



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Química



RICHARD PEROSA FERNANDES

Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e
Phomopsis cassiae isolados de *Senna spectabilis*

Araraquara
2017

RICHARD PEROSA FERNANDES

Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae*
isolados de *Senna spectabilis*

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Co-orientador: Dr. Alan Cesar Pilon

Araraquara
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

F363e Fernandes, Richard Perosa
Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae* isolados de *Senna spectabilis*/ Richard Perosa Fernandes. – Araraquara : [s.n.], 2017
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Ian Castro-Gamboa

Coorientador: Alan Cesar Pilon

1. Microorganismos. 2. Fungos-cultura e meios de cultura.
3. Metabólitos. 4. Compostos bioativos. 5. Quimiometria. I. Título.

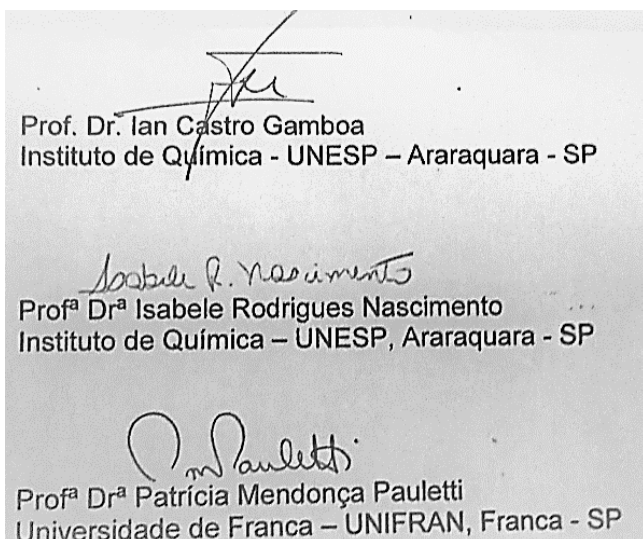
RICHARD PEROSA FERNANDES

Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae*
isolados de *Senna spectabilis*

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

Araraquara, 20 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA



DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Richard Perosa Fernandes

Data de Nascimento: 13 de março de 1991

Naturalidade: Maracaju – MS

Nacionalidade: Brasileiro

Filiação: Pai: Joaquim Alves Fernandes Mãe: Eliane Maria Perosa Fernandes

Nome em citações bibliográficas: Fernandes, R. P.

Endereço profissional

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Rua Prof. Francisco
Degni, 55, Bairro Quitandinha, CEP: 14800-060 – Araraquara, SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2015-2017: Mestrado em Química

Área de Concentração: Química Orgânica.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IQ-UNESP, Araraquara.

Dissertação: Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae* isolados de *Senna spectabilis*

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Bolsa: CNPq.

2016: Licenciatura em Química.

Faculdade Associação Brasil, FAB

2009-2014: Bacharelado em Química com ênfase tecnológica.

Universidade Federal de São Carlos, UFSCar

Monografia: Avaliação do perfil espectral de elementos químicos em poeira no campus São Carlos da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

3. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentação de trabalhos

BARSANELLI, P. L.; FERNANDES, R. P.; AUGUSTO, A. S.; PEREIRA, F. M. V. Prediction of Ca content in fortified food using LIBS and chemometrics. In: II Workshop sobre Laser em Química Analítica, São Carlos, 2015.

FERNANDES, R. P.; PAVANI, V. D.; CARDOSO, P.; PILON, A. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Indução de metabólitos através da co-cultura de fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani* isolados da rizosfera de *Senna spectabilis*. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal, 2016.

PAVANI, V. D.; FERNANDES, R. P.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P. Desreplicação dos metabólitos produzidos por *Fusarium oxysporum* isolado da rizosfera de *Senna spectabilis*. In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Agropecuária, Agrícola e Ambiental, Jaboticabal, 2016.

PAVANI, V. D.; FERNANDES, R. P.; TRINDADE, R. N.; CARDOSO, P.; CASTRO-GAMBOA, I. Co-cultivo em meio solido de *Fusarium solani* e *Shigella* sp visando a identificação de novos compostos. In: Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, Goiânia, 2016.

Participação em eventos científicos

Workshop: Ano Internacional da Luz – IYL 2015, realizado no dia 5 de março de 2015, Instituto de Química, UNESP-Araraquara.

II Workshop sobre Laser em Química Analítica, realizado no período de 27 a 31 de julho de 2015, Departamento de Química, UFSCar – São Carlos.

1º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Agropecuária, Agrícola e Ambiental, realizado no período de 09 a 12 de maio, 2016, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Jaboticabal.

Artigos

FERNANDES, R. P.; PAVANI, V. D.; CARDOSO, P.; PILON, A. C.; CASTRO-GAMBOA, I. Metabolite induction by co-culture of the *Fusarium oxysporum* and *F. solani* fungi isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere. **Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. 1, 2016.

PAVANI, V. D.; FERNANDES, R. P.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P.; Desreplication of metabolites produced by *Fusarium oxysporum* isolated from *Senna spectabilis*'s rhizosphere. **Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. 1, 2016.

4. ESTÁGIOS E BOLSAS

Estágio curricular obrigatório na Escola Estadual Manoel Ferreira de Lima (Maracaju – MS), realizado no período de março a junho de 2016.

Estágio docência na disciplina de Química Orgânica II no Instituto de Química, IQ-UNESP, orientado pelo Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa, (Araraquara – SP), realizado no período de junho a dezembro de 2015.

Estágio curricular obrigatório no Grupo de Análise Instrumental Aplicada, UFSCar (São Carlos – SP), realizado no período de janeiro a junho de 2014.

Bolsa do programa de Tutoria do Departamento de Matemática, referente a disciplina básica de Matemática: Cálculo, de março a junho de 2014.

Aos meus pais, Joaquim e Eliane.

*Exemplos de, honestidade, respeito e perseverança.
Por me guiar durante minhas dificuldades e me
incentivar a seguir adiante independente dos
problemas enfrentados*

Aos meus tios, Silvana e João.

*Por todo apoio e incentivo que me deram durante
todos esses anos, estando presentes e ajudando em
todas as etapas e desafios de minha vida.*

Ao Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa.

*Por aceitar ser meu orientador, pela amizade,
paciência, competência, dedicação e pelo imenso
carinho e respeito. Suas inúmeras qualidades
contribuíram para o meu crescimento profissional
e pessoal. Obrigado por tudo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me auxiliarem durante todos os momentos de minha vida. Muito obrigado pelas inúmeras demonstrações de afeto e carinho. Mesmo com tantos obstáculos, demonstraram sempre força e perseverança para seguir adiante.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ian, pela amizade, pelas conversas e ensinamentos filosóficos sobre a vida. Obrigado pela oportunidade que me deu em um momento de dificuldade, pela paciência e dedicação, levarei seus ensinamentos pelo resto da vida, tanto pessoal, quanto profissional.

Ao meu co-orientador Dr. Alan, pelos conselhos e colaboração no decorrer do mestrado.

Aos meus colegas de grupo: Afif, Patrícia, Denise, Alan, Laura, Natália. Em especial ao Victor, por toda paciência e dedicação que teve comigo durante o mestrado, tanto dentro, como fora do laboratório.

Aos meus colegas da UFSCar: Rogério, Binho, Ivanor e Diego, grandes amigos que levo comigo desde a graduação.

Aos amigos que estão comigo a longas datas, mesmo à distância: Guilherme (Bolacha), Franklin (Crius) e Henrique (Rik). Em especial ao meu grande amigo Caio Hagge, parceiro e irmão.

Ao Roberth, pela amizade, bebedeiras e conversas durante diversas noites.

Ao meu grande amigo José Augusto, pelo companheirismo, prosas, cervejas e pelo que a de vir.

À Renata, pelos incentivos e conselhos que me deu para que fizesse mestrado, preocupando-se sempre com minha vida pessoal e profissional.

Ao Nivaldo e a Lucineia, pelos espectros de RMN.

À Juliana e o João, pela paciência e ensinamentos

Aos amigos, professores e funcionários do Instituto de Química de Araraquara - UNESP.

Aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação, por serem sempre prestativos.

A todos os funcionários do Instituto de Química de Araraquara.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

"In any war, there are calms between storms. There will be days when we lose faith. Days when our allies turn against us... but the day that we give up should never come."

- Optimus Prime

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos".

- Charlie Chaplin

"A causa da derrota, não está nos obstáculos, ou no rigor das circunstâncias, está na falta de determinação e desistência da própria pessoa".

- Buda

"Não confunda derrotas com fracasso, nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias".

- Roberto Shinyashiki

RESUMO

Nos últimos anos, a busca por compostos bioativos oriundos de rotas metabólicas silenciadas (em microrganismos) tem levado o desenvolvimento de novas ferramentas analíticas assim como a aplicação de diferentes metodologias. Uma das mais importantes estratégias para acessar tal produção metabólica é o uso de cultivos em co-cultura, onde a interação entre dois ou mais microrganismos pode mimetizar, de certa maneira, as relações tróficas existentes na natureza. A relação de competição por nutrientes e espaço leva a produção de enzimas e compostos relativos a um determinado tipo de interação que pode estar relacionado a reprodução, inibição de crescimento ou estimulação. Neste trabalho, foi realizado o co-cultivo entre os fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae*, ambos isolados da *Senna spectabilis*. A investigação foi direcionada ao encontro de novos produtos naturais biossintetizados pelas espécies em co-cultivo. Para isso, os fungos foram cultivados em meio sólido de batata dextrose ágar. O acompanhamento do crescimento dos fungos visou a observação de possíveis distinções morfológicas de acordo com nível de interação. Os perfis metabólicos dos microrganismos foram obtidos através do uso de técnicas do estado da arte em CLAE-DAD, CG-EM e RMN. Para os fungos em co-cultivo foi possível determinar a presença de cinco substâncias quando comparado aos cultivos isoladamente pela técnica de CLAE-DAD com o auxílio das ferramentas quimiométricas. Os espectros obtidos por RMN de ^1H propiciaram a visualização da existência de sinais únicos presentes no experimento de co-cultivo, porém, sua proporção minoritária impossibilitou a correlação ou identificação dos sinais. A técnica de CG-EM propiciou a sugestão de 30 substâncias através da comparação com o banco de dados NIST.

Palavras Chaves: Microorganismos. Fungos-cultura e meios de cultura. Metabólitos. Compostos bioativos. Quimiometria

ABSTRACT

In recent years, the search for new bioactive compounds has increased the need to develop several methods of analysis, aiming to activate metabolic routes silenced in microorganisms. An important strategy to access the production of distinct secondary metabolites is co-culture, where the interaction between two or more microorganisms occurs, mimicking, to a certain extent, the relationships existing in nature. The competition for nutrients and space leads to the production of enzymes and compounds, which are related to the type of interaction (reproduction, inhibition of growth or stimulation). In this work, co-cultivation was carried out between the fungi *Fusarium solani* and *Phomopsis cassiae*, both isolated from *Senna spectabilis*'s. The research was directed to the encounter of new natural products biosynthesized by the species in co-cultivation. For this, the fungi were cultivated in the solid batata dextrose agar medium, being monitored their growth in order to observe possible distinctions in their morphologies when the interaction occurs. The metabolites profiles of the microorganisms were observed through the LC-DAD, GC-MS and NMR techniques. For the fungi in co-culture it was possible to determine the presence of five substances when compared to the cultures alone by the CLAE-DAD technique with the help of chemometric tools. The spectra obtained by ^1H NMR allowed the visualization of the existence of unique signals present in the co-cultivation experiment, however, its minority proportion made it impossible to correlate or identify the signals. The CG-EM technique provided the suggestion of 30 substances by comparison with the NIST database.

Keywords: Microorganisms. Fungi-culture and culture media. Metabolites. Bioactive compounds. Chemometrics

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata Dextrose Ágar
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
FDA	Food and Drugs Administration
H ₂ O	Água
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
MeOH	Metanol
min.	Minutos
Nipals	Nonlinear Iterative Partial Least Square
PCA	Análise de Componentes Principais
PCs	Componentes Principais
PN	Produtos Naturais
PLS-DA	Mínimos Quadrados Parciais para Análise Discriminante
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
SVD	Singular Value Decomposition
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV/VIS	Ultravioleta e Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fonte de Fármacos aprovados entre 01/1981 a 12/2014.	17
Figura 02 - Exemplo de estruturas de fármacos oriundos de microrganismos.	19
Figura 03 - Exemplo ilustrativo de uma árvore do gênero <i>Senna</i>	20
Figura 04 - Exemplo de substâncias isoladas de <i>Fusarium</i>	22
Figura 05 - Exemplo de substâncias isoladas de <i>Phomopsis</i>	24
Figura 06 - Evolução do número de artigos publicados ao longo dos anos em revistas indexadas na base de dados Web of Science relacionados ao termo “co-culture”.	25
Figura 07 - Ilustração dos tipos de interações presentes em co-cultivo	26
Figura 08 - Exemplo da discriminação entre grupos ao se realizar o cálculo da PCA.	28
Figura 09 - Exemplo de dendograma proveniente do HCA.	29
Figura 10 - Fluxograma geral das metodologias aplicadas	32
Figura 11 - Esquematização das distribuições geométricas dos fungos nos experimentos.	34
Figura 12 - Comparação dos crescimentos dos fungos <i>P. cassiae</i> e <i>F. solani</i> em meio czapek dox ágar.	38
Figura 13 - Comparação dos crescimentos dos fungos <i>P. cassiae</i> e <i>F. solani</i> em meio BDA.	39
Figura 14 - Imagem da frente e verso das placas de Petri dos fungos selecionados em meio BDA, 12 dias.	39
Figura 15 - Evolução temporal do experimento de co-cultivo.	40
Figura 16 - Comparação da interação de inibição a distância em relação a inibição por contato.	41
Figura 17 - Cromatogramas CLAE-DAD em gradiente de metanol dos extratos brutos em PDB, 254 nm.	42
Figura 18 - Cromatogramas em gradiente de acetonitrila dos extratos brutos em PDB, 254 nm.	43
Figura 19 - Comparação das absorbâncias entre metanol e acetonitrila.	44
Figura 20 - Relação entre a mistura de solventes e pressão em uma coluna (STR ODS-II, 150 x 4.6 mm).	44
Figura 21 - Comparação da eluição da cafeína em gradiente metanol e acetonitrila.	45
Figura 22 - Cromatogramas do fungo <i>F. solani</i> seguindo as metodologias com acetonitrila e metanol.	46
Figura 23 - Comparação de um mesmo sinal para diferentes fases moveis.	46
Figura 24 - Exemplificação da diferença de intensidades de absorção máximas.	47
Figura 25 - Exemplificação gráfica de uma matriz com todos os comprimentos de onda.	47
Figura 26 - Cromatogramas do fungo <i>F. solani</i> : refeito com a função MAX e em 254 m.	48
Figura 27 - Dendograma obtido pela análise não supervisionada HCA para o conjunto de dados de CLAE-DAD.	49
Figura 28 - Gráfico de <i>scores</i> das variáveis refeitas de CLAE-DAD.	50
Figura 29 - Elucidação e análise dos grupos formados no gráfico de <i>scores</i>	51
Figura 30 - Gráfico de <i>scores</i> observado tridimensionalmente.	52
Figura 31 - Comparação do gráfico de <i>loadings</i> da PC1 e PC2 com a média das réplicas dos cromatogramas.	53
Figura 32 - Absorções das substâncias induzidas em co-cultivo.	54
Figura 33 - Espectro de ¹ H RMN do fungo <i>F. solani</i> em meio batata dextrose ágar (CD ₃ OD – 600 MHz).	55
Figura 34 - Espectro de ¹ H RMN do fungo <i>P. cassiae</i> em meio batata dextrose ágar (CD ₃ OD – 600 MHz).	56

Figura 35 - Espectro de ^1H RMN do experimento de co-cultivo dos fungos <i>P. cassiae</i> e <i>F. solani</i> em meio batata dextrose ágar (CD_3OD – 600 MHz).	57
Figura 36 - Espectro de ^1H RMN do meio batata dextrose ágar (CD_3OD – 600 MHz).	58
Figura 37 - Diferença de sinais do co-cultivo em relação as culturas isoladas.	59
Figura 38 - Diferença de sinais do co-cultivo em relação as culturas isoladas.	59
Figura 39 - Cromatogramas dos extratos obtidos por CG-EM.	61
Figura 40 - Esquema simplificado das reações de metoximação seguido de sililação.	62
Figura 41 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - N,N'-di(trimetilsilil)ureia.	73
Figura 42 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - trimetilsilil eter de glicerol.	73
Figura 43 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido propanoico, 2,3-di[(trimetilsilil)oxi.	74
Figura 44 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido nonanoico, trimetilsilil ester.	74
Figura 45 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido malico, trimetilsilil, di(trimetilsilil) ester.	75
Figura 46 - Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido Hexanedioico, di(trimetilsilil) ester.	75
Figura 47 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - 3,8-dioxi-2,9-disilildecano.	76
Figura 48 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - butanal, 2,3,4-tri[(trimetilsilil)oxi.	76
Figura 49 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - trimetil(2,6 ditert.-butilfenoxi)silano.	77
Figura 50 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido threonico, tri(trimetilsilil)éter.	77
Figura 51 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido xilonico, 2,3,5-tri(trimetilsilil).	78
Figura 52 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido azelaico, di(trimetilsilil) ester.	78
Figura 53 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido mannoico, 2,3,5,6-tetra(trimetilsilil).	79
Figura 54 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido octanedioico, di(trimetilsilil) ester.	79
Figura 55 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - arabitól, penta(trimetilsilil) éter.	80
Figura 56 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido azelaico, di(trimetilsilil) ester.	80
Figura 57 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido ribonico, 2,3,4,5-tetra(trimetilsilil).	81
Figura 58 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - pirrolo[1,2]pirazina-1,4-diona.	81
Figura 59 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido tetradecanoico, trimetilsilil ester.	82
Figura 60 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ribo-hexitól, 3-deoxi-1,2,4,5,6-penta(trimetilsilil).	82
Figura 61 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - frutose, 1,3,4,5,6-penta(trimetilsilil).	83

Figura 62 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - glicose, hexa(trimetilsilil).	83
Figura 63 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - trimetilsilil eter de glucitol.....	84
Figura 64 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido Palmiteladico, trimetilsilil ester.	84
Figura 65 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - tetrahydro-7-metilbenzoacridina.	85
Figura 66 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido linoleico, trimetilsilil.	85
Figura 67 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - benzilhexahidropirrolol[1,2]pirazina-1,4-diona.....	86
Figura 68 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - xilofuranoso-1,2,3,5-tetra(trimetilsilil).	86
Figura 69 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido 1,2-benzenodicarboxilico, mono(2-etilhexil) ester.	87
Figura 70 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - 3,6-dioxi-2,7-disiloctano.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Método empregado nas análises de CLAE-DAD.....	35
Tabela 2 - Exemplo da esquematização das matrizes para tratamento quimiométrico.	36
Tabela 3 - Massa e coloração dos extratos obtidos em meio BDA.	41
Tabela 4 - Contagem de picos ao se utilizar metanol e acetonitrila como fase móvel, 254 nm	45
Tabela 5 - Identificação dos compostos em co-cultivo em relação a técnica de CLAE-DAD	53
Tabela 6 - Comparação com banco de dados NIST dos sinais observados em CG-MS.	63
Tabela 7 - IDs referentes aos sinais de CG-EM quando comparado as amostras de extratos.	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A química dos produtos naturais	17
1.2	Produtos naturais derivados de microrganismos	18
1.3	<i>Senna spectabilis</i> – Aspectos Gerais	20
1.4	<i>Fusarium</i> – Aspectos Gerais	21
1.5	<i>Phomopsis</i> – Aspectos Gerais.....	23
1.6	Co-cultivo – Uma abordagem visando a interação de microrganismos	24
1.6.1	Tipos de interação em co-cultivo	25
1.7	Quimiometria	26
1.7.1	Análise Não-Supervisionada	27
1.7.2	Análise de Componentes Principais (PCA).....	27
1.7.3	Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).....	29
1.7.4	Análise discriminatória.....	29
1.7.5	PLS-DA	30
2	OBJETIVOS	31
3	PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1	Materiais, instrumentos e técnicas	32
3.1.1	Meios para cultivo dos microrganismos.....	32
3.1.2	Esterilização dos materiais e manipulação dos experimentos	33
3.1.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detectores de Arranjos de Diodo	33
3.1.4	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.....	33
3.1.5	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H.....	33
3.1.6	Solventes utilizados	34
3.1.7	Outros equipamentos	34
3.2	Metodologia Experimental	34
3.2.1	Cultivo dos fungos para obtenção dos extratos brutos	34
3.2.2	Avaliação do Perfil Químico dos Extratos Brutos	35
3.2.3	Tratamento quimiométrico	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1	Crescimento dos fungos selecionados	38
4.1.1	Observações morfológicas do experimento de co-cultivo.....	39
4.2	Obtenção dos extratos brutos	41

4.3	Análise por CLAE-DAD dos extratos em meio BDA	42
4.3.1	Avaliação da fase móvel para a metodologia de CLAE-DAD	43
4.3.2	Extraindo as intensidades máximas e otimizando os cromatogramas de CLAE-DAD	47
4.4	Abordagem quimiométrica para os dados de CLAE-DAD	48
4.4.1	Visualização de similaridade do conjunto de dados por HCA	48
4.4.2	Utilização de método supervisionado PLS-DA para otimização de resultados	49
4.5	Análise dos extratos por RMN de ¹H	54
4.6	Análise dos extratos por CG-EM	61
5	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

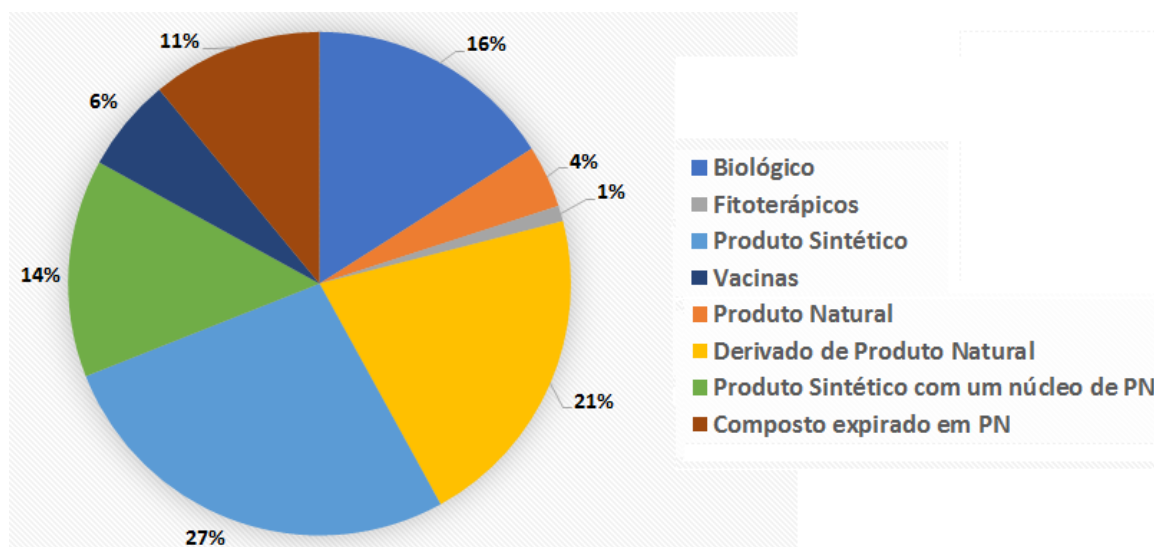
1.1 A química dos produtos naturais

A química de produtos naturais (PN) ganhou grande enfoque ao decorrer dos anos, sendo utilizada pela humanidade desde tempos imemoriais, através do fornecimento de compostos químicos com valor curativo. A busca por alívio e cura de doenças, por meio da ingestão de ervas e folhas, talvez tenha sido um dos primeiros empregos de PN, havendo relatos da utilização de óleos a base de plantas desde a Mesopotâmia em 2600 a.C (BORCHARDT et al., 2002).

Alguns exemplos importantes de fármacos provenientes de PN são: a artemisinina (antimalárico) isolado da *Artemisia annua*, a reserpina (anti-hipertensivo) obtido de *Rauwolfia serpentina*, a efedrina (termogênico) presente em *Ephedra sinica*, salbutamol (antiasmático) e tubocararina (relaxante muscular) isolados das espécies de *Chrondrodendron* e *Curarea*. O taxol, presente nas cascas de espécies do gênero *Taxus* e os compostos topotecano, irinotecano e belotecano, isolados da árvore ornamental *Camptotheca acuminata*, são utilizados no mercado farmacêutico como agentes quimioterápicos. (NEWMAN; CRAGG, 2013).

Atualmente, derivados de PNs ainda desempenham um papel importante na medicina, apesar da existência de diferentes fontes para o descobrimento de novos fármacos, uma grande parcela dos compostos bioativos descobertos ainda é oriunda ou inspirada em PN. Uma análise dos fármacos lançados entre 01/1981 a 12/2014 (Figura 1), demonstra que apenas 21% dos compostos existentes no mercado são verdadeiramente sintéticos (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 1 - Fonte de Fármacos aprovados entre 01/1981 a 12/2014.



Fonte: Adaptado de Newman, 2016.

Apesar da expressiva parcela de compostos provenientes de produtos naturais observada no gráfico, o descobrimento de novos fármacos oriundos de produtos naturais tem decrescido nos últimos anos devido ao conhecimento dos principais quimiotipos produzidos por plantas e o uso de abordagens reducionistas, que estimulam a pesquisa fazendo uso de mecanismos químicos em nível molecular (VERPOORTE et al., 2005). Contudo, a contribuição de produtos naturais ainda é expressiva, no final de 2013, a FDA (*Food and Drugs Administration*), agência norte-americana responsável pela aprovação de novos fármacos, aprovou 547 fármacos de produtos naturais e/ou derivados, o que representou 38% do total de novos compostos moleculares aprovados (PATRIDGE et al., 2016).

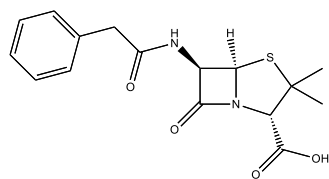
1.2 Produtos naturais derivados de microrganismos

O grande marco inicial dos microrganismos como fonte de compostos bioativos foi dado pela descoberta da penicilina em 1928, acontecimento que revolucionou as pesquisas que visavam o descobrimento de novos fármacos (BUTLER et al., 2004). Um grande enfoque foi dado a área de descobrimento de antibióticos produzidos por microrganismos, a chamada “Grande era de ouro dos antibióticos” (NEWMAN; CRAGG et al., 2012), que teve como resultado a descoberta de diversos produtos farmacêuticos importantes, tais como agentes antibacterianos: penicilina (1), cefalosporinas (2), aminoglicosídeos, tetraciclina (3) e outros policetídeos; imunossupressores como: ciclosporina (4) e rapamicina (5); antilipídicos: lovastatina (6) e mevastatina (7) e agentes antiparasitários, como a ivermectina (8) (Figura 2).

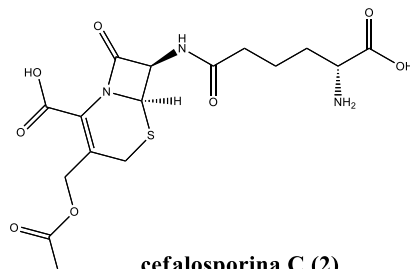
Um ponto crucial referente a fármacos provenientes de microrganismos está na capacidade de serem produzidos em larga escala em laboratórios, sendo o processo de obtenção desses compostos passível de otimização através da mudança das condições de cultivo. Em conjunto, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular propiciou, em determinados casos, a produção majoritária de compostos específicos. Dessa maneira, a molécula desejada é obtida através de expressões heterólogas em um organismo hospedeiro (GOMEZ-ESCRIBANO; BIBB, 2014).

Adicionalmente, acredita-se que os tipos de metabolitos secundários produzidos por determinados microrganismos podem apresentar relação com a planta hospedeira através de recombinação gênica entre as espécies durante a fase evolutiva. Um exemplo notável de tal afirmação foi o isolamento do antitumoral taxol do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, associado a *Taxus brevifolia*, além de casos mais recentes, como a vincristina, camptotecina, podofilotoxina e hipericina, que foram também isolados de fungos endofíticos associados aos respectivos hospedeiros vegetais (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

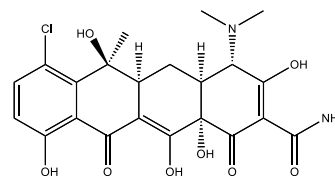
Figura 2 – Exemplo de estruturas de fármacos oriundos de microrganismos.



