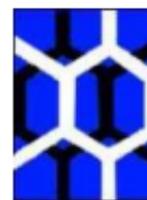




UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



IQB

ALESSANDRE CARMO CRISPIM

**ESTUDO METABOLÔMICO DO FILTRADO DA CULTURA DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Rhizoctonia solani***

MACEIÓ

2015

ALESSANDRE CARMO CRISPIM

**ESTUDO METABOLÔMICO DO FILTRADO DA CULTURA DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Rhizoctonia solani***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

MACEIÓ

2015

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

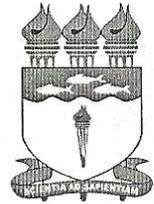
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

- C932e Crispim, Alexandre Carmo.
Estudo metabômico do filtrado da cultura do fungo endofítico
Rhizoctonia solani / Alexandre Carmo Crispim. – 2015.
65 f. : il., graf., tabs.
- Orientador: Edson de Souza Bento.
Coorientador: Luiz Carlos Caetano.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de
Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.
- Bibliografia: f. 55-62.
Apêndices: f. 63-65.
1. Fungos. 2. *Rhizoctonia solani*. 3. Ressonância Magnética Nuclear
(RMN). 4. Análise multivariada. 5. Metabólitos. I. Título.

CDU: 547.9:579.222



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

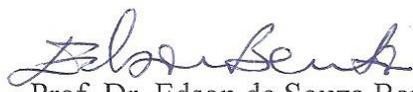


BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

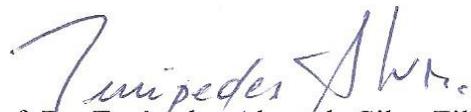
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Alessandre Carmo Crispim**, intitulada: “ESTUDO METABOLÔMICO DO FILTRADO DA CULTURA DO FUNGO ENDOFÍTICO *Rhizoctonia Solani*”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 14 de julho de 2015, às 14h, na Sala de Reuniões do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Edson de Souza Bento
Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Francine Santos de Paula
(IQB/UFAL)


Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho
(ICBS/UFAL)


Prof.^a. Dr.^a. Josiane de Souza Luna
(IFAL)

Dedico todas as minhas vitórias primeiramente a DEUS, que sempre atendeu minhas preces, depois aos meus pais, Geliete e Edivar Crispim, aos irmãos João Emerson e Felipe que da forma que puderam sempre tentaram fazer o melhor por mim, dedico também a minha esposa Shirley Melo por estar ao meu lado e a minha FILHA Alexia que está vindo para alegrar minha vida ao máximo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus amigos e amigas de laboratório: Mariel Matias, Lucas Henrique, Michele Marques e Islane Maia, por todas as ajudas e alegrias que temos juntos já há alguns anos. A Raquel Ferreira por ter me iniciado no laboratório e por todos seus conselhos. A minha eterna co-orientadora, Prazeres Menezes, por todo conhecimento passado. A Stephanie Cordova, Isah Ferreira, Lucas Fernando, Daniel Inácio, Maria Amélia, Douglas Rozendo e Evellyn Santos, por toda companhia que me proporcionaram.

Agradeço a Jéssica Rocha pelo conhecimento compartilhado durante meu mestrado. A Andressa Soares por ter enfrentado trancos e barrancos junto a mim, tenha sido nas disciplinas, no laboratório ou tentando resolver burocracias.

Agradeço a Jéssica Guerra, que apesar de ter sido por pouco tempo, me ajudou com meu trabalho de mestrado.

Ao meu orientador Edson de Souza Bento e ao meu co-orientador Luiz Carlos Caetano, inicialmente por terem aceitado me orientar durante essa fase da minha vida, o qual foi muito proveitosa, e por todo conhecimento que continuo adquirindo, algo que dinheiro nenhum pode pagar.

E agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram em minha formação.

“Tente, porque o não você já tem, o pior que pode acontecer é ficar como está. ”

Edson de Souza Bento

RESUMO

Os fungos constituem um grupo de microrganismo de grande interesse prático e científico. Algumas espécies de fungos são utilizadas na produção de alimentos, bebidas e medicamentos. Sendo o *Rhizoctonia solani*, um dos poucos fungos encontrado em praticamente todos os continentes e tendo varais plantas como hospedeiras, seu metabolismo tende a sofrer algumas alterações devido a interação com a planta hospedeira e a variações regionais. Em um trabalho canadense, sendo descrito como um patógeno, foi isolado dipeptídeos cíclicos do tipo 2,6-dioxopiperazinas do filtrado da cultura do fitopatôgeno *Rhizoctonia solani*, já em um trabalho brasileiro, descrito como endofítico da planta *S. terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como *aroeira*, foi relatado que do extrato metanólico do micélio apresentou atividade antinociceptiva em ratos. Com o objetivo de estudar o metabolismo presente em filtrados da cultura (FCc) do endofítico *Rhizoctonia solani*, o fungo foi cultivado em seis frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio BD (Batata-Dextrose) durante oito semanas, sem agitação, no escuro. A cada 7 dias, alíquotas de 1,5 mL de meio, foram filtradas em Millipore® (0,22 µM). Cada fração de 300 µL destas foram adicionadas de 300 µL de solução tampão fosfato (pH 7.4, contendo 1 mM de TSP) e 50 µL de D₂O transferidas para tubos próprios e analisadas por RMN-1H (Bruker 400 MHz, UltraShield). Os dados obtidos foram pré-processados no TopSpin®, e a região contendo o sinal da água foi suprimida utilizando do experimento NOESY1D. Para identificação dos metabólitos utilizou-se de banco de dados da literatura e do programa Chenomx®, verificando a presença acetaldeído, acetato, alanina, betaina, citrato, etanol, metanol, succinato e uracila. Os dados foram então normalizados e alinhados antes de serem submetidos a análise estatística multivariada utilizando-se o programa MatLab® através de ferramentas desenvolvidas pelo Dr. K. Veselkov (Imperial College, London, UK) e SIMCA®. Embora não se tenha detectado metabólitos secundários no filtrado da cultura, observou-se uma alta produção de etanol.

Palavras-chave: Fungos. *Rhizoctonia solani*. RMN. Análise Multivariada. Metabólitos.

ABSTRACT

Fungi constitute a microorganism group that has great scientific and practical interest. Some species of fungi have been used in the production of foods, beverages and medicines. Being the *Rhizoctonia solani*, one of the few fungi found in almost all continents and having poles plants as host, your metabolism tends to undergo some changes due to interaction with the host plant and regional variations. In a Canadian study, it is described as a pathogen, it was isolated cyclic dipeptides of type 2.6-dioxopiperazines of the pathogen *Rhizoctonia solani* culture, already in a Brazilian study, with the endophyte *Rhizoctonia solani*, of the plant *S. terebintifolius Raddi*, popularly known as *aroeira*, it was reported that the methanol extract of mycelium was obtained antinociceptive activity in rats. With the objective of studying the metabolism present in culture filtrates (CF) of endophytic *Rhizoctonia solani*, the fungus was grown in six Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the BD medium for eight weeks, without agitation, in the dark. Every 7 days, 1.5 mL aliquots of medium, were filtered in Millipore® (0.22 µM). Each fraction of 300 µL of these were added for 300 µL of phosphate buffer solution (pH 7.4, containing 1 mM of TSP), 50 µL of D₂O and transferred to own tubes, and analyzed by ¹H-NMR (400 MHz Bruker, UltraShield). Data were preprocessed using the TopSpin® program, and the region containing the sign of the water was suppresses using NOESY1D experiment. For metabolites identification it was used literatures databases and of the Chenomx® program, verifying the presence of acetaldehyde, acetate, alanine, betaine, citrate, ethanol, methanol, succinate and uracil. The data were then standardized and aligned before being subjected to multivariate analysis using the MatLab® program through tools developed by Dr. K. Veselkov (Imperial College, London, UK) and SIMCA®, although secondary metabolites are not detected in the culture filtrate, it was observed high yields of ethanol.

Keywords: Fungi. *Rhizoctonia solani*. NMR. Multivariate Analysis. Metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial de interação e utilização dos fungos	16
Figura 2. Principais malefícios causados por fungos	17
Figura 3. (a) Representação de diferentes hifas (b) Representação de diferentes micélios	17
Figura 4. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	23
Figura 5. Representação esquemática do metabolismo da glicose e TCA (Ciclo do Ácido Tricarboxílico) ou Ciclo de Krebs	24
Figura 6. Compostos extraídos e elucidados por PEDRAS (2005).....	26
Figura 7. Próton girando em torno do seu próprio eixo gerando um momento angular e um momento magnético.....	27
Figura 8. (a) Número de orientações que um núcleo pode assumir de acordo com o seu I. (b) Diferença de energia entre os estados α e β quando expostos a um campo magnético externo.....	29
Figura 9. Movimento de precessão efetuado pelo núcleo quando exposto a um campo externo	30
Figura 10. A soma de todos os vetores resultando na formação de um vetor magnético M_0	30
Figura 11. Obtenção do sinal de RMN	31
Figura 12. Espectro de RMN H^1 do CH_3CH_2OH a 60 MHz e 100 MHz	32
Figura 13. (a) Tetrametil-silano (TMS) e (b) Trimetilsilil propionato de sódio (TSP)	33
Figura 14. Campo sentido por H_A	34
Figura 15. Desdobramento do sinal.....	34
Figura 16. Triangulo de Pascal.....	35
Figura 17. Comportamento do fungo <i>R. solani</i> em meio BDA.....	42
Figura 18. Cultivo do fungo <i>Rhizoctonia solani</i> em meio BD, com 1 semana.	42
Figura 19. Espectro de RMN- 1H do filtrado da cultura sem (a) e com (b) supressão do sinal da água	43
Figura 20. Sinais referentes a α e β dextrose e sacarose no espectro de RMN- 1H do meio BD puro....	44
Figura 21. Metabólitos identificados no espectro de RMN- 1H do meio BD puro, na região de 0.75-2.80 ppm, ampliado 16x.....	44
Figura 22. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de -0.30-4.21 ppm	45
Figura 23. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de 1.23-3.62 ppm ampliado 32 vezes.....	46
Figura 24. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de 3.00-6.00 ppm ampliado 8 vezes	46
Figura 25. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de 5.70-9.77 ppm ampliado 256 vezes.....	47
Figura 26. Distinção dos hidrogênios “a” e “b” do citrato causado pelo efeito anisotrópico das ligações π das carbonilas.....	48
Figura 27. Sobreposição dos espectros dos filtrados das culturas <i>R. solani</i> da 1 ^a -8 ^a semana, da região 1.37 -3.61 ppm, respectivamente de baixo para cima	49
Figura 28. Curva de variação dos metabólitos primários, detectados nos filtrados da 1 ^a -8 ^a semanas de cultura de <i>Rhizoctonia solani</i> , tendo a semana zero como o controle, ou seja, o meio sem o fungo.....	49
Figura 29. Curva de variação da Dextrose (Glicose) e da Sacarose.....	50
Figura 30. Curva de crescimento do micélio de <i>Rhizoctonia solani</i> ao longo de 8 semanas.....	51
Figura 31. Análise estatística multivariada dos dados de RMN obtidos do filtrado da cultura de <i>Rhizoctonia solani</i> mostrando os scores plot do OPLS (3+3+0). Cultivo efetuado ao longo de oito semanas (n=6). Cores diferentes (1-8) correspondem a alíquotas coletadas semanalmente do meio. O símbolo de cor verde (0) corresponde ao meio de cultura puro (n=1). Valores cumulativos, previstos: $R^2X = 0,287$, $R^2Y = 0,377$ e $Q^2 = 0,0843$ e valores ortogonais: $R^2X = 0,346$	52
Figura 32. Curva de variação de um duplete encontrado em 0,88 ppm	63
Figura 33. Curva de variação de um tripleto encontrado em 1,03 ppm	63

Figura 34. Gráfico de STOCSY do duplete em 0,88 ppm mostrando uma alta correlação com o tripleto em 1,03 ppm.....	64
Figura 35. Curva de variação do sinal encontrado em 1,03 ppm	64
Figura 36. Curva de variação do sinal encontrado em 1,03 ppm	65
Figura 37. Curva de variação do sinal encontrado 1,45 ppm em 1,03 ppm	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Elementos requeridos pela célula do fungo	18
Tabela 2. Tabela 2. Propriedades dos núcleos de spin $\frac{1}{2}$ selecionados. As frequências são dadas para um espectrômetro de 400 MHz (magneto de 9,4 T), as sensibilidades são dados relativos às observações de prótons e incluem termos tanto para sensibilidade intrínseca do núcleo e quanto sua abundância natural	28
Tabela 3. Quantidade de micélio coletado ao longo de 6 semanas, a média de 5 massas e o aumento percentual.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD → Batata-Dextrose

BDA → Batata-Dextrose-Ágar

B_0 ou B_z → Campo magnético gerado pelo equipamento

B_1 → Pulso de radio frequência

CW → Onda Continua

D1 → Tempo deixado pelo equipamento para ocorrer o processo de relaxação do spin.

D₂O → Água deuterada

FID → Decaimento da Energia Livre

FT → Transformada de Fourier

g → Gramas

h → Constante de Planck

HCA → Análise Hierárquica de Agrupamento

I → Número quântico de Spin

k → Constante de Boltzmann

L → Litros

M → mol/L

MHz → Megahertz

mL → Mililitros

mM → Milimolar (10^{-3} M)

M_0 → Resultante dos vetores magnéticos dos spins

NOE → Efeito Nuclear Overhauser

NS → Números de experimentos

N_α → Número de spins alinhados paralelamente ao campo B_0

N_β → Número de spins alinhados antiparalelamente ao campo B_0

OPLS → Análise do Mínimo Quadrado Parcial Ortogonal

O1P → Sinal que vai ser saturado

PCA → Análise do Componente Principal

pH → Potencial Hidrogeniônico

PLS → Análise Mínimo Quadrado Parcial

ppm → parte por milhão

RG → Ajuste do Ganho no experimento de RMN

RMN → Ressonância Magnética Nuclear

SW → Tamanho da janela no espectro de RMN

T → Temperatura

TD → Número de pontos que geram o espectro

TMS → Tetrametil-silano

TSP → *Trimetilsilil propionato de sódio*

T_1 → Relaxação Longitudinal

UK → Reino Unido

ν → Constante de Larmor

ν_{ef} → Frequência de aparição do sinal no espectro de RMN

ν_{eq} → Frequência do equipamento de RMN

γ → Representa a Razão Giromagnética

δ → Representa o Deslocamento Químico

μ → Representa o Momento magnético

ρ → Representa o Momento Angular

σ → Representa a Constante de Blindagem

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVO	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	15
3.	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	FUNGOS.....	16
3.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS	20
3.3	METABÓLITOS PRIMÁRIOS	21
3.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	22
3.5	<i>RHIZOCTONIA SOLANI</i>	25
3.6	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	26
3.6.1	Princípios de Ressonância Magnética Nuclear.....	27
3.6.2	Obtenção de espectro de Ressonância Magnética Nuclear.....	31
3.6.3	Deslocamento Químico	32
3.6.4	Acoplamento	33
3.6.5	Integração.....	35
3.6.6	Efeito Nuclear Overhauser (NOE)	35
3.7	ANÁLISE MULTIVARIADA	36
3.8	METABOLÔMICA	37
4.	METODOLOGIA	39
4.1	ESTERILIZAÇÃO	39
4.2	MEIOS DE CULTURA.....	39
4.2.1	Meio BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA)	39
4.2.2	Meio BATATA-DEXTROSE (BD).....	39
4.3	CULTIVO	39
4.4	EXTRAÇÕES.....	39
4.4.1	Filtrado da Cultura	39
4.4.2	Micélio.....	40
4.5	METABOLÔMICA DO FILTRADO DA CULTURA	40
4.5.1	Tampão Fosfato de Sódio 0,1M (pH = 7,4) com 1 mM de TSP	40
4.5.2	Experimentos de RMN- ¹ H.....	40
4.5.3	Análise	41
4.6	CRESCIMENTO DO MICÉLIO.....	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.	CONCLUSÃO	53

7. PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE.....	63

1. INTRODUÇÃO

A Natureza tem sido, por milhares de anos, uma fonte de agentes terapêuticos, e muitos fármacos existentes atualmente derivam de fontes naturais (SARKER et al., 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 75% das pessoas ainda recorrem primeiramente a produtos à base de plantas para tratar problemas de saúde (SARKER et al., 2006).

Fungos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente como fábricas celulares para a produção de enzimas e uma grande variedade de metabólitos. São conhecidas diversas fontes de compostos bioativos de fungos e a pesquisa para o isolamento de novos metabólitos a partir de fungos, que teve início há muitos anos atrás, ainda continua muito ativa (ARCHER *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2010). Produtos naturais de fungos tem sido fármacos revolucionários contra diversas doenças, e também tem servido como inspiração para fármacos inovadores (JIANG e AN, 2000).

A metabolômica é geralmente definida tanto quanto a análise qualitativa como a quantitativa de todos os metabólitos em um organismo. Ao analisar um metaboloma será detectado tanto os metabólitos primários quanto os secundários (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007).

Dipeptídeos cíclicos do tipo 2,6-dioxipiperazinas foram isolados do filtrado da cultura do fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, em trabalho realizado no Canadá. Em um trabalho executado no Brasil, com o endofítico *Rhizoctonia solani*, isolado da planta *Schinus terebitifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, foi relatado que do extrato metanólico do micélio apresentou atividade antinociceptiva em ratos. O presente trabalho objetiva estudar os metatabólitos presentes, inicialmente, no filtrado da cultura do endofítico *Rhizoctonia solani*.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os metabólitos presentes no filtrado e no micélio da cultura do fungo endofítico *Rhizoctonia solani* aplicando a técnica de RMN.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Cultivar o fungo em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar)
- Cultivar o fungo endofítico *Rhizoctonia solani* durante seis e oito semanas em meio BD (Batata-Dextrose);
- Realizar coletas semanais do filtrado e do micélio da cultura do fungo;
- Realizar experimentos de RMN-¹H, utilizando a técnica de NOESY 1D, com o filtrado da cultura do fungo endofítico *Rhizoctonia solani*;
- Identificar os metabólitos presentes no filtrado da cultura do fungo ao longo de oito semanas;
- Construir uma curva de crescimento do micélio ao longo de seis semanas.
- Executar análise multivariada dos dados de RMN-¹H, mostrando a evolução metabólica da cultura através análise de OPLS.

