

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudos dos metabólitos secundários de *Exophiala spinifera* em
diferentes condições de cocultivos com *Leucoagaricus
gongylophorus* para o controle de formigas cortadeiras**

Dorai Periotto Zandonai

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTORA EM
CIÊNCIAS, área de concentração:
QUÍMICA.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

**São Carlos – SP
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Dorai Periotto Zandonai, realizada em 29/07/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Batista Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (UFSCar)

Prof. Dr. Raquel Peres de Moraes Urano (IQSC/USP)

Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrozini (UNIFAL - MG)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedicatórias

A Deus,

Por tudo de bom que aconteceu nestes anos de aprendizado, por ter dado forças para superar e aprender com as dificuldades e tornar tudo possível.

A minha família, por ser meu porto seguro, apoio e incentivo constante para que eu conseguisse seguir em frente, não medindo esforços para tornar possível a minha formação.

Aos meus pais, Ermelindo Periotto (in memoriam) e Elisa Gonçalves Pereira Periotto, minha admirável mãe, pelos conselhos e alegria de estarmos juntas, sempre ao meu lado incentivando e admirando o meu trabalho.

Aos meus filhos queridos, Alexandra Paola Zandonai, Carlos Augusto Zandonai e Germano Arthur Zandonai, meus presentes da vida, pelo amor, carinho e admiração.

Ao marido Carlos Roberto Zandonai, pela paciência, grande ajuda, pelo carinho.

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes, que me permitiu enfrentar grandes desafios, obrigada pelo incentivo e por acreditar no meu trabalho. Pela orientação durante esses anos e pelos conhecimentos adquiridos. Sua orientação e auxílio permitiram-me concretizar esse estudo.

A Dra. Alana Kelyene Pereira, obrigada por compartilhar grandes momentos de aprendizado, expresso aqui minha eterna gratidão pela ajuda e incentivo constante.

A Dra. Maria Clara Aguiar, muito obrigada paciência, dedicação, por estar sempre me apoiando nas horas mais difíceis da minha caminhada. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, obrigada pelas valiosas contribuições desde o início do meu trabalho e auxílio no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, obrigada por gentilmente aceitar em participar da minha banca, sua contribuição será muito importante e certamente enriquecerá o meu trabalho.

A Dra. Raquel Urano, muito obrigada por estar presente mais uma vez e por avaliar meu trabalho desde o início e de todas as valiosas sugestões e contribuições.

A Profa. Dra. Alessandra Regina Pepe Ambrosin, muito obrigada pela satisfação e alegria em participar da minha avaliação e fazer parte de mais uma etapa importante da minha vida. Seus conhecimentos ajudaram a enriquecer este meu trabalho.

A Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva, obrigada por aceitar em participar da minha defesa, pela atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno, obrigada por contribuir para meu trabalho e por gentilmente aceitar em participar da minha banca.

Ao Prof. Dr. Eli Fernando Pimenta, seu apoio e sua ajuda foram muito importantes para mim. Muito obrigada!

Ao Me. Luciano Rodrigues Pereira, obrigada por estar pronto para auxiliar, sem medir esforços nas horas que precisei, pela atenção e por todo o aprendizado.

Ao Me. Sean dos Santos Araújo, obrigada por compartilhar seu aprendizado nos importantes ensaios biológicos executados, pelos conhecimentos adquiridos e pela sua disposição e atenção durante esse tempo especial.

Ao Dr. João Gabriel Moraes Junqueira, meus sinceros agradecimentos por todo o apoio recebido, minha eterna gratidão.

A Dra. Dianne Dominguez Formoso, muito obrigada pela ajuda, sempre atenciosa e prestativa na condução desse trabalho.

Ao Dr. Guilherme Grosselli, obrigado, pelo aprendizado e por sempre estar pronto a me ajudar, tirando dúvidas, nas horas que mais precisei.

A todos do grupo de Pesquisa em Produtos naturais, obrigada pelo apoio de todos.

A todos do Departamento de Química, docentes, técnicos e secretárias, que sempre me apoiaram os mais sinceros agradecimentos.

Lista de abreviaturas

COSY ^1H - ^1H	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
GNPS	<i>Global Natural Product Social Molecular Networking</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
LC/MS Q-ToF	<i>Liquid Chromatography coupled mass spectrometry</i> <i>6545 Q-ToF (Agilent Technologies)</i>
m/z	Razão massa/carga
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
ppm	parte por milhão
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em fase sólida)
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
UPLC	Waters Acquity UPLC I-Class (Waters ACQUITY Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) System)
δ	Deslocamento químico

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Informações sobre os microrganismos: fungo mutualista e levedura negra.....	11
TABELA 2 - Valores das áreas e das médias das bandas anotadas nos cromatogramas de 5 em 5 dias até 40 dias de incubação.....	31
TABELA 3 - Relações <i>ID</i> , <i>m/z</i> cocultivo C-H_15 dias e H_15 dias, e os tempos de retenção respectivamente dos agrupamentos mostrado no gráfico de mapa de calor <i>Heat Map</i> com <i>test T features</i>	47
TABELA 4 - Variáveis (<i>m/z</i>) anotados do agrupamento <i>Heat Map</i> (mapa de calor do cocultivo H-C_ML_30 dias, monoculturas C_ML_15 dias.....	56
TABELA 5 - Ions <i>m/z</i> detectados do cocultivo e monoculturas.....	59
TABELA 6 - Dados dos deslocamentos químicos de RMN ¹ H (400 MHz) e RMN ¹³ C (400 MHz) e 2D obtidos em MeOD _{d4} , para o composto isolado P7..	83
TABELA 7 - Valores em mm dos halos de inibição dos extratos bruto dos metabólitos do cocultivo H-C, <i>E. spinifera</i> (C) e da substância isolada (P7). .	102
TABELA 8 -Porcentagem de inibição (% I) do Extrato C (cultura pura da <i>E. spinifera</i>) e do Composto isolado da cultura pura da <i>E. spinifera</i> (P7), nas AChEs de peixe-elétrico e AChE- <i>Atta sexdens</i> da formiga cortadeira (C=0,1mg/mL).	104
TABELA 9 - Porcentagem de inibição em cada concentração testada e também o valor de C50 para cada solução estudada.....	107

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Formigas cortadeiras - manejo integrado de saúvas e quenquéns...	5
FIGURA 2 - Ilustração do formigueiro mostrando a rainha e o fungo mutualista <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	7
FIGURA 3 - Representação Microscópica da <i>Exophiala spinifera</i>	9
FIGURA 4 - Representação de um cocultivo em meio sólido.....	10
FIGURA 5 - Características morfológicas da <i>Exophiala spinifera</i> incluídas neste estudo. (A) fotos de colônias com 15 dias, em ágar batata dextrose, (B) morfologia da colônia mostrando as gêmulas, (C) a morfologia de aparência viscosa descritos no texto.	27
FIGURA 6 - Cromatograma referentes aos extratos brutos dos metabólitos da <i>E. spinifera</i> em meio líquido, Potato Dextrose Broth (BD), as diferentes cores representam as três réplicas.	29
FIGURA 7 - Cromatogramas acima são referentes aos extratos brutos dos metabólitos da <i>E. spinifera</i> em meio líquido, MIX, as diferentes cores representam as três réplicas.	29
FIGURA 8 - Cromatogramas acima são referentes aos extratos brutos dos metabólitos da <i>E. spinifera</i> em meio líquidos, MF, as diferentes cores representam as três réplicas.	30
FIGURA 9 - Cromatogramas acima são referentes aos extratos brutos dos metabólitos da <i>E. spinifera</i> em meio líquido, Czapek Dox Broth, as diferentes cores representam as três réplicas.	30
FIGURA 10 - Cinética de crescimento em meio de cultura líquido Czapek Dox Broth da levedura negra <i>E. spinifera</i> utilizando a média das áreas dos picos versus dias de incubação.	32
FIGURA 11 - Cromatograma das análises dos extratos metabólitos, por espectrometria de massas de alta resolução (Waters Acquity UPLC I-Class), de diferentes cocultivos.....	35
FIGURA 12 - Mapa de calor (HeatMap) para a correlação entre cocultivos e cultivos das monoculturas. A escala é baseada nas cores do vermelho ao azul representando as correlações. Cada metabólito no quadrado representa o	

coeficiente de correlação de Pearson de diferentes amostras. A ordem dos metabólitos é determinada como no agrupamento hierárquico usando distância euclidiana foi aplicado.....	37
FIGURA 13 - Gráfico de <i>scores</i> PC1 - PC2 de PCA, usando dados cromatográficos processados com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.	38
FIGURA 14 - Gráfico de <i>scores</i> PCA: PC1-PC3 e PC1-PC4, usando dados cromatográficos processados com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.	39
FIGURA 15 - Gráfico de <i>scores</i> : PC1–PC5 de PCA, usando dados cromatográficos processados com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.	39
FIGURA 16 - Gráfico <i>Scree plot</i> , mostra a variância explicada pelas PCs. A linha verde é a variância acumulada e a azul mostra a variância explicada de cada PC.	40
FIGURA 17 - Validação do método pelo coeficiente de correlação quadrado múltiplo, R2 e Q2.....	42
FIGURA 18 - Representação gráfica da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLSDA - <i>Scores</i>) e na forma de dimensão 3 D.....	43
FIGURA 19 - Representação gráfica 2 da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA - <i>Scores</i>) e na forma 3 D.....	433
FIGURA 20 - Dendograma de similaridade entre os cocultivos, monoculturas e meio de cultura	444
FIGURA 21 - Gráfico de mapa de calor <i>Heat Map</i> com <i>test T features</i> com todos os dados mostrando os resultados de agrupamentos com todos os cocultivos, monoculturas e meio Czapek Dox Broth.	46
FIGURA 22 - Cromatograma <i>full scan</i> – ions totais (TIC no modo ESI-)	48
FIGURA 23 - Cromatograma do íon extraído <i>m/z</i> 721,24588 DA (EIC).	48
FIGURA 24 - Espectro MS do cocultivo C-H_ML_15 dias.	49
FIGURA 25 - Gráficos de PCAs individuais dos cocultivos: C com H_ML_15 d, C com H_ML_30 d, C-H_ML_30 d, H-C_ML_30 d e C+H_ML_30 d.	50

FIGURA 26 - Gráficos de PLS-DAs individuais dos cocultivos: C com H_ML_15 d, C com H_ML_30 d, C-H_ML_30 d, H-C_ML_30 d e C+H_ML_30 d. O gráfico em escala maior representa o cocultivo que melhor mostrou a separação entre os metabólitos induzidos.	52
FIGURA 27 - Dendograma de similaridade entre os cocultivos C com H_ML_15 dias, monoculturas e meio de cultura.	53
FIGURA 28 - Dendograma de similaridade entre os cocultivos CcomH_ML_30 dias, culturas axênicas e meio de cultura	53
FIGURA 29 - Gráfico Biplot do PCA, onde é possível ver as amostras e as variáveis em um mesmo gráfico.	54
FIGURA 30 - Gráfico PLS-DA cocultivo H-C_ML_30 dias, monoculturas C_ML_30 dias e H_ML_30 dias e meio de cultura, mostra a nítida separação entre os scores.	55
FIGURA 31 - Resultado do agrupamento como Heat Map (mapa de calor do cocultivo H-C_ML_30 dias, monoculturas H_ML e C_ML_30 dias e meio de cultura Czapek Dox Broth.	57
FIGURA 32 - Gráfico VIP score mostra a razão de abundância em cores de vermelho intenso (alta) à azul escuro (baixa) dos metabólitos. Variáveis selecionadas pelo modelo PLS-DA para os componentes.	58
FIGURA 33 - Resultado de agrupamento mostrado como dendograma de similaridade entre os cocultivos (H-C_ML_30 d), monoculturas e meio de cultura.	59
FIGURA 34 - Validação do método pelo coeficiente de correlação quadrado múltiplo, R^2 e Q^2	60
FIGURA 35 - Cromatograma do meio de cultura Czapek DOX Broth, extraído, referente a injeção no sistema HPLC preparativo, monitorando a presença de alguma substancia residual que possa interferir nas interpretações das análises das frações coletadas.	80
FIGURA 36 - Cromatograma da amostra da Fração F1, referente a análise exploratória (HPLC escala preparativo), mostrando a absorção nomeada de F1.2_ amostra P7.	80
FIGURA 37 - Comparação dos espectros de RMN ^1H das frações P1 a P7, obtidos em obtidos em MeOH_{d4}	81

FIGURA 38 - Foto da substância isolada P7, sendo evaporada pelo evaporador rotativo, mostrando a formação de um precipitado branco, aparentando um pó fino.....	82
FIGURA 39 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto isolado P7.....	84
FIGURA 40 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz) do composto isolado P7.....	85
FIGURA 41 - Espectro de RMN DEPT (400 MHz) do composto isolado P7..	85
FIGURA 42 - Espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7. .	86
FIGURA 43 - Ampliação da região δ 0,5 a 3,5 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.	86
FIGURA 44 - Ampliação da região δ 2,3 a 4,3 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.	87
FIGURA 45 - Ampliação da região δ 4,2 a 8,2 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.	87
FIGURA 46 - Ampliação da região δ 5,95 a 6,95 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.	88
FIGURA 47 - Ampliação da região δ 0,55 a 1,50 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.	881
FIGURA 48 - Ampliação da região δ 1,51 a 1,75 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.	89
FIGURA 49 - Ampliação da região δ 2,3 a 4,0 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.	89
FIGURA 50 - Ampliação da região δ 6,20 a 6,85 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.	90
FIGURA 51 - Ampliação da região δ 0,6 a 3,0 no espectro de RMN HSQC (400 MHz) do composto isolado P7.	903
FIGURA 52 - Ampliação da região δ 3,10 a 4,10 no espectro de RMN HSQC (400 MHz) do composto isolado P7.	91
FIGURA 53 - Ampliação da região δ 6,25 a 6,95 no espectro de RMN HSQC (400 MHz) do composto isolado P7.	91
FIGURA 54 - Proposta da molécula do composto isolado P7.....	93

FIGURA 55 - Espectro de MS <i>Full Scan</i> do composto isolado P7.	93
FIGURA 56 - Espectro no infravermelho do composto isolado P7.....	95
FIGURA 57- Representação da estrutura molecular do composto isolado P7 e do ácido exophílico.	96
FIGURA 58 - Cromatogramas do íon extraído, mostrando a ausência de picos do meio de cultura, do solvente e da monocultura do <i>L. gongylophorus</i>	97
FIGURA 59 - Espectro <i>Full Scan</i> , cocultivo H-C_30 dias, presença do composto isolado P7 sodiado.	98
FIGURA 60 - Espectro <i>Full Scan</i> , cocultivo H-C_30 dias, mostrando a presença de um dímero.....	98
FIGURA 61 - Cromatograma (EIC) da monocultura <i>E. spinifera</i> (C).....	99
FIGURA 62 - Espectro de massas <i>Full Scan</i> para a monocultura <i>E. spinifera</i> (C), no T _R 16.832 min, da monocultura <i>E. spinifera</i> (C).	100
FIGURA 63 - Espectro de massas <i>Full Scan</i> para a monocultura <i>E. spinifera</i> (C), no T _R 16.172-16.205 min.....	100
FIGURA 64 - Espectro de massas, cocultivo H-C_30 dias, mostrando a presença de um íon de razão m/z = 329,1742	101
FIGURA 65 - Ensaio de avaliação antifúngica, difusão em ágar dos extratos bruto dos metabólitos do cocultivo H-C, da <i>E. spinifera</i> (C) e da substância isolada (P7).	102
FIGURA 66 - Efeito dos tempos de incubação do extrato, CZAPEK e composto P7 nas correntes de pico de oxidação da tiocolina, calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI 60 mmol.L ⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ . [AChE]= 0,05 mg.mL ⁻¹ . Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.	106
FIGURA 67 - Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração das soluções de extrato, CZAPEK e Composto P7. Solução de ASChI 60 mmol.L ⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ . [AChE]= 0,05 mg.mL ⁻¹ . Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.	107

Resumo

ESTUDOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Exophiala spinifera* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE COCULTIVOS COM *Leucoagaricus gongylophorus* PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS.

As formigas cortadeiras estão entre as principais pragas da agricultura brasileira, causando significativos prejuízos ao agronegócio. Estratégias de controle cultural, químico e biológico têm sido desenvolvidas especialmente para reduzir custos e a quantidade de inseticidas aplicados. A química de produtos naturais vem como uma importante aliada para estudar o perfil metabólico de plantas e micro-organismos, a fim de isolar e/ou identificar os metabólitos secundários produzidos com atividades biológicas específicas e proporcionando menores impactos ao meio ambiente. O cocultivo de fungos tem sido descrito como uma estratégia promissora para induzir a produção de novos metabólitos através das interações entre diferentes cepas. Portanto, esse trabalho teve como objetivo principal avaliar condições de cocultivos entre o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* responsável pela produção de enzimas que degradam polissacarídeos foliares em nutrientes assimiláveis para as formigas juntamente com a levedura negra *Exophiala spinifera* (Herpotrichiellaceae), isolada do bitu de *Atta laevigata*, (Formidaceae). Além disso buscou-se realizar o cultivo da levedura negra, para isolar e identificar novos metabólitos com atividade biológica no controle de formigas cortadeiras. As condições de crescimento dos cocultivos e do cultivo de cepas pura foram avaliadas neste estudo determinando-se como melhor meio de cultura e o tempo hábil de produção de metabólitos por meio do estudo de cinéticas de crescimento. Para estudar os metabólitos induzidos nas interações fúngicas, análises de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas de Alta Resolução foram realizadas e associadas à aplicação de ferramentas metabolômicas e da plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) em cepas de culturas puras e em suas cocultura. Este conjunto de técnicas possibilitou identificar metabólitos destacados nos cocultivos e na cultura pura. Entre os resultados se destaca o isolamento de um derivado do ácido exophílico (Ácido 2-hidroxi-4-[4-hidroxi-2-nonil-6-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)-oxan-2-il]oxibenzoil]oxi-6-nonilbenzóico) ($C_{40}H_{58}O_{17}$). Ensaio de difusão em ágar foram realizados com cocultivo H-C_30 dias, (halo de inibição 24,5 mm); do extrato bruto da *Exophiala spinifera*, cultura pura (halo de inibição 24,8 mm) e composto isolado (P7) (halo de inibição 25,8 mm), apresentaram inibição para *L. gongylophorus*. Bioensaios também foram realizados com a enzima Acetilcolinesterase (AChE) extraída do *Electrophorus electricus* e AChE extraída da formiga cortadeira *Atta sexdens*. Foram ensaiados com extrato bruto da *Exophiala spinifera* (I % $75,04 \pm 0,099$) e com o composto isolado (P7) das culturas puras da levedura negra (I % $68,45 \pm 0,020$), que apresentaram inibição. O composto isolado P7 e o extrato bruto da *Exophiala spinifera* foram avaliados para a inibição da enzima Acetilcolinesterase em

microelétrodos descartáveis, apresentando inibição. Nesse contexto, compostos biosintetizados pelo microrganismo *Exophiala spinifera* podem ser uma alternativa natural para o controle de formigas cortadeiras.

Palavras chaves: Formigas cortadeiras, *Exophiala spinifera*, *Leucoagaricus gongylophorus*, Cocultivo microbiano, Controle biológico.

Abstract

STUDIES OF SECONDARY METABOLITES UNDER DIFFERENT COCULTIVATION CONDITIONS BETWEEN *Exophiala spinifera* and *Leucoagaricus gongylophorus* FOR THE CONTROL OF LEAF-CUTTING ANT.

Leaf-cutting ants are among the main pests of Brazilian agriculture, causing significant damage to agribusiness. Cultural, chemical and biological control strategies were specially developed to reduce costs and the amount of insecticides applied. The chemistry of natural products appears as an important ally to study the metabolic profile of plants and microorganisms in order to isolate and/or identify the secondary metabolites produced with specific biological activities and providing less impact to the environment. Co-cultivation of fungi has been described as a promising strategy to induce the production of new metabolites through interactions between different strains. Therefore, this work aimed to evaluate co-culture conditions between the mutualistic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* responsible to produce enzymes that degrade foliar polysaccharides into assimilable nutrients for ants together with the black yeast *Exophiala spinifera* (Herpotrichiellaceae), isolated from the ant male of *Atta laevigata*, (Formicidae). In addition, we sought to carry out the cultivation of black yeast, to isolate and identify new metabolites with biological activity in the control of leaf-cutting ants. The growth conditions of the co-cultures and the cultivation of pure strains were evaluated in this study, determining the best culture medium and the time of production of the metabolites through the study of the growth kinetics. To study the metabolites induced in fungal interactions, Nuclear Magnetic Resonance and High-Resolution Mass Spectrometry analyses were performed associated with the application of metabolomics tools and the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) platform in strains of pure cultures and their cocultures. This set of techniques, made it possible to identify metabolites highlighted in co-cultures. Among the results, the isolation of an exophilic acid derivative (2-hydroxy-4-[4-hydroxy-2-nonyl-6-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybenzoyl]oxy-6-nonylbenzoic acid), ($C_{40}H_{58}O_{17}$). Agar diffusion assays were performed with co-culture (halo de inhibition 24,5 mm) and pure culture of the crude extract *Exophiala spinifera* (halo de inhibition 24,8 mm) and isolated compound (P7) (halo de inhibition 25,8 mm) showed inhibition for *L. gongylophorus*. Bioassays were also performed with the enzyme Acetylcholinesterase (AChE) extracted from *Electrophorus electricus* and AChE the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. They were tested with crude extract of *Exophiala spinifera* (I % 75.04 ± 0.099) and with the compound isolated (P7) from black yeast monocultures (I % 68.45 ± 0.020), which showed inhibition. The isolated compound P7 and the crude extract of *Exophiala spinifera* was evaluated for the inhibition of Acetylcholinesterase enzyme in disposable microelectrodes, showing inhibition. In this context, compounds biosynthesized

by the microorganism *Exophiala spinifera* can be natural alternative for the control of leaf-cutting ants.

Keywords: Leaf-cutting ants, *Exophiala spinifera*, *Leucoagaricus gongylophorus*, Microbial coculture, Biological control.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Importância da Agricultura.....	1
2. Objetivos	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. Revisão Bibliográfica.....	5
3.1 Formigas cortadeiras	5
3.2 O Fungo mutualista das formigas cortadeiras, <i>L. gongylophorus</i>	6
3.3 Leveduras negras	7
3.3.1 Levedura negra <i>Exophiala sp.</i>	8
3.4 Cocultivo de microrganismos	9
4. Metodologias	11
4.1 Materiais e métodos	11
4.2 Otimização das condições de crescimento em meio líquido	12
4.2.1 Seleção do meio de cultura	12
4.3 Procedimento da Extração líquido-líquido	13
4.4 Cinética de crescimento da <i>E. spinifera</i> em meio líquido.....	14
4.5 Cocultivos em diferentes condições entre <i>L. gongylophorus</i> e <i>E. spinifera</i>	14
4.6 Análise uni e multivariada dos dados dos cocultivos.....	16
4.7 Construção dos mapas moleculares na plataforma GNPS (<i>Global Natural Product Social Molecular Networking</i>).....	16
4.8 Estudo da cultura pura da levedura negra <i>Exophiala spinifera</i>	18
4.8.1 Crescimento do <i>Exophiala spinifera</i> em maior quantidade para o estudo químico	18
4.8.2 Procedimento da análise exploratória da cultura pura <i>Exophiala spinifera</i>	18
4.8.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do composto isolado.....	20
4.8.4 Metodologia de análises por UHPLC-Q-ToF-MS do composto isolado	20
4.9 Atividades Biológicas.....	22
4.9.1 Ensaio antifúngico de difusão em ágar	22

4.9.2 Ensaio na enzima Acetilcolinesterase.....	23
4.9.3 Método de ensaio para a inibição da enzima acetilcolinesterase em microeletrodos descartáveis.....	24
4.9.3.1 Construção dos microeletrodos e imobilização da enzima acetilcolinesterase	24
4.9.3.2 Ensaio de imobilização da enzima acetilcolinesterase.....	25
5. Resultados e discussões.....	26
5.1 Características das cepas da levedura negra <i>E. spinifera</i>	26
5.2 Otimização do crescimento da levedura negra <i>E. spinifera</i>	27
5.2.1 Escolha do meio de cultura	27
5.2.2 Cinética de crescimento	30
5.3 Cocultivos em diferentes condições em meio líquido	33
5.4 Análise estatísticas geral dos dados	35
5.4.1 Análises estatísticas dos cocultivos: Uso do MetaboAnalyst	35
5.4.1.1 HeatMap análise de correlação	35
5.4.1.2 Análises de componentes principais (PCA, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>) de todos os cocultivos.....	37
5.4.1.2.1 Variância explicada.....	40
5.4.1.3 Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) de todos os cocultivos.....	41
5.4.1.4 Análise de agrupamento hierárquico (HCA) de todos os cocultivos..	44
5.4.1.5 <i>Heat Map</i> com <i>test T features</i> com todos os dados	45
5.5 Análise estatística individuais de cada cocultivo	49
5.5.1 Análises dos PCAs individuais dos cocultivos.....	49
5.5.2 Análise de PLS-DAs individuais dos cocultivos	51
5.6 Estudo detalhado do cocultivo H-C_ML_30 dias	55
5.6.1 Análise do PLS-DA do cocultivo H-C_ML_30 dias.....	55
5.6.2 Análise do <i>HeatMap</i> do cocultivo H-C_30 dias.....	56
5.6.3 Análise da projeção de importância da variável (VIP) do PLS-DA, do cocultivo H-C_ML_30 dias.....	57
5.7 Construção das redes moleculares na plataforma GNPS- Global Natural Products Social.....	60
5.7.1 Redes Moleculares	60
5.8 Resultados dos estudos do extrato da monocultura da <i>Exophiala spinifer</i>	79
5.8.1 Isolamento do metabólito secundário da levedura negra <i>Exophiala spinifera</i>	79

5.8.2 Elucidação estrutural do metabolito da levedura negra <i>Exophiala spinifera</i>	85
5.8.2.1 Análise de espectrometria no infravermelho	94
5.8.2.2 Espectrometria de massa do composto isolado em outras culturas ...	96
<u>6. Atividades biológicas.....</u>	101
6.1 Avaliação antifúngica de difusão em ágar	101
6. 2 Avaliação da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo método espectrofotométrico de Ellman	102
6.3 Ensaio para a inibição da enzima acetilcolinesterase em microelétrodos descartáveis.....	104
7. Conclusões.....	108
8. Referências bibliográficas	110
Anexo 1.....	118

1.1 Importância da Agricultura

Ao longo da história do desenvolvimento da vida na terra, a natureza sempre se adequou em encontrar um equilíbrio para a competição entre diferentes espécies por recursos naturais permitindo o desenvolvimento e a coexistência entre os diferentes organismos. Entretanto neste sistema complexo um pequeno desequilíbrio causado por determinadas situações pode acarretar consequências muitas vezes trágicas. O homem como parte deste sistema sempre participou desta competição buscando a melhora da sua condição de vida e gradativamente a sua expectativa de vida aumentou, conseqüentemente ocorreu um aumento da população (BARBOSA, 2004).

Desde os primórdios, o homem tira seu sustento da terra, viviam da caça, da pesca, frutos etc. encontrados na natureza. Com o estabelecimento da agricultura há aproximadamente 10000 anos, passou a cultivar inúmeras espécies de vegetais, iniciou-se a estocagem de grãos, carnes e vegetais, com a expansão da área agrícola (BARBOSA, 2004; CARVALHO, 2006) o que também resultou num crescimento da atuação de insetos pragas.

Tais fatores intensificaram o desenvolvimento da agricultura convencional (PIMENTEL; BURGESS, 2014) mais sustentável e ecologicamente correta, aderindo algumas tecnologias tradicionais de agriculturas orgânicas. Mas foi à curto prazo, com aumento da produção de alimentos, no entanto à longo prazo foram gerados diversos problemas ambientais (CARVALHO, 2006).

Como consequência, os campos cultivados tornaram-se uma excelente fonte de alimentos para vários tipos de insetos, roedores e também alvo de ataques de fungos e bactérias (BARBOSA, 2004), que prejudicam as plantações e, conseqüentemente, o rendimento agrícola.

Insetos e fitopatógenos que, devido à disponibilidade de alimentos, se multiplicam rapidamente e em grande escala, tornando-se um problema para o sustento humano e, em razão disso, serem consideradas como pragas (BARBOSA, 2004). Todos estes fatores têm levado à busca contínua por novos agentes pesticidas eficientes, que representem maior segurança ao homem e ao meio ambiente. Com a finalidade de mudar este cenário, inúmeros agentes agroquímicos são propostos para o uso, embora alguns sejam eficientes na erradicação de pragas, demonstram ser mais prejudiciais que benéficos ao meio ambiente. Por isso, práticas agrícolas consolidadas no uso do controle químico convencional, vem se atualizando, considerando aspectos de segurança e a conservação do equilíbrio do ecossistema via métodos alternativos ao controle, por exemplo, de insetos praga (VIEGAS, 2003).

Embora já exista no mercado um grande número de compostos para controle de diversos de insetos, o mercado exige uma demanda crescente por novos produtos, pelo fato de que os organismos desenvolvem resistências a estes produtos após certo tempo de contato com eles. Dessa forma, estes passam a ser menos efetivos e/ou muitas vezes perdem completamente a sua atividade, o que demanda da aplicação de doses mais concentradas ou mesmo do desenvolvimento de novos produtos para controle (BARBOSA, 2004).

Há vários anos muitos pesquisadores vem estudando o comportamento das formigas cortadeiras que causam grandes danos e prejuízos à agricultura. Essas espécies afetam plantações em qualquer época do ano sendo encontradas diversas variedades no Brasil (SOUSA, 1996).

Novas técnicas de manejo de formigas cortadeiras vêm sendo estudada e utilizada na agricultura. Um exemplo é a utilização de microrganismos que produzem metabólitos que podem ser usados como agroquímicos ou como inibidores de sua função frente ao inseto invasor.

Portanto esse trabalho propôs mostrar que o conhecimento da química de produtos aliada ao manejo integrado de pragas e controle biorracional

de insetos pragas, podem possibilitar o desenvolvimento de métodos eficazes de controle de formigas cortadeiras a partir do cocultivo de fungos simbiotes.

2.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho foi o controle do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, e como consequência de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*). Portanto o trabalho buscou algumas estratégias com o objetivo de induzir substâncias químicas por meio de condições de cocultivo em caldos entre levedura negra *Exophiala spinifera* e o mutualista das formigas cortadeiras *Leucoagaricus gongylophorus*, determinando metabólitos secundários produzidos por essa levedura em comparação com seu cultivo isolado. Finalmente também buscou-se avaliar as atividades biológicas de extratos e metabólitos resultantes dos cultivos.

2.2 Objetivos específicos

1) Realizar o cocultivo entre o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* frente a levedura negra *Exophiala spinifera*, do ninho das formigas cortadeiras do gênero *Atta*, usando diferentes condições de cocultivo em meio líquido, com a finalidade de induzir metabólitos secundários com atividade biológica para o controle da formiga cortadeira.

2) Utilizar ferramentas estatísticas multivariadas e mapeamento por *Molecular Networking* dos metabólitos produzidos nos cocultivos, associados com análises quimiométrico com a finalidade de testar diferentes proposições a partir dos dados empíricos obtidos.

3) Verificar atividade biológica, fungicida e atividade enzimática contra o fungo mutualista *L. gongylophorus*, para o controle da formiga cortadeira (*Atta sexdens*).

3.1 Formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras são insetos sociais da tribo Attini, pertencem a ordem Hymenoptera, família Formicidae e subfamília Myrmicinae. Os gêneros de maiores importância são as *Attas* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) (MUELLER *et al.*, 1998).

Os ninhos adultos das formigas cortadeiras (gênero *Atta* e *Acromyrmex*) são compostos por milhares de câmaras subterrâneas, as quais abrigam o jardim de fungo, resíduos e a população desses insetos.

Estes gêneros estão distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina (MARICONI, 1970; DELABIE *et al.*, 2011). Suas colônias são grandes. Saúvas e quenquéns utilizam folhas frescas, brotações e flores como substrato para o cultivo de seu fungo, e por esse motivo são consideradas pragas potenciais para as atividades agrícolas e florestais (Figura 1).



FIGURA 1 - Formigas cortadeiras - manejo integrado de saúvas e quenquéns
Fonte de imagem Disponível em: <https://www.cpt.com.br/artigos/formigas-cortadeiras-manejo-integrado-de-sauvas-e-quenquens> tp.com.br . Acesso em: julho de 2019.

3.2 O Fungo mutualista das formigas cortadeiras, *L. gongylophorus*

O fungo cultivado pelas saúvas é um Basidiomiceto, do qual as formigas se alimentam, fornecendo-o também às larvas como único alimento. Esse fungo é cultivado pelas formigas, inoculando-o sobre material vegetal repicado que foi coletado (SOUSA, 1996).

Todos os anos entre outubro e novembro ocorrem à propagação, que é feita por rainhas jovens, que saem, no período do "voo nupcial". Estas rainhas saem de seus ninhos, são fertilizadas pelos machos e, em seguida, vão ao solo já desalada para formar novos ninhos (WEBER, 1972).

Elas trazem um inóculo do fungo em sua cavidade bucal, que é expelido assim que elas preparam o substrato para o início de seu cultivo, que nesta fase é feito em ovos colocados pela rainha especialmente para este fim (SILVA *et al.*, 2004). Após eclodirem as primeiras operárias, estas iniciam então a coleta de material foliar no ambiente externo, e é neste substrato que o fungo vai produzir biomassa para o crescimento do ninho. O substrato vegetal coletado para o cultivo do fungo é preparado cuidadosamente pelas operárias (SILVA *et al.*, 2004).

O fungo *L. gongylophorus* produz enzimas que degradam polissacarídeos foliares, transformando-os em nutrientes assimiláveis, que são utilizados tanto para o seu crescimento, como para suportar a sobrevivência das formigas (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2004) (Figura 2).



FIGURA 2 - Ilustração do formigueiro mostrando a rainha e o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus*.

Fonte de imagem: Atta colombica queen, photo courtesy of Wikimedia commons. Disponível em: <Commus.wikimedia.org> Acesso em: julho de 2019.

3.3 Leveduras negras

As leveduras negras formam um grupo de fungos heterogêneos quanto à taxonomia e filogenia que abrange membros Ascomicetos pertencentes quase que exclusivamente as ordens Dothideales e Chaetothyriales (DE HOOG *et al.*, 2011).

De acordo com ALVIANO e colaboradores (2004) a maioria das leveduras negras são sapróbios habituais do solo e de vegetais em decomposição e também ocorrem em ambientes próximos das formigas e no corpo delas. Estudos indicam que a levedura negra compete por nutrientes com a Actinobactéria *Pseudonocardia*, interferindo em seu crescimento.

Na literatura encontra-se muitas pesquisas realizadas voltadas ao caráter patogênico da levedura negra, que são na maioria potenciais oportunistas (DE HOOG *et al.*, 2011). Infecções micóticas causadas por *Exophiala* sp. têm sido relatadas, e em muitos casos podem levar a óbito.

As leveduras negras também pertencem a um grupo de fungos poliextremotolerantes, pertencentes principalmente à ordem Chaetothyriales, capazes de se desenvolverem em ambientes extremos. A tolerância a habitats hostis pode ser explicada por sua própria capacidade de sobreviver sob condições

ácidas, alcalinas e tóxicas, alta temperatura e baixa disponibilidade de nutrientes (MORENO, L.F. *et al.*, 2018).

Embora esse grupo de leveduras sejam de grande potencial patógenos e oportunista, algumas espécies são isoladas em ambientes naturais, o que nos indicam que as espécies de *Exophiala* se adaptam e prosperam em múltiplos habitat (MACIÁ-VICENTE, J.C. *et al.* 2016).

3.3.1 Levedura negra *Exophiala* sp.

Os fungos pertencentes ao gênero *Exophiala* sp (Família Herpotrichiellaceae) são descritos como leveduras negras devido seu crescimento ser igual a de leveduras. O aspecto morfológico é leveduriforme e apresentam produção de melanina.

Exophiala spinifera (Figura 3) é um destes microrganismo com potencial patogênico em pacientes imunodeprimidos, e é conhecido como fungo negro devido à pigmentação encontrada em sua parede celular (GUERIM, I. 2007).

Geralmente as colônias apresentam um aspecto escuro (marrom, verde oliva ou negras) filamentosos, onde microscopicamente observam-se hifas com septos escuros. Muitas espécies são sapróbias (alimentam-se de matéria orgânica provenientes de organismos mortos) e de crescimento rápido.

Existem espécies patogênicas que se desenvolvem lentamente em meios de cultura definidos (DE HOOG e GUARRO, 1995). A melanização da parede celular depende das condições de cultivo utilizada e, assim, pode variar de acordo com o meio de cultivo, temperatura e tempo de incubação utilizado.

É uma levedura negra encontrada no solo, material de plantas e biodegradação. Podem ser causa de algumas inflamações: como faeohifomicoses, infecções viscerais e pulmonares, particularmente em pacientes imunocomprometidos (SUZUKI *et al.*, 2015).

O gênero *Exophiala*, caracterizado pela conidiogênese anelídica, compreende atualmente mais de 40 espécies (ZENG *et al.*, 2007).



FIGURA 3 - Representação Microscópica da *Exophiala spinifera*

Fonte: Imagens representativas de leveduras negras do Broad Institute cortesia de Tadahiko Matsumoto, P. McIntosh, PJ Szaniszlo, CR Cooper, Jr., JD Marlow e MJ Wheeler. Acesso em: julho 2019.

3.4 Cocultivo de microrganismos

Nos últimos anos, a busca por compostos bioativos provenientes de rotas metabólicas tem levado ao desenvolvimento de novas ferramentas analíticas, bem como a aplicação de diferentes metodologias. Uma das estratégias para tal produção metabólica é o uso de cultivos em cocultura, onde a interação entre dois ou mais microrganismos pode mimetizar, de certa maneira, as relações tróficas existentes na natureza (FERNANDES, 2017) (Figura 4).

No cocultivo há competição por nutrientes e espaço que leva a produção de compostos relativos a um determinado tipo de interação que pode estar relacionado a inibição de crescimento ou estimulação.

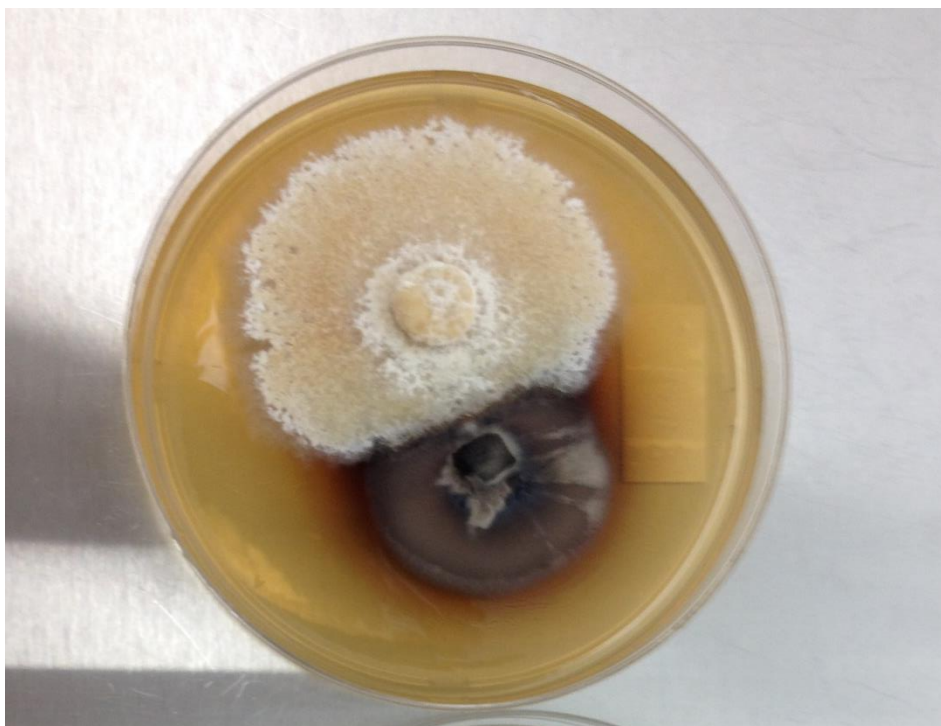


FIGURA 4 - Representação de um cocultivo em meio sólido
Fonte imagem fotografada pelo autor durante experimentos.

A ideia de cocultura de microrganismos é uma reprodução das comunidades naturais de microrganismos que está presente em todo lugar na natureza. Dentro dessas comunidades, os micróbios interagem através de moléculas de sinalização ou defesa.

Os metabólitos secundários obtidos de microrganismos são considerados os melhores recursos para a descoberta de medicamentos. Nos últimos anos cresceram também o número de isolamento de novos produtos naturais microbianos e reisolamento de metabólitos secundários conhecidos (RATEB, M.E. *et al.*, 2013).

Pesquisas apontam que a tendência é cada vez maior e tais estudos são de potencial interesse como novas alternativas para a descoberta de novos compostos (BERTRAND, S. *et al.*, 2014).

4.1 Materiais e métodos

Para este estudo, utilizou-se cepas do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e da levedura *Exophiala spinifera* gentilmente cedidas pelo Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP Rio Claro e registradas no Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN – Brasil).

Estas cepas foram isoladas das formigas cortadeiras, especificamente a *E. spinifera* do bitú (macho) de *Atta laevigata* (saúva cabeça de vidro), o *L. gongylophorus* do jardim de fungos do ninho de formigas cortadeiras *Atta* e foram armazenadas em *vial*, contendo meio de cultura composto por extrato de levedura, extrato de malte e ágar, na temperatura à 4 °C. Informações adicionais sobre os microrganismos podem ser verificadas na Tabela 1.

TABELA 1 -Informações sobre os microrganismos: fungo mutualista e levedura negra.

	Levedura negra	Fungo mutualista
Táxons	<i>Exophiala spinifera</i>	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>
GenBank	AY484985	-
Similaridade	97%	-
Código das Cepas	AP449	FF2006 - LG
Fonte de isolamento	Bitu de <i>Atta laevigata</i>	Jardins de <i>Atta sexdens</i>
Cidade e Ano	Botucatu - SP, 2012	Corumbataí - SP, 2006

Fonte: Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP Rio Claro

Análise microscópica foi realizada na cepa cultivada em BDA por 15 dias, 25 °C para observar no microscópio óptico LEICA ICC50 HD, objetiva PLAN 10 x /0,22, a viabilidade das mesmas.

Repiques foram periodicamente executados para a conservação das cepas. Esta técnica consiste na realização de repiques das culturas de microrganismos em placas de Petri, contendo meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), incubadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a temperatura de 25 °C, a cada 20 dias, para *E. spinifera*, e para o *L. gongylophorus* foi utilizado o Meio Mix (Mix-sigla utilizada), que é um meio composto de malte enriquecido com Peptona G e *Yeast extract* e agar).

4.2 Otimização das condições de crescimento em meio líquido

4.2.1 Seleção do meio de cultura

Para a obtenção do meio de cultura líquido que possibilitasse o crescimento da levedura negra, *E. spinifera*, e ao mesmo tempo estimulasse a produção de uma maior variedade de metabólitos, estudos preliminares foram executados. Para isso, quatro meios de culturas foram preparados, sendo eles:

1. Meio BD: Meio batata dextrose (BD).
2. Meio MIX: Meio malte enriquecido com peptona G e extrato de levedura.
3. Meio Forte (MF): Meio enriquecido com glicose, amido, peptona G, soytona, extrato de carne e extrato de levedura.
4. Czapek Dox Broth: Meio de sacarose, nitrato de sódio, difosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de potássio e sulfato de ferro (Czapek).

Os meios de culturas foram preparados no volume de 250 mL, em frascos marca Shott, (500 mL) e autoclavados à temperatura de 121 °C, à pressão 1 atm., durante 20 min.

Um dia após o preparo dos meios de cultura, verificaram-se possíveis contaminações ambientais no meio e/ou manipulações. A levedura negra foi inoculada adicionando três discos da cultura repicada em BDA (aproximadamente 10 mm de diâmetro) em cada frasco. Posteriormente, os frascos foram mantidos em repouso em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 21 dias. Esse experimento foi preparado em quadruplicatas.

4.3 Procedimento da Extração líquido-líquido

Após o crescimento da cultura de *E. spinifera* por 21 dias, foram realizadas extrações utilizando uma cuba ultrassônica com banho de água (Soni-tech TDR force), à temperatura ambiente por 15 min. A suspensão obtida foi transferida para um funil de Buchner de 400 mL, encaixado em Kitassato de 1000 mL, filtrado à vácuo utilizando papel de filtro qualitativo de 12,5 cm, para retirar partes do micélio e possíveis partículas sólidas. Após essa etapa iniciou-se a extração líquido-líquido empregando um funil de separação (2000 mL). Para cada volume do filtrado aquoso foi adicionado acetato de etila PA em igual proporção (1:1 v/v), sendo submetido a três extrações líquido-líquido sucessivamente, objetivando a extração de substâncias orgânicas presentes no filtrado. A fase orgânica foi reservada, e a fase aquosa foi descartada. Depois de terminada a extração, a fase orgânica foi submetida a três extrações utilizando água destilada na proporção (1:1 v/v) (*clean up*).

Em seguida o extrato orgânico foi seco sob vácuo, utilizando um evaporador rotativo (Marca Buchi, Brasil), na temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os extratos secos foram dissolvidos em pequena quantidade de acetona PA e deixados para a completa secagem em capela de exaustão por 24 h.

