

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 06/04/2020.

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.

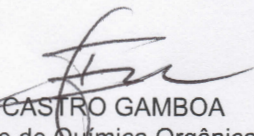
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

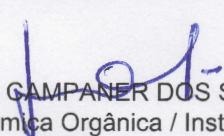
TÍTULO DA TESE: "Co-cultura de micro-organismos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*"

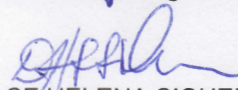
AUTOR: VÍCTOR DAMASCENO PAVANI

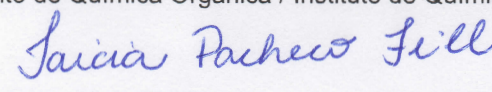
ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

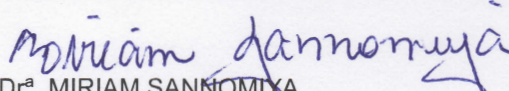
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


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. TAICIA 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 Research.* (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 metabolitos 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 *Rhinoctadiella 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*, *Rhinoctadiella 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>Rhinocladiella 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 m/z 194,1166.....	73
Figura 32: Espectro de massas do composto m/z 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 m/z 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 m/z 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 m/z 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 $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$	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 ^1H	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. Desreplicação.....	39
1.6. <i>Rhinoctadiella 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. Ensaios 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 (Desreplicação).....	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 ^1H 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>Rhinochadiella 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. Ensaios de co-cultivo em meio sólido.....	178
4.7.1. <i>Fusarium oxysporum</i> VS <i>Rhinochadiella similis</i>	178
5. Conclusão	188
Referências	190

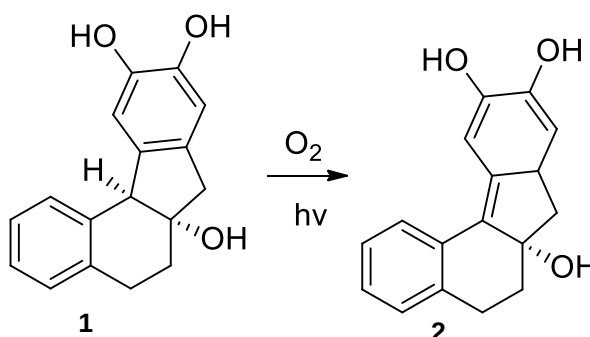
INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Produtos naturais: uma visão geral

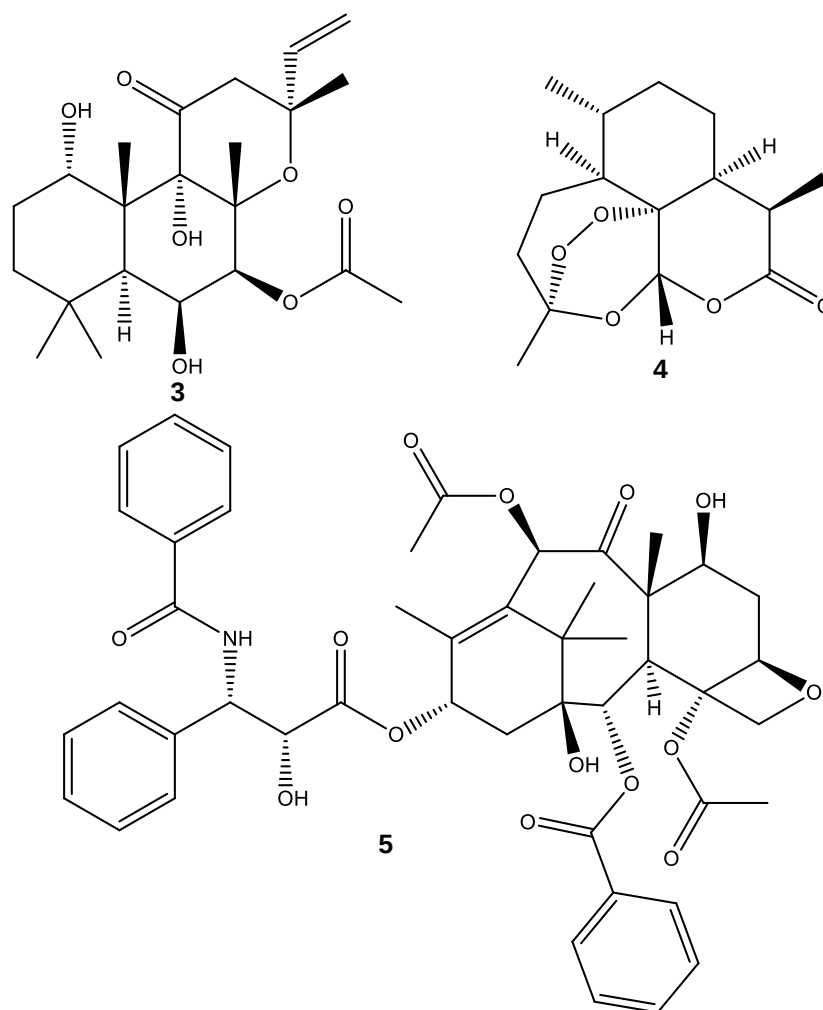
Os produtos naturais como fonte de agentes terapêuticos fazem parte da história da humanidade. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. No Brasil, 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 barbatulus*, 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).

