

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL - PROFAGROEC

MOACIR TORRES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO DA LEVEDURA
Lachancea thermotolerans CCMA 0763

MARINGÁ - PR

2020

MOACIR TORRES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DO EXTRATO DA LEVEDURA

***Lachancea thermotolerans* CCMA 0763**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Mestrado Profissional, do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agroecologia, na Área de concentração: Agroecologia.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada.

MARINGÁ - PR

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)


T693c	<p>Torres, Moacir</p> <p>Caracterização química parcial do extrato da levedura <i>Lachancea thermotolerans</i> CCMA 0763 / Moacir Torres. -- Maringá, PR, 2020. 44 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada. Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agroecologia - Mestrado Profissional, 2020.</p> <p>1. Levedura (<i>L.thermotolerans</i>). 2. Controle biológico - Agricultura - Doenças e pragas. 3. Metabólitos secundários. 4. Espectrometria de massas. I. Estrada, Kátia Regina Freitas Schwan, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia - Mestrado Profissional. III. Título.</p> <p>CDD 23.ed. 632.9</p>
-------	---

MOACIR TORRES

**Caracterização química parcial do extrato da levedura
Lachancea thermotolerans CCMA 0763.**


Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia – Mestrado Profissional, para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

APROVADO em 26 de fevereiro de 2020.


Dr. **Marcos Alessandro Ribeiro**


Prof^a Dr^a **Aline José Maia**


Prof. Dr. **Higo Forlan Amaral**


Prof^a Dr^a **Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada**
Orientadora

DEDICATÓRIAS...

À minha mãe Alice, que me educou com amor incondicional.

À Professora Dra. Kátia Regina Freitas Schwan Estrada, pela orientação, paciência e amizade.

À minha filha Paula, pela inspiração e amor verdadeiro.

À querida Norma pelo carinho e admiração.

Aos amigos, Clemenceau (in memoriam) e Donizete (in memoriam), Edson (Copiadora), Leonardo e Sérgio (DBC/UEM) e Idineu e Lúcia (DAA/UEM) que sempre me lisonjearam.

Ao Júlio, João Arthur e Prof. João do laboratório de Biotecnologia Microbiana - DBC/UEM.

À Bruna e ao Paulo do laboratório de Controle Alternativo de Fitopatologia e especialmente ao Prof. José Marcos de Bastos Andrade - DAG/UEM.

Ao Marcos “San” Alessandro, ao Prof. “Broken Heart” e ao “Clube dos Corações Solitários”, pela experiência.

E a todos aqueles que acompanharam direta ou indiretamente este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela força que Ele me concede na vida para ser feliz.

Ao Departamento de Agronomia pelo Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, ao Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular e ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá/PR pelo apoio para realização deste trabalho.

À minha família que sempre acreditou em mim.

Em especial à minha Orientadora, a “Mãe”, com a qual tive o prazer de trabalhar, me apoiando com paciência, dedicação e compreensão.

Aos professores pelo incentivo e informações compartilhadas.

E a todos os amigos, pelas alegrias durante esse ciclo.

EPIGRAFE

“Percebi há muito tempo que as pessoas realizadas raramente relaxaram e esperaram que as coisas lhes acontecessem. Eles foram à procura e as coisas aconteceram.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Os fungos são organismos vivos de grande importância na área da agricultura, na indústria de alimentos e indústria farmacêutica. O uso desses micro-organismos na agricultura tem sido empregado para o biocontrole de doenças em plantas de interesse comercial. Os fungos leveduriformes, podem combater fitopatógenos através de seus metabólitos secundários, inibindo o desenvolvimento destes patógenos. Algumas espécies de leveduras apresentam resultados positivos no controle de patologias em diversas culturas sendo usadas como agentes de biocontrole. Dentre elas, está a levedura *Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans*, que se encontra presente em plantas (como uvas), no solo e em insetos, pode se adaptar a diferentes ambientes e, possivelmente, atuar no controle biológico, embora não seja completamente conhecido o seu modo de ação. Este trabalho teve como objetivo analisar e identificar metabólitos secundários produzidos pela levedura *L. thermotolerans* CCMA 0763 isolada de uva passa e cedida pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola (UFLA-Lavras-MG-BR), utilizando-se o método analítico de Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) (HRMS) e Espectrometria de Massas em Tandem (MS/MS). Foram identificados quatro compostos heterocíclicos da classe dos Alcalóides, sendo três (03) naturais: 4-Hidroxiquinolina, Xantina e Calistegina A3 e um (01) sintético: Clausehainanina C. Esses compostos apresentam na literatura atividades antimicrobiana, antiproliferativa inibitória e regulatória, podendo assim ser testados como agentes de biocontrole.

Palavras-chave: levedura; controle biológico; metabólito secundário; UHPLC; Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Fungi are living organisms of great importance in the area of agriculture, food industry, and the pharmaceutical industry. The usage of these microorganisms in agriculture is for the biocontrol of diseases in plants of commercial interest. Yeast can fight phytopathogens through their secondary metabolites, inhibiting or developing these pathogens. Some yeast species show positive results in the control of pathologies in different cultures. Yeasts have been used as biocontrol agents, and among them, a *Lachancea (Kluyveromyces) thermotolerans*, which is present in plants (such as grapes), soil and insects, can be adapted to different environments and, possibly perform biological control, although it is not known its mode of action. This work aimed to analyze and identify secondary metabolites used by the yeast *L. thermotolerans* CCMA 0763 isolated from commercial grapes in the Agricultural Microbiology Laboratory (UFLA-Lavras-MG-BR), using the analytical method of Ultra High-Efficiency Liquid Chromatography (UHPLC) (HRMS) and Tandem Mass Spectrometry (MS/MS). Four heterocyclic compounds of the Alkaloids class were identified, three (03) natural: 4-Hydroxyquinoline, Xanthine and Calistegine A3, and one (01) synthetic: Clausehainanine C. Thus, be tested as biocontrol agents.

Keywords: yeas; biological control; secondary metabolite; UHPLC; Mass Spectrometry.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos identificados no extrato de <i>Lachancea thermotolerans</i>	28
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Utilização de Espectrometria de Massas em diferentes áreas do conhecimento (CROTTI, 2006).....	20
Figura 2 - Cromatogramas UPLC-Q-TOF/MS BPI modo positivo dos extratos EtOAc-Meio BD (controle) e <i>Lachancea thermotolerans</i> (amostra).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 3 - Estruturas dos compostos identificados no extrato <i>Lachancea thermotolerans</i>	29
Figura 4 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto 4-Hidroxiquinolina.	30
Figura 5 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto Xantina.....	31
Figura 6 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto Calistegina A3.	32
Figura 7 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto Clausehainanina C.	33
Figura 8 - Aplicações dos compostos identificados em diferentes áreas do conhecimento, destacando-se a Agricultura (2015-2020).	34

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão da Literatura	16
2.1. Contexto geral sobre leveduras	16
2.2. Controle biológico	17
2.3. Metabólitos secundários ou especializados	19
2.4. Espectrometria de Massas (MS)	20
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Obtenção dos extratos brutos de metabólitos secundários.....	23
3.2. Análise química	23
3.2.1. Análise dos Compostos por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC).....	23
3.2.2. Análise dos Compostos por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) (HRMS) e Espectrometria de Massas em Tandem (MS/MS)	24
3.2.3. Processamento de Dados e Análises Estatísticas.....	24
4. Resultados e Discussão	25
5. Conclusão	38
6. Bibliografia.....	39

1. INTRODUÇÃO

Os fungos pertencem ao Reino Fungi, são organismos vivos, eucariotos e heterotróficos, apresentando parede celular rica em quitina e possuem a capacidade de armazenar glicogênio, assim como as células animais. Estes micro-organismos encontram-se dispersos nos mais diversos ecossistemas, contribuindo nos ciclos biológicos e ecológicos. Dentre os fungos de interesse comercial e biotecnológico, estão as leveduras ou fungos leveduriformes, que podem ser encontrados naturalmente na superfície de plantas e no solo (OLIVEIRA et al., 2011).

As leveduras podem ser definidas como fungos não filamentosos, predominantemente unicelulares, não móveis, que não apresentam corpos de frutificação e a reprodução assexuada se dá por brotamento ou fissão. A maioria das leveduras são sapróbios e algumas são parasitas oportunistas. As leveduras estão associadas a processos fermentativos e substratos que contenham hexoses (ROSA, 2009).

A importância das leveduras é reconhecida desde o início da história da humanidade, e com o avançar da tecnologia, as pesquisas demonstraram a sua importância na produção de pães, queijos e outros produtos como o álcool etílico, cervejas e vinhos. Algumas características deste micro-organismo também o tornam promissor para sua utilização na agricultura no controle de fitopatógenos. Dentre estas características estão: não produzirem esporos alergênicos e nem toxinas, não serem exigentes nutricionalmente, apresentarem crescimento rápido, não apresentarem riscos ao consumidor e atuarem como antagonistas, seja por competição por nutrientes, antibiose ou hiperparasitismo (WISNIEWSKI et al., 2016; RAMOS et al., 2010).

O modo de ação das leveduras como antagonistas ainda não é totalmente esclarecido e também não se conhece os metabolitos produzidos que poderiam ser utilizados futuramente no controle de doenças de plantas. Micro-organismos antagônicos podem suprimir, ou interferir no crescimento e na atividade patogênica de fitopatógenos, sendo os mesmos referenciados como “agentes de controle biológico” (DUKARE et al., 2018).

As micotoxinas, os metabólitos fúngicos secundários de espécies toxigênicas, são produzidos principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estas espécies toxigênicas contaminam predominantemente cereais durante o armazenamento pré e pós-colheita e muitos outros estágios (MILANI, 2013). A produção de micotoxinas em grãos

depende de vários fatores, incluindo: umidade, temperatura, atividade da água, danos mecânicos e potenciais toxigênicos fúngicos (TOLA; KEBEDE, 2016).

O controle biológico é uma importante estratégia de manejo para doenças fúngicas, tendo como princípio básico a utilização de micro-organismos antagonistas para reduzir e/ou manter a população de um fitopatógeno abaixo dos níveis que causam perda econômica (CARMONA-HERNANDES et al., 2019).

O controle orgânico usando agentes biológicos contra micotoxinas é considerado uma opção mais segura até agora, obtendo popularidade na indústria de alimentos (TSITSIGIANNIS et al., 2012). De fato, a aplicação de leveduras (células e seus voláteis) e derivados de levedura têm grande potencial para minimizar as perdas econômicas causadas por micotoxigênicos fungos.

Várias espécies de leveduras foram identificadas como tendo atividades eficazes de controle biológico de fungos, onde eles podem ser utilizados contra fungos toxigênicos para inibir seu crescimento e síntese de micotoxinas (KABAK; DOBSON; VAR, 2006).

