

PERFIL DOS COMPONENTES VOLÁTEIS PRODUZIDOS PELO FUNGO FITOPATÓGENO *Albonectria rigidiuscula* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Francisco C. Oliveira^a, Francisco G. Barbosa^{a,*}, Jair Mafezoli^a, Maria da C. F. de Oliveira^a, Francisco J. T. Gonçalves^b e Francisco C. O. Freire^b

^aDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60455-760 Fortaleza – CE, Brasil

^bEmbrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Planalto do Pici, 60511-110 Fortaleza – CE, Brasil

Recebido em 15/12/2016; aceito em 10/04/2017; publicado na web em 13/06/2017

VOLATILE COMPONENTS PROFILE PRODUCED BY THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Albonectria rigidiuscula* IN DIFFERENT CONDITIONS CULTURE. The VOCs produced by the *Albonectria rigidiuscula* fungus in different conditions were obtained by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) and analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Forty-four VOCs were identified in different culture media and incubation periods. The highest production of VOCs occurred in solid rice medium and 14 days of incubation. The compounds 3-methylbutan-1-ol, 2-methylbutan-1-ol, γ -muurolene and nerolidol acetate were produced by *A. rigidiuscula* in all culture conditions. γ -Muurolene was identified as the major compound (40.78%, 26.24% and 27.04%) in PD medium and it was suggested as a chemical marker for this fungus. The use of multivariate data analysis (PCA) and (HCA) allowed the discrimination of the volatile chemical profiles according to the culture medium.

Keywords: *Albonectria rigidiuscula*; VOCs; HS-SPME; multivariate analysis.

INTRODUÇÃO

Albonectria rigidiuscula (Berk. & Br.) Ross. & Sam., sin. *Calonectria rigidiuscula* e *Nectria rigidiuscula* (Nectriaceae) é um fungo fitopatogênico que tem como anamorfo o fungo *Fusarium decemcellulare*.¹ A espécie *A. rigidiuscula* é comum em países tropicais, sendo descrita também na China.²⁻⁴ No Brasil esta espécie é causadora da canrose da pinha (*Annona squamosa* L.) e compromete o cultivo dessa cultura no cerrado de Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal. Neste caso, a infecção da planta é iniciada por conídios ou esporos do anamorfo *F. decemcellulare* ou por ascósporos de *A. rigidiuscula*. Após o estabelecimento da fitopatologia e formação do cancro, a resposta desencadeada pela planta infectada faz com que o anamorfo *F. decemcellulare*, em estágio envelhecido, passe a produzir a sua fase teleomorfa ou perfeita, transformando-se em *A. rigidiuscula*.⁵

O anamorfo *F. decemcellulare* também está relacionado com importantes fitopatologias, tais como morte de ponteiros, canrose, galhas, podridão dos frutos, cancro-do-ramo e superbrotaamento de plantas das famílias Anacardiaceae, Annonaceae, Sterculiaceae, Malvaceae, Apocynaceae, Euphorbiaceae, Meliaceae, Moraceae e Myrtaceae.⁵ Exemplo de dano causado na agricultura foi relatado por Qi *et al.*, no qual durante os anos de 2009 e 2011 uma doença causada por *F. decemcellulare* comprometeu significativamente o cultivo de manga (*Mangifera indica*) na China.⁶ A partir do cultivo de *A. rigidiuscula* em meio fermentativo de arroz foram isolados quatro derivados de pirrolidinona com potencial citotóxico.³ Para o anamorfo *F. decemcellulare* foram identificados 10 pigmentos naftoquinônicos, sendo sua biossíntese influenciada diretamente pelas condições de cultivo.⁷ Não há relatos de estudos relacionados à produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) por *A. rigidiuscula* ou seu anamorfo.

Em nosso grupo de pesquisa temos investigado a produção de COVs como uma ferramenta auxiliar na discriminação de fungos da família Botryosphaeriaceae. Nos estudos são combinadas técnicas de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), análise por

cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e análise multivariada de dados (PCA e HCA).⁸

Sabendo-se que a produção de COVs por espécies fúngicas ocorre através de mecanismos diversificados em função das diferentes fontes de carbono ou nitrogênio,⁹ neste trabalho, descreve-se a investigação do perfil de COVs produzidos pelo fungo fitopatogênico *A. rigidiuscula* cultivado em quatro meios de cultura diferentes e em três períodos de incubação; usando a HS-SPME como técnica de extração, a CG-EM como técnica de análise e a PCA/HCA como ferramenta quimiométrica para tratamento de dados.