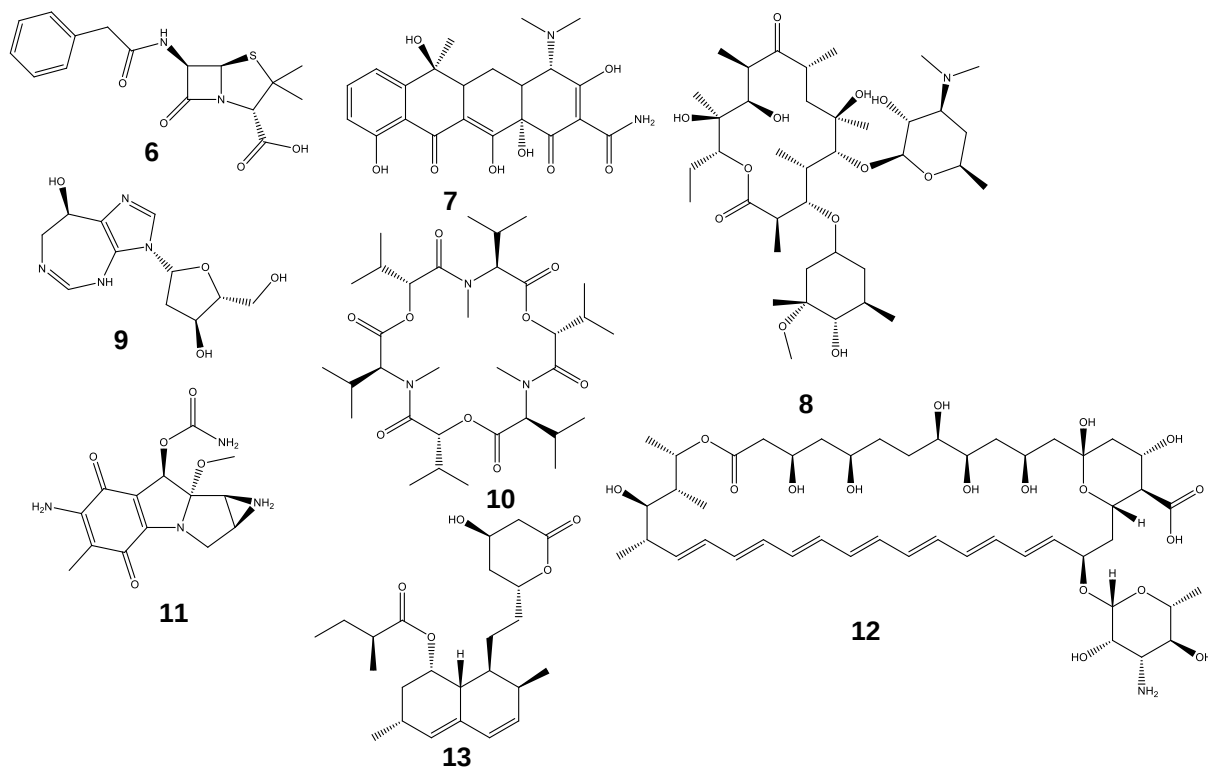
Dentre os organismos encontrados na rizosfera se destacam: bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas, nematoides, vermes enquitreídeos, minhocas, centopeias, lacraias, insetos, ácaros, caracóis, pequenos animais e vírus do solo que competem constantemente por água, nutriente e espaço.

