

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Roberth Nascimento da Trindade

Exploração racional da rizosfera de *Senna spectabilis*: Interações entre
as bactérias *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella sp.*

Araraquara
2016

Roberth Nascimento da Trindade

Exploração racional da rizosfera de *Senna spectabilis*: Interações entre as bactérias *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella sp.*

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

T832e Trindade, Roberth Nascimento da
Exploração racional da rizosfera de *Senna spectabilis*.
interações entre as bactérias pseudoxanthomonas indica e
shigella sp / Roberth Nascimento da Trindade –
Araraquara : [s.n], 2016
66 f. : il.

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

1. Metabólitos. 2. Shigella. 3. Bactérias. 4. Rizosfera.
5. Espectrometria de massa. I. Título.

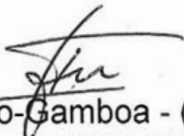
Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

ROBERTH NASCIMENTO DA TRINDADE

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

Araraquara, 22 de janeiro de 2016.

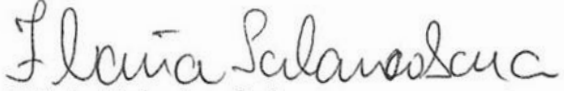
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa - (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof^a. Dr^a. Flávia Talarico Saia
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / Santos – SP

*“Olhe sempre pros dois lados antes de julgar, de se manifestar
ou pra cruzar a rua...”*

Nenhum de Nós – Dança do Tempo

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Roberth Nascimento da Trindade

Data de Nascimento: 04 de outubro de 1987

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: Ilhéus – BA

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Gerônimo Nascimento da Trindade e Maria Vitória de Jesus Nascimento

Endereço: Rua Alto Belmonte, 407 Ilhéus – BA

E-mail: octuberman@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Ensino Médio

Centro Educacional Álvaro Melo Vieira, Ilhéus – BA. Concluído em 2005.

2.2 Ensino Superior

Licenciado em Química, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus -BA.

Concluído em 2012.

3. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.1 Participação em eventos científicos

São Paulo Advanced School on Bioorganic Chemistry., Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- (unesp-IQ/CAr), Araraquara –SP, 2013.

38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia SP, 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as agências de fomento que foram de grande suporte para o seguimento das análises empregadas nesse trabalho. Aos meus pais que foram e são de grande importância ao longo de toda a minha jornada, ou ainda desde quando me entendo por pessoa, obrigado por toda dedicação e carinho. Aos meus professores que fizeram parte da minha formação acadêmica até então, em especial ao Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, por toda paciência, orientação e as várias conversas em sua sala. Dentre os outros, que citados assim como outros, parecem ser mencionados como menos significantes, mas contraditoriamente a essa ideia, os outros que cito aqui são os amigos! Ah, esses sim também se fizeram presentes e essenciais durante todo esse período, não é fácil mudar, ir embora deixar um tanto do que foi construído ao longo de um tempo para ir atrás de uma nova jornada, um outro jeito de viver a vida, pois então, amigos, foram presente e se fizeram presentes durante muitos e muitos dias e também durante duradouras conversas madrugada a fora. Aos amigos de longa data, os novos, esses últimos que embora corroborem dos mais recentes dias, são como se fosse parte daquele passado lá atrás. Por hora deixo aqui aquela minha singela gratidão e homenagem a eles. Nomes? Não se fazem necessários, pois como já fora ouvido por uma cantora que aprecio muito: “ não basta o compromisso, vale mais o coração...” então dispenso-me do compromisso com nomes e deixo nessa entre linha minha gratidão aos meus amigos, sem mais delongas obrigado por tudo mais uma vez.

RESUMO

O descobrimento de novas moléculas bioativas tem sido o grande alvo ao decorrer dos anos da química dos produtos naturais, particularmente, micro-organismos tem se evidenciado como uma importante fonte do descobrimento de novos fármacos. Uma ampla gama de compostos provenientes de organismos microbianos são relatados na literatura, porém, recentes pesquisas demonstram que tais micro-organismos podem sofrer indução por determinados agentes externos, químicos ou físicos, através de mecanismos de defesa ou até mesmo o mutualismo existente em determinado meio, produzindo novas estruturas químicas, que até então, tinham sua rota biosintética silenciada devido a metodologias padrões de cultivo isolado. Através de utilização de culturas mistas de bactérias, o presente trabalho proporciona o conhecimento da relação existente entre *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella sp.*, ambas provenientes da rizosfera de *Senna spectabilis*. Para isso, as bactérias foram cultivadas em meio de cultivo líquido czapek broth, sendo realizado o estudo do crescimento das bactérias e produção de metabolitos frente ao tempo, tendo em vista uma maximização de resultados e maior indução de compostos químicos. A utilização de ferramentas analíticas de análise rápida e eficiente como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) propiciaram a obtenção do perfil cromatográfico dos micro-organismos estudados em cultura mista e simples, sendo possível observar a existência de compostos químicos produzidos apenas em co-cultura, evidenciado o potencial existente da abordagem utilizada.

Palavras-chave: *Senna spectabilis*; *Pseudoxanthomonas indica*; *Shigella sp.*; co-cultivo; rizosfera

ABSTRACT

The discovery of new bioactive molecules has been the big target to over the years the chemistry of natural products, particularly micro-organisms has been shown to be an important source of discovery of new drugs. A wide range of compounds from microbial organisms are reported in the literature, however, recent research shows that these micro-organisms can undergo induction by certain external, chemical or physical agents, through defense mechanisms or even the existing mutualism on a particular medium, producing new chemical structures, which until then had silenced their biosynthetic route due to methodologies patterns of isolated farming. Through use of mixed cultures of bacteria, this study provides knowledge of the relationship between *Pseudoxanthomonas indica* and *Shigella sp.*, Both from the rhizosphere of *Senna spectabilis*. For this, bacteria were grown in liquid Czapek broth cultivation being conducted the study of the growth of bacteria and production of metabolites against time, with a view to maximizing results and greater induction of chemical compounds. The use of analytics quickly and efficiently analyzes such as high-performance liquid chromatography tools (HPLC) associated with high resolution mass spectrometry (HRMS) enabled the obtaining of the chromatographic profile of microorganisms studied in mixed and single culture, and you can to observe the existence of chemical compounds produced only in co-culture demonstrated the potential of the approach used.

Keywords: *Senna spectabilis*; *Pseudoxanthomonas indica*; *Shigella sp.*; co-culture; rhizosphere

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das moléculas de penicilina e estreptomicina.	12
Figura 2 - Estrutura das moléculas de avermectina e artemisina.	13
Figura 3 – frutos e flores de <i>Senna spectabilis</i>	14
Figura 4 - alcaloides piperidinicos descritos por (SILVA et al., 2010) para <i>Senna spectabilis</i>	15
Figura 5 - Representação esquemática da metodologia empregada para curva de crescimento.	24
Figura 6 - Curva de monitoramento do crescimento das linhas <i>Pseudoxanthomonas indica</i> (CSP-49) e <i>Shigella sp.</i> (CSP-52b)	27
Figura 7 - <i>Fingerprint</i> obtido a partir de análise por HPLC-CAD para o extrato CSP-49 (preto) e czapek (vermelho).	29
Figura 8 - <i>Fingerprint</i> obtido a partir de análise por HPLC-CAD para o extrato CSP-52b (preto) e czapek (vermelho).	30
Figura 9 - <i>Fingerprint</i> obtido a partir de análise por HPLC-CAD para o extrato CSP-MIX (preto) e czapek (vermelho).	31
Figura 10 – Sobreposição do perfil cromatográfico dos extratos CSP-49, CSP52b e CSP-MIX.	32
Figura 11 - Cromatograma de íons totais do extrato de CSP-49 (<i>P. indica</i>).	33
Figura 12 - Pico relativo ao íon extraído m/z 146,0617 do TIC de CSP-49 (<i>P. indica</i>).	34
Figura 13 - Picos relativos aos íons extraídos $[M+H]^+ = m/z$ 245,0248 e $[M+Na]^+ = 267,0089$ do TIC de CSP-49 (<i>P. indica</i>).	35
Figura 14 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 382,1551 do TIC de CSP-49 (<i>P. indica</i>).	36
Figura 15 - Picos relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 301,1414 do TIC de CSP-49 (<i>P. indica</i>)	37
Figura 16 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 315,1567 do TIC de CSP-49 (<i>P. indica</i>).	38
Figura 17 - Cromatograma de íons totais para o extrato de CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>).	39
Figura 18 - Picos relativos aos íons extraídos $[M+H]^+ = m/z$ 147,0930 e m/z 279,1349 do TIC de CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>)	40

Figura 19 - Picos relativos aos íons extraídos $[M+H]^+ = m/z$ 243,0883 e $[M+Na]^+ = m/z$ 265,0702 do TIC de CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>)	42
Figura 20 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 295,1891 do TIC de CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>)	43
Figura 21 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 329,1727 do TIC de CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>)	44
Figura 22 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 282,2801 do TIC de CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>)	45
Figura 23 - Cromatograma de íons totais para o extrato da co-cultura entre as linhagens CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>) e CSP-49 (<i>P. indica</i>).	46
Figura 24 – Região ampliada de 27,5 min – 31,5 min do cromatograma de íons totais para o extrato da co-cultura entre as linhagens CSP-52b (<i>Shigella sp.</i>) e CSP-49 (<i>P. indica</i>).	47
Figura 25 - Mapas de íons 2D dos extratos (Rt vs. m/z), CSP-49	48
Figura 26 - Mapas de íons 2D dos extratos (Rt vs. m/z), para o extrato de CSP-52b	49
Figura 27 - Mapas de íons 2D dos extratos (Rt vs. m/z), para o extrato CSP-MIX	50
Figura 28 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 302,0977 do TIC de CSP-MIX (co-cultivo.)	52
Figura 29 - Íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 250,1124 do TIC de CSP-MIX (co-cultivo.).	53
Figura 30 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 373,1524 do TIC de CSP-MIX (co-cultivo.).	54
Figura 31 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 250.	55
Figura 32 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 282.	55
Figura 33 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 302.	56
Figura 34 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 313.	56
Figura 35 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 354.	57
Figura 36 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 373.	57
Figura 37 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 389.	58
Figura 38 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 475.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
C18	Octadecilsilano
CAD	<i>Charged Aressol Detector</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DNP	<i>Dicionary Natural Products</i>
ECMDB	<i>E. Coli Metabolome Database</i>
EtOH	Etanol
HMDB	<i>The Human Metabolome Database</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (cromatografia líquida)
mAU	<i>Mili Absorbance Units</i> (mili unidades de absorbância)
MeOH	Metanol
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de massa)
mV	Milivolts
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
pA	<i>Pico Ámpere</i>
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i>
PN	<i>Produto Natural</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Micro Extraction</i>
SB	<i>System biology</i>
TOF	<i>Time of flight</i>
UA	Unidades de Área
µL	Microlitros

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO
	12
	<i>Senna spectabilis</i>
	13
	Rizosfera
	16
	Bactérias
	17
	Co-cultivo microbiano
	17
	Desreplicação
	18
2	OBJETIVOS
	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS
	21
	Estudos prévios sobre <i>S. spectabilis</i>.
	21
3.1	Assepsia de materiais.
	22
3.2	Equipamentos
	22
3.3	Soluções utilizadas
	23
3.4	Bactérias
	23
3.5	Monitoramento do crescimento bacteriano
	23
3.6	Cultivo e co-cultivos das bactérias
	24
3.7	Obtenção dos extratos bruto
	25
3.8	Análises cromatográficas
	25
3.9	Análises espectrometria de massas
	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO
	27
4.1	Monitoramento do crescimento bacteriano
	27
4.2	<i>Firngerprint</i> das linhagens bacterianas
	29
4.3	Análises por espectrometria de massas de alta resolução
	33
5	CONCLUSÕES
	60
6	PERSPECTIVAS
	61
	REFERÊNCIAS
	63

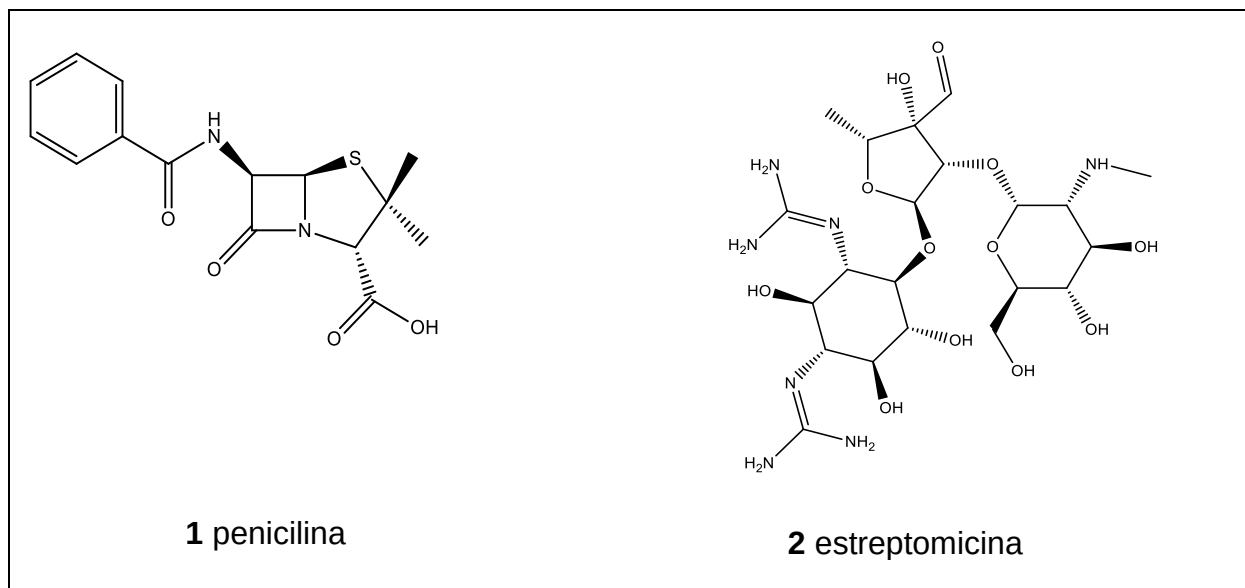
1 INTRODUÇÃO

Durante a história do homem, desde as civilizações egípcias, greco-romanas e chinesas, utiliza-se fontes naturais para alívio e cura de doenças (MOLINSKI, 2010). Por possuírem essas propriedades, conduziram novas descobertas visando moléculas medicamentosas (Produtos Naturais), demandando estudos interdisciplinares nas áreas de química, biologia e medicina (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os Produtos Naturais (PNs) são metabolitos secundários produzidos por diversas fontes naturais como, plantas, micróbios e outros organismos, possuindo uma enorme diversidade estrutural e química (MOLINSKI, 2010).

Em meados da década de 50, as descobertas da penicilina (**1**) e estreptomicina (**2**) (Figura 1), por Alexander Fleming e Selman Abraham Waksman, respectivamente, estimularam as pesquisas de produtos naturais voltadas ao descobrimento de novas drogas (LI; VEDERAS, 2009)(ALY et al., 2010).

Figura 1 - Estrutura das moléculas de penicilina e estreptomicina.

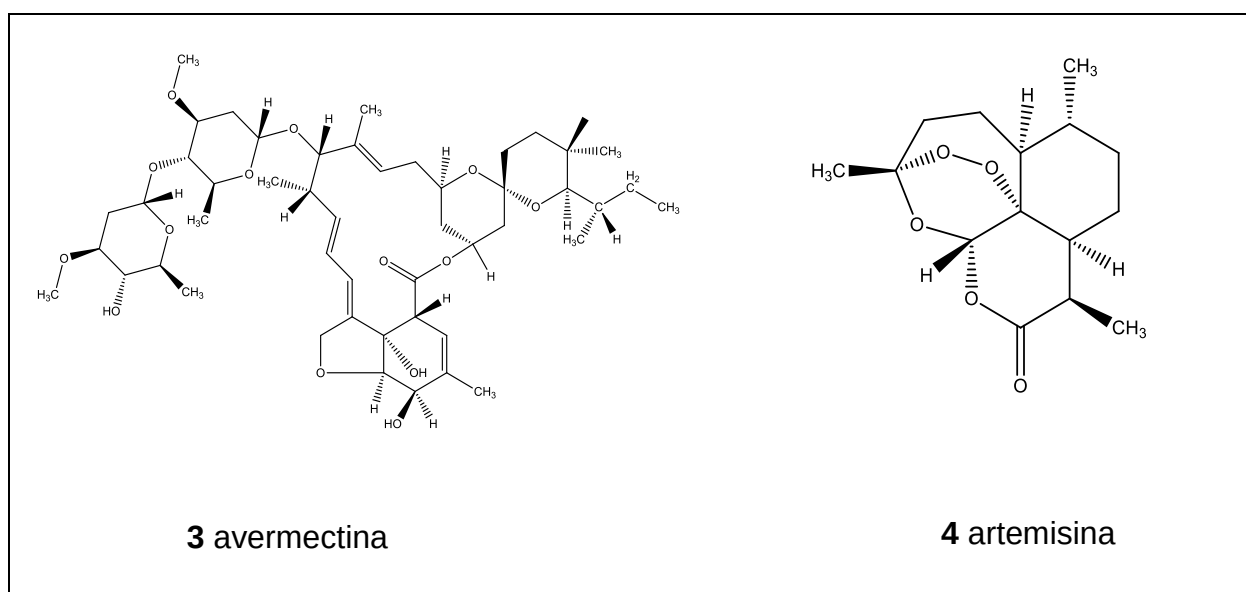


Contudo, ao final da década de 90, o emprego da técnica de triagem biológica automatizada em alta escala (HTS – *high throughput screening*), que baseia-se em sínteses combinatórias, substituíram o isolamento de produtos naturais, visto que,

consistiam muitas vezes de extratos e frações parcialmente purificadas (LI; VEDERAS, 2009).

Em 2015 após a laureação com o Nobel em Fisiologia ou Medicina de Willian C. Campbell e Satoshi Omura, pela descoberta do produto natural microbiano, avermectina (**3**), e YouYou Tu pela artemisina (**4**) (Figura 2) juntamente com o avanço de tecnologias analíticas, as pesquisas em PNs foram resgatadas, demonstrando a sua importância no cenário da terapêutica moderna (SHEN, 2015).

Figura 2 - Estrutura das moléculas de avermectina e artemisina.



1.1 *Senna spectabilis*

Senna spectabilis popularmente conhecida como são-joão, cássia-do-nordeste, canafístula-de-besouro e pau-de-ovelha, apresenta-se no Brasil nos estados de Santa Catarina, Paraná e algumas regiões do sudeste (ALBUQUERQUE MELO, DE et al., 2014).

As plantas dessa espécie são angiospermas com porte médio de 10 m, caule com de 30-40 cm de diâmetro, e suas folhas são compostas por aproximadamente 12 pares de folíolos pontiagudos na extremidade, suas flores são amarelas e florescem em buquês, já seus frutos apresentam-se em favas (Figura 3).

Figura 3 – frutos e flores de *Senna spectabilis*

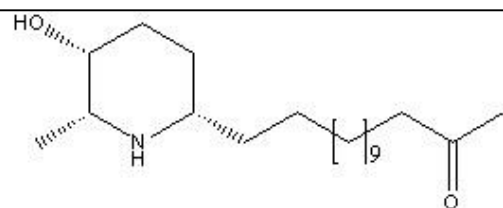


Quanto a classificação da ordem taxonômica a *S. spectabilis* apresenta a seguinte hierarquia segundo *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS):

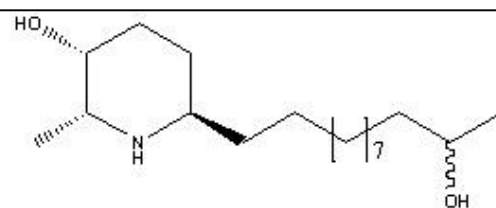
reino	Plantae
sub reino	Viridiplantae
infra reino	Streptophyta
super divisão	Embryophita
divisão	Tracheophyta
subdivisão	Spermatophytina
classe	Magnoliopsida
super ordem	Rosanae
ordem	Fabales
família	Fabaceae
gênero	Senna
espécie	spectabilis

Estudos associados à *S. spectabilis* denotou a presença de alcaloides, piperidínicos como, (-)-espectalina (5), 6-iso-espectalina (6), (-)-7-hidroxi-espectalina (7), (-)-3-O-acetil-espectalina (8), (-)-espectalinina (9), (-)-6-iso-carnavalina (10), carnavalina (11), leptofilina A (12), 3-O-acetil-leptofilina A (13) e leptofilina B (14). (Figura 4).