EXPERIMENTAL

Obtenção e identificação do fungo

Uma cepa do fungo *A. rigidiuscula* foi isolada a partir de ramos de *Psidium guajava* com sintomas de seca descendente, coletada no bioma Caatinga, Crato-CE (S 07°13'38"; W 39°26'20"), Brasil e encontra-se depositada no laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical – CNPAT sob a supervisão do Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire.

A identificação do fungo se deu através de biologia molecular, com DNA extraído a partir do micélio de uma cepa, utilizando kit de isolamento UltraClean Microbial DNA da Mo-Bio laboratories. Fragmentos contendo o gene do RNA ribossomal 26S, grande subunidade D1 e D2 região (LSU) foram amplificados utilizando os primers LR0R (ACCCGCTGAACCTTAAGC) e LR5 (TCCTGAGGGAAACTTCG). Fragmentos contendo o espaçador transcrito interno 1 e 2 e o gene 5.8.S (ITS) foram amplificados utilizando primers LS266 (GCATTCCCAAACAACCTCGACTC) e V9G (TTACGTCCCTTTGTA). Fragmentos contendo o fragmento parcial do gene betatubulina (BT) foram amplificados utilizando primers BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC). Fragmentos contendo o fragmento parcial do gene de actina (ACT) foram amplificados utilizando primers ACT-512F (ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC) e ACT-783R (TACGAGTCCTTCTGGCCCAT). Fragmentos contendo

*e-mail: fgerhar@gmail.com

o Translocation Elongation Factor 1 alfa (TEF) foram amplificados utilizando primers EF1-728F (CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG) e EF2 (AACTTGCAGGCAATGTGG). Os fragmentos foram sequenciados com o kit de sequenciamento ABI Prim[®] Big Dye[™] Terminator v.3.0 ready Reaction Cycle. As amostras foram analisadas em analisador genético ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer e os contigs foram montados utilizando as sequências de avanço e retrocesso com o programa SeqMan da LaserGene package. Uma análise multigênica foi realizada comparando as sequências no GenBank, on <http://www.cbs.knaw.nl/> e na base de dados interna da CBS com as espécies mais recentes.

Meios de cultura e materiais

Caldo de batata dextrose (BD) foi adquirido da Himedia[®] (Mumbai, Índia) e preparado de acordo com instruções do fabricante (24,0 g L⁻¹, pH 5,1±0,2). O meio peptona foi obtido da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, USA). O meio semi-sólido batata dextrose agar (BDA) foi obtido da Himedia[®] (Mumbai, Índia) e preparado de acordo com instruções do fabricante. O meio sólido foi preparado com arroz "Uncle Bens"[®] (10 g) adicionado em um frasco de vidro de 40 mL, juntamente com 8,4 mL de água destilada e autoclavado por 45 min a 15 lbs (121 °C). Os vials de vidro (40 mL) com tampas de rosca e septos de PTFE/silicone e as fibras de polidimetilsiloxano (PDMS 100 µm) e polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB 65 µm) foram obtidas da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, USA). As placas de Petri estéreis descartáveis (90 x 15 mm) foram adquiridas da J. Prolab[®] (São José dos Pinhais, Brasil). A mistura de n-alcenos saturados C₇-C₃₀ foi obtida da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, USA).

Cultivo do fungo e extração dos COVs

A cepa de fungo foi inoculada em placas de Petri contendo meio BDA e incubada durante 7 dias a 25 °C para assegurar que tinha a mesma idade. Um *pellet* (6 mm de diâmetro) da cepa foi transferido para frascos (40 mL) contendo 10 mL de BD, BDA, Peptona ou grãos de arroz (10 g) e imediatamente selados com septos de PTFE/silicone e tampas roscadas. Após incubação durante 7, 14 e 21 dias a 25 °C sob condições estáticas, os frascos foram colocados em banho de etileno glicol a 60 °C e os COVs foram extraídos por 10 min por HS-SPME utilizando uma fibra PDMS/DVB colocada acima (cerca de 1 cm) da superfície da cultura fúngica. Em seguida, a fibra foi removida e inserida na CG-EM a 250 °C durante 4 min para a dessorção dos COVs. Utilizou-se como controle (brancos) os frascos contendo apenas os meios de cultivo sem adição do fungo. Para a otimização das condições HS-SPME foi realizado um planejamento com duas variáveis quantitativas em dois níveis (temperatura: 50 e 60 °C e tempo de extração: 10 e 20 min), em duplicata, e uma variável qualitativa (tipo de fibra: PDMS e PDMS/DVB). Foram realizados 24 experimentos, sendo 16 com o fungo e 8 controles. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Quality Tools: Statistics in Quality Science.¹⁰