Pelo mesmo processo descrito acima foram preparados meios de cultura não inoculados que foram utilizados como controle.

Na próxima etapa as amostras dos extratos foram dissolvidas em metanol, na concentração de 1 mg. mL⁻¹ (metanol grau HPLC) e filtrados usando filtros PTFE (Politetrafluoroetilenos) com 0,22 µm de porosidade.

Os extratos obtidos foram analisados utilizando um sistema de cromatografia líquida Waters Acquity UPLC I-Class equipado com um detector de arranjo de fotodiodo (PDA) (Milford, MA, USA).

4.4 Cinética de crescimento da *E. spinifera* em meio líquido

Para verificar a diversidade metabólica produzida em função do tempo de incubação (cinética de crescimento), foram realizados experimentos de culturas em meio líquido, utilizando diferentes períodos de crescimentos da levedura negra *E. spinifera*.

Neste estudo, a levedura negra foi incubada adicionando-se três discos da cultura repicada em BDA (aproximadamente 10 mm de diâmetro) em frascos marca Schott (500 mL) contendo 200 mL de meio de cultura Czapek Dox Broth. A cada cinco dias de incubação foram retirados três frascos (experimentos em triplicata), e realizadas extrações líquido-líquido, conforme descrito na seção 4.3. Para cada volume do filtrado aquoso foi adicionado acetato de etila PA em igual proporção (1:1 v/v), sendo submetido a três extrações líquido-líquido sucessivamente.

O período total de incubação do experimento foi de quarenta dias. Portanto, um total de oito diferentes períodos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias) foram analisados. Os extratos obtidos também foram analisados no cromatógrafo Waters Acquity UPLC I-Class.

4.5 Cocultivos em diferentes condições entre *L. gongylophorus* e *E. spinifera*

Para executar os experimentos, culturas puras da levedura negra *E. spinifera* (C) e do fungo mutualista *L. gongylophorus* (H) foram cultivados separadamente em meio de cultura sólido BDA e no meio de cultura Mix respectivamente, obedecendo todas as condições ótimas de cultivo de cada um isoladamente.

Foram realizadas cinco condições de cocultivo, sendo:

- a) O fungo mutualista (H) e a levedura negra (C) foram inoculados no mesmo dia e no mesmo frasco (Shott, 200 mL), (**sigla HcomC_15 d**). Esse cocultivo permaneceu incubado por 15 dias a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). A extração líquido-líquido foi realizada com 15 dias de incubação.
- b) O fungo mutualista (H) e a levedura negra (C) foram inoculados no mesmo dia e no mesmo frasco (Shott 200 mL), (**sigla HcomC_30 d**). Esse cocultivo permaneceu incubado por 30 dias a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). A partição líquido-líquido foi realizada com 30 dias de incubação.
- c) O fungo mutualista (H) foi inoculado por 15 dias, e após este período inoculou-se a levedura negra (C), (**sigla H-C_30 d**). Esse cocultivo permaneceu mais 15 dias incubado, em temperatura ambiente (25 ± 3 °C). O tempo total de incubação foi de 30 dias e após esse período a extração líquido-líquido foi realizada.
- d) A levedura negra (C) foi inoculada por 15 dias e posteriormente o fungo mutualista (H) foi inoculado, (**sigla C-H_30 d**). Esse cocultivo permaneceu mais 15 dias incubado, a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). O tempo total de incubação foi de 30 dias, intervalo em que se realizou a extração líquido-líquido.
- e) O cultivo do fungo mutualista (H) e da levedura negra (C) foi realizado separadamente. Após 15 dias, removeu-se 100 mL de cada cultura e misturou-se em um frasco (Shott, 200 mL), (**sigla H+C_30d**). Esse cocultivo permaneceu incubado mais 15 dias, a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). O tempo total de

incubação foi de 30 dias, A extração líquido-líquido foi realizada com 30 dias de incubação.

Para os controles negativos, as culturas puras de *L. gongylophorus* (H) e de *E. spinifera* (C) foram cultivadas e retiradas para extração com 15 e 30 dias.

4.6 Análise uni e multivariada dos dados dos cocultivos

Para a análise uni e multivariada dos dados, inicialmente os arquivos dos dados adquiridos nas análises por LC-MS (extensão ".d"), foram convertidos para a extensão "mzXML" utilizando o *software* MSConvert (*Proteowizard website*). Depois de convertidos, os dados foram processados no MZMine 2.34 (MZmine VTT, Finland), compatíveis com o detector Q-ToF- MS para o processamento dos dados (CHONG; YAMAMOTO; XIA, 2019) e a organização em tabelas.

Nas tabelas, os dados foram organizados em função da razão m/z , dos tempos de retenção e da área dos picos. Estas variáveis foram avaliadas nas análises estatísticas univariadas e multivariadas de PCA, PLS-DA e HCA realizadas utilizando-se a plataforma *Metaboanalyst* 4.0 (Ferramenta de processamento de dados de metabolômica, de acesso gratuito, acessível em <http://www.metaboanalyst.ca>), importante neste estudo porque possibilitou a obtenção de resultados que permitiu responder aos objetivos desse trabalho.

4.7 Construção dos mapas moleculares na plataforma GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*)

Para a anotação dos espectros de fragmentação, foi realizado o uso da Plataforma do *Global Natural Products Social* (GNPS) na construção das redes moleculares usando diferentes ferramentas disponíveis na plataforma. Para a construção dos mapas molecular, os arquivos no formato mzML foram

submetidos a plataforma, e os dados foram organizados pela similaridade espectral (com o cosine score de 0.65, na qual quanto mais próximo de 1 mais similares são os espectros).

Os links utilizados nestas análises foram os descritos a seguir:

Geral:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=f937bd27869046658988307270468c12>

Cocultivo A (Levedura negra com *Leucoagaricus gongylophorus*) (C com H_15 dias)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=7fd75c2ae9c0431d849fb4532f95d46c>

Cocultivo B (Levedura negra com *Leucoagaricus gongylophorus*) (C com H_30 dias)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1ec0777033e84e4f9be24cfef35a7b3d>

Cocultivo C (*Leucoagaricus gongylophorus*- Levedura negra) (H-C_30 dias)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=1705c7fff074463da32bcd336127fb3d>

Cocultivo D (Levedura negra - *Leucoagaricus gongylophorus*) (C-H_30 dias)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=89bed670891a497cb59a8464c6e306f2>

Cocultivo E (Levedura negra + *Leucoagaricus gongylophorus*) (C+H_30 dias)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b2537e0713184463a02772eb783eae19>

MolNetEnhancer

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ea26c6dd41174d11b9ca6664eae6620>

4.8 Estudo da cultura pura da levedura negra *Exophiala spinifera*

4.8.1 Crescimento do *Exophiala spinifera* em maior quantidade para o estudo químico

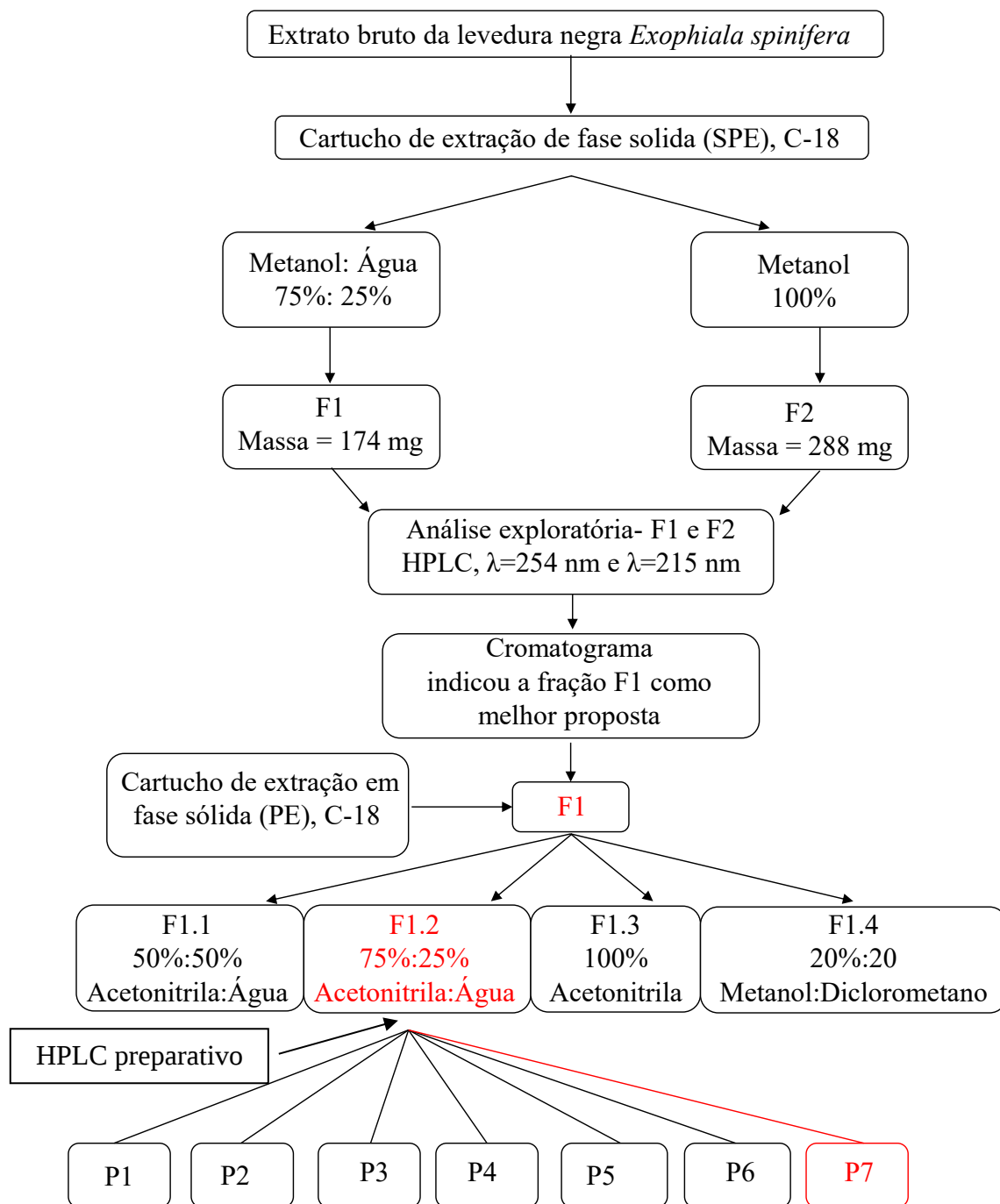
Para executar o experimento, culturas puras da levedura negra *E. spinifera* previamente cultivadas em placas de Petri, com meio de cultura sólido BDA, obedecendo todas as condições ótimas de cultivo foram utilizadas.

Um estudo da cultura axênica em meio líquido foi estabelecido usando 10 litros de meio de cultura Czapek Dox Broth (marca KASVI), para a obtenção de uma maior quantidade de massa seca de possíveis metabólitos. Três inóculos da levedura negra foram adicionados em 200 mL de meio de cultura líquido, contidos em frascos de vidro (Schott 500 mL), sem agitação, por 30 dias, a temperatura ambiente (25 ± 3 °C). A extração líquido-líquido foi realizada seguindo a mesma metodologia descrita na seção 4.3. Para o extrato seco, iniciou-se a etapa de separação e isolamento das substâncias.

4.8.2 Procedimento da análise exploratória da cultura pura *Exophiala spinifera*

Primeiramente o extrato bruto da levedura negra *E. spinifera* foi dissolvido em metanol grau HPLC e a solução concentrada de extrato foi submetida à extração em fase sólida (SPE) utilizando sistema Manifold (Allcrom) à vácuo e cartuchos compostos por sílica C-18, 10 g, 60 mL, SPE tube, marca SupelcleanTM, Sigma Aldrich. Para cada extrato obtido foram realizadas duas extrações distintas para avaliar a influência da mistura extratora, como pode-se observar no Esquema 1. Assim, avaliou-se a eluição dos metabólitos utilizando metanol e água, na proporção 75:25 (v/v), e 100 % de metanol grau HPLC. Nestas eluições foram coletadas duas frações denominadas F1(massa = 174 mg) e F2

(massa = 288 mg). O Esquema 1 mostra a sequência de ações na separação dos metabólitos do cultivo da cultura pura da levedura negra *E. spinifera*.



Esquema 1 - Sequência de ações na separação dos metabólitos do cultivo da levedura negra *E. spinifera*.

As frações F1 e F2 foram diluídas para a concentração de 2 mg/mL, utilizando metanol e submetidas a uma análise exploratória no cromatógrafo líquido de alta eficiência (Cromatógrafo líquido de alta eficiência, acoplado ao detector PDA: Shimadzu® Corporation, modelo LC-20AR Prominence®, equipado, com degaseificador DGU-20A5R, bomba quaternária LC-20AR Prominence®, módulo de comunicação CBM-20A, amostrador automático SIL-10AF e coletor de frações FRC-10^a e detector de arranjo de fotodiodo SPD-M-20^a); no comprimento de onda (λ) 254 nm e 215 nm.

Foi empregada uma fase móvel, usando acetonitrila grau HPLC e água ultrapura (Milli-Q, v/v), ambas com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente foi de 5% a 95% de acetonitrila acidificada, com tempo total de análise 40 min. A coluna utilizada para as análises foi Phenomenex, (P/Nº: 00G-4435-E0); Gemini® de 5µm C18 110 Å; 250 x 4.6 mm).

4.8.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do composto isolado

Para o composto isolado da levedura negra *E. spinifera* foram executadas as análises de RMN ¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HMBC, HSQC. Estas análises foram adquiridas em espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz, utilizando tubos de RMN de 5 mm, (marca Bruker). As amostras foram preparadas em solvente deuterado metanol *d*4 (Sigma-Aldrich®).

4.8.4 Metodologia de análises por UHPLC-Q-ToF-MS do composto isolado

As amostras foram analisadas em Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPLC-Q-ToF-MS, Agilent 6545 B). A fase móvel composta por água Ultrapura (Milli-Q) e a Acetonitrila grau HPLC, ambas acidificadas com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. As análises foram realizadas empregando a

proporção de 20:80 (v/v) respectivamente. A vazão da fase móvel foi 0,300 mL/min e o volume de injeção foi de 1 µL. A coluna utilizada para a separação foi SB-C18RRHD (Agilent, 3.0 x 50 mm, 1.8 µm).

As aquisições de espectros de MS, foram realizadas usando um sistema Agilent 6545, Q-ToF-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma interface eletrospray, no modo positivo (ESI⁺), sendo empregado os seguintes parâmetros para a ionização e análise:

Tipo de ionização	ESI ⁺
Gás Temp. (°C)	320
Gás Flow (L.min ⁻¹)	8
Nebulizer (Psi)	35
Sheath Gás Temp. (°C)	350
Sheath Gás Flow	11
VCap	3500
Nozzle Voltage (V)	1000
Fragmentor	30,60,80
Skimmer	65
Energia de colisão	-
OctopoleRFPeak	750

A faixa *m/z* monitorada foi de 50 a 1500 Da, faixa de varredura de três espectros por segundo e processado pelo *software Mass Hunter Workstation Software*, versão B.08.00. (Agilent).

4.9 Atividades Biológicas

4.9.1 Ensaio antifúngico de difusão em ágar

Para a realização dos experimentos, inicialmente o fungo mutualista *L. gongylophorus* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura Mix, devidamente esterilizado e este se manteve incubado em BOD durante 28 dias.

Após o período de incubação do fungo mutualista, iniciou-se a preparação do inóculo adicionando um volume de 5 mL da solução salina de NaCl 0,9 % (m/v), autoclavada (121 °C, pressão de 1 atm., durante 20 min.), sobre o ágar na placa de Petri e homogeneizou-se para retirar os conídios do fungo. Transferiu-se com auxílio de uma pipeta a solução da placa de Petri para um tubo Falcon de plástico de 15 mL. Manteve-se essa solução por aproximadamente 15 min. para decantar as partículas maiores. Com uma pipeta retirou-se a suspensão homogênea e foi adicionada em outro tubo Falcon (15 mL).

Esse inóculo foi ativado em frasco de vidro (20 mL) contendo uma solução preparada na proporção 1: 5 de caldo Sabouraud (39 g/L, autoclavado à 121 °C, 1 atm. Por 20 min) e uma solução salina contendo fungo. Eles foram mantidos em BOD a temperatura 25 °C, durante 15 dias.

Na placa de Petri contendo o meio Mix, fez-se um orifício de aproximadamente 6 mm de diâmetro, em seguida pipetou-se com auxílio de uma pipeta de 1 mL de inóculo na placa de Petri, tomando-se o cuidado de não deixar cair dentro do orifício. O inóculo contido na placa foi espalhado com uma alça de Digalski esterilizada, aguardou-se 30 min. para permitir que o excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido.

Neste tempo prepararam-se as amostras na concentração de 0,1 g/mL, em solvente DMSO (dimetilsulfóxido). Pipetou-se 50 µL do extrato no interior do orifício, fechou-se a placa de Petri com filme e a placa foi mantida sob incubação em BOD a temperatura de 25 °C, durante 15 dias. Todos os ensaios

foram realizados em quadruplicatas. Foram realizados experimentos de controle negativo, substituindo a amostra por DMSO puro, também preparou-se uma placa sem adição da amostra, contendo apenas o fungo mutualista.

4.9.2 Ensaio na enzima Acetilcolinesterase

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi determinada em cubetas baseada no método espectrofotométrico de Ellman, modificado por (RHEE *et al.*, 2001). A acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus*, o 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), o substrato iodeto de acetiltiocolina (ASChI) foram obtidos da Sigma. A AChE de *Atta sexdens* foi obtida por extração e purificação no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE). Em cada cubeta foram adicionados 37,5 μ L de ASChI 1 mg. mL⁻¹, 37,5 μ L de DTNB, 125 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 520 μ L de água ultrapura e 80 μ L do extrato do fungo e do composto, em concentração de 1 mg.mL⁻¹. DMSO e tris-HCl foram usados como controles. A absorbância foi medida em comprimento de 412 nm utilizando o leitor Thermoplate[®], modelo TP-reader.

Aumentos na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foram corrigidos pela subtração da taxa de reação em controle sem adição da enzima. A porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte equação:

$$\% I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$$

Sendo Abs₀ e Abs₁ as absorbâncias medidas antes e após a inibição.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade enzimática e o percentual de inibição da AChE foram calculados utilizando o programa Microsoft[®] Excel.

4.9.3 Método de Ensaio para a inibição da enzima acetilcolinesterase em microeletrodos descartáveis

4.9.3.1 Construção dos microeletrodos e imobilização da enzima acetilcolinesterase

O método *screen-printing*, ou serigrafia, foi utilizado para a construção dos microeletrodos. Os desenhos para os eletrodos foram desenvolvidos pelo *software* Silhouette Studio V3.

Uma folha adesiva de vinil foi recortada no formato desenhado para os eletrodos por uma impressora de recorte. Após o recorte a folha de vinil foi transferida para uma folha de poliéster. Então, com o auxílio de um espalhador tipo rodo, a tinta de carbono foi dispersa sobre o vinil recortado.

Para a cura da tinta, os eletrodos foram mantidos em estufa à 90 °C por um tempo de 30 min. Em seguida, na área do eletrodo de referência, foi aplicada com o auxílio de um pincel, tinta de cloreto de prata, e os eletrodos foram mantidos mais uma vez em estufa, à 60 °C por 30 min. Antes de cada experimento, a área de delimitação para o contato elétrico e a superfície do eletrodo foi definida com um recorte de folha de vinil.

Para a etapa de imobilização da AChE em SPE, foi necessária modificação da superfície do eletrodo de trabalho, adicionando 10 μL da solução de 2,0 mg. mL^{-1} de poli (cloreto de dialildimetilamônio, PDDA) e deixando a mesma sobre o eletrodo de trabalho durante 20 min. Em seguida, após retirada de excesso, foram adicionados 1 μL de nanopartículas de ouro decoradas com glutathione (AuNP-GSH) que por 20 min. agiu sobre o eletrodo. Após nova secagem à temperatura ambiente, 10 μL de solução de EDC-HOBt, foram adicionados ao eletrodo onde permaneceram por 10 min.

Esta etapa foi crucial para a fixação da enzima no SPE, pois o EDC ativa os grupos carboxilas presentes nas AuNPs, que pertencem a glutathione, para posterior reação de amidização com grupos aminas presentes em aminoácidos da

enzima. Após os 10 min. de reação da solução EDC-HOBt, os eletrodos foram lavados com água ultrapura e adicionou-se 10 µL da solução de AChE e os mesmos foram mantidos em placa de Petri umedecida por 120 min. Para evitar reações inespecíficas, foram acrescentados 10 µL de solução de etanolamina, com o intuito de bloquear os sítios ativos que não reagiram com a enzima, que permaneceram sobre os eletrodos de trabalho por 1 h.

4.9.3.2 Ensaio de imobilização da enzima acetilcolinesterase

As medidas voltamétricas, com tempo de análise de 10 min., foram realizadas em 50 µL de solução de ASChI $5,82 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH 7,4. Primeiro definiu-se o tempo de incubação dos biossensores nas soluções de extrato do fungo, meio de crescimento (Czapek) e o composto P7. Os tempos em que as soluções agiram sobre os biossensores, foram de 1, 5, 10, 15, 20 e 30 min. Após a incubação eles foram lavados com PBS-TW20 e inseridos no potenciostato para as medições eletroquímicas. Concentração das soluções de extrato e Czapek= 5 mg.L^{-1} ; Concentração do composto P7= 1 mg.L^{-1} .

Escolhido o tempo de incubação para cada solução ensaiada, os eletrodos foram incubados nas seguintes concentrações para o extrato e Czapek: 10 mg.L^{-1} ; 15 mg.L^{-1} ; 20 mg.L^{-1} ; 25 mg.L^{-1} e 30 mg.L^{-1} . Para o composto P7 foi de 5 mg.L^{-1} até 25 mg.L^{-1} . Após o tempo demarcado, eles foram lavados com PBS-TW20 e conectados no potenciostato para as medições eletroquímicas. Os resultados foram obtidos através do processo de inibição enzimática, calculando a porcentagem de inibição (% I) em função da variação das soluções dos possíveis inibidores da enzima. O cálculo de inibição foi realizado utilizando a Equação:

$$\% I = \frac{I_0 - I_1}{I_0} \times 100, \text{ com as correntes obtidas após o tempo de 10 min. de}$$

análise:

Sendo I_0 e I_1 as correntes medidas antes e após a inibição.

Neste trabalho são apresentados os resultados dos estudos da interação entre o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* e a levedura negra *Exophiala spinifera* que consistiu na cocultura destes dois microrganismos isolados do formigueiro de formigas cortadeiras. São apresentados também os resultados dos estudos da cultura da levedura negra isoladamente nas mesmas condições.

Serão mostrados os resultados obtidos de alguns estudos preliminares que foram necessários, como a seleção da melhor alternativa do meio de cultura, a cinética de crescimento da levedura negra no meio de cultura selecionado e os resultados das diferentes condições de cocultivos na produção de metabólitos. Para a interpretação dos resultados, ferramentas estatísticas foram utilizadas e os dados são apresentados na forma de *HeatMap*, PCA, PLS-DA e HCA. Mapas moleculares da plataforma GNPS também foram utilizados.

São apresentados a seguir os resultados do estudo da cultura pura da levedura negra *E. spinifera*, como as análises exploratórias, as análises dos espectros de RMN, de espectrometria de massas e infravermelho que levaram a identificação do composto isolado de *E. spinifera*.

5.1 Características das cepas da levedura negra *E. spinifera*

Uma análise microscópica realizada em cepa cultivada em BDA por 15 dias a 25 °C, foi observada para a visualização da morfologia da levedura negra *E. spinifera* (Figura 5).



FIGURA 5 - Características morfológicas da *Exophiala spinifera* incluídas neste estudo. (A) fotos de colônias com 15 dias, em ágar batata dextrose, (B) morfologia da colônia mostrando as gêmulas, (C) a morfologia de aparência viscosa descritos no texto.

Fonte: elaborada pelo autor: imagem fotografada no microscópio LEICA ICC50 HD, do laboratório Produtos Naturais.

A levedura negra *E. spinifera* tem a característica comum deste gênero que é a presença de melanina nas paredes celulares de suas células, um pigmento de coloração preto oliva (Figuras 5A, B e C). Verifica-se também que as células da levedura são inicialmente cremosas/viscosas no centro (formação leveduriforme) e depois se tornando aveludadas nas bordas, o que é característico das leveduras (ZENG; HOOG, 2008) (Figura 5B e C).

Focalizando as bordas do cultivo (Figura 3C), nota-se estrutura microscópica mais comuns, de forma arredondada ou ovalada que são os blastoconídios, também denominados gêmulas (TRABULSI, L.R, *et al.* 2005).

5.2 Otimização do crescimento da levedura negra *E. spinifera*

5.2.1 Escolha do meio de cultura

Os estudos dos metabólitos secundários de microrganismos vêm sendo amplamente avaliados na busca de novas substâncias que estão sendo aplicadas em diversas áreas: farmacêutica, bioquímica, agrícola e em diversas outras áreas. Cada vez mais a estratégia OSMAC (*One Strain Many Compounds*),

que significa uma linhagem e vários compostos, vem sendo utilizada na expectativa de conseguir ativar rotas diferenciadas de produção de metabólitos secundários, para a produção de produtos naturais (PAN, R. *et al.*, 2019).

Desta forma, neste estudo usamos a abordagem OSMAC, submetendo a levedura negra *E. spinifera*, à uma variedade de composição do meio de cultura, com o objetivo de estimular a produção de uma maior diversidade de metabólitos secundários.

Nos meios empregados (BD, Mix, MF e Czapek Dox Broth) as análises dos perfis cromatográficos apresentados nas Figuras 6 a 9 apontaram que a levedura negra em meio Czapek Dox Broth, apresentou maior número de picos quando comparados aos outros meios de cultura (BD, Mix, MF), sendo assim, não foi dado continuidade a estudos de crescimento nesses outros meios de cultura.

Estas cepas foram capazes de se desenvolverem e interagirem em meio de cultura Czapek Dox Broth, um meio composto de sais como fontes de íons essenciais, a sacarose como fonte de carbono, nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e o fosfato dipotássico como tamponante do meio de cultura. Na literatura estudos mostram bons resultados no cultivo da levedura negra no meio de cultura Czapek Dox Broth (GUERIN, I. 2007). Assim, este meio de cultura foi selecionado para as próximas etapas deste estudo. As Figuras de 6 à 9, mostram os cromatogramas adquiridos nos diferentes meios de cultura: Potatoes Dextrose Broth (BD); MIX; MF; Czapek Dox Broth.

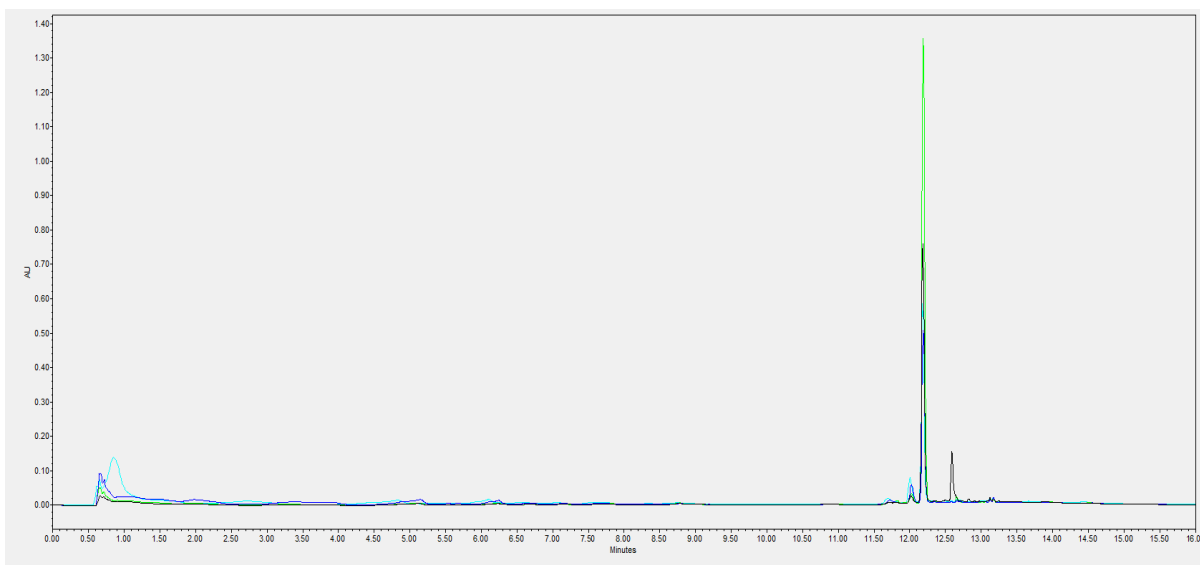


FIGURA 6 - Cromatogramas referentes aos extratos brutos dos metabólitos da *E. spinifera* em meio líquido, Potato Dextrose Broth (BD). As diferentes cores representam as três réplicas.

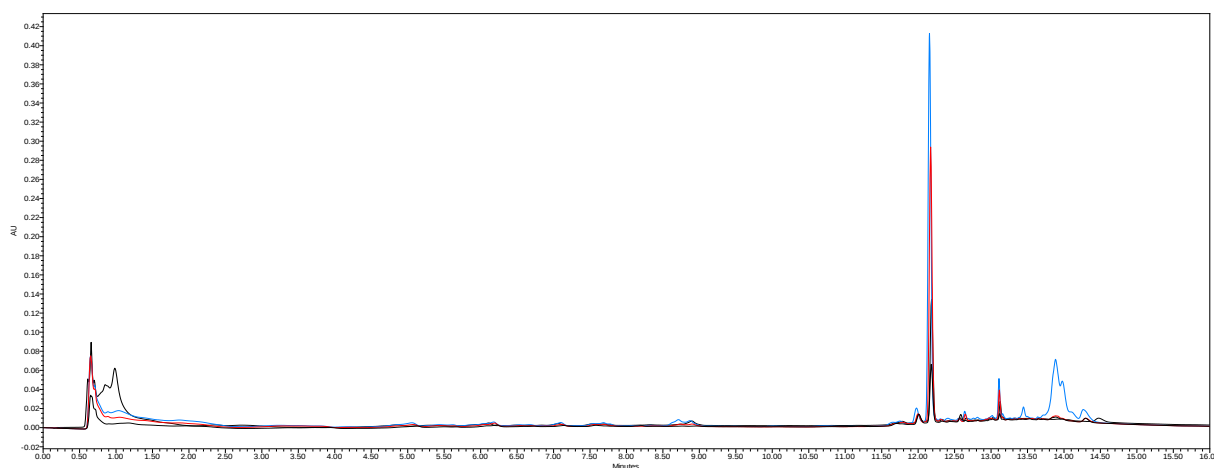


FIGURA 7 - Cromatogramas referentes aos extratos brutos dos metabólitos da *E. spinifera* em meio líquido, MIX. As diferentes cores representam as três réplicas.

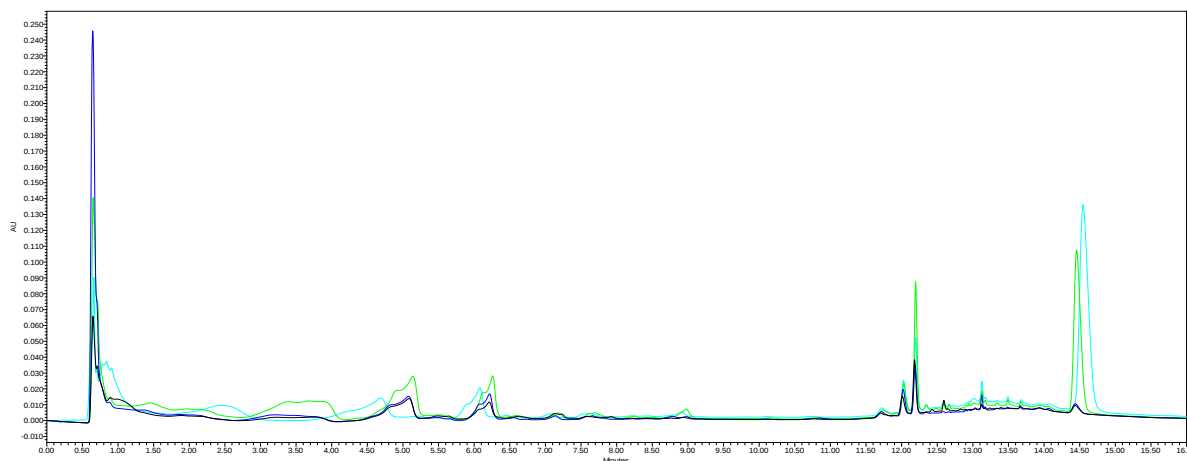


FIGURA 8 - Cromatogramas referentes aos extratos brutos dos metabólitos da *E. spinifera* em meio líquidos, MF. As diferentes cores representam as três réplicas.

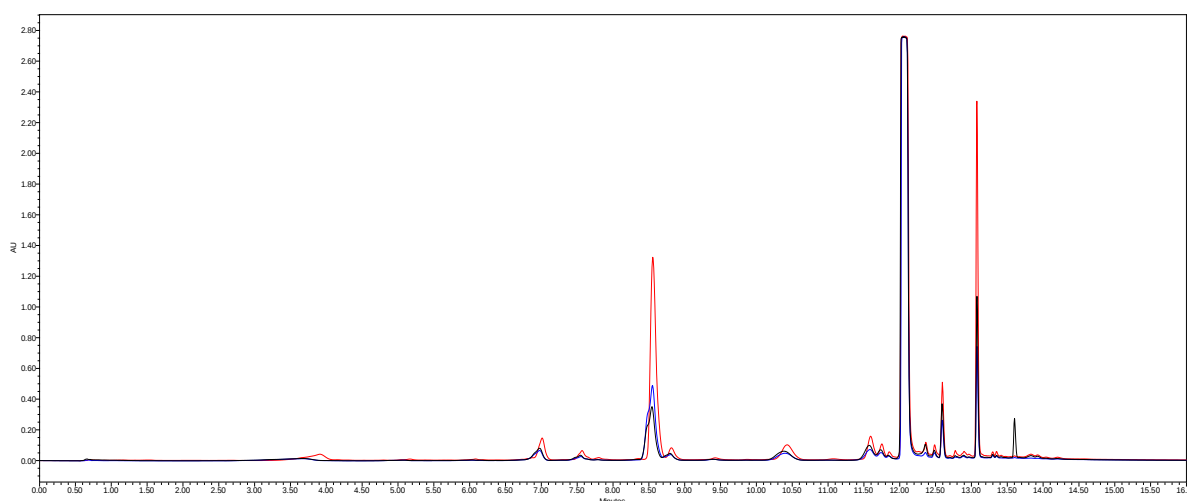


FIGURA 9 - Cromatogramas referentes aos extratos brutos dos metabólitos da *E. spinifera* em meio líquido, Czapek Dox Broth. As diferentes cores representam as três réplicas.

5.2.2 Cinética de crescimento

Após a seleção do meio de cultura líquido Czapek Dox Broth, a levedura negra foi incubada durante 40 dias, e, após, a extração dos metabólitos secundários de cinco em cinco dias, realizaram-se análises por UHPLC e cromatogramas foram gerados. A partir dos cromatogramas obtidos, picos foram extraídos e a partir da média do somatório das áreas das bandas, a cinética de crescimento foi construída (vide anexo 1). As médias das áreas estão apresentadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Valores das áreas e das médias das bandas anotadas nos cromatogramas de 5 em 5 dias até 40 dias de incubação.

5 dias/áreas/tr.	10 dias/áreas/tr.	15 dias/áreas/tr.	20 dias/áreas/tr.	25 dias/áreas/tr.	30 dias/áreas/tr.	35 dias/áreas/tr.	40 dias/áreas/tr.
236985/0,69	135986/4,22	117268/0,72	869936/0,68	240748/0,64	212810/0,69	158172/0,69	331300/0,69
679986/4,33	126443/9,35	112088/9,25	230069/1,03	150983/1,04	217779/1,10	171133/7,99	136249/1,09
112689/4,65	143502/11,97	3810874/12,29	142153/2,05	152459/9,43	352197/9,46	398208/9,53	135568/9,53
232358/7,57	137944/12,11	732596/12,55	298792/9,47	174896/11,46	227130/11,49	281125/11,55	266069/11,54
174265/7,98	4571122/12,31	147304/12,81	244069/12,01	153056/11,99	219794/12,00	280174/12,02	247764/12,02
438630/9,40	951992/12,56	130174/13,11	840955/12,23	164368/12,22	320788/12,22	199897/12,11	732296/12,24
112308/11,56	206856/12,82	314453/13,31	6253300/12,34	7764513/12,32	9036695/12,33	9832839/12,34	9100248/12,34
159470/12,04	692914/13,30	703708/13,59	288709/12,58	107816/12,70	318120/12,82	343364/12,56	285738/12,56
264878/12,16	112943/13,36		189213/12,83	189804/12,81	219848/13,02	310974/12,82	289188/12,82
230733/12,26	408538/13,58		205628/13,03	118768/13,11	150626/13,14	288009/13,03	602820/13,34
5569053/12,35	320531/13,81		755681/13,34	617005/13,33	1877130/13,33	1366240/13,34	107449/13,60
254275/12,58	983926/13,98		267233/13,68	318299/13,67	155874/13,60	233245/13,72	492776/13,72
186076/12,71			292154/14,11	330537/14,07	183515/13,72	318966/14,11	
186143/12,83					257547/14,24		
172496/13,01							
256421/13,12							
677887/13,31							
421701/13,60							
244865/13,99							
406123/14,24							
média	média	média	média	média	média	média	média
550867,1	732724,8	758558,1	836760,9	806404,0	982132,4	1090950,0	1060622,0

tr = tempo de retenção em minuto, unidade de area (UA)

A cinética de crescimento (médias das áreas *versus* dias de incubação) pode ser observada na Figura 10.

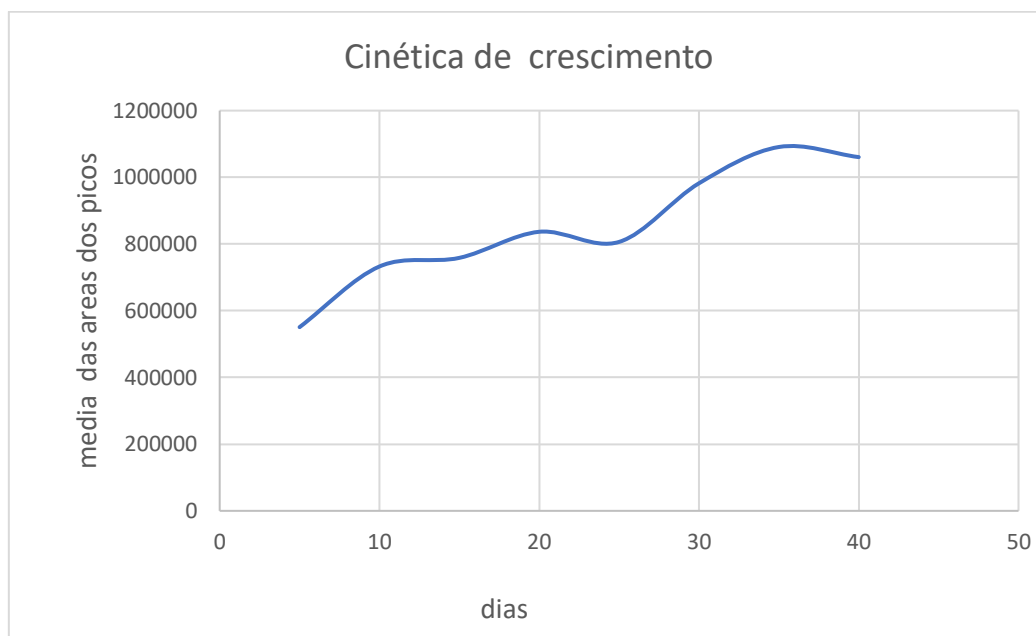


FIGURA 10 - Cinética de crescimento em meio de cultura líquido Czapek Dox Broth da levedura negra *E. spinifera* utilizando a média das áreas dos picos *versus* dias de incubação.

A partir da cinética de crescimento pode-se observar que nos primeiros 20 dias ocorreu um pequeno aumento no somatório das médias das áreas dos metabólitos extraídos da *E. spinifera*. Isto se deve ao tempo inicial de adaptação da levedura negra ao meio de cultura e também preparando-se para seu crescimento (fase lag). Com a síntese de DNA e de novas proteínas e enzimas que são necessárias para a sua nova fase (ASSIS, 2011), pode-se dizer que ela está produzindo os metabólitos primários que são importante para a sua sobrevivência. Após 25 dias de incubação a produção apresentou um maior aumento, considerando o período avaliado (Figura 10). Neste período a levedura já atingiu um elevado grau de crescimento (fase log), (CISALPINO, P.S., 2011).

Nesta fase o microrganismo já produziu o suficiente para a seu crescimento,

desenvolvimento e reprodução e é nesta fase que o microrganismo inicia a sua produção de metabólitos secundários que são por consequência de sua interação com o ambiente que se encontra, e no caso de cocultivo, a presença de um outro microrganismo no mesmo meio de cultura. Depois de 35 dias observa-se o início do declínio dessa produção, que pode ser explicada devido ao esgotamento de nutrientes do meio de cultura, aumento da concentração de produtos do metabolismo tóxicos, deficiência de oxigênio e outros fatores que envolvem o crescimento e declínio do microrganismo (CISALPINO, P.S., 2011).

A importância de se estudar a cinética de crescimento é encontrar o período que as possibilidades de indução dos metabólitos secundários sejam mais evidentes.

Com esses resultados, estabeleceu-se que para uma maior produção de metabólitos, deve-se manter o inóculo sob incubação adequada no período de 25 a 35 dias.

Estabelecidos o melhor meio de cultura e o tempo de incubação para produção de metabólitos, elabora-se para este trabalho cinco diferentes condições de cocultivos.

5.3 Cocultivos em diferentes condições em meio líquido

Os estudos dos compostos produzidos nas diferentes condições de cocultivos contribuem para ampliar o conhecimento sobre a levedura negra *E. spinifera*, objetivando encontrar compostos bioativos para o controle da formiga cortadeira.

O cocultivo pode ser uma estratégia para que surjam novos metabólitos bioativos. Os experimentos de cocultura de microrganismo podem ser executados em meio sólido e em meio líquido, isto depende do propósito de cada experimento (BERTRAND *et al.*, 2014). Neste caso optou-se pelo meio líquido, pois há vantagens significativas que colaboram para o sucesso do experimento.

Uma vantagem é a maior interação entre os microrganismos em vista do volume de meio utilizado e isto pode acarretar maior quantidade de metabólitos.

Em busca de possíveis efeitos de indução gerados pela interação da levedura negra, *E. spinifera* com o fungo mutualista *L. gongylophorus*, foram realizados experimentos com cinco diferentes condições de cocultivos e controles negativos: C com H_15 dias; C com H_30 dias; H-C_30 dias; C-H_30 dias; H+C_30 dias. Controles negativos: H_15 dias; H_30 dias; C_15 dias e C_30 dias. Onde a sigla da monocultura da levedura negra, *E. spinifera* é **C** e do fungo mutualista *L. gongylophorus* é **H**.

Nas análises dos extratos por espectrometria de massas de alta resolução (Waters Acquity UPLC I-Class), observou-se que estão presentes algumas bandas nos cocultivos que não são observadas nas monoculturas (com destaque para os compostos que eluem entre 5,00 e 5,60 min. (Figura 11), sugerindo que essa metodologia pode apresentar vantagens na descoberta de metabólitos secundários que não são produzidos na monocultura e possam ter alguma atividade biológica.

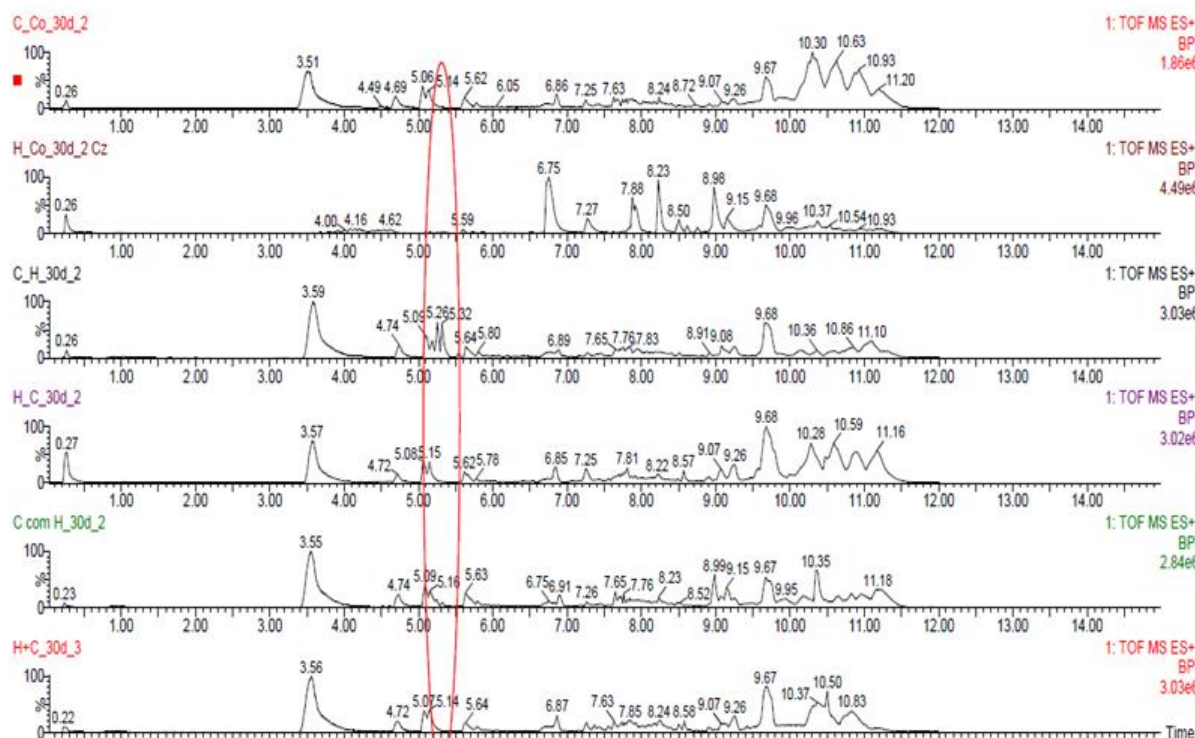


FIGURA 11 - Cromatograma das análises dos extratos de metabólitos, por espectrometria de massas de alta resolução (Waters Acquity UPLC I-Class), de diferentes cocultivos.