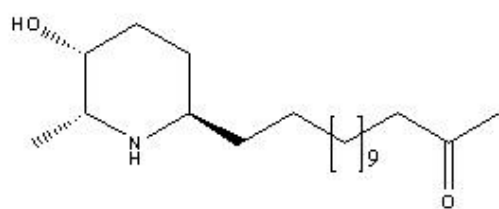
Figura 4 - alcaloides piperidínicos descritos por (SILVA et al., 2010) para *Senna spectabilis*



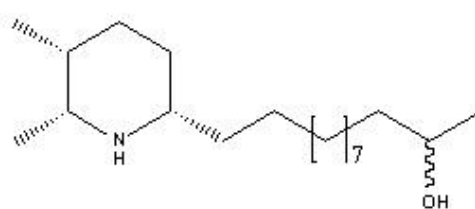
5 (-)-espectalina



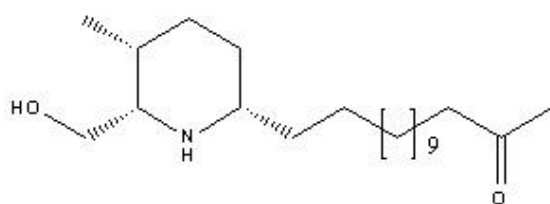
10 (-)-6-iso-carnavalina



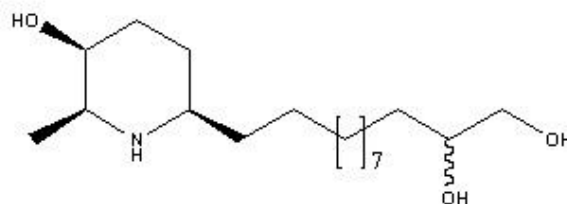
6 6-iso-espectalina



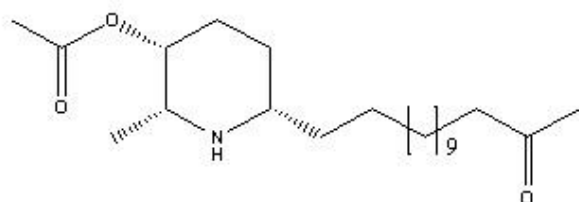
11 camavalina



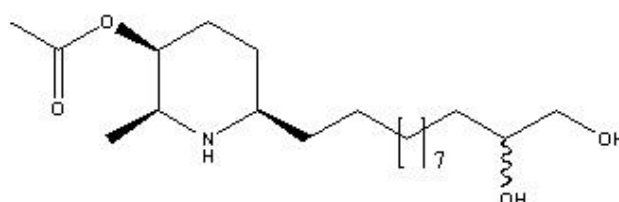
7 (-)-7-hidroxi-espectalina



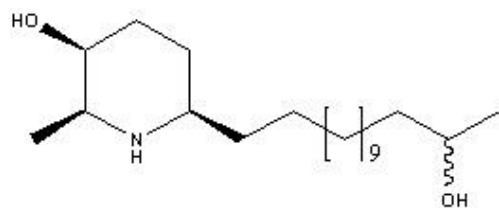
12 leptofilina A



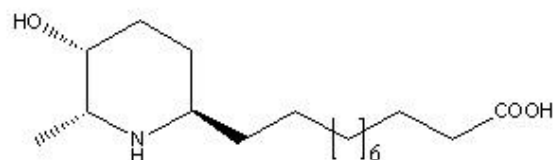
8 (-)-3-O-acetil-espectalina



13 3-O-acetil-leptofilina A



9 (-)-espectalinina



14 leptofilina B

Estudos indicaram que esses alcaloides piperidínicos apresentaram atividades anti-inflamatórias, analgésicas, laxativas, anestésicas, antimicrobianas e principalmente com protótipos inibidores da acetilcolinesterase sugerindo potencial tratamento para o mal de Alzheimer (VIEGAS et al., 2004)(VIEGAS JUNIOR et al., 2006) (BOLZANI et al., 1995) (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003).

1.2 Rizosfera

A rizosfera refere-se à região do solo, aproximadamente 1 mm de largura, diretamente associada às raízes onde está localizada máxima atividade microbiana. O crescimento das plantas é controlado, substancialmente, pelo solo na região radicular, ambiente que a própria planta ajuda a criar através dos seus exsudatos (LINES-KELLY et al., 2005).

Os exsudatos são constituídos por água, aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos que atuam como mensageiros estimulando as interações físicas e biológicas entre as raízes e uma diversidade de organismos presentes no solo (EL-SHATNAWI; MAKHADMEH, 2001).

Dentre os organismos encontrados na rizosfera destacam-se: bactérias, actinomicetos, fungos, protozoários, algas, nematóides, vermes enquitreídeos, minhocas, centopéias, lacraias, insetos, ácaros, caracóis, pequenos animais e vírus do solo que competem constantemente por água, comida e espaço (FAURE et al., 2009).

Essa atividade e diversidade biológica fazem com que a rizosfera seja o ambiente mais dinâmico do solo. No entanto, o destino completo dos exsudatos na rizosfera e a complexa natureza de suas reações no solo permanecem pouco compreendidas e estudadas (LINES-KELLY et al., 2005; FAURE et al., 2009).

De maneira geral, até 2012, foram isolados 136 fungos filamentosos, 61 bactérias da rizosfera de *S. spectabilis*. Neste trabalho foram selecionadas duas bactérias, *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella* sp.

1.3 Bactérias

As bactérias que colonizam a área denominada como rizosfera são conhecidas como rizobactérias. Elas podem atuar de forma indireta pela supressão de doenças e diretamente pela produção ou alteração da concentração de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos ou outros nutrientes do solo, oxidação de enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos promovendo o crescimento da planta (MARIANO & KLOEPPER, 2000).

Dentre as 61 bactérias isoladas da rizosfera de *S. spectabilis* podemos destacar as *Pseudoxanthomonas. indica* e *Shigella. sp.*, presentes neste trabalho.

O gênero *Pseudoxanthomonas* pertence à família *Xanthomonadaceae* da ordem *Xanthomonadales*. Os membros deste gênero são aeróbios, gram-negativos e não formadores de esporos. Sua espécie *P. indica* é lisa, esférica e possui coloração amarelo forte, apresentando temperatura ótima de crescimento em 28°C. (KUMARI et al., 2011)

Já *Shigella sp.* pertence à família *Enterobacteriaceae* da ordem *Enterobacteriales*. Também são gram-negativas e não formadoras de esporos. Ao contrário da bactéria anterior, são aeróbios e anaeróbios facultativos, em formato de bastonete. Sua temperatura de crescimento pode variar de 10-45°C tendo como temperatura ótima em 37°C (YANG et al., 2005).

Há poucos trabalhos que relatam o estudo dos metabólitos secundários produzidos por essas bactérias. A diversidade estrutural e química destes produtos naturais torna-se potencial a novos trabalhos e descobertas.

1.4 Co-cultivo microbiano

Os estudos de produtos naturais vindos de micro-organismos são usualmente focados a partir de culturas individuais. Essa abordagem, por mais efetiva que seja, não é capaz de observar um comportamento próximo ao natural (Oslen, et al. ,1986).

Uma forma de contornar essa problemática é através do co-cultivo. Nele, diferentes micro-organismos são cultivados em um mesmo meio, induzindo a competição e/ou sinergismo entre eles.

Estas interações induzem uma resposta química, resultando no aumento de alguns metabólitos, redução, produção de novos, ou ainda podem não sofrerem

interação apresentando características idênticas às culturas individuais, simulando assim algumas interações bióticas (ALY et al., 2011).

O co-cultivo sugere um avanço nos estudos de produtos naturais uma vez que foi pouco explorado na literatura. Assim ensaios de indução inter-espécie e inter-gênero se fazem necessários.

Tendo isso em vista, esta abordagem se torna valiosa, diante do panorama exposto da exploração racional da rizosfera.

1.5 Desreplicação

A “Desreplicação” constitui um conjunto de metodologias rápidas de detecção de substâncias pertencentes a uma matriz bruta com o objetivo de evitar o re-isolamento de compostos já relatados na literatura. O processo de desreplicação inclui o acoplamento de técnicas de separação e detecção (HPLC-NMR - cromatografia líquida com ressonância magnética nuclear; GC-MS - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e HPLC-MS - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas), bem como bioensaios e análises que permitam a comparação dos conjuntos de dados obtidos através do uso de bibliotecas virtuais detentoras de dados quimiotaxonômicos, farmacológicos e físico-químicos, tais como NAPRALERT ou DNP (Dicionário de Produtos Naturais) (CORDELL et al., 1997; LANG et al., 2008, NG et al., 2009).

A ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massas são as técnicas mais utilizadas para a detecção da composição metabólica de um determinado sistema:

- A espectrometria de massas é altamente sensível e proporciona informações moleculares e padrões de fragmentos para uma ampla gama de metabólitos. No entanto, requer a confirmação a partir de compostos padrão, que muitas vezes não está disponível, especialmente para substâncias desconhecidas (TANG et al., 2009);

- A ressonância magnética nuclear possui robustez e alta sensibilidade na quantificação dos núcleos ativos orgânicos mais populosos: ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P e permite que um catálogo de espectros bidimensionais possa ser utilizado para obter conectividade atômica em uma molécula e subsequentemente a sua elucidação (VERPOORTE et al., 2007; KIM et al., 2010). Entretanto possui baixa sensibilidade intrínseca para baixas concentrações de metabólitos e a sobreposição de sinais em

uma mistura complexa dificulta a elucidação da estrutura destes compostos em baixa concentração (TANG et al., 2009).

Para superar as limitações impostas pelos equipamentos e reunir as vantagens das técnicas acima mencionadas, algumas metodologias e acoplamentos têm sido desenvolvidos como é o caso da técnica hifenada que utiliza a combinação da separação por HPLC, a detecção por DAD e MS, além de extração em fase sólida (SPE – *solid phase extraction*) para o enriquecimento do metabólito e RMN para a revelação de conectividade núcleos (HPLC-DAD-MS-SPE-NMR) (JAROSZEWSKI, 2005; TANG et al., 2009)

Diante desse cenário que contempla desde o potencial etnofarmacológico que foram base para estudos com resultados satisfatórios frente a ensaios preliminares de bioatividade, que apontaram potencial promissor para uma exploração ainda mais ampla da espécie em discussão, esta pesquisa visa o estudo das rizobactérias associadas à rizosfera da espécie *Senna spectabilis*. Objetiva-se conhecer a produção metabólica dessas bactérias, e empregar ainda o uso da co-cultura de micro-organismos que é uma abordagem que atualmente vem sendo bastante pesquisada. O uso da co-cultura microbiana é de grande relevância. Este tipo de técnica contempla uma mimetização do ambiente competitivo dos micro-organismos e aproximando-a do ambiente natural. Isto associado a estudos que dispõe de propostas analíticas utilizando das principais ferramentas espectroscópicas do estado da arte, há possibilidade do entendimento de associações sinérgicas e da complexidade micromolecular.

2 OBJETIVOS

Cultivar em cultura simples e em cultura mista micro-organismos selecionados da rizosfera de *Senna spectabilis*. Estudar a diversidade dos metabólitos produzidos pelos micro-organismos selecionados;

Monitorar o crescimento microbiano dos indivíduos selecionados;

Utilizar métodos de desreplicação para análise dos metabólitos secundários dos micro-organismos em estudo;

Estabelecer um paralelo entre os metabólitos obtidos em cultura simples e em co-cultura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudos prévios sobre *S. spectabilis*.

Inicialmente, os estudos sobre *S. spectabilis* foram conduzidos por Marcos Pivatto em 2009. Sementes dessas plantas foram coletadas a partir de vagens de árvores adultas localizadas nas dependências do Instituto de Química UNESP-AQA.

Após a coleta das sementes, a Dr. Patrícia Cardoso, promoveu um vasto e promissor estudo sobre a rizosfera dessa espécie de plantas. Obtendo o isolamento de 136 fungos, 61 bactérias (CARDOSO, 2015).

Para tal, foram seguidos alguns processos como a escarificação e germinação das sementes, cultivo das plântulas em rizotron e por fim, o isolamento de micro-organismos.

No processo de escarificação e germinação, sementes uniformes quanto à cor, tamanho e estado de conservação foram selecionadas. A seguir, empregou-se a metodologia descrita por Souza e colaboradores e Jeller e colaboradores (2001). Após, as sementes foram germinadas em placas de petri previamente estéreis, contendo um papel de filtro com 4,0 mL de água.

Para o cultivo de plântulas em rizotron, três sementes geminadas foram transferidas para recipientes contendo areia previamente tratada e levadas à casa de vegetação. O meio de cultivo foi feito com soluções nutrientes baseadas nas composições descritas por Clark (1975), e Hoagland e Arnon (1950). Antes de serem levadas aos vasos de rizotron, as mudas foram lavadas com água e hipoclorito de sódio 2 % (v/v). Posteriormente, as plantas foram coladas nos vidros rizotron, onde as partes aéreas foram deixadas para fora do recipiente. Em seguida, foi adicionado areia sobre as raízes até cobertura de 5 cm.

Passados 60 dias em rizotron, a rizosfera da *S. spectabilis* foi coletada, seguindo a metodologia adaptada de Aneja (2003). A partir de então, iniciou-se o processo de identificação e isolamento dos micro-organismos (fungos, bactérias e actinomicetes) presentes.

Assim, dentro do cenário de vários micro-organismos, para este trabalho foram selecionadas as bactérias previamente identificadas como, *Pseudoxanthomonas*

indica e *Shigella sp.*, por apresentarem viabilidade e não conter relatos sobre co-cultivo.

Materiais e Métodos.

3.1 Assepsia de materiais.

Para o estudo de crescimento, cultivo e manipulação dos micro-organismos, foi empregada vidrarias como, placa de petri, espátulas, erlenmeyers, micropipetas, alças de níquel-cromo, previamente esterilizadas em autoclave por 20 minutos a temperatura de 120 ° C e pressão de 1,5 atm.

3.2 Equipamentos

Para a esterilização dos meios de cultura, frascos coletores de amostras e o descarte do material microbiológico, foi utilizado autoclave (Quimis Aparelhos Científicos Ltda).

Para os experimentos de isolamento e inoculação dos micro-organismos, foi empregada uma Câmara de Fluxo Laminar (Pachame PA 310-Série 172-99).

Para a agitação dos erlenmeyers foi empregado um Shaker (WEQ CFW08).

Para concentrar os extratos bacterianos foi empregado um evaporador rotatório a vácuo Bruchi R-114.

Para o estudo do crescimento bacteriano foi empregado um espectrofotômetro operando na faixa do ultravioleta e do visível (UV/VIS) Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro.

Para a separação cromatográfica dos extratos por polaridade, foi utilizado Phenomenex® Knitex C-18 com 5 µm de tamanho de partícula, apresentando diâmetro interno 4,6 nm e largura 150 mm.

Para a análise dos extratos previamente separados foram empregados cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC-Shimadzu, acoplado as bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SLC-10VP-Shimadzu e detector de arranjo de diodos UV/VIS-Shimadzu PC 1520 – Diode Array. Cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC Dionex® Ultimate 3000 (Sunnyvale, EUA), equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), amostrador automático modelo WPS-3000 SL. Espectrômetro de

massa ESI-MS micro-TOF, Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA.) que possui ionizador por eletrospray (ESI). Espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific.

3.3 Soluções utilizadas

Para os meios de cultivo feitas foram feitas soluções que continham o Czapek[®] Dox Broth e o Czapek[®] Dox Agar, com composição descrita na Tabela 1. Os meios de cultivo foram preparados com água deionizada (18 mΩ, Milli-Q, Millipore) e autoclavados durante 20 min, a 120°C e 1,5 atm.

Tabela 1: Composição do meio de cultivo Czapek Dox Broth[®] e o Czapek Dox Agar[®].

Composição	Massa (g)
Sacarose	30
NaNO ₃	3
Na ₂ (PO) ₃	1
MgSO ₄	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄	0,01
Agar*	15

*presente apenas no Czapek Dox Agar[®]

3.4 Bactérias

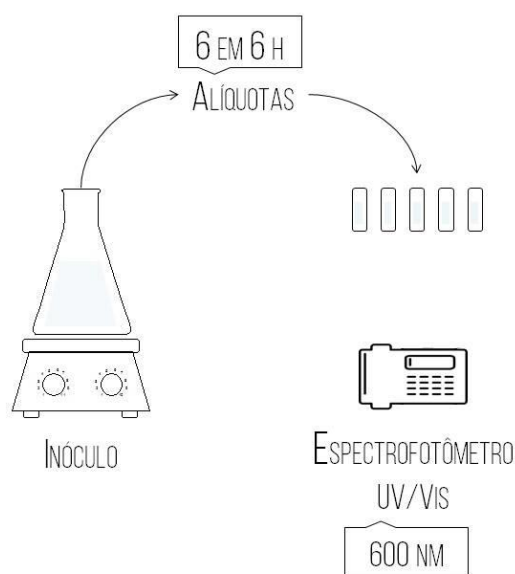
As bactérias *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella sp.* foram selecionadas a partir das 61 bactérias isoladas da *S. spectabilis*, previamente estudadas pela Dr. Patrícia Cardoso (CARDOSO, 2015).

3.5 Monitoramento do crescimento bacteriano

O monitoramento do crescimento bacteriano foi conduzido segundo Madigan et al (2012), com modificações. Assim, o pré-inóculo foi feito em diferentes erlenmeyers com 100 mL de meio de cultivo líquido, adicionando as linhagens selecionadas e deixando-as sob agitação à 110 rpm, por 48 horas a 25°C.

Após as 48 horas de crescimento, 2,0 mL de solução foram transferidos para Erlenmeyers com 300 mL de meio de cultivo líquido mantido sob agitação de 110 rpm e a 25 °C. Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 6 em 6 horas para a determinação da densidade óptica em espectrofotômetro de UV/VIS, analisando comprimento de onda em 600 nm (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática da metodologia empregada para curva de crescimento.



3.6 Cultivo e co-cultivo das bactérias

Inicialmente, as bactérias de *Pseudoxanthomonas indica* e *Shigella* sp. codificadas como CSP-49 e CSP-52b respectivamente, foram repicadas em placas de Petri separadamente contendo o meio Czapek Dox Agar e 100 mL do meio Czapek Dox Broth e posteriormente foram incubados por 24 h.

Após essa etapa, essas bactérias foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 300 mL de meio Czapek Dox Broth, sobre agitação de 110 rpm e temperatura de 27 °C para posterior extração do extrato bruto. É importante ressaltar, que nesta etapa também foi feita a inoculação do branco, ou seja, apenas o meio de cultivo.

Para o co-cultivo, alíquotas de 2,0 mL dos dois pré-inóculos de cada bactéria separadas e foram inoculadas em Erlenmeyers contendo 300 mL de Czapek Dox Broth para incubação, e estas foram denominadas CSP-MIX.

3.7 Obtenção do extrato bruto

Para a obtenção do extrato bruto, foi necessária a etapa de extração líquido-líquido dos metabólitos secundários produzidos pelas linhagens CSP-49, CSP- 52b e CSP-Mix.

Após o período de incubação das linhagens, para cessar seu crescimento, foram adicionados 50 mL de acetato de etila (AcOEt). Em seguida, a solução foi filtrada, e submetida a extração múltipla líquido-líquido com três alíquotas de 500 mL de AcOEt como solvente extrator, a fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório a vácuo, fornecendo os extratos brutos.

Os extratos foram suspensos em metanol grau HPLC e filtrados em membrana 0,22 µm para posterior análise do perfil cromatográfico (HPLC-CAD) e análise dos metabólitos (HPLC-ESI-TOF e HPLC-MS/MS).

