



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

**RODOLFO DANTAS LIMA JUNIOR**

**DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Fusarium***  
**CAUSADORES DE PODRIDÃO DO PEDÚNCULO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.):**  
**UMA ABORDAGEM EM *FINGERPRINTING* LIPÍDICO VIA ESI-QTOF-MS**

**FORTALEZA**

**2020**

RODOLFO DANTAS LIMA JUNIOR

DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES CRÍTICAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Fusarium*  
CAUSADORES DE PODRIDÃO DO PEDÚNCULO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.): UMA  
ABORDAGEM EM *FINGERPRINTING* LIPÍDICO VIA ESI-QTOF-MS

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.

Orientadora: Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri.

Coorientador: Dr. Guilherme Julião Zocolo.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

L71d Lima Junior, Rodolfo Dantas.  
Diferenciação de espécies crípticas de fungos do gênero *Fusarium* causadores de Podridão do Pedúnculo do Melão (*Cucumis melo* L.) : Uma abordagem em fingerprinting lipídico via ESI-QTOF-MS / Rodolfo Dantas Lima Junior. – 2020.  
56 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Dávila de Souza Zampieri.

Coorientação: Prof. Dr. Guilherme Julião Zocolo.

1. espectrometria de massas. 2. Fingerprinting lipídico. 3. quimiometria. 4. melão. 5. *Fusarium* sp.. I.  
Título.

---

CDD 540

RODOLFO DANTAS LIMA JUNIOR

DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES CRÍPTICAS DE FUNGOS DO GÊNERO *Fusarium*  
CAUSADORES DE PODRIDÃO DO PEDÚNCULO DO MELÃO (*Cucumis melo* L.): UMA  
ABORDAGEM EM *FINGERPRINTING* LIPÍDICO VIA ESI-QTOF-MS

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.

Aprovada em: 05/11/2020

BANCA EXAMINADORA

---

Profª. Dra. Dávila de Souza Zampieri (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Elenilson Godoy Alves Filho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Pedro Henrique Vendramini  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

À minha avó e mãe Meire e à minha mãe Kátia.

Ao meu afilhado Nicolas recém-nascido.

## AGRADECIMENTOS

Geralmente existem motivações que nos levam a trilhar caminhos e caminhos e, geralmente, temos o nome destas motivações. Maria Meire da Silva e Kátia Alves da Silva Dantas são a minha motivação em estar onde estou. São nomes que habitam corpos tão fortes, vestidos de fé e garra infinita. Com esses e tantos outros atributos conseguiram me fazer gente. Com seus esforços diários conseguiram me manter gente, e gente crente de que um dia tudo seria diferente, com mais oportunidade e dignidade. Agradeço por tudo que fizeram e fazem por mim.

Durante minha caminhada até aqui, consegui alcançar grandes feitos graças aos que me acompanharam em períodos longos, curtos, tristes e felizes. Flaviana Medeiros, Ana Aline, Gladysane Santos, Cristine Vidal, Natalia Porto, Valdirene Oliveira, Gisele Silvestre, e Erivaldo (Eri) são pessoas que eu sempre vou guardar na memória e no coração, pois fizeram parte de momentos importantes dessa caminhada.

Em especial ao Diego Saldanha por partilhar de vários momentos dessa jornada ao meu lado, me apoiando e me motivando a continuar.

Agradeço de forma mais que especial à Profa. Dra. Dávila Zampieri, pela orientação, por acreditar no meu potencial, por me conceder oportunidades únicas e grandes ensinamentos para a vida acadêmica. Obrigado por cada sim e por todos os não, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Dr. Guilherme Zocolo pela oportunidade de fazer parte do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN), sediado na EMBRAPA. Foi de grande valia aprender mais com seus ensinamentos e sua vasta experiência.

Ao Prof. Dr. Elenilson Godoy pelas grandiosas contribuições neste trabalho, por sua paciência e dedicação a nós iniciantes do ramo da quimiometria.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de bolsa, estrutura e acesso ao conhecimento.

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

Hoje eu me vejo em um momento único, escrevendo as últimas linhas do meu esforço e da minha dedicação nessa fase da minha vida. É com o coração e olhos cheios que eu escrevo o meu MUITO OBRIGADO!

## RESUMO

O melão é uma das cucurbitáceas com grande valor nutricional apreciada no mundo inteiro, porém sua produção está sujeita a diversos problemas a nível de pós-colheita. A contaminação do fruto por fungos do gênero *Fusarium* pode causar podridões capazes de comprometer seu consumo e conseqüentemente sua comercialização. Espécies crípticas de fungos desse gênero têm se tornado um desafio no processo de identificação e controle de doenças no melão devido à grande semelhança existente a nível morfológico. Com o intuito de promover uma rápida identificação e diferenciação de espécies crípticas de fitopatógenos em melão, este trabalho utilizou a espectrometria de massas de alta resolução juntamente a métodos de análise univariada e multivariada, para o estudo piloto da possibilidade de diferenciação de perfis lipídicos de isolados de fungos do complexo de espécies *Fusarium equiseti-incarnatum*, frente ou não a amostras de melão sadio. Os dados obtidos foram capazes de distinguir os isolados pertencentes a um mesmo complexo de espécie a partir de um padrão de *fingerprinting* lipídico, indicando lipídios candidatos a biomarcadores responsáveis por diferenciar os isolados e que permaneceram diferenciáveis após análise conjunta com o perfil lipídico de *Cucumis melo* L. Os lipídios estatisticamente relevantes, obtidos a partir de análises por PLS-DA, VIP e ANOVA one-way foram categorizados como glicerofosfolipídios (GP) e esfingolipídios (SP), utilizado o LIPID MAPS® como base de dados. Este estudo reporta a primeira aplicação do *fingerprinting* de lipídios por análise via *flow injection* em espectrometria de massas para a diferenciação de espécies crípticas de fungos fitopatógenos de melão a partir de uma metodologia analítica robusta e reprodutível aliada a métodos quimiométricos.

**Palavras-chave:** espectrometria de massas; *Fingerprinting* lipídico; quimiometria; melão; *Fusarium* sp..

## ABSTRACT

Melon is one of the cucurbits with great nutritional value appreciated worldwide, but its production is subject to several problems at the post-harvest level. Contamination of the fruit by fungi of the genus *Fusarium* can cause rot capable of compromising its consumption and consequently its commercialization. Cryptic species of fungi of this genus have become a challenge in the process of identification and control of diseases in melons due to the great similarity that exists at the morphological level. In order to promote a rapid identification and differentiation of cryptic species of phytopathogens in melon, this work used high resolution mass spectrometry together with univariate and multivariate analysis methods, for the pilot study of the possibility of differentiating lipid profiles of isolates of fungi of the *Fusarium equiseti-incarnatum* species complex, in front or not of healthy melon samples. The obtained data were able to distinguish the isolates belonging to the same species complex from a lipid fingerprinting pattern, indicating lipids candidate for biomarkers responsible for differentiating the isolates and which remained distinguishable after joint analysis with the lipid profile of *Cucumis melo* L. The statistically relevant lipids obtained from analyzes by PLS-DA, VIP and ANOVA one-way were categorized as glycerophospholipids (GP) and sphingolipids (SP), using LIPID MAPS® as a database. This study reports the first application of lipid fingerprinting by flow injection analysis in mass spectrometry for the differentiation of cryptic species of melon phytopathogenic fungi from a robust and reproducible analytical methodology combined with chemometric methods.

**Keywords:** mass spectrometry; Lipid fingerprinting; chemometrics; melon; *Fusarium* sp..



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Melão ( <i>Cucumis melo</i> L.) amarelo e sua estrutura fisiológica.....	16
Figura 2	- Variedades de melão do tipo a) Cantaloupe; b) Pele de sapo; c) Gália e d) Amarelo, contaminados com fungos na região do pedúnculo com sintomas de Podridão de Fusarium.....	18
Figura 3	- Componentes básicos de um espectrômetro de massas.....	21
Figura 4	- Representação de um espectro de massas de um íon hipotético (H) de $m/z$ 60.....	21
Figura 5	- Esquema geral para ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).....	22
Figura 6	- Esquema geral de uma fonte de ionização por electrospray (ESI).....	24
Figura 7	- Representação das estruturas químicas de oito categorias de lipídios.....	26
Figura 8	- Esquema geral de um sistema ESI-QTOF-MS.....	28
Figura 9	- Coleta de alíquota do micélio dos isolados LPPC072 - <i>F. sulawense</i> (morfofoto: <i>F. equiseti</i> ) e LPPC074 - <i>Fusarium</i> sp. (morfofoto: <i>F. incarnatum</i> ) para a posterior extração de lipídios totais pelo método Bligh e Dyer.....	35
Figura 10	- Método de coleta utilizado para obtenção de 5 alíquotas das amostras de melões sadios ( <i>Cucumis melo</i> L.).....	35
Figura 11	- Fluxo de trabalho realizado na extração de lipídios das amostras de fungo (micélio) e melão.....	36
Figura 12	- <i>Fingerprints</i> representativos de lipídios característicos de melão sadio ( <i>Cucumis melo</i> L.) (a) e dos isolados de <i>Fusarium</i> sp. (morfofoto incarnatum – LPPC074 (b)), <i>Fusarium sulawense</i> (morfofoto equiseti – LPPC072(c)).....	39
Figura 13	- a) Gráfico de <i>scores</i> para o isolado fúngico LPPC072 (azul), e isolado LPPC074 (vermelho); b) Gráfico de <i>loadings</i> com as variáveis relevantes (picos de $m/z$ 600 a 1000) para classificação das amostras; c) VIP <i>scores</i>	40

para a classificação das amostras com limite inferior igual a 1.....

Figura 14 - a) Gráfico de *scores* para o isolado fúngico LPPC072 (azul), isolado LPPC074 (vermelho) e para melão sadio em verde; b) Gráfico de *loadings* com as variáveis relevantes (picos de *m/z* 600 a 1000) para classificação das amostras; c) *VIP scores* para a classificação das amostras com limite inferior igual a 1.....

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de VIP, média e desvio padrão das abundâncias relativas dos íons candidatos a biomarcadores da diferenciação dos isolados LPPC072 e LPPC074 sob a influência (F×M) ou não (F×F) do melão sadio.....	41
Tabela 2 - Parâmetros estatísticos dos modelos de classificação das análises multivariadas.....	46
Tabela 3 - Identificação putativa da categoria de nove diferentes lipídios referentes aos isolados LPPC072 e LPPC074, selecionados de acordo com os valores de <i>VIP scores</i> .....	47

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Cultivo de melão no Brasil e seus percalços.....	15
2.2	Podridão-do-pedúnculo em <i>Cucumis melo</i> L.....	17
2.3	Identificação de fitopatógenos no setor agrícola.....	19
2.4	Espectrometria de massas na análise de microrganismos fitopatógenos.....	20
2.5	<i>Fingerprint</i> lipídico na análise de fitopatógenos.....	25
2.6	Análise estatística.....	29
2.6.1	<i>Análise multivariada e métodos supervisionados</i> .....	29
2.6.2	<i>Análise univariada</i> .....	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo Geral.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
4.1	Obtenção e crescimento dos isolados de fitopatógenos.....	34
4.2	Obtenção do fruto ( <i>Cucumis melo</i> L.) sadio.....	34
4.3	Extração de lipídios para análise por ESI-QTOF.....	34
4.3.1	<i>Amostragem</i> .....	34
4.3.2	<i>Extração de lipídios</i> .....	36
4.4	Parâmetros para análise em ESI-QTOF-MS.....	36
4.5	Parâmetros para análise quimiométrica no software PLS Toolbox <sup>TM</sup> .....	37
4.6	Parâmetros para a identificação putativa de lipídios.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda do mercado de alimentos cresce exponencialmente de acordo com o aumento da população e das exigências impostas por estes e, com isso, novas estratégias são pensadas para a manutenção e ampliação da produção de culturas que se mostram cada vez mais importantes, tanto para a base da dieta alimentar diária, quanto para a movimentação da economia regional, nacional e internacional.<sup>1-2</sup> Neste aspecto, o mercado da fruticultura assume destaque principalmente no Brasil, por ser o terceiro maior país produtor de frutas do mundo, sendo possível obter uma gama de diferentes opções de frutos devido a diversidade de climas possíveis em seu território.<sup>1</sup>

O melão (*Cucumis melo* L.), uma das commodities líderes de exportação do país, possui uma variedade de espécies, onde um dos mais produzidos e exportados é caracterizado como sendo do tipo Valenciano, ou popularmente conhecido como “melão amarelo”.<sup>1-3</sup> Grande parte de sua produção concentra-se na região nordeste, sendo esta responsável por cerca de 22 mil hectares de terra no cultivo de melão, tendo sido encarregada por mais de 95% da produção nacional dos últimos anos (2017-2018).<sup>4</sup>

A “podridão do *Fusarium*” ou “podridão do pedúnculo” é um tipo de doença pós-colheita que causa transtornos à cultura do melão na região nordeste desde 1999. Essa é causada por fungos do gênero *Fusarium* que se depositam no fruto, ainda no campo, a partir de fissuras na região do pedúnculo ou por ranhuras oriundas do processo de manejo, podendo causar rachaduras ou intenso crescimento micelial branco na superfície do fruto.<sup>5</sup> A dificuldade envolvida no manejo da doença supracitada encontra-se na forma como essa exterioriza seus sintomas, pois mesmo após a infecção no campo e transferência para câmaras de armazenamento, o fungo mantém-se latente dentro do fruto e este permanece com aspecto saudável.<sup>6</sup> Os sintomas da doença podem manifestar-se apenas durante o processo de armazenamento e transporte, chegando em más condições ao destino final, com aparência e qualidade inaptas ao mercado consumidor.<sup>7</sup>

Assim, diante da necessidade de um processo de produção e comercialização ambientalmente consciente e de qualidade, pautado nas regulamentações fitossanitárias de acordo com o Programa Integrado de Frutas (PIF) estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), torna-se necessário a elaboração de abordagens envolvendo o rápido diagnóstico de doenças pós-colheita que atacam culturas importantes, como o melão.<sup>8</sup>

O processo atual de identificação de fitopatógenos tem sido realizado através da coleta e crescimento do patógeno em condições laboratoriais, a fim de avaliar a sua morfologia,

ou por uso de métodos de amplificação de DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*) baseados em regiões específicas do código genético capazes de classificar esses organismos em gênero e espécie. Ambos os processos de identificação demandam um tempo considerado elevado, visto que é necessário que o patógeno cresça em condições propícias ao seu desenvolvimento, podendo sofrer interferência do meio e, também, demandando instrumentação especializada e experiência do analista devido as semelhanças morfológicas entre organismos do mesmo gênero, por exemplo.<sup>9-11</sup>

No entanto, sabe-se que fungos filamentosos, assim como os do gênero *Fusarium*, podem possuir diferentes lipídios como moléculas formadoras de suas estruturas membranosas, chegando a ocorrer discriminação entre diferentes espécies do mesmo gênero.<sup>12-13</sup> Com base neste aspecto, neste trabalho empregou-se a espectrometria de massas como uma técnica analítica, juntamente com análises multivariada e univariada de dados, para a realização do estudo do perfil lipídico de fungos causadores da podridão do pedúnculo em melão, visando a diferenciação de espécies crípticas do complexo de espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC).