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

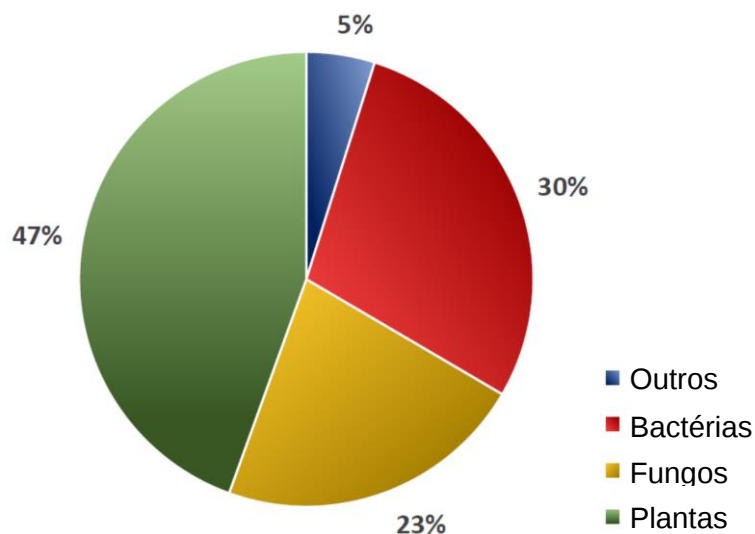
A busca por compostos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente que a dos produtos derivados de plantas. Iniciou-se com a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928, fato que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas, levando pesquisadores a procurar intensivamente produtos 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**), tetraciclinas (**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.

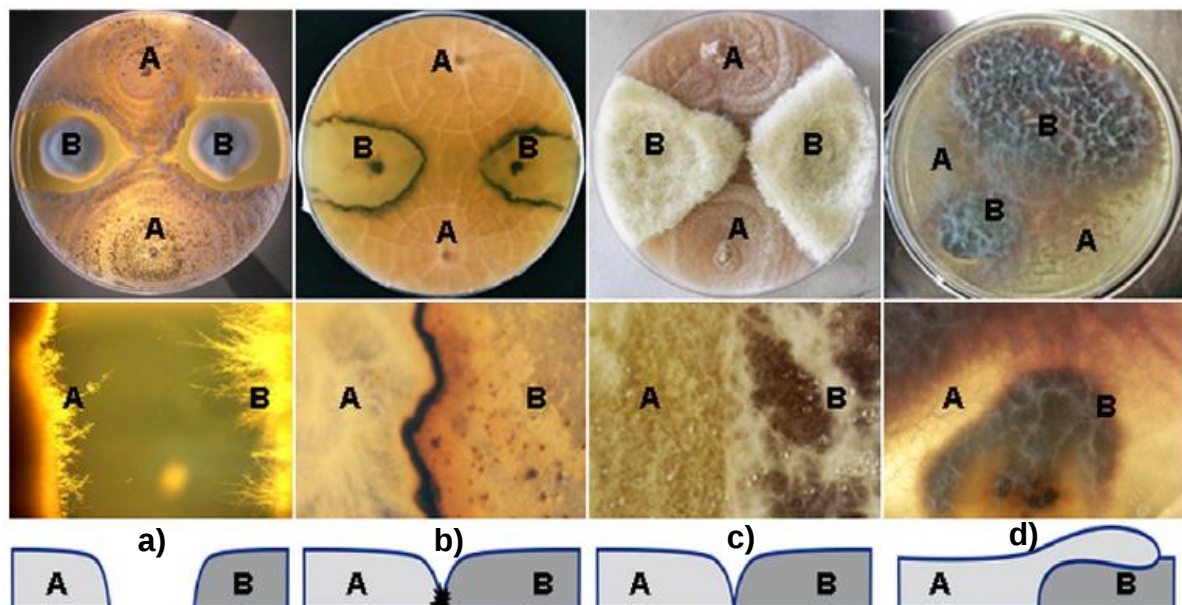
Mesmo sabendo do potencial dos micro-organismos na produção de compostos quimioterapêuticos e, das importantes substâncias biologicamente ativas já relatadas pela literatura proveniente desses organismos, apenas um subconjunto de vias biossintéticas são expressadas em condições normais de cultivo em 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 metabolitos 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).