3.8 Análises cromatográficas

Para a análise em HPLC-CAD foram utilizadas como fases móveis água (bomba A) e metanol (bomba B), ambos acidificados com 0.1% V/V de ácido fórmico. O gradiente utilizado nas análises está descrito abaixo.

Tabela 2. Gradiente exploratório empregado nas análises de HPLC-CAD, para as amostras CSP-49, CSP-52b e CSP-MIX.

Tempo (min)	Ação	Valor (%)
0.01	B. Conc	5
10.01	B. Conc	5
45.00	B. Conc	100
55.00	B. Conc	100
65.00	B. Conc	5
70.00	B. Conc	5
70.01	Stop	

3.9 Análises de espectrometria de massas

Os parâmetros para aquisição de dados por a análise de espectrometria de massas foram 4,500 kV, temperatura de dessolvatação de 450 ° C, pressão de gás de nebulização em 10 psi e energia de colisão de 25 eV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

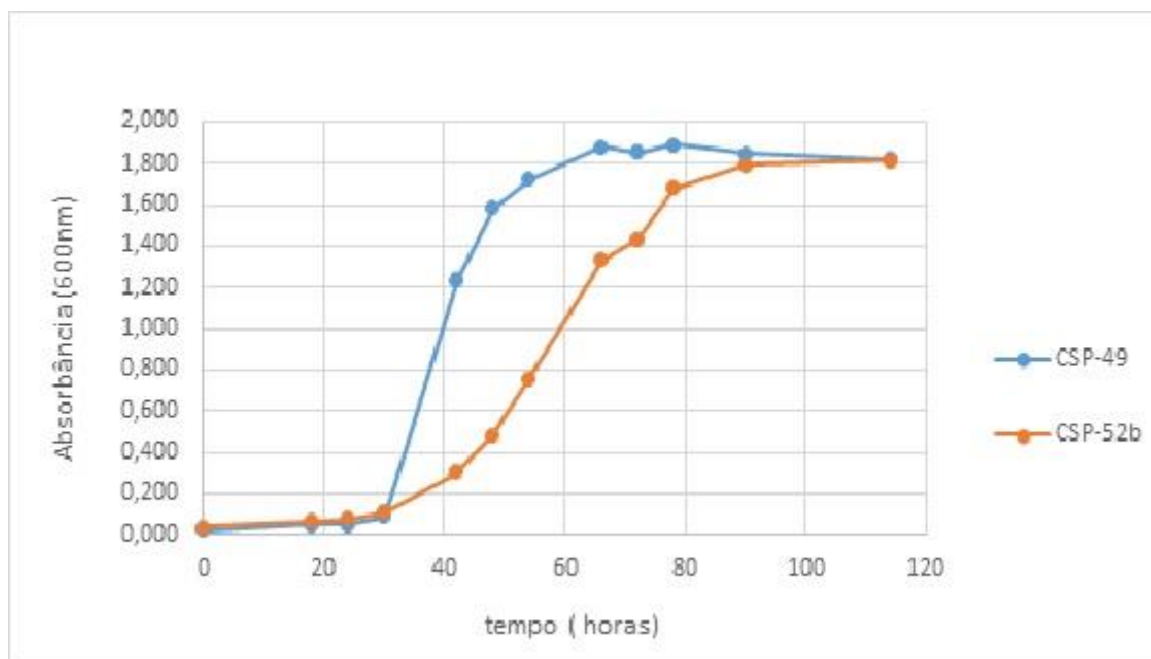
Os resultados foram adquiridos em três etapas; a primeira visou o monitoramento do crescimento bacteriano; a segunda, contemplou a obtenção dos perfis cromatográficos em cultura simples e co-cultura e a terceira, propostas de moléculas utilizando banco de dados através de análise de massas em alta resolução.

4.1 Monitoramento do crescimento bacteriano

O monitoramento da velocidade de crescimento bacteriano é de crucial para conhecimento do ciclo biológico dos micro-organismos selecionados. Utilizando-se deste, é possível prever a produção de metabólitos, sejam eles primários ou secundários. A produção de metabólitos primários tem por início na fase Log, fase onde há um intenso crescimento bacteriano, por sua vez, a produção de metabólitos secundários ocorre na fase estacionária da curva, fase onde o crescimento bacteriano alcança uma cinética de equilíbrio (MADIGAN, 2012).

Os resultados do estudo de crescimento das células bacterianas são representados a seguir (Figura 6).

Figura 6 - Curva de monitoramento do crescimento das linhas *Pseudoxanthomonas indica* (CSP-49) e *Shigella sp.* (CSP-52b)



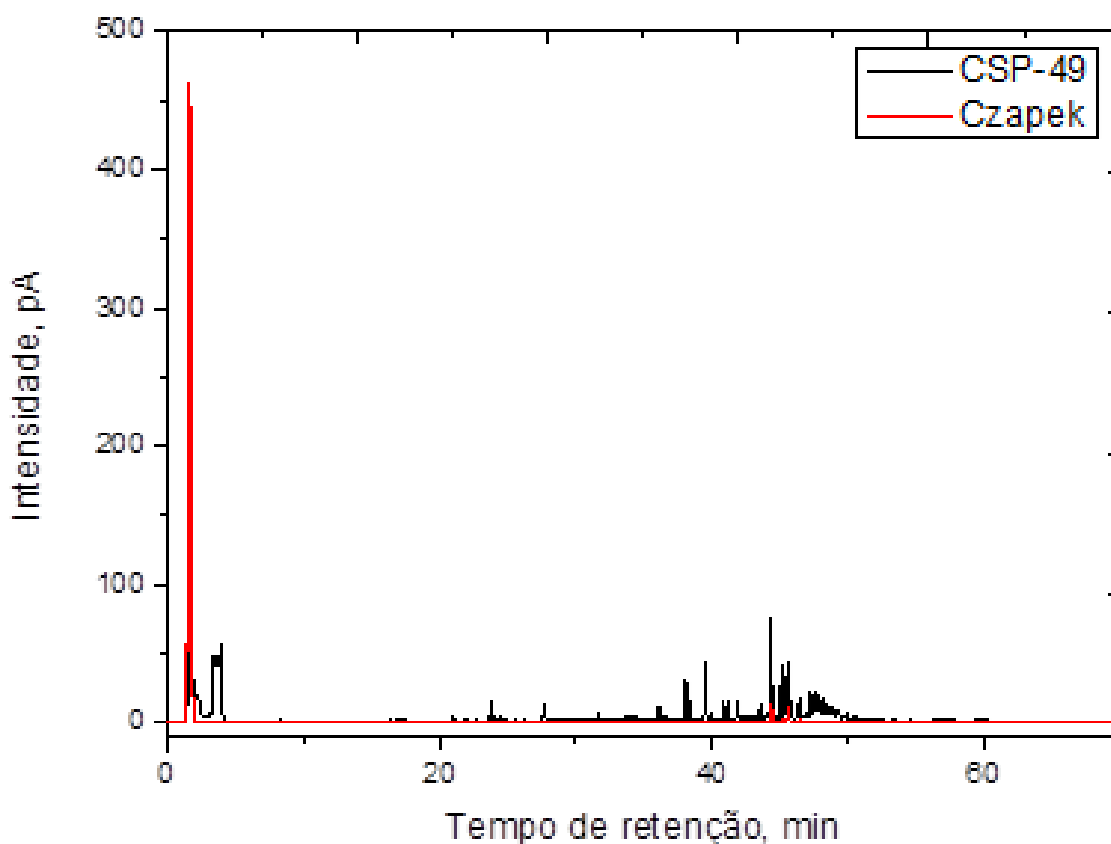
Pode ser observado na Figura 6 que as bactérias apresentaram três fases de crescimento, Lag, Log e estacionária. A fase Lag ou fase de adaptação das duas linhagens são semelhantes, a fase Log, de maior crescimento, ambas se mostraram diferentes. A linhagem CSP-49 apresentou maior taxa de crescimento, sendo assim, essa linhagem atinge a fase estacionária em um menor tempo. A fase estacionária, a fase de interesse, iniciou-se em ~ 66 horas de incubação na linhagem CSP-49, enquanto na CSP-52b iniciou-se em ~ 72 horas de incubação. Admite-se que os tempos de início da fase estacionária para as distintas bactérias compreende um intervalo de 6 horas, o que pode ser um fator de influência na produção de metabólitos no cultivo misto entre as duas linhagens.

4.2 *Fingerprint* das linhagens bacterianas

Todos os extratos obtidos após incubação das linhagens bacterianas foram analisados quanto ao seu perfil cromatográfico, empregando detecção por aerossol carregado.

Em busca da elaboração de um perfil cromatográfico, junto à análise dos perfis dos extratos brutos provenientes das amostras CSP-49 (Figura 7), CSP-52b (Figura 8) e CSP-MIX (Figura 9), a última consiste no extrato resultante do metabolismo misto entre CSP-49 e CSP-52b. Foi realizada também análise cromatográfica do extrato do branco (meio de cultivo sem o inóculo). Todos os cromatogramas a seguir apresentam os experimentos realizados comparando-os com perfil do branco (cromatogramas preto) com a finalidade de fazer uma relação direta entre os compostos pertencentes ao meio utilizado e os produzidos pelos micro-organismos.

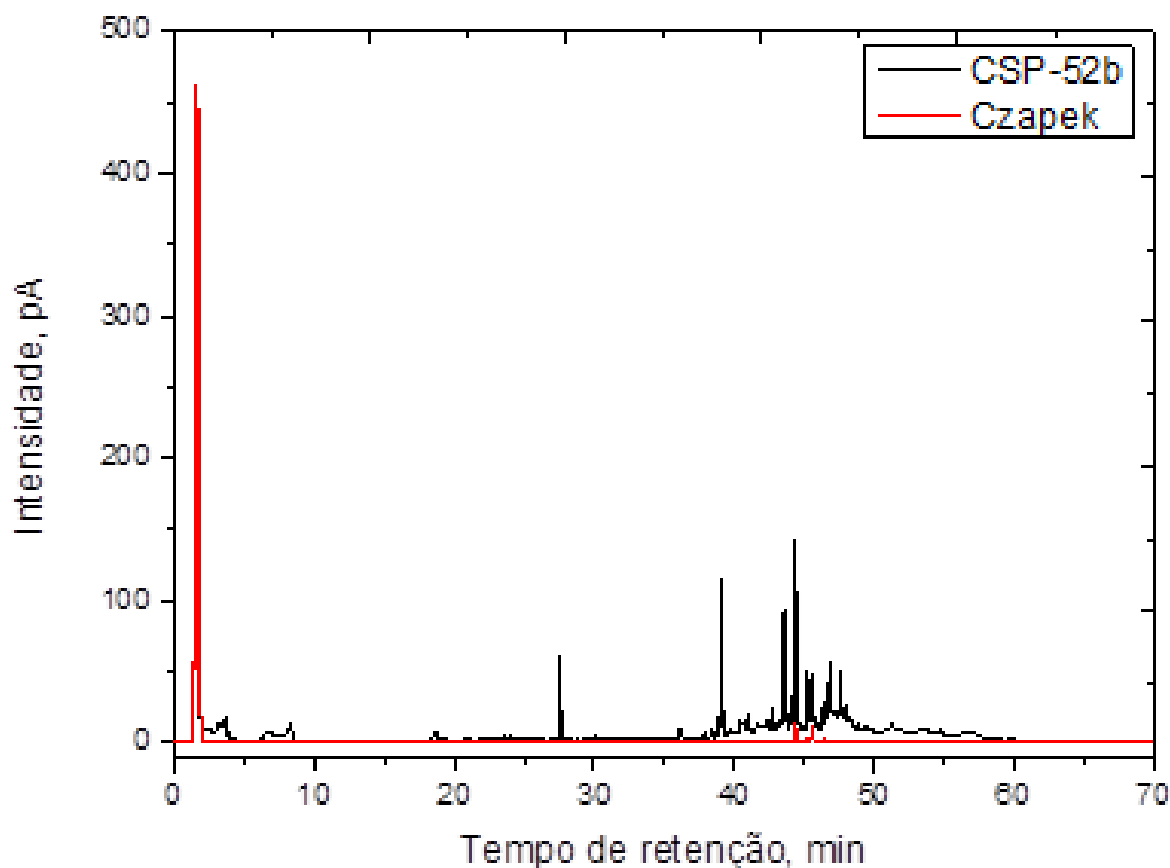
Figura 7 - *Fingerprint* obtido a partir de análise por HPLC-CAD para o extrato CSP-49 (preto) e czapek (vermelho).



A Figura 7 acima evidencia a complexidade do perfil químico produzido pela bactéria *P. indica*, apresentando uma composição majoritária de compostos de características apolar, a sobreposição dos cromatogramas (czapek e CSP-49), apontam que os compostos são produzidos pela bactéria e não provenientes do meio de cultivo.

Picos presentes no cromatograma evidenciam características intrínsecas do extrato obtido a partir do metabolismo aeróbio de *Pseudoxanthomonas indica*, chamando a atenção para o pico em tempo de retenção de 44,49 min e intensidade de 75,14 pA que se apresenta como majoritário dentre os componentes do extrato. Vale ressaltar que próximo ao mesmo intervalo de tempo há um pico relativo ao branco que apresenta intensidade 12,89 pA, o que pode indicar que esse composto seja proveniente do meio de cultivo.

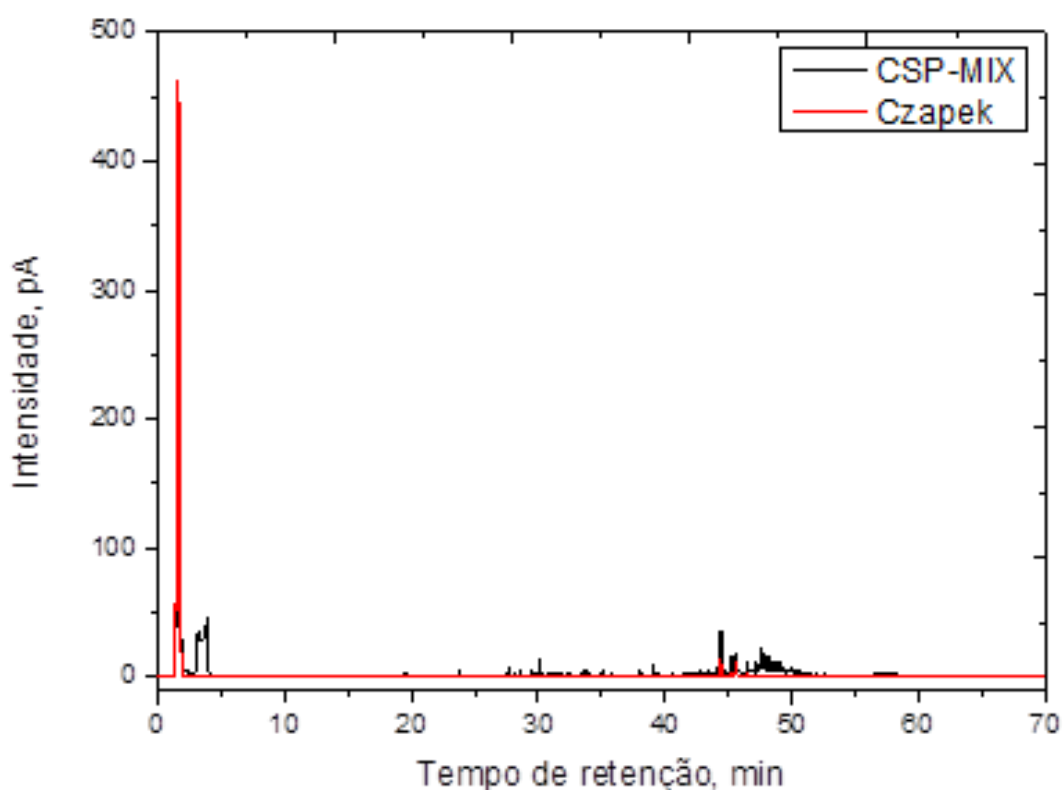
Figura 8 - *Fingerprint* obtido a partir de análise por HPLC-CAD para o extrato CSP-52b (preto) e czapek (vermelho).



De maneira análoga ao apresentado na Figura 7, é possível observar também a produção de compostos com características apolares (Figura 8). Em comparação ao perfil do branco, mais uma vez, se faz presente um pico no extrato de CSP-52b próximo a 44,4 min o que reforça que esse sinal pertence ao meio de cultivo (Figura 8). Comparando os dois perfis, de CSP-49 e CSP-52b, é possível observar características distintas entre os extratos (Figuras 7 e 8). Como exemplo os sinais em 39,04; 43,44; 46,85 min, entre outros, que só são observados no cromatograma do extrato de CSP-52b (preto). Outros exemplos são os sinais particulares do extrato de CSP-49 (vermelho) nos tempos de retenção de 38,11; 39,44; 41,93 min.

Por fim, temos a análise de *fingerprint* proveniente do extrato da co-cultura entre as linhagens de *P. indica* e *Shigella sp.* codificado com CSP-MIX (Figura 9).

Figura 9 - *Fingerprint* obtido a partir de análise por HPLC-CAD para o extrato CSP-MIX (preto) e czapek (vermelho).

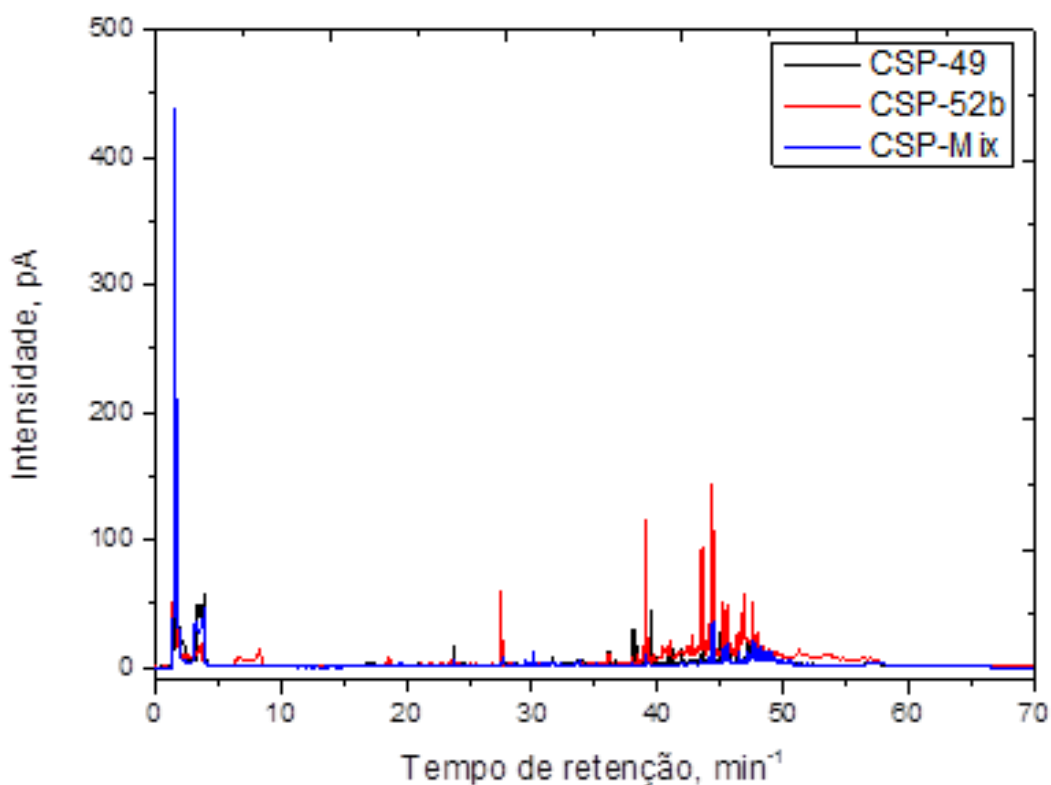


A análise cromatográfica possibilita observar simultaneamente sinais característicos dos extratos de CSP-49 e CSP-52b, como por exemplo a faixa do tempo de retenção de 40 a 50 min, mas também é observado uma região exclusiva

do co-cultivo (25-35 min), isso pode ser devido a interações entre os micro-organismos, que podem revelar vias biosintéticas distintas de quando os micro-organismos são cultivados isoladamente.

