



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DAVI DANTAS GUIMARÃES

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE FUNGICIDA DOS EXTRATOS DE *FUSARIUM*
***EQUISETI*: ABORDAGEM METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA**

FORTALEZA

2019

DAVI DANTAS GUIMARÃES

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE FUNGICIDA DOS EXTRATOS DE *FUSARIUM*
EQUISETI: ABORDAGEM METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Anne S. Lima
Coorientadora: Profa. Dra. Dávila Zampieri

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G977p Guimaraes, Davi Dantas.
Perfil químico e atividade fungicida dos extratos de *Fusarium equiseti*: abordagem metabolômica e quimiométrica / Davi Dantas Guimaraes. – 2019.
80 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.
Coorientação: Profa. Dra. Davila Zampieri.
1. *Fusarium equiseti*. 2. Metabólitos secundários. 3. UPLC-QOF-MSE. 4. Metabolômica. I. Título.
CDD 540
-

DAVI DANTAS GUIMARÃES

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE FUNGICIDA DOS EXTRATOS DE *FUSARIUM*
EQUISETI: ABORDAGEM METABOLÔMICA E QUIMIOMÉTRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mary Anne Sousa Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gisele Simone Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, José Hélio e Dorly Gomes.

AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade.

Aos meus pais, José Hélio Guimarães e Dorly Gomes Dantas Guimarães por todo amor, carinho, educação e pela confiança depositada durante a toda a minha jornada acadêmica. Sem vocês eu jamais teria forças para chegar até aqui.

À minha família que também acreditou e sonhou com a chegada desse dia.

À professora Dra. Mary Anne Sousa Lima por me orientar desde a iniciação científica até o mestrado. Pelos ensinamentos, incentivo, conselhos e cobranças, pois sem eles, não seria possível chegar até aqui.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Davila Zampieri que, desde o início me recebeu com enorme carinho e atenção, sendo sempre muito solícita. Por todos os ensinamentos das técnicas de laboratório, pela sua paciência, otimismo e conselhos para a vida.

À professora Dra. Antônia Torres Ávila Pimenta, pelo apoio e conselhos dados durante essa jornada.

Ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, que esteve sempre presente com todo apoio durante a realização deste trabalho, além de todo o incentivo à pesquisa.

Aos professores do programa de pós-graduação em química da UFC pelos valiosos ensinamentos.

À Embrapa pela oportunidade de desenvolver parte da pesquisa durante o mestrado.

Ao Dr. Cleberson de Freitas Fernandes por permitir que os testes de atividade fungicidas fossem realizados no laboratório de fitopatologia da Embrapa, além de supervisionar e colaborar na interpretação dos dados obtidos.

À Dra. Andreia Hansen Oster por me conceder a cepa do fungo *F. equiseti* utilizada neste trabalho, além de fornecer o espaço do laboratório para cultivo, possibilitando a realização deste trabalho. Ao Ageu que sempre se dispôs a verificar a pureza das culturas e forneceu grandes ensinamentos.

Aos funcionários e aos alunos do Laboratório Multiusuário de Química e Produtos Naturais, em especial ao Dr. Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro, pela enorme contribuição sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) da Universidade Federal do Ceará, em nome do seu coordenador Dr. Edilberto Rocha Silveira pela oportunidade de atuar como operador do equipamento de RMN durante os primeiros períodos do mestrado.

À equipe do Laboratório de Micologia da UFC, em especial ao Dr. Cristiano Souza Lima que sempre foi muito solícito, além de fornecer o espaço para cultivo, possibilitando a realização deste trabalho e ao Israel Lopes de Andrade que sempre se dispôs a verificar a pureza das culturas e forneceu grandes ensinamentos.

Aos professores Dr. Marcos Carlos de Mattos e Dr. Jair Mafezoli que, juntamente com o Dr. Guilherme Julião Zocolo, forneceram valiosas contribuições no exame de qualificação.

Aos professores da banca examinadora por aceitar o convite e pelas contribuições.

À Sarah, pelo carinho, apoio e compreensão, principalmente nas horas mais difíceis.

Aos meus grandes amigos Jonathan, Davi Xavier (*in memoriam*), Vilamar, Breno e Luan pelo carinho e apoio de sempre.

A todos os amigos da graduação, em especial ao Armando Diego, Orlando Carlota, Mayara, Geângela, Ronnie, Abraão e Severiano por todo apoio e companhia durante esta jornada.

Aos amigos de laboratório, com quem muito aprendi: Hélio Oliveira, João Evangelista, Regivaldo Gomes, Henrique Cezar, Débora Sousa e Paula Karina pelos ensinamentos de técnicas, orientações e incentivo. À Letícia Holanda, Robert Bertoldo, Nicaely Oliveira, Isabelle Bonfim, Thaizy Martins Tayná Mendes e Matheus Areal pelo apoio, amizade, incentivo e por tornarem cada dia de trabalho no laboratório mais agradável. Vocês foram essenciais para a efetivação desse trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Obrigado!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.” (Isaac Newton).

RESUMO

Fusarium equiseti é um fitopatógeno responsável por várias doenças em plantas. Este trabalho relata um estudo metabolômico de *F. equiseti* através do seu cultivo em diferentes meios nutricionais: BD (batata-dextrose), BDL (batata-dextrose-levedura), MPD (malte-peptona-dextrose) e MnTPL (manitol-peptona-levedura); e variação no tempo de cultivo: 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Uma análise preliminar por CCD e CLAE dos extratos obtidos revelou que, em todos os meios nutricionais, o período de cultivo de 14 dias se mostrou como o mais promissor na produção de metabólitos secundários. Desta forma, estes extratos foram selecionados para a análise por UPLC-QTOF-MS^E, e os dados de fragmentação de massas foram submetidos a uma análise comparativa em banco de dados. Este procedimento resultou na tentativa de identificação de 10 diferentes metabólitos secundários, dos quais os compostos equisetina e a ciclo-L-proliglicina possuem relatos na literatura para *F. equiseti*, enquanto que os compostos ácido (-) *cis* - 9,10 - epóxiesteárico, capsenona, criptocina, fenil acetaldéido, fusapirona, fusarielina B, maculosina e ácido glicodeoxicólico estão sendo relatados pela primeira vez para a espécie. Os extratos foram posteriormente submetidos a teste de atividade fungicida contra *Colletotrichum musae*, onde o extrato BDL (14 dias) apresentou uma maior inibição no crescimento do patógeno. Para esse extrato (BDL) foram realizados novos testes de atividade antifúngica, através da análise dos extratos (7, 14, 21, 28 e 35 dias). A partir destes resultados, foram realizadas análises estatísticas utilizando os dados de espectrometria de massas obtidos para os extratos BD, BDL, MPD e MnTPL. A análise de componentes principais (PCA) possibilitou diferenciar de maneira eficiente o perfil metabólico de cada um dos extratos, os quais apresentaram algumas semelhanças, porém o extrato BDL mostrou-se como o mais distinto. Desta forma, a partir da análise de discriminação de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) juntamente com os gráficos de S-Plot e VIP dos extratos BDL 14 dias (mais ativo) e BDL 28 dias (menos ativo) foi possível detectar nove biomarcadores presentes apenas no extrato ativo BDL (14 dias), e conseqüentemente, possivelmente associados à atividade fungicida observada. Os resultados obtidos demonstraram o potencial químico de *F. equiseti* na biossíntese de metabólitos secundários, através da influência dos meios nutricionais e tempo de cultivo, além da eficiência do uso da técnica UPLC-QTOF-MS^E e quimiometria na identificação de compostos orgânicos bioativos.

Palavras-chave: *Fusarium equiseti*. Metabólitos secundários. UPLC-QOF-MS^E. Metabolômica.

ABSTRACT

Fusarium equiseti is a phytopathogen responsible for several diseases in plants. This work reports a metabolomic study of *F. equiseti* through its cultivation in different nutritional media: BD (potato dextrose), BDL (potato dextrose-yeast), MPD (malt-peptone-dextrose) and MnTPL (mannitol- yeast); and variation in culture time: 7, 14, 21, 28 and 35 days. A preliminary analysis by CCD and HPLC of the extracts obtained showed that, in all nutritional media, the culture period of 14 days proved to be the most promising in the production of secondary metabolites. Thus, these extracts were selected for analysis by UPLC-QTOF-MSE, and the data of mass fragmentation were submitted to a comparative analysis in database. This procedure resulted in an attempt to identify 10 different secondary metabolites, of which the equisetin and cyclo-L-proliglicin compounds have reports in the literature for *F. equiseti*, whereas the compounds *cis* - 9,10 - epoxy stearic acid, capsenone, , cryptocine, phenyl acetaldehyde, fusapirone, fusarielin B, maculosin and glycooxycholic acid are being reported for the first time for the species. These extracts were subsequently tested for fungicidal activity against *Colletotrichum musae*, where the BDL extract (14 days) showed a greater inhibition in the growth of the pathogen. For this extract (BDL) new tests of antifungal activity were carried out, through the analysis of the extracts (7, 14, 21, 28 and 35 days). From these results, statistical analyzes were performed using the mass spectrometry data obtained for the extracts BD, BDL, MPD and MnTPL. The main components analysis (PCA) allowed to differentiate efficiently the metabolic profile of each of the extracts, which presented some similarities, but the BDL extract showed to be the most distinct. Thus, from the analysis of orthogonal partial least squares discrimination (OPLS-DA) together with the S-Plot and VIP graphs of the BDL extracts 14 days (more active) and BDL 28 days (less active) was possible to detect nine biomarkers present only in the active extract BDL (14 days), and consequently, possibly associated with the observed fungicidal activity. The results obtained demonstrated the chemical potential of *F. equiseti* in the biosynthesis of secondary metabolites through the influence of nutritional media and culture time, as well as the efficiency of the use of the UPLC-QTOF-MSE technique and chemometry in the identification of bioactive organic compounds.

Keywords: *Fusarium equiseti*. Secondary metabolites. UPLC-QTOF-MS^E. Metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) <i>Penicillium notatum</i> (b) Fórmula estrutural da Penicilina (c) <i>Penicillium roqueforti</i> e (d) <i>Aspergillus oryza</i>	18
Figura 2 - Estrutura de compostos de origem microbiana com atividade antibacteriana.....	19
Figura 3 - Fórmula estrutural do taxol.....	20
Figura 4 - Fórmulas estruturais da podofilotoxina e do otoposídeo.....	21
Figura 5 - Murcha e amarelecimento foliar em bananeira com mal-do-Panamá	22
Figura 6 - Fusariose em fungo de centeio	23
Figura 7 - Fórmula estrutural da karuquinona A	23
Figura 8 - Fórmula estrutural da fusarubina e 3- <i>O</i> -metil fusarubina	24
Figura 9 - Fórmula estrutural do 4-hidroxibenzaldeído	24
Figura 10 - Fórmula estrutural do sambacide	24
Figura 11 - Macronídeos de <i>Fusarium equiseti</i>	25
Figura 12 - Fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica	38
Figura 13 - <i>Fusarium equiseti</i> inoculado em meio BDA em placa de Petri	40
Figura 14 - Esquema de obtenção dos extratos para análise por CL-EM	43
Figura 15 - Cromatogramas dos extratos de <i>Fusarium equiseti</i> com 14 dias de cultivo nos meios BD, BDL, MPD e MnTPL	48
Figura 16 - Cromatograma do extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio BD 14 dias.....	52
Figura 17 - Fragmentação do fenilacetaldéido.....	53
Figura 18 - Espectro MS ² do fenilacetaldéido.....	53
Figura 19 - Espectro MS ² da fusapirona.....	54
Figura 20 - Cromatograma do extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio BDL 14 dias.....	55
Figura 21 - Espectro MS ² do fusarielina B	55
Figura 22 - Fragmentação da equisetina	56

Figura 23 - Espectro MS ² da equisetina.....	57
Figura 24 - Fragmentação da maculosina	57
Figura 25 - Espectro MS ² da maculosina	58
Figura 26 - Cromatograma do extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio MPD 14 dias	58
Figura 27 - Espectro MS ² do ácido glicodeoxicólico	59
Figura 28 - Cromatograma do extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio MnTPL 14 dias...	59
Figura 29 - Fragmentação da ciclo-L-prolina-L-glicina.....	60
Figura 30 - Espectro MS ² da ciclo-L-prolina-L-glicina.....	60
Figura 31 - Estruturas dos compostos identificados.....	61
Figura 32 - Ensaio in vitro mostrando com inibição do crescimento do fitopatógeno (<i>Colletotrichum musae</i>) quando cultivado em meio contendo a solução dos extratos de <i>Fusarium equiseti</i> nos meios BD, BDL, MPD e MnTPL 14 dias.....	64
Figura 33 - Gráfico S-Plot (A) e gráfico de barras (B) com os tempos de retenção e valores de massas de alta resolução dos possíveis biomarcadores a partir dos dados do gráfico OPLS-DA dos extratos BDL (14 e 28 dias).....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Classes de metabólitos secundários identificados em <i>F. equiseti</i>	32
Gráfico 2 - Número de publicações sobre desreplicação nos últimos anos	37
Gráfico 3 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de <i>Colletotrichum musae</i> na presença de extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio BD 14 dias	62
Gráfico 4 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de <i>Colletotrichum musae</i> na presença de extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio BDL 14 dias.....	63
Gráfico 5 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de <i>Colletotrichum musae</i> na presença de extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio MPD 14 dias.....	63
Gráfico 6 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de <i>Colletotrichum musae</i> na presença de extrato de <i>Fusarium equiseti</i> em meio MnTPL 14 dias.....	64
Gráfico 7 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de <i>Colletotrichum musae</i> , na presença dos extratos de <i>Fusarium equiseti</i> em meio BDL nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias e os respectivos controles	65
Gráfico 8 - Análise de PCA 2D de amostras de <i>Fusarium equiseti</i> , nos meios de cultura BD, BDL, MPD, MnTPL e os respectivos controles (branco) (modo positivo, intervalo de tr: 0,0 a 16,5min).....	67
Gráfico 9 - Análise de loadings de PCA 2D de amostras de <i>Fusarium equiseti</i> , nos meios de cultura BD, BDL, MPD, MnTPL e os respectivos controles (branco) (modo positivo, intervalo de tr: 0,0 a 16,5 min)	68
Gráfico 10 - Análise de OPLS-DA dos grupos: BDL 14 dias – BDL 28 dias de <i>Fusarium equiseti</i>	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Metabólitos secundários isolados de <i>Fusarium equiseti</i>	26
Tabela 2	- Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.....	42
Tabela 3	- Identificação de metabólitos secundários de <i>Fusarium equiseti</i> nos meios BD, BDL, MPD e MNTPL – 14 dias.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
BD	Meio de Cultura Batata-Dextrose
BDA	Meio de Cultura Batata-Dextrose Ágar
BDL	Meio de Cultura Batata-Dextrose e Levedura
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CL-EM	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
MeOH	Metanol
MPD	Meio de cultura Malte, Peptona e Dextrose
MntPL	Meio de cultura Manitol, Peptona e Levedura
PCA	Principal Component Analysis
UPLC-QTOF-MS ^E	Ultra High Efficiency Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometer with Time-of-Flight Analyzer

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- © Copyright
- ® Marca Registrada

SUMÁRIO

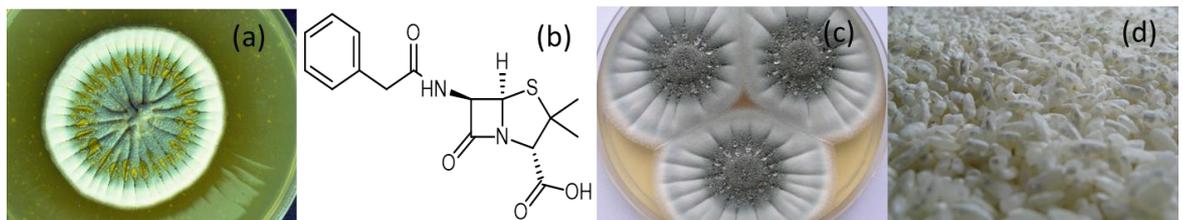
1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Considerações sobre o gênero <i>Fusarium</i>	21
1.2	<i>Fusarium equiseti</i> : Ocorrência, levantamento bibliográfico acerca de seus metabólitos secundários e atividades farmacológicas.....	25
1.2.1	<i>Ocorrência</i>	25
1.2.2	<i>Metabólitos secundários produzidos por Fusarium equiseti</i>	26
1.2.3	<i>Atividades farmacológicas dos metabólitos secundários</i>	32
1.3	Estudos de Metabolômica: Desreplicação e Quimiometria.....	34
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos.....	39
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	40
3.1	Identificação molecular de <i>Fusarium equiseti</i>	40
3.2	Cultivo, Preservação e Repicagem.....	41
3.3	Produção dos metabólitos secundários de <i>Fusarium equiseti</i>	41
3.3.1	<i>Estudo de otimização do crescimento do fungo em diferentes intervalos de tempo do cultivo</i>	41
3.4	Métodos Cromatográficos e Espectrométricos.....	43
3.4.1	<i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	43
3.4.2	<i>Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	44
3.4.3	<i>Condições das análises realizada em UPLC-QTOF-MS-MS</i>	44
3.5	Preparo das amostras para análise em UPLC.....	45
3.6	Identificação Molecular.....	45
3.7	Metodologia de avaliação do potencial de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	45
3.8	Análise quimiométrica.....	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	Estudos dos metabólitos secundários de <i>Fusarium equiseti</i>	48
4.1.1	<i>Análise dos metabólitos de Fusarium equiseti em meio BD 14 dias</i>	52
4.1.2	<i>Análise dos metabólitos de Fusarium equiseti em meio BDL 14 dias</i>	55
4.1.3	<i>Análise dos metabólitos Fusarium equiseti em meio MPD 14 dias</i>	58
4.1.4	<i>Análise dos metabólitos de Fusarium equiseti em meio MnTPL 14 dias</i>	59

4.2	Estudo do potencial fungicida dos extratos de <i>Fusarium equiseti</i> em diferentes meios de cultivo.....	61
4.3	Análise Multivariada.....	66
4.3.1	<i>Análise dos componentes principais (PCA) dos meios BD, BDL, MPD e MNTP.</i>	66
4.3.2	<i>Análise OPLS-DA dos extratos de <i>Fusarium equiseti</i> BDL -14 e BDL- 28 dias....</i>	68
4.4	Potenciais biomarcadores.....	69
5	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos pelo homem já é uma prática bastante antiga na história da humanidade. *Aspergillus oryza* tem sido usado para fazer koji a partir de arroz por 5000 anos, enquanto que *Penicillium roqueforti* tem sido empregado para fazer queijo por quase 4000 anos (DEMAIN, 2009). No último século o homem também começou a investigar o potencial químico e farmacológico dos produtos naturais produzidos pelos microrganismos em seu benefício, motivado pela descoberta da penicilina, isolada em 1929 por Fleming a partir do fungo *Penicillium notatum*, revisado como *P. rubens*, sendo também o primeiro medicamento produzido em larga escala já na década de 40 (HOUBRAKEN, FRISVAD & SAMSON, 2011) (Figura 1).

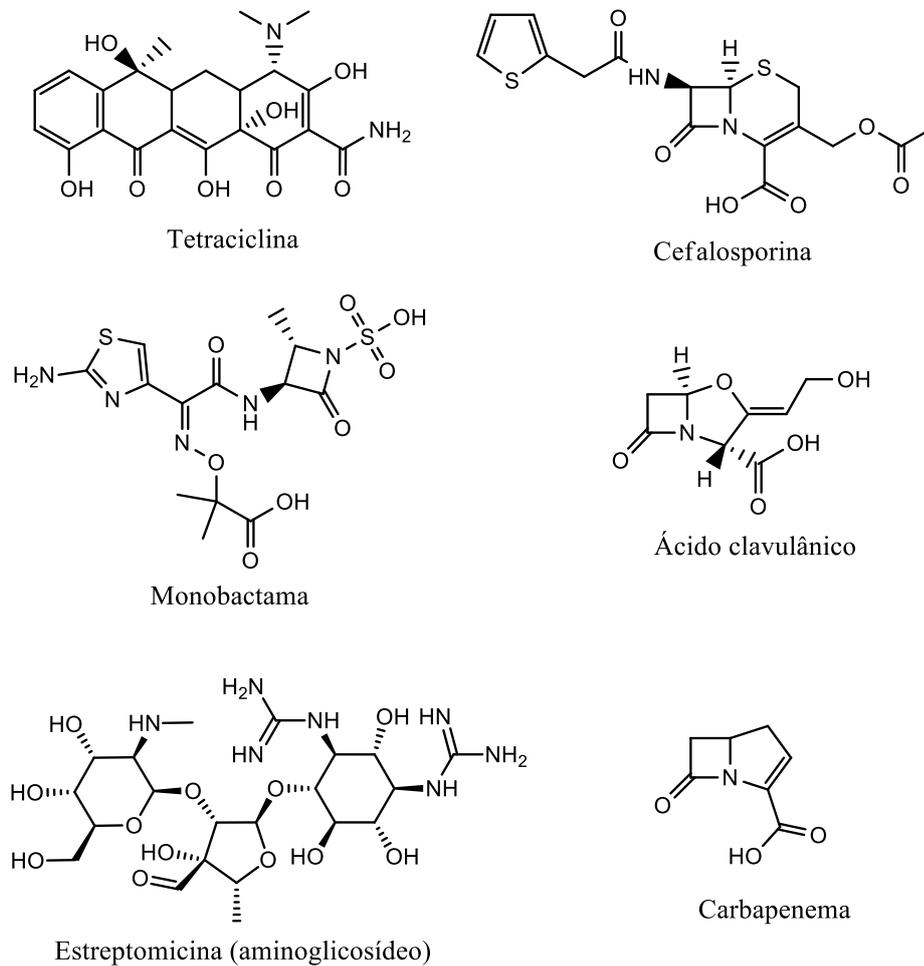
Figura 1 - (a) *Penicillium notatum* (b) Fórmula estrutural da Penicilina (c) *Penicillium roqueforti* e (d) *Aspergillus oryza*.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Os microrganismos são fontes renováveis e reprodutíveis quando comparadas como outras fontes naturais como plantas e animais. Em torno de 130 fármacos que abastecem a indústria farmacêutica são de origem microbiana, e dentre os exemplos mais clássicos estão os antibacterianos, penicilinas, cefalosporinas, ácido clavulânico, carbapeninas e monobactamas, tetraciclina e minoglicosídeos (LAM, 2007) (Figura 2).

Figura 2 – Estrutura de compostos de origem microbiana com atividade antibacteriana.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

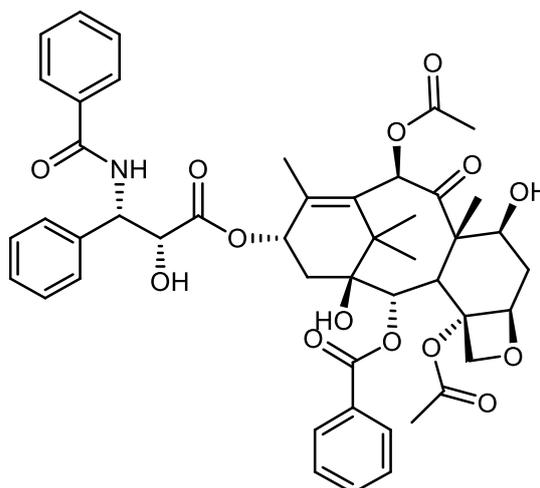
Um grupo de microrganismos que tem se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos é o dos endófitos, que representam uma importante fonte genética para aplicações biotecnológicas. Estes microrganismos constituem um grande grupo variado de fungos, bactérias, cianobactérias, que habitam o interior dos tecidos vegetais desde as raízes até as folhas das plantas sem causar-lhes efeitos imediatos, e com ocorrência em diferentes habitats, seja nos oceanos, florestas tropicais ou ambientes desérticos. (KHARWAR *et al.*, 2011)

A partir da estimativa de que existem cerca de mais de trezentas mil espécies de plantas terrestres, e que cada uma destas espécies pode acomodar centenas de espécies de microrganismos endófitos através de uma relação mutualística ou parasita, os fungos endofíticos mostram-se como uma vasta e diversificada fonte de metabólitos secundários (KHARWAR *et al.*, 2011; CHAPLA *et al.*, 2013).