O bom desempenho das leveduras como agentes de biocontrole se deve a diversos modos de ação desses microrganismos contra os fitopatógenos. Dentre esses podemos destacar a competição com os fitopatógenos por espaço e nutrientes, micoparasitismo, antibiose, indução de resistência em plantas e a produção de toxinas antimicrobianas e de álcool pelas leveduras. O entendimento desses mecanismos de biocontrole é fundamental para se aprimorar a ação desses micro-organismos no combate de doenças em plantas (RIMA; STEVE; ISMAIL, 2012; MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

Nos últimos anos, o controle biológico na pós-colheita de frutos vem se mostrando como uma alternativa promissora ao controle químico (ZHIMO et al., 2016). Em geral, os mecanismos de ação dos micro-organismos antagonísticos no biocontrole são competição por espaço e nutrientes, competição pelo elemento ferro, produção de compostos antifúngicos e compostos voláteis, parasitismo, produção de enzimas hidrolíticas, indução de resistência, resposta oxidativa e produção de *toxinas killer* (LIU et al., 2013; FERRAZ et al., 2016; SPADARO & DROBY, 2016; CUNHA et al., 2018).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente os metabólitos secundários produzidos pela levedura *Lachancea thermotolerans* CCMA 0763, isolada de uva passa comercial, através da técnica analítica de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) (HRMS) e Espectrometria de Massas em Tandem (MS/MS).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Contexto geral sobre leveduras

As leveduras são desde o período neolítico amplamente utilizadas para a produção de alimentos, bebidas, biocombustíveis e uma variedade de compostos bioquímicos (SICARD, LEGRAS, 2011) e apresentam um modelo eucariótico mais bem estudado com sequências genômicas disponíveis para centenas de linhagens (BORNEMAN, 2016; STROPE et al.; 2015). Além disso, existem projetos em andamento com o objetivo de determinar funções biológicas e interações genéticas de todo e qualquer componente de seu genoma (KELLY, 2001; BOONE et al., 2014).

Esses micro-organismos participam ativamente de vários processos biotecnológicos significativos para a indústria, como na fermentação de produtos alimentícios para produção de pães, queijos, vinhos e cervejas. Uma das espécies representativas desse grupo é a *Saccharomyces cerevisiae*, com crescente interesse em vários processos de ruptura celular, garantindo o teor de proteínas, umidade, aumento na formação de espuma, estabilidade, diminuição em suas propriedades emulsificante e capacidade de retenção de óleo e água (BERTOLO et al., 2019).

Elas geralmente têm nutrientes simples e são capazes de colonizar superfícies secas por muitos períodos de tempo, bem como suportar muitos pesticidas usados no ambiente pós-colheita (EL-TARABILY e SIVASITTHAMPARAM, 2006). Além do que, leveduras podem crescer rapidamente em substratos baratos, fermentadores e, portanto, fáceis de produzir em grandes quantidades (DRUVEFORS, 2004).

Uma espécie de levedura com potencial biotecnológico é a levedura *Lachancea thermotolerans*, conhecida anteriormente como *Kluyveromyces thermotolerans*, mas foi recentemente redesignada no gênero *Lachancea* de acordo com a análise de sequência multigênica (KURTZMAN, 2003). A levedura *L. thermotolerans* (LT) é uma espécie global que geralmente pode ser encontrada em uvas, mas também em outros habitats como solo, insetos e plantas (GANTER, P.F, 2006). Também pode ser encontrada naturalmente em fermentações espontâneas de vinhos com baixas concentrações no segundo e quarto dia de fermentação (COMBINA et al., 2005). Morfologicamente, é globosa ou elipsoidal, indistinguível de *S. cerevisiae* e pode ser encontrada como células únicas em meio líquido ou em pequenos grupos. É uma levedura teleomórfica que apresenta reprodução sexuada com a formação de ascósporos esféricos. A reprodução assexuada é produzida com brotamento

multilateral. LT forma colônias cremosas com textura butirosa em meio sólido (MORATA, A. et al., 2016).

A espécie *L. thermotolerans* é uma espécie do gênero *Lachancea* (KURTZMAN, 2003) que acomoda um grupo de vários gêneros diferentes, mostrando semelhanças no nível de rRNA. Até hoje, o gênero abriga 11 outras espécies: *L. cidri*, *L. dasiensis*, *L. fantastica*, *L. fermentati*, *L. kluyveri*, *L. lanzarotensis*, *L. meyersi*, *L. mirantina*, *L. nothofagi*, *L. quebecensis* e *L. walti*. Do ponto de vista ecológico, a maioria das espécies de *Lachancea* é onipresente (KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT; 2011). *L. thermotolerans* ocupa habitualmente uma série de habitats naturais e antrópicos, incluindo insetos, plantas, solo e culturas hortícolas, em especial uvas e vinhos (FREEL, 2014; SIPICZKI, 2016).

Outra particularidade apresentada por espécies de leveduras é a utilização no controle de doenças agrícolas. A espécie *Candida oleophila* produz um composto comercial denominado Aspire[®], que apresenta excelentes resultados no controle dos fungos de decomposição pós-colheita, permitindo menos perdas e desperdícios, proporcionando, assim, maiores lucros aos produtores (JANISIEWICZ e KORSTEN, 2002; PICCININ et al., 2005; DROBY, 2006; CHANCHAIOVIVAT et al. 2008).

As leveduras isoladas do ambiente, principalmente das áreas agrícolas, podem apresentar melhores resultados no controle biológico de fitopatógenos (AHANSAL et al., 2008). Outra forma de controle é a capacidade da levedura de se desenvolver rapidamente nas superfícies das folhas, frutas e flores, especialmente na presença de açúcar, e dominar todo o ambiente, inibindo o desenvolvimento de outros micro-organismos através da competição por espaço e nutrientes (SALIGKARIAS et al. 2002; VERO et al. 2002)

2.2. Controle biológico

Recentemente, o controle biológico foi desenvolvido como uma alternativa ao fungicida sintético. O resultado foi considerável utilizando-se micro-organismos antagônicos para controlar tanto a pré-colheita como doenças pós-colheita (JANISIEWICZ e KORSTEN, 2002). Uma variedade de antagonistas microbianos tem controlado vários patógenos diferentes em vários frutos e legumes (FRAVEL, 2005; MARI e GUIZZARDI, 1998). Entre esses organismos antagônicos, leveduras naturais têm sido eficazes como agentes de controle biológico (IRTWANGE, 2006; QING e SHIPING, 2000).

A estratégia geral do controle biológico é usar um organismo vivo para controlar outro (DRUVEFORS, 2004). Os agentes de controle podem ser micro-organismos antagonísticos ou mesmo compostos naturais de origem vegetal e animal (PAL e GARDENER, 2006).

A antracnose causada por *Colletotrichum capsici* é uma doença grave de vegetais tropicais como a pimenta (*Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh.) (HADDEN e BLACK, 1989; PAKDEEVARAPORN et al., 2005). Esta doença aparece como podridão em frutas maduras matando-as. (MEHROTRA e AGGARWAL, 2003).

A maioria das frutas são produtos altamente perecíveis, especialmente durante o pós-colheita, e uma grande perda é causada por patógenos fúngicos (SPADARO e GULLINO, 2004). *Botrytis cinerea* Pers. Fr., um onipresente patógeno fúngico, causa “podridão cinzenta” em um grande número de importantes culturas agrícolas e hortícolas (KELLER et al., 2003). Este é o patógeno pós-colheita mais comum das uvas na maioria das regiões do mundo, resultando graves perdas pós-colheita (NALLY et al., 2012; QIN et al., 2010).

A podridão azeda é uma doença emergente da uva que afeta tardiamente cultivares de maturação em condições de pós-colheita (HASHIM-BUCKEY et al. al., 2008; PUELLES TAMSEC e SEPULVEDA RAMIREZ, 2012). Esta doença está associada a uma grande variedade de micro-organismos, incluindo leveduras, bactérias e fungos filamentosos (BARATA et al., 2011; NALLY et al., 2013).

Os produtos químicos são o principal método para controlar a podridão cinzenta, mas tratamentos com esses produtos estão rapidamente se tornando ineficientes (CALVO-GARRIDO et al., 2013a; COUDERCHET, 2003).

Apesar do aumento da incidência de podridão azeda da uva, faltam estratégias de controle químico (CALVO-GARRIDO et al., 2013b). O uso de leveduras de biocontrole para gerenciar decadência de frutas foi estudado para reduzir ou substituir o uso de fungicidas sintéticos (DROBY et al., 2009; WILSON e WISNIEWSKI, 1989; LIU et al., 2013).

Mecanismos que foram relatados para desempenhar um papel significativo na atividade de biocontrole de leveduras *não Saccharomyces* contra fungos inclui: competição por espaço e nutrientes (BENCHEQROUN et al., 2007; DROBY et al., 1989; LIU et al., 2013), produção de laminarinases e quitinases (FAN et al., 2002; GREVESSE et al., 2003; MASIH e PAUL, 2002), indução da resistência do hospedeiro (DROBY et al., 2002; EL-GHAUTH et al, 2003), redução na germinação de esporos, diminuição de comprimento do tubo germinativo (ZHENG et al., 2005) e inibição do crescimento micelial fúngico por metabólitos difusíveis e voláteis (HUANG et al., 2011; LUTZ et al., 2013).

Entretanto, existem poucos relatos sobre mecanismos antifúngicos de fungos *não Saccharomyces* contra isolados de ambientes vitícolas (CASTORIA et al., 2001; RABOSTO et al., 2006) e não há relatos sobre os mecanismos de ação dos *Saccharomyces* biofungicidas contra fungos isolados de uvas. Elucidação destes mecanismos podem ser úteis para a otimização de um inóculo com leveduras de biocontrole *Saccharomyces* e *não Saccharomyces*, o que provavelmente resultaria em um controle mais consistente da podridão cinzenta.

2.3. Metabólitos secundários ou especializados

A partir do metabolismo primário, as plantas produzem uma enorme gama de metabólitos que, primeiramente, foram chamados de secundários, pois não estão relacionados diretamente ao desenvolvimento da planta. No entanto, atualmente sabe-se que esses metabólitos exercem um papel fundamental na adaptação e sobrevivência das plantas. Portanto, acreditamos ser mais pertinente o uso do termo metabólitos especializados ao invés de secundários (ARIMURA E MAFFEI, 2017; CROTEAU; KUNTCHAN; LEWIS, 2000).

Pensava-se que metabólitos secundários ocorriam apenas em plantas superiores, porém estudos revelaram que são também sintetizados por bactérias, plantas inferiores e fungos (HADACEK, 2002). Produtos do metabolismo secundário desempenham funções de relevada importância na interação de plantas com o meio ambiente, tais como adaptação às condições de clima e solo, competição entre plantas e atração de organismos benéficos (polinizadores, dispersores de sementes e micro-organismos simbiotes), defesa contra herbívoros e ataque de patógenos (CHEN, F., LIU, C.J; TSCHAPLINSKI, T.J., ZHAO, N., 2009). Além disso, um vasto número de metabólitos secundários é de grande importância comercial na área farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (SIMÕES et al., 2007).

Milhares de estruturas de metabólitos especializados são conhecidas atualmente. Com base em sua estrutura química, eles são classificados em nitrogenados e não nitrogenados. O primeiro compreende os alcalóides, aminoácidos não proteicos, aminas, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos. O segundo compreende os terpenóides, poliactilenos, policetídeos, fenilpropanóides e flavonoides (WINK, 1999).