Dentro dessa abordagem, empregou-se a espectrometria de massas por injeção em fluxo (FI-MS, do inglês *Flow Injection Mass Spectrometry*) para a obtenção do *fingerprinting* lipídico de fitopatógenos do gênero *Fusarium* a partir da infusão de extratos lipídicos brutos em um espectrômetro de massas de alta resolução, sem o uso de um sistema cromatográfico.<sup>14</sup>

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultivo de melão no Brasil e seus percalços

A ingestão de alimentos saudáveis é considerada, a nível global, uma das principais formas de reduzir o índice de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão, e cânceros específicos.<sup>15-17</sup> Exemplos desses alimentos são as frutas, que enquadram-se como um item alimentar capaz de prevenir tais doenças por apresentarem em sua composição substâncias como vitaminas, carboidratos complexos, fibras, minerais e compostos bioativos que auxiliam no processo metabólico contra agentes externos e disfunções internas.<sup>15-16,18</sup>

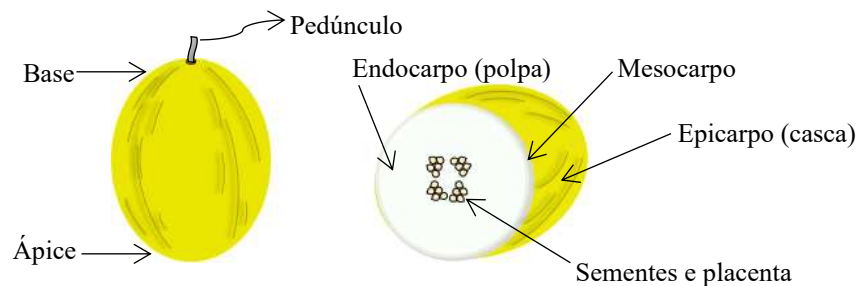
Juntamente com a necessidade do consumo de frutas frescas visando uma dieta saudável, surge a grande demanda do mercado da fruticultura em produzir diversas espécies de frutas com qualidade garantida, de acordo com os princípios da segurança alimentar, visando abastecer os portos de diferentes países. Nesse cenário, o Brasil destaca-se por produzir o terceiro maior volume de frutas do mundo, sendo beneficiado por conter regiões com climas diferentes, característicos e essenciais para o cultivo de uma diversidade de espécies de frutos.<sup>1</sup>

Uma das commodities de grande importância para o mercado brasileiro da fruticultura é o melão (*Cucumis melo* L.), fruto do meloeiro, uma planta herbácea e rasteira, pertencente à família Cucurbitaceae.<sup>3</sup> O melão é um fruto que possui diversas variedades com alto valor nutricional, excelente qualidade de sabor e supridas de uma gama de compostos bioativos necessários para a dieta humana.<sup>19</sup> Essa commodity é de ampla comercialização no mundo, possuindo grande influência no mercado brasileiro de fruticultura, caracterizando o país como um dos principais produtores e exportadores da América do Sul.<sup>1,3</sup> Uma das variedades mais produzidas no Brasil é caracterizada como do tipo *Inodorus*, onde destaca-se o melão amarelo (ou valenciano), de origem espanhola, casca amarela pouco rugosa, forma oval, polpa branca esverdeada, espessa e resistente ao transporte e armazenamento (Figura 1).<sup>20-21</sup>

O melão oriundo do mercado brasileiro é considerado como uma espécie de forte consumo a nível internacional, uma vez que cerca de 60% da produção é destinada ao mercado externo, liderando o ranking de exportação para os países da União Europeia e sendo uma das preferências do mercado de frutas do Oriente Médio.<sup>1</sup> Segundo a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2018) o Brasil ocupa a 14ª posição no ranking mundial dos países produtores de melão.<sup>4</sup> Este destaque é possível devido aos estados da região nordeste do Brasil serem responsáveis por manterem em produção cerca de 22 mil hectares de melão,

sendo essa região encarregada por aproximadamente 95% da produção de melão no país em 2018, onde contribuiu com cerca de 551.411 mil toneladas de um total de 581.478 mil toneladas de melão fresco.<sup>1,4</sup>

**Figura 1.** Melão (*Cucumis melo* L.) amarelo e sua estrutura fisiológica.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Atualmente os estados do Rio Grande do Norte e Ceará atuam como líderes na produção de melão em território brasileiro devido a fatores climáticos, como a característica semiárida da região em que se encontram, marcada pela baixa incidência de chuva, alta luminosidade e baixa umidade relativa, beneficiando o cultivo do melão e gerando frutos de qualidade a partir de boas práticas agrícolas a fim de atender a demanda do mercado.<sup>22</sup>

No entanto, mesmo com todo o desenvolvimento de tecnologias que auxiliam as práticas no campo, e com a disposição do conjunto clima-solo com características essenciais para o cultivo de qualidade do melão, este ainda sofre com problemas que acarretam a diminuição da sua produção. Dentre uma gama de percalços, as doenças ainda se destacam como um dos principais fatores capazes de diminuir a produção e gerar despesas ao fruticultor. Segundo o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2016) a produção de melão na região nordeste é afetada pela variação climática em períodos de estiagem, favorecendo o aumento da incidência de pragas e doenças, levando ao comprometimento da produção do fruto e, em consequência, aumentando os custos com agroquímicos.<sup>23-24</sup>

As doenças no melão podem ser de diferentes origens como microbianas, fisiológicas, nutricionais ou decorrentes de fatores ambientais, provocando a inibição de iniciativas empresariais de produção e exportação, dificultando a geração de emprego e renda.<sup>25</sup> Dentre as ocorrências, doenças de origem microbiana demandam maior atenção dos produtores por serem capazes de devastar hectares de plantações, podendo ser causadas por agentes patogênicos como bactérias, fungos, vírus e nematoides.<sup>26</sup> Destes, os fungos se destacam por serem responsáveis por perdas no processo de produção de diferentes culturas, principalmente



no cultivo de melão, por este possuir suscetibilidade significativa frente a fungos causadores de podridões, tanto a nível de pré-colheita quanto de pós-colheita.<sup>3</sup>

Os fungos são organismos eucarióticos pertencentes ao reino Eumycota, presentes em diferentes ecossistemas, podendo ser de diversas espécies, apresentando morfologias e tamanhos variados. Dentro de uma estimativa de mais de 1,5 milhão de espécies existentes, os fungos podem ser classificados como filamentosos, também conhecidos como saprófitos (ou bolores), quando caracterizados pelo crescimento de hifas que suportam estruturas reprodutivas sexuadas e assexuadas.<sup>27</sup>

Podridões causadas por esses fungos têm sido relatadas como sendo um dos principais fatores que afetam a produtividade e qualidade do melão em diferentes regiões, seja pela desqualificação do produto final ou pela produção de substâncias tóxicas (micotoxinas) que são capazes de afetar consideravelmente a saúde humana.<sup>3,23,28</sup> Uma das principais consequências de podridões causadas por fungos em melão é a diminuição de aproximadamente 15% do produto destinado à exportação devido a sintomas de doenças pós-colheita ao chegar ao destino final.<sup>29</sup>

A “podridão-do-pedúnculo” ou “podridão do Fusarium” é um exemplo de fitopatologia pós-colheita que surgiu em meados de 1999 no Estado do Rio Grande do Norte e que cresce em ocorrência no Brasil e em outros países. Esta doença de origem fúngica causa danos irreparáveis às culturas de melão.<sup>5</sup>

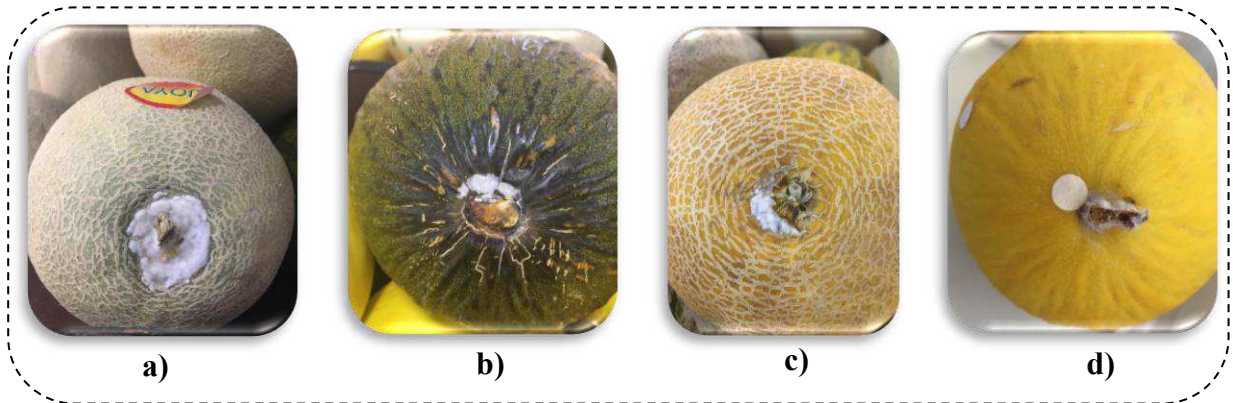
## 2.2 Podridão-do-pedúnculo em *Cucumis melo* L.

“Podridão-do-pedúnculo” ou “Podridão de Fusarium” é um exemplo de doença pós-colheita que ataca a cultura do melão, sendo causada por *Fusarium incarnatum* (= *Fusarium pallidoroseum*), um fungo filamentoso predominantemente encontrado no solo, água ou ar de regiões tropicais e subtropicais.<sup>30-32</sup> Essa doença afeta negativamente a cultura do melão levando a obtenção de frutos de baixa qualidade e, por consequência, fora dos padrões exigidos pelo mercado consumidor.<sup>30,32-33</sup>

A característica de planta rasteira conferida ao meloeiro favorece a contaminação do fruto ainda no solo, onde a infecção por espécies de *Fusarium* pode ocorrer no momento do corte do pedúnculo do melão ou por rachaduras naturais na zona de abscisão peduncular.<sup>6-7,30</sup> O fungo patógeno classificado como quiescente tem a característica de penetrar a estrutura peduncular e permanecer com metabolismo latente dentro do fruto até que este atinja a fase de senescência. Mesmo após o processo de armazenamento em câmaras frias, o patógeno continua

ativo dentro do fruto, causando lesões que podem ocorrer em qualquer parte do hospedeiro além do pedúnculo, surgindo inicialmente como uma pequena lesão encharcada seguida de intenso crescimento cottonoso branco (Figura 2).

**Figura 2.** Variedades de melão do tipo a) Cantaloupe; b) Pele de sapo; c) Gália e d) Amarelo, contaminados com fungos na região do pedúnculo com sintomas e sinais de Podridão de Fusarium.



Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Uma das principais características dos isolados causadores de podridão peduncular no melão é a de serem considerados espécies crípticas, ou seja, espécies que apresentam elevada similaridade de estruturas reprodutivas, sendo de difícil distinção a nível morfológico via microscopia óptica. A literatura tem reportado que *F. incarnatum* e *F. equiseti*, espécies crípticas pertencentes ao complexo FIESC, atuam como sendo causadoras de Podridão de Fusarium em melão ao redor do mundo, assim como na região nordeste do Brasil.<sup>34-38</sup>

Segundo Lima E. N. *et al.* (2020), uma nova linhagem no complexo de espécies FIESC foi identificada como sendo um dos agentes causais da podridão do pedúnculo em frutos de melão no nordeste do Brasil, juntamente com o primeiro relato da espécie *F. sulawense* como agente etiológico da doença em frutos de melão. A partir de estudos morfológicos e genéticos, foi possível classificar os isolados da nova linhagem como sendo pertencentes ao clado *incarnatum*, bem como os demais isolados juntamente com *F. sulawense* no clado *equiseti*.<sup>5</sup>

Dentre as principais desvantagens no processo de controle da Podridão de Fusarium destaca-se a não possibilidade de visualização de sintomas ou sinais na superfície do fruto antes da exportação, fato que não contribui para a diagnose precoce uma vez que a doença se desenvolve a partir de condições favoráveis de temperatura e umidade, encontradas normalmente durante o armazenamento e transporte.<sup>6,39-40</sup> Por consequência, o melão chega ao

destino final em condições inaptas ao mercado consumidor.

Por outro lado, a característica de espécies crípticas causadoras da doença dificulta ainda mais o processo de identificação dos agentes causais, principalmente de espécies do gênero *Fusarium*, por ser um gênero detentor de uma taxonomia complexa.<sup>41</sup> Assim, a partir da classificação de *Fusarium* spp. como sendo espécies difíceis de serem identificadas por métodos convencionais, surge a necessidade do uso de métodos rápidos e eficientes de identificação dos isolados responsáveis por doenças severas, como a Podridão de Fusarium.<sup>41</sup>

### 2.3 Identificação de fitopatógenos no setor agrícola

No contexto que envolve a manutenção da qualidade de frutas suscetíveis a infecção por patógenos que causam podridão, é de grande valia o interesse pelo uso e desenvolvimento de métodos de identificação de tais microrganismos, para que assim seja possível a implementação de protocolos capazes de manter a integridade da qualidade do produto a nível de mercado externo e interno. Dentro desse viés, diversas metodologias foram desenvolvidas e são atualmente empregadas na identificação de patógenos causadores de doenças em plantas, frutos e diversos outros produtos de interesse agrícola.<sup>9</sup>

Dentre os métodos mais comumente utilizados na análise e identificação de fungos filamentosos estão os métodos que envolvem a análise de características morfológicas e fenotípicas, bem como métodos moleculares capazes de diferenciar os fungos a partir do uso da reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para amplificação de regiões no DNA microbiano consideradas como código de barras na identificação filogenética de fungos.<sup>10-11</sup>

Para métodos baseados na análise da morfologia de fungos fitopatógenos, ocorre primeiramente a coleta e cultivo do fungo em meios de cultura sólidos específicos, responsáveis por disponibilizar nutrientes necessários para o crescimento do fungo em condições controladas e padronizadas.<sup>42</sup> Em seguida, com auxílio de microscópio óptico e mão de obra altamente especializada, são realizadas análises de estruturas de reprodução como conídios e conidióforos, ascos, ascósporos etc.

Porém, a identificação a partir do fenótipo apresenta algumas desvantagens, como longo tempo atrelado aos procedimentos necessários, podendo durar de 2 a 14 dias, a depender de como o patógeno se desenvolve em condições laboratoriais. Além disso, este método clássico está propenso a grandes chances de erro por parte do analista, levando geralmente a não identificação completa do isolado ou a uma identificação ambígua.<sup>43-44</sup>

Na análise por PCR, as reações envolvidas são responsáveis por amplificar uma pequena região do genoma dos microrganismos, como supracitado, a partir dos iniciadores de reação denominados de *primers*. Esses *primers* são moléculas curtas e específicas de DNA que são projetadas para serem responsáveis por se ligar a regiões específicas do DNA do microrganismo, regiões essas que são amplificadas e trazem a informação filogenética capaz de categorizá-lo a nível de gênero e espécie.<sup>45</sup>

Mesmo com toda a sofisticação e sensibilidade do método de identificação e diferenciação de fungos e outros organismos por PCR, esta técnica traz consigo desvantagens assim como os métodos clássicos. Ainda que, a análise por PCR mais sofisticada, conhecida como PCR em tempo real (RT-PCR, do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*), possa ser mais rápida em torno de 2 a 3 horas, o procedimento como um todo demanda mais recursos e mão de obra técnica experiente. Nesse caso, a mão de obra chega a ser ainda mais específica por necessitar de conhecimento genômico para o desenho dos iniciadores de reações, os *primers*, pois apenas a partir dessa etapa que é possível realizar a amplificação correta da região específica do microrganismo em estudo.<sup>45</sup>

Apesar da grande difusão do uso da técnica de PCR no setor agrícola, métodos que envolvem o uso da técnica de espectrometria de massas na detecção, identificação e diferenciação de microrganismos, principalmente fungos fitopatógenos, vêm tomando grandes proporções em aplicações de commodities importantes.

## 2.4 Espectrometria de massas na análise de microrganismos fitopatógenos

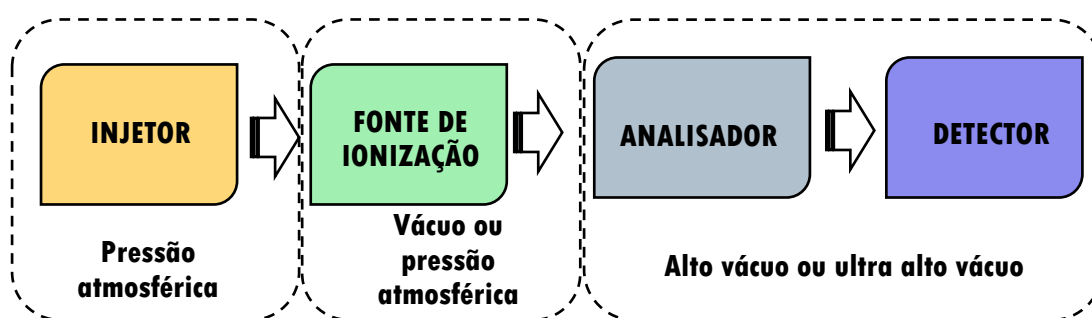
Desde o fim do século XIX, a espectrometria de massas, ou somente MS (do inglês, *Mass Spectrometry*), vem se consolidando em diversos ramos da pesquisa científica a partir da aplicação de seus princípios baseados na medição precisa da massa de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos.

A espectrometria de massas teve início a partir de experimentos de J. J. Thomson (Prêmio Nobel de Física em 1906), pela descoberta do elétron, e por experimentos de Aston (Prêmio Nobel de Química em 1922) envolvendo medição das massas de átomos (isótopos) carregados (íons) no estado gasoso a partir de desvios específicos desses íons.<sup>46-47</sup> Os desvios característicos gerados pela aplicação de campos elétricos e magnéticos para cada uma das partículas em estudo, segundo Aston, tinham relação direta com a carga e massa da partícula ( $e/m$ ), hoje conhecida como relação massa/carga ( $m/z$ ).<sup>46</sup>

Atualmente a MS pode ser definida como uma técnica responsável pela medição da

relação massa/carga de átomos e moléculas, de forma precisa, a partir da ionização das espécies em fase gasosa a fim de caracterizá-las a nível de estrutura ou propriedades físico-químicas.<sup>48</sup> As substâncias analisadas podem ser de baixa, média ou alta polaridade, podendo ser orgânicas ou inorgânicas. Um esquema básico de um espectrômetro de massas ocorre a partir da inserção da amostra pelo injetor, ocorrendo posteriormente a geração de íons na fase gasosa pela fonte de ionização. Os íons são transferidos para o analisador onde são separados de acordo com a razão  $m/z$  e, posteriormente, encaminhados para um detector.<sup>49</sup> A Figura 3 ilustra os principais componentes de um espectrômetro de massas.