O interesse científico na investigação química destes fungos aumentou nos anos 90, a partir da busca de microrganismos que pudessem produzir substâncias bioativas e estruturalmente complexas e difíceis de serem sintetizadas em laboratório (BUGNI e IRELAND, 2004).

O taxol®, um diterpeno com alta atividade anticancerígena, foi isolado preliminarmente a partir da casca do Teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), o que ocasionou a destruição das populações selvagens das espécies vegetais (STROBEL, 1993). As pesquisas direcionadas à química dos microrganismos endofíticos de *T. brevifolia* permitiu a obtenção do taxol a partir dos fungos endófitos *Taxomices andreanae*, (STROBEL, 1993), e posteriormente, a partir de *Penicillium rastrickii* (STIERLE, A. A. & STIERLE, D. B., 2014) (Figura 3).

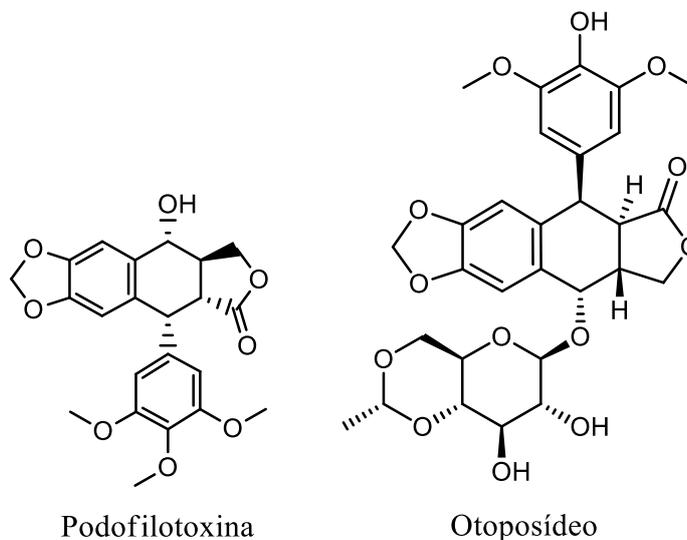
Figura 3 – Fórmula estrutural do taxol.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A podofilotoxina, um produto natural originalmente isolado de *Podophyllum emodi* do Himalaia, e alguns de seus derivados, como o otoposídeo, são drogas anticâncer eficazes de largo espectro. De forma análoga ao taxol, as dificuldades envolvidas na síntese destes compostos, levaram à investigação do isolamento de endófitos de *P. emodi* capazes de produzir podofilotoxina e análogos relacionados. A podofilotoxina foi também purificada a partir de cepas do endófito *Phialocephala fortinii* associado à *Podophyllum peltatum* (PURI *et al.*, 2006; EYBERGER, DONDAPAT & PORTER, 2006). Em adição, este composto também foi obtido a partir de fungos associados a várias plantas do gênero *Juniperus*. A partir do fungo *Alternaria sp.* associado a *J. vulgaris* (LU *et al.*, 2006); de *Fusarium oxysporum* associado a *J. recurva*; (KOUR *et al.*, 2008) e de *Aspergillus fumigatus* associado a *J. communis* (KUSARI, LAMSHOFT & SPITELLER, 2009) (Figura 4).

Figura 4 – Fórmulas estruturais da podofilotoxina e do otoposídeo



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

1.1 Considerações sobre o gênero *Fusarium*

De acordo com Ploetz (1990, *apud* MELO, 2014), espécies do gênero *Fusarium* são fungos endofíticos com ocorrência mundial e grande importância do ponto de vista econômico e social, já que ocupam a terceira posição entre os gêneros com maior número de espécies que podem causar doenças em plantas, devido à ação de algumas de suas micotoxinas.

Micotoxinas são metabólitos secundários de fungos com atividade fitotóxica, zootóxica e antibiótica. Nas ciências animais, veterinária e na medicina humana a palavra micotoxina é usada para se referir a metabólitos fúngicos tóxicos para humanos e organismos animais. Algumas delas têm múltiplos efeitos, podendo ser fitotóxicas, antimicrobiano, causar síndromes, além de toxicidade animal (NESIC *et al.*, 2014).

Devido à capacidade de sobrevivência por longos períodos no solo pela formação de clamidósporos, espécies de *Fusarium* podem contaminar as plantas com micotoxinas através da colonização dos ramos, folhas, inflorescências e frutos, pelos seus conídios disseminados através da água de irrigação ou de implementos agrícolas que contenham propágulos de solo contaminado (DAVIS *et al.*, 2006). As doenças nas plantas geralmente incluem pragas de plântulas e raízes (BAKKER *et al.*, 2016), doenças vasculares (MICHIELSE e REP, 2009), doenças dos tecidos reprodutivos e sementes em desenvolvimento (KAZAN *et al.*, 2012) e doenças de armazenamento (GACHANGO *et al.*, 2012).

Dentre os casos de doenças em plantas causadas por *Fusarium* destaca-se o “Mal do

Panamá”, ocorrido na década de 1960, onde plantações de banana foram totalmente devastadas na América Central pela ação do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Atualmente esta doença ainda atinge plantações de banana em países de vários continentes, inclusive no Brasil (CORDEIRO, 2016). A sintomatologia envolve, em um primeiro estágio, o amarelamento das folhas infectadas, ocorrendo posterior murcha e ressecamento. Estima-se que a doença chega a provocar perdas de 100% nas culturas de alguns tipos de banana, como a banana maçã, por exemplo (CORDEIRO, 2016). A Figura 5 mostra a murcha e amarelecimento foliar em bananeira contaminada por *Fusarium*.

Figura 5 - Murcha e amarelecimento foliar em bananeira com mal-do-Panamá.



Fonte: Matos (2018)

Outra patologia importante causada por *Fusarium* é a ferrugem de cereais responsável por significativas perdas na agricultura, devido à alta concentração de micotoxinas dos grupos dos tricotecenos, enniatinas e zearalenonas. O acúmulo dessas micotoxinas também causa efeitos adversos na saúde humana e na pecuária, através do consumo de grãos contaminados (MELO, 2014; PESTKA, 2010; PROCTOR *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2014; RICHARD, 2007), e, por esta razão, são rotineiramente monitoradas nos grãos através de técnicas analíticas (KELLY *et al.*, 2015, NATHANAIL *et al.*, 2015; RUBERT *et al.*, 2012) (Figura 6).

Figura 6 – Fusariose em fungo de centeio.

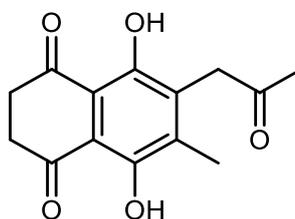


Fonte: Junior (2018)

No entanto, espécies de *Fusarium* também possuem a capacidade genética de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários estruturalmente diversos, com funções ecológicas ou farmacológicas importantes, embora ainda pouco investigadas (MA *et al.*, 2013; HANSEN *et al.*, 2015; BROWN & PROCTOR, 2016; NIEHAUS *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2017).

A karuquinona A, isolado a partir de uma cepa de *F. solani*, (TAKEMOTO *et al.*, 2014), se encontra dentre alguns metabólitos secundários bioativos conhecidos. Esse composto exibiu alta atividade citotóxica quando testado frente a três células tumorais de cancro humano e uma linha de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), através de um mecanismo de indução de apoptose e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 7).

Figura 7- Fórmula estrutural da karuquinona A.

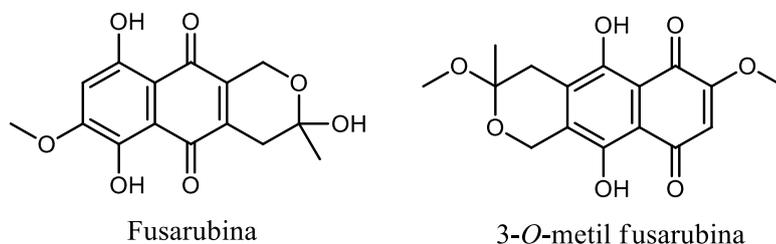


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A fusarubina e 3-O-metil fusarubina apresentaram atividade antimicrobiana de amplo espectro contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Scherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida rugosa*. A eficácia citotóxica destes compostos contra seis linhas celulares de cancro (MCF7, HeLa, DU145, A549, MDA-B231 e B16F10) foi revelada através da inibição da viabilidade celular

com valores de IC₅₀ entre 1 e 15 μ M, demonstrando um grande potencial como possíveis agentes quimioterápicos (KUMAR *et al.*, 2017) (Figura 8).

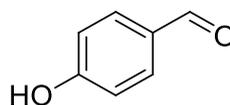
Figura 8- Fórmula estrutural da fusarubina e 3-*O*-metil fusarubina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Masi e colaboradores (2017) avaliaram o potencial fitotóxico de metabólitos secundários de *F. tricinctum* frente à *Bromus tectorum*, um tipo de capim altamente invasivo e comum no semiárido do oeste da América do Norte, em um bioensaio de plântulas. Neste experimento, o 4-hidroxibenzaldeído levou a uma redução do comprimento de coleóptilos e radículas de plântulas de capim de forma significativa, o que sugeriu o uso deste composto como controle biológico contra *B. tectorum* (Figura 9).

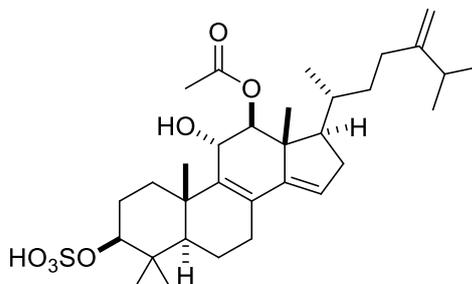
Figura 9- Fórmula estrutural do 4-hidroxibenzaldeído.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Por outro lado, o sambacide foi obtido a partir da fermentação de uma cepa de *F. sambucinum*, e mostrou atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (DONG *et al.*, 2016) (Figura 10).

Figura 10- Fórmula estrutural do sambacide.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

1.2 *Fusarium equiseti*: Ocorrência, levantamento bibliográfico acerca de seus metabólitos secundários e atividades farmacológicas

1.2.1 Ocorrência

Fusarium equiseti é o fitopatógeno mais comum em regiões tropicais e subtropicais, porém já foi recuperado de cereais em regiões temperadas na Rússia, Europa e América do Norte (KHARWAR *et al.*, 2011; RUBELLA *et al.*, 2008; KOSIAK *et al.*, 2003; BOSCH e MIROCHA, 1992; STACK *et al.*, 1997; TEKAUZ *et al.*, 2005; WING *et al.*, 1993; XUE *et al.*, 2006) (Figura 11).

Figura 11 – Macronídeos de *Fusarium equiseti*.



Fonte: LPPC-Embrapa (2019).

Este microrganismo possui fácil disseminação dentro do campo, através do vento e respingos de água de chuva ou irrigação, sendo capaz de sobreviver em sementes, solo e restos culturais, e tem sido apontado como agente causal de várias patologias de plantas conhecidas como fusarioses.

As fusarioses têm sido relatadas como patologias presentes em sementes, raízes, tubérculos e frutas de alto valor econômico, tais como o algodão (*Gossypium hirsutum* EU.; CHIMBEKUJWO, 2000), o caupi (*Vigna unguiculata* (L.) WAL .; RODRIGUES & MENEZES 2005), em lentilhas (*Lens culinaris*, MEDIK, CHAUDHARY & KAUR, 2002), na beterraba açucareira (*Beta vulgaris*; STOJSIN *et al.*, 2001), na batata (*Solanum tuberosum* EU.; RAI, 1979; THERON & HOLTZ, 1989) e em pinheiros (*Pinus* spp .; OCAMB & JUZWIK, 1995).

1.2.2 Metabólitos secundários produzidos por *Fusarium equiseti*

O levantamento bibliográfico acerca dos metabólitos secundários isolados de *F. equiseti* foi realizado utilizando-se a base de dados Scifinder e as palavras-chave “*Fusarium equiseti*”, sem a restrição do período.

Nesta pesquisa observou-se um perfil químico bastante diversificado para as cepas de *F. equiseti* investigadas, através do isolamento de diferentes tipos estruturais de metabólitos secundários, caracterizados como alcalóides (5, 15, 16, 18, 24, 25, 35 e 36), esteróides (1, 26 e 34), ftalatos (14), dicetopiperazinas (3, 5, 12, 15-18, 33, 35 e 36), antraquinonas (4, 10, 31 e 38), glicosídeo (27), derivado de tetra-hidrofurano (20), dipeptídeo cíclico (19), tricotecenos (9, 11 e 23), cromanonas (6-8, 22, 28 e 30), macrolactona (37) e depsipeptídeo (13).

A Tabela 1 mostra as informações relativas aos metabólitos secundários isolados, os diferentes meios nutricionais e as respectivas referências bibliográficas. O Quadro 13 mostra as respectivas estruturas químicas dos metabólitos secundários citados na Tabela 1.

Tabela 1 – Metabólitos secundários isolados de *Fusarium equiseti*.

COMPOSTO	MEIO DE CULTURA	REFERÊNCIA
β -sitosterol-3-O- β -glicosídeo (1)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
(\pm)-2-Acetamida-2,5-di-hidro-5-oxofurano (2)	Extrato de milho	WHITE, 1967
(2R,3R,5S)-2-(6-Aminopurin-9-il)-5-(hidroximetil)oxolan-3-ol (3)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
1,8-Di-hidroxi-3-metilantraceno-9,10-diona (4)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
17-Desmetil-2,11-didesoxi-rizoxina (5)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016

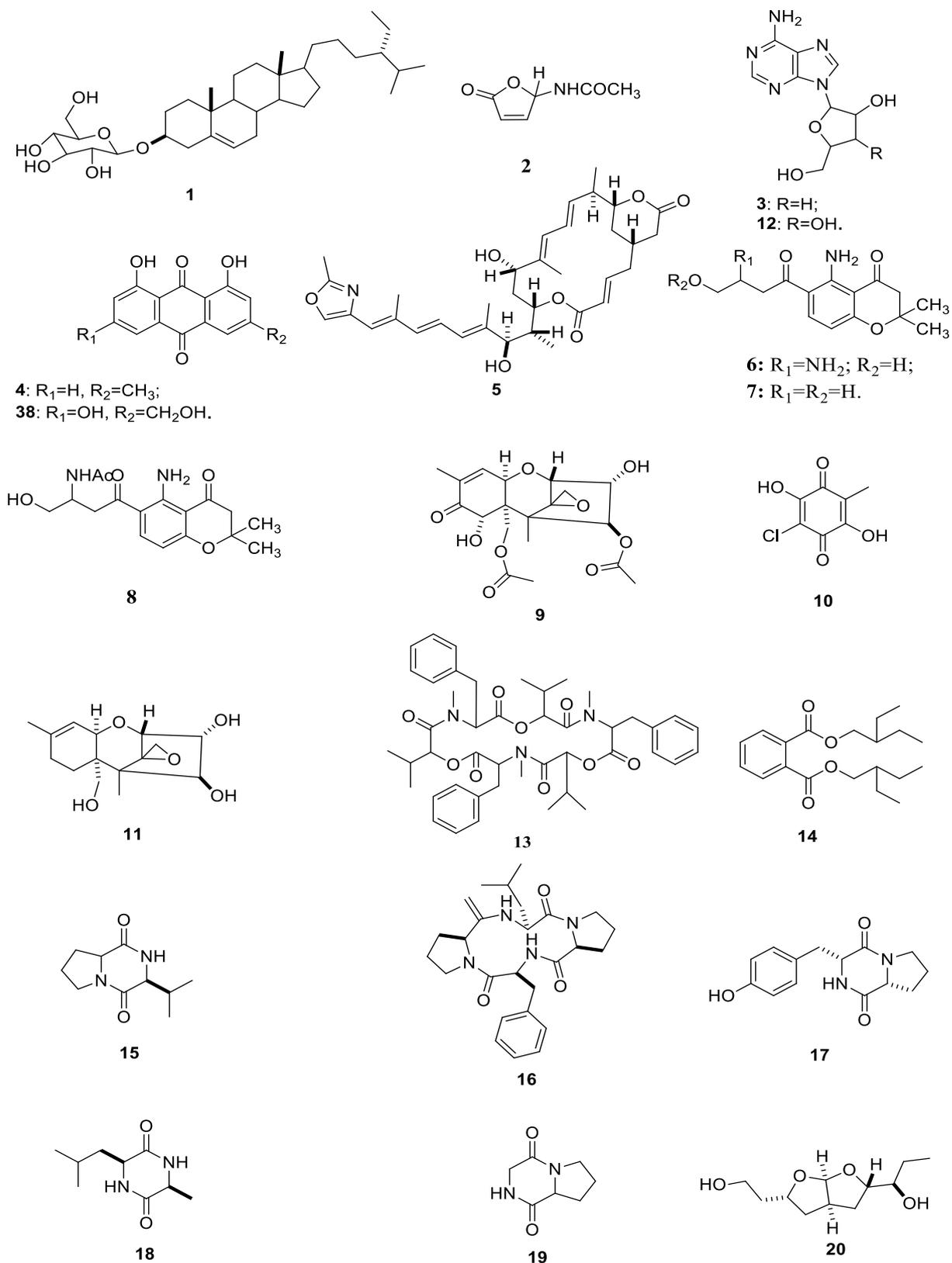
2,2-Dimetil-5-amino-6-(2'E-ene-4'-hidroxibutiril)-4-cromanona (6)	Extrato de arroz	XIE & MIROCHA, 1995
2,2-Dimetil-5-amino-6-(4'-hidroxibutiril)-4-cromanona (7)	Extrato de arroz	XIE & MIROCHA, 1995
3'-N-Acetil fusariocromanona (8)	Extrato de arroz	XIE <i>et al.</i> , 1991
4,15-Diacetato nivalenol (9)	Extrato de malte	MORRISON <i>et al.</i> , 2002
5-Cloro-3,6-dihidroxi-2-metil-1,4-benzoquinona (10)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Anguidol (11)	Extrato de malte	MORRISON <i>et al.</i> , 2002
Ara-A (12)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Beauveracina (13)	Extrato de arroz	STEPIEN <i>et al.</i> , 2013
Bis-2-etil-hexil-ftalato (14)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Ciclo (L-Pro-L-Val) (15)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Ciclo (Fenil-Pro-Leu-Pro) (16)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Ciclo-(L-Tir-L-Pro) (17)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Ciclo-(L-Ala-L-Leu) (18)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Ciclo-L-Proliglicina (19)	Extrato de arroz	WHITE, 1972
Communiol D (20)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016

Deoxifusapirona (21)	Extrato de arroz	SHIONO <i>et al.</i> , 2013
Diacetil-fusariocromanona (22)	Extrato de arroz	MIROCHA, 1991
Diacetoxiscipenol (23)	Extrato de malte	MORRISON <i>et al.</i> , 2002
Epi-equisetina (24)	BD	WHEELER, STIPANOVIC & PUCKHABER, 1999
Equisetina (25)	Grão de milho	BURMEISTER <i>et al.</i> , 1974
Ergos-5,7-dien-3β-ol (26)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Etil-O-β-glicosídeo (27)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Formil-fusariocromanona (28)	Extrato de arroz	MIROCHA, 1991
Fusaequisina A (29)	Extrato de arroz	SHIONO <i>et al.</i> 2013
Fusariocromanona (30)	Extrato de malte	MORRISON <i>et al.</i> , 2002
Griseoxantona C (31)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Neofusapirona (32)	Extrato de arroz	SHIONO <i>et al.</i> 2013
Perlolarina (33)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Peróxido de ergosterol (34)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Timina (35)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016
Uracila (36)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016

Zearalenona (37)	Extrato de arroz	CASTILLO <i>et al.</i> , 2002
ω-Hidroxiemodina (38)	Czapek-peptona	HAWAS <i>et al.</i> , 2016

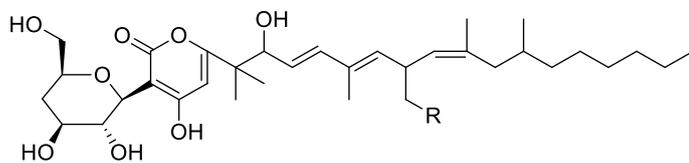
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

QUADRO 1 - Estruturas químicas dos metabólitos secundários isolados de *Fusarium equiseti* de acordo com a Tabela 1.

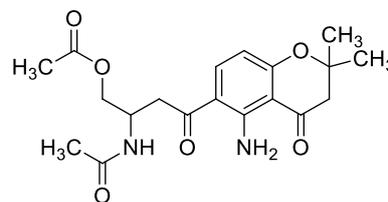


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

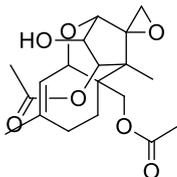
QUADRO 1 – Continuação.



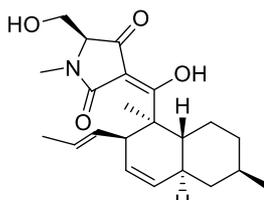
21: R=H;
32: R=OH.



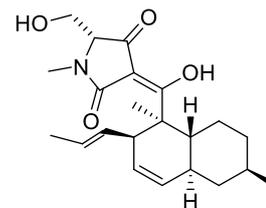
22



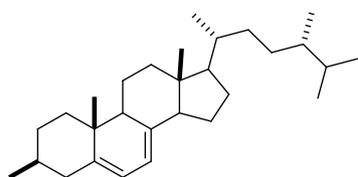
23



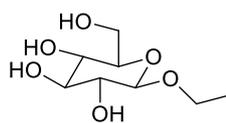
24



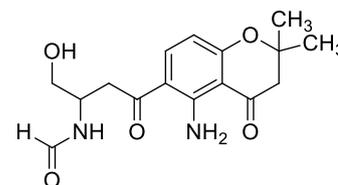
25



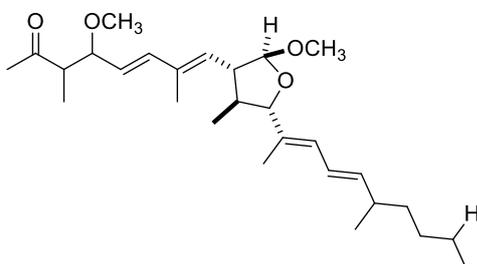
26



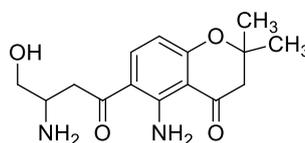
27



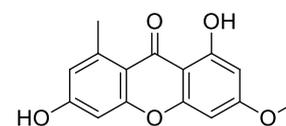
28



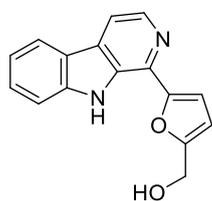
29



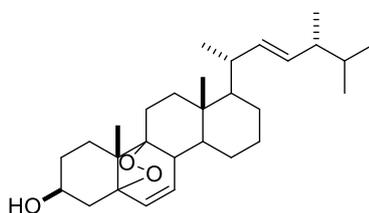
30



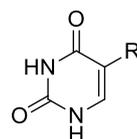
31



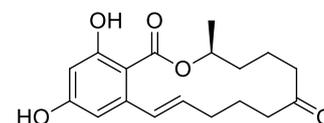
33



34



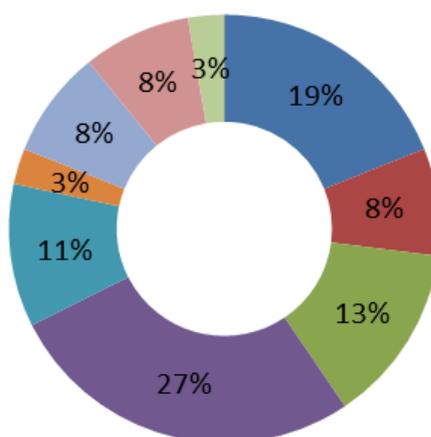
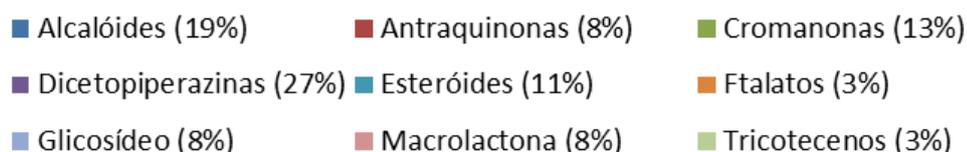
35: R=CH₃;
36: R=H.