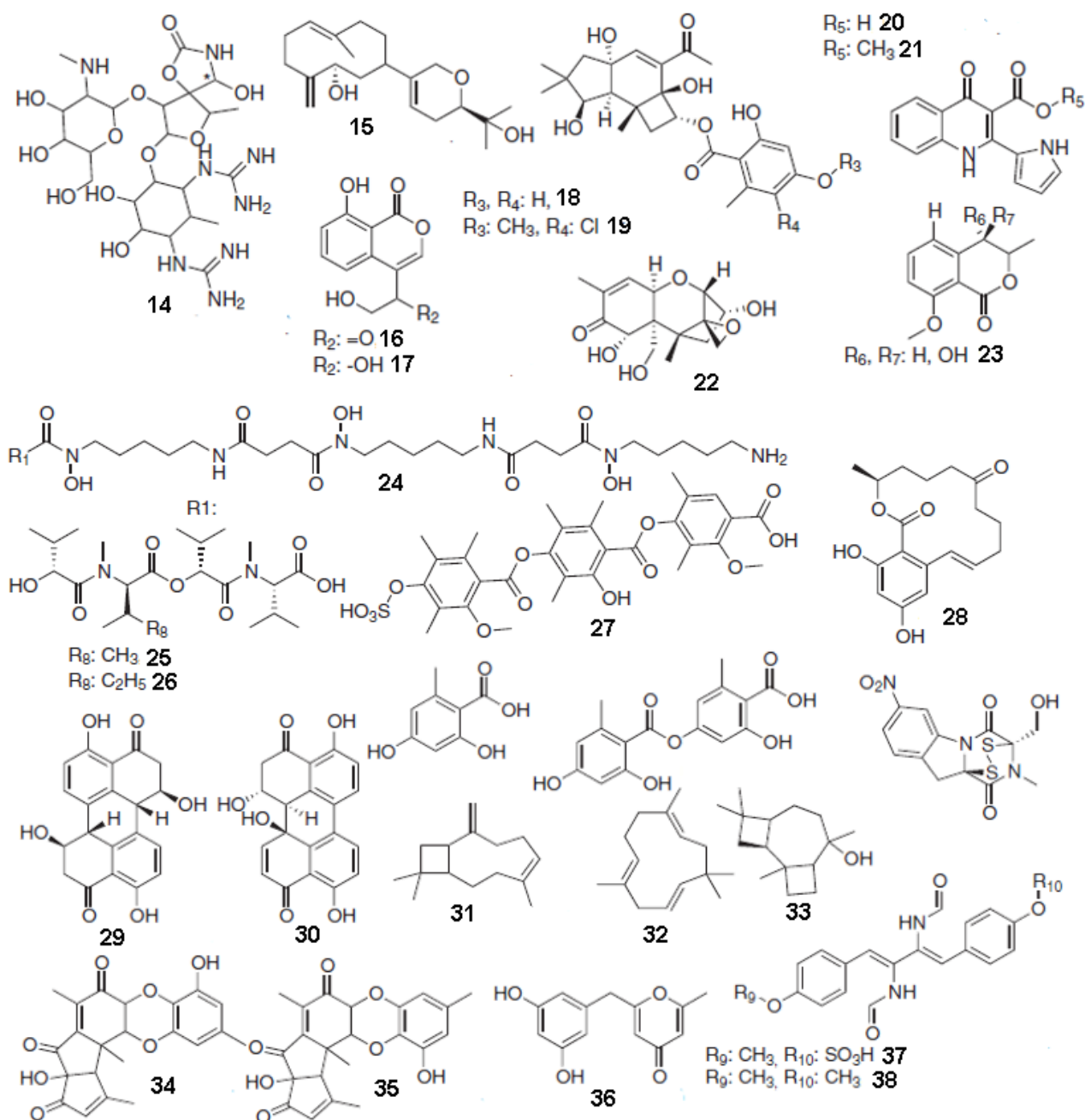
Nessas análises vários métodos estatísticos podem ser empregados, incluindo análise de componentes principais (PCA), análise de variância (ANOVA) e regressão de mínimos quadrados com análise discriminante (PLS-DA) (BERTRAND et al., 2013). PCA e PLS-DA exibem as relações entre as distribuições das amostras, 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 alcaloides 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)

