

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

**“Análises de meroterpenos produzidos por
Penicillium brasilianum”**

Patrícia de Fátima Menegoci Eugênio*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2008**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

E87am

Eugêni, Patrícia de Fátima Menegoci.

Análises de meroterpenos produzidos por *Penicillium
brasilianum* / Patrícia de Fátima Menegoci Eugêni. -- São
Carlos : UFSCar, 2008.
195 f.

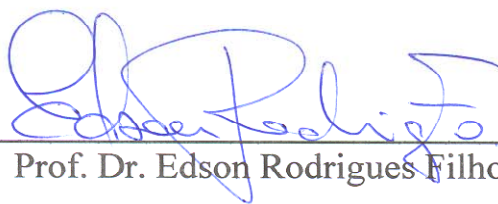
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2008.

1. Microorganismos endofíticos. 2. Metabólitos
secundários de fungos. 3. Melia azedarach. I. Título.

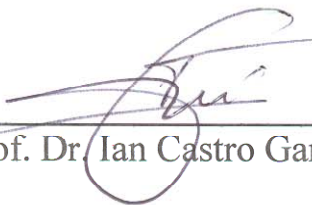
CDD: 547.3 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado

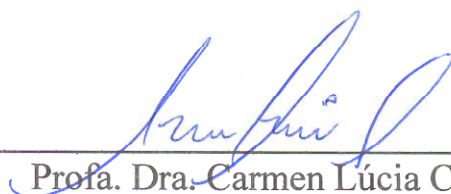
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Patrícia de Fátima Menegoci Eugênio** realizado em 14 de fevereiro de 2008:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. Ian Castro Gamboa



Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

Dedico esta dissertação...
...aos meus pais, Lourdes e Eugênio, por me ensinarem a lutar
...aos meus irmãos, Rodrigo e Leandro pelo carinho e apoio
...ao Thiago, pela paciência, atenção, carinho e companheirismo.

Agradecimentos

A Deus, por me conceder a oportunidade de sempre estar aprendendo mais, e por sua proteção constante.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela orientação, por abrir as portas de seu laboratório, e por seus ensinamentos.

A todos os professores do Departamento de Química da UFSCar, em especial à Prof. Dr^a. Quezia Bezerra Cass, e à Prof. Dr^a Regina V. Oliveira, pelos ensinamentos e pela disponibilidade.

A todo corpo técnico e administrativo do Departamento de Química da UFSCar.

Aos meus companheiros do Laboratório de Produtos Naturais, pela convivência e pela ajuda nas horas de dúvida.

Aos meus amigos do LABIOMMI: Bianca, Luiz Fernando, Rodrigo, Juliana, Gezimar, Taícia, Thais, Luciana, Renata, Diana, Lívia, Cíntia, Amanda, Marília, Malu, Joseph e Diego, pela amizade, companheirismo, colaboração e também pelas piadas de cada dia.

Pelos demais amigos que fiz durante minha estada na UFSCar.

À Silmary, pelo grande apoio e pelos conselhos dados.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todos que colaboraram para a realização deste presente trabalho.

Principais Símbolos ou Abreviações

APCI	- Atmospheric pressure chemical ionization
BDA	- Batata-ágar-dextrose
CC	- Cromatografia em coluna
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CCDP	- Cromatografia em camada delgada preparativa
d	- Dubleto
DAD	- Diode array detector
dd	- Duplo dubleto
ddd	- Duplo duplo dubleto
d.i.	- Diâmetro interno
dl	- Dubleto largo
ESI ⁺	- Electrospray (modo positivo de ionização)
HPLC	- High performance liquid chromatography
LC-MS	- Liquid chromatography coupled to mass spectrometry
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
ODS	- Octadecilsilano
PA	- Padrão analítico
<i>t_r</i>	- Tempo de retenção
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono-13
UV	- Ultravioleta
δ	- Deslocamento químico em partes por milhão
λ _{max}	- Comprimento de onda máximo
φ	- Diâmetro
SRM	- Selected reaction monitoring

Lista de Tabelas

TABELA 3.1 - Quantidade dos materiais utilizados para o cultivo fúngico em meios sólidos.....	21
TABELA 3.2 – Quantidade dos nutrientes utilizados para a produção do meio Czapeck.....	22
TABELA 3.3 - Método cromatográfico utilizado nas análises por LC-APCI-MS.....	30
TABELA 3.4 - Condições de análise utilizadas para as análises por LC-ESI-MS.....	31
TABELA 3.5 - Condições de análise utilizadas para as análises por LC-APCI-MS.....	31
TABELA 4.1 - Eluição gradiente utilizada para otimização da separação dos padrões de meroterpenos por HPLC-DAD. Fase estacionária: Phenyl-hexyl acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: acetonitrila. Volume de injeção: 35 µL. Monitoramento em 215 nm.....	36
TABELA 4.2 - Tempos de retenção dos padrões de meroterpenos e seus respectivos comprimentos de onda máximos.....	36
TABELA 4.3 - Tempos de retenção (HPLC-DAD e HPLC-ESI-MS) dos meroterpenos.....	58
TABELA 4.4 - Tempos de retenção (LC-APCI-MS e LC-APCI-MS-MS) dos meroterpenos analisados pelo método descrito na seção 3.9.3.....	98
TABELA 4.5 - Prováveis meroterpenos encontrados nos extratos analisados via LC-ESI-MS, no modo positivo.....	126
TABELA 4.6 - Prováveis meroterpenos encontrados nos extratos analisados via LC-APCI-MS, no modo positivo.....	127
TABELA 4.7 - λ_{\max} do padrão de ácido benzóico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.69.....	131
TABELA 4.8 - λ_{\max} do padrão de ácido benzóico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.70.....	133
TABELA 4.9 - λ_{\max} do padrão de ácido salicílico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.71.....	135
TABELA 4.10 - λ_{\max} do padrão de ácido salicílico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.72.....	137
TABELA 4.11 - Dados de RMN ^{13}C do ácido oleanólico. * CDCl_3 , ** DMSO.....	140
TABELA 4.12 - λ_{\max} do padrão de ácido oleanólico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.75.....	142
TABELA 4.13 - λ_{\max} do padrão de ácido oleanólico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.76.....	144
TABELA 4.14 - λ_{\max} do extrato do meio + resina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.78.....	147
TABELA 4.15 - λ_{\max} do extrato do meio + resina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.79.....	149
TABELA 4.16 - λ_{\max} do extrato do meio + alizarina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.80.....	151
TABELA 4.17 - λ_{\max} do extrato do meio + alizarina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.81.....	153

TABELA 4.18 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.86, do extrato do meio + ácido 2,5-dihidroxibenzoico e do branco.....	160
TABELA 4.19 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.87, do extrato do meio + ácido 2,5-dihidroxibenzoico e do branco.....	162
TABELA 4.20 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.88, do extrato do meio + ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzoico e do branco.....	164
Tabela 4.21 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.89, do extrato do meio + ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzoico e do branco.....	166
TABELA 4.22 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.90, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrosalicílico e do branco.....	168
TABELA 4.23 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.91, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrosalicílico e do branco.....	170
TABELA 4.24 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.92, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrobenzoico e do branco.....	172
Tabela 4.25 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.93, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrobenzoico e do branco.....	174
Tabela 4.26 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.94, do extrato do meio + ácido ferúlico e do branco.....	176
Tabela 4.27 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.95, do extrato do meio + ácido ferúlico e do branco.....	178
Tabela 4.28 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.96, do extrato do meio 2',4',6'-trihidroxiacetofena e do branco.....	180
Tabela 4.29 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.97, do extrato do meio 2',4',6'-trihidroxiacetofena e do branco.....	182

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 - A) Estrutura molecular do ácido giberélico. B) Placa de Petri contendo o fungo <i>Gibberela fugikuroi</i>	2
FIGURA 1.2 - Estrutura molecular do diterpenóide paclitaxel.....	2
FIGURA 1.3 - Estrutura molecular da podofilotoxina.....	3
FIGURA 1.4 - Alguns metabólitos meroterpenoídicos.....	8
FIGURA 1.5 - Meroterpenos isolados de <i>Penicillium brasilianum</i>	14
FIGURA 1.6 - Limonóides isolados de plantas da família Meliaceae.....	14
FIGURA 3.1 - Estruturas moleculares dos substratos exógenos utilizados junto ao cultivo de <i>P. brasilianum</i>	25
FIGURA 3.2 - Espectros de absorção da diazodiamida e do antraceno, e suas respectivas estruturas moleculares.....	32
FIGURA 4.1 - Fotografias das partes superior (esquerda) e inferior (direita) da placa de Petri com meio BDA contendo um fungo isolado a partir de pedaços da epiderme de <i>Melia azedarach</i> , recolhidos no dia 10 de Janeiro de 2006.....	33
FIGURA 4.2 - Fotografias das partes superior (esquerda) e inferior (direita) das placas de Petri com meio BDA contendo os diferentes fungos isolados a partir de pedaços do córtex de <i>Melia azedarach</i> , recolhidos no dia 8 de Fevereiro de 2006.....	34
FIGURA 4.3 - Estruturas moleculares dos meroterpenos produzidos por <i>P. brasilianum</i> , isolado como endofítico de <i>M. azedarach</i>	35
FIGURA 4.4 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A. Bomba A: água. Bomba B: acetonitrila. Eluição gradiente (método 1): de 5 a 100% de B em 60 minutos. Vazão: 1,5 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	38
FIGURA 4.5 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A. Bomba A: água. Bomba B: acetonitrila. Eluição isocrática (método 2): 47% B por 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	38
FIGURA 4.6 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição isocrática (método 3): 57% B por 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	39
FIGURA 4.7 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	40

FIGURA 4.8 - Espectros de absorção no ultravioleta dos picos cromatográficos relativos aos padrões de meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, ilustrados na Figura 4.7B.....	41
FIGURA 4.9 - Cromatograma do extrato fúngico de arroz. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	42
FIGURA 4.10 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos (na Figura 4.9B), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.....	43
FIGURA 4.11 - Cromatograma do extrato fúngico de trigo. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	43
FIGURA 4.12 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos (na Figura 4.11B), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.....	44
FIGURA 4.13 - Cromatograma do extrato fúngico de milho. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	45
FIGURA 4.14 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos (na Figura 4.13B), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.....	45
FIGURA 4.15 - Cromatogramas do extratos fúngicos em caldo de arroz (partição com acetato de etila). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.....	46
FIGURA 4.16 - Cromatogramas do extratos fúngicos em caldo de arroz (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.....	47
FIGURA 4.17 - Cromatogramas do extratos fúngicos em filtrado do caldo de arroz (partição com acetato de etila). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a	

análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.....	48
FIGURA 4.18 - Cromatogramas dos extratos fúngicos em filtrado do caldo de arroz (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.....	49
FIGURA 4.19 - Cromatogramas dos extratos fúngicos em arroz (A e B) e em arroz cozido (C e D). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (C): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (D): região de eluição dos meroterpenos expandida.....	50
FIGURA 4.20 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos, ilustrados na Figura 4.19D (arroz cozido), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.....	51
FIGURA 4.21 - Cromatograma do extrato fúngico em leite de soja (partição com acetato de etila). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	51
FIGURA 4.22 - Cromatograma do extrato fúngico em leite de soja (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	52
FIGURA 4.23 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos, ilustrados na Figura 4.22B. (extrato de leite de soja – micélio), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.....	53
FIGURA 4.24 - Cromatograma do extrato fúngico em Czapeck (partição com acetato). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna-guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	53
FIGURA 4.25 - Cromatograma do extrato fúngico em Czapeck (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	54
FIGURA 4.26 - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-3 (A), PSP-4 (C) e PSP-6 (E) e de seus respectivos adutos de sódio (B, D e F). Abaixo, os espectros de massas dos meroterpenos PSP-3, PSP-4 e PSP-6.....	56

FIGURA 4.27 - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-8 (A), PSP-9 (C) e PSP-13 (E) e de seus respectivos adutos de sódio (B, D e F). Abaixo, os espectros de massas dos meroterpenos PSP-8, PSP-9 e PSP-13.....	57
FIGURA 4.28 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de arroz. (A): espectro de massas de $[M+Na]^+$ m/z 579 com t_r 22,61 minutos. (B): espectro de massas de $[M+H]^+$ m/z 445 com t_r 23,38 minutos e (C): espectro de massas de $[M+H]^+$ m/z 445 com t_r 24,13 minutos. Ionização por ESI ⁺	59
FIGURA 4.29 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z 445 e m/z 579, no branco de arroz. Ionização por ESI ⁺	60
FIGURA 4.30 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de trigo. (A) a (F): espectros de massas das espécies de interesse detectadas nos cromatogramas. Ionização por ESI ⁺	61
FIGURA 4.31 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de trigo. Ionização por ESI ⁺	63
FIGURA 4.32 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de milho. (A) a (D): espectros de massas das espécies de interesse detectadas nos cromatogramas. Ionização por ESI ⁺	65
FIGURA 4.33 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de milho. Ionização por ESI ⁺	66
FIGURA 4.34 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato de etila. Ionização por ESI ⁺	67
FIGURA 4.35 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz sem glicose – micélio. (A): espectro de massa da espécie de interesse detectada no cromatograma $[M+Na]^+$ 437. Ionização por ESI ⁺	68
FIGURA 4.36 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz com glicose – partição com acetato. Ionização por ESI ⁺	70
FIGURA 4.37 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz com glicose – micélio. (A) e (B): espectro de massa das espécies de interesse detectadas. Ionização por ESI ⁺	72
FIGURA 4.38 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato. Ionização por ESI ⁺	74
FIGURA 4.39 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – micélio. Ionização por ESI ⁺	76
FIGURA 4.40 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – partição com acetato. Ionização por ESI ⁺	77
FIGURA 4.41 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – micélio. Ionização por ESI ⁺	79
FIGURA 4.42 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de arroz cozido. Ionização por ESI ⁺	81

FIGURA 4.43 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de soja (partição com acetato). Ionização por ESI ⁺	83
FIGURA 4.44 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico micelial de soja. Ionização por ESI ⁺	85
FIGURA 4.45 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de Czapeck (partição com acetato). Ionização por ESI ⁺	86
FIGURA 4.46 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de Czapeck (micélio). Ionização por ESI ⁺	88
FIGURA 4.47 - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-1 (E), PSP-3 (A), PSP-4 (B), PSP-6 (C), PSP-8 (D), PSP-9 (F) e PSP-13 (G). Abaixo, (A' a G'), seus respectivos espectros de massas. Análise por LC-APCI-MS no modo positivo.....	91
FIGURA 4.48 - Cromatogramas da mistura de padrões de meroterpenos obtidos via LC-APCI-MS-MS.....	92
FIGURA 4.49 - Espectros de massas dos padrões de meroterpenos PSP-1, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, obtidos via APCI no modo positivo com 24 eV de energia de colisão.....	93
FIGURA 4.50 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de arroz e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI ⁺	99
FIGURA 4.51 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de arroz. Ionização por APCI ⁺	100
FIGURA 4.52 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de trigo e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI ⁺	101
FIGURA 4.53 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de trigo. Ionização por APCI ⁺	103
FIGURA 4.54 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de milho e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI ⁺	104
FIGURA 4.55 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de milho. Ionização por APCI ⁺	105
FIGURA 4.56 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato de etila, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	106
Figura 4.57 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz sem glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	108
FIGURA 4.58 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz com glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	110
FIGURA 4.59 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz com glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	111

FIGURA 4.60 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	113
FIGURA 4.61 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	114
FIGURA 4.62 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	115
FIGURA 4.63 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	117
FIGURA 4.64 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato fúngico de arroz cozido, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	119
FIGURA 4.65 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de leite de soja – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	121
FIGURA 4.66 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de leite de soja – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI ⁺	122
FIGURA 4.67 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de Czapeck – partição com acetato. Ionização por APCI ⁺	124
FIGURA 4.68 - Cromatogramas de íons selecionados de <i>m/z</i> relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de Czapeck – micélio. Ionização por APCI ⁺	125
FIGURA 4.69 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido benzóico. E – cromatograma do padrão de ácido benzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μL. Monitoramento em 216 nm.....	130
FIGURA 4.70 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido benzóico. E – cromatograma do padrão de ácido benzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μL. Monitoramento em 216 nm.....	132
FIGURA 4.71 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido salicílico. E – cromatograma do padrão de ácido salicílico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Fluxo: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μL. Monitoramento em 216 nm.....	134
FIGURA 4.72 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido salicílico. E – cromatograma do padrão de ácido salicílico. Fase	

estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.....	136
FIGURA 4.73 - (A) Espectro de RMN ¹ H (200MHz, CDCl ₃) do ácido oleanólico após a purificação. (B) Ampliação do espectro A.....	138
FIGURA 4.74 - (A) Espectro de RMN ¹³ C (200MHz, CDCl ₃) do ácido oleanólico após a purificação. (B) Ampliação do espectro A.....	139
FIGURA 4.75 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido oleanólico. E – cromatograma do meio + ácido oleanólico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.....	141
FIGURA 4.76 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido oleanólico. E – cromatograma do meio + ácido oleanólico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.....	143
FIGURA 4.77 - Espectro de RMN ¹³ C (200MHz, CDCl ₃) da resina de <i>Pinus taeda</i>	145
FIGURA 4.78 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de resina. E e F– cromatograma do meio + resina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.....	146
FIGURA 4.79 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de resina. E e F– cromatograma do meio + resina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.....	148
FIGURA 4.80 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de alizarina. E – cromatograma do meio + alizarina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.....	150
FIGURA 4.81 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de alizarina. E e F– cromatograma do meio + alizarina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38	

minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	152
FIGURA 4.82 - Curva de desaparecimento da alizarina durante o cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i>	154
FIGURA 4.83 - Placa de CCD mostrando os perfis de eluição do padrão de alizarina (AP), do experimento branco (B), e do extrato com alizarina (AC).....	155
FIGURA 4.84 - Espectro de RMN ¹ H da fração 1-175D (400 MHz, acetona-d ₆). (A) Espectro completo; (B) Região entre 7 e 8 ppm ampliada.....	156
FIGURA 4.85 - Espectro de RMN ¹ H da alizarina (400 MHz, acetona-d ₆). (A) Espectro completo; (B) Região entre 7 e 8 ppm ampliada.....	157
FIGURA 4.86 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,5-dihidroxibenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,5-dihidroxibenzóico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	159
FIGURA 4.87 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,5-dihidroxibenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,5-dihidroxibenzóico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	161
FIGURA 4.88 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	163
Figura 4.89 - Extratos do micélio. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	165
FIGURA 4.90 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	167
FIGURA 4.91 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4):	

40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	169
FIGURA 4.92 - Extratos de acetato. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrobenzóico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	171
FIGURA 4.93 - Extratos miceliais. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrobenzóico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	173
Figura 4.94 - Extratos de acetato. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido ferúlico. E – cromatograma do padrão de ácido ferúlico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	175
FIGURA 4.95 - Extratos miceliais. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido ferúlico. E – cromatograma do padrão de ácido ferúlico. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	177
Figura 4.96 - Extratos de acetato. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de 2',4',6'-trihidroxiacetofena. E – cromatograma do padrão de 2',4',6'-trihidroxiacetofena. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	179
Figura 4.97 - Extratos miceliais. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de 2',4',6'-trihidroxiacetofena. E – cromatograma do padrão de 2',4',6'-trihidroxiacetofena. Fase estacionária: Luna 5 µ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 20 µL. Monitoramento em 216 nm.....	181
Figura 4.98 - Cromatogramas do experimento de SRM com o extrato de acetato do experimento com ácido ferúlico. Transições monitoradas: 415 - 365, 427 – 329, 461 – 393, 499 – 457 e 557 – 479.....	183
FIGURA 4.99 – Cromatogramas do experimento de SRM com o extrato micelial do experimento com ácido ferúlico. Transições monitoradas: 415 - 365, 427 – 329, 461 – 393, 499 – 457 e 557 – 479.....	184

FIGURA 4.100 - Estruturas moleculares dos limonóides L1 e L2.....	186
FIGURA 4.101 - Cromatogramas de íons selecionados dos extratos da epiderme e do córtex de <i>M. azedarach</i> . Ionização por APCI ⁺	186
FIGURA 4.102 - Cromatograma do extrato da cepa isolada de <i>Melia azedarach</i> , cultivada em arroz. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹ . Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.....	187
FIGURA 4.103 - Espectros de absorção no ultravioleta dos picos cromatográficos eluídos entre 15 e 35 minutos, do extrato da cepa isolada de <i>Melia azedarach</i> , ilustrados na Figura 4.102B.....	188
FIGURA 4.104 - Cromatogramas de íons selecionados das massas dos meroterpenos encontradas no extrato da cepa isolada de <i>Melia azedarach</i> cultivada em arroz. Ionização por APCI ⁺	189

Lista de Esquemas

ESQUEMA 1.1 - Modificações da porção orselinato nos metabólitos meroterpenoídicos.....	10
ESQUEMA 1.2 - Caminho biossintético dos meroterpenos de origem fúngica.....	12
ESQUEMA 1.3 - Proposta biossintética para a formação do intermediário I-2.....	13
ESQUEMA 1.4 - Proposta biossintética para a formação do anel espiro em meroterpenos.....	13
ESQUEMA 4.1 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-13.....	94
ESQUEMA 4.2 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-9.....	95
ESQUEMA 4.3 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-8.....	95
ESQUEMA 4.4 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-6.....	96
ESQUEMA 4.5 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-3.....	97
ESQUEMA 4.6 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-1.....	98
ESQUEMA 4.7 - Biotransformações realizadas pelo fungo <i>P. brasilianum</i> , endófito de <i>M. azedarach</i>	128

Resumo

“ANÁLISES DE MEROTERPENOS PRODUZIDOS POR *Penicillium brasilianum*” – Este trabalho descreve o uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com a técnica de espectrometria de massas para análise de extratos fúngicos, visando principalmente a detecção de meroterpenos, produzidos por *P. brasilianum*. A espécie fúngica *P. brasilianum* foi cultivada em diversos meios de cultura artificiais: arroz, trigo, milho, caldo de arroz, filtrado do caldo de arroz e meio líquido Czapeck. Em todos os meios de cultivo testados o fungo apresentou um ótimo crescimento, e também, em todos os extratos fúngicos produzidos através destes cultivos foram detectados íons relacionados aos meroterpenos de interesse, exceto no meio Czapeck. A técnica de ionização química a pressão atmosférica (APCI) foi comparada com a de *electrospray*, para a análise destes meroterpenos, e o resultado obtido foi um aumento significativo no poder de detecção desta classe de compostos com o uso de APCI. O fungo *P. brasilianum* foi cultivado em meio Czapeck, na presença de resina de *Pinus taeda*, alizarina, ácidos oleanólico, benzóico, salicílico, 2,5-dihidroxibenzóico, 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico, 3,5-dinitrosalicílico, 3,5-dinitrobenzóico e ferúlico, e a 2',4',6'-trihidroxiacetofenona. A presença destes aditivos exógenos modificou o perfil metabólico do fungo, pois os perfis cromatográficos dos extratos produzidos se diferenciaram em relação ao extrato fúngico sem nenhum aditivo. Somente o extrato fúngico produzido na presença de ácido ferúlico apresentou os meroterpenos PSP-3 e PSP-8. Os extratos fúngicos produzidos na ausência de aditivos também não apresentaram meroterpenos.

Abstract

“ANALYSIS OF MEROTERPENS PRODUCED BY *Penicillium brasilianum*” – This work describes the use of the high performance liquid chromatography (HPLC) technique coupled to the mass spectrometry technique for the analysis of fungal extracts, and the main purpose was the detection of meroterpenes produced by *P. Brasilianum*. The fungal species *P. Brasilianum* was cultivated in a variety of artificial culture media: rice, wheat, maize, rice broth, solid decanted from rice broth and liquid medium Czapeck. In all the culture media tested the fungus presented a very good development, and also, the ions related to the meroterpenes in study were detected in all the fungal extracts produced by these cultivations, except in Czapeck medium. The atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was compared to the electrospray ionization, for the meroterpenes analysis, and the result obtained was a great increase in detection power for this class of compounds, with the use of APCI. The *P. brasilianum* fungus was cultivated in Czapeck medium in the presence of *Pinus taeda* resin, alizarin, oleanolic, benzoic, salicylic, 2,5-dihydroxybenzoic, 2,6-dihydroxy-4-methyl-benzoic, 3,5-dinitrosalicylic, 3,5-dinitrobenzoic and ferulic acids, and 2',4',6'-trihydroxyacetophenone. The presence of these exogenous additives modified the fungal metabolic profile, because the chromatographic profiles of the extracts produced showed a differentiation, in comparison to the fungal extract without additive. Only the fungal extract produced in the presence of ferulic acid presented the meroterpenes PSP-3 and PSP-8. The fungal extracts produced without any additive also did not present meroterpenes.

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - INTERAÇÃO PLANTA- MICROORGANISMO.....	1
1.2 - FUNGOS.....	3
1.2.1 - <i>Importância dos fungos</i>	4
1.2.2 - <i>Relações simbióticas em fungos</i>	5
1.3 - MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	6
1.3.1 - <i>Isolamento de endófitos</i>	6
1.4 - CULTIVO DE FUNGOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA ARTIFICIAIS	7
1.5 - MEROTERPENOS	8
1.5.1 - <i>Meroterpenos derivados de Farnesil-pirofosfato e 3,5-dimetilorselinato</i>	10
1.5.2 - <i>Austina</i>	11
1.6 - MÉTODO DE ANÁLISE.....	15
2 - OBJETIVOS.....	16
2.1 - OBJETIVO GERAL	16
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 - PARTE EXPERIMENTAL	17
3.1 - MATERIAIS	17
3.2 - EQUIPAMENTOS.....	18
3.3 - ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE TECIDOS SADIOS DE MELIA AZEDARACH	19
3.3.1 - <i>Preparo do meio de cultura BDA</i>	19
3.3.2 - <i>Preparo do meio de cultura BDA com solução de tetraciclina</i>	20
3.3.3 - <i>Conservação dos fungos isolados de Melia azedarach</i>	20
3.4 - CULTIVO DO FUNGO <i>P. BRASILIANUM</i> EM MEIOS DE CULTURA ARTIFICIAIS	20
3.4.1 - <i>Cultivo do fungo P. brasilianum em meios sólidos (arroz, milho e trigo)</i>	21
3.4.2 - <i>Cultivo do fungo P. brasilianum em caldo de arroz, arroz cozido e no resíduo sólido do caldo de arroz</i>	21
3.4.3 - <i>Cultivo do fungo P. brasilianum em leite de soja</i>	22
3.4.4 - <i>Cultivo do fungo P. brasilianum em meio líquido Czapeck</i>	22
3.4.5 - <i>Cultivo da cepa isolada de Melia azedarach em arroz</i>	22
3.5 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS	23
3.5.1 - <i>Extração dos metabólitos da cultura de P. brasilianum nos meios sólidos (arroz, arroz cozido, milho e trigo)</i>	23
3.5.2 - <i>Extração dos metabólitos da cultura de P. brasilianum nos meios líquidos de caldo de arroz e resíduo sólido de caldo de arroz</i>	23
3.5.3 - <i>Extração dos metabólitos da cultura de P. brasilianum nos meios líquidos de leite de soja e Czapeck</i>	23
3.5.4 - <i>Extração dos metabólitos da cultura da cepa isolada de Melia azedarach em arroz</i>	24
3.6 - ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE <i>P. BRASILIANUM</i> NA PRESENÇA DE SUBSTRATOS EXÓGENOS.....	24
3.6.1 - <i>Substratos utilizados</i>	24
3.6.2 - <i>Pré-purificação do ácido oleanólico</i>	25
3.6.3 - <i>Meio de cultivo</i>	26
3.6.4 - <i>Procedimento de extração dos metabólitos</i>	26
3.6.5 - <i>Isolamento dos metabólitos secundários do experimento com alizarina</i>	26
3.6.6 - <i>Curva de consumo da alizarina pelo fungo</i>	27
3.7 - ESTUDO DOS LIMONÓIDES NOS EXTRATOS DE MELIA AZEDARACH.....	28

3.7.1 Preparo dos extratos	28
3.8 - PREPARO DE AMOSTRAS	28
3.8.1 - Método de pré-purificação e concentração dos extratos fúngicos	28
3.8.2 - Método de pré-purificação e concentração dos extratos de <i>Melia azedarach</i>	29
3.9 - OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE ANÁLISE POR HPLC	29
3.9.1 - Desenvolvimento de um método único para análise dos extratos por HPLC.....	29
3.9.2 - Método cromatográfico para análise dos pontos da curva de consumo da alizarina	30
3.9.3 - Método cromatográfico para as análises por LC-APCI-MS.....	30
3.9.4 - Condições experimentais do espectrômetro de massas usadas nas análises por LC-MS.....	31
3.9.5 - Padrões inicial e final das análises cromatográficas	31
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1 - ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MELIA AZEDARACH.....	33
4.2 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA ANÁLISE DOS EXTRATOS POR HPLC	34
4.3 - CULTIVO DO FUNGO <i>P. BRASILIANUM</i> EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA ARTIFICIAIS	41
4.3.1 - Análises por HPLC-DAD	41
4.3.2 - Análises por HPLC-ESI-MS	54
4.3.3 - Análises por HPLC-APCI-MS.....	89
4.3.4 - Comparação entre os meios de cultura e produção de meroterpenos..	126
4.4 - ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE <i>P. BRASILIANUM</i> NA PRESENÇA DE SUBSTRATOS EXÓGENOS.....	128
4.4.1 - Análises por HPLC-DAD	129
4.4.1.1 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido benzóico	129
4.4.1.2 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido salicílico	133
4.4.1.3 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido oleanólico.....	137
4.4.1.4 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença da resina de <i>Pinus taeda</i>	144
4.4.1.5 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de alizarina	149
4.4.1.6 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido 2,5-dihidroxibenzóico.....	158
4.4.1.7 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico	162
4.4.1.8 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico	166
4.4.1.9 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico.....	170
4.4.1.10 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de ácido ferúlico	174
4.4.1.11 - Estudo do metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i> na presença de 2',4',6'-trihidroxiacetofena.....	178
4.4.2 - Análises por HPLC-APCI-MS e HPLC-APCI-MS-MS.....	182

4.4.3 - Discussões sobre o estudo do metabolismo secundário de <i>P.brasilianum</i> na presença de aditivos exógenos	184
4.5 - ESTUDO DOS LIMONÓIDES NOS EXTRATOS DE MELIA AZEDARACH.....	185
4.6 - ANÁLISE DO EXTRATO FÚNGICO DA CEPA ISOLADA DE MELIA AZEDARACH, CULTIVADA EM ARROZ	187
5 - CONCLUSÕES	190
6 - BIBLIOGRAFIAS	191

1 - Introdução

1.1 - Interação planta- microorganismo

O estudo da interação entre plantas e microorganismos surgiu desde que a humanidade passou a usar a terra para cultivo de alimentos, porque foi neste período que surgiram os primeiros problemas com doenças de plantas, que chegaram a trazer escassez absoluta de algumas espécies cultivadas. A ruína de safras inteiras já causou sérios problemas econômicos e de falta de alimentos a comunidades que dependiam exclusivamente desses cultivos ^[1].

Outro problema causado por este tipo de interação foi o envenenamento de animais e do próprio homem, devido à ingestão de alimentos contaminados por microorganismos. Entre as milhares de espécies de fungos existentes, algumas sobrevivem no interior de produtos agrícolas. Dentre estes, incluem-se alguns fungos produtores de metabólitos secundários capazes de causar efeitos bastante prejudiciais aos animais e ao homem. Estes compostos são conhecidos pelo nome de micotoxinas ^[1-3].

Os fungos podem ser encontrados na água, no ar e no solo. Desta forma, o simples cultivo de um gênero alimentício em solo infectado permite que alguns fungos lá existentes passem a viver no interior dessas plantas. O armazenamento inadequado de grãos e outros produtos, em más condições de umidade e temperatura, permite que os fungos já existentes no interior dos mesmos ou outros fungos do próprio ambiente cresçam e passem a produzir cada vez mais micotoxinas, contaminando todo o estoque ^[3].

Porém, a interação planta-microorganismo não gera somente problemas, ela é muito explorada no ramo agrícola em geral, devido aos benefícios que esta relação traz às culturas.

Os microorganismos são empregados na agricultura para diversos fins, agindo, por exemplo, como controladores de microorganismos fitopatogênicos e de insetos, além de proteger a planta contra herbívoros. Alguns microorganismos são capazes de aumentar a tolerância da planta a condições drásticas como seca e aumento de temperatura. Esses seres vivos podem auxiliar suas plantas hospedeiras a sobreviverem sob condições de estresse, agindo como “gatilhos” de acionamento do sistema de resposta ou produzindo, por si próprios, metabólitos secundários que protegem as plantas das ameaças do ambiente. Existem também fungos e bactérias capazes de se fixarem às raízes de algumas plantas, promovendo o aumento da absorção de nutrientes pelos seus hospedeiros. Em troca, recebem nutrientes e proteção da hospedeira, numa interação mutualística, de benefícios para ambas espécies ^[1,4-8].

Esses microorganismos que habitam o interior de plantas representam, ainda, uma valiosa ferramenta para o campo da biotecnologia, visto que provaram ser capazes de sintetizar substâncias antes só encontradas em suas hospedeiras. O primeiro exemplo deste fato foi dado pelo fungo *Gibberella fugikuroi*, encontrado em associação com a espécie *Cucurbita máxima*, o qual mostrou-se capaz de produzir derivados do ácido giberélico, um diterpeno com atividade hormonal de crescimento antes somente encontrado em plantas ^[9]. A Figura 1.1 abaixo mostra a estrutura do ácido giberélico e uma placa de Petri contendo o fungo *Gibberella fugikuroi*.

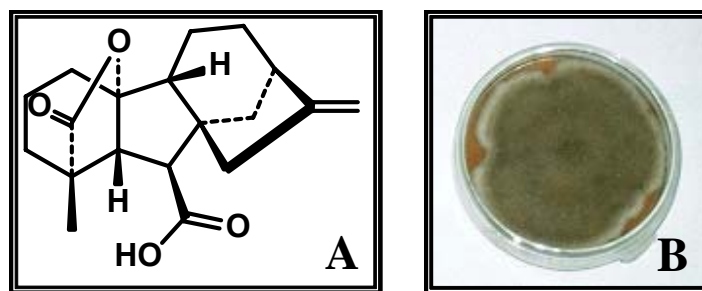


FIGURA 1.1 - A) Estrutura molecular do ácido giberélico. B) Placa de Petri contendo o fungo *Gibberella fugikuroi*.

Nos anos 90 do século passado, estudos realizados por Stierle *et al.* evidenciaram que o fungo *Taxomyces andreae*, isolado de *Taxus brevifolia*, era, assim como sua hospedeira, capaz de produzir o diterpenóide paclitaxel, conhecido comercialmente como Taxol (Figura 1.2), reconhecido principalmente por suas propriedades anticancerígenas ^[10]. Além desta, outras espécies de fungos são produtoras de taxol, e com rendimentos muito maiores que os conseguidos pela extração do produto através de material botânico. Essas espécies foram isoladas dos tecidos de *Taxus brevifolia* ^[11,12], e de outras espécies de *Taxus* ^[13,14].

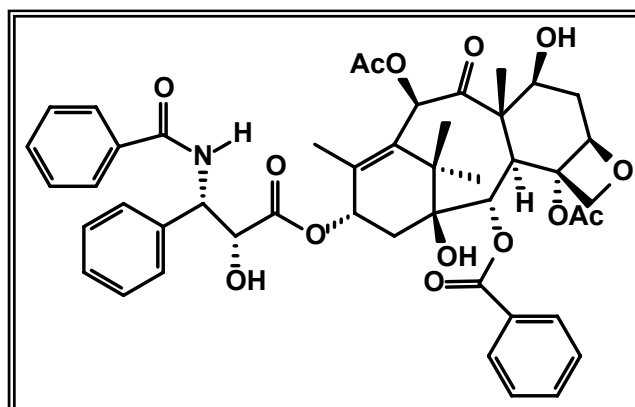


FIGURA 1.2 - Estrutura molecular do diterpenóide paclitaxel.

Outro exemplo mais recente deste fenômeno ocorre com o fungo *Phialocephala fortinii*, isolado dos tecidos sadios de *Podophyllum peltatum* (Mayapple), e com o fungo *Trametes hirsuta*, encontrado no interior da espécie *P. hexandrum*. A substância podofilotoxina (Figura 1.3), é uma importante precursora para a síntese de compostos usados clinicamente como antitumorais, etoposídeos, teniposídeos e etoposídeos fosfato, possuindo um grande potencial para uso em doenças inflamatórias. A planta *Podophyllum peltatum* é uma fonte natural deste composto, porém em baixos rendimentos. Após tentativas sem muito sucesso da síntese orgânica da podofilotoxina, pesquisadores passaram a procurar outras fontes alternativas viáveis para sua comercialização. Dessa forma, descobriu-se que os fungos *Phialocephala fortinii* e *Trametes hirsuta* produzem esta substância em rendimentos maiores do que os obtidos pela planta seca ^[15,16].

Estes fatos mostram que o estudo da interação planta-microorganismo pode levar a novas descobertas, sendo o estudo deste assunto uma grande fonte de informações úteis para o homem.

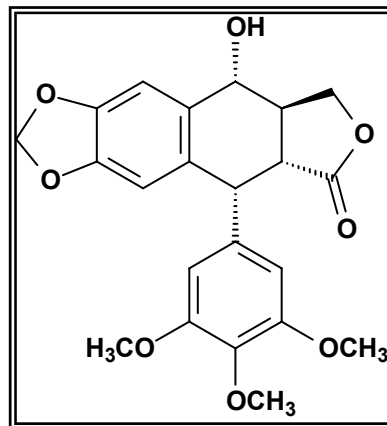


FIGURA 1.3 - Estrutura molecular da podofilotoxina.

1.2 - Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, isto é, que possuem membrana nuclear e não são fotossintetizantes. Com algumas exceções, os fungos possuem parede celular e podem ser uni (as leveduras) ou multicelulares. Alguns deles são microscópicos, enquanto outros, como os cogumelos e os fungos que crescem na madeira, são visíveis a olho nu^[17].

Os fungos absorvem os nutrientes necessários à vida por absorção, geralmente apresentando exigências nutricionais simples. Eles podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. Várias espécies podem crescer em ambientes com valores de pH extremamente baixos e com temperaturas altas ou baixas. Porém, certos fungos exigem meios especiais para seu crescimento e isolamento^[17-20].

Os fungos são seres quimiorganotróficos, que utilizam compostos orgânicos diversos como fontes de carbono e energia, e por esta razão, são facilmente cultiváveis em laboratório. Os nutrientes básicos para o crescimento destes e de outros micróbios podem ser divididos em dois grupos: os macronutrientes, necessários em grandes quantidades, e os micronutrientes, necessários em quantidades menores^[18,19].

Os principais macronutrientes são o carbono e o nitrogênio, seguido pelos elementos químicos P, S, K, Mg, Ca, Na e Fe, cada um deles desempenhando papéis fundamentais para a sobrevivência do microorganismo. Os micronutrientes correspondem aos metais, muitos deles desempenhando papel estrutural em várias enzimas^[17,18].

Para o cultivo de fungos e outros microorganismos em laboratório são utilizados diversos meios de cultura, preparados a partir de produtos naturais. Alguns exemplos de produtos naturais adicionados ao meio incluem extrato de carne, peptonas (proteínas parcialmente degradadas), extrato de levedura, extrato de solo entre outros. Todos estes substratos são substâncias complexas contendo açúcares, aminoácidos, vitaminas e sais. Em geral, os meios de cultivo de fungos têm uma concentração maior de açúcar e um valor de pH menor. Quando um meio solidificado é necessário para o crescimento ou estudo de algum microorganismo, utiliza-se um agente solidificante ao meio líquido. O ágar é o agente mais empregado para esta função. Este é um polissacarídeo complexo, extraído de algas marinhas, que se funde em torno de 100°C e torna-se sólido por volta de 40°C. O ágar não é metabolizado pela maioria dos microorganismos^[17,18].

Assim, sabendo-se quais são as necessidades nutricionais de cada fungo, e também de outros micróbios, é possível criar meios seletivos que permitam o crescimento de somente uma espécie específica. Além disso, o estudo da influência de diversos meios no crescimento e desenvolvimento do fungo pode trazer muitas informações sobre o metabolismo e biossíntese destes microorganismos.

Os fungos produzem esporos, estruturas utilizadas para proteção e reprodução. Os esporos sexuados, utilizados para a reprodução, são produzidos através da fusão de duas células reprodutivas especializadas (gametas) em uma célula fertilizada. Já a formação dos esporos assexuados não envolve a fusão de gametas, e sua função é disseminar a espécie. Os esporos assexuados são normalmente brancos quando recém-produzidos, mas adquirem sua cor característica com a idade ^[17,20]. Os micologistas dependem significativamente do reconhecimento dos esporos sexuais e assexuais característicos, tanto para classificar quanto para identificar os fungos ^[19,20].

Os fungos apresentam diversos *habitats*. Alguns são aquáticos, mas a maioria deles vive em habitats terrestres, no solo ou em matéria vegetal morta. Um grande número deles vive no interior de plantas, não especificamente numa relação parasita. Alguns poucos fungos são parasitas de animais ^[18].

As paredes celulares dos fungos assemelham-se estruturalmente às paredes celulares de vegetais. Porém, quimicamente a maioria delas é formada de quitina, um derivado de glicose, embora alguns fungos possuam parede celular celulósica. As paredes celulares de fungos são geralmente compostas por 80-90% de polissacarídeos com proteínas, lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos ^[18,19].

1.2.1 - Importância dos fungos

1.2.1.1 - Importância ecológica

Junto com as bactérias heterotróficas, os fungos são os principais decompositores da biosfera. Estima-se que, em média, os 20 cm superiores de solo fértil podem conter quase 5 toneladas de fungos e bactérias por hectare. Devido ao seu arsenal enzimático poderoso que degrada moléculas orgânicas, incluindo lignina e celulose, os fungos, muitas vezes causam problemas ao homem, pois destroem também materiais importantes como tecidos, madeiras, cabos e fios, além de combustíveis, entre outros ^[21].

1.2.1.2 - Importância econômica

Certas leveduras, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, são úteis porque produzem etanol e dióxido de carbono, os quais têm papel fundamental na panificação, fermentação e na indústria de vinhos. Outros fungos proporcionam aromas peculiares de diversos queijos apreciados pelo homem ^[21,22].

O uso dos fungos na indústria farmacêutica tem aumentado cada vez mais. Diversos metabólitos secundários de fungos estão sendo estudados devido a suas qualidades terapêuticas. Muitos antibióticos, dos quais a penicilina foi pioneira, são por eles produzidos. O fungo *Tolypocladium niveum* foi a fonte primária de ciclosporina, uma droga que suprime as reações imunológicas que causam rejeições de órgãos transplantados, reduzindo a probabilidade de rejeição, mas com a

vantagem de não apresentar os efeitos colaterais das outras drogas utilizadas para o mesmo fim ^[21-23].

Por serem capazes de degradar muitos materiais, os fungos são utilizados na biorremediação, limpando o ambiente de poluentes e lixos tóxicos ^[20,24].

1.2.2 - Relações simbióticas em fungos

Simbiose (“viver junto”) é uma associação íntima e duradoura entre organismos de espécies diferentes. Dentre estas relações, existem as parasíticas, que causam prejuízo a uma das espécies e as mutualísticas, na qual as duas espécies se beneficiam com a associação. Os líquens e as micorrizas são dois exemplos de associações mutualísticas.

1.2.2.1 - Líquens

Líquens são associações entre um componente fúngico e uma população de algas unicelulares ou filamentosas, ou de ciano bactérias. Os líquens são capazes de viver em lugares completamente inóspitos e, por esta razão, são amplamente distribuídos pela Terra ^[20,21].

Neste relacionamento, o fotobionte (algas) transfere carboidratos e compostos nitrogenados para o micobionte (fungo), e o último, por sua vez, proporciona ao fotobionte ambiente físico adequado para sua sobrevivência e repassa nutrientes minerais que absorve do ambiente ^[21].

1.2.2.2 - Micorrizas

As micorrizas são associações simbióticas mutualísticas entre fungos e raízes, e ocorrem na maioria das plantas vasculares. Essa relação de benefício mútuo funciona da seguinte maneira: os fungos micorrízicos beneficiam suas hospedeiras com o aumento da capacidade da planta em absorver água e outros elementos essenciais, como fósforo, zinco, manganês e cobre. Eles também protegem as plantas do ataque de fungos patogênicos e nematóides. Em troca, recebem da planta carboidratos e vitaminas essenciais para seu crescimento.

Existem dois tipos principais de micorrizas: endomicorrizas e ectomicorrizas.

As endomicorrizas penetram nas células da raiz, sendo o tipo mais comum de micorrizas. As hifas (filamentos dos fungos) penetram nas células corticais da raiz da planta, formando estruturas ramificadas conhecidas como arbúsculus, e em alguns casos, formando até vesículas entumecidas.

Nas ectomicorrizas, o fungo apenas envolve as células vivas da raiz, mas não as penetra. Esta associação torna as árvores mais resistentes às condições severas do ambiente, como frio e seca ^[21].

1.3 - Microorganismos endofíticos

Microorganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas numa interação mutualística, sendo encontrados nas partes aéreas, como folhas, caule, e também nas raízes. Esta comunidade endofítica não causa nenhum dano a seus hospedeiros ^[4]. Os microorganismos endofíticos se diferenciam dos microorganismos epifíticos pois estes últimos vivem apenas na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Entretanto, eventualmente um microorganismo epifítico pode, num determinado período de sua vida, habitar o interior de uma planta, passando então a ser considerado endofítico. Da mesma forma um microorganismo endofítico pode, num determinado momento, causar algum prejuízo ou doença à planta hospedeira. Tudo dependerá das condições ambientais e das condições fisiológicas do hospedeiro ^[25,26]. Dessa forma, a melhor definição dada para microorganismos endofíticos é a de Petrini *et al.* ^[27], que engloba neste grupo todos os microorganismos presentes no interior dos tecidos das plantas que, durante certo período de suas vidas não causam nenhum sintoma de infecção. É possível também que ocorram desequilíbrios na micota endofítica, devido a problemas metabólicos das plantas. Estes podem ser desencadeados por práticas agrícolas mal realizadas ou por razões naturais, fazendo com que a planta fique mais suscetível a ataque de fitopatógenos ou que os próprios endofíticos passem a causar prejuízo a suas hospedeiras ^[4].

1.3.1 - Isolamento de endófitos

O isolamento de endófitos exige primeiramente uma esterilização externa dos tecidos do hospedeiro, a fim de eliminar qualquer microorganismo epifítico existente. Para isso é necessário proceder a uma lavagem com substâncias utilizadas em processos de assepsia, como etanol e hipoclorito de sódio. O tempo de lavagem e a concentração das soluções dependem do tipo de tecido utilizado ^[23, 28].

A próxima etapa de isolamento é escolher um meio adequado para incubar os tecidos vegetais e estimular o crescimento dos microorganismos. Os meios “sabourand” e o de “batata-dextrose-ágar” (BDA) são comumente usados para este fim, sendo adicionados em placas de Petri ^[23,28]. Em alguns casos, torna-se favorável a adição de antibióticos para impedir o crescimento de bactérias no meio, porém alguns fungos têm seu crescimento prejudicado ou modificado quando entram em contato com essas substâncias.

Após a incubação das placas, o crescimento dos fungos deve ser cuidadosamente monitorado, pois alguns fungos crescem mais rapidamente que outros, proliferando por toda a placa e prejudicando o crescimento e visualização dos outros fungos que crescem mais lentamente.

A separação de cada fungo existente no meio incubado se dá por replicações consecutivas, até que cada um deles esteja isolado dos outros.

A idade da planta, a região e época de coleta dos materiais botânicos exercem uma grande influência na quantidade e nas espécies de fungos que serão encontrados. Estas informações são muito importantes num trabalho de pesquisa de microorganismos endofíticos.

1.4 - Cultivo de fungos em diferentes meios de cultura artificiais

Os componentes de um determinado meio de cultura podem ser ótimos para o crescimento e esporulação de determinadas espécies fúngicas, porém, não são todos os fungos que se adequarão ao meio de cultivo em questão. O mesmo pode-se dizer quanto às condições de cultivo como umidade e temperatura. Apesar dos fungos serem capazes de utilizar diversas variedades de fontes de carboidratos e nitrogênio para suprir suas necessidades dos principais macronutrientes necessários, as diferenças entre essas fontes podem influenciar bastante no desenvolvimento das espécies.

Um estudo foi realizado com três gêneros de *Entomophthorales*: *Batkoa*, *Fúria* e *Neozygites*. Os resultados mostraram que, para esses gêneros, os componentes presentes como fontes de nitrogênio tiveram maior impacto em seus crescimentos do que os componentes de carboidratos. Em outro trabalho, foi constatado que as melhores fontes de carbono utilizadas para cultivo das espécies *Hirsuttela rhossiliensis* e do fungo Arkansas 18 (ARF18) eram glicogênio e caseína, respectivamente. A razão C:N também é um fator importante para o crescimento e esporulação de espécies fúngicas. Este fato foi demonstrado num estudo envolvendo a espécie *Colletotrichum truncatum* NRRL 13737 em cultura líquida. Este mesmo estudo foi também realizado com outras espécies fúngicas, e os resultados mostraram que a razão C:N influenciou de maneiras diferentes as diversas espécies estudadas, assim como as diferentes cepas isoladas [29,30].

A espécie *Aspergillus ochraceus* é conhecida por produzir a Ocratoxina A (OTA), que tem sido detectada em cereais, legumes, café, temperos, frutas secas, sucos de uva e vinhos. Sua germinação, crescimento e esporulação são dependentes da temperatura e da atividade da água. As condições ótimas encontradas para seu crescimento micelial (30°C e 0,95 – 0,99 para a atividade da água) coincidiram com as condições para produção máxima de OTA em uvas. Este fato mostra que o estudo das condições de cultivo são essenciais não somente para o crescimento da massa micelial de um determinado fungo, mas também para a otimização da produção de metabólitos secundários [31].

A produção e atividade de certas enzimas por fungos podem também ser influenciadas pela concentração de nutrientes disponíveis no meio de cultivo. Por exemplo, a produção das enzimas peroxidase manganês-dependente e lacase pelo fungo *Pleurotus sajor-caju* é dependente da disponibilidade de manganês e nitrogênio no meio de cultura [32].

Estes resultados comprovam que o estudo de diferentes meios de cultivo para o crescimento de fungos e otimização da produção de metabólitos secundários é de grande importância, pois a partir deste estudo é possível selecionar quais condições são mais viáveis e satisfatórias para se conseguir determinados objetivos, e até mesmo selecionar quais são as necessidades nutricionais básicas de cada espécie estudada.

1.5 - Meroterpenos

O termo meroterpeno foi inicialmente proposto em 1968 por Cornforth, para definir compostos que possuem uma biogênese mista, contendo em suas estruturas elementos de origem terpenoídica [33]. Em 1987, Simpson restringiu ainda mais esta classe de substâncias, definindo meroterpenos como compostos de origem mista, com uma parte policetídica e outra terpenoídica [34].

As fontes naturais de meroterpenos podem ser plantas e microorganismos, como fungos e bactérias. Diversos meroterpenos conhecidos possuem atividades biológicas conhecidas. A Figura 1.4 apresenta alguns esqueletos de meroterpenos com diferentes precursores biossintéticos.

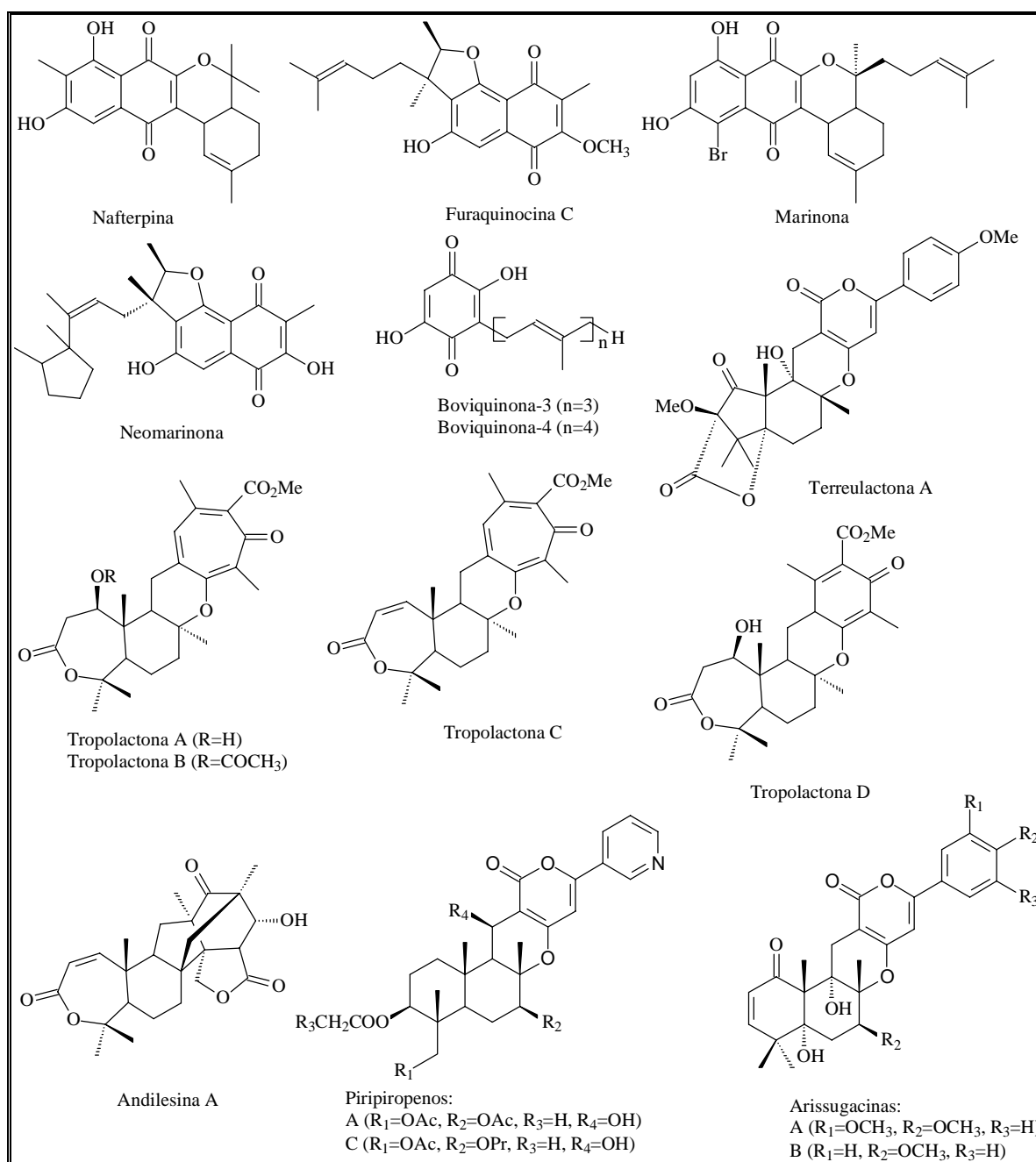


FIGURA 1.4 - Alguns metabólitos meroterpenoídicos.

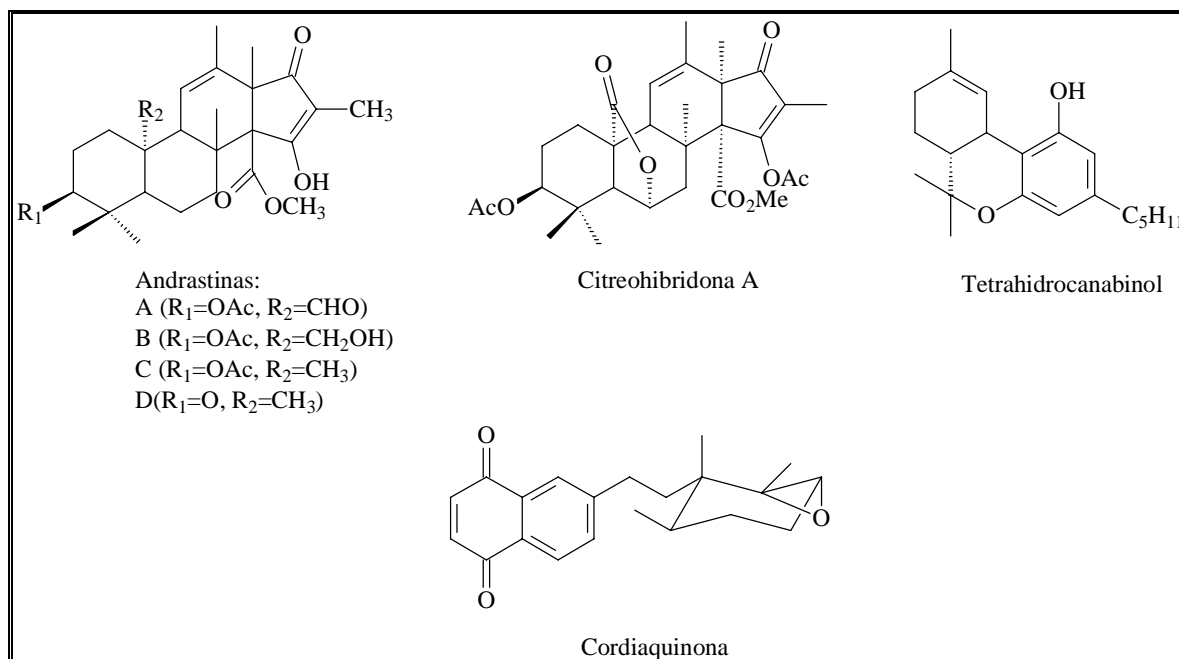


FIGURA 1.4 (CONTINUAÇÃO) - Alguns metabólitos meroterpenoídicos.

Entre os meroterpenóides produzidos por bactérias inclui-se o grupo de naftoquinonas preniladas com atividades antibiótica e anticâncer, como a nafterpina, produzida pelo Actinomiceto *Streptomyces aeriouvifer*, e a furaquinocina C, as naftoquinonas sesquiterpênicas marinona e neomarinona, e algumas naftoquinonas dissustituídas, cujas estruturas moleculares estão ilustradas na Figura 1.4 ^[35].

A substância helvetica (boviquinona 3 farnesilada) foi isolada dos fungos *Chroogomphus rutilus* e *C. helveticus* enquanto que a espécie *Suillus bovinus* produz a boviquinona 4 (seu homólogo geranyl-geranyl). As boviquinonas 3 e 4 são produzidas a partir da alquilação do ácido 3,4-dihidroxibenzoico ^[36].

As Terreulactonas A-D, isoladas de *Aspergillus terreus*, possuem atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE). A Terreulactona A é um meroterpeno do tipo sesquiterpeno lactona ^[37].

As Tropolactonas A-D são meroterpenos citotóxicos (apresentam citotoxicidade contra células do adenocarcinoma do cólon humano) produzidos pelo fungo *Aspergillus sp.*, isolado de uma esponja marinha não identificada. As Tropolactonas são da mesma classe estrutural da Andilesina A, isolada de *Aspergillus varicolor*, e possuem como precursor biossintético o intermediário tetracetídeo 3,5-dimetilorselinato, que é alquilado por um precursor farnesil pirofosfato no início de sua biossíntese ^[38].

Compostos da classe dos Piripiropenos foram isolados da espécie *Aspergillus fumigatus*. Os Piripiropenos A e C são potentes inibidores da colesterol aciltransferase (ACAT). A ACAT contribui para o processo da arteriosclerose, e é responsável pela absorção de colesterol pelos intestinos, entre outras funções. Estudos biossintéticos dos piripiropenos revelaram que eles são biossintetizados a partir de um sesquiterpeno, um dicetídeo e do ácido nicotínico ^[39].

Outros meroterpenos isolados de fungos possuem atividades biológicas, como as Arissugacinas A e B, isoladas de *Penicillium sp.* Estes compostos são inibidores da acetilcolinesterase. As Andrastinas, isoladas de *P. sp.*,

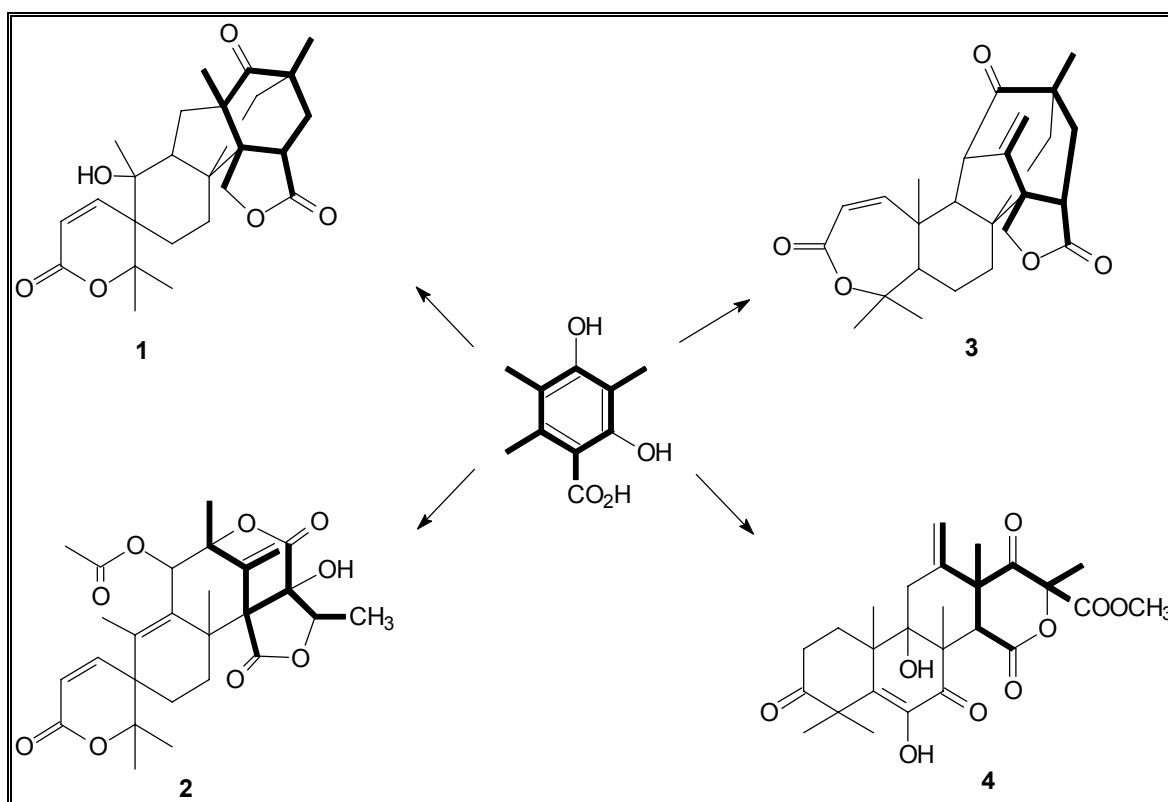
são auxiliares no tratamento de câncer. As Citreohibridonas, isoladas de *P. Citreoviride*, mostraram atividade inseticida contra *P. xylostella* [39,40].

Dentre os meroterpenos isolados de plantas estão o agente psicoativo Δ^9 -tetrahydrocannabinol, isolado de plantas do gênero *Cannabis*, e meroterpenos do grupo das cordiaquinonas, encontrados nas raízes de *Cordia linnaei* [41,42].

1.5.1 - Meroterpenos derivados de Farnesil-pirofosfato e 3,5-dimetilorselinato

Poucos estudos foram realizados até então para se compreender o caminho biossintético dos meroterpenos, sendo principalmente utilizados marcadores isotópicos. Estudos com precursores duplamente marcados (^{13}C) para meroterpenos de origem policetídic-terpenoídica (1-4) forneceram informações sobre o modo de união e os rearranjos ocorridos nos esqueletos carbônicos desses terpenóides e policetídeos. Outros precursores marcados com ^2H e ^{18}O auxiliaram na compreensão da rota biossintética dos meroterpenos, fornecendo detalhes sobre as modificações oxidativas ocorridas durante sua biogênese [34,43].

O policetídeo 3,5-dimetilorselinato (DMO) é um intermediário comum desses meroterpenos, e no início da rota biossintética destes compostos o tetracetídeo sofre alquilação por um precursor farnesil difosfato. O modo de incorporação do esqueleto carbônico deste precursor nos meroterpenos 1-4 está resumido no Esquema 1.1.



ESQUEMA 1.1 - Modificações da porção orselinato nos metabólitos meroterpenoídicos [44].

Nota-se que o intermediário policetídeo pode incorporar-se intacto, como na andibenina (1), ou sofrer modificações, como abertura de anel - na anditamina (3), entre outras ^[43]. Dessa forma, é possível que metabólitos estruturalmente distintos possam ter alguma relação biogénica entre si, como mostra o Esquema 1.2 ^[44].

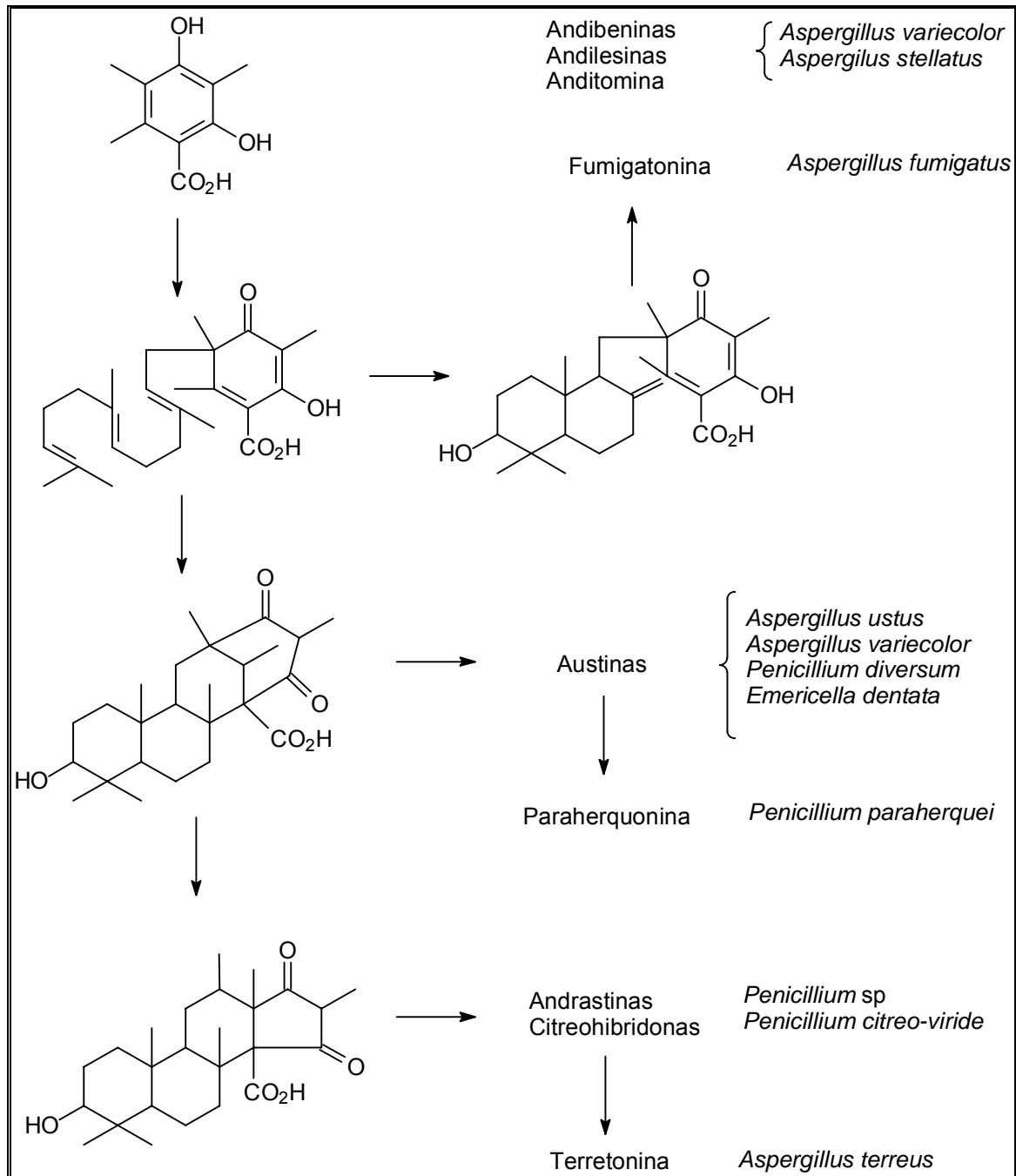
1.5.2 - Austina

A biossíntese da austina, produzida pelo fungo *Aspergillus ustus*, foi estudada por Simpson e Stenzel que, através de estudos com marcadores isotópicos, concluíram que este meroterpeno tem sua biogênese através de um caminho triprenilfenol, no qual o precursor tetracetídeo bis-C-metilado (I-1) é alquilado pelo farnesil pirofosfato.

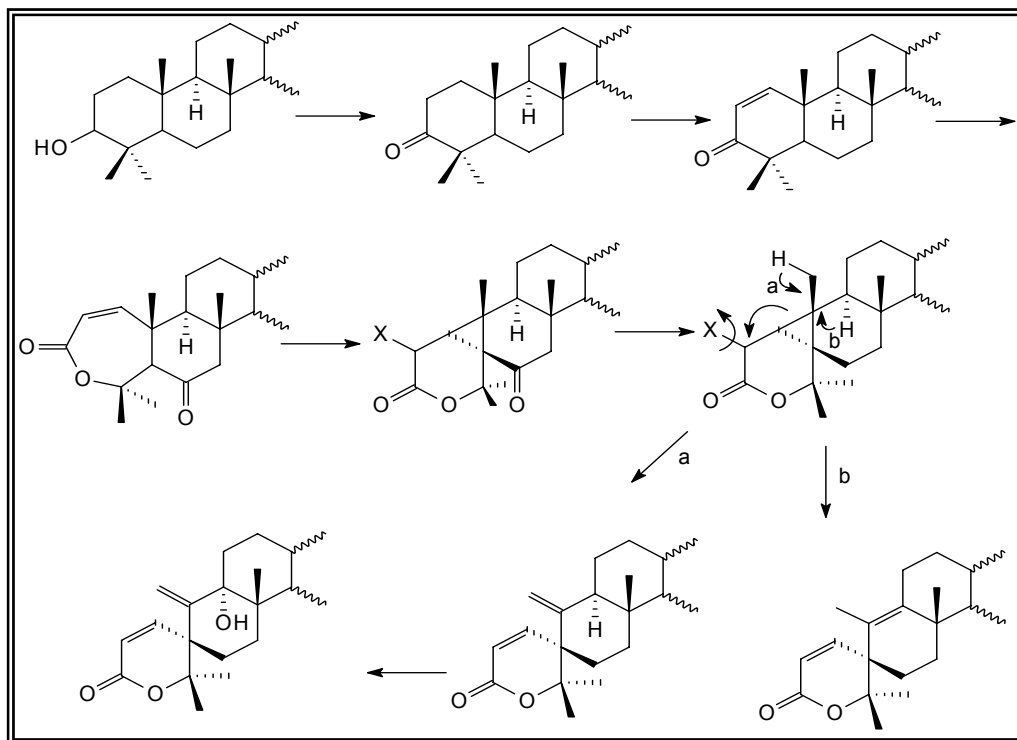
A biossíntese da austina passa por um intermediário-chave (I-2) que é formado pela ligação entre os carbonos C-8 e C-7', contração do anel e clivagem oxidativa do anel fenólico, conforme mostrado no esquema 1.3 ^[45]. O esquema 1.4 apresenta uma proposta biossintética para a formação do anel spiro presente em alguns meroterpenos estudados neste trabalho.

Em recente trabalho do grupo de pesquisa do professor doutor Edson Rodrigues Filho sobre o fungo *Penicillium brasilianum*, um fungo endofítico da planta *Melia azedarach* (Meliaceae), foram mostrados alguns meroterpenos anteriormente desconhecidos: preaustinóide A (PSP-1) (5), B (PSP-2) (6), A1 (PSP-9) (7), A2 (PSP-4) (8), B1 (PSP-11) (9) e austinoneol (PSP-13) (10) ^[46-49]. Acredita-se que estes novos compostos sejam intermediários biossintéticos na rota de produção da austina, devido à grande relação estrutural destes compostos com esta. As estruturas desses meroterpenos estão representadas na Figura 1.5.