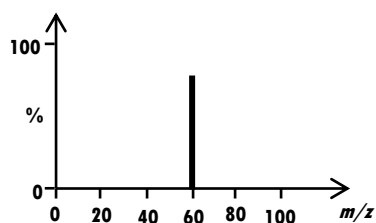
**Figura 3.** Componentes básicos de um espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptada de Gross, 2017.<sup>49</sup>

O resultado da análise gera o que conhecemos como espectro de massas, que pode ser definido com uma representação gráfica, bidimensional, da abundância relativa com que o íon analisado foi detectado (eixo  $y$ ) versus a relação  $m/z$  medida para o íon em análise (eixo  $x$ ). A Figura 4 ilustra um espectro de massas para um íon hipotético (H).

**Figura 4.** Representação de um espectro de massas de um íon hipotético (H) de  $m/z$  60.



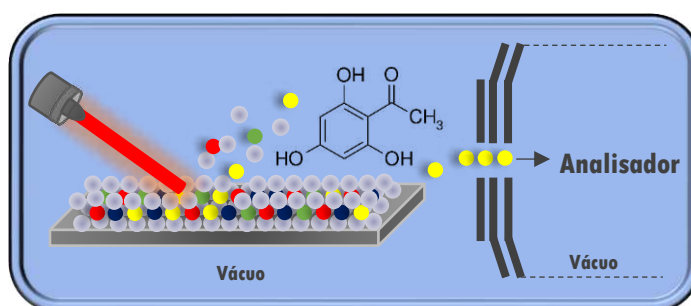
Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Desde o desenvolvimento de técnicas de ionização branda, como ionização por

nebulização, ESI (do inglês, *Electrospray Ionization*) e dessorção/ionização assistida por matriz, MALDI (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*), foi possível a realização de análises de biomoléculas de alta massa molecular a partir de espectrometria de massas. Esses avanços nas técnicas de ionização combinados à sensibilidade aprimorada e alta precisão e reprodutibilidade, inseriram a espectrometria de massas em diversas áreas da biotecnologia.<sup>50</sup>

O princípio da técnica de MALDI baseia-se na mistura da amostra a ser analisada com uma substância, denominada matriz, capaz de absorver a energia de um pulso de laser irradiado sobre a amostra. A absorção da energia por parte da matriz favorece a transferência de parte da energia do pulso de laser para a amostra, obtendo-se uma ionização branda dos compostos presentes na amostra e sua consequente dessorção, gerando assim íons no estado gasoso.<sup>45</sup> A Figura 5 ilustra um esquema básico da técnica de MALDI-MS. As esferas em cinza representam a matriz, e as esferas coloridas representam os compostos presentes na amostra.

**Figura 5.** Esquema geral para ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI).



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Inúmeros trabalhos já relataram o uso da espectrometria de massas por MALDI na identificação de diversos tipos de microrganismos. Seu uso abrange o ramo da medicina para a identificação de patógenos humanos<sup>51-53</sup>, na indústria de bebidas para o controle de qualidade microbiológico<sup>45</sup>, bem como no setor agrícola para a detecção, identificação e diferenciação de fungos fitopatógenos de diversos gêneros e espécies.<sup>54-56</sup> O fluxo de trabalho para a identificação desses microrganismos segue um padrão geral característico, onde primeiro é realizado o crescimento dos isolados, a extração de substâncias a serem analisadas e que serão responsáveis pela diferenciação dos isolados, seguida de análise por MALDI-MS e interpretação dos dados.

A obtenção dos espectros padrões para a classe de substâncias extraída de um

isolado microbiano, onde geralmente são proteínas/peptídeos, fornecem um resultado conhecido como *fingerprint* ou “impressão digital”. Um *fingerprint* pode ser definido como um padrão espectral característico de uma classe de substâncias oriundas de um microrganismo, no qual contém valores de  $m/z$  considerados como sendo padrões (biomarcadores) que caracterizam o gênero ou espécie do microrganismo em estudo. Este *fingerprint* pode ainda ser inserido em um banco de dados e ser usado como um padrão de comparação para a identificação de isolados desconhecidos.<sup>57</sup>

A utilização de padrões espectrais na identificação de fungos fitopatógenos pode ser exemplificada por trabalhos de Chalupová, J. *et al.*<sup>58</sup>, onde um banco de dados de perfis de proteínas e peptídeos de diversos microrganismos de referência foi criado visando a utilização na identificação de fitopatógenos presentes no campo. Na busca pelo controle de pragas quarentenárias, Tao, J. *et al.*<sup>59</sup> reportaram a construção de um banco de dados de *fingerprint* proteico obtidos por MALDI-MS, especificamente para identificação de fungos do gênero *Verticillium* causador de doenças em commodities como tomate e algodão.

Aplicações de MALDI-MS na identificação rápida e reprodutível de fungos filamentosos patógenos de frutas também são relatadas na literatura a partir da análise do perfil proteico dos isolados. Com base nos estudos de Horká, M. *et al.*<sup>60</sup>, foi possível obter um método de caracterização, por MALDI-MS, de isolados do gênero *Monilinia* responsáveis por grandes perdas no mercado de frutas como pera, maçã, pêssego e damasco.

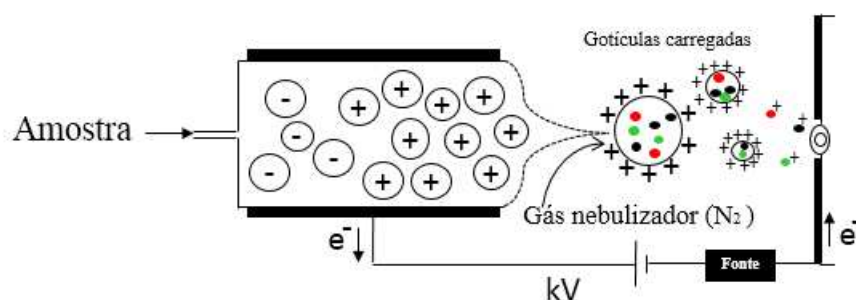
Apesar da grande maioria dos estudos por MALDI-MS focarem na classe das proteínas/peptídeos para a identificação de fungos, os trabalhos iniciais para a identificação de microrganismos se deram com o estudo de uma outra classe de moléculas, os lipídios.<sup>61</sup> Poucos são os trabalhos que envolvem a análise do perfil de lipídios na diferenciação e caracterização de isolados que causam danos no sistema de produção agrícola, mesmo essa classe de substância sendo considerada um potencial alvo para obtenção de perfis característicos únicos dos organismos em estudo.<sup>62</sup>

A técnica de ESI, desenvolvida por volta dos anos 1980, surgiu em paralelo com a técnica de MALDI, também sendo considerada como uma técnica de ionização branda.<sup>63-64</sup> O mecanismo de obtenção de íons em fase gasosa em ESI inicia-se pela chegada do fluxo de amostra, solubilizada em solvente orgânico polar, em um fino capilar metálico da fonte de ionização. Quando em solventes polares próticos, os analitos participam de reações ácido-base gerando íons a partir das espécies moleculares, onde esses íons podem ser protonados (representados por  $[M+H]^+$ ), desprotonados (representados por  $[M-H]^-$ ), cationizados (representados por  $[M+Na]^+$ , ou outro metal livre em solução capaz de se coordenar) ou

anionizados (representados por  $[M+Cl]^-$ ).<sup>65</sup>

Após chegada da solução no capilar, ocorre a aplicação de uma diferença de potencial no capilar metálico, na qual é responsável pelo processo de migração das cargas das espécies presentes em solução para a superfície do líquido (interface metal-solução). Com influência do fluxo da amostra, das forças eletrostáticas presentes na ponta do capilar e de um fluxo de gás nebulizador, ocorre a formação do cone de Taylor, no qual culmina em um fino spray de gotículas do solvente contendo os analitos carregados.<sup>66</sup> Um fluxo de gás de secagem é aplicado a fim de diminuir a quantidade de solvente presente nas gotas carregadas. Quando grande parte do solvente presente nas gotas diminui, ocorre um aumento da repulsão coulômbica entre os íons que estão solvatados, culminando em uma explosão coulômbica. Os íons então são expelidos do restante do solvente que o solvata passando à fase gasosa de forma individual por dois mecanismos, podendo ser expulso da gota (conhecido como *chain ejection model*, CEM) ou a partir da dessolvatação consequente da secagem da gota (conhecido como *charge residual model*, CRM).<sup>66</sup> Após esse processo, os íons são aspirados para o analisador de massas. A Figura 6, ilustra um esquema geral de uma fonte de ESI.

**Figura 6.** Esquema geral de uma fonte de ionização por electrospray (ESI)



Fonte: Adaptado de KONERMANN, L. *et al.*<sup>69</sup>

A capacidade da análise por ESI-MS de fornecer espectros ricos em informação molecular, de suspensões de células bacterianas, foi relatada pela primeira vez em 1999<sup>67</sup>, onde demonstrou ser útil na discriminação de um grande número de microrganismos.<sup>68</sup> A ionização por ESI a partir da infusão direta da amostra é uma abordagem analítica de alto rendimento em que misturas complexas são resolvidas em componentes, íons, que diferem em massa sem o uso de separação cromatográfica.<sup>69</sup> Os metabólitos são ionizados, normalmente por electrospray ou via ionização química a pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric-*



*pressure Chemical Ionization*), e os perfis de intensidade de íons resultantes são analisados por análise estatística multivariada, que permite a classificação e agrupamento dos íons detectados de acordo com o perfil de cada microrganismo em estudo.

A ausência de cromatografia prévia à análise por ESI-MS é vantajosa, devido aos menores tempos de execução, tornando-a uma técnica atraente. No entanto, assim como todas as técnicas, a análise por ESI-MS tem suas limitações. Isômeros com a mesma massa exata não podem ser distinguidos sem separação prévia. Além disso, o uso de ESI dará origem a problemas de supressão de íons, esse fenômeno pode ocorrer durante a ionização de misturas complexas, levando a ionização não eficiente dos componentes e uma diminuição significativa na resposta do perfil de substâncias analisadas.

Um dos primeiros exemplos que descreve o uso de ESI-MS no estudo de fungos foi apresentado por Smedsgaard e Frivad, em 1996.<sup>70</sup> Os autores extraíram os metabólitos de 10 espécies diferentes de fungos do gênero *Penicillium* crescidos em Ágar Batata Dextrose. Os extratos foram infundidos em um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo e ionizados por ESI em modo positivo. O método foi bem-sucedido, discriminando as diferentes cepas de *Penicillium* com base no *fingerprint* dos metabólitos secundários por ESI-MS. Esse trabalho também mostrou como o método pode ser usado para perfis qualitativos de extratos de cultura de fungos.

## **2.5 *Fingerprint* lipídico na análise de fitopatógenos**

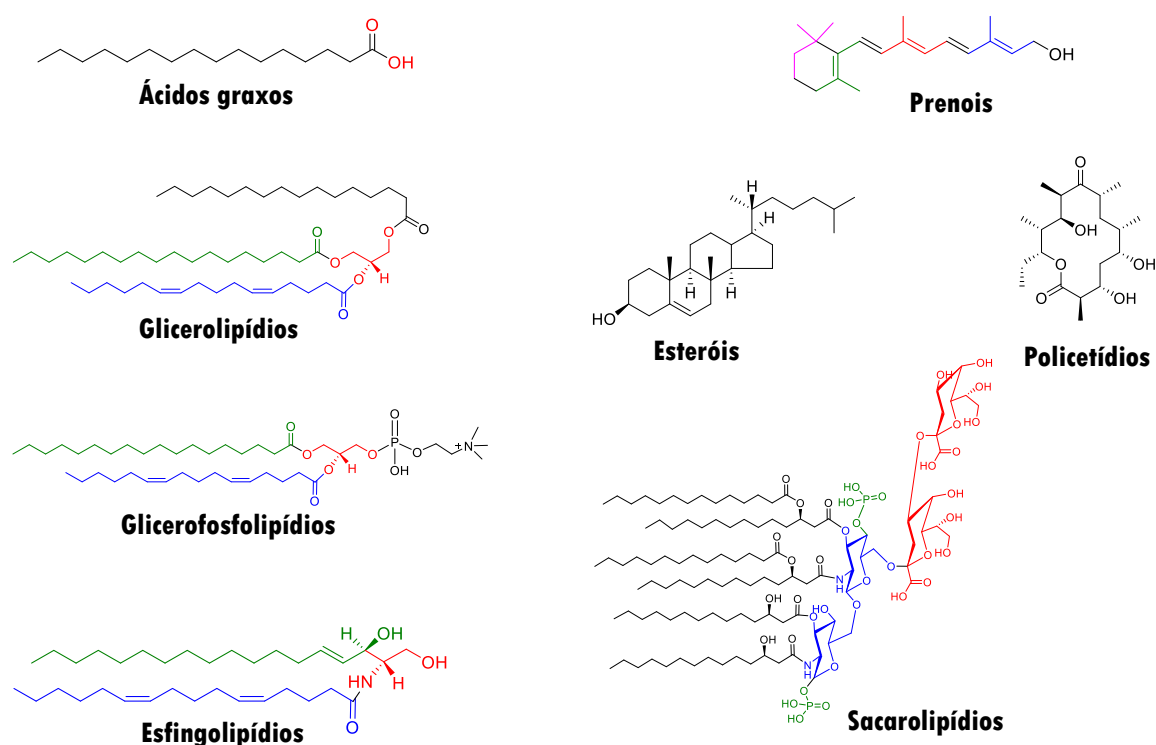
A análise do *fingerprint* lipídico a partir da espectrometria de massas para identificação de microrganismos foi primeiramente relatada por Anhalt e Fenselau (1975), onde a partir da inserção do conteúdo bacteriano liofilizado na fonte de ionização do espectrômetro de massas à uma temperatura em torno de 300°C, foi possível obter um espectro do conteúdo de ácidos graxos e ubiquinonas característicos para as cepas analisadas.<sup>71</sup> A partir desses experimentos foi possível concluir que o perfil de lipídios tem grande potencial de aplicação na diferenciação de microrganismos não só a nível de gênero, mas também a nível de espécie.

Os lipídios são resultados do metabolismo primário dos organismos eucarióticos, sendo responsáveis pela formação da bicamada lipídica que envolve todo o conteúdo celular, denominada membrana plasmática. Essa bicamada lipídica também está presente nas delimitações de regiões especializadas dentro das células, as organelas. Ou seja, os lipídios possuem função vital dentro das células, sendo responsáveis pela manutenção da estrutura, atuando como moléculas sinalizadoras de processos bioquímicos e, como responsáveis pelo

armazenamento de energia.<sup>72</sup>

Para os organismos fúngicos os lipídios podem estar envolvidos em funções bem mais específicas, como no desenvolvimento das hifas durante o crescimento, na diferenciação entre fungos e em seu processo de patogênese.<sup>73</sup> De uma maneira geral é possível definir os lipídios como sendo moléculas hidrofóbicas ou anfipáticas que podem ser originadas inteiramente ou em parte por condensações de carbânios de tioésteres podendo gerar (Figura 7) ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, sacarolipídios e policetídeos. Reações baseadas em condensações de unidades de isopreno também podem gerar prenóis e esteróis, completando o sistema de classificação de lipídios adotado internacionalmente pela comunidade científica através do consórcio LIPID MAPS®.<sup>74</sup>

**Figura 7.** Representação das estruturas químicas de oito categorias de lipídios.



Fonte: Autor (Adaptado de HOLČAPEK, M.; LIEBISCH, G.; EKROOS, K., 2018)<sup>14</sup>.

