

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 13/07/2024.

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química de Araraquara

GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas
para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos
isolados das raízes de *Senna spectabilis*

Araraquara

2022

GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas
para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos
isolados das raízes de *Senna spectabilis*

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2022

E74u Escaliante, Gabriela Anjos de Stefano
Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis* / Gabriela Anjos de Stefano
Escaliante. -- Araraquara, 2022
113 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Micotoxinas. 4. Metabólitos. 5. Quimiometria. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

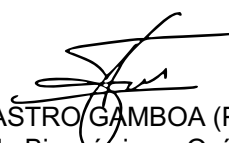
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Uso da metabolômica e de ferramentas quimiométricas para a anotação de metabólitos de fungos endofíticos isolados das raízes de *Senna spectabilis*"

AUTORA: GABRIELA ANJOS DE STEFANO ESCALIANTE

ORIENTADOR: IAN CASTRO-GAMBOA

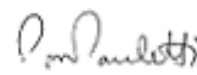
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Ian Castro
Gamboa:213
66541871

Assinado de forma digital por Ian Castro
Gamboa:21366541871
Dados: 2022.07.13
17:26:28 -03'00'


Profa. Dra. REBECA PREVIANTE MEDINA (Participação Virtual)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo - IFSP - Cubatão


Profa. Dra. PATRÍCIA MENDONÇA PAULETTI (Participação Virtual)
Universidade de Franca - UNIFRAN - Franca

Araraquara, 13 de julho de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Gabriela Anjos De Stefano Escaliente

Nome em citações científicas: Escaliente, G. A. S.

e-mail: gabriela.escaliente@unesp.br

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP.

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP 14.800-060, Araraquara, SP, Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2020

Graduação: Bacharelado em Química (2016 – 2020)

Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – UNESP – Instituto de Química de Araraquara – SP.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015

Técnico em Química (08/2014-12/2015)

Instituição: Fundação Indaiatubana de Educação e Cultura (FIEC) – SP.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

ESCALIANTE, G. A. S.; CUNHA, C. L.; NASCIMENTO, I. R. Phytochemical Analysis of *Aristolochia gigantea* Seeds using GC/MS Molecular Networking. In: ANAIS DO BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 2021, Goiânia. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2021. Disponível em: <<https://proceedings.science/bcnp-series/bcnp-2021/papers/phytochemical->

analysis-of-aristolochia-gigantea-seeds-using-gc-ms-molecular-networking?lang=en> Acesso em: 28 nov. 2021.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

8th BCNP. Phytochemical Analysis of *Aristolochia gigantea* Seeds using GC/MS Molecular Networking. 2021. (Congresso).

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre me apoiar e me incentivar a seguir os meus sonhos. Por todo amor e carinho, pelos conselhos e por sempre apoiar as minhas escolhas, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, pela oportunidade de poder realizar esse trabalho, por toda dedicação que teve para me orientar e por todo carinho que sempre tem com todos os seus alunos.

Aos meus amigos Mayara, Thais, Flávia, Jessica, Larissa, Luiza e Thales, por todos os momentos felizes e por sempre demonstrarem seu carinho e apoio até nos momentos mais difíceis, eu não conseguiria ter chegado até aqui sem a amizade de vocês.

Aos mestrandos Mayara e Emanuel por todo apoio, ensinamentos e momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório.

Aos doutorandos Juvenal Henrique, Victor, Rafael, Maria e Camila, por todo os ensinamentos que me proporcionaram e por todo auxílio que me deram dentro e fora do laboratório.

A Professora Dra. Isabele Nascimento por ceder solvente para a realização das minhas análises.

A Professora Dra. Ilana L. B. C. Camargo pela realização dos ensaios biológicos.

Ao Professor Dr. Marcos Antônio Soares pela realização da identificação das linhagens fúngicas.

Aos técnicos João e Juliana por todas as análises realizadas.

A todos funcionários do Instituto de Química por estarem sempre de prontidão para nos auxiliarem no que for preciso.

Ao grupo de pesquisa NuBBE e a Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Câmpus Araraquara, por fornecer o espaço e todo o suporte indispensável para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa concedida (Nº do processo 88887.484085/2020-00).

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que em um período do seu ciclo de vida colonizam os tecidos das raízes e da parte aérea de plantas sem causar nenhum dano aparente às mesmas, sendo responsáveis por produzirem ou levarem a planta a produzir uma vasta gama de metabólitos secundários de interesse. Diante disso, visando entender como diferentes fontes de nutrientes podem inibir ou ativar diferentes rotas biossintéticas do fungo *Fusarium oxysporum*, duas linhagens dessa espécie foram cultivadas nos meios de Czapek, Malte e PDB. Os extratos obtidos foram submetidos a ensaios de atividade antibacteriana e analisados por LC-MS utilizando-se das redes moleculares a partir da plataforma GNPS e do UNIFI (Sistema de Informação Científica – Waters Corporation) para avaliar a variação da produção de metabólitos secundários. Realizou-se um planejamento fatorial 2^2 para uma das linhagens em meio de PDB, onde analisou-se como as variáveis agitação e exposição a luz afetaram o rendimento e a diversidade química dos extratos brutos obtidos e uma curva de crescimento por 35 dias para observar o padrão de crescimento micelia. A partir dos seis extratos estudados foi possível anotar 35 metabólitos sendo eles alcaloides, derivados de naftoquinonas, peptídeos cíclicos entre outros. Dentre esses, os derivados de naftoquinonas foram produzidos quase que exclusivamente no meio de Malte, o que nos mostra a influência da OSMAC na ativação de outras rotas biossintéticas. O planejamento fatorial nos indicou a possibilidade da otimização da variável agitação visando obter maiores quantidades de determinados metabólitos. A curva de crescimento resultou em um perfil de crescimento como uma curva de segundo grau. A partir dela também se acompanhou a produção de determinadas micotoxinas, o que indicou que as enniatinas possam ser um produto de degradação da beauvericina e que essas substâncias possam ser utilizadas pelo *Fusarium oxysporum* como fonte de aminoácidos.