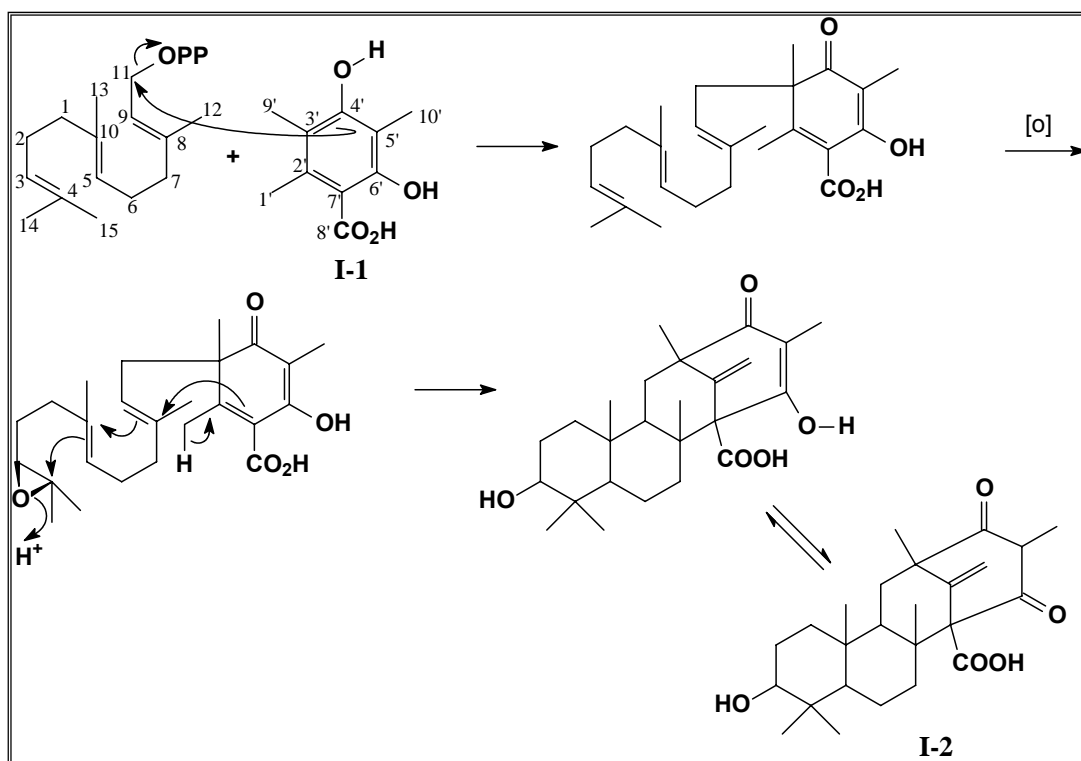
Os principais metabólitos secundários produzidos por *Melia azedarach* e outros indivíduos desta família são conhecidos como limonóides. Um exemplo desta classe de compostos é a azadiractina (Figura 1.6), que possui atividade inseticida ^[50,51]. Esses compostos são produzidos através da degradação de triterpenos pelas plantas, e parecem ocorrer em várias etapas, incluindo reações do tipo Baeyer-Villiger e rearranjos estruturais ^[52].



ESQUEMA 1.2 - Caminho biossintético dos meroterpenos de origem fúngica ^[44].



ESQUEMA 1.3 - Proposta biossintética para a formação do intermediário I-2 [46].



ESQUEMA 1.4 - Proposta biossintética para a formação do anel espiro em meroterpenos [46].

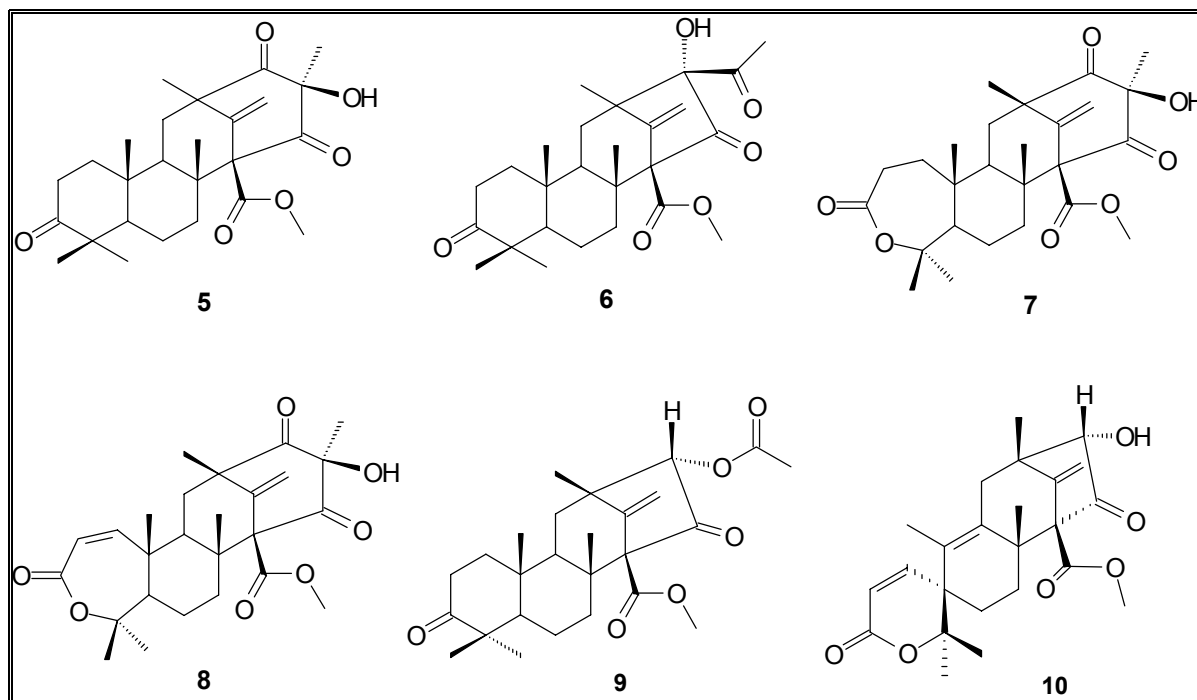


FIGURA 1.5 - Meroterpenos isolados de *Penicillium brasilianum* [46-49].

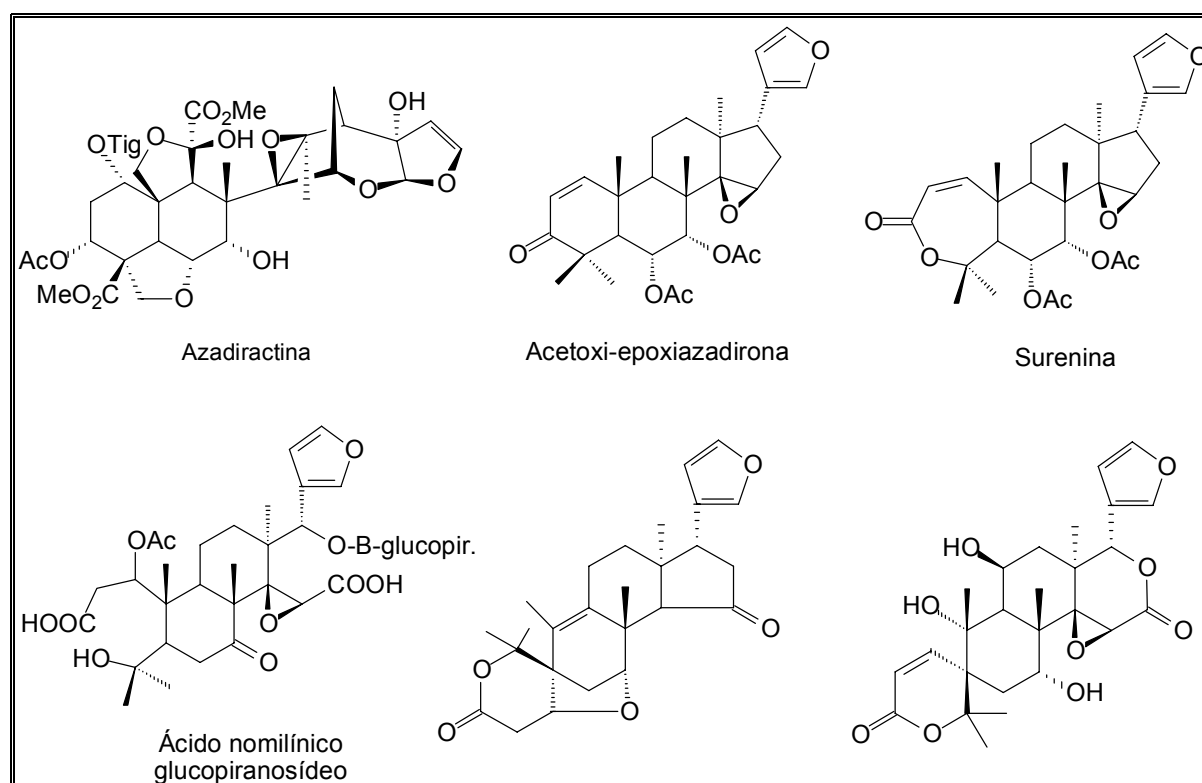


FIGURA 1.6 - Limonóides isolados de plantas da família Meliaceae [51, 53, 54].

As porções terpenoídicas dos meroterpenos produzidos por *Penicillium brasilianum* (Figura 1.5) parecem ter sofrido modificações muito semelhantes às encontradas nos limonóides (Figura 1.6). Este fato é um grande indício de que as enzimas responsáveis pelas modificações nestes compostos são produzidas devido

a genes biossintéticos, que foram adquiridos pelas espécies fúngicas através de troca de plasmídeos com a planta hospedeira.

Estas similaridades podem ser resultado de uma “transferência genética horizontal”, expressão que descreve a hipótese de genes poderem ser adquiridos de um organismo pelo outro, não intimamente relacionados entre si, por um processo diferente dos seus ancestrais ^[55]. Se esta hipótese for verdadeira, o estudo da genética molecular relacionada às diversas enzimas necessárias para a produção de produtos naturais será de grande valor, e facilitará muitos campos de pesquisa, desde a química pura até a medicina. O presente trabalho é de extrema importância para o desenvolvimento de toda a pesquisa relacionada à biossíntese destes meroterpenos, visto que o estudo dos melhores meios de cultura para o desenvolvimento e produção dos meroterpenos pela espécie *P. brasilianum*, assim como o estudo das consequências da adição de substratos exógenos no metabolismo secundário do mesmo pode trazer informações essenciais para as etapas futuras desta pesquisa.

Alguns dos meroterpenos produzidos pelo fungo endofítico *P. brasilianum* mostraram atividades antibacteriana, como as substâncias PSP-1 e PSP-2, larvicida contra *Aedes aegyptii* (PSP-6) e inseticida contra formigas cortadeiras (PSP-1 e PSP-8) ^[42]. A otimização da produção destas substâncias é interessante também por este motivo, pois elas podem vir a serem utilizadas futuramente para esses fins ou podem até ser testadas em relação a outras atividades biológicas de interesse.

1.6 - Método de análise

A técnica de espectrometria de massas acoplada a técnicas de separação é uma ferramenta poderosa para análises de amostras complexas, conseguindo-se, ao mesmo tempo, separação e identificação dos compostos nelas presentes, sem a necessidade de uma etapa longa de preparo das mesmas ^[56,57]. Este método é muito útil principalmente para confirmação de estruturas por comparação com padrões previamente isolados, e para diferenciar compostos que coeluem num mesmo pico cromatográfico. Neste caso, é importante que os caminhos de fragmentação destes compostos sejam diferentes ^[58].

O desenvolvimento de métodos de análises rápidos e precisos para os meroterpenos é de extrema importância, pois permite um avanço maior deste estudo, sendo ainda que estes mesmos métodos podem ser aplicados posteriormente para a análise de outros extratos fúngicos.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi:

- desenvolver métodos e aplicar os métodos já conhecidos para análise de meroterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Penicillium brasilianum*, utilizando para isso técnicas de separação (HPLC) acopladas à espectrometria de massas, com formas de ionização química a pressão atmosférica (APCI – atmospheric pressure chemical ionization) e *electrospray*, além do recurso *tandem*.

2.2 - Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- A.** Re-isolar fungos do gênero *Penicillium* a partir de tecidos de *Melia azedarach*.
- B.** Cultivar os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* em meios de cultura artificiais e checar a produção de meroterpenos.
- C.** Desenvolver e aplicar as metodologias para a análise dos meroterpenos presentes nos extratos das espécies de *Penicillium*.
- D.** Estudar a influência de substratos exógenos na produção dos meroterpenos já conhecidos e de outros meroterpenos.

3 - Parte Experimental

3.1 - Materiais

a) Solventes para cromatografia

Para obtenção dos extratos fúngicos e dos tecidos de planta foram utilizados solventes de grau analítico (PA) e de grau cromatográfico (HPLC) da Merck, Synth, Aldrich, J. T. Baker, Tedia e Mallinckrodt;

Para cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (CCD) foram utilizados solventes destilados no DQ-UFSCar;

Para o preparo de amostras por extração em fase sólida (SPE – solid phase extraction), assim como para uso em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High performance liquid chromatography) e HPLC-MS foram utilizados solventes de grau HPLC da Merck, J. T. Baker, Tedia e Mallinckrodt, e água purificada em sistema Millipore Mili-Q.

b) Suportes para cromatografia

Sílica gel 230-400 mesh (tipo flash), para CC e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP);

As análises por CCD foram feitas usando placas de alumínio contendo sílica gel (200 µm), da Sorbtec.

c) Reagente para revelação das placas de CCD

Reagente vanilina-ácido sulfúrico (1g de vanilina dissolvida em 100 mL de ácido sulfúrico e aquecida após imersão).

d) Cartuchos para SPE

Foram utilizados cartuchos de 3mL da Supelco, LC-18; Foram utilizados também cartuchos de 6 mL preenchidos com sílica C-18, da Sigma.

e) Solventes para obtenção de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)

Solventes deuterados da Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (99,8%).

f) Reagentes utilizados para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos

- etanol 70%, da Tec Lab
- hipoclorito de sódio 11%
- ágar, da Aldrich
- D-glicose anidra (dextrose), da Synth
- K₂HPO₄, Synth
- MgSO₄·7H₂O, da Mallinckrodt
- FeSO₄·7H₂O, da Quimibrás indústria química S. A.
- NaNO₃, da Synth

- KCl, da Synth
- extrato de levedura, da Acumedia
- tetraciclina, da Medley
- alizarina, da Aldrich
- ácido salicílico, da Fluka
- ácido benzóico, da Synth
- ácido oleanóico, isolado a partir do cravo da Índia
- resina de Pinus, obtida da planta *Pinus taeda*
- diazodiamida, da Reichert
- antraceno, da E Merck Ag – Darmstadt
- ácido 3,5-dinitrobenzóico, da Aldrich
- ácido 3,5-dinitrosalicílico, da Fluka
- ácido ferúlico, da Fluka
- ácido 2,5-dihidroxibenzóico, da Aldrich
- ácido 2,6-dihidroxi-4-metil-benzóico, da Aldrich
- 2',4',6'-trihidroxiacetofenona, da Aldrich

g) Meios artificiais para cultivo de fungo

- Arroz parboilizado da marca Uncle Bens;
- Trigo para Kibe da marca Yoki;
- Milho branco para canjica da marca Dafap's.
- BDA (batata - dextrose - ágar)

h) Filtros e papéis de filtro

Para filtragem dos extratos foram utilizados papéis de filtro qualitativos Satelit, Ø 11,5 cm. Para filtragem das fases móveis para HPLC foram utilizados filtros de membrana de Nylon, com 0,45 µ de tamanho de poro e 47 mm de diâmetro, da Phenomenex.

i) Outros

Pipetadores automáticos de 100 e 1000 µL, da Eppendorf.

3.2 - Equipamentos

- Aparelho de HPLC da marca Shimadzu, com bombas LC-10AD e LC-10ADVP, detector Diode Array SPD-M10AVP, auto injetor SIL-10ADVP e sistema de controle SCL-10AVP. Sistema de comunicação detector/computador Shimadzu CBM-10A Communication BUS Module.
- Aparelho de HPLC da Waters modelo 2695, com detector de arranjo de fotodiodos 2996.
- Espectrômetro de massas Quattro LC, da Micromass.
- Espectrômetro de RMN da Bruker (ARX-200), com campo de 4,7 Tesla.
- Espectrômetro de RMN da Bruker (Avance DRX-400), com campo de 9,4 Tesla.
- Rotoevaporador rotativo Tecnal (TE 20)
- Rotoevaporador Buchi 461-water bath (EL 131).
- Câmara de fluxo laminar da Veco, modelo VL FS-12M.

- Autoclaves verticais da marca Phoenix, modelos AV30 e AV75.
- Triturador Turratec TE-102, da Tecnal.
- Balança semi-analítica Gehaka modelo BG 4001.
- Balança analítica Mettler AE 240.
- Sonicador Branson 1510.
- Agitador de tubos de ensaio Phoenix AP-56.
- Bomba à vácuo Tecnal Te-0581.
- Moinho tipo Willey modelo TE-631, Tecnal.

3.3 - Isolamento de fungos endofíticos a partir de tecidos sadios de *Melia azedarach*

Tendo como objetivo isolar fungos endofíticos da planta *Melia azedarach*, principalmente fungos dos gêneros *Penicillium*, foram coletados nos dias 10 de Janeiro e 8 de Fevereiro de 2006 pedaços de folhas jovens, de folhas adultas, da epiderme (parte externa) e do córtex (parte interna) do caule de uma árvore da espécie *Melia azedarach*, encontrada no estacionamento do departamento de química da UFSCar.

Estes materiais botânicos foram cortados em pedaços de 1cm² e esterilizados. Para isso, mergulhou-se, nesta seqüência, cada pedaço de material por 90 segundos em hipoclorito de sódio 11%, 1 minuto em água destilada, 1 minuto em etanol 70% e por mais 1 minuto em água destilada.

A seguir, estes materiais foram incubados durante aproximadamente sete dias em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA (batata-ágar-dextrose), utilizando a técnica de semeadura em superfície.

Os diferentes fungos foram separados visualmente através de sucessivos repiques do material das placas, até que somente um fungo passasse a crescer em cada placa de Petri.

Os materiais botânicos coletados no dia 10 de Janeiro foram incubados em BDA sem o antibiótico tetraciclina e, a partir do primeiro repique, as plaquinhas utilizadas já continham o antibiótico. Os materiais coletados em Fevereiro já foram incubados em BDA com antibiótico, a fim de evitar qualquer contaminação prévia de bactérias.

3.3.1 - Preparo do meio de cultura BDA

No preparo de meio BDA suficiente para 12 placas de Petri de 9cm de diâmetro, foram utilizados:

- 60 g de batata inglesa descascada
- 4,5 g de ágar
- 6,0 g de dextrose
- 300 mL de água destilada.

Cozinhou-se a batata em água destilada suficiente para cobri-las, em um microondas à potência de 60 W por cerca de 8 minutos. As batatas foram espremidas separando-se o caldo da parte sólida, filtrando com um coador de pano. Junto com o caldo adicionou-se a dextrose, o ágar e completou-se o volume para 300 mL com água destilada. Esta mistura foi colocada em um erlenmeyer, coberto com filme plástico e papel alumínio. O meio foi previamente esterilizado em

autoclave a 121°C por 12 minutos. As placas de Petri também foram autoclavadas por 15 minutos antes da adição do meio. Após ter sido autoclavado, o meio foi vertido nas placas ainda quente, dentro da capela de fluxo laminar previamente esterilizada.

3.3.2 - Preparo do meio de cultura BDA com solução de tetraciclina

Para o preparo da solução de tetraciclina foram necessários:

- 1 cápsula de 500 mg de tetraciclina
- 5 mL de álcool etílico 70%
- 5 mL de água destilada estéril.

Primeiramente autoclavou-se por 40 minutos o tubo utilizado para estocar a solução e o volume de água destilada necessário.

A seguir, o conteúdo da cápsula foi dissolvido em 5 mL de álcool 70%, com o auxílio de um agitador de tubos, e, em seguida, os 5 mL de água destilada estéril foram acrescentados à mistura. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar previamente esterilizada.

Para cada 200 mL de meio BDA ainda quente, adicionou-se 400 µL da solução de tetraciclina.

3.3.3 - Conservação dos fungos isolados de *Melia azedarach*

Cada cultura fúngica pura foi conservada em frascos do tipo penicilina, seguindo-se o procedimento a seguir.

Utilizou-se 4 frascos do tipo penicilina para cada fungo endofítico isolado. Em todos os frascos adicionou-se 10 mL de água destilada, tampou-se com filme plástico e papel alumínio. As tampinhas de borracha foram primeiramente fervidas em água destilada, utilizando um forno de microondas, até que a água permanecesse límpida após o procedimento de fervura. Posteriormente, as tampinhas foram imersas novamente em água destilada, e foram autoclavadas juntamente com os frascos de vidro, já contendo a água destilada para a conserva dos fungos. O processo de esterilização se deu por 1 hora, e realizado duas vezes consecutivas.

Após a esterilização, todo o material foi resfriado na capela de fluxo laminar, sob radiação ultravioleta (UV). De cada colônia fúngica pura foram retirados blocos de BDA contendo as células vivas, sendo transferidos para seus respectivos frascos do tipo penicilina. Esses frascos foram imediatamente tampados com as tampinhas de borracha e vedados com aro de metal. O armazenamento se deu em temperatura ambiente, na micoteca do LaBioMMi, DQ-UFSCar.

3.4 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meios de cultura artificiais

Para o estudo dos diferentes meios artificiais de cultivo desta espécie fúngica, a cepa utilizada para inoculação foi aquela previamente isolada e identificada durante o trabalho da ex-aluna de doutorado Regina Geris dos Santos [46].

3.4.1 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meios sólidos (arroz, milho e trigo)

A Tabela 3.1 apresenta as quantidades dos meios sólidos e outros materiais utilizados para cultivo da espécie *P. brasilianum*.

TABELA 3.1 - Quantidade dos materiais utilizados para o cultivo fúngico em meios sólidos.

Meio de cultura (MC)	Massa de MC por erlenmeyer (g)	Volume de água por erlenmeyer (mL)	Números de erlenmeyers (volume)
Arroz parboilizado	90,00	75,00	12 (500 mL)
Milho	50,00	42,00	10 (500 mL)
Trigo	50,00	42,00	10 (500 mL)

O procedimento experimental de cultivo foi semelhante para todos os meios. Adicionou-se aos materiais sólidos os respectivos volumes de água destilada. Os erlenmeyers foram então fechados com bonecas e esperou-se em torno de meia hora, até os grãos absorverem a água. Depois autoclavou-se os frascos por 40 minutos. No dia seguinte os frascos foram novamente autoclavados por mais 40 minutos. Durante este intervalo, a autoclave permaneceu fechada e com os erlenmeyers no seu interior. A seguir, os frascos foram retirados de lá e colocados sob luz UV por 30 minutos, ou até o meio esfriar. Colocou-se três pedaços de meio BDA (com área em torno de 1 cm²) contendo o fungo em cada frasco, tampou-se os mesmos e esperou-se 20 dias até a extração. 3 erlenmeyers contendo arroz, 2 contendo milho e 2 contendo trigo não foram inoculados, e foram usados como controle (branco).

3.4.2 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em caldo de arroz, arroz cozido e no resíduo sólido do caldo de arroz

Seguiu-se o seguinte procedimento para estes cultivos: cozinhou-se em microondas 300 g de arroz parboilizado com 2 L de água destilada. Filtrou-se a mistura arroz-água a quente em coador de pano, separando o arroz do líquido. Esperou-se o arroz secar em temperatura ambiente e a seguir colocou-se 70 g deste arroz mais 60 mL de água destilada em cada erlenmeyer de 500 mL, dando um total de oito frascos com arroz. Eles foram tampados com bonecas e autoclavados duas vezes por 40 minutos, uma vez por dia, em dias seguidos. O filtrado foi acondicionado em geladeira e esperou-se decantar as partículas sólidas. Após decantar, filtrou-se a mistura sob vácuo, separando o caldo líquido do resíduo decantado de cor branca. O caldo foi dividido em oito erlenmeyers de 250 mL (80 mL de caldo em cada frasco). Destes frascos com caldo, em quatro deles foi adicionado dextrose numa concentração de 20 g L⁻¹, e nos outros quatro nada foi adicionado. O resíduo que decantou foi separado entre oito erlenmeyers de 250 mL, ficando em cada frasco cerca de 18 mL de resíduo. Em cada amostra deste resíduo foi adicionada uma quantidade suficiente de água destilada para se completar um volume de 100 mL. Mais uma vez, foi colocado em quatro destes frascos 20 g L⁻¹ de

dextrose, e mais nada nos outros quatro. Enfim, o fungo *P. brasilianum* foi inoculado em todos os frascos com arroz, caldo e resíduo sólido, utilizando para isso pedaços de meio BDA (1 cm²) com o microorganismo. Esperou-se vinte dias até a extração.

3.4.3 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em leite de soja

Para este cultivo foram preparados 600 mL de leite de soja em água destilada, numa concentração de 0,01 g mL⁻¹. Este volume foi dividido igualmente entre 5 erlenmeyers de 1 L. Dois frascos foram usados como controle. Antes de inocular o fungo presente em placas de Petri com BDA, todos os erlenmeyers foram autoclavados por 12 minutos. O tempo de cultivo foi de vinte dias.

3.4.4 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio líquido Czapeck

O meio Czapeck utilizado para o cultivo do fungo foi preparado utilizando-se os nutrientes descritos a seguir na Tabela 3.2:

TABELA 3.2 - Quantidade dos nutrientes utilizados para a produção do meio Czapeck.

Reagente	Massa (gramas)
Dextrose	60,00
NaNO ₃	6,00
K ₂ HPO ₄	2,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
KCl	1,00
Extrato de levedura	40,00

Todos os reagentes foram dissolvidos em água destilada, num volume final de 2 L. Em cada erlenmeyer de 1 L foram colocados 200 mL do meio líquido, num total de 10 frascos. A seguir, todos os frascos foram fechados com bonecas e autoclavados por 15 minutos. Após esfriarem sob luz UV, inoculou-se o fungo utilizando pedaços de meio BDA, em 8 erlenmeyers. Dois erlenmeyers contendo o meio Czapeck foram utilizados como controle. Esperou-se 20 dias até o processo de extração.

3.4.5 - Cultivo da cepa isolada de *Melia azedarach* em arroz

A fim de verificar se o fungo isolado de *Melia azedarach* durante a primeira etapa deste presente trabalho era capaz de produzir meroterpenos, ele foi cultivado em arroz. Para isso foram necessários 5 frascos erlenmeyers de 250 mL. Adicionou-se a cada um 25 g de arroz parboilizado e 21 mL de água destilada. Os procedimentos seguintes foram semelhantes aos descritos na seção 3.4.1 (página 21). Dois erlenmeyers contendo arroz não foram inoculados, e foram usados como controle. Este experimento foi realizado duas vezes.

3.5 - Obtenção dos extratos fúngicos

3.5.1 - Extração dos metabólitos da cultura de *P. brasilianum* nos meios sólidos (arroz, arroz cozido, milho e trigo)

Para a extração dos metabólitos secundários de *P. brasilianum* cultivado nos meios sólidos, primeiramente adicionou-se 1,2 mL de metanol grau HPLC por grama de meio de cultura em cada erlenmeyer, inclusive nos frascos de controle, triturou-se o material de cada frasco separadamente e a extração ocorreu de modo estático por 12 horas. A seguir, foram acrescentados 2,4 mL de acetato de etila PA por grama de meio de cultura em cada frasco, aguardando por mais 6 horas. Finalmente, cada mistura foi filtrada a vácuo e os filtrados foram armazenados em erlenmeyers diferentes para posterior particionamento líquido-líquido.

A partição foi realizada através da adição de água destilada a cada filtrado (volume igual ao de metanol adicionado em cada meio). Com a adição de água, formaram-se duas fases: orgânica e hidroalcolica. De cada fase orgânica retirou-se uma alíquota de 5 e outra de 10 mL, que foram secas em capela e posteriormente pré-purificadas e concentradas por extração em fase sólida (SPE – solid phase extraction). O restante de todas as fases orgânicas foi reunido e concentrado no rotoevaporador, e posteriormente estocado. As fases aquosas foram descartadas.

3.5.2 - Extração dos metabólitos da cultura de *P. brasilianum* nos meios líquidos de caldo de arroz e resíduo sólido de caldo de arroz

Em cada erlenmeyer contendo a cultura foi adicionado 20 g de NaCl para matar as células fúngicas e auxiliar na extração dos metabólitos do interior de suas células. Esperou-se por 12 horas. Após este período filtrou-se a mistura sob vácuo. O micélio foi recolocado no interior de cada frasco e neles foram adicionados 150 mL de etanol grau HPLC, deixando em repouso por 2 dias. Depois filtrou-se as misturas à vácuo. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Todo o etanol de cada micélio cultivado igualmente (com e sem glicose) foi estocado junto. Retirou-se uma alíquota de 5 e uma de 10 mL de cada filtrado etanólico, deixando-se evaporar em capela. O restante foi concentrado em rotoevaporador e estocado. Cada filtrado aquoso foi particionado com 80 mL (caldo de arroz) ou 100 mL (resíduo sólido de caldo de arroz) de acetato de etila PA. De cada fase de acetato foram retiradas alíquotas de 5 e 10 mL, e o restante foi concentrado.

3.5.3 - Extração dos metabólitos da cultura de *P. brasilianum* nos meios líquidos de leite de soja e Czapeck

Em cada erlenmeyer foi adicionado 20 g de NaCl. Aguardou-se 12 horas. Após este período filtrou-se as misturas sob vácuo e os filtrados foram estocados em geladeira para posterior partição. Os micélios foram recolocados no interior de cada frasco e neles foram adicionados 90 mL (leite de soja) ou 150 mL (Czapeck) de etanol grau HPLC, triturou-se cada micélio isoladamente e deixou-se

as misturas em repouso por 6 horas. Depois filtrou-se todos os materiais a vácuo. Retirou-se uma alíquota de 5 mL e outra de 10 mL de cada filtrado etanólico, deixando-se evaporar em capela. O restante foi concentrado em rotoevaporador e estocado. Os filtrados aquosos foram particionados com 120 mL (leite de soja) ou 200 mL (Czapeck) de acetato de etila PA. De cada fase de acetato foram retiradas também duas alíquotas: uma de 5 mL e outra de 10 mL, e o restante foi concentrado.

3.5.4 - Extração dos metabólitos da cultura da cepa isolada de *Melia azedarach* em arroz

A extração dos metabólitos foi realizada seguindo-se o procedimento descrito na seção 3.5.1. Somente as quantidades de solventes orgânicos foram diferentes: 108 mL de metanol e 216 mL de acetato de etila para cada erlenmeyer. Para cada partição foi utilizado 108 mL de água destilada.

3.6 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de substratos exógenos

Para este estudo também se utilizou a cepa fúngica previamente isolada e identificada durante o trabalho de doutorado de Regina M. Geris dos Santos ^[46].

3.6.1 - Substratos utilizados

As estruturas moleculares dos aditivos utilizados nesta etapa do trabalho estão representadas na Figura 3.1 a seguir:

Em adição aos compostos relacionados na Figura 3.1, uma resina extraída de *Pinus taeda* também foi utilizada para estudo de sua influência no metabolismo secundário de *P. brasilianum*. Com exceção da resina e do ácido oleanólico, que foram isolados anteriormente no laboratório de produtos naturais do DQ-UFSCar, todos os outros aditivos foram adquiridos comercialmente, não necessitando, portanto, de qualquer tratamento preliminar de purificação.

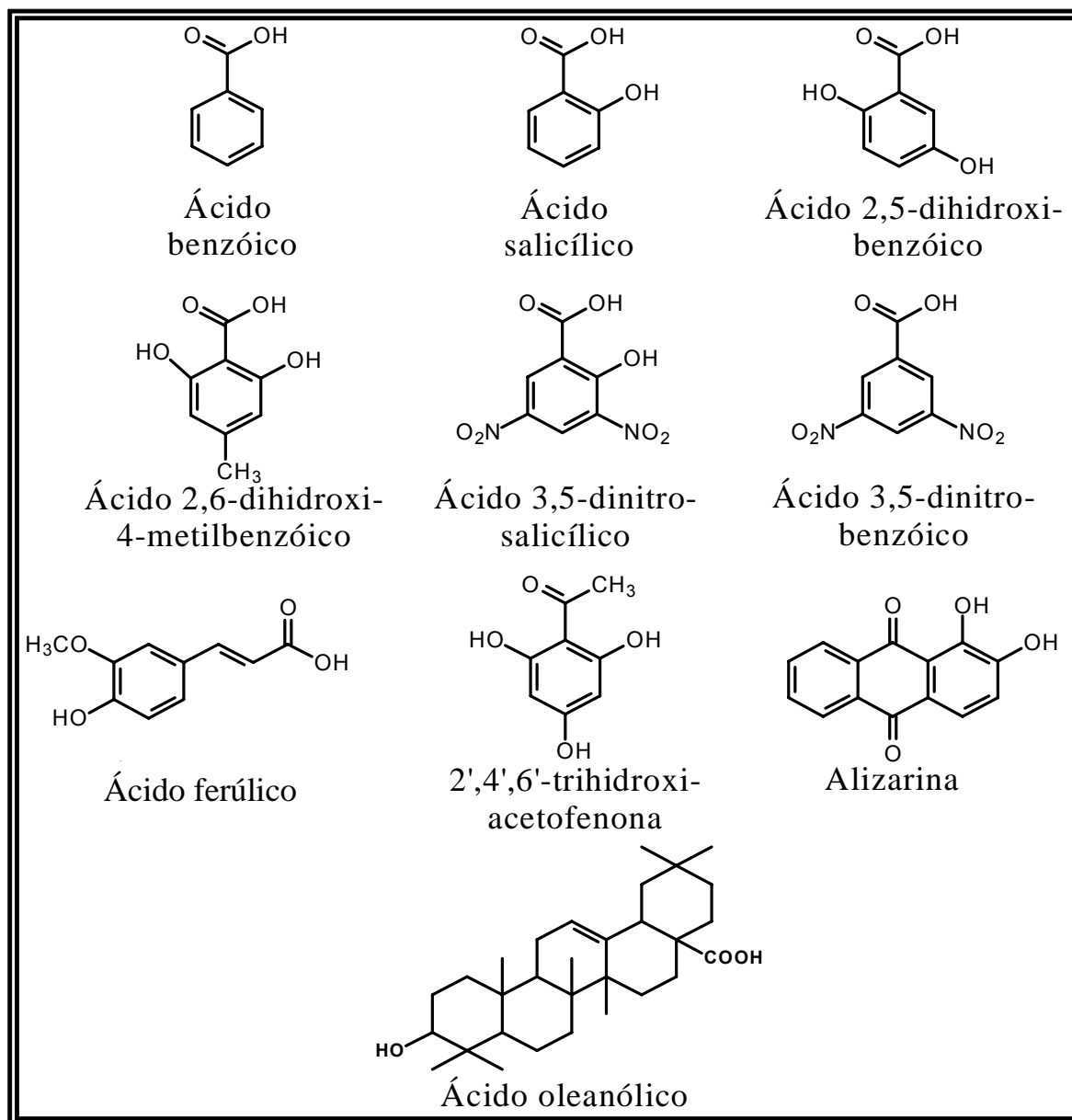


FIGURA 3.1 – Estruturas moleculares dos substratos exógenos utilizados junto ao cultivo de *P. brasilianum*.

3.6.2 - Pré-purificação do ácido oleanólico

O padrão ácido oleanólico foi purificado por CC, usando-se fase estacionária de sílica gel (flash). As medidas da coluna utilizada foram: 3,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento. A massa de ácido oleanólico submetida ao processo de purificação foi 5,3 g. As frações 1-113 foram recolhidas utilizando-se como eluente diclorometano: acetato de etila (9:1). As frações seguintes foram recolhidas usando-se o eluente diclorometano : acetato de etila (7:3). Ao total, foram 150 frações de 20 mL cada.

3.6.3 - Meio de cultivo

O meio de cultivo escolhido para os experimentos com os substratos exógenos foi o de Czapeck. Este meio foi preparado seguindo-se os procedimentos descritos na seção 3.4.4 (página 22). Os primeiros aditivos a serem estudados foram os seguintes: ácidos benzóico, oleanólico e salicílico, alizarina e a resina de Pinus. Para cada uma dessas substâncias foram preparados 6 erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do meio líquido. Em cada um dos 6 frascos foram adicionados 30 mg do substrato utilizado. Somente após a introdução dos aditivos nos frascos os mesmos foram autoclavados. A espécie *P. brasilianum* foi então inoculada em apenas 3 dos 6 frascos contendo os aditivos. Os outros frascos foram utilizados como controle. Em adição, foram também utilizados três erlenmeyers com 200 mL de meio líquido cada um para o cultivo do fungo na ausência de qualquer substrato exógeno, e foram utilizados como o branco dos experimentos. Estes testes foram realizados juntos em batelada, isto é, o preparo, inoculação e cultivo se deram em dias iguais, portanto, em condições experimentais semelhantes, de luz, temperatura e umidade. Estes experimentos foram repetidos três vezes, em meses diferentes.

Os demais aditivos foram estudados posteriormente, seguindo-se os mesmos procedimentos já descritos, em triplicata, com 3 controles para cada aditivo e mais três erlenmeyers de branco (meio mais fungo). Estes experimentos foram realizados em conjunto, nos mesmos dias de preparo do meio, inoculação do microorganismo e crescimento do mesmo. Porém, não foram repetidos novamente.

3.6.4 - Procedimento de extração dos metabólitos

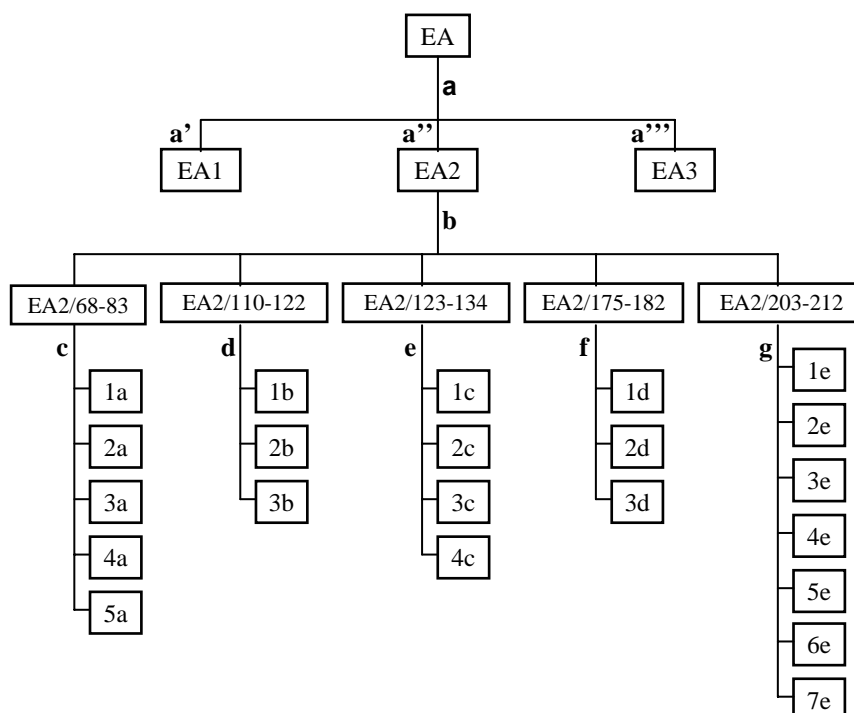
A extração dos metabólitos fúngicos de todos os experimentos com os substratos exógenos se deu seguindo-se o procedimento descrito na seção 3.5.3 (página 23).

3.6.5 - Isolamento dos metabólitos secundários do experimento com alizarina

Após as análises realizadas por HPLC, verificou-se uma mudança visualmente significativa no perfil cromatográfico dos extratos do experimento com alizarina, se comparado com os cromatogramas dos brancos (meio líquido + fungo). Por esta razão, os extratos miceliais deste experimento foram reunidos e submetidos a diversos fracionamentos, visando o isolamento dos metabólitos secundários presentes no micélio de *P. brasilianum*.

O fluxograma 3.1 ilustra os procedimentos cromatográficos aos quais o extrato micelial reunido (EA) foi submetido. Nele estão também citadas as condições, eluentes e fases estacionárias utilizadas em cada etapa.

FLUXOGRAMA 3.1 – Isolamento dos metabólitos secundários do micélio (EA) de *P. brasilianum* cultivado na presença de alizarina.



a: coluna cromatográfica de dimensões $h \times \varnothing = 28,0 \times 3,0$ cm. Fase estacionária: sílica gel tipo flash. Gradiente de eluição: **a'** - 780 mL de hexano/diclorometano (1: 1); **a''** - 400 mL de diclorometano/metanol (85 : 15); **a'''** - 240 mL de metanol 100%.

b: coluna cromatográfica de dimensões $h \times \varnothing = 28,5 \times 2,3$ cm. Fase estacionária: sílica gel tipo flash. Gradiente de eluição: 100% hexano até 90% acetato de etila, obtendo 208 frações recolhidas em frascos de 20 mL. A seguir, utilizou-se 400 mL de uma mistura de acetato/metanol (9 : 1), obtendo as frações 209 – 223.

c: cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões $h \times \varnothing = 20,0 \times 20,0$ cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente: hexano/acetato (7 : 3).

d: cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões $h \times \varnothing = 20,0 \times 20,0$ cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente: hexano/acetato (6 : 4).

e: cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões $h \times \varnothing = 20,0 \times 20,0$ cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente: hexano/acetato (6 : 4).

f: cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões $h \times \varnothing = 20,0 \times 20,0$ cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente: hexano/acetato (4 : 6).

g: cromatografia em camada delgada preparativa de dimensões $h \times \varnothing = 20,0 \times 20,0$ cm com camada de 1 mm de sílica. Eluente: hexano/acetato (1 : 9).

3.6.6 - Curva de consumo da alizarina pelo fungo

Este experimento foi realizado em meio Czapeck, cuja forma de preparo foi anteriormente descrita na seção 3.4.4 (página 22). Uma solução de concentração 15 mg mL^{-1} de alizarina foi preparada num balão volumétrico de 50 mL, pesando-se uma massa de 0,75 g de alizarina, e dissolvendo-se o sólido em acetona.

Foram utilizados no total 21 erlenmeyers de 500 mL, nos quais foram adicionados 100 mL do meio líquido e 1 mL da solução de alizarina em cada um. Os frascos foram autoclavados após a adição da alizarina.

Para a inoculação do fungo, adicionou-se a cada erlenmeyer 1 mL de uma solução de esporos de *P. brasilianum*, preparada em água destilada

previamente esterilizada. Os volumes da solução de alizarina e da solução de esporos foram pipetados com o mesmo pipetador automático de 1000 µL. Os pontos da curva foram os seguintes: dias 0, 2, 4, 7, 10, 15 e 25. Em cada um desses dias, três culturas fúngicas foram extraídas, portanto, todos os pontos foram realizados em triplicata.

O procedimento de extração foi semelhante ao citado na seção 3.5.3 (página 23), somente as quantidades de sal e dos solventes foram diferentes: para matar as células fúngicas, foi utilizado 10 g de NaCl em cada frasco. Os volumes de etanol e acetato de etila foram, respectivamente, 75 mL e 100 mL.

3.7 - Estudo dos limonóides nos extratos de *Melia azedarach*

O preparo dos extratos botânicos de *M. azedarach* se deu a partir de tecidos coletados no mesmo dia em que foram também coletados aqueles utilizados para o isolamento dos fungos (dia 8 de Fevereiro de 2006), realizado conforme citado na seção 3.3 (página 19).

3.7.1 Preparo dos extratos

Material botânico: foram utilizados 2,0 g da epiderme (parte exterior) e 2,0 g do córtex (parte interior) do caule de *M. azedarach*.

Após secagem ao ar livre, estes materiais foram pulverizados em moinho tipo Willey. Em seguida, esses materiais foram extraídos com 50 mL de etanol grau HPLC, sonicando-se a mistura por 20 minutos, e filtrados por gravidade.

De cada filtrado foi retirada uma alíquota de 5 mL, que foi evaporada e acondicionada para posterior pré-purificação por SPE.

3.8 - Preparo de amostras

3.8.1 - Método de pré-purificação e concentração dos extratos fúngicos

Os compostos de interesse existentes nos extratos (meroterpenos) possuíam média a baixa polaridade. Assim, utilizou-se a técnica de SPE com cartuchos contendo fase estacionária LC-18 no preparo das amostras. Esta técnica permite uma pré-purificação e uma concentração dos compostos de interesse ao mesmo tempo, através do uso correto de solventes para ativar, condicionar a fase estacionária e eluir os compostos.

Estudos anteriores a este presente trabalho foram realizados para se definir o melhor método de preparo das amostras ^[59]. O método escolhido está descrito a seguir, e foi aplicado a todas as alíquotas retiradas de cada extrato fúngico: os volumes de 5 mL e 10 mL das fases orgânicas concentradas em capela foram ressuspensas em 5 mL de metanol grau HPLC e 20 mL de água mili-Q. Essas suspensões foram filtradas em algodão e aplicadas em cartuchos de SPE (6 mL) contendo 1 g de fase estacionária ODS. Os cartuchos foram previamente ativados com metanol (10 mL) e condicionados com água mili-Q (15 mL). Após a introdução de toda a amostra os cartuchos foram lavados com 15 mL de uma mistura de

água/metanol (9 : 1), e a fração de interesse foi novamente concentrada e rediluída em 500 µL de acetonitrila para as análises por HPLC e HPLC-MS.

3.8.2 - Método de pré-purificação e concentração dos extratos de *Melia azedarach*

Cada alíquota de 5 mL dos extratos da planta foi ressuspensa em 45 mL de água mili-Q. A seguir, a suspensão foi passada em cartucho de SPE (6 mL) contendo 1 g de fase estacionária ODS, previamente ativado com 10 mL de metanol e condicionado com 15 mL de água mili-Q. O cartucho foi posteriormente lavado com 10 mL de água, e a fração de interesse foi eluída com 5 mL de metanol.

3.9 - Otimização dos métodos de análise por HPLC

3.9.1 - Desenvolvimento de um método único para análise dos extratos por HPLC

A otimização do método cromatográfico de análise foi realizada utilizando-se uma coluna Luna 5 µ C-18(2) 100A (25,0 x 0,46 cm d.i., 5 µm de diâmetro do poro), da marca Phenomenex. O desenvolvimento do método cromatográfico foi realizado utilizando-se uma mistura conhecida de padrões de meroterpenos. Posteriormente, o método escolhido foi aplicado para a análise dos extratos fúngicos e da planta.

Tomando-se como base os procedimentos de Snyder ^[60] para otimização da resolução cromatográfica, a fase móvel utilizada no modo reverso consistiu de água, metanol e acetonitrila. A janela de comprimento de onda utilizada na detecção foi de 200 a 450 nm.

O volume de injeção da mistura de padrões foi de 5 µL. Os métodos utilizados com a coluna de ODS foram:

- Método 1: Gradiente exploratório utilizando água (A) e acetonitrila (B). Variação do gradiente: 5 - 100% de B em 60 minutos. Vazão: 1,5 mL min⁻¹.
- Método 2: Modo isocrático utilizando água (A) e acetonitrila (B). Porcentagem de B: 47%. Tempo de corrida: 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹.
- Método 3: Modo isocrático utilizando água (A) e metanol (B). Porcentagem de B: 57%. Tempo de corrida: 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹.
- Método 4: Modo gradiente utilizando água (A) e metanol (B). Variação do gradiente: 40 - 100% de B em 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹.

Escolhido o método cromatográfico, todas as análises de interesse foram realizadas acoplado-se à coluna analítica uma coluna guarda de ODS (Security Guard, Phenomenex).

3.9.2 - Método cromatográfico para análise dos pontos da curva de consumo da alizarina

Foi necessário desenvolver um método cromatográfico para análise dos pontos da curva de consumo da alizarina pelo fungo, visando a otimização da resolução cromatográfica da banda relativa à alizarina. O método utilizado está descrito a seguir:

- Método 5: Fase estacionária: coluna Luna 5 μ C-18(2) 100A (25 x 0,46 cm d.i., 5 μ m de diâmetro do poro), da marca Phenomenex acoplada a uma coluna guarda de ODS (Security Guard, Phenomenex). Fase móvel: água (A) e acetonitrila (B). Variação do gradiente: 5 - 100% de B em 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. A janela de comprimento de onda utilizada na detecção foi de 200 a 450 nm.

3.9.3 - Método cromatográfico para as análises por LC-APCI-MS

No período das análises por LC-APCI-MS, a coluna de C-18 utilizada para otimização do método de separação foi perdida. Por esta razão, utilizou-se uma coluna Synergy 4 μ Fusion-RP 80A (25 x 0,46 cm d.i., 4 μ m de diâmetro do poro), Phenomenex. O método gradiente está descrito na Tabela 3.3.

TABELA 3.3 - Método cromatográfico utilizado nas análises por LC-APCI-MS.

Tempo (min)	%A (água)	%B (acetonitrila)	%C (metanol)	%D (isopropanol)	Fluxo (mL min ⁻¹)
0,00	45,00	0,00	55,00	0,00	0,6
20,00	15,00	0,00	85,00	0,00	0,6
25,00	0,00	50,00	50,00	0,00	0,6
30,00	0,00	0,00	80,00	20,00	0,6
31,00	50,00	0,00	50,00	0,00	0,6
40,00	50,00	0,00	50,00	0,00	0,6

3.9.4 - Condições experimentais do espectrômetro de massas usadas nas análises por LC-MS

As condições de análise com o probe de ESI no modo positivo estão apresentadas na Tabela 3.4 a seguir.

TABELA 3.4 - Condições de análise utilizadas para as análises por LC-ESI-MS.

Experimento	Full scan
Capilar	3,29 kV
Cone	29 V
Extrator	4 V
Lentes de radiofrequência	0,69 V
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura do probe	350 °C
Fluxo de gás de dessolvatação (N ₂)	621 L h ⁻¹

As condições de análise com o probe de APCI (LC-APCI-MS) no modo positivo estão apresentadas na Tabela 3.5 a seguir.

Os experimentos de íons produto (MS/MS) utilizando o probe de APCI foram realizados com as mesmas condições citadas na Tabela 3.5, com energia de colisão de 24 eV.

TABELA 3.5 - Condições de análise utilizadas para as análises por LC-APCI-MS.

Experimento	Full scan
Corona	3,10 Kv
Cone	25 V
Extrator	5 V
Lentes de radiofrequência	0,73 V
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura do probe	350 °C
Fluxo de gás de dessolvatação (N ₂)	401 L h ⁻¹

3.9.5 - Padrões inicial e final das análises cromatográficas

Todas as amostras analisadas foram diluídas em 500 µL de uma solução contendo diazodiamida (padrão inicial) e antraceno (padrão final). Estes compostos foram escolhidos para servirem de referência em relação a qualquer mudança nos tempos de retenção dos picos cromatográficos. Ambas as substâncias possuem uma boa absorção na região do espectro de ultravioleta (Figura 3.2), característica esta importante para a escolha de padrões a serem utilizados em análises de HPLC com detector DAD.

Preparo da solução contendo os padrões: 5 mg de cada padrão foi adicionada num balão volumétrico de 50 mL, e preenchido com acetonitrila até o

volume marcado. A concentração final da solução foi de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, relativa a cada padrão.

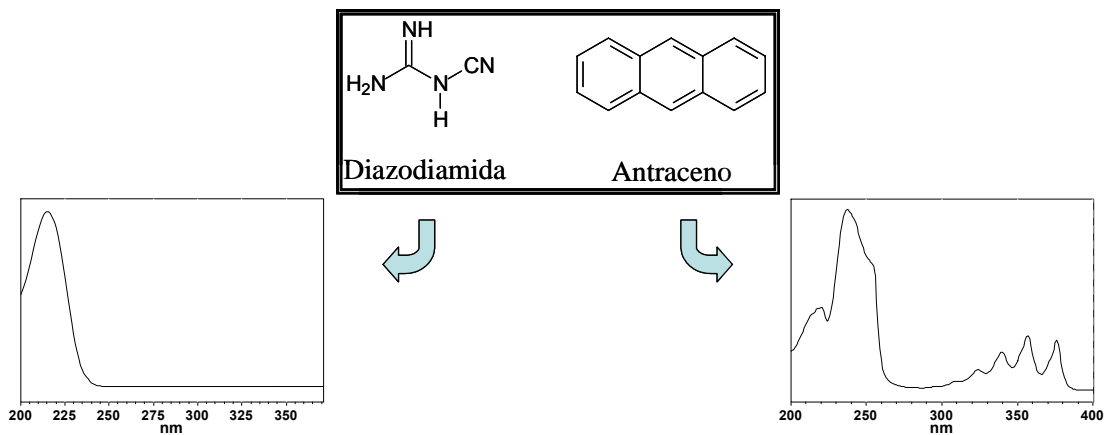


FIGURA 3.2 – Espectros de absorção da diazodiamida e do antraceno, e suas respectivas estruturas moleculares.

4 - Resultados e discussões

4.1 - Isolamento de fungos endofíticos de *Melia azedarach*

Dos materiais botânicos coletados no dia 10 de Janeiro de 2006, foi possível o isolamento de apenas um fungo da epiderme, pois algumas das placas incubadas com os tecidos da planta foram contaminadas por bactérias, e em outras, alguns fungos com desenvolvimento mais rápido cresceram por toda a área superficial do meio de BDA, e impediram a visualização, o isolamento e o desenvolvimento dos outros fungos existentes no material. A contaminação por bactérias poderia ter sido evitada utilizando-se desde o início placas de Petri contendo meio BDA e antibiótico.

FIGURA 4.1 - Fotografias das partes superior (esquerda) e inferior (direita) da placa de Petri com meio BDA contendo um fungo isolado a partir de pedaços da epiderme de *Melia azedarach*, recolhidos no dia 10 de Janeiro de 2006.

Para evitar a contaminação das placas incubadas com os tecidos botânicos na segunda tentativa de isolamento, os materiais recolhidos no dia 8 de Fevereiro foram depositados em meio BDA contendo antibiótico tetraciclina. Após a incubação, as placas de Petri foram cuidadosamente examinadas, dia a dia, para acompanhar o crescimento de todos os fungos. Quando um fungo se mostrava mais desenvolvido, ele era imediatamente repicado para outra placa com BDA. Desta forma, foi possível isolar 5 fungos com aspectos diferentes. Suas fotos estão mostradas na Figura 4.2.

As espécies endofíticas isoladas nesta etapa do trabalho ainda não foram identificadas, porém foram todas conservadas em água destilada e adicionadas à micoteca do Labbiommi. O principal objetivo desta etapa foi tentar o re-isolamento de espécies de *Penicillium*, discriminadas pelas suas características macroscópicas, visando um posterior cultivo em meio artificial a fim de checar a produção ou não de meroterpenos.

O fungo verde mostrado na parte superior direita da Figura 4.2 mostrou um modo de crescimento e coloração muito semelhante à do *P. brasilianum*, com a parte superior da placa verde e a parte inferior amarelada. Sua forma de crescimento se deu por toda a área superficial do meio BDA, desenvolvendo pontos verdes por toda a superfície. Desta forma, pode-se sugerir que se trata de um fungo do gênero *Penicillium*, ou até mesmo da espécie *P. brasilianum*. Por esta razão, ele foi escolhido para o cultivo em meio artificial de arroz, a fim de verificar a produção ou não de meroterpenos.

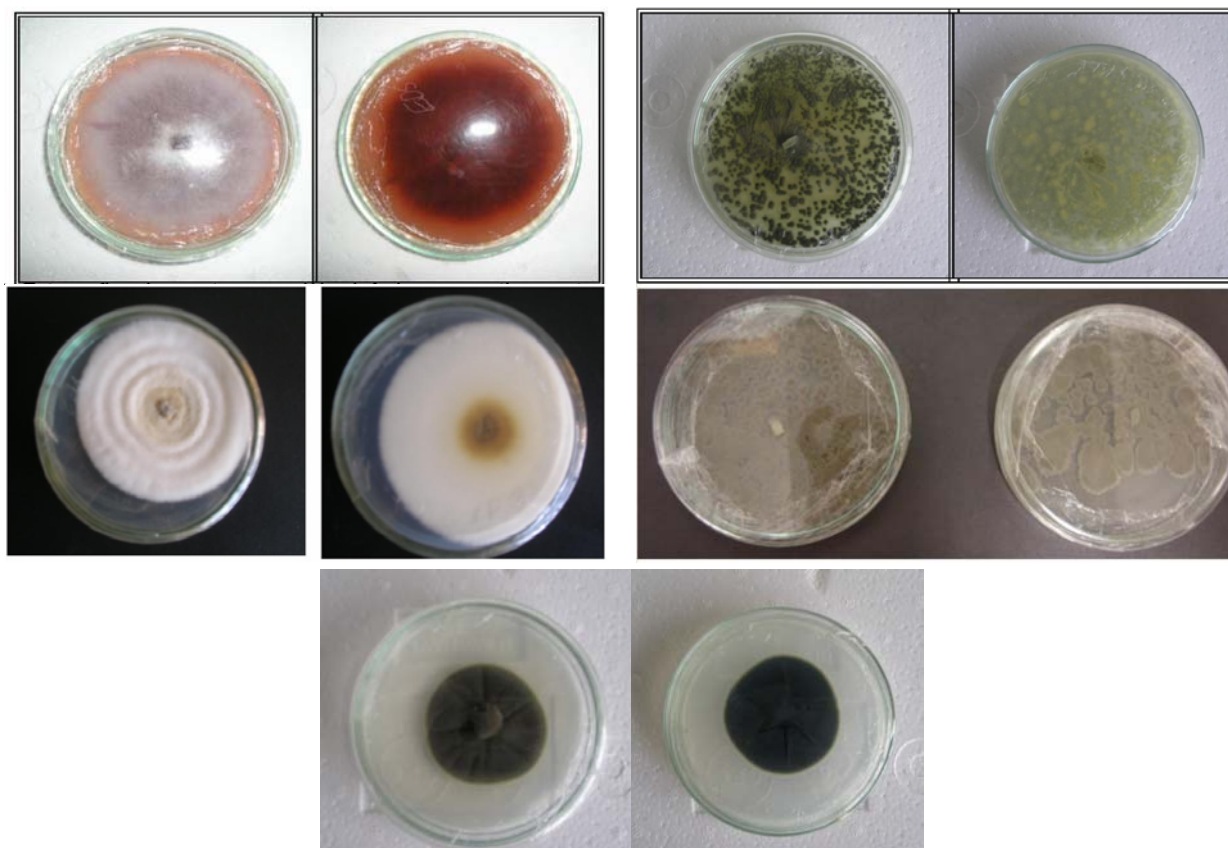


FIGURA 4.2 - Fotografias das partes superior (esquerda) e inferior (direita) das placas de Petri com meio BDA contendo os diferentes fungos isolados a partir de pedaços do córtex de *Melia azedarach*, recolhidos no dia 8 de Fevereiro de 2006.

4.2 - Desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos extratos por HPLC

O desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos extratos fúngicos foi realizado em busca de uma melhor resolução cromatográfica dos compostos de maior interesse: os meroterpenos (Figura 4.3). O tempo total de análise também foi levado em conta, a fim de se conseguir aliar uma boa resolução dos picos de cada meroterpeno a um tempo de análise razoável.

Embora não seja necessária uma resolução de linha de base para a análise de compostos por LC-MS/MS, quando os mesmos apresentam caminhos de fragmentação distintos ^[58,61,62], uma separação cromatográfica razoável é interessante, pois a diferenciação de substâncias de mesma classe pelos seus respectivos tempos de retenção é um parâmetro analítico que vem a somar, para a identificação dos mesmos numa matriz complexa.

Estudos realizados explicam que a eficiência da separação cromatográfica, juntamente com a complexidade da matriz da amostra são fatores decisivos para o efeito de supressão da ionização em espectrometria de massas. Este efeito é mais pronunciado quando se utiliza ionização por *electrospray*, se comparada com a técnica de APCI. Desta forma, a otimização do método cromatográfico, incluindo a metodologia de preparo das amostras (pré-purificação,

concentração) são determinantes para se conseguir uma boa sensibilidade nas análises por LC-MS e LC-MS/MS [63-65].

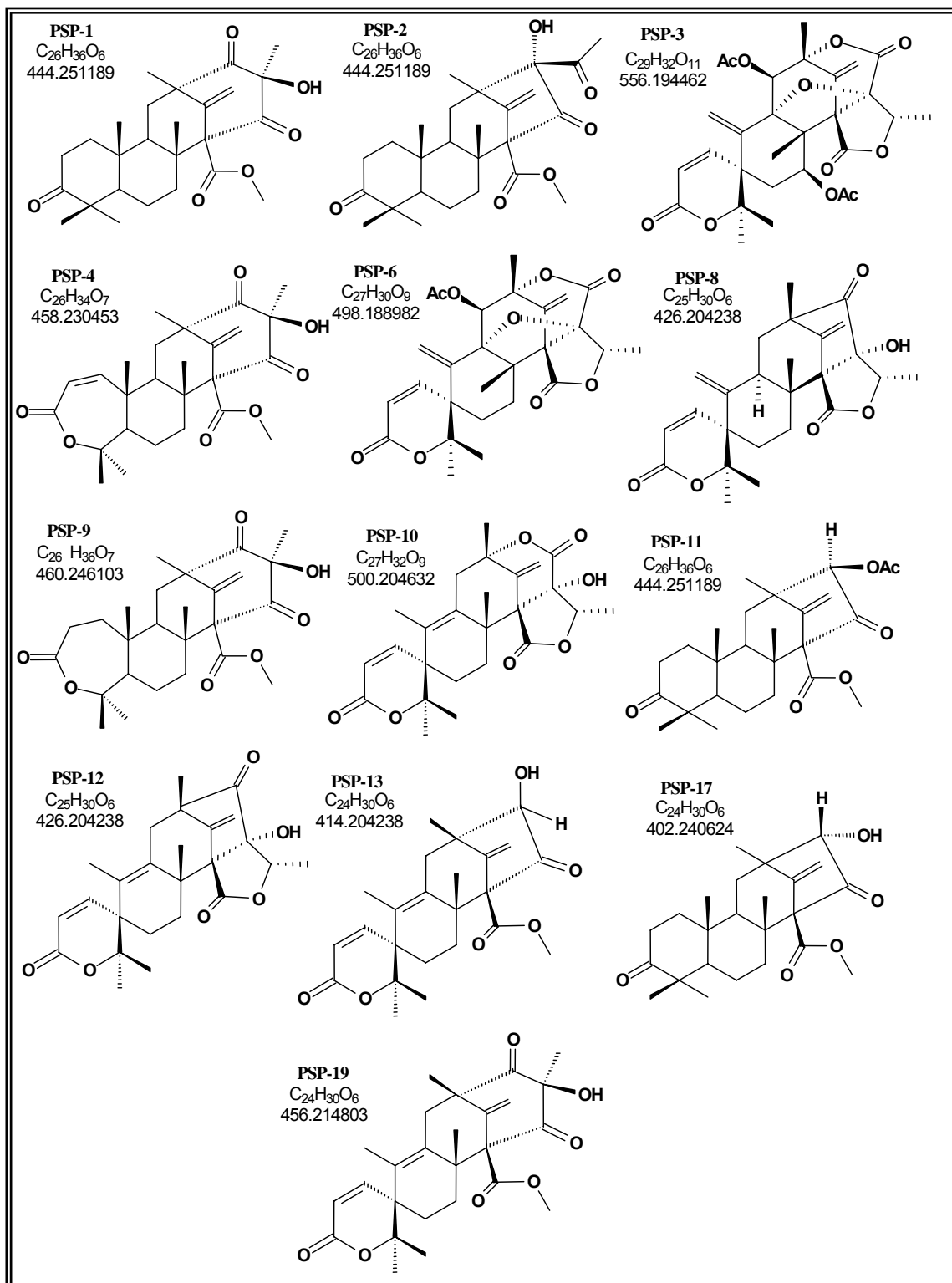


FIGURA 4.3 - Estruturas moleculares dos meroterpenos produzidos por *P. brasilianum*, isolado como endofítico de *M. azedarach* [46].

As primeiras tentativas de desenvolvimento do método cromatográfico foram realizadas em trabalhos anteriores, pela então aluna de doutorado Regina Geris dos Santos ^[46,59]. As fases estacionárias testadas nestes trabalhos foram, primeiramente, uma coluna Hypersil 5-ODS (25 x 0,46 cm d.i., 5 µm de diâmetro de poro), e posteriormente uma coluna Phenyl-hexyl (Luna 5 µ Phenyl-hexyl, 25 x 0,46 cm d.i., Phenomenex) acoplada a uma coluna guarda de ODS (Security Guard, Phenomenex). O método gradiente que proporcionou resultados mais satisfatórios está descrito na Tabela 4.1 a seguir.

Um total de 10 padrões de meroterpenos foram analisados separadamente, por HPLC-DAD, seguindo o protocolo de análise descrito na Tabela 4.1. Seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda máximos seguem descritos na Tabela 4.2.

Analisando os valores de tempo de retenção descritos na Tabela 4.2, pode-se verificar que os resultados de separação ainda não foram satisfatórios. Os meroterpenos PSP 3, PSP 4, PSP 6 e PSP 8 apresentaram tempos de retenção muito próximos, assim como os meroterpenos PSP 9, PSP 13 e austina.

TABELA 4.1 - Eluição gradiente utilizada para otimização da separação dos padrões de meroterpenos por HPLC-DAD. Fase estacionária: Phenyl-hexyl acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: acetonitrila. Volume de injeção: 35 µL. Monitoramento em 215 nm ^[59].

Tempo (min)	Porcentagem de B (%)
0,0	50,0
10,0	75,0
25,0	80,0
35,0	100,0

TABELA 4.2 - Tempos de retenção dos padrões de meroterpenos e seus respectivos comprimentos de onda máximos*.

Substância	T _r (min)	λ _{max} (nm)
PSP 1	19,02	200
PSP 2	20,82	200, 230 (sh)*
PSP 3	17,03	200, 236 (sh)
PSP 4	17,10	
PSP 6	17,42	200, 236 (sh)
PSP 8	17,45	210
PSP 9	16,42	200
PSP 11	22,60	200, 220 (sh)
PSP 13	16,65	210, 260 (sh)
Austina	16,99	205, 240 (sh)

*Metodologia de análise: coluna Phenyl-hexyl acoplada a uma coluna guarda de ODS; fase móvel: acetonitrila (solvente B) e água (solvente A); eluição gradiente descrita na Tabela 4.2. Volume de injeção: 35 µL, monitoramento em 215 nm. sh = ombro ^[59].

Partindo desses resultados, escolheu-se usar uma coluna C-18 para a separação dos compostos de interesse. Os métodos cromatográficos desenvolvidos estão detalhados na seção 3.9.1 (página 29).

O primeiro método utilizado foi um gradiente exploratório (método 1) a fim de verificar a força do solvente necessária para eluir os meroterpenos. A fase móvel utilizada foi uma mistura de água e acetonitrila. Para o desenvolvimento do método, duas substâncias foram adicionadas à mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12: os padrões inicial e final diazodiamida e antraceno, respectivamente. A Figura 4.4 mostra o resultado obtido com este gradiente exploratório.

Analisando o cromatograma da Figura 4.4, é possível notar que o método gradiente utilizado ainda não possibilitou uma resolução adequada dos meroterpenos presentes na mistura de padrões. Porém, foi possível saber a força de solvente adequada para eluir estes compostos. A partir daí desenvolveu-se um método isocrático com 47% de acetonitrila (método 2, descrito na seção 3.9.1) para uma nova análise da mistura de padrões. O resultado está mostrado no cromatograma da Figura 4.5.

Nesta Figura nota-se que o método 2 possibilitou uma melhora significativa na resolução dos picos relativos a cada meroterpeno, porém não foi possível ainda visualizar 7 picos relativos a cada padrão presente na mistura. Assim, a próxima tentativa foi modificar a fase móvel para água e metanol, porém mantendo a mesma força relativa. O método testado foi o método 3 descrito na seção 3.9.1. A Figura 4.6 ilustra os resultados conseguidos.

O cromatograma da Figura 4.6 mostra uma separação ainda melhor utilizando metanol e água como fase móvel (método 3), quando comparado com o método 2, no qual foi usada uma mistura de acetonitrila e água. Pelo método 3, foi possível visualizar seis picos referentes aos meroterpenos, enquanto que pelo método 2 (Figura 4.5), apenas três picos tiveram resolução de linha de base. No entanto, o tempo de análise pelo método 3 praticamente duplicou, sendo que o último pico eluiu em torno de 48 minutos. Além disso, o objetivo desta otimização era uma posterior análise de extratos fúngicos, nos quais existem compostos de polaridades diferentes, e um método isocrático geralmente não resolve o problema de extratos complexos, devido à força do solvente utilizada durante toda a análise não permitir a eluição de todos os compostos nele presentes. Por essas razões, o próximo passo para otimização do método cromatográfico foi adaptar o método 3 isocrático para um método final gradiente. Este método final é o método 4, e o cromatograma da Figura 4.7 mostra o resultado obtido por este método. Os meroterpenos utilizados neste teste foram aqueles com tempos de eluição mais próximos (segundo os resultados da Tabela 4.2), ou seja, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13.

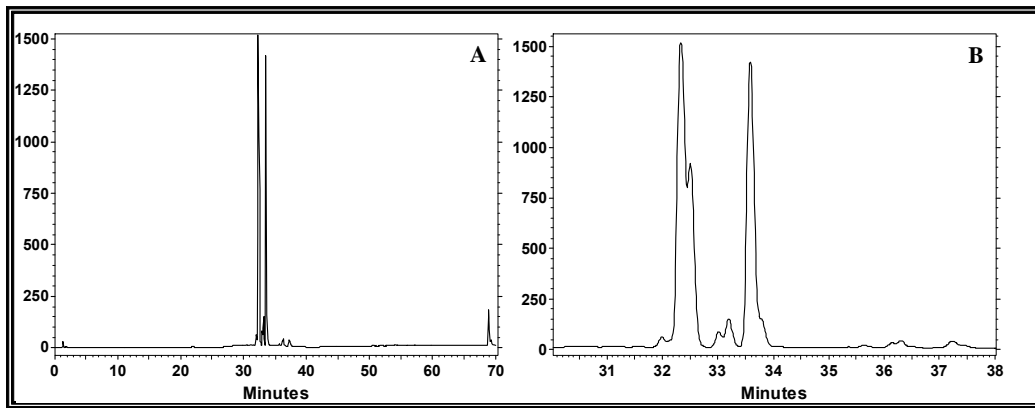


FIGURA 4.4 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A. Bomba A: água. Bomba B: acetonitrila. Eluição gradiente (método 1): de 5 a 100% de B em 60 minutos. Vazão: 1,5 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

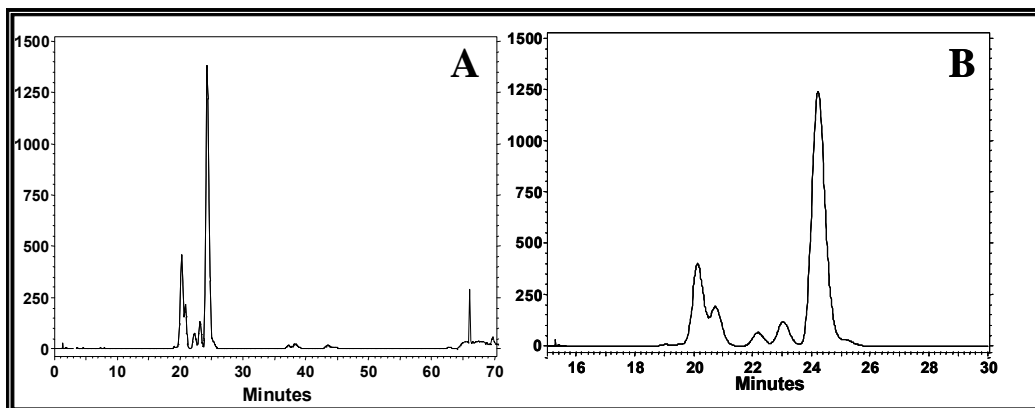


FIGURA 4.5 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A. Bomba A: água. Bomba B: acetonitrila. Eluição isocrática (método 2): 47% B por 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

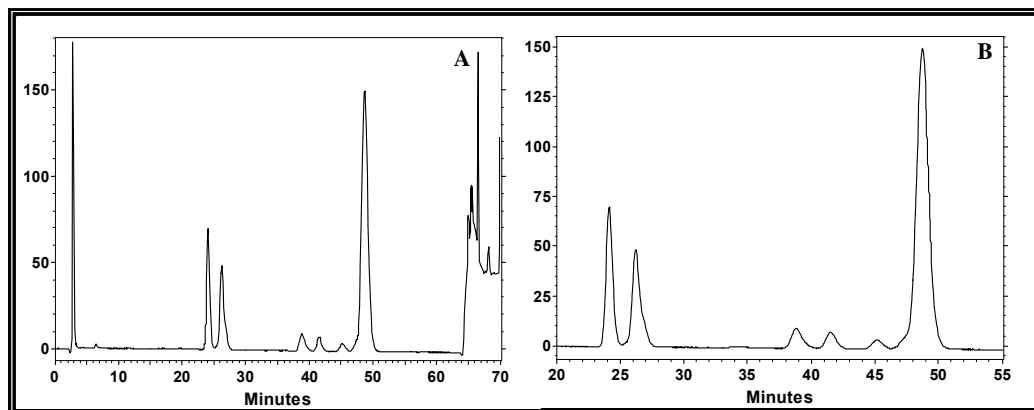


FIGURA 4.6 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-2, PSP-4, PSP-8, PSP-9, PSP 10, PSP-11 e PSP-12. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição isocrática (método 3): 57% B por 60 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

O cromatograma da Figura 4.6 mostra uma separação ainda melhor utilizando metanol e água como fase móvel (método 3), quando comparado com o método 2, no qual foi usada uma mistura de acetonitrila e água. Pelo método 3, foi possível visualizar seis picos referentes aos meroterpenos, enquanto que pelo método 2 (Figura 4.5), apenas três picos tiveram resolução de linha de base. No entanto, o tempo de análise pelo método 3 praticamente duplicou, sendo que o último pico eluiu em torno de 48 minutos. Além disso, o objetivo desta otimização era uma posterior análise de extratos fúngicos, nos quais existem compostos de polaridades diferentes, e um método isocrático geralmente não resolve o problema de extratos complexos, devido à força do solvente utilizada durante toda a análise não permitir a eluição de todos os compostos nele presentes. Por essas razões, o próximo passo para otimização do método cromatográfico foi adaptar o método 3 isocrático para um método final gradiente. Este método final é o método 4, e o cromatograma da Figura 4.7 mostra o resultado obtido por este método. Os meroterpenos utilizados neste teste foram aqueles com tempos de eluição mais próximos (segundo os resultados da Tabela 4.2), ou seja, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13.