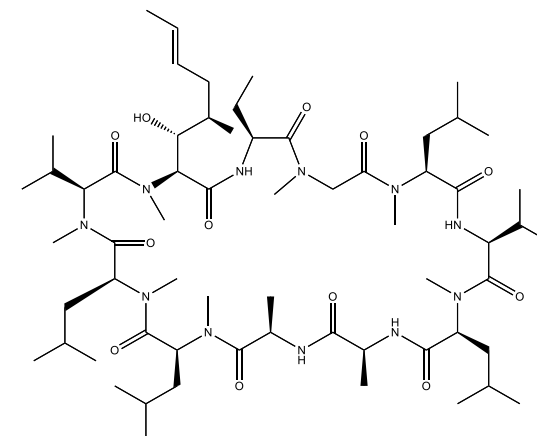
penicilina (1)



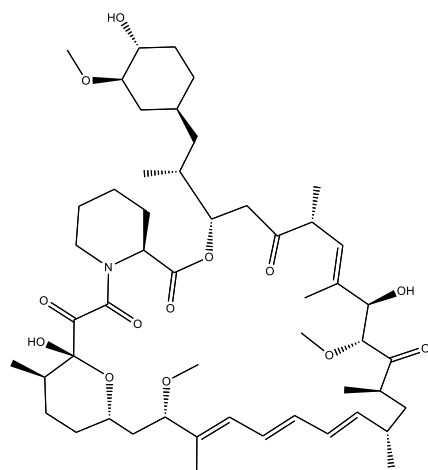
cefalosporina C (2)



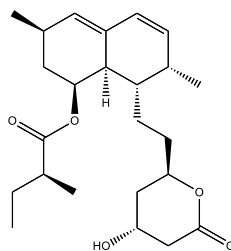
clorotetraciclina (3)



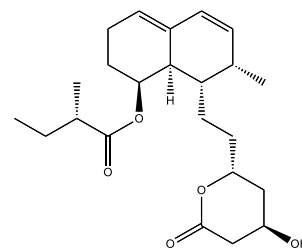
ciclosporina (4)



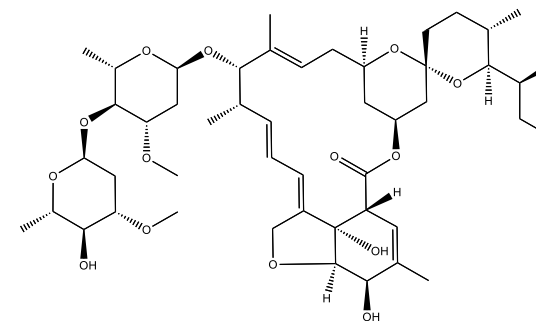
rapamicina (5)



lovastatina (6)



mevastatina (7)



ivermectina (8)

Fonte: Autor

Além dessas considerações gerais sobre o papel que os microrganismos desempenham na pesquisa de PN, uma área que apresenta grande interesse é a possibilidade de gerar novas abordagens para a descoberta de compostos bioativos. Além da bioprospecção de espécies, uma outra estratégia consiste na exploração de rotas biossintéticas que não são expressas em condições padrão de laboratório

Existem vários métodos para induzir a quimiodiversidade em microrganismos, afetando diferentes níveis celulares, variando desde o genoma até ao metaboloma. As relações químicas que ocorrem em comunidades de organismos vivos (interações entre espécies) podem ser exploradas. Neste contexto, uma nova abordagem, em que microrganismos são cultivados em conjunto (experiências de co-cultura) tem recebido um interesse crescente, sendo tal fato relacionado com o potencial de descoberta de novas pistas para compreender a expressão de rotas biossintéticas específicas, principalmente relacionadas com a defesa de microrganismos.

1.3 *Senna spectabilis* – Aspectos Gerais

O gênero *Senna* pertencente à família Fabaceae (Leguminosae) compreende mais de 600 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais pelo mundo, sendo nativa na América Central e do Sul. Essa árvore é frequentemente encontrada em diversos biomas brasileiros, principalmente nas regiões de florestas tropicais e cerrado. As plantas deste gênero possuem porte médio, com 4 a 9 metros de altura, possuindo coroa arredondada verde escura e com folhas pequenas e de cor amarelada (Figura 3) (SELEGATO et al., 2017).

Figura 3 – Exemplo ilustrativo de uma árvore do gênero *Senna*.



Fonte: Baumann, 2009.

Em relação ao caráter taxonômico, a *Senna spectabilis* é uma das espécies mais estudadas do gênero *Senna* em relação a aspectos químicos e farmacológicos. Essa planta tem sido utilizada na Ásia e em vários países no tratamento de diversas doenças devido suas propriedades diversificadas, como: antimicrobiana, laxativa, analgésica, anti-inflamatória e anti-ulcerogênica (LORENZI, et al., 2002). Na medicina popular brasileira é utilizada no tratamento de gripes, resfriados e como purgativa (VIEGAS, et al., 2004).

Estudos fitoquímicos revelam o isolamento de mais de 350 compostos oriundos do gênero *Senna*, sendo 40 metabólitos secundários da *Senna spectabilis*, como: alcalóides piperidínicos, triterpenos pentacíclicos, esteróides, pironas, antraquinonas, flavonoides, entre outros (SELEGATO et al., 2017).

1.4 *Fusarium* – Aspectos Gerais

O gênero *Fusarium* é um dos fungos fitopatogênicos mais conhecidos, compreendendo muitas espécies, estando presente em solos e materiais vegetais em decomposição, onde atuam como decompositores, apresentando atividade patógena contra um grande número de plantas agronomicamente importantes, incluindo a ervilha, cucurbitáceas e batata-doce. Coletivamente, as doenças que envolvem o fungo incluem pragas, apodrecimentos e cancrios em ecossistemas agrícolas e naturais. Além disso, são cada vez mais associados a infecções em seres humanos e outros animais, causando infecções sistêmicas, bem como infecções localizadas na pele e outras partes do corpo (SUMMERELL et al., 2011).

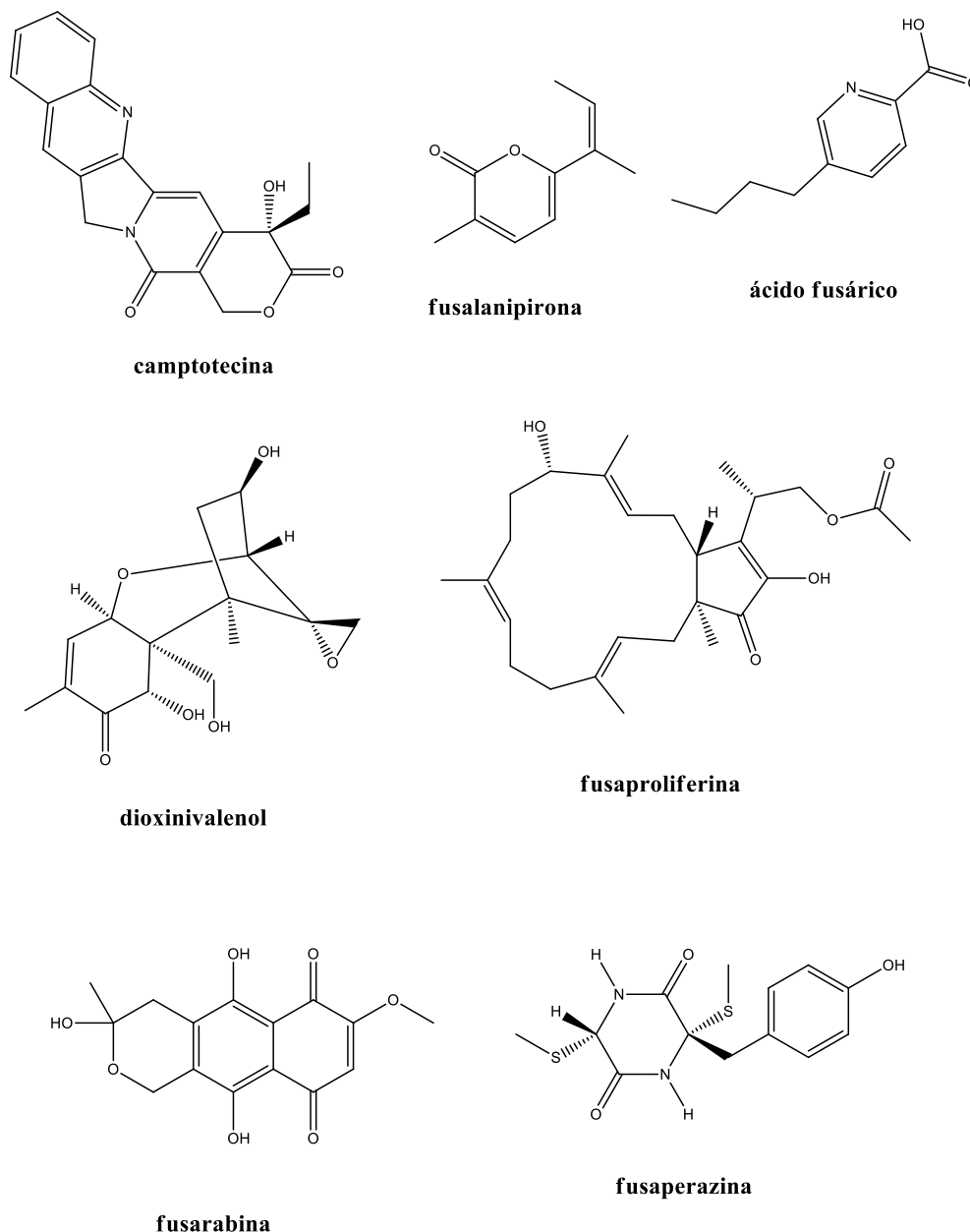
Uma ampla gama de micotoxinas são produzidas por esse gênero, sendo cancerígenas e tóxicas para humanos e animais, apresentando influência em diversas doenças de plantas (ESCRIVÁ et al., 2015). Espécies de *Fusarium* produzem três das mais importantes classes de micotoxinas: fumonisinas, zearalenona e tricotecenos (deoxinivalenol, nivalenol, T-2 e HT-2 toxinas), além da fusaproliferina, beauvericina, eniatinas e moniforminas (ESCRIVÁ et al., 2015).

Alguns compostos isolados do gênero ainda demonstraram atividade antitumoral contra diversas linhagens de câncer (CALVERT et al., 2005), atividade anti-oomicetos (SON et al., 2008), inseticida, antibacteriana e antifúngica (RATHNA et al., 2016), anticolinesterásicos (SOLFRIZZO et al., 1994), antialérgicos, anti-inflamatórios (MAHAPATRA et al., 2012). Tais fatos reforçam a necessidade de estudo de fungos deste gênero, tanto pelo setor que envolve o desenvolvimento agrícola, quanto para objetivos medicinais.

Dentre as substâncias isoladas da espécie *Fusarium solani* temos: camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, 9-metoxicamptotecina (SHWETA et al., 2010), fusalanipirona (ABRAHAM; ARFMANN, 1988), três derivados de naftopiranodionas (TATUM et al., 1989),

fusarabina, javanicina (TATUM et al., 1983), ácido fusárico (BANI et al., 2014), dioxinivalenol (EL-BANNA, et al., 1984), toxina T-2, solaniol, diacetoxiscirpenol (ISHII et al., 1971), fusaperazina C (GUIMARÃES et al., 2010), paclitaxel e fusaproliferina (CHAKRAVARTHI et al., 2008), sendo algumas delas vistas na Figura 4.

Figura 4 – Exemplo de substâncias isoladas de *Fusarium*.



Fonte: Autor

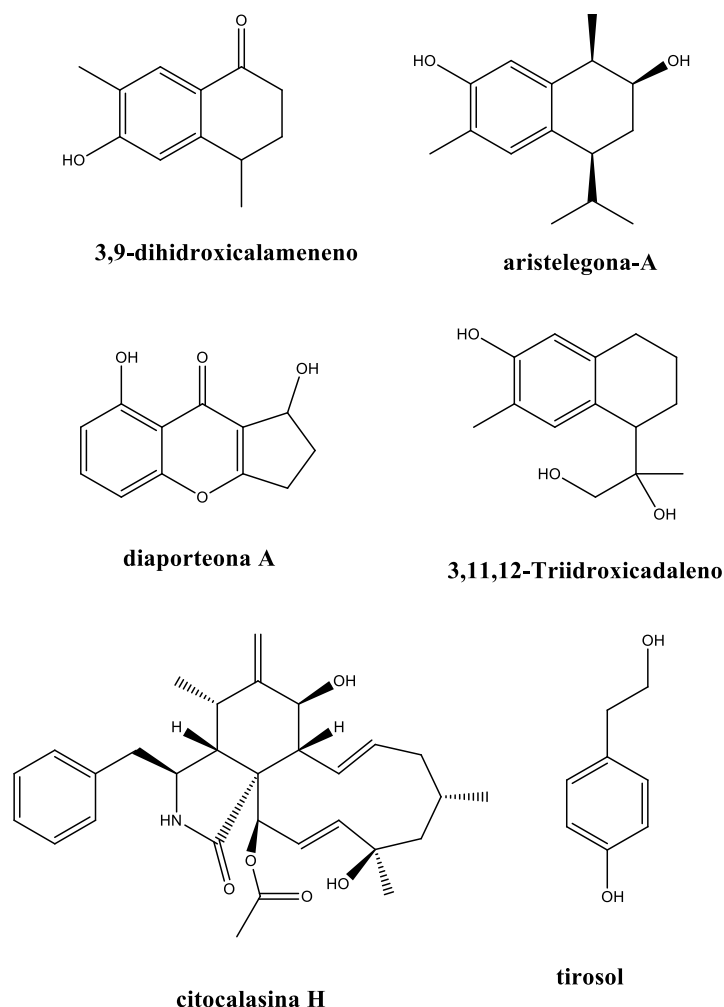
1.5 *Phomopsis* – Aspectos Gerais

O gênero *Phomopsis* compreende mais de 900 espécies em uma ampla gama de hospedeiros (UDAYANGA et al., 2011), podendo ser encontrado como patógeno em plantas herbáceas, como nas folhas de *Myracrodruon urundeuva* (ANJOS et al., 2001) que causa queimaduras nas folhas, na forma de doença de cancro em plantações de chás (PONMURUGAN et al., 2008) e uvas (NITA, et al., 2007). Porém, sua fitopatogenicidade foi aproveitada para o biocontrole de pragas, atuando como bioherbicida contra a erva daninha *Amaranthus sp.*, que afeta plantações de grãos (WYSS et al., 2004).

Estes microrganismos produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários, com distintos tipos de atividades, entre elas: citocalasinas (antifúngico), policetídeos (antimicrobianos e anticancerígenos), phomoxantonas (antimalárico e antitubercular), phomodiol (antifúngico), phomoxantona A (antifúngico), biraril éteres (herbicidas) nafto- γ -pirona (citotóxico) e o alcaloide fomoenamida (antitubercular) (ERBERT et al., 2012).

Em relação a espécie *Phomopsis cassiae*, dois policetídeos e cinco sesquiterpenos da classe dos cadinanos foram isolados em 2006, sendo que algumas apresentaram atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, em conjunto, demonstraram atividade citotóxica, *in vitro*, contra linhagem de células do tumor cervical humano (HeLa) (SILVA et al., 2006). Destaca-se o isolamento de duas novas benzopiranonas deste fungo, as quais demonstraram a capacidade de inibir o crescimento da linhagem *Mycobacterium tuberculosis* (BUNGIHAN et al., 2011). Além dos compostos citados anteriormente, encontra-se na literatura o isolamento de dois sesquiterpenos da classe dos cadinanos (ZANARDI, 2010) e dois novos metabolitos: 2,4-diidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila e a phomopsilactona (SILVA, 2005), sendo algumas delas vistas na Figura 5.

Figura 5 - Exemplo de substâncias isoladas de *Phomopsis*.



Fonte: Autor

1.6 Co-cultivo – Uma abordagem visando a interação de microrganismos

Microrganismos fazem parte de uma longa história, como importante fonte de produtos naturais bioativos, particularmente no campo que tangência a descoberta de novos fármacos, tendo sido estudados para biossíntese de uma grande variedade de moléculas. Os recentes avanços no sequenciamento de genomas, revelaram que tais organismos têm o potencial ainda maior de produção de metabolitos secundários (BERTRAND et al., 2014).

Em muitos casos, agrupamentos de genes microbianos podem ser silenciados sob condições de crescimento de laboratório padrão, ou seja, quando crescem isoladamente de outros organismos vivos. Nos últimos dez anos, vários métodos têm sido desenvolvidos para auxiliar na ativação dessas vias biossintéticas silenciadas. Uma destas abordagens é a co-cultura de microrganismos, que envolve o cultivo de duas ou mais culturas de microrganismos no mesmo ambiente confinado. A co-cultura de microrganismos é inspirada nos ambientes naturais que estão presentes na natureza.

Dentro dessas comunidades, ocorre a interação entre os organismos através de moléculas, compostos químicos, de sinalização ou de defesa entre si. Tais compostos químicos são de potencial interesse para obtenção de medicamentos, tendo em vista que a defesa de um microrganismo frente a outro pode produzir substâncias de valor agregado (PETTIT et al., 2009; BERTRAND et al., 2014).

Realizando um levantamento bibliográfico, com o intuito de demonstrar o crescente aumento no número de pesquisas que trabalham com co-cultura de microrganismos, através do acesso e busca na base de dados Web of Science acessando-se os seguintes parâmetros de busca: resumo, palavra-chave e título do artigo. O seguinte termo de busca foi usado: “co-culture”. Pode-se perceber uma nítida tendência no aumento do número de trabalhos que se correlacionam com o termo “co-culture” (Figura 6).

Figura 6 - Evolução do número de artigos publicados ao longo dos anos em revistas indexadas na base de dados Web of Science relacionados ao termo “co-culture”.



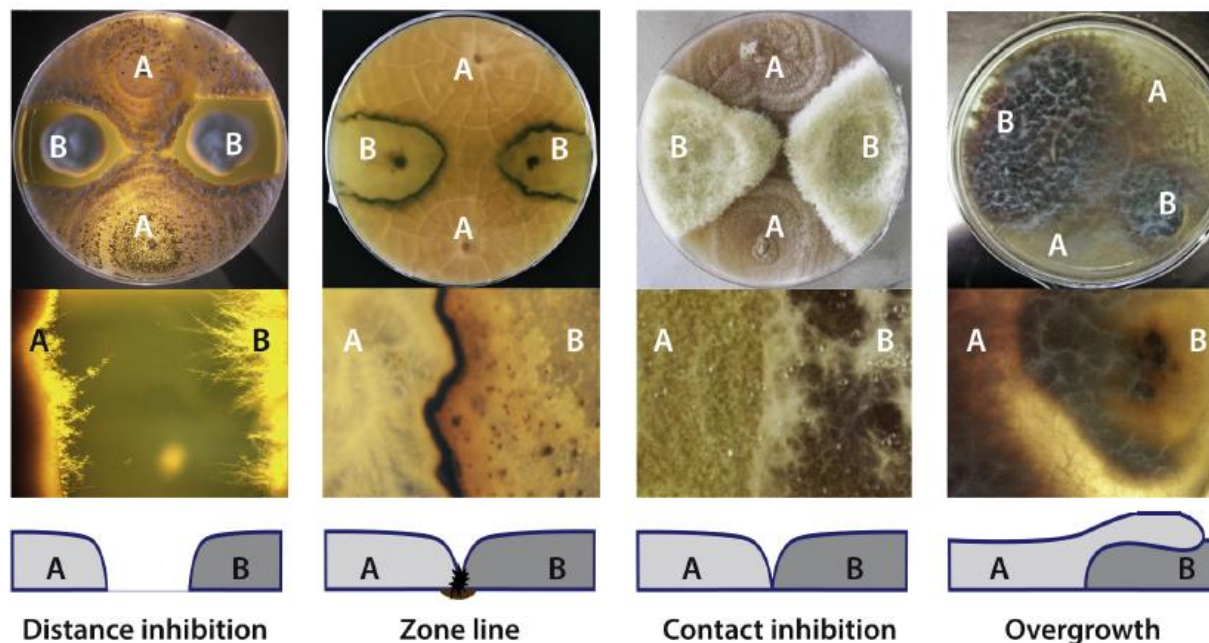
Fonte: Autor.

1.6.1 Tipos de interação em co-cultivo

Bertrand e colaboradores, em 2013, observaram diversos experimentos de co-cultivo, chegaram à conclusão que a interação entre dois fungos poderia ser classificada em 4 tipos: 1) inibição a distância, onde o crescimento dos fungos cessa a uma determinada distância da outra colônia. 2) linha de confronto: os dois fungos crescem o suficiente para terem contato e ocorre a formação de um precipitado escuro na região de contato. 3) inibição por contato: os fungos crescem o suficiente para se tocarem, respeitando o espaço um do outro e não ocorrendo mudanças em suas

morfologias. 4) sobreposição: ocorre a completa invasão de uma colônia sobre a outra (Figura 7) (BERTRAND et al., 2014).

Figura 7 - Ilustração dos tipos de interações presentes em co-cultivo



Fonte: Adaptado Bertrand et al., 2014.

1.7 Quimiometria

Ferramentas quimiométricas permitem a análise discriminante dos dados e criação de modelos de maneira sistemática, produzindo uma resposta visual e estatística da matriz. Atualmente, na ciência de produtos naturais, a quimiometria vem sendo aplicada não só na metabolômica, mas também na construção de modelos quantitativos de atividade-estrutura e no monitoramento e controle de sistemas biológicos, emergindo como uma das principais estratégias computacionais (ERIKSSON et al., 2001).

De maneira simplista, as análises quimiométricas podem ser divididas em três principais categorias, sendo (1) análises não-supervisionadas exploratórias, que buscam reconhecer padrões em um dado sistema complexo; (2) análises supervisionadas e discriminantes, que classificam amostras em categorias ou grupos; (3) análise de regressão e predição de modelos, que determinam a relação quantitativa entre duas matrizes de dados distintas (ERIKSSON et al., 2001).

1.7.1 Análise Não-Supervisionada

Análises não-supervisionadas, também chamadas de análises exploratórias, aplicam ferramentas estatísticas e matemáticas na matriz, permitindo uma visão geral de toda a natureza do dado, bem como a detecção de tendências, padrões ou agrupamentos. Na prática, em Química de PN o que se observa em extratos orgânicos é uma visão geral dos metabólitos produzidos, no chamado perfil metabólico, buscando fatores discriminantes entre os grupos estudados através de métodos exploratórios.

Existem diversos métodos “cegos” disponíveis, sendo os mais comumente empregados a Análise de Componentes Principais (PCA), um método exploratório discriminatório, e a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), que agrupa as amostras de acordo com a similaridade entre elas.

Dentre os softwares disponíveis para este tipo de processamento, destaca-se MATLAB (Mathworks, EUA), Amix (Bruker, EUA), Biodiversity Pro (BD Pro.) e Statistical Software and Data Analysis (XLSTAT, Excel, EUA).

1.7.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A metabolômica de produtos naturais realiza o reconhecimento de processos metabólicos dinâmicos primeiramente através de estudos quimiométricos comparativos, sendo o PCA a ferramenta não-supervisionada mais empregada. Esta técnica reduz as dimensões originais de um conjunto de dados numéricos através das componentes principais (PCs), convertendo dados multidimensionais em um modelo com dimensões reduzidas (SMOLINSKA et al., 2012).

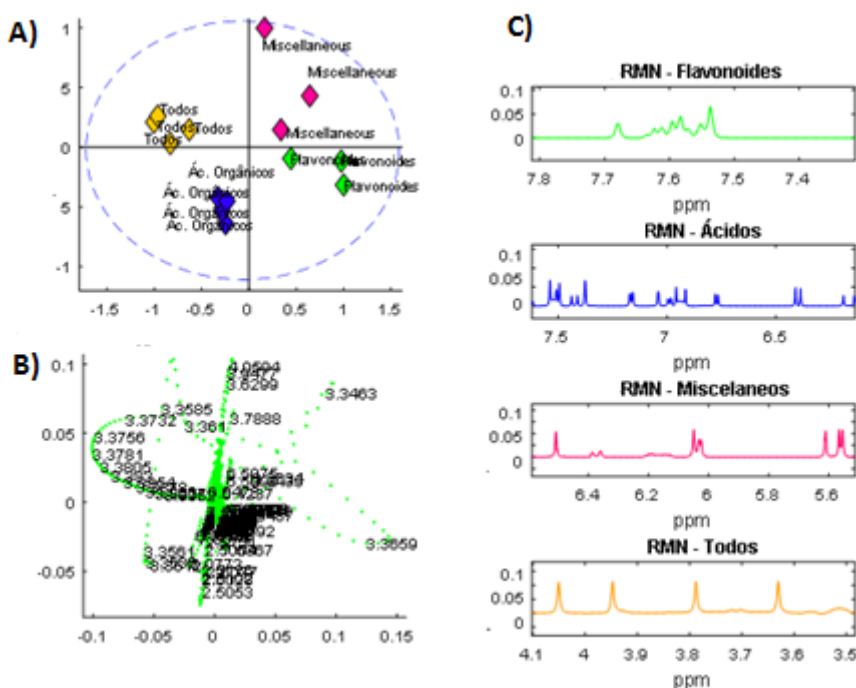
As PCs são combinações lineares das variáveis originais e explicam o máximo de valor de variância que não foi contabilizado nas PCs anteriores. Basicamente, PCs são eixos ortogonais entre si, construídos em ordem decrescente da variância, sendo sua principal função a determinação da dimensionalidade intrínseca do conjunto de dados (PEARSON, 1901; SMOLINSKA, ET AL., 2012).

Durante seu processo, a PCA converte o conjunto de dados originais em duas matrizes distintas, conhecidas como matriz de *scores* e matriz de *loadings*. Os *scores* são definidos como as novas coordenadas das amostras, sendo seu gráfico uma representação de como estas interagem entre si em um espaço *n*-dimensional. Já os *loadings* descrevem a maneira como as variáveis dos dados originais estão combinadas nas PCs, indicando quais possuem maior contribuição para a formação da determinada PC.

Diferentes algoritmos são utilizados para a decomposição das matrizes complexas, a exemplo do algoritmo *Nonlinear Iterative Partial Least Square* (Nipals) (WOLD, 1966; WOLD, 1975), que aplica métodos iterativos dos mínimos quadrados parciais não lineares, ou *Singular Value Decomposition* (SVD), que realiza a decomposição da matriz em sub-matrizes de *score* e *loading* de maneira singular (MARTENS; NAES, 1975).

Na análise de perfis metabólicos, a composição química de cada amostra influencia as PCs, permitindo separação destas em um espaço multidimensional, observado no gráfico de *scores*, sendo a razão química desta separação observada no gráfico de *loadings*. Como amostras similares permanecem próximas no espaço, através desta análise é possível a detecção de padrões e observação de tendências, garantindo discriminação entre grupos amostrais (Figura 8).

Figura 8 – Exemplo da discriminação entre grupos ao se realizar o cálculo da PCA.



A) Gráfico de *scores* B) Gráfico de *loadings* C) Espectros de RMN de ^1H

Fonte: Autor

Adicionalmente à exploração não supervisionada dos dados, um aspecto importante do PCA é permitir a detecção de *outliers*, que são definidos como amostras dispostas além do intervalo de confiança definido para análise, prejudicando análises de quadrados parciais supervisionadas. Apesar de eficaz, deve-se ter em mente que o PCA não é capaz de determinar todas as amostras discrepantes, pois durante sua projeção, *outliers* ortogonais são agrupados com a maioria, impedindo sua visualização (VERBOVEN, 2005).

