Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Elicitação do metabolismo secundário de *Streptomyces lunalinharesii* através do
co-cultivo com *Rhizoctonia solani*

Naydja Moralles Maimone

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2020

Naydja Moralles Maimone
Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas

Elicitação do metabolismo secundário de *Streptomyces lunalinharesii* através do co-cultivo com
Rhizoctonia solani

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profª Drª SIMONE POSSEDENTE DE LIRA

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Maimone, Naydja Morales

Elicitação do metabolismo secundário de *Streptomyces lunalinharesii* através do co-cultivo com *Rhizoctonia solani* / Naydja Morales Maimone. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

83 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Metabólitos secundários 2. Bioprospecção 3. Actinobactérias endofíticas 4. Molecular networking 5. Metabolômica I. Título

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Simone Possedente de Lira.

Aos meus pais, Jaques e Niceia.

Aos meus demais familiares.

Ao meu namorado, Endrews.

Aos meus sogros, Dionel e Roselene.

Aos gerbils Merry e Pippin.

A todos os meus colegas de laboratório.

Ao Prof. Dr. Roberto Berlinck e à técnica Fabiana Rodrigues.

A CAPES (código de financiamento 001) e a FAPESP (projeto temático nº 2013/50228-8)
pelo suporte financeiro.

EPÍGRAFE

Durante muito, muito tempo, ninguém disse nada. Com o canto do olho, Phouchg via pela janela o mar de rostos cheios de expectativa na praça.

“Nós vamos ser linchados, não vamos?”, sussurrou.

“A pergunta não foi fácil”, disse o Pensador Profundo, com modéstia.

“Quarenta e dois!”, berrou Loonquawl. “É tudo o que você tem a nos dizer depois de sete milhões e quinhentos mil anos de trabalho?”

“Eu verifiquei cuidadosamente”, disse o computador, “e não há dúvida de que a resposta é essa. Para ser franco, acho que o problema é que vocês jamais souberam qual é a pergunta.”

“Mas era a Grande Pergunta! A Questão Fundamental da Vida, o Universo e Tudo Mais”, gritou Loonquawl.

“É”, disse o Pensador Profundo, num tom de voz de quem tem enorme paciência para aguentar pessoas estúpidas, “mas qual é exatamente a pergunta?”

Um silêncio de estupefação aos poucos dominou os homens, que olharam para o computador e depois se entreolharam.

“Bem, você sabe, é simplesmente tudo... Tudo...”, começou Phouchg, vacilante.

“Pois é!”, disse Pensador Profundo, “Assim, quando vocês souberem qual é a pergunta, vocês saberão o que significa a resposta.”

Douglas Adams, em O Guia do Mochileiro das Galáxias.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. ACTINOBACTÉRIAS	13
2.2. <i>STREPTOMYCES LUNALINHARESII</i>	14
2.3. ISOLAMENTO DE NOVOS METABÓLITOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS	14
2.4. ELICITAÇÃO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS POR CO-CULTIVO	16
2.5. ABORDAGENS METABOLÔMICAS PARA A DESCOBERTA E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS.....	18
3. OBJETIVO.....	23
4. METODOLOGIA	25
4.1. AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, PRESERVAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS (ETAPAS REALIZADAS PREVIAMENTE A ESTE TRABALHO POR MEMBROS DO GRUPO DE PESQUISA)	25
4.2. ENSAIO DE CULTIVO PAREADO.....	26
4.3. EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS A PARTIR DO CO-CULTIVO	26
4.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (UPLC-MS/MS)	27
4.5. ANÁLISE DOS DADOS DE UPLC-MS/MS	28
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
4.7. TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL (<i>'POISONED FOOD'</i>)	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1. AVALIAÇÃO DO ENSAIO ANTAGÔNICO ENTRE AS LINHAGENS DE <i>S. LUNALINHARESII</i> E <i>R. SOLANI</i>	31
5.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR MOLECULAR NETWORKING.....	33
5.3. ESTUDO ESTATÍSTICO APLICADO À METABOLÔMICA.....	35
5.4. DERREPLICAÇÃO DOS COMPOSTOS	38
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO CRESCIMENTO MICELIAL PELOS EXTRATOS.....	45
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICES.....	65

RESUMO

Elicitação do metabolismo secundário de *Streptomyces lunalinharesii* através do co-cultivo com *Rhizoctonia solani*

A crescente preocupação frente à necessidade de se preservar a biodiversidade e os processos naturais faz com que a busca por alternativas à utilização de defensivos químicos na agricultura seja incentivada, visto que o uso indiscriminado destes pode causar efeitos indesejados aos seres vivos e ao ambiente. Ao mesmo tempo, observa-se o surgimento de patógenos resistentes a produtos agroquímicos já utilizados. Neste contexto, os microrganismos são considerados fontes promissoras de compostos bioativos e as actinobactérias possuem particular relevância, visto que são reconhecidas produtoras de metabólitos secundários de possível aplicação na agricultura, como compostos de atividade antifúngica. Sendo assim, este estudo objetivou investigar o perfil metabólico de uma linhagem de actinobactéria isolada como endofítica de *Anthurium urvilleanum* na ilha de Palmas (litoral do Estado de São Paulo) e identificada como *Streptomyces lunalinharesii*, com foco na busca por moléculas de ação fungicida. Utilizamos a metodologia de co-cultivo com o fitopatógeno *Rhizoctonia solani* para promovermos a elicitação do metabolismo secundário da actinobactéria. Testes de avaliação de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno pelos extratos obtidos indicaram a presença de compostos capazes de inibir o crescimento de *R. solani* produzidas por *S. lunalinharesii* especialmente quando esta linhagem foi co-cultivada com fungo fitopatogênico. Análises metabolômicas permitiram a avaliação do perfil metabólico da linhagem quando crescida em modo axênico e em co-cultivo, enquanto análises estatísticas possibilitaram a comparação de tais perfis e a identificação de metabólitos produzidos em maior quantidade relativa na condição de elicitação. Tais metodologias proporcionaram a seleção de moléculas com elevado potencial bioativo para derreplicação e futuro isolamento. Utilizamos ferramentas *in silico* para anotar compostos já descritos na literatura, e verificamos que há diversos metabólitos de *S. lunalinharesii* que possivelmente representam estruturas inéditas.

Palavras-chave: Metabólitos secundários, Bioprospecção, Actinobactérias endofíticas, Molecular networking, Metabolômica

ABSTRACT

Elicitation of secondary metabolism in *Streptomyces lunalinharesii* through co-culture with *Rhizoctonia solani*

The concern regarding the necessity to preserve biodiversity and natural processes means that the search for alternatives to the use of chemical pesticides in agriculture is encouraged, since the indiscriminate use of these can cause undesired effects on living beings and the environment. At the same time, there is the emergence of pathogens which are resistant to agrochemical products already in use. In this context, microorganisms are considered as promising sources of bioactive compounds and actinobacteria are particularly relevant there, since they are known to produce secondary metabolites with possible applications in agriculture, as molecules of antifungal activity. Thus, this study aimed to investigate the metabolic profile of an actinobacterial strain isolated as endophytic on an island off the coast of the State of São Paulo and identified as *Streptomyces lunalinharesii*, with a focus on the search for molecules with fungicidal action. We used the methodology of co-cultivation with the phytopathogen *Rhizoctonia solani* to promote the secondary metabolism elicitation of the actinobacteria. Tests to evaluate the pathogen mycelial growth inhibition by the extracts obtained in our treatments indicated the presence of molecules capable of inhibiting the growth of *R. solani* produced by *S. lunalinharesii* differentially when in the presence of the fungus during fermentation. Metabolomic analyzes allowed the evaluation of the metabolic profile of the isolate when grown in axenic mode and in co-cultivation, while statistical analyzes enabled the comparison of such profiles and the identification of metabolites produced in greater relative quantities in the elicitation condition. Such methodologies provided the selection of molecules with high bioactive potential for derreplication and future isolation. We use *in silico* tools to annotate compounds already described in the literature, and we verified that there are several metabolites of *S. lunalinharesii* that possibly represent new structures.

Keywords: Secondary metabolites, Bioprospection, Endophytic actinobacteria, Molecular networking, Metabolomics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de alguns compostos bioativos produzidos por diferentes espécies de actinobactérias.	15
Figura 2. Exemplos de moléculas produzidas por diversos microrganismos em condições de co-cultivo.	18
Figura 3. Região do meio coletada a partir do co-cultivo. Zi: zona de inibição; Ac: colônia da actinobactéria.	27
Figura 4. Cultivo pareado entre o fungo fitopatogênico <i>R. solani</i> e as linhagens de <i>S. lunalinharesii</i> , realizado em meio bda por um período de 5 dias, a 28°C. a) a5.1; b) a15a; c) a15b; d) a42b; e) a54a; f) a54b; g) controle do <i>R. solani</i>	31
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de <i>Rhizoctonia solani</i> em cultivo axênico (a e b) e em cultivo pareado com <i>Streptomyces lunalinharesii</i> linhagem A15A (c, d, e e f).	32
Figura 6. a) FBMN com íons obtidos do co-cultivo (em rosa), do cultivo axênico da actinobactéria (em azul) e do cultivo axênico do fitopatógeno (em verde). <i>Self-loops</i> foram omitidos da imagem. clusters em destaque possuem íons produzidos somente pela actinobactéria b) Maior cluster onde constam somente íons produzidos pela actinobactéria, em cultivo axênico e em co-cultivo com o fungo. c) Diagrama de venn com o total de íons observados entre as amostras.	34
Figura 7. a) <i>Heatmap</i> gerado a partir da hca dos íons mais significantes ($p < 0,05$) presentes nas amostras. b) <i>scores plot</i> da pca baseada na tabela de quantificação dos íons encontrados entre as amostras. Legendas: a monocultura da actinobactéria é representada pela cor vermelha, o co-cultivo pela cor verde e a monocultura do fungo pela cor azul.	36
Figura 8. <i>Volcano plot</i> explicitando diferenças nos perfis metabólicos entre as monoculturas (representada no quadrante à esquerda) e o co-cultivo (quadrante à direita). os eixos x e y representam, respectivamente, o log2 da variação quantitativa dos compostos (fold change, fc) e o -log10 do p-valor de todos os metabólitos. Os círculos em rosa representam íons cuja diferença de intensidade diferiu ao menos três vezes entre os conjuntos de dados. Íons destacados em vermelho são provavelmente produzidos pelas actinobactérias, já aqueles em preto não puderam ter sua origem predita.	37
Figura 9. Clusters onde se encontram os dois íons com maior variação quantitativa e significância estatística do co-cultivo. Íons obtidos do co-cultivo estão coloridos em rosa, íons do cultivo axênico da actinobactéria em azul e do cultivo axênico do fitopatógeno em verde.	38
Figura 10. Nodo de m/z 628,1953, anotado como luteolina 3',4'-di-o-beta-d-glucopiranosídeo. em verde no <i>mirror match</i> são mostrados os picos do composto conforme dados depositados na biblioteca do GNPS e em preto os nossos dados experimentais. No nodo, a cor azul representa a quantificação do íon no cultivo axênico da actinobactéria e a cor verde no cultivo axênico do fitopatógeno.	39
Figura 11. Clusters priorizados para derreplicação. informações sobre a m/z de cada íon e seu tempo de retenção cromatográfico se encontram ao lado dos nodos. Íons obtidos do co-cultivo estão coloridos em rosa, íons do cultivo axênico da actinobactéria em azul e do cultivo axênico do fitopatógeno em verde.	40
Figura 12. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster A.	41
Figura 13. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster B.	41
Figura 14. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster C.	42
Figura 15. Molécula indicada pelo NAP como candidata à identificação do composto pertencentes ao cluster D de m/z 518,2793.	43
Figura 16. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster E.	43
Figura 17. Estrutura molecular do DHQ7.	45
Figura 18. Teste de inibição do crescimento micelial, com extratos e fungicidas na concentração de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. a) fungicida priori xtra; b) fungicida fox; c) BRsolZi; d) CB; e) CRSol; f) DMSO 10%.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de inibição entre as linhagens de <i>S. lunalinharesii</i> e o fitopatógeno <i>R. solani</i> . valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,01$) de acordo com o teste de Tukey.....	31
Tabela 2. Lista de fórmulas moleculares identificadas pelo Sirius com maior <i>score</i> para os íons selecionados via mn para derreplicação.....	42
Tabela 3. Atividade antifúngica dos extratos obtidos das culturas axênicas da actinobactéria (cb) e fungo (crsol) e do co-cultivo (BRsolZi), em comparação com os controles positivos (antifúngicos comerciais fox e priori xtra) e negativo (solução de DMSO 10%). os resultados representam médias e desvios padrão de quatro repetições. valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....	46