Análises de CG-EM

As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo QP-2010 Ultra), equipado com detector seletivo de massas, com auto injetor (Shimadzu, modelo AOC-20i), com coluna capilar de sílica fundida RTX-5MS[®] (Bellefonte, USA), (5% de dimetilsiloxisano), com dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. A programação de temperatura do forno CG consistiu em 25 °C durante 2 min (período de dessorção), 20 °C/min, até 195 °C, 10 °C min⁻¹ até 220 °C, 20 °C min⁻¹ até 280 °C. Os parâmetros instrumentais

foram: temperatura do injetor de 250 °C; modo de injeção split de 1:5; vazão volumétrica da fase móvel de 1,7 mL min⁻¹; temperatura do detector de 250 °C.

Os COVs produzidos por *A. rigidiuscula* sob diferentes condições foram identificados pela comparação dos espectros de massa obtidos com os de bibliotecas espectrais de massa (Adams,¹¹ Pherobase¹² e NIST¹³), bem como dos índices de retenção calculados baseados na cromatografia gasosa com programação linear de temperatura¹⁴ com os da literatura.^{12,13} Os n-alcenos (C₇-C₃₀, Sigma-Aldrich[®]) foram utilizados como pontos de referência no cálculo dos índices de retenção linear.

Análise multivariada de dados

Os constituintes voláteis, extraídos por HS-SPME e identificados por CG-EM, foram submetidos a análises de PCA e HCA, utilizando o software livre R Project da R Foundation for Statistical Computing[®].¹⁰ Os dados analisados correspondem às médias das injeções em triplicata e o arranjo matricial foi constituído por doze linhas (número de condições de cultivo) e quarenta e quatro colunas (compostos identificados). Para o HCA utilizou-se a distância euclidiana como coeficiente de dissimilaridade e o agrupamento foi feito pelo método de associação média (Ward), com a opção de truncamento automático para definir os conglomerados e obter o dendrograma.¹⁵

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de compostos voláteis por HS-SPME produzidos pelo fungo *A. rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo foi otimizada através de planejamento experimental 2³, considerando-se temperatura (50 e 60 °C), tempo de extração (10 e 20 min) e tipo de fibra (PDMS e PDMS/DVB) como variáveis. Como resultado, obteve-se o maior número de COVs detectados quando o experimento foi realizado a 60 °C, 10 min e com a fibra PDMS/DVB.

Conforme mostrado no gráfico de Pareto (Figura 1), a temperatura (A) foi a variável, que isoladamente apresentou maior influência na extração de COVs, mostrando que a otimização das condições de extração de VOCs por HS-SPME é necessária. De acordo com dados da literatura,^{8,16} a temperatura e o tempo afetam a eficiência de extração, alterando a cinética de transferência de massa dos compostos voláteis entre as diferentes fases do sistema, bem como a termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição dos COVs.

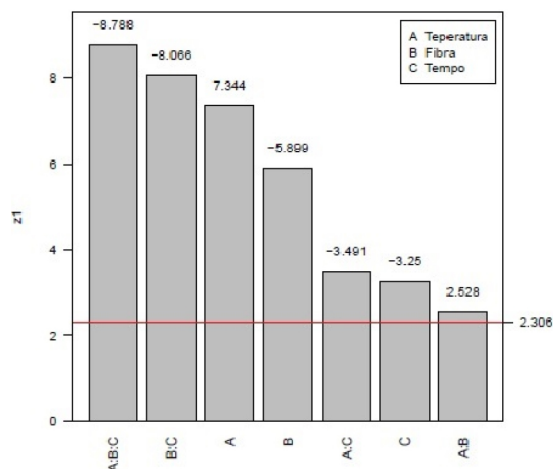


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos da temperatura (A), tipo de fibra (B) e tempo (C) na extração de COVs por HS-SPME do fungo *A. rigidiuscula*

Foram utilizados dois meios de cultivo líquidos, sendo um rico em carbono (BD sintético) e outro rico em carbono e nitrogênio (peptona sintético), um meio semi-sólido (BDA) e um meio sólido (arroz). Em todos os casos, *A. rigidiuscula* foi cultivado em três períodos distintos (7, 14 e 21 dias), sendo as extrações e análises de COVs realizadas no final de cada período.

