



UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EMANUEL VICTOR DOS SANTOS NUNES

**Investigação biológica e química dos fungos endofíticos isolados de
Galianthe thalictroides com atividade antagônica frente ao fitopatógeno
*Sclerotinia sclerotiorum***

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Co-orientador: Prof. Dr. Helder Lopes Teles

EMANUEL VICTOR DOS SANTOS NUNES

**Investigação biológica e química dos fungos endofíticos isolados de
Galianthe thalictroides com atividade antagônica frente ao fitopatógeno
*Sclerotinia sclerotiorum***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, como parte dos requisitos para obtenção
do título de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Co-orientador: Prof. Dr. Helder Lopes Teles

N972i	Nunes, Emanuel Victor dos Santos Investigação biológica e química dos fungos endofíticos isolados de <i>Galianthe thalictroides</i> com atividade antagônica frente ao fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> / Emanuel Victor dos Santos Nunes. -- Araraquara, 2023 129 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Ian Castro Gamboa Coorientador: Helder Lopes Teles 1. Estatística. 2. Espectrometria de massa. 3. Fungos endofíticos. 4. Estatinas (Agentes cardiovasculares). 5. Planejamento experimental. 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: "Investigação biológica e química dos fungos endofíticos isolados de *Galianthe thalictroides* com atividade antagônica frente ao fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*"

AUTOR: EMANUEL VICTOR DOS SANTOS NUNES

ORIENTADOR: IAN CASTRO GAMBOA

COORIENTADOR: HELDER LOPES TELES

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



Documento assinado digitalmente
IAN CASTRO GAMBOA
Data: 24/02/2023 17:41:51-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)

Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Documento assinado digitalmente
TAICIA PACHECO FILL
Data: 24/02/2023 18:58:05-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profª. Drª. TAICIA PACHÊCO FILL (Participação Virtual)

Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas



Documento assinado digitalmente
ALAN CESAR PILON
Data: 24/02/2023 18:02:50-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Dr. ALAN CESAR PILON (Participação Virtual)

Departamento de Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 24 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES
EMANUEL VICTOR DOS SANTOS NUNES

I. DADOS PESSOAIS

Nascimento: 28/11/1994
Nacionalidade: Brasileiro
Naturalidade: Rondonópolis - MT
Filiação:
Mãe: Silvana Guedes dos Santos
Pai: Altair Piccini Nunes

II. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016-2020 Graduação em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Mato Grosso, Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil.
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso

III. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

Apresentação do **pôster** “Characterization of the Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Axonopus leptostachyus* (Flüggé) Hitchc (Poaceae)” em **Annals of the Applied Microbiology Symposium 9th Edition**, 2019 (Congresso nacional).

Apresentação **oral e pôster** “Bioprospection of Special Metabolites from Endophytic Fungi Associated with Roots of *Axonopus leptostachyus* (Poaceae)” em **7th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXIII RESEM Proceedings**, 2019 (Congresso internacional).

Apresentação **oral** “OSMAC approach for assessing the metabolism of *Penicillium javanicum* isolated from *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae), a Brazilian Pantanal medicinal plant” em **IV LAMPS MEETING**, 2022 (Congresso internacional).

Dedico esse trabalho à minha mãe **Silvana**.
Obrigado por confiar em mim, e sempre me apoiar.

AGRADECIMENTOS

À minha família, sinto todo o amor e apoio mesmo há milhares de quilômetros de distância.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Ian Castro Gamboa e Prof. Dr. Helder Lopes Teles, por confiarem em mim e se dedicarem tanto a me ajudar nesse período formativo.

Aos muitos colegas de laboratório do NuBBE, que me ajudaram tanto na minha jornada de aprendizado. Um agradecimento especial aos técnicos responsáveis pelas análises de espectrometria de massas, João e Juliana.

À minha namorada Nicole, pelo amor, pela paciência nos momentos difíceis, e pela companhia. A jornada teria sido muito mais difícil sem você ao meu lado.

À Prof. Dr. Marcia Regina von Zeska Kress e à técnica Msc. Ludmilla Tonani Carvalho por me auxiliarem na identificação das linhagens fúngicas.

Ao Instituto de Química e ao grupo de pesquisa NuBBE, pelo espaço cedido e todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CNPq, FAPESP e, em especial, à CAPES pelo auxílio financeiro (nº 88887.608022/2021-00).

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da doença popularmente conhecida como “mofo branco”, é um dos fitopatógenos mais devastadores da área agrícola, afetando colheitas de feijão, amendoim e soja, e causando milhões de dólares em danos no mundo inteiro. A técnica mais comum de manejo do *S. sclerotiorum* ocorre através do emprego extensivo de produtos químicos potencialmente danosos ao meio ambiente e à saúde humana, o que aumenta a demanda por formas alternativas de controle. Uma das alternativas em desenvolvimento é o emprego de metabólitos de fungos endofíticos, microrganismos que habitam naturalmente o interior dos tecidos vegetais, de forma assintomática, e se apresentam como promissores na produção de novos antibióticos naturais e outros metabólitos com interesse biotecnológico. O presente trabalho avaliou o antagonismo de fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Galianthe thalictroides*, uma planta medicinal do pantanal sul-mato-grossense, frente ao *S. sclerotiorum*. A linhagem identificada como *Penicillium javanicum* (GTB-10) inibiu o crescimento do fitopatógeno em 72% em triagem por antibiose em co-cultura e foi investigada quimicamente utilizando a abordagem OSMAC (*One Strain Many Compounds*), técnicas de metabolômica global por CL-EM/EM, e atividade antifúngica dos extratos AcOEt. Análises metabolômicas permitiram a anotação de 14 substâncias, incluindo estatinas como a mevastatina e dihidromevastatina, a 2,5-dicetopiperazina felutanina A, e a isoflavona daidzeína. Análises estatísticas permitiram avaliar que o meio de cultura foi a variável com a maior contribuição para a variação metabólica, e ainda indicou as estatinas como agentes da atividade antifúngica contra o *S. sclerotiorum*. Esse foi o primeiro estudo de fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *G. thalictroides*, e os resultados corroboram o potencial biotecnológico de endófitos de plantas medicinais do Pantanal.

Palavras chave: Estatística; Espectrometria de massa; Fungos endofíticos; Estatinas (agentes cardiovasculares); Planejamento Experimental

ABSTRACT

The fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, agent of the disease commonly known as “white mold”, is one of the most devastating phytopathogens of the agricultural industry, affecting crops such as beans, peanuts and soy, and causing millions of dollars in damages worldwide. The most common control technique of *S. sclerotiorum* is by the extensive application of agrochemicals potentially harmful to the environment and human health, which raises the demand for alternative manners of control. One of the budding alternatives is employing metabolites from endophytic fungi, microorganisms that naturally inhabit inner plant tissues in an asymptomatic way, and presents themselves as promising producers of natural antibiotics, and other metabolites of biotechnological interest. The present work evaluates the antagonism of endophytic fungi associated with the plant species *Galianthe thalictroides*, a medicinal plant from Mato Grosso do Sul Pantanal, against the *S. sclerotiorum*. The strain identified as *Penicillium javanicum* (GTB-10) inhibited the phytopathogen growth by 72% in antibiosis screening by cocultivation and was chemically evaluated using an OSMAC (One Strain, Many Compounds) approach, untargeted metabolomics techniques by LC-MS/MS and fungal activity of the EtOAc extracts against *S. sclerotiorum*. Metabolomic analyses enabled the annotation of 14 substances, including statins such as mevastatin and dihydromevastatin, the 2,5-diketopiperazin fellutanine A, and the isoflavone daidzein. Statistical analyses allowed to assess that the culture medium was the most influential condition regarding metabolic variation, and indicated a correlation of the statins to the antifungal activity against *S. sclerotiorum*. This was the first study of endophytic fungi isolated from the plant species *G. thalictroides*, and the results endorse the huge biotechnological potential of endophytes from Pantanal medicinal plants.

Keywords: Statistics; Mass spectrometry; Endophytic fungi; Statins (cardiovascular agents); Experimental design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da interação multilateral entre plantas, fungos endofíticos, fungos comensais, patógenos latentes e patógenos.....	20
Figura 2 - Efeitos da colonização de fungos endofíticos nas espécies vegetais. A ausência de uma comunidade microbiológica endofítica saudável deixam plantas vulneráveis a estresses bióticos e abióticos.....	23
Figura 3 - Espécie vegetal coletada na região do pantanal <i>Galianthe thalictroides</i> (K.Schum.).	26
Figura 4 - Substâncias de interesse econômico isoladas do gênero <i>Penicillium</i>	28
Figura 5 - Agentes agrotóxicos de uso comum frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	29
Figura 6 - localização de coleta da espécie vegetal <i>Galianthe thalictroides</i> , próxima do município de Bonito-MS, região do pantanal (20°56'08.8"S 56°39'32.0"W).	36
Figura 7 - Extração do DNA dos fungos endofíticos.....	38
Figura 8 - Desenvolvimento do fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> após 7 dias de incubação a 25°C em meio PDA. SS: <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	40
Figura 9 - Esquema dos ensaios OSMAC.....	41
Figura 10 - Esquema da preparação e obtenção de extrato bruto dos ensaios OSMAC do fungo endofítico <i>P. javanicum</i> GTB-10.....	43
Figura 11 - Reunião dos extratos das réplicas dos cultivos OSMAC para fins de realizar os ensaios de atividade antifúngica frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	46
Figura 12 - Endófito GTB-10 (B10) co-cultivado com o fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (SS) em meio PDA, após incubação de 7 dias a 25°C.	48
Figura 13 - Ensaio de atividade antifúngica dos endófitos com maior atividade.....	49
Figura 14 – Fungo endofítico <i>P. javanicum</i> (GTB-10) cultivado em meio BDA.	50
Figura 15 - Análise de agrupamento hierárquico dos extratos.	51
Figura 16 - Mapa de correlação entre as amostras da abordagem OSMAC.	52
Figura 17 - Gráfico de score da análise de componentes principais, visualizando a variação entre os ensaios com diferentes meios de cultura (Batata e Czapek).	54
Figura 18 - Gráfico de score da análise de componentes principais, visualizando a variação entre os ensaios com diferentes modos de cultivo (dinâmico e estático).	55

Figura 19 - Classificação por <i>Random forest</i> dos metabólitos que mais contribuem para a variação de produção metabólica do endófito GTB-10 <i>P. javanicum</i> variando o modo de cultivo em estático e dinâmico.....	56
Figura 20 - Gráfico de score da análise de componentes principais, visualizando a variação entre os ensaios com diferentes ambientes de cultivo (co-cultura e puro).	57
Figura 21 - Classificação por <i>Random forest</i> dos metabólitos que mais contribuem para a variação de produção metabólica do endófito GTB-10 <i>P. javanicum</i> variando o ambiente de cultivo em co-cultura e puro.....	58
Figura 22 – Gráfico tridimensional da APC, utilizando os CPs 1, 2 e 3.	59
Figura 23 - Famílias moleculares formadas por FBMN e MS2LDA.	60
Figura 24 - Representação das redes moleculares dos policetídeos obtidos dos diferentes ensaios OSMAC, visualizado no software Cytoscape.	62
Figura 25 - Efeito de estatinas naturais na via biossintética de colesterol.....	63
Figura 26 - Espectros de massa das substâncias mevastatina ácida (1) e mevastatina lactona (2)	64
Figura 27 - Relação entre proposta de fragmentação e os picos EM/EM observados.....	66
Figura 28 - Gráficos box-plot da quantificação dos features correspondentes às substâncias mevastatina ácida (1) e lactona (2)	68
Figura 29 - Relação entre proposta de fragmentação e os picos EM/EM observados.....	70
Figura 30 - Relação entre propositura de fragmentação e os picos EM/EM observados.....	72
Figura 31 - Correspondência espectral da substância mevastatina metil-carboxilato (10) com as bibliotecas do GNPS.	74
Figura 32 - Relação entre propositura de fragmentação e os picos EM/EM observados.....	75
Figura 33 - Espectro EM/EM do sinal m/z 427 $[M+Na]^+$ da 8-(3-oxo) mevastatina (11)	76
Figura 34 - Hidroxilação da mevastatina (2) em pravastatina (XXII) por um sistema citocromo P450.	77
Figura 35 - BPC dos extratos de <i>P. javanicum</i> reunidas. Amplitude de m/z : 407,2395-407,2461.	77

Figura 36 - BPC em amplitude de m/z : 447,2317-447,2389, correspondente ao padrão pravastatina sódica.	78
Figura 37 - Espectro EM/EM do sinal m/z 447 observado em todos os isômeros nas amostras OSMAC.....	79
Figura 38 - Família molecular dos derivados de aminoácidos, destacando os padrões de fragmentação detectados pelo MS2LDA.	82
Figura 39 - Colônias do fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i> após tratamento com os extratos dos ensaios OSMAC do endófito <i>P. javanicum</i> GTB-10.....	85
Figura 40 - Gráficos de score e S-plot do OPLS-DA dos dados dos ensaios OSMAC do fungo <i>P. javanicum</i> avaliados pela atividade antifúngica frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	86
Figura 41 - Gráficos de score e S-plot do OPLS-DA dos dados dos ensaios OSMAC do fungo <i>P. javanicum</i> (GTB-10) testados em ensaios de antibiose frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	87
Figura 42 - Efeito de estatinas naturais na via biossintética de colesterol e ergosterol, relacionando a presença das estatinas à bioatividade observada nos ensaios de antibiose.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos parâmetros e dos níveis utilizados.	41
Tabela 2 - Descrição dos ensaios codificados, baseados no desenho experimental OSMAC.	41
Tabela 3 - Código dos fungos isolados e suas identificações moleculares.	48
Tabela 4 - Resultados dos ensaios de antagonismo em co-cultura dos fungos endofíticos frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	49
Tabela 5 – Massas (mg) dos extratos brutos de GTB-10 <i>P. javanicum</i> obtidas após o processo de cultivo e extração do metabolismo secundário por meio do solvente AcOEt.	50
Tabela 6 - Sinais agrupados na família dos policetídeos. Em parênteses estão os íons fragmento dos adutos sodiados.	80
Tabela 7 - Sinais agrupados na família dos derivados de aminoácidos, com informações sobre as anotações pelo MS2LDA.	83
Tabela 8 - Resultado dos ensaios de inibição do fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i> frente ao tratamento com extratos dos ensaios OSMAC do endófito <i>P. javanicum</i> GTB-10.	85

LISTA DE APÊNDICE

Apêndice 1 - Parâmetros utilizados no pré-processamento dos dados no MZmine 2.53.	110
Apêndice 2 - Parâmetros utilizados para a formação das redes moleculares.....	110
Apêndice 3 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Talaromyces verruculosus</i> GTR-07.	111
Apêndice 4 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Aspergillus hiratsukae</i> GTF-25.....	111
Apêndice 5 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Fusarium</i> sp. GTB-04.	112
Apêndice 6 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Aspergillus</i> sp. GTF-15.	112
Apêndice 7 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Exserohilum</i> / <i>Curvularia</i> sp.	113
Apêndice 8 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Paecilomyces</i> sp. GTF-37.	113
Apêndice 9 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Diaporthe</i> sp. GTR-17.	114
Apêndice 10 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Fusarium</i> / <i>Penicillium</i> sp. GTR-25.....	114
Apêndice 11 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico <i>Neofusicoccum parvum</i> GTF-32.....	115
Apêndice 12 - Triplicata da antibiose do ensaio 1 (OSMAC).	115
Apêndice 13 - Triplicata da antibiose do ensaio 2 (OSMAC).	116
Apêndice 14 - Triplicata da antibiose do ensaio 3 (OSMAC).	116
Apêndice 15 - Triplicata da antibiose do ensaio 4 (OSMAC).	117
Apêndice 16 - Triplicata da antibiose do ensaio 5 (OSMAC).	117
Apêndice 17 - Duplicata da antibiose do ensaio 6 (OSMAC).	118
Apêndice 18 - Duplicata da antibiose do ensaio 7 (OSMAC).	118
Apêndice 19 - Triplicata da antibiose do ensaio 8 (OSMAC).	119
Apêndice 20 - Triplicata da antibiose do branco (DMSO).	120
Apêndice 21 - Triplicata da antibiose do controle (Thiram).	120

Apêndice 22 - Sinais detectados da coleção de ensaios do fungo endofítico <i>P. javanicum</i> GTB-10.....	121
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E DEFINIÇÕES

AcOEt	Acetato de etila
ACP	Análise de Componentes Principais
AGRAER/MS	Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural do Mato Grosso do Sul
BLAST	Sigla em inglês para <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPC	Sigla em inglês para <i>Base Peak Chromatogram</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Da	Daltons
DDA	Sigla em inglês para <i>Data Dependent Aquisition</i>
DIA	Sigla em inglês para <i>Data Independent Acquisition</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Sigla em inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
Ens	Ensaio
ESI	Sigla em inglês para <i>Electrospray ionization</i>
FBMN	Sigla em inglês para <i>Feature Based Molecular Networking</i>
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto
<i>Feature</i>	Características que compõem um sinal de espectrometria de massas (<i>m/z</i> , tr)
G	Gravidade

Gly	Glicina
GNPS	Sigla em inglês para <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
GTB	Sigla para <i>Galianthe thalictroides</i> Bulbo
GTF	Sigla para <i>Galianthe thalictroides</i> Folha
GTR	Sigla para <i>Galianthe thalictroides</i> Raiz
HMGR	HMG-CoA Redutase
HPLC	Sigla em inglês para <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
INBIO/UFMS	Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
ITS	Sigla em inglês para <i>Internal Transcribed Spacer</i>
<i>Lock Mass</i>	Íon de <i>m/z</i> conhecida, derivado de um composto padrão introduzido simultaneamente à amostra a ser analisada, que permite a correção em tempo real de desvios de leitura de <i>m/z</i> decorrentes da variação do próprio instrumento.
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
min.	Minutos
MS	Sigla em inglês para <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Sigla em inglês para <i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NCBI	Sigla em inglês para <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OPLS-DA	Sigla em inglês que para <i>Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis</i>
OSMAC	Sigla em inglês para <i>One Strain, Many Compounds</i>
PC	Sigla para em inglês <i>Principal Components</i>

PCR	Sigla em inglês para <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDA	Sigla em inglês para <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	Sigla em inglês para <i>Potato Dextrose Broth</i>
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por milhão
Q-TOF	Sigla em inglês para <i>Quadrupole Time of Flight</i>
rDNA	DNA recombinante
rpm	Rotações por minuto
tr	Tempo de retenção
U	Unidade enzimática
UFR	Universidade Federal de Rondonópolis
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UPLC	Sigla em inglês para <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Nicho ecológico endofítico	19
1.2 Fungos endofíticos como alternativa sustentável de controle de fitopatógenos	21
1.3 Pantanal: domínio em sério risco.....	24
1.4 A espécie vegetal <i>Galianthe thalictroides</i>	25
1.5 Os fungos de gênero <i>Penicillium</i>	27
1.6 O fitopatógeno <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	28
1.7 Método de cultivo (OSMAC)	29
1.7.1 Meio de cultivo	30
1.7.2 Modo de cultivo	31
1.7.3 Ambiente biótico do cultivo.....	31
1.8 Metabolômica global	31
2. OBJETIVOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Coleta do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos	35
3.2 Identificação genética	37
3.2.1 Extração de DNA genômico de fungo filamentoso	37
3.2.2 Amplificação por PCR das regiões ITS do rDNA	39
3.3 Triagem da atividade antifúngica dos fungos endofíticos isolados frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	39
3.4 Método de cultivo e planejamento experimental.....	40
3.4.1 OSMAC acoplado a planejamento fatorial 2 ³	40
3.4.2 Incubação e extração dos metabólitos secundários.....	41
3.5 Análise em UPLC-QTOF-MS.....	43
3.6 Métodos estatísticos	45

3.7 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos OSMAC frente ao fitopatógeno	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Identificação genética dos fungos isolados.....	48
4.2 Triagem da atividade antifúngica dos fungos endofíticos isolados frente ao fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i>	48
4.3 OSMAC e cultivo para produção de extratos.....	50
4.4 Análise qualitativa dos extratos	50
4.4.1 Análise de agrupamento hierárquico	50
4.4.2 Análise de Componentes Principais (APC)	53
4.4.2.1 Meio de cultura.....	53
4.4.2.2 Modo de cultivo	54
4.4.2.3 Ambiente de cultivo	56
4.5 Redes moleculares	60
4.5.1 Policetídeos – estatinas	61
4.5.1.1 Hidroxilação da mevastatina	76
4.5.2 Derivados de aminoácidos	81
4.5.3 Isoflavonóide	84
4.6 Ensaios de atividade antifúngica dos extratos	85
5. CONCLUSÕES.....	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
APÊNDICE	110

1. INTRODUÇÃO

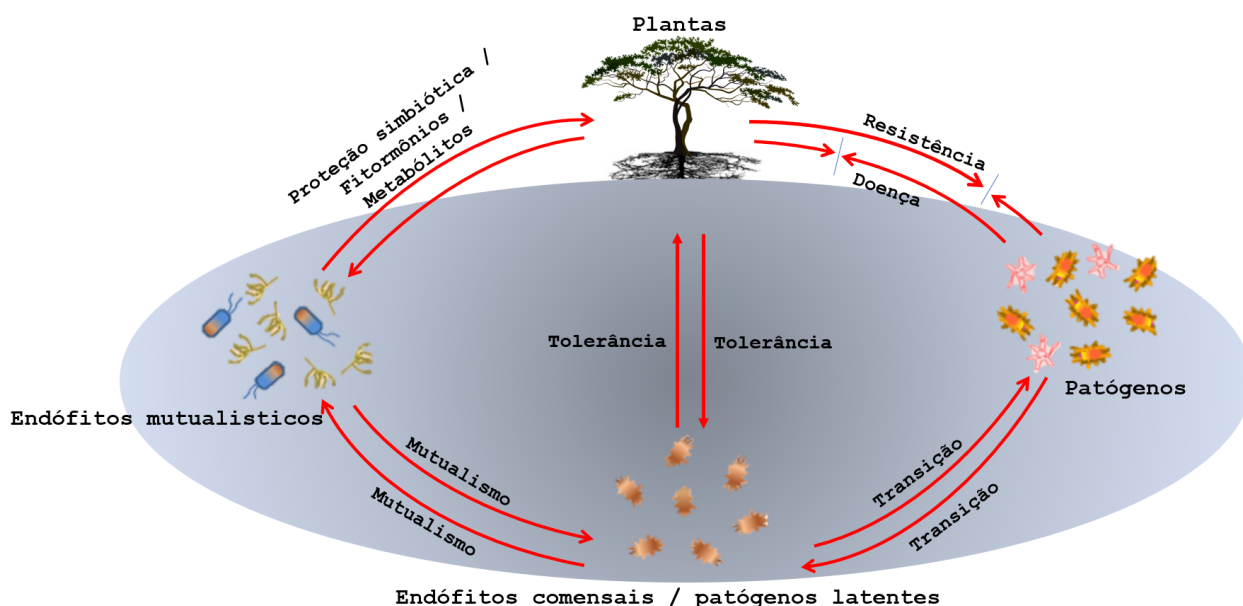
1.1 Nicho ecológico endofítico

As plantas são colonizadas por vários tipos de microrganismos endofíticos, que passam parte ou todo o seu ciclo de vida dentro dos seus espaços intra ou intercelular (DEMAIN, 2014), interagindo com o vegetal hospedeiro de forma comensal ou mutualística (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011; HAMILTON; BAUERLE, 2012; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). Nessa classe de microrganismos se enquadram fungos, bactérias e vírus, em constante estado de coexistência e competição com microrganismos patógenos, com agentes do sistema defensivo das plantas, e com outros endófitos disputando por espaço e nutrientes (ALAM et al., 2021) (Figura 1).

Para ilustrar o rico nicho ecológico que todos os tecidos vegetais abrigam, Kusari (et al., 2014) define o conjunto de interações multilaterais entre sistemas de defesa da planta, os microrganismos endófitos e os patógenos como um enorme “mercado ecológico”, onde “vários microrganismos simbióticos e mutualistas interagem ‘socialmente’ e ‘negociam’ com os agentes ‘trapaceiros’ e ‘antagonistas’”. Em outras palavras, todos os agentes desse nicho ecológico colocam uns aos outros em xeque, onde qualquer desequilíbrio pode afetar a saúde das outras populações.

Uma planta que possua um ambiente micro ecológico que afeta a comunidade de endófitos mutualísticos pode ser suscetível a adoecer por doenças oportunistas causadas por patógenos latentes, que de outra forma seriam controlados pela pressão exercida por microrganismos endofíticos competindo por espaço e nutrientes, e produzindo substâncias que auxiliam a vitalidade da planta hospedeira (PARTIDA-MARTÍNEZ; HEIL, 2011).

Figura 1 - Esquema da interação multilateral entre plantas, fungos endofíticos, fungos comensais, patógenos latentes e patógenos.



Fonte: adaptado de ALAM et al., 2021.

Além de defender as plantas de tais estresses bióticos, foi observado que a presença de fungos endofíticos eleva a resistência natural à estresses abióticos (SHORESH; HARMAN; MASTOURI, 2010; BUSBY et al., 2017), além de melhorar a absorção de nutrientes (XIE et al., 2019). Rodriguez e Redman (2008) declaram no título do seu trabalho, de forma provocativa: “mais de 400 milhões de anos de evolução, e as plantas ainda não conseguem se virar sozinhas”, onde eles descrevem não só os benefícios que endófitos podem trazer para plantas, como também a co-evolução planta-endófito que levou à alta especificidade, dependendo do tipo de estresse que seu habitat aplicava.

No “mercado ecológico” (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014) forjado por milhões de anos no interior dos tecidos vegetais, a “troca de mercadoria” entre os agentes previamente citados vai além da simples comunicação por substâncias químicas descrito pelo fluxo de metabólitos e proteínas, como também chega a atingir reprogramação da planta hospedeira através de modificações epigenéticas, ainda que os mecanismos exatos estejam por serem elucidados (MEJÍA et al., 2014; CUI et al., 2017; LIAO et al., 2019).

Dos microrganismos que possuem estilo de vida como endofítico, os mais comuns são os fungos (KHARE; MISHRA; ARORA, 2018), sendo capazes de colonizar virtualmente todos os tipos de tecidos vegetais, como raízes, caules e

folhas (KHAN et al., 2012); galhos, cascas, frutas e sementes (GEISEN et al., 2017; MARCELLANO; COLLANTO; FUENTES, 2017; SRITHARAN et al., 2019; TATENO et al., 2015); meristemas, pecíolos e flores (HATA; ATARI; SONE, 2002; RUBINI et al., 2005; NIU et al., 2022), todos esses tecidos podem ter espécies especializadas, que produzem tipos diferentes de metabólitos e podem auxiliar a saúde da planta de diversas maneiras (ABO NOUH, 2019).

1.2 Fungos endofíticos como alternativa sustentável de controle de fitopatógenos

Com a população mundial atingindo 8 bilhões, e com projeções de atingir 9 bilhões até 2050, é estimado que a produção de alimentos precisa crescer 70% para atender o nível básico de segurança alimentar (FAOUN, 2009). Nesse contexto, a qualidade do plantio é de vital importância para vários setores da economia; além de providenciar o setor alimentício, também é utilizada na produção de madeiras, fibras, medicamentos, bioenergia, entre outros. A maior causa da perda de produtividade e perdas econômicas, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, são as doenças vegetais, que podem levar a consequências sociais desastrosas (GOSS et al., 2014; HAVERKORT et al., 2008; SAVARY et al., 2019; YOSHIDA et al., 2013).

As duas principais formas de manejo de fitopatógenos se concentram na engenharia de espécies vegetais geneticamente resistentes, e no emprego de agrotóxicos tradicionais. Os agrotóxicos são muito utilizados e são eficientes na maioria dos casos (HIROOKA; ISHII, 2013), no entanto existem dois pontos centrais que os tornam problemáticos:

- Possíveis danos à saúde humana e meio ambiente (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022). O Brasil pós-2016 retrocedeu em políticas públicas regulatórias de seu uso indiscriminado a serviço de uma elite empresarial do setor agrário, diminuindo a rigorosidades dos processos de licenciamento ambiental, e na autorização de uso e importação de diversos pesticidas e agrotóxicos; 33% dos agrotóxicos que tiveram seu uso autorizado desde janeiro de 2019 são banidos na União Europeia por serem considerados muito perigosos (GURGEL et al., 2021; OLLINAHU; PEDLOWSKI; KRÖGER, 2022);

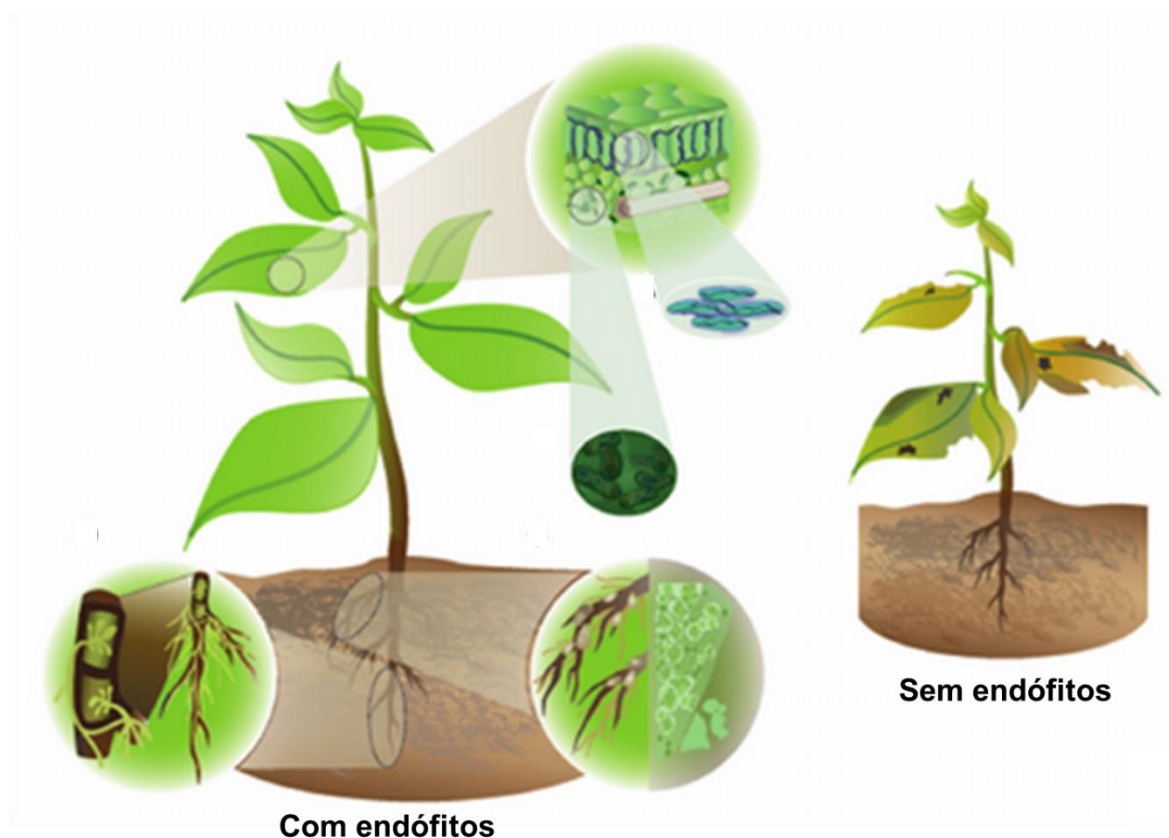
- Além do custo social de agrotóxicos, seu uso exaustivo pode levar populações de fitopatógenos a desenvolver resistências aos princípios ativos (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008; LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015; M A WAARD et al., 2003).

Nesse cenário, o estudo de técnicas alternativas ou complementares de manejo cresceu muito nos últimos anos e conquistou espaço entre as técnicas tradicionais, com destaque para a aplicação de fungos endofíticos no controle biológico (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019) e na indução das defesas naturais das plantas (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013) (Figura 2). Por exemplo, uma linhagem do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* mostrou ser eficaz como agente de biocontrole, protegendo plantações de tomate do fungo fitopatogênico *Phytophthora infestans* (KIM et al., 2007).

Recentemente, um estudo mostrou que um endófito do gênero *Penicillium* mostrou efetivo controle do fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* em cultivares de tomate (DEY et al., 2022). Na indução de resistência das plantas, o fungo *Piriformospora indica* mostrou auxiliar a defesa de cultivares de banana frente a linhagens fitopatogênicas de *F. oxysporum* (CHENG et al., 2020), e espécies de *Penicillium* promoveram a resistência de cultivares de trigo e bananas frente a linhagens patogênicas de *Fusarium* (DEY et al., 2022; TING; MAH; TEE, 2012).

Os mecanismos de controle biológico por fungos endofíticos frente a fitopatógenos incluem a competição por espaço e nutrientes, produção de substâncias antagonistas e parasitismo direto (FONTANA et al., 2021), e frequentemente o mesmo agente utiliza muitos mecanismos simultaneamente para diferentes patógenos. Por exemplo, fungos do gênero *Trichoderma* antagonizam o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (popularmente conhecido como mofo branco) através de parasitismo direto, no qual o *Trichoderma* estrangula e degrada as hifas do fitopatógeno (INBAR; MENENDEZ; CHET, 1996), sendo capaz de antagonizar por meio de secreção de substâncias antifúngicas e competição por espaço (ABDULLAH; ALI; SULEMAN, 2008). O fungo *Purpureocillium lilacinum* é capaz de inibir o crescimento do *S. sclerotiorum* secretando enzimas extracelulares (ELSHERBINY; TAHER; ELSEBAI, 2019), e também nematoides associados às raízes das plantas ao predaar seus ovos (SILVA et al., 2017), demonstrando que endófitos afetam a saúde das plantas de várias formas simultaneamente (Figura 2).

Figura 2 - Efeitos da colonização de fungos endofíticos nas espécies vegetais. A ausência de uma comunidade microbiológica endofítica saudável deixam plantas vulneráveis a estresses bióticos e abióticos.



Fonte: PARTIDA-MARTÍNEZ; HEIL, 2011.

O desenvolvimento de um produto comercial derivado desses endófitos benéficos encontra alguns desafios práticos, como o método de aplicação, a comercialização de esporos e a vida-útil dos produtos, que não são fáceis de contornar (FONTANA et al., 2021). A discrepância entre os resultados *in vivo* obtidos em ambientes controlados está entre as mais importantes limitações. Interferentes do ambiente fora do controle de laboratórios geralmente levam a conclusões enganosas (LAUR et al., 2018). Ademais, outro problema é a ineficácia desses endófitos quando aplicados a ambientes diferentes daqueles previstos em laboratório, em populações diferentes de fitopatógenos, ou em diferentes linhagens de plantas-hospedeiras (FONTANA et al., 2021).

O manejo biológico de doenças vegetais não segue o mesmo padrão do manejo por agrotóxicos. A aplicação de endófitos é complexa e influenciada pelo ambiente e pelas condições do plantio, e não visa erradicar os patógenos, mas os controlar a níveis em que não causem infestações em larga escala (WALTERS et

al., 2005). Mesmo assim, o emprego de endófitos mostrou muitas vantagens, que irá crescer com mais pesquisas feitas no estudo dessas aplicações (FONTANA et al., 2021).

No contexto da busca por fungos endofíticos utilizáveis no manejo alternativo de doenças de lavoura, o presente estudo se propôs a investigar a atividade biológica de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Galianthe thalictroides*, nativa do pantanal sul-matogrossense, frente ao fitopatógeno de interesse econômico *Sclerotinia sclerotiorum*, conhecido popularmente como “mofo branco”, e investigar os constituintes metabólicos presumivelmente responsáveis pela atividade antagonica.

1.3 Pantanal: domínio em sério risco

Localizado no interior da América do Sul, o domínio morfoclimático do pantanal é composto pela maior área alagada do mundo, com 155,355 km², dos quais 140,000 km² estão no Brasil, e com partes no Paraguai e na Bolívia (ALHO et al., 2019). Reconhecido pela UNESCO como Patrimônio Mundial Natural, o Pantanal tem uma biodiversidade mundialmente aclamada pela comunidade internacional, e também contribui enormemente para a subsistência e bem-estar dos povos locais (OLIVEIRA et al., 2011), e para fins comerciais e ecoturismo (CHIARAVALLOTI; HOMEWOOD; ERIKSON, 2017; TORTATO et al., 2017).

Apesar da sua importância, o Pantanal esporadicamente é assunto de manchetes relatando seu desmatamento (GUERRA et al., 2020), perda de biodiversidade pela introdução de espécies invasoras (GALETTI et al., 2015; ROQUE et al., 2016), avanço da agropecuária (FERRANTE; FEARNside, 2022), garimpo (JÚNIOR et al., 2018), caça ilegal (CAVALCANTI et al., 2012), e mais recentemente, incêndios devastadores como o que ocorreu em 2020 (FINDLAY, 2022; LEAL FILHO et al., 2021; SILGUEIRO et al., 2021). Devido à alta dependência de fatores hidrológicos, mudanças de temperatura e precipitação, esse nicho ecológico pode alterar imensamente suas funções ecossistêmicas (JUNK, 2013).

Fatores antropogênicos influenciaram significativamente a frequência, duração e intensidade de secas meteorológicas ao redor do mundo (CHIANG; MAZDIYASNI; AGHAKOUCHAK, 2021), e estão relacionados à maior incidência de

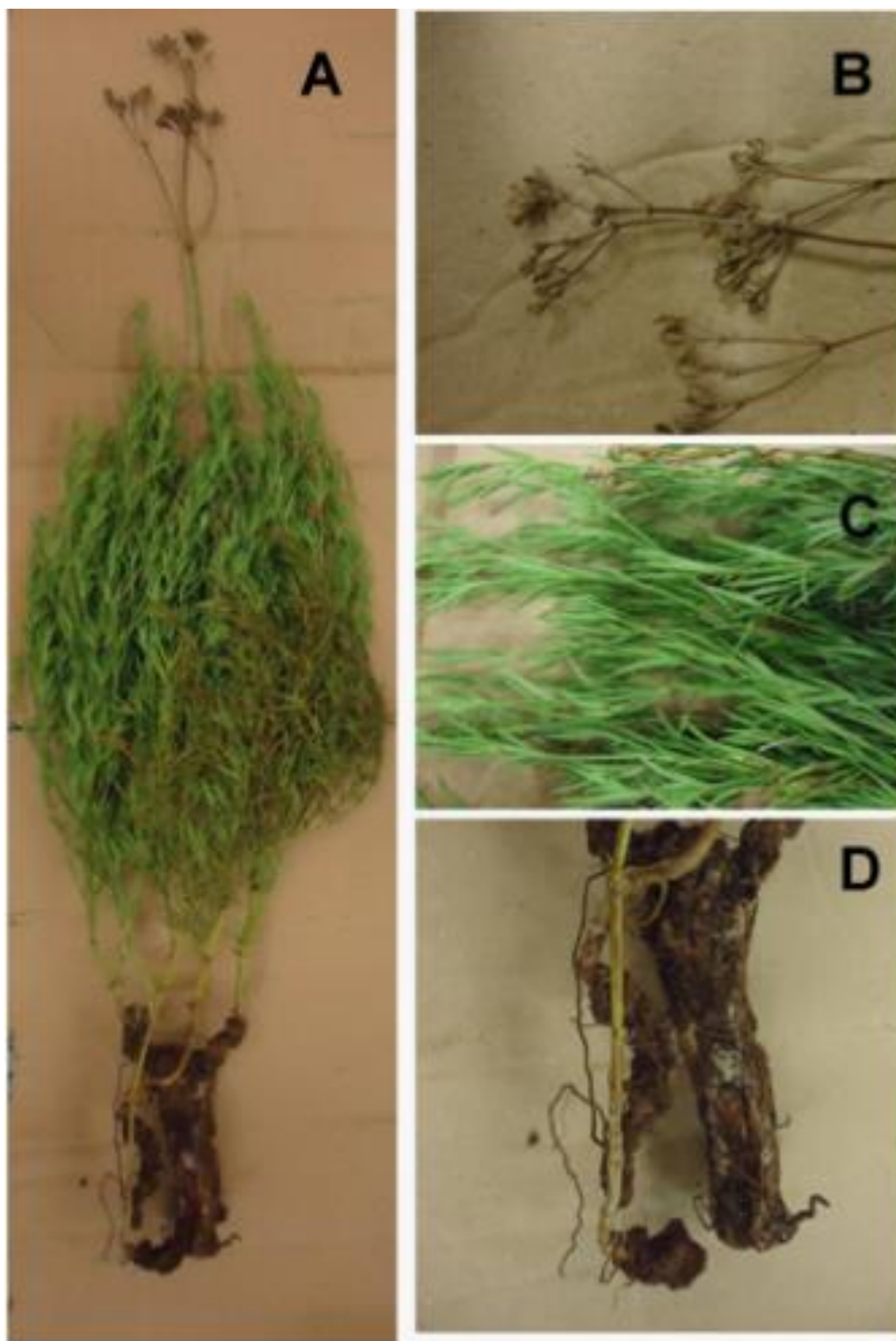
incêndios em larga escala. Os impactos desses incêndios na vida selvagem ainda é pouco conhecido e dificulta o entendimento dos efeitos cumulativos do funcionamento ecossistêmico (DUANE; CASTELLNOU; BROTONS, 2021). No contexto da contínua degradação do Pantanal causada por pressões antropogênicas tanto a nível regional quanto no nível global, novas pesquisas sobre a diversidade e riqueza mico-vegetal da área contribuem para esforços de conservação.