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a população da Terra irá atingir o patamar de 9 bilhões de habitantes em 2050. Produzir alimentos suficientes para alimentar tantas pessoas irá requerer uma expansão de cerca de 60% na produção agrícola em relação ao que é produzido atualmente (ALEXANDRATOS; BRUINSMA, 2012). Frente ao crescimento populacional global em um mundo que apresenta limites à expansão das terras destinadas à agricultura, a produção em nível sustentável de produtos agrícolas se faz urgente, ao mesmo tempo em que representa um desafio à humanidade. Parte significativa desta demanda envolve o combate a fitopatógenos, que são responsáveis por perdas médias anuais de 30 a 40% na produção agrícola (FLOOD, 2010). A maioria das doenças que acometem plantas são causadas por fungos, capazes de afetar qualquer tecido vegetal a qualquer estágio de seu desenvolvimento (RAMIREZ-MARES; HERNANDEZ-CARLOS, 2015), causando prejuízos no campo e também na pós-colheita principalmente em países de clima tropical e sub-tropical (BRIMNER; BOLAND, 2003).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, há cerca de quinhentas marcas comerciais registradas de fungicidas químicos (AGROFIT, 2019). Entretanto, os fitopatógenos geralmente apresentam populações muito grandes e elevadas taxas de mutação genética, o que pode fazer com que facilmente adquiram resistência aos pesticidas convencionais (YANG et al., 2008). De fato, muitos fungicidas químicos já comprovadamente perderam sua eficácia no campo (SALLATO; LATORRE; AYLWIN, 2006; PRICE et al., 2015; CHEVAL et al., 2017), e além disso podem causar efeitos indesejados no ambiente, como poluição e diminuição na diversidade de populações não-alvo, e danos à saúde humana (KHAMNA et al., 2009). Frente a estes fatos, interesse tem se dado à busca de alternativas ao uso de agroquímicos, como produtos naturais com potencial antifúngico para substituir (ao menos parcialmente) produtos já utilizados ou servir de base para novas inspirações de ativos, preferencialmente com diferentes mecanismos de ação, já que os atualmente disponíveis nem sempre possuem os efeitos esperados. A busca por compostos oriundos de fontes naturais tem se concentrado majoritariamente em plantas e microrganismos, sendo estes últimos os mais prolíficos.

Destaque neste âmbito se dá ao filo Actinobacteria, considerado um proeminente grupo para a prospecção de compostos bioativos a partir de seus metabólitos secundários (WILLIAMS, 2009; KIM et al., 2012b; TRUJILLO, 2016). Constituindo uma das maiores unidades taxonômicas dentro das linhagens pertencentes ao domínio Bacteria (VENTURA et

al., 2007), as actinobactérias são capazes de produzir compostos com uma ampla gama de atividades biológicas (RAVIKUMAR et al., 2011; PASSARI et al., 2017, 2018). Em mais de sete décadas de trabalhos de bioprospecção de produtos naturais oriundos de actinobactérias, mais de cinco mil diferentes compostos foram obtidos, o que corresponde a cerca de 90% dos antibióticos comerciais produzidos (JOSE; JHA, 2016). Estima-se que somente o gênero *Streptomyces* seja responsável pela produção de 75% dos antibióticos de uso médico e de 60% dos utilizados na agricultura (WATVE et al., 2001; SANGHVI et al., 2014).

Diante da demanda por novos produtos, seja qual for a aplicação de interesse, nos últimos anos observamos o desenvolvimento de novas ferramentas para processamento (*e.g.* Mzmine 2) e análise (*e.g.* MetaboAnalyst, Global Natural Product Social Molecular Networking) de dados de metabolômica, o que tem possibilitado aprimoramentos na área de pesquisa em produtos naturais microbianos, facilitando a seleção de isolados para fermentação, otimização de condições de cultura e métodos de extração de metabólitos (CRÜSEMANN et al., 2017; MACHUSHYNETS et al., 2019), bem como a derreplicação *in silico* de compostos com base em bancos de dados de produtos naturais (ALLARD et al., 2016; DA SILVA et al., 2018) e o isolamento guiado de compostos de interesse (CONDE-MARTÍNEZ et al., 2019; MUDALUNGU et al., 2019). Além disso, várias técnicas podem ser aplicadas para promover a elicitação da produção de compostos por isolados microbianos, caracterizando as chamadas abordagens OSMAC (One Strain Many Compounds) (BODE et al., 2002), como por exemplo o co-cultivo (BERTRAND et al., 2014).

Frente a estes fatos, o presente trabalho tem como objetivo investigar a produção de metabólitos secundários de ação antifúngica por uma linhagem da actinobactéria *Streptomyces lunalinharesii* isolada como endofítica de um espécime de *Anthurium urvilleanum* (coletado na Ilha de Palmas, litoral norte do estado de São Paulo). Utilizamos a abordagem de elicitação do metabolismo secundário através do co-cultivo com o fungo fitopatogênico *Rhizoctonia solani* (linhagem CMAA 1589), um dos fitopatógenos de maior importância na atualidade (ZAMOUM et al., 2017) e agente causador do ‘tombamento’ ou ‘damping-off’, doença que afeta um grande número de culturas agrícolas (GOUDJAL et al., 2014). Ademais, empregamos ferramentas de análise metabolômica para comparar os perfis metabólicos dos isolados quando cultivados em conjunto e em cultivos axênicos, a fim de selecionar moléculas produzidas pela actinobactéria em resposta ao fungo, as quais priorizamos para derreplicação e futuro isolamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Actinobactérias

As actinobactérias formam um grande e diverso grupo de bactérias Gram-positivas que possuem uma alta proporção de guaninas e citosinas em seu genoma (entre 50 e 70 mol%) (VENTURA et al., 2007). Os membros deste filo podem ser aeróbios ou anaeróbios, organismos unicelulares ou filamentosos formadores de esporos (LEWIN et al., 2016). São comumente encontradas no solo e em sedimentos marinhos e de água doce, onde podem atuar como decompositoras de matéria orgânica, mas também são encontradas espécies endofíticas e associadas a invertebrados. A maioria possui estilo de vida livre, e há espécies patogênicas para plantas e animais (*e.g. Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium spp.*) (TRUJILLO, 2016). As actinobactérias filamentosas, em consequência à formação de seus característicos micélios e esporos, inicialmente foram creditadas como filogeneticamente relacionadas aos fungos (o termo ‘actinomicetos’, ainda utilizado, reflete esta antiga classificação equivocada) (DOROGHAZI; METCALF, 2013). Estudos genéticos baseados no rRNA 16S comprovaram posteriormente que o filo Actinobacteria é um agrupamento monofilético pertencente ao domínio Bacteria e do qual fazem parte microrganismos com diferentes características morfológicas (STACKEBRANDT; WARD-RAINEY; RAINEY, 1997; TRUJILLO, 2016).

A elevada capacidade das actinobactérias em produzir metabólitos secundários bioativos está relacionada a seu potencial genético. É comum encontrar um grande número de clusters de genes biossintéticos em seu genoma (UNDABARRENA et al., 2017), sendo que a detecção destes pode oferecer um panorama inicial do potencial de biossíntese de metabólitos das diferentes cepas (LI et al., 2014). Por isso, é comum verificar se há a presença de genes codificantes de policétido sintases (PKS-I e PKS-II) e de peptídeos não-ribossomais (NRPS), responsáveis pela síntese de uma ampla gama de moléculas bioativas de interesse farmacêutico, agrícola e industrial (AYUSO-SACIDO; GENILLOUD, 2005), nos trabalhos de bioprospecção em microrganismos, sendo que para actinobactérias a ocorrência estimada destes genes é entre 21-66% (PKS-I), 45-82% (PKS-II) e 33-100% (NRPS) (MATSUMOTO; TAKAHASHI, 2017).

2.2. *Streptomyces lunalinharesii*

No melhor de nosso conhecimento, na literatura não há relatos de isolamento de metabólitos secundários produzidos por esta espécie, que foi isolada anteriormente uma única vez a partir do solo do cerrado brasileiro em 2008 (DE SOUZA et al., 2008). Na base de dados Web of Science (acesso em 12/05/2020) foram encontrados apenas 6 artigos relacionados a esta espécie, publicados entre os anos de 2008 e 2016. Neles são apresentados estudos avaliando seu potencial de bioabsorção dos metais cobre, zinco (VENEU; TOREM; PINO, 2013) e cádmio (VENEU et al., 2012) e também sua capacidade de produzir substâncias inibidoras de crescimento de bactérias envolvidas em processos de biocorrosão (PACHECO DA ROSA et al., 2013) e bactérias formadoras de biofilme e redutoras de sulfato (ROSA et al., 2016), o que seria de grande interesse industrial e medicinal. A linhagem ainda apresentou alta atividade endoquitinase, sugerindo que se trata de uma possível linhagem quitinolítica (DE SOUZA et al., 2008).

2.3. Isolamento de novos metabólitos bioativos produzidos por actinobactérias

Entre os compostos produzidos por actinobactérias, destacam-se aqueles das classes dos policetídeos e peptídeos não-ribossômicos, metabólitos secundários que apresentam grande diversidade estrutural e cuja via sintética se codifica pelos genes PKS e NRPS. Como exemplos temos a estreptomicina (**1**), cloranfenicol (**2**) (compostos de atividade antibacteriana), nistatina (**3**), rimocidina (**4**) (atividade antifúngica), avermectina (**5**) (atividade antiparasítica), actinomicina (**6**) (compostos antitumorais), ácido clavulânico (**7**) (inibidor enzimático), entre outros (BÉRDY, 2005; ZHANG; DEMAINE, 2005; SOLANKI; KHANNA, 2008; CHAUDHARY et al., 2013). Apesar da grande quantidade de produtos naturais isolados de actinobactérias e demais microrganismos ao longo das últimas décadas, recentemente verificou-se uma redução na obtenção de compostos inéditos, tal fato devendo-se principalmente a exploração excessiva de determinados ambientes para coleta de material visando isolamento e/ou posterior fermentação das linhagens obtidas em meios comuns e pouco diversificados (MINCER et al., 2002). Por conta disso, as buscas por novos compostos de aplicação farmacêutica, agrícola e industrial obtidos a partir de microrganismos têm se voltado a áreas até então sub-exploradas, como os oceanos, ambientes extremos e ilhas (HUG et al., 2018). Além disso, mais atenção nesse sentido está sendo dada às linhagens endofíticas (LAM, 2007; GOUDA et al., 2016; CONTI et al., 2016).

Figura 1. Estrutura química de alguns compostos bioativos produzidos por diferentes espécies de actinobactérias.

Considerando-se que cada indivíduo de uma das cerca de 300 mil espécies de plantas existentes possui ao menos um microrganismo endofítico a ele associado (STROBEL et al., 2004), o potencial que os recursos representados por tamanha biodiversidade apresentam para a descoberta de novos compostos é elevado (ZHANG; REN; ZHANG, 2012; TANVIR; SAJID; HASNAIN, 2014; WANG et al., 2014). Ademais, outras estratégias para se obter

moléculas inéditas incluem utilizar metodologias de eliciação do metabolismo secundário microbiano (RAMADAN et al., 2015), técnicas mais avançadas para isolamento e derreplicação dos compostos (BÉRDY, 2005; TEDESCO et al., 2016), principalmente as relacionadas a cromatografia (WOLFENDER; QUEIROZ, 2012; CORDERO-MALDONADO et al., 2013), ressonância nuclear magnética (RNM) (DALISAY et al., 2009) e novas metodologias para análise de dados de espectrometria de massas (*e.g.* Molecular Networking) (WANG et al., 2016).