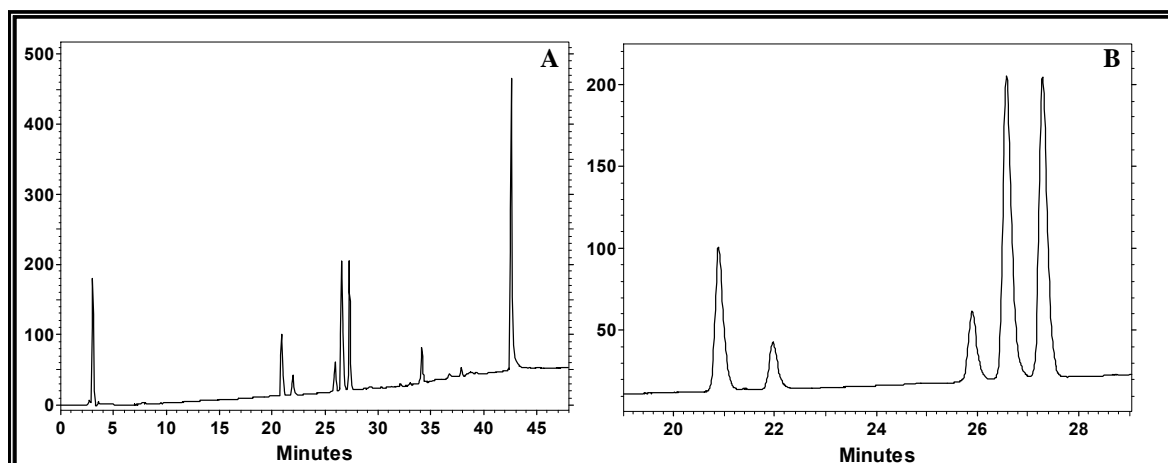


FIGURA 4.7 - Cromatograma da mistura de padrões de meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

O método 4 permitiu a separação de 5 picos relativos aos meroterpenos presentes na mistura, como pode ser visto pelo cromatograma da Figura 4.7. Não foi possível a separação de todos os padrões da mistura, porém o tempo de eluição dos compostos mostrou ser ideal para as análises posteriores por LC-MS, visto que o último pico de padrão eluiu antes de 28 minutos, não exigindo, portanto, um tempo muito longo para cada corrida cromatográfica.

Além disso, este seria um método viável para as análises preliminares dos extratos por HPLC-DAD, a fim de verificar a presença de metabólitos que coeluem na região dos meroterpenos (entre 20 e 30 minutos), e também para a comparação do perfil metabólico do fungo *P. brasilianum* em cada experimento. Como este método cromatográfico seria posteriormente utilizado para extratos fúngicos com diversos compostos polares adicionais, procurou-se manter a região inicial do cromatograma sem os meroterpenos alvos. Este foi, portanto, o método cromatográfico adotado para todas as análises subseqüentes por HPLC. As exceções serão discutidas posteriormente.

Para as análises dos extratos acoplou-se à coluna de ODS uma coluna-guarda de ODS, a fim de se evitar o entupimento da coluna analítica com impurezas presentes nos extratos. Nesta etapa do trabalho não foi possível inferir qual padrão de meroterpeno estava relacionado a cada pico eluído no cromatograma da Figura 4.7, visto que todos os padrões analisados possuíam um espectro de absorção bastante semelhante entre si, conforme pode ser visualizado pela Figura 4.8. Devido a problemas com o espectrômetro de massas, as primeiras análises foram realizadas utilizando-se apenas a detecção por DAD.

Os espectros da Figura 4.8 mostram que as absorções destes meroterpenos (assim como os demais ilustrados na Figura 4.3, página 35) se dão em comprimentos de onda baixos, sendo este um fator adicional que dificulta sua detecção apenas por DAD. Seus espectros são característicos de espécies químicas que não possuem bons grupos cromóforos.

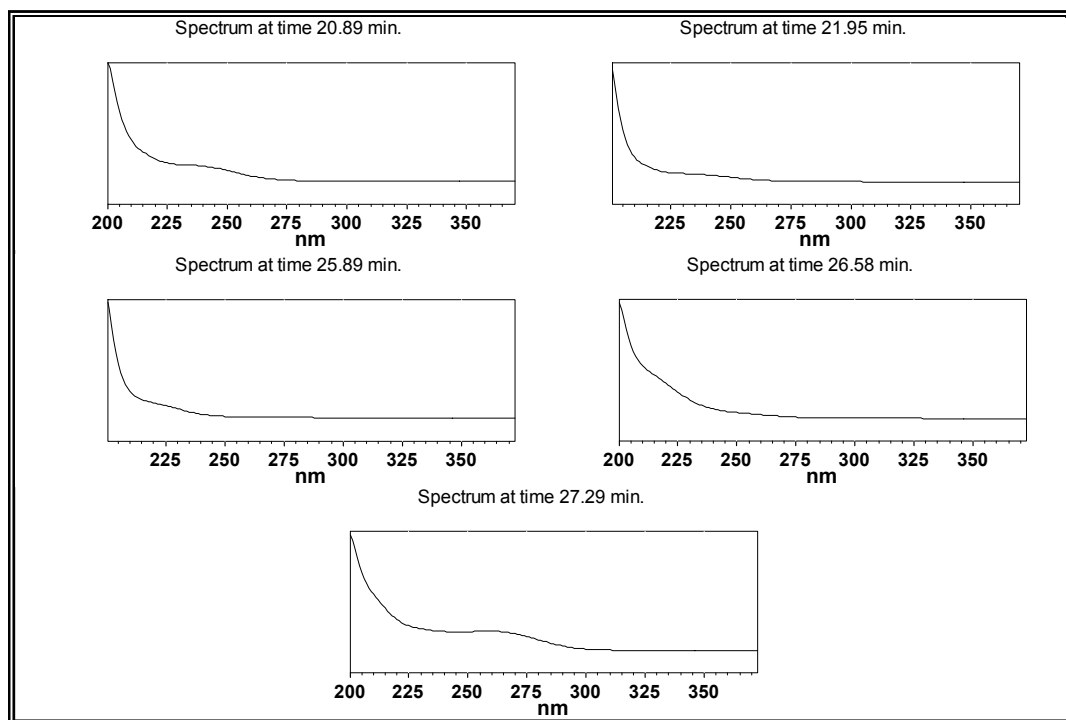


FIGURA 4.8 - Espectros de absorção no ultravioleta dos picos cromatográficos relativos aos padrões de meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, ilustrados na Figura 4.7B.

4.3 - Cultivo do fungo *P. brasilianum* em diferentes meios de cultura artificiais

4.3.1 - Análises por HPLC-DAD

Um total de 7 diferentes meios de cultura foram testados a fim de se verificar sua viabilidade para o crescimento das células fúngicas de *P. brasilianum*, como também estudar uma possível influência de cada meio na produção de diferentes metabólitos secundários, em especial, os meroterpenos.

No período das análises destes extratos fúngicos, o espectrômetro de massas estava com problemas, por isso os únicos resultados obtidos nesta etapa foram conseguidos através da detecção por DAD, procurando-se observar os tempos de retenção dos compostos presentes nas amostras, isto é, se existiam compostos que eluíam no intervalo dos padrões de meroterpenos segundo o método cromatográfico desenvolvido e aplicado, e também levando-se em conta os perfis de absorção dos mesmos.

Todas as amostras de extratos fúngicos produzidos em meios sólidos foram injetadas num volume de 5 μ L, e as amostras de extratos produzidos em meios líquidos foram injetadas num volume de 20 μ L, pois estas apresentaram picos cromatográficos pouco intensos, visualizáveis somente a maiores volumes.

4.3.1.1 - Meio de arroz

O primeiro meio de cultura testado foi arroz, sendo o preparo do meio, cultivo do fungo e extração dos metabólitos descrito na parte experimental. A Figura 4.9 mostra o cromatograma dos extratos de arroz e a região de eluição dos meroterpenos expandida. Pode-se notar a presença de diversos picos cromatográficos eluindo entre 15 e 35 minutos. A análise dos espectros de absorção dos picos presentes nesta região mostrou que, em sua grande maioria, eles possuem um perfil de absorção muito semelhante entre si, e compatível ao dos meroterpenos (Figura 4.8). As exceções são os espectros dos picos com tempos de eluição em 15,79; 22,38; 23,11; 29,87; 32,46 e 32,98 minutos (Figura 4.10), que são os mais intensos do cromatograma. Os outros picos cromatográficos são menos intensos e apresentam basicamente apenas um máximo de absorção, em torno de 200 nm. Esta absorção no ultravioleta é característica dos meroterpenos de interesse.

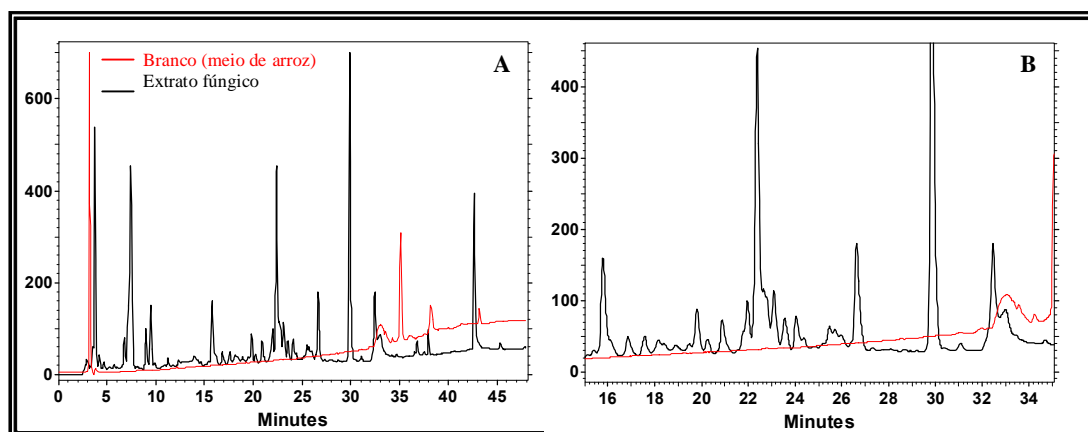


FIGURA 4.9 - Cromatograma do extrato fúngico de arroz. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

Os cromóforos existentes nos meroterpenos são, em sua grande maioria, grupos carbonila, sendo alguns deles conjugados com duplas ligações, como nos meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-10, PSP-12 e PSP-13. Estes meroterpenos não possuem, assim, grupos cromóforos capazes de absorver em altos comprimentos de onda.

Na Figura 4.9B, nota-se a presença de dois picos cromatográficos com tempos de retenção iguais aos dos padrões analisados previamente (20,89 e 21,95 minutos). Seus espectros de absorção são igualmente idênticos aos mostrados na Figura 4.8 (página 41). A presença destes compostos com tempos de retenção iguais e espectros de absorção semelhantes é um grande indício da presença destes meroterpenos no extrato de arroz. Porém, a existência de outros compostos com espectros de ultravioleta bastante semelhantes aos dos meroterpenos, mas com tempos de retenção ligeiramente diferentes, exige uma análise posterior de suas massas moleculares, assim como estudos de suas fragmentações por espectrometria de massas, para confirmação destes resultados.

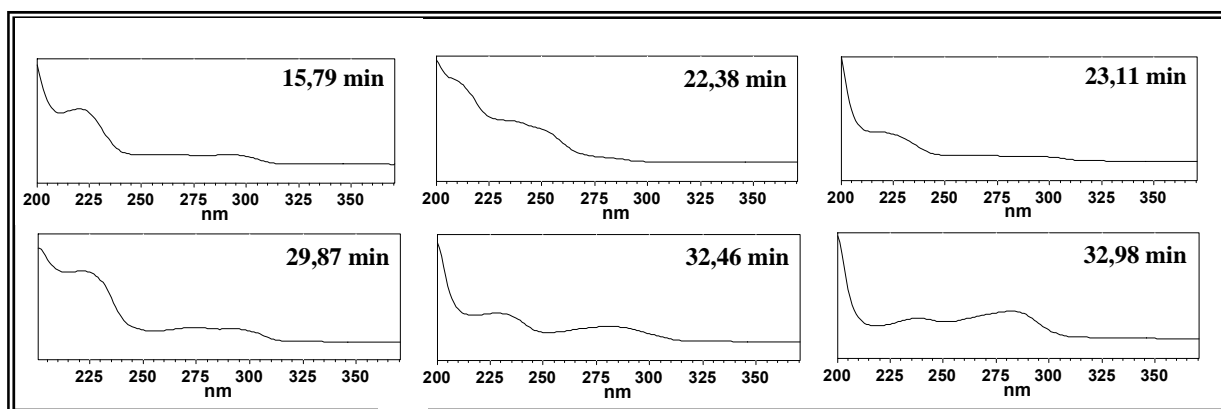


FIGURA 4.10 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos (na Figura 4.9B), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.

4.3.1.2 - Meio de trigo

O fungo *P. brasilianum* foi cultivado também em trigo, sendo o cromatograma do extrato produzido ilustrado na Figura 4.11.

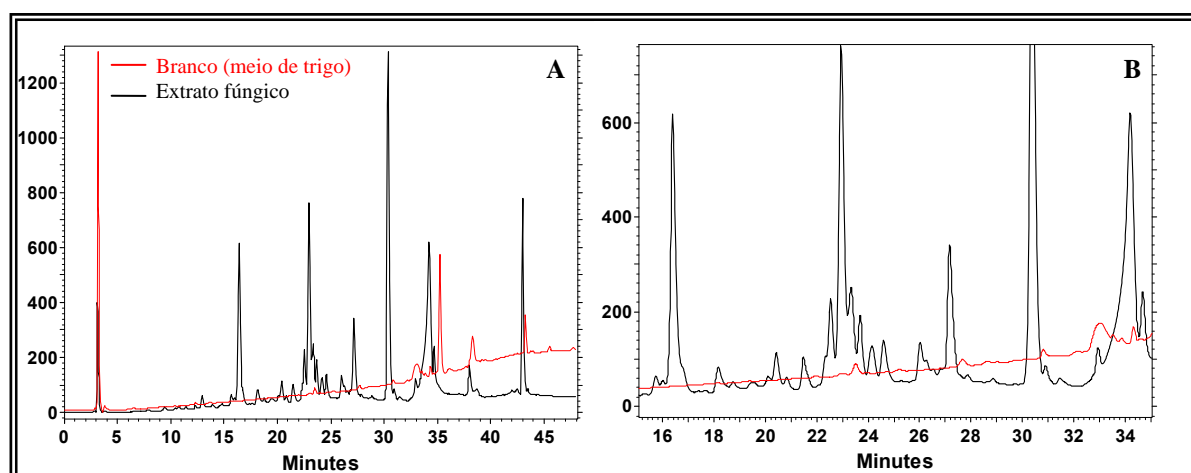


FIGURA 4.11 - Cromatograma do extrato fúngico de trigo. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

Observando a Figura 4.11, nota-se que no extrato fúngico de trigo ocorreu igualmente a produção de vários compostos que eluem entre 15 e 35 minutos no cromatograma. Os espectros de absorção de vários picos presentes nesta região são semelhantes aos dos meroterpenos. Entretanto, alguns picos, como os de tempo de retenção em 15,98; 16,38; 18,17; 22,92; 30,37; 32,94 e 34,19 minutos não possuem um perfil de absorção característico dos compostos em estudo (Figura 4.12), porém pode estar ocorrendo neles coeluição entre substâncias diferentes, distorcendo as bandas de absorção em questão. O espectro em 34,70 minutos é relativo ao padrão final utilizado como referência.

Desta vez, nenhum pico do extrato de trigo coincidiu em tempo de retenção exato aos dos padrões analisados. Mesmo assim, este fato não descarta a possibilidade de que os compostos padrões estejam presentes no mesmo, isto porque o padrão final antraceno também eluiu em um tempo de retenção menor (em torno de 0,45 minutos antes). Pequenas diferenças de temperatura da coluna ou mesmo variações de condicionamento da mesma podem acarretar num deslocamento dos picos cromatográficos. Por isso é importante sempre utilizar um padrão de referência.

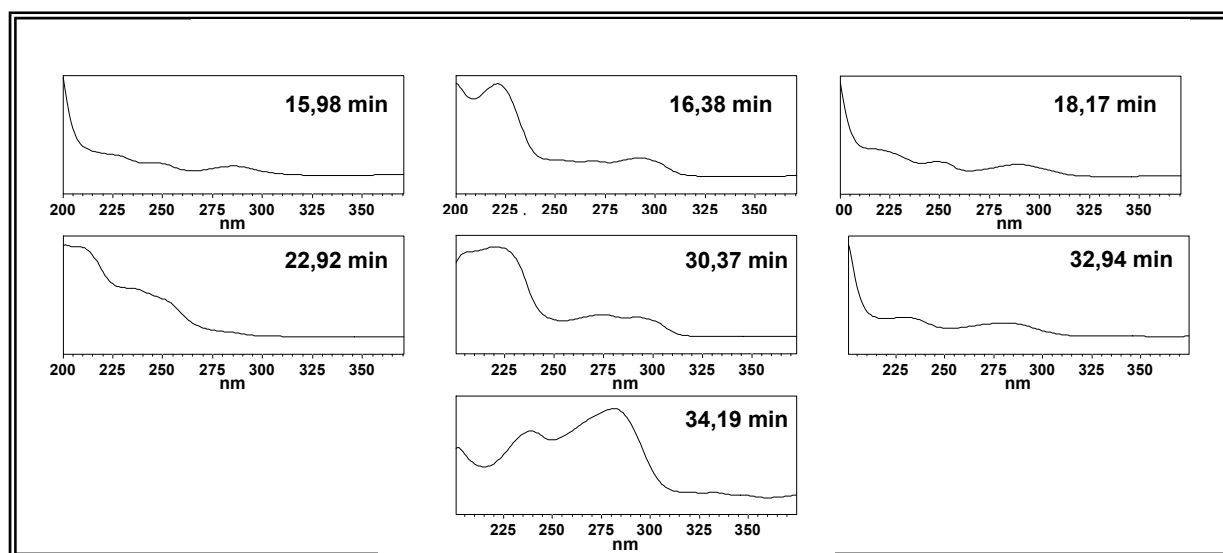


FIGURA 4.12 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos (na Figura 4.11B), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.

4.3.1.3 - Meio de milho

Outro meio de cultivo sólido, desta vez o milho, foi utilizado como teste para verificação do crescimento do fungo e sua produção de meroterpenos. O cromatograma do extrato produzido está ilustrado na Figura 4.13. Mais uma vez verifica-se a produção de compostos de média a baixa polaridade pelo fungo, desta vez em milho, como pode ser comprovado pelos cromatogramas da Figura 4.13 A e B. No intervalo de eluição de interesse (de 15 a 35 minutos) existem vários picos com espectros de ultravioleta idênticos aos dos meroterpenos de interesse, com máximos em 200 nm, e outros com espectros diferenciados, como pode ser verificado na Figura 4.14. De fato pode-se tratar de outras classes de compostos com estruturas ausentes de bons grupos cromóforos, porém isto só pode ser concluído através da técnica de espectrometria de massas.

Neste extrato observou-se a presença de um pico em 20,89 minutos que coincidiu com o tempo de retenção e espectro de absorção de um dos padrões analisados pelo mesmo método cromatográfico (Figura 4.8, página 41). Outro pico do extrato, em 21,71 minutos, pode ser relativo ao mesmo composto padrão com tempo de retenção 21,95 minutos, da análise da mistura de padrões em solvente anteriormente realizada. Este fato deverá ser confirmado, entretanto, por análises de LC-MS.

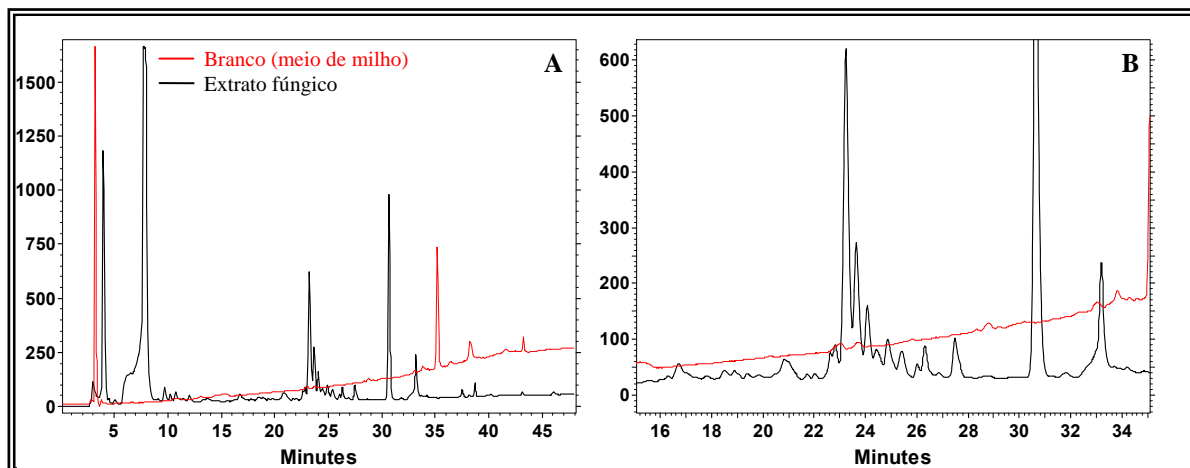


FIGURA 4.13 - Cromatograma do extrato fúngico de milho. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

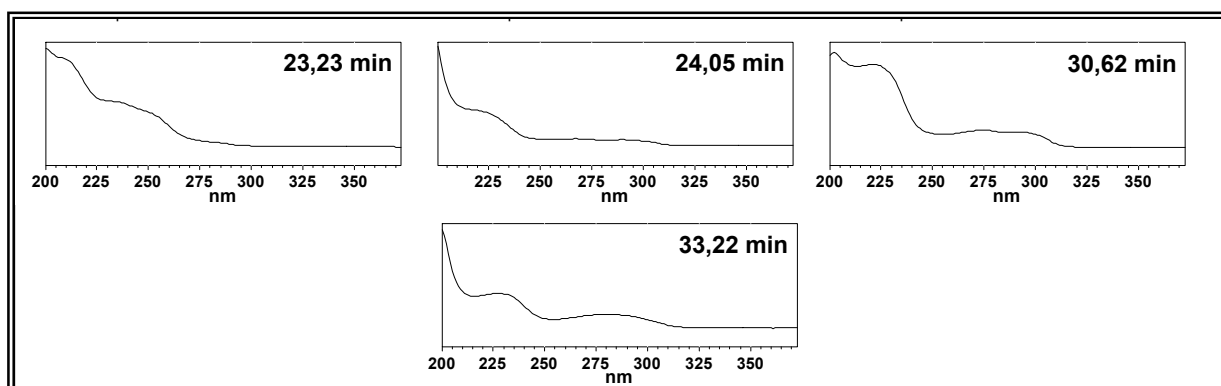


FIGURA 4.14 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos (na Figura 4.13B), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.

4.3.1.4 - Meios de caldo de arroz, filtrado do caldo de arroz e arroz cozido

O fungo *P. brasilianum* foi cultivado em dois meios de cultura produzidos através de arroz parboilizado: caldo de arroz, com e sem a adição de glicose, e filtrado do caldo de arroz, com e sem glicose. A função da glicose nestes experimentos foi de servir como uma fonte adicional de carbono para o consumo do fungo. Os modos de preparo, cultivo e extração destes experimentos foram anteriormente descritos nas seções 3.4 e 3.5.

A Figura 4.15 mostra os cromatogramas dos extratos fúngicos obtidos através de partições líquido-líquido dos meios aquosos de caldo de arroz com e sem glicose. Pelos cromatogramas observa-se que neste meio de cultura a produção de metabólitos secundários se deu em menor quantidade, se comparada com os meios sólidos estudados até então, tanto que nos cromatogramas A e D não expandidos

da Figura 4.15, não foi possível visualizar outros picos além dos relativos aos padrões inicial e final.

Cabe lembrar que, para as análises, todos os extratos de meio líquido testados foram injetados em quantidade quatro vezes maior do que os extratos de meio sólido e, mesmo assim, as intensidades dos picos cromatográficos relativos aos meios líquidos permaneceram muito baixas. Foi possível notar também que a presença de glicose no meio de cultura não causou nenhuma diferença aparente na produção de metabólitos secundários pelo fungo (nestas análises por HPLC-DAD), já que o número de picos e suas distribuições no cromatograma são idênticas, tanto no extrato de caldo de arroz com glicose (A, B e C) quanto no extrato sem glicose (D, E e F).

Todos os espectros de ultravioleta dos picos eluídos entre 15 e 35 minutos, nos extratos produzidos na presença e na ausência de glicose, se mostraram idênticos entre si, possuindo um único máximo de absorção em 200 nm. Entretanto, nota-se que estas substâncias possuem o mesmo perfil de absorção de alguns dos meroterpenos em estudo. Este é um indício de que ocorreu sua produção neste meio de cultivo, mesmo que em baixas quantidades.

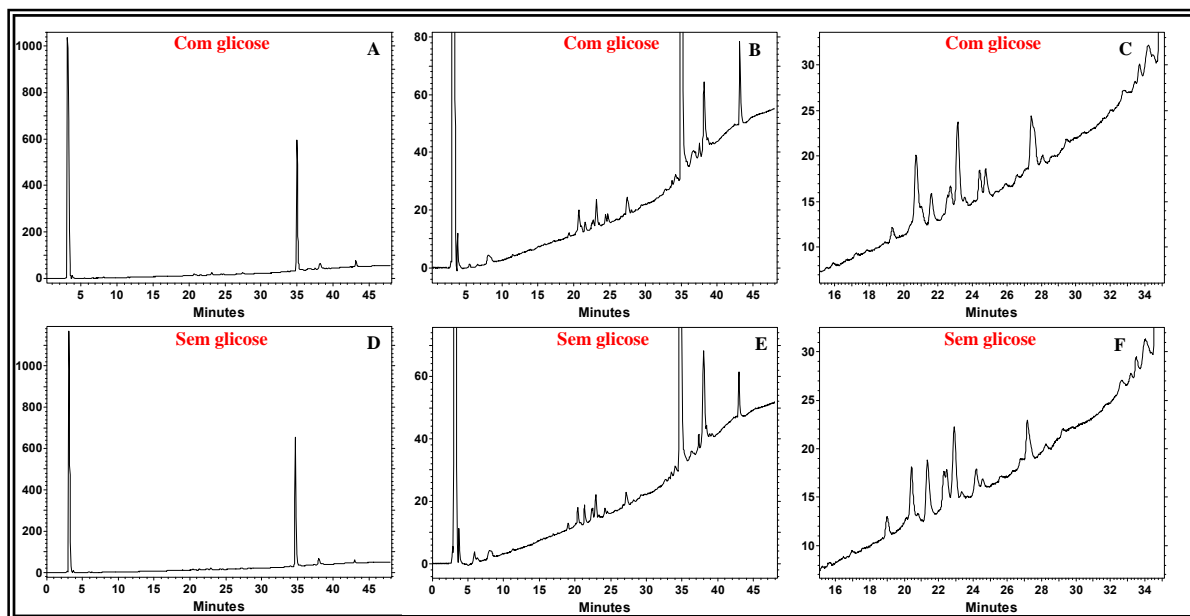


FIGURA 4.15 - Cromatogramas do extratos fúngicos em caldo de arroz (partição com acetato de etila). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.

Nos extratos miceliais produzidos em caldo arroz, com e sem glicose, houve também a detecção de metabólitos secundários, como pode ser visto pela Figura 4.16. Pelos cromatogramas ilustrados, nota-se que os metabólitos fúngicos detectados nos extratos miceliais estão também em baixas concentrações, dadas as baixas intensidades dos picos. Há uma pequena diferenciação em relação ao número de picos do cromatograma do micélio com glicose (Figura 4.16C) e sem glicose (Figura 4.16F).

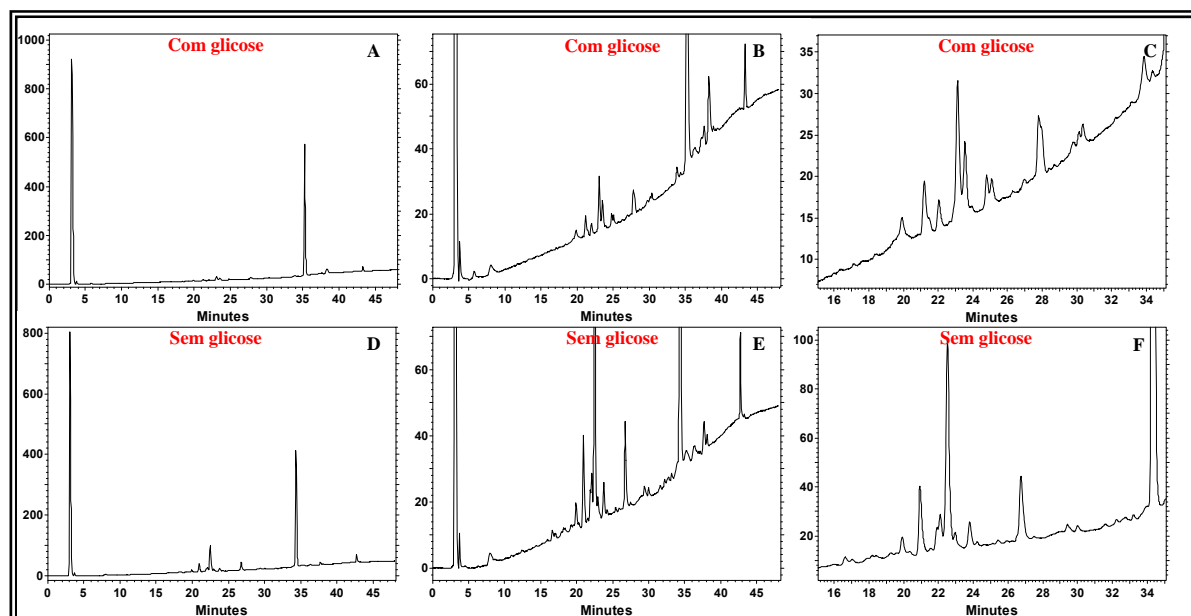


FIGURA 4.16 - Cromatogramas do extratos fúngicos em caldo de arroz (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.

Nestes extratos de caldo de arroz foi possível verificar também que os espectros de ultravioleta dos picos eluídos entre 15 e 35 minutos, tanto nos extratos produzidos na presença quanto na ausência de glicose, se mostraram idênticos entre si, possuindo um único máximo de absorção em 200 nm. Estas substâncias possuem o mesmo perfil de absorção de alguns dos meroterpenos em estudo.

O filtrado do caldo de arroz foi diluído em água destilada e utilizado também como meio de cultura artificial do fungo *P. brasilianum*. Os modos de preparo, cultivo e extração foram especificados nas seções 3.4 e 3.5. Neste experimento estudou-se também a influência da adição de glicose na produção de metabólitos pelo fungo. A Figura 4.17 a seguir ilustra os cromatogramas dos extratos obtidos a partir da partição deste meio líquido com acetato de etila.

Nota-se, através dos cromatogramas da Figura 4.17, que tanto no filtrado de arroz com glicose quanto no sem glicose os picos dos compostos são muito pouco intensos, mesmo com a injeção de 20 μ L de amostra. Mesmo que a absorção destes analitos sejam baixas no ultravioleta, o que pode ser comprovado pelos seus espectros de absorção, a quantidade dos mesmos nos extratos provavelmente é muito pouca também. No cromatograma expandido F, pode-se notar alguns picos diferenciados em relação ao cromatograma C, como os de tempo de retenção em 17,76; 18,19 e 30,54 minutos.

Os espectros de ultravioleta dos compostos eluídos na região dos meroterpenos para o filtrado de arroz com e sem glicose são muito parecidos entre si, e possuem um único máximo de absorção em 200 nm. Seus perfis de absorção também coincidem com os dos padrões de meroterpenos analisados, fortalecendo a hipótese de que estes analitos tenham sido produzidos neste meio artificial. Os

extratos miceliais do cultivo em filtrado de caldo de arroz também foram analisados, e seguem ilustrados na Figura 4.18.

Pelos resultados da Figura 4.18, observa-se que os extratos miceliais do fungo cultivado no filtrado de caldo de arroz possuem também uma baixa concentração de analitos, principalmente no meio de cultivo com glicose (Figura 4.18C). Provavelmente este meio, assim como os outros meios líquidos derivados do arroz estudados, não suprem as necessidades nutricionais para uma alta produção de metabólitos pela espécie fúngica, mesmo com a adição de glicose como fonte de carbono. Porém, o crescimento da massa micelial nestes meios artificiais ocorreu de forma satisfatória.

Os espectros de ultravioleta dos compostos eluídos na região dos meroterpenos, para os meios de filtrado de arroz (extrato micelial) com e sem glicose, mostraram também um perfil muito semelhante entre si, com máximos em 200 nm. A única exceção foi o espectro relativo ao composto eluído em 30,55 minutos, do extrato micelial sem glicose (Figura 4.18F), que apresentou também um máximo de absorção menos intenso em torno de 245 nm, e um outro máximo ainda menos intenso em 270 nm. Este espectro em questão não se parece com nenhum espectro dos meroterpenos de interesse, podendo-se tratar, portanto, de um composto diferenciado presente neste extrato.

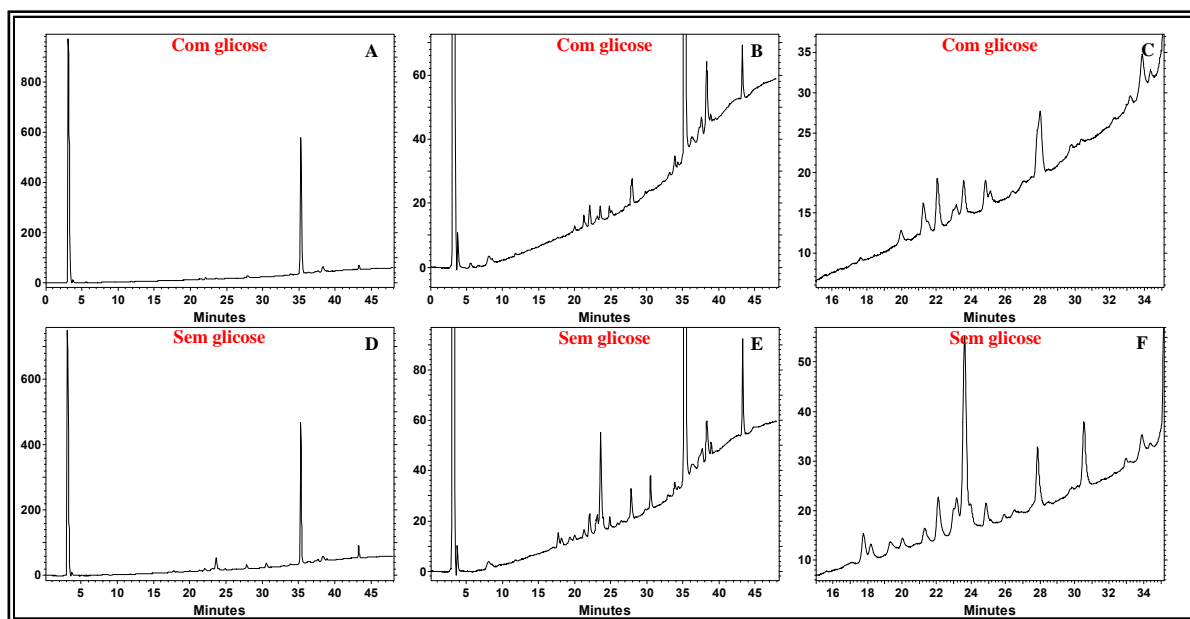


FIGURA 4.17 - Cromatogramas do extratos fúngicos em filtrado do caldo de arroz (partição com acetato de etila). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.

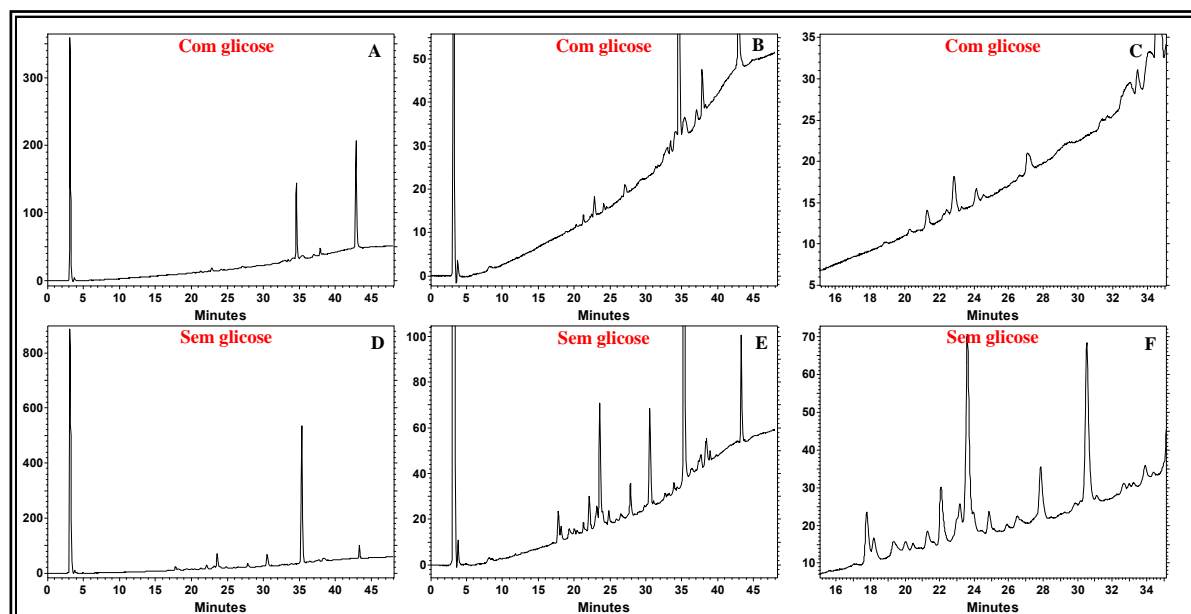


FIGURA 4.18 - Cromatogramas dos extratos fúngicos em filtrado do caldo de arroz (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (D): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (E): cromatogramas expandidos, (C) e (F): regiões de eluição dos meroterpenos expandidas.

O arroz cozido do qual se produziu o caldo de arroz foi também inoculado com o fungo, com o objetivo de se verificar se ainda existiam, nos grãos, nutrientes capazes de propiciar o crescimento fúngico e a produção de meroterpenos. O cromatograma do extrato fúngico em arroz cozido está mostrado na Figura 4.19 (C e D). Foi possível verificar a produção de vários metabólitos secundários por *P. brasilianum* neste meio de cultivo, mesmo após a extração do caldo de arroz a partir dos seus grãos. O perfil cromatográfico deste extrato fúngico se mostra praticamente idêntico ao do experimento realizado anteriormente, em arroz sem cozimento prévio, mostrado na Figura 4.9 (página 42). Os cromatogramas destes dois experimentos seguem ilustrados na Figura 4.19, de maneira comparativa.

Comparando os cromatogramas expandidos B e D da Figura 4.19, foi possível observar que existem poucas diferenças entre os dois no intervalo de 15 a 30 minutos. No extrato de arroz, por exemplo (cromatograma B), os picos em 16,84 e 17,56 minutos não aparecem na análise do extrato de arroz cozido, assim como o pico em 32,46 minutos. Estas diferenças podem ser devido à produção de diferentes metabólitos pelo fungo nos dois meios ou mesmo à diferença de compostos próprios da matriz. Não se pode deixar de lado o fato de esses diferentes estudos terem sido realizados em períodos diferentes, durante os quais podem ter ocorrido mudanças de temperatura, iluminação, diferenças de umidade no meio de cultura, entre outros fatores, que podem acarretar diferenciações no metabolismo fúngico.

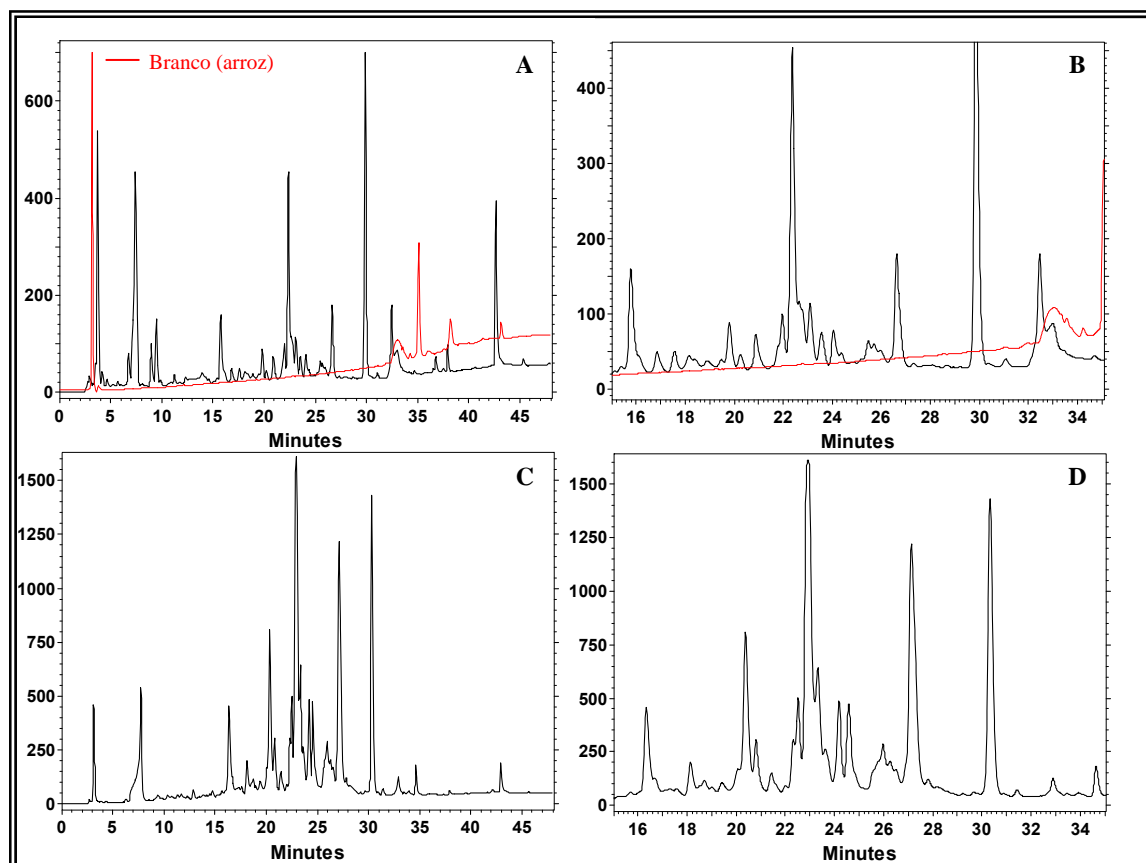


FIGURA 4.19 - Cromatogramas dos extratos fúngicos em arroz (A e B) e em arroz cozido (C e D). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) e (C): cromatogramas mostrando toda a análise, (B) e (D): região de eluição dos meroterpenos expandida.

No cromatograma do extrato de arroz cozido (Figura 4.19 C e D) os espectros relativos aos picos com tempos de retenção em 16,34; 18,14; 20,36; 22,91, 23,32; 24,17; 27,13 e 30,34 minutos (Figura 4.20) são muito diferentes dos espectros dos meroterpenos de estudo; todos os outros apresentam um perfil de absorção semelhante ao dos compostos de interesse, cujos máximos de absorção estão apresentados na Tabela 4.2 (página 36). Esta semelhança nas absorções dos vários compostos presentes no extrato torna as análises dos meroterpenos por ultravioleta menos confiável, visto que os picos podem ser referentes a outras classes de compostos, e não os meroterpenos. O espectro em 34,63 é relativo ao padrão final utilizado na análise.

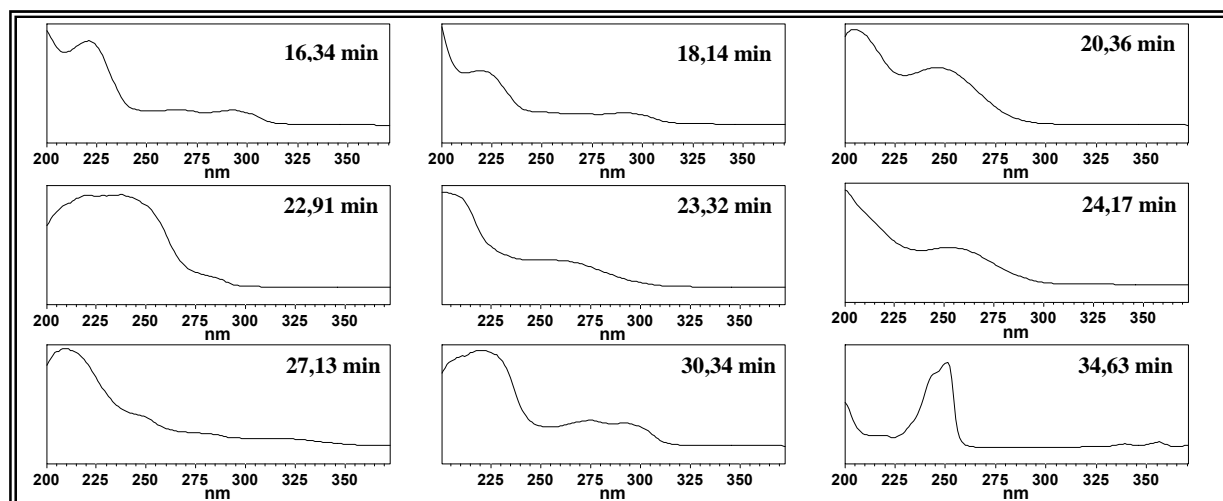


FIGURA 4.20 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos, ilustrados na Figura 4.19D (arroz cozido), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.

4.3.1.5 - Meio de leite de soja

O fungo *P. brasilianum* foi cultivado em leite de soja a fim de verificar a viabilidade do uso deste meio de cultura. O cromatograma do extrato produzido a partir da partição do meio líquido com acetato de etila está representado na Figura 4.21.

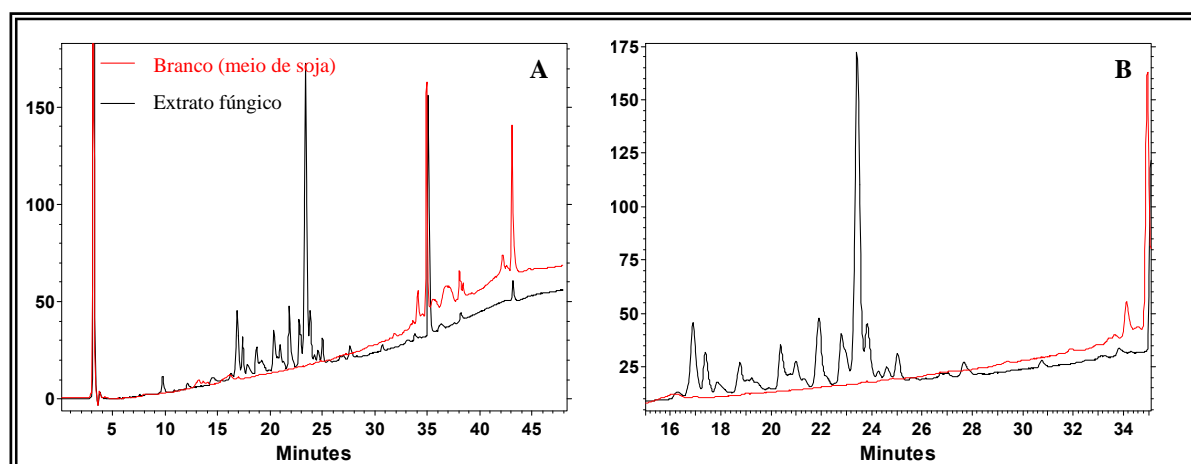


FIGURA 4.21 - Cromatograma do extrato fúngico em leite de soja (partição com acetato de etila). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

Pelo cromatograma mostrado na Figura 4.21, nota-se que houve a produção de vários metabólitos fúngicos neste meio de cultura, principalmente entre

15 e 35 minutos, como pode ser observado pela Figura 4.21B expandida. Todos os picos desta região apresentaram espectros de absorção com máximos em 200 nm, muito semelhantes aos meroterpenos. Porém, os seus tempos de retenção não foram exatamente coincidentes aos dos padrões previamente analisados (Figura 4.8, página 41). O leite de soja mostrou não possuir nenhum composto interferente na região de eluição dos meroterpenos, como pode ser visto pelo gráfico em vermelho. Este foi o meio líquido que garantiu melhores resultados para a produção de metabólitos secundários pela espécie fúngica, se comparado com os outros utilizados.

Porém, nos meios sólidos, os extratos obtidos mostraram ser mais complexos, pois os cromatogramas exibiram maior quantidade de picos, principalmente nos extratos de arroz e trigo. Os picos cromatográficos destes mostraram-se mais intensos, o que sugere uma maior quantidade dos compostos presentes nas amostras.

O extrato micelial deste experimento também foi analisado, e seu cromatograma segue ilustrado na Figura 4.22. Nele é possível observar vários picos relativos aos compostos produzidos pelo fungo neste meio líquido, e a maioria deles eluem entre 15 e 35 minutos, como pode ser visto pela Figura 4.22B. Seus espectros de absorção apresentam, na grande maioria, um único máximo em 200 nm. As exceções são os espectros dos picos com tempos de retenção 17,16; 17,64; 20,14 e 23,29 minutos (Figura 4.23).

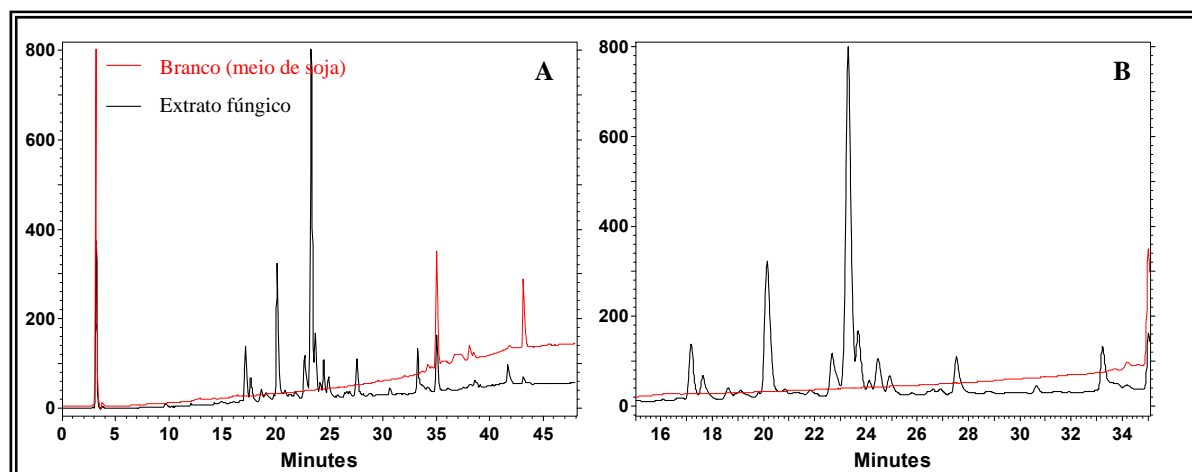


FIGURA 4.22 - Cromatograma do extrato fúngico em leite de soja (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

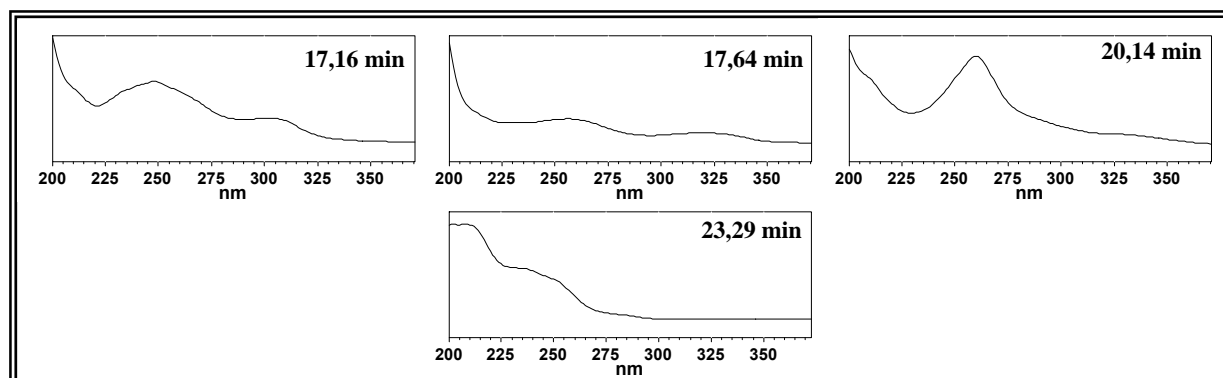


FIGURA 4.23 - Espectros de absorção no ultravioleta relativos aos picos eluídos entre 15 e 35 minutos, ilustrados na Figura 4.22B. (extrato de leite de soja – micélio), que apresentam padrões de absorção diferentes dos meroterpenos.

4.3.1.6 - Meio Czapeck

O último meio de cultura testado para o cultivo do fungo foi o meio líquido Czapeck. A vantagem do uso deste meio de cultura é que seus extratos geralmente não são muito complexos, o que facilita a visualização de alguma diferenciação que possa ocorrer no perfil metabólico do fungo. Este fato pode ser observado através do cromatograma apresentado na Figura 4.24 que se segue, do extrato produzido pela partição do meio com acetato de etila.

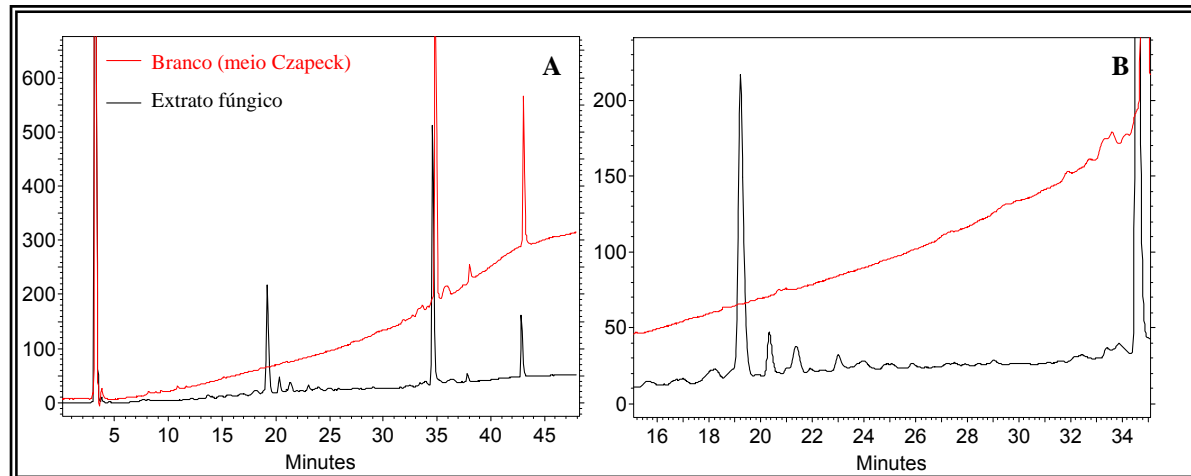


FIGURA 4.24 - Cromatograma do extrato fúngico em Czapeck (partição com acetato). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna-guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

O extrato fúngico de acetato de etila produzido em meio Czapeck apresenta picos com intensidades baixas, se comparado com os meios sólidos testados anteriormente. Seu perfil cromatográfico é menos complexo, conforme o esperado, como pode ser visto pelos cromatogramas apresentados na Figura 4.24.

O cromatograma B expandido permite verificar a presença de poucos compostos que eluem na região dos meroterpenos.

A maioria dos compostos deste extrato que eluem entre 15 e 35 minutos possui um perfil de absorção semelhante ao dos padrões de meroterpenos (Figura 4.8, página 41), com máximos em 200 nm. O pico em 19,22 minutos possui também um máximo de absorção em 220 nm. O composto eluído em 25,86 minutos possui um tempo de retenção coincidente com o de um padrão analisado anteriormente, que elui em 25,89 minutos. O extrato micelial também foi analisado por HPLC, sendo seu cromatograma ilustrado na Figura 4.25.

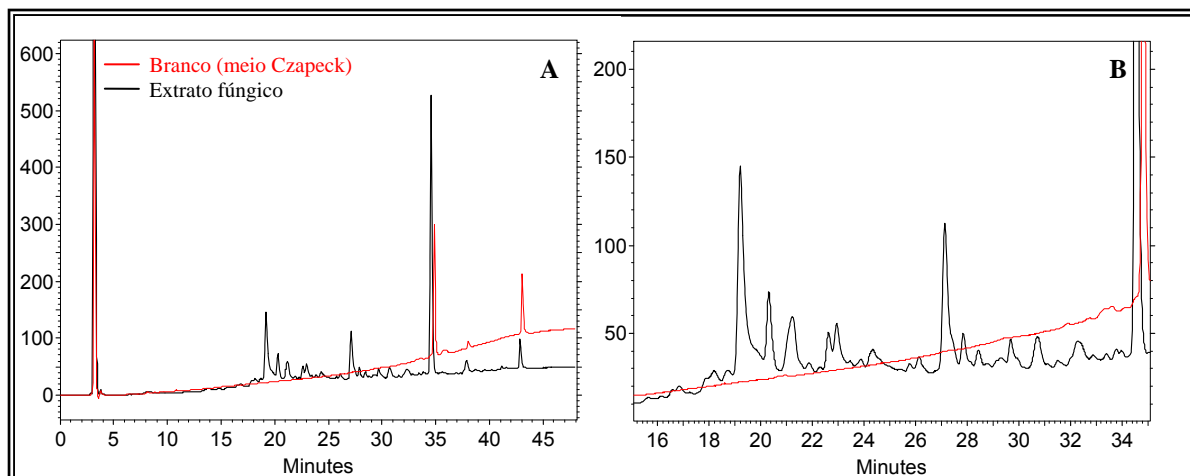


FIGURA 4.25 - Cromatograma do extrato fúngico em Czapeck (micélio). Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

O cromatograma do extrato micelial de Czapeck mostrou a presença de uma quantidade maior de diferentes analitos, se comparado com o extrato de acetato de etila, embora seus picos também sejam pouco intensos, como pode ser visto através da Figura 4.25. Vários compostos eluem na região dos meroterpenos, conforme apresentado na Figura 4.25B. Seus espectros de ultravioleta também se mostraram semelhantes aos dos meroterpenos, exceto o pico em 27,15 minutos, que apresentou dois máximos adicionais em 235 e 330 nm. Porém, nenhum deles coincidiu em tempo de retenção com os padrões analisados previamente (Figura 4.8, página 41).

4.3.2 - Análises por HPLC-ESI-MS

4.3.2.1 - Análises dos padrões de meroterpenos

Nas primeiras análises de LC-MS, utilizou-se o modo de ionização por ESI, pois, na época destas análises, o “probe” de APCI não estava disponível para uso. Apesar de os meroterpenos em estudo serem ionizáveis tanto no modo positivo quanto no modo negativo, optou-se pelo modo positivo visto que, em geral, este modo de ionização garante uma maior sensibilidade das análises, enquanto que o

modo negativo traz uma maior informação estrutural das moléculas. A fase estacionária e o método cromatográfico utilizados foram os mesmos das análises por LC-DAD: coluna de ODS acoplada a uma coluna-guarda de ODS e o método 4, descrito na seção 3.9.1.

Inicialmente realizou-se a análise de uma mistura conhecida de padrões de meroterpenos, a fim de se conhecer o tempo de retenção preciso de cada um. A mistura utilizada nesta análise continha os meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, cujas estruturas moleculares foram mostradas anteriormente na Figura 4.3 (página 35).

As Figuras 4.26 e 4.27 mostram os cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6 e PSP-8, PSP-9, PSP-13, os cromatogramas de íons selecionados de seus adutos de sódio e os espectros de massas de cada padrão analisado.

Os cromatogramas de íons-selecionados B, D e F da Figura 4.26 mostram que os adutos de sódio dos padrões analisados foram úteis para a confirmação dos tempos de retenção reais dos mesmos, visto que, nos cromatogramas de íons selecionados A, C e E, relativos às moléculas de meroterpenos protonadas, não aparece apenas um único pico, mas outros provavelmente devido a impurezas presentes na mistura de padrões. A coincidência entre os tempos de retenção dos picos presentes nos cromatogramas dos adutos de sódio com um dos picos presentes em cada cromatograma das moléculas protonadas dá uma certeza maior em relação ao tempo de retenção real dos padrões analisados.

Nos cromatogramas C e D da Figura 4.26, os picos referentes a m/z 459 com t_r 28,14 minutos ($[PSP4 + H]^+$) em C, e m/z 481 com t_r 27,37 minutos ($[PSP4 + Na]^+$) em D não coincidem quanto ao tempo de retenção. Porém, o espectro de massas do pico cromatográfico com t_r 27,37 minutos (Figura 4.26D) mostrou um pico bastante intenso de m/z 481, como pode ser visto no espectro PSP-4 da Figura 4.26. Este fato fortalece a hipótese de que o merotepeno PSP-4 tenha sido detectado na forma de aduto de sódio, e não como molécula protonada, sendo este aduto bastante estável devido à intensidade do pico de m/z 481, do espectro de massas PSP-4. Portanto, provavelmente a espécie detectada no t_r 28,14 minutos (cromatograma C) não se trata do meroterpeno PSP-4 protonado.

O espectro de massas de PSP-3 também apresenta um pico muito intenso referente ao seu aduto de sódio (m/z 579). O espectro de massas PSP-6 apresenta, além dos picos $[M+H]^+$ m/z 499 e $[M+Na]^+$ m/z 521, um pico de m/z 553,4 de maior intensidade, que provavelmente é devido à detecção da espécie $[M+MeOH+Na]^+$.

Os adutos de sódio também foram úteis para confirmação dos tempos de retenção dos meroterpenos PSP-8, PSP-9 e PSP-13, cujos cromatogramas de íons-selecionados e espectros de massas estão apresentados na Figura 4.27. Porém, analisando os cromatogramas E ($[PSP13 + H]^+$ m/z 415) e F ($[PSP13 + Na]^+$ m/z 437), observa-se que o pico em E não coincidiu em tempo de retenção com nenhum dos picos presentes em F. Somente com a análise de cada espectro de massas foi possível deduzir que o tempo de retenção do meroterpeno PSP-13 é 28,16 minutos, detectado como um aduto de sódio. Seu espectro de massas mostra a presença de um aduto ainda mais estável: $[PSP13 + MeOH + Na]^+$ m/z 469.

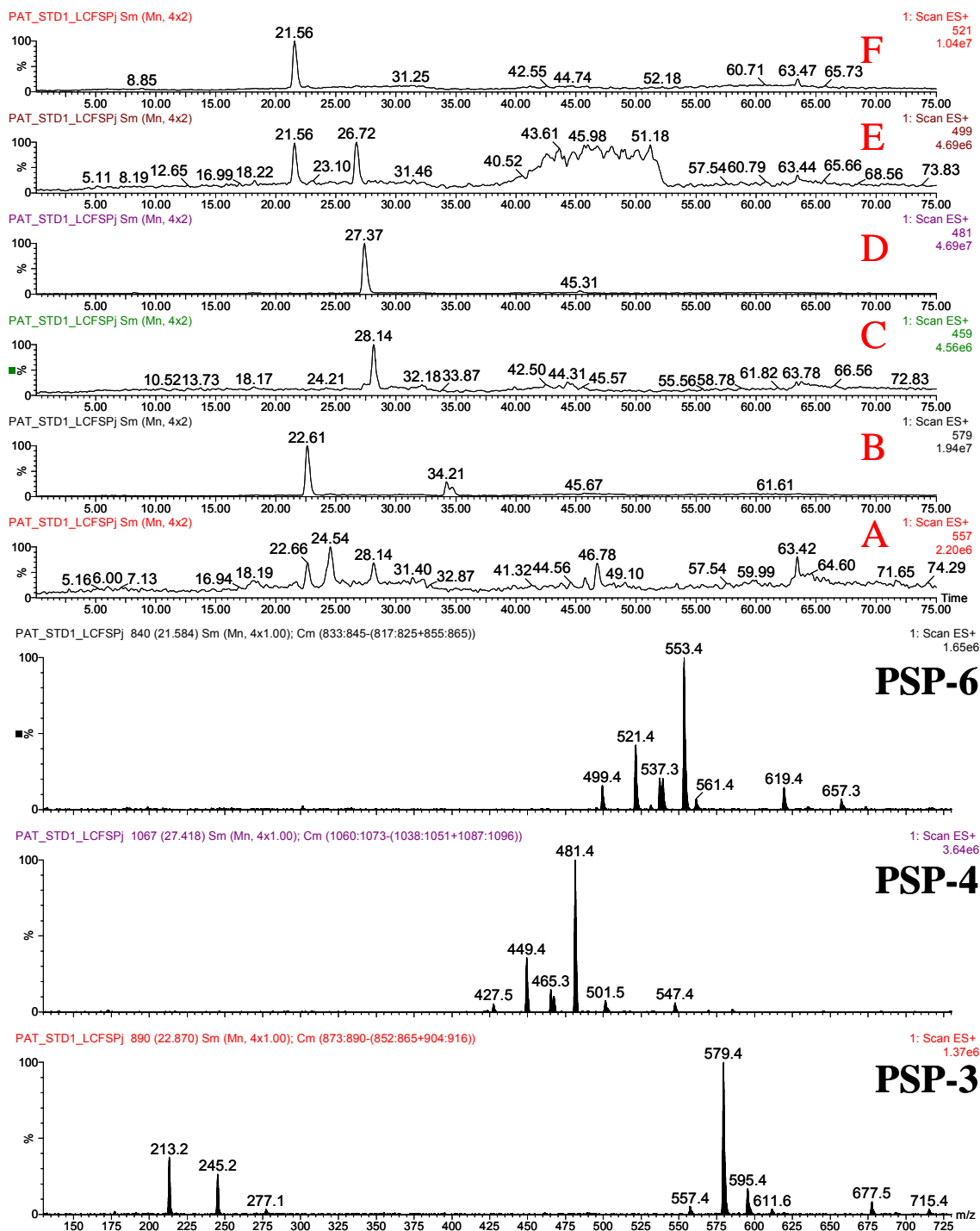


FIGURA 4.26 - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-3 (A), PSP-4 (C) e PSP-6 (E) e de seus respectivos adutos de sódio (B, D e F). Abaixo, os espectros de massas dos meroterpenos PSP-3, PSP-4 e PSP-6.

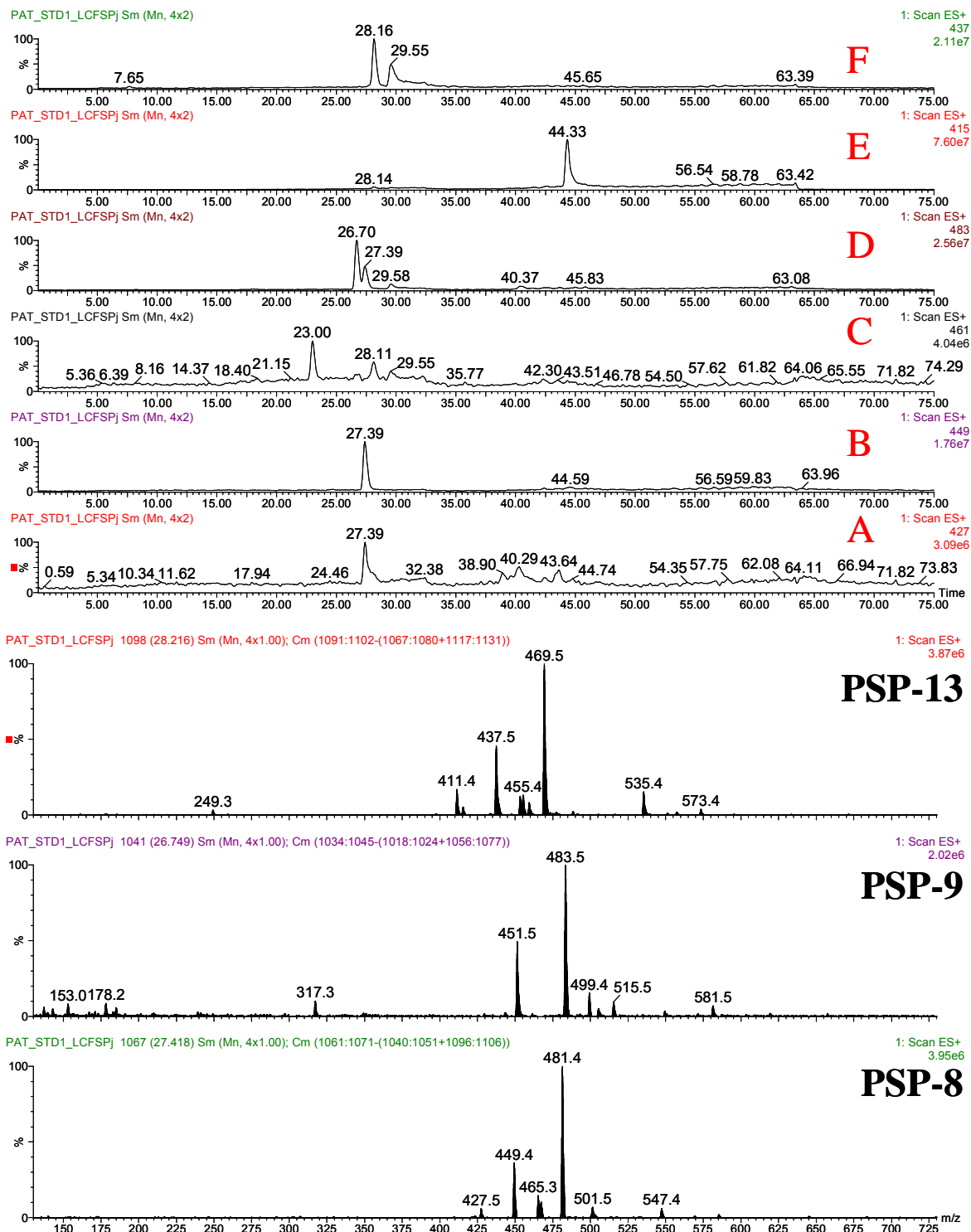


FIGURA 4.27 - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-8 (A), PSP-9 (C) e PSP-13 (E) e de seus respectivos adutos de sódio (B, D e F). Abaixo, os espectros de massas dos meroterpenos PSP-8, PSP-9 e PSP-13.