Palavras-chave: Produtos Naturais. *Senna spectabilis*. *Fusarium oxysporum*. OSMAC. GNPS. UNIFI.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that during their life cycle colonize the tissues of the roots and aerial parts of plants without causing any apparent damage to them, being responsible for producing or leading the plant to produce a wide range of secondary metabolites of interest. Therefore, aiming to understand how different nutrient sources can inhibit or activate different biosynthetic pathways of the fungus *Fusarium oxysporum*, two strains of this fungus were cultivated in Czapek, Malt and PDB culture media. The extracts obtained were submitted to antibacterial activity assays and analyzed by LC-MS using molecular networks from the GNPS platform and UNIFI (Scientific Information System - Waters Corporation) to evaluate the variation in the production of secondary metabolites. A factorial design 2^2 was performed for one of the strains in PDB medium, where it was analyzed how the variables agitation and light exposure affected the yield and chemical diversity of the crude extracts obtained, and a thirty-five-day growth curve to observe the mycelia growth pattern. From the six extracts studied it was possible to annotate thirty-five-metabolites being them alkaloids, naphthoquinone derivatives, cyclic peptides among others. Among these, the naphthoquinone derivatives were produced almost exclusively in the malt medium, which shows us the influence of OSMAC in the activation of other biosynthetic routes. The factorial design indicated the possibility of optimizing the agitation variable to obtain larger quantities of certain metabolites. The growth curve resulted in a growth profile as a second-degree curve. From this curve the production of certain mycotoxins was also followed, which indicated that the enniatins could be a degradation product of beauvericin and that these substances could be used by *Fusarium oxysporum* as a source of amino acids.

Keywords: Natural products. *Senna spectabilis*. *Fusarium oxysporum*. OSMAC. GNPS. UNIFI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos.....	19
Figura 2: <i>Senna spectabilis</i>	21
Figura 3: Substâncias bioativas isoladas da <i>Senna spectabilis</i>	22
Figura 4: <i>Fusarium oxysporum</i> em placa de Petri com PDA.....	23
Figura 5: Metabólitos secundários de <i>Fusarium oxysporum</i>	25
Figura 6: Esquema da obtenção de redes moleculares a partir da plataforma GNPS	28
Figura 7: Esquema da obtenção de dados em aquisição MS ^E para análise no sistema UNIFI.....	29
Figura 8: Esquema de obtenção dos extratos brutos nos meios de Malte, PDB e Czapek	35
Figura 9: Esquema dos extratos brutos para cada linhagem fúngica em diferentes meios líquidos.....	36
Figura 10: Esquema de obtenção dos extratos brutos do planejamento fatorial 2 ²	40
Figura 11: Imagens do macrocultivo e microcultivo da linhagem fúngica S.S_R3.....	43
Figura 12: Imagens do macrocultivo e microcultivo da linhagem fúngica S.S_R9.....	43
Figura 13: Comparação do perfil químico dos extratos brutos nos meios de Czapek, PDB e Malte por HPLC-DAD.....	47
Figura 14: Espectros de RMN de ¹ H dos extratos da linhagem S.S_R3 nos meios de Czapek, PDB e Malte (D ₃ COD, 14, 1 T)	48
Figura 15: Espectros de RMN de ¹ H dos extratos da linhagem S.S_R9 nos meios de Czapek, PDB e Malte (D ₃ COD, 14, 1 T)	49
Figura 16: Gráfico de scores para as linhagens S.S_R3 e S.S_R9 nos diferentes meios de cultivo	50
Figura 17: Perfil BPC das linhagens S.S_R3 e S.S_R9 por LC-ESI-(+)-IT-MS51	
Figura 18: Representação da rede molecular gerada a partir dos dados de LC-ESI-(+)-IT-MS visualizada no Cytoscape 3.9.0	52
Figura 19: Cluster das enniatinas (1-6) e suas respectivas estruturas.....	54
Figura 20: Espectros de MS ² por LC-ESI-(+)-IT-MS das substâncias 5 e 6 extraídos através do software DataAnalysis 4.3.....	55

Figura 21: Esquema do cluster contendo a substância (7) com a sua respectiva estrutura e espectro de MS ² por LC-ESI-(+)-IT-MS extraído através do software DataAnalysis 4.3	56
Figura 22: Cluster onde foram anotadas as substâncias 8 e 9 e suas respectivas estruturas	57
Figura 23: Espectro de MS ² via LC-ESI-(+)-IT-MS da substância 8.....	58
Figura 24: Proposta de fragmentação da substância 8 por ESI	58
Figura 25: Espectro de MS ² via LC-ESI-(+)-IT-MS da substância 9.....	59
Figura 26: Proposta de fragmentação da substância 9 por ESI	60
Figura 27: Estrutura da substância 10 anotada via UNIFI.....	68
Figura 28: Íons fragmentos da substância 4 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	69
Figura 29: Proposta de fragmentação por ESI para a substância 4.....	70
Figura 30: Íons fragmentos da substância 7 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	71
Figura 31: Proposta de fragmentação de íons característicos da substância 7	72
Figura 32: Estrutura dos alcaloides (11-18) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI.....	73
Figura 33: Íons fragmentos das substâncias 11-14 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	74
Figura 34: Proposta de fragmentação da substância 11 por ESI	76
Figura 35: Espectro de MS ² via UPLC-QTOF/MS ^E da substância 15	77
Figura 36: Proposta de fragmentação da substância 15 por ESI	77
Figura 37: Espectro de MS ² via UPLC-QTOF/MS ^E da substância 16	78
Figura 38: Íons fragmentos da substância 17 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	78
Figura 39: Íons fragmentos da substância 18 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	78
Figura 40: Estrutura dos derivados de naftoquinona (19-27) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI	80
Figura 41: Íons fragmentos da substância 19 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	81
Figura 42: Proposta de fragmentação da substância 19 por ESI	81

Figura 43: Íons fragmentos da substância 9-O-metilfusarubina por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI.....	82
Figura 44: Proposta de fragmentação da substância 22 por ESI	83
Figura 45: Íons fragmentos da substância 24 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	84
Figura 46: Íon fragmento da substância 25 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	84
Figura 47: Proposta de fragmentação da substância 26 por ESI	85
Figura 48: Íons fragmentos das substâncias 26 e 27 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	86
Figura 49: Estrutura dos terpenoides (28-31) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI.....	87
Figura 50: Íons fragmentos das substâncias 28 e 29 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	88
Figura 51: Íon fragmento da substância 30 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	88
Figura 52: Íon fragmento da substância 31 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	89
Figura 53: Estrutura dos derivados de jasmonato (32 e 33) anotados por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI	89
Figura 54: Íons fragmentos das substâncias 32 e 33 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	90
Figura 55: Estrutura das antraquinonas (34 e 35) anotadas por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI.....	90
Figura 56: Íons fragmentos das substâncias 34 e 35 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	91
Figura 57: Gráfico das médias marginais para a resposta massa do extrato bruto	92
Figura 58: Diagrama de Pareto para os efeitos sobre a massa do extrato bruto	93
Figura 59: Perfil metabólico BPC em modo positivo os ensaios únicos P1SSR9 a P4SSSR9 de <i>F. oxysporum</i> nas diferentes condições do planejamento fatorial em LC-ESI-(+)-IT-MS	94

