

Natália Carolina Vieira

**Estudos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*:
Uma exploração racional da biodiversidade molecular com potencial citotóxico
e anticolinesterásico**

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

V657e Vieira, Natália Carolina
Estudos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*: uma exploração racional da biodiversidade molecular com potencial citotóxico e anticolinesterásico / Natália Carolina Vieira – Araraquara : [s.n], 2016
115 f. : il.

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

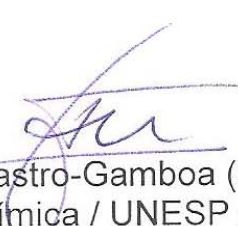
1. Metabolômica. 2. Rizosfera. 3. *Fusarium solani*. 4. *Fusarium oxysporum*. 5. Espectrometria de massa.
I. Título.

NATÁLIA CAROLINA VIEIRA

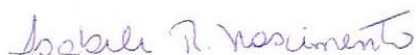
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 01 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



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



Profª. Drª. Isabele Rodrigues Nascimento
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª. Drª. Flávia Talarico Saia
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / Santos - SP

DADOS CURRICULARES

Formação acadêmica

2014 - 2016

Mestrado em Química

Local: Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Campus de Araraquara.

Título: Estudos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*: Uma exploração racional da biodiversidade molecular com potencial citotóxico e anticolinesterásico.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa.

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Disciplinas cursadas durante o mestrado

- Métodos Espectrométricos I: Conceito A
- Química Orgânica Avançada: Conceito B
- Análise Qualitativa em Misturas Complexas: Conceito A
- Introduction to Metabolomics and Chemometrics applied to natural product chemistry: Conceito A
- Introduction to NMR and Metabolomics: Conceito A

2009 – 2013

Licenciatura em Química

Local: Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Campus de Araraquara.

Formação Complementar

2009 - 2009

Análise e Tratamento de Águas. (Carga horária: 20h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2009 – 2009

Ensino de Química para Deficientes Visuais. (Carga horária: 6h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2013 – 2013

História e Filosofia da Ciência Catalisando Ações Transdisciplinares. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014 - 2014

Introduction to Metabolomics and Chemometrics appl. (Carga horária: 30h). Instituto de Química - UNESP Araraquara.

2014 - 2014

Introduction to NMR and Metabolomics. (Carga horária: 30h). Instituto de Química - UNESP Araraquara.

Atuação

2010 – 2013

Iniciação Científica

Título: Desenvolvimento de Método Analítico para Detecção de Adulteração de Etanol por Metanol em Postos de Abastecimento de Combustíveis

Bolsista: (Pibic - CNPq)

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

2013 – 2013

Professora de matemática da rede básica

Escola: Escola Estadual Prof. Alzira Dias de Toledo Piza, Américo Brasiliense - SP.

Produções Bibliográficas

Apresentações de Trabalho

1. **VIEIRA, N. C.**; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Desenvolvimento de Método Analítico para Detecção de Adulteração de Etanol por Metanol em Postos de Abastecimento de Combustíveis. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. **VIEIRA, N. C.**; NASCIMENTO, A. C. G. G.; FERNANDES, F. C. B.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Desenvolvimento de Método Analítico para Determinação de Dapsona em Fluidos Biológicos por Análise em Fluxo com Detecção Espectrofotométrica. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. FERNANDES, F. C. B.; **VIEIRA, N. C.**; NASCIMENTO, A. C. G. G.; FIGUEIRA, M. R.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Desenvolvimento de Procedimento em Fluxo para Determinação de Dapsona em Formulações Farmacêuticas, Leite Bovino e Urina Sintética. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. SELEGATO, D. M.; **VIEIRA, N. C.**; FREIRE, R. T.; PAVANI, V. D.; CASTRO-GAMBOA, I. Metabolomic studies of fungi isolated from the rhizosphere of *Senna spectabilis* by NMR spectroscopy and bioassays: selection of biologically promising extracts for co-culture. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Participação em Eventos

1. 39º Semana da Química. 2009.

2. VII Evento de Educação em Química - Materiais Didáticos: Suas Aplicações e Avaliações, 2009.

3. XXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, no Instituto de Química da UNESP campus de Araraquara, 2011.

4. XXIV Congresso de iniciação Científica da Unesp, no Instituto de Química da UNESP campus de Araraquara, 2012.

5. XI Evento de Educação em Química – Educação Inclusiva: Uma Nova Maneira de Ensinar Química, 2013.

6. 1st UNESP NMR Symposium Recent Advances in NMR Spectroscopy: A Powerful Tool for Fundamental and Applied Research. 2015. (Simpósio).

Organização de Eventos

1. VIEIRA, N. C. X EVEQ – A Química como Ferramenta Interdisciplinar. 2012.

2. VIEIRA, N. C. IX EVEQ – Linguagem no Ensino de Química. 2011.

3. VIEIRA, N. C. VIII EVEQ – Os Instrumentos de Avaliação no Ensino de Química. 2010.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Joaquim e Angela, e aos meus irmãos, Fábio e Jeferson, por todo o amor, apoio, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem a ser uma pessoa melhor em todos os momentos da minha vida profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e meus irmãos por todo o amor, companheirismo, paciência e incentivo durante cada degrau da minha vida, pois vocês são o principal motivo de eu ter conseguido chegar até aqui, e são o principal motivo de fazer a vida ter sentido!

Ao Adriano, por toda dedicação, por estar comigo em todos os momentos, por me amar do meu jeito e principalmente por toda a sua paciência infinita!

Ao Professor Ian, por toda sensibilidade, ensinamentos, amizade, e por sempre me encorajar e me fazer ver a ciência da melhor forma devido a sua paixão pelo que faz sendo assim um exemplo, que lavarei para a vida, de como um professor deve ser!

A todos os meus amigos do grupo de pesquisa, em especial ao Rafael e Afif pelo companheirismo, amizade, sabedoria, risadas e viagens a Ribeirão Preto, e também a Denise que ajudou a clarear os caminhos no início desse trabalho. Sou muito grata por fazer parte desse grupo com vocês!

Aos meus eternos amigos da Lic. 2009 que me proporcionaram os melhores anos da minha vida tanto nos momentos de estudo como de diversão durante a graduação, os quais alguns ainda caminham comigo hoje.

Aos meus amigos da vida, que sempre estão comigo me apoiando e me encorajando nos momentos bons ou ruins, pois vocês ajudam a completar minha felicidade!

Aos professores e alunos do NuBBE por todo o apoio.

Aos técnicos Nivaldo e Juliana pela dedicação e ensinamentos.

Aos docentes e funcionários do Instituto de Química.

As agências de fomento pelo apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP.

Agradeço também as parcerias realizadas que contribuíram grandemente para o desenvolvimento desse trabalho.

E por último agradeço a Deus por proporcionar em minha vida tantas coisas boas, e me ajudar a superar todos os desafios que a vida traz mesmo que sejam duros e difíceis, mas que me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia!

RESUMO

A cada ano vem crescendo a busca por novas fontes de produtos naturais, na qual os micro-organismos recebem uma grande atenção, sendo eles de extrema importância na descoberta de compostos bioativos e promissores a novos fármacos. Esse trabalho teve como foco o estudo de fungos filamentosos da rizosfera de *Senna spectabilis*. Foram testadas suas viabilidades e após esse processo, dez fungos foram escolhidos para esse trabalho e submetidos aos testes biológicos como citotóxico, anticolinesterásico e antifúngico e também foram obtidos seus perfis cromatográficos e químicos por CLAE-DAD e RMN, além da identificação filogenética. Após esses resultados iniciais, dois fungos foram escolhidos para desenvolver o método de desreplicação, sendo eles *Fusarium solani* e *F. oxysporum*. Esses fungos apresentaram atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e também apresentaram atividade anticolinesterásica, além disso, *F. oxysporum* apresentou também atividade antitumoral contra câncer do colorretal. Através das técnicas CG-EM, CLAE-EM, CLAE-EM/EM e RMN foram propostas estruturas moleculares interessantes para substâncias produzidas por esses micro-organismos, sendo que para o extrato de *Fusarium solani* foram identificados 12 metabólitos: ácido fumárico, ácido málico, tirosol, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido azelaico, ácido fusárico, (-)-ácido jasmônico/ácido (+)-7-*iso*-jasmônico, 10-hidroxicaptotecina, C-16-esfinganina, xestoaminol C, armilarina/armilaripina e beauvericina e para o extrato do fungo *Fusarium oxysporum* foram observados 14 metabólitos: ácido succínico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, ácido fusárico e três de seus derivados, integracídeo C, fusagerina C/D, C-16-esfinganina, xestoaminol C, armilarina/armilaripina e beauvericina. Além desses compostos, outros 5 metabólitos comuns às espécies *solani* e *oxysporum* foram observados, mas não puderam ser estruturalmente caracterizados por CLAE-EM/EM, no entanto, suas massas moleculares já foram relatadas para espécies de *Fusarium*.

Palavras-chave: *Senna spectabilis*. Rizosfera. *Fusarium solani*. *Fusarium oxysporum*. Desreplicação.

ABSTRACT

The search for new sources of natural products has been increasing to the rational exploration of microorganisms as great sources for the discovery of bioactives and promising compounds as well as new drugs. This work focused on the study of filamentous fungi, isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere from which were tested its viabilities. Thereon, ten fungi were chosen for this work and were submitted to biological tests, such as cytotoxic, anticholinesterase and antifungal. In addition, their chemical profiles were obtained for HPLC and NMR, besides phylogenetic identification. Finally, two fungi were chosen to develop dereplication method, being them *Fusarium solani* and *F. oxysporum*. These fungi showed anticholinesterase activity and antifungal activity against *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. Additionally, *F. oxysporum* showed antitumor activity against colorectal cancer. Through the GC-MS, HPLC-MS, HPLC-MS/MS and NMR, we were able to obtain interesting molecular chemotypes for these microorganisms; for *F. solani* we identified 12 metabolites, fumaric acid, malic acid, tyrosol, *p*-hydroxybenzoic acid, azelaic acid, fusaric acid, (+)-7-iso-jasmonic acid/(-)-jasmonic acid, 10-hydroxycamptotecin, C16-sphinganine, xestoaminol C, armillarin/armillaripin and beauvericin and for *F. oxysporum* was observed 14 metabolites, succinic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, hexadecanoic acid, octadecanoic acid, fusaric acid and its three derivatives, integracide C, fusagerin C/D, C-16-sphinganine, xestoaminol C, armillarin/armillaripin and beauvericin. Besides these compounds, others 5 metabolites common to both species (*solani* and *oxysporum*) couldn't be structurally characterized thorough LC-MS/MS, but they were accounted in several *Fusarium* species.

Key words: *Senna spectabilis*. Rhizosphere. *Fusarium solani*. *Fusarium oxysporum*. Dereplication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do Taxol.....	20
Figura 2 - Estrutura geral de derivados de penicilina.	21
Figura 3 - <i>Senna spectabilis</i>	21
Figura 4 - Alcalóides piperidínicos isolados da espécie <i>Senna spectabilis</i>	22
Figura 5 - Região ITS do DNA ribossomal.....	24
Figura 6 - Etapas da PCR.....	25
Figura 7 - Reação colorimétrica de MTT.....	39
Figura 8 - Fungo CSP-3a, (a)frente (b)verso.	40
Figura 9 - Fungo CSP-5a, (a)frente (b)verso	41
Figura 10 - Fungo CSP-5b, (a)frente (b)verso	41
Figura 11 - Fungo CSP-11c, (a)frente (b)verso	41
Figura 12 - Fungo CSP-17N, (a)frente (b)verso.....	42
Figura 13 - Fungo CSP-19b, (a)frente (b)verso	42
Figura 14 - Fungo CSP-32b, (a)frente (b)verso	42
Figura 15 - Fungo CSP- 46, (a)frente (b)verso	43
Figura 16 - Fungo CSP-57R37, (a)frente (b)verso.....	43
Figura 17- Fungo CSP-58-59, (a)frente (b)verso	43
Figura 18 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-3a em meio czapek preparado.....	45
Figura 19 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-5a em meio czapek preparado.....	45
Figura 20 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-5b em meio czapek preparado.....	46
Figura 21 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-11c em meio czapek preparado.....	46
Figura 22 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-17N em meio czapek preparado.....	47
Figura 23 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-19b em meio czapek preparado.....	47
Figura 24 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-32b em meio czapek preparado.....	48
Figura 25 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-46 em meio czapek preparado.....	48
Figura 26 - Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do extrato do fungo CSP-58/59 em meio czapek preparado.....	49
Figura 27 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-3a em czapek.	49
Figura 28 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-5a em czapek.	50
Figura 29 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-5b em czapek.	50
Figura 30 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-11c em czapek.	50
Figura 31 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-17N em czapek.....	51
Figura 32 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-19b em czapek.	51

Figura 33 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-32b em czapek.....	51
Figura 34 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-46 em czapek.....	52
Figura 35 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-58/59 em czapek. ..	52
Figura 36 - Inibição da acetilcolinesterase para os extratos dos fungos.....	53
Figura 37 - Inibição da acetilcolinesterase para os extratos dos fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-11c, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37 e CSP-58/59.....	54
Figura 38 - Inibição do Fungo <i>C. cladosporioides</i> para os extratos dos fungos CSP-5b e CSP-17N.	56
Figura 39 - Inibição do Fungo <i>C. sphaerospermum</i> para os extratos dos fungos CSP-5b e CSP-17N.	56
Figura 40 - Inibição de <i>C. cladosporioides</i> para os extratos dos fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-11c, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37 e CSP-58/59.....	57
Figura 41 - Inibição de <i>C. sphaerospermum</i> para os extratos dos fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-11c, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37 e CSP-58/59....	58
Figura 42 - Reação de Metoximação.....	62
Figura 43 - Reação de silição, precedida de metoximação, de um esteróide.	62
Figura 44 - Cromatograma (CG-EM) do extrato bruto do fungo <i>F. solani</i>	63
Figura 45 - Cromatograma (CG-EM) do extrato bruto do fungo <i>F. oxysporum</i>	63
Figura 46 - polidimetilsiloxano.....	64
Figura 47 - Espectro de massas do ácido <i>trans</i> -butenodióico siliado.	64
Figura 48 - Proposta de fragmentação do ácido <i>trans</i> -butenodióico siliado.....	65
Figura 49 - Espectros de massas do ácido málico siliado.	65
Figura 50 - Proposta de fragmentação do ácido málico siliado.....	66
Figura 51 - Espectros de massas do tirosol siliado.	66
Figura 52 - Proposta de fragmentação do tirosol siliado.....	67
Figura 53 - Espectros de massas do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico siliado.....	67
Figura 54 - Proposta de fragmentaçãodo ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico siliado.	68
Figura 55 - Espectros de massas do ácido azelaico siliado.....	68
Figura 56 - Proposta de fragmentação do ácido azelaico siliado.	68
Figura 57 - Espectros de massas do ácido butanodióico siliado.	69
Figura 58 - Proposta de fragmentação do ácido butanóico siliado.	69
Figura 59 - Espectros de massas do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico siliado.....	70
Figura 60 - Proposta de fragmentação do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico siliado.	70
Figura 61 - Espectros de massas do ácido hexadecanóico siliado.....	70
Figura 62 - Proposta de fragmentação do ácido hexadecanóico siliado.	71
Figura 63 - Espectros de massas do composto ácido Octadecanóico siliado.	71
Figura 64 - Proposta de fragmentação do ácido octadecanóico siliado.	72
Figura 65 - Cromatograma de íons totais para o extrato bruto de <i>F. solani</i>	73
Figura 66 - Cromatograma de íons totais para o extrato bruto de <i>F. oxysporum</i>	73
Figura 67 - Espectro de massas por CLAE-EM.....	79
Figura 68 - Fragmentação do ácido fusárico	79
Figura 69 - Espectro de UV do ácido fusárico.	79

Figura 70 - Comparação do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD do ácido fusárico, Azul: extrato bruto de <i>Fusarium oxysporum</i> . Vermelho: simulação do espectro do ácido fusárico.....	80
Figura 71 - Sobreposição dos sinais do TOCSY 1D do extrato em 0,971 ppm (vermelho) com o espectro simulado do ácido fusárico (azul).	80
Figura 72 - Espectro de massas do derivado 1.	81
Figura 73 - Fragmentação do derivado 1.....	81
Figura 74 - Espectro de massas do derivado 2.	82
Figura 75 - Fragmentação do derivado 2.....	82
Figura 76 - Espectro de massas do derivado 3.	83
Figura 77 - Perfil de fragmentação do derivado 3.	83
Figura 78 - Espectro de massas, MS ² , de integracídeo C.....	84
Figura 79 - Proposta de fragmentação para integracídeo C.....	85
Figura 80 - Estrutura molecular de (a) fusagerina C e (b) fusagerina D	86
Figura 81 - Massa de alta resolução do composto.....	86
Figura 82 - Espectro de massas, MS ² , do composto fusagerina C ou D.	87
Figura 83 - Proposta de fragmentação de fusagerina C ou D.	87
Figura 84 - Espectro de massas, MS ² , de C16-esfinganina.	88
Figura 85 - Proposta de fragmentação para C16-esfinganina.....	88
Figura 86 - Espectro de massas, MS ² , de xestoaminol C.	88
Figura 87 - Proposta de fragmentação de xestoaminol C.....	89
Figura 88 - Composto armillaripina ou armillarina sodiado e protonado em CLAE-EM de alta resolução.....	89
Figura 89 - Estrutura molecular de (a) armillarina e (b) armillaripina	90
Figura 90 - Espectro de massas, MS ² , de armillaripina ou armillarina.	90
Figura 91 - Proposta de fragmentação de um dos compostos.	91
Figura 92 - Massa de beauvericina, protonada e sodiada, apresentada no experimento CLAE-EM de alta resolução.....	92
Figura 93 - Espectro de massas, MS ² , da beauvericina.	92
Figura 94 - Fragmentação da beauvericina.....	93
Figura 95 - Sobreposição do espectro de RMN ¹ H do extrato de <i>Fusarium oxysporum</i> (vermelho) com o espectro simulado da beauvericina (azul).	93
Figura 96 - TOCSY 1D do extrato bruto de <i>Fusarium oxysporum</i> (vermelho), e espectro da beauvericina simulado (azul).	94
Figura 97- Estrutura molecular dos tricotocenos sugeridos para a massa <i>m/z</i> 325,1598.	95
Figura 98 - Espectro de massas, MS ² , do composto <i>m/z</i> 325,1598, que apresenta a perda de uma molécula de água com <i>m/z</i> 307.....	95
Figura 99 - Estrutura molecular de compostos relatados para o extrato de <i>Fusarium oxysporum</i>	96
Figura 100 - Espectro de massas de alta resolução, dos compostos da figura 85.	97
Figura 101 - Estrutura de (a) (-)-ácido jasmônico e (b) ácido (+)-7- <i>iso</i> -jasmônico.	98

Figura 102 - Espectro de massas, MS ² , de (-)-ácido jasmônico ou seu diastereoisômero ácido (+)-7- <i>iso</i> -jasmônico.	98
Figura 103 - Proposta de fragmentação do (-)-ácido jasmônico ou seu diastereoisômero ácido (+)-7- <i>iso</i> -jasmônico..	99
Figura 104 - Espectro de massas de 10-hidroxicamptotecina.	99
Figura 105 - Proposta de fragmentação do composto 10-hidroxicamptotecina.	100
Figura 106 - Espectro de massas de alta resolução dos compostos de <i>F. solani</i> iguais aos de <i>Fusarium oxysporum</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metodologia empregada na análise de CLAE-DAD.....	32
Tabela 2 - Massa dos extratos brutos dos fungos.	44
Tabela 3 - Resultado dos testes de inibição da enzima acetilcolinesterase. (Placa - CHCl ₃ :MeOH (95:5))	54
Tabela 4 - Resultado dos testes de inibição da enzima acetilcolinesterase. (PLACA - AcOEt:Hex (90:10))	55
Tabela 5 - Resultado de inibição do crescimento de <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> . (PLACA 2 - CHCl ₃ :MeOH (95:5))	58
Tabela 6 - Resultado de inibição do crescimento de <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i> . (PLACA 1 - AcOEt:Hex (90:10))	59
Tabela 7 - Análise da pureza e dosagem do DNA.....	60
Tabela 8 - Dosagem e análise da pureza dos produtos de PCR.	60
Tabela 9 - Identificação dos isolados após seqüenciamento de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA.	61
Tabela 10 - Dados CG-EM para o fungo <i>Fusarium solani</i>	64
Tabela 11 - Dados CG-EM para o fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	69
Tabela 12 - Massas moleculares de compostos sugeridos para o extrato de <i>Fusarium oxysporum</i>	74
Tabela 13 - Massas moleculares de compostos sugeridos para o extrato de <i>Fusarium solani</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AChE= Acetilcolinesterase

AcOEt:Hex= Acetato de Etila: Hexano

CCDA= Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CG-EM= Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CHCl₃:MeOH= Clorofórmio: Metanol

CLAE-DAD= Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos

CLAE-EM/ CLAE-EM/EM = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

dNTP= Deoxinucleotídeo

DMSO= Dimetilsulfóxido

DNA (ADN)= Ácido Desoxirribonucléico

IR = Índice de retenção

ITS= Espaço Interno Transcrito

MSTFA= N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida

NuBBE= Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

OD_{260/280}= Densidade Óptica

PCR= Reação em Cadeia da Polimerase

R_f = *ratio to front*

RMN= Ressonância Magnética Nuclear

RMN ¹H= Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rRNA= Ácido ribonucléico ribossomal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Produtos naturais.....	19
1.2 Micro-organismos como fonte de metabólitos bioativos	20
1.3 <i>Senna spectabilis</i>	21
1.4 Interações microbianas e fungos filamentosos na rizosfera	22
1.5 Rizosfera de <i>Senna spectabilis</i>	23
1.6 O gênero <i>Fusarium</i>	23
1.7 Desreplicação	24
1.8 Identificação filogenética.....	24
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Equipamentos.....	28
3.2 Reagentes e Meios de cultivo	29
3.3 Derivatização dos extratos para análise em CG-EM	30
3.4 Preservação dos fungos.....	30
3.5 Cultivo dos fungos em placa.....	30
3.6 Cultivo dos fungos em meio líquido.....	30
3.7 Obtenção dos extratos brutos	31
3.8 Otimização do método cromatográfico para placa de CCD (Cromatografia em Camada Delgada) para os extratos fúngicos	31
3.9 Metodologia empregada para CLAE- DAD	31
3.10 Parâmetros empregados para CLAE-EM – Alta Resolução.....	32
3.11 Parâmetros empregados para CLAE-EM/EM	33
3.12 Parâmetros empregados para CG-EM.....	33
3.13 Metodologia empregada para RMN	34
3.14 Identificação dos fungos	35
3.14.1 Extração de DNA dos fungos	35
3.14.2 Amplificação da região ITS pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ...	36
3.14.3 Sequenciamento dos produtos da PCR.....	36
3.15 Ensaio biológicos	37
3.15.1 Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE).....	37
3.15.2 Bioautografia com <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i> para avaliação preliminar da atividade antifúngica.	38
3.15.3 Ensaio Citotóxico	38

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1 Fungos filamentosos da rizosfera de <i>Senna spectabilis</i>	40
4.2 Análises dos extratos por RMN ¹H	44
4.3 Perfil em CLAE-DAD (<i>Footprinting</i>)	49
4.4 Ensaio Biológicos	52
4.4.1 Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE) Ensaio Qualitativo por Bioautografia (CCDA).....	52
4.4.2 Bioautografia com <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i> para avaliação preliminar da atividade antifúngica.	55
4.4.3 Ensaio Citotóxico (Antitumoral)	59
4.5 Identificação filogenética	60
4.6 Fungos escolhidos para a desreplicação	61
4.7 Desreplicação	62
4.7.1 Análise por CG-EM.....	62
4.7.2 Análises por CLAE-EM, CLAE-EM/EM e RMN.....	73
5 CONCLUSÕES	104
PERSPECTIVAS FUTURAS	106
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

Fontes de produtos naturais apresentam um importante posto na descoberta de novos fármacos, sendo assim, o estudo de suas produções metabólicas vem crescendo ao longo dos anos e proporcionando importantes estudos a respeito de seus quimiotipos.

1.1 Produtos naturais

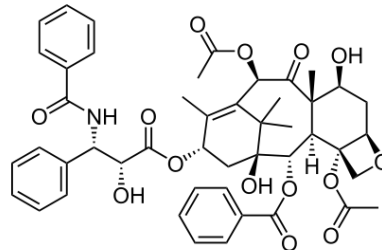
Os produtos naturais desempenham um papel extremamente importante na descoberta de novos fármacos, além de metabólitos eficazes contra ataques microbianos, resistência a stress ambiental e moléculas sinalizadoras em comunicação intraespecífica (LEE et al., 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Muitas tecnologias têm sido desenvolvidas para explorar fontes naturais e descobrir compostos de interesse farmacológicos. (MOLINSKI et al., 2010). Entretanto, o descobrimento de novos fármacos provenientes de produtos naturais decresceu em alguns anos, devido ao conhecimento dos principais quimiotipos produzidos por eles (VERPOORTE et al., 2005). Devido a isso, a química de produtos naturais tem buscado novas metodologias, como a metabolômica- que faz o estudo da maior parte de metabólitos produzidos por um organismo; a quimiometria - que faz uso de ferramentas estatísticas e a desreplicação que detecta compostos sem a necessidade de isolamento (ULRICH-MERZENICH et al., 2007; NICHOLSON; LINDON, 2008; LANG et al., 2008; LI et al., 2009), para auxiliar na descoberta de novos compostos.

Um exemplo clássico no estudo de produtos naturais para o descobrimento de novos fármacos é o Paclitaxel (Taxol) (Figura 1.) isolado pela primeira vez da casca do caule de *Taxus brevifolia*, que rendeu no ano de 2000 cerca de US \$ 2 bilhões. Esse composto é utilizado como agente quimioterapêutico para o tratamento de vários cânceres incluindo câncer de mama, ovário refratário, cólon e sarcoma de Kaposi. E esse composto pôde também ser encontrado no fungo endofítico, *Taxomices andreanae* isolado das cascas do caule de *Taxus brevifolia*, na década de 1990, mostrando um tipo de relação que pode ocorrer entre o micro-organismo e

sua planta superior. (OBERLIES; KROLL, 2004; TAJIK et al., 2015, STIERLE et al., 1993).

Figura 1- Estrutura do Taxol



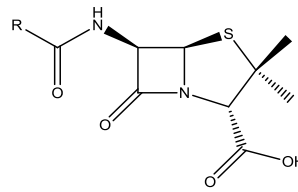
1.2 Micro-organismos como fonte de metabólitos bioativos

Na década de 1940 o estudo terapêutico da penicilina (Figura 2) como antibiótico, descoberto por Alexander Fleming em 1928 e produzido pelo fungo *Penicillium notatum*, abriu a era do uso de antibióticos na terapêutica moderna e assim, o interesse no estudo de micro-organismos como fonte de agentes bioativos (SCRIABINE et al., 1999).

Atualmente cerca de 1% dos micro-organismos conhecidos são estudados devido à dificuldade de cultivá-los por técnicas comuns de laboratório. No entanto, existem inúmeros compostos terapêuticos eficazes produzidos por micro-organismos capazes de serem cultivados. Adicionalmente, existe uma grande parte desse mundo microbiano, ainda inexplorado, capaz de ser estudado para a descoberta de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2013), abrindo possibilidades de exploração racional dentro da química de produtos naturais e associações com outras vertentes como a biotecnologia.

Neste contexto, os fungos são capazes de produzir metabólitos secundários pertencentes a várias classes como, esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, furanodionas, terpenóides e citocalasinas (SCHULZ; BOYLE, 2005), nos quais grande parte desses compostos possuem alguma atividade biológica de interesse.

Figura 2 - Estrutura geral de derivados de penicilina.



Fonte: elaborado pela autora.

1.3 *Senna spectabilis*

Senna spectabilis (Figura 3) é uma árvore encontrada na América do Sul e África. Ela é muito comum no Brasil, conhecida popularmente como cássia-do-nordeste, e é muito utilizada para paisagismo e recomposição de áreas degradadas devido a sua beleza.

Na medicina popular, várias partes desta árvore são utilizadas para o tratamento de doenças como prisão de ventre, insônia, ansiedade, epilepsia, malária, disenteria, dor de cabeça, além de atividade anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antiulcerogênica. E estudos fitofarmacológicos apontam atividade anticonvulsivante, sedativa, anti-malárica, leishmanicida, antimicrobiana e citotóxica. (MELLO et al., 2014; SILVA, F. et al., 2010; e SILVA et al., 2011).

Figura 3 - *Senna spectabilis*.

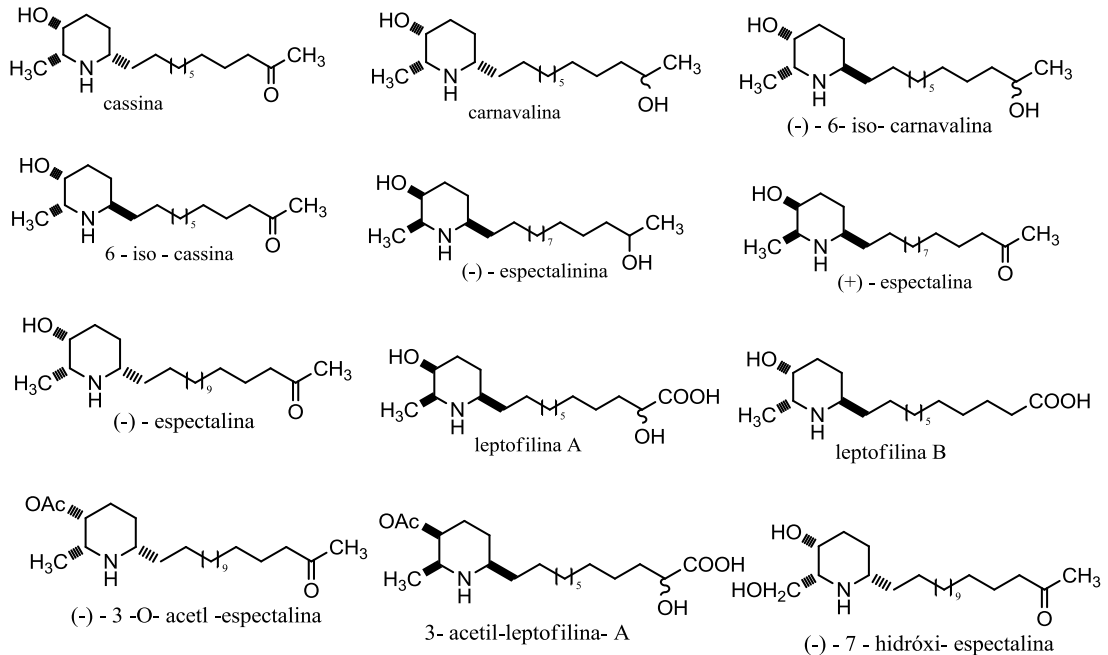


Fonte: Silva, D. et al. (2010).

Alguns metabólitos secundários são de extremo interesse na espécie de *Senna spectabilis*, em especial os alcalóides piperidínicos (alguns representados na Figura 4), que possuem efeitos farmacológicos interessantes como atividade citotóxica

seletiva, analgésica periférica, anestésica, antibiótica e inibidores da acetilcolinesterase (SILVA, D. et al., 2010; VIEGAS et al., 2004; VIEGAS et al., 2006).

Figura 4 - Alcalóides piperidínicos isolados da espécie *Senna spectabilis*.



Fonte: Viegas, et. al. (2004); Viegas, et. al. (2006)

1.4 Interações microbianas e fungos filamentosos na rizosfera

A rizosfera é a região do solo em contato direto com as raízes das plantas e possui uma máxima atividade microbiana. É uma região rica que a própria planta ajuda a criar, no qual fungos micorrízicos são os principais componentes da microbiota do solo e vivem em sinergismo com outros micro-organismos na rizosfera. Esses fungos favorecem o crescimento da planta, bem como auxiliam na absorção de nutrientes, qualidade do solo, proteção contra stress, também protegem a planta de patógenos com origem no solo (BAREA et al., 2002; CORDIER et al., 1999), auxiliam nas trocas de O₂ e CO₂, mineralização, amonificação e etc. (ECOLOGIA..., 2008).

E no caso dos fungos presentes na rizosfera, também são beneficiados, de forma simbiótica, pois podem obter, através da planta superior, fonte de açúcares, por exemplo, para seu crescimento (MIYAUCHI, 2012).

O estudo de micro-organismos isolados de plantas é interessante pelo fato de que estes micro-organismos podem produzir metabólitos interessantes, iguais aos que a planta produz, sugerindo que pode haver uma troca de genes ocorrendo entre eles (BROWN et al., 2003). Dessa forma, propriedades medicinais e atividades biológicas de algumas espécies de plantas têm sido atribuídas aos micro-organismos que vivem em associação com elas (KETTERING et al., 2004).

1.5 Rizosfera de *Senna spectabilis*

A Dra. Patrícia Cardoso em sua pesquisa de doutorado (CARDOSO, 2015) foi a responsável por produzir experimentos que permitissem a geração de uma coleção de micro-organismos pertencente à rizosfera de *S. spectabilis*. A partir desta pesquisa foram isolados, em meio hidropônico, 94 fungos e 31 bactérias da primeira coleta; 14 fungos e 6 bactérias da segunda coleta; 21 fungos e 14 bactérias da terceira coleta. E em meio rizotron foram isolados 6 fungos, 10 bactérias e 1 actinomiceto. E a partir de então a rizosfera de *Senna spectabilis* passou a ser explorada pela equipe de pós-graduandos sob orientação do Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, elucidando a produção de metabólitos e o seu comportamento interespecífico.

1.6 O gênero *Fusarium*

Fusarium é um gênero de fungo comumente encontrado no solo e suas espécies são conhecidas por serem patógenas a várias plantas, causando, por exemplo, prejuízos financeiros à indústria alimentícia por causar podridão em trigo (WANG L. et al., 2015), batata (WHARTON et al., 2014), milho (SMALL et al., 2012) e etc. Além de serem patógenos humanos, podendo causar queratite (ANTEQUERA et al., 2014), onicomiose (CARVALHO et al., 2014) e hialohifomicose (HOCQUETTE et al., 2005) principalmente a pacientes debilitados como vítimas de queimaduras e que receberam transplante de medula óssea (MYCOLOGI ONLINE).