Até o momento, mais de 200.000 metabólitos secundários foram identificados a partir de vários organismos vivos, em sua maioria plantas. Entretanto, estima-se que esse número seja maior, sendo, em parte, limitado a técnicas analíticas. Com o avanço instrumental, compostos de alto grau de dificuldade de análise, seja devido a sua abundância, diversidade

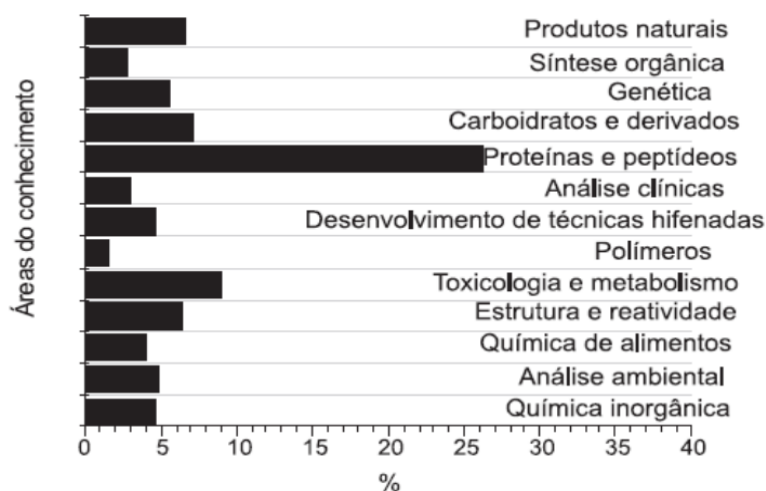
estrutural ou a complexidade da matriz, têm sido constantemente identificados (ZHAO et al., 2013).

A espectrometria de massas (MS) vem sendo a técnica de detecção mais escolhida para análise de metabólitos devido a sua abrangência, sensibilidade e seletividade, principalmente após o surgimento de técnicas mais suaves de ionização e de alta resolução. Apesar do potencial da MS, por si só, esta técnica não é capaz de resolver uma mistura complexa de metabólitos, sendo altamente requerida e fundamental à elucidação estrutural, uma previa etapa de separação e simplificação da amostra para posterior detecção no MS. A cromatografia é um dos mais valiosos e difundidos métodos indicados para essa função (PRATA, P.S., NOROSKA, G. S. M, Fabio AUGUSTO, F., 2016)

2.4. Espectrometria de Massas (MS)

O desenvolvimento da Espectrometria de Massas (MS) teve seu surgimento, em 1897, pelo trabalho pioneiro de J. J. Thomson. Desde então é uma ferramenta muito utilizada em estudos de identificação e isolamento de compostos sintéticos, orgânicos e biomoleculares (CROTTI et. al., 2004; NEWMAN e CRAGG, 2012; PICHINI, et. al., 2016). Nesses estudos os autores relatam a evolução dos trabalhos nas áreas que utilizam técnicas de Espectrometria de Massas, e apresentam as diversidades de analisadores de massas utilizados nesses equipamentos. Nos últimos anos, a espectrometria de massas com ionização por "electrospray" (IES-EM) tem se difundido às mais diversas áreas da ciência (Fig.1).

Figura 1 - Utilização de Espectrometria de Massas em diferentes áreas do conhecimento (CROTTI, 2006)



Fonte: ISI Web of Knowledge (1993-2004), considerando as 500 primeiras citações de cada ano em áreas que atingiram mais de 1% de utilização.

A técnica de ionização por IES envolve um processo de transferência de íons pré-existent em solução para a fase gasosa, utilizando uma quantidade de energia menor (soft ionization) em relação as técnicas anteriores como o bombardeamento de átomos (FAB) (MORAES e LAGO, 2003). Outra vantagem está associada à dessolvatação ocorrer gradualmente em temperaturas baixas (tipicamente, de temperatura ambiente até 80 °C), de forma a não gerar fragmentos de moléculas ionizadas e manter exatamente a mesma estrutura e carga das espécies em solução (MORAES e LAGO, 2003) e possibilitar a análise de moléculas termolábeis e de alta massa molecular, como proteínas e peptídeos.

Devido a essa característica, o número de artigos usando “eletrospray” passou de 100 para 7800 no período de 1980 a 2000, sendo que 80% destes estão relacionados à análise de biomoléculas e de compostos orgânicos; 10% são relativos à instrumentação e estudos sobre aspectos fundamentais de formação de “eletrospray” e 10% das publicações estão associadas a espécies organometálicas e inorgânicas nas mais diferentes formas (MORAES e LAGO, 2003).

Porém, a versatilidade de equipamentos que utilizam fonte de ionização por “eletrospray” se estende para análises de moléculas protonadas/desprotonadas ($[M+H]^+$ / $[M-H]^-$) e moléculas cationizadas ($[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$) ou anionizadas ($[M+Cl]^-$), todos provenientes de reações redox, ácido/base e de coordenação de cátions (CROTTI et. al., 2005).

Além da possibilidade de analisar todas essas espécies ionizadas em solução, esse equipamento possibilita estudos em múltiplos estágios, utilizando analisador de massas como o triplo e pentaquátrupolos, armadilha de íons (íon traps), setores elétricos e magnéticos e equipamento híbridos (Q-tof, Q-trap) permitindo o acesso a técnicas de espectrometria de massas sequencial (MS/MS ou MSⁿ) e aumentando o potencial analítico da técnica (CHEN et. al., 2017). A possibilidade do uso de técnicas de espectrometria de massa sequencial permite a identificação da razão massa/carga (m/z) dos íons envolvidos e, também, fornece informações estruturais de todos os íons, permitindo, a “reconstrução” da molécula precursora.

Outra possibilidade de uso da Espectrometria de Massas é a Cromatográfica líquida/espectrômetro de massas tandem (LC/MS/MS), que é empregada para avaliar a influência da α - ou β - orientação do C8 dos compostos Budleina A e Centratherina em seus perfis fragmentados. Nesse estudo foi observado que dependendo da orientação do C8 o caminho de fragmentação é dirigido e sempre ocorre com a formação de um íon (SARTORI, et. al., 2014).

Outra classe de compostos amplamente estudada em Espectrometria de Massas por Ionização de eletrospray são os flavonóides. Em um trabalho empregando espectrômetro de massas tandem de tempo-de-voou quadrupolo por ionização por eletrospray de alta-resolução (ESI Q-TOF MS/MS), foi possível diferenciar os flavonoides 6-C e 8-C-glicosilados como: Iso-orientina (Luteolina-6-glucosídeo), Orientina (Luteolina-8-C-glucosídeo), Isovitexina (Apigenina-6-C-glucosídeo) e o Vitexina (Apigenina-8-C-glucosídeo), considerados como de difícil elucidação (GUO, et. al., 2013).

Também são relatados estudos utilizando essa técnica para compostos como ácidos clorogênicos. Um exemplo foi o estudo de fragmentação do ácido 3,5 e 4,5-Dicafeoilquínico (ADCQ). Nesse estudo foram exploradas as técnicas como ionização por bombardeamento de átomos rápidos (fast atom bombardement - FAB) e análises de ESI e EI. O autor observou que nas técnicas de FAB e EI uma perda de água característica do 3,5-ADCQ, mas não observada para o isômero 4,5-ADCQ. Porém quando analisado por ESI, a informação estrutural foi maior, especialmente em modo íons negativos (MIKETOVA, et. al., 1999).

O mesmo procedimento foi empregado para análise dos ácidos 1,3 e 1,5-Dicafeoilquínico e observou-se diferenças na abundância dos íons formados e/ou presença ou ausência de íons específicos. Para o 1,3-ADCQ apresenta o pico base de m/z 179 e o segundo, o mais intenso produto de íon de m/z 335. Para o composto 1,5-ADCQ observa o íon $[M-H-18]^-$, ausente para o composto 1,3-Dicafeoilquínico e a perda consecutiva de moléculas de água a partir do íon de m/z 353 e o íon de m/z 191 ausente no espectro do composto 1,3-Dicafeoilquínico; possibilitando a identificação inequívoca desses compostos (SCHRAM, et. al., 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos extratos brutos de metabólitos secundários

A levedura *Lachancea thermotolerans* CCMA 0763 isolada de uva passa comercial no Laboratório de Microbiologia Agrícola (UFLA-MG/BR) foi cultivada em placa de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) por 2 dias e posteriormente coletado 10 µL e transferido para Erlenmeyers contendo meio de cultura Batata-Dextrose (BD) com pH 6,8 e incubados sem agitação por 21 dias a 28°C. O meio fermentado foi filtrado em algodão e gaze hidrofóbica, sendo posteriormente centrifugado a 2750 rpm durante 15 minutos.

Os meios filtrados foram transferidos para um Funil de Separação, onde empregou-se solvente orgânico Acetato de Etila (EtOAc P.A) na proporção de 80 mL para 250 mL de meio fermentado. Após leve agitação, duas fases se formaram: a) Fase Orgânica (metabólitos secundários) e b) Fase Aquosa (meio de cultura).

Ao final, as fases orgânica e aquosa foram tratadas com sal inorgânico Sulfato de Sódio Anidro (Na₂SO₄ P.A) durante 48h e submetidas, após filtração, à evaporação rotativa com banho-maria 37° C, pressão à vácuo de 600 mmHg e refrigeração de 4°C, obtendo-se assim o Extrato Bruto concentrado de metabólitos secundários da levedura *L. thermotolerans* e do controle (Batata Dextrose). Os extratos foram eluídos em Metanol (MeOH) e transferidos para frascos de vidro esterilizados. As quantidades de massas obtidas foram: 1,0141g para levedura e Controle: 1,1979g para o controle.

3.2. Análise química

3.2.1. Análise dos Compostos por Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC)

Os solventes utilizados foram: Acetonitrila grau UHPLC-MS (J.T. Baker-Phillipsburg, NJ, EUA), Água Deionizada a partir de sistema reagente de água Millipore Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e Ácido Fórmico grau analítico (85%).

O extrato da levedura *L. thermotolerans* (1,0141g) foi solubilizado em metanol e a concentração da solução foi corrigida para 1,0 mg/mL. Para as análises de espectrometria de massas foi coletado um volume de 1,0 mL do extrato da levedura, e adicionado 10,0 µL de ácido fórmico 0,1% (V/V) (análise em modo positivo). Essa solução foi colocada em vial para análise no espectrômetro de massas.

Os extratos foram analisados utilizando Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplada em Espectrômetro de Massas de Alta Resolução (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com Fonte de Ionização Electrospray. A separação cromatográfica foi realizada com coluna Acquity UPLC[®] CSH[™] C18, tamanho de partícula de 2,1 µm, com 2,1x100 mm (Waters, Irlanda) e vazão de 0,200 mL min⁻¹. A mistura de gradiente dos solventes A (H₂O com 0,1% (v/v) de Ácido Fórmico) e B (Acetonitrila com 0,1% (v/v) de Ácido Fórmico) como segue: 5% B 0-1 min, 50% B 1-5 min, 95% B 5-10 min e mantida a 95% de B 10-16 min, 5% de B 16-18 min e mantida a 5% de B 18-32 min a 40 °C.

3.2.2. *Análise dos Compostos por Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) (HRMS) e Espectrometria de Massas em Tandem (MS/MS)*

A fonte de ionização foi operada em modos positivo e negativo de ionização e ajustados para 4500 e 3000 V, respectivamente; com um potencial de end plate offset -500 V. Os parâmetros de gás de secagem foram ajustados para 8 L min⁻¹ a 180 °C e pressão do gás de nebulização a 4 bar. Os dados foram coletados de m/z 50 a 1300 com uma taxa de aquisição de 5 Hz e os 4 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto MS/MS).