37

De acordo com os resultados apresentados, foi possível a construção do Gráfico 1, contendo a distribuição percentual das principais classes de compostos identificadas em *F. equiseti*.

Gráfico 1 - Classes de metabólitos secundários identificados em *F. equiseti*.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A partir desta análise, pôde-se observar que as dicotopiperazinas e os alcalóides se apresentam como as classes estruturais de metabólitos secundários mais frequentes para *F. equiseti*. Do ponto de vista químico pode-se concluir que essa espécie foi ainda pouco investigada, já que somente 38 metabólitos secundários foram relatados, geralmente utilizando os meios nutricionais Czpeck-peptona, extrato de arroz e de malte para o cultivo do microrganismo.

1.2.3 Atividades farmacológicas dos metabólitos secundários

Alguns metabólitos secundários isolados para *F. equiseti* foram relatados com atividade antibacteriana e antifúngica. A ciclo (L-Pro-L-Val) (**15**) e a ω -hidroxiemodina (**38**) foram testadas contra as culturas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium* e *Candida albicans*. A melhor ação antimicrobiana foi encontrada para a ω -

hidroxiemodina (**38**), com zonas de inibição de 17 e 19 mm para *B. megaterium* e *C. albicans*, respectivamente (HAWAS *et al.*, 2016). O mesmo grupo constatou que a ciclo (L-Pro-L-Val) (**15**) se mostrou altamente eficiente contra *Bacillus subtilis*, com zona de inibição de 18 mm.

A equisetina (**25**), um derivado da lactoma N-metil-2,4-pirrolidona, mostrou atividade contra cepas de bactérias gram-positivas (*B. subtilis* e *S. aureus*), porém, tem seu potencial reduzido frente a bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) ou contra o fungo patogênico *C. albicans* (RATNAWEERA, SILVA, WILLIAMS e ANDERSEN, 2015; BURMEISTER *et al.*, 1974;). Além das atividades antibacterianas e fungicidas, a equisetina (**25**) demonstrou fitotoxicidade e inibiu a enzima integrase recombinante *in vitro*, necessária para a replicação do HIV (SINGH, 1998).

Hawas e colaboradores (2018) avaliaram as propriedades citotóxicas tanto do extrato bruto de *Fusarium equiseti*, como para os compostos isolados, 17-desmetil-2,11-didesoxi-rizoxina (**5**), ergos-5,7-dien-3 β -ol (**26**), β -sitosterol-3-O- β -glicosídeo (**1**), griseoxantona C (**31**) e ciclo-(L-Tir-L-Pro) (**17**), frente às seguintes linhagens de câncer de fígado (HEP-G2), leucemia (CCRF-CEM), cólon (Colon 38) e pulmonar (H-125). A melhor atividade citotóxica foi observada contra a linhagem de câncer de fígado (HEP-G2), onde o extrato bruto e a griseoxantona C (**31**) apresentaram os resultados mais significativos. A 17-desmetil-2,11-didesoxi-rizoxina (**5**) e a ciclo-(L-Tir-L-Pro) (**17**) apresentaram significativa atividade citotóxica contra células de câncer de cólon (Colon 38). Lee e colaboradores (2010) relataram a atividade citotóxica do crisofanol (**4**) contra a linhagem de câncer de cólon humano (SNU-C5), através do bloqueio da proliferação dessa mesma linhagem celular e indução da apoptose. (LEE *et al.*, 2010). Em adição, a fusariocromanona (**30**), conhecida por causar discondroplasia tibial aviária (DTA) em aves de corte (LEE *et al.*, 1985), foi testada contra sete linhagens celulares de câncer (HaCat, SRB12-p9, MCF7, MDA-MB231, SV-HUC, UM-UC14 e PC3), e os resultados mostraram a sua capacidade de afetar simultaneamente a sinalização da angiogênese, a transdução do sinal do câncer e a apoptose.

Por outro lado, a atividade antifibrótica e os mecanismos de ação do peróxido de ergosterol (**34**) em linhagens de rim de rato (NRK-49F) foi investigada (ZHU *et al.*, 2014). Os resultados revelaram que **34** foi capaz de suprimir a ativação de fibroblastos induzida por TGF- α 1 em NRK-49F, sugerindo o seu uso terapêutico na intervenção e prevenção da fibrose renal.

1.3 Estudos de Metabolômica: Desreplicação e Quimiometria

Os metabólitos secundários são produzidos pelos fungos através de vários caminhos biossintéticos e espécies geneticamente distintas, e os estudos relacionados ao entendimento do genoma microbiano revelam informações valiosas sobre os princípios da biossíntese destes constituintes químicos (SPECIAN *et al.*, 2014).

O metabolismo de um organismo vivo representa o conjunto de reações químicas conduzidas por enzimas específicas, visando a obtenção de nutrientes e a produção de metabólitos primários e secundários, de acordo com as suas necessidades de sobrevivência. Os metabólitos primários são essenciais nos processos vitais, e responsáveis pelas atividades metabólicas que visam o crescimento celular através da geração de energia para as células. O metabolismo secundário inclui a biossíntese de compostos que não são essenciais ao crescimento celular, sintetizados na fase final de crescimento ou durante a fase estacionária, e utilizada para sobrevivência, comunicação ou proteção contra patógenos no meio externo (CHASE, 2001).

Baseados no fato de que os microrganismos possuem potencial para produzir um número muito maior de metabólitos secundários em relação aos que têm sido isolados, esses estudos sugerem que a maioria dos genes envolvidos na biossíntese destes compostos é silenciada ou pouco expressada quando o microrganismo é cultivado no laboratório (CHIANG *et al.*, 2013). A manipulação de fatores nutricionais e os parâmetros de fermentação como tempo, temperatura e pH podem levar a uma alteração do ambiente em torno dos fungos, levando-os a adaptar-se para sobreviver nessas novas condições. Estes fatores alteram completamente a biossíntese de seus compostos permitindo a produção de diferentes metabólitos a partir de uma única cepa (KUHN E GHANNOUM, 2003).

Desta forma, o estudo químico de fungos endofíticos apresenta uma grande vantagem em comparação com outras fontes naturais não renováveis, já que podem ser cultivadas em grande escala em laboratórios, tornando-se uma fonte ilimitada e contínua de matéria-prima com ilimitado potencial econômico nas áreas de biotecnologia e bioprospecção.

A metabolômica, definida por NICHOLSON *et al* (1999), como sendo “a medida quantitativa da dinâmica resposta metabólica dos sistemas vivos aos estímulos fisiopatológicos ou modificação genética” ou, segundo YULIANA *et al*, 2011, como sendo “a identificação quantitativa e qualitativa de todos os metabólitos presentes em um organismo simultaneamente, em um determinado momento e sobre determinadas condições”, têm sido

uma das metodologias mais utilizadas para se obter o perfil metabólico de células microbianas.

O processo de isolamento e identificação de metabólitos secundários a partir de um extrato bruto é complexo, devido à baixa concentração desses constituintes químicos e ao tempo demandado pelo uso de técnicas cromatográficas clássicas, sendo eficiente muitas vezes apenas na identificação dos compostos majoritários. No entanto, devido ao grande avanço tecnológico das técnicas analíticas nos últimos anos, especialmente a espectrometria de massas, a identificação desses metabólitos minoritários diretamente no extrato têm sido cada vez mais possível. Para isto, são utilizadas técnicas analíticas hífenadas com alta sensibilidade, permitindo a observação das mínimas diferenças entre as amostras. (JANSEN *et al.*, 2005; VILLAS-BÔAS *et al.*, 2005)

A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida (CL) de alta e de ultra-alta eficiência (CLAE e CLUE, respectivamente), se apresentam como técnicas de separação modernas e comumente aplicadas em estudos metabolômicos, por serem adequadamente compatíveis com a grande maioria dos analitos (FUNARI *et al.*, 2013). No entanto, cada uma dessas técnicas possuem vantagens e desvantagens. A CG, por exemplo, tem como vantagem as suas colunas com alta capacidade na separação de sinais e a não utilização de solventes durante as análises, porém exige compostos volatilizáveis e termoestáveis a aproximadamente 350 °C. A CLAE e a CLUE são instrumentos de fácil manuseio, totalmente automatizados, exibem boa resolução, reprodutibilidade e seletividade, mas ainda pode ocorrer co-eluição de um número significativo de substâncias na análise de uma amostra complexa, devido às limitações em capacidade de separação de picos e tempo de análise. Além disso, o impacto causado pelo descarte dos solventes também é apontado como uma grande desvantagem da CL. (WOLFENDER *et al.*, 2009; TISTAERT *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2009).

As técnicas espectrométricas, a espectrofotometria no ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis) e a espectrometria de massas (EM) são as mais comumente acopladas a CLAE e CLUE, por apresentarem alta sensibilidade e boa linearidade e serem relativamente insensíveis a mudanças no fluxo e temperatura da fase móvel. Estas técnicas são bastante confiáveis e fáceis de operar, além de proverem informações estruturais sobre os constituintes da amostra, caso os detectores com arranjo de diodos forem utilizados para os analitos que absorvem na região UV/Visível. A espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) e a ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) são essenciais para se obter um

“fingerprint” de analitos mais complexos, especialmente para os extratos brutos (VERPOORTE, CHOI e KIM, 2007; WOLFENDER, 2009).

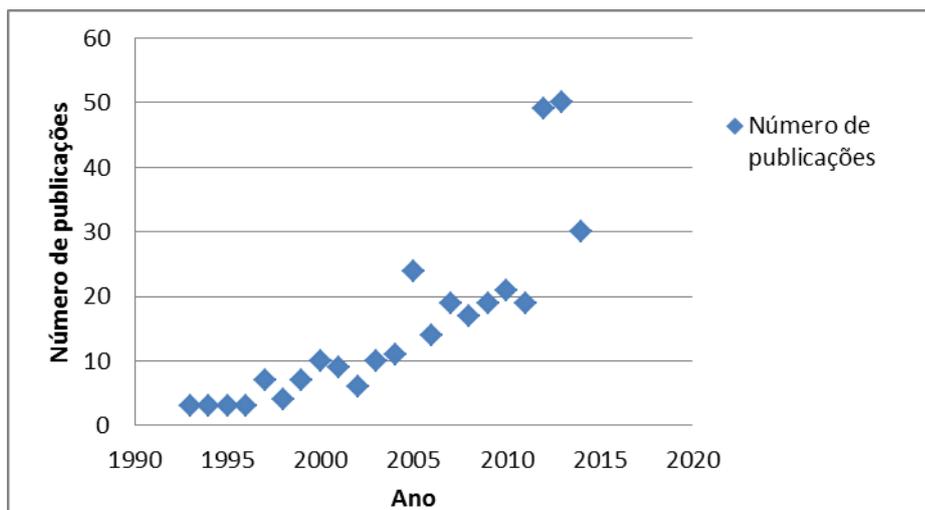
O uso da RMN vem crescendo nos últimos anos, por ser uma técnica muito sensível na quantificação de núcleos orgânicos ativos. Com a possibilidade de ser usada acoplada a um equipamento de CL em fluxo contínuo para determinação dos constituintes majoritários, ou por coleta de frações em micro colunas de extração de fase sólida (SPE) permitindo a realização de espectros bidimensionais e a detecção dos compostos minoritários. Além disto, por meio do uso de sequências de pulso adequadas, é possível a detecção *in situ* de compostos conhecidos por meio da obtenção de espectros de RMN de moléculas individuais em mistura sem haver a necessidade de separação. No entanto, além dos problemas inerentes à técnica, em especial aqueles dos isótopos menos abundantes como o ^{13}C , há também a sobreposição dos sinais em espectros de alta complexidade que dificultam as análises, sendo necessária a incorporação de experimentos bidimensionais para vencer esse obstáculo (VERPOORTE, CHOI e KIM, 2007).

Atualmente, a combinação de CLUE acoplada à EMAR com ionização por eletrospray e analisador por tempo de voo (IES-ToF) e/ou a espectrometria de massas tandem (EM^n) é a abordagem que fornece a melhor relação custo-benefício por ser uma técnica extremamente sensível, demandando quantidades mínimas de amostra, menor tempo de análise e custo instrumental, proporcionando um arsenal de informações valiosas quanto à estrutura dos metabólitos de interesse (FUNARI *et al.*, 2013; WOLFENDER, 2009).

Dentro deste contexto, a metodologia denominada desreplicação (do inglês dereplication, “não replicar”) foi introduzida no início da década de 90, com o objetivo de otimizar o tempo e o custo das análises, e definida como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos, a fim de evitar o re-isolamento de substâncias já conhecidas, através de uma análise qualitativa em misturas complexas (NG *et al.*, 2009).

Segundo Gaudencio e Pereira (2015), a desreplicação é um assunto atual e de grande interesse na comunidade científica, e a sua importância na descoberta de novas moléculas protótipos de drogas pode ser revelada através do expressivo crescimento do número de publicações no período de 1993 até 2014. O desenvolvimento de processos da desreplicação multidisciplinar certamente resultarão em um aumento expressivo no número de produtos naturais (ou derivado diretamente deles) e de drogas aprovadas em um iminente futuro. O gráfico 2 mostra o número de publicações sobre desreplicação nos últimos anos.

Gráfico 2 - Número de publicações sobre desreplicação nos últimos anos.



Fonte: Gaudencio e Pereira (2015, com adaptações).

Diante do panorama de grande avanço tecnológico na área instrumental, comumente introduzidos nas análises de rotina em laboratórios de pesquisa, uma grande quantidade de dados é gerada, sendo necessário a sua análise e interpretação corretas. Desta forma, a quimiometria surgiu de uma busca por ferramentas matemáticas e estatísticas para transformar um conjunto de dados brutos em informação (GRANATO *et al.*, 2018).

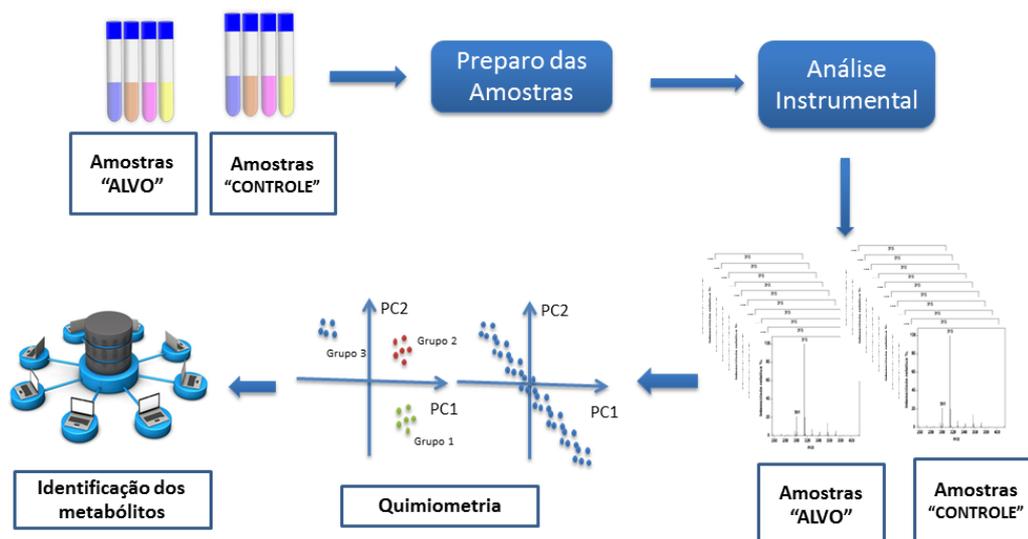
A partir do pré-tratamento dos dados, sejam aqueles obtidos por técnicas de separação e/ou espectroscópicas, técnicas quimiométricas capazes de selecionar informações relevantes são utilizadas para diferentes propósitos. As comparações de amostras para efeito de acesso de identidade podem ser feitas por meio de coeficientes de correlação ou calculando-se o grau de similaridade entre uma amostra e aquela de referência (VANDER, 2008). Em estudos taxonômicos e de quimiossistemática, ou para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica, a aplicação de técnicas quimiométricas de análise multivariada é recomendada, pois permitem a classificação ou a formação de conglomerados de dados, por meio da análise de componentes principais (PCA) ou de análise hierárquica de agrupamentos (HCA), mínimos quadrados parciais (PLS), análises discriminantes, análises de correlações, etc (GRANATO *et al.*, 2018; VANDER, 2008; FUNARI *et al.*, 2013; VERPOORTE, CHOI e KIM, 2007).

Assim, a fim de melhorar e facilitar as análises, a quimiometria vem sendo utilizada como uma importante ferramenta para a organização e interpretação dos resultados obtidos. As informações relevantes dentro de um conjunto de dados são separadas e a sua visualização se torna mais fácil, sendo possível

descobrir e interpretar as diferenças existentes entre as variáveis e examinar as relações que podem existir entre as amostras.

A Figura 12 abaixo demonstra a análise metabolômica de diferentes extratos de um microrganismo aplicando todas as etapas da técnica da desreplicação na obtenção de novas moléculas.

Figura 12 – Fluxograma de trabalho envolvido na análise metabolômica.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Desta forma, o conjunto destas abordagens modernas permitem a seleção de extratos de microrganismos potencialmente promissores, que podem ser utilizados em estudos adicionais de validação de atividade e de isolamento dirigido para as substâncias ativas, ou para obtenção de novos metabólitos secundários, agilizando, desta forma, o processo de desenvolvimento de novos produtos de interesse.

Dentro deste contexto, o fungo endofítico *F. equisetii* foi selecionado para a investigação do perfil químico e avaliação da atividade fungicida dos diferentes extratos obtidos com variações nos meios nutricionais e tempo de cultivo, através de uma análise metabolômica, utilizando espectrometria de massas e quimiometria.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o estudo metabolômico de *Fusarium equiseti* utilizando variação do meio nutricional e tempo de cultivo, através da desreplicação dos diferentes extratos utilizando UPLC-QTOF-MS^E, avaliação da atividade fungicida frente à cepa do fungo *Colletotrichum musae*, e determinação dos biomarcadores responsáveis pela atividade biológica através de análise quimiométrica.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o cultivo de *Fusarium equiseti* nos diferentes meios nutricionais: BD (batata-dextrose), BDL (batata-dextrose-levedura), MPD (malte-peptona-dextrose) e MnTPL (Manitol-Peptona-Levedura), e em diferentes tempos de cultivo (períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias)
- Avaliar as diferenças entre os perfis metabólicos dos diferentes extratos de *Fusarium equiseti* a partir da técnica UPLC-QTOF-MS^E.
- Caracterizar tentativamente os metabólitos secundários dos diferentes extratos utilizando o banco de dados PubChem, ChemSpider, KNApSACK e pesquisa bibliográfica.
- Avaliar a atividade fungicida dos extratos obtidos frente a cepa do fungo *C. musae*.
- Reunir os dados espectrométricos através da análise quimiométrica utilizando ferramenta matemática PCA, OPL-DA, S-Plot e VIP.
- Correlacionar os dados de quimiometria e atividade fungicida visando à identificação dos metabólitos secundários ativos.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Identificação molecular de *Fusarium equiseti*

O fungo *F. equiseti* foi isolado a partir do fruto do melão, onde mantinha uma relação parasitária. A coleta do microrganismo foi realizada no comércio local na cidade de Fortaleza-CE, em 2014, e a cepa do fungo foi cedida pela EMBRAPA-Agroindústria Tropical-CE. O microrganismo encontrava-se inoculado em meio semi-sólido BDA em placa de petri (Figura 13).

Figura 13 – *Fusarium equiseti* inoculado em meio BDA em placa de Petri



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A identificação molecular da cepa foi realizada por análise filogenética de sequências de DNA dos genes fator de alongação 1 alfa (EF-1 α) e RNA polimerase II (RPB2). O DNA do isolado foi extraído de acordo com Murray e Thompson (1980) e fragmentos do gene EF-1 α foram amplificados e sequenciados, utilizando-se os primers Ef-1 (forward; 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') e Ef-2 (reverse; 5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (O'DONNELL *et al.*, 1998). Já os fragmentos do gene RPB2 foram amplificados e sequenciados, utilizando-se os primers 5F2 (forward; 5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3') e 7cR (reverse; 5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') (O'DONNELL *et al.*, 2010).

As sequências dos isolados foram confrontadas com os dados do GenBank, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando BLAST e alinhamentos múltiplos foram gerados para o complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) com as sequências obtidas nas buscas, juntamente com as obtidas no presente estudo. A cepa deste microrganismo encontra-se preservada no Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Embrapa, sob o código LPPC-072

3.2 Cultivo, Preservação e Repicagem

F. equiseti foi preservado segundo o método Castellani (CASTELLANI, 1963), em água estéril e à temperatura ambiente, e inicialmente cultivado em meio semi-sólido BDA vertido em placa de petri por um período de 5 dias. Foram retirados discos contendo o fungo crescido em meio BDA de aproximadamente 5 mm de diâmetro, com o auxílio de canudos previamente esterilizados. Os discos foram colocados no interior de tubos criogênicos de 5 mL, contendo 4 mL de água destilada estéril e lacrados com tampa e fita parafilme, para impedir a entrada de agentes contaminantes e a evaporação da água. Os tubos contendo o material fúngico foram armazenados sob temperatura ambiente no laboratório de Micologia da UFC.

A repicagem do fungo foi efetuada quinzenalmente com a transferência do microrganismo para tubos de ensaio e placas de petri contendo meio BDA. Os processos de repicagem foram efetuados em câmara de fluxo laminar Labconco[®], e todo material necessário aos processos foram submetidos à esterilização em autoclave vertical da marca Phoenix[®] AV75, à 121°C e 1 atm de pressão durante 15 minutos.

3.3 Produção dos metabólitos secundários de *Fusarium equiseti*

3.3.1 Estudo de otimização do crescimento do fungo em diferentes intervalos de tempo do cultivo

Um estudo prévio em pequena escala foi realizado para o cultivo do fungo em quatro meios de cultura líquidos diferentes: batata-dextrose (BD), batata-dextrose-extrato de levedura (BDL), malte-peptona-dextrose (MPD) e manitol-peptona-levedura (MnTPL). Os meios foram solubilizados em água destilada e preparados conforme as proporções dos nutrientes previamente estipuladas (Tabela 2). Os componentes de cada meio de cultura foram dissolvidos em 3,0 L de água destilada, o qual foi distribuído em porções iguais de 200 mL em 15 erlenmeyers de 500 mL. Os erlenmeyers foram lacrados com tampões de algodão hidrófobo e submetidos ao processo de autoclavagem à 121°C por 15 minutos. Após este tempo, os erlenmeyers foram retirados da autoclave para o resfriamento, seguido pela inoculação de *F. equiseti*.