3. REVISÃO DE LITERATURA

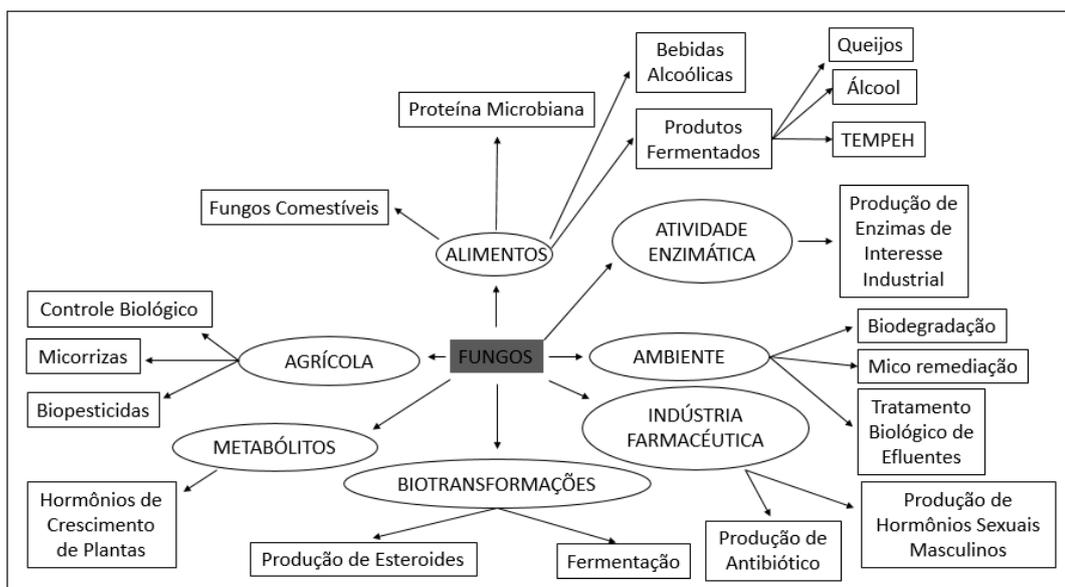
Por milhares de anos a medicina e os produtos naturais estão intimamente ligados através da utilização de medicamentos populares e o uso de venenos naturais (BUTLER, 2004).

Os produtos naturais têm sido a fonte de maior sucesso de droga em potencial. No entanto, os recentes esforços na implementação de descoberta e desenvolvimento de drogas têm demonstrado um declínio no interesse. Entretanto, os produtos naturais continuam a fornecer uma diversidade estrutural única em comparação com a química combinatória padrão, que apresenta oportunidades para descobrir novos compostos, principalmente de baixo peso molecular. Uma vez que menos de 10% da biodiversidade do mundo foi avaliada com potencial atividade biológica, muitos compostos naturais podem ser descobertos, com o desafio sendo acessar essa diversidade química natural (MISHRA; TIWARI, 2011; REY-LADINO et al., 2011; CRAGG; NEWMAN, 2005; HAEFNER, 2003; BUTLER, 2004).

3.1 FUNGOS

Desde o surgimento do primeiro fungo há milhares de anos até os dias atuais, os mesmos têm desempenhado papéis muito importantes, indo desde a degradação de materiais orgânicos à produção de fármacos como mostrado na figura 1.

Figura 1. Potencial de interação e utilização dos fungos



Fontes: ESPOSITO, 2010 apud ALEXOPOULOS, 1996.

Os fungos, também chamados de bolores, mofos ou cogumelos, na maior parte das vezes, são lembrados somente pelos danos que algumas espécies causam, como mostrado na

Figura 2, onde de cerca de 1,5 milhões de espécies a qual estima-se existir, cerca de 90 mil foram descritas e menos de 150 foram descritas como patógenos ao ser humano (AZEVEDO, 1997; ANVISA, 2004, ESPOSITO, 2010).

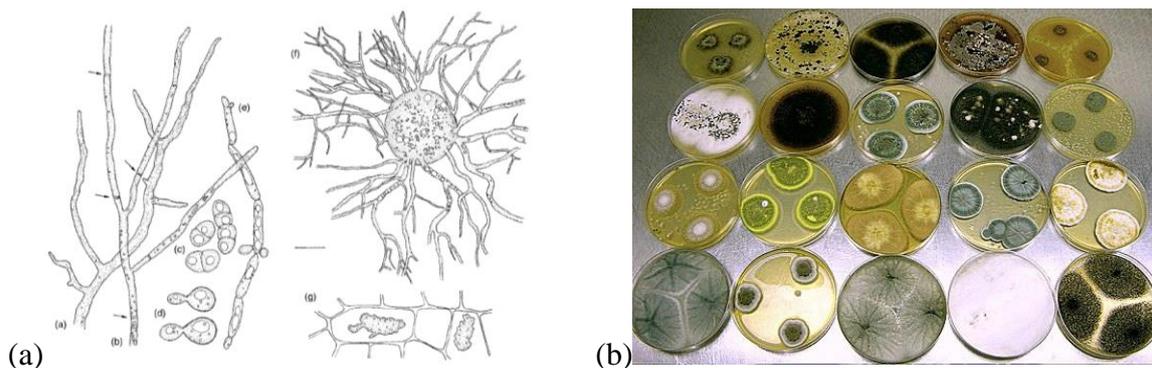
Figura 2. Principais malefícios causados por fungos



Fonte: PUTZKE e PUTZKE 2002

Os fungos são geralmente formados por um emaranhado de filamentos de células, denominadas **hifas**, as quais variam em diâmetro, espessura (Figura 3.a) e cor, o qual facilitam a colonização das fontes de alimentos, e sua reprodução. O tamanho das hifas pode variar de 1 a 30 μ m, ou mais, dependendo da espécie e das condições de crescimento. O conjunto de hifas é denominado **micélio** (Figura 3.b) (PUTZKE; PUTZKE, 2004; WEBSTER; WEBER, 2007; KAVANAGH, 2005).

Figura 3. (a) Representação de diferentes hifas (b) Representação de diferentes micélios



Fontes: (a) WEBSTER; WEBER, 2007, (b) < <http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/2011/286/quando-os-microrganismos-salvam-vidas>> acessado em: 08/06/2015

Diferente dos animais e plantas, a reprodução dos fungos é algo facultativo, ou seja, se as condições do meio onde vivem permitem sua reprodução, então a mesma ocorre (ESPOSITO, 2010). Dependendo da espécie do fungo, o mesmo pode se reproduzir de forma sexuada (isto é, a fusão nuclear e meiose) ou assexuada (isto é, puramente divisão celular mitótica) (WEBSTER; WEBER, 2007).

Os fungos são seres **heterótrofos**, ou seja, que não produzem seu próprio alimento, obtendo assim seus nutrientes parasitando outros ambientes, tendo sua necessidade nutricional dividida em duas classes, os macronutrientes (exigindo em quantidades por volta de 10^{-3} M) e os micronutrientes (requeridos em quantidades por volta de 10^{-6} M ou menos), tendo como macronutrientes carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio, e como micronutrientes ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio. Para alguns fungos também são necessários como micronutrientes escândio, gálio, vanádio e cobalto (PUTZKE; PUTZKE, 2002 apud RUIZ-HERRERA et al 1990, SERANO; RODRIGUEZ-DE-VALE, 1990, FRIES, 1965). A tabela 1 descreve a finalidade de alguns nutrientes.

Segundo PUTZKE e PUTZKE (2002), o metabolismo dos fungos constitui-se em uma série de reações químicas que servem para duas funções:

- 1- Anabólica: consiste na troca de nutrientes nos componentes estruturais e funcionais do organismo, sendo considerada a fase construtiva; ela depende da função catabólica;
- 2- Catabólica: consiste na extração de energia química ou de elementos nutritivos de substâncias complexas para prover de energia e de materiais as reações anabólicas, sendo considerada uma fase de consumo.

Os fungos obtêm a sua energia a partir da oxidação de compostos orgânicos carbonados, como a glicose. Metabolicamente, os fungos são versáteis bioquimicamente, produzindo metabólitos primários como o ácido cítrico, etanol, glicerol e metabólitos secundários como antibióticos (penicilina) e aflotoxinas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2005).

Tabela 1. Elementos requeridos pela célula do fungo

Elemento	Fontes Comuns	Função na Célula
Carbono	Açúcar	Estrutura elementar das células do fungo em combinação com hidrogênio,

		oxigênio e nitrogênio. Fonte de energia
Hidrogênio	Prótons de ambientes ácidos	PH ácido intracelular (em torno de 5-6) necessária para o metabolismo dos fungos
Oxigênio	Ar, O ₂	Substrato para respiratório e outras enzimas oxidativas de função mista. Essencial para a síntese de ergosterol e ácido oleicos insaturados
Nitrogênio	Sais de NH ₄ ⁺ , uréia, amino ácidos	Estruturalmente e funcionalmente como nitrogênio amínico orgânico em proteínas e enzimas
Fósforo	Fosfatos	Transformação de energia, ácido nucleico e estrutura da membrana
Potássio	Sais de K ⁺	Balanço iônico, atividade enzimática
Magnésio	Sais de Mg ²⁺	Atividade enzimática, células e estrutura de organelas
Enxofre	Sulfetos, Metionina	Aminoácidos e vitaminas sulfidrilo
Cálcio	Sais de Ca ²⁺	Possível mensageiro secundário na transdução de sinal

Cobre	Sais de cobre	Pigmento redox
Ferro	Sais de ferro: Fe^{3+} é quelatado e lançado como Fe^{2+} dentro da célula	Proteínas heme, citocromos
Magnésio	Sais de Mn^{2+}	Atividade enzimática
Zinco	Sais de Zn^{2+}	Atividade enzimática
Níquel	Sais de Ni^{2+}	Atividade enzimática
Molibdênio	Na_2MoO_4	Metabolismo de nitratos, vitamina B_{12}

Fonte: Kavanagh, 2005.

3.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS

A palavra ‘endofítico’ etimologicamente significa ‘dentro da planta’ (endon: dentro, phyton: planta). Inicialmente, o termo endofítico se referia a qualquer organismo que colonizasse o interior de uma planta, mas foi Wilson em 1995 quem restringiu o termo unicamente para micro-organismo, referindo-se somente a fungos e bactérias que não provocam danos aparente a planta hospedeira. Atualmente, este termo se refere a fungos, bactérias, algas e insetos, onde os fungos são os micro-organismos que se tem isolado com maior frequência como endofítico (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012, RODRÍGUEZ et al., 2009, SCHULZ e BOYLE, 2005, STROBEL et al., 2004, TAN, 2001).

Os fungos vivem em mutualismo, comensalismo ou antagonismos com uma ampla faixa de organismo (KRIEL; SWART; CROUS, 2000). Os fungos não produzem clorofila, então, em alguns casos, sua sobrevivência depende do sucesso da sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas (ZOBERI, 1972).

O endofitismo se refere a uma associação de custo-benefício não obstrutiva, e sim assintomática e transitória, definida por localização, e que se estabelece dentro do tecido vivo da planta hospedeira (KURASI; HERTWECK; SPITELLER, 2012, RODRÍGUEZ, 2009,

SCHULZ, 2005, STROBEL, 2004, TAN, 2001), o fungo passa a receber nutrição e abrigo da planta, aumentando sua sobrevivência. A planta, por sua vez, aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos (CLAY; SCHARDL, 2002) e abióticos (SAIKKONEN et al., 1998; SCHARDL; LEUCHTMANN; SPIERRING, 2004). O mecanismo pelo qual o fungo beneficia e aumenta o desempenho do seu hospedeiro é através da excreção de metabólitos (SCHULZ et al., 1995), beneficiando por meio de três mecanismos:

1. Direto: por meio de enzimas e/ou metabólitos secundários com atividade anti-patógeno, produzidos diretamente pelo fungo endofítico;
2. Indireto: consiste na indução ou aumento da expressão do mecanismo de defesa química ou fisiológica intrínsecos a sua planta hospedeira;
3. Ecológico: são realizadas por ocupar nichos ecológicos, hiper-parasitismo e predação (HERRE et al., 2007, GAO et al., 2010).

Os endofíticos podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta (PETRINI et al. 1992), possuindo as exoenzimas necessárias para colonizar seus hospedeiros (SCHULZ et al., 2002), mas, usualmente, habitam as partes superiores de plantas como folhas, galhos, cascas, pecíolos e estruturas reprodutivas (FAETH & FAGAN, 2002). Estes micro-organismos foram descobertos em todas as plantas examinadas até o momento (ARNOLD et al., 2000), sendo capazes de colonizar uma ampla faixa de hospedeiros, alguns mostrando especificidade à certas plantas (KRIEL; SWART; CROUS, 2000).

Os micro-organismos endofíticos constituem uma fonte potencial de produtos naturais pouco explorada, quando comparada às plantas e organismo marinhos. A maioria das pesquisas com endofíticos têm sido realizadas em países do hemisfério norte e Nova Zelândia. Os resultados de regiões tropicais são menos numerosos, mas têm mostrado que as plantas tropicais apresentam grande diversidade de micro-organismos endofíticos, muitos deles ainda não classificados e que podem pertencer a novos gêneros e espécies (AZEVEDO et al, 2000; STROBEL, 2002). Uma grande diversidade de metabólitos pode ser encontrada com o estudo de fungos obtidos em uma única espécie vegetal, pois se estima que cerca de $1,3 \times 10^6$ endofíticos habitem as 270.000 plantas vasculares conhecidas (BRADY; CLARDY, 2000).

3.3 METABÓLITOS PRIMÁRIOS

Metabólitos primários estão envolvidos no crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo. O metabólito principal é tipicamente um componente-chave na manutenção de processos fisiológicos normais; assim, é muitas vezes referido como um metabólito central.

Metabólitos primários são tipicamente formados durante a fase de crescimento, como resultado do metabolismo energético, e são consideradas essenciais para o crescimento adequado (Boudless, 2015). São usados em indústrias alimentícias e de ração incluindo álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantona), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflaxina, cianocobalamina, biotina) (DEMAIN, 2000; RAJASEKARAN; CHANDRASEKARAN; MUTHSELVAM, 2008).

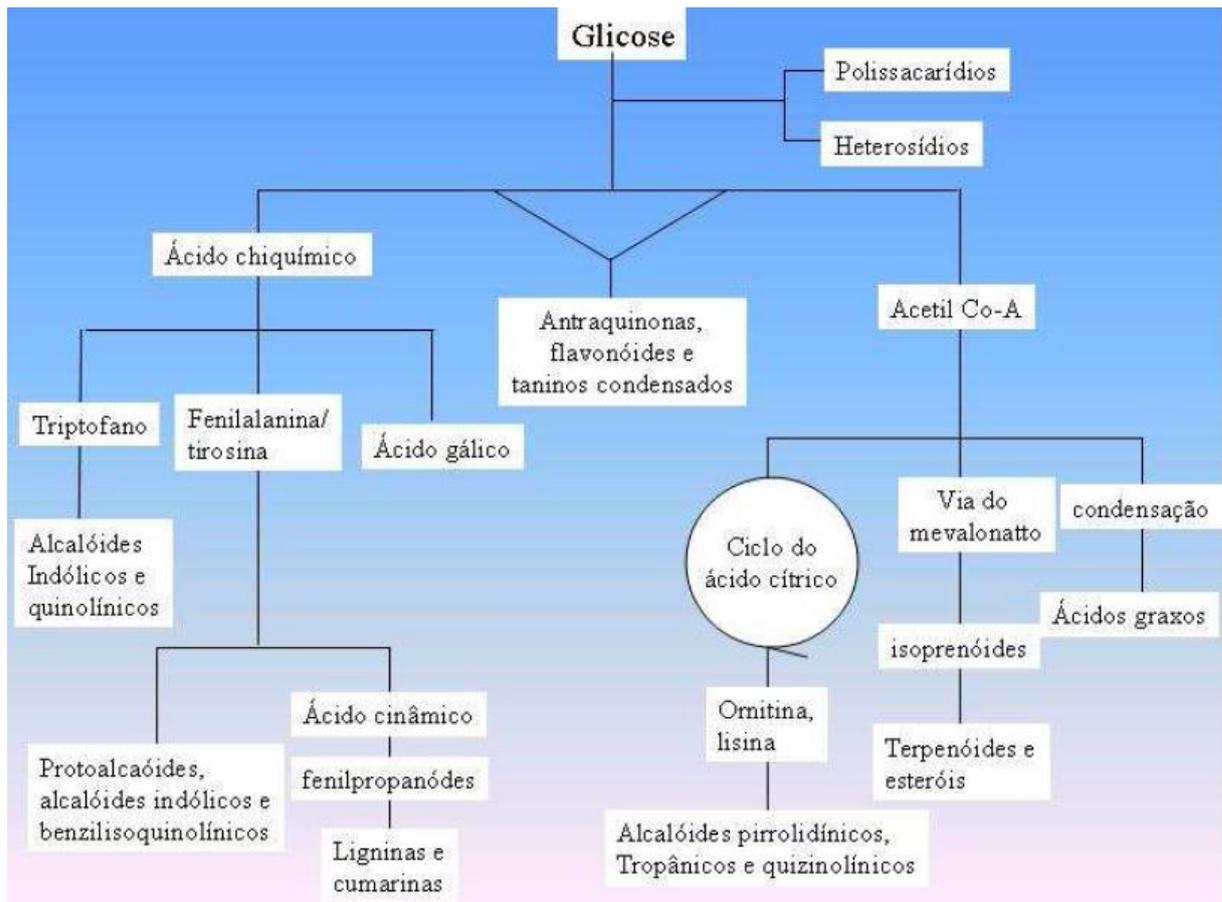
3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Em contraste aos metabólitos primários, os metabólitos secundários não são essenciais ao crescimento e de fato pode ter pouca ou nenhuma função primária dentro do organismo. Os metabólitos secundários são produzidos quando o organismo entra na fase estacionária. Os metabólitos produzidos nesta fase são muitas vezes associados com a diferenciação e a esporulação e podem ter importantes atividades biológicas, as quais, em alguns casos, têm sido exploradas economicamente (KAVANAGH, 2005) para a produção de inseticidas, corantes, flavorizantes, aromatizantes e medicamentos (MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R., 2007).