1.4 A espécie vegetal *Galianthe thalictroides*

Conhecido popularmente como baicurú, a espécie *Galianthe thalictroides* (K. Schum.) (Figura 3) é uma planta de distribuição restrita a regiões da América do Sul, encontrada no Brasil nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e também na Argentina e Paraguai (CABRAL; BACIGALUPO, 1997). A utilização etnobotânica dessa espécie ocorre pelo preparo do material vegetal (raízes, folhas) na forma de “garrafadas”, chás e misturas com ervas de tereré (bebida tradicional da região) (FIGUEIREDO et al., 2011).

Essa espécie produz alcalóides β -carbolínicos com atividade citotóxica (FIGUEIREDO et al., 2011), cilopeptídeos tipo-Rubiaceae (FIGUEIREDO et al., 2016), flavonóides, cumarinas, antraquinonas e esteróides (FIGUEIREDO et al., 2014). Até o momento, não há relatos na literatura sobre fungos endofíticos isolados dessa espécie.

Figura 3 - Espécie vegetal coletada na região do pantanal *Galianthe thalictroides* (K.Schum.).



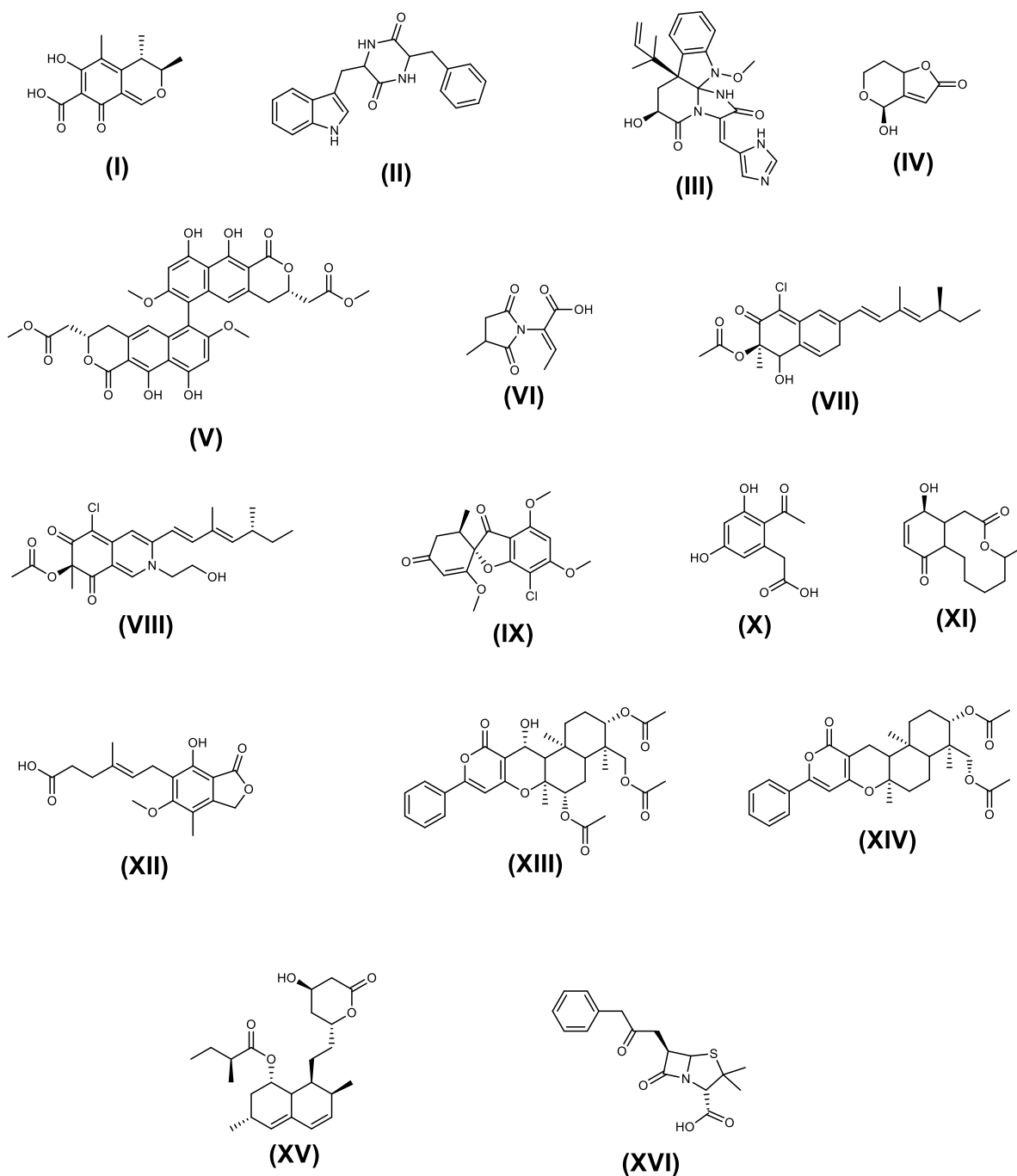
a) espécime; **b)** flores; **c)** folhas; **d)** raízes.

Fonte: KATO Jr., 2022 (tese de doutorado).

1.5 Os fungos de gênero *Penicillium*

Um dos fungos selecionados para o estudo nesse trabalho foi identificado como *Penicillium javanicum*. O gênero *Penicillium* é um dos clados fúngicos mais comuns, presente em vários tipos de habitats no mundo inteiro e com grande impacto econômico na vida humana nos mais diversos setores, como na produção de alimentos, processos biotecnológicos, estudos fitopatológicos e produção de fármacos (BAZIOLO et al., 2017), e engloba 483 espécies (HOUBRAKEN et al., 2020). *Penicillium* é capaz de produzir um vasto leque de metabólitos de interesse comercial, como as micotoxinas cinitrina **(I)**, isorugulosuvina **(II)**, neoxalina **(III)**, patulina **(IV)** e viriditoxina **(V)** (FRISVAD et al., 2004), os antibactericidas pencolida **(VI)**, esclerotiorina **(VII)** e isocromofilona VI **(VIII)** (LUCAS et al., 2007), os compostos antifúngicos griseofulvina **(IX)**, ácido curvulínico **(X)** e Sch 642305 **(XI)** (NICOLETTI et al., 2007), o imunossupressor ácido micofenólico **(XII)** (MAHMOUDIAN et al., 2021), agentes redutores de colesterol fenilpiropenos A **(XIII)** e B **(XIV)**, e lovastatina **(XV)**. O exemplo mais icônico de produtos desse gênero é a penicilina **(XVI)**, o primeiro antibiótico comercial da história (FLEMING, 1929) (Figura 4). Dessa forma, o gênero *Penicillium* é um dos clados mais influentes da história, e tem enorme potencial biotecnológico.

Figura 4 - Substâncias de interesse econômico isoladas do gênero *Penicillium*.



1.6 O fitopatígeno *Sclerotinia sclerotiorum*

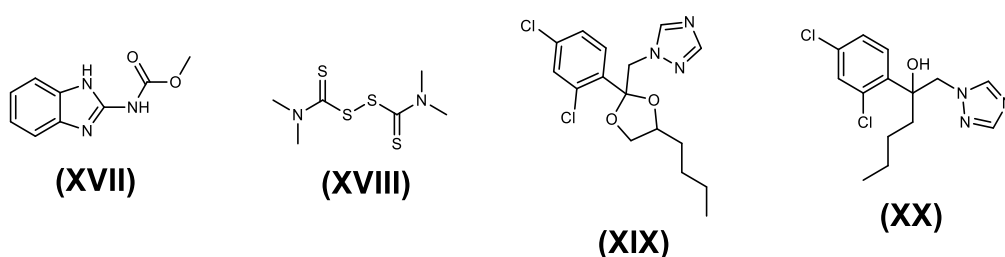
O fungo necrofítico *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da doença do mofo branco, é caracterizado pela capacidade de formar estruturas de sobrevivência conhecidas como escleródios, conjuntos de hifas firmemente compactadas e rico em melanina, capazes de permanecerem viáveis por até 8 anos no solo

(BRUSTOLIN; REIS; PEDRON, 2016), e germinarem em condições apropriadas de humidade, luz e temperatura (SUN; YANG, 2000).

Esse fungo infecta colheitas em quase todas as zonas de produção agrícola, desde a soja (*Glycine max*) ao redor do mundo, passando por feijões (*Phaseolus vulgaris*) em regiões tropicais, até canola (*Brassica napus*) em regiões temperadas da Europa e América do Norte (LEHNER et al., 2017; WILLBUR et al., 2019), resultando na perda de milhões de dólares da produtividade do setor agrário (GUPTA et al., 2019).

A principal forma de manejo desse fitopatógeno é o combate químico por meio do emprego de agrotóxicos, como carbendazima (XVII), thiram (XVIII), propiconazol (XIX) e hexaconazol (XX) (BHARTI et al., 2015) (Figura 5). No entanto, há progressos no desenvolvimento de técnicas integradas de manejo que combinam controle biológico e químico, complementando os regimes de agrotóxicos com práticas de rotação de cultivos utilizando espécies não-hospedeiras (ROUSSEAU; RIOUX; DOSTALER, 2007), emprego de espécies resistentes (HOFFMAN et al., 2002), e mais recentemente na aplicação de microrganismos endofíticos como estreptomicetos (CHEN et al., 2016), bactérias (MASSAWE et al., 2018), e fungos das espécies *Paraconiothyrium* spp. (ALVES et al., 2021), *Penicillium* spp. (YADERETS et al., 2021) e *Trichoderma* spp. (SILVA et al., 2021). Esses avanços indicam que há uma demanda latente do setor agrícola para encontrar alternativas para o manejo desse fitopatógeno.

Figura 5 - Agentes agrotóxicos de uso comum frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*.



1.7 Método de cultivo (OSMAC)

Ainda que metabólitos de fungos endofíticos sejam reconhecidos como fonte importante de substâncias com bioatividade em diversas áreas de importância industrial, acredita-se que muitos conjuntos genéticos estão silenciados durante

condições normais de cultivo (WASIL et al., 2013). Condições laboratoriais não emulam os ricos nichos ecológicos nas quais fungos endofíticos ocorrem na natureza, pois são cultivados *in vitro* isoladamente, e não possuem as mesmas concentrações de nutrientes, aeração, pH, pO_2 , pCO_2 , temperatura e agitação do ambiente natural do apoplasto vegetal (GUPTA et al., 2020).

Estratégias foram desenhadas para ativar esses genes silenciados, explorando as regiões de interesse através da regulação de promotores, indução de mutações, expressão heteróloga em outros microrganismos, e variação das condições de cultivo (SCHNEIDER; MISIEK; HOFFMEISTER, 2008). A última é considerada a estratégia mais simples e efetiva, e foi apelidada como OSMAC (*one strain, many compounds*), “uma linhagem, muitos compostos” (BODE et al., 2008). Essa abordagem consiste em variar o meio de cultivo (utilizando diferentes fontes de carbono e nitrogênio), condições físicas (pH, temperatura, luz, salinidade, aeração), co-cultivo com outros microrganismos (exemplo, endofíticos e patógenos) e adição de eliciadores químicos (antibióticos, ácido salicílico, ácido benzoico), além de outros modificadores epigenéticos (PAN et al., 2019).

1.7.1 Meio de cultivo

Geralmente, carbono e nitrogênio são os principais componentes em meios de cultura. A fonte de carbono provê a base para construção de biomassa e representa a fonte de energia, e a fonte de nitrogênio é requerida na síntese de proteínas essenciais e ácidos nucleicos, assim como outros metabólitos nitrogenados. Sabe-se também que diferentes tipos de carbonos e nitrogênios (presentes em diferentes estruturas químicas que serão degradadas e consumidas) também tem uma influência significativa no metabolismo secundário dos microrganismos (RUIZ et al., 2010; SINGH et al., 2017). Foram relatados muitos metabólitos secundários detectados exclusivamente em certos tipos de meio de cultura (PAN et al., 2019) como Batata Dextrose (HEWAGE et al., 2014) e Czapek-Dox (WANG et al., 2015a).

1.7.2 Modo de cultivo

Trabalhos anteriores evidenciam que variar o modo de cultivo em estático (GAO et al., 2013; ZHOU et al., 2011) ou dinâmico (WANG et al., 2015b, 2015c, 2014) é capaz de afetar diretamente os processos metabólicos de microrganismos. Em comparação com o modo estático, o modo dinâmico não só garante que há maior contato entre o microrganismo com o meio de cultivo e outros microrganismos em co-cultivo, como também é capaz de alterar reações bioquímicas ao mudar a disponibilidade de oxigênio e ativar outros conjuntos genéticos (PAN et al., 2019).

1.7.3 Ambiente biótico do cultivo

Co-cultivo entre duas linhagens, introduzindo microrganismos em competição por espaço e nutrientes, pode ser uma estratégia capaz de alterar a produção de determinados compostos e gerar substâncias que não são detectadas em ambientes de cultivo puro (OLA et al., 2013). É postulado que isso ocorre devido à produção de enzimas que ativam precursores metabólicos na linhagem em co-cultivo, ou pela indução de modificações epigenéticas que favorecem o principal sistema de defesa desses organismos, que é a produção de metabólitos bioativos (MARMANN et al., 2014; PAN et al., 2019).

1.8 Metabolômica global

O objetivo da metabolômica global (*Untargeted Metabolomics*) é a caracterização abrangente dos metabólitos (moléculas pequenas de até 1500 Da, WOLFENDER et al., 2019) envolvidos no processo biológico de um organismo vivo (SCHRIMPE-RUTLEDGE et al., 2016). A elucidação completa da coleção de todos os metabólitos de um organismo é capaz de prever sinais de atividade bioquímica, que podem então ser correlacionados aos seus fenótipos para desvendar as relações entre vias biossintéticas e seus mecanismos biológicos (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012; TWEEDDALE; NOTLEY-MCROBB; FERENCI, 1998; WISHART, 2007).

Comparado a outros níveis ômicos como o genoma e o proteoma, a metabolômica tem como vantagem a sua capacidade de representar o dinamismo de sistemas biológicos (KITANO, 2002). Isso se deve ao fato de que metabólitos são produtos derivados de genes e proteínas, sendo o resultado tanto de modificações no genoma, quanto de influências ambientais (BINO et al., 2004). Dessa forma, a metabolômica se tornou peça-chave em muitos campos da ciência, como na pesquisa de doenças humanas (HOUTEN, 2009), na descoberta de biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de enfermidades (COOK et al., 2016; JAIN et al., 2012; LLOYD-PRICE et al., 2019), e na pesquisa de produtos naturais, que busca extrair substâncias do metabolismo de organismos vivos e avaliar seu potencial biológico e aplicabilidade (WOLFENDER et al., 2019). No contexto do presente trabalho, a metabolômica é uma ferramenta que ajuda a desvendar como certos estímulos ambientais, como mudança de dieta e ambiente biótico podem afetar a produção de certos metabólitos, e possivelmente alterar a produção de substâncias bioativas.

Ao contrário de estudos mais direcionados, onde o objetivo é investigar metabólitos já conhecidos, a metabolômica global tem como objetivo caracterizar o maior número de metabólitos possíveis de uma amostra sem que haja enviesamento, tornando a elucidação estrutural das substâncias o seu gargalo mais comum. (SCHRIMPE-RUTLEDGE et al., 2016). Isso ocorre porque são gerados milhares de sinais (ALSEEKH et al., 2021) onde apenas uma fração pode ser identificada por correspondência em bibliotecas espectrais e em dados de referência (AKSENOV et al., 2017; DA SILVA; DORRESTEIN; QUINN, 2015).

Atualmente, a cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas sequencial (CL-EM/EM) é uma das plataformas de análise mais utilizadas em metabolômica global (BLAŽENOVIC et al., 2018; DA SILVA; DORRESTEIN; QUINN, 2015; WOLFENDER et al., 2019). Suas vantagens são a alta seletividade (os sinais pertencentes a substâncias diferentes são registrados de forma separada), sensibilidade (sinais mais fracos de substâncias pouco abundantes são detectados), ampla cobertura do espaço químico e habilidade de realizar grande volume de experimentos (BLAŽENOVIC et al., 2018; DA SILVA; DORRESTEIN; QUINN, 2015). Basicamente, CL-EM/EM primeiramente separa as moléculas pela sua interação físico-química diferenciada com o sistema cromatográfico, resultando em diferenças no tempo de retenção (tr). Em seguida, a espectrometria de massas

é utilizada para separar os íons moleculares pela sua razão massa-carga (m/z). Subsequentemente, íons dentro de uma faixa específica de massa e m/z são isolados e fragmentados, cujas intensidades são registradas como EM/EM (espectrometria de massas sequencial). Em um experimento de metabolômica global, é gerado uma tríade contendo dados de m/z , m/z e EM/EM, também chamados de *features*, que correspondem às moléculas detectadas na amostra (ALONSO; MARSAL; JULIÀ, 2015), e podem ser comparadas com bibliotecas de referência, como o MassBank (HORAI et al., 2010) e o GNPS (WANG et al., 2016).

Apesar do crescimento das bibliotecas com curadoria pública como o GNPS, a maioria das substâncias não podem ser identificadas por falta de espectros de referência. Uma das técnicas computacionais recentemente desenvolvidas é o MS2LDA (VAN DER HOOFT et al., 2016), que busca encontrar padrões de fragmentação e perdas neutras em coleções de dados espectrais, para caracterizar, anotar e agrupar moléculas com base na co-ocorrência de fragmentações.

2. OBJETIVOS

Investigar a interação entre o fungo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* e os fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Galianthe thalictroides*, e investigar a composição química do extrato bioativo produzido pelo endófito de interesse por meio da abordagem OSMAC e metabolômica.

Objetivos específicos

- ❖ Avaliar se existe um possível antagonismo entre os endófitos e o mofo branco por meio de ensaios de co-cultivo.
- ❖ Identificar as linhagens de fungos endofíticos isoladas de *Galianthe thalictroides*;
- ❖ Estimular a variabilidade e a diversidade química do cultivar do fungo endofítico promissor;
- ❖ Identificar substâncias produzidas pelo endófito bioativo nos experimentos de metabolômica.
- ❖ Avaliar os extratos em ensaios de atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos

As raízes, caule e folhas jovens e incólumes de *Galianthe thalictroides* foram coletadas no mês de setembro de 2011, no município de Bonito – Mato Grosso do Sul (20°56'08.8"S 56°39'32.0"W), região do pantanal (Figura 6), pelo pesquisador Ayrton José Silva Garcez (Agência de Desenvolvimento Agrário e Extensão Rural do Mato Grosso do Sul – AGRAER/MS) e identificadas pelo Prof. Dr. Arnildo Pott (Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – INBIO/UFMS), sendo armazenadas em sacos plásticos, acondicionadas em caixa de isopor com refrigeração e transportadas até ao Laboratório de Bioprospecção da Universidade Federal de Rondonópolis – UFR, para tratamento apropriado e isolamento dos fungos endofíticos. Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário CGMS localizado no INBIO-UFMS sob o número 29003.

Figura 6 - localização de coleta da espécie vegetal *Galianthe thalictroides*, próxima do município de Bonito-MS, região do pantanal (20°56'08.8"S 56°39'32.0"W).



Fonte: Google Earth™.

O material passou pelo processo de assepsia superficial. A superfície do material vegetal foi lavada com água e sabão, e esterilizada por imersão em NaClO 1% por 3 minutos, imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguida de uma dupla lavagem em água estéril por 10 minutos e posterior secagem. Pedacos de folhas foram cortadas assepticamente (3 a 4 mm²) e inseridos em meio de cultura sólido BDA suplementado com antibiótico gentamicina para evitar o crescimento bacteriano. O crescimento dos fungos foi monitorado até suas hifas apresentarem aproximadamente 2-3 cm de diâmetro, sendo então retirada uma pequena massa micelar de cada linhagem, e inoculada separadamente em outra placa (SOUZA et al.,

2004). Este procedimento foi realizado até a obtenção da cultura pura. O material está preservado em BDA, em frascos “padrão penicilina” de 12 mL, sob refrigeração a 5 °C.

Para organizar e diferenciar as linhagens de endófitos pendentes de sequenciamento genético, foram atribuídos códigos de identificação, que consiste em “GT”, referente à planta hospedeira *Galianthe thalictroides*, seguido pela letra que indica o órgão da planta de onde o endófito foi obtido (F para folha, B para bulbo do caule e R para raiz), e um algarismo sequencial. Algumas linhagens se mostraram inviáveis em subseqüentes tentativas de cultivo, e seus códigos foram omitidos.

O fitopatógeno foi cedido pelo Prof. Dr. Geraldo Humberto da Silva, da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O isolamento das linhagens microbianas foi desenvolvido junto ao Laboratório de Bioprospecção da UFR, sob orientação do Prof. Dr. Helder L. Teles e Profa. Dra. Helen C. F. Lisboa.

3.2 Identificação genética

A identificação molecular de cada linhagem foi baseada na amplificação por PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) de parte da região ITS do microrganismo, seguidas pelo sequenciamento de ácidos nucleicos pelo método de Sanger, no aparelho ABI3100 *Fluorescence Futomated Fequencer* (Applied Biosystems). A sequência de DNA gerada em cada reação de sequenciamento foi comparada com sequências depositadas no banco de dados no NCBI utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Todo o processo foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto) – FCFRP-USP, junto a MSc. Ludmilla Tonani Carvalho e sob a orientação da Prof. Dra. Márcia Regina von Zeska Kress.

3.2.1 Extração de DNA genômico de fungo filamentoso

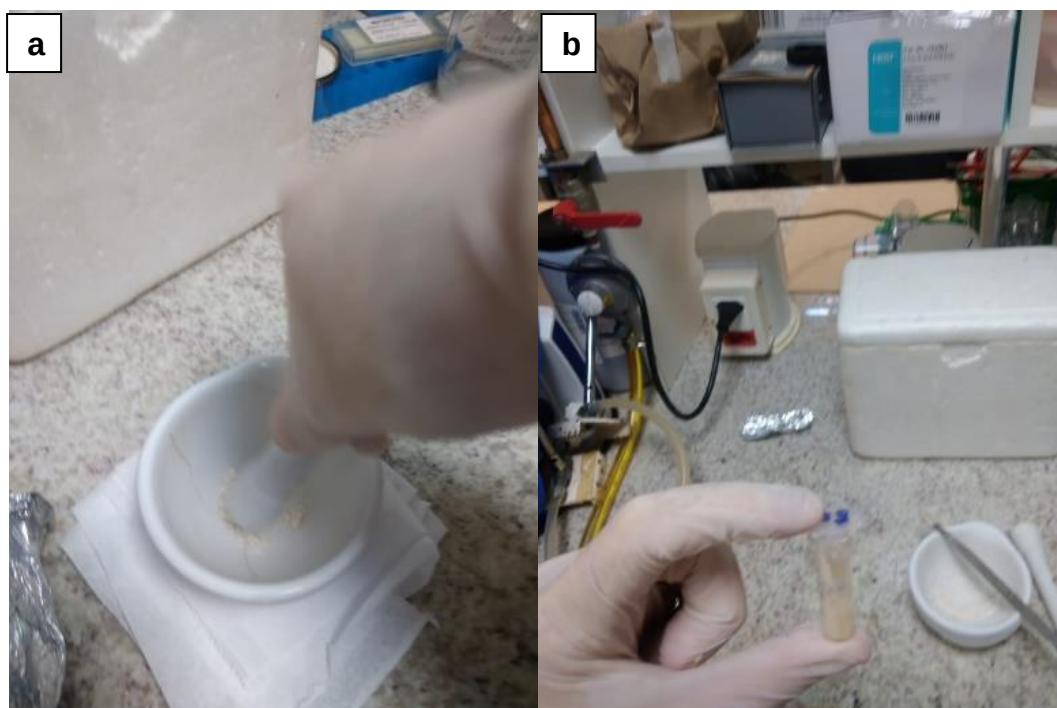
Aproximadamente 5×10^7 conídios de cada endófito foram inoculados em 50 mL de meio de cultura PDB (*Potato Dextrose Broth*) e incubados a 28°C por 48 h a 150 rpm para a produção de micélio. Este micélio foi coletado por filtração, congelado em nitrogênio líquido e triturado com o auxílio de grau com pistilo (Figura

7a). Para cada 40 mg de micélio triturado foi acrescentado 480 μ L de tampão de extração de DNA. Em cada amostra foi acrescentado um volume igual de fenol-clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada vigorosamente por 10 min para precipitar as proteínas e quebrar a membrana e parede das células (Figura 7b).

Para sedimentar as proteínas precipitadas, as amostras foram centrifugadas a 16000 G por 15 min (Eppendorf, Alemanha). A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL (Axygen Scientific, EUA) e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram novamente centrifugadas a 16000 G por 5 min, e a fase aquosa superior foi transferida novamente para outro microtubo onde foi acrescentado 0,54 volume de isopropanol (JT Barker, EUA) para precipitar o DNA.

A amostra foi centrifugada a 16000 G por 1 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 16000 G por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol evaporado na temperatura ambiente por 30 min (O'BRIEN et al., 2005).

Figura 7- Extração do DNA dos fungos endofíticos.



a) Pulverização da massa micelar previamente congelada; **b)** Extração dos ácidos nucleicos pela solução fenol-clorofórmio (1:1).

Fonte: Elaborado pelo autor.

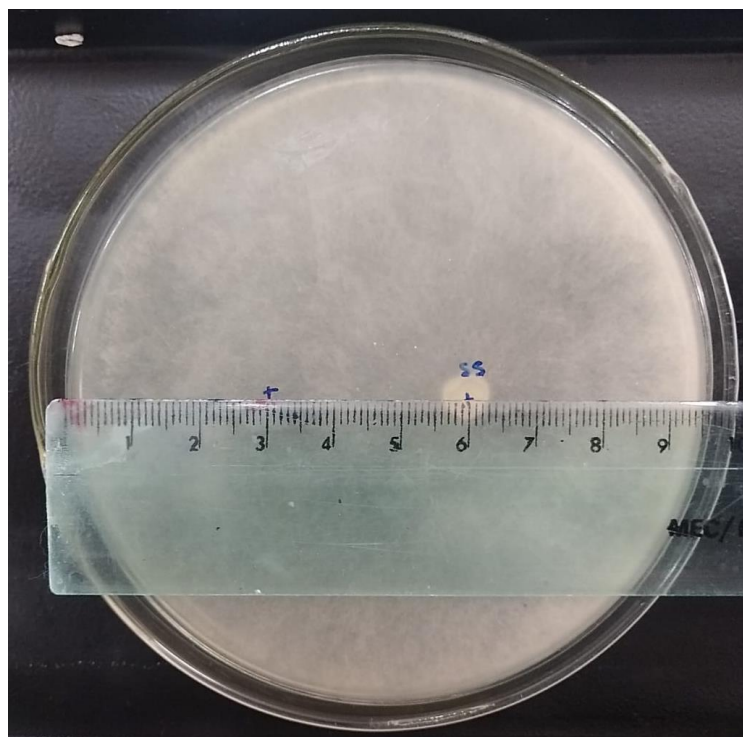
3.2.2 Amplificação por PCR das regiões ITS do rDNA

A amplificação por PCR das regiões ITS1 e ITS2 foi realizada utilizando-se 0,5 µM dos primers, 0,2 mM de dNTP, 1X de tampão apropriado para a polimerase (buffer GC), 100 ng de DNA genômico e 1 U de enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) em volume final de 20 µL de reação. Em seguida, o produto de cada PCR foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% e cada banda contendo o produto da PCR foi excisada do gel, com o auxílio de um bisturi estéril, e purificada com o kit de purificação de DNA de gel de agarose, Gel Band (Promega, EUA), de acordo com as normas do fabricante. Em seguida, cada amostra foi quantificada por espectrofotometria e a integridade observada em eletroforese de gel de agarose 1%. A sequência resultante foi alinhada e comparada com as sequências de referência disponíveis no *GenBank* (DENNIS BENSON et al., 2010).

3.3 Triagem da atividade antifúngica dos fungos endofíticos isolados frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*

Os endófitos isolados foram individualmente avaliados pelo seu antagonismo ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* em ensaios de antibiose por pareamento em co-cultura, realizados em triplicata. O cultivo do fitopatógeno e das linhagens de fungos endofíticos foi realizado separadamente em meio PDA por 7 dias em estufa a 25°C. Após o crescimento, foram retirados discos miceliais (5 mm de diâmetro) do patógeno e do endófito, e inseridos em uma placa de Petri (95 mm) contendo PDA a uma distância de 3 centímetros um do outro, no centro da placa. O controle consistiu no cultivo do fitopatógeno sem a presença de endófitos (Figura 8).

Figura 8 - Desenvolvimento do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* após 7 dias de incubação a 25°C em meio PDA. SS: *Sclerotinia sclerotiorum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 7 dias, e a interação inibitória foi calculada, levando em conta exclusivamente o eixo endófito-fitopatógeno, pela seguinte fórmula (RAJANI et al., 2021):

$$\% \text{ de inibição} = \frac{C_d - T_d}{C_d - 5\text{mm}} \times 100$$

onde C_d = diâmetro do crescimento do patógeno em cultura pura e T_d = diâmetro do patógeno em cultura dupla com o fungo endofítico.

3.4 Método de cultivo e planejamento experimental

3.4.1 OSMAC acoplado a planejamento fatorial 2^3

Os parâmetros selecionados nesse estudo foram: substrato (Czapek-Dox [-] ou Batata Dextrose [+]), modo (estático [-] e dinâmico [+]) e o ambiente biótico

(cultura pura [-] ou co-cultivo com *S. sclerotiorum* [+]) (Tabela 1). Os cultivos foram realizados em triplicata, resultando em 24 experimentos de 8 ensaios únicos (Tabela 2). O modo dinâmico foi definido como agitação à 150 rpm.

Para fins de simplicidade e uniformização, os meios de cultura serão referidos daqui em diante como meios Batata e Czapek.

Tabela 1 - Descrição dos parâmetros e dos níveis utilizados.

Parâmetro	Níveis	
	-	+
Meio de cultura	Czapek	Batata
Modo	Estático	Dinâmico
Ambiente biótico	Puro	CC

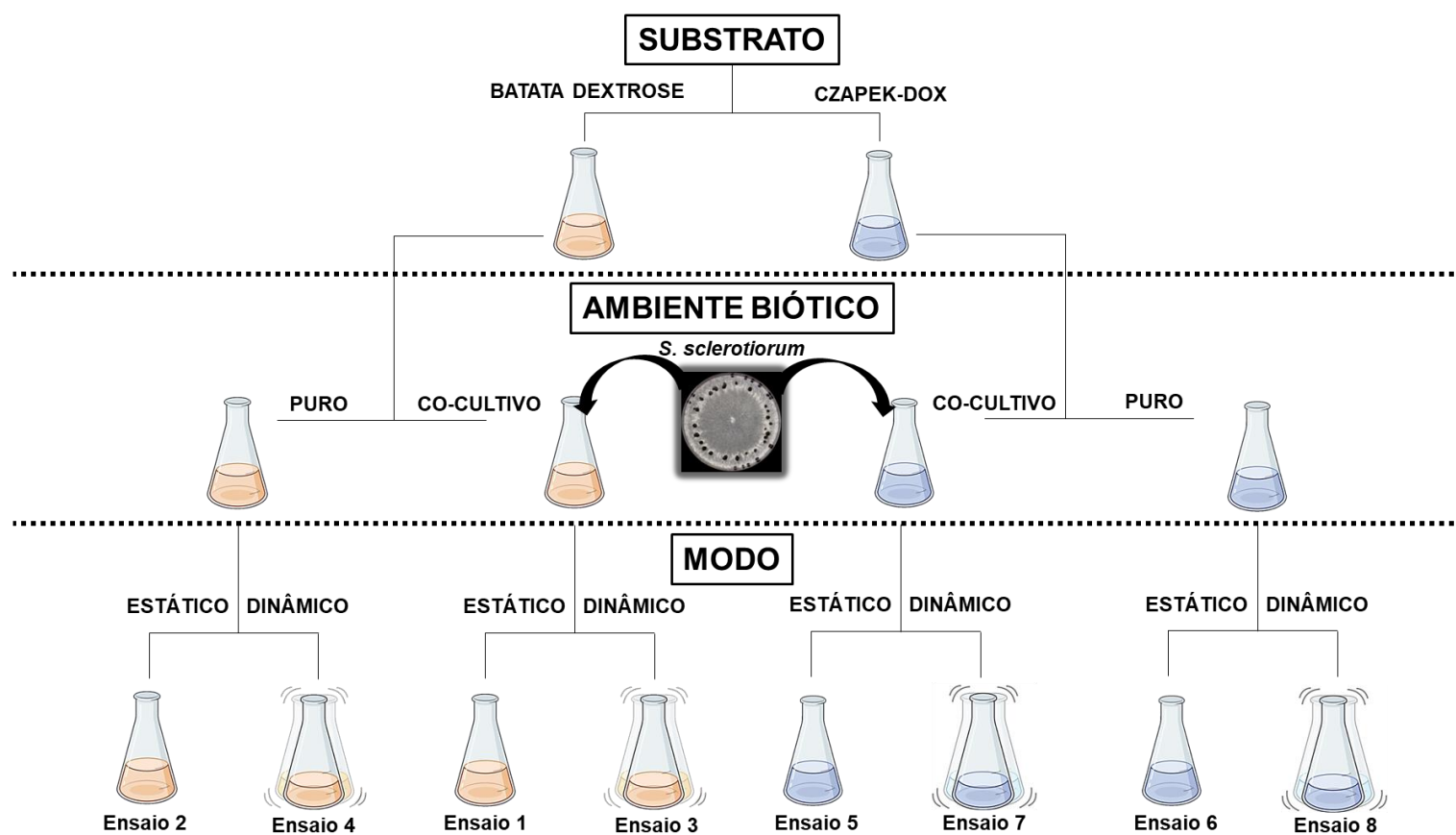
*CC: co-cultivo.

Tabela 2 - Descrição dos ensaios codificados, baseados no desenho experimental OSMAC.

Ensaio	Meio de cultura	Agitação	Fitopatógeno
1	1	-1	1
2	1	-1	-1
3	1	1	1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	-1	-1	-1
7	-1	1	1
8	-1	1	-1

A incubação do *P. javanicum* foi realizada conforme o esquema da Figura 9.

Figura 9 - Esquema dos ensaios OSMAC.



Fonte: Elaborado pelo autor.

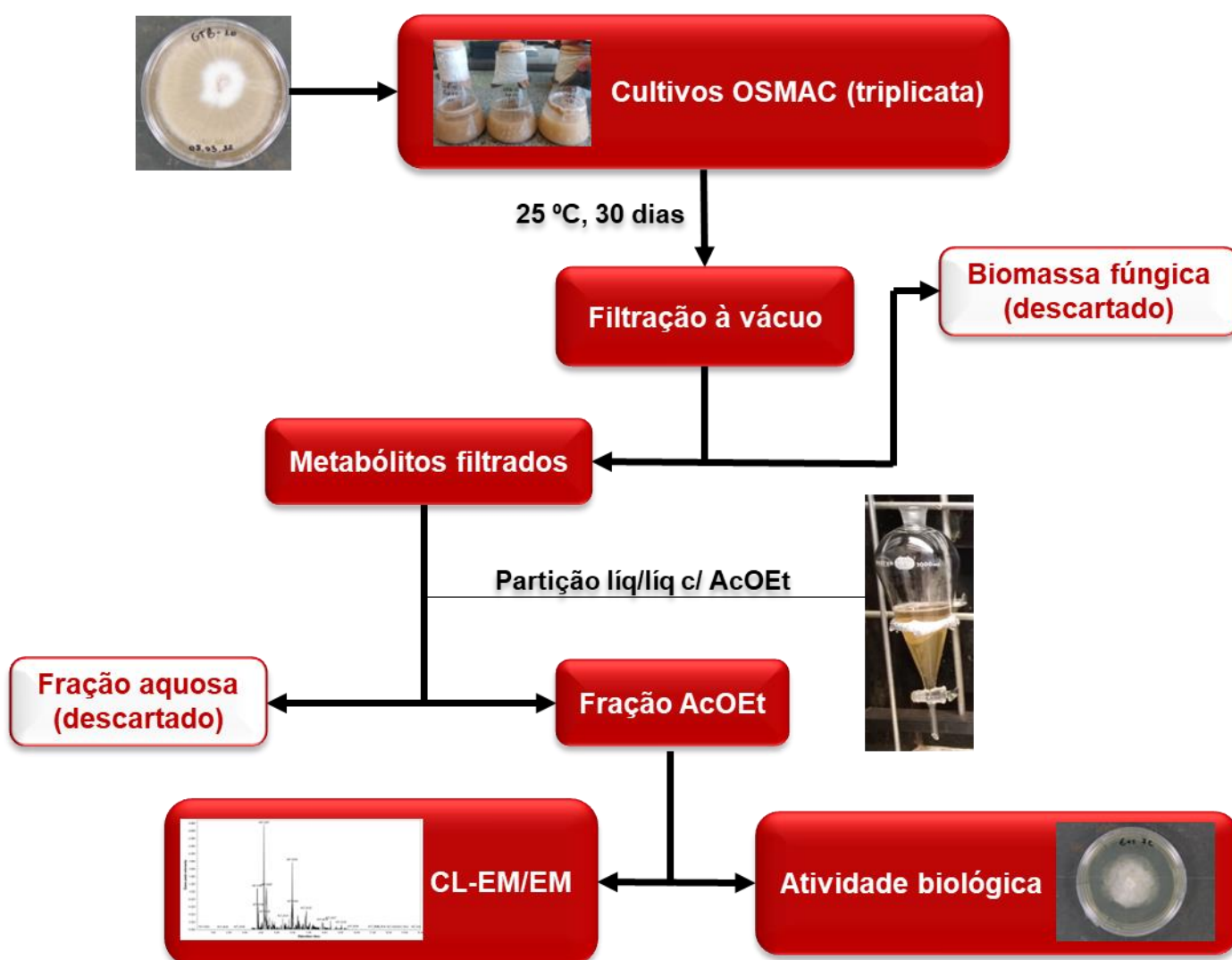
3.4.2 Incubação e extração dos metabólitos secundários

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante:

- ➔ *Potato Dextrose Broth* (Batata Dextrose Caldo), ou simplesmente Batata. Marca Neogen, código NCM0157A, lote US112738B. Composição: Extrato de batata (4,0 g/L), equivalente a 200g de infusão de batata e dextrose (20,0 g/L).
- ➔ *Czapek Dox Broth* (Czapek Dox Caldo), marca Kasvi, código K25-610072, lote 062317502. Composição: nitrato de sódio (2,0 g/L), sulfato de magnésio (0,5 g/L), cloreto de potássio (0,5 g/L), sulfato ferroso (0,01 g/L), difosfato de potássio (1,0 g/L) e sacarose (30,0 g/L).