3.2.3. *Processamento de Dados e Análises Estatísticas*

O software utilizado para o processamento de dados para detecção de pico, análise multivariada e identificação foi o DataAnalysis 4.0 (Bruker, Germany). Para a identificação dos compostos foram utilizados sites de banco de dados especializados: MoNa (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) e Metlin (<https://metlin.scripps.edu>). Os parâmetros de pesquisa nos bancos de dados online foram: massa do precursor com erro ≤ 10 ppm, tolerância do fragmento ≤ 10 ppm. As análises de componente principal (PCA) e discriminação por projeção em estrutura latente ortogonal (OPLC-DA) foram geradas através do software ProfileAnalysis 2.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 2 representa a diversidade dos perfis químicos dos extratos *L. thermotolerans* e meio BD (Batata Dextrose) no formato de intensidade de pico base (BPI), gerado a partir de UHPLC-HRMS. A corrida cromatográfica teve um tempo de 28.0 min por injeção com 4.0 min para o equilíbrio e limpeza da coluna. Foi revelado nessa primeira análise que no tempo entre 1.0 a 6.0 min os dois Cromatogramas exibem um comportamento diferente em relação à intensidade e áreas dos picos, isso também é observado no tempo entre 14.0 e 25.5 min. Porém, o perfil cromatográfico é muito similar entre o controle e a amostra, sendo de difícil diferenciação entre eles.

Entretanto, as análises de UHPLC-HRMS fornecem uma cobertura do espaço químico baseado em dados de MS e MS/MS. Para esse experimento a extensão de massas moleculares estudadas foi de 50 a 1300 Dalton (Da). Essa distribuição de massa de precursores foi baseada em estudos presentes na literatura (MACIÁ-VICENTE, J.G. et al., 2018).

O espaço químico global observado no conjunto de dados completo compreendeu aproximadamente oito mil espectros exclusivos de MS/MS após a primeira inspeção para a amostra e o controle. Para minimizar e descartar potenciais ruidosos ou artefatos presentes em análises de UHPLC-HRMS, foram impostas três condições de contorno: primeiro, a remoção de espectros presentes somente no controle ou nos espaços em branco; segundo, considerar os espectros finais que ocorreram somente na amostra; terceiro, considerar espectros com MS/MS adquirido. A terceira condição é importante para auxiliar na identificação dos compostos presentes na amostra.

Para auxiliar a diferenciação entre o controle e a amostra foi empregado análise quimiométrica usando estudo estatístico de PCA e OPLS-DA. O tempo de retenção e os picos obtidos nos espectros de massas de alta-resolução foram considerados para o teste de diferenciação entre os extratos. Posteriormente os dados foram submetidos a deconvolução dos íons e excluídos adutos de sódio e potássio.

Todos os dados espectrais foram coletados e processados usando métodos de centralização, padrão isotópico, filtragem, tempo de retenção e reconhecimento de pico para gerar uma matriz de dados incluindo identidade de amostra, identidade de íons e abundância de íons. O resultado desse procedimento matemático de deconvolução forneceu 126 íons exclusivos da amostra.

O software utilizado para o processamento de dados para detecção de pico, análises multivariadas e identificação foi DataAnalysis 4.0 (Bruker, Germany) e Software

ProfileAnalysis 2.1. Para a identificação dos compostos foram utilizados sites de Banco de Dados especializados como: MoNa, ChemSpider e Metlin. Outros parâmetros, como pontuação de fragmentação e registro bibliográfico sobre a ocorrência das moléculas, também foram considerados para desambiguação. Os principais fatores de exclusão empregados para identificação foram: erro de massa menor ou maior a 10 ppm para diminuir o número de candidatos, perfil de fragmentação para justificar e comprovar a identificação e a probabilidade de ionização por ESI.

Toda essa preocupação em vários fatores de exclusão está associada à possibilidade de compostos dentro de uma faixa de massa de 0,5 a 5 ppm que costumam ter números muito diferentes de átomos de carbono; a biossíntese a partir de unidades com uma composição elementar comum que fornece informações limitadas. Assim, a precisão da massa e a razão isotópica são parâmetros quase ortogonais que podem ser usados para excluir composições elementares hipotéticas, mas não estabelece uma identificação consistente (NIELSEN et al., 2011).

Nesses casos, MS/MS, ou preferencialmente por Espectrometria de Massas Sequencial (MS^n), com padrões de fragmentação subsequentes é mais eficiente, assumindo que padrões de referência estejam disponíveis para modelar a fragmentação da classe de compostos (A. SHARMA et al., 2007). Dessa forma, todos os precursores foram submetidos a esses parâmetros aqui apresentados para corroborar na própria identificação. Até o momento foram identificados quatro compostos (Tab.1) com seus espectros ESI-MS/MS, respectivamente (Figs.4,5,6 e 7).

Todos os compostos identificados são alcaloides (Fig.3) e apresentam em seu esqueleto químico átomos de nitrogênio e um perfil de fragmentação diferenciado. Dentre as atividades presente na literatura para essas moléculas estão: atividade antibacteriana em dermatite digital em gado leiteiro, atividades inibitórias da glicosidase e atividade antiproriferativa frente a linhagem de células humanas (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7 e SW480) *in vitro* com valores de IC_{50} entre 0,12 a 15,56 M (OELSCHLAEGEL,S.,et al.,2012).

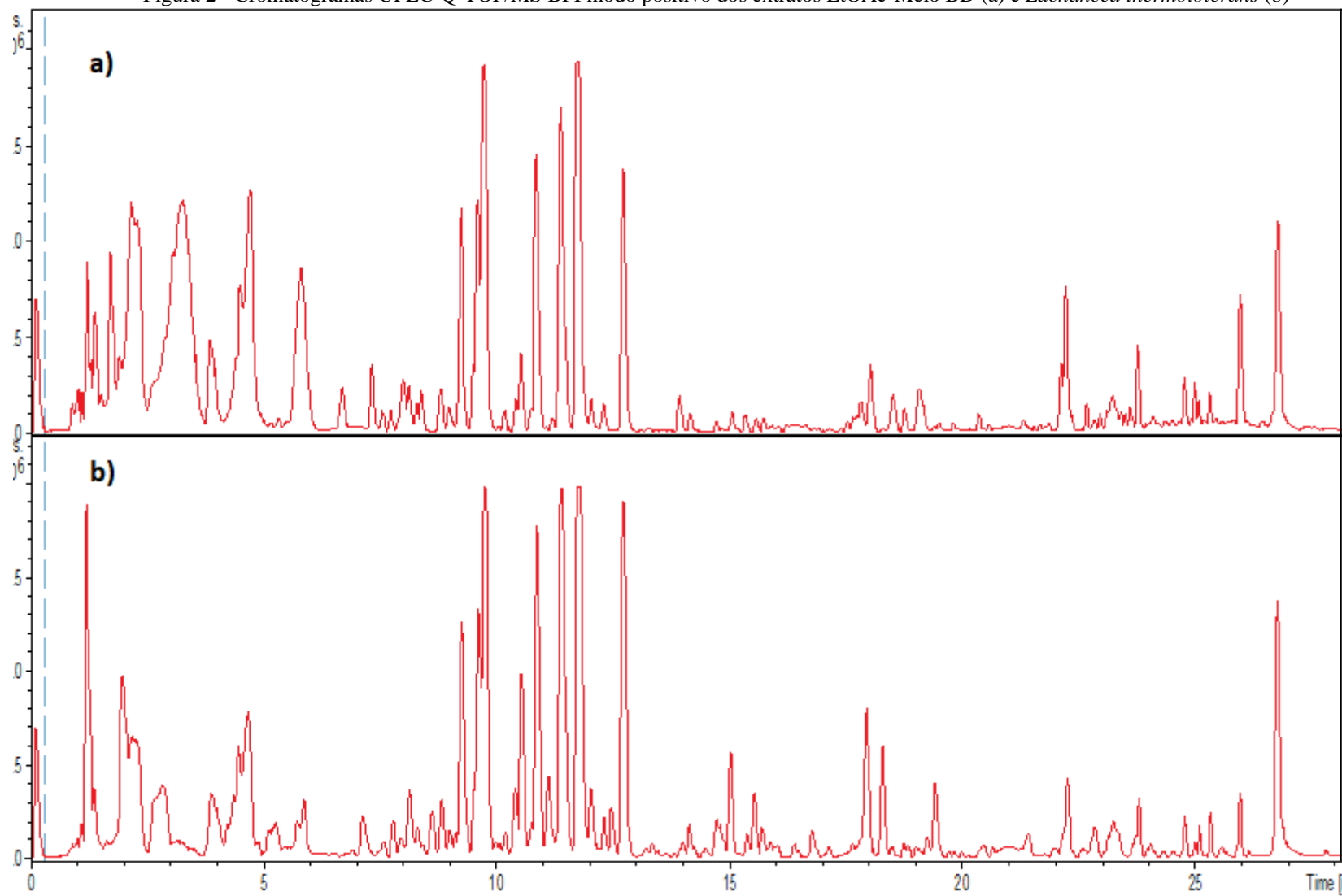
Figura 2 - Cromatogramas UPLC-Q-TOF/MS BPI modo positivo dos extratos EtOAc-Meio BD (a) e *Lachancea thermotolerans* (b)

Tabela 1 - Compostos identificados no extrato de *Lachancea thermotolerans*.

Biblioteca	Composto	Modo ESI	m/z	Tempo de retenção (min.)	Massa exata	Formula molecular	Íons produtos	Erro (ppm)
Mona	4-Hidroxiquinolina	[M+H] ⁺	146.0585	6.49	145.0528	C ₉ H ₇ NO	128.1057; 118.0634; 111.0423; 104.1057; 99.0426; 86.0953	-10.27
Mona	Xantina	[M+H] ⁺	153.0395	2.70	152.0334	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	136.0133; 110.0343	7.19
Goldmann, et al., 1990	Calistegina A ₃	[M+H] ⁺	160.0958	1.03	159.0895	C ₇ H ₁₃ NO ₃	142.0853; 130.0854; 124.0748; 112.0752; 103.0385; 94.0648; 86.0600; 82.0648	6.25
Ma, et al., 2018	Clausehainina C	[M+H] ⁺	292.1332	0.34	291.1259	C ₁₉ H ₁₇ NO ₂	246.1301; 200.1253; 158.1159; 112.1110	0.3

Figura 3 - Estruturas dos compostos identificados no extrato *Lachancea thermotolerans*.