Na natureza, metabólitos secundários são importantes para os organismos que os produzem, funcionando como (i) hormônios sexuais, (ii) ionóforos, (iii) “armas” competitivas contra bactérias, fungos, amebas, insetos e plantas, (iv) atividades desconhecidas (DEMAIN; ADRIO, 2008). Metabólitos secundários são usualmente separados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossomais, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos de policetídeos-peptídeos (KEMPKEN; ROHLFS, 2010; ROZE; CHANDRA; LINZ, 2011).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavanóides e dos taninos condensados (Figura 4) (SANTOS, 2004).

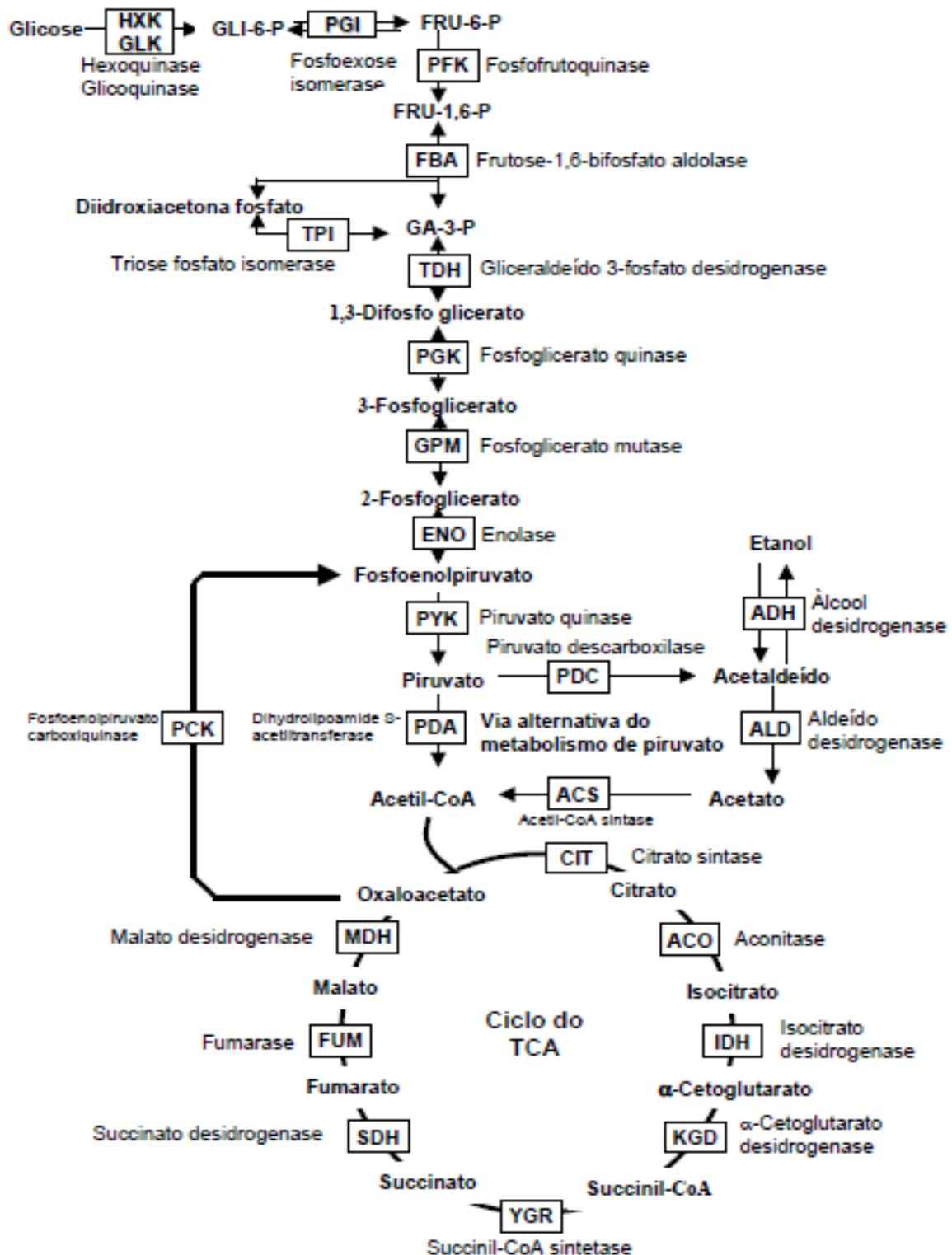
Figura 4. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários



Fonte: SANTOS, (2004)

O metabolismo da glicose ocorre pela glicólise, uma via central e universal, através da qual ocorre, na maioria das células, o principal fluxo do carbono (JOHNSTON, 1999) (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática do metabolismo da glicose e TCA (Ciclo do Ácido Tricarboxílico) ou Ciclo de Krebs



Fonte: ALCADE, 2002

3.5 RHIZOCTONIA SOLANI

A forma do gênero *Rhizoctonia* é considerada como um conjunto heterogêneo de táxons de fungos filamentosos que não produzem esporos assexuais e compartilham uma série de características comuns em seus estados anamórficos (formas mais complexas). Os organismos pertencentes a este complexo de espécies são geralmente fungos do solo, em sua maioria associados com raízes e, geralmente, patógenos, embora tenha havido relatos de um número de taxa saprófita e simbiótica (GARCÍA et al., 2006).

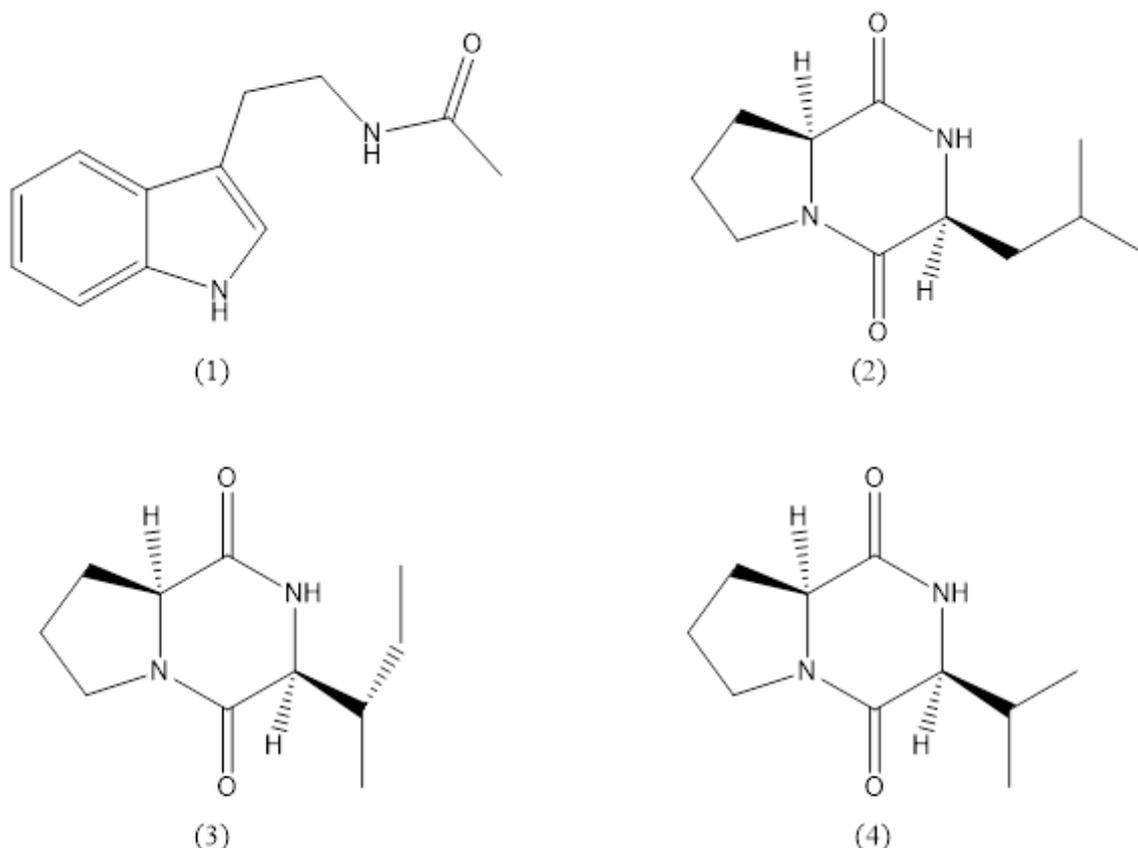
Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia*, fitopatogênicos ou saprofíticos, não descritos ao nível de espécie são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação impostas por limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, tais como: (i) ausência de esporos assexuais; (ii) instabilidade na morfologia de culturas e escleródios, em função de variações nas condições de cultivo (PARMETER; WHITNEY, 1970); (iii) ampla variabilidade morfológica, sendo que há espécies constituídas por diferentes grupos de isolados com afinidade para efetuar anastomose de hifas entre si (OGOSHI, 1987); (iv) necessidade de métodos específicos para se induzir estruturas basidiais *in vitro* (CARLING; SUMMNER, 1992) e (v) desconhecimento dos teleomorfos para algumas espécies anamórficas (STALPERS; ANDERSEN, 1996).

Rhizoctonia solani, é o mais estudado do seu gênero, é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros e causador de importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo incluindo agrônomicas, ornamentais e espécies florestais, sendo considerado um dos patógenos de plantas mais destrutivos (ANDERSON, 1982; CASTRO et al, 2009; SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

De acordo com trabalho de PEDRAS et al. (2005), quatro metabólitos secundários foram isolados e identificados, pela primeira vez, do filtrado da cultura de *Rhizoctonia solani*: (1) N₆-acetiltriptamina e três dioxopiperazinas, (2) ciclo(S-Pro-S-Leu), (3) ciclo(S-Pro-S-Ile) e (4) ciclo(S-Pro-S-Val) (FIGURA 6).

Diferente do trabalho de PEDRAS et al. (2005) e muitos outros, BARROS et al. (2011) trata o fungo *Rhizoctonia solani* com um endofítico, o qual foi extraído da planta *Schinus terebinthifolius*, popularmente conhecida como *aroeira*, onde do extrato metanólico do micélio foi detectada atividade antinociceptiva em ratos.

Figura 6. Compostos extraídos e elucidados por PEDRAS (2005)



Fonte: Próprio autor.

3.6 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

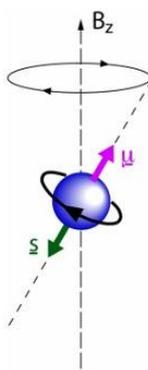
O contínuo progresso da espectroscopia de RMN pode claramente ser vista na lista de ganhadores de prêmios Nobel. Em 1944, o primeiro Prêmio Nobel de Física foi concedido a Isaac Rabi pelo desenvolvimento de um método de ressonância que possibilitou o registro das propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. Bloch e Purcell receberam o prêmio em 1952 como uma homenagem aos primeiros experimentos práticos de RMN, que foram realizadas independentemente por ambos em 1945, em diferentes lugares. A partir deste momento, a espectroscopia de RMN começou a se tornar mais do que um experimento físico. Pela descoberta do “deslocamento químico” o método tornou-se uma ferramenta útil para os químicos na elucidação de estruturas. Os primeiros espectrômetros de RMN úteis foram de onda contínua (CW), cujos instrumentos utilizavam eletroímãs permanentes. Sua utilidade chegou ao fim com o surgimento dos magnetos supercondutores na década de 1970. No entanto, somente quando Ernst desenvolveu os princípios básicos do método de transformada de Fourier (FT), os fundamentos dos métodos modernos de espectroscopia de RMN foi colocado.

Inicialmente, a espectroscopia de RMN era um domínio de médicos, sendo Ernst o primeiro químico na lista de ganhadores do Prêmio Nobel, em 1991. Uma década mais tarde, Wüthrich foi o segundo químico agraciado. Ele recebeu o Prêmio em 2002 pela elucidação de estruturas tridimensionais de macromoléculas. A técnica de RMN tornou-se uma ferramenta importante em vários campos científicos, especialmente para medicina. Não é de estranhar que apenas um ano depois, a técnica de RMN foi homenageada novamente, e os prêmios Nobel foram concedidos a Lauterbach e Mansfield por suas pesquisas em imagens de ressonância magnética. Atualmente, a comunidade RMN espera novos Prêmios no futuro, em uma das áreas de aplicação da espectroscopia de RMN (HOLZGRABE; DIEHL; WAWER, 2008).

3.6.1 Princípios de Ressonância Magnética Nuclear

Os núcleos de todos os átomos, podem ser caracterizados por um número quântico de spin nuclear, I , que pode ter valores maiores ou igual a zero e que são múltiplos de $\frac{1}{2}$. Aqueles com $I = 0$ não possuem spin nuclear e desta forma não apresentam o fenômeno da RMN. Embora muitos núcleos possuam $I = 0$, como por exemplo o carbono-12, pelo menos um de seus isótopos possui spin nuclear diferente de zero, como é o caso do carbono-13 (Tabela 2). A propriedade de spin nuclear é fundamental para que ocorra o fenômeno de RMN. Como todo núcleo possui um momento angular, ou seja, possui um movimento giratório em torno de seu próprio eixo, faz com que seja gerado um momento magnético (Figura 7) (CLARIDGE, 2009).

Figura 7. Próton girando em torno do seu próprio eixo gerando um momento angular e um momento magnético



Fonte: TÉLLEZ, M. A. La Mecánica Cuántica, disponível em < <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com.br/2009/08/el-experimento-stern-gerlach.html> >, acessado em 14/06/2015.

O momento magnético gerado é diretamente proporcional ao momento angular ρ , e a razão giromagnética γ do núcleo em questão, a qual é um valor constante para cada isótopo.

$$\mu = \rho\gamma \quad (\text{Eq. 1})$$

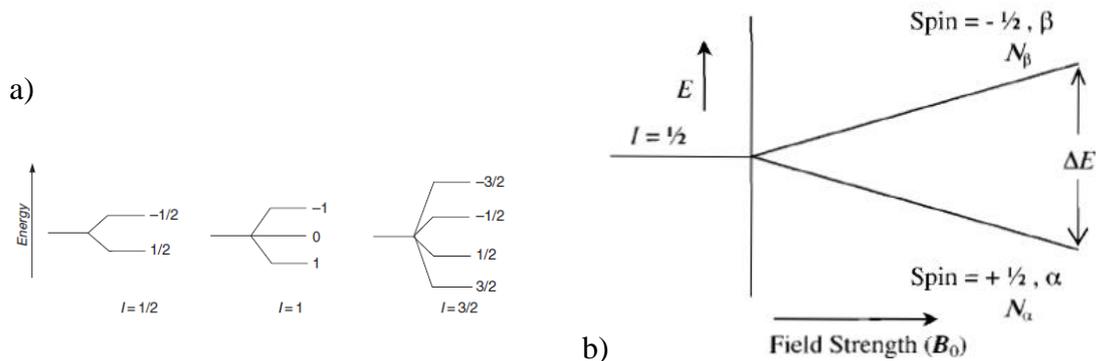
Tabela 2. Propriedades dos núcleos de spin $1/2$ selecionados. As frequências são dadas para um espectrômetro de 400 MHz (magneto de 9,4 T), as sensibilidades são dados relativos às observações de prótons e incluem termos tanto para sensibilidade intrínseca do núcleo e quanto sua abundância natural

Isótopo	Abundância Natural	Frequência RMN (MHz)	Sensibilidade Relativa
^1H	99,98	400	1,0
^3H	0	426,7	1,2
^{13}C	1,11	100,6	$1,76 \times 10^{-4}$
^{15}N	0,37	40,5	$3,85 \times 10^{-6}$
^{19}F	100,00	376,3	0,83
^{29}Si	4,7	79,5	$3,69 \times 10^{-4}$
^{31}P	100,00	161,9	$6,63 \times 10^{-2}$
^{77}Se	7,58	76,3	$5,25 \times 10^{-4}$
^{103}Rh	100,00	12,6	$3,11 \times 10^{-5}$
^{113}Cd	12,16	88,7	$1,33 \times 10^{-3}$
^{119}Sn	8,58	149,1	$4,44 \times 10^{-3}$
^{183}W	14,40	16,6	$1,03 \times 10^{-5}$
^{195}Pt	33,80	86,0	$3,36 \times 10^{-3}$
^{207}Pb	22,60	83,7	$2,07 \times 10^{-3}$

Fonte: CLARIDGE, 2009

Quando não expostos a um campo magnético forte, todos os núcleos, de um mesmo elemento, são equivalentes. No entanto, quando expostos a um campo magnético externo (\mathbf{B}_0), os momentos magnéticos dos núcleos alinham-se com este campo, adquirindo $2I + 1$ (Eq. 2) orientações (Figura 8a), onde, os núcleos que alinham a favor do campo B_0 (spin α) corresponde ao estado de menor energia, já os núcleos que se alinham contra o campo B_0 (spin β) corresponde ao estado de maior energia. A diferença de energia entre o estado α e β é quantizada e diretamente proporcional a intensidade do campo B_0 ($\Delta E = h\nu = -\left(\frac{h\gamma}{2\pi}\right)B_0$ Eq. 3), como pode ser observado na Figura 8b, onde h corresponde a constante de Planck (CLARIDGE, 2009; KEELER, 2002; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005)

Figura 8. (a) Número de orientações que um núcleo pode assumir de acordo com o seu I. (b) Diferença de energia entre os estados α e β quando expostos a um campo magnético externo.



Fontes: a) CLARIDGE, 2009; b) SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005.