Observando cuidadosamente os espectros de massas de PSP-4, na Figura 4.26, e o espectro de PSP-8 na Figura 4.27, nota-se que os dois são idênticos, e apresentam picos relativos às espécies $[PSP4 + Na]^+$ m/z 481, $[PSP8 + H]^+$ m/z 427 e $[PSP8 + Na]^+$ m/z 449. Este fato indica que os meroterpenos PSP-4 e PSP-8 coeluem num mesmo pico cromatográfico. A análise desta mistura de

padrões por LC-DAD fortalece a hipótese pois, conforme visto na Figura 4.7 (página 40), existem apenas 5 picos cromatográficos na análise dos 6 meroterpenos.

A Tabela 4.3 a seguir apresenta os tempos de retenção de cada meroterpeno analisado via LC-DAD (equipamento de HPLC Shimadzu) e LC-ESI-MS (equipamento de HPLC Waters), a partir da mistura dos padrões analisada. A injeção de cada padrão individualmente não foi realizada porque não havia massa disponível de cada um dos meroterpenos puro.

TABELA 4.3 - Tempos de retenção (HPLC-DAD e HPLC-ESI-MS) dos meroterpenos*.

Meroterpenos	PM	t _R LC-DAD (min)	t _R LC-MS (min)	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
PSP-3	556	21,95	22,6	557	579
PSP-4	458	26,58	27,37	459	481
PSP-6	498	20,89	21,56	499	521
PSP-8	426	26,58	27,39	427	449
PSP-9	460	25,89	26,70	461	483
PSP-13	414	27,29	28,16	415	437

*Análises realizadas aplicando-se o método 4, utilizando como fase estacionária uma coluna Luna 5 μ C-18(2) acoplada a uma coluna guarda de ODS.

Pode ser observado, pelos dados da Tabela 4.3, que os tempos de retenção dos meroterpenos obtidos pela análise de HPLC-DAD são diferentes em relação aos mesmos obtidos pela análise de HPLC-ESI-MS. Isto se deve ao fato de que os equipamentos de HPLC utilizados não foram os mesmos, ocasionando por isso a diferenciação observada dos tempos de eluição dos picos.

Sabendo-se os tempos de retenção dos padrões, o próximo passo foi encontrar nos extratos fúngicos substâncias com tempos de retenção e massas iguais às fornecidas pela Tabela 4.3.

4.3.2.2 - Análises do extrato de arroz

A Figura 4.28 apresenta os cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, e os espectros de massas dos picos com tempos de retenção coincidentes aos da Tabela 4.3.

Observando os cromatogramas de íons selecionados da Figura 4.28, pode-se notar a presença de um pico em 22,61 minutos, relativo a uma espécie com m/z 579. Estes dados coincidem exatamente com os relativos ao aduto de sódio do meroterpeno PSP-3, como pode ser comprovado pelos resultados apresentados na Tabela 4.3. Este é um forte indício de que o meroterpeno PSP-3 realmente esteja presente neste extrato fúngico. As análises por HPLC-DAD mostradas na seção 4.3.1.1 já indicaram uma provável existência deste meroterpeno na amostra, devido à presença de um pico com t_r 21,95 minutos e espectro de ultravioleta com máximo em 200 nm (página 42). Além deste pico, foram detectados também outros dois, ambos de m/z 445. Esta massa é referente aos meroterpenos PSP-1, PSP-2 e PSP-11 produzidos por *P. brasilianum*. Estes padrões não foram analisados a fim de se conhecer seus tempos de retenção. Porém, devido à grande intensidade de seus picos no cromatograma de íons selecionados, e à coincidência de seus tempos de retenção também em outros extratos, como poderá ser visto mais à frente, acredita-se que alguns destes meroterpenos (ou até mesmo os três) possam realmente estar

presentes nas amostras. No entanto, com apenas estes resultados não se pode afirmar que eles existam nos extratos fúngicos.

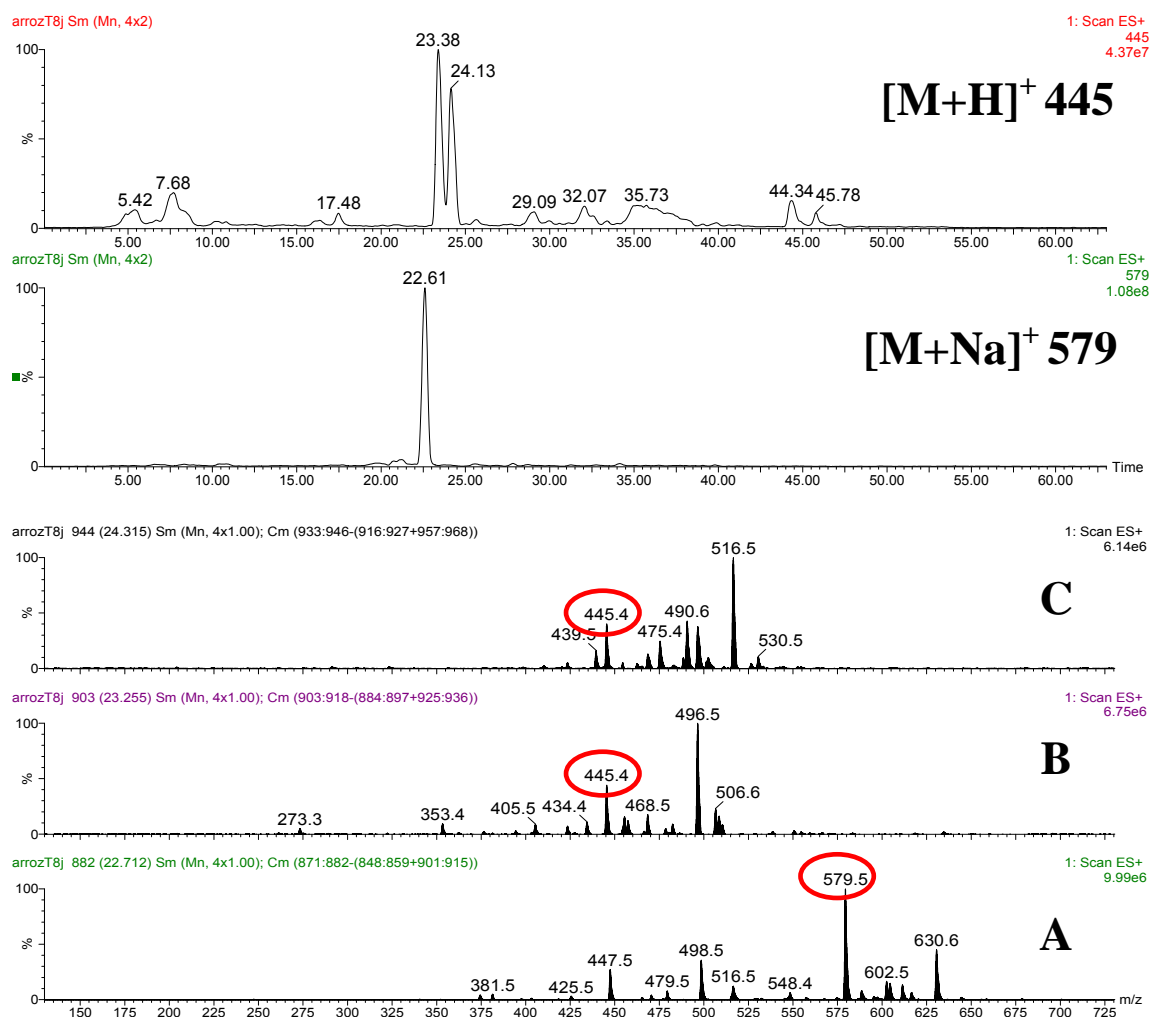


FIGURA 4.28 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de arroz. (A): espectro de massas de $[M+Na]^+$ m/z 579 com t_r 22,61 minutos. (B): espectro de massas de $[M+H]^+$ m/z 445 com t_r 23,38 minutos e (C): espectro de massas de $[M+H]^+$ m/z 445 com t_r 24,13 minutos. Ionização por ESI⁺.

A Figura 4.29 apresenta os cromatogramas de íons selecionados do branco do arroz, indicando a ausência de picos referentes às espécies detectadas no extrato com os mesmos tempos de retenção. Desta forma, descarta-se a possibilidade de que as espécies detectadas no extrato fúngico de arroz sejam do próprio meio de cultivo, pois elas estão ausentes nos cromatogramas de íons selecionados do extrato branco.

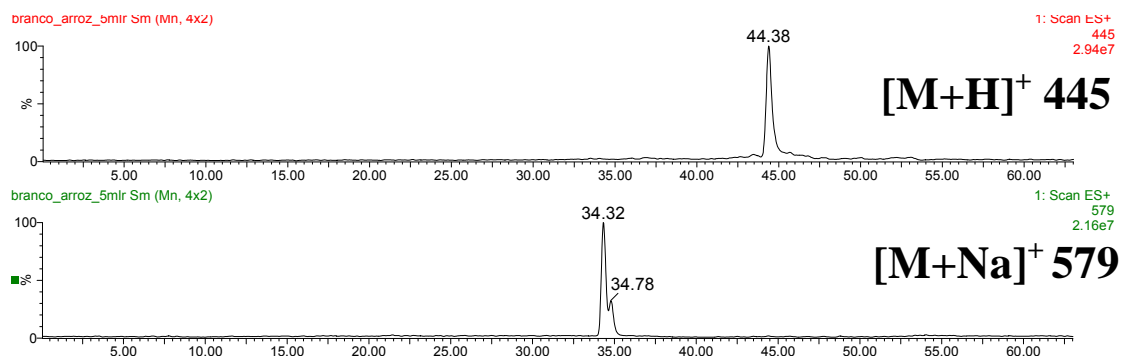


FIGURA 4.29 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z 445 e m/z 579, no branco de arroz. Ionização por ESI⁺.

4.3.2.3 - Análises do extrato de trigo

A Figura 4.30 mostra os cromatogramas de íons selecionados de alguns íons relativos a meroterpenos ou seus adutos de sódio, e os espectros de massas dos picos com tempos de retenção coincidentes aos da Tabela 4.3 (página 58), detectados no extrato fúngico de trigo.

Observa-se, no primeiro cromatograma de íons selecionados da Figura 4.30, a presença de dois picos referentes a m/z 445 que eluem na região dos meroterpenos. Seus tempos de retenção coincidem com os das mesmas espécies detectadas no extrato de arroz, como pode ser visto pela Figura 4.28. Além destes íons, outros com valores de m/z de interesse foram detectados: 437, que coincide com a massa do aduto de sódio de PSP-13 e seu tempo de retenção (28,18 minutos), 459 (t_r 27,41 minutos) e 481 (t_r 27,46 minutos), que podem estar relacionados ao PSP-4, 557 e 579 (ambos com t_r 22,57 minutos), que eluem com tempo de retenção semelhante ao do PSP-3, 427 (t_r 27,43 minutos) e 449 (t_r 27,38 minutos), podendo-se tratar do PSP-8, e os íons 499 e 521 (ambos com t_r 21,49 minutos), que são um indício da presença do PSP-6 neste extrato.

Os espectros de massas dos picos cromatográficos de interesse, apresentados na Figura 4.30, mostram que, com exceção dos espectros relativos a m/z 445 (E e F), todos os outros apresentam os picos dos supostos adutos dos meroterpenos como os mais intensos do espectro. Em D, pode-se ver o pico do provável aduto de sódio do PSP-13, de m/z 437 e também um pico referente a $[M+Na+MeOH]^+$ m/z 469 de maior intensidade, circulado em azul. Pelo espectro C, a hipótese de que os meroterpenos PSP-4 e PSP-8 estejam coeluinto fica reforçada, pela presença dos íons de m/z 427, 449 e 481 no mesmo espectro de massas. Em B, pode-se notar a presença de $[M+H]^+$ m/z 557 muito pouco intenso e seu aduto de sódio $[M+Na]^+$ m/z 579, referentes ao PSP-3. Finalmente em A, observa-se os picos de $[M+H]^+$ m/z 499, de $[M+Na]^+$ m/z 521 e de $[M+Na+MeOH]^+$ m/z 553, circulado em azul, supostamente devido à presença do meroterpeno PSP-6.

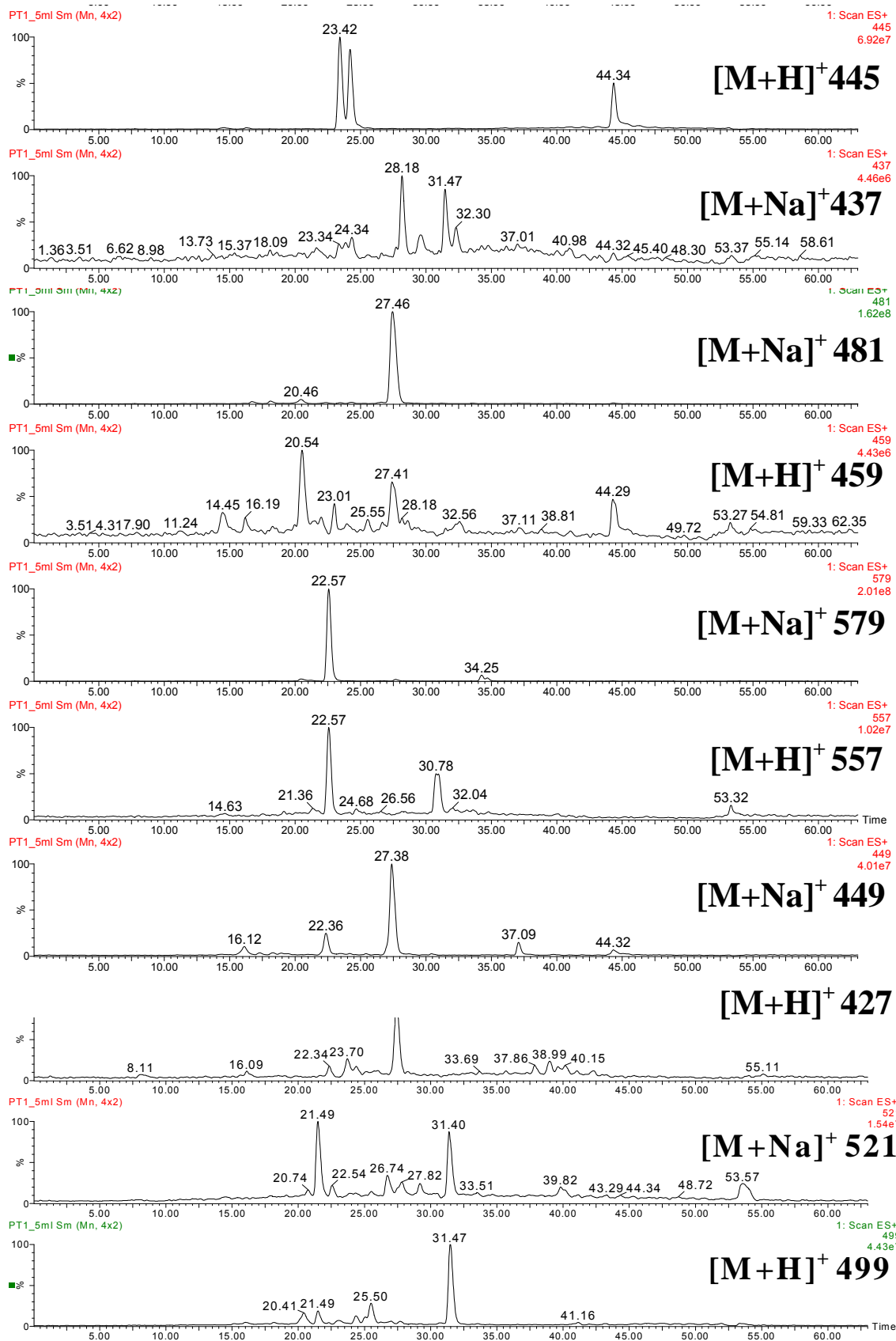


FIGURA 4.30 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de trigo. (A) a (F): espectros de massas das espécies de interesse detectadas nos cromatogramas. Ionização por ESI⁺.

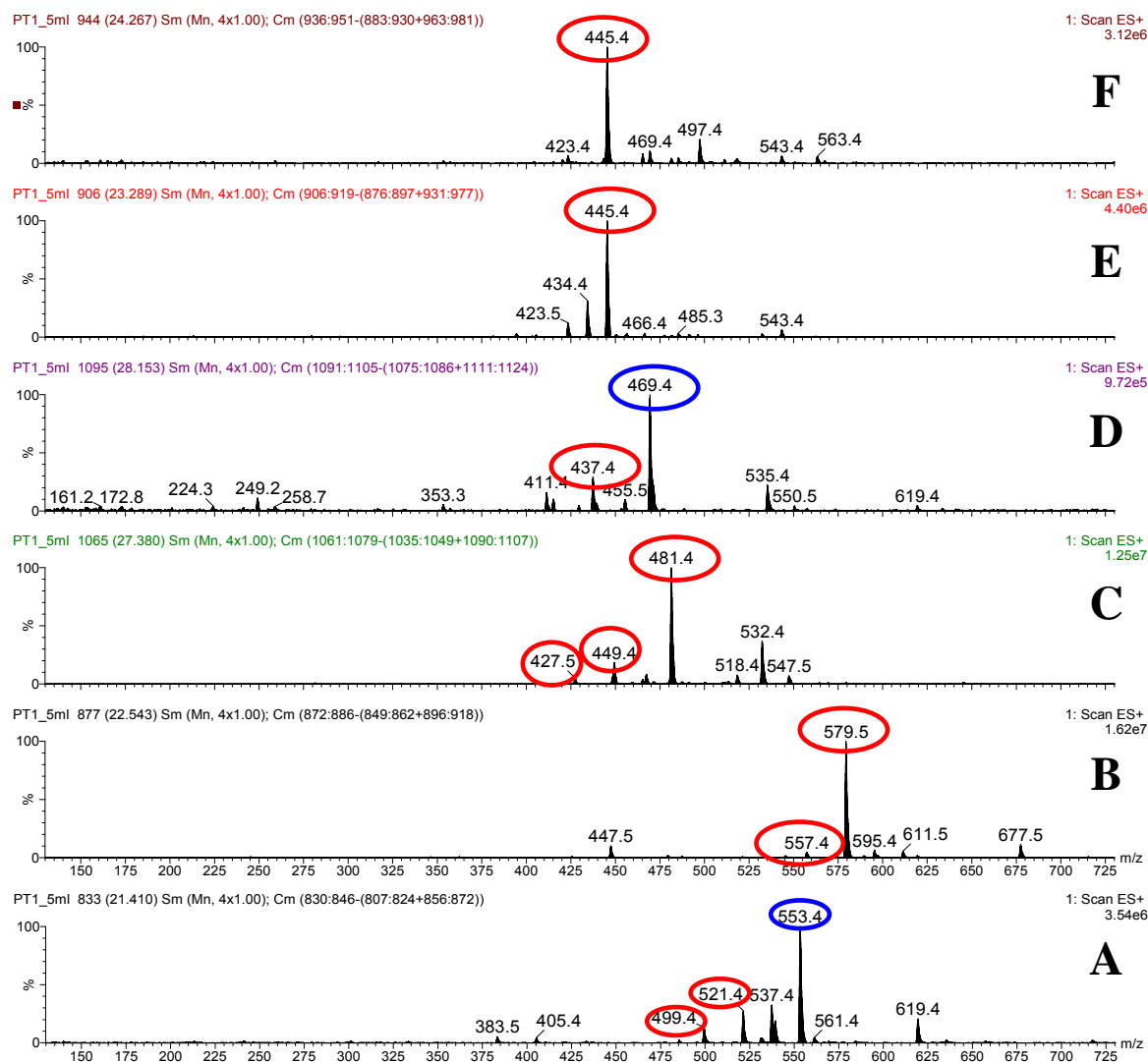


FIGURA 4.30 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de trigo. (A) a (F): espectros de massas das espécies de interesse detectadas nos cromatogramas. Ionização por ESI⁺.

A Figura 4.31 ilustra os cromatogramas de íons selecionados do branco do trigo. Nota-se que nestes cromatogramas não existe nenhum pico referente a íons com valores de m/z citados na Tabela 4.3 (página 58) com tempos de retenção coincidentes. Desta forma, é possível afirmar que as espécies de interesse detectadas no extrato fúngico de trigo não existem devido a substâncias características do meio de cultura, mas são de fato metabólitos produzidos pelo fungo.

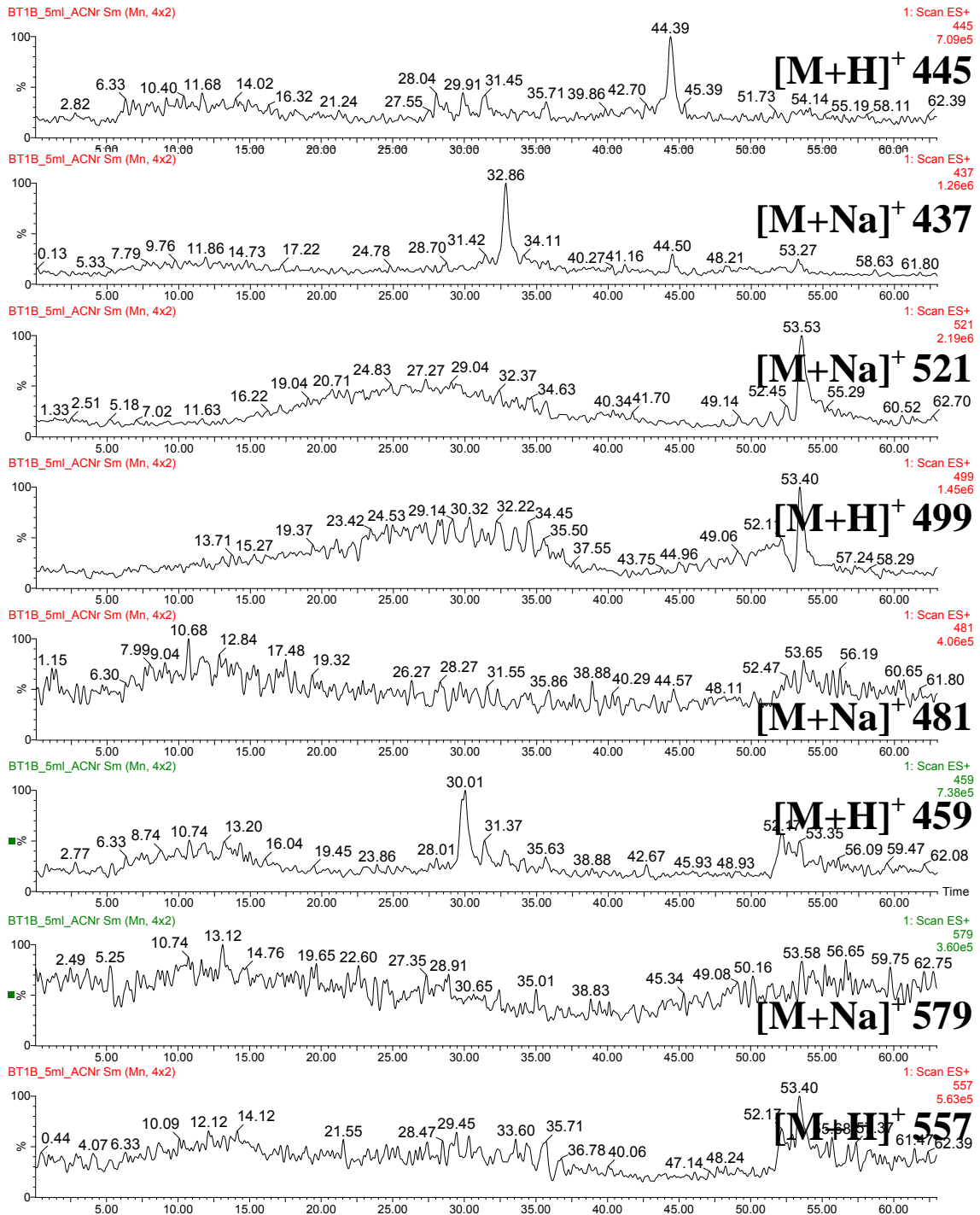


FIGURA 4.31 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de trigo. Ionização por ESI⁺.

4.3.2.4 - Análises do extrato de milho

O extrato fúngico de milho foi analisado via LC-ESI-MS e seus cromatogramas de íons selecionados, assim como os espectros de massa dos picos com tempos de retenção iguais aos dos meroterpenos estão ilustrados na Figura 4.32.

Pelos cromatogramas de íons selecionados da Figura 4.32 e os espectros de massas (A) a (D), observa-se que alguns íons citados na Tabela 4.3 (página 58) estão presentes no extrato de milho, com tempos de retenção iguais. O íon de m/z 579 (espectro A), detectado em 22,62 minutos, pode indicar a presença do meroterpeno PSP-3 na amostra, e os íons de m/z 481 e 449 (espectro B), indicam a presença de PSP-4 e PSP-8, respectivamente, ambos coeluído em torno de 27,4 minutos. As análises anteriores do extrato de milho por HPLC-DAD já mostraram um pico cromatográfico com mesmo espectro de absorção e tempo de retenção do PSP-3 (t_r 21,71 minutos), o que fortalece a hipótese de este composto ter sido produzido pelo fungo neste meio de cultura (seção 4.3.1.3, página 44). Os espectros C e D mostram a existência de espécies com m/z 445 que eluem entre 23 e 25 minutos no cromatograma. Como já foi enfatizado anteriormente, não se pode afirmar que estas espécies estão relacionadas aos meroterpenos PSP-1, PSP-2 ou PSP-11, mas esta seria apenas uma hipótese.

O branco do milho (meio de cultivo não inoculado com o fungo) foi também analisado, e os cromatogramas de íons selecionados estão ilustrados na Figura 4.33. Observa-se que nenhuma das espécies de interesse detectadas na Figura 4.32, do extrato fúngico de milho, estão presentes nos cromatogramas do branco. Portanto, pode-se afirmar que estes analitos são substâncias realmente produzidas pelo fungo.

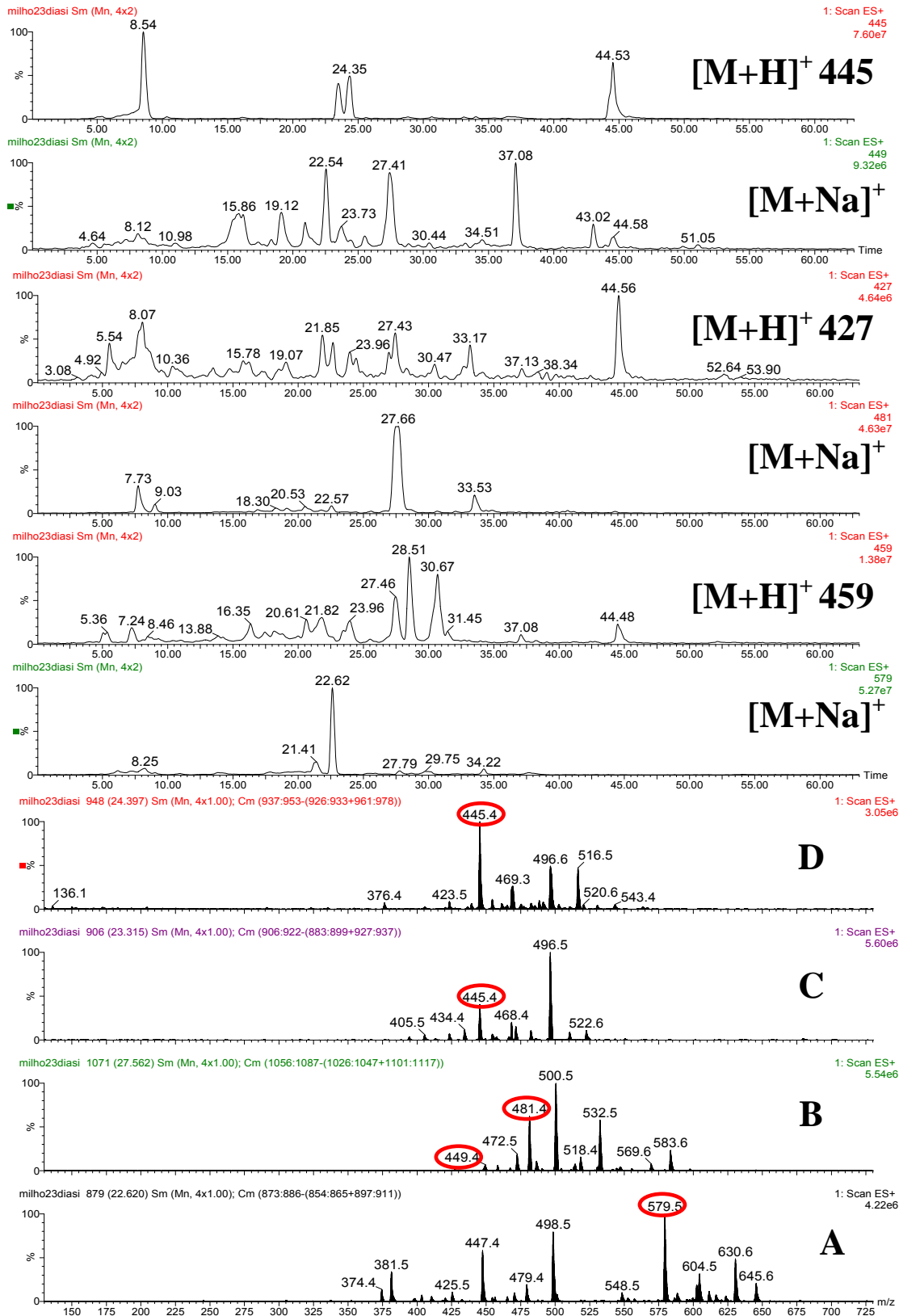


FIGURA 4.32 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de milho. (A) a (D): espectros de massas das espécies de interesse detectadas nos cromatogramas. Ionização por ESI⁺.

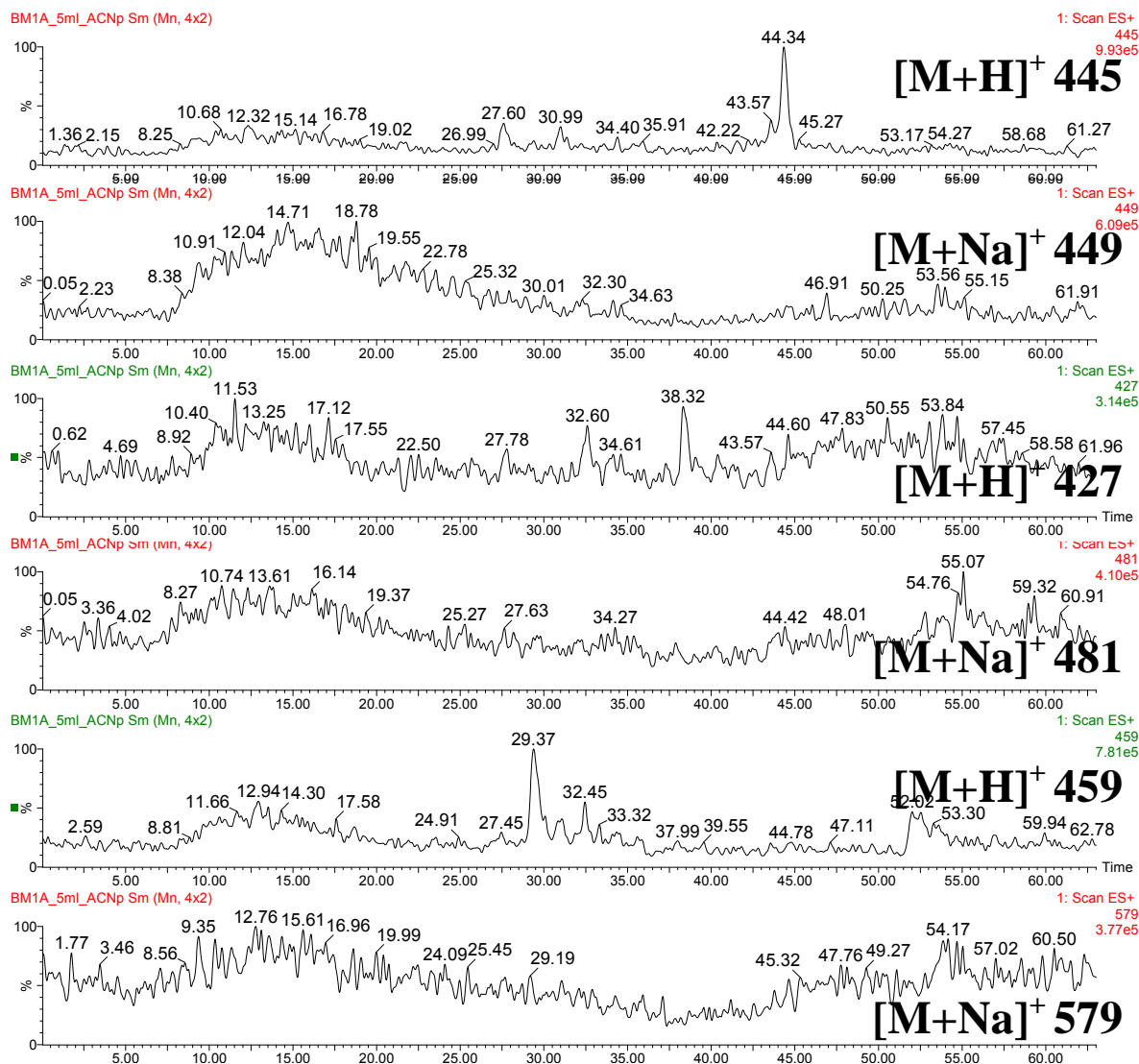


FIGURA 4.33 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de milho. Ionização por ESI⁺.

4.3.2.5 - Análises dos meios de caldo de arroz, filtrado do caldo de arroz e arroz cozido

Os extratos fúngicos de caldo de arroz foram analisados via LC-ESI-MS a fim de se verificar a produção de meroterpenos pelo fungo *P. brasilianum* neste meio de cultivo.

A Figura 4.34 a seguir apresenta os cromatogramas de íons selecionados da análise do extrato fúngico de acetato de etila, produzido em caldo de arroz sem glicose.

Resultados e Discussões

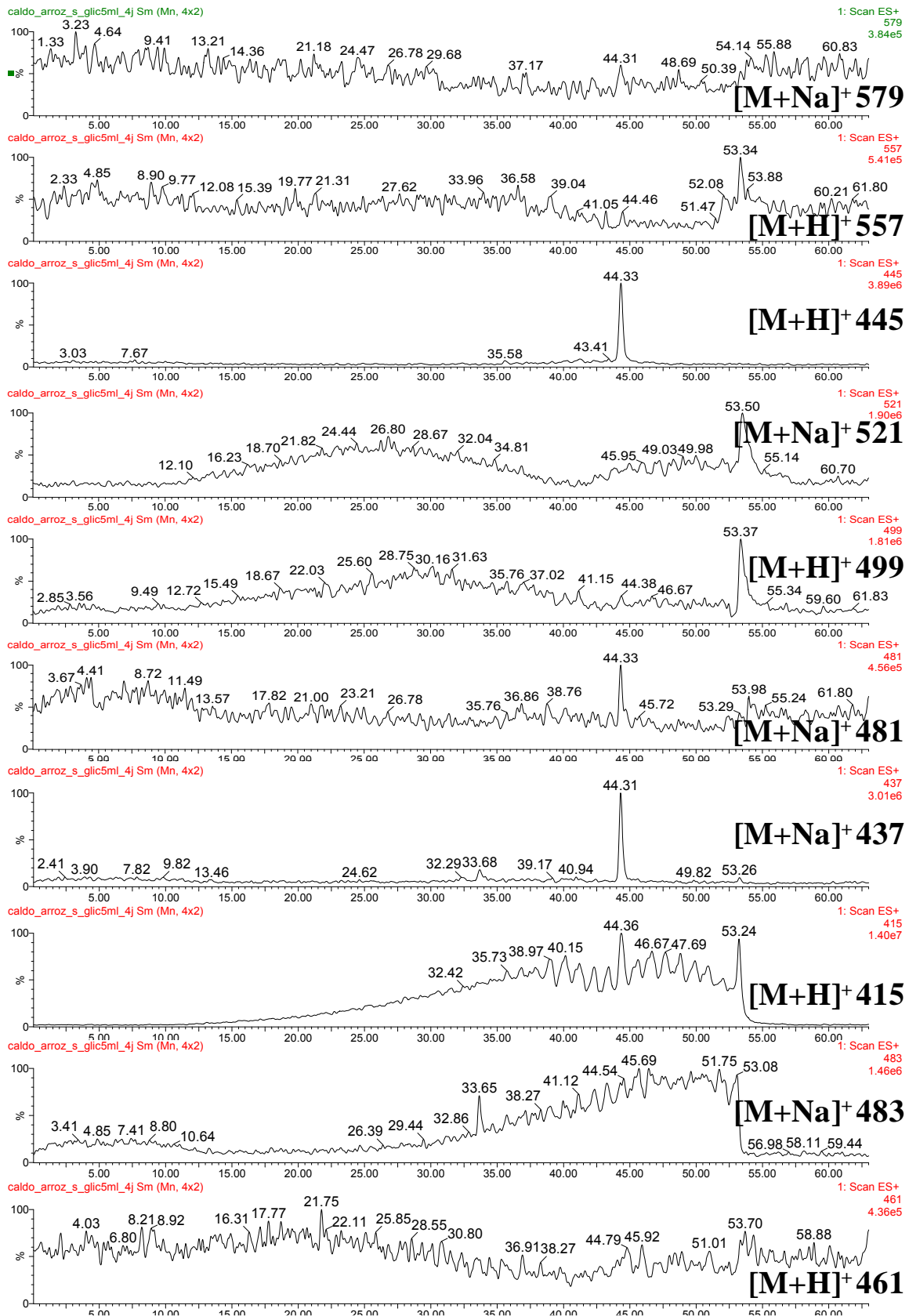


FIGURA 4.34 - Cromatogramas de íons selecionados de *m/z* relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato de etila. Ionização por ESI⁺.

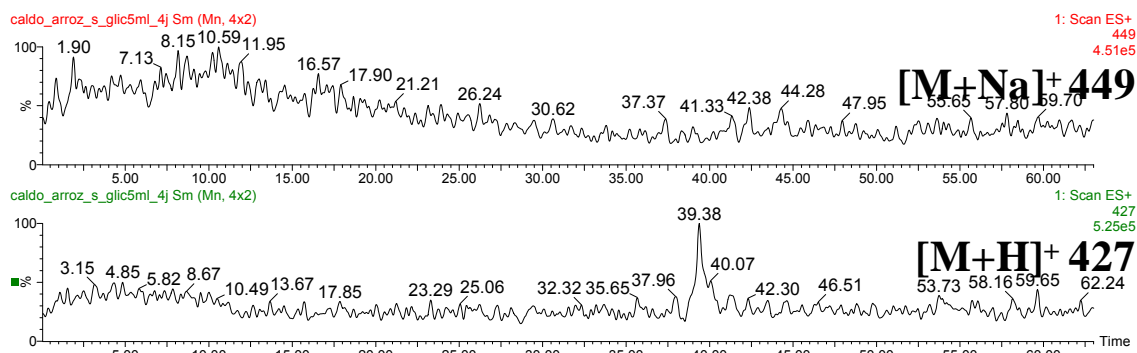


FIGURA 4.34 (CONTINUAÇÃO) – Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato de etila. Ionização por ESI⁺.

Pela análise dos cromatogramas da Figura 4.34, é possível notar que nenhum dos picos cromatográficos detectados coincide em tempos de retenção com os meroterpenos citados na Tabela 4.3 (página 58). No cromatograma de íons selecionados de $[M+H]^+$ 445 também não foi detectada a presença de espécies que eluem na região dos compostos de interesse. O extrato micelial deste experimento também foi analisado, e os cromatogramas de íons selecionados estão ilustrados na Figura 4.35 a seguir.

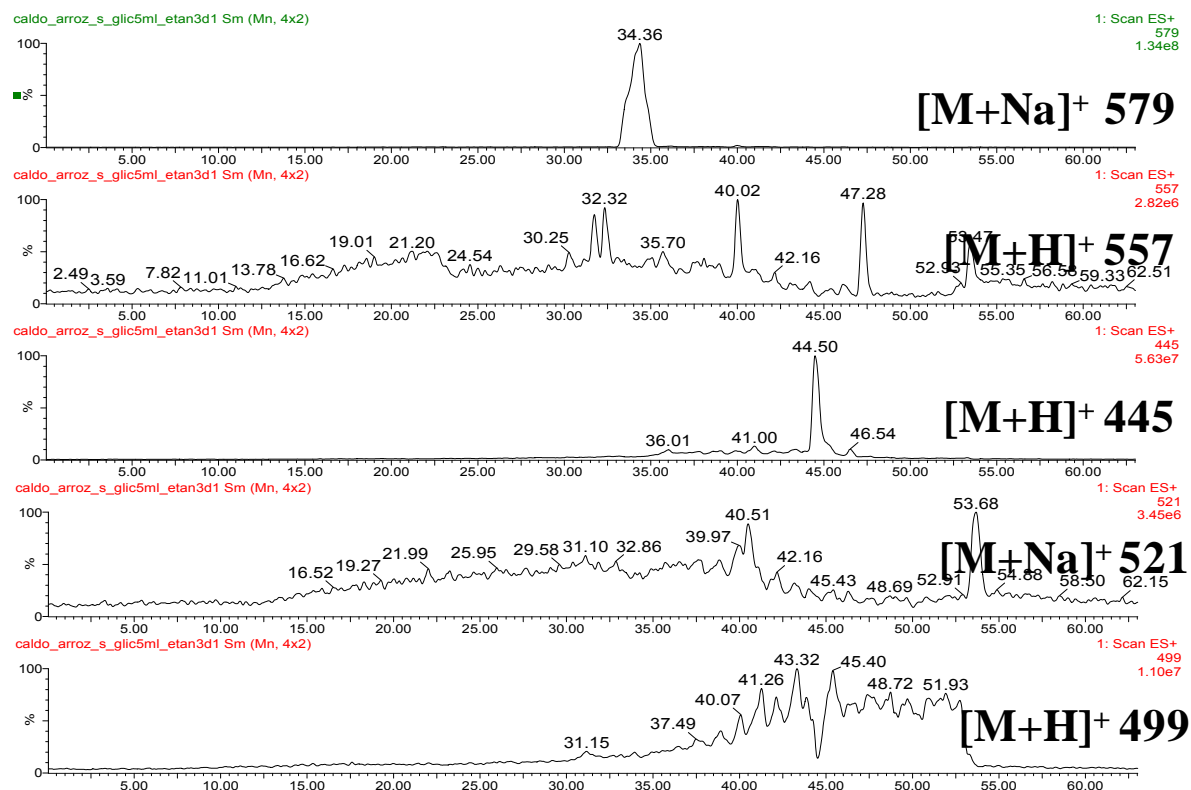


FIGURA 4.35 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz sem glicose – micélio. (A): espectro de massa da espécie de interesse detectada no cromatograma $[M+Na]^+$ 437. Ionização por ESI⁺.

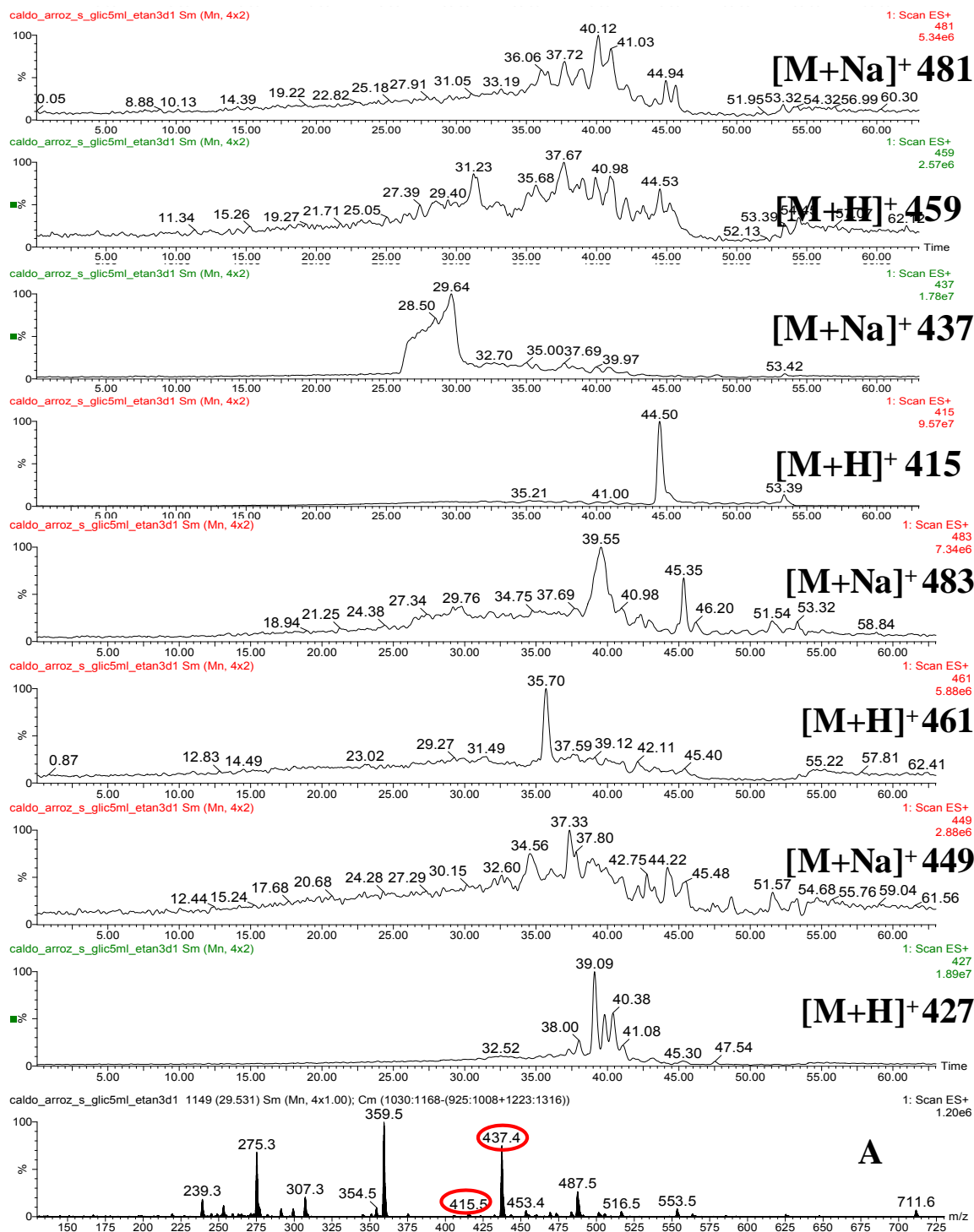


FIGURA 4.35 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz sem glicose – micélio. (A): espectro de massa da espécie de interesse detectada no cromatograma $[M+Na]^+$ 437. Ionização por ESI⁺.

Como pode ser visto através dos cromatogramas da Figura 4.35, no extrato micelial de caldo de arroz sem glicose também não foi detectada nenhuma espécie com m/z e tempo de retenção igual aos dos padrões de meroterpenos. Apenas no cromatograma de $[M+Na]^+$ 437 existe uma banda larga com seu máximo

em 29,64 minutos, cujo espectro de massas está representado na Figura 4.35A. De fato, os íons de m/z 415 e 437, característicos do meroterpeno PSP-13, aparecem no espectro, porém, não se pode afirmar precisamente o tempo de retenção deste composto, visto que a base de sua banda cromatográfica é muito larga, em torno de 7 minutos. Portanto, este composto pode ter eluído em 25 minutos ou até 31 minutos, tornando mais incerta a afirmação de que se trata do PSP-13 ionizado.

Estes resultados levam à conclusão de que é muito improvável que os meroterpenos de interesse tenham sido produzidos no meio de caldo de arroz sem glicose. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que eles possam existir numa quantidade não detectável nestas condições de análise (ionização por ESI), já que nas análises por HPLC-DAD os picos cromatográficos apareceram muito pouco intensos, principalmente se comparados com os extratos de meios sólidos. Além disso, os meroterpenos não ionizam facilmente por ESI, o que pode ter diminuído ainda mais a sensibilidade de detecção por esta técnica.

Os extratos fúngicos produzidos no caldo de arroz com glicose também foram analisados. Na Figura 4.36 seguinte estão representados os cromatogramas de íons selecionados da análise do extrato de acetato deste experimento.

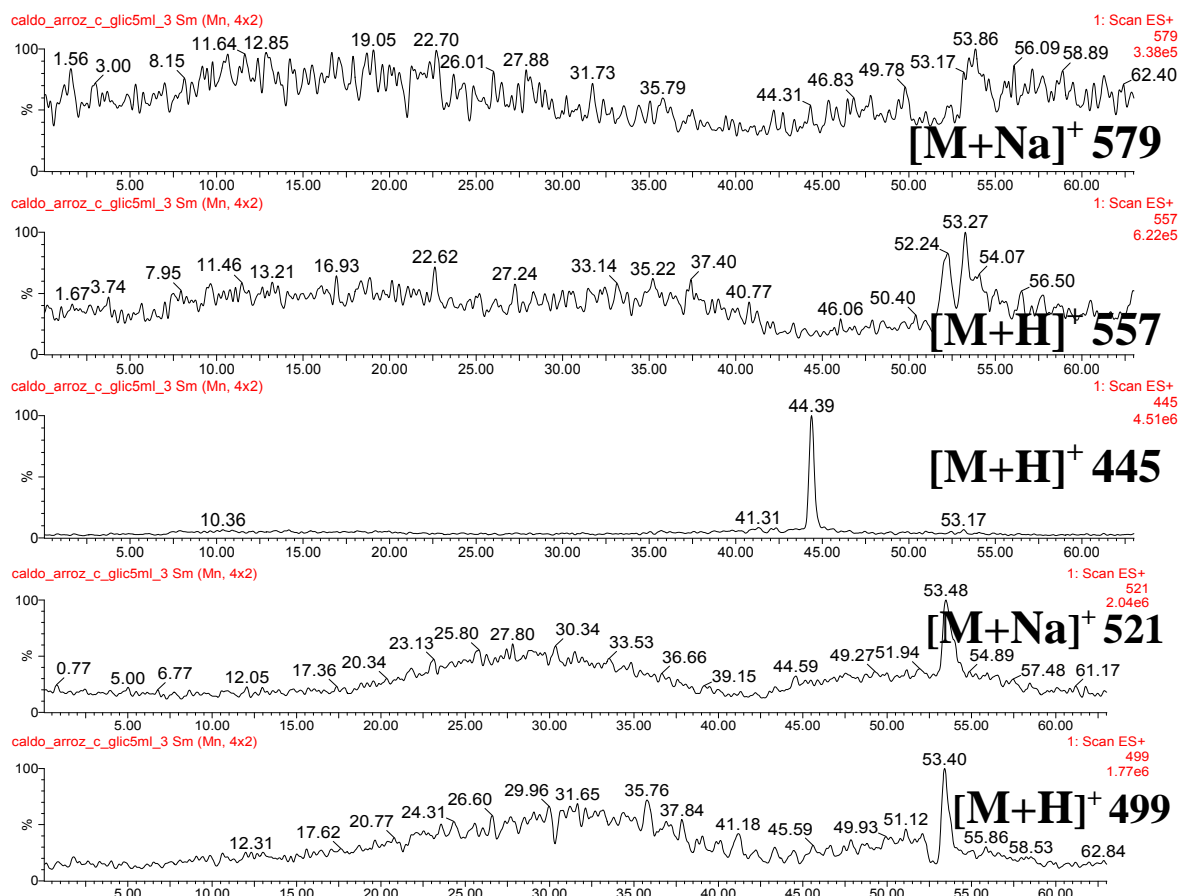


FIGURA 4.36 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz com glicose – partição com acetato. Ionização por ESI⁺.

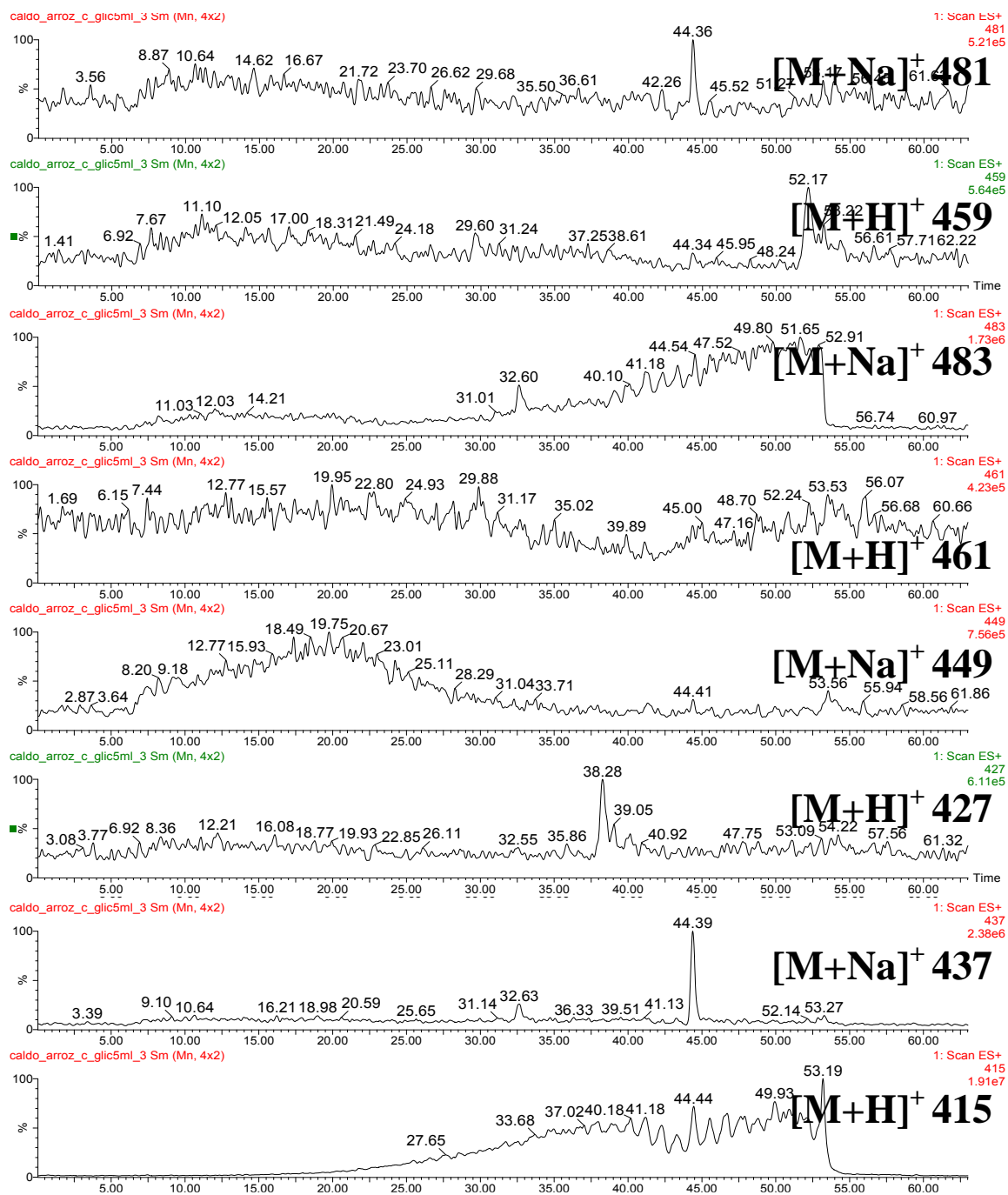


FIGURA 4.36 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz com glicose – partição com acetato. Ionização por ESI^+ .

Pode ser observado, pelos cromatogramas da Figura 4.36, que no extrato de acetato de caldo de arroz com glicose nenhuma espécie relacionada aos padrões de meroterpenos (com valores de m/z e t_r semelhantes aos dos meroterpenos) foi detectada. Os cromatogramas do extrato micelial deste mesmo experimento encontram-se ilustrados na Figura 4.37.

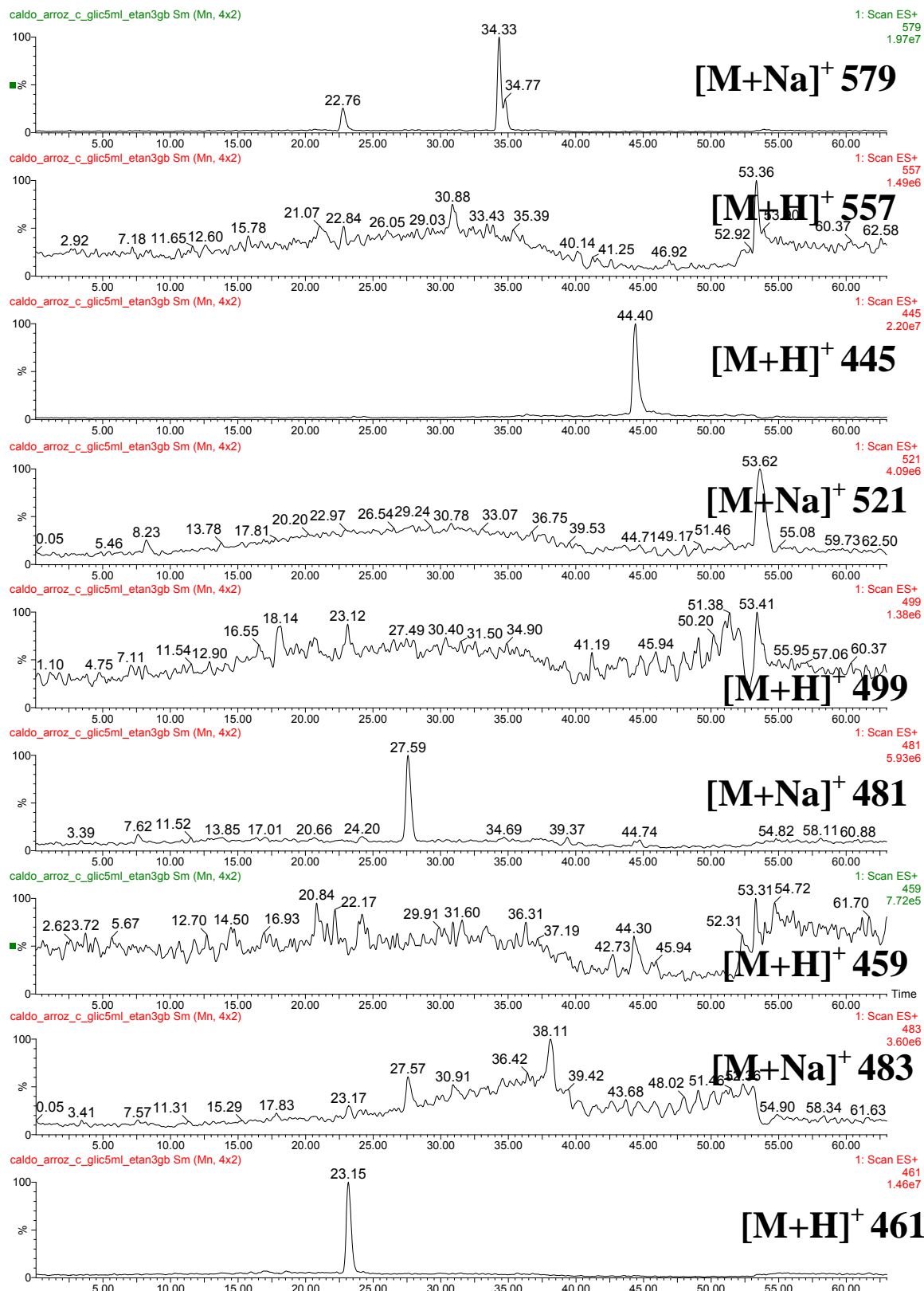


FIGURA 4.37 - Cromatogramas de íons selecionados de *m/z* relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz com glicose – micélio. (A) e (B): espectro de massa das espécies de interesse detectadas. Ionização por ESI⁺.

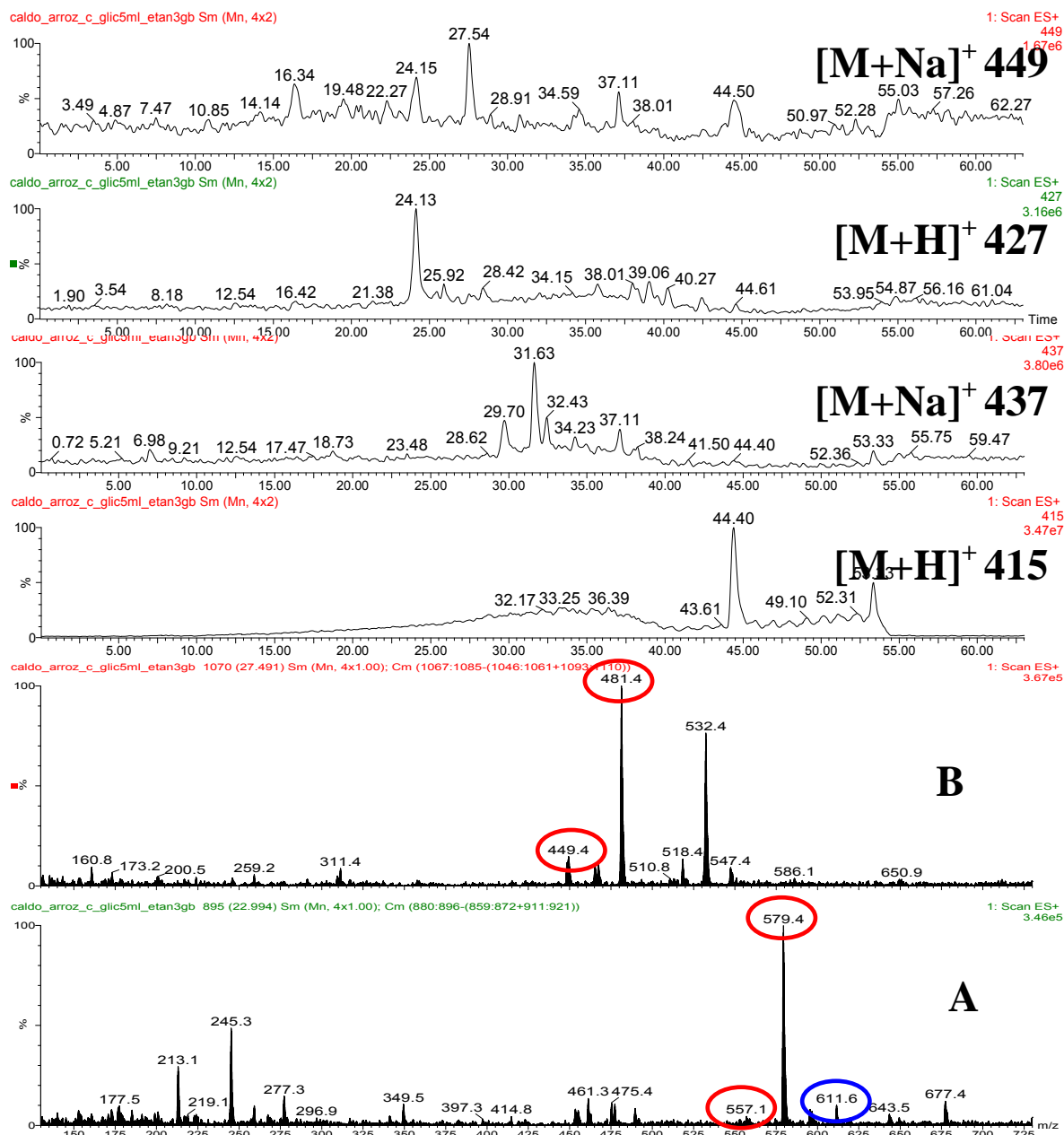


FIGURA 4.37 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados em extrato de caldo de arroz com glicose – micélio. (A) e (B): espectro de massa das espécies de interesse detectadas. Ionização por ESI^+ .

Como pode ser observado pelos cromatogramas e pelos espectros de massas A e B da Figura 4.37, foram detectados alguns íons de interesse no extrato micelial de caldo de arroz com glicose. No cromatograma de íons selecionados $[M+Na]^+$ 579, em 22,76 minutos aparece um pico, e seu espectro de massas (A) exhibe os íons de m/z 557, 579 e 611, que podem estar relacionados ao meroterpeno PSP-3, sendo m/z 557, o íon da molécula protonada, m/z 579 o aduto de sódio da molécula e m/z 611 a molécula do meroterpeno ligada a uma molécula de metanol e a um íon sódio. Nos cromatogramas de $[M+Na]^+$ 481 e $[M+Na]^+$ 449 existem picos com tempos de eluição semelhantes aos dos meroterpenos PSP-4 e PSP-8, em torno 27,4 minutos. O espectro de massas B apresenta os picos dos íons referentes

a esses meroterpenos, circulados. Este resultado pode indicar que o fungo produziu meroterpenos em meio de caldo de arroz com glicose.

Os extratos produzidos nos filtrados do caldo de arroz foram igualmente analisados. A Figura 4.38 apresenta os cromatogramas de íons selecionados da análise do extrato fúngico de acetato de etila, do filtrado de caldo de arroz sem glicose.

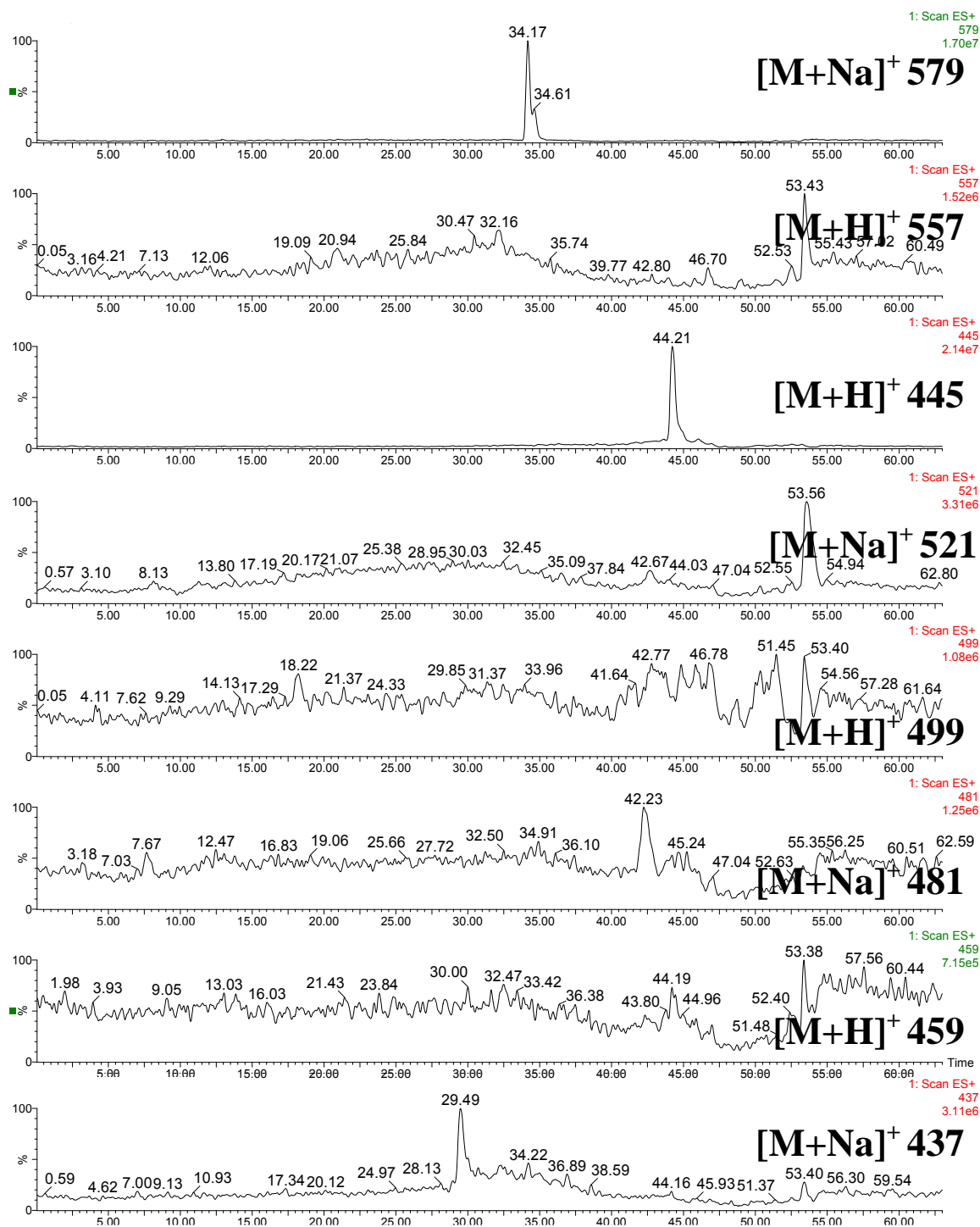


FIGURA 4.38 - Cromatogramas de íons selecionados de *m/z* relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato. Ionização por ESI⁺.

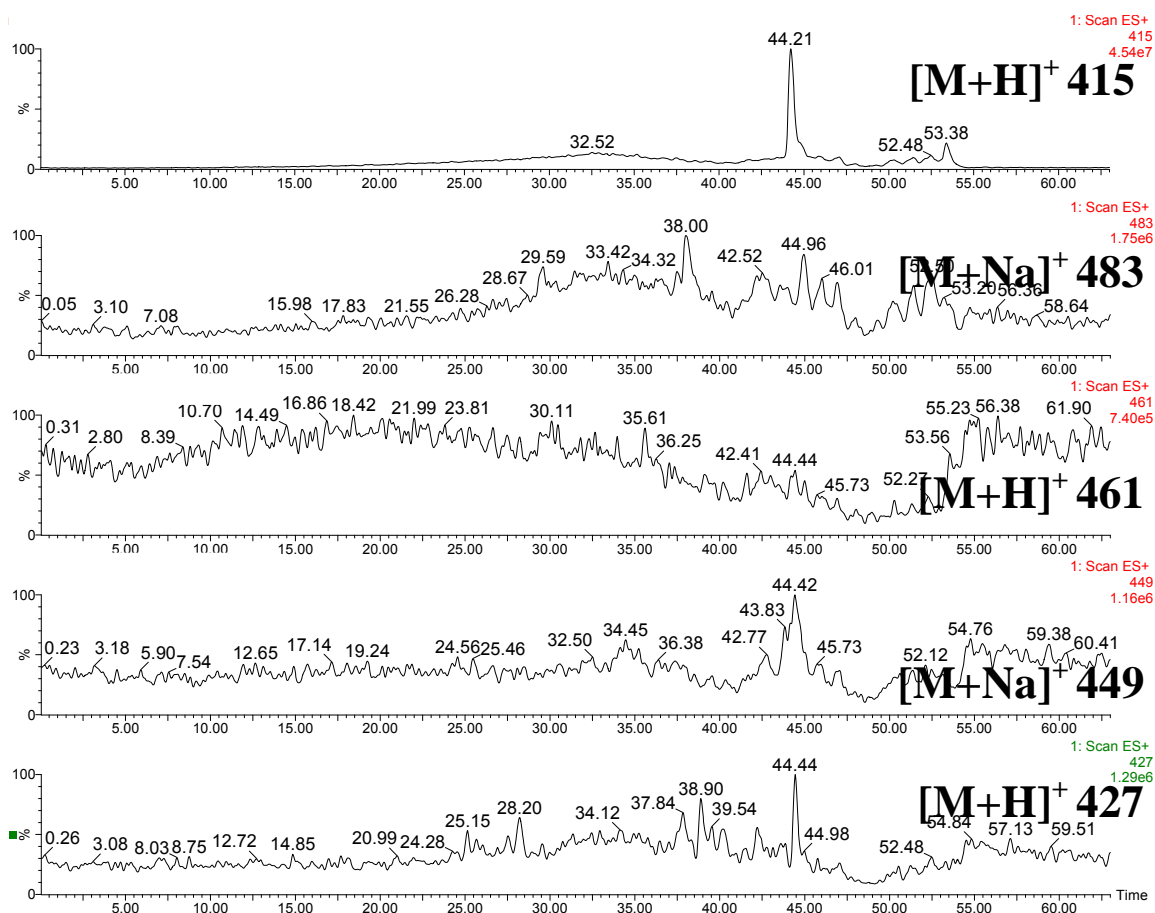


FIGURA 4.38 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato. Ionização por ESI⁺.