Os cultivos em meio líquido foram preparados com um volume de 300 mL e incubados a 25°C por 30 dias em incubadora shaker refrigerada com agitação orbital (SOLAB SL-223). Em seguida, o caldo foi separado da biomassa micelar por filtração à pressão reduzida e submetido a partição líquido-líquido com AcOEt (3x 100 mL) (Figura 10).

Figura 10 - Esquema da preparação e obtenção de extrato bruto dos ensaios OSMAC do fungo endofítico *P. javanicum* GTB-10.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A fase AcOEt foi filtrada, reduzida e seca em evaporador rotatório para a obtenção do extrato bruto (BUDIONO et al., 2019). O procedimento foi realizado em triplicata, e a análise CL-EM/EM de cada réplica foi conduzida individualmente. Para obtenção dos controles, o mesmo procedimento de extração foi realizado nos meios de cultivo sem microrganismos, e em cultivos puros do fitopatógeno *S.*

sclerotiorum nos meios Batata e Czapek, incubados por 30 dias à 25°C, em modo estático.

3.5 Análise em UPLC-QTOF-MS

Os solventes utilizados nos processos cromatográficos foram da marca LiChrosolv ® de grau HPLC. A água foi destilada e deionizada em aparelho da marca Milli-Q (resistividade mínima 18,2 MΩ.cm à 25°C).

Os extratos brutos foram preparados para análise em UPLC-QToF-MS. Para isso, foram solubilizados em solução hidrometanólica [MeOH:H₂O (95:5)] à 10 mg/mL e submetidos ao processo de extração em fase sólida (*clean-up*) utilizando um cartucho “Sep-Pak” (SPE, Macherey-Nagel C18ec, 3,0 mL, 500 mg, Chromabond®). As amostras foram evaporadas e solubilizadas em acetonitrila grau HPLC e preparadas na concentração de 500 ppm.

Para realizar as análises em CL-EM/EM utilizou-se o sistema UPLC-QTOF-MS Xevo G2-S Q-TOF (Waters Corporation). Os parâmetros utilizados para as análises foram: fase móvel A: água (0,1 % de ácido fórmico V/V), fase móvel B: acetonitrila (0,1 % de ácido fórmico V/V); o método foi realizado em gradiente linear: de 5-100 % de B em 8 minutos, de 8-14 min permanece em 100%, e 14-20 min retorna para a condição inicial de 5% de B; fluxo: 0,45 mL.min⁻¹; volume de injeção: 0,2 µL; fase estacionária: coluna de fase reversa C18 Acquity UPLC®HSS T3 Column (1,8 µm; 2,1 mm x 100 mm) e temperatura de 35 °C. Os espectros foram adquiridos em modo positivo, com faixa de massa de *m/z* 100-1500 operando em Auto (MS).

Análises em DDA (*Data Dependent Aquisition*) foram realizadas com capilar: 2,5 kV; rampa de energia de colisão LM, começo: 10 eV; rampa de energia de colisão LM fim: 30 eV; rampa de energia de colisão HM, começo: 50 eV; rampa de energia de colisão HM fim: 70 eV; energia de colisão: 4 eV; Foi alterado para EM/EM quando: intensidade subir acima do limite (500.000); incluir precursor detectado: Usar exclusão em tempo real; inclusão de precursor detectado; incluir depois do tempo (5 segundos); *Lock Mass*: *m/z* 556.277100.

Os dados foram convertidos do formato *WATERS.raw* para o formato *.mzML* utilizando o software ProteoWizard MSConvert e processados no Software MZMine 2.53, e exportados nos formatos *.mgf* e *.csv* para a formação de redes moleculares

na plataforma GNPS pelo método computacional FBMN (*Feature Based Molecular Network*, release_28.2). Os espectros EM/EM foram comparados com as bibliotecas espectrais públicas e reanalisados pela ferramenta MS2LDA (release_31). Os parâmetros das etapas de processamento e formação de redes moleculares estão dispostos nos apêndices 1 e 2. A visualização da rede foi feita no software Cytoscape 3.9.0, atribuindo cores aos nodos de forma a diferenciar as diferentes condições de cultivo.

3.6 Métodos estatísticos

O arquivo .csv exportado foi adaptado para análises subsequentes na plataforma *MetaboAnalyst* (XIA et al., 2009), filtrando manualmente os sinais detectados nos controles (acetonitrila, meios de cultivo, extrato do fungo *S. sclerotiorum*). Antes das análises univariadas, os dados foram normalizados, transformados e escalonados por ferramentas integradas à plataforma.

- Normalização pela soma: todos os valores de intensidade de sinais são divididos pela soma de todas as amostras e multiplicado por 100.
- Transformação logarítmica (base 10);
- Escalonados pelo método de Pareto: todos os sinais de picos são centralizados na média e divididos pela raiz quadrada do desvio padrão.

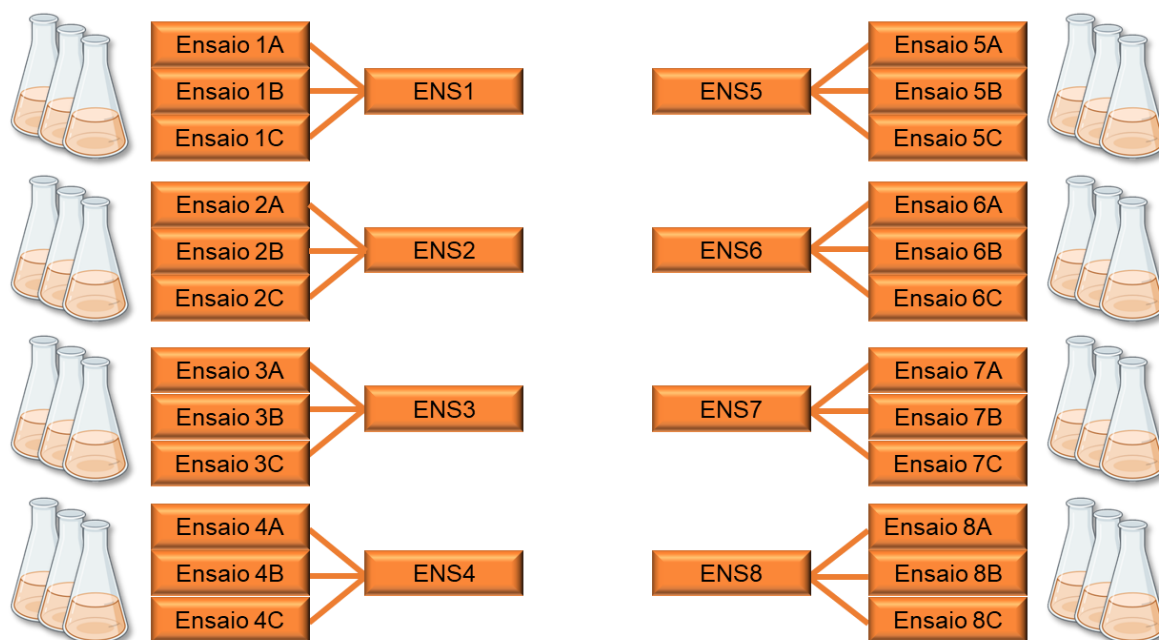
As análises aplicadas foram: mapa de correlação entre amostras, análise de Componentes Principais (ACP), análise de agrupamento hierárquico, Análise discriminante por projeções ortogonais à estrutura latente (OPLS-DA) e *Random Forest* (500 árvores formadas, número de preditores: 7) nos parâmetros não resolvidos pela ACP.

3.7 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos OSMAC frente ao fitopatógeno

Os extratos AcOEt dos cultivos OSMAC do endófito *P. javanicum* (GTB-10) foram avaliados quanto a capacidade de inibição do fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

Devido as pequenas quantidades de massas de cada réplica, estas foram reunidas, totalizando 8 amostras, conforme a Figura 11.

Figura 11 - Reunião dos extratos das réplicas dos cultivos OSMAC para fins de realizar os ensaios de atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a avaliação foi utilizada uma solução em DMSO do extrato na concentração de 80 mg/mL, sendo inseridos 100 µL desta solução à superfície de placas de Petri com meio PDA, espalhado com alça de Drigalski e aguardado 3 h para a penetração da solução no meio de cultura. Em seguida, um plug de micélio (1 mm²) do fitopatógeno foi transferido ao centro de cada placa para se observar a inibição do crescimento. O controle negativo foi realizado utilizando somente DMSO, sem extrato e cada experimento foi realizado em triplicata, com incubação de 7 dias a 25°C. A avaliação foi feita medindo-se e comparando-se os diâmetros das colônias do fitopatógeno (ensaio e controle), comparando com e sem o extrato bruto (STANGARLIN, et al., 1999). A inibição de crescimento micelial foi calculada através da fórmula:

$$\%IC = \frac{(DC - DTRAT)}{DC} \times 100$$

IC: inibição de crescimento (%);

DC: diâmetro da colônia do fitopatógeno sozinho (controle);

DTRAT: diâmetro da colônia do fitopatógeno de cada tratamento com extrato.

O controle positivo foi conduzido substituindo-se a solução do extrato bruto pela solução do fungicida comercial Thiram®, aplicado na mesma concentração (Apêndice 21). O método de análise discriminante por projeções ortogonais à estrutura latente (OPLS-DA) foi utilizado para explorar as correlações entre os resultados dos ensaios de atividade antifúngica e os metabólitos detectados (LOTFY et al., 2021).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação genética dos fungos isolados

O resultado do sequenciamento das regiões ITS foi alinhado e comparado com as sequências de referência disponíveis no *GenBank*, onde % de identidade estão dispostas na Tabela 3. Os apêndices 3 - 11 dispõem as imagens dos endófitos.

Tabela 3 - Código dos fungos isolados e suas identificações moleculares.

Código do isolado	Identificação final	Identidade	Acesso
GTB-04	<i>Fusarium fujikuroi</i> / <i>proliferatum</i>	100% / 99,8%	KJ000428.1 / KP407870.1
GTR-07	<i>Talaromyces</i> <i>trachyspermus</i>	100%	MF681554.1
GTF-08	<i>Exserohilum rostratum</i> / <i>Curvularia</i> sp.	100% / 99,8%	MN599610.1 / LC317566.1
GTB-10	<i>Penicillium javanicum</i>	100%	MK450698.1
GTF-15 A	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	100%	MK850383.1
GTF-15 B	<i>Aspergillus versicolor</i>	99,8%	KM613141.1
GTF-17	<i>Diaporthe</i> sp.	99,4%	OL981188.1
GTF-25	<i>Aspergillus hiratsukae</i>	100%	MK850383.1
GTR-25 A	<i>Fusarium fujikuroi</i> / <i>proliferatum</i>	99,8%	KJ000428.1 / MH766394.1
GTR-25 B	<i>Penicillium</i> sp.	100%	HM469430.1
GTF-32	<i>Neofusicoccum parvum</i>	100%	KY053039.1
GTF-37	<i>Paecilomyces</i> sp.	99,8%	MZ151383.1

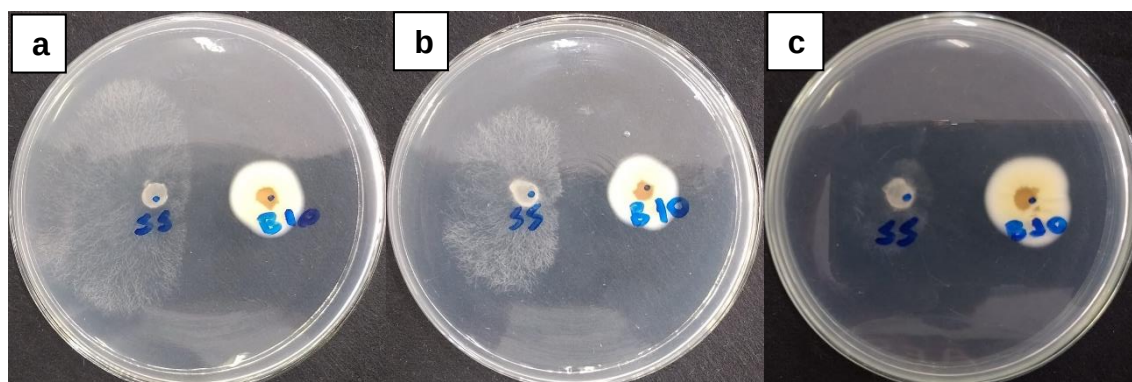
4.2 Triagem da atividade antifúngica dos fungos endofíticos isolados frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*

Após 7 dias de co-cultivo dos endófitos com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, o diâmetro da massa micelar foi medido em relação ao eixo endófito-patógeno, como exemplo para o fungo GTB-10: 4,2 cm (Figura 12a), 3,0 cm (Figura 12b) e 2,7 cm (Figura 12c). Média = 3,3 cm.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{12 - 3,3}{12 - 0,5} \times 100$$

$$\% \text{ de inibição} = 72,65$$

Figura 12 - Endófito GTB-10 (B10) co-cultivado com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) em meio PDA, após incubação de 7 dias a 25°C.

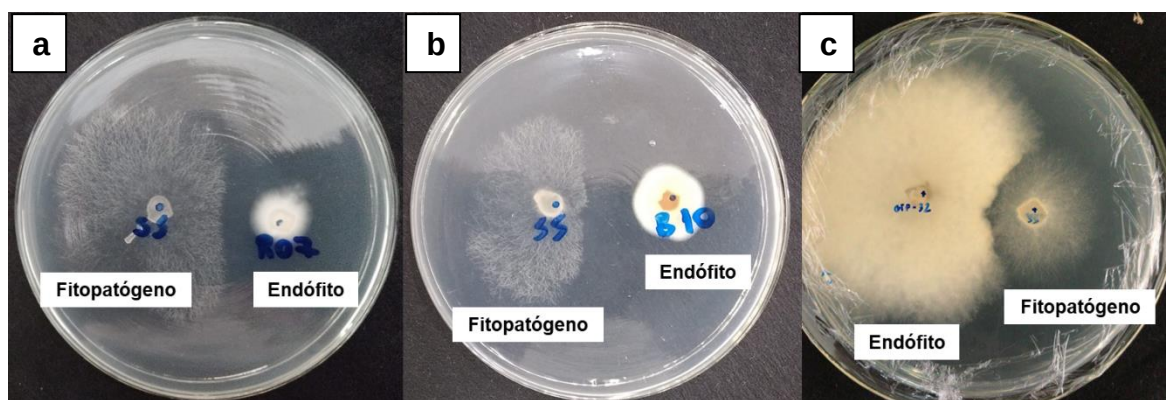


a)-c): As três réplicas. **SS:** *S. sclerotiorum*. **B10:** GTB-10.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os endófitos que apresentaram maior atividade foram o *P. javanicum* (GTB-10), o *Neofusicoccum parvum* (GTF-25) e o GTR-07 *Talaromyces trachyspermus* (GTR-07) (Tabela 4). Observa-se nos ensaios que os fungos GTR-07 (Figura 13a) e GTB-10 (Figura 13b) exibiram uma lacuna no eixo endófito-fitopatógeno que impede o contato das colônias, presumivelmente resultado da produção de substâncias antifúngicas pelo fungo endofítico. Nos ensaios com o fungo GTF-25 (Figura 13c) há uma rápida colonização da superfície do meio de cultura pelo endófito, aparentemente restringindo o crescimento do fitopatógeno.

Figura 13 - Ensaio de atividade antifúngica dos endófitos com maior atividade.



a) GTR-07; b) GTB-10; c) GTF-25. **SS**: *S. sclerotiorum*.

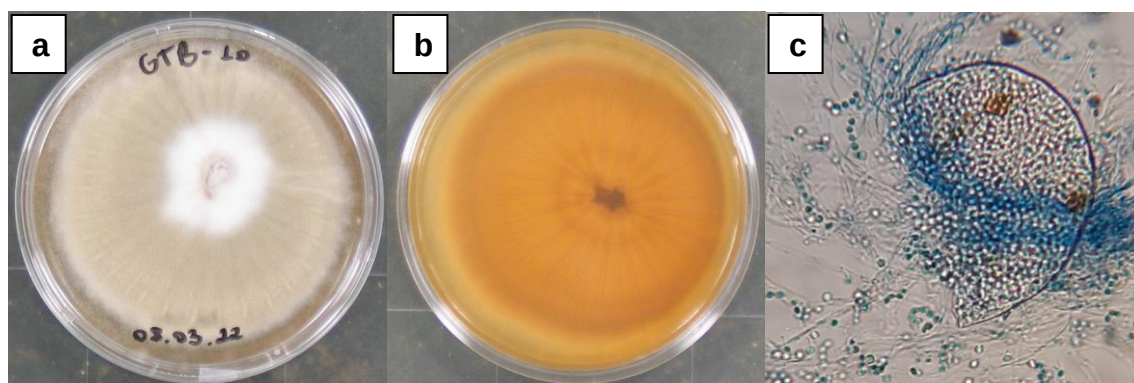
Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido a contrições de tempo, apenas o endófito *P. javanicum* (GTB-10) foi selecionado para dar seguimento ao trabalho, de acordo com o potencial de inibição e ao comportamento específico do fitopatógeno em co-cultivo. Sua colônia e esporos estão dispostos na Figura 14. Os ensaios com os demais endófitos podem ser visualizados na seção **Apêndice**.

Tabela 4 - Resultados dos ensaios de antagonismo em co-cultura dos fungos endofíticos frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

Código / nome do fungo endofítico	% de inibição
GTF-08 <i>Exserohilum rostratum</i> / <i>Curvularia</i> sp.	34,4
GTF-15 <i>Aspergillus hiratsukae</i> / <i>versicolor</i>	34,9
GTF-25 <i>Aspergillus hiratsukae</i> /	38,5
GTF-32 <i>Neofusicoccum parvum</i>	71,5
GTF-37 <i>Paecilomyces</i> sp.	28,7
GTB-04 <i>Fusarium fujikuroi</i> / <i>proliferatum</i>	35,0
GTB-10 <i>Penicillium javanicum</i>	72,65
GTR-07 <i>Talaromyces trachyspermus</i>	70,2
GTR-17 <i>Diaporthe</i> sp.	n/a
GTR-25 <i>Fusarium fujikuroi</i> / <i>proliferatum</i> / <i>Penicillium</i> sp.	33,3

Figura 14 – Fungo endofítico *P. javanicum* (GTB-10) cultivado em meio BDA.



a) Frente da placa; **b)** Verso da placa; **c)** Microscopia óptica dos esporos com corante azul-de-algodão.

Fonte: próprio autor.

4.3 OSMAC e cultivo para produção de extratos

As massas dos extratos GTB-10, obtidas para cada réplica dos ensaios, estão dispostas na Tabela 5. Um claro padrão observado, considerando a média, é que há diminuição de rendimento nos ensaios onde há o cultivo com meio Batata, especialmente o ensaio 3.

Tabela 5 – Massas (mg) dos extratos brutos de GTB-10 *P. javanicum* obtidas após o processo de cultivo e extração do metabolismo secundário por meio do solvente AcOEt.

Ensaio	Réplica			Média
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	
1 ^{†*}	43,9	17,8	25,9	29,2
2 [†]	71,2	30,0	25,4	42,2
3 ^{†◇*}	7,3	15,7	9,6	10,9
4 ^{†◇}	35,8	34,5	32,6	34,3
5 ^{‡*}	48,1	80,2	61,8	63,4
6 [‡]	72,1	84,7	35,6	67,7
7 ^{‡◇*}	71,8	73,6	56,8	67,4
8 ^{‡◇}	65,1	39,8	83,9	62,9

*Ensaio com presença de co-cultivo. [†]Batata. [‡]Czapek. [◇]Ensaio em modo dinâmico.

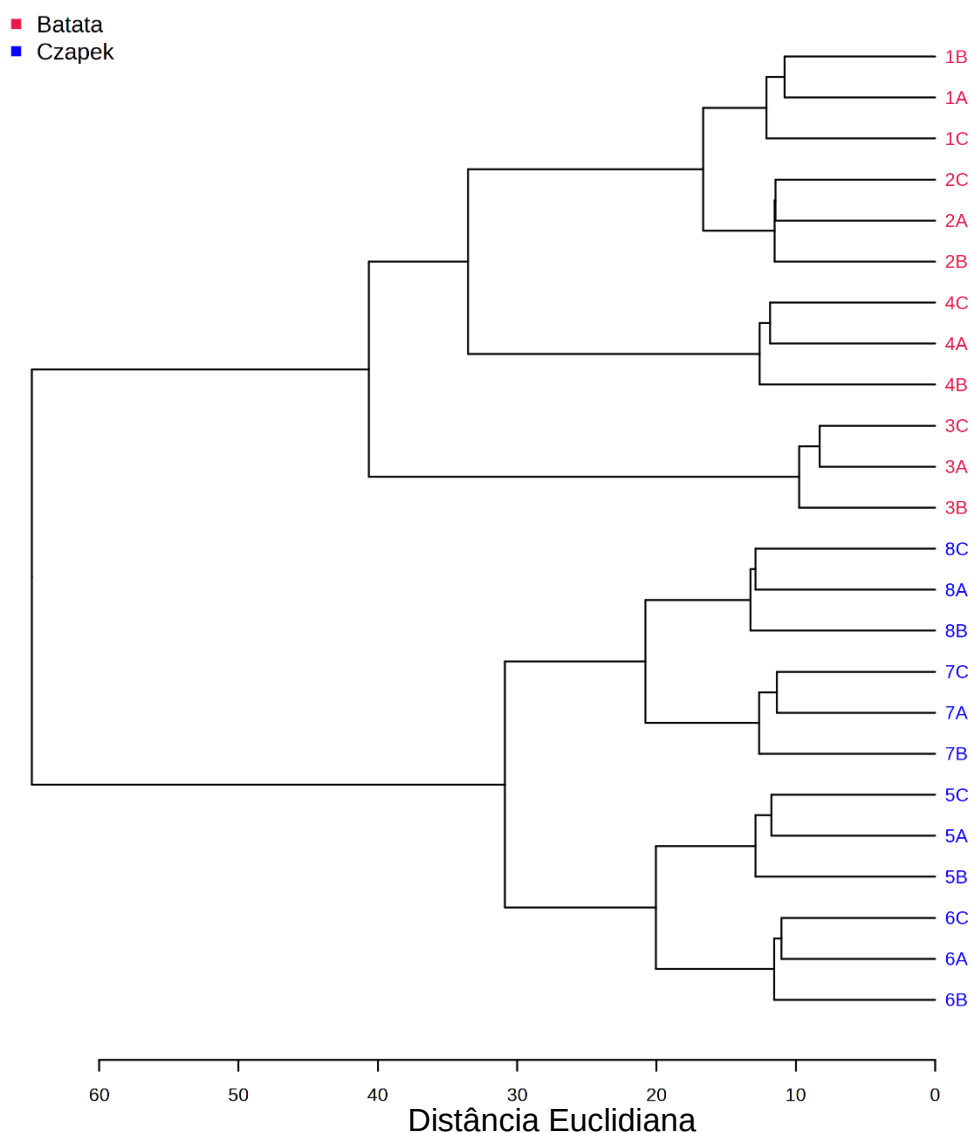
4.4 Análise qualitativa dos extratos

Os resultados apresentados a seguir derivam dos dados de CL-EM/EM obtidos e exportados no formato .csv após pré-processamento pelo MZMine, como descrito no item **3.7** e analisados pelo *MetaboAnalyst*, descrito no item **3.8**.

4.4.1 Análise de agrupamento hierárquico

O agrupamento hierárquico de amostras fornece fundamentos para o argumento sobre quais dos parâmetros OSMAC mais afetaram a produção metabólica do *P. javanicum* GTB-10 (Figura 15). A maior similaridade ocorreu entre as réplicas do mesmo ensaio. No meio Batata, os ensaios 1 e 2 mostraram grande similaridade, indicando que o co-cultivo contribuiu pouco para a variação da produção metabólica. O ensaio 3 aparece em uma hierarquia separada dos outros ensaios neste meio.

Entre os ensaios com o meio de cultura Czapek, o agrupamento hierárquico sugere que o ambiente de cultivo foi o menos influente na produção metabólica, seguido do modo de cultivo. De modo geral, o maior nível hierárquico pertence ao meio de cultivo, que contribuiu para a clara separação entre o grupo dos ensaios de Batata e Czapek.

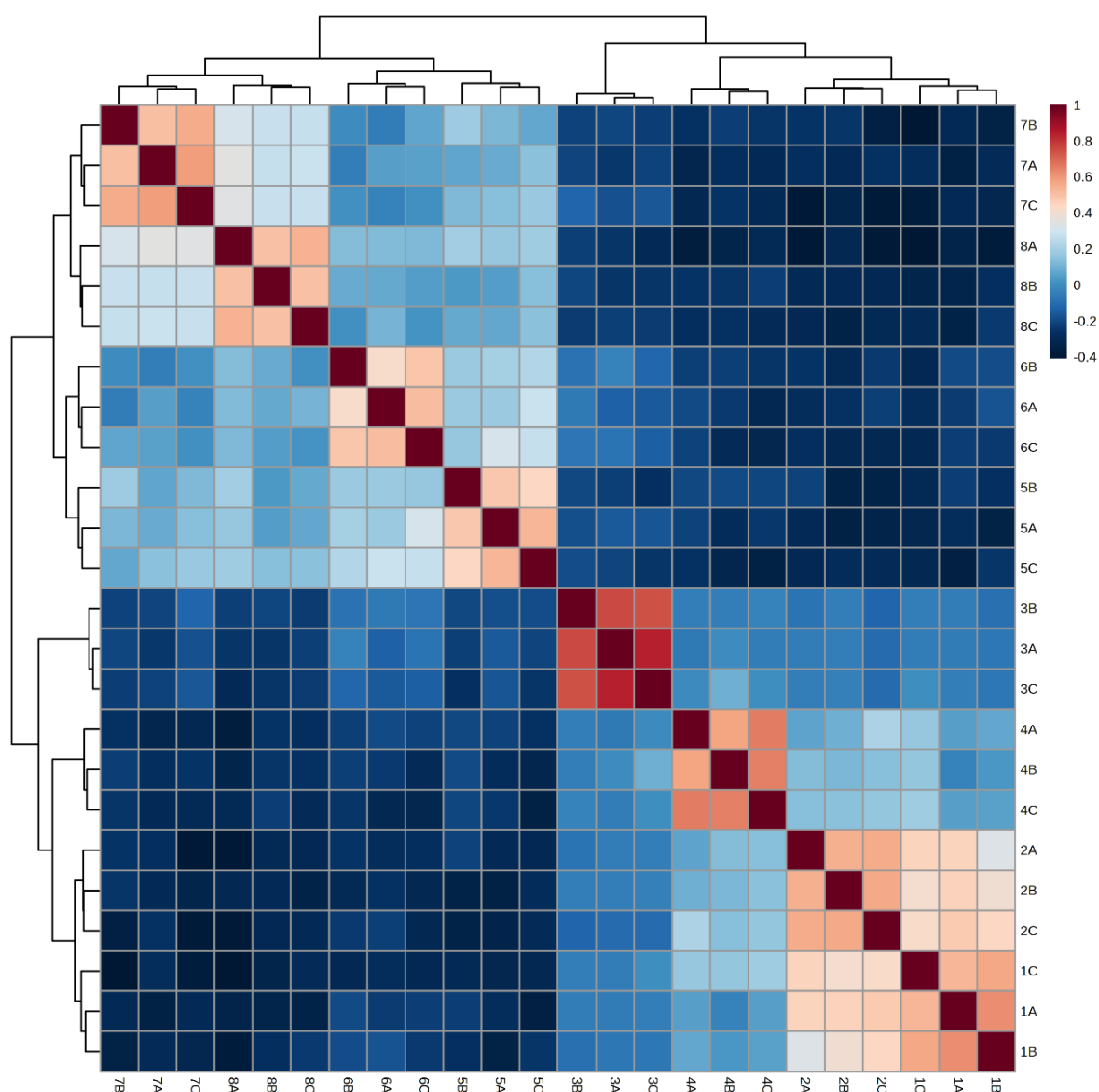
Figura 15 - Análise de agrupamento hierárquico dos extratos.

A, B e C se referem às três réplicas do cultivo.

Fonte: MetaboAnalyst.

O mapa de correlação auxilia a visualização da análise de agrupamento hierárquico (Figura 16). Entre as amostras cultivadas em batata (Ensaio 1 a 4), o ensaio 3 (dinâmico, co-cultivo) mostrou estar menos correlacionado com o restante dos ensaios, e muito correlacionado entre suas réplicas. A maior correlação entre amostras que compartilham o mesmo meio de cultura concorda com a ideia de que as fontes de carbono e nitrogênio são os mais determinantes nos tipos de esqueletos moleculares que essa linhagem é capaz de sintetizar (PAN et al., 2019).

Figura 16 - Mapa de correlação entre as amostras da abordagem OSMAC.



Fonte: MetaboAnalyst.

4.4.2 Análise de Componentes Principais (APC)

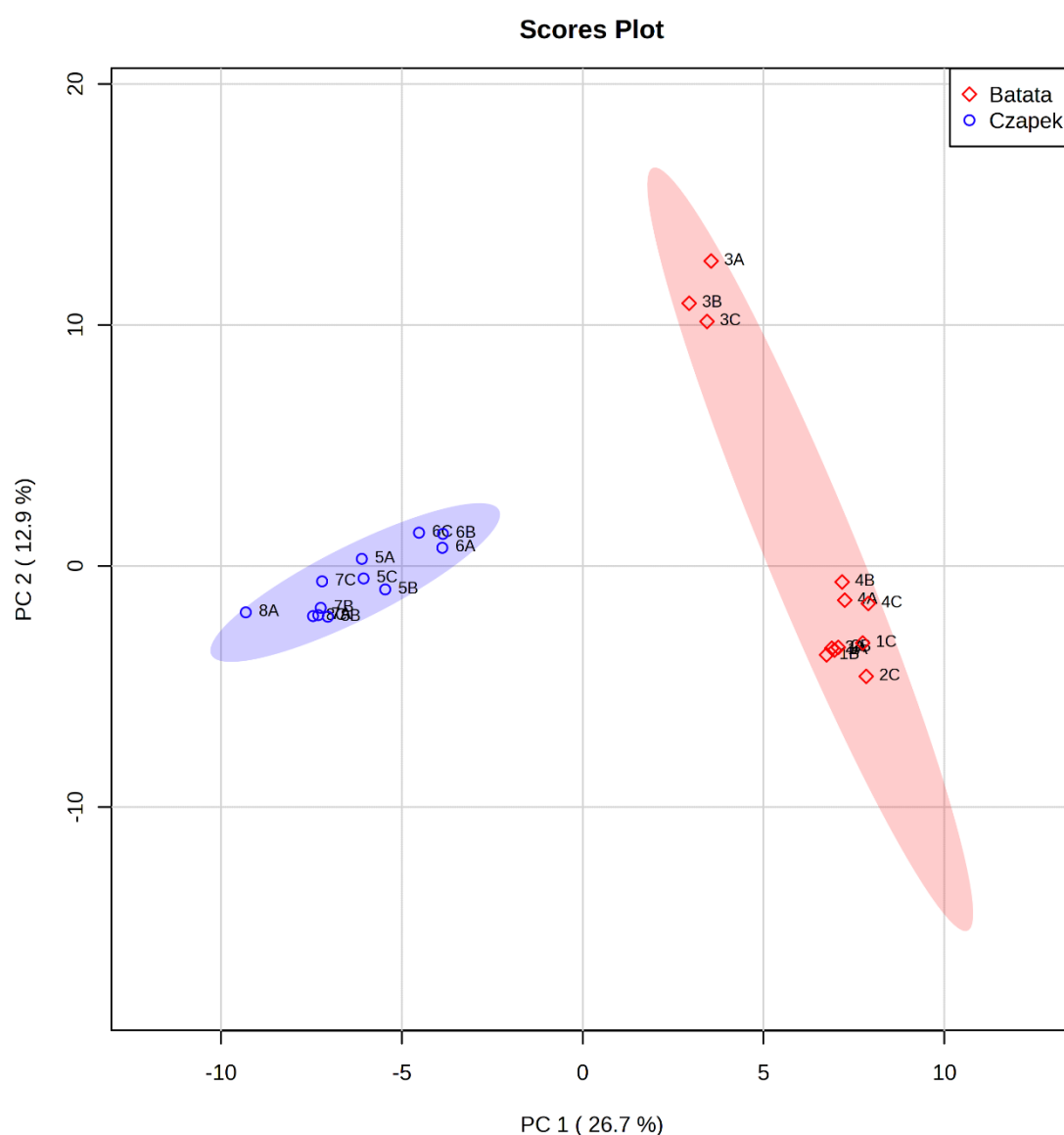
A seguir, estão dispostos os gráficos de *score* da análise de componentes principais, visualizados de acordo com os parâmetros OSMAC. As áreas coloridas correspondem às regiões com 95% de confiança.

4.4.2.1 Meio de cultura

O eixo PC1 explica 26,7% dos valores de variância, e o eixo PC2 explica 12,9%. Pelo gráfico (Figura 17) é possível notar que as amostras estão separadas

de acordo com o meio de cultivo, indicando que mudar as fontes de carbono e nitrogênio foi importante para variar a produção metabólica desse fungo (PAN et al., 2019). É possível notar que, assim como no mapa de correlação, os ensaios 3 (batata, modo dinâmico, co-cultivo) mostraram metabólitos diferentes do restante dos ensaios em batata. Já nos ensaios envolvendo Czapek, a ACP indica que não houve uma diferença significativa na variação do modo e ambiente de cultivo.

Figura 17 - Gráfico de score da análise de componentes principais, visualizando a variação entre os ensaios com diferentes meios de cultura (Batata e Czapek).

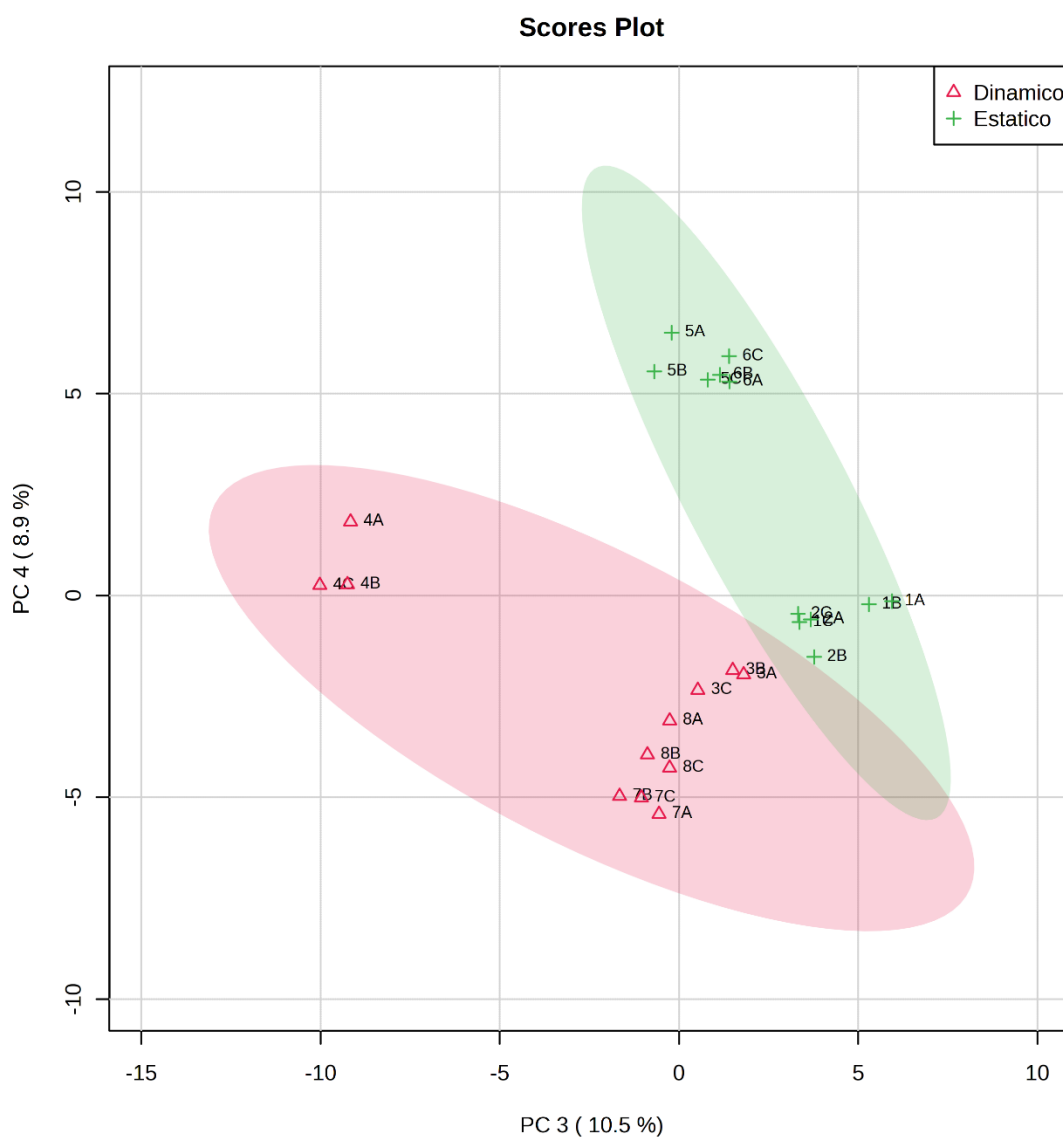


Fonte: MetaboAnalyst.

4.4.2.2 Modo de cultivo

O eixo PC3 explica 10,5% dos valores de variância, e o eixo PC4 explica 8,9%. A variação do modo de cultivo (Figura 18), como estabelecido no desenho experimental OSMAC, apresentou baixa diferenciação nas projeções feitas pela análise de componentes principais, indicando que o parâmetro não foi efetivo em ativar vias biossintéticas alternativas para o fungo estudado.