A distribuição dos spins nos dois níveis de energia é regida pela equação de Boltzmann (MAZZOLLA, 2009):

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right)} \quad \text{Eq. 4}$$

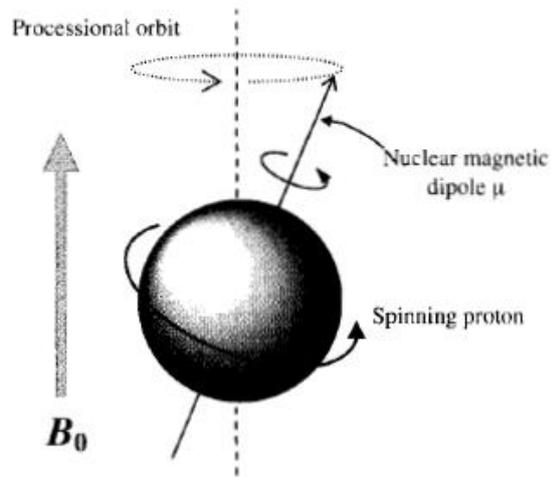
Onde N_{α} é o número de spins alinhados paralelamente, N_{β} é o número de spins alinhados antiparalelamente, K é a constante de Boltzmann $k=1,3805 \times 10^{-23}$ joules/kelvin e T é a temperatura em Kelvin.

A orientação paralela é a de menor energia potencial e, portanto, representa a situação mais estável. Nela, o sentido dos momentos magnéticos coincide com o sentido do vetor campo magnético. Na orientação antiparalela, o vetor momento magnético se dispõe em sentido contrário ao vetor campo magnético. Esse é um estado metaestável, isto é, um estado excitado, cuja energia potencial é superior à energia do estado paralelo (GARCIA, 1998).

Uma vez expostos a um campo magnético, os núcleos tendem a tentarem se alinhar com o campo B_0 , no entanto o momento angular faz com que surja um novo movimento, chamado de movimento de precessão (Figura 9). A frequência com que o núcleo precessa é denominada frequência de Larmor

(MAZZOLLA<http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/images/documentos/Principios_fisicos_da_ressonancia_magnetica.pdf>).

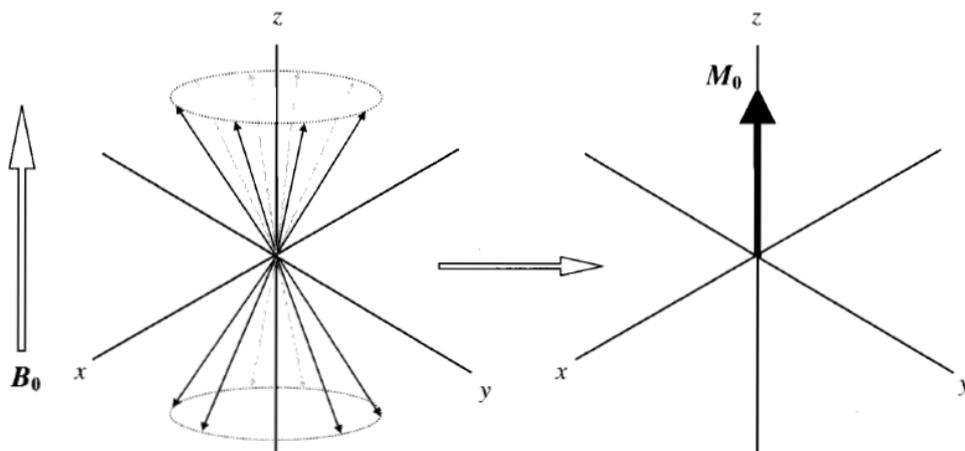
Figura 9. Movimento de precessão efetuado pelo núcleo quando exposto a um campo externo



Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005.

Quando os núcleos estão orientados por um campo magnético externo, a soma de todos os vetores magnéticos fornece uma resultante M_0 que tem a mesma direção e sentido do vetor campo magnético (Figura 10), essa resultante se deve ao fato da população de spins orientada no mesmo sentido do campo aplicado ser mais numerosa do que a população orientada no sentido contrário a este campo (GARCIA, 1998).

Figura 10. A soma de todos os vetores resultando na formação de um vetor magnético M_0



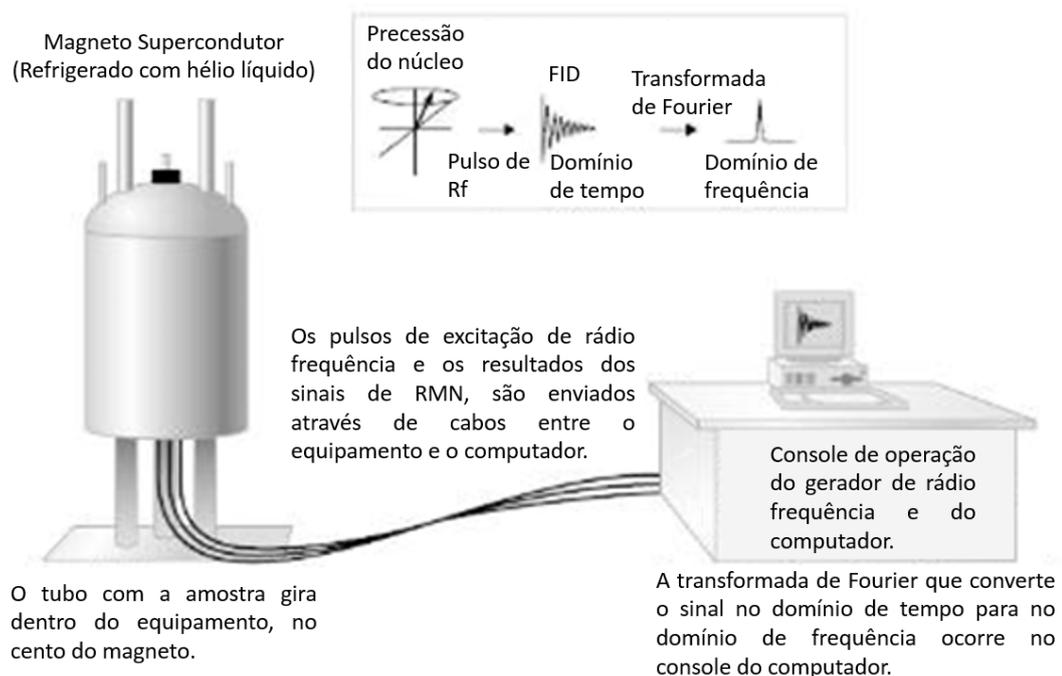
Fonte: SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005

3.6.2 Obtenção de espectro de Ressonância Magnética Nuclear

Após a amostra ser inserida no equipamento, passando a ficar exposta a um campo B_0 , que tem a finalidade de alinhar todos os núcleos das moléculas, são aplicados pulsos de energia de radiofrequência B_1 perpendicular ao campo B_0 . Por convenção, considera-se que o campo B_0 está paralelo ao eixo z e o campo B_1 ao eixo x. Ao absorver a energia fornecida, ocorre a magnetização do núcleo no plano x-y. Contudo, o núcleo mantém seu movimento precessional em torno do eixo z. Ao ser cessado o pulso de RF o núcleo tende a retornar ao seu estado inicial, ou seja, libera a energia absorvida à medida que retorna ao seu estado de origem, alinhado com o campo B_0 . Esta energia é detectada e medida por bobinas próxima a amostra que transforma o sinal em um espectro de decaimento da energia livre (FID, do inglês *Free Induction Decay*). Os sinais coletados correspondem à diferença entre a frequência aplicada e a frequência de Larmor (CLARIDGE, 2009; PAVIA et al., 2012; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Os sinais adquiridos sofrem um processo matemático denominado Transformada de Fourier, que gera um espectro convencional de RMN, como se segue na figura 11:

Figura 11. Obtenção do sinal de RMN



Fonte: Adaptado de RAFAEL, 2015

3.6.3 Deslocamento Químico

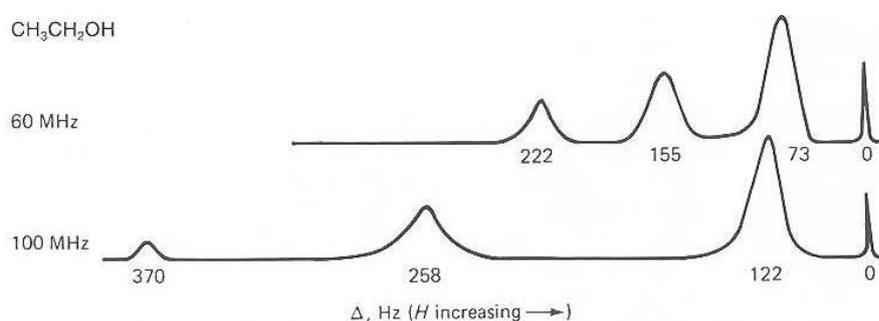
De acordo com a eq. 5 ($\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$), todos os núcleos de determinado átomo, deveriam entrar na mesma frequência com o campo magnético aplicado, contudo, isso não ocorre, devido a presença dos elétrons, que por estarem em movimento geram seu próprio campo magnético. Este campo gerado interage com o átomo, blindando o núcleo, ou seja, o campo incidente no átomo, quando o pulsos de radiofrequência for aplicado, será de menor intensidade que o aplicado devido ao efeito de blindagem dos elétrons, fazendo, desta forma, com que o campo aplicado tenha diferentes intensidades em cada ponto da molécula, gerando diferentes *ambientes químicos* na molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; HOLZGRABE, 2008). Devido a isto, a eq. 5 foi alterada, para:

$$\nu_{ef} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} (1 - \sigma) \quad (\text{Eq. 6})$$

O símbolo σ acrescentado corresponde à *constante de blindagem*, que pode variar dependendo do ambiente químico no qual o núcleo se encontra.

De acordo com a eq. 6 o deslocamento químico dos sinais de um composto em um espectro de RMN será dado de acordo com campo B_0 (Figura 12), variando com a variação do campo efetivo (KEELER, 2002).

Figura 12. Espectro de RMN H^1 do CH_3CH_2OH a 60 MHz e 100 MHz



Fonte: <http://www.ifsc.usp.br/~donoso/espectroscopia/RMN.pdf>

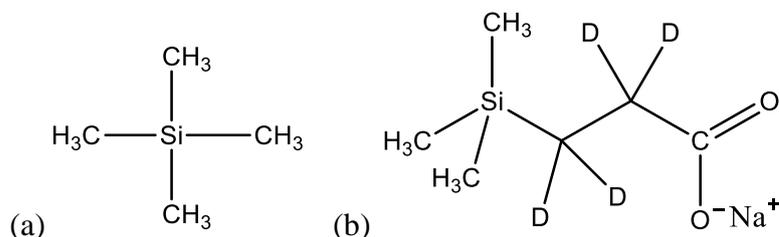
Para não haver diferença de deslocamento químico entre diferentes equipamentos convencionou-se a utilização de uma escala em ppm (parte por milhão), visto que 1 MHz corresponde a 1 milhão de Hertz, onde a escala é dada em δ que corresponde a:

$$\delta = \frac{\nu_{ef} - \nu_{TMS}}{\nu_{eq.}} \times 10^6 \quad (\text{Eq. 7})$$

onde, ν_{ef} corresponde a frequência observada do ambiente químico, ν_{TMS} a frequência observada de um composto de referência neste caso o tetrametil-silano, que por convenção seu

deslocamento químico foi determinado como sendo zero e ν_{eq} a frequência de operação do equipamento. Convertendo a escala de deslocamento químico de Hz para δ , o deslocamento químico de um mesmo ambiente químico sempre corresponderá ao mesmo valor independente do equipamento que se utilize (KEELER, 2002).

Figura 13. (a) Tetrametil-silano (TMS) e (b) Trimetilsilil propionato de sódio (TSP)



Fonte: (a) Próprio autor

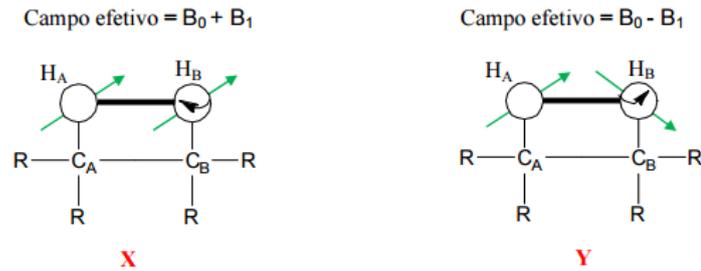
Os TMS e o TSP, Figura 13, são utilizados como compostos de referência pelo fato de possuírem seus prótons bastante blindados, tendo sido a eles atribuídos, por convenção, como deslocamento químico, valor igual a 0 (zero) ppm. No entanto, o TSP é utilizado como composto de referência de deslocamento químico quando o solvente utilizado é a água, e o TMS para os demais solventes.

3.6.4 Acoplamento

Observando-se um espectro de RMN, pode-se ver que os sinais originados das absorções nem sempre aparecem como picos únicos ou singletos, mas podem aparecer também como dupletos, tripletos, quartetos etc., o que está relacionado com o que se chama acoplamento spin-spin (NASCIMENTO, JR., 2001).

O acoplamento spin-spin resulta da influência que o campo magnético gerado por um núcleo exerce sobre um outro núcleo. Na Figura 14 podemos observar esse acoplamento, onde na situação X, o campo sentido por H_A será o campo gerado por H_B (B_1) mais o campo B_0 aplicado, por outro lado, na situação Y, o campo sentido por H_A será o campo aplicado B_0 menos o campo gerado por H_B (B_1) (SALLES, 2009).

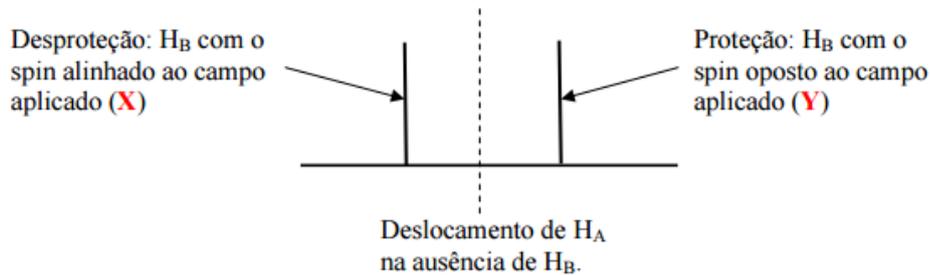
Figura 14. Campo sentido por H_A



Fonte: SALLES, 2009

Portanto, o sinal gerado para H_A , apresentado na Figura 15, mostra um desdobramento de sinais gerado pelo acoplamento de spins, onde o sinal à esquerda é de desproteção e o gerado à direita é de proteção (SALLES, 2009).

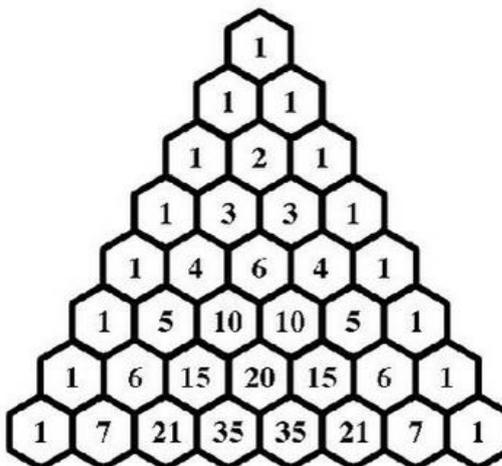
Figura 15. Desdobramento do sinal



Fonte: SALLES, 2009

As intensidades dos picos em um multipeto não são as mesmas. Elas estão associadas ao número de transições naquela determinada frequência de cada um dos picos observados. Para núcleos com $I = \frac{1}{2}$, a intensidade dos picos do multipeto pode ser obtida a partir do triângulo de Pascal (Figura 16), dispensando o cálculo dos números de transições associadas a cada um dos picos. Assim, para um dupeto, por exemplo, a intensidade dos sinais será de 1:1; para um triplete, de 1:2:1; para um quarteto, de 1:3:3:1; e assim por diante, segundo os valores expressos no triângulo de Pascal (NASCIMENTO, JR., 2001).

Figura 16. Triângulo de Pascal



Fonte: <http://cognosco.blogs.sapo.pt/arquivo/590173.html>, acessado em, 15/06/2015

3.6.5 Integração

A área de cada sinal, em um espectro de RMN de hidrogênio, corresponde à quantidade de núcleos que representa aquele sinal. No entanto, a quantidade determinada é relativa e não absoluta.

3.6.6 Efeito Nuclear Overhauser (NOE)

O NOE é de grande importância na espectroscopia por RMN. Este efeito é oriundo da interação dipolo-dipolo entre spins. Diferentemente do acoplamento escalar, ocorre através do espaço, quando a distância entre eles é próxima o suficiente para os dipolos interagirem magneticamente. Devido a este acoplamento, os spins não relaxam independentemente. Enquanto que as componentes transversais relaxam para um valor nulo, o mesmo não acontece com as componentes longitudinais (FADEL, 2003).

O NOE utiliza uma fonte adicional para irradiar um núcleo em sua frequência de ressonância (ν_2) e detectar o efeito da irradiação em um núcleo distinto usando um pulso usual (ν_1). Neste experimento é produzida uma polarização provocada pela irradiação ν_2 através do espaço, e isto provoca o aumento da população do nível mais alto de energia no hidrogênio vizinho não irradiado. Este excesso de população sofre relaxação T_1 a um nível de energia mais baixo, aumentando assim a intensidade do sinal do(s) hidrogênio(s) vizinho(s). Em moléculas muito grandes, outros fatores podem intervir e o resultado pode ser a diminuição da intensidade do sinal. (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

3.7 ANÁLISE MULTIVARIADA

O desenvolvimento de técnicas instrumentais sofisticadas e de processos químicos avançados em conjunto com a grande evolução na área da computação conduziram a uma necessidade crescente do uso de procedimentos matemáticos e estatísticos mais complexos no tratamento dos dados obtidos.

Em todo experimento, a parte essencial e determinante do sucesso na obtenção dos resultados é a análise de dados, que pode ser univariada ou multivariada. Nomeia-se de análise univariada de dados quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras, sendo esta uma forma de tratamento de dados bastante utilizada, apesar de sua aplicação estar se tornando cada vez mais limitada. Já a análise multivariada de dados vem ganhando um espaço cada vez maior. Esta consiste na verificação da relação entre grupos de variáveis dependentes coletadas sobre a mesma amostra e corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos (BARROS; PIMENTEL; ARAUJO, 2002).

Por muitos anos, predominou o paradigma de que era necessário uma complexa análise dos dados, então o experimento não teria sido planejado de forma correta. Na atualidade reconhece-se que a maioria dos sistemas são de natureza múltipla e, assim sendo, as abordagens univariadas não podem resultar em soluções ideais (HOPKE, 2003).