A condição que apresentou a maior produção de COVs foi o cultivo de *A. rigidiuscula* em arroz durante 14 dias de incubação, sendo produzidos 32 compostos voláteis. No entanto, neste meio, houve uma diminuição na produção destes compostos com 21 dias de incubação. O cultivo de *A. rigidiuscula* em BD com 7 dias de incubação apresentou a menor produção de compostos voláteis, totalizando 7 COVs. Contudo, neste mesmo meio, houve um aumento crescente de COVs diretamente proporcional ao aumento do período de incubação, sendo observada a produção máxima de 28 COVs em 21 dias de incubação. Para os meios peptona e BDA não houve variações significativas na produção de COVs (Figura 2).

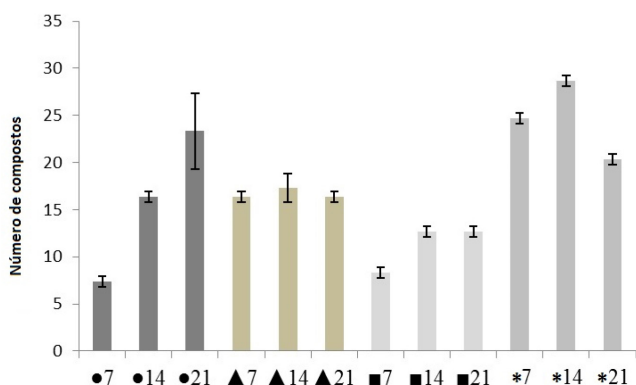


Figura 2. Produção de COVs pelo fungo *A. rigidiuscula* em diferentes condições: BD (● 7, 14 e 21 dias), peptona (▲ 7, 14 e 21 dias), BDA (■ 7, 14 e 21 dias) e arroz (* 7, 14 e 21 dias), sendo $n=3$

Utilizando-se as condições otimizadas de extração por HS-SPME, após análise por CG-EM, foram identificados 44 COVs, os quais não foram observados nos cultivos controles (Tabela 1). A maioria dos compostos identificados pertence às classes dos sesquiterpenos (7 não oxigenados e 3 oxigenados) e monoterpênicos (6 oxigenados). Além desses, foram identificados hidrocarbonetos de baixa massa molecular (4), hidrocarbonetos aromáticos (4), álcoois de baixa massa molecular (3), aldeídos (2), cetonas (2), ésteres de baixa e média massa molecular (5), compostos aromáticos oxigenados (5) e ésteres etílicos de ácidos graxos (3).

Os únicos compostos produzidos por *A. rigidiuscula* nos quatro meios de cultura e nos três períodos de incubação foram o 3-metilbutan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, γ -muuroleno e acetato de nerolidol. Embora em alguns casos esses compostos tenham sido detectados em pequenas quantidades, a prevalência em todas as condições credenciam este grupo de COVs como possíveis marcadores para este fungo. Dentre estes compostos, o γ -muuroleno foi o majoritário e produzido, principalmente, no meio BD com teores significativos (40,78%; 26,24% e 27,04%) para 7, 14 e 21 dias de incubação, respectivamente.