Apesar de sua patogenicidade, espécies de *Fusarium* produzem compostos de interesse farmacêutico e medicinal como anticolinesterásicos (SOLFRIZZO et al., 1994), anti-alérgicos, anti-inflamatórios (MAHAPATRA et al., 2012) entre outros. Por

isso são fungos filamentosos interessantes para estudo de seus constituintes químicos na busca por moléculas bioativas que eles podem sintetizar.

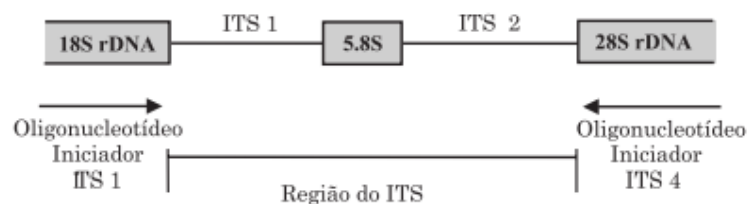
1.7 Desreplicação

A desreplicação é uma abordagem metodológica utilizada para diferenciar, de extratos de alta complexidade molecular oriundos de produtos naturais, os compostos já conhecidos daqueles possíveis compostos desconhecidos e com algum potencial de interesse (LANG et al., 2008). Para tanto, várias técnicas combinadas de separação e detecção são utilizadas, sendo elas CL-RMN - cromatografia líquida acoplada com ressonância magnética nuclear; CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e CL-EM - cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, bioensaios e análises que permitam a comparação dos conjuntos de dados obtidos através do uso de base de dados (CORDELL et al., 2009; LANG et al., 2008, NG et al., 2009). Isso tudo auxilia na elucidação de moléculas bioativas sem precisar re-isolar compostos já conhecidos descritos na literatura e disponíveis nessas bases, acelerando a descoberta de moléculas com algum potencial.

1.8 Identificação filogenética

Para identificação filogenética de fungos, faz-se uso do sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que é uma região do DNA que consiste em seqüências altamente conservadas podendo diferenciar gênero e espécie. Essa região separa os genes 18s e 28s do RNA ribossomal dos fungos (CHEN et al., 2004; Fungaro, 2000) (Figura 5).

Figura 5 - Região ITS do DNA ribossomal.



Fonte: Lupani et al. (2008)

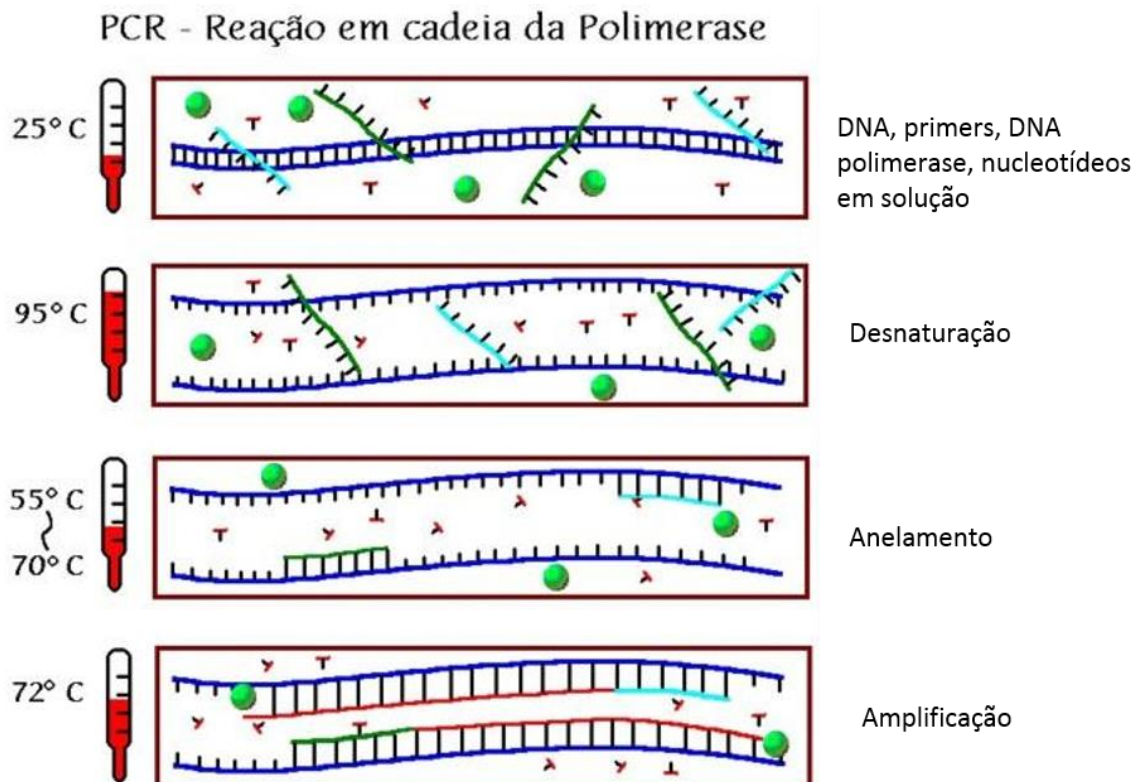
Para identificação a partir dessa região é comum realizar sua amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Esse processo é feito após a extração e purificação do DNA molde do micro-organismo, que contenha a região a ser amplificada (FUNGARO, 2000). A PCR (Figura 6) então se dá por três processos (MIYAMOTO, 2013):

1° Desnaturação: no qual ocorre a abertura da dupla fita de DNA por aumento de temperatura, que desfaz as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas da fita.

2° Anelamento: ocorre o pareamento de *primers* (inicializadores correspondentes) a fita de DNA a ser sintetizada, sendo que a temperatura ideal desse processo é de 5 °C abaixo da temperatura de fusão dos *primers*.

3° Amplificação: etapa que ocorre a ação da enzima DNA polimerase na presença dos 4 nucleotídeos livres à temperatura ideal da enzima, dando início à amplificação da região do DNA.

Figura 6 - Etapas da PCR.



Fonte: Matioli (2015).

Para o sequenciamento do DNA, é comum utilizar o método de Sanger, que consiste em determinar a sequência de nucleotídeos utilizando inibidores de síntese, que são nucleotídeos modificados (não possuem uma hidroxila na posição 3' e sim um hidrogênio tornando-os incapazes de se ligarem a outro nucleotídeo) que atuam como terminadores da síntese do DNA. E então, quando um *primer* é adicionado a uma mistura de DNA, DNA polimerase, nucleotídeos e inibidores de síntese, são obtidos fragmentos do DNA com a mesma inicialização em 5', mas com resíduos de inibidores de síntese na extremidade 3' em diferentes posições para cada uma das bases nitrogenadas. Pelo processo de fracionamento por eletroforese (ou, atualmente, por um equipamento sequenciador), o padrão de bandas mostra a distribuição dos nucleotídeos no DNA recentemente sintetizado, fornecendo o sequenciamento de DNA que pode ser comparado com bases de dados disponíveis (SANGER, 1997).

2 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Desreplicação dos extratos de fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*, que apresentam potencial biológico promissor.

Objetivos Específicos

- Testar a viabilidade e escolher fungos filamentosos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*;
- Obter seus extratos brutos;
- Submeter os extratos para os testes biológicos: anticolinesterásico, citotóxico e antifúngico;
- Obter os perfis químicos e cromatográficos de seus extratos por RMN ¹H e CLAE-DAD;
- Desreplicar seus extratos com auxílio de técnicas como CLAE-EM, CLAE-EM/EM, CG-EM e RMN.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o manuseio, crescimento, reprodução, preservação e extração dos fungos filamentosos da rizosfera de *Senna spectabilis* foram utilizados os seguintes materiais, esterilizados quando necessário: Erlenmeyers, alça de platina, placas de Petri, espátula, bastão de vidro, funil de separação, funil, capilar, placa de sílica gel, acetato de etila, hexano e clorofórmio.

3.1 Equipamentos

- BALANÇA ANALÍTICA - Os meios de cultura e as amostras dos extratos foram pesados em balança analítica Mettler Toledo AG 204.
- AUTOCLAVE VERTICAL - A esterilização dos meios de cultura e, dos frascos coletores de amostras, e o descarte do material microbiológico foram realizados em autoclave Quimis Aparelhos Científicos Ltda, (15 minutos, a 121°C).
- CÂMARA DE FLUXO LAMINAR - O repique, o isolamento e a inoculação dos micro-organismos foram realizados em câmara de Fluxo Laminar Pachame PA 310-Serie 172-99.
- CROMATOGRÁFO LIQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC – Shimadzu acoplado as bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10VP-Shimadzu, detector de arranjo de diodos UV/VIS- Shimadzu PC1520 – Diode Array.
- COLUNA: Kinetex 5 μ C18 100Å phenomenex.
- EVAPORADOR ROTATÓRIO A VÁCUO – Buchi R- 114.
- RMN: Bruker Avance 600 operando em 600 MHz, operando com um criossonda de 3 mm, para o núcleo de ^1H .
- ULTRASSOM: Elma S 60H Elmasonic U= 220-240 V e P= 550 W.
- CÂMARA DE UV: Solab- 254 nm e 365 nm
- CENTRÍFUGA: Gilson GmC Lab. Mode I: capsulefuge PMC-880. Corrente nominal 90 mA. Velocidade: 6,200 r/min.
- ESTUFA: Gehaka G4023D.
- BANHO MARIA: Hexis científica IKA HB 05.06 CN.

3.2 Reagentes e Meios de cultivo

- METANOL DEUTERADO: Cambridge Isoto e Laboratories, Inc. (CIL). D, 99,8%. Lote: 9H-138.
- PIRIDINA: PR1498-002. Lot 904145, Tedia Company, INC, USA.
- N-METIL-N-(TRIMETILSILIL)TRIFLUOROACETAMIDA: Sigma. Lot # BCBN 4262V. Alemanha.
- CLORIDRATO DE METOXIAMINA: Sigma Aldrich Chemistry. Lot 0001380182. Suíça.
- ÁGUA DEIONIZADA: A água utilizada no preparo dos meios de cultivo foi deionizada (18mΩ; Milli-Q, Millipore).

Os meios de cultivo foram autoclavados durante 15 minutos, a 121°C, para o processo de crescimento dos fungos:

- CZAPEK DOX AGAR: 49,01g/l HiMedia. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.23, Vandhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, Índia. Lot: 0000132901. pH final= 7.3 +- 0.2 at 25 °C.
- NUTRIENTE BROTH: Beef extract. Acumedia, NEOGEN Corporation. Lansing Michigan 48912, Lot: 104,936A.
- CZAPEK BOTH PREPARADO:
0,5g/l de Cloreto de Potássio PA ACS (KCl): QHEMIS. Hexis Científica S.A. Indaiatuba SP. Lote: 13074635.
3g/l de Nitrato de sódio P.A. (NaNO₃): Synth. Labsynth Produtos para laboratórios Ltda. Diadema SP. Lote: 166550.
0,5g/l de Sulfato de Magnésio, P.A. (MgSO₄.7H₂O): Reagen. Quimibrás Industrias Químicas S.A. Rio de Janeiro. Lot: 891011.
0,01g/l de Sulfato ferroso: marca não especificada.
30g/l de Sacarose P.A.: Neon. Neon Comercial LTDA. São Paulo. Lote: 2526.
1g/l fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄): MalinckrodtGenAR. Lote: 7746 KTPT.

Obs: Utilizou-se o Fosfato de Potássio Monobásico, enquanto o Czapek comercial faz uso do Fosfato de Potássio Dibásico.

3.3 Derivatização dos extratos para análise em CG-EM

Metoximação: 5-10 mg da amostra foram solubilizados em 80 µl de uma solução de metoxiamina em piridina (20 mg/ml) e em seguida adicionou-se mais 100 µl de piridina e aqueceu-se em banho-maria a 30 °C por 90 min.

Sililação: Na amostra metoximada adicionou-se 200 µl de MSTFA [N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida] homogeneizou-se bem e aqueceu-se a 37°C por 30 min.

Após esses procedimentos a amostra foi filtrada com microfiltro de 0,22 µm e transferida para vial com *insert* de 350 µl.

3.4 Preservação dos fungos

A preservação é feita a partir dos *slants* (fragmento do fungo) dos fungos, crescidos no meio de cultura em czapek dox gar, e adicionados a frascos limpos com água deionizada previamente autoclavados (15 minutos a 121°C em autoclave vertical). Os frascos foram devidamente etiquetados e lacrados para preservação.

3.5 Cultivo dos fungos em placa

O meio selecionado para ser utilizado (czapek Agar) foi solubilizado em água deionizada em concentração adequada utilizando erlenmeyer. Após autoclavar o meio foi vertido nas placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar e após o endurecimento do meio as placas foram vedadas.

Depois de frio, o *slant* do fungo foi colocado no meio da placa a fim de observar o seu crescimento.

Esse processo foi feito para todos os fungos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*, para testar suas viabilidades.

3.6 Cultivo dos fungos em meio líquido

Em oito frascos erlenmeyers de 1000 ml para cada fungo foram adicionados 300 ml de meio líquido czapek preparado e em seguida autoclavados. Após os meios

encontrarem-se devidamente frios, os *slants* dos fungos selecionados a partir do total preservados (CSP-3a, CSP-5a, CSP-5b, CSP-11c, CSP-17N, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37, CSP-58/59) foram cortados da placa de Petri, na qual foram crescidos, e adicionados aos frascos com meio líquido e incubados à 25°C durante 28 dias (protocolo do NuBBE) para a extração dos metabólitos.

3.7 Obtenção dos extratos brutos

Após o período de incubação, o micélio de cada fungo foi filtrado e o meio líquido reservado para a extração líquido-líquido dos metabólitos produzidos por eles utilizando-se três porções de 300 ml de acetato de etila (AcOEt - extrai compostos lipofílicos e de baixa polaridade) para cada 1 litro de meio líquido, dentro da capela

Em seguida os extratos foram solubilizados em metanol e passados por uma etapa de *clean-up* (Strata X, C18) e filtrados em membrana 0,22 µm. Esse processo foi feito para cada um dos 10 fungos.

3.8 Otimização do método cromatográfico para placa de CCD (Cromatografia em Camada Delgada) para os extratos fúngicos

Para os 10 fungos, dois sistemas diferentes de eluição foram utilizados: CHCl₃:MeOH (95:5) e AcOEt:Hex (90:10).

Após a realização da cromatografia, a placa foi seca em estufa e as manchas foram observadas em câmara de UV (254 nm e 365 nm) e reveladas com reagente anisaldeído.

3.9 Metodologia empregada para CLAE- DAD

As amostras foram preparadas em uma concentração de 4 mg/ml em uma proporção de 9:1 metanol:água.

Tabela 1 - Metodologia empregada na análise de CLAE-DAD.

Método	Descrição
Equipamento	Shimadzu Class-LC 10
Detector	Detector de arranjo de diodos (DAD) em varredura de 190 a 800 nm.
Taxa de fluxo	1 ml min ⁻¹
Fase estacionária	Kinetex C18 100 R, 150 x 4,60 mm
Volume de injeção	20 µL
Padrão	Solução de Benzeno/Tolueno 0,01% em ACN (15 µL)

Sistema de solventes: Fase móvel: mistura do solvente com água ultra pura Mili-Q (bomba A, solvente aquoso) e MeOH (bomba B, solvente orgânico); Gradiente exploratório: 5% a 100% de B em 40 minutos, 40-50 minutos em 100% de B, 50-55 minutos retornando a condição inicial de 5% de B e de 60-65 minutos permanecendo em 5% para o reequilíbrio da coluna.

3.10 Parâmetros empregados para CLAE-EM – Alta Resolução

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

O equipamento utilizado foi do modelo: micrOTOF II - ESI-TOF Mass Spectrometer, Fabricante: Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA.

As Condições do Experimento foram: Bomba de infusão, Fluxo 300 µl/h, Fase Móvel para a solubilização: H₂O:MeOH. E o modo de detecção foi positivo para as amostras.

O Aparelho é de alta resolução necessitando de calibração interna antes de realizar as análises usando-se uma solução de Na-TFA a 10 mg/ml (TOF).

Em relação às condições de análises do aparelho foram os seguintes valores: End Plate: 500 Volts, Capillary: 3500 Volts, Capillary Exit: 120 Volts, Skimmer 1: 50 Volts, Skimmer 2: 22 Volts, Transfer: 65 µs.

Para análises de CLAE-EM foram utilizadas as seguintes condições: Dry Gas Temp 220 C, Dry GasFlow 10 l/min, Neb Gas, Pressure 5.5 Bar e Gás nitrogênio. Modelo prominence SHIMADZU, Bombas de alta pressão, modelo LC-20AD, Faixa

de fluxo: 0.0001 ml/min a 10.000 ml/min, Detector espectrofotométrico "Photodiode Array" modelo SPD-M20A, Marca SHIMADZU, Módulo de comunicação modelo CBM-20^a, Desgaseificador modelo DGU-20A-5, Marca SHIMADZU, Bomba de infusão modelo COLE PARMER. E o software utilizado para tratamento dos dados foi Data Analysis versão 4.2

3.11 Parâmetros empregados para CLAE-EM/EM

As análises por CLAE-EM/EM foram realizadas no departamento de Química da Universidade de São Paulo (USP) campus de Ribeirão Preto no laboratório GCBPN sobre a supervisão da Professora Dra. Carmen Lúcia Cardoso.

O sistema cromatográfico utilizado Nexera XR (Shimadzu, Kyoto, Japão) consiste de duas bombas LC-20AD XR, um injetor automático SIL-20AD com um loop de 50 µl, um desgaseificador DGU-20A3R, um detector de arranjo de diodos SPD-M20A, um forno de colunas CTO-20A e um controlador de sistema CBM-20A. O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas Amazon Speed (BrukerDaltonics, GmbH, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte ESI, operando no modo positivo. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis versão 4.3 (Bruker Daltonics).

As análises foram realizadas em Auto_MS e os parâmetros foram: Trap drive: 58.0, Helium pressure: 37,13%, Helium differential pressure: $1,70 \cdot 10^{-6}$ mbar, Capillary Exit 140 V, Dry temp: 350 °C, Nebulizer: 70 psi, Dry gas: 12 l/min, HV capillary: - 4500 V, Current Capillary: 2500,928 nA, Current end plate: 2002,417 nA, HV end plate offset -550 V.

3.12 Parâmetros empregados para CG-EM

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

Para as análises por CG-EM utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 equipado com injetor automático AOC-5000 *Shimadzu* e interface com um espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi EN5MS (30 m x 0,25 µm x 0,25

mm), *GCMS solutions Ver. 2.5*. A temperatura do forno foi assim programada: 120 °C (3 min) 3 °C/min 320 °C (10 min) até 79.67 min. A temperatura do injetor foi 260 °C. Modo de injeção: *splitless/split (Grob)*. Início *splitless*, 0,75 min *split (1/50)*, 2 min *split 1/20*, gás de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1,3 ml/min, o volume de amostra injetado foi de 1 µL. Pressão: 114.9 kPa, velocidade linear: 43.1 cm/sec., fluxo total: 17.3. Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa das massas de aquisição de *m/z* 40-600 Daltons.

As moléculas propostas foram analisadas pelo software Shimadzu GCMS solution Ver. 2.61, os índices de retenção (IR) foram calculados pela equação de Van den Dool e Kratz (equação 1), utilizando um padrão de hidrocarbonetos (C₈-C₄₀) analisados nas mesmas condições dos extratos, e em seguida esses índices de retenção foram comparados com as bases de dados NIST (Instituto Nacional de Normas e Tecnologia) e GMD (*Golm Metabolome Database*).

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

n= número de carbonos do hidrocarboneto que eluiu antes ao analito;

tR_x= tempo de retenção do analito;

tR_n= tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao analito;

tR_{n+1}= tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao analito.

3.13 Metodologia empregada para RMN

As amostras foram analisadas em RMN Bruker Avance 600 operando em 600 MHz, operando com um criossonda de 3 mm, para o núcleo de ¹H.

4 miligramas do extrato fúngico bruto foi pesado em eppendorf de 2 ml e solubilizado com 200 µl de CD₃OD com auxílio de um ultrassom (com exceção do fungo CSP-19b, que foi necessária uma concentração muito menor, utilizando 0,5 mg do extrato para se obter uma melhor resolução dos sinais na análise). Em seguida os extratos foram centrifugados durante 15 minutos a 6,200 r/min e o sobrenadante foi recolhido e adicionado a um tubo de RMN de 3 mm com auxílio de

uma pipeta. Após a transferência, a região externa do tubo foi limpa com acetona para eliminar sujeiras e gorduras que pudessem interferir na análise.

Os parâmetros utilizados foram: Sequência de pulso: zgcprr (pre-saturação), TD (time domain - número de pontos): 57690, DS (dummyscan): 4, NS (number of scans): 208, SW (spectral window): 16.0221, O1P (ponto de irradiação): 4.9 ppm (2940.64Hz), O2P: 49.497 ppm (7469.22Hz), D1: 2, Temperatura: 22 °C.

Obs: Devido ao alto teor de açúcares apresentados, os extratos escolhidos para a desreplicação passaram por uma partição água:acetato (1:1) a fim de remover a presença desses açúcares para uma melhor análise e comparação dos espectros de RMN.

3.14 Identificação dos fungos

A extração do DNA e a identificação pela região ITS dos fungos da rizosfera foram feitos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-CAR sob supervisão das Professoras Doutoras Maria José Soares Mendes Giannini e Ana Marisa Fusco Almeida.

3.14.1 Extração de DNA dos fungos

Os fungos que ainda não tinham identificação foram crescidos em meio líquido nutriente both por sete dias, e o micélio formado foi filtrado e macerado em nitrogênio líquido. Após o maceramento foi feita a lise celular química utilizando tampão de lise composto por 10 mM Tris/HCl (Cloridrato de Trizma), 1 mM EDTA, 1% SDS e 100 µg de proteinase K. Após a lise celular, o DNA foi precipitado utilizando-se CTAB (brometo de acetiltrimetilamônio), um detergente catiônico que tem propriedade de precipitar ácidos nucleicos e polissacarídeos ácidos em soluções de baixa concentração iônica. Após a precipitação, o DNA foi tratado com RNase (seqüenciador) (50 µg/ml) e então seguiu-se com a purificação do DNA utilizando-se Fenol:Clorofórmio:Alcool-iso-amílico (25:24:1) (BAEZA et al. 2006). Após a purificação o DNA foi precipitado utilizando-se acetato de sódio 3M e etanol absoluto seguido de lavagem com etanol 70%. O DNA precipitado foi então

ressuspendido em H₂O DEPC (Dicarbonato de dietila). O DNA foi então dosado e teve sua pureza avaliada utilizando-se o aparelho Nano Vue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Lifescience).

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

Primers ITS 1 e ITS4, que amplificam a região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA, foram utilizados para identificar os fungos da rizosfera.

As reações foram realizadas utilizando-se 10 pmol de cada *primer* ITS1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 2,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP (5 mM), 5 µl de tampão da Taq 10 X, 1U unidade de Taq DNA Polimerase e 20 ng de DNA em uma reação de volume total de 50 µl. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) seguindo o seguinte programa: 95°C 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56 °C por 15 segundos e 72 °C por 65 segundos, após os ciclos, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 72 °C seguido de resfriamento a 4 °C. A reação foi então verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (40 mM Trisaminometano (pH 7.6), 20 mM ácido acético 1 mM EDTA) e amostras coradas com Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium), sendo as bandas visualizadas com o auxílio de luz UV. Após a verificação da amplificação, os produtos das PCRs foram purificados utilizando o kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram dosados e tiveram a pureza avaliada utilizando-se o aparelho NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Lifescience).

3.14.3 Sequenciamento dos produtos da PCR

O produto da PCR foi utilizado na reação de sequenciamento, baseado no método de SANGER (SANGER, et al., 1977) utilizando dideoxynucleotídeos fluorescentes e sequenciador automático modelo ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). As reações de sequenciamentos foram realizadas com a adição de 1 µl de primer (5 µM), 2 µl de tampão de sequenciamento 2X, 40 ng de

produto de PCR e 2 µl do BigDye. As reações foram realizadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies) seguindo o seguinte programa: 96 °C por um 1 minuto, seguido por 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após a reação, os produtos foram purificados utilizando o kit Big Dye X Terminator® Purification Kit (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação as amostras foram submetidas ao sequenciador ABI Prism 3130. As sequências obtidas foram analisadas utilizando os programas Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (ALTSCHUL, et al., 1990), disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. E o seqüenciamento obtido foi comparado com a base de dados GenBank.

3.15 Ensaio biológicos

Os extratos foram submetidos a testes de atividade biológica em São Paulo, no Instituto de Botânica de São Paulo - Seção de Fisiologia Vegetal, sob supervisão da Dra. Maria Claudia Marx Young para análise de atividade anticolinesterásica e antifúngica. E submetidos também para o Ceará, no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (LOE-UFC) com supervisão do Prof. Dr. Diego Wilke para análise antitumoral.

3.15.1 Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE)

- Ensaio Qualitativo por Bioautografia (CCD)

Amostras do extrato bruto (200 µg) foram analisadas em CCD de sílica gel 60 F254 (Merck). Como controle positivo foi utilizado fisostigmina (0,05 µg). Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com uma solução de enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%). Logo após, a placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com uma mistura da solução etanólica de acetato de 1-naftila (5 ml; 0,25%) e aquosa do sal Fast Blue B (20 ml; 0,25%) (Marston, et al. 2002). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca, sobre o fundo de coloração roxa indica inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. As cromatoplasmas obtidas foram observadas

em comprimento de onda 254 nm e 366 nm em equipamento CAMAG Repro Star 3, e fotografados em câmera fotográfica Epson Photo PC 3000 Z. Os valores dos Rf (fator de retenção) foram calculados onde houve inibição da reação enzimática, observados pela presença de halos brancos sobre o fundo roxo. E as atividades observadas nesse ensaio são consideradas forte (***), moderada (**) e fraca (*).

3.15.2 Bioautografia com *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* para avaliação preliminar da atividade antifúngica.

Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos e das frações, amostras dos extratos brutos (400 µg) foram analisadas em CCD, em cromatoplasacas de sílica gel F254 (Merck), desenvolvidas com o sistema de eluentes, e após completa evaporação dos solventes, as placas foram borrifadas com suspensão de esporos dos fungos *C. cladosporioides* (Fresen) de Vries (CCIBt 140) ou *C. sphaerospermum* (CCIBt491) em meio líquido de sais minerais e glucose (6:1) e incubadas em câmara úmida a 25 °C, no escuro, por 48 horas, segundo método de Homans & Fuchs (1970). Após o período de incubação, zonas claras de inibição do crescimento do(s) fungo(s) se formaram em contraste com um fundo de coloração escura, nas amostras que apresentaram atividade, e o fator de retenção (Rf) dos constituintes ativos foi determinado. Nistatina (5 µg) foi utilizada como controle positivo.

3.15.3 Ensaio Citotóxico

A linhagem tumorigênica humana utilizada foi HCT 116 (cólon - humano).

As células foram cultivadas em meio de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, sendo mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

A análise de citotoxicidade pelo método do MTT consiste em uma análise colorimétrica, pela qual ocorre a conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazana, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (reação na figura 7).

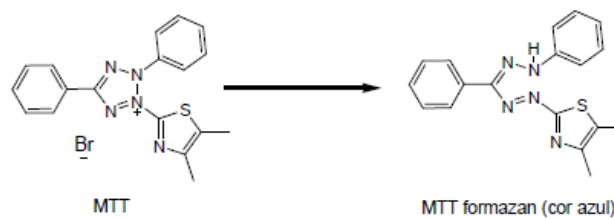
As células foram plaqueadas na concentração de $0,7 \times 10^5$ cél/ml para a linhagem HCT 116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C . Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e os sobrenadantes removidos.

Em seguida, foram adicionados $150\ \mu\text{l}$ da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com $150\ \mu\text{l}$ de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a $595\ \text{nm}$.

Os experimentos foram estatisticamente validados, segundo suas médias, de acordo com o programa Graph Pad Prism, empregando esse para a determinação do IC_{50} (concentração inibitória capaz de diminuir em 50% a viabilidade celular), o padrão utilizado foi o quimioterápico doxorrubicina.

- Extrato promissor: quando há inibição $>75\%$ na concentração de $50\ \mu\text{g/ml}$.

Figura 7 - Reação colorimétrica de MTT.



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

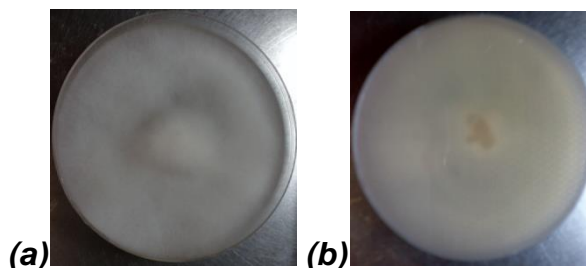
Da coleção de fungos filamentosos, isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*, crescidos em placa em meio de cultivo czapek Agar, escolheram-se dez que obtiveram um crescimento homogêneo, livre de contaminação e conseqüentemente um melhor aspecto morfológico apresentado, para posterior obtenção de análise dos seus extratos.

4.1 Fungos filamentosos da rizosfera de *Senna spectabilis*

Os fungos escolhidos estavam codificados como: CSP-3a, CSP-5a, CSP-5b, CSP-11c, CSP-17N, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37, CSP-58/59. Esses micro-organismos foram isolados da rizosfera de *S. spectabilis* sendo que os fungos CSP-58/59 e CSP-57/R37 foram isolados do cultivo em rizotron, e os fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-5b, CSP-11c, CSP-17N, CSP-19b, CSP-32b e CSP-46 foram isolados do cultivo hidropônico. Desses dez micro-organismos escolhidos, dois deles foram identificados no trabalho da aluna Dra. Patrícia Cardoso, sendo eles, CSP-5b: *Fusarium solani* e CSP-11c: *Fusarium* sp. O restante dos fungos foram identificados, mais adiante, nesse trabalho.

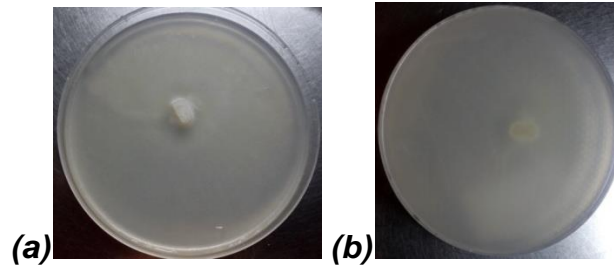
Seguem abaixo as fotos (Figura 8-17) e características dos fungos escolhidos para o presente estudo, crescidos em meio czapek Agar, com 28 dias de cultivo, armazenados na geladeira após 15 dias de crescimento.

Figura 8 - Fungo CSP-3a, (a) frente (b) verso.



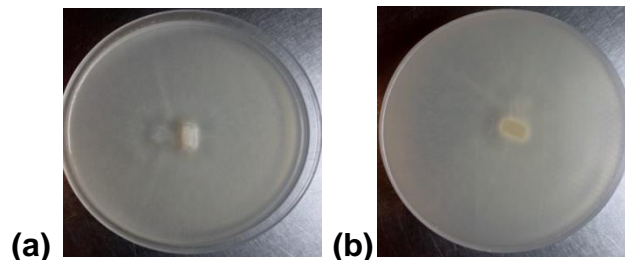
O fungo CSP-3a cresceu de forma homogênea na placa a partir do *slant*. Ele apresentou-se branco e suas hifas cresceram grandes na forma de algodão.

Figura 9 - Fungo CSP-5a, (a) frente (b) verso



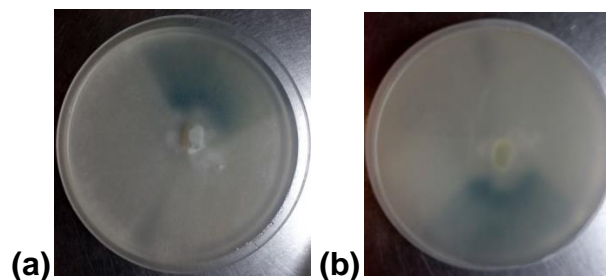
O fungo CSP-5a cresceu de forma homogênea na placa a partir do *slant*. Ele apresentou-se branco e suas hifas cresceram com um leve aspecto de algodão, porém não tão felpudo como o CSP-3a.

Figura 10 - Fungo CSP-5b, (a) frente (b) verso



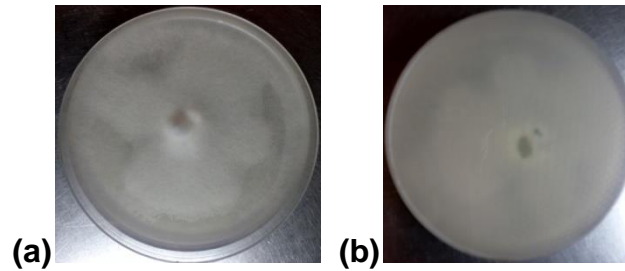
O fungo CSP-5b cresceu muito parecido com o CSP-5a, tem os mesmos aspectos morfológicos.

Figura 11 - Fungo CSP-11c, (a) frente (b) verso



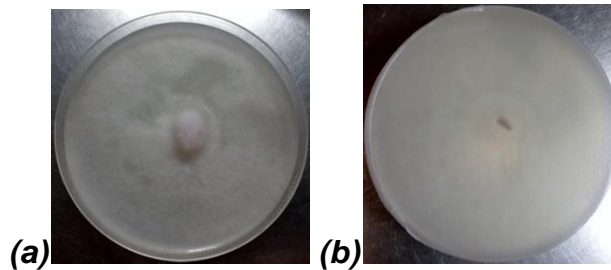
O fungo CSP-11c cresceu de forma singular, como podemos observar na figura, parece uma espécie de contaminação. Porém, quando realizado o repique desse fungo em novas placas com meio de cultura, observou-se a mesma formação da coloração azul e branca, mesmo quando se utilizou somente o *slant* da parte azul, ou somente o *slant* da parte branca para o repique. Dessa forma chegou-se a conclusão de que é um único fungo e não há contaminação.