Figura 60: Análise de Componentes Principais (PC1xPC2) para as 4 condições de cultivo do fungo <i>F. oxysporum</i>	95
Figura 61: Curva de crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> no meio de PDB em 35 dias.....	97
Figura 62: Ajuste polinomial de segunda ordem da curva de crescimento de <i>F. oxysporum</i> no meio de PDB em 35 dias	98
Figura 63: Perfis cromatográficos dos extratos obtidos a cada 5 dias	98
Figura 64: Perfil químico por UPLC-ESI-QTOF-MS dos extratos brutos em diferentes períodos de cultivo para o meio de PDB	99
Figura 65: Perfil químico por UPLC-ESI-QTOF-MS do extrato bruto no meio de PDB em 28 dias de cultivo	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis planejamento fatorial 2 ²	39
Tabela 2: Matriz do planejamento fatorial completo 2 ²	39
Tabela 3: Resultado da triagem inicial dos extratos a 512 µg/mL	44
Tabela 4: Valores de CIM e CBM do extrato S.S_R9-P	45
Tabela 5: Massa dos extratos brutos de cada meio para as duas linhagens fúngicas.....	46
Tabela 6: Substâncias anotadas através da plataforma GNPS para os extratos de ambas as linhagens nos diferentes meios de cultivo	61
Tabela 7: Metabólitos anotados para as duas linhagens de <i>F. oxysporum</i> nos diferentes meios de cultivo por UPLC-QTOF/MS ^E no modo positivo através do software UNIFI	64
Tabela 10: Respostas obtidas para cada um dos ensaios do planejamento fatorial completo 2 ²	91
Tabela 11: Efeitos calculados das variáveis estudadas para a massa do extrato bruto	92
Tabela 12: Média das massas das triplicatas e peso seco dos micélios de <i>F. oxysporum</i> a cada cinco dias	96
Tabela 13: Equações de regressão, valores de R ² ajustado e valores de AIC dos modelos correspondentes à produção micelial.....	97

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1: Estruturas das possíveis anotações para as substâncias 5 e 6	108
Apêndice 2: Íons fragmentos da substância 2 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	109
Apêndice 3: Íons fragmentos da substância 3 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	110
Apêndice 4: Íons fragmentos da substância 27 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	111
Apêndice 5: Íons fragmentos da substância 20 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	112
Apêndice 6: Íons fragmentos da substância 21 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	112
Apêndice 7: Íons fragmentos da substância 23 por UPLC-QTOF/MS ^E em modo positivo via UNIFI	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
AIC	Sigla em inglês para <i>Critério de Informação de Akaike</i>
BPC	Sigla em inglês <i>Cromatograma do Pico Base</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
C18	Adsorvente de Fase Reversa tipo Octadecil Silano
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DBQO	Departamento de Bioquímica e Química Orgânica
DDA	Sigla em inglês para <i>Modo de aquisição dependente de dados</i>
DIA	Sigla em inglês para <i>Modo de aquisição independente de dados</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
D ₃ COD	Metanol deuterado
ESI	Sigla em inglês para <i>Ionização por Electrospray</i>
FOSC	Sigla em inglês para <i>Complexo da espécie Fusarium oxysporum</i>
GC-MS	Sigla em inglês para <i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas</i>
GNPS	Sigla em inglês <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HPLC	Sigla em inglês para <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
IT	Sigla em inglês <i>Ion trap</i>
ITS	Sigla em inglês para <i>Espaçador transcrito interno</i>
LC-MS	Sigla em inglês para <i>Cromatografia líquida acoplada a</i>

espectrometria de massas

LEMiMo	Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular
MeOH	Metanol
MHCA	Mueller hinton cátion ajustado
MS	Sigla em inglês para <i>Espectrometria de massas</i>
MS ^E	Sigla em inglês <i>Mass spectrometry (E-energy)</i>
MS ²	Sigla em inglês <i>Tandem mass spectrometry</i>
MS/MS	Sigla em inglês <i>Tandem mass spectrometry</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OSMAC	Sigla em inglês <i>One Strain Many Compounds</i>
PCA	Sigla em inglês para <i>Análise de Componentes Principais</i>
PDA	Sigla em inglês <i>Potato dextrose agar</i>
PDB	Sigla em inglês <i>Potato dextrose broth</i>
Q-TOF	Sigla em inglês <i>Quadrupole time-of-flight</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso
UPLC	Sigla em inglês para <i>Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</i>
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1.	Microrganismos como fonte de produtos naturais	18
1.2.	Fungos endofíticos	20
1.3.	<i>Senna spectabilis</i>	20
1.4.	<i>Fusarium oxysporum</i>	23
1.5.	Variação das condições de cultivo	26
1.6.	Metabolômica e desreplicação	26
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
3	PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1	Especificações dos materiais e equipamentos	31
3.1.1	Solventes	31
3.1.2	Meios de cultura	31
3.1.3	Análises cromatográficas	31
3.1.4	Equipamentos	31
3.2	Isolamento dos fungos endofíticos	32
3.3	Identificação das linhagens	33
3.4	Cultivo dos fungos endofíticos e análises	33
3.5	Ensaio biológico de atividade antibacteriana	36
3.5.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	37
3.5.2	Determinação da Concentração Bactericida Mínima	38
3.6	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i> (GNPS)	38
3.7	UNIFI	39
3.8	Planejamento Fatorial	39
3.9	Análise de Componentes Principais (PCA)	40
3.10	Curva de crescimento	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Identificação das linhagens fúngicas	43
4.2	Ensaio biológico de atividade antibacteriana	44

4.3 Análise qualitativa dos efeitos da OSMAC	45
4.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	49
4.3.2 GNPS	52
4.3.3 UNIFI	63
<u>Peptídeos cíclicos</u>	68
<u>Alcaloides (11-18)</u>	72
<u>Derivados de naftoquinona (19-27)</u>	79
<u>Terpenoides (28-31)</u>	87
<u>Derivados de jasmonatos (32 e 33)</u>	89
<u>Antraquinonas (34 e 35)</u>	90
4.4 Planejamento Fatorial Completo 2 ²	91
4.5 Curva de crescimento	96
5 CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICE	108

1 INTRODUÇÃO

1.1. Microrganismos como fonte de produtos naturais

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade há milhares de anos, sendo que as civilizações antigas ingeriam folhas e ervas para o tratamento de doenças. O avanço nos estudos de produtos naturais atingiu o auge no final do século XX com o surgimento de ferramentas de análise espectroscópica, que permitiram a obtenção de um vasto conhecimento do metabolismo secundário de organismos vivos (BERLINCK *et al.*, 2017).