Alguns compostos foram específicos para um determinado meio de cultura. O octano, acetato de 3-metilbutan-1-ol, acetato de 2-metilbutan-1-ol, octan-3-ona, eucaliptol, acetato de octan-3-ol e α -muuroleno foram produzidos pelo fungo apenas em arroz. O composto decan-3-ona foi específico para o meio BD. Já os compostos etilbenzeno, 1,2,4-trimetilbenzeno, decanal e triacetina foram específicos para o meio de cultivo BDA. De acordo com a literatura, compostos microbianos podem ser produzidos de

forma exclusiva por determinados microrganismos em condições controladas.^{9,17}

Comparação dos compostos identificados em *A. rigidiuscula* com banco de dados de compostos voláteis microbianos¹⁸ revelou que apenas dezesseis deles foram anteriormente descritos como compostos voláteis de fungos (3-metilbutan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, octano, etilbenzeno, acetato de 3-metilbutan-1-ol, acetato de 2-metilbutan-1-ol, 1,2,4-trimetilbenzeno, feniletanol, naftaleno, decanal, (*E*)-geranilacetona, γ -muuroleno, β -selineno, valenceno, epizonareno, α -muuroleno). Compostos como borneol, 2-metilisoborneol, decan-3-ona, isoborneol, 4-etilguaicol, decanoato de etila e β -cariofileno foram relatados como COVs de origem bacteriana. Já a maior parte dos compostos identificados (21, ca. 48%) estão sendo relatados pela primeira vez como COVs fúngicos.

A análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA), utilizando o programa R,¹⁰ foram empregadas como técnicas estatísticas multivariadas para explicar as diferenças entre conjuntos das doze amostras (condições de cultivo), sendo quatro meios de cultivo e três períodos de incubação do fungo *A. rigidiuscula*. Os dados submetidos à análise multivariada correspondem aos resultados cromatográficos (CG-EM) da média calculada das injeções em triplicata dos VOCs extraídos por HS-SPME. Para analisar e comparar os perfis de voláteis, todos os compostos identificados foram considerados.

De acordo com a análise de PCA (Figura 3), a partir dos perfis de voláteis foi possível distinguir quase todas as condições de cultivo, que explica em dois componentes principais 42,27% da variância total. A PCA só se mostrou ambígua na discriminação dos perfis voláteis do fungo cultivado em BD e BDA no período de sete dias. O dendrograma da análise de HCA (Figura 4) permite identificar um padrão de similaridade nos perfis de voláteis, conforme o meio de cultivo. Contudo, para os meios BD e BDA em sete dias de incubação essa distinção não se mostra satisfatória.

CONCLUSÃO

O perfil de compostos orgânicos voláteis de uma cepa do fungo *A. rigidiuscula*, em diferentes meios de cultivo e em diferentes períodos de incubação, foi investigada pela primeira vez, e quarenta e quatro compostos foram identificados. A utilização da PCA e HCA permitiu a discriminação dos perfis químicos de voláteis de acordo com o meio de cultivo, principalmente para os meios Batata-Dextrose e Arroz. A maior produção de COVs ocorreu no meio sólido Arroz com 14 dias de incubação. Alguns compostos foram identificados em todas as condições de cultivo. Dentre estes, o γ -muuroleno, que é produzido majoritariamente no meio BD e apresenta potencial para ser utilizado como marcador químico volátil para o fungo *A. rigidiuscula*.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figuras 1S-50S com espectros de massa dos COVs obtidos por CG-EM estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, em arquivo pdf, com livre acesso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras CNPq (484130/2012-9 e 405001/2013-4) e FUNCAP (004.01.00/10) pelo apoio financeiro, à Profa. Dra. Terezinha F. de Oliveira (Faculdade de Estatística, UFPA) pelas discussões da análise multivariada e à CAPES pela bolsa de Francisco C. de Oliveira.

Tabela 1. Constituintes químicos voláteis identificados do fungo *A. rigidiuscula* em diferentes condições de cultivo, sendo as replicatas (n=3) referentes a cada cultivo.