Figura 12 - Fungo CSP-17N, (a) frente (b) verso



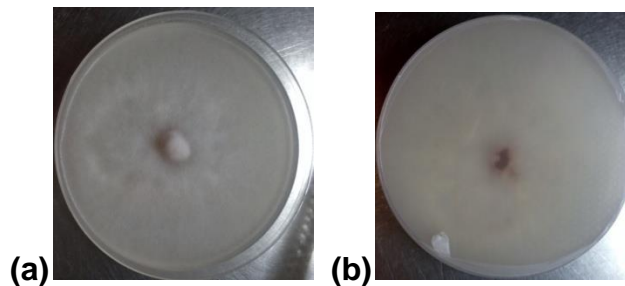
O fungo CSP-17N cresceu de forma homogênea na placa. Sua cor apresentou-se branca e suas hifas cresceram com aspecto de algodão.

Figura 13 - Fungo CSP-19b, (a) frente (b) verso



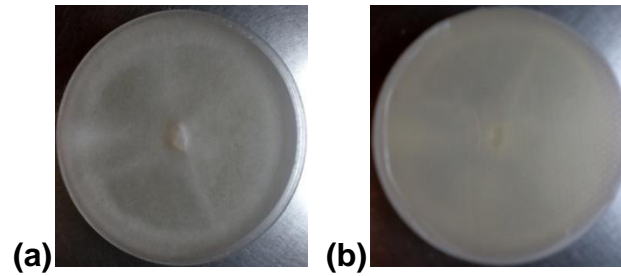
O fungo CSP-19b, assim como os outros, cresceu de forma homogênea na placa. Ele apresentou coloração branca e suas hifas cresceram com aspecto de algodão.

Figura 14 - Fungo CSP-32b, (a) frente (b) verso



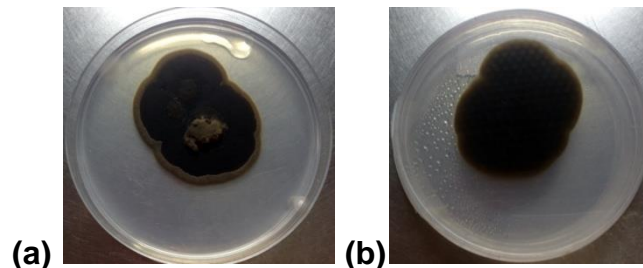
O fungo CSP-32b cresceu de forma homogênea na placa, com coloração branca.

Figura 15 - Fungo CSP- 46, (a) frente (b) verso



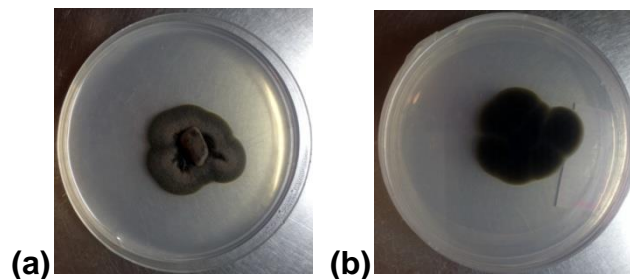
O fungo CSP-46 também cresceu de forma homogênea na placa e apresentou coloração branca. Tem aspecto de algodão, sendo que nas bordas da placa o aspecto é mais felpudo.

Figura 16 - Fungo CSP-57R37, (a) frente (b) verso



Os fungos CSP-57R37 e CSP-58/59 apresentaram coloração verde musgo. E diferente dos fungos brancos, eles cresceram muito pouco em czapek Agar.

Figura 17- Fungo CSP-58-59, (a) frente (b) verso



Os 10 fungos foram crescidos em meio líquido czapek preparado e após o período de incubação foram obtidos seus extratos brutos.

Foi escolhido, para este trabalho, o meio líquido czapek devido ao fato de facilitar as análises por desreplicação, de forma que os espectros e cromatogramas não mostrem tantos sinais referentes ao meio de cultivo.

Depois da extração líquido-líquido com AcOEt e do *clean up*, as massas obtidas dos extratos brutos foram as seguintes:

Tabela 2 - Massa dos extratos brutos dos fungos.

Código	Massa do extrato (mg)
CSP - 3a	683,8
CSP - 5a	73,1
CSP - 5b	91,1
CSP - 11c	374,7
CSP - 17N	570,4
CSP - 19b	63,2
CSP - 32b	459,1
CSP - 46	72,1
CSP - 57/R37	2,5
CSP - 58/59	18,9

4.2 Análises dos extratos por RMN ¹H

A fim de se obter o perfil metabólico dos fungos filamentosos foram analisados seus espectros de RMN (Figura18-26). As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado que apresenta sinal padrão em 3,33 ppm.

Como era esperado, os espectros apresentaram uma complexidade muito grande por se tratar de extrato bruto, e mostraram alguns sinais interessantes.

Para todos os fungos, observaram-se sinais intensos na região de 3-5 ppm, indicando presença de muitos açúcares nos extratos. E devido à alta intensidade desses sinais, nós pudemos ver algumas outras regiões com menor intensidade. A região de 5,5-7,5 ppm, aproximadamente, que são sinais característicos de hidrogênios aromáticos e que observamos uma menor complexidade para os fungos CSP-3a, CSP-32b e principalmente para o CSP-19b que possui essa região muito limpa, já para os outros fungos a região é bastante congestionada. Na região de 9 ppm podemos observar simpletos característicos de hidrogênios de compostos fenólicos. E para o fungo CSP-19b esses sinais são bastante interessantes por serem mais alargados, podendo ser característicos de ácidos carboxílicos. Entre 5-6 ppm, observamos alguns sinais característicos de hidrogênios anoméricos para os fungos CSP-5a e CSP-5b, já para os demais fungos a visualização é mais difícil.

Foram observadas também, algumas similaridades entre alguns espectros, sugerindo possíveis gêneros e/ou espécies iguais, que mais adiante neste trabalho foram confirmados pela identificação filogenética desses micro-organismos.

Figura 18 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-3a em meio czapek preparado.

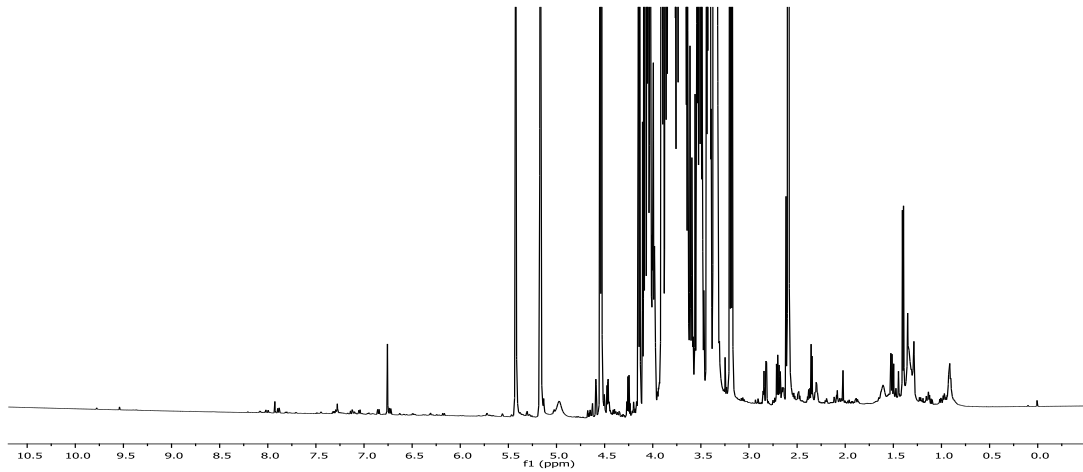


Figura 19 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-5a em meio czapek preparado.

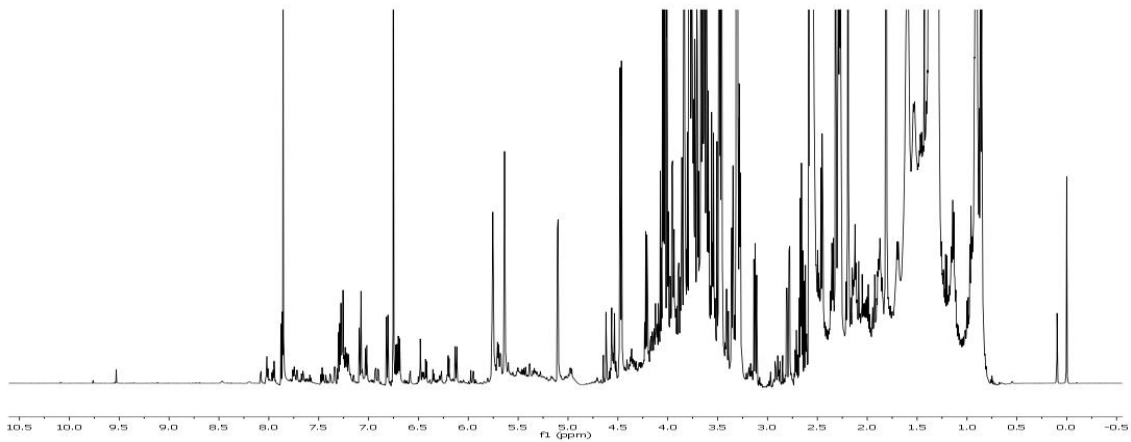


Figura 20 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-5b em meio czapek preparado.

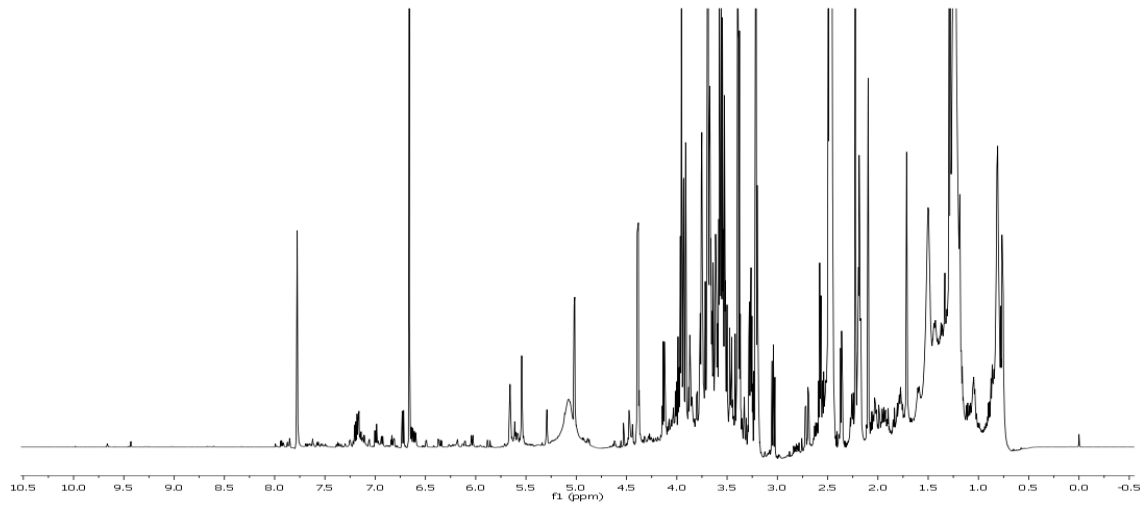


Figura 21 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-11c em meio czapek preparado.

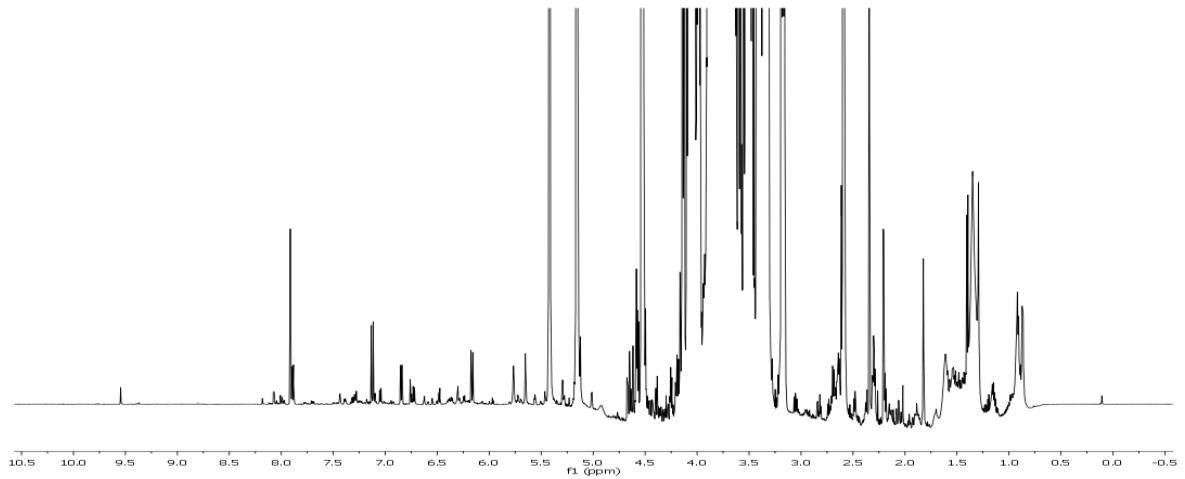


Figura 22 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-17N em meio czapek preparado.

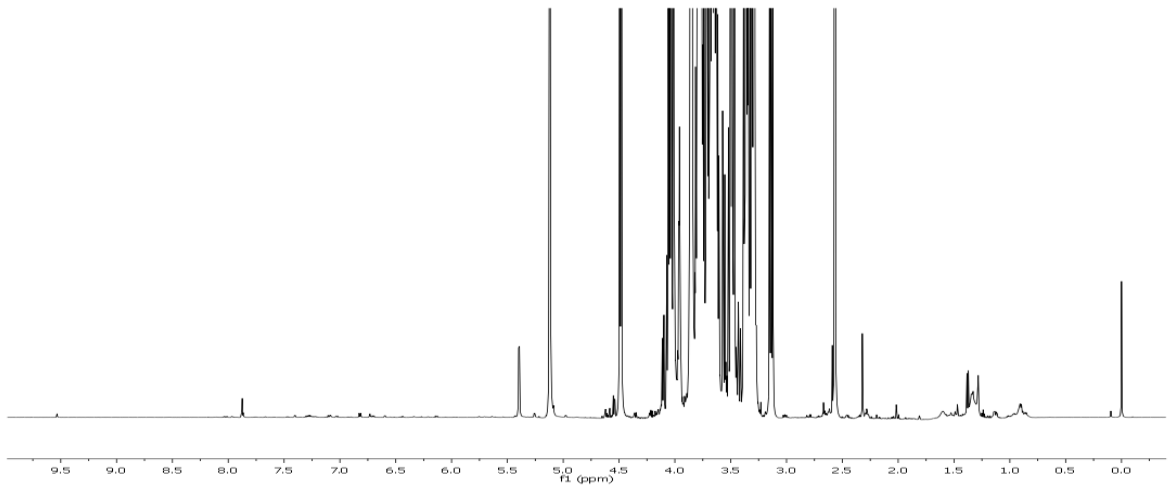


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-19b em meio czapek preparado.

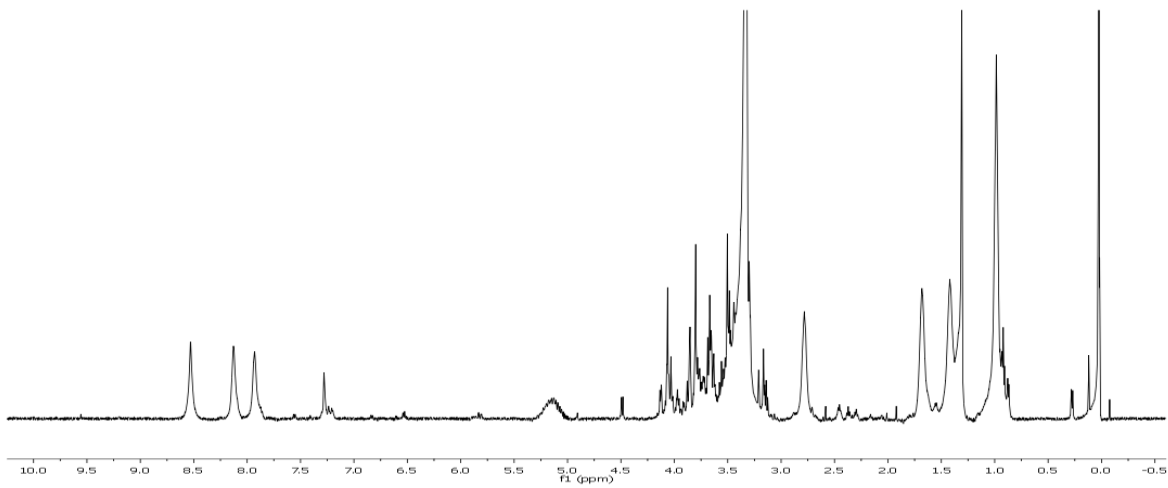


Figura 24 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-32b em meio czapek preparado.

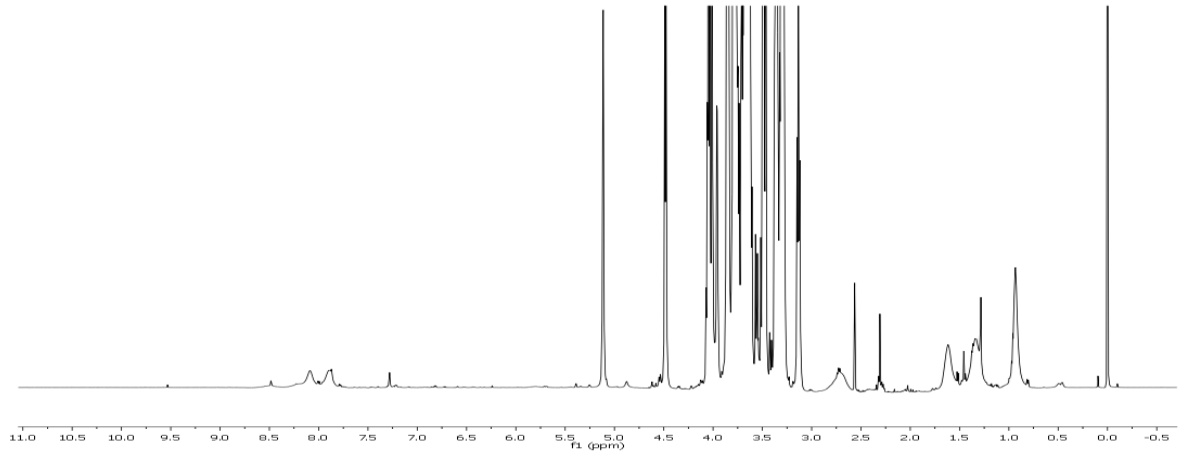


Figura 25 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-46 em meio czapek preparado.

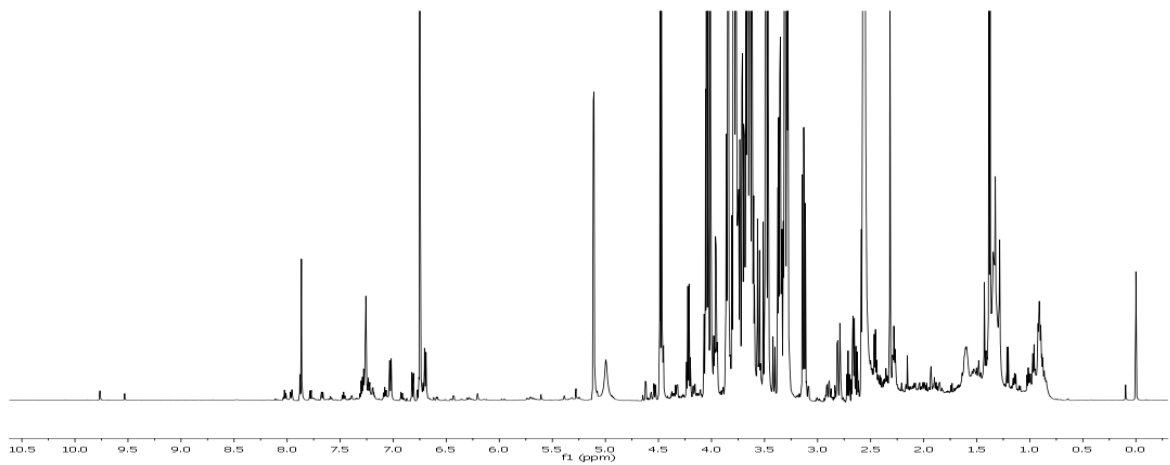
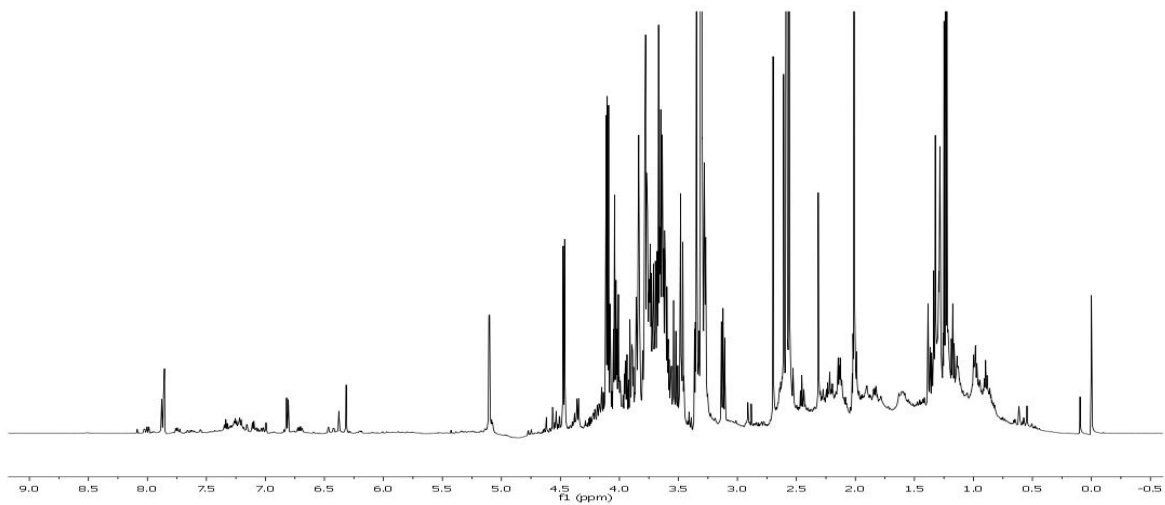


Figura 26 - Espectro de RMN ^1H em CD_3OD do extrato do fungo CSP-58/59 em meio czapek preparado.



4.3 Perfil em CLAE-DAD (*Footprinting*)

Os fungos CSP-19b e CSP-32b não apresentaram tantos compostos polares como o restante dos fungos. Podemos observar muitas substâncias eluindo no início da corrida até aproximadamente 13 minutos para a maioria dos fungos, indicando substâncias muito polares, provavelmente devido à compostos glicosilados presentes.

Os cromatogramas (254 nm) podem ser observados nas figuras 27-35. Em azul está representado o branco (meio de cultivo e solvente) e em vermelho está representado o extrato de cada fungo.

Figura 27 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-3a em czapek.

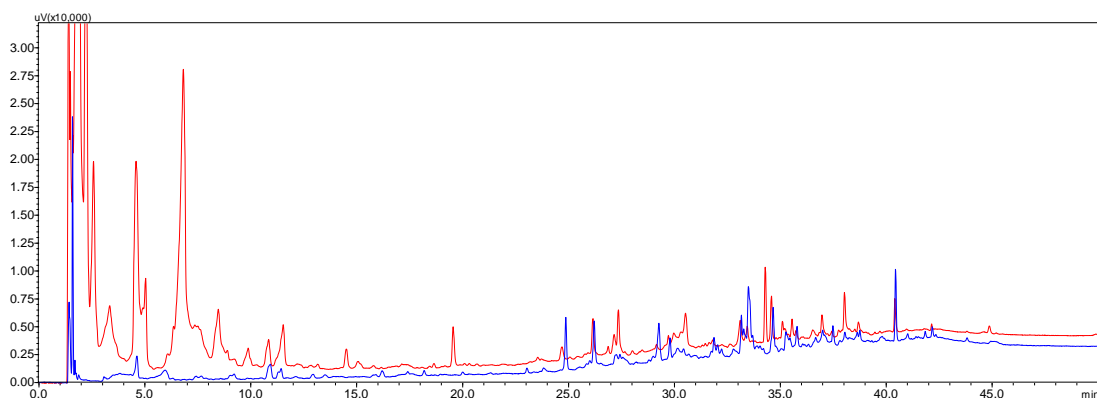


Figura 28 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-5a em czapek.

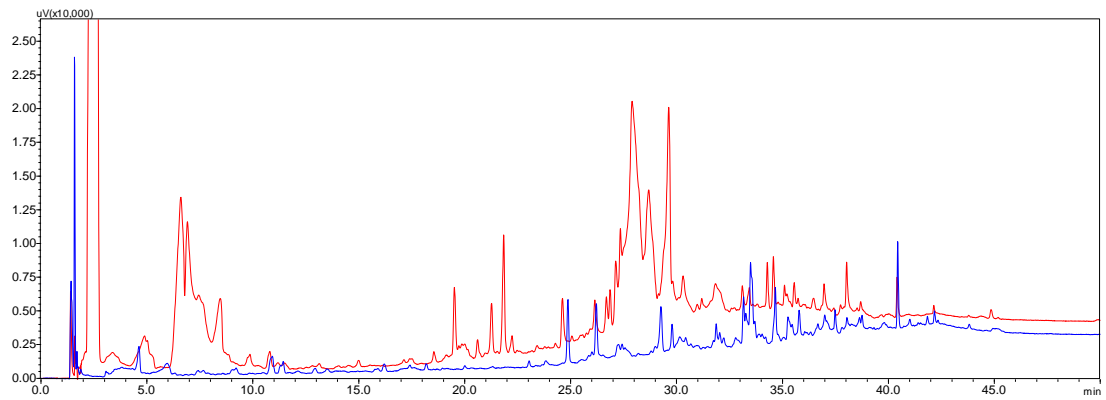


Figura 29 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-5b em czapek.

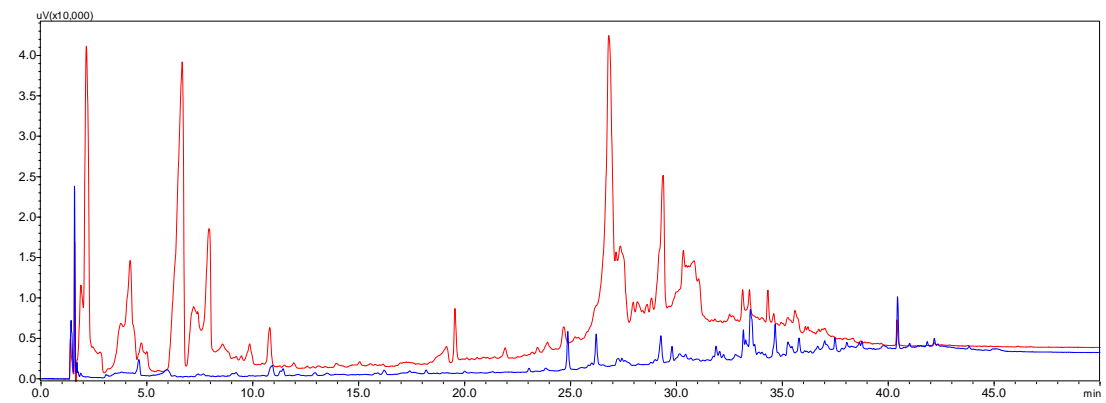


Figura 30 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-11c em czapek.

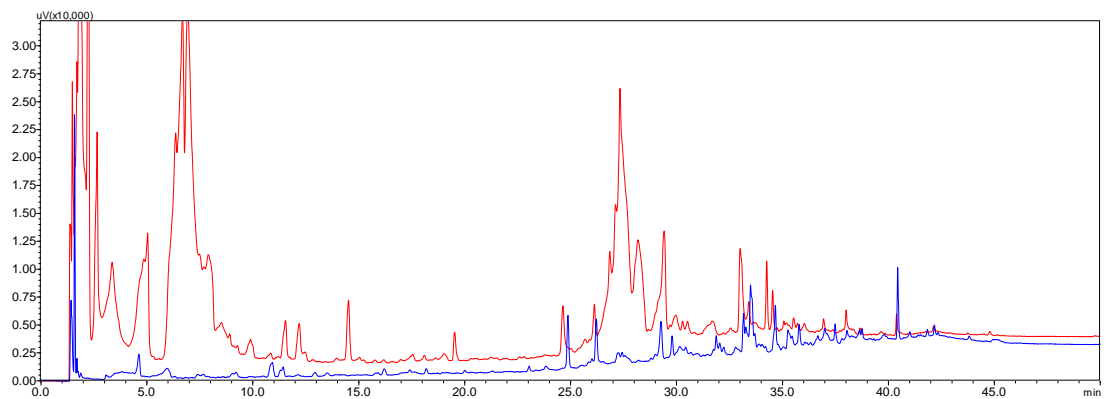


Figura 31 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-17N em czapek.

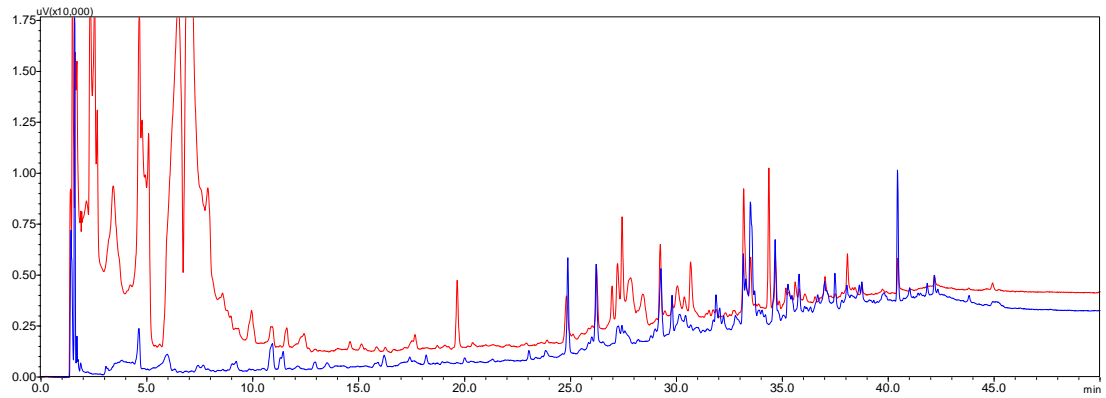


Figura 32 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-19b em czapek.

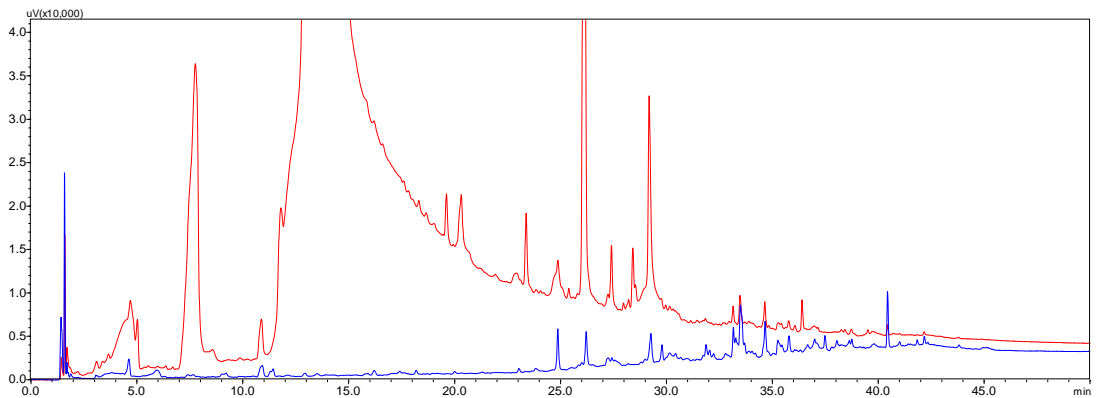


Figura 33 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-32b em czapek.

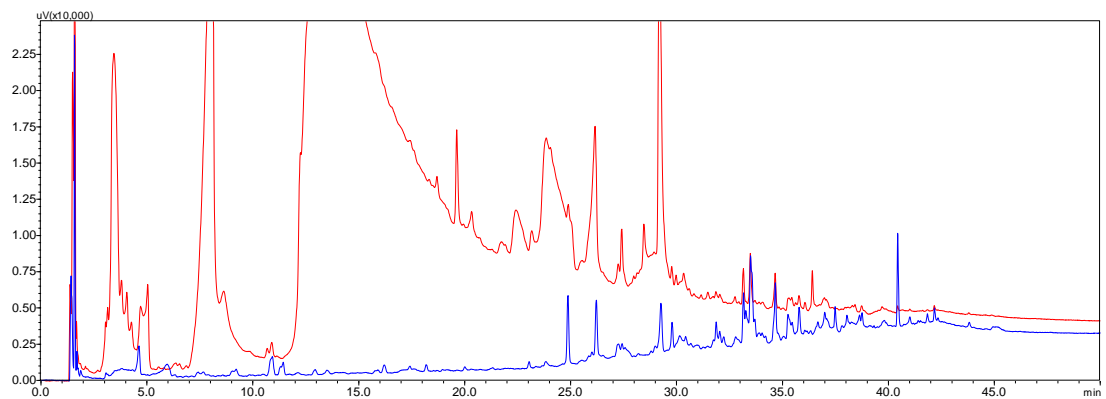


Figura 34 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-46 em czapek.