Devido a diferentes condições e a grandes quantidades de dados, a interpretação dos resultados das análises tornou-se uma tarefa difícil e os espectros obtidos dos extratos brutos dos cocultivos apresentaram uma complexidade que dificultaram as informações dos metabólitos induzidos pelas cocultura. Assim, análises estatísticas multivariadas e univariadas dos dados foram utilizadas para a interpretação e comparação da produção metabólica dos cocultivos e cultivos (GORROCHATEGUI, E. *et al.*, 2016).

5.4 Análise estatísticas geral dos dados

5.4.1 Análises estatísticas dos cocultivos: Uso do MetaboAnalyst

5.4.1.1 HeatMap análise de correlação

Inicialmente, a análise do coeficiente de correlação de Pearson foi realizada para determinar a confiabilidade das condições de cultivo e da extração e separação dos metabólitos entre as amostras analisadas por LC-MS (FIGUEIREDO FILHO, D.B. e DA SILVA JUNIOR, J.A. , 2009). Um Heatmap foi construído com todas as variáveis para melhor entender a correlação entre o tipo de cocultivos e o cultivo das monoculturas com metabólitos extraídos, sendo apresentado na Figura 12.

Os resultados baseados na análise de correlação também demonstraram que a monocultura *L. gongylophorus* (H_ML 15 d, réplicas 1, 2 e 3) apresentou uma maior distinção na produção dos metabólitos, apresentando apenas valores de correlação de Pearson negativos (azul). Ou seja, a monocultura do *L. gongylophorus* apresentou menor expressão quando comparada com as amostras dos diferentes cocultivos entre o *L. gongylophorus* e a *E. spinifera* (C) que apresentaram uma alternância entre os valores de correlação positivos e negativos para os metabólitos extraídos (FIGUEIREDO FILHO, D.B. e DA SILVA JUNIOR, J.A., 2009).

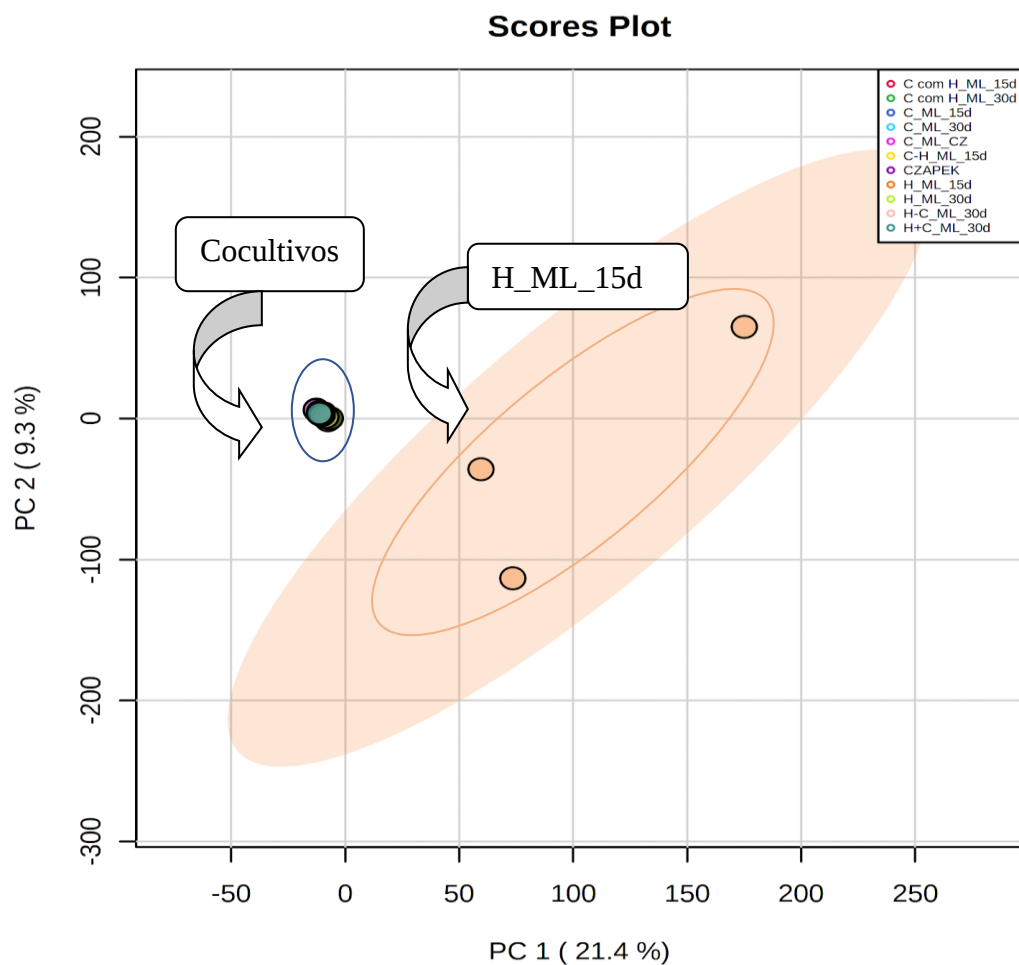


FIGURA 13 - Gráfico de *scores* PC1 - PC2 de PCA, usando dados cromatográficos processados com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.

Ao realizar uma análise da PCA, com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura, obteve-se a informação de que 51,6% da variância total foi acumulada em cinco principais componentes (PC). A Figura 13 apresenta o gráfico de *scores* da PCA para a primeira e segunda PCs obtidas, PC1 e PC2. Pode-se observar uma baixa correlação entre os ensaios ($PC1+PC2 = 30,7\%$), o que era esperado por conter diferentes metabólitos. Assim como é verificado nas PCAs, das Figuras 14 e 15 a seguir, onde mostra aglomerados de metabólitos dos cocultivos, indicando *scores* semelhantes.

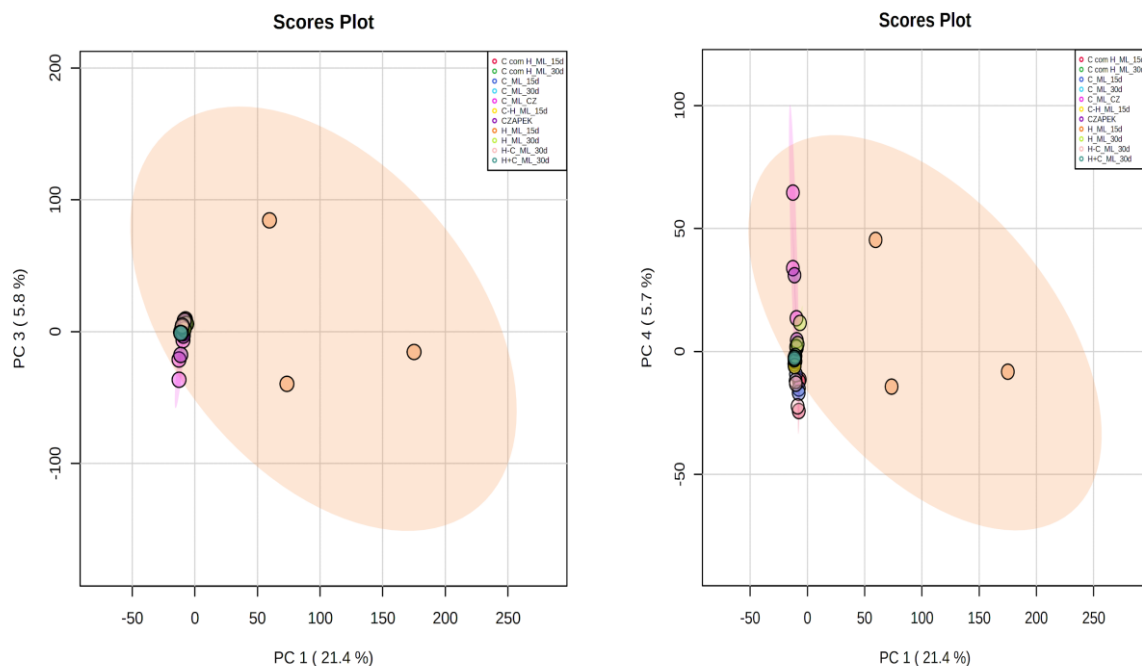


FIGURA 14 - Gráfico de scores PCA: PC1-PC3 e PC1-PC4, usando dados cromatográficos processados com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.

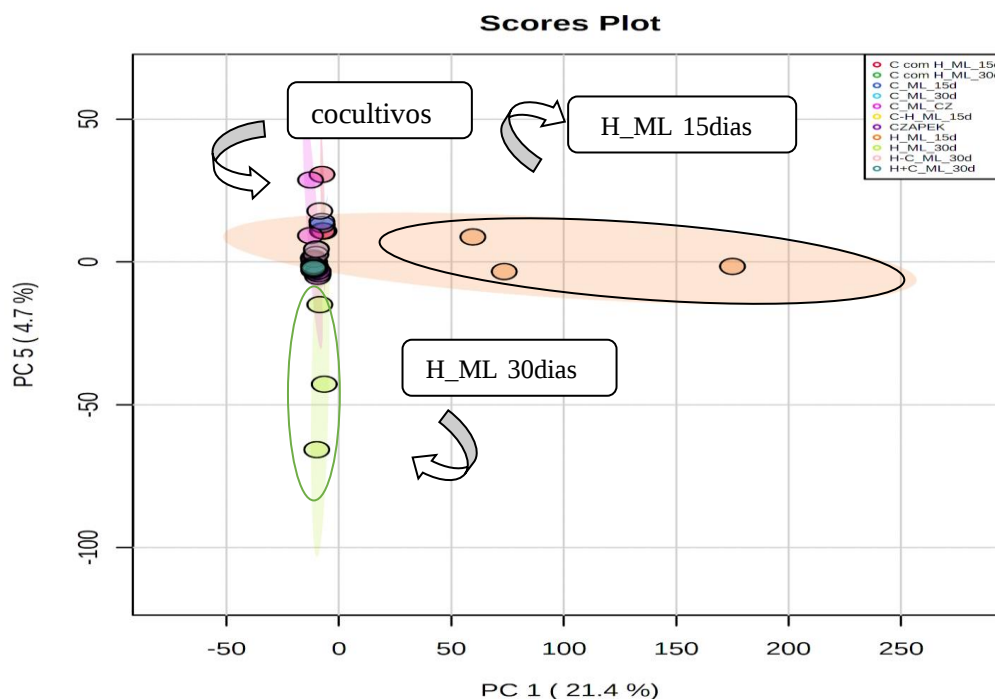


FIGURA 15 - Gráfico de scores: PC1-PC5 de PCA, usando dados cromatográficos processados com todos os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.

5.4.1.2.1 Variância explicada

Em estatística multivariada o gráfico *Scree plot* (Figura 16) é um gráfico de autovalores de fatores de componentes principais em uma análise, representa a variância explicada *versus* PC. A variância explicada é um valor em porcentagem, que informa através de cálculos matemáticos, o quanto das informações das componentes principais permanecem em uma análise. Como verificado por exemplo a PC1 explica 21,4 % da variância explicada, isto significa que ela consegue explicar 21,4 % das informações a serem mantidas na PC1. Geralmente a PC1 é a que mais explica.

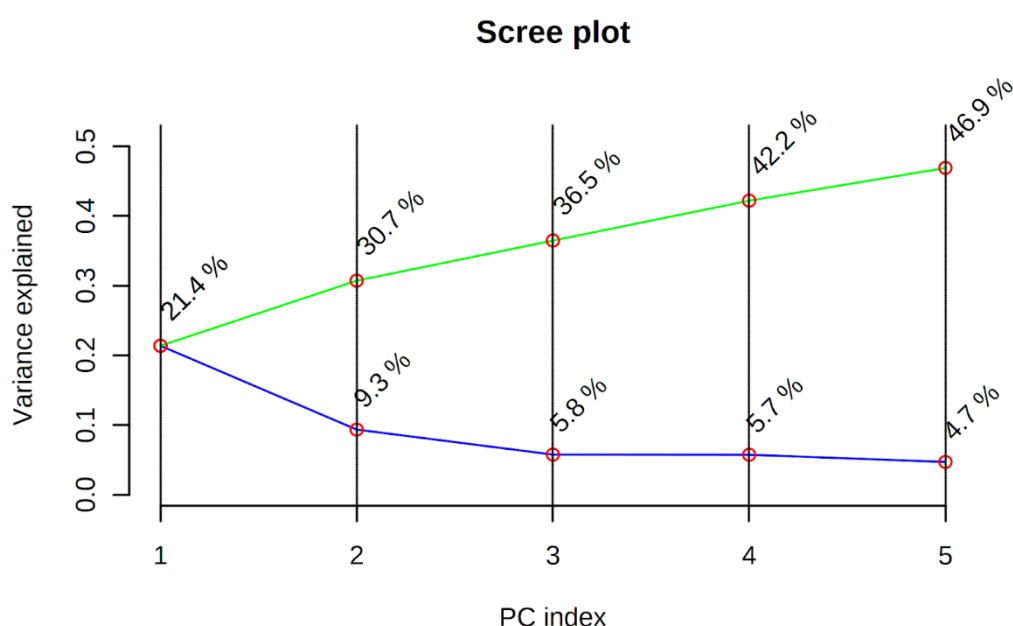


FIGURA 16 - Gráfico *Scree plot*, mostra a variância explicada pelas PCs. A linha verde é a variância acumulada e a azul mostra a variância explicada de cada PC.

Observando a Figura 15, verifica-se que a amostra da monocultura de *L. gongylophorus* por quinze dias (H_ML 15d) (em laranja) se diferencia das demais amostras. Este resultado corrobora com as informações apresentadas pela análise de correlação (Figura 12). Além disso, usando as informações apresentadas pela PC1 e PC5 (Figura 15), a amostra H_ML 30d (monocultura de

L. gongylophorus por trinta dias), também se diferenciou das demais formas de cultivo.

Por fim, verificou-se um maior agrupamento das amostras obtidas por meio de cocultivos (Figura 15). Para verificar se o maior agrupamento se relaciona à uma maior ou menor similaridade entre as amostras de cocultivo, cuja visualização pode ser prejudicada pela grande quantidade de metabólitos. Sendo assim é importante a aplicação da análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) de todos os cocultivos

5.4.1.3 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) de todos os cocultivos

Na busca de informações dos metabólitos induzidos nos cocultivos entre a levedura negra e o fungo mutualista, e monoculturas, avaliados pelo método quimiométrico não supervisionado PCA, não se obteve resultados satisfatórios para a diferenciação dos metabólitos induzidos pelos cocultivos e monoculturas analisados em conjunto. Portanto, uma análise usando o método multivariado supervisionado que diminui o número de variáveis criando modelo simples, foi necessária.

A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*) foi aplicada para detectar os metabólitos expressos nas coculturas que não estão presentes nas monoculturas.

A PLS-DA foi avaliada por um método que consiste em um vetor Y que representa os valores das classes, em relação ao vetor X que é o conjunto de dados, que tem como parâmetro R^2 , que mede o ajuste do modelo, para o conjunto de dados e o Q^2 avalia as principais variáveis responsáveis pela separação, ou seja,

Método Supervisionado de Classificação. Neste caso o valor de R^2 na componente dois é 0,9 (90 %) e o Q^2 é aproximadamente 0,4 (40 %), um valor, que pode-se atribuir que o sistema estatisticamente está validado pois tem um R^2 alto. Fazendo uso destas informações de classes, o PLS-DA tende a melhorar a separação entre os grupos de amostras (SZYMAŃSKA, E. *et al.* 2012).

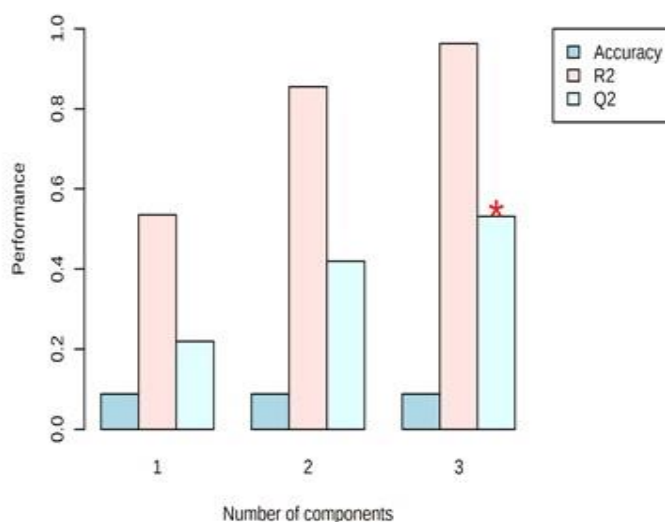


FIGURA 17 - Validação do método pelo coeficiente de correlação quadrado múltiplo, R^2 e Q^2 .

Das cinco condições de cocultivos pode-se observar através da representação gráfica na Figura 18 da análise de PLS-DA, uma maior diferenciação entre os metabólitos da monocultura do fungo mutualista e dos componentes do meio de cultura quando comparados com os metabólitos extraídos e produzidos pelos cocultivos.

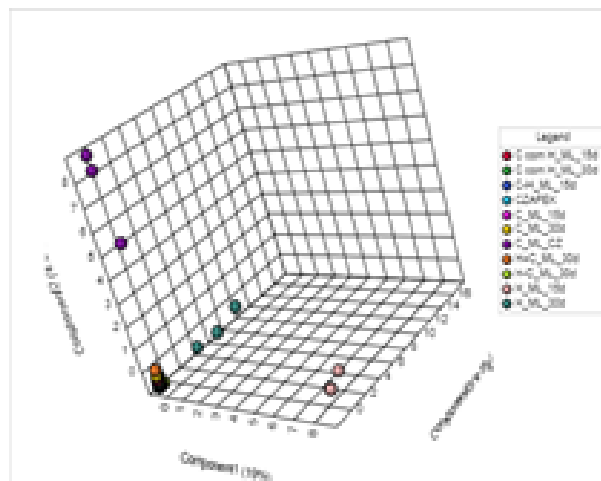
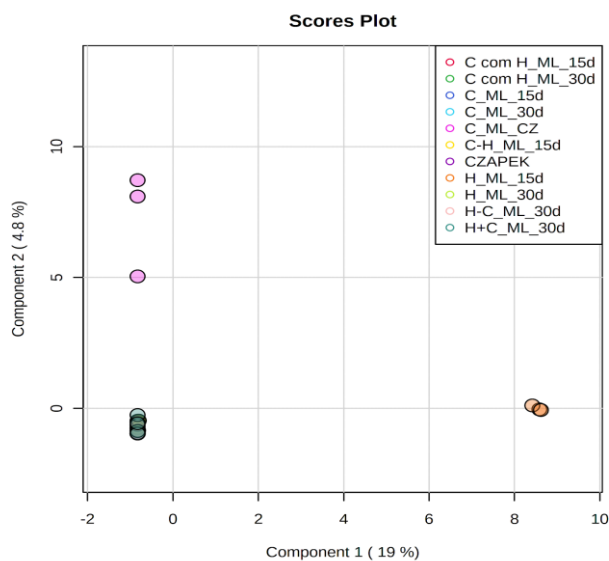


FIGURA 18 - Representação gráfica da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLSDA - Scores) e na forma de dimensão 3 D.

Analizando a representação gráfica na Figura 19 mostrado na dimensão 3 D também se verifica uma pequena diferenciação entre a produção dos metabólitos das coculturas e monoculturas. Estas pequenas diferenças indicam a importância de se ter um conjunto de dados iniciais que podem apoiar nas possíveis condições de produção de metabólitos.

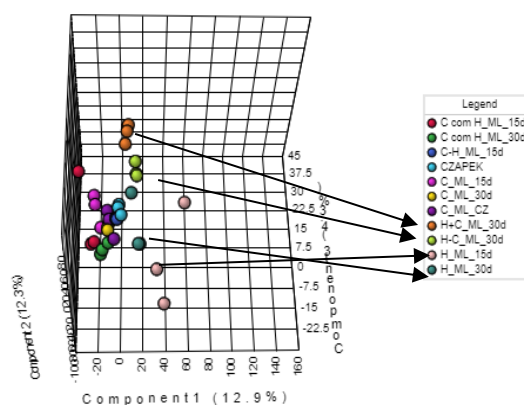
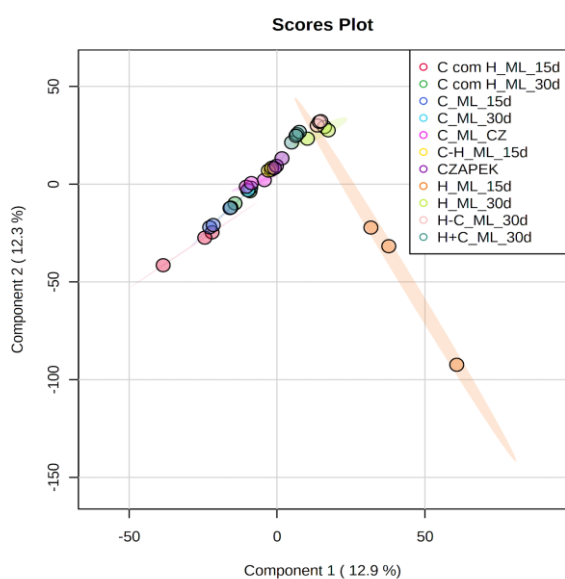


FIGURA 19 - Representação gráfica 2 da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA - Scores) e na forma 3 D.

5.4.1.4 Análise de agrupamento hierárquico (HCA) de todos os cocultivos

Outro método não supervisionado usado nas análises dos cocultivos e monoculturas foi o HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), que avalia a distância dos agrupamentos que são formados de acordo com sua similaridade (PILON, A. *et al.* 2020). O HCA foi aplicado nos dados de LC-MS e a distância euclidiana foi usada para calcular as similaridades das amostras.

As linhas verticais representam os cocultivos e as horizontais as semelhanças entre as amostras. Os agrupamentos se apresentam: em pares de amostras; entre uma amostra e um grupo de amostras; e entre grupos de amostras (DA COSTA *et al.*, 2016). Os dados de cocultivos, monoculturas e meio de cultura estão representados no dendograma na Figura 20.

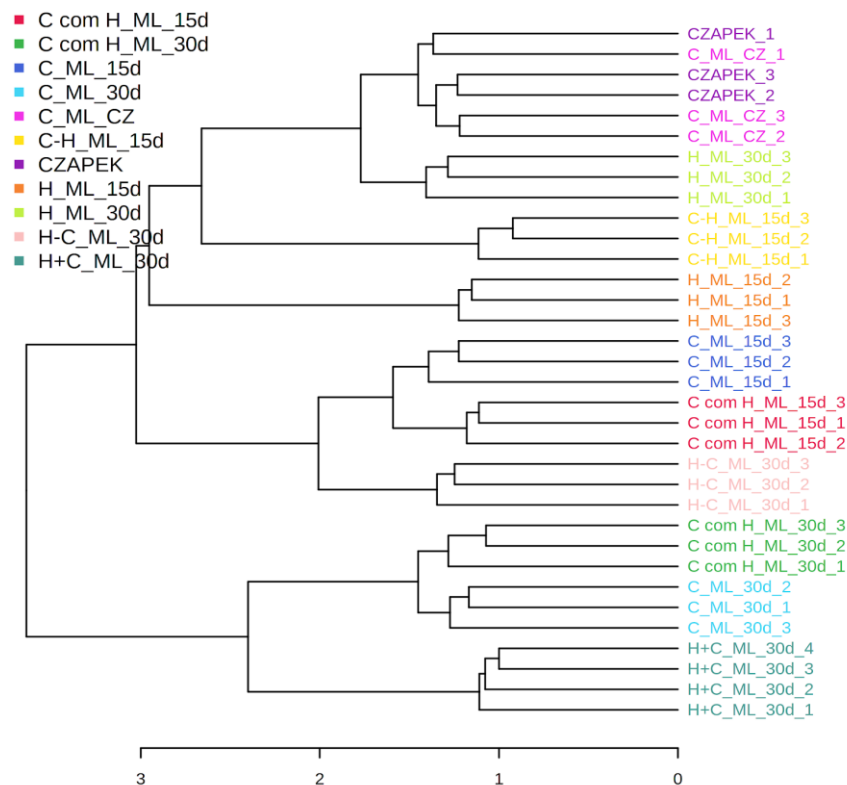


FIGURA 20 - Dendograma de similaridade entre os cocultivos, monoculturas e meio de cultura.

Nesta análise nota-se que alguns dos cocultivos como C com H_ML_30 dias, H+C_ML_30 dias e a monocultura C, ficaram agrupados, indicando semelhança entre a indução de metabólitos. Assim como mostra as análises de PCA e PLS-DA.

5.4.1.5 *Heat Map* com *test T features* com todos os dados

Em busca de encontrar os metabólitos que têm maior impacto na diferenciação dos grupos, uma análise estatística com base no *test T* foi realizada (Figura 21) e obteve-se o seguinte *HeatMap* que destaca as relações massa/carga da Tabela 3:

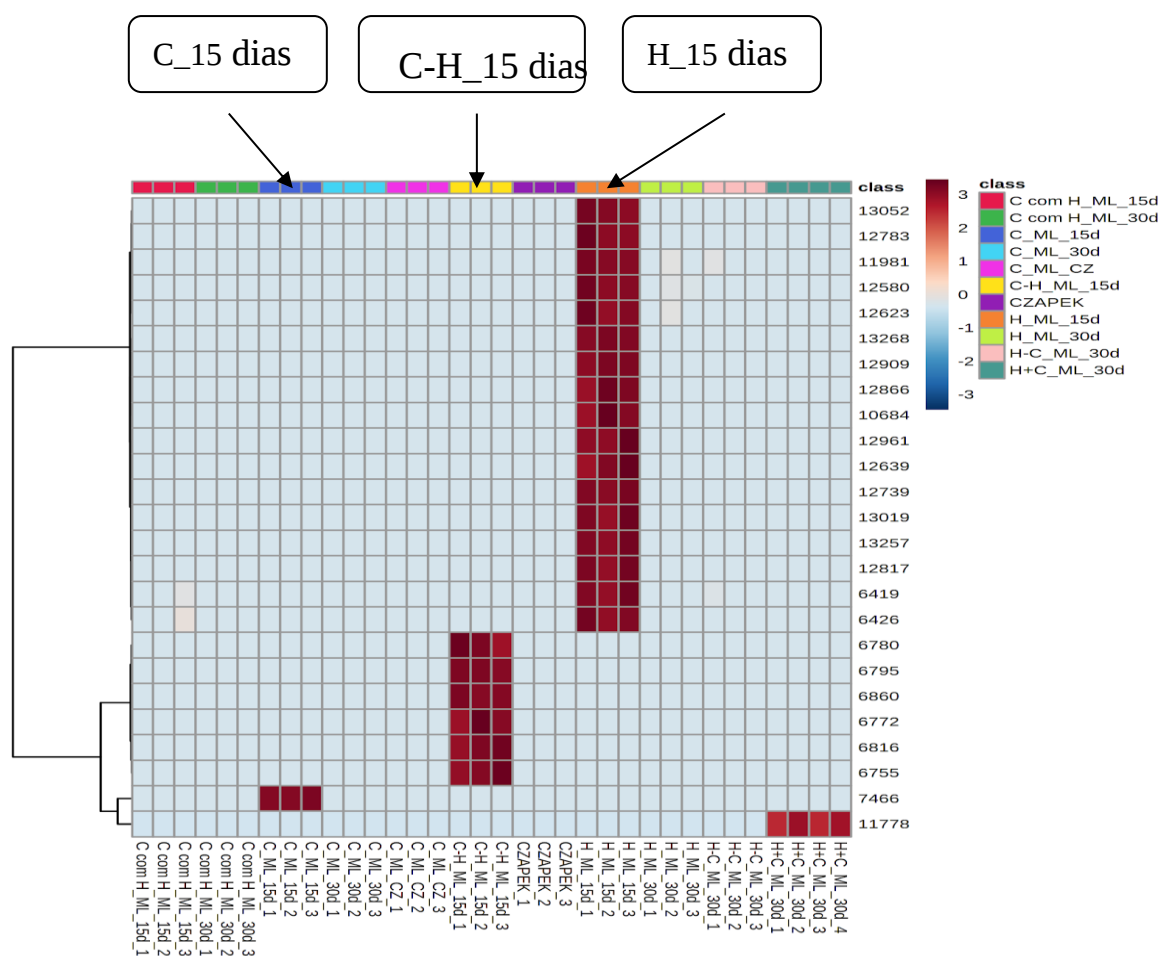


FIGURA 21 - Gráfico de mapa de calor *Heat Map* com *test T features* com todos os dados mostrando os resultados de agrupamentos com todos os cocultivos, monoculturas e meio Czapek Dox Broth.

TABELA 3 - Relações *ID*, *m/z* cocultivo C-H_15 dias e H_15 dias, e os tempos de retenção respectivamente dos agrupamentos mostrado no gráfico de mapa de calor *Heat Map* com *test T features*.

<i>ID</i> C-H_15 dias	(<i>m/z</i>)	Tempo de retenção (min)	<i>ID</i> H_15 dias	(<i>m/z</i>)	Tempo de retenção (min)
6780	857,2248	25,1952	13052	844,5300	25,4232
6795	123,0310	22,8580	12783	746,2600	16,0622
6860	721,2458	22,8412	11981	468,7548	13,7711
6772	332,3038	17,8041	12580	527,2889	16,6800
6816	873,1976	25,1783	12623	574,3168	13,9400
6755	721,2597	25,2120	13268	696,3864	23,9343
			129091	573,7894	16,6259
			12866	465,7499	16,7095
			10684	125,0838	11,3922
			12961	482,2527	13,8192
			12639	805,4174	13,6050
			12739	394,2076	13,6209
			13019	575,8055	16,6091
			13257	855,4428	24,1193
			12817	553,7941	16,6259
			6419	910,4898	13,7252
			6426	420,2378	13,6096

Retirados os *ID* da tabela de dados MZMine_*mz*_RT.csv

Na Tabela 3, pode-se conferir que íons foram anotados pelo gráfico de mapa de calor *Heat Map* com *test T features*, mas nos cromatogramas não foram detectados.

Na busca dos íons diferenciados, uma análise *full scan* – íons totais (TIC no modo ESI-) foi executada, gerando um cromatograma, onde pode-se observar no espectro de massas, a presença do composto oriundo do metabólito do cocultivo C-H_ML_15 dias.

Nos cromatogramas Figuras 22, 23 e 24, estão representados os íons totais, íon extraído e os espectros MS no modo de ionização negativo (ES-).

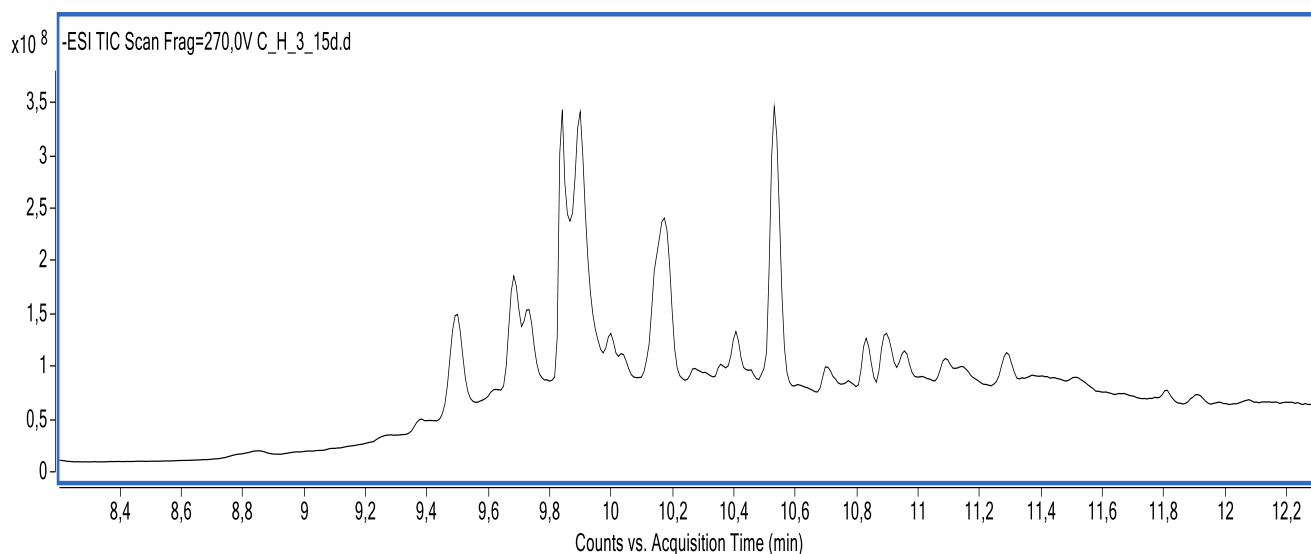


FIGURA 22 - Cromatograma *full scan* – íons totais (TIC no modo ESI-)

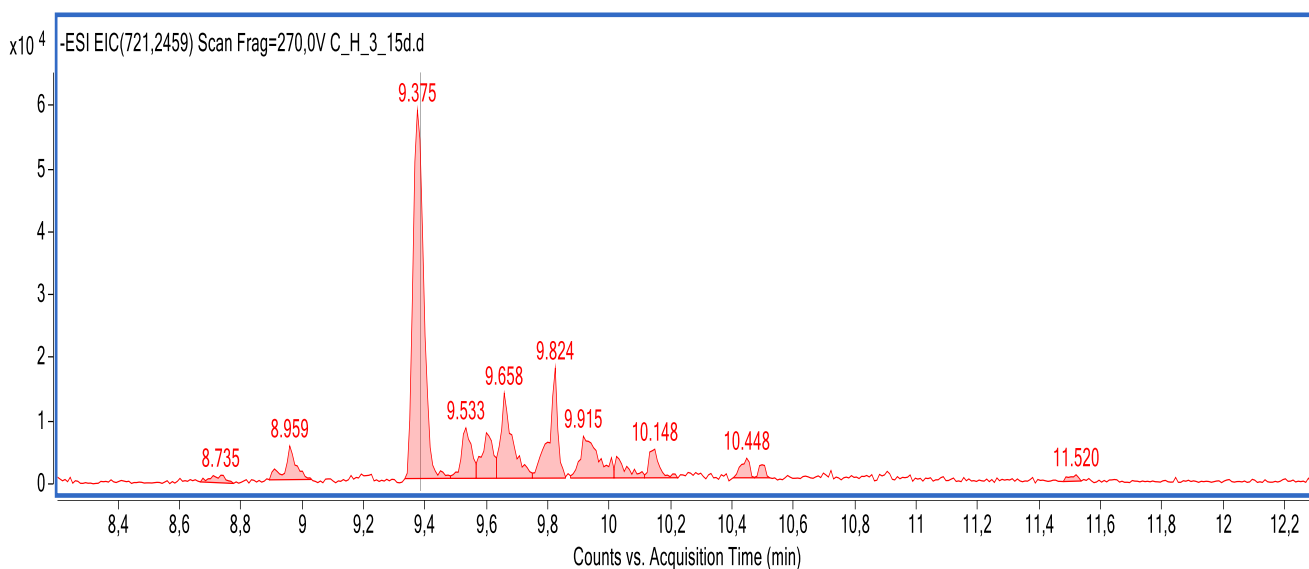


FIGURA 23 - Cromatograma do íon extraído m/z 721,2459 DA (EIC).

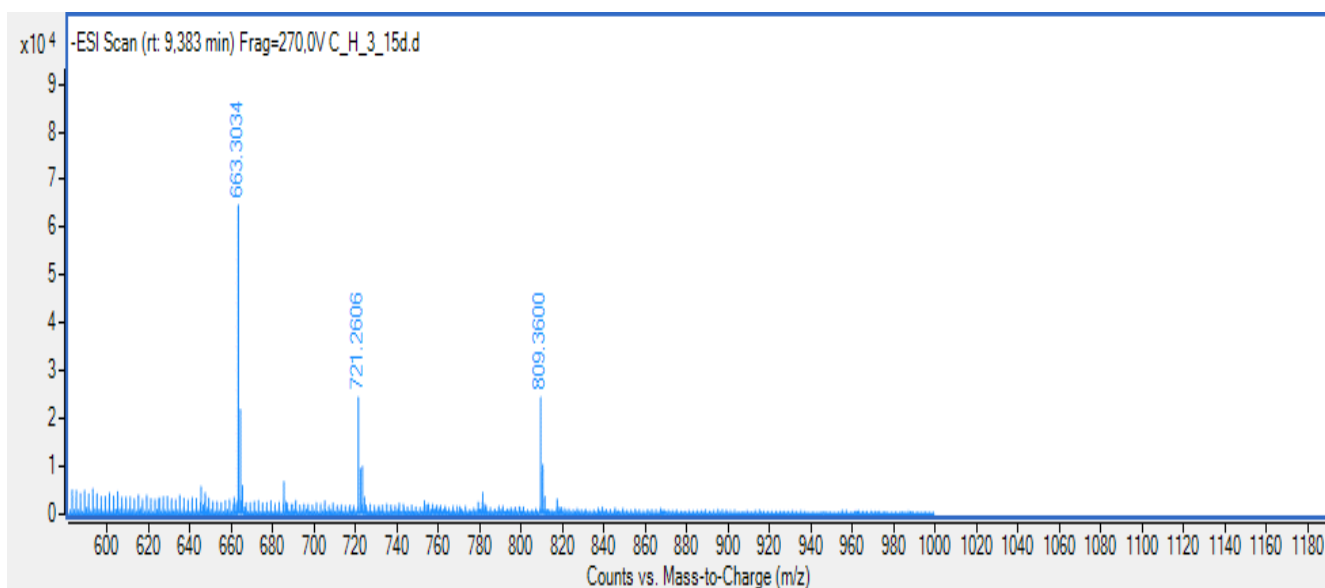


FIGURA 24 - Espectro MS do cocultivo C-H_ML_15 dias.

Embora alguns metabólitos foram evidenciados no cocultivo, mas não foi possível observar a presença nas anotações do gráfico de mapa de calor *Heat Map* com *test T features*.

Ao analisar muitos dados por Análise multivariada não foi possível diferenciar os grupos, tornando-se difícil as interpretações, portando realizou-se o estudo individual de cada condição de cocultivo utilizada neste trabalho.

5.5 Análise estatística individuais de cada cocultivo

5.5.1 Análises dos PCAs individuais dos cocultivos

Nas análises de PCA do cocultivo (C com H_ML_15 dias), quando executadas individualmente foi observado amostras muito semelhantes entre cocultivo e a monocultura da levedura negra, diferenciando apenas na monocultura do fungo mutualista. Isso também ocorreu quando analisados o cocultivo C com H_ML_30 dias.

Nos cocultivos C-H_ML_30 dias e H+C_ML_30 dias, as análises de PCAs não apresentaram separações, provavelmente essa condição de cocultura não induziu muitos metabólitos. Entretanto o cocultivo H-C_ML_30 dias observou-se uma separação nítida entre o cocultivo, as monoculturas e meio de cultura, destacando ser um cocultivo promissor ente os demais analisados pelas PCAs. Os gráficos (Figura 25) mostram as análises:

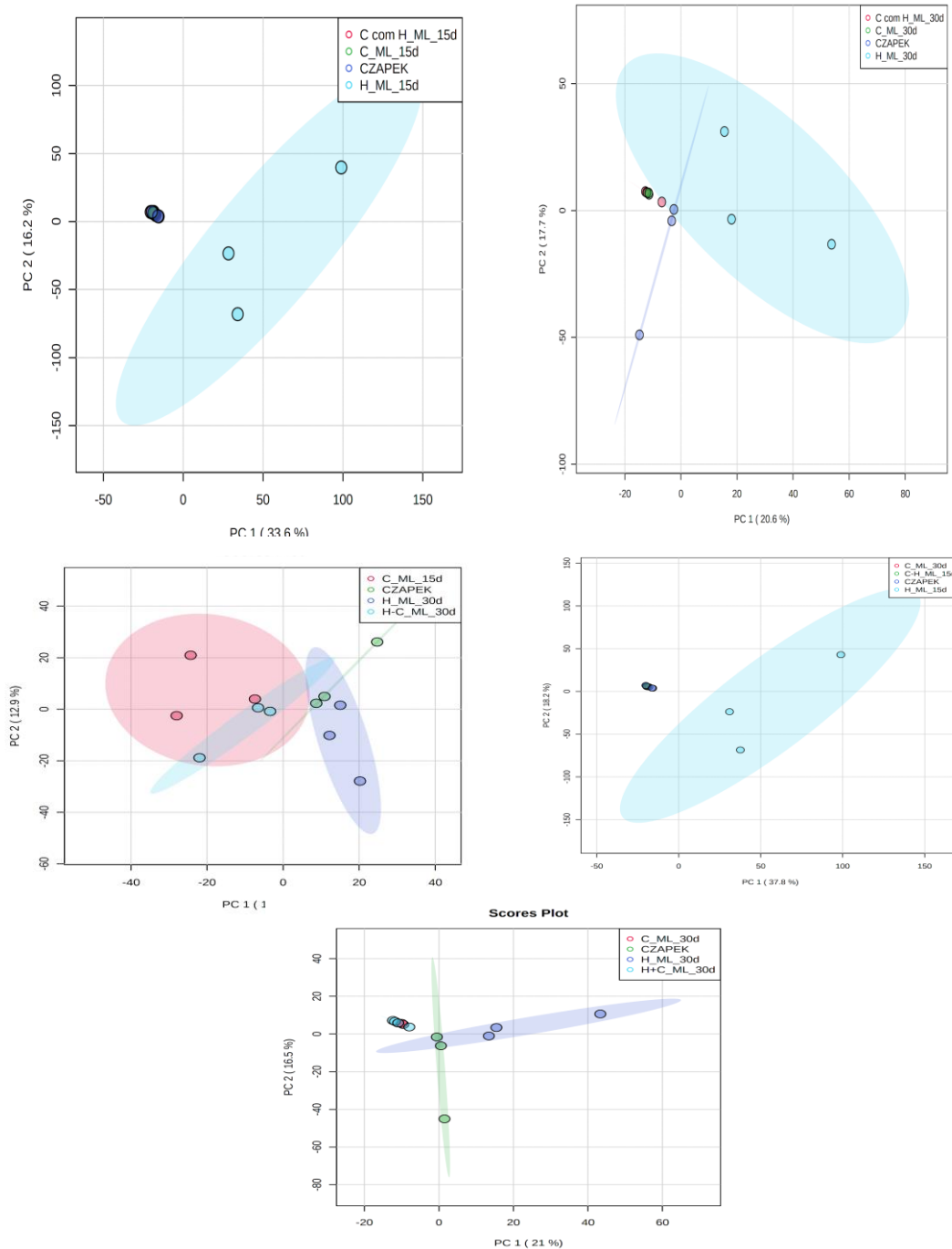


FIGURA 25 - Gráficos de PCAs individuais dos cocultivos: C com H_ML_15 d, C com H_ML_30 d, C-H_ML_30 d, H-C_ML_30 d e C+H_ML_30 d.

Como por meio das análises não supervisionada de PCAs não foram notadas grandes diferenças, apenas um cocultivo se destacou (H-C_ML_30 dias), então foram executadas análises supervisionadas PLS-DA dos cocultivos individualmente.

5.5.2 Análise de PLS-DAs individuais dos cocultivos

As análises individuais de PLS-DA foram executadas para todos os cocultivos. Analisando o cocultivo C com H_ML_15 e 30 dias observou-se que houve uma boa separação entre os metabólitos dos cocultivos, monoculturas e meio de cultura.

A análise do PLS-DA do cocultivo C-H_ML_30 dias, mostrou uma pequena separação entre os metabólitos nesta condição de cocultivo, como foi registrado outro cocultivo com melhor separação considerou-se esse cocultivo menos promissor.

No cocultivo H+C_ML_30 dias, as análises de PLS-DA registraram uma boa separação entre os metabólitos.

O cocultivo que se mostrou promissor pelas análises de PLS-DA foi H-C_ML_30 dias, onde as separações entre os agrupamentos de metabólitos induzidos entre os cocultivos, monoculturas e meio de cultura foram evidentes como pode-se conferir nos gráficos abaixo (Figura 26).