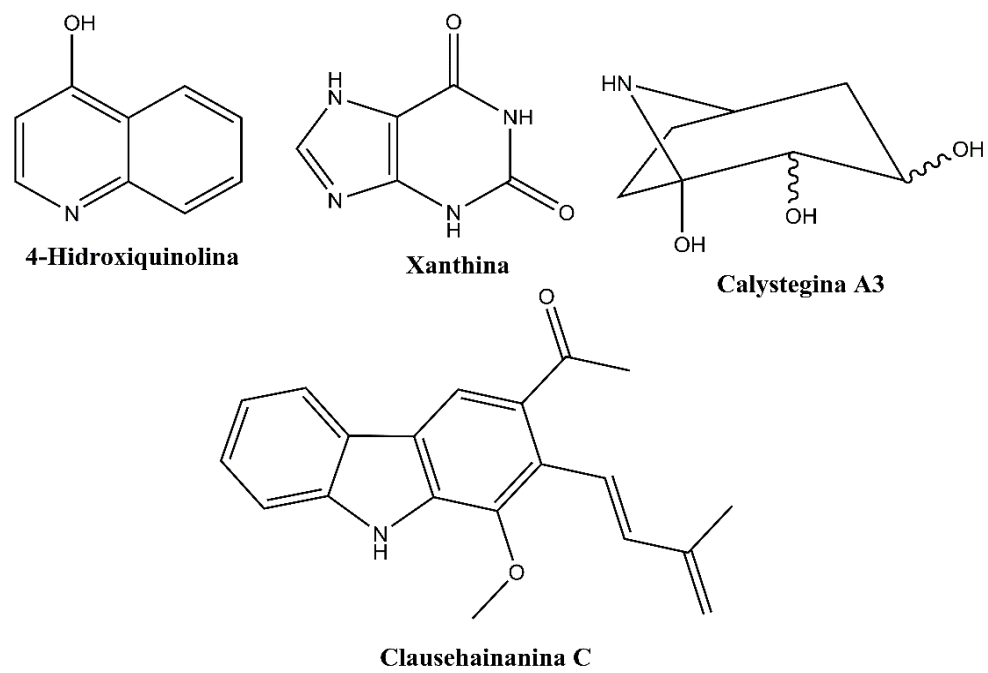


Figura 4 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto 4-Hidroxiquinolina.

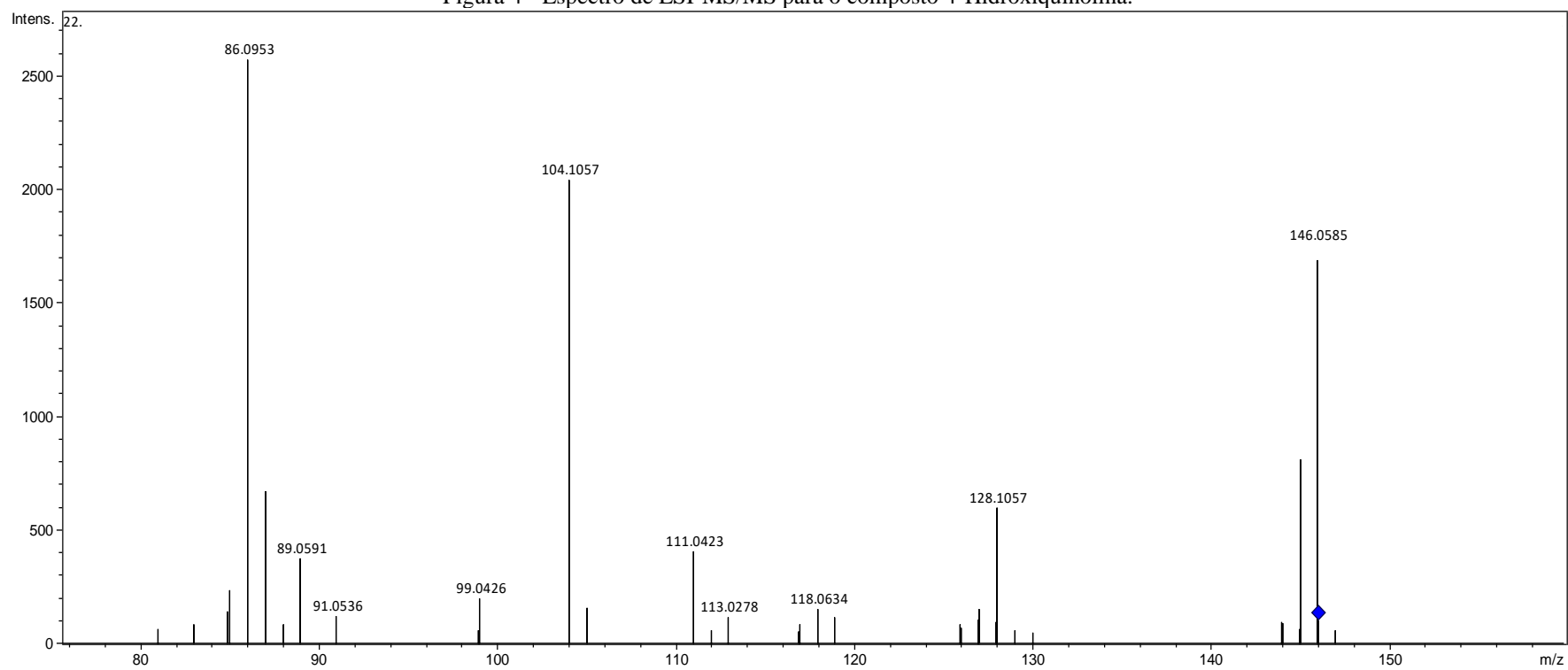


Figura 5 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto Xantina.

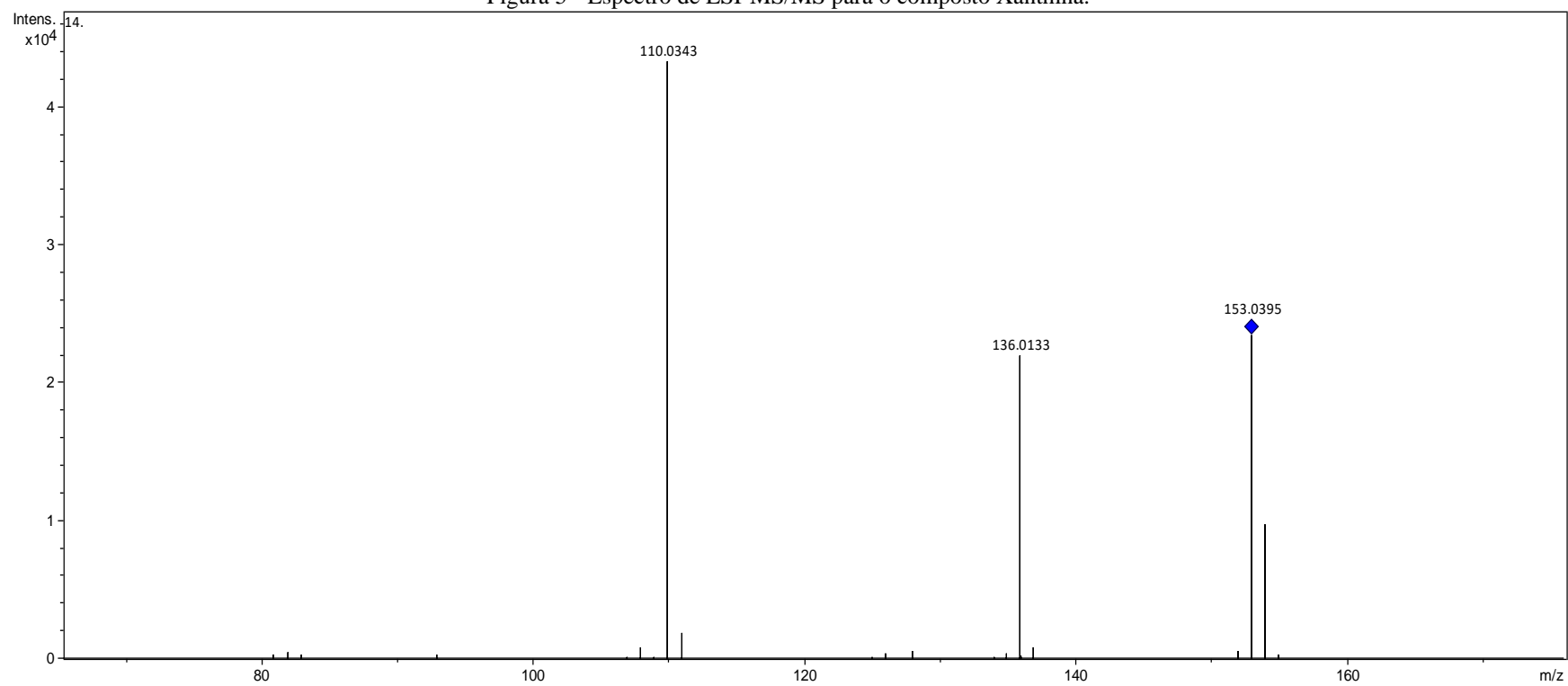


Figura 6 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto Calistegina A3.

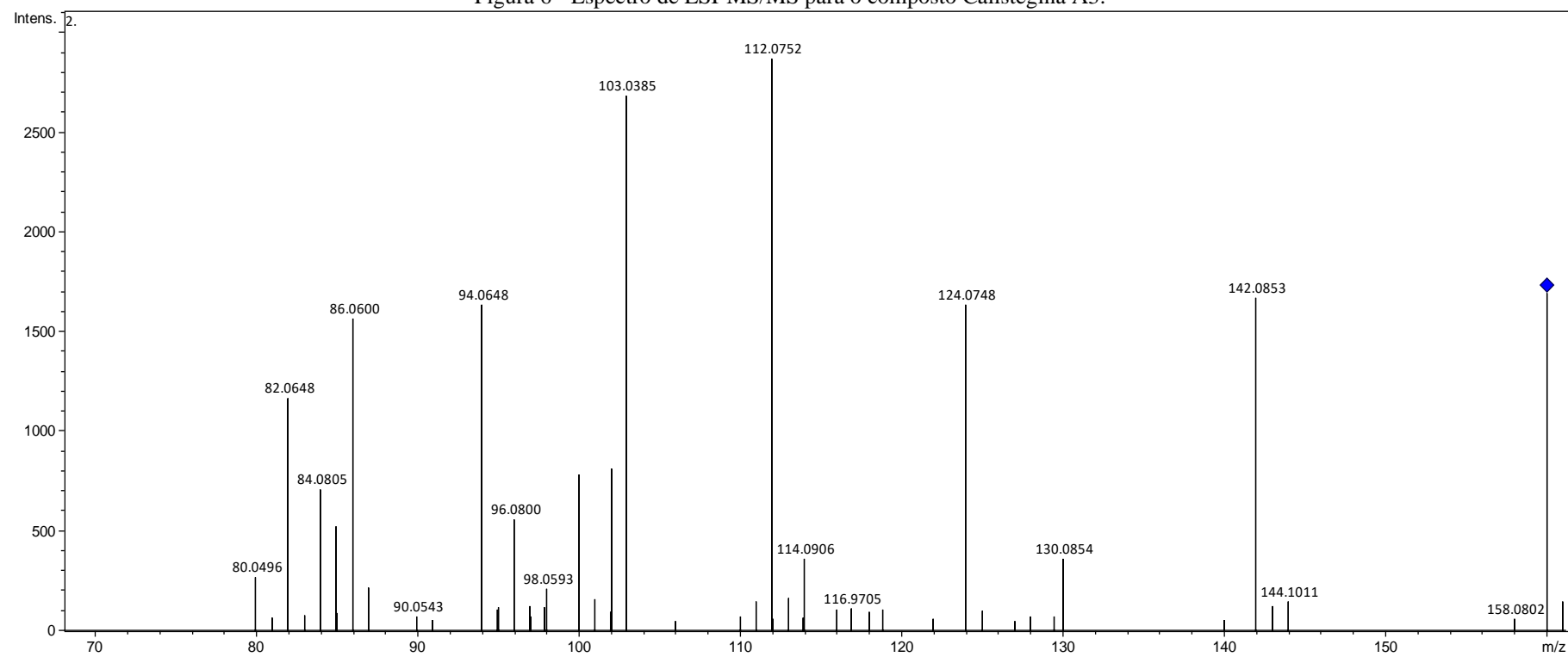


Figura 7 - Espectro de ESI-MS/MS para o composto Clausehainanina C.