Tabela 2 – Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições

<i>Meio de Cultura</i>	<i>Composição</i>
<i>BD</i>	Batata-Dextrose 24g/L
<i>BDL</i>	Batata-Dextrose 24g/L; Extrato de Levedura 2,5g/L
<i>MPD</i>	Extrato de malte 20g/L; Peptona 2g/L; Dextrose 20g/L
<i>MnTPL</i>	Manitol 4g/L; Peptona 2g/L; Extrato de Levedura 2g/L

Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

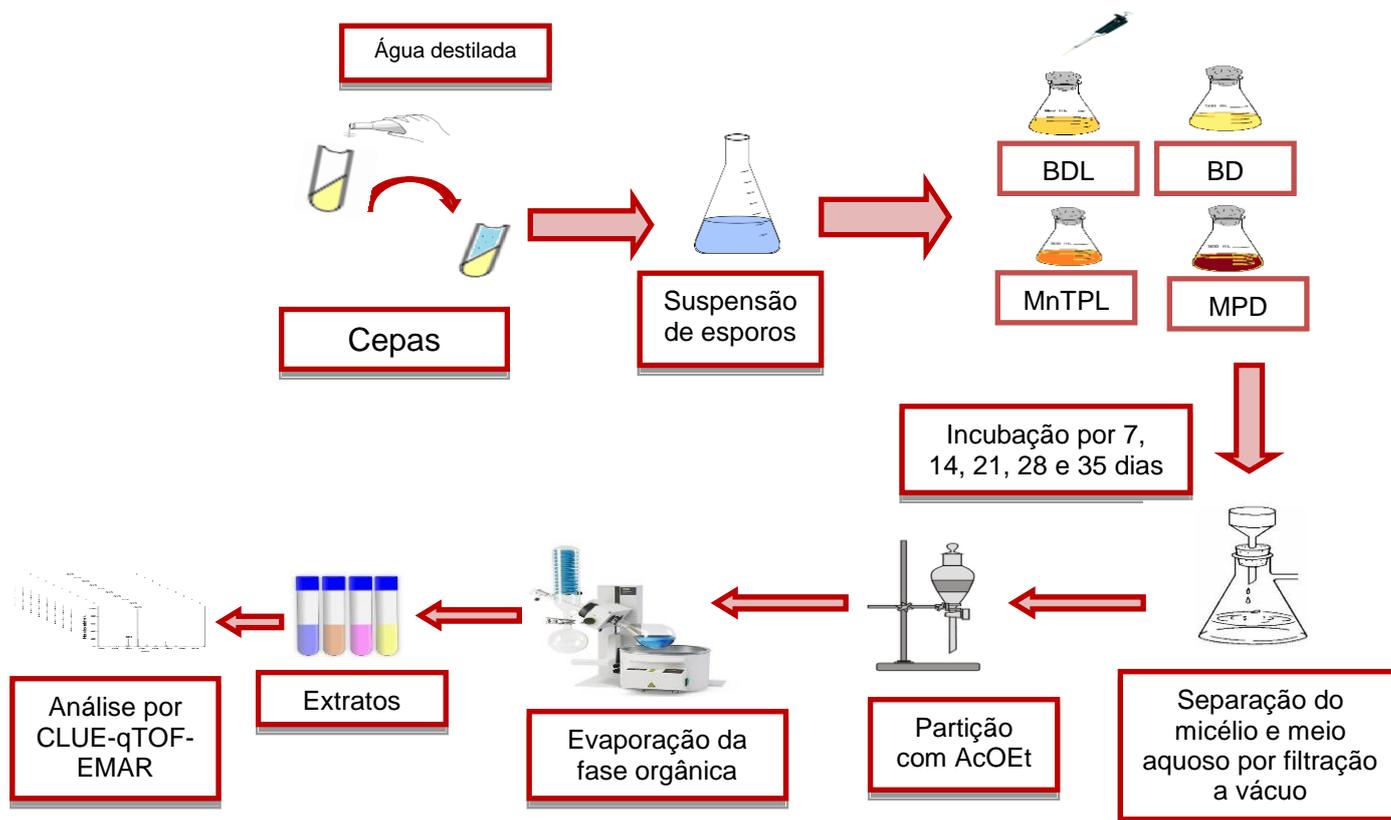
O processo de inoculação foi realizado no laboratório de Micologia da UFC em câmara de fluxo laminar Labconco[®], cuja assepsia foi realizada previamente com álcool 70%. Ao fungo que se encontrava crescido por 7 dias em tubos de ensaio contendo meio semi-sólido inclinado BDA (batata-dextrose-ágar), foi adicionado água destilada estéril para o desprendimento dos esporos. Foram preparados 85 mL de suspensão de esporos, que foi filtrada em filtros estéreis com membrana de nylon (100 µm, Falcon), e a absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro obtendo-se um valor de 0,44. Em seguida, 2 mL da solução de esporos foi adicionada a cada erlenmeyer contendo o respectivo meio de cultura. Para cada meio, foram preparados 3 erlenmeyers, dos quais um deles não foi inoculado, para servir como controle.

A partir deste procedimento foi possível verificar que o fungo apresentou um crescimento diferenciado nos diferentes meios nutricionais. Nos meios BD, BDL e MPD houve a formação de uma grande quantidade de massa micelial com tom amarelo-branco, onde o microrganismo se desenvolveu com crescimento rápido na superfície central ou intermediária. No entanto, no meio de cultura MnTPL o crescimento micelial se apresentou mais difuso e lento, com pouca massa micelial em relação aos demais meios (branco) do experimento.

O experimento foi realizado em um período total de 35 dias e em duplicata para prevenção de perdas oriundas de possíveis contaminações. A cada intervalo de 7 dias, foram retirados 3 erlenmeyers de cada meio de cultivo (dois erlenmeyers contendo o fungo inoculado e um contendo apenas o meio de cultura, branco).

Os micélios foram separados dos meios de cultivo através de filtração a vácuo e o meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila (AcOEt) na proporção 3:1 (3x). O solvente da fase orgânica foi evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida para a obtenção dos respectivos extratos (Figura 14).

Figura 14 - Esquema de obtenção dos extratos para análise por CL-EM.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

3.4 Métodos Cromatográficos e Espectrométricos

3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análises das amostras por CCD foram utilizadas placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F254 – Merck (espessura 0,2 mm). As placas foram submetidas à luz ultravioleta (lâmpada da marca spectroline[®] modelo CM-10) e a análise foi feita em dois comprimentos de onda, 254 e 365 nm. Após a análise em lâmpada UV, as placas foram imersas em solução de vanilina (utilizado como revelador) e submetidas ao aquecimento em chapa elétrica CIENTEC até a completa revelação. Para as referidas análises foram utilizados solventes grau P.A. das marcas Synth[®] e Vetec[®]. Os solventes utilizados como eluentes foram diclorometano, acetato de etila, metanol e hexano, combinados em misturas em proporções

adequadas às análises ou utilizados individualmente.

3.4.2 Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em equipamento constituído por um sistema de bomba ternária de alta pressão SHIMADZU LC-20AT, detector UV-Visível com arranjo de diodo SHIMADZU SPD-M20A e um forno termostático para acomodação da coluna.

A coluna de fase reversa utilizada nas análises por CLAE era constituída de sílica C-18 (Phenomenex). Para isso, utilizou-se uma coluna analítica (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). As análises foram feitas com as amostras dissolvidas com os solventes usados na fase móvel, e filtradas num sistema manual de membrana de teflon com poros de 0,22 µm (Phenomenex). Os solventes usados na fase móvel foram previamente filtrados e pertencentes às marcas Tedia e Panreac, todos grau HPLC, enquanto que a água foi obtida de um equipamento de purificação e ultrapurificação Milli-Q.

3.4.3 Condições das análises realizada em UPLC-QTOF-MS-MS

A análise dos extratos foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QtoF, Waters) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. As análises cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 milímetros, 1,7µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; (15,1-17) min (100%) de B; (17,1-19,1) min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µl. O modo ESI+ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 350 L / h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Em baixo scan, a tensão de cone foi 35 V, energia de colisão de 5 eV (trap). Em alto scan, a tensão do cone foi de 35 V, com uma variação de energia de colisão de 20-40 eV (trap). Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MSE. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

3.5 Preparo das amostras para análise em UPLC

Foram dissolvidos 1,0 mg de cada um dos extratos a serem analisados em 1,0 mL de metanol grau CLAE. Após a solubilização, a solução foi transferida para uma seringa acoplada ao filtro PTFE 0,22 µm. A alíquota filtrada foi recolhida em vials e encaminhada para análise em UPLC-QTOF-MS^E.

3.6 Identificação Molecular

Os dados gerados pelas análises em UPLC-QTOF-EM^E foram processados utilizando o software *MassLynx* versão 4.1. A comparação de todos os picos no cromatograma de massas foi feita baseando-se numa tolerância de ±0,05 Da para a massa exata. Todas as possíveis fórmulas moleculares foram extraídas (elementos C, H, O, N, S e tolerância de 10 ppm a nível de família e 15 ppm para os compostos já relatados para o gênero *Fusarium*) usando a ferramenta *Elemental Composition* do *MassLynx*. A fórmula molecular extraída foi corrigida retirando-se um hidrogênio (em modo positivo) para posterior pesquisa na literatura.

O erro em ppm é calculado pela Equação (1) que leva em consideração a massa observada no espectrômetro de massas e a massa calculada pela ferramenta composição elementar do software *MassLynx*.

$$\text{Erro (ppm)} = \left[\frac{(\text{Massa observada} - \text{Massa calculada})}{(\text{Massa observada})} \right] \times 10^6 \quad (1)$$

3.7 Metodologia de avaliação do potencial de atividade antimicrobiana *in vitro*

Após a obtenção dos extratos oriundos do cultivo de *F. equiseti* em diferentes meios nutricionais (BD, BDL, MPD e MnTPL), conforme descrito na seção 3.3.1, foram realizados testes de atividade fungicida utilizando estes extratos contra o fitopatógeno *Colletotrichum musae*.

Os experimentos de atividade antifúngica das amostras foram realizados nos Laboratórios de Fitopatologia e de Patologia de Pós-Colheita, ambos pertencentes à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT), sob supervisão do pesquisador Dr. Cléber de Freitas.

A sensibilidade de *Colletotrichum musae* frente aos diferentes extratos foi

avaliada segundo a metodologia de difusão em ágar, com modificações (BAUER *et al.*, 1959). Os ensaios foram realizados incorporando-se as soluções dos extratos brutos ao meio de cultura, de modo que o método utilizado se mostrou rápido, sensível e barato.

O experimento foi organizado utilizando como controle positivo o fungicida comercial Tecto® (Tiabendazol) 0,1%. Como controle negativo, o fungo *Colletotrichum musae* foi cultivado em meio BDA, e placas contendo o fungo e o solvente DMSO (dimetilsulfóxido, 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de meio). Para os testes, foram utilizadas placas contendo o fungo *C. musae* no meio de crescimento BDA que continha uma solução dos extratos de *F. equiseti* (BD, BDL, MPD e MnTPL) e os respectivos brancos nos meios BDA. Este mesmo procedimento foi adotado para os testes com os extratos de *F. equiseti* nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

Um erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura BDA foi autoclavado para cada extrato a ser testado. Cada extrato foi solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) puro estéril nas concentrações estoque de 2 mg.mL^{-1} , e foram testados nas concentrações únicas de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (para todos os extratos).

Uma alíquota de 150 μL de cada extrato foi retirada e inserida em seus respectivos erlenmeyers, contendo meio BDA previamente esterilizado em autoclave. Após a homogeneização, o meio contendo o respectivo extrato foi vertido em placas de petri estéreis, em triplicata.

Após a solidificação do meio de cultura, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados do meio de cultura contendo o fungo (*C. musae*) com o auxílio de uma alça de platina e colocados no centro das placas de Petri contendo os extratos. As placas foram colocadas em câmara de crescimento, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do experimento teve início 24 h após a inoculação de *C. musae*, medindo-se com o auxílio de um paquímetro digital o crescimento micelial em cada intervalo de 24 h, durante o período de 5 dias.

Os dados obtidos foram organizados em planilhas do Excel para a construção de gráficos que possibilitassem verificar o percentual de inibição do crescimento do microrganismo testado frente aos extratos utilizados.

A porcentagem de inibição foi calculada de acordo a Equação 2, desenvolvida por (SIVAN, ELAD e CHET 1984):

$$\% \text{ De inibição} = [1 - (F / C)] \times 100 \quad (2)$$

Onde:

F = diâmetro (mm) do halo de crescimento fúngico da amostra teste.

C = diâmetro (mm) do halo do crescimento fúngico do controle negativo.

3.8 Análise quimiométrica

Visando identificar o potencial discriminatório dos compostos tentativamente identificados nos extratos de *F. equiseti* (BD, BDL, MPD e MnTPL), obtidos por meio do CLUE-qTOF-EM, todos os dados foram processados pelo software *MarkerLynx* (SOUSA *et al.*, 2017). A partir dos dados obtidos foi concebida a análise multivariada, a PCA (Análise de Componentes Principais) e a OPLS-DA (Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonais). A análise multivariada foi realizada nas seguintes condições: tempo de retenção 0,0 a 16,5 min, variação de massas de 110 a 1200 Da, tolerância de massas 0,05 Da, e eliminação de ruídos ao nível de 5.

Para análise dos dados, foi gerada uma lista das intensidades dos picos detectados usando o par tempo de retenção (t_r) e dados de massa (m/z) como identificador de cada pico. Uma identificação arbitrária foi atribuída a cada um desses pares t_r - m/z com base em sua ordem de eluição do sistema CLUE-qTOF-EM. As intensidades dos íons para cada pico foram normalizadas contra a soma das intensidades do pico usando o *MarkerLynx*. Os íons de amostras diferentes foram considerados idênticos quando combinavam os seus valores de t_r e m/z . (SOUSA *et al.*, 2017).

O conjunto de dados foi centrado na média e o método de escala Pareto foi usado para gerar o gráfico PCA. Os dados que compõem o número de pico (par t_r - m/z), o nome da amostra e a intensidade do íon foram analisados por análise de componentes principais (PCA), e análise discriminante de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA) usando o software *MarkerLynx* (VAN DEN BERG *et al.*, 2006; NI *et al.*, 2008; SOUSA *et al.*, 2017). A centralização média calcula o espectro médio do conjunto de dados e subtrai a média de cada espectro, visando focar a parte flutuante dos dados em vez do valor original. A escala de Pareto mede cada variável pela raiz quadrada de seu desvio padrão, amplificando a contribuição de metabólitos de menor concentração (BERG *et al.*, 2006; NI *et al.*, 2008).

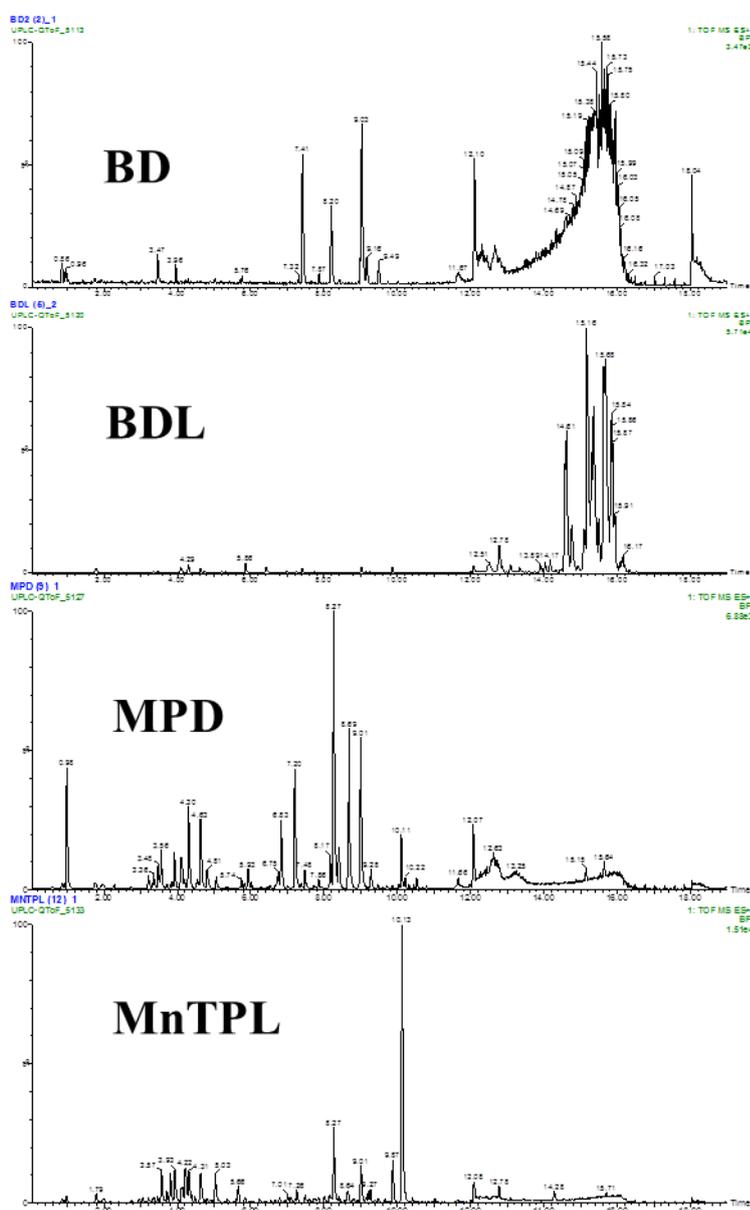
Com o propósito de identificar os possíveis biomarcadores foram utilizadas outras ferramentas estatísticas, o VIP e S-Plot que foram obtidos a partir das análises de OPLS-DA para todas as amostras. A variável de importância na projeção (VIP) é uma forma de classificar a melhor faixa em que estão inseridos os metabólitos discriminantes, e é considerada estatisticamente significativa quando o valor é superior a 1,0 (MAO *et al.*, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos dos metabólitos secundários de *Fusarium equiseti*

A partir da análise preliminar por CCD e CLAE dos extratos obtidos (BD, BDL, MPD e MNTPL) em diferentes períodos de cultivo (7, 14, 21, e 28 dias) pôde-se observar que os extratos de *F. equiseti* produzidos no período de 14 dias, revelaram a produção de um maior número de metabólitos secundários, para todos os meios nutricionais, de acordo com os cromatogramas ilustrados na figura 15.

Figura 15 – Cromatogramas dos extratos de *Fusarium equiseti* com 14 dias de cultivo nos meios BD, BDL, MPD e MnTPL.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019)

Desta forma, estes extratos referentes aos 4 meios de culturas neste período (14 dias) foram selecionados para teste de atividade fungicida contra *C. musae*.

A identificação dos metabólitos dos respectivos extratos baseou-se em medição de massa exata, fórmula molecular, fragmentação MS/MS e comparação com dados de MS disponíveis na literatura, através de consulta realizada nas bases de dados (KNApSAcK, PubChem e ChemSpider), além de análise em artigos relacionados aos metabólitos secundários isolados do gênero *Fusarium*. Foram considerados não somente os picos com alta intensidade nas amostras, mas também aqueles picos com baixa intensidade.

Na tabela 3, são exibidos os metabólitos secundários tentativamente identificados e os não identificados, assim como seus íons protonados $[M+H]^+$ e íons fragmentos, o erro em partes por milhão (ppm) e sua possível fórmula molecular.

Tabela 3 - Identificação de metabólitos secundários de *Fusarium equiseti* nos meios BD, BDL, MPD e MNTPL – 14 dias.

Tr	[M+H] ⁺ Observado	[M+H] ⁺ Calculado	Fragmentos de íons (MS/MS)	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Tentativa de identificação	BD	BDL	MPD	MNTPL	Referências
1,976	155,0887	155,0821	99,0914; 84,0343; 81,9731;	C ₇ H ₁₁ N ₂ O ₂	-9,0	Ciclo-L- prolilglicina (19)				+	TRIGOS, REYNAS E CERVANTES, 1995
2,952	158,0615	158,0606	130,0637; 70,0649;	C ₁₀ H ₇ NO	5,7	—				+	
3,035	261,1267		136,0730; 107,0500; 91,0542;	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂	10,7	Maculosina (39)		+	+	+	CHEN e MURAKAMI, 1971
3,474	121,0665	121,9653	103,0559; 91,0518; 77,0385;	C ₈ H ₈ O	9,9	Fenil acetaldeído (40)	+				DONG <i>et al.</i> , 2015
3,814	173,0683	173,0675	155,0600; 130,0637;	C ₅ H ₈ N ₄ O ₃	4,6	—				+	
5,653	271,1453	271,1465	243,1519; 173,0704; 161,0689; 55,0534;	C ₁₅ H ₂₃ O ₂ Cl	-4,4	—				+	
6,839	182,0931	182,0930	180,0778; 167,0692; 165,0671;	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₂	0,5	—			+		
7,412	398,3400	398,3423	184,0733; 113,9645;	C ₂₇ H ₄₃ NO	-5,8	—	+				

7,419	389,2721	389,2692	371,2603; 353,2497; 335,2349;	$C_{24}H_{37}O_4$	10,0	—				+	
8,129	421,2834	421,2885	369,2567; 322,2173;	$C_{25}H_{40}O_5$	-12,1	Fusarielina B (41)				+	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1995
8,201	607,3831	607,3846	629,3731; 589,3749; 391,3332;	$C_{34}H_{54}O_9$	-2,5	Fusapirona (42)	+	+	+		ALTOMARE <i>et al.</i> , 2000.
8,416	450,3245	450,3219	432,3104; 414,3004;	$C_{26}H_{43}NO_5$	5,8	Ácido Glicodeoxicólico (43)				+	OHASHI <i>et al.</i> , 2007
8,668	235,1680	235,1698	184,0753; 149,0311; 72,9353;	$C_{15}H_{22}O_2$	-7,7	Capsenona (44)	+				STOESSL <i>et al.</i> , 1973
9,266	354,2110	354,2128		$C_{15}H_{31}NO_8$	-5,1	—				+	
9,719	362,2327	362,2321	344,2209; 271,1678; 243,1683; 203,1840;	$C_{21}H_{31}NO_4$	-1,1	Criptocina (45)				+	LI <i>et al.</i> , 2000
9,872	406,2232	406,2230	316,1931; 156,0652;	$C_{22}H_{31}NO_6$	0,5	—				+	
10,56	299,2604	299,2586	279,1012; 243,1823;	$C_{18}H_{34}O_3$	6,0	Ácido (-)- <i>cis</i> -9,10- epóxi esteárico (46)				+	GENG, HARNLY E CHEN, 2015
12,780	374,2378	374,2321	346,2684; 170,0732;	$C_{22}H_{31}NO_4$	12,6	Equisetina (25)				+	BURMEISTER <i>et al.</i> , 1974

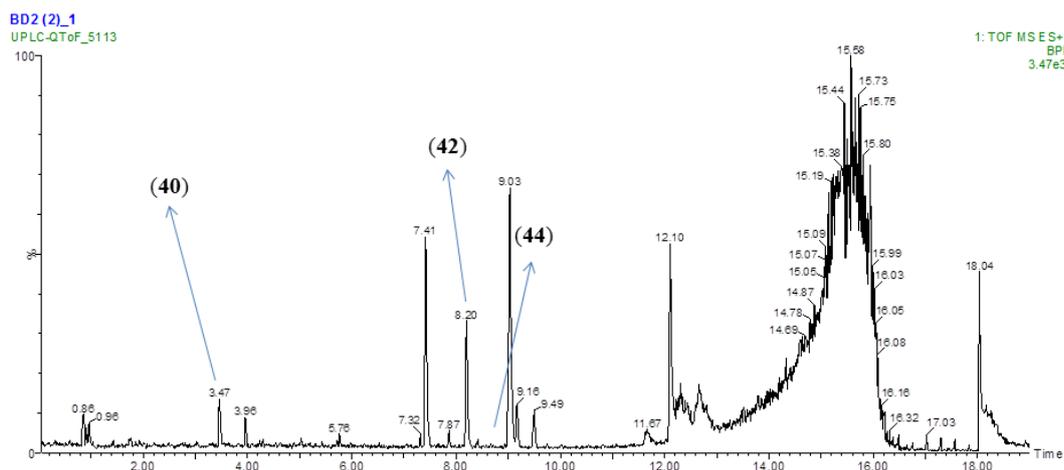
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.1.1 Análise dos metabólitos de *Fusarium equiseti* em meio BD 14 dias

A partir da obtenção dos cromatogramas, foi realizada a análise de todos os sinais, onde foi possível a tentativa de identificação de alguns metabólitos, de acordo com os respectivos padrões de fragmentação nos espectros de massas de cada sinal.