Pelos cromatogramas da Figura 4.38, foi possível constatar que nenhum íon característico dos meroterpenos de interesse, tanto os adutos de sódio como as moléculas protonadas, foi detectado no extrato de acetato deste experimento, nos tempos de retenção citados na Tabela 4.3 (página 58). Desta forma, pode-se dizer que, ou estes meroterpenos realmente não foram produzidos pelo fungo neste meio, ou eles estão presentes em quantidades muito pequenas neste extrato, por isso não foram detectados nestas condições de análise empregadas.

A Figura 4.39 a seguir ilustra os cromatogramas de íons selecionados do extrato micelial do filtrado do caldo de arroz sem glicose. E como pode ser visto, assim como no extrato de acetato de etila, no extrato micelial do filtrado de arroz sem glicose também não foi detectado nenhum íon característico dos meroterpenos em estudo. Este meio de cultivo provavelmente não supriu as necessidades nutricionais necessárias para a produção destes metabólitos pela espécie fúngica.

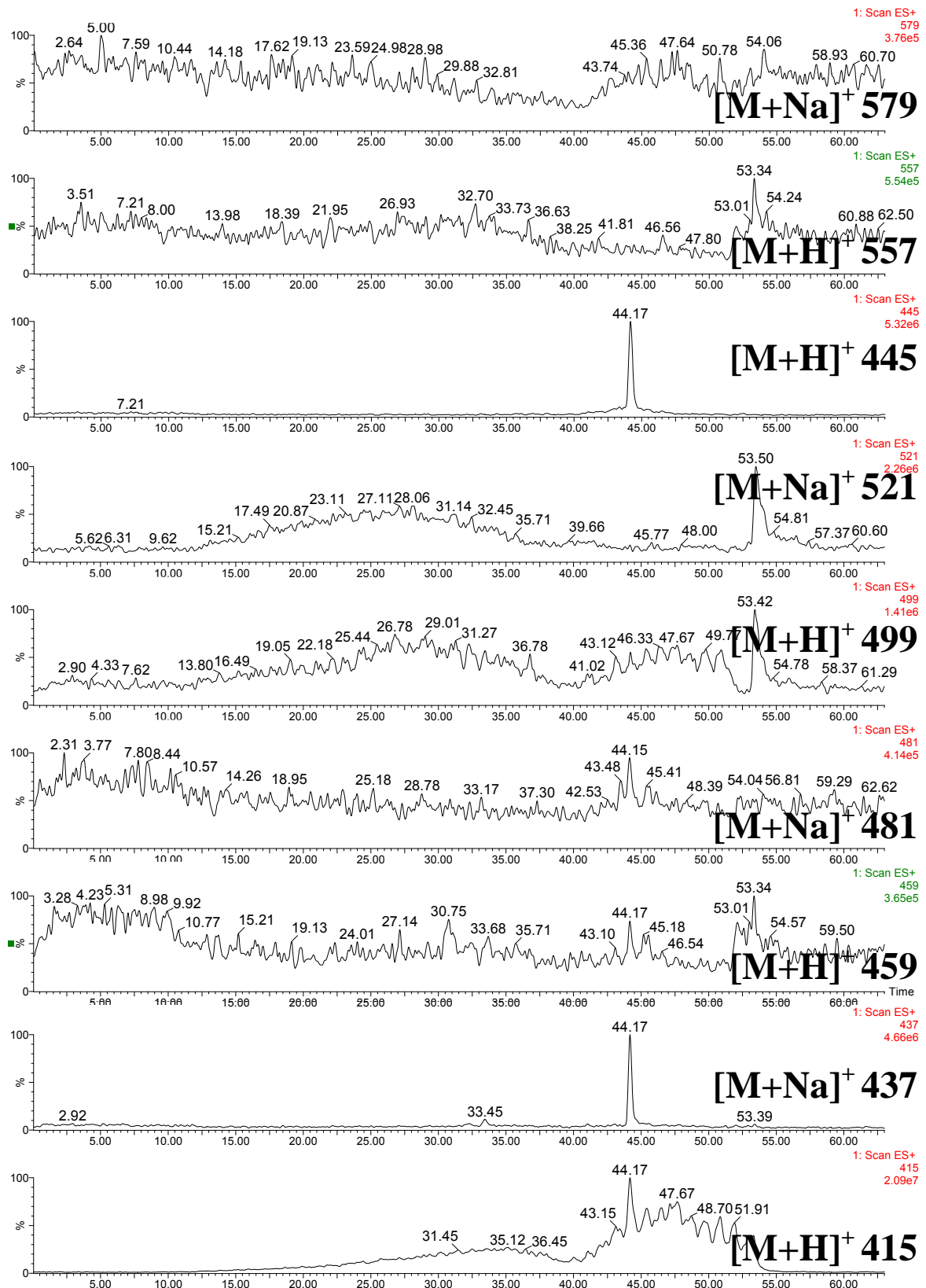


FIGURA 4.39 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – micélio. Ionização por ESI⁺.

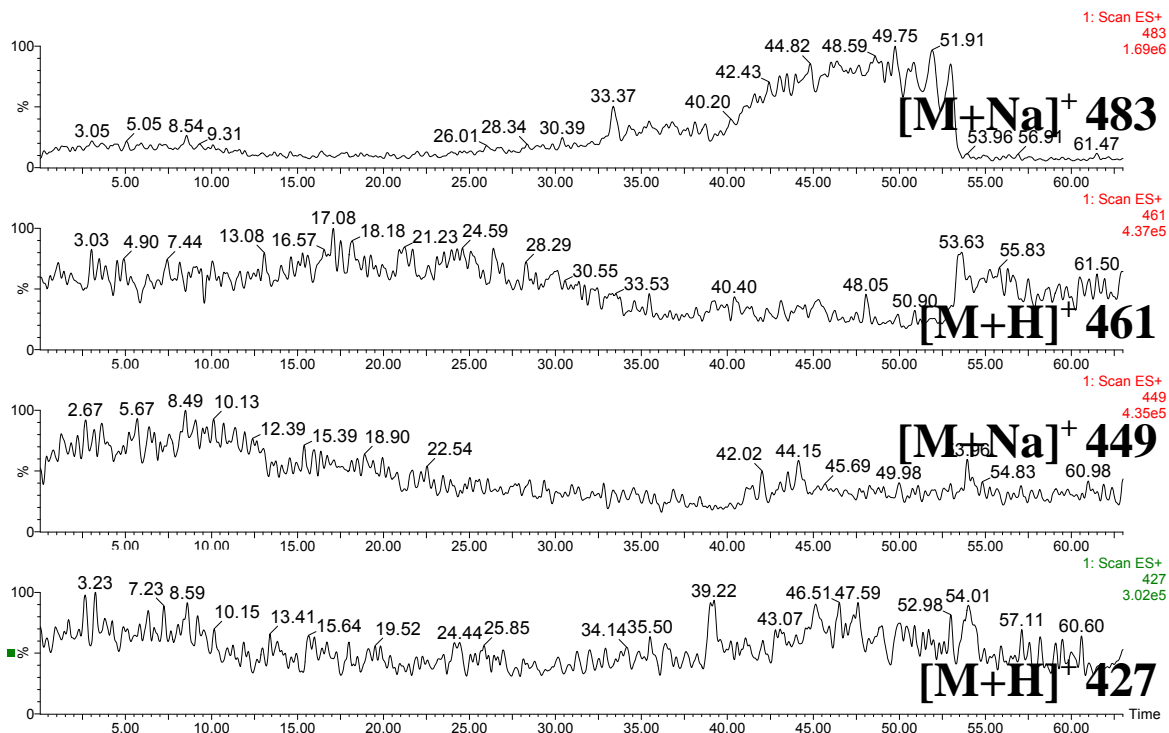


FIGURA 4.39 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – micélio. Ionização por ESI⁺.

Este meio de cultivo também foi testado com glicose adicional, e a análise de seu extrato de acetato apresentou os seguintes resultados, ilustrados na Figura 4.40.

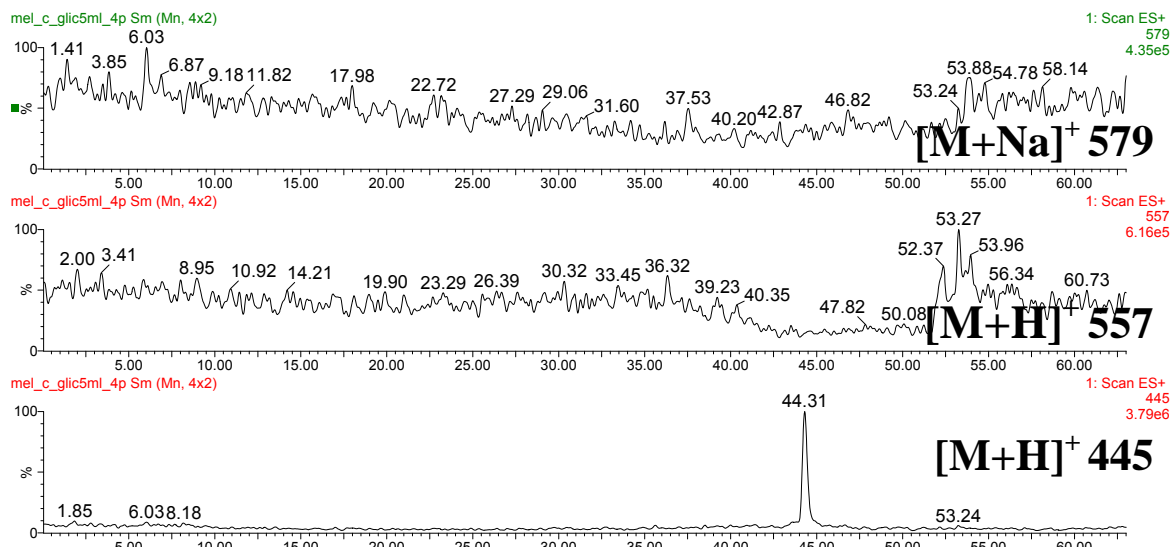


FIGURA 4.40 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – partição com acetato. Ionização por ESI⁺.

Resultados e Discussões

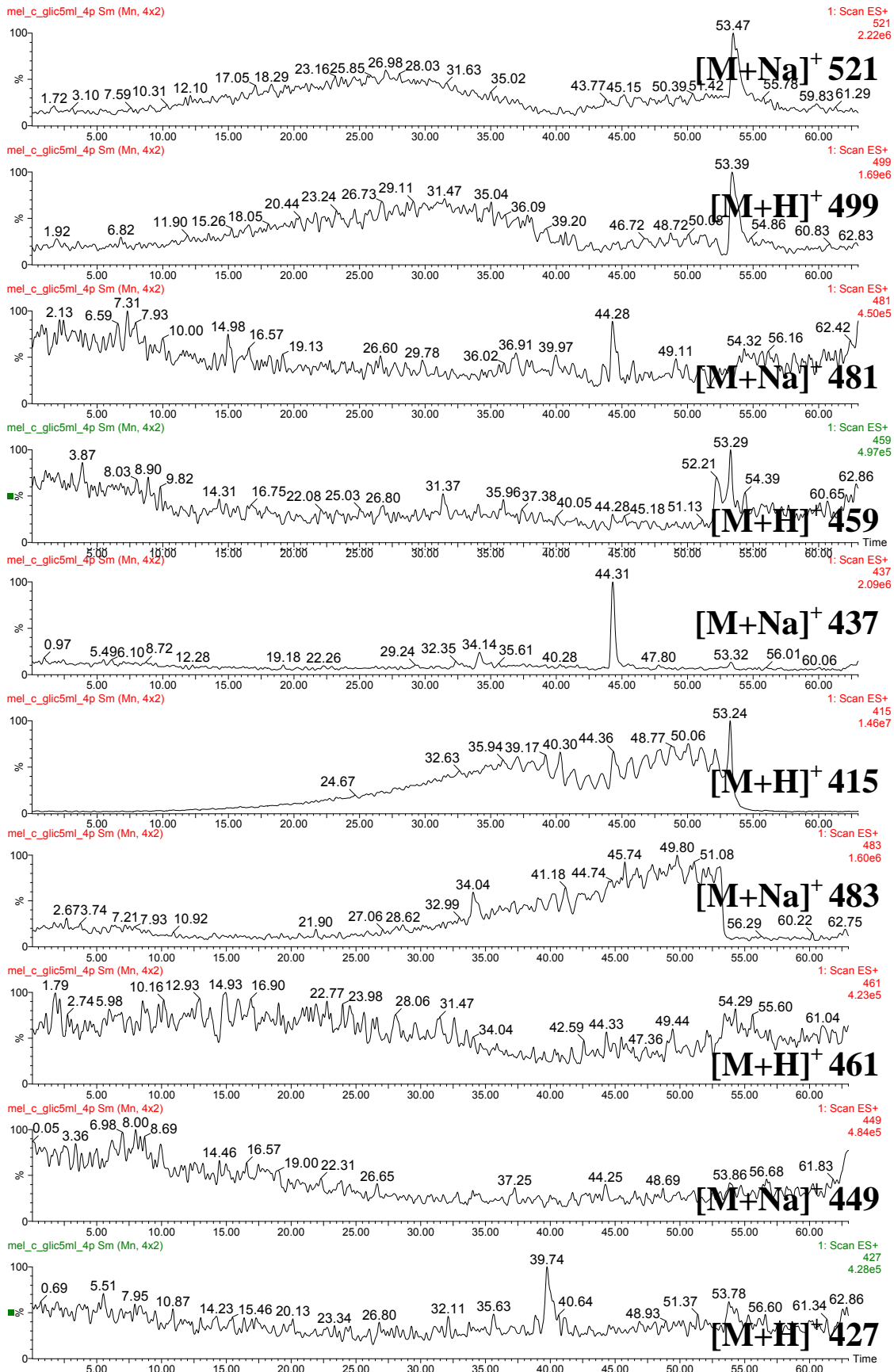


FIGURA 4.40 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – partição com acetato. Ionização por ESI^+ .

Nenhum dos cromatogramas de íons selecionados apresentados na Figura 4.40 mostrou picos na região de eluição dos meroterpenos de interesse. Mesmo com a adição de glicose ao meio, provavelmente as necessidades nutricionais do fungo não foram supridas a fim de se produzir grandes quantidades dos metabólitos de interesse.

O extrato fúngico micelial do filtrado de caldo de arroz com glicose foi igualmente analisado, e seus cromatogramas estão apresentados na Figura 4.41 que se segue.

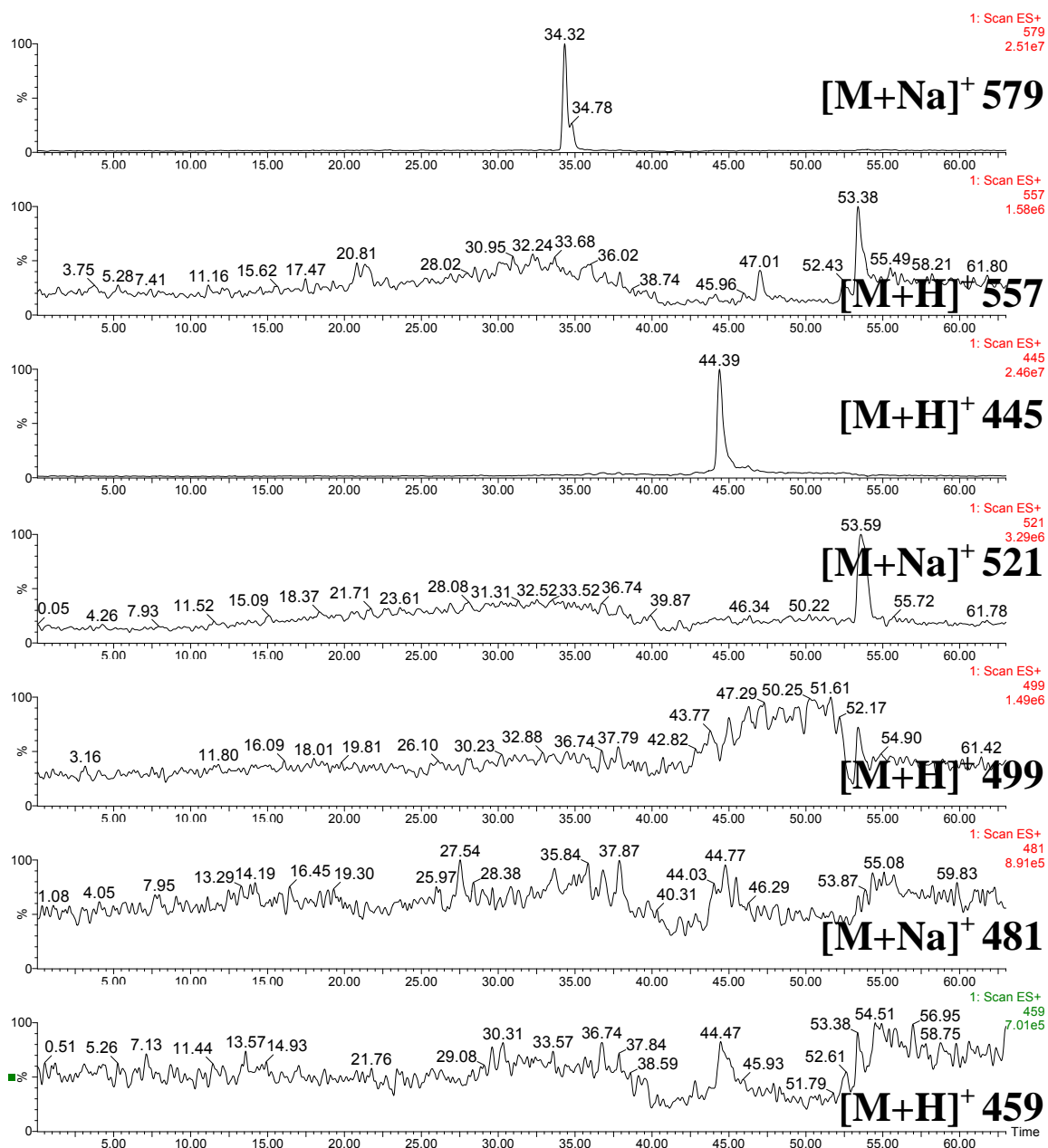


FIGURA 4.41 - Cromatogramas de íons selecionados de *m/z* relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – micélio. Ionização por ESI⁺.

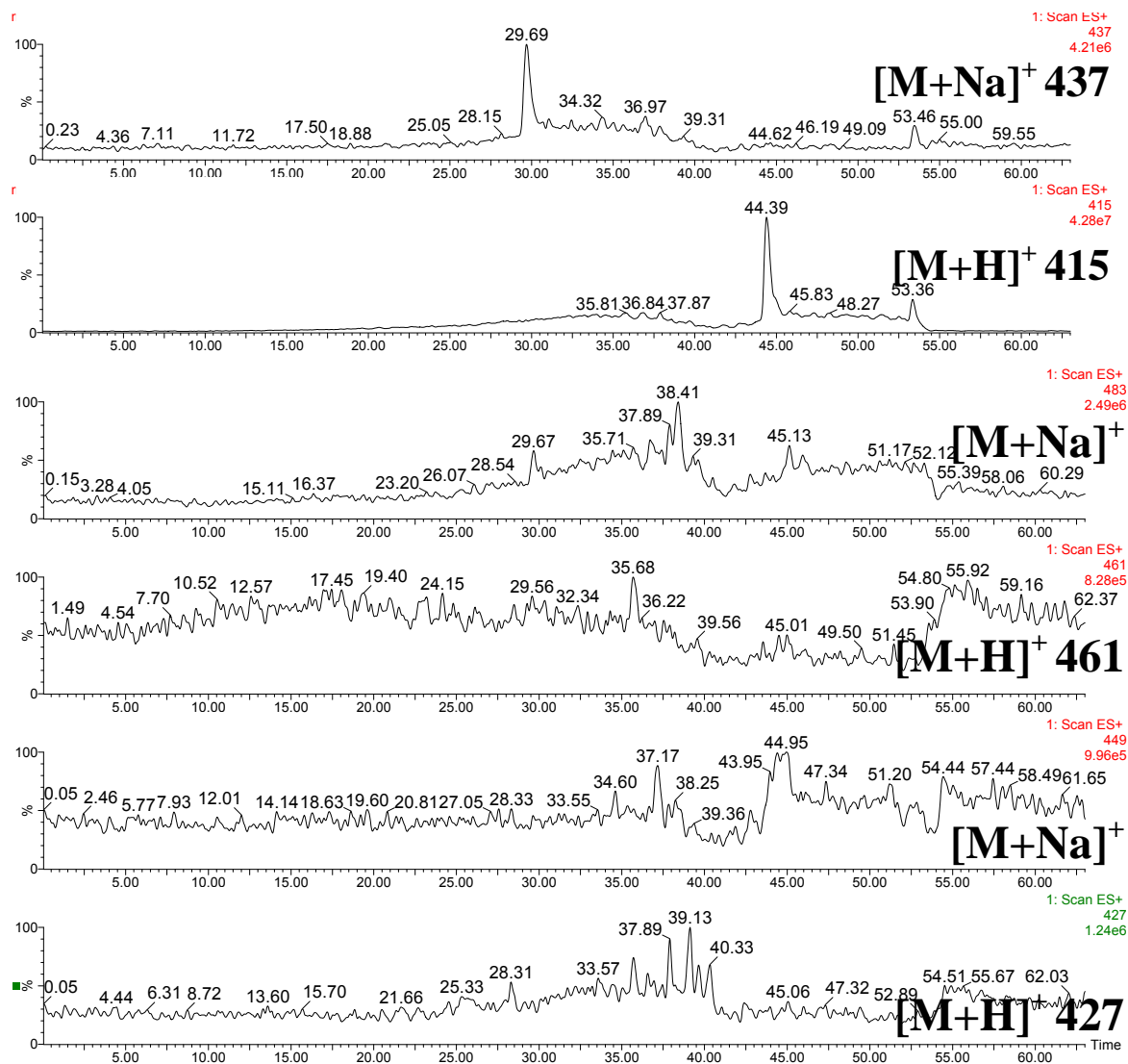


FIGURA 4.41 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – micélio. Ionização por ESI⁺.

Também no micélio não foi detectado nenhum íon relacionado aos meroterpenos, como observado na Figura 4.41, já que nenhum dos picos cromatográficos presentes nos cromatogramas de íons selecionados mostrou tempos de retenção semelhantes aos apresentados na Tabela 4.3 (página 58).

As análises por LC-APCI-MS poderão dar melhores resultados em relação à sensibilidade das análises. No entanto, os resultados de LC-ESI-MS mostram que os meios líquidos derivados do arroz não foram muito adequados para o cultivo da espécie *P. brasilianum* visando a otimização da produção de meroterpenos, provavelmente devido à falta de nutrientes necessários para isso. O único extrato que mostrou a existência de íons característicos de meroterpenos com tempos de retenção semelhantes aos registrados na Tabela 4.3 foi o extrato micelial do caldo de arroz com glicose (ver página 72, Figura 4.37). Nele, foram detectados íons que podem estar relacionados aos meroterpenos PSP-4, PSP-8 e PSP-3. O último extrato deste experimento a ser analisado foi o extrato fúngico de arroz cozido. Seus cromatogramas de íons selecionados estão ilustrados na Figura 4.42.

Resultados e Discussões

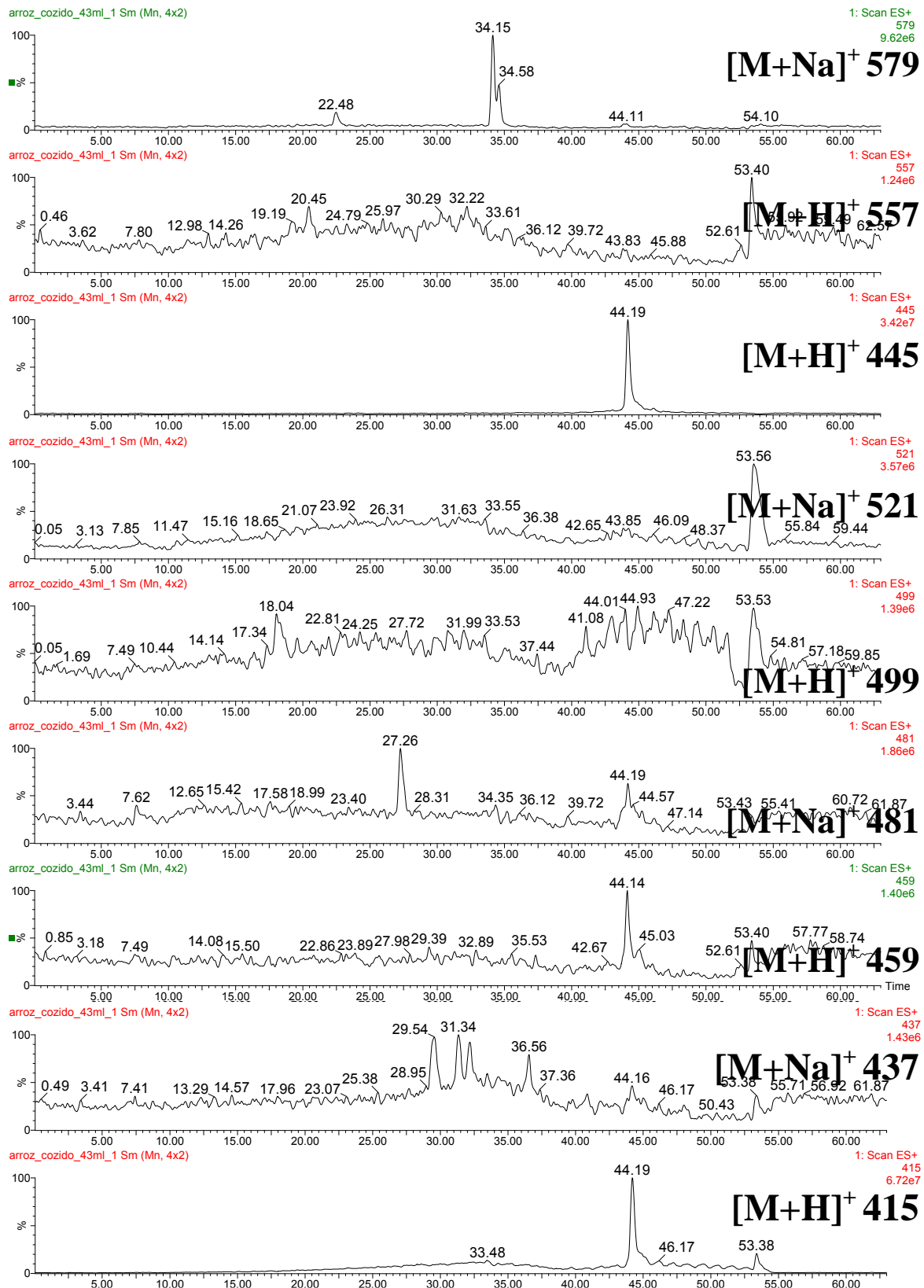


FIGURA 4.42 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de arroz cozido. Ionização por ESI⁺.

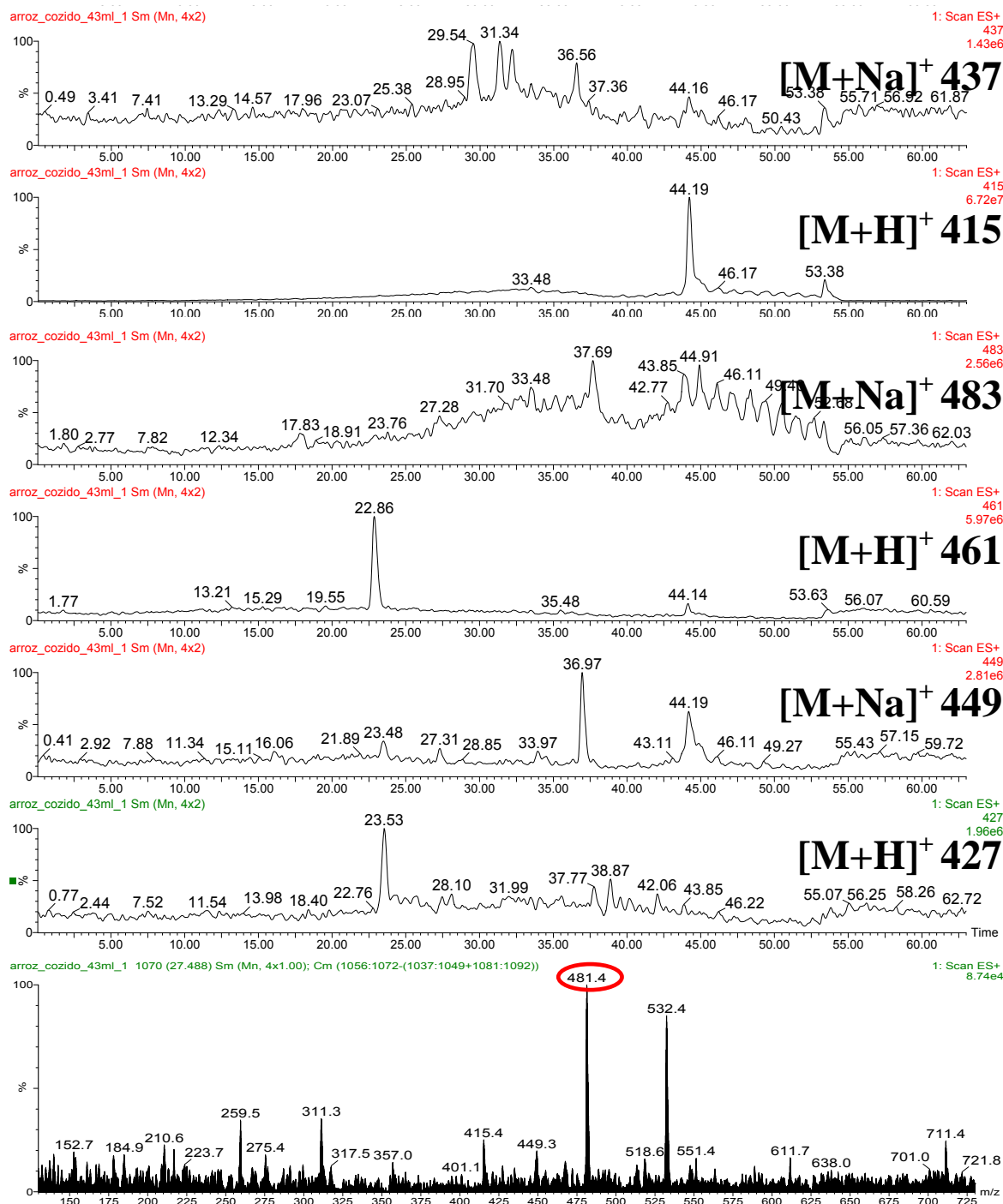


FIGURA 4.42 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato de arroz cozido. Ionização por ESI⁺.

Conforme visto na Figura 4.19 (página 50), das análises do extrato de arroz cozido por LC-DAD, o perfil cromatográfico do extrato de arroz cozido mostrou-se muito semelhante ao do extrato de arroz sem cozimento prévio. Neste extrato foram detectados vários metabólitos secundários. Pelas análises de LC-ESI-MS, porém, observa-se que no arroz cozido o único íon detectado com m/z e tempo de retenção semelhante ao dos meroterpenos de interesse foi o íon de m/z 481, com tempo de retenção 27,26 minutos. Seu espectro de massas (A) apresenta um pico de maior intensidade, relativo a esta espécie, que se acredita ser um aduto de sódio

do meroterpeno PSP-4. Seu tempo de retenção, no entanto, está um pouco deslocado em relação ao encontrado pela análise da mistura dos padrões: 27,37 minutos. No extrato fúngico de arroz sem cozimento prévio, no entanto, foram detectados outros íons com provável relação com os meroterpenos.

4.3.2.6 - Análises dos extratos de leite de soja

O extrato fúngico de acetato produzido em leite de soja também foi analisado via LC-ESI-MS, e os cromatogramas de íons selecionados adquiridos estão ilustrados na Figura 4.43. Estes cromatogramas mostram que nenhum íon relacionado aos meroterpenos foi detectado no extrato fúngico de acetato produzido em leite de soja. Os picos detectados nos cromatogramas de íons selecionados não possuem tempos de retenção semelhantes aos encontrados para a mistura dos padrões analisada (Tabela 4.3, página 58). Este fato pode ser resultado da não produção de meroterpenos pelo fungo, ou da existência de pouca quantidade dos compostos neste extrato, quantidade esta não detectável pela técnica analítica utilizada

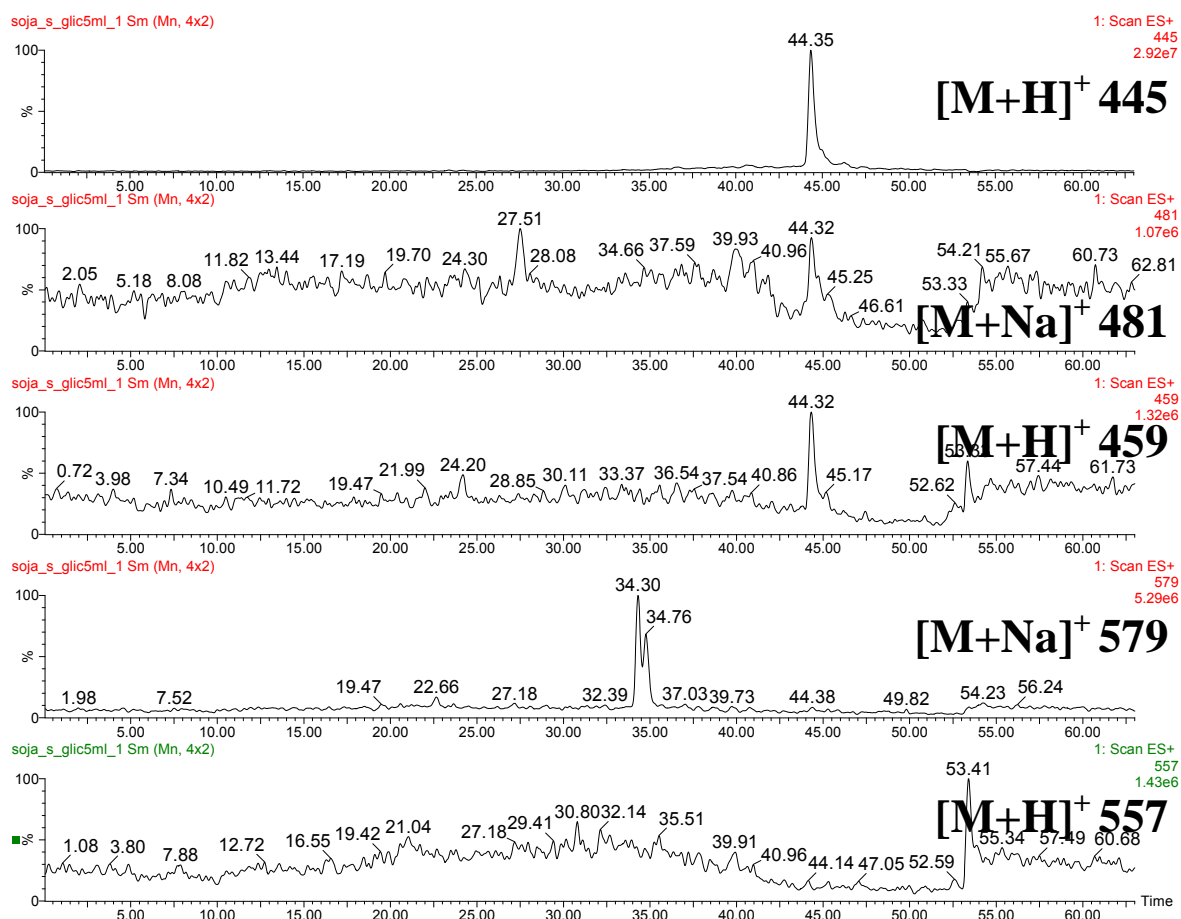


FIGURA 4.43 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de soja (partição com acetato). Ionização por ESI⁺.

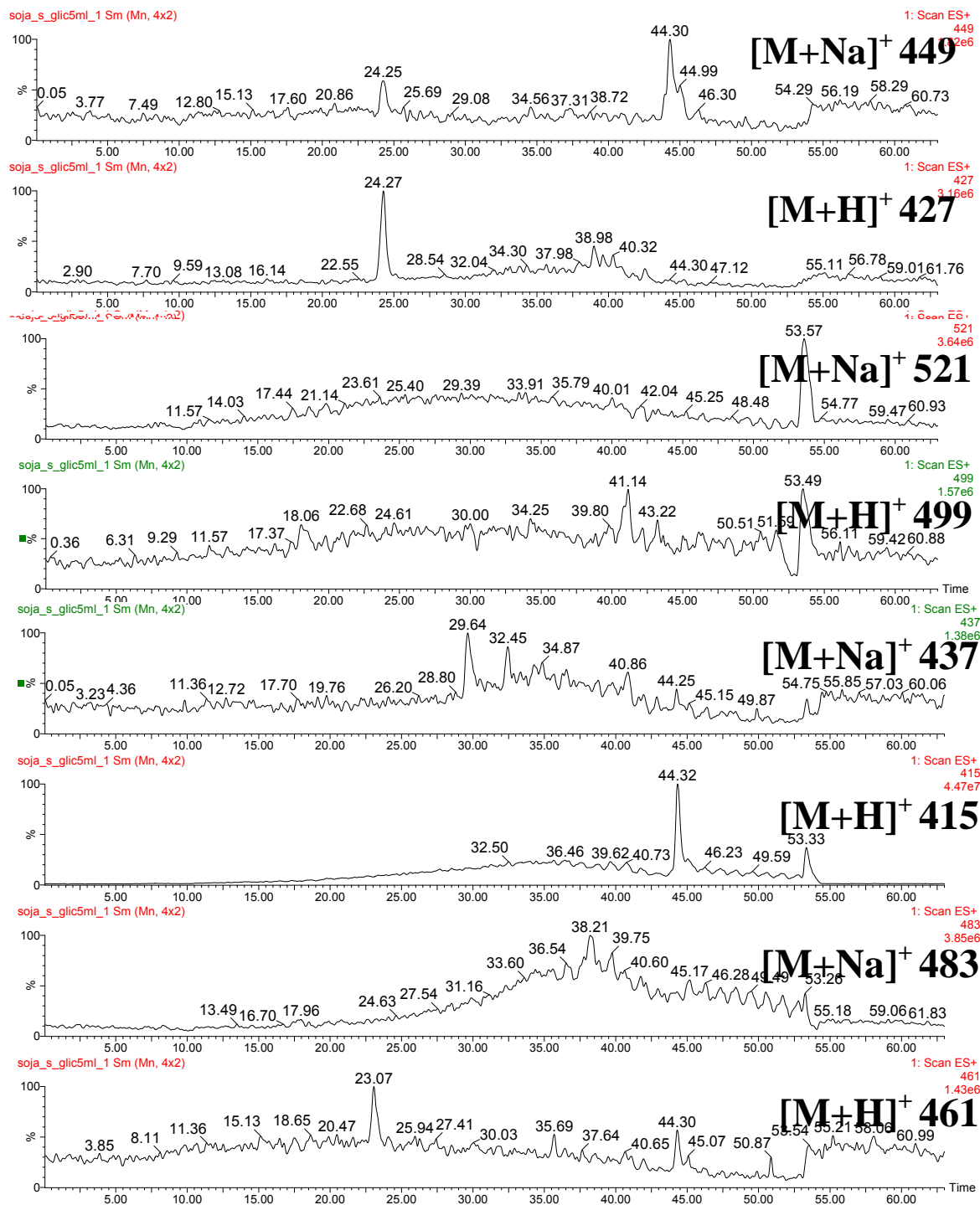


FIGURA 4.43 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de soja (partição com acetato). Ionização por ESI⁺.

O extrato micelial deste experimento foi igualmente analisado, e a Figura 4.44 apresenta os cromatogramas de íons selecionados adquiridos. Observa-se que estes cromatogramas de íons selecionados do extrato micelial produzido em leite de soja também não apresentaram nenhum íon relacionado aos meroterpenos de interesse, em tempos de retenção semelhantes aos dos padrões.

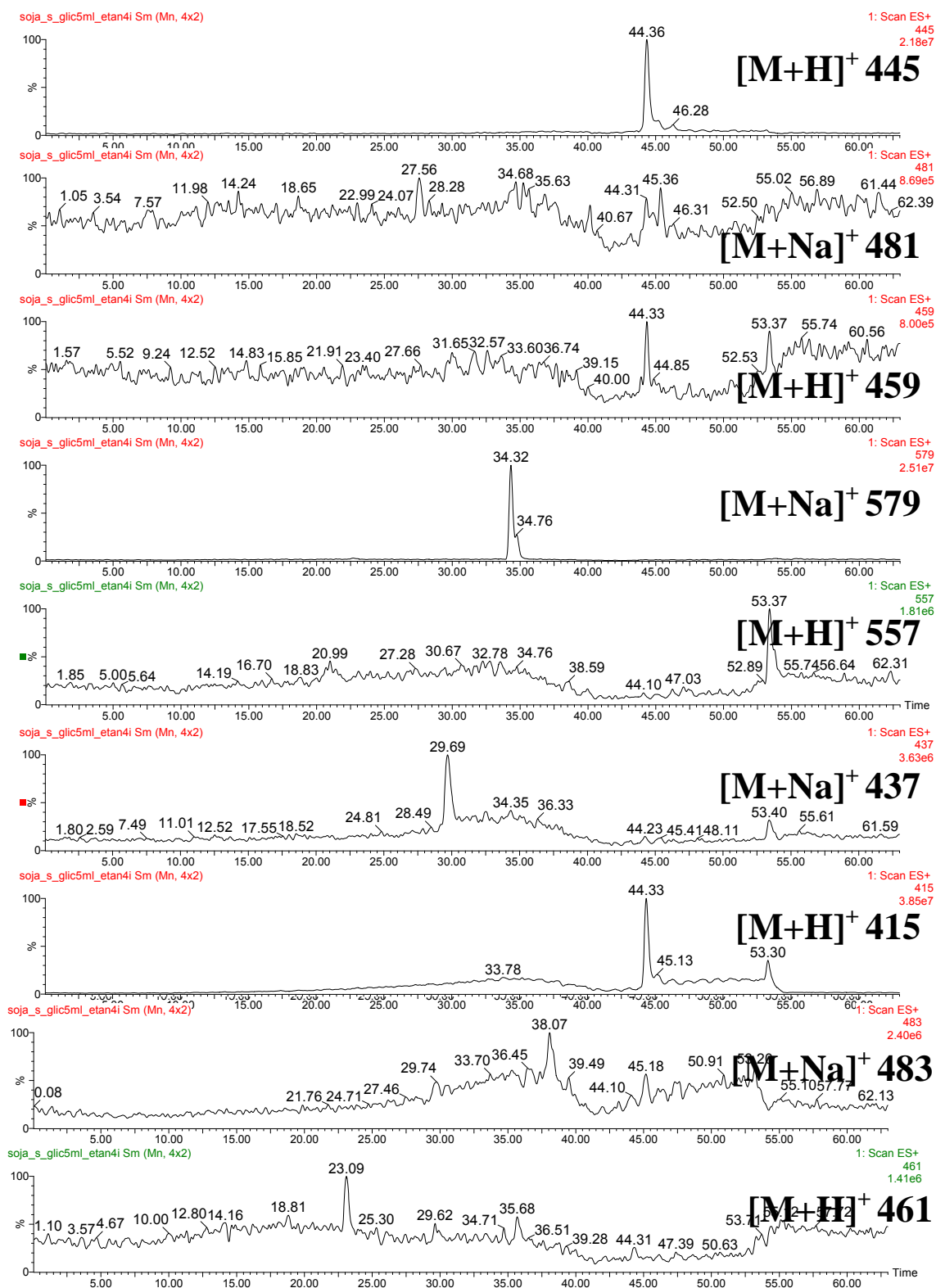


FIGURA 4.44 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico micelial de soja. Ionização por ESI⁺.

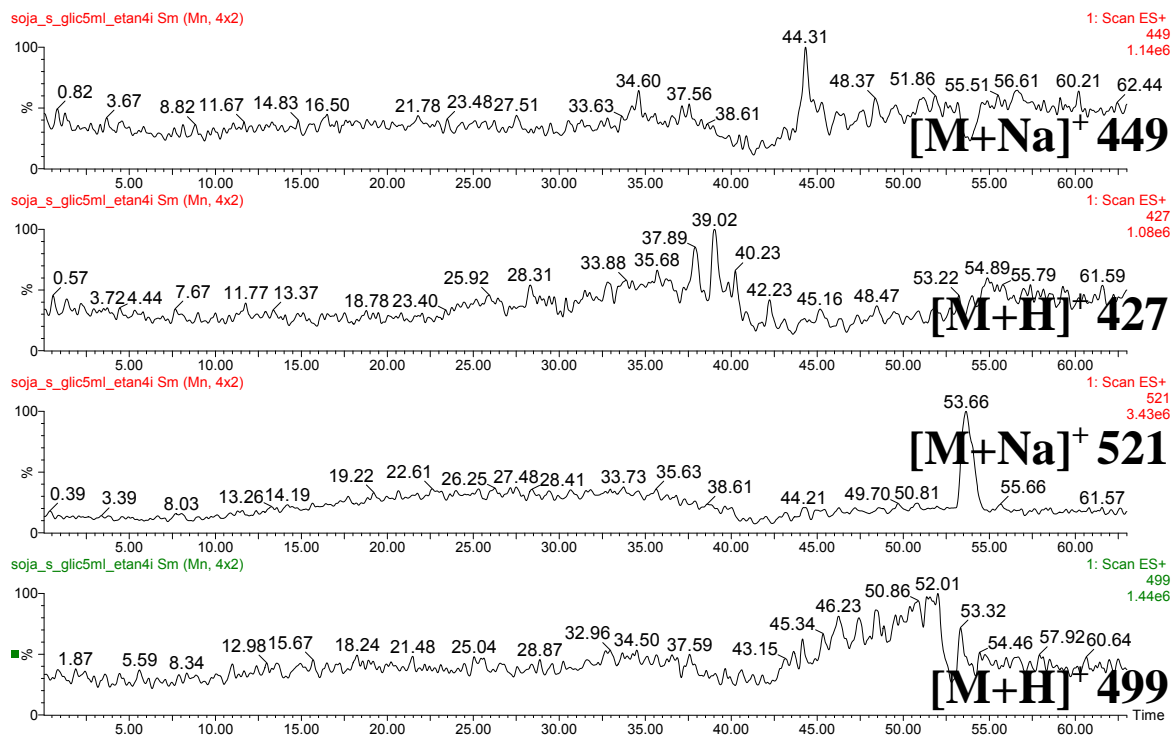


FIGURA 4.44 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico micelial de soja. Ionização por ESI⁺.

4.3.2.7 - Análises dos extratos de Czapeck

O último meio de cultura analisado foi o de Czapeck, e seus extratos foram igualmente analisados por LC-ESI-MS. A Figura 4.45 apresenta os cromatogramas de íons selecionados do extrato de acetato de etila. Este extrato de meio líquido também mostrou ser pobre em meroterpenos, visto que nenhuma espécie foi detectada com m/z e tempos de retenção semelhantes aos dos meroterpenos em estudo.

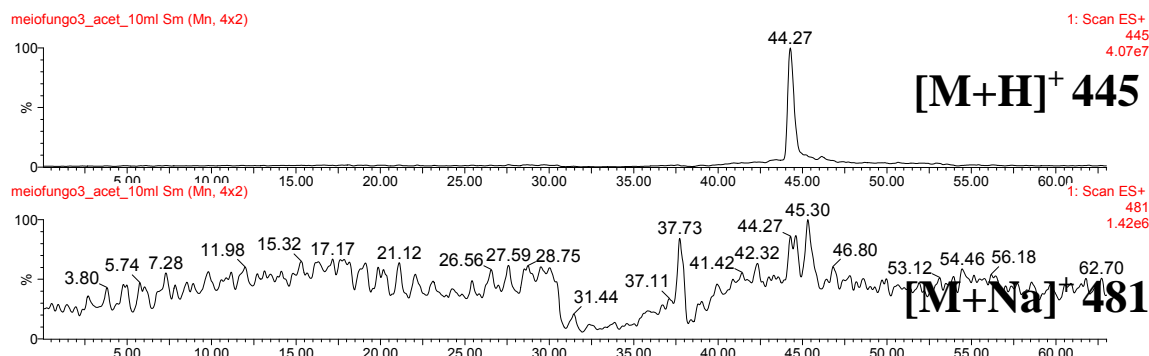


FIGURA 4.45 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de Czapeck (partição com acetato). Ionização por ESI⁺.

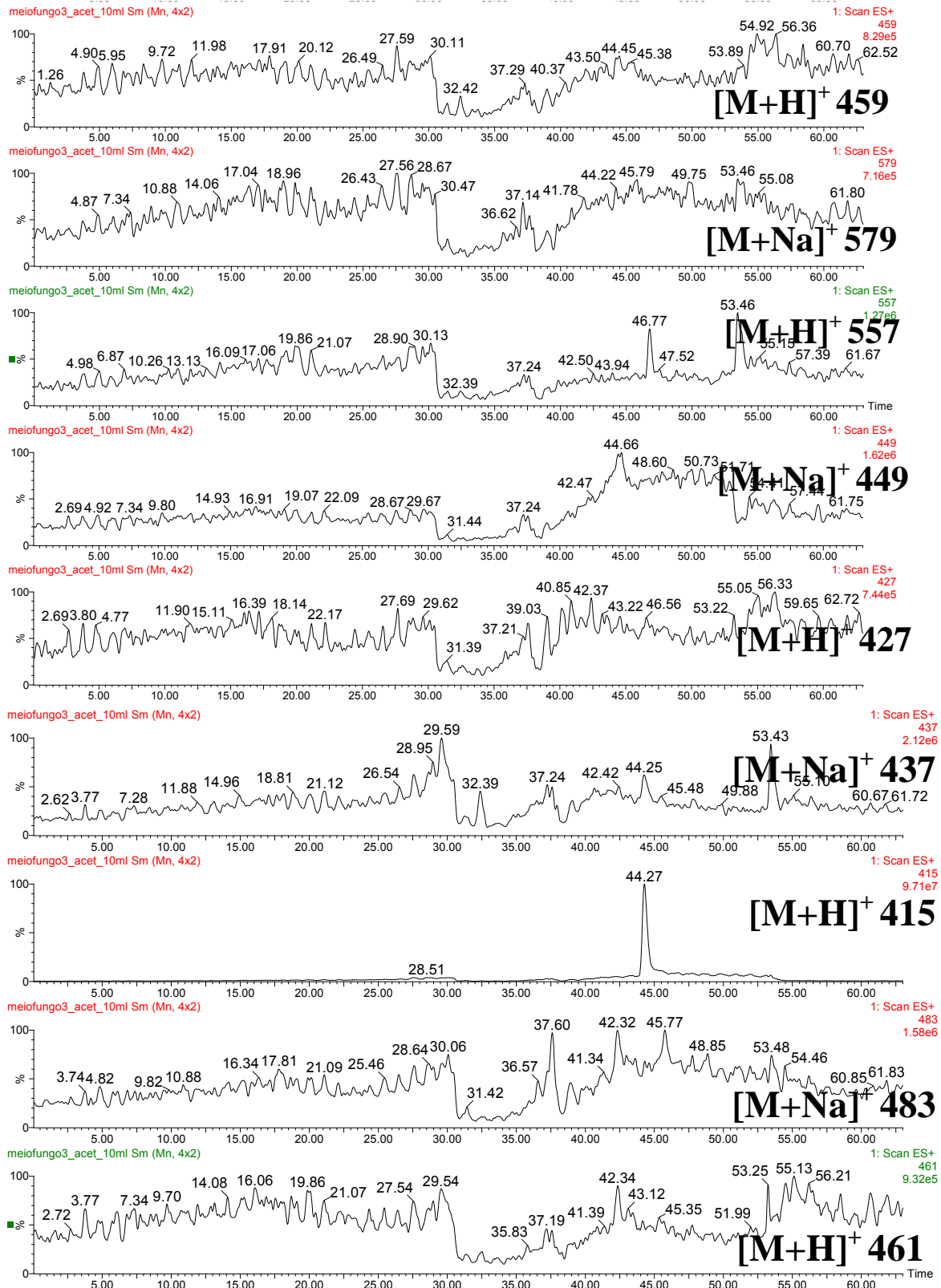


FIGURA 4.45 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de Czapeck (partição com acetato). Ionização por ESI⁺.

O extrato micelial deste experimento foi igualmente investigado via LC-ESI-MS, e os cromatogramas resultantes estão ilustrados na Figura 4.46 a seguir. Nota-se também nestes cromatogramas a ausência de íons relacionados aos meroterpenos de interesse, visto que os tempos de retenção dos picos detectados não coincidem com os apresentados na Tabela 4.3.

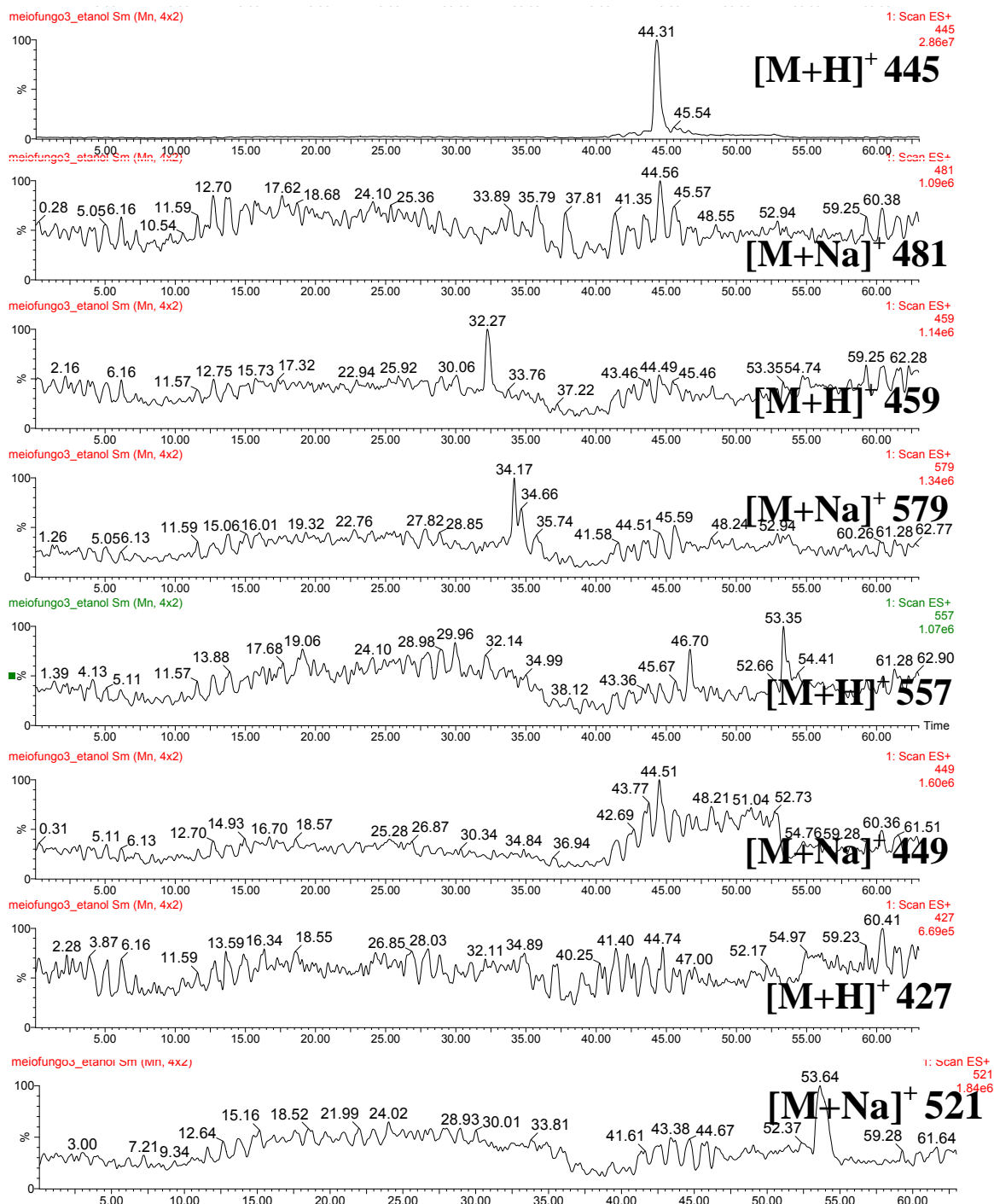


FIGURA 4.46 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de Czapeck (micélio). Ionização por ESI⁺.

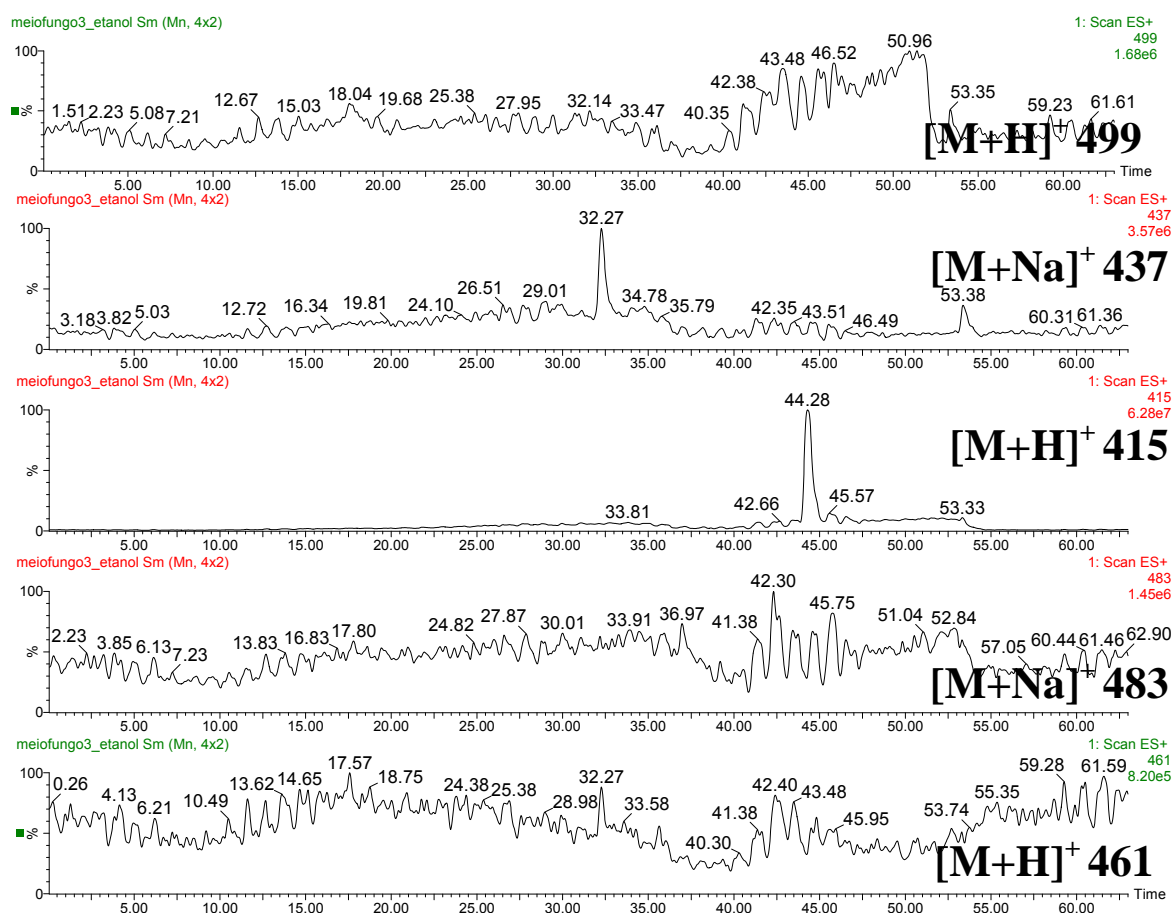


FIGURA 4.46 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos ou seus adutos de sódio, encontrados no extrato fúngico de Czapeck (micélio). Ionização por ESI⁺.

4.3.3 - Análises por HPLC-APCI-MS

Após o conserto de probe de APCI, todas as análises restantes foram realizadas utilizando esta técnica de ionização. As análises já feitas por ESI foram repetidas, visto que haveria uma possibilidade maior de detecção dos meroterpenos por APCI. Conforme pode ser observado pelas estruturas moleculares dos meroterpenos em estudo, ilustradas na Figura 4.3 (página 35), estas moléculas não possuem sítios básicos ou ácidos, e também são moléculas de média a baixa polaridade, o que dificulta sua ionização em solução, quando se utiliza o probe de ESI. O probe de APCI, por sua vez, é uma boa alternativa para a ionização destes compostos, pois ela ocorre na fase gasosa.

Desta forma, os resultados obtidos por LC-APCI-MS foram úteis para confirmar a ausência de meroterpenos em alguns extratos, e para detectar outros meroterpenos não detectáveis por LC-ESI-MS.

4.3.3.1 - Análises dos padrões de meroterpenos

Infelizmente, no período em que se realizaram as análises por LC-APCI-MS, a coluna analítica C-18 que foi utilizada para otimização do método cromatográfico para separação dos meroterpenos foi perdida. Por isso, optou-se por usar uma coluna synergi para as análises seguintes.

Para o desenvolvimento do novo método cromatográfico utilizou-se uma mistura de padrões contendo os meroterpenos PSP-1, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13. A Figura 4.47 apresenta os cromatogramas de íons selecionados obtidos pela análise de *full-scan* no modo positivo da mistura de meroterpenos, e os espectros de massas dos picos cromatográficos.

Pelos espectros de massas da Figura 4.47, nota-se que, exceto em B', os picos de $[M+H]^+$ dos meroterpenos são os de maior intensidade em cada espectro. O fato da não ocorrência de adutos de sódio destes compostos nas análises com o probe de APCI é muito importante para os experimentos confirmatórios, de íons produto, porque quanto maior a quantidade da molécula de interesse protonada, maior será, também, a quantidade de íons produto característicos de cada composto, aumentando a sensibilidade destas análises.

O espectro de massas B', relativo ao meroterpeno PSP-4, é o único que apresenta o pico da molécula protonada menos intenso. Se este íon realmente está relacionado ao meroterpeno PSP-4, provavelmente este composto está presente em menor quantidade na mistura de padrões. É possível também que, devido à coeluição de três dos padrões analisados – PSP-4, PSP-8 e PSP-9 – a ionização do PSP-4 tenha sido suprimida, diminuindo a sensibilidade de detecção deste composto. Uma outra possibilidade é que, na verdade, este íon de m/z 459 esteja relacionado a alguma impureza presente na mistura de padrões.

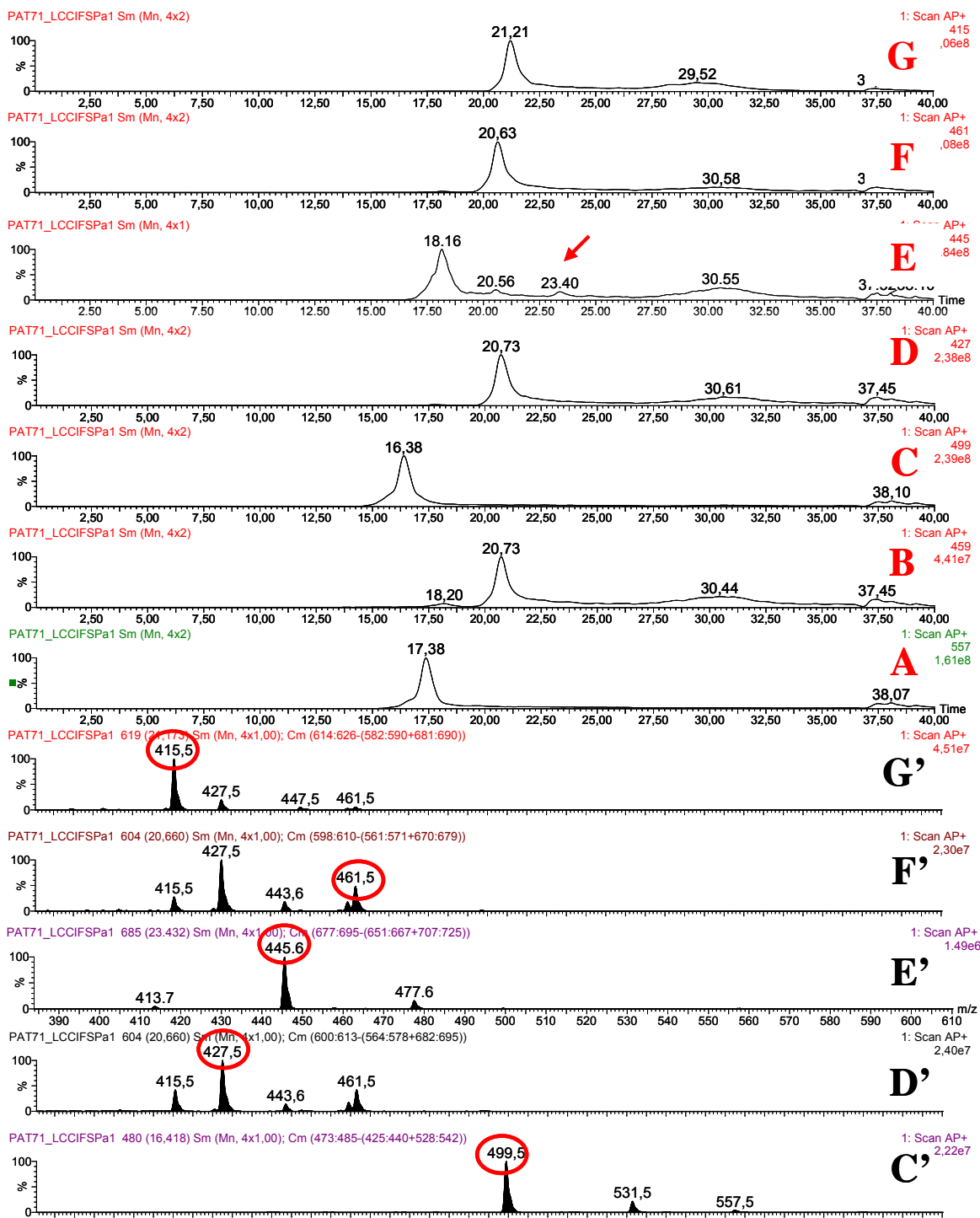


FIGURA 4.47 - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-1 (E), PSP-3 (A), PSP-4 (B), PSP-6 (C), PSP-8 (D), PSP-9 (F) e PSP-13 (G). Abaixo, (A' a G'), seus respectivos espectros de massas. Análise por LC-APCI-MS no modo positivo.

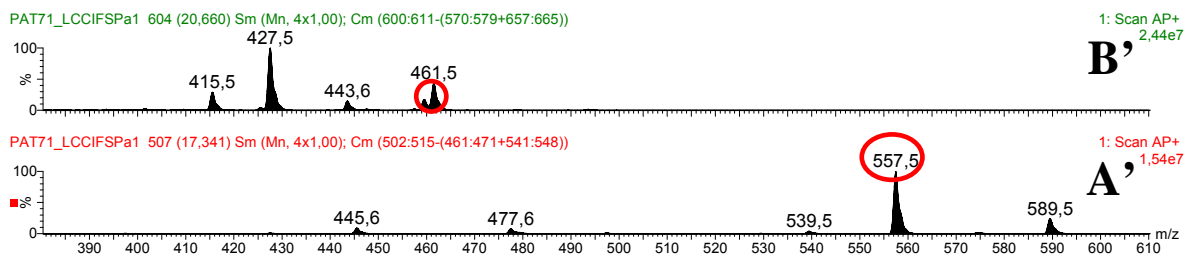


FIGURA 4.47 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados dos meroterpenos PSP-1 (E), PSP-3 (A), PSP-4 (B), PSP-6 (C), PSP-8 (D), PSP-9 (F) e PSP-13 (G). Abaixo, (A' a G'), seus respectivos espectros de massas. Análise por LC-APCI-MS no modo positivo.

O recurso *tandem* (LC-APCI-MS-MS) também foi aplicado na análise desta mistura de meroterpenos, a fim de se adquirir mais informação estrutural a respeito de cada composto, sendo possível atribuir com maior certeza a existência destes padrões em extratos complexos. Os cromatogramas resultantes deste experimento estão mostrados na Figura 4.48.

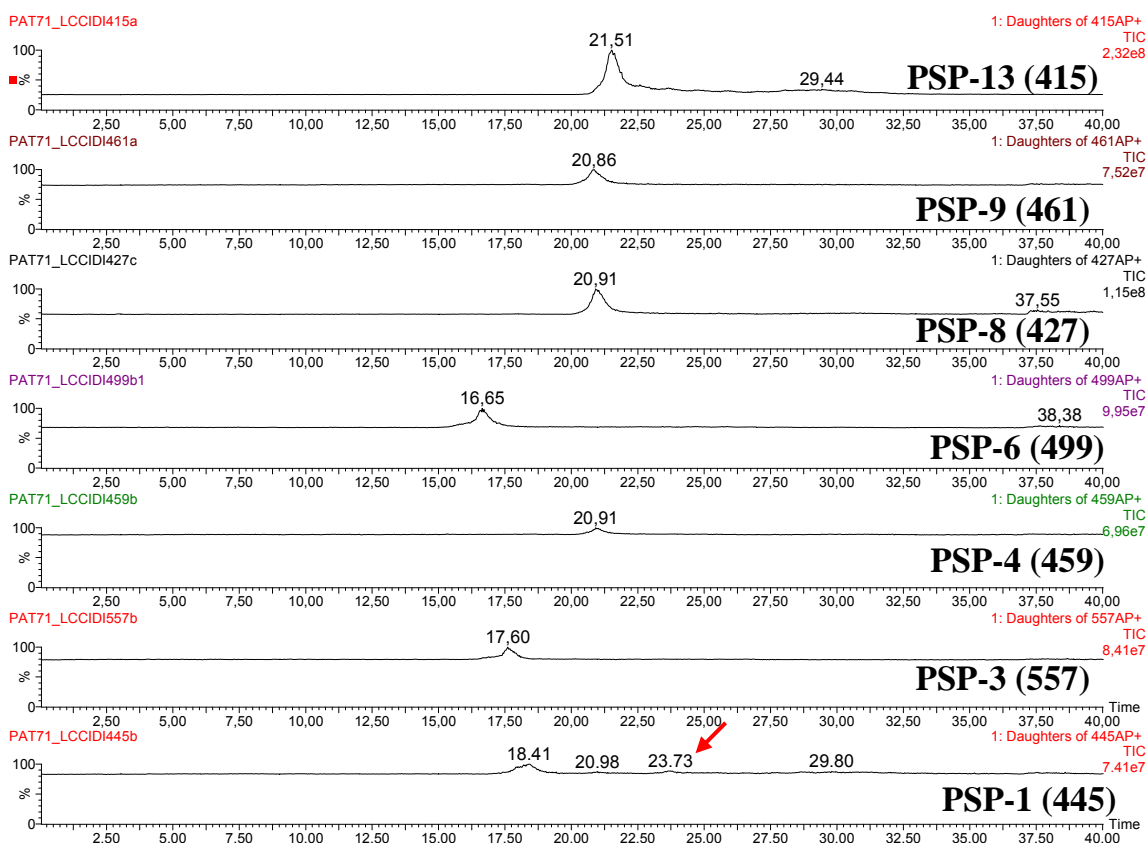


FIGURA 4.48 - Cromatogramas da mistura de padrões de meroterpenos obtidos via LC-APCI-MS-MS.