É observável aqui que o cromatograma apresenta características dos mesmos associados as monoculturas das linhagens, assim mostrando picos que já são presentes nas culturas. A Figura 10, apresenta a sobreposição dos cromatogramas do czapek, CSP-49, CSP-52b e CSP-MIX, afim de melhor reportar as semelhanças e/ou diferença apresentada nos *fingerprints* aqui discutidos.

Figura 10 – Sobreposição do perfil cromatográfico dos extratos CSP-49, CSP52b e CSP-MIX.



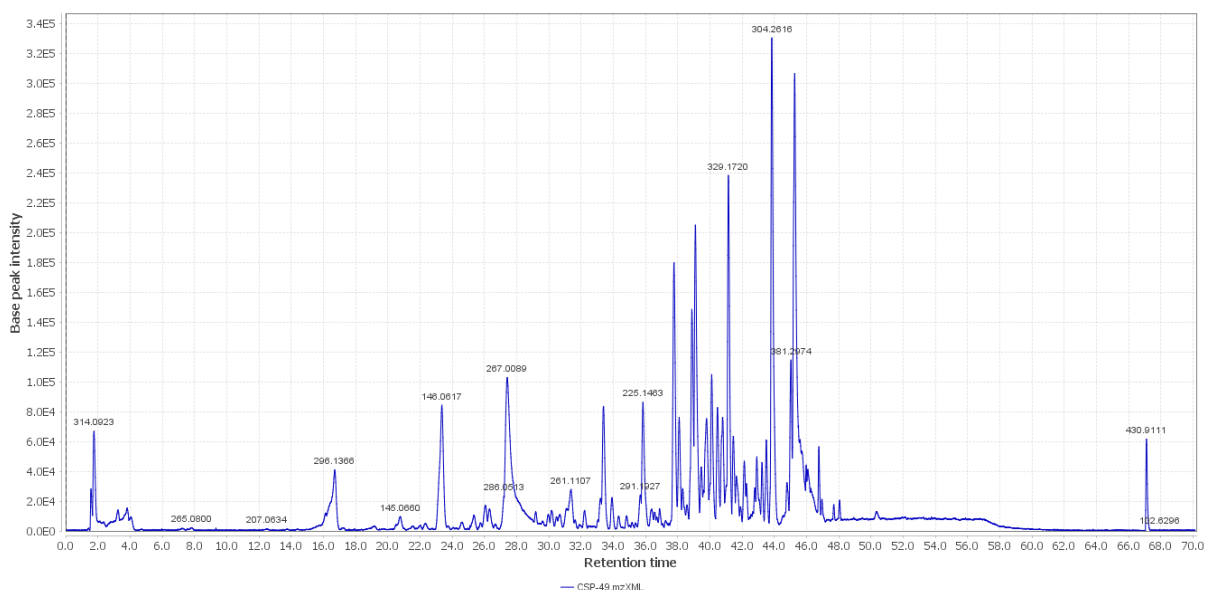
4.3 Análises por espectrometria de massas de alta resolução

Foram realizadas análises de espectrometria de massas de alta resolução das linhagens selecionadas e do co-cultivo.

As massas de alta resolução de cada metabolito produzido pela *P. indica* foram adquiridos e comparados com auxílio de bases de dados já consolidadas na literatura como: METLIN (Metabolite and Tandem MS Database); DNP (Dictionary of Natural Products); MassBank (High Quality Mass Spectral Database) e ECMDB (*E. coli* Metabolome Database), assim, foi possível propor algumas possíveis moléculas.

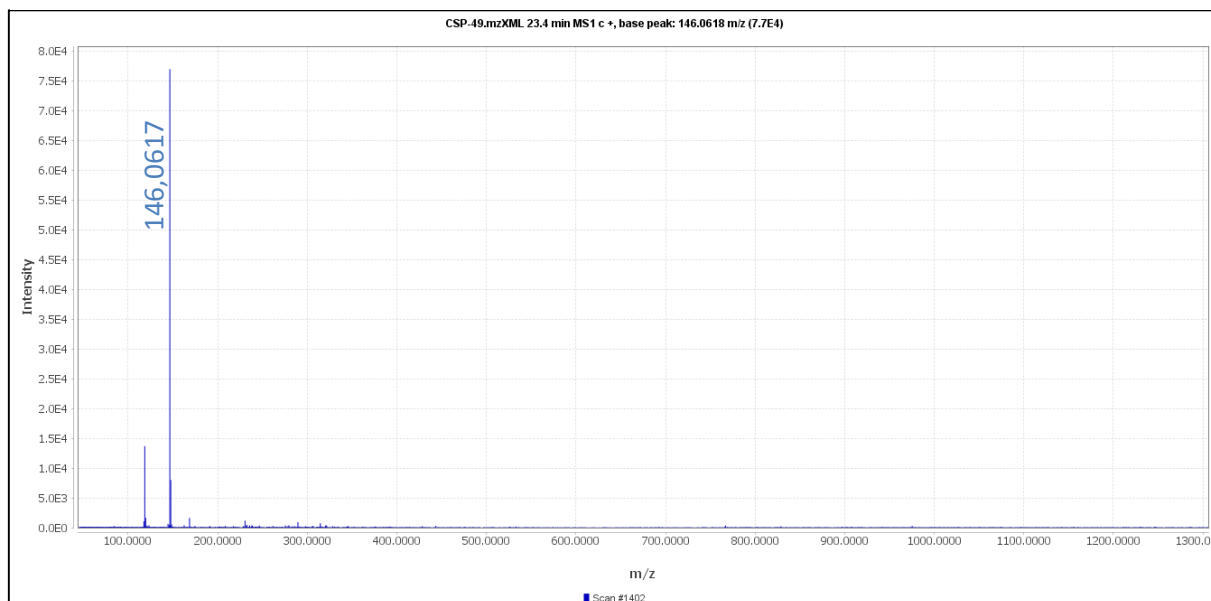
A figura a seguir representa pico referente ao íon extraído do cromatograma de íons totais para o extrato de CSP-49 (Figura 11).

Figura 11 - Cromatograma de íons totais do extrato de CSP-49 (*P. indica*).



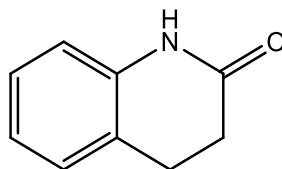
Para contemplar uma melhor visualização dos íons utilizados para busca nas bases de dados foram extraídos TIC os íons de interesse.

Figura 12 - Pico relativo ao íon extraído m/z 146,0617 do TIC de CSP-49 (*P. indica*).



No tempo de retenção de 23,4 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 146,0617 como propostas para referida massa:

Estrutura



Massa

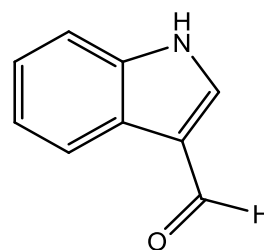
145,0527

Nome

quinolin-2-ol

CAS No.

59-31-4

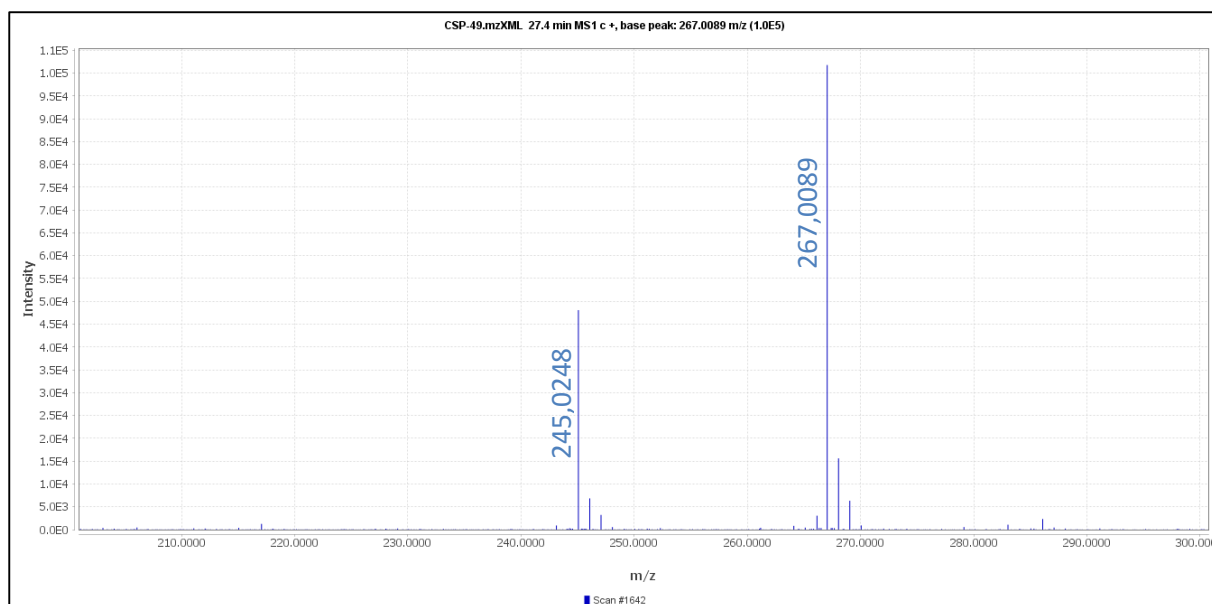


145,0527

Indol-3-carbaldeído

487-89-8

Figura 13 - Picos relativos aos íons extraídos $[M+H]^+ = m/z$ 245,0248 e $[M+Na]^+ = 267,0089$ do TIC de CSP-49 (*P. indica*).



No tempo de retenção de 27,4 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 245,0248 como propostas para referida massa são;

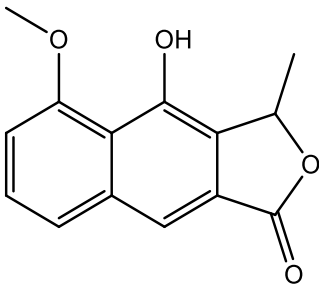
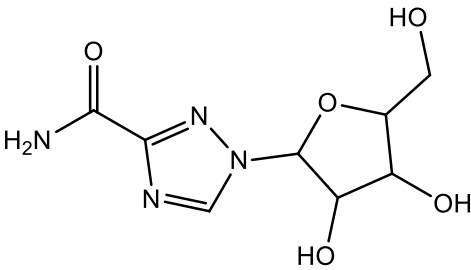
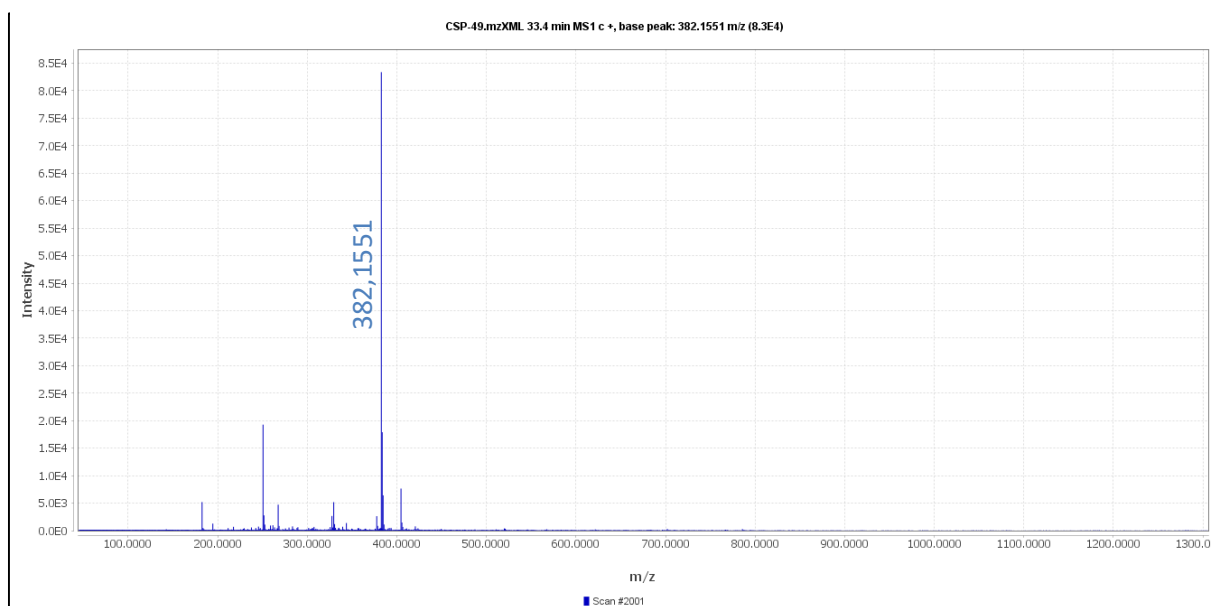
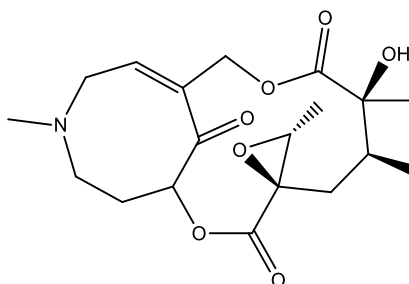
Estrutura		
Massa	244,0735	244,0807
Nome	euleterol	ribavirina
CAS No.	480-00-2	36791-04-5

Figura 14 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 382,1551 do TIC de CSP-49 (*P. indica*).



No tempo de retenção de 33,42 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 382,1551 como propostas para referida massa são:

Estrutura



Massa

381,1787

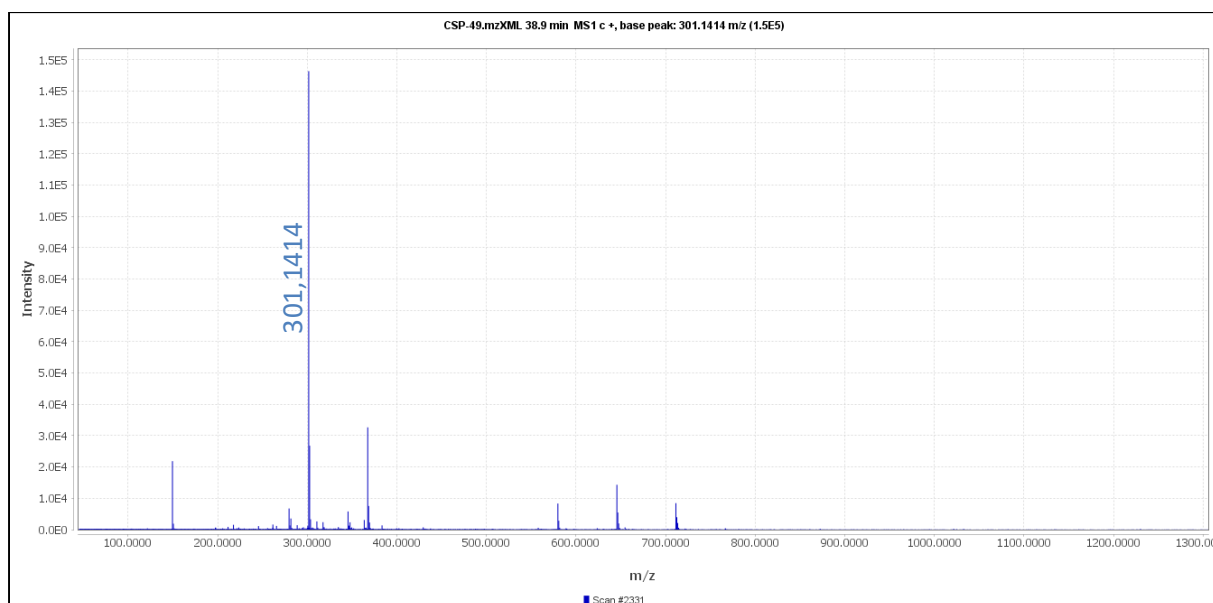
Nome

otosenina

CAS No.

16958-29-5

Figura 15 - Picos relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 301,1414 do TIC de CSP-49 (*P. indica*)



No tempo de retenção de 37,81 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 301,1414 como propostas para referida massa são:

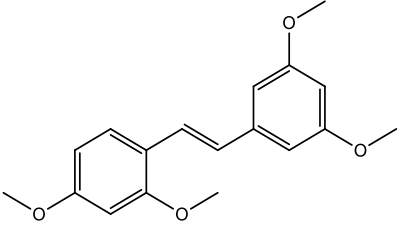
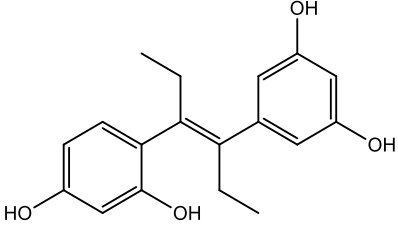
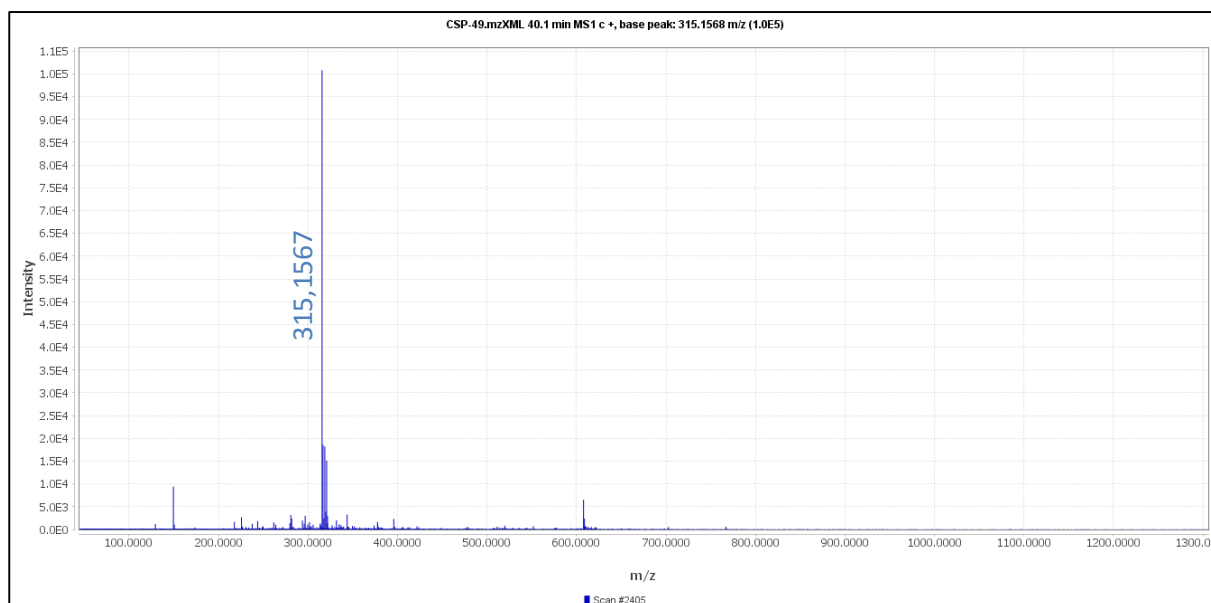
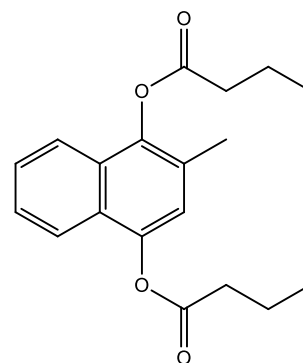
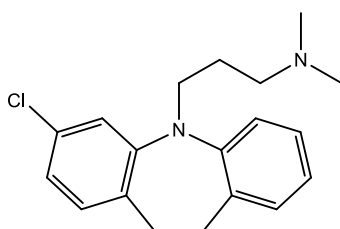
Estrutura		
Massa	300,1362	300,3490
Nome	2,3',4,5'-Tetrametoxistilbeno	α,α' -dietil-3,4,3',4'-stilbenetetraol
CAS No.	24144-92-1	-

Figura 16 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 315,1567 do TIC de CSP-49 (*P. indica*).