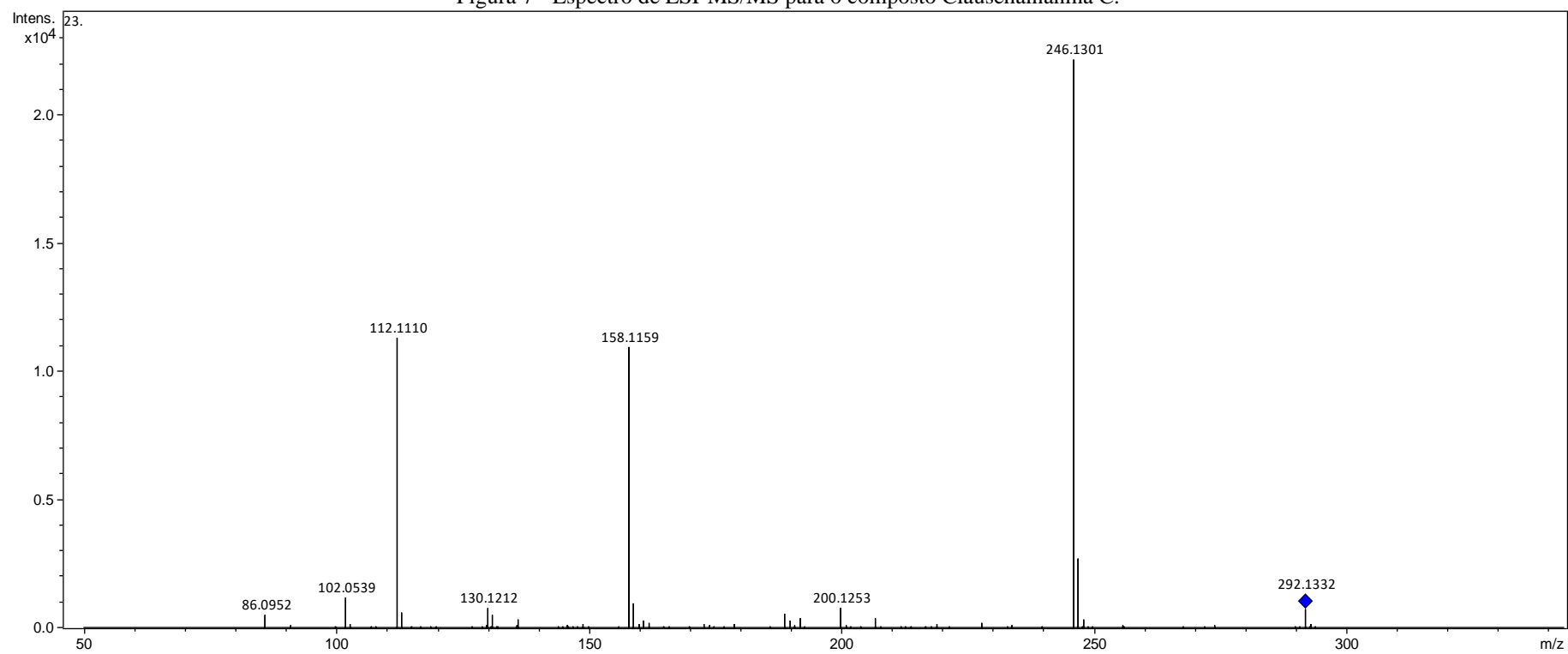
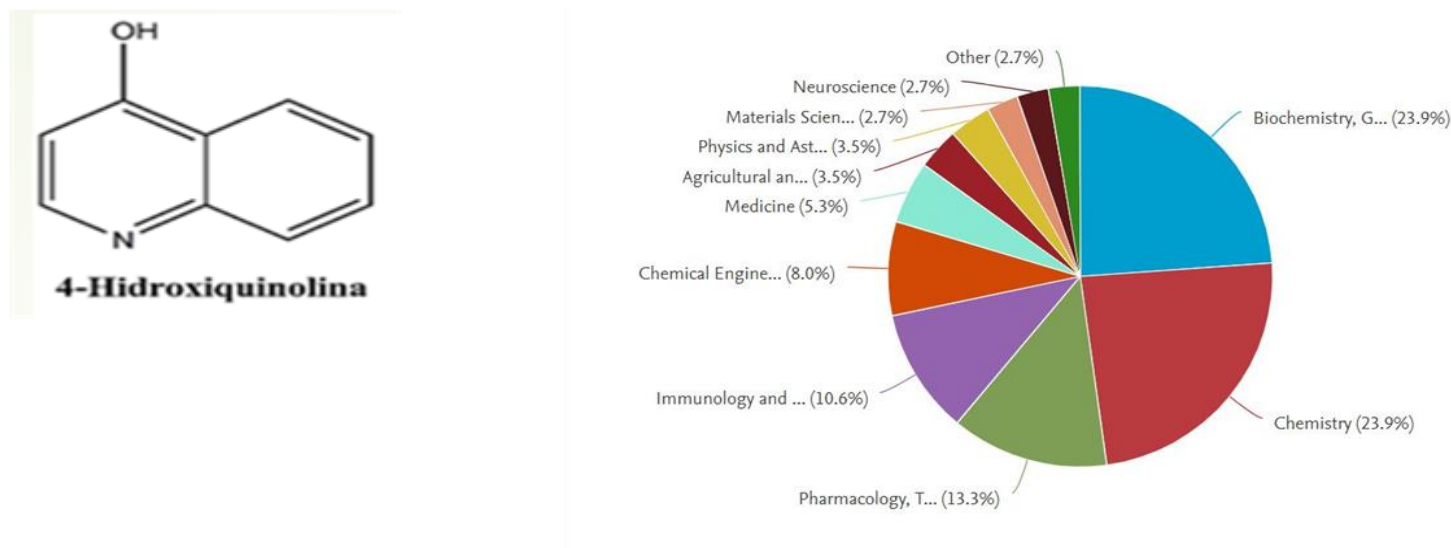


Figura 8 - Aplicações dos compostos identificados em diferentes áreas do conhecimento, destacando-se a Agricultura (2015-2020).

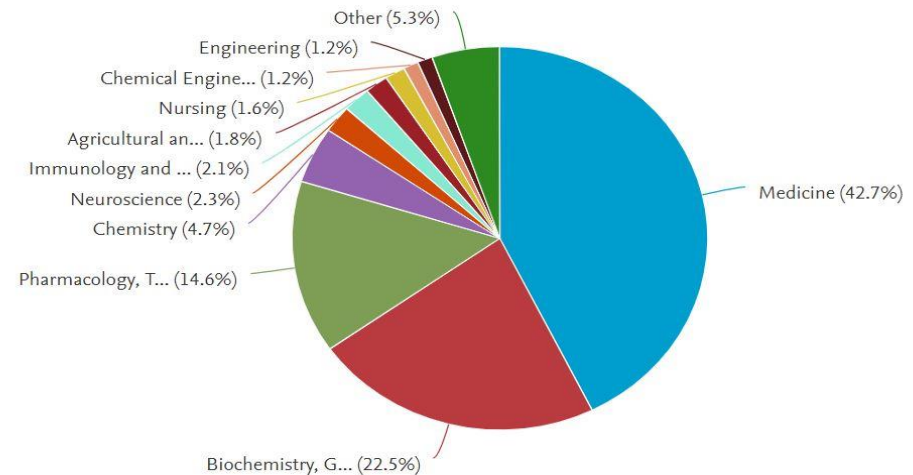
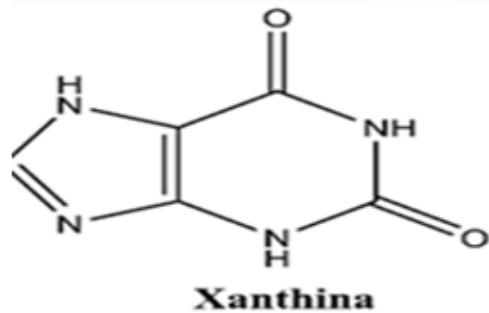
I



O composto identificado 4-hidroxiquinolina pertence ao grupo de compostos nitrogenados heterocíclicos da classe de Alcaloides Quinolínicos. Eles desempenham papel importante em diversas áreas do conhecimento e apresentam grande diversidade de substâncias naturais. As Quinolonas são moléculas estruturalmente derivadas do heterocíclico Quinolina, estando distribuídas na natureza como produto do metabolismo secundário de várias espécies de plantas e fungos, principalmente em espécies da família *Rutaceae* (CUCA et al., 2011). Dessa

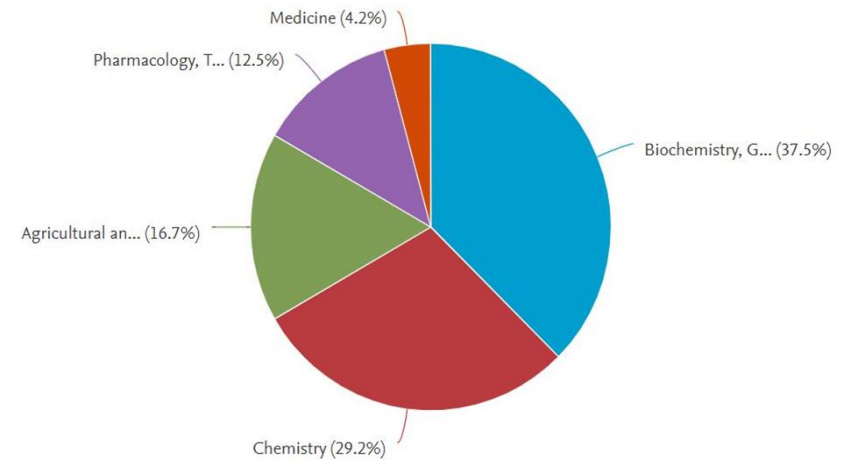
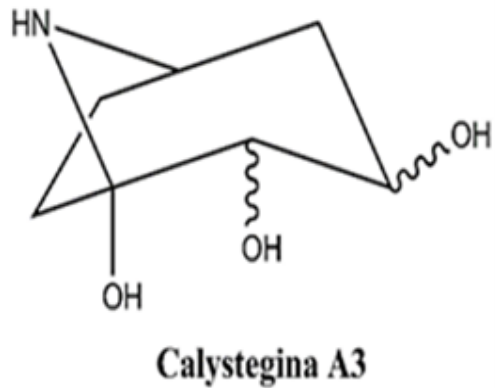
família têm sido isolados diversos derivados de Quinolona com atividades analgésica, amebicida, antiviral, herbicida e fungicida (CUCA et al., 2007). O composto 8-Hidroxiquinolina e seus derivados são uma subclasse de Quinolinas com uma grande variedade de atividades biológicas. Elas têm sido utilizadas como fungicida na agricultura e conservante nas indústrias têxtil, madeireira e papelaria (Oliveri e Vecchio, 2016).