Os espectros de massas dos meroterpenos PSP-1, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, obtidos via LC-APCI-MS-MS, estão apresentados na Figura 4.49, e os esquemas 4.1 a 4.6 trazem as propostas de fragmentação desses compostos.

Pelos espectros de massas mostrados na Figura 4.49, pode-se ver que não foi possível obter os íons produto do meroterpeno PSP-4, já que o espectro obtido em seu tempo de retenção é igual ao do meroterpeno PSP-8.

A Tabela 4.4 mostra os tempos de retenção dos padrões de meroterpenos determinados via LC-APCI-MS e LC-APCI-MS-MS.

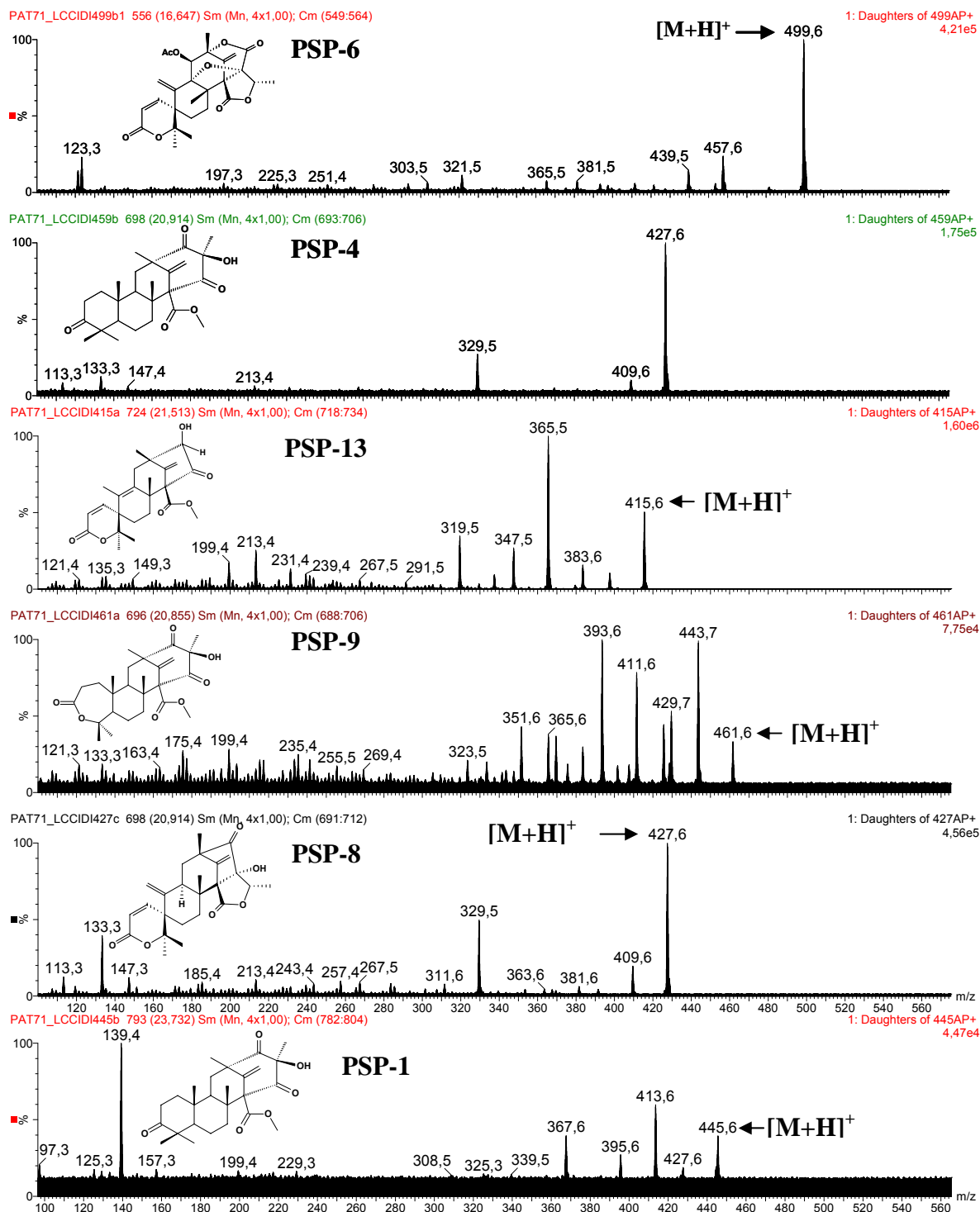


FIGURA 4.49 - Espectros de massas dos padrões de meroterpenos PSP-1, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, obtidos via APCI no modo positivo com 24 eV de energia de colisão.

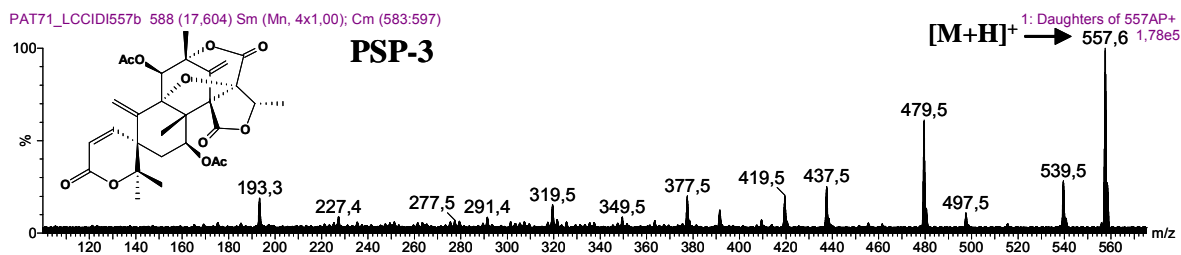
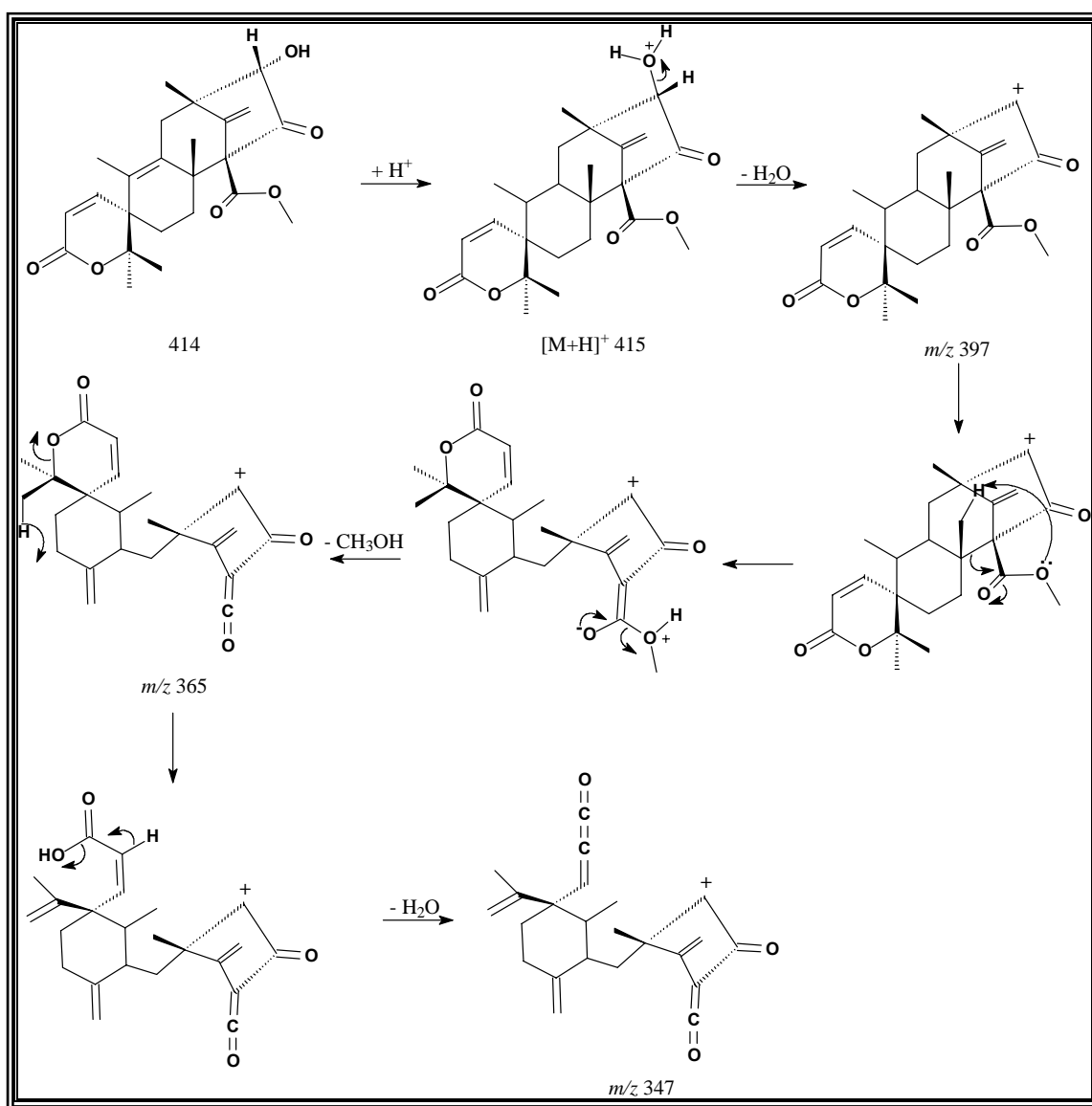
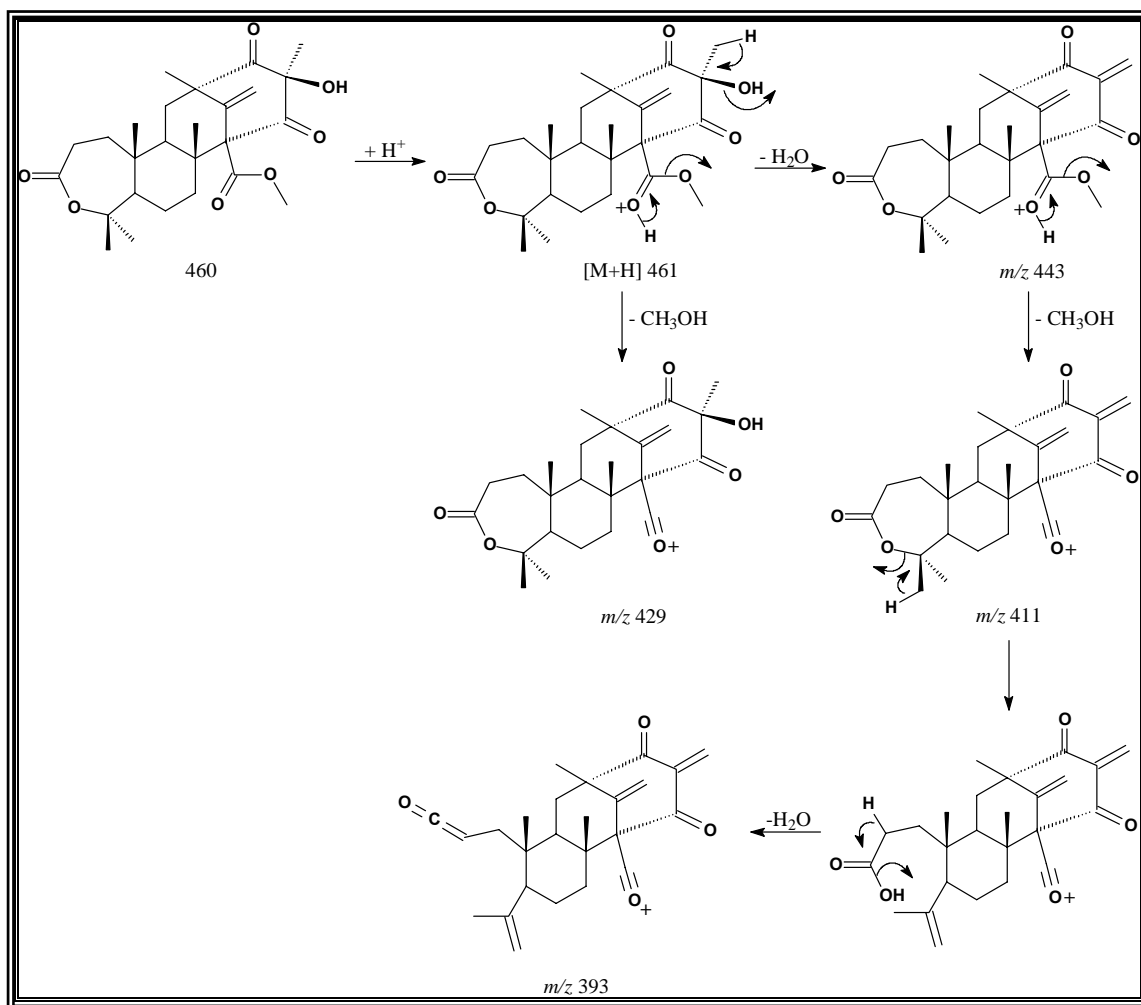


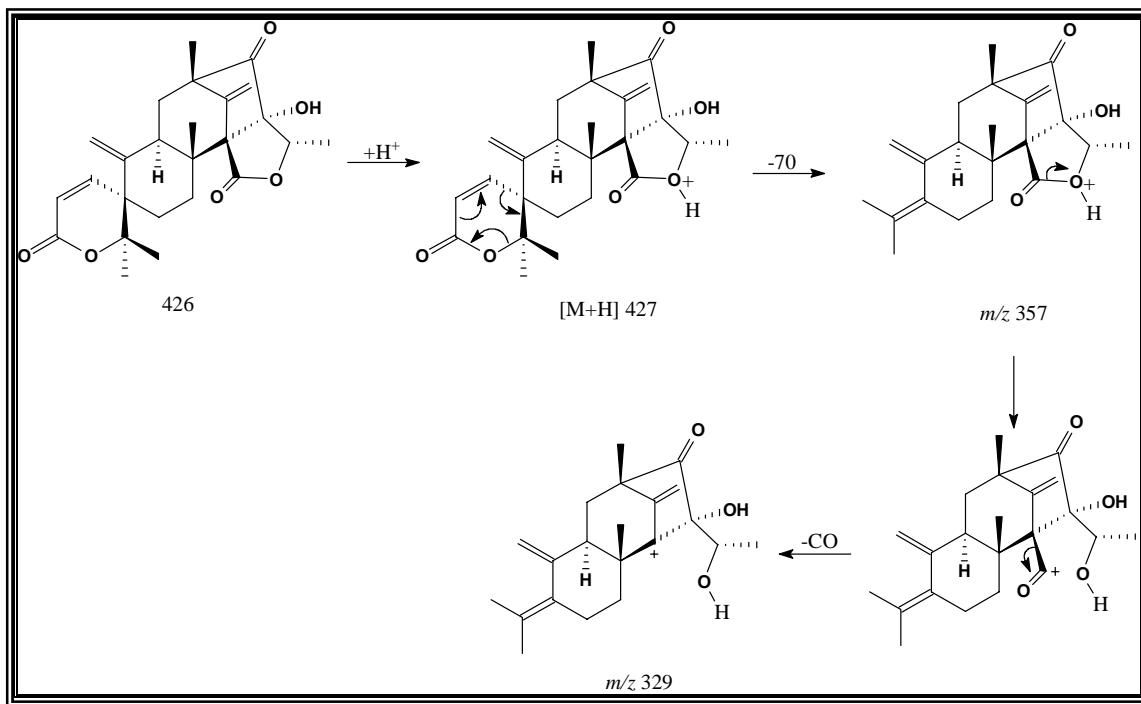
FIGURA 4.49 (CONTINUAÇÃO) – Espectros de massas dos padrões de meroterpenos PSP-1, PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, obtidos via APCI no modo positivo com 24 eV de energia de colisão.



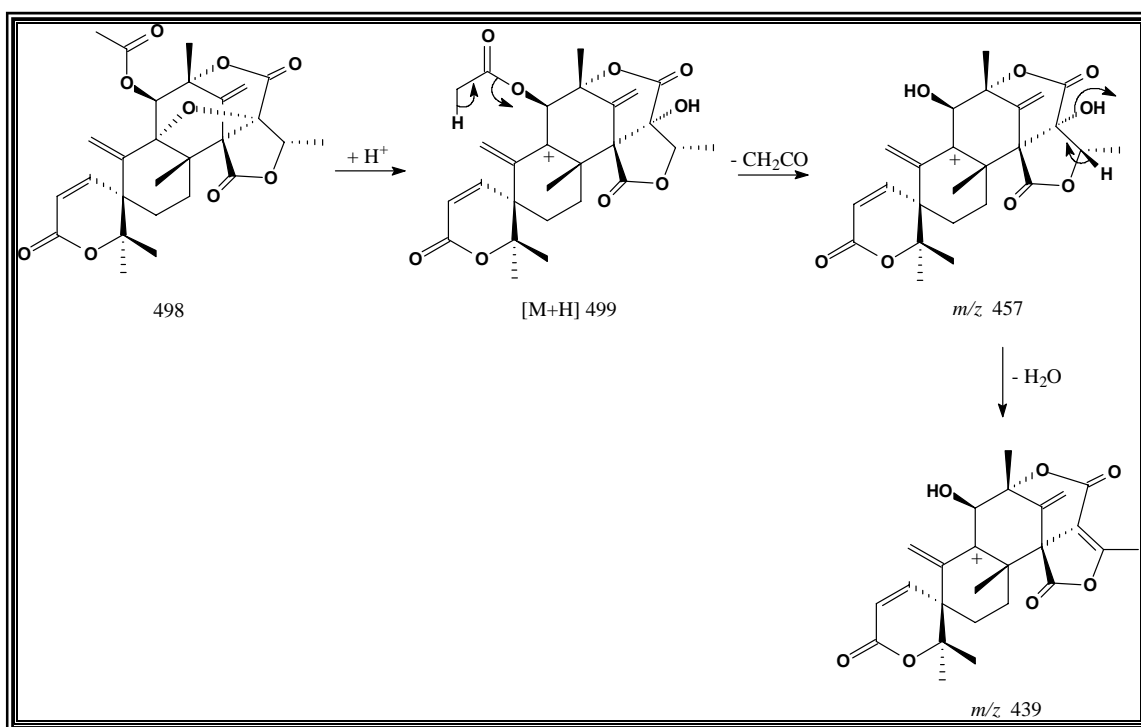
ESQUEMA 4.1 - Proposta de fragmentação para o meroterpene PSP-13.



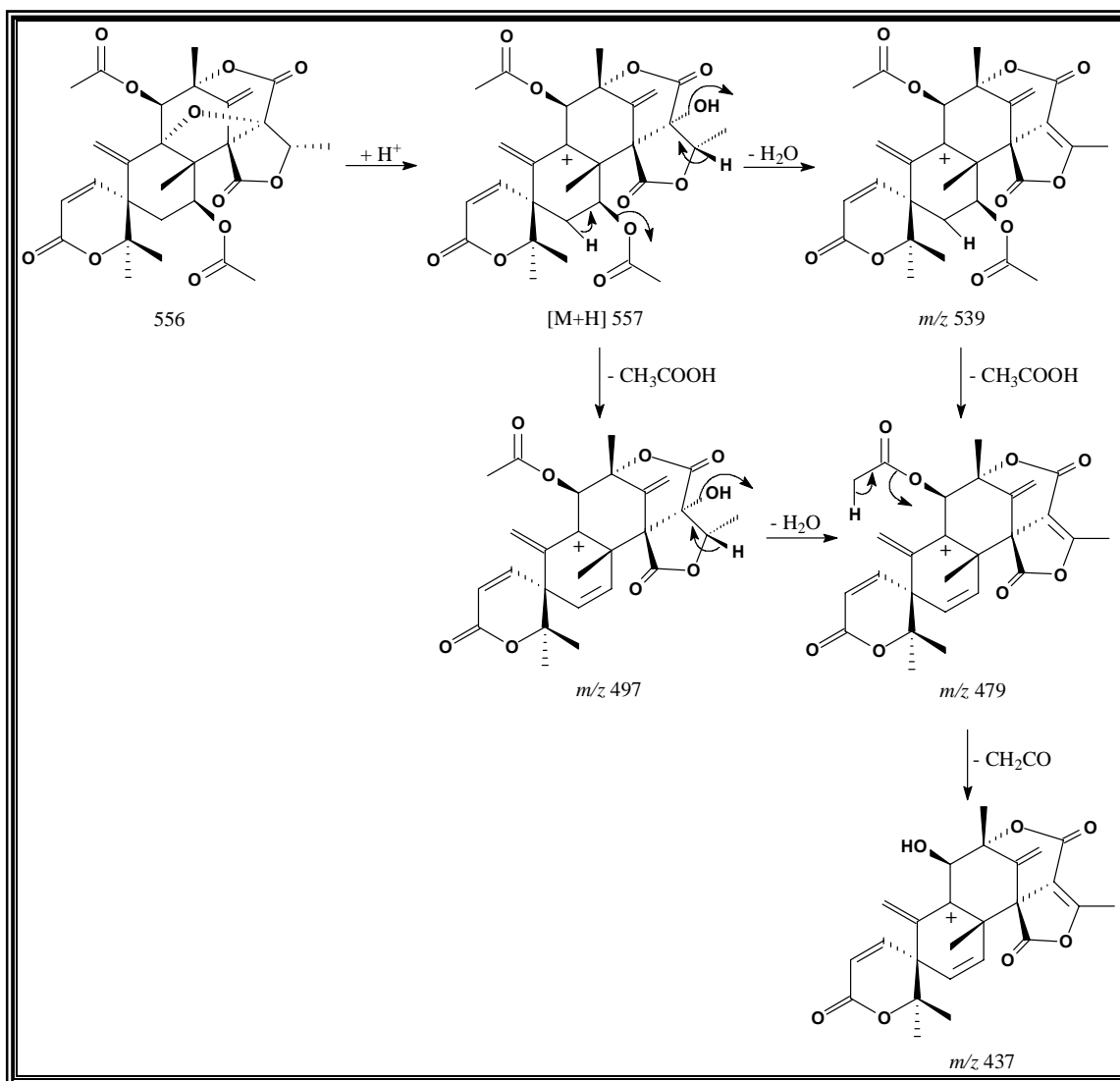
ESQUEMA 4.2 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-9.



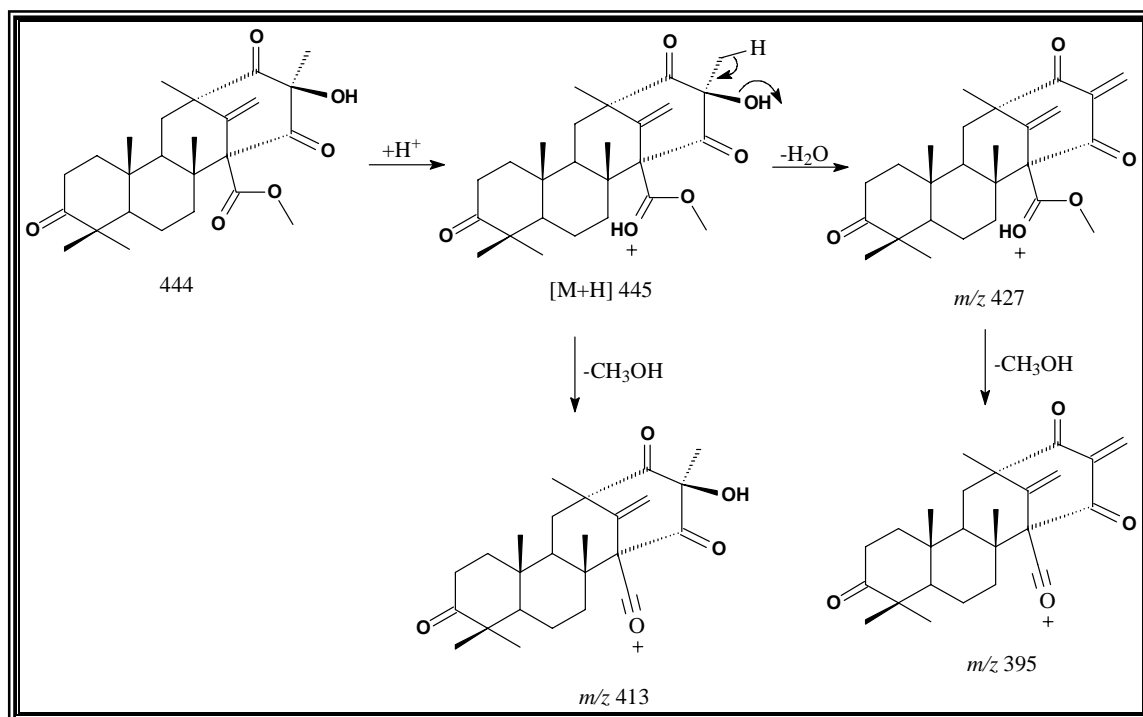
ESQUEMA 4.3 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-8.



ESQUEMA 4.4 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-6.



ESQUEMA 4.5 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-3.



ESQUEMA 4.6 - Proposta de fragmentação para o meroterpeno PSP-1.

TABELA 4.4 - Tempos de retenção (LC-APCI-MS e LC-APCI-MS-MS) dos meroterpenos analisados pelo método descrito na seção 3.9.3.

Meroterpenos	PM	t _R LC-MS (min)	t _R LC-MS-MS (min)	[M+H] ⁺
PSP-1	444	23,40	23,73	445
PSP-3	556	17,38	17,60	557
PSP-6	498	16,38	16,65	499
PSP-8	426	20,73	20,91	427
PSP-9	460	20,63	20,86	461
PSP-13	414	21,21	21,51	415

4.3.3.2 - Análises do extrato de arroz

Os extratos fúngicos dos diferentes meios de cultura foram novamente analisados com o intuito de tentar detectar outros meroterpenos além daqueles já detectados por LC-ESI-MS, visto que a técnica de ionização por APCI se mostrou mais eficiente para estes compostos.

A Figura 4.50 mostra os cromatogramas de íons selecionados da análise de *full scan* do extrato fúngico de arroz. Nela, os picos cromatográficos apontados pelas flechas são referentes aos íons de mesmo valor de *m/z* e com tempos de retenção coincidentes aos dos meroterpenos citados na Tabela 4.4. No cromatograma de íons selecionados [M+H]⁺ 445 não se detectou nenhum íon com tempo de retenção semelhante ao do padrão PSP-1. Os resultados desta análise sugerem, então, a presença dos meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13 no extrato de arroz. Em cada espectro de massas apresentado (relativo aos picos cromatográficos marcados), o pico referente a [M+H]⁺ está circulado. Foi possível

notar que os espectros de massas dos íons de m/z 415, 461 e 427 são similares, pois seus picos cromatográficos coeluem.

A Figura 4.51 mostra os cromatogramas de íons selecionados do branco do arroz. Estes cromatogramas confirmam a ausência dos íons relacionados aos meroterpenos de interesse que foram encontrados no extrato fúngico de arroz (Figura 4.50). Portanto, pode-se afirmar que estes compostos ionizados são metabólitos do fungo *P. brasilianum*.

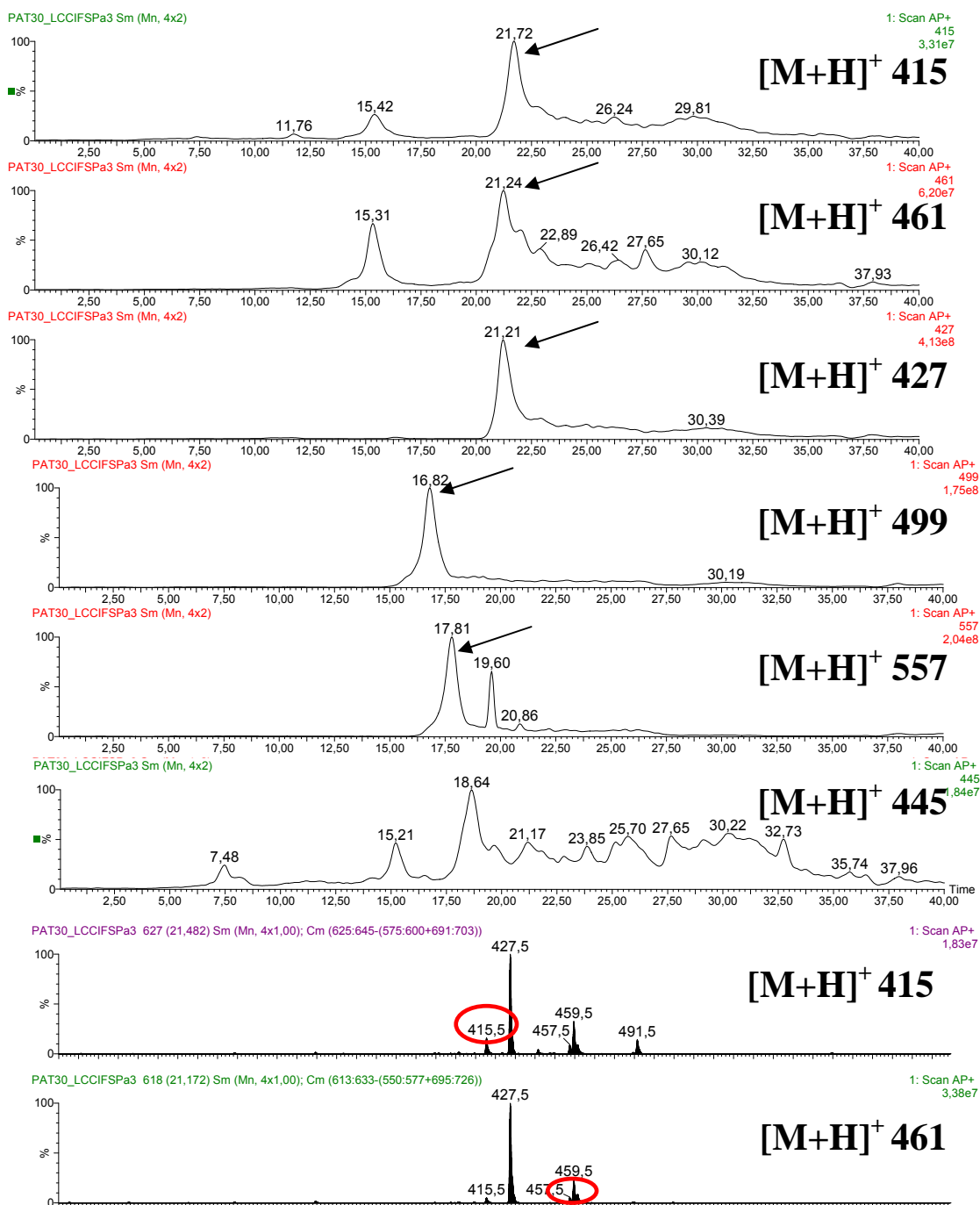


FIGURA 4.50 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de arroz e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI⁺.

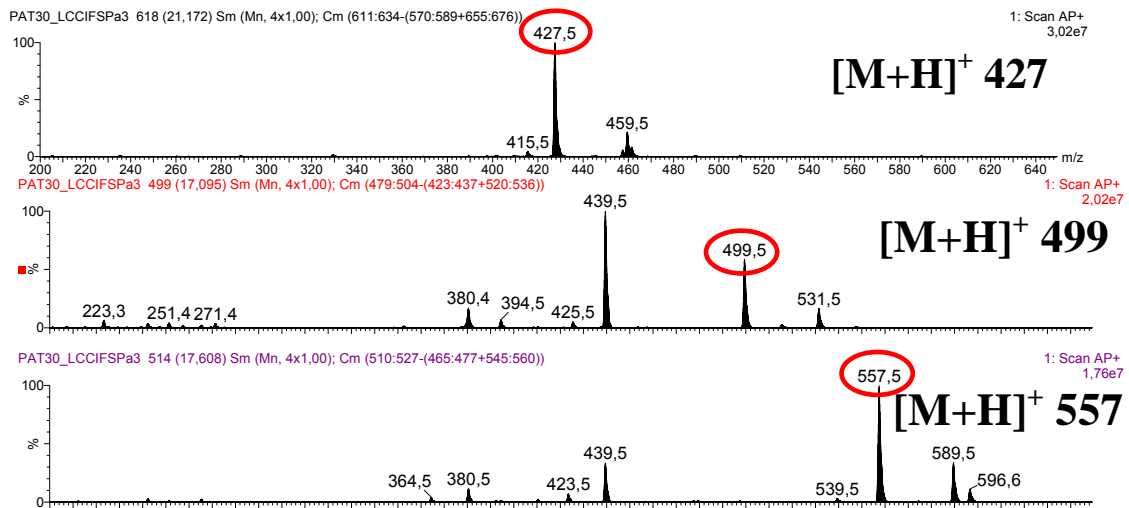


FIGURA 4.50 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de arroz e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI⁺.

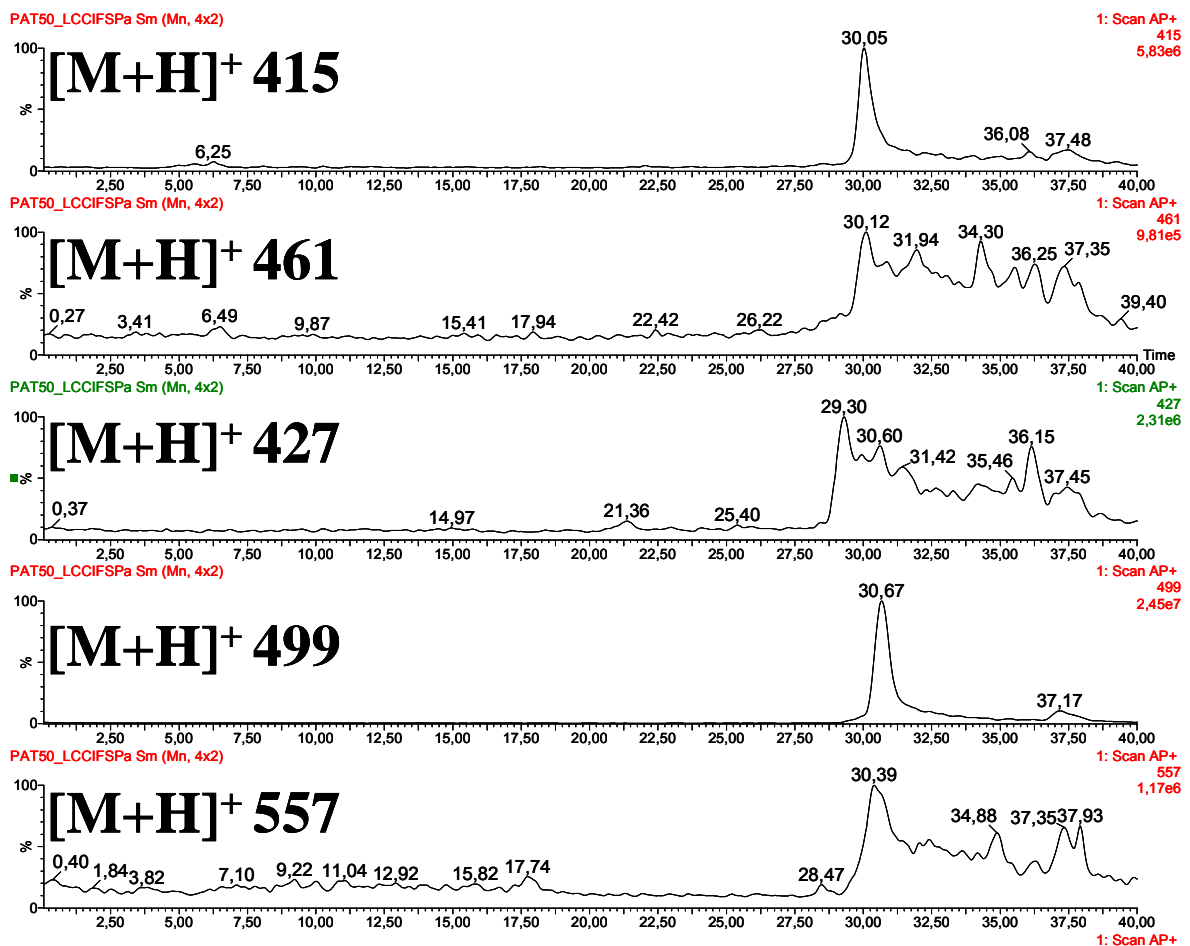


FIGURA 4.51 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de arroz. Ionização por APCI⁺.

4.3.3.3 - Análises do extrato de trigo

O extrato fúngico de trigo também apresentou alguns íons de interesse, como pode ser visualizado pelos cromatogramas (picos marcados com flechas) e espectros de massas da Figura 4.52.

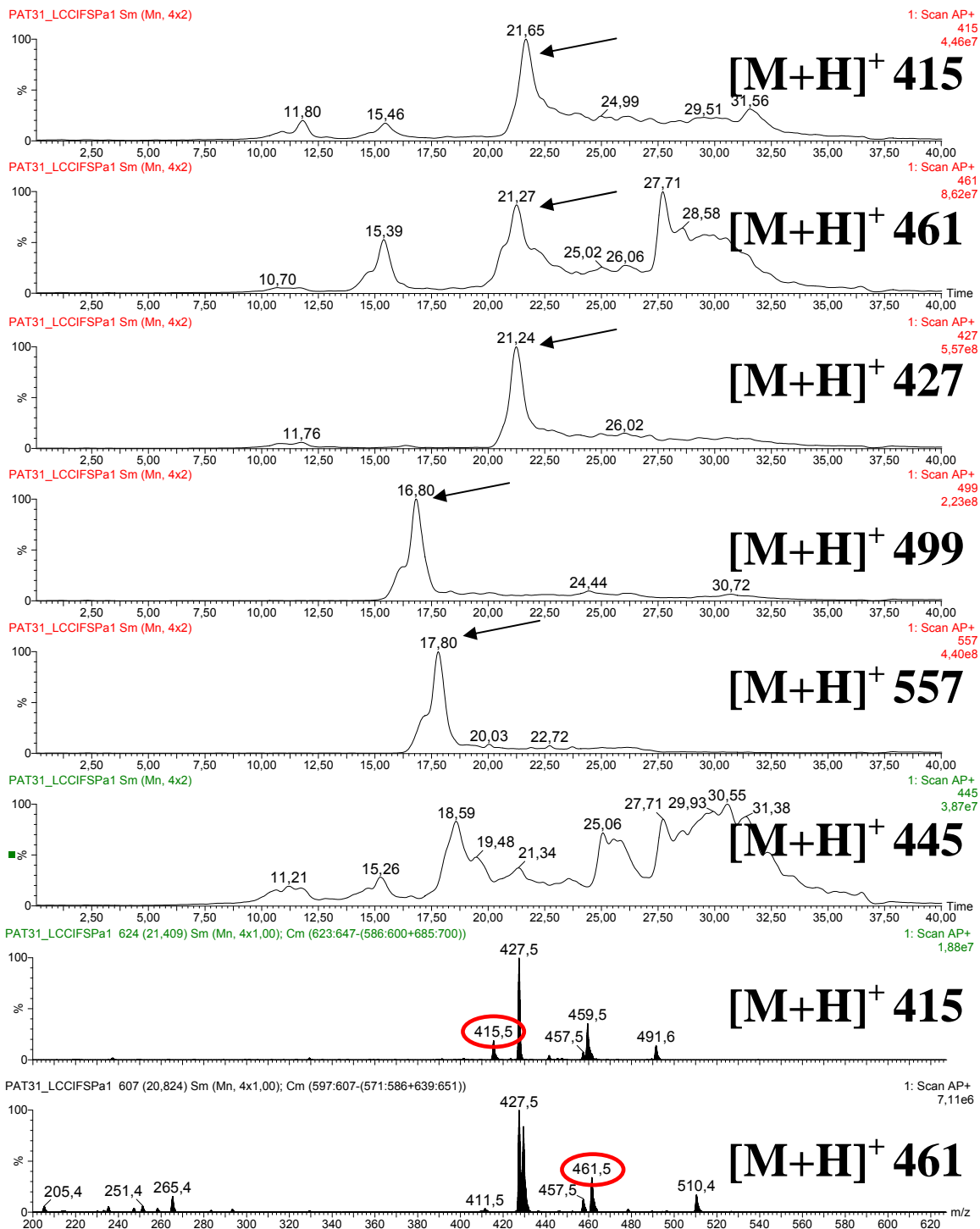


FIGURA 4.52 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de trigo e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI⁺.

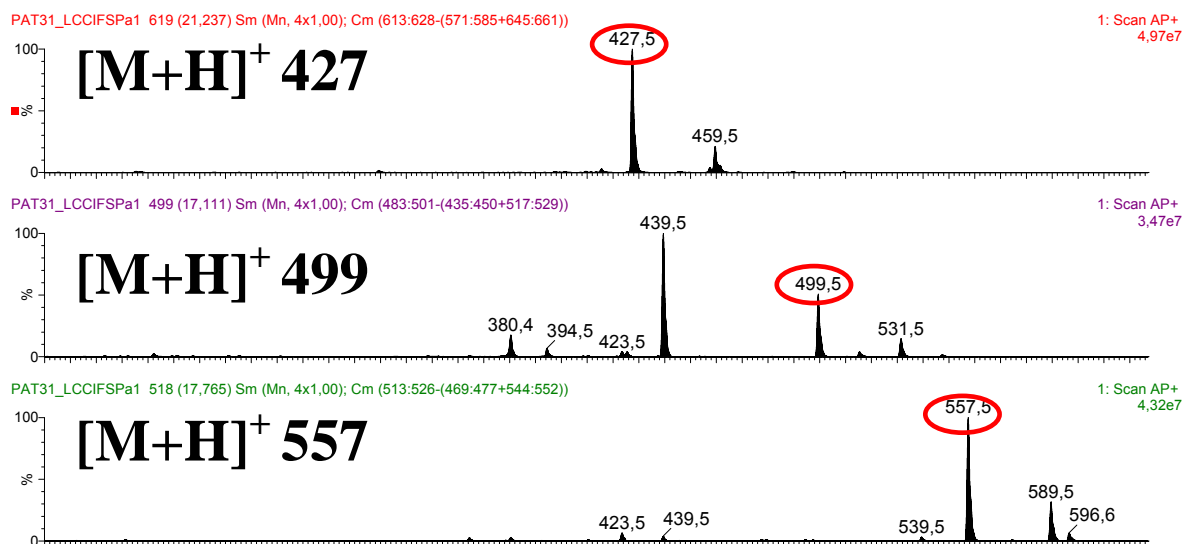


FIGURA 4.52 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de trigo e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI⁺.

Como pode ser observado pelos cromatogramas de íons selecionados e pelos espectros de massas da Figura 4.52, no extrato de trigo foram encontrados também todos os íons relacionados aos padrões de meroterpenos citados na Tabela 4.4 (PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13), exceto em relação ao PSP-1, como pode ser visto pela ausência de um pico cromatográfico com mesmo tempo de retenção deste padrão no cromatograma $[M+H]^+$ 445. A ionização por APCI se mostrou mais eficiente para a análise destes compostos, visto que, utilizando ESI, não foram detectados todos estes meroterpenos no extrato de trigo.

A amostra de branco do trigo foi igualmente analisada, e seus cromatogramas de íons selecionados (Figura 4.53) mostram a ausência de íons de m/z e tempos de retenção iguais aos dos meroterpenos. Este resultado comprova que as substâncias encontradas no extrato fúngico de trigo são relativas a metabólitos secundários do fungo, e muito provavelmente aos padrões em estudo.

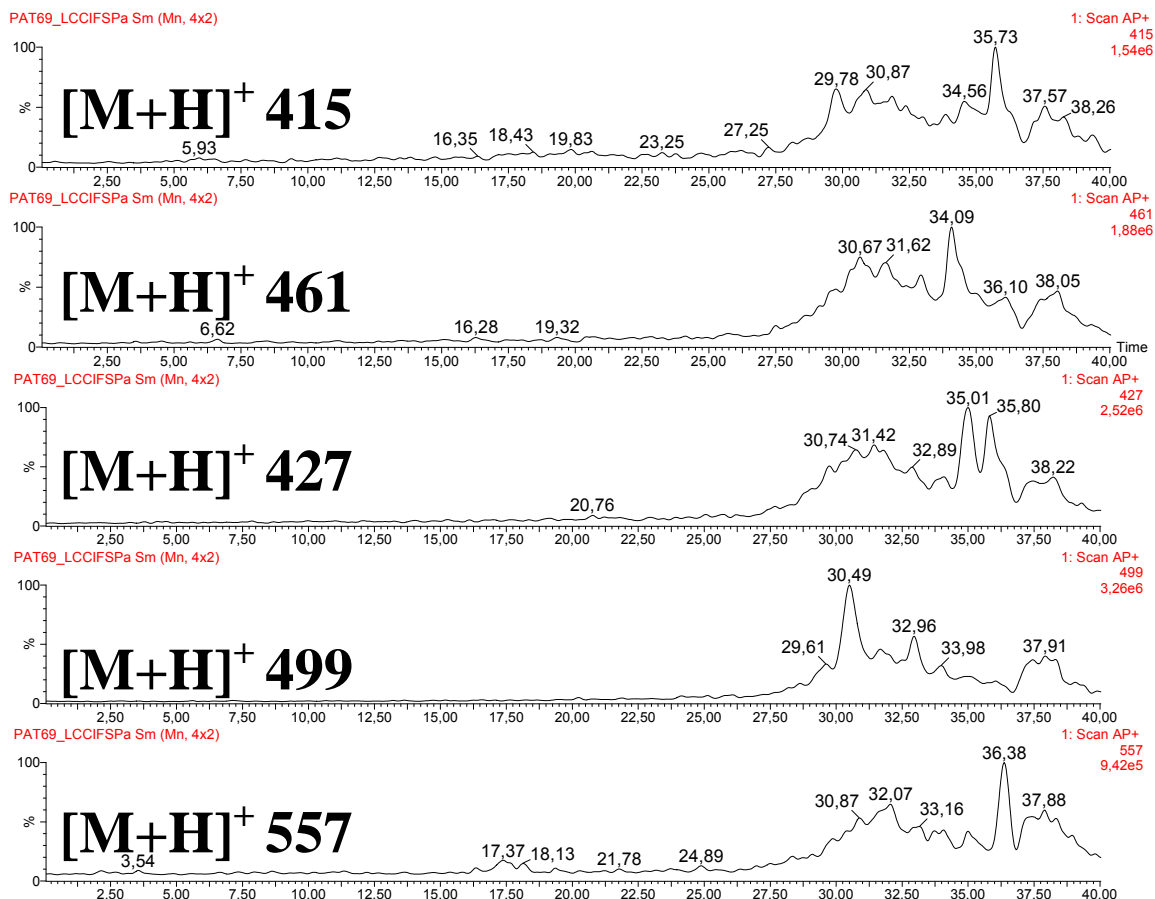


FIGURA 4.53 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de trigo. Ionização por APCI⁺.

4.3.3.4 - Análises do extrato de milho

O extrato obtido através do cultivo do fungo em milho foi igualmente analisado via LC-APCI-MS, e os resultados mostrados na Figura 4.54 revelaram a existência de íons provavelmente relacionados aos meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, devido à coincidência dos valores de *m/z* e tempos de retenção das espécies selecionadas nos cromatogramas. Em relação ao meroterpeno PSP-1, não foi detectado nenhum íon com *m/z* e tempo de retenção iguais aos deste padrão no extrato, já que o último espectro de massas da Figura 4.54, relativo ao pico cromatográfico em 23,76 minutos (do cromatograma [M+H]⁺ 445), não apresentou um pico com *m/z* 445.

A Figura 4.55 apresenta os cromatogramas do branco do milho, nos quais não foram detectados íons relacionados aos meroterpenos de interesse, conforme já era esperado.

Resultados e Discussões

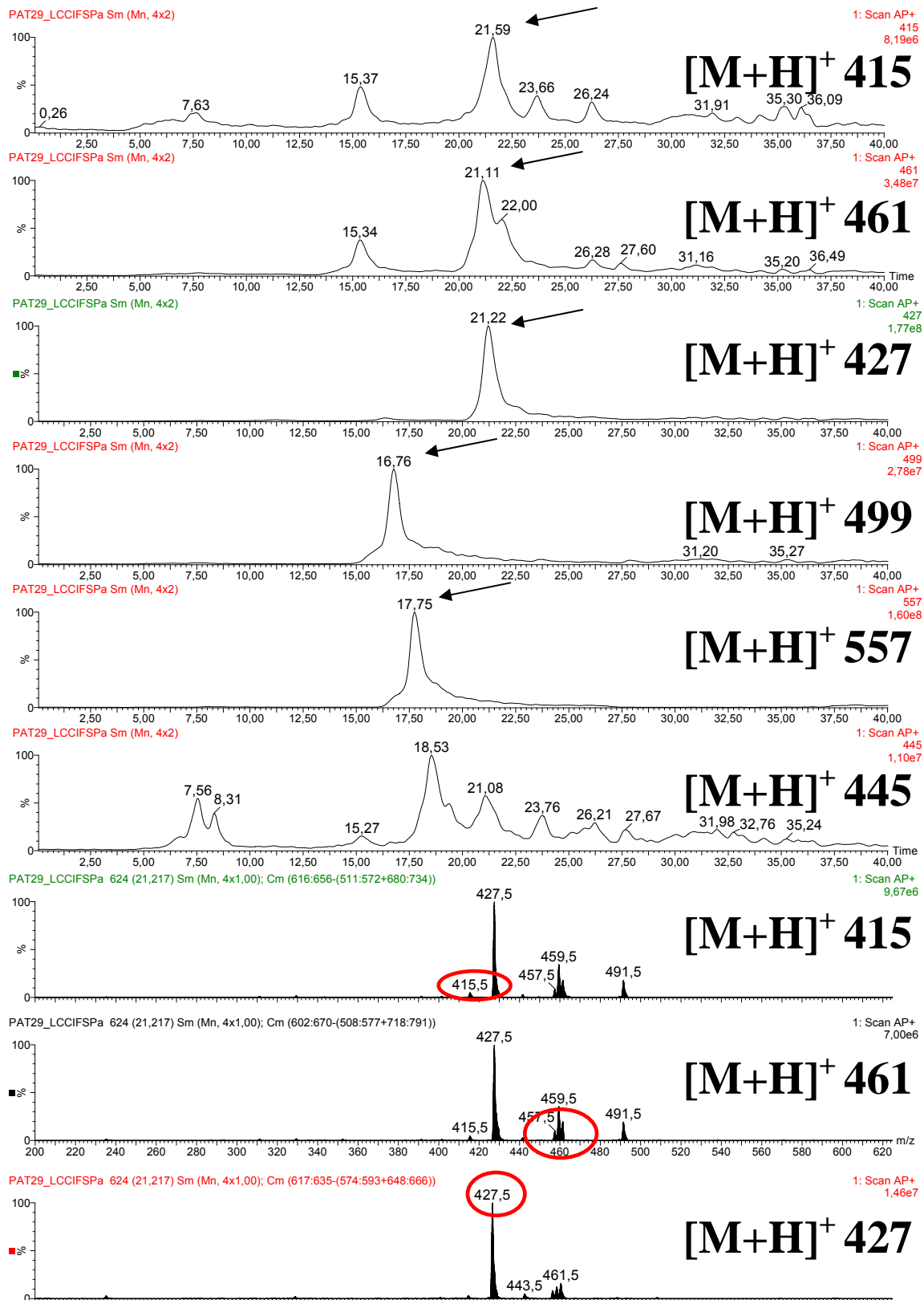


FIGURA 4.54 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de milho e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI⁺.

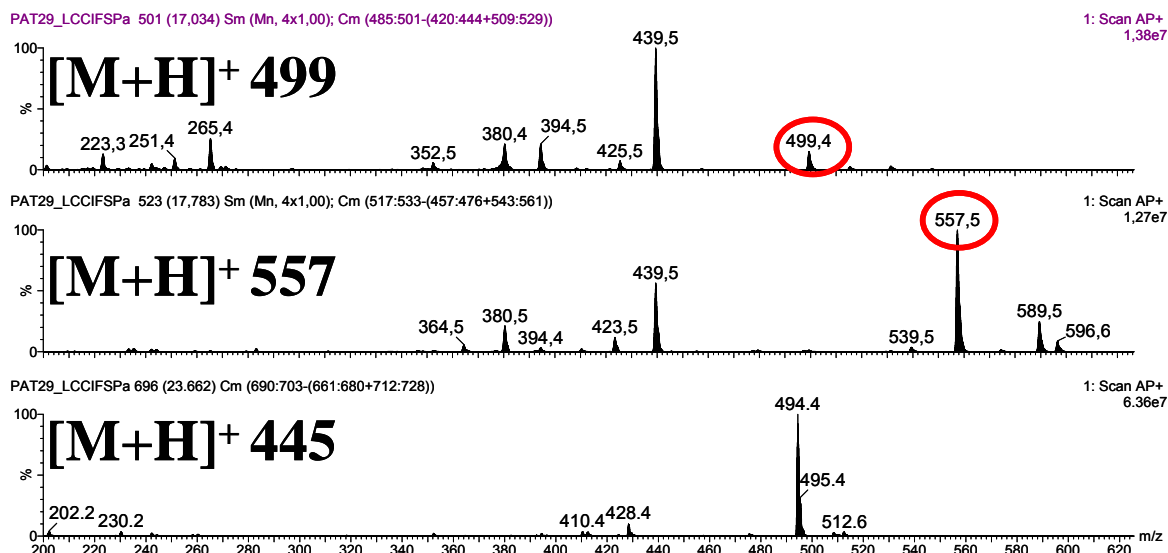


FIGURA 4.54 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de *m/z* relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de milho e seus respectivos espectros de massa. Ionização por APCI⁺.

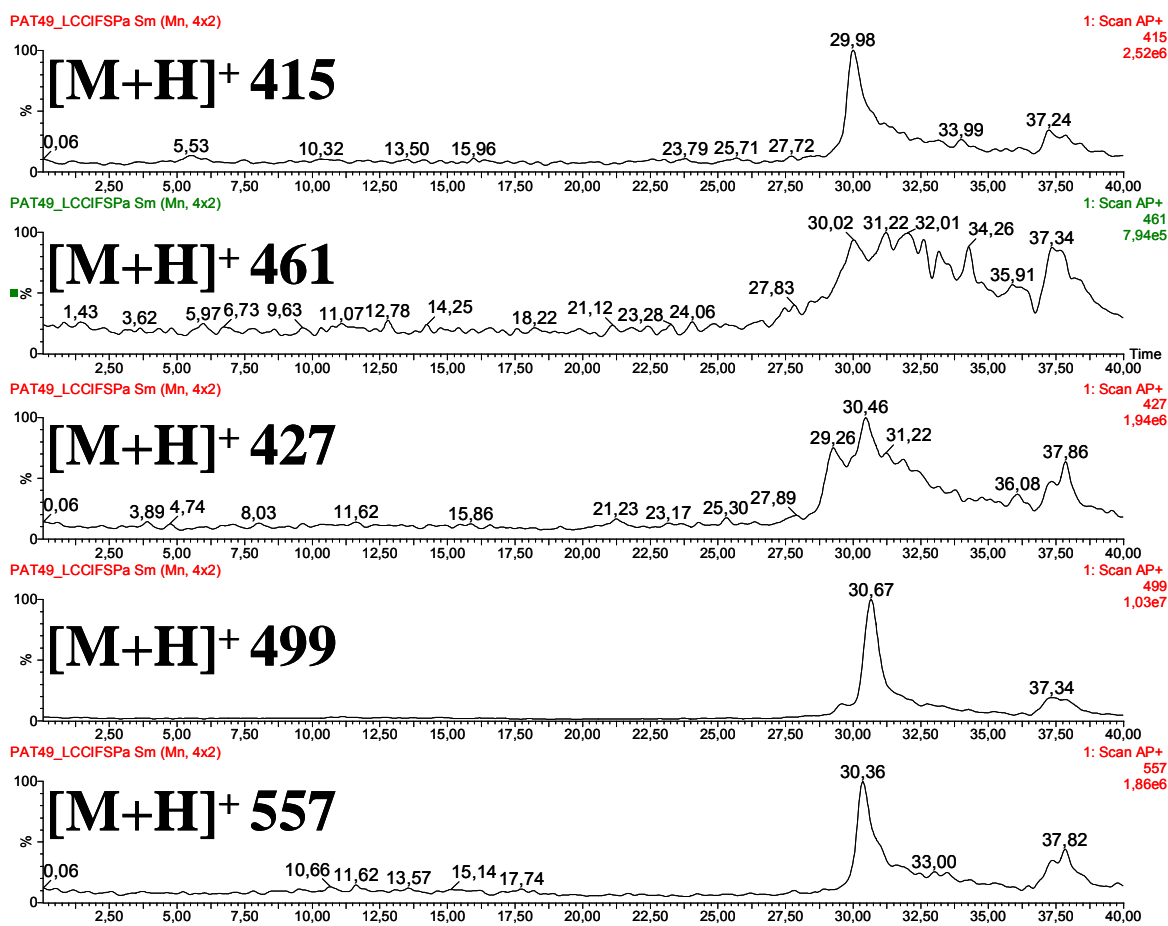


FIGURA 4.55 - Cromatogramas de íons selecionados do branco de milho. Ionização por APCI⁺.

4.3.3.5 - Análises dos meios de caldo de arroz, filtrado do caldo de arroz e arroz cozido

Como foi visto pelas análises dos extratos dos meios líquidos derivados do arroz via LC-ESI-MS, na seção 4.3.1.4, somente dois íons relacionados aos padrões de meroterpenos foram detectados, no extrato micelial do caldo de arroz com glicose. As novas análises com o probe de APCI, porém, trouxeram resultados mais sensíveis em relação à existência ou não dos compostos de interesse nestes meios.

A Figura 4.56 apresenta os cromatogramas de íons selecionados do extrato de acetato do caldo de arroz sem glicose, e os espectros de massas dos picos com tempos de retenção semelhantes aos dos meroterpenos. A presença neste extrato de íons com valores de m/z e tempos de retenção semelhantes aos apresentados na Tabela 4.4 (página 98) é um forte indício da produção de meroterpenos pelo fungo neste meio de cultura. As análises por APCI permitiram a detecção destes compostos, mesmo podendo eles estar em pequenas concentrações. Nota-se que no espectro de massas de $[M+H]^+$ 415, o pico relativo ao meroterpeno protonado não é o de maior intensidade. O suposto pico do meroterpeno PSP-9 (em 21,53 minutos, no cromatograma $[M+H]^+$ 461) está deslocado em torno de 1 minuto em relação ao tempo de retenção obtido para o composto analisado na mistura dos padrões. E também não foi possível visualizar o pico de m/z 461 no seu espectro de massas. No cromatograma de íons selecionados $[M+H]^+$ 445, não foram detectados íons com tempo de retenção semelhante ao do padrão de meroterpeno PSP-1 (t_r 23,73 minutos). Pelos resultados apresentados, portanto, é possível sugerir que apenas os meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8 e PSP-13 estejam presentes neste extrato fúngico.

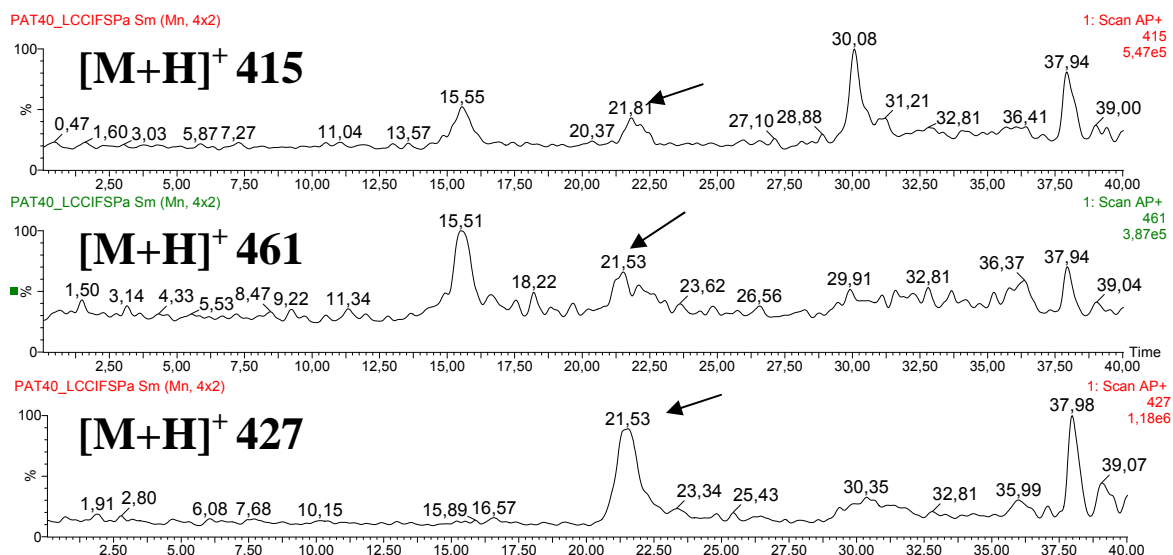


FIGURA 4.56 – Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato de etila, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

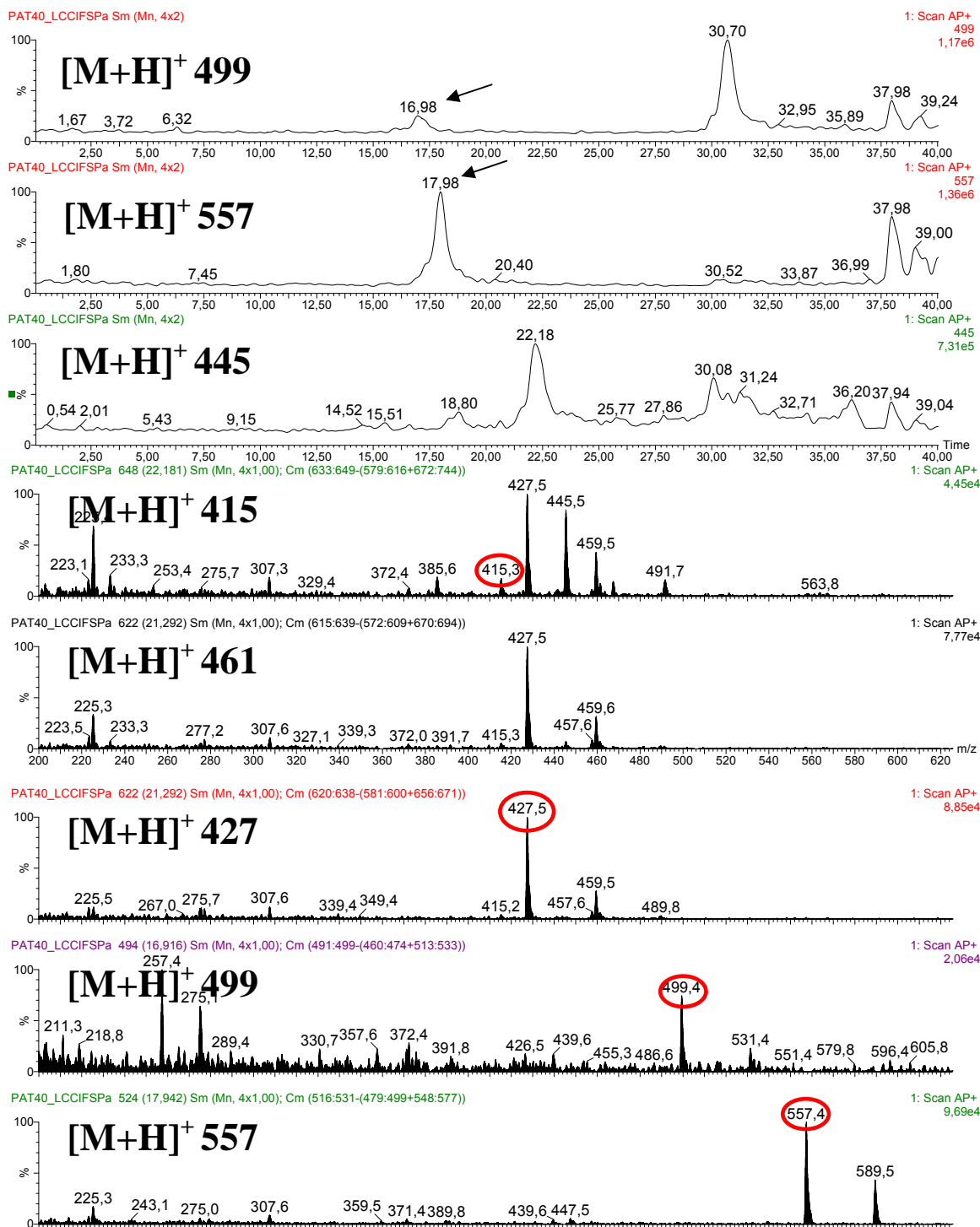


FIGURA 4.56 (CONTINUAÇÃO) – Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato de etila, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

Da mesma forma que no extrato de acetato, no extrato micelial também foram detectados íons provavelmente relacionados aos meroterpenos, como pode ser visto pelos cromatogramas e espectros de massas da Figura 4.57. Apesar de os cromatogramas de íons selecionados $[M+H]^+$ 461 e $[M+H]^+$ 415 apresentarem picos com tempos de retenção semelhantes aos dos meroterpenos PSP-9 e PSP-13, respectivamente, seus espectros de massas não mostraram os picos dos íons em

questão, como é observado nos espectros $[M+H]^+$ 461 e $[M+H]^+$ 415. O cromatograma de íons selecionados $[M+H]^+$ 445 também não apresentou nenhum pico com tempo de retenção coincidente ao do padrão PSP-1. Com estes resultados, pode-se dizer que é mais provável a existência dos meroterpenos PSP-3, PSP-6 e PSP-8 no extrato micelial de caldo de arroz sem glicose. Pelos resultados de *full scan* nada se pode falar sobre a existência dos meroterpenos PSP-9 e PSP-13 neste extrato, visto que os picos dessas moléculas protonadas não apareceram nos seus respectivos espectros de massas.

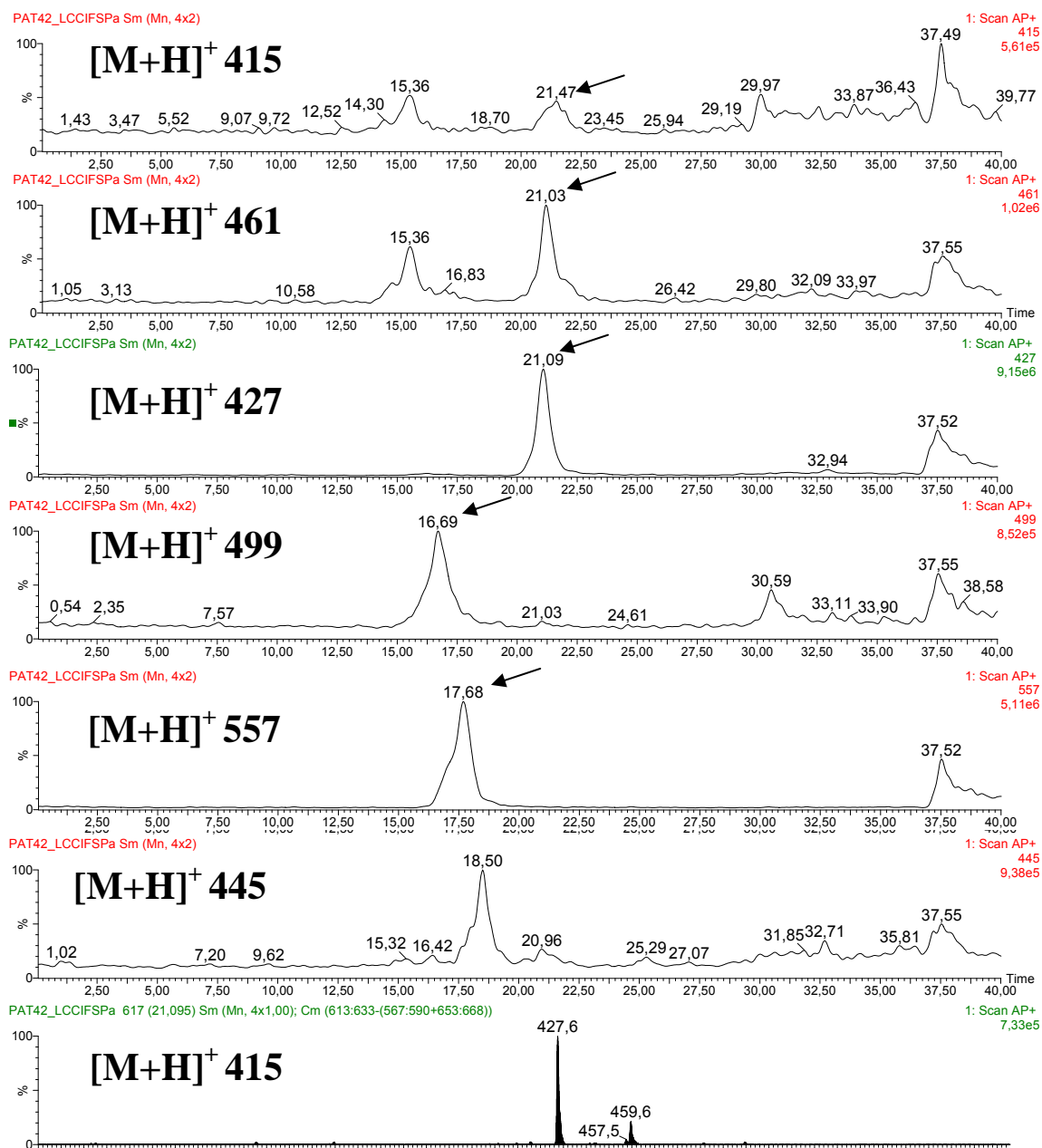


Figura 4.57 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz sem glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por $APCI^+$.

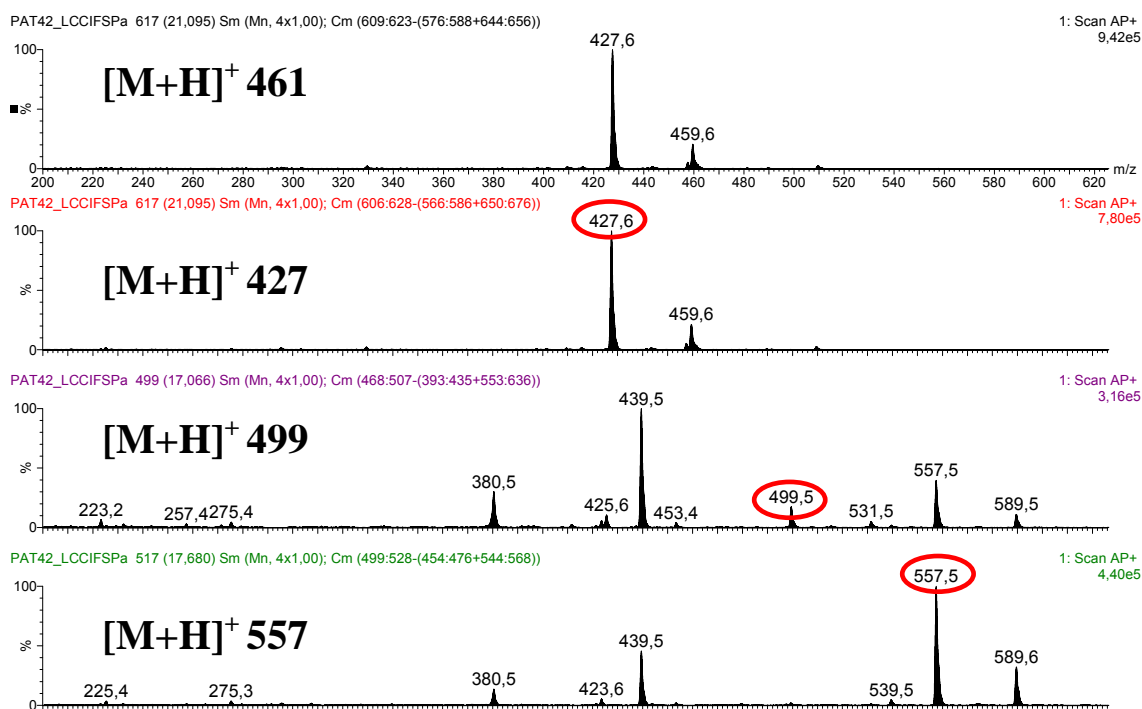


FIGURA 4.57 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz sem glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI^+ .