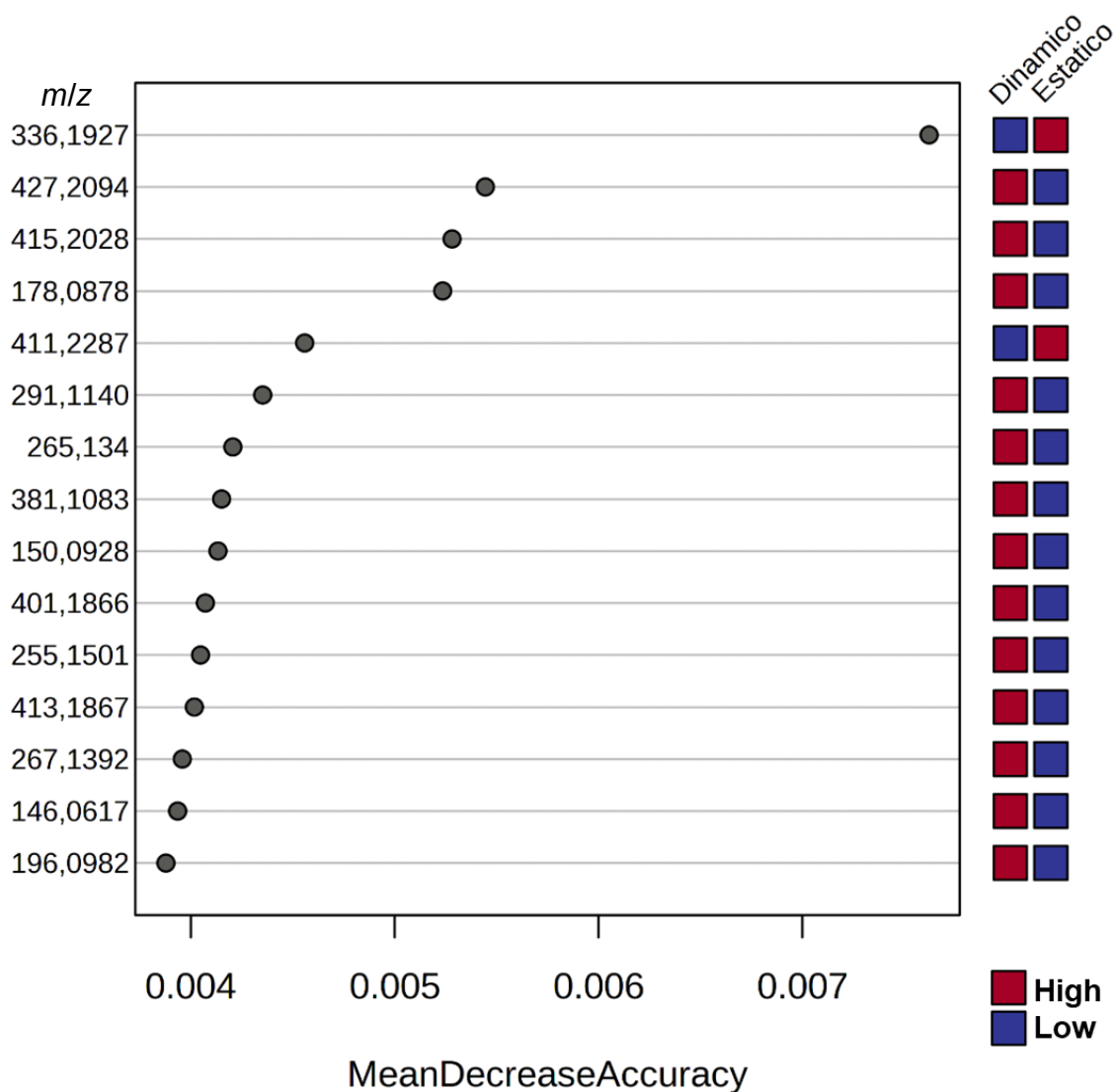
Figura 18 - Gráfico de score da análise de componentes principais, visualizando a variação entre os ensaios com diferentes modos de cultivo (dinâmico e estático).



Fonte: MetaboAnalyst.

De acordo com o classificador *Random Forest*, os metabólitos que mais contribuem para a diferenciação metabólica entre os modos de cultivo são: metabólito m/z 336,1927 (não anotado) presente majoritariamente nos ensaios em modo estático, e os metabólitos m/z 427,2094 (família das estatinas), m/z 178,0878 e m/z 415,2028 (família dos derivados de aminoácidos) encontrados principalmente nos ensaios em modo dinâmico (Figura 19). O termo *Mean Decrease Accuracy* descreve a importância do metabólito na discriminação entre os modos de cultivo. O quadrado vermelho indica o principal nível do parâmetro influenciado.

Figura 19 - Classificação por *Random forest* dos metabólitos que mais contribuem para a variação de produção metabólica do endófito GTB-10 *P. javanicum* variando o modo de cultivo em estático e dinâmico.

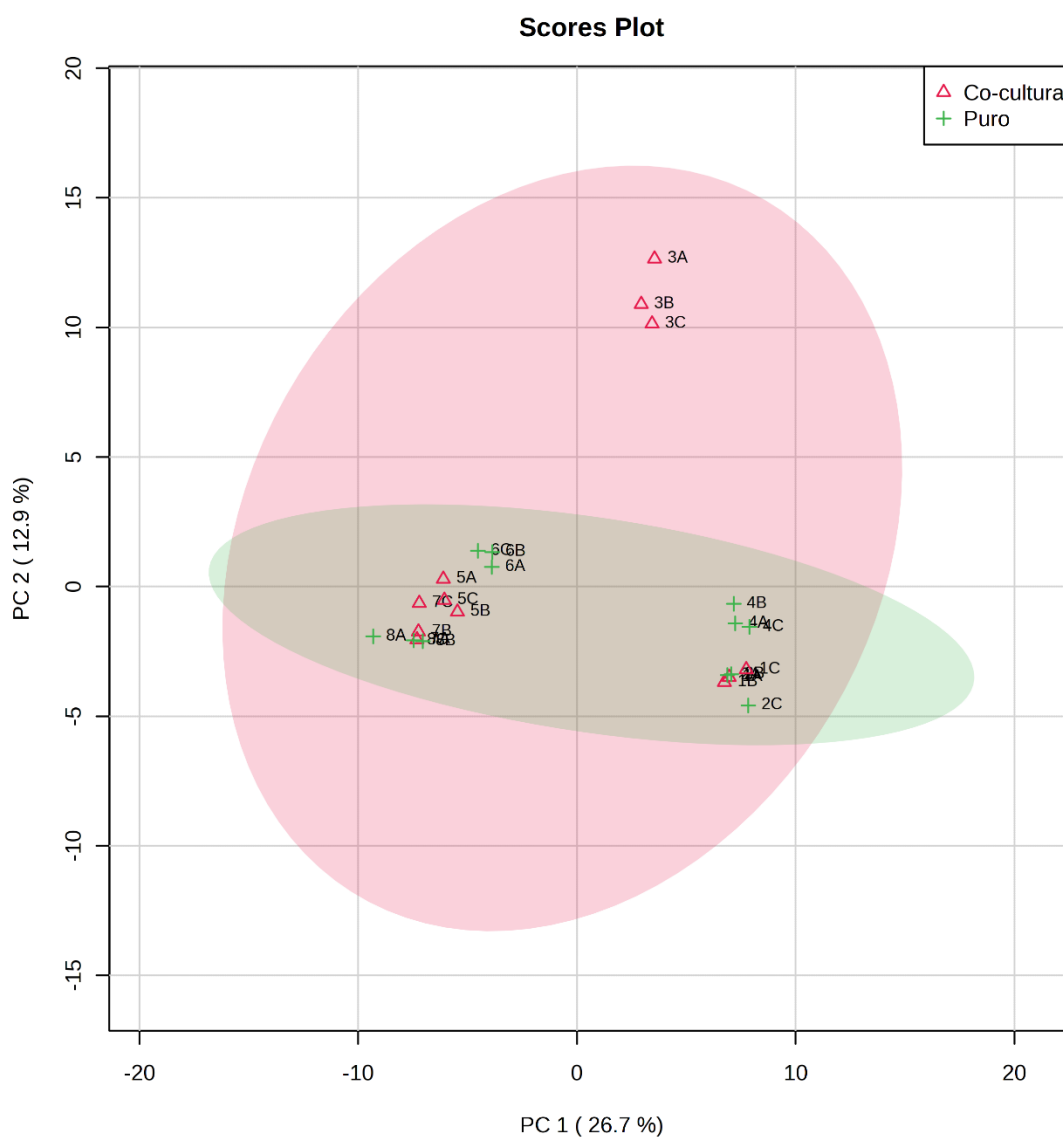


Fonte: MetaboAnalyst.

4.4.2.3 Ambiente de cultivo

O eixo PC1 explica 26,7% dos valores de variância, e o eixo PC2 explica 12,9%. O ambiente de cultivo (Figura 20) não mostrou grande diferenciação entre os ensaios, com exceção do ensaio 3, que aparece isoladamente e não agrupado com os demais

Figura 20 - Gráfico de score da análise de componentes principais, visualizando a variação entre os ensaios com diferentes ambientes de cultivo (co-cultura e puro).

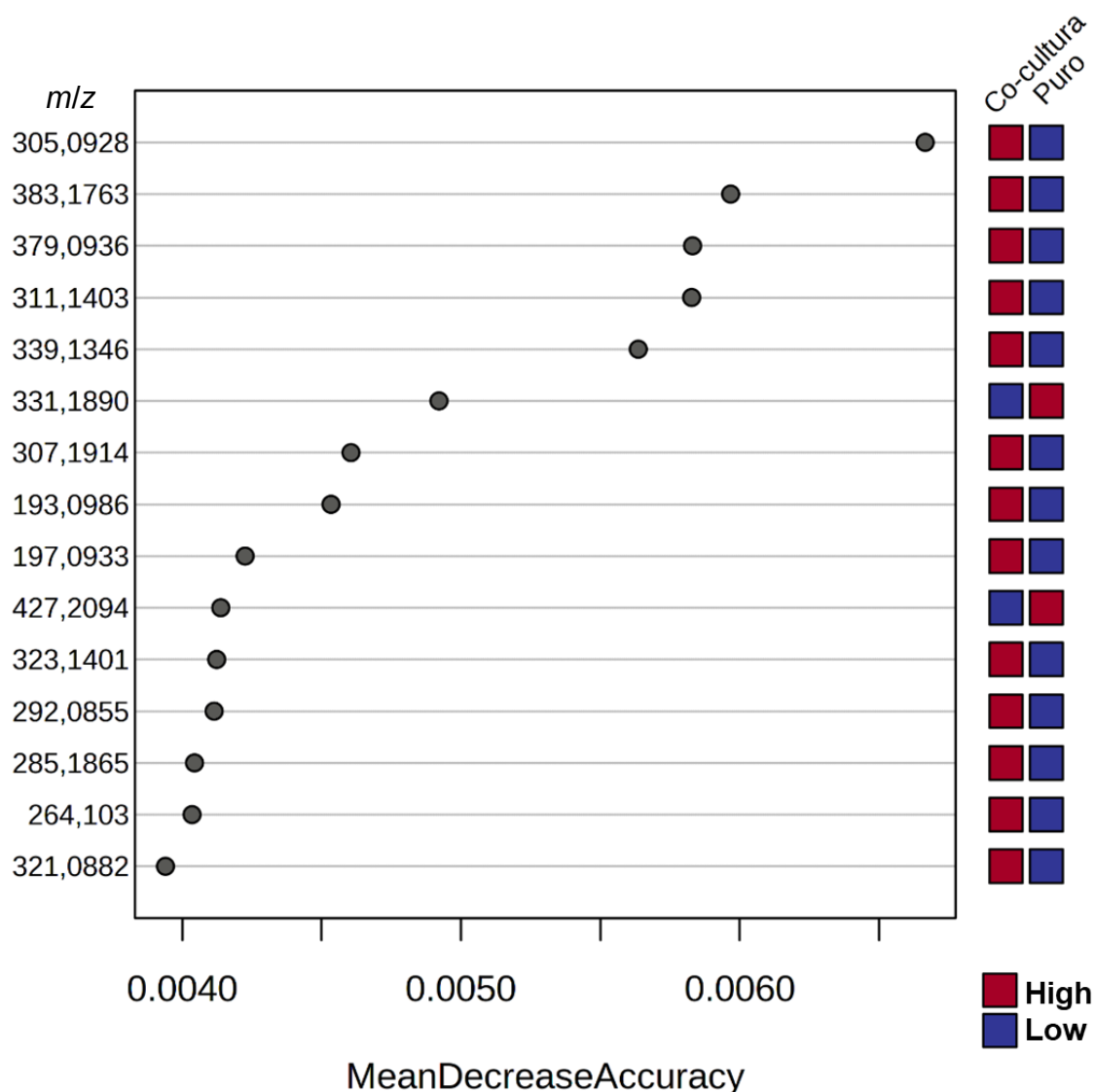


Fonte: MetaboAnalyst.

O classificador *Random Forest* (Figura 21) aponta os metabólitos *m/z* 305,0928 (não anotado), *m/z* 383,1763, *m/z* 339,1346 (família dos derivados de

aminoácidos), m/z 373,0936 e m/z 311,1403 (não anotados) como os principais contribuidores para essa diferenciação, ocorrendo exclusivamente nos ensaios com Czapek em co-cultivo (ensaios 5 e 7).

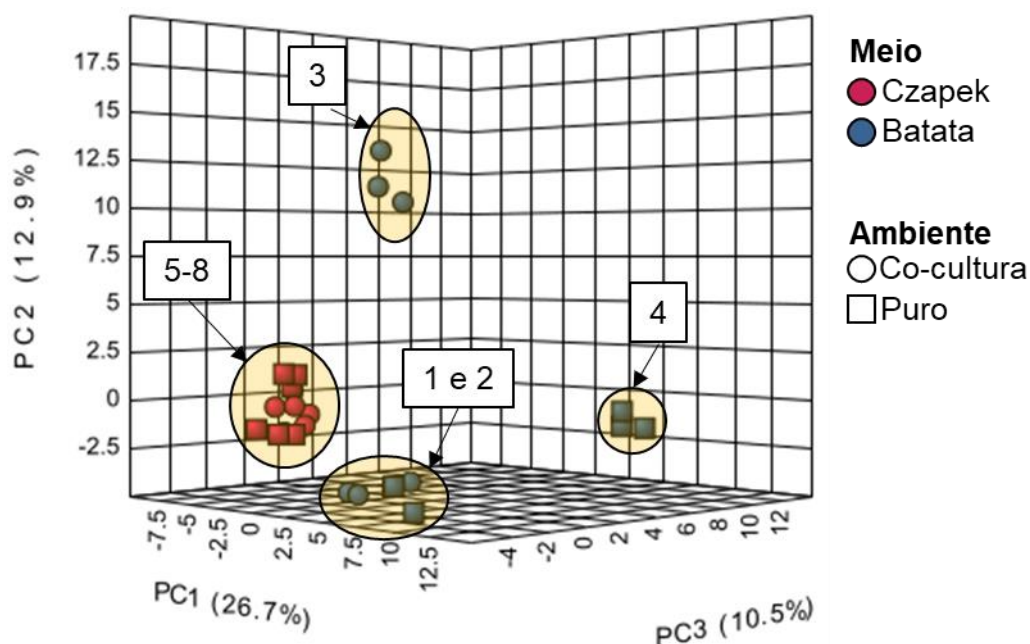
Figura 21 - Classificação por *Random forest* dos metabólitos que mais contribuem para a variação de produção metabólica do endófito GTB-10 *P. javanicum* variando o ambiente de cultivo em co-cultura e puro.



Fonte: MetaboAnalyst.

A projeção tridimensional explica 51,1% da variabilidade entre os experimentos (CP1: 26,7%; CP2: 12,9%; CP3: 10,5%) (Figura 22). Nessa projeção é possível observar a baixa variabilidade entre os experimentos do meio Czapek (ensaios 5-8), a similaridade entre os ensaios 1 e 2, e o alta variabilidade entre os ensaios 3 e 4.

Figura 22 – Gráfico tridimensional da APC, utilizando os CPs 1, 2 e 3.

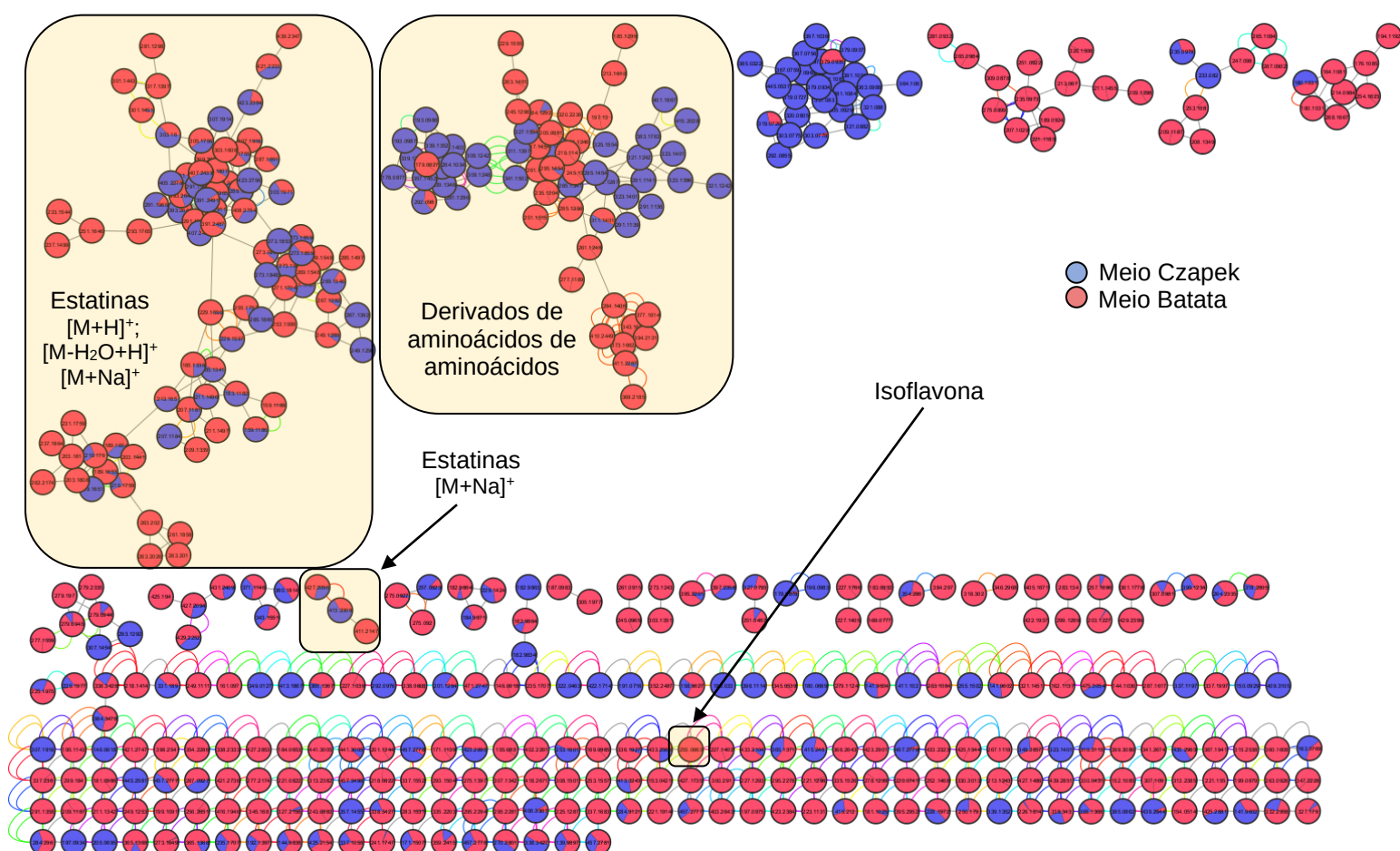


Ainda que os sinais dos metabólitos encontrados no cultivo puro do fitopatógeno tenham sido filtrados antes das análises estatísticas, não é possível inferir com certeza se os sinais exclusivos aos experimentos em ambiente de co-cultivo são produtos do endófito *P. javanicum*, uma vez que a ativação de *clusters* genéticos através de interações em co-cultivo é uma via de mão dupla, podendo ser produto da variação metabólica do fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

4.5 Redes moleculares

As redes moleculares dispostas a seguir são resultados dos métodos computacionais FBMN e MS2LDA, visualizados no software Cytoscape. A correspondência com bibliotecas espectrais e buscas na literatura permitiu a anotação de 15 substâncias, entre elas, estatinas, derivados de aminoácidos e uma isoflavona (Figura 23).

Figura 23 - Famílias moleculares formadas por FBMN e MS2LDA.

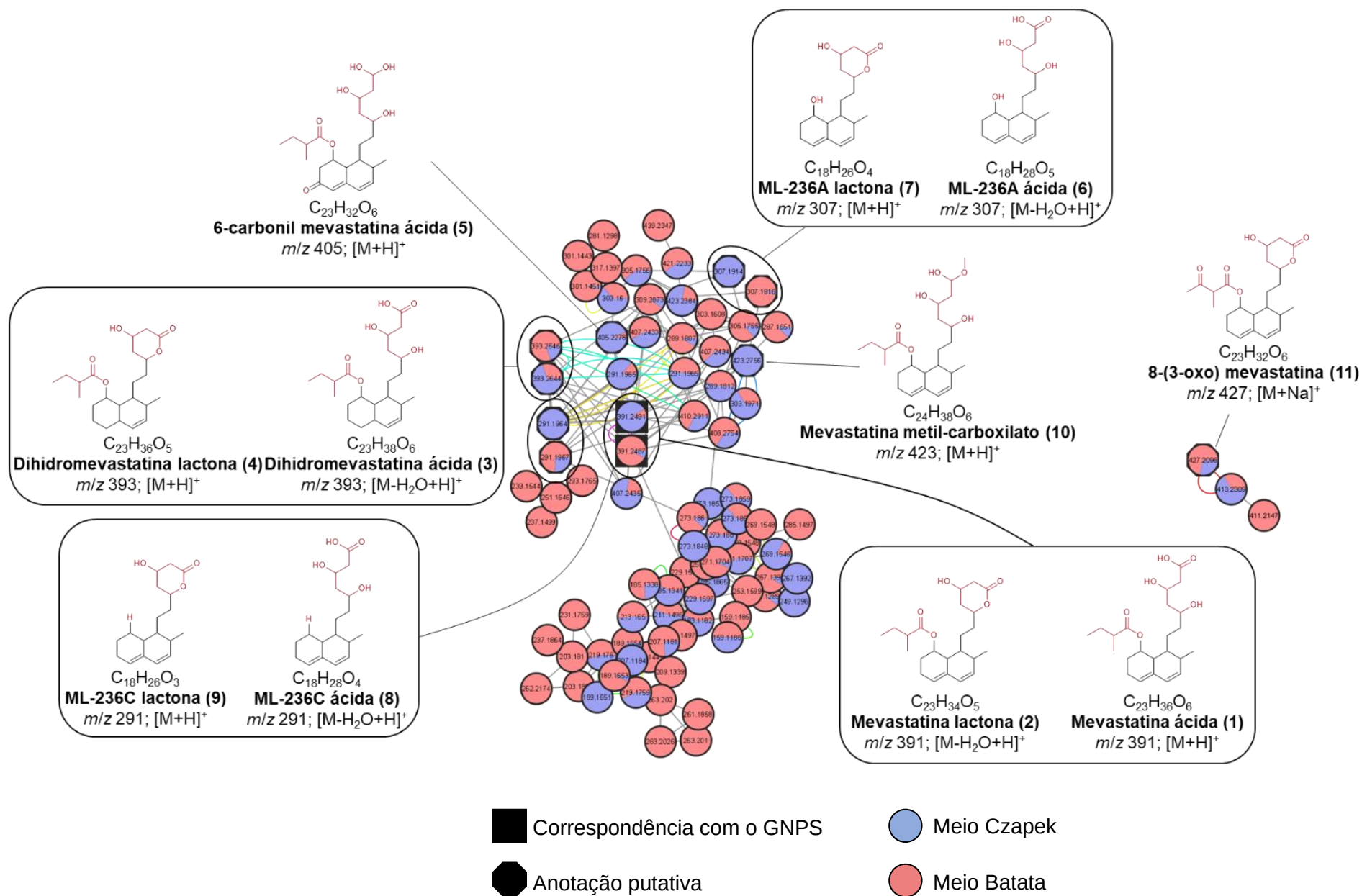


O gráfico dos setores (em cada nodo) representa a proporção de sinais obtidos nos ensaios de Batata (rosa) e Czapek (azul).

4.5.1 Policetídeos – estatinas

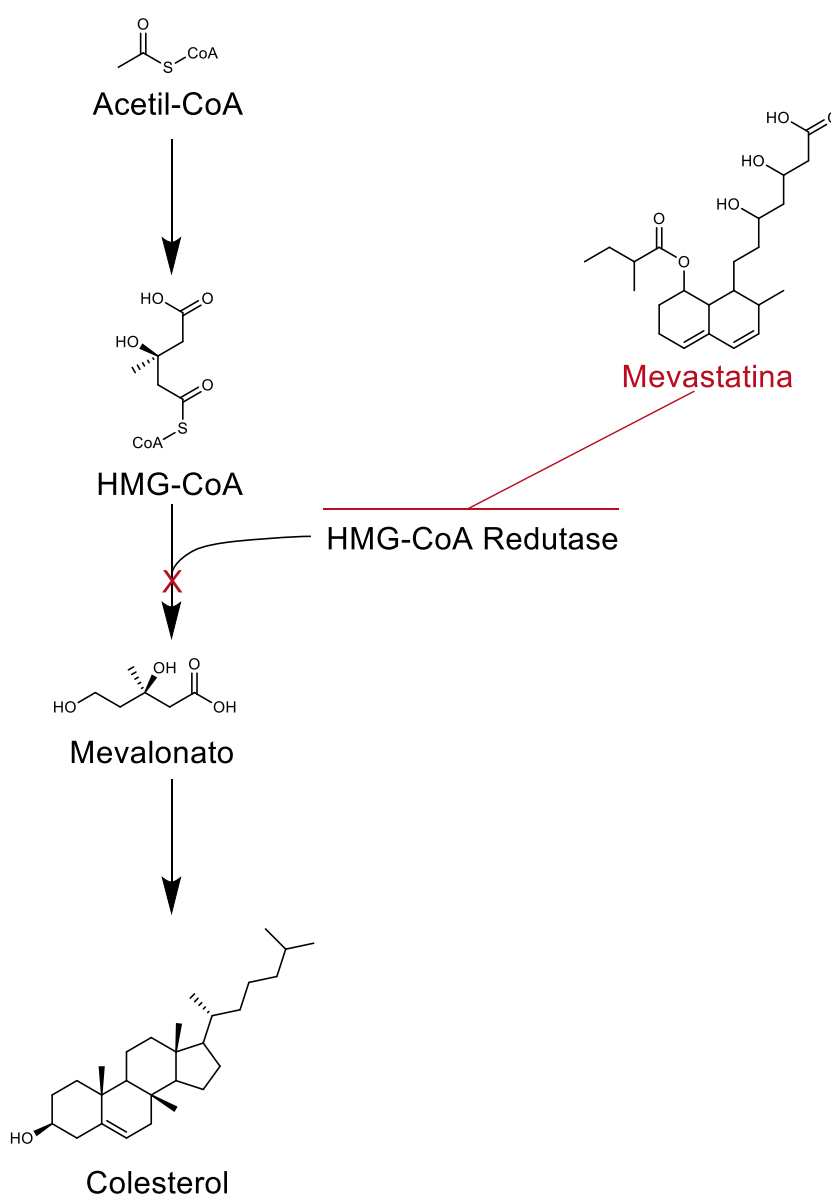
Fungos e bactérias produzem policetídeos (Figura 24) contendo decalinas, com um amplo espectro de atividades biológicas, cuja rota pode ser atribuída a diferentes vias biossintéticas. Algumas propostas envolvem a junção de uma unidade linear de policetídeo, então cicloadicionados por reação Diels-Alder mediada por enzimas policetídeo sintase (PKS), formando os esqueletos decalínicos (KELLY, 2008).

Figura 24 - Representação das redes moleculares dos policetídeos obtidos dos diferentes ensaios OSMAC, visualizado no software Cytoscape.



Fungos endofíticos como *P. javanicum* são capazes de produzir policetídeos cíclicos da classe farmacológica das estatinas, cuja principal atividade de interesse humano é inibir a enzima 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGR), que catalisa uma importante etapa na biossíntese do colesterol (CORSINI; MAGGI; CATAPANO, 1995; ISTVAN; DEISENHOFER, 2001) (Figura 25).

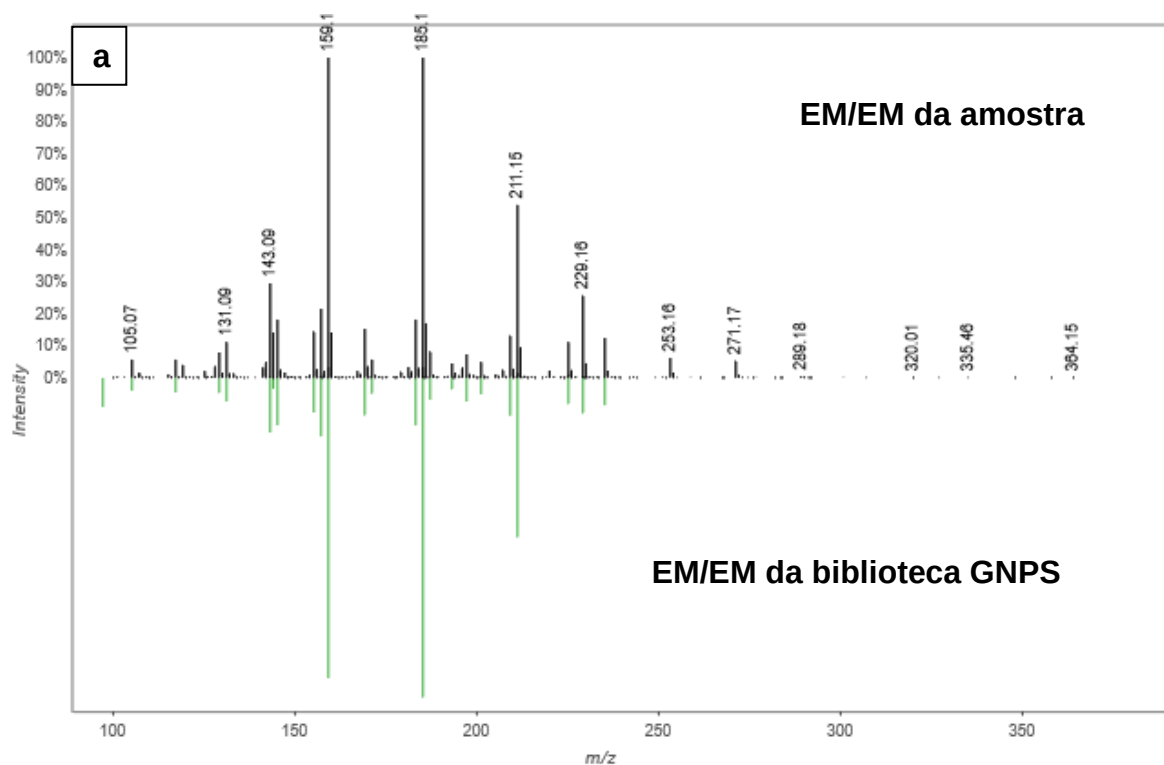
Figura 25 - Efeito de estatinas naturais na via biossintética de colesterol.

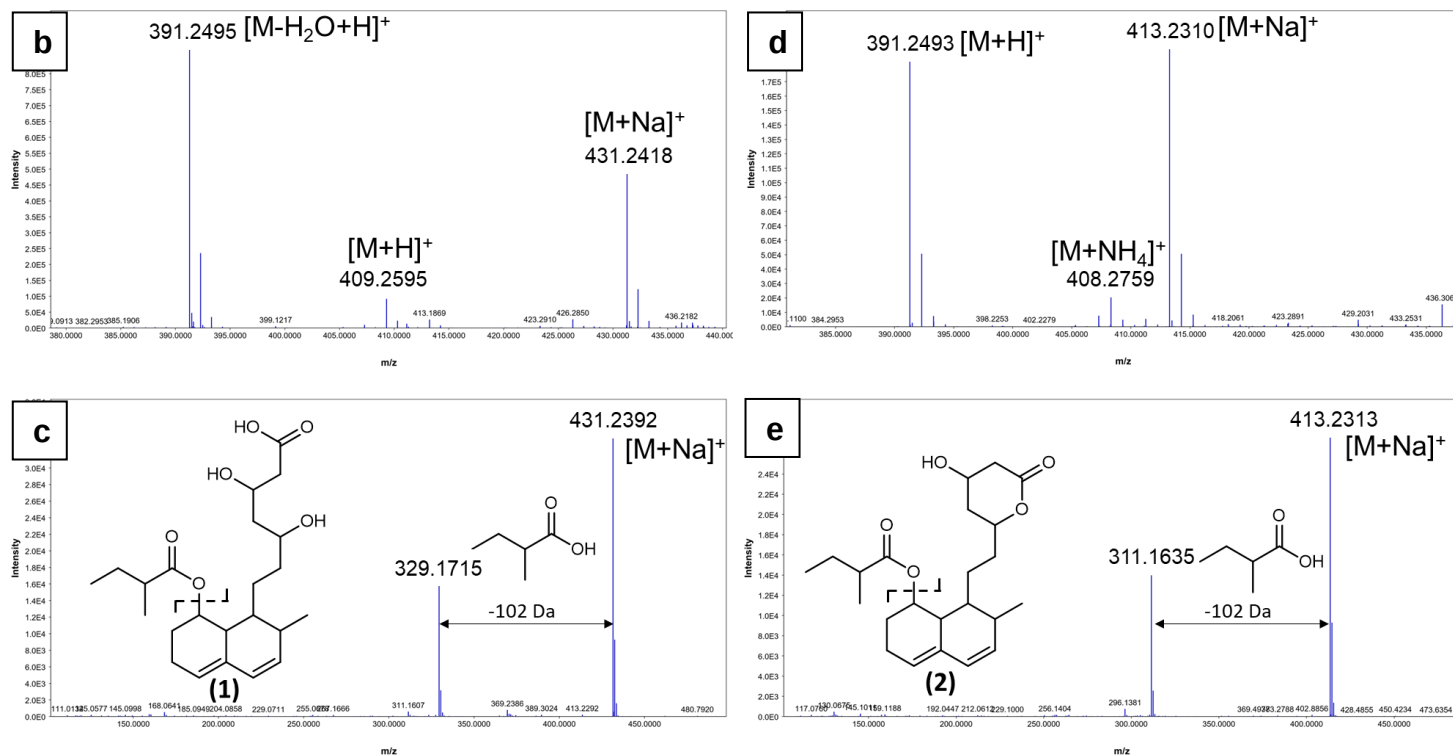


A correspondência com as bibliotecas do GNPS (cosseno: 0,92, Figura 26a) auxiliou na anotação das substâncias mevastatina ácida (**1**) e mevastatina lactona

(**2**), que são caracterizadas como produtos de espécies do gênero *Penicillium* (CHAKRAVARTI; SAHAI, 2004). Mesmo sendo observadas com idênticos íons precursores m/z 391 ((**1**) $[M-H_2O+H]^+$; (**2**) $[M+H]^+$), são facilmente diferenciadas pelo tempo de retenção e identificação do aduto $[M+Na]^+$ ((**1**) tr 7,1; m/z 431; (**2**) tr 7,9; m/z 413). Sob condições normais de ESI^+ , essa classe de substâncias produz muitos íons protonados e sodiados. Fragmentos com o aduto de sódio costumam não conter muita informação na análise por espectrometria de massas, mostrando apenas um íon relativo à saída do grupo éster (Figura 26b-e) (CHAKRAVARTI; SAHAI, 2004). A substância **2** foi detectada em todos os ensaios OSMAC, enquanto **1** não foi detectada apenas nas amostras do ensaio 3.

Figura 26 - Espectros de massa das substâncias mevastatina ácida (**1**) e mevastatina lactona (**2**).

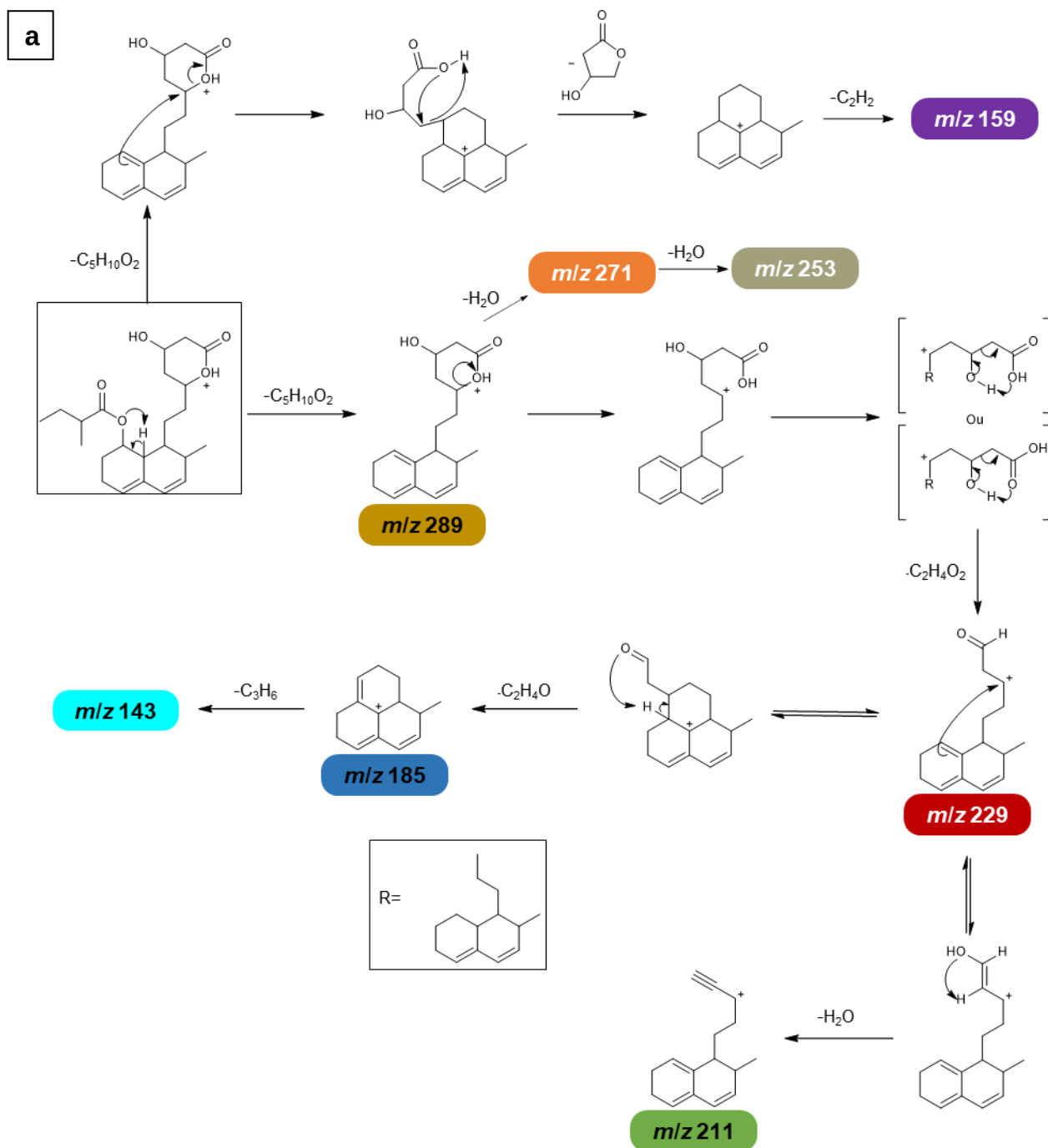


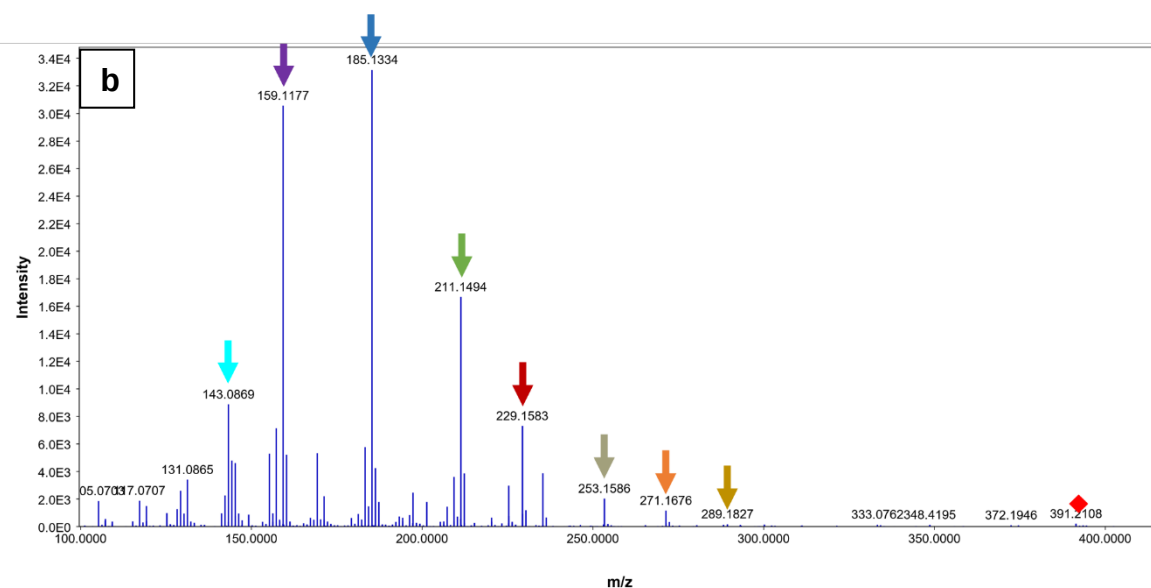


a) Correspondência espectral com as bibliotecas do GNPS. **b)** Espectro de massa da substância 1, sendo **c)** o EM/EM do aduto de sódio dessa substância. **d)** Espectro de massas da substância 2, sendo **e)** seu EM/EM do aduto de sódio.