2.4. Elicitação da produção de metabólitos por co-cultivo

O cultivo axênico de isolados microbianos em laboratório não reflete as condições ambientais originalmente enfrentadas pelos microrganismos, principalmente no que diz respeito à competição intensa com os demais membros da microbiota. Sob estas ‘condições clássicas’ de cultivo, a ausência de moléculas estimulantes e de sinalização envolvidas na comunicação química e nas relações de antagonismo entre as espécies de microrganismos pode resultar no silenciamento de clusters gênicos biossintéticos e, conseqüentemente, na produção de um menor número de metabólitos de interesse (MARMANN et al., 2014; MOUSSA et al., 2019). Para amenizar este problema, várias estratégias para promover a eliciação do metabolismo secundário microbiano podem ser utilizadas (RAMADAN et al., 2015). Uma delas é o co-cultivo, técnica que envolve a cultura de duas espécies distintas concomitantemente em um mesmo recipiente, e que representa uma maneira simples e barata (porém bastante promissora) de induzir a produção de metabólitos secundários no meio de cultura por torná-lo um ambiente competitivo, favorecendo o *crosstalk* entre as espécies e o estabelecimento de mecanismos químicos de defesa entre elas (ZUCK; SHIPLEY; NEWMAN, 2011; SCHERLACH; GRAUPNER; HERTWECK, 2013). De fato, o estresse gerado pelo co-cultivo pode gerar compostos com atividade antimicrobiana, anti-câncer e fitotóxica (BERTRAND et al., 2013a, 2013b).

Exemplos de novos compostos e/ou aumento da produção de determinados compostos (em relação às culturas axênicas) obtidos a partir desta técnica incluem inibidores de crescimento reportados em um co-cultivo entre *Trichophyton rubrum* e *Bionectria ochroleuca* (BERTRAND et al., 2013a); o alcalóide de atividade bactericida aspergicina (**8**) produzido a partir do co-cultivo de duas espécies de *Aspergillus* (ZHU et al., 2011); os diterpenóides de ação citotóxica libertelenonas A (**9**) e D (**10**) oriundos do cultivo de uma α -proteobacteria marinha (CNJ-328) e o fungo *Libertella* sp. (CNL-52) (OH et al., 2005); a

glionitrina A (**11**), composto com atividades antibióticas e anti-tumorais obtido do cultivo entre a bactéria *Sphingomonas* sp. (KMK-001) e o fungo *Aspergillus fumigatus* (PARK et al., 2009). Em relação a co-cultivos envolvendo actinobactérias, temos o relato de aumento na produção do composto antibiótico lateropirona (**12**) e diversas outras moléculas crípticas em uma cultura de *Streptomyces lividans* e *Fusarium tricinctum* (tais compostos também foram encontrados nas culturas axênicas, mas em quantidades muito baixas) (MOUSSA et al., 2019); os potentes compostos algicidas triptamida (**13**) e bacilamida (**14**), de potenciais aplicações no controle de florações de cianobactérias produtoras de toxinas, foram produzidos em quantidades consideráveis em um co-cultivo entre *Streptomyces* sp. (CGMCC4.7185) e *Bacillus mycoides* (YU; HU; MA, 2015); os compostos bactericidas emericelamidas A (**15**) e B (**16**) foram obtidos de um co-cultivo entre o fungo de origem marinha *Emericella* sp. (CNL-878) com a actinobactéria marinha *Salinispora arenicola* (OH et al., 2007).

Apesar do co-cultivo poder ser realizado tanto em meios de cultura líquidos quanto em sólidos, estes últimos possuem algumas vantagens sobre os primeiros, provavelmente por possuírem maior similaridade às condições ambientais nas quais os microrganismos se desenvolvem (BERTRAND et al., 2013b). Por exemplo, cultivos em meio sólido já demonstraram resultar em um número significativamente maior de metabólitos produzidos por diversas espécies, em relação ao meio líquido (CRÜSEMANN et al., 2017; FAN et al., 2019). Além disso, é possível inferir a colônia de origem de determinados metabólitos a partir da região da placa onde o meio foi coletado (SERRANO et al., 2017). Em resumo, o co-cultivo representa uma boa metodologia para ativação de vias biossintéticas crípticas, o que por sua vez implica em um grande potencial para se detectar novos compostos ativos (BRAKHAGE, 2013; NETZKER et al., 2015).

Figura 2. Exemplos de moléculas produzidas por diversos microrganismos em condições de co-cultivo.

2.5. Abordagens metabolômicas para a descoberta e caracterização de produtos naturais microbianos

Conceitualizada na década de 1950 (SCHNEIDER; TENER; STRONG, 1952), a técnica de isolamento de compostos bioativos guiada por bioensaios foi extremamente importante para a descoberta de novas moléculas ao longo das últimas décadas e ainda hoje é utilizada por pesquisadores acadêmicos e pela indústria farmacêutica. Basicamente, tal metodologia consiste em: a) obter uma amostra que apresente alguma atividade de interesse, b) realizar nela um procedimento de extração com solventes orgânicos, c) fracionar os extratos através de cromatografia, d) realizar bioensaios com os extratos obtidos, e) isolar as

moléculas presentes nos extratos ativos, f) promover novos bioensaios com as moléculas puras e g) identificá-las com técnicas espectroscópicas (NEWMAN; CRAGG, 2012). Apesar de sua relevância, esta técnica apresenta alguns aspectos negativos relacionados a sua aplicação, sendo o principal deles a elevada taxa de isolamento de compostos já conhecidos (BERTRAND et al., 2013a). Além disso, é comum que durante os fracionamentos as amostras obtidas deixem de apresentar ou diminuam sua atividade (neste caso, por ela se dever a efeitos sinérgicos) ou que os compostos bioativos se degradem ao longo dos processos cromatográficos (NOTHIAS et al., 2018).

Para evitar o reisolamento de compostos, é importante que se promova desde os estágios iniciais da pesquisa a derreplicação (*i.e.* identificação) das moléculas já descritas presentes em uma amostra, o que minimiza custos e esforço e otimiza o tempo gasto no processo (GERWICK; MOORE, 2012). Estratégias para derreplicação geralmente envolvem a utilização de uma técnica espectroscópica como LC-MS, LC-MS/MS, LC-RNM ou LC-MS-RNM (JOHANSEN et al., 2011; WUBSHET et al., 2012) e buscam explorar o fato de que moléculas idênticas ou com estruturas quimicamente semelhantes tendem a possuir propriedades similares quanto aos perfis de fragmentação de massas e ressonância magnética, tempo de retenção cromatográfico, entre outros (YANG et al., 2013). Sendo assim, é possível por exemplo se obter informações sobre as massas dos íons precursores de moléculas de um extrato e buscar manualmente por moléculas com as mesmas massas em bancos de dados como o “Dictionary of Natural Products” (DNP) (BUCKINGHAM, 1997) e o ‘AntiBase’ (LAATSCH, 2010). Entretanto, os dados de MS/MS são mais discriminativos que a massa dos íons precursores em si (pois provém informações sobre a estrutura química das moléculas), e por esse motivo o uso de espectrometria de massas *in tandem* (MS/MS) para derreplicação de produtos naturais é mais efetivo. Recentemente, tivemos o desenvolvimento de uma série de ferramentas de bioinformática que utilizam dados de MS/MS para promover a caracterização química e anotação de compostos em amostras complexas, como o Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) (WANG et al., 2016).

O Molecular Networking (MN), introduzido em 2012 (WATROUS et al., 2012), hoje é uma das ferramentas mais utilizadas para a análise e anotação de dados de MS/MS não direcionados (*untargeted mass spectrometry*) (FOX RAMOS et al., 2019). O MN utiliza algoritmos computacionais capazes de comparar os espectros de MS/MS das amostras com espectros de referência (permitindo a derreplicação) e vai além disso, comparando os espectros das moléculas entre si e agrupando-as quando certo grau de similaridade é encontrado (GUTHALS et al., 2012; WATROUS et al., 2012). Considera-se que moléculas

agrupadas em um mesmo cluster serão sempre pertencentes a uma mesma classe ou ‘família’ molecular (o termo *molecular family* também é empregado para designar clusters moleculares), e geralmente diferirão umas das outras por alterações pequenas que podem ser detectadas observando-se diferenças em seus pesos moleculares (por exemplo, uma diferença de 14 Da sugere a adição de um grupo CH₂, já uma de 16 Da sugere uma oxigenação) (NOTHIAS et al., 2018). As redes moleculares geradas podem ser visualizadas com o software Cytoscape (CLINE et al., 2007), onde cada nodo representa um íon da amostra. Além do MN ‘clássico’ (que utiliza arquivos sem processamento prévio, em formatos como .mzxml, .mzml, entre alguns outros), também há a possibilidade de se utilizar o chamado Feature Based Molecular Networking (FBMN) quando se opta por pré-processar os dados manualmente em softwares específicos como o Mzmine 2 (NOTHIAS et al., 2019). Tal abordagem é vantajosa em diversos aspectos, pois integra à análise variáveis como tempo de retenção e quantificação dos íons, além de permitir a detecção de isômeros (NOTHIAS et al., 2019). O pré-processamento dos dados também facilita a integração do FBMN com análises estatísticas (NOTHIAS et al., 2019).

O GNPS possui uma biblioteca espectral própria que conta com mais de 70.000 compostos (VINAIXA et al., 2016) e que permite que os próprios usuários do sistema disponibilizem seus espectros à comunidade. Ainda assim é comum que, dependendo da origem das amostras analisadas, seja possível identificar somente um pequeno número de moléculas através dela. Contra este problema, uma possível solução é integrar bancos de dados próprios (com dados experimentais de MS/MS obtidos *in house*) ao GNPS (FOX RAMOS et al., 2017). Outra alternativa é utilizar ferramentas baseadas em fragmentação *in silico*, constituídas por algoritmos capazes de prever possíveis padrões de fragmentação para os compostos de determinado banco de dados estruturais previamente disponível, baseando-se somente em suas estruturas químicas. Como exemplo, temos o UNPD-ISDB (ALLARD et al., 2016). Gerado a partir da ‘Universal Natural Products Database’ (composta por 197.201 produtos naturais) (GU et al., 2013) e integrado ao MN feito na plataforma do GNPS, esta ferramenta possibilitou a identificação de compostos em diversos trabalhos (OPPONG-DANQUAH et al., 2018; FAN et al., 2019). Recentemente, a plataforma online do GNPS introduziu o Networking Annotation Propagation (NAP) (DA SILVA et al., 2018), baseado no algoritmo de fragmentação *in silico* MetFrag (RUTTKIES et al., 2016). O NAP é capaz de utilizar a topologia do MN (*i.e.* a conformação dos clusters, que reflete a similaridade entre as moléculas) e os *hits* obtidos da biblioteca do GNPS (caso existam) para ranquear as moléculas

candidatas a cada nodo, aumentando as chances de anotar corretamente os compostos e facilitando a conferência manual dos resultados (FOX RAMOS et al., 2019). Além disso, ele reúne espectros gerados a partir de seis diferentes bancos de dados de livre acesso, incluindo o Super Natural II (BANERJEE et al., 2015), que compreende mais de 326.000 compostos. Por sua fácil aplicação e prática visualização dos resultados, além do fato de estar integrado à plataforma GNPS, o NAP vem sendo utilizado para derreplicação de compostos em diversos trabalhos na área de produtos naturais microbianos (KANG et al., 2018; NOTHIAS-ESPOSITO et al., 2019; REMY et al., 2019). Ainda dentro deste contexto, outra ferramenta promissora é o SIRIUS 4 (DÜHRKOP et al., 2019), capaz de calcular a fórmula molecular de um composto com base em seus dados de MS1 e MS/MS e ainda retornar estruturas moleculares (dentre as existentes dentro de banco de dados como PubChem (ACLAND et al., 2013) e ChemSpider (WILLIAMS; TKACHENKO, 2014)) que melhor explicam os dados experimentais obtidos para um dado íon, com base no algoritmo CSI:FingerID (DÜHRKOP et al., 2015). Cabe ressaltar que, apesar da eficiência considerada satisfatória tanto das ferramentas que utilizam bibliotecas espectrais quanto das que utilizam os algoritmos de fragmentação *in silico*, ainda é sempre necessário conferir manualmente os resultados gerados. Espera-se que estas ferramentas sejam constantemente melhoradas para aumentar sua acurácia, principalmente através da aplicação de *machine learning* em grandes bancos de dados (BLAŽENOVIC et al., 2018).

3. OBJETIVO

Investigar o potencial antifúngico de uma linhagem endofítica da actinobactéria *S. lunalinharesii* (isolada de um espécime de *A. urvilleanum* na ilha de Palmas, São Paulo, Brasil) utilizando o co-cultivo com o fungo *Rhizoctonia solani* para eliciação de seu metabolismo secundário.

