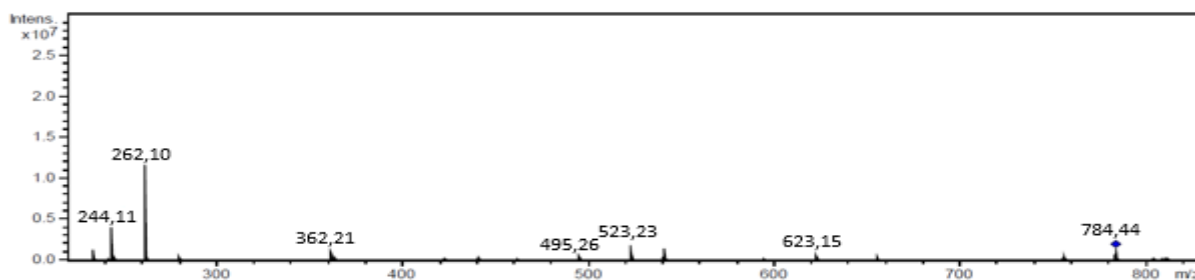
O composto 7 apresentou m/z 784,4120, referente ao íon protonado, e m/z 806,3926, referente ao molécula sodiada, e foi sugerido pelo banco de dados como a beauvericina, com erro em ppm de 4,81, como mostra a Figura 38.

Figura 38: a) Sugestão encontrada no banco de dados para o composto de m/z 784,4120; b) espectro de massas do composto 7, obtido por CLAE-QTOF.



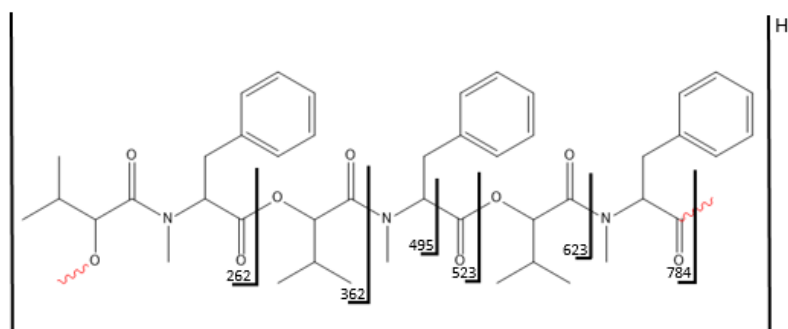
Realizou-se um experimento de EM^2 do composto 7, a fim de justificar a estrutura sugerida pelo banco de dados, como mostra a Figura 39.

Figura 39: Espectro de EM² do composto 7, obtido por CLAE-IONTRAP.



O espectro do composto 7 apresentou semelhança com a proposta de fragmentação para beauvericina, justificando a sugestão dada pelo banco de dados (Figura 40).

Figura 40: Proposta de fragmentação do composto sugerido pelo banco de dados para o composto 7.



A beauvericina é um depsipeptídeo cíclico que contém três resíduos de *N*-metilfenilalanil e três ácido *D*-hidroxi-isovalérico em sequência alternada, conhecida como uma importante micotoxina produzida por diferentes espécies de *Fusarium*, possui atividade inseticida, antibiótica contra bactérias gram positivas e citotóxica relatada pela literatura (WANG et al., 2012).

A Tabela 07, sumariza os compostos identificados para o *Fusarium oxysporum*, por CLAE-EM, com os respectivos erros em ppm, e referências dos compostos propostos.

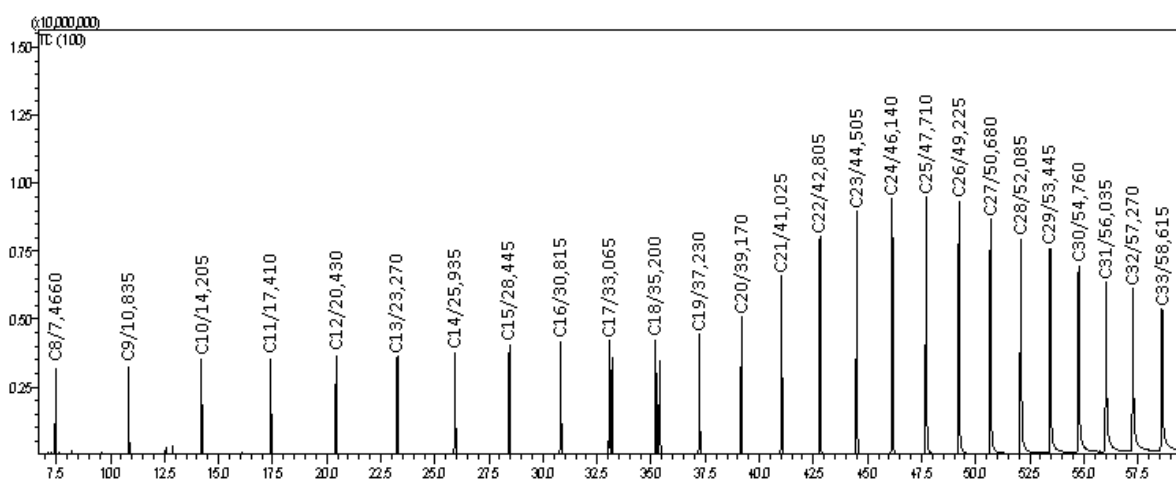
Tabela 07: Compostos identificados por CLAE-QTOF para o fungo *Fusarium oxysporum*.

Linagem	Formula molecular	m/z calculada	m/z encontrado	Erro (ppm)	Referência
<i>F. oxysporum</i>	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	196,0970	196,0965	2,56	Bani, M. et al., 2014.
	C ₁₀ H ₁₁ NO ₂	178,0865	178,0860	2,81	Bani, M. et al., 2014.
	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	180,1021	180,1022	0,56	Bani, M. et al., 2014.
	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	211,1329	211,1315	6,29	Mierscha, O. et al., 1999.
	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	194,1177	194,1166	5,67	Bani, M. et al., 2014.
	C ₁₉ H ₃₁ NO ₄	338,2323	338,2356	9,75	Mierscha, O. et al., 1999.
	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	784,4158	784,4120	4,81	Moretti, A et al., 2002.

4.6.1.1. Identificação dos constituintes voláteis por índice de retenção e espectrometria de massas (CG-EM).

Para a identificação dos constituintes voláteis de *F. oxysporum*, foi calculado o índice de retenção de cada constituinte usando a equação de VAN DEN DOOL E KRATZ (equação 1), tendo como referência uma série homóloga de alcanos (C₈-C₄₀), cromatograma apresentado na Figura 41.

Figura 41: Análise de hidrocarbonetos C8-C40 em CG-EM.

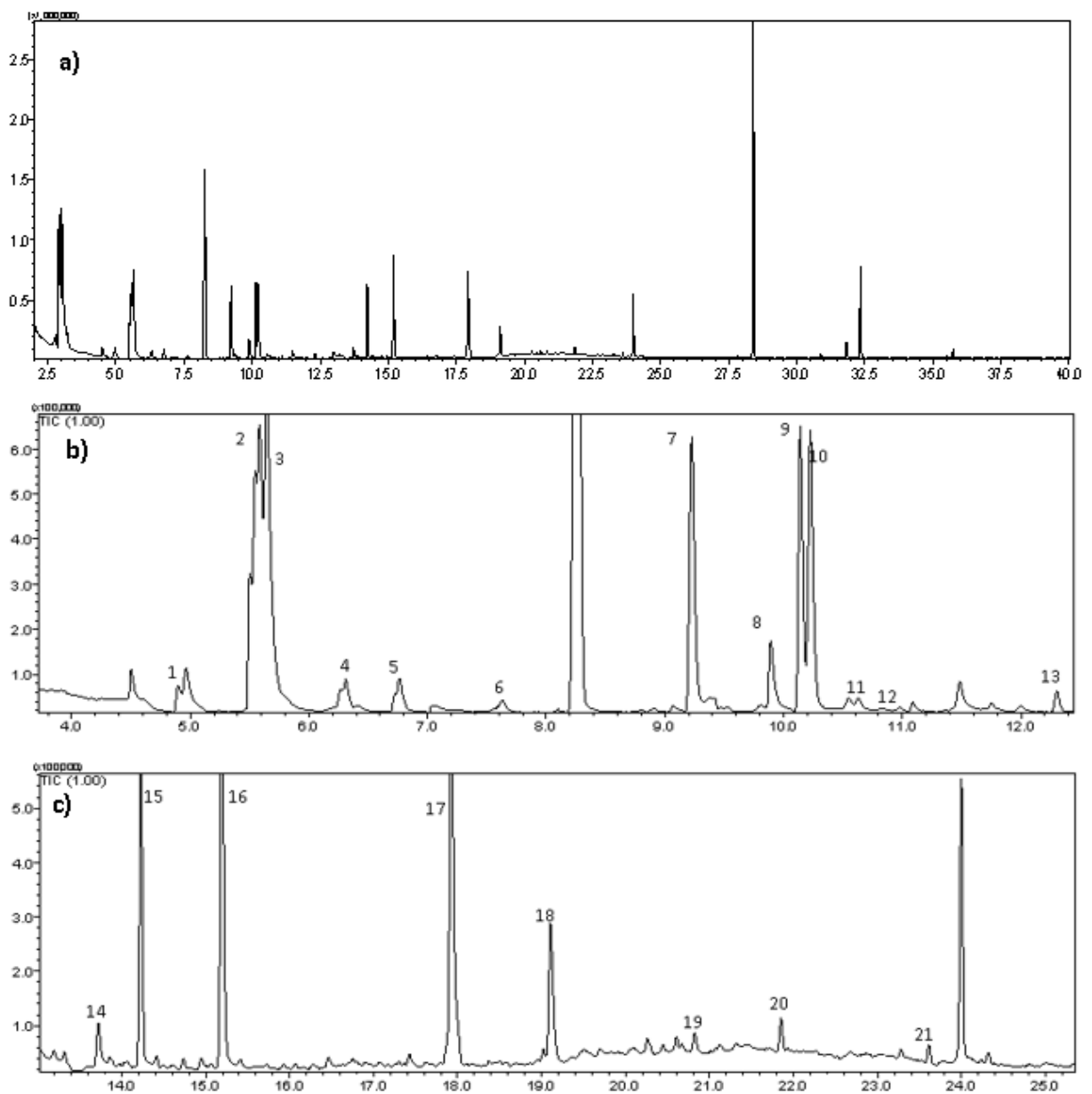


O índice de retenção é o número obtido pela interpolação do tempo de retenção do componente de interesse com os tempos de retenção de dois padrões da série homóloga de alcanos eluídos imediatamente antes e após o componente de interesse, calculado o IR, a identificação do composto foi proposta comparando com o índice de retenção da literatura (NIST), e confirmada quando a comparação do espectro de

massas obtido com o da literatura resultou em mais de 85% de similaridade e o padrão de fragmentação de cada composto foi proposto.

A comparação dos dados de índice de retenção e espectros de massas experimentais com os dados da literatura possibilitaram a identificação de 21 constituintes voláteis de *Fusarium oxysporum*, como mostra a Figura 42.

Figura 42: a) perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de *F. oxysporum*, b) ampliação do perfil cromatográfico (4,0 a 12,5 min); c) ampliação do perfil cromatográfico (12,5 a 25,0 min).



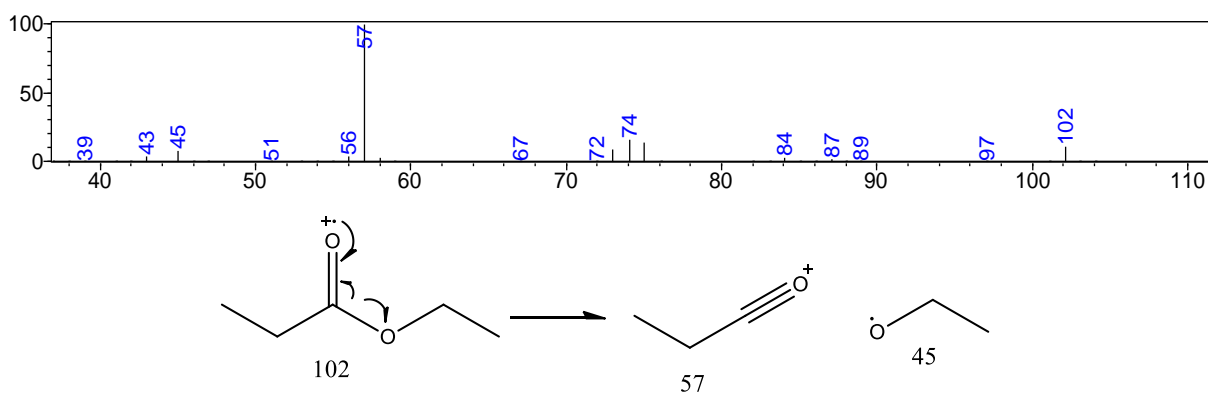
Entre esses constituintes encontram-se, álcoois, ésteres e cetonas, mostrados na Tabela 08.

Tabela 08: Proposta de identificação dos constituintes voláteis de *F. oxysporum*.

Picos	tR (min)	CAS	IR (exp)	IR (Lit)	Similaridade	Identificação
1	4,898	105 - 37 - 3	-	714	97%	propanoato de etila
2	5,500	123 - 51 - 3	-	734	98%	3-metilbutanol
3	5,584	137 - 32 - 6	-	736	95%	2-metilbutanol
4	6,298	97 - 62 - 1	-	756	95%	Isobutirato de etila
5	6,761	110 - 19 - 0	-	767	95	etanoato de isobutila
6	7,605	105-54-4	804	803	96%	butanoato de etila
7	9,220	7452-79-1	852	850	96%	2-metil-butaoato de etila
8	9,900	111-27-3	872	874	98%	1-hexanol
9	10,140	123-92-2	879	878	98%	etanoato de isopentila
10	10,225	624-41-9	882	882	97%	etanoato de 2-metilbutila
11	10,615	110-43-0	893	893	90%	2-heptanona
12	10,955	627-59-8	904	-	93%	5-metil-2-hexanol
13	12,305	5837-78-5	944	949	93%	2-metil-2-butenoato de etila
14	13,865	106-68-3	990	989	89%	3-octanona
15	14,235	142-92-7	1017	1017	95%	etanoato de hexila
16	15,247	104-93-8	1023	1024	92%	1-metoxi-4-metilbenzeno
17	17,930	1515-95-3	1116	1122	98%	1-metoxi-4-etilbenzeno
18	19,115	123-07-9	1170	1168	95%	4-etilfenol
19	20,820	112-14-1	1214	1214	91%	etanoato de octila
20	21,855	101-97-3	1250	1249	95%	etil fenilacetato
21	23,610	143-13-5	1313	1313	92%	etanoato de nonila

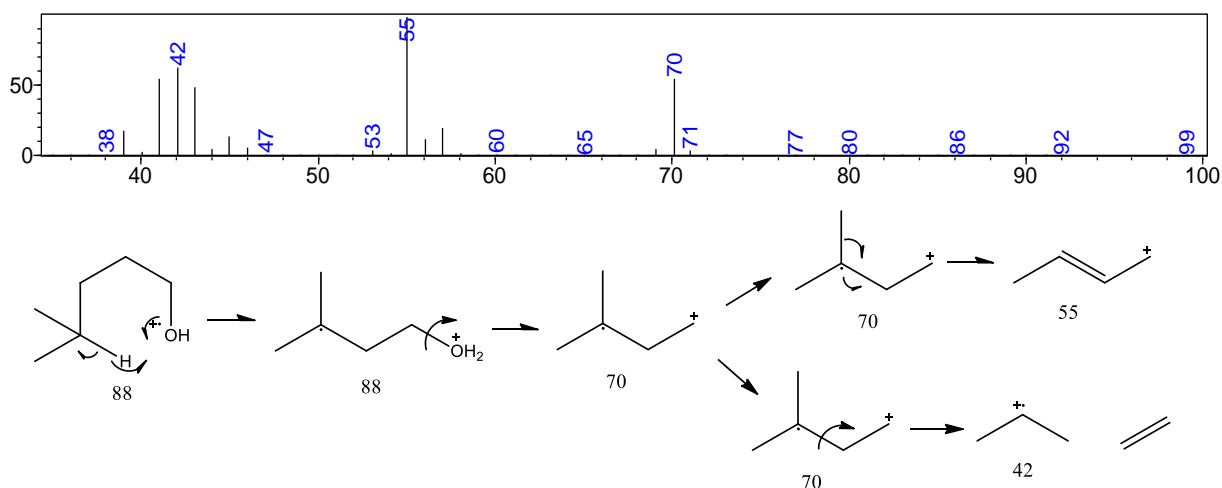
Para os cinco primeiros compostos não foi possível calcular o índice de retenção (IR) devido que o tempo de retenção desses compostos serem menores que o primeiro hidrocarboneto (C8), portanto, suas estruturas foram confirmadas avaliando somente o padrão de fragmentação. Para os demais compostos, foi calculado o índice de retenção (IR exp.) e comparado com o IR da literatura, e confirmada também avaliando o padrão de fragmentação.

Figura 43: Proposta de fragmentação do propanoato de etila (composto 1).



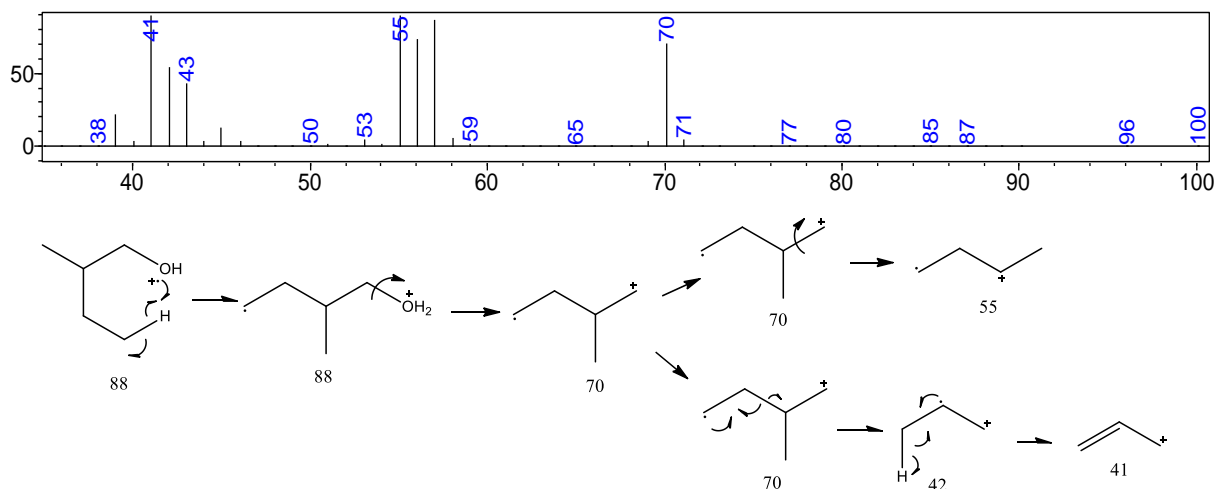
É possível observar uma quebra homolítica alfa a carbonila, formando o íon *acilium* de m/z 57, fragmento bem comum para essa classe de compostos.

Figura 44: Proposta de fragmentação do 3-metilbutanol (composto 2).



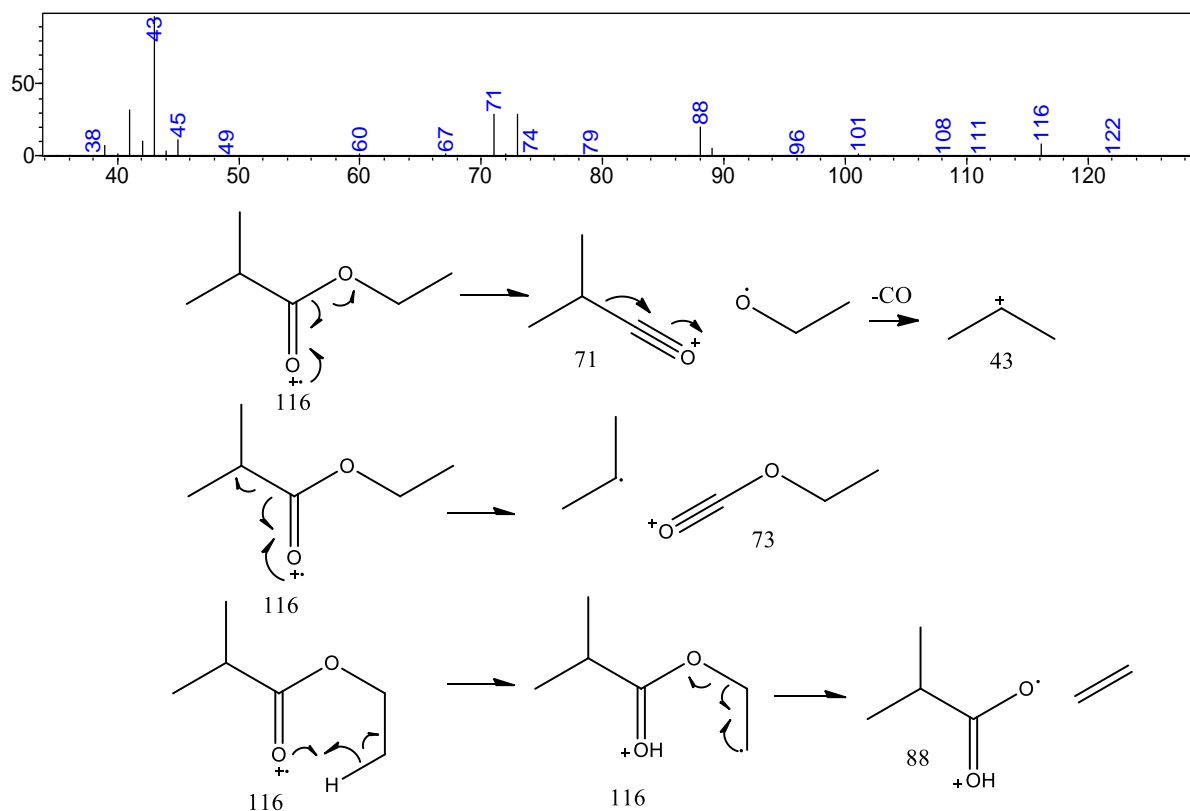
Neste composto ocorre um rearranjo de McLafferty, seguida de uma clivagem heterolítica alfa a hidroxila (saída de H_2O), formando o íon de m/z 70, ocorrendo a saída de uma metila e formação do íon alílico de m/z 55 (estável), e a formação do íon de m/z 42, devido a clivagem heterolítica do íon de m/z 70.

Figura 45: Proposta de fragmentação do 2-metilbutanol (composto 3).



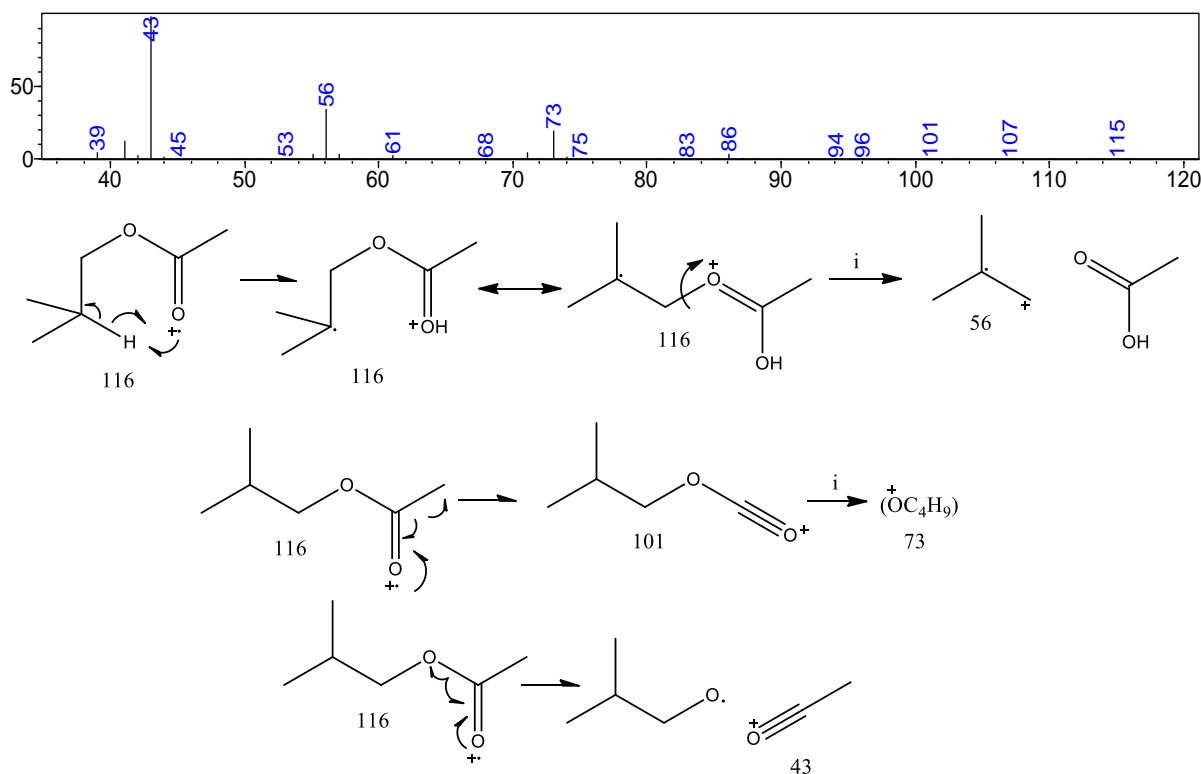
Mais uma vez ocorre o rearranjo de McLafferty e a desidratação formando o íon de m/z 70, seguida de clivagens homolítica e heterolítica, formando os íons de m/z 43 e 55, respectivamente, fragmentos comuns ao composto anterior, mas para este composto nota-se a formação de um íon alílico de m/z 41, que para este composto é mais intenso que o íon de m/z 42, o que distingue os dois compostos.

Figura 46: Proposta de fragmentação do isobutirato de etila (composto 4).



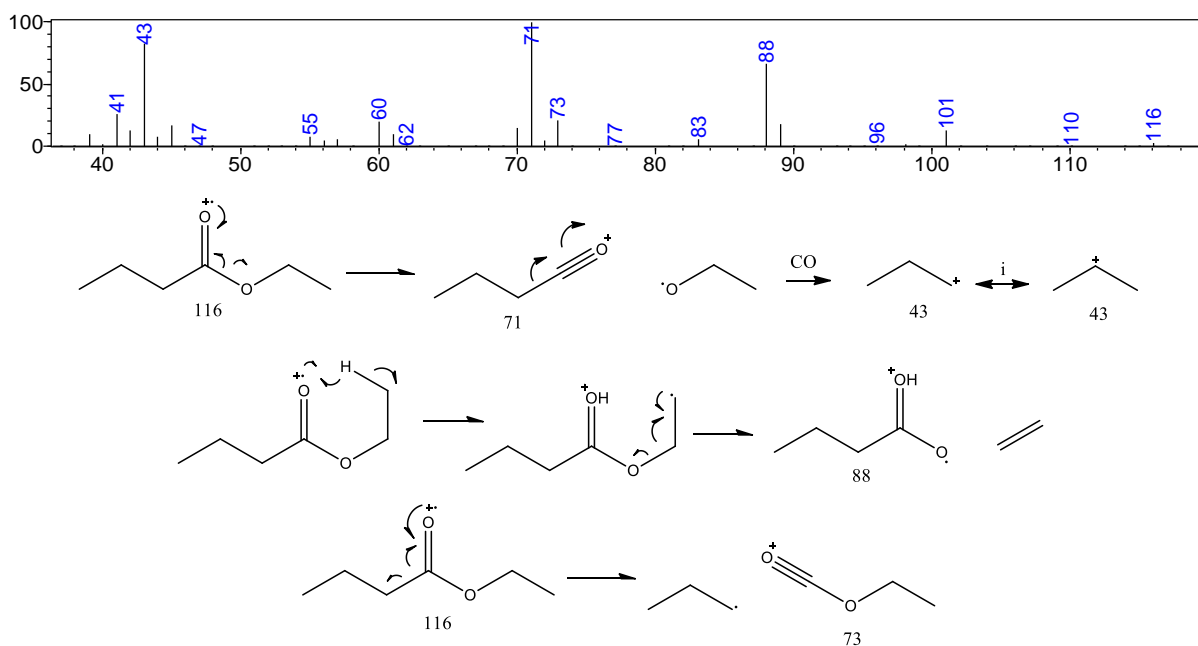
Neste composto ocorre clivagens homolíticas alfa a carbonila, formando os íons de m/z 71 e 73, podendo ocorrer uma clivagem heterolítica e a saída de monóxido de carbono (CO) para a formação do íon de m/z 43, devido a presença de hidrogênio gama a carbonila, pode ocorrer o rearranjo de McLafferty e posterior clivagem homolítica beta a carbonila, formando o íon de m/z 88 e molécula neutra (eteno).

Figura 47: Proposta de fragmentação do etanoato de isobutila (composto 5).



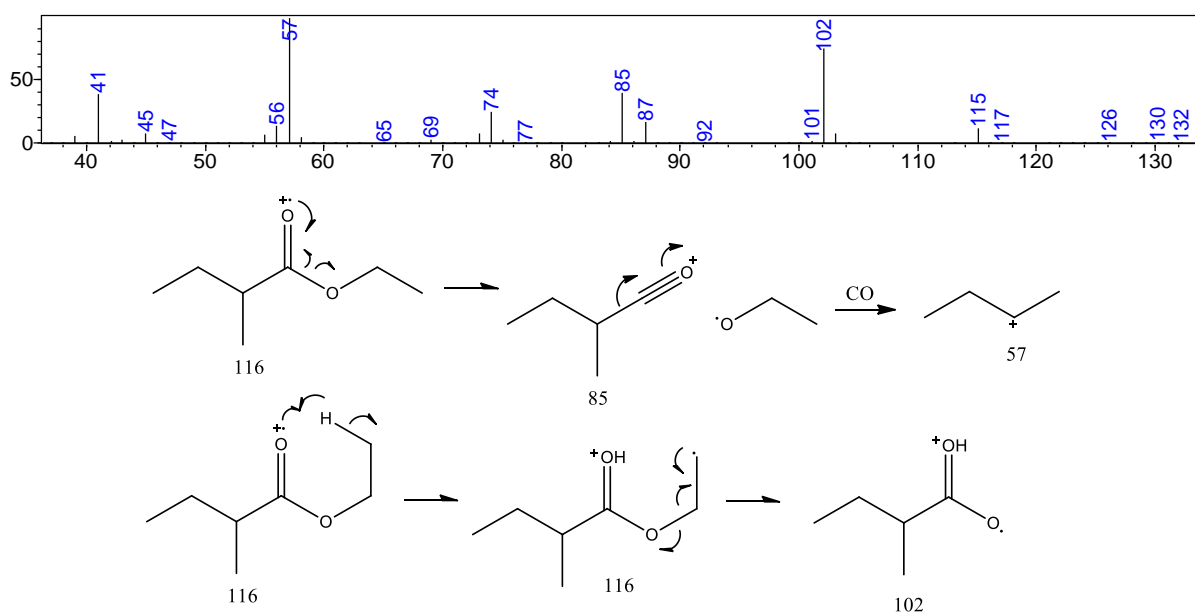
Nota-se neste composto mais uma vez a presença de hidrogênios gama a carbonila, podendo então ocorrer o rearranjo de McLafferty, seguida de uma clivagem heterolítica alfa a carbonila e a formação do íon de m/z 56. Ocorre também uma clivagem homolítica alfa a carbonila, formando os íons 43 e 101, neste último íon pode ocorrer a formação do íon de m/z 73.

Figura 48: Proposta de fragmentação do etanoato de butila (composto 6).



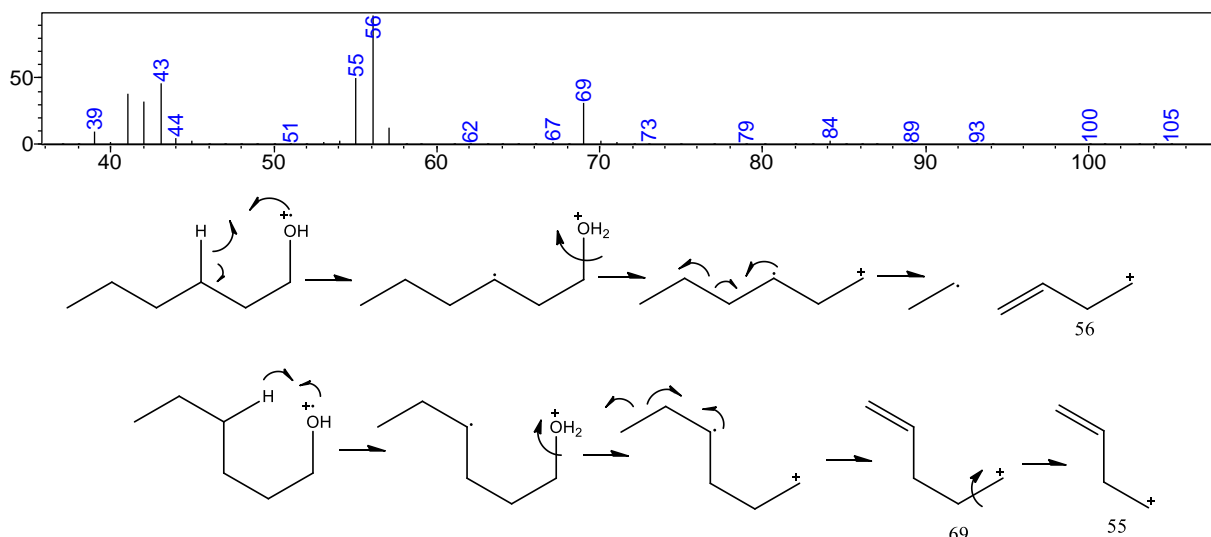
Para este composto é possível observar o íon de m/z 71, mais abundante, que é formado pela clivagem homolítica alfa a carbonila, podendo ocorrer também uma clivagem heterolítica (perda de monóxido de carbono) e a formação do íon de m/z 43, é possível notar outra clivagem homolítica alfa a carbonila, formando o íon de m/z 73, como este composto também apresenta hidrogênio gama a carbonila observa-se o íon de m/z 88, formado a partir do rearranjo de McLafferty seguida de uma clivagem homolítica beta a carbonila.

Figura 49: Proposta de fragmentação do 2-metilbutanoato de etila (composto 7).



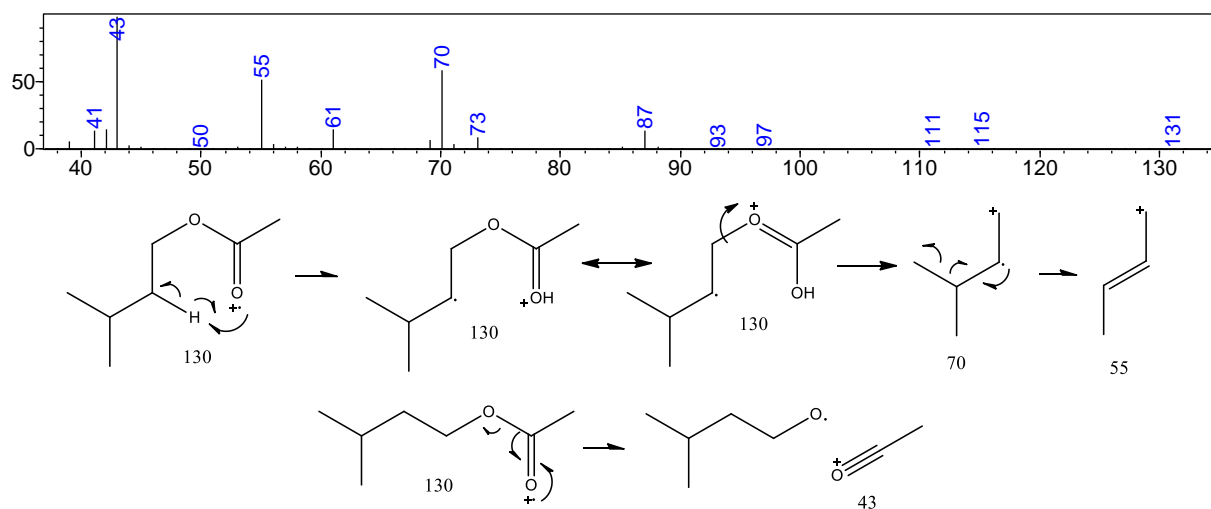
A formação do íon de m/z 102 é justificada pelo rearranjo de McLafferty seguida de uma clivagem homolítica beta a carbonila, muito comum de ocorrer em compostos desta classe, já o íon de m/z 85 ocorre devido a clivagem alfa a carbonila, em seguida pode ocorrer a perda de monóxido de carbono e a formação do íon de m/z 57.

Figura 50: Proposta de fragmentação do hexanol (composto 8).



Neste composto são observados fragmentos da parte alquílica deste composto, como os íons de m/z , 55, 56 e 69, devido às configurações do espectrômetro de massas, não foi possível observar o íon de m/z 31 ($\text{CH}_2=\text{OH}^+$) bem comum em álcoois alifáticos.

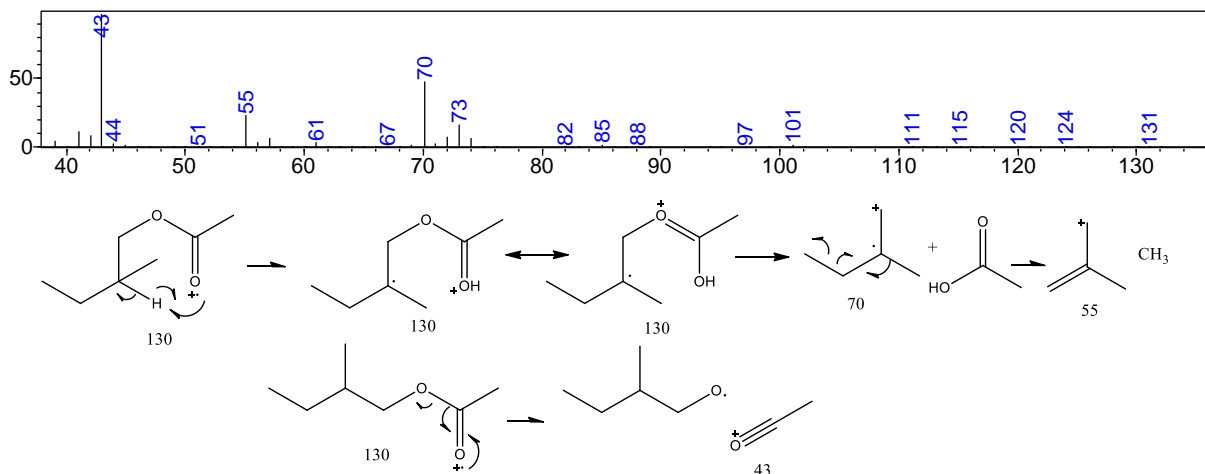
Figura 51: Proposta de fragmentação do etanoato de isopentila (composto 9).



Neste composto ocorre o rearranjo de McLafferty seguida de clivagem heterolítica beta a carbonila formando o íon de m/z 70 podendo em seguida ocorrer

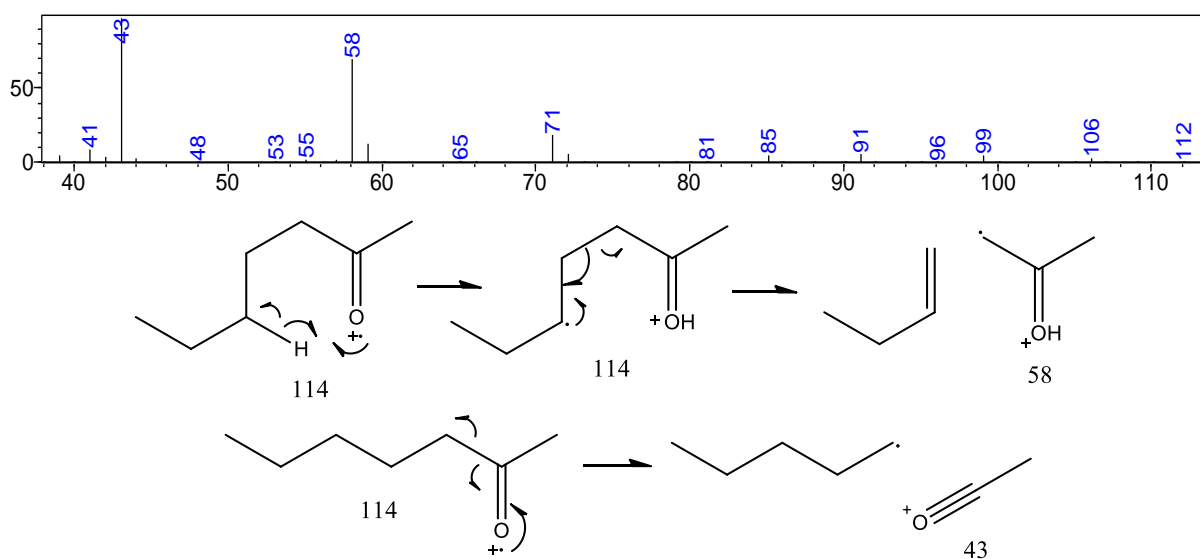
uma clivagem homolítica (perda de metila) para formação do íon alílico de m/z 55, já o íon de m/z 43 é explicada pela clivagem homolítica alfa a carbonila (fragmento comum em etanoatos).

Figura 52: Proposta de fragmentação do etanoato de 2-metilbutila (composto 10).



Nota-se a semelhança do padrão de fragmentação desse composto com o seu isômero de posição (composto 9), diferenciando somente na abundância do íon de m/z 55, que neste composto tem menor abundância, devido a ocorrência do carbocátion primário, menos estável, do que o carbocátion secundário, formado no composto anterior.

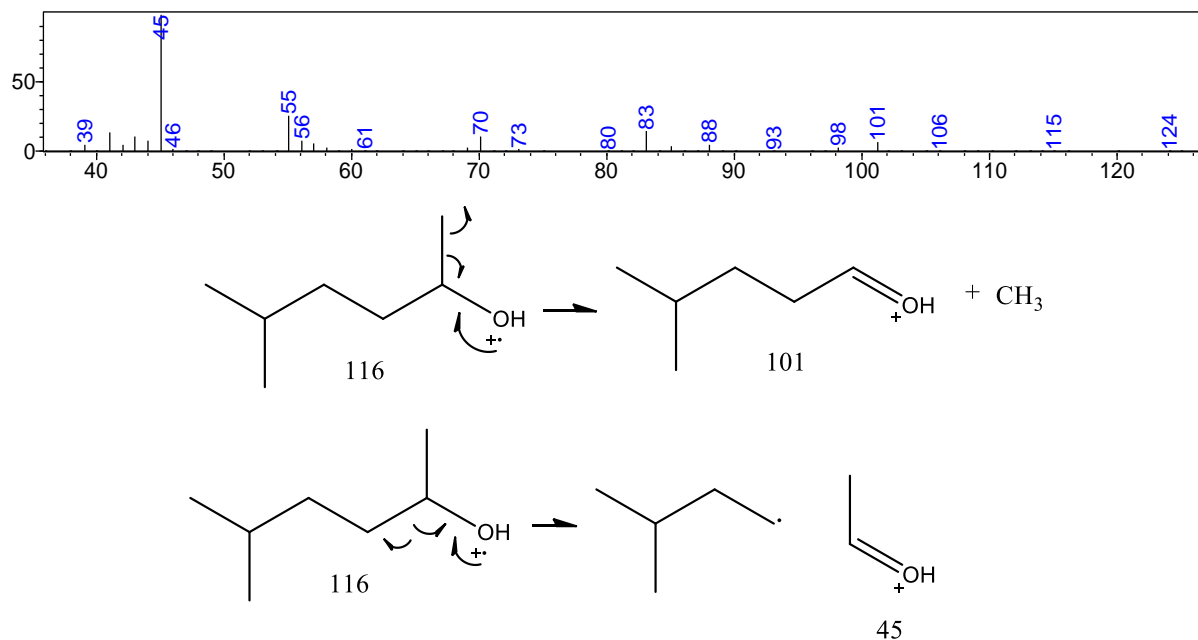
Figura 53: Proposta de fragmentação do 2-heptanona (composto 11).



A formação do íon de m/z 58 é explicado pelo rearranjo de McLafferty seguida de uma clivagem homolítica beta a carbonila, já a formação do íon mais estável de

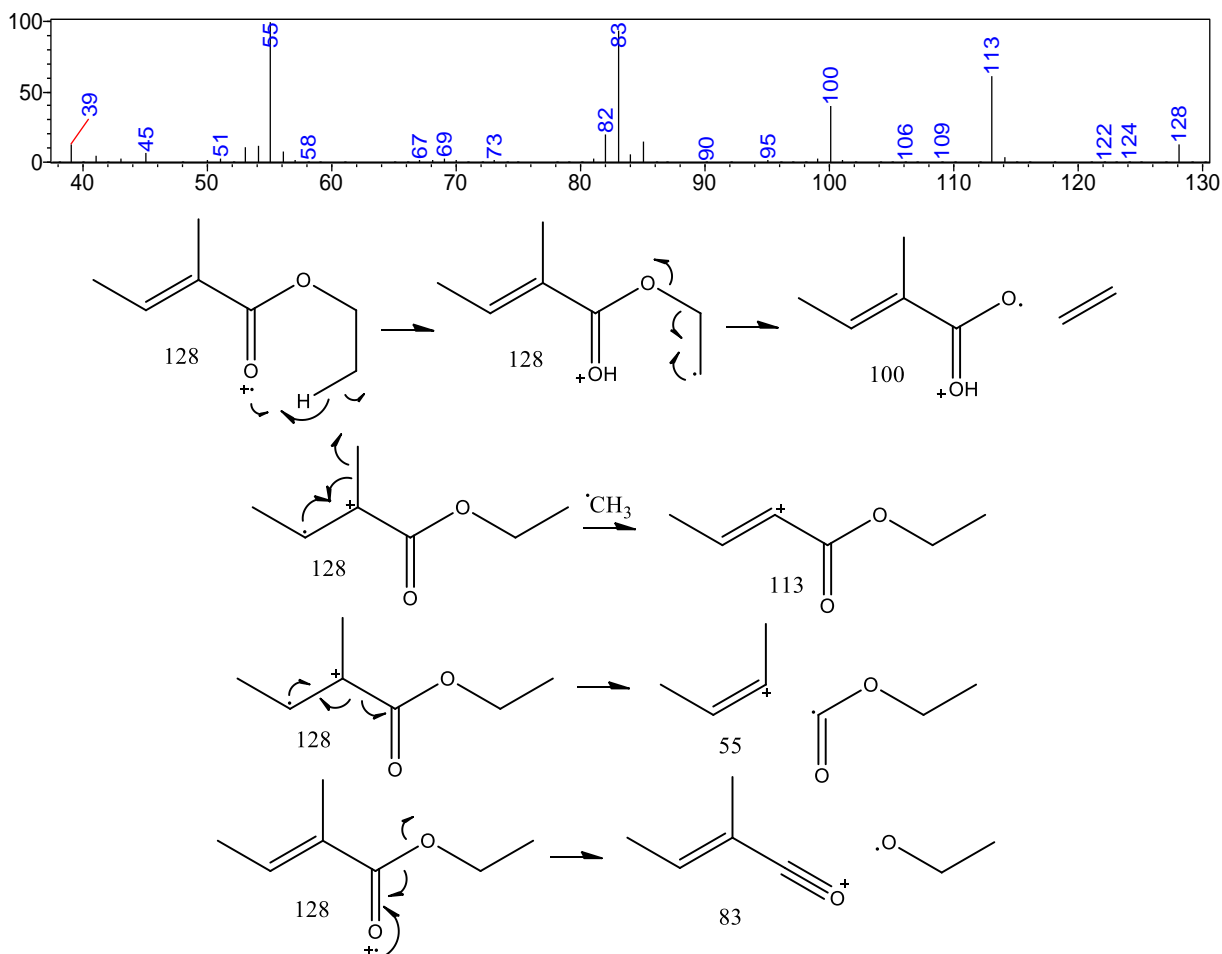
m/z 43 ocorrem devido à uma clivagem homolítica alfa a carbonila, comum em cetonas e ésteres.