Para as análises de *fingerprint* lipídico, são necessários métodos de extração específicos para a obtenção do que se entende por lipidoma, ou seja, a maior quantidade possível de lipídios que pode representar um estado fenotípico do organismo em estudo.<sup>14</sup> Lipídios oriundos de organismos eucarióticos, como os fungos filamentosos, são comumente extraídos por dois métodos: o método de Bligh e Dyer ou o método de Foch.<sup>75-76</sup> Esses métodos

baseiam-se em extrações líquido-líquido utilizando solventes orgânicos como água, metanol, clorofórmio (método Bligh Dyer) e solução salina (método de Folch). O método de extração descrito por Bligh e Dyer possui a vantagem da formação de uma solução trifásica a partir da mistura de água, metanol e clorofórmio, favorecendo a separação da fase orgânica rica em lipídios extraídos.<sup>77</sup>

Após extração dos lipídios de interesse, estes podem ser analisados via espectrometria de massas assim como as proteínas, utilizando uma fonte de ionização capaz de gerar íons das moléculas em fase gasosa para que sejam posteriormente analisados. Porém, além da técnica de MALDI para a análise de lipídios, também pode-se usar a ESI, na qual possui diferenças e vantagens em seu mecanismo de ionização em relação a técnica de MALDI.<sup>14</sup>

A ESI é considerada uma técnica poderosa para análise de lipídios, visto que é capaz de analisar uma ampla faixa de classes de lipídios com alta sensibilidade, além das informações estruturais que são fornecidas devido sua ionização branda, podendo gerar íons no modo positivo ( $[M+H]^+$ ) e negativo ( $[M-H]^-$ ) e, ainda, sendo possível de ser utilizada em acoplamento ou não com outras técnicas, como exemplo de sistemas cromatográficos.<sup>14,64,78</sup> As amostras de lipídios, por exemplo, podem ser injetadas diretamente em um espectrômetro de massas, seja via sistema de *looping* ou a partir de um injetor automático com auxílio do sistema de bombas de um cromatógrafo à líquido. Ao tipo de análise que utiliza diretamente o *looping* do espectrômetro de massas dá-se o nome de Espectrometria de Massas por Injeção Direta (DI-MS, do inglês *Direct Infusion Mass Spectrometry*). Já ao tipo de análise que utiliza um injetor automático e o sistema de bombas de um cromatógrafo, dá-se o nome de Espectrometria de Massas de Injeção por Fluxo (FI-MS, do inglês *Flow Injection Mass Spectrometry*).<sup>79</sup>

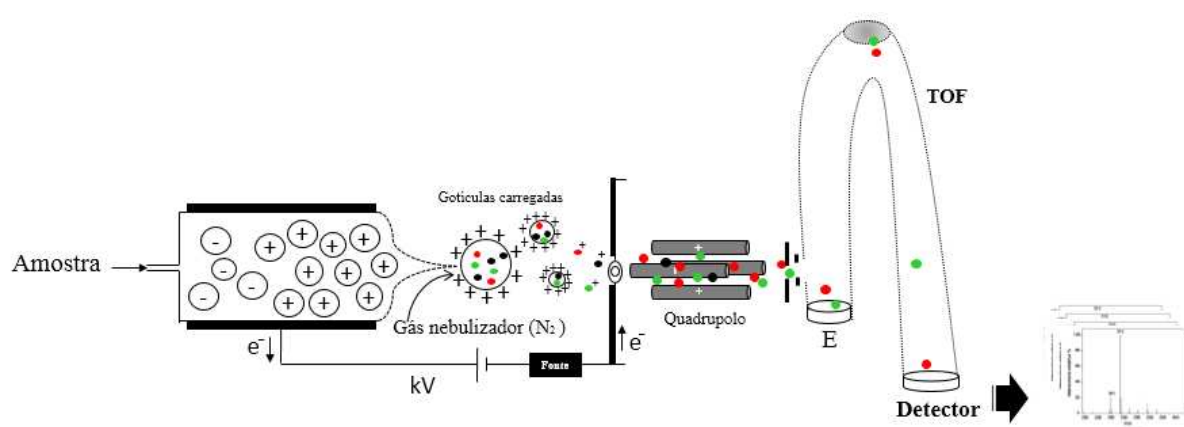
Quando a ESI é acoplada a analisadores de massas de alta resolução, a análise de lipídios passa a ter um poder de sensibilidade ainda maior, visto que analisadores híbridos possuem alta precisão de massa. Analisadores híbridos do tipo quadrupolo-tempo de voo (QTOF, do inglês *Quadrupole Time-of-Flight*), são exemplos de sucesso na análise de lipídios, devido ao seu alto poder de resolução de massa.<sup>80</sup>

O analisador do tipo QTOF baseia-se primeiramente na passagem da corrente de íons pelo analisador quadruplo, no qual é composto por quatro barras cilíndricas responsáveis pela filtragem da corrente de íons de acordo com as razões  $m/z$  específicas, a depender da escolha do analista. A escolha da faixa de massa implica na geração de um campo elétrico entre as barras que é dependente da razão  $m/z$ . Caso os íons estejam na faixa de massa escolhida pelo analista, estes irão passar pelo quadrupolo sem sofrer desvios, chegando, assim, ao analisador TOF. Se um íon estiver fora da faixa de massa a ser analisada, este terá uma oscilação diferente

dos demais, se chocando com as paredes do quadrupolo e sendo retirado de dentro do aparelho por um sistema de bombas de vácuo.<sup>81</sup>

No analisador TOF, os íons são acelerados a partir da aplicação de um campo elétrico, favorecendo o ganho de velocidade dentro do tubo de voo, sendo essa velocidade inversamente proporcional a massa dos íons. Dessa forma os íons de massas mais baixas chegam mais rapidamente no detector, e o inverso ocorre para íons de massas mais altas.<sup>81</sup> A Figura 8 ilustra um analisador do tipo QTOF acoplado a uma fonte de ionização do tipo ESI.

**Figura 8.** Esquema geral de um sistema ESI-QTOF-MS.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Mesmo com todo o potencial envolvendo a análise de lipídios por ESI acoplada a sistemas de analisadores híbridos, e sabendo de todo o potencial desse conjunto de ferramentas para a identificação de microrganismos, ainda assim poucos são os trabalhos que reportam o uso da ESI aliada a analisadores híbridos na identificação e diferenciação de fungos fitopatogênicos. A análise por MALDI, continua a ser mais utilizada na diferenciação de isolados fúngicos que causam grandes perdas ao mercado da fruticultura. Como exemplo, podemos citar Dos Santos, F. N. *et al.* (2017) que mostrou uma abordagem por *fingerprint* de lipídios e proteínas na identificação e diferenciação de fitopatogênicos dos gêneros *Moniliophthora*, *Ceratocystis* e *Phytophthora* responsáveis por grandes perdas no sistema de produção de cacau.<sup>12</sup> Outro exemplo desse tipo de estudo é reportado por Rocha, D. F. O. *et al.* (2017), que a partir de fitopatogênicos da banana mostrou que é possível o uso do perfil lipídico para diferenciação de isolados de forma interespecífica, bem como no estudo da relação patógeno-hospedeiro.<sup>13</sup> Até o presente momento a técnica de MALDI se destaca como pioneira no processo de diferenciação de fungos do gênero *Fusarium* pertencentes a complexos de espécies,

como reportado por Wigmann e colaboradores (2019).

## 2.6 Análise estatística

A quantidade de dados obtidos por espectrometria de massas é de grande dimensão a depender do estudo em que se propõe. Dessa forma, sabendo que uma quantidade massiva de dados é obtida em análises de identificação de microrganismos, métodos de análise estatística são aplicados aos dados para a filtragem das informações relevantes. No processo de diferenciação de fungos isolados a partir de *fingerprint* lipídico, sem uso de bancos de dados de isolados padrões, por exemplo, métodos de análise multivariada podem ser empregados para a verificação de padrões de classificação, baseados em íons de  $m/z$  que se mostram estatisticamente significantes. Assim, métodos quimiométricos de análise, como Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), acompanhada por análise de variáveis importantes de projeção (VIP, do inglês *Variable Importance Projection*), podem ser utilizadas para a discriminação das variáveis mais importantes na classificação das amostras, possuindo uma característica específica ou não, como por exemplo, discriminar um isolado fúngico de outro pela presença de lipídios característicos do gênero ou espécie.<sup>12</sup> Bem como, o uso de análises univariadas, como ANOVA one-way, onde é possível salientar que determinadas variáveis do estudo são responsáveis pela discriminação de amostras com grande significância estatística.

### 2.6.1 Análise multivariada e métodos supervisionados

A utilização de técnicas como a espectrometria de massas, capaz de gerar um grande volume de dados contendo um número elevado de variáveis (íons de diferentes razões  $m/z$  com diferentes abundâncias em diferentes grupos de amostras), acaba por requerer a aplicação de métodos sofisticados de análises estatísticas capazes de lidar com a necessidade de correlacionar a importância das principais variáveis presentes nas amostras com a pergunta biológica. Assim, a possibilidade de manter a integridade das variações biológicas em um estudo, acompanhada da capacidade de redimensionamento do conjunto de dados com o objetivo de gerar informações sem redundância e com elevada confiabilidade, permitiu que a quimiometria trouxesse luz a análise de dados complexos.<sup>83</sup>

Dentro das diferentes possibilidades de modelar uma quantidade massiva de dados na busca por reconhecimento de padrões usando ferramentas quimiométricas, têm-se métodos não-

supervisionados e supervisionados. Métodos não-supervisionados são usualmente utilizados para explorar toda a estrutura dos dados com objetivo de encontrar uma tendência de agrupamentos baseando-se nas variáveis que compõe o conjunto de amostras após um redimensionamento dos dados originais. Como exemplo de métodos amplamente utilizados têm-se os métodos por Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*).<sup>83</sup>

Diferentemente de métodos não-supervisionados, os métodos supervisionados aplicam-se a um conjunto de dados no qual se tem uma hipótese que delinea o estudo, sendo possível realizar predições de diferentes características, como a classificação de amostras em diferentes grupos a partir da relação existente com a composição das suas variáveis.<sup>84</sup> Esses métodos proporcionam a obtenção de modelos treinados a partir de dados já conhecidos, como por exemplo, o treinamento de amostras de melão infectado e saudável para posterior predição de amostras testes. Diferentes métodos de classificação podem ser utilizados, como métodos lineares, a exemplo do método por PLS-DA, bem como análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA, do inglês *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*).<sup>84-85</sup> De forma geral, os métodos supervisionados são usados para a geração de modelos de predição a partir de amostras que possuam características conhecidas (exemplo: microorganismo A e microorganismo B), e a partir disso ser possível realizar a predição de amostras desconhecidas.

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) utiliza da técnica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para a construção dos modelos de classificação. A diferença entre as duas análises é o dado de entrada na qual se quer relacionar com a resposta instrumental, sendo para a PLS a utilização de uma variável contínua (de caráter quantitativo) e para a PLS-DA a utilização de uma variável categórica (uma atribuição de classe A ou B).<sup>83,85</sup> Em uma aplicação com dados de espectrometria de massas e construção de um modelo por PLS-DA, ocorre a busca da relação entre uma matriz X (valores de  $m/z$  nas linhas e abundâncias relativas nas colunas) com uma matriz Y (valores 0 e 1 que representam as classificações A e B já conhecidas, como saudável e infectado, por exemplo). Como consequência da combinação linear das variáveis da matriz X (que estão diretamente relacionadas a matriz Y) têm-se as variáveis latentes que favorecem uma redução na dimensionalidade dos dados em um espaço onde a separação entre as classes seja maximizada.

Por fim, esse método permite a extração das informações mais relevantes dentro de um conjunto de dados complexo, sendo possível indicar, por exemplo, se amostras em estudo estão associadas a classe A ou B com base na sua composição/perfil metabólico.

Ainda dentro da análise por PLS-DA existem formas de selecionar, dentre tantas variáveis importantes possíveis para a classificação de grupos de amostras, quais variáveis possuem uma maior contribuição dentro do conjunto de dados usados para a construção do modelo. Essa métrica é conhecida como Variáveis Importantes na Projeção (*VIP-scores* ou VIP, do inglês *Variable Importance in Projection*), entendida como um dos métodos de seleção de variáveis mais populares e úteis na compreensão das variáveis preditoras da matriz X que melhor explicam a variância na matriz Y.<sup>86-87</sup>

Já em termos de avaliação da qualidade do modelo construído, métodos de validação são aplicados buscando entender a confiabilidade da capacidade preditiva com base nas amostras usadas. A validação cruzada é uma das formas de se realizar essa verificação, utilizando parte das amostras para a construção do modelo (etapa 1) e, posteriormente, utilizando as amostras não utilizadas na construção inicial para realizar a predição (etapa 2).<sup>85</sup> Esse processo é repetido até que todas as amostras tenham passado pelas duas etapas. Um dos tipos de validação cruzada existentes é conhecido como venezianas (do inglês, *venetian blinds*), onde o conjunto de amostras é dividido em intervalos igualmente espaçados para a realização das etapas 1 e 2 descritas acima.<sup>88</sup> Após cada ciclo de previsão são calculados erros para o conjunto teste, que ao serem combinado ao final de toda a validação, geram o que conhecemos como raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada ou RMSECV (do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*), considerado uma das figuras de mérito importantes para validação do modelo. Outros parâmetros utilizados no processo de avaliação do modelo construído e que estão relacionadas à seletividade do método analítico são as figuras de mérito qualitativas, como sensibilidade (SEM, habilidade de detecção de amostras verdadeiramente positivas) e especificidade (ou seletividade) (SPE, habilidade de detecção de amostras verdadeiramente negativas).<sup>88</sup> Essas figuras de mérito levam em consideração a relação entre os valores de falso positivo (amostras que não pertencem à classe e foram classificadas erroneamente) e falso negativo (amostras que pertencem à classe e não foram classificadas erroneamente).

### 2.6.2 Análise univariada

Diferentemente de métodos multivariados, onde utilizam covariâncias ou correlações que refletem a extensão das relações entre as variáveis contidas no conjunto de dados, os métodos univariados se concentram exclusivamente na média e na variância de cada variável separadamente. Dentro das análises univariadas são buscadas as variáveis que apresentam um efeito significativo em termos das diferenças, por exemplo, das médias das abundâncias de metabólitos entre dois grupos avaliados. Assim, análises por métodos univariados podem corroborar com resultados obtidos por métodos multivariados.<sup>88</sup> Os métodos univariados incluem testes estatísticos que visam comparar diferentes conjuntos de amostras, como o teste *t* de *Student* ou ANOVA (análise de variância).

A análise por ANOVA fornece uma avaliação da significância estatística envolvendo três variáveis individuais, através de testes independentes, diferindo do teste *t* de *Student*, que envolve a análise e comparação de duas variáveis. Uma das variações da ANOVA é conhecida como “one-way” ou unidirecional, sendo entendido como um teste estatístico orientado para determinar se os dados de grupos diferentes possuem uma média comum.<sup>89</sup>

A partir de todo esse preambulo informacional, pode-se perceber inúmeras possibilidades através do uso de sistemas rápidos de injeção de amostra utilizando a ESI hifenadas a analisadores híbridos na busca por perfis lipídicos característicos de fungos causadores de podridão-do-pedúnculo em melão. De forma complementar, diferentes métodos estatísticos estão disponíveis como uma ferramenta indispensável na correta tomada de decisão frente ao volume de dados adquiridos por espectrometria de massas. Desta maneira, este trabalho buscou trazer como principal proposta, o estudo piloto do uso da ESI-QTOF-MS em uma abordagem de infusão via FI-MS, para auxiliar no processo de diagnose da podridão do pedúnculo no melão, causada por fungos fitopatógenos do complexo FIESC. A partir da obtenção do *fingerprint* lipídico desses fitopatógenos, bem como de amostras de melão sadio, cogitou-se a construção de um modelo de classificação baseado em análises multivariada e univariada capaz de identificar biomarcadores lipídicos da diferenciação das espécies dos fungos e diferenciação destes frente a amostras de melão sadio.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver um estudo de *fingerprint* lipídico utilizando a técnica de espectrometria de massas por injeção de fluxo para detectar e diferenciar o perfil lipídico de fitopatógenos do gênero *Fusarium* spp., quando comparados entre si e frente ao perfil lipídico de melão amarelo (*Cucumis melo* L.).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil lipídico de espécies de fungos do gênero *Fusarium* de morfotipo *esquiseti* e *incarnatum* isoladas de melões contaminados, e o perfil lipídico de melões sadios;
- Diferenciar o perfil lipídico entre as espécies de fungos e, entre estas espécies e o perfil lipídico de melão sadio, a partir de métodos estatísticos multivariados e análises univariadas.
- Identificar putativamente os biomarcadores responsáveis pela distinção entre as espécies de fungos com o auxílio de bancos de dados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e crescimento dos isolados de fitopatógenos

Dois isolados de fungos do gênero *Fusarium*, codificados como LPPC072 e LPPC074, fazem parte da coleção do Laboratório de Patologia Pós-Colheita da Embrapa Agroindústria Tropical em Fortaleza, Ceará, Brasil. Os isolados foram obtidos nas safras de 2009, 2013 e 2015 de frutos de melão com sintomas típicos de podridão do pedúnculo, nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Ambos os isolados são registrados no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen) reconhecido pelo Ministério do Meio Ambiente. Os isolados LPPC074 e LPPC072 foram previamente estudados e caracterizados a partir da morfologia e estudos filogenéticos com duas regiões gênicas (TEF1 e RPB2), sendo o isolado LPPC072 pertencente ao clado Incarnatum e o isolado LPPC074 agrupado ao clado Equiseti.<sup>19</sup>

As cepas foram cultivadas em placas de Petri, em meio de BDA (Batata Dextrose Ágar, 24 g L<sup>-1</sup>), durante 14 dias sob a temperatura de 28 ± 2 °C, na ausência de luz (protocolo realizado pelo Laboratório de Patologia e Pós-colheita, pertencente a Embrapa Agroindústria tropical, Ceará, Brasil).