A proposta de fragmentação das formas protonadas está disposta a seguir, adaptado de um estudo realizado em substâncias análogas (WANG; WU; ZHAO, 2001). As cores indicadas para os fragmentos m/z correspondem às setas no espectro EM/EM. Para fins de simplificação, as figuras ilustram a forma lactona, que se fragmenta de forma idêntica às formas $[M-H_2O+H]^+$ (Figura 27).

Figura 27 - Relação entre proposta de fragmentação e os picos EM/EM observados.





a) Proposta de mecanismo de fragmentação da mevastatina lactona. **b)** Espectro EM/EM da mevastatina lactona. Setas de diferentes cores indicam correspondência da proposta ao pico observado.

As formas isoméricas ácido/lactona são comuns em estatinas naturais, sendo a forma ácida bioativa (LI; KUSARI; SPITELLER, 2014). A maioria dos análogos da mevastatina detectadas nesse estudo foram encontrados nas duas formas, sendo que os ácidos aparecem com menor tempo de retenção devido ao modo cromatográfico aplicado. As substâncias **1** e **3** (ativas) não foram detectadas nas amostras do ensaio 3 (Figura 28), enquanto **2** e **4** (inativas) aparecem em todos os ensaios.

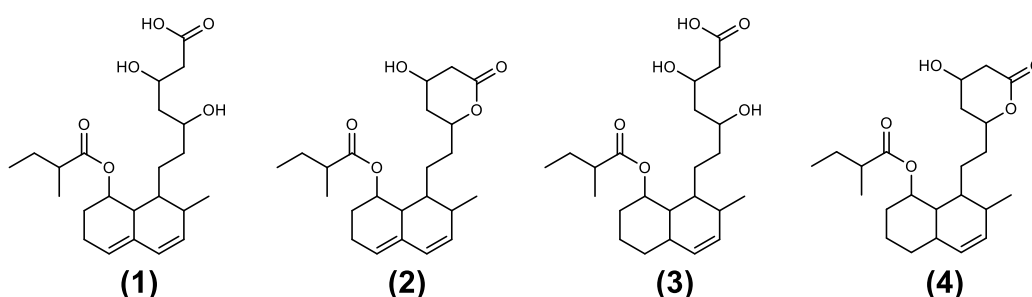
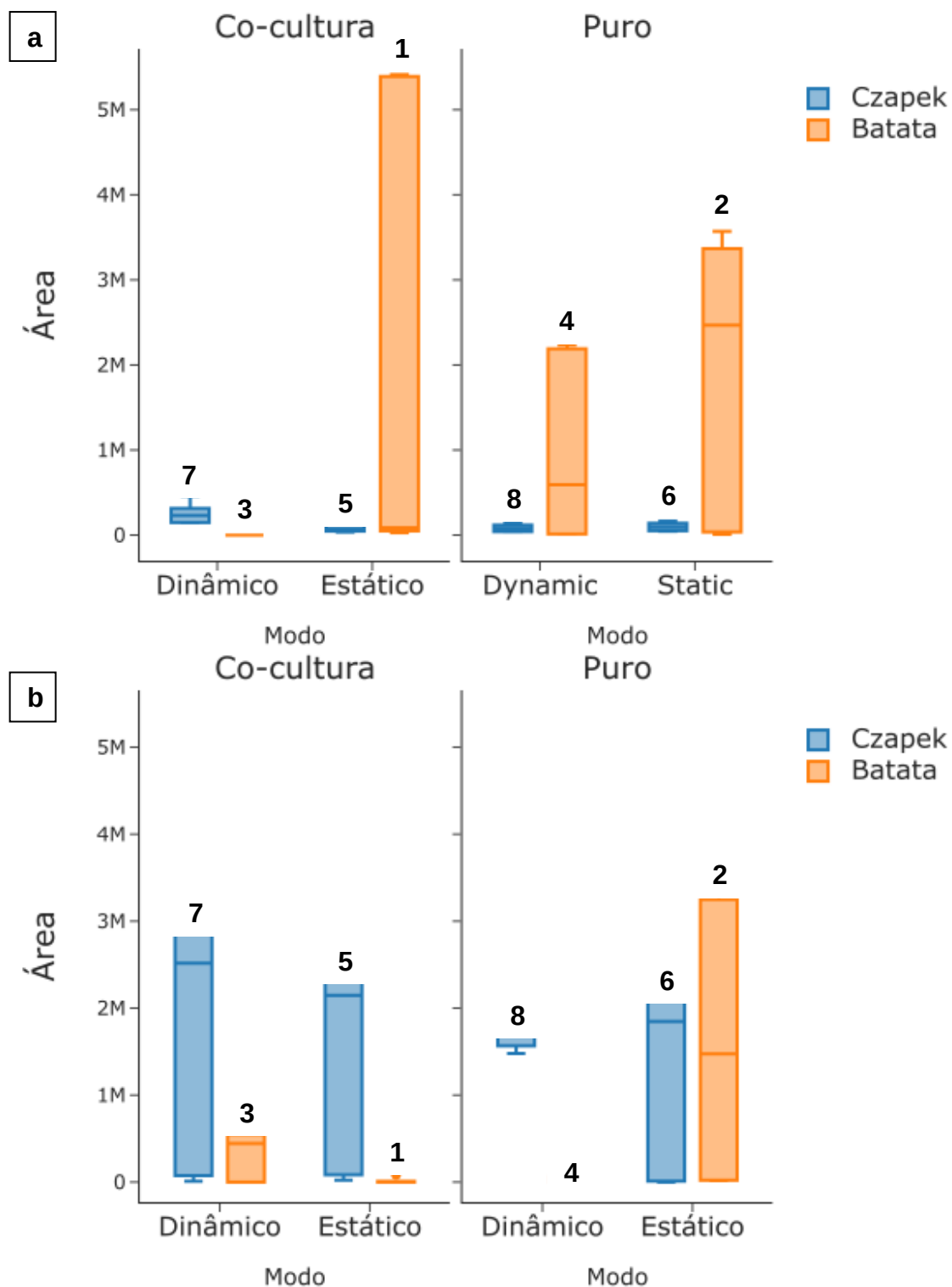


Figura 28 - Gráficos box-plot da quantificação dos features correspondentes às substâncias mevastatina ácida (1) e lactona (2).

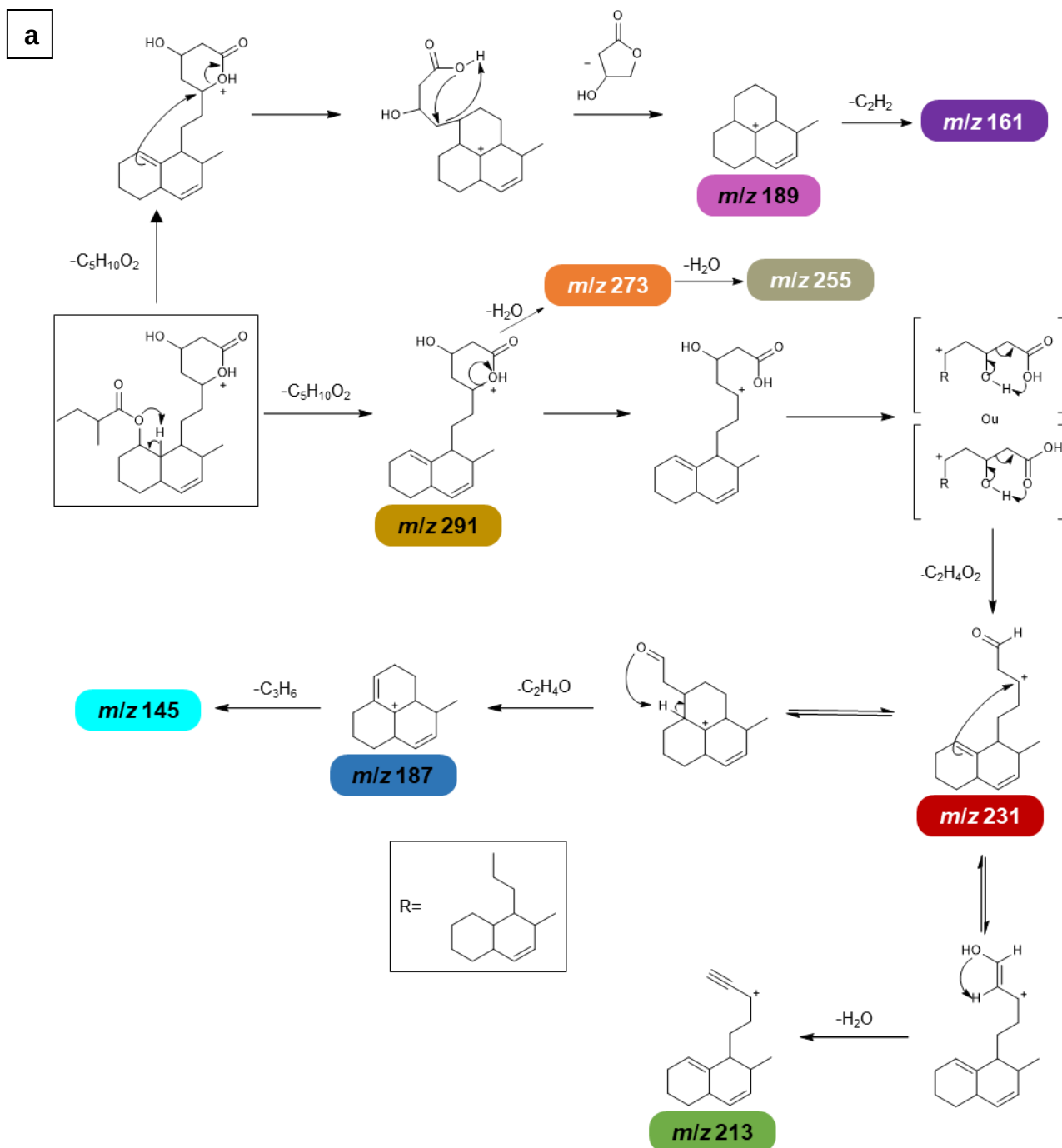


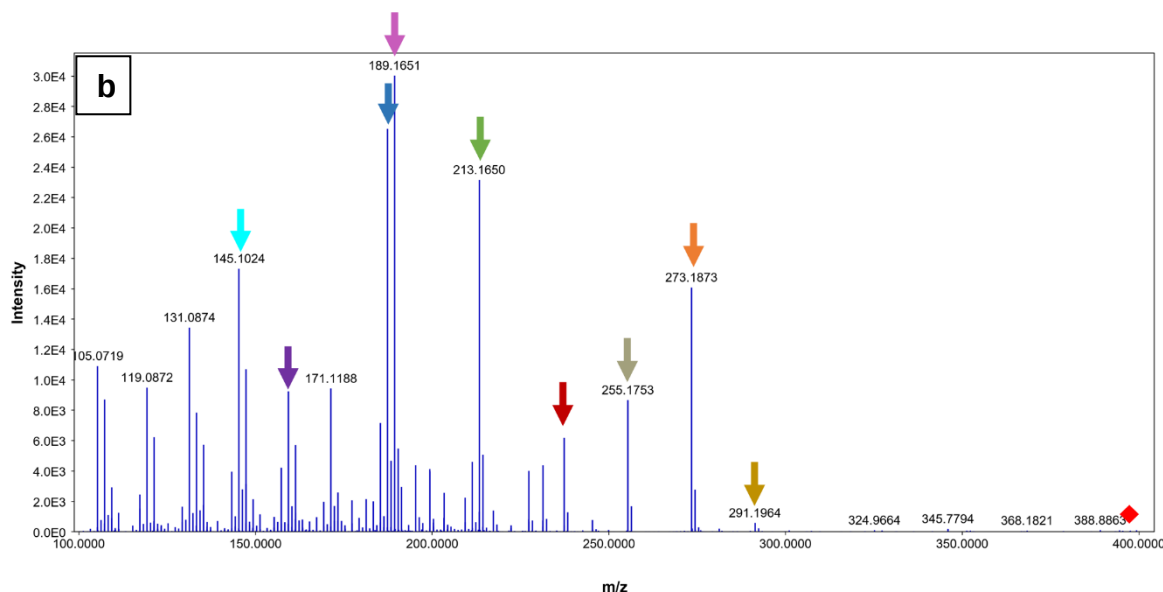
Os números se referem ao planejamento OSMAC correspondente. **a)** área do feature do composto mevastatina ácida (1). **b)** área do feature do composto mevastatina lactona (2).

Fonte: FBMN Interactive Plotting.

Relacionados às mevastatinas, os íons precursores m/z 393,2646 apresentam uma diferença adicional de massa de 2 Da, compatível com a saturação de uma das ligações duplas da decalina observada no composto dihidromevastatina ácida **(3)** $[M-H_2O+H]^+$ (erro: 2,8 ppm) e dihidromevastatina lactona **(4)** $[M+H]^+$ (erro: 2,29 ppm) (Figura 29, Tabela 6). A substância já havia sido identificada dentro do gênero *Penicillium*, e mostrou potência similar à mevastatina na inibição da enzima HMG-CoA (LAM et al., 1981).

Figura 29 - Relação entre proposta de fragmentação e os picos EM/EM observados.





a) Proposta de mecanismo de fragmentação da dihidromevastatina lactona. b) Espectro EM/EM. Setas de diferentes cores indicam correspondência da proposta ao pico observado.

O composto 6-carbonil mevastatina ácida (**5**) foi identificado putativamente pelos sinais em 405,2278 m/z $[M-H_2O+H]^+$ (erro: 1,23 ppm) e 423,2390 m/z $[M+H]^+$, juntamente com o seu aduto 445,2212 m/z $[M+Na]^+$ (Tabela 6). O único pico da fragmentação da molécula sodiada mostra uma perda de 102 Da, indicando a saída do grupo éster idêntico ao da mevastatina (**1-4**). A forma lactona não foi detectada com intensidade suficiente para gerar fragmentos EM/EM e *features*. Essa substância nunca foi relatada como produto natural, mas como subproduto da síntese de análogos da mevastatina (TURABI et al., 1995).

Não há relatos de bioatividade para essa substância, mas uma vez sendo observada em sua forma ácida, hipoteticamente competiria pelo substrato de HMGR. O levantamento de informações em bancos de dados como *Dictionary of Natural Products* e *Scifinder* não apresentou resultados para a fragmentação EM/EM. O mecanismo de fragmentação foi proposto na Figura 30, baseado em padrões já discutidos para os policetídeos.

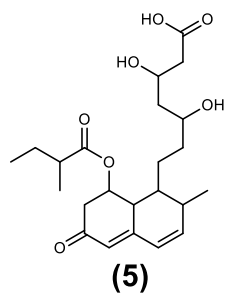
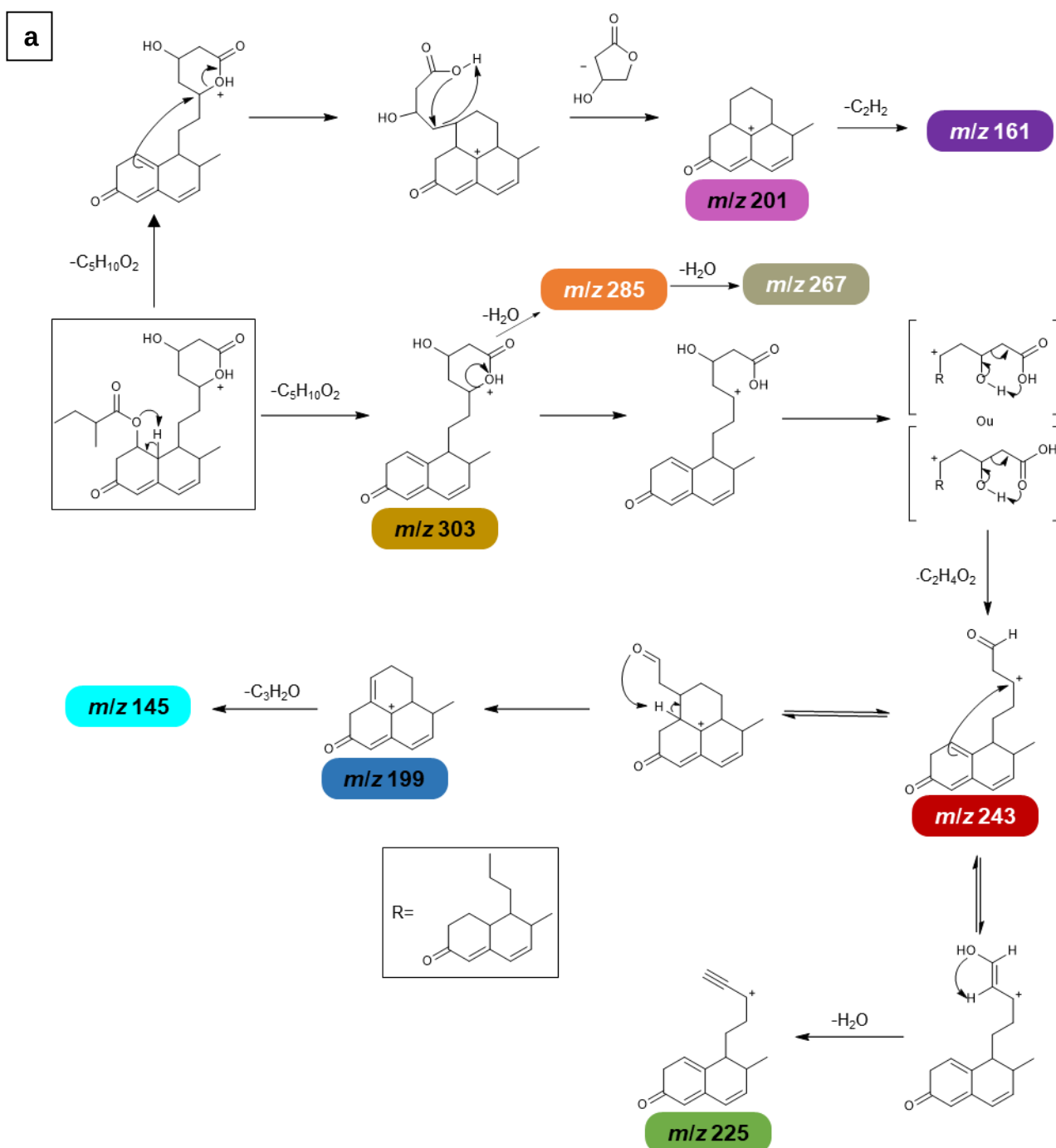
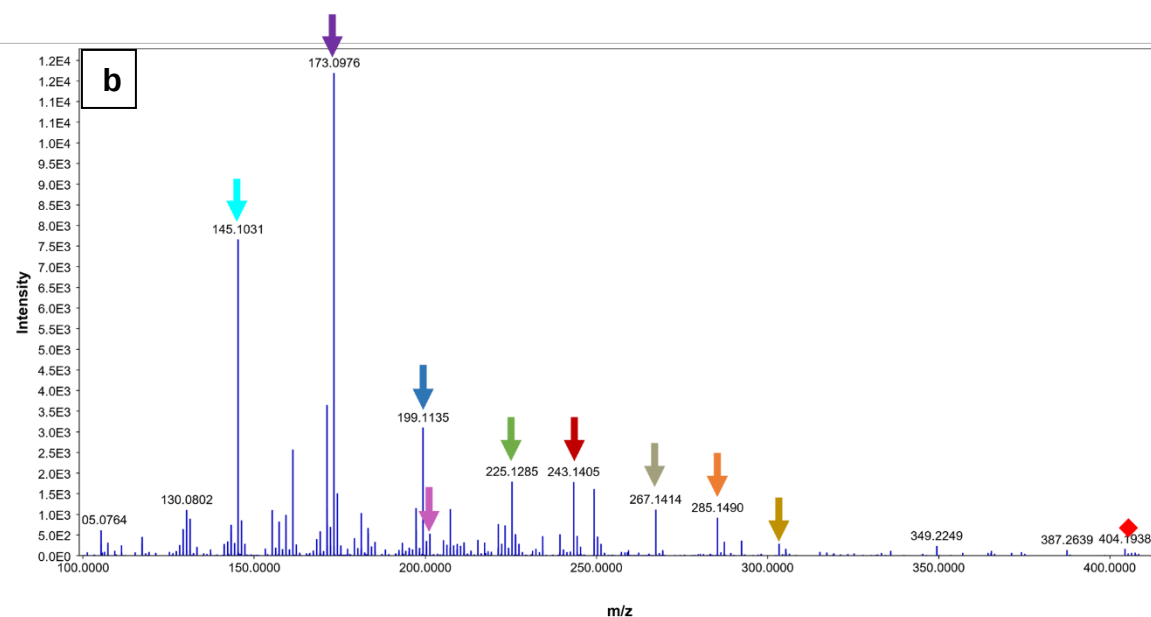


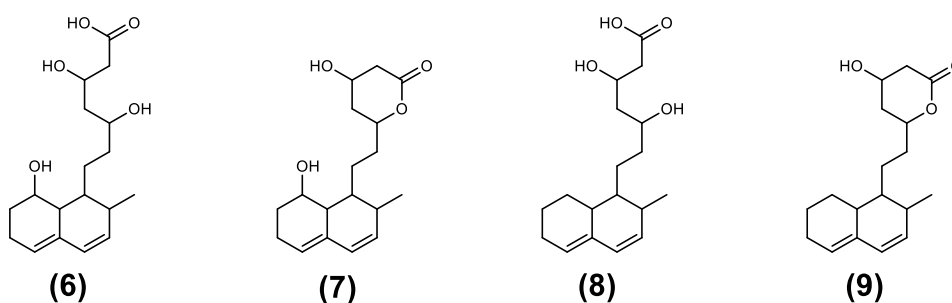
Figura 30 - Relação entre proposutura de fragmentação e os picos EM/EM observados.





a) Proposta de mecanismo de fragmentação da 6-carbonil mevastatina lactona. **b)** Espectro EM/EM da 6-carbonil-mevastatina lactona. Setas de diferentes cores indicam correspondência da proposta ao pico observado.

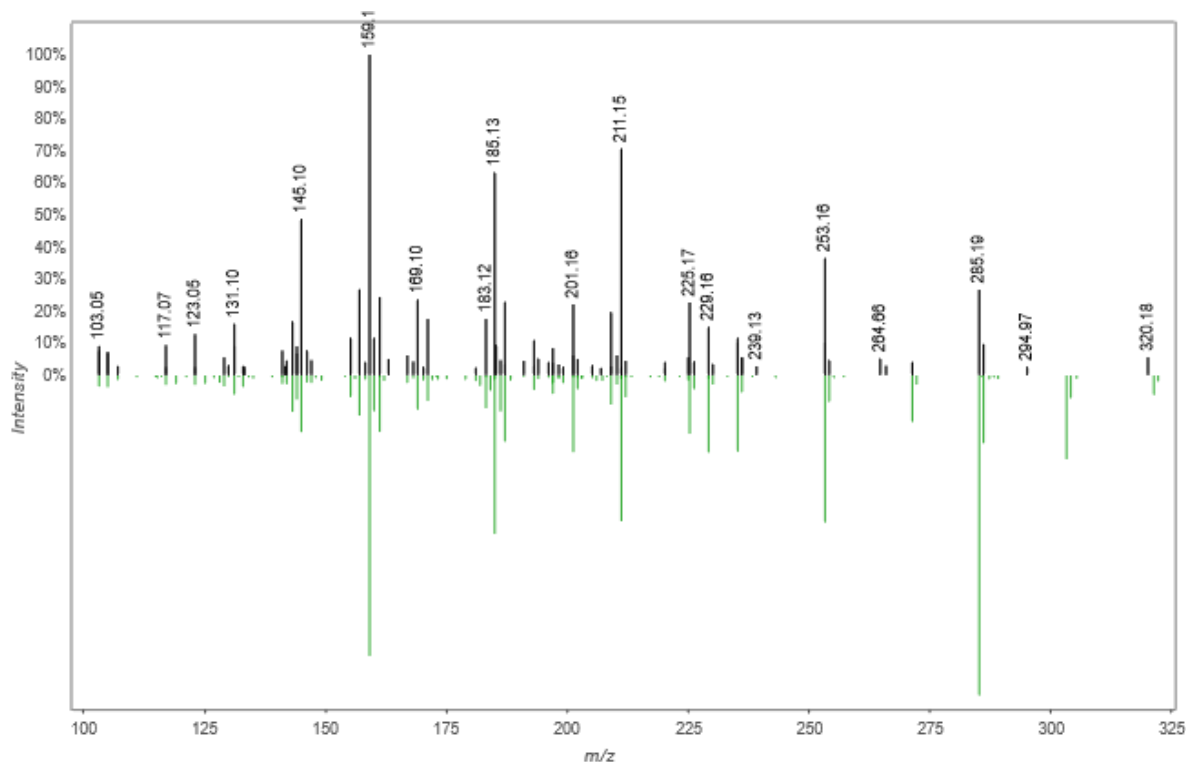
Outros policetídeos detectados nessa família molecular foram ML-236A (forma ácida) **(6)** (erro: 3,25 ppm) nos ensaios 5, 7 e 8, ML-236A (forma lactona) **(7)** (erro: 4,56 ppm) nos ensaios 5-8, ML-236C (forma ácida) **(8)** (erro: 2,75 ppm) e ML-236 (forma lactona) **(9)** (erro: 2,78 ppm) nos ensaios 2, 4-8 (Tabela 6). Essas substâncias já foram relatadas co-ocorrendo com a mevastatina (também conhecida como ML-236B) em culturas de fungos do gênero *Monascus* e *Penicillium* (BROWN et al., 1976; OKAMOTO et al., 2004).



A correspondência desses dados com a biblioteca do GNPS (cosseno: 0,77; Figura 31) permitiu a anotação da substância mevastatina metil-carboxilato **(10)** (erro: 3,14 ppm), detectada apenas no ensaio 7 (Czapek, modo dinâmico, cultura pura) (Tabela 6). O espectro EM/EM e a rota de fragmentação proposta estão na

Figura 32. O levantamento bibliográfico relata essa substância como subproduto da síntese da mevastatina (ROSEN; HEATHCOCK, 1985).

Figura 31 - Correspondência espectral da substância mevastatina metil-carboxilato (10) com as bibliotecas do GNPS.



Detectada nos ensaios 4-8, a substância 8-(3-oxo) mevastatina (**11**) foi putativamente anotada de acordo com a fragmentação do sinal m/z 427 $[M+Na]^+$ (erro: -0,23 ppm) (Tabela 6). Seu espectro EM/EM (Figura 33) apresenta sinal m/z 311, que corresponde a perda de 116 Da, atribuída ao grupo 2-metil-3-oxobutanato. Não foi possível definir a posição da carbonila, todavia, foi inferida de acordo com o análogo monacolina X (**XXI**) (ENDO et al., 1985).

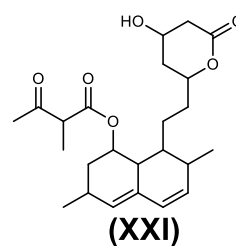
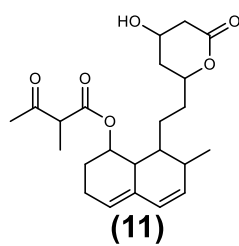
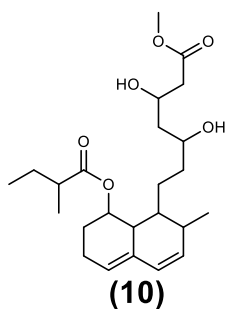


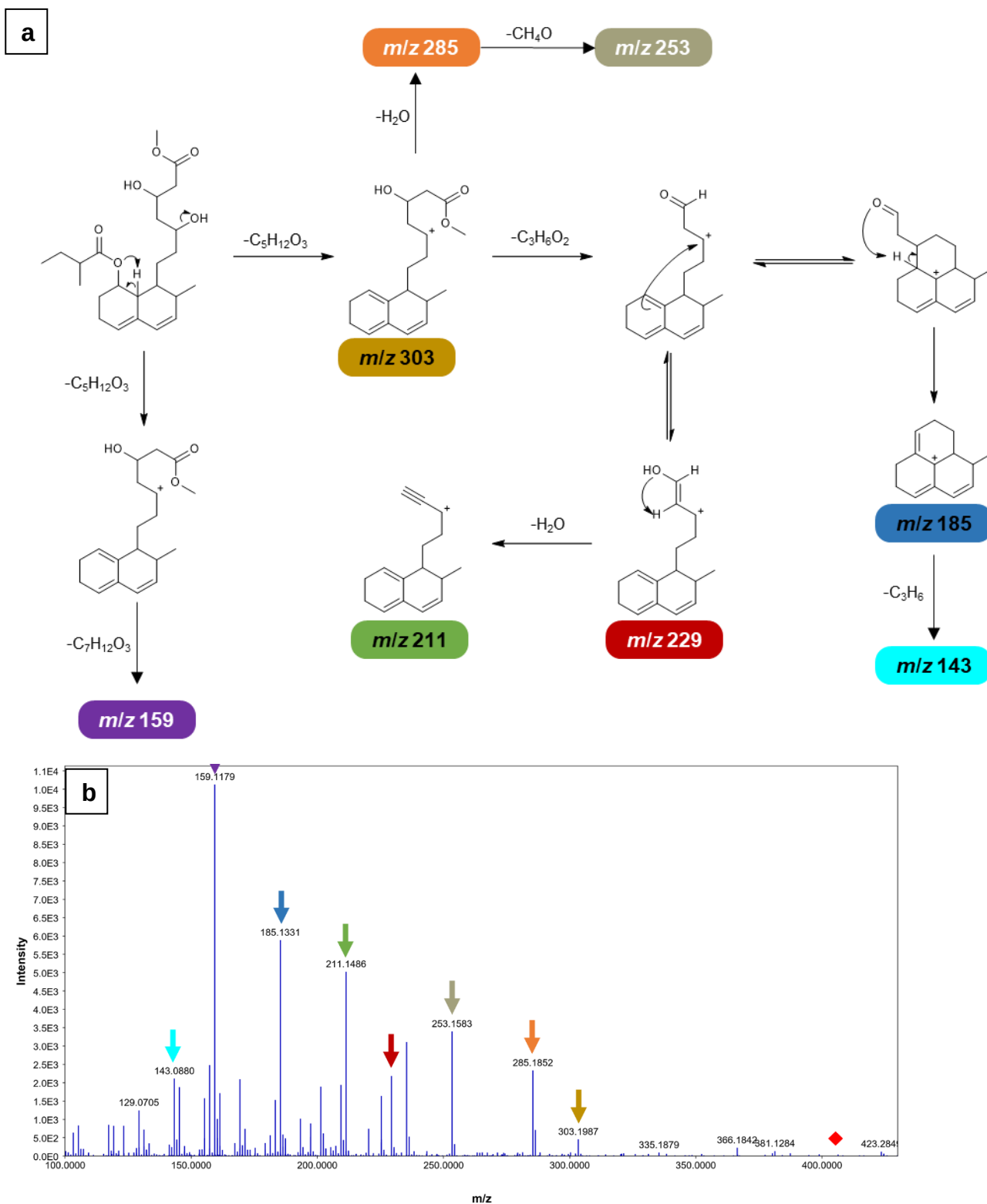
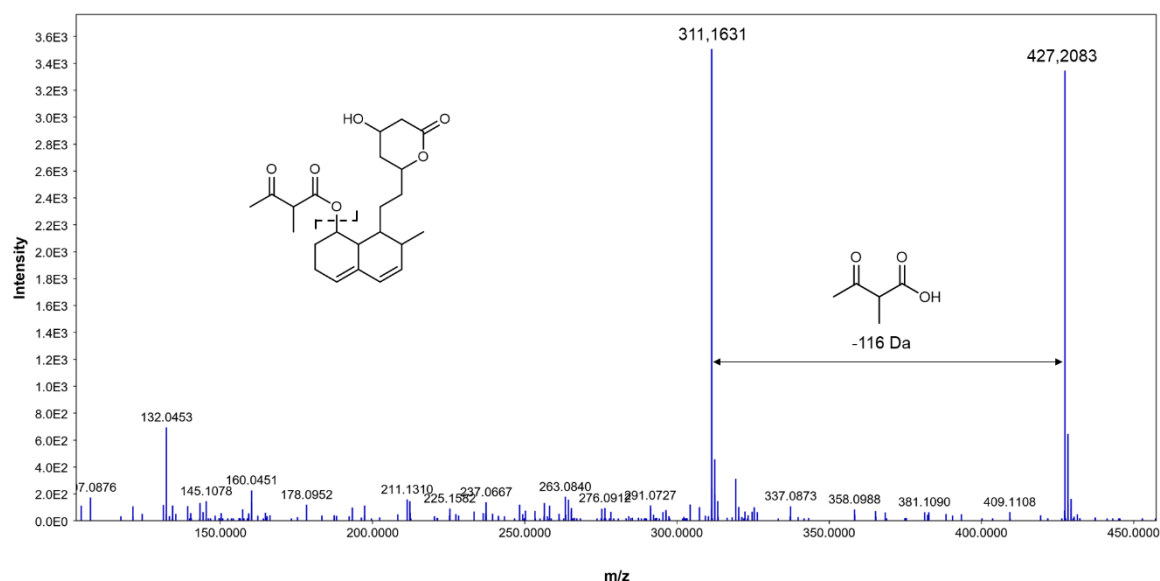
Figura 32 - Relação entre proposutura de fragmentação e os picos EM/EM observados.**a)** Proposta de mecanismo de fragmentação da metilglucuronide. **b)** Espectro EM/EM. Setas de diferentes cores indicam correspondência da proposta ao pico observado.

Figura 33 - Espectro EM/EM do sinal m/z 427 $[M+Na]^+$ da 8-(3-oxo) mevastatina (**11**).

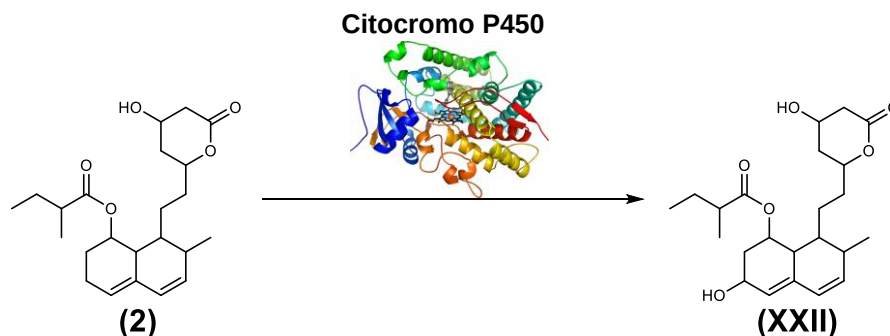


4.5.1.1 Hidroxilação da mevastatina

Apesar dos efeitos inibitórios de HMG-CoA em ensaios *in vitro*, a mevastatina não é indicada para uso terapêutico devido a efeitos colaterais indesejados (SERAJUDDIN; RANADIVE; MAHONEY, 1991). No entanto, desde os anos 90, pesquisadores têm avaliado seu potencial produtivo através da fermentação de fungos e sua biotransformação em pravastatina (**XXII**), um análogo com níveis seguros de toxicidade em humanos devido à maior seletividade tecidual (TSUJITA et al., 1986).

Esse análogo é caracterizado por uma β -hidroxilação na posição 8 da decalina intermediado por bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Bacillus*, entre outras (SYED; PONNUSAMY, 2018) (Figura 34). Todavia, esse processo fermentativo possui alguns problemas, fazendo com que estudos para encontrar uma linhagem fúngica capaz de produzir diretamente essa estatina sejam muito importantes (SEYDAMETOVA; ZAINOL, 2021).

Figura 34 - Hidroxilação da mevastatina (**2**) em pravastatina (**XXII**) por um sistema citocromo P450.



Vários sinais m/z 407 estão presentes na família das estatinas. O cálculo de massa molecular indicou a fórmula $C_{23}H_{34}O_6$ (erro: 1,7 ppm), correspondendo à adição de um grupo hidroxílico à mevastatina. Os únicos relatos da produção direta da pravastatina (**XXII**) pertencem a fungos do gênero *Penicillium* isolados da rizosfera de manguezais tropicais (áreas alagadas, como o Pantanal) (EMINE et al., 2015). Para confirmar a presença ou ausência dessa substância, uma pravastatina sódica comercial (Medley, 20 mg) foi analisada em CL-EM/EM usando os mesmos métodos de aquisição de dados descritos no **item 3.5** (solubilizado em acetonitrila na concentração de 500 ppm) e comparada com as amostras fúngicas. Para isso, foi formado um *BPC* para comparar os tempos de retenção dos sinais m/z 447 entre as amostras dos extratos de *P. javanicum* (GTB-10) (Figura 35) e o fármaco (Figura 36).

Figura 35 - BPC dos extratos de *P. javanicum* reunidas. Amplitude de m/z : 407,2395-407,2461.