Figura 54: Proposta de fragmentação do 5-metil-2-hexanol (composto 12).



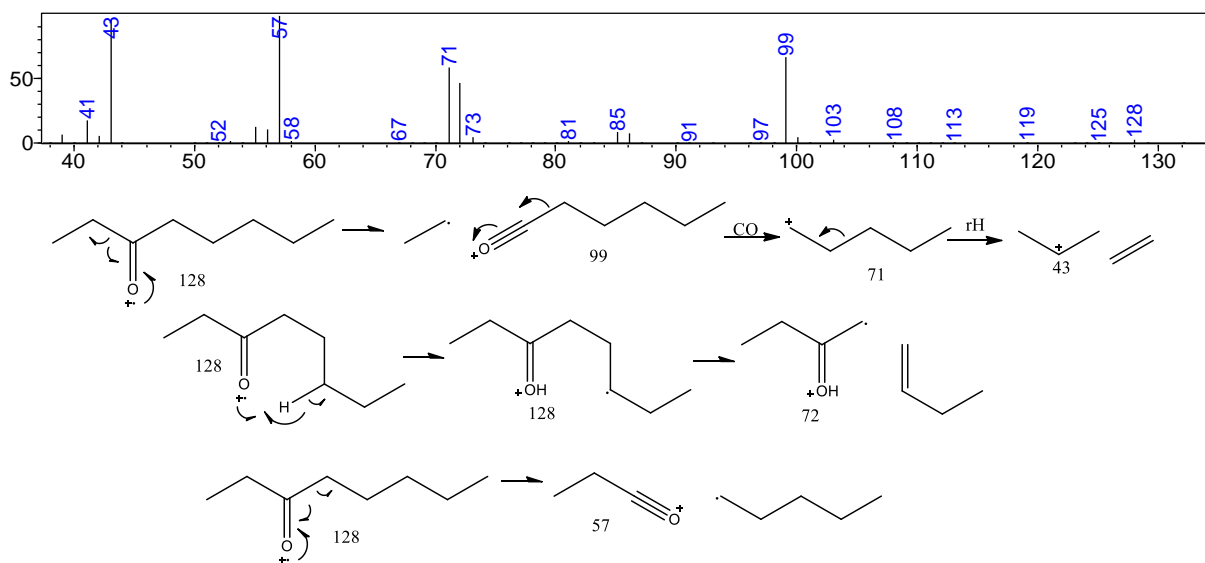
Nessa molécula ocorrem duas clivagens beta a hidroxila: uma que provoca a perda da metila, formando o íon de m/z 101 e outra formando o íon de m/z 45. A maior intensidade do íon de m/z 45 é explicado pelo fato que o radical $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\cdot$ é mais estável do que o radical $\cdot\text{CH}_3$ (quanto maior o número de ligações mais estados vibracionais o radical possui podendo absorver melhor a energia).

Figura 55: Proposta de fragmentação do 3-metil-2-butenato de etila (composto 13).



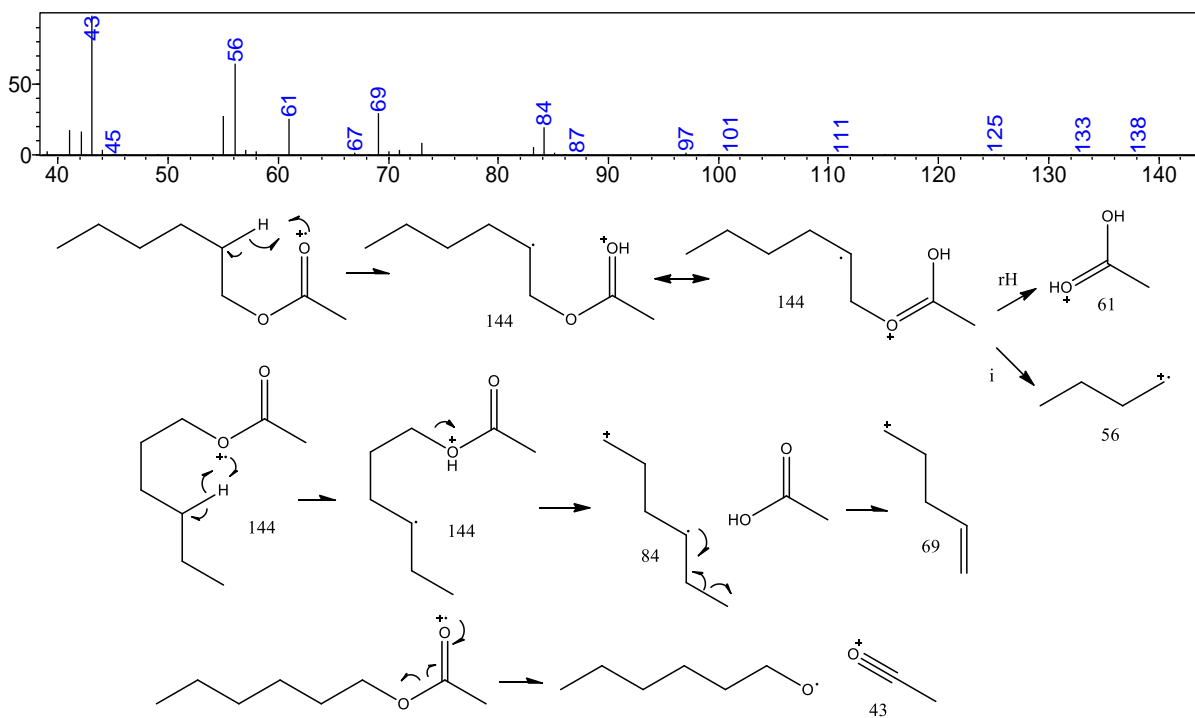
A clivagem homolítica alfa à carbonila forneceu os íons de m/z 83 e 55. A clivagem homolítica beta a carbonila e perda da metila forneceu o íon de m/z 113, enquanto que o rearranjo de McLaffert e posterior clivagem homolítica gerou o íon de m/z 100.

Figura 56: Proposta de fragmentação do 3-octanona (composto 14).



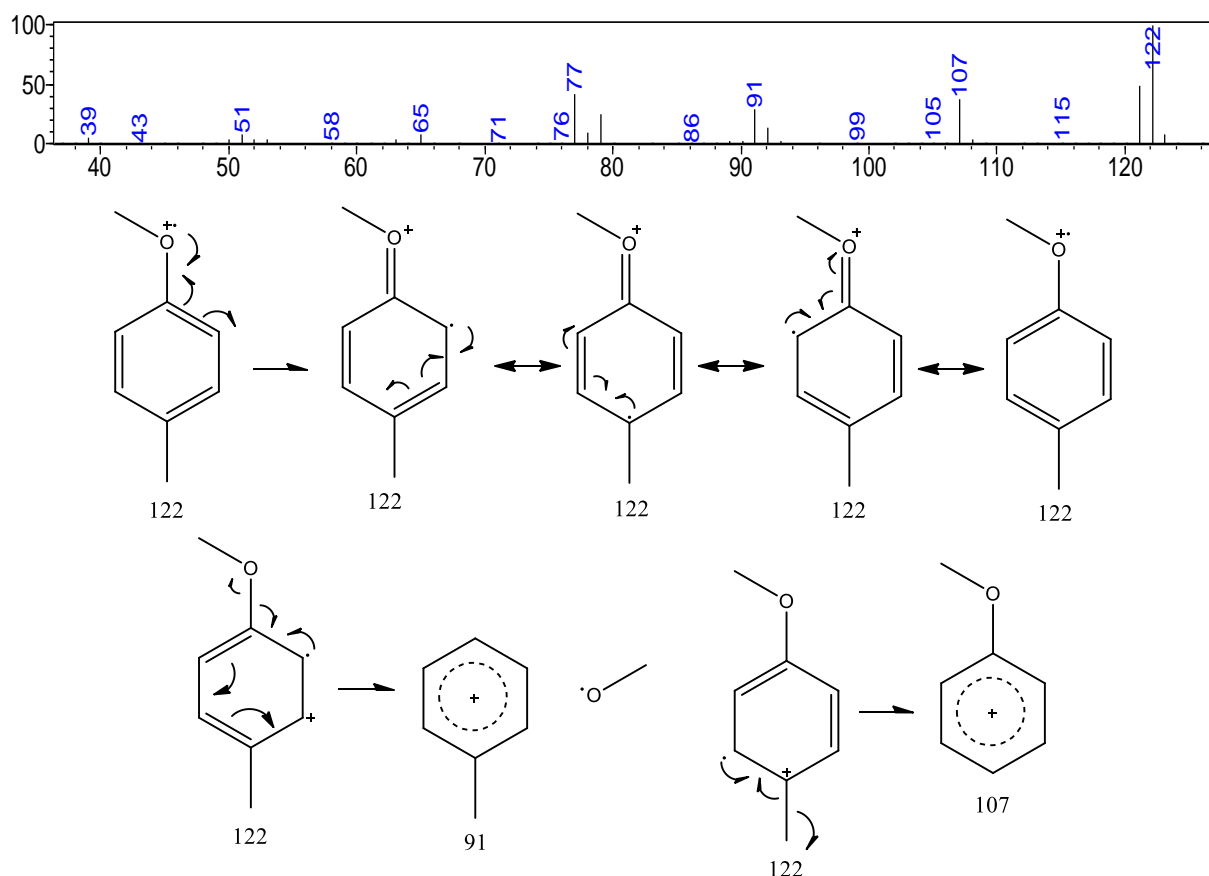
A formação dos íons de m/z 57 e 99 é formado pela clivagem homolítica alfa a carbonila (uma de cada lado da carbonila), podendo ocorrer a saída de monóxido de carbono e a formação do íon de m/z 71, seguida de clivagem heterolítica (saída de eteno) e a formação do íon de m/z 43, já o íon de m/z 72 é explicada pelo rearranjo de McLafferty, seguida de uma clivagem homolítica beta a carbonila.

Figura 57: Proposta de fragmentação de etanoato de hexila (composto 15).



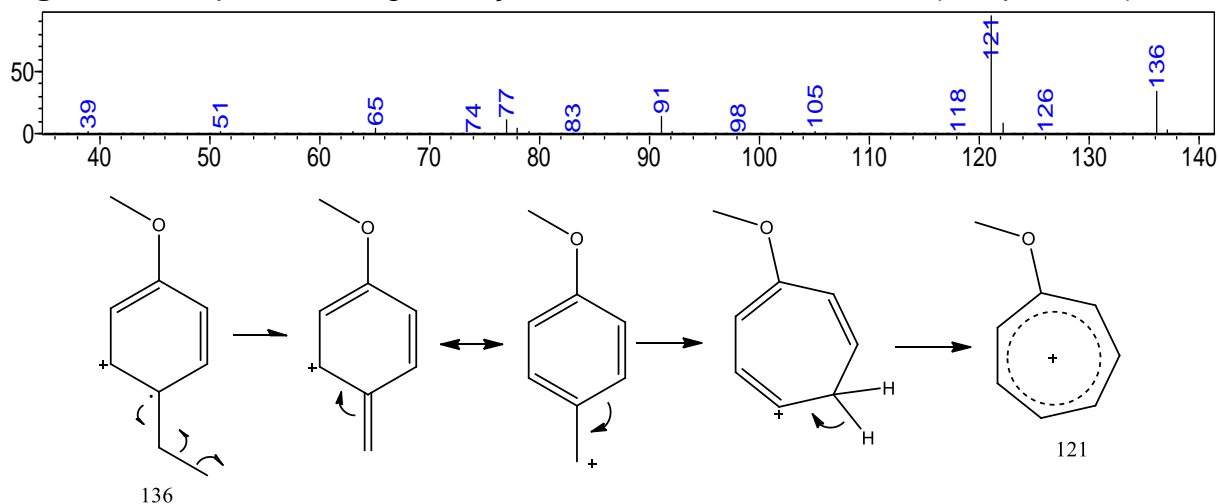
Os íons de m/z 56, 61 são formados pelo rearranjo de McLafferty. O íon de m/z 84 é formado pelo rearranjo de McLafferty seguido de uma clivagem heterolítica beta a carbonila. O íon de m/z 69 é formado pela clivagem homolítica e a saída de uma metila do íon de m/z 84. O íon de m/z 43 é formado pela clivagem homolítica alfa a carbonila, característico dessa classe de composto.

Figura 58: Proposta de fragmentação de 1-metoxi-4-metilbenzeno (composto 16).



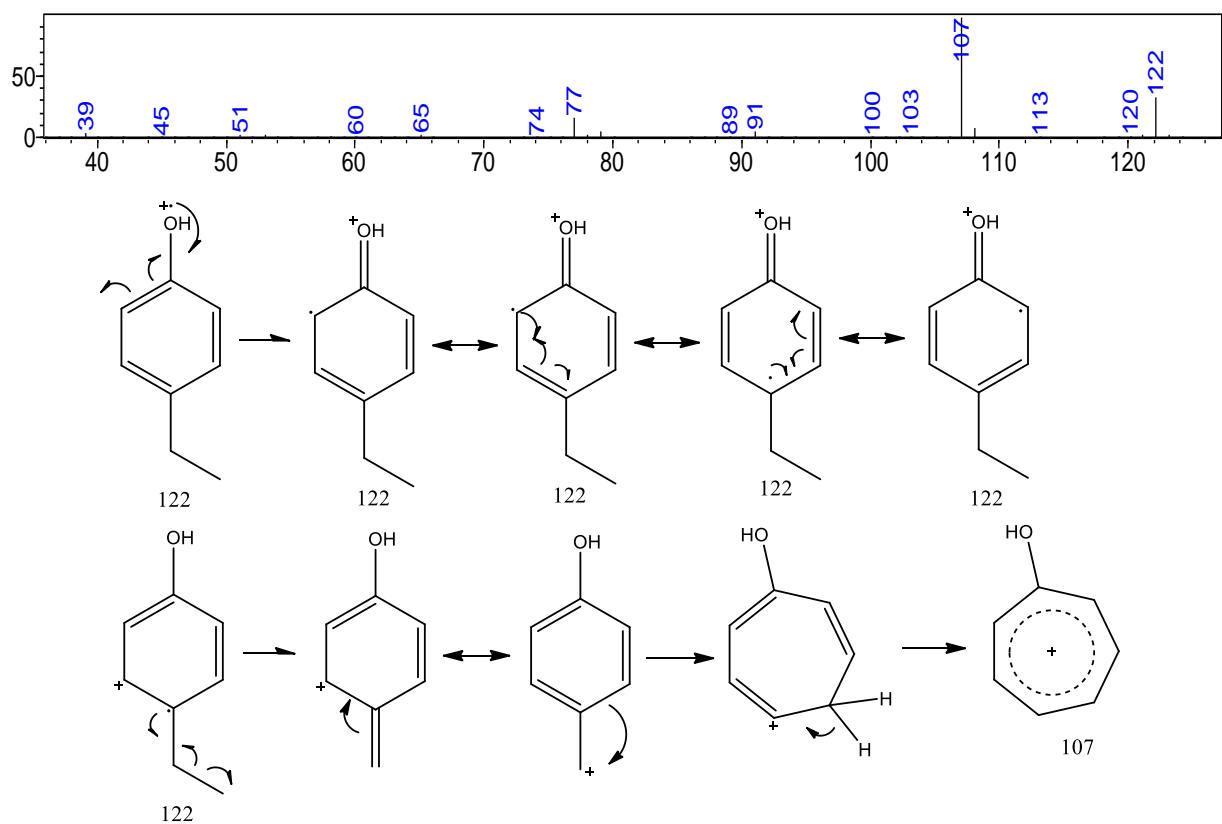
Nota-se a presença do íon molecular de m/z 122 com elevada abundância, que é explicado pela alta estabilidade devido a presença de quatro estruturas de ressonância (comuns de compostos aromáticos), e os íons de m/z 77, 91 e 107 que também são íons referência de compostos aromáticos.

Figura 59: Proposta de fragmentação de 1-metoxi-4-etilbenzeno (composto 17).



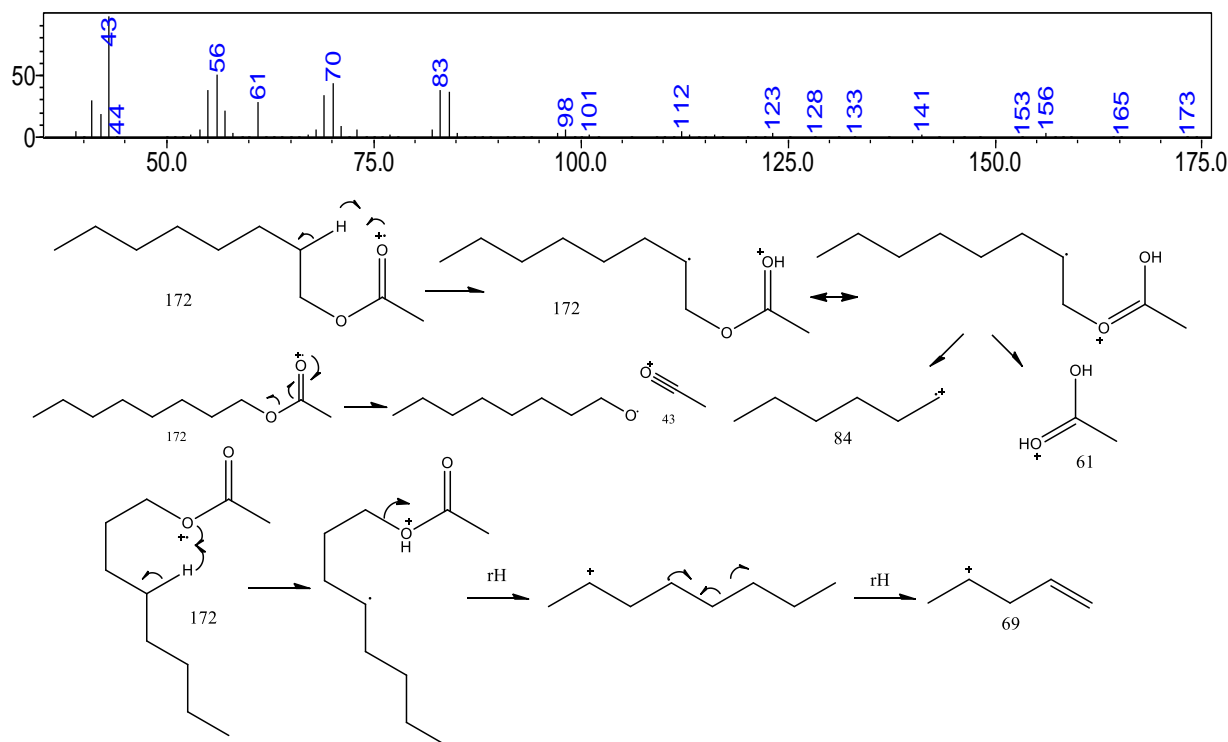
Mais uma vez é possível notar a presença do íon de m/z 77 e a presença do íon molecular de (m/z 136), característico de sistemas aromáticos, e a formação íon *tropilium* de m/z 121.

Figura 60: Proposta de fragmentação de 4-etilfenol (composto 18).



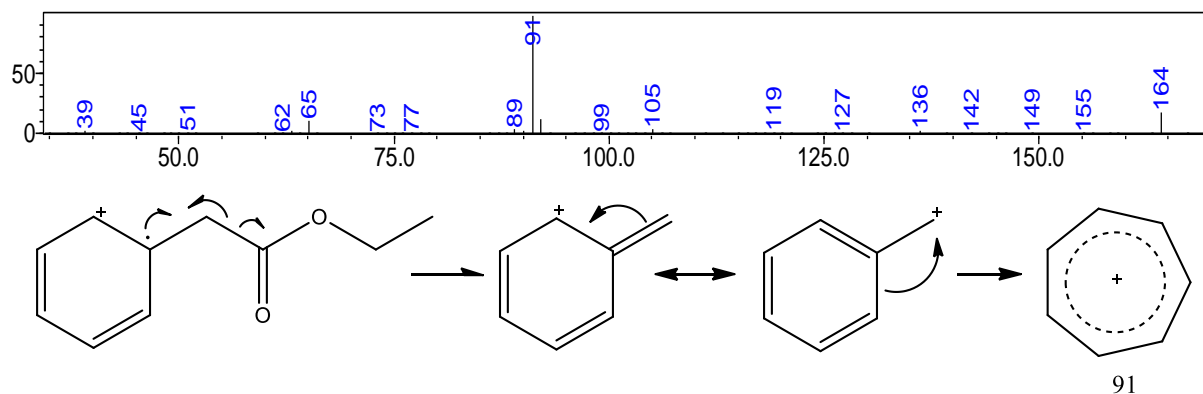
Para este composto nota-se mais uma vez os íons característicos de compostos aromáticos (íon molecular e o íon de m/z 77) e íon *tropilium* (m/z 107), muito estável.

Figura 61: Proposta de fragmentação de etanoato de octila (composto 19).



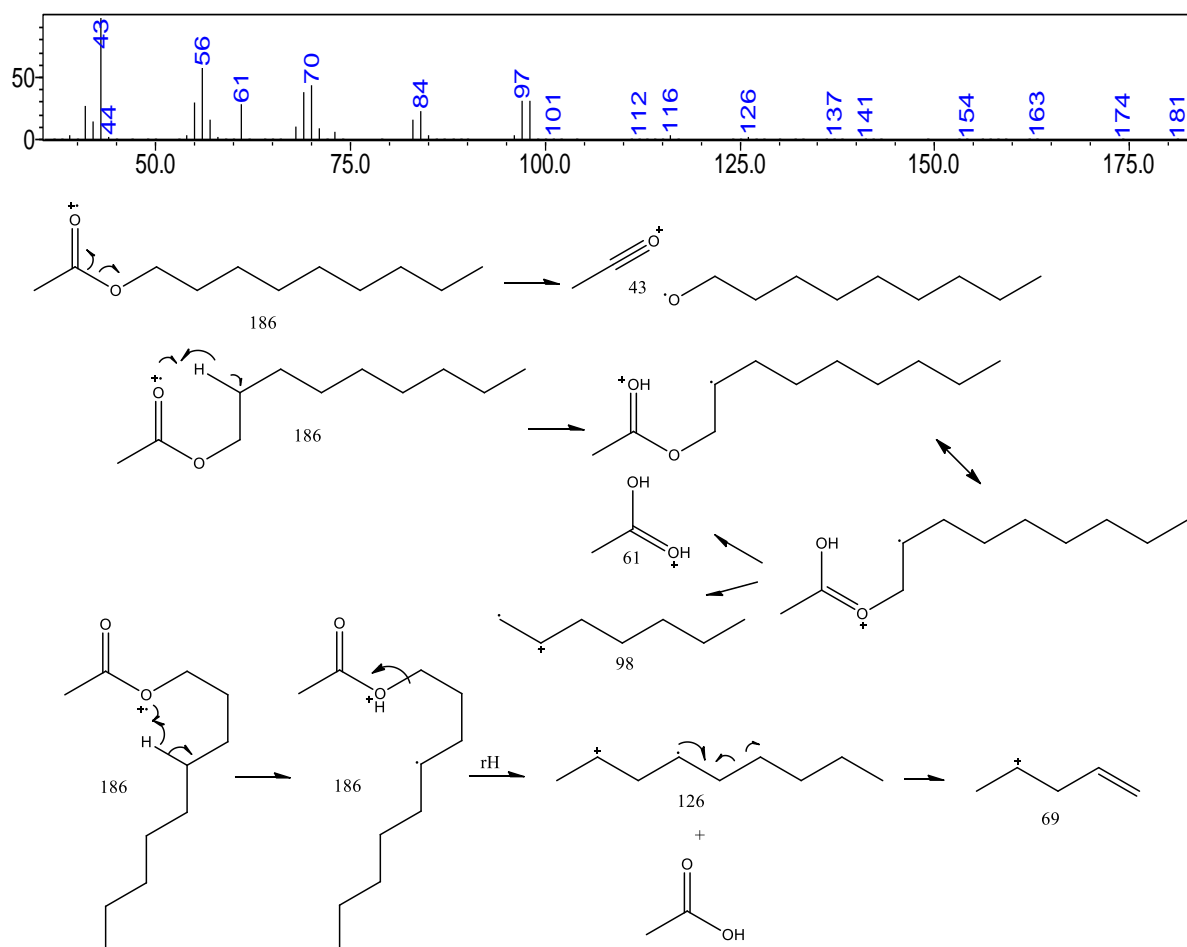
Os íons de m/z 84, 61 e 69 são explicados devido a presença de hidrogênios gama a carbonila o que possibilita ocorrer o rearranjo de McLafferty. O íon abundante de m/z 43 é formado pela clivagem homolítica alfa a carbonila (característico de etanoatos), enquanto que o íon de m/z 69 é formado pelo rearranjo de McLafferty seguido de uma clivagem heterolítica beta a carbonila, seguida de uma clivagem homolítica.

Figura 62: Proposta de fragmentação do fenilacetato de etila (composto 20).



Nota-se mais uma vez a presença do íon molecular (m/z 164) e a formação do íon *tropilium* (m/z 91) indicando mais uma vez que o composto possui um anel aromático.

Figura 63: Proposta de fragmentação do etanoato de nonila (composto 21).



Neste composto é possível notar o íon mais intenso de m/z 43, formado pela clivagem homolítica alfa a carbonila formando o íon *acilium*, característico de compostos dessa classe. Observa-se a presença de hidrogênios gama a carbonila ocorrendo então o rearranjo de McLafferty e a formação dos íons de m/z 69, 61 e 98.

Ainda é pouco conhecido o papel dos compostos voláteis em micro-organismos, o que se conhece é que podem inibir a germinação de esporos em um grande número de espécies fúngicas, ou serem tóxicos a outros micro-organismos, como por exemplo nematoides (RIGA et al., 2008), e sua atuação em plantas, como por exemplo quando sofrem ataque de um herbívoro liberam compostos voláteis, atraindo predadores naturais deste herbívoro (BALDWIN, 2010). Também utilizam dessa classe de compostos para atrair agentes polinizadores, como por exemplo, as coníferas liberam uma mistura de voláteis que atraem vespas que confundem esse aroma com o odor das lagartas, e enquanto as procuram nas flores, tornam-se agentes polinizadores (RAGUSO, 2008), e também podem utilizar desses compostos na comunicação com o exterior, provendo informações a outros organismos acerca da fisiologia da planta (UNSICKER et al., 2009). O que se pode afirmar é que são claramente um fator importante de comunicação e a compreensão dessa linguagem química é de grande valor, e já vem sendo utilizado no campo da agronomia em biocontrole de pragas.

As análises realizadas em duas técnicas cromatográficas diferentes (CLAE e CG) acopladas a espectrometria de massas (EM) tornaram possível a identificação de 28 compostos de diferentes classes e funções, que estão mostrados na Figura 64.

Figura 64: Compostos de *F. oxysporum* identificados neste trabalho.

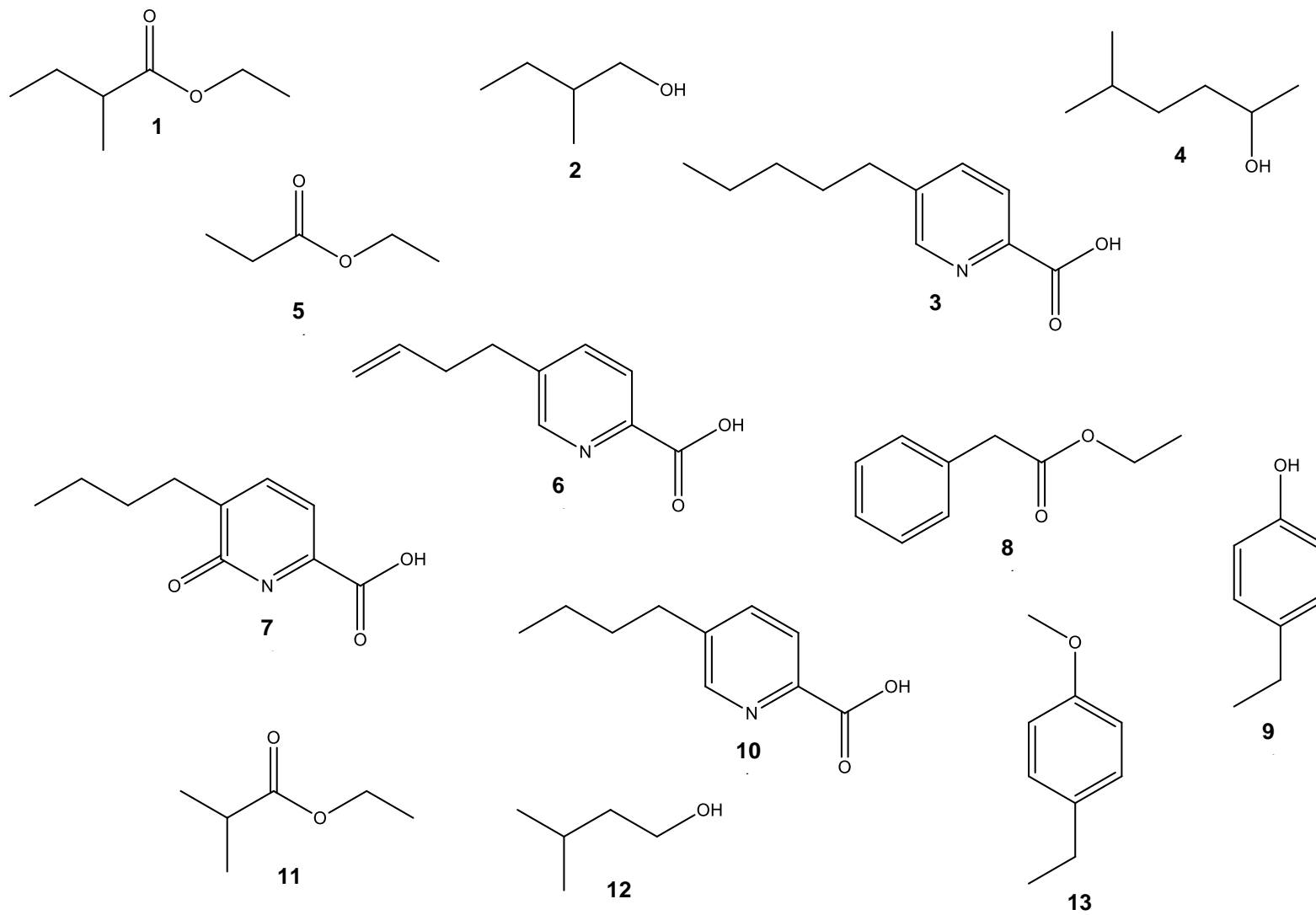
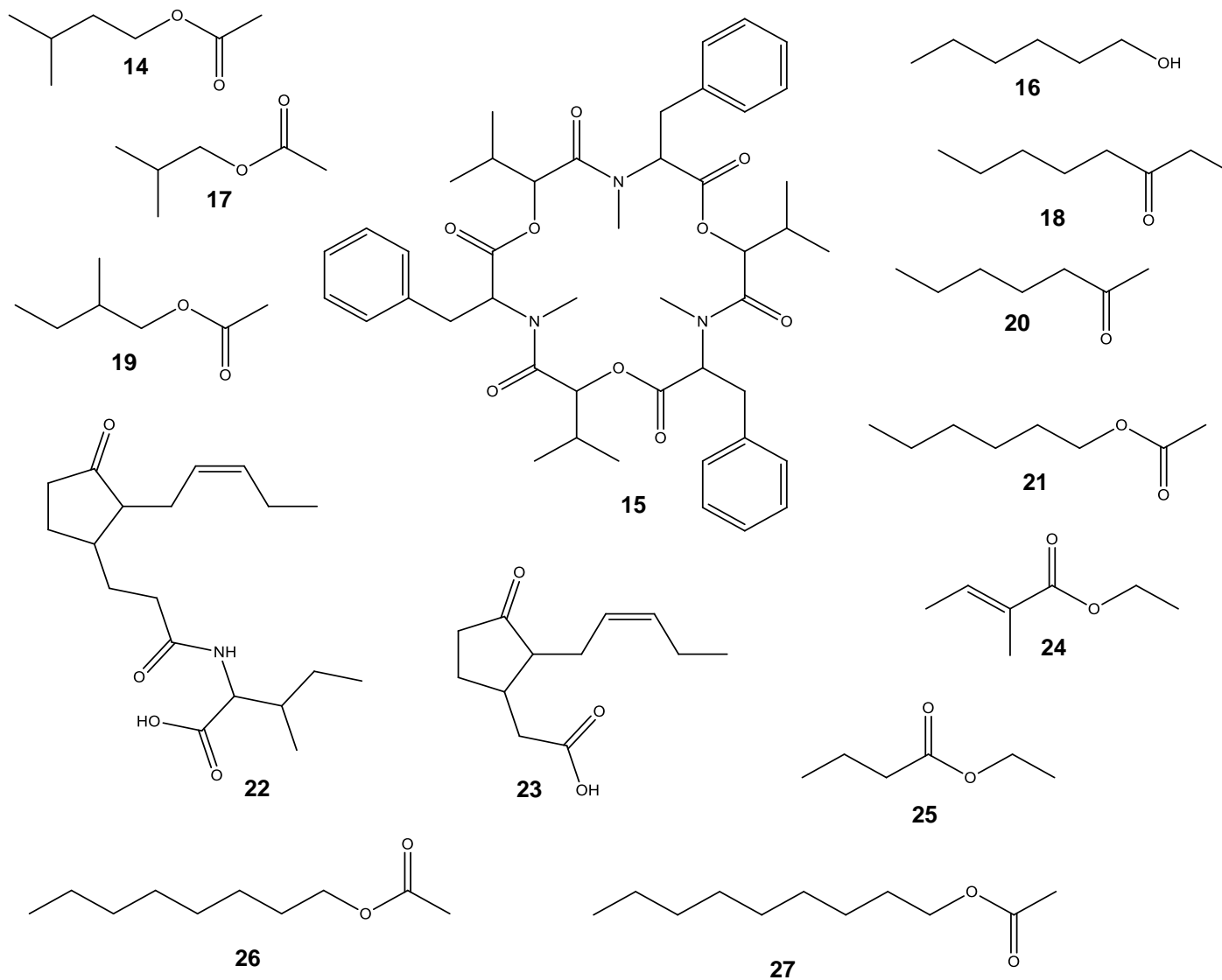


Figura 65: Continuação da Figura 64.



4.6.2. *Rhinocladiella similis*

Para este micro-organismo não existem dados na literatura de metabólitos identificados. Dentro dessa perspectiva de exploração por novas fontes metabólicas e para enriquecer os dados das relações moleculares presentes em matrizes exóticas de plantas, optou-se pelo isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos produzidos por esse organismo, buscando-se o entendimento do metaboloma do fungo *R. similis*. Sendo assim, preferimos utilizar abordagens que propiciassem um estímulo maior para produção de metabólitos, como por exemplo, mudanças nas condições de cultivo abióticas (luz, agitação, componentes do meio de cultivo, entre outros). Para observar quais fatores que influenciam na produção e variação metabólica do fungo em estudo, um planejamento de experimento foi aplicado usando três variáveis (luz, agitação e dias de incubação). O planejamento consistiu de oito amostras, com três réplicas cada, contendo um nível baixo e alto de acordo com a sistemática que abrange o planejamento fatorial completo. A resposta foi medida em termos de quantidade de picos observados nos cromatogramas de CLAE-DAD.

Após obtenção dos perfis cromatográficos de cada extrato, foi quantificado o número total de bandas cromatográficas, com o objetivo de encontrar a condição de cultivo que resulta em maior quantidade de metabólitos produzidos por este micro-organismo, os valores são descritos na Tabela 09 em conjunto com as variáveis de otimização.

Tabela 09: Esquematização do planejamento fatorial completo com os resultados, média e variância de cada experimento.

Experimento	Agitação	Luz	Dias	Número de bandas	Média
1	1	1	1	75	
2	1	1	1	79	77
3	1	1	1	78	
4	1	1	-1	62	
5	1	1	-1	56	59
6	1	1	-1	59	
7	1	-1	-1	50	
8	1	-1	-1	52	52
9	1	-1	-1	55	
10	1	-1	1	36	
11	1	-1	1	39	37
12	1	-1	1	37	
13	-1	-1	-1	99	
14	-1	-1	-1	101	102
15	-1	-1	-1	106	
16	-1	1	1	93	
17	-1	1	1	96	97
18	-1	1	1	101	
19	-1	-1	1	110	
20	-1	-1	1	108	109
21	-1	-1	1	110	
22	-1	1	-1	94	
23	-1	1	-1	91	94
24	-1	1	-1	97	

Analisando os dados obtidos em diferentes condições (Tabela 09), nota-se um aumento de 77,9% no número médio de picos para o parâmetro agitação, ao se variar do nível alto para o baixo, enquanto luz e dias apresentam um aumento de 8,6% e 4,3%, respectivamente, do nível baixo para o alto, observados na Tabela 10, em conjunto com a média de picos das variáveis AB, AC, BC e ABC para cada nível, com seus respectivos efeitos estimados e o erro padrão.

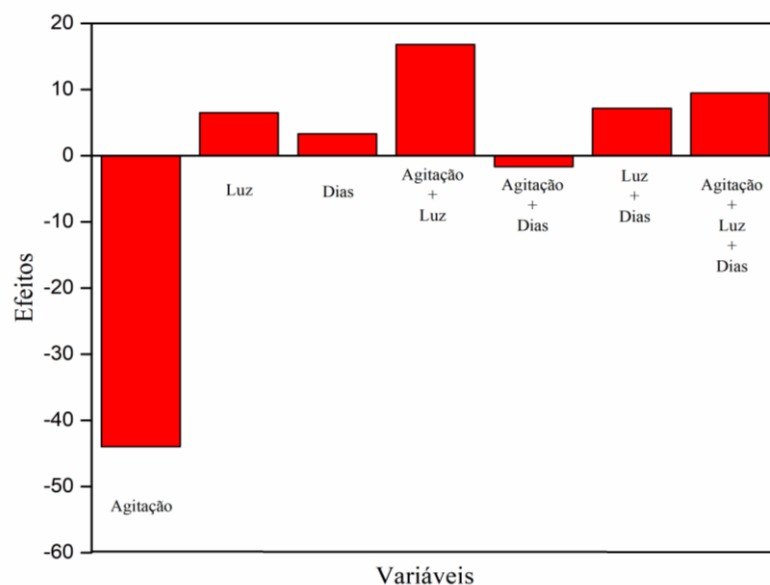
Tabela 10: Valores médios dos picos observados em CLAE-DAD para os níveis superior e inferior, em conjunto com os efeitos estimados e o erro padrão.

Variável	Média (-)	Média (+)	Efeito Estimado	Erro Padrão
Média Total			78,50	0,57
Agitação (A)	100,50	56,50	-44,00	1,13
Luz (B)	75,25	81,75	6,50	1,13
Dias (C)	76,83	80,17	3,33	1,13
AB	70,08	86,92	16,83	1,13
AC	79,33	77,67	-1,67	1,13
BC	74,92	82,08	7,17	1,13
ABC	73,75	83,25	9,50	1,13

Analisando os efeitos estimados (Figura 66), observa-se que a produção metabólica do fungo *Rhinoctadiella similis* é negativamente influenciada pela agitação, tendo em vista que a ausência deste parâmetro diminui a concentração de oxigênio no meio quando comparado ao meio em estado dinâmico, o que corrobora com o fato de que o micro-organismo foi isolado de um ambiente com certa escassez de oxigênio (rizosfera), sendo assim esse organismo é mais adaptado a esta característica. Já os dias de crescimento e luz influenciaram positivamente, com maior tempo de incubação, ocorre um maior consumo de metabólito primário e maior produção de metabólito secundário (fase logarítmica->fase estacionária), já em relação à luz, os fungos podem reagir à iluminação de diferentes maneiras, ao traduzir a energia

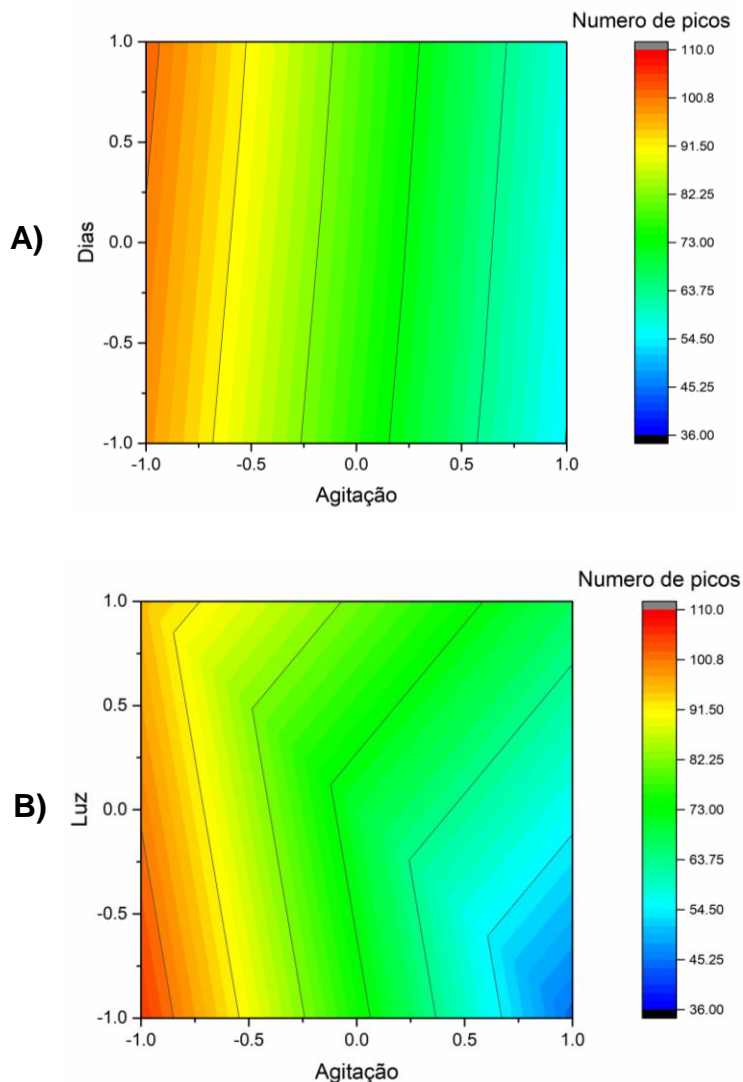
eletromagnética (fótons) em linguagem química, adaptando suas vias metabólicas, e assim, ocorrendo maior variabilidade metabólica (TISCH e SCHMOLL, 2010).

Figura 66: Gráfico dos efeitos de cada variável que influenciam na quantidade de bandas cromatográficas.



É possível observar na Figura 65 que a variável agitação apresenta o maior efeito em relação ao número de picos no cromatograma, ou seja, é a variável mais importante para este micro-organismo e deve ser sempre levada em consideração. Para avaliar melhor as outras variáveis, dois gráficos de superfície de contorno foram plotados (Figura 67), sempre considerando a variável agitação.

Figura 67: Gráficos de contorno das variáveis Dias, Agitação e Luz em relação ao número de picos observados em CLAE-DAD. (A) Dias versus Agitação (B) Luz versus Agitação.



No gráfico A, temos que o máximo de número de picos é observado no ponto de nível alto (+) de Dia e baixo (-) de Agitação. Em relação ao gráfico B, observa-se máximo, com agitação e luz em nível baixo, apesar da luz apresentar uma maior influência quando trabalhada no nível alto, existe um maior resultado da variável que envolve o sinergismo entre ambas (AB – 16,33) do que o parâmetro isolado da luz (B – 6,33), assim sendo, para que AB apresente um nível alto, levando em consideração que a agitação apresenta a maior contribuição e deve ser mantida no nível baixo, o parâmetro luz deve ser fixado no nível baixo, pois A (-) e B (-) resultam em AB (+), o

que demonstra a importância de abordagens de otimização de processos que trabalhem de modo multivariado em relação a univariado.

O modelo matemático obtido, tendo como base os efeitos estimados e erros de cada efeito estão apresentados na equação abaixo, onde os valores estatisticamente não significativos foram retirados, os resultados da análise de variância para a resposta número de picos estão descritos na Tabela 11.

$$N^{\circ} \text{ de picos} = (78,5 \pm 0.57) - (22A \pm 0.57) + (3,25B \pm 0.57) - (1,67C \pm 0.57) + (8,41AB \pm 0.57) + (3,58BC \pm 0.57) + (4,75ABC \pm 0.57)$$

Tabela 11: Análise de variância para a o modelo gerado da equação 2.

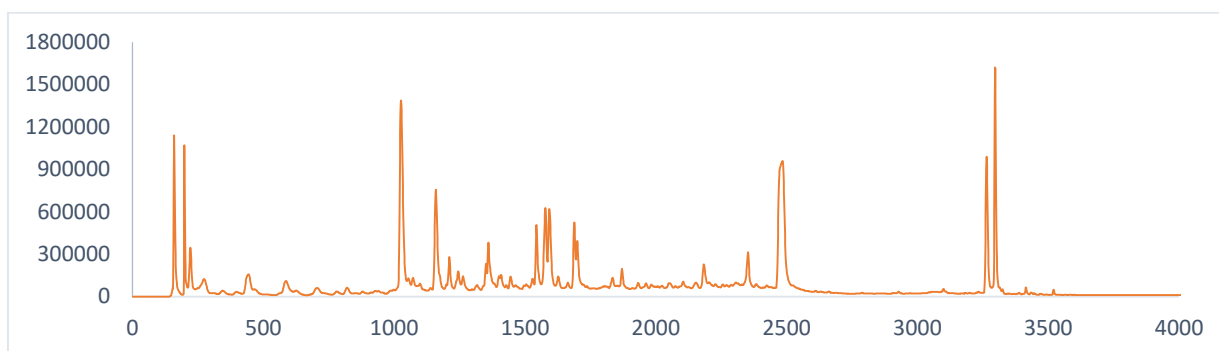
Variável	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F
A	1	11616	269
B	1	253	1507
C	1	66	33
AB	1	1700	9
AC	1	16	221
BC	1	308	2
ABC	1	541	40
Resíduo	16	8	-
% variância explicada	Coefficiente correlação	F _{calculado}	F _{tabelado}
97,55	0,9916	268	2,65

Observa-se um coeficiente de determinação de 0,9755 e coeficiente de correlação 0,9916. Em conjunto, o valor de F_{calculado} = 268 é maior que o de F_{tabelado} = 2,65, cerca de cem vezes, com 95% de confiança com 7 e 16 graus de liberdade, mostrando que o modelo foi bem ajustado e estatisticamente significativo.