### 4.2 Obtenção do fruto (*Cucumis melo* L.) sadio

O melão amarelo foi obtido na Fazenda Agrícola, em Mossoró – Rio Grande do Norte, Brasil (04°54'09.4'' S, 37°21'59.9'' W), sendo submetido a processos de inspeção fitossanitária para a certificação de não contaminação por patógenos, sendo enquadrado como sadio mediante protocolos padrões determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e processados pelo Laboratório de Patologia e Pós-colheita.<sup>5</sup>

### 4.3 Extração de lipídios para análise em ESI-QTOF-MS

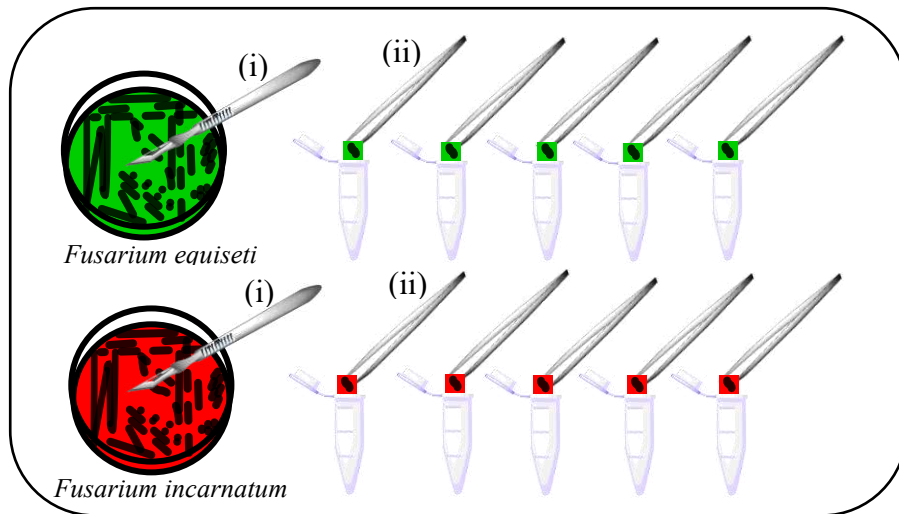
#### 4.3.1 Amostragem

O micélio dos fungos, assim como representado na Figura 9, foi obtido diretamente da cultura pura, sem o meio de cultura, a partir de um corte com material esterilizado, assim como demonstrado no item (i). O material biológico foi armazenado em frascos tipo eppendorf (ii) para a posterior extração dos lipídios, seguindo uma adaptação da metodologia descrita por Bligh e Dyer.<sup>76</sup>

Para a extração dos lipídios do fruto, foram coletadas 5 réplicas biológicas da polpa do fruto na região do pedúnculo de um melão sadio, com auxílio de um perfurador (i), assim como

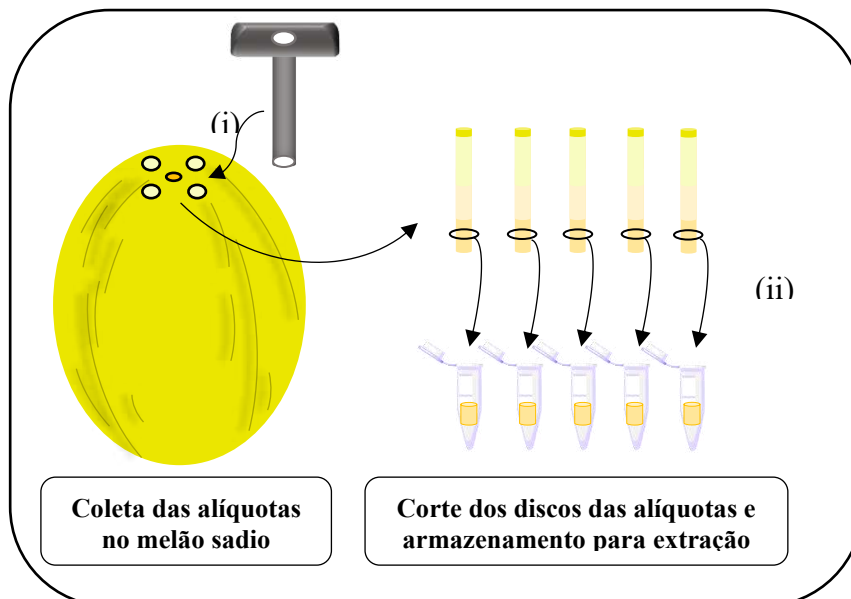
demonstrado na Figura 10. Os discos da polpa, cortados com material esterilizado, foram armazenados em frascos tipo eppendorf, assim como demonstrado no item (ii) na Figura 10, para a posterior extração dos lipídios.

**Figura 9.** Coleta de alíquota do micélio dos isolados LPPC072 - *F. sulawense* (morfortipo: *F. equiseti*) e LPPC074 - *Fusarium* sp. (morfortipo: *F. incarnatum*) para a posterior extração de lipídios totais pelo método Bligh e Dyer.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

**Figura 10.** Método de coleta utilizado para obtenção de 5 alíquotas de amostras de melões sadios (*Cucumis melo* L.).



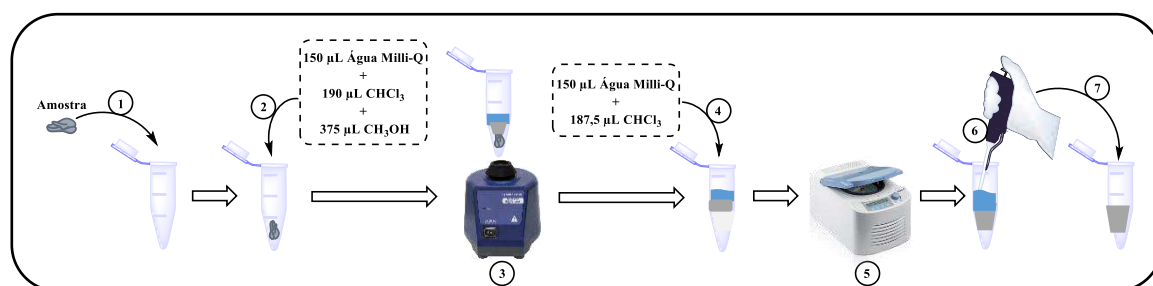
Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

### 4.3.2 Extração de Lipídios

Foram inicialmente adicionados 150  $\mu\text{L}$  de água deionizada aos frascos tipo eppendorfs esterilizados contendo as amostras biológicas, assim como demonstrado no fluxo de trabalho da Figura 11. Posteriormente, foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), acompanhados por 375  $\mu\text{L}$  de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), ambos sendo de grau HPLC. Após a adição dos solventes, os sistemas (amostra biológica contendo solvente) foram levados ao vórtex por 2 minutos. Após agitação em vórtex para a promoção da lise celular e favorecimento do íntimo contato entre a mistura de solvente e a classe de compostos alvo, foram adicionados 187,5  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, acompanhados por 150  $\mu\text{L}$  de água deionizada. Posterior a esta adição, os sistemas foram centrifugados por 2 minutos sob 13.000 rotações por minuto (rpm), dando origem à uma mistura bifásica.

A fase inferior, contendo os lipídios de interesse dissolvidos em clorofórmio, foi recolhida com auxílio de pipeta automática, sendo transferida para um segundo frasco esterilizado e devidamente tarado. A amostra foi seca utilizando um concentrador a vácuo e posteriormente armazenada em ultrafreezer à  $-80^\circ\text{C}$ .

**Figura 11.** Fluxo de trabalho realizado na extração de lipídios das amostras de fungo (micélio) e melão.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

### 4.4 Parâmetros para análise em ESI-QTOF-MS

As análises de lipídios foram realizadas em espectrômetro de massas Xevo G2-XS (Waters Corporation) equipado com sistema de analisador QTOF e fonte de ionização ESI. Os espectros foram obtidos em um tempo de aquisição de 2 min, em uma faixa de massas de  $m/z$  600 a 1000, no modo de ionização positivo, a partir do método  $\text{MS}^E$  de aquisição no modo centroide. As condições ESI foram definidas como sendo a temperatura da fonte em  $120^\circ\text{C}$ , temperatura de dessolvatação em  $350^\circ\text{C}$ , tensão do capilar em 3200 V, tensão do cone em 40

V, fluxo de gás do cone em 5 L/h e fluxo de gás de dessolvatação em 500 L/h.

#### 4.5 Parâmetros para análise quimiométrica no software PLS Toolbox™

O processamento dos dados foi realizado antes da análise estatística para todos os dados obtidos usando o software MarkerLynx XS (Waters Corporation). Todos os picos detectados foram coletados usando 0,05 Da para tolerância de massa. A matriz de dados contendo os picos detectados (571) foi gerada usando dados de massa ( $m/z$ ) como um identificador para cada pico, bem como a intensidade dos picos, os nomes das amostras e os grupos nos quais eles estão contidos (LPPC072, LPPC074, melão sadio). Uma matriz numérica foi construída usando o conjunto de dados MS entre  $m/z$  600 e 1000 de duas espécies de fungos diferentes em quintuplicata biológica.

As análises estatísticas foram realizadas em duas etapas, a saber: primeira etapa teve como objetivo principal a análise exploratória dos perfis lipídicos dos dois isolados LPPC072 e LPPC074 por métodos supervisionados, aplicando a análise discriminante por mínimos quadrados parciais discriminantes (PLS-DA), obtendo-se a modelagem de classificação multivariada para destacar os íons candidatos como biomarcadores lipídicos responsáveis pela discriminação das amostras.

A matriz resultante com 5.710 pontos de dados (10 amostras de fungos  $\times$  571 variáveis com  $m/z$  600 e 1000) foi importada pelo pacote PLS Toolbox™ (8.6.1 - Eigenvector Research Inc., Wenatchee, EUA) trabalhando em ambiente Matlab. O conjunto de dados dos fungos foi normalizado pela área a fim de reduzir pequenos erros da replicação experimental, e o algoritmo para centralização pela média foi aplicado sobre as amostras, uma vez que destaca os compostos relevantes para a discriminação dos fungos. O algoritmo SIMPLS (Simplified PLS), foi aplicado para decompor a matriz em *scores*, *loadings* e respectivos valores de mérito para avaliação classificatória por modelagem PLS-DA.

Para a segunda parte da análise estatística, outra matriz numérica foi construída usando os dados de fungos acima mencionados na presença do conjunto de dados do melão adquirido em quintuplicata biológica, apresentando no total 8.565 pontos de dados de 15 amostras  $\times$  571 variáveis entre  $m/z$  600 e 1000. O mesmo software quimiométrico e abordagens de algoritmos foram aplicados para desenvolver a modelagem de classificação multivariada. Essa análise foi realizada para verificar se existem diferenças, com relevância estatística, entre os perfis lipídicos dos três grupos de amostras.

Para ambas as modelagens de classificação, o número de variáveis latentes (*Latent*

*Variables - LV*) foi selecionado de acordo com os seguintes parâmetros estatísticos: sensibilidade com validação cruzada (*Cross-Validated - CV*); especificidade do CV; erro quadrático médio da calibração (*Root Mean Square Error of Calibration - RMSEC*); erro quadrático médio da validação cruzada (*Root Mean Square Error of Cross-Validation - RMSECV*); bias e CV bias. O método *Venetian Blind* foi aplicado para validação do modelo abaixo de 10 *splits* e *blind thickness* igual a 1. Os metabólitos diferenciais de importância significativa no conjunto de dados foram identificados de acordo com a variável de importância na projeção (VIP).

Por fim, para certificar estatisticamente a variância dos compostos entre as amostras, os biomarcadores destacados pela análise por VIP foram avaliados pela análise de variância (ANOVA one-way). Portanto, esses resultados estabeleceram os íons candidatos como biomarcadores para diferenciação de amostras de fungos (entre si) e melão saudável. A comparação de médias foi realizada por meio do teste de Tukey sob nível de significância de 0,05 e o teste de Levene foi aplicado para verificar a homogeneidade da variância.

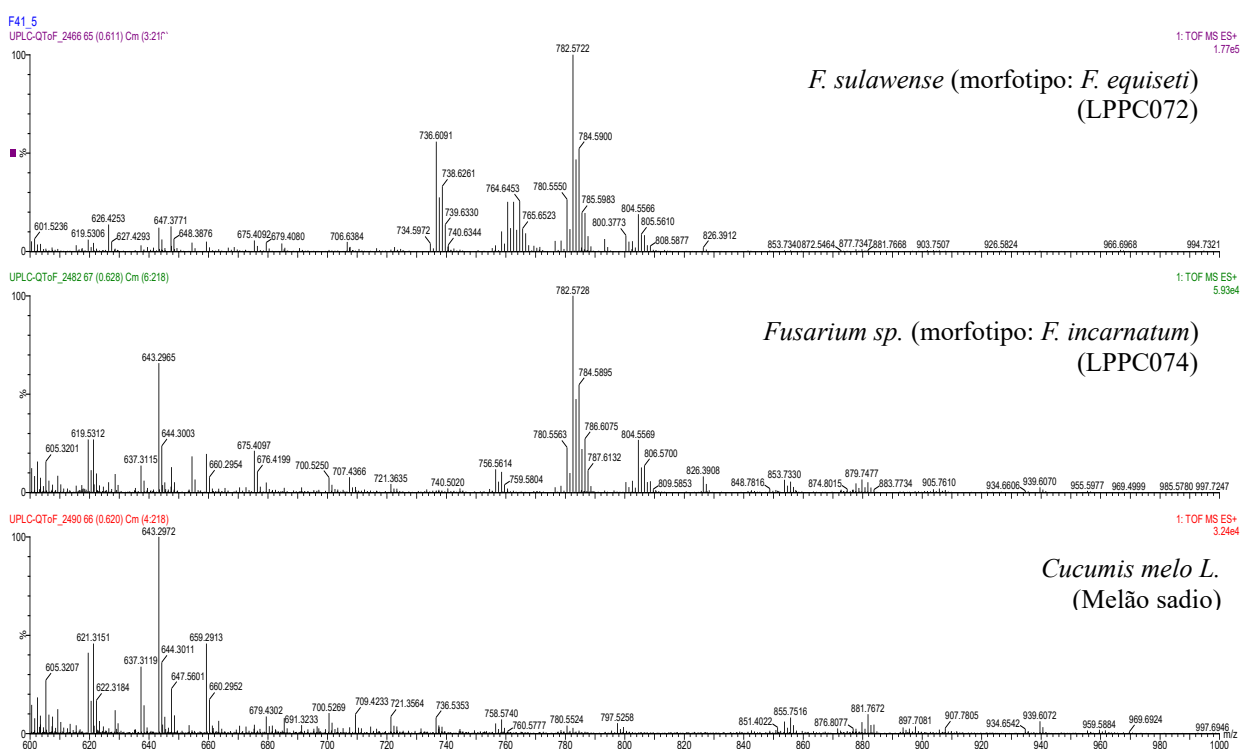
#### 4.6 Parâmetros para a identificação putativa de lipídios

Após a determinação dos lipídios responsáveis pela maior contribuição na classificação diferencial das amostras dos isolados LPPC072 e LPPC074 a partir das análises estatísticas multivariadas e univariadas, os valores de *m/z* das variáveis mais significativas, com *VIP score*  $\geq 3,5$ , foram buscadas no banco de dados LIPID MAPS *In-Silico Structure Database* (LMISSD) e LIPID MAPS *Structure Database* (LMSD) ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)). A busca teve como objetivo a classificação das variáveis de acordo com o sistema de classificação de lipídios da plataforma, na qual considera oito subclasses de lipídios: ácidos graxos (FA – do inglês *fatty acyls*), glicerolipídios (GL – do inglês *glycerolipids*), glicerofosfolipídios (GP – do inglês *glycerophospholipids*), esfingolipídios (SP – do inglês *sphingolipids*), prenois (PR – do inglês *prenol*), sacarolipídios (SL – do inglês *saccharolipids*), esteróis (ST – do inglês *sterol lipids*) e policetídeos (PK – do inglês *polyketides*). A identificação levou em consideração o melhor match sendo o que apresentou o menor erro de massa, considerando 10 ppm como limite máximo em relação a massa teórica.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros de perfis lipídicos dos três grupos de amostras, referentes aos isolados LPPC072 (*Fusarium sp.* – morfotipo equiseti) e LPPC074 (*Fusarium sulawense* – morfotipo incarnatum), assim como o perfil lipídico de melão amarelo sadio, foram obtidos em um tempo de 2 min de análise, sendo perceptível a clara diferença entre as três composições lipídicas a partir de uma inspeção visual dos dados de FI-MS (Figura 12a, b e c).