Os pesquisadores devem ter cautela ao trabalhar com as técnicas de análise multivariada, pois a arte do seu uso está na escolha das opções mais apropriadas para detectar os padrões esperados nos seus dados, e as opções mais apropriadas podem não estar no programa de seu computador. Leva-se algum tempo até escolher as opções menos ruins em análises multivariadas, recomenda-se que os leitores exercitem, com cautela, durante o tempo necessário para apreender as limitações dessas análises, antes de tentar explorar suas grandes potencialidades (MAGNUSSON; MOURÃO, 2003).

Os métodos multivariados são escolhidos de acordo com os objetivos da pesquisa, pois sabe-se que a análise multivariada é uma análise exploratória de dados, prestando-se a gerar hipóteses, e não tecer confirmações a respeito dos mesmos, o que seria uma técnica confirmatória, como nos testes de hipótese, nos quais se tem uma afirmação a respeito da amostra em estudo, embora, às vezes, possa ser utilizada para confirmação dos eventos (HAIR et al, 2005).

3.8 METABOLÔMICA

O Metaboloma é a composição de todas as pequenas moléculas presentes em um organismo. A tecnologia voltada para o fornecimento de uma visão geral compreensiva qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é denominada Metabolômica (HALL, 2006).

Metabolômica é um termo recente, introduzido nos anos 2000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (FIEHN et al., 2000), e que vem sendo muito utilizado nesta era “OMICS”, de genômica, transcriptômica, proteômica, dentre outras. Os experimentos de metabolômica fornecem resultados únicos para melhorar a compreensão das informações biológicas relacionadas ao metaboloma e mais comumente à genômica funcional. O tamanho do metaboloma varia muito, pois depende do organismo estudado. *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, contém aproximadamente 600 metabólitos, identificados até o momento, enquanto as plantas têm aproximadamente 200.000 metabólitos primários e secundários (DUNN; ELLIS, 2005).

O mapeamento completo da constituição metabólica de uma espécie exige, necessariamente, o uso de instrumentos e de técnicas analíticas avançadas de alto desempenho, pois o número de compostos micromoleculares em um extrato à base de plantas ou de outros materiais de origem biológica pode chegar a milhares. Por isso, o acoplamento de uma técnica que leve à separação dos constituintes de uma amostra com uma ou mais técnicas espectroscópicas que forneçam informações sobre a estrutura destes constituintes é frequentemente utilizada para o estabelecimento dos perfis metabólicos de amostras (FUNARI et al., 2013).

Os mapeamentos metabolômicos, principalmente com auxílio da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, têm-se demonstrado viável para identificar substâncias presentes em uma determinada espécie (SOUZA et al., 2008).

A maior limitação da metabolômica é a inabilidade de incluir todos os metabólitos em apenas uma análise, obtendo assim um perfil do metaboloma. Esta inabilidade está diretamente relacionada com a complexidade química do metaboloma, a variação biológica inerente (natural) nos organismos vivos, e a limitações no acesso instrumental (SUMMER *et al.*, 2003).

A presença de alguns metabólitos em elevadas concentrações pode causar significantes interferências químicas que limitam a identificação do perfil de outros metabólitos (SUMMER; MENDES; DIXON, 2003).

A geração de muitos dados que podem ser coletados a partir do uso das técnicas analíticas modernas, em estudos metabolômicos exige, necessariamente, a associação de técnicas e de abordagens estatísticas (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007, HEYDEN, 2008). A partir do pré-tratamento dos dados, sejam aqueles obtidos por técnicas de separação e/ou espectroscópicas, técnicas quimiométricas capazes de selecionar informações relevantes poderão ser usadas para diferentes propósitos. Por exemplo, comparações de amostras para efeito de acesso de identidade podem ser feitas por meio de coeficientes de correlação ou calculando-se o grau de similaridade entre uma amostra e aquela de referência (HEYDEN, 2008). Já para estudos taxonômicos e de quimiosistemática, ou para correlacionar um perfil metabólico a uma determinada atividade biológica, a aplicação de técnicas quimiométricas de análise multivariada é recomendada (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007, HEYDEN, 2008). Elas permitem a classificação ou a formação de conglomerados de dados ou *clusters*, por meio da análise de componentes principais (PCA) ou de análise hierárquica de agrupamentos (HCA), *mínimos quadrados parciais (PLS)*, análises discriminantes, análises de correlações, etc (VERPOORTE; CHOI; KIM, 2007, FUNARI, 2012, HEYDEN, 2008).

4. METODOLOGIA

Este trabalho utilizou o fungo *Rhizoctonia solani* isolado como endofítico de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi, popularmente conhecida como aroeira, e identificado morfológicamente por Albuquerque (2007).

4.1 ESTERILIZAÇÃO

Todo material utilizado foi previamente lavado e esterilizado, tenha sido em estufa a 200 °C por 1 hora ou em autoclave a 1 atm por 15 minutos.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA)

Para cada 1L de meio foi utilizado 200 g de batata inglesa previamente descascadas, em seguida as batatas foram cozidas por 30 minutos com 500 mL de água destilada, filtrou-se a mistura, ainda quente, com papel de filtro, ao filtrado foi adicionado 20 g de dextrose (VERTEC, QUÍMICA FINA), 20 g de ágar (VERTEC, QUÍMICA FINA) e mais 500 mL de água destilada, após dissolver completamente a mistura levou-se a mesma à autoclave por aproximadamente 15 minutos a 1 atm, para esterilização do meio.

4.2.2 Meio BATATA-DEXTROSE (BD)

Para o meio BD foi utilizado o mesmo procedimento para o meio BDA, só não foi adicionado o ágar. Antes de autoclavar o meio, foi transferido 100 mL do meio para cada frasco erlenmeyer.

4.3 CULTIVO

O micro-organismo endofítico foi cultivado por um período de 30 dias em meio BDA, para se adquirir uma quantidade maior do mesmo e ser inoculado em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL do meio BD onde foi cultivado por um período de 56 dias para análise do filtrado da cultura e 42 dias para análise do micélio.

4.4 EXTRAÇÕES

4.4.1 Filtrado da Cultura

Coletou-se de 6 frascos Erlenmeyers, alíquotas de 1,5 mL do filtrado da cultura, a cada 7 dias, durante 56 dias, sendo transferidas separadamente para micro-tubos e conservadas em refrigerador.

As coletas foram realizadas utilizando-se os mesmos frascos, para uma maior exatidão nos resultados.

4.4.2 Mícélio

Foi coletado todo micélio de 5 frascos Erlenmeyers separadamente a cada sete dias, de um total de 30 frascos, em um período de 42 dias, sendo transferido para placas de Petri, previamente taradas. Manteve-se por 2 semanas o micélio coletado em estufa (UNITERM® Serie 1500) a 50 °C para secagem do material, o qual em seguida foi pesado, para determinação da massa total extraída.

Obs.: Como foram utilizados os mesmos frascos Erlenmeyers para as coletas do filtrado da cultura e os mesmos foram abertos semanalmente para se realizar a coleta, durante as coletas dos micélios, a cada sete dias os frascos Erlenmeyers restantes foram abertos e novamente vedados, para aumentar as semelhanças com a análise do filtrado da cultura.

4.5 METABOLÔMICA DO FILTRADO DA CULTURA

4.5.1 Tampão Fosfato de Sódio 0,1M (pH = 7,4) com 1 mM de TSP

Adicionou-se 0,31 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 1,09 g de Na_2HPO_4 (anidro) a 100 mL de água destilada. O pH da solução final foi de 7,4. Ao tampão foi adicionado 0,1 mM (0,0172 g) de TSP, para ser utilizado como padrão de deslocamento nos experimentos de RMN. O tampão foi conservado em geladeira a 4 °C por no máximo 1 mês.

4.5.2 Experimentos de RMN- ^1H

Para cada análise utilizou-se de 350 μL do filtrado da cultura, adicionados a 350 μL de solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4, com TSP) e 50 μL de D_2O em tubos próprios de 5 mm de diâmetro. O experimento foi realizado a 25 °C utilizando-se do experimento NOESY1D (sequência de pulsos Noesypr1d), para supressão do sinal referente a água, em um espectrômetro BRUKER UltraShield 400 MHz.

Para todos os experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros:

TD: 64K (número de pontos do espectro)

NS: 64 (número de experimentos)

SW: 13,0143 ppm (largura da janela)

RG: 256

O1P: 4,692 ppm (posição onde aparece o sinal referente a água e, portanto, é irradiada)

D1: 12,00 s (tempo de relaxação)

4.5.3 Análise

Os espectros foram pré-processados no software TopSpin[®]. Para identificação dos metabólitos utilizou-se o software Chenomx[®] e de banco de dados disponível em www.hmdb.ca. A análise estatística multivariada foi realizada utilizando-se o software MatLab[®] através de ferramenta desenvolvida pelo Dr. K. Veselkov (Imperial College, London, UK).

4.6 CRESCIMENTO DO MICÉLIO

A taxa de crescimento do micélio foi determinada pela média de 5 amostras coletadas separadamente a cada sete dias, de um total de 30 amostras. Utilizando-se do micélio previamente seco e pesado construiu-se uma tabela com os valores encontrados e um gráfico contendo a *taxa de crescimento / semana*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cultura do fungo *Rhizoctonia solani* em meio BDA apresentou-se com uma coloração acinzentada do micélio e com uma cor avermelhada no meio de cultura (Figura 17).

Figura 17. Comportamento do fungo *R. solani* em meio BDA.



Fonte: Próprio autor

Durante o cultivo em meio BD (Figura 18) foi observado que a coloração avermelhada apenas começou a aparecer na terceira semana, aumentando sua tonalidade até a sexta semana onde não houve mais alteração visível significativa em sua coloração.

Figura 18. Cultivo do fungo *Rhizoctonia solani* em meio BD, com 1 semana.



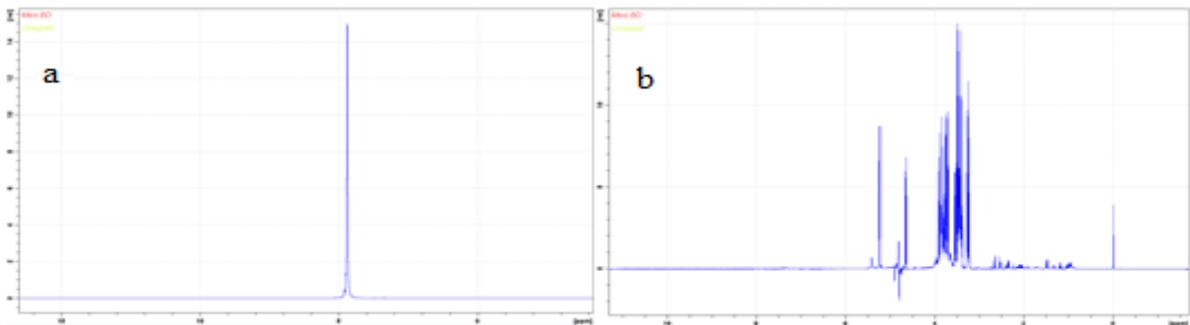
Fonte: Próprio autor

A análise do filtrado da cultura do fungo *Rhizoctonia solani* tornou-se impossível sem a supressão do sinal da água. Conforme visto na Figura 19 (a) os sinais referentes a amostra possuem intensidade muito inferior em comparação com o sinal da água, tornando-se impossível visualizá-los. Utilizando-se o experimento NOESY1D com pressaturação, tonou-se

possível a visualização dos sinais referentes a amostra, após suprimir o sinal da água, como observado na figura 19 (b).

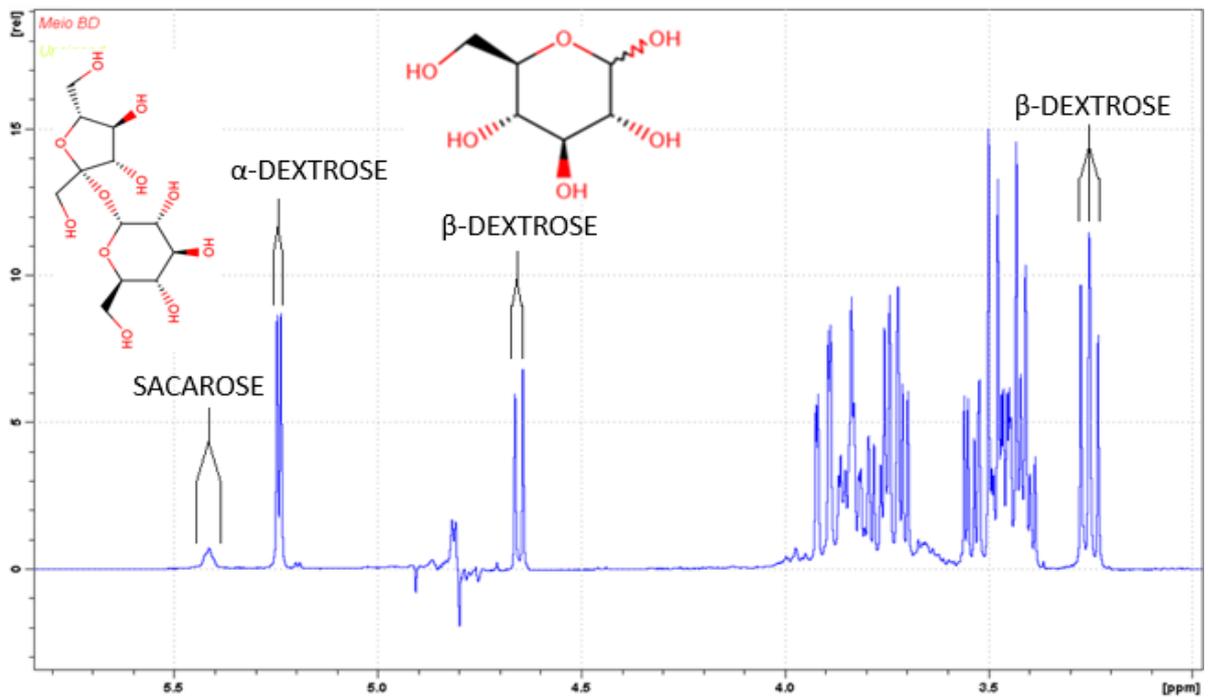
Analisando o espectro de RMN-¹H do meio BD puro, ou seja, do meio sem a presença do fungo, identificou-se os sinais referentes a α - e β -dextrose, 5,24 e 4,65 ppm, respectivamente, e, ainda, mesmo em pequena quantidade, foi possível verificar a presença de sinais característicos da sacarose em 5,41 ppm, alanina (1,48 ppm, d, $J = 7,25$ Hz, CH₃), acetato (1,92 ppm, s, CH₃), succinato (2,40 ppm, s, CH₂) e citrato (2,53 ppm, d, $J = 15,88$, H_a; 2,66 ppm, d, $J = 15,88$, H_b) (Figura 20 e 21). Com exceção da dextrose que foi adicionada ao meio, a presença de sacarose e dos metabólitos provem da extração da batata durante o cozimento. A presença de vários metabólitos contidos na batata já havia sido citada anteriormente por ROESSNER *et al.* (2000) e PARR *et al.* (2005), no entanto, os mesmos foram detectados através da técnica de cromatografia líquida e gasosa e por espectroscopia de massas.

Figura 19. Espectro de RMN-¹H do filtrado da cultura sem (a) e com (b) supressão do sinal da água



Fonte: Próprio autor

Figura 20. Sinais referentes a α e β dextrose e sacarose no espectro de RMN- ^1H do meio BD puro.



Fonte: Próprio autor

Figura 21. Metabólitos identificados no espectro de RMN- ^1H do meio BD puro, na região de 0.75-2.80 ppm, ampliado 16x.

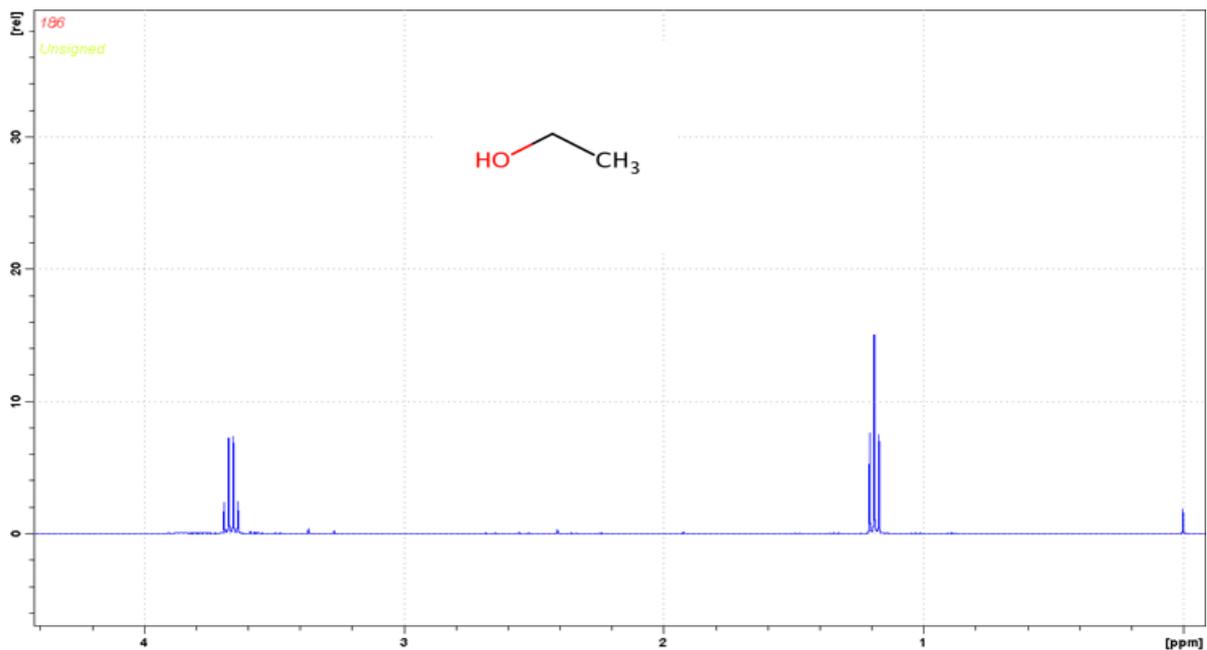


Fonte: Próprio autor

Utilizando-se uma amostra da 8ª semana de cultura e baseando-se no banco de dados disponibilizado pelo *Chemomx* e pela literatura, foi possível identificar a presença de: etanol (1,18 ppm, t, $J = 7,00$, CH_3 ; 3,66 ppm, q, $J = 7,00$, CH_2). Ampliando a região do espectro no intervalo de 1,24-3,62 ppm em 32 vezes foi possível visualizar a presença de alanina (1,48 ppm, d, $J = 7,25\text{Hz}$, CH_3), acetato (1,92 ppm, s, CH_3), succinato (2,40 ppm, s, CH_2), citrato (2,53 ppm, d, $J = 15,88$, H_a ; 2,66 ppm, d, $J = 15,88$, H_b), betaina (3,26 ppm, s; CH_3 ; 3,85 ppm, s, CH_2) e metanol (3,36 ppm, s), e na região de 5,70-9,77 ppm ampliado 256 vezes foi visualizado a presença de uracila (5,8 ppm, d, $J = 7,69\text{Hz}$, CH; 7,54 ppm, d, $J = 7,69\text{Hz}$, CH) e acetaldeído (2,25 ppm, d, $J = 9,68$ ppm, d, $J = 2,69$ Hz, CH_2) como descritos nas Figuras 22, 23, 24 e 25. Devido ao grande número de sobreposições não foi possível visualizar o quarteto referente ao CH da alanina, o qual deveria ser visível em aproximadamente 3.8 ppm.