Analisando os resultados, a condição ótima obtida (maior número de picos) ocorre quando os parâmetros agitação e luz são fixados no nível baixo (ausência) e para os dias no nível alto (28 dias).

A partir das condições de cultivo otimizadas, foi possível estabelecer o perfil cromatográfico a seguir, Figura 68.

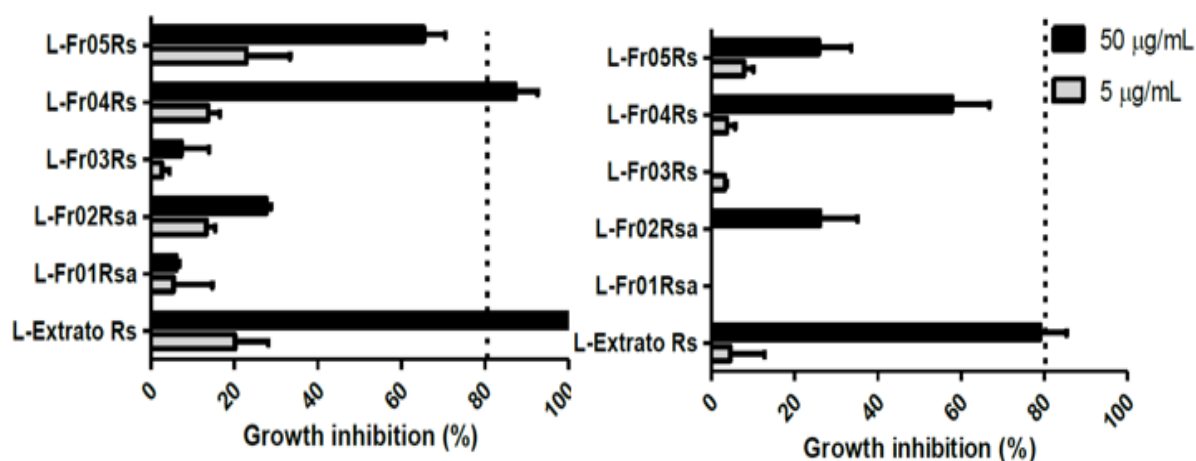
Figura 68: perfil químico obtido pela análise do extrato em meio líquido de *R. similis* em CLAE-DAD, a 25°C e, estático e vinte e oito dias de crescimento (condições otimizadas).



Coluna: fase reversa (C18, Kinetex, Phenomenex, 150 X 4,60 mm (5 µm)); fase móvel utilizada: acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) e água deionizada (0,1% de ácido fórmico); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL; programa de eluição em gradiente (5% B de 0 a 5 min, 5 até 100% de 5 a 45 min).

É possível observar no cromatograma uma certa complexidade, com picos por todo o cromatograma o que caracteriza compostos de diferentes polaridades e estruturas, visando isolar esses compostos, realizou-se o fracionamento do extrato em cinco partes. Esses extratos foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade que está representado na Figura 69.

Figura 69: Percentual de inibição do crescimento celular das frações em linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7) com as concentrações de 5 µg mL⁻¹ e 50 µg mL⁻¹.



Observa-se que a fração L-Fr04Rs demonstrou alto potencial (valor de inibição >80%) citotóxico frente à linhagem tumoral HCT-116 e moderado frente a linhagem MCF-7 na concentração de 50 µg mL⁻¹ e baixa atividade na concentração de 5 µg mL⁻¹ frente as duas linhagens testadas. A fração L-Fr05Rs apresentou moderado potencial em ambas as concentrações (20% < valor de inibição < 75%) frente a linhagem HCT-116 e moderado na concentração de 50 µg mL⁻¹ e baixo na concentração de 5 µg mL⁻¹ frente a linhagem MCF-7. A fração L-Fr02Rsa apresentou atividade moderada frente às duas linhagens testadas, enquanto as frações L-Fr01Rsa e L-Fr03Rs apresentaram baixo potencial (valor de inibição < 20%) para as duas linhagens testadas. A Tabela 12 sumariza os resultados demonstrados acima.

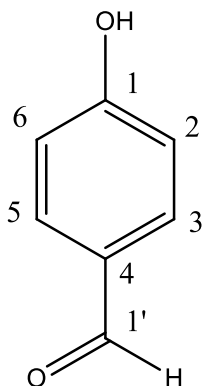
Tabela 12: Inibição do crescimento celular (%) do L-Extrato Rs e frações L-Rr01Rsa, L-Rr02Rsa, L-Rr03Rs, L-Rr04Rs e L-Rr05Rs em linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de 5 µg/mL e 50 µg/mL (média ± SEM) (n=2).

	HCT-116				MCF-7			
	5 µg/mL		50 µg/mL		5 µg/mL		50 µg/mL	
	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
L-Extrato Rs	20,11	8,04	100,00	0,73	4,51	8,25	79,07	6,29
L-Fr01Rsa	5,47	9,27	6,08	0,74	0,00	0,07	0,00	5,77
L-Fr02Rsa	13,33	2,07	27,74	1,03	0,00	5,71	26,13	8,92
L-Fr03Rs	2,72	1,73	7,31	6,60	3,20	0,57	0,00	2,53
L-Fr04Rs	13,75	2,78	87,31	5,25	3,74	1,96	57,85	8,93
L-Fr05Rs	22,94	10,41	65,4	5,10	7,86	2,22	25,79	7,81

Com isso o próximo passo foi isolar e identificar os metabólitos do fungo *R. similis* das frações 04 e 05 responsáveis por resultados positivos de citotoxicidade.

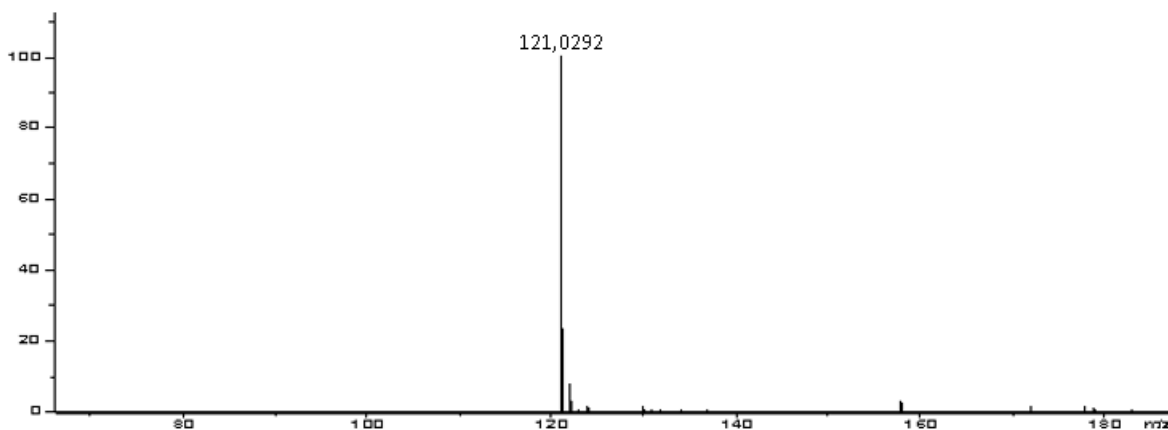
4.6.2.1. Determinação estrutural da substância 1.

Figura 70: Estrutura da substância 1.



A substância 1 foi isolada como um sólido branco com 2,8 mg de massa, no espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por eletrospray, no modo negativo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 121,0292 (erro calculado de 3,3) referente a molécula desprotonada $[M-H]^-$, como mostra a Figura 71.

Figura 71: Espectro de massas de alta resolução da substância 1, adquirido no modo negativo.



Com isso foi possível obter a fórmula molecular $C_7H_6O_2$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C (HSQC). Nos espectros de 1H e HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos, Figura 72 e Figura 73.

Figura 72: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 1.

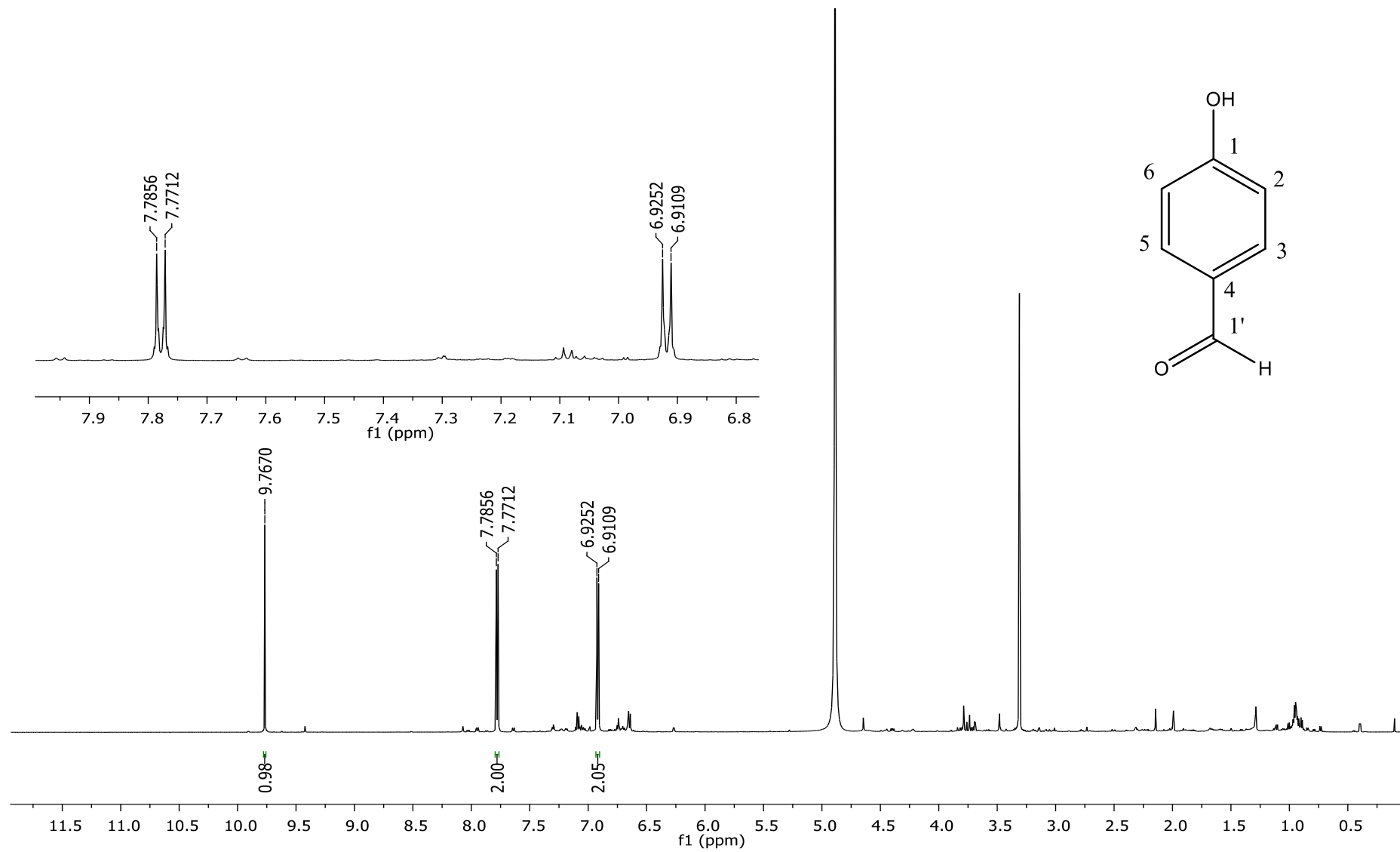
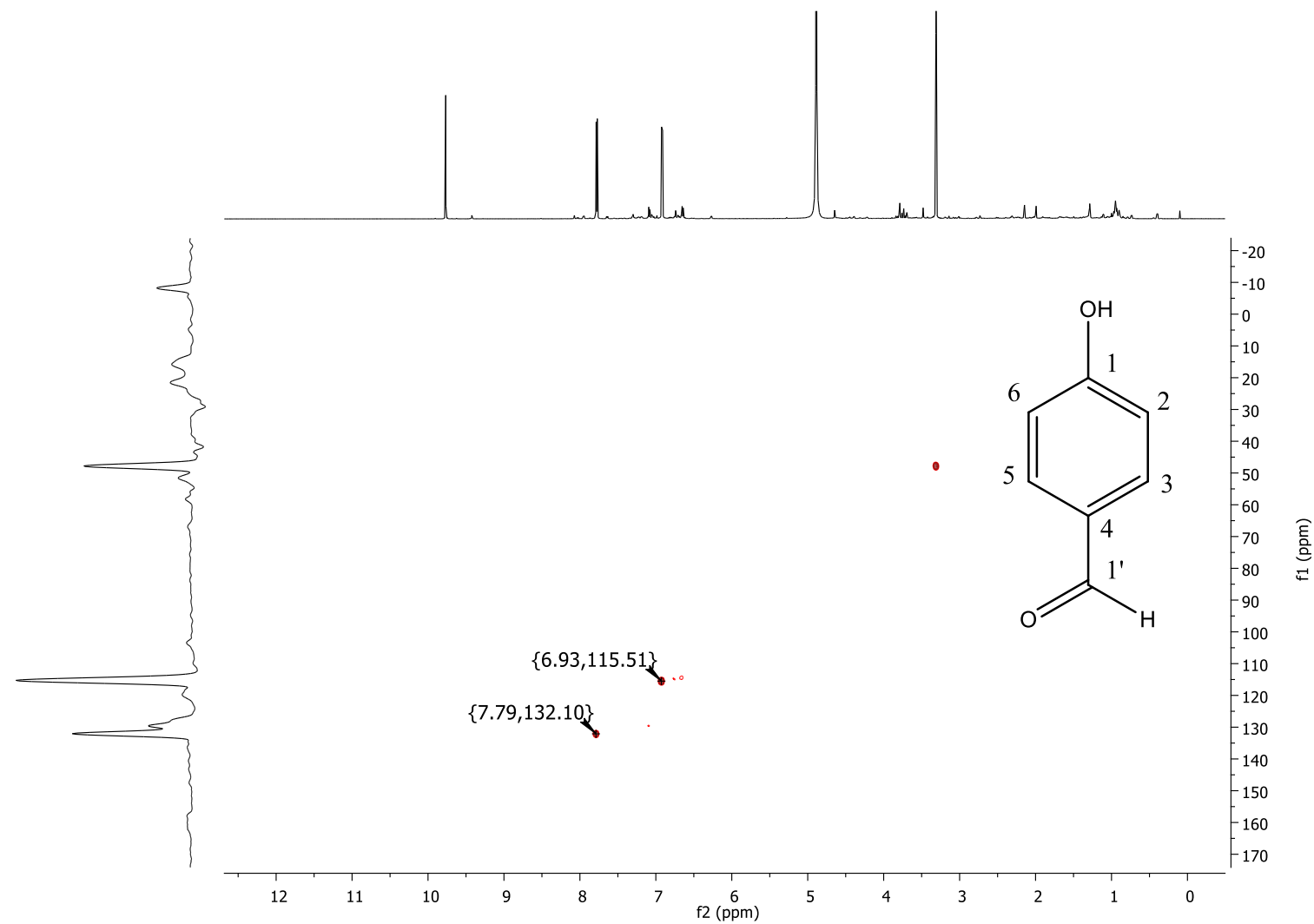


Figura 73: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 1.



Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,92 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 115,4)) e C-3/C-5 (δ 7,78 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 132,0)), aliado às correlações observadas no experimento de HSQC, foi possível sugerir um anel aromático para-substituído. O experimento de HMBC (Figura 74) possibilitou atribuir o substituinte do anel aromático. O deslocamento químico do carbono C-1' (δ_{C} 191,3) e a correlação do hidrogênio H-1' (δ_{H} 9,77), sugeriu a presença de uma carbonila de aldeído.

Figura 74: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 1.

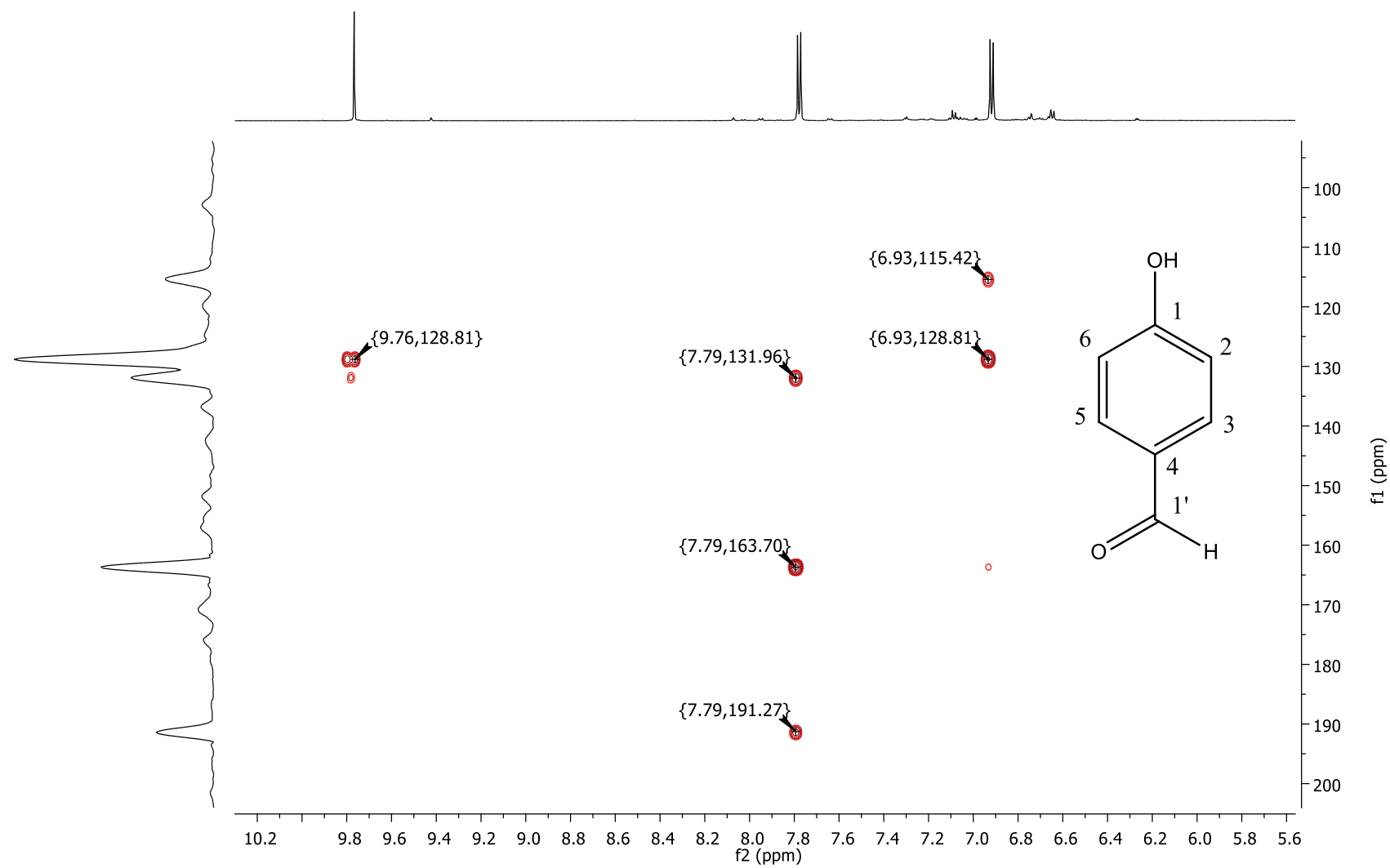
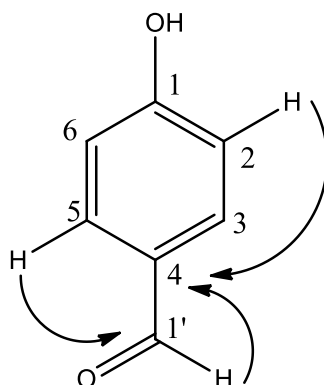


Figura 75: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).



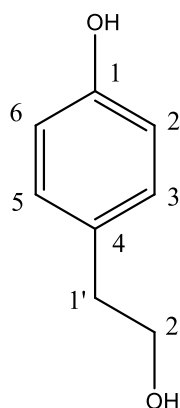
Este composto já é relatado pela literatura, foi isolado de alga marinha *Grateloupia lívida*, dos fungos *Aspergillus sp*, *Pyronema sp* e *Pestalotropsis sp*, e de raiz de *Pluchea indica* entre outras matrizes e apresentou atividade antioxidante relevante (DENG et al., 2017; YANG et al., 2016; LIU et al., 2017; OKE-ALTUNTAS et al., 2016; TANG et al., 2017; HONG-XIA et al., 2017). Os deslocamentos químicos para a substância 1 encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 1.

Substância 1; 600 MHz; CD ₃ OD			
Posição.	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1	-	128,8 C	-
3,5	7,79; <i>d</i> (8,5)	132,0 C-H	132,0; 163,7; 191,3
2,6	6,93; <i>d</i> (8,5)	115,4 C-H	115,4; 128,8
4	-	163,7 C	-
1'	9,79; <i>s</i>	191,3 C=O	128,8

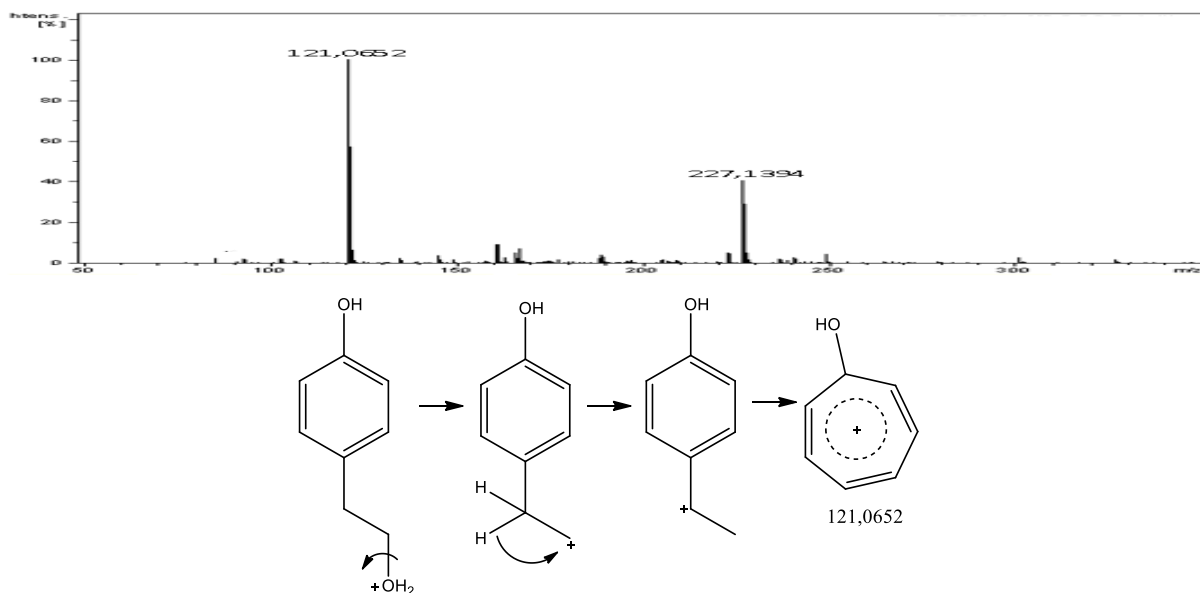
4.6.2.2. Determinação estrutural da substância 2.

Figura 76: Estrutura da substância 2.



A substância 2 foi isolada como um sólido branco com 0,7 mg de massa. No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray*, no modo positivo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 121,0652 (erro calculado de 3,3) referente a molécula $[M+H-H_2O]^+$, devido à formação do íon *tropilium* como mostra a Figura 77.

Figura 77: Espectro de massas de alta resolução da substância 2 e proposta de formação do íon de m/z 121, adquirido no modo positivo.



Com isso foi possível chegar na fórmula molecular $C_8H_{10}O_2$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C (HSQC). Nos espectros de 1H e HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos, Figura 78 e Figura 79.

Figura 78: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 2.

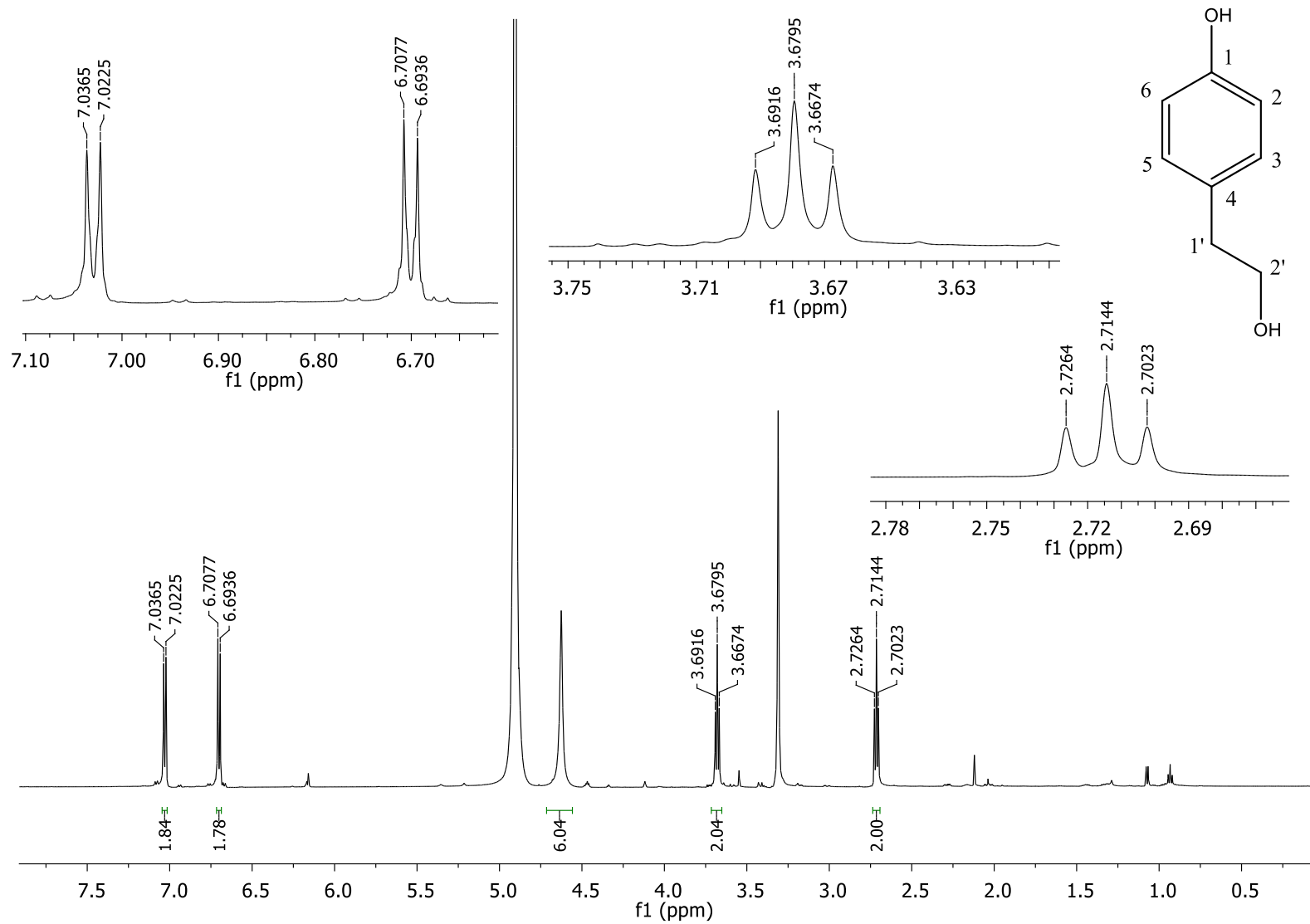
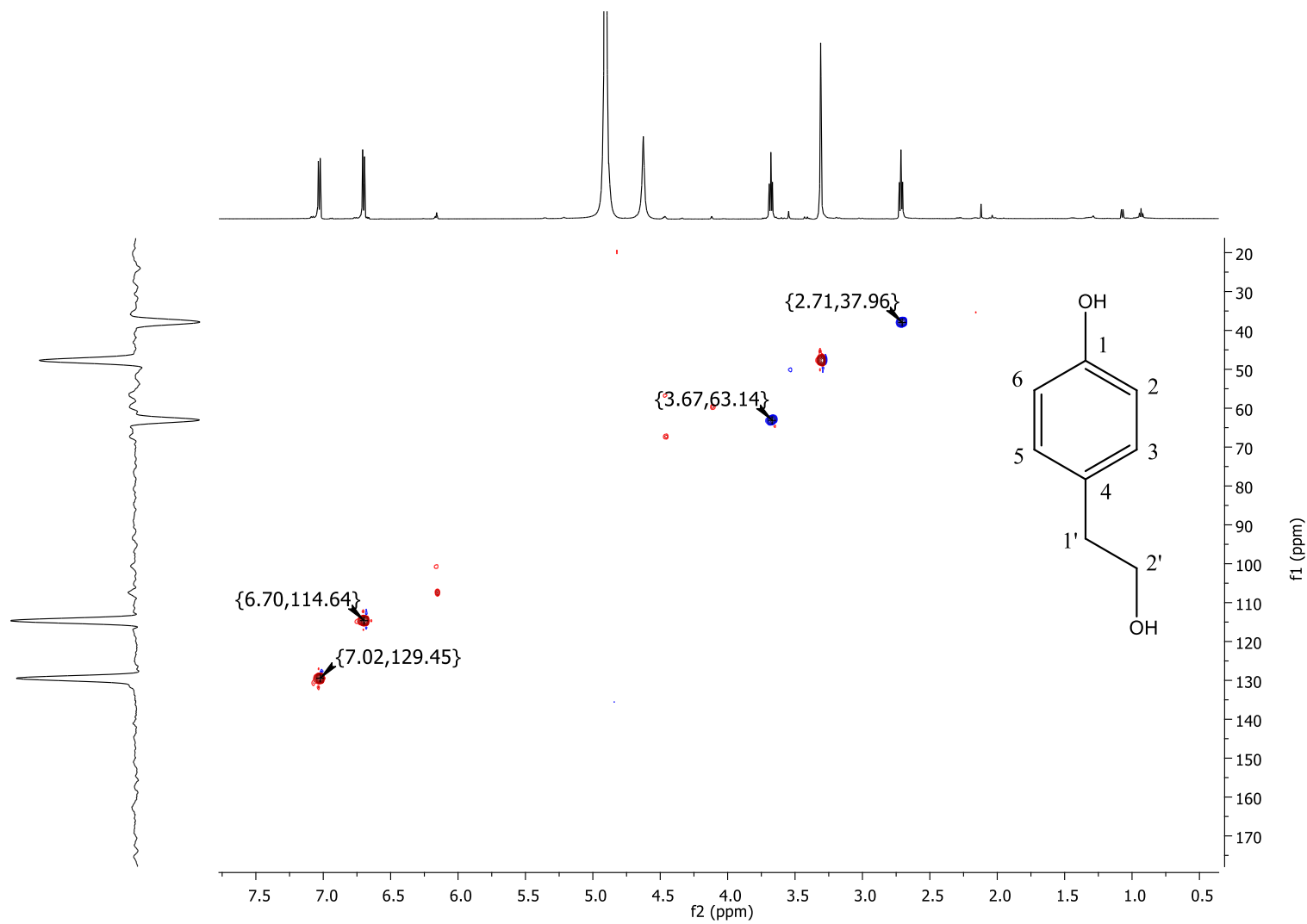


Figura 79: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 2.



Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,70 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 114,6)) e C-3/C-5 (δ 7,02 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 129,4)), aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 80**), foi possível sugerir um anel aromático *para*-substituído, e o deslocamento químico do carbono C-1' (δ_{C} 37,9), C-2' (δ_{C} 63,1) e dos hidrogênios H-1' (δ_{H} 2,71 (2H, *t*, $J=7,3$ e 14,5 Hz)), e H-2'' (δ_{H} 3,67 (2H, *t*, $J=7,3$ e 14,5 Hz)), sugeriu a presença de dois carbonos metilênicos vizinhos, e o último ligado a um heteroátomo (O).

Figura 80: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 2.

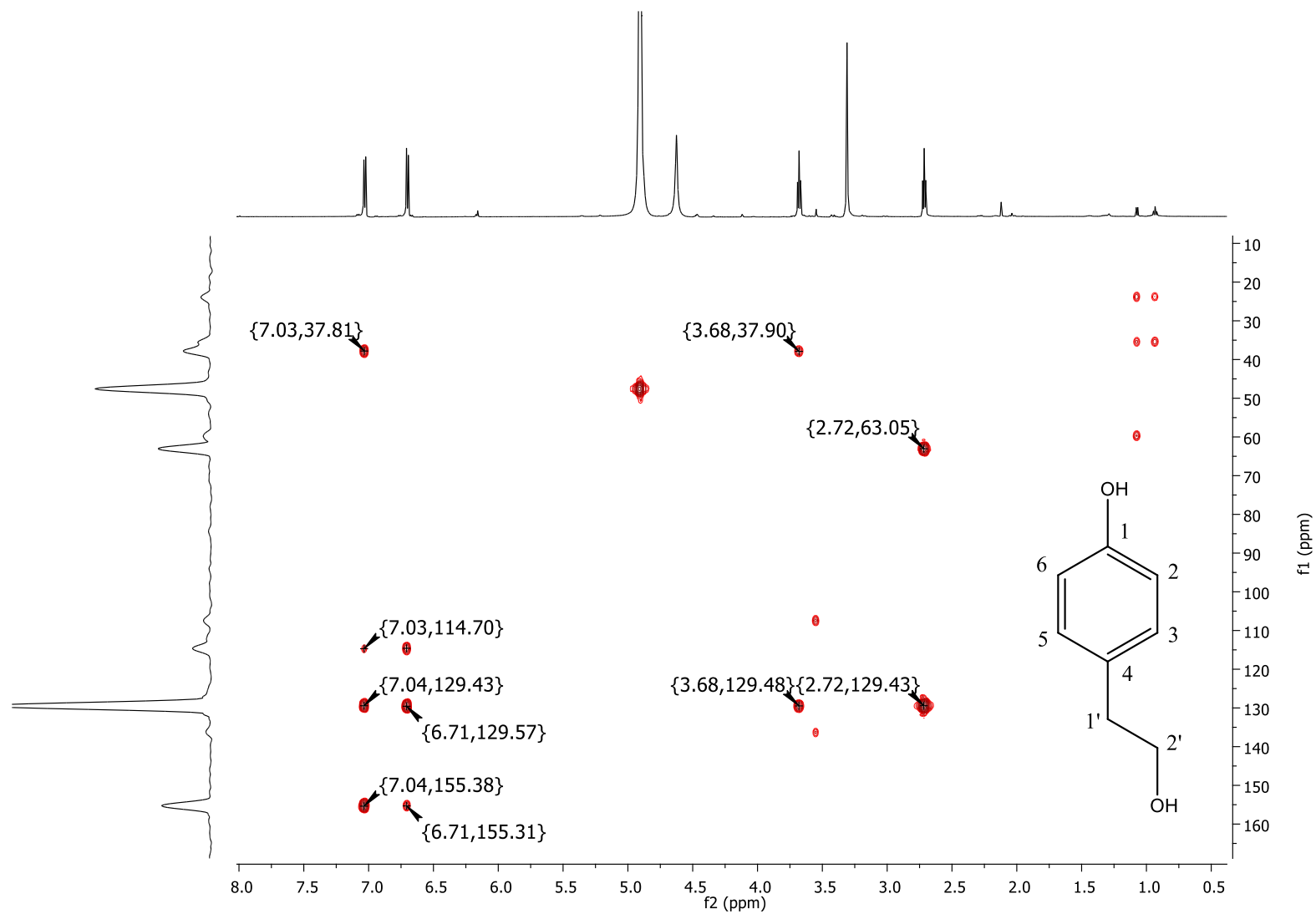
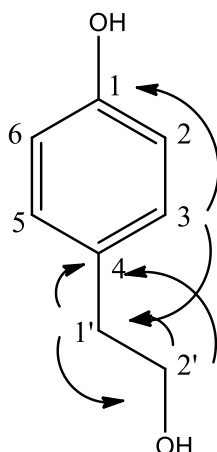


Figura 81: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).



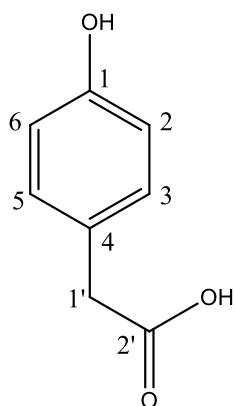
Este composto já é conhecido pela literatura, foi isolado da raiz de *Heracleum dissectum*, encontrado em *Aspergillus sp*, entre outros micro-organismos, apresenta atividade antioxidante e antifúngica relevantes e desempenha um papel importante na preservação de doenças cardiovasculares, há relatos que esse composto atua como um *quorum sensing*, forma de comunicação química intra e interespecífica (CHANDRAMOHAN, R. e PARI, L., 2016; BRILHANTE et al., 2016;). Os deslocamentos químicos para a substância 2 encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 2.

Substância 2; 600 MHz; CD ₃ OD			
Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC
1	-	155,4 C	-
2,6	6,70; <i>d</i> (8,5)	114,6 CH	114,6; 129,4; 155,4
3,5	7,03; <i>d</i> (8,5)	129,4 CH	37,9; 114,6; 129,6; 129,4 155,4
4	-	129,6 C	-
1'	2,71; <i>t</i> (7,3)	37,9 CH ₂	63,1; 129,4
2'	3,67; <i>t</i> (7,3))	63,1 C-OH	37,9; 129,6

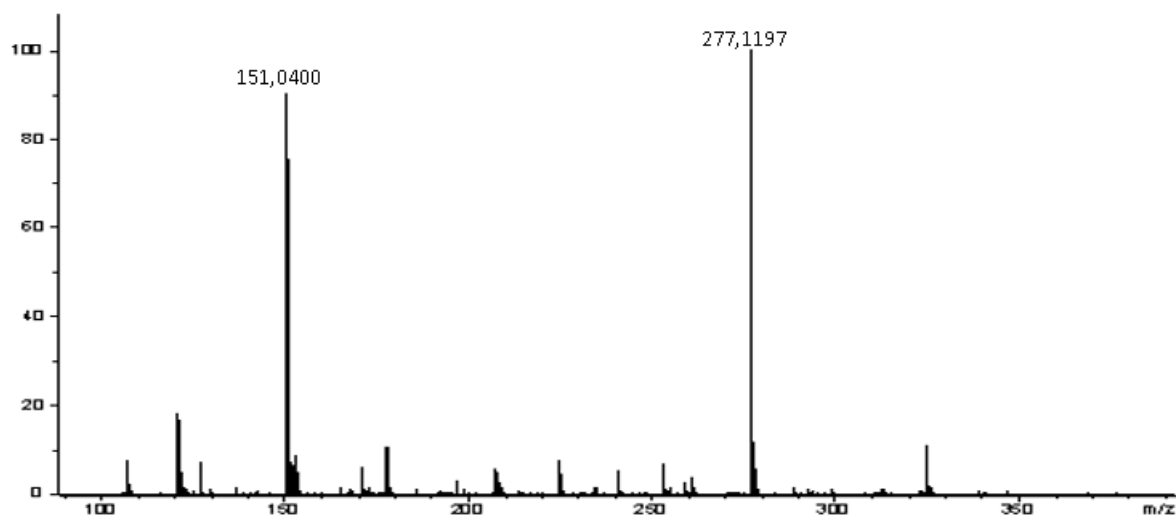
4.6.2.3. Determinação estrutural da substância 3.

Figura 82: Estrutura da substância 3.



A substância 3 foi isolada como um sólido branco com 6,2 mg de massa. No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por eletrospray, no modo negativo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 151,0400 (erro calculado de 4,63) referente a molécula desprotonada $[M-H]^-$, como mostra a Figura 83.

Figura 83: Espectro de massas de alta resolução da substância 3.



Com isso foi possível obter a fórmula molecular $C_8H_8O_3$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C (Figuras 84 e 85).

Figura 84: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 3.

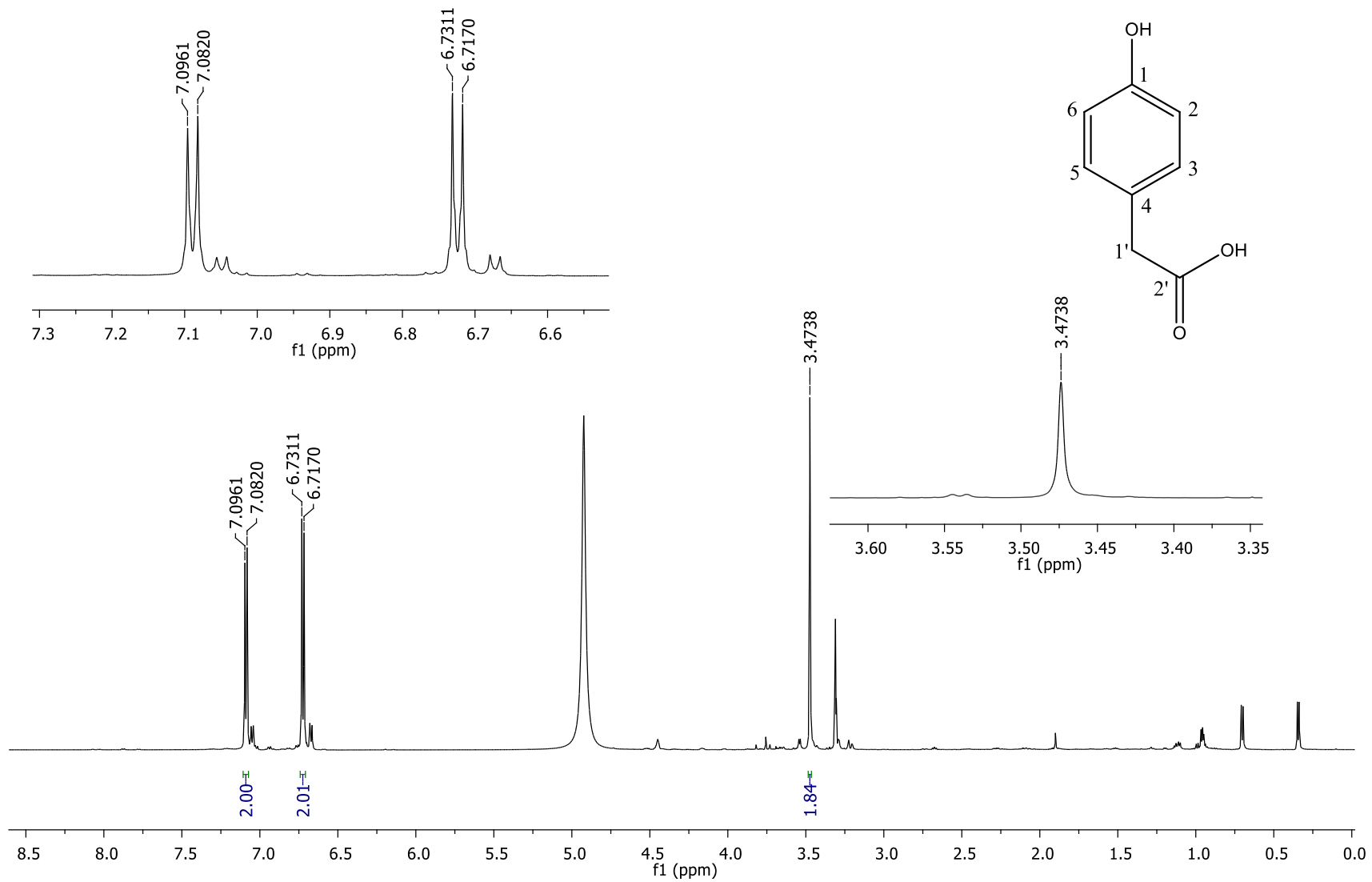
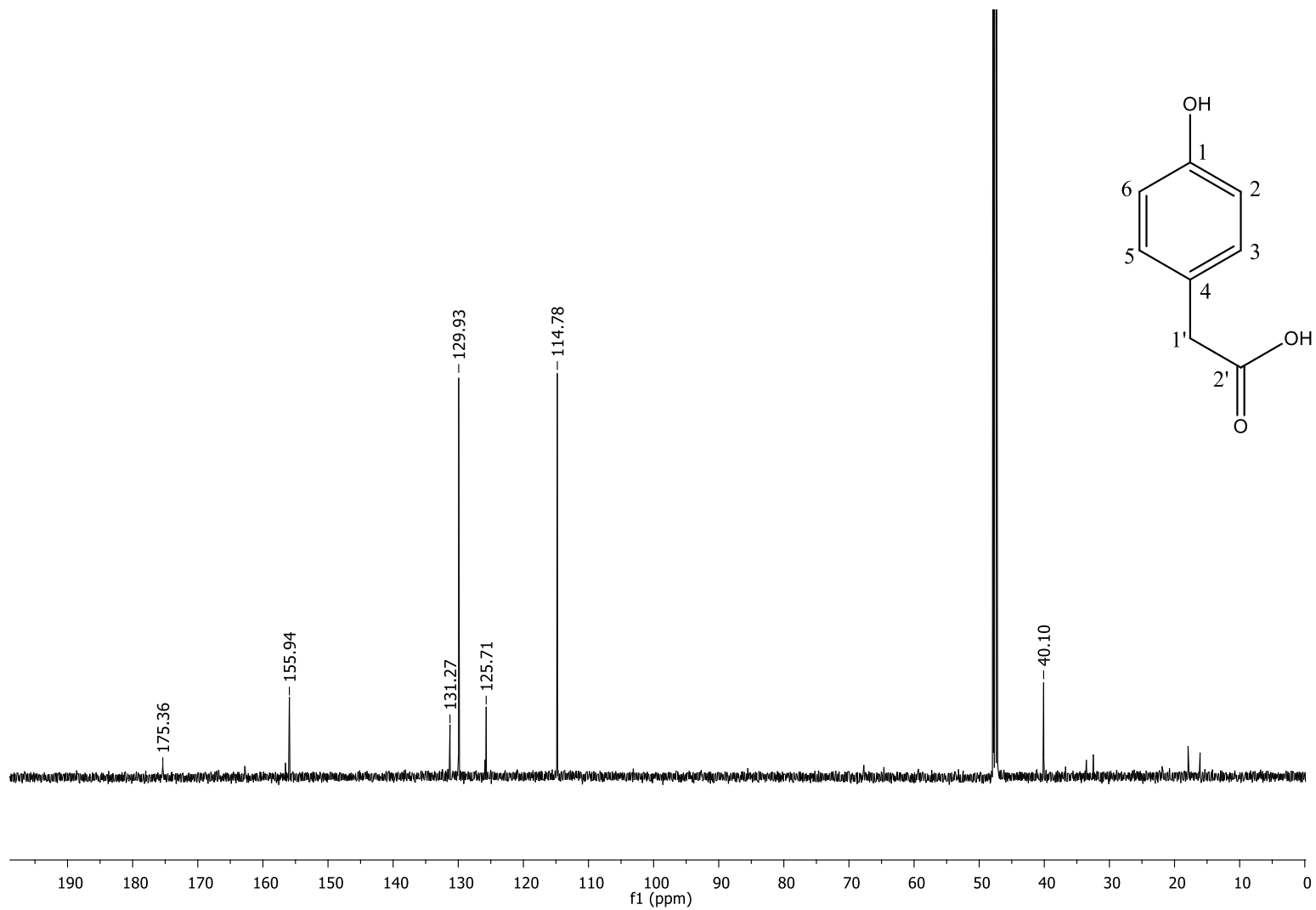


Figura 85: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da substância 3.