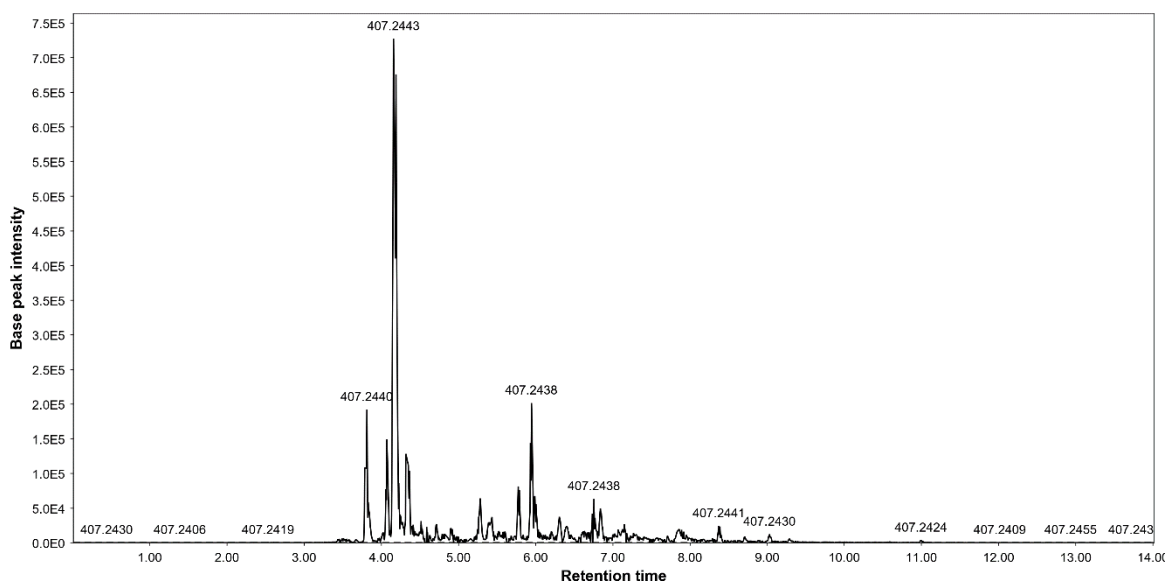
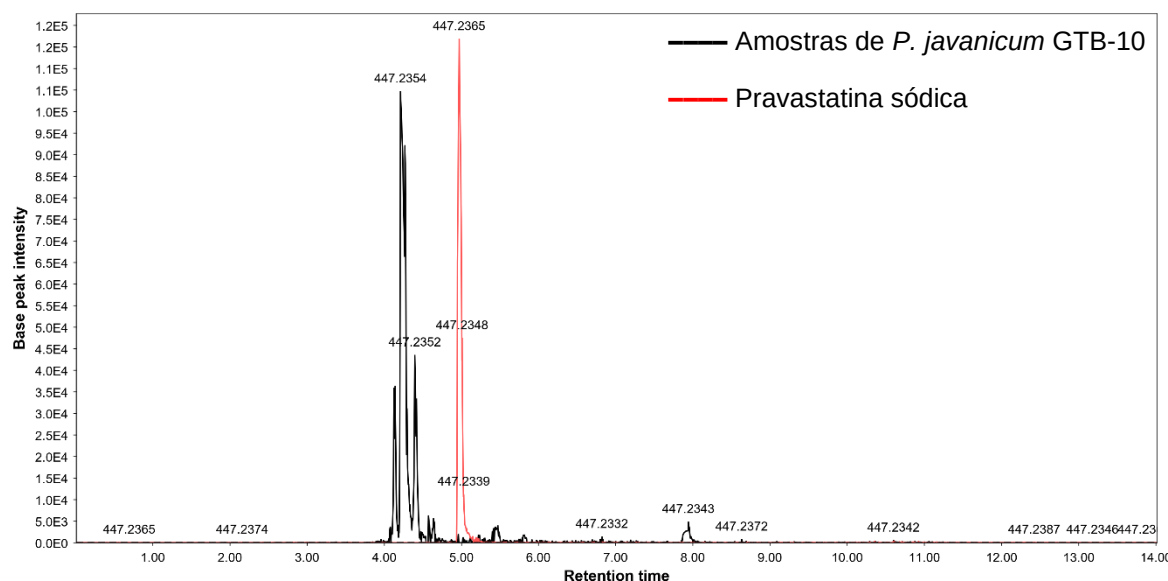
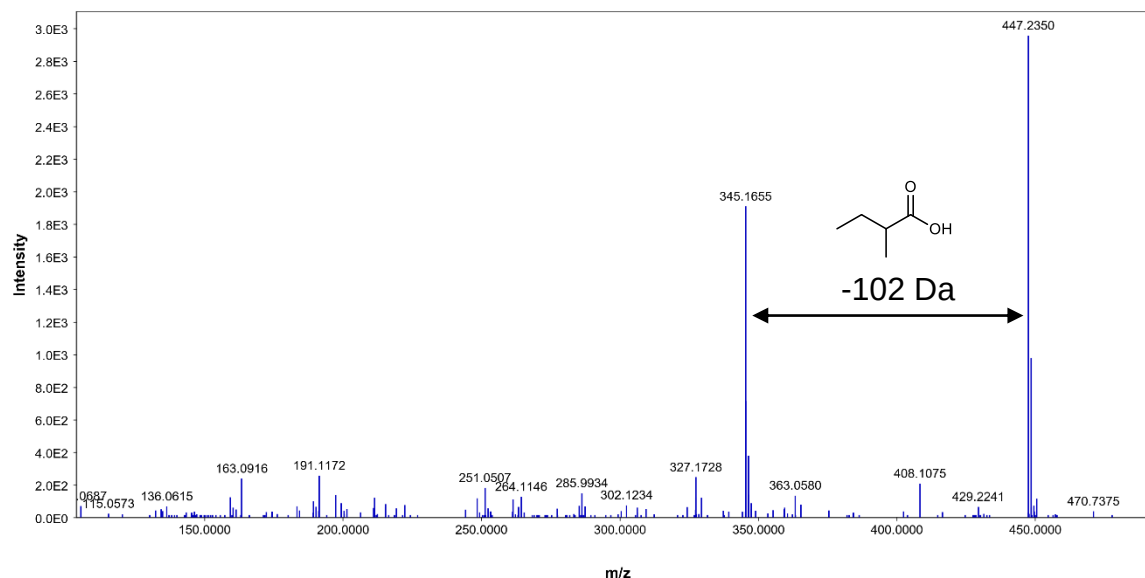


Figura 36 - BPC em amplitude de m/z : 447,2317-447,2389, correspondente ao padrão pravastatina sódica.



Observa-se que a ausência de co-eluição com o pico da pravastatina comercial evidencia que os derivados produzidos pelo endófito não possuem exatamente o mesmo padrão de substituição e/ou estereoquímica, sendo necessárias análises complementares para a caracterização estrutural desses isômeros. É possível descartar a presença da hidroxila no grupo éster devido à sua fragmentação EM/EM, através do fragmento m/z 345 (-102 Da), equivalente à saída do grupo α -metilbutirato ($C_5H_{10}O_2$) idêntico às mevastatinas (**1-4**) (Figura 37).

Figura 37 - Espectro EM/EM do sinal m/z 447 observado em todos os isômeros nas amostras OSMAC.



A interpretação dos sinais dos isômeros m/z 407 é desafiadora, já que as estatinas possuem uma alta fragmentação na fonte durante o método CL-EM/EM- ESI^+ utilizado, fazendo com que sinais dos íons precursores se percam e não atinjam a intensidade determinada para obtenção dos espectros EM/EM ou detecção de *features*. Essa característica também se aplica para os sinais presentes na Tabela 6.

Tabela 6 - Sinais agrupados na família dos policetídeos. Em parênteses estão os íons fragmento dos adutos sodiados.

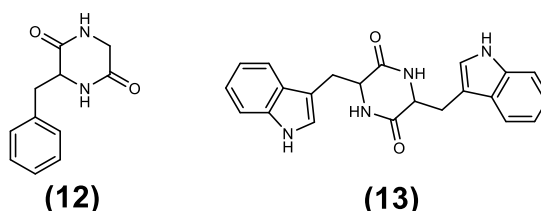
nº	m/z observado	tr (min)	Ensaio OSMAC	Anotação	Adutos	Fórmula molecular	m/z calculado	Erro (ppm)	Íons fragmento (m/z)
1	391,2487; 431,2407	7,09	1; 2; 4; 5; 6; 7; 8	Mevastatina ácida	[M-H ₂ O+H] ⁺ ; [M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₆ O ₆	391,2479; 431.2404	2,04; 0,69	159; 185; 211; 143; 229; 271 (329)
2	391,2492; 408,2754; 413,2309	7,91	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8	Mevastatina lactona	[M+H] ⁺ ; [M+NH ₄] ⁺ ; [M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	391,2479; 408,2744; 413.2298	3,32; 2,66; 2,44	159; 185; 211; 143; 229; 271 (311)
3	393,2646; 433,2567	7,76	1; 2; 4; 5; 6; 7; 8	Dihidromevastatina ácida	[M-H ₂ O+H] ⁺ ; [M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₈ O ₆	393,2635; 433.2561	2,8; 1,38	189; 187; 213; 273 (331)
4	393,2644; 410,2911; 415,2460	8,54	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8	Dihidromevastatina lactona	[M+H] ⁺ ; [M+NH ₄] ⁺ ; [M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₆ O ₅	393,2635; 410,2901; 415,2455	2,29; 2,44; 1,20	189; 187; 213; 273 (313)
5	405,2278; 423,2390; 445,2212	4,63	4;5;6;7;8	6-carbonil mevastatina ácida	[M-H ₂ O+H] ⁺ ; [M+H] ⁺ ; [M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	405,2272	1,23	173; 145; 199; 201; 225; 243; 267; 285; 161 (343)
6	307,1914	3,21	5;7;8	ML-236A (forma ácida)	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ O ₅	307,1904	3,25	159; 271; 211; 243; 185; 289; 253
7	307,1918	5,10	5;6;7;8	ML-236A (forma lactona)	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	307,1904	4,56	159; 271; 211; 243; 185; 289; 253
8	291,1963	4,74	2;7;8	ML-236C (forma ácida)	[M-H ₂ O+H] ⁺ ; [M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	291.1955; 309.2060	2,75; 2,26	189; 145; 213; 173
9	291,1966	5,30	2;4;5;6;7;8	ML-236C (forma lactona)	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	291.1955	2,78	189; 145; 213; 173
10	423,2756; 445,2580	8,05	7	Mevastatina metil-carboxilato	[M+H] ⁺ ; [M+Na] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	423,2741; 445,2566	3,54; 3,14	159; 185; 211; 235; 253; 258 (343)
11	427,2096	6,68	4;5;7	8-(3-oxo) mevastatina	[M+Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	427,2097	-0,23	(331)
-	281,1298	3,00	1; 2; 3	N/A	-	-	-	-	187; 160; 133
-	269,1548	3,53	4	N/A	-	-	-	-	209; 167; 155; 181; 141; 195
-	237,1864	3,77	1; 2; 3	N/A	-	-	-	-	105; 107; 159;145; 135; 201; 219
-	203,1808*	3,99	4	N/A	-	-	-	-	119; 147; 105; 133
-	407,2434*	4,01	1;2;3;4;5;7;8	N/A	-	-	-	-	245; 201; 183; 157; 161; 217; 227; 269; 287; 133; 305
-	407,2433*	4,34	1;2;3;4;5;6;7; 8	N/A	-	-	-	-	245; 201; 183; 157; 161; 217; 227; 269; 287; 133; 305
-	423,2384*	4,93	3;4;5;6;7;8	N/A	-	-	-	-	159; 131; 199; 149; 249; 207; 267; 285; 303; 321; 324
-	237,1499	5,07	1;2;4	N/A	-	-	-	-	159; 173; 145; 109; 191; 219; 201; 117

-	267,1392*	5,24	4;8	N/A	-	-	-	-	207; 205; 165; 179; 192
-	439,2347	5,25	4	N/A	-	-	-	-	159; 139; 121
-	421,2233	5,29	4;5;6	N/A	-	-	-	-	181; 171; 155; 147; 141; 199
-	261,1858*	5,47	1;2	N/A	-	-	-	-	131; 229; 159; 105; 219; 145; 187
-	263,2010*	5,69	1;2;4;7	N/A	-	-	-	-	231; 199; 105; 175; 219
-	301,1451*	5,82	4;5	N/A	-	-	-	-	171; 145
-	262,2174*	5,86	1;2	N/A	-	-	-	-	119; 147; 105; 135; 203
-	407,2435*	5,96	3;4;5;6;7;8	N/A	-	-	-	-	175; 227; 201; 161; 287; 131
-	267,1392*	6,24	7;8	N/A	-	-	-	-	207; 205; 165; 179; 192
-	269,1548*	6,43	4	N/A	-	-	-	-	155; 209; 233; 167; 181; 141; 218; 251
-	317,1397	6,62	4	N/A	-	-	-	-	187; 213; 195; 293; 281; 299
-	303,1608*	6,7	4	N/A	-	-	-	-	199; 159; 225; 171;167; 243
-	285,1497*	6,70	4	N/A	-	-	-	-	171; 255; 249; 197; 267
-	263,2026*	7,59	1;2	N/A	-	-	-	-	231; 105; 119; 161; 133
-	263,202*	8,16	1	N/A	-	-	-	-	231;161;133;119;105;175;193

* Aparentemente resultado de alta fragmentação na fonte.

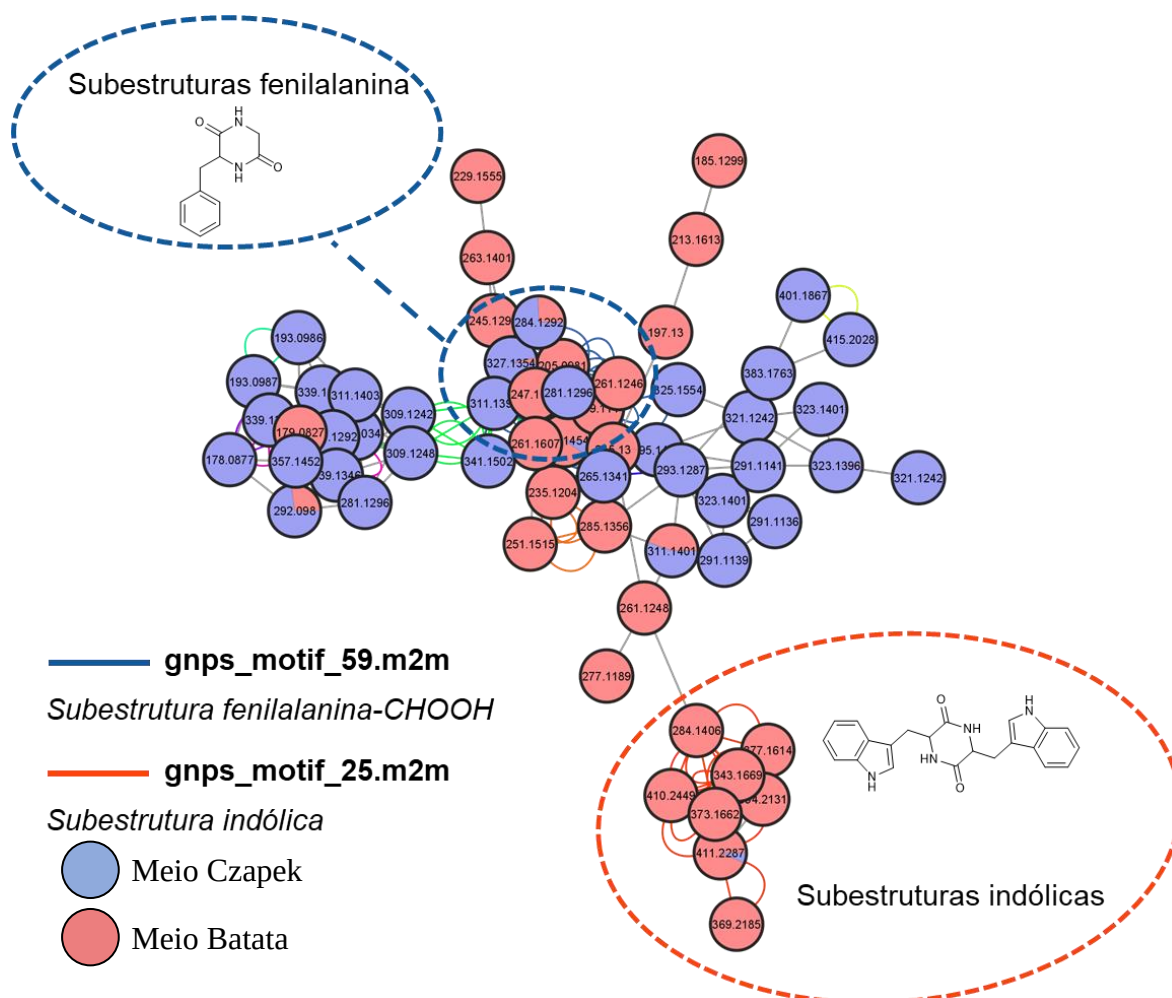
4.5.2 Derivados de aminoácidos

As correspondências com a biblioteca GNPS e literatura permitiram a anotação das substâncias derivados de aminoácidos: Ciclo-(Gly-Phe) **(12)** (m/z 205 $[M+H]^+$, erro: 4,39 ppm), Felutanina A **(13)** (m/z 373 $[M+H]^+$, erro: 0,8 ppm) (Tabela 7). A substância **12** é um dipeptídeo comum em fungos endofíticos, ainda que não haja relatos de bioatividade (CHEN et al., 2003; HUANG et al., 2007; JIANG et al., 2020). Já a 2,5-dicetopiperazina **13** foi relatada no gênero *Penicillium* e mostrou atividade antibiótica frente a bactérias resistentes (BORTHWICK, 2012; KOZLOVSKY et al., 2000).



Sinais adjacentes à substância **13** na rede molecular (m/z 343, 369, 377, 410 e 411) foram apontados pelo MS2LDA, compartilhando o mesmo padrão de fragmentação comum de subgrupos indólicos (gnps_motif_25.m2m). Não foram encontradas na literatura dicetopiperazinas correspondentes a essas massas, sendo possivelmente análogas ainda não relatadas. O MS2LDA também apontou que sinais vizinhos da substância **12** (m/z 265, 281, 311 e 327) compartilham a subestrutura Phe-CHOOH, porém, não houve correspondência espectral com dados das bibliotecas do GNPS e literatura (Figura 38). Outros padrões foram apontados pelo MS2LDA, mas sem anotações sobre a informação química.

Figura 38 - Família molecular dos derivados de aminoácidos, destacando os padrões de fragmentação detectados pelo MS2LDA.



Com exceção do sinal m/z 411, todas as outras apontadas com subestrutura indólica foram detectadas apenas no meio de batata, enquanto as subestruturas fenilalanina-CHOOH foram detectadas em ambos os substratos. Muitos *features* foram detectados exclusivamente em um ou outro substrato, possivelmente em consequência das diferentes fontes de nitrogênio dos meios Batata (aminoácidos endógenos) e Czapek (nitrato de sódio), que ativam diferentes vias biossintéticas. Todos os sinais m/z dessa família molecular estão dispostos na Tabela 7.

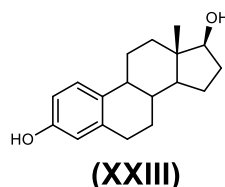
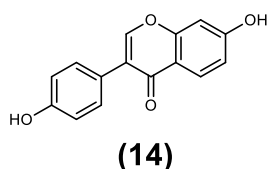
Tabela 7 - Sinais agrupados na família dos derivados de aminoácidos, com informações sobre as anotações pelo MS2LDA.

nº	m/z observado	tr (minutos)	Ensaio OSMAC	Anotação	Adutos	Fórmula molecular	m/z calculado	Erro (ppm)	Íons fragmento (m/z)	MS2LDA <i>motif</i>	Anotação do <i>motif</i>
12	205,0981	2,42	1;2;3;4	Ciclo(Gly-Phe)	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205,0972	4,39	120	gnps_motif_59.m2m	Substrutura fenilalanina-CHOOH
13	373,1662	4,37	1;2	Felutanina A	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ N ₄ O ₂	373,1659	0,8	130	gnps_motif_25.m2m	Substrutura indólica
-	411,2287	7,74	1;2;3;4;5;6;7;8	-	-	-	-	-	-	gnps_motif_25.m2m	Substrutura indólica
-	178,0877	5,80	5;8	-	-	-	-	-	118	-	-
-	193,0986	4,54	5;6;7;8	-	-	-	-	-	118	motif_512	Sem anotação
-	193,0987	5,13	5;6;7;8	-	-	-	-	-	118	motif_512	Sem anotação
-	229,1555	2,46	4	-	-	-	-	-	211; 183; 166; 138	-	-
-	245,1296	2,56	3	-	-	-	-	-	217; 120; 130; 175; 200	-	-
-	264,1034	5,12	5;7;8	-	-	-	-	-	118	motif_647	Sem anotação
-	265,1341	4,42	7;8	-	-	-	-	-	120; 118	gnps_motif_59.m2m	Substrutura fenilalanina-CHOOH
-	281,1296	5,88	3;5;6;7;8	-	-	-	-	-	120	gnps_motif_59.m2m	Substrutura fenilalanina-CHOOH
-	291,1136	4,43	5	-	-	-	-	-	118; 104; 263; 173; 200	-	-
-	291,1139	4,09	5;7;8	-	-	-	-	-	118; 104; 263; 173; 200	-	-
-	291,1141	5,04	7;8	-	-	-	-	-	116; 118; 128; 173	-	-
-	293,1287	4,69	5;6;7;8	-	-	-	-	-	120; 118; 265	motif_600	Sem anotação
-	309,1242	4,25	5;6;7;8	-	-	-	-	-	118	motif_494	Sem anotação
-	311,1397	4,41	5;7;8	-	-	-	-	-	120	gnps_motif_59.m2m	Substrutura fenilalanina-CHOOH
-	311,1403	5,10	5;7;8	-	-	-	-	-	118; 193	-	-
-	321,1242	5,12	8	-	-	-	-	-	116; 171; 203; 144	-	-
-	321,1242	5,94	7;8	-	-	-	-	-	116; 150; 173; 201; 290	-	-

-	323,1396	4,99	3;6;8	-	-	-	-	-	116; 118; 201; 173; 150; 128	-	-
-	323,1401	5,44	5;7;8	-	-	-	-	-	116; 128; 201; 173; 144	-	-
-	325,1554	5,24	7;8	-	-	-	-	-	120; 128; 146; 103	-	-
-	327,1354	5,89	3;5;6;7;8;	-	-	-	-	-	120; 281; 134	gnps_motif_59.m2m	Substrutura fenilalanina- CHOOH
-	339,1346	3,97	5;7;8	-	-	-	-	-	118; 193; 264	motif_647	Sem anotação
-	339,1351	4,57	5;7;8	-	-	-	-	-	118; 193	motif_647	Sem anotação
-	339,1352	5,03	5;7;8	-	-	-	-	-	118; 193	motif_647	Sem anotação
-	341,1502	4,87	5;6;8	-	-	-	-	-	150	motif_494	Sem anotação
-	343,1669	7,74	1;2	-	-	-	-	-	130; 256	gnps_motif_25.m2m	Substrutura indólica
-	357,1452	4,54	8	-	-	-	-	-	118; 193	motif_647	Sem anotação
-	369,2185	8,22	1;4	-	-	-	-	-	130; 198; 144; 313	gnps_motif_25.m2m	Substrutura indólica
-	377,1614	4,37	1;2	-	-	-	-	-	130; 170; 284	gnps_motif_25.m2m	Substrutura indólica
-	383,1763	5,88	5;7;8	-	-	-	-	-	292; 201; 264; 355; 118	-	-
-	394,2131	5,45	1;2;4	-	-	-	-	-	130; 284	-	-
-	401,1867	5,86	7;8	-	-	-	-	-	210; 265; 292	motif_428	Sem anotação
-	410,2449	6,56	1;2;4	-	-	-	-	-	130; 300	gnps_motif_25.m2m	Substrutura indólica
-	415,2028	7,68	7;8	-	-	-	-	-	210; 264; 292; 255; 383	motif_428	Sem anotação

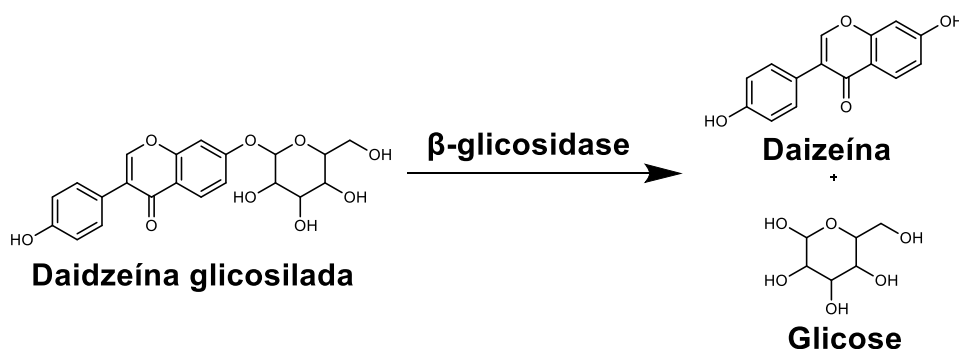
4.5.3 Isoflavonóide

Desconectada de outros nodos, a isoflavona daidzeína **(15)** (m/z 255,0653 $[M+H]^+$, erro: 0,39 ppm) (Apêndice 22) foi detectada na maioria dos ensaios com batata (ensaios 1, 2 e 4), e tem grande interesse industrial. Esse composto possui um esqueleto 3-fenilcromano e é análogo estrutural do 17β -estradiol **(XXIII)**, o mais potente estrogênio humano. Devido à similaridade estrutural, a isoflavona é capaz de se ligar a receptores de estrogênio e mimetizar a sua função (PATERNI et al., 2014).



A daidzeína tem amplo uso na prevenção de osteoporose e doenças cardiovasculares (SATHYAPALAN et al., 2018), redução dos efeitos da menopausa (LIU et al., 2014), e como agente anti-carcinogênico antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano (HILLMAN et al., 2011). É consistente com a literatura que a substância **14** seja encontrada apenas nos ensaios com batata, que é um legume rico em isoflavonas glicosiladas (LIGGINS et al., 2000).

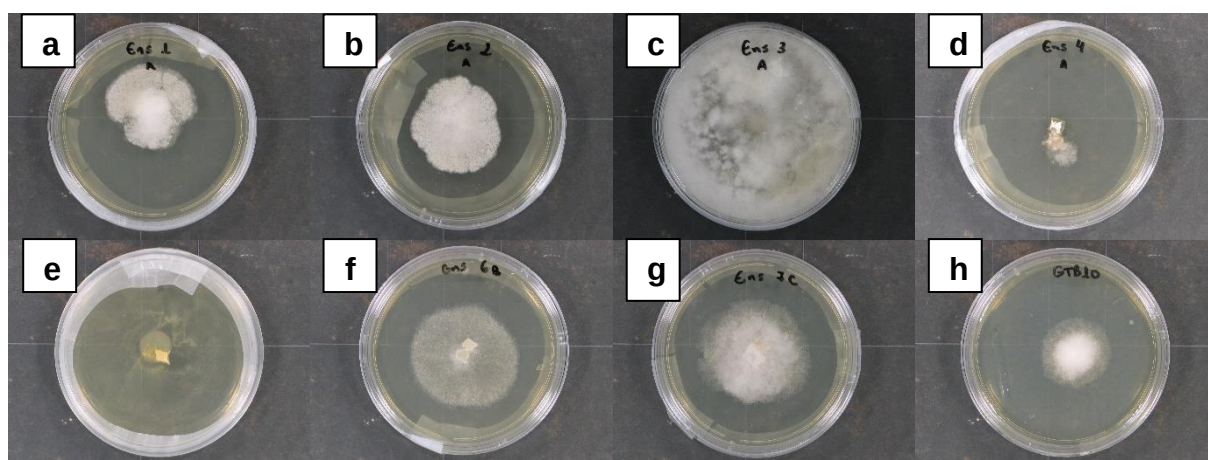
Uma estratégia para obtenção em larga escala dessas substâncias de interesse industrial consiste na fermentação fúngica do material vegetal, que hidrolisa enzimaticamente a ligação glicosídica da isoflavona. Dessa forma, a detecção da substância **14** nos extratos do GTB-10 *P. javanicum* cultivados em caldo de batata sugere que essa linhagem produz a enzima β -glicosidase (EC 3.2.1.21).



4.6 Ensaios de atividade antifúngica dos extratos

Os resultados dos ensaios de atividade antifúngica dos extratos estão dispostos a seguir na Figura 39 e Tabela 8. Os ensaios 6C e 7A contaminaram e não puderam ser refeitos em tempo hábil, sendo desconsiderados no cálculo da média.

Figura 39 - Colônias do fitopatógeno *S. sclerotiorum* após tratamento com os extratos dos ensaios OSMAC do endófito *P. javanicum* GTB-10.



a) Ensaio 1; **b)** Ensaio 2; **c)** Ensaio 3; **d)** Ensaio 4; **e)** Ensaio 5; **f)** Ensaio 6; **g)** Ensaio 7; **h)** Ensaio 8.

Tabela 8 - Resultado dos ensaios de inibição do fitopatógeno *S. sclerotiorum* frente ao tratamento com extratos dos ensaios OSMAC do endófito *P. javanicum* GTB-10.

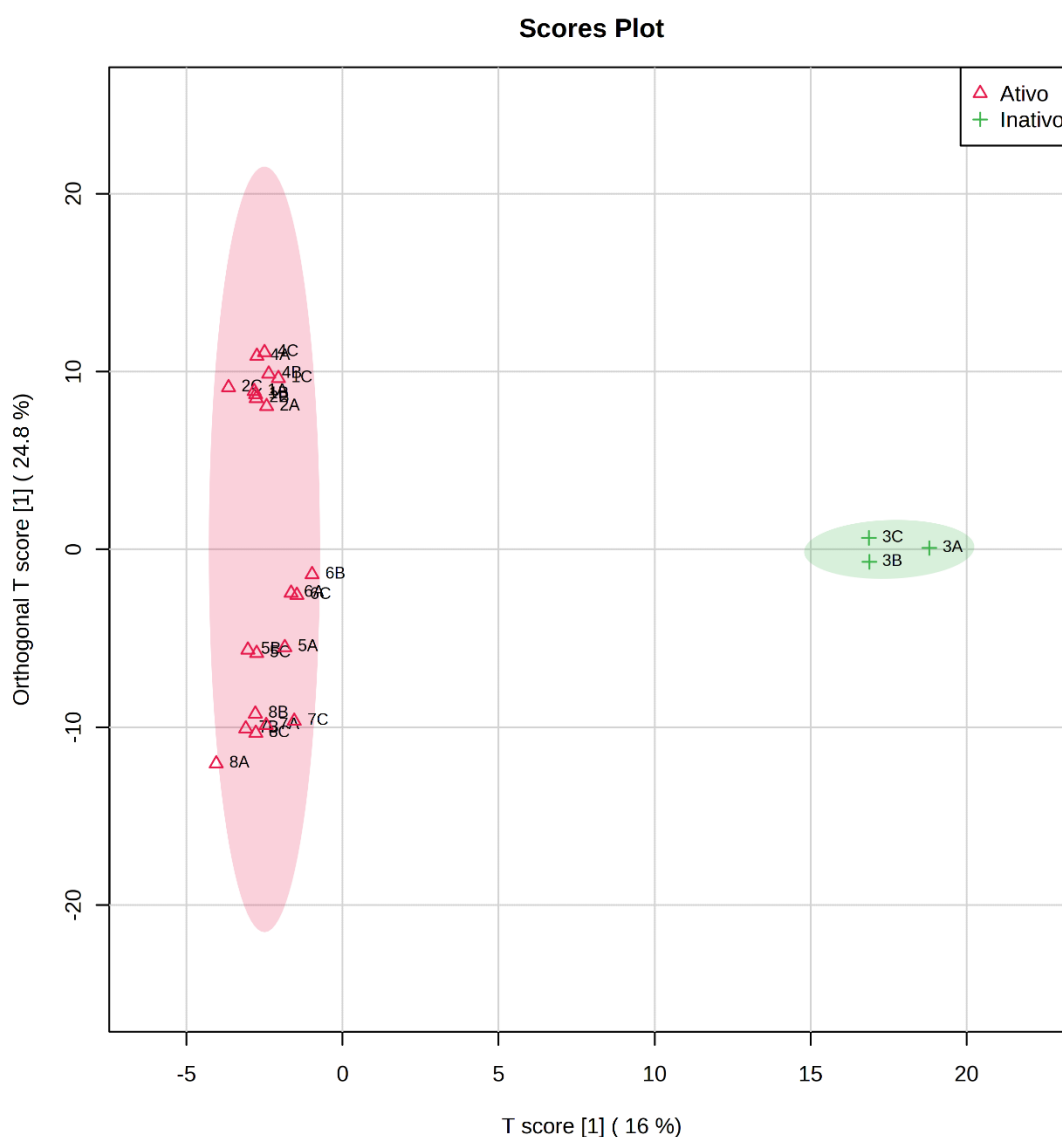
Diâmetro da colônia do fitopatógeno (cm)							Média
	A	B	C	IC%			
1	4,01	1,98	1,14	52,82	76,71	86,59	72,04
2	4,19	4,35	2,6	50,71	48,82	69,41	56,31
3	8,5	8,5	8,5	0,00	0,00	0,00	0,00
4	1,74	2,53	1,64	79,53	70,24	80,71	76,82
5	0	0,87	2,62	100,00	89,76	69,18	86,31
6	5,5	4,81	-*	35,29	43,41	-	39,35
7	-*	7,68	5,35	-	9,65	37,06	23,35
8	3,01	3,1	5,87	64,59	63,53	30,94	53,02
DMSO	8,5	8,5	8,5	0,00	0,00	0,00	0,00
Thiram	0	0	0	100	100	100	100

*ensaios não realizados.

Análise discriminante por projeções ortogonais à estrutura latente (OPLS-DA) foi utilizada para classificar os metabólitos bioativos no ensaio de atividade antifúngica. O modelo mostrou boa performance ($R^2X = 0,16$; $R^2Y = 0,939$; $Q^2 =$

0,903). Para os propósitos desse trabalho, extratos de ensaios que mostraram %IC >0% foram considerados ativos. A Figura 40 mostra uma clara separação entre os ensaios ativos e o ensaio inativo (ensaio 3), sugerindo que compartilham as substâncias bioativas, ainda que não haja um agrupamento total ao longo do T ortogonal.

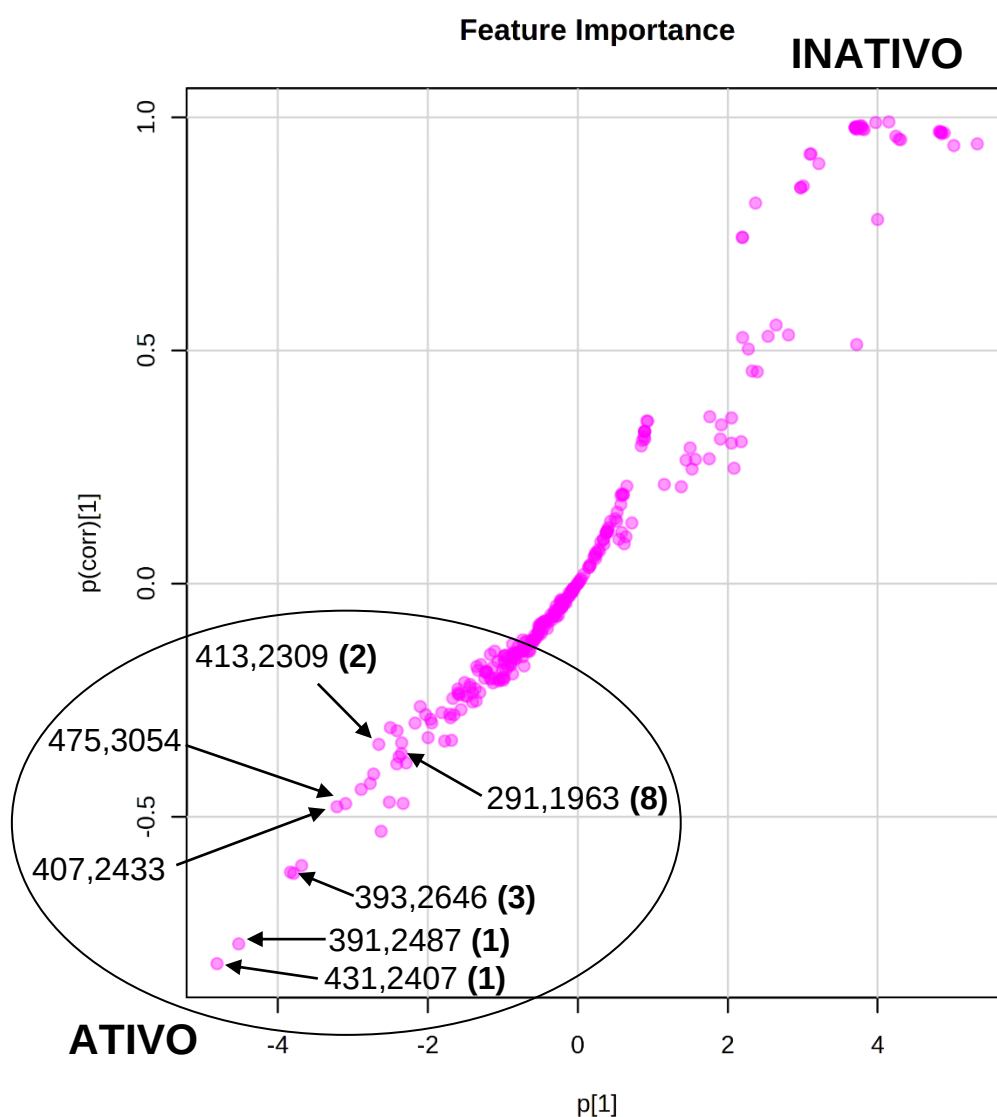
Figura 40 - Gráficos de score e S-plot do OPLS-DA dos dados dos ensaios OSMAC do fungo *P. javanicum* avaliados pela atividade antifúngica frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*.



O *S-plot* derivado da OPLS-DA foi utilizado para determinar os metabólitos que discriminam os ensaios bioativos frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum*, dispondo as substâncias na parte inferior como sendo os mais correlacionados com a bioatividade observada (Figura 41). Os metabólitos de *m/z* 431,2407 e 391,2487

(anotados como mevastatina ácida, substância **1**), 393,2646 (anotado como dihidromevastatina ácida, substância **3**), 407,2433 (substância na família das estatinas), 475,3054, 291,1963 (anotado como ML-236C [forma ácida], substância **8**) e 413,2309 (anotado como mevastatina lactona, substância **2**) foram indicados como os *features* mais discriminantes do grupo dos ensaios ativos.

Figura 41 - Gráficos de score e S-plot do OPLS-DA dos dados dos ensaios OSMAC do fungo *P. javanicum* (GTB-10) testados em ensaios de antibiose frente ao fitopatôgeno *S. sclerotiorum*.

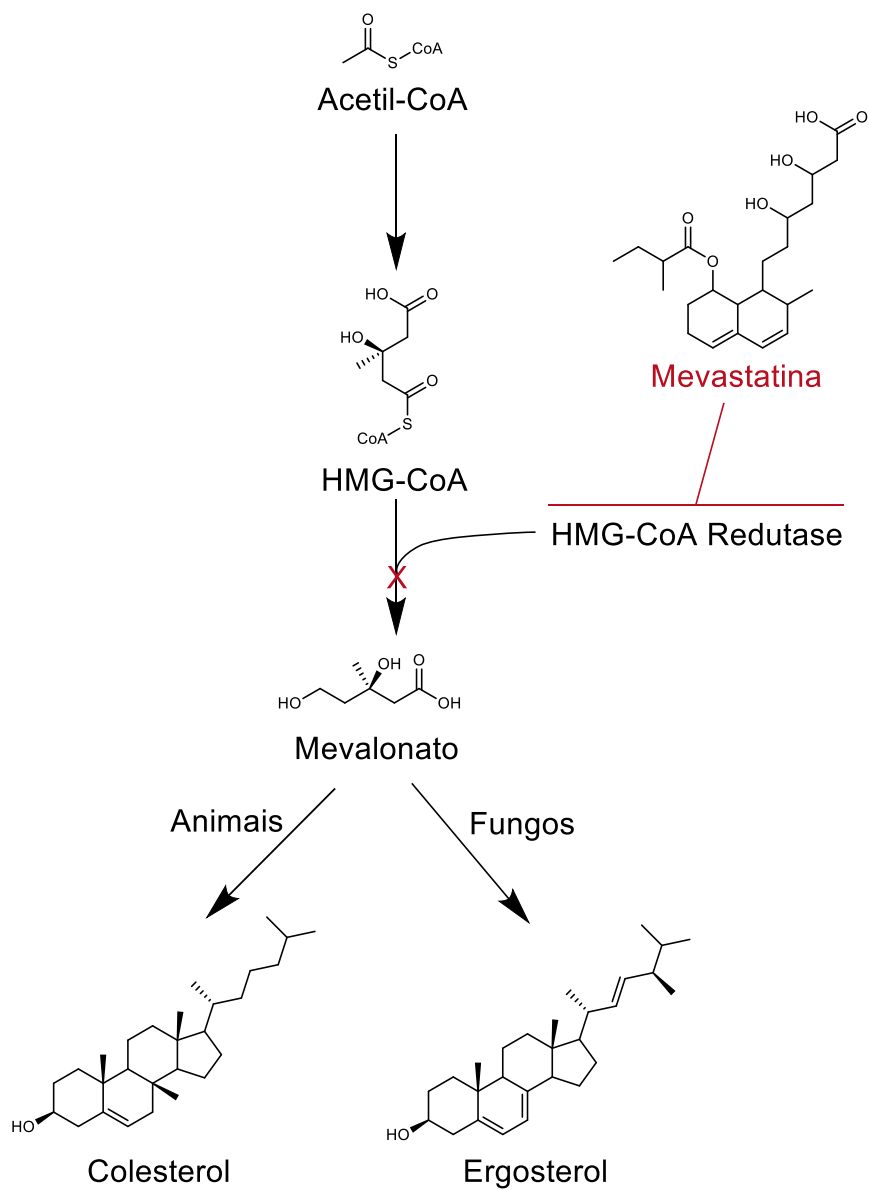


Os resultados são consistentes com a literatura, que indica que as versões ácidas das estatinas são as mais bioativas. O metabólito *m/z* 475,3054 não aparece na família das estatinas, mas compartilha sinais EM/EM, ainda que em intensidades baixas, indicando que possa ser um análogo ainda não relatado. O ensaio 3 (meio batata, modo dinâmico, co-cultivo) não produziu as estatinas na sua

forma ácida (substâncias **1** e **3**). As estatinas lactônicas não são completamente inativas, mas requerem maior quantidade para exibirem bioatividade (SIRTORI, 2014).