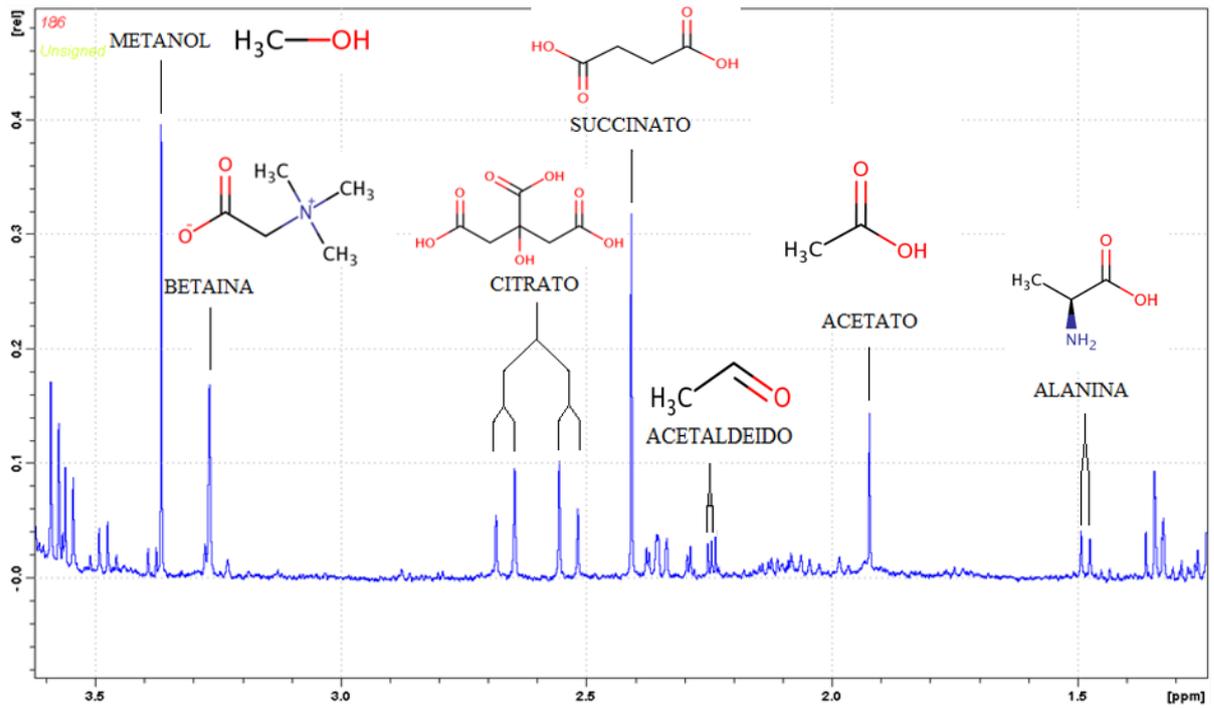
Pelo fato dos hidrogênios ácidos provenientes das hidroxilas e aminas fazerem ligações de hidrogênio com a água, seus sinais aparecem somados ao da água, no momento em que o sinal da água foi supressos, os sinais dos hidrogênios ácidos também foram eliminados.

Figura 22. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de -0.30-4.21 ppm



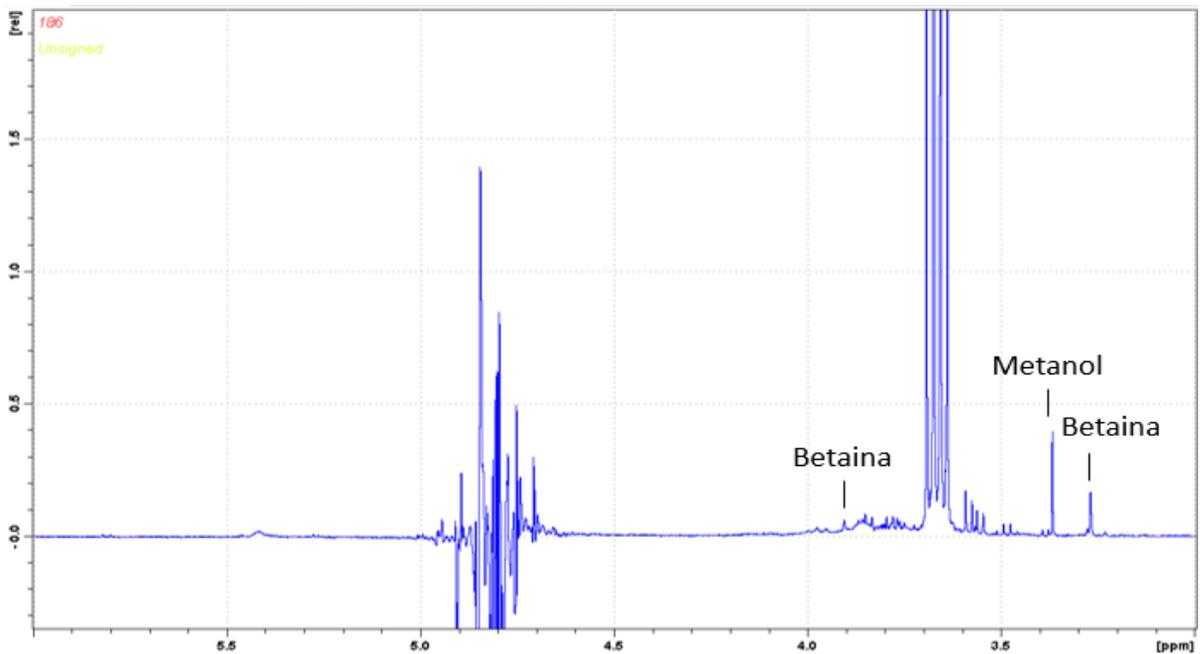
Fonte: Próprio autor

Figura 23. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de 1.23-3.62 ppm ampliado 32 vezes



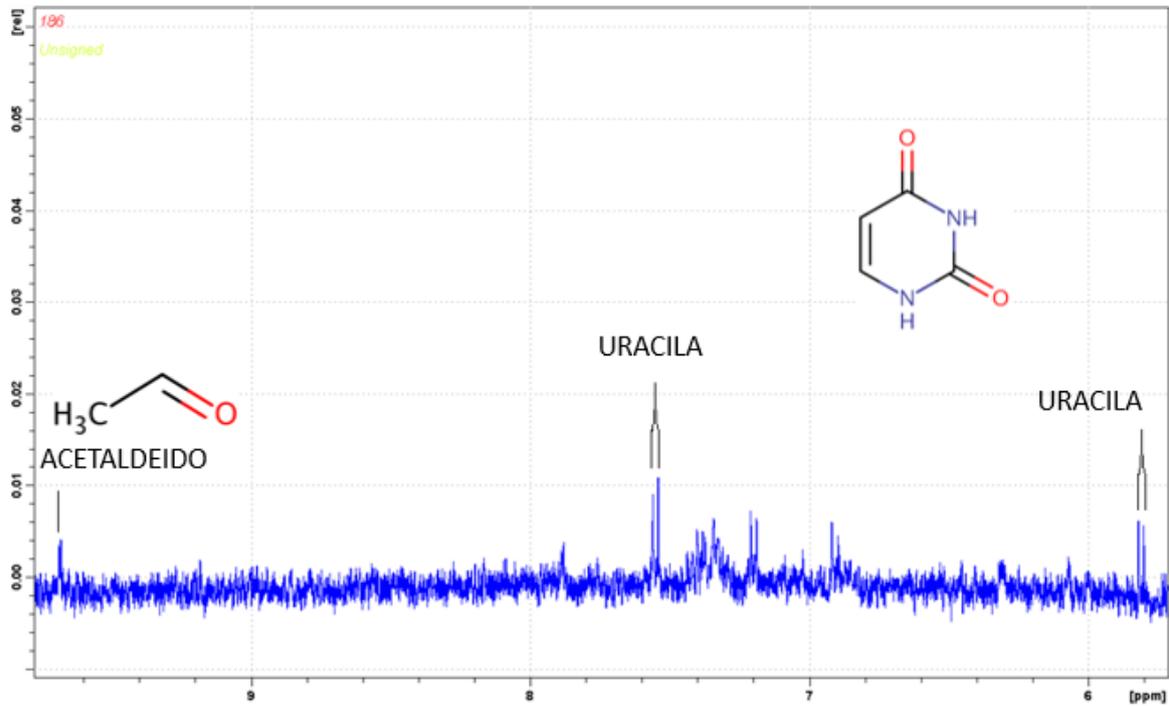
Fonte: Próprio autor

Figura 24. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de 3.00-6.00 ppm ampliado 8 vezes



Fonte: Próprio autor

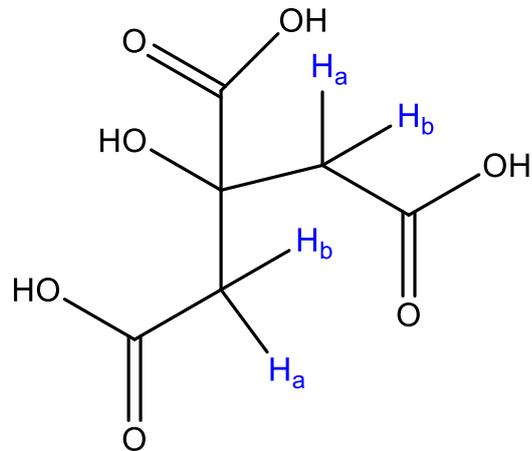
Figura 25. Espectro da oitava semana do filtrado da cultura no intervalo de 5.70-9.77 ppm ampliado 256 vezes



Fonte: Próprio autor

O efeito anisotrópico gerado pelas ligações π das carbonilas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005) do citrato, blinda um dos hidrogênios do CH_2 , fazendo com que os hidrogênios se comportem de forma distinta (Figura 26), possuindo ambientes químicos diferentes, onde o hidrogênio “b” mais blindado aparece em um deslocamento químico mais baixo, mesmo estando ligados ao mesmo carbono, desta forma, o hidrogênio “a” acopla com o hidrogênio “b” e vice-versa, gerando dois dupletos, ao invés de um singlet.

Figura 26. Distinção dos hidrogênios “a” e “b” do citrato causado pelo efeito anisotrópico das ligações π das carbonilas.



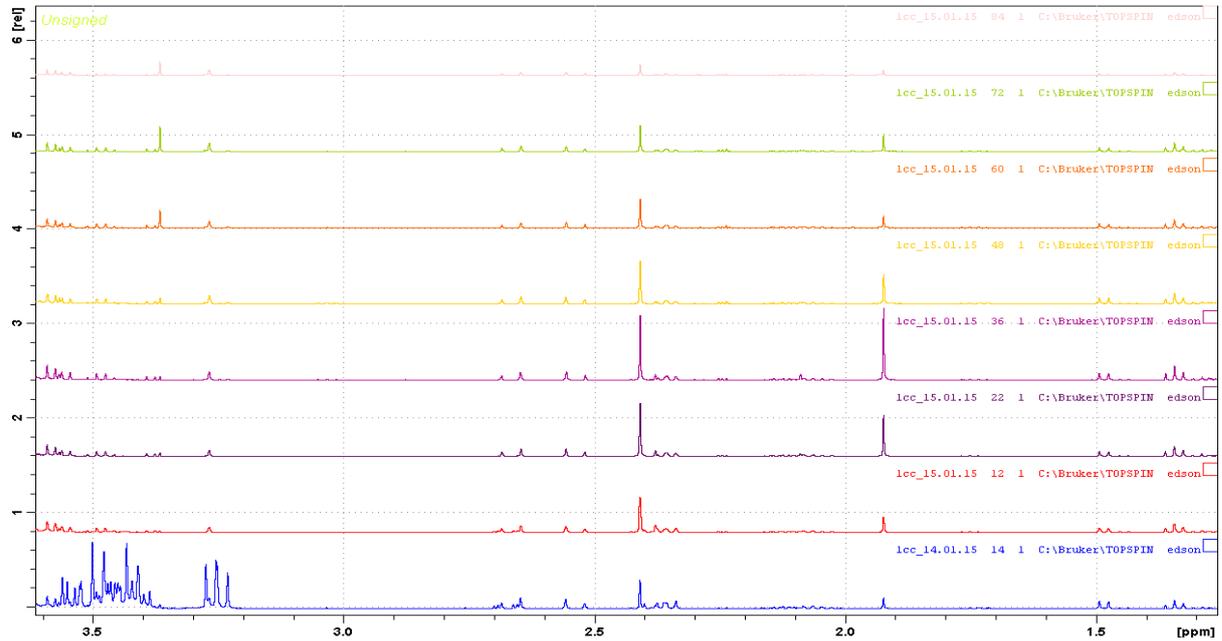
Fonte: Próprio autor.

Após a inoculação do fungo no meio BD o mesmo passa a ter a dextrose como sendo sua principal fonte de energia e de carbono para o seu desenvolvimento, analisando os espectros de RMN- ^1H das alíquotas coletadas semanalmente de 6 frascos Erlenmeyer, durante 8 semanas, do filtrado da cultura, com as ferramentas estatísticas do MatLab[®], foi possível analisar quantitativamente os metabólitos identificados, a dextrose e a sacarose, e construir uma curva de variação, como descrita na Figura 28, onde é possível visualizar que há um consumo quase que total da glicose em apenas duas semanas, tendo nesse mesmo período sua produção máxima de etanol. Observou-se que no período da 3^a à 4^a semana há uma baixa variação na produção de vários metabólitos, também sendo possível observar pela curva de crescimento do micélio (Figura 30) que no período de 3-4 semanas, o fungo tem seu crescimento praticamente interrompido, sendo de apenas 0,18% como demonstrado na tabela 3, certamente devido à baixa concentração de glicose no meio, no entanto, o fungo retorna o seu crescimento a partir da 5^a semana, fato este podendo ser justificado pelo consumo de alguns dos metabólitos anteriormente produzidos, tais como: acetato, alanina, succinato e citrato, e da sacarose.

O consumo da sacarose pode ser demonstrado com o aumento na quantidade de dextrose da segunda para terceira semana, proveniente da degradação da sacarose em dextrose e frutose. Como pode ser observado na figura 29, a qual mostra que da 1^a-2^a semana há uma diminuição intensa da dextrose, tendo um leve aumento em seguida. O consumo da sacarose, também pode ser justificado pelo aumento da quantidade de acetato a partir da 6^a semana (Figura 28), onde provavelmente o fungo siga a via alternativa do metabolismo do piruvato (Figura 5, pag.24), formando acetaldeído e acetato, antes de formar a acetil-CoA.

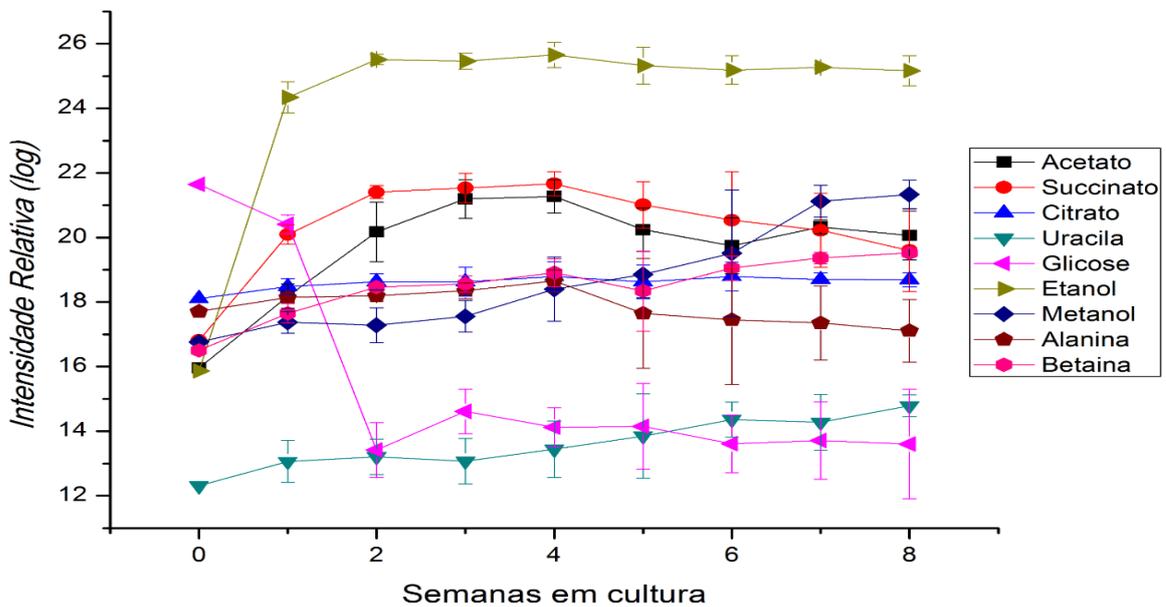
A intensidade relativa na figura 28 é dada em $\log_2(abs + 1000)$, logo a variação de uma unidade corresponde a uma variação de $2^{(abs+1000)}$.