Os extratos de caldo de arroz com glicose foram igualmente analisados, e como pode ser visto pelos resultados apresentados na Figura 4.58, no extrato de acetato foi possível detectar todos os íons relacionados aos meroterpenos da Tabela 4.4 (página 98) nos seus respectivos tempos de retenção, exceto em relação ao padrão PSP-1, visto que seu cromatograma de íons selecionados não apresentou um pico característico do composto. Os espectros de massas ilustrados apresentam os picos dos íons de interesse, que estão circulados. Dessa forma, é possível sugerir que os meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13 tenham sido produzidos pelo fungo neste meio de cultura.

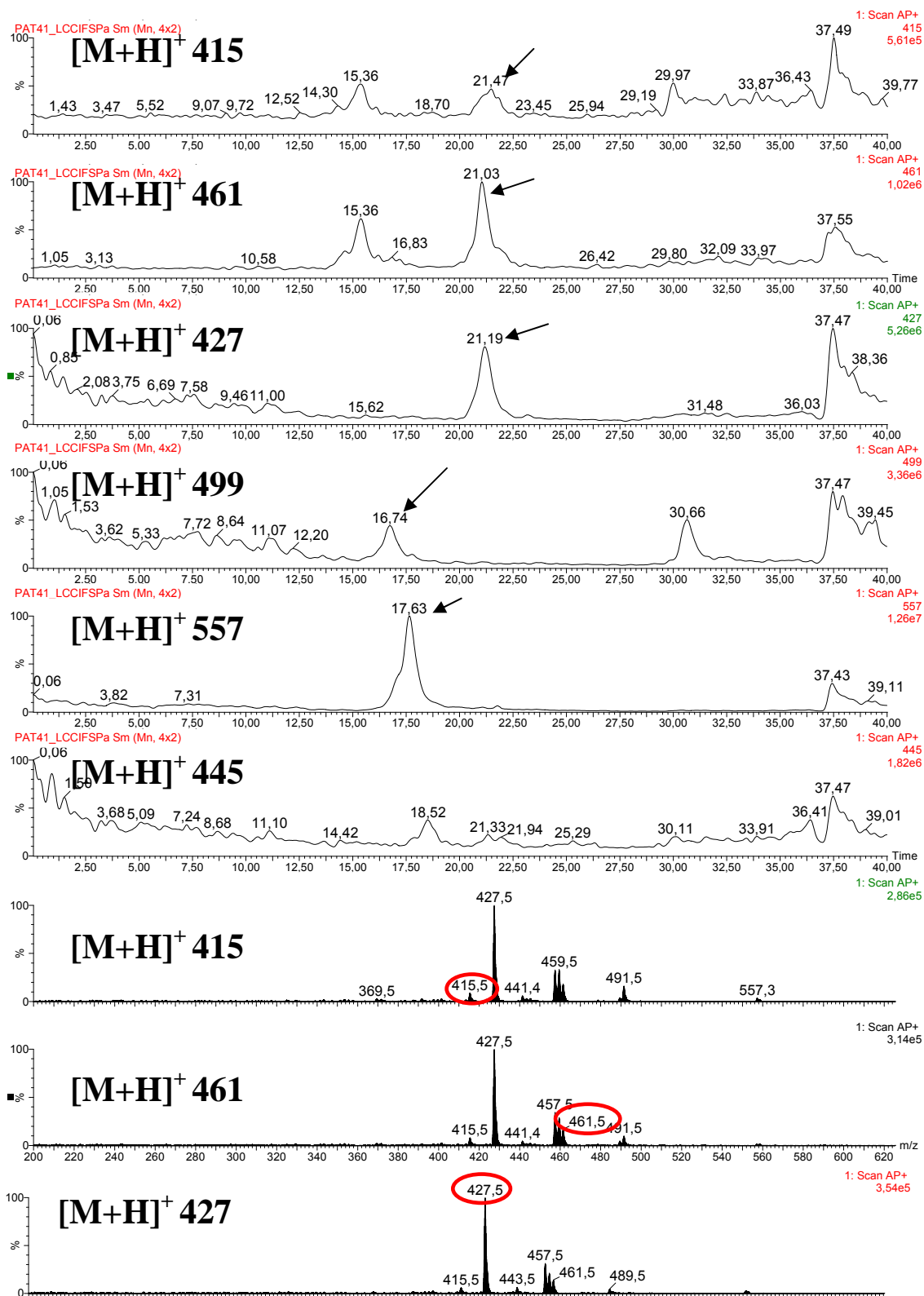


FIGURA 4.58 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz com glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por $APCI^+$.

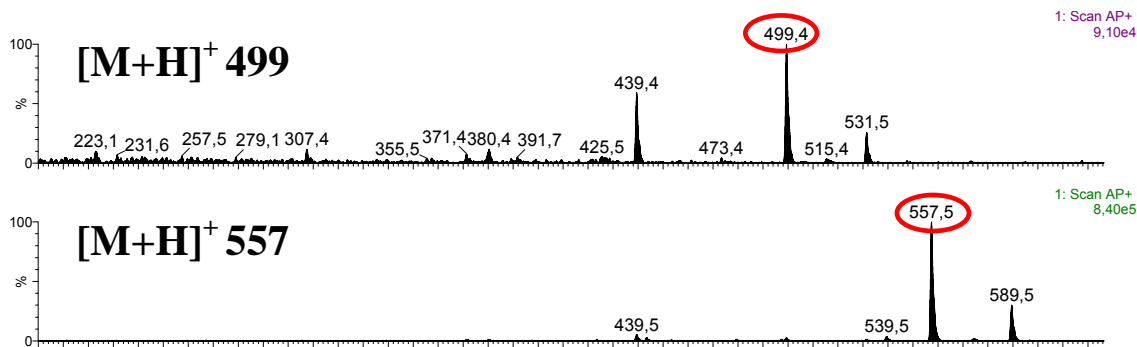


FIGURA 4.58 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz com glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

No extrato fúngico micelial de caldo de arroz com glicose foram detectados também alguns íons de interesse, como pode ser visto na Figura 4.59. Os picos cromatográficos apontados pelas flechas e seus respectivos espectros de massas destacam a presença de íons relativos aos meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13.

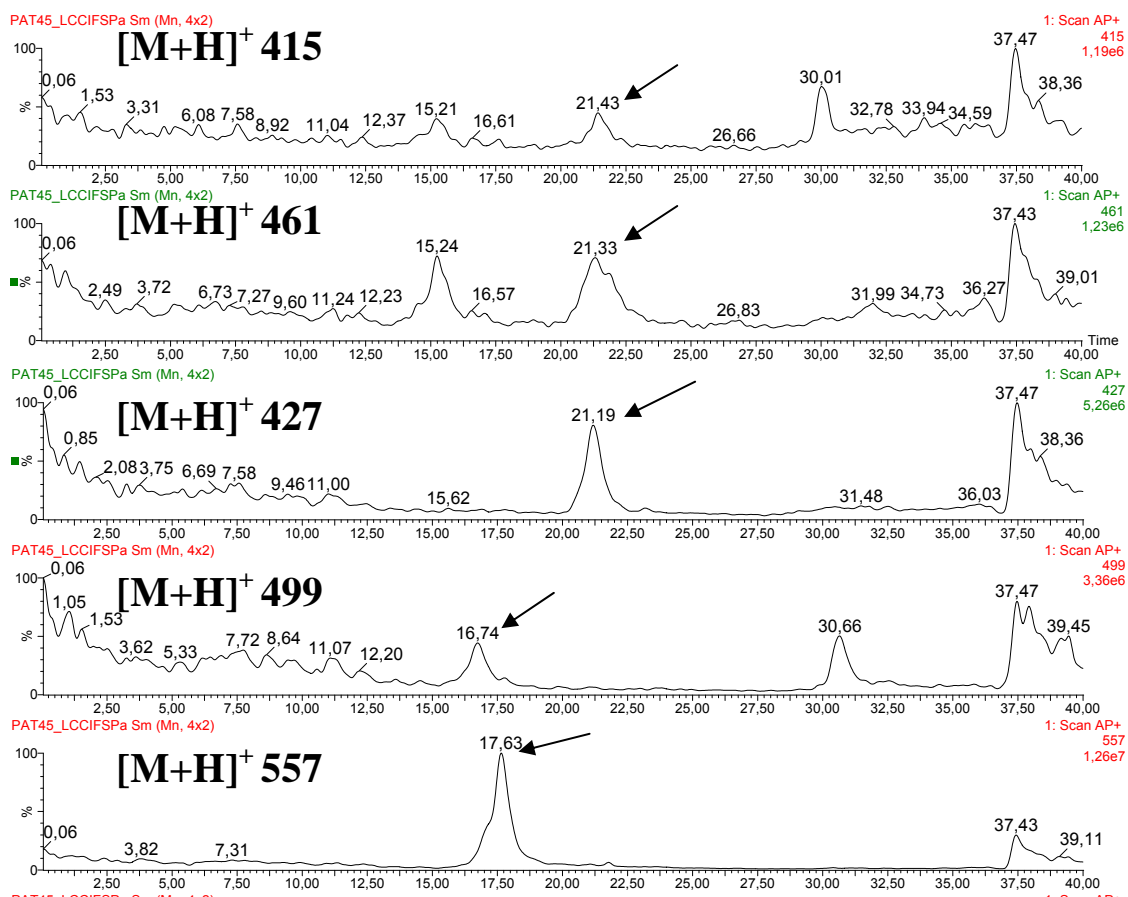


FIGURA 4.59 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz com glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

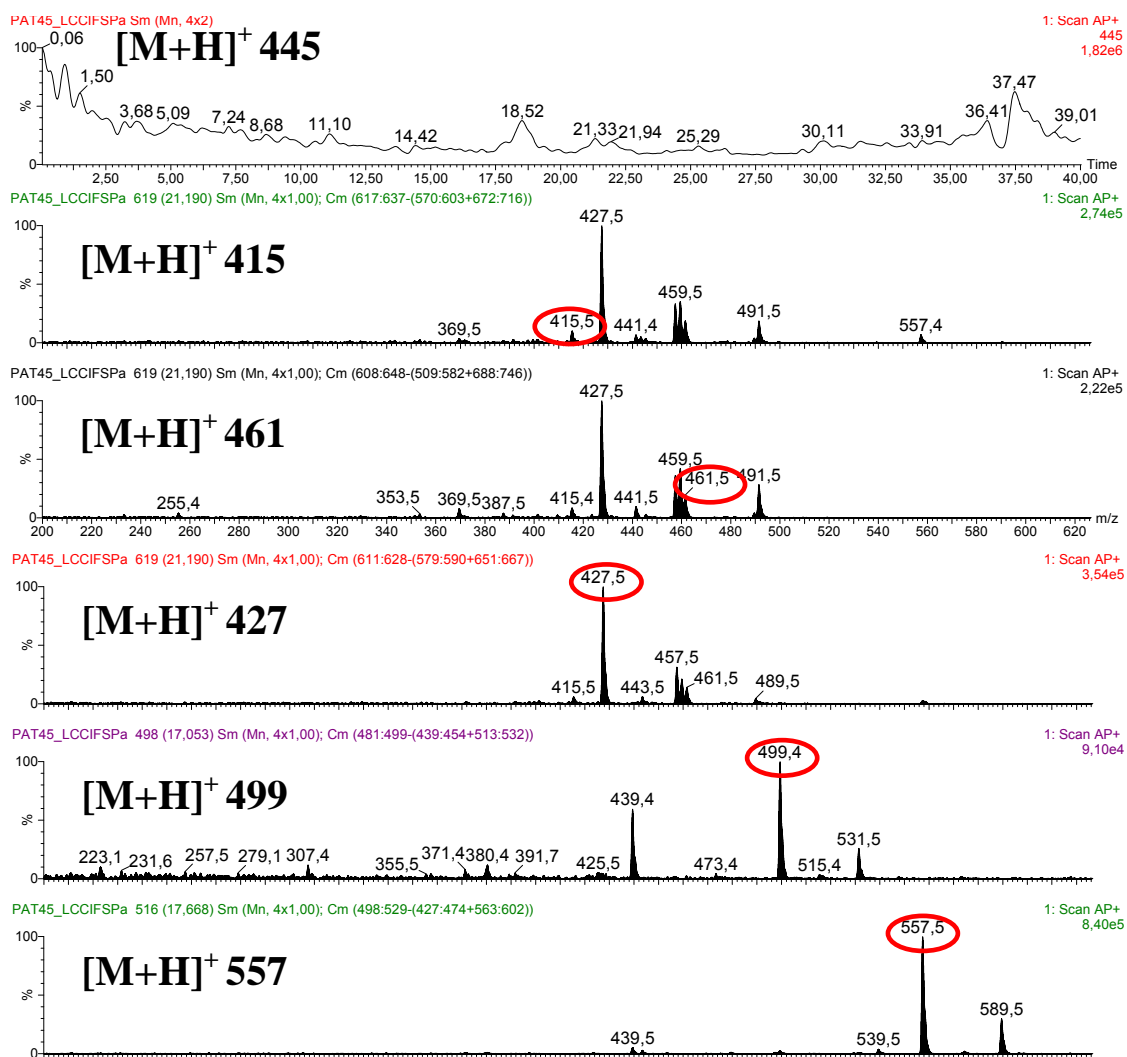


FIGURA 4.59 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de caldo de arroz com glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

Os extratos de filtrado do caldo de arroz, analisados por LC-APCI-MS também mostraram a presença de alguns meroterpenos. A Figura 4.60 ilustra os cromatogramas de íons selecionados e os espectros de massas da análise do extrato fúngico de acetato de etila, do cultivo em filtrado de caldo de arroz sem glicose. Observando o cromatograma de íons selecionados de $[M+H]^+$ 415, nota-se que não foi detectado nenhum íon com este valor de m/z na região de eluição dos meroterpenos. No cromatograma de $[M+H]^+$ 445, não existe nenhum pico cromatográfico com tempo de retenção 23,73 minutos, que é o tempo de retenção do padrão PSP-1. O cromatograma de $[M+H]^+$ 461 apresenta um pico intenso em 21,13 minutos, porém seu espectro de massas não mostra um pico relativo a um íon de valor de m/z 461. Os outros cromatogramas e espectros de massas sugerem a existência dos meroterpenos PSP-3, PSP-6 e PSP-8 neste extrato fúngico, devido à detecção de íons com m/z 557, 499 e 427.

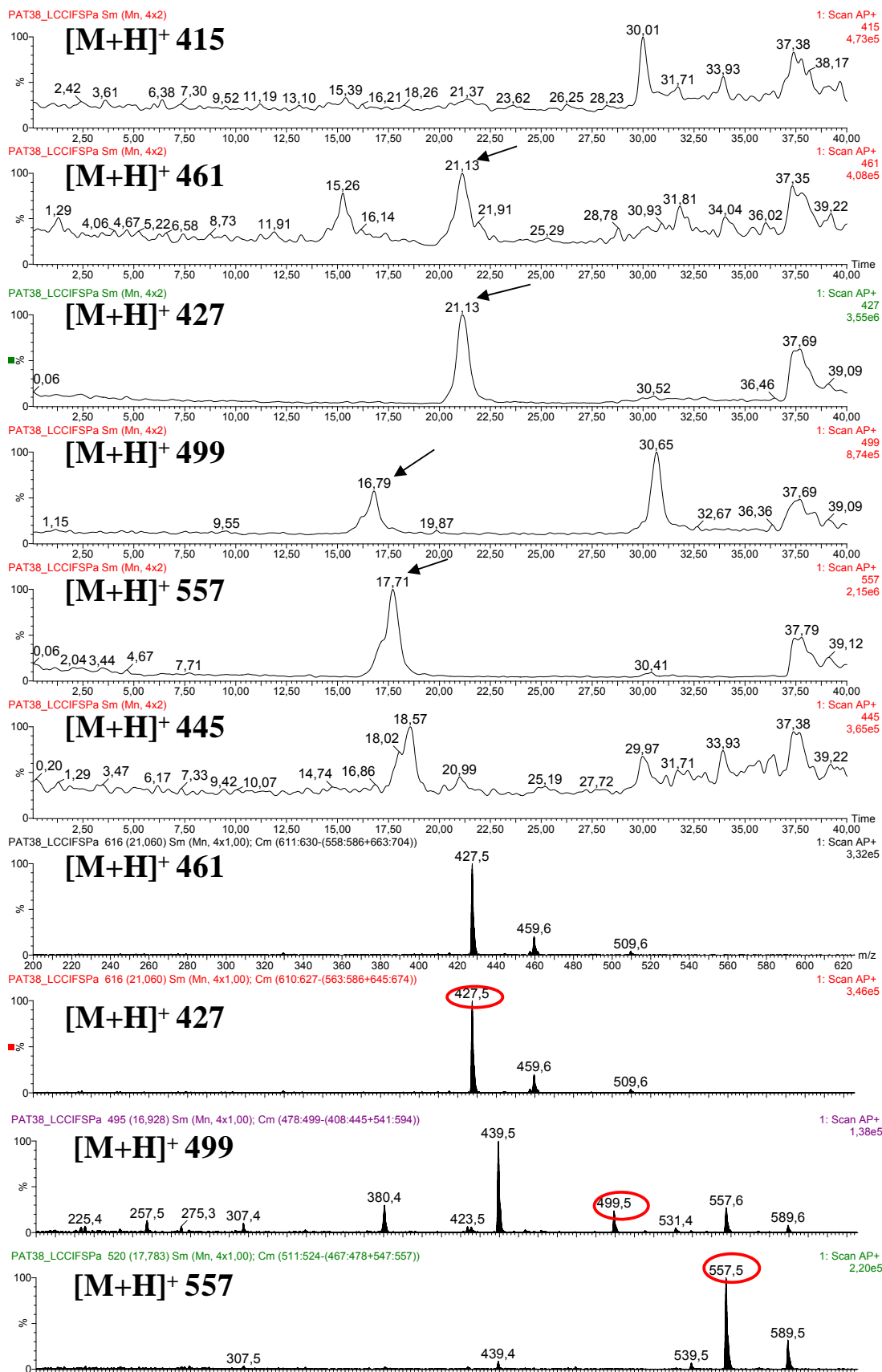


FIGURA 4.60 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por $APCI^+$.

O extrato fúngico micelial do filtrado de caldo de arroz sem glicose foi igualmente analisado (Figura 4.61) e em todos os cromatogramas de íons selecionados adquiridos, exceto no de $[M+H]^+$ 445, foi possível observar picos de íons provavelmente relacionados aos meroterpenos da Tabela 4.4 (página 98), com tempos de retenção semelhantes. Porém, o espectro de massas do pico com tempo de retenção 21,06 minutos, do cromatograma de $[M+H]^+$ 461, não apresentou nenhum íon com m/z 461. Desta forma, é muito provável que somente os meroterpenos PSP-13, PSP-8, PSP-6 e PSP-3 estejam presentes neste extrato.

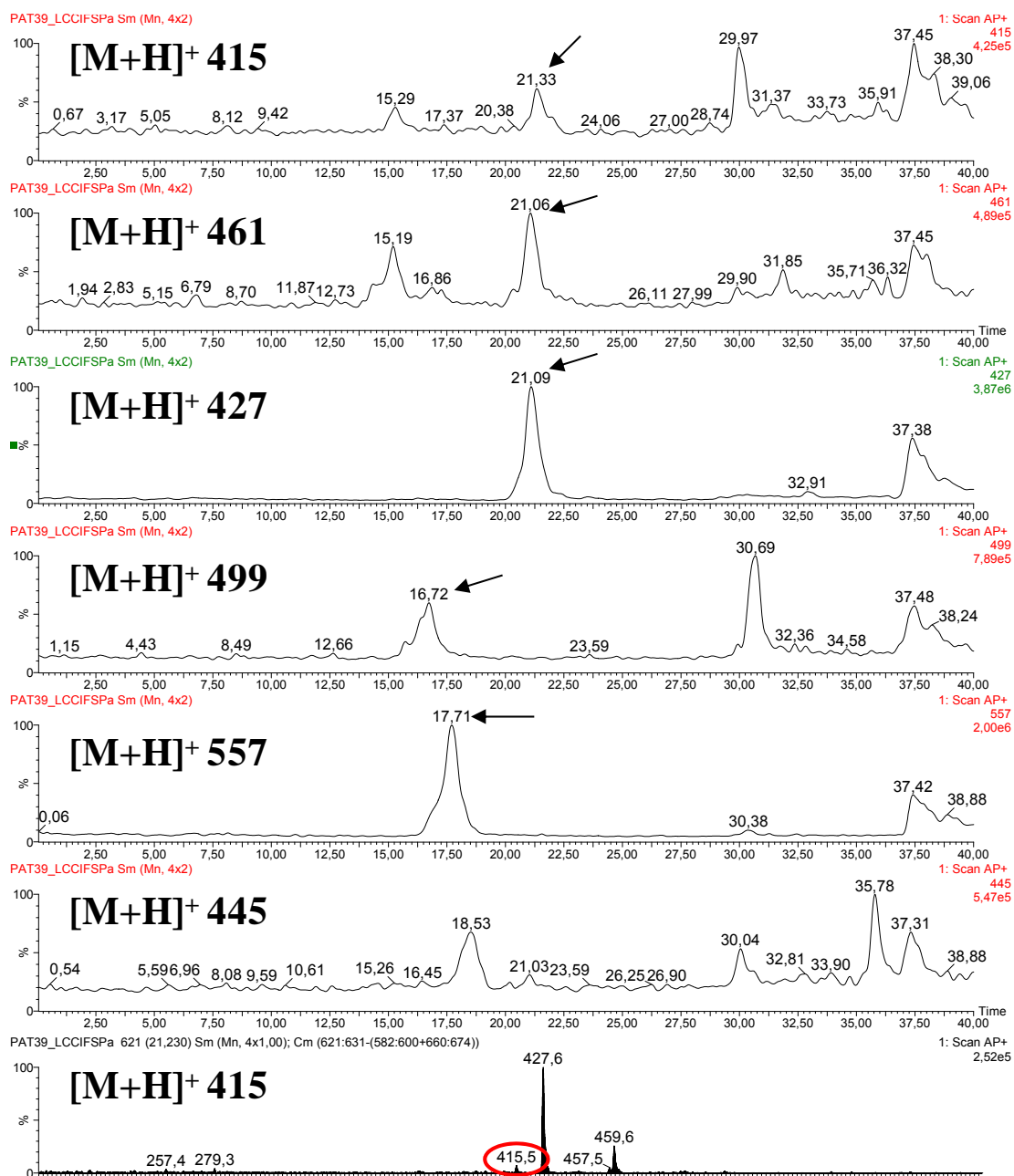


FIGURA 4.61 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

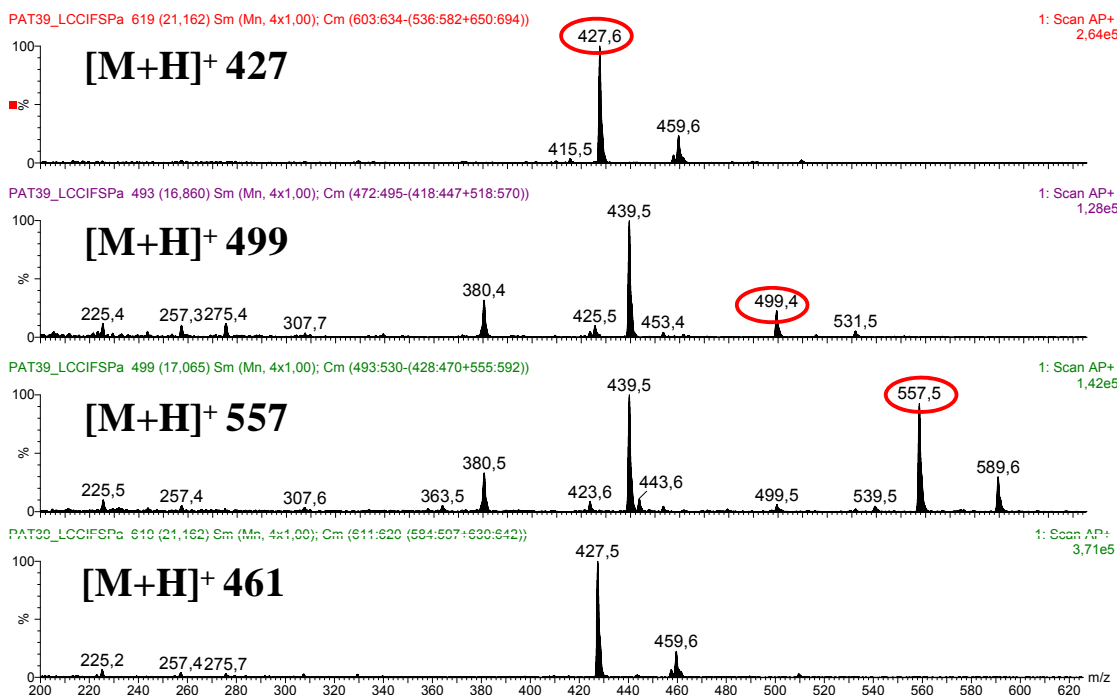


FIGURA 4.61 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz sem glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

Alguns íons relacionados aos meroterpenos também foram detectados nos extratos fúngicos de filtrado de caldo de arroz com glicose. O extrato de acetato deste experimento foi analisado via LC-APCI-MS, e os cromatogramas de íons selecionados e os espectros de massas dos íons de interesse estão ilustrados na Figura 4.62.

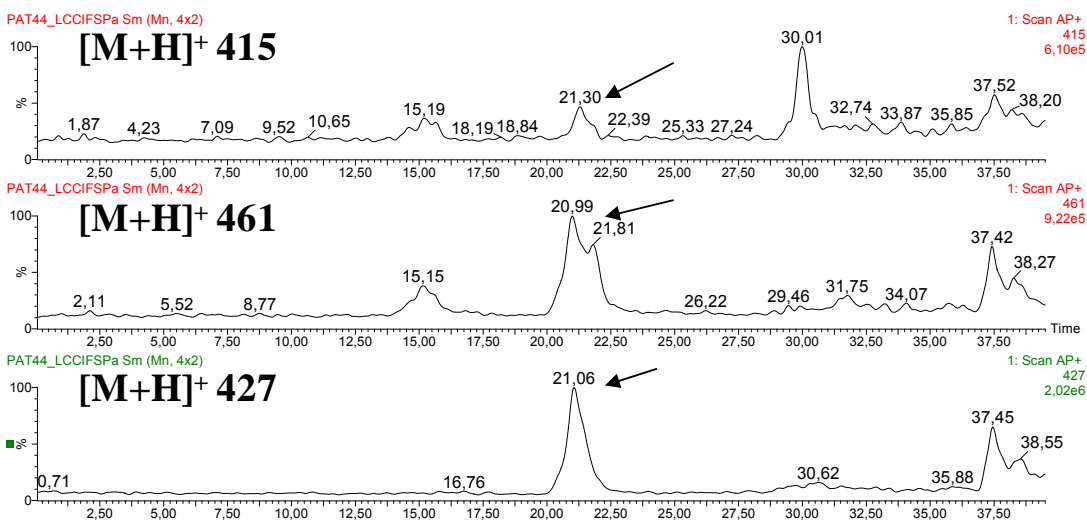


FIGURA 4.62 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

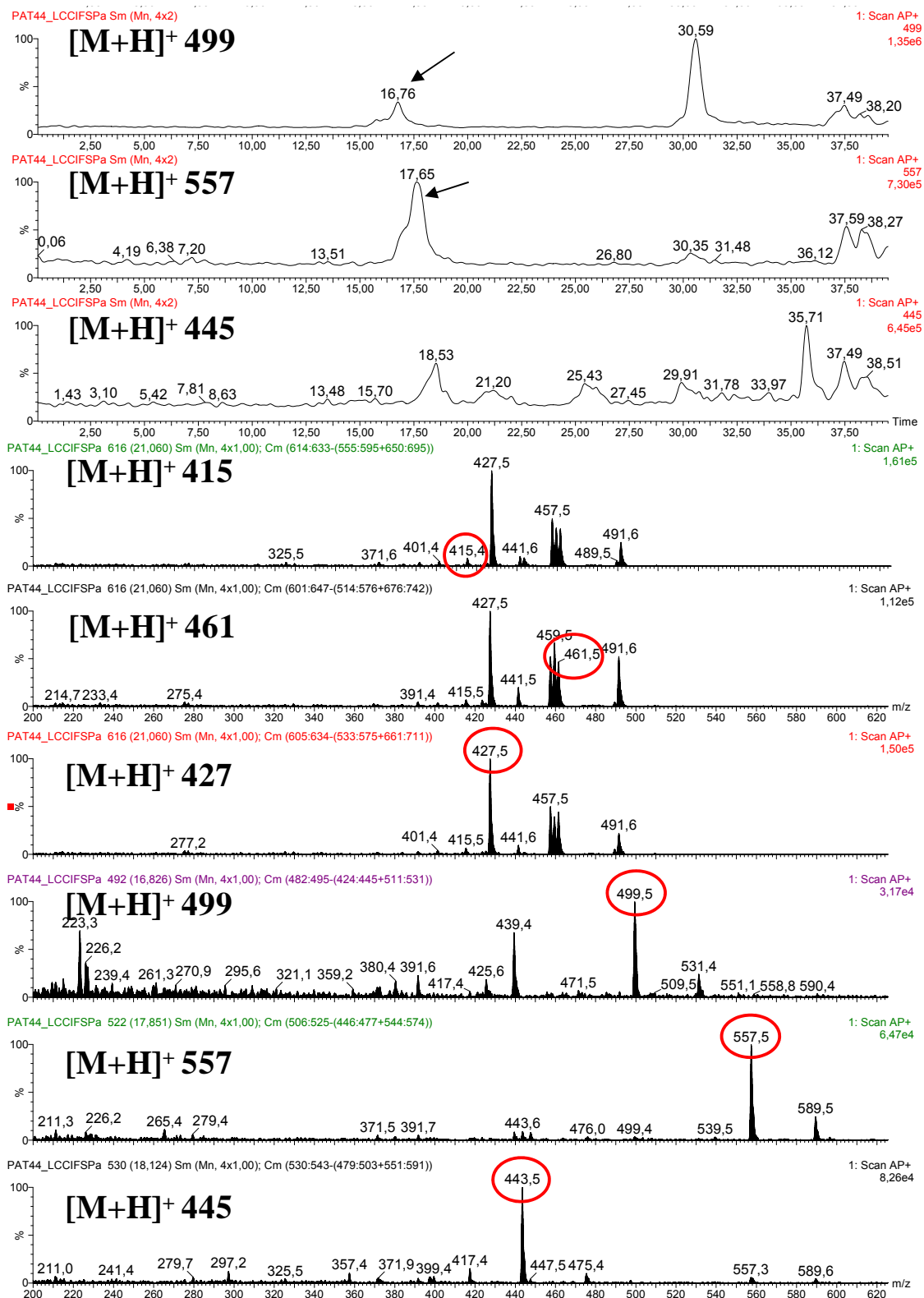


FIGURA 4.62 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCl⁺.

Pela Figura 4.62 pode-se ver que no extrato de acetato do filtrado de caldo de arroz com glicose foi possível a detecção de todos os íons característicos dos meroterpenos da Tabela 4.4, em seus respectivos tempos de retenção, exceto

em relação ao íon do meroterpeno PSP-1 (m/z 445, em 23,73 minutos), cujo cromatograma de íons selecionados não mostrou um pico característico do mesmo. Em todos os espectros de massas dos picos sinalizados nos cromatogramas observou-se o pico de m/z de interesse. Portanto, esses dados sugerem que o fungo *P. brasilianum* tenha produzido os meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13 neste meio de cultivo.

O extrato micelial deste experimento também foi analisado. Seus cromatogramas de íons selecionados, assim como os espectros de massas dos picos de interesse estão ilustrados na Figura 4.63.

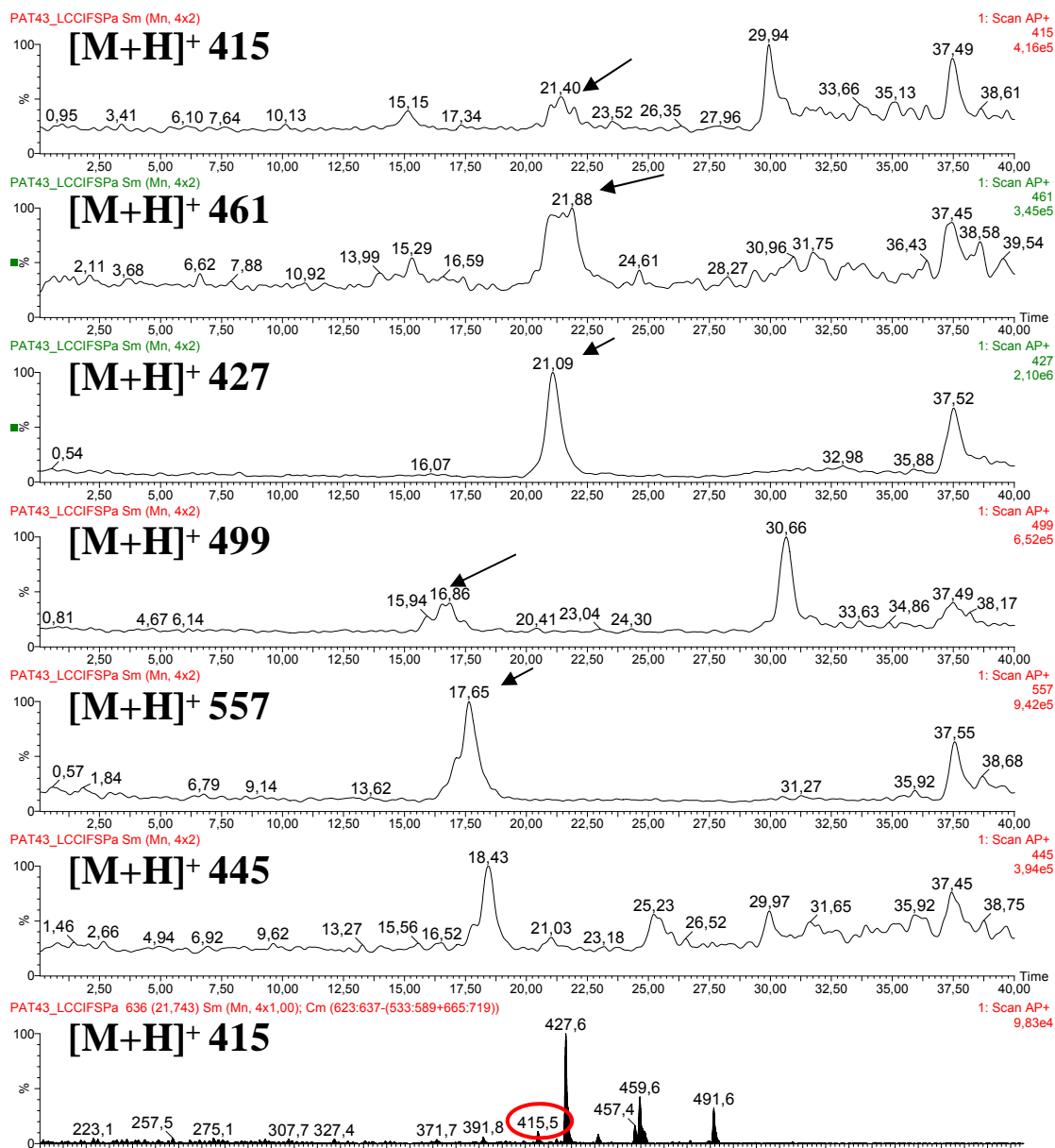


FIGURA 4.63 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

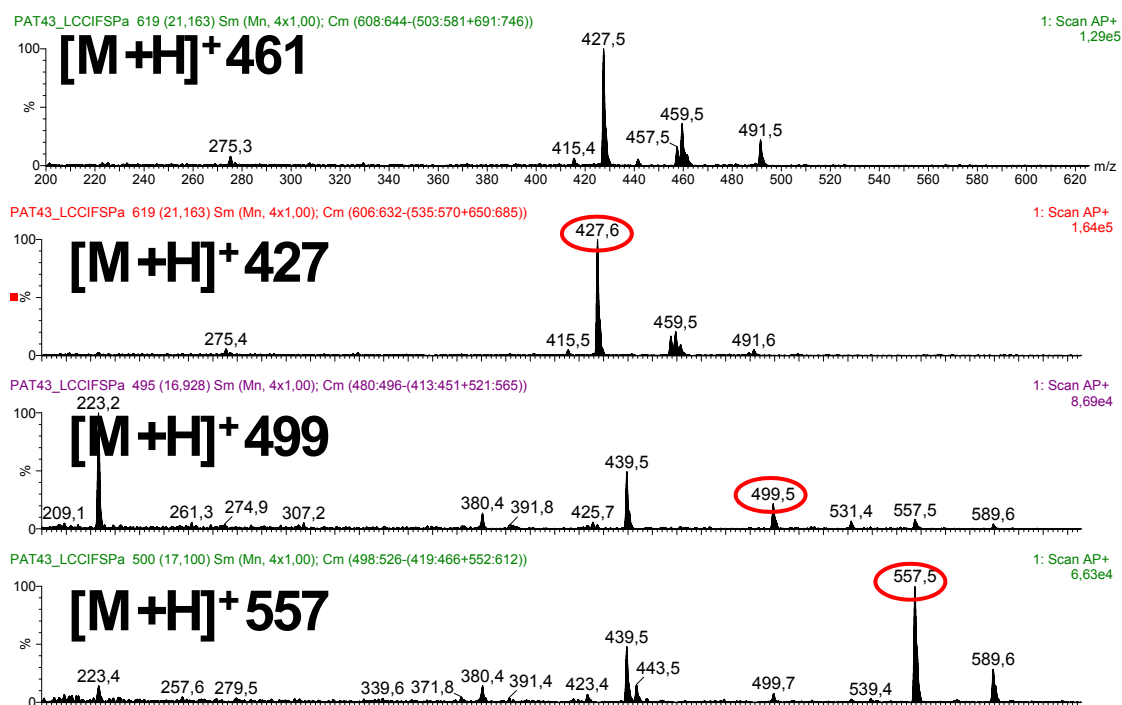


FIGURA 4.63 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de filtrado de caldo de arroz com glicose – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

Nos cromatogramas apresentados na Figura 4.63 foram igualmente detectados íons característicos dos meroterpenos em estudo, exceto o de m/z 445, com t_r 23,73 minutos, relativo ao PSP-1. Nos espectros de massas dos picos de interesse também foi possível visualizar os íons com m/z de interesse, exceto no espectro de $[M+H]^+$ 461. Desta forma pode-se supor que neste extrato existam os meroterpenos PSP-13, PSP-8, PSP-6 e PSP-3.

Por fim, foi analisado o extrato fúngico em arroz cozido, para verificar a presença de meroterpenos. A Figura 4.64 apresenta os resultados conseguidos. Seus cromatogramas de íons selecionados mostram que o extrato de arroz cozido é uma mistura mais complexa, pois existem mais picos no cromatograma, além daqueles que eluem na região dos meroterpenos. Muitos destes compostos existentes no extrato de arroz são característicos do próprio meio de cultura, que contém muito mais substâncias se comparado com os meios líquidos. No extrato de arroz cozido foram detectados todos os íons característicos dos meroterpenos da Tabela 4.4 (página 98), tanto nos cromatogramas quanto nos espectros de massas. Porém, os picos cromatográficos de interesse em $[M+H]^+$ 415 e $[M+H]^+$ 461 estão mais alargados, provavelmente devido à ionização de compostos interferentes juntamente com os de interesse. Com este alargamento dos picos, não foi possível saber o tempo de eluição preciso dos íons de interesse. No cromatograma de $[M+H]^+$ 445, mais uma vez não foi detectado um íon com tempo de retenção 23,73 minutos, característico de PSP-1. Portanto, mesmo com a perda de alguns nutrientes durante o processo de fervura do arroz, ele ainda manteve os nutrientes necessários para o fungo produzir estes metabólitos.

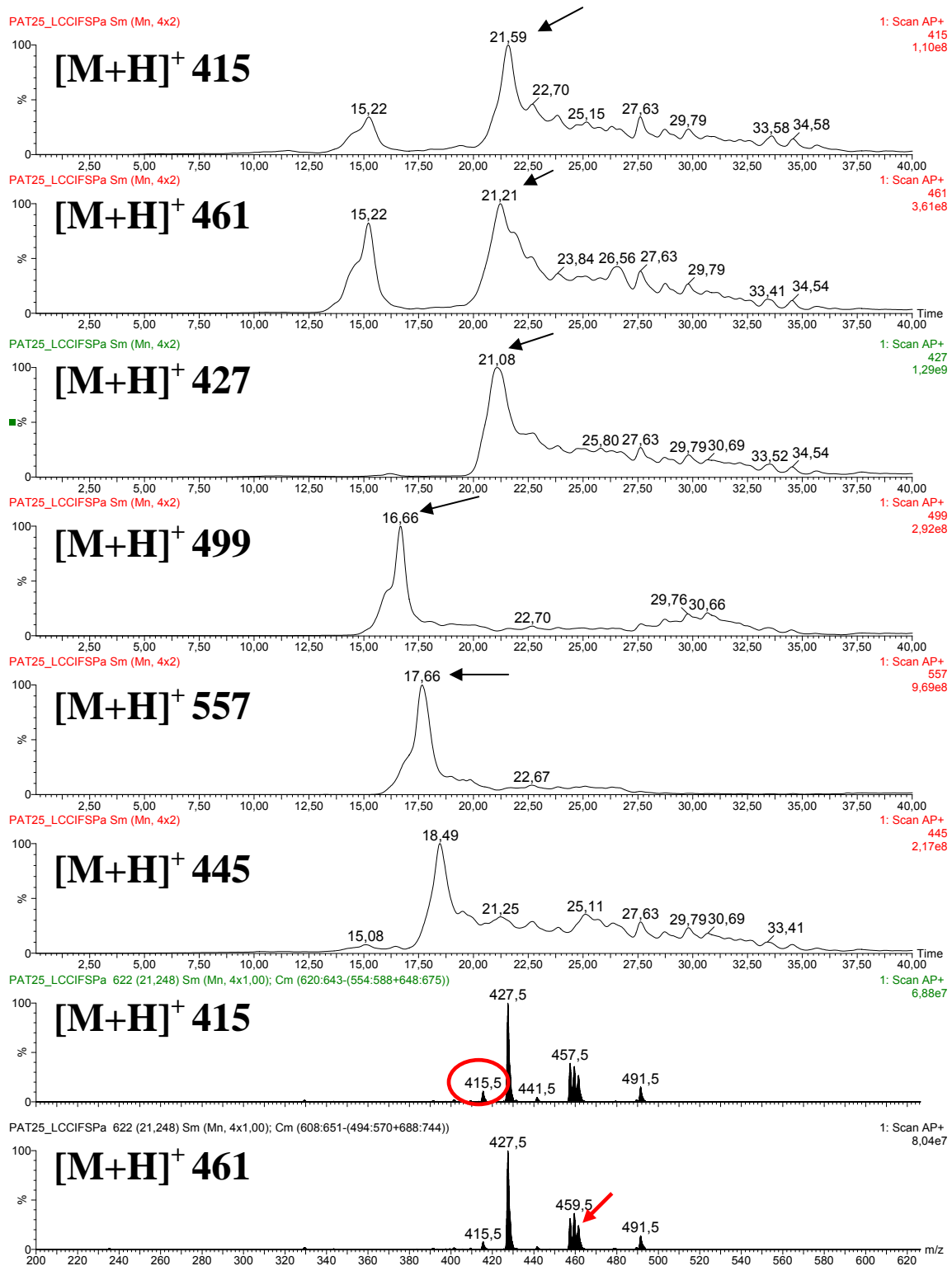


FIGURA 4.64 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato fúngico de arroz cozido, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

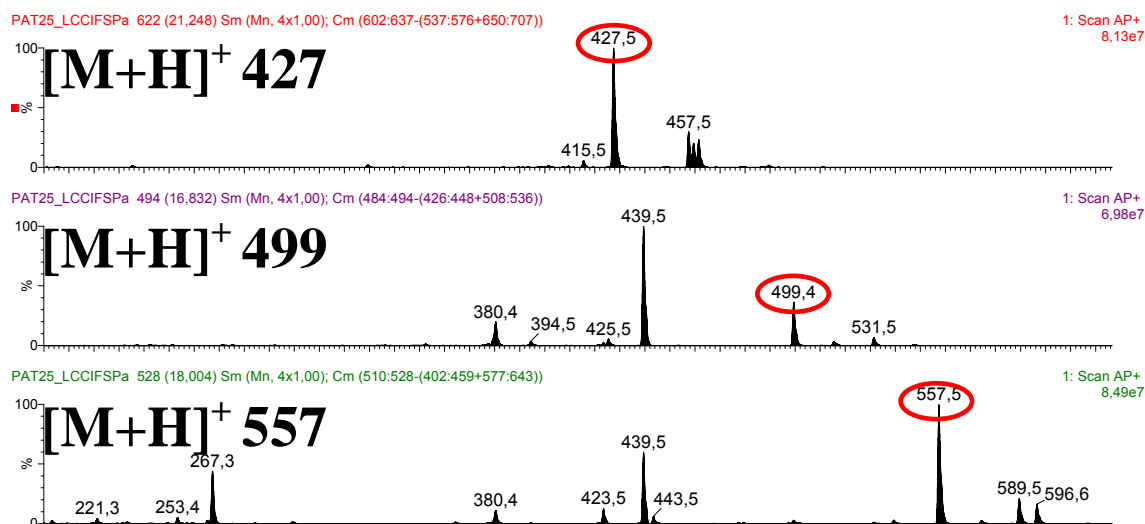


FIGURA 4.64 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato fúngico de arroz cozido, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

4.3.3.6 - Análises dos extratos de leite de soja

Os extratos produzidos em leite de soja também foram investigados quanto à existência de meroterpenos, via LC-APCI-MS. Pelos cromatogramas da análise do extrato de acetato (Figura 4.65), observa-se que o meio de leite de soja é também bastante complexo, pois apresenta vários picos cromatográficos em cada cromatograma de íons selecionados. Nos cromatogramas de $[M+H]^+$ 415 e $[M+H]^+$ 445 não se observou nenhum pico característico de meroterpenos. No cromatograma de $[M+H]^+$ 461 pode-se visualizar um pico pouco intenso em 21,29 minutos. Seu espectro de massas, mostra um pico relativo a m/z 461 também pouco intenso, que pode estar relacionado ao PSP-9. Os outros íons característicos dos meroterpenos da Tabela 4.4 (página 98) aparecem mais intensamente nos seus respectivos cromatogramas de íons selecionados e nos espectros de massas, dando fortes indícios da presença destes compostos neste extrato fúngico. Desta forma, é possível que os meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8 e PSP-9 estejam presentes neste extrato.

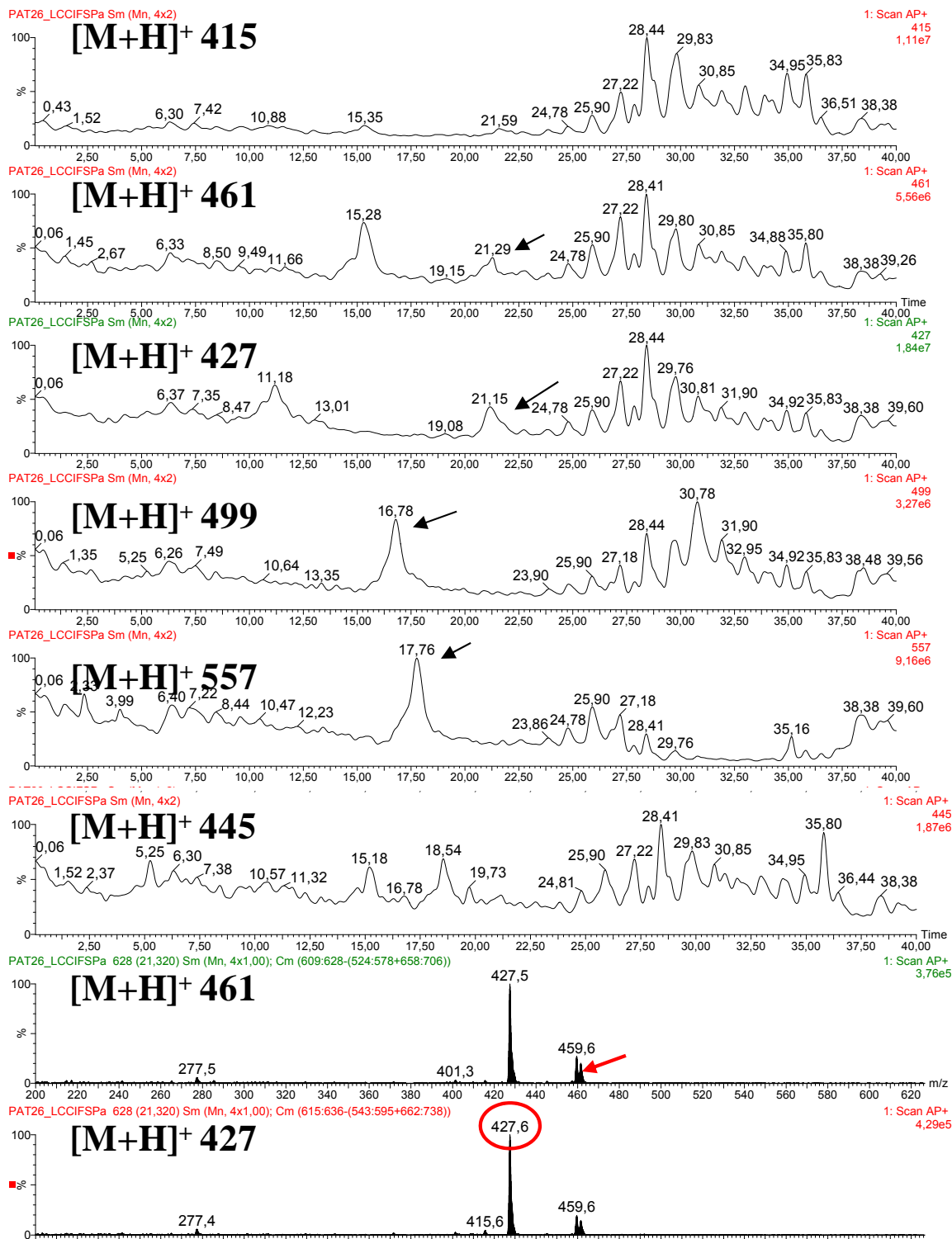


FIGURA 4.65 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de leite de soja – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

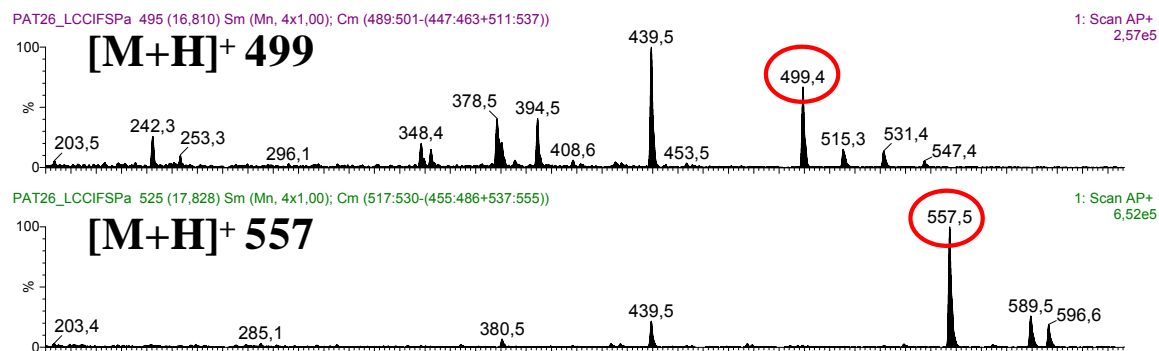


FIGURA 4.65 (CONTINUAÇÃO)- Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de leite de soja – partição com acetato, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

Já no extrato micelial de leite de soja, os cromatogramas de íons selecionados e os espectros de massas de sua análise (Figura 4.66) revelam a presença de íons característicos dos meroterpenos PSP-3, PSP-6, PSP-8 e PSP-13. O espectro de $[M+H]^+$ 461 não mostra nenhum pico relativo a este íon, portanto, não se pode sugerir que o meroterpeno PSP-9 esteja presente no extrato somente com estas análises de *full scan*. Da mesma forma, o íon de m/z 445 e t_r 23,73 minutos, relativo ao padrão PSP-1, não foi detectado no cromatograma de íons selecionados $[M+H]^+$ 445.

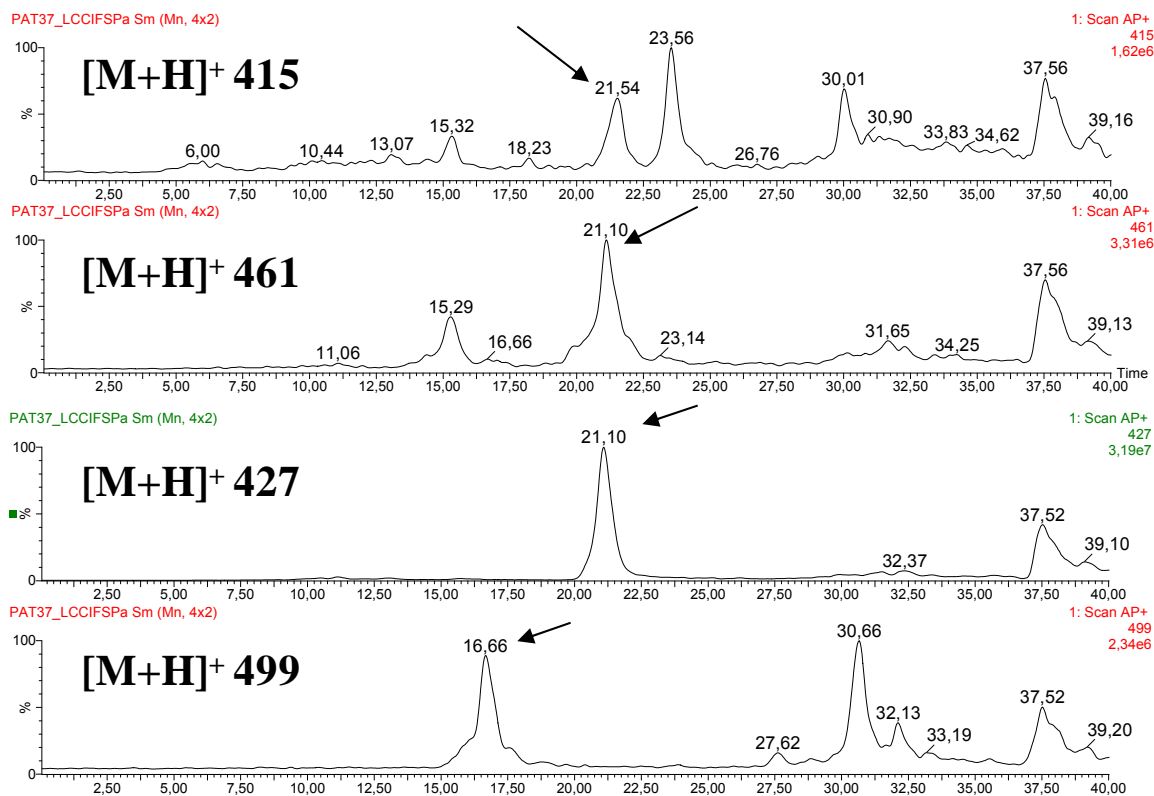


FIGURA 4.66 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de leite de soja – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

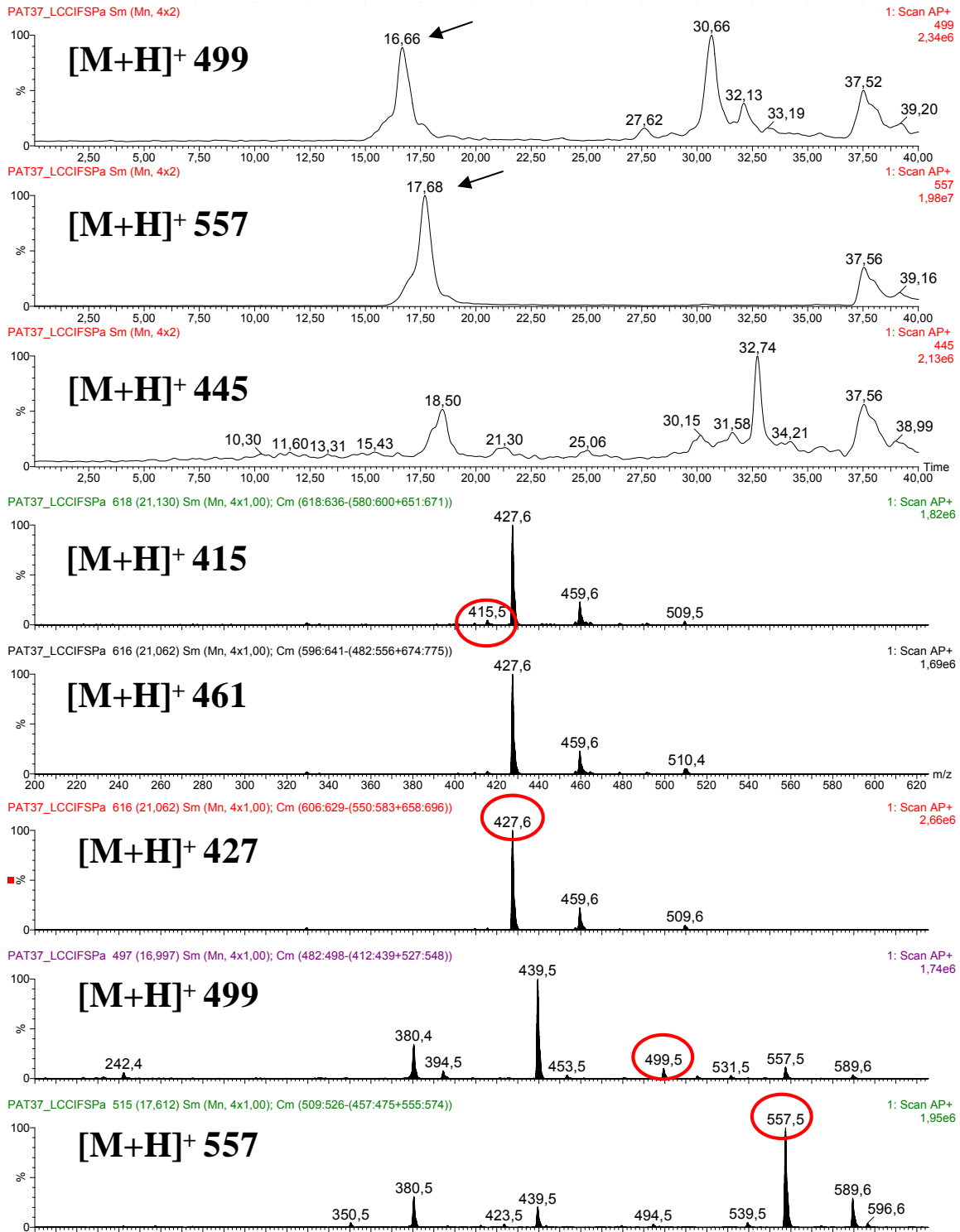


FIGURA 4.66 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de leite de soja – micélio, e seus espectros de massas. Ionização por APCI⁺.

4.3.3.7 - Análises dos extratos de Czapeck

O último extrato fúngico analisado por LC-APCI-MS foi o produzido em meio Czapeck. A Figura 4.67 seguinte apresenta os cromatogramas de íons selecionados do extrato de acetato deste meio. É possível notar que nenhum íon característico dos meroterpenos de interesse foi detectado neste extrato de acetato, fato este inesperado.

Igualmente, nos cromatogramas de íons selecionados da análise do extrato micelial de Czapeck (Figura 4.68) também não foram encontrados íons característicos dos meroterpenos.

Estes resultados foram semelhantes aos das análises realizadas por LC-ESI-MS, na Seção 4.3.2.7 (página 86), pelas quais também não foram detectados íons relacionados aos meroterpenos em estudo. Esperava-se, entretanto, a detecção destes compostos neste extrato fúngico, já que resultados anteriores mostraram que o fungo *P. brasilianum* foi capaz de produzir alguns meroterpenos em meio Czapeck [46]. Apesar da não detecção destes íons neste experimento, verificou-se um ótimo crescimento de massa fúngica.

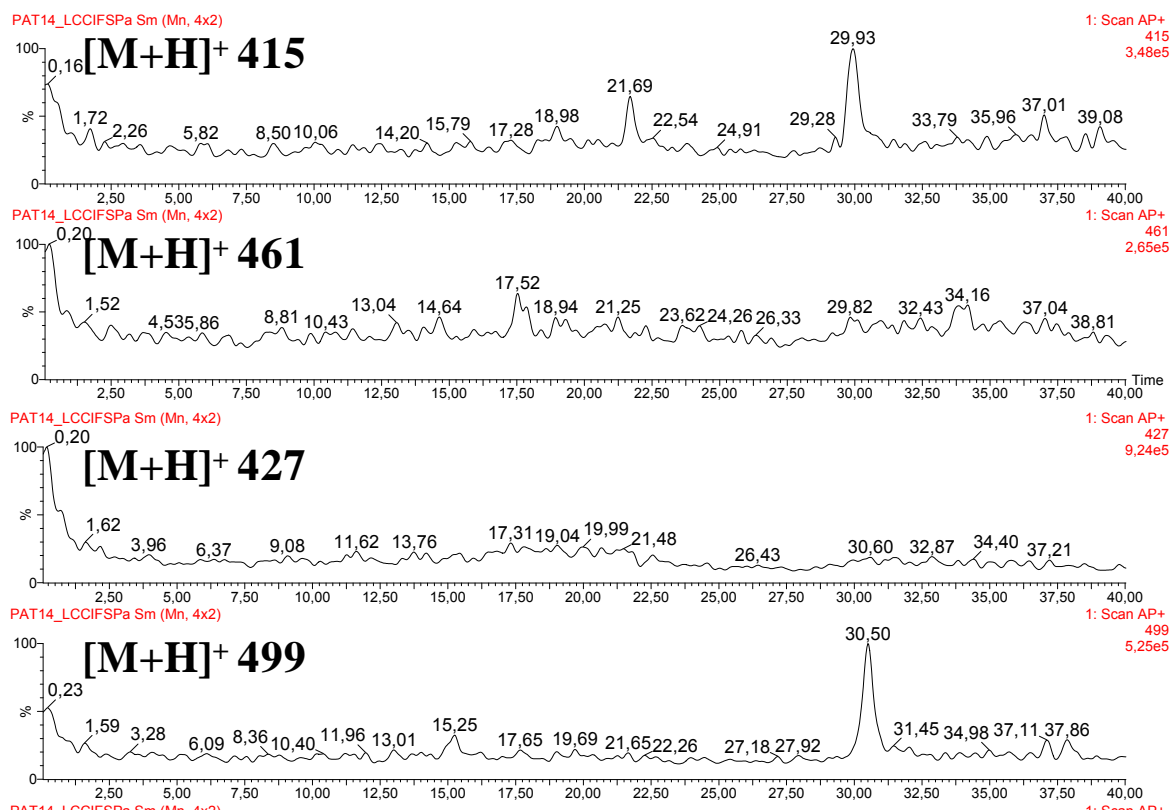


FIGURA 4.67 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de Czapeck – partição com acetato. Ionização por APCI⁺.

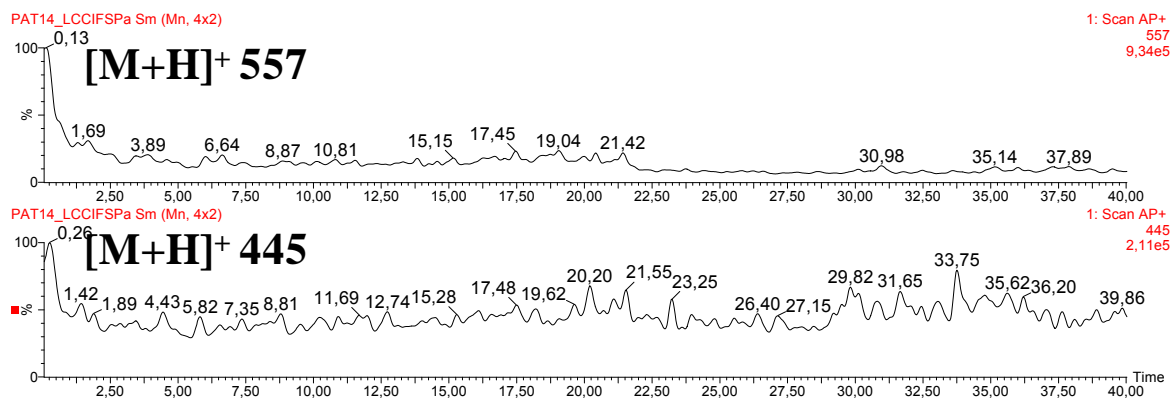


FIGURA 4.67 (CONTINUAÇÃO) - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de Czapeck – partição com acetato. Ionização por $APCI^+$.

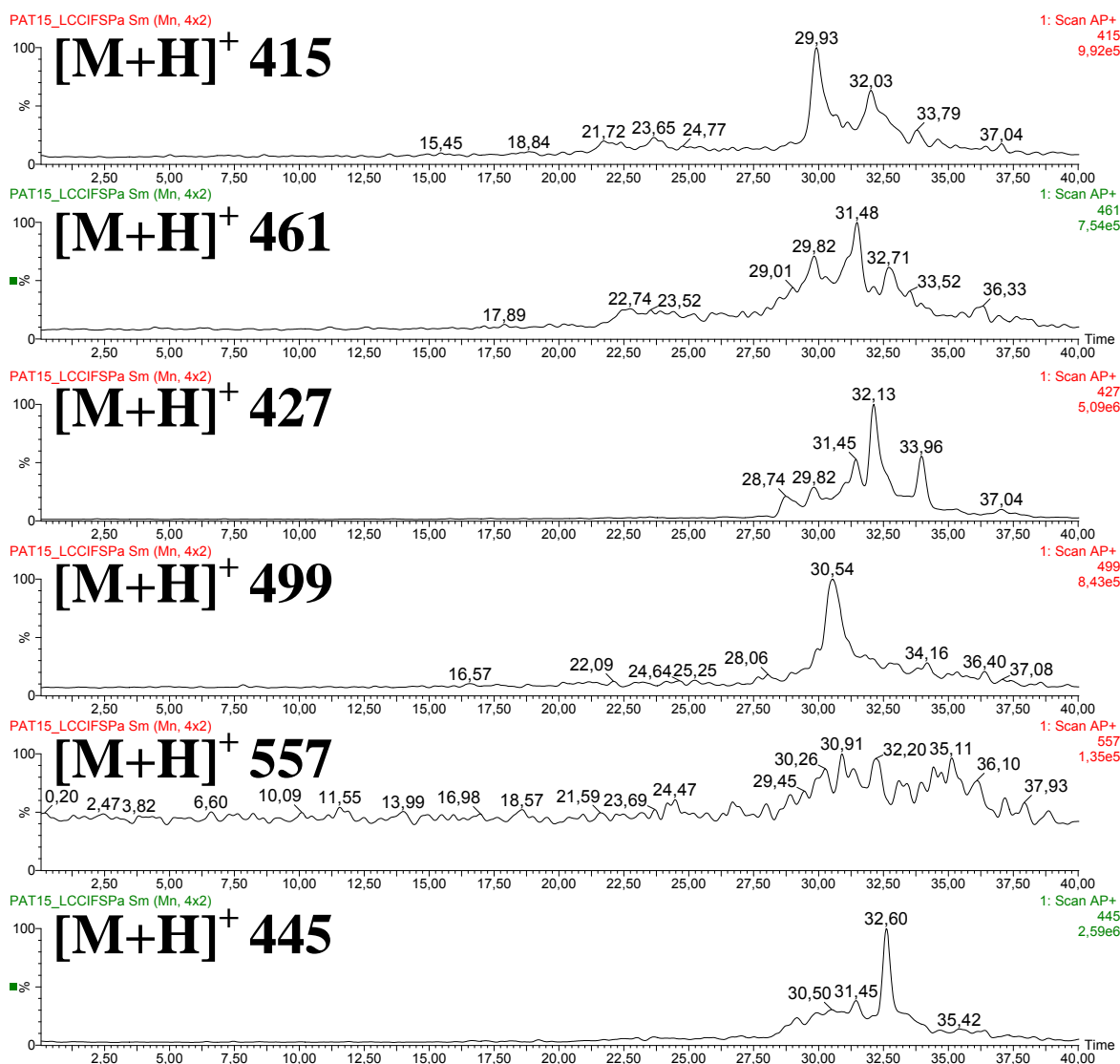


FIGURA 4.68 - Cromatogramas de íons selecionados de m/z relativos aos meroterpenos encontrados no extrato de Czapeck – micélio. Ionização por $APCI^+$.

4.3.4 - Comparação entre os meios de cultura e produção de meroterpenos

Para fins comparativos, as Tabelas 4.5 e 4.6 apresentam os meroterpenos encontrados em cada extrato analisado, baseado nos íons com valores de m/z e t_r conhecidos, encontrados nestas amostras, e comparando com a análise dos padrões feita anteriormente. A Tabela 4.5 apresenta os resultados adquiridos via LC-ESI-MS, e a Tabela 4.6, os resultados de LC-APCI-MS.

TABELA 4.5 - Prováveis meroterpenos encontrados nos extratos analisados via LC-ESI-MS, no modo positivo.

Extrato fúngico	PSP-3	PSP-4	PSP-6	PSP-8	PSP-9	PSP-13	m/z 445
Arroz	X						X
Trigo	X	X	X	X		X	X
Milho	X	X		X			X
Caldo de arroz sem glicose (partição acetato)							
Caldo de arroz sem glicose (micélio)							
Caldo de arroz com glicose (partição acetato)							
Caldo de arroz com glicose (micélio)	X	X		X			
Filtrado do caldo de arroz sem glicose (partição acetato)							
Filtrado do caldo de arroz sem glicose (micélio)							
Filtrado do caldo de arroz com glicose (partição acetato)							
Filtrado do caldo de arroz com glicose (micélio)							
Arroz cozido		X					
Leite de soja (partição acetato)							
Leite de soja (micélio)							
Czapeck (partição acetato)							
Czapeck (micélio)							

TABELA 4.6 - Prováveis meroterpenos encontrados nos extratos analisados via LC-APCI-MS, no modo positivo.

Extrato fúngico	PSP-1	PSP-3	PSP-6	PSP-8	PSP-9	PSP-13
Arroz		X	X	X	X	X
Trigo		X	X	X	X	X
Milho		X	X	X	X	X
Caldo de arroz sem glicose (partição acetato)		X	X	X		X
Caldo de arroz sem glicose (micélio)		X	X	X		
Caldo de arroz com glicose (partição acetato)		X	X	X	X	X
Caldo de arroz com glicose (micélio)		X	X	X	X	X
Filtrado do caldo de arroz sem glicose (partição acetato)		X	X	X		
Filtrado do caldo de arroz sem glicose (micélio)		X	X	X		X
Filtrado do caldo de arroz com glicose (partição acetato)		X	X	X	X	X
Filtrado do caldo de arroz com glicose (micélio)		X	X	X		X
Arroz cozido		X	X	X	X	X
Leite de soja (partição acetato)		X	X	X	X	
Leite de soja (micélio)		X	X	X		X
Czapeck (partição acetato)						
Czapeck (micélio)						

Comparando os dados das Tabelas 4.5 e 4.6, é possível dizer que a técnica de ionização por APCI permitiu uma maior sensibilidade das análises dos extratos fúngicos em relação aos meroterpenos pois, mesmo nos meios líquidos produzidos a partir do arroz, onde a concentração de metabólitos é muito menor do que nos meios sólidos (isso pode ser visto pelas análises de LC-DAD), foi possível detectar vários íons característicos dos meroterpenos de interesse.

Apesar de este estudo ter sido realizado de maneira qualitativa, é possível notar que nos meios derivados do arroz (caldo de arroz e filtrado do caldo de arroz) com glicose, foi detectada uma maior variedade de meroterpenos, somando os resultados do extrato de acetato e do micélio. Isto pode ser melhor visualizado pelos dados da Tabela 4.6. Estes resultados mostram que a quantidade de fonte de carbono presente no meio de cultura é um fator limitante para a otimização da produção de meroterpenos por *P. brasilianum*, apesar de o crescimento de massa fúngica ocorrer de maneira satisfatória tanto na ausência quanto na presença de glicose adicional.