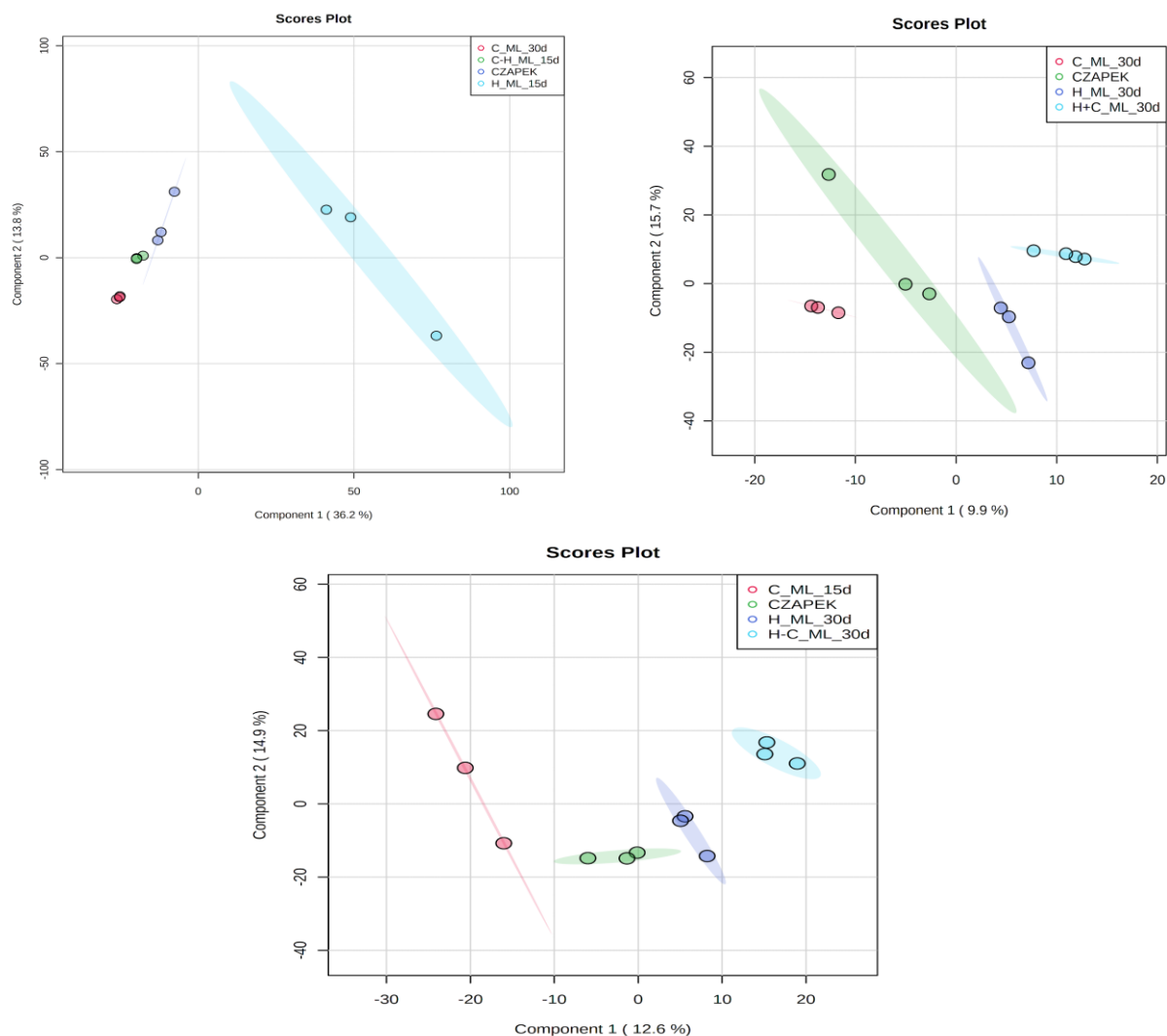


FIGURA 26 - Gráficos de PLS-DAs individuais dos cocultivos: C com H_ML_15 d, C com H_ML_30 d, C-H_ML_30 d, H-C_ML_30 d e C+H_ML_30 d. O gráfico em escala maior representa o cocultivo que melhor mostrou a separação entre os metabólitos induzidos.

Embora alguns resultados mostraram satisfatórios em algumas análises de PCA e PLS-DA (C com H_ML_15dias e 30dias), um gráfico de HCA foi traçado para mostrar mais algumas evidências entre os cocultivos.

Análises individuais de HCA do cocultivo CcomH_ML_15d e CcomH_ML_30d, registrou-se que os cocultivos se diferenciaram das monoculturas, mas nas análises de PCA não foram evidentes as separações. É interessante que todas as análises mostrassem resultados satisfatório quanto as separações.

Os dendrogramas estão nas Figuras 27 e 28:

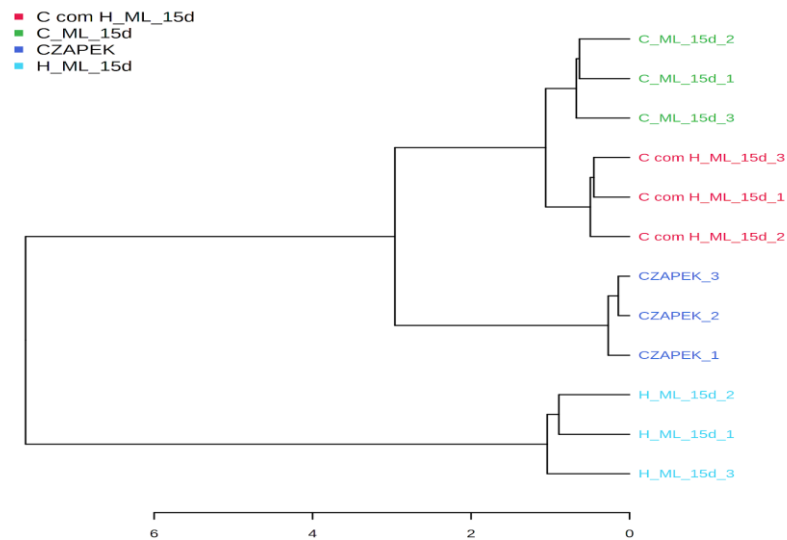


FIGURA 27 - Dendrograma de similaridade entre os cocultivos C com H_ML_15 dias, monoculturas e meio de cultura.

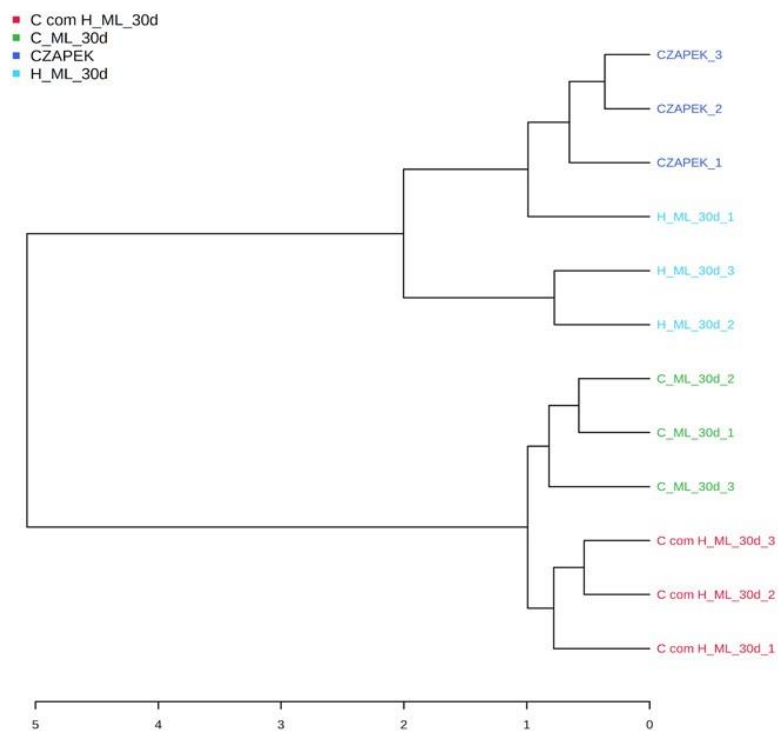


FIGURA 28 - Dendrograma de similaridade entre os cocultivos CcomH_ML_30 dias, culturas axênicas e meio de cultura

Mais um gráfico o *Biplot* foi elaborado para que fosse possível observar a melhor condição de cocultivo já evidenciada nas análises de PCA, PLS-DA e HCA.

No gráfico *Biplot* do PCA pode-se observar que houve uma maior indução de metabólitos do cocultivos H-C_30 d e da monocultura C_ML_15 d. Percebe-se na Figura 29 uma região mais densa onde se concentra maior número de metabólitos. A direção das flechas indica a presença dos metabólitos de referido cocultivo, monocultura e meio, como mostra a Figura 29.

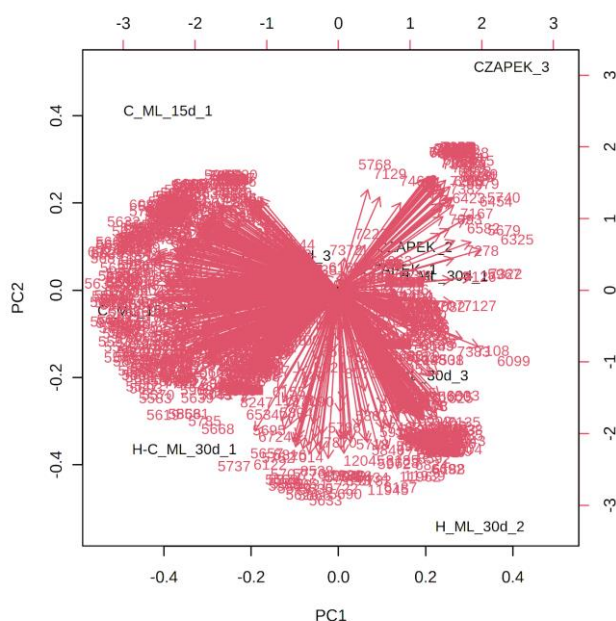


FIGURA 29 - Gráfico Biplot do PCA, onde é possível ver as amostras e as variáveis em um mesmo gráfico.

Pelas análises de PCA observou-se que houve apenas um cocultivo (**H-C_ML_30 dias**) que mais se diferenciou das monoculturas e do meio de cultivo, por isso foi necessário realizar a análise de PLS-Da, uma análise supervisionada, para verificar diferença entre os grupos de metabólitos induzido pelo cocultivo. Com esse resultado evidenciado, essa condição de cocultivo mostrou-se promissoras para a indução de metabólitos.

Assim, as demais análises serão focadas nessa condição de cocultivo (**H-C_ML_30 dias**).

5.6 Estudo detalhado do cocultivo H-C_ML_30 dias

5.6.1 Análise do PLS-DA do cocultivo H-C_ML_30 dias

Neste gráfico da análise do PLS-DA (Figura 30), pode-se observar que amostras com características parecidas estão agrupadas separadamente, ou seja os cocultivos (H-C_ML_30 dias) estão separados das monoculturas (C_ML_15 dias) e do meio de cultura (CZAPEK Dox Broth).

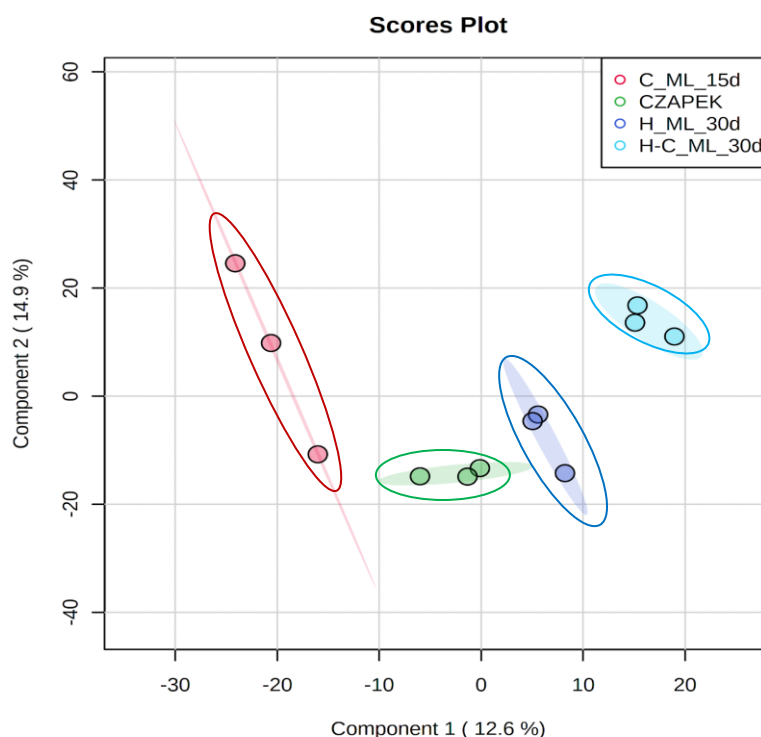


FIGURA 30 - Gráfico PLS-DA cocultivo H-C_ML_30 dias, monoculturas C_ML_30 dias e H_ML_30 dias e meio de cultura, mostra a nítida separação entre os scores.

5.6.2 Análise do *HeatMap* do cocultivo H-C_30 dias

Nesta análise de agrupamento *HeatMap* foram registrados 24 metabólitos do cocultivo, 26 da monocultura e uma baixa concentração de metabólitos do fungo mutualista e meio de cultura, ficando assim evidente a indução de metabólitos de cocultivos e nas monoculturas como mostra a Tabela 4 e o gráfico *HeatMap* da Figura 31.

TABELA 4 - Variáveis (m/z) anotados do agrupamento *Heat Map* (mapa de calor do cocultivo H-C_ML_30 dias, monoculturas C_ML_15 dias).

m/z cocultivo H-C_ML_30 dias	Tempo de retenção(min)	m/z cultivo C-ML_15 dias	Tempo de retenção (min)
421,3150	27,0689	899,2997	16,7995
381,0501	2,7893	277,1215	16,7907
365,0777	2,8011	666,2975	23,3716
483,3690	26,9852	978,5052	26,0104
687,2243	22,8671	680,2748	19,0022
433,2093	15,3171	409,2432	27,0228
367,0838	18,2703	685,2286	19,0265
715,2518	26,3398	682,2901	22,0440
681,1752	20,7337	665,2036	21,0715
278,1253	16,8045	487,2319	18,8933
397,1551	12,9879	501,2090	20,6287
277,1216	16,5925	439,1633	24,9787
487,2300	21,2194	708,3059	24,7854
446,8524	2,2846	687,2440	19,8575
664,2807	21,7867	713,2589	24,9523
827,1765	21,7606	841,3346	24,6417
685,2090	21,8165	487,2321	21,5443
207,0922	20,7927	671,2513	21,5234
644,4380	25,8722	420,3001	27,8156
503,2242	19,7197	403,2750	27,8112
940,6122	27,6226	503,2255	19,8558
825,0393	27,7601	559,1961	23,5138
1062,4451	23,5271	397,1558	23,4951
123,0315	23,1213	664,2815	22,1239
		681,1757	21,0066
		459,2027	21,0543

Retirados da tabela de dados MZMine_mz_RT.csv

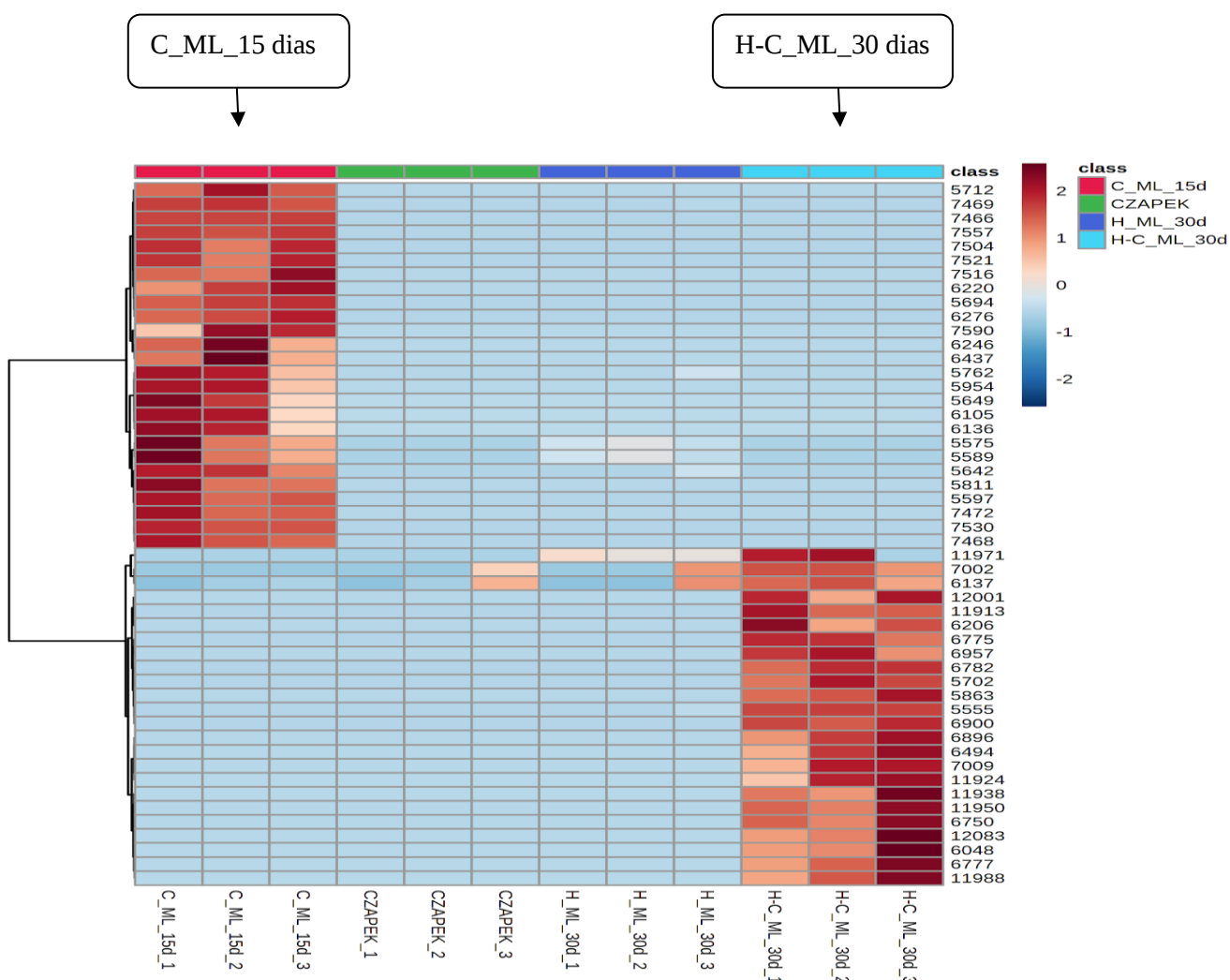


FIGURA 31 - Resultado do agrupamento como Heat Map (mapa de calor do cocultivo H-C_ML_30 dias, monoculturas H_ML e C_ML_30 dias e meio de cultura Czapek Dox Broth).

5.6.3 Análise da projeção de importância da variável (VIP) do PLS-DA, do cocultivo H-C_ML_30 dias.

Na análise *VIP scores*, metabólitos destacados com alto *VIP* são mais importantes na separação de classes dos metabólitos (marcados em quadrados coloridos vermelho intenso) enquanto os com baixo *VIP* (azul intenso) estão em baixas concentrações.

Esses resultados indicaram que no cocultivo H-C_ML_30 dias comparados com as monoculturas C (*Exophiala spinifera*) e H (*Leucoagaricus gongylophorus*), estão presentes vários metabólitos em alta concentração que são produzidos por essa condição de cocultivo (listados Figura 32) assim como também mostrou metabólitos em alta concentração que estão presentes nas monoculturas.

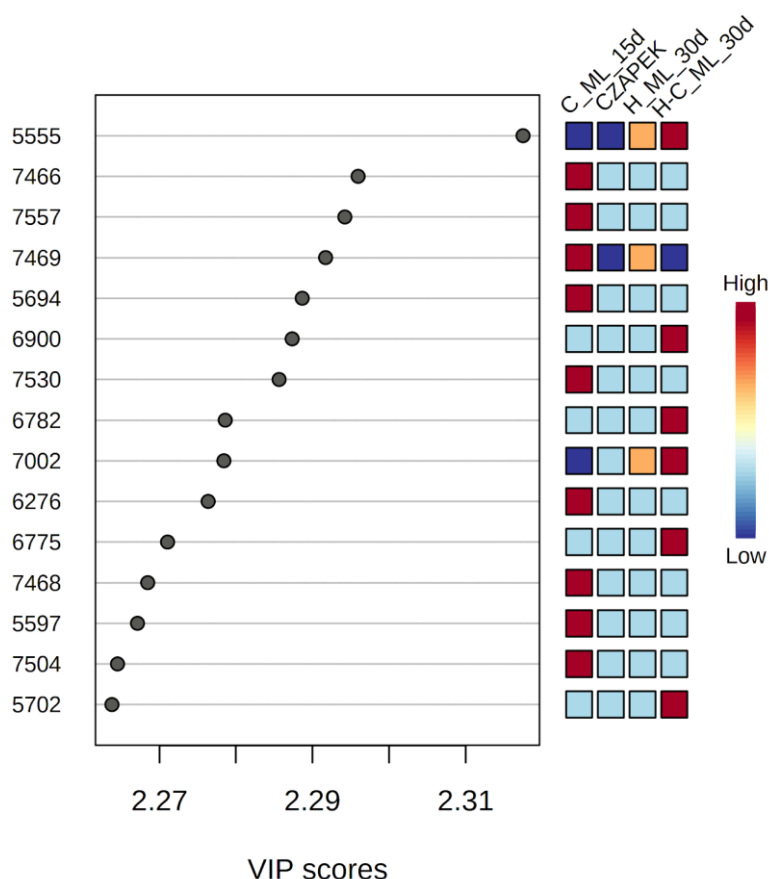


FIGURA 32 - Gráfico VIP score mostra a razão de abundância em cores de vermelho intenso (alta) à azul escuro (baixa) dos metabólitos. Variáveis selecionadas pelo modelo PLS-DA para os componentes.

Na representação gráfica *VIP Score*, íons detectados no cocultivo H-C ML_30 dias e na monocultura C_ML_15 dias, H_ML_30 dias e meio de cultura Czapek Dox Broth, foram buscados em bases de dados de produtos naturais (Tabela 5).

TABELA 5 - Ions m/z detectados do cocultivo e monoculturas

Razão m/z H-C_ML_30 dias (alta)	Razão m/z C_ML_15 dias (alta)	Razão m/z H_ML_30 dias (média)
277,1216	666,2975	277,1216
487,2300	978,5052	277,1215
681,1752	277,1215	381,0501
381,0501	665,2036	
367,0838	681,1757	
278,1253	487,2319	
	459,2027	
	397,1558	
	680,2748	

Apresentação do dendograma HCA e a validação revelam a similaridade entre o cocultivo e a monocultura da levedura negra (Figura 33 e 34),

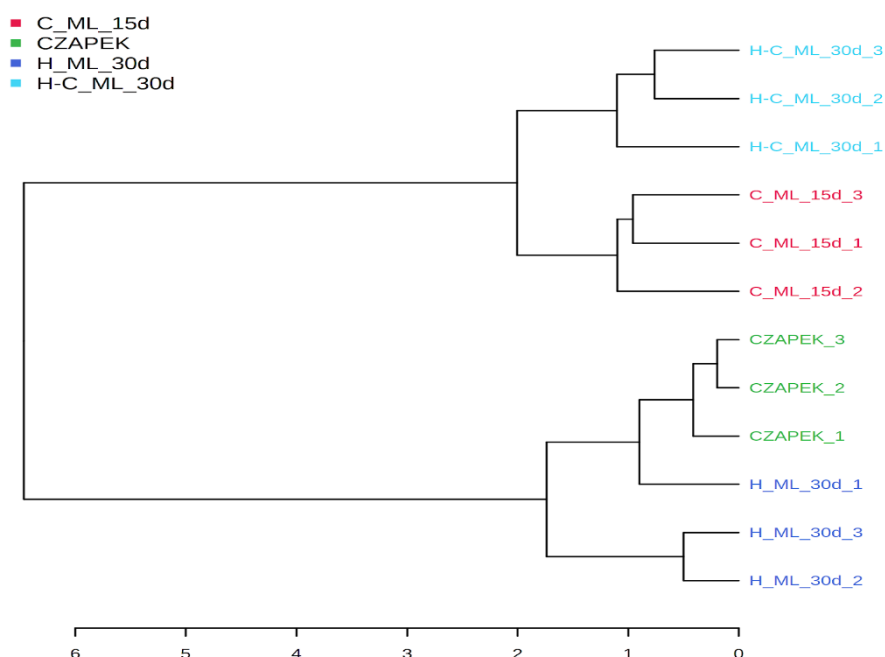


FIGURA 33 - Resultado de agrupamento mostrado como dendograma de similaridade entre os cocultivos (H-C_ML_30 d), monoculturas e meio de cultura.

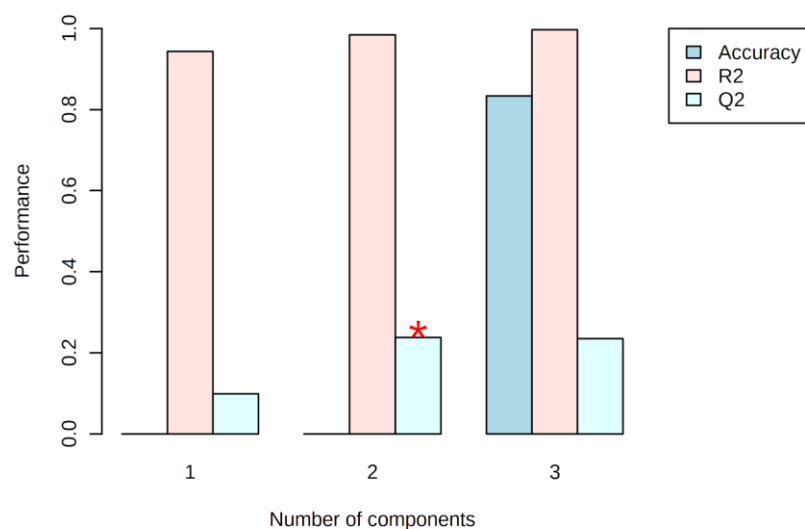


FIGURA 34 - Validação do método pelo coeficiente de correlação quadrado múltiplo, R^2 e Q^2 .

Com esses resultados, considera-se que o HCA associado a uma visualização do *HeatMap* e *VIP scores* facilitaram a interpretação de dados e leva a compreender as semelhanças e diferenças entre monoculturas, a cocultura H-C_ML_30dias.

5.7 Construção das redes moleculares na plataforma *GNPS- Global Natural Products Social*

5.7.1 Redes Moleculares

A plataforma *Global Natural Products Social* (GNPS; <https://gnps.ucsd.edu/>), oferece vários recursos para análise de dados de LC-MS ou MS/MS. Uma das ferramentas mais utilizadas é a redes moleculares que são feitas para reunir em famílias moleculares, grupos de compostos com semelhança encontradas a partir das análises entre os espectros MS/MS, organizando em redes por similaridade

espectral. Nas redes moleculares cada nó representa um espectro e as arestas (conexões) entre os nós representa os alinhamentos espectral que detecta espectros de moléculas estruturalmente semelhantes, entendendo que essas moléculas fragmentam-se de forma semelhantes aos padrões MS/MS (NGUYEN, D.D. *et al.*, 2016).

A principal vantagem de se construir as redes moleculares é que por meio destas consegue-se uma visualização da diversidade química contida em uma amostra com dados obtidos de misturas complexas analisadas por espectrometria de massas e dos espectros de fragmentação (Molecular Networking, MOURA, M.S., 2022).

O processamento dos dados obtidos através da técnica de LC-MS permite a organização dos dados associados de uma forma que possibilita a comparação entre elas. Nesse caso, tem-se as informações relacionadas a m/z , associada a um tempo de retenção e da área do pico relacionado, a essas informações dá-se o nome de variável. As anotações das variáveis, que neste caso a variável é a razão massa/carga, obtidas através do processamento dos dados de LC/MS, permitem organizar as classes das substâncias produzidas por essa levedura negra em interação com o fungo mutualista.

Durante a construção das redes moleculares, os espectros de fragmentação também são comparados com uma biblioteca espectral de acesso aberto, que inclui o HMDB:

<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/gnpslibraries/>.

No item de informação *Mirror match* mostra o espectro de fragmentação que compara a amostra com a biblioteca e no item de informação *cosine similarity* mostra a similaridade entre os espectros.

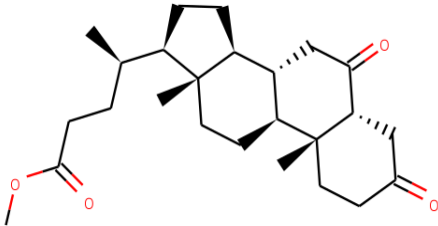
De acordo com a biblioteca do GNPS, que abriga cerca de 8 mil espectros de fragmentação de substâncias conhecidas, 49 metabólitos foram

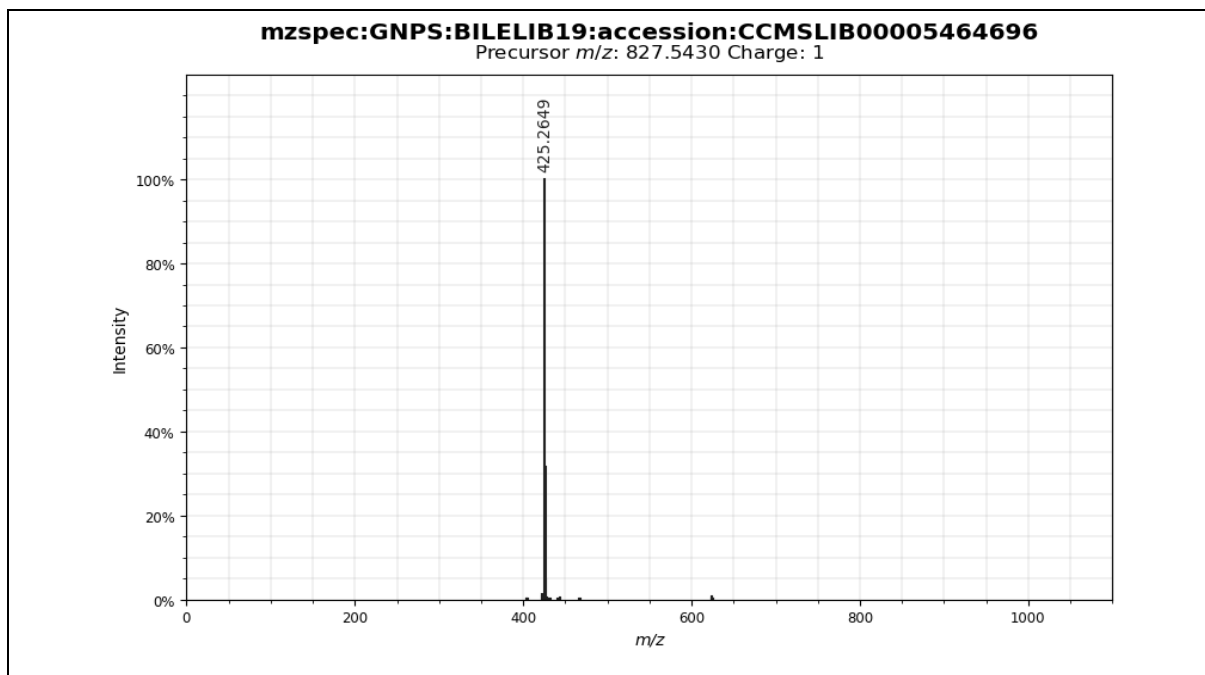
anotados. Após a verificação manual e busca na literatura de cada uma das sugestões, um total de 13 metabólitos foram relacionados.

Os compostos relacionados são das classes dos esteróides colano, diterpenóides tetracíclicos, diterpenóides tigliano, esteróides colestano, ácidos dicarboxílicos, hidroxi ácidos graxos, benzopiranos, 4',6-dimetoxiisoflavone-7-o-beta-d-glucopyranoside, benzenóides, ácidos cinâmicos e derivados, esteróides furostano, álcoois e polióis, acils graxos são apresentadas a seguir:

Na anotação 04 pode-se observar as informações sobre a classe de produtos naturais que aponta um esteróide colano ($C_{25}H_{38}O_4$), de massa isotópica $[M+2H]^+$, m/z 402,5739 Da e o íon precursor $[M+Na]^+$ de relação de origem marinha por estratégia de mutagênese química usando dietilsulfato m/z 827,5430 Da. Segundo XIA *et al.* (2009, 2014), o artigo refere-se a uma produção ativada de metabólitos silenciosos no fungo *Penicillium purpurogenum* (DES).

Anotação 04

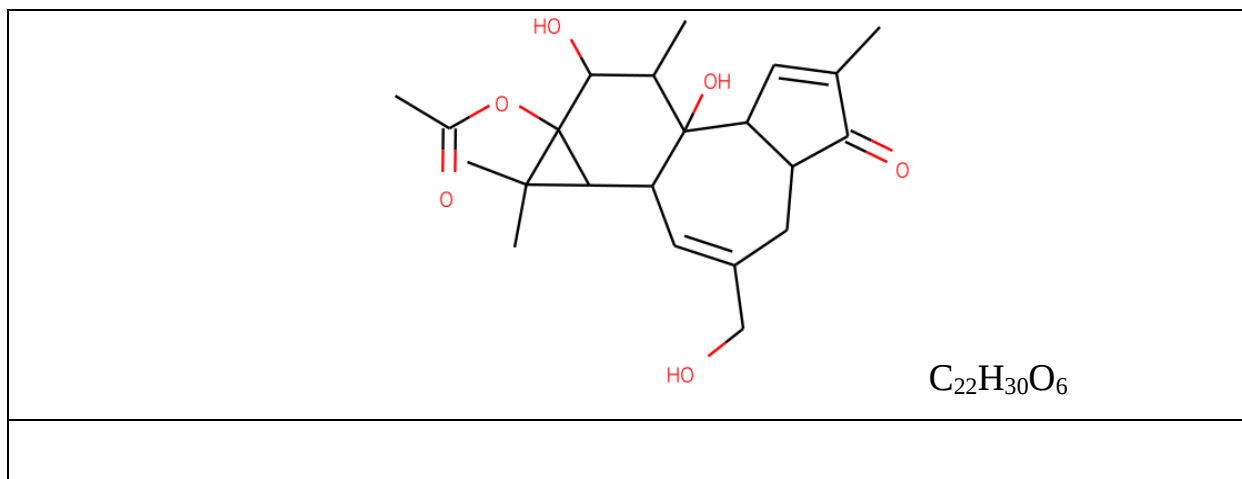
Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	Massa isotópica m/z (Da)	Classe PN
"metil (4R)-4-(5R,8S,9S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-3,6-dioxohexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoato"	9344	0,92	827,5430	402,5739	Esteroides colano
 $C_{25}H_{38}O_4$					



Na anotação 07, de acordo com LIU, Y.H. *et al.*, (2016) essa substância de fórmula $C_{22}H_{30}O_6$ de íon precursor de relação m/z 431,5228 Da, tem como fonte folhas e caule de uma planta chamada *Isodon coetsa*.

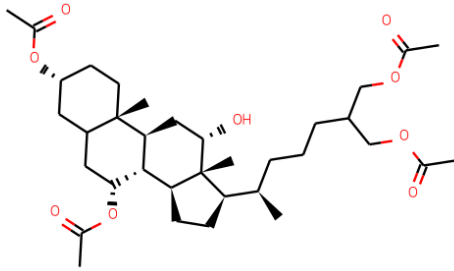
Anotação 07

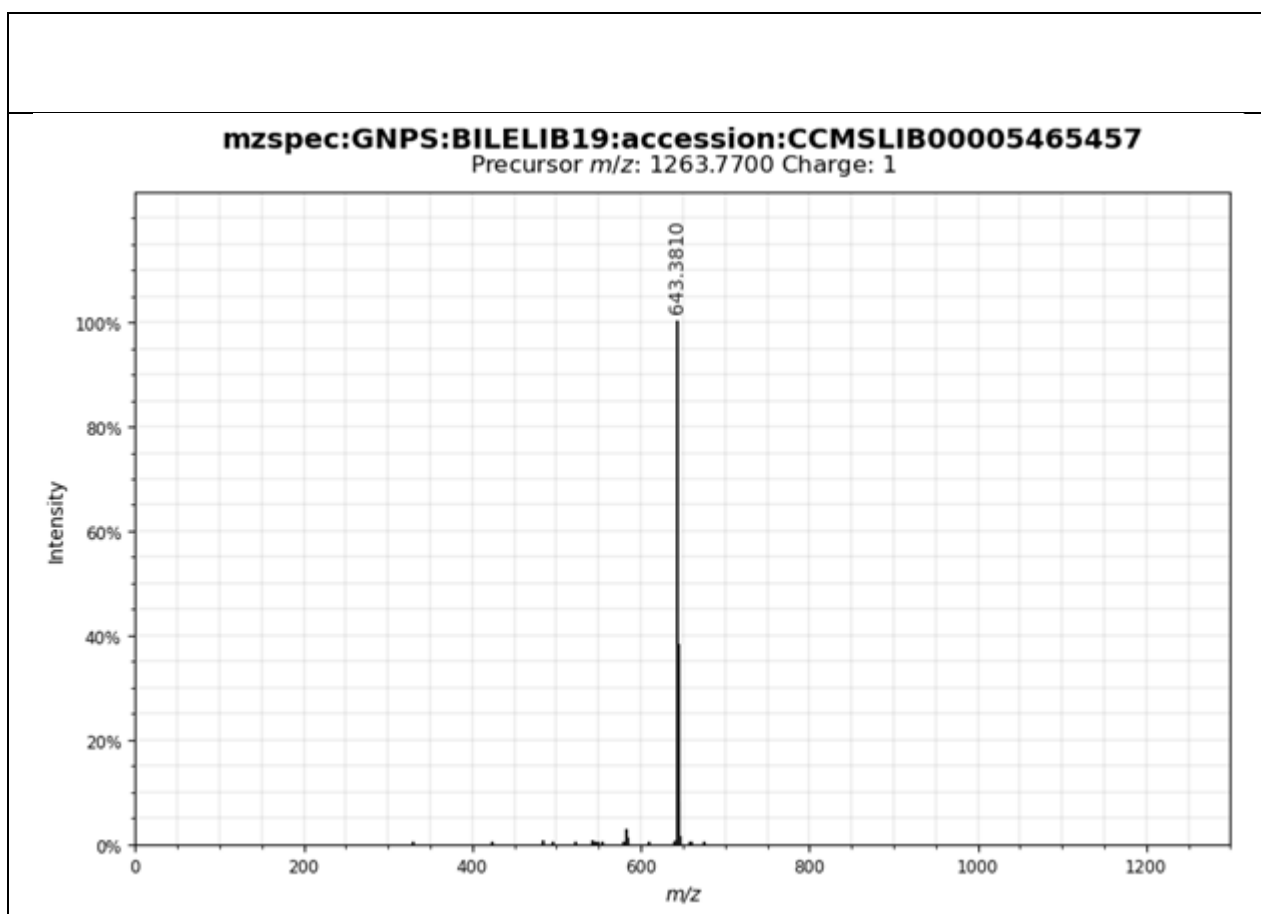
Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	Classe PN
7b,9-Dihidroxi-3-(hidroximetil)-1,1,6,8-tetrametil-5-oxo-1,1a,1b,4,4a,5,7a,7b,8,9-decahidro-9aH-ciclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulen-9a-il acetato	5355	0,91	390,4751 [M+ACN] ⁺ (431,5228 Da)	Diterpenóides tetracíclicos Diterpenóides tigliano



Na anotação 12, de acordo com FAN *et al.*, (2017) é uma substância da classe de produtos naturais, esteróide colestano ($C_{35}H_{54}O_9$) de massa = 618,8064 Da, de íon precursor $[2M+Na]^+$ de relação m/z 1260,6026 Da, esse composto tem origem na China, nomeado *Cimicifugae Rhizoma* [“Sheng-ma”], derivada do gênero *Cimicifuga* (família Ranunculaceae).

Anotação 12

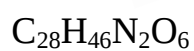
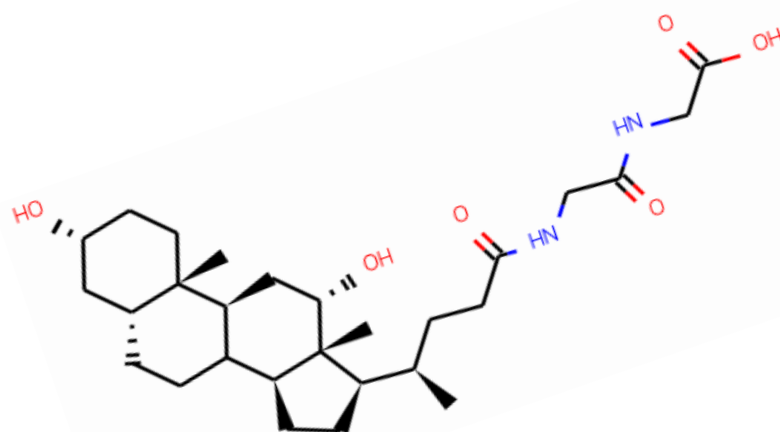
Composto anotação	Cluster idx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	Massa m/z (Da)	Classe PN
""(3R,5R,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-7-acetoxi-6-(acetoximetil)heptan-2-il)-12- hidroxi-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-3,7-diil diacetato""	10055	0,88	1263,7700 Da $[2M+Na]$	619,8143 Da $M+H]^+$	Esteróides colestano
 $C_{35}H_{54}O_9$					



Anotação 17 refere-se a uma classe de esteróide colano de razão m/z 1035,8052 Da, $[2M+Na]^+$, de massa exata m/z 506,4077 Da. Este esteróide se apresenta com ramificação no carbono 17, de uma molécula de glicina.