O efeito antifúngico das estatinas está bem estabelecido na literatura. O mecanismo de ação é idêntico ao esquema da Figura 25, sendo que em células fúngicas as estatinas afetam a biossíntese de ergosterol, análogo fúngico do colesterol e com propriedades similares (Figura 42). A perturbação nos níveis de ergosterol modifica as propriedades das membranas celulares fúngicas, afetando a homeostase celular e inibindo seu crescimento (LEFEBVRE; ALSHAWA; DUPONT, 2010). O controle das hifas e esporos do fungo *S. sclerotiorum* já foi relacionada à presença de estatinas naturais, como a mevastatina (YADERETS et al., 2021) e a lovastatina (AL-KARAAWI; AL-WAILY, 2022), e artificiais como a fluvastatina (GALGÓCZY; PAPP; VÁGVÖLGYI, 2009).

Figura 42 - Efeito de estatinas naturais na via biossintética de colesterol e ergosterol, relacionando a presença das estatinas à bioatividade observada nos ensaios de antibiose.



5. CONCLUSÕES

A atividade antagônica dos fungos endofíticos frente ao fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi avaliada, permitindo classificar a linhagem GTB-10, identificada genética e fenotipicamente como *Penicillium javanicum*, como a mais promissora para estudos químicos. A abordagem OSMAC dentro de um planejamento fatorial completo 2³, permitiu discriminar o meio de cultivo como o maior determinante para a variação de produção metabólica desse endófito. Ainda que o modo e ambiente de cultivo tenham se mostrado pouco influentes, principalmente nos ensaios com o meio Czapek, é possível afirmar que OSMAC foi bem sucedido.

Técnicas de metabolômica global permitiram a anotação da mevastatina nas formas ácida **(1)** e lactona **(2)**, características desse gênero, seus análogos, e outras substâncias de interesse comercial como as dicetopiperazinas felutanina A **(13)** e B **(14)** e a isoflavona daidzeína **(15)**.

Quase todos os extratos resultantes dos ensaios OSMAC mostraram atividade antifúngica contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, destacando GTB-10 e GTR-07 como endófitos promissores para a continuidade dos estudos. Foram utilizadas ferramentas estatísticas para interpretar os resultados de antibiose, que correlacionaram a presença das estatinas ácidas à bioatividade observada.

Dessa forma, é possível afirmar que todos os objetivos propostos nesse trabalho foram atingidos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A perspectiva futura para esse trabalho se desenha em duas frentes:

➤ a frente química, implementando técnicas de metabolômica global adicionais, como exemplo: análises por DIA (*Data Independent Acquisition*) e CG-EM (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas) para melhor entendimento do espaço químico das amostras; elucidação das substâncias de interesse por meio de técnicas espectroscópicas;

➤ a frente biológica: uma vez estabelecidas as substâncias de interesse (mevastatina de dihidromevastatina ácida), é possível otimizar as condições de cultivo buscando maior rendimento na produção dessas substâncias. Além disso, se faz necessária a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) das amostras frente ao *S. sclerotiorum*, para a realização de ensaios biológicos *in vivo*, aplicando o endófito *P. javanicum* (GTB-10), ou seus extratos, em plantas sob condições de campo.

Por fim, esse trabalho evidencia o enorme potencial a ser explorado de fungos endofíticos isolados de espécies vegetais medicinais do Pantanal, e contribui para o estabelecimento dos fungos da linhagem *Penicillium* como candidatos a serem aplicados no manejo de fitopatógenos fúngicos, especialmente contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1354–1359, 1 out. 2008.

ABO NOUH, F. A. Endophytic fungi for sustainable agriculture. **Microbial Biosystems**, v. 4, n. 1, p. 31–44, 3 jul. 2019.

AKSENOV, A. A. et al. Global chemical analysis of biology by mass spectrometry. **Nature Reviews Chemistry** 2017 1:7, v. 1, n. 7, p. 1–20, 5 jul. 2017.

ALAM, B. et al. Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 791033, p. 24, 2021.

ALHO, C. J. R. et al. Threats to the Biodiversity of the Brazilian Pantanal due to Land Use and Occupation. **Ambiente & Sociedade**, v. 22, p. 1891, 25 nov. 2019.

AL-KARAAWI, K.; AL-WAILY, D. Morphological and Molecular Diagnosis of Bio-fungus Isolate *Penicillium commune* DSKZ and its Laboratory Use in Biological Control of Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Biological control of plant diseases View project Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in eggplant by *Penicillium chrysogenum* in vitro & field View project. **NeuroQuantology**, v. 20, n. 10, p. 1612–1621, 2022.

ALONSO, A.; MARSAL, S.; JULIÀ, A. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. MAR, p. 23, 5 mar. 2015.

ALSEEKH, S. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. **Nature Methods** 2021 18:7, v. 18, n. 7, p. 747–756, 8 jul. 2021.

ALVES, N. M. et al. A Trojan horse approach for white mold biocontrol: *Paraconiothyrium* endophytes promotes grass growth and inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 160, p. 104685, 1 set. 2021.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology** **2011** **90:6**, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 27 abr. 2011.

BAZIOLI, J. M. et al. Insights into *Penicillium brasilianum* Secondary Metabolism and Its Biotechnological Potential. **Molecules** **2017**, Vol. **22**, Page **858**, v. 22, n. 6, p. 858, 20 jun. 2017.

BHARTI, O. et al. Effect of Fungicides on Mycelium Growth of *Sclerotinia* Stem Rot Caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Indian Mustard. **The Bioscan**, v. 10, n. 4, p. 1767–1969, 2015.

BINO, R. J. et al. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 418–425, 1 set. 2004.

BLAŽENović, I. et al. Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. **Metabolites** **2018**, Vol. **8**, Page **31**, v. 8, n. 2, p. 31, 10 maio 2018.

BODE, H. B. et al. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. SUPPL. 1, mar. 2008.

BORTHWICK, A. D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry and Bioactive Natural Products. **Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry**, v. 112, p. 3641–3716, 2012.

BROWN, A. G. et al. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions** **1**, n. 11, p. 1165–1170, 1 jan. 1976.

BRUSTOLIN, R.; REIS, E. M.; PEDRON, L. Longevity of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia on the soil surface under field conditions. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 172–174, 1 abr. 2016.

BUDIONO et al. Antioxidant Activity of *Syzygium samarangense* L. and Their Endophytic Fungi. **Molekul**, v. 14, n. 1, p. 48–55, 4 jun. 2019.

BUSBY, P. E. et al. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. **PLOS Biology**, v. 15, n. 3, p. 1–14, 2017.

CABRAL, E. L.; BACIGALUPO, N. M. Revision del genero *Galianthe* subg. *Ebelia* stat. Nov. (Rubiaceae: Spermacoceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 84, n. 4, p. 857–877, 1997.

CAVALCANTI, S. M. C. et al. The status of the jaguar in the Pantanal. *Ciencia Pantanal*. **Cat News**, v. 7, p. 29–34, 2012.

CHAKRAVARTI, R.; SAHAI, V. Compactin - A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 618–624, 19 jun. 2004.

CHEN, G. et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (No. 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. **Tetrahedron**, v. 59, n. 26, p. 4907–4909, 23 jun. 2003.

CHEN, X. et al. Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic streptomycetes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAY, p. 714, 20 maio 2016.

CHENG, C. et al. The root endophytic fungus *Serendipita indica* improves resistance of Banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n. 1, p. 87–100, 1 jan. 2020.

CHIANG, F.; MAZDIYASNI, O.; AGHAKOUCHAK, A. Evidence of anthropogenic impacts on global drought frequency, duration, and intensity. **Nature Communications** **2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 12 maio 2021.

CHIARAVALLOTI, R. M.; HOMEWOOD, K.; ERIKSON, K. Sustainability and Land tenure: Who owns the floodplain in the Pantanal, Brazil? **Land Use Policy**, **64 pp. 511-524. (2017)**, v. 64, p. 511–524, 1 maio 2017.

COOK, J. A. et al. Mass spectrometry-based metabolomics identifies longitudinal urinary metabolite profiles predictive of radiation-induced cancer. **Cancer Research**, v. 76, n. 6, p. 1569–1577, 15 mar. 2016.

CORSINI, A.; MAGGI, F. M.; CATAPANO, A. L. Pharmacology of competitive inhibitors of HMg-CoA reductase. **Pharmacological Research**, v. 31, n. 1, p. 9–27, 1995.

CUI, J. L. et al. Fungal endophyte-induced salidroside and tyrosol biosynthesis combined with signal cross-talk and the mechanism of enzyme gene expression in *Rhodiola crenulata*. **Scientific Reports** **2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2 out. 2017.

DA SILVA, R. R.; DORRESTEIN, P. C.; QUINN, R. A. Illuminating the dark matter in metabolomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 41, p. 12549–12550, 13 out. 2015.

DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, P. et al. Further constituents of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) and inhibition of DNA topoisomerases I and II α by its cytotoxic β -carboline alkaloids. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 5, p. 1358–1361, 1 mar. 2014.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 286–295, abr. 2008.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 185–201, 2014.

DENNIS BENSON, G. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_1, p. D46–D51, 1 jan. 2010.

DEVI, P. I.; MANJULA, M.; BHAVANI, R. V. Agrochemicals, Environment, and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 47, n. 1, p. 399–421, 17 out. 2022.

DEY, P. et al. Lipid-rich endo-metabolites from a vertically transmitted fungal endophyte *Penicillium* sp. PM031 attenuate virulence factors of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum*. **Microbiological Research**, v. 261, p. 127058, 1 ago. 2022.

DUANE, A.; CASTELLNOU, M.; BROTONS, L. Towards a comprehensive look at global drivers of novel extreme wildfire events. **Climatic Change 2021 165:3**, v. 165, n. 3, p. 1–21, 5 abr. 2021.

ELSHARBINY, E. A.; TAHER, M. A.; ELSEBAI, M. F. Activity of *Purpureocillium lilacinum* filtrates on biochemical characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* and induction of defense responses in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, n. 1, p. 39–52, 1 set. 2019.

EMINE, S. et al. Mangrove Rhizosphere Soils: A Unique Natural Source of Pravastatin-Producing *Penicillium* Microfungi. **International Journal of Extensive Research**, v. 5, p. 79–87, 2015.

ENDO, A. et al. Dihydromonacolin L and Monacolin X, new metabolites those inhibit Cholesterol Biosynthesis. **The Journal of Antibiotics**, v. 38, n. 3, p. 321–327, 1985.

FAOUN. **2050 High-Level Experts Forum: The Forum**. Disponível em: <<https://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-forum/pt/>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

FERRANTE, L.; FEARNside, P. M. Brazil's Pantanal threatened by livestock. **Science**, v. 377, n. 6607, p. 720–721, 12 ago. 2022.

FIGUEIREDO, P. O. et al. A new cytotoxic β -carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. **Planta medica**, v. 77, n. 16, p. 1852–1854, 2011.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Rubiaceae-Type Cyclopeptides from *Galianthe thalictroides*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 1165–1169, 22 abr. 2016.

FINDLAY, A. Pantanal fires. **Nature Climate Change** **2022 12:2**, v. 12, n. 2, p. 118–118, 8 fev. 2022.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226, 1929.

FONTANA, D. C. et al. Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. **Pathogens** **2021, Vol. 10, Page 570**, v. 10, n. 5, p. 570, 8 maio 2021.

FRISVAD, J. C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 201–241, 2004

GALETTI, M. et al. Diet overlap and foraging activity between feral pigs and native peccaries in the Pantanal. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, 4 nov. 2015.

GALGÓCZY, L.; PAPP, T.; VÁGVÖLGYI, C. In vitro interaction between suramin and fluvastatin against clinically important Zygomycetes. **Mycoses**, v. 52, n. 5, p. 447–453, 1 set. 2009.

GAO, H. et al. Diorcinols B-E, new prenylated diphenyl ethers from the marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLN-60. **The Journal of Antibiotics** **2013** **66:9**, v. 66, n. 9, p. 539–542, 15 maio 2013.

GEISEN, S. et al. Seed and root endophytic fungi in a range expanding and a related plant species. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1645, 29 ago. 2017.

GOSS, E. M. et al. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 24, p. 8791–8796, 17 jun. 2014.

GUERRA, A. et al. Drivers and projections of vegetation loss in the Pantanal and surrounding ecosystems. **Land Use Policy**, v. 91, p. 104388, 1 fev. 2020.

GUPTA, S. et al. Epigenetic-based developments in the field of plant endophytic fungi. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 394–400, 1 nov. 2020.

GUPTA, T. et al. Biology and mycovirus-assisted biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* infecting vegetable and oilseed crops. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 52, n. 13–14, p. 1049–1067, 27 ago. 2019.

GURGEL, A. M. et al. Flexibilização da regulação de agrotóxicos enquanto oportunidade para a (necro)política brasileira: avanços do agronegócio e retrocessos para a saúde e o ambiente. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 57, n. 0, p. 135–159, 30 jun. 2021.

HAMILTON, C. E.; BAUERLE, T. L. A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 39–49, 29 maio 2012.

HATA, K.; ATARI, R.; SONE, K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. **Mycoscience**, v. 43, n. 5, p. 369–373, 25 out. 2002.

HAVERKORT, A. J. et al. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. **Potato Research**, v. 51, n. 1, p. 47–57, 28 mar. 2008.

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, 10 out. 2014.

HILLMAN, G. G. et al. Monitoring Sunitinib-Induced Vascular Effects to Optimize Radiotherapy Combined with Soy Isoflavones in Murine Xenograft Tumor. **Translational Oncology**, v. 4, n. 2, p. 110–121, 1 abr. 2011.

HIROOKA, T.; ISHII, H. Chemical control of plant diseases. **Journal of General Plant Pathology**, v. 79, n. 6, p. 390–401, 6 nov. 2013.

HOFFMAN, D. D. et al. Selected Soybean Plant Introductions with Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 86, n. 9, p. 971–980, 2002.

HORAI, H. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry: JMS**, v. 45, n. 7, p. 703–714, 2010.

HOUBRAKEN, J. et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. **Studies in Mycology**, v. 95, p. 5–169, 1 mar. 2020.

HOUTEN, S. M. Metabolomics: Unraveling the chemical individuality of common human diseases. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 6, p. 402–407, 2009.

HUANG, H. et al. Cyclic peptides from an endophytic fungus obtained from a mangrove leaf (*Kandelia candel*). **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 11, p. 1696–1699, nov. 2007.

INBAR, J.; MENENDEZ, A.; CHET, I. Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and its role in biological control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 6, p. 757–763, 1 jun. 1996.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. **Science**, v. 292, n. 5519, p. 1160–1164, 11 maio 2001.

JAIN, M. et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. **Science**, v. 336, n. 6084, p. 1040–1044, 25 maio 2012.

JIANG, Q. et al. Secondary Metabolites of the Endophytic Fungus *Cladosporium* sp. CYC38. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 56, n. 6, p. 1166–1169, 1 nov. 2020.

JÚNIOR, J. A. M. et al. Mercury content in the fur of jaguars (*Panthera onca*) from two areas under different levels of gold mining impact in the Brazilian Pantanal. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2 SUPPL. 1, p. 2129–2139, 2018.

JUNK, W. J. Current state of knowledge regarding South America wetlands and their future under global climate change. **Aquatic Sciences**, v. 75, n. 1, p. 113–131, 28 jan. 2013.

KATO Jr. W. H. Metabólitos secundários das folhas de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae). 2022. Tese (Doutorado) – Curso de Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2022.

KELLY, W. L. Intramolecular cyclizations of polyketide biosynthesis: mining for a “Diels–Alderase”? **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 24, p. 4483–4493, 27 nov. 2008.

KHAN, S. A. et al. Isolation of plant growth promoting endophytic fungi from dicots inhabiting coastal sand dunes of Korea. **Pakistan Journal of Botany**, v. 44, n. 4, p. 1453–1460, 2012.

KHARE, E.; MISHRA, J.; ARORA, N. K. Multifaceted interactions between endophytes and plant: Developments and Prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. NOV, p. 2732, 15 nov. 2018.

KIM, H. Y. et al. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 332–337, 1 mar. 2007.

KITANO, H. Systems Biology: A Brief Overview. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1662–1664, 1 mar. 2002.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 845, 9 jul. 2019.

KOZLOVSKY, A. G. et al. New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 698–700, maio 2000.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297–303, 1 jun. 2014.

LAM, Y. K. T. et al. Dihydrocompactin, a new potent inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase from *Penicillium citrinum*. **The Journal of antibiotics**, v. 34, n. 5, p. 614–616, 1981.

LAUR, J. et al. Effectors involved in fungal–fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent–powdery mildew–plant. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 713–725, 1 jan. 2018.

LEAL FILHO, W. et al. Fire in Paradise: Why the Pantanal is burning. **Environmental Science & Policy**, v. 123, p. 31–34, 1 set. 2021.

LEFEBVRE, M.; ALSHAWA, K.; DUPONT, B. L'activité antifongique des statines. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 20, n. 3, p. 212–217, 1 set. 2010.

LEHNER, M. S. et al. Independently founded populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from a tropical and a temperate region have similar genetic structure. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0173915, 1 mar. 2017.

LI, G.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Natural products containing 'decalin' motif in microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 9, p. 1175–1201, 6 ago. 2014.

LIAO, H. L. et al. Fungal endophytes of *Populus trichocarpa* alter host phenotype, gene expression, and rhizobiome composition. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 7, p. 853–864, 10 jun. 2019.

LIGGINS, J. et al. Daidzein and genistein contents of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v. 84, p. 717–725, 2000.

LIU, Z. M. et al. Effect of whole soy and purified isoflavone daidzein on renal function—a 6-month randomized controlled trial in equol-producing postmenopausal women with prehypertension. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 13–14, p. 1250–1256, 1 set. 2014.

LLOYD-PRICE, J. et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. **Nature** **2019 569:7758**, v. 569, n. 7758, p. 655–662, 29 maio 2019.

LOTIFY, M. M. et al. Metabolomic profiling, biological evaluation of *Aspergillus awamori*, the river Nile-derived fungus using epigenetic and OSMAC approaches †. 2021.

LUCAS, E. M. F. et al. Antimicrobial Properties of Sclerotiorin, Isochromophilone VI and Pencolide, Metabolites from a Brazillian Cerrado Isolate of *Penicillium*

sclerotiorum Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 785–789, 2007.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The Evolution of Fungicide Resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v. 90, p. 29–92, 1 jan. 2015.

M A WAARD et al. Chemical Control of Plant Diseases: Problems and Prospects. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, n. 1, p. 403–421, 28 nov. 2003.

MAHMOUDIAN, F. et al. Production of Mycophenolic Acid by a Newly Isolated Indigenous *Penicillium glabrum*. **Current Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2420–2428, 1 jun. 2021.

MARCELLANO, J. P.; COLLANTO, A. S.; FUENTES, R. G. Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Isolated from the Bark of *Cinnamomum mercadoi*. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 3, p. 405–409, 2017.

MARMANN, A. et al. Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043–1065, 2014.

MASSAWE, V. C. et al. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1373–1385, 1 dez. 2018.

MEJÍA, L. C. et al. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. SEP, p. 479, 12 set. 2014.

NICOLETTI, R. et al. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 295–301, 12 maio 2007.

NIU, L. et al. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi from the Flowers of the Medicinal Plant *Vernonia anthelmintica*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11935, 1 out. 2022.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, set. 2005.

OKAMOTO, S. et al. New Decalin Derivatives, Eujavanoic Acids A and B, from *Eupenicillium javanicum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 9, p. 1580–1583, set. 2004.

OLA, A. R. B. et al. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 11, p. 2094–2099, 22 nov. 2013.

OLIVEIRA, A. K. M. et al. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1 SUPPL., p. 283–289, abr. 2011.

OLLINAHU, O. I.; PEDLOWSKI, M. A.; KRÖGER, M. Toxic turn in Brazilian agriculture? The political economy of pesticide legalisation in post-2016 Brazil. **Third World Quarterly**, 2022.

PAN, R. et al. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 294, 26 fev. 2019.

PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P.; HEIL, M. The microbe-free plant: Fact or artifact? **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. DEC, 29 dez. 2011.

PATERNI, I. et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13–29, 15 nov. 2014.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2012 **13:4**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 22 mar. 2012.

RAJANI, P. et al. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. **Microbiological research**, v. 242, 1 jan. 2021.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1109–1114, 1 mar. 2008.

ROQUE, F. O. et al. Upland habitat loss as a threat to Pantanal wetlands. **Conservation Biology**, v. 30, n. 5, p. 1131–1134, 1 out. 2016.

ROSEN, T.; HEATHCOCK, C. H. Total Synthesis of (+)-Compactin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 12, p. 3731–3733, 1985.

ROUSSEAU, G.; RIOUX, S.; DOSTALER, D. Effect of crop rotation and soil amendments on Sclerotinia stem rot on soybean in two soils. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 87, n. 3, p. 605–614, 2007.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 24, 2005.

RUIZ, B. et al. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146–167, maio 2010.

SATHYAPALAN, T. et al. Soy isoflavones improve cardiovascular disease risk markers in women during the early menopause. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 28, n. 7, p. 691–697, 1 jul. 2018.

SAVARY, S. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution** 2019 3:3, v. 3, n. 3, p. 430–439, 4 fev. 2019.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. In vivo and in vitro production options for fungal secondary metabolites. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 234–242, mar. 2008.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A. C. et al. Untargeted Metabolomics Strategies—Challenges and Emerging Directions. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 27, n. 12, p. 1897–1905, 1 dez. 2016.

SERAJUDDIN, A. T. M.; RANADIVE, S. A.; MAHONEY, E. M. Relative Lipophilicities, Solubilities, and Structure–Pharmacological Considerations of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) Reductase Inhibitors Pravastatin, Lovastatin, Mevastatin, and Simvastatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 9, p. 830–834, 1 set. 1991.

SEYDAMETOVA, E.; ZAINOL, N. Morphological, physiological, biochemical and molecular characterization of statin-producing *Penicillium* microfungi isolated from little-explored tropical ecosystems. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100044, 1 dez. 2021.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>, v. 48, p. 21–43, 5 ago. 2010.

SILGUEIRO, V. DE F. et al. Dimensions of the 2020 wildfire catastrophe in the Pantanal wetland: the case of the municipality of Poconé, Mato Grosso, Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e08101522619–e08101522619, 15 nov. 2021.

SILVA, F. DE A. et al. Introduction of *Trichoderma* spp. biocontrol strains against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary change soil microbial community composition

in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation. **Biological Control**, v. 163, p. 104755, 1 nov. 2021.

SILVA, S. D. et al. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. **Journal of Nematology**, v. 49, n. 1, p. 77–85, 1 mar. 2017.

SINGH, V. et al. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, 6 jan. 2017.

SIRTORI, C. R. The pharmacology of statins. **Pharmacological Research**, v. 88, p. 3–11, 1 out. 2014.

SOUZA, A. Q. L. DE et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.

SRITHARAN, T. et al. Isocoumarins and dihydroisocoumarins from the endophytic fungus *Biscogniauxia capnodes* isolated from the fruits of *Averrhoa carambola*. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 5, 1 maio 2019.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. v. 1, p. 16-21, 1999.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491, dez. 2003.

SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287–1293, 2000.

SYED, M. B.; PONNUSAMY, T. Bioconversion of mevastatin to pravastatin by various microorganisms and its applications – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 62–74, 1 jan. 2018.

TATENO, O. et al. Beech cupules share endophytic fungi with leaves and twigs. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 252–256, 1 maio 2015.

TING, A. S. Y.; MAH, S. W.; TEE, C. S. Evaluating the feasibility of induced host resistance by endophytic isolate *Penicillium citrinum* BTF08 as a control mechanism for Fusarium wilt in banana plantlets. **Biological Control**, v. 61, n. 2, p. 155–159, 1 maio 2012.

TORTATO, F. R. et al. The numbers of the beast: Valuation of jaguar (*Panthera onca*) tourism and cattle depredation in the Brazilian Pantanal. **Global Ecology and Conservation**, v. 11, p. 106–114, 1 jul. 2017.

TSUJITA, Y. et al. CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: tissue-selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. **Biochimica et biophysica acta**, v. 877, n. 1, p. 50–60, 11 jun. 1986.

TURABI, N. et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors: oxime ether analogs of pravastatin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1479–1484, 1 nov. 1995.

TWEEDDALE, H.; NOTLEY-MCROBB, L.; FERENCI, T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ('metabolome') analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5109–5116, 1998.

VAN DER HOOFT, J. J. J. et al. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 48, p. 13738–13743, 29 nov. 2016.

WALTERS, D. et al. Induced Resistance for Plant Disease Control: Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. **Phytopathology**, v. 95, n. 12, p. 1368–1373, 2005.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, 1 mar. 2013.

WANG, B. et al. Transferring Fungi to a Deuterium-Enriched Medium Results in Assorted, Conditional Changes in Secondary Metabolite Production. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1415–1421, 26 jun. 2015a.

WANG, H.; WU, Y.; ZHAO, Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 1, p. 58–70, 1 jan. 2001.

WANG, J. et al. Cytotoxic cytochalasins from marine-derived fungus *Arthrinium arundinis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 2, p. 160–166, 2015b.

WANG, J. et al. Arthpyrones A-C, pyridone alkaloids from a sponge-derived fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3. **Organic Letters**, v. 17, n. 3, p. 656–659, 6 fev. 2015c.

WANG, J. F. et al. A new naphthalene glycoside from the sponge-derived fungus *Arthrinium* sp. ZSDS1-F3. **Natural Products Research**, v. 28, n. 14, p. 1070–1074, 2014.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology** 2016 **34:8**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.

WASIL, Z. et al. One pathway, many compounds: heterologous expression of a fungal biosynthetic pathway reveals its intrinsic potential for diversity. **Chemical Science**, v. 4, n. 10, p. 3845–3856, 28 ago. 2013.

WILLBUR, J. et al. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 3–11, 2019.

WISHART, D. S. Current Progress in computational metabolomics. **Briefings in Bioinformatics**, v. 8, n. 5, p. 279–293, 1 set. 2007.

WOLFENDER, J. L. et al. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704–742, 2 jan. 2019.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl_2, p. W652–W660, 1 jul. 2009.

XIE, W. et al. Improved phosphorus nutrition by arbuscular mycorrhizal symbiosis as a key factor facilitating glycyrrhizin and liquiritin accumulation in *Glycyrrhiza uralensis*. **Plant and Soil**, v. 439, n. 1–2, p. 243–257, 15 jun. 2019.

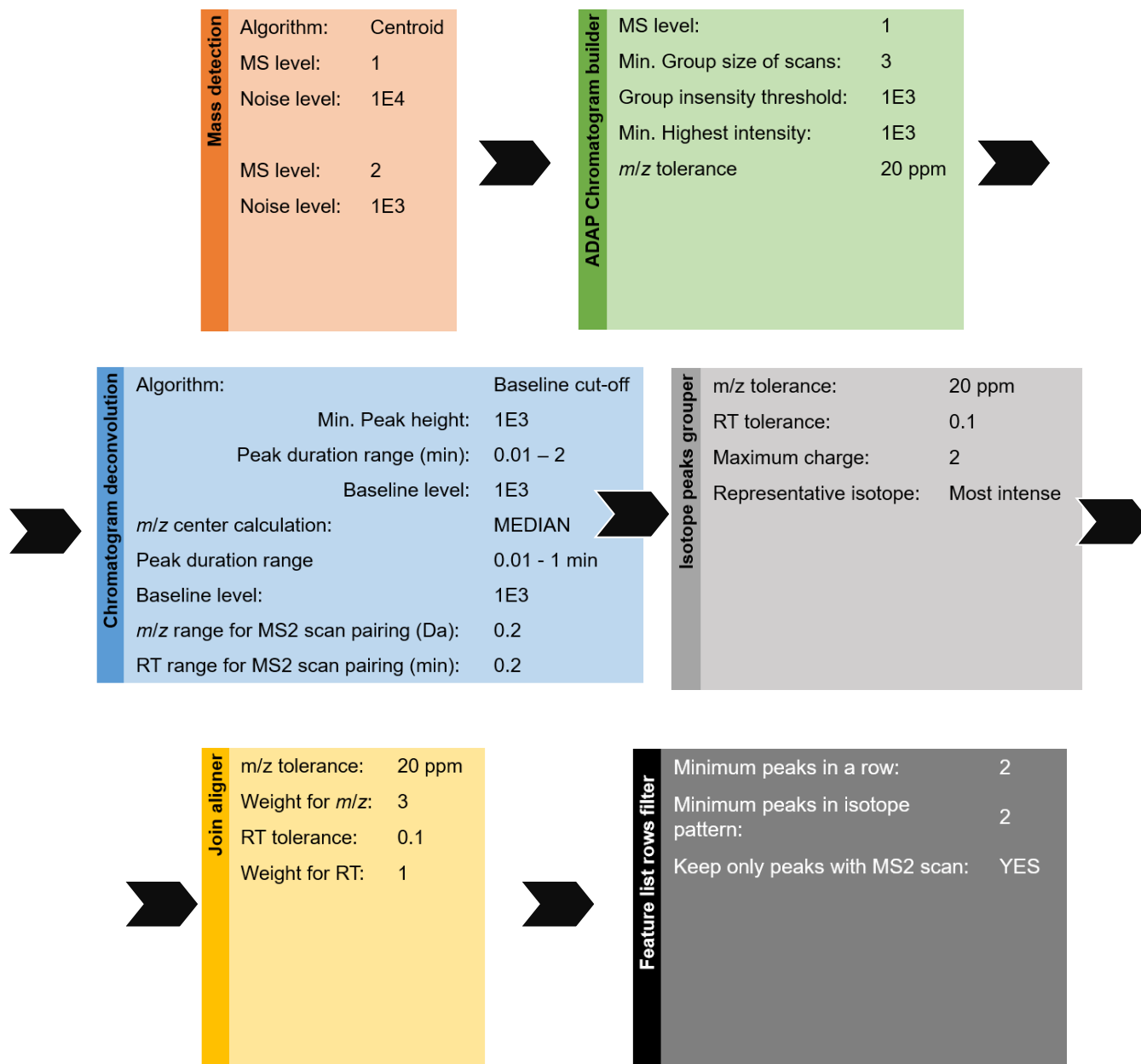
YADERETS, V. V. et al. Inhibition of the growth and development of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by combining azoxystrobin, *Penicillium chrysogenum* vkm f-4876d, and bacillus strains. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2520, 1 dez. 2021.

YOSHIDA, K. et al. The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. **eLife**, v. 2013, n. 2, 28 maio 2013.

ZHOU, L. N. et al. Two New Cyclic Pentapeptides from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 6, p. 1065–1070, 1 jun. 2011.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Parâmetros utilizados no pré-processamento dos dados no MZmine 2.53.



Apêndice 2 - Parâmetros utilizados para a formação das redes moleculares.

Workflow: FEATURE-BASED-MOLECULAR-NETWORKING (version release_28.2)		
Etapa	Parâmetro	Valor
Basic options	Precursor Ion Mass Tolerance	2,0 Da
	Fragment Ion Mass Tolerance	0,02 Da
Advanced Network Options	Min Pairs Cos	0,6
	Network TopK	10
	Maximum Connected Component Size	100
	Minimum Matched Fragment Ions	4
	Maximum shift between precursors	500
Advanced Library Search Options	Library Search Min Matched Peaks	4
	Score Threshold	0.6
Advanced Filtering Options	Filter Precursor Window	Filter
	Filter peaks in 50Da Window	Filter
	Minimum Peak Intensity	10

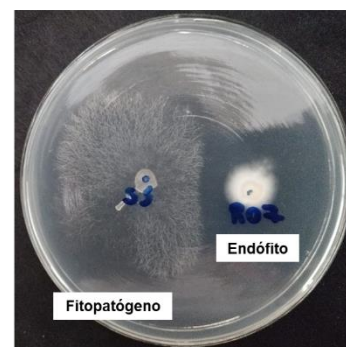
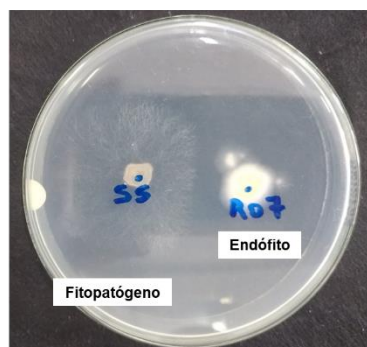
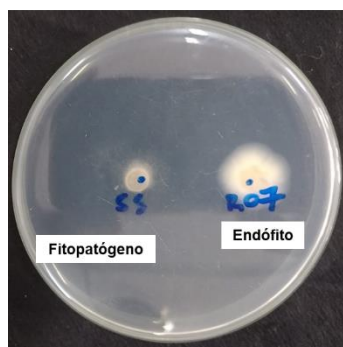
Apêndice 3 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Talaromyces verruculosus* GTR-07.

$$\% \text{inibição} = \frac{\text{Diâmetro do controle} - \text{Diâmetro do endófito}}{\text{Diâmetro do controle} - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

$$\% \text{inibição} = \frac{12 - ((3,4+4,0+4,4)/3)}{12 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

$$\% \text{inibição} = \frac{8,0667}{11,5} \times 100$$

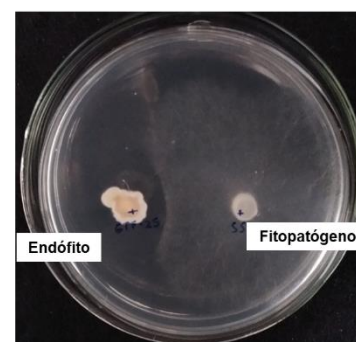
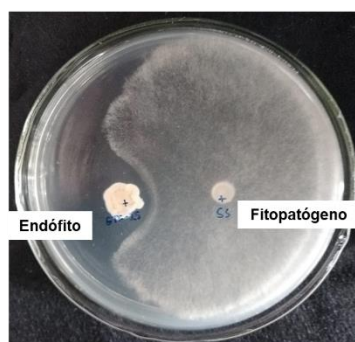
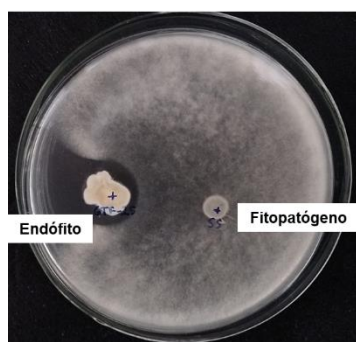
$$\% \text{inibição} = 70,14\%$$



Apêndice 4 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Aspergillus hiratsukae* GTF-25.

$$\% \text{inibição} = \frac{12 - ((6,1+8,3+8,3)/3)}{12 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

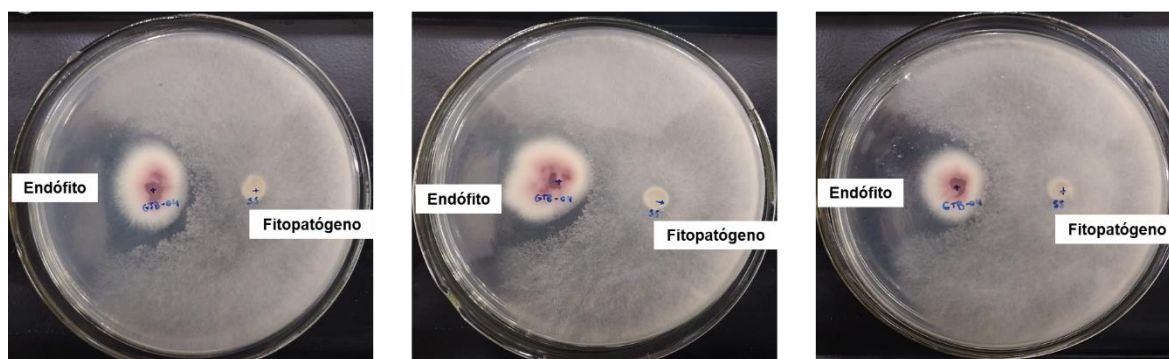
$$\% \text{inibição} = 38,55\%$$



Apêndice 5 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Fusarium* sp. GTB-04.

$$\% \text{inibição} = \frac{12 - ((8,1 + 7,9 + 7,9)/3)}{12 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

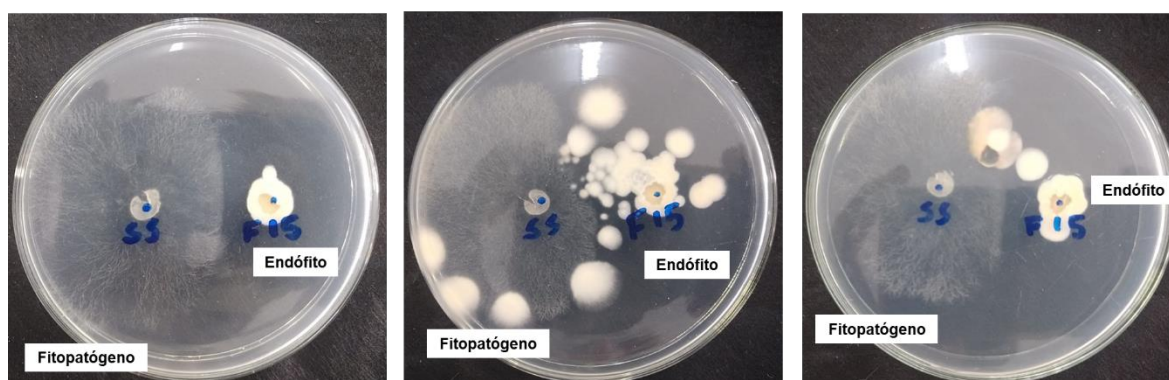
$$\% \text{inibição} = 35,07\%$$



Apêndice 6 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Aspergillus* sp. GTF-15.

$$\% \text{inibição} = \frac{6,8 - ((4,8 + 4,2 + 4,8)/3)}{6,8 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

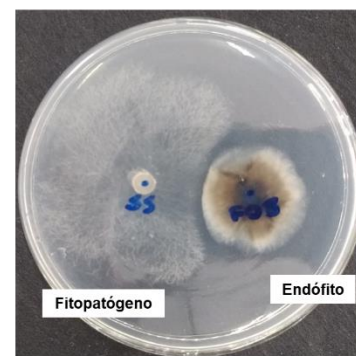
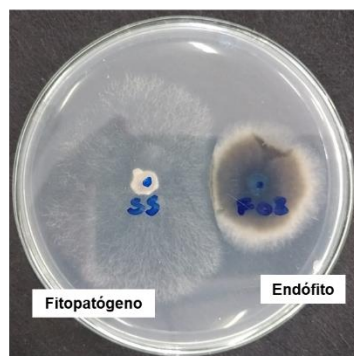
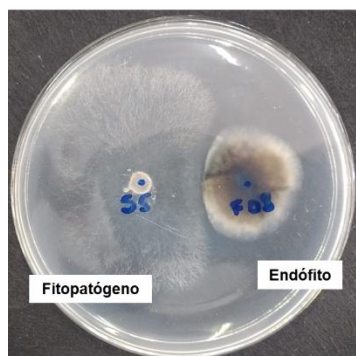
$$\% \text{inibição} = 34,9\%$$



Apêndice 7 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Exserohilum* / *Curvularia* sp. GTF-08.

$$\% \text{inibição} = \frac{6,8 - ((4,4 + 5,1 + 4,4)/3)}{6,8 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

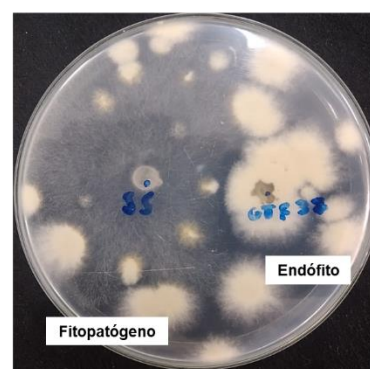
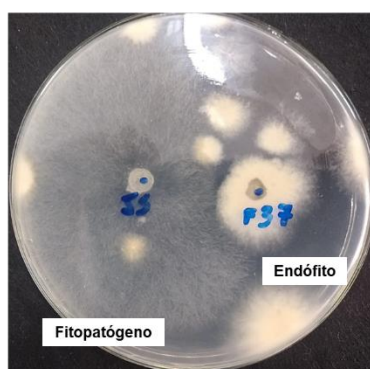
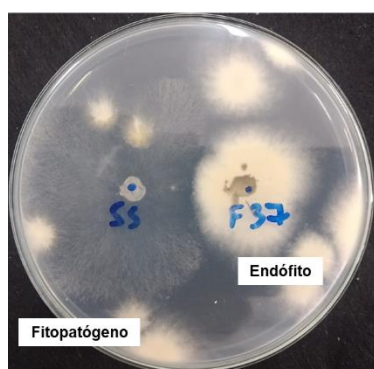
$$\% \text{inibição} = 34,4\%$$



Apêndice 8 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Paecilomyces* sp. GTF-37.