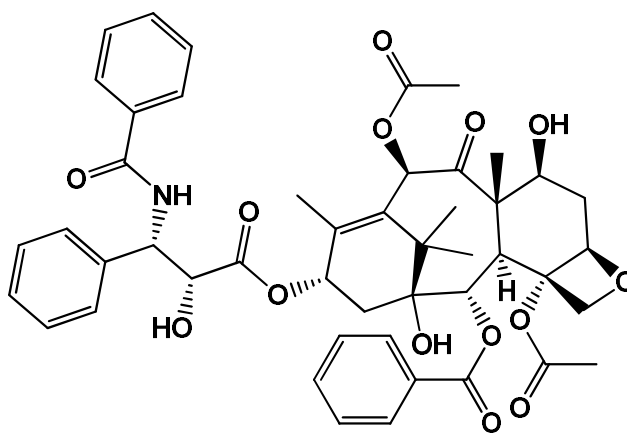
Os produtos naturais e seus derivados exercem um importante papel como fonte de novos fármacos, sendo responsáveis por quase 50% dos existentes atualmente, onde cerca de 10% desses são provenientes de microrganismos cultiváveis. Ainda assim, estima-se que atualmente apenas 5% da biodiversidade de todo o planeta tenha sido estudada (cerca de 2 milhões de espécies de plantas, animais e microrganismos), o que indica a existência de diversas fontes inovadoras de biodiversidade a serem estudadas, podendo resultar na descoberta de novos compostos com atividade biológica (SPECIAN *et al.*, 2014).

Dentre os fármacos vendidos mundialmente é possível citar diversos exemplos que têm como fonte produtos naturais e seus derivados, sendo eles a Aspirina®, morfina, penicilina, os agentes antiolesterolínicos sinvastatina e lovastatina, o agente imunossupressor ciclosporina A, o agente antitumoral Taxol®, dentre outros (CALIXTO, 2019; SILVA, 2010).

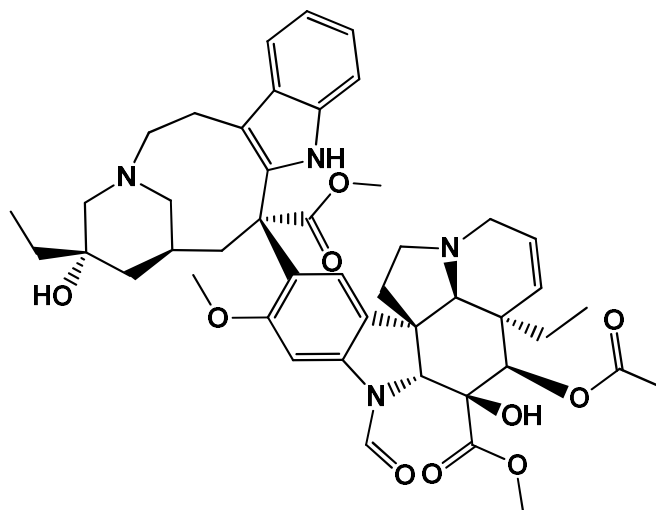
O uso de metabólitos de microrganismos endofíticos se tornou significativo a partir da descoberta da produção do diterpenoide Taxol® (paclitaxel) e compostos relacionados pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*. O Taxol® (**Figura 1**) é um composto antitumoral que tem sido utilizado no tratamento de câncer de mama e de ovário devido a sua atividade citotóxica. Antes disso o Taxol® comercializado era proveniente da extração do mesmo de espécies de plantas do gênero *Taxus*, um método menos eficiente e que trazia consigo um custo elevado no mundo todo (SPECIAN *et al.*, 2014; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Um outro anticancerígeno importante é a vincristina (**Figura 1**) que foi isolada da planta *Catharanthus roseus*, e que recentemente foi obtida a partir do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* presente nessa mesma planta (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

Figura 1: Substâncias bioativas isoladas de fungos endofíticos



Taxol®
(Antitumoral)



Vincristina
(Anticancerígeno)

Fonte: CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013.

Sendo assim, os pesquisadores têm voltado seu foco para o estudo de fungos endofíticos, uma vez que obter esses metabólitos secundários úteis à indústria farmacêutica a partir de um microrganismo ao invés de sua planta hospedeira causa menores impactos ambientais, pois é necessária uma grande quantidade de material

vegetal para se obter uma quantidade desejável desses compostos, o que pode levar a espécie a extinção (TORRES-MENDOZA; ORTEGA; CUBILLA-RIOS, 2020).

1.2. Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são aqueles que em ao menos em um determinado período do seu ciclo de vida colonizam os tecidos das raízes e da parte aérea de plantas sem causar nenhum dano aparente às mesmas. Dentre as interações endófito-planta se observam as simbióticas, neutras e antagônicas, sendo que os mecanismos dessa relação são pouco conhecidos. No caso de uma interação simbiótica entre os endófitos e a planta, esses microrganismos são responsáveis por produzirem ou induzirem a planta a produzir metabólitos primários e secundários, como alcaloides, hormônios, enzimas e antibióticos que tornam a planta menos suscetível ao ataque de insetos e predadores herbívoros, além de proporcionar o controle de outros microrganismos patógenos. Em retorno, a planta oferece a esses microrganismos abrigo e nutrientes, além de transferi-los para as próximas gerações. (MUSSI-DIAS *et al.*, 2012)

Alguns dos compostos produzidos pelos fungos endofíticos podem apresentar certa toxicidade, como por exemplo os alcaloides que são produzidos com o objetivo de proteger a planta, porém esses efeitos prejudiciais são mínimos quando comparados aos benefícios para a planta oriundos da associação com o endófito (SOUZA *et al.*, 2004).