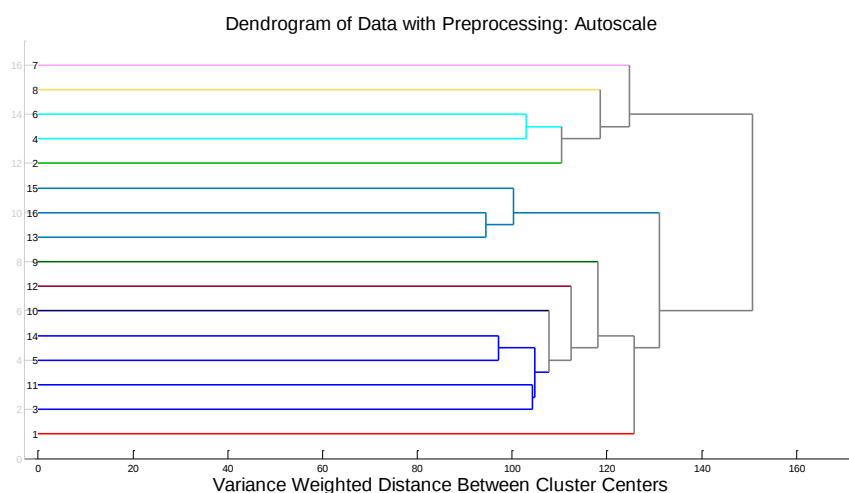
Para produtos naturais, as matrizes comumente empregadas na PCA contêm dados espectroscópicos ou espectrométricos, como CLAE-DAD, EM ou RMN de ^1H , sendo aplicado principalmente para discriminação de amostras submetidas a diferentes condições genéticas e ambientais.

1.7.3 Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

A HCA é outro método não-supervisionado comumente empregado na análise de perfis metabólicos e consiste no agrupamento de amostras de acordo com a sua similaridade. Nesta análise, é necessário o input das funções (a) métrica, que determina a distância utilizada para o cálculo da similaridade, como euclidiana, minkowski e mahalanobis; (b) de ligação entre as amostras, como completo, médio, mediana ou Ward. Vale ressaltar que a escolha das funções influencia diretamente no resultado, comumente disposto em dendograma de árvore (Figura 9) (WEBB, 2002; DUDA et al., 2000).

Apesar de simples de ser realizado, o HCA apresenta como principal desvantagem não informar a razão química dos agrupamentos, não revelando, portanto, os metabólitos responsáveis por determinado grupo.

Figura 9 – Exemplo de dendograma proveniente do HCA.



Fonte: Autor.

1.7.4 Análise discriminatória

A análise discriminatória tem sido amplamente utilizada na descoberta de biomarcadores, classificação e predição de características, tendo em vista que o conjunto de dados a ser processado necessita de uma variável resposta de interesse, podendo essas ser de caráter discreto ou contínuo.

O objetivo principal de métodos supervisionados é obter uma correlação entre uma variável de resposta e um conjunto de dados usado como base para previsão. Um dos métodos mais usualmente utilizados para análise discriminatória é o PLS-DA (Partial Least Squares - Discriminant Analysis) (STAHLE, 1977).

1.7.5 PLS-DA

A utilização da técnica PLS foi primeiramente desenvolvida buscando solucionar problemas de regressão. Com o desenvolvimento da mesma, problemas de classificação foram abordados através da análise discriminatória, PLS-DA (BOULESTEIX, 2004; NGUYEN; ROCKE, 2002). O método consiste de um vetor Y que representa os valores das classes em relação ao vetor X (conjunto de dados). O modelo gerado tem como parâmetros o R², que mede a adequação do modelo para o conjunto de dados de treino, enquanto Q² e PRESS são utilizados para avaliar a capacidade de previsão do modelo, sendo recomendado o uso de dupla validação cruzada (SZYMANSKA et al., 2012) juntamente com o número de erros de classificação como estatística de diagnóstico.

A técnica tem apresentado sucesso em sua aplicação em diversos estudos que visam a classificação e também a identificação de biomarcadores (MARZETTI et al., 2014; VELAGAPUDI et al., 2010; WANG et al., 2012).

2 OBJETIVOS

-Cultivar co-culturas dos fungos *Phomopsis cassiae* e *Fusarium solani* isolados de *S. Spectabilis*, em meio sólido (Ágar).

-Obter o perfil cromatográfico (*fingerprint*) dos extratos produzidos pelos microrganismos nas culturas puras e co-culturas.

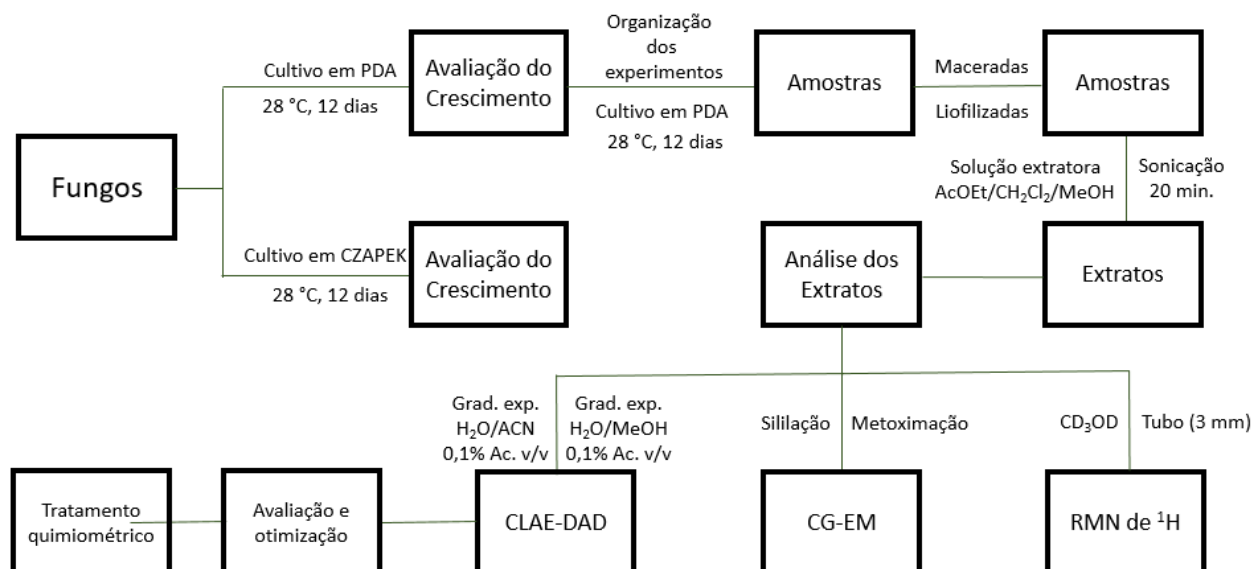
-Avaliar a indução de metabólitos produzidos em co-cultivo através do auxílio das técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

-Utilizar métodos quimiométricos com o intuito de auxiliar na interpretação e maximização das informações obtidas.

3 PARTE EXPERIMENTAL

O fluxograma geral utilizado, que engloba sucintamente os procedimentos realizados ao decorrer desse trabalho são descritos na Figura 10, sendo os materiais, instrumentos e técnicas descritos na seção 3.1 e as metodologias aplicadas na seção 3.2.

Figura 10 – Fluxograma geral das metodologias aplicadas



Fonte: Autor

3.1 Materiais, instrumentos e técnicas

3.1.1 Meios para cultivo dos microrganismos

Os fungos *F. solani* e *P. cassiae*, previamente isolados e pré-cultivados (CARDOSO, 2015; CHAPLA, 2010), foram cultivados em meios de cultura sólidos comerciais do fabricante Himedia:

Czapek dox ágar: 49,01 g/L água, pH final = $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C. [Sacarose (30 g); nitrato de sódio (2 g); fostato dipotássico (1 g); sulfato de magnésio (0,5 g); cloreto de potássio (0,5 g); sultato ferroso (0,01 g); ágar (15 g)]

Batata dextrose ágar (BDA): 39 g/L água, pH final = $5,6 \pm 0,2$ a 25°C. [Fécula de batata (4 g), dextrose (20 g), ágar (15 g)].

Os experimentos foram mantidos dentro de uma incubadora termostaticamente isolada com temperatura controlada (28 °C).

3.1.2 Esterilização dos materiais e manipulação dos experimentos

A esterilização dos materiais utilizados para manipulação dos microrganismos e meios de cultivo foram autoclavados por aproximadamente 20 minutos à temperatura de 121 °C e 1 atm.

Todos os procedimentos foram realizados em Capela de Fluxo Laminar Pachame PA-310 Série 172-99 previamente esterelizada com etanol 70% (v/v) e radiação ultravioleta.

3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detectores de Arranjos de Diodo (CLAE-DAD)

O equipamento utilizado da marca Shimadzu, acoplado a bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10VP, detector de arranjo de diodos UV/VIS- PC1520 – DiodeArray, A seguinte coluna analítica foi utilizada: Phenomenex® Kinetex C18 5 μ 100Å, 150 X 4,60 mm.

3.1.4 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para as análises por CG-EM utilizou-se cromatografo a gas Shimadzu QP-2010 equipado com injetor automatico AOC-5000 Shimadzu e interface com um espectrometro de massas. A coluna utilizada foi EN5MS (30 m x 0,25 ϕ x 0,25 mm), GCMS solutions Ver. 2.5. A temperatura do forno foi assim programada: 120 °C para 320 °C a uma taxa de aquecimento de 3 °C/ min 73 minutos. 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, gas de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1,0 mL/min, o volume de amostra injetado foi de 1 μ L. Pressão: 114,9 kPa, velocidade linear: 43,1 cm/sec., fluxo total: 17,3. Condições EM: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa da massas de aquisição de m/z 40-800 Daltons.

3.1.5 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Os espectros de ^1H RMN foram realizados em um instrumento Bruker Avance 600 operando a 600 MHz, na frequência do hidrogênio, operando com uma criossonda de 3 mm.

3.1.6 Solventes utilizados

Água deionizada: A água utilizada no preparo dos meios de cultivo foi deionizada (18 mΩ; Milli-Q, Millipore).

Metanol Deuterado: Cambridge Isoto e Laboratories, Inc. (CIL), 99,8%.

Acetato de etila: Merck, 99,8%.

Diclorometano: Merck, 99,8%.

Acetonitrila: grau HPLC, Merck, 99,9%

Metanol: grau HPLC, Merck, 99,9%

3.1.7 Outros equipamentos

Balança analítica: Os meios de cultura e as amostras dos extratos foram pesados em balança analítica Mettler Toledo AG 204.

Ultrassom: Elma S 60H Elmasonic U=220-240V e P=550W.

Liofilizador: ALPHA 2-4, LDPLUS, Christ Analítica

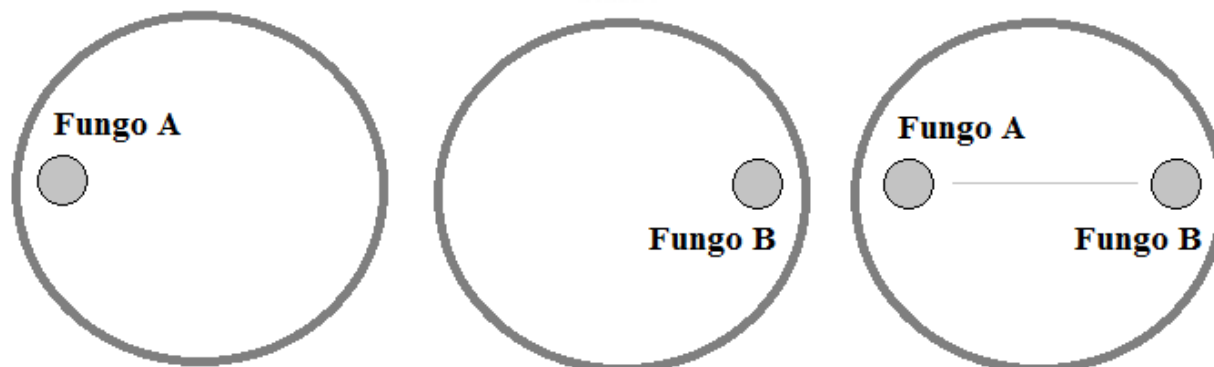
Incubadora: SHAKER Refrigerada SL – 223, SOLAB

3.2 Metodologia Experimental

3.2.1 Cultivo dos fungos para obtenção dos extratos brutos

As linhagens dos fungos *F. solani* e *P. cassiae* foram repicadas para placas de Petri previamente preparadas e esterilizadas. A distribuição geométrica dos inóculos ocorreu segundo a Figura 11, sendo feita três replicatas para cada experimento (Branco, Co-cultivo, *P. cassiae* e *F. solani*). Os cultivos foram mantidos sob temperatura controlada (28°C) por 12 dias.

Figura 11 – Esquematisação das distribuições geométricas dos fungos nos experimentos.



Fonte: Autor.

Ao final do período de incubação, todo o material contido na placa foi cortado em cubos (salvo os experimentos de co-cultivo que tiveram apenas a região de confronto recolhida) e armazenado em potes de vidros estereis a -80°C por dois dias. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 2 dias, visando remover o excesso de água do meio de cultivo e congeladas 2 dias. Em seguida, foram trituradas manualmente com auxílio de um bastão de vidro, sendo adicionado 20 mL de uma solução extratora (Acetato de etila: Diclorometano: Metanol - 3:2:1) e sonicadas por 20 minutos (BERTRAND et al, 2013). Os extratos foram então congelados, liofilizados e pesados.

3.2.2 Avaliação do Perfil Químico dos Extratos Brutos

Os extratos brutos obtidos de cada fungo foram submetidos às análises químicas utilizando as seguintes técnicas

1) Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos

As amostras foram preparadas em uma concentração de 5 mg.mL^{-1} 100% metanol e filtradas. Os perfis cromatográficos foram obtidos utilizando como fases móveis:

- Água (A) e metanol (B), ambas acidificadas com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, com uma vazão de $1,0\text{ mL.min}^{-1}$.

- Água (A) e acetonitrila (B), ambas acidificadas com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, com uma vazão de $1,0\text{ mL.min}^{-1}$.

A eluição em gradiente seguiu o método descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Método empregado nas análises de CLAE-DAD.

Tempo (min)	Ação	B(%)
0,01	B. Conc.	15
30	B. Conc.	100
35	B. Conc.	100
36	B. Conc.	15
50	B. Conc.	15

Fonte: Autor

3) Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas

A preparação das amostras consistiu na metoximação e sililação das amostras através dos seguintes procedimentos:

Metoximação: 5-10 mg da amostra foram solubilizados em $80\text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de metoxiamina em piridina (20 mg.mL^{-1}), em seguida adicionou-se $100\text{ }\mu\text{L}$ 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.

4) Análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H RMN)

Para obtenção dos espectros de RMN de ^1H dos extratos brutos, as amostras foram preparadas em uma concentração de 5 mg.mL⁻¹, filtradas e submetidas à análise utilizando CD₃OD como solvente deuterado.

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 windows): 160221, O1P (ponto de irradiação): 4,9 (2940,64 Hz); D1: 2, Temperatura: 22 °C.

3.2.3 Tratamento quimiométrico

Todos os dados obtidos pela técnica de CLAE-DAD foram organizados em uma matriz, onde as linhas são relativas as amostras (número de cromatogramas) e as colunas representam as intensidades relativas em cada tempo de eluição. A Tabela 2 exemplifica o procedimento adotado.

Tabela 2 – Exemplo da esquematização das matrizes para tratamento quimiométrico.

Dados cromatográficos			
Am 01	15	20	Intensidade n_1
Am 02	7	0	Intensidade n_2
Am 03	59	66	Intensidade n_3
...	...	...	...
Am X	23	35	Intensidade n_x

Fonte: Autor

A matriz foi normalizada, afim de compensar possíveis variações decorrentes da preparação das amostras e erros sistemáticos dos equipamentos, sendo posteriormente centrada na média, para que as coordenadas ficassem no centro do conjunto de dados. O software utilizado para o tratamento dos dados foi o programa computacional Matlab (2014a).

Os perfis cromatográficos obtidos foram analisados utilizando as ferramentas quimiométricas:

a) Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA – Hierarchical Cluster Analysis).

b) Análise Discriminatória por Mínimos Quadrados (PLS-DA – Partial last Square Discriminant Analysis).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

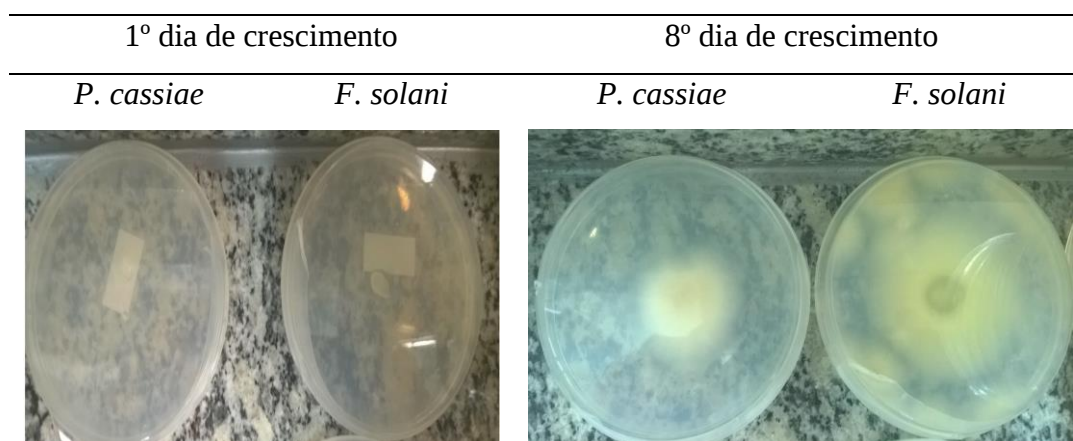
4.1 Crescimento dos fungos selecionados

Os microrganismos, em geral, apresentam uma ampla versatilidade e diversidade em suas exigências nutricionais, sendo que alguns deles necessitam apenas de poucos nutrientes inorgânicos como sua fonte de alimento, enquanto outros requerem meios de cultivo mais complexos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Dessa maneira, cada estudo metabolômico em microrganismos deve ter como base a observação do crescimento, analisando se determinado meio é adequado para o desenvolvimento do organismo vivo.

O cultivo dos fungos foi realizado, primeiramente, como culturas isoladas no meio czapek dox ágar, a escolha desse meio foi feita através da observação de um importante fenômeno que induz a produção de metabolitos secundários em co-cultivo: a competição por nutrientes (BERTRAND et al., 2013). Dessa maneira, um meio de cultivo escasso em nutrientes poderia sugerir uma maior indução de metabolitos referente a interação entre os microrganismos.

Ao se avaliar o crescimento de ambos os fungos, foi observado que a espécie *P. cassiae* obteve uma baixa taxa de crescimento comparado ao *F. solani* (Figura 12). Adicionalmente, das cinco réplicas do fungo *P. cassiae*, apenas duas se desenvolveram, sugerindo que o fungo em questão poderia necessitar de um meio com maior teor de nutrientes.

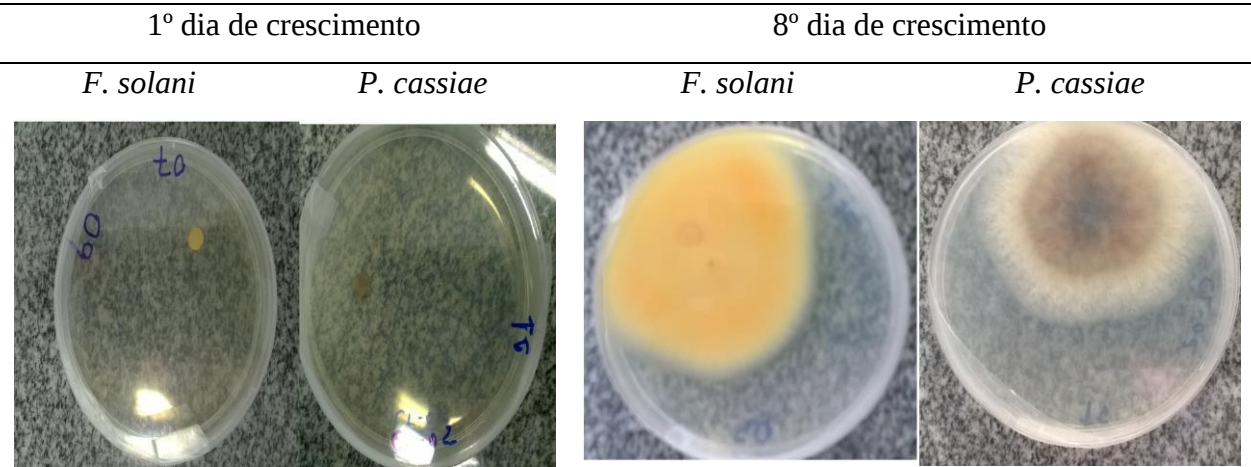
Figura 12 – Comparação dos crescimentos dos fungos *P. cassiae* e *F. solani* em meio czapek dox ágar.



Fonte: Autor.

Neste contexto, o meio de cultivo foi alterado para BDA, que possuiu mais nutrientes comparado ao czapek dox ágar. Observou-se um bom desenvolvimento para ambos os fungos em todas as cinco réplicas, demonstrando uma taxa de crescimento semelhante ao decorrer dos dias (Figura 13).

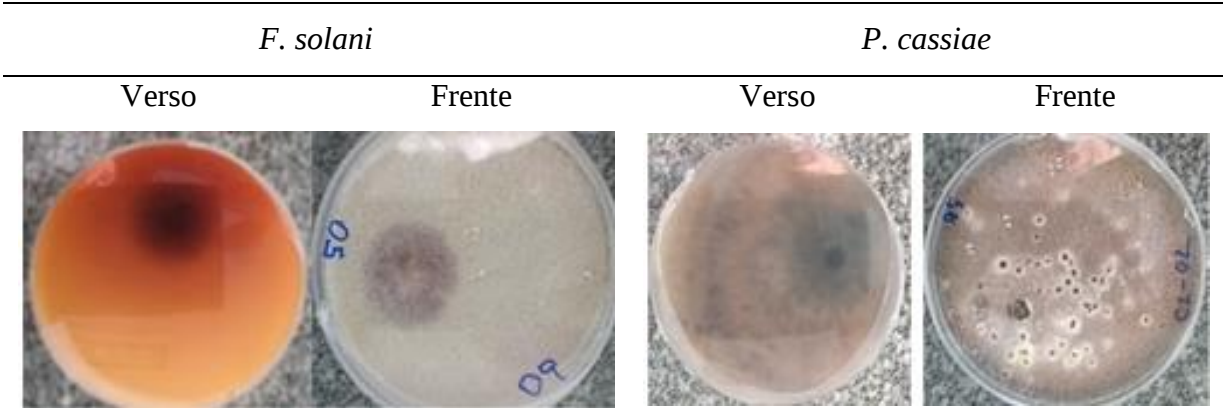
Figura 13 - Comparação dos crescimentos dos fungos *P. cassiae* e *F. solani* em meio BDA.



Fonte: Autor.

É importante avaliar que a mudança do meio de cultivo resultou em diferentes pigmentações dos fungos, Figura 14 comparada a 12, fato já relatado previamente (PRADEEP et al., 2013). Ao final do experimento (período de incubação de 12 dias), ambos os fungos preencheram a placa de Petri (Figura 14).

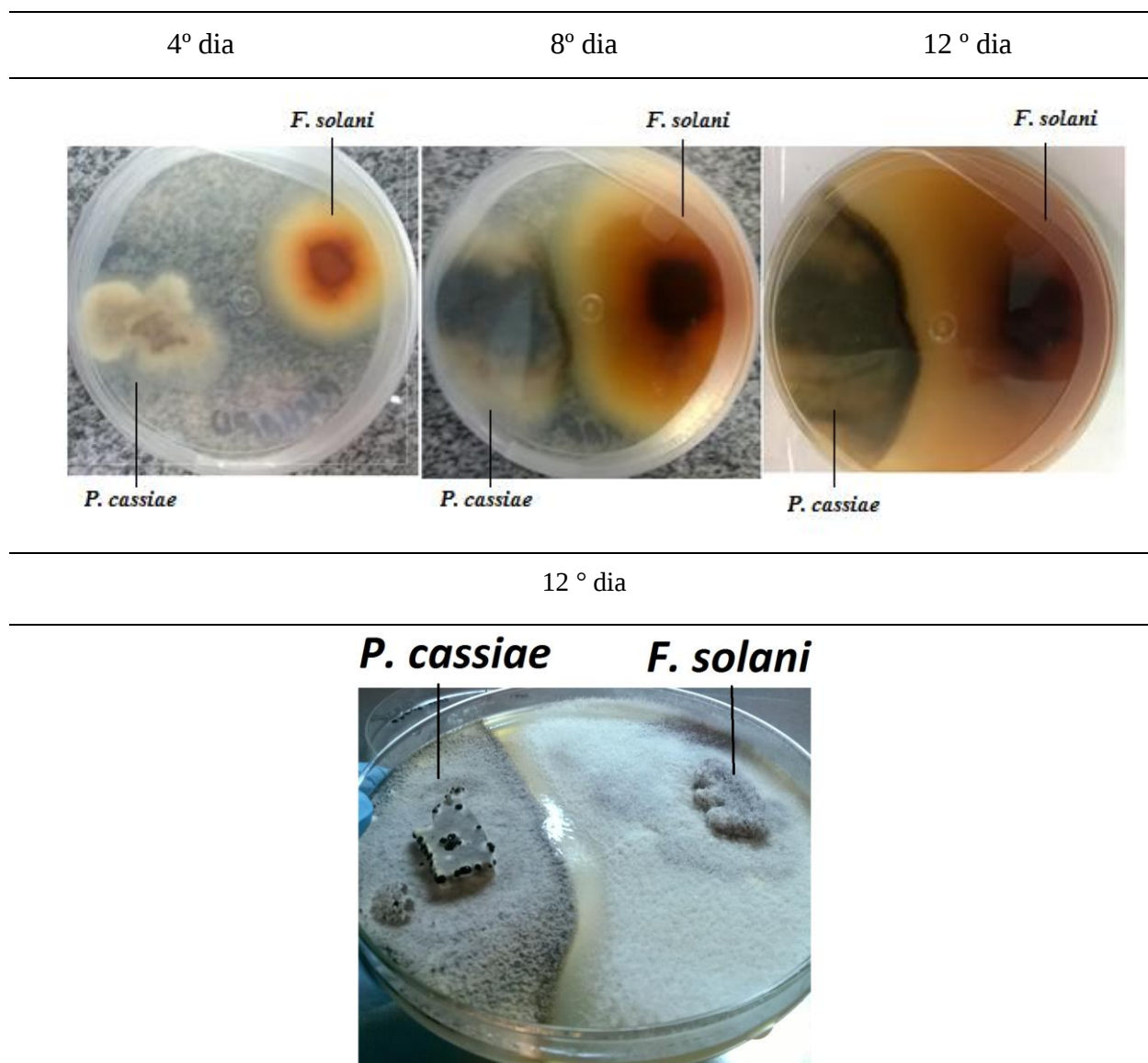
Figura 14 – Imagem da frente e verso das placas de Petri dos fungos selecionados em meio BDA, 12 dias.



Fonte: Autor.

4.1.1 Observações morfológicas do experimento de co-cultivo

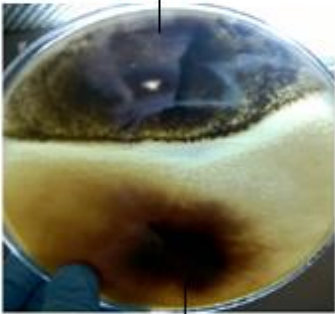
Ao analisarmos a morfologia dos fungos em co-cultivo, observasse que a espécie *P. cassiae* apresenta bordas claras nos primeiros dias, porém, quando ocorre a aproximação do fungo *F. solani* as bordas começam a escurecer, formando um precipitado escuro (Figura 15), sugestivo da produção ou modificação estrutural de algum metabolito na região de confronto.

Figura 15 – Evolução temporal do experimento de co-cultivo.

Fonte: Autor.

Concomitantemente, é importante observarmos na Figura 15 que os fungos não se tocam ao final do experimento, sugerindo que ocorra o tipo de interação chamado inibição a distância. Este padrão sugere fortemente a liberação de uma ou mais substâncias antifúngicas no meio (BERTRAND et al., 2013), que evitaria a aproximação do *F. solani*. Para caráter de comparação, a Figura 16 demonstra o co-cultivo aonde ocorre a inibição por contato, onde se observa as diferenças notáveis entre os tipos de interação (Inibição por contato *versus* Inibição a distância).

Figura 16 - Comparação da interação de inibição a distância em relação a inibição por contato.

Tipo de Interação e Fungos	Frente	Verso
Inibição a distância – Co-cultivo dos fungos <i>F. solani</i> e <i>P. cassiae</i>		
	<i>P. cassiae</i> <i>F. solani</i>	<i>P. cassiae</i> <i>F. solani</i>
Inibição por contato – Co-cultivo dos fungos <i>F. solani</i> e <i>F. oxysporum</i>		
	<i>F. oxysporum</i> <i>F. solani</i>	<i>F. solani</i> <i>F. oxysporum</i>

Fonte: Autor.