Para tanto, focam-se as seguintes metas:

- Realizar ensaios antagônicos de cultivo pareado em meio sólido com o fungo fitopatogênico *R. solani*, verificando a interação entre as colônias através de análise visual e com microscopia eletrônica de varredura;
- Realizar o co-cultivo e cultivos axênicos para obtenção de extratos metabólicos, para o MN;
- Derreplicar os compostos presentes nos extratos através de ferramentas *in silico* e através de buscas manuais em bancos de dados de produtos naturais;
- Selecionar através do MN e de análises estatísticas possíveis metabólitos secundários inéditos produzidos pela actinobactéria quando em co-cultivo com o *R. solani*;
- Avaliar os extratos em ensaios fungitóxicos contra o *R. solani in vitro*;

4. METODOLOGIA

4.1. Amostragem, isolamento, purificação, preservação e identificação das linhagens (etapas realizadas previamente a este trabalho por membros do grupo de pesquisa)

A coleta do material de trabalho foi realizada em outubro de 2016 na Ilha de Alcatrazes (24°10'S, 45°70'W), pertencente ao município de São Sebastião, e na Ilha de Palmas (23°33'S, 45°02'W), município de Ubatuba, ambas localizadas no litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil. Foram coletados espécimes de *Anthurium alcatrazense*, espécie endêmica na ilha de Alcatrazes, e de *Anthurium urvilleanum* na Ilha de Palmas. Para isolamento das actinobactérias endofíticas foram utilizados três meios de cultivo diferentes (Amido-Caseína-Ágar, Ácido húmico com vitamina B10 e Vitamina-Arginina-Ágar). Todos os meios de cultivo foram acrescidos do antibiótico Tetraciclina (100 mg mL⁻¹) e do fungicida Nistatina (100 mg mL⁻¹). As placas de Petri inoculadas foram transferidas ao Laboratório de Microbiologia e Química Orgânica de Produtos Naturais da ESALQ/USP. A medida em que foi observado o crescimento de actinobactérias nas placas, estas foram codificadas e transferidas para novas placas contendo meio sólido Amido-Caseína-Ágar até a obtenção dos isolados puros, que foram posteriormente preservados pelo método Castellani (PIMENTEL; FIGUEIREDO, 1989) e pela técnica de criopreservação. Tais procedimentos foram realizados pelas colaboradoras Diana Fortkamp e Joelma Marcon.

Para identificação das linhagens, utilizou-se o kit Ultra Clean® Microbial DNA Isolation MoBio para extração de DNA, seguindo-se as especificações do fabricante. O gene que codificante do rRNA 16S foi amplificado (TURNER et al., 1999) utilizando-se o primer universal 8F (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG). As sequências foram comparadas com sequências de linhagens tipo utilizando o servidor EzTaxon-e (KIM et al., 2012). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Das linhagens de actinobactérias obtidas, seis foram identificadas como *S. lunalinharesii*, as quais receberam os seguintes códigos: A5.1, A15A, A15B, A42B, A54A e A54B. Estes procedimentos foram realizados pela Ms. Lucianne F. P. Oliveira.

O isolado do fungo *R. solani* utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela EMBRAPA - Meio Ambiente. Esta linhagem, identificada como CMAA 1589, foi isolada a partir de uma planta de orégano (*Origanum vulgare*) infectada.

4.2. Ensaio de cultivo pareado

O bioensaio antagonista visou avaliar a interação entre as seis linhagens de *S. lunalinharesii* com a linhagem fúngica fitopatogênica *R. solani*, a fim de selecionar apenas um isolado para ser analisado nas etapas posteriores do trabalho. Foi utilizada a técnica de cultivo pareado conforme metodologia descrita por Khamna et al. (2009), com algumas modificações. Os isolados foram inoculados por *plug* em placas de Petri contendo meio BDA, a 1 cm da borda, dois dias antes da inoculação do fitopatógeno. Os *plugs* do fungo foram acondicionados nas placas exatamente do lado oposto ao das actinobactérias, também a 1 cm da borda. Ensaios com placas controle foram realizados somente com a presença do fungo e somente com a presença das actinobactérias para avaliação de crescimento. Após a incubação por cinco dias a 30°C, o tipo de interação entre as colônias das actinobactérias e do fungo foi anotado segundo Bertrand et al. (2013), foram registradas imagens das placas e estas foram visualizadas no programa *ImageJ* (Image Processing and Analysis in Java) para o cálculo da porcentagem de inibição (PI) de cada isolado, expresso como a razão entre a área da zona de inibição e a área total da placa. Os tratamentos foram realizados em triplicata, sendo as médias calculadas e comparadas através do teste de Tukey ($p < 0,01$), utilizando-se o software R.

Foi realizado estudo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com a linhagem que demonstrou maior PI no ensaio de cultivo pareado. Para isso, novas placas foram preparadas com as actinobactérias e o fungo e a partir destas foram coletadas porções quadrangulares (com aproximadamente 1 cm de lado) do micélio fúngico na borda da zona de inibição de seu crescimento. Também foram coletadas porções do micélio em cultivos axênicos do fungo, para controle. As amostras foram fixadas com glutaraldeído (2,5%) e paraformaldeído (2%) em tampão cacodilato (0,05 M) por 24 horas. Após esse período, foram realizadas três lavagens com o tampão e as amostras foram desidratadas com etanol em lavagens sucessivas num gradiente de concentração do solvente de 30 a 100%. As amostras desidratadas passaram por secagem em ponto crítico de CO₂, foram afixadas em *stubs* e cobertas com uma película de ouro. As observações foram feitas no aparelho LEO 435-VP, do Laboratório de Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA) da ESALQ/USP.

4.3. Extração de metabólitos a partir do co-cultivo

Este procedimento foi realizado conforme descrito por Bertrand et al. (2013), com modificações. A linhagem de *S. lunalinharesii* selecionada a partir do ensaio de cultivo

pareado foi novamente crescida em co-cultivo com o fungo *R. solani* em meio BDA por cinco dias e, após este período, foi coletada a região da placa correspondente à zona de inibição (Zi) do crescimento do fungo (Figura 3).

Figura 3. Região do meio coletada a partir do co-cultivo. Zi: zona de inibição; Ac: colônia da actinobactéria.

Também foi coletado meio a partir de cultivos axênicos para controle, tanto da actinobactéria quanto do fungo, e meio estéril (sem inoculação de microrganismos, para aquisição do branco). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata. O material foi acondicionado em tubos de ensaio de vidro e liofilizado. A extração foi realizada em um sonicador (15 minutos por amostra) com os solventes CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O (64:36:8), utilizando-se 20 mL da mistura de solventes para cada 300 mg de material seco. Posteriormente, as amostras foram filtradas com lã de vidro e secas sob vácuo. Para remoção dos compostos mais apolares, que são incompatíveis com a cromatografia em fase reversa, as amostras foram ressuspensas em água ultrapura e eluídas em colunas Discovery® DSC₁₈ SPE, sendo secas sob vácuo novamente após este processo. Cerca de 1 mg de cada amostra obtida foi enviado para realização de cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas *in tandem* (UPLC-MS/MS), em parceria com o Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

4.4. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-MS/MS)

Para esta análise as amostras foram ressuspensas em ACN, atingindo-se a concentração de 1 mg mL^{-1} , sendo injetados 10 μL no equipamento Acquity UPLC H Class - Xevo G2-XS Qtof (Waters), operando em modo eletrospray com faixa de detecção entre 100 a 1500 Da e energia de ionização 1,2 Kv. Os valores de m/z foram gravados no modo

centroide, sendo realizadas detecções em modo positivo. A aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa MassLynx. A fase estacionária utilizada foi uma coluna Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) e a fase móvel foi em gradiente de (A) água ultrapura (acrescida 0,1% de ácido fórmico) em (B) ACN grau HPLC (acrescida 0,1% de ácido fórmico), iniciando a corrida em 90A:10B (durante seis minutos), 50A:50B (por três minutos), 2A:98B (um minuto), totalizando dez minutos de análise, com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

4.5. Análise dos dados de UPLC-MS/MS

Os dados brutos foram primeiramente convertidos do formato 'raw' para 'mzXML' com o software MSConvert (ProteoWizard) (CHAMBERS et al., 2012) e depois processados com o software MZmine 2 utilizando-se as seguintes etapas e parâmetros: a) detecção de massas (níveis de ruído atribuídos como 5000 para MS1 e 3000 para MS2), b) construção dos cromatogramas (tempo mínimo de duração dos picos: 0,1 minuto; altura mínima dos picos: 5000; tolerância para m/z : 0,02 Da), c) deconvolução dos cromatogramas (algoritmo *local minimum search*; variação mínima no tempo de retenção: 0,1 minuto; limiar cromatográfico: 70%; altura mínima relativa: 1%; altura mínima absoluta: 5000; variação na duração dos picos: 0,05 - 1 minuto), d) agrupamento dos picos isotópicos (tolerância para m/z : 0,02 Da; tolerância para tempo de retenção: 0,1 minuto; pico mais intenso como representativo), e) alinhamento (algoritmo *join aligner*; tolerância para m/z : 0,02 Da, ponderação para m/z : 75%; tolerância para tempo de retenção: 0,1 minuto; ponderação para tempo de retenção: 25%), f) filtragem dos dados (mínimo de picos presentes em uma mesma coluna: 2; mínimo de picos presentes em um padrão isotópico: 2) e g) exportação de dados para o GNPS (manter somente picos com dados de MS/MS). O arquivo com os dados espectrais (formato .mgf) e a tabela de quantificação dos compostos (formato .csv), ambos gerados com o Mzmine 2, e também uma tabela de meta-dados contendo informações sobre as amostras foram utilizados para criar um MN através do *workflow* do FBMN, no site do GNPS. Os dados foram filtrados para remover picos relativos ao meio de cultivo e solventes. As tolerâncias para massa do íon precursor e para os fragmentos dos íons nos espectros de MS/MS foram ambas estabelecidas em 0,02 Da. As redes foram criadas considerando-se o valor mínimo de cosseno de 0,7 e no mínimo seis picos em comum entre os nodos. Os espectros presentes no MN foram confrontados com o banco de dados do GNPS. A rede gerada foi importada para visualização no software

Cytoscape, onde o plugin *Venn and Euler Diagrams* foi utilizado para gerar um diagrama de Venn para comparação quantitativa dos íons registrados no MN entre as diferentes amostras.

Utilizamos a ferramenta NAP para derreplicação *in silico* dos compostos, selecionando o banco de dados Super Natural II e considerando os adutos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ para as buscas. O programa MS2LDA (WANDY et al., 2018) foi empregado para identificar padrões de fragmentação e perdas neutras (que geralmente representam subestruturas moleculares) entre os espectros de MS/MS dos nodos do MN. Para uma melhor compreensão das redes moleculares geradas pelo MN, utilizamos o MolNetEnhancer (ERNST et al., 2019), que permitiu a visualização das classes e sub-classes químicas anotadas com maior probabilidade de acerto para cada cluster, facilitando a verificação dos resultados do NAP. Por fim, investigamos manualmente as fórmulas moleculares indicadas pelo software SIRIUS (versão 4.0.1) e as fórmulas estruturais indicadas como candidatas pelo NAP para os compostos selecionados nos bancos de dados The Natural Products Atlas (NPA) (SANTEN et al., 2019), SciFinder (<https://www.cas.org/pt-br/products/scifinder>) e StreptomeDB 2.0 (KLEMENTZ et al., 2016) (onde realizamos buscas por similaridade estrutural, coeficiente de Tanimoto > 0,85), sempre buscando registros que nos indicassem a produção destes compostos por actinobactérias do gênero *Streptomyces*. Também buscamos por dados de MS/MS das moléculas candidatas, para comparação com nossos dados experimentais. Em suma, somente consideramos um candidato como identificação provavelmente correta se obtivemos indício de sua produção por *Streptomyces* e conseguimos comparar dados espectrais disponíveis na literatura com os dados que possuímos.