Analisando os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figuras 84 e 85**) foi possível observar a presença de oito átomos de carbono, consistentes com seis aromáticos (dois quaternários (δ_{C} 125,7 e 155,9), quatro metínicos (δ_{H} 6,71; δ_{C} 114,8) e (δ_{H} 7,08; δ_{C} 129,9), um carbono metilênico (δ_{H} 3,47; δ_{C} 40,1) e uma carbonila de ácido carboxílico (δ_{C} 175,4).

No espectro de HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos (Figura 86). Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,71 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 114,8)) e C-3/C-5 (δ_{H} 7,08 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 129,9)), aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 87**), foi possível sugerir um anel aromático para-substituído, e o deslocamento químico do carbono C-1' (δ_{C} 40,1) e do hidrogênio H-1' (δ_{H} 3,47), C-2' (δ_{C} 175,4), sugeriu a presença de um carbono metilênico, e uma carbonila de ácido carboxílico, respectivamente.

Figura 86: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 3.

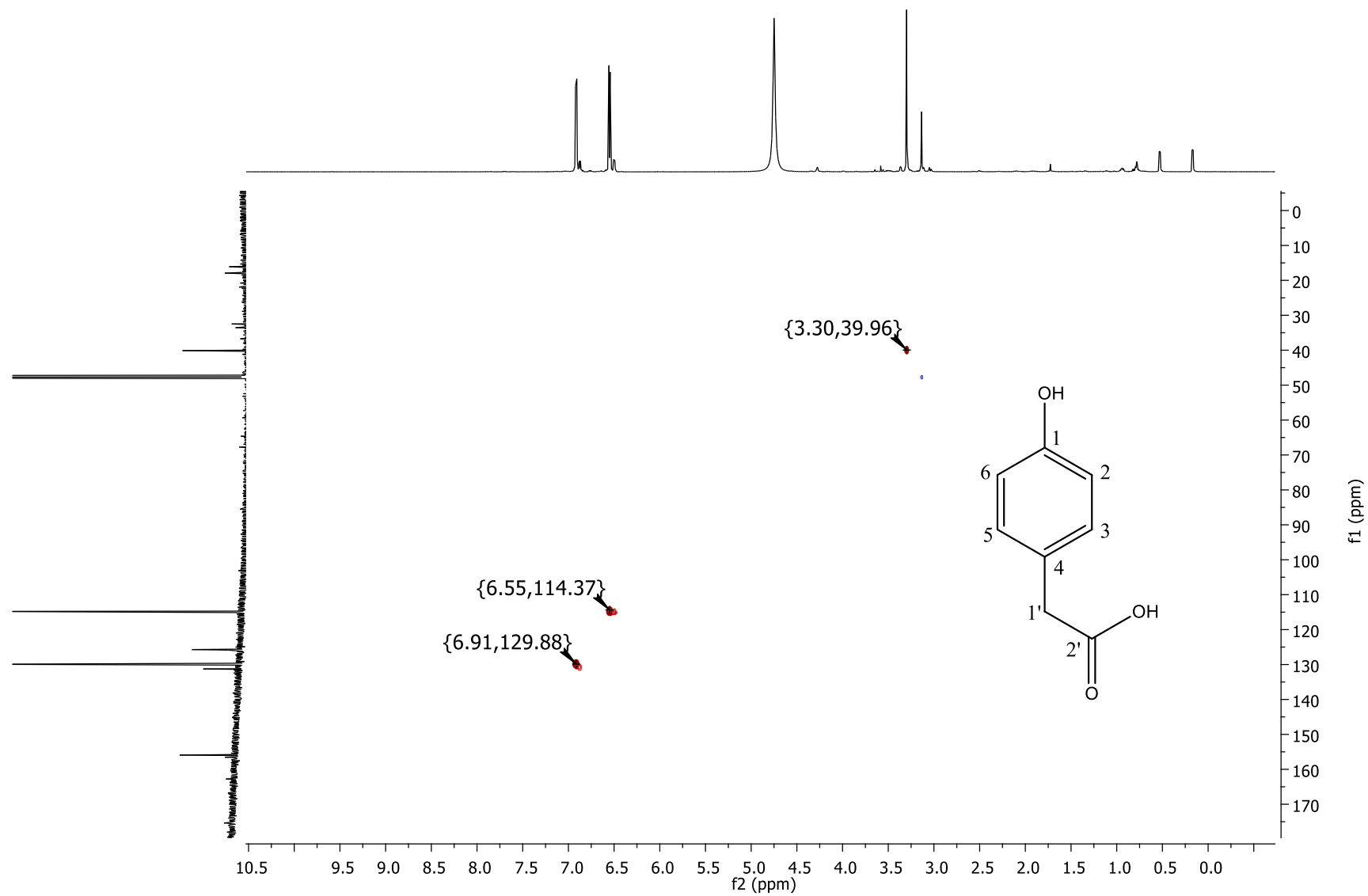
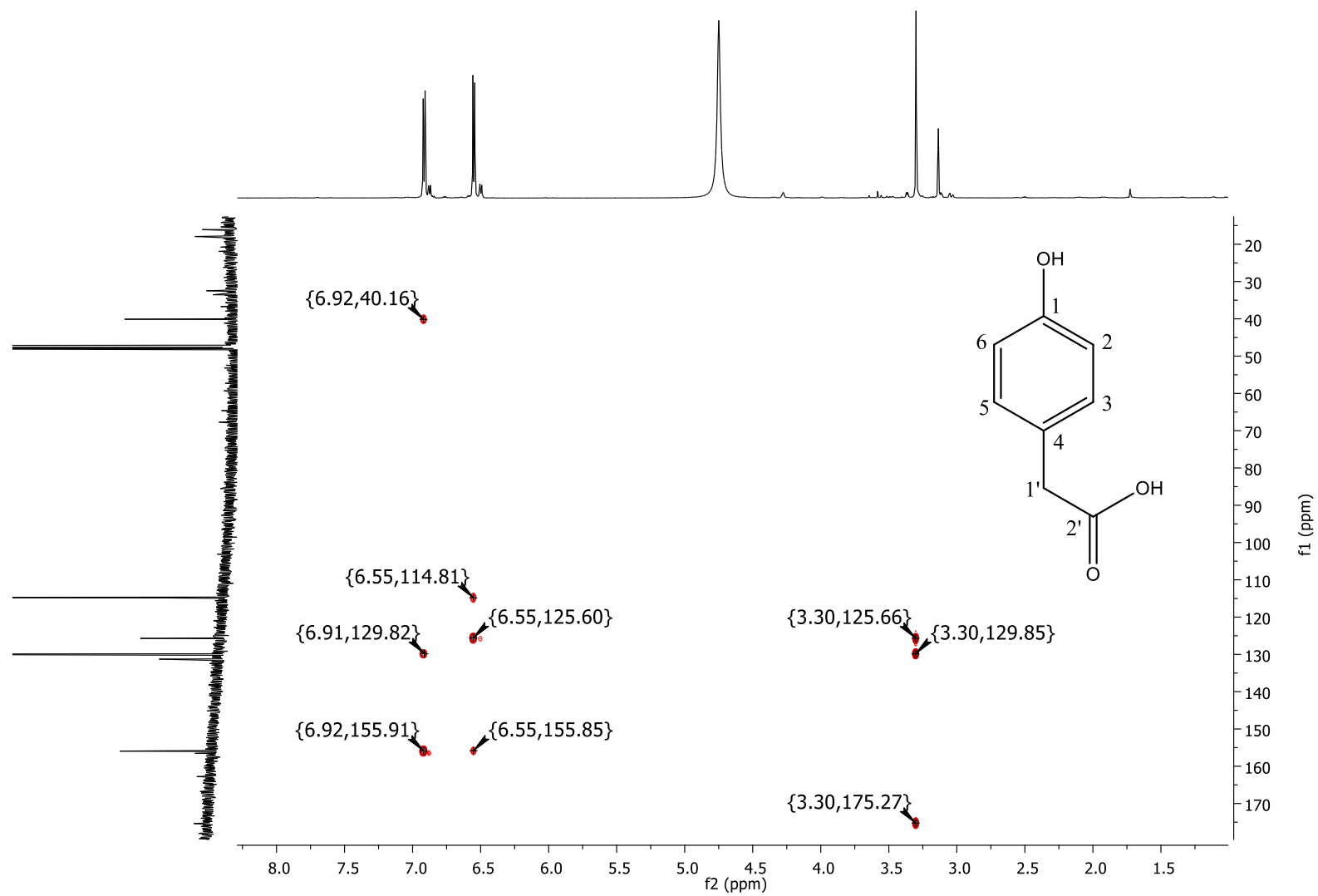
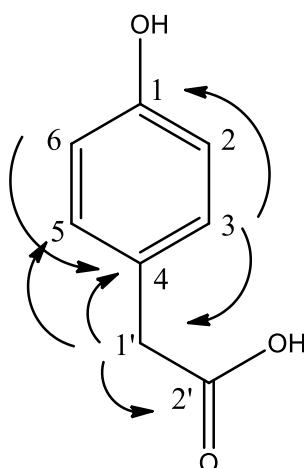


Figura 87: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 3.



Análise do mapa de contorno do experimento HMBC foi decisivo na determinação estrutural desta substância, fornecendo subsídio para posicionar os substituintes no anel aromático *para*-substituído. O carbono C1' foi conectada em C-4, devido às correlações a longa distância observada entre H-1'-> C-4/C-3/C-5, e a posição da carbonila foi atribuída devido a correlação de H-1'-> C-2', como mostra a Figura 88.

Figura 88: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).



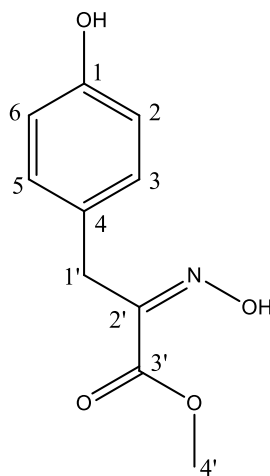
Este composto já é conhecido pela literatura, encontrado nos fungos *Aspergillus sydowii*, *Galumannomyces sp*, *Sabicea cinérea*, em semente de *Camellia sinensis* entre outros (BECERRA-HERRERA, M. et al., 2017; Tang, L. et al., 2017). Os deslocamentos químicos para a substância 3 encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 3.

Substância 3; 600 MHz; CD ₃ OD			
Posição	δ_{H} (J em HZ)	δ_{C} , tipo	HMBC
1	-	155,9 C	-
2.6	6,72; <i>d</i> (8,5)	114,8 CH	114,8; 125,7; 155,9
3.5	7,08; <i>d</i> (8,5)	129,9 CH	40,1; 129,9; 155,9
4	-	125,7 C	-
1'	3,48; <i>s</i>	40,1 CH ₂	125,7; 129,9; 175,4
2'	-	175,4; HO-C=O	-

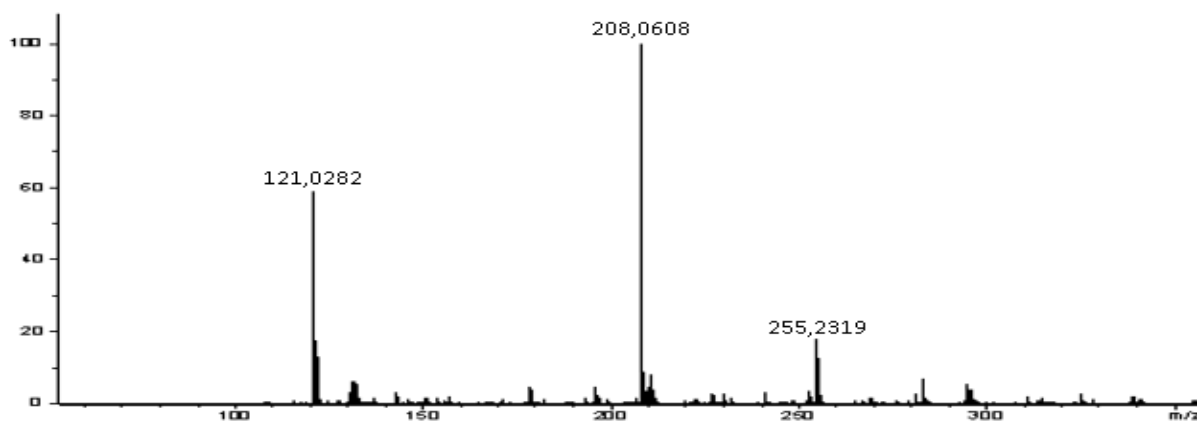
4.6.2.4. Determinação estrutural da substância 4.

Figura 89: Estrutura da substância 4.



A substância 4 foi isolada como um sólido amarelo com 1,2 mg de massa. No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray*, no modo negativo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 208,0608 (erro calculado de 0,48) referente a molécula desprotonada $[M-H]^-$, como mostra a Figura 90.

Figura 90: Espectro de massas de alta resolução da substância 4.



Com isso foi possível chegar na fórmula molecular $C_{10}H_{11}NO_4$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C (HSQC). Nos espectros de 1H e HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos, Figura 91 e Figura 92.

Figura 91: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 4.

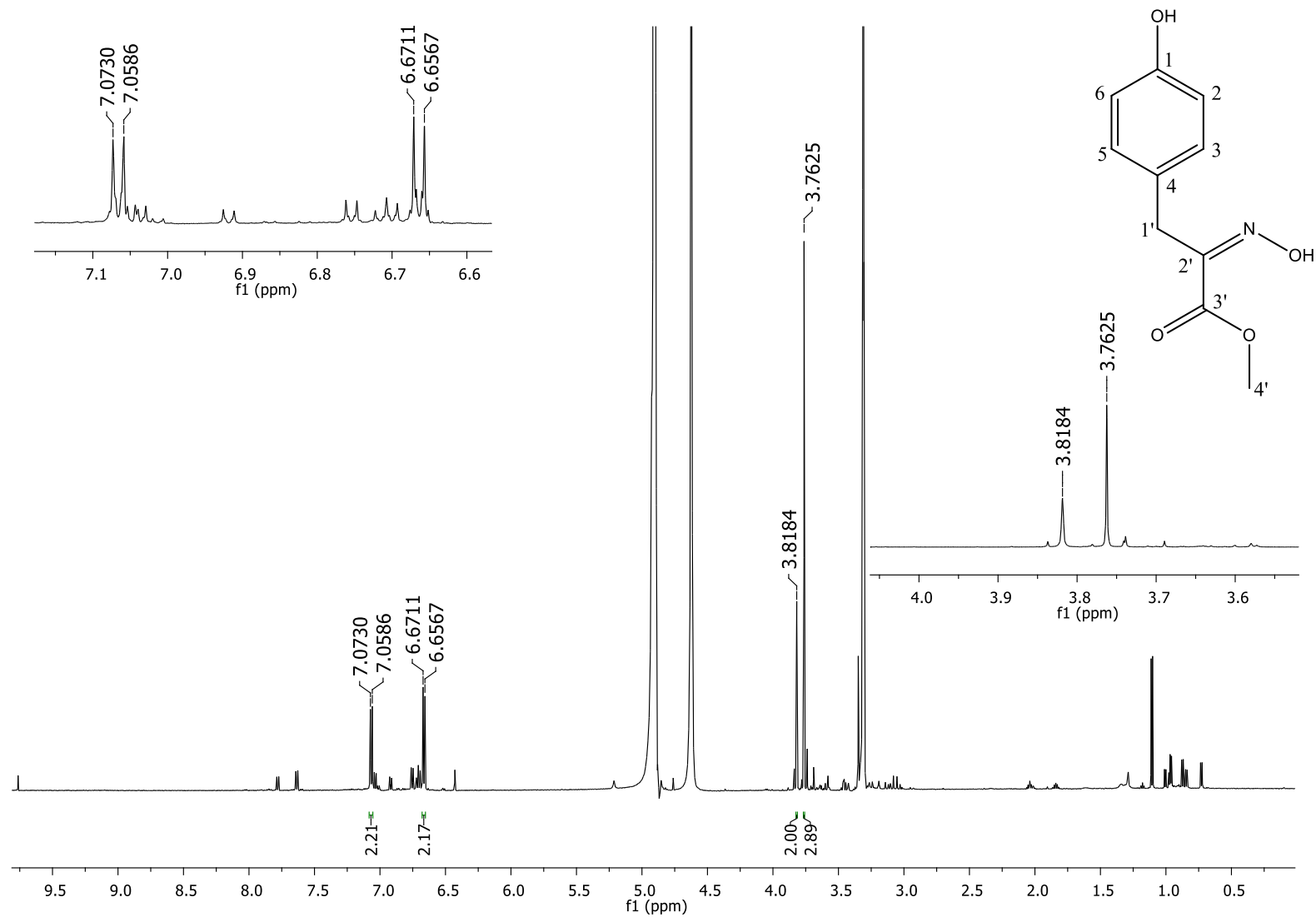
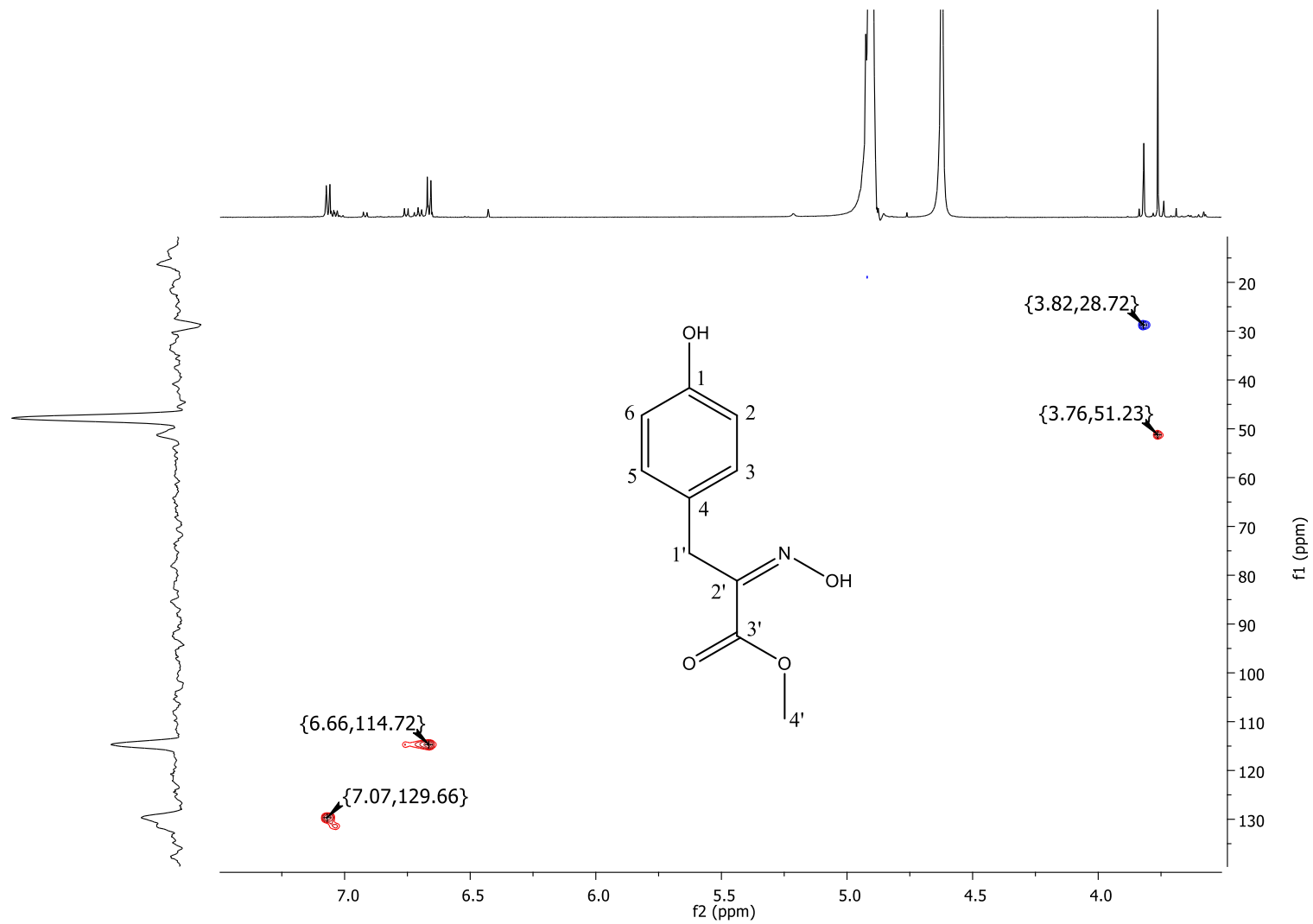
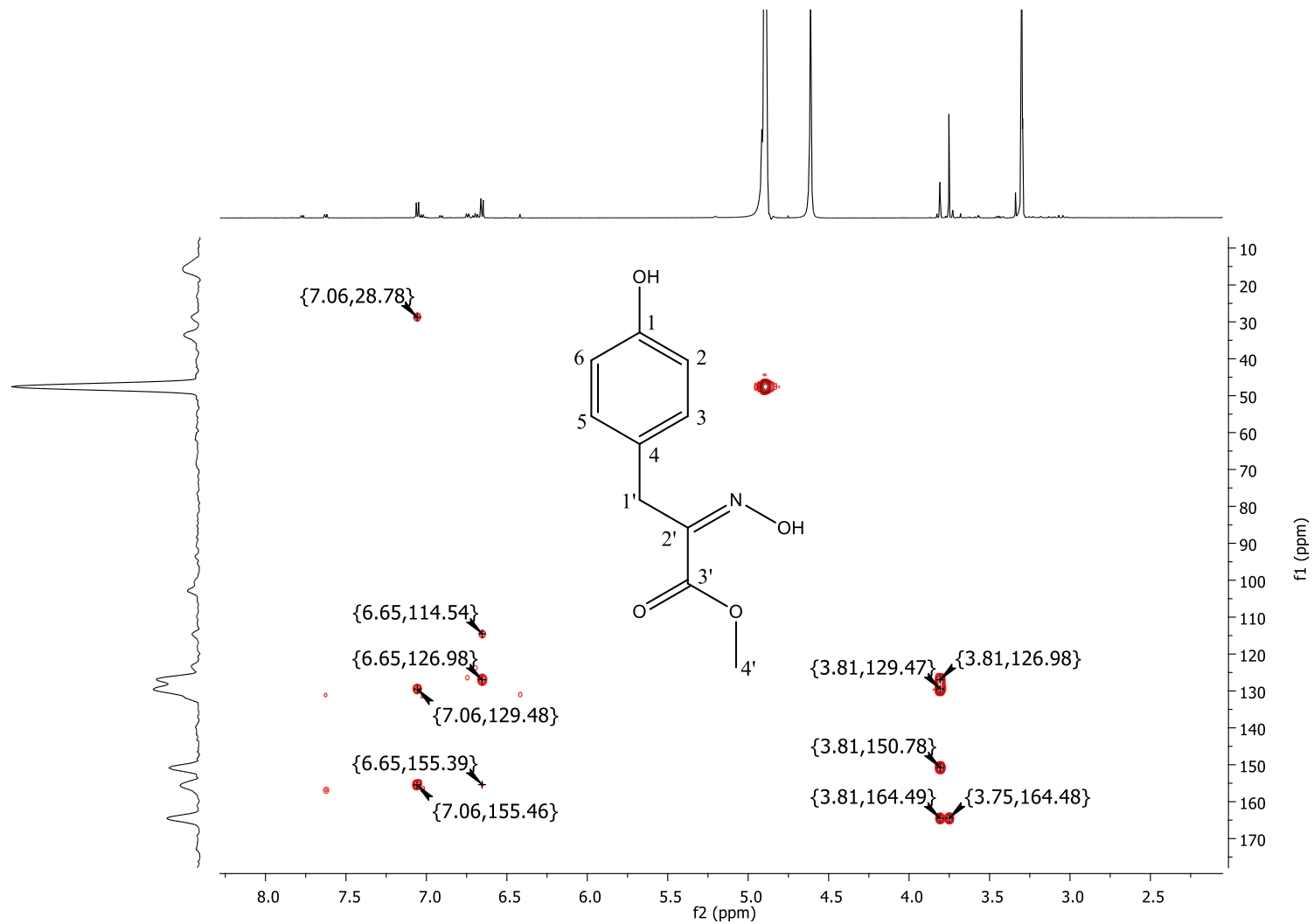


Figura 92: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 4.



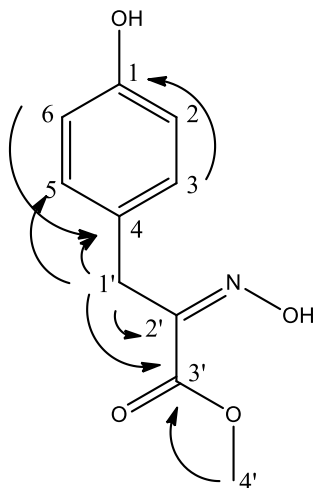
Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,66 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 114,7) e C-3/C-5 (δ 7,06 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 129,7), foi possível sugerir um anel aromático *para*-substituído, e o deslocamento químico do carbono C-1' (δ_{C} 28,7), C-4' (δ_{C} 51,2) e do hidrogênio H-1' (δ_{H} 3,81), H-5' (δ_{H} 3,76), sugeriu a presença de um carbono metilênico, e uma metoxila. Aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 93**), forneceu subsídio para posicionar os substituintes no anel aromático. O carbono C-1' foi ligado diretamente ao carbono C-4, devido às correlações a longa distância observadas entre H-1'->C-4/C-3/C-5, o C-2' foi ligado diretamente ao C-1', devido a correlação do hidrogênio H-1' com o carbono C-2', já a carbonila foi ligada diretamente ao C-2', devido as correlações a longa distância observada entre H-1'->C-3' e H-4'->C-3', fornecendo subsídio para o fechamento da fórmula estrutural deste composto.

Figura 93: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 4.



A Figura 94 sumariza as principais correlações observadas no experimento HMBC para essa substância.

Figura 94: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).



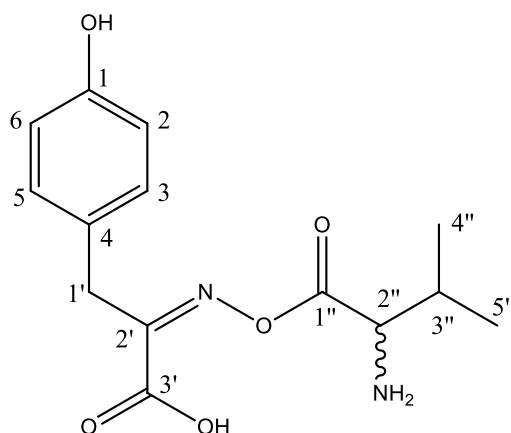
Este composto já é conhecido pela literatura, foi isolado da esponja marinha *Lanthela basta* e do fungo *Aspergillus aculeatos*, e apresentou atividade anticâncer (INGAVAT, N. et al., 2009, MATHIEU, V. et al., 2013). Os deslocamentos químicos para a substância 4 encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 4.

Substância 4; 600 MHz; CD ₃ OD			
Posição	δ_{H} (J em HZ)	δ_{C} , tipo	HMBC
1	-	155,4 C-OH	-
2,6	6,66; <i>d</i> (8,5)	114,7 CH	114,7; 127,0; 155,4
3, 5	7,06; <i>d</i> (8,5)	129,7 CH	28,7; 114,7; 127,0; 155,4
4	-	127,0 C	-
1'	3,81; <i>s</i>	28,7 CH ₂	127,0; 129,7; 150,8; 164,5
2'	-	150,8 C=N	-
3'		164,5 O-C=O	-
4'	3,75; <i>s</i>	51,2 CH ₃	164,5

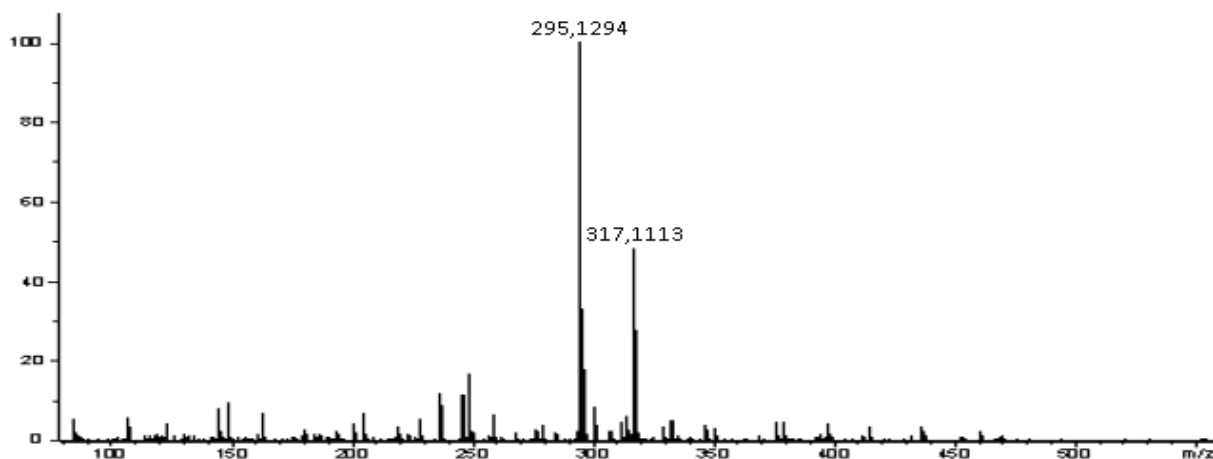
4.6.2.5. Determinação estrutural da substância 5.

Figura 95: Estrutura da substância 5.



A substância 5 foi isolada como um sólido amarelo com 1,3 mg de massa, no espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por eletrospray, no modo positivo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 295,1294 (erro calculado de 1,69) referente a molécula protonada $[M+H]^+$, como mostra a Figura 96.

Figura 96: Espectro de massas de alta resolução da substância 5.



Com isso foi possível chegar na fórmula molecular $C_{14}H_{18}N_2O_5$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C (HSQC). Nos espectros de 1H e HSQC foi possível atribuir os sinais de hidrogênios aos respectivos carbonos, Figura 97 e Figura 98.

Figura 97: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 5.

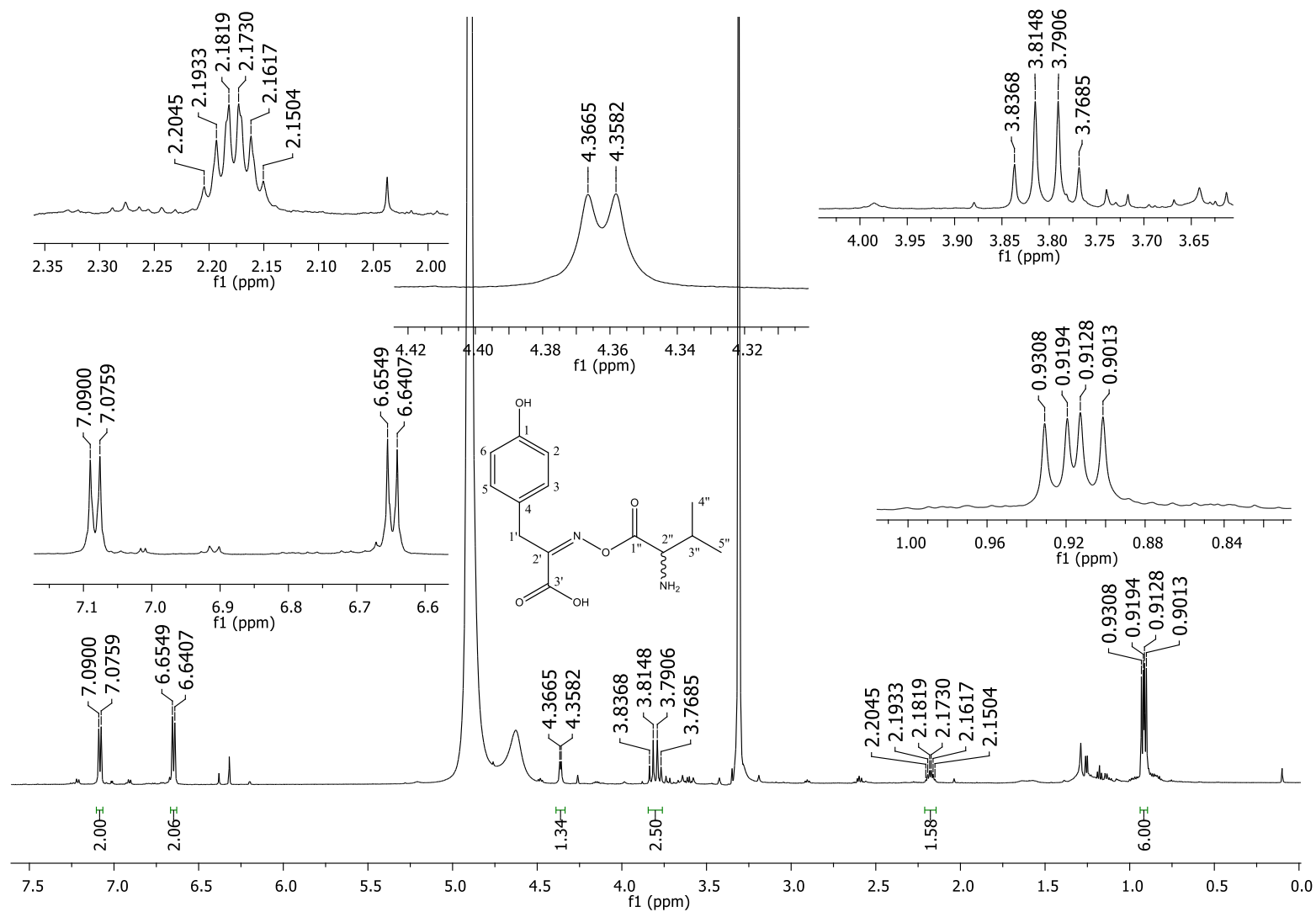
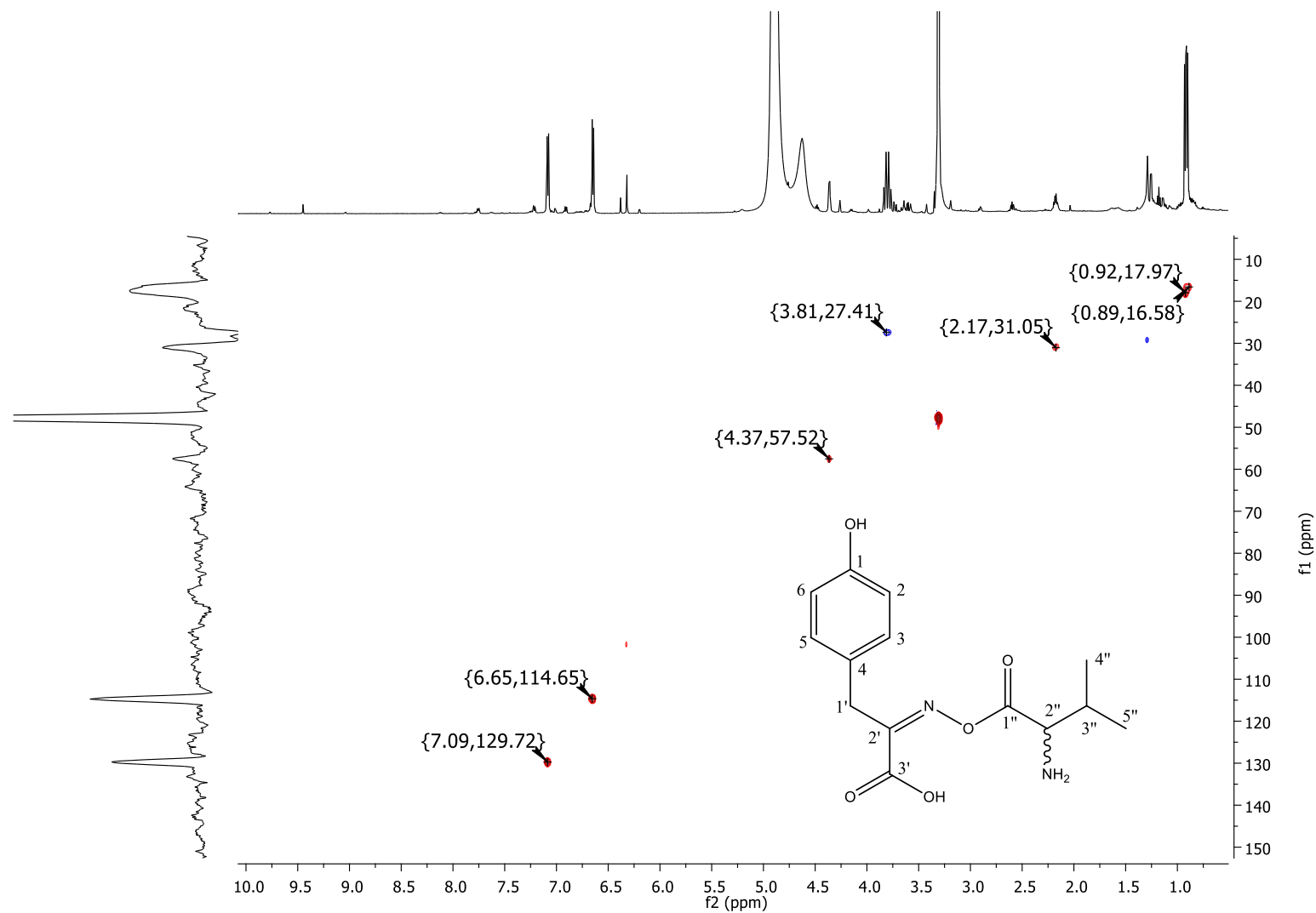
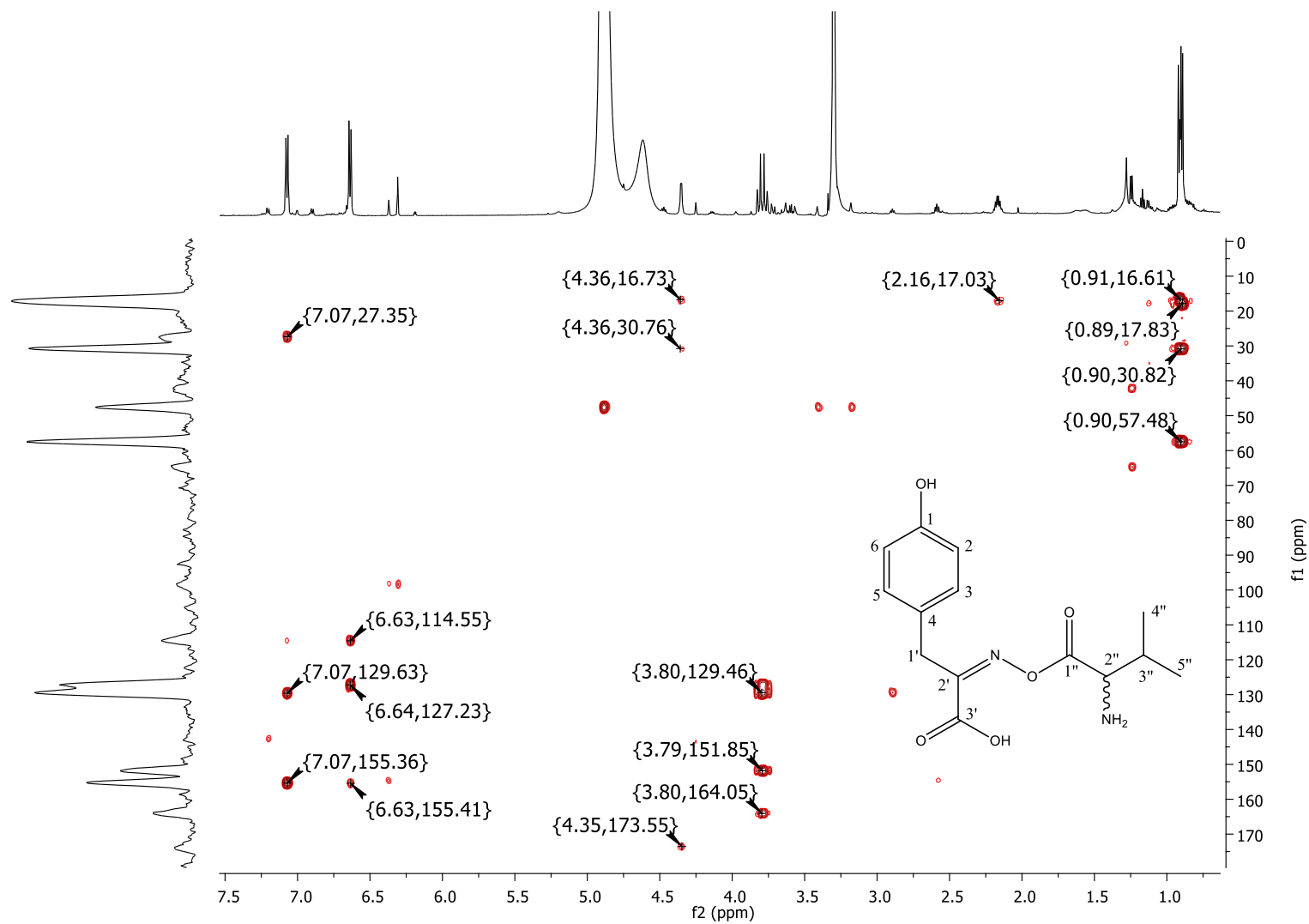


Figura 98: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 5.



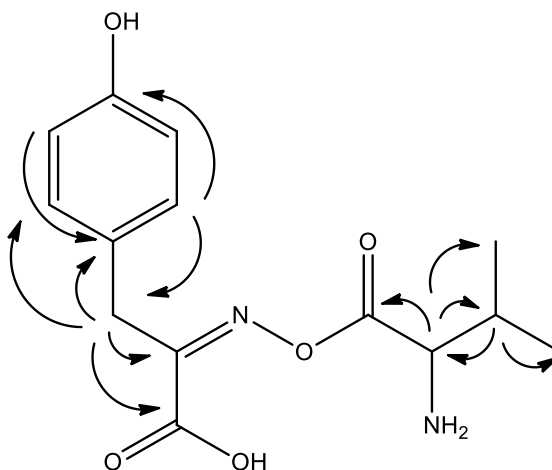
Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,64 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 114,6)) e C-3/C-5 (δ 7,08 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 129,7)), foi possível sugerir um anel aromático *para*-substituído, o deslocamento químico do carbono C-1' (δ_{C} 27,4), hidrogênio H-1' (δ_{H} 3,80), sugeriu a presença de um carbono metilênico, o deslocamento químico do carbono C-2'' (δ_{C} 57,5) e do hidrogênio H-2'' (δ_{H} 4,34 (1H, *d*,)) sugeriu um C-H ligado a um heteroátomo (N), o deslocamento químico do carbono C-3'' (δ_{C} 31,0) e do hidrogênio H-3'' (δ_{H} 2,17 (1H, *m*,)) sugeriu um metino vizinho ao duas metilas (confirmado posteriormente pelo experimento de HMBC e o deslocamento químico dos carbonos C4'' e C5'' (δ_{C} 16,6 e 18,0) e dos hidrogênios H-4'' e H-5'' (δ_{H} 0,90 e 0,91 (6H, *d*,)) indicou duas metilas ligados em um metino (um sistema de isopropila). Aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 99**), forneceu subsídio para elucidar a estrutura da substância 5.

Figura 99: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 5.



Com os dados de correlações a longa distância foi possível posicionar os substituintes no anel aromático, O carbono C-1' foi ligado diretamente ao carbono C-4, devido às correlações a longa distância observada entre H-1'->C-4/C-3/C-5, o C-2' foi ligado diretamente ao C-1', devido a correlação do hidrogênio H-1' com o carbono C-2', já a carbonila (ácido carboxílico) foi ligada nesta posição, devido as correlações a longa distância observada entre H-1' e H-4' com o carbono C-3', já as metilas do sistema isopropila são confirmadas devido a correlação observado do carbono C-2'' com os hidrogênios H-3'', H-4''e H-5'', foi possível posicionar a carbonila ($\delta_c 173,5$) devido a correlação do H-2'' com o carbono C-1''. A Figura 100 sumariza as correlações a longa distância descritas a cima.

Figura 100: Principais correlações observadas no experimento de HMBC (H->C).



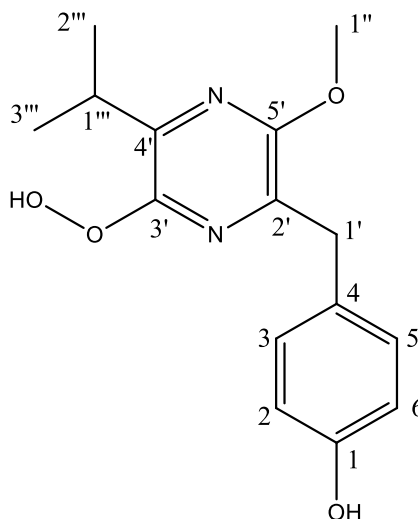
Essas análises permitiram determinar a substância 5, como inédita na literatura. Essa classe de compostos são derivados da tirosina e apresentam uma série de atividade relatadas, principalmente citotóxica (INGAVAT, et al., 2009). Sabendo disso será realizado ensaio biológico buscando essa atividade. Os deslocamentos químicos para a substância 5 encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 5.