4.2 Obtenção dos extratos brutos

As massas dos extratos brutos estão descritas na Tabela 3, em conjunto com a coloração de cada extrato.

Tabela 3 – Massa e coloração dos extratos obtidos em meio BDA.

Fungo Replica	<i>F. solani</i>			<i>P. cassiae</i>			Co- cultivo			Branco		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Massa de Extrato (mg)	6,7	9,0	5,6	8,5	7,1	9,9	3,8	3,5	4,4	12,7	22,0	7,2
Coloração dos Extratos												

Fonte: Autor.

Um aspecto notável quando analisamos a Tabela 3 é em relação ao baixo rendimento de cada experimento. A utilização de meios de cultura sólido apresentam algumas vantagens, podendo propiciar a identificação de padrões de interações, assim como, a visualização de possíveis mudanças nas morfologias dos microrganismos quando em co-cultivo. Entretanto, a quantidade de extrato obtida nessa abordagem é baixa quando comparada ao meio líquido, o que gera um desafio ao analista quanto ao isolamento de metabólitos (BERTRAND et al., 2014).

4.3 Análise por CLAE-DAD dos extratos em meio BDA

Os cromatogramas obtidos pela técnica CLAE-DAD dos extratos brutos em gradiente acetonitrila e metanol, Figuras 14 e 15, apresentam vários sinais com diferentes absorbâncias e tempos de retenção variados, sugerindo compostos com polaridades diversas.

Figura 17 – Cromatogramas CLAE-DAD em gradiente de metanol dos extratos brutos em PDB, 254 nm.

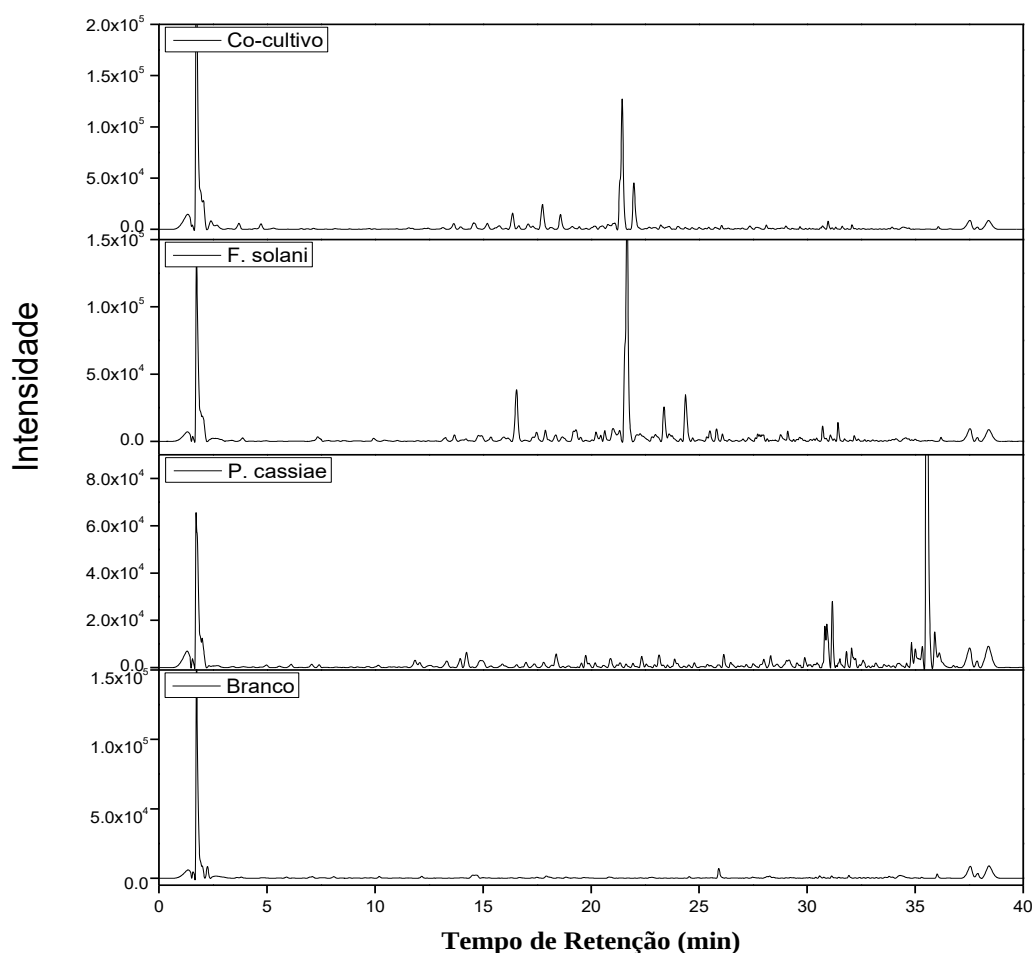
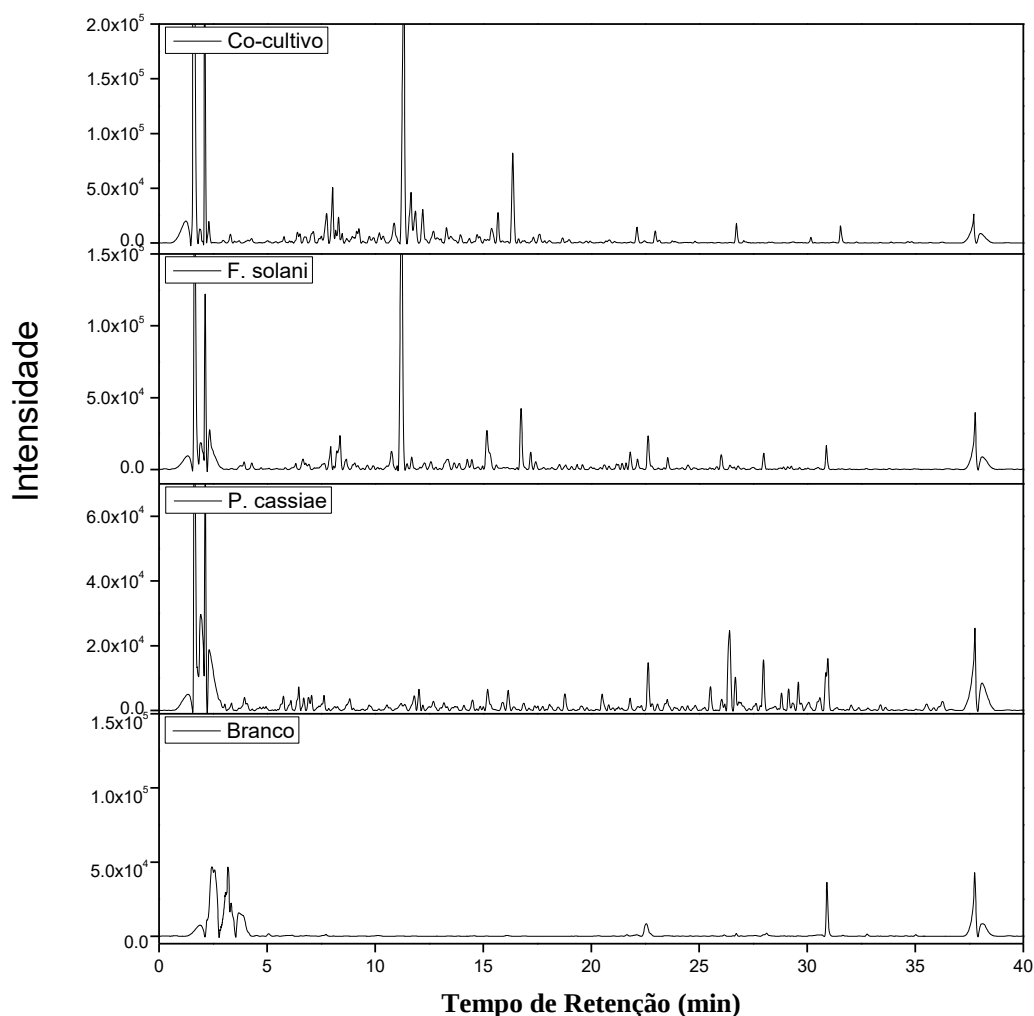


Figura 18 - Cromatogramas em gradiente de acetonitrila dos extratos brutos em PDB, 254 nm.



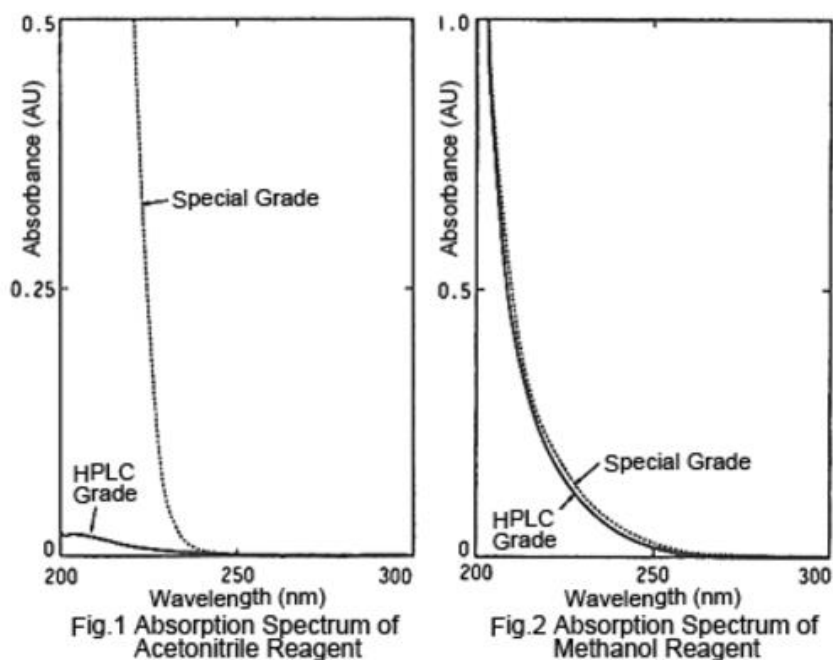
Fonte: Autor

4.3.1 Avaliação da fase móvel para a metodologia de CLAE-DAD

Os solventes orgânicos mais frequentemente utilizados como fase móvel em cromatografia reversa são acetonitrila e metanol, sendo a mais empregada a acetonitrila. A escolha tem como base algumas características desse solvente:

1) Absorbância: da acetonitrila apresenta uma absorção baixa ao se trabalhar com comprimentos de onda menores (200-250 nm) em comparação com metanol (Figura 19), tendo como possibilidade observar compostos dentro da faixa de 205-220 nm (SNYDER et al., 2010).

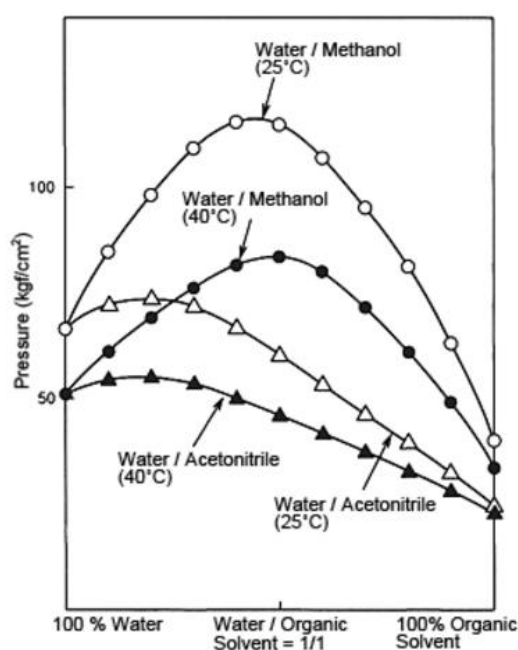
Figura 19 – Comparação das absorbâncias entre metanol e acetonitrila.



Fonte: SNYDER et al., 2010.

2) Pressão na coluna: a pressão varia de acordo com a proporção e o tipo da mistura existente na coluna. A Figura 20 mostra as diferenças existentes entre os dois solventes, considerando uma mesma vazão. Soluções com acetonitrila apresentam uma menor pressão na coluna (SNYDER et al., 2010).

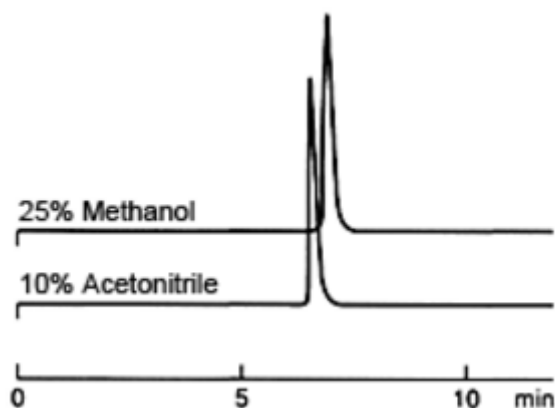
Figura 20 – Relação entre a mistura de solventes e pressão em uma coluna (STR ODS-II, 150 x 4.6 mm).



Fonte: SNYDER et al., 2010

3) Força de eluição: a acetonitrila apresenta uma maior força de eluição, em alguns casos, quando comparada ao metanol em concentrações mais baixas (Figura 21) (SNYDER et al., 2010).

Figura 21 – Comparação da eluição da cafeína em gradiente metanol e acetonitrila.



Fonte: SNYDER et al., 2010

Além dessas três características citadas, pode haver diferenças na separação dos compostos e formato das bandas cromatográficas. Porém, a utilização de acetonitrila apresenta fatores negativos, como o custo do solvente, toxicidade e, interações com a fase estacionária, diminuindo o tempo de vida da coluna.

- Quantidade de bandas

O primeiro parâmetro a ser observado foi a diferença na quantidade de sinais entre ambas as metodologias (Tabela 4).

Tabela 4 – Contagem de picos ao se utilizar metanol e acetonitrila como fase móvel, 254 nm.

Tipo de solvente	Branco	<i>F. solani</i>	<i>P. cassiae</i>	Co-cultivo
Metanol	90	102	111	111
Acetonitrila	87	167	164	168

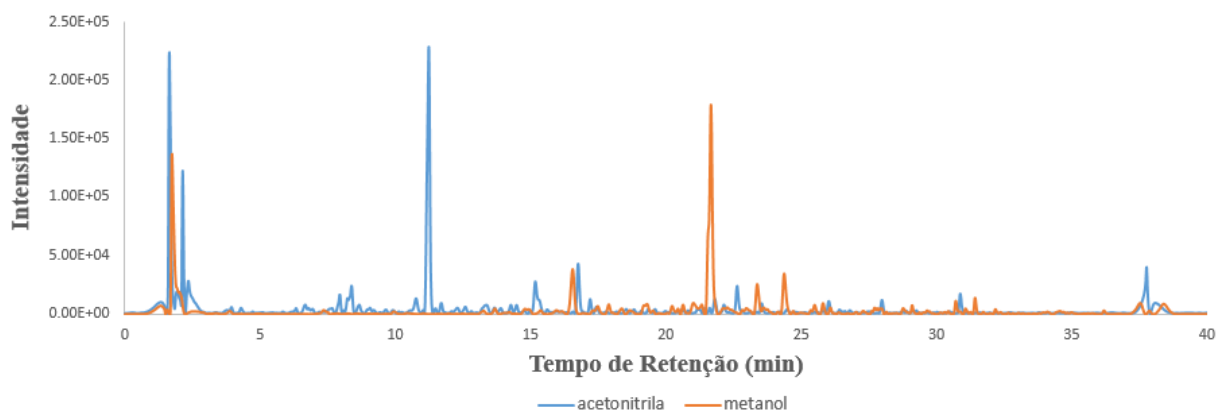
Fonte: Autor

Constata-se que ocorreu um aumento no número de bandas próximo de 29,4% de metanol para acetonitrila. Um aumento do número de sinais observados corresponde com uma resolução global aumentada, em outras palavras, a metodologia que utiliza de acetonitrila como fase móvel propiciou uma melhor separação dos compostos presentes no extrato.

- Força de eluição e afinamento dos sinais

Em relação a força de eluição dos solventes, ao compararmos dois cromatogramas referente ao fungo *F. solani* em ambas as metodologias (Figura 22), nota-se um deslocamento para a esquerda dos sinais ao se utilizar acetonitrila

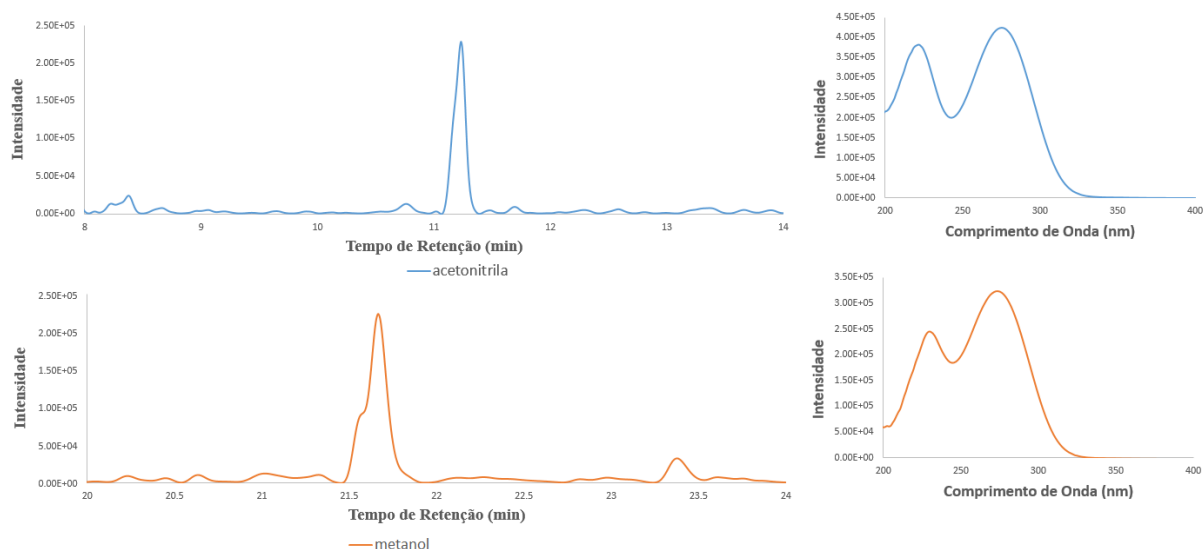
Figura 22 – Cromatogramas do fungo *F. solani* seguindo as metodologias com acetonitrila e metanol.



Fonte: Autor

Ao compararmos um mesmo composto que elui em 11,29 min. em acetonitrila – 21,65 min. em metanol (Figura 23), é observado um afinamento nos sinais, o que sugere que a metodologia que utiliza acetonitrila pode propiciar uma maior detecção, tendo em vista que o alargamento dos sinais diminui a intensidade e pode provocar a sobreposição de sinais. Dessa maneira, a fase móvel escolhida foi a acetonitrila.

Figura 23 – Comparação de um mesmo sinal para diferentes fases moveis.

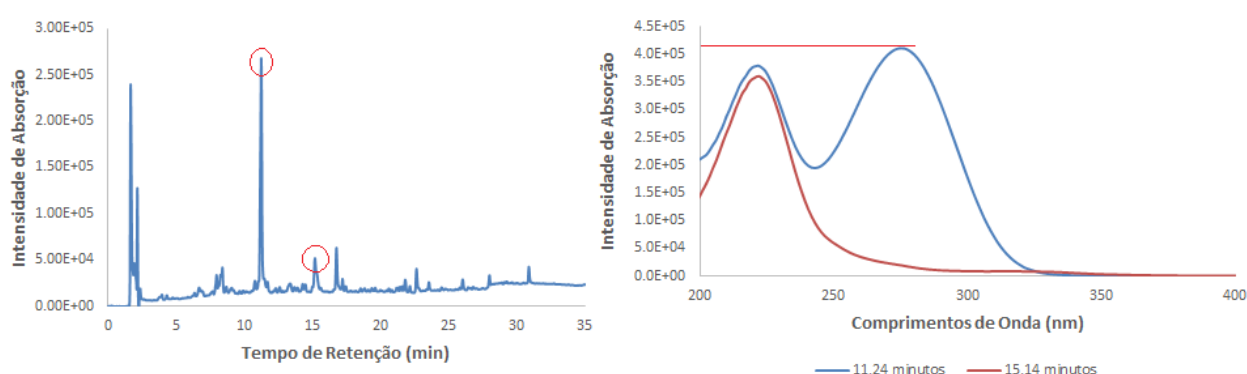


Fonte: Autor

4.3.2 Extraindo as intensidades máximas e otimizando os cromatogramas de CLAE-DAD

Uma das abordagens iniciais ao se trabalhar com dados de CLAE-DAD é analisar qual comprimento de onda é mais adequado para se observar e comparar os cromatogramas. Tal procedimento, em alguns casos, pode não chegar em uma condição otimizada para todas as substâncias eluídas, tendo em vista a grande quantidade de compostos químicos que podem absorver em comprimentos de ondas distintos (Figura 24).

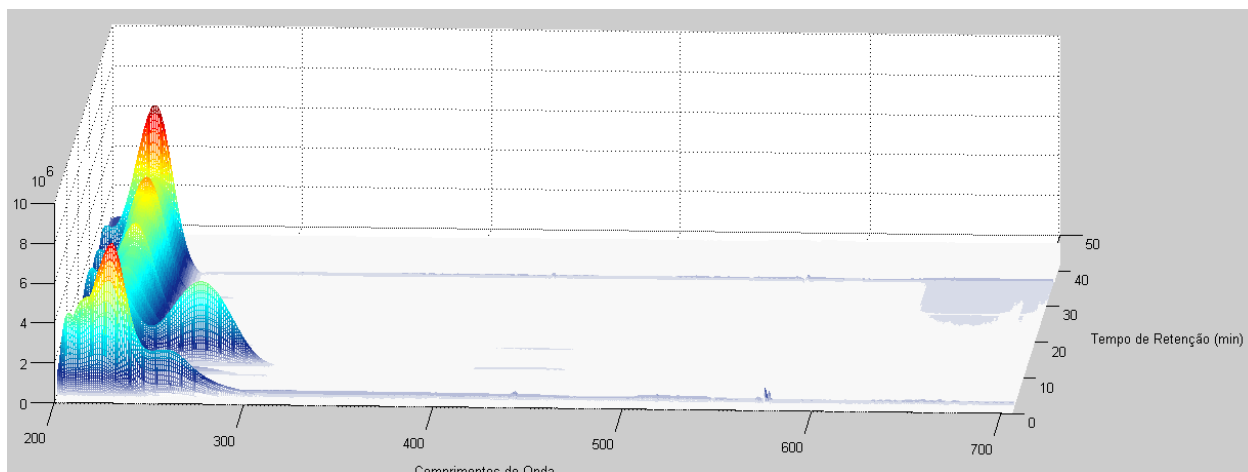
Figura 24 – Exemplificação da diferença de intensidades de absorção máximas.



Fonte: Autor.

Uma abordagem proposta para trabalhar com maiores intensidades e facilitar a visualização e comparação dos cromatogramas pode ser feita através da função “MAX” do Matlab, onde ocorre a busca pelo valor máximo de cada tempo de retenção. Dessa maneira, os dados de CLAE-DAD obtidos foram organizados em matrizes com todos os comprimentos de onda analisados e suas intensidades relativas (Figura 25).

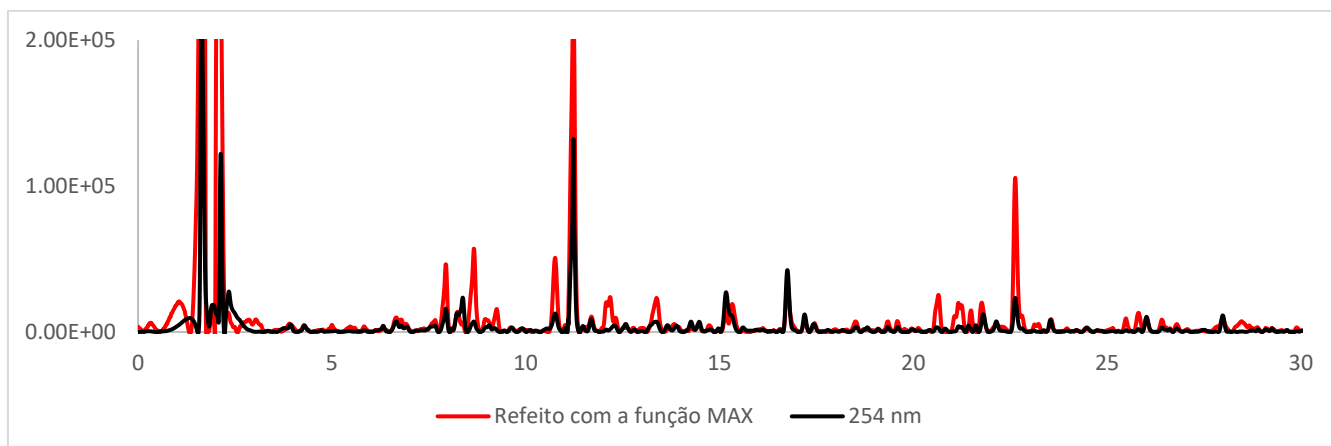
Figura 25 – Exemplificação gráfica de uma matriz com todos os comprimentos de onda.



Fonte: Autor.

Após a organização, foram extraídas as intensidades máximas através do comando: $[Y]=\max(X,[],DIM)$ e posteriormente a linha de base foi refeita. Ao compararmos um cromatograma refeito através deste procedimento e um descrito na seção 4.2.1, ambos da mesma réplica e fungo, torna-se notável o aumento das intensidades (Figura 26).

Figura 26 – Cromatogramas do fungo *F. solani*: refeito com a função MAX e em 254 m.



Fonte: Autor.

Observa-se que a utilização da função MAX melhora as intensidades dos cromatogramas, facilitando a comparação e visualização de sinais. Dessa maneira, as abordagens quimiométricas foram baseadas em cromatogramas refeitos com a função MAX.

4.4 Abordagem quimiométrica para os dados de CLAE-DAD

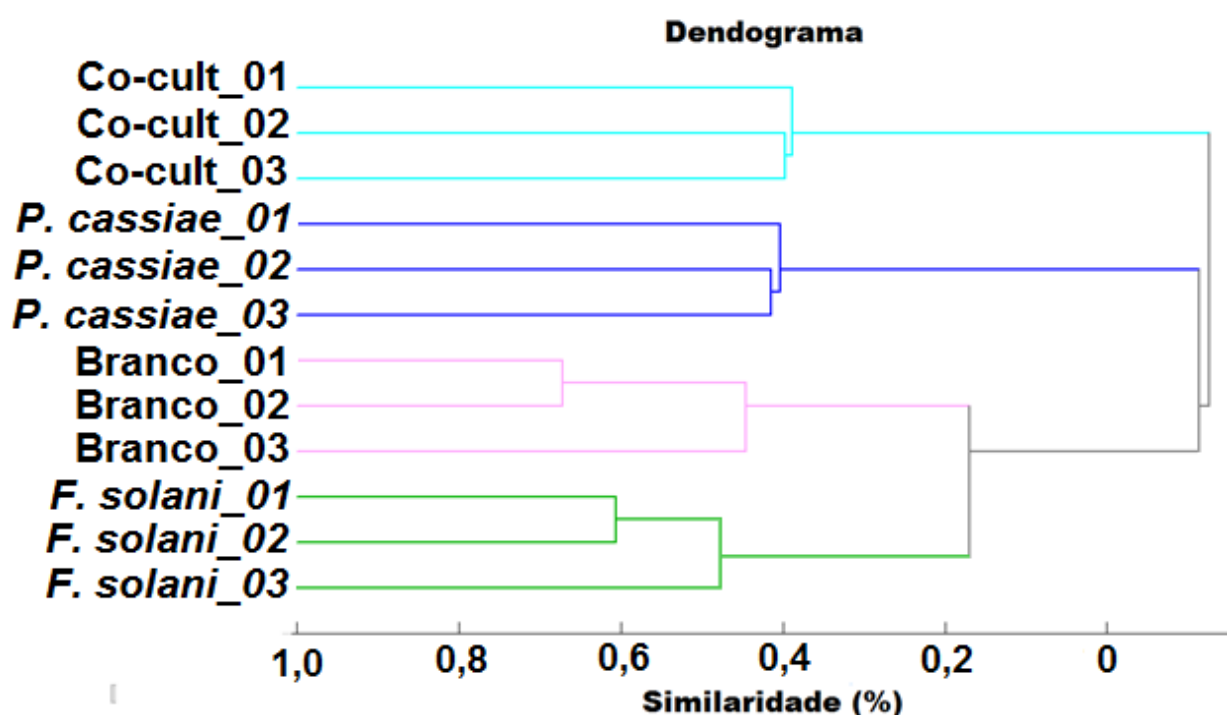
4.4.1 Visualização de similaridade do conjunto de dados por HCA

A análise não supervisionada utilizada nesse trabalho consiste no uso da ferramenta HCA, que busca verificar a similaridade existente entre um determinado conjunto amostral, analisando como um todo a matriz de dados. Dessa maneira, é possível verificar visualmente a concordância entre amostras pelos graus de similaridade encontrados através de um dendograma.