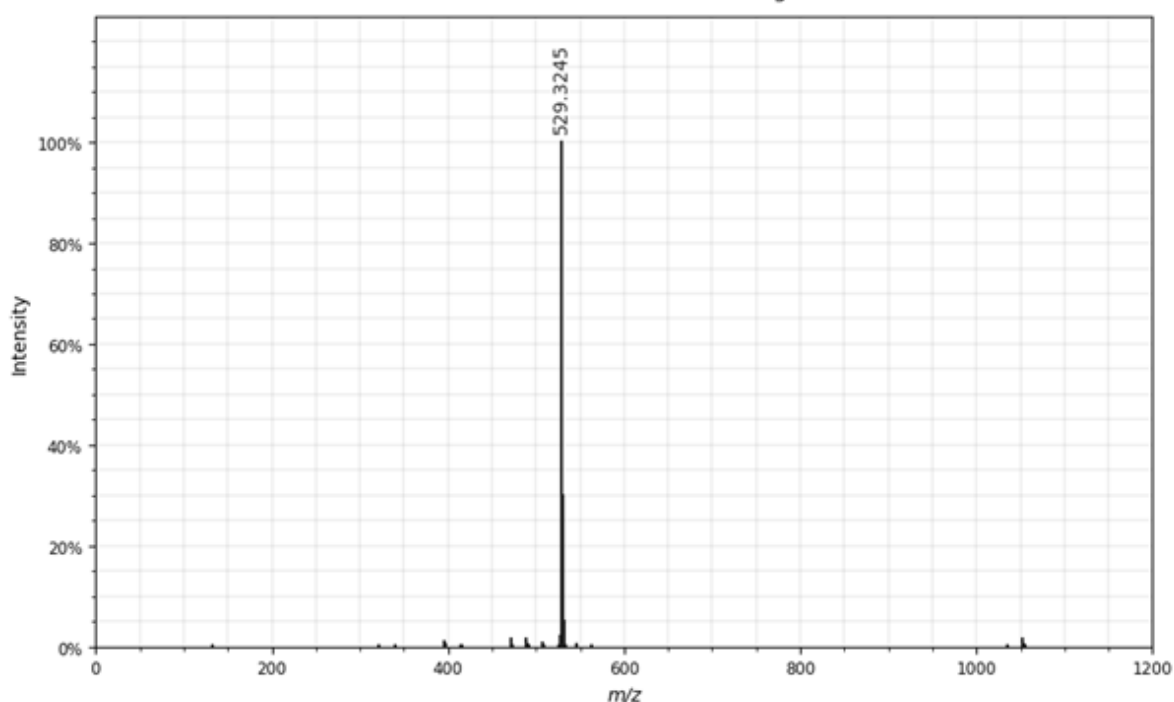
Anotação 17

Composto anotação	Cluster ldx	Cosse- no	Ion precursor m/z (Da)	Massa exata m/z (Da)	Classe PN
""((4R)-4- ((3R,5R,9S,10S,12S,13R,14 S,17R)-3,12-dihidroxi-10,13- dimetilhexadecahidro-1H- ciclopenta[a]fenantren-17 - il)pentanoil)glicilglicina""	10041	0,84	1035,8052 Da, $[2M+Na]^+$	506,4077 Da	Esterói- de colano



mzspec:GNPS:BILELIB19:accession:CCMSLIB00005465706

Precursor m/z : 1035.6600 Charge: 1



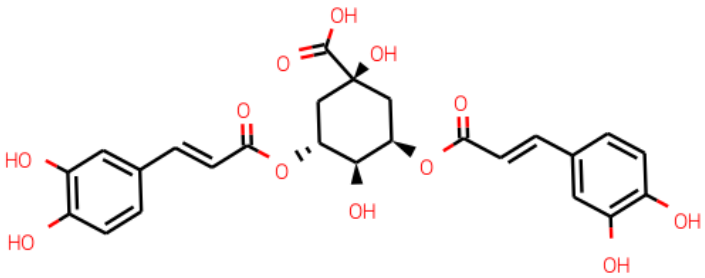
Anotação 42 refere-se a uma classe de ácidos cinâmicos e derivados de razão m/z 517,127 Da, $[M+H]^+$, de massa m/z 516,127 Da. Fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$. É um polifenol, com várias atividades biológicas inibe a acetilcolinesterase (AChE) e a α -glicosidase de maneira dependente da

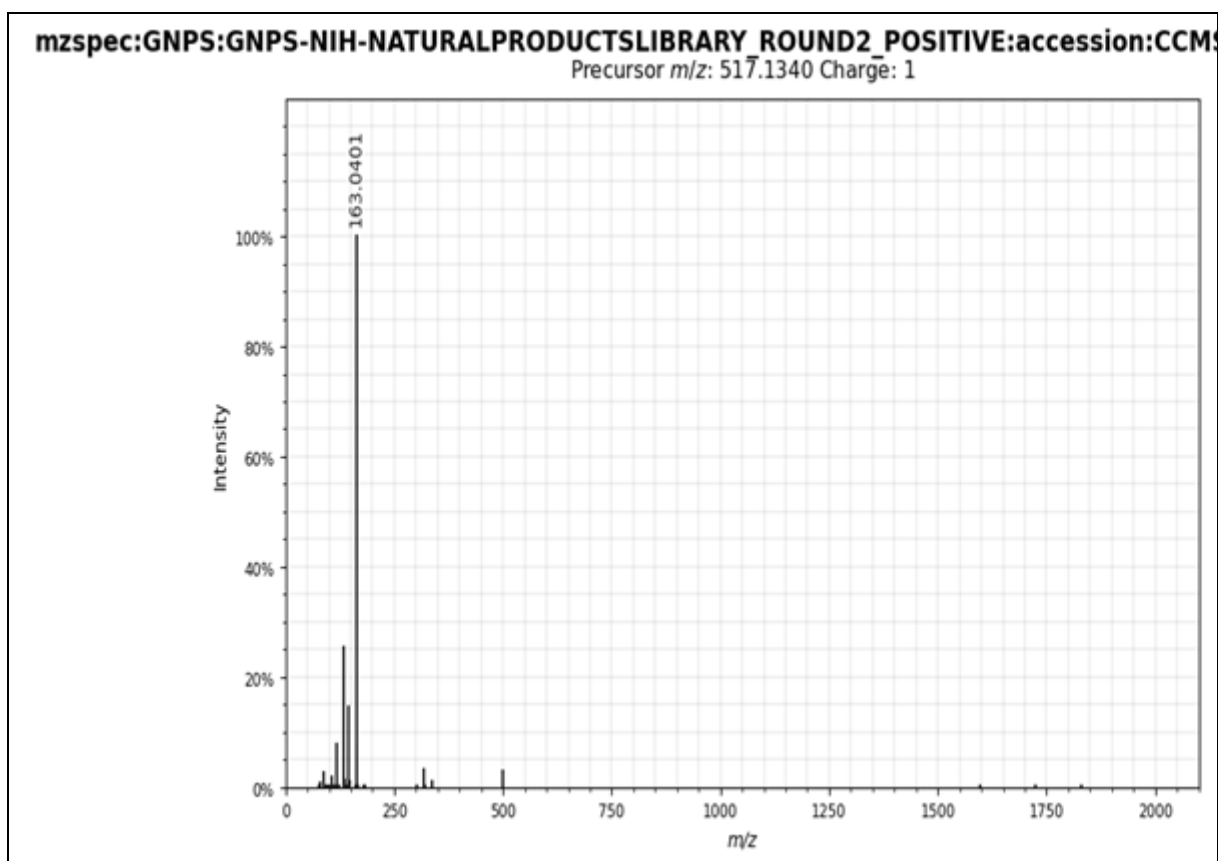
concentração. (Disponível no site:
<https://www.smolecule.com/products/s622082>)

Os esteroides fazem parte da estrutura das membranas dos fungos, hormônios sexuais e fatores de crescimento.

Foi anotado (42), ácido cinâmico e seus derivados tem aplicação terapêutica, além de baixa toxicidade (Disponível no site:
<https://www.smolecule.com/products/s622082>).

Anotação 42

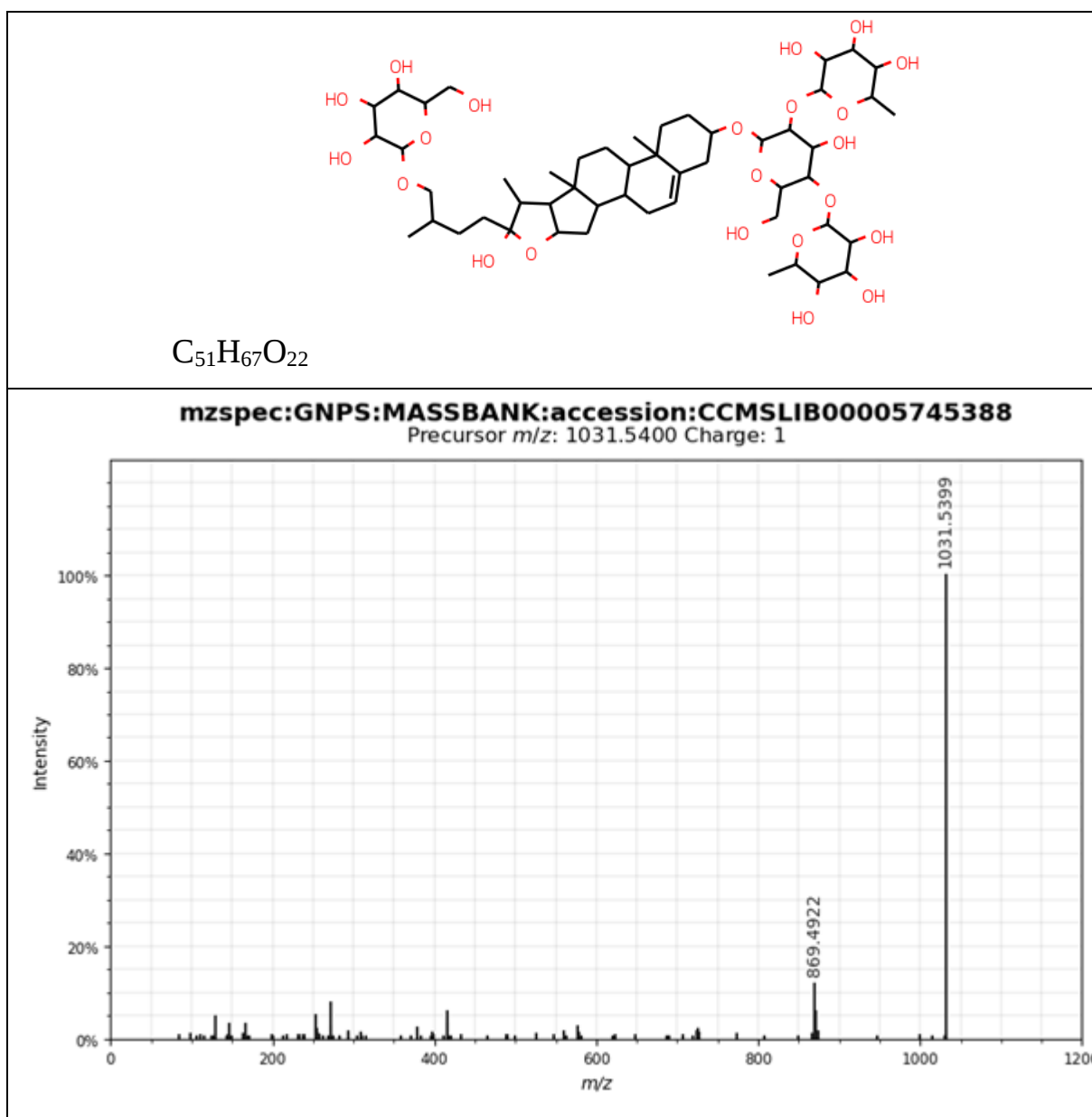
Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion percursor m/z (Da)	Massa exata m/z(Da)	Classe PN
Ácido (3R,5R)-3,5-bis[[<i>(E)</i> -(3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoil)oxi]-1,4-dihidroxiciclohexano-1-carboxílico	7397	0,68	517,1340 [M+H] ⁺	516,127	Ácidos cinâmicos e derivados
 C₂₅H₂₄O₁₂					



A anotação 44, se refere a classe anotada de esteroides de furostano são saponinas esteroidais neutras, que tem como íon precursor de razão m/z 1031,5400 Da. Sua estrutura é composta de uma aglicona com esqueleto de triterpeno, esteroide ou alcalóide esteroidal, no qual está ligada uma ou duas cadeias de açúcar, que podem ser lineares ou ramificadas.

Anotação 44

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	Subclasse:	Classe PN
Base de furostano -2H + O-Hex, O-Hex- dHex-dHex	10038	0,68	1031,5400	Glicosíde- os esteróides	Esteróides de furostano

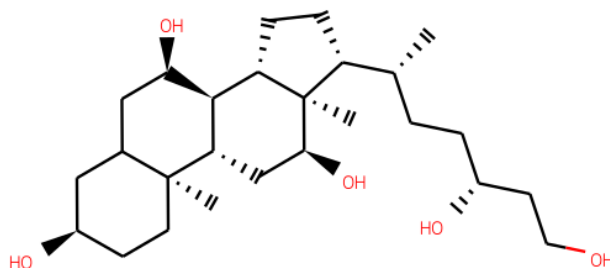


Anotação 45, mostra a classe de produtos naturais esteróides colestano, de massa exata 438,335 Da, de íon precursor 899,658 Da.

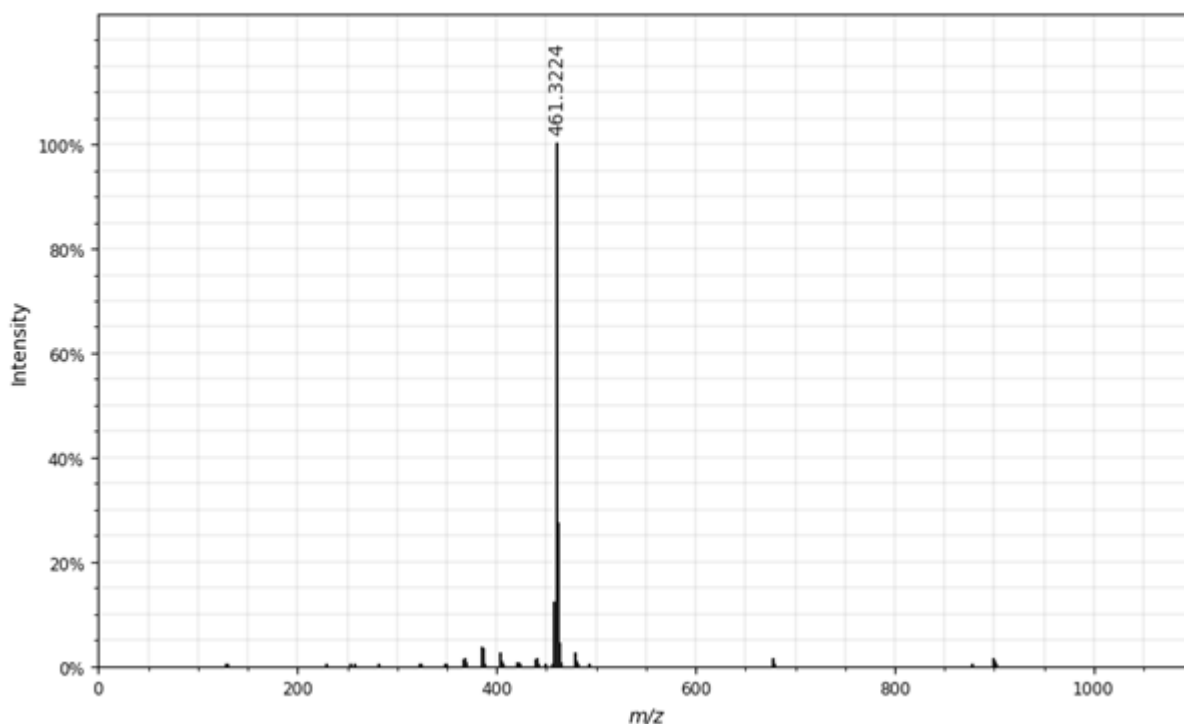
Anotação 45

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	Massa exata m/z (Da)	Classe PN
-------------------	-------------	---------	--------------------------	------------------------	-----------

(3R,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5,7-dihidroxiheptan-2-il)-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-3,7,12-triol""	9787	0,67	899, 658 [2M+Na]	438,335	Esteróides colestano
--	------	------	---------------------	---------	-------------------------



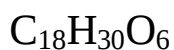
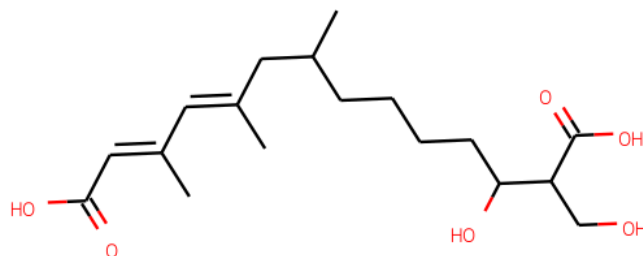
mzspec:GNPS:BILELIB19:accession:CCMSLIB00005465362
Precursor m/z : 899.6580 Charge: 1



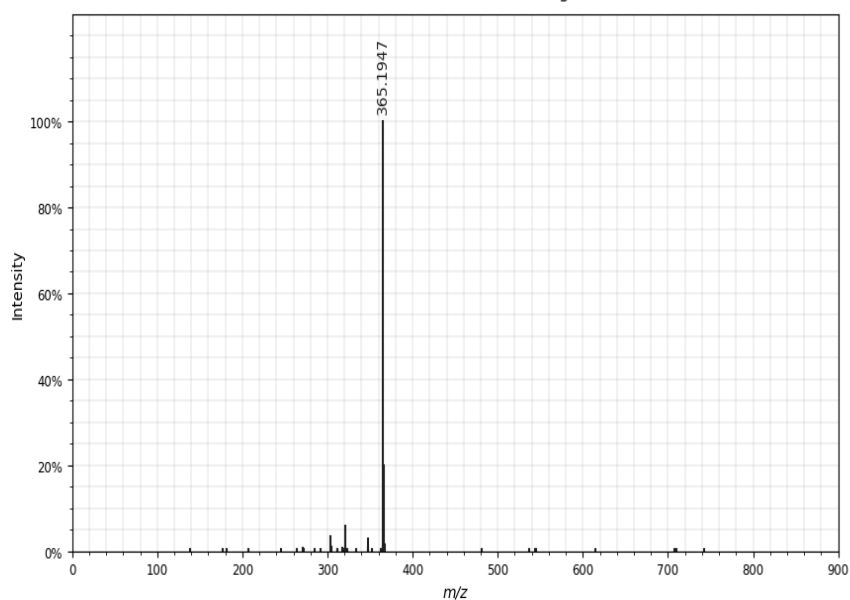
Anotação 15, mostra a classe de produtos naturais, tais como: dos ácidos dicarboxílicos, ácidos graxos hidroxilados de massa exata 342,206 Da $[2M+Na]^+$, de íon precursor 707,4010 Da $[M+H]$.

Anotação 15

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	Massa exata m/z(Da)	Classe PN
Ácido (2E,4E)-12-hidroxi-13-(hidroximetil)-3,5,7-trimetiltetradeca-2,4-dienodiólico [IIN-baseado em: CCMSLIB00000847643]	8784	0,87	707,4010 Da [M ⁺ H]	342,206 [2M+Na] ⁺	Ácidos dicarboxílicos Ácidos graxos hidroxilados



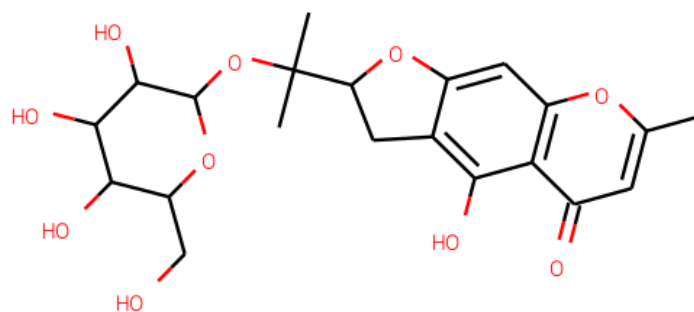
mzspec:GNPS:GNPS-NIH-NATURALPRODUCTSLIBRARY ROUND2_POSITIVE:accession:CCMSLIB00005721493
Precursor m/z: 707.4010 Charge: 1



Anotação 23, indica a classe de produtos naturais como benzopiranos, de íon precursor de razão m/z 439,1600Da.

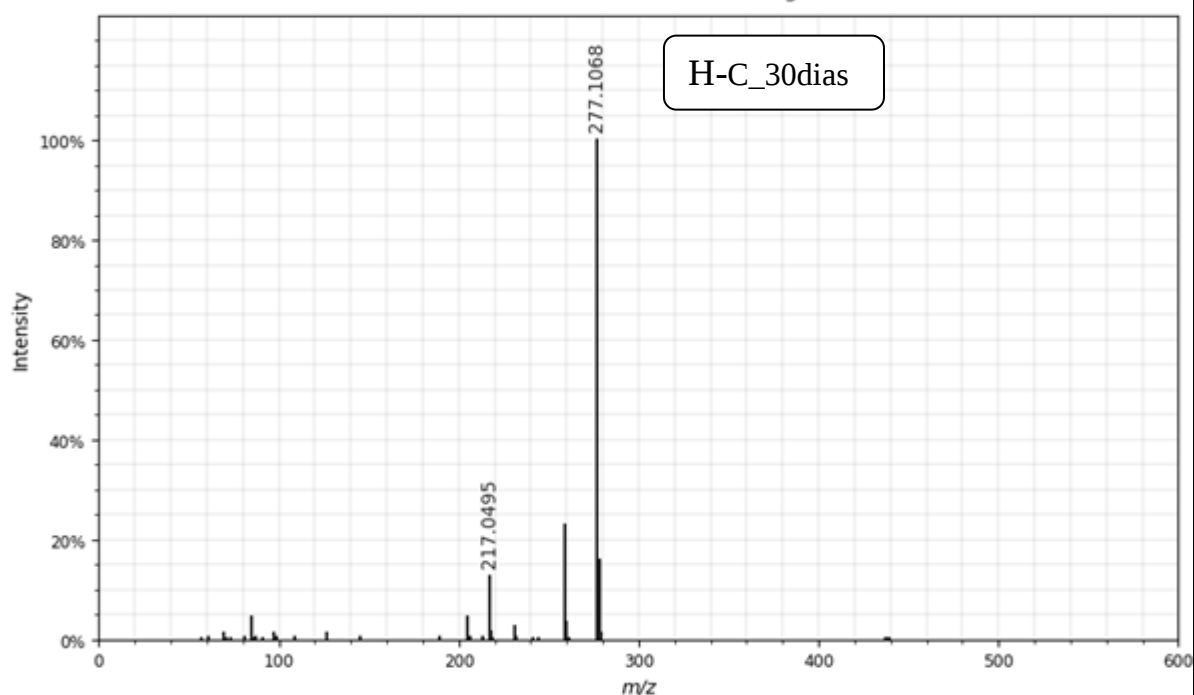
Anotação 23

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)		Classe PN
4-hidroxi-7-metil-2-[2-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxipropan-2-il]-2,3-di-hidrofuro[3,2-g]cromen-5-um	5631	0,78	439,1600 Da [M+H] ⁺		Benzopiranos



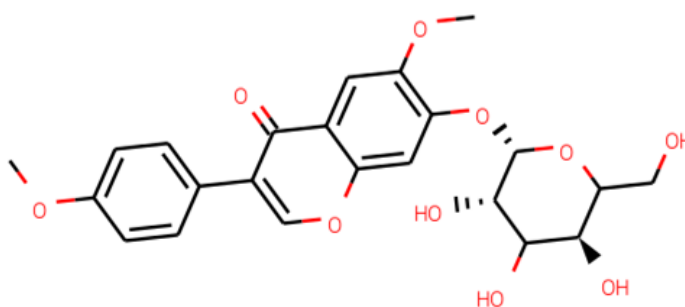
$C_{21}H_{27}O_{10}$

mzspec:GNPS:MONA:accession:CCMSLIB00004709169
Precursor m/z : 439.1600 Charge: 1



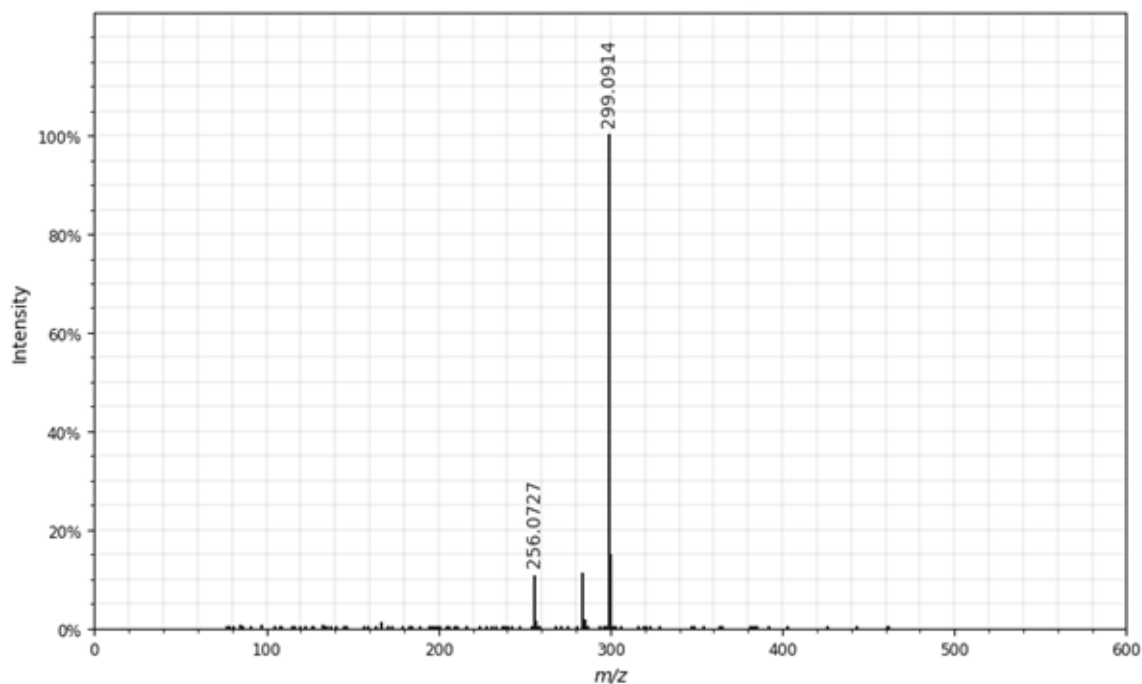
Anotação 31

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion percursor <i>m/z</i> (Da)	Massa <i>m/z</i> (Da)	Classe PN
Correspondência Espectral para 4',6- Dimetoxiisoflavona- 7-O-.beta.-D- glucopiranosídeo de NIST14	6384	0,73	461,145 Da	460.434 Da	CAS: 19046265 4',6- dimetoxiisoflavone- 7-o-beta-d- glucopyranoside; Sinônimo_7-(β-d- glucopiranosiloxi) - 6-metoxi-3-(4- metoxifenil) -4h-1- benzopirano



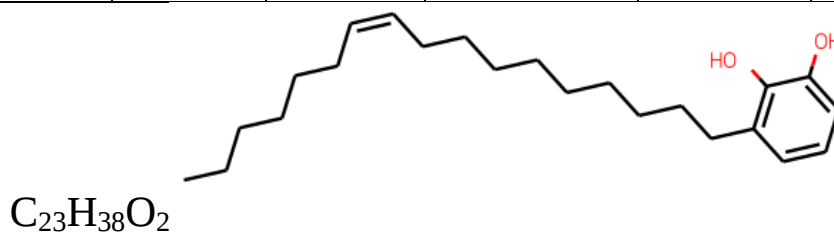
$C_{23}H_{24}O_{10}$

mzspec:GNPS:GNPS-NIST14-MATCHES:accession:CCMSLIB00003134734
Precursor *m/z*: 461.1450 Charge: 1

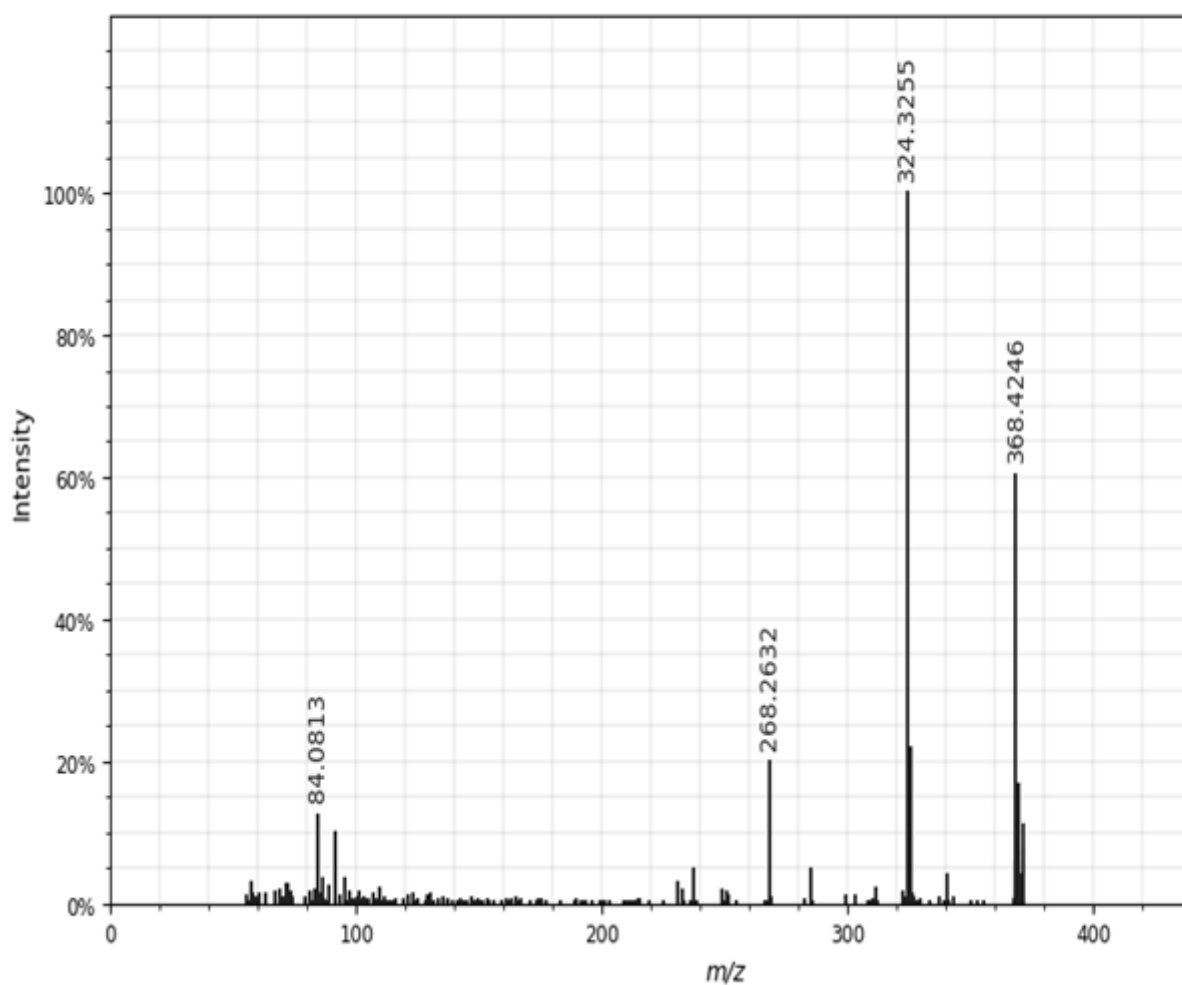


Anotação 34

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor <i>m/z</i> (Da)	Classe	Super classe
3-[(Z)-heptadec-10-enil]benzeno-1,2-diol	3553	0,73	369,544 Da [M+Na] ⁺	Fenóis	Benzenóides

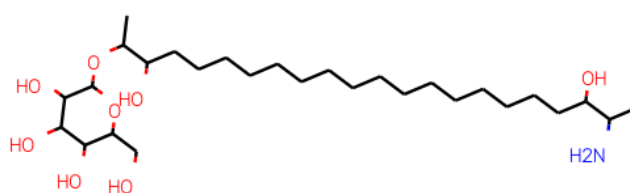


mzspec:GNPS:MONA:accession:CCMSLIB0000469824
Precursor *m/z*: 369.2760 Charge: 1



Anotação 48

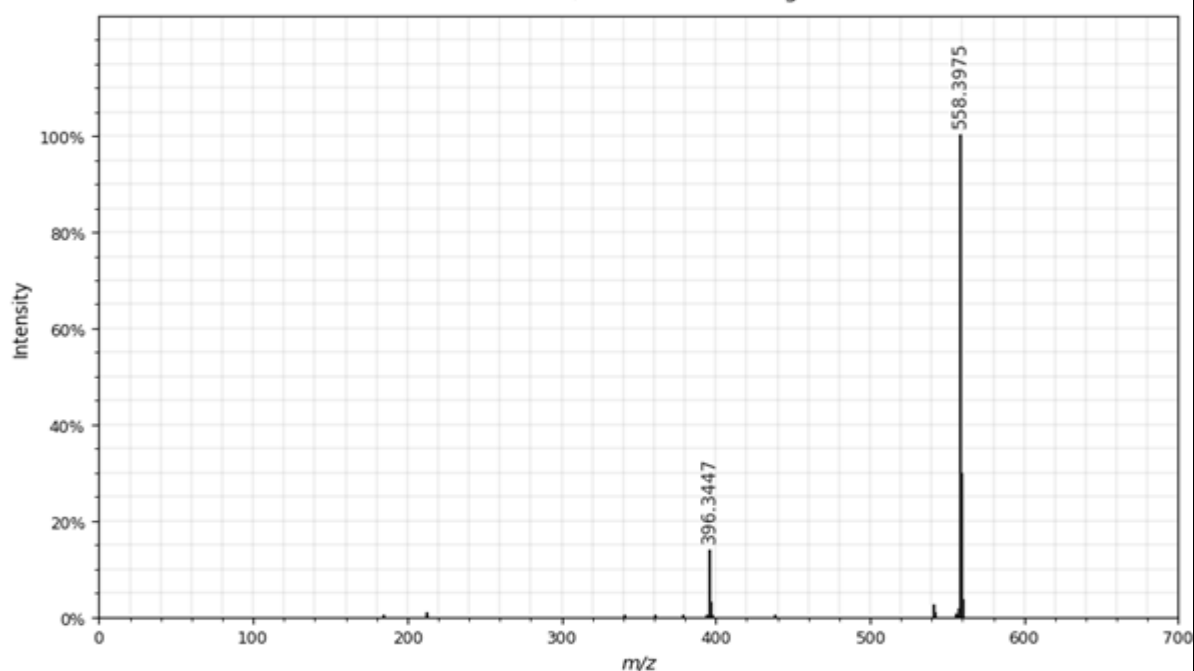
Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor m/z (Da)	SuperClasse	Classe
2-(21-amino-3,20-dihydroxidocosan-2-il)oxi-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol	7832	0,66	558,40 [M+Na] ⁺	Lipídios e moléculas semelhantes a lipídios	Acils Graxos



$C_{28}H_{57}O_8N_1$

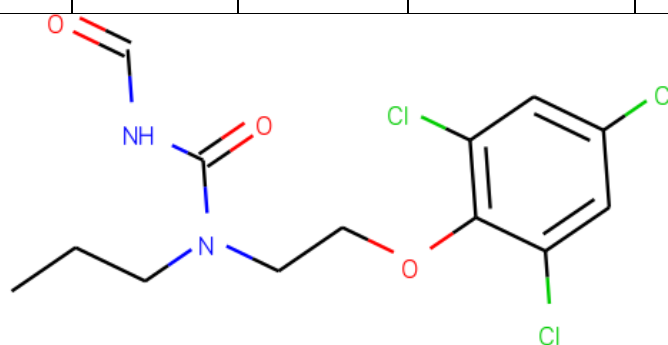
mzspec:GNPS:MONA:accession:CCMSLIB00004709211

Precursor m/z : 558.3980 Charge: 1



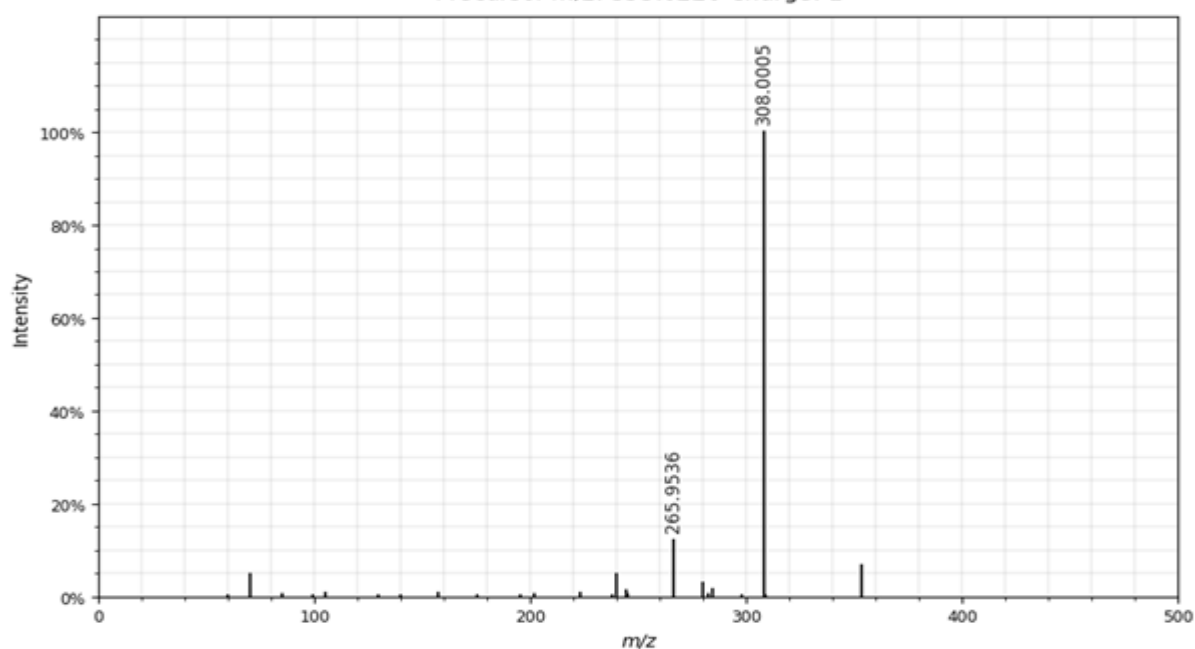
Anotações 49

Composto anotação	Cluster ldx	cosseno	Ion precursor <i>m/z</i> (Da)	Pathway NP
N-[propil-[2-(2,4,6- triclorofenoxi)etil]carbamoil] formamida	2787	0,66	353,632	alcalóide



$C_{13}H_{15}N_2O_3Cl_3$

mzspec:GNPS:MASSBANK:accession:CCMSLIB00005726972
Precursor *m/z*: 353.0220 Charge: 1

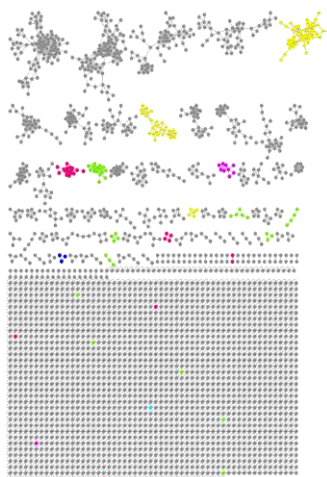


Ferramenta do MolNetEnhancer

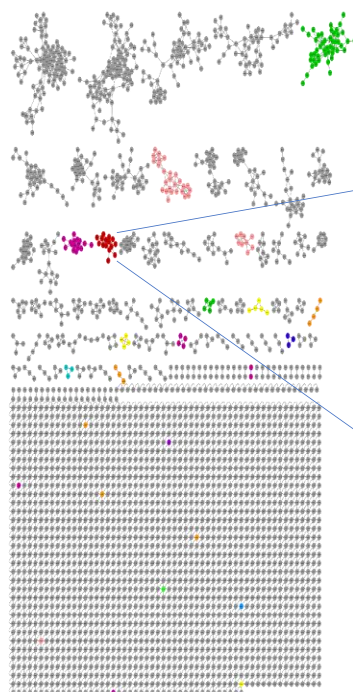
Com a ferramenta do **MolNetEnhancer**, é possível visualizar as superclasses existentes nas amostras.

Visão Geral

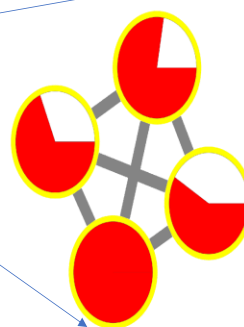
Column	
Mapping Type	Discn
Alkaloids and derivatives	
Benzenoids	
Lipids and lipid-like molecules	
Nucleosides, nucleotides, and analogues	
Organic Polymers	
Organic acids and derivatives	
Organic nitrogen compounds	
Organic oxygen compounds	
Organohalogen compounds	
Organoheterocyclic compounds	
Phenylpropanoids and polyketides	
no matches	



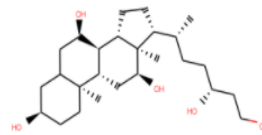
Alcohols and polyols	
Benzoic acids and derivatives	
Bile acids, alcohols and derivatives	
Fatty acid esters	
Fatty acids and conjugates	
Flavonoid glycosides	
O-methylated flavonoids	
Steroidal glycosides	
Terpene lactones	
Tetracarboxylic acids and derivatives	
nan	
no matches	



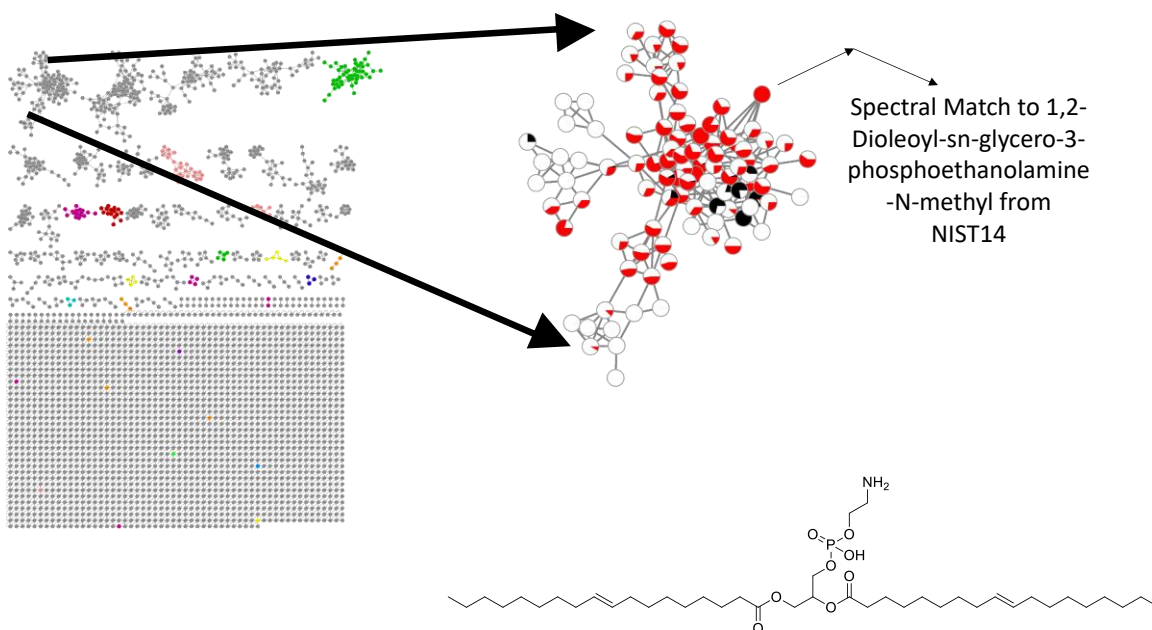
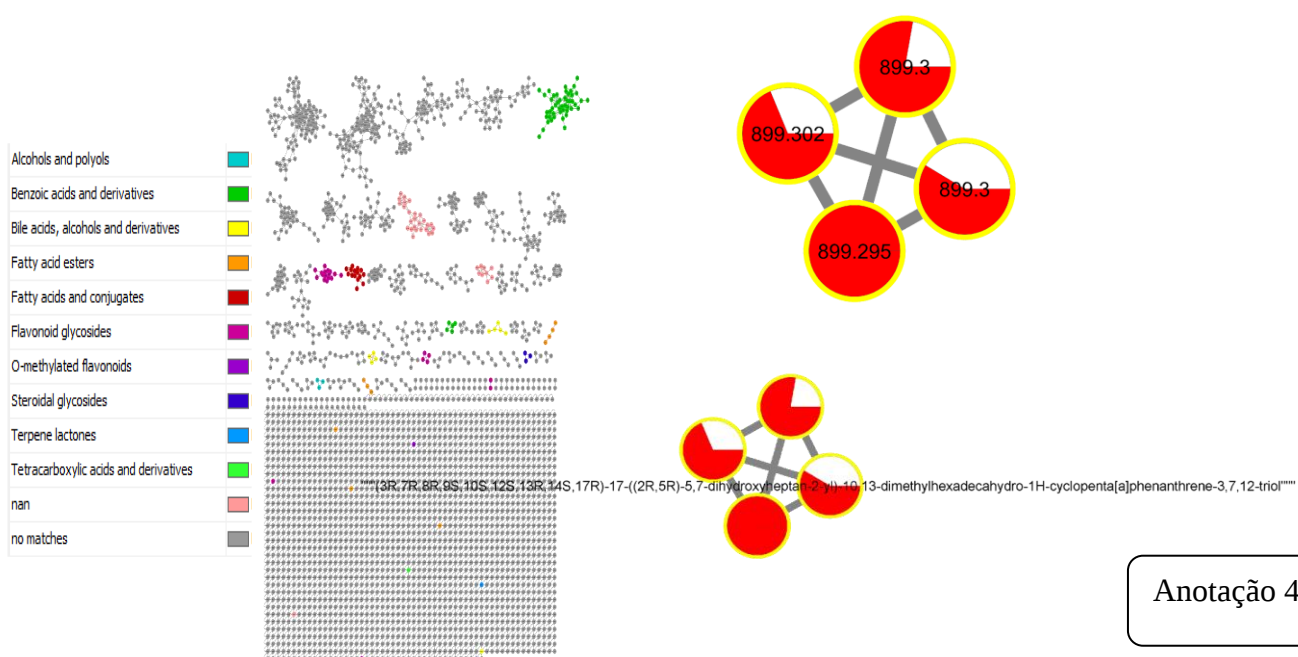
Lipids and lipid-like molecules



Anotação 45
Esteróide
colestano



(3R,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((2R,5R)-5,7-dihydroxyheptan-2-yl)-10,13-dimethylhexadecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,7,12-triol



5.8 Resultados dos estudos do extrato da monocultura da *Exophiala spinifera*

5.8.1 Isolamento do metabólito secundário da levedura negra *Exophiala spinifera*

Nesta parte do trabalho investigou-se os constituintes da monocultura da levedura negra *Exophiala spinifera*, isolada da formiga cortadeira especificamente do bitú (macho) de *Atta laevigata* (saúva cabeça de vidro) presente no jardim de fungos do ninho.

Como primeiro passo desse estudo, priorizou-se a preparação de monoculturas em meio sólido da levedura negra *E. spinifera*, para posteriormente transferir inóculos para o meio Czapek Dox Broth, sendo necessários um maior volume (10 L) para a obtenção de uma quantidade de massa significativa para a realização das análises.

Iniciaram-se os estudos da monocultura da levedura negra, e os possíveis metabólitos presentes foram separados em um equipamento HPLC (Shimadzu® Corporation) de escala preparativa.

Análises da fração F1 foram executadas e também foi analisado a amostra do meio de cultura Czapek Dox Broth, (Figura 35) extraído usando mesmo procedimento da extração das frações da cultura, com a finalidade de monitorar a presença de alguma substância residual que possa interferir nas interpretações das análises das frações coletadas. Como pode-se observar no cromatograma da Figura 35, não apresentou resíduos significativos que poderiam interferir na interpretação dos cromatogramas adquiridos.

Na análise da fração F1 foi gerado um cromatograma, que permitiu ter informações sobre a fração, indicando ser a melhor proposta, para o estudo do isolamento de substâncias da monocultura *E. spinifera* com uma absorção intensa,

evidenciando a presença de substância que possibilitou a coleta para que fosse estudada, como representa o cromatograma na Figura 36.