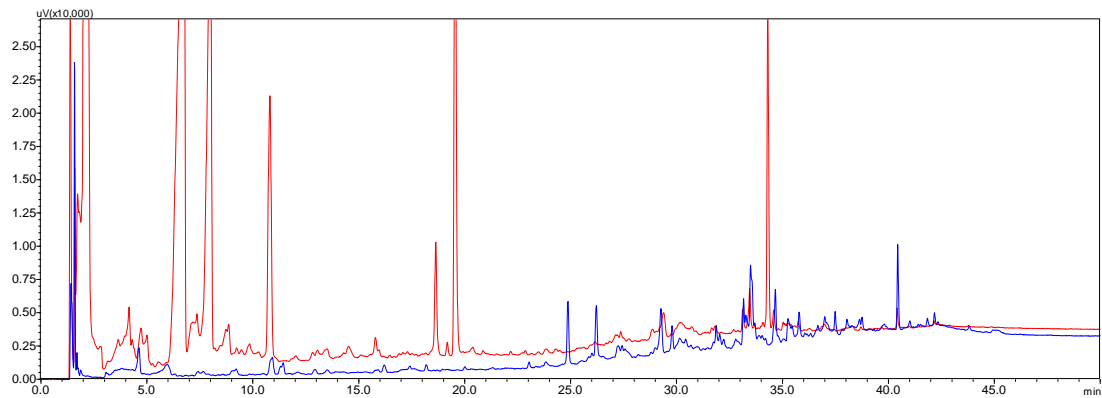
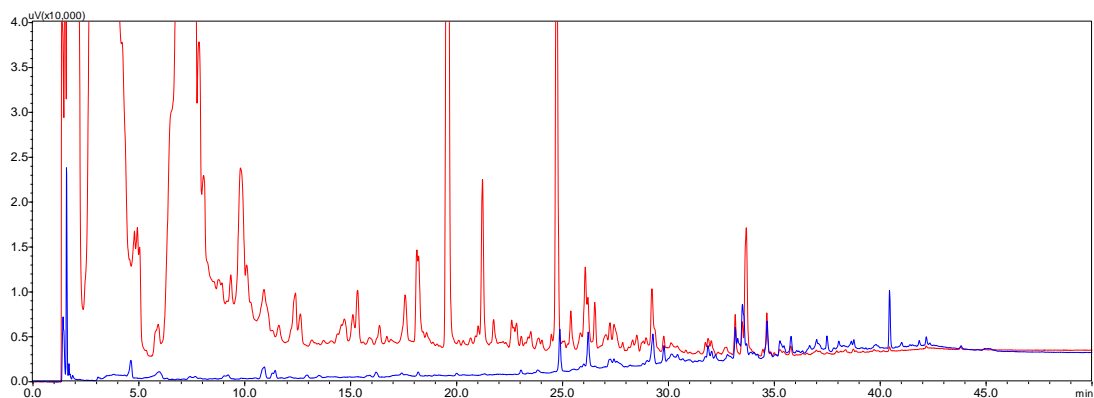


Figura 35 - Perfil cromatográfico do extrato do fungo CSP-58/59 em czapek.



4.4 Ensaios Biológicos

Para a escolha dos micro-organismos, visando o desenvolvimento da desreplicação, foram escolhidos aqueles que se mostraram positivos frente aos testes biológicos realizados.

4.4.1 Atividade Inibidora da Acetilcolinesterase (AChE)

Ensaio Qualitativo por Bioautografia (CCDA)

A inibição da enzima acetilcolinesterase pode ser evidenciada através do aparecimento de uma mancha branca na placa, como podemos observar nas figuras 36 e 37. Em alguns extratos é possível detectar mais de um halo de inibição, o que sugere a presença de mais uma molécula capaz de inibir a enzima. Além disso, algumas moléculas não eluíram, devido a sua alta polaridade. Assim sendo, elas

ficaram retidas na sílica no ponto de aplicação, comprometendo a resolução, no entanto apontando que há presença, nesse ponto de origem, de substâncias positivas ao ensaio. As tabelas 3 e 4 mostram o resultado dos ensaios biológicos, associados aos valores de Rf (*ratio to front*) pertencentes aos halos de inibição observados.

Figura 36 - Inibição da acetilcolinesterase para os extratos dos fungos

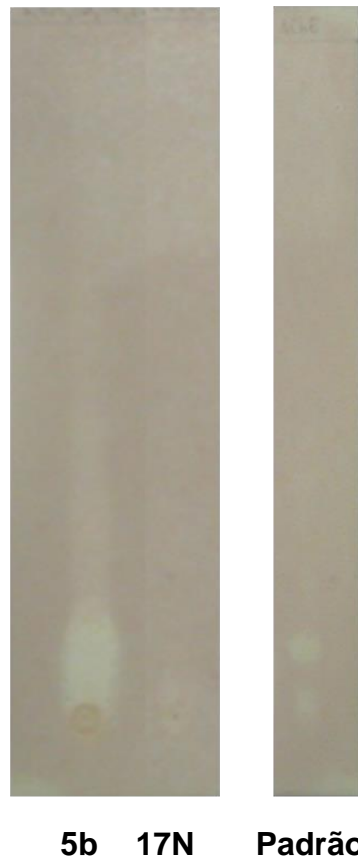


Figura 37 - Inibição da acetilcolinesterase para os extratos dos fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-11c, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37 e CSP-58/59.

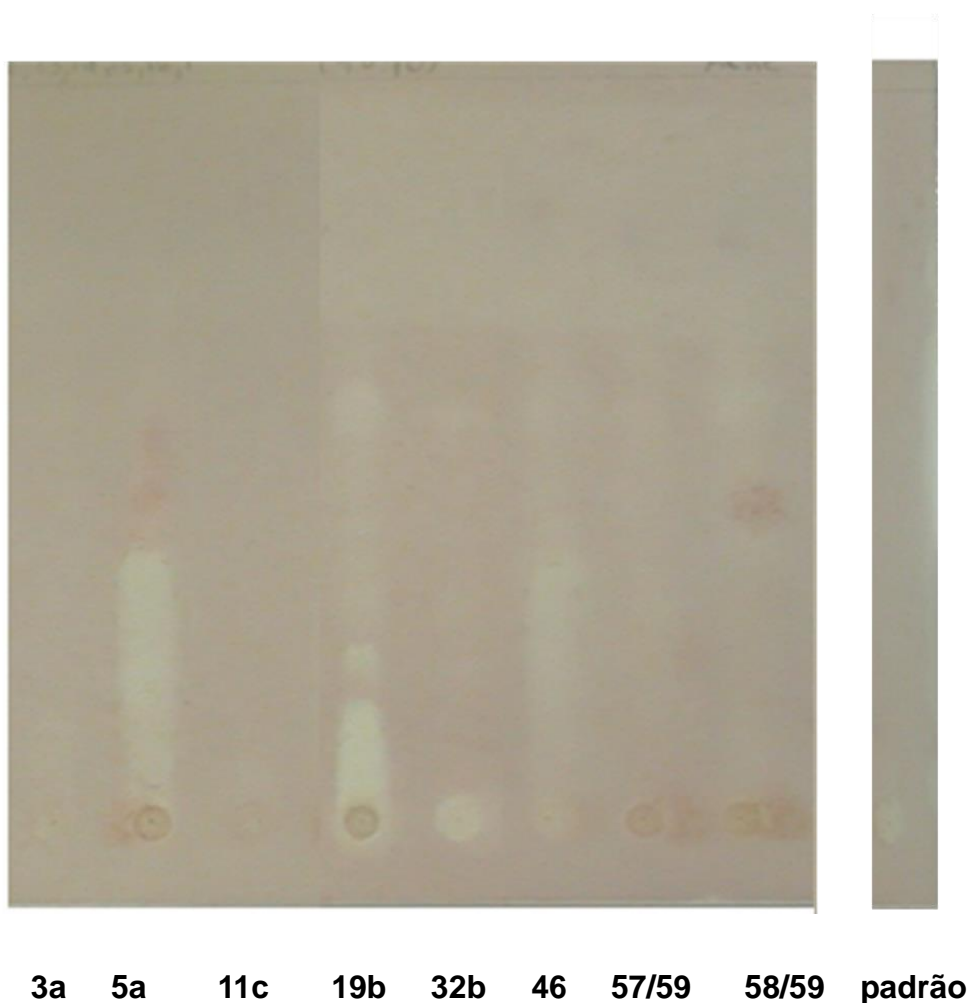


Tabela 3 - Resultado dos testes de inibição da enzima acetilcolinesterase.

(Placa - CHCl₃:MeOH (95:5))

Amostra	Anticolinesterásico
CSP-5b	origem a 0,14***
CSP-17N	i

Obs: i= inativo; ***alta atividade.

**Tabela 4 - Resultado dos testes de inibição da enzima acetilcolinesterase.
(PLACA - AcOEt:Hex (90:10))**

Amostra	Anticolinesterásico
CSP-3a	i
CSP-5a	0,05 a 0,36***
CSP-11c	i
CSP-19b	origem a 0,15***/ 0,22*
CSP-32b	origem***
CSP-46	origem a 0,34**
CSP-57/R37	i
CSP-58/59	i

Obs: i= inativo; * baixa atividade; ** média atividade; ***alta atividade.

Cinco extratos dos fungos apresentaram-se positivos para esse teste de inibição da enzima acetilcolinesterase.

4.4.2 Bioautografia com *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* para avaliação preliminar da atividade antifúngica.

No ensaio antifúngico contra os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, pudemos observar manchas brancas que são halos de inibição do crescimento dos fungos na placa, como mostram as figuras 38-41.

Assim como o ensaio anticolinesterásico, pudemos observar, em alguns extratos, mais de um halo de inibição. Bem como compostos que estão retidos na origem da sílica e apresentam atividade contra estes fungos. As tabelas 5 e 6 mostram os resultados das atividades antifúngicas para os extratos com os valores de Rf (*ratio to front*) dos halos de inibição.

Figura 38 - Inibição do Fungo *C. cladosporioides* para os extratos dos fungos CSP-5b e CSP-17N.



Figura 39 - Inibição do Fungo *C. sphaerospermum* para os extratos dos fungos CSP-5b e CSP-17N.



Figura 40 - Inibição de *C. cladosporioides* para os extratos dos fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-11c, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37 e CSP-58/59.

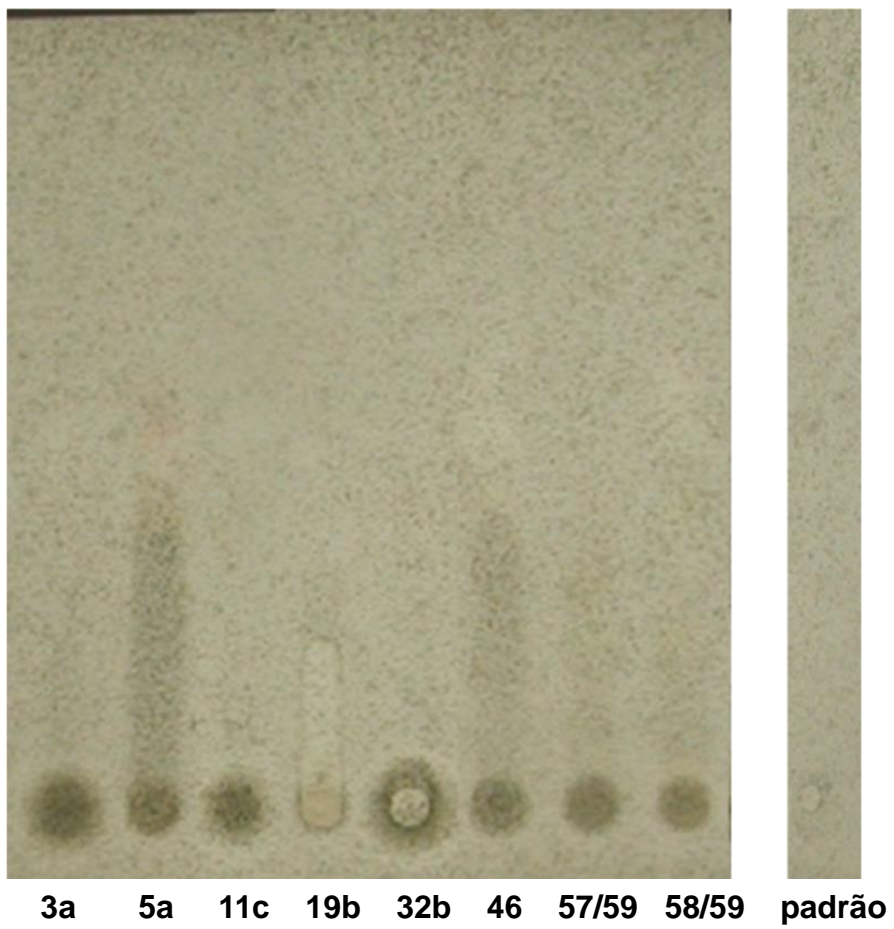


Figura 41 - Inibição de *C. sphaerospermum* para os extratos dos fungos CSP-3a, CSP-5a, CSP-11c, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-57/R37 e CSP-58/59.

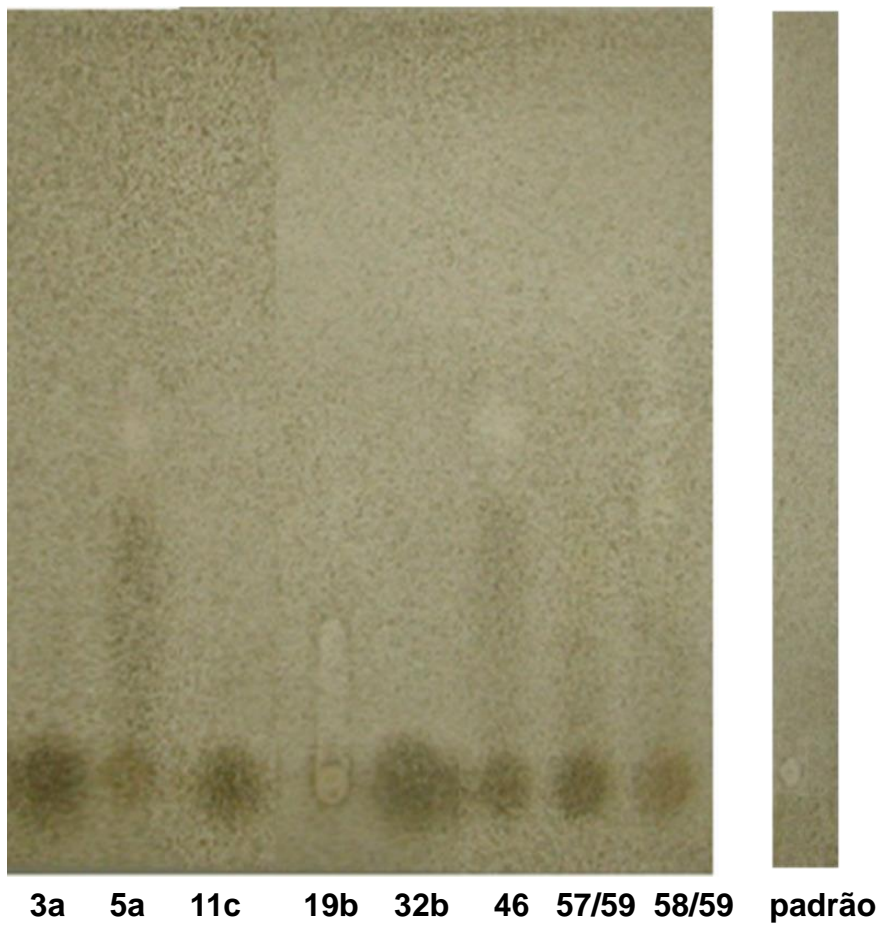


Tabela 5 - Resultado de inibição do crescimento de *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. (PLACA 2 - CHCl₃:MeOH (95:5))

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
CSP-5b	origem**	origem**
CSP-17N	i	i

Obs: i= inativo; ** média atividade.

Tabela 6 - Resultado de inibição do crescimento de *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. (PLACA 1 - AcOEt:Hex (90:10))

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
CSP-3a	i	i
CSP-5a	0,47*	0,47**
CSP-11c	i	i
CSP-19b	origem a 0,21**	origem a 0,22*
CSP-32b	origem**	i
CSP-46	0,49*	0,48**
CSP-57/R37	i	i
CSP-58/59	0,52*	0,38*/ 0,49*

Obs: i= inativo; * baixa atividade; ** média atividade; ***alta atividade.

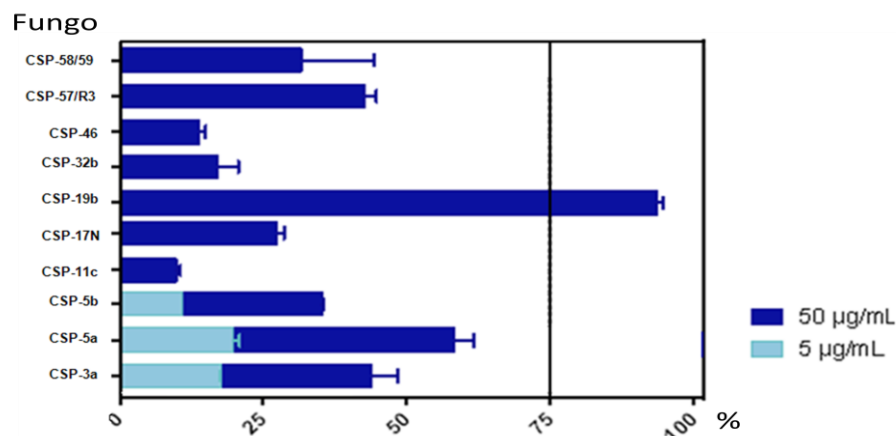
Seis extratos dos fungos apresentaram atividade contra o fungo patogênico *C. cladosporioides* e cinco extratos obtiveram seus extratos ativos contra *C. sphaerospermum*.

4.4.3 Ensaio Citotóxico (Antitumoral)

Apenas o extrato CSP-19b obteve um resultado promissor na inibição de mais de 75% das células de câncer colorretal, como vemos no gráfico 1.

E algumas amostras foram testadas já em duas concentrações (5 e 50 µg/ml), mas em 5 µg/ml as inibições foram extremamente baixas e em 50 µg/ml também não foram suficientes para os outros extratos.

Gráfico 1 -Citotoxicidade das amostras avaliadas em células de câncer colorretal HCT 116 após 72h de incubação pelo teste do MTT.



4.5 Identificação filogenética

A identificação dos 8 fungos (CSP-3a, CSP-5a, CSP-17N, CSP-19b, CSP-32b, CSP-46, CSP-58/59 e CSP-57/R37) foi realizada através da análise da região ITS com o objetivo de, através da sequência de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA de fungos isolados da rizosfera de *Senna spectabilis* utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4, identificá-los.

Podemos observar a dosagem e análise de pureza do DNA na tabela 7, bem como a dosagem e análise dos produtos da PCR na tabela 8 e a identificação após o seqüenciamento, a porcentagem de semelhança da seqüência obtida dos fungos com a comparada com o GenBank e o número de acesso ao GenBank estão na tabela 9.

A razão de OD_{260}/OD_{280} , que é a razão da absorção máxima de nucleotídeos (260 nm) e a absorção máxima de proteínas (280 nm), deve estar entre 1,8 e 2,0, caso esse valor seja menor, pode indicar contaminação com proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvem no mesmo comprimento de onda. As tabelas 7 e 8 nos mostram esses valores dentro do aceitável, indicando alta pureza na extração do DNA.

Tabela 7 - Análise da pureza e dosagem do DNA.

Código	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (OD_{260}/OD_{280})
CSP-3a	430	1,8
CSp-5a	140	1,8
CSP-17N	88	1,8
CSP-19b	505	2,0
CSP-46	110	2,0
CSP-58/59	100	1,9

Tabela 8 - Dosagem e análise da pureza dos produtos de PCR.

Código	Concentração (ng/ μ L)	Pureza (OD_{260}/OD_{280})
CSP-3a	27,4	1,8
CSp-5a	71,7	1,8
CSP-17N	31,7	1,8
CSP-19b	50,6	1,9
CSP-46	25,1	1,8
CSP-58/59	14,2	1,8

Tabela 9 - Identificação dos isolados após seqüenciamento de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA.

Código	Identificação molecular	Identidade (%)	Número de acesso
CSP-3a	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	KF381081.1
CSp-5a	<i>Fusarium solani</i>	99	JX435189.1
CSP-17N	<i>Fusarium solani</i>	93	JX535014.1
CSP-19b	<i>Fusarium oxysporum</i>	99	LC055797.1
CSP-46	<i>Fusarium solani</i>	99	KC907714.1
CSP-58/59	<i>Rhinoctadiella similis</i>	99	LC018820.1

Obs: Os fungos CSP-32b e CSP-37/R3 não puderam ser identificados por conta da falta de pureza apresentada na extração de seus DNAs.

Foi observado que houve um gênero dominante, *Fusarium*. O que já era esperado devido à semelhança de alguns espectros de RMN com outros, bem como a morfologia desses fungos em meio de cultivo sólido.

4.6 Fungos escolhidos para a desreplicação

Os fungos CSP-5b e CSP-19b, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, respectivamente, foram escolhidos para o desenvolvimento da técnica de desreplicação.

Os critérios de seleção foram a alta atividade biológica, a análise dos espectros de RMN que foi bastante complexa para o fungo *Fusarium solani* e bastante singular para o fungo *Fusarium oxysporum*, pois a sua região aromática é extremamente limpa, ao contrário do que se espera para um espectro de um extrato bruto.

Ambos o fungo tem características muito distintas, que observamos nos espectros de RMN e também no perfil cromatográfico, mesmo sendo do mesmo gênero.

Além disso, o fungo *Fusarium solani* apresentou atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e alta atividade anticolinesterásica. E o fungo *Fusarium oxysporum* foi o único, dos dez fungos analisados, a apresentar atividade antitumoral, além da atividade antifúngica contra *C. cladosporioidese* e *C. sphaerospermum* e alta atividade anticolinesterásica.

4.7 Desrepliação

A partir da análise por desrepliação, usando técnicas como CG-EM, CLAE-EM e RMN, foram propostas estruturas moleculares de compostos produzidos por *F. solani* e *F. oxysporum*.

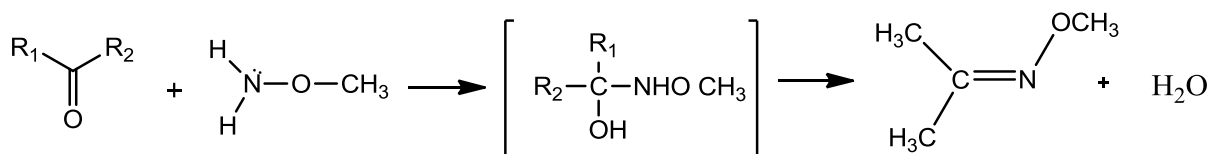
4.7.1 Análise por CG-EM

Para melhor análise por CG-EM foi necessário fazer a derivatização dos extratos, de modo a analisar compostos não voláteis e para evitar degradação por alta temperatura, além de diminuir a polaridade dos compostos facilitando a separação pela coluna.

A metoximação de aldeídos e cetonas é feita antes da sililação para evitar que apareçam picos cromatográficos diferentes relacionados ao mesmo monossacarídeo na forma cíclica e acíclica, só dando lugar para as moléculas *syn* e *anti* formadas pela adição da metoxima (GULLBERG et al., 2004).

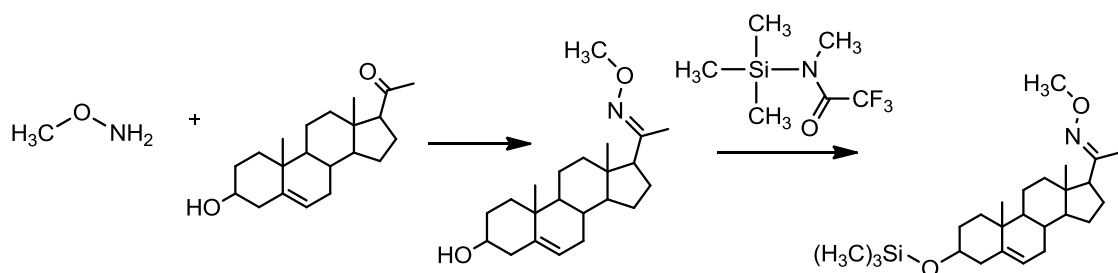
Já a sililação reduz a polaridade de grupos funcionais como, -COOH, -OH, -NH, -NH₂ e C=O facilitando a separação por cromatografia gasosa. Abaixo seguem as reações representadas:

Figura 42 - Reação de Metoximação



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 43 - Reação de sililação, precedida de metoximação, de um esteróide.



Fonte: elaborado pela autora.

Podemos observar nas figuras 44 e 45 os cromatogramas de íons totais dos extratos de *F. solani* e *F. oxysporum* respectivamente, por CG-EM.

Figura 44 - Cromatograma (CG-EM) do extrato bruto do fungo *F. solani*.

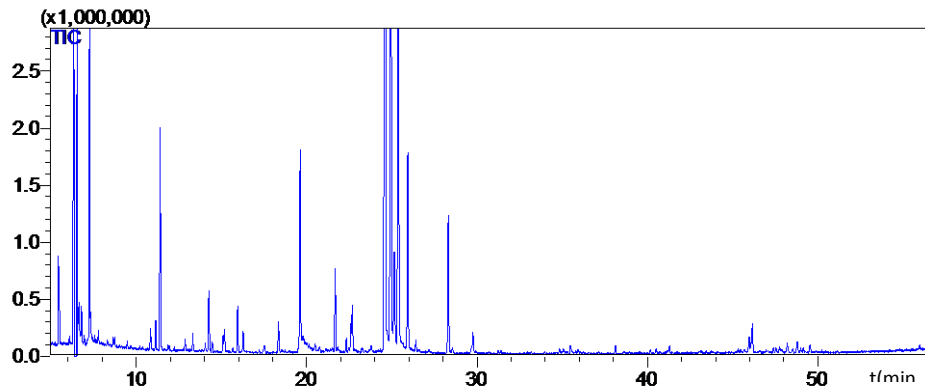
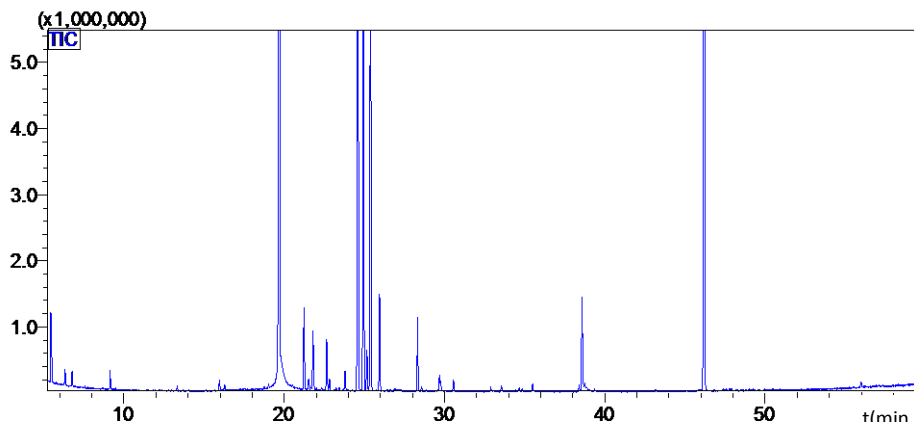


Figura 45 - Cromatograma (CG-EM) do extrato bruto do fungo *F. oxysporum*.

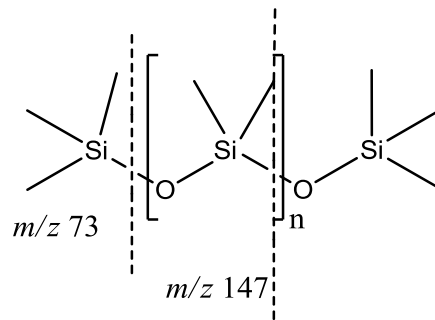


As tabelas 10 e 11 mostram os compostos sugeridos, bem como a diferença do IR calculado e do IR encontrado nas bases de dados e também a similaridade fornecida pelo software para cada estrutura, para os fungos *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*.

Em seguida, foram observados os fragmentos de massas dessas moléculas (sililadas) que ajudaram a confirmar suas estruturas.

Foi muito comum observar os íons m/z 147 e m/z 73 (Figuras 47, 49, 51, 53, 57, 59, 61 e 63) nas análises efetuadas, que se tratam de alguns fragmentos comuns em análise por CG-EM de amostras sililadas, que são dimetilpolisiloxanos, formados por uma ou mais moléculas de TMS (Figura 46) (PROESTOS et al., 2013; AGILENT TECHNOLOGIES).

Figura 46 - polidimetilsiloxano



Fonte: elaborada pela autora.

E devido à alta energia utilizada para fragmentação nesse experimento, alguns íons moleculares não foram possíveis de serem observados nos fragmentogramas, então observamos diretamente o primeiro fragmento.

Tabela 10 - Dados CG-EM para o fungo *Fusarium solani*.

Tr	IR (Literatura)	IR (calculado)	DIRs	Composto	Similaridade (%)
7,258	1345,5	1340,256	5,244	ácido <i>trans</i> -butenodióico	97
11,412	1479	1485,724	6,724	ácido málico	96
14,050	1568,7	1566,636	2,064	tirosol	86
15,954	1629	1623,621	5,379	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	92
21,683	1800	1793,450	6,55	ácido azelaico	93

- ácido *trans*- butenodióico

O ácido *trans*-butenodióico, ou ácido fumárico, (Figura 47 e 48) é uma matéria-prima importante para a polimerização, importante também no tratamento da psoríase em medicina, além de ser utilizado como suplemento na alimentação de gado (ENGEL et al., 2008) e também é considerado um aditivo e acidulante alimentar (ZHENGXIONG et al., 2011).

Figura 47 - Espectro de massas do ácido *trans*-butenodióico sililado.

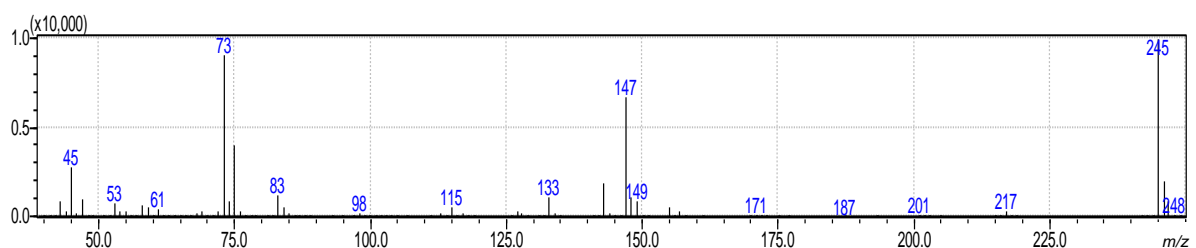
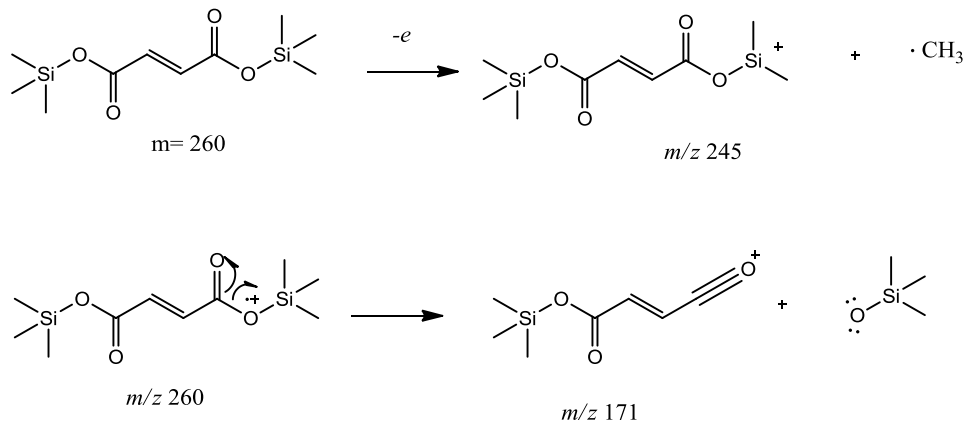


Figura 48 - Proposta de fragmentação do ácido trans-butenodióico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

- ácido málico

Ácido málico (Figura 49 e 50) é utilizado na indústria alimentícia como aditivo, além de ser utilizado em produtos cosméticos para melhorar a textura da pele, pigmentação e rugas (AYDOGAN et al., 2015) e também é utilizado como um intermediário farmacêutico (ZANG et al., 2015).

Figura 49 - Espectros de massas do ácido málico siliado.

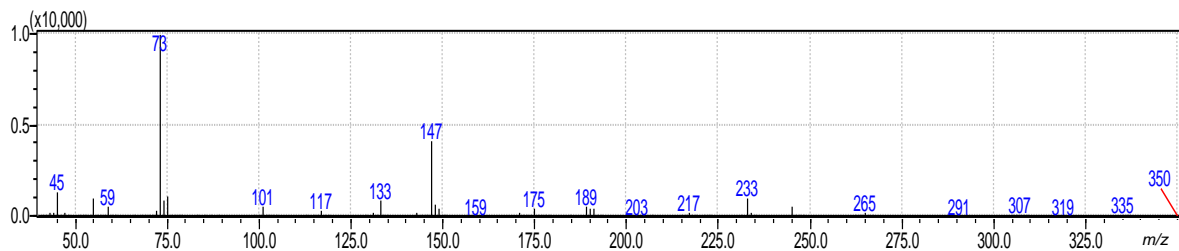
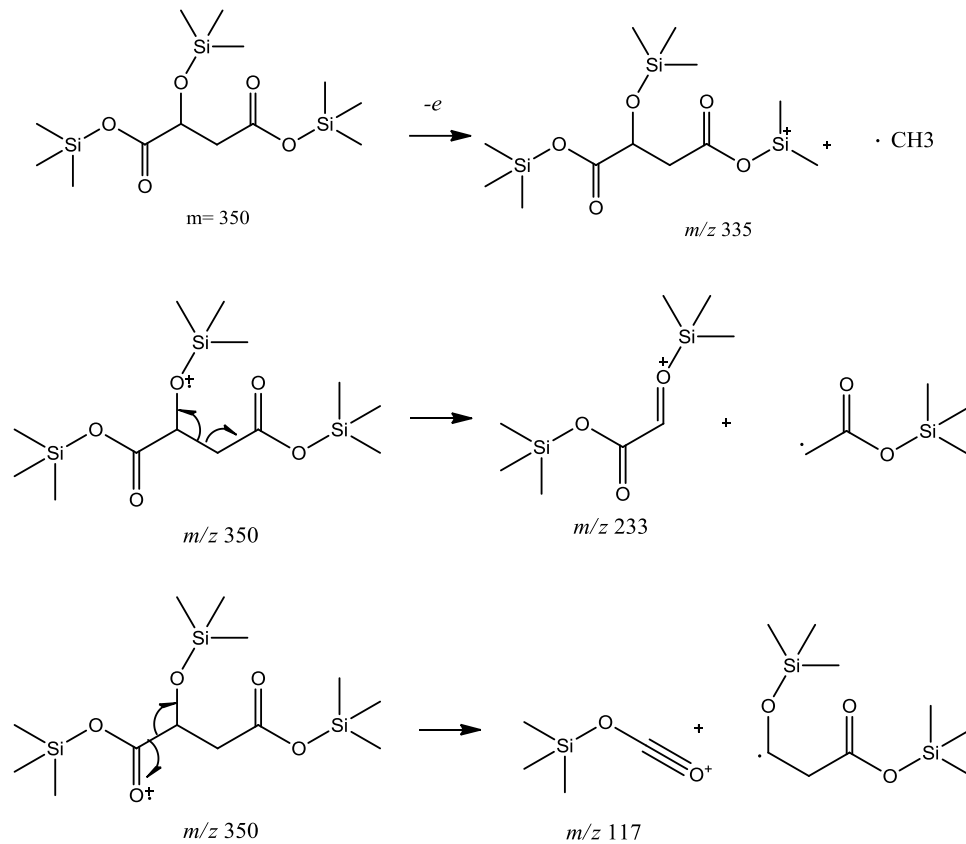


Figura 50 - Proposta de fragmentação do ácido málico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

- tirosol

Tirosol (Figura 51 e 52) é comumente encontrado em óleo de oliva e vinho, e também já descrito na literatura como metabólito secundário produzido pela espécie *Fusarium solani* (KONGKIAT et al., 2013). Tem propriedades antioxidante, antifúngica, é utilizado também para tratamento de algumas doenças como trombose e doenças cardiovasculares (SPECIAN et al., 2012). Além de tudo, esse composto é considerado como uma possível molécula sinalizadora para produção de outros compostos (GUIMARÃES et al. 2009).