**Figura 12.** Fingerprints representativos de lipídios característicos de melão sadio (*Cucumis melo* L.) (a) e dos isolados de *Fusarium sp.* (morfotipo incarnatum – LPPC074 (b)), *Fusarium sulawense* (morfotipo equiseti – LPPC072(c)).

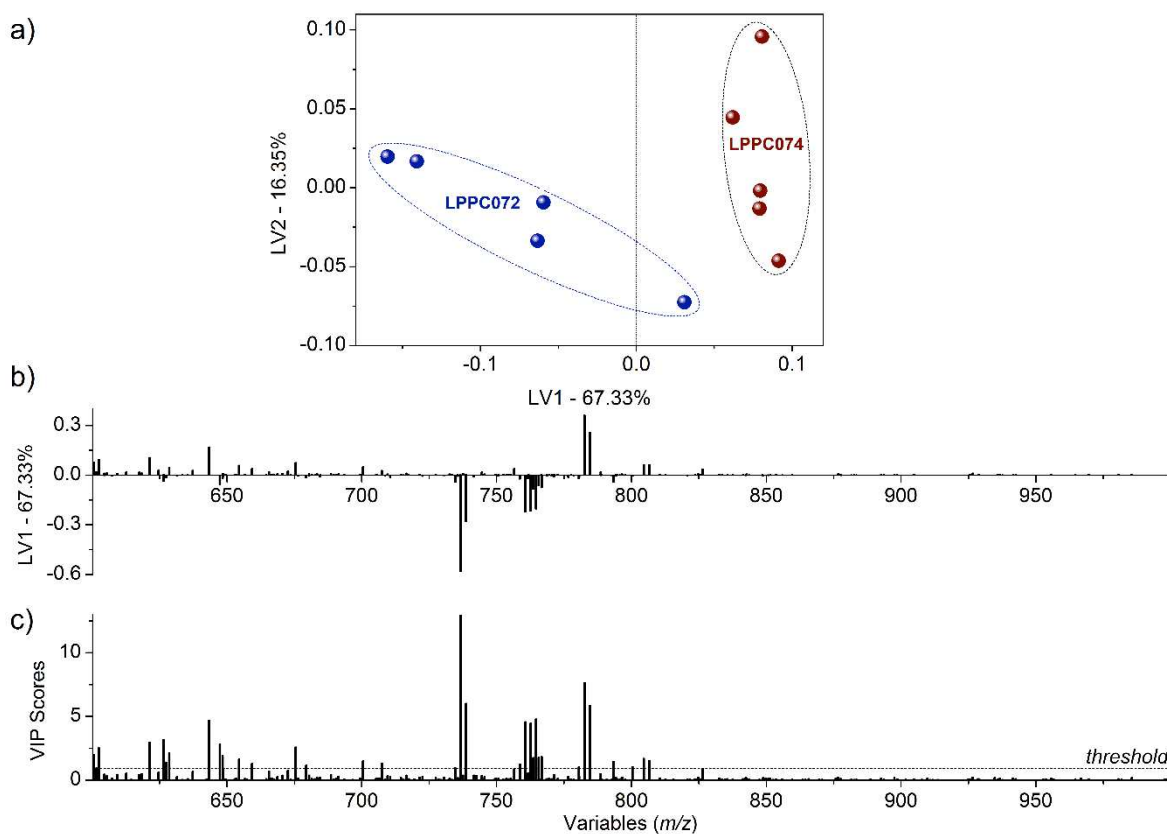


Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Os íons presentes na região de  $m/z$  600 a 1000 foram os principais responsáveis pela caracterização dos perfis das cepas LPPC072 e LPPC074, diferenciando-as facilmente a nível de espécie e diferenciando estas do perfil lipídico do fruto de melão sadio. Assim, a hipótese de bons resultados a partir de uma análise exploratória e de visualização de padrões claros de agrupamentos entre as amostras passou a ser esperada nas análises multivariadas, bem como a obtenção de diferenças estatisticamente significativas entre as médias de abundância dos íons contidos nas amostras por análise univariada.

Inicialmente, a análise estatística multivariada foi realizada para classificação dos isolados fúngicos de acordo com as espécies com base na composição do *fingerprít* lipídico. A Figura 13 ilustra o resultado da análise de PLS-DA para o isolado LPPC072 (em azul) e LPPC074 (em vermelho) de acordo seus perfis lipídicos.

**Figura 13.** a) Gráfico de *scores* para o isolado fúngico LPPC072 (azul), e isolado LPPC074 (vermelho); b) Gráfico de *loadings* com as variáveis relevantes (picos de *m/z* 600 a 1000) para classificação das amostras; c) VIP *scores* para a classificação das amostras com limite inferior igual a 1.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A modelagem dos dados por PLS-DA ressaltou, a partir de análise das LV's 1 e 2, que o modelo foi capaz de classificar os agrupamentos com 83,68% da variância total explicada, sendo 67,33% por LV1 e 16,35% por LV2. LV1 foi então responsável pela maior contribuição na separação das classes, assim como observado no gráfico de *scores* na Figura 13a.

A partir das correlações entre os gráficos de *scores* (Figura 13a) e *loadings* (Figura 13b) foi possível identificar as principais variáveis responsáveis pela classificação das amostras em



dois grupos. As replicatas biológicas referentes ao isolado LPPC072, de morfotipo equiseti, apresentaram agrupamento em valores negativos de LV1 no gráfico de *scores*, já as replicatas referentes ao isolado LPPC074, de morfotipo incarnatum, apresentaram agrupamento em valores positivos de LV1. A avaliação das regiões no gráfico de *loadings* (Figura 13b) correspondentes as regiões de agrupamento no gráfico de *scores* (Figura 13a), revelou que os íons de *m/z* 736.6088, 736.6120, 738.6240, 760.6091, 760,6106, 762.6240 e 764.6480 foram sete das principais variáveis que contribuíram fortemente para o agrupamento das amostras correspondentes ao isolado de morfotipo equiseti.

Para o agrupamento das amostras correspondente ao isolado LPPC074, de morfotipo incarnatum, foram observados os íons de *m/z* 600.5531, 602.4704, 621.3137, 643.2962, 675.408, 700.5251, 782.5743, 784.5895, 804.5554 e 806.5783 como sendo dez das principais variáveis que influenciaram fortemente para o agrupamento das amostras de morfotipo incarnatum, capazes de distingui-las do isolado de morfotipo equiseti.

As análises por VIP foram realizadas para verificação das principais variáveis responsáveis pela classificação dos dois grupos de amostras obtidos por PLS-DA. Os valores de VIP *scores* (Figura 13c) maiores que o limite inferior (maiores que 1) apresentaram os compostos mais relevantes para as classificações obtidas. A Tabela 1 fornece as variáveis com valores de VIP acima do threshold (1), onde dentre os íons apresentados como significativos na classificação dos isolados, os íons 643.2962, 736.6088, 736.6120, 738.6240, 760.6091, 762.6240, 764.6480, 782.5743 e 784.5895 apresentaram destaque quanto aos seus altos valores de VIP, sendo os principais responsáveis pela diferenciação dos dois grupos de isolados, assim como verificado anteriormente pelo gráfico de *loadings* (Figura 13b).

**Tabela 1.** Valores de VIP, média e desvio padrão das abundâncias relativas dos íons candidatos a biomarcadores da diferenciação dos isolados LPPC072 e LPPC074 sob a influência (F<sub>x</sub>M) ou não (F<sub>x</sub>F) do melão sadio.

<i>m/z</i>	VIP (F <sub>x</sub> F)	VIP (F <sub>x</sub> M)	LPPC072	LPPC074	Melão sadio	NPB
600.5531	2.01172	1.91087	70.32 <sup>c</sup> ± 55.23	204.72 <sup>b</sup> ± 55.42	312.08 <sup>a</sup> ± 57.24	3
602.4681	1.911	1.47418	0 <sup>c</sup> ± 0	101.85 <sup>b</sup> ± 63.88	188.05 <sup>a</sup> ± 54.95	3
602.4704	2.53747	2.47861	69.50 <sup>c</sup> ± 54.42	236.53 <sup>b</sup> ± 67.30	390.76 <sup>a</sup> ± 80.62	3
621.3137	2.96104	3.79885	74.59 <sup>c</sup> ± 64.91	266.80 <sup>b</sup> ± 82.73	603.05 <sup>a</sup> ± 95.67	3

621.314	1.70553	2.11197	44.06 <sup>c</sup> ± 60.42	160.65 <sup>b</sup> ± 65.85	334.72 <sup>a</sup> ± 32.74	<b>3</b>
626.4224	2.85522	1.18277	118.09 <sup>a</sup> ± 79.33	19.89 <sup>b</sup> ± 32.28	2.97 <sup>a</sup> ± 6.64	<b>2</b>
628.593	2.12255	1.81754	26.86 <sup>c</sup> ± 24.99	136.64 <sup>b</sup> ± 83.20	271.79 <sup>a</sup> ± 53.85	<b>3</b>
643.2962	4.70126	4.83095	159.95 <sup>c</sup> ± 103.97	466.56 <sup>b</sup> ± 189.99	802.70 <sup>a</sup> ± 169.63	<b>3</b>
643.2966	3.27663	5.65271	156.02 <sup>c</sup> ± 97.82	377.11 <sup>b</sup> ± 126.70	950.84 <sup>a</sup> ± 144.20	<b>3</b>
647.3762	2.08948	1.14142	108.49 <sup>a</sup> ± 25.11	13.06 <sup>b</sup> ± 29.20	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
647.3775	2.84631	1.64729	151.82 <sup>a</sup> ± 24.03	12.81 <sup>b</sup> ± 28.64	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
648.3872	1.92861	ND*	84.61 <sup>a</sup> ± 35.80	8.44 <sup>b</sup> ± 18.87	2.83 <sup>b</sup> ± 6.33	<b>2</b>
654.4555	1.66323	1.55501	58.42 <sup>b</sup> ± 28.49	165.23 <sup>a</sup> ± 72.82	14.93 <sup>b</sup> ± 20.85	<b>2</b>
659.2898	1.30564	2.08118	30.65 <sup>b</sup> ± 35.09	91.38 <sup>b</sup> ± 58.75	320.21 <sup>a</sup> ± 190.84	<b>1</b>
675.408	2.5948	2.21128	78.23 <sup>b</sup> ± 22.28	230.76 <sup>a</sup> ± 95.25	17.55 <sup>b</sup> ± 24.43	<b>2</b>
675.4097	2.08761	1.97407	79.60 <sup>b</sup> ± 18.14	204.96 <sup>a</sup> ± 90.70	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
700.5251	1.53091	1.49282	32.12 <sup>c</sup> ± 23.29	128.20 <sup>b</sup> ± 33.50	229.24 <sup>a</sup> ± 50.31	<b>3</b>
707.4346	1.33305	ND*	21.67 <sup>b</sup> ± 13.50	88.41 <sup>a</sup> ± 33.52	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
736.6088	5.18056	4.18764	360.13 <sup>a</sup> ± 209.51	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
736.6113	2.23055	1.73766	149.60 <sup>a</sup> ± 134.68	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
736.6120	12.98849	10.4974	907.31 <sup>a</sup> ± 464.41	4.51 <sup>b</sup> ± 10.07	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
738.6240	6.02489	4.87096	420.60 <sup>a</sup> ± 252.29	2.29 <sup>b</sup> ± 3.14	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
760.6091	4.58438	3.53699	315.30 <sup>a</sup> ± 264.13	10.74 <sup>b</sup> ± 24.01	7.19 <sup>b</sup> ± 16.08	<b>2</b>
760.6106	1.92038	1.4278	122.95 <sup>a</sup> ± 120.79	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
762.6240	4.47335	3.53207	304.82 <sup>a</sup> ± 253.37	0.65 <sup>b</sup> ± 1.45	5.69 <sup>b</sup> ± 12.71	<b>2</b>
762.6290	1.83296	1.28992	111.53 <sup>a</sup> ± 116.30	0.70 <sup>a</sup> ± 1.57	0 <sup>a</sup> ± 0	<b>0</b>
763.6412	1.77255	1.31112	113.53 <sup>a</sup> ± 108.80	0.58 <sup>b</sup> ± 1.29	1.69 <sup>b</sup> ± 3.78	<b>2</b>
764.6480	4.79695	3.83526	329.67 <sup>a</sup> ± 153.57	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
765.6524	1.8031	1.35045	116.73 <sup>a</sup> ± 96.61	0.38 <sup>b</sup> ± 0.84	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
766.6636	1.84634	1.46498	126.24 <sup>a</sup> ± 53.35	0 <sup>b</sup> ± 0	2.46 <sup>b</sup> ± 3.40	<b>2</b>
780.5539	1.05905	1.24744	197.40 <sup>a</sup> ± 72.44	151.76 <sup>b</sup> ± 122.24	24.52 <sup>b</sup> ± 54.84	<b>2</b>
782.5726	1.34879	2.43627	290.80 <sup>b</sup> ± 70.25	304.19 <sup>a</sup> ± 172.15	0 <sup>a</sup> ± 0	<b>2</b>
782.5741	1.29082	3.32746	416.41 <sup>a</sup> ± 96.39	409.29 <sup>a</sup> ± 239.91	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>1</b>

782.5743	7.64709	12.64616	993.95 <sup>b</sup> ± 308.54	1524.83 <sup>a</sup> ± 284.03	0 <sup>c</sup> ± 0	<b>3</b>
784.5895	5.88419	6.46296	503.53 <sup>b</sup> ± 346.14	780.36 <sup>a</sup> ± 531.63	9.15 <sup>b</sup> ± 20.46	<b>2</b>
793.2349	1.46547	1.02323	88.09 <sup>a</sup> ± 83.73	0 <sup>b</sup> ± 0	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
804.5554	1.70043	2.03296	116.89 <sup>b</sup> ± 35.92	227.38 <sup>a</sup> ± 130.09	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>
806.5738	1.5374	1.4641	29.67 <sup>b</sup> ± 51.29	133.88 <sup>a</sup> ± 84.53	0 <sup>b</sup> ± 0	<b>2</b>

<b>NPB</b>	Nível de Potencial Biomarcador
<b>0</b>	Não diferencia os fungos entre si e não diferencia os fungos das amostras de melão;
<b>1</b>	Não diferencia os fungos um do outro, mas é capaz de diferenciá-los das amostras de melão;
<b>2</b>	Capaz de diferenciar apenas os fungos entre si e um dos fungos das amostras de melão (verificar letras sobrescritas);
<b>3</b>	Capaz de diferenciar os fungos entre si e diferenciar ambos das amostras de melão;