4.6. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas, utilizamos a ferramenta MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2018). Os dados foram pré-processados no Mzmine 2 segundo os mesmos parâmetros descritos no item 4.5, com duas alterações: a) o passo ‘preenchimento de lacunas’ (algoritmo *peak finder multi-threaded*; tolerância de intensidade: 1%; tolerância para m/z : 0,02 Da; tolerância para tempo de retenção: 0,2 minutos) foi realizado após a filtragem dos dados e b) a exportação dos dados foi feita para o MetaboAnalyst. Os íons oriundos dos brancos do meio de cultivo e solventes foram excluídos, e os dados foram normalizados através de uma transformação logarítmica e do escalonamento de Pareto. Também foi necessário filtrar os dados antes das análises, visto que o preenchimento de lacunas no Mzmine 2 pode gerar ruídos que interferirão nos resultados finais (HACKSTADT; HESS, 2009). Para isso, utilizamos o algoritmo *mean intensity value* no MetaboAnalyst. A análise de agrupamento

hierárquico (*hierarchical clustering analysis*, HCA) dos íons mais significantes (ANOVA, $p < 0,05$) entre as amostras correspondentes ao co-cultivo e os cultivos axênicos foi utilizada para montagem de um *heatmap*, onde os íons de maior abundância foram exibidos em tons de vermelho e os de menor abundância em azul. A HCA foi construída ponderando-se a distância Euclideana e o algoritmo de agrupamento de Ward. Performamos uma análise de componentes principais (*principal component analysis*, PCA) com o conjunto de dados e geramos um *volcano plot* (diferença de intensidade mínima de três vezes entre os conjuntos de dados, $p < 0,05$) para melhor visualizar os íons produzidos em maior quantidade na condição de co-cultivo em relação aos cultivos axênicos.

4.7. Teste de Inibição do Crescimento Micelial (*‘Poisoned Food’*)

A atividade dos extratos contra o *R. solani* foi avaliada pelo teste de Inibição do Crescimento Micelial (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988), com algumas modificações. Resumidamente, após ressuspensão em solução de DMSO e água destilada esterilizada (1:9), os extratos foram adicionados a meio BDA, obtendo-se a concentração final de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. *Plugs* de 5 mm de raio contendo micélio do *R. solani* foram adicionados ao centro das placas com os extratos, que foram incubadas a 28°C por dois dias. Como controle positivo, utilizamos os fungicidas Fox® e Piori Xtra®, comercialmente utilizados contra o *R. solani* em grandes culturas (soja e arroz, respectivamente), com seus princípios ativos diluídos na mesma concentração dos extratos, e como controle negativo utilizamos a mesma quantidade da solução de DMSO 10% adicionada ao meio, sem extratos. O crescimento radial do fungo nas placas foi mensurado a partir da borda do *plug* até a distância máxima atingida pela colônia na placa. A inibição do crescimento observada nos tratamentos, em relação ao controle, foi calculada de acordo com (GAMLIEL; KATAN; COHEN, 1989), segundo a equação:

$$\text{Porcentagem da inibição do crescimento (PIC)} = 100 - \left[\left(\frac{R^2}{r^2} \right) \times 100 \right],$$

onde R e r representam, respectivamente, os raios das colônias do fungo nos tratamentos e no controle. Cada tratamento foi testado em quadruplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação do ensaio antagônico entre as linhagens de *S. lunalinharesii* e *R. solani*

O co-cultivo performed em placas de Petri entre diferentes isolados microbianos pode resultar em quatro principais tipos de interação: a) inibição a distância, b) inibição por contato direto, c) *overgrowth* (i.e. quando uma linhagem cresce em sobreposição à outra) e d) contato direto com formação de linhas de delimitação entre as colônias (BERTRAND et al., 2013b). Neste trabalho, o tipo de interação observado foi a inibição a distância (Figura 4). Com isso, foi possível calcular a porcentagem de inibição dos isolados frente ao fungo (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de inibição entre as linhagens de *S. lunalinharesii* e o fitopatógeno *R. solani*. Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,01$) de acordo com o teste de Tukey.

Linhagem	Local de coleta	Planta de origem	Fonte	PI (%)
A5.1	Palmas	<i>A. urvilleanum</i>	Folha	31,71 b
A15A	Palmas	<i>A. urvilleanum</i>	Raiz	36,47 a
A15B	Palmas	<i>A. urvilleanum</i>	Raiz	29,57 c
A42B	Alcatrazes	<i>A. alcatrazense</i>	Folha	32,29 b
A54A	Palmas	<i>A. urvilleanum</i>	Folha	33,40 b
A54B	Palmas	<i>A. urvilleanum</i>	Folha	26,58 d

Figura 4. Cultivo pareado entre o fungo fitopatogênico *R. solani* e as linhagens de *S. lunalinharesii*, realizado em meio BDA por um período de 5 dias, a 28°C. a) A5.1; b) A15A; c) A15B; d) A42B; e) A54A; f) A54B; g) controle do *R. solani*.

O isolado A15A, obtido da raiz de *A. urvilleanum*, foi aquele com maior PI frente ao *R. solani*. Por tal motivo, esta linhagem foi selecionada para as etapas posteriores deste

estudo. Por propiciar a visualização da interação entre os microrganismos (GLAUSER et al., 2009), o co-cultivo em meio sólido permite que se selecione partes específicas do meio para posterior extração e análise. Regiões diferentes da placa de Petri podem apresentar diferentes perfis metabólicos (SERRANO et al., 2017), e priorizar a região da interação pode facilitar a identificação e/ou isolamento dos compostos produzidos devido à comunicação química entre os isolados. Assim, neste trabalho optou-se por coletar somente o meio de cultivo relativo à zona de inibição nas placas.

Com a MEV foi possível melhor compreender como o antagonismo frente à actinobactéria afeta o fitopatógeno (Figura 5).

Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *Rhizoctonia solani* em cultivo axênico (a e b) e em cultivo pareado com *Streptomyces lunalinharesii* linhagem A15A (c, d, e e f).

Esta técnica permitiu observar as hifas ramificadas características do fungo quando cultivado na ausência de antagonistas (5a e 5b). Quando crescido na presença da actinobactéria, houve formação de poros na superfície das hifas (5c), enrugamento do micélio e encurvamento das extremidades das hifas (5c e 5d). Também foi possível observar a perda de crescimento apical (5e) e encolhimento e lise das hifas (5e e 5f). Resultados semelhantes aos aqui observados, em relação às alterações causadas ao fungo, foram encontrados em cultivo pareado entre *R. solani* e *Bacillus pumilus* (HUANG et al., 2012), entre *R. solani* e *Paenibacillus illinoisensis* (JUNG et al., 2003) e entre *R. solani* e *Streptomyces toxytricini* (PATIL et al., 2010). Todavia, tais trabalhos não buscaram isolar metabólitos secundários que poderiam possivelmente estar relacionados à inibição do crescimento do fitopatógeno, se limitando a caracterizar a interação entre os microrganismos (HUANG et al., 2012) ou a testar os antagonistas somente quanto a produção de quitinases (JUNG et al., 2003; PATIL et al., 2010). No melhor de nosso conhecimento, somente um estudo utilizou a MEV para avaliar alterações estruturais no micélio de *R. solani* após exposição a extratos de origem natural. Em Plodpai et al. (2013), as hifas do fungo se tornaram enrugadas quando tratadas com extratos brutos da planta *Desmos chinensis*, que continham biflavonas, derivados de éster benzoato e derivados do ácido benzóico (moléculas de conhecida atividade antifúngica). Esta referência nos deu indícios de que as alterações nas estruturas fúngicas podem de fato ocorrer pela ação de metabólitos secundários.

5.2. Análise das amostras por Molecular Networking

O FBMN permitiu observar os perfis metabólicos dos isolados nas diferentes condições de cultivo. Obtivemos um total de 311 nodos, dos quais 99 foram organizados em 17 clusters com pelo menos dois íons (Figura 6A).

Figura 6. A) FB-MN com íons obtidos do co-cultivo (em rosa), do cultivo axênico da actinobactéria (em azul) e do cultivo axênico do fitopatógono (em verde). *Self-loops* foram omitidos da imagem. Clusters em destaque possuem íons produzidos somente pela actinobactéria B) Maior cluster onde constam somente íons produzidos pela actinobactéria, em cultivo axênico e em co-cultivo com o fungo. C) Diagrama de Venn com o total de íons observados entre as amostras.

Neste trabalho, filtramos os espectros de MS/MS de baixa qualidade (*i.e.* espectros que apresentam muito ruído) no pré-processamento dos dados com o MZMine 2 (etapa ‘*deteção de massas*’) para que pudéssemos obter uma rede que refletisse da melhor maneira possível a real proporção do número de compostos presentes entre as amostras. Sendo assim, podemos assumir que o co-cultivo induziu um aumento significativo na produção de moléculas, com 88 íons detectados no MN (28% do total) sendo observados exclusivamente neste tratamento (Figura 6C). Apesar da maioria dos clusters conterem íons oriundos das três amostras, três deles são formados por compostos provavelmente produzidos unicamente pelas actinobactérias (circulados na figura 6A). O cluster destacado na Figura 6B, por exemplo, é composto por um íon detectado somente no cultivo axênico da actinobactéria (m/z : 531,2594, t_R : 5,25 minutos) e mais três íons detectados somente em condições de co-cultivo (porém muito provavelmente produzidos pela actinobactéria por fazerem parte da mesma classe química de um composto sintetizado por ela em modo axênico) (m/z : 531,2594, t_R : 4,88

minutos; m/z : 515,2639, t_R : 5,58 minutos; m/z : 533,9823, t_R : 5,59 minutos). É interessante notar que há dois nodos com o mesmo valor de m/z porém com valores distintos de t_R , o que pode ser um indicativo de que estes íons sejam isômeros. O FBMN permite que se diferenciem moléculas com determinados tipos de isomeria (*e.g.* isômeros de posição), o que não seria possível no MN clássico (NOTHIAS et al., 2019). Nosso FBMN pode ser acessado na plataforma GNPS através do link:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=d01fd0f9463c4f39b26f2790c069dd0d>

5.3. Estudo estatístico aplicado à metabolômica

Estudos em metabolômica geralmente envolvem conjuntos de dados muito grandes, relativos aos metabólitos detectados em amostras biológicas. Assume-se que a presença/ausência de certos compostos ou suas variações quantitativas entre extratos podem refletir as diferentes condições biológicas testadas (*e.g.* diferentes fontes de carbono fornecidas em um meio de cultivo, cultivos axênicos *versus* co-cultivo), e é um desafio tentar identificar quais metabólitos de fato são produzidos diferencialmente pelas condições avaliadas em um estudo em detrimento aos demais, cuja ocorrência não se relaciona aos fenômenos investigados (SACCENTI et al., 2014). A análise estatística de dados em metabolômica viabiliza o exame comparativo entre diferentes amostras e compostos nelas presentes. Ela geralmente envolve métodos multivariados, capazes de possibilitar a exploração de centenas ou milhares de variáveis em um conjunto de dados simultaneamente (TRYGG; HOLMES; LUNDSTEDT, 2007), mas métodos em estatística univariada, onde cada variável é analisada isoladamente (SOKAL; ROHLF, 1995), também são empregados.

A figura 7 apresenta os resultados da HCA dos íons mais significativos presentes em nossos tratamentos e a PCA baseada na quantificação dos íons encontrados entre as amostras.

Figura 7. A) *Heatmap* gerado a partir da HCA dos íons mais significativos ($p < 0,05$) presentes nas amostras. B) *Scores plot* da PCA baseada na tabela de quantificação dos íons encontrados entre as amostras. Legendas: a monocultura da actinobactéria é representada pela cor vermelha, o co-cultivo pela cor verde e a monocultura do fungo pela cor azul.

A PCA não-supervisionada é amplamente utilizada para a comparação dos perfis metabólicos entre amostras oriundas de diferentes tratamentos (CHEN; GONZALEZ; IDLE, 2007; WORLEY; POWERS, 2013). No presente estudo, os dois primeiros componentes da PCA explicaram 69% da variância observada entre as amostras (sendo 41.4% da variância explicada pela PC1 e 27.6% pela PC2). Conforme demonstrado pelo *Scores Plot* (Figura 7B), o tratamento relativo ao co-cultivo é metabolicamente distinto das monoculturas, que também diferem entre si. Além disso, o agrupamento aqui observado das réplicas de cada tratamento é indicativo da reprodutibilidade do experimento (OPPONG-DANQUAH et al., 2018). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para a comparação das diferenças na produção de metabólitos entre os três tratamentos. Um total de 459 variáveis significativas ($p < 0,05$) foram identificadas e uma HCA foi utilizada para gerar um *heatmap* mostrando a distribuição destas entre as amostras (Figura 7A). Um cluster com 119 íons encontrados em altas abundâncias no co-cultivo e em pequenas quantidades nos demais tratamentos (Figura 7A, em evidência) nos chamou a atenção. Este resultado reforça o que foi observado através do

diagrama de Venn realizado com o MN (Figura 6C), indicando que o co-cultivo induz a produção de um elevado número de metabólitos não encontrados nos cultivos axênicos. Cabe aqui ressaltar que o número de íons detectados nas análises estatísticas foi maior que no MN provavelmente pelo fato de que, para este último, somente *features* que possuem dados de MS/MS são analisados (as análises estatísticas utilizam dados de MS, somente). Além disso, a filtragem dos dados realizada no MetaboAnalyst também pode acabar removendo algumas das informações que foram consideradas pelo GNPS para montagem do MN. Sendo assim, é normal que haja uma pequena diferença entre os íons identificados por estas duas abordagens.