Figura 51 - Espectros de massas do tirosol siliado.

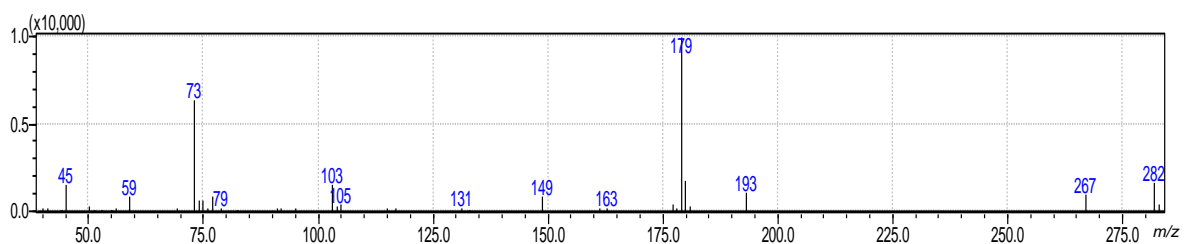
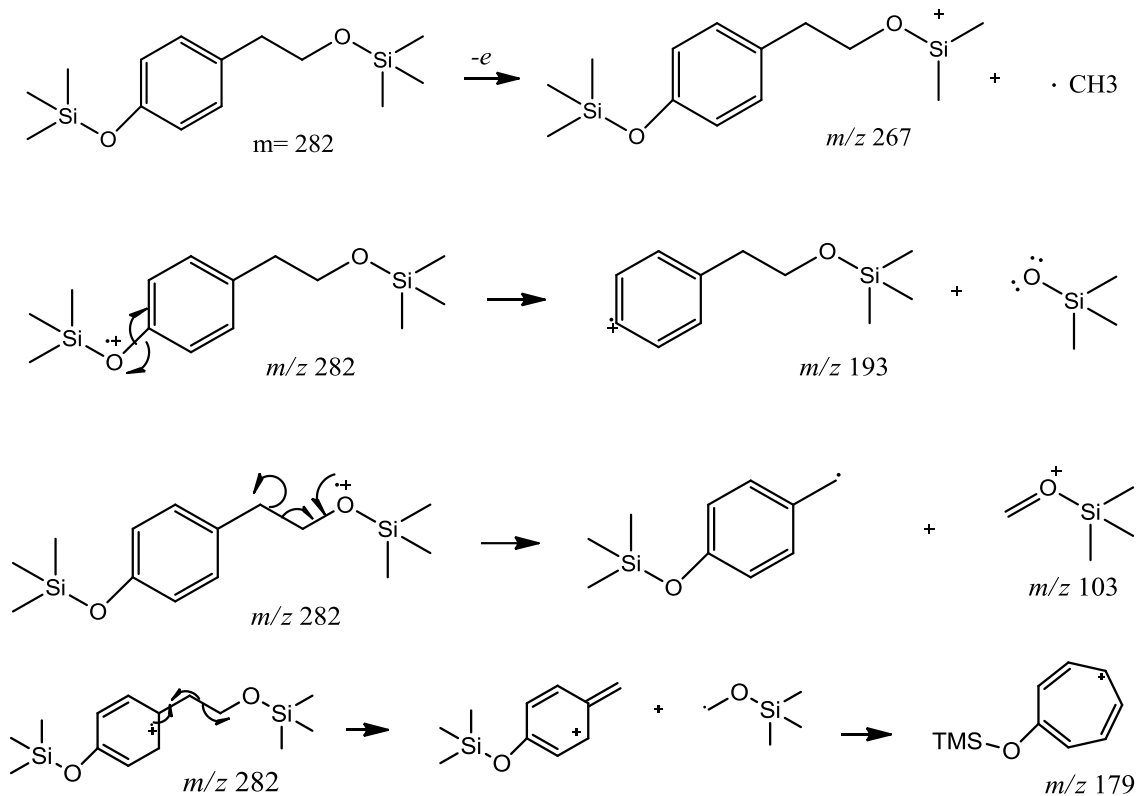


Figura 52 - Proposta de fragmentação do tirosol siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

- ácido *p*-hidroxibenzóico

Ácido *p*-hidroxibenzóico (Figura 53 e 54) é produzido por fungos e utilizado como intermediário para produção de pesticidas, anti-sépticos e produtos farmacêuticos (KUNAMNENI et al., 2008; OECD SIDS, 2015).

Figura 53 - Espectros de massas do ácido *p*-hidroxibenzóico siliado.

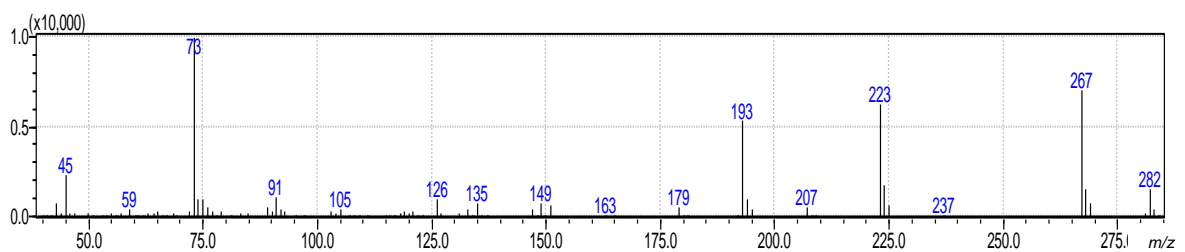
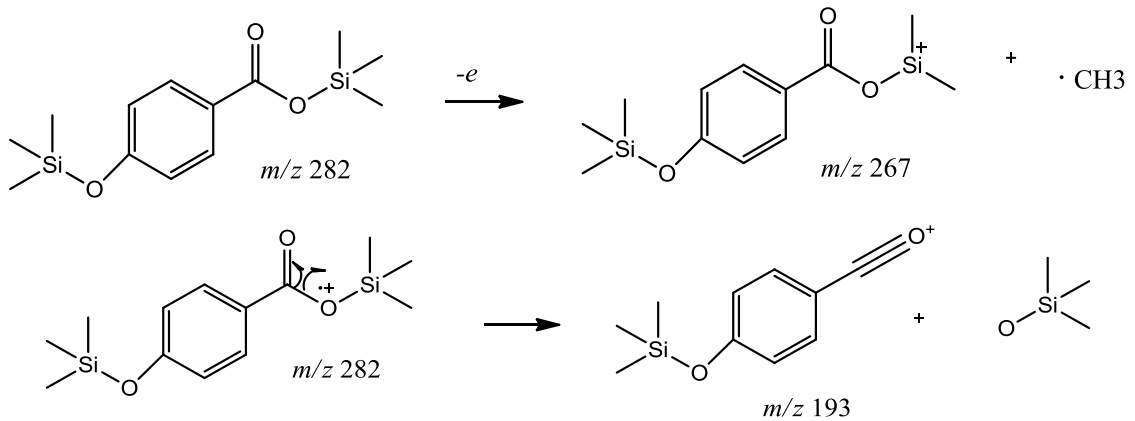


Figura 54 - Proposta de fragmentação do ácido *p*-hidroxibenzóico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

- ácido azelaico

Ácido azelaico (Figura 55 e 56) é utilizado no tratamento da acne, rosácea, além de possuir atividade antimicrobiana e anticancerígena (PANYOSAK et al., 2009).

Figura 55 - Espectros de massas do ácido azelaico siliado.

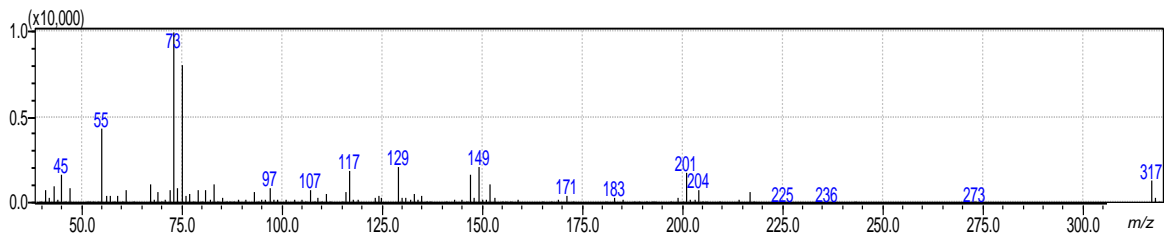
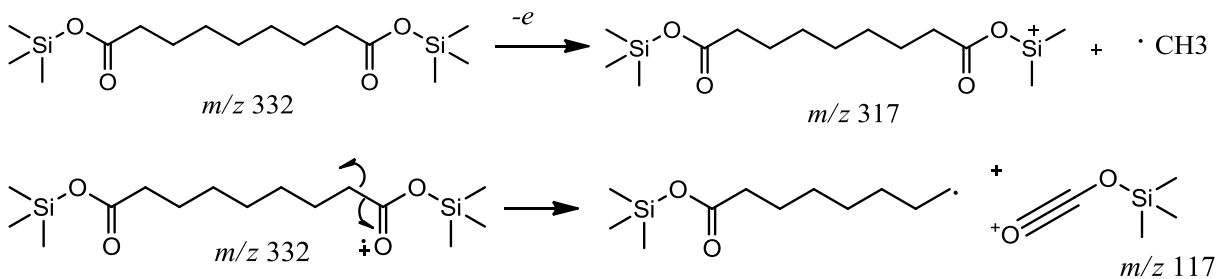


Figura 56 - Proposta de fragmentação do ácido azelaico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 11 - Dados CG-EM para o fungo *Fusarium oxysporum*.

Tr	IR(Literatura)	IR(calculado)	Δ IR	Composto	Similaridade (%)
6.336	1314	1304,533	9,466	ácido butanodióico	93
15.963	1629	1623,887	5,113	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	91
29.682	2053	2043,883	9,117	ácido hexadecanóico	90
35.491	2248	2241,708	6,292	ácido octadecanóico	84

-ácido butanodióico

Ácido butanodióico (Figura 57 e 58) é produzido na fermentação microbiana e pode ser utilizado na produção de polímeros biodegradáveis, na indústria alimentícia, na produção de solventes verdes e na indústria farmacêutica (HYOHAK et al., 2006). Também conhecido como ácido succínico, esse composto já foi identificado em outro gênero, *Fusarium* sp (SHAIKH et al., 2013).

Figura 57 - Espectros de massas do ácido butanodióico siliado.

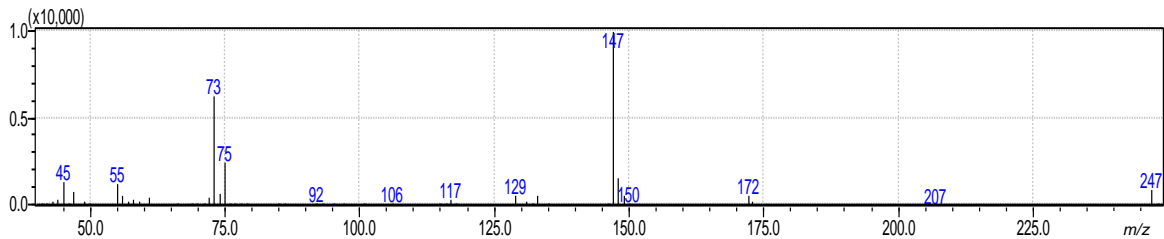
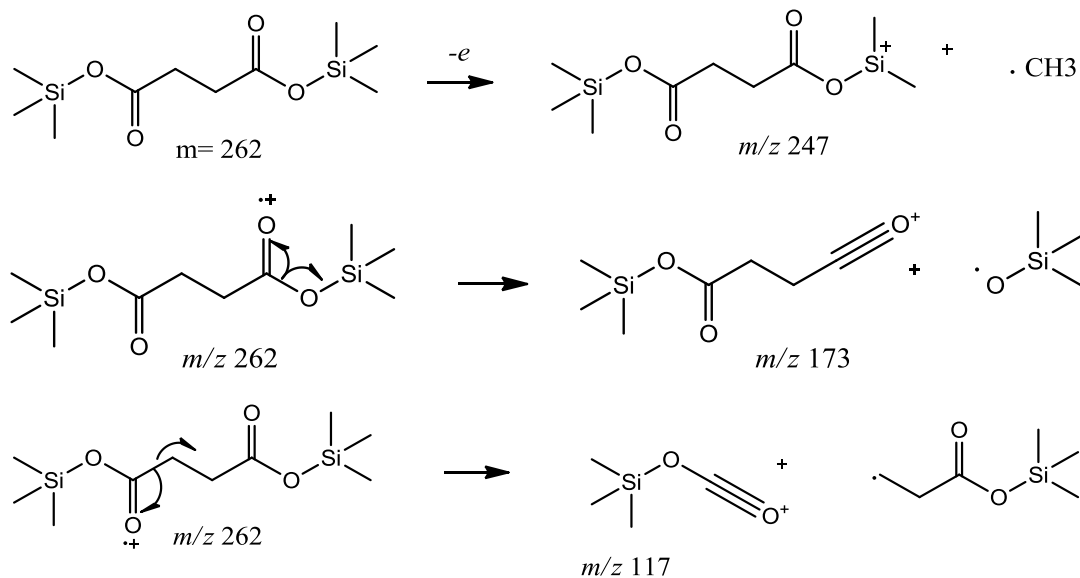


Figura 58 - Proposta de fragmentação do ácido butanóico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

-ácido *p*-hidroxibenzóico

Ácido *p*-hidroxibenzóico (Figura 59 e 60) é produzido por fungos e utilizado como intermediário para produção de pesticidas, anti-sépticos e produtos farmacêuticos (KUNAMNENI et al., 2008 e UNEP)

Figura 59 - Espectros de massas do ácido *p*-hidroxibenzóico siliado.

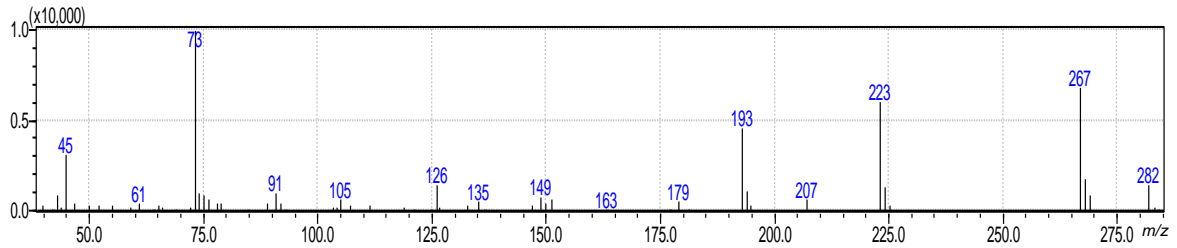
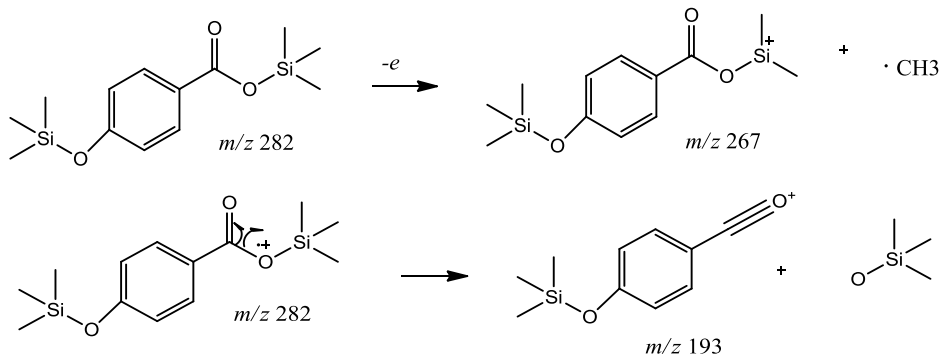


Figura 60 - Proposta de fragmentação do ácido *p*-hidroxibenzóico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

- ácido hexadecanóico

Ácido hexadecanóico (Figura 61 e 62) é um composto utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel (WEI et al., 2015).

Figura 61 - Espectros de massas do ácido hexadecanóico siliado.

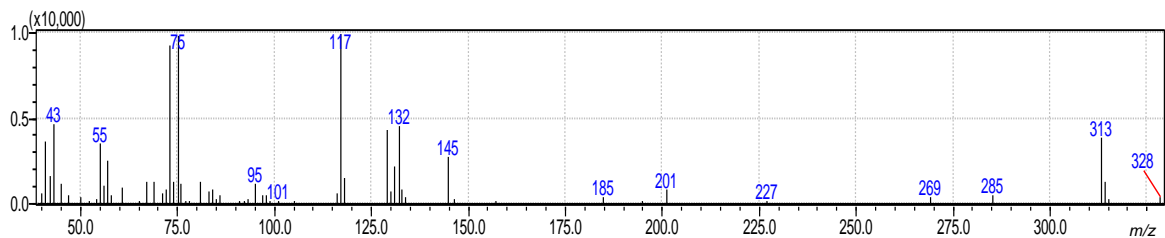
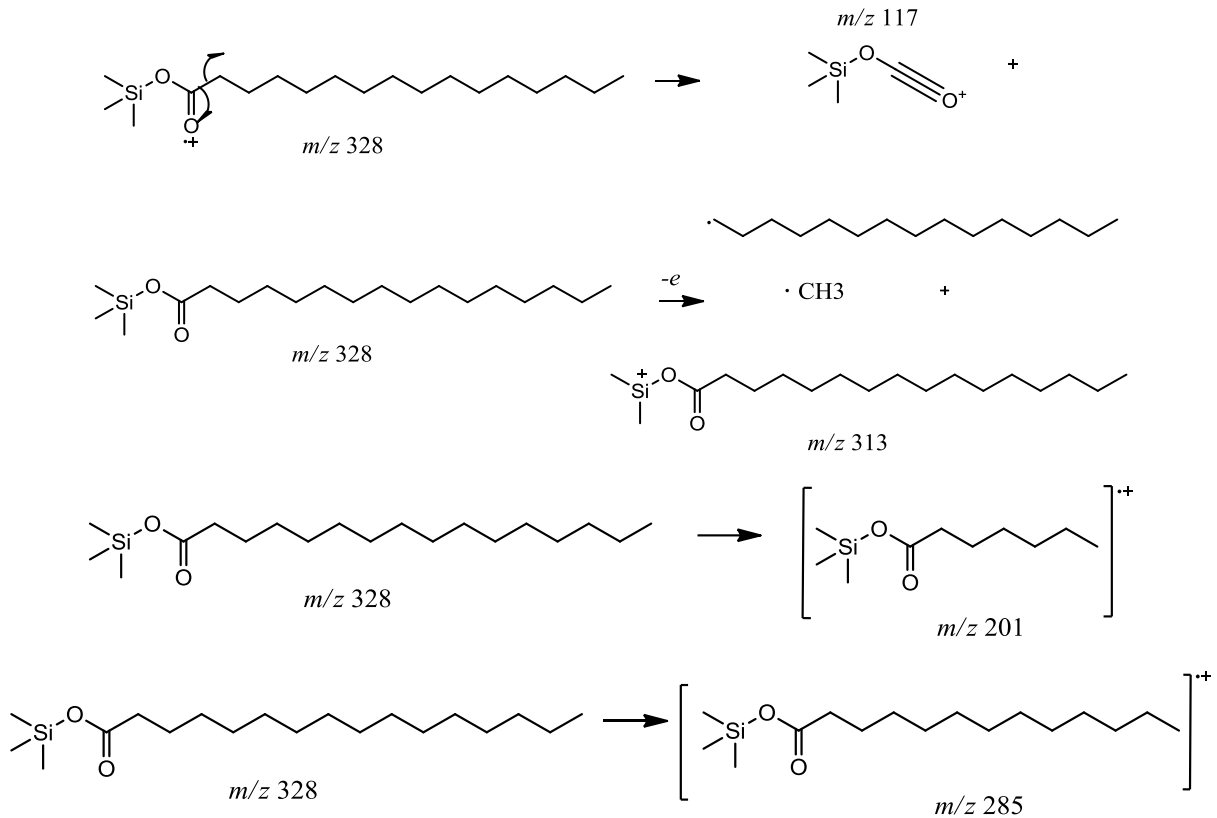


Figura 62 - Proposta de fragmentação do ácido hexadecanóico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

- ácido octadecanóico

Ácido octadecanóico (Figura 63 e 64) e derivados dele tem sido estudados como matéria-prima na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, e também está associado a diminuição do colesterol por via oral (SAGIRI et al., 2015).

Figura 63 - Espectros de massas do composto ácido Octadecanóico siliado.

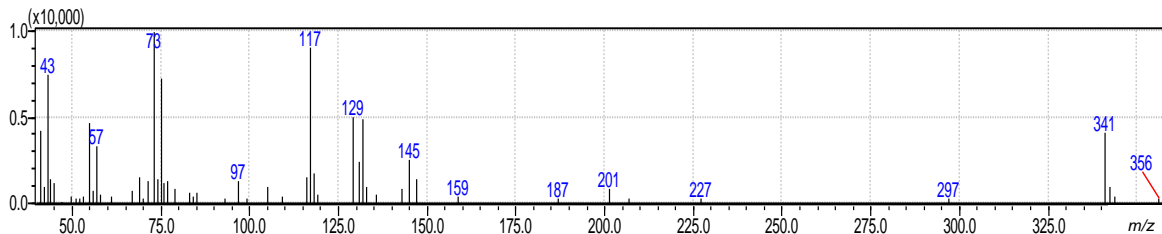
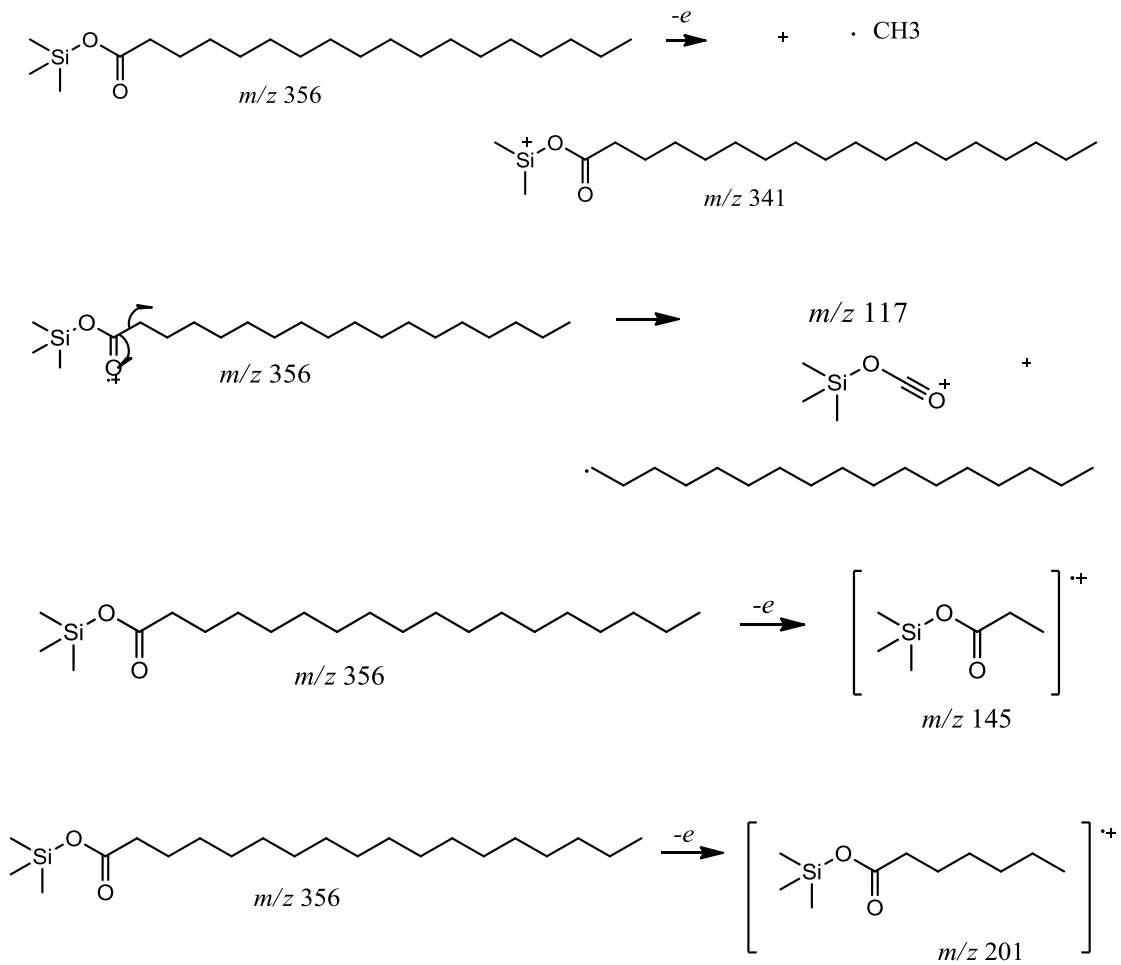


Figura 64 - Proposta de fragmentação do ácido octadecanóico siliado.



Fonte: elaborada pela autora.

Cinco compostos puderam ser identificados para *F. solani* e quatro compostos para *F. oxysporum*, por CG-EM, na maioria ácidos orgânicos, que podem ser atribuídas aos metabólitos primários que são industrialmente importantes. Os metabólitos primários, de fungos, mais comumente utilizados na indústria são ácidos orgânicos, vitaminas, aminoácidos, nucleotídeos e solventes (DEMAIN et al., 2000).

E foi observado para as duas espécies o composto ácido *p*-hidroxibenzoico, que é comumente encontrado em fungos (KUNAMNENI et al., 2008).

4.7.2 Análises por CLAE-EM, CLAE-EM/EM e RMN

As massas de alta resolução, dos compostos no extrato, geradas nas análises por CLAE-EM (Figuras 65 e 66), foram comparadas com a base de dados METLIN e também com dados da literatura para espécies de *Fusarium* que gerou algumas propostas de moléculas apresentadas nas tabelas 12 e 13.

A base de dados e os dados da literatura sugeriram moléculas interessantes com atividades biológicas promissoras, como citotóxica, antifúngica, antiinflamatória, e etc., assim como moléculas já descritas para algumas espécies de *Fusarium* e outros fungos, e alguns possíveis precursores de alcalóides piperidínicos, estes comumente encontrados em *Senna spectabilis* com diversas atividades biológicas.

As análises dos fragmentos desses compostos tanto em CLAE-EM (fragmentação na fonte) como CLAE-EM/EM nos confirmaram a presença de algumas dessas moléculas nos extratos, em alguns casos também foi possível observar sinais característicos por RMN.

Figura 65 - Cromatograma de íons totais para o extrato bruto de *F. solani*.

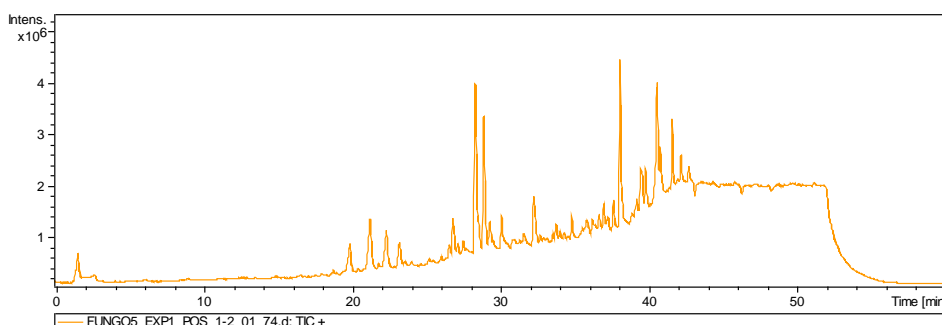


Figura 66 - Cromatograma de íons totais para o extrato bruto de *F. oxysporum*.

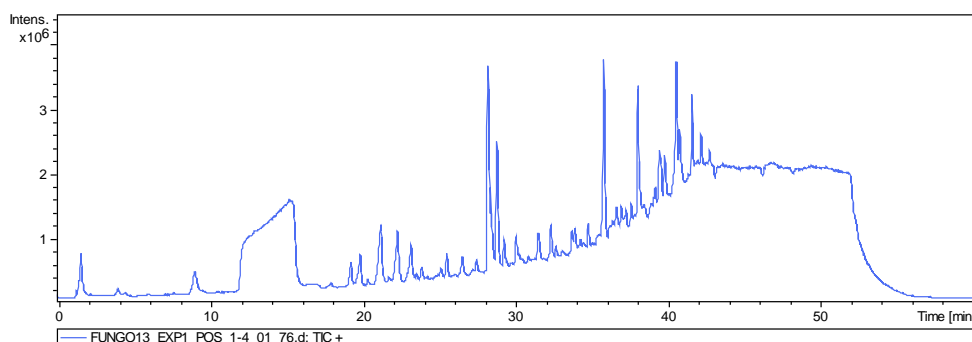


Tabela 12 - Massas moleculares de compostos sugeridos para o extrato de *Fusarium oxysporum*.

tR (min)	Massa Molecular	Composto 1	Composto 2	Composto 3	Já identificado em <i>Fusarium</i> :	Referência
4,0	194,0810	ácido 5-(but-9-enil)-6-oxo-1,6-dihidropiridina-2-carboxílico	-	-	<i>oxysporum</i>	(CHEN et al., 2013)
4,5	196,0964	ácido 5-butil-6-oxo-1,6-diidropiridina-2-carboxílico	-	-	<i>oxysporum</i>	(CHEN et al., 2013), (STIPANOVIC et al. 2011)
9,1	178,0860	ácido deshidrofusárico	-	-	<i>oxysporum</i>	(BANI et al., 2014.)
12,4	180,1020	ácido fusárico	-	-	<i>oxysporum, moniliforme, crookwellense, subglutinans, napiforme, heterosporum, solani</i>	(BACON et al., 1996)
25,1	530,248	integracideo C	-	-	sp	(SINGH et al., 2003)
25,5	251,1382	fusagerina C	fusagerina D	-	sp	(WEN et al., 2015)
28,2	274,2736	C16-esfinganina	-	-	-	METLIN
28,8	230,2472	xestoaminol C	-	-	-	METLIN
29,3	437,1903	armilarina	armillaripina	-	-	METLIN
30,9	299,1593	t2-tetraol	-	-	<i>solani, poae e sporotrichioides</i>	(SUGIMOTO et al., 2002),

						(MIROCHA et al., 1989)
34,8	325,1598	<i>monoacetoxyscirpenol</i> (1)	4- <i>acetoxyscirpene-3,15-diol</i> (2)	3- <i>acetoxyscirpene-4,15-diol</i> (3)	(1) <i>roseum, equiseti</i> (2, 3) <i>oxysporum</i>	(PATHRE et al., 1976), (CLARIDGE; SHMITZ, 1979)
35,8	784,4064	beauvericina	-	-	<i>proliferatum, semitectum, acuminatum, anthophilum, avenaceum, beomiforme, dlamini, equiseti, longipes, nygamai, oxysporum, poae, sambucinum, subglutinan, solani, moniliforme</i>	(EKUNDAYO et al., 2007), (LOGRIECO et al., 1998), (EKUNDAYO et al., 2007), (BACON et al. 1996)
39,4	381,2941	3-[[4-[(3-methyl-2-buten-1-yl)oxy]phenyl]methyl]-3,6-bis(methylthio)-, (3S,6R)-2,5-piperazinedione	-	-	sp	(GUIMARÃES et al., 2010.)
40,5	338,3366	<i>N</i> -[(-)-jasmonoil-(S)-isoleucina	ácido <i>N</i> -[(+)-7-isojasmônico-(S)]-isoleucina	-	<i>oxysporum</i>	(MIERSCHA et al., 1999)
40,8	467,0973	t-2-toxina	-	-	<i>oxysporum, sporotrichioides, langsethiae</i>	(MIROCHA et al., 1989), (IMATHIU et al., 2013)

Tabela 13 - Massas moleculares de compostos sugeridos para o extrato de *Fusarium solani*.

tr (min)	Massa Molecular	Composto 1	Composto 2	Composto 3	Já identificado em <i>Fusarium</i> :	Referência
12,5	180,1030	ácido fusárico			<i>oxysporum, moniliforme, crookwellense, subglutinans, napiforme, heterosporum, solani</i>	(BACON et al., 1996)
18,8	211,0962	(-)-ácido jasmônico	ácido (+)-7- <i>iso</i> -jasmônico	-	<i>oxysporum</i>	(MIERCHA et al. 1999)
26,8	365,1945	10-hidroxicamptotecina	-	-	<i>solani</i>	(SHWETA et al. 2010)
28,3	274,2759	C16-esfinganina	-	-	-	METLIN
28,8	230,2491	xestoaminol C	-	-	-	METLIN
29,3	437,1934	armilarina	armillaripina	-	-	METLIN
30,9	299, 1621	t-2-tetraol	-	-	<i>solani, poae e sporotrichioides.</i>	(SUGIMOTO et al., 2002), (MIROCHA et al. 1989)
34,8	325,1630	<i>monoacetoxyscirpenol</i> (1)	<i>4-acetoxyscirpene-3,15-diol</i> (2)	<i>3-acetoxyscirpene-4,15-diol</i> (3)	(1) <i>roseum, equiseti</i> (2, 3) <i>oxysporum</i>	(PATHRE et al., 1976), (CLARIDGE; SHMITZ, 1979)

35,8	784,4288	beauvericina	-	-	<i>Proliferatum, semitectum, acuminatum, anthophilum, avenaceum, beomiforme, dlamini, equiseti, longipes, nygamai, oxysporum, poae, sambucinum, subglutinan, solani, moniliforme.</i>	(EKUNDAYO et al., 2007), (LOGRIECO et al., 1998), (EKUNDAYO et al., 2007), (BACON et al., 1996)
39,5	381,2969	(3S,6R)-3-(4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)benzyl)-3,6-bis(methylthio)piperazine-2,5-dione	-	-	sp	(GUIMARÃES et al., 2010.)
40,6	338,3430	N-[(-)-jasmonoil-(S)-isoleucina	ácidoN-[(+)-7-iso-jasmônico-(S)-isoleucine	-	<i>oxysporum</i>	(MIERSCHA et al., 1999)
40,8	467,1004	t-2-toxina	-	-	<i>oxysporum, sporotrichioides, langsethiae</i>	(MIROCHA et al., 1989), (IMATHIU et al., 2013)

Fusarium oxysporum

No experimento de massas de alta resolução do extrato de *Fusarium oxysporum* foi observado em 12,3 minutos o ácido fusárico (ácido 5-butiril-picolínico), apresentando um $[M+H]^+$ de m/z 180,1017, com fragmentações, na fonte, características de m/z 162 que representa uma desidratação, m/z 134 proveniente da perda do monóxido de carbono (HAN et al., 2014) e m/z 152 responsável pela perda do alceno formando o íon *piridinium* (Figura 67 e 68).