1.3. *Senna spectabilis*

A família Fabaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, sendo constituída por 727 gêneros que abrangem em torno de 19.325 espécies. Se distribui nas três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae e em 36 tribos. Apresenta uma distribuição cosmopolita podendo ser encontrada desde em floresta tropicais até em desertos e regiões alpinas (SILVEIRA; MIOTTO, 2013). É constituída por árvores, arbustos, ervas, lianas e subarbustos, e classificada como aquática, epífita, rupícola e terrícola de acordo com os seus substratos (FABACEAE, 2022).

Dentro dessa família se encontra o gênero *Senna* Mill., pertencente a tribo Cassieae Bronn, subtribo Cassiinae Irwin & Barneby, que consiste em 260 espécies sendo que 200 dessas se encontram no continente americano. No Brasil, este gênero é representado por 80 espécies com distribuição em todos os domínios fitogeográficos do país (SOUZA; BORTOLUZZI, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2005).

As espécies do gênero *Senna* estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas. Dentre as classes de metabólitos secundários produzidos pelas plantas do gênero *Senna* as mais frequentemente encontradas são as antraquinonas e os alcaloides piperidínicos (SILVA *et al.*, 2016; INOUE ANDRADE *et al.*, 2015).

A *Senna spectabilis* é uma árvore nativa da América do Sul e da África, podendo ser comumente encontrada no Brasil, na Colômbia e em países tropicais e subtropicais da África. No Brasil ela apresenta ocorrência confirmada em 21 estados. Essa planta é conhecida popularmente no Brasil como “cássia-do-nordeste” e “canafístula-de-Besouro” (**Figura 2**) (BORTOLUZZI *et al.*, 2022; MELO *et al.*, 2014).

Figura 2: *Senna spectabilis*

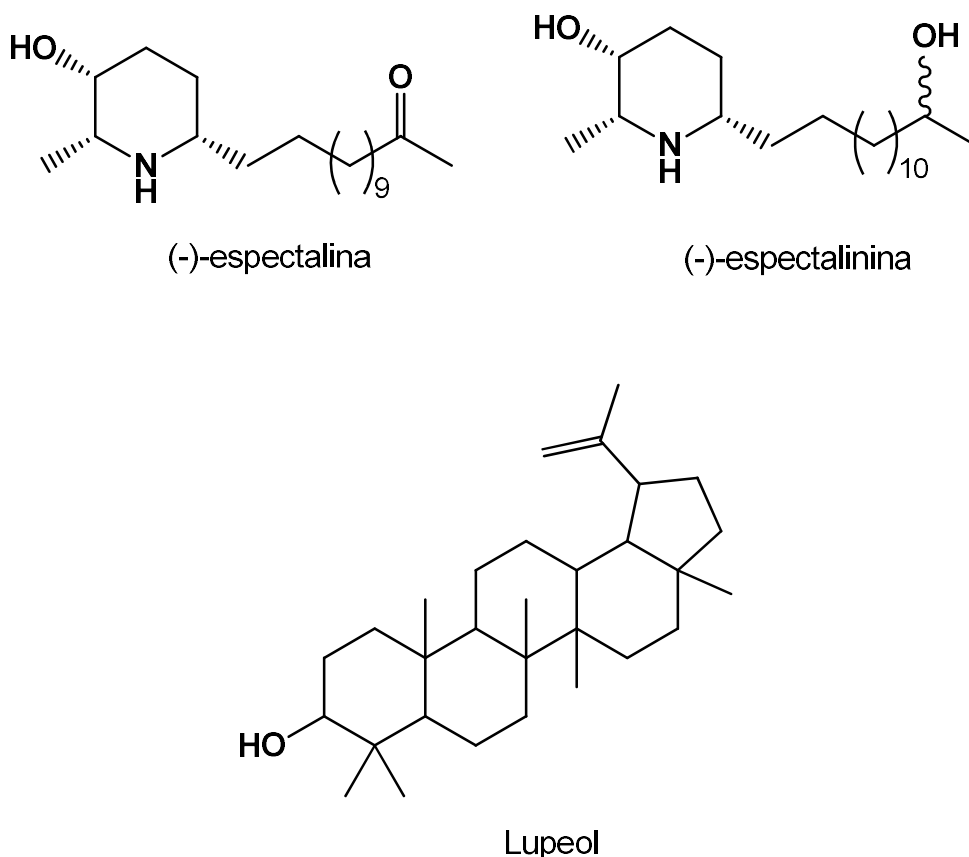


Fonte: Jardim Botânico (UTAD JARDIM BOTÂNICO).

A espécie *Senna spectabilis* é considerada uma das mais importantes dentro do gênero *Senna* e é amplamente estudada em relação a suas propriedades químicas. Essa espécie é muito utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças. No Brasil é utilizada no tratamento de insônia, ansiedade, constipação, epilepsia e malária, além de também serem utilizadas para o tratamento do reumatismo e lesões de pele em alguns países da Ásia (SELEGATO *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2014).

Foram descobertas cerca de 350 moléculas provenientes de espécies do gênero *Senna*, sendo que aproximadamente 11% dessas são metabólitos secundários da espécie *Senna spectabilis*. Em uma revisão acerca dos perfis químicos e biológicos de *S. spectabilis*, os autores mostraram a elucidação de aproximadamente 49 substâncias pertencentes a essa espécie que englobam várias classes de metabólitos secundários como alcaloides, triterpenos pentacíclicos (TPs), esteroides, pironas, antraquinonas e flavonoides. Dentre essas predominam os alcaloides de núcleo piperidínico, como a (-)-espectralina e a (-)-espectalinina que apresentam atividade antitumoral, leishmanicida, analgésica e antimicrobiana, e os TPs, como é o caso do Lupeol que foi o primeiro TP isolado de *S. spectabilis* (**Figura 3**) (SILVA, 2010; BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995).

Figura 3: Substâncias bioativas isoladas da *Senna spectabilis*



1.4. *Fusarium oxysporum*

O fungo estudado nesse trabalho de pesquisa é o *Fusarium oxysporum* (**Figura 4**) (Ordem: Hypocreales; Família: Nectriaceae; Divisão: Ascomycota).