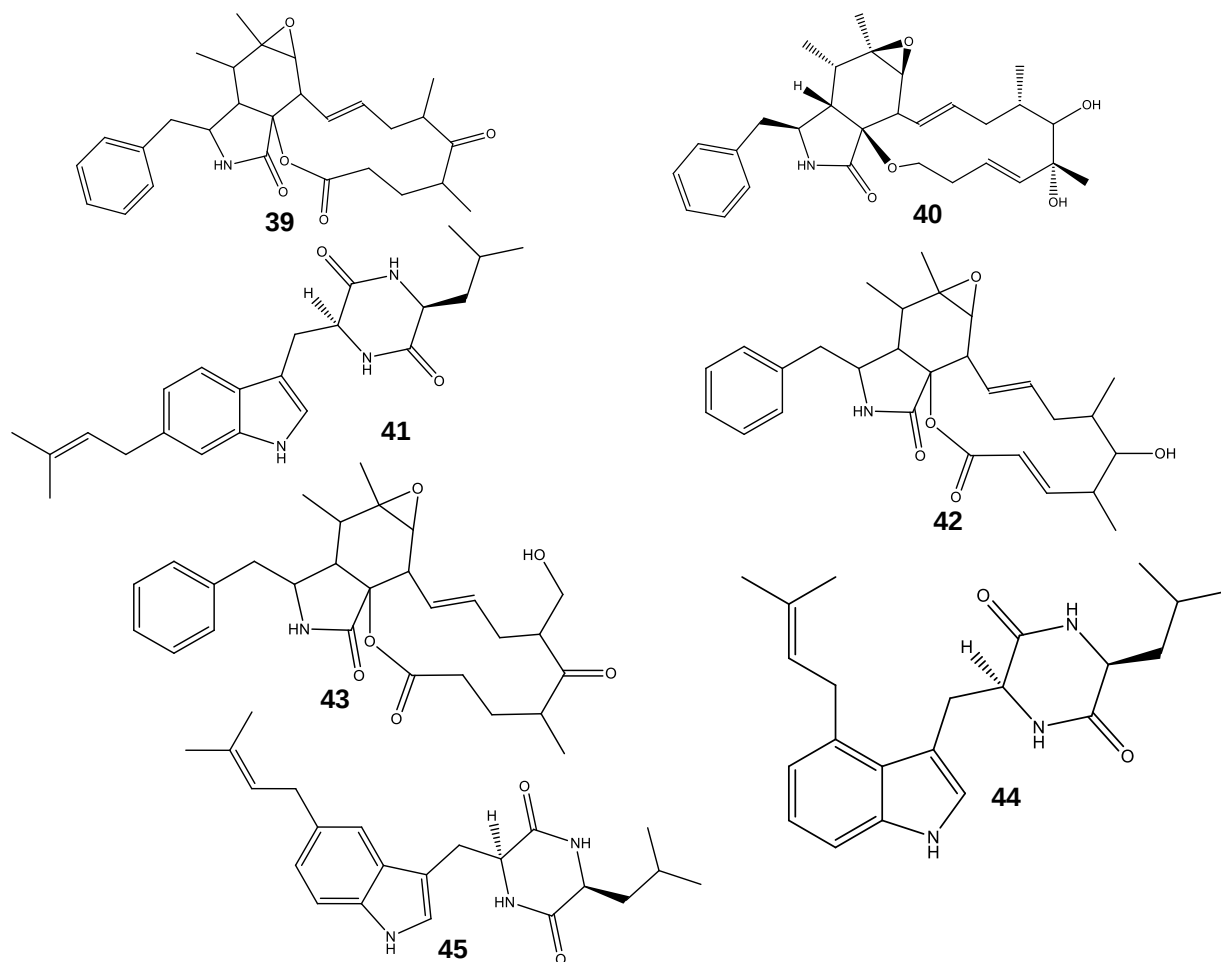
1.6. *Rhinocladiella similis*



Os fungos *Rhinocladiella* spp. pertencem à ordem Chaetothyriales (Ascomycota) e família Herpotrichiellaceae, essa família apresenta cinco principais espécies, *R. aquaspera*, *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.