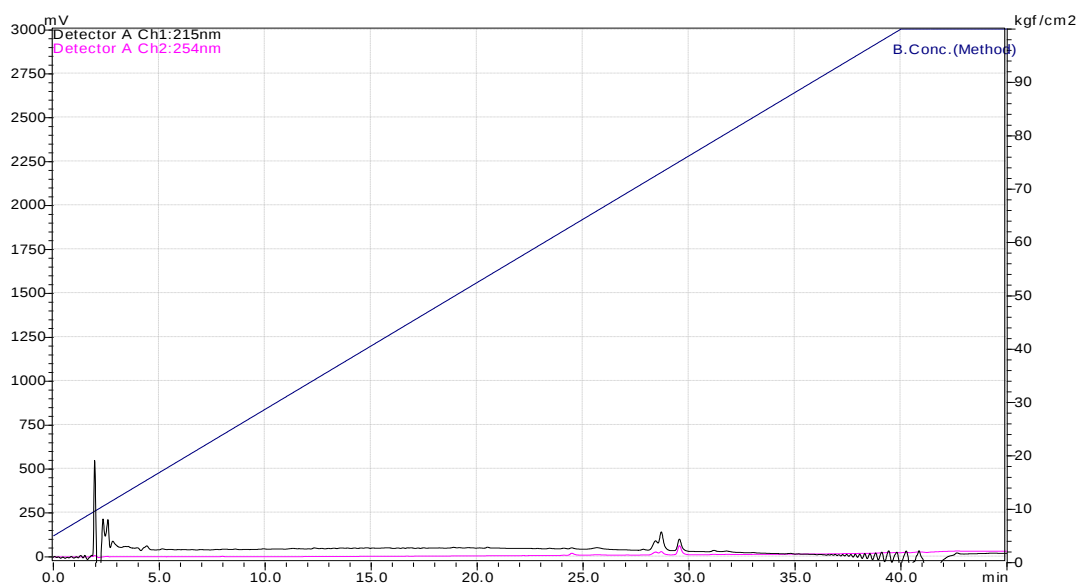


FIGURA 35 - Cromatograma do meio de cultura Czapek DOX Broth, extraído, referente a injeção no sistema HPLC preparativo, monitorando a presença de alguma substância residual que possa interferir nas interpretações das análises das frações coletadas.

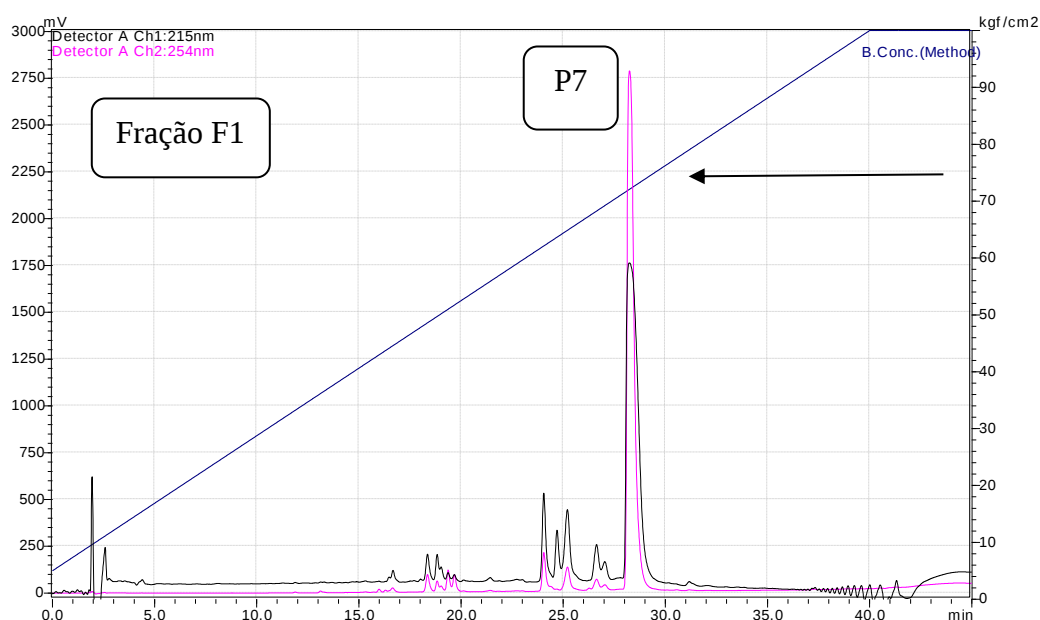


FIGURA 36 - Cromatograma da amostra da fração F1, referente a análise exploratória (HPLC escala preparativo), mostrando a absorção nomeada de F1.2_ amostra P7.

Nesta separação ilustrada na Figura 36, foi gerado sete frações, denominadas P1, P2, P3, P4, P4, P5, P6, P7. Todas as frações foram analisadas por RMN ^1H , as quais apresentaram sinais de pouca intensidade exceto a fração P7 que exibiu sinais representativos e isto indicou ser a melhor fração a ser estudada.

Esta Figura 37 mostra os resultados dos espectros de RMN ^1H das sete frações analisadas:

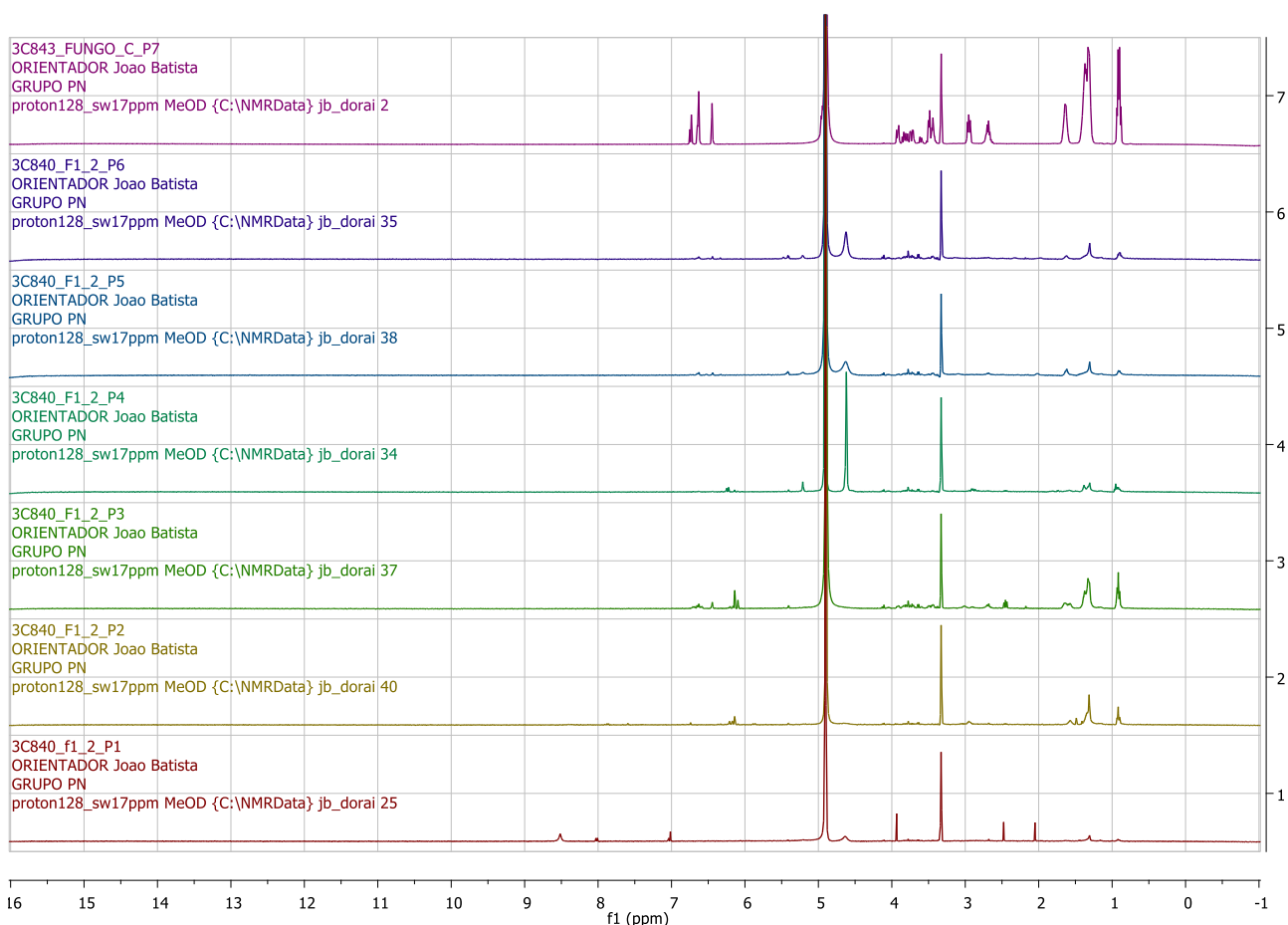


FIGURA 37 - Comparação dos espectros de RMN ^1H das frações P1 a P7, obtidos em obtidos em MeOH_{d4} .

A fração P7 (68,5 mg) apresentou um precipitado com aparência de um pó fino, de coloração branca ilustrado na Figura 38, numa quantidade visivelmente considerável para execução de futuras análises.



FIGURA 38 - Foto da substância isolada P7, sendo evaporada pelo evaporador rotativo, mostrando a formação de um precipitado branco, aparentando um pó fino.

5.8.2 Elucidação estrutural do metabólito isolado da levedura negra *Exophiala spinifera*

A partir da fração isolada, amostras foram preparadas para iniciar a caracterização e possível elucidação da estrutura da substância isolada (P7). A elucidação estrutural do metabólito isolado da levedura negra foi realizada através de dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), RMN 1D e 2D, espectrometria de massas e espectrometria no infravermelho. Dados foram obtidos e todas as atribuições dos sinais observados nas análises de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , e DEPT, COSY, HSQC e HMBC estão apresentados na Tabela 06. Em seguida estão os respectivos espectros.

TABELA 6 - Dados dos deslocamentos químicos de RMN ^1H (400 MHz) e RMN ^{13}C (400 MHz) e 2D obtidos em MeOD_{d4} , para o composto isolado P7.

Carbono- Hidrogênio	^1H δ ppm	^{13}C δ ppm		Carbono- Hidrogênio	^1H δ ppm	^{13}C δ ppm
1		173,9		1' C=O		164,0
2		113,2		2'		113,2
3		155,7		3'		155,7
4	6,60sl	102,5		4'		163,93
5		161,6		5'	6,72d J8Hz	109,0
6	6,43sl	111,8		6'	6,62d J8Hz	116,8
7		145,0		7'		149,0
8	2,66 t	34,9		8'	2,93	36,9
9	1,61	30,8		9'	1,62	32,7
10	1,31	30,8		10'	1,29	33,1
11	1,31	30,8		11'	1,31	30,8
12	1,31	30,6		12'	1,31	30,6
13	1,30	23,7		13'	1,30	23,7
14	0,88	14,4		14'	0,88	14,4
				1''	3,70	102,3
				2''	3,46	75,0
				3''	3,69	77,2
				4''	3,42	71,3
				5''	3,44	78,1
				6''	3,71	62,6
				1'''	3,72	102,5
				2'''	3,58	75,0
				3'''	3,81	72,3
				4'''	3,88	70,1
				5'''	3,44	78,1
				6'''	3,88/3,77	62,4

Espectro de RMN ^1H (400 MHz)

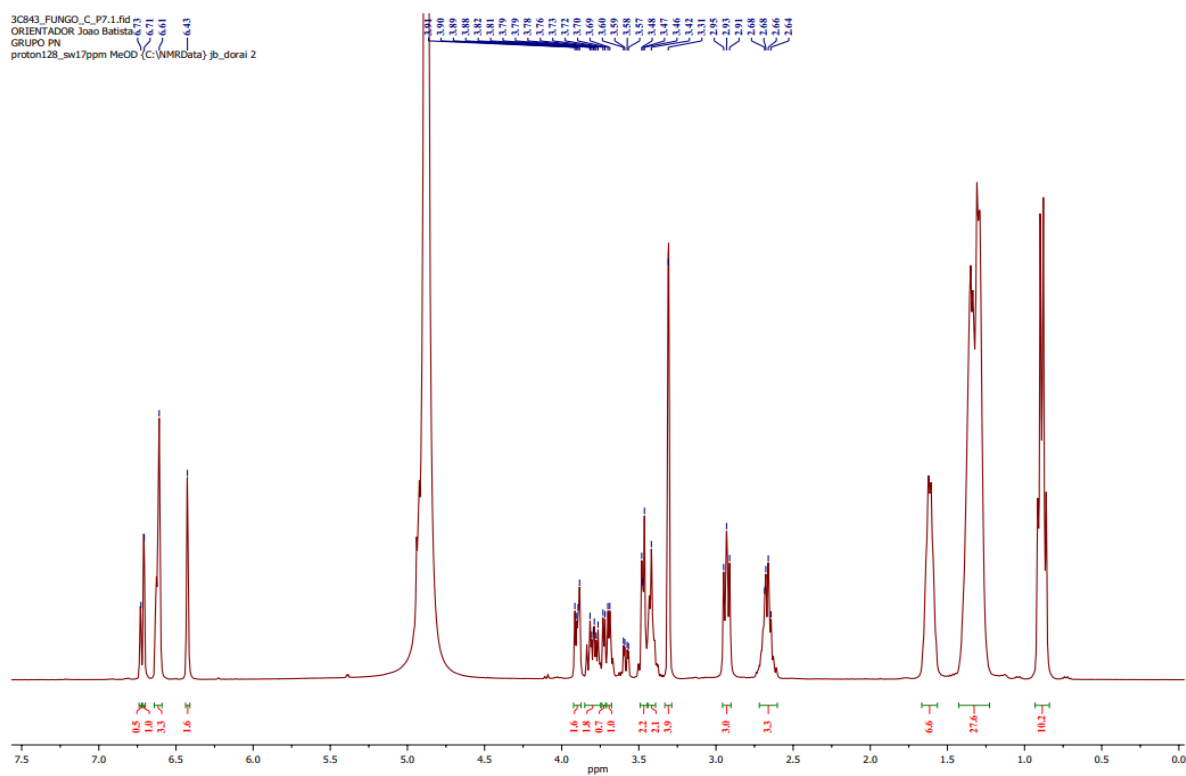


FIGURA 39 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz) do composto isolado P7.

Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz)

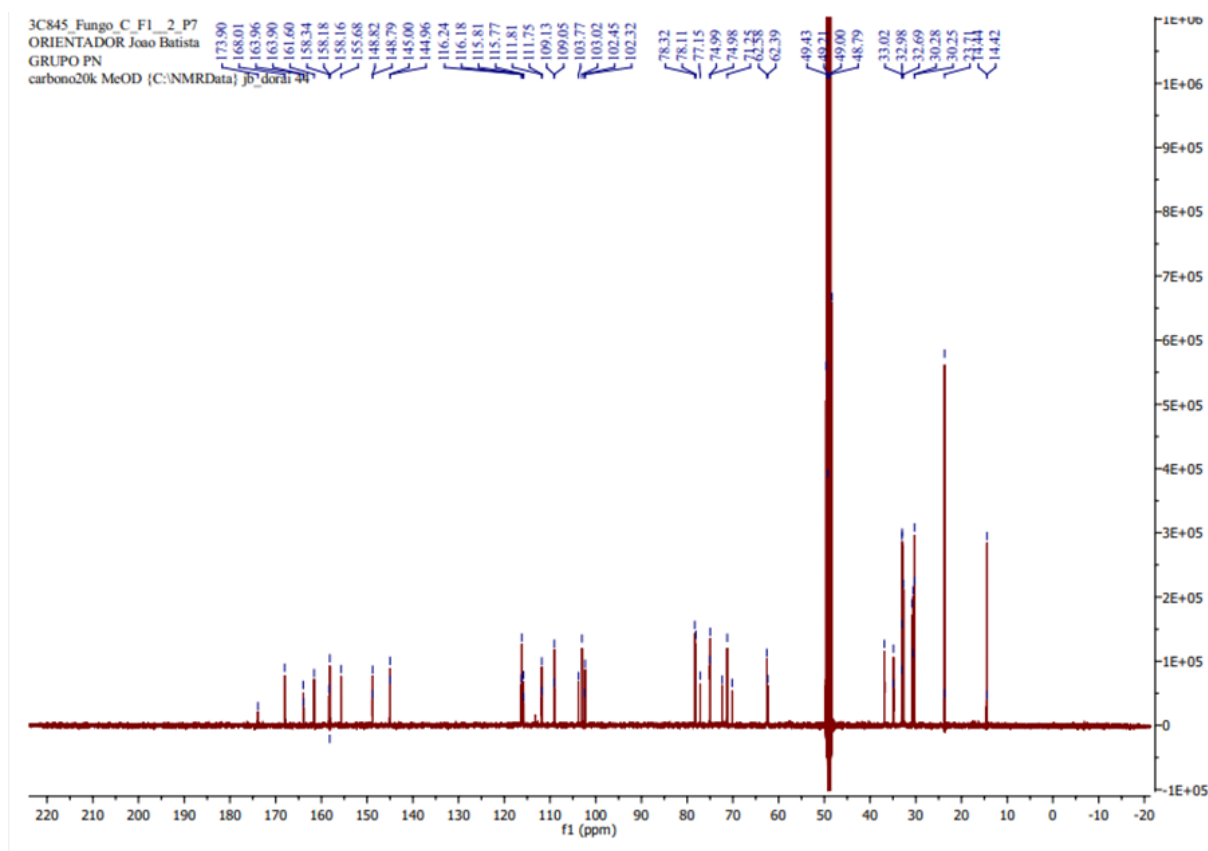


FIGURA 40 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz) do composto isolado P7.

Espectro de RMN DEPT do composto isolado P7.

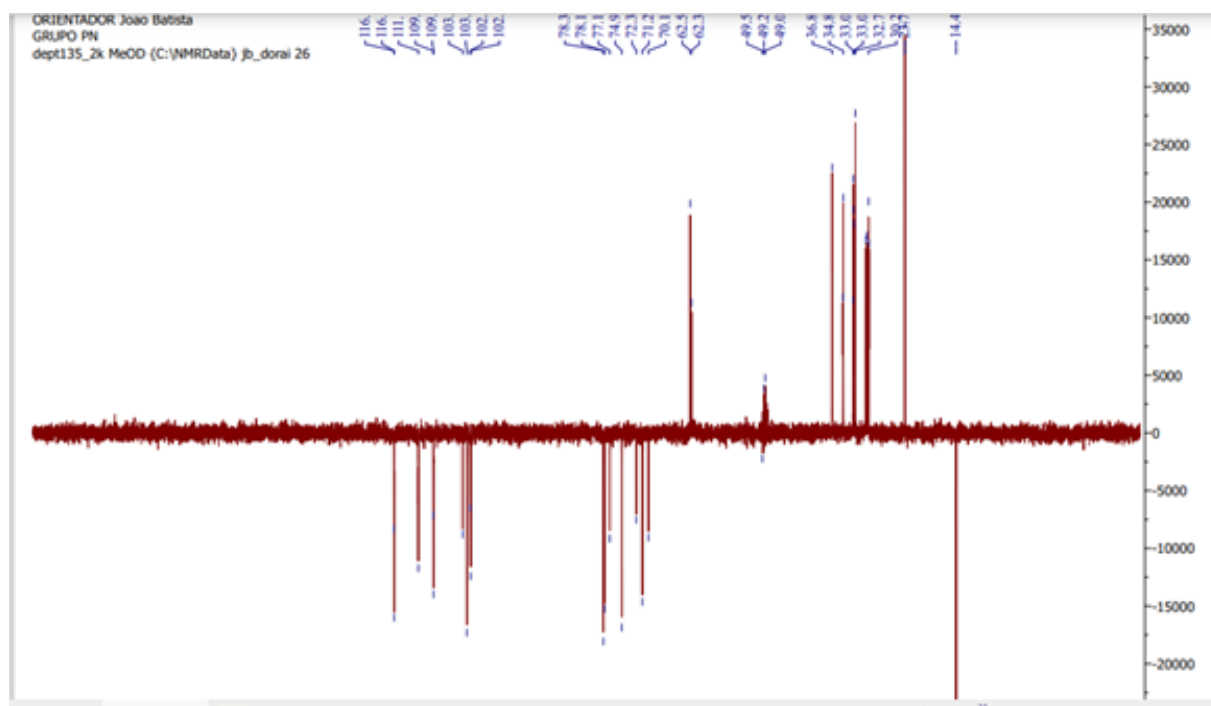


FIGURA 41 - Espectro de RMN DEPT (400 MHz) do composto isolado P7.

Espectro de RMN 2D COSY do composto isolado P7.

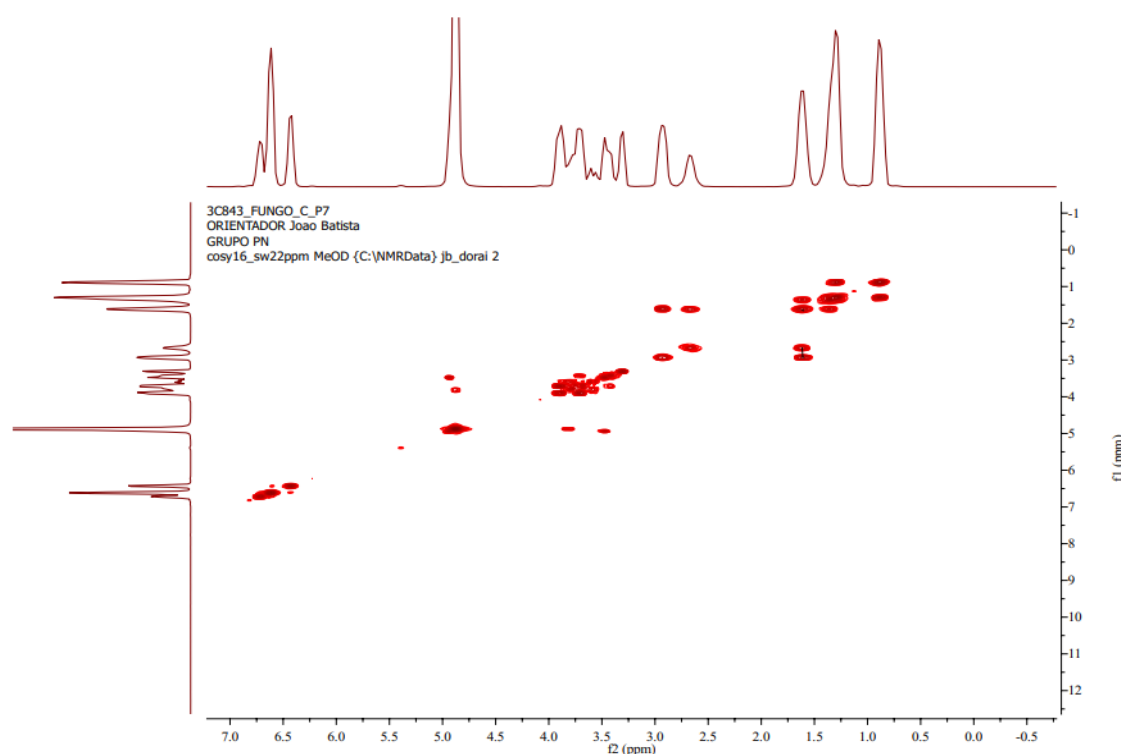


FIGURA 42 - Espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.

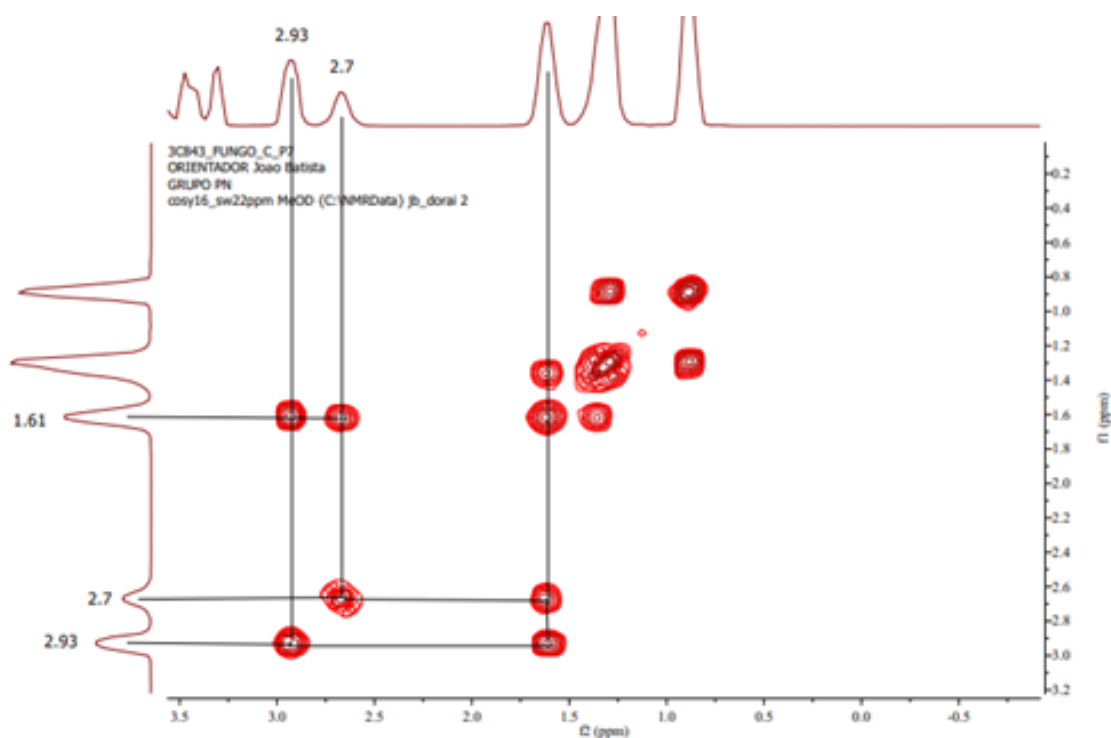


FIGURA 43 - Ampliação da região δ 0,5 a 3,5 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.

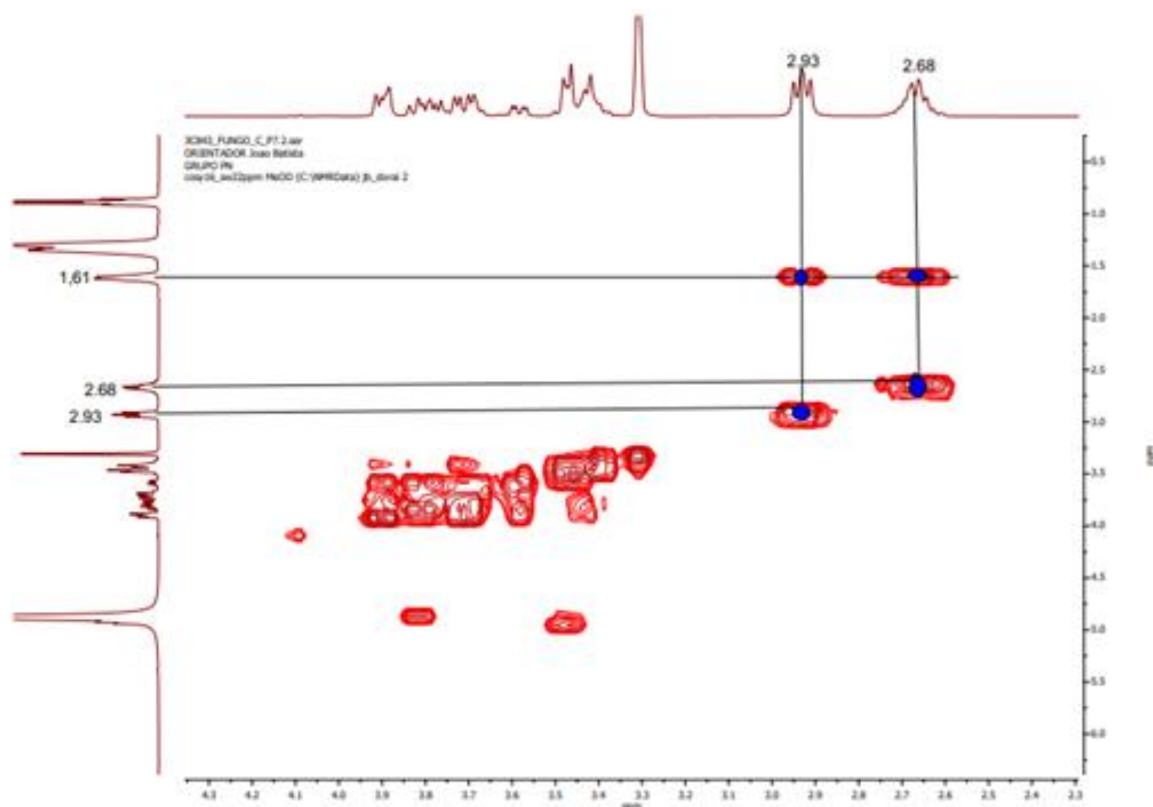


FIGURA 44 - Ampliação da região δ 2,3 a 4,3 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.

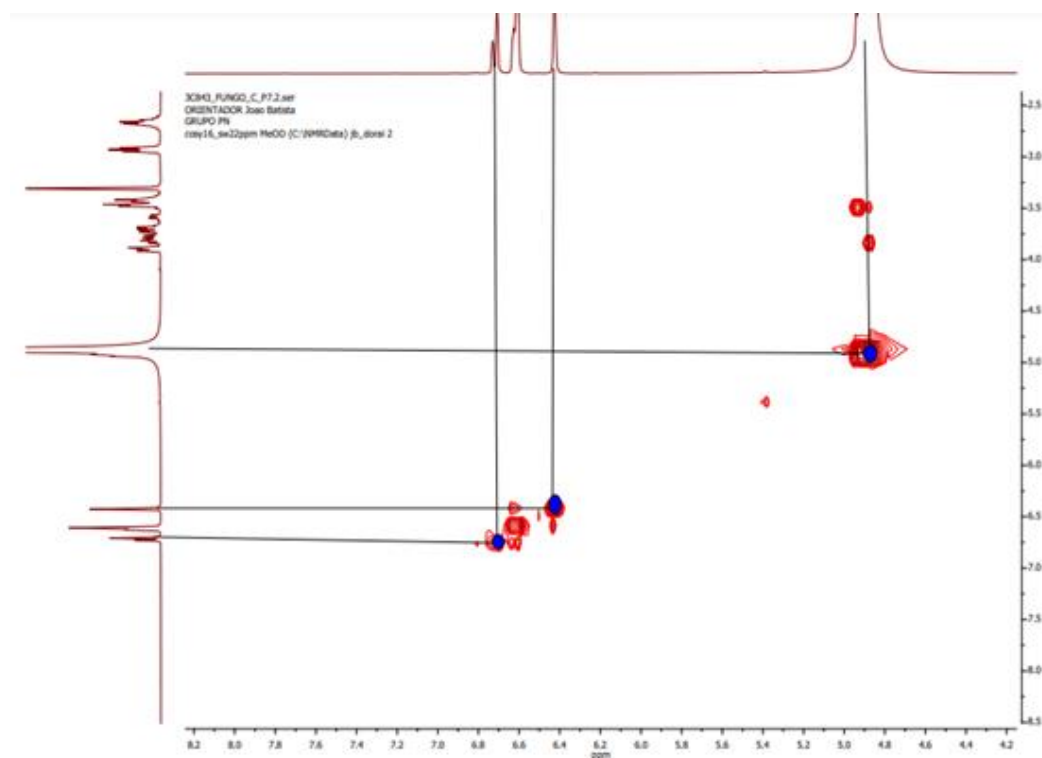


FIGURA 45 - Ampliação da região δ 4,2 a 8,2 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.

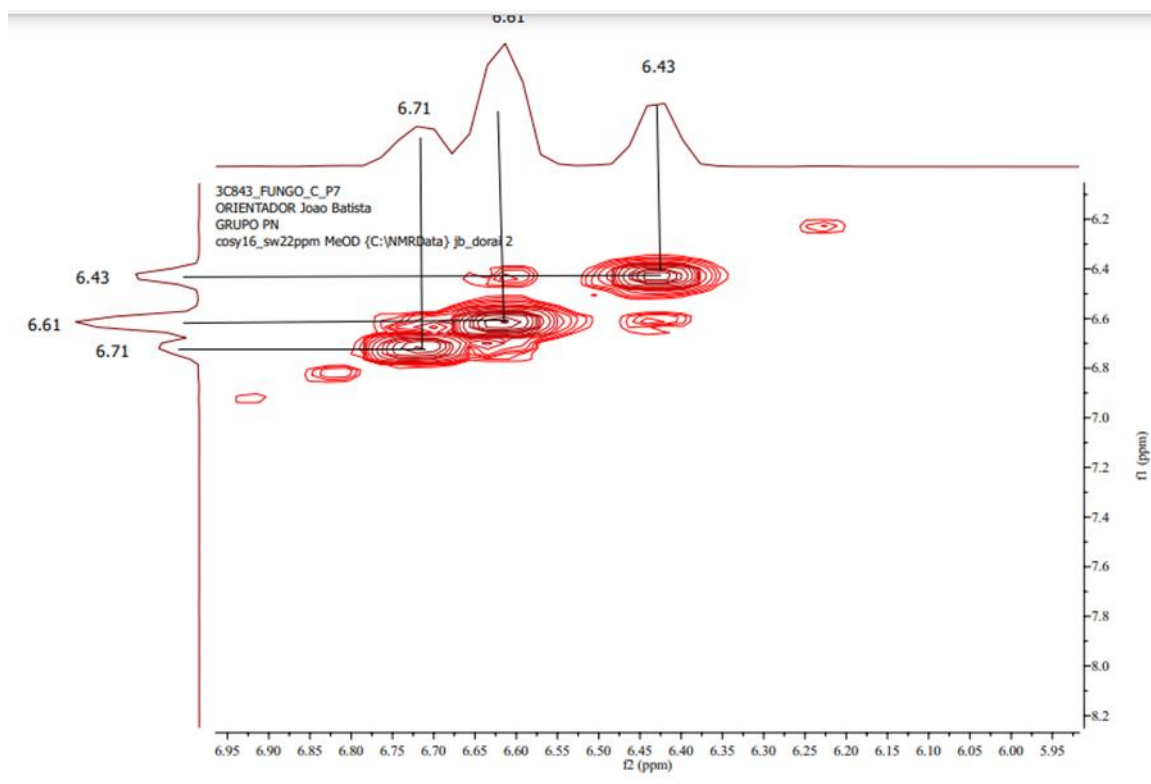


FIGURA 46 - Ampliação da região δ 5,95 a 6,95 no espectro de RMN COSY (400 MHz) do composto isolado P7.

Espectros ampliados de RMN 2D, HMBC do composto isolado P7

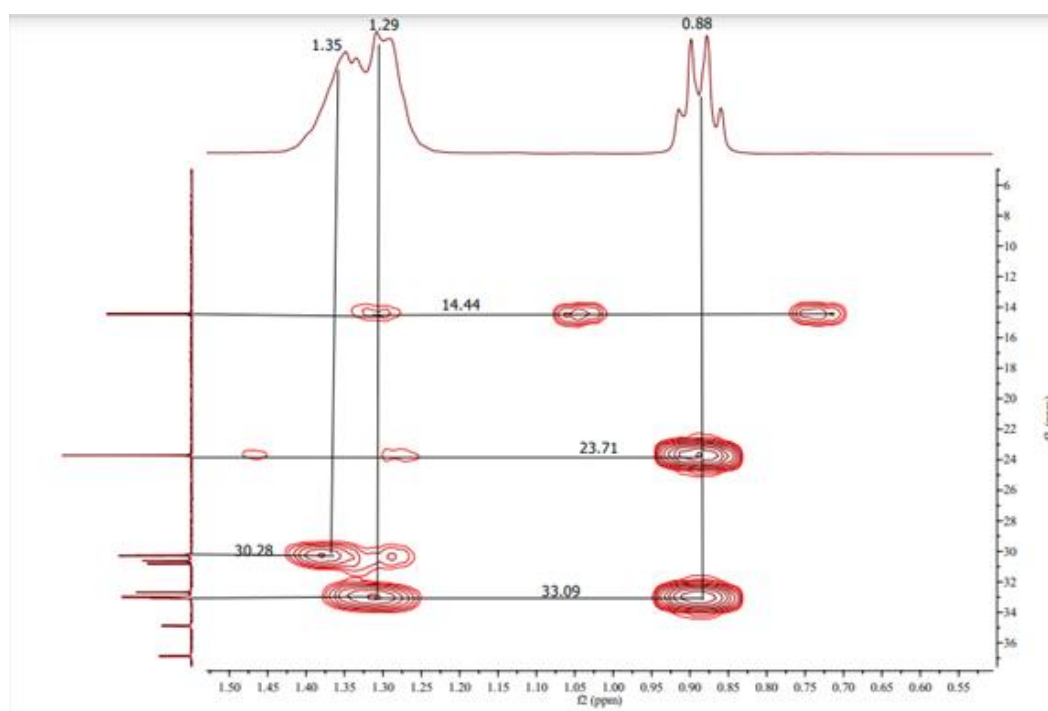


FIGURA 47 - Ampliação da região δ 0,55 a 1,50 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.

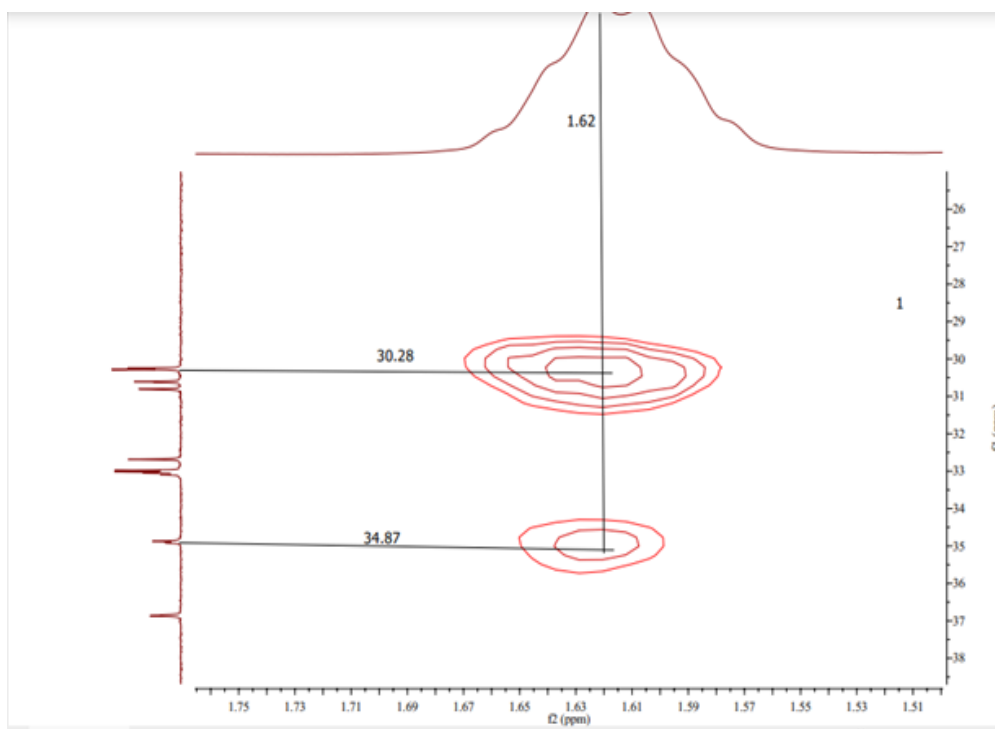


FIGURA 48 - Ampliação da região δ 1,51 a 1,75 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.

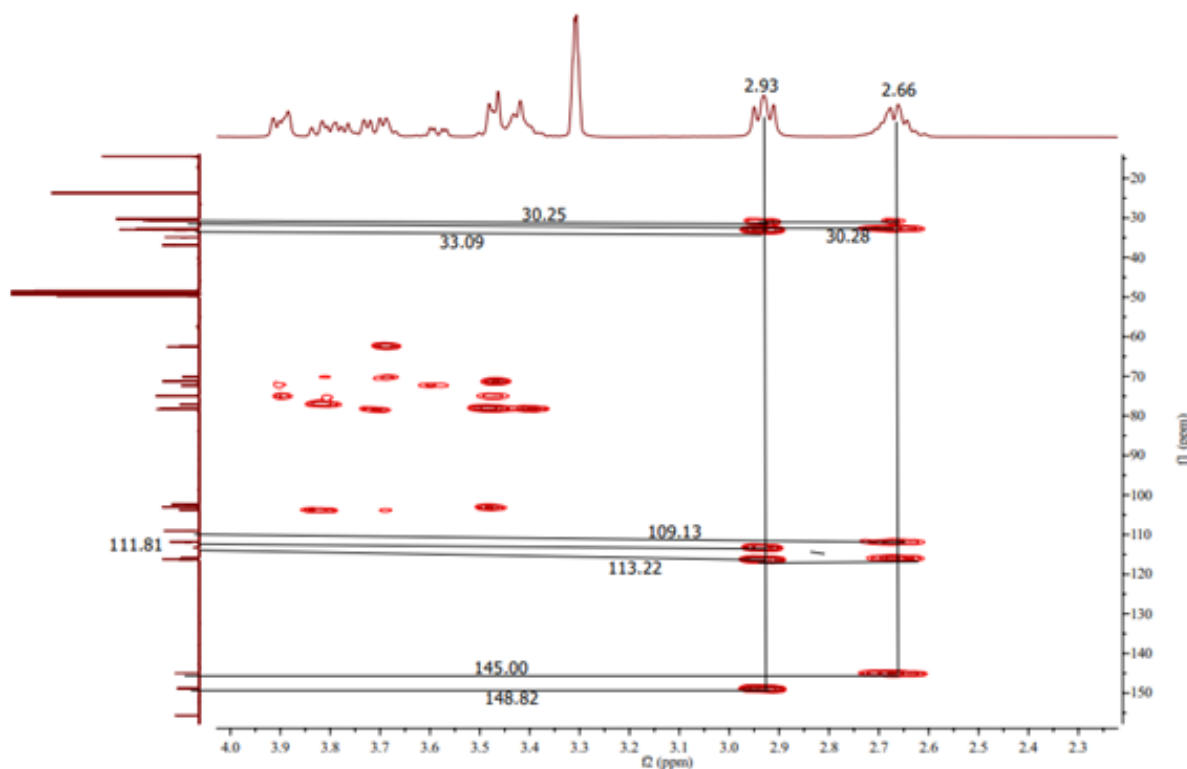


FIGURA 49 - Ampliação da região δ 2,3 a 4,0 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.

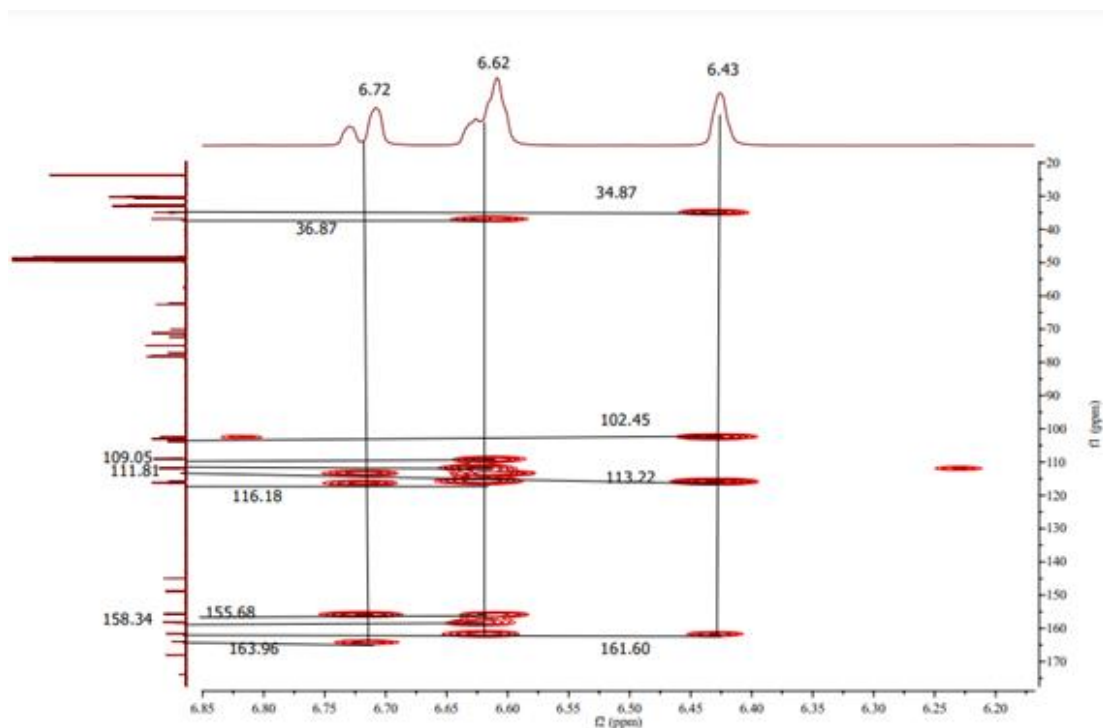


FIGURA 50 - Ampliação da região δ 6,20 a 6,85 no espectro de RMN HMBC (400 MHz) do composto isolado P7.