Para o extrato *F. equiseti* BD 14 dias foi obtido o cromatograma abaixo:

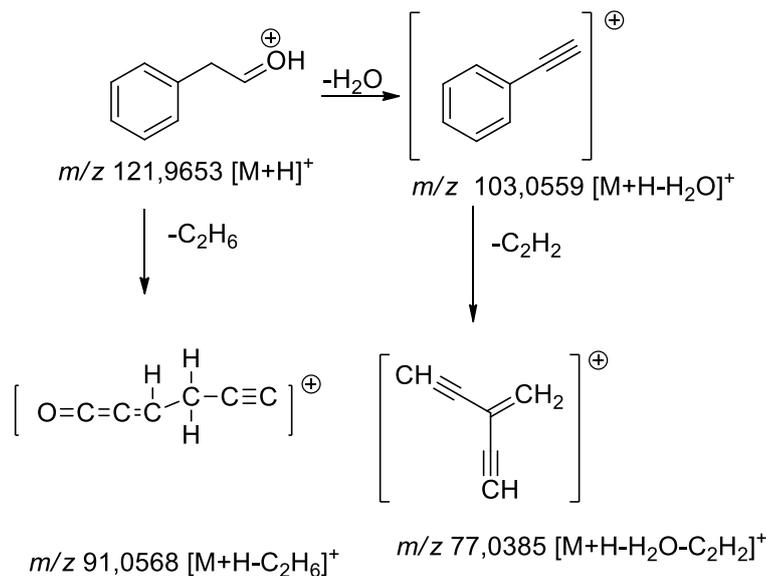
Figura 16 – Cromatograma do extrato de *Fusarium equiseti* em meio BD 14 dias.



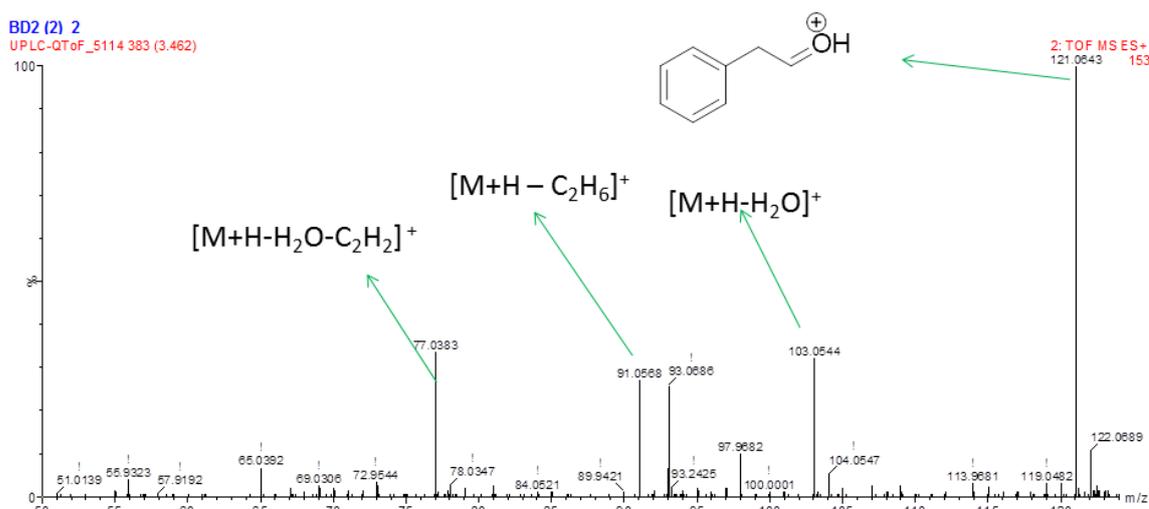
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

No sinal com $t_r = 3,474$ min foi observado um íon com m/z 121,0665 $[M+H]^+$ referente à fórmula molecular C_8H_8O e erro de 9,9 ppm. No espectro de massas de MS/MS o íon m/z 103,0559 corresponde à saída do fragmento H_2O $[M+H-18]$, m/z 77,0385 $[M+H-H_2O-C_2H_2]$ e m/z 91,0518 $[M+H-C_2H_6]$, que está de acordo com o padrão de fragmentação para o fenilacetaldeído (40), um composto já relatado para *Fusarium poae* (DONG *et al.*, 2015). As rotas de fragmentação e o espectro de massas desse composto estão apresentados nas figuras 17 e 18, respectivamente.

Figura 17 – Fragmentação do fenilacetaldéido.



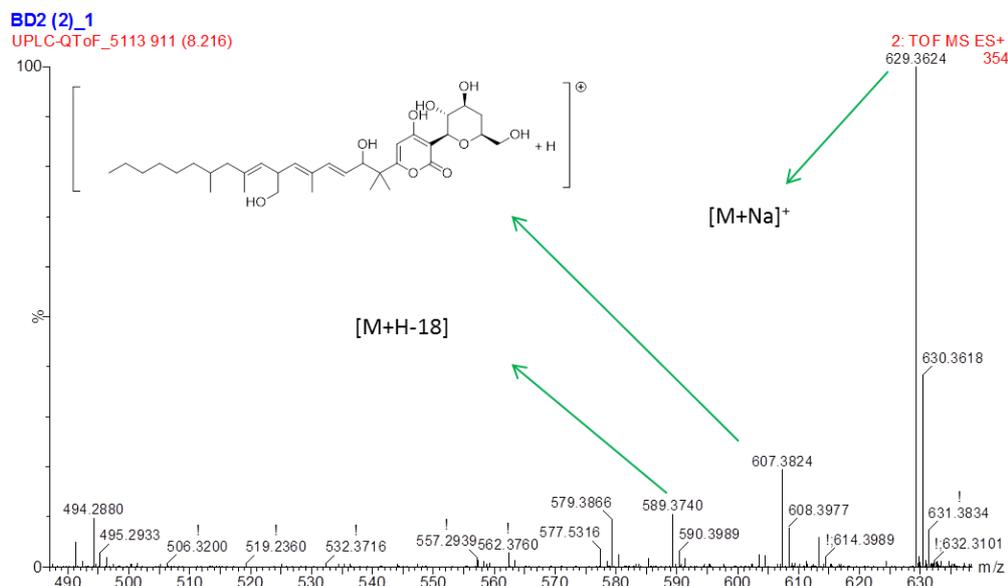
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 18 - Espectro MS² do fenilacetaldéido.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

No sinal com $t_r = 8,20$ min foi observado um íon com m/z 607,3824 $[M+H]^+$ referente à fórmula molecular $C_{34}H_{54}O_9$ e erro de 2,8 ppm. No espectro de massas de MS/MS o íon m/z 589,3740 corresponde à saída do fragmento H_2O $[M+H-18]$, m/z 629,3624 $[M+Na]^+$, que justifica a estrutura da fusapirona (42). Esse mesmo metabólito foi identificado nos extratos dos meios de cultura BDL e MPD. Esse composto já foi relatado para a espécie *Fusarium semitectum* (ALTOMARE *et al.*, 2000). O espectro de massas desse composto está apresentado na figura 19.

Figura 19 - Espectro MS² da fusapirona.



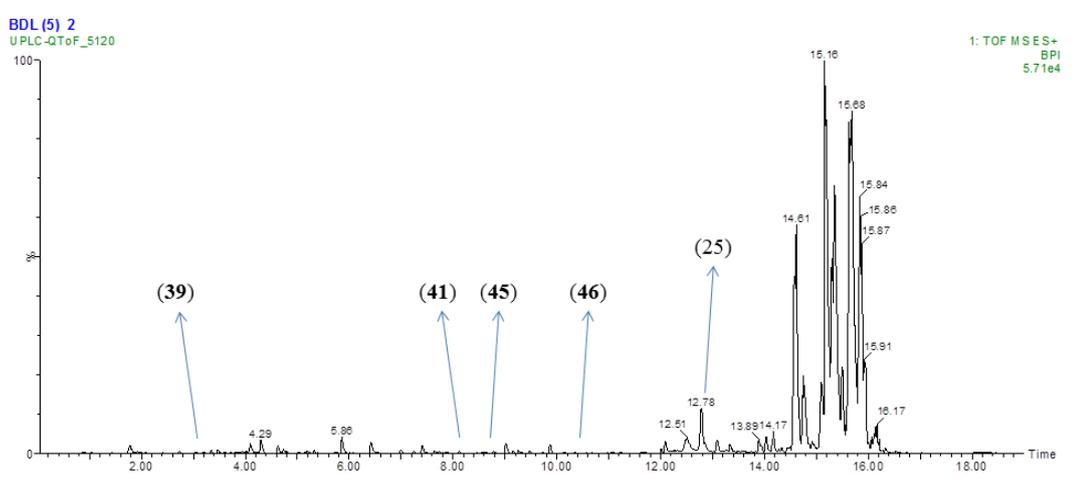
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

No sinal com $t_r = 8,668$ min foi observado um íon com m/z 236,168 [M+H]⁺ referente à fórmula molecular C₁₂H₂₂O₂ e erro de -7,7 ppm. No espectro de massas de MS/MS o íon m/z 218,9874 corresponde à saída do fragmento H₂O [M+H-18]; Assim como os íons m/z 93,0693 e m/z 72,9353, que correspondem aos dados encontrados na literatura para a estrutura da capsenona (**44**), um composto já identificado em *Fusarium oxysporum* (ALTOMARE *et al.*, 2000).

4.1.2 Análise dos metabólitos de *Fusarium equiseti* em meio BDL 14 dias

Para o extrato *F. equiseti* BDL 14 dias foi obtido o seguinte cromatograma:

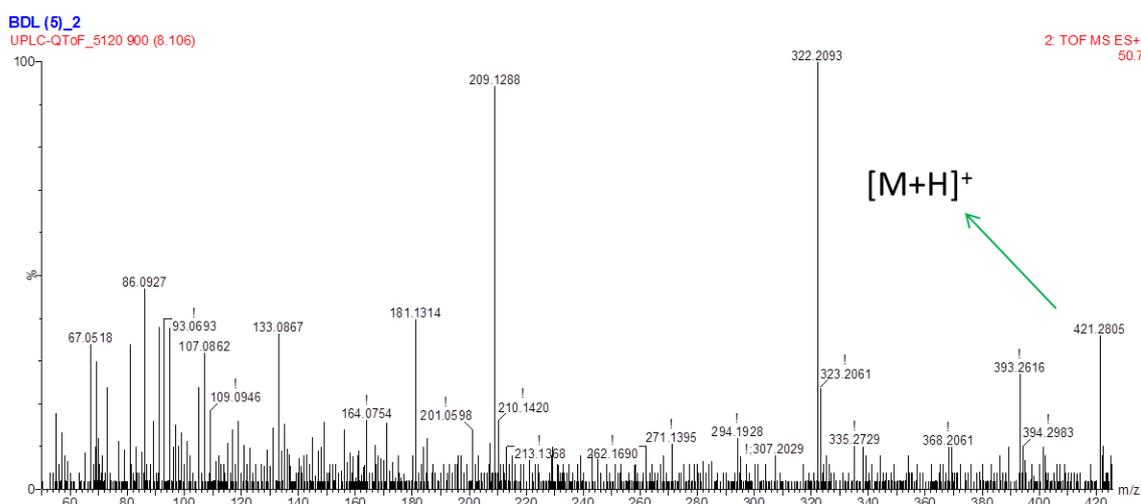
Figura 20 – Cromatograma do extrato de *Fusarium equiseti* em meio BDL 14 dias.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O sinal com tempo de retenção em 8,12 min, apresentou o íon com m/z 421,2834 $[M+H]^+$, relativo à fórmula molecular $C_{25}H_{40}O_5$ com erro de -12,1 ppm e no espectro de massas de MS/MS o íon com m/z 369,2567, e m/z 322,2182, que de acordo com a literatura indica a presença de fusarielina B (41), um composto já relatado para *Fusarium sambucinum* (KOBAYASHI *et al.*, 1995). O espectro de massas desse composto está apresentado na figura 21.

Figura 21 - Espectro MS^2 do fusarielina B.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

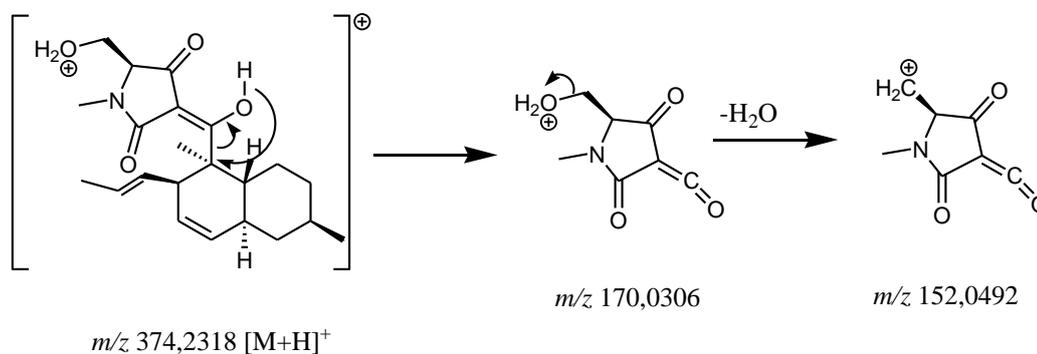
O sinal com tempo de retenção em 9,719 min, apresentou o íon com m/z 362,2365 $[M+H]^+$, relativo à fórmula molecular $C_{21}H_{31}NO_4$ com erro de -1,1 ppm e no espectro de

massas de MS/MS o íon com m/z 344,2220 $[M+H-H_2O]^+$, e m/z 271,1706, que de acordo com a literatura indica a presença de criptocina (**45**), um composto este que está sendo relatado pela primeira vez para o gênero *Fusarium* (LI *et al.*, 2000).

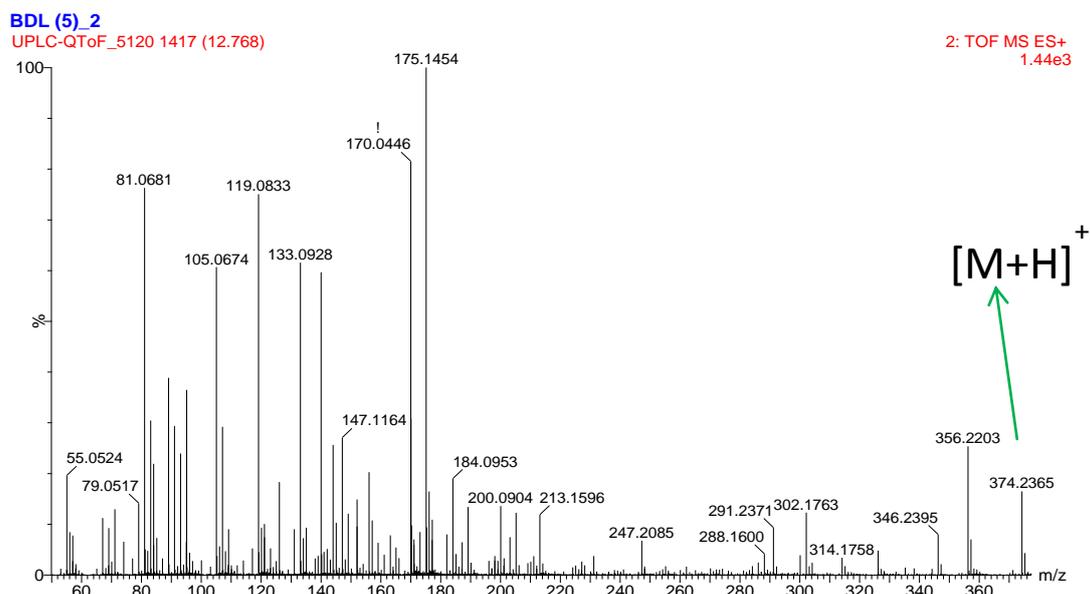
O sinal com tempo de retenção em 10,56 min, apresentou o íon com m/z 299,2604 $[M+H]^+$, relativo à fórmula molecular $C_{18}H_{34}O_3$ com erro de 6,0 ppm e no espectro de massas de MS/MS os íons com m/z 279,1012 e m/z 243,1823, indicando a presença do ácido (-)-*cis*-9,10-epoxiesteárico (**46**). Este composto já foi relatado para *F. oxysporum* (GENG, HARNLY e CHEN, 2015).

O composto com tempo de retenção em 12,78 min apresentou o íon com m/z 374,2365, correspondente à fórmula molecular $C_{22}H_{31}NO_4$, com erro de 12,6 ppm. Com base nos dados do experimento de MS/MS, foram encontrados os íons com m/z 170,0446 m/z 152,0492. Estes dados corroboram com o padrão de fragmentação da equisetina (**25**), já isolada de *Fusarium equiseti* (TUROS *et al.*, 1989). As rotas de fragmentação e o espectro de massas desse composto estão apresentados nas figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22 - Fragmentação da equisetina.



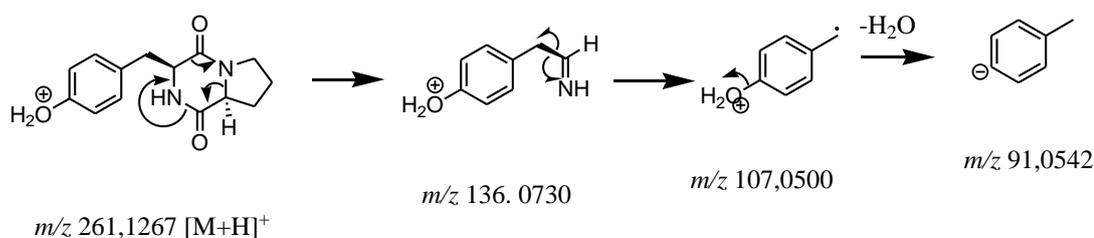
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 23 - Espectro MS² da equisetina.

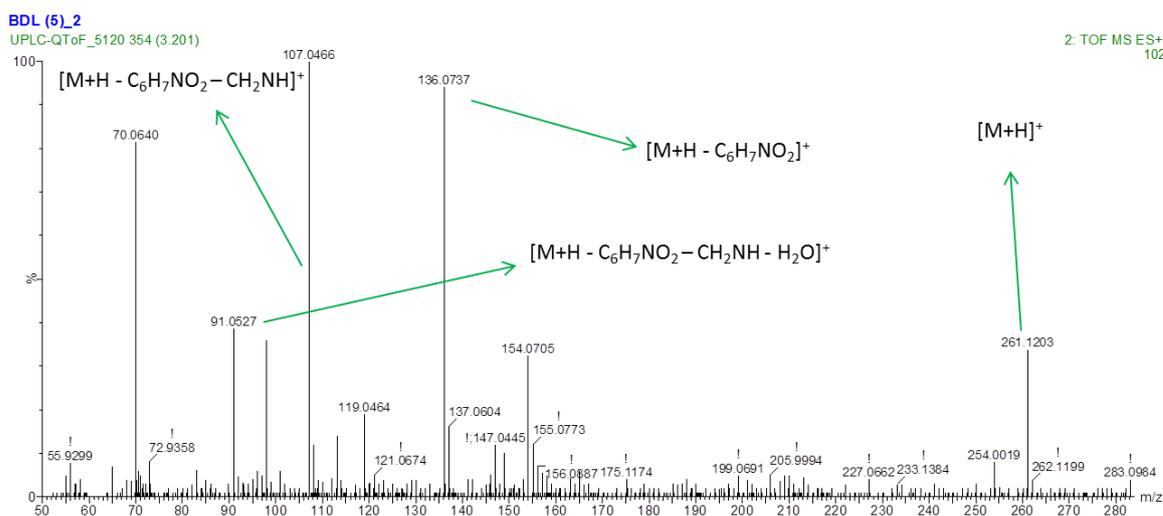
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O sinal com o tempo de retenção em 3,03 min, apresentou o íon a m/z 261,1267 com fórmula molecular $C_{14}H_{16}N_2O_3$ e erro de 10,7 ppm. A fragmentação desse íon no experimento de MS/MS mostrou os íons de m/z 136, 0730, referente à perda do fragmento $[M+H - C_6H_7NO_2]^+$, m/z 107,0500 $[M+H - C_6H_7NO_2 - CH_2NH]^+$ e m/z 91,0542 $[M+H - C_6H_7NO_2 - CH_2NH - H_2O]^+$, que está de acordo com o padrão de fragmentação para maculosina (**39**). A maculosina foi isolada anteriormente do fungo *Penicillium canescens* Sopp (ZAHER *et al.*, 2015) e de *Fusarium nivale* (CHEN E MURAKAMI, 1971). Esse mesmo composto também foi observado nos meios de cultura MnTPL e MPD. As rotas de fragmentação e o espectro de massas desse composto estão apresentados nas figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24 – Fragmentação da maculosina.



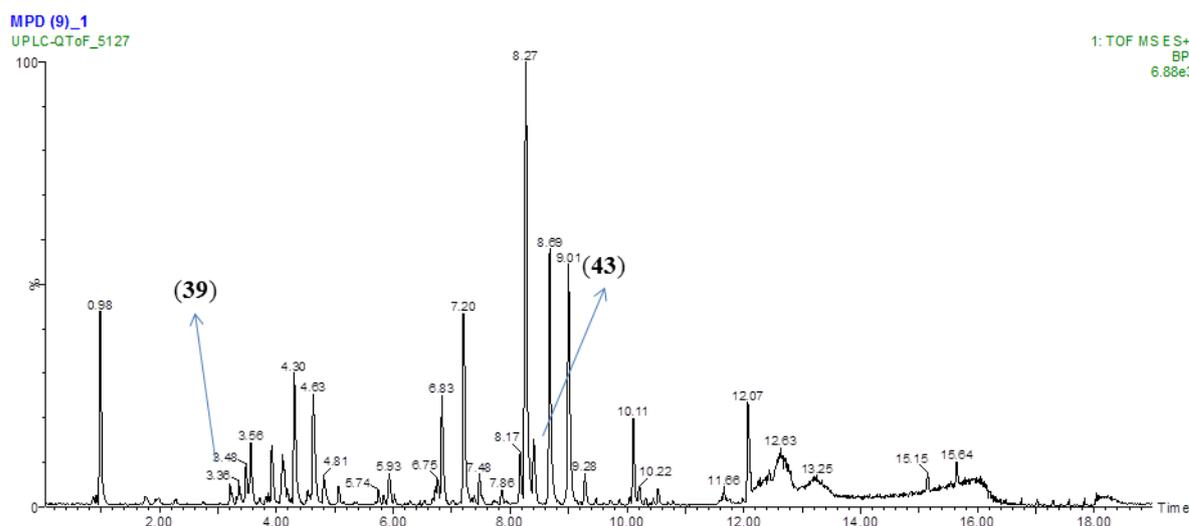
Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

Figura 25 - Espectro MS² da maculosina.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.1.3 Análise dos metabólitos de *Fusarium equiseti* em meio MPD 14 dias

Para o extrato *F. equiseti* obtido no meio MPD 14 dias foi obtido o cromatograma abaixo:

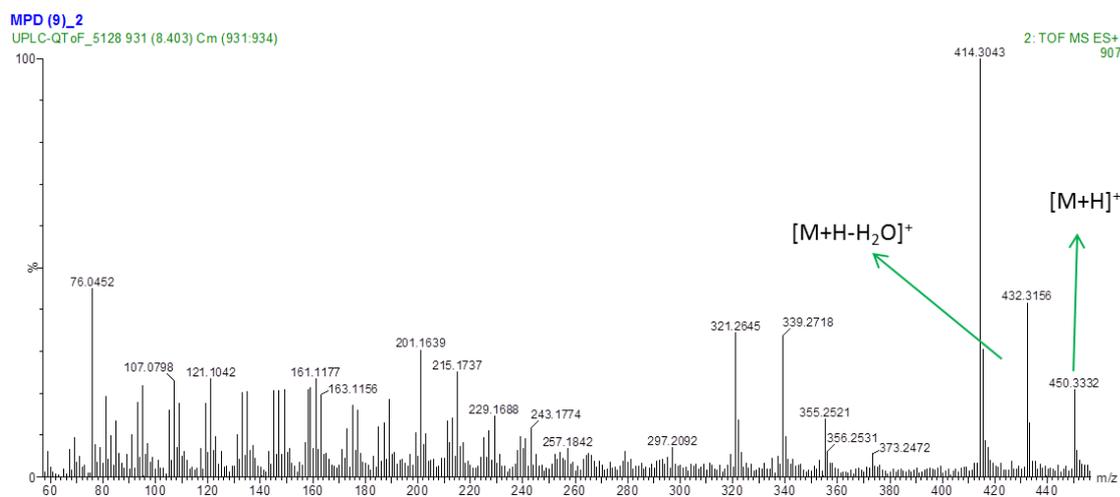
Figura 26 – Cromatograma do extrato de *Fusarium equiseti* em meio MPD 14 dias.

Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O composto com tempo de retenção em 8,403 min apresentou o íon com m/z 450,3332 correspondente à fórmula molecular $C_{26}H_{43}NO_5$, com erro de 5,8 ppm. Com base

nos dados do experimento de MS/MS, foram encontrados os íons com m/z 432,3156, correspondente à saída do fragmento H_2O $[M+H-18]$ e m/z 414,3043. Estes dados combinam com o padrão de fragmentação do ácido glicodeoxicólico (**43**), já isolado de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium*, sendo esse o primeiro relato para *Fusarium* (OHASHI *et al.*, 2007). O espectro de massas desse composto está apresentado na figura 27.

Figura 27 - Espectro MS² do ácido glicodeoxicólico.

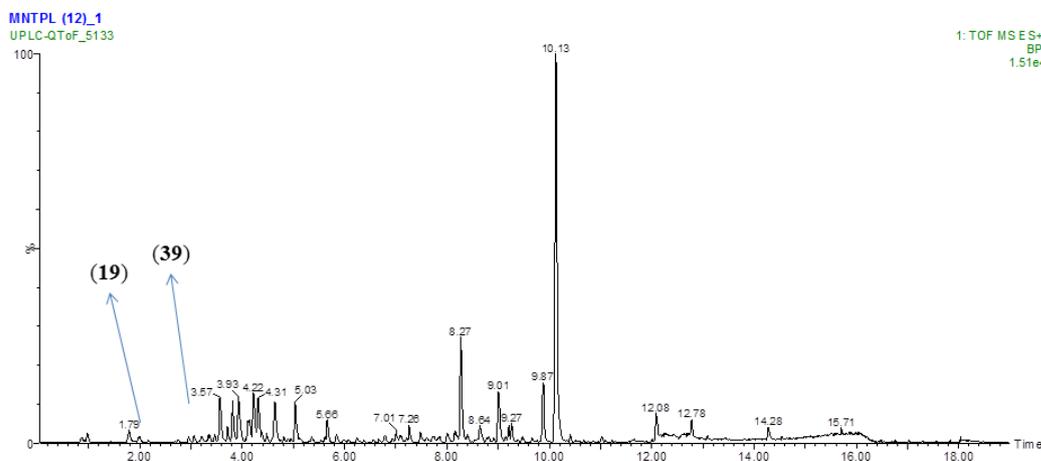


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

4.1.4 Análise dos metabólitos de *Fusarium equiseti* em meio MnTPL 14 dias

Para o extrato *F. equiseti* MnTPL 14 dias, foi obtido o seguinte cromatograma:

Figura 28 – Cromatograma do extrato de *Fusarium equiseti* em meio MnTPL 14 dias.

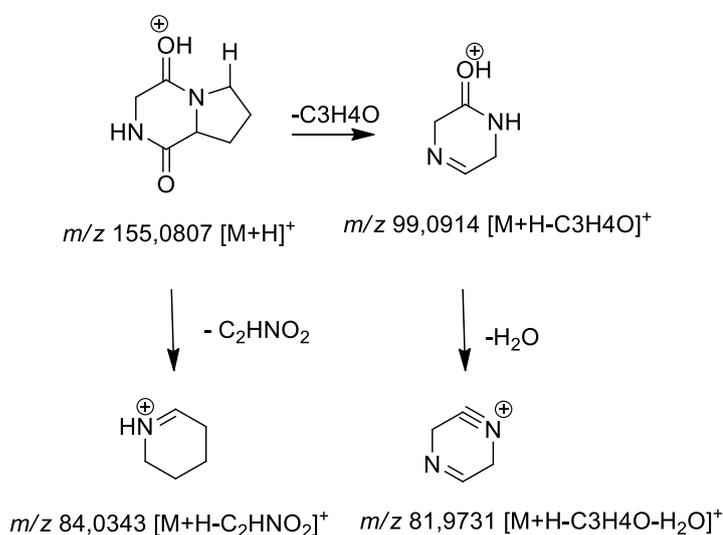


Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

O sinal com tempo de retenção em 1,976 min, apresentou em seu espectro de

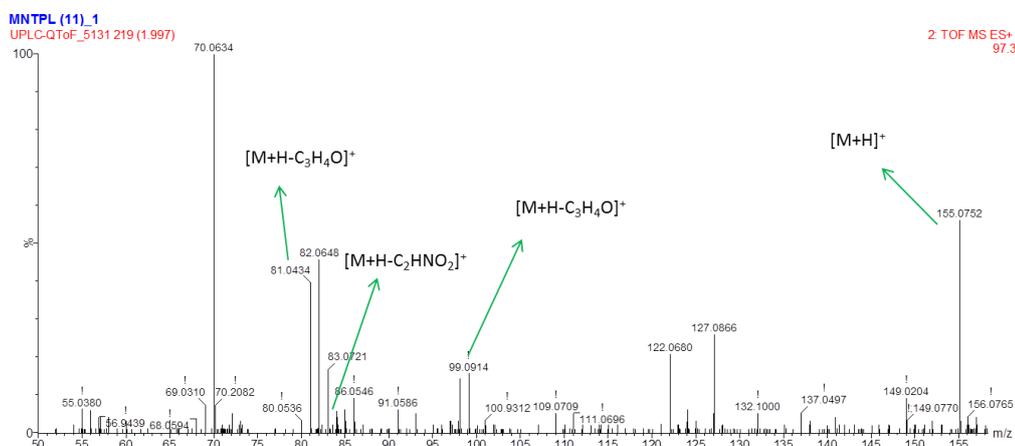
massas o íon de m/z 155,0807 $[M+H]^+$, relacionado a fórmula molecular $C_7H_{10}N_2O_2$ com erro de -9,0 ppm, e no espectro de massas de MS/MS foi observado o íon com m/z 99,0914 correspondente ao fragmento $[M+H-C_3H_4O]$ e o íon m/z 84,0343, correspondente a perda ao fragmento $[M+H-C_2HNO_2]$, bem como o íon m/z 81,9731 correspondente ao fragmento $[M+H-C_3H_4O-H_2O]$. De acordo com a literatura, este composto pode ser relacionado a ciclo-L-prolina-L-glicina (**19**), já identificado para *Fusarium equiseti* (TRIGOS, REYNAS E CERVANTES, 1995). As rotas de fragmentação e o espectro de massas desse composto estão apresentados nas figuras 29 e 30, respectivamente.

Figura 29 – Fragmentação da ciclo-L-prolina-L-glicina



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

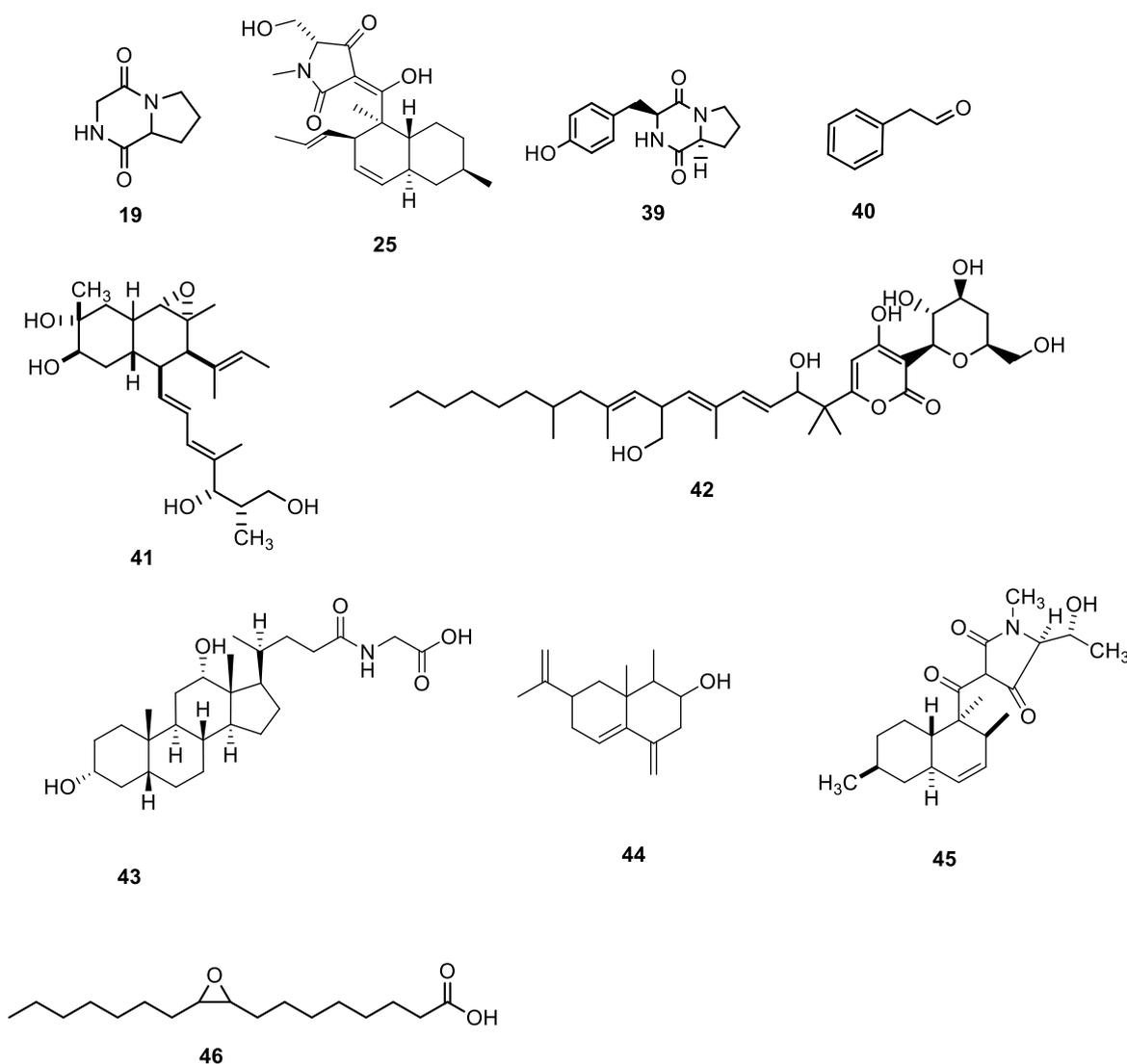
Figura 30 - Espectro MS² da ciclo-L-prolina-L-glicina.



Fonte: Elaborada pelo autor (2019).

A figura 31 abaixo mostra as estruturas químicas de todos os metabólitos identificados, dos quais dos quais os compostos equisetina (25) e a ciclo-L-proliglicina (19) já possuem relatos na literatura para *F. equiseti*, enquanto que os compostos ácido (-) cis - 9,10 - epóxiesteárico (46), capsenona (44), criptocina (45), fenil acetaldéido (40), fusapirona (42), fusarielina B (41) e maculosina (39) e o ácido glicodeoxicólico (43) estão sendo relatados pela primeira vez para a espécie.

Figura 31 – Estruturas dos compostos identificados.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

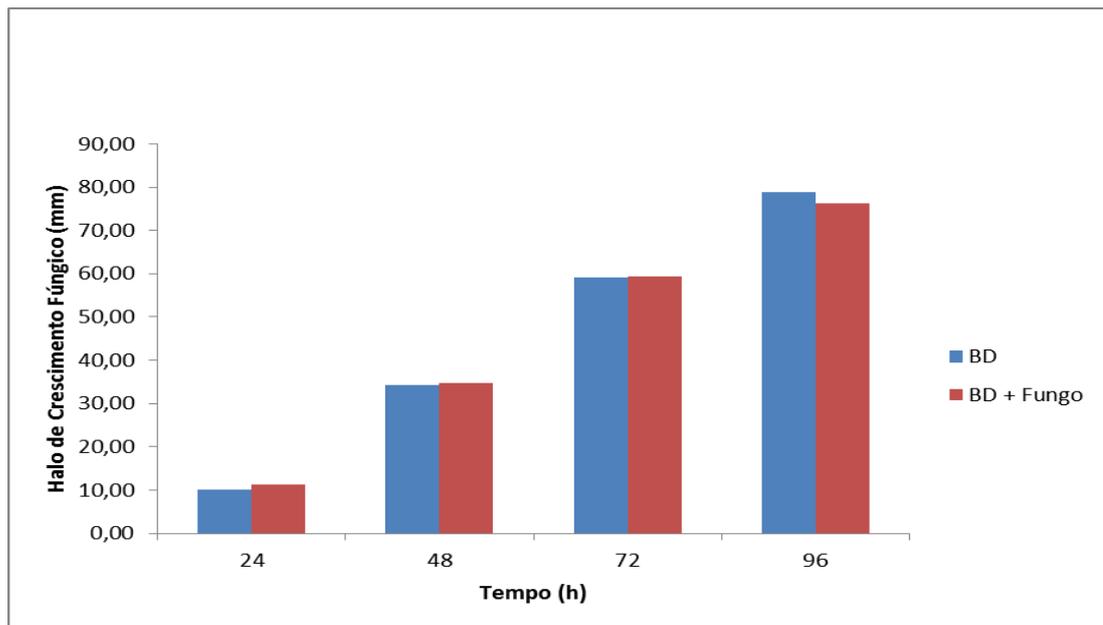
4.2 Estudo do potencial fungicida dos extratos de *Fusarium equiseti* em diferentes meios de cultivo

Os extratos referentes aos 4 meios de culturas (BD, BDL, MPD e MnTPL) - 14 dias foram selecionados para teste de atividade fungicida contra *C. Musae* de acordo com o procedimento detalhado no item 3.7., já que esse é um fitopatógeno de culturas de plantas

economicamente importantes para o estado do Ceará.

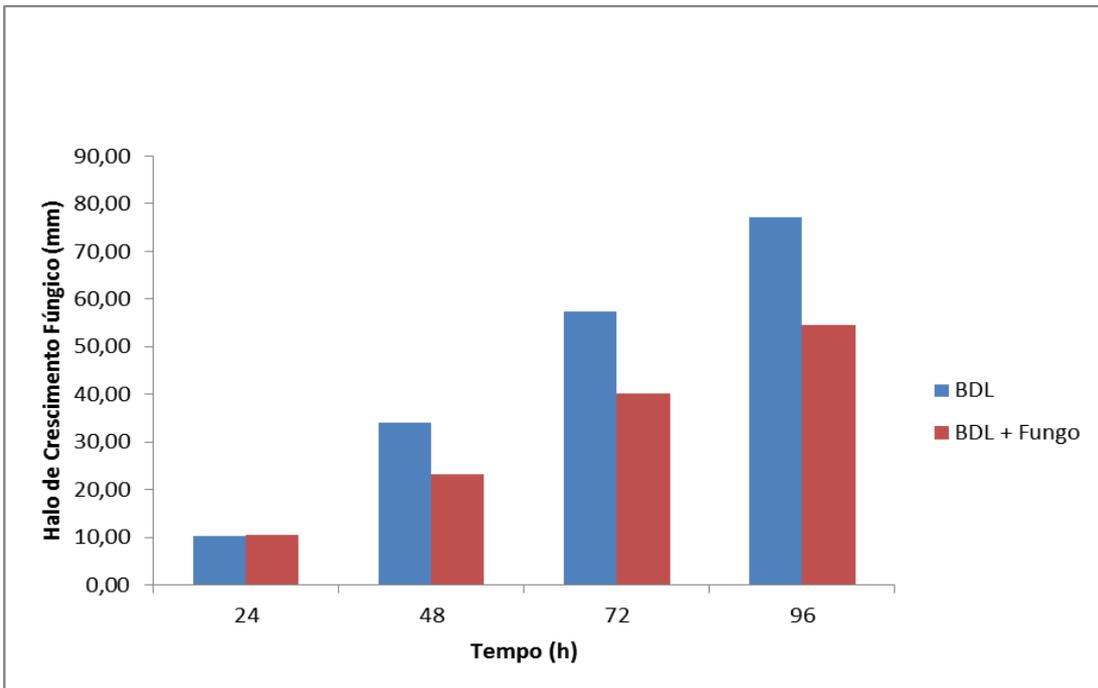
Os gráficos abaixo mostram o crescimento de *C. musae* em meio BDA sem adição dos extratos (faixa azul), e o crescimento de *C. musae* em meio BDA com a adição da solução dos extratos (faixa vermelha).

Gráfico 3 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de *Colletotrichum musae* na presença de extrato de *Fusarium equiseti* em meio BD 14 dias.



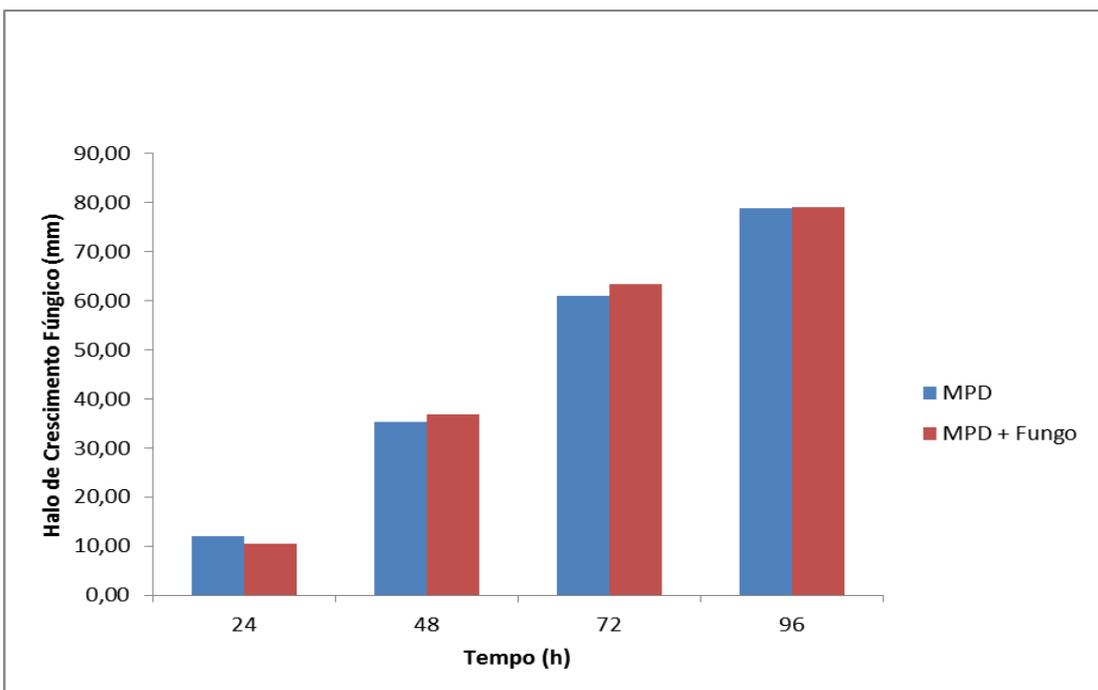
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Gráfico 4 – Ensaio in vitro mostrando o crescimento de *Colletotrichum musae* na presença de extrato de *Fusarium equiseti* em meio BDL 14 dias.



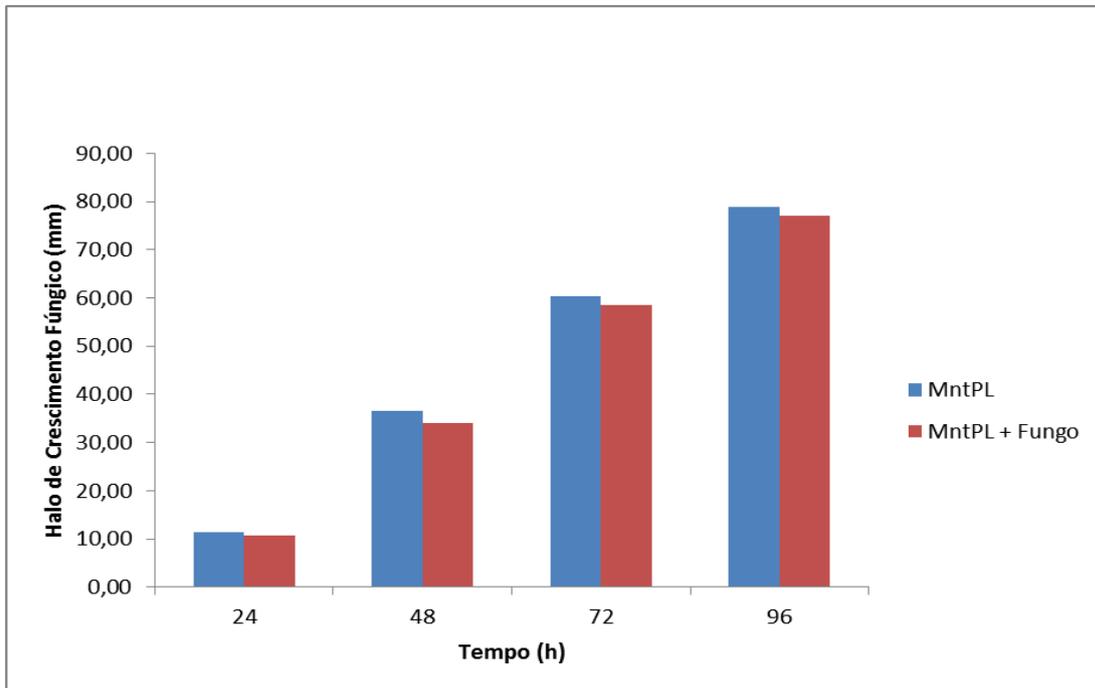
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Gráfico 5 – Ensaio in vitro mostrando o crescimento de *Colletotrichum musae* na presença de extrato de *Fusarium equiseti* em meio MPD 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

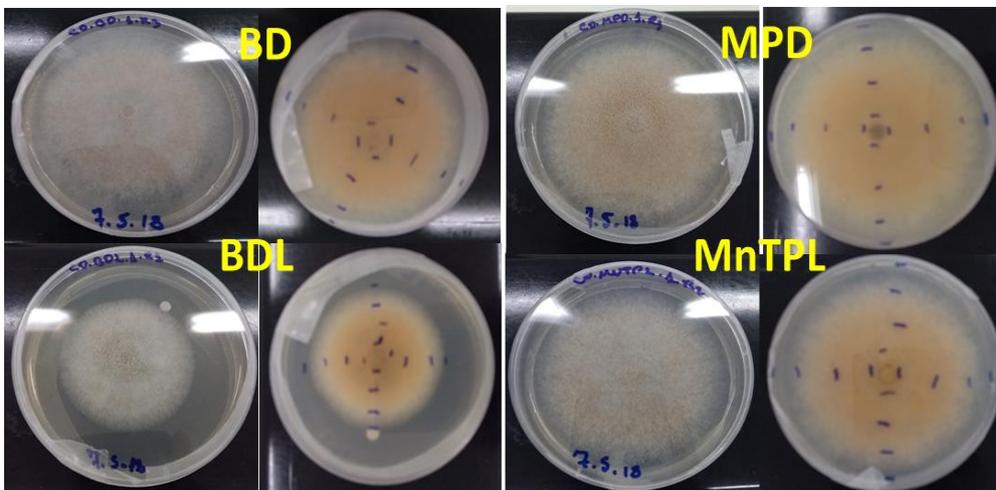
Gráfico 6 – Ensaio in vitro mostrando o crescimento de *Colletotrichum musae* na presença de extrato de *F. equiseti* em meio MnTPL 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

De acordo com estes experimentos, constatou-se que o extrato do meio BDL-14 dias foi o mais ativo contra *C. musae*, enquanto que os demais extratos testados (BD, MPD E MnTPL) não mostraram distinções dos entre os valores de inibição do controle, e os respectivos extratos, conforme a figura 31.