Volcano plots são representações gráficas bidimensionais que mostram a significância estatística (p-valor) de cada variável no eixo y e sua variação quantitativa no eixo x. Recentemente, eles vêm sendo amplamente utilizados para identificar metabólitos com padrões de covariância significativos em comparações binárias entre extratos (HUR et al., 2014; LOPEZ et al., 2019; MACHUSHYNETS et al., 2019). Neste trabalho, os extratos do co-cultivo foram avaliados contra todas as amostras relativas às monoculturas, consideradas em conjunto. O *volcano plot* gerado evidenciou quais foram os compostos diferencialmente produzidos no co-cultivo (Figura 8).

Figura 8. *Volcano plot* explicitando diferenças nos perfis metabólicos entre as monoculturas (representada no quadrante à esquerda) e o co-cultivo (quadrante à direita). Os eixos x e y representam, respectivamente, o log2 da variação quantitativa dos compostos (fold change, FC) e o -log10 do p-valor de todos os metabólitos. Os círculos em rosa representam íons cuja diferença de intensidade diferiu ao menos três vezes entre os conjuntos de dados. Íons destacados em vermelho são provavelmente produzidos pelas actinobactérias, já aqueles em preto não puderam ter sua origem predita.

Ressaltamos que, devido a presença de dois microrganismos distintos no meio de cultivo, é difícil confirmar qual deles produziu cada composto assinalado sem considerações adicionais. Sendo assim, levamos em conta o MN para prever as moléculas possivelmente produzidas pelas actinobactérias no co-cultivo, considerando os três clusters onde foram unicamente encontrados íons dos cultivos axênicos da actinobactéria e do co-cultivo (sem íons produzidos pelo fungo em cultivo axênico) (Figura 6, em destaque). Dos quatro metabólitos produzidos no co-cultivo com maiores variações quantitativas e significâncias estatísticas (localizados na parte superior direita do *volcano plot*), dois foram encontrados no MN (m/z : 518,27; 540,27) (Figura 9), porém não puderam ter seu microorganismo produtor predito. Ainda assim, estes íons (e os demais de seus clusters) também foram priorizados para derreplicação devido a sua abundância nas amostras.

Figura 9. Clusters onde se encontram os dois íons com maior variação quantitativa e significância estatística do co-cultivo. Íons obtidos do co-cultivo estão coloridos em rosa, íons do cultivo axênico da actinobactéria em azul e do cultivo axênico do fitopatógeno em verde.

5.4. Derreplicação dos compostos

Obtivemos apenas um hit através da comparação de nossos espectros de MS/MS com aqueles presentes biblioteca espectral do GNPS (Figura 10).

Figura 10. Nodo de m/z 628,1953, anotado como Luteolina 3',4'-di-O-beta-D-glucopiranosídeo. Em verde no *mirror match* são mostrados os picos do composto conforme dados depositados na biblioteca do GNPS e em preto os nossos dados experimentais. No nodo, a cor azul representa a quantificação do íon no cultivo axênico da actinobactéria e a cor verde no cultivo axênico do fitopatígeno.

O composto de m/z 628,1953 e t_R : 9,88 minutos, observado tanto no cultivo axênico da actinobactéria quanto do fungo, foi anotado como Luteolina 3',4'-di-O-beta-D-glucopiranosídeo. Trata-se de um glicosídeo flavonóide originalmente isolado da planta *Caralluma negevensis* (BALDER et al., 2003). Apesar da similaridade encontrada entre nossos dados experimentais e os dados da biblioteca, consideramos que não se trate especificamente deste composto anotado, mas possivelmente de uma molécula pertencente à esta mesma classe química. De fato, glicosídeos flavonóides já foram isolados tanto de *Streptomyces* (KANG et al., 2016) quanto de fungos endofíticos (EBADA et al., 2016).

Tomando como base as análises químicas e estatísticas das amostras, bem como a atividade antifúngica promissora apresentada pelo extrato obtido do co-cultivo (item 5.5),

priorizamos compostos pertencentes a cinco diferentes clusters do MN para derreplicação (Figura 11).

Figura 11. Clusters priorizados para derreplicação. Informações sobre a m/z de cada íon e seu tempo de retenção cromatográfico se encontram ao lado dos nodos. Íons obtidos do co-cultivo estão coloridos em rosa, íons do cultivo axênico da actinobactéria em azul e do cultivo axênico do fitopatógeno em verde.

Conforme explanado nos tópicos anteriores, admitimos que os clusters A, B, e C são formados por moléculas produzidas provavelmente pelas actinobactérias. O cluster D possui compostos produzidos tanto pelo fungo quanto pela actinobactéria, com uma molécula produzida somente no co-cultivo ou por apenas uma destas linhagens ou por ambas. O cluster E é constituído por dois íons dos quais não temos indício, em um primeiro momento, de sua linhagem precursora (ambas foram produzidas apenas no co-cultivo e não se relacionam com nenhum outro íon encontrado nos monocultivos).

Nenhum dos nodos destes clusters foi identificado através da biblioteca espectral do GNPS. Em casos como esse, o NAP (que prioriza hits obtidos pelo MN na biblioteca do GNPS) ainda assim é capaz de prever corretamente cerca de 63% das subestruturas presentes na primeira molécula candidata da lista de possíveis compostos gerada para cada íon (DA SILVA et al., 2018). Além disso, utilizamos a ferramenta MolNetEnhancer, que reúne os resultados do MN, NAP e MS2LDA para identificar as classes e subclasses moleculares

representadas com maior probabilidade estatística por cada cluster (Apêndices A-D). Para aumentar as chances de anotarmos corretamente os compostos, comparamos os candidatos de cada lista do NAP quanto as suas configurações estruturais, classe química anotada (em comparação com o resultado do MolNetEnhancer) e número relativo de fragmentos de MS/MS explicados. Pesquisamos os candidatos retornados pela ferramenta em bancos de dados online, a fim de obtermos mais informações sobre as moléculas.

Para o cluster A, as moléculas indicadas para os dois nodos são pertencentes à classe dos *peptídeos miméticos* (Figura 12).

Figura 12. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster A.

No caso do cluster B, o NAP anotou duas moléculas pertencentes à classe química dos *ácidos carboxílicos e derivados*. Apesar das estruturas moleculares serem similares (Figura 13), as mesmas não apresentam ácidos carboxílicos em suas estruturas como anotado.

Figura 13. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster B.

Para o cluster *C*, os nodos foram anotados como pertencentes à classe dos *esteróides e derivados* (Figura 14). Os dois íons de mesmo valor para m/z não retornaram resultados similares na derreplicação, e uma inspeção nos espectros de MS/MS de ambos realmente revelou distinções (Apêndices J e K). Portanto, provavelmente não se trata de isômeros posicionais.

Figura 14. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster *C*.

O cluster *D* foi anotado com moléculas pertencentes a classes químicas dos *esteróides e derivados* (Figura 15) tal qual o cluster *C*, porém com menor probabilidade estatística (Apêndices A e B). O nodo demarcado com asterisco na figura 15 não obteve candidatos indicados pelo NAP. Informações sobre as moléculas cujas estruturas químicas e nomes não foram demonstrados na figura se encontram no Apêndice E.

Figura 15. Molécula indicada pelo NAP como candidata à identificação do composto pertencentes ao cluster *D* de m/z 518,2793.

A classe química das *cumarinas* foi atribuída ao cluster *E* (Figura 16).

Figura 16. Moléculas indicadas pelo NAP como candidatas à identificação dos compostos pertencentes ao cluster *E*.

Após buscar pelas moléculas indicadas pelo NAP nos bancos de dados StreptomeDB 2.0 e SciFinder, verificamos que nenhuma delas tem até o momento registro de isolamento a partir de actinobactérias do gênero *Streptomyces*, portanto não foi possível confirmar as indicações fornecidas por esta ferramenta como corretas. Visto que o NAP se baseia na fragmentação *in silico* de bancos de dados estruturais, pode-se concluir que as predições incorretas se dão devido à ausência das estruturas que realmente correspondem aos nodos nessas bibliotecas (DA SILVA et al., 2018). Entretanto, assume-se que parte dos componentes

subestruturais anotados pela ferramenta deve ser de fato encontrada na molécula correta (KANG et al., 2018), revelando segmentos do esqueleto químico dos compostos, o que permite ao MolNetEnhancer inferir as classes químicas as quais estes compostos pertencem (ERNST et al., 2019).

Os resultados obtidos com a ferramenta SIRIUS foram sumarizados na Tabela 2. Os Apêndices E-U apresentam as árvores de fragmentação, quando computadas, e os espectros MS/MS dos íons selecionados para derreplicação.

Tabela 2. Lista de fórmulas moleculares identificadas pelo SIRIUS com maior *score* para os íons selecionados via MN para derreplicação.

Cluster	<i>m/z</i> Experimental	Íon Detectado	Fórmula Molecular	Desvio médio de massa (ppm)
A	515,2638	[M + H] ⁺	C ₂₉ H ₃₈ O ₈	-1,08
	497,2426	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₃₆ N ₈ O ₂ S ₂	-2,05
B	553,3328	[M + Na] ⁺	C ₂₂ H ₄₆ N ₁₀ O ₃ S	3,72
	558,3291	[M + H] ⁺	C ₂₉ H ₄₃ N ₅ O ₆	-5,94
C	531,2594 (1)	[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ N ₂ O ₁₁	-4,16
	531,2594 (2)	[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₃₈ N ₂ O ₁₁	0,95
	515,2639	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₆	-1,08
	533,2811	[M + H] ⁺	C ₂₈ H ₄₀ N ₂ O ₈	-0,47
D	518,2793	[M + H] ⁺	C ₃₉ H ₃₅ N	9,52
	548,2786	[M + H] ⁺	C ₂₆ H ₃₃ N ₁₁ O ₆	1,69
	504,2520	[M + Na] ⁺	C ₂₀ H ₃₉ N ₃ O ₁₀	1,56
	518,2797	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ N ₁₁ O ₇	0,33
	540,2926	[M + Na] ⁺	C ₂₆ H ₄₃ N ₃ O ₈	1,38
	562,3053	[M + K] ⁺	C ₃₁ H ₄₅ N ₃ O ₄	-0,73
E	540,2727	[M + H] ⁺	C ₂₃ H ₃₇ N ₇ O ₈	9,16
	532,2856	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₉ N ₇ O ₆	2,56

Para determinação das fórmulas moleculares, selecionados os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre (CHNOPS). O SIRIUS calcula um *score* para cada fórmula possível computando árvores de fragmentação para os compostos (as comparando com os dados de MS/MS quando fornecidos), o número de picos explicados e suas intensidades relativas, bem como os desvios de massa em cada caso (LUDWIG et al., 2020), o que torna seus resultados mais robustos que aqueles fornecidos por algoritmos que somente consideram os valores de *m/z* e o modo de ionização empregado. Buscamos pelas fórmulas moleculares indicadas nos bancos de dados NPA, considerando como origem biológica os gêneros *Streptomyces* e/ou *Rhizoctonia*, e StreptomeDB 2.0. As buscas manuais indicaram o composto DHQ7 (Figura 17), benzoquinona da classe das ansamicinas, como possível identificação do nodo de *m/z* 533,2811 (cluster C). Tal composto foi originalmente

isolado de *Streptomyces hygroscopicus* e classificado como análogo à geldanamicina (WU et al., 2011), que por sua vez possui uma série de atividades biológicas reportadas, inclusive atividade antifúngica (ZHANG et al., 2013). Todavia, não encontramos referências com o espectro de MS/MS dessa substância para comparação com nossos dados experimentais e, sendo assim, estudos adicionais são necessários para correta identificação deste composto.

Figura 17. Estrutura molecular do DHQ7.