O método não supervisionado HCA (Figura 27) conseguiu separar o conjunto de dados em 4 clases distintas com uma similaridade de 38%. As amostras do branco 01 e 02 são as mais semelhantes, seguidas das amostras *F. solani* 01 e 02. O conjunto de dados ficou organizado em grupos com similaridades entre 50% a 38%. Valores próximos a 100% correspondem a amostras idênticas, a medida que esse valor decresce, significa que as amostras começam a diferir em suas informações em relação ao conjunto de dados, chegando a zero, onde não existe nenhuma similaridade.

É importante destacar que as diferenças podem ser virtude do comportamento único em cada experimento devido à grande complexidade existente quando se trabalha com matrizes biológicas. Sabe-se que podem existir fenômenos de indução ainda incompreensíveis que acontecem em um número aleatório de réplicas (JANSEN et al., 2015), em conjunto com possíveis variações metabólicas e biológicas que possam ocorrer durante o crescimento de microrganismos (WILLIAMS, et al. 2008).

Figura 27 – Dendograma obtido pela análise não supervisionada HCA para o conjunto de dados de CLAE-DAD.



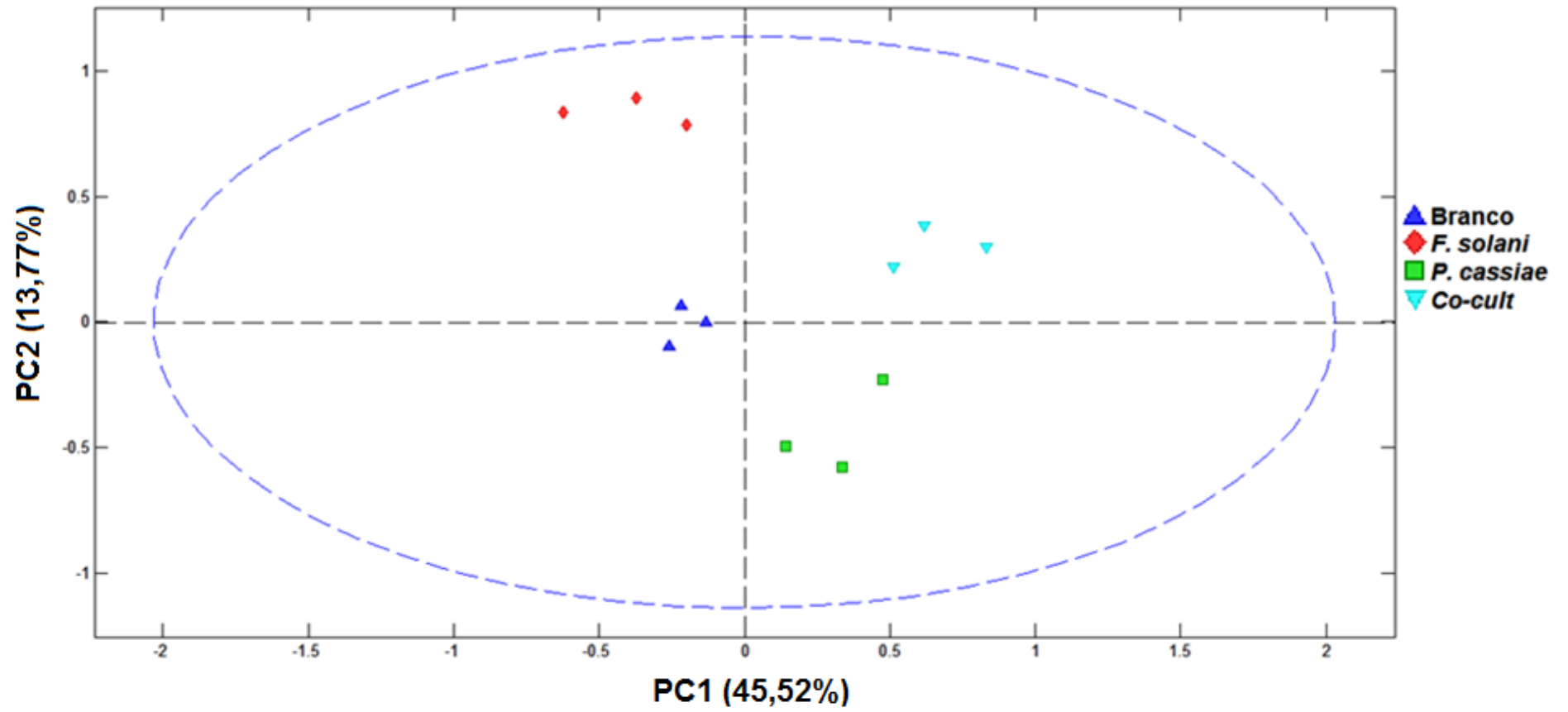
Fonte: Autor

O método utilizado indicou a existência de diferenças entre as amostras de co-cultivo e das culturas isoladas, porém, não propicia a visualização de quais sinais são responsáveis por tal separação, consequentemente, uma segunda ferramenta quimiométrica foi utilizada, com o intuito de observar quais variáveis são responsáveis pela distinção do conjunto amostral.

4.4.2 Utilização de método supervisionado PLS-DA para otimização de resultados

Visando observar as diferenças existentes entre os experimentos de co-cultivo em relação as culturas isoladas, o modelo de classificação PLS-DA foi aplicado aos dados de CLAE-DAD da seção 4.3.2. Na Figura 28 temos o gráfico de *scores* gerado.

Figura 28 - Gráfico de *scores* das variáveis refeitas de CLAE-DAD.

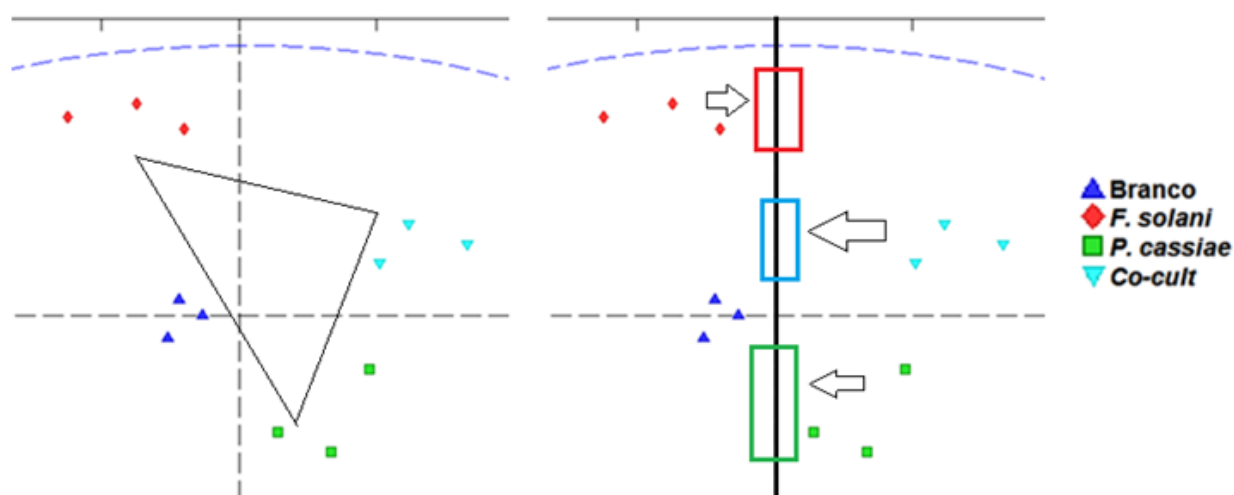


Fonte: Autor

A posição das amostras no gráfico de *scores* informa quais são suas características em relação aos dados de CLAE-DAD. Em um primeiro momento, o agrupamento das amostras sugere uma certa concordância em relação a cada grupo de experimentos, onde cada réplica se apresenta próxima a outra.

As distribuições dos *scores* das amostras do branco estão mais próximas, o que era esperado, tendo em vista que apresentam apenas compostos do meio batata dextrose ágar, que devem variar apenas em concentração de constituintes, levando em consideração possíveis erros aleatórios. Em relação ao co-cultivo, temos uma distribuição geométrica na forma de um triângulo em relação a cada cultivo isolado. Em determinada dimensão ele está numa região que fica entre os dois fungos, demonstrando que existem variáveis existentes no experimento de co-cultivo que estão presentes nas culturas isoladas (Figura 29). Em outras palavras, os sinais de CLAE-DAD encontrados em *F. solani* e *P. cassiae* podem ser encontrados no experimento de co-cultivo.

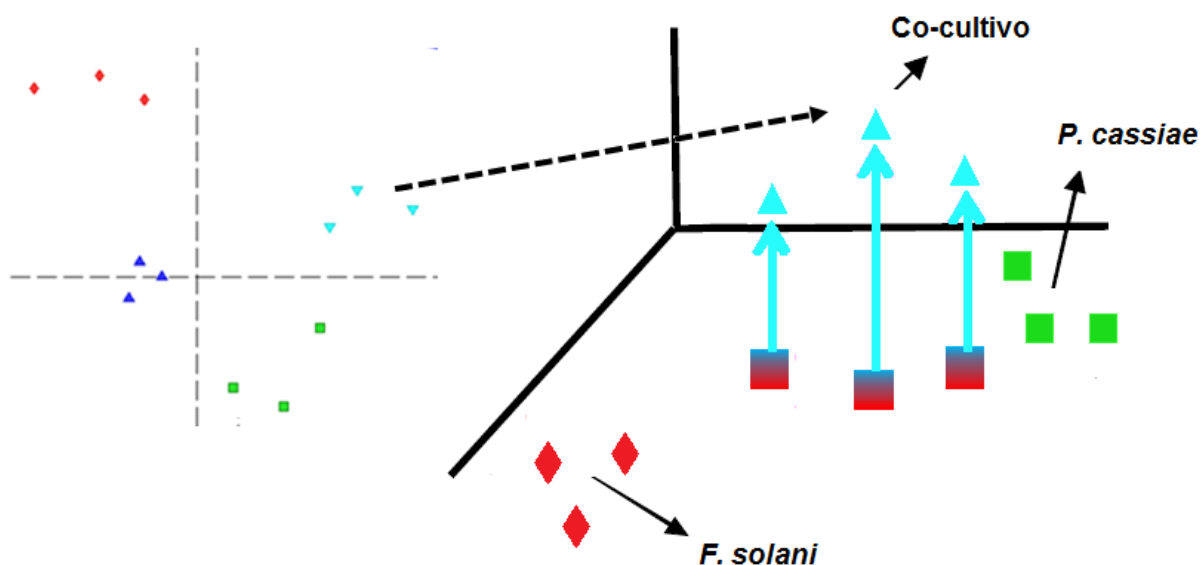
Figura 29 – Elucidação e análise dos grupos formados no gráfico de *scores*.



Fonte: Autor

Por outro lado, o co-cultivo se distânciava de ambos os cultivos isolados quando observamos o vértice do triângulo mais próximo do co-cultivo, demonstrando que, em seu conjunto de dados, existe algum sinal que o distingue das culturas isoladas (Figura 29-30).

Figura 30 – Gráfico de *scores* observado tridimensionalmente.

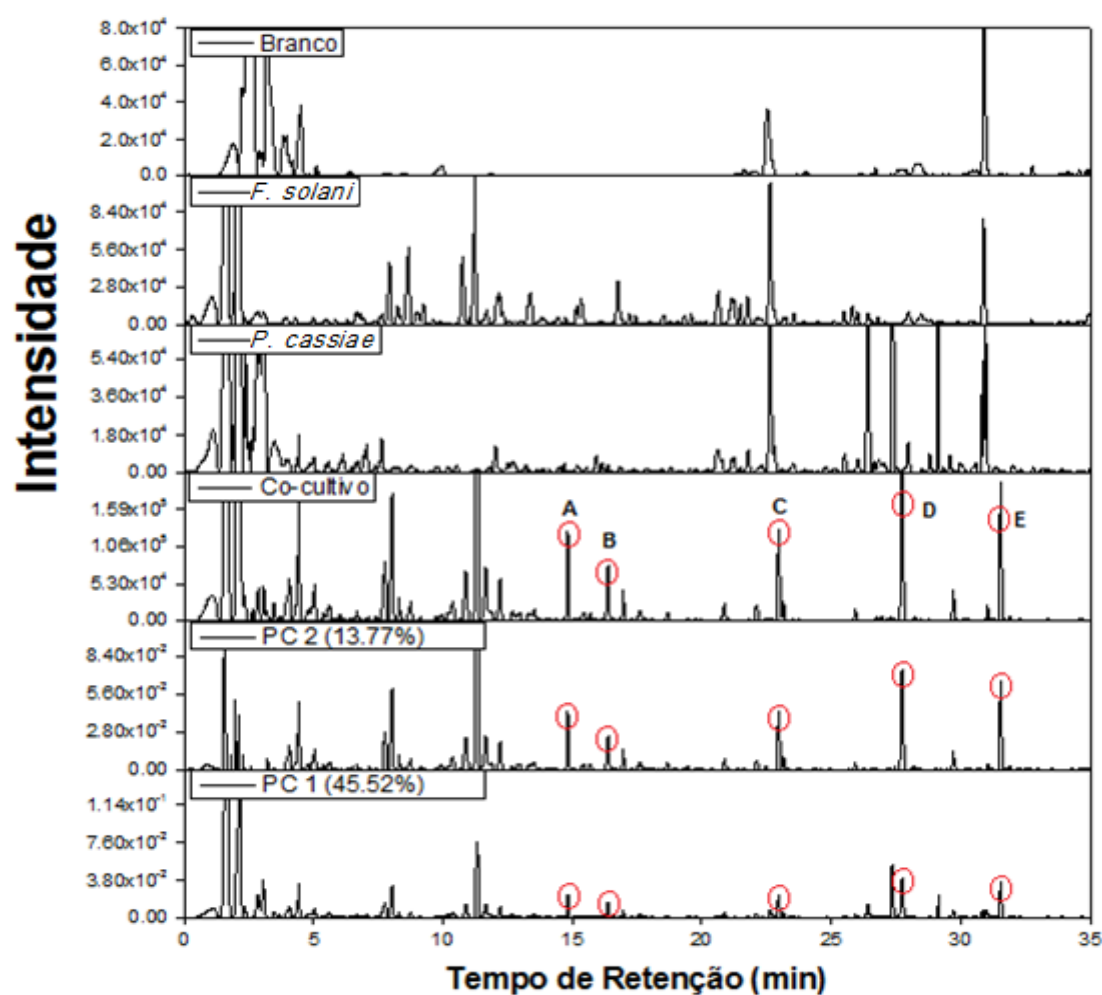


Fonte: Autor

Ao direcionarmos a análise para os metabolitos induzidos, analisou-se quais coordenadas (PC1 e PC2) e qual parte dessas coordenadas (ambas positivas) (Figura 29) encontravam-se as réplicas dos experimentos de co-cultivo.

O gráfico de *loadings* mostra o conjunto de variáveis responsáveis pela distribuição geométrica das amostras no gráfico de *scores*, dessa maneira, foi efetuada uma comparação entre os sinais positivos presentes na PC1 e PC2 com os cromatogramas da seção 4.3.2. Em virtude da existência de três réplicas para cada amostra, foi realizada a média dos cromatogramas de cada experimento e, posteriormente, a comparação com os gráficos de *loadings* da PC1 e PC2. Ao analisarmos a Figura 31, observamos que alguns dos sinais que provocaram o afastamento das amostras de co-cultivo no gráfico de *scores*, estão presentes apenas nos experimentos onde ocorreu a interação entre os dois microrganismos, demonstrando indícios da produção de novos metabólitos.

Figura 31 – Comparação do gráfico de *loadings* da PC1 e PC2 com a média das réplicas dos cromatogramas.



Fonte: Autor

Os sinais identificados apenas nos experimentos de co-cultivo estão descritos na Tabela 5 e os cromatogramas das absorções no UV na Figura 32.

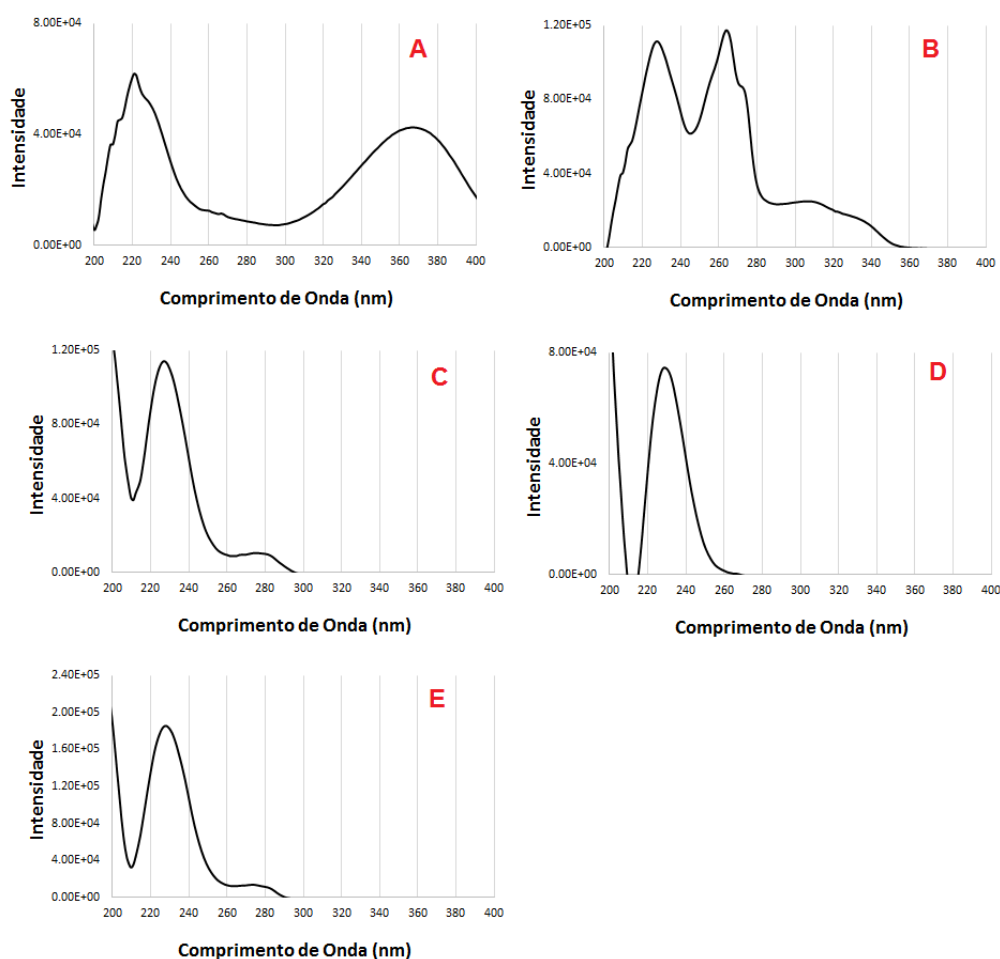
Tabela 5 – Identificação dos compostos em co-cultivo em relação a técnica de CLAE-DAD

Identificação	Tempo de Retenção (min)	Absorção no UV
A	14,85	222; 371
B	16,39	228; 265
C	23,00	228
D	27,75	230
E	31,55	228

Fonte: Autor

Na maioria dos casos é possível salientar que o comprimento de onda revela compostos com baixo número de cromóforos, exceto para a substância A, na qual é possível indicar a presença de grupos aromáticos policonjugados. Podemos ainda notar que o tempo retenção sugere compostos de média para baixa polaridade (Figura 32). Contudo, os valores de UV são insuficientes para a determinação dos compostos que marcam o grupo do co-cultivo e assim técnicas mais sofisticadas foram utilizadas afim de solucionar a estrutura desses compostos.

Figura 32 – Absorções das substâncias induzidas em co-cultivo.

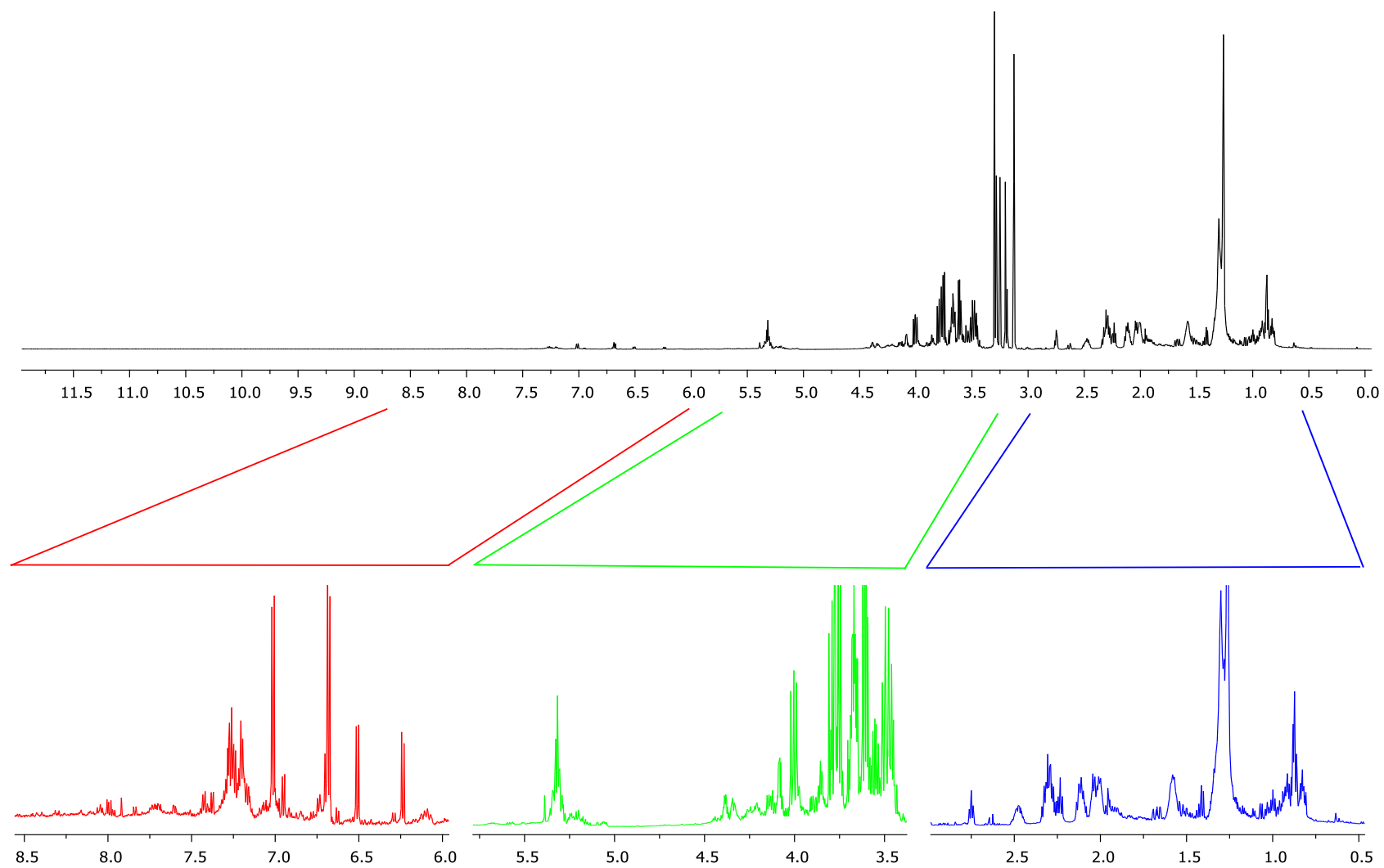


Fonte: Autor

4.5 Análise dos extratos por RMN de ^1H

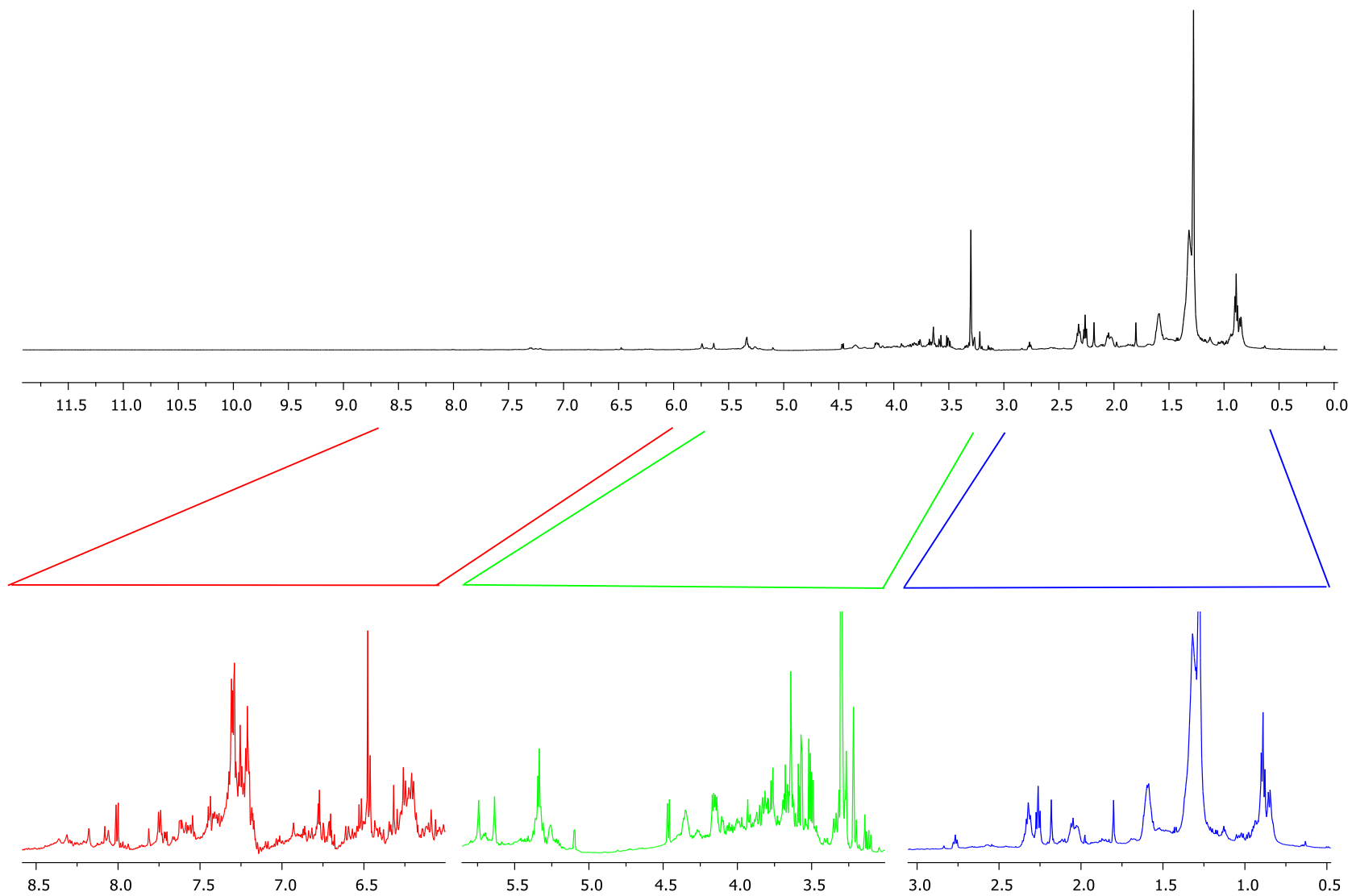
Os espectros dos extratos, Figura 33-36, obtidos pela análise de ^1H RMN apresentaram uma complexidade elevada por se tratar de extratos brutos.

Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H do fungo *F. solani* em meio batata dextrose ágar (CD_3OD – 600 MHz).