A sugestão da fórmula molecular dada pelo software "*data analysis*" confere com a estrutura molecular do ácido fusárico, sendo $C_{10}H_{14}NO_2$.

E o seu espectro no ultravioleta nos fornece uma banda em 271 nm como sugere a literatura devido à presença do anel piridinico (BACON et al., 1996) (Figura 69).

O espectro simulado de RMN 1H do ácido fusárico é compatível com o espectro real do extrato de *Fusarium oxysporum*, que podemos observar na figura 70. A sobreposição dos sinais indica a presença desse composto no extrato como um composto majoritário.

Em seguida, um experimento TOCSY 1D foi realizado, fazendo irradiação do sinal apresentado em 0,97 ppm, permitindo observar o sistema de spin dos sinais pertencentes a região alifática, comprovando que esses sinais estão correlacionados e, portanto, compatíveis com a estrutura do ácido fusárico (Figura 71).

O ácido fusárico é uma micotoxina de baixa e média toxicidade e comumente encontrada em espécies de *Fusarium* e é importante por suas relações sinérgicas podendo aumentar a toxicidade de outras micotoxinas. É também comumente encontrado em grãos e por esse motivo apresenta-se como um indicador de contaminação em grãos por espécies de *Fusarium* (BACON et al., 1996 e SANTIN et al., 2001). Já apresentou atividade antiomiceto e (SON et al., 2007) atividade antimicrobiana (HAN et al., 2014), é considerado um potente inibidor de dopamina in vitro e também já apresentou atividade anti-hipertensiva, além de ser um composto herbicida (SONG; YEE, 2000). Um fator importante a se considerar, sabendo que essa espécie de *Fusarium* apresenta esse composto como majoritário, dentro das condições utilizadas nesse trabalho, é o seu alto valor agregado de R\$1.633,00 cada 1 grama de acordo com o site SIGMA ALDRICH 20015a.

Figura 67 - Espectro de massas por CLAE-EM.

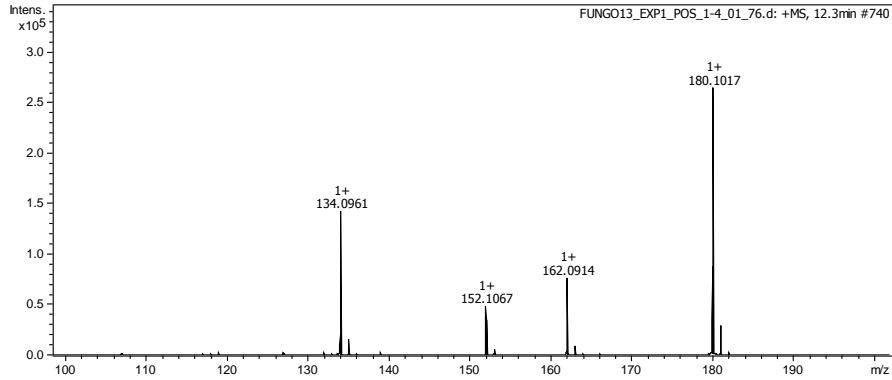
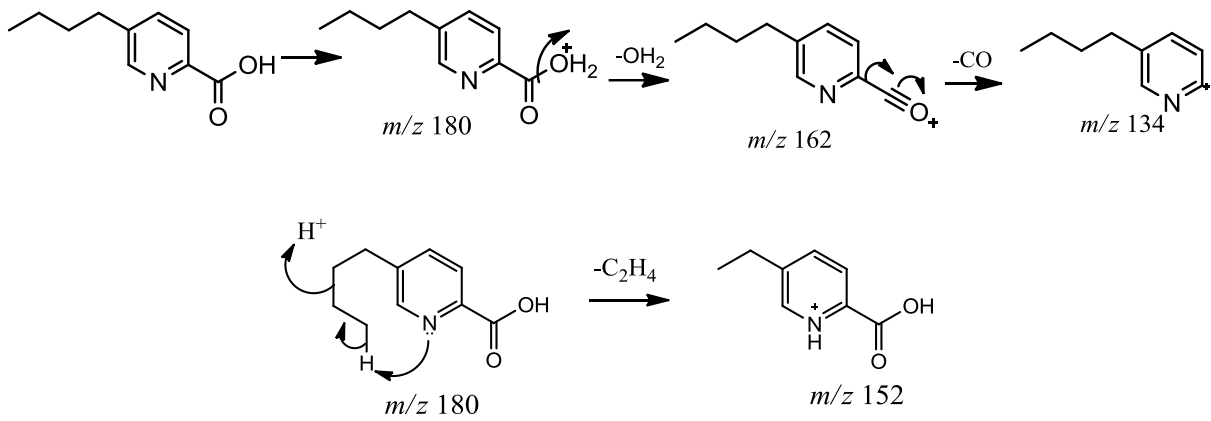


Figura 68 - Fragmentação do ácido fusárico



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 69 - Espectro de UV do ácido fusárico.

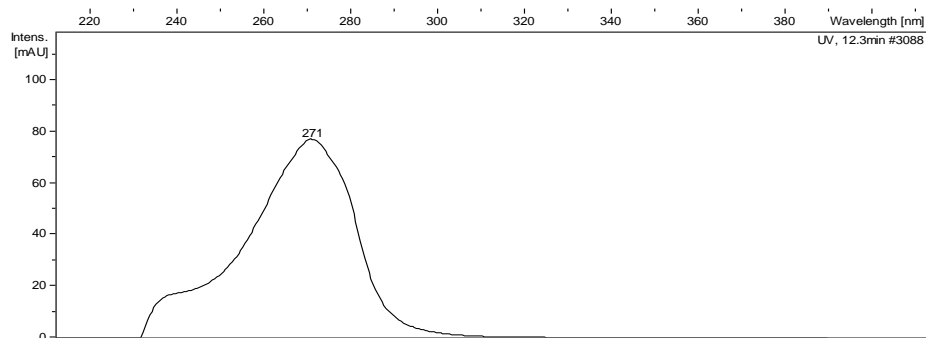


Figura 70 - Comparação do espectro de RMN ^1H em CD_3OD do ácido fusárico, Azul: extrato bruto de *Fusarium oxysporum*. Vermelho: simulação do espectro do ácido fusárico.

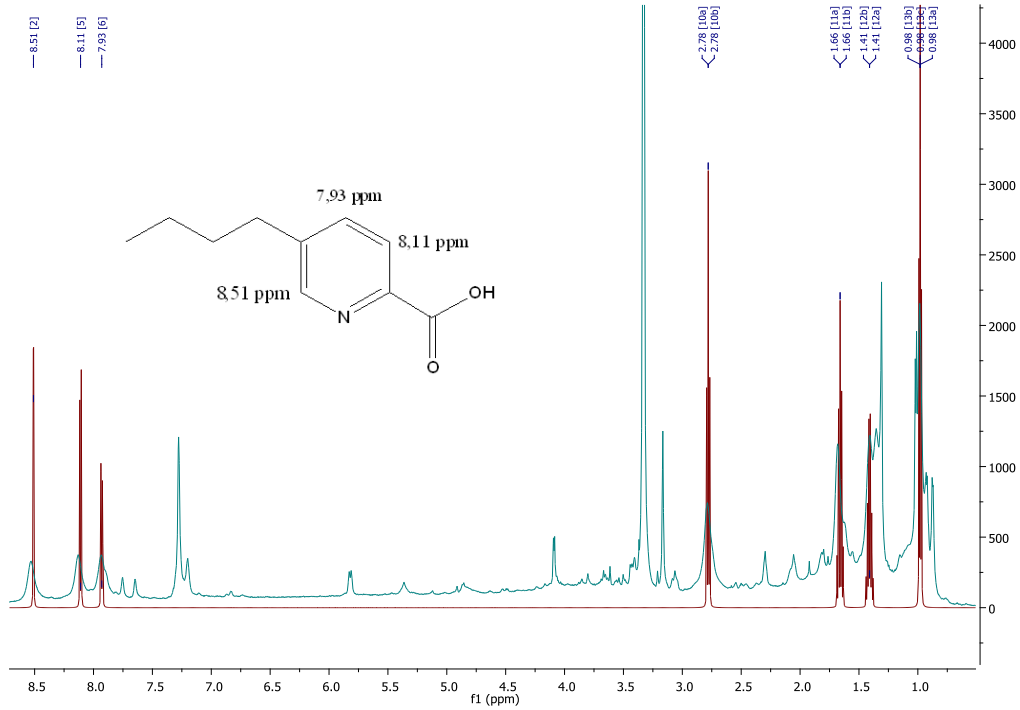
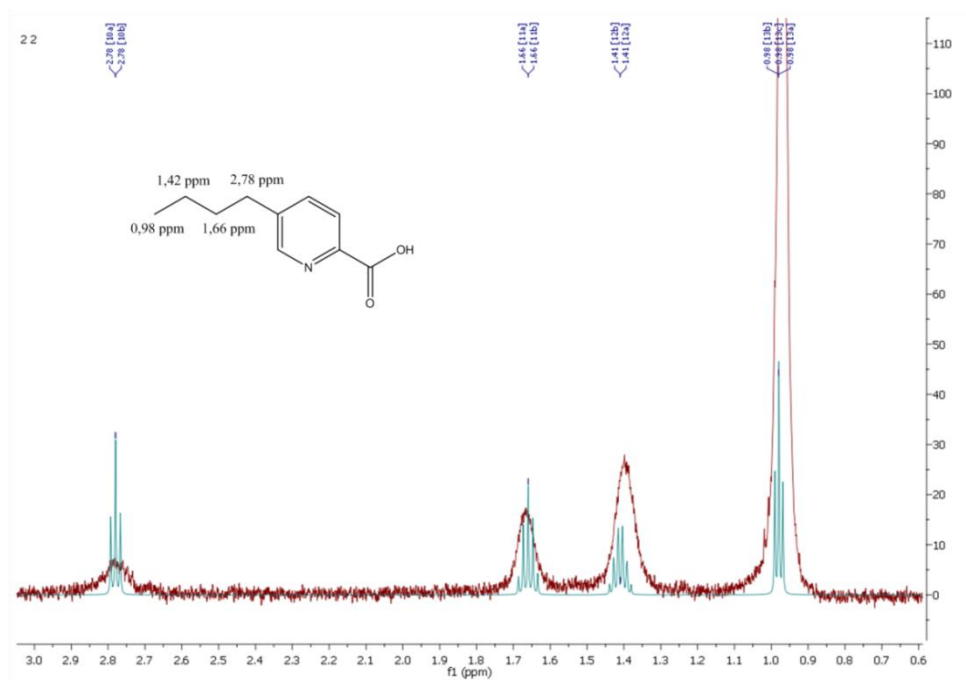


Figura 71 - Sobreposição dos sinais do TOCSY 1D do extrato em 0,971 ppm (vermelho) com o espectro simulado do ácido fusárico (azul).



Dessa forma foram observados 3 derivados do ácido fusárico, pertencentes a esse extrato bruto de *Fusarium oxysporum*.

Em 4,0 minutos foi observado, em CLAE-EM, o derivado 1 do ácido fusárico que apresenta um alceno terminal na posição 5 do anel piridínico (CHEN et al., 2013), apresentando $[M+H]^+$ m/z 194,0810 e subseqüentes fragmentações na fonte m/z 176 referente a uma desidratação, m/z 166 que representa a perda do alceno C_2H_4 a partir de mecanismo de McLafferty e m/z 148 referente a perda de uma molécula de monóxido de carbono (Figura 72 e 73).

A sugestão de fórmula molecular dada pelo software “*data analysis*” confere com essa estrutura molecular, sendo $C_{10}H_{12}NO_3$.

Figura 72 - Espectro de massas do derivado 1.

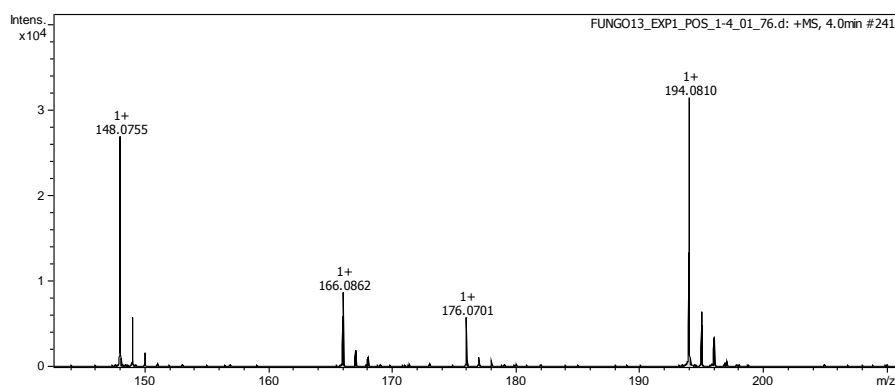
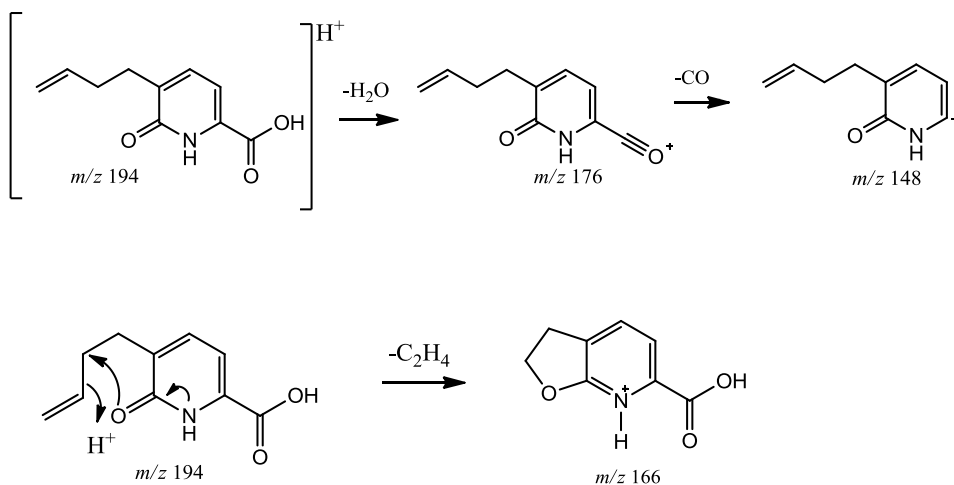


Figura 73 - Fragmentação do derivado 1.



Fonte: elaborada pela autora.

Em 4,5 minutos foi observado o derivado 2 piridônico, análogo ao ácido fusárico, (CHEN et al., 2013), com $[M+H]^+$ m/z 196,0964 e fragmentações, na fonte, com m/z 178 que caracteriza uma desidratação, m/z 150 que caracteriza a perda do monóxido de carbono e m/z 168 que se refere a perda de eteno (Figura 74 e 75).

A sugestão de fórmula molecular dada pelo software “*data analysis*” confere com essa estrutura molecular, sendo $C_{10}H_{14}NO_3$.

Figura 74 - Espectro de massas do derivado 2.

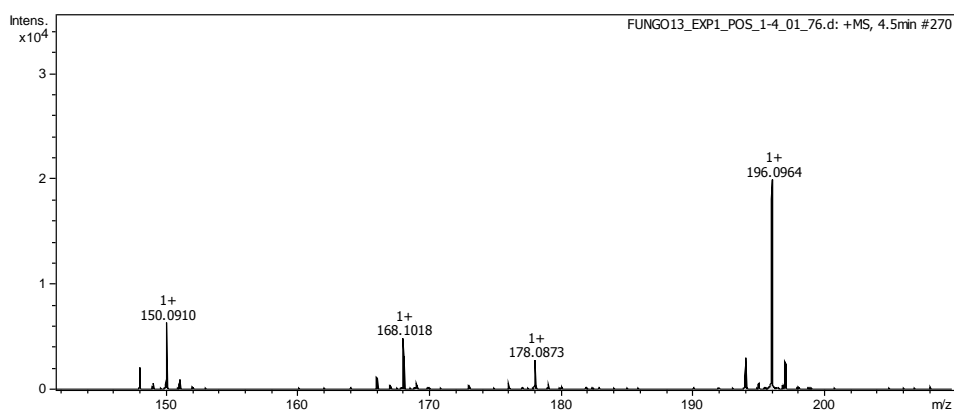
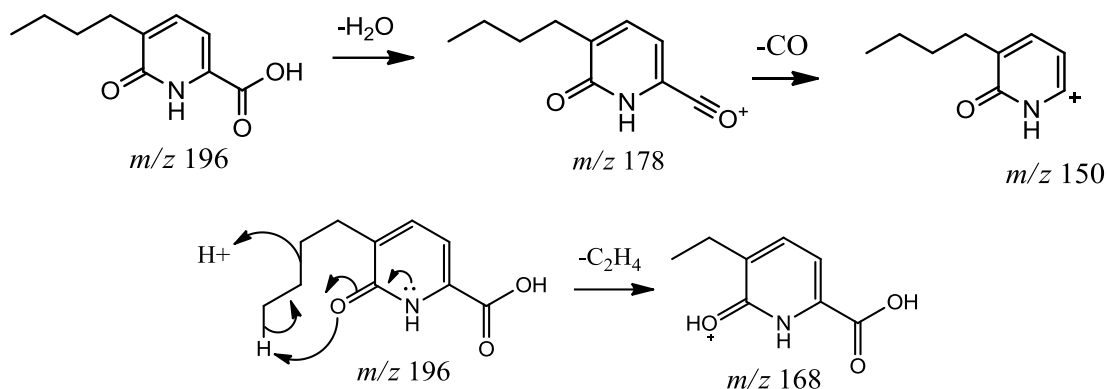


Figura 75 - Fragmentação do derivado 2.



Fonte: elaborada pela autora.

Em 9,1 minutos observou-se a presença do derivado 3, ácido deshidrofusárico, (BANI et al., 2014), em CLAE-EM, com $[M+H]^+$ 178,0860 e fragmentações, na fonte, com m/z 160 proveniente da perda de uma molécula de água, m/z 132 referente a perda do eteno C_2H_4 e m/z 150 proveniente da perda de uma molécula de monóxido de carbono como mostram as figura 76 e 77.

A sugestão de fórmula molecular dada pelo software “*data analysis*” também confere com essa estrutura molecular, sendo $C_{10}H_{12}NO_2$.

Figura 76 - Espectro de massas do derivado 3.

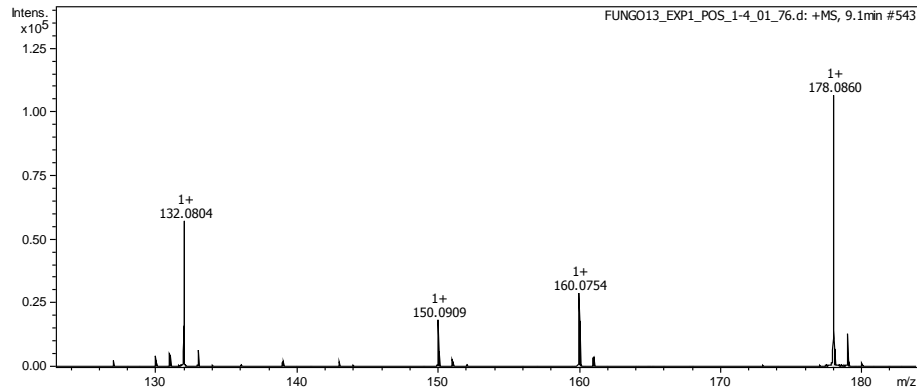
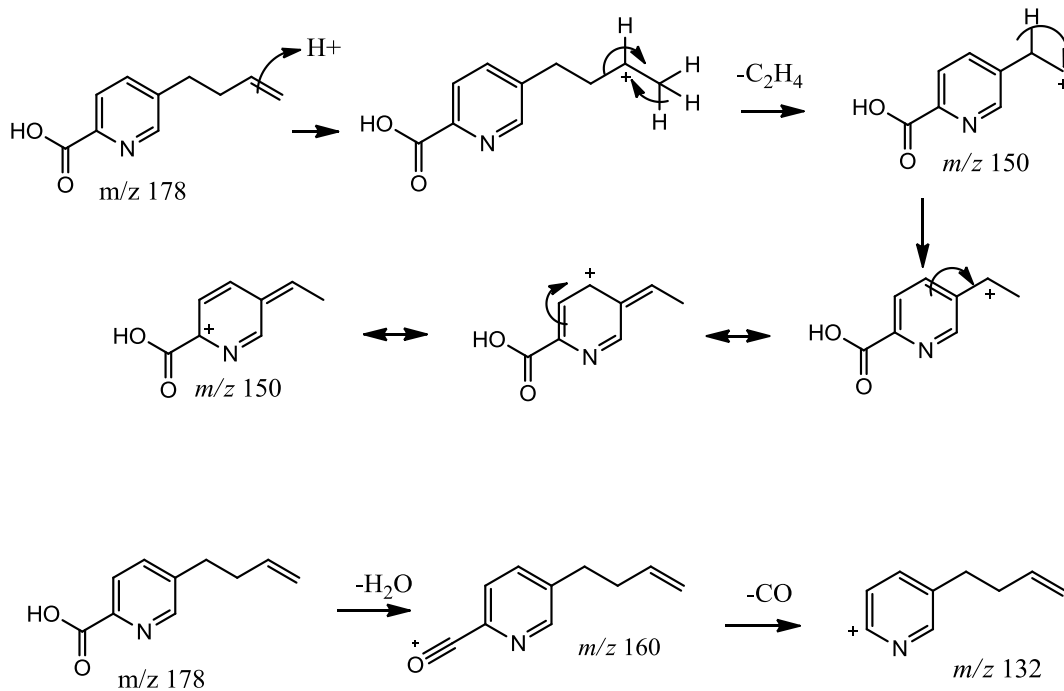


Figura 77 - Perfil de fragmentação do derivado 3.



Fonte: elaborada pela autora.

Em 25,1 minutos, foi observado em CLAE-EM o provável composto integracéideo-C, um triterpenóide tetracíclico, apresentando uma massa de alta resolução de $[M+H]^+$ 530,2480, e fragmentos de m/z 512 pela desidratação e m/z 470 responsável pela perda de ácido acético, possíveis de observar no experimento MS^2 (Figura 78 e 79). Esse composto já foi identificado no fungo *Fusarium* sp, (SINGH et al., 2003).

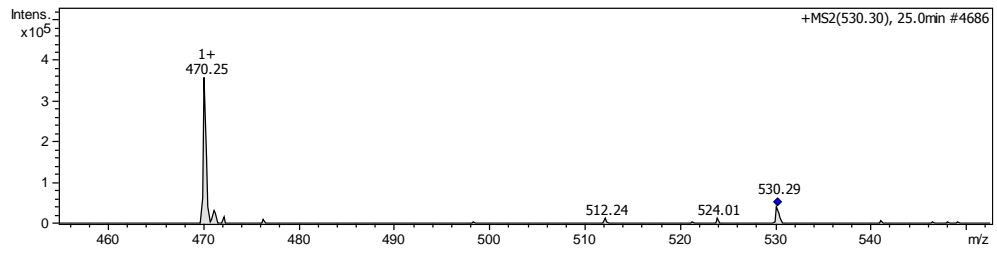
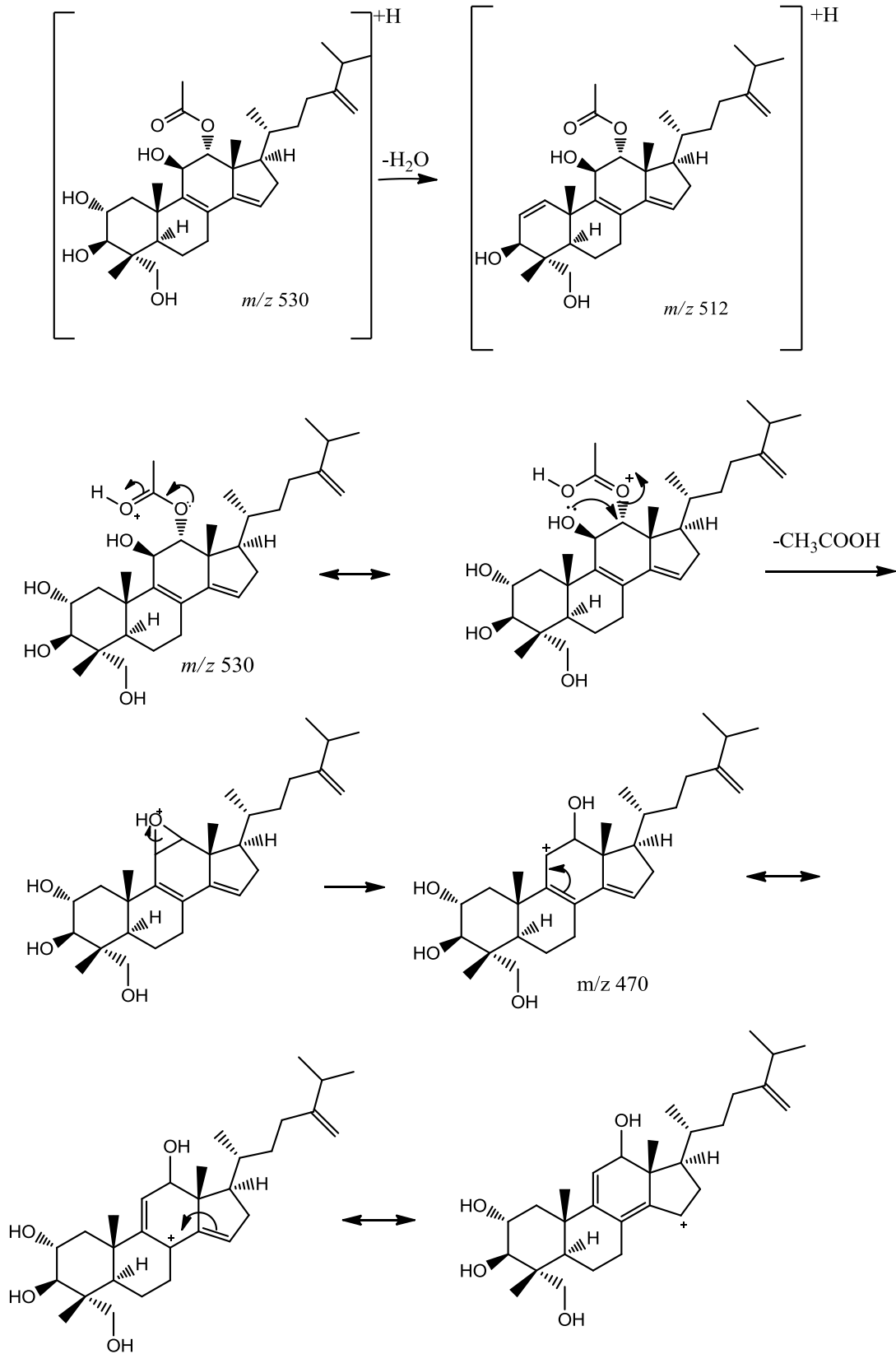
Figura 78 - Espectro de massas, MS², de integracido C.

Figura 79 - Proposta de fragmentação para integracéide C.



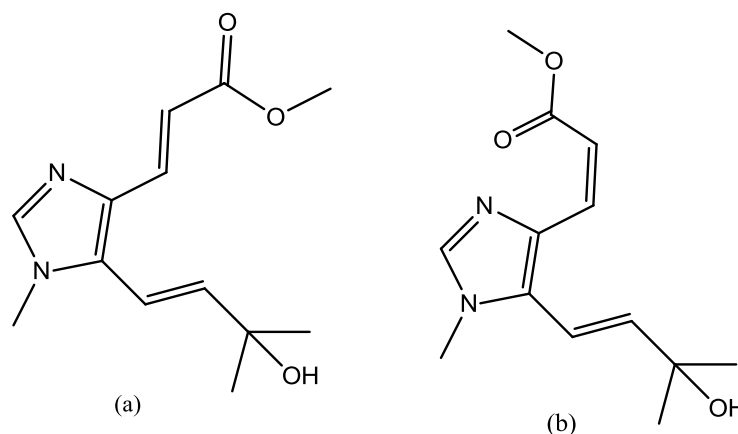
Fonte: elaborada pela autora.

Em 25,5 minutos foi observado o composto de massa de alta resolução de $[M+H]^+$ 251,1382 (Figura 81), com uma fragmentação de m/z 233 referente a uma desidratação (Figura 82 e 83).

Sugere-se que seja um dos alcalóides estereoisoméricos fusagerina C ou D (Figura 80) descritos para o fungo *Fusarium* sp por Wen et al., 2015, no qual eles demonstraram massa de alta resolução muito próxima da observada nesse extrato, sendo que a massa apresentada para fusagerin C foi de 251,1388 e para fusagerin D foi de 251,1391.

O software “*data analysis*” também sugere a fórmula molecular, como sendo $C_{13}H_{19}N_2O_3$, compatível com esses isômeros.

Figura 80 - Estrutura molecular de (a) fusagerina C e (b) fusagerina D



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 81 - Massa de alta resolução do composto

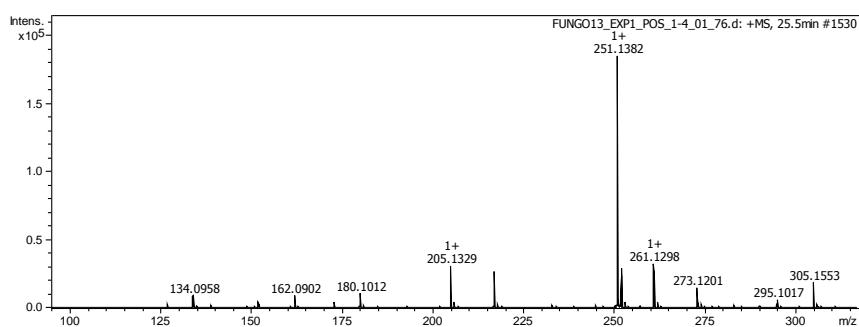


Figura 82 - Espectro de massas, MS², do composto fusagerina C ou D.

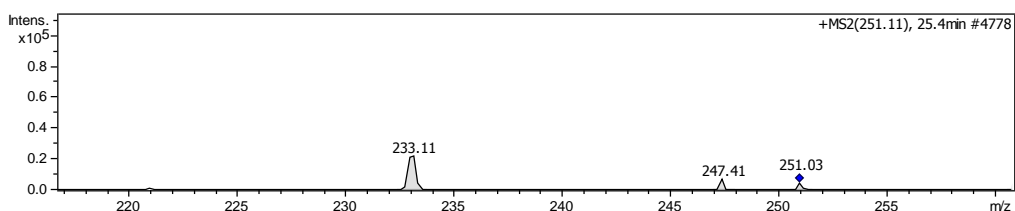
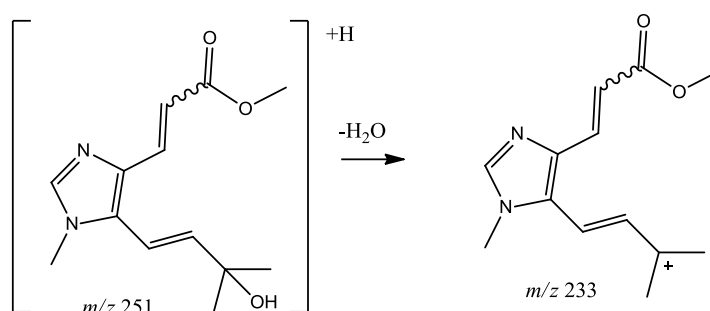


Figura 83 - Proposta de fragmentação de fusagerina C ou D.



Fonte: elaborada pela autora.

Em 28,2 minutos foi observado em alta resolução o composto de $[M+H]^+$ 274,2736 que pode se tratar do composto C16-esfinganina, de acordo com a base de dados METLIN. Esse composto apresentou, em CLAE-EM/EM, o fragmento de m/z 256 que se refere a uma desidratação (Figura 84 e 85). De acordo com a estrutura molecular desse composto, podemos observar que há dificuldade de fragmentação da longa cadeia de hidrocarbonetos por electrospray, sendo assim só pudemos observar uma desidratação, e o íon molecular continua intenso no fragmentograma.

O software “*data analysis*” sugere a formula molecular compatível com C16-esfinganina protonada, sendo $C_{16}H_{36}NO_2$.

Mais um indício de conter esse composto no extrato se dá pelo fato de que estruturas de moléculas relacionadas com esfinganina já foram identificadas em *Fusarium moniliforme* e também em outros fungos como *Alternaria alternata* (WANG W. et al., 1996).

Figura 84 - Espectro de massas, MS², de C16-esfinganina.