II



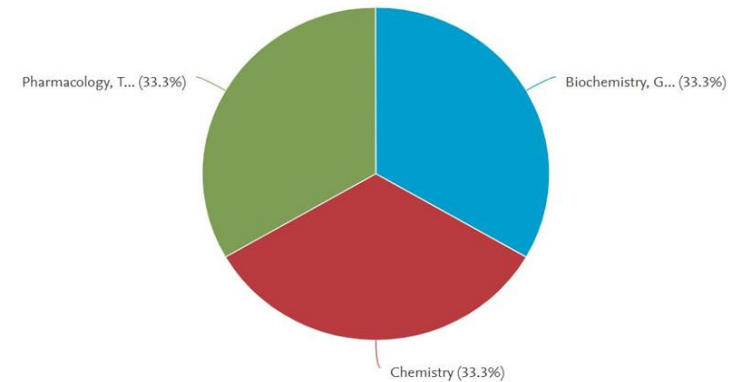
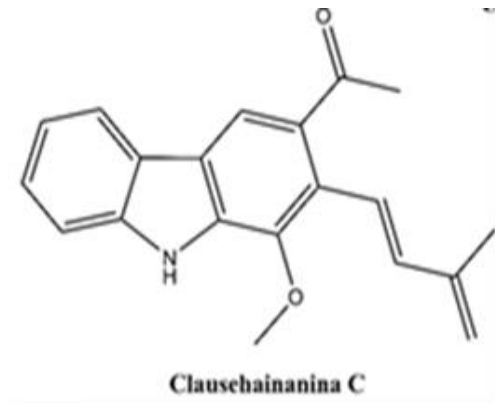
As Xantinas são uma classe de Alcaloides Purínicos encontrados em muitas plantas diferentes, incluindo erva-mate (1,3 e 3,7 Dimetilxantina), café (1,3,7-Trimetilxantina) e cacau (Athayde et., 2000). Outra particularidade associada a esses compostos é sua função biológica em conjunto com a enzima Xantina A Desidrogenase (XDH), uma Hidroxilase contendo Molibdênio, sendo importante para regulação do metabolismo de Purinas e Ácido Úrico responsáveis pela regulação do envelhecimento e da resistência ao estresse de *Arabidopsis*, ervilha, milho e uvas (Witte 2011; Brychkova et al. 2008; Zdunek-Zastocka and Lips 2003; (Katalin et al. 2000; You et al. 2017; Han et al. 2020).

III



As Calisteginas são um grupo de Alcalóides (Glicoalcalóides) descoberto inicialmente nas raízes de culturas de *Calystegia sepium* e *Atropa beladonna*. As estruturas químicas contém um sistema de anel Nortropano com 3, 4, ou 5 grupos Hidroxila (Calisteginas A, B ou C, respectivamente) localizados em várias posições com diferentes estereoquímicas (funcionalidade Aminocetal), e um grupo Amino de ponte (Asano et al., 2000; Biastof et al. 2007). Esses compostos foram identificados em vários gêneros como *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* e *Escopolia* pertencente as famílias *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Erythroxylaceae* e *Brassicaceae* (Asano et. al., 2000; Schimming et. al., 2005; Brock et al.; 2005 e 2006; Romera -Torres et al., 2019). As atividades biológicas associadas aos Alcalóides Polihidroxilados são seus níveis de toxicidades a bactérias, fungos, vírus, insetos, animais e humanos (Friedman 2006).

IV



Os Alcalóides Carbazólicos são caracterizados por um esqueleto básico aromático tricíclico que consiste em um anel de Pirrol central fundido com dois anéis de Benzeno. O próprio Carbazol foi originalmente isolado da fração Antraceno do alcatrão de carvão (Graebe e Glaser 1872). Eles foram encontrados em bactérias, mixomicetos, fungos, esponjas, tunicados e nas famílias de plantas relacionadas *Apocynaceae* e *Loganiaceae*. A grande maioria dos Carbazóis, compreendendo mais de 330 derivados, demonstrou ser derivado do 3-Metilcarbazol como precursor comum. Este tipo de Carbazóis foi designado por Fitocarbazóis (Chakraborty 1977). Entretanto não há evidências científicas de estudos recentes relacionados a aplicações desse composto na área de agricultura, podendo assim ser objeto de pesquisa a ser investigado.

5. CONCLUSÃO

O extrato bruto de metabólitos secundários da levedura *Lachancea thermotolerans* apresentou oito mil espectros exclusivos de MS/MS através da análise de UHPLC-HRMS. Esses dados foram submetidos ao procedimento matemático de deconvolução, obtendo-se 126 íons exclusivo da amostra.

O método analítico de UHPLC-HRMS tem sido uma ferramenta de alto desempenho para identificação de compostos orgânicos e biomoléculas de grande diversidade estrutural para a análise de metabólitos secundários.

Desse modo, foram identificados quatro compostos orgânicos da classe de Alcalóides Heterocíclicos, sendo três (03) naturais: 4-Hidroxiquinolina, Xantina e Calistegina A3; e um (01) sintético: Clausehainanina C, do extrato bruto de *L. thermotolerans*.

Esses compostos apresentam, através da literatura, atividades antimicrobiana, antiproliferativa, inibitória e regulatória, aplicados em diversas áreas do conhecimento, podendo assim, ser testados como agentes de biocontrole em testes antagonistas de ensaios biológicos contra fitopatógenos causadores de doenças fúngicas e bacterianas nas culturas agrícolas de interesse.

BIBLIOGRAFIA

AHANSAL, L. et al. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) in Morocco. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v.24, p. 777-782, 2008.

ARIMURA, G.-I.; MAFFEI, M. (Eds.) **Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions**. CRC Press, 2017.

ASANO, N., NASH, R. J., MOLYNEUX, R.J., FLEET, G.W.J. Sugarmimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. **Tetrahedron: Asymmetry**, 11, 1645-1680. 2000.

ATHAYDE, M.L., COELHO, G.C., Schenkel EP. Cafeína e teobromina em cera epicuticular de *Ilex paraguariensis* A. **St-Hil Phytochem** 55: 853-857, 2000.

BARATA, A. et al. Influence of sour rotten grapes on the chemical composition and quality of grape must and wine. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 233, p.183-194, 2011.

BENCHEQROUN, S.K. et al. In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: evidence for the involvement of competition for nutrients. **Post. Biol. Technol**, v.46, p.128-135, 2007.

BERTOLO, A. P. et al. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p.3697–3706; 2019.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03833-3>.

BIASTOFF, S., DRÄGER, B. Calystegines. In the Alkaloids: Chemistry and Biology; Cordell, G. A., Ed.; **Academic Press**: New York, Vol. 64, pp 49-102, 2007.

BOONE, C. et al. Yeast systems biology: our best shot at modeling a cell. **Genetics**, v.198, p. 435-437, 2014.

BORNEMAN, A.R. et al. Whole genome comparison reveals high levels of inbreeding and strain redundancy across the spectrum of commercial wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.6, p.957-71, 2016.

BROCK, A., BIERI, S., CHRISTEN, P., DRÄGER, B. Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. **Phytochemistry**, 66, 1231-1240. 2005.

BROCK, A., HERZFELD, T., PASCHKE, R., KOCH, M., DRÄGER, B. *Brassicaceae* contain nortropane alkaloids. **Phytochemistry**, 67, 2050-2057. 2006.

BRYCHKOVA, G., ALIKULOV, Z., FLUHR, R., SAGI, M., A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. **Plant J** 54:496-509, 2008.

CALVO-GARRIDO, C. et al. Biological control of *botrytis* bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. **Plant Pathol**, 62, 510-519; 2013a.

CALVO-GARRIDO, C. et al. *Candida sake* CPA-1 and other biologically based products as potential control strategies to reduce sour rot of grapes. **Lett. Appl. Microbiol**, v.57, p.356-361, 2013b.

CARMONA-HERNANDEZ, S., REYES-PÉREZ, J.J., CHIQUITO CONTRERAS, R. G., RINCON-ENRIQUEZ, G., CERDAN-CABRERA, C. R., & HERNANDEZ-MONTIEL, L. G. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: **A review**. **Agronomy**, 9(3), 121. 2019.

CASTORIA, R. et al. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. **Post. Biol. Technol.**, v.22, p.7-17, 2001.

CHAKRABORTY, D.P. Carbazole Alkaloids. In: HERZ, W., GRISEBACH, H., KIRBY, G.W. (eds) Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe, vol 34. **Springer**, Wien, New York. 1977.

CHANCHAI OVIVAT, A., PANIJPAN, B., RUENWONGSA, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. **Biol Control**, v.47, p.207-215, 2008.

CHEN, F., LIU, C.J.; TSCHAPLINSKI, T.J., ZHAO, N. Genomics of Secondary Metabolism in *Populus*: Interactions with Biotic and Abiotic Environments. **CRC Crit Rev Plant Sci** 28(5): 375-392, 2009.

CHEN, Y.T. et al. Development of a Multiplexed Liquid Chromatography Multiple-Reaction-Monitoring Mass Spectrometry (LC-MRM/MS) Method for Evaluation of Salivary Proteins as Oral Cancer Biomarkers. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.24, p.799-811, 2017.

COMBINA, M.; ELÍA, A.; MERCADO, L.; CATANIA, C.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **Int. J. Food Microbiology**, 99, 237-243, 2005.

COUDERCHET, M. Review: benefits and problems of fungicide control of *Botrytis cinerea* in vineyards of champagne. **Vitis**, v.42, p.165-171, 2003.

CROTTI, A. E. M. et al. The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.232, p.271-276, 2004.

CROTTI, A. E. M. et al. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of gayazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v.40, p.1030-1034, 2005.

CUCA, L. E. S.; COY, C. A. B. Metabolitos secundarios aislados de los géneros *Raputia* y *Esenbeckia* (*Rutaceae*). **Scientia et Technica**, v. 33, p. 337-338, 2007.

- CUCA, L. E. S.; COY, C. A. B.; COY, E. D.B.; LOZANO, J. M. M. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 45, n. 2, p. 275-282, 2011.
- DROBY, S. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. **Can. J. Microbiol.**, v.35, p.794-800; 1989.
- DROBY, S. et al. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Phytopathology**, v.92, p.393-399, 2002.
- DROBY, S. et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? **Post. Biol. Technol**, v.52, p.137-145, 2009.
- DUKARE, A. S., SANGEETA, P., NAMBIN, V. E., GUPTA, R., SHARMA, K., & VISHWAKARMA, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 16, 1-16, 2018.
- DRUVEFORS, U. Yeast biocontrol of grain spoilage mold. (Doctoral dissertation, Swedish University of Agricultural Sciences). 43p. 2004.
- EL-GHAUTHG, A. et al. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, v.93, p.344-348, 2003.
- EI-TARABILY, K.A., SIVASITHAMPARAM, K. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. **Mycoscience**, v.47, p.25-35, 2006.
- FAN, Q. et al. Production of β 1,3- glucanase and chitinase of two biocontrol agents and their possible modes of action. **Chin. Sci. Bull.**, v.47, p.292-296, 2002.
- FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.43, p.337-359, 2005.
- FRELL, K.C. Population genomic analysis reveals highly conserved mitochondrial genomes in the yeast species *Lachancea thermotolerans*. **Genome biology and evolution**, v. 6, p.2586-94, 2014. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu203> PMID: 25212859; 2014.
- FRIEDMAN, M., Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. **J.Agric. Food Chem.**54, 8655-8681. 2006.
- GANTER, P.F. Yeast and invertebrate associations. **In Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**; Rosa, C.A., Gabor, P., Eds.; Springer: Berlin, Germany; pp. 303-370, 2006.
- GRAEBE, C., GLASER, C. (1872) Ueber Carbazol. **Chem Ber** 5:12-15. 1872.
- GREVESSE, C. et al. Characterization of the exoglucanase encoding gene PaEXG2 and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* strain K. **Phytopathology**, v.93, p.1145-1152; 2003.