Espectros ampliados de RMN 2D, HSQC do composto isolado (P7)

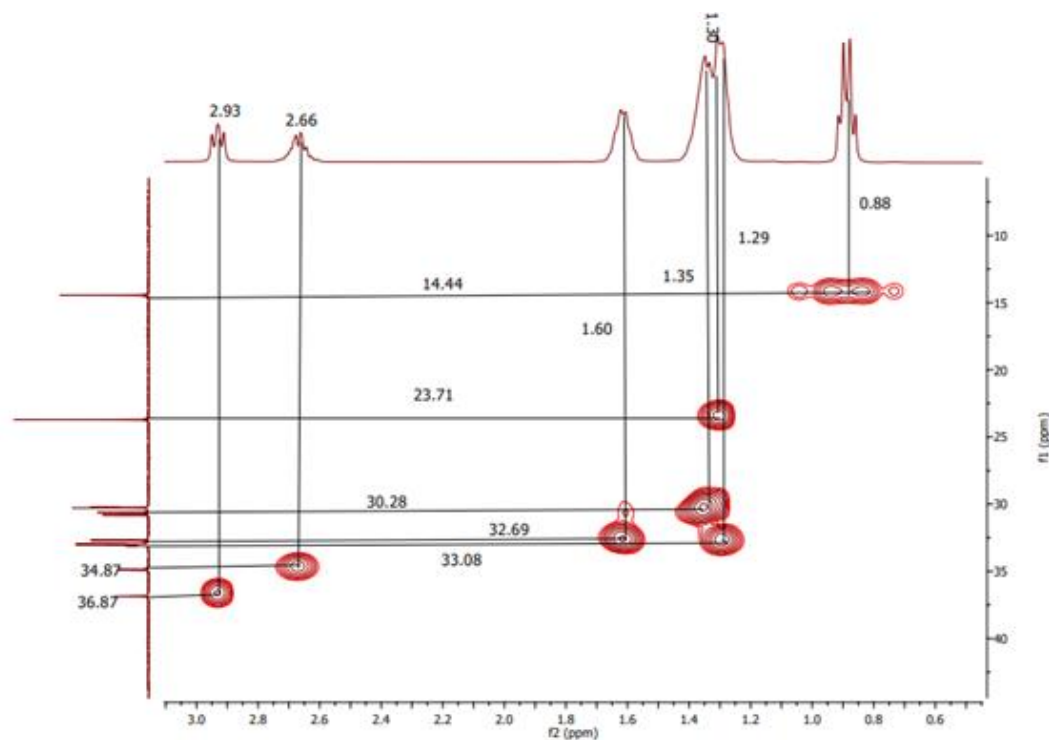


FIGURA 51 - Ampliação da região δ 0,6 a 3,0 no espectro de RMN HSQC (400 MHz) do composto isolado P7.

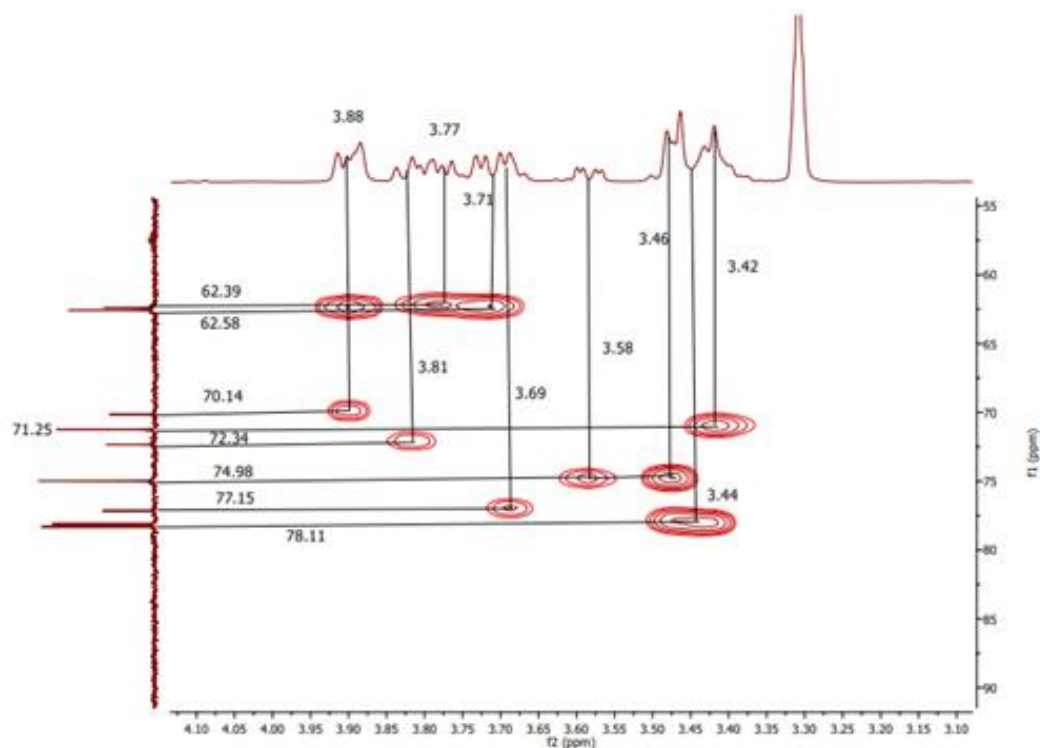


FIGURA 52 - Ampliação da região δ 3,10 a 4,10 no espectro de RMN HSQC (400 MHz) do composto isolado P7.

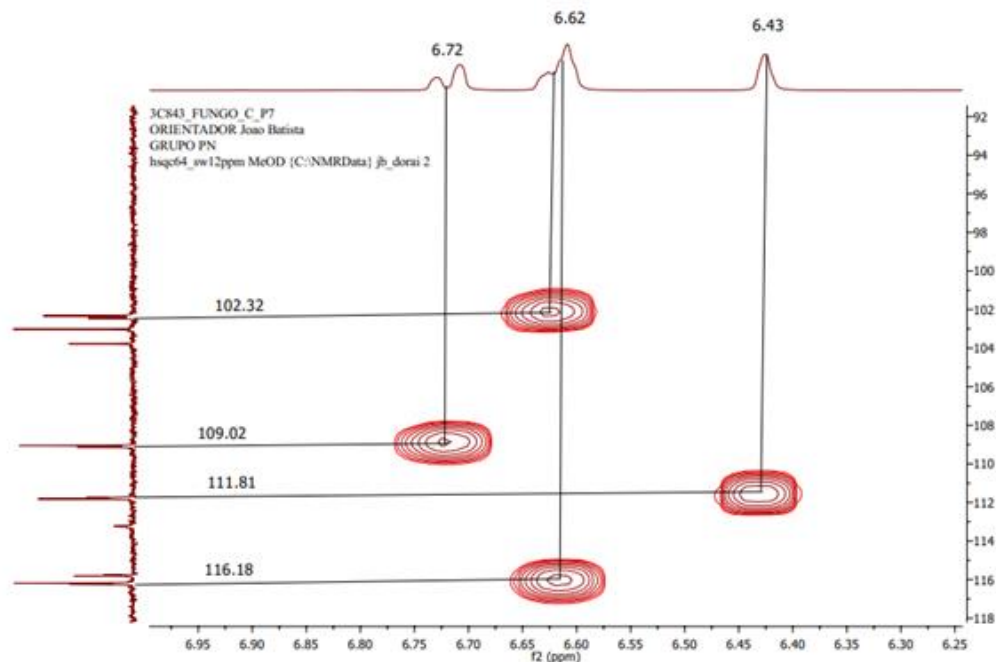


FIGURA 53 - Ampliação da região δ 6,25 a 6,95 no espectro de RMN HSQC (400 MHz) do composto isolado P7.

Iniciando as análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear pode-se verificar no espectro de RMN¹H que em posição meta aparecem dois dubletos correspondendo a hidrogênios de anel aromático (δ_H 6,72; δ_H 6,62, $J=8\text{Hz}$) e um tripleto (δ_H 0,88) correspondendo um grupo terminal metila.

O espectro de RMN de ¹³C exibiu ressonância de quarenta carbonos, incluindo um de carbonila de éster em (δ_C 163,69 referente ao C-1', C=O), um grupo metil em δ_C 14,44 referente ao C-14' e seis grupos metilenos entre δ_C 23,71 e δ_C 34,87 característicos de cadeia longas alquílicas.

Os anéis aromáticos foram caracterizados pelos sinais correspondentes de carbonos quaternários C-2', C-3', C-4', C-7' respectivamente $\delta_{C2'}$ 113,22; $\delta_{C3'}$ 155,68; $\delta_{C4'}$ 102,45; $\delta_{C7'}$ 148,82 e quatro carbonos CH no C-4, C-6, C-5' e C-6' referentes δ_{C4} 102,45; δ_{C6} 111,81; $\delta_{C5'}$ 163,93; $\delta_{C6'}$ 111,81 que mostram correlações com δ_H 6,60; δ_H 6,43; δ_H 6,72; δ_H 6,62 respectivamente no HSQC.

Os valores para os glicopiranosídeos foram caracterizados pelos sinais de C-1'' ao C-6'' os $\delta_{C1''}$ 102,32; $\delta_{C2''}$ 74,98; $\delta_{C3''}$ 77,15; $\delta_{C4''}$ 71,25; $\delta_{C5''}$ 78,11 e $\delta_{C6''}$ 62,58 e para o outro glicopiranosídeo de C-1''' a C-6''', o $\delta_{C1'''}$ 102,45; $\delta_{C2'''}$ 74,98; $\delta_{C3'''}$ 72,34; $\delta_{C4'''}$ 70,14; $\delta_{C5'''}$ 78,11 e $\delta_{C6'''}$ 62,39.

Com as atribuições dos espectros de Ressonância magnética Nuclear de ¹H, ¹³C, COSY, DEPT, HMBC e HSQC, foi proposta a estrutura apresentada na Figura 48 para o composto isolado da monocultura da levedura negra *E. spinifera*. A razão massa carga 833,3572 DA e a fórmula molecular C₄₀H₅₈NaO₁₇ (molécula sodiada), foram obtidas para esta molécula em seu espectro de massas de alta resolução.

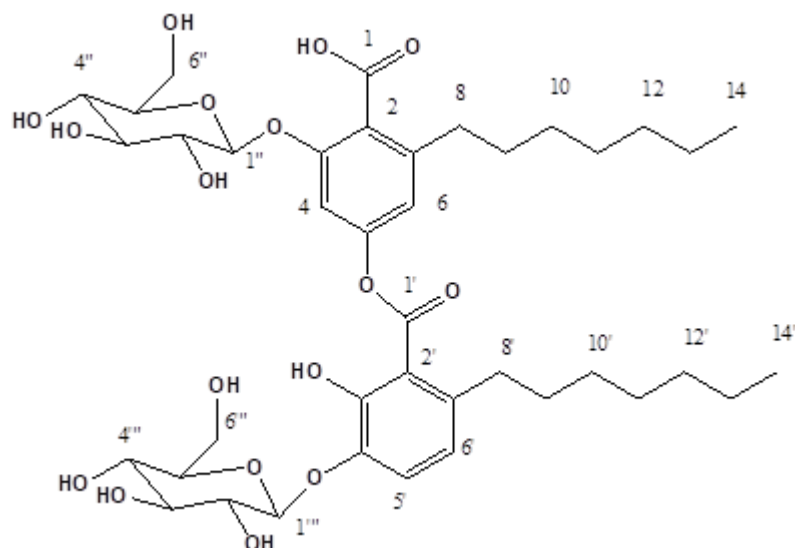


FIGURA 54 - Proposta da molécula do composto isolado P7.

Para confirmar a estrutura da substância P7 produzida pela levedura negra, foi realizada análises de espectrometria de massas que apresentou o seguinte espectro:

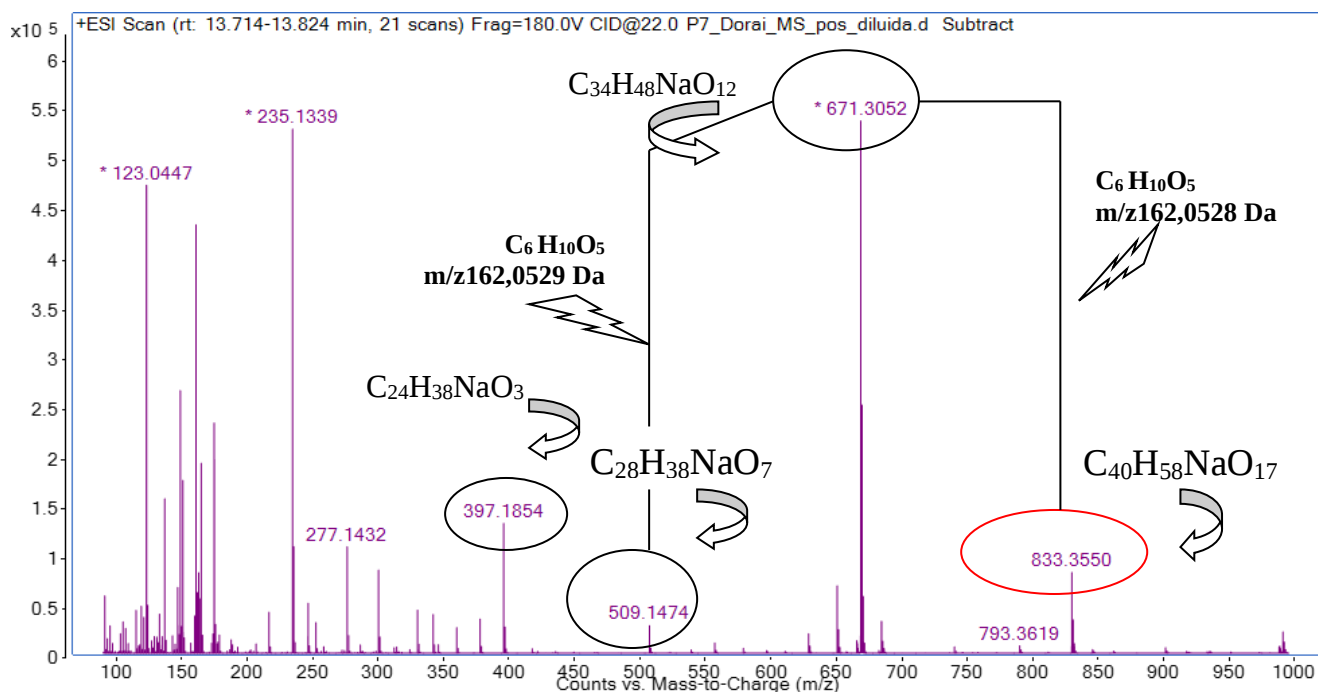


FIGURA 55 - Espectro de MS *Full Scan* do composto isolado P7.

O espectro de massa mostra a presença do íon molecular sodiado de massa molecular 833,3550 Da, assim como possível fragmentação da molécula sugerida em seguida:

Fragmentação foi sugerida:

C₄₀H₅₈NaO₁₇ de relação (*m/z* 833,3550 Da),

Perda do fragmento **C₆H₁₀O₅ *m/z* 162,0528 Da**, um grupo glicosil) gerando o fragmento **C₃₄H₄₈NaO₁₂ de relação (*m/z* 671,3044 Da),**

Perda do fragmento **C₆H₁₀O₅ (*m/z* 162,0529 Da**, um grupo glicosil) gerando o fragmento **C₂₈H₃₈NaO₇ de relação (*m/z* 509,2515 Da),**

Perda do fragmento **C₅H₄O₃ (*m/z* 111,9796 Da)**, gerando o fragmento **C₂₄H₃₈NaO₃ de relação (*m/z* 397,2719 Da).**

5.8.2.1 Análise de espectrometria no infravermelho

A análise do espectro no infravermelho fornece informações que auxiliaram na determinação da estrutura da molécula apresentando absorções características importantes de grupos funcionais encontradas apenas em certas regiões do infravermelho.

O espectro no infravermelho do composto isolado (P7) exibiu em 3427 cm⁻¹, um sinal de uma banda larga e intensa correspondente a hidroxila (OH) de ácido carboxílico. Em 2924 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹ observa-se sinais de estiramento C-H sp³. Destaca-se em 1718 cm⁻¹ uma banda intensa de estiramento de carbonila de ácido carboxílico (C=O). É possível também observar sinais de estiramento em 1610 cm⁻¹ e 1465 cm⁻¹ referentes a C=C de anéis aromático e sinais de estiramento C-O aparecem em 1058 cm⁻¹ e 1244 cm⁻¹ (PAVIA D. *et al.* 2015).

Portanto, a análise do espectro no infravermelho (Figura 56) revela que tem-se um composto com anel aromático, tem uma parte alifática e tem um grupo carbonila pelo aparecimento da absorção em 1718 cm⁻¹.

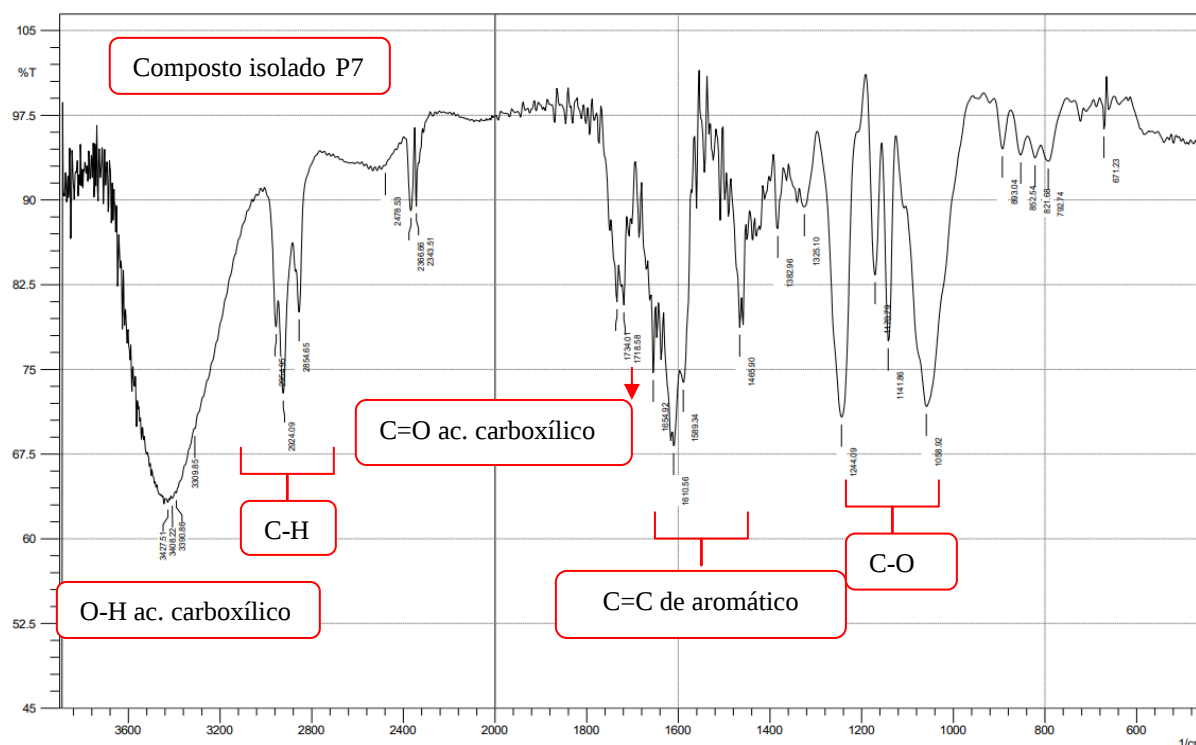


FIGURA 56 - Espectro no infravermelho do composto isolado P7.

Pelas análises de RMN 1D e 2D, pelos espectros de massa, infravermelho e do perfil de fragmentação, observou-se que a levedura negra *E. spinifera* produz um derivado do ácido exophílico (P7), e em alguns espectros de massa mostra a presença dessa substância que está presente também no cocultivo H-C_ML_30 dias.

O ácido exophílico (Figura 57) foi reportado pela primeira vez por (ONDEYKA, J.G. *et al.*, 2004). Em 2015, CHEIKH-ALI, Z. *et al.* isolaram e identificaram 21 metabólitos secundários derivados do ácido exophílico nas cepas de *Exophiala sp.* entretanto essas moléculas são diferentes da isolada e identificada neste estudo. Até o momento pesquisado na literatura, este é o primeiro estudo que isolou este derivado em cepas de *Exophiala* ou outra fonte ou tenha sido sintetizado.

Composto isolado P7

Ácido exophilico

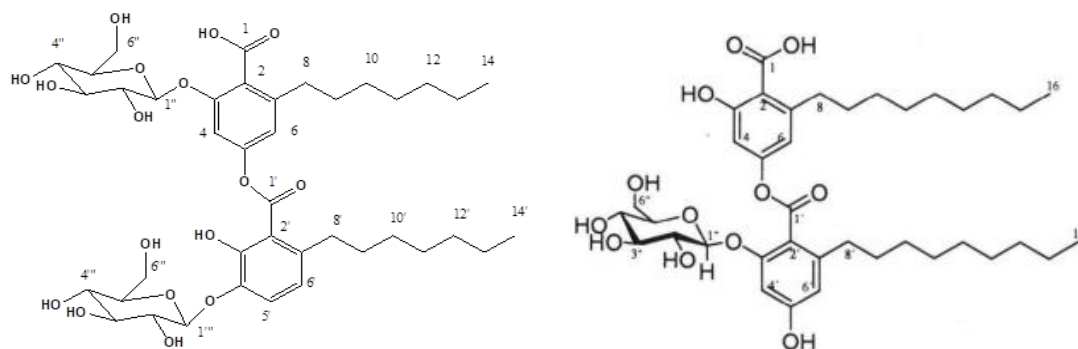


FIGURA 57- Representação da estrutura molecular do composto isolado P7 e do ácido exophilico.

5.8.2.2 Espectrometria de massa do composto isolado em outras culturas

Para os espectros de massa, o banco de dados da Agilent MassHunter METLIN inserida no LC/MS Q-Tof, mostrou a presença do composto isolado P7 de razão m/z 833,3566 Da na condição do cocultivo entre *L. gongylophorus* e *E. spinifera* (H-C_30 dias) e na monocultura da levedura negra *E. spinifera* (C).

Os cromatogramas do íon extraído Figura 58, mostra que não há picos no meio de cultura CZAPEK, na monocultura do fungo *L. gongylophorus* e não há picos no cromatograma do solvente.

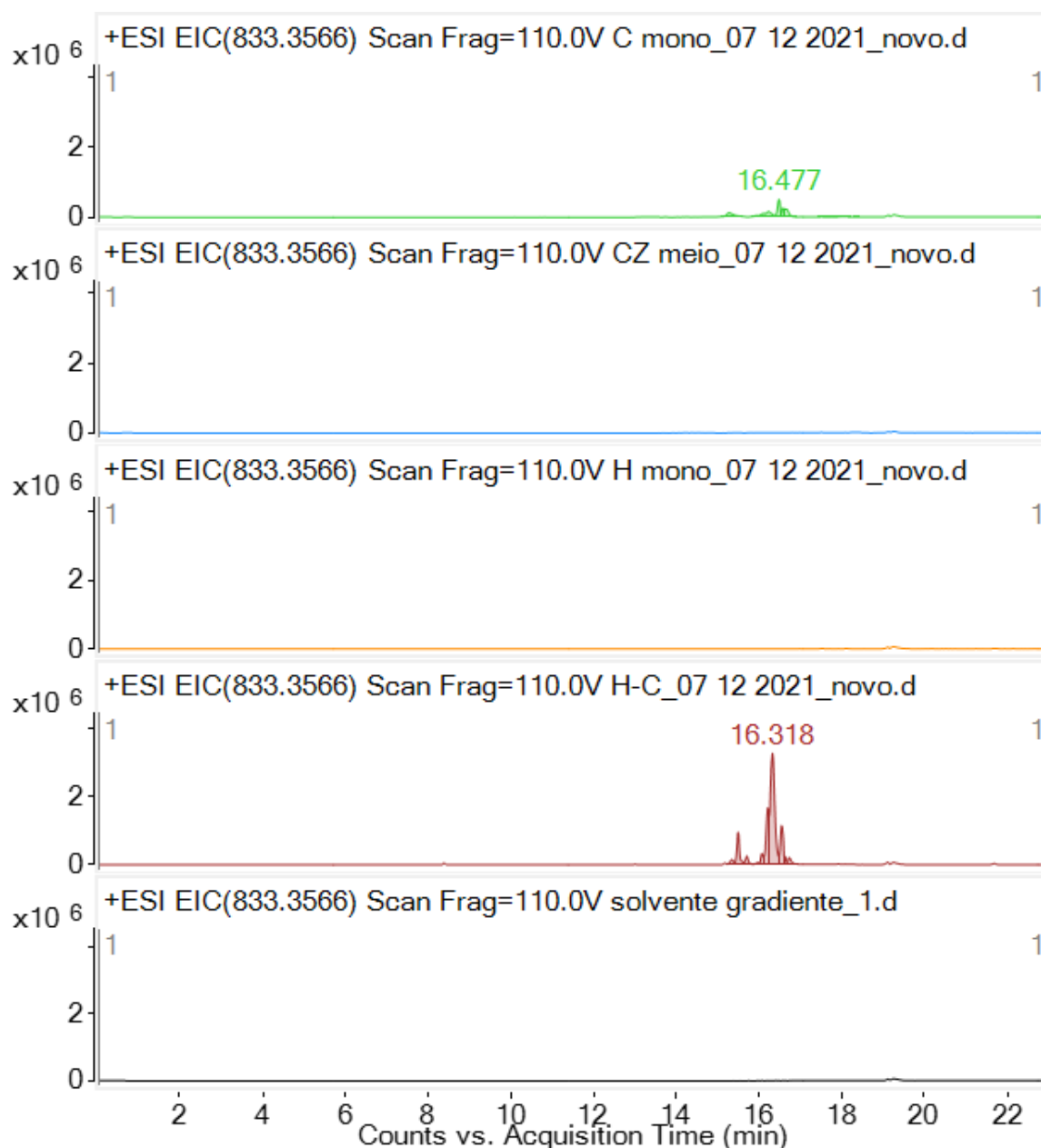


FIGURA 58 - Cromatogramas do íon extraído, mostrando a ausência de picos do meio de cultura, do solvente e da monocultura do *L. gongylophorus*.

Os cromatogramas do íon extraído (EIC), foram focados no composto isolado P7 de razão $m/z = 833,3597$ Da, íon sodiado, cocultivo entre *L. gongylophorus* e *E. spinifera* (H-C_ 30 dias).

No espectro *Full Scan* (Figura 59) modo de ionização positivo do cocultivo H-C_30 dias. Observa-se a presença do composto isolado P7 sodiado.

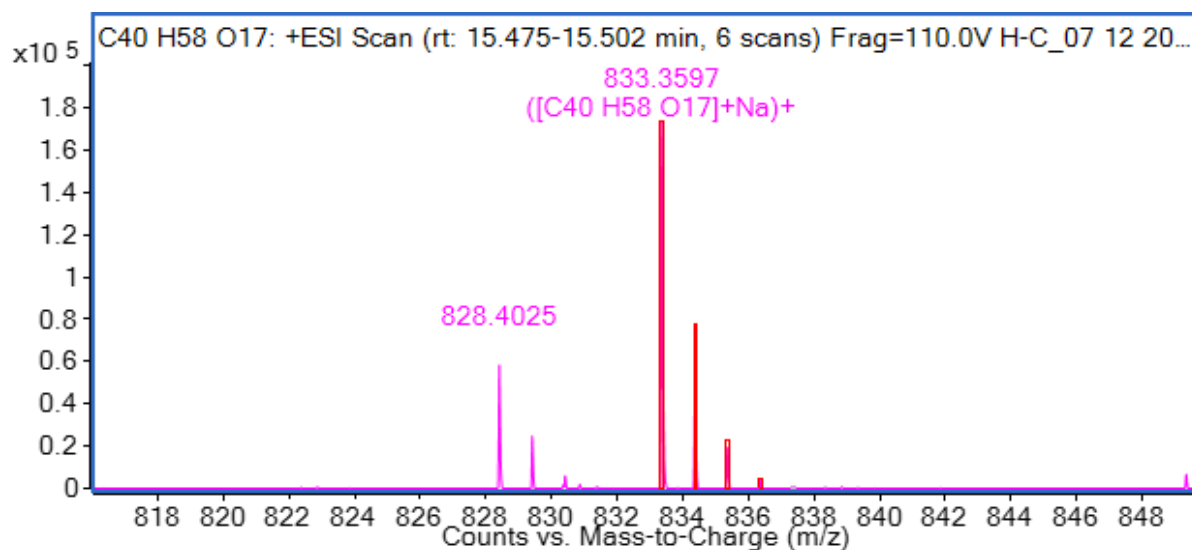


FIGURA 59 - Espectro *Full Scan*, cocultivo H-C_30 dias, presença do composto isolado P7 sodiado.

O espectro do cocultivo H-C_30 dias (Figura 60), foi detectado além do composto isolado P7, um outro íon de razão $m/z = 669,2911$ Da que é um íon sodiado, que provavelmente forma um dímero $m/z = 1315,5918$ Da.

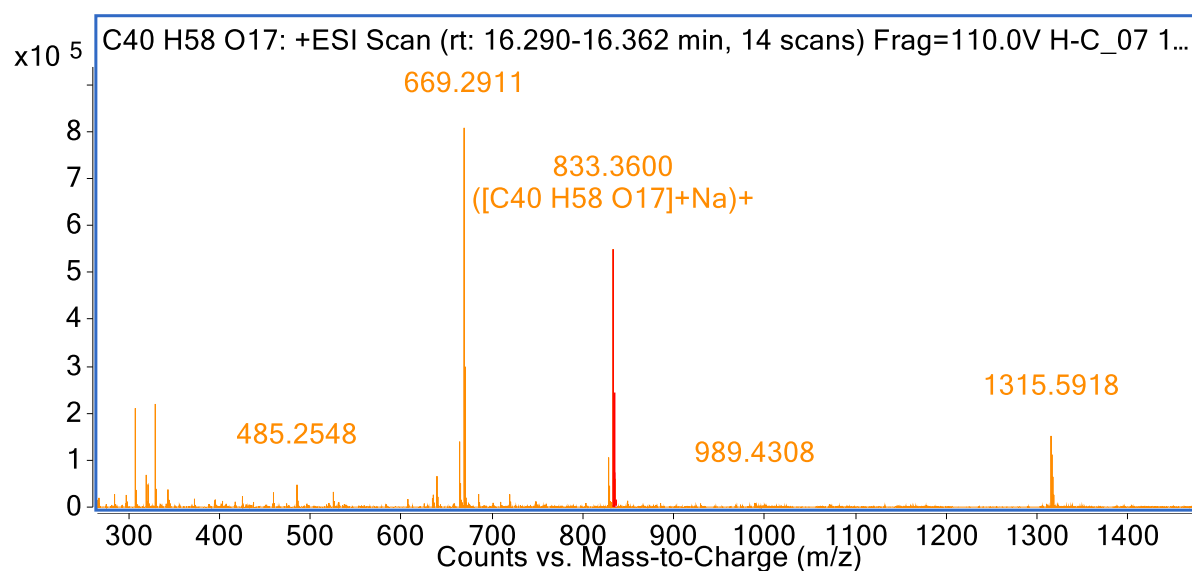


FIGURA 60 - Espectro *Full Scan*, cocultivo H-C_30 dias, mostrando a presença de um dímero.

Buscando a massa de 487.2300 Da (Figura 61), encontrou-se na monocultura *E. spinifera* este perfil:

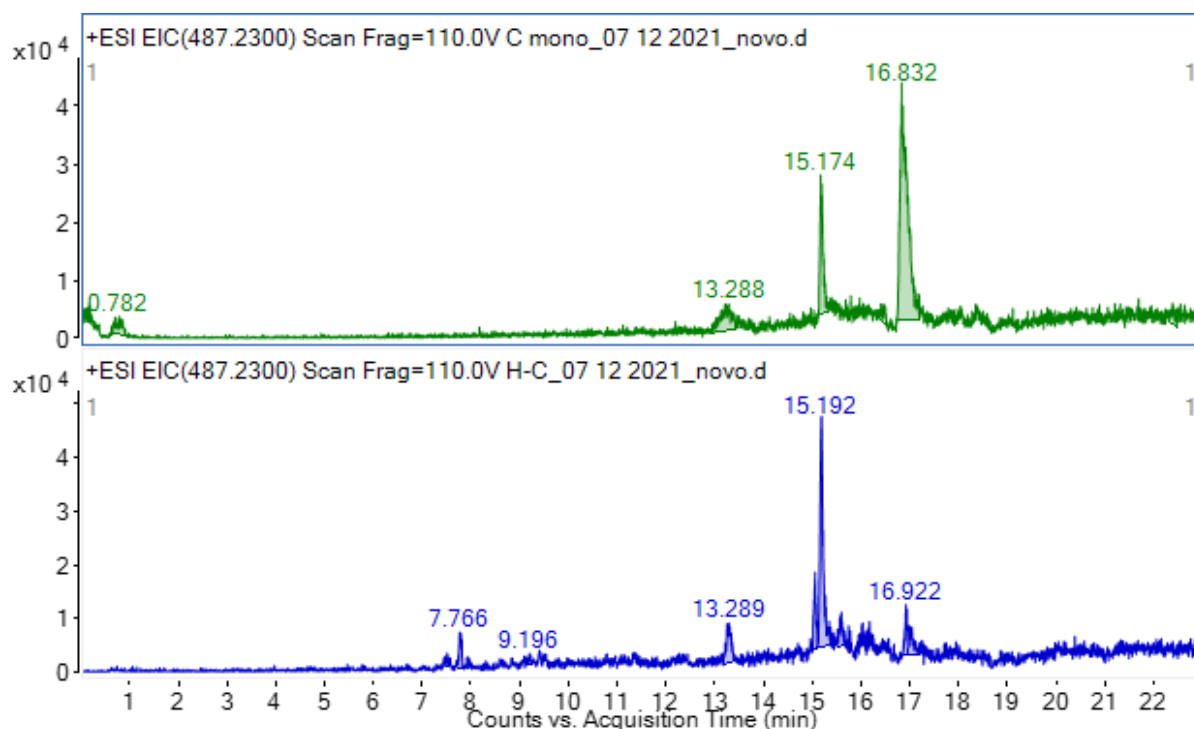


FIGURA 61 - Cromatograma (EIC) da monocultura *E. spinifera* (C). e do cocultivo H-C.

Ao extrair o espectro de massas no tempo de retenção, T_R 16.832 min, para a monocultura *E. spinifera* (C), o espectro mostra (Figura 62) provavelmente, a presença de uma substância com $[M+Na]^+$ m/z 671,3081 e também a formação de um dímero massa 1319,6262 Da ($671,3081 - 22,99 = 648,3181 \times 2 = 1296,6362 + 22,99 = 1319,6262$).

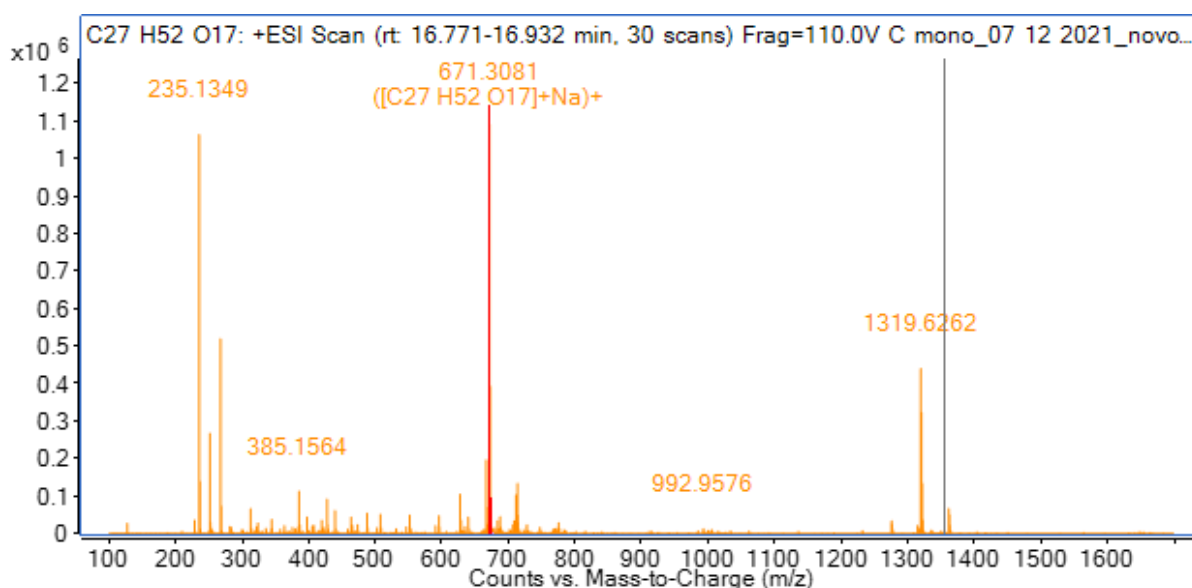


FIGURA 62 - Espectro de massas *Full Scan* para a monocultura *E. spinifera* (C), no T_R 16.832 min, da monocultura *E. spinifera* (C).

Este espectro de massas da monocultura *E. spinifera* (C), indica a presença de uma substância com $[M+Na]^+$ m/z 669.2924 Da e que pode formar uma dímero (massa/carga 1315,5947 Da) ($669,2924 \times 2 = 1338,5848$ Da). (1338,5848 - 22,99 = 1315,5948 Da).

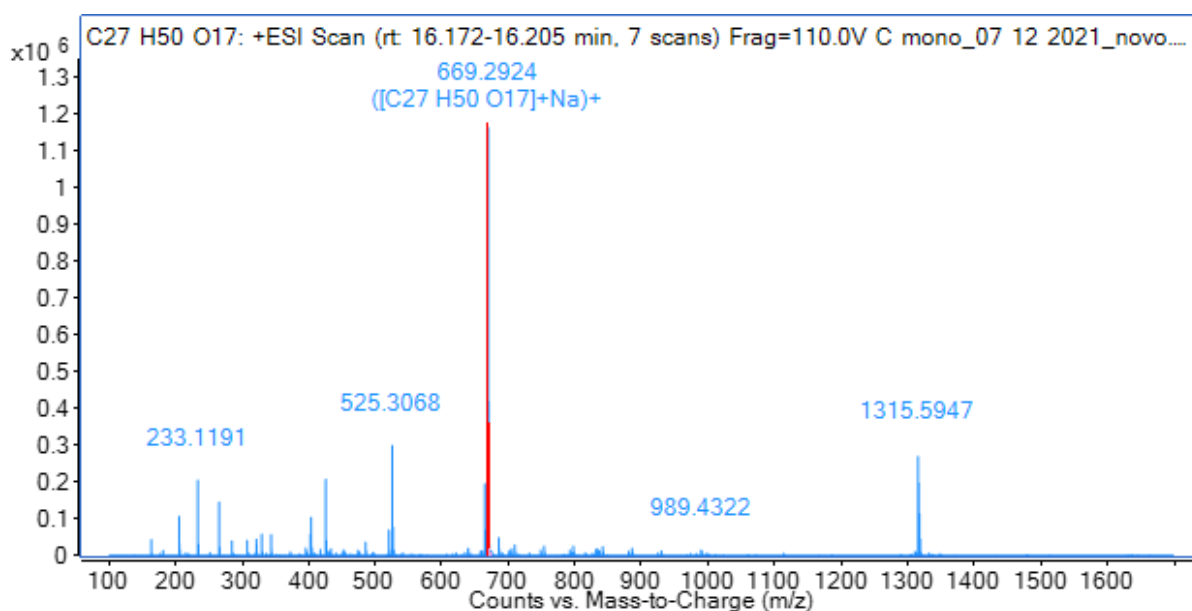


FIGURA 63 - Espectro de massas *Full Scan* para a monocultura *E. spinifera* (C), no T_R 16.172-16.205 min.

Este espectro de massas, mostra (Figura 64), um íon de razão $m/z = 329,1742$ Da de formula molecular $[(C_{20}H_{24}O_4)+H]^+$, presente no cocultivo H-C_30 dias.

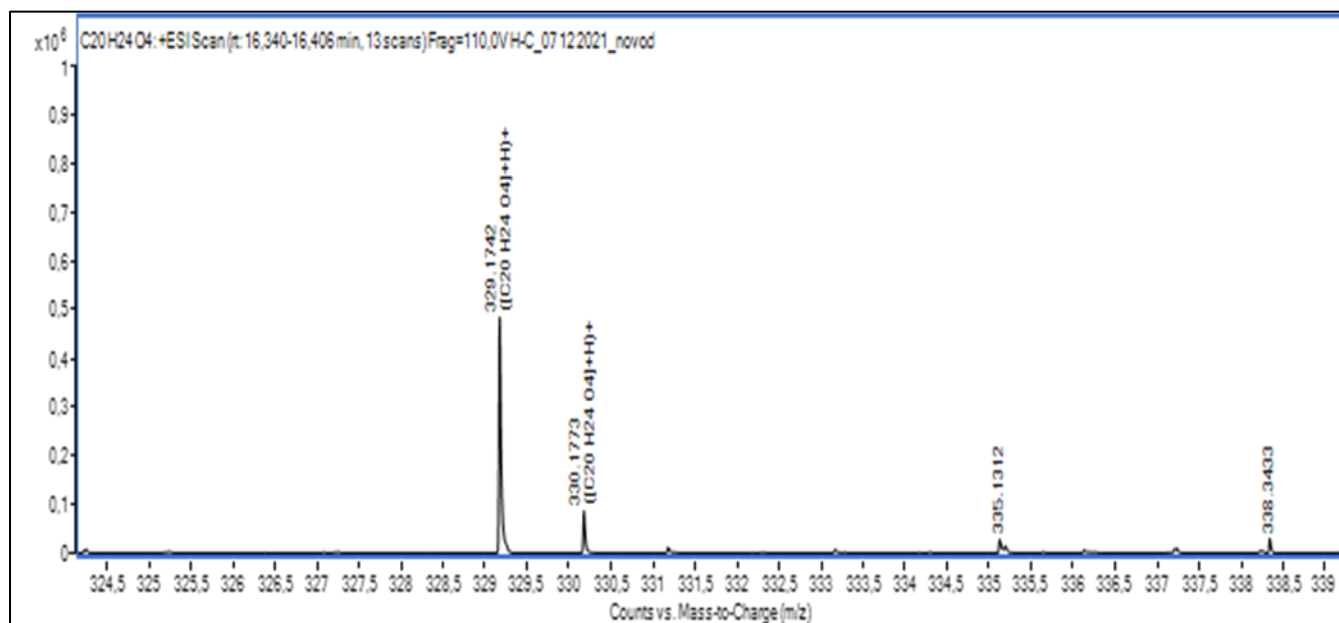


FIGURA 64 - Espectro de massas, cocultivo H-C_30 dias, mostrando a presença de um íon de razão $m/z = 329,1742$

Essas análises de espectrometria de massa mostram alguns compostos induzidos no cocultivo H-C_ML_30 dias e na monocultura da levedura negra.

6. Atividades biológicas

6.1 Avaliação antifúngica de difusão em ágar

Uma avaliação antifúngica de difusão em ágar foi executada para o cocultivo entre o *L. gongylophorus* e *E. spinifera* (H-C), para extrato bruto da monocultura da *E. spinifera* (C), para o composto isolado (P7) e para o solvente que foi solubilizada as amostras dimetilsulfóxido (DMSO) (Figura 65).

O método de difusão em ágar é um teste qualitativo que não requer equipamento específico, é simples, de baixo custo e de fácil interpretação, e

forneem resultados que orientam na triagem de substâncias com ação antimicrobiana (AMPARO *et al.*, 2020).

Foram considerados microrganismos suscetíveis aqueles que tinham uma média de halo de inibição maior que 10 mm. (Tabela 7) (AMPARO, T.R. *et al.*, 2020).

TABELA 7 - Valores em mm dos halos de inibição dos extratos bruto dos metabólitos do cocultivo H-C, *E. spinifera* (C) e da substância isolada (P7).

	Extrato bruto Cocultivo (H-C)	Solvente DMSO	Extrato bruto <i>E. spinifera</i> (C)	Substância isolada (P7)
Halo de inibição (mm)	24,5	0	24,8	25,8

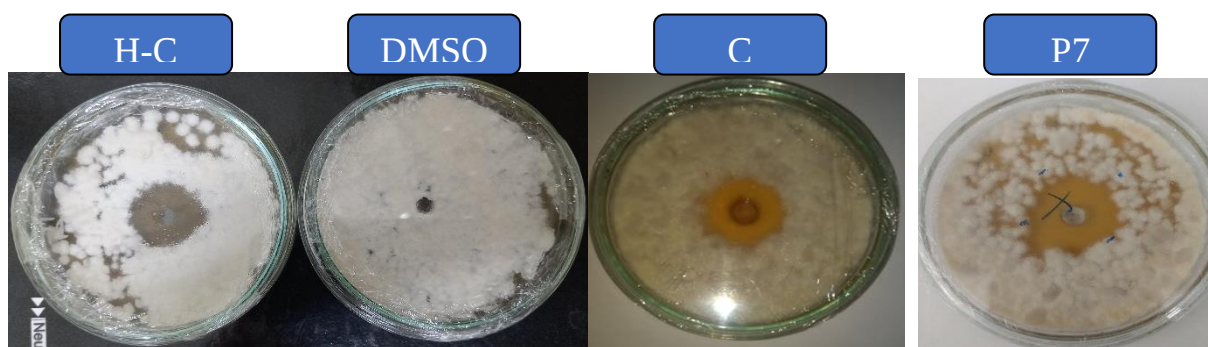


FIGURA 65 - Ensaio de avaliação antifúngica, difusão em ágar dos extratos bruto dos metabólitos do cocultivo H-C, da *E. spinifera* (C) e da substância isolada (P7).

Os resultados indicam um halo translúcido de inibição das amostras ensaiadas, com valores acima de 10 mm que é considerado ativo para o microrganismo, resultado positivo para inibição do *L. gongylophorus*.

6.2 Avaliação da enzima acetilcolinesterase (AChE) pelo método espectrofotométrico de Ellman

Na busca de novos inseticidas, o composto isolado (P7) da levedura negra *E. spinifera* e o extrato bruto da monocultura, foi ensaiado com a enzima

acetilcolinesterase (AChE) isolada da formiga cortadeira *Atta sexdens* e a acetilcolinesterase (AChE) do peixe *Electrophorus electricus*.