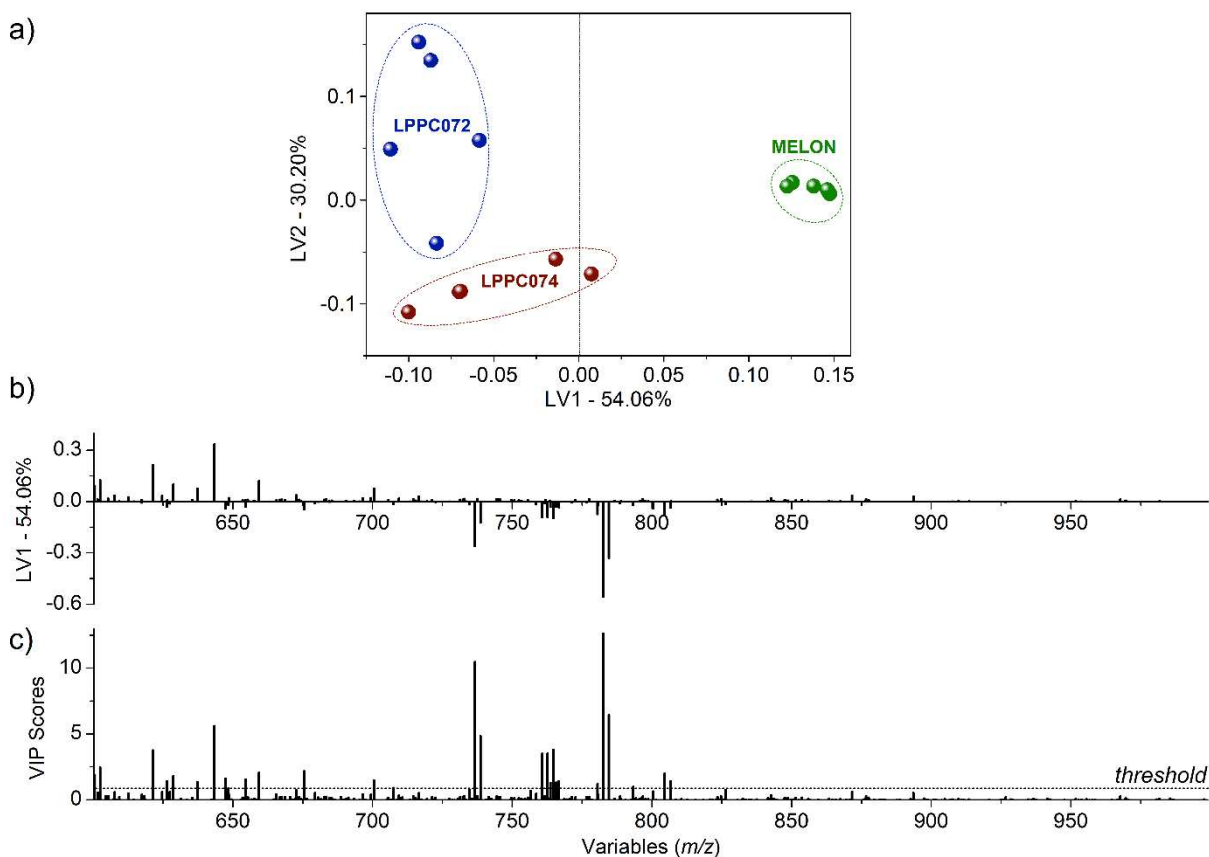
\*ND – não detectado;

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Com base na escala que foi atribuída (Nível de Potencial Biomarcador – NPB) de acordo com os resultados obtidos por ANOVA one-way (as letras sobrescritas indicando igualdade (mesma letra) ou diferença (letras distintas) estatística entre os valores), estes íons foram considerados potenciais biomarcadores na diferenciação das duas espécies crípticas do gênero *Fusarium* que atuam como fitopatógenos de melão. Esse resultado eleva a hipótese de que a espectrometria de massas de alta resolução, quando aplicada por métodos rápidos de análise sem acoplamento com sistemas cromatográficos, apresenta-se como estratégia auxiliar em potencial no processo de diferenciação de espécies crípticas de fungos filamentosos. Logo, a avaliação por ANOVA dos dados de FI-MS indicou que grande parte das variáveis identificadas por PLS-DA e VIP são estatisticamente significantes para diferenciação das amostras dos fitopatógenos em estudo.

Após a perfeita classificação (diferenciação) dos fungos (LPPC072 e LPPC074) em diferentes espécies, baseada em *fingerprint* lipídico, foi realizada uma modelagem para detectar e distinguir os fungos acima mencionados sob a presença do *fingerprint* lipídico de amostras de melão.

**Figura 14.** a) Gráfico de *scores* para o isolado fúngico LPPC072 (azul), isolado LPPC074 (vermelho) e para melão sadio em verde; b) Gráfico de *loadings* com as variáveis relevantes (picos de *m/z* 600 a 1000) para classificação das amostras; c) VIP *scores* para a classificação das amostras com limite inferior igual a 1.



Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

A avaliação do gráfico de *scores* obtido por PLS-DA (Figura 14a) ilustra claramente a classificação das amostras em três diferentes grupos, onde é possível visualizar a permanência da nítida classificação dos isolados de *Fusarium sulawense* (morfofoto equiseti – LPPPC072) e *Fusarium* sp. (morfofoto incarnatum – LPPC074) mesmo na presença de amostras do perfil lipídico de melão saudável. A clara distinção dos grupos de amostras eleva a hipótese de que o método proposto poderia auxiliar no processo de identificação dos isolados de fitopatógenos quando estes estivessem no fruto, pois espera-se que os íons biomarcadores da presença dos fitopatógenos sejam evidentes na região de *m/z* 600 a 1000 de amostras de melão infectado. Sabe-se também que células do hospedeiro de fitopatógenos possuem a capacidade de utilizar lipídios para a geração de ácidos graxos que são precursores de ácido jasmônico, sendo este um sinalizador responsável pela ativação de uma cascata de reações bioquímicas na ativação de

genes de resistência que auxiliam na batalha do hospedeiro contra fitopatógenos.<sup>90</sup> Assim, estudos futuros podem indicar uma diferenciação do perfil lipídico do fruto na presença do fitopatógeno, podendo este perfil ser característico da doença podridão-do-pedúnculo.

Ao realizar a inspeção do gráfico de *scores* (Figura 14a) é possível visualizar a classificação das amostras de fungos na região negativa de LV1, contrapondo-se a região onde foi classificada as amostras de melão. Mesmo as classificações de LPPC072 e LPPC074 estando em regiões negativas de LV1, esta variável latente foi a maior responsável pela separação das três classificações, obtidas a partir da explicação de 54,65% da variância total dos dados.

A análise do gráfico de *loadings* (Figura 14b) juntamente com a visualização dos valores de VIP para as variáveis foi capaz de revelar que a grande maioria dos íons envolvidos na diferenciação dos isolados LPPC072 e LPPC074 na primeira etapa da análise estatística, permaneceram como potenciais biomarcadores da diferenciação dos isolados mesmo na presença de amostras de melão sadio, assim como mostrado na Tabela 1. Esse resultado corrobora com a hipótese de que a região espectral característica de lipídios de membrana de fungos apresenta potencial alvo de uso em estratégias de diferenciação de fungos crípticos em matrizes vegetais, como frutas tropicais, podendo ainda ser usada para identificação e diferenciação dos fitopatógenos.

Os parâmetros estatísticos usados para avaliar a qualidade dos métodos (Tabela 2) indicaram modelos bem ajustados de acordo com alta variância total acumulada usando apenas 2 LV's (superior a 83%), baixos erros de calibração e de validação cruzada (RMSEC e RMSECV) e a proximidade entre eles (índice de similaridade), bem como baixos valores para bias e CV bias. Além disso, considerando que a sensibilidade e especificidade de +1 representa a separação perfeita do agrupamento, e -1 indica a discordância total entre a separação dos grupos, os modelos apresentaram alta qualidade. Portanto, a indicação da presença de ambos os fungos pode ser alcançada com sucesso frente a composição do melão utilizando o modelo de classificação multivariado desenvolvido, bem como discriminar os isolados.

**Tabela 2.** Parâmetros estatísticos dos modelos de classificação das análises multivariadas.

<b>Modelo</b>	<b>Fungos</b>	<b>Fungos + Melão</b>
<i>Variância capturada (%)</i>	83.68	84.26
<i>Número de LV<sup>a</sup></i>	2	2
<i>CV<sup>b</sup> - Sensibilidade</i>	1.00	1.00
<i>CV<sup>b</sup> - Especificidade</i>	1.00	1.00
<i>RMSEC<sup>c</sup></i>	0.20	0.21
<i>RMSECV<sup>d</sup></i>	0.30	0.26
<i>RMSEC / RMSECV<sup>e</sup></i>	0.67	0.81
<i>Bias</i>	-1.1 10 <sup>-16</sup>	0.0
<i>CV<sup>b</sup> Bias</i>	0.02	0.01

<sup>a</sup>Latent variable; <sup>b</sup>Cross-validation; <sup>c</sup>Root Mean Squares Error of Calibration; <sup>d</sup>Root Mean Squares Error of Cross-Validation; <sup>e</sup>Índice de similaridade.

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

O processo de identificação foi seguido apenas para a análise dos potenciais biomarcadores referentes a diferenciação entre as cepas de fungos visto que estes apresentaram massas características de íons intactos na região de  $m/z$  600 a 1000, não característica do perfil lipídico de melão sadio. Assim, a partir da utilização do banco de dados LIPID MAPS® na tentativa de identificação das categorias lipídicas, foi possível confrontar os resultados, como massa exata e fórmula molecular do banco de dados com as informações dos dados de alta resolução. A Tabela 3 ilustra as categorias de lipídios encontradas para os potenciais biomarcadores.

De acordo com a identificação putativa verificou-se a existência de lipídios categorizados como glicerofosfolipídios (GP) para os íons  $m/z$  643.2962, 764.6480 e 784.5895. Esta categoria de lipídios funciona como blocos estruturais das membranas biológicas de organismos eucarióticos e, especificamente de fungos do gênero *Fusarium*, onde pode representar cerca de 4 a 21% da massa total de lipídios, dependendo da espécie.<sup>91-92</sup> A categoria dos esfingolipídios (SP), também encontrada como proposta para alguns dos biomarcadores, como os íons  $m/z$  736.6088, 736.6120, 738.6240, 782.5743 e 784.5895, são lipídios que constituem a membrana celular de organismos fúngicos, assim como os glicerofosfolipídios.<sup>93</sup>

**Tabela 3.** Identificação putativa da categoria de nove diferentes lipídios referentes aos isolados LPPC072 e LPPC074, selecionados de acordo com os valores de VIP scores.

Massa exata ( <i>m/z</i> )	Biomarcadores	Erro (ppm)	Formula Molecular	Categoria/ Lipídios	LPPC072	LPPC074	Ref.*
643.2962	643.298271	-3.2	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>12</sub> P <sub>2</sub> Na	GP	-	+	(2)
736.6088	736.6086	0.27	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>7</sub>	SP	+	-	(1)
736.6120	736.6086	4.6	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>7</sub>	SP	+	-	(1)
738.6240	738.6242	0.27	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>7</sub>	SP	+	-	(1)
760.6091	NE	NE	NE	NE	+	-	NE
762.6240	NE	NE	NE	NE	+	-	NE
764.6480	764.6528	-6.28	C <sub>43</sub> H <sub>87</sub> O <sub>7</sub> P	GP	+	-	(1)
782.5743	782.5753	1.27	C <sub>42</sub> H <sub>81</sub> NO <sub>10</sub> Na	SP	-	+	(1)
784.5895	784.5851	5.6	C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P <sup>(1)</sup>	GP	-	+	(1;2)
			C <sub>44</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>8</sub> P <sup>(1)</sup>				
			C <sub>44</sub> H <sub>84</sub> NO <sub>9</sub> P <sup>(1)</sup>				
			C <sub>44</sub> H <sub>79</sub> O <sub>8</sub> P <sup>(1)</sup>				
			C <sub>44</sub> H <sub>83</sub> NOP <sup>(2)</sup>				

\*Banco de dados: 1 – LIPID MAPS (LMSD); 2 – LIPID MAPS (LMISSD); NE – não encontrado

Fonte: Elaborada pelo autor (2020).

Os lipídios categorizados como SP possuem grande interesse de estudo pois são considerados não só como blocos construtores da bicamada lipídica das células, mas também estão envolvidos em processos de sinalização e virulência de fungos patogênicos.<sup>93-94</sup>

A identificação inequívoca da espécie lipídica esbarra na existência de uma variedade de ácidos graxos que constituem as estruturas lipídicas, existência de espécies isobáricas com a mesma massa nominal, diferentes grupos funcionais ligados, gerando uma grande quantidade de isômeros e dificultando a atribuição completa da estrutura.<sup>95-97</sup> Porém, ainda assim é possível obter resultados satisfatórios na atribuição de categorias lipídicas a partir de *fingerprint*, possibilitando o conhecimento prévio do perfil lipídico característico da amostra em estudo.<sup>98</sup>

## 6 CONCLUSÃO

A partir do *fingerprint* de lipídios por FI-MS aliada a métodos quimiométricos de análise foi possível distinguir dois fungos fitopatogênicos isolados de melão, *Fusarium sulawense* (morfotipo equiseti – LPPPC072) e *Fusarium* sp. (morfotipo incarnatum – LPPC074) pertencentes ao complexo de espécies FIESC. Os resultados das análises estatísticas foram promissores, onde a combinação de análises supervisionadas de dados na construção de modelos de classificação por PLS-DA, juntamente com a análise univariada de dados (ANOVA one-way), forneceram alta capacidade preditiva para as duas espécies crípticas analisadas frente ou não a amostras de melão sadio, sendo capaz de distinguir as amostras pelo perfil lipídico bruto com um alto grau de confiança e fornecer potenciais lipídios biomarcadores para a região de massa de  $m/z$  600 a 1000.

Esse fato efetivou a potencialidade da abordagem exposta nesse estudo piloto, alavancando-a como potencial método a ser utilizado em laboratórios especializados na área de fitopatologia, pois traz à tona a possibilidade de utilizar essa abordagem na busca de marcadores taxonômicos entre espécies de diferentes fitopatógenos através de um método sensível, rápido e preciso de análise, podendo ser utilizado em consonância com os métodos atualmente empregados na diferenciação de espécies crípticas de fungos.

Por fim, é possível afirmar que diante dos resultados apresentados, a abordagem proposta possui grande potencial para posteriores estudos visando o processo de identificação e classificação de amostras de melão em “sadio” ou “contaminado”, visto que o perfil lipídico do fruto possui uma faixa de *fingerprint* único quando comparado com os fitopatógenos, onde seria possível a visualização dos potenciais biomarcadores das espécies crípticas ou de uma alteração lipídica decorrente da infecção. Assim, a abordagem visa atender demandas futuras relacionadas as adversidades causadas por fitopatógenos fúngicos encontradas no manejo da cultura de melão, principalmente quando se diz respeito aos problemas ocasionados por doenças pós-colheita, especificamente para a podridão do pedúnculo-do-melão, podendo ainda ser estendido para outros frutos e outros fitopatógenos.



## REFERÊNCIAS

- 1 KIST, B. B. *et al.* **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Gazeta ed. Santa Cruz do Sul: [s.n.]. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/flip/anuario-fruticultura-2018/files/assets/common/downloads/publication.pdf>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 2 SANTERAMO, F. G. *et al.* Emerging trends in European food, diets and food industry. **Food Research International**, [s.l.], v. 104, p. 39–47, 1 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.039>. Acesso em: 19 set 2019.
- 3 MACEDO, S. A. *et al.* Combined chitosan and *Cymbopogon citratus* (D.C. ex Nees) Stapf. essential oil to inhibit the fungal phytopathogen *Paramyothecium roridum* and control crater rot in melon (*Cucumis melo* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], p. 1–9, 11 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00378-y>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 4 FAO. (2019). FAOSTAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/S>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 5 LIMA, E. N. *et al.* A novel lineage in the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex is one of the causal agents of fusarium rot on melon fruits in Northeast Brazil. **Plant Pathology**, [s.l.], p. ppa.13271, 6 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ppa.13271>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 6 TERAPO, D. *et al.* Manejo da podridão de melão pelo controle do amadurecimento através do 1-mcp, sob duas condições de armazenamento. **Summa Phytopathologica**, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 110–115, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200005>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 7 TERAPO, D. *et al.* Manejo Integrado de Doenças do Meloeiro. *In*: Produção Integrada da Planta. BRAGA S. *et al.*. (Org.). **A Produção integrada de melão**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; Banco do Nordeste do Brasil, 2008., pp 207-225. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1106355>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 8 FARIAS, R. D. M.; MARTINS, C. R. Produção Integrada de Frutas - Revisão Bibliográfica. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 33–47, 2002. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2142>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 9 GAUTAM, A. K.; KUMAR, S. Techniques for the Detection, Identification, and Diagnosis of Agricultural Pathogens and Diseases. *In*: **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 135–142. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00012-9>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 10 EDWARDS, S. G.; O'CALLAGHAN, J.; DOBSON, A. D. W. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. **Mycological Research**, [s.l.], v. 106, n. 9, p. 1005–1025, 1 set. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0953756202006354>. Acesso em: 13 maio 2020.