Considerando que trabalhamos com diversos bancos de dados de produtos naturais distintos na tentativa de derreplicar os compostos (biblioteca espectral do GNPS, Super Natural II, NPA, SciFinder e StreptomeDB 2.0) e mesmo assim não foi possível encontrar candidatos plenamente satisfatórios para identificação dentre todos os compostos selecionados, acreditamos que pelo menos parte deles represente moléculas inéditas. Para confirmar esta hipótese, entretanto, é necessário realizar o isolamento dos compostos e submetê-los a análises espectroscópicas adicionais (como RNM, por exemplo).

5.5. Avaliação da atividade inibitória do crescimento micelial pelos extratos

Os mesmos extratos avaliados via UPLC-MS/MS foram submetidos ao teste de inibição do crescimento micelial (*poisoned food*) contra o fungo *R. solani*. Os resultados deste ensaio são apresentados na Tabela 3 e Figura 18.

Tabela 3. Atividade antifúngica dos extratos obtidos das culturas axênicas da actinobactéria (CB) e fungo (CRsol) e do co-cultivo (BRsolZi), em comparação com os controles positivos (antifúngicos comerciais Fox e Priori Xtra) e negativo (solução de DMSO 10%). Os resultados representam médias e desvios padrão de quatro repetições. Valores seguidos da mesma letra não são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Tratamentos	PIC (%)
Priori Xtra	100.00 ± 0.00 a
Fox	98.37 ± 1.87 a
BRsolZi	88.43 ± 3.33 b
CB	50.83 ± 7.00 c
CRsol	0.00 ± 0.00 d
Controle 10% DMSO	0.00 ± 0.00 d

Figura 18. Teste de inibição do crescimento micelial, com extratos e fungicidas na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. a) Fungicida Priori Xtra; b) Fungicida Fox; c) BRsolZi; d) CB; e) CRsol; f) DMSO 10%.

Conforme esperado, este ensaio indicou que os extratos oriundos do cultivo axênico do *R. solani* (CRsol) e o controle negativo não inibiram o crescimento do fungo. O extrato obtido a partir do co-cultivo entre *S. lunalinharesii* e *R. solani* (BRsolZi) foi efetivo contra o *R. solani* (Figura 18C), com uma porcentagem de inibição de 88,43% do crescimento micelial. Já para o extrato obtido da cultura axênica da actinobactéria (CB), houve inibição, mas em um índice inferior (50,83%) ao do extrato obtido em co-cultivo. Embora tal atividade seja estatisticamente inferior a dos fungicidas comerciais e das concentrações de extratos e dos fungicidas terem sido as mesmas ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) nos tratamentos, cabe ressaltar que nos extratos os compostos ativos se encontram em concentrações individuais menores em

comparação aos controles. Sendo assim, consideramos como promissora a atividade apresentada e como eficiente a metodologia de co-cultivo para este propósito.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As linhagens de *S. lunalinharesii* analisadas neste trabalho, endofíticas de plantas do gênero *Anthurium* coletadas em ilhas oceânicas, possuem capacidade de inibir o crescimento do fungo fitopatogênico *R. solani* em condições de cultivo pareado em meio sólido. A MEV possibilitou observar alterações no micélio fúngico quando cultivado na presença do isolado A15A.

O FBMN viabilizou a análise geral dos perfis metabólicos da actinobactéria e do fungo cultivados em modo axênico, além de apontar íons produzidos diferencialmente por estas linhagens quando em co-cultivo. Aliado às análises estatísticas dos tratamentos, o FBMN auxiliou na priorização de compostos para derreplicação. As ferramentas NAP e MolNetEnhancer permitiram a identificação das classes químicas as quais pertencem os clusters selecionados.

O co-cultivo foi uma metodologia efetiva para elicitação do metabolismo secundário microbiano neste estudo, levando ambos os microrganismos a sintetizar compostos que não foram produzidos normalmente em cultivos axênicos.

A inibição do crescimento de *R. solani* é provavelmente causada por metabólitos secundários de atividade antifúngica produzidos pela actinobactéria *S. lunalinharesii*. Tal afirmação é contundente com o indicado pelo teste de inibição do crescimento micelial (*poisoned food*), onde o extrato obtido a partir de co-cultivo obteve resultados promissores ao ser avaliado na mesma concentração que os fungicidas comerciais.

Como não foi possível identificar de forma conclusiva as moléculas correspondentes aos íons priorizados para derreplicação, acreditamos que a linhagem de actinobactéria estudada possa produzir moléculas biologicamente ativas ainda não descritas na literatura. Estudos futuros de isolamento e identificação dos compostos poderão confirmar esta hipótese.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o co-cultivo é uma metodologia eficaz para a eliciação do metabolismo secundário de *S. lunalinharesii*, linhagem produtora de compostos antifúngicos. A utilização de ferramentas de análise em metabolômica se mostrou promissora e evidenciou a provável produção de compostos ainda não descritos na literatura.

REFERÊNCIAS

- ACLAND, A. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. 8–20, 2013.
- ALEXANDRATOS, N.; BRUINSMA, J. World agriculture towards 2030/2050. **Land Use Policy**, v. 20, n. 4, p. 375, 2012.
- ALLARD, P. M. et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 2016.
- AYUSO-SACIDO, A.; GENILLOUD, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 1, p. 10–24, 2005.
- BALDER, A. et al. Further constituents from *Caralluma negevensis*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1277–1281, 2003.
- BANERJEE, P. et al. Super Natural II-a database of natural products. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D935–D939, 2015.
- BÉRDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of Antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1–26, 2005.
- BERTRAND, S. et al. De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1157–1165, 2013a.
- BERTRAND, S. et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 219–228, 2013b.
- 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.
- BLAŽENović, I. et al. Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 2, 2018.
- BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.
- BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

- BRIMNER, T. A.; BOLAND, G. J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 100, n. 1–3, p. 3–16, 2003.
- BUCKINGHAM, R. Dictionary of Natural o TitleProducts, Supplement 4. **CRC Press: Boca Raton, FL**, 1997.
- CHAMBERS, M. et al. A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–920, 2012.
- CHEN, C.; GONZALEZ, F. J.; IDLE, J. R. LC-MS-based metabolomics in drug metabolism. **Drug Metabolism Reviews**, v. 39, n. 2–3, p. 581–597, 2007.
- CHEVAL, P. et al. Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France. **Crop Protection**, v. 92, p. 131–133, 2017.
- CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4 . 0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. v. 46, n. May, p. 486–494, 2018.
- CLINE, M. S. et al. Integration of biological networks and gene expression data using cytoscape. **Nature Protocols**, v. 2, n. 10, p. 2366–2382, 2007.
- CONDE-MARTÍNEZ, N. et al. Integrating Molecular Network and Culture Media Variation to Explore the Production of Bioactive Metabolites by *Vibrio diabolus* A1SM3. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 1–18, 2019.
- CORDERO-MALDONADO, L. et al. Integration of Microfractionation , qNMR and Zebrafish Screening for the In Vivo Bioassay-Guided Isolation and Quantitative Bioactivity Analysis of Natural Products. v. 8, n. 5, 2013.
- CRÜSEMANN, M. et al. Prioritizing Natural Product Diversity in a Collection of 146 Bacterial Strains Based on Growth and Extraction Protocols. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 3, p. 588–597, 2017.
- DA SILVA, R. R. et al. Propagating annotations of molecular networks using in silico fragmentation. **PLoS Computational Biology**, v. 14, n. 4, p. 1–26, 2018.
- DALISAY, D. S. et al. Structure Elucidation at the Nanomole Scale . 1 . Trisoxazole Macrolides and Thiazole-Containing Cyclic Peptides from the Nudibranch *Hexabranchus sanguineus*. v. 1, p. 732–738, 2009.
- DE SOUZA, R. F. et al. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 2774–2778, 2008.

- DOROGHAZI, J. R.; METCALF, W. W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.
- DÜHRKOP, K. et al. Searching molecular structure databases with tandem mass spectra using CSI:FingerID. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 41, p. 12580–12585, 2015.
- DÜHRKOP, K. et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. **Nature Methods**, v. 16, n. 4, p. 299–302, 2019.
- EBADA, S. S. et al. The Fungal Endophyte *Nigrospora oryzae* Produces Quercetin Monoglycosides Previously Known Only from Plants. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 11, p. 2767–2771, 2016.
- ERNST, M. et al. Molnetenhancer: Enhanced molecular networks by integrating metabolome mining and annotation tools. **Metabolites**, v. 9, n. 7, 2019.
- FAN, B. et al. Influence of OSMAC-based cultivation in metabolome and anticancer activity of fungi associated with the brown alga *fucus vesiculosus*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 2019.
- FLOOD, J. The importance of plant health to food security. **Food Security**, v. 2, n. 3, p. 215–231, 2010.
- FOX RAMOS, A. E. et al. Revisiting Previously Investigated Plants: A Molecular Networking-Based Study of *Geissospermum laeve*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1007–1014, 2017.
- FOX RAMOS, A. E. et al. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 7, p. 960–980, 2019.
- GAMLIEL, A.; KATAN, J.; COHEN, E. Toxicity of chloronitrobenzenes to *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* as related to their structure. **Phytoparasitica**, v. 17, n. 2, p. 101–106, 1989.
- GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 1, p. 85–98, 2012.
- GLAUSER, G. et al. Differential analysis of mycoalexins in confrontation zones of grapevine fungal pathogens by ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and capillary nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1127–1134, 2009.

- GOUDA, S. et al. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–8, 2016.
- GU, J. et al. Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.
- GUTHALS, A. et al. The spectral networks paradigm in high throughput mass spectrometry. **Molecular Biosystems**, v. 8, n. 10, p. 2535–2544, 2012.
- HACKSTADT, A. J.; HESS, A. M. Filtering for increased power for microarray data analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1–12, 2009.
- HIGGS, R. E. et al. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 371–376, 2001.
- HUANG, X. et al. Biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off disease in cucumber with Bacillus pumilus SQR-N43. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 135–143, 2012.
- HUG, J. et al. Concepts and Methods to Access Novel Antibiotics from Actinomycetes. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 44, 2018.
- HUR, M. et al. A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 565–583, 2014.
- ISHII, H. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 40, n. 3, p. 205–211, 2006.
- JOHANSEN, K. T. et al. From retrospective assessment to prospective decisions in natural product isolation: HPLC-SPE-NMR analysis of carthamus oxyacantha. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 11, p. 2454–2461, 2011.
- JOSE, P. A.; JHA, B. New dimensions of research on actinomycetes: Quest for next generation antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–5, 2016.
- JUNG, W. J. et al. Biological control of damping-off caused by Rhizoctonia solani using chitinase-producing Paenibacillus illinoisensis KJA-424. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 1261–1264, 2003.
- KANG, K. BIN et al. Targeted Isolation of Neuroprotective Dicoumaroyl Neolignans and Lignans from Sageretia theezans Using in Silico Molecular Network Annotation Propagation-Based Dereplication. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 8, p. 1819–1828, 2018.

- KANG, H. R. et al. Termisoflavones A-C, Isoflavonoid Glycosides from Termite-Associated *Streptomyces* sp. RB1. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 12, p. 3072–3078, 2016.
- KEKUDA, T. R. P.; SHOBHA, K. S.; ONKARAPPA, R. Available online through Studies on antioxidant and anthelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soils of Agumbe , Karnataka. v. 3, n. 1, p. 26–29, 2010.
- KHAMNA, S. et al. Antifungal activity of *Streptomyces* spp . isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. v. 6, n. 3, p. 143–147, 2009.
- KIM, O. S. et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. PART 3, p. 716–721, 2012.
- KLEMENTZ, D. et al. StreptomeDB 2.0 - An extended resource of natural products produced by streptomycetes. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D509–D514, 2016.
- LAATSCH, H. AntiBase, a Database for Rapid Dereplication and Structure Determination of Microbial Natural Products. **Wiley-VCH**, 2010.
- LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 279–289, 2007.
- LEWIN, G. R. et al. Evolution and Ecology of *Actinobacteria* and Their Bioenergy Applications. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 235–254, 2016.
- LI, J. et al. Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coral-associated actinomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 623–635, 2014.
- LOPEZ, J. A. V. et al. Nocardamin glucuronide, a new member of the ferrioxamine siderophores isolated from the ascamycin-producing strain *Streptomyces* sp. 80H647. **Journal of Antibiotics**, v. 72, n. 12, p. 991–995, 2019.
- LUDWIG, M. et al. De Novo Molecular Formula Annotation and Structure Elucidation Using SIRIUS 4. **Methods in Molecular Biology**, v. 2104, p. 185–207, 2020.
- MACHUSHYNETS, N. V. et al. Discovery of novel glycerolated quinazolinones from *Streptomyces* sp. MBT27. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 3–4, p. 483–492, 2019.
- MARMANN, A. et al. Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 1043–1065, 2014.
- MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y. Endophytic actinomycetes: Promising source of novel bioactive compounds. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 5, p. 514–519, 2017.