A acetilcolinesterase é a enzima responsável pela catálise da hidrólise do neurotransmissor (moléculas produzidas e liberadas por neurônios) acetilcolina produzindo acetato e colina.

Nos insetos, a acetilcolina é um dos mais importantes neurotransmissores, e a inibição da AChE produz um colapso generalizado que leva o inseto a morte, o que faz com que a enzima AChE seja um alvo importante para o desenvolvimento de novos inseticidas (RHEE, I.K. *et al.*, 2001).

Conforme pode se observar na Tabela 8, houve diferença de interação entre o extrato da cultura pura da *E. spinifera* (extrato C) e o Composto isolado (P7) da monocultura da *E. spinifera* com as enzimas acetilcolinesterase (AChE) do peixe *Electrophorus electricus* e da formiga *Atta sexdens*. Estas enzimas apresentam diferenças no sequenciamento de aminoácidos presentes em cada enzima. A AChE de *E. electricus* se assemelha à AChE humana em identidade sequencial de aminoácidos aproximadamente em 84%, já a identidade sequencial da AChE de *A. sexdens* com a de *Homo sapiens* é de 43 % (SANTOS, 2017).

Os extratos de metabólitos *E. spinifera* e P7 foram submetidos aos testes com as enzimas AChE e os resultados desses ensaios são apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 - Porcentagem de inibição (% I) do Extrato C (cultura pura da *E. spinifera*) e do Composto isolado da cultura pura da *E. spinifera* (P7), nas AChEs de peixe-elétrico e AChE-*Atta sexdens* da formiga cortadeira (C=0,1mg/mL).

Fungo	% I AChE- <i>Electrophorus electricus</i>	% I AChE- <i>Atta sexdens</i>
Extrato bruto metabólitos <i>E. spinifera</i>	75,04 ($\pm 0,099$)	46,42 ($\pm 0,005$)
Composto isolado de metabólitos <i>E. spinifera</i> (P7)	68,45 ($\pm 0,020$)	28,57 ($\pm 0,001$)

Conforme os resultados observados, os ensaios com a enzima AChE-*Electrophorus electricus* indicaram o extrato bruto oriundo da cultura pura da *E. spinifera* e do composto isolado do metabólito *E. spinifera* P7, foram efetivo com uma porcentagem de inibição 75,04 % ($\pm 0,099$) e 68,45 % ($\pm 0,020$) respectivamente. Já para os mesmos extratos ensaiados com a enzima AChE-*Atta sexdens* houve inibição, mas em um índice inferior de 46,42 % ($\pm 0,005$) e de 28,57 ($\pm 0,001$) respectivamente.

Embora as atividades de inibições com a enzima AChE-*Atta sexdens*, seja inferior, ainda pode-se considerar que é um bom resultado levando-se em consideração da baixa concentração (0,1 mg/mL) dos extratos testados.

Com esses resultados pode-se considerar promissora as inibições apresentadas e como eficiente a metodologia de cultivo para essa finalidade.

6.3 Ensaio para a inibição da enzima acetilcolinesterase em Microelétrodos descartáveis

Nas áreas médicas, industrial e ambiental, há uma grande demanda por eletrodos sólidos e muitas tentativas de se construir eletrodos descartáveis

tem-se desenvolvido. A regeneração da superfície após o uso é o maior obstáculo para o desenvolvimento de eletrodos sólidos comerciais.

Uma das alternativas apresentada foi o desenvolvimento de eletrodos descartáveis, logo os descartáveis eliminariam a necessidade de regeneração da superfície. As vantagens destes também são fácil construção, baixo custo, boa reprodutibilidade, e ainda podem ser produzidos em massa (NASCIMENTO, V.B.; ANGNES, L., 1998).

Essa técnica foi usada para medir a porcentagem de inibição da AChE com o extrato bruto da levedura negra, o composto isolado P7 e do meio de cultura como controle.

Nota-se na Figura 66 que a inibição é proporcional ao tempo de ação do composto sobre a AChE, de forma que a partir de 10 minutos de incubação nos biossensores para as soluções de extrato e CZAPEK, a corrente de inibição tende a manter a mesma faixa de porcentagem de inibição devido a cinética da reação. Para a solução do P7, com o tempo de 10 minutos de reação, a corrente de inibição está em 47,9% e acima deste tempo a mesma também se estabiliza em faixas próximas de porcentagem de inibição. Para obter um método rápido de teste de inibição, optou-se por trabalhar com esta faixa de tempo (10 minutos de incubação) para o estudo de variação de concentrações das três soluções testadas. Sendo que em 10 minutos de reação a solução de extrato inibiu a atividade enzimática em 40,74% e a solução do meio CZAPEK obteve 25,66% de inibição.

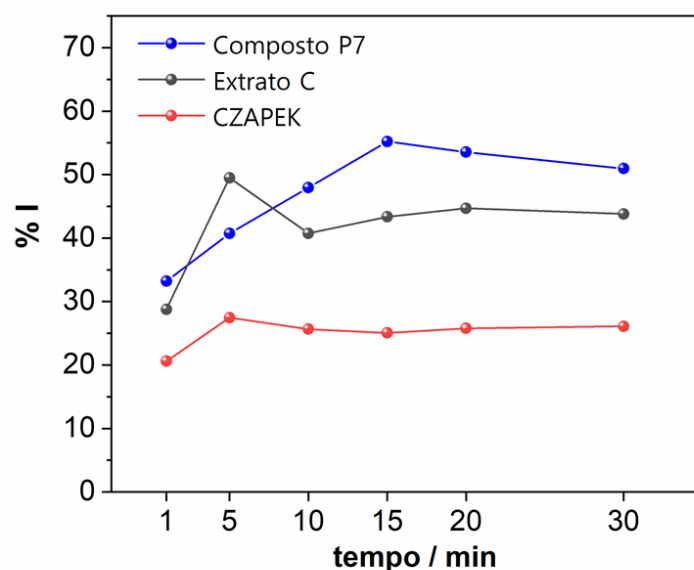


FIGURA 66 - Efeito dos tempos de incubação do extrato, CZAPEK e composto P7 nas correntes de pico de oxidação da tiocolina, calculado pela porcentagem de inibição. Solução de ASChI 60 mmol.L^{-1} em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} . $[\text{AChE}] = 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$. Amplitude = 50 mV ; $f = 50 \text{ Hz}$.

Analisando a Figura 67, percebe-se que as três soluções utilizadas para os bioensaios não apresentaram um aumento significativo de inibição em proporção com o aumento de concentração das mesmas. Entende-se aqui que os três inibidores em concentrações maiores que 5 mg.mL^{-1} tendem a atingir a cinética da reação com a enzima presente na superfície dos biossensores causando assim uma estabilização da corrente de inibição. É notável que a solução de CZAPEK apresenta a menor porcentagem de inibição entre as três soluções, obtendo uma resposta entre 27% a 31%. Na Tabela 9 segue de forma detalhada a porcentagem de inibição em cada concentração testada e também o valor de IC_{50} para cada solução estudada.

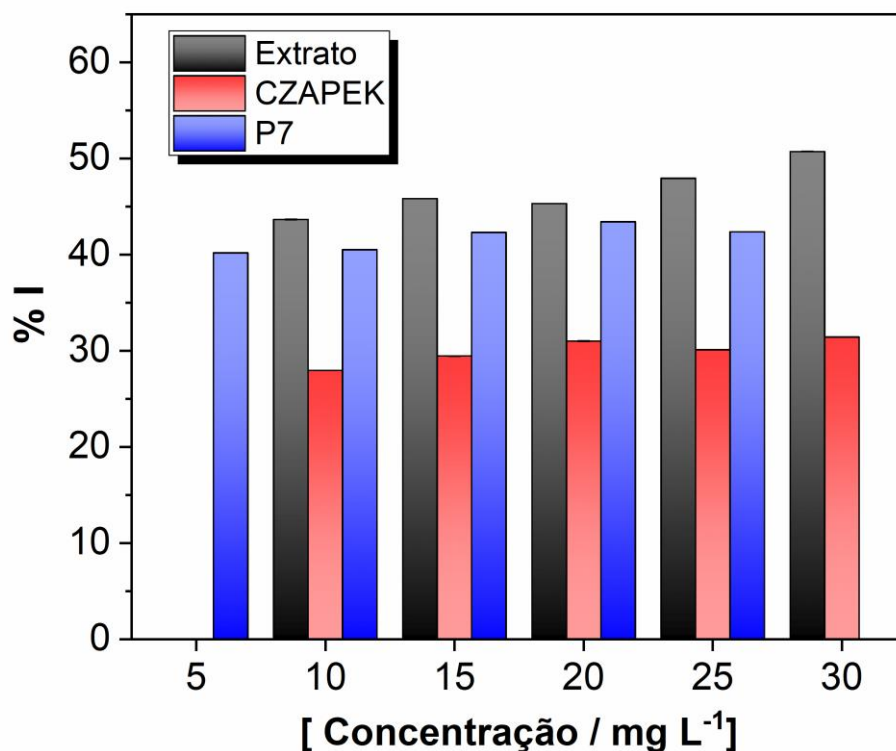


FIGURA 67 - Gráfico de correlação entre a porcentagem de inibição e a variação de concentração das soluções de extrato, CZAPEK e Composto P7. Solução de ASChI 60 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹. [AChE]= 0,05 mg.mL⁻¹. Amplitude= 50 mV; f= 50 Hz.

TABELA 9 - Porcentagem de inibição em cada concentração testada e também o valor de C50 para cada solução estudada.

Concentração mg.mL ⁻¹	5	10	15	20	25	30	IC 50 mg.L ⁻¹
CZAPEK (I %)	-	27,94	29,43	30,98	30,09	31,40	3,51 (±1,27)
Extrato (I%)	-	43,65	45,82	45,31	47,94	50,72	2,44 (±1,8)
P7 (I%)	40,18	40,51	42,31	43,41	42,37	-	0,39 (±0,49)

7. Conclusões

A levedura negra *E. spinifera* estudada neste trabalho demonstrou que o cocultivo é uma metodologia que pode ser aplicada para a indução de metabólitos secundários da levedura negra *Exophiala spinifera* juntamente com o fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* que apontou ser uma linhagem produtora de antifúngico, visto que a relação m/z do composto isolado P7 aparece em dois dos cocultivos, o C-H_ML_15 dias e no cocultivo que mais se destacou na produção de metabólitos H-C_30 dias que foram alvo de nossos estudos.

Ao analisar muitos dados por Análise multivariada não foi possível diferenciar os grupos, tornando-se difícil as interpretações, portando realizou-se o estudo individual de cada condição de cocultivo utilizada neste trabalho.

Pela análise estatística com base no teste *T*, o íon m/z 721,2606 Da foi evidenciado do cocultivo C-H_15 dias e também o íon de m/z 833,3600 Da.

Pelas análises de PCA observou-se que houve apenas um cocultivo (**H-C_ML_30 dias**) que mais se diferenciou das monoculturas e do meio de cultivo, por isso foi necessário realizar a análise de PLS-Da, uma análise supervisionada, para verificar diferença entre os grupos de metabólitos induzido pelo cocultivo. Com esse resultado evidenciado, essa condição de cocultivo mostrou ser uma metodologia interessante para indução de metabólitos.

A utilização de ferramentas analíticas nos cocultivos foi importante, pois apresentou a provável produção de compostos ainda não descritos na literatura.

Análises de RMN, espectrometria de massas e infravermelho confirmaram a produção de um metabolito presente na monocultura da levedura negra *E. spinifera* (P7), que, até onde se sabe, este é o primeiro estudo que isolou este derivado em cepas de *Exophiala spinifera*.

Os espectros de massas comprovaram a presença do composto isolado P7 da monocultura, no cocultivo entre a levedura negra *E. spinifera* com o fungo mutualista *L. gongylophorus* (H-C_30 dias).

Os resultados nos ensaios com acetilcolinesterase de peixe elétrico *Electrophorus electricus* e da formiga *Atta sexdens*, na concentração de 0,1 mg/mL foram muito promissores nos estudos da aplicação dessas enzimas como potenciais inseticidas e nos estudos do controle da formiga cortadeira.

Ensaio para a inibição da enzima acetilcolinesterase em microelétrodos descartáveis foram executados e apresentaram inibição da AChE para a composto isolado P7, com o tempo de 10 minutos de reação, a corrente de inibição está em 47,9% e acima deste tempo a mesma também se estabiliza em faixas próximas de porcentagem de inibição. Embora as atividades de inibições com a enzima AChE seja inferior, ainda pode-se considerar que é um bom resultado levando-se em consideração as baixas concentrações de inibição (IC50) dos extratos, P7 e CZPEK testados.

Os conjuntos de resultados obtidos nesse trabalho sobre o estudo do cocultivo entre *L. gongylophorus* e *E. spinifera* e cultivo da monocultura da levedura negra *E. spinifera* fornecem dados que impulsionam a pesquisa no controle das formigas cortadeiras.

8. Referências bibliográficas

ALVIANO, D. S. *et al.* Melanin from *Fonsecaea pedrosoi* induces production of human antifungal antibodies and enhances the antimicrobial efficacy of phagocytes. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 1, p. 229–237, 2004.

AMPARO, T.R. *et al.* Antibacterial substances from leaves of *Protium spruceanum* (Burseraceae): In vitro and in silico evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 56, 2020.

ASSIS, A. A. R., VALADÃO, G. E. W., CISALPINO, P. S. Levantamento da curva de crescimento da bactéria *M. Phlei* para obtenção de biomassa em ensaios de separação sólido-líquido. *XXIV ENTMME* p. 749–755, 2011.

BARBOSA, L.C.A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Minas Gerais: Ed. UFV, 2004. p. 215.

BERTRAND, S. *et al.* Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 6, p. 1180–1204, 2014.

CARVALHO, F.P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy*, v. 9, p. 685-692, 2006

CHEIKH-ALI, Z. *et al.* Diversity of exophillic acid derivatives in strains of an endophytic *Exophiala* sp. *Phytochemistry*, v. 118, p. 83–93, 2015.

CISALPINO, P. S. Levantamento da curva de crescimento da bactéria *M. Phle* para obtenção de massa em ensaios de separação sólido-líquido. *XXIV Entmme* p. 749–755, 2011.

CHONG, J.; YAMAMOTO, M.; XIA, J. MetaboAnalystR 2.0: From raw spectra to biological insights. *Metabolites*, v. 9, n. 3, 57, 2019.

DA COSTA, D. *et al.* Using LC and hierarchical cluster analysis as tools to distinguish timbó collections into two *Deguelia* species: A contribution to chemotaxonomy. *Molecules*, v. 21, n. 5, 2016.

DE HOOG, G. S.; GUARRO J. (eds) Atlas of clinical fungi. Editora, Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995. 720 p. ISBN 9070351269, 9789070351267.

DE HOOG, G. S. *et al.* Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-

blooded animals. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 27, p. 46–72, 2011.

DELABIE, J.H.C.; ALVES, H.S.R.; REUSS-STENZEL, G.M.; CARMO, A.F.R.; NASCIMENTO, I.C. Distribuição das formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: T.M.C. DELLA LUCIA (Ed.): Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo: 87-89. Editora Folha de Viçosa, Viçosa, 2011.

FAN, M. *et al.* Identification and differentiation of major components in three different “Sheng-ma” crude drug species by UPLC/Q-TOF-MS. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 7, n. 2, p. 185–192, 2017.

FERNANDES, R.P. Estudo do comportamento em co-cultivo dos fungos *Fusarium solani* e *Phomopsis cassiae* isolados de *Senna spectabilis*, Dissertação de mestrado apresentada Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), 2017.

FIGUEIREDO FILHO, D.B.; DA SILVA JÚNIOR, J.A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). *Revista Política Hoje*, v. 18, n. 1, p. 115–146, 2009.

GORROCHATEGUI, E. *et al.* Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 82, p. 425–442, 2016.

GUERIN, I. *Exophiala spinifera*: polissacarídeos de parede celular, exopolissacarídeos e antígenos dissertação de mestrado. p. 1–93, 2007.

LIU, Y.H. *et al.* Crystal structure of 1 α ,7 β -dihydroxy-11 β -acetoxy-ent-7 β ,20-epoxykaur-16-en-15-one, C₂₂H₃₀O₆. *Zeitschrift für Kristallographie - New Crystal Structures*, v. 231, n. 3, p. 891–892, 2016.

MACIÁ-VICENTE, J.G. *et al.* A new species of *Exophiala* associated with roots. *Mycological Progress*, v. 15, n. 2, p. 1–12, 2016.

MARICONI, F.A.M. As saúvas. São Paulo-SP: Agronômica Ceres, 1970. p.167.

MORENO, L.F. *et al.* Sybren. Black yeasts in the omics era: Achievements and challenges. *Medical Mycology*, v. 56, p. S32–S41, 2018.

MOURA, M.S. Uso de redes moleculares para anotações de compostos em

metabolômica. *Revista Virtual de Química* v. 14, n. 2, p. 214–223, 2022.

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in ants. *Science* v. 281, p. 2034–2038, 1998.

NASCIMENTO, V.B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. *Química Nova*, v. 21, n. 5, p. 614–629, 1998.

NGUYEN, D.D. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

ONDEYKA, J.G. *et al.* Isolation, structure and HIV-1 integrase inhibitory activity of exophillic acid, a novel fungal metabolite from *Exophiala pisciphila*. *ChemInform*, v. 35, n. 25, 2004.

PAN, R. *et al.* Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 1–20, 2019.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G.; VYVYAN, J. Introdução à espectroscopia. 2015 Edição Português. Ce.ngage Learning

PILON, A. *et al.* Metabolômica de plantas: métodos e desafios. *Química Nova*, v. 43, n. 3, p. 329–354, 2020.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M. An environmental, energetic and economic comparison of organic and conventional farming systems. *Integrated Pest Management: Pesticide Problems*, Vol.3, v. 3568, n. 9, p. 141–166, 2014.

RATEB, M.E. *et al.* Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Advances*, v. 3, n. 34, p. 14444–14450, 2013.

RHEE, I.K. *et al.* Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, v. 915, n. 1–2, p. 217–223, 2001.

SANTOS, A.M. Estudos bioquímicos e cinéticos de acetilcolinesterases de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*). Tese de Doutorado, PPGQ - Universidade Federal de São Carlos, 2017.

SILVA, A. Alfa-amilase e maltase nos simbiontes *Leucoagaricus gongylophorus* singer (möller) (Leucocoprineae: Agaricaceae) e *Atta sexdens* Linnaeus (Attini: Formicidae), Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. 2004.

SIQUEIRA, C.G *et al.* Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied Environment Microbiology*, v. 12, p. 4820-4822, 1998.

SOUSA, N.J. Avaliação do uso de três tipos de porta-iscas no controle de formigas cortadeiras, em áreas preparadas para implantação de povoamentos de *Pinus taeda* L. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná. 1996 72P.

SUZUKI, K.; NAKAMURA, A.; FUJIEDA, A.; NAKASE, K.; KATAYAMA, Pulmonary infection caused by *Exophiala dermatitidis* in a patient with multiple myeloma: a case report and a review of the literature, *N. Med. Mycol. Case Rep.* v. 1, p. 95–98, 2015.

SZYMAŃSKA, E. *et al.* Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* 8 (Suppl 1), 3–16 (2012).

TRABULSI, L.R.; TEIXEIRA, L.M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 718p. Cap. 20.

VIEGAS, C.. Terpenes with insecticidal activity: An alternative to chemical control of insects. *Quimica Nova*, v. 26, n. 3, p. 390–400, 2003.

XIA, M.W. *et al.* Three new and eleven known unusual C25 steroids: Activated production of silent metabolites in a marine-derived fungus by chemical mutagenesis strategy using diethyl sulphate. *Marine Drugs*, v. 12, n. 3, p. 1545–1568, 2014.

XIA, J., PSYCHOGIOS, N., YOUNG, N., & WISHART, D. S. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic acids research*, 37(W), W652– W660, 2009.

WEBER, N.A. Gardening ants: the Attines. Philadelphia: *The American Philosophical Society*, p. 87-115. 1972

ZENG, J.S. *et al.* Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Medical Mycology*, v. 45, n. 6, p. 547–558, 2007.

ZENG, J.S.; HOOG, G.S.D.E. *Exophiala spinifera* and its allies : diagnostics from morphology to DNA barcoding. *Medicinal Micology*. v. 46, n 3, p. 193-208, 2008.

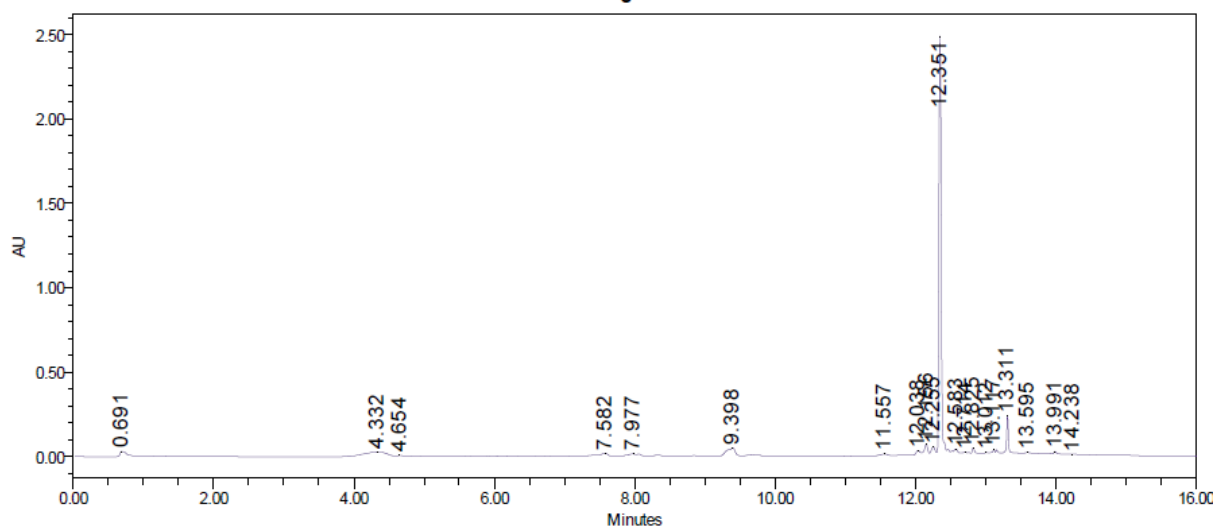
Anexo 1

Report _Fungo C_5 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CML_5d_1	Acquired By:	UFSCAR
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS 14_11_2017
Vial:	1:B,3	Acq. Method Set:	Metodo agua e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	11/14/2017 3:44:07 PM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:20:12 PM BRST		

Cromatograma



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.691	236985	31273		
2	Peak2 254.0nm	4.332	679986	29014		
3	Peak3 254.0nm	4.654	112689	6961		
4	Peak4 254.0nm	7.582	232358	17992		
5	Peak5 254.0nm	7.977	174265	14407		
6	Peak6 254.0nm	9.398	438630	49923		
7	Peak7 254.0nm	11.557	112308	12313		
8	Peak8 254.0nm	12.038	159470	34308		
9	Peak9 254.0nm	12.156	264878	73584		
10	Peak10 254.0nm	12.255	230733	56498		

Peak Results

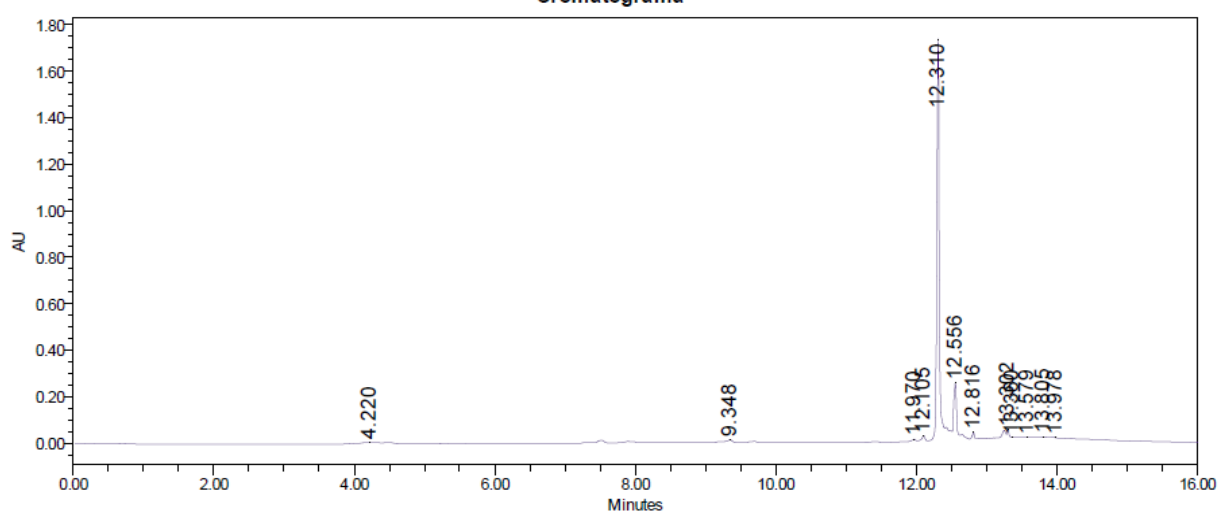
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
11	Peak11 254.0nm	12.351	5569053	2490026		
12	Peak12 254.0nm	12.583	254275	42445		
13	Peak13 254.0nm	12.714	186076	22869		
14	Peak14 254.0nm	12.825	186143	50888		
15	Peak15 254.0nm	13.012	172496	21447		
16	Peak16 254.0nm	13.117	256421	42485		
17	Peak17 254.0nm	13.311	677887	240507		
18	Peak18 254.0nm	13.595	421701	23232		
19	Peak19 254.0nm	13.991	244865	25908		
20	Peak20 254.0nm	14.238	406123	10676		

Report_ Fungo C_10 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CML_10d_1	Acquired By:	UFSCAR
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS 27_11_2017
Vial:	1:B,3	Acq. Method Set:	Método água e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	11/27/2017 2:30:08 PM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:28:01 PM BRST		

Cromatograma



Peak Results

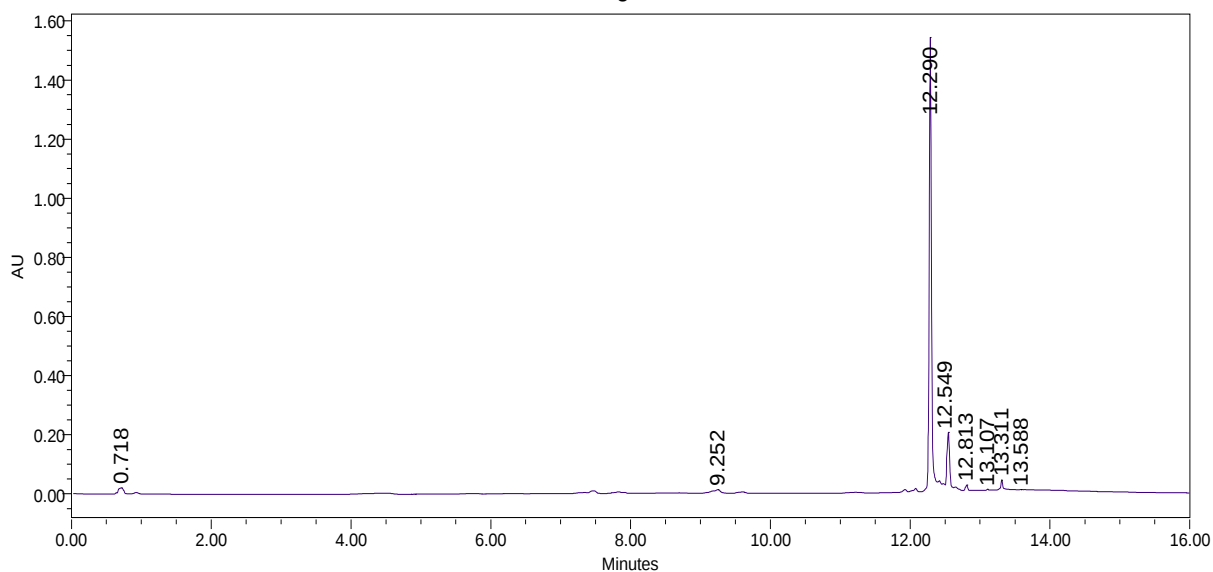
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	4.220	135986	5824		
2	Peak2 254.0nm	9.348	126443	13378		
3	Peak3 254.0nm	11.970	143502	14758		
4	Peak4 254.0nm	12.105	137944	31541		
5	Peak5 254.0nm	12.310	4571122	1736194		
6	Peak6 254.0nm	12.556	951992	259172		
7	Peak7 254.0nm	12.816	206856	44542		
8	Peak8 254.0nm	13.302	692914	55752		
9	Peak9 254.0nm	13.360	112943	23242		
10	Peak10 254.0nm	13.579	408538	23728		
11	Peak11 254.0nm	13.805	320531	24788		
12	Peak12 254.0nm	13.978	983926	20429		

Report _Fungo C_15 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CML_15d_1	Acquired By:	UFSCAR
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS 2_12_2017
Vial:	1:A,8	Acq. Method Set:	Metodo agua e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	12/2/2017 2:02:05 PM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:29:36 PM BRST		

Cromatograma



Peak Results

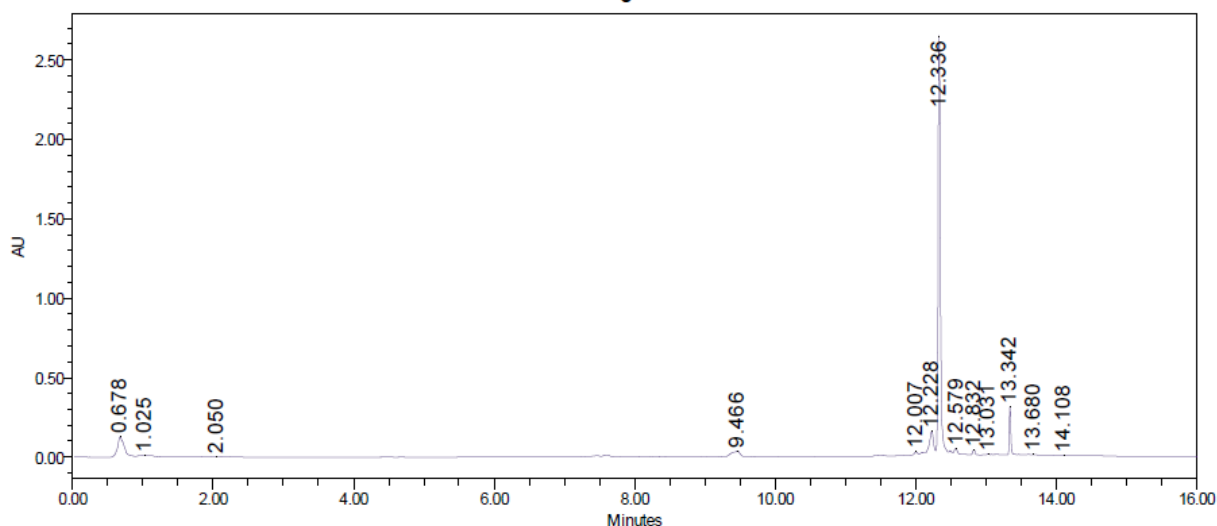
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.718	117268	21077		
2	Peak2 254.0nm	9.252	112088	12553		
3	Peak3 254.0nm	12.290	3810874	1543121		
4	Peak4 254.0nm	12.549	732596	205883		
5	Peak5 254.0nm	12.813	147304	27948		
6	Peak6 254.0nm	13.107	130174	12625		
7	Peak7 254.0nm	13.311	314453	44468		
8	Peak8 254.0nm	13.588	703708	11376		

Report_Fungo C_20 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CML_20d_1	Acquired By:	UFSCAR
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS_04_01_2018
Vial:	1:E,4	Acq. Method Set:	Método água e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	1/5/2018 1:35:57 AM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:33:21 PM BRST		

Cromatograma



Peak Results

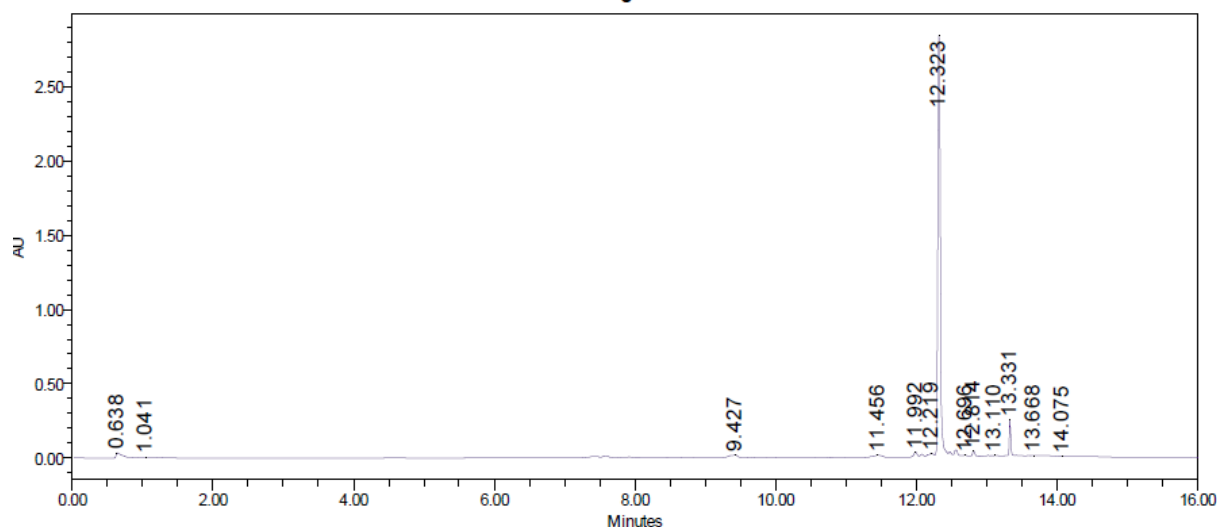
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.678	869936	127314		
2	Peak2 254.0nm	1.025	230069	12811		
3	Peak3 254.0nm	2.050	142153	4140		
4	Peak4 254.0nm	9.466	298792	36280		
5	Peak5 254.0nm	12.007	244069	29885		
6	Peak6 254.0nm	12.228	840955	158150		
7	Peak7 254.0nm	12.336	6253300	2651549		
8	Peak8 254.0nm	12.579	288709	49451		
9	Peak9 254.0nm	12.832	189213	41964		
10	Peak10 254.0nm	13.031	205628	17531		
11	Peak11 254.0nm	13.342	755681	311852		
12	Peak12 254.0nm	13.680	267233	12696		
13	Peak13 254.0nm	14.108	292154	7578		

Report Fungo C_25 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CML_25d_1	Acquired By:	UFSCAR
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS_04_01_2018
Vial:	1:E,7	Acq. Method Set:	Método água e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	1/5/2018 2:26:07 AM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:34:39 PM BRST		

Cromatograma



Peak Results

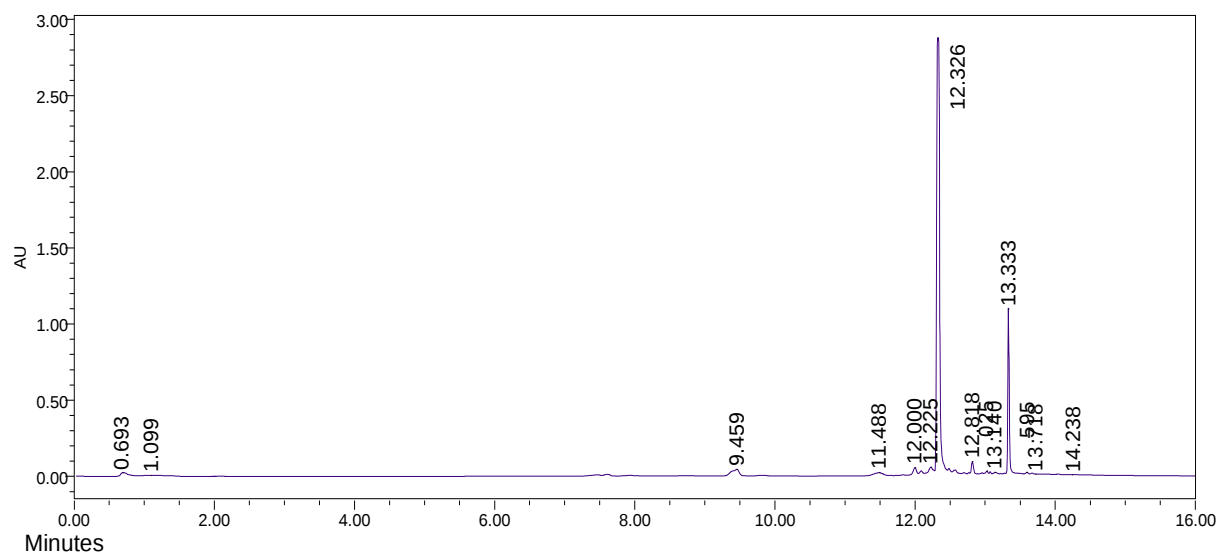
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.638	240748	36134		
2	Peak2 254.0nm	1.041	150983	7144		
3	Peak3 254.0nm	9.427	152459	18148		
4	Peak4 254.0nm	11.456	174896	16465		
5	Peak5 254.0nm	11.992	153056	38123		
6	Peak6 254.0nm	12.219	164368	28845		
7	Peak7 254.0nm	12.323	7764513	2843454		
8	Peak8 254.0nm	12.696	107816	17538		
9	Peak9 254.0nm	12.814	189804	47323		
10	Peak10 254.0nm	13.110	118768	14441		

11	Peak11 254.0nm	13.331	617005	254294		
12	Peak12 254.0nm	13.668	318299	13819		
13	Peak13 254.0nm	14.075	330537	8769		

Report_ Fungo C_30 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CML_30d_1	Acquired By:	UFSCAR
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS_04_01_2018
Vial:	1:F,2	Acq. Method Set:	Metodo agua e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	1/5/2018 3:16:16 AM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:36:15 PM BRST		



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.693	212810	25164		
2	Peak2 254.0nm	1.099	217779	7836		
3	Peak3 254.0nm	9.459	352197	44256		
4	Peak4 254.0nm	11.488	227130	22047		
5	Peak5 254.0nm	12.000	219794	54703		
6	Peak6 254.0nm	12.225	320788	58091		
7	Peak7 254.0nm	12.326	9036695	2878227		
8	Peak8 254.0nm	12.818	318120	94548		
9	Peak9 254.0nm	13.025	219848	32454		
10	Peak10 254.0nm	13.140	150626	24011		

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
11	Peak11 254.0nm	13.333	1877130	1102049		
12	Peak12 254.0nm	13.595	155874	24031		
13	Peak13 254.0nm	13.718	183515	12294		
14	Peak14 254.0nm	14.238	257547	7834		

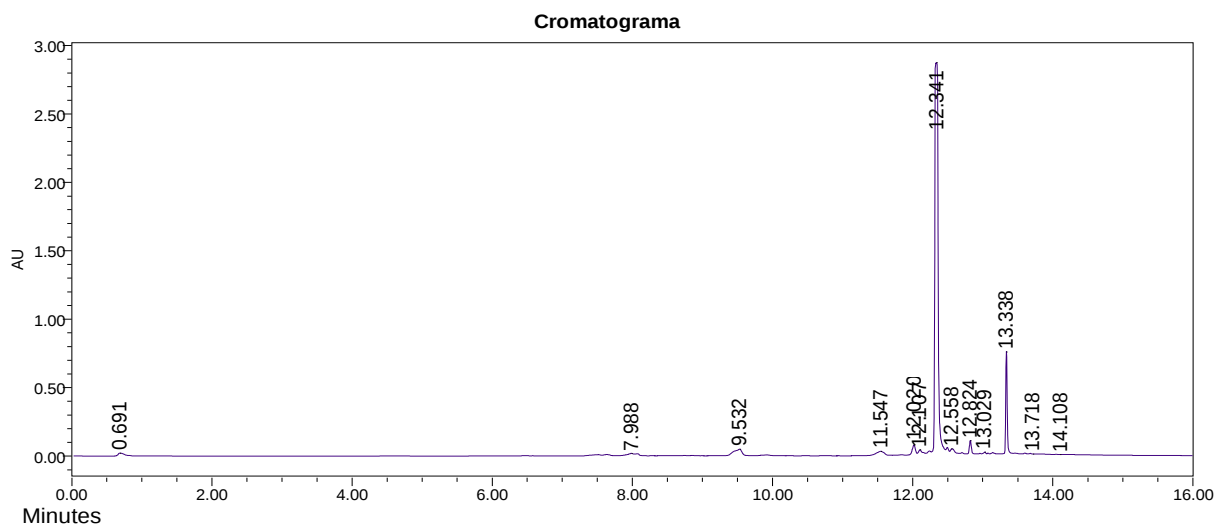
Report_Fungo C_35 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: CML_35d_1

Acquired By: UFSCAR

Sample Type:	Unknown	Sample Set Name	AMOSTRAS_04_01_2018
Vial:	1:F,5	Acq. Method Set:	Método água e ACN 16 min
Injection #:	1	Processing Method	PM CML
Injection Volume:	5.00 ul	Channel Name:	254.0nm
Run Time:	16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired:	1/5/2018 4:06:25 AM BRST		
Date Processed:	1/21/2018 12:37:55 PM BRST		



Peak Results

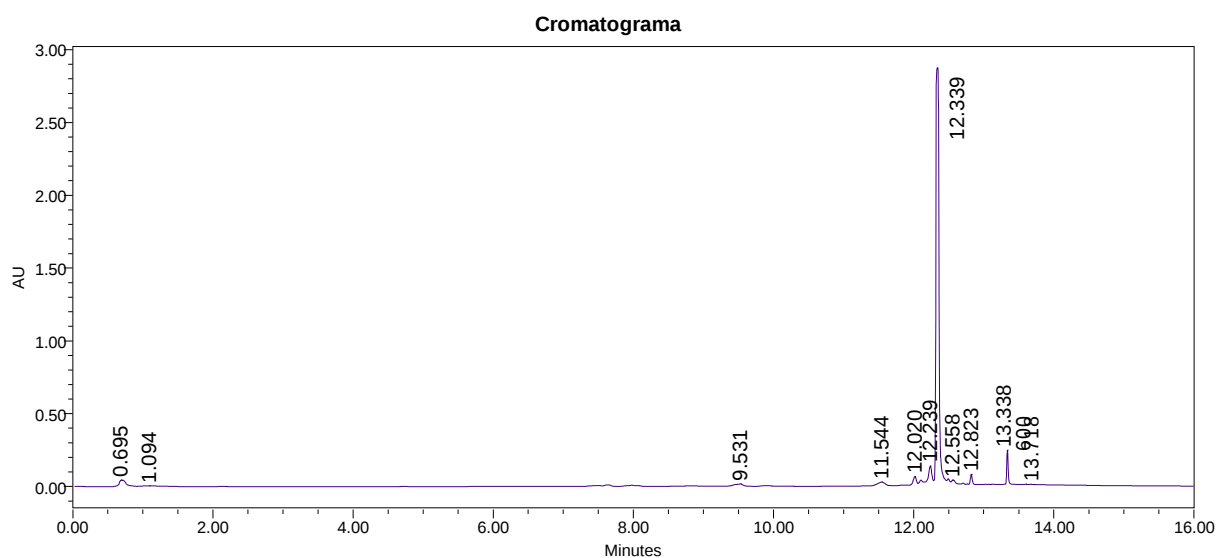
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.691	158172	22548		
2	Peak2 254.0nm	7.988	171133	17399		
3	Peak3 254.0nm	9.532	398208	48025		
4	Peak4 254.0nm	11.547	281125	32324		
5	Peak5 254.0nm	12.020	280174	77929		
6	Peak6 254.0nm	12.107	199897	43491		
7	Peak7 254.0nm	12.341	9832839	2873189		
8	Peak8 254.0nm	12.558	343364	50963		
9	Peak9 254.0nm	12.824	310974	110924		
10	Peak10 254.0nm	13.029	288009	26750		

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
11	Peak11 254.0nm	13.338	1366240	761628		
12	Peak12 254.0nm	13.718	233245	11954		
13	Peak13 254.0nm	14.108	318966	8293		

Report Fungo C_40 dias

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: CML_40d_1	Acquired By: UFSCAR
Sample Type: Unknown	Sample Set Name: AMOSTRAS_04_01_2018
Vial: 1:F,8	Acq. Method Set: Método água e ACN 16 min
Injection #: 1	Processing Method: PM CML
Injection Volume: 5.00 ul	Channel Name: 254.0nm
Run Time: 16.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: PDA Spectrum PDA 254.0 nm
Date Acquired: 1/5/2018 4:56:35 AM BRST	
Date Processed: 1/21/2018 12:39:33 PM BRST	



Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	Peak1 254.0nm	0.695	331300	46333		
2	Peak2 254.0nm	1.094	136249	4808		
3	Peak3 254.0nm	9.531	135568	16061		
4	Peak4 254.0nm	11.544	266069	28718		
5	Peak5 254.0nm	12.020	247764	66496		
6	Peak6 254.0nm	12.239	732296	138889		
7	Peak7 254.0nm	12.339	9100248	2874401		
8	Peak8 254.0nm	12.558	285738	41767		
9	Peak9 254.0nm	12.823	289188	80883		
10	Peak10 254.0nm	13.338	602820	246174		

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
11	Peak11 254.0nm	13.600	107449	13428		
12	Peak12 254.0nm	13.718	492776	10235		