Substância 5; 600 MHz; CD₃OD			
Posição	δ_{H} (J em HZ)	δ_{C}, tipo	HMBC
1	-	155,4 C-OH	-
2,6	6,64; <i>d</i> (8,5)	114,6 CH	114,6; 127,2; 155,4
3, 5	7,08; <i>d</i> (8,5)	129,7 CH	27,4; 129,7; 155,4
4	-	127,2 C	-
1'	3,77; <i>dd</i> (13,0)	27,4CH ₂	129,7; 151,8; 164,0
2'	-	151,8 C=N	-
3'	-	164,0 HO-C=O	-
1''	-	173,5 O-C=O	-
2''	4,33; <i>d</i> (5 Hz)	57,5; C-N	31,0; 16,6; 173,5
3''	2,16; <i>m</i>	31,0; C-H	16,6
4''	0,91, <i>d</i> , (6,8 Hz)	16,6, CH ₃	31,0; 57,5; 18,0
5''	0,92, <i>d</i> , (6,8 Hz)	18,0, CH ₃	31,0; 57,5; 16,6

4.6.2.6. Determinação estrutural da substância 6.

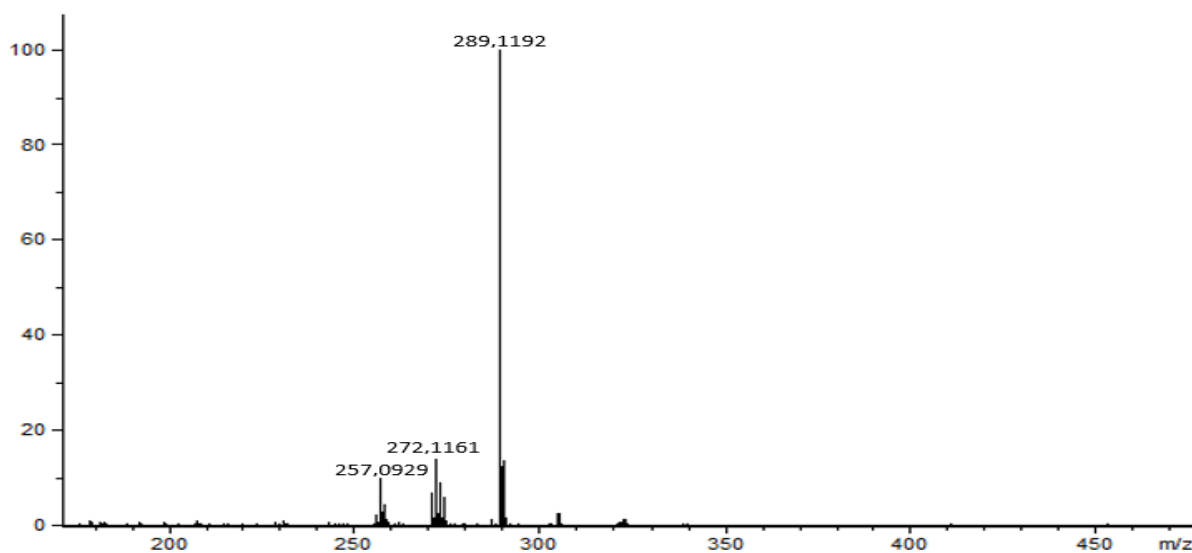
Figura 101: Estrutura da substância 6.



A substância 6 foi isolada como um sólido branco com 13,3 mg de massa. No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por eletrospray, no modo negativo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 289,1192

(erro calculado de 2,77) referente a molécula desprotonada $[M-H]^-$, como mostra a Figura 102.

Figura 102: Espectro de massas de alta resolução da substância 6.



Com isso foi possível chegar na fórmula molecular $C_{15}H_{18}N_2O_4$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C , como mostram as Figuras 103 e 104.

Figura 103: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.

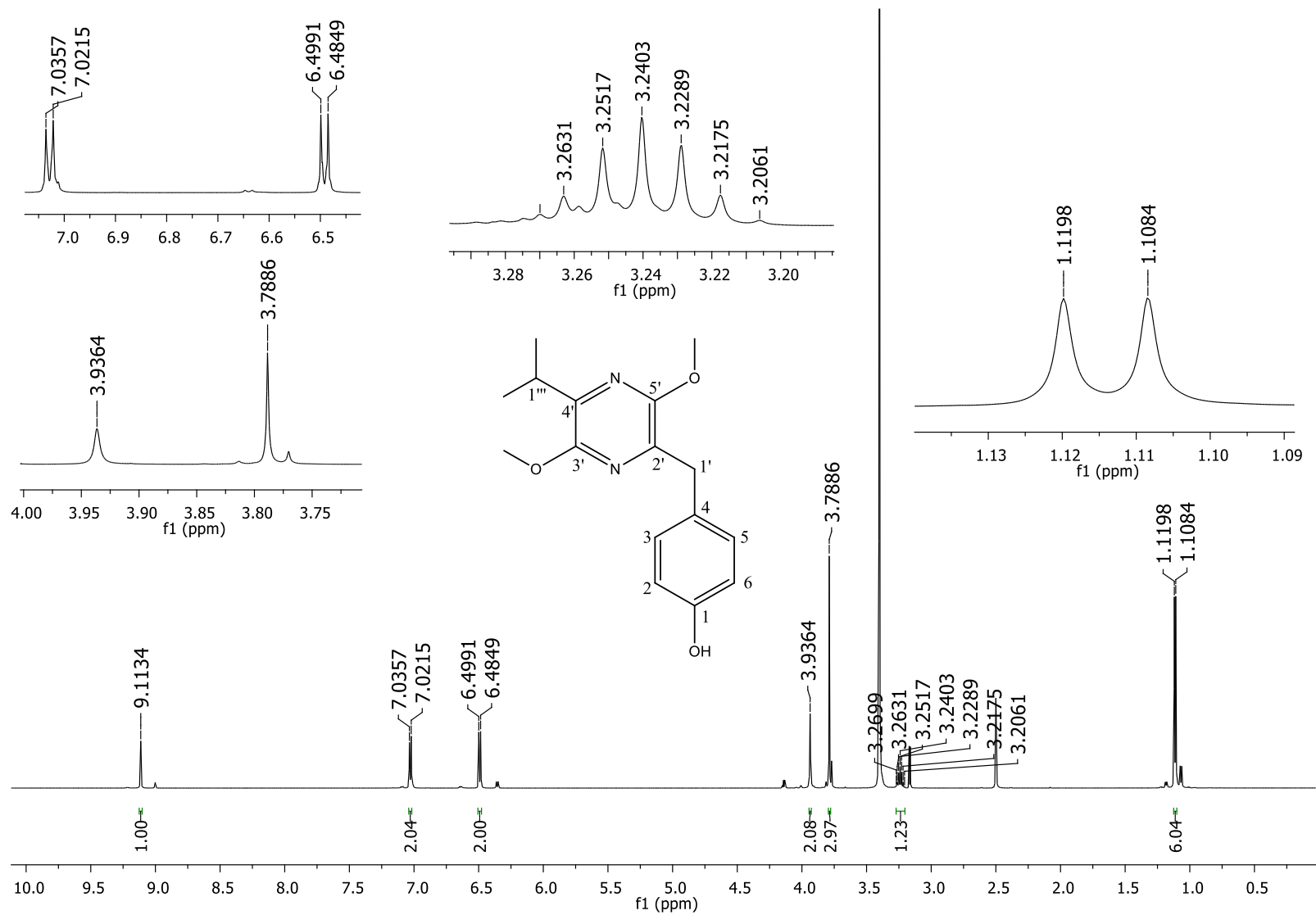
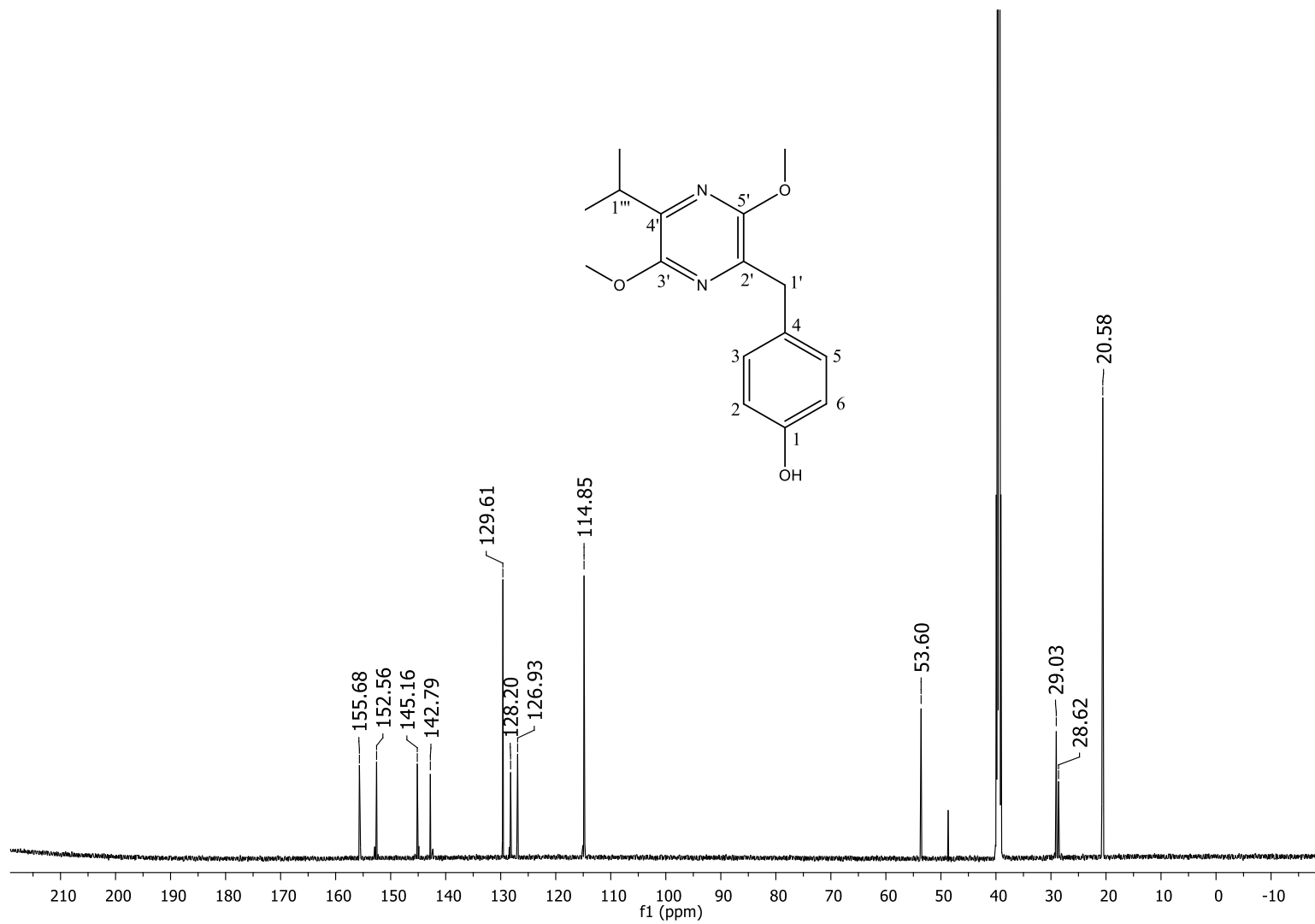


Figura 104: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da substância 6.



Analisando os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figuras 103 e 104**) foi possível observar a presença de 15 átomos de carbono, dez aromáticos (seis quaternários (δ_{C} 126,9; 128,2; 142,8; 145,2; 152,6 e 155,7), quatro metínicos (δ_{H} 6,48; δ_{C} 114,9) e (δ_{H} 7,02; δ_{C} 129,6), um carbono metilênico (δ_{H} 3,94; δ_{C} 28,6), uma metoxila (δ_{H} 3,79; δ_{C} 53,6) e um sistema isopropílico (δ_{H} 1,10 e δ_{H} 3,24; δ_{C} 20,6 e δ_{C} 29,0).

No espectro de HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos (**Figura 105**), Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,48 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 114,9)) e C-3/C-5 (δ_{H} 7,02 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 129,6)), aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 106**), foi possível sugerir um anel aromático *para*-substituído, o deslocamento químico do carbono C-1' (δ_{C} 28,6), hidrogênio H-1' (δ_{H} 3,94, 2H, *s*), sugeriu a presença de um carbono metilênico, vizinho a dois carbonos quaternários, o deslocamento químico do hidrogênio H-1'' (δ_{H} 3,79 (3H, *s*)), carbono (δ_{C} 53,6) sugeriu a presença de uma metoxila, o deslocamento químico do carbono C-3'' (δ_{C} 29,0) e do hidrogênio H-3'' (δ_{H} 3,24 (1H, *sp*)) sugeriu um metino vizinho a duas metilas e um carbono quaternário (confirmado posteriormente pelo experimento de HMBC) e o deslocamento químico dos carbonos C2''' e C3''' (δ_{C} 20,6) e dos hidrogênios H-2''' e H-3''' (δ_{H} 1,10 (6H, *d*)) indicou duas metilas ligados em um metino (um sistema isopropílico), para montar os substituintes do anel aromático e pirazínico, realizou-se experimentos de HMBC.

Figura 105: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.

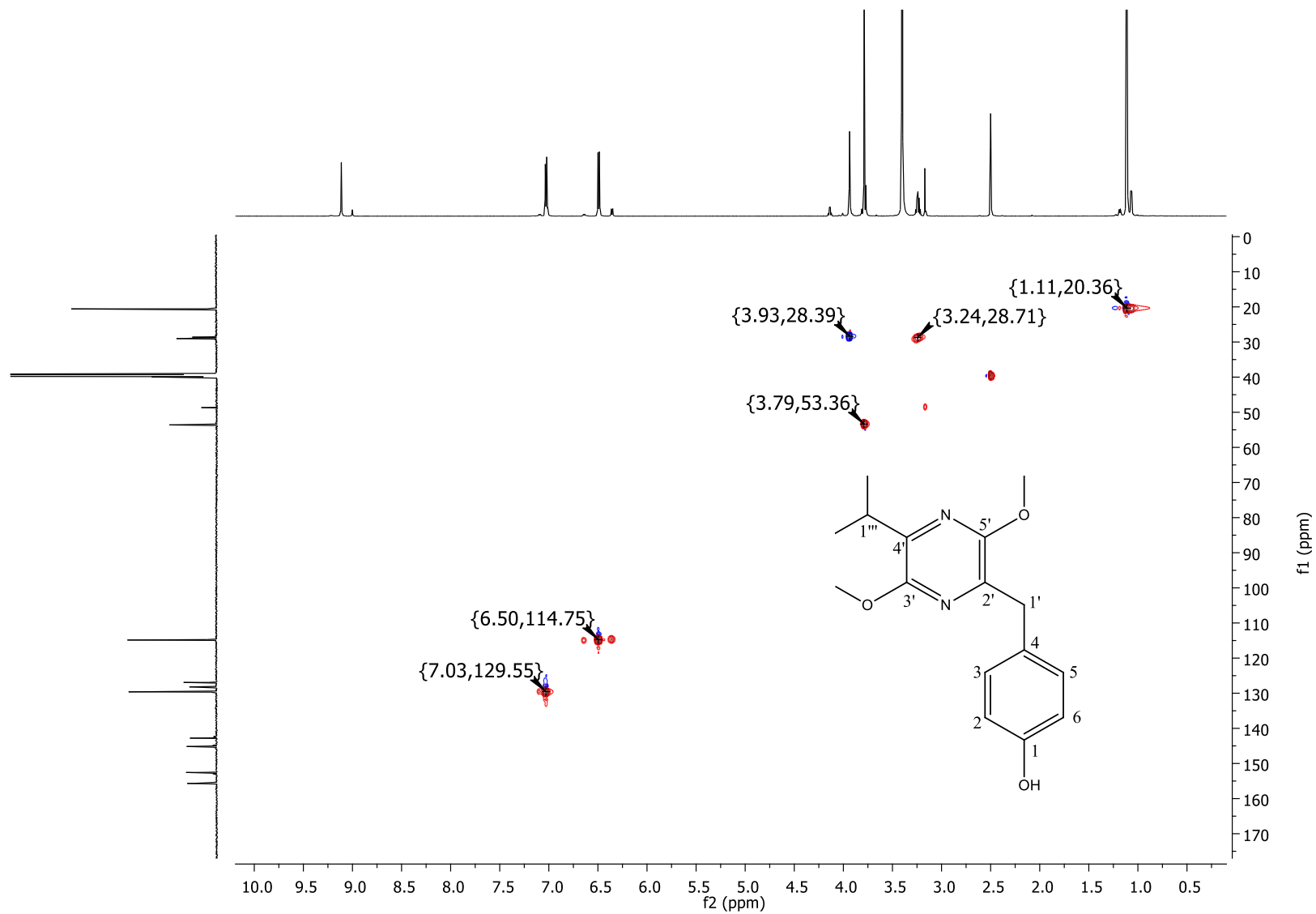
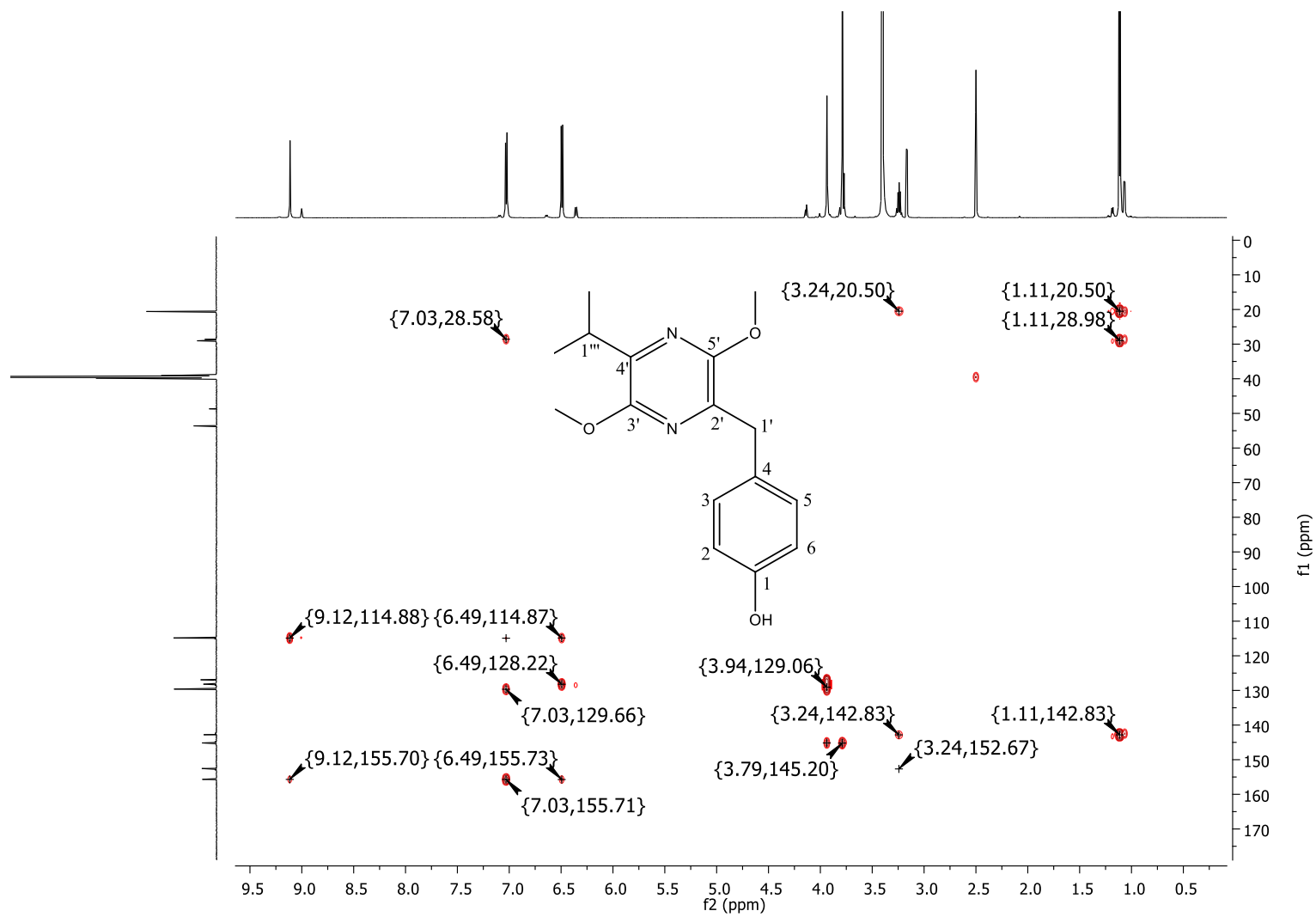
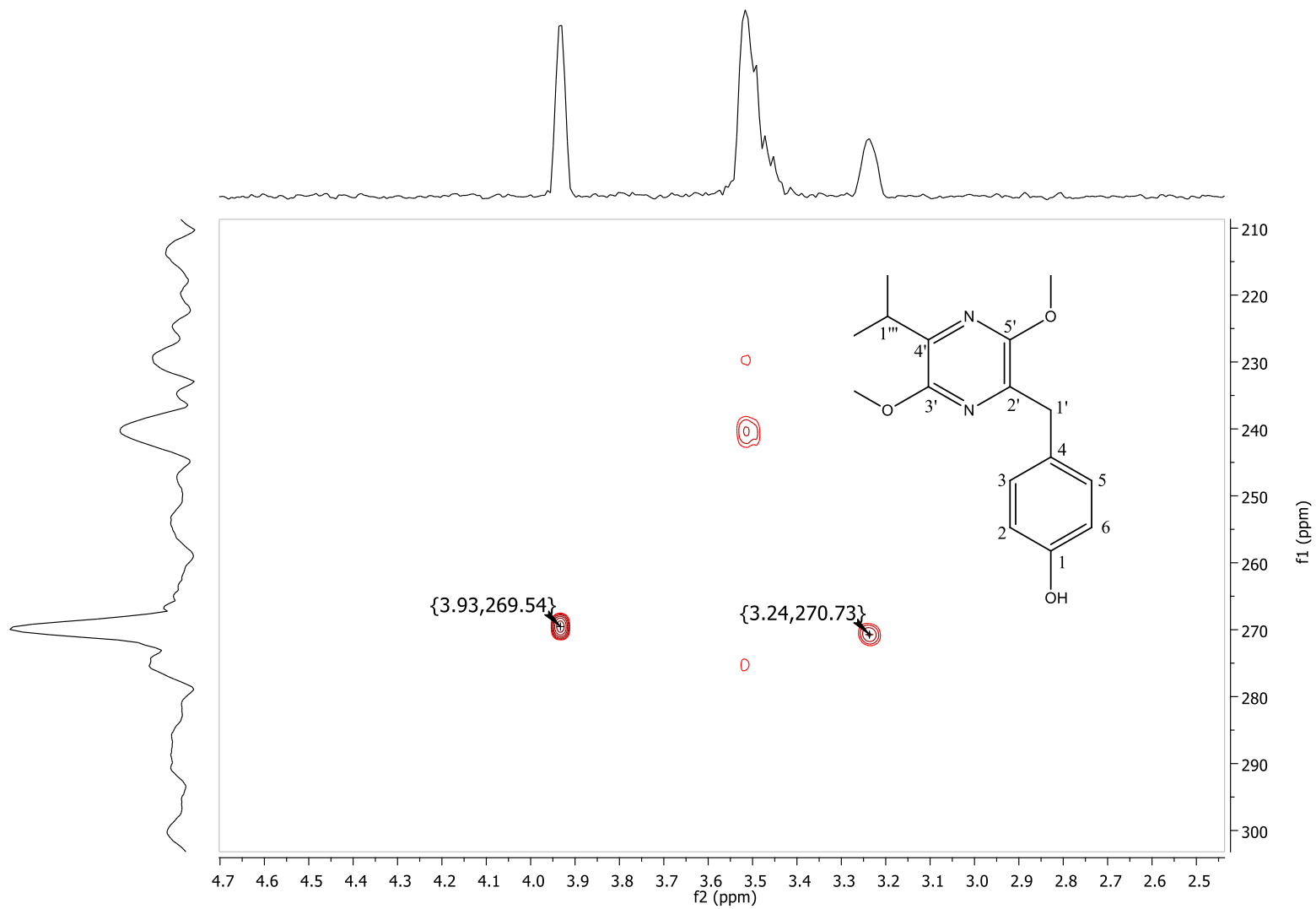


Figura 106: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.



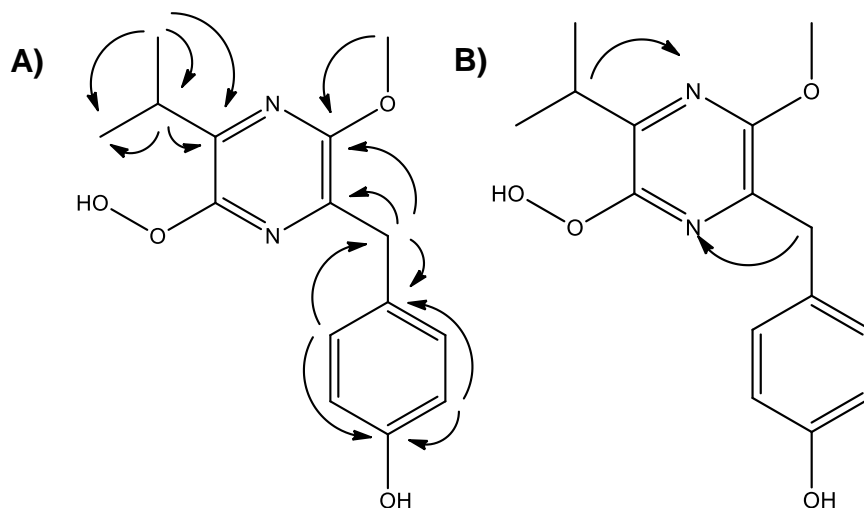
Com os dados de correlações a longa distância foi possível atribuir os substituintes no anel aromático, O carbono C-1' foi ligado diretamente ao carbono C-4, devido às correlações a longa distância observada entre H-1'->C-4/C-3/C-5, o anel pirazínico foi sugerido devido as correlações observadas a longa distância (HMBC ^1H - ^{15}N , **Figura 107**), os substituintes deste anel foram sugeridos analisando os dados de correlações da Figura 106 (HMBC ^1H - ^{13}C), o carbono C-2' foi ligado diretamente ao C-1', devido a correlação do hidrogênio H-1' com o carbono C-2', a metoxila foi ligada ao carbono C-5' devido a correlação observada entre H-1''->C-5', já a isopropila foi ligada ao carbono C-4' devido a correlação do H-1''', H-2''' e H-3'''->C-4'.

Figura 107: Mapa de correlação ^1H - ^{15}N a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 6.



Analisando o espectro de HMBC (^1H - ^{15}N) foi possível confirmar a presença de um anel 1,4-pirazinico, a Figura 108 sumariza todas as correlações a longa distância descritas a cima.

Figura 108: Principais correlações observadas no experimento de **A)** HMBC (^1H - ^{13}C) e **B)** HMBC (^1H - ^{15}N).

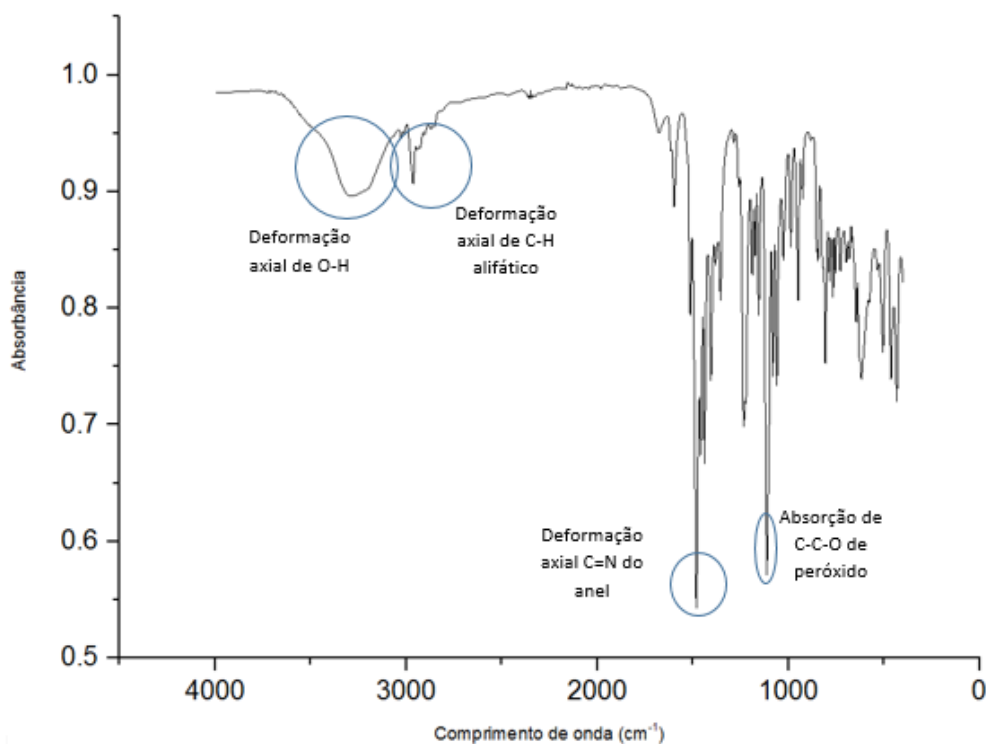


Comparando a fórmula molecular sugerida por espectrometria de massas ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$) e a fórmula molecular observada pelos dados de ressonância magnética nuclear ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$) ocorreu a discrepância de um oxigênio, o que levou a sugestão do peróxido, confirmado por infravermelho (**Figura 109**). Os deslocamentos químicos para a substância 6 encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 6.

Substância 6; 600 MHz; MeOD			
Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C} , tipo	HMBC
1	-	155,7 C	-
2,6	6,48; <i>d</i> (8,5Hz)	114,9 CH	114,9; 128,2; 155,7 28,6; 114,9; 129,6;
3, 5	7,02; <i>d</i> (8,5Hz)	129,6 CH	155,7
4	-	128,2 C	-
1'	3,94; <i>s</i>	28,6 CH ₂	128,2; 145,2
2'	-	126,9 C-N	-
3'	-	152,6 C-O	-
4'	-	142,8 C-N	-
5'	-	145,2 O-C-N	-
1'''	3,24; <i>sp</i> (6,8Hz)	29,0 CH	20,6; 142,8; 152,6
2''', 3'''	1,1; <i>d</i> (6,8Hz)	20,6 2CH ₃	20,6; 29,0 ; 142,8
1''	3,79 <i>s</i>	53,6 CH ₃	145,2

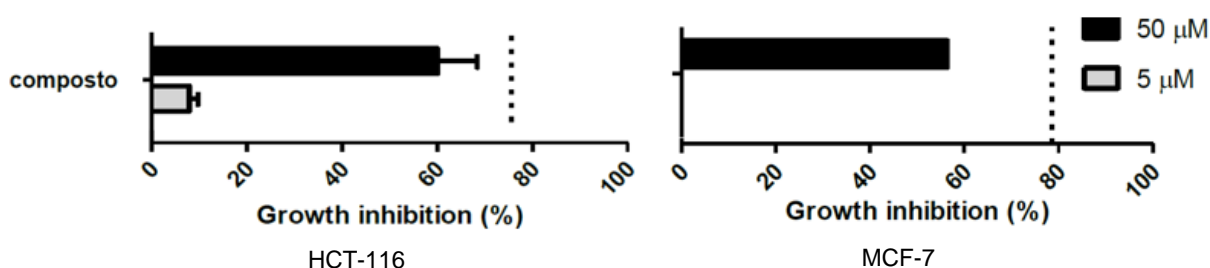
Figura 109: Espectro de infravermelho da substância 6.



O espectro de IV (**Figura 109**) exibiu uma banda intensa e larga em 3336 cm^{-1} característico de deformação axial de hidroxila, uma banda associada a deformação axial de C=N conjugada em 1435 cm^{-1} e uma banda em 1260 cm^{-1} característico de absorção de C-C-OH de peróxido.

Essas análises permitiram determinar a substância 6, inédita na literatura, para esse composto foi testado a atividade citotóxica frente a linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116) e adenocarcinoma mamário (MCF-7), Figura 110.

Figura 110: Percentual de inibição do crescimento celular da substância 6, frente a linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.



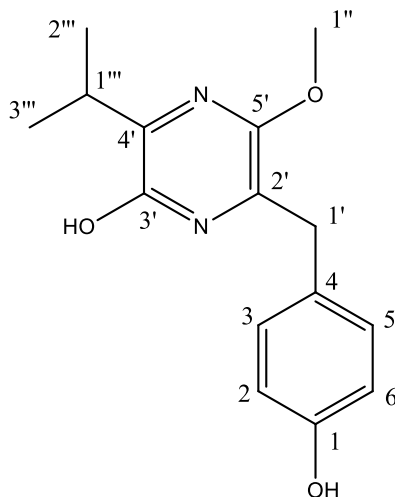
Observa-se que o composto 6 demonstrou atividade citotóxica moderada ($20\% < \text{valor de inibição} < 75\%$) frente às duas linhagens testada na concentração de $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e baixa atividade na concentração de $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (valor de inibição $< 20\%$). Os resultados estão sumarizados na Tabela 19.

Tabela 19: Inibição do crescimento celular (%) do composto 6 em linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116), e adenocarcinoma mamário (MCF-7), com as concentrações de $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ e $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ (média \pm SEM) (n=2).

	HCT-116				MCF-7			
	5 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$		5 $\mu\text{g/mL}$		50 $\mu\text{g/mL}$	
	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM	Média	SEM
Composto 6	8,47	1,91	63,87	8,83	0,00	10,24	56,40	0,01

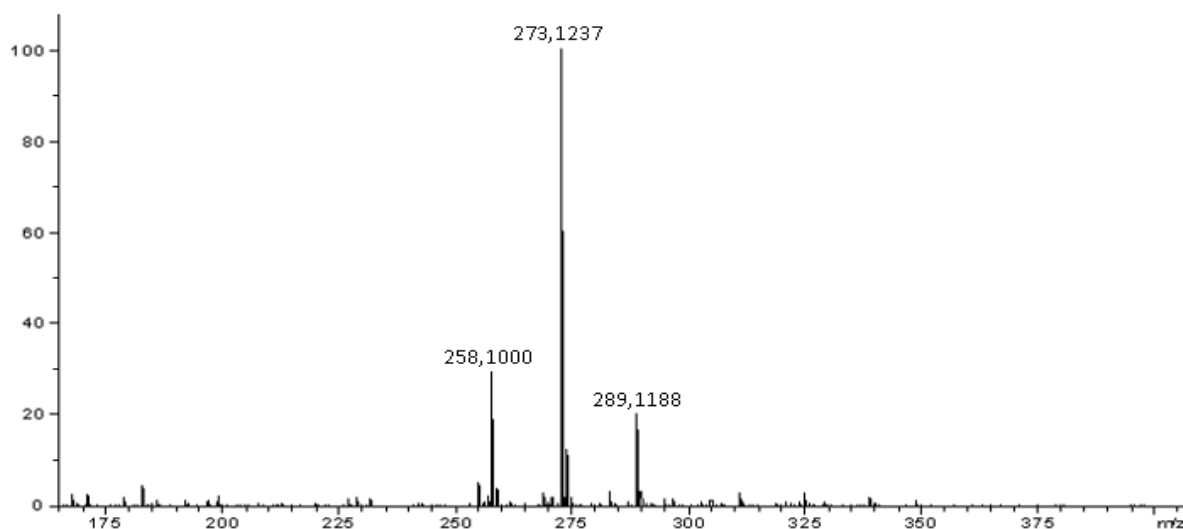
4.6.2.7. Determinação estrutural da substância 7.

Figura 111: Estrutura da substância 7.



A substância 7 foi isolada como um sólido amarelo com 3,8 mg de massa. No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray*, no modo negativo (LC-QTOF), foi visualizado o sinal de m/z 273,1237 (erro calculado de 0,73) referente a molécula desprotonada $[M-H]^-$, como mostra a Figura 112.

Figura 112: Espectro de massas de alta resolução da substância 7.



Com isso foi possível chegar na fórmula molecular $C_{15}H_{18}N_2O_3$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C , como mostra as Figuras 113 e 114.

Figura 113: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da substância 7.

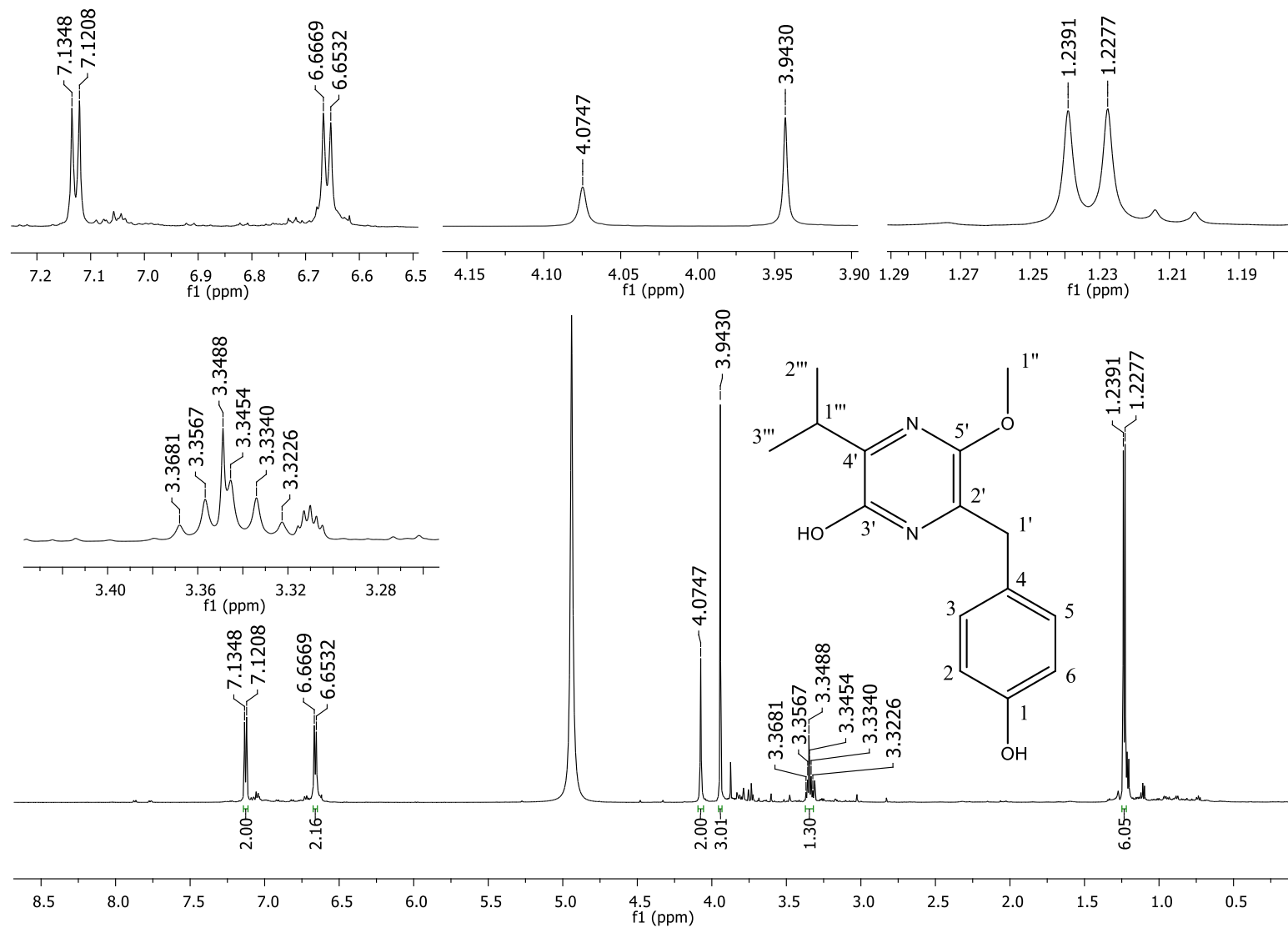
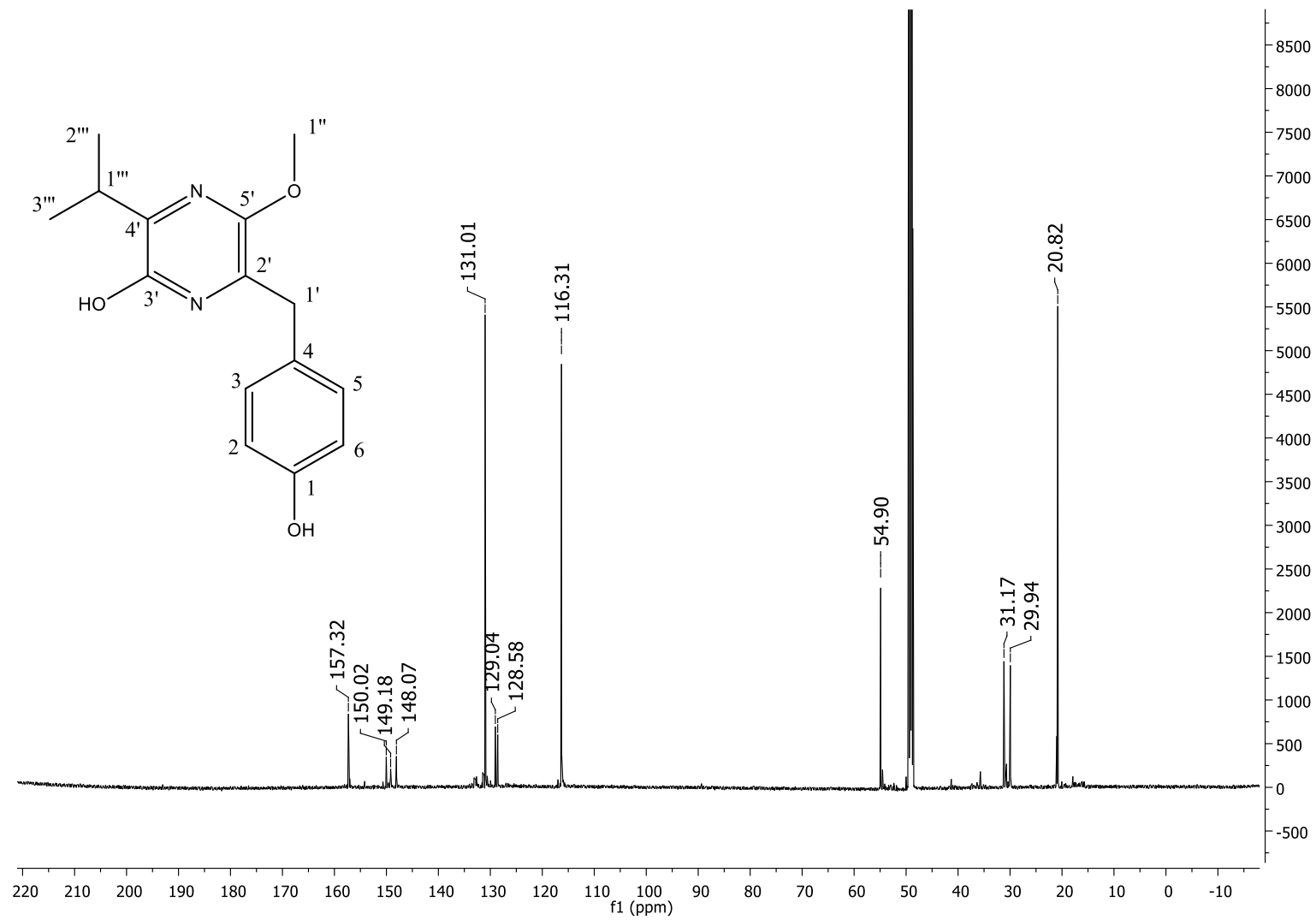


Figura 114: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da substância 7.



Pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figuras 113 e 114**) foi possível observar a presença de 15 átomos de carbono, dez aromáticos (seis quaternários (δ_{C} 128,6; 129,0; 148,0; 149,2; 150,0 e 157,3), quatro metínicos (δ_{H} 6,65; δ_{C} 116,3) e (δ_{H} 7,12; δ_{C} 131,0), um carbono metilênico (δ_{H} 4,07; δ_{C} 29,9), uma metoxila (δ_{H} 3,94; δ_{C} 54,9) e um sistema isopropílico (δ_{H} 1,22 e δ_{H} 3,34; δ_{C} 20,8 e δ_{C} 31,2), se observarmos há uma certa semelhança com os espectros da substância 6, porém esse composto apresenta 16 unidades de massa a menos, o que sugeriu a mesma estrutura, o que foi confirmado posteriormente com as análises de HSQC e HMBC.

No espectro de HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos, Figura 115, Através da análise dos espectros de RMN de ^1H em conjunto com os valores de deslocamento químico para os carbonos C-2/C-6 (δ_{H} 6,65 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 116,3)) e C-3/C-5 (δ_{H} 7,12 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 131,0)), e confirmar o carbono metilênico, a metoxila e o sistema isopropílico, aliado às correlações observadas no experimento de HMBC (**Figura 116**), foi possível sugerir um anel aromático *para*-substituído, e um anel pirazínico, para montar os substituintes dos dois anéis realizou-se experimentos de HMBC.

Figura 115: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da substância 7.