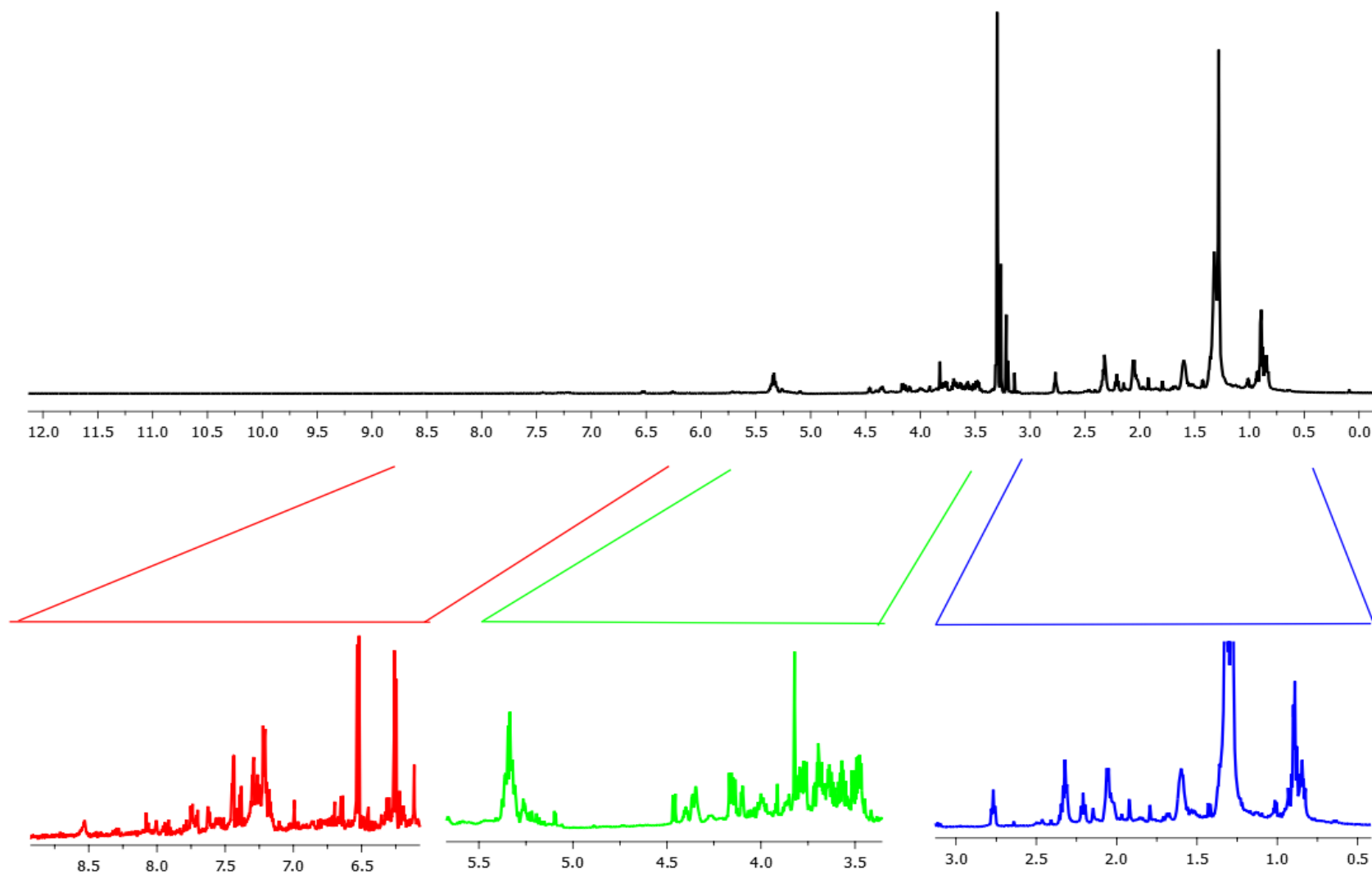
Fonte: Autor

Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H do fungo *P. cassiae* em meio batata dextrose ágar (CD_3OD – 600 MHz).



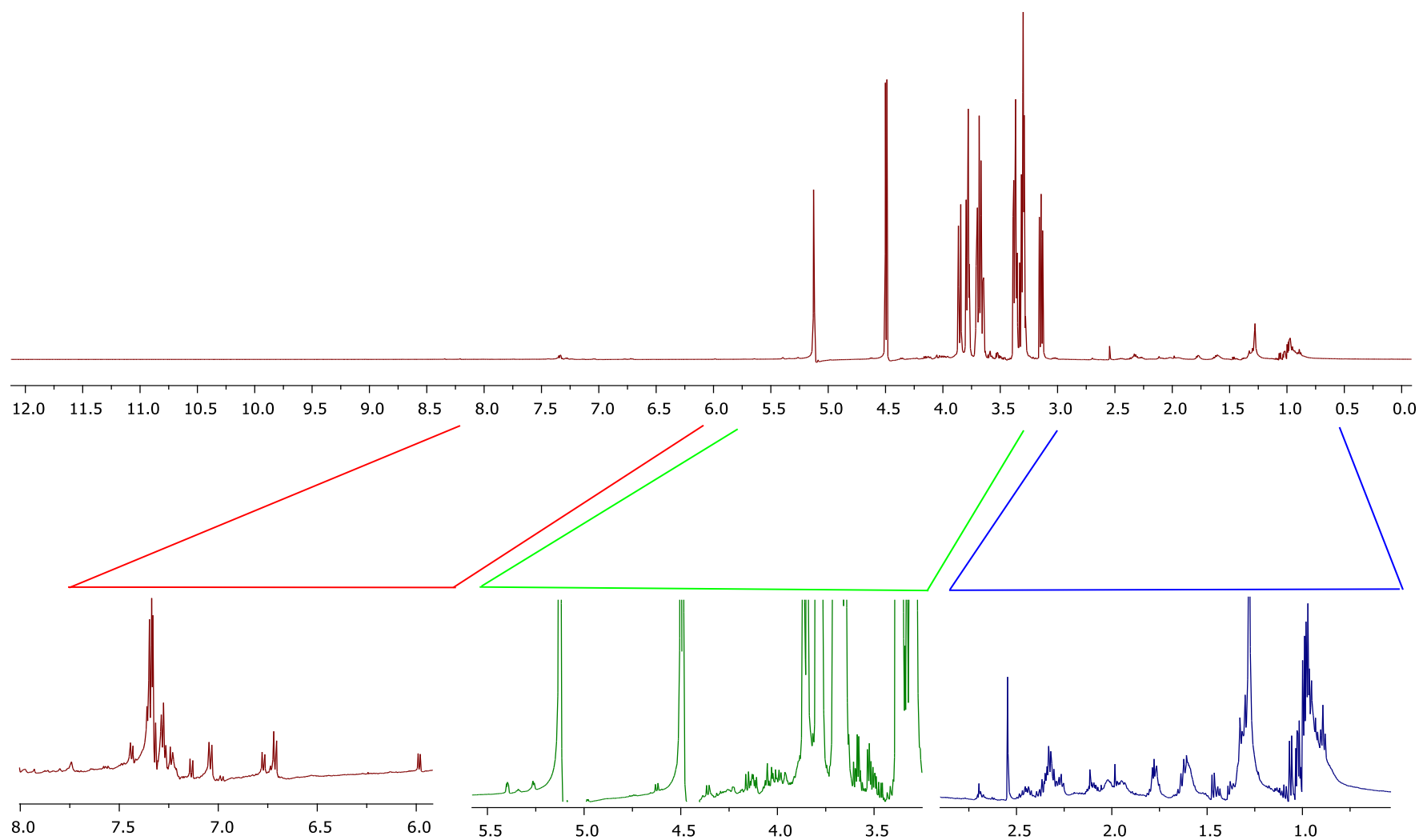
Fonte: Autor

Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do experimento de co-cultivo dos fungos *P. cassiae* e *F. solani* em meio batata dextrose ágar (CD_3OD – 600 MHz).



Fonte: Autor

Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H do meio batata dextrose ágar (CD_3OD – 600 MHz).

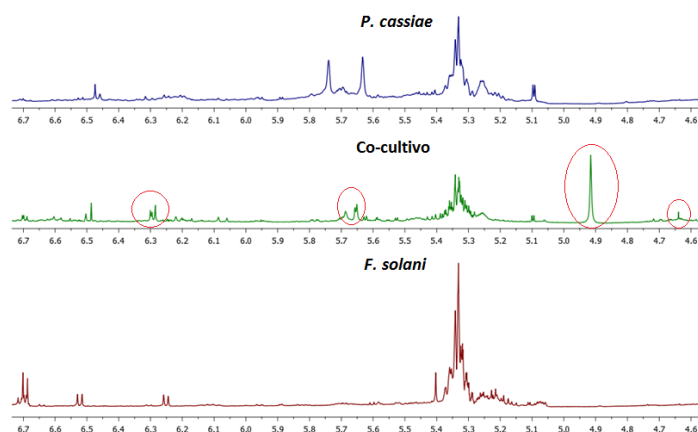


Fonte: Autor

Os espectros referente aos fungos *F. solani* e *P. cassiae* apresentaram perfil químico distintos. É possível verificar no espectro de *F. solani* uma maior complexidade nas regiões de hidrogênios alifáticos (0,0-3,0 ppm), metílicos, metilênicos e metínicos ligados a oxigênios e olefinicos (3,0-5,5 ppm) quando comparada esta mesma região no espectro do *P. cassiae*. Ainda observou-se uma baixa intensidade na região de hidrogênios aromáticos (6,0-8,5 ppm) para ambos os espectros.

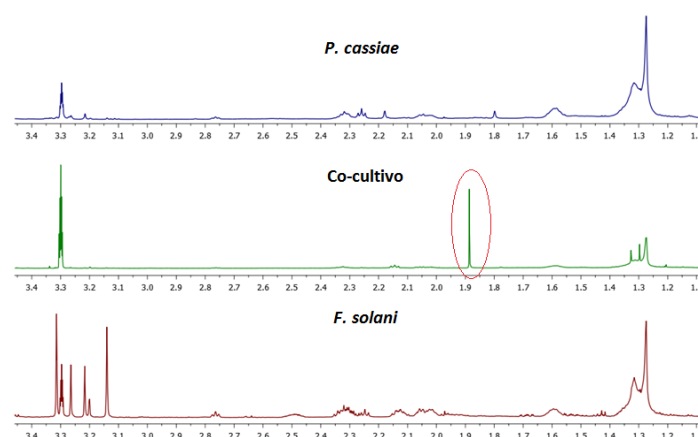
O espectro do co-cultivo apresentou uma maior similaridade com o espectro do *F. solani*, sendo observado diferenças de sinais em diversos deslocamentos que são demonstrados na Figura 37-38.

Figura 37 – Diferença de sinais do co-cultivo em relação as culturas isoladas.



Fonte: Autor

Figura 38 - Diferença de sinais do co-cultivo em relação as culturas isoladas.



Fonte: Autor

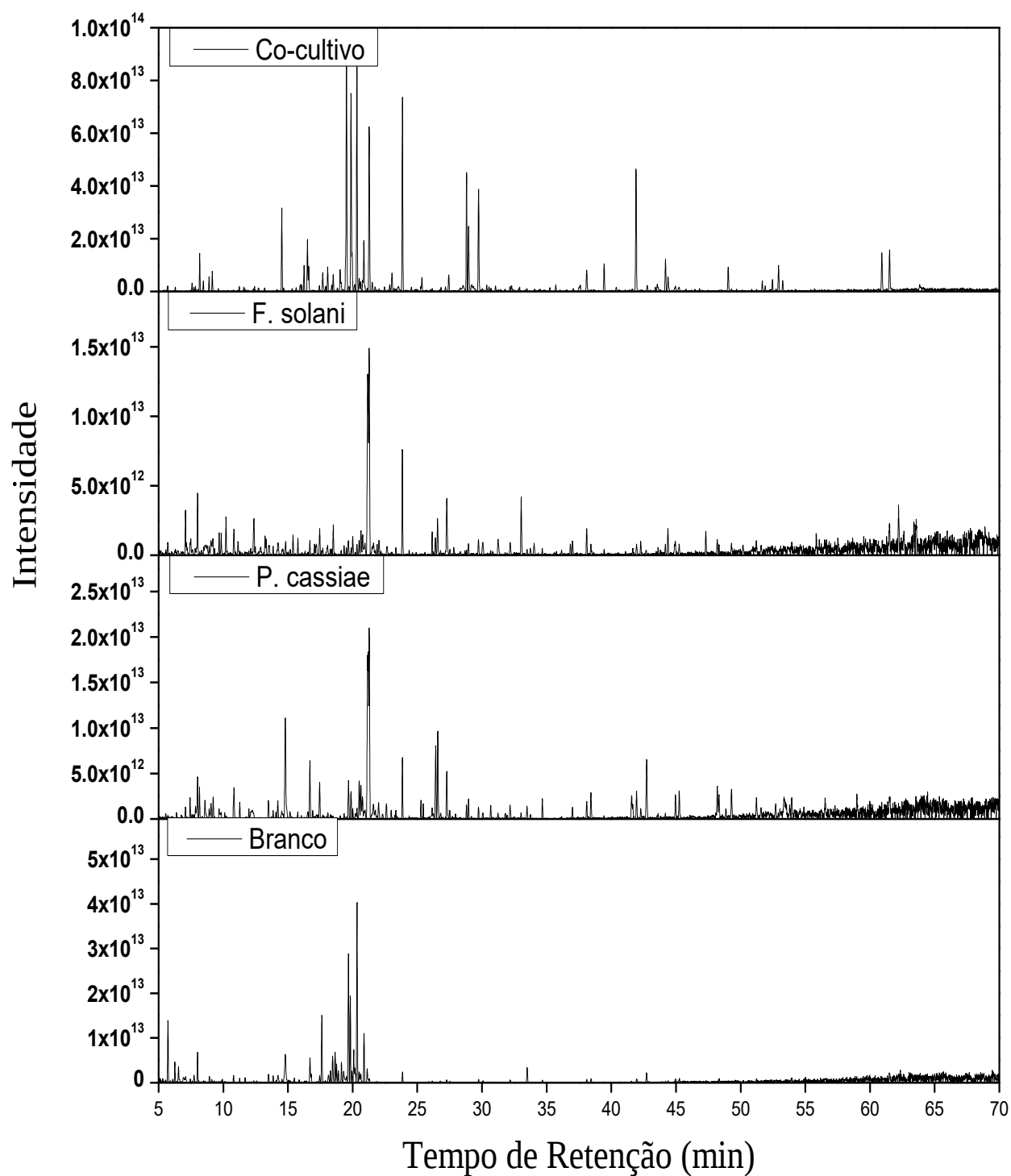
Apesar das diferenças significativas encontradas, não foi possível realizar experimentos na tentativa de elucidar ou correlacionar as moléculas em mistura. As amostras foram submetidas a técnicas como TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond

Correlation) e HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation), porém, os sinais observados encontram-se numa proporção minoritária quando comparado com o restante do extrato, o que impossibilitou a identificação das mesmas. Dessa maneira, foi proposto a análise por CG-EM, uma técnica extremamente sensível e com melhor capacidade de separação cromatográfica afim de determinar os possíveis compostos.

4.6 Análise dos extratos por CG-EM

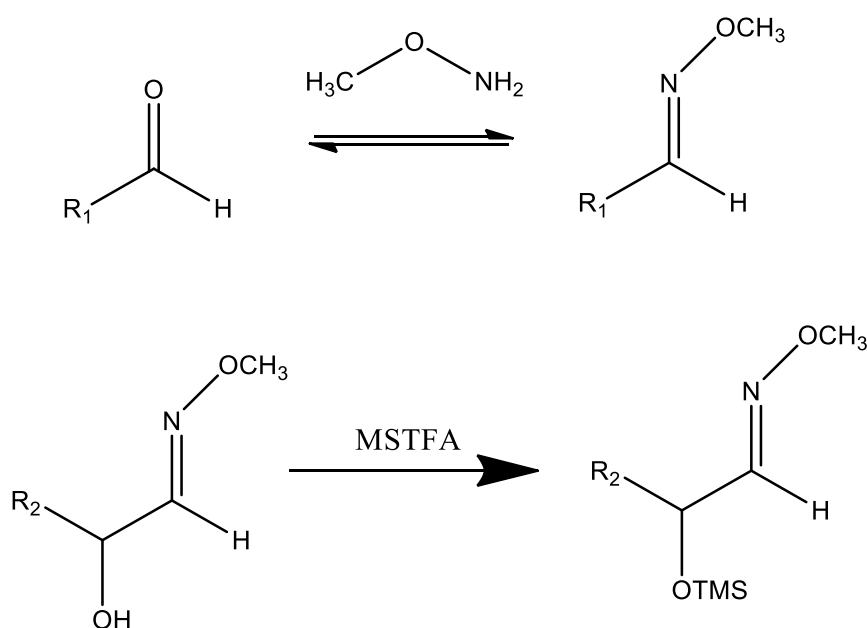
Os cromatogramas obtidos dos extratos em meio potato dox ágar pela técnica CG-EM são apresentados na Figura 39.

Figura 39 – Cromatogramas dos extratos obtidos por CG-EM.



Apesar dos cromatogramas não estarem na mesma escala, é possível avaliar visualmente a diferença nos perfis cromatográficos. Vale ressaltar que a natureza da técnica empregada leva em consideração que os compostos analisados devem ser voláteis e termicamente estáveis, fato que não ocorre em metabólitos polares. Dessa maneira, as derivatizações visam produzir mudanças nas estruturas químicas das substâncias com o objetivo de torná-las termicamente estáveis, menos reativas e que interajam menos com a coluna (LUEDEMANN et al., 2008). A Figura 40 demonstra um esquema simplificado de metoximação seguido de sililação.

Figura 40 – Esquema simplificado das reações de metoximação seguido de sililação.



Fonte: Autor

Através da base de dados NIST, foi realizada uma busca dos sinais observados nos cromatogramas com uma similaridade superior a 70%, sendo encontradas as substâncias descritas na Tabela 6 e os fragmentos comparados nas Figuras em anexo 41-70.

Tabela 6 – Comparação com banco de dados NIST dos sinais observados em CG-MS.

ID	Tempo de Retenção (min)	(m/z)	Similaridade	Substâncias
1	3,31	204	91%	<i>N,N'</i> -di(trimetilsilil)ureia
2	3,72	108	92%	Trimetil silil eter de glicerol
3	4,51	322	92%	ácido propanoico, 2,3-di[(trimetilsilil)oxi
4	4,89	230	71%	ácido nonanoico, trimetilsilil ester
5	7,59	350	83%	ácido malico, trimetilsilil, di(trimetilsilil) ester
6	7,86	350	82%	ácido hexanedioico, di(trimetilsilil) ester
7	7,99	290	83%	3,8-dioxi-2,9-disilildecano, 2,2,9,9-tetrametil-5,6-di[(trimetilsilil)oxi
8	8,18	410	72%	butanal, 2,3,4-tri[(trimetilsilil)oxi
9	8,91	336	92%	trimetil(2,6 ditert.-butilfenoxi)silano
10	9,62	424	91%	ácido treonico, tri(trimetilsilil) eter
11	11,59	364	85%	ácido xilonico, 2,3,5-tri(trimetilsilil)
12	12,33	332	72%	ácido azelaico, di(trimetilsilil) ester
13	12,72	466	77%	ácido mannoico, 2,3,5,6-tetra(trimetilsilil)
14	13,19	318	79%	ácido octanedioico, di(trimetilsilil) ester
15	14,53	512	95%	arabitol, penta(trimetilsilil) eter
16	16,25	322	86%	ácido azelaico, di(trimetilsilil) ester
17	16,51	526	89%	ácido ribonico, 2,3,4,5-tetra(trimetilsilil)
18	17,43	210	76%	pirrolo[1,2]pirazina-1,4-diona
19	17,69	300	92%	ácido tetradecanoico, trimetilsilil ester
20	18,07	526	84%	ribo-hexitol, 3-deoxi-1,2,4,5,6-penta(trimetilsilil)
21	18,81	569	84%	frutose, 1,3,4,5,6-penta(trimetilsilil)
22	20,33	627	86%	glicose hexa(trimetilsilil)
23	21,28	604	91%	trimetilsilil eter de glucitol
24	23,21	326	77%	ácido Palmiteladico, trimetilsilil ester
25	25,29	247	76%	tetrahidro-7-metilbenzoacridina
26	33,49	244	82%	ácido linoleico, trimetilsilil
27	34,23	244	85%	benzilhexahidropirrolo[1,2]pirazina-1,4-diona
28	35,71	438	77%	xilofuranoso-1,2,3,5-tetra(trimetilsilil)
29	38,10	278	91%	ácido 1,2-benzenodicarboxílico, mono(2-etilhexil) ester
30	42,78	358	75%	3,6-dioxi-2,7-disiloctano

Fonte: Autor

A presença de açúcares nas amostras é sugerida quando realizamos a busca no banco de dados, sendo possível constatar a presença de frutose, glicose e derivados. Uma grande variedade de ácidos é encontrada, junto com heterociclos e estruturas com cadeias carbônicas longas. A Tabela 7 esquematiza os sinais observados em cada amostra em relação a Tabela 6.

Tabela 7 – IDs referentes aos sinais de CG-EM quando comparado as amostras de extratos.

Amostras	Sinais integrados	ID observadas	Compostos Adicionais
Branco	27	2, 6, 7, 20, 21, 22, 23	-
<i>P. cassiae</i>	56	6, 7, 12, 14, 16, 19, 20, 21, 25, 27, 29	1-metil-2-metoxi-2-piridinol 1-dodecanol ; 3,5-di(1,1-dimetiletil)fenol
<i>F. solani</i>	51	6, 8, 9, 11, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 27	2-4-dietilheptanol; 1-tetradecanol
Co-cultivo	85	Todas	

Fonte: Autor

Alguns ácidos orgânicos apresentados na Tabela 6 podem ser atribuídos aos metabólitos primários que tem importância industrial (DEMAIN et al., 2000). Por exemplo:

A) Ácido azelaico: utilizado no tratamento de acne, possuindo atividade antimicrobiana e anticancerígena (PANYOSAK et al., 2009).

B) Ácido hexadecanóico: utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel (CHEN et al., 2015).

C) Ácido octadecanóico: tem sido estudado como matéria-prima na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, sendo associado a diminuição do colesterol por via oral (SAGIRI et al., 2015).

D) Ácido linoleico: utilizado no tratamento de acnes, possuindo propriedades anti-inflamatórias (LETAWE et al., 1998), além de ser essencial para o organismo humano.

E) Ácido xilônico: possui aplicações na indústria alimentícia, na redução da concentração de acrilamidas, e na agricultura no combate a determinados patógenos (TOMODA et al., 2004; PUJOS, 2006).

Apesar do número de sinais observados em cada cromatograma, poucas substâncias são encontradas na base de dados NIST quando comparamos perfis de fragmentação, isso ocorre pelo fato de que a maioria dos compostos presentes da base de dados pertencem a plantas, enquanto que a informação de metabólitos oriundos de fungos ainda é reduzida.

5 CONCLUSÕES

As análises e discussões, neste trabalho, tiveram como objetivo verificar possíveis efeitos de indução de metabólitos provenientes da interação dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae* num experimento de co-cultivo.

Em relação a aspectos morfológicos, obtiveram-se dois indícios de uma possível variação metabólica dos fungos no experimento de co-cultivo: 1) Quando acompanhamos o crescimento de ambos os fungos e notamos que o fungo *Phomopsis cassiae* modificou a coloração de suas bordas nas regiões próximas ao *Fusarium solani*. 2) A existência de uma região de inibição. Tais fatos sugerem a produção de algum composto (ou compostos) que pudesse ser decorrente de um mecanismo de defesa, sinalizando para que o fungo *Fusarium solani* pare de se desenvolver na região próxima ao contato entre ambos, preservando o espaço já ocupado pelo *Phomopsis cassiae*.

Através das análises de CLAE-DAD, e com o auxílio de ferramentas quimiométricas, foi possível confirmar a existência de compostos produzidos apenas nos experimentos de co-cultivo. É importante ressaltar que o método supervisionado PLS-DA indicou que todos os experimentos de co-cultivo apresentaram boa correlação e que pelo menos cinco substâncias estão presentes em todas as réplicas, demonstrando a reprodutibilidade da metodologia aplicada.

Os dados provenientes de CG-EM sugerem substâncias para os extratos, sendo encontrado diferentes compostos para cada amostra com um grau de similaridade superior a 70%. Apesar da diferença existente entre os sinais do co-cultivo em relação ao resto das amostras, não foi possível afirmar que as substâncias observadas nos cromatogramas de CG-EM são as mesmas sugeridas nos cromatogramas de CLAE-DAD.

A comparação dos espectros de ^1H RMN demonstrou diversos sinais que existem apenas nos experimentos de co-cultivo. Porém, a proporção minoritária dos mesmos impossibilitou a correlação ou identificação de tais sinais.

A utilização de ferramentas quimiométricas demonstrou ser de grande valia, maximizando e otimizando o conjunto de dados gerados, propiciando uma melhor observação das substâncias induzidas e correlacionando as réplicas com seus respectivos sinais.

Embora o cultivo em meio sólido possibilite uma melhor visualização no escopo de um experimento de co-cultivo, ele se demonstra limitado em relação a quantidade de extrato obtido, o que impossibilita, em muitos casos, a identificação das substâncias induzidas, fato relatado na literatura (BERTRAND et al., 2013).

Conclui-se que a abordagem experimental em co-cultivo se revela uma boa ferramenta para indução de metabólitos em microrganismos, estimulando a produção de compostos com diversos potenciais. Porém, existem ainda desafios a serem superados quando o objetivo é a identificação

de metabolitos induzidos, devido a proporção minoritária desses compostos em relação ao restante das substâncias produzidas.

Esse trabalho tem como perspectivas a produção e análise dos metabólitos induzidos no experimento de co-cultivo, tendo em vista o potencial dessas substâncias para atuar no controle do crescimento de microrganismos ou até mesmo no combate dos mesmos.

Tal fato é passível de afirmação ao se observar as relações ecológicas existentes na natureza, onde a busca por alimento ou a preservação de espaço é consequência de compostos químicos secretados por um microrganismo na tentativa de se defender dos outros. Para tanto, é necessário aumentar a fonte de extrato, visando uma maior massa que permita a separação dos constituintes de interesse, fazendo uso de técnicas como EM e experimentos de RMN mono e bidimensionais.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. R.; ARFMANN, H. A. Fusalanipyrone, a monoterpenoid from *Fusarium solani*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3310-3311, 1988.
- ANJOS, J. R. N.; CHARCHAR, M. J. A.; GUIMARÃES, D. P. Ocorrência de queima das folhas causadas por *Phomopsis* sp. em Aroeira no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 649-650, 2001.
- 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, 2014.
- BAUMANN, G. *Senna spectabilis*. **Central African Plants: a Photo Guide**, 2009. Disponível em: <http://www.centralafricanplants.senckenberg.de/root/index.php?page_id=34&id=2760#> . Acesso em: 03 fev. 2017.
- BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARD, A.; AZZOLLINI, A.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 219-228, 2013.
- BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- BORCHARDT, J. K. The beginnings of drug therapy: ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspectives**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.
- BOULESTEIX, A. L. PLS dimension reduction for classification with microarray data. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 3, n. 1, 2004. doi:10.2202/1544-6115.1075.
- BUNGIHAN, M. E.; TAN, M. E.; KITAJIMA, M.; KOGURE, N.; FRANZBLAU, S. G.; EDISON, T. E. C.; TAKAYAMA, H.; NONATO, B. G. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 3, p. 606-609, 2011.
- BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.
- CALVERT, T. W.; AIDOO, K. E.; CANDLISH, A. G.; FUAT, A. R. Comparison of in vitro cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 413-419, 2005.
- CARDOSO, P. **Metabolomic evaluation of interactions in rhizosphere between *Senna spectabilis* and associated microorganisms**. 2015. 151 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

CHAKRAVARTHI, B. V.; DAS, P.; SURENDRANATH, K.; KARANDE, A. A. Jayabaskaran, C. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 2, p. 259-267, 2008.

CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis sp.* isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 174 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CHEN, W.; MA, L.; ZHOU, P.-P.; ZHU, Y.-M.; WHANG, 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, n. 15, p. 128-138, 2015.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern classification**. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. 680 p.

EL-BANNA, A. A.; SCOTT, P. M.; LAU, P.; SAKUMA, T.; PLATT, H. W.; CAMPBELL, V. Formation of trichothecenes by *Fusarium solani* var. *coeruleum* and *Fusarium sambucinum* in potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1169-1171. 1984.