Figura 27. Sobreposição dos espectros dos filtrados das culturas *R. solani* da 1^a-8^a semana, da região 1.37 -3.61 ppm, respectivamente de baixo para cima



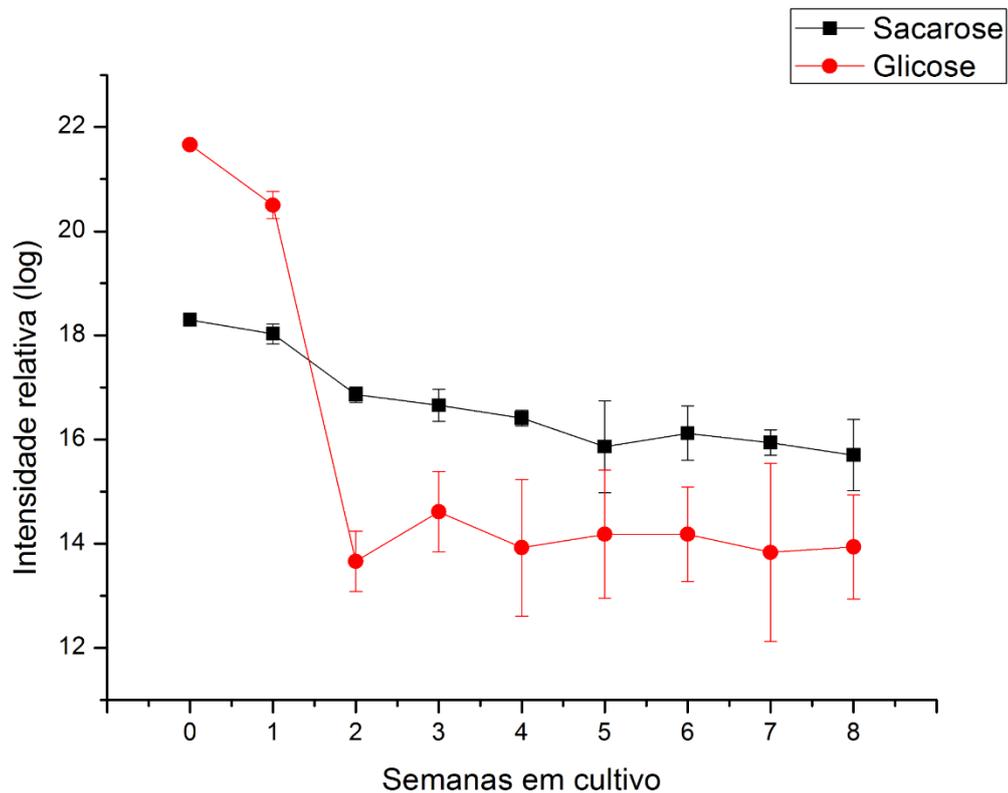
Fonte: Próprio autor

Figura 28. Curva de variação dos metabólitos primários, detectados nos filtrados da 1^a-8^a semanas de cultura de *Rhizoctonia solani*, tendo a semana zero como o controle, ou seja, o meio sem o fungo



Fonte: Próprio autor

Figura 29. Curva de variação da Dextrose (Glicose) e da Sacarose



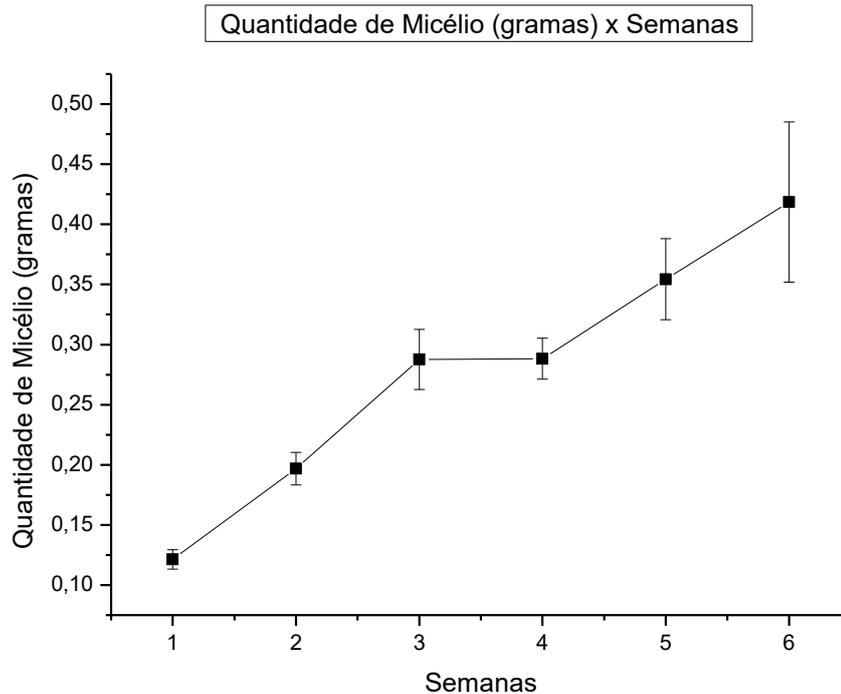
Fonte: Próprio autor

Tabela 3. Quantidade de micélio coletado ao longo de 6 semanas, a média de 5 massas e o aumento percentual

	Quantidade de Micélio (g)					Média (g)	Aumento (%)
1ª Semana	0,1244	0,1141	0,1171	0,1169	0,1340	0,1213	
2ª Semana	0,2063	0,1845	0,1823	0,2133	0,1974	0,19676	62,209
3ª Semana	0,2840	0,2938	0,2467	0,3070	0,30,70	0,2877	46,219
4ª Semana	0,2929	0,3045	0,2912	0,2643		0,288225	0,182
5ª Semana	0,3115	0,3323	0,3964	0,3753	0,3561	0,35432	22,932
6ª Semana	0,4913	0,4589	0,3572	0,3671		0,418625	18,149

Fonte: Próprio autor

Figura 30. Curva de crescimento do micélio de *Rhizoctonia solani* ao longo de 8 semanas

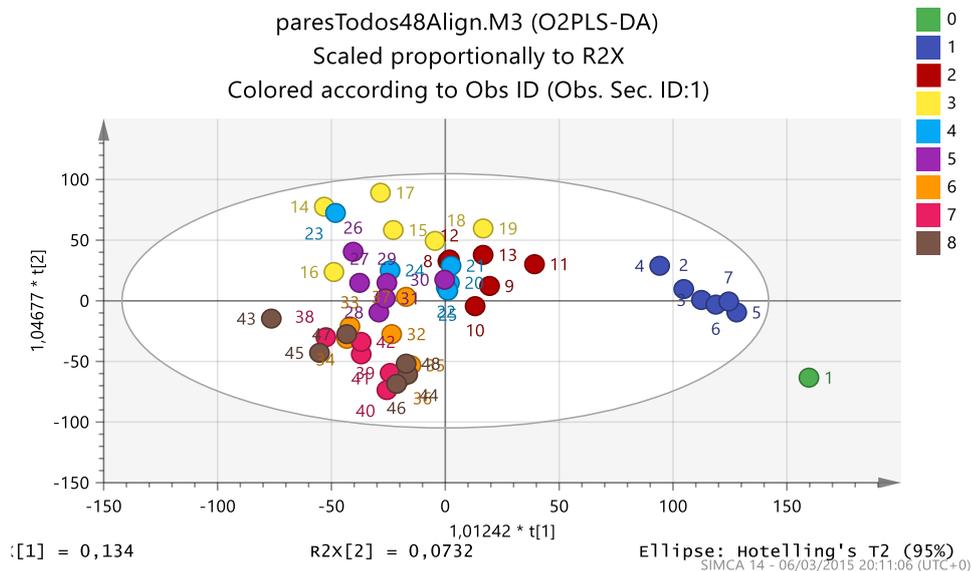


Fonte: Próprio autor

Devido a contaminação, não foi possível continuar o experimento de monitoramento do crescimento micelial, tendo sido desta forma interrompido na 6ª semana.

O gráfico de OPLS (Figura 31) mostrou uma leve semelhança entre as 3ª e 4ª semanas, onde é demonstrado que em uma visão geral não há alteração significativa no metabolismo, fato este que se assemelha a curva de crescimento do micélio onde da 3ª a 4ª semana não houve aumento significativo na massa, após esse período nas duas figuras é verificada alterações. Pode se verificar também semelhança entre o metabolismo da 6ª, 7ª e 8ª semanas. O meio de cultura virgem é classificado fora do intervalo de confiança de 95% o que o caracteriza ser bastante diferente do meio cultivado. Apesar do baixo valor obtido para o R2X acumulado de 0,287, o modelo obtido pode ser considerado válido porque a diferença para o valor de Q2 é menor do que 0,3 (Manual SIMCA-P).

Figura 31. Análise estatística multivariada dos dados de RMN obtidos do filtrado da cultura de *Rhizoctonia solani* mostrando os scores plot do OPLS (3+3+0). Cultivo efetuado ao longo de oito semanas (n=6). Cores diferentes (1-8) correspondem a alíquotas coletadas semanalmente do meio. O símbolo de cor verde (0) corresponde ao meio de cultura puro (n=1). Valores cumulativos, previstos: R2X = 0,287, R2Y = 0,377 e Q2= 0,0843 e valores ortogonais: R2X = 0,346.



Fonte: Próprio autor

A produção de etanol pela cultura de fungo anaeróbico do gênero *Piromyces*, já foi mencionada anteriormente (Cheng et al. 2013), bem como a produção de formato, lactato, acetato, succinato, aminoácidos e α -cetoglutarato. O succinato é considerado um metabólito de fungo anaeróbico. No entanto, apresentamos pela primeira vez o etanol como produto majoritário.

Esclerótia é uma estrutura de resistência do gênero *Rhizoctonia*, e pode sobreviver independente por vários anos no solo. Análise da composição química do seu exsudato mostrou uma grande variedade de compostos, tais como: fenólicos (17.40%), ácidos carboxílicos (12.79%), carboidratos (6.08%), ácidos graxos (3.78%), e amino ácidos (3.47%). (KONSTANTINOS et al. 2010).

6. CONCLUSÃO

Inicialmente a principal fonte de energia e nutrição do fungo é a dextrose, no entanto, a presença de sacarose no meio, torna-se uma fonte alternativa. A degradação da sacarose em dextrose e frutose, permite o retorno do crescimento do mesmo.

Deve-se levar em consideração que, com exceção da dextrose e da sacarose, as quais foram apenas consumidas, a quantidade de todos os outros metabólitos deve ser tratada com cautela, uma vez que o fungo pode os ter liberado para o meio por estarem em excesso em suas células, para posterior consumo quando o mesmo necessitar.

Até o final da oitava semana, não foi possível encontrar metabólitos secundários no filtrado da cultura, apenas primários. A não detecção dos metabólitos secundários descritos por PREDAS (2005) pode decorrer de questões regionais, apesar de ser o mesmo fungo.

7. PERSPECTIVAS

- Identificar os metabólitos apresentados no anexo;
- Identificar os metabólitos presentes no micélio;
- Analisar os metabólitos presentes no micélio do endofítico *Rhizoctonia solani*, ao longo das oito semanas, e confrontar os dados encontrados no filtrado da cultura com o que vier a ser encontrado no micélio.
- Construir as rotas metabólicas presentes no cultivo de *R.solani*.
- Identificar o metabólito que apresenta atividade antinociceptiva, com base nos dados metabolômicos do micélio, e verificar qual o melhor período para sua extração.

8. REFERÊNCIAS

- ALCADE, F. S. C. **Elucidação do destino metabólico de glicose no fungo filamentoso *Trichoderma reesei* por análise EST (Expressed Sequence Tags) e “microarrays” de cDNA**. 2002. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- RAFAEL, A. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAetZUAK/apostila-qoe-parte-2-1sem-2011>>. Acessado em 10 de junho de 2015.
- ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Ann Rev Phytopathol**, v.20, p. 329-347, 1982.
- ANVISA (2004) Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica.
- ARCHER, D. B.; CONNERTOR, I. F.; MACKENZIE, D. E. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. In: Stahl, U.; Donalies, U. E. B.; Nevoigt, E. **Food Biotechnology**. Springer, 2008, p 99-147.
- ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR. T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**. v. 3, p. 267-274, 2000.
- AZEVEDO, J.L. Fungos. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, 1, 12-15, 1997.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr, W.; PEREIRO, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.3, p. 40-65, 2000.
- BARROS, B. S.; SILVA, J. da S.; FERRO, J. N. de S.; AGRA, I. K. R.; BRITO, F. de A.; Albuquerque, É. D.; CAETANO, L. C.; BARRETO, E. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **J. Nat. Med.** v.65, p. 526–531, 2011.
- BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**. v.25, n.5, p. 856-65, 2002.

Boundless. Primary and Secondary Metabolites.” *Boundless Microbiology*. Disponível em: <<https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/industrial-microbiology-17/industrial-microbiology-198/primary-and-secondary-metabolites-999-5345/>> Acessado em 09 de junho de 2015

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**. v.63, p. 1447-1448, 2000.

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal Natural Products**. v.67, p. 2141-2153, 2004.

CARLING, E. E.; SUMMNER, D. R. Rhizoctonia. In: SINGLETON L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Eds). **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. Minnesota: APS Press, p.157-165, 1992.

CASTRO, C. V. B.; MIRANDA, V. S.; BRIOSO, P. S. T.; POLTRONIERI, L. S.; REIS, I. N. R. S. Variabilidade genética de isolados de *Rhizoctonia solani*, de parte aérea, analisadas por meio de marcadores RAPD. **Rev. Ciênc. Agrár.**, Belém-PA, n. 52, p.179-187, 2009.

CLARIDGE, T. D. W. **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. 2. d. Vol. 27; ELSEVIER, 2009. p. 384.

CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophytes symbiosis with grasses. **American Naturalist**, v.160, p. S99-S127, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem**. v.77, p. 7–24, 2005.

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

DEMAIN, A.L.; ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology, **Molecular Biotechnology**, v.38, p. 45-55, 2008.

DONOSO, J. P.; RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. Disponível em <<http://www.ifsc.usp.br/~donoso/espectroscopia/RMN.pdf>> acessado em 15/06/2015.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 285-294, 2005.

ESPOSITO, O. E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. d. Caxias do Sul. 2010, p. 638.

FADEL, V. **ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA CROTAMINA EXTRAÍDA DO VENENO DA CASCATELA *Crotalus durissus terrificus* UTILIZANDO RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR HOMONUCLEAR**. 2003. p. 105 Tese (Doutorado em Biofísica) Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo.

FAETH, S.H.; FAGAN, W. F. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**. v. 42(2), p. 360-368, 2002.

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, p. 1157- 1161, 2000.

FRIES, N. Vitamins and other growth factors. In. G. C. Ainsworth; A. S. Sussman. **The Fungi**. v. 1, 1965, p. 491-523. New York: Academic Press.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S. **METABOLÔMICA, UMA ABORDAGEM OTIMIZADA PARA EXPLORAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: ESTADO DA ARTE, PERSPECTIVAS E DESAFIOS**. *Quim. Nova*, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P. A.; WOLFENDER, J. L.; SILVA, D. H. S. High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. **J. Chromatogr. A**, v. 1259, p. 167-168, 2012.

GAO, F. K.; DAI, C. C.; LIU, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 13, p. 1346-1351, 2010.

GARCIA, E. A. C. **Biofísica**. São Paulo, SP: Sarvier. 1998. p. 387.

GARCÍA, V. G.; ONCO, M. A. P.; SUSAN V. R. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctoni*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 1, p. 55-79, 2006.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, v. 8, p. 536–544, 2003.

- HAIR, J. F.; ANDERSON, et al. **Análise multivariada de dados**. 5. d. Porto Alegre. 2005.
- HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Cambridge, v. 169, p. 453-468, 2006.
- HERRE, E. A.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D. A.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; BUTLER, A.; BAEL, S. A. V. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology Society of America**, v. 88, p. 550-558, 2007.
- HEYDEN, Y. V. Extracting information from chromatographic herbal fingerprints. **LC-GC Europe**, v. 21, p. 438, 2008.
- HOLZGRABE, U.; DIEHL, B; WAWER, I. **NMR SPECTROSCOPY IN PHAMACEUTICAL ANALYSIS**, Elsevier, 2008.
- HOPKE, P.K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 365-377, 2003.
- JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p. 245-72, 2000.
- JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. **Trends genet.**, v. 15, p. 29-33, 1999.
- KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. Irlanda: Wiley, 2005
- KEELER, J. **Understanding NMR Spectroscopy**. ESTADOS UNIDOS DA AMERICA, JOHN WILEY PROFESSIO, 2002.
- KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defense strategy against antagonistic animals? **Fungal Ecology**, v. 3, p. 107-114, 2010.
- KRIEL, W. M.; SWART, W. J.; CROUS, P. W. Foliar endophytes and their interactions qith host plants, with specific reference to the Gymnospermae. **Advances in Botanical Research**, v. 33, p. 1-34, 2000.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secundaray metabolites. **Chem. & Biol.** v. 19, p. 792-798, 2012.
- LOPES, A. A.; GUIMARÕES, D. O.; PUPO, M. T.; Quando os microrganismos salvam vidas disponível em < <http://cienciahoje.uol.com.br/revista-ch/2011/286/quando-os-microrganismos-salvam-vidas>> Acesso em: 08/06/15

MAGNUSSON, W. E.; MOURÃO, G. Estatística sem matemática: a ligação entre as questões e a análise. Curitiba: 2003.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do Metabolismo Secundário: Otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. **Biociência & Desenvolvimento**

MAZZOLA, A. A.: Princípios Físicos da Ressonância Magnética, Disponível em <http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/images/documentos/Principios_fisicos_da_ressonancia_magnetica.pdf>, em 14/06/2015

MAZZOLA, A. A. Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional. **Revista Brasileira de Física Médica**. v. 3, n. 1, p. 117-29, 2009.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **Eur. J. Med. Chem**. v. 46, p. 4769–4807, 2011.