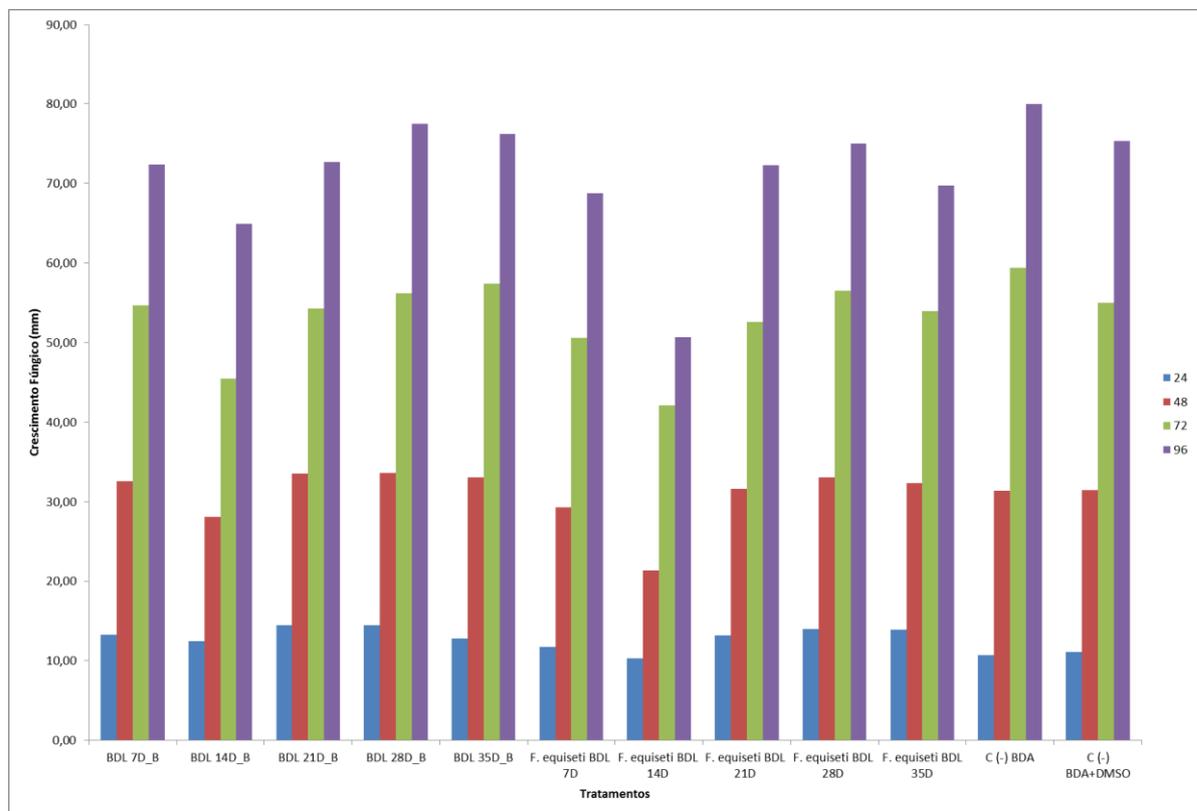
Figura 32 – Ensaio in vitro mostrando com inibição do crescimento do fitopatógeno (*Colletotrichum musae*) quando cultivado em meio contendo a solução dos extratos de *F. equiseti* nos meios BD, BDL, MPD e MnTPL 14 dias.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

A partir desses resultados, foram realizados testes de atividade fungicida frente ao patógeno utilizando os extratos do meio BDL provenientes do experimento de variação do tempo de cultivo (7, 14, 21, 28 e 35 dias), para avaliação de alguma alteração da atividade biológica. O experimento foi avaliado quando *C. musae* foi cultivado no meio BDA contendo as soluções dos extratos de *F. equiseti* em meio BDL nos tempos de cultivo de 24, 48, 72 e 96 h, relacionados às cores azul, vermelho, verde e roxo no gráfico 7, respectivamente.

Gráfico 7 - Ensaio in vitro mostrando o crescimento de *Colletotrichum musae* na presença dos extratos de *Fusarium equiseti* em meio BDL nos períodos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias e os respectivos controles



Legenda:

BDL 7D_B – extrato do meio BDL – 7 dias – Controle
BDL 14D_B – extrato do meio BDL – 14 dias – Controle
BDL 21D_B – extrato do meio BDL – 21 dias – Controle
BDL 28D_B – extrato do meio BDL – 28 dias – Controle
BDL 35D_B – extrato do meio BDL – 35 dias – Controle
F. equiseti BDL 7D – extrato de *F. equiseti* em meio BDL – 7 dias
F. equiseti BDL 14D – extrato de *F. equiseti* em meio BDL – 14 dias
F. equiseti BDL 21D – extrato de *F. equiseti* em meio BDL – 21 dias
F. equiseti BDL 28D – extrato de *F. equiseti* em meio BDL – 28 dias
F. equiseti BDL 35D – extrato de *F. equiseti* em meio BDL – 35 dias
C(-) BDA – Controle negativo em meio BDA
C(-) BDA + DMSO - Controle negativo em meio BDA + DMSO

Neste experimento pôde-se constatar que o extrato BDL-14 dias continuou sendo o mais efetivo contra *C. musae* através de uma maior inibição do crescimento do fungo. Os extratos BDL relativos aos períodos 7, 21, 28 e 35 dias não mostraram inibições significativas no crescimento do fungo, apresentando comportamentos bastante semelhantes.

Diante destes resultados, foram realizadas análises quimiométricas utilizando o extrato de *F. equiseti* BDL 14 dias (mais ativo) confrontado com o extrato BDL 28 dias (menos ativa), e os respectivos brancos BDL 14 dias e BDL 28 dias através da estatística multivariada utilizando PCA, OPLS-DA e S – Plot, visando à determinação de biomarcadores possivelmente associados à atividade antifúngica.

4.3 Análise Multivariada

4.3.1 Análise dos componentes principais (PCA) dos meios BD, BDL, MPD e MNTPL

A PCA é um método estatístico exploratório que consiste em reduzir a complexidade de uma grande quantidade de dados, com a menor perda possível de informações (MARCHETTI *et al.*, 2015). Essa técnica permite observar, interpretar e correlacionar às diferenças existentes entre as amostras, além de promover a formação de grupos com semelhanças entre si (WORLEY; HALOUSKA; POWERS, 2013). Neste caso, a PCA foi utilizada para verificar as diferenças entre os perfis químicos dos quatro extratos de *F. equiseti* (BD, BDL, MPD e MNTPL) e os respectivos extratos controles (B-BD, B-BDL, B-MPD e B-MNTPL), através dos dados de fragmentação de massas obtidos por UPLC-QTOF-MS^E. Os dados obtidos foram submetidos, inicialmente a uma abordagem com PCA utilizando a escala pareto, como representado nas Figuras 8 e 9, um gráfico de scores e um de loadings, respectivamente.

O gráfico de PCA (Gráfico 8) representou 77,31% da variância total ($R^2X [1] = 0,4702$ e $R^2X [2] = 0,3029$). Os dados obtidos foram inicialmente submetidos a uma abordagem de PCA com escala centrada na média. Os resultados mostraram que as oito amostras foram claramente separadas e agrupadas em quatro grupos correspondentes: 1 (BDL); 2 (MnTPL-branco); 3 (MPD e MnTPL), e 4 (BD, BD-branco, BDL-branco e MPD-branco).

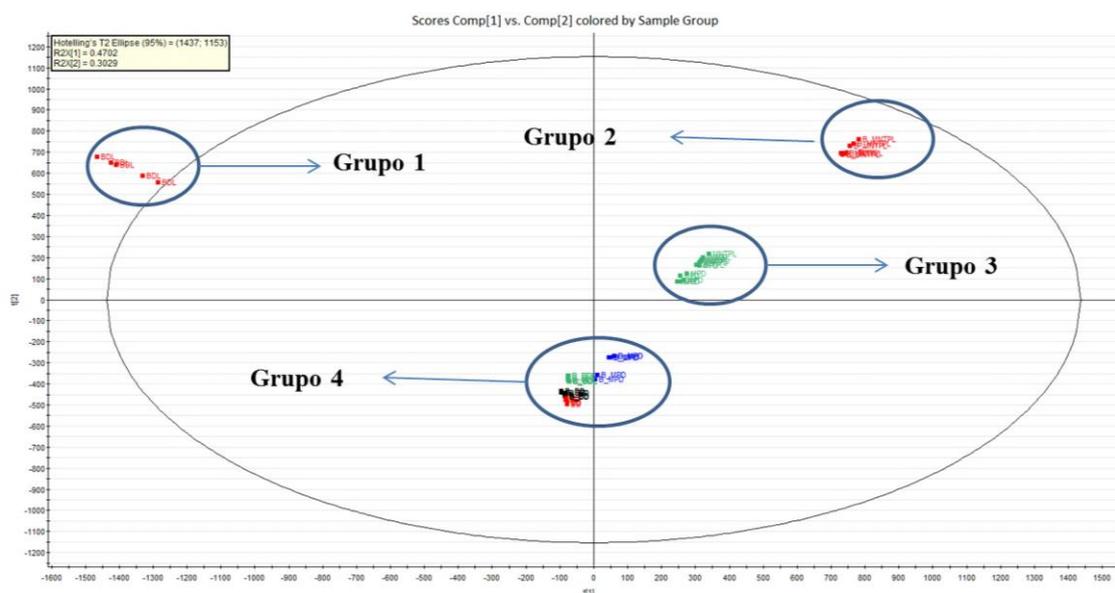
No gráfico 8, possível visualizar que os aglomerados formados indicaram que os metabólitos secundários produzidos no meio BDL diferem significativamente dos demais extratos. O primeiro componente principal 1 (PC1) representa a maior variação em um

conjunto de dados, as amostras dos meios BDL, BDL-branco, BD e BD-branco estão agrupadas no lado negativo de PC1, enquanto as demais amostras estavam no lado positivo de PC1, sugerindo uma proximidade no perfil metabólico do fungo quando cultivado nesses meios de cultura, o que é esperado já que a composição nutricional desses meios de cultura é semelhante.

O segundo componente principal (PC2, gráfico 8), que correspondeu à quantidade máxima de variância não explicada pelo PC1, em que BDL, MPD, MNTPL e MNTPL (branco) encontram-se no lado positivo de PC2 e os demais extratos BD, BD-branco, BDL-branco e MPD-branco estão localizados no lado negativo.

Desta forma, a análise dos dados do gráfico de PCA permitiu evidenciar uma diferença no perfil metabólico do cultivo do fungo nos diferentes meios nutricionais, onde foi possível observar uma semelhança entre os extratos dos meios MPD e MNTPL, assim como o extrato do meio BD e BD-branco foram muito semelhantes. Porém, observa-se uma clara distinção do perfil metabólico do meio BDL, lado positivo de PC1 e PC2.

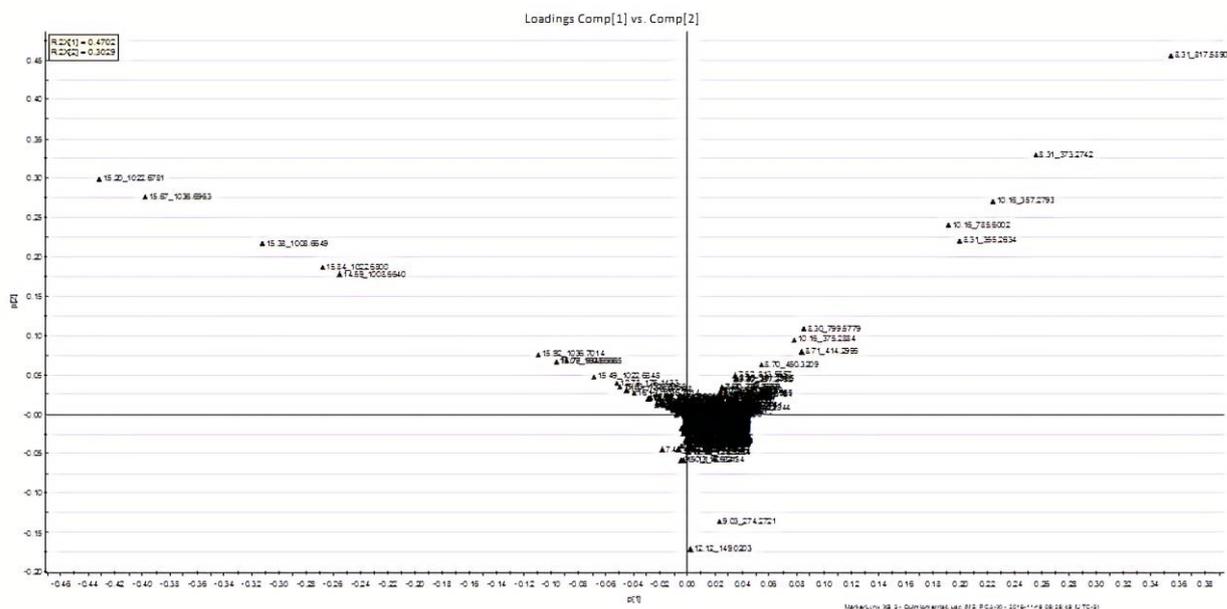
Gráfico 8 - Análise de PCA 2D de amostras de *Fusarium equiseti*, nos meios de cultura BD, BDL, MPD, MntTPL e os respectivos controles (branco) (modo positivo, intervalo de tr: 0,0 a 16,5 min).



Grupo 1: meio BDL ■
 Grupo 2: meio MntTPL-branco ■
 Grupo 3: meio MPD e MntTPL ■
 Grupo 4: meio BD-branco ■, BD ■, BDL-branco ■
 e MPD-branco ■.

Fonte: Elaborado pelo Autor (2019).

Gráfico 9 - Análise de loadings de PCA 2D de amostras de *Fusarium equiseti*, nos meios de cultura BD, BDL, MPD, MnTPL e os respectivos controles (branco) (modo positivo, intervalo de tr: 0,0 a 16,5 min).



4.3.2 Análise OPLS-DA dos extratos de *Fusarium equiseti* BDL -14 e BDL- 28 dias.

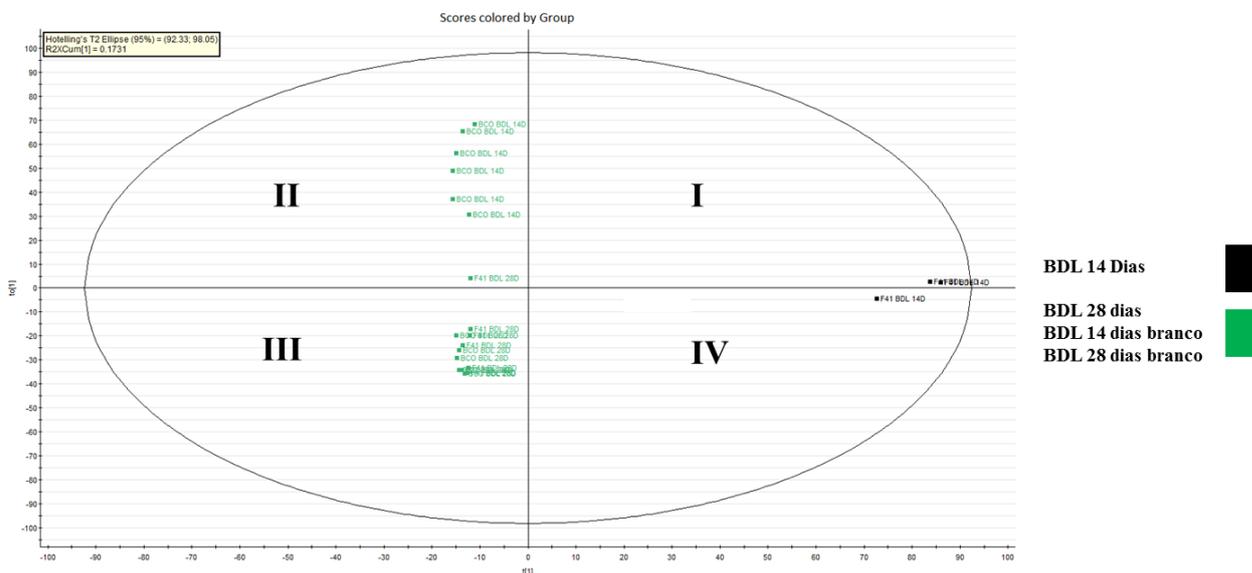
Após a análise de PCA para todos os extratos, foi realizado o OPLS-DA (Gráfico 9) somente para os extratos do meio BDL, visando identificar os metabólitos secundários que contribuíram para as variações observadas na atividade fungicida para os extratos oriundos deste mesmo meio nutricional. Nesse caso, foi comparada a diferença sempre entre dois grupos: extrato BDL 14 dias (mais ativo) e extrato de BDL 28 dias (menos ativo) e os seus respectivos extratos controle (brancos).

O gráfico de OPLS-DA (Gráfico 9) mostrou que cada grupo foi claramente separado, sendo evidente a diferença entre o extrato de BDL 14 dias comparado aos demais extratos, onde este ficou mais concentrado nos quadrantes I e IV e os demais se apresentaram mais concentrados nos quadrantes II e III, demonstrando inclusive diferenças intra-grupos, em relação à variação entre a dispersão da concentração de seus metabólitos, já que se observa uma certa dispersão dentro de um mesmo grupo.

A qualidade dos modelos de OPLS-DA foi avaliada utilizando dois parâmetros o R²Y (variância explicada), que é o grau de explicação que o modelo possui sob os dados apresentados e o Q² (variância predita), quanto o modelo prediz das variáveis (TRIBA *et al.*, 2015). Para as análises realizadas, o R²Y = 0,99 e o Q² varia de 0,92 a 0,98, o que indica a

boa qualidade do modelo.

Gráfico 10 - Análise de OPLS-DA dos grupos: BDL 14 dias – BDL 28 dias de *Fusarium equiseti*.



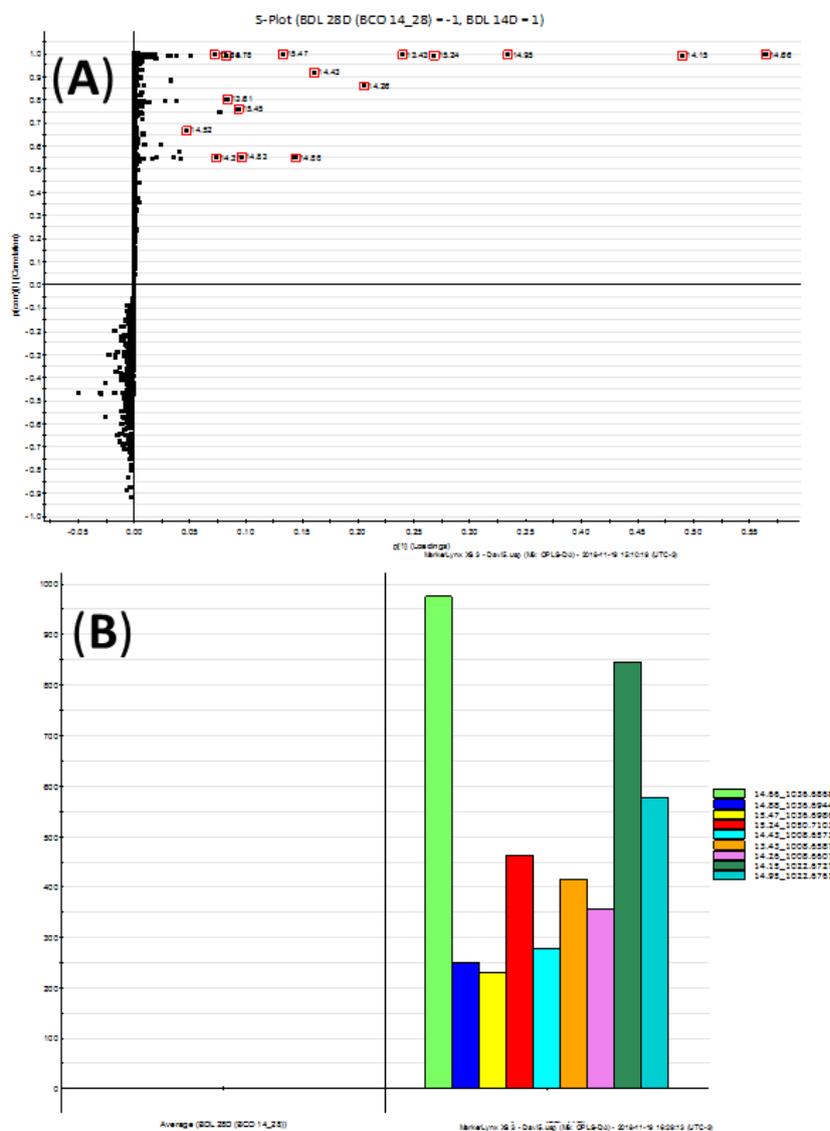
Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.4 Potenciais biomarcadores

Gráficos S-Plot (figura 33) permitem a identificação dos compostos mais proeminentes em cada extrato. De acordo com este gráfico, dois eixos (X e Y) são mostrados, um para cada grupo analisado, onde os íons mais distantes da origem contribuem de forma mais significativa para a separação entre grupos, portanto, eles podem ser considerados como biomarcadores.

A partir dos dados de OPLS-DA (Gráfico 9, p. 70), foram gerados os gráficos S-Plot e VIP (ambos na Figura 33). Desta forma, o gráfico de S-plot mostra 9 metabólitos potenciais biomarcadores, proveniente do extrato de *F. equiseti* BDL 14 dias, que estão relacionados aos sinais que se encontram mais distantes do eixo Y.

Figura 33 - Gráfico S-Plot (A) e gráfico de barras (B) com os tempos de retenção e valores de massas de alta resolução dos possíveis biomarcadores a partir dos dados do gráfico OPLS-DA dos extratos BDL (14 e 28 dias).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Na Figura 33, nove íons foram apontados como biomarcadores do extrato BDL 14 dias de *F. equiseti* em relação ao BDL 28 dias de *F. equiseti*, com os valores de m/z. 1036,6868; 1036,6944; 1036,6986; 1050,7103; 1008,6573; 1008,6587; 1008,6607; 1022,6727; 1022,6761. Estes íons correspondem a compostos que foram encontrados em maiores concentrações relativas de área, como demonstrado através dos gráficos de barras (Figura 33B). No entanto, a identificação estrutural destes compostos não foram possíveis,

devido à falta de dados na literatura relativos aos íons de m/z 1008 a 1036 Da, e dados de fragmentação de massas que corroborem os resultados apresentados. Desta forma, estes dados nos levam a crer que estes compostos sejam, provavelmente, estruturalmente inéditos.