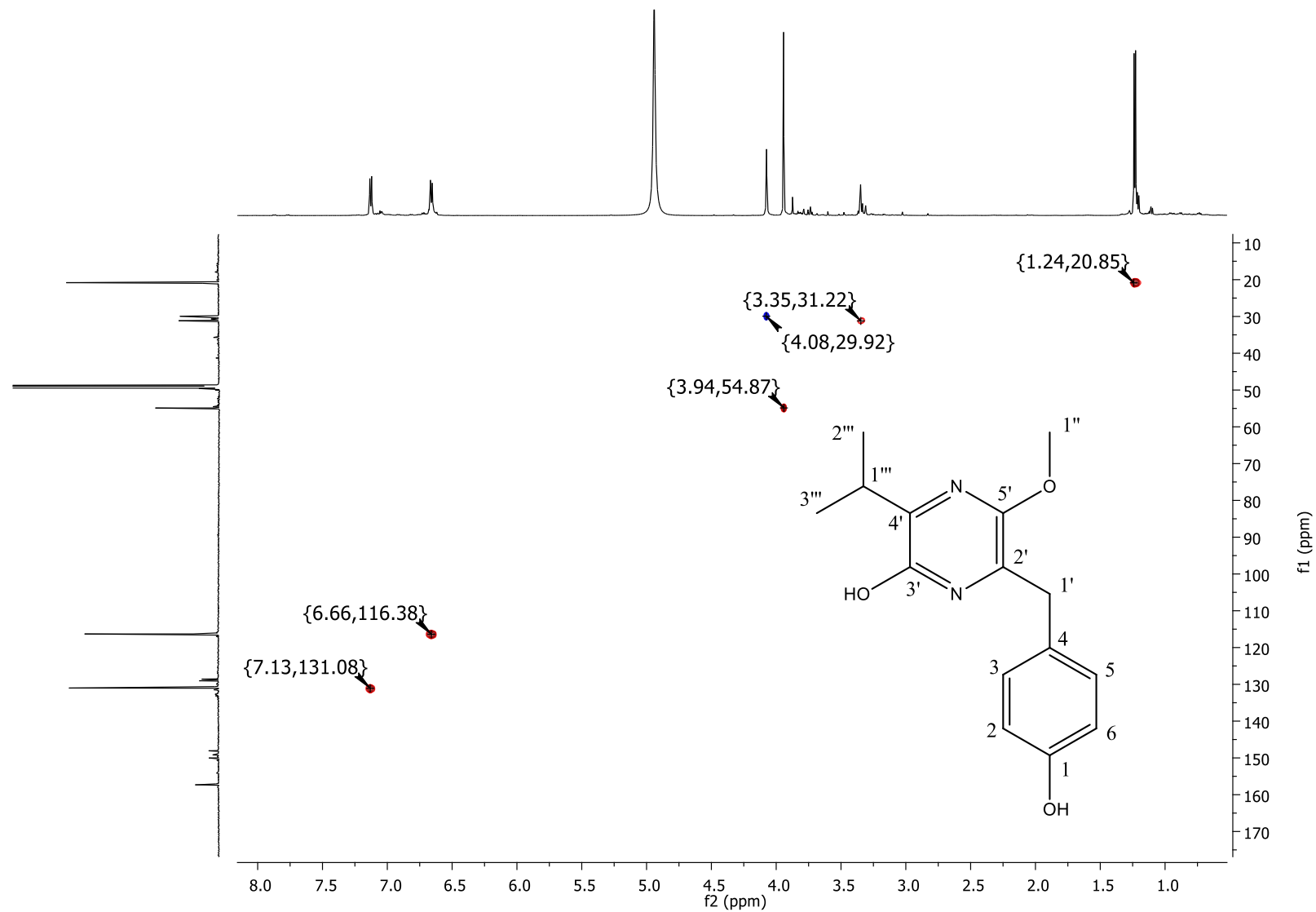
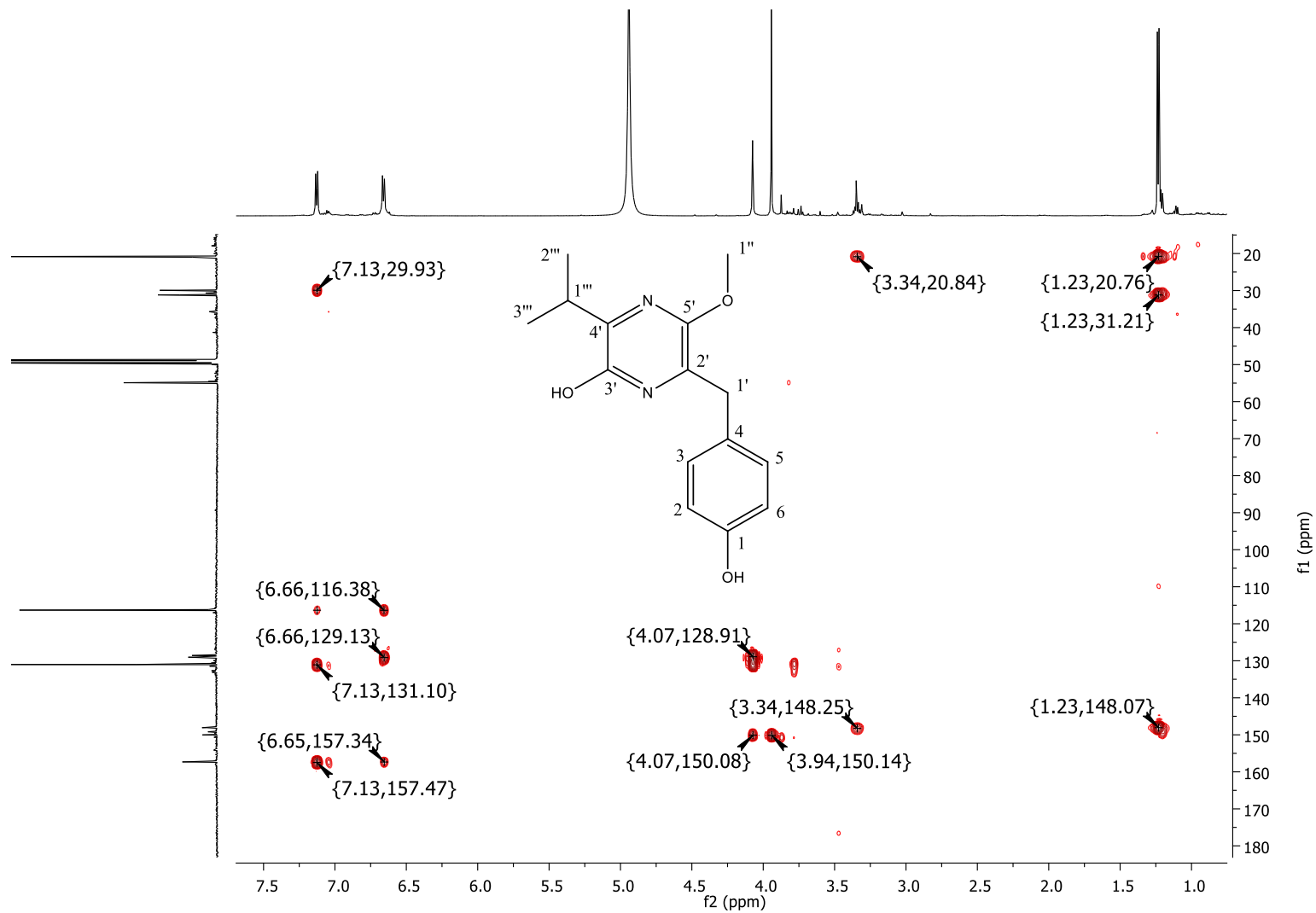
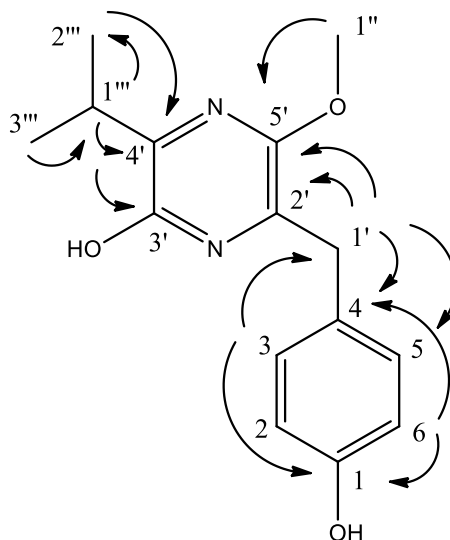


Figura 116: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da substância 7.



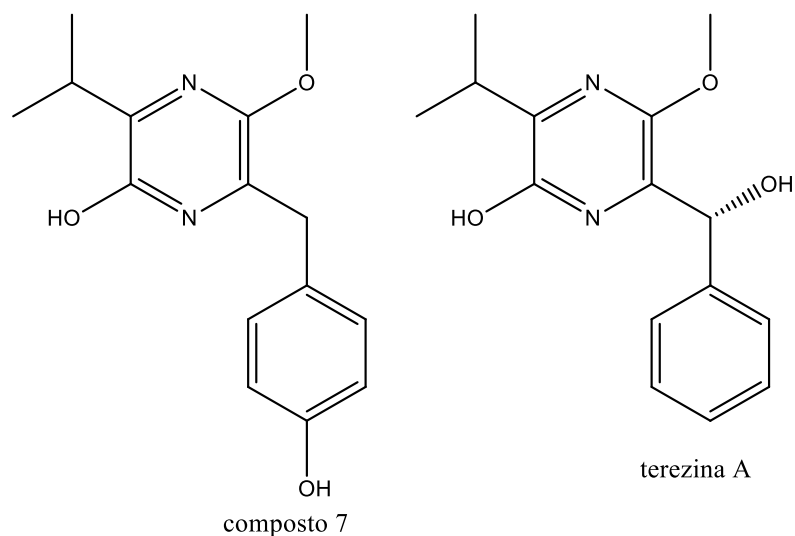
Com os dados de correlações a longa distância foi possível observar as mesmas correlações propostas para a substância 6 (Figura 101, p. 137), mediante esses dados, posicionou-se os substituintes no anel aromático. O carbono C-1' foi ligado diretamente ao carbono C-4, devido às correlações a longa distância observada entre H-1'->C-4/C-3/C-5, os substituintes deste anel foram sugeridos analisando os dados de correlações da Figura 116 (HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$), o carbono C-2' foi ligado diretamente ao C-1', devido a correlação do hidrogênio H-1' com o carbono C-2', a metoxila foi ligada ao carbono C-5' devido a correlação observada entre H-1''->C-5', já a isopropila foi ligada ao carbono C-4' devido a correlação do H-1''', H-2''' e H-3'''->C-4'. A Figura 117 sumariza as correlações a longa distância descritas a cima.

Figura 117: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($^1\text{H}-^{13}\text{C}$).



Essas análises permitiram determinar a estrutura da substância 7, como inédita na literatura. A atividade antimicrobiana será avaliada deste composto, visto sua semelhança com um metabólito do fungo *Sporormiella teretispora*, a terezina A (**Figura 118**), que apresentou atividade contra uma gama de micro-organismos (ex: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* entre outros) (WANG, Y. e GLOER, J. B., 1995).

Figura 118: Comparação da fórmula estrutural do composto 7 com a terezina A.



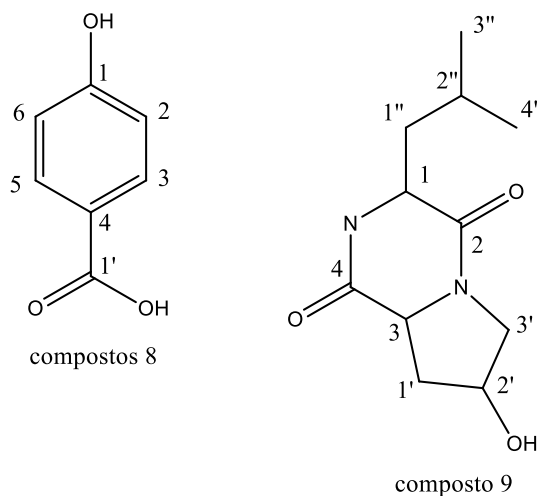
Os deslocamentos químicos para a substância 7 encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 7.

Substância 7; 600 MHz; CD₃OD			
Posição	δ_{H} (J em HZ)	δ_{C}, tipo	HMBC
1	-	157,3 C-OH	-
2,6	6,66; <i>d</i> (8,5Hz)	116,3 CH	116,3; 129,0; 157,3
3, 5	7,13; <i>d</i> (8,5Hz)	131,0 CH	29,9; 116,3; 131,0; 157,3
4	-	129,0 C	-
1'	4,07; <i>s</i>	29,9 CH ₂	129,0; 149,2;
2'	-	128,6 C-N	-
3'	-	150,0 C-O	-
4'	-	148,0 C-N	-
5'	-	149,2	-
1'''	3,35; <i>m</i>	31,2 CH	20,8; 148,0
2''', 3'''	1,22 <i>d</i> (6,8Hz)	20,8 2CH ₃	20,8; 31,2; 148,0
1''	3,94 <i>s</i>	55, OCH ₃	149,2

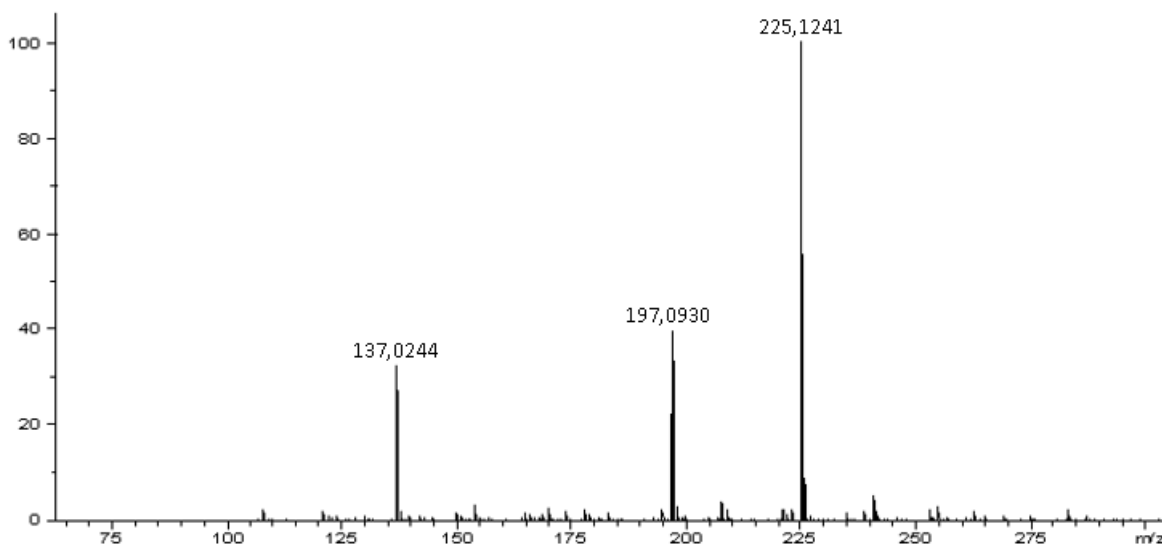
4.6.2.8. Determinação estrutural das substâncias 8 e 9.

Figura 119: Estrutura das substâncias 8 e 9.



As substâncias 8 e 9 (4,5 mg) foram identificadas em uma mistura. No espectro de massas de alta resolução utilizando a técnica de ionização por *eletrospray*, no modo negativo (LC-QTOF), foi visualizado os sinais de m/z 137,0244 e m/z 225,1241 (erro calculado de 3,65 e 0,88) referente aos pais das moléculas desprotonadas $[M-H]^-$ dos compostos 8 e 9 respectivamente, como mostra a Figura 120.

Figura 120: Espectro de massas de alta da mistura (substâncias 8 e 9).



Com isso foi possível chegar nas fórmulas moleculares $C_7H_6O_3$ e $C_{11}H_{18}N_2O_3$, resultado confirmado com o auxílio dos dados de RMN 1H e ^{13}C , como mostram as Figuras 121 e 122.

Figura 121: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).

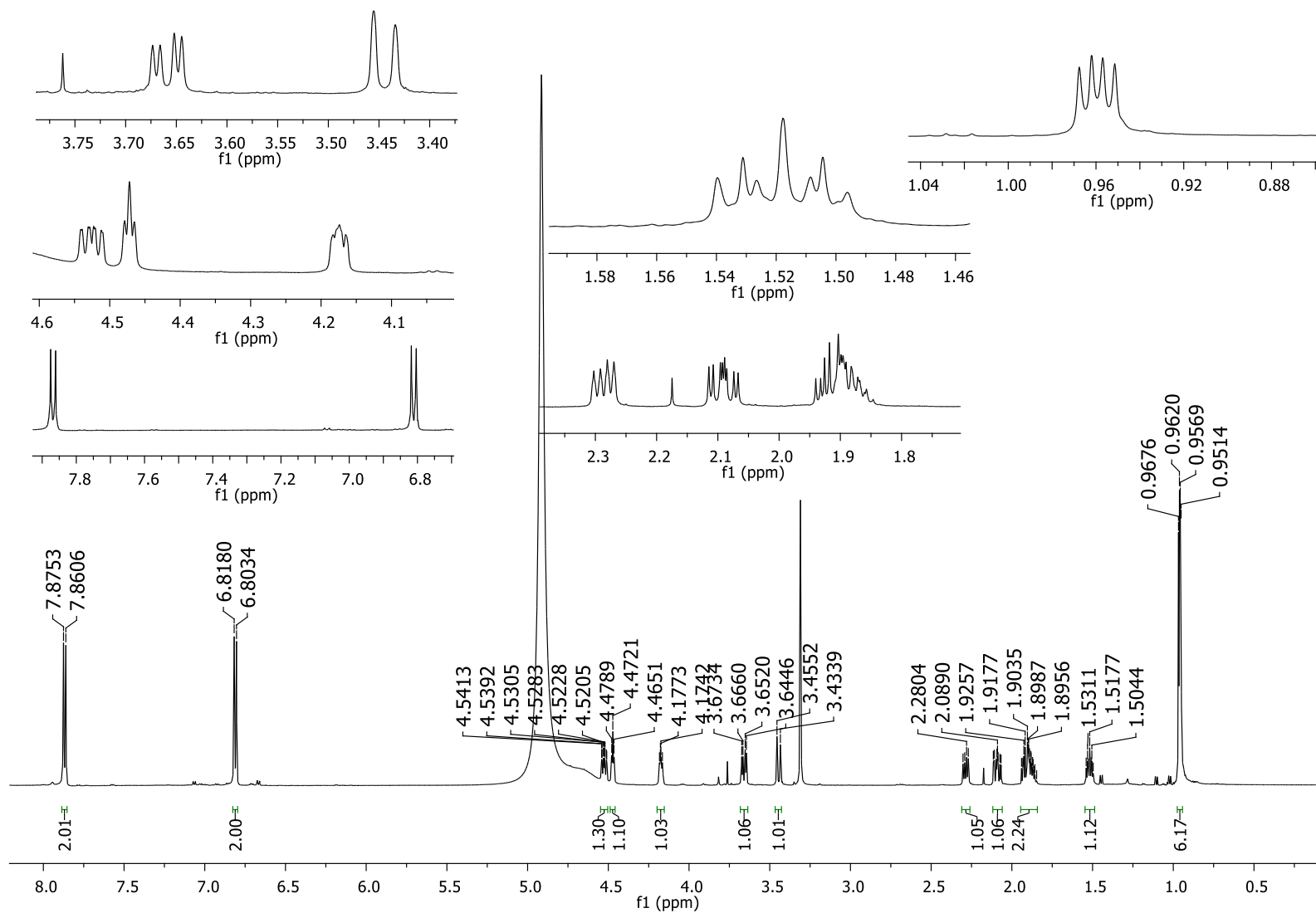
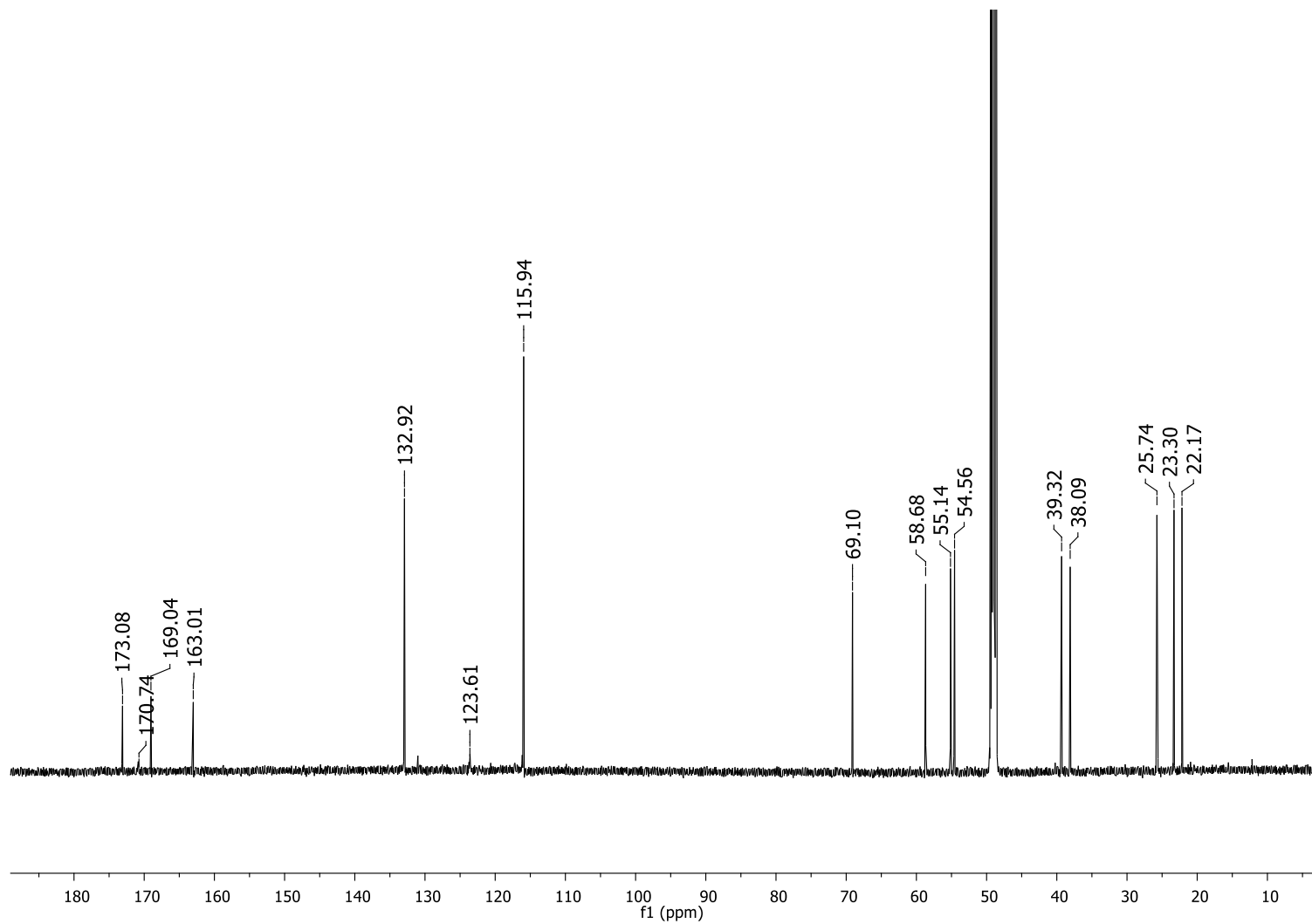


Figura 122: Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).



Análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**Figuras 121 e 122**) possibilitou observar a presença de um anel aromático *para*-substituído C-2/C-6 (δ_{H} 6,80 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 115,9)) e C-3/C-5 (δ_{H} 7,86 (2H, *d*, $J=8,5$ Hz; δ_{C} 132,9), C-1 (δ_{C} 163,0) e C-4 (δ_{C} 123,6), uma carbonila C-1' (δ_{C} 170,7), que foram atribuídas a substância 8. Observou-se também um sistema isopropila C-3'' (δ_{H} 0,95 (3H, *d*, $J=6,30$ Hz; δ_{C} 22,1), C-4'' (δ_{H} 0,96 (3H, *d*, $J=6,30$ Hz; δ_{C} 23,3), duas carbonilas C-2 e C-4 (δ_{C} 169,0 e 173,0), e um metino C-2' (δ_{H} 4,48 (H, *tl*, $J=8,25$ e 4,25 Hz; δ_{C} 69,1) ligado a um heteroátomo (O), atribuídos a substância 9. Os demais sinais observados foram atribuídos mediante análise dos espectros de HSQC e HMBC (Figuras 123 e 124).

No espectro de HSQC foi possível atribuir os hidrogênios aos respectivos carbonos, observar três hidrogênios diastereoisotópicos H-1' (δ_{H} 2,09; 2,29), H-3' (δ_{H} 3,44; 3,67) e H-1'' (δ_{H} 1,52; 1,89), e confirmar o sistema isopropílico. Analisando as correlações a longa distância (espectro de HMBC) para o composto 8, foi possível observar as correlações dos hidrogênios H-2 e H-6 com os carbonos C-4 e C-1, as correlações dos hidrogênios H-3 e H-5 com os carbonos C-1 e C-1', fechando a estrutura da substância 8. Também foi possível observar as correlações para a substância 9, do hidrogênio H-1 com os carbonos C-2, C-1'' e C-2''. As correlações do hidrogênio H-3 com os carbonos C-4 e C-1', correlações do hidrogênio H-1' com os carbonos C-4, C-3, C-2' e C-3', correlações do hidrogênio H-2' com os carbonos C-3, correlações do hidrogênio H-3'' com os carbonos C-1', C-3, C-2', correlações do hidrogênio H-1''' com os carbonos C-3''', C-4''', C-2''', C-1, C-2, e as correlações do hidrogênio H-2''' com os carbonos C-1''', C-3''' e C-4''' e com isso fechar a estrutura do composto 9.

Figura 123: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a uma ligação (600 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).

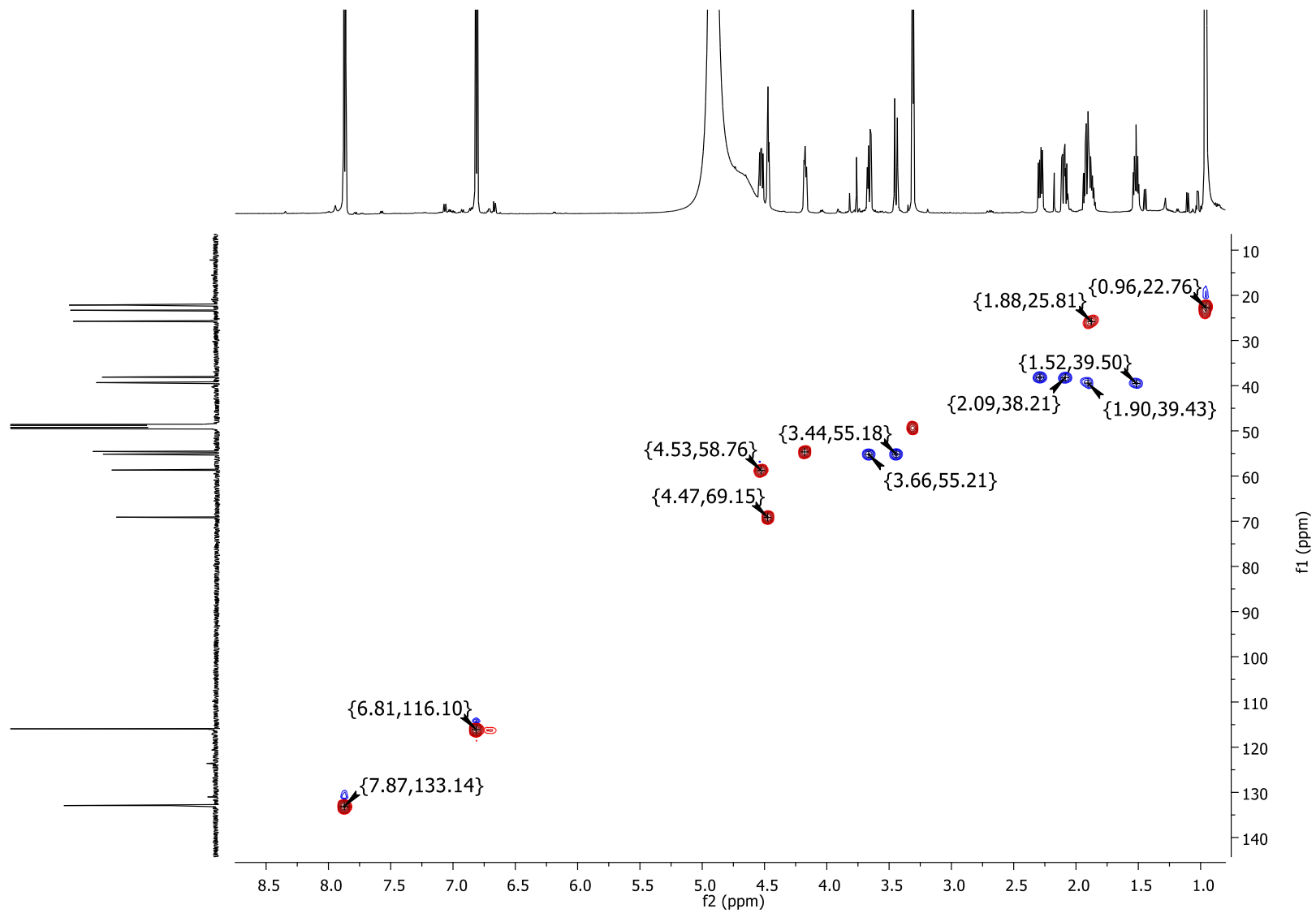
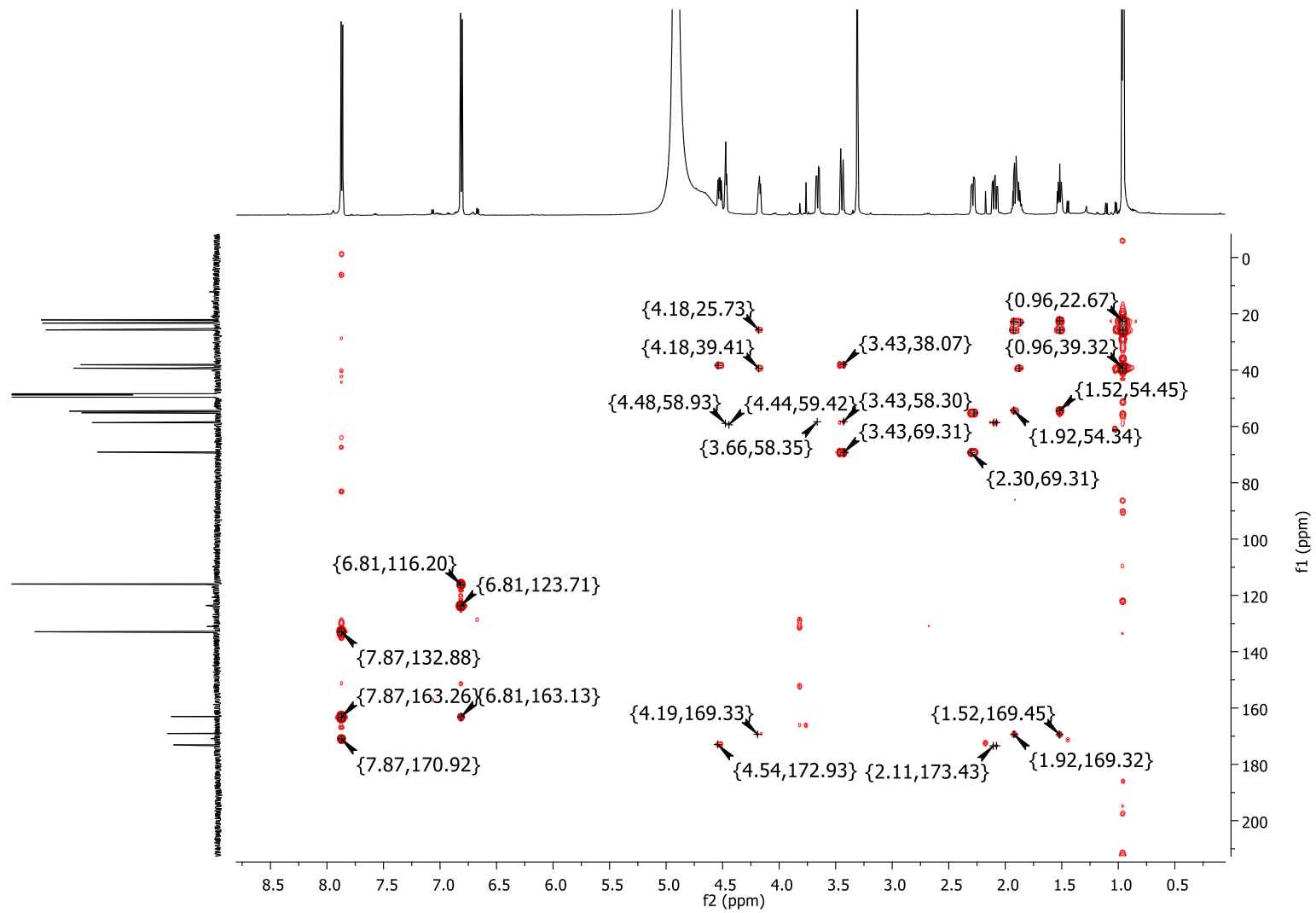
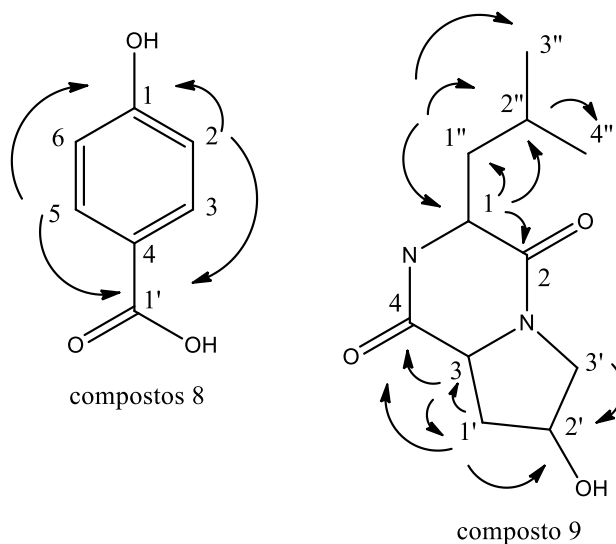


Figura 124: Mapa de correlação ^1H - ^{13}C a longa distância (600 MHz, CD_3OD) da mistura (substâncias 8 e 9).



A Figura 125 sumariza as correlações a longa distância mostradas a cima.

Figura 125: Principais correlações observadas no experimento de HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$).



Essas análises permitiram determinar as substâncias 8 e 9, dois compostos já conhecidos pela literatura, e que apresentam diversas atividades relatadas. Os deslocamentos químicos para as substâncias 8 e 9 encontram-se nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 8.

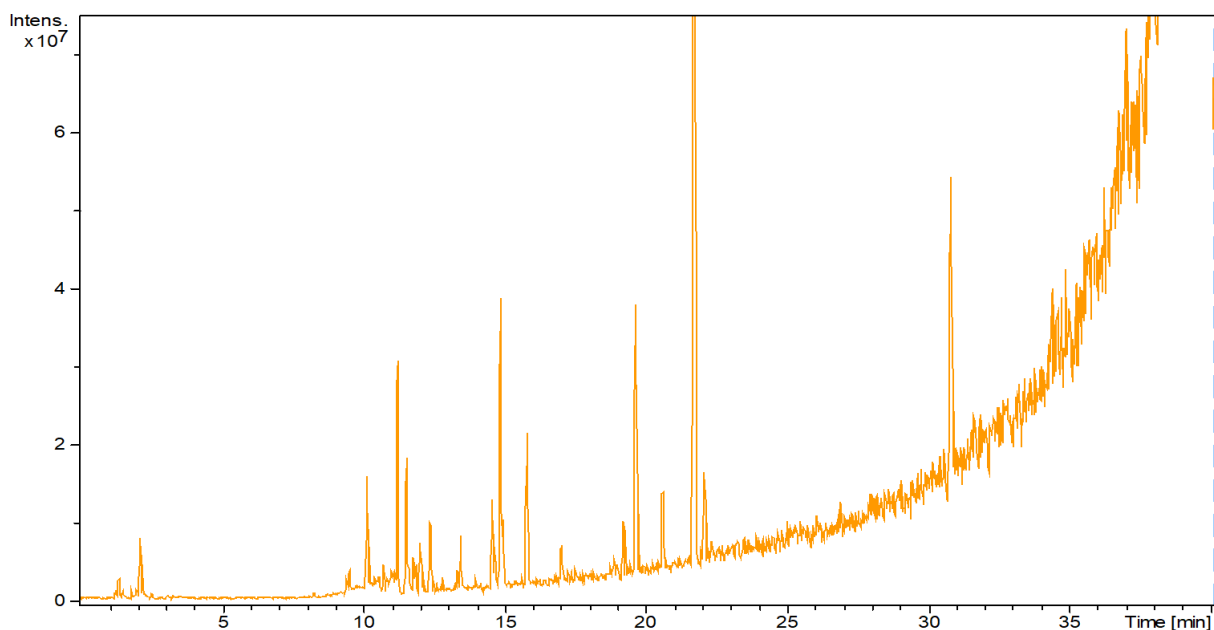
Substância 8; 600 MHz; CD_3OD			
Posição	δ_{H} (J em HZ)	δ_{C} , tipo	HMBC
1	-	163,0 C-OH	-
2,6	6,80; <i>d</i> (8,8Hz)	115,9 CH	115,9; 123,6; 163,0
3, 5	7,86; <i>d</i> (8,8Hz)	132,9 CH	132,9; 163,0; 170,7
4	-	123,6 C	-
1'	-	170,7 O-C=O	-

Tabela 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 9.

Substância 9; 600 MHz; CD_3OD			
Posição	δ_{H} (J em HZ)	δ_{C} , tipo	HMBC
1	4.18; <i>m</i>	54,6 CH-N	25,7; 39,3; 169,0
2	-	169,0 N-C=O	-
3	4.52; <i>m</i>	58,7 CH	38,1; 173,0
4	-	173,0 N-C=O	-
1'	2,09;2,29; <i>m</i>	38,1 CH_2	55,1; 58,7; 69,1; 173,0
2'	4.48; <i>tt</i> ; (8,2; 4,0 Hz)	69,1 CH	38,1; 169,0
3'	3,44; <i>d</i> (12,8Hz)	55,1 $\text{CH}_2\text{-N}$	38,1; 58,7; 69,1
	3,67; <i>dd</i> (4,5; 12,8 Hz)		
1''	1,52;1,89; <i>m</i>	39,3 CH_2	22,1; 25,7; 54,6; 169,0
2''	1.87; <i>m</i>	25,7 CH	23,3; 39,3
3''	0,95; <i>d</i> (6.4Hz)	22,1 CH_3	23,3; 25,7; 39,3
4''	0,96; <i>d</i> (6.4Hz)	23,3 CH_3	22,1; 25,7; 39,3

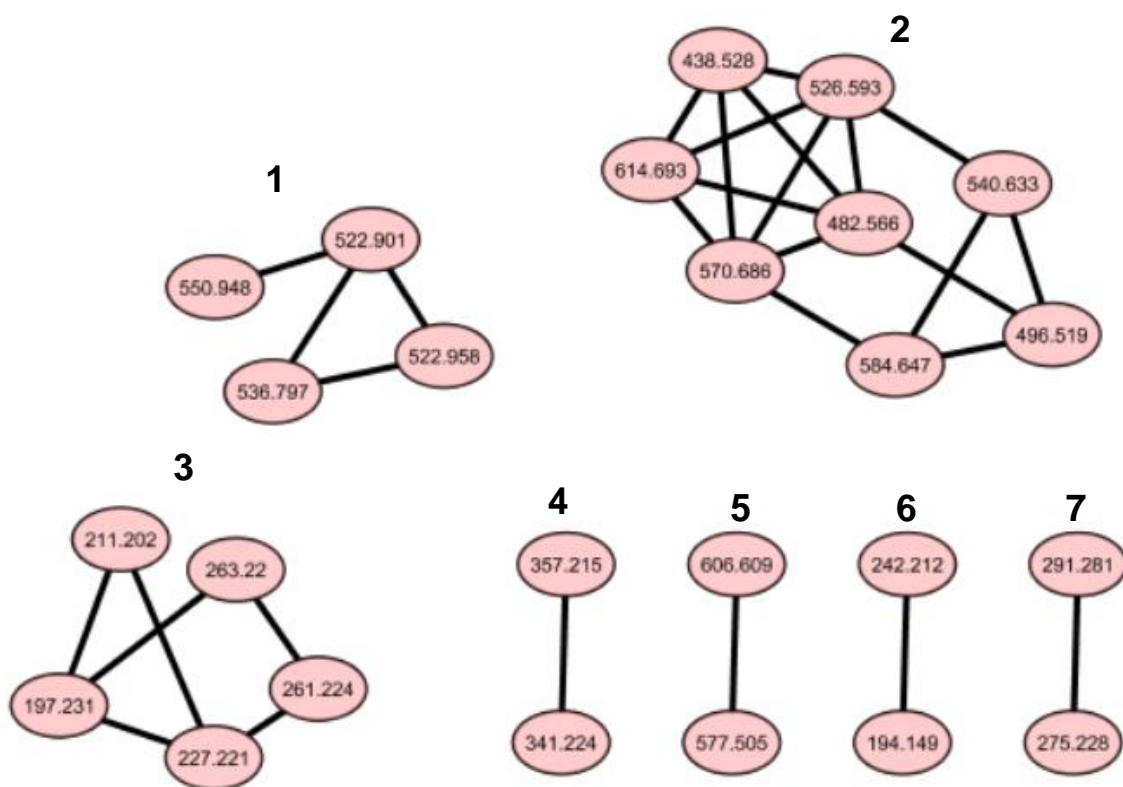
Visando identificar mais compostos da classe das dicetopiperazinas, dados obtidos por CLAE-autoEM/EM foram adquiridos (**Figura 126**).

Figura 126: Espectro de CLAE-autoEM/EM obtido do extrato de *R. similis*.



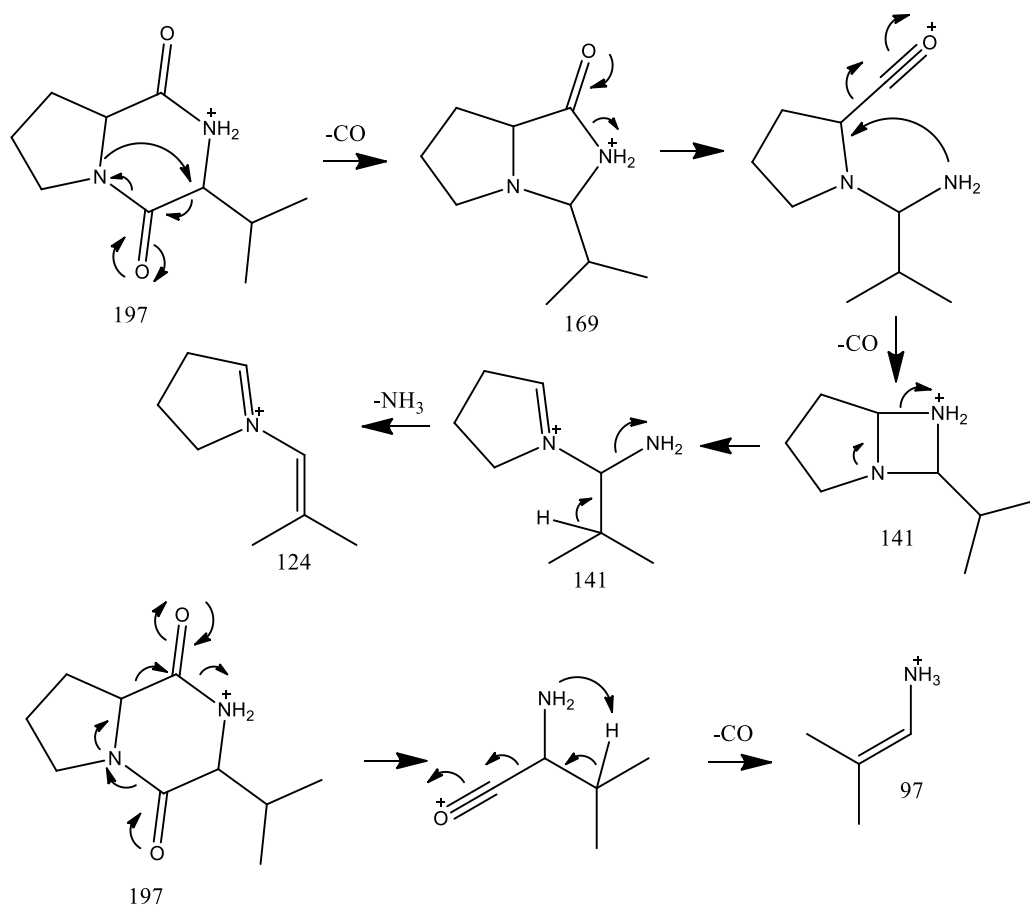
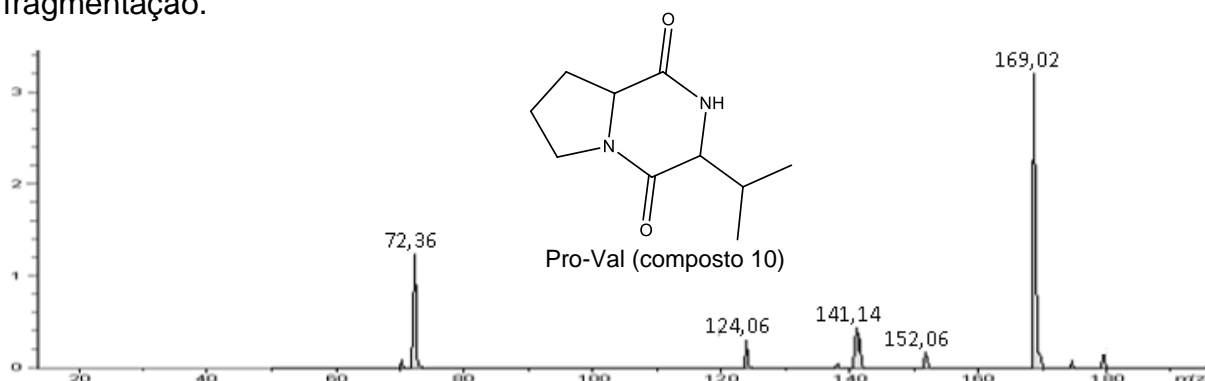
Em seguida, os arquivos foram submetidos ao software *Spectral Networks*, disponível online na plataforma GNPS (*Global Natural Products Molecular Networking*), que permitiu calcular o nível de similaridade entre dois conjuntos de dados (fragmentograma). Para este cálculo de similaridade entre espectros foram selecionados espectros com no mínimo quatro pares de íons iguais. Em seguida, os resultados foram exportados para o software Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>) e transformados em mapas de rede molecular, Figura 127.

Figura 127: Mapa da rede molecular obtida para os dados EM/EM do extrato de *R. similis*.



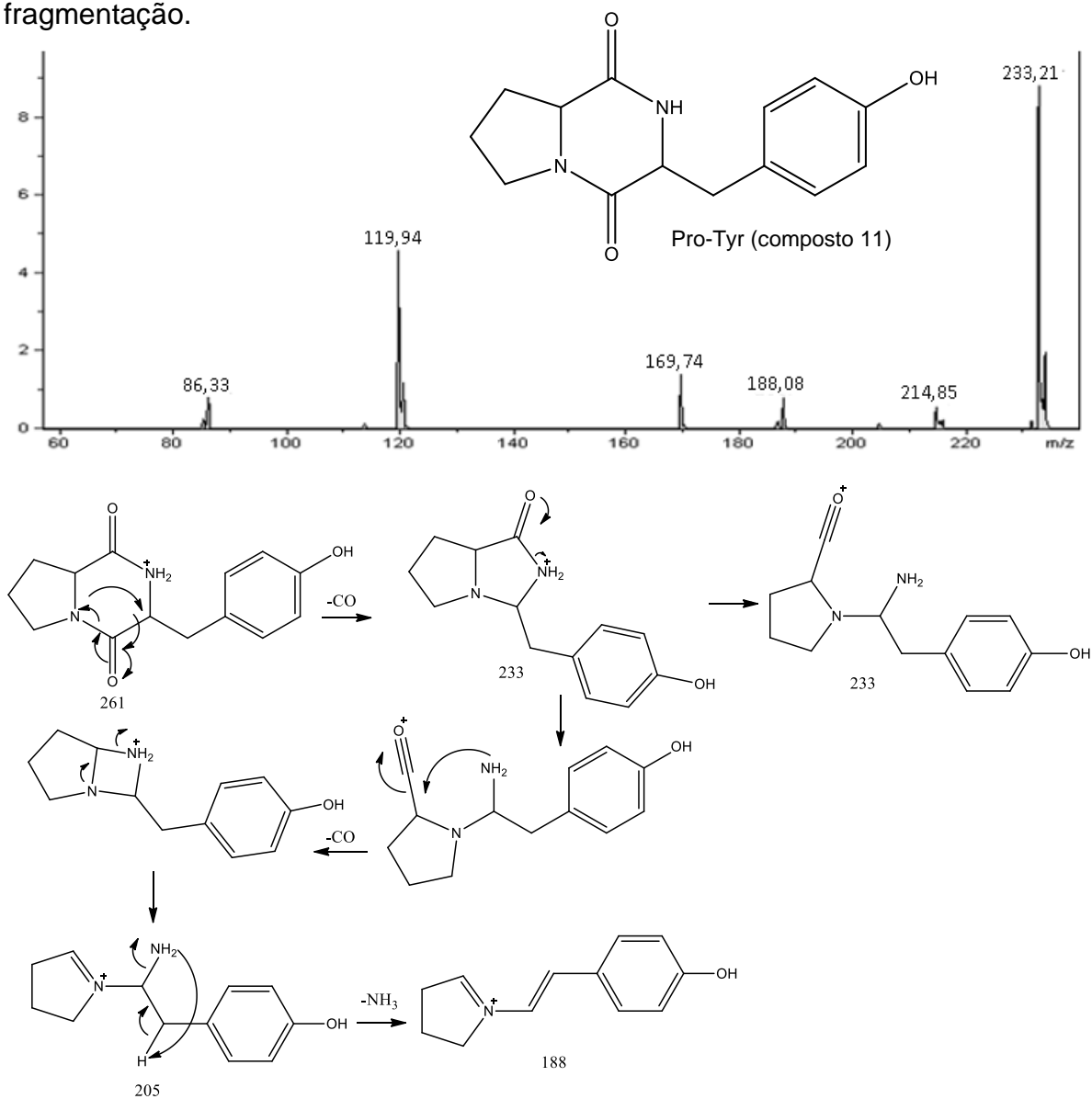
É possível observar que o software conseguiu agrupar sete sistemas diferentes, sendo o sistema 3 o responsável pelo agrupamento das dicetopiperazinas. Possibilitando assim identificação de mais quatro compostos pertencentes a essa classe, descritos abaixo.