No tempo de retenção de 40,12 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 315,1567 como propostas para referida massa são:

Estrutura



Massa

314,1549

314,1518

Nome

Clomipramina

Menadiol dibutirato

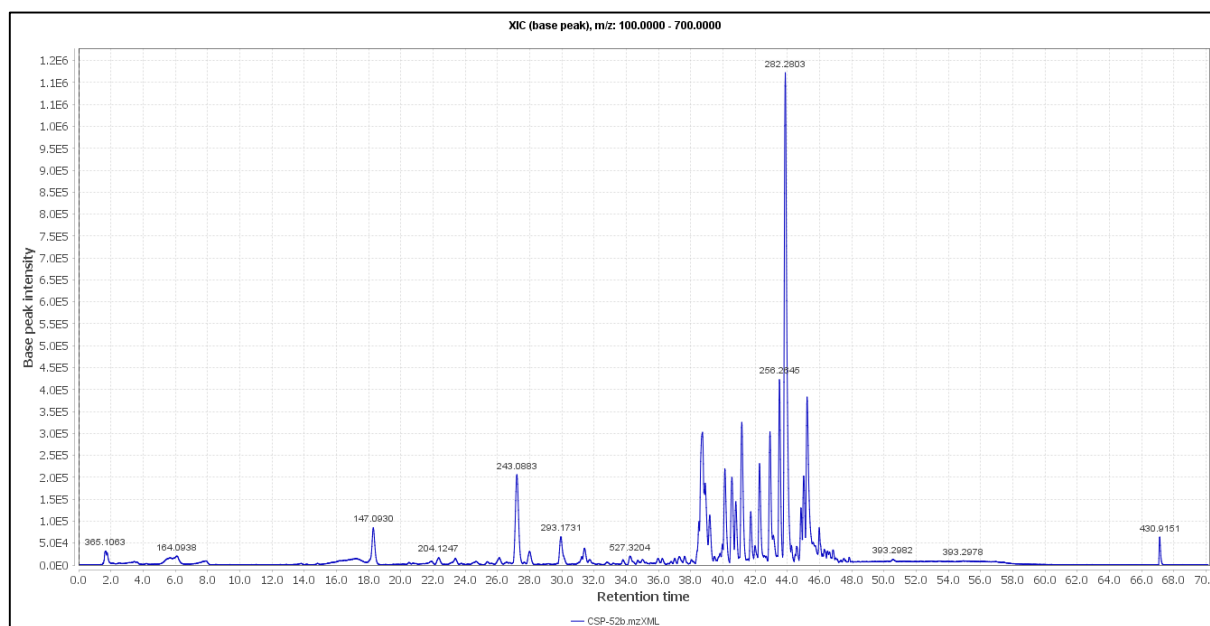
CAS No.

303-49-1

53370-44-8

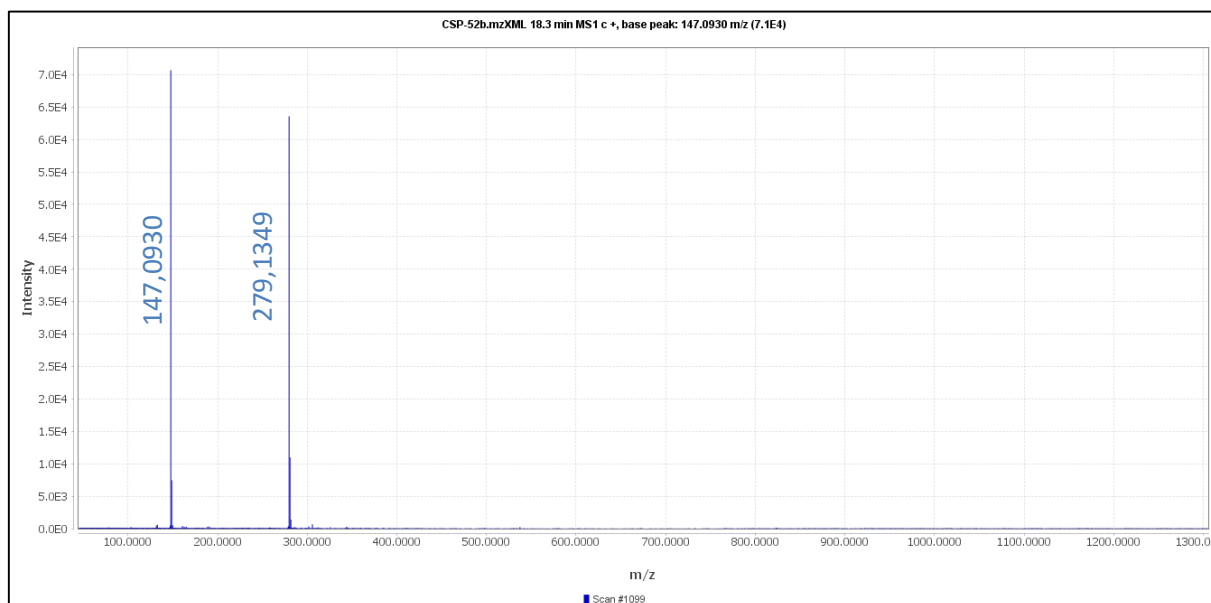
Foi também realizada análise de espectrometria de massas de alta resolução da linhagem CSP-52b (figura 17).

Figura 17 - Cromatograma de íons totais para o extrato de CSP-52b (*Shigella sp.*).



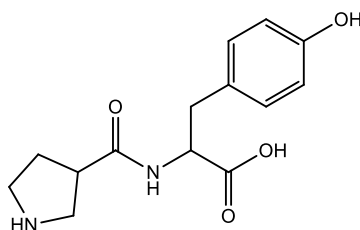
Utilizou-se dos mesmos bancos de dados para a procura de propostas dos metabólitos de CSP-49. Comparando os dois perfis químicos dos extratos, fica evidente, mais uma vez, a produção de compostos diferentes, devida a presença de distintas massas de alta resolução existente em cada TIC. Dessa forma, as Figuras seguintes representam os íons extraídos do cromatograma de íons totais do extrato de CSP-52b.

Figura 18 - Picos relativos aos íons extraídos $[M+H]^+ = m/z$ 147,0930 e m/z 279,1349 do TIC de CSP-52b (*Shigella* sp.)



No tempo de retenção de 18,31 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 279,1349 como propostas para referida massa;

Estrutura



Massa

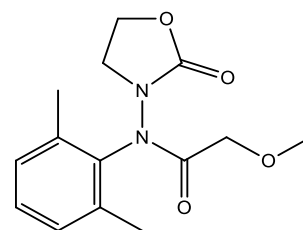
278,1266

Nome

prolil-tirosina

CAS No.

-



278,1266

oxadixil

77732-09-3

Ainda nesse tempo de retenção, temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 147,0930 e também como propostas para referida massa;

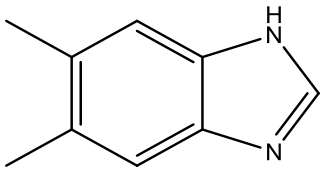
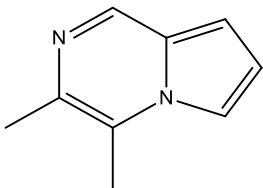
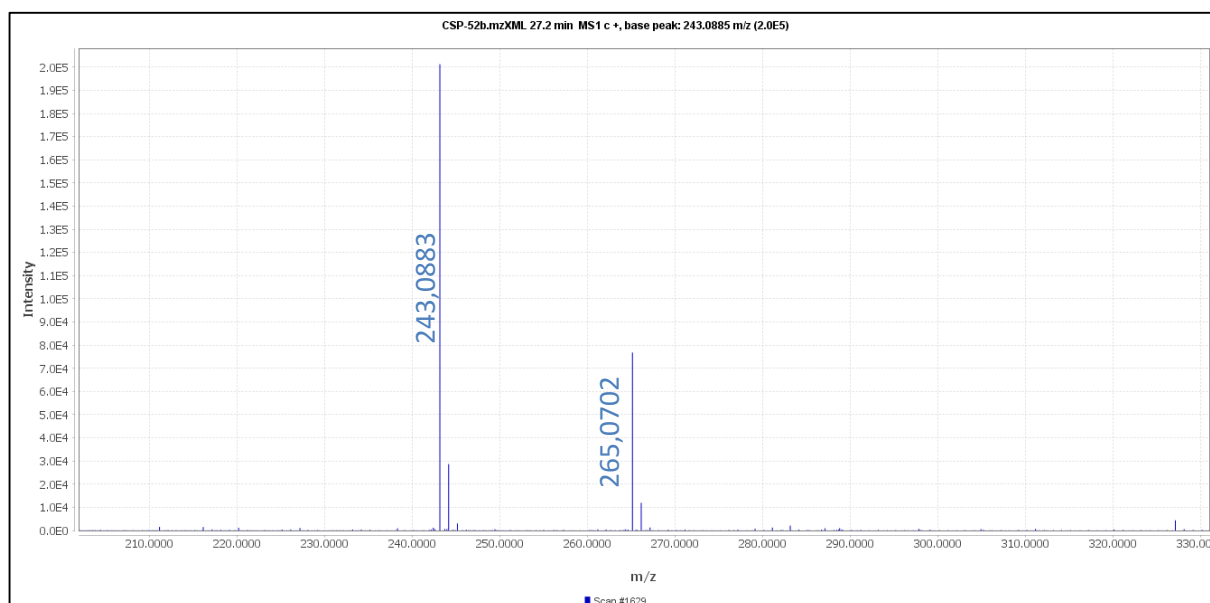
Estrutura		
Massa	146,1891	146,1877
Nome	5,6-Dimetilbenzimidazol	3,4-dimetilpirrol[1,2-a]pirazina
CAS No.	582-60-5	64608-64-6

Figura 19 - Picos relativos aos íons extraídos $[M+H]^+ = m/z$ 243,0883 e $[M+Na]^+ = m/z$ 265,0702 do TIC de CSP-52b (*Shigella* sp.)



No tempo de retenção de 27,2 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 243,0883 como propostas para referida massa são:

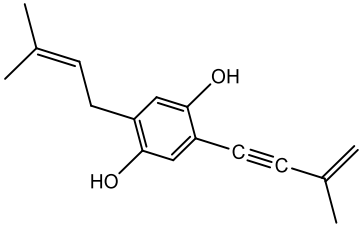
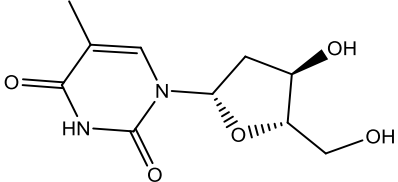
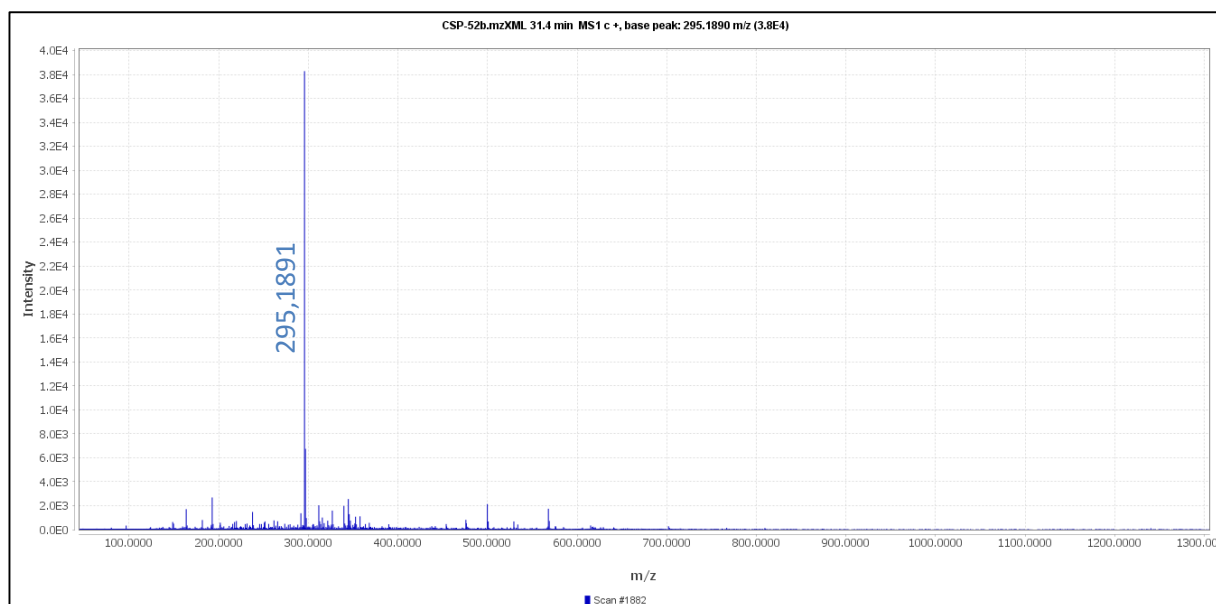
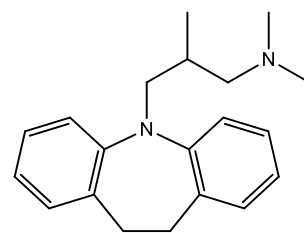
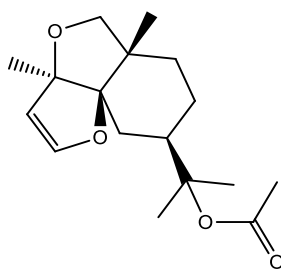
Estrutura		
Massa	242,1306	242,0901
Nome	2-(3-Metil-2-butenil)-5-(3-metil-3-buten-1-inil)-1,4-benzenediol	Timidina
CAS No.	-	50-89-5

Figura 20 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 295,1891 do TIC de CSP-52b (*Shigella sp.*)



No tempo de retenção de 31,40 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 295,1891 como propostas para referida massa são:

Estrutura



Massa

294,1831

294,2096

Nome

Fitotuberina

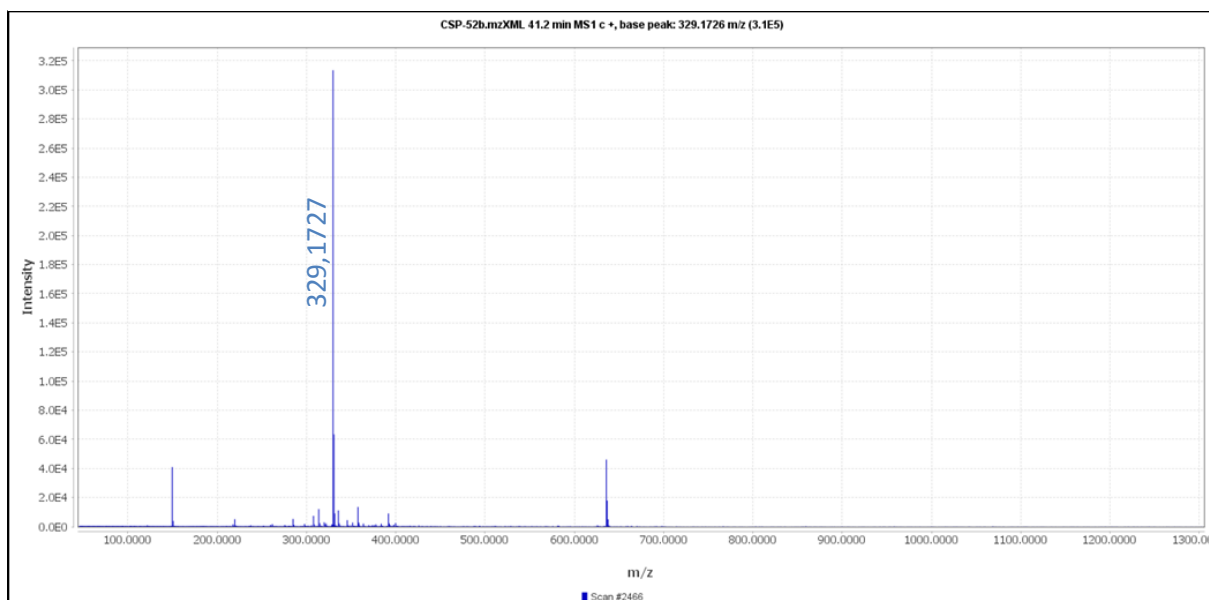
Trimipramina

CAS No.

37209-50-0

739-71-9

Figura 21 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 329,1727 do TIC de CSP-52b (*Shigella* sp.)



No tempo de retenção de 41,21 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 329,1727 como propostas para referida massa são:

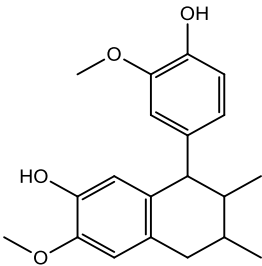
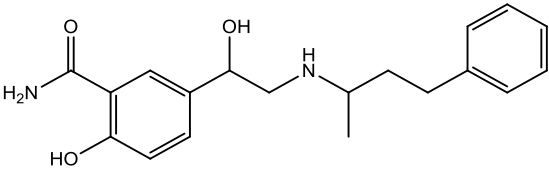
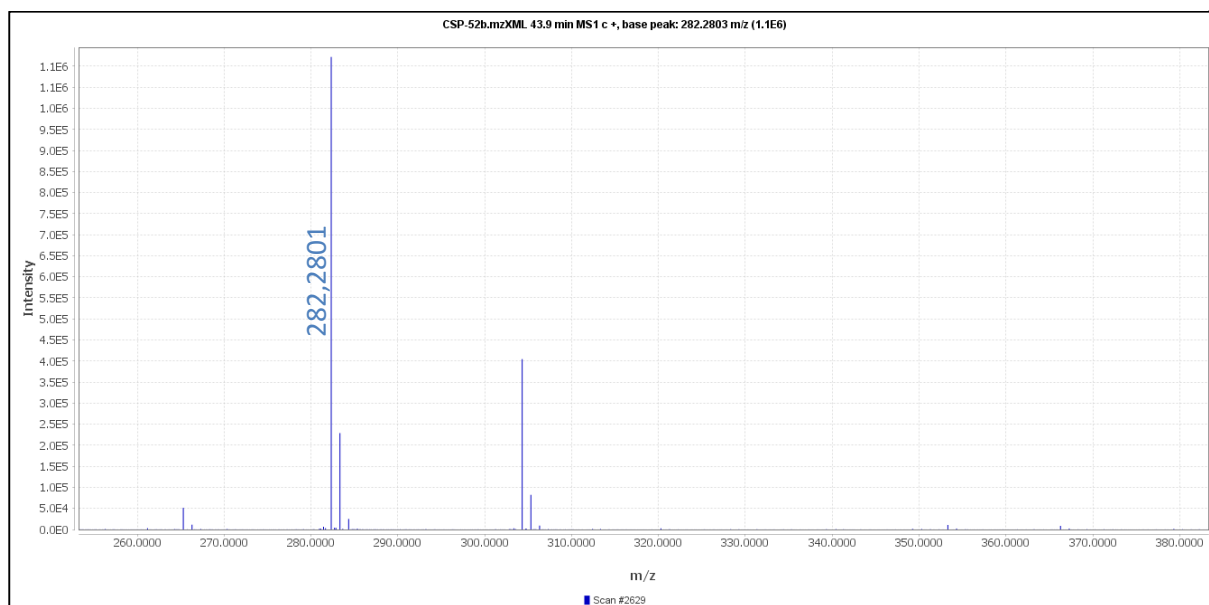
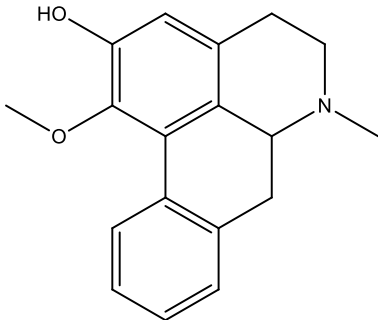
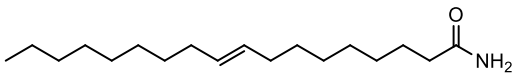
Estrutura		
Massa	328,1675	328,1786
Nome	guaiacina	labetalol
CAS No.	36531-08-5	36894-69-6

Figura 22 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 282,2801 do TIC de CSP-52b (*Shigella sp.*)



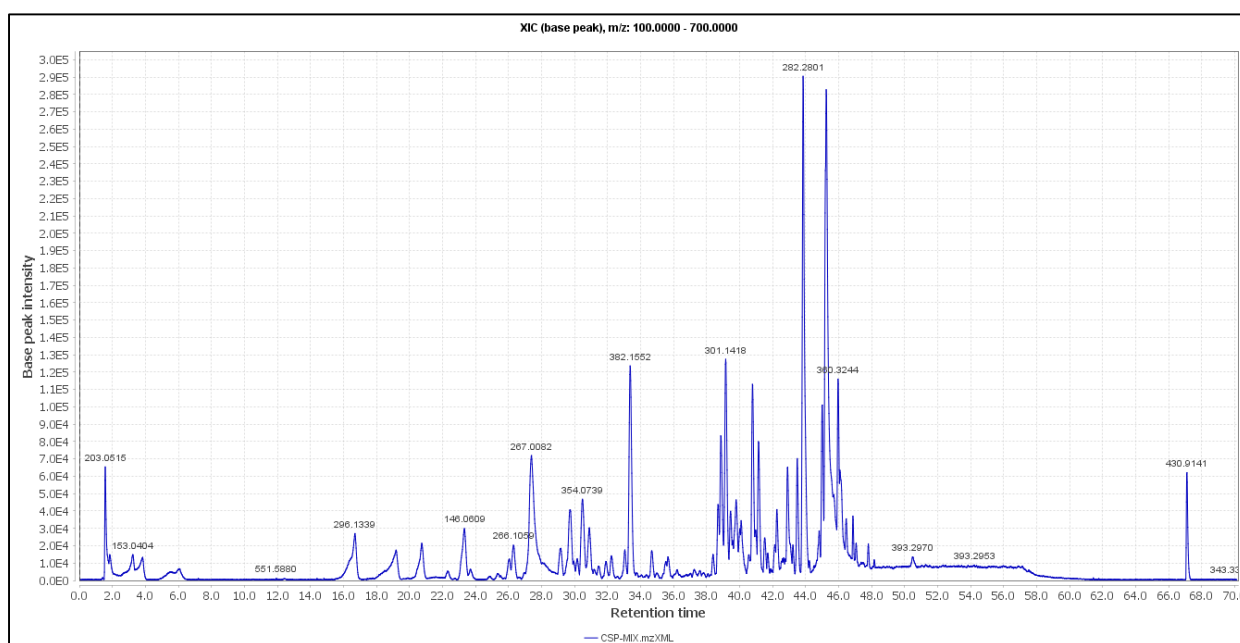
No tempo de retenção de ~ 43,91 min temos o íon $[M+H]^+ = m/z$ 282,2801, temos as seguintes propostas:

Estrutura		
Massa	281,1415	281,2791
Nome	floribundina	oleamida
CAS No.	3153-55-7	301-02-0

Mais uma vez, é válido ressaltar que as propostas oriundas das bases de dados não são suficientes para identificação estrutural dos compostos presentes no extrato, ainda que as propostas obedeçam ao limite de 10 ppm, a falta de estudos químicos dessa bactéria presente na literatura dificulta a desreplicação.