Figura 4: *Fusarium oxysporum* em placa de Petri com PDA

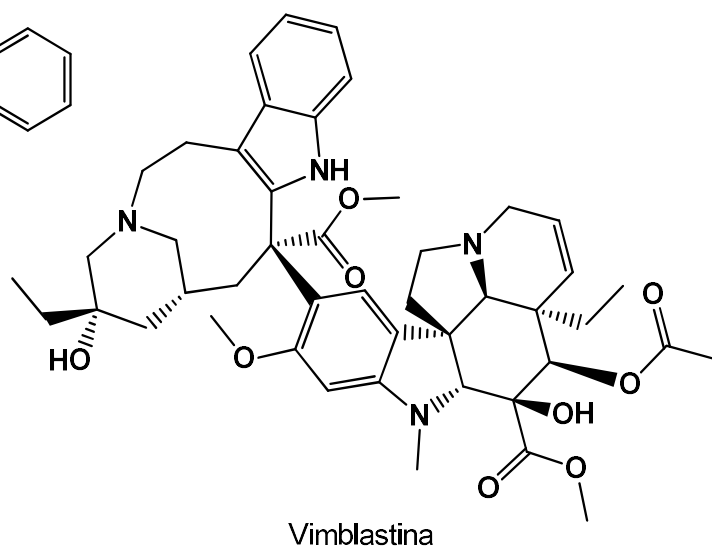
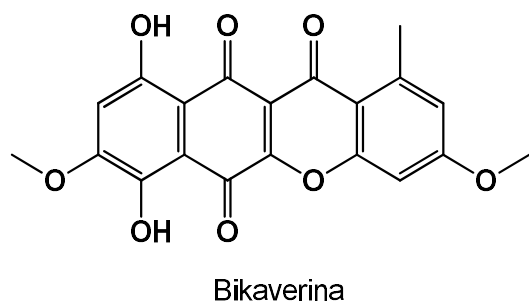


Fonte: Prof. Marcos Antônio Soares

O gênero *Fusarium* consiste em um grupo de fungos que são comumente encontrados no solo, na água ou associados a plantas e que engloba diversas espécies produtoras de micotoxinas e patógenos de plantas de importância econômica mundial (IBRAHIM *et al.*, 2021). O *Fusarium oxysporum* é um fungo filamentoso patógeno de plantas comumente encontrado no solo e é muito conhecido devido a sua capacidade de causar o apodrecimento das raízes, o processo de murchar e até necrose em uma vasta gama de plantas hospedeiras de importância econômica como a banana, o tomate e a ervilha. A patogenicidade do mesmo nos seus hospedeiros está relacionada com a produção de micotoxinas como a beauvericina, o ácido fusárico e as fumonisinas (**Figura 5**) (ZURIEGAT *et al.*, 2021).

Dentro do complexo de espécie *Fusarium oxysporum* (FOSC) se encontram linhagens patogênicas que são divididas em *formae speciales* de acordo com as plantas hospedeiras que infectam, e linhagens não patogênicas que geralmente habitam as raízes de planta sem causar nenhuma doença aparente na planta hospedeira (SON *et al.*, 2008). Existem diversos estudos onde linhagens não patogênicas de *F. oxysporum* foram usadas com o objetivo de reduzir os efeitos de infecções por linhagens patogênicas de *F. oxysporum*, como foi o caso da linhagem Fo-B2 que em condições de estufa foi capaz de diminuir os efeitos da murcha de *Fusarium* em tomate (SHISHIDO *et al.*, 2005).

Além das micotoxinas, o *F. oxysporum* é capaz de produzir uma variedade de classes de metabólitos secundários como alcaloides, peptídeos cíclicos, depsipeptídeos cíclicos, jasmonatos, xantonas, quinonas e terpenoides. Dentre eles se encontram diversos metabólitos de interesse farmacêutico como o anticancerígeno vincristina, que já foi previamente citado, o anticancerígeno vimblastina e a bikaverina, um pigmento vermelho que apresenta atividade antimicrobiana e antitumoral (**Figura 5**) (IBRAHIM *et al.*, 2021; SANTOS; MENDONÇA; BICAS, 2020).



1.5. Variação das condições de cultivo

Os fatores ambientais, como as condições de crescimento e estresses bióticos e abióticos, influenciam na produção de metabólitos secundários por microrganismos, de modo que a mudança seletiva de meios de cultivo pode levar a uma maior diversidade de metabólitos (HEWAGE *et al.*, 2014).

Com o intuito de estudar de maneira racional a variação metabólica produzida por fungos endofíticos, utiliza-se a técnica OSMAC (*One Strain Many Compounds*), buscando diferentes metabólitos ou até mesmo o crescimento da produção de uma determinada substância. A partir dessa técnica é possível variar o meio de cultivo, bem como parâmetros físicos como a temperatura, luz, agitação, pH e diversos outros, o que diretamente leva a uma mudança na produção de metabólitos por esses fungos (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

Sendo assim a OSMAC se mostra como uma abordagem racional e interessante para explorar a variação metabólica nas linhagens de fungos que serão estudadas.

1.6. Metabolômica e desreplicação

A metabolômica é uma das abordagens mais abrangentes para se obter um mapeamento químico de um organismo, pois consiste na identificação da maior quantidade possível de metabólitos secundários produzidos por um determinado organismo. Ela pode ser utilizada para diversos tipos de estudo, como a busca por alterações na produção metabólica de um organismo resultante da resposta ao estresse induzido devido a alteração das condições de cultivo (luz, temperatura, pH, meio de cultivo etc.) (FUNARI *et al.*, 2013). Para isso é preciso a aplicação de ferramentas como a quimiometria, que se utiliza de métodos matemáticos e estatísticos para planejar experimentos de uma maneira otimizada de modo a fornecer a maior quantidade de informação química possível através da análise dos conjuntos de dados complexos obtidos (YULIANA *et al.*, 2013).