ERBERT, C.; LOPES, A. A.; YOKOYA, N. S.; FURTADO, N. A. J. C.; CONTI, R.; PUPO, M. T.; LOPES, J. L. C.; DEBONSI, H. M. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. **Botanica Marina**, v. 55, n. 4, p. 435-440, 2012.

ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; KETTANEH-WOLD, N.; WOLD, S. **Multi and megavariate data analysis**. 3rd ed. New York: Umetrics Academy, 2001, 491 p.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of *fusarium* mycotoxins in the last decade: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185-206, 2015.

GOMES, A. T.; SMANIA, J. A.; SEIDEL, C.; SMANIA, E. F. A.; HONDA, N. K.; ROESE, F. M.; MUZZI, R. M. Antibacterial activity of orsellinates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 194-196, 2003.

GUIMARÃES, D. O.; BORGES, W. S.; VIEIRA, N. J.; OLIVEIRA, L. F.; 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, n. 11/12, p. 1423-1429, 2010.

ISHII, K.; SAKAI, K.; UENO, Y.; TSUNODA, H.; ENOMOTO, M. Solaniol, a toxic metabolite of *Fusarium solani*. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 718-720. 1971.

JANSEN, J. J.; BLANCHET, I.; BUYDENS, L. M. C.; DAM, N. M.; BERTRAND, S.; WOLFENDER, J. L. Projected orthogonalized chemical encounter monitoring (POCHEMON) for microbial interactions in co-culture. **Metabolomics**, v. 11, n. 4, p. 908-919, 2015.

LETAWE, C.; BOONE, M.; PIÉRARD, G. E. Digital image analysis of the effect of topically applied linoleic acid on acne microcomedones. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 56-58, 1998.

LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUEDEMANN, A.; STRASSBURG, K.; ERBAN, A.; KOPKA, J. Tag finder for the quantitative analysis of gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. **Bioinformatics**, v. 24, n. 5, p. 732-737, 2008.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 683-689, 2012.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: Wiley, 1989, 504 p.

MARZETTI, E.; LANDI, F.; MARINI, F.; CESARI, M.; BUFORD, T. W.; MANINI, T. M.; ONDER, G.; PAHOR, M.; BERNABEI, R.; LEEUWENBURGH, C.; CALVANI, R. Patterns of circulating inflammatory biomarkers in older persons with varying levels of physical performance: a partial least squares-discriminant analysis approach. **Frontiers in Medicine**, 2014. doi:10.3389/fmed.2014.00027.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 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, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NGUYEN, D. V.; ROCKE, D. M. Multi-class cancer classification via partial least squares with gene expression profiles. **Bioinformatics**, v. 18, n. 9, p. 1216-1226, 2002.

NITA, M.; ELLIS, M. A.; WILSON, L. L.; MADDEN, L. V. Evaluation of the curative and protectant activity of fungicides and fungicide–adjuvant mixtures on *Phomopsis* cane and leaf spot of grape: a controlled environment study. **Crop Protection**, v. 26, n. 9, p. 1377-1384, 2007.

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, p. 387-392, 2009.

PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Philosophical Magazine Series 6**, v. 2, n. 11, p. 559-572, 1901.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 1, 556 p.

PETTIT, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 1, p. 19-25, 2009.

PONMURUGAN, P.; BABY, U. I. Estimation of different cellular compounds from the mycelium of *Phomopsis theae*, causal agent of *Phomopsis* canker disease of tea. **Journal of Phytopathology**, v. 156, n. 6, p. 358-361, 2008.

PRADEEP, F. S.; BEGAM, M. S.; PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B. V. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from Paddy field soil. **World Applied Sciences Journal**, v. 22, n. 1, p. 70-77, 2013.

PUJOS, P.; JIJAKI, M. H. **Compositions for use against one or more pathogens**. WO2006032530, 23 Sept. 2004, 30 Mar. 2006.

RATHNA, J.; YAZHINI, K. B.; AJILDA, A. A.; PRABU, H. G.; PANDIAN, S. K. Production of naphthoquinones and phenolics by a novel isolate *Fusarium solani* PSC-R of Palk Bay and their industrial applications. **Bioresourcessource Technology**, v. 213, p. 289-298, 2016.

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, 2015.

SAVORANI, F.; RASMUSSEN, M.; MIKKELSEN, M.; ENGELSEN, S. B. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1131-1145, 2013.

SELEGATO, D. M.; MONTEIRO, A. F.; VIEIRA, N. C.; CARDOSO, P.; PAVANI, V. D.; BOLZANI, V. S.; CASTRO-GAMBOA, I. Biological and chemical aspects of *Senna spectabilis*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 415-426, 2017.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B. T.; PRITI, V.; MOHANA, K. P.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; UMA, S. R. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 117-122, 2010.

SMOLINSKA, A.; BLANCHET, L.; COULIER, L.; AMPT, K. A. M.; LUIDER, T.; HINTZEN, R. Q.; WIJMEGA, S. S.; BUYDENS, L. M. C. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: from data acquisition to biomarker discovery: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 82-97, 2012.

SILVA, G. H. **Substâncias bioativas isoladas dos fungos endofíticos *Xylaria* sp., *Phomopsis cassiae* e *Acremonium* sp. associados a espécies vegetais do Cerrado**. 2005. 306 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

- SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; MARX, Y. M. C.; EBERLIN, M. N.; HADAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, S. V.; ARAÚJO A. R. Cadinane sesquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1964-1969, 2006.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.
- SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Anticholinesterase activity of the *Fusarium* metabolite visoltricin and its N-methyl derivative. **Toxicology in Vitro**, v. 8, n. 3, p. 461-465, 1994.
- SON, S. W.; KIM, H. Y.; CHOI, G. J.; LIM, H. K.; JANG, K. S.; LEE, S. O.; LEE, S.; 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, n. 3, p. 692-698, 2008.
- STÄHLE, L.; WOLD, S. Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: a monte carlo study. **Journal of Chemometrics**, v. 1, n. 3, p. 185-196, 1987.
- SUMMERELL, B. A.; LESLIE, J. F. Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? **Fungal Diversity**, v. 50, n. 135, p. 135-144, 2011.
- SZYMAŃSKA, E.; SACCENTI, E.; SMILDE, A. K.; WESTERHUIS, J. A. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. **Metabolomics**, v. 8, n. 1, p. 3-16, 2012.
- TATUM, J. H.; BAKER, R. A. Naphthoquinones produced by *Fusarium solani* isolated from citrus. **Phytochemistry**, v. 22, n. 2, p. 543-547, 1983.
- TATUM, J. H.; BAKER, R. A.; BERRY, R. E. Metabolites of *Fusarium solani*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 1, p. 283-284, 1989.
- TOYO SUISAN KAISHA (United State). Y. Tomoda; A. Hanaoka; T. Yasuda; T. Takayama; A. Hiwatashi. **Method of decreasing acrylamide in food cooked under heat**. US 200413737, 18 Dec. 2003, 8 July 2004.
- UDAYANGA, D.; LIU, X.; MCKENZIE, E. H. C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A. H. A.; HYDE, K. D. The genus *Phomopsis*: biology applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 189, p. 189-225, 2011.
- VELAGAPUDI, V. R.; HEZAVEH, R.; REIGSTAD, C. S.; GOPALACHARYULU, P.; YETUKURI, L.; ISLAM, S.; FELIN, J.; PERKINS, R.; BOREN, J.; ORESIC, M.; BACKHED, F. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. **The Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 5, p. 1101-1112, 2010.
- VERBOVEN, S.; HUBERT, M. LIBRA: a MATLAB library for robust analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 75, n. 2, p. 127-136, 2005.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic math. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 53-56, 2005.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 908-910, 2004.

WANG, X.; ZHANG, A.; HAN, Y.; WANG, P.; SUN, H.; SONG, G.; DONG, T.; YUAN, Y.; YUAN, X.; ZHANG, M.; XIE, N.; ZHANG, H.; DONG, H.; DONG, W. Urine metabolomics analysis for biomarker discovery and detection of jaundice syndrome in patients with liver disease. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 370-380, 2012.

WEBB, A. **Statistical pattern recognition**. 3rd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. 666 p.

WILLIAMS, R. B.; HENRIKSON, J. C.; HOOVER, A. R.; LEE, A. E.; CICHEWICZ, R. H. Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 11, p. 1895-1897, 2008.

WOLD, H. Estimation of principal components and related models by iterative least squares. In: KRISHNAIAH, P. R. (Ed.). **Multivariate analysis**. New York: Academic Press, 1966. p. 391-420.

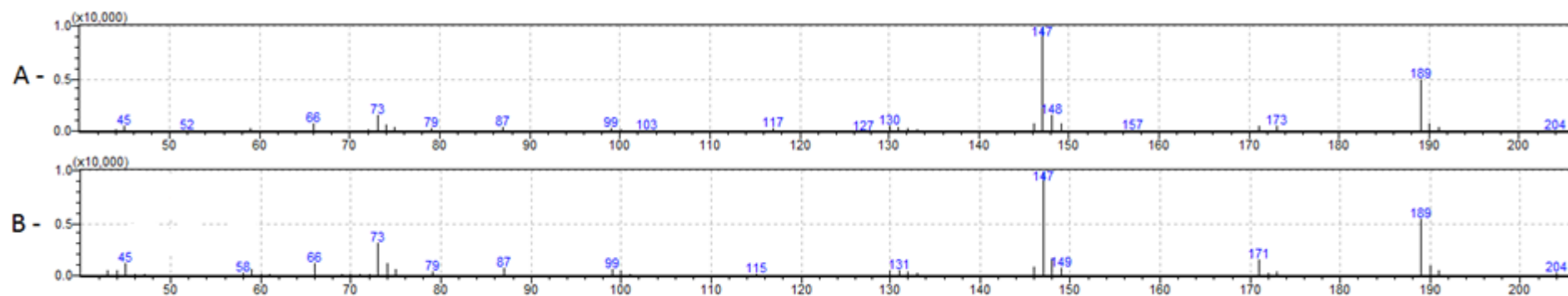
WOLD, H. Path models with latent variables: The NIPALS approach. In: BLALOCK H. M.; AGANBEGIAN, A.; BORODKIN, F. M.; BOUDON, R.; CAPECCHI, V. **Quantitative sociology: international perspectives on mathematical and statistical model building**. New York: Academic press, 1975. p. 307-357.

WYSS, G. S.; CHARUDATTAN, R.; ROSSKOPF, E. N.; LITTELL, R. C. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a biocontrol agent for *Amaranthus* sp. **Weed Research**, v. 44, n. 6, p. 469-482, 2004.

ZANARDI, L. M. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos associados a *Senna spectabilis***. 2010. 254 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

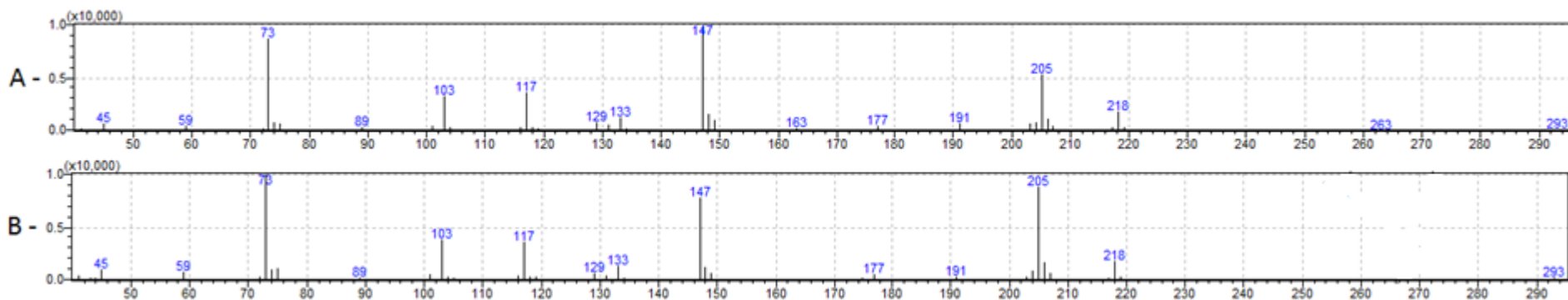
ANEXOS

Figura 41 – A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - N,N'-di(trimetilsilil)ureia.



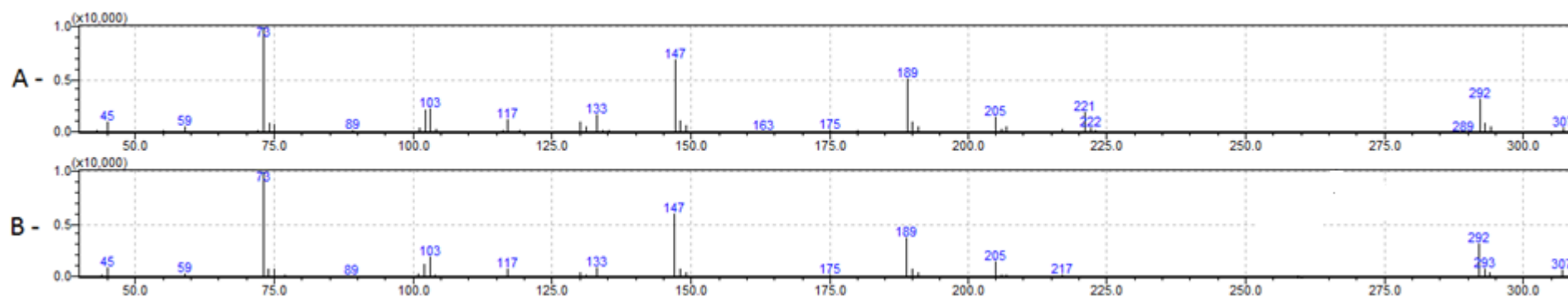
Fonte: Autor

Figura 42 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - trimetilsilil eter de glicerol.



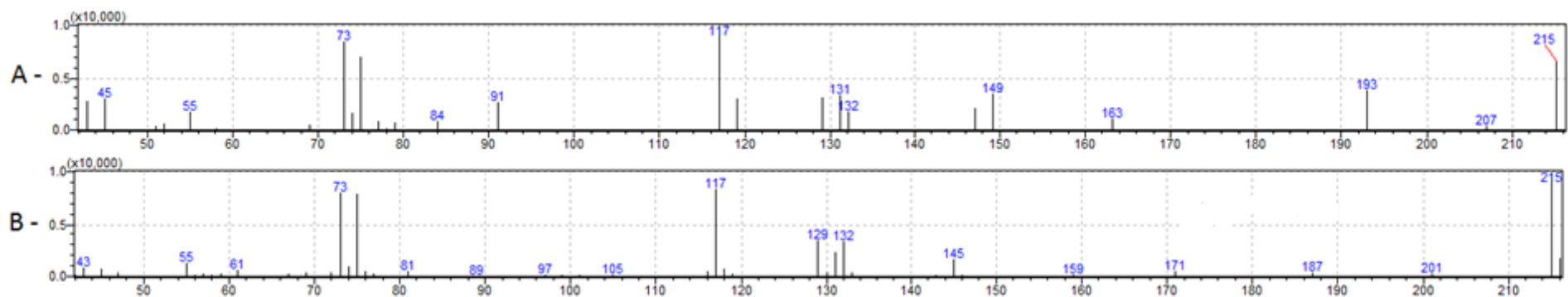
Fonte: Autor

Figura 43 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido propanoico, 2,3-di[(trimetilsilil)oxi].



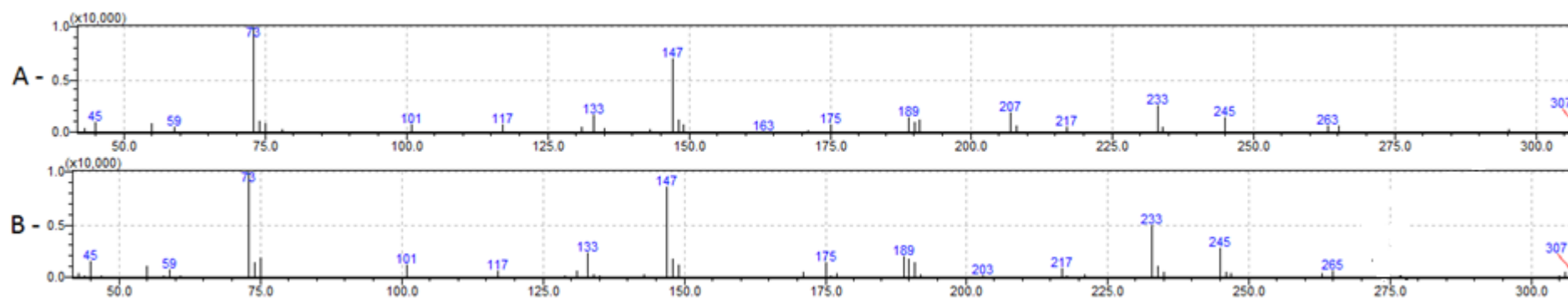
Fonte: Autor

Figura 44 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido nonanoico, trimetilsilil ester.



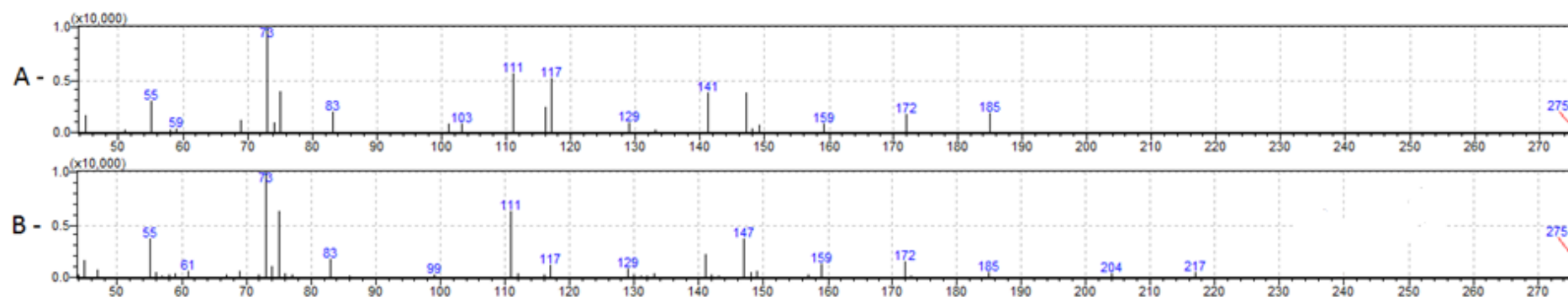
Fonte: Autor

Figura 45 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido malico, trimetilsilil, di(trimetilsilil) ester.



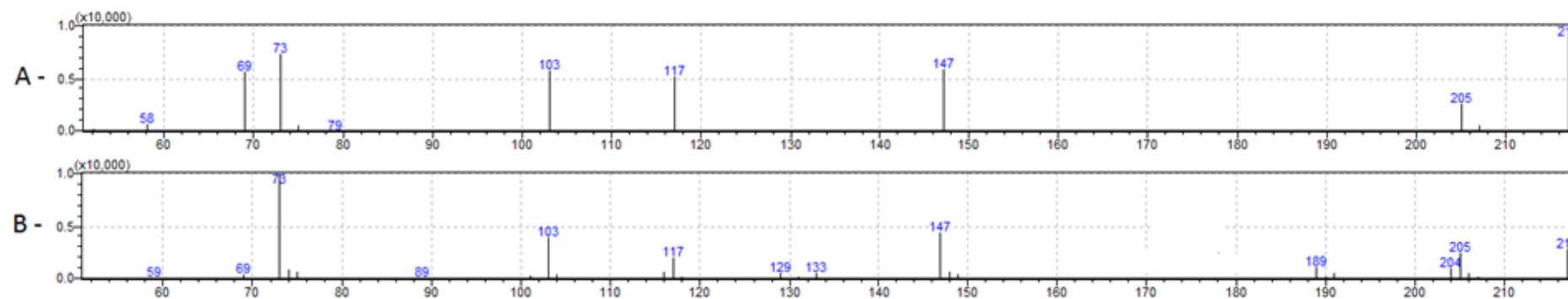
Fonte: Autor

Figura 46 - Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido Hexanedioico, di(trimetilsilil) ester.



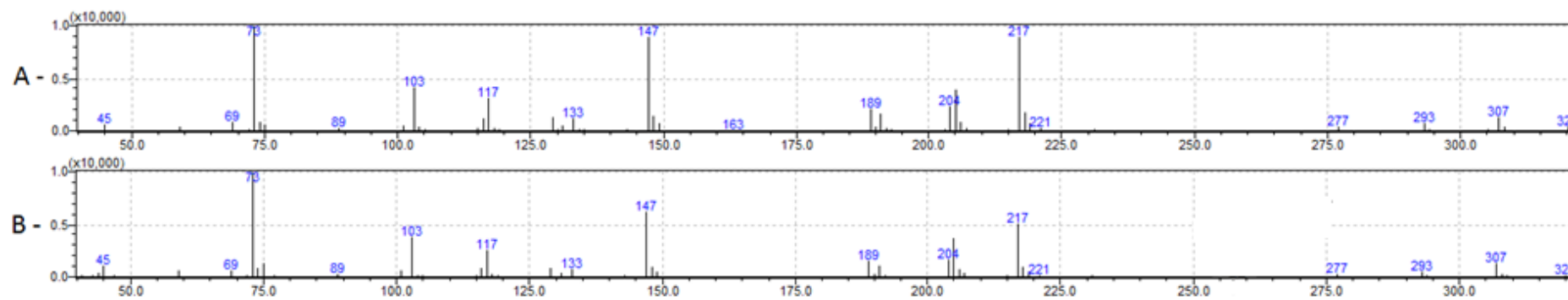
Fonte: Autor

Figura 47 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - 3,8-dioxi-2,9-disilildecano.



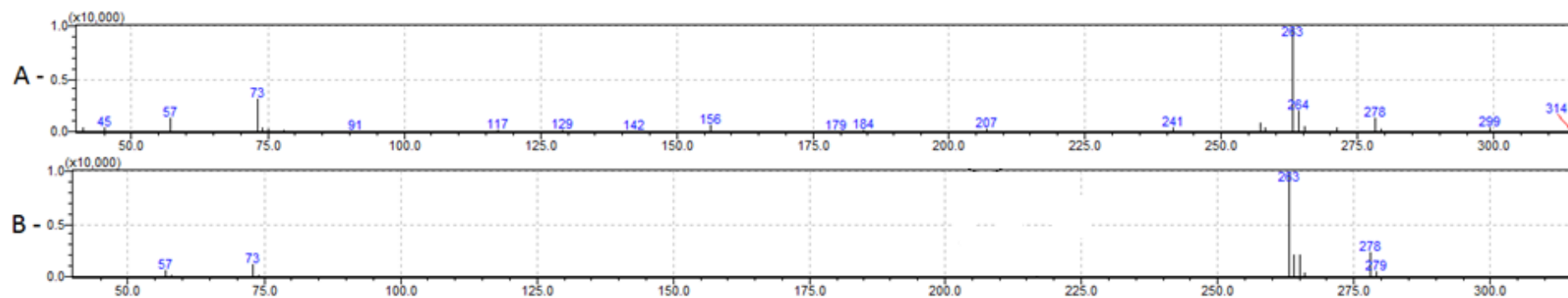
Fonte: Autor

Figura 48 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - butanal, 2,3,4-tri[(trimetilsilil)oxi].



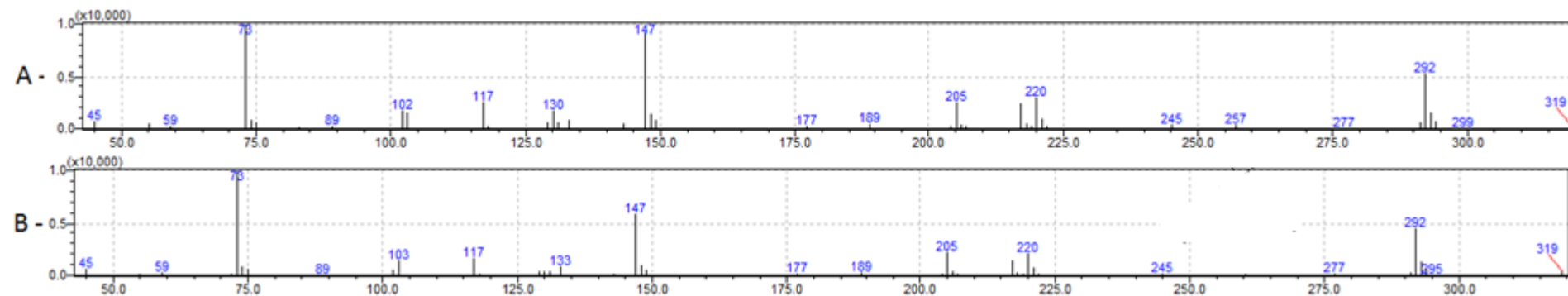
Fonte: Autor

Figura 49 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - trimetil(2,6 ditert.-butilfenoxi)silano.



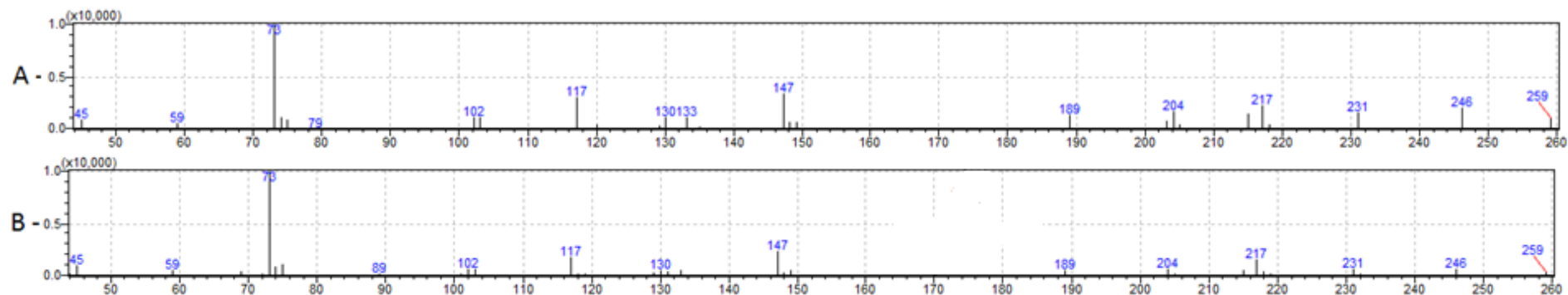
Fonte: Autor

Figura 50 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido threonico, tri(trimetilsilil)éter.



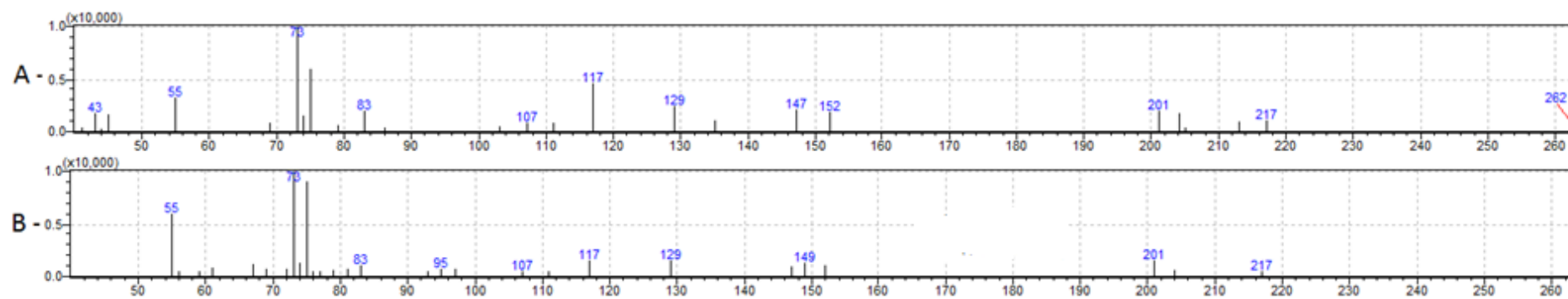
Fonte: Autor

Figura 51 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido xilônico, 2,3,5-tri(trimetilsilil).