Composto	IR1	IR2	BD7	BD14	BD21	PEP7	PEP14	PEP21	BDA7	BDA14	BDA21	Arroz7	Arroz14	Arroz21
3-Metilbutan-1-ol	737	738	20.96±3.48	11.97±1.46	12.36±1.22	7.28±2.28	8.57±0.48	10.01±1.36	11.15±2.26	5.22±2.78	8.38±1.36	2.57±1.36	3.53±0.12	4.57±2.24
2-Metilbutan-1-ol	740	755	8.84±0.03	6.86±0.23	7.88±0.41	9.77±2.38	7.28±0.12	13.64±1.63	8.72±4.15	4.04±0.28	4.53±0.71	1.24±0.33	1.24±0.33	0.97±0.77
Octano	783	800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.72±0.28	-	0.81±0.56
Etilbenzeno	858	858	-	-	-	-	-	-	-	-	1.73±0.58	-	-	-
Acetato de 3-metilbutila	880	876	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.65±0.07	-
Acetato de 2-metilbutila	882	887	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.47±0.32	-
Estireno	889	890	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.14±1.11	-	0.96±0.40
Heptan-1-ol	977	969	-	-	-	-	0.32±0.23	0.79±0.23	-	-	-	2.13±1.38	3.46±2.30	6.12±1.87
Octan-3-ona	989	984	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2,4-Trimetilbenzeno	990	985	-	-	-	-	-	-	-	-	1.87±1.59	-	-	-
Eucaliptol	1030	1032	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.79±0.67	1.32±0.81	1.25±0.76
(E)-Oct-2-enal	1061	1057	-	-	0.42±0.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Etilanisol	1115	1110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Feniletanol	1118	1121	19.28±2.06	20.38±2.06	26.40±0.63	7.26±1.58	12.25±1.05	21.94±1.37	14.09±2.90	2.73±0.82	12.07±1.65	0.82±0.53	25.30±15.0	-
Acetato de octan-3-ila	1126	1126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.45±0.57	2.36±1.36	3.74±2.63
4-Metoxi-estireno	1153	1151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.07±0.02	0.67±0.17	-
4-Etilfenol	1156	1153	-	2.28±1.38	1.41±0.77	-	-	-	-	-	-	8.41±2.07	2.19±0.53	6.70±0.13
Isoborneol	1162	1157	-	-	0.41±0.32	-	-	0.27±0.19	-	-	-	0.78±0.73	0.83±0.18	0.38±0.15
Borneol	1165	1165	2.94±0.02	0.81±0.65	0.32±0.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naftaleno	1184	1179	-	-	-	2.72±2.69	1.96±1.06	-	-	1.33±0.30	-	-	-	-
2-Metilisoborneol	1186	1180	-	-	0.14±0.07	-	-	-	-	-	-	1.11±0.19	-	-
Decan-3-ona	1192	1195	-	-	-	1.06±0.52	-	-	-	-	-	-	-	-
Decanal	1211	1209	-	-	-	-	-	-	2.29±0.90	-	-	-	-	-
NI	1218	-	-	-	-	1.60±1.34	0.88±0.04	0.69±0.44	-	-	-	37.05±5.69	7.93±5.10	30.60±3.77
4-Etilguaiaacol	1282	1282	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NI	1290	1288	-	-	-	-	-	-	-	-	4.12±2.26	-	-	-
(5Z,7E)-dodeca-1,5,7-trieno	1294	-	-	-	-	6.36±1.56	4.84±0.37	3.09±2.11	-	3.54±0.79	4.47±1.52	-	-	-
(5E)-Dodec-5-en-7-ino	1296	-	0.72±0.13	-	-	3.99±0.59	6.49±0.56	5.16±3.52	-	4.79±0.14	-	-	-	-
(5Z)-Dodec-5-en-7-ino	1306	-	1.54±0.93	2.29±1.20	2.29±1.20	22.01±16.2	25.68±1.87	12.40±3.78	-	18.04±6.37	12.18±1.99	-	-	-
NI	1315	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Etil-1,2-dimetoxibenzeno	1328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.33±2.96	25.41±5.56	10.49±2.12
Triacetina	1356	1350	-	-	-	-	-	-	1.99±1.13	-	-	-	-	-
Eugenol	1372	1370	-	-	0.52±0.37	-	-	-	-	-	-	1.26±1.12	1.74±0.30	-
Decanoato de etila	1399	1397	-	1.00±0.76	0.70±0.58	-	-	-	-	-	-	5.86±1.65	-	3.45±0.48
β-Cariofileno	1424	1423	-	-	0.18±0.04	-	-	-	-	3.52±0.52	1.01±1.19	0.83±0.19	1.50±0.42	0.81±0.29
NI	1453	-	-	-	-	-	0.68±0.67	-	-	-	-	-	-	-
NI	1455	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.37±0.37	0.22±0.17	-	-
(E)-Geraniacetona	1458	1452	-	2.78±0.52	3.50±0.43	1.57±1.13	0.68±0.28	0.73±0.55	3.97±3.20	2.32±0.33	-	0.23±0.00	0.20±0.11	-
γ-Muroleno	1492	1488	40.78±1.84	26.24±5.76	27.04±0.00	22.43±7.26	13.12±1.44	15.60±3.38	35.88±9.82	11.19±1.54	14.65±6.31	11.35±2.55	4.48±1.97	8.38±4.29
β-Selineno	1495	1490	-	-	0.59±0.41	-	-	-	-	-	-	0.74±0.33	0.08±0.07	1.67±0.81
Valenceno	1497	1496	1.56±0.77	0.90±0.37	0.08±0.00	1.30±0.32	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Muroleno	1505	1498	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03±0.01	-
Epizonareno	1506	1500	-	-	0.14±0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-γ-Cadineno	1514	1513	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-Nerolidol	1570	1563	-	0.79±0.67	1.32±0.15	-	1.00±0.34	1.15±1.08	-	-	-	-	0.23±0.02	-
Acetato de cis-nerolidol	1629	1632	5.15±2.97	9.46±2.05	5.52±3.15	7.18±2.48	3.35±0.11	5.05±2.30	21.34±5.96	34.95±0.54	25.08±10.4	2.78±0.63	1.08±0.00	1.94±0.58
NI	1689	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.38±1.84	-	-	-
Hexadecanoato de etila	1999	1992	-	8.58±1.81	5.13±2.79	2.54±1.15	3.68±0.56	4.86±19.95	2.83±1.80	5.99±1.11	5.05±2.77	1.51±0.97	1.82±1.23	5.28±1.59
Linoleato de etila	2169	2163	-	3.90±1.47	2.74±1.06	2.08±1.61	2.02±0.32	2.44±1.28	-	-	-	0.80±0.55	1.17±0.79	3.88±1.11
Óleo de etila	2174	2169	-	1.82±0.49	-	0.42±0.14	-	1.29±1.08	-	-	-	1.23±0.15	1.30±1.00	3.66±1.00
Total (%)			99.5±0.70	99.65±0.56	99.05±1.30	99.55±0.70	99.15±0.31	99.03±1.05	99.98±0.01	99.96±0.04	98.89±1.40	99.65±0.35	91.74±1.89	96.11±3.90