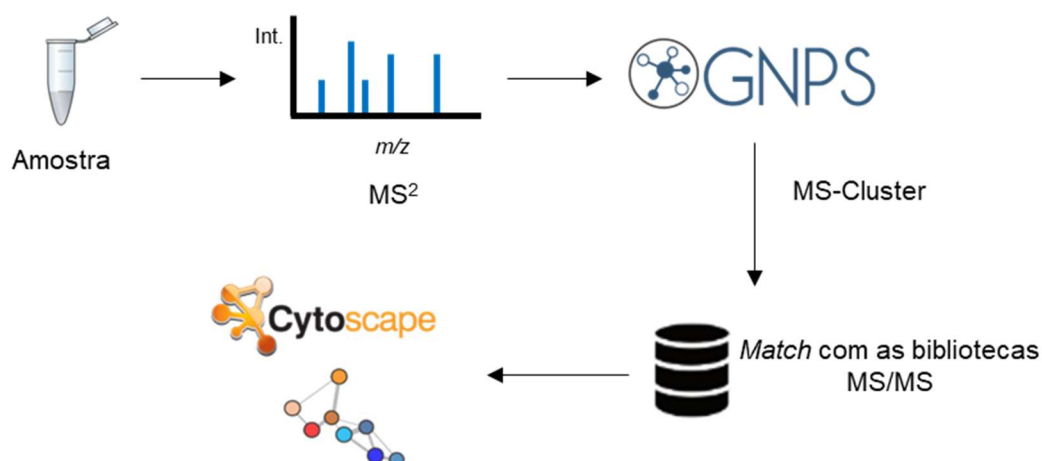
As técnicas mais comumente utilizadas para a análise metabolômica são a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN), sendo que para escolher a técnica mais

adequada para cada caso é preciso levar em conta as vantagens e suas desvantagens (YULIANA *et al.*, 2013). Essas técnicas analíticas são as principais utilizadas para realizar a desreplicação, que se baseia na detecção e anotação de metabólitos que já são conhecidos e que estão presentes nos extratos brutos (TANG; XIAO; WANG, 2009).

Para uma análise rápida e eficiente de conjunto de dados de bibliotecas de produtos naturais, tem-se usado novas abordagens para a análise de dados de espectros de massas, como por exemplo *Molecular Networking*, que pode ser usada com análise diferencial e bases de dados online, como a plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*). Essa análise diferencial engloba diversos processos como o alinhamento, a filtração de sinais autênticos dos espectros de massas da amostra e a detecção de picos. Sendo assim os metabólitos que já são conhecidos podem ser associados aos respectivos compostos utilizando-se de uma base de dados (WANG *et al.*, 2016).

A GNPS é uma plataforma que armazena, analisa e dissemina o conhecimento de espectros de MS/MS, permitindo o compartilhamento e anotações contínuas dos dados que são armazenados. Através dessa plataforma é possível analisar um conjunto de espectros, comparando-os com todos os dados que se encontram disponíveis publicamente, de modo que é possível realizar a desreplicação online e a análise de redes de interação molecular (*Molecular Networking*), que são geradas a partir da correlação e visualização dos espectros, podendo assim agrupar moléculas relacionadas mesmo que os espectros não tenham sido atribuídos a moléculas conhecidas (WANG *et al.*, 2016) (**Figura 6**).

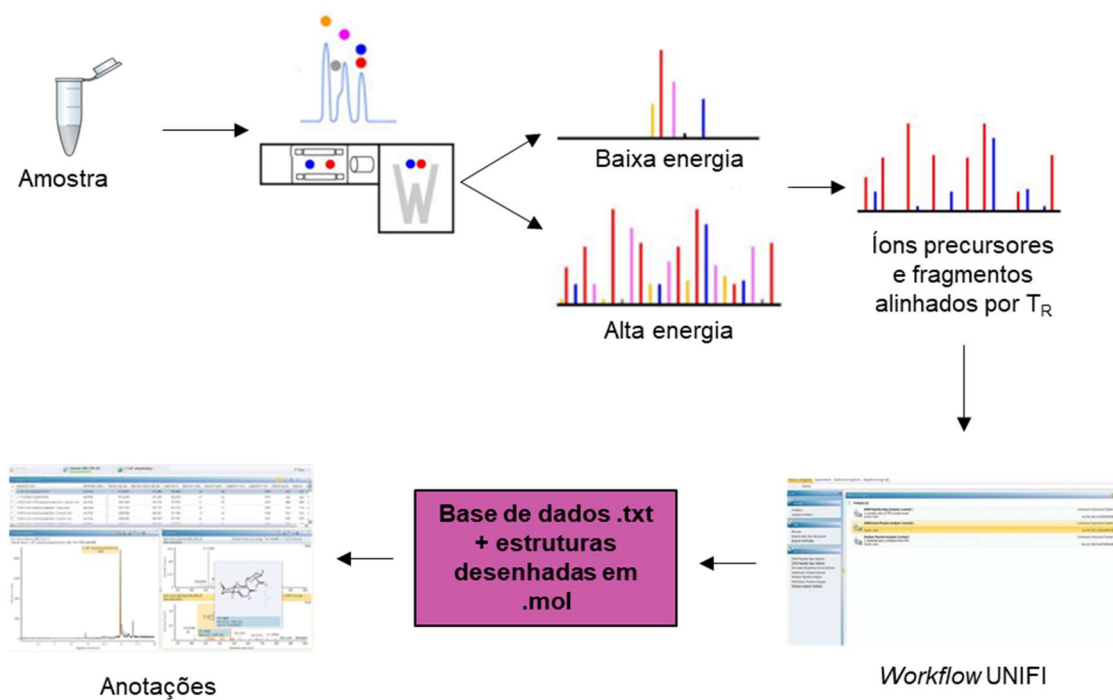
Figura 6: Esquema da obtenção de redes moleculares a partir da plataforma GNPS



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

Além dessa plataforma, o UNIFI, um Sistema de Informação Científica da Waters Corporation, tem sido utilizado como ferramenta de desreplicação pois ele integra a separação cromatográfica por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) das substâncias de um extrato e a aquisição de dados ESI-Q-TOF-MS no modo de aquisição MS^E. Nesse modo de aquisição os espectros de massas são gerados em condições de baixa e alta energia. Os dados em baixa energia nos fornecem a massa de alta resolução do íon precursor e os de alta energia a fragmentação desses íons precursores. Esses dados são alinhados por um algoritmo de acordo com o tempo de retenção e depois são comparados com bibliotecas de substâncias do próprio UNIFI ou criadas pelo usuário a partir de um *workflow*. O UNIFI consegue então prever possíveis fragmentos das substâncias presentes na amostra, uma vez que a partir do arquivo .mol o algoritmo consegue testar diferentes desconexões da estrutura molecular das substâncias presentes na biblioteca e depois comparar os fragmentos teóricos com os dados experimentais. Isso gera um relatório de informações e indica anotações de substâncias conhecidas de acordo com os seus padrões de fragmentação (**Figura 7**) (WHITE PAPER WATERS A, 2022; XU *et al.*, 2020).