O perfil químico por espectrometria de massas do co-cultivo também foi traçado para avaliação dos metabólitos (Figura 23).

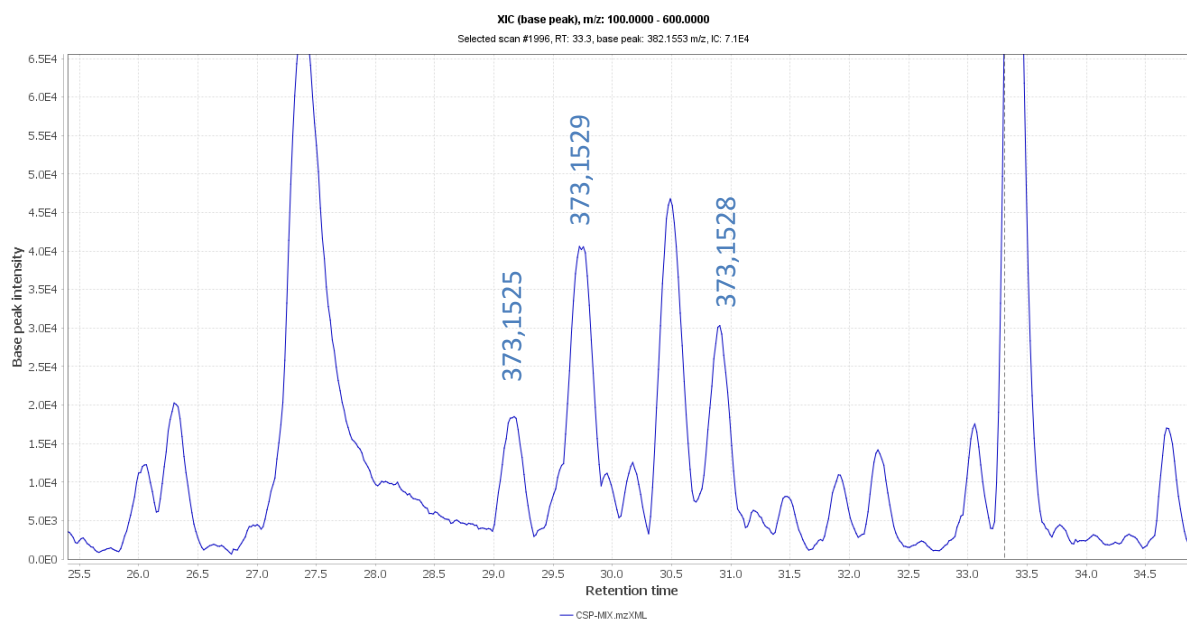
Figura 23 - Cromatograma de íons totais para o extrato da co-cultura entre as linhagens CSP-52b (*Shigella sp.*) e CSP-49 (*P. indica*).



Para o perfil do extrato de co-cultivo das linhagens bacterianas estudadas, observou-se massas já conhecidas no perfil dos extratos de monocultura, como por exemplo: m/z 267,0082 no tempo de retenção 27,5 min; m/z 382,1552 no tempo de retenção de 33,3 min, que estão presentes no perfil químico do extrato da bactéria *P. indica*, o que aponta que estes compostos são produzidos por essa bactéria, assim como já relatado na análise de dados por HPLC-CAD. Para o perfil de MS, o mesmo comportamento se repete, são observadas algumas massas que são identificadas apenas para o extrato de CSP-MIX, extrato que corresponde aos íons: m/z 373,1525; m/z 373,1529 e m/z 373,1528 de tempos de retenção 29,2; 29,8 e 30,9 min, respectivamente, por apresentarem semelhantes massas de alta resolução e tempo

de retenção próximos, sugere-se que sejam isômeros (Figura 24). Outro exemplo evidente de íon presente apenas no extrato da co-cultura é o m/z 302,0977 com tempo de retenção de 19,2 min.

Figura 24 – Região ampliada de 27,5 min – 31,5 min do cromatograma de íons totais para o extrato da co-cultura entre as linhagens CSP-52b (*Shigella sp.*) e CSP-49 (*P. indica*).



A escassez de nutrientes foi também um fator limitante para propiciar um ambiente mais competitivo entre as bactérias, o que pode ter remetido a um ambiente de maior interação dinâmica, forçando a produção de novos compostos. O uso do meio de cultivo czapek broth induz uma competitividade ou ainda uma sinergia para sobrevivência das linhagens, já que é composto em sua maioria em sacarose, como fonte de carbono, pequenas quantidades de minerais como os sais de sulfato (SO_4^-), nitrato (NO_3^-), cloreto (Cl^-) e difosfato (HPO_4^{2-}) (Tabela 1).

A Figura 27 representa um mapa bidimensional de m/z vs. tempo de retenção, evidenciando os compostos que só foram produzidos em co-cultivo.

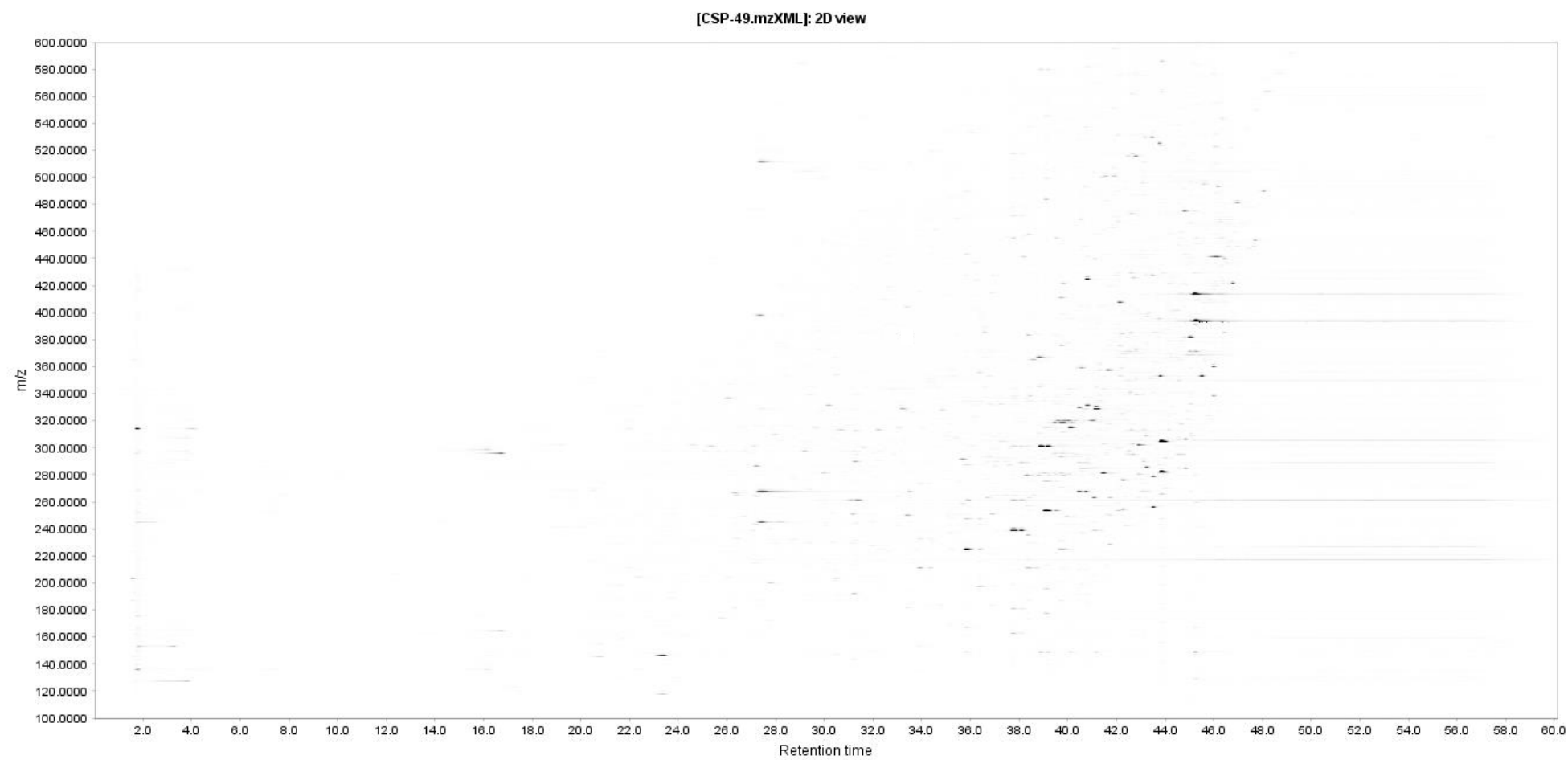
Figura 25 - Mapas de íons 2D dos extratos (Rt vs. m/z), CSP-49

Figura 26 - Mapas de íons 2D dos extratos (Rt vs. m/z), para o extrato de CSP-52b

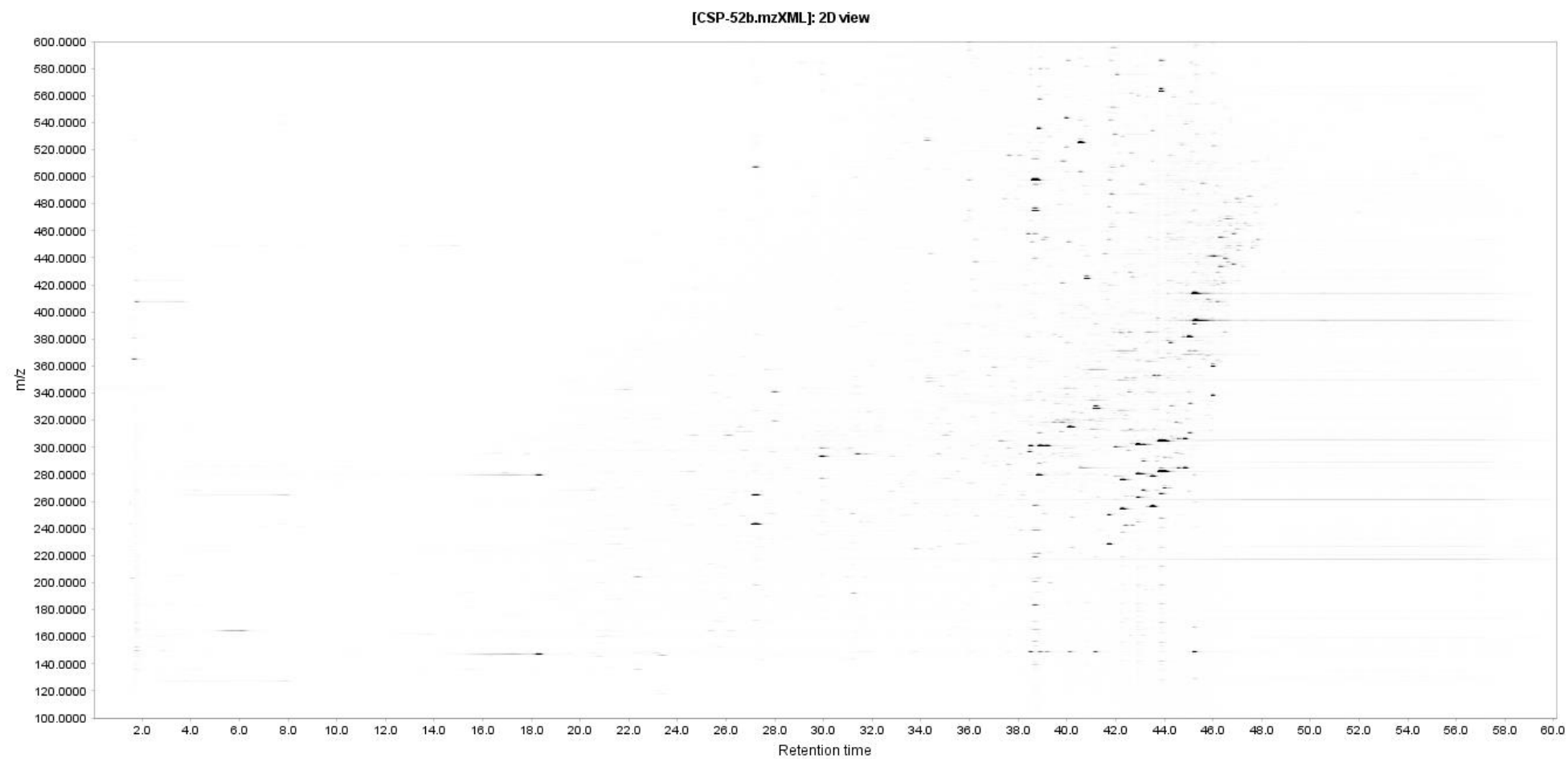
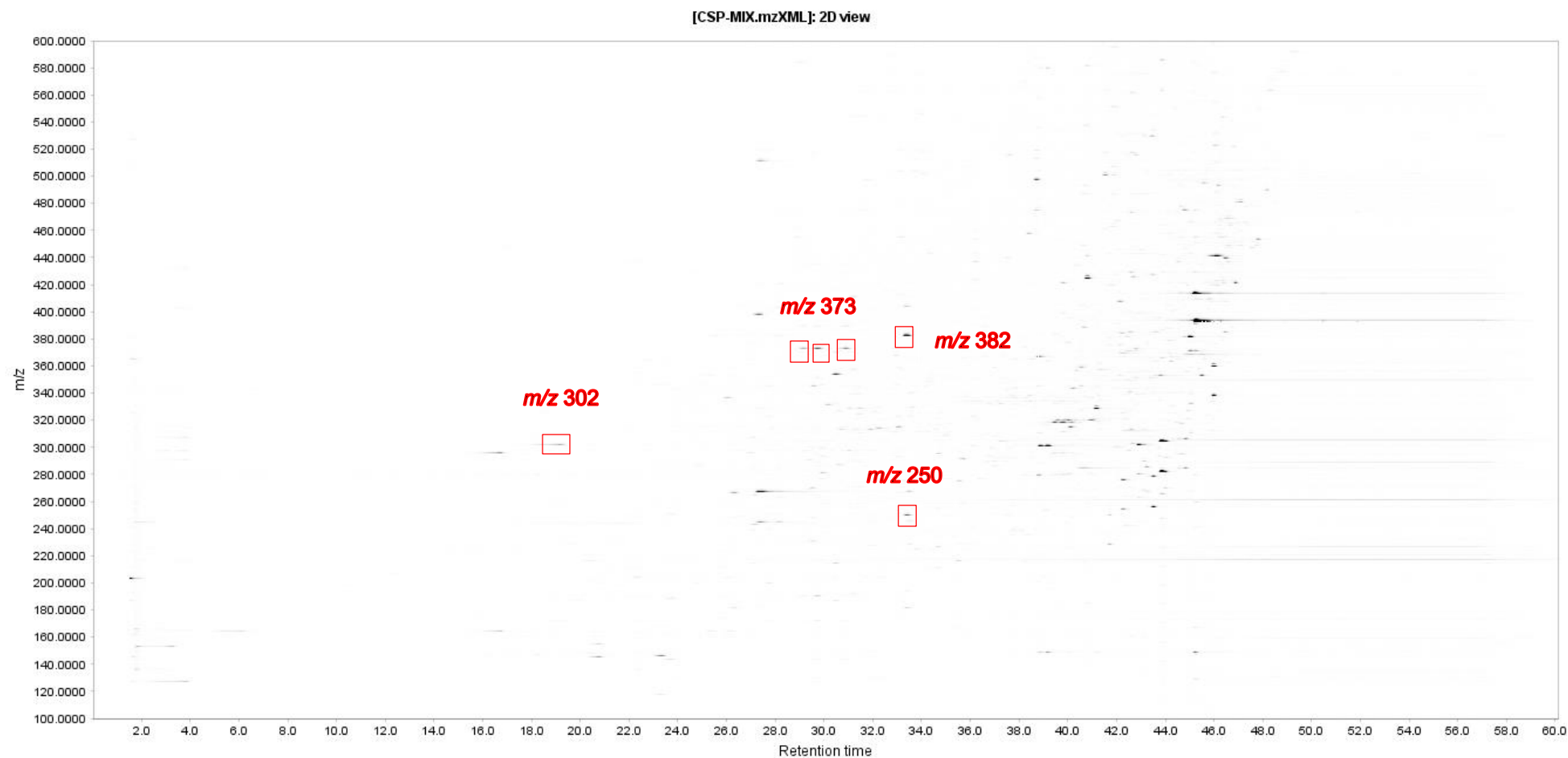


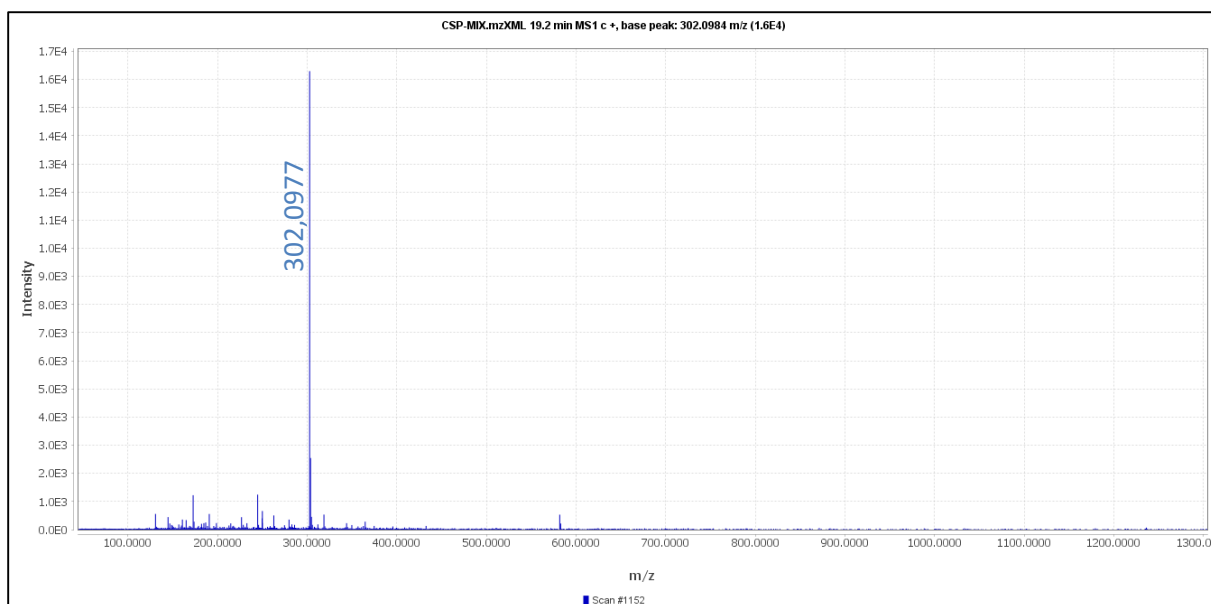
Figura 27 - Mapas de íons 2D dos extratos (Rt vs. m/z), para o extrato CSP-MIX

Os sinais destacados em vermelho contemplam compostos que só estão presente no co-cultivo, é possível também verificar a contribuição de cada um dos extratos de monocultura (Figura 25) e (Figura 26), para com o extrato de co-cultivo (Figura 27). A região mais apolar no mapa do co-cultivo apresenta características que são pertencentes ao extrato da bactéria *Shigella* sp., a região polar a média polaridade contempla características pertencentes ao perfil químico do extrato de *P. indica*.