GUO, X. et al. A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.333, p.59-66, 2013.

HADACEK, F. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. **CRC Crit Rev Plant Sci**. 21(4): 273–322, 2002.

HADDEN, J.F., BLACK, L.L. Anthracnose of pepper caused by *Colletotrichum* spp. In: Green, S.K., Griggs, T.D., Mclean, B.T. (Eds.), **Tomato and Pepper Production in the Tropics**. AVRDC: Shauhua, Taiwan, p. 189-191, 1989.

HAN, R., HE, X., PAN, X., SHI, Q. and WU, Z. Enhancing Xanthine Dehydrogenase activity is an effective way to delay leaf senescence and increase rice yield. **Rice**. <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00375-7>. 2020.

HASHIM-BUCKEY, J. et al. Effectiveness of preharvest applications of fungicides on preharvest bunch rot and postharvest sour rot of 'redglobe'. Grapes **Proceedings** of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference, University of California, Davis, p. 33-36, 2008.

HUANG, R. et al. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. **Phytopathology**, v.101, p.859–869, 2011.

IRTWANGE, S.V. Application of biological control agents in pre-and postharvest operations. **Int. Comm. Agric. Eng.**, v.8, p.1–11, 2006.

JACOBS, C.J.; VAN VUOREN, H.J.J. Effects of different “killer” yeast on wine fermentations. **Journal of Amsterdam Society Brewing**, v.42, p.295-299, 1991.

JANISIEWICZ, W.J., KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. **Annu Rev. Phytopathol.**, v.40, p.411–441, 2002.

KATALIN, B.N., OMAROV, R.T., ERDEI, L., HERMAN, L.S. Distribution of the Moenzymes Aldehyde oxidase, Xanthine dehydrogenase and Nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots as affected by nitrogen and salinity. **Plant Sci** 155:49-58. 2000.

KELLER, M. et al. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. **Phytopathology**, v.93, p.316-322, 2003.

KELLY, D.E, LAMB, D.C, KELLY, S.L. Genome-wide generation of yeast gene deletion strains. **Comparative and functional genomics**, v.2, p.236-242, 2001. <https://doi.org/10.1002/cfg.95> PMID: 18628917.

KURTZMAN, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygotoruspora*. **FEMS Yeast Res**, 4, 233-245, 2003.

KURTZMAN, C., FELL, J.W, BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a taxonomic study**. London, Elsevier, p.511-519, 2011.

LUTZ, M.C. et al. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **Int. J. Food Microbiol.**, v.164, p.166-172, 2013.

MACIÁ-VICENTE, J.G. et al. Metabolomics-based chemotaxonomy of root endophytic fungi for natural products discovery, **Environ. Microbiol.**, v.20, p.1253-1270, 2018. doi:10.1111/1462-2920.14072.

MARI, M., GUIZZARDI, M. The postharvest phase: emerging technologies for the control of fungal diseases. **Phytoparasitica**, v.26, p.59-66, 1998.

MASIH, E.I., PAUL, B. Secretion of β 1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. **Curr. Microbiol.**, v.44, p.391-395, 2002.

MEHROTRA, R.S., AGGARWAL, A. **Fundamentals of Plant Pathology**. Tata McGraw Hill Education Private Limited, 454p, 2013.

MIKETOVA, P. et al. Mass spectrometry of 3, 5-and 4, 5-dicaffeoylquinic acids and selected derivatives. **J. Mass Spectrom.**, v.34, p.1240-1252, 1999.

MILANI, J.M. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: **A review. Vet. Med.**, 58, 405-411, 2013.

MORAES, M. C. B. e LAGO, C. L. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v.26, p.556-563, 2003.

MORATA, A.; LOIRA, I.; SUÁREZ LEPE, J.A. Influence of Yeasts in Wine Colour. In Grape and Wine Biotechnology; Morata, A., Loira, I., Eds.; **IntechOpen**: London, UK, 2016; pp. 285-305, 2016.

MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 588-611, 2015.

NALLY, M.C. et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. **Post. Biol. Technol.**, v.64, p.40-48, 2012.

NALLY, M.C. et al. Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by *Saccharomyces* and other yeast species. **Post. Biol. Technol.**, v.86, p.456-462, 2013.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of New Drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, 73, 311-335, 2012.

NIELSEN, K.F. et al. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 2338-2348, 2011. doi:10.1021/np200254t.

OELSCHLAEGEL, S. et al. Floral markers of cornflower (*Centaurea cyanus*) honey and its peroxide antibacterial activity for an alternative treatment of digital dermatitis. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, p.11811-11820, 2012. doi:10.1021/jf303699t.

OLIVEIRA, A.V.O. et al. Biocontrole in vitro de *Botrytis cinerea* por leveduras *killer* visando aplicação em morangos pós-colheita. **Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, p. 353-364, Edição especial, 2011.

OLIVERI, V., VECCHIO, G. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: a structural perspective. **Eur J Med Chem**, 120(2016):252-274, 2016.

PAKDEEVARAPORN, P. et al. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breed.**, v.124, p.206-208, 2005.

PAL, K.K., GARDENER, B.M. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**. doi: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02, 2006.

PICCININ, E. DI PIERO, R.M., PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* no desenvolvimento de sorgo e severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.5-9, 2005.

PICHINI, S. et al. Ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of antidepressant and anxiolytic drugs in neonatal meconium and maternal hair. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.118, p.9-16, 2016.

(PRATA, P.S., NOROSKA, G. S. M, Fabio AUGUSTO, F. Multidimensional Chromatographic Techniques on the Investigation of Secondary Metabolites. **Scientia Chromatographica**, 8(4):209-229, 2016.

PUELLES TAMSEC, J., SEPULVEDA RAMIREZ, P. Pudrición ácida- Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chile. **Cartilla Divulgativa**, v.5, p.1-4, 2012.

QING, F., SHIPING, T. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. **Plant Dis.**, v.84, p.1212-1216, 2000.

QIN, G. et al. Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action. **Int. J. Food Microbiol.**, v.138, p.145-150, 2010.

RABOSTO, X. et al. Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.57, p.332-338, 2006.

RAMOS, D.M.B. et al. Inibição *in vitro* de fungos toxigênicos por *Pichia* sp. e *Debaryomyces* sp. isoladas de frutos de café (*Coffea arabica*). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 397-402, 2010.

RIMA, H.; STEVE, L.; ISMAIL, F. Antimicrobial and probiotic properties of yeast: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 421, 2012.

ROMERA-TORRES, A., ARREBOLA-LIÉBANAS, J., VIDAL, J.L.M. and FRENIC, A.G. Determination of Calystegines in Several Tomato Varieties Based on GC-Q-Orbitrap Analysis and Their Classification by ANOVA. **J. Agric. Food Chem.** 67, 1284-1291. 2019.

ROSA, M.M. Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos. Tese-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada). Rio claro, 169, 2009.

SALIGKARIAS, I.D, GRAVANIS, F.T, EPTON, H.A.S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain . **Biol Control**, v.25, p. 151-161, 2002.

SANTOS, A., MARQUINA, D. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. **Microbiology**, v.150, p. 2527-2534; 2004.

SARTORI, L.R. et al. Systematic investigation of the fragmentation pattern of two furanoheliangolide C-8 stereoisomers using electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.28, p.723-730, 2014.

SCHIMMING, T., JENETT-SIEMS, K., MANN, P., TOFERN-REBLIN, B., MILSON, J., JOHNSON, R.W., DEROIN, T., AUSTIN, D.F., EICH, E. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, 66, 469-480. 2005.

SCHRAM, K. et al. Mass spectrometry of 1,3- and 1,5-dicaffeoylquinicacids. **J. Mass Spectrom.**, v.39, p.384-395, 2004. doi: 10.1002/jms.600.

SHARMA, A. et al. Rhamnolipids from the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. GRP3 that reduces damping-off disease in chilli and tomato nurseries, **J. Nat. Prod.**, v.70, p.941-947, 2007. doi:10.1021/np0700016.

SICARD, D., LEGRAS, J.L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p.229-236, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016> PMID: 21377618.

(SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL E.P, GOSMAN, G., MELLO, J.C.P, MENTZ, L.A, PETROVICK, P.R; Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Editores da UFSC**: 3ed, 5, 2007.

SIPICZKI, M. Overwintering of vineyard yeasts: Survival of interacting yeast communities in grapes mummified on vines. **Frontiers in microbiology**, v.7, p.1-17, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00212> PMID: 26973603.

SPADARO, D., GULLINO, M.L. State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. **Int. J. Food Microbiol**, v.91, p.185-194, 2004.

STROPE, P.K. et al. The 100-genomes strains, an *S. cerevisiae* resource that illuminates its natural phenotypic and genotypic variation and emergence as an opportunistic pathogen. **Genome research.**, v.25, p.762-74, 2015. <https://doi.org/10.1101/gr.185538.114> PMID: 25840857.

TSITSIGIANNIS, D.I.; DIMAKOPOULOU, M.; Antoniou, P.P.; TJAMOS, E.C. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. **Phytopathol. Mediterr.**, 51, 158-174, 2012.

TOLA, M.; KEBEDE, B. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. **Cogent Food Agric.**, 2, 2016.

VERO, S. et al. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. **Postharvest Biology and Technology**, v.26, p. 91-98, 2002.

WEILER, F., SCHIMIDT, M.J. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. **FEMS Yeast Res**, v.3, p.69-76, 2003.

WINK, M. Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. In: WINK, M. (Ed.). **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 1999.

WISNIEWSKI, M. et al. Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. **Postharvest Biol. Technol.**, v.122, p.3-10, 2016.

WITTE, C., WERNER, A.K. The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. **Trends Plant Sci** 16: 381-387, 2011.

YOU, S., ZHU, B., WANG, F., HAN, H., SUN, M., ZHU, H., SUN, M., ZHU, H., PENG, R., YAO, Q. A *Vitis vinifera* xanthine dehydrogenase gene, VvXDH, enhances salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Biotechnol Rep** 11:147-160. 2017.

ZDUNEK-ZASTOCKA, E., LIPS, H.S. Is Xanthine dehydrogenase involved in response of pea plants (*Pisum sativum* L.) to salinity or ammonium treatment? **Acta Physiol Plant** 25:395-401. 2003.

ZHAO, N., WANG, G., NORRIS, A., CHEN, X., CHEN, F. Studying Plant Secondary Metabolism in the Age of Genomics. **CRC Crit Rev Plant Sci.**,32(6): 369-382, 2013.

ZHENG, X.D. et al. Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. **Eur. Food Res. Technol**, v.220, p.353-357, 2005.