Figura 7: Esquema da obtenção de dados em aquisição MS^E para análise no sistema UNIFI



Fonte: Esquema elaborado pela autora.

5 CONCLUSÃO

Os estudos metabolômicos de duas linhagens de *Fusarium oxysporum* levaram a anotação de 35 metabólitos nos seis extratos avaliados na primeira parte deste trabalho. Foi possível evidenciar, também através da estatística e de ensaios biológicos, como a OSMAC influencia na ativação de algumas vias biossintéticas ao cultivar ambas em diferentes fontes de nutrientes. Como exemplo temos o caso dos derivados de naftoquinonas, produzidos quase que exclusivamente no meio de Malte e de somente o extrato de uma linhagem no meio de PDB apresentar atividade antibacteriana. Isso nos mostra um potencial para a ativação de rotas biossintéticas do *Fusarium oxysporum* em diferentes condições de cultivo podendo levar a produção de substâncias inéditas.

Os resultados do planejamento fatorial para uma das linhagens de *F. oxysporum* cultivada em PDB nos permitiram verificar a partir da análise quimiométrica dos dados de LC-MS a possibilidade de a agitação contribuir para a diversidade química dos extratos obtidos quando otimizada, especialmente para uma produção de maiores quantidades de enniatinas, substâncias essas que apresentam diversas propriedades farmacológicas. Os resultados da curva de crescimento para essa mesma linhagem cultivada em PDB nos permitiram observar o padrão de crescimento dela além de acompanhar a variação metabólica de determinadas micotoxinas durante os diferentes dias do cultivo, o que nos levou a indicação de que as enniatinas podem resultar da degradação da beauvericina, uma vez que ambas são produzidas pela mesma enzima precursora e como provavelmente o *Fusarium oxysporum* utiliza esses peptídeos cíclicos como fonte de nutriente.

REFERÊNCIAS

- BERLINCK, R. G. *et al.* A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-710, 2017.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929-5934, 1995.
- BORTOLUZZI, R.L.C. *et al.* *Senna* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23172>>. Acesso em: 26 mai. 2022
- BURMEISTER, H. R.; PLATTNER, R. D. Enniatin production by *Fusarium tricinctum* and its effects on germinating wheat seeds. **Phytopathology**, v. 77, p. 1483–1487, 1987.
- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.
- CHEN, J. *et al.* Fusariumins C and D, two novel antimicrobial agents from *Fusarium oxysporum* ZZP-R1 symbiotic on *Rumex madaio* Makino. **Fitoterapia**, v. 134, p. 1-4, 2019.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests For Bacteria That Grow aerobically; Approved standard, 10th Edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. In: 23th Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne: 2013.
- DIVITO, E. B. *et al.* Electrospray ionization and collision induced dissociation mass spectrometry of primary fatty acid amides. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 2388-2394, 2012.

Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 26 mai. 2022.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

HEWAGE, R. T. *et al.* One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87–94, 2014.

HU, L.; RYCHLIK, M. Biosynthesis of $^{15}\text{N}_3$ -labeled enniatins and beauvericin and their application to stable isotope dilution assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7129-7136, 2012.

IBRAHIM, S. R. M. *et al.* Bright Side of *Fusarium oxysporum*: Secondary Metabolites Bioactivities and Industrial Relevance in Biotechnology and Nanotechnology. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 943, 2021.

INOUE ANDRADE, F. *et al.* Chemical constituents and an alternative medicinal veterinary herbal soap made from *Senna macranthera*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

MASI, M.; EVIDENTE, A. Fungal bioactive anthraquinones and analogues. **Toxins**, v. 12, n. 11, p. 714, 2020.

MELO, G. M. de A. *et al.* Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 277-281, 2014.

MUSSI-DIAS, V. *et al.* Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

MYERS, O. D. *et al.* One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: new algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 8696-8703, 2017.

NATHANAIL, A. V. *et al.* Metabolism of the *Fusarium* mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin in wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7862-7872, 2015.

NIEHAUS, E. M. *et al.* Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 4, p. 1749-1762, 2014.

PANG, Z. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W388-W396, 2021.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 864-870, 2004.

PLUSKAL, T. *et al.* MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2010.

RODRIGUES, R. S. *et al.* O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2005.

SANTOS, M. C.; MENDONÇA, M. L.; BICAS, J. L. Modeling bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in shake flask cultures. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2020.

SELEGATO, D. M. *et al.* Update: Biological and Chemical Aspects of *Senna spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 415-426, 2017.

SHISHIDO, M. *et al.* Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. **Phytopathology**, v. 95, n. 9, p. 1072-1080, 2005.

SILVA, E. O. Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii*. 2010. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade

de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. doi:10.11606/D.60.2010.tde-08062010-161118. Acesso em: 20 mai. 2022.

SILVA, F. O. *et al.* Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *exce/sa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, p. 1874-1876, 2010.

SILVA, J.G.A. *et al.* Chemical profile and cytotoxic activity of leaf extracts from *Senna* spp. from Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 10, p. 1872-1880, 2016.

SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, 2013.

SIQUEIRA, K. *et al.* Endophytism and bioactivity of endophytic fungi isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Symbiosis**, v.71, p. 211-222, 2017.

SON, S. W. *et al.* Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 692-698, 2008.

SOUZA, A. Q. L. D. *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham*. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, V.C.; BORTOLUZZI, R.L.C. 2015 *Senna* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23149>>. Acesso em: 06 jun. 2022.

SPECIAN, V. *et al.* A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2014.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, 1993.

STUDT, L. *et al.* Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4468-4480, 2012.

SY-CORDERO, A. A.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Revisiting the enniatins: a review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 11, p. 541-549, 2012.

TANG, H.; XIAO, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. S1, p. S157-S162, 2009.

TORRES-MENDOZA, D.; ORTEGA, H. E.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 58, 2020.

VANDERMOLEN, K. M. *et al.* Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 7, p. 1–7, 2013.

WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WHITE PAPER WATERS A. Componentization following 3D-peak detection in the UNIFI scientific information system. Disponível em: <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005480en.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2022.

XU, L. *et al.* Rapid identification of chemical profile in Gandou decoction by UPLC-Q-TOF-MSE coupled with novel informatics UNIFI platform. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 1, p. 35-48, 2020.

YULIANA, N. D. *et al.* Metabolomics for the rapid dereplication of bioactive compounds from natural sources. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 2, p. 293-304, 2013.

ZURIEGAT, Q. *et al.* Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 7, p. 882-895, 2021.