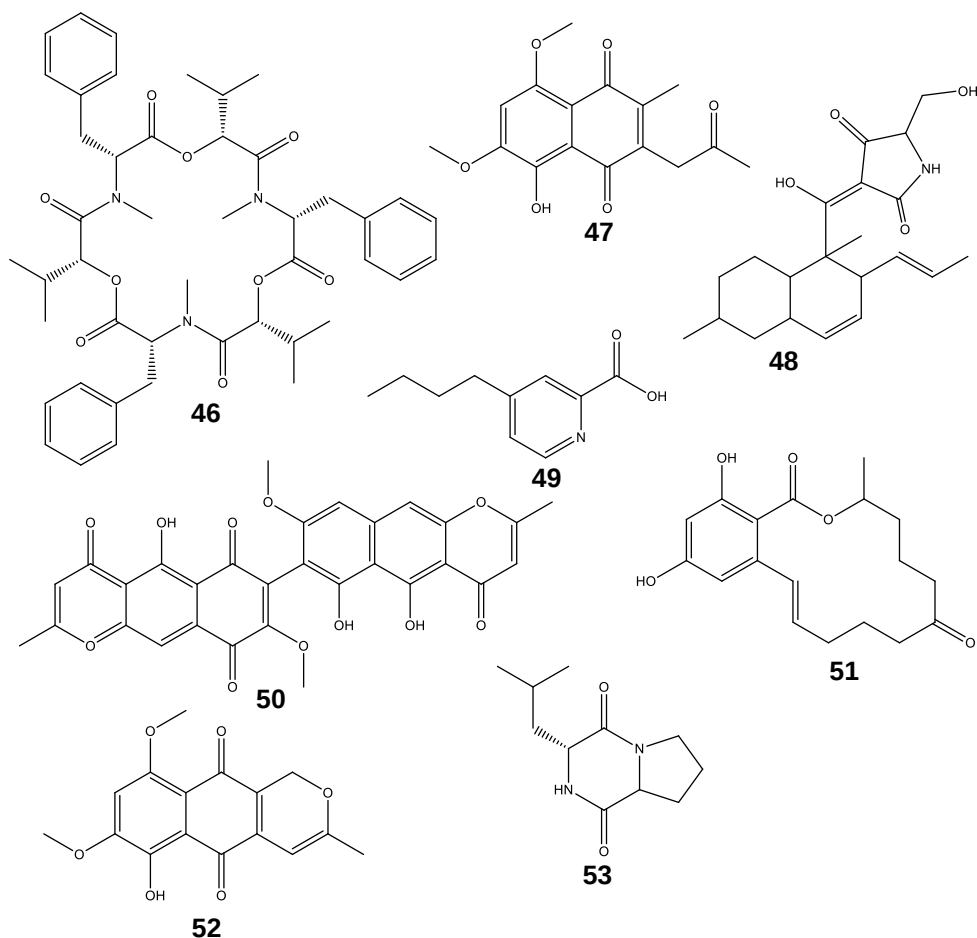
Para o fungo *Rhinocladiella similis* nenhum metabólito secundário foi relatado pela literatura, fato que instigou a busca e identificação de metabólitos desse micro-organismo neste trabalho.

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*.