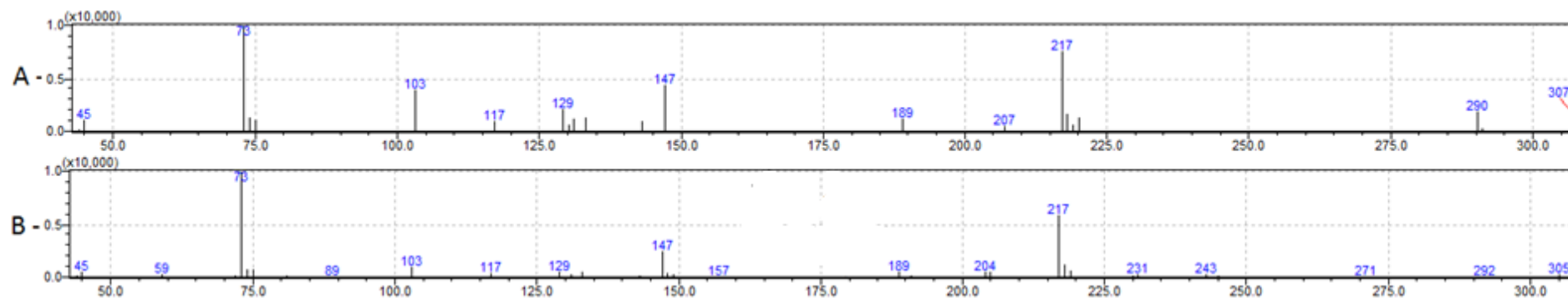
Fonte: Autor

Figura 52 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido azelaico, di(trimetilsilil) ester.



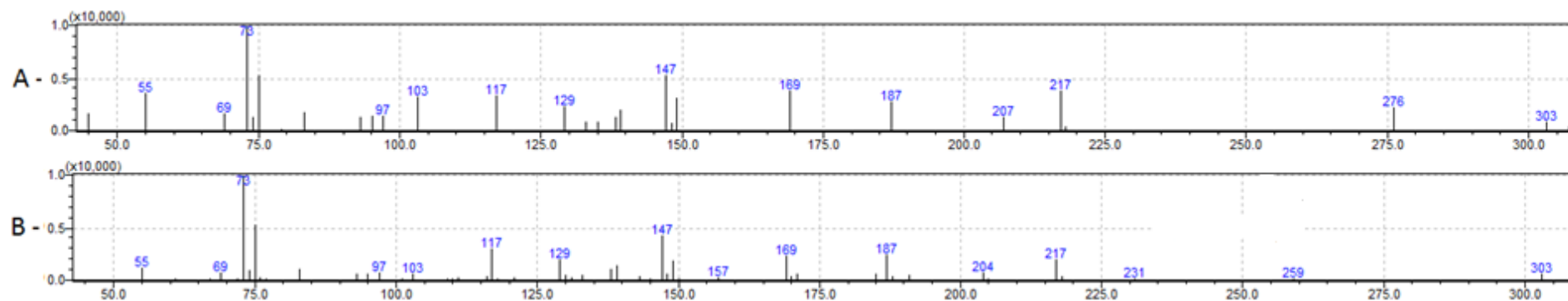
Fonte: Autor

Figura 53 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido mannoônico, 2,3,5,6-tetra(trimetilsilil).



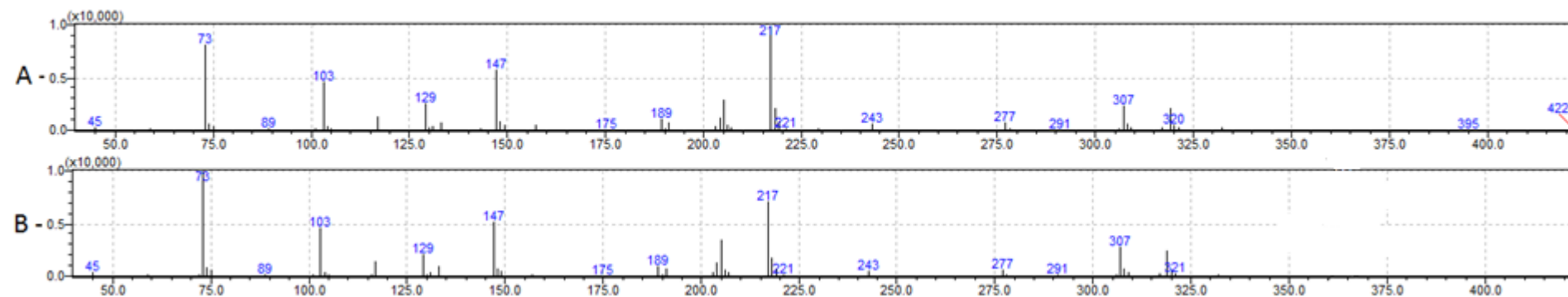
Fonte: Autor

Figura 54 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido octanedioico, di(trimetilsilil) ester.



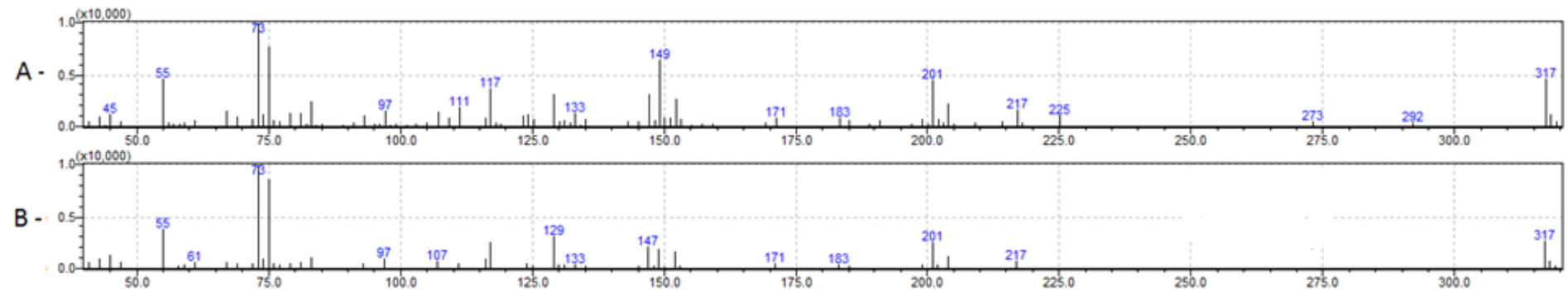
Fonte: Autor

Figura 55 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - arabitol, penta(trimetilsilil) éter.



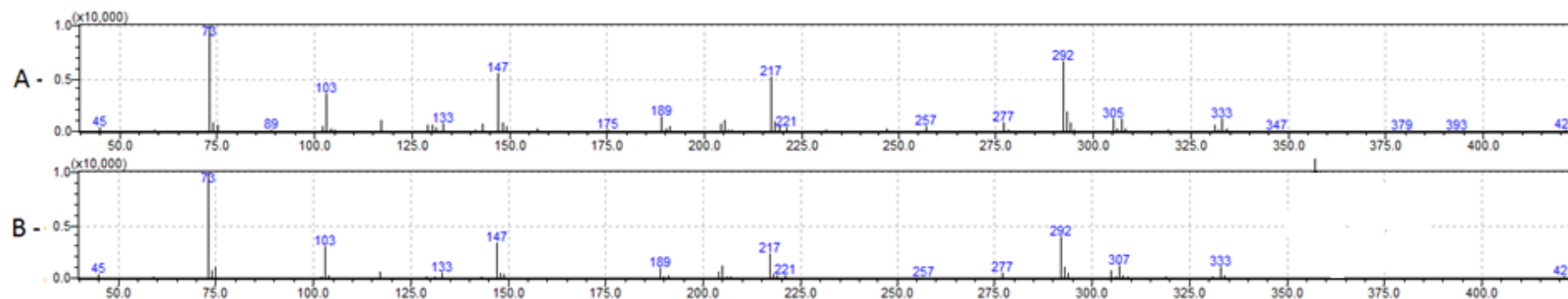
Fonte: Autor

Figura 56 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido azelaico, di(trimetilsilil) éster.



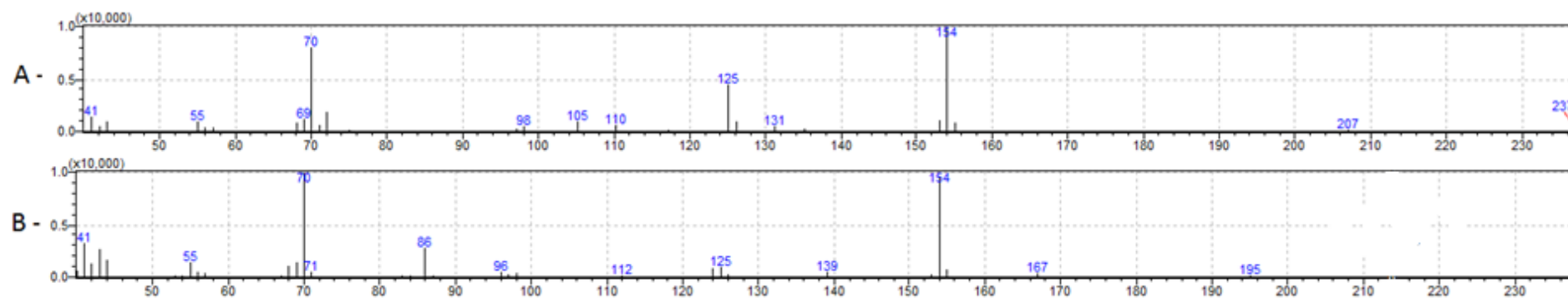
Fonte: Autor

Figura 57 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido ribonico, 2,3,4,5-tetra(trimetilsilil).



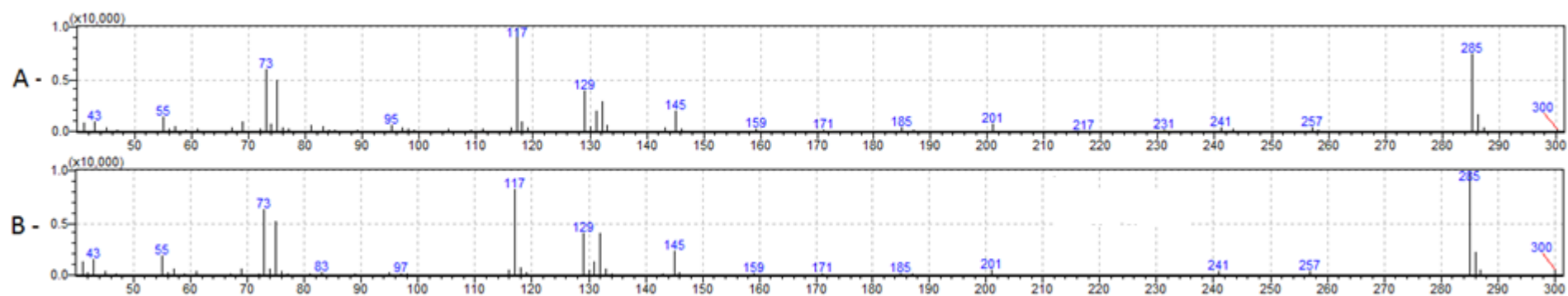
Fonte: Autor

Figura 58 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - pirrolo[1,2]pirazina-1,4-diona.



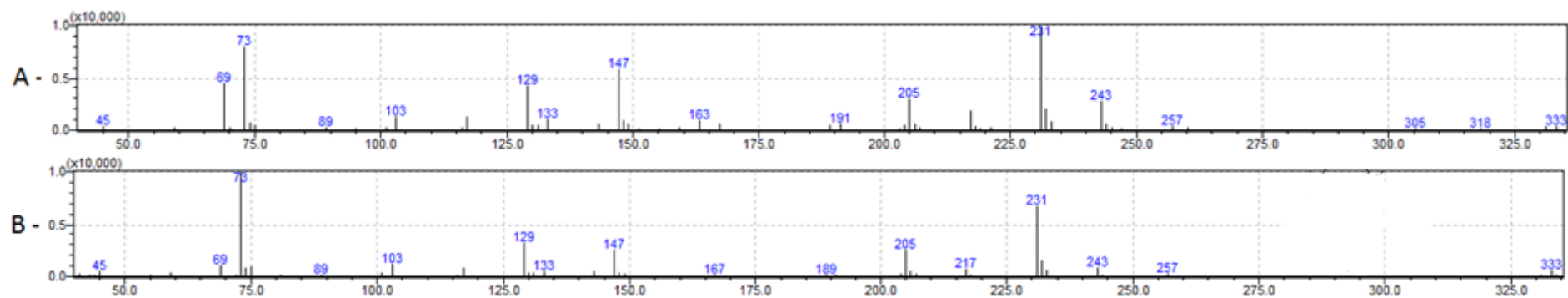
Fonte: Autor

Figura 59 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido tetradecanoico, trimetilsilil ester.



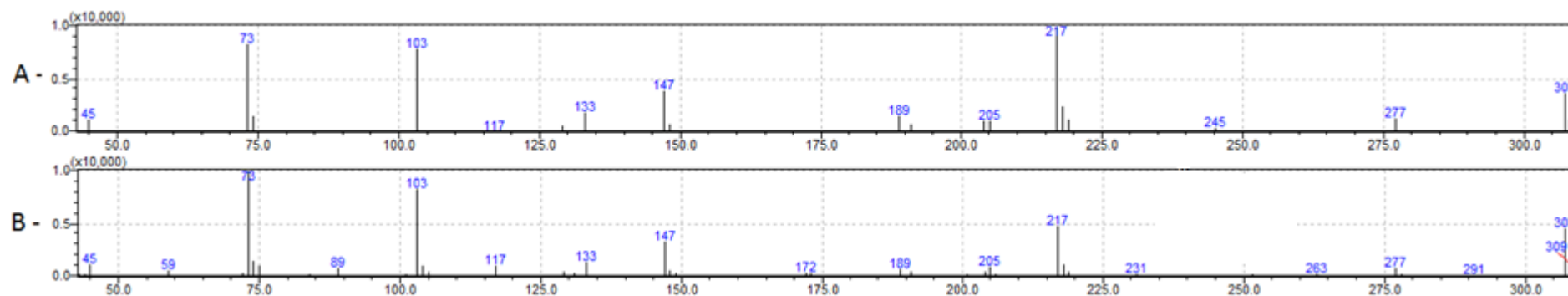
Fonte: Autor

Figura 60 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ribo-hexitol, 3-deoxi-1,2,4,5,6-penta(trimetilsilil).



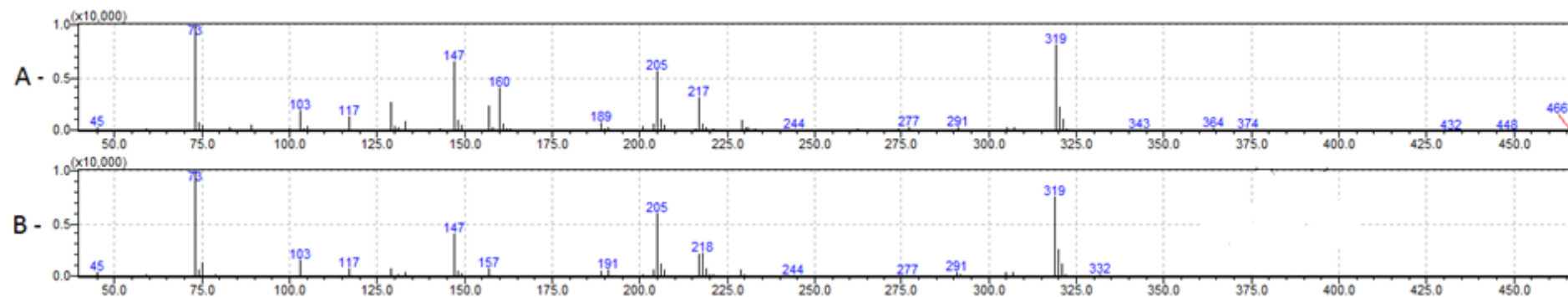
Fonte: Autor

Figura 61 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - frutose, 1,3,4,5,6-penta(trimetilsilil).



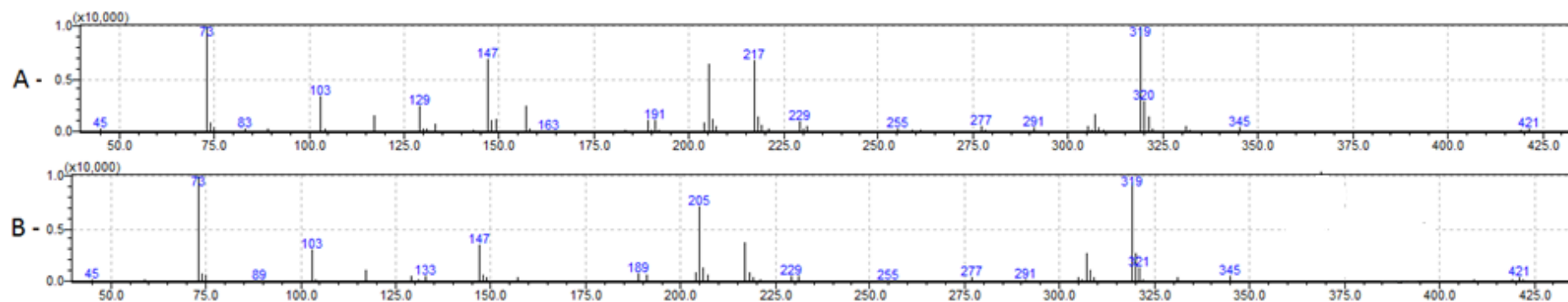
Fonte: Autor

Figura 62 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - glicose, hexa(trimetilsilil).



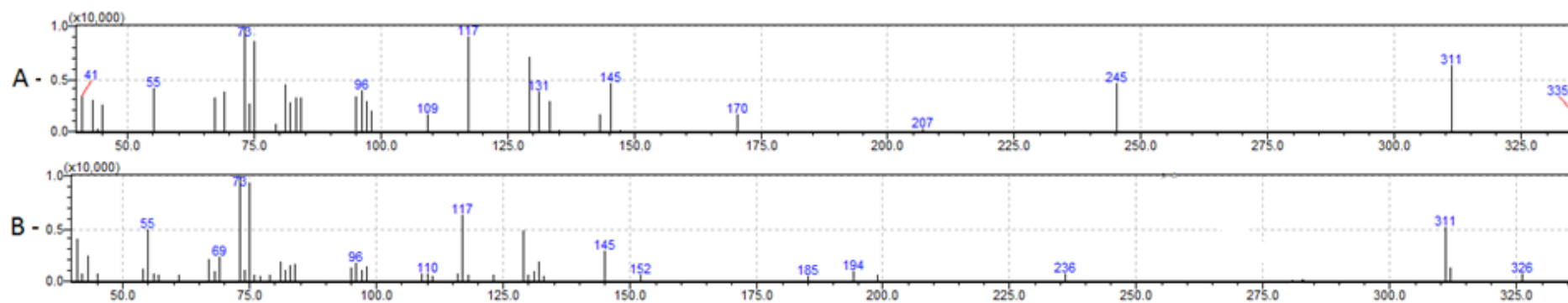
Fonte: Autor

Figura 63 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - trimetilsilil eter de glucitol.



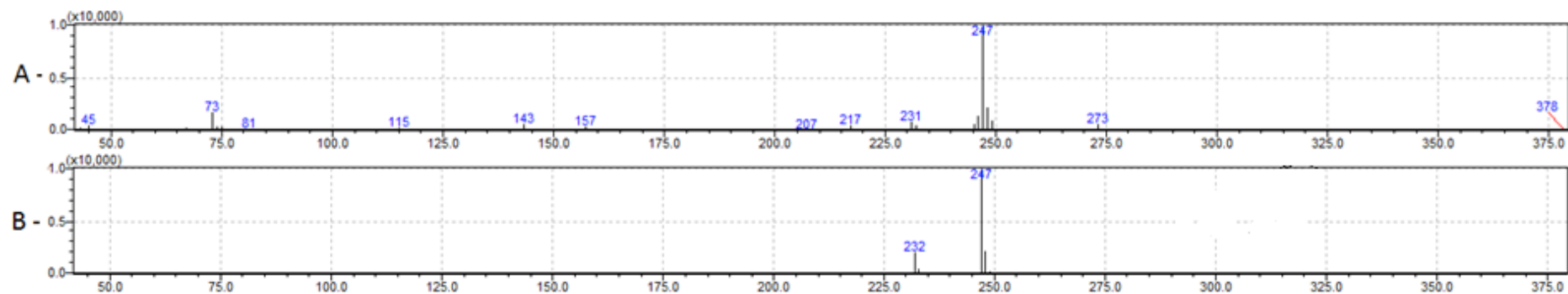
Fonte: Autor

Figura 64 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido Palmiteladico, trimetilsilil ester.



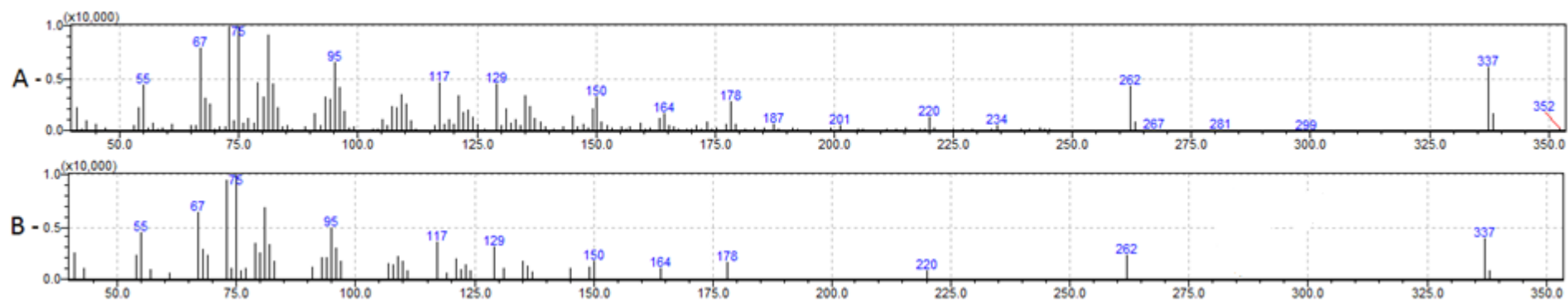
Fonte: Autor

Figura 65 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - tetrahydro-7-metilbenzoacridina.



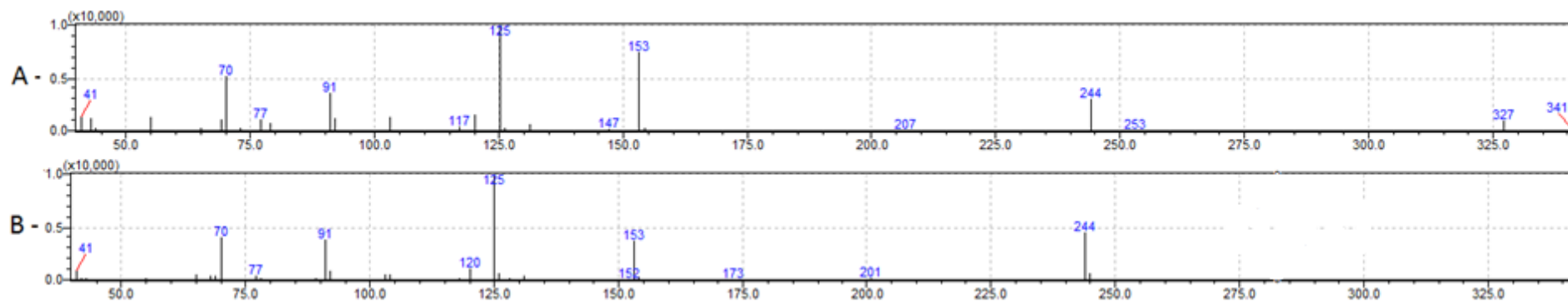
Fonte: Autor

Figura 66 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido linoleico, trimetilsilil.



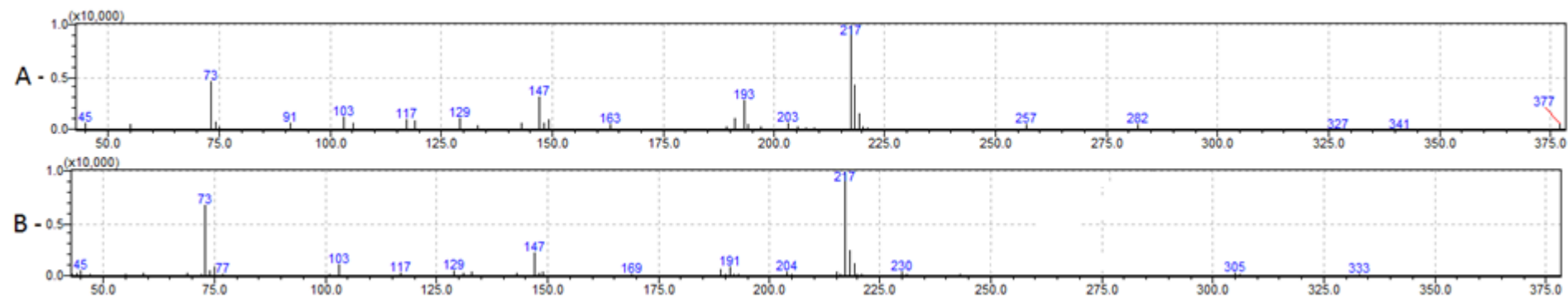
Fonte: Autor

Figura 67 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - benzilhexahidropirrolol[1,2]pirazina-1,4-diona.



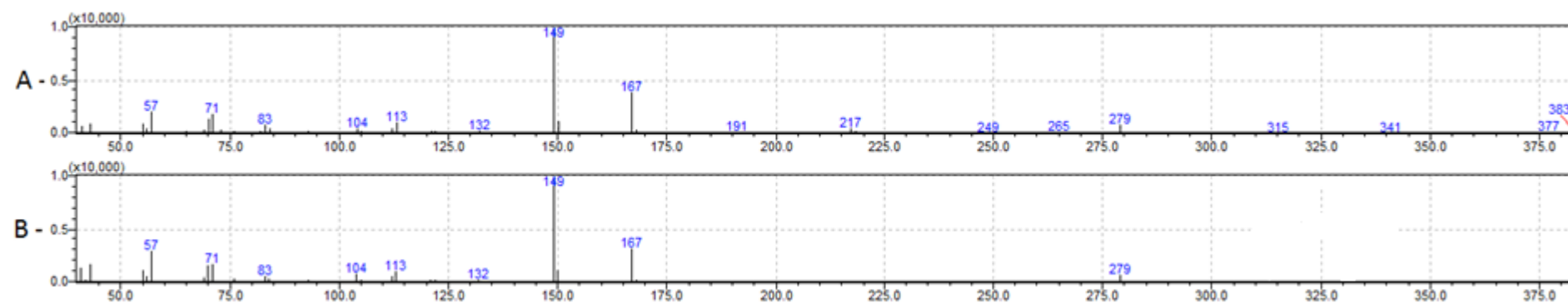
Fonte: Autor

Figura 68 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - xilofuranoso-1,2,3,5-tetra(trimetilsilil).



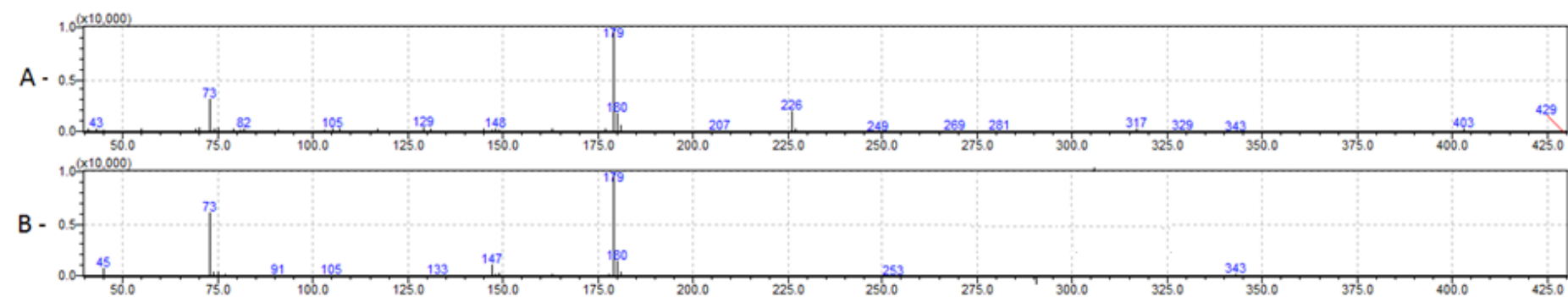
Fonte: Autor

Figura 69 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - ácido 1,2-benzenodicarboxílico, mono(2-etilhexil) ester.



Fonte: Autor

Figura 70 - A) Fragmentação observada no extrato B) Fragmentação existente na base de dados - 3,6-dioxi-2,7-disiloctano.



Fonte: Autor