IR1 - Índices de retenção calculados; IR2 - Índices de retenção da literatura^{1,2,3}; NI - Não identificado; PDB: Meio batata dextrose; PEP: Meio batata dextrose; BDA: Meio arroz.

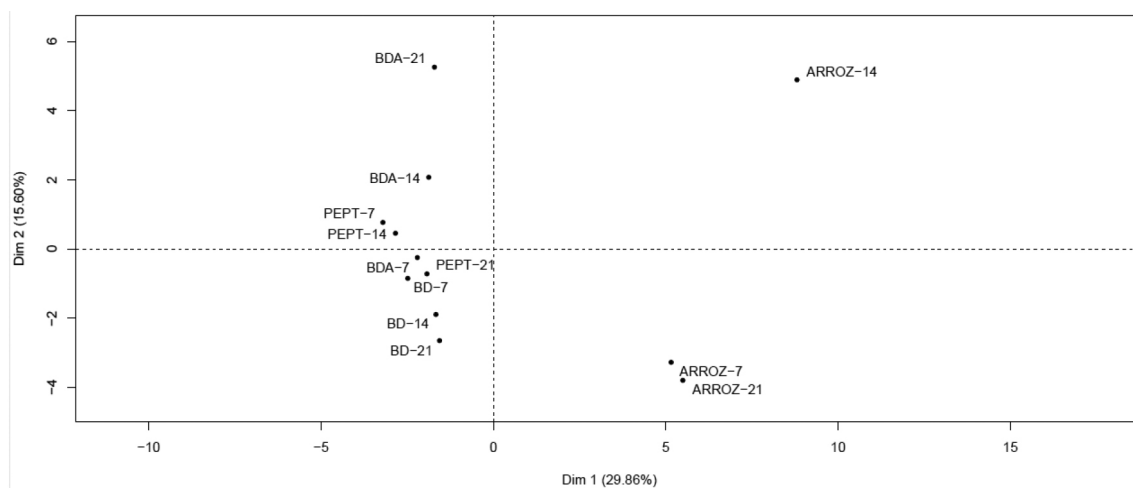


Figura 3. PCA dos escores de 44 variáveis de doze amostras obtidas por HS-SPME e CG-EM do fungo *A. rigiduscula* em diferentes condições de cultivo