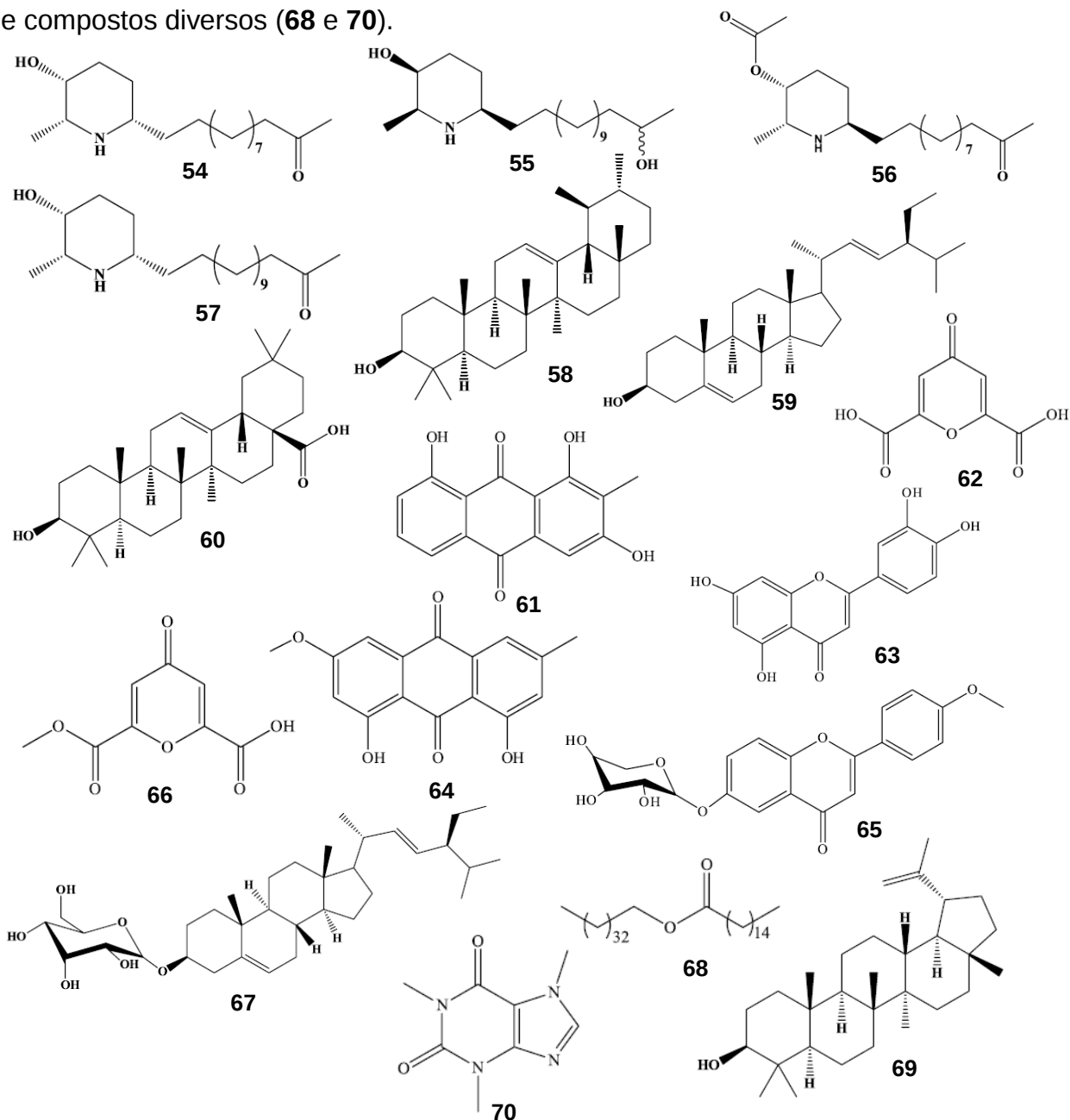


1.8. *Senna spectabilis*

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).

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. *lisi* 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 *Rhinocladiella 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. Metabonomics. **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 peperidini 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.

WAGENAR, M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three New cytochalasins produced by an endophytic fungus in the Genus *Rhinoctadiella*. **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. Invesigation 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 *Rhinoctadiella* 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.