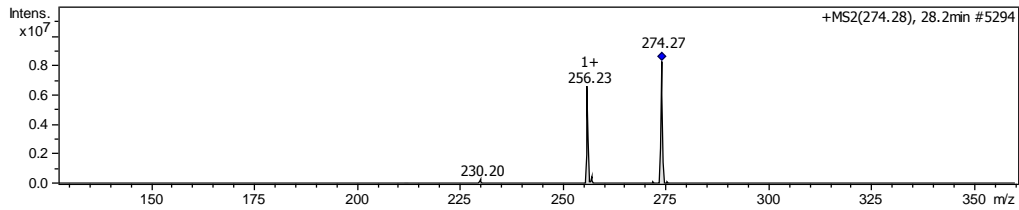
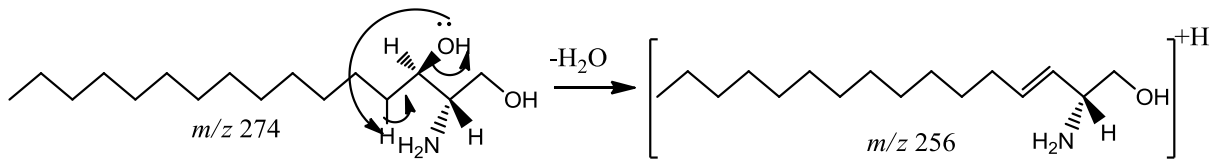


Figura 85 - Proposta de fragmentação para C16-esfinganina



Fonte: elaborada pela autora.

Em 28,8 minutos foi observado o composto de massa de alta resolução [M+H]⁺ m/z 230,2472, no qual a base de dados METLIN nos sugeriu ser o xestoaminol C que apresentou o fragmento, MS², de m/z 212 referente a perda de uma molécula de água (Figura 86 e 87), seguindo o mesmo perfil do composto anterior C16-esfinganina, com tempo de retenção próximo.

O software “data analysis” sugere a fórmula molecular compatível com xestoaminol C protonada, sendo C₁₄H₃₂NO.

Xestoaminol C, já foi isolado da esponja *Xestospongia* sp, e apresentou atividade inibidora da transcriptase reversa (ICHIHASHI; MORI, 2003).

Figura 86 - Espectro de massas, MS², de xestoaminol C.

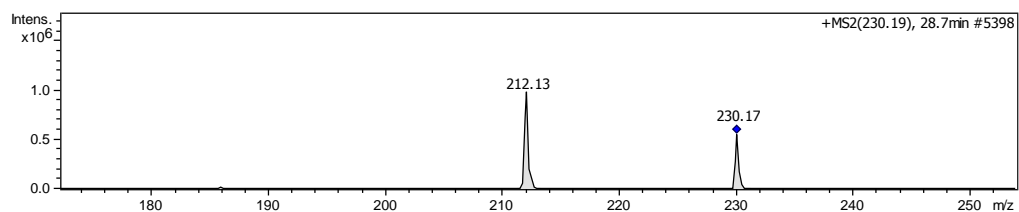
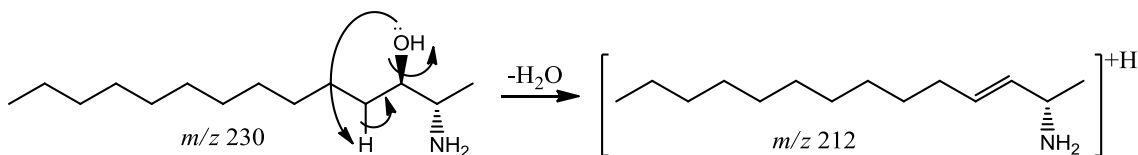


Figura 87 - Proposta de fragmentação de xestoaminol C.



Fonte: elaborada pela autora.

Esses dois compostos, C16-esfingalina e xestoaminol C, são candidatos potenciais a precursores de alcalóides piperidínicos que a planta hospedeira *Senna spectabilis* produz. Há poucos estudos sobre a biossíntese desses compostos relatadas na literatura e, portanto, não sabemos certamente qual a origem desses alcalóides (PIVATO, 2005), por esse motivo C16-esfingalina e xestoaminol C são interessantes nesse contexto, pois podem participar da síntese desses alcalóides.

Em 29,3 minutos foi observado o composto de massa de alta resolução $[M+Na]^+$ 437,1902 e $[M+H]^+$ 415,208 (Figura 88), com fragmentações características, no experimento CLAE-EM/EM de m/z 397 referente a perda de uma molécula de água, m/z 383 referente a perda de metanol e m/z 277 referente a formação de um íon *acilium* (Figura 90 e 91). Podendo ser os isômeros de constituição armillaripina ou armillarina (Figura 89).

Armillarina e armillaipina são compostos comumente isolados do fungo *Armillaria mellea* (GAO et al., 2009).

Figura 88 - Composto armillaripina ou armillarina sodiado e protonado em CLAE-EM de alta resolução.

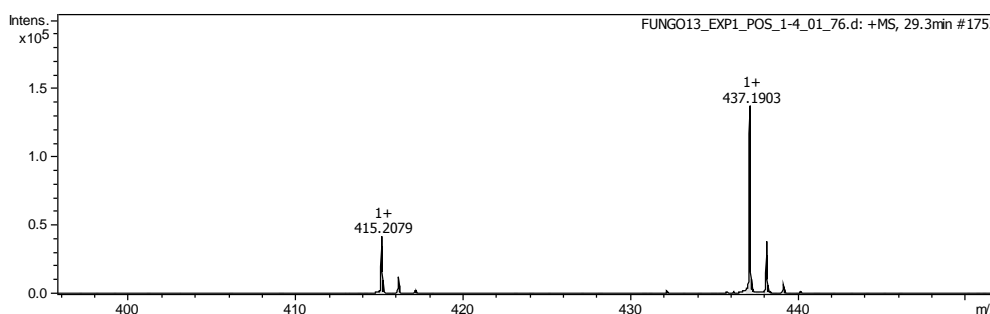
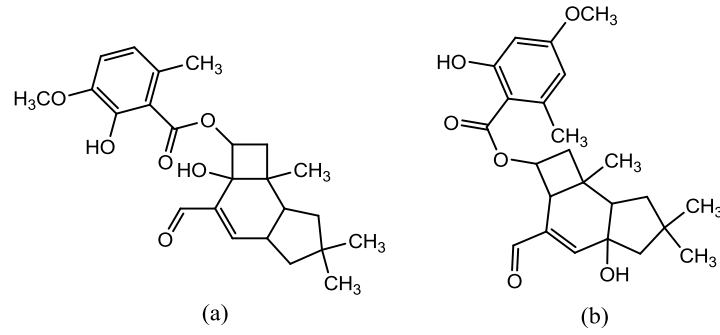


Figura 89 - Estrutura molecular de (a) armillarina e (b) armillaripina



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 90 - Espectro de massas, MS², de armillaripina ou armillarina.

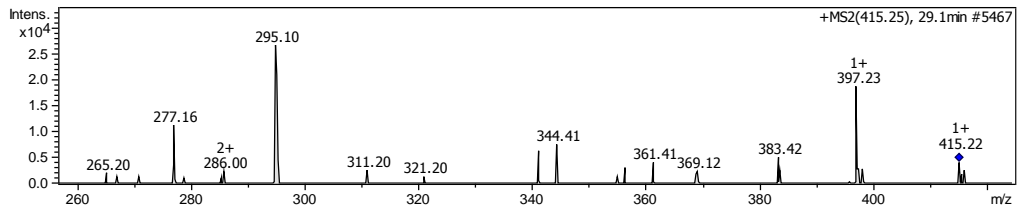
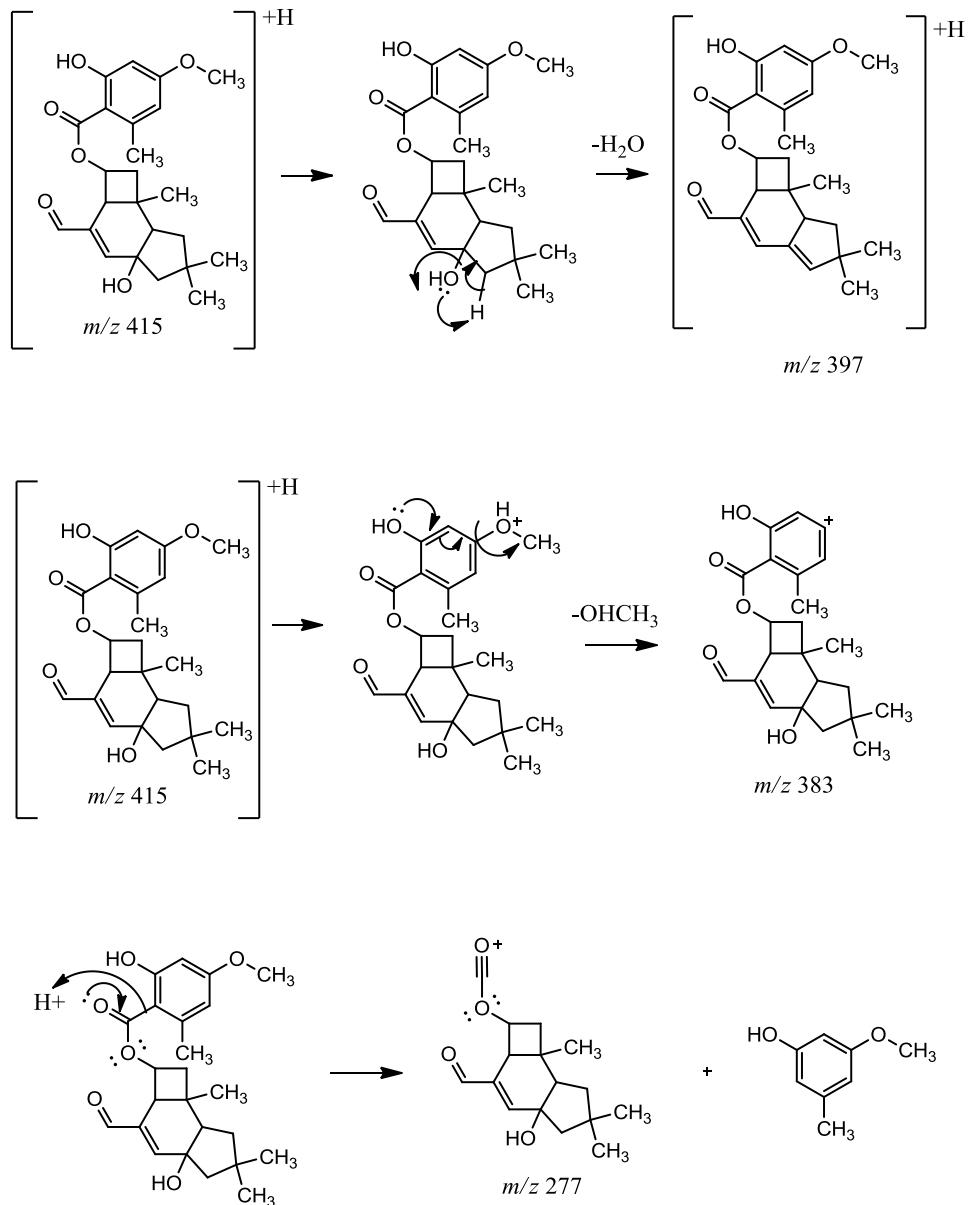


Figura 91 - Proposta de fragmentação de um dos compostos.



Fonte: elaborada pela autora.

Também foi observado o composto beauvericina, já descrito para *Fusarium oxysporum* e outras espécies, em 35,8 minutos, e sua massa de alta resolução apresentou-se compatível com artigos relatados na literatura ($[M+H]^+$ 784,4064 e $[M+Na]^+$ 806,3885) (Figura 92), bem como sua fragmentação característica pelo experimento CLAE-EM/EM (Figura 93) que apresenta o íon $[M+H]^+$ 784, com fragmentações de m/z 262 proveniente da perda do aminoácido fenilalanina e m/z 244 que representa uma desidratação (Figura 94) (HU et al., 2012). Na figura 95 podemos observar os sinais no RMN 1H do extrato de *Fusarium oxysporum* que são

compatíveis com os sinais do espectro de beauvericina simulado, podemos observar dois dupletos muito blindados referentes a duas metilas e também os sinais na região aromática bastante compatíveis. Os deslocamentos da beauvericina variaram um pouco por conta de ser uma simulação e o software apresentar algumas limitações, além dos dados utilizados da literatura para a correção dos deslocamentos químicos poderem sofrer diferença devido a utilização de outro solvente deuterado e também outro modelo de equipamento de RMN utilizado para a análise. Mas com um experimento TOCSY 1D comprovou-se parte do sistema de spins muito característicos dessa molécula, confirmando mais uma vez sua presença no extrato, com os dois dupletos que representam as metilas acopladas (Figura 96).

A beauvericina também se apresentou como um composto majoritário para esse fungo. E de acordo com Wang e Xu 2012, essa molécula possui atividade inseticida, antitumor para células de leucemia, antibactericida, antifúngica e antiviral contra o vírus da AIDS. E possui também, alto valor agregado, no qual o custo de 5 mg chega a R\$1.113,00 de acordo com o site SIGMA ALDRICH 2015b.

Figura 92 - Massa de beauvericina, protonada e sodiada, apresentada no experimento CLAE-EM de alta resolução.

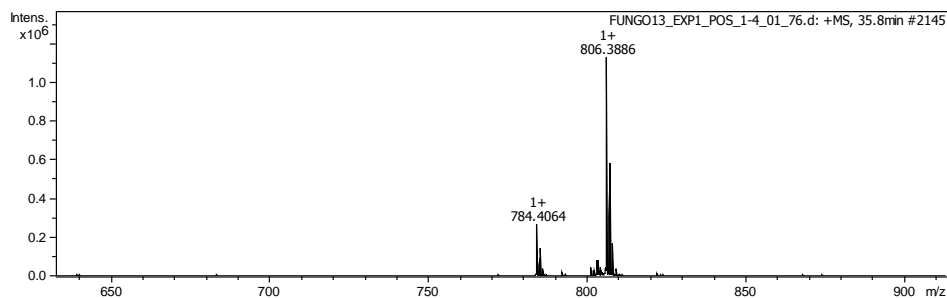


Figura 93 - Espectro de massas, MS², da beauvericina.

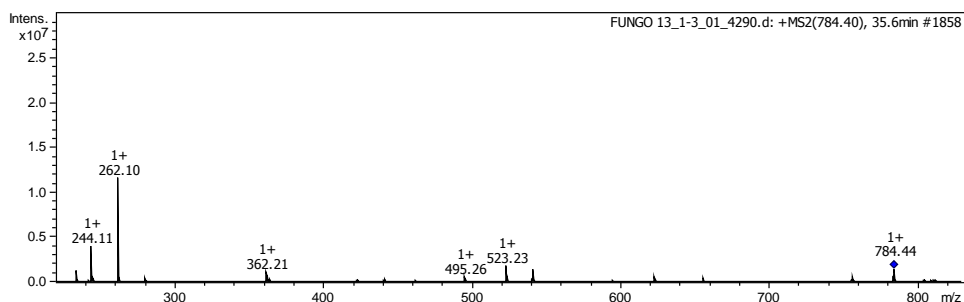
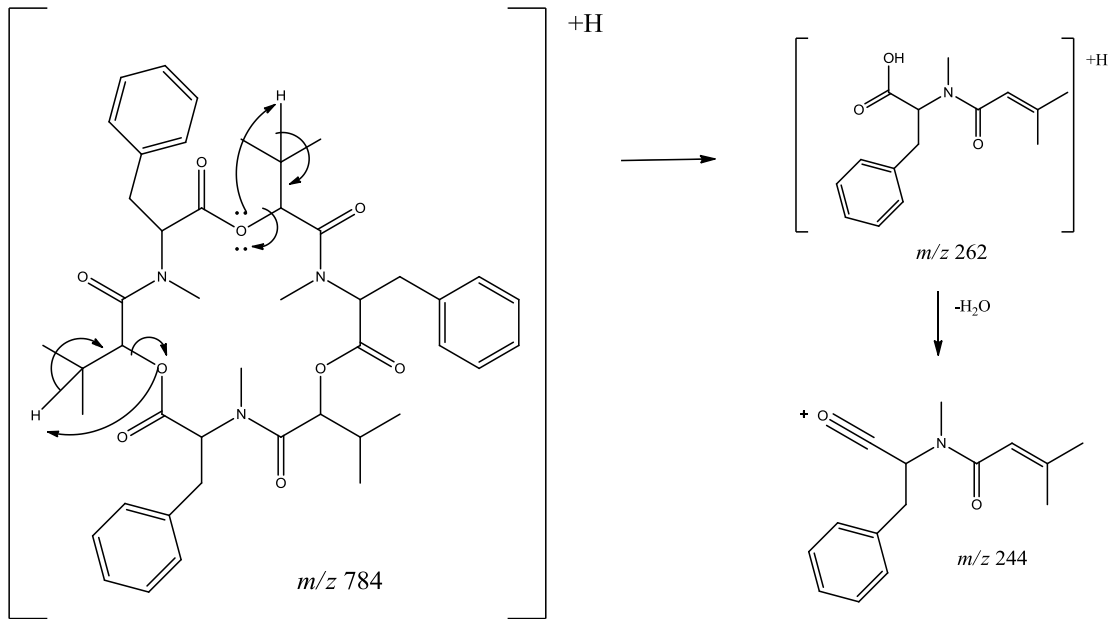


Figura 94 - Fragmentação da beauvericina.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 95 - Sobreposição do espectro de RMN 1H do extrato de *Fusarium oxysporum* (vermelho) com o espectro simulado da beauvericina (azul).

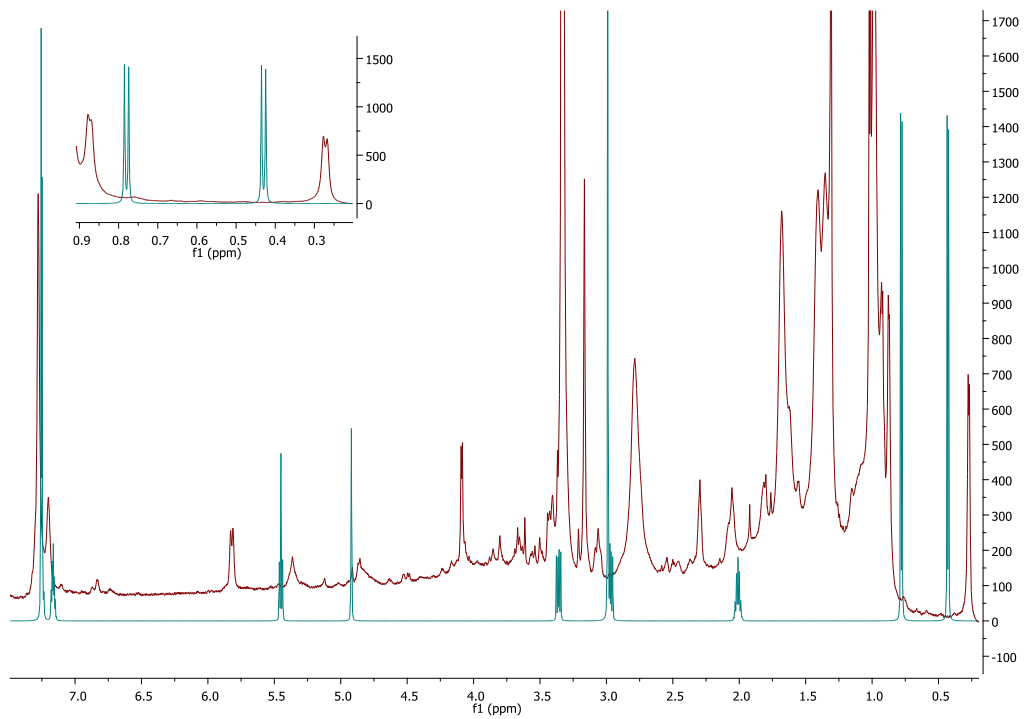
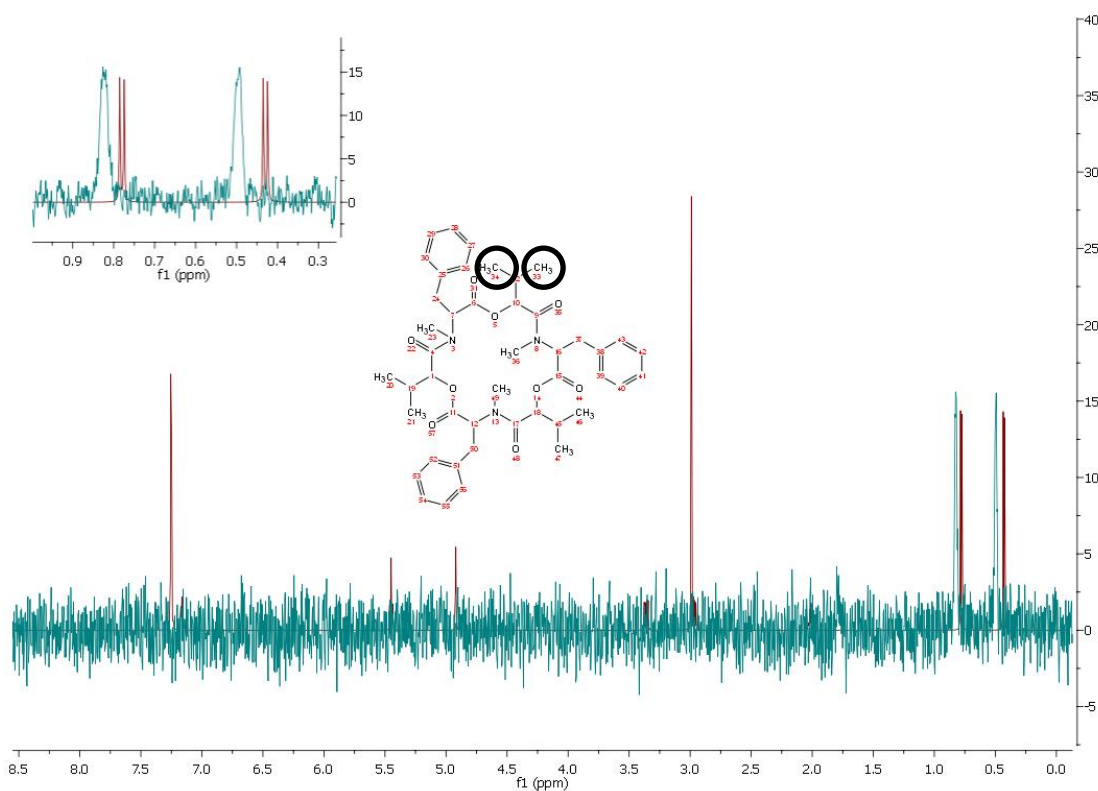


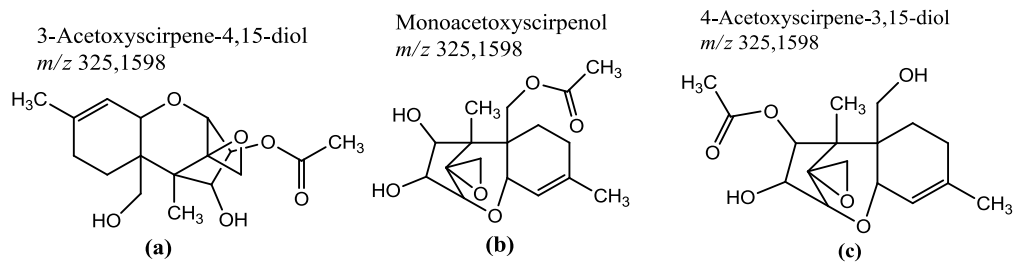
Figura 96 - TOCSY 1D do extrato bruto de *Fusarium oxysporum* (vermelho), e espectro da beauvericina simulado (azul).



Para o extrato de *Fusarium oxysporum*, também foram observadas algumas massas de alta resolução compatíveis com metabólitos já identificados para espécies de *Fusarium* relatadas na literatura, porém, nos experimentos de MS² realizados, não foi possível observar os seus fragmentos para confirmar com mais certeza a presença desses compostos. A figura 99 apresenta as estruturas moleculares desses compostos e a figura 100 apresenta os seus espectros de massas obtidos.

Para um tricotoceno (Figura 97 e 98) foi possível observar somente a perda de uma molécula de água.

Figura 97- Estrutura molecular dos tricotocenos sugeridos para a massa m/z 325,1598.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 98 - Espectro de massas, MS^2 , do composto m/z 325,1598, que apresenta a perda de uma molécula de água com m/z 307.

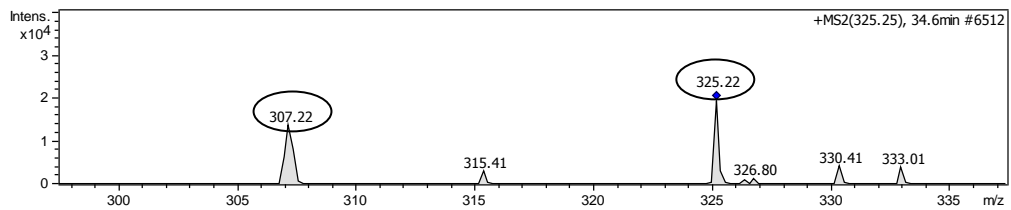
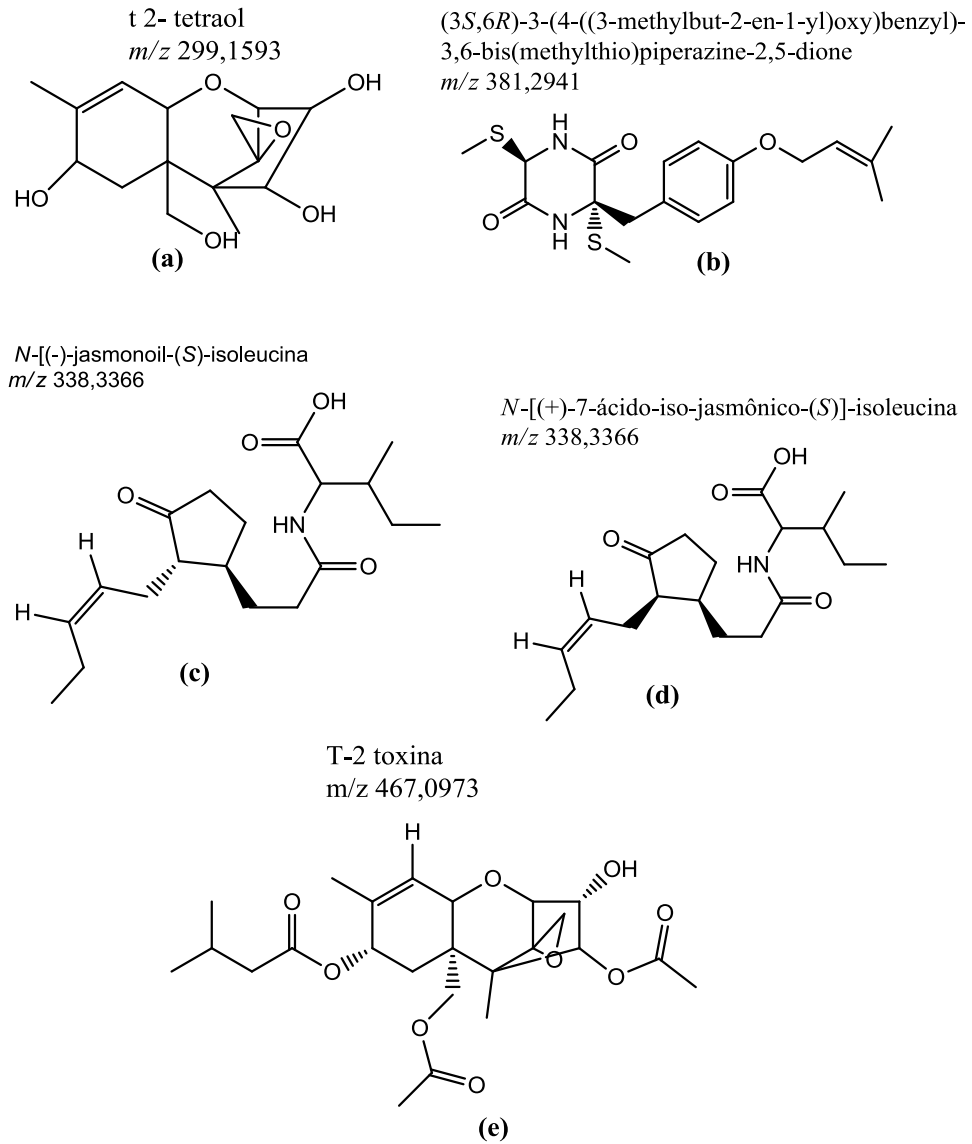


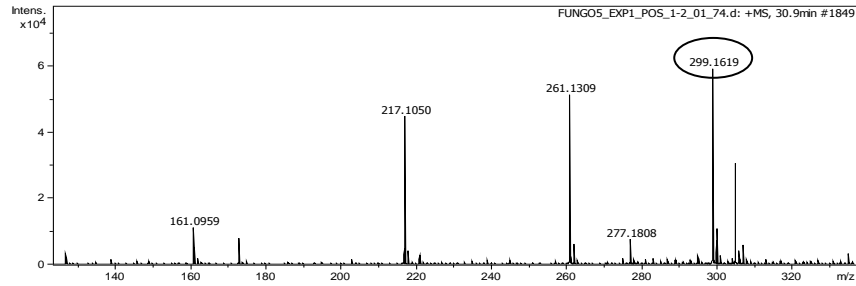
Figura 99 - Estrutura molecular de compostos relacionados para o extrato de *Fusarium oxysporum*.



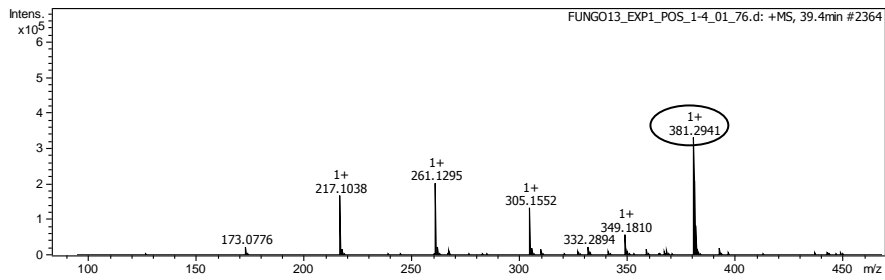
Fonte: elaborada pela autora.

Figura 100 - Espectro de massas de alta resolução, dos compostos da figura 85.

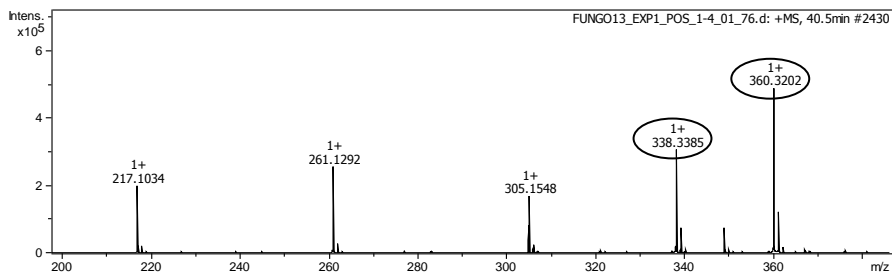
Composto (a)



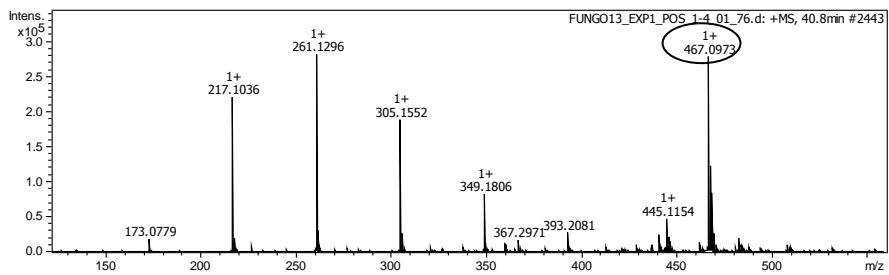
Composto (b)



Composto (c) ou (d)



Composto (e)

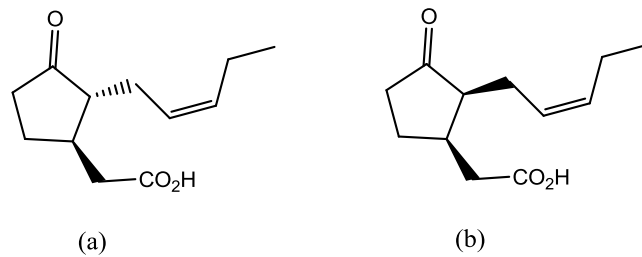


Fusarium solani

Em 18,8 minutos foi observado o composto de massa de alta resolução $[M+H]^+$ 211,0962 e que apresentou fragmentos, no experimento MS^2 , de m/z 193 referente a perda de uma molécula de água e m/z 181 referente a perda de monóxido de carbono gerando a contração do anel (Figura 102 e 103). Esse metabólito pode ser definido como sendo (-)-ácido jasmônico ou seu diastereoisômero ácido (+)-7-iso-jasmônico (Figura 101).

Esses metabólitos são jasmonatos já descritos para a espécie *Fusarium oxysporum* (MIERSCHA et al., 1999).

Figura 101 - Estrutura de (a) (-)-ácido jasmônico e (b) ácido (+)-7-iso-jasmônico.



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 102 - Espectro de massas, MS^2 , de (-)-ácido jasmônico ou seu diastereoisômero ácido (+)-7-iso-jasmônico.

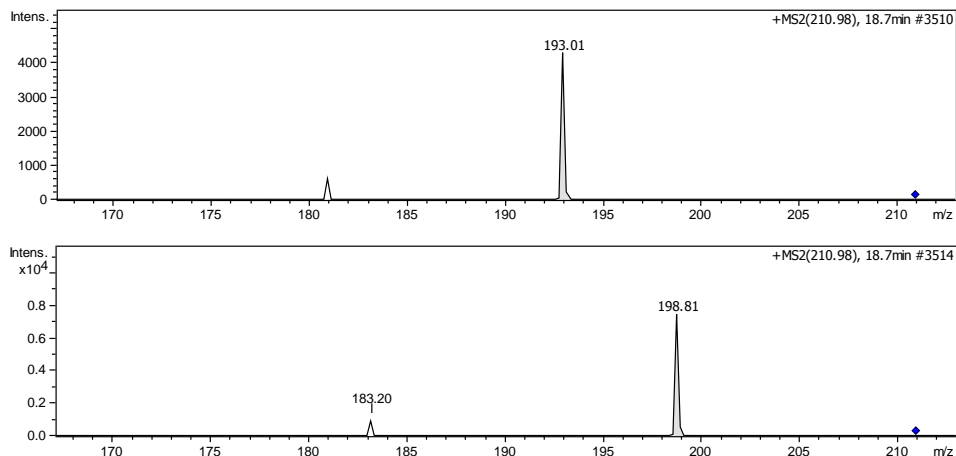
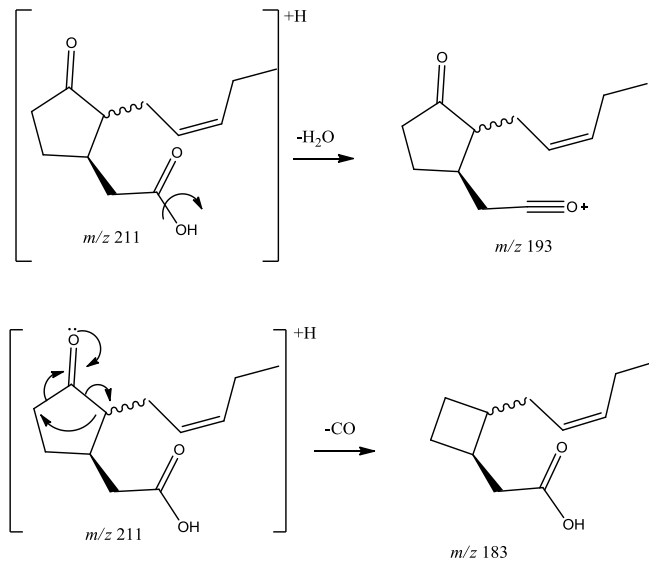


Figura 103 - Proposta de fragmentação do (-)-ácido jasmônico ou seu diastereoisômero ácido (+)-7-*iso*-jasmônico..