Supõe-se ainda que, esses compostos possuem características estruturais semelhantes relacionados à uma série homóloga, já que apresentam tempos de retenção similares, e massa molar diferenciando-se apenas pela quantidade de grupos metileno (CH_2). No entanto, estudos posteriores serão necessários para o isolamento e caracterização estrutural destes compostos.

5 CONCLUSÃO

Os experimentos de cultivo de *F. equiseti* nos meios BD, BDL, MPD e MnTPL, e em diferentes dias de incubação (7, 14, 21, 28 e 35 dias), foram realizados visando verificar a influência do meio nutricional e do período de cultivo no perfil metabolômico do fungo. Os extratos provenientes de 14 dias de cultivo foram selecionados para o estudo metabolômico, por se apresentarem mais promissores na produção de metabólitos secundários após análise preliminar por CLAE e CCD.

A análise inicial dos diferentes extratos obtidos no período de 14 dias por UPLC-ESI-QTOF-MS^E permitiu a visualização de perfis químicos diferenciados para os diferentes extratos, e possibilitou identificar tentativamente a presença 14 diferentes metabólitos secundários. Dentre estes compostos, a equisetina (**25**) e a ciclo-L-proliglicina (**19**) já foram reportados para *F. equiseti*, enquanto que o ácido (-)-*cis*-9,10-epóxiesteárico (**46**), capsenona (**44**), criptocina (**45**), fenil acetaldeído (**40**), fusapirona (**42**), fusarielina B (**41**), maculosina (**39**) e o ácido glicodeoxicólico (**43**) estão sendo relatados pela primeira vez para a espécie.

Os extratos BD-14 dias, MNTPL-14 dias, MPD-14 dias e BDL 14-dias foram submetidos a testes de atividade fungicida frente ao fitopatógeno *C. musae*, e o extrato BDL-14 dias revelou o melhor resultado de inibição de crescimento do fungo. A análise dos componentes principais (PCA) dos extratos BD-14 dias, MNTPL-14 dias, MPD-14 dias e BDL 14-dias foi realizada. Este estudo revelou um perfil metabólico diferenciado para o extrato BDL-14 dias, corroborando os resultados da atividade biológica.

Diante deste resultado, foi realizada uma análise comparativa entre todos os extratos oriundos do meio BDL (7, 14, 21, 28 e 35 dias) frente ao teste de atividade antifúngica contra *C. musae*, e novamente o extrato BDL -14 dias revelou-se mais ativo.

Desta forma, foi realizada uma análise comparativa dos extratos BDL -14 dias (mais ativo) e BDL- 28 dias (menos ativo) utilizando a técnica OPLS-DA, onde foi possível identificar 09 metabólitos biomarcadores responsáveis pela atividade antifúngica do extrato BDL-14 dias.

Os supostos compostos biomarcadores apresentaram uma elevada massa molecular (1008-1036 Da) e foram sugeridos como sendo uma série homóloga. No entanto, a ausência de dados na literatura referente às fragmentações observadas nos respectivos espectros de massas, impossibilitou a caracterização estrutural destes compostos. Estudos posteriores serão necessários para o isolamento e a elucidação estrutural utilizando outras técnicas espectroscópicas.

Os resultados obtidos demonstraram o potencial químico e biológico de *F. equiseti*, além da eficiência do uso da técnica UPLC-QTOF-MS^E e quimiometria na identificação de compostos orgânicos bioativos.

REFERÊNCIAS

- ALTOMARE, C.; PERRONE, G.; ZONNO, M. C.; et al. Biological characterization of fusapyrone and deoxyfusapyrone, two bioactive secondary metabolites of *Fusarium semitectum*. **Journal of Natural Products**, [s.l.] v. 63, n. 8, p. 1131–1135, 2000.
- BAKKER M. G.; ACHARYA J.; MOORMAN T. B.; et al. The potential for cereal rye cover crops to host corn seedling pathogens. **Phytopathology**, [s.l.], v. 106, n. 6, p.591–601, 2016.
- BAUER, A. W.; PERRY, D. M.; KIRBY, W. M. M.; Single-Disk Antibiotic-Sensitivity Testing of *Staphylococci* - An Analysis of technique and results. **American Medical Association Archive Internal Medicine**, [s.l.: s.n], v. 1042, p. 208-216, 1959.
- BOSCH, U.; MIROCHA, C. J.; Toxin production by *Fusarium* species from sugar-beets and natural occurrence of zearalenone in beets and bet fibers. **Applied Environmental Microbiology**, [s.l.: s.n], v. 58, p. 3233-3239, 1992.
- BROWN, D. W.; PROCTOR, R. H.; Insights into natural products biosynthesis from analysis of 490, polyketide synthases from *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, [s.l.:s.n], v. 89, p. 37–51, 2016.
- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M.; Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Products Reports**, [s.l.:s.n], v. 21, p. 143-163, 2004.
- BURMEISTER, H. R.; BENNETT, G. A.; VESONDER, R. F.; HESSELTINE, C. W.; Antibiotic produced by *Fusarium equiseti* NRRL 5537. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 634–639, 1974.
- CASTELLANI, A. M. D.; Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, Lisboa, v. 12, n. 3, p. 1-6, 1963.
- CASTILLO, M.; SAMAR, M.; MOLT, G.; et al.; Trichothecenes and zearalenone production by *Fusarium* species isolated from Argentinean black beans. **Mycotoxin Research**, [s.l.:s.n], v. 18, p. 31–36, 2002.
- CHANDRA, S.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; et al.; The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, [s.l.:s.n], v. 122, p. 494–510, 2006.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R.; Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013.
- CHASE, M. CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; et al.; DNA Data and Orchidaceae Systematics: A new Phylogenetic Classification. Orchid Conservation. **Natural History Publications**, Kota Kinabalu, Sabah, [s.n], v. 5, p. 69-89. 2003.
- CHAUDHARY, R. G., KAUAR, A.; Wilt disease as a cause of shift from lentil cultivation in Sangod Tehsil of Kota, Rajasthan. **Indian Journal of Pulses Research**, [s.l.: s.n], v. 15, p.

193-194, 2002.

CHEN, C.; MURAKAMI, T.; Recherches toxicologiques des substances metaboliques du *Fusarium nivale*, la quatrieme substance metabolique de *F. nivale*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [s.l], v. 19, n. 1970, p. 1968–1970, 1971.

CHIANG, Y. M.; OAKLEY, C. E.; AHUJA, M.; et al.; An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l], v. 135, n. 20, p. 7720–7731, 2013.

CHIMBEKUJWO, I. B.; Frequency and pathogenicity of *Fusarium* wilts (*Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*) of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Adamawa in Nigeria. **Revista de Biologia Tropical**, [s.l], v. 48, n. 1, p. 1–5, 2000.

CORDEIRO, Z. J. M.; **Cultivo da Banana para o Pólo Petrolina Juazeiro**. Circular Técnica. Brasília, 2003.

CROPS, S.; ARS, U.; ROAD, B.; STATION, C.; Phytotoxicity of equisetin and epi -equisetin isolated from *Fusarium equiseti* and *F. pallidoroseum*. **Mycology Research**, [s.l], v. 103, n. 8, p. 967–973, 1999.

DAVIS, R. M.; COLYER, P. D.; ROTHROCK, C. S.; KOCHMAN, J. K.; *Fusarium* wilt of cotton: Population diversity and implications for management. **Plant Disease**, [s.l], v. 90, n. 6, p. 692–703, 2006.

DEMAIN, A. L.; Antibiotics: Natural products essential to human health. **Medicinal Research Reviews**, [s.l: s.n], v. 29, p. 821–841, 2009.

DONG, L.; LIU, R.; DONG, H.; et al.; Volatile metabolite profiling of malt contaminated by *Fusarium poae* during malting. **Journal of Cereal Science**, [s.l:s.n], v. 66, p. 37–45, 2015.

FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; et al. High resolution ultra high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian Lippia species. **Journal of Chromatography**, [s.l] v. 1259, n. A, p. 167-178, 2012.

GACHANGO, E.; HANSON, L. E.; ROJAS, A.; *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. **Plant Disease**, [s.l: s.n], v. 96, p. 1767–1774, 2012.

GAUDÊNCIO, P. S.; PEREIRA, F.; Dereplication: racing to speed up the natural products discovery process. **The Royal Society of Chemistry**, [s.l:s.n], v. 32, p. 779–810, 2015.

GENG, P.; HARNLY, J. M.; CHEN, P.; Differentiation of whole grain from refined wheat (*T. aestivum*) flour using lipid profile of wheat bran, germ, and endosperm with UHPLC-HRAM mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l:s.n], v. 63, p. 6189–6211, 2015.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for

multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l], v. 72, n. 2018, p. 83–90, 2018.

HANSEN, F. T.; GARDINER, D. M.; LYSOE, E.; An update to polyketide synthase and non-ribosomal synthetase genes and nomenclature in *Fusarium*. **Fungal Genetic Biology**, [s.l: s.n], v. 75, p. 20–29, 2015.

HAWAS, U. W.; AL-FARAWATI, R.; EL-KASSEM, L. T. A.; TURKI, A. J.; Different culture metabolites of the red sea fungus *Fusarium equiseti* optimize the inhibition of hepatitis C virus NS3/4A Protease (HCV PR). **Marine Drugs**, [s.l:s.n], v. 14, p. 1–12, 2016.

HEYDEN, Y. V.; Extracting information from chromatographic herbal fingerprints. **LC-GC Europe**, [s.l] v. 21, n. 9, p. 438-443, 2008.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. **IMA Fungus**, [s.l: s.n], v. 2, p. 87-95, 2011.

JANSEN, C.; WETTSTEIN, D.; SCHAFER, W.; Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A**, [s.l:s.n], v. 102, p. 16892-16897, 2005.

KAZAN, K.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M.; On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and host resistance. **Molecular Plant Pathology**. [s.l: s.n], v. 13, p. 399–413, 2012.

KELLY, A. C.; CLEAR, R. M.; O'DONNELL, K.; Diversity of *Fusarium* head blight populations and trichothecene toxin types reveals regional differences in pathogen composition and temporal dynamics. **Fungal Genetics and Biolog**, [s.l: s.n] v. 82, p. 22–31, 2015.

KHARWAR, R. N.; MISHRA, A.; GOND, S. K.; STIERLE, A.; STIERLE, D.; Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, [s.l: s.n], v. 28, p. 1208–1228, 2011.

KIM, H. S.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; Comparative genomic analyses of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in 207 isolates of *Fusarium*. **Genetics Society of America**, Pacific Grove, CA, [s.l:s.n], p. 170, 2017.

KOBAYASHI, H.; SLJNAGA, R.; Isolation and structures of an antifungal antibiotic, fusarielin A, and related compounds produced by a *Fusarium* sp. **The Journal of Antibiotics**, [s.l], v. 48 n. 1, p. 42–52, 1995.

KOSIAK, B.; TORP, M.; SKJERVE, E.; THRANE, U.; The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. **Acta Agricultura e Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, [s.l:s.n], v. 53, p. 168-176, 2003.

KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A.; Indoor mold, toxigenic fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious disease perspective fungal organisms in damp buildings. **Clinical**

Microbiology Reviews, [s.l],v. 16, n. 1, p. 144–172, 2003.

KUMAR, K. P.; JAVVAJI, K.; POORNACHANDRA, Y.; ALLANKI, A. D.; MISRA, S.; Antimicrobial, anti-plasmodial and cytotoxicity properties of bioactive compounds from *Fusarium sp.* USNPF102. **Journal of Microbiology Research**, [s.l], v. 7, n. 2, p. 23–30, 2017.

KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; SPITELLER, M.; *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l:s.n], v. 107, p. 1019–1030, 2009.

LAM, K. S.; New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, [s.l], v. 15, n. 6, p. 279–289, 2007.

LEE, M. S.; CHA, E. Y.; SUL, J. Y.; et al.; Chrysophanic acid blocks proliferation of colon cancer cells by inhibiting EGFR / mTOR pathway. **Phytotherapy Research**, [s.l:s.n], v. 837, p. 833–837, 2011.

LEE, Y.; MIROCHA, C. J.; SHROEDER, D. J.; WALSER, M. M.; TDP-1, a toxic Component causing tibial dyschondroplasia in broiler chickens, and trichothecenes from *Fusarium roseum* and *F. Graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l], v. 50, n. 1, p. 102–107, 1985.

LI, J. Y.; STROBEL, G.; HARPER, J.; et al.; Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Organic Letters**, [s.l:s.n], v. 2, , p. 767-770, 2000.

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; et al.; *Fusarium* pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, [s.l: s.n], v. 67, p. 399–416, 2013.

MAO, Q.; BAI, M.; XU, J. D.; Discrimination of leaves of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* by ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**, [s.l:s.n], v. 97 p. 129–140, 2014.

MARCHETTI, M.; BOUCHER, V.; DUMOULIN, J.; COLOMB, M.; Retrieving visibility distance in fog combining infrared thermography, principal components analysis and partial least-square regression, **Infrared Physics and Technology**, [s.l:s.n], v. 71, p. 289–297, 2015.

MASI, M.; MEYER, S.; CLEMENTE,S.; et al.; Metabolites produced by foliar pathogens for buffelgrass biocontrol in the Sonoran Desert, **ACS National Meeting & Exposition**, [s.l: s.n], v. 33, 2017.

MELO, M. P. D. E.; **Espécies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi***. 2008. 132 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MICHIELSE, C. B.; REP, M.; Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular and Plant Pathology**, [s.l: s.n], v. 10, p. 311–324, 2009.

MORRISON, E.; RUNDBERGET, T.; KOSIAK, B.; et al.; Cytotoxicity of trichothecenes and fusarochromanone produced by *Fusarium equiseti* strains isolated from Norwegian cereals. **Mycopathologia**, [s.l: s.n], v. 153, p. 49–56, 2002.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W.; Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, [s.l], v. 8, n. 19, p. 4321-4326, 1980

NATHANAIL, A. V.; SYVÄHUOKO, J.; MALACHOVÁ, A.; et al.; Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l: s.n], v. 407, p. 4745–4755, 2015.

NESIC, K.; IVANOVIC, S.; NESIC, V. Fusarial Toxins : Secondary metabolites of *Fusarium* fungi. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, [s.l: s.n], v. 228, p. 101–120, 2014.

NG, J.; BANDEIRA, N.; LIU, W. T.; et al.; Dereplication and de novo sequencing of nonribosomal peptides. **Natural Methods**, [s.l:s.n], v. 6, p. 596-599, 2009.

NI, Y.; SU, M.; LIN, J.; et al.; Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. **FEBS Letters**, [s.l], v. 582, n. 17, p. 2627–2636, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E.; “Metabolomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, [s.l], v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 1999.

NIEHAUS, E. M.; MUNSTERKOTTER, M.; PROCTOR, R. H.; et al.; Comparative “omics” of the *Fusarium fujikuroi* species complex highlights differences in genetic potential and metabolite synthesis. **Genome Biology and Evolution**, [s.l:s.n], v. 8, p. 3574–3599, 2016.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C.; Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l], v. 95. n. 5, p. 2044-2049, 1998.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; et al.; Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l], v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.

OCAMB, C. M.; JUZWICK, J.; *Fusarium* species associated with rhizosphere soil and diseased roots of eastern White pine seedlings and associated nursery soil. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l: s.n], v. 17, p. 325-330, 1995.

OHASHI, K.; MIYAGAWA, E. Y.; Bioproduction of bile acids and the glycine conjugates by *Penicillium* fungus. **Journal of Natural Medicine**, [s.l:s.n], v. 62, p. 83–86, 2008.

PESTKA, J.; Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. **World Mycotoxin Journal**, [s.l:s.n], v. 3, p. 323–347, 2010.

PROCTOR, R. H.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P.; Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s.l:s.n], v.8, p. 593–601, 1995.

QAZI, P. H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R. K.; VERMA, V.; Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l:s.n], v. 24, p. 1115–1121, 2008.

RAI, R. P.; *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. causing dry rot of potato-tuber-new report. **Current Science**, [s.l:s.n], v.48, p. 1043-1045, 1979.

RATNAWEERA, P. B.; SILVA, E. D.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin from endophytic *Fusarium sp.* **BMC Complementary and Alternative medicine**, [s.l:s.n], v. 15, p. 1–7, 2015.

RICHARD, J. L.; Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l:s.n],v. 119, p. 3–10, 2007.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, M.; Identifications and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. **Mycopathology**, [s.l:s.n], v. 159, p. 79-85, 2005.

RUBELLA, S.; GOSWAMI, Y. D.; ZAMIR, K. P.; Host range and mycotoxin production by *Fusarium*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l:s.n], v. 30, p. 155–160, 2008.

RUBERT, J.; RIGHETTI, L.; STRANSKA-ZACHARIASOVA, M.; et al.; Untargeted metabolomics based on ultra-high-performance liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry merged with chemometrics: A new predictable tool for an early detection of mycotoxins. **Food Chemistry**, [s.l:s.n], v. 224, p. 423–431, 2017.

SHI, Y. H.; XIE, Z. Y.; WANG, R.; Quantitative and chemical fingerprint analysis for the quality evaluation of *Isatis indigotica* based on ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detector combined with chemometric methods. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l:s.n], v. 13, p. 9035-9050, 2012.

SHIONO, Y.; SHIBUYA, F.; MURAYAMA, T.; KOSEKI, T.; A polyketide metabolite from an endophytic *Fusarium equiseti* in a medicinal plant. **Zeitschrift für Naturforschung**, [s.l:s.n], v. 68b, p. 9–12, 2013.

SINGH, S. B.; ZINK, D. L.; GOETZ, M. A.; et al.; Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 39, n. 1998, p. 2243–2246, 2000.

SOUSA, A. D.; MAIA, I. V.; RIBEIRO, K. M.; et al.; UPLC-QTOF-MS-based chemometric approach driving the choice of the best extraction process for *Phyllanthus niruri*. **Separation**

Science and Technology, [s.l.], v. 52, n. 10, p. 1–11, 2017.

SPECIAN, V.; CASAROTTI, R.; CRISTINA, A.; LÚCIO, J.; ALENCAR, J. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, [s.l.], n. 345, p. 345–352, 2014.

STACK, R. W.; FROHBERG, R. C.; CASPER, H.; Reaction of spring wheats incorporating sumai 3-derived resistance to inoculation with seven *Fusarium* species. **Cereal Research Communications**, [s.l.:s.n.], v. 25, p. 667-671, 1997.

STEPIEN, L.; WASKIEWICZ, A.; Sequence divergence of the enniatin synthase gene in relation to production of beauvericin and enniatins in. **Toxins**, [s.l.:s.n.], v. 5, p. 537–555, 2013.

STIERLE, A. A.; Bioactive compounds from four endophytic *Penicillium* of a northwest pacific yew tree. **Studies in Natural Products Chemistry**, [s.l.:s.n.], v. 24, p. 933–977, 2000.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, [s.l.], v. 260, n. 11, p. 2–4, 1978.

STOESSL, A.; UNWIN, C. H.; WARD, E. B. W. Postinfectious fungal inhibitors from plants: fungal oxidation of capsidiol in pepper fruit. **Agricultural Research Institute**, v. 63, p. 1225–1231, 1973. London.

STOJSIN, V.; BALAZ, F.; BAGI, F.; KELJACKI, I.; Pathogenicity of *Fusarium* spp. isolates from sugar beet root. **Zastita-Bilja**, [s.l.:s.n.], v. 52, p. 241-249, 2001.

TAKEMOTO, K.; KAMISUKI, S.; CHIA, P. T.; et al.; Bioactive dihydronaphthoquinone derivatives from *Fusarium solani*. **Journal of Natural Products**, [s.l.:s.n.], v. 2, p. 2–6, 2014.

TEKAUS, A.; MUELLER, E.; BEYENE, M.; STULZER, M.; *Fusarium* head blight of winter wheat in Manitoba in 2004. **Canadian Plant Disease Survey**, [s.l.:s.n.], v. 85, p. 47-48, 2005.

THERON, D. J., HOLZ, G.; *Fusarium* species associated with dry and stem-end roto potatoes in South Africa. **Phytophylactica**, [s.l.:s.n.], v. 21 p. 175-181, 1989.

TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; VANDER, H.; Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.:s.n.], v. 690, p. 148-161, 2011.

TRIBA, M. N.; LE MOYEC, L.; AMATHIEU, R.; PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. **Molecular BioSystems**, [s.l.:s.n.], v. 11, p. 13–19, 2015.

TRIGOS, A.; REYNA, S.; CERVANTES, L.; Three diketopiperazines from the cultivated fungus *Fusarium oxysporum*. **Natural Product Letters**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 241–246, 1995.

TUROS, E.; AUDIA, J. E.; DANISHEFSKY, J.; Total synthesis of the *Fusarium* toxin equisetin: Proof of the stereochemical relationship of the tetramate and terpenoid sectors. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.:s.n.], v. 111, p. 8231-8236, 1989.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H.C.; WESTERHUIS, J.A.; et al.; Centering, scaling and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, [s.l.: s.n], v. 15, p. 1–15, 2006.

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

VILLAS-BÔAS, S.; MAS, S.; AKESSON, J. S.; NIELSEN, J.; Mass spectrometry in metaboloma analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, [s.l.:s.n], v. 24, p. 613-646, 2005.

WHITE, E. P.; Isolation of (±)-2-Acetamido-2,5-dihydro-5-oxofuran from *Fusarium equiseti*. **Journal of Chemistry Society**, [s.l.:s.n], p. 346–347, 1967.

WING, N.; BRYDEN, W. L.; LSUREN, D. R.; BURGESS, L. W.; Toxigenicity of *Fusarium* species and subspecies in section *Gibbosum* from diferente regions of Australia. **Mycological Research**, [s.l.:s.n], v. 97, p. 1441-1446, 1993.

WOLFENDER, J. L.; GLAUSER, G; BOCCARD, J.; RUDAZ, S.; MS-based plant metabolomic approaches for biomarker discovery. **Natural Product Communcation**, [s.l.], v. 4, n. 10, p. 1417-1430, 2009.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J.; Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s.l.:s.n], v. 5, p. 351–372, 2014.

XIE, W.; MIROCHA, C. J.; WEN, Y.; Formyl fusarochromanone and diacetyl fusarochromanone, two new metabolites of *Fusarium equiseti*. **Journal of Natural Products**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 1165–1167, 1991.

XIE, W.; MIROCHA, C. J.; WEN, Y.; Isolation and structure identification of two new derivatives of the mycotoxin fusarochromenone produced by *Fusarium equiseti*. **Journal of Natural products**, [s.l.], v. 58, n. 1, p. 124–127, 1995.

XUE, A. C.; HO, K. M.; BUTLER, G; VIGIER, B. J.; et al.; Pathogenicity of *Fusarium* species causing head blight in barley, **Phytoprotection**, [s.l.:s.n], v. 87, p. 55-61, 2006.

YULIANA N. D.; KHATIB, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Resarch**. [s.l.:s.n], v.25 p. 157-169, 2011.

ZAHER, A. M.; MOHARRAM, A. M.; DAVIS, R.; et al.; Characterisation of the metabolites of an antibacterial endophyte *Botryodiplodia theobromae* Pat. of *Dracaena draco* L. by LC-MS/MS. **Natural Product Research**, [s.l.], v. 29, n. 24, p. 2275–2281, 2015.

ZHANG, Y.; HE, J.; JIA, L.; et al.; Cellular tracking and gene profiling of *Fusarium graminearum* during maize stalk rot disease development elucidates its strategies in confronting phosphorus limitation in the host apoplast. **Plos Pathogens**, [s.l.:s.n], v. 1, p. 1–34, 2016.

ZHU, R.; ZHENG, R.; DENG, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, S. Phytomedicine Ergosterol peroxide from *Cordyceps cicadae* ameliorates TGF-1-induced activation of kidney fibroblasts. **European Journal of Integrative Medicine**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 372–378, 2014.