Figura 128: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 197 e proposta de fragmentação.



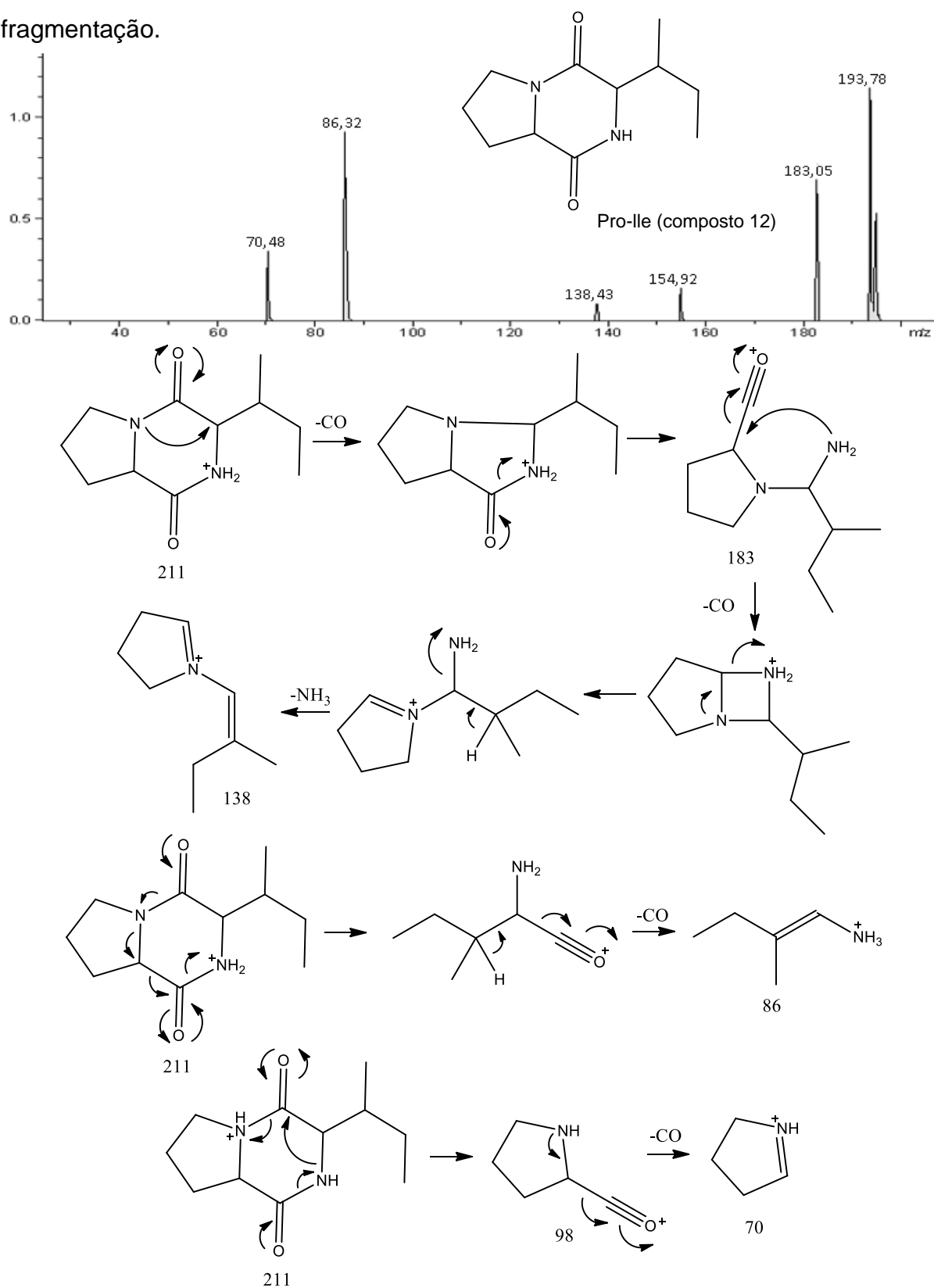
Foi observado que a fragmentação ocorre de duas maneiras, a primeira, o íon m/z 197 perde CO duas vezes, originando o íon m/z 169 e o íon m/z 141 que por sua vez perde NH_3 originando o íon m/z 124 (comprovando a prolina), o segundo mecanismo, o íon m/z 197 sofre uma fissão no anel central, perdendo CO dando origem ao íon m/z 72 (comprovando a valina).

Figura 129: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 261 e proposta de fragmentação.



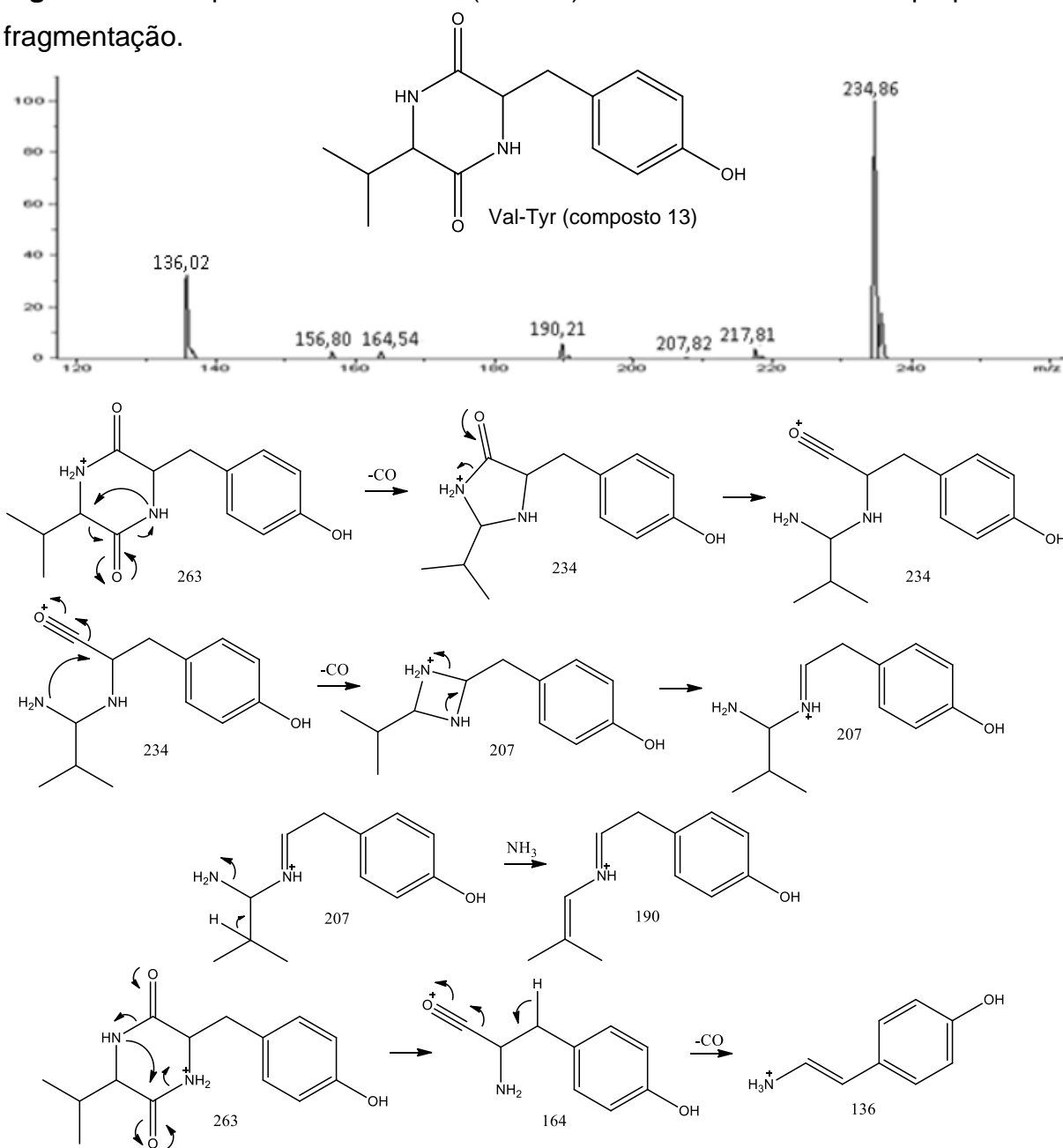
O íon m/z 261 sofre dois tipos de fragmentações no anel central, a primeira ocorre a formação do íon de m/z 233 (comprovando a tirosina) e a outra formando o íon de m/z 188 (comprovando a prolina).

Figura 130: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 211 e proposta de fragmentação.



A fragmentação ocorre por três vias, sendo elas: primeira via, o íon m/z 211 perde CO duas vezes, onde a primeira da origem ao íon m/z 183 e a segunda ao íon m/z 155, que por sua vez perde NH_3 originando o íon m/z 138 (comprovando a leucina), a segunda via, o íon m/z 211 sofre uma fissão no anel central, perdendo CO dando origem ao íon m/z 86 (íon característico de leucina), a terceira via, o íon de m/z 211 sofre uma fissão no anel central gerando o íon m/z 98 e seguida de uma perda de CO originando o íon m/z 70.

Figura 131: Espectro de massas (EM/EM) do íon de m/z 263 e proposta de fragmentação.



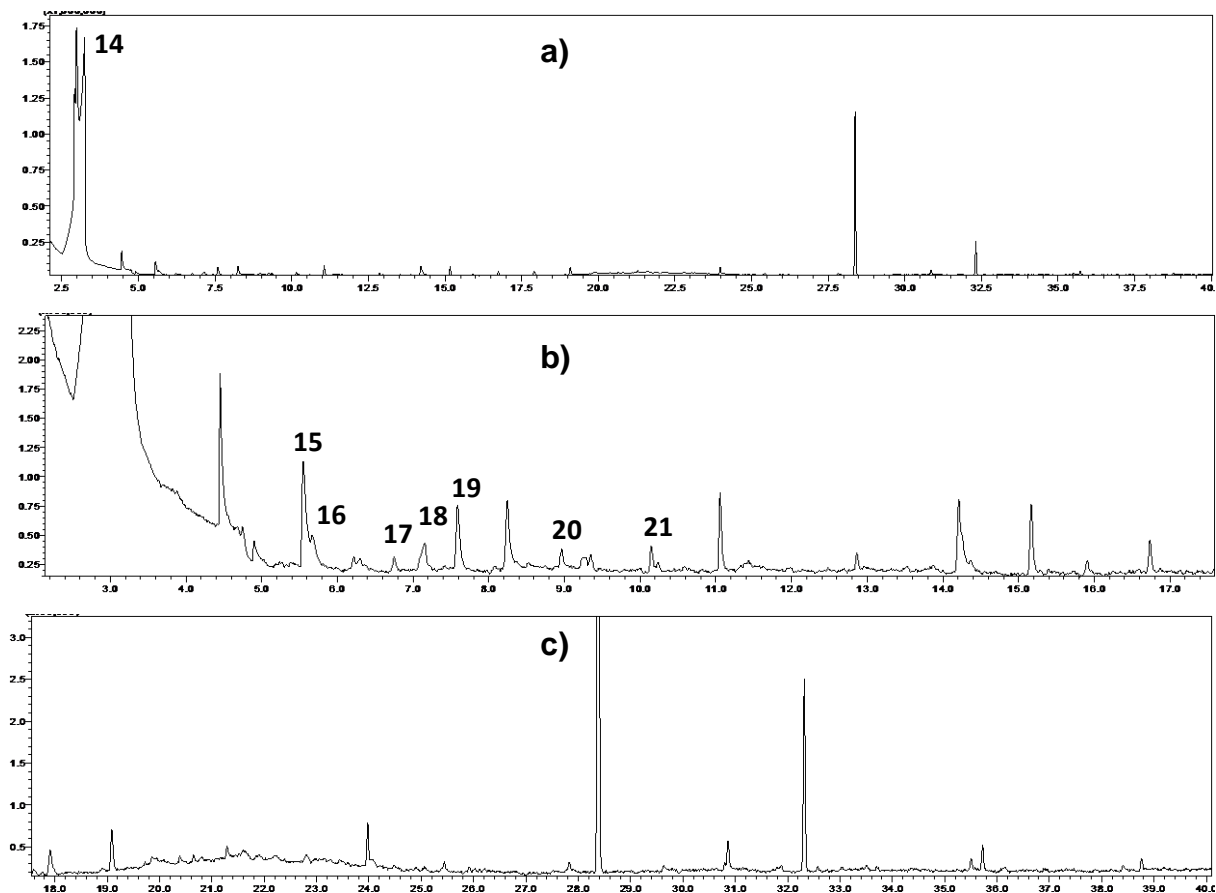
Podemos sugerir o processo de fragmentação por duas vias, primeira via, o íon m/z 263, perde CO duas vezes, onde a primeira da origem ao íon m/z 234 (íon característico de dicetopiperazina Val-Tyr), estabilidade explicada pela formação do íon *tropilium*, e a segunda ao íon m/z 207, que por sua vez perde NH₃ originando o íon m/z 190 (comprovando a tirosina), a segunda via, o íon m/z 263 sofre uma fissão no anel central, perdendo CO originando o íon m/z 136 (íon também característico de tirosina).

4.6.2.9. Identificação dos constituintes voláteis por índice de retenção e espectrometria de massas (CG-EM), de *R. similis*.

Para a identificação dos constituintes voláteis de *R. similis*, foi calculado o índice de retenção de cada constituinte usando a equação de VAN DEN DOOL E KRATZ (**equação 1**), tendo como referência uma série homóloga de alcanos (C₈-C₄₀), cromatograma apresentado anteriormente (**Figura 41, p. 79**).

A comparação dos dados de índice de retenção e espectros de massas experimentais com os dados da literatura possibilitaram a identificação de 8 metabolitos de *R. similis*, como mostra a Figura 132.

Figura 132: a) perfil cromatográfico dos constituintes voláteis de *R. similis*, b) ampliação do perfil cromatográfico (0,0 a 17 min); c) ampliação do perfil cromatográfico (17,5 a 40,0 min).



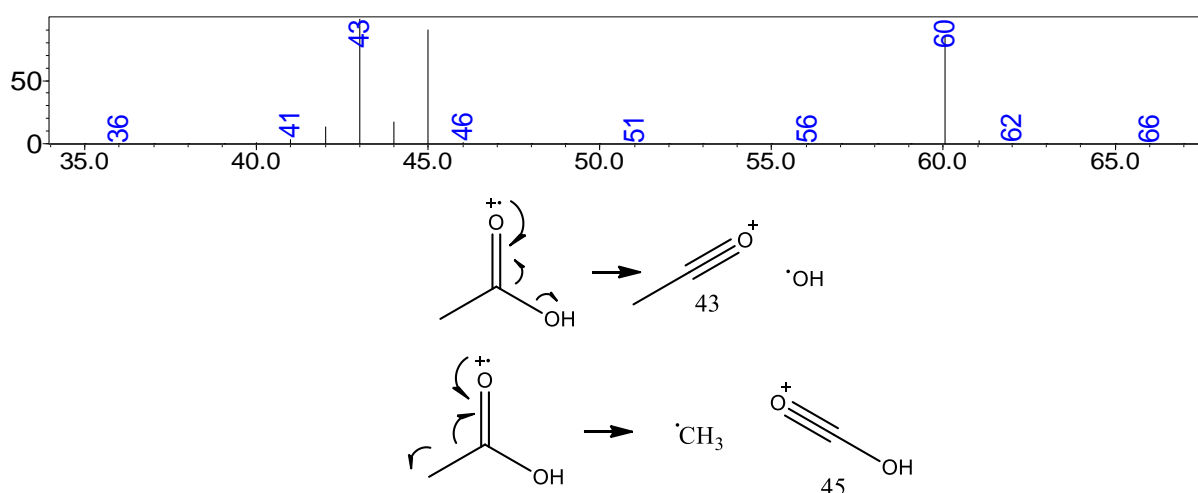
Entre esses constituintes encontram-se, álcoois, ésteres e ácido carboxílico, como mostra a Tabela 23.

Tabela 23: Proposta de identificação dos constituintes voláteis de *R. similis*.

Picos	tR (min)	CAS	IR (exp)	IR (Lit)	Similaridade	Identificação
14	3.253	64 - 19 - 17	-	-	97%	ácido acético
15	5.577	123 - 51 - 3	-	-	98%	3-metilbutanol
16	5.683	137 - 32 - 6	-	-	94%	2-metilbutanol
17	6.752	110 - 19 - 0	-	-	95%	acetato de isobutila
18	7.158	107 - 92 - 6	-	-	94%	ácido butanoico
19	7.590	105-54-4	804	803	94%	butanoato de etila
20	8.970	503 - 74 - 2	845	844	95%	ácido 3-metilbutanoico
21	10.168	123 - 92 - 2	880	883	97%	acetato de 3-metilbutila

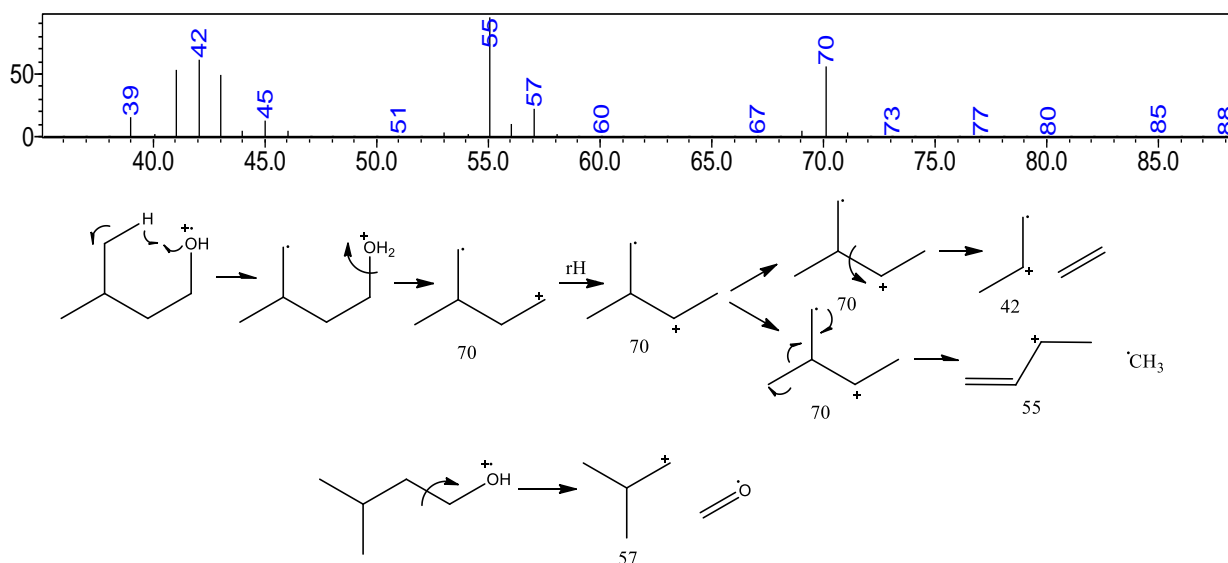
Para os seis primeiros compostos não foi possível calcular o índice de retenção (IR) devido que o tempo de retenção desses compostos foi menor que o primeiro hidrocarboneto (C8), por tanto, suas estruturas foram confirmadas avaliando somente o padrão de fragmentação, para os demais compostos, foi calculado o índice de retenção (IR exp) e comparado com o IR da literatura, e confirmada também avaliando o padrão de fragmentação.

Figura 133: Proposta de fragmentação do ácido acético (composto 14).



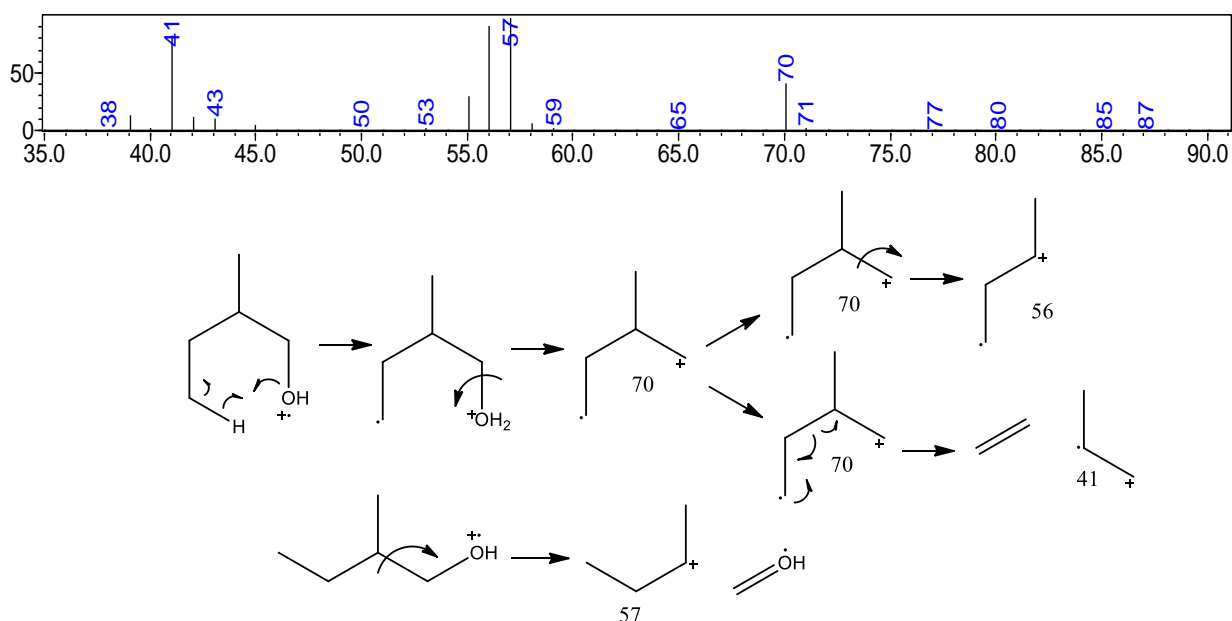
Para este composto é observado duas quebras homolíticas alfa à carbonila, formando os íons acílio de m/z 43 e 45.

Figura 134: Proposta de fragmentação do 3-metilbutanol (composto 15).



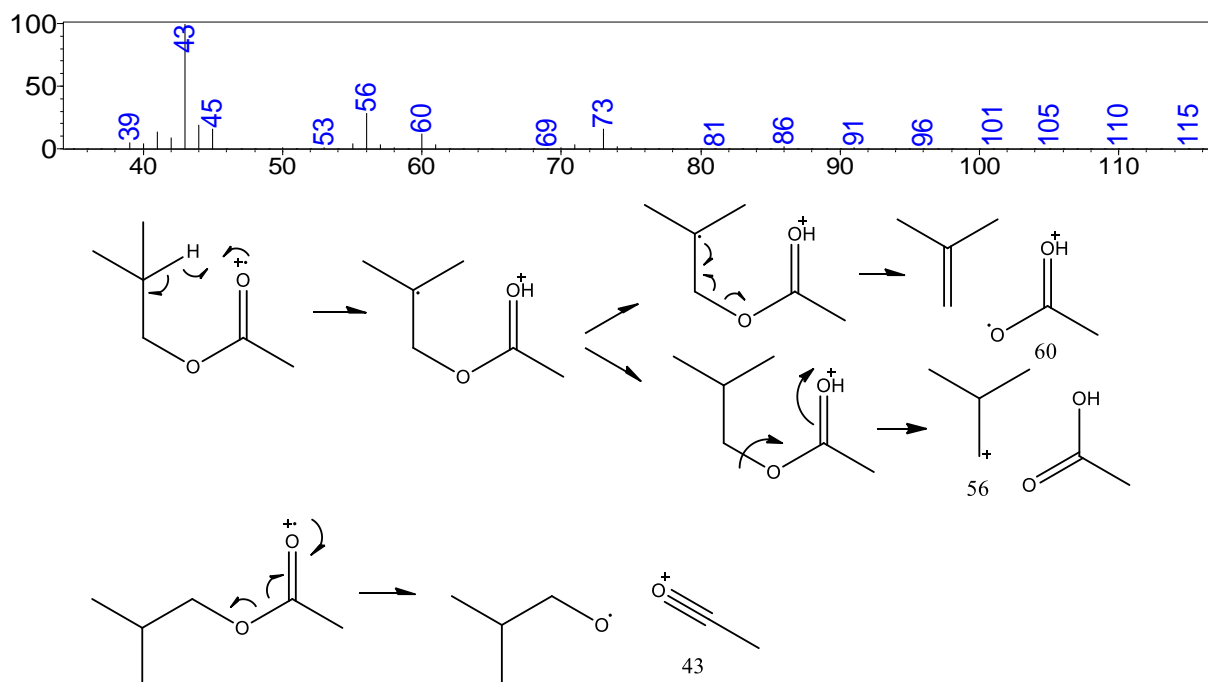
Para este composto é observado um rearranjo de McLafferty seguida de uma perda de água (H_2O), formando o íon de m/z 70, que apresenta uma certa estabilidade devido a formação do carbocátion secundário, em seguida pode ocorrer uma quebra heterolítica para a formação do íon de m/z 42, ou uma quebra homolítica formando o íon alílico de m/z 55, o que explica a sua estabilidade, já a formação do íon de m/z 57, ocorre pela quebra heterolítica beta a hidroxila.

Figura 135: Proposta de fragmentação do 2-metilbutanol (composto 16).



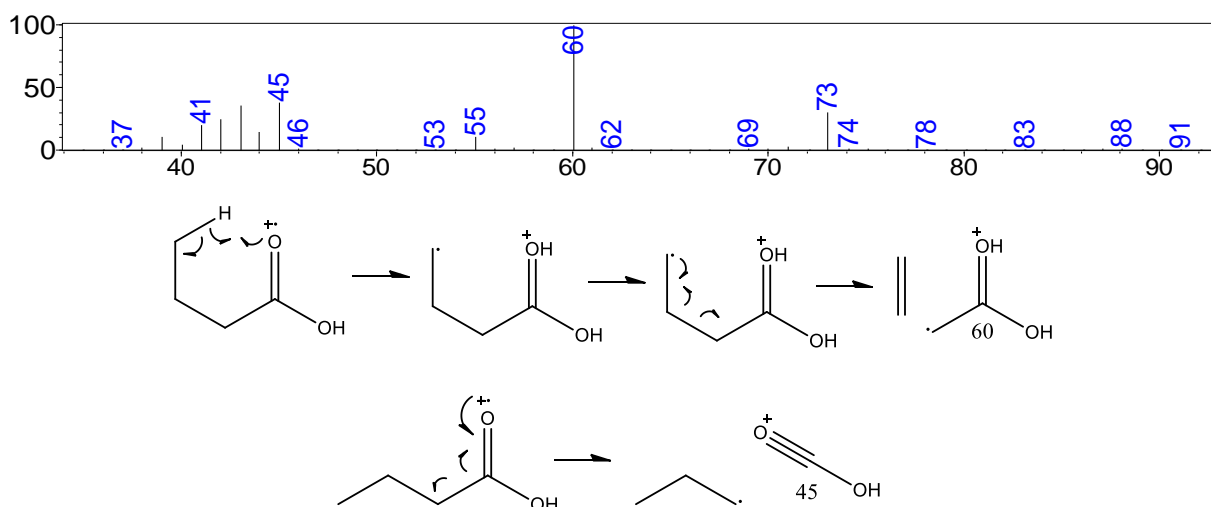
Neste composto é possível observar que novamente ocorre o rearranjo de McLafferty seguida da perda de H_2O (característico de compostos desta classe), formando o íon de m/z 70, só que agora ocorre uma quebra heterolítica formando o íon de m/z 56, ou uma quebra homolítica para a formação do íon de m/z 41. A formação do íon de m/z 57 ocorre pela quebra heterolítica beta ao grupo hidroxila, como no composto anterior, porém neste composto ocorre a formação de carbocátion secundário (mais estável), o que explica maior abundância desse íon no espectro deste composto.

Figura 136: Proposta de fragmentação do acetato de isobutila (composto 17).



Para este composto é possível observar a presença de hidrogênios gama à carbonila, ocorrendo então o rearranjo de McLafferty, em seguida pode ocorrer uma quebra homolítica e/ou heterolítica beta a carbonila, formando os íons de m/z 60 e 56 respectivamente, pode também ocorrer uma quebra homolítica alfa à carbonila (característico de ésteres) formando o íon *acilium* de m/z 43.

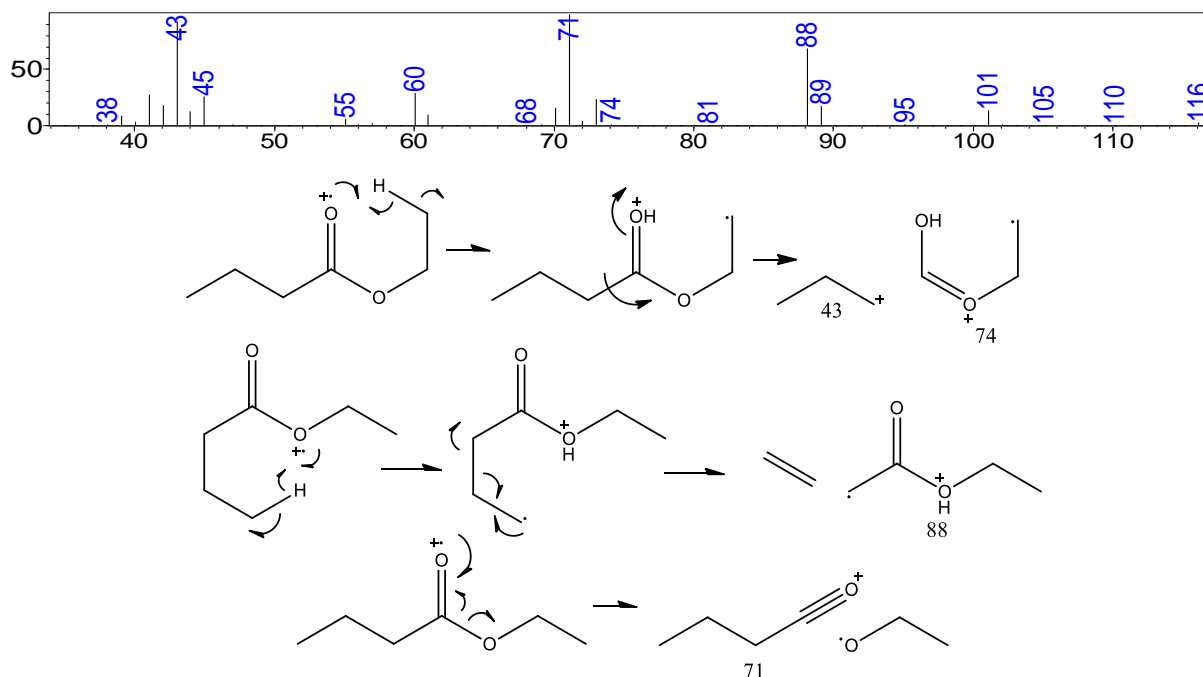
Figura 137: Proposta de fragmentação do ácido butanoico (composto 18).



Neste composto é observado o íon de m/z 60, que é explicado pelo rearranjo de McLafferty seguida de uma quebra homolítica beta à carbonila, já o íon de m/z 45

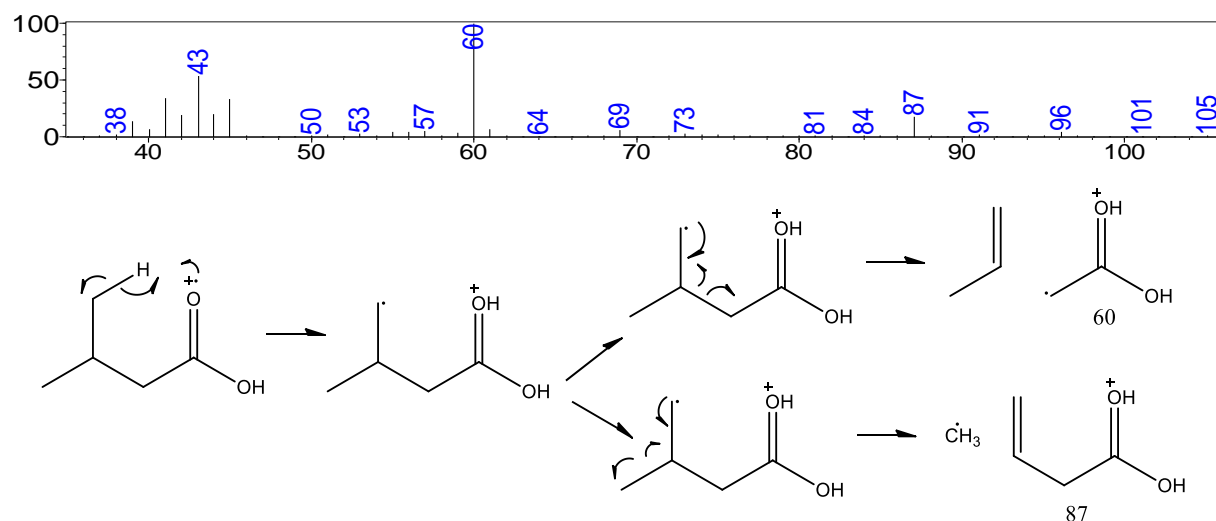
é formado a partir de uma quebra homolítica alfa à carbonila, característica desta classe de compostos.

Figura 138: Proposta de fragmentação do butanoato de etila (composto 19).



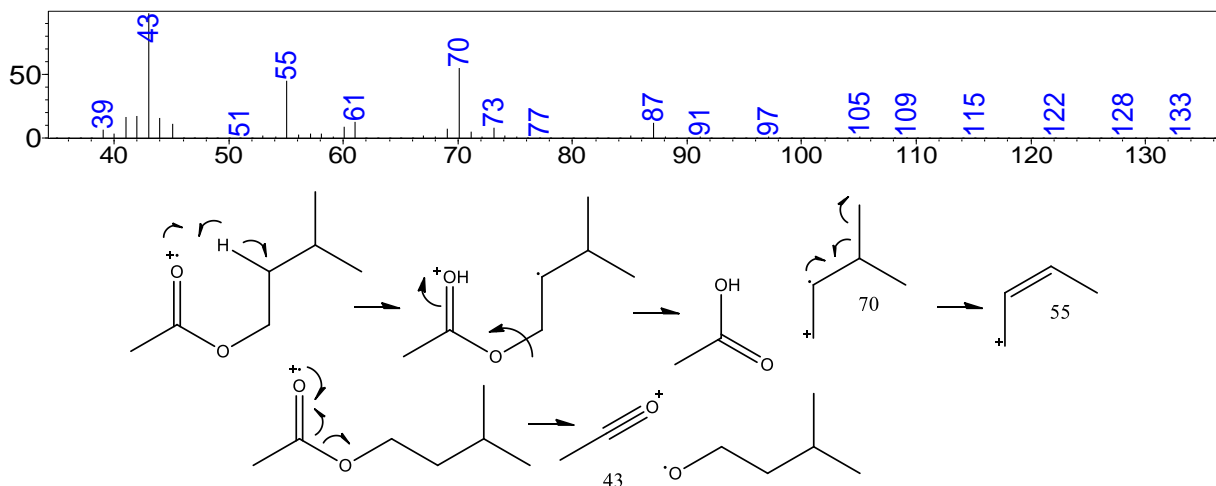
Neste composto mais uma vez é observado a presença do íon *acilium* (m/z 71) como o mais abundante, característico de ésteres, os íons de m/z 43, 74 e 88 são formados pelo rearranjo de McLafferty e posterior quebra heterolítica alfa à carbonila e homolítica beta a carbonila.

Figura 139: Proposta de fragmentação do ácido 3-metilbutanoico (composto 20).



Nota-se que ocorreu o rearranjo de McLafferty e depois duas quebras homolítica gama à carbonila, formando os íons de m/z 60 e 87.

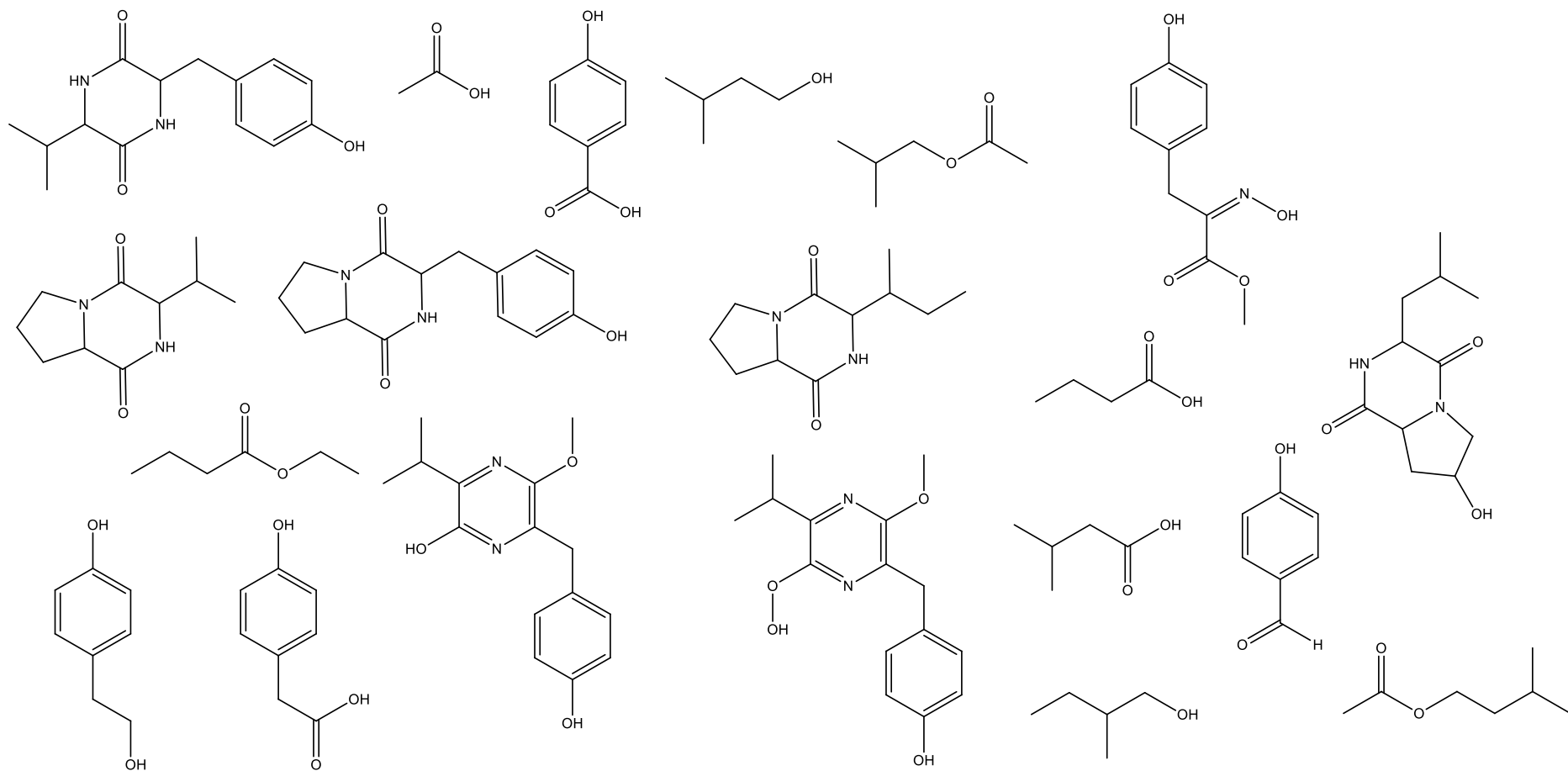
Figura 140: Proposta de fragmentação do acetato de 3-metilbutila (composto 21).



Neste composto foi possível observar uma quebra homolítica alfa à carbonila, formando o íon de m/z 43 (bem comum em compostos dessa classe), e um rearranjo de McLafferty e formação dos íons de m/z 70 e 55, devido a presença de hidrogênio gama carbonílicos.

As análises realizadas em duas técnicas cromatográficas diferentes (CLAE e CG) acopladas a espectrometria de massas (EM) tornaram possível a identificação de 21 metabólitos de *R. similis* de diferentes classes e funções, que estão mostrados na Figura 141.

Figura 141: Compostos de *R. similis* identificados neste trabalho.



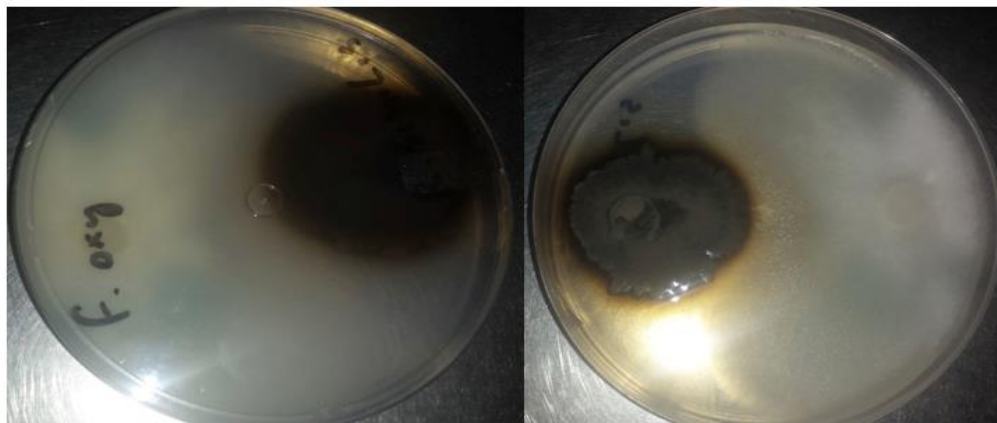
4.7. Ensaio de co-cultivo em meio sólido.

4.7.1. *Fusarium oxysporum* VS *Rhinoctadiella similis*.

Como a placa de Petri apresenta um espaço limitado e contém quantidades restritas de nutrientes, o experimento de co-cultivo foi usado para estimular a produção de novos metabólitos secundários em resposta à interação entre esses organismos. Este tipo de cultivo permite o estudo morfológico (interações) e mudanças metabólicas (novos compostos).

Inicialmente estudou-se o tipo de interação que esses dois organismos apresentam (**Figura 142**), segundo Bertrand, S. et al. (2014) existem quatro tipos de interações predominantes em cultivo misto realizados em placas de Petri, distância de inibição, linha de confronto, inibição por contato e crescimento um em cima do outro.

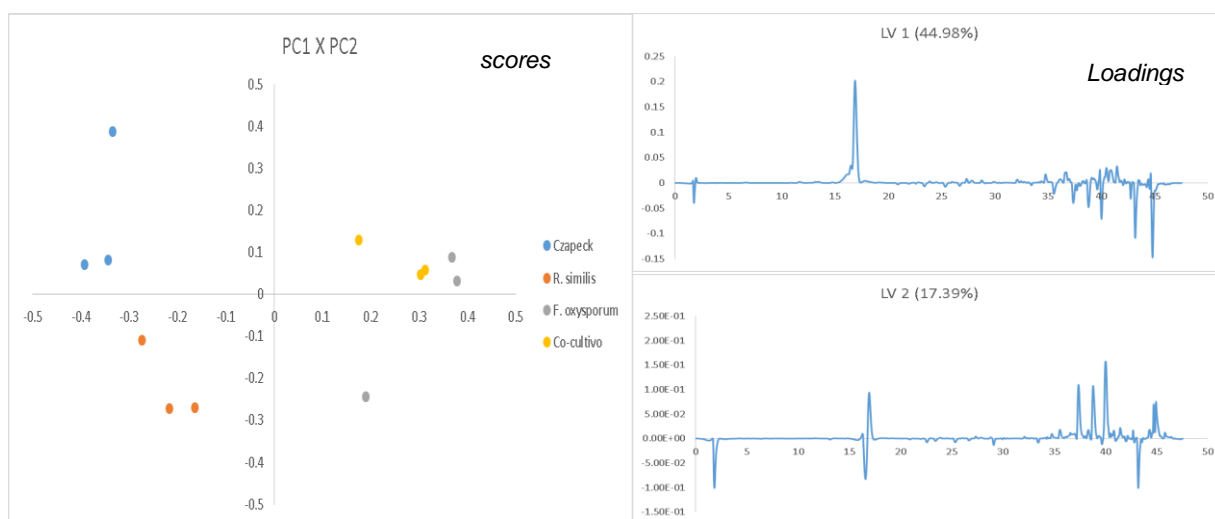
Figura 142: Co-cultivo dos fungos *F. oxysporum* e *R. similis*, com 15 dias de crescimento, em meio Czapeck DOX Agar, a 25 °C.



É possível observar na Figura 142 que o fungo *F. oxysporum* apresenta uma taxa de crescimento maior do que o fungo *R. similis*, tomando quase que totalmente a placa de Petri. Essa característica é vantajosa em sistemas extremamente competitivos (alta atividade de micro-organismos), como é o caso da rizosfera, o que também corrobora com a alta taxa de micro-organismos deste gênero isolados e identificados neste ambiente. Pode-se observar também que não houve a formação de um halo de inibição, e sim que ao se tocarem inibiram o crescimento um do outro, esse tipo de interação é denominada de interação de inibição por contato.