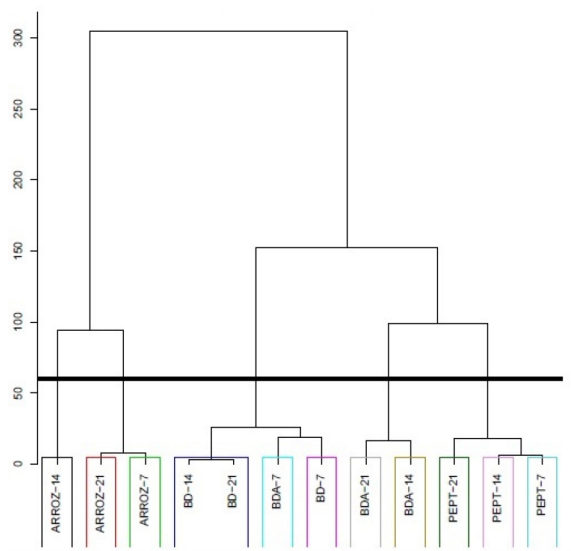


Figura 4. Dendrograma de HCA de doze amostras obtidas por HS-SPME e CG-EM do fungo *A. rigiduscula* em diferentes condições de cultivo

REFERÊNCIAS

- Rossmann, A. Y.; Samuels, G. J.; Rogerson, C. T.; Lowen, R.; *Stud. Mycol.* **1999**, *42*, 105.
- Nong, Y.; Zhuang, W. Y.; *Fungal Divers.* **2005**, *19*, 95.
- Li, J.; Liu, S.; Niu, S.; Zhuang, W.; Che, Y.; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 2184.
- Lombard, L.; Bogale, M.; Montenegro, F.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J.; *Fungal Divers.* **2008**, *31*, 73.
- Junqueira, N. T. V.; Santiago, D. V. R.; Pinto, A. C. Q.; Chaves, R. C.; *Embrapa Cerrados* **2001**, *16*, 21.
- Qi, Y. X.; Pu, J. J.; Zhang, X.; Zhang, H.; Lu, Y.; Yu, Q. F.; Zhang, H. Q.; Xie, Y. X.; *J. Phytopathol.* **2013**, *161*, 735.
- Medentsev, A. G.; Arinbasarova, A. Yu.; Akimenko, V. K.; *Appl. Biochem. Microbiol.* **2005**, *41*, 503.
- Oliveira, F. C.; Barbosa, F. G.; Mafezoli, J.; Oliveira, M. C. F.; Camelo, A. L. M.; Longhinotti, E.; Lima, A. C. A.; Câmara, M. P. S.; Gonçalves, F. J. T.; Freire, F. C. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 2189.
- Bago, B.; Pfeffer, P. E.; Douds, D. D.; Brouillette, J.; Bécard, G.; Shachar-Hill, Y.; *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 263.
- R Development Core Team (2014); *R: A language and environment for statistical computing*; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, available at <http://www.R-project.org>.
- Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed., Carol Stream: Illinois, 2007.
- <http://www.pherobase.com/database/compound/compounds-index.php?isvalid=yes>, accessed in May 2017.
- <http://webbook.nist.gov/chemistry/>, accessed in May 2017.
- Van den Dool, H.; Kratz, P.D.; *J. Chromatogr.* **1963**, *11*, 463.
- Hair Jr, J. F.; Anderson, R. E.; Tatham, R. L.; Black, W. C. *Análise Multivariada de Dados*. 5^a ed., Bookman: Porto Alegre, 2005.
- Valente, A. L. P.; Augustos, F.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 523; Dórea, H. S.; Gaujac, A.; Navickiene, S.; *Scientia Plena* **2008**, *4*, 1.
- Polizzi, V.; Adams, A.; Malysheva, S. V.; Saeger, S.; Peteghem, C. V.; Moretti, A.; Picco, A. M.; Kimpe, N. *Sci Total Environ.* **2012**, *414*, 277.
- Lemfack, M. C.; Nickel, J.; Dunkel, M.; Preissner, R.; Piechulla, B.; *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 744.