- 11 EL SHEIKHA, A. F. Molecular Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods: The Case for Using PCR-DGGE. **Food Biotechnology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 54–108, 2 jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1547644>. Acesso em: 13 maio 2020.
- 12 DOS SANTOS, F. N. *et al.* Major phytopathogens and strains from cocoa (*Theobroma cacao* L.) are differentiated by MALDI-MS lipid and/or peptide/protein profiles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 409, n. 7, p. 1765–1777, 27 mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0133-5>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 13 ROCHA, D. F. O. *et al.* Lipid and protein fingerprinting for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strain-level classification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 409, n. 29, p. 6803–6812, 25 nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0638-6>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 14 HOLČAPEK, M.; LIEBISCH, G.; EKROOS, K. Lipidomic Analysis. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 90, n. 7, p. 4249–4257, 3 abr. 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.7b05395>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 15 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia Alimentar para a População Brasileira**. 2. ed. Brasília: [s.n.]. Disponível em: [https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_alimentar\\_populacao\\_brasileira\\_2ed.pdf](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf). Acesso em: 12 out. 2020.
- 16 REZENDE, L. F. M. DE *et al.* Coronary heart disease mortality, cardiovascular disease mortality and all-cause mortality attributable to dietary intake over 20 years in Brazil. **International Journal of Cardiology**, [s.l.], v. 217, n. March 1987, p. 64–68, ago. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.176>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 17 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy on diet, physical activity and health: Eighth plenary meeting**. Geneva: 2004. Disponível em: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA57/A57\\_R17-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA57/A57_R17-en.pdf). Acesso em: 12 out. 2020.
- 18 MAQSOOD, S. *et al.* Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 308, p. 125522, 5 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125522>. Acesso em: 7 out. 2020.
- 19 SILVA, M. A. *et al.* Melon (*Cucumis melo* L.) by-products: Potential food ingredients for novel functional foods? **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 98, p. 181–189, 1 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.005>. Acesso em: 7 out. 2020.
- 20 MOREIRA, S.R.; MELO, A.M.T. de; PURQUERIO, L.F.V.; TRANI, P.E.; NARITA, N. **Melão (*Cucumis melo* L.)**. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_3/melao/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/melao/index.htm). Acesso em: 8 out. 2020.
- 21 GÓMEZ-GARCÍA, R. *et al.* Valorization of melon fruit (*Cucumis melo* L.) by-products: Phytochemical and Biofunctional properties with Emphasis on Recent Trends and

- Advances. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 99, p. 507–519, 1 maio 2020. Disponível em: <https://10.1016/j.tifs.2020.03.033>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 22 DE SOUSA LINHARES, C. M. *et al.* Effect of temperature on disease severity of charcoal rot of melons caused by *Macrophomina phaseolina*: implications for selection of resistance sources. **European Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 158, n. 2, p. 431–441, 29 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02083-w>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 23 NASCIMENTO, P. G. M. L. *et al.* Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. **European Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 152, n. 2, p. 433–446, 1 out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1488-6>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 24 TREICHEL, M. *et al.* **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Gazeta ed. Santa Cruz do Sul: [s.n.]. Disponível em: <http://www.editoragazeta.com.br/produto/anuario-brasileiro-da-fruticultura-2016/>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 25 LUCAS, J. A. **Plant Pathology and Plant Pathogens**. 4. ed. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=pgfYDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Plant+Pathology+and+Plant+Pathogens&ots=gC9Rntk5yE&sig=WkIPE0tmLNWpRJjKWt4541bDTfl>. Acesso em: 8 out. 2020.
- 26 VIANA, F. M. P. *et al.* **Recomendações para o Controle das Principais Doenças que Afetam a Cultura do Melão na Região Nordeste**. Fortaleza, 2001. Disponível em: [http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo\\_2854.pdf](http://www.ceinfo.cnpat.embrapa.br/arquivos/artigo_2854.pdf). Acesso em: 8 out. 2020.
- 27 LIMA, N.; SANTOS, C. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. **Current Opinion in Food Science**, [s.l.], v. 13, p. 26–30, 1 fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.002>. Acesso em: 9 out. 2020.7
- 28 LIU, J. *et al.* The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 58, n. 10, p. 1681–1687, 3 jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1279122>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 29 HANSEN, A. *et al.* **Luz Ultravioleta Pulsada no Controle de Podridão Pós-Colheita e na Qualidade de Melão para Exportação**. Fortaleza: [s.n.]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1098235/1/BPD18022.pdf>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 30 FILHO, F. O. *et al.* Effect of pulsed light on postharvest disease control-related metabolomic variation in melon (*Cucumis melo*) artificially inoculated with *Fusarium pallidroseum*. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. e0220097, 20 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220097>. Acesso em: 2 maio. 2020.
- 31 PAZIANI, M. H. *et al.* First Comprehensive Report of Clinical *Fusarium* Strains Isolated in the State of Sao Paulo (Brazil) and Identified by MALDI-TOF MS and Molecular Biology. **Microorganisms**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 66, 31 dez. 2019. Disponível em:

- <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010066>. Acesso em: 11 maio. 2020.
- 32 HUANG, K. *et al.* Combining UV-C treatment with biocontrol yeast to control postharvest decay of melon. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 22, n. 18, p. 14307–14313, 16 set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4687-0>. Acesso em: 12 maio 2020.
- 33 SUI, Y. *et al.* Reduction of Fusarium rot and maintenance of fruit quality in melon using eco-friendly hot water treatment. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 21, n. 24, p. 13956–13963, 18 dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3302-0>. Acesso em: 12 maio 2020.
- 34 XIA, J. W. *et al.* Numbers to names - restyling the Fusarium incarnatum-equiseti species complex. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 186–221, 31 dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.05>. Acesso em: 7 out. 2020.
- 35 CAO, P. *et al.* First Report of Fusarium incarnatum - equiseti Species Complex Causing Fruit Rot on Muskmelon ( Cucumis melo ) in China. **Plant Disease**, [s.l.], v. 103, n. 7, p. 1768, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1603-PDN>. Acesso em: 13 maio 2020.
- 36 WONGLOM, P.; SUNPAPAO, A. Fusarium incarnatum is associated with postharvest fruit rot of muskmelon (Cucumis melo). **Journal of Phytopathology**, [s.l.], v. 168, n. 4, p. 204–210, 1 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jph.12882>. Acesso em: 9 de out. 2020.
- 37 NUANGMEK, W. *et al.* First report of fruit rot on cantaloupe caused by Fusarium equiseti in Thailand. **Journal of General Plant Pathology**, [s.l.], v. 85, n. 4, p. 295–300, 31 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00841-1>. Acesso em: 13 maio 2020.
- 38 ADEYEYE, S. A. O. Fungal mycotoxins in foods: A review. **Cogent Food & Agriculture**, [s.l.], v. 2, n. 1, 21 jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>. Acesso em: 13 de out. 2020.
- 39 TERAQ, D. *et al.* Integração de fungicidas à refrigeração no controle de podridão pós-colheita em frutos de meloeiro. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 89–93, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000100016>. Acesso em: 7 out. 2020.
- 40 TERAQ, D. *et al.* POTENTIAL USE OF BIOAGENTS IN THE CONTROL OF POSTHARVEST ROT IN MELON. **Acta Horticulturae**, [s.l.], v. 1053, n. 1053, p. 65–74, 20 out. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1053.4>. Acesso em: 12 maio 2020.
- 41 MARINACH-PATRICE, C. *et al.* Use of mass spectrometry to identify clinical Fusarium isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 634–642, 1 jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x>. Acesso em: 6 maio 2020.

- 42 ARUNMOZHI BALAJEE, S.; SIGLER, L.; BRANDT, M. E. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p. 475–490, 1 jan. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13693780701449425>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 43 AHMAD, F.; BABALOLA, O. O.; TAK, H. I. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: Identification of plant-associated microorganisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.]. Springer, 30 set. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6091-7>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 44 MARINACH-PATRICE, C. *et al.* Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 634–642, 1 jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x>. Acesso em: 9 out. 2020.
- 45 TURVEY, M. E. *et al.* The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. **Journal of the Institute of Brewing**, [s.l.], v. 123, n. 3, p. 373–387, 1 jul. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.428>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 46 GRIFFITHS, I. W. J. J. Thomson — the Centenary of His Discovery of the Electron and of His Invention of Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 2–16, 15 jan. 1997. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19970115\)11:1%3C2::AID-RCM768%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0231(19970115)11:1%3C2::AID-RCM768%3E3.0.CO;2-V). Acesso em: 10 out. 2020.
- 47 BAUER, S. H. Mass spectrometry in the Mid-1930's: Were chemists intrigued? **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 12, n. 9, p. 975–988, 1 set. 2001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jasms.8b01666>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 48 VESSECCI, R. *et al.* Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000025>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 49 GROSS, J. H. Introduction. In: **Mass Spectrometry**, [s.l.], Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 1–28. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-54398-7>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 50 WIESER, A. *et al.* MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 93, n. 3, p. 965–974, 25 fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 51 MARINACH-PATRICE, C. *et al.* Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 634–642, 1 jul. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x>. Acesso em: 11 out. 2020.

- 52 LAU, S. K. P. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for rapid identification of mold and yeast cultures of *Penicillium marneffei*. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 1, 10 mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0656-0>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 53 CHEN, Y.-S. *et al.* Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry Bruker Biotyper for identification of *Penicillium marneffei*, *Paecilomyces* species, *Fusarium solani*, *Rhizopus* species, and *Pseudallescheria boydii*. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 6, n. JUL, 8 jul. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00679>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 54 XU, X. *et al.* Discrimination of the microbial subspecies using the ribosomal protein spectra coupled with the metabolite high resolution mass spectra. **Talanta**, [s.l.], v. 208, p. 120361, 1 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120361>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 55 INGLIS, P. W. *et al.* Trichoderma from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. e0228485, 4 mar. 2020. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0228485>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 56 KEMPTNER, J. *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 23, n. 6, p. 877–884, 30 mar. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.3949>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 57 FAGERQUIST, C. K. *et al.* Genomic and Proteomic Identification of a DNA-Binding Protein Used in the “Fingerprinting” of *Campylobacter* Species and Strains by MALDI-TOF-MS Protein Biomarker Analysis. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 77, n. 15, p. 4897–4907, 1 ago. 2005. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac040193z>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 58 CHALUPOVÁ, J. *et al.* Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology Advances**, [s.l.], jan. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 59 TAO, J. *et al.* Detection of pathogenic *Verticillium* spp. using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 23, n. 23, p. 3647–3654, 15 dez. 2009. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.4296>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 60 HORKÁ, M. *et al.* Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS – Suitable tools for identification of filamentous fungi. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 716, p. 155–162, 24 fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.032>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 61 HELLER, D. N. *et al.* Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 59, n. 23, p. 2806–2809, dez. 1987. Disponível em:

- <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00150a018>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 62 STÜBIGER, G. *et al.* Characterization of Yeasts and Filamentous Fungi using MALDI Lipid Phenotyping. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 130, p. 27–37, 1 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.010>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 63 GRIFFITHS, J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 80, n. 15, p. 5678–5683, 1 ago. 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac8013065>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 64 IVANOVA, P. T. *et al.* Glycerophospholipid Identification and Quantitation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 432p. 21–57. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)32002-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)32002-8). Acesso em: 12 out. 2020.
- 65 VESSECCHI, R. *et al.* Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 840–853, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400026>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 66 KONERMANN, L. *et al.* Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, n. 1, p. 2–9, 2 jan. 2013. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac302789c>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 67 KRISHNAMURTHY, T. *et al.* Liquid chromatography/microspray mass spectrometry for bacterial investigations. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 39–49, 15 jan. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19990115\)13:1<39::AID-RCM445>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19990115)13:1<39::AID-RCM445>3.0.CO;2-7). Acesso em: 19 out. 2020.
- 68 GOODACRE, R.; HEALD, J. K.; KELL, D. B. Characterisation of intact microorganisms using electrospray ionisation mass spectrometry. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 176, n. 1, p. 17–24, 1 jul. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13636.x>. Acesso em: 19 out. 2020.
- 69 KOULMAN, A. *et al.* High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 421–428, 15 fev. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.2854>. Acesso em: 19 out. 2020.
- 70 SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J. C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 5–17, 1 mar. 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(95\)00073-9](https://doi.org/10.1016/0167-7012(95)00073-9). Acesso em: 19 out. 2020.
- 71 ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 2, p. 219–225, 1 fev. 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 72 VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they

- are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 112–124, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2330>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 73 FERNANDES, C. M.; GOLDMAN, G. H.; DEL POETA, M. Biological Roles Played by Sphingolipids in Dimorphic and Filamentous Fungi. **mBio**, [s.l.], v. 9, n. 3, 15 maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.00642-18>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 74 FAHY, E. *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, [s.l.], v. 50, n. Supplement, p. S9–S14, abr. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>. Acesso em: 11 out. 2020.
- 75 FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of biological chemistry**, [s.l.], p. 497–509, 1957. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5). Acesso em: 12 out. 2020.
- 76 BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p. 911–917, 1 ago. 1959. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/o59-099>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 77 BRUM, A. A. S.; DE ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Extraction methods and quality of the lipid fraction of vegetable and animal samples. **Quimica Nova**, [s.l.], v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400005>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 78 STÅHLMAN, M. *et al.* High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. Elsevier, [s.l.], 15 set. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.037>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 79 IBÁÑEZ, C. *et al.* The role of direct high-resolution mass spectrometry in foodomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s.l.], v. 407, n. 21, p. 6275–6287, 5 ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8812-1>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 80 WANG, M.; WANG, C.; HAN, X. Selection of internal standards for accurate quantification of complex lipid species in biological extracts by electrospray ionization mass spectrometry-What, how and why? **Mass Spectrometry Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 6, p. 693–714, 1 nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mas.21492>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 81 CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 36, n. 8, p. 849–865, 1 ago. 2001. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.207>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 82 WIGMANN, É. F. *et al.* MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 103, n. 13, p. 5323–5337, 4 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09794-z>. Acesso em: 9 out. 2020.



- 83 LUNZHAO, Y. *et al.* Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 914, p. 17-34, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.02.001>. Acesso em: 6 dez. 2020.
- 84 HU, CHUNXIU; XU, GUOWANG. Mass-spectrometry-based metabolomics analysis for foodomics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 52, p. 36-46, dec. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.09.005>. Acesso em: 6 dez. 2020.
- 85 DE SANTANA, F. B. *et al.* Experimento didático de quimiometria para classificação de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio combinado com análise discriminante por mínimos quadrados parciais: um tutorial, parte v. **Química Nova**, [s.l.], v. 43, No. 3, p. 371-381, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170480>. Acesso em: 6 dez. 2020.
- 86 CHONG, IL-GYO; JUN CHI-HYUCK. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, [s.l.], v. 78, p. 103-112, jul. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>. Acesso em: 6 dez. 2020.
- 87 BOTELHO, B. G. *et al.* Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 181, p. 31-37, ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.077>. Acesso em: 6 dez. 2020.
- 88 SACCENTI, E. *et al.* Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, [s.l.], v. 10, p. 361-374, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0598-6>. Acesso em: 7 dez. 2020.
- 89 GORROCHATEGUI, E. *et al.* Chemometric strategy for untargeted lipidomics: Biomarker detection and identification in stressed human placental cells. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 854, p. 20-33, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.010>. Acesso em: 7 dez. 2020.
- 90 DEUNER, C. *et al.* Ácido jasmônico como promotor de resistência em plantas. **Revista de Ciências Agrárias**. [s.l.], 2015. v. 38. Disponível em: [http://scielo.pt/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0871-018X2015000300001&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2015000300001&lng=pt&nrm=iso). Acesso em: 12 out. 2020.
- 91 FRICK, M.; SCHMIDT, C. Mass spectrometry—A versatile tool for characterising the lipid environment of membrane protein assemblies. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s.l.], v. 221, p. 145–157, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.04.001>. Acesso em: 30 out. 2019.
- 92 SARKAR, P. K. *et al.* A Timeline of Stable of Isotopes and Mass Spectrometry. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 47, n. 12, p. 987–992, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mas.21497>. Acesso em: 30 out. 2020.
- 93 SINGH, A.; DEL POETA, M. Sphingolipidomics: An Important Mechanistic Tool for Studying Fungal Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. APR, 14 abr. 2016.

- Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00501>. Acesso em: 30 out. 2019.
- 94 BECCACCIOLI, M.; REVERBERI, M.; SCALA, V. Fungal lipids: biosynthesis and signalling during plant-pathogen interaction. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s.l.], v. 24, p. 172–185, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/4712>. Acesso em: 20 out. 2019.
- 95 KOELMEL, J. P. *et al.* Common cases of improper lipid annotation using high-resolution tandem mass spectrometry data and corresponding limitations in biological interpretation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s.l.], v. 1862, n. 8, p. 766–770, ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.02.016>. Acesso em: 10 out. 2020.
- 96 LEE, H.; YOKOMIZO, T. Applications of mass spectrometry-based targeted and non-targeted lipidomics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 504, n. 3, p. 576–581, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.081>. Acesso em: 12 out. 2020.
- 97 PAULING, J. K. *et al.* Proposal for a common nomenclature for fragment ions in mass spectra of lipids. **PLOS ONE**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. e0188394, 21 nov. 2017. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0188394>. Acesso em: 4 maio 2019.
- 98 LÍSA, M. *et al.* Lipidomic analysis of biological samples: Comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods. **Journal of Chromatography A**, [s.l.], v. 1525, p. 96–108, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.022>. Acesso em: 12 out. 2019.