Fonte: elaborada pela autora.

Em 26,9 minutos foi observado o composto de massa de alta resolução $[M+H]^+$ 365,1945, com fragmentação, MS^2 , de m/z 347 referente a perda de uma molécula de água e m/z 321 referente a uma reação Retro-Diels-Alder que ocorre eliminando CO_2 (Figura 104 e 105), característico do composto 10-hidroxicamptotecina.

Esse metabólito já foi identificado em *Fusarium solani* e é considerado um composto precursor para a síntese de drogas anti-câncer, assim como o seu análogo muito conhecido, camptotecina (SHWETA et al., 2010).

Figura 104 - Espectro de massas de 10-hidroxicamptotecina.

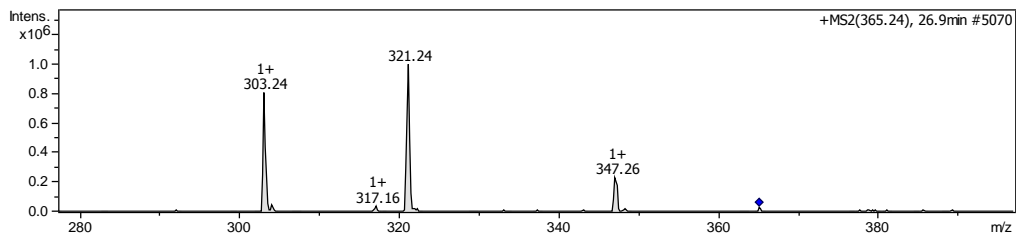
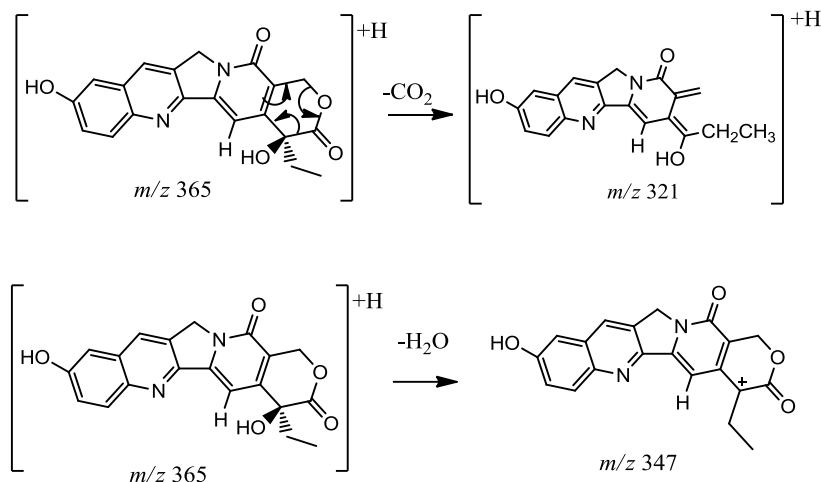


Figura 105 - Proposta de fragmentação do composto 10-hidroxicamptotecina.



Fonte: elaborada pela autora.

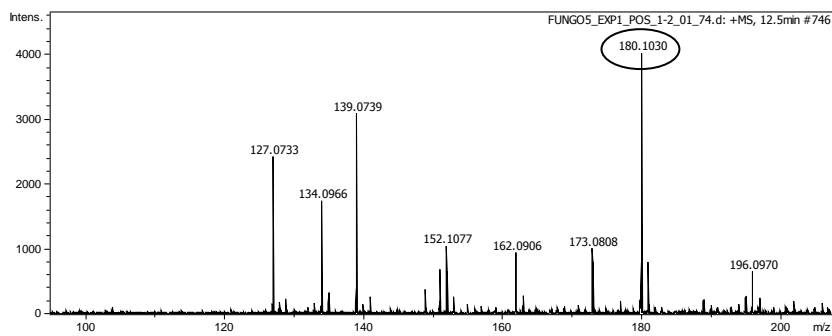
Para o extrato de *Fusarium solani* alguns íons aparecem no mesmo tempo de retenção que para o extrato *Fusarium oxysporum*, com a mesma massa molecular, sendo assim deduz-se que se tratam dos mesmos compostos identificados nas duas espécies. E seus espectros de massa de alta resolução são apresentados na figura 106. Os compostos em comum são:

- (a) ácido fusárico ($[M+H]^+$ 180,1030),
- (b) T-2-tetraol ($[M+H]^+$ 299,1621),
- (c) *monoacetoxyscirpenol*, *4-acetoxyscirpene-3,15-diol* ou *3-acetoxyscirpene-4,15-diol* ($[M+H]^+$ 325,1629),
- (d) beauvericina ($[M+Na]^+$ 806,3960),
- (e) (3*S*,6*R*)-3-(4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)benzyl)-3,6-bis(methylthio)piperazine-2,5-dione ($[M+H]^+$ 381,2969),
- (f) *N*-[(-)-jasmonoyl-(*S*)-isoleucine] ou *N*-[(+)-7-iso-jasmonic acid-(*S*)]-isoleucine ($[M+H]^+$ 338,3412),
- (g) T-2 toxina ($[M+H]^+$ 467,1004),
- (h) armillaripina ou armillarina ($[M+H]^+$ 437,1934),
- (i) C16-esfinganina ($[M+H]^+$ 274,2759),
- (j) xestoaminol C ($[M+H]^+$ 230,2491).

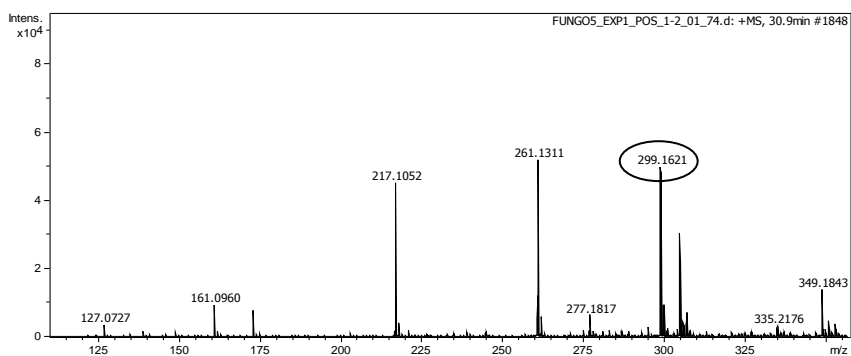
Porém, para *F. solani*, alguns compostos, principalmente beauvericina e ácido fusárico apresentaram-se de forma muito minoritária, diferente do que ocorre para *F. oxysporum*.

Figura 106 - Espectro de massas de alta resolução dos compostos de *F. solani* iguais aos de *Fusarium oxysporum*.

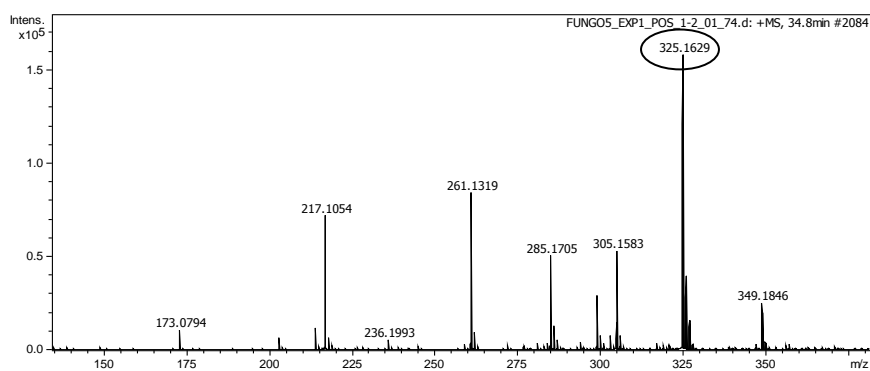
(a) ácido fusárico

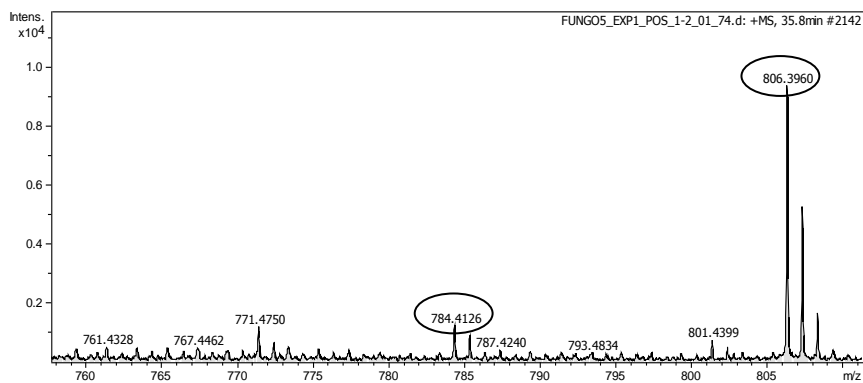
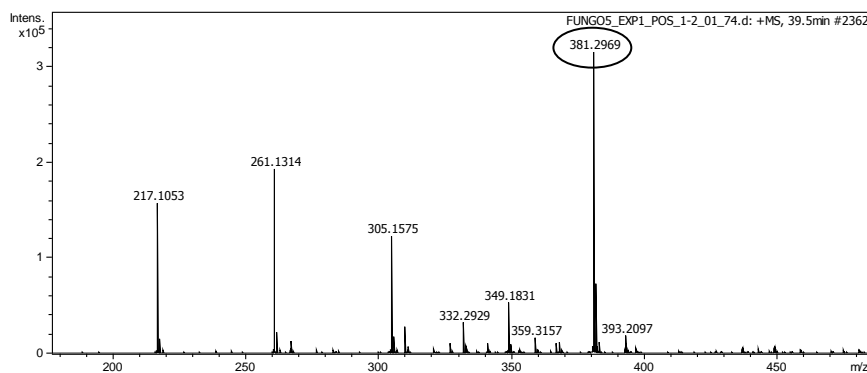
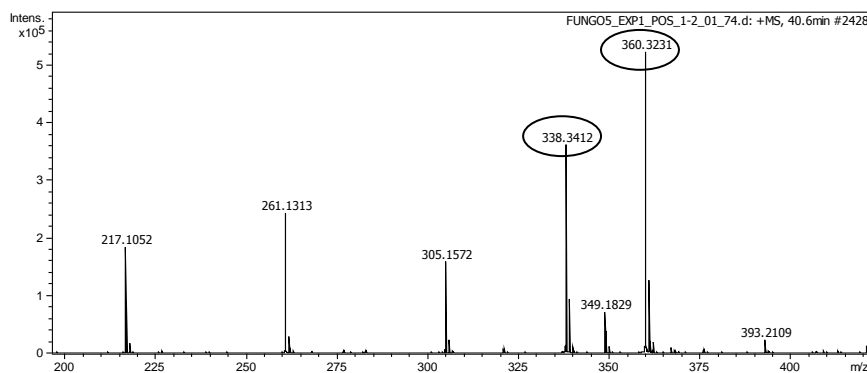


(b) T-2-tetraol

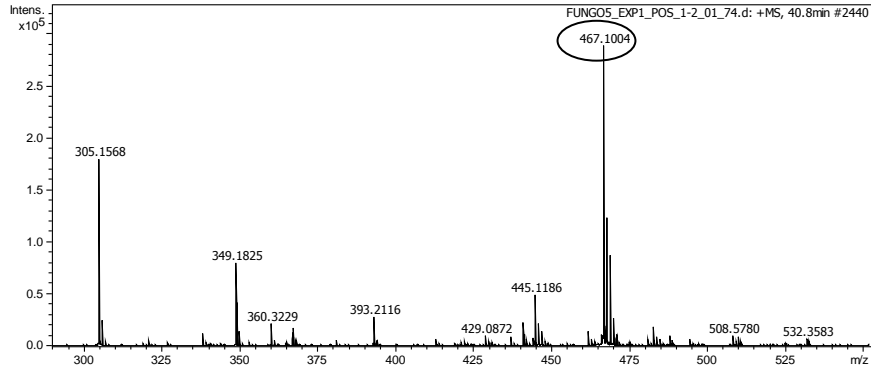


(c) monoacetoxyscirpenol, 4-acetoxyscirpene-3,15-diol ou 3-acetoxyscirpene-4,15-diol

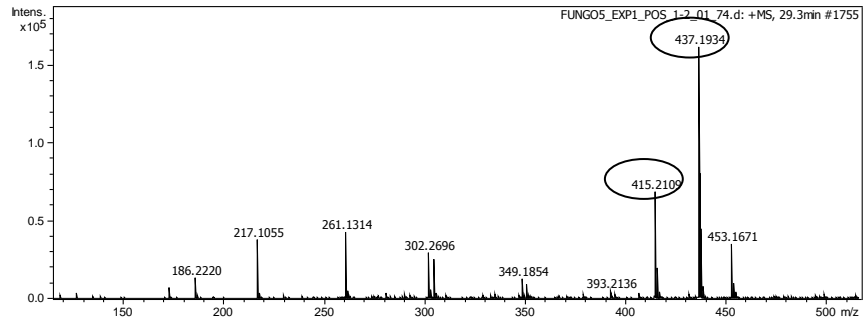


(d) beauvericina**(e) (3*S*,6*R*)-3-(4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)benzyl)-3,6-bis(methylthio)piperazine-2,5-dione****(f) *N*-[(-)-jasmonoil-(*S*)-isoleucina ou ácido *N*-[(+)-7-*iso*-jasmônico(*S*)]-isoleucina**

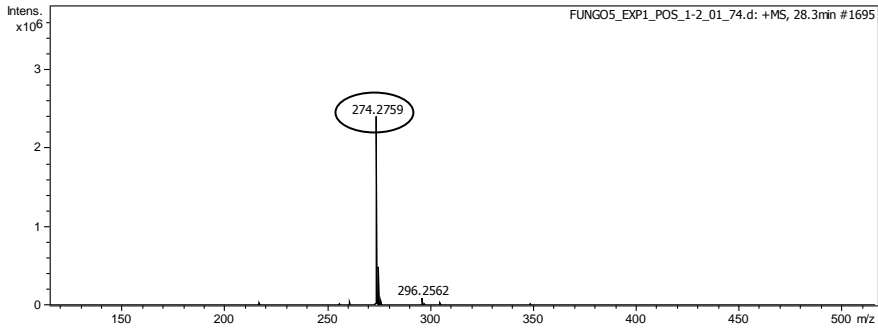
(g) T-2 toxina



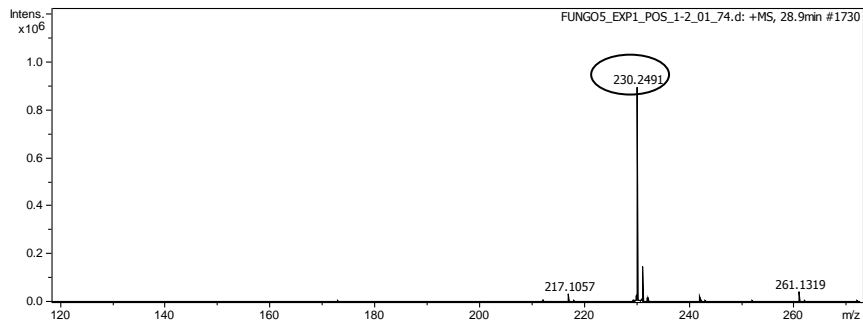
(h) armillarina ou armillaripina



(i) C16-esfinganina



(j) xestoaminol C



5 CONCLUSÕES

Neste trabalho de mestrado, grande parte dos fungos escolhidos para os testes preliminares, foram identificados como o gênero *Fusarium*, variando entre as espécies *solani* e *oxysporum*, fato que foi constatado devido às similaridades observadas em meio de cultivo sólido e no perfil por CLAE-DAD e RMN.

A maior parte das espécies de *Fusarium* apresenta muitos estudos químicos relatados na literatura viabilizando o desenvolvimento e aplicação da técnica de desrepliação dos extratos em estudo.

Os dois fungos escolhidos para o desenvolvimento do trabalho foram *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, ambos apresentando atividade biológica promissora anticolinesterásica e antifúngica contra os fungos patogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, além do extrato de *F. oxysporum* ter sido o único a apresentar atividade citotóxica contra câncer do colorretal.

A desrepliação nos forneceu resultados satisfatórios, com auxílio das técnicas CG-EM, CLAE-EM, CLAE-EM/EM e RMN, sendo que para *F. solani* foram identificados 12 metabólitos (ácido fumárico, ácido málico, tirosol, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido azelaico, ácido fusárico, (-)-ácido jasmônico/ácido (+)-7-*iso*-jasmônico, 10-hidroxicaptotecina, C-16-esfinganina, xestoaminol C, armilarina/armilaripina e beauvericina), 4 já relatados para essa espécie, 1 identificados em outras espécies de *Fusarium*. E para o extrato do fungo *F. oxysporum*, 14 metabólitos foram identificados (ácido succínico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, ácido fusárico e três derivados, integracédeo C, fusagerina C/D, C-16-esfinganina, xestoaminol C, armilarina/armilaripina e beauvericina), sendo 5 já relatados para essa espécie, 3 identificados em outras espécies de *Fusarium*.

E de todos esses metabólitos identificados, 5 deles foram iguais para as duas espécies.

Além desses compostos, outros cinco metabólitos comuns às espécies *solani* e *oxysporum* não puderam ser estruturalmente caracterizados por CLAE-EM/EM, no entanto, suas massas moleculares foram condizentes com compostos já relatados para espécies de *Fusarium* na literatura.

Outra observação importante foi a utilização do meio líquido czapek, que se trata de um meio pobre, mas, no entanto, o fungo *F. oxysporum* foi capaz de produzir dois compostos majoritários de alto valor agregado e que possuem promissoras atividades biológicas relatadas na literatura, sendo eles ácido fusárico e beauvericina.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A abordagem da desreplicação hoje é uma ferramenta interessante, quando se trata de sua aplicação em produtos naturais, tendo em vista o alto conhecimento prévio de compostos já relatados e depositados em bancos de dados para as fontes de produtos naturais. Dessa forma pudemos trabalhar, nesta dissertação, no conhecimento da composição do extrato de dois fungos nos quais já encontravam-se muitos compostos produzidos por eles em bases de dados. E sem a necessidade de isolamento pudemos identificar alguns metabólitos que ainda não haviam sido identificados para essas espécies, aplicando informações já arquivadas, visando a abordagem da química verde, sem o uso desnecessário de solventes orgânicos, por exemplo.

Além disso essa ferramenta pode nos auxiliar muito nos estudos metabolômicos que fazem parte das pesquisas em nosso grupo de pesquisa.

Após desenvolver um conhecimento prévio do extrato, ele se apresenta mais interessante no momento de isolar compostos ou de trabalhar com uma complexidade maior como no caso de co-cultivos com micro-organismos, que é estratégia sugerida para trabalhos futuros na busca por compostos bioativos e no isolamento de compostos que não constam nas bases de dados.

A relevância dessas discussões pretendem nos levar a conhecer a produção de compostos por esses micro-organismos da rizosfera e sua relação com a planta *Senna spectabilis* e, o que todo esse universo pode nos fornecer como fontes interessantes de compostos bioativos ou de alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

- AGILENT TECHNOLOGIES. **Maintaining your Agilent GC and GC/MS systems**. Disponível em: <<http://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/public/5990-5451EN.pdf>>. Acesso em: 17 de jun. 2015.
- ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- ANTEQUERA, P.; GARCIA-CONCA, V.; MARTÍN-GONZÁLEZ, C.; ORTIZ-DE-LA-TABLA, V. Queratitis por *Fusarium* multirresistente. **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, v. 90, n. 8, p. 382-384, abr. 2015.
- AYDOGAN, C.; KARAKOÇ, V.; DENIZLI, A. Chiral ligand-exchange separation and determination of malic acid enantiomers in apple juice by open-tubular capillary electrochromatography. **Food Chemistry**, v. 187, p. 130-134, Nov. 2015.
- BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039-4043, Nov. 1996.
- BAEZA, L. C.; MATSUMOTO, M. T.; ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by randomly amplified polymorphic DNA and analysis of rDNA nontranscribed spacer. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 429-436, Apr. 2006.
- BANI, M.; RISPAIL, N.; EVIDENTE, A.; RUBIALES, D.; CIMMINO, A. Identification of the main toxins isolated from *Fusarium oxysporum f. sp. pisi* race 2 and their relation with isolates' pathogenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 12, p. 2574-2580, Mar. 2014.
- BAREA, J. M.; AZCÓN R.; AZCÓN-AGUILAR, C. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, p. 343-35, Aug. 2002.
- BROWN, J. R. Ancient horizontal gene transfer. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 121-132, Feb. 2003.
- CARDOSO, P. **Metabolomic evaluation of interactions in rizosphere between *Senna spectabilis* and associated microorganisms**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- CARVALHO, V. O.; VICENTE, V. A.; WERNER, B.; GOMES, R. R.; FORNARI, G.; HERKERT, P. F.; RODRIGUES, C. O.; ABAGGE, K. T.; ROBL, R.; CAMIÑA, R. H. Onychomycosis by *Fusarium oxysporum* probably acquired in utero. **Medical Mycology Case Reports**, v. 6, p. 58-61, Oct. 2014.
- CHEN, A. C. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in scleractinian corals. **Zoological Studies**, v. 43, n. 4, p. 759-771, June 2004.

CHEN, H. J.; AWAKAWA, T.; SUN, J. Y.; WAKIMOTO, T.; ABE, I. Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. **Natural Products and Biopropecting**, v. 3, p. 20-23, Feb. 2013.

CHEN, W.; MA, L.; ZHOU, P.-P.; ZHU, Y.-M.; WANG, X.-P.; LUO, X.-A.; BAO, Z.-D.; YU, L. J. A novel feedstock for biodiesel production: the application of palmitic acid from *Schizochytrium*. **Energy**, v. 86, p. 128-138, June 2015.

CLARIDGE, C. A.; SCHMITZ, H. Production of 3-acetoxyscirpene-4, 15-diol from anguidine (4, 15-diacetoxyscirpene-3-ol) by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 693-696, Apr. 1979.

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

CORDIER, C.; LEMOINE, M. C.; LEMANCEAU, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. The beneficial rhizosphere: a necessary strategy for microplant production. **Acta Horticulturae**, v. 530, p. 259-265, Sept. 1999.

DAVIES, J. Darwin and microbiomes. **Embo Reports**, v. 10, p. 805, Aug. 2009.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 499-514, Oct. 2000.

ECOLOGIA da rizosfera e filosfera. **Embrapa e Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/unidade/index.php3?id=228&func=unid>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

EKUNDAYO, F. O.; OLADUNMOYE, M. K. Influence of benomyl on ability of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* to produce beauvericin and rhizosphere organisms of cow pea. **International Journal of Soil Science**, v. 2, n. 2, p. 135-141, 2007.

ENGEL, C. A. R.; STRAATHF, J. J.; ZIJLMANS, T. W.; GULIK, W. M.; WIELEN, L. A. M. Fumaric acid production by fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 379-389, Mar. 2008.

FANG, K.; PAN, X. J.; HUANG, B.; LIU, J. L.; WANG, Y.; GAO, J. P. Progress on keto groups derivatization of steroid hormones in gas chromatography-mass spectrometry analysis. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, p. 743-751, May 2010.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 12-16, 2000.

GAO, L. W.; LI, W. Y.; ZHAO, Y. L.; WANG, J. W. The cultivation, bioactive components and pharmacological effects of *Armillaria mellea*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, p. 7383-7390, Dec. 2009.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; PUPO, M. T. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from endophytic fungi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 188-194, 2009.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F. de; SILVA, C. H. T. P. da; LOPES, N. P.; DIAS, L. G.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I. G.; PUPO, M. T. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v.71, p.1423-1429, Aug. 2010.

GULLBERG, J.; MORITZ, T.; SJÖSTRÖM, M.; NORDSTRÖM, A.; JONSSON, P. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, p. 283-295, Aug. 2004.

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

HOCQUETTE, A.; GRONDIN, M.; BERTOUT, S.; MALLIÉ, M. Les champignons des genres *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* et *Scopulariopsis* responsables de hyalohyphomycoses. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 15, p. 136-149, 2005.

HU, L.; RYCHLIK, M. Biosynthesis of ¹⁵N₃-labeled enniatins and beauvericin and their application to stable isotope dilution assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7129-7136, July 2012.

HYOHAK, S.; SANG, Y. L. Production of succinic acid by bacterial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 352-361, July 2006.

ICHIHASHI, M.; MORI, K. Determination of the absolute configuration of (+)-xestoaminol C [(2 S, 3 R)-2-amino-3-tetradecanol], a metabolite of fiji sponge, *Xestospongia* sp., by the synthesis of its N,O-Diacetyl derivative. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 2, p. 329-333, 2003.

IMATHIU, S. M.; EDWARDS, S. G.; RAY, R. V.; BACK, M. A. *Fusarium langsethiae* - a HT-2 and T-2 toxins producer that needs more attention. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 1, p. 1-10, 2013.

KETTERING, M.; WEBER, D.; STERNER, O.; ANKEM, T. Secondary metabolites of fungi – functions and uses. **BIOspectrum**, v. 10, p. 147-149, 2004.

KIM, K. H.; LEE, Y. W.; MIROCHA, C. J.; PAWLOSZY, R. J. Isoverrucarol production by *Fusarium oxysporum* CJS-12 isolated from corn. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 260-263, Jan. 1990.

KONGKIAT, T.; VATCHARIUN, R.; KAWITSARA, B.; SOUWALAK, P.; JARIYA, S. Pyrone derivatives from the soil fungus *Fusarium solani* PSU-RSPG37. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 495-497, Aug. 2013.

KUNAMNENI, A.; CAMARERO, S.; GARCÍA-BURGOS, C.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 32, Nov. 2008. doi:10.1186/1475-2859-7-32.

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, n. 9, p. 1595-1599, Aug. 2008.

LEE, W. L.; SHIAU, J. Y.; SHYUR, L. F. Taxol, camptothecin and beyond for cancer therapy. **Advances in Botanical Research**, v. 62, p. 134-166, 2012.

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, July 2009.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; CASTELLA, G.; KOSTECKI, M.; GOLINSKI, P.; RITIENI, A.; CHELKOWSKI, J. Beauvericin production by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 3084-3088, Aug. 1998.

LUBIAN, C. T.; TEIXEIRA, J. M.; LUND, R. G.; NASCENTE, P. S.; DEL PINO, F. A. B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 157-162, fev. 2010.

LUPATINI, M.; MELLO, A. H. de; ANTONIOLLI, Z. I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* w. hill ex- maiden. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32 p. 2677-2682, Oct./Dec. 2008.

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

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.

MATIOLLI, S. R. **Introdução ao estudo dos QTLs (Locos de caracteres quantitativos)**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências. Marcadores moleculares. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/evolucao/QTL/marcadores.html>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

MELO, G. A. M.; SILVA, M. R. C.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTA, C. B. B.; QUEIROZ, A. C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. da S.; MOREIRA-ALEXANDRE, M. S.; VIEGAS JÚNIOR, C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 277-281, Feb. 2014.

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

MIROCHA, C. J.; ABBAS, H. K.; KOMMEDAHL, T.; JARVIS, B. B. Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis spp.* from Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 254-255, Jan. 1989.

MIYAMOTO, C. A. Produção de proteínas recombinantes *Escherichia coli*. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 220-233, 2013.

MIYAUCHI, M. Y. H. **Biocontrole de fungos fitopatogênicos por actinobactérias isoladas de rizosfera de *Araucaria angustifolia***. 2012. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

MYCOLOGI ONLINE. ***Fusarium sp.*** Adelaide. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/)>. Acesso em: 19 jun. 2015.

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, Feb. 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, June 2013.

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, July 2009.

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

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 129-135, Feb. 2004.

OECD SIDS. **4-hydroxybenzoic acid**. [S.l.]: Unep Publication, 1999. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/99967.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

- PANYOSAK, A.; MANOSROI, J.; ROJANASAKUL, Y.; MANOSROI, A. Safety assessment of azelaic acid and its derivatives entrapped in nanovesicles. **Human & Experimental Toxicology**, v. 28, n. 6/7, p. 387-392, June 2009.
- PATHRE, S. V.; MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M.; BEHRENS, J. Monoacetoxyscirpenol. New mycotoxin produced by *Fusarium roseum* Gibbosum. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 97-103, Jan./Feb. 1976.
- PIVATO, M. **Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla***. 2005, 137 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
- PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC coupled to diode array detector (DAD) and GC-MS after silylation. **Foods**, v. 2, n. 1, p. 90-99, Mar. 2013.
- SAGIRI, S. S.; VINAY, K. S.; BANERJEE, I.; BASAK, P. Stearic acid based oleogels: a study on the molecular, thermal and mechanical properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 688-699, Mar. 2015.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.
- SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 185-190, jan./fev. 2001.
- SCRIABINE, A. Discovery and development of major drugs currently in use. In: ACHILLADELIS, B.; LANDAU, R.; SCRIABINE, A. (Ed.). **Pharmaceutical innovation: revolutionizing human health**. Philadelphia: Chemical Heritage Press, c1999. Chap. 2, p. 148-165.
- SHAIKH, Z.; QURESHI, P. Screening and isolation of organic acid producers from samples of diverse habitats. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n. 9, p. 39-44, 2013.
- SHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Micological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, June 2005.
- SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; KUMAR, P. M.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; SHAANKER, R. U. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 117-122, Jan. 2010.
- SIGMA ALDRICH. **Beauvericin**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b7510?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 10 de nov. 2015a.

SIGMA ALDRICH. **Fusaric acid**. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/f6513?lang=pt®ion=BR>>.

Acesso em: 10 de nov. 2015b.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38-46, Aug. 2010.

SILVA, F. O.; OLIVEIRA, Í. R.; SILVA, M. G. V. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. *excelsa* (Schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874-1876, Sept. 2010.

SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; FENG, D.; FREITAS, R. M. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 255-259, Mar. 2011.

SINGH, S. B.; ZINK, D. L.; DOMBROWSKI, A. W.; POLISHOOK, J. D.; ONDEYKA, J. G.; HIRSHFIELD, J.; HAZUDA, D. J. Integracides: tetracyclic triterpenoid inhibitors of HIV-1 integrase produced by *Fusarium* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 1577-1582, 2003.

SMALL, I. M.; FLETT, B. C.; MARASAS, W. F. O.; McLEOD, A.; VILJOEN, A. Use of resistance elicitors to reduce *Fusarium* ear rot and fumonisin accumulation in maize. **Crop Protectio**, v. 41, p. 10-16, Nov. 2012.

SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Anticholinesterase activity os the *Fusarium* metabolite visoltricin and its *N*-methyl derivative. **Toxicol in Vitro**, v. 8, n. 3, p. 461-465, June 1994.

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

SONG, J. J.; YEE, N. K. A concise synthesis of fusaric acid and (S)-(+)-fusarinolic acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 605-608, Jan. 2001.

SPECIAN, M.; SARRAGIOTTO, M. H.; PAMPHILE, J. A.; CLEMENTE, E. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1174-1182, July/Sept. 2012.

STIERLE, A; STROBEL, G; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, p. 216-216, Apr. 1993.

STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S.; LIU, J.; BELL, A.A. Phytotoxicity of fusaric acid and analogs to cotton. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 176-178, Jan. 2011.

SUGIMOTO, Y.; AHMED, N. E.; YASUDA, N.; INANAGA, S. Trichothecene inhibitors of *Striga hermonthica* germination produced by *Fusarium solani*. **Weed Science Society of America**, v. 50, n. 5, p. 658-661, Oct. 2002.

TAJIK, S.; TAHER, M. A.; BEITOLLAHI, H.; MAHANI, M. T. Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a ds-DNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor. **Talanta**, v. 134, p. 60-64, Mar. 2015.

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.

VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1/2, p. 53-56, Aug. 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. da 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, n. 5, p. 908-910, May 2004.

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. da S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, nov./dez. 2006.

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

WANG, Q.; XU, L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2367-2377, Feb. 2012.

WANG, W.; JONES, C.; CIACCI-ZANELLA, J.; HOLT, T.; GILCHRIST, D. G.; DICKMAN, M. B. Fumonisin and *Alternaria alternata lycopersici* toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 8, p. 3461-3465, Apr. 1996.

WEN, H.; LI, Y.; LIU, X.; YE, W.; YAO, X.; CHE, Y. Fusagerins A-F, new alkaloids from the Fungus *Fusarium* sp. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 5, n. 4, p. 195-203, Sept. 2015.

WHARTON, P. S.; KIRK, W. W. Evaluation of biological seed treatments in combination with management practices for the control of *Fusarium* dry rot of potato. **Biological Control**, v. 73, p. 23-30, June 2014.

ZANG, Q.; YANG, Y.; CHENG, L.; CAO, C.; DING, Z.; WANG, C.; YANG, W.; HU, Y.; LI, Y. Thermodynamic models for determination of the solubility of DL-malic acid in methanol plus (acetonitrile, N,N-dimethylformamide, isopropyl alcohol) binary solvent mixtures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 85, p. 148-154, June 2015.

ZHENGXIONG, Z.; GUOCHENG, D.; ZHAOZHE, H.; JINGWEN, Z.; CHEN, J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 9345-9349, Oct. 2011.