MURRAY, P. R. ; ROSENTHAL, K. S. ; PFALLER, M. A. **Medical microbiology**. 5. d. 2005

NASCIMENTO, C. J. do; JR., C. B. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: Gradus Primus. **Biociência & Desenvolvimento**. n. 21, 2001.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 125-143, 1987.

PAIVA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução a Espectroscopia**. 2012. Tradução Pedro Barros, Paulo Sergio Santos, Carlos Alberto Villarruel Moreira e Adriane Peçanha Sueli Bossi. 4ª Ed. São Paulo. Cengage Learning.

PARMETER, J. R.; WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: PARMETER, J.R. (Ed.). ***Rhizoctonia solani*; biology and pathology**. London: University of California, 1970

PARR, A. J.; MELLON, F. A.; COLQUHOUN, I. J.; DAVIES, H. V. Dihydrocaffeoyl Polyamines (Kukoamine and Allies) in Potato (*Solanum tuberosum*) Tubers Detected during Metabolite Profiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 5461-5466, 2005.

PEDRAS, M. S. C.; YU, Y.; LIU, J.; TANDRON-MOYA, Y. A. Metabolites Produced by the Phytopathogenic Fungus *Rhizoctonia solani*: Isolation, Chemical Structure Determination, Syntheses and Bioactivity. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60c, p. 717-722, 2005.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**. v. 1, p. 185–196, 1992.

PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**, v. 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

PUTZKE, J; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos dos Fungos**, v. 1, 2. d. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHSELVAM, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in na área of massive impact. **Advanced Biotech**, p. 19-25, 2008.

REY-LADINO, J.; ROSS, A. G.; CRIPPS, A. W.; MCMANUS, D. P.; QUINN, R. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 29, p. 6464–6471, 2011.

RODRÍGUEZ, R.; WHITE, J.; ARNOLD, A. E; REDMAN, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. **New. Phytol**. v. 182, p. 314-330, 2009.

ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPKA, J.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**. v. 23(1), p. 131-142, 2000.

ROZE, L. V.; CHANDA, A.; LINZ, J. E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 35-48, 2011.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SALLES, R. C. **Atribuição Inequívoca dos Sinais de RMN e da Estereoquímica Relativa de Compostos Rígidos tipo “Gaiola” (Cage-Like): Estudo Experimental e Teórico**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5. ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. *Natural Products Isolation: Methods in Biotechnology*. New Jersey: Humana Press, 2006.

SCHARDL, C. L.; LEUCHTMANN, A.; SPIERING, M. J. Symbiosis of grasses with seedborne fungal endopytes. **Annual Review of Plant Biology**. v. 55, p. 315-340, 2004.

SCHULZ, B; BOYLE, C The endophytic continuum. **Mycol. Res**. v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; SUCKER, J.; AUST, H. J.; KROHN, K.; LUDEWIG, K.; JONES, P. G.; DORING, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. **Mycological Research**, v. 99, p. 1007-1015, 1995.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHM, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, p. 996–1004, 2002.

SERANO, S; RODRIGUEZ-DE-VALE, N. Calcium uptake and efflux during the yeast to mycelium transition in *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, n. 112, p.1-9, 1990.

SIGMA-ALDRICH Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/269913?lang=pt®ion=BR>>, acessado em 15/06/2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF ORGANIC COMPOUNDS**, 7. d. 2005. JOHN WILEY SONS, INC, 2005.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of Rhizoctonia species**. APS Press. St. Paul, 1991.

SOUZA, N. D. de; ABREU, H. dos S.; MONTEIRO, M. B. de O.; PEREIRA, R. P. W.; MAEDA, J. M.; RESCK, I. S. Proposta de análise metabolômica com RMN ¹³C da madeira do híbrido *Eucalyptus urograndis*. **Floresta e Ambiente**. v.15, n.1, p. 49 – 61, 2008.

- STALPERS, J. A.; ANDERSEN, T. F. A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S. L. In: SNEH, B.; JABAJI-HARE, S.; NEATE, S.; DIJST, G. (Ed.) ***Rhizoctonia species: biology, ecology, pathology and disease control***. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996 p. 37-47.
- STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 2002.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.
- SUMMER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Review Plant metabolomics: largescale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817–836, 2003.
- SUN, R.; GAO, Y. X.; SHEN, K. Z.; XU, Y. B.; WANG, C. R.; LIU, H. Y.; DONG, J. Y. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*, **Phytochemistry Letters**, 2010 doi: 10.1016/j.pjytol.2010.12.001.
- TAN, R. X., ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 448-459, 2001.
- TÉLLEZ, M. A. La Mecánica Cuántica, disponível em < <http://la-mecanica-cuantica.blogspot.com.br/2009/08/el-experimento-stern-gerlach.html> >, acessado em 14/06/2015.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H.; KIM, H. K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry **Phytochem. Rev.**, v. 6, p. 3-14, 2007.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi**. 3. d. CAMBRIDGE, 2007.
- WILSON, D. Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, p. 274-276, 1995.
- ZOBERI, M. H. Tropical microfungi. London: The MacMillan Press, 1972. p. 1.

APÊNDICE

Figura 32. Curva de variação de um duplete encontrado em 0,88 ppm

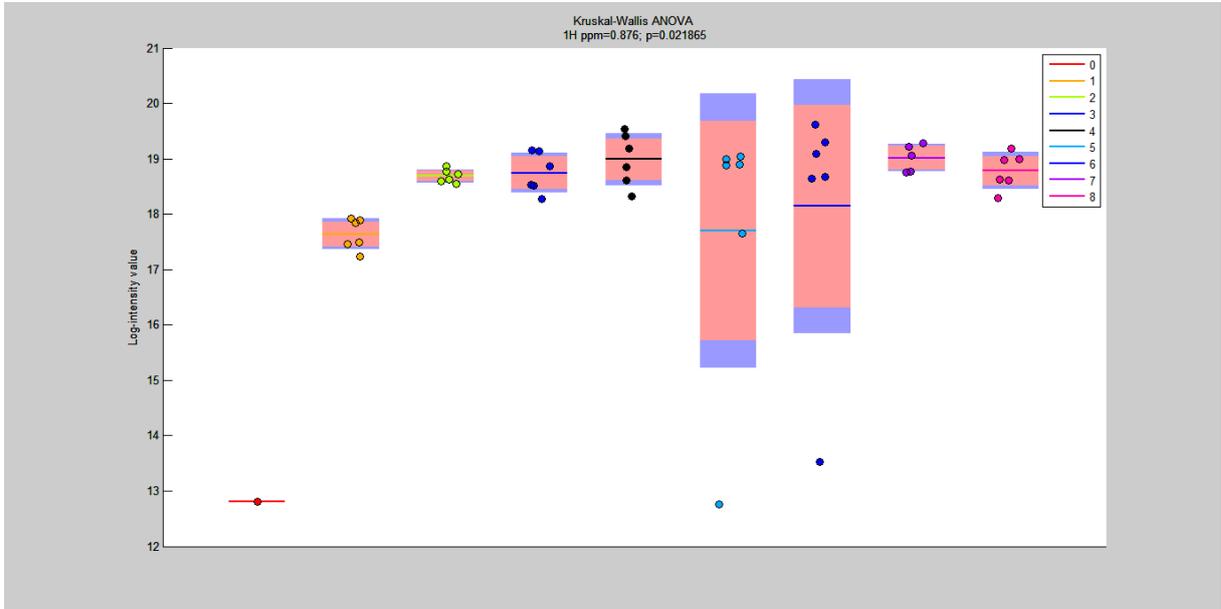


Figura 33. Curva de variação de um tripleto encontrado em 1,03 ppm

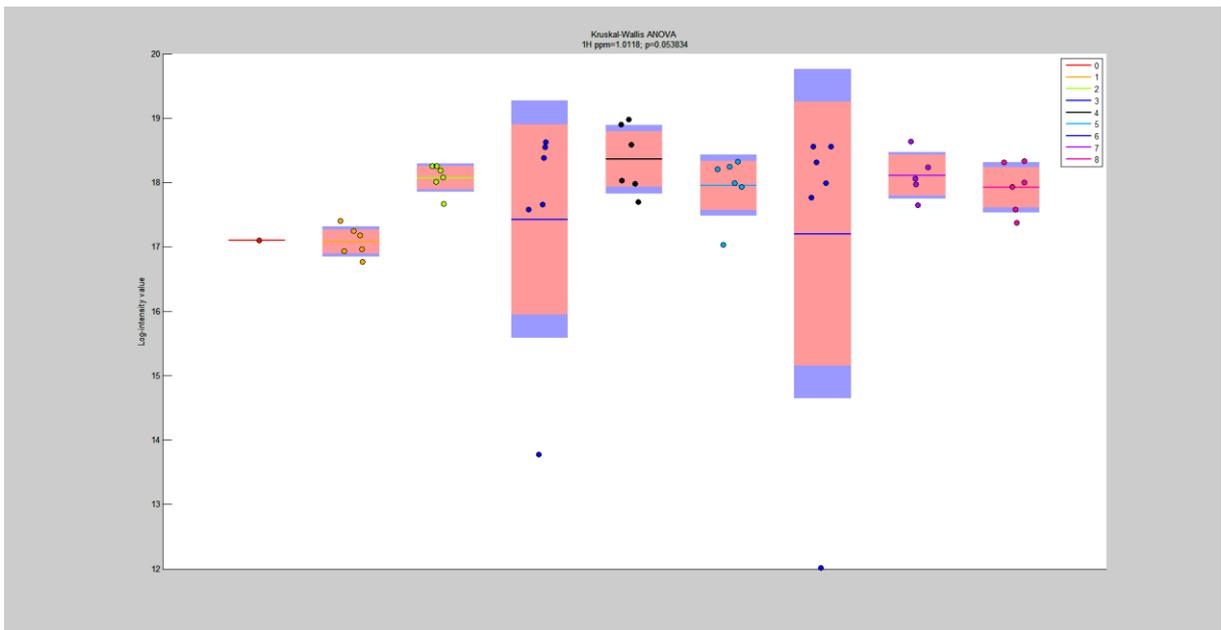
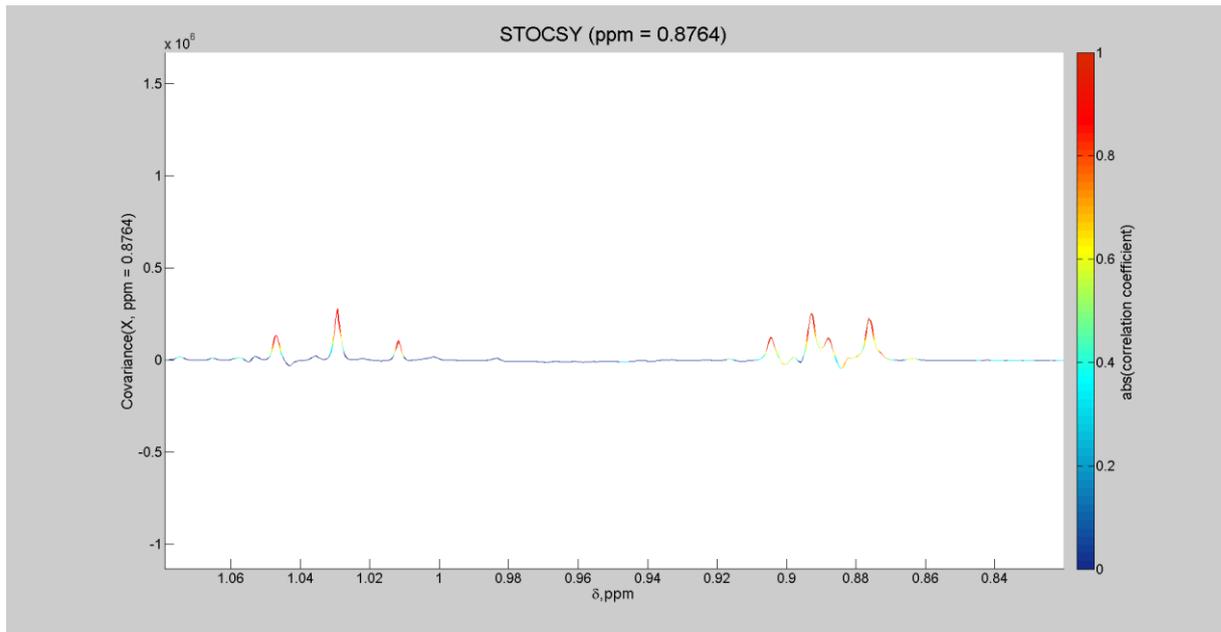


Figura 34. Gráfico de STOCSY do duplete em 0,88 ppm mostrando uma alta correlação com o tripleto em 1,03 ppm



O STOCSY (Figura 33) mostra que o metabólito correspondente ao duplete em 0,88 ppm é diretamente correlacionado com o tripleto em 1,03 ppm, sugerindo que os dois metabólitos podem pertencerem a mesma rota metabólica.

Figura 35. Curva de variação do sinal encontrado em 1,03 ppm

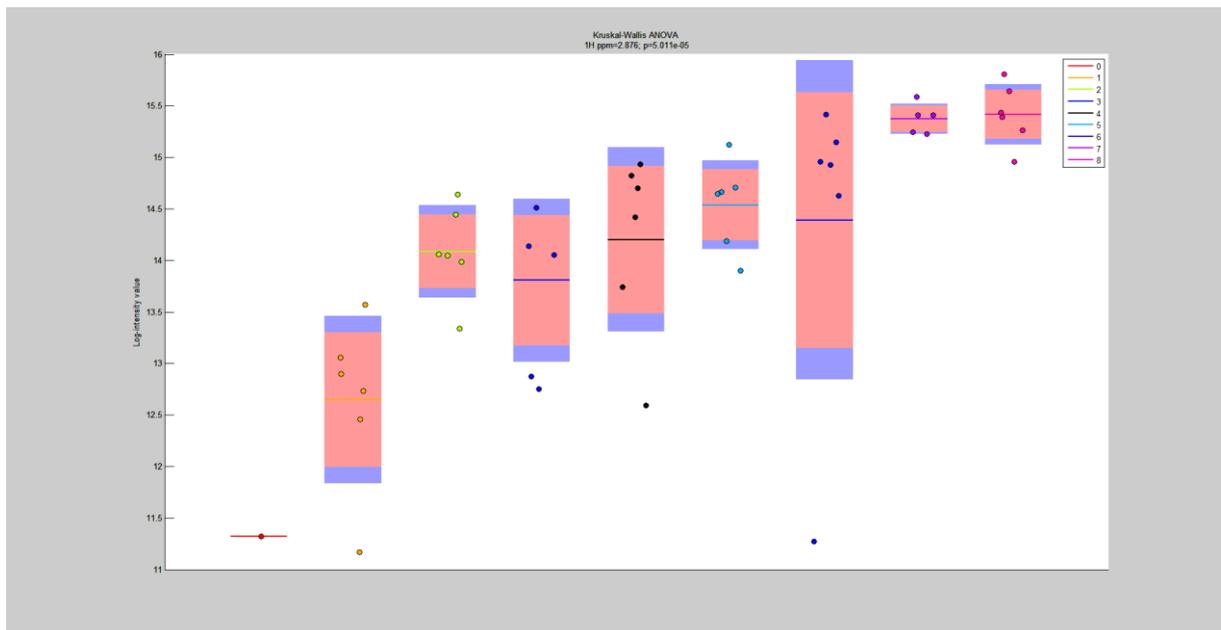


Figura 36. Curva de variação do sinal encontrado em 1,03 ppm

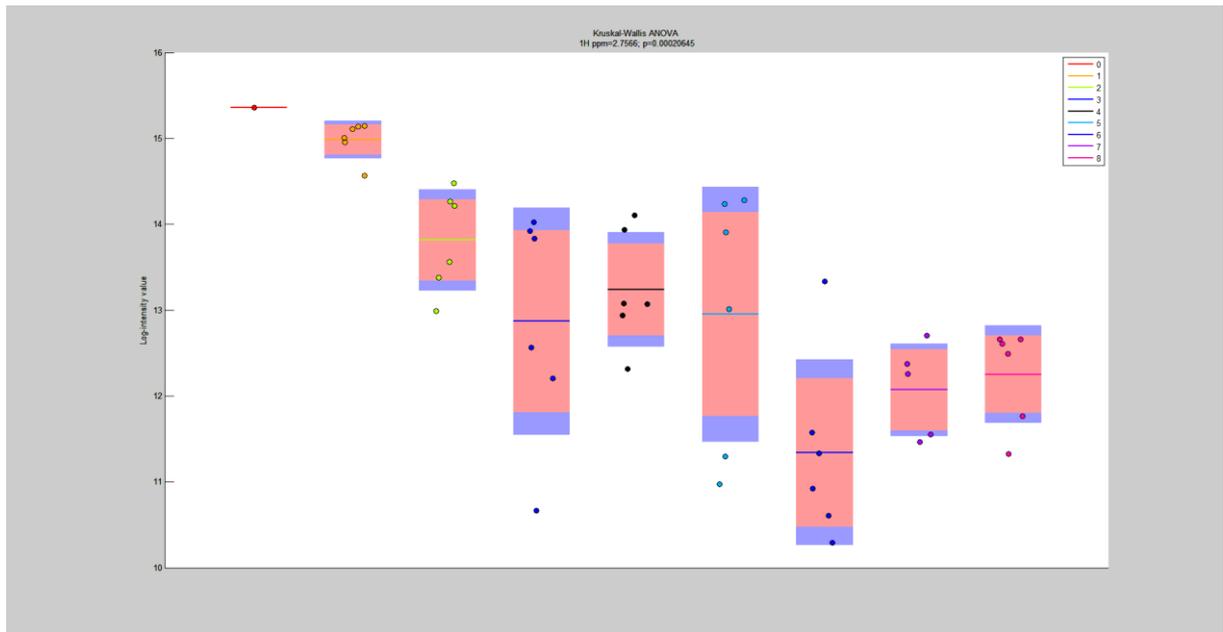


Figura 37. Curva de variação do sinal encontrado 1,45 ppm em 1,03 ppm