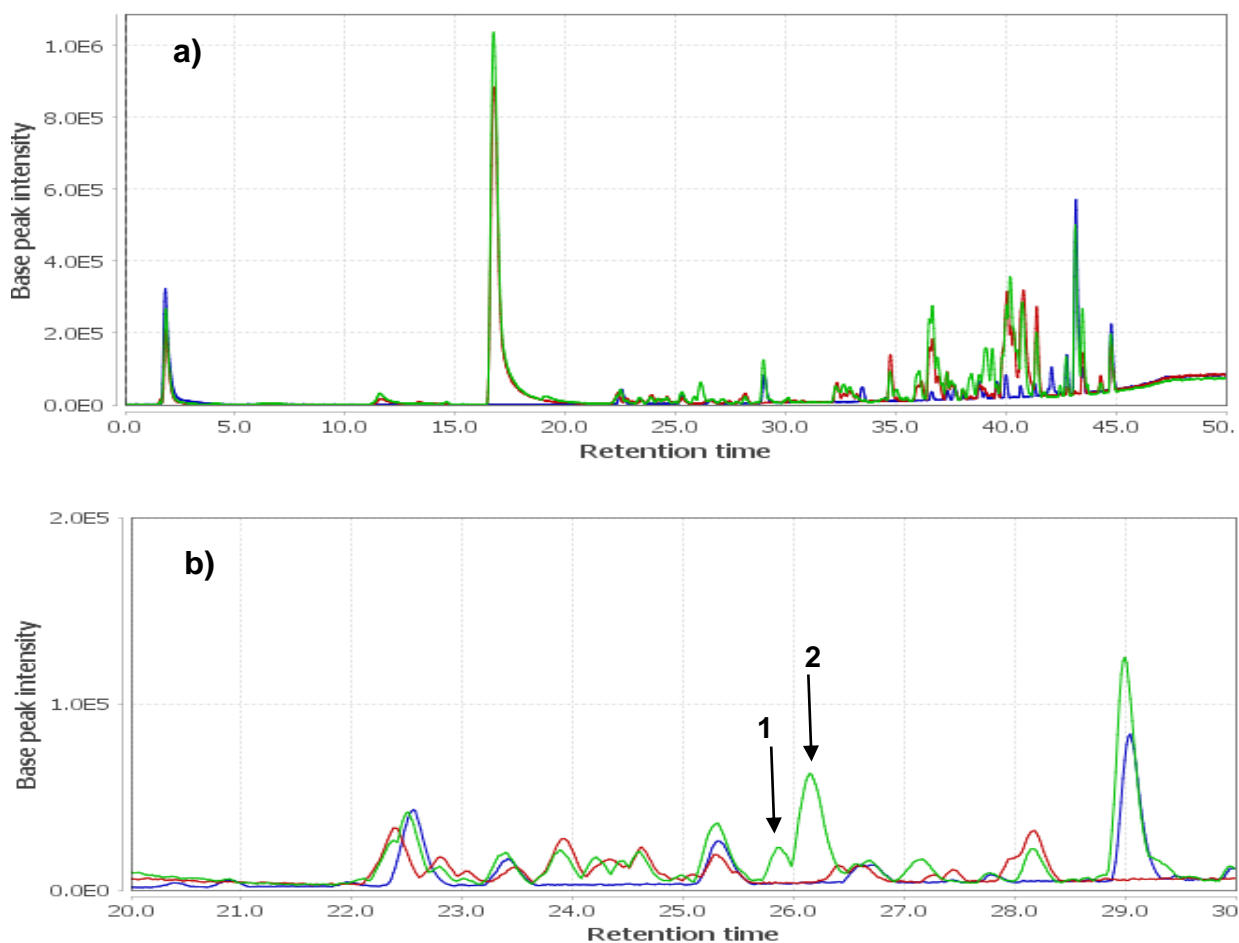
Em experimentos em co-cultivo é interessante buscar responder duas perguntas, como o co-cultivo assemelha-se aos cultivos simples? e como o co-cultivo diferencia-se dos cultivos simples? Para tanto, aplicou-se um modelo de classificação PLS-DA (*Partial Least Square Discriminant Analysis*) aos cromatogramas obtidos dos cultivos simples e misto (**Figura 143**).

Figura 143: Gráfico de *scores* e *loadings* das variáveis obtidas pela análise de CLAE-EM, do branco, co-cultivo e os respectivos cultivos simples.



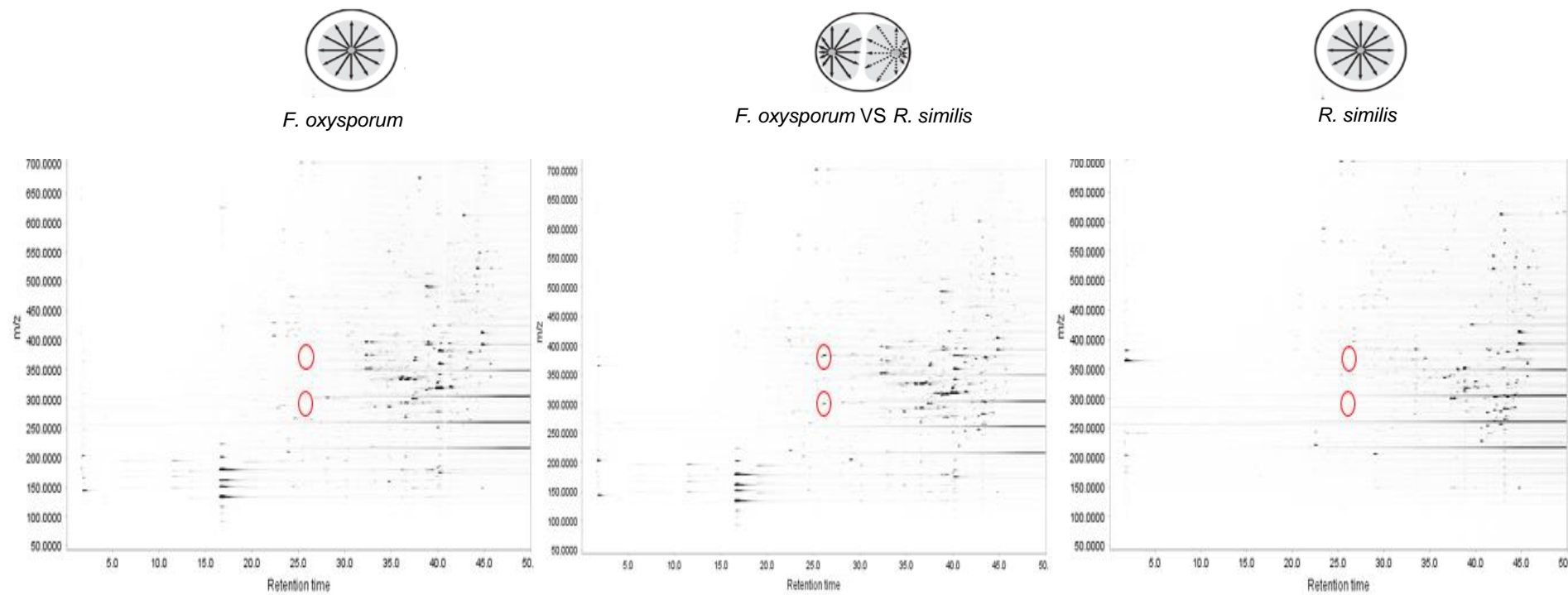
A proximidade com os spots cinzas (*F. oxysporum*) no gráfico de *scores* indica que o cultivo misto apresenta características predominantes do cultivo de *F. oxysporum* se comparado com o cultivo de *R. similis*, o que responde a primeira hipótese. A não sobreposição dos spots (gráfico de *scores*) indica que o cultivo misto apresenta características diferentes se comparados aos respectivos cultivos simples, buscando encontrar como o cultivo misto difere dos cultivos simples, e assim responder a segunda hipótese, comparou-se o perfil químico do cultivo misto, com o os perfis dos cultivos simples (CLAE-EM), como mostra a Figura 144.

Figura 144: a) Cromatogramas de íons totais (TICs), b) ampliação dos TICs. *F. oxysporum*, co-cultivo e *R. similis*.



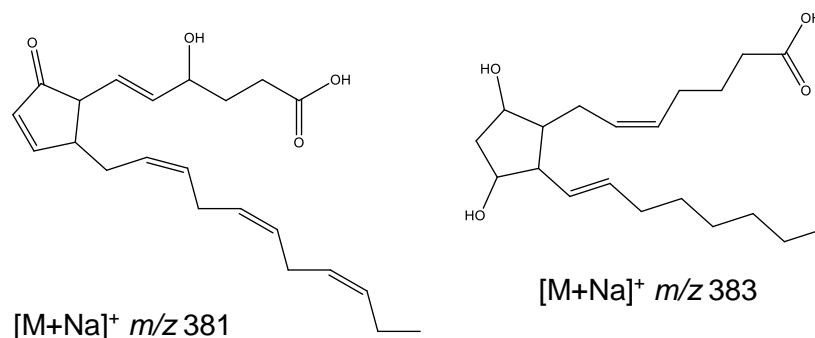
Comparando o perfil químico do co-cultivo com os perfis dos cultivos simples, é possível notar dois sinais (picos), tempo de retenção de 25,9 e 26,2 minutos, que estão presentes unicamente no cromatograma referente ao co-cultivo (verde), indicando que são compostos exclusivos deste experimento, e são responsáveis pela diferença observada no gráfico de scores. Visando obter a razão massa carga (m/z) desses íons, o mapa de íons 2D foi analisado, como mostra a Figura 145.

Figura 145: Mapa de íons 2D obtidos a partir do *fingerprint* de *F. oxysporum* e *R. similis*.



Quando analisamos o mapa de íons 2D, foi possível observar a presença de dois íons nos tempos de retenção indicados na Figura 145, que só estão presentes no ensaio de cultivo misto, um íon de m/z 381,1999 (tempo de retenção de 25,9 minutos) e o outro de m/z 383,2153 (tempo de retenção de 26,2 minutos), circulado em vermelho na Figura 145. Esses dois íons foram comparados às bases de dados METLIN e Dicionário de Produtos Naturais (DNP), e diversas propostas foram encontradas. Dentre as propostas sugeridas, o composto da esquerda chamou atenção, por ser da classe dos jasmonatos, classe de composto já encontrados em espécies de *Fusarium* no cultivo simples (**Figura 146**).

Figura 146: Estrutura química dos compostos sugeridos pela base de dados Metlin e dicionário de produtos naturais (erro ≤ 10 ppm).

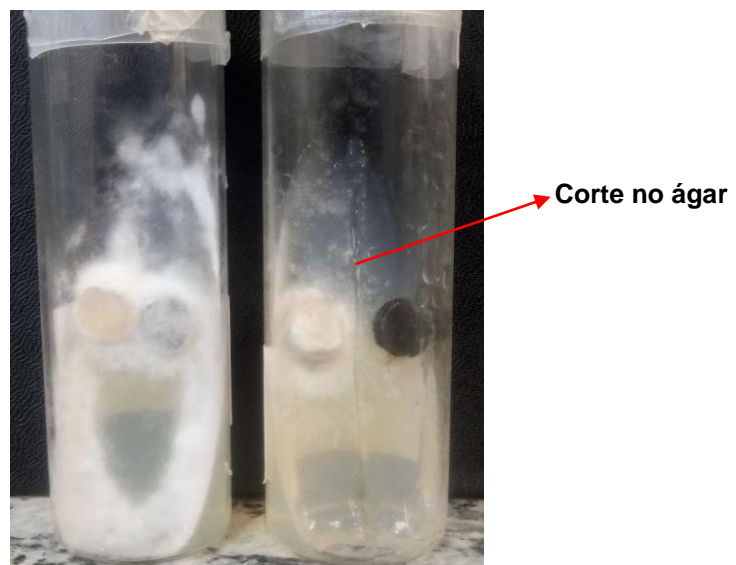


Sabendo que esse composto pertencem à classe dos jasmonatos, classe de compostos muito comum em espécies de *Fusarium*, gerou a hipótese que o fungo *Fusarium oxysporum* pode ter biossintetizado esse composto em resposta a interação com o *Rhinochadiella similis*.

Esses compostos foram isolados, visando confirmar suas estruturas, porém, devido a diferença de sensibilidade entre a espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear não foi possível a identificação dos mesmo. A identificação por ressonância magnética nuclear foi prejudicada devido à baixa quantidade desses compostos no extrato, dificuldade já relatada por outros grupos de pesquisa que trabalharam com essa metodologia de co-cultivo.

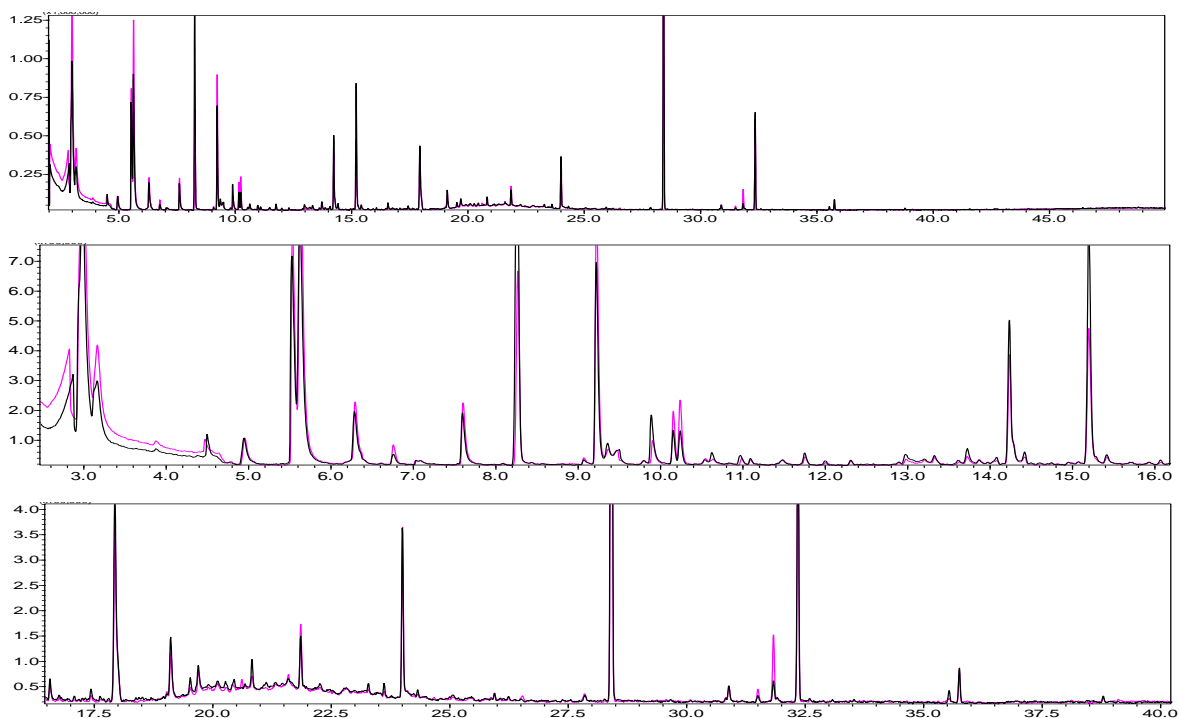
Durante as análises dos ensaios de co-cultura surgiu uma terceira pergunta, como os micro-organismos sentem a presença um do outro, por contato ou pela química? para responder à essa pergunta, analisou-se os compostos voláteis de experimentos de co-cultivo onde o contato físico entre as linhagens era permitido, e onde o contato não era permitido (somente contato via química), como mostra a Figura 147.

Figura 147: Ensaio de co-cultivo permitindo o contato (esquerda) e proibindo o contato (direita).



É possível notar no frasco da direita que existe um corte no ágar impossibilitando o contato físico entre as linhagens, porém, permitido o contato químico (voláteis). Desta forma foi comparado os perfis dos constituintes voláteis de cada experimento, como mostra a Figura 148.

Figura 148: a) perfil cromatográfico dos constituintes voláteis do co-cultivo, permitindo o contato (preto) e **proibindo o contato (rosa)**, b) ampliação do perfil cromatográfico dos constituintes voláteis do co-cultivo (0,0 a 16 min); c) ampliação do perfil cromatográfico dos constituintes voláteis do co-cultivo (16 a 40,0 min).



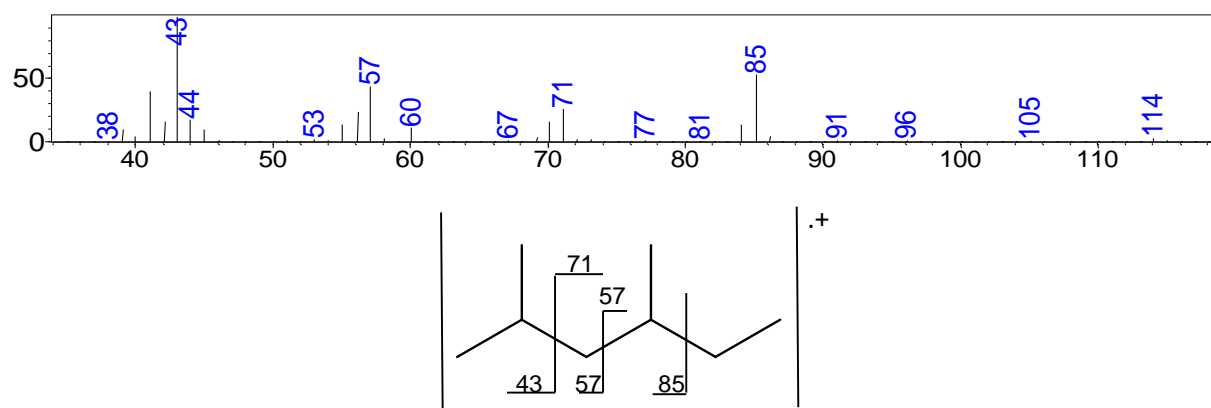
É possível notar que não houve mudança no perfil cromatográfico, o que demonstrou que mesmo não havendo o contato, os micro-organismos sentiram a presença um do outro, devido a presença de voláteis (química) comuns nos dois experimentos. Com isso foi comparado o perfil do co-cultivo com os respectivos cultivos simples, buscando quais compostos são responsáveis por essa comunicação (compostos exclusivos do co-cultivo), esses compostos estão mostrados na Tabela 24.

Tabela 24: Proposta de identificação dos constituintes voláteis do co-cultivo entre *F. oxysporum* e *R. similis*.

Picos	tR (min)	CAS	IR (exp)	IR (Lit)	Similaridade	Identificação
1	7,405	589 - 43 - 5	-	-	91%	2,4-dimetilhexano
2	8,057	123 - 86 - 4	819	818	85%	acetato de butila
3	20,389	106 - 32 - 1	1195	1199	94%	octanoato de etila
4	20,796	112 - 14 - 1	1213	1213	96%	acetato de octila
5	25,846	110 - 38 - 3	1399.1	1397	94%	decanoato de etila

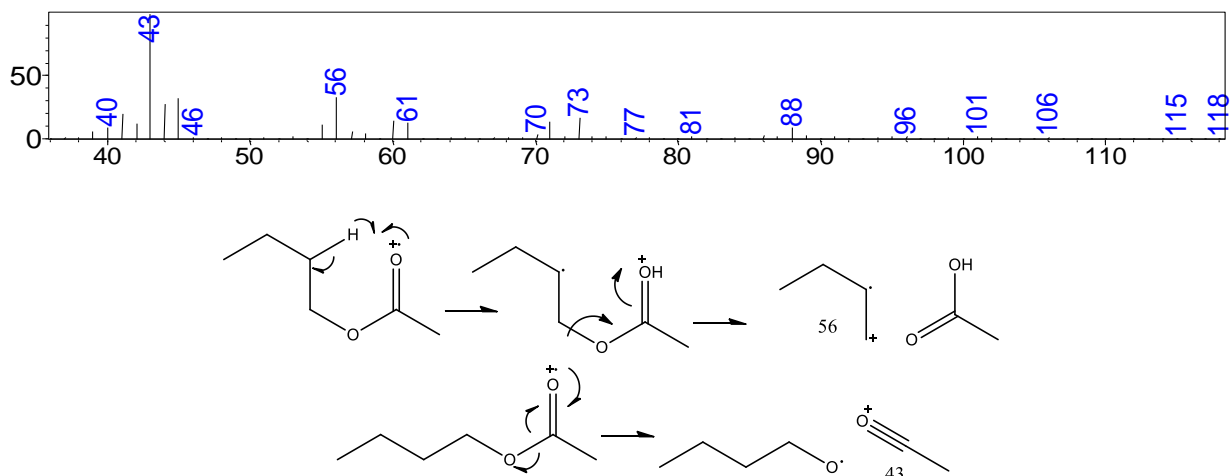
O primeiro composto não foi possível calcular o índice de retenção (IR) devido ao tempo de retenção desses compostos serem menor que o primeiro hidrocarboneto (C8), portanto, sua estrutura foi confirmada avaliando somente o padrão de fragmentação. Para os demais compostos, foi calculado o índice de retenção (IR exp) comparado com o IR da literatura, e confirmada também avaliando o padrão de fragmentação.

Figura 149: Proposta de fragmentação do 2,4-dimetilhexano (composto 1).



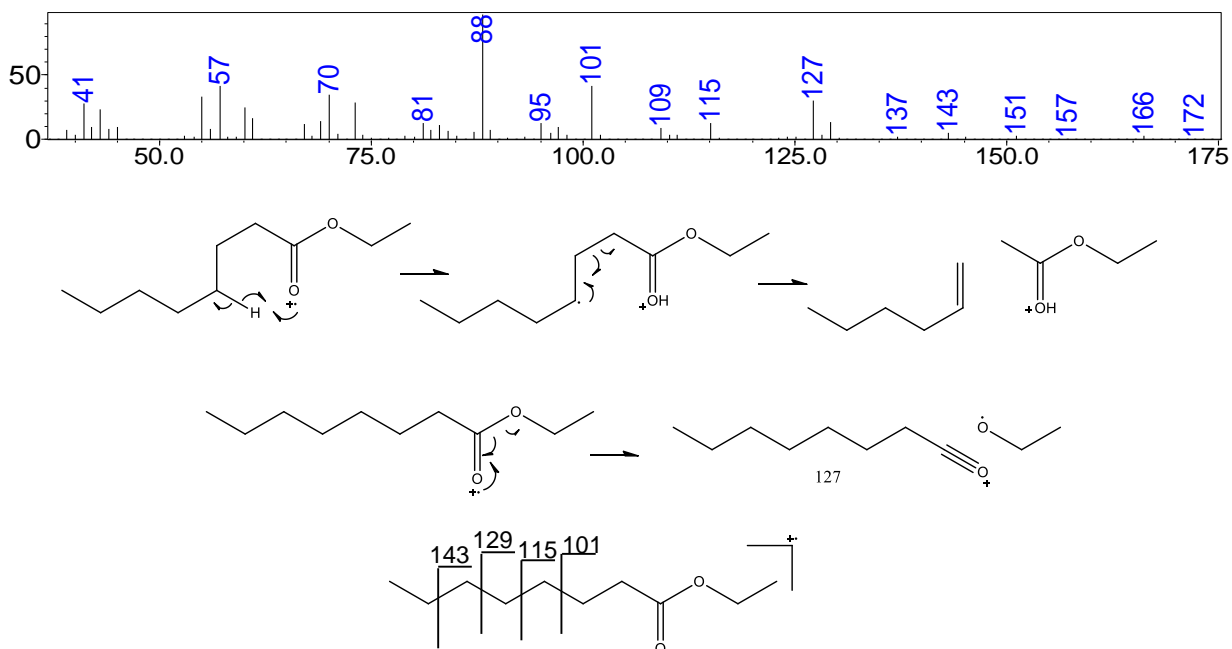
Hidrocarbonetos saturados apresentam normalmente espectros de massas complexos com diversas possibilidades de fragmentações. O elétron pode ser removido de qualquer carbono da cadeia pela clivagem de ligações C-C, com a perda de R \cdot , e formação RCH $_2^+$, dessa forma é possível encontrar séries de $m/z +14$, característico dessa classe de composto.

Figura 150: Proposta de fragmentação do acetato de butila (composto 2).



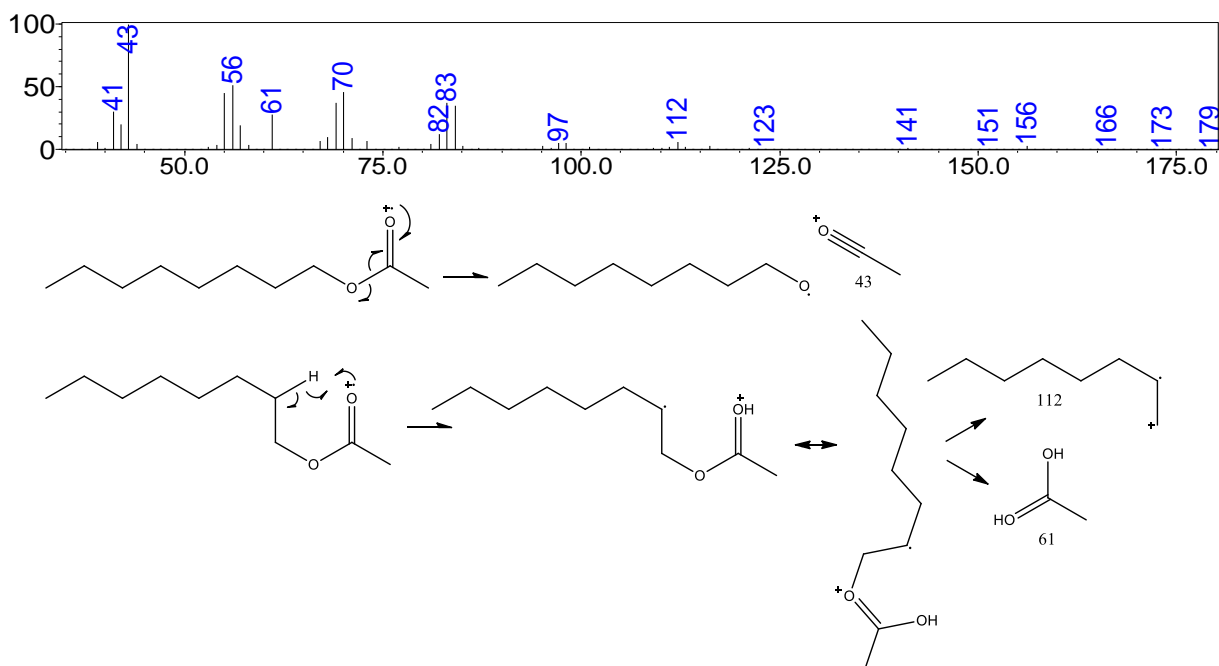
Para este composto é possível observar uma quebra homolítica alfa à carbonila formando o íon *acilium* de m/z 43 como o mais abundante, o que é característico desta classe de compostos. Também foi possível observar a presença de hidrogênios gama à carbonila, possibilitando ocorrer rearranjo de McLafferty, seguida de quebra heterolítica beta à carbonila, formando o íon de m/z 56.

Figura 151: Proposta de fragmentação do octanoato de etila (composto 3).



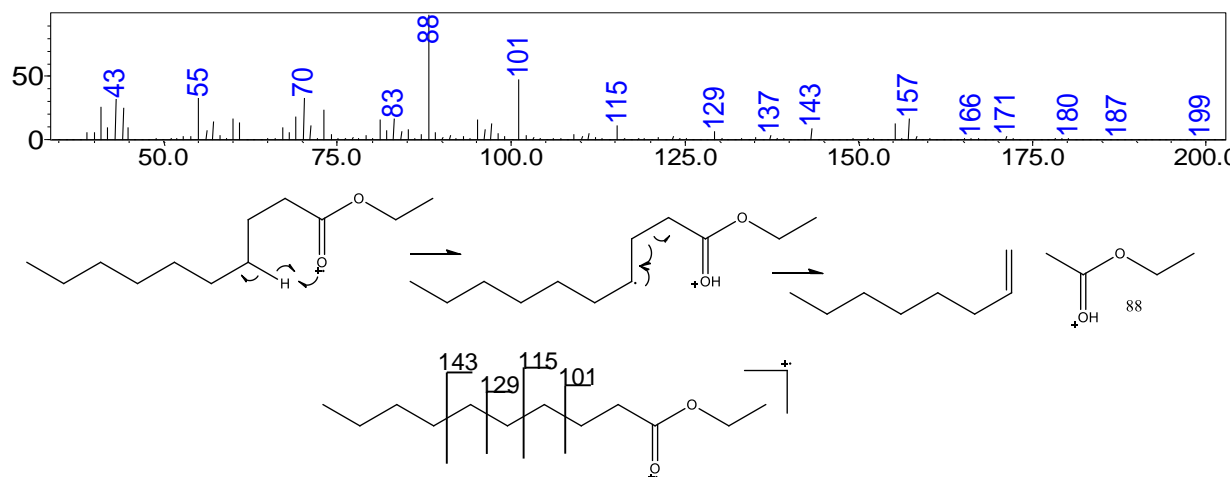
Ocorre uma quebra homolítica alfa à carbonila formando o íon de m/z 127, o íon de m/z 88 é formado pelo rearranjo de McLafferty seguido de uma quebra homolítica beta à carbonila, já os íons de m/z 101, 115, 129 e 143 é formado pela quebra da parte alquila do composto, característico em sistemas alquila longos.

Figura 152: Proposta de fragmentação do acetato de octila (composto 4).



Mais uma vez é possível notar o íon acílio de m/z 43 como o mais abundante, e é formado pela quebra homolítica alfa à carbonila, também é observado a presença de hidrogênio gama à carbonila, possibilitando o rearranjo de McLafferty formando os íons de m/z 112 e 61.

Figura 153: Proposta de fragmentação do decanoato de etila (composto 5).



Neste composto é possível observar mais uma vez o rearranjo de McLafferty (formado pela presença de hidrogênios gama à carbonila) seguida de uma quebra homolítica beta à carbonila formando o íon de m/z 88, também é possível notar fragmentações da parte alquila do composto (íons de m/z 143, 129, 115 e 101).

Como esses compostos são a resposta a algum tipo de interação entre os fungos *Fusarium oxysporos* e *Rhinoctadilla similis*, sugere-se que possuem função de comunicação inter e/ou intraespecífica.

CONCLUSÃO

5. Conclusão

A predominância de espécies de *Fusarium* observada no ambiente rizosférico deve-se a alta taxa de crescimento destes em suporte sólido, e também, a produção de compostos antagônicos, como as micotoxinas (ácido fusárico e seus derivados, tricotecenos e zearalenonas) e antimicrobianos (enniáticas e beauvericinas). Essas características são valorizadas em um ambiente tão dinâmico e competitivo, o que torna os micro-organismos presentes nesses ambientes, detentores de uma fonte de compostos de interesse farmacológico, confirmado nos resultados positivos dos ensaios biológicos, realizados nos extratos neste trabalho.

Visando compreender a dinâmica desse ambiente natural, buscou-se primeiramente estudar os metabólitos secundários produzidos por *R. similis* e *F. oxysporum*, em cultivo simples.

O *F. oxysporum* tem sua química bem descrita na literatura, o que possibilitou a desreplicação de compostos da classe dos jasmonatos, importantes nos processos de comunicação e defesa das plantas. Micotoxinas, ácido fusárico e derivados, e a beauvericina (antimicrobiano). Já para o fungo *R. similis* não há nenhum relato na literatura, dificultando a desreplicação, o que incentivou a otimização do processo (planejamento fatorial completo), isolamento e identificação dos metabólitos secundários deste organismo.

O estudo de otimização, mostrou que o parâmetro agitação apresenta a maior influência no número de bandas observadas nos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD, e conseqüentemente no modelo criado, sendo então a variável mais importante, e deve ser levada em consideração. Já a análise dos efeitos sinérgicos mostrou-se de

valia, evidenciando a importância de abordagens de otimização de processos que trabalhem de modo multivariado em relação a univariado. Esse processo permitiu o isolamento e identificação de treze compostos produzidos por essa espécie de fungo, sendo cinco da classe das dicetopiperazinas e 5 derivados fenólicos, já relatados na literatura, e possuem uma gama de atividades biológicas e três compostos inéditos.

Conhecendo a química desses micro-organismos cultivados em separado, buscou-se estudar a influência das interações no metabolismo destes fungos, e para isso realizou-se ensaios em co-cultura em meio sólido. O meio sólido (placa de Petri) foi preferido ao líquido, pois mimetizam melhor o ambiente natural (rizosfera, solo, interior da planta, entre outros) e, também é possível observar as colônias, o que permite estudar as interações que ocorrem do ponto de vista morfológico. O estudo das interações em co-cultivo de *R. similis* VS *F. oxysporum* sugeriu uma interação mutualística (os dois se beneficiam sem prejudicar um ao outro) entre eles, o que pode indicar uma interação harmônica no ambiente natural (rizosfera).

O co-cultivo apresentou-se como uma estratégia interessante para acessar vias silenciadas em condições normais de laboratório, induzindo a produção de dois novos compostos (exclusivos da co-cultura). Porém, a identificação desses compostos foi dificultada, devido à baixa quantidade (traço) no extrato, não sendo possível analisar por ressonância magnética nuclear. Para contornar esse problema grupos de pesquisas estão aumentando o tamanho das placas de Petri e/ou utilizando da sensibilidade da espectrometria de massas (CLAE-EM) e utilizando fontes diretas como por exemplo o DESI (*Desorption Electrospray Ionization*), o que vem mostrando ser uma saída bem interessante para a identificação destes compostos.

Ainda é pouco conhecido o papel dos compostos voláteis em micro-organismos, devido aos trabalhos envolvendo micro-organismos em simbiose, como aqueles associados a plantas e/ou organismos marinhos. Para isto, tem sido direcionada seguindo as estratégias experimentais tradicionais da química de produtos naturais, ou seja, envolve o isolamento da linhagem microbiana de seu ambiente, cultivo em laboratório e uma triagem biológica dos extratos guiando o isolamento e identificação dos metabólitos bioativos. Esta abordagem não fornece respostas para a questão que envolve as razões pelas quais os produtos naturais são biossintetizados.

O pouco que se conhece, é o papel fundamental dessa classe de compostos na atividade inibitória do crescimento de outros organismos, podendo inibir a germinação de esporos em um grande número de espécies fúngicas ou serem tóxicos a outros micro-organismos, e sua atuação em plantas (comunicação e defesa). O que se pode afirmar é que essa linguagem química é de grande valor e vem sendo muito utilizada no campo da agronomia, como por exemplo, no biocontrole de pragas de cana de açúcar e/ou outras culturas.

As abordagens utilizadas nesse trabalho geraram informações importantes sobre a relação desses micro-organismos e a rizosfera, destacando a importância e a complexidade desse rico ambiente. Esses resultados servirão como base para trabalhos futuros buscando o esclarecimento e a exploração racional das relações microbianas e, suas trocas metabólicas oriundas da microflora com a planta e/ou outros organismos.

Referências

- ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039-4043, Nov. 1996.
- BAEZA, L. C.; MATSUMOTO, M. T.; ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 429-436, 2006.
- BAIS H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitate by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 307-319, 2004.
- BALDWIN, I. T. Plant Volatiles. **Current Biology**, v. 20, p. R392–R397, 2010.
- BANI, M.; RISPAIL, N.; EVIDENTE, A.; RUBIALES, D.; CIMMINO, A. Identification of the Main Toxins Isolated from *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* Race 2 and Their Relation with Isolates' Pathogenicity. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2574-2580, 2014.

BECERRA-HERRERA, M., ANA SAYAGO, A.; RAFAEL BELTRÁN, R. Exploring antioxidant reactivity and molecular structure of phenols by means of two coupled assays using fluorescence probe (2,3 diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene, DBO) and free radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH·). **Journal of Chemical Sciences**, v. 129, p. 1381-1390, 2017.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S., McCOY, K. D.; WANG, R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J-L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, p. 1180-1204, 2014.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; MONOD, M.; GINDRO, K. AND WOLFENDER, J-L. De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1157-1165, 2013.

BOCCARD, J.; VEUTHEY, J-L.; RUDAZ, S. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 290-304, 2010.

BOHNI, N.; SCHUMPP, O.; SCHNEE, S.; BERTRAND, S.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J-L. Targeted isolation of induced and bioactive metabolites from fungal co-cultures. **Planta Medica**, v. 79, 2013.

BRILHANTE, R. S. N.; CAETANO, E. P.; LIMA, R. A. C.; MARQUES, F. J DE F.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; MELO, C. V. S.; GUEDES, G. M. DE M.; OLIVEIRA, J. S.; CAMARGO, Z. P.; MOREIRA, J. L. B.; MONTEIRO, A. J.; BANDEIRA, T. DE J. P. G.; CORDEIRO, R. DE A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Terpinen-4-ol, tyrosol, and -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 917-924, 2016.

CARNEIRO, E. A conquista da Amazônia. [Rio de Janeiro], Ministério da Viação e Obras Públicas, 1956. (Coleção Mauá).

CARVALHO, V. O.; VICENTE, V. A.; WERNER, B.; GOMES, R. R.; FORNARI, G.; HERKERT, P. F.; RODRIGUES, C. O.; ABAGGE, K. T.; ROBL, R.; CAMIÑA, R. H. Onychomycosis by *Fusarium oxysporum* probably acquired in utero. **Medical Mycology Case Reports**, v. 6, p. 58-61, Oct. 2014.

CHANDRAMOHAN, R.; PARI, L. Anti-inflammatory effects of tyrosol in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats, **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 17-28, 2016.

CHAPLA, V. M.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V.; ZANARDI, L. M.; LOPES, M.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; FONSECA, L.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis* sp., an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, p. 6597, 2014.

CHEN, A. C. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinian corals. **Zoological Studies**, v. 43, p. 759-771, 2004.

CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; CONSTANT, H. L.; FANG, L.; SEO, E. K.; LONG, L.; CUI, B. L.; BARRILOS, K. S. The desreplication of natural products. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 19, p. 749-791, 1996.

DE ROY, K.; MARZORATI, M.; VAN DEN ABEELE, P. VAN DE WIELE, T. BOON, N. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. **Environmental Microbiology**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/462-2920.12343>. [Epub Dec 16, 2013].

DENG, Z.; LI, C.; LUO, D.; TENG, P.; GUO, Z.; TU, X.; ZOU, K.; GONG, D. A new cinnamic acid derivative from plant-derived endophytic fungus *Pyronema* sp. **Natural Product Research**, v. 20, p. 2413-2419, 2017.

FARRAR, J.; HAWES, M.; JONES, D.; LINDOW, S. How roots control the flux of carbon to the rhizosphere. **Ecology**, v. 84, n. 4, p. 827-837, 2003.

FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAW, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant Soil**, v. 321, p. 279-303, 2009.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, p. 12-16, 2000.

GALLO, M. B. C. et al. Natural products from endophytic fungi. In: SAIKA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**, p. 139-168, 2008.

GROSS, H. Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, p. 266-277, 2009.

HAN, Z.; FENG, Z.; SHI, W.; ZHAO, Z.; WU, Y.; WU, A. A quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample pretreatment and liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 33 mycotoxins in *Lentinula edodes*. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 15, p. 1957-1966, Aug. 2014.

HEIDRICH, D.; GONZÁLEZ, G. M.; PAGANI, D. M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SCROFERNEKER, M. L. Chromoblastomycosis caused by *Rhinochrysiella similis*: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v. 16, p. 25-27, 2017.

HOMANS, A. L. & FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

ICHIKAWA, K.; KAWASAKI, S.; TANAKA, C.; TSUDA, M. Induced resistance against Fusarium diseases of Cymbidium species by weakly virulent strain HPF-I (Fusarium sp.). **Journal of General Plant Pathology**, v. 69, p. 400-405, 2003.

INGAVAT, N.; DOBEREINER, J.; WIYAKRUTTA, S.; MAHIDOL, RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Aspergillusol A, an r-Glucosidase Inhibitor from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 2049-2052, 2009.

JOTHY, S. L.; TOREY, A.; DARAH, I.; CHOONG, Y. S.; SARAVANAN, D.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; DEIVANAI, S.; SASIDHARAN, S. Cassia spectabilis (DC) Irwin et Barn: a promising traditional herb in health improvement. **Molecules**, v.17, p. 10292-10305, 2012.

KIND, T.; FIEHN, O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 105, 2007.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VANDERSAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LÉON, J.; ROJO, E. e SANCHES-SERRANO, J. J. Wound signalling in plants. **Journal Experimental Botany**, v. 52, p.1-9, 2001.

LINES-KELLY, R. The rhizosphere: soil biology basics. **Profitable and sustainable primary industries**. 2005. Disponível em: <http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/42259/Rhizosphere.pdf>. Acesso em: 23 out. 2016.

LIU, X.; YIN, C.; CAO, Y.; ZHOU, J.; WU, T.; Cheng, Z. Chemical constituents from *Gueldenstaedtia verna* and their anti-inflammatory activity. **Natural Products Research**, v. 32, p. 1145-1149, 2017.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 683-689, Sept. 2012.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MESA, A. M. Perspectiva histórica de antimaláricos de origen natural. **Anales De la Real Academia Nacional de Farmacia**, v. 83, p. 167-174, 2017.

MIERSCHA, O.; BOHLMANN, H.; WASTERACK, C. Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. **Phytochemistry**, v.50, p.517-523, 1999.

MORETTI, A.; BELISARIO, A.; TAFURI, A.; RITIENI, A.; CORAZZA, L.; LOGRIECO, A. Production of beauvericin by different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis, the *Fusarium* wilt agent of muskmelon. **European Journal of Plant Pathology**, v.108, p. 661–666, 2002.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W. T.; GHASSEMIAN, M.; SIMMONS, T. L.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R.; DORRESTEIN, P. C.; PEVZNER, P. A. Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Nature Methods**, v. 6, p. 596-599, 2009.

NGUYEN, Q-T.; MERLO, M. E.; MEDEMA, M. H.; JANKEVICS, A.; BREITLING, R.; TAKANO, E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS Lett**, v. 586, p. 2177-2183, 2012.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabolomics. **Nature**, v. 455, p. 1054-1056, 2008.

OH, D. C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Induced production of emericellamides A and B from marine-derived fungus *Emericella* sp. In competing co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 515-520, 2007.

OKE-ALTUNTAS, F., IPEKCIOGLU, S.; YAGLIOGLU, A. S.; BEHCET, L.; DEMIRTAS, I. Phytochemical analysis, antiproliferative and antioxidant activities of *Chrozophora tinctoria*: a natural dye plant. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, p.966-973, 2017.

PARK, H. B.; KWON, H. C.; LEE, C-H.; YANG, H. O. Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. **Journal of Natural Products**, v. 72, p-248-252, 2009.

PATRIDGE, E.; GEREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, p. 204-207, 2016.

PHELAN, V. V.; LIU, W.; POGLIANO, K.; DORRESTEIN, P. C. Microbial metabolic exchange - the chemotype-to-phenotype link. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 26-35, 2012.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

RAGUSO, R. A. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 549–569, 2008.

RIGA, E.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, v. 45, p. 380-365, 2008.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. Controle Biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 11, p. 195-228, 2003.

ROY, M. P.; PODDAR, M.; SINGH, K. K.; GHOSH, S. Purification, characterization and properties of phytase from *Shigella sp.* CD2. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 49, p. 266-271, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SELEGATO, D. M.; FREIRE, R. T.; TANNÚS, A.; CASTRO-GAMBOA, I. New dereplication method applied to NMR-based metabolomics on different *Fusarium* species isolated from rhizosphere of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1421-1431, 2016.

SLATTERY, M.; RAJBHANDARI, I.; WESSON, K. Competition-mediated antibiotic induction in the marine bacterium *Streptomyces tenjimariensis*. **Microbial Ecology**, v. 41, p. 90-96, 2001.

SON, S. W.; KIM, H. Y.; CHOI, G. J.; LIM, H. K.; JANG, K. S.; LEE, S. O.; LEE, N. D.; SUNG, N. D.; KIM, J. C. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 692-698, 2008.

SOUZA, C. R. G.; LUNA, G. C. Unidades quaternárias e vegetação nativa de planície costeira e baixa encosta no litoral norte de São Paulo. **Revista do Instituto Geológico**, v. 29, p. 1-18, 2008.

SOUZA-BRITO, A. R.; SOUZA-BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, n.1, p.53-67, 1993.

STROBEL, G. A. HESS, W. M., FORD, E., SIDHU, R. S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.17, p. 417-423, 1996.

TANG, L.; CHEN, Y-C.; JIANG, Z-B.; ZHONG, S-P.; CHEN, W-Z.; CHEN, W-D.; ZHUANG, Y-J. SHI, G-G. Phytochemical investigation of the marine alga *Grateloupia lívida*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 53, 2017.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 1259-1277, 2010.

TRAXLER, M. F.; WATROUS, J. D.; ALEXANDROV, T.; DORRESTEIN, P. C.; KOLTER, R. Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. **mBio**, v. 4, p. 459-13, 2013.

ULRICH-MERZENICH, U.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H.; WAGNER, H. Application of the "-Omic-" technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, p. 70-82, 2007.

UNSICKER, S.B., KUNERT, G., AND GERSHENZON, J. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biology*, v. 12, p. 479–485, 2009.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and system biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 100, p. 53-56, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, p. 1279-1286, 2006.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 908-910, 2004.

VIEGAS JR., C.; PIVATTO, M.; REZENDE, A.; HAMERSKI, L.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. (-)-7-hydroxycassine: a new 2,6-dialkylpiperidin-3-ol alkaloid and other constituents isolated from flowers and fruits of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 230, 2013.

WANG, Y. AND GLOER, J. B. Terezines a-d: new amino acid-derived bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella teretispora*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 93-99, 1995.

WANG, L.-Y.; XIE, Y.-S.; CUI, Y.-Y.; XU, J.; HE, W.; CHEN, H.-G.; GUO, J.-H. Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against Fusarium root rot and Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum*. **Microbiological Research**, v. 177, p. 34-42, May 2015.

WANG, L.; XU, B.; SU, Z.; LIN, F.; ZHANG, C.; KUBICEK, C. P. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 1231-1239, 2012.

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a Bioactive Compound Produced by Fungi: A Short Review. **Molecules**, v. 17, p. 2367-2377, 2012.

WAGENNAR, M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three New cytochalasins produced by an endophytic fungus in the Genus *Rhinocladiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1692-1695, 2000.

WOLFENDER, J-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009.

WOLFENDER J-L.; RUDAZ, S.; HAE CHOI, Y.; KYONG KIM, H. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1056-1090, 2013.

YANG, B.; TAO, H.; QIN, X-C.; WANG, Z.; DONG, J.; LIN, X.; ZHOU, X.; LI, J-L.; TU, Z-C.; LIU, Y. Aspergone, a new chromanone derivative from fungus *Aspergillus* sp. SCSIO41002 derived of mangrove soil sample. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, p. 1-3, 2017.

YATEEM, A.; AL-SARRAH, T. BIN-HAJI, A. Investigation of microbes in the rhizosphere of selected grasses for rhizoremediation oh hydrocarbon-contaminated soils. **Soil and Sediment Contamination**, v. 16, p. 269-280, 2007.

ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; TREVISAN, H. C.; ARAÚJO, A. R.; YOUNG, M. C. M. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v. 35, p. 2233-2236, 2012.

ZHANG, D.B.; YANG, Z.D.; XUE, P.H.; ZHI, K.K.; SHI, Y.; WANG, M.G. Two new cyclic dipeptides from *Rhinocladiella* sp. lgt-3, a fungal endophyte isolated from *Tripterygiun wilfordii* Hook. **Nature Products Research**, v. 28, p. 1760-1764, 2014.

ZUO, H-L.; YANG, F-Q.; HUANG, W-H.; XIA, Z-N. Preparative gas chromatography and its applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, p. 704-715, 2013.

ZWAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. A brief History of taxol. **Journal of Medical Science**, v. 83, 2014.