Assim como para os demais extratos, foi realizada uma busca em base de dados de possíveis moléculas para os íons em destaque no mapa de íons do co-cultivo.

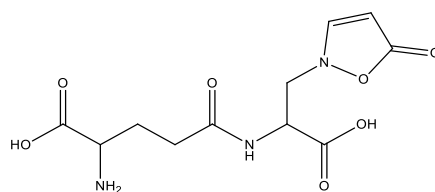
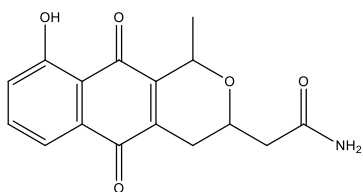
A Figura 28 subsequente apresenta o pico referente ao íon extraído do cromatograma de íons totais do extrato proveniente do co-cultivo das linhagens bacterianas estudadas (Figura 28).

Figura 28 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 302,0977 do TIC de CSP-MIX (co-cultivo.)



Para o tempo de retenção 19,0 min, $[M+H]^+ = m/z$ 302,0977;

Estrutura



Massa

301,0950

301,0910

Nome

nanaomicina C

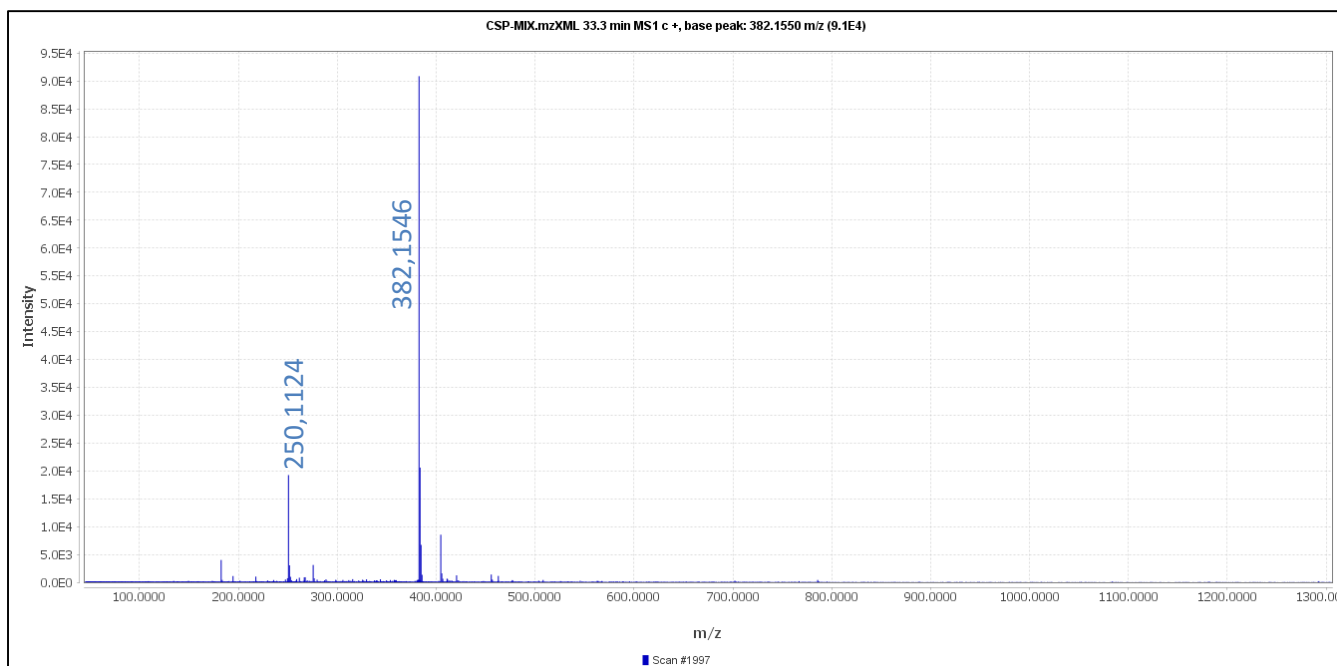
γ -glutamyl- β -(isoxazolin-5-on-2-il)alanina

CAS No.

58286-55-8

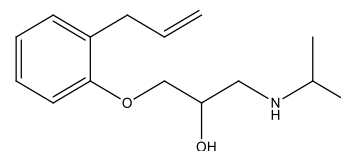
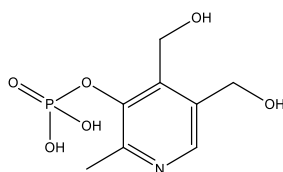
142115-24-0

Figura 29 - Íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 250,1124 do TIC de CSP-MIX (co-cultivo.).



Para o tempo de retenção 33,40 min, $[M+H]^+ = m/z$ 250,1124

Estrutura



Massa

249,1117

249,1132

Nome

Piridoxol
dihidrogenofosfato

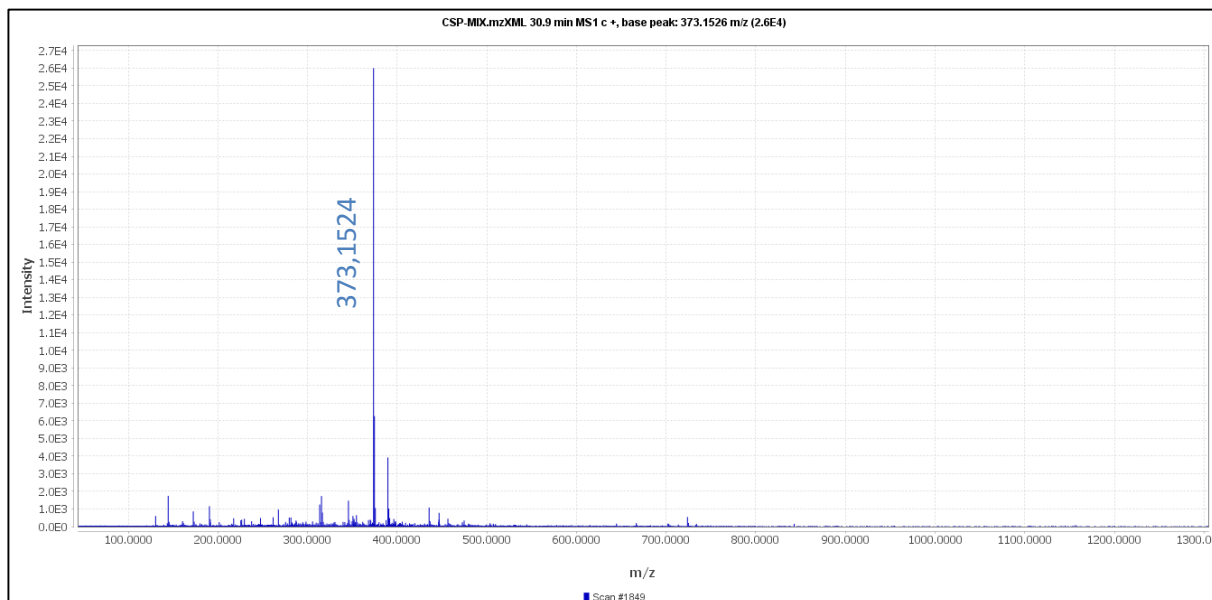
Alprenolol

CAS No.

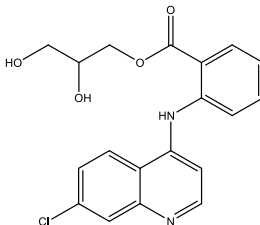
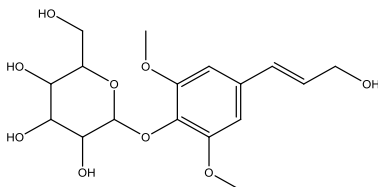
447-05-2

13655-52-2

Figura 30 - Pico relativo ao íon extraído $[M+H]^+ = m/z$ 373,1524 do TIC de CSP-MIX (co-cultivo.).



Para o tempo de retenção 29,2 min, $[M+H]^+ = m/z$ 373,1524

Estrutura		
Massa	372,0876	372,1420
Nome	glafenina	siringina
CAS No.	3820-67-5	118-34-3

Para tentar confirmar as propostas sugeridas pelas bases de dados consultadas, foi realizado um estudo de massas por fragmentação em modo *tandem* (do tipo MS/MS), para alguns dos íons proveniente do extrato do co-cultivo, uma vez que o mesmo dispõe das relações m/z dos extratos de monoculturas e também os íons que apenas são existentes no cultivo misto.

As Figuras subsequentes, dispõem dos valores de m/z dos íons alvos, e também os fragmentos gerados por meio do experimento HPLC-MS/MS, dados foram adquiridos por meio de um equipamento HPLC- LTQ-Orbitrap Velos.

Figura 31 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 250.

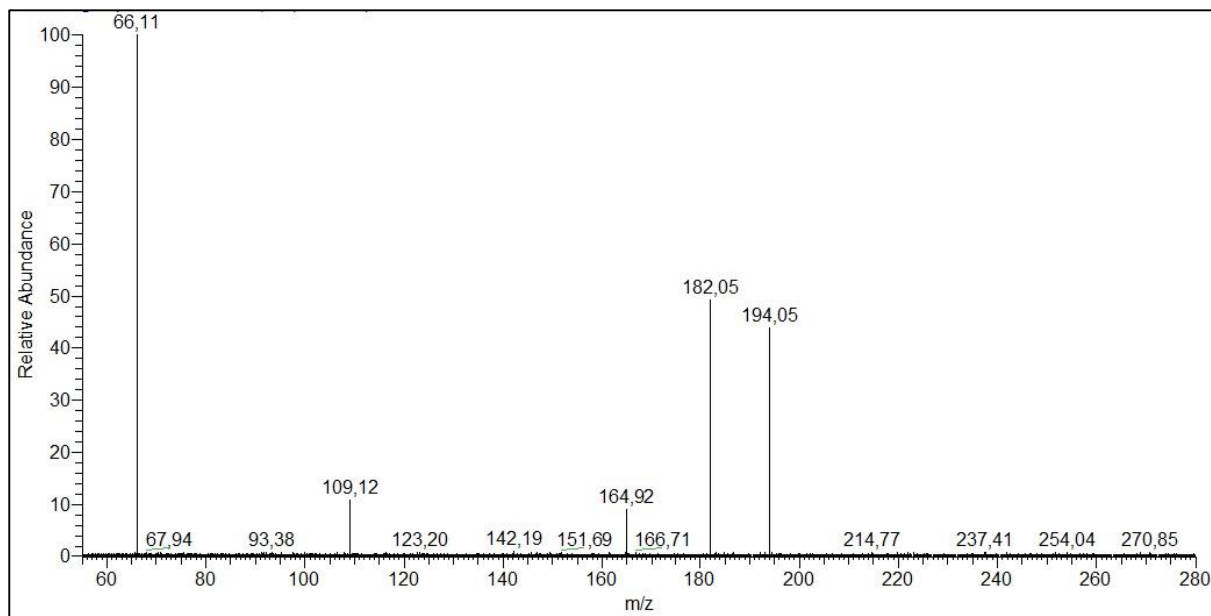


Figura 32 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 282.

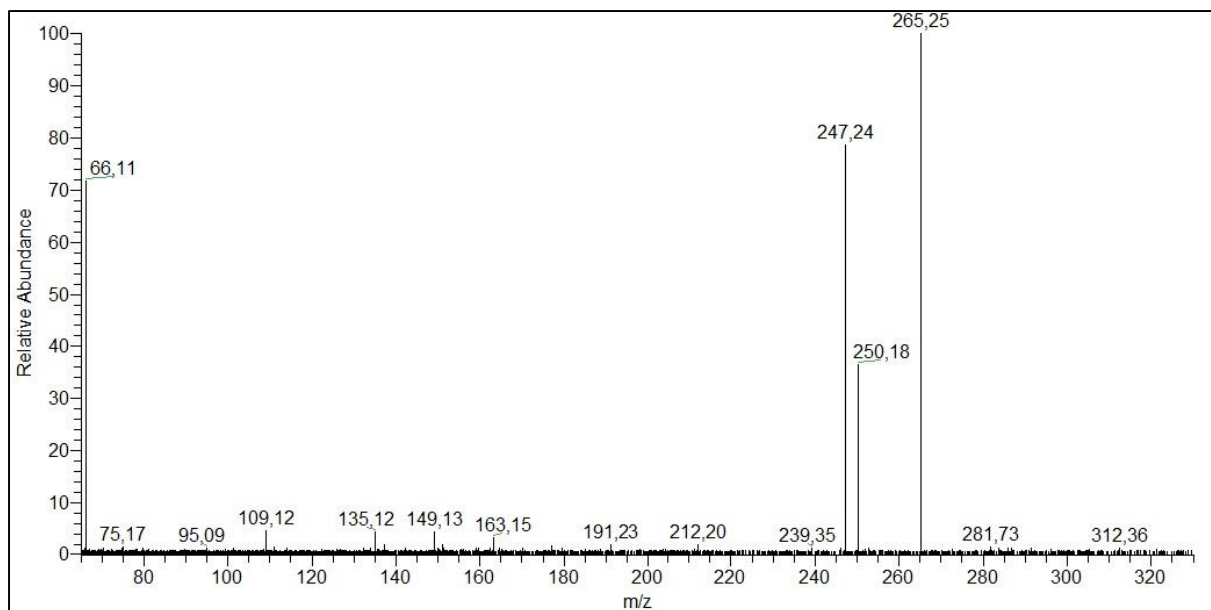


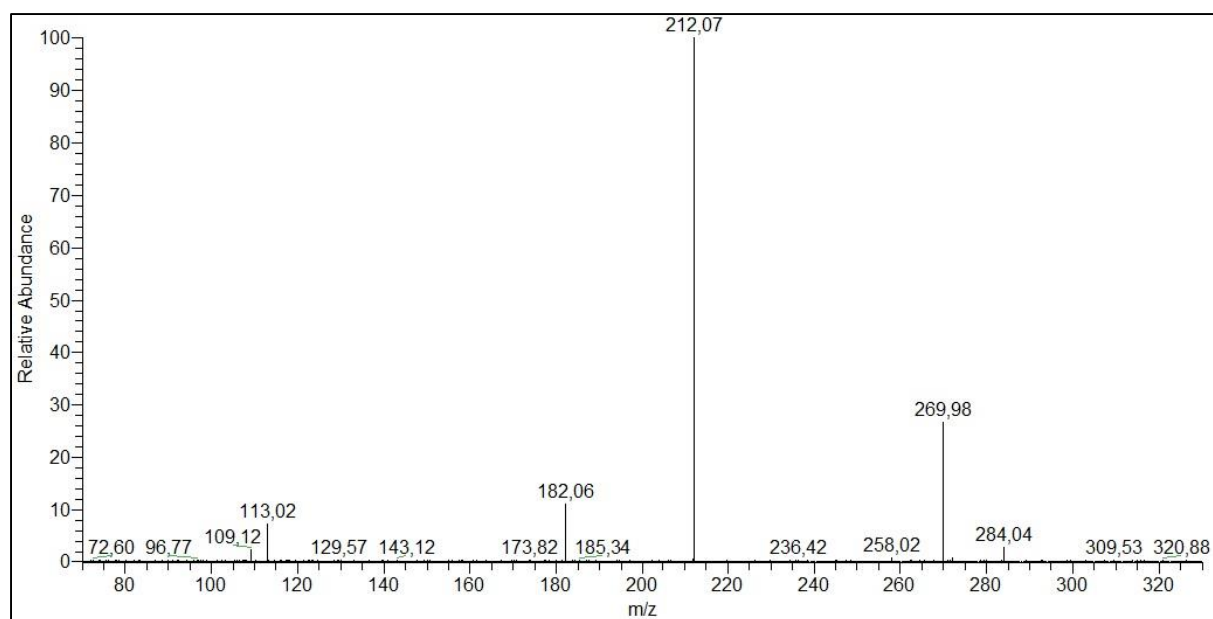
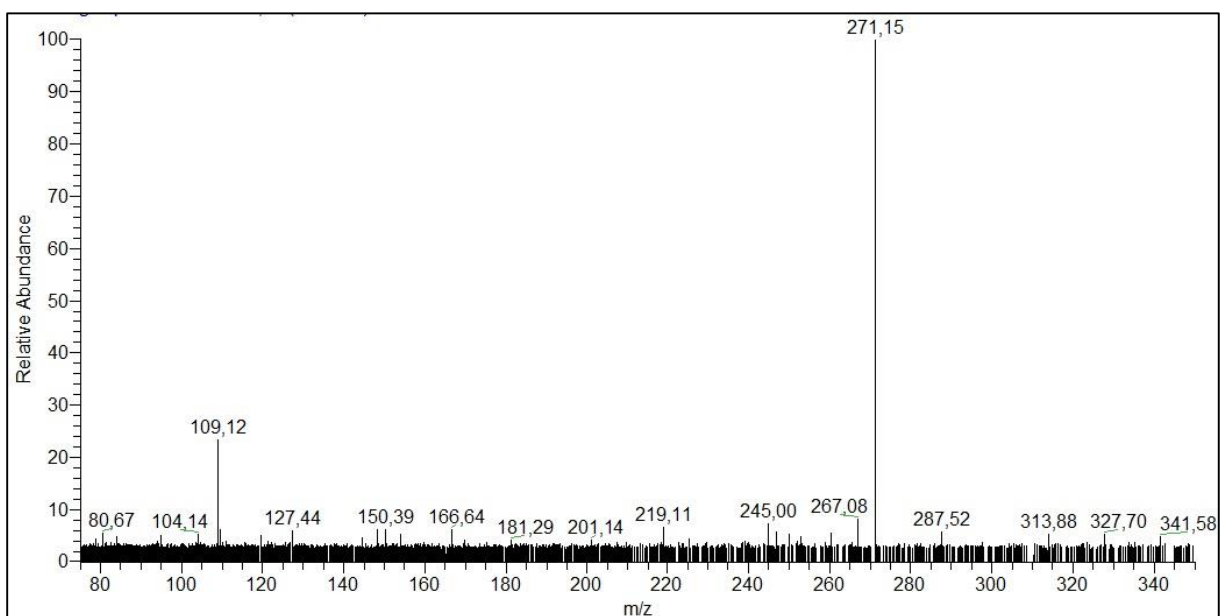
Figura 33 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 302.Figura 34 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 313.