- MINCER, T. J. et al. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5005–5011, 2002.
- MOUSSA, M. et al. Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers †. **RSC Advances**, v. 9, p. 1491–1500, 2019.
- MUDALUNGU, C. M. et al. Noursamycins, Chlorinated Cyclohexapeptides Identified from Molecular Networking of *Streptomyces noursei* NTR-SR4. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 6, p. 1478–1486, 2019.
- NETZKER, T. et al. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–13, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- NOTHIAS-ESPOSITO, M. et al. Investigation of Premyrsinane and Myrsinane Esters in *Euphorbia cupanii* and *Euphorbia pithyusa* with MS2LDA and Combinatorial Molecular Network Annotation Propagation. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 6, p. 1459–1470, 2019.
- NOTHIAS, L. F. et al. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 758–767, 2018.
- NOTHIAS, L. F. et al. Feature-based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment. 2019.
- OH, D. C. et al. Libertellenones A-D: Induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 17, p. 5267–5273, 2005.
- OH, D. C. et al. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 4, p. 515–520, 2007.
- OPPONG-DANQUAH, E. et al. Molecular networking-based metabolome and bioactivity analyses of marine-adapted fungi co-cultivated with phytopathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–20, 2018.

- PACHECO DA ROSA, J. et al. Streptomyces lunalinharesii strain 235 shows the potential to inhibit bacteria involved in biocorrosion processes. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- PARK, H. B. et al. Glionitrin A , an Antibiotic-Antitumor Metabolite Derived from Competitive Interaction. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 248–252, 2009.
- PASSARI, A. K. et al. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–17, 2017.
- PASSARI, A. K. et al. Bioprospection of actinobacteria derived from freshwater sediments for their potential to produce antimicrobial compounds. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2018.
- PATIL, H. J. et al. Selective isolation, evaluation and characterization of antagonistic actinomycetes against Rhizoctonia solani. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 2163–2170, 2010.
- PLODPAI, P. et al. Anti-Rhizoctonia solani activity by Desmos chinensis extracts and its mechanism of action. **Crop Protection**, v. 43, p. 65–71, 2013.
- PRICE, C. L. et al. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. **Pest Management Science**, v. 71, n. 8, p. 1054–1058, 2015.
- QUINN, R. A. et al. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–154, 2017.
- RAMADAN, U. et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 798–811, 2015.
- RAMIREZ-MARES, M. V.; HERNANDEZ-CARLOS, B. Plant-Derived Natural Products From the American Continent for the Control of Phytopathogenic Fungi: a Review. **Journal of Global Innovations in Agricultural and Social Sciences**, v. 3, n. 4, p. 96–118, 2015.
- RAVIKUMAR, S. et al. Available online through Diversity of endophytic actinomycetes from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacte- rial potential against bacterial pathogens. v. 4, n. 1, p. 294–296, 2011.
- REMY, S. et al. Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from Sagotia racemosa. **Phytochemistry**, v. 167, n. May, p. 112101, 2019.

- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2–3, p. 127–149, 1988.
- ROSA, J. P. DA et al. *Streptomyces lunalinharesii* 235 prevents the formation of a sulfate-reducing bacterial biofilm. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 603–609, 2016.
- RUTTKIES, C. et al. MetFrag relaunched: Incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2016.
- SACCENTI, E. et al. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data. **Metabolomics**, v. 10, n. 3, p. 361–374, 2014.
- SALLATO, B. V; LATORRE, B. A.; AYLWIN, G. First report of practical resistance to QoI fungicides in *Venturia inaequalis* (apple scab) in Chile. **Plant Disease**, v. 90, n. 3, p. 375, 2006.
- SANGHVI, G. V. et al. Isolation and partial purification of erythromycin from alkaliphilic *Streptomyces werraensis* isolated from Rajkot, India. **Biotechnology Reports**, v. 1–2, p. 2–7, 2014.
- SANTEN, J. et al. The Natural Products Atlas: An Open Access Knowledge Base for Microbial Natural Products Discovery. **ACS Central Science**, n. November, p. acscentsci.9b00806, 2019.
- SCHERLACH, K.; GRAUPNER, K.; HERTWECK, C. Molecular Bacteria-Fungi Interactions: Effects on Environment, Food, and Medicine. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 375–397, 2013.
- SCHNEIDER, H. G.; TENER, G. M.; STRONG, F. M. Separation and determination of antimycins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 37, n. 1, p. 147–157, 1952.
- SERRANO, R. et al. Co-culturing of Fungal Strains Against *Botrytis cinerea* as a Model for the Induction of Chemical Diversity and Therapeutic Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. April, p. 1–15, 2017.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. [s.l: s.n.].
- STACKEBRANDT, E.; WARD-RAINEY, N. L.; RAINEY, F. A. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actino bacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 479–491, 1997.
- STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.

- TANVIR, R.; SAJID, I.; HASNAIN, S. Larvicidal potential of Asteraceae family endophytic actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. **Natural Product Research**, v. 28, n. 22, p. 2048–2052, 2014.
- TEDESCO, P. et al. Antimicrobial activity of monoramnholipids produced by bacterial strains isolated from the Ross Sea (Antarctica). **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, 2016.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- TRUJILLO, M. E. Actinobacteria. **eLS**, n. 2008, p. 1–16, 2016.
- TRYGG, J.; HOLMES, E.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics in metabonomics. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 2, p. 469–479, 2007.
- TURNER, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327–338, 1999.
- UNDABARRENA, A. et al. -Genomic data mining of the marine actinobacteria *Streptomyces* sp. H-KF8 unveils insights into multi-stress related genes and metabolic pathways involved in antimicrobial synthesis. **PeerJ**, v. 5, p. e2912, 2017.
- VENEU, D. M. et al. Biosorptive removal of cadmium from aqueous solutions using a *Streptomyces lunalinharesii* strain. **Minerals Engineering**, v. 29, p. 112–120, 2012.
- VENEU, D. M.; TOREM, M. L.; PINO, G. A. H. Fundamental aspects of copper and zinc removal from aqueous solutions using a *Streptomyces lunalinharesii* strain. **Minerals Engineering**, v. 48, p. 44–50, 2013.
- VENTURA, M. et al. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 3, p. 495–548, 2007.
- VINAIXA, M. et al. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 23–35, 2016.
- WANDY, J. et al. Ms2lda.org: Web-based topic modelling for substructure discovery in mass spectrometry. **Bioinformatics**, v. 34, n. 2, p. 317–318, 2018.
- WANG, M. 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.

- WANG, P. et al. Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica* 161111. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 477–490, 2014.
- WATROUS, J. et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **PNAS**, v. 109, n. 26, p. 1743–1752, 2012.
- WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, n. 5, p. 386–390, 2001.
- WILLIAMS, A.; TKACHENKO, V. The Royal Society of Chemistry and the delivery of chemistry data repositories for the community. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 28, n. 10, p. 1023–1030, 2014.
- WILLIAMS, P. G. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45–52, 2009.
- WOLFENDER, J.; QUEIROZ, E. F. New Approaches for Studying the Chemical Diversity of Natural Resources and the Bioactivity of their Constituents. v. 66, n. 5, p. 324–329, 2012.
- WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2013.
- WU, C. Z. et al. New non-quinone geldanamycin analogs from genetically engineered *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 6, p. 461–463, 2011.
- WUBSHET, S. G. et al. Direct ¹³C NMR detection in HPLC hyphenation mode: Analysis of *Ganoderma lucidum* terpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 876–882, 2012.
- YANG, J. Y. et al. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.
- YANG, L. et al. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1 - Potential antibiotics against plant pathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 909–915, 2008.
- YU, L.; HU, Z.; MA, Z. Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine *Streptomyces* with *Bacillus mycoides*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 22, p. 2087–2091, 2015.
- ZAMOUM, M. et al. Development of formulations based on *Streptomyces rochei* strain PTL2 spores for biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato seedlings. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 6, p. 723–738, 2017.
- ZHANG, J. et al. Antifungal Activity of Geldanamycin Alone or in Combination with Fluconazole Against *Candida* species. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3–4, p. 273–279, 2013.

- ZHANG, X.; REN, K.; ZHANG, L. Screening and Preliminary Identification of Medicinal Plants Endophytic Actinomycetes Used for Inhibiting Penicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Biology**, v. 4, n. 2, p. 119–124, 2012.
- ZHU, F. et al. Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 5, p. 767–769, 2011.
- ZUCK, K. M.; SHIPLEY, S.; NEWMAN, D. J. Induced Production of N-Formyl Alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by Co-culture with *Streptomyces peucetius*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1653–1657, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Classes químicas anotadas para os clusters do FBMN através da ferramenta MolNetEnhancer.

APÊNDICE B. Índice de confiabilidade das anotações para classes químicas dos clusters do FBMN.

ÊNDICE C. Sub-classes químicas anotadas para os clusters do FBMN através da ferramenta MolNetEnhancer.

ÂNDICE D. Índice de confiabilidade das anotações para sub-classes químicas dos clusters do FBMN.

APÊNDICE E. Lista de compostos anotados pelo NAP para os nodos do cluster D.

<i>m/z</i> Experimental	Anotação do NAP	Picos Explicados
548.2786	2-[(1S,2R,10S,11S,14R,15S,17S)-14,17-dihydroxy-2,15-dimethyl-5-oxotetracyclo[8.7.0.0 ² ,7.0 ¹¹ , ¹⁵]heptadeca-3,6-dien-14-yl]-2-oxoethyl 3-[(2,2-dimethoxyethyl)carbamoyl]propanoate	03/12
504.2520	2-[(1S,2R,10S,11S,14R,15S,17S)-14,17-bis(acetyloxy)-2,15-dimethyl-5-oxotetracyclo[8.7.0.0 ² ,7.0 ¹¹ , ¹⁵]heptadeca-3,6-dien-14-yl]-2-oxoethyl acetate	04/14
518.2797	2-[(1S,2R,10S,11S,14R,15S,17S)-14,17-dihydroxy-2,15-dimethyl-5-oxotetracyclo[8.7.0.0 ² ,7.0 ¹¹ , ¹⁵]heptadeca-3,6-dien-14-yl]-2-oxoethyl 2-[(tert-butoxycarbonyl)amino]acetate	04/13
540.2926	2-[(1R,2R,10R,11S,14R,15S,17S)-14,17-dihydroxy-2,15-dimethyl-5-oxotetracyclo[8.7.0.0 ² ,7.0 ¹¹ , ¹⁵]heptadeca-6-en-14-yl]-2-oxoethyl 3-[[[(2R)-butan-2-yl]carbamoyl}propanoate	02/10
562.3053	(2S,6S)-6-[(2S,7R,10S,11S,12R,15R)-10,12-dihydroxy-2,6,6,11,15-pentamethyl-5,9,16-trioxotetracyclo[8.7.0.0 ² ,7.0 ¹¹ , ¹⁵]heptadeca-1(17),13-dien-14-yl]-6-hydroxy-2-methyl-4-oxoheptanoic acid	02/12

APÊNDICE F. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de *m/z* 515,2638.

APÊNDICE G. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 497,2426.

APÊNDICE H. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 553,3328.

APÊNDICE I.

Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 558,3291.

Charge: 1

APÊNDICE J. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 531,2594 (1).

APÊNDICE K. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de *m/z* 531,2594 (2).

APÊNDICE M. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de *m/z* 533,2811.

APÊNDICE N. Espectro MS/MS do composto de m/z 518,2793

APÊNDICE O. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 548,2786.

APÊNDICE P. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 504,2520.

APÊNDICE Q. Espectro MS/MS do composto de m/z 518,2797

APÊNDICE R. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 540,2926.

APÊNDICE S. Espectro MS/MS do composto de m/z 562,3053

APÊNDICE T. Espectro MS/MS do composto de m/z 540,2727.

APÊNDICE U. Árvore de fragmentação e espectro MS/MS do composto de m/z 532,2856.