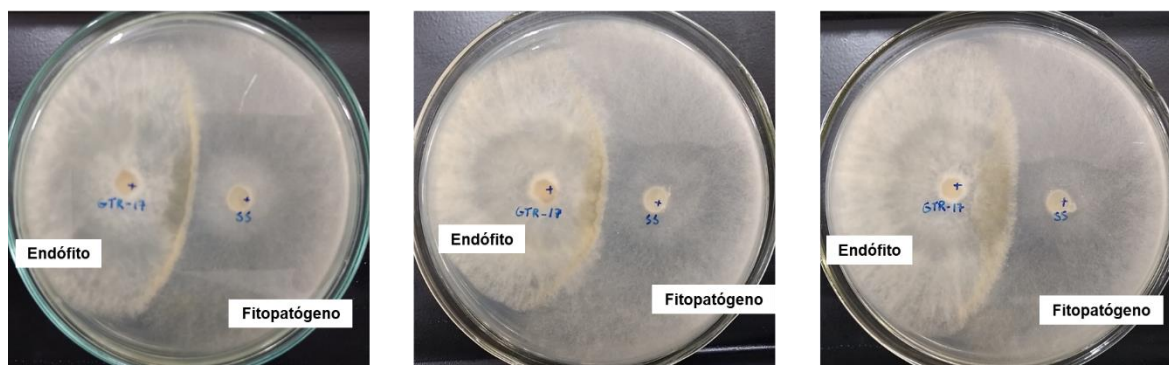
$$\% \text{inibição} = \frac{12 - ((4,3 + 5,1 + 5,4)/3)}{12 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

$$\% \text{inibição} = 28,6\%$$

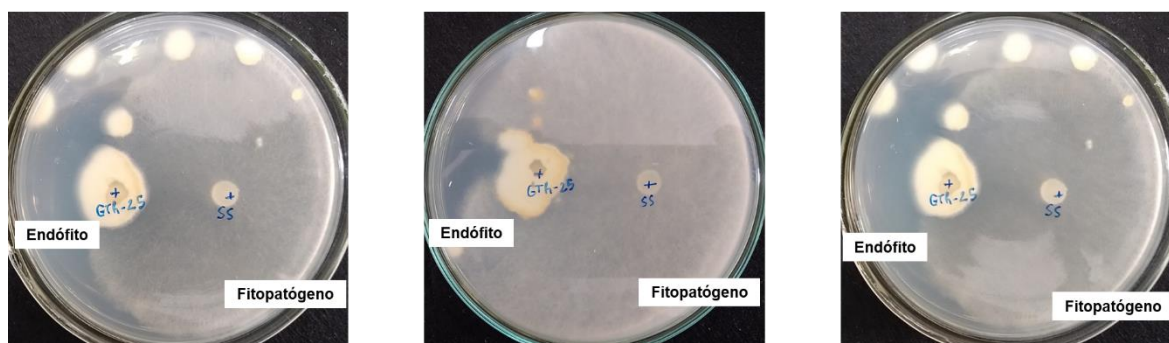


Apêndice 9 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Diaporthe* sp. GTR-17.

%inibição= **n/a**

**Apêndice 10** - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Fusarium* / *Penicillium* sp. GTR-25.

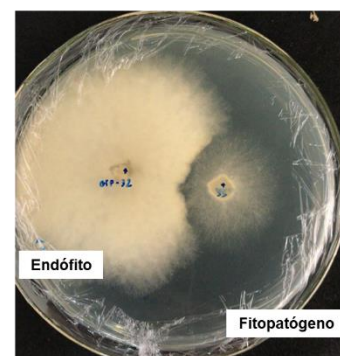
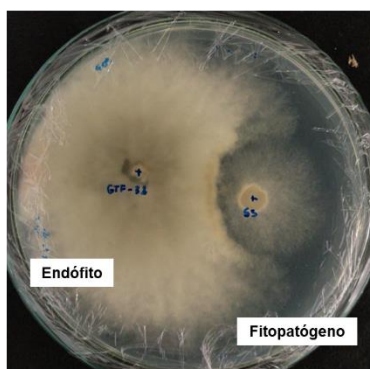
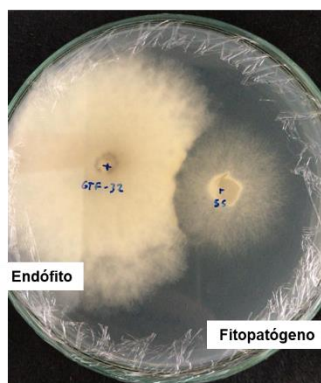
%inibição= **n/a**



Apêndice 11 - Ensaios de antagonismo do fungo endofítico *Neofusicoccum parvum* GTF-32.

$$\% \text{inibição} = \frac{6,8 - ((2,31 + 2,34 + 2,24) / 3)}{6,8 - 0,5 \text{ cm}} \times 100$$

%inibição= 71,5%



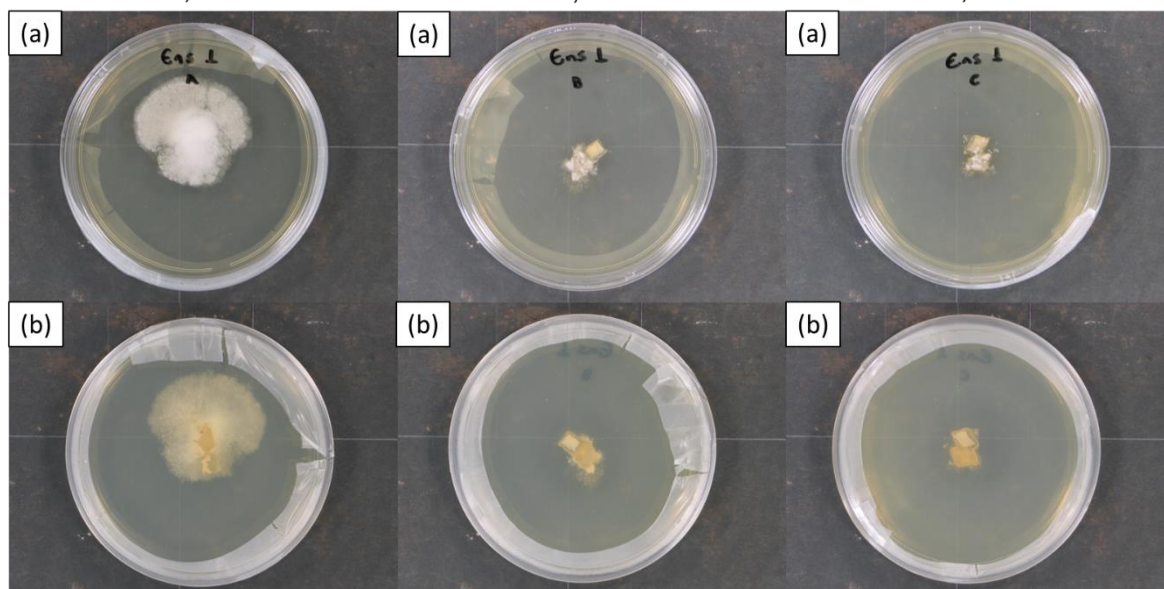
Apêndice 12 - Triplicata da antibiose do ensaio 1 (OSMAC).

Ensaio 1
Média IC: 72,04%

52,82 %

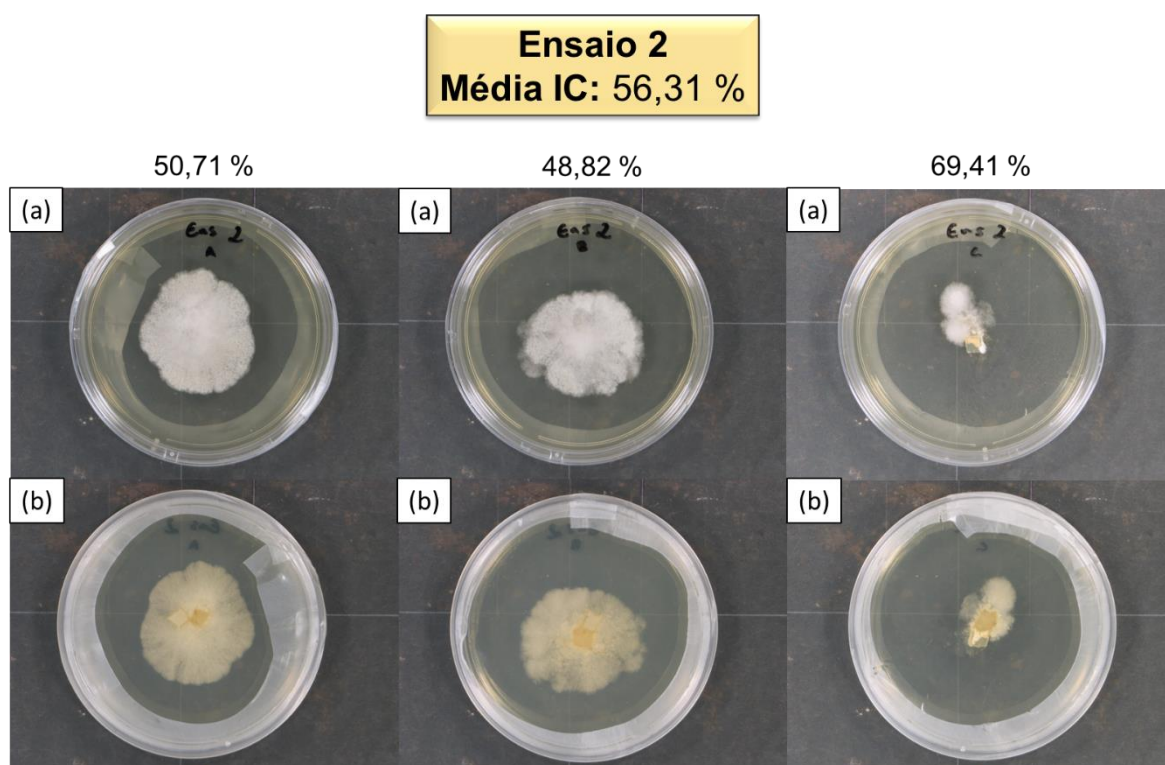
76,71 %

86,59 %



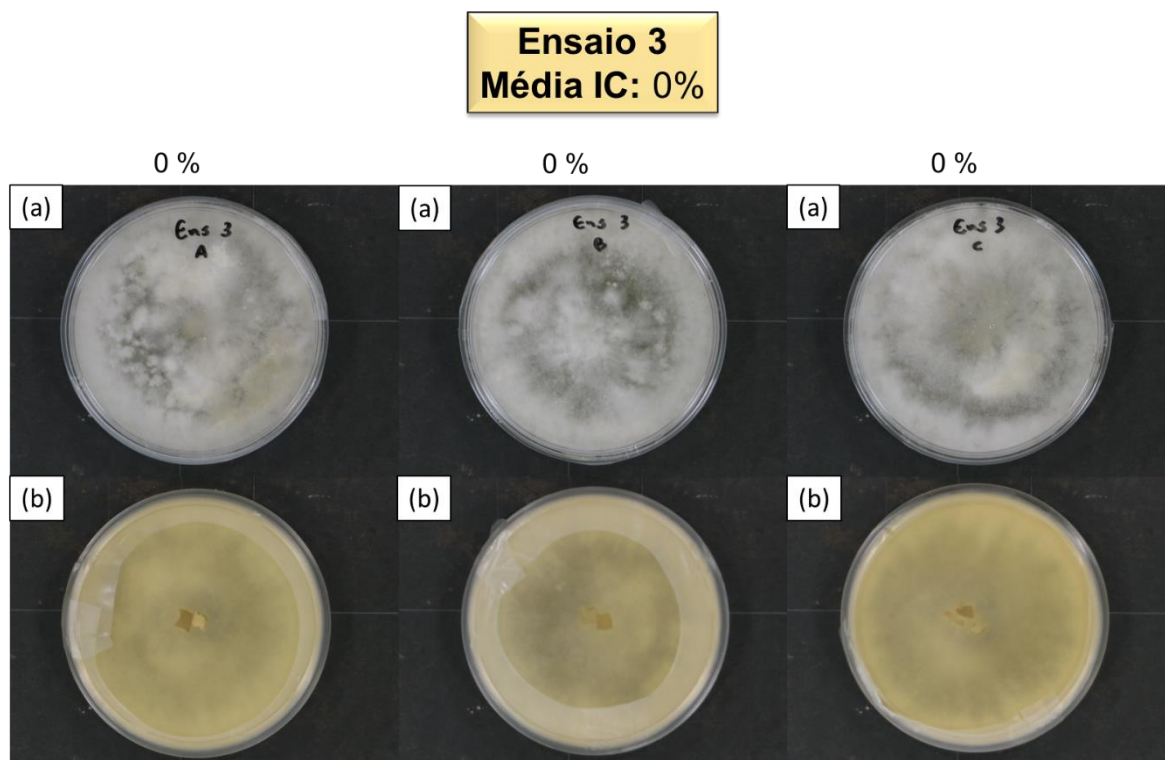
a) frente; **b)** verso.

Apêndice 13 - Triplicata da antibiose do ensaio 2 (OSMAC).



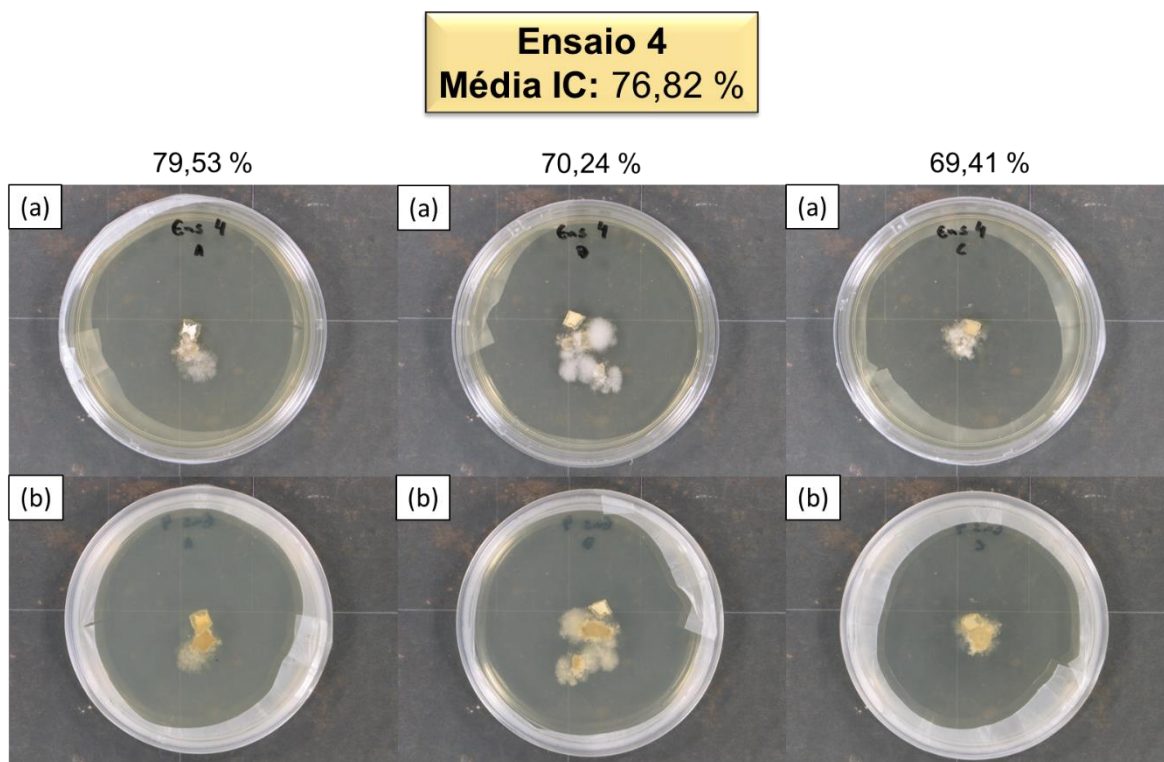
a) frente; b) verso.

Apêndice 14- Triplicata da antibiose do ensaio 3 (OSMAC).



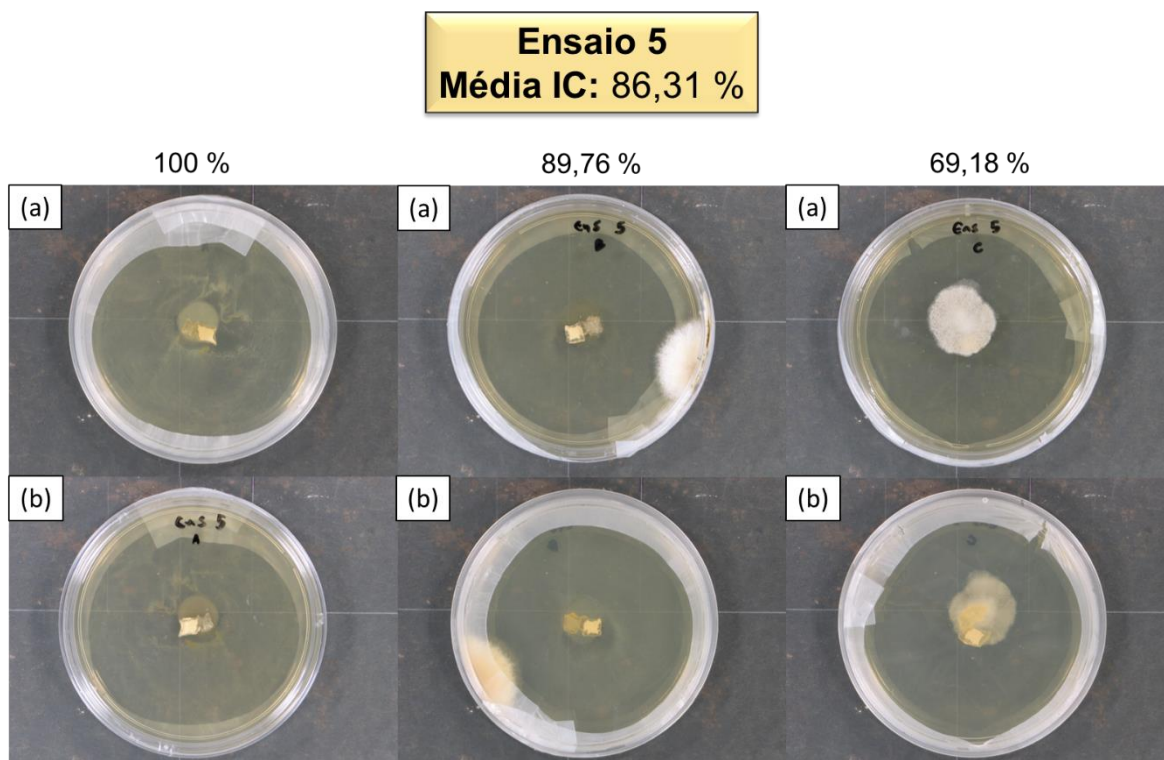
a) frente; b) verso.

Apêndice 15 - Triplicata da antibiose do ensaio 4 (OSMAC).

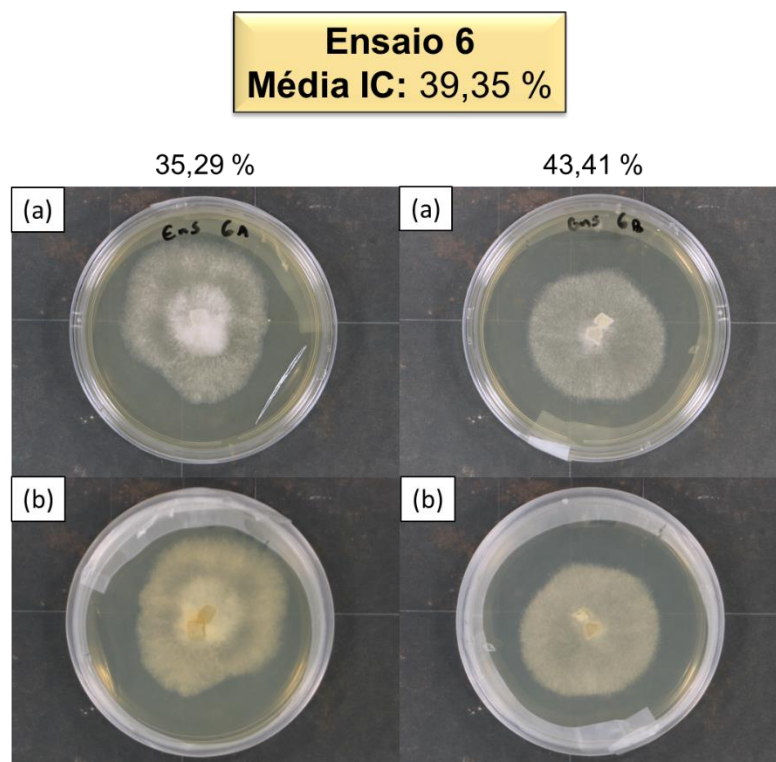


a) frente; b) verso.

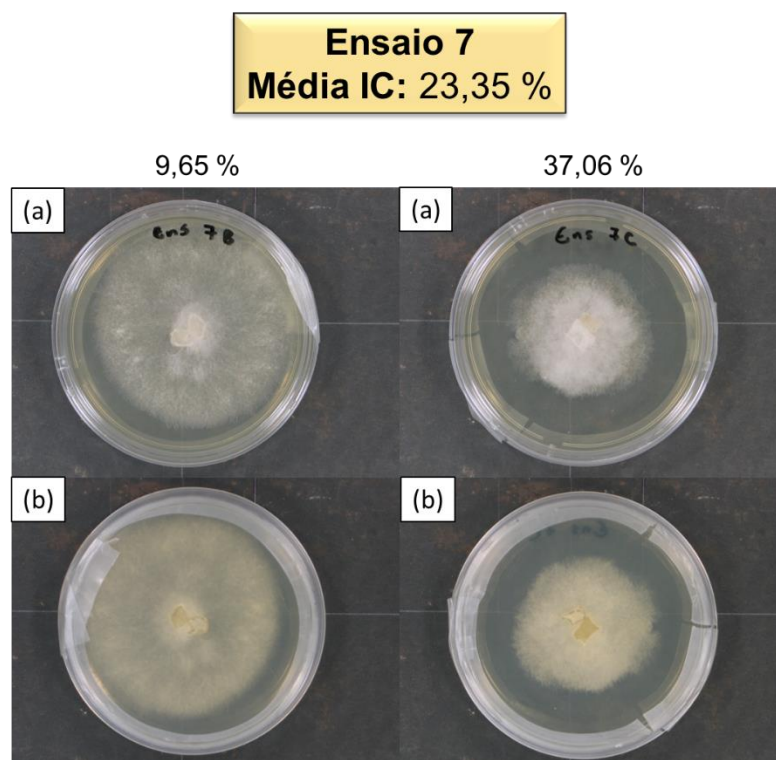
Apêndice 16 - Triplicata da antibiose do ensaio 5 (OSMAC).



a) frente; b) verso.

Apêndice 17 - Duplicata da antibiose do ensaio 6 (OSMAC).

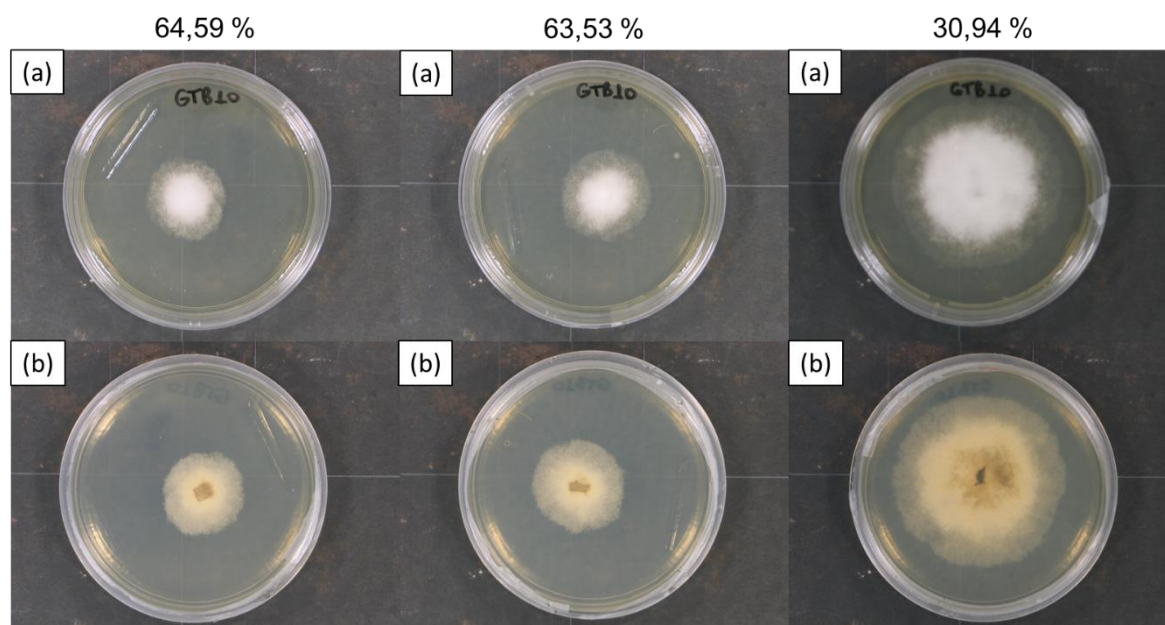
a) frente; b) verso.

Apêndice 18 - Duplicata da antibiose do ensaio 7 (OSMAC).

a) frente; b) verso.

Apêndice 19 - Triplicata da antibiose do ensaio 8 (OSMAC).

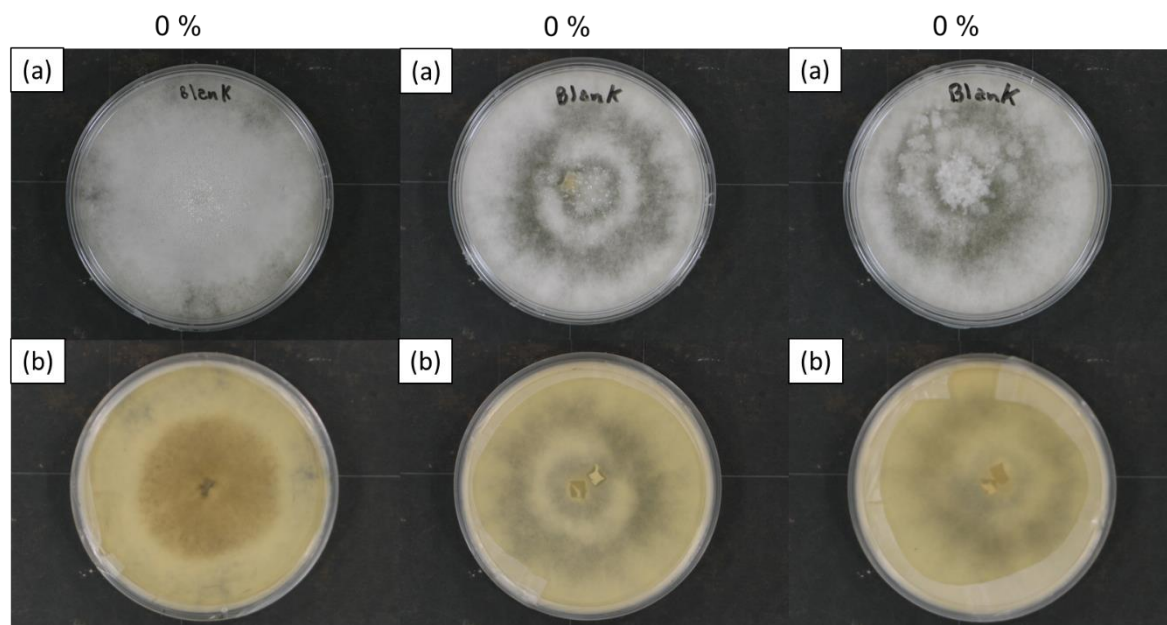
Ensaio 8
Média IC: 53,02 %



a) frente; **b)** verso.

Apêndice 20 - Triplicata da antibiose do branco (DMSO).

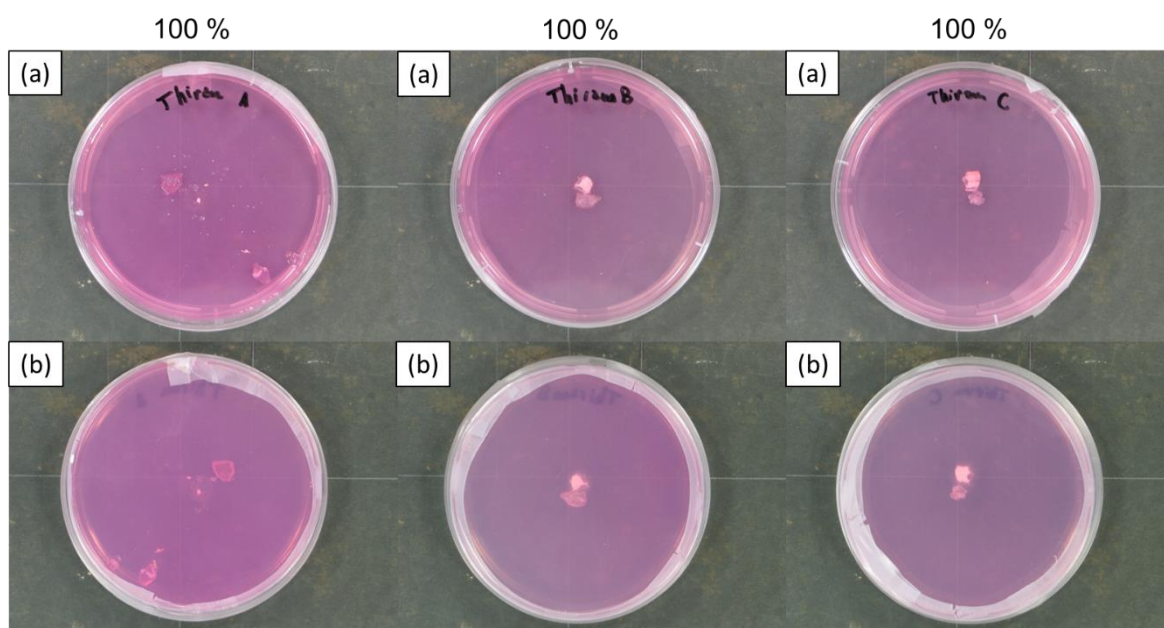
Branco (DMSO)
Média IC: 0 %



a) frente; b) verso.

Apêndice 21 - Triplicata da antibiose do controle (Thiram).

Branco (Thiram)
Média IC: 100 %



a) frente; b) verso.

Apêndice 22 - Sinais detectados da coleção de ensaios do fungo endofítico *P. javanicum* GTB-10.

Sinais da família dos policetídeos				
nº	m/z observado	tr (minutos)	Ensaio OSMAC	Anotação
1	391,2487; 431,2407	7,09	1; 2; 4; 5; 6; 7; 8	Mevastatina ácida
2	391,2492; 408,2754; 413,2309	7,91	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8	Mevastatina lactona
3	393,2646; 433,2567	7,76	1; 2; 4; 5; 6; 7; 8	Dihidromevastatina ácida
4	393,2644; 410,2911; 415,2460	8,54	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8	Dihidromevastatina lactona
5	405,2278; 423,2390; 445,2212	4,63	4;5;6;7;8	6-carbonil mevastatina ácida
6	307,1914	3,21	5;7;8	ML-236A (forma ácida)
7	307,1918	5,10	5;6;7;8	ML-236A (forma lactona)
8	291,1963	4,74	2;7;8	ML-236C (forma ácida)
9	291,1966	5,30	2;4;5;6;7;8	ML-236C (forma lactona)
10	423,2756; 445,2580	8,05	7	Mevastatina metil-carboxilato
11	427,2096	6,68	4;5;7	8-(3-oxo) mevastatina
-	281,1298	3,00	1; 2; 3	N/A
-	269,1548	3,53	4	N/A
-	237,1864	3,77	1; 2; 3	N/A
-	203,1808**	3,99	4	N/A
-	407,2434**	4,01	1;2;3;4;5;7;8	N/A
-	407,2433**	4,34	1;2;3;4;5;6;7;8	N/A
-	423,2384**	4,93	3;4;5;6;7;8	N/A
-	237,1499	5,07	1;2;4	N/A
-	267,1392**	5,24	4;8	N/A
-	439,2347	5,25	4	N/A
-	421,2233	5,29	4;5;6	N/A
-	261,1858**	5,47	1;2	N/A
-	429,2252	5,62	1;2;3;4;5;6;7;8	N/A
-	427,2094	5,64	4;8	N/A
-	263,2010**	5,69	1;2;4;7	N/A
-	301,1451**	5,82	4;5	N/A
-	262,2174**	5,86	1;2	N/A
-	407,2435**	5,96	3;4;5;6;7;8	N/A
-	425,1940	6,15	4	N/A
-	267,1392**	6,24	7;8	N/A
-	269,1548**	6,43	4	N/A
-	317,1397	6,623	4	N/A
-	427,2096	6,68	4;5;7	N/A
-	303,1608**	6,7	4	N/A

-	285,1497**	6,70	4	N/A
-	263,2026**	7,59	1;2	N/A
-	411,2147	7,66	4	N/A
-	263,202**	8,16	1	N/A
Sinais da família dos derivados de aminoácidos				
12	205,0981	2,42	1;2;3;4	Ciclo(Gly-Phe)
13	373,1662	4,37	1;2	Felutanina A
-	411,2287	7,74	1;2;3;4;5;6;7;8	-
-	178,0877	5,80	5;8	-
-	193,0986	4,54	5;6;7;8	-
-	193,0987	5,13	5;6;7;8	-
-	229,1555	2,46	4	-
-	245,1296	2,56	3	-
-	264,1034	5,12	5;7;8	-
-	265,1341	4,42	7;8	-
-	281,1296	5,88	3;5;6;7;8	-
-	291,1136	4,43	5	-
-	291,1139	4,09	5;7;8	-
-	291,1141	5,04	7;8	-
-	293,1287	4,69	5;6;7;8	-
-	309,1242	4,25	5;6;7;8	-
-	311,1397	4,41	5;7;8	-
-	311,1403	5,10	5;7;8	-
-	321,1242	5,12	8	-
-	321,1242	5,94	7;8	-
-	323,1396	4,99	3;6;8	-
-	323,1401	5,44	5;7;8	-
-	325,1554	5,24	7;8	-
-	327,1354	5,89	3;5;6;7;8;	-
-	339,1346	3,97	5;7;8	-
-	339,1351	4,57	5;7;8	-
-	339,1352	5,03	5;7;8	-
-	341,1502	4,87	5;6;8	-
-	343,1669	7,74	1;2	-
-	357,1452	4,54	8	-
-	369,2185	8,22	1;4	-
-	377,1614	4,37	1;2	-
-	383,1763	5,88	5;7;8	-

-	394,2131	5,45	1;2;4	-
-	401,1867	5,86	7;8	-
-	410,2449	6,56	1;2;4	-
-	415,2028	7,68	7;8	-
Sinal do isoflavonóide				
14	255,0652	4,3	1;2;4	Daidzeína
Sinais de família molecular não identificada #1				
-	397,1036	5,04	5;6;7;8	-
-	379,0935	5,19	3;5;6;7;8	-
-	321,0880	5,56	5;6;7	-
-	319,0726	5,71	3;5;6;7;8	-
-	379,0934	5,82	5;6;7;8	-
-	367,0756	5,82	5;6;7;8	-
-	427,0968	6,07	5;6;7;8	-
-	445,0537	6,15	5;6;7;8	-
-	292,0855	6,15	5	-
-	385,0322	6,16	5;7	-
-	320,0805	6,16	5;6;7;8	-
-	381,1083	6,17	6;7;8	-
-	303,0778	6,21	3;5;6;7;8	-
-	397,1036	6,35	5;6;7;8	-
-	337,0830	6,35	5;6;7;8	-
-	319,0727	6,36	5;6;7;8	-
-	305,0929	6,36	5;7	-
-	367,0759	6,36	5;6;7;8	-
-	321,0882	6,49	5;7;8	-
-	363,0988	6,50	5;6;7;8	-
-	381,1091	6,55	5;6;7	-
-	364,1060	6,87	5;7;8	-
-	303,0775	7,03	5;6;7;8	-
Sinais de família molecular não identificada #2				
-	275,0927	7,30	1;2;3;4;6;8	-
-	257,0823	7,26	2;4;5;6	-
-	275,0920	4,45	1;2;4	-
Sinais de família molecular não identificada #3				
-	273,1243	2,67	3	-
-	303,1351	2,54	1;2;4	-
Sinais de família molecular não identificada #4				

-	405,1671	5,47	3	-
-	422,1937	5,47	3	-
Sinais de família molecular não identificada #5				
-	397,2358	9,64	2;4;7;8	-
-	395,2201	8,96	2;4;5;7	-
Sinais de família molecular não identificada #6				
-	178,0878	3,03	3;7;8	-
-	196,0983	3,04	7;8	-
Sinais de família molecular não identificada #7				
-	346,2968	5,26	3	-
-	318,3020	6,85	3	-
Sinais de família molecular não identificada #8				
-	299,1289	6,62	4	-
-	283,1340	6,15	4	-
Sinais de família molecular não identificada #9				
-	429,2399	6,13	1;2	-
-	361,1778	6,14	1;2	-