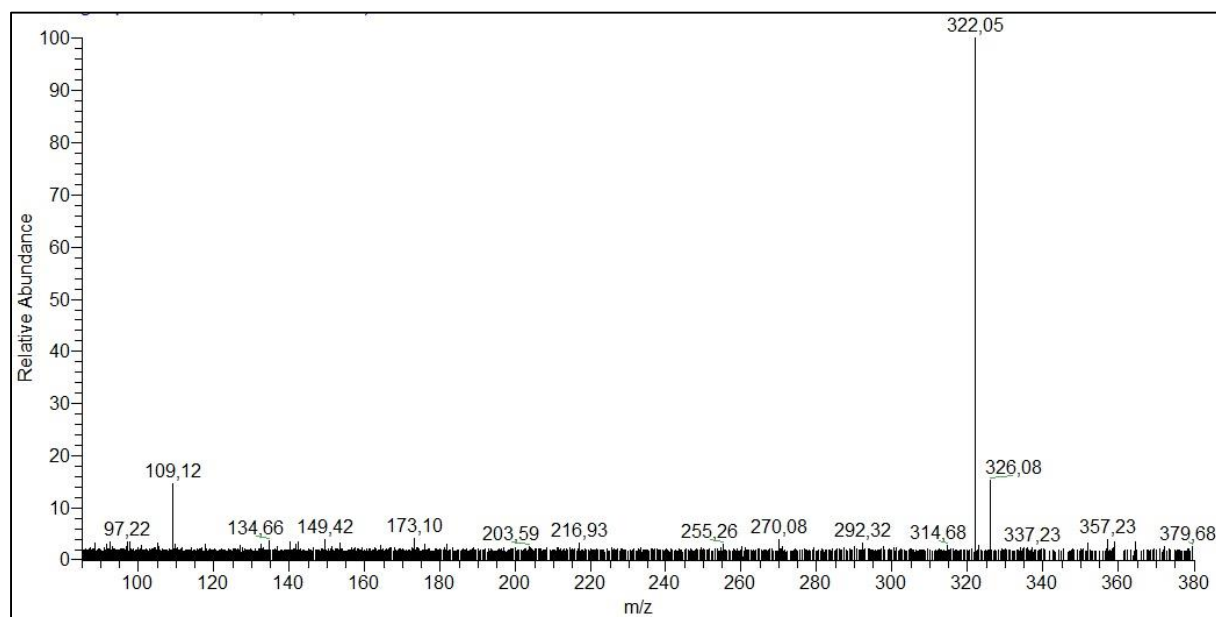
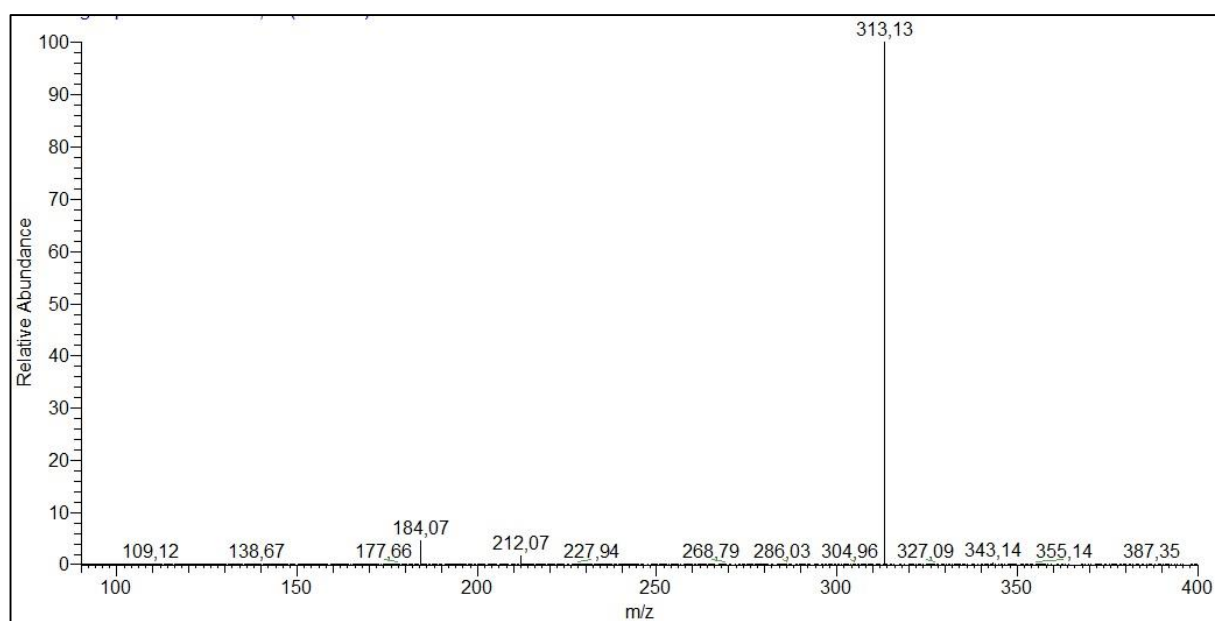
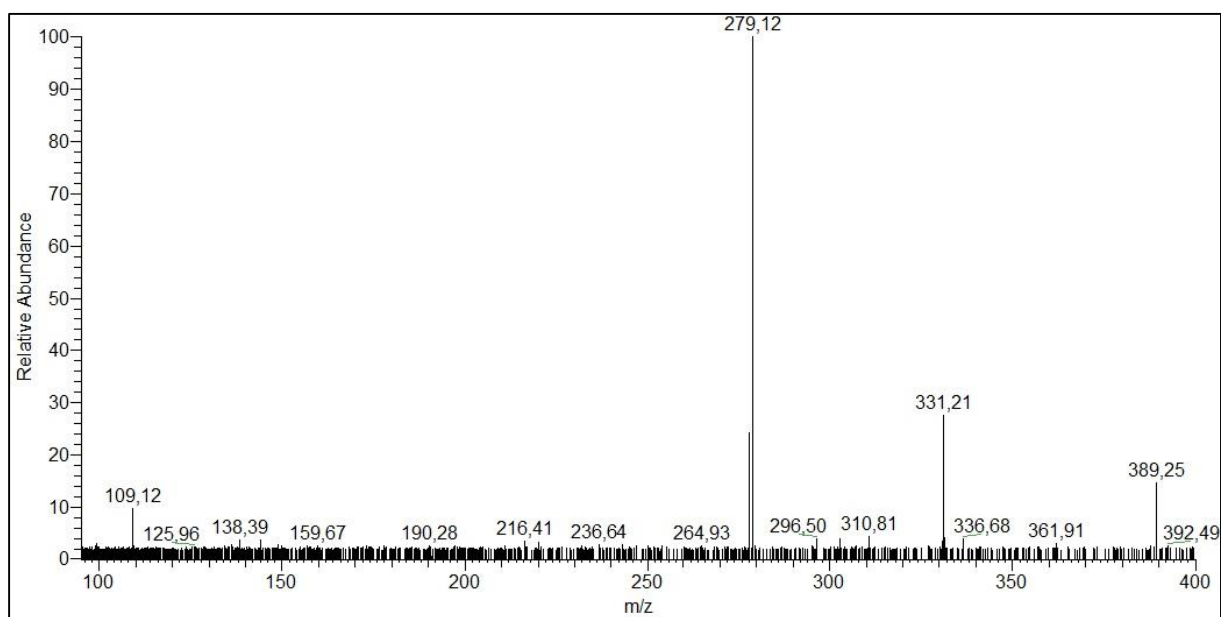
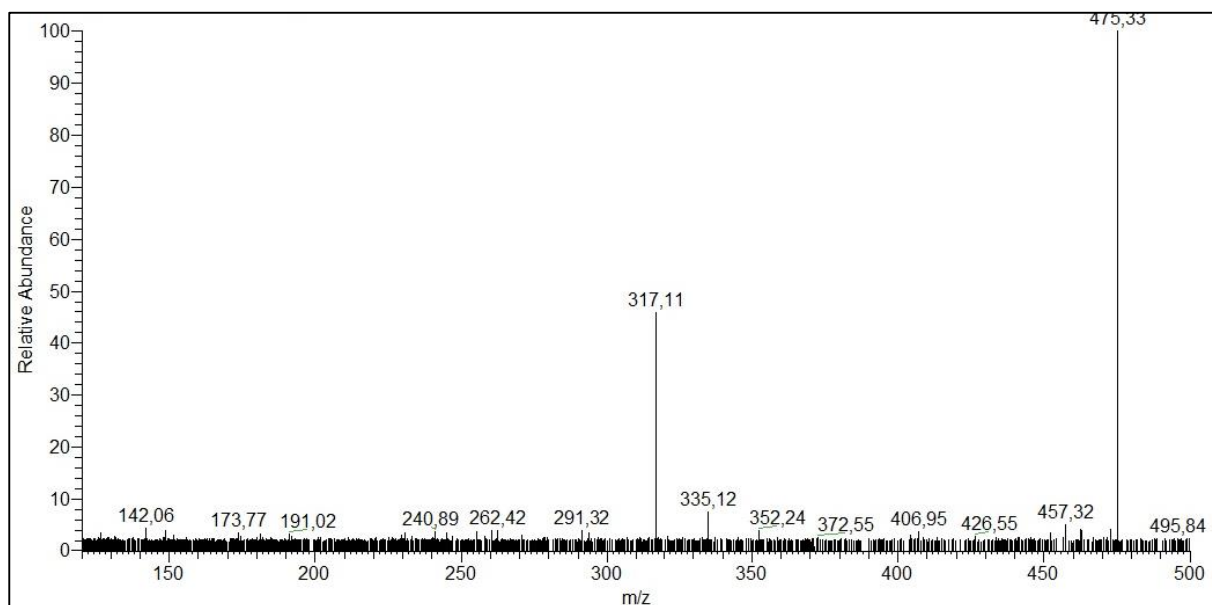
Figura 35 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 354.Figura 36 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 373.

Figura 37 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 389.Figura 38 - Fragmentograma relativo ao íon alvo m/z 475.

De posse das possíveis moléculas sugeridas pelas bases de dados, não foi possível detectar nenhuma molécula (dentro de um erro 10 ppm) para os íons geradores dos fragmentos atendessem às possíveis fragmentações adquiridas pela análise de MS/MS. De antemão, sugere-se que as respectivas moléculas aqui citadas dentre outras investigadas podem não pertencer aos extratos em estudo. Vale ressaltar, que as bases dispõem de um vasto exemplar de moléculas descrita de inúmeras fontes de produtos naturais.

Se referindo a *Shigella* sp., ainda que se tenha conhecimento do gênero e não espécie definida como no caso da *P. indica*, não foi possível encontrar na literatura estudos que tratasse de análise dos metabólitos produzidos por esse gênero. O que é possível encontrar, são estudos que contemplam outra área de aplicabilidade como o trabalho de Meng e colaboradores, (2015) que estudaram a capacidade do gênero de *Pseudoxanthomonas* sp. em degradação di(2-etilexil) ftalato (DEHP, do inglês) e juntamente a capacidade de desnitrificação, o que apontou a capacidade da espécie em utilizar do DEHP como fonte de carbono e energia, e ainda, evidenciando a possibilidade de desnitrificação e redução de nitrato e nitrito. Já para *Shigella* que é um gênero mais conhecido devido ao seu potencial patogênico, se comparado a *Pseudoxanthomonas*, há estudos que visam a inibição de uma espécie pertence a esse gênero, entre eles segue o trabalho de Mabel Lum e colaboradores (2013), que visaram a inibição de espécie de *S. flexneri*, um patógeno que faz vitima desde adultos até crianças de idade inferior a 5 anos.

Todavia a aplicação da desreplicação aqui associada com uso das bases de dados para identificação de moléculas para extratos não foi suficiente para identificação de compostos pertencente a matriz de estudo.

Sugere-se, um fracionamento desses extratos estudados, seguido do uso da técnica de extração em fase sólida (SPE - *solid phase extraction*), para melhor elucidação estrutural dos compostos dos extratos.

5 CONCLUSÕES

O estudo de crescimento bacteriano foi uma etapa crucial para obtenção de um extrato mais rico em metabólitos secundários. Foi indispensável conhecer a curva de crescimento para assim programar uma melhor fase para extração, seja em culturas isoladas ou cultura mista.

Técnicas como HPLC-CAD, HPLC-HRMS, MS/MS e RMN que possibilitaram o estudo em amostras em pequenos volumes. Assim, propiciou uma química mais verde, em termos de consumo excessivo de solventes.

O emprego de estratégias que contemplam a desreplicação é de grande valia para estudo de metabólitos secundários, ainda que estes são encontrados em meio a um extrato de alta complexidade.

A aplicação da desreplicação além de evitar o re-isolamento de substâncias já descritas na literatura, contribuiu para uma abordagem que também segue a química verde.

A necessidade indispensável de base de dados, acarreta à análise certa dificuldade, pois se tem conhecimento na literatura de bastante compostos oriundos das partes aéreas até sistema radicular. Quanto a metabólitos provenientes de bactérias, ainda há pouco relatos.

Esses estudos relacionados a metabólitos provenientes de bactérias presentes na rizosfera pode desencadear um amplo leque de compostos novos para as inúmeras aplicações, contribuindo de suporte para pesquisas subsequentes.

Com as ferramentas utilizadas até então, foi possível analisar a vasta riqueza dos extratos obtidos. Podendo-se verificar a presença de possíveis produtos provenientes dos micro-organismos associando-os a rizosfera de *S. spectabilis*, fato que estimula a investigação mais profunda dessa microbiota e suas interações tanto por meio das culturas isoladas, como em co-cultivo.

6 PERSPECTIVAS

A química envolvente nos produtos naturais sempre recebeu grande enfoque em pesquisas que visam a descobertas de fármacos. Ao decorrer dos anos, bactérias e fungos se tornaram uma fonte atrativa para obtenção de medicamentos.

A extensa biodiversidade de organismos, em conjunto com uma vasta quimiodiversidade existente em um mesmo gênero, possibilitam diferentes abordagens para a prospecção de novas drogas.

Diversas metodologias podem ser aplicadas no cultivo de micro-organismos para uma dada pesquisa, estimulando de maneira diferente genes e rotas biosintética, ou até mesmo inibindo a produção de determinados metabólitos.

Apesar do crescente número de trabalhos na área, ainda existe uma escassez no número de compostos presentes na literatura para determinadas espécies de micro-organismos.

As perspectivas para esse trabalho, circundam para análise mais pontual desses metabólitos. Desse modo, os resultados aqui preliminares, propiciarão a exploração mais minuciosa dessa gama de dados.

Contudo, espera-se a elucidação dos componentes que compõe esses produtos incubação das linhagens associadas a rizosfera de *S. spectabilis*, em ambos os extratos de cultura simples e co-cultura.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE MELO, G. M. de; SILVA, M. C. R.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTA, C. B. da; QUEIROZ, A. C. de; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. da S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 277–281, 2014.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; PALHARES DE MIRANDA, A. L.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Antinociceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795–799, 2003.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1829-1845, 2011.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010.
- ANEJA, K. R. **Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology**. 4th ed. New Delhi: New Age International, 2003. 632 p.
- BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. Bacteria plant growth-promoting. In: HILLEL, D. (Ed.). **Encyclopedia of soils in the environment**. Oxford: Elsevier : Academic Press, 2005. v. 1, p. 103-115.
- BERLEC, A. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics. **Plant Science**, v. 193/194, p. 96-102, 2012.
- BOLZANI, V. da S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, p. 5929-5934, 1995.
- BORGES, C. N.; BRUNS, R. E.; ALMEIDA, A. A.; SCARMINIO, I. S. Mixture-mixture design for the *fingerprint* optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, p. 28-37, 2007.
- CARDOSO, P. **Metabolomic evaluation of interactions in rhizosphere between *Senna spectabilis* and associated microorganisms**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.

CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, A. D.; PEZZUTO, J. M.; CONSTANT, H. L.; FANG, L.; SEO, E.-K.; LONG, L.; CUI, B.-L.; SLOWING-BARRILOS, K. The dereplication of plant-derived natural products. In: RAHMAN, ATTA-ur (Ed.). **Studies in natural products chemistry: structure and chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1997. v. 19, p. 749-791.

COWAN, D.; MEYER, Q.; STAFFORD, W.; MUYANGA, S.; CAMERON, R.; WITTEW, P. Metagenomic gene discovery, past, present and future. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 321-329, 2005.

CUETO, M.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1444-1446, 2001.

EL-SHATNAWI, M. K. J.; MAKHADME, I. M. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 187, p. 1-9, 2001.

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

FERRER, M.; MARTINEZ-ABARCA, F.; GOLYSHIN P. N. Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 588-593, 2005.

FREITAS, J. R.; GERMIDA, J. J. Growth promotion of winter wheat by fluorescent pseudomonads under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 1127-1135, 1992.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, p. 231-240, 2008.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-985, 2004.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology an Fertility and Soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

JELLER, H.; PEREZ, S. C. J. G. A. Efeitos dos estresses hidrico e salino e da ação de giberelina em sementes de *Senna spectabilis*). **Revista Ciência Florestal**, v. 11, n. 1, p. 93-104, 2001.

KARKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1911-1923, 2010.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR based metabolomic analysis of plant. **Nature Protocols**, v. 5, p. 536-549, 2010.

KUMARI, K.; SHARMA, P.; TYAGI, K.; LAL, R. *Pseudoxanthomonas indica* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dumpsite. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, pt. 9, p. 2107–2111, 2011

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 298-300, 2000.

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

LEWIS, G. P. **Legumes of the world**. Richmond: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

LI, W. H. J.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LINES-KELLY, R. **The rhizosphere**. 2005. Disponível em: <http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0004/42259/Rhizosphere.pdf>. Acesso em: 15 out. 2015.

LUM, M.; ATTRIDGE, S. R.; MORONA, R. Impact of dynasore an inhibitor of dynamin II on *Shigella flexneri* infection. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84975, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0084975.

MacLEAN, D.; JONES, J. D.; STUDHOLME, D. J. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 287-296, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Brock biology of microorganisms**. 13th ed. Boston: Benjamin Cummings, 2012. 1043 p.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 121-137, 2000.

MELLO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa CNPMA, 1998. p. 87-116.

MENG, X.; NIU, G.; YANG, W.; CAO, X. Di(2-ethylhexyl) phthalate biodegradation and denitrification by a *Pseudoxanthomonas* sp. strain. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 356-359, Mar. 2015.

MOLINSKI, T. F. NMR of natural products at the “nanomole-scale”. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 321-329, 2010.

MOREIRA, M. S. A.; VIEGAS JUNIOR, C.; MIRANDA, A. L. P.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Antinociceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795-799, 2003.

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

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

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

OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R. ; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution-ribosomal-RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 337-365, 1986.

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

PIVATTO, M. **Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil de *S. spectabilis* e *Cássia leptophylla***. 2005.153 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; RACKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, p. 1-20, 2001.

SANTOS, S. N.; KAVAMURA, V. N.; SILVA, J. L.; MELO, I. S.; ANDREOTE, F. D. Plant growth promoter rhizobacteria in plants inhabiting harsh tropical environments and its role in agricultural improvements. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Plant growth and health promoting bacteria**. Heidelberg: Springer, 2011. p. 251-272. (Microbiology monographs, v. 18).

SHEN, B. A new golden age of natural products drug discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by growth-promotion rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 191-196, 1999.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; MOHANA, K. P.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, p. 117-122, 2010.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectralina, cassina e análogos semi-sintéticos como potenciais candidatos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 38-46, 2010.

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

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, p. 1-30, 2000.

TANG, H.; XIAOA, C.; WANG, Y. Important roles of the hyphenated HPLC-DAD-MS-SPE-NMR technique in metabonomics. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 5157-5162, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

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

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, p. 453-483, 1998.

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

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, p. 3-14, 2007.

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

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

YANG, F.; YANG, J.; ZHANG, X.; CHEN, L.; JIANG, Y.; YAN, Y.; TANG, X.; WANG, J.; XIONG, Z.; DONG, J.; XUE, Y.; ZHU, Y.; XU, X.; SUN, L.; CHEN, S.; NIE, H.; PENG, J.; XU, J.; WANG, Y.; YUAN, Z.; WEN, Y.; YAO, Z.; SHEN, Y.; QIANG, B.; HOU, Y.; YU, J.; JIN, Q. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 19, p. 6445-6458, 2005.