Todos os meios analisados, exceto o Czapeck, mostraram ser adequados para o cultivo do fungo visando a produção de meroterpenos. Este não foi um resultado esperado, como já explicado anteriormente, visto que o meio de Czapeck preparado contém fontes de vitaminas, sais minerais, nitrogênio (aminoácidos), fontes de carbono, enfim, os nutrientes necessários para um

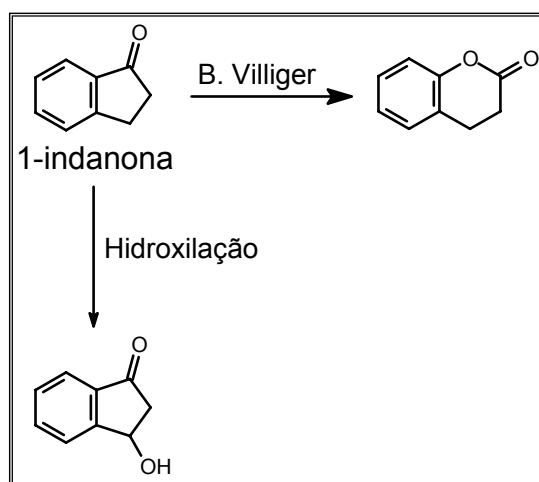
desenvolvimento normal do fungo, assim como os outros meios utilizados no estudo. Porém, não se pode deixar de lado o fato de que estes experimentos não foram todos realizados numa mesma data. Portanto, no caso dos extratos de Czapeck, existe uma possibilidade de que no período do cultivo algum problema possa ter ocorrido, ou com a cepa fúngica utilizada para inoculação, ou mesmo com condições de temperatura, umidade e outras variáveis passíveis do ambiente.

4.4 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de substratos exógenos

Como já foi discutido na Introdução, os meroterpenos produzidos pelo fungo endofítico *P.brasilianum* possuem uma grande semelhança estrutural com o meroterpeno austina, isolado das culturas de *Aspergillus ustus* [66]. Desta forma, acredita-se que alguns destes meroterpenos sejam precursores biossintéticos da austina, assim como de outros meroterpenos análogos. Conseqüentemente, acredita-se que o ácido 3,5-dimetilorselínico seja também o precursor destes meroterpenos, assim como é o precursor da austina [45].

Por esta razão surgiu a idéia de adicionar ao meio de cultura fúngica diferentes aditivos exógenos derivados do ácido benzóico, para verificar se estas substâncias poderiam ser utilizadas pelo fungo para produção de meroterpenos.

Em relação aos outros aditivos (alizarina, resina, ácido oleanólico), o principal objetivo foi verificar sua influência no metabolismo fúngico em geral, e uma provável modificação estrutural destes compostos pelo fungo. Em outro trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa, pela aluna de doutorado Bianca Ferreira da Silva, o fungo *P. brasilianum* mostrou-se capaz de biotransformar a 1-indanona, realizando tanto uma hidroxilação quanto uma reação de Baeyer Villiger [67], como pode ser visto no esquema 4.7. Estes resultados foram motivadores para estes experimentos.



ESQUEMA 4.7 - Biotransformações realizadas pelo fungo *P. brasilianum*, endofítico de *M. azedarach*.

Os primeiros aditivos testados foram: ácido benzóico, ácido salicílico, ácido oleanólico, resina e alizarina. Estes experimentos foram realizados em batelada. Portanto, seus extratos foram comparados com os extratos do experimento branco feitos na mesma época. Os outros aditivos testados foram comparados com os outros extratos de branco.

É importante salientar que a escolha do meio de cultura para o estudo da influência dos substratos exógenos, Czapeck, e o próprio cultivo do fungo com estes substratos foi realizada anteriormente às análises de LC-MS dos testes de meios de cultura (Seção 4.3), em razão da quebra do equipamento de espectrometria de massas. Portanto, os únicos resultados conhecidos do cultivo de *P. brasilianum* foram relativos à tese de doutorado de Regina Geris dos Santos ^[46], que comprovaram ser este meio adequado para a produção de meroterpenos pela espécie endofítica.

4.4.1 - Análises por HPLC-DAD

4.4.1.1 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido benzóico

Inicialmente os extratos fúngicos do experimento com ácido benzóico foram analisados por LC-DAD, para se conhecer seus perfis cromatográficos. A Figura 4.69 mostra os cromatogramas obtidos do extrato de acetato de etila deste experimento, em comparação com o mesmo extrato do branco que, neste caso, é o extrato fúngico sem a adição de ácido benzóico ao meio. Um cromatograma do padrão de ácido benzóico também está mostrado na Figura 4.69. Observando os cromatogramas A e C, não foi possível notar uma diferença muito marcante entre o experimento com o ácido benzóico e o branco. Porém, os cromatogramas expandidos B e D facilitam a visualização de algumas diferenças no perfil cromatográfico dos dois extratos. A região do cromatograma B circulada (entre 10 e 19 minutos), do extrato branco, apresenta um maior número de picos cromatográficos, se comparado com a mesma região do cromatograma D, do experimento com ácido benzóico. No cromatograma D existem dois picos de maior intensidade, circulados, que não aparecem no extrato branco.

Os comprimentos de onda máximos dos picos do padrão de ácido benzóico e das regiões circuladas no cromatograma estão apresentados na Tabela 4.7. Através desta tabela é possível notar que o padrão de ácido benzóico não foi detectado no extrato fúngico cultivado na presença do mesmo. É importante esclarecer que foi feito um extrato de acetato de etila a partir de uma mistura do meio Czapeck mais ácido benzóico, para verificar o tempo de retenção deste padrão na matriz. Porém, neste extrato não foi detectado o ácido benzóico, provavelmente por ele ter permanecido na fase aquosa.

Os compostos detectados na região entre 10 e 19 minutos, no extrato do branco, não foram detectados no extrato do experimento com o ácido benzóico. E os compostos detectados no extrato do experimento com o aditivo também não foram encontrados no branco, como pode também ser observado pelos dados da Tabela 4.7. Estes resultados mostram que realmente ocorreu uma diferenciação no metabolismo fúngico. Nota-se também que em ambos os extratos, a absorção dos compostos é baixa, com λ_{\max} 200 nm.

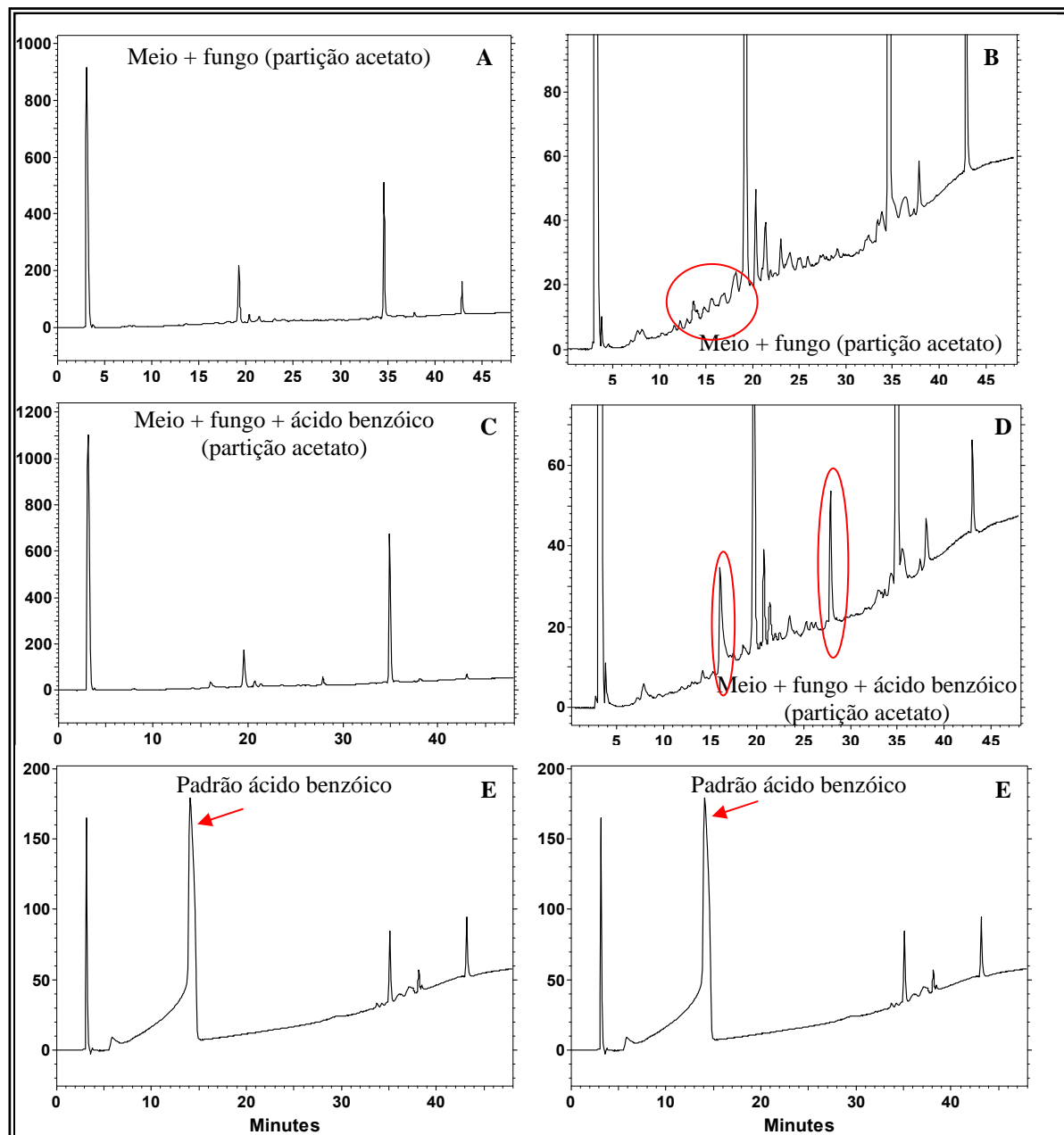


FIGURA 4.69 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido benzóico. E – cromatograma do padrão de ácido benzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.7 - λ_{\max} do padrão de ácido benzóico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.69.

t_R (min)	Padrão ac. benzóico	Meio+fundo	Meio+fundo + ácido benzóico	λ_{\max} (nm)
14,09	X			200, 226
10,26		X		200
11,58		X		200
12,15		X		200
12,90		X		200
13,65		X		200
14,04		X		200
14,17			X	200
14,83		X		200
15,61		X		200
16,05			X	200
18,14		X		200
19,22		X		200, 215
19,61			X	200, 215
27,86			X	200, 310

Os extratos miceliais do branco e do experimento com o ácido benzóico também foram analisados por LC-DAD, e seus cromatogramas seguem ilustrados na Figura 4.70. Nota-se que nos extratos miceliais também se observou alguma diferença entre o branco e o experimento com o ácido benzóico. O extrato do branco apresentou um maior número de picos cromatográficos entre 14 e 20 minutos (região circulada, no cromatograma B), e este fato leva a acreditar que o ácido benzóico influenciou de alguma maneira o metabolismo fúngico.

Os máximos de absorção dos picos cromatográficos situados nesta região, nos dois extratos miceliais, estão apresentados na Tabela 4.8.

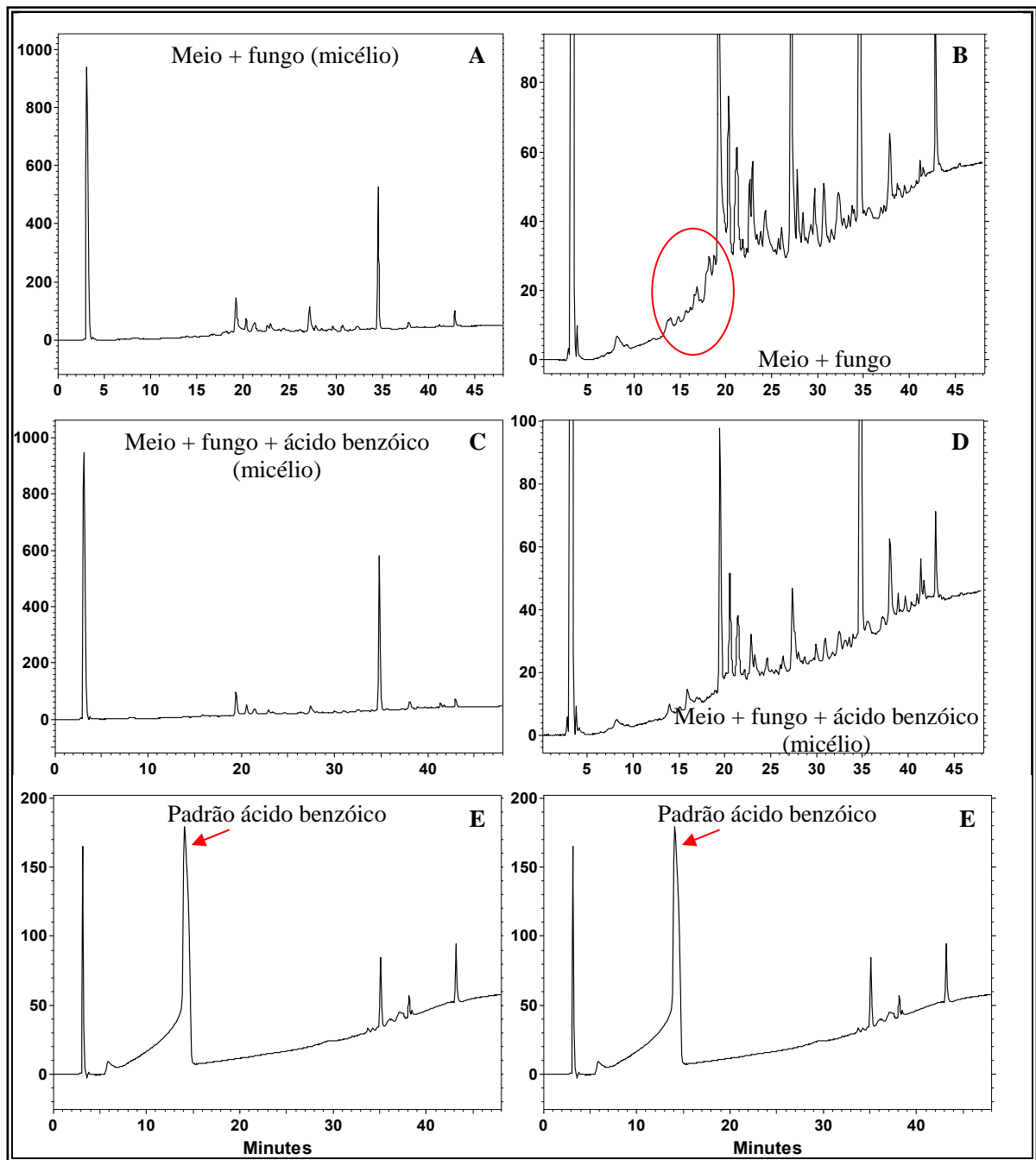


FIGURA 4.70 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido benzóico. E – cromatograma do padrão de ácido benzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.8 - λ_{\max} do padrão de ácido benzóico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.70.

t_R (min)	Padrão ac. benzóico	Meio+fungo	Meio+fungo + ácido benzóico	λ_{\max} (nm)
14,09	X			200, 226
14,78		X		200
15,59		X		200
15,89			X	200
16,65		X		200
18,20		X		200
18,73		X		200
19,20		X		200, 215
19,47			X	200, 215

4.4.1.2 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido salicílico

Os cromatogramas do extrato de acetato de etila do experimento com ácido salicílico estão ilustrados na Figura 4.71 a seguir, juntamente com o extrato de acetato do branco e com o cromatograma do padrão de ácido salicílico. Nos cromatogramas B e D é possível notar algumas diferenças entre o extrato de acetato do branco e do experimento com ácido salicílico. As regiões com perfis mais diferenciados estão circuladas.

Os máximos de absorção dos picos cromatográficos diferenciados e do padrão de ácido salicílico estão apresentados na Tabela 4.9. Estes dados confirmam que de fato houve diferenciação entre os dois extratos comparados. No extrato de acetato do experimento com o aditivo não foi detectado o ácido salicílico. No extrato do branco existe uma maior número de compostos que eluem entre 10 e 20 minutos, se comparado com o extrato do ácido salicílico. E novamente os compostos destes extratos exibem máximos de absorções em 200 nm.

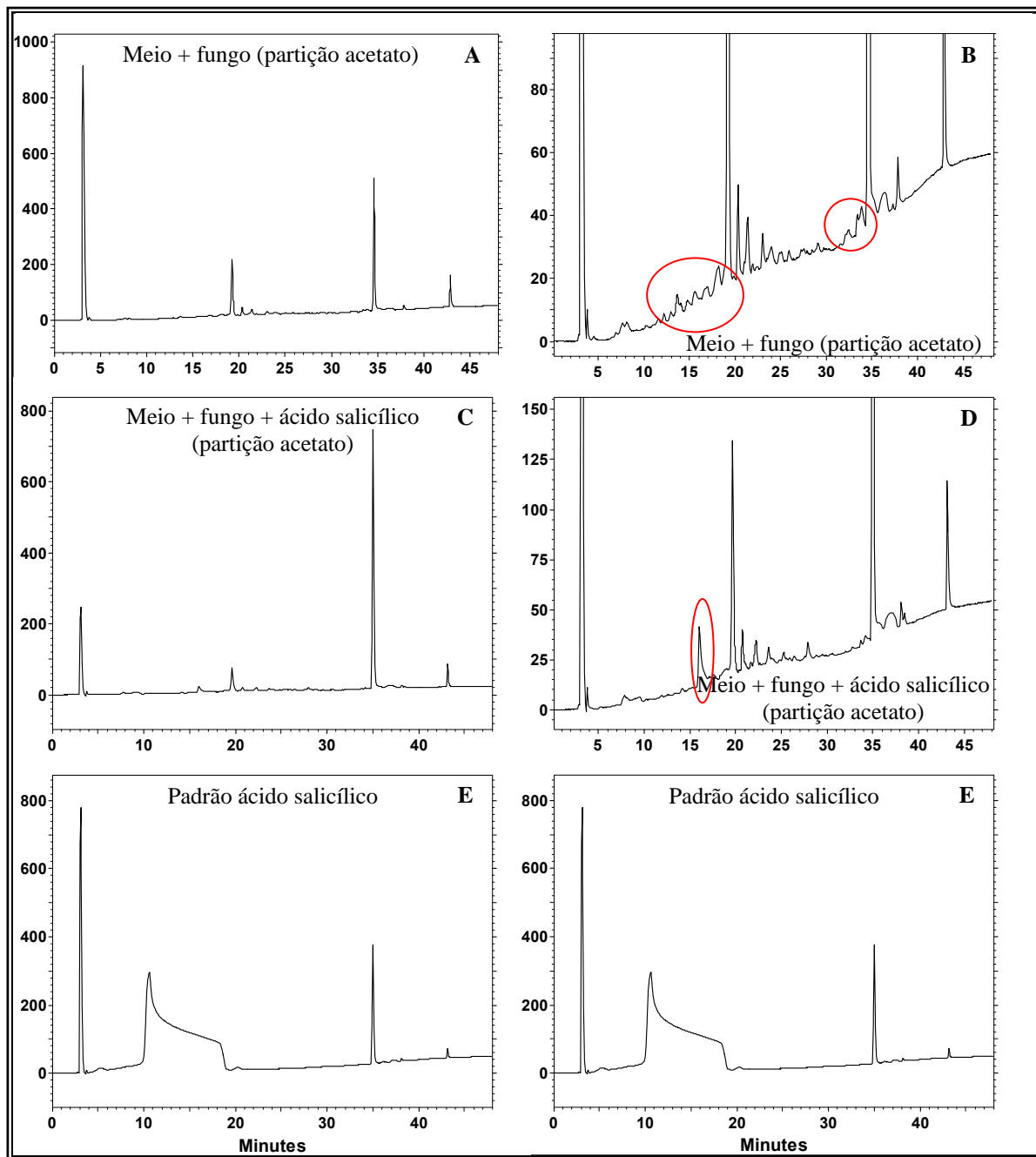


FIGURA 4.71 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido salicílico. E - cromatograma do padrão de ácido salicílico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Fluxo: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.9 - λ_{\max} do padrão de ácido salicílico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.71.

t_R (min)	Padrão ac. salicílico	Meio+fundo	Meio+fundo + ácido salicílico	λ_{\max} (nm)
10,26		X		200
10,54	X			200, 230, 296
11,58		X		200
12,15		X		200
12,90		X		200
13,65		X		200
14,04		X		200
14,17			X	200
14,83		X		200
15,61		X		200
16,03			X	200
18,14		X		200
19,22		X		200, 215
19,63				210
32,41		X		200
33,41		X		200

O extrato micelial com ácido salicílico também foi analisado por LC-DAD, e comparado com o extrato micelial do branco. A Figura 4.72 ilustra esses cromatogramas. Aparentemente os cromatogramas expandidos B e D apresentam algumas diferenças nas regiões circuladas. A análise dos espectros de ultravioleta destes picos diferenciados apresentou os máximos de absorção apresentados na Tabela 4.10.

Pelos dados da Tabela 4.10, observa-se que o extrato micelial com ácido salicílico apresentou um pico cromatográfico com t_r 9,62 minutos, com um perfil de absorção muito semelhante ao do padrão de ácido salicílico, porém com seus máximos de absorção um pouco deslocados para comprimentos de onda menores. E o t_r (9,62 minutos) deste pico também está um pouco deslocado em relação ao do padrão (10,54 minutos). Entre 10 e 19 minutos foram detectados mais picos cromatográficos no branco do que no experimento com o ácido salicílico. Porém, após 19 minutos, aparentemente os picos encontrados nos extratos do branco e do experimento com aditivo parecem apenas estar um pouco deslocados, porém eles apresentam os mesmos perfis de absorção.

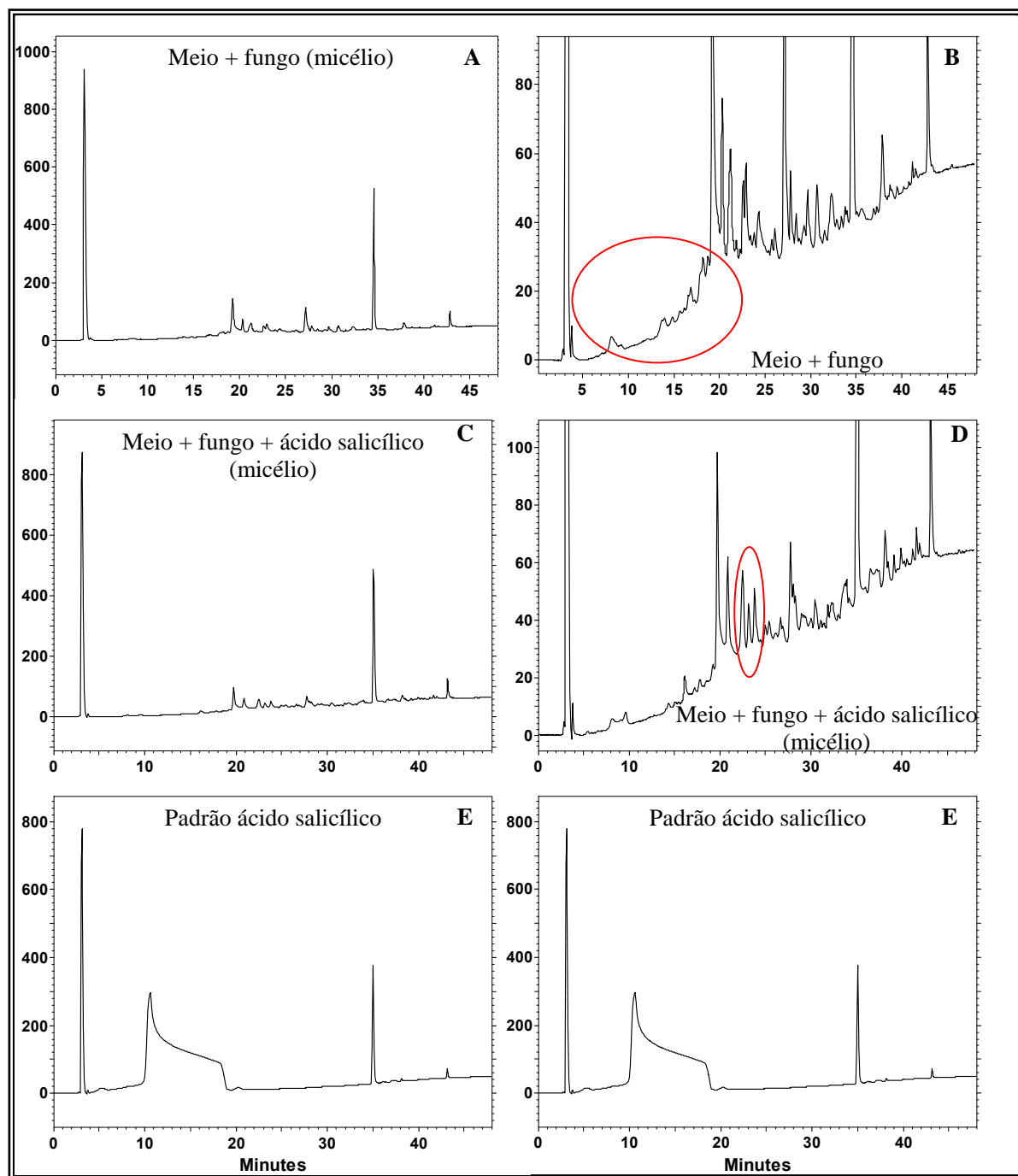


FIGURA 4.72 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido salicílico. E – cromatograma do padrão de ácido salicílico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.10 - λ_{\max} do padrão de ácido salicílico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.72.

t_R (min)	Padrão ac. salicílico	Meio+fungo	Meio+fungo + ácido salicílico	λ_{\max} (nm)
8,15		X		200
9,62			X	200, 225, 280
10,54	X			200, 230, 296
13,75		X		200
14,78		X		200
15,59		X		200
16,13			X	200
16,65		X		200
18,20		X		200
18,73		X		200
19,20		X		200, 215
19,72			X	200, 215
20,29		X		200, 220
20,86			X	200
21,19		X		200
22,49			X	200
22,62		X		200, 220
23,17			X	200, 220
23,82			X	200
24,34		X		200

4.4.1.3 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido oleanólico

O padrão de ácido oleanólico disponível para os experimentos estava presente numa mistura de três compostos, que puderam ser visualizados por plaquinha de CCD. Por esta razão, o ácido oleanólico foi purificado por CC, conforme citado na seção 3.6.2. O composto purificado foi analisado por RMN ^1H (Figura 4.73) e ^{13}C (Figura 4.74).

No espectro de RMN ^1H do ácido após a purificação (Figura 4.73) foi possível observar a presença de um sinal em δ_{H} 5,27 referente a uma hidrogênio olefínico atribuído ao H-12. Na região blindada do espectro, pôde-se observar a presença de sete singletos de metila relativos ao ácido oleanólico (δ_{H} 0,76; 0,78; 0,91; 0,93; 0,95; 1,13; 1,27).

No espectro de RMN ^{13}C (figura 4.74) não foi possível observar o sinal de atribuído ao carbono carbonílico C-28; podê-se observar dois sinais de carbono sp_2 , (δ_{C} 144,0 e 122, 5) que foram atribuídos aos carbonos C-12 e C-13; e um sinal referente ao carbono carbinólico em δ_{C} 79,1 foi observado. Os valores observados no deslocamento químico de carbono foram comparados com os da literatura ^[68] e a partir dos dados obtidos, pôde-se concluir que a substância era de fato o ácido

oleanólico, porém ainda com algumas impurezas. Os dados espectroscópicos da Tabela 4.11 são referentes ao espectro de RMN ^{13}C do ácido oleanólico.

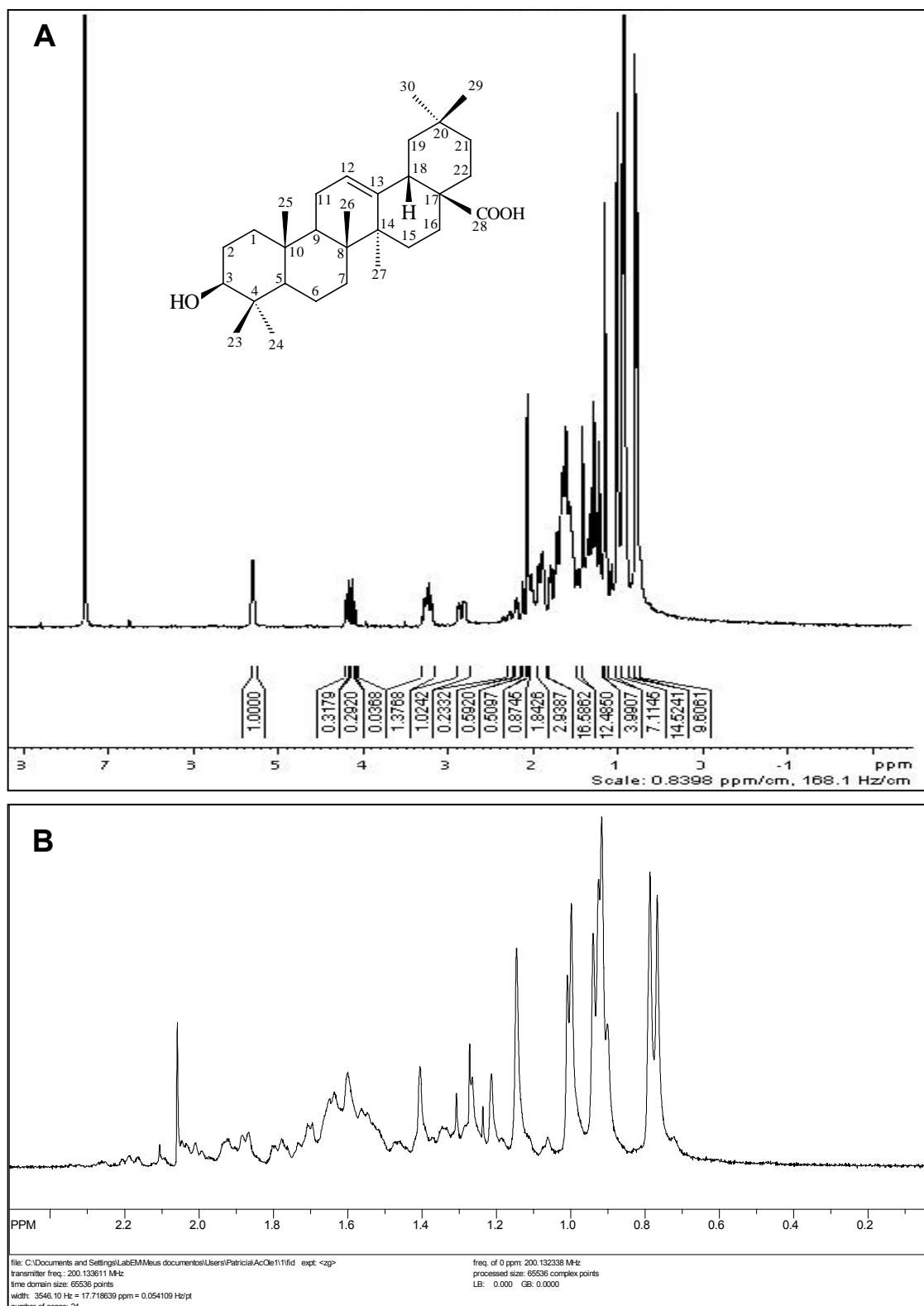


FIGURA 4.73 - (A) Espectro de RMN ^1H (200MHz, CDCl_3) do ácido oleanólico após a purificação. (B) Ampliação do espectro A.

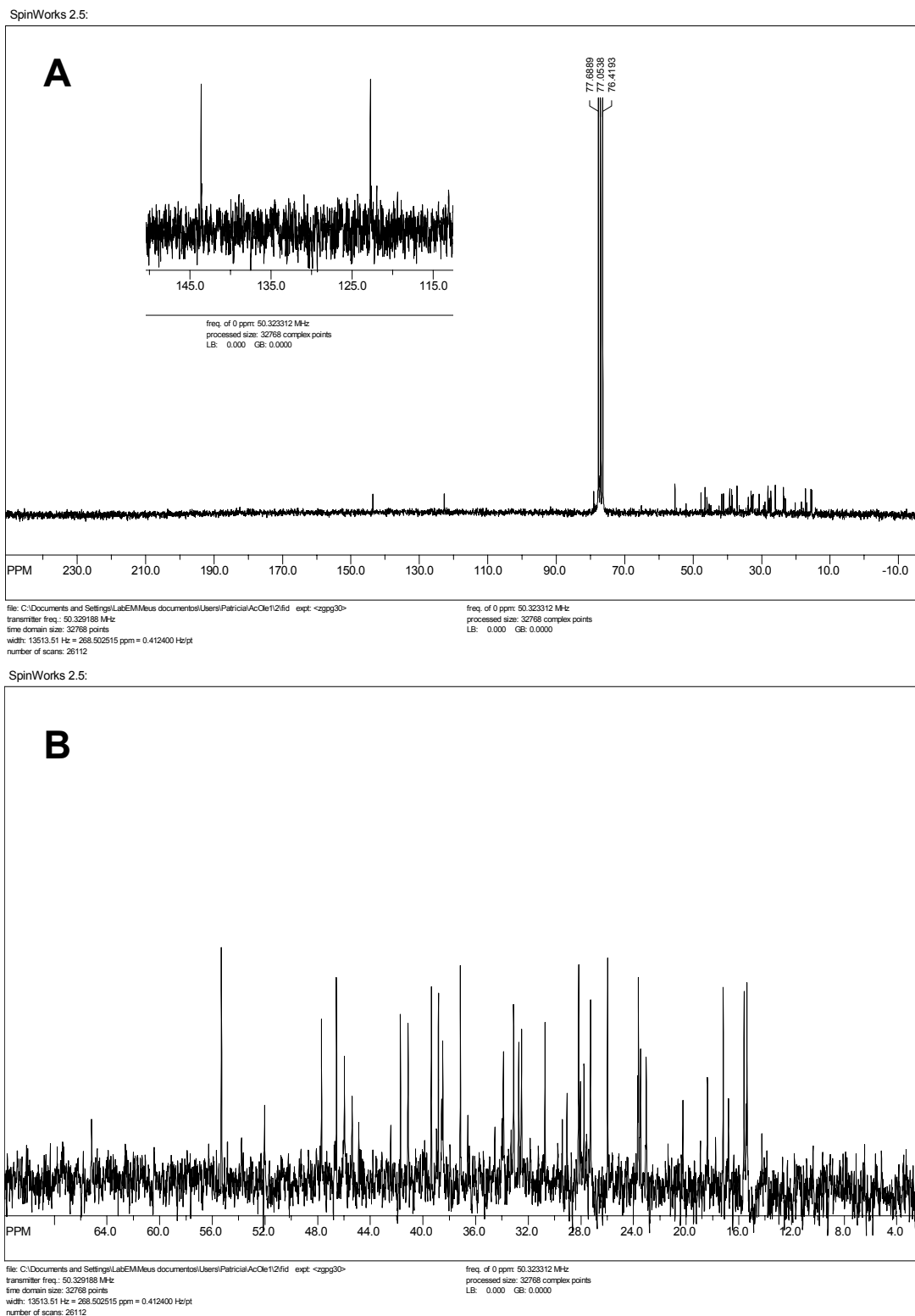


FIGURA 4.74 - (A) Espectro de RMN ^{13}C (200MHz, CDCl_3) do ácido oleanólico após a purificação. (B) Ampliação do espectro A.

TABELA 4.11 - Dados de RMN ^{13}C do ácido oleanólico. * CDCl_3 , ** DMSO [68].

carbonos	δ_c * ácido oleanólico	δ_c ** lit. ácido oleanólico
1	38,5	38,3
2	27,9	27,9
3	78,0	78,0
4	39,2	39,2
5	55,4	55,7
6	18,4	18,4
7	33,1	33,2
8	39,4	39,6
9	47,8	47,9
10	37,0	37,3
11	23,7	23,7
12	122,5	122,5
13	144,0	144,7
14	42,5	42,1
15	28,8	28,2
16	23,7	23,7
17	46,6	46,6
18	41,8	41,9
19	46,7	46,4
20	30,7	30,8
21	33,9	34,1
22	33,0	33,2
23	28,2	28,2
24	16,5	16,4
25	15,6	15,4
26	17,2	17,3
27	26,0	26,1
28		180,1
29	32,9	33,2
30	23,6	23,7

Após a purificação, o ácido oleanólico foi utilizado como aditivo no cultivo da espécie fúngica.

O extrato fúngico de acetato de etila do experimento com ácido oleanólico foi inicialmente analisado por LC-DAD, e comparado com o extrato de acetato do experimento branco, para verificar alguma diferenciação entre os perfis cromatográficos. Estes cromatogramas, junto com o do padrão de ácido oleanólico, estão mostrados na Figura 4.75. O cromatograma D mostra dois picos circulados, de maior intensidade, detectados no extrato com o ácido oleanólico. Pode-se notar também que na região entre 10 e 20 minutos o cromatograma do branco apresenta mais picos cromatográficos que o extrato do experimento com aditivo. Portanto, houve uma diferenciação entre estes dois extratos analisados. O ácido oleanólico foi detectado no extrato com este aditivo, como pode ser visto, em D, com t_r 40,49 minutos.

Os t_r e os comprimentos de onda de absorção dos picos eluídos nas regiões citadas acima estão apresentados na Tabela 4.12 seguinte, onde pode-se notar também a diferenciação entre os extratos analisados.

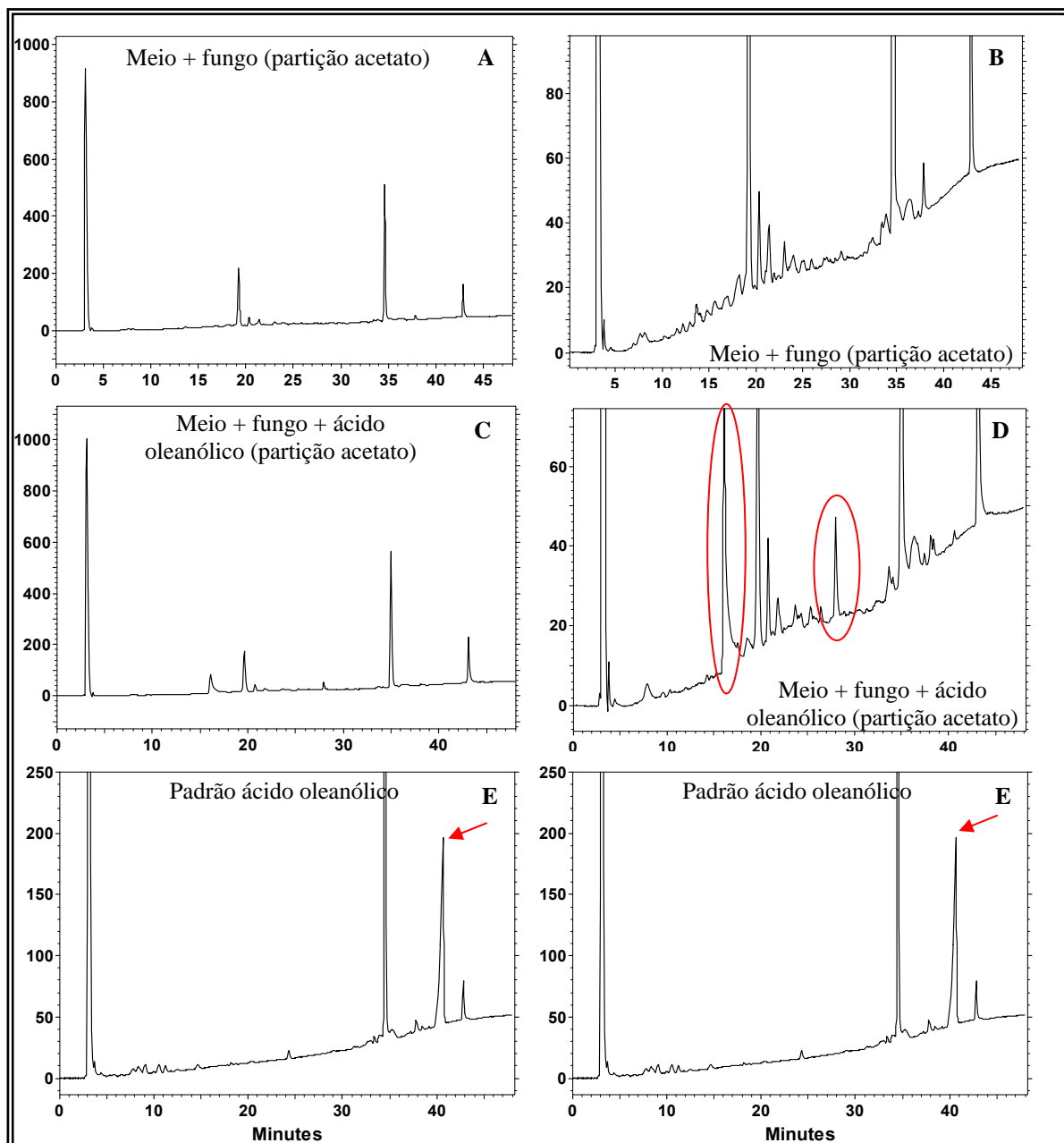


FIGURA 4.75 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido oleanólico. E – cromatograma do meio + ácido oleanólico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.12 - λ_{\max} do padrão de ácido oleanólico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.75.

t_R (min)	Meio + ac. oleanólico	Meio+fungo	Meio+fungo + ácido oleanólico	λ_{\max} (nm)
10,26		X		200
10,33			X	200
11,58		X		200
12,15		X		200
12,90		X		200
13,65		X		200
14,04		X		200
14,23			X	200
14,83		X		200
15,61		X		200
16,09			X	210
18,14		X		200
18,55			X	200
19,22		X		200, 215
19,70				210
27,94			X	200, 310
40,64	X		X	200

O extrato micelial deste experimento foi igualmente analisado por LC-DAD, e comparado com o extrato micelial do experimento branco. Os cromatogramas resultantes estão ilustrados na Figura 4.76. Novamente, comparando os cromatogramas dos dois extratos, foi possível notar uma diferenciação do perfil cromatográfico, principalmente na região circulada. O extrato do branco possui mais compostos eluindo nesta região do que o extrato do experimento com ácido. Os máximos de absorção dos picos situados nesta região, tanto do branco quanto do experimento com o ácido, estão mostrados na Tabela 4.13, e apresentam em geral um perfil semelhante, com máximos em 200 nm.

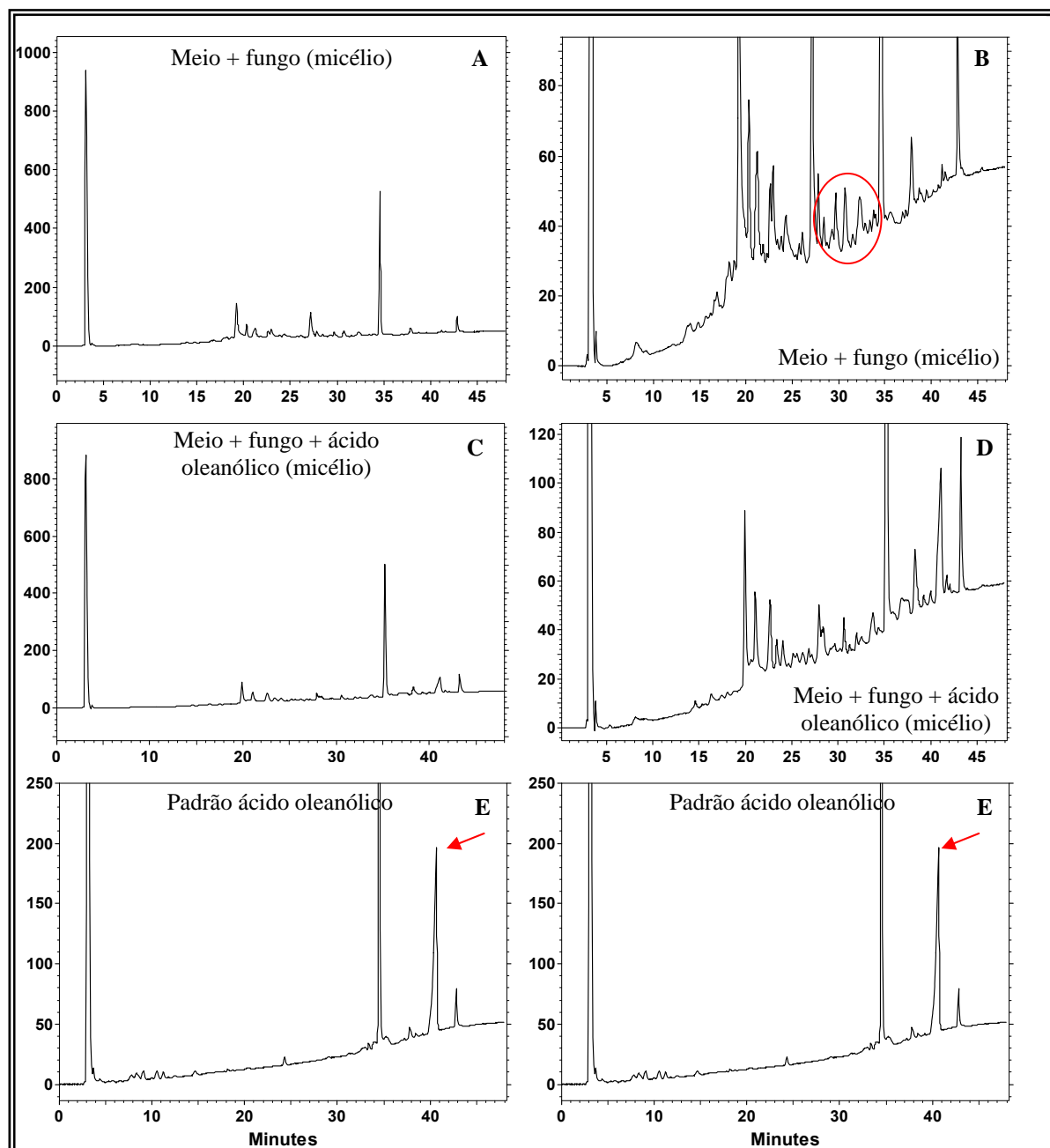


FIGURA 4.76 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido oleanólico. E – cromatograma do meio + ácido oleanólico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.13 - λ_{\max} do padrão de ácido oleanólico e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.76.

t_R (min)	Padrão ac. oleanólico	Meio+fungo	Meio+fungo + ácido oleanólico	λ_{\max} (nm)
27,16		X		200, 235, 325
27,95			X	200, 325
27,85		X		200
28,45		X		200
29,32		X		200
29,69		X		200
30,65			X	200
30,72		X		200
31,52		X		200
32,32		X		200
33,76			X	200
40,64	X			200

4.4.1.4 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença da resina de *Pinus taeda*

Outro aditivo utilizado nesta parte do trabalho foi uma resina extraída de *Pinus taeda*. Esta resina contém triterpenos, sesquiterpenos e outros compostos com cadeias insaturadas. Pelo espectro de RMN- C^{13} desta resina (Figura 4.77) pode-se notar vários sinais entre δ 100 e 150, região esta do espectro onde aparecem os sinais de carbonos insaturados.

A Figura 4.78 apresenta os cromatogramas de LC-DAD do extrato fúngico de acetato com resina, comparado com o mesmo extrato do branco, e com o extrato de meio + resina. Observando cuidadosamente os cromatogramas expandidos B, D e F, pode-se notar a presença de picos em D, no extrato fúngico com resina, que não aparecem nem no extrato do branco (B) nem no extrato de meio + resina (F). A Tabela 4.14 apresenta de maneira organizada os diferentes picos encontrados em cada extrato de acetato analisado, com seus máximos de absorção. Por esta tabela é possível observar melhor as diferenças entre eles.

SpinWorks 2.5:

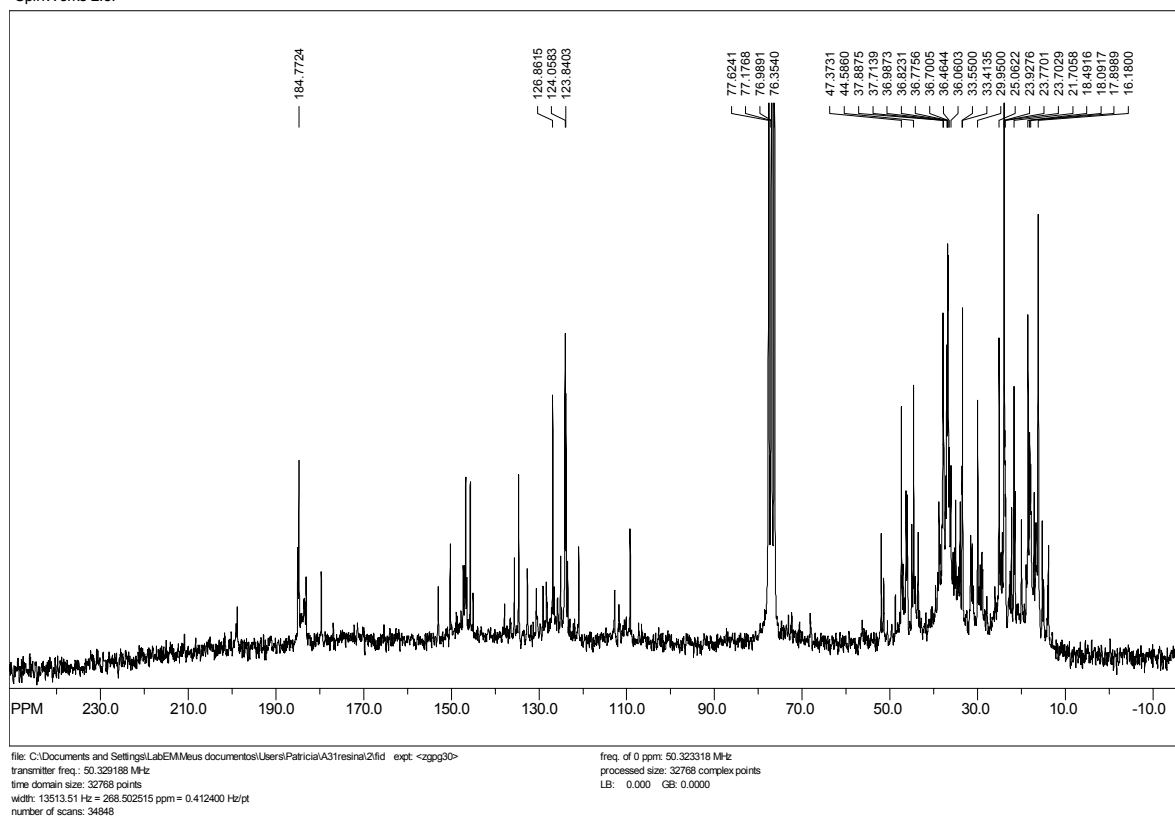


FIGURA 4.77 - Espectro de RMN ^{13}C (200MHz, CDCl_3) da resina de *Pinus taeda*.

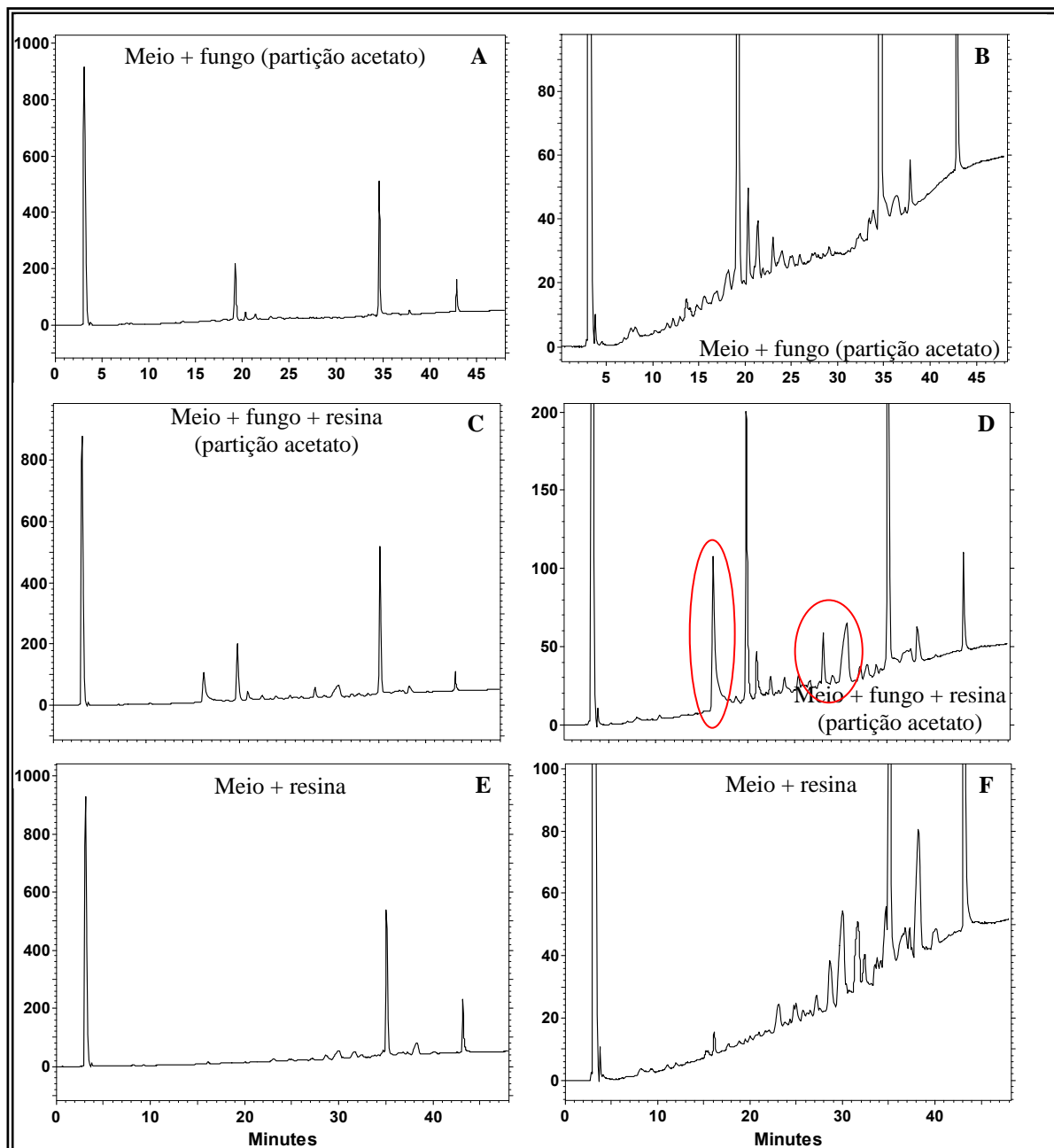


FIGURA 4.78 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D - - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de resina. E e F- cromatograma do meio + resina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.14 - λ_{\max} do extrato do meio + resina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.78.

t_R (min)	Meio + resina	Meio+ fungo	Meio+fungo + resina	λ_{\max} (nm)
10,26		X		200
10,33			X	200
11,58		X		200
12,15		X		200
12,90		X		200
13,65		X		200
14,04		X		200
14,83		X		200
15,68		X		200
16,14	X			200
16,20			X	200, 210
18,14		X		200
19,22		X		200, 215
19,81			X	200, 215
25,82		X		200
28,12			X	200, 310
28,63	X			200
29,11			X	200
29,72	X			200
30,53			X	200
31,64	X			200
32,04			X	200
32,39	X			200
33,83			X	200
34,71	X			200

A diferenciação observada nos cromatogramas dos extratos mostrados na Figura 4.78 leva à conclusão de que a resina de Pinus também influenciou de alguma maneira o metabolismo fúngico, fazendo com que outros compostos tenham sido produzidos pela espécie neste meio.

O extrato micelial do experimento com resina também foi analisado por LC-DAD, e comparado com o mesmo extrato do branco. Os cromatogramas resultantes estão ilustrados na Figura 4.79. As regiões dos cromatogramas expandidos B e D foram as que mostraram uma maior diferenciação entre si, comprovando a modificação do metabolismo fúngico com a adição da resina ao meio de cultivo. Para melhor visualização, os máximos de absorção de cada pico eluído nestas regiões dos cromatogramas, tanto do extrato micelial branco quanto do extrato com resina e do meio + resina estão especificados na Tabela 4.15 a seguir.

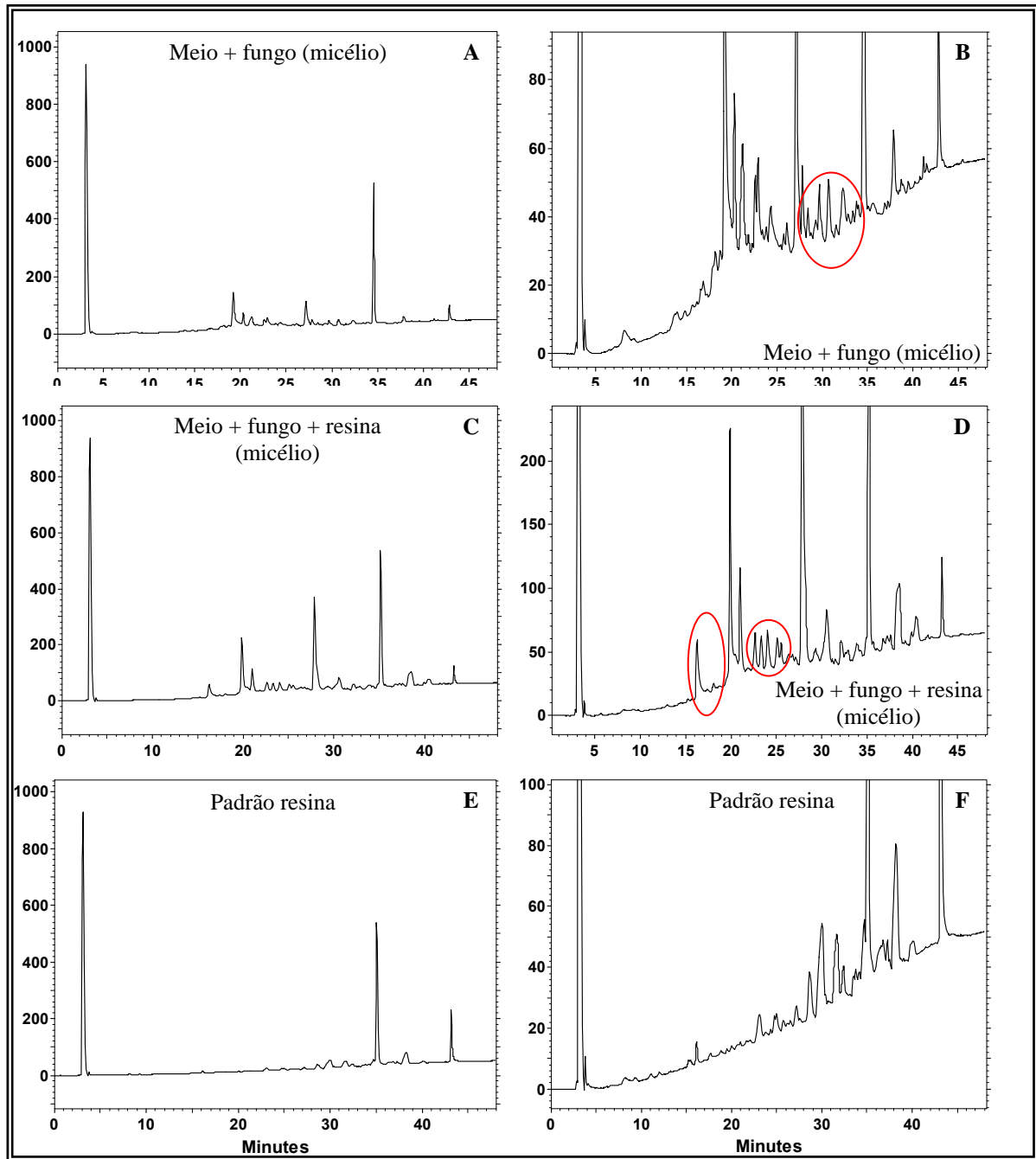


FIGURA 4.79 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de resina. E e F– cromatograma do meio + resina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.15 - λ_{\max} do extrato do meio + resina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.79.

t_R (min)	Padrão resina	Meio+ fungo	Meio+fungo + resina	λ_{\max} (nm)
16,14	X			200
16,27			X	200, 210
22,61			X	200
22,62		X		200
22,94		X		200, 275
23,02	X			200
23,32			X	200, 225
24,05			X	200, 270
24,34		X		200
24,73	X			200
24,98	X			200
25,06			X	200
25,53			X	200
25,73	X			200
25,78		X		200
26,11		X		200

4.4.1.5 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de alizarina

Os extratos do experimento com alizarina foram da mesma forma analisados, primeiramente por LC-DAD, a fim de visualizar as modificações ocorridas no perfil cromatográfico dos mesmos. O cromatograma do extrato de acetato do experimento com alizarina está mostrado na Figura 4.80 a seguir, e comparado com o mesmo cromatograma do extrato branco e do extrato do meio + alizarina.

De todos os aditivos testados, a alizarina foi o que mostrou uma maior influência no metabolismo fúngico, como pode ser facilmente visualizado pelos cromatogramas C e D da Figura 4.80. Vários picos cromatográficos diferentes foram detectados no extrato fúngico com alizarina, se comparado com o extrato do branco (A e B). Os máximos de absorção dos picos eluídos nas regiões circuladas do cromatograma C estão citados esquematicamente na Tabela 4.16 a seguir, e comparados com os máximos dos picos encontrados no cromatograma B.

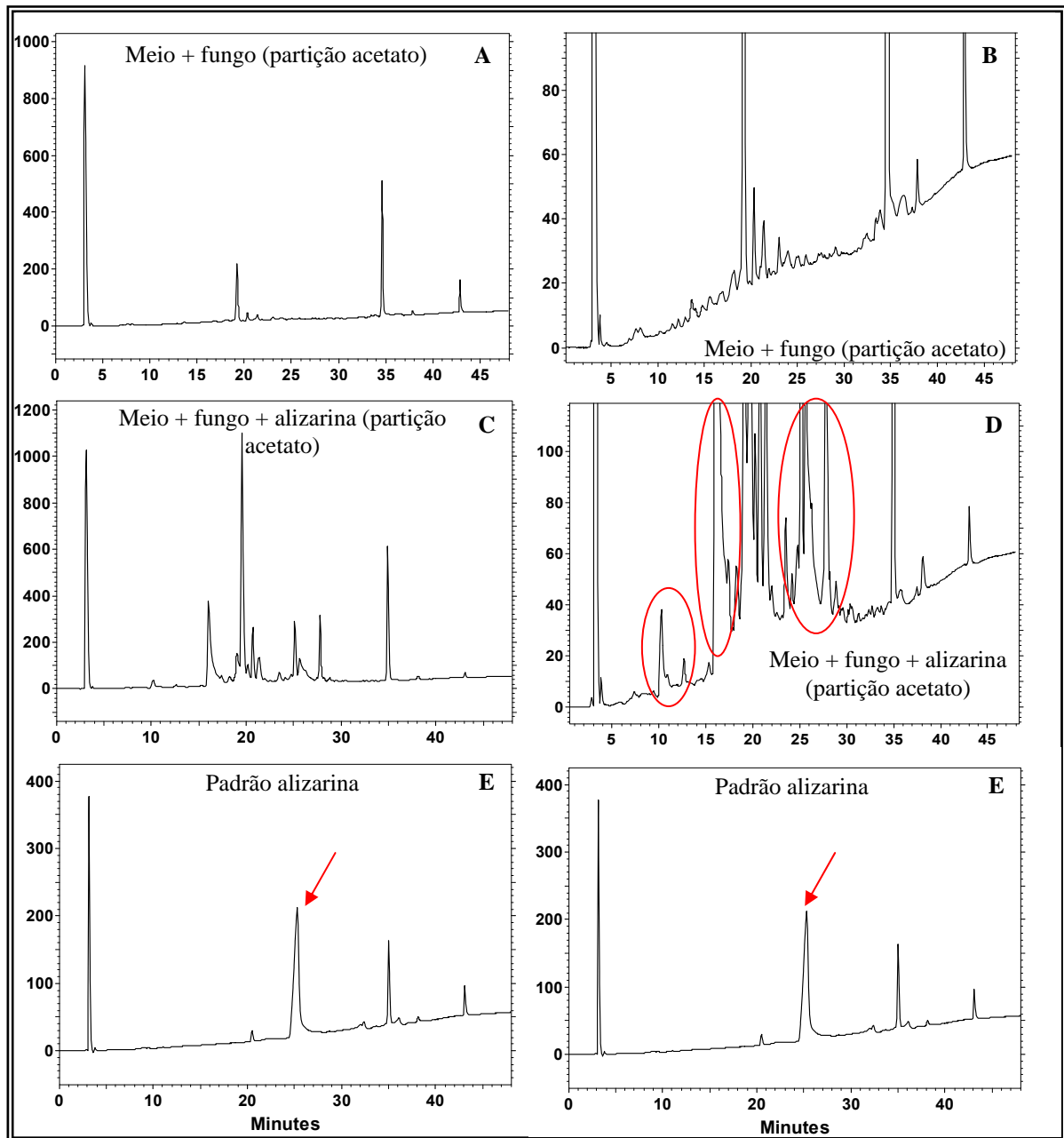


FIGURA 4.80 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de alizarina. E - cromatograma do meio + alizarina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.16 - λ_{\max} do extrato do meio + alizarina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.80.

t_R (min)	Meio + alizarina	Meio+ fungo	Meio+fungo + alizarina	λ_{\max} (nm)
10,26		X		200
10,26			X	200, 215
11,58		X		200
12,15		X		200
12,63			X	200, 340
12,90		X		200
13,65		X		200
14,04		X		200
14,83		X		200
15,29			X	200
15,61		X		200
16,03			X	200, 215, 290
18,14		X		210
19,03			X	200, 220
19,22		X		200, 215
19,64			X	215, 290
25,12			X	200, 220, 280, 330
25,24	X			200, 250, 264, 280, 330
25,62			X	200, 220
25,85		X		200
27,80			X	200, 220, 285, 330

Dos vários picos cromatográficos e seus máximos de absorção apresentados na Tabela 4.16, os que mais chamam a atenção são os picos de t_r 25,12 e 27,80 minutos que possuem dois máximos de absorção na mesma região espectral dos máximos do padrão de alizarina, com t_r 25,24 minutos. Este fato pode ser um indício da ocorrência de alguma modificação estrutural na molécula de alizarina, provavelmente realizada pelo fungo *P. brasilianum*.

O extrato micelial deste experimento também foi investigado por LC-DAD. Os cromatogramas do micélio deste experimento estão ilustrados na Figura 4.81, e comparados com o cromatograma micelial do branco. Através destes resultados apresentados é possível visualizar nitidamente vários picos nos cromatogramas do extrato micelial (C e D) do experimento com alizarina que não existem no cromatograma do branco (A e B). As regiões dos cromatogramas que apresentam estas diferenciações estão circuladas. Alguns picos cromatográficos destas regiões foram investigados em relação aos perfis de absorção. A Tabela 4.17 mostra os máximos de absorção destes picos cromatográficos.

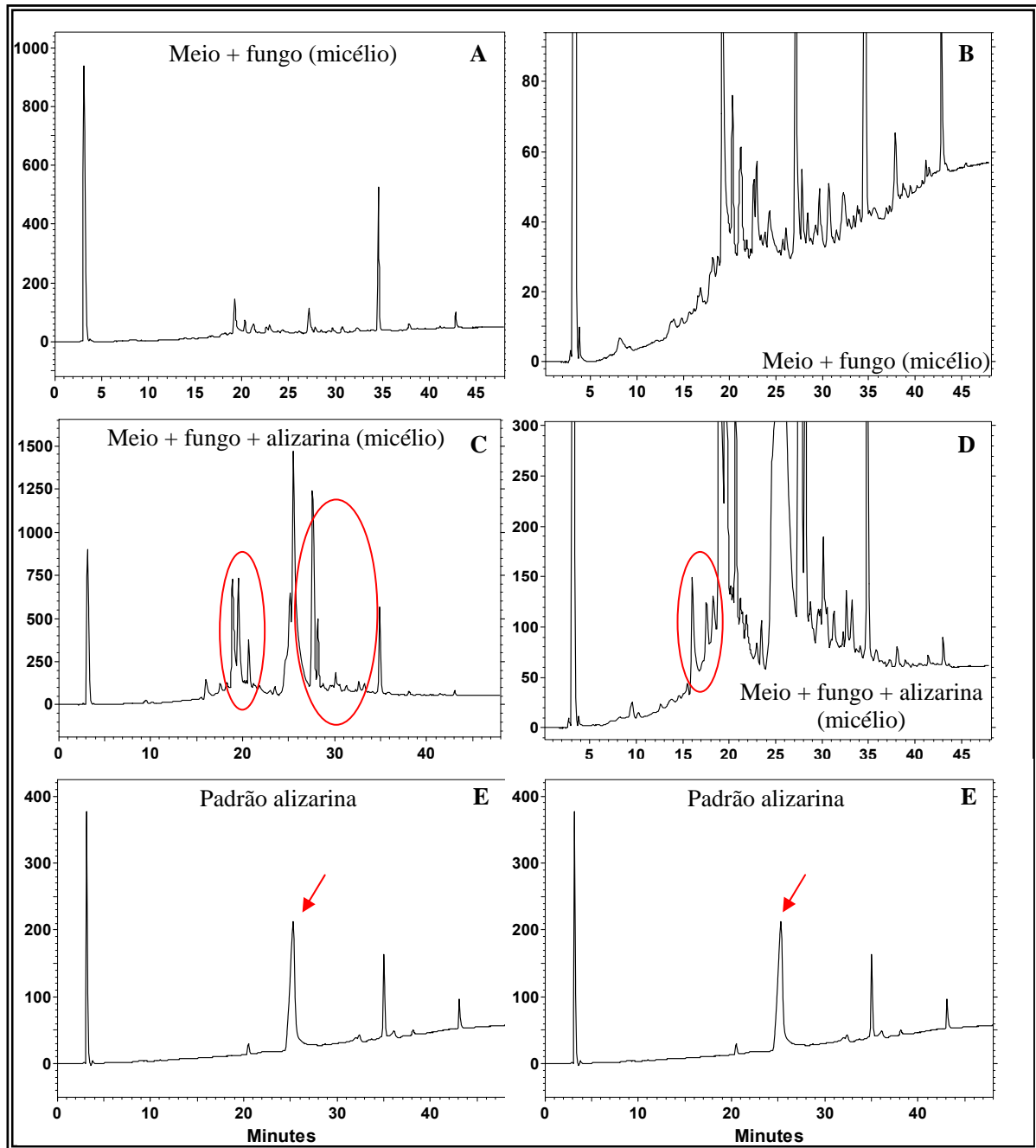


FIGURA 4.81 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D - - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de alizarina. E e F- cromatograma do meio + alizarina. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.17 - λ_{\max} do extrato do meio + alizarina e dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.81.

t_R (min)	Meio + alizarina	Meio+ fungo	Meio+fungo + alizarina	λ_{\max} (nm)
15,59		X		200
16,00			X	200, 210
16,65		X		200
17,54			X	200, 220, 260, 280, 330
18,20		X		200
18,24			X	200, 220, 257, 280
18,73		X		200
18,92			X	200, 220, 282, 318, 330
19,20		X		200, 215
19,59			X	200, 215, 286
20,29		X		200, 220
21,19		X		200
22,62		X		200, 220
22,94		X		200, 275
23,04			X	200, 220
23,51			X	200, 220, 273
24,34		X		200
25,13			X	200, 250, 280, 327
25,24	X			200, 250, 264, 280, 330
25,52			X	205, 220, 241, 285, 318, 330
25,78		X		200
26,11		X		200
27,16		X		200, 235, 325
27,62			X	210, 240, 325
27,85		X		200
28,19			X	205, 240, 294

Devido à grande mudança do metabolismo fúngico na presença da alizarina, levando à produção de diversos outros metabólitos pelo fungo neste experimento, foi dada uma maior atenção a este substrato, e uma curva de desaparecimento da alizarina foi realizada, durante um período estipulado de cultivo do fungo na presença deste aditivo. Os pontos escolhidos para a curva de desaparecimento foram: dias 0, 2, 4, 7, 10, 15 e 25. Cada ponto foi realizado em triplicata. A Figura 4.82 traz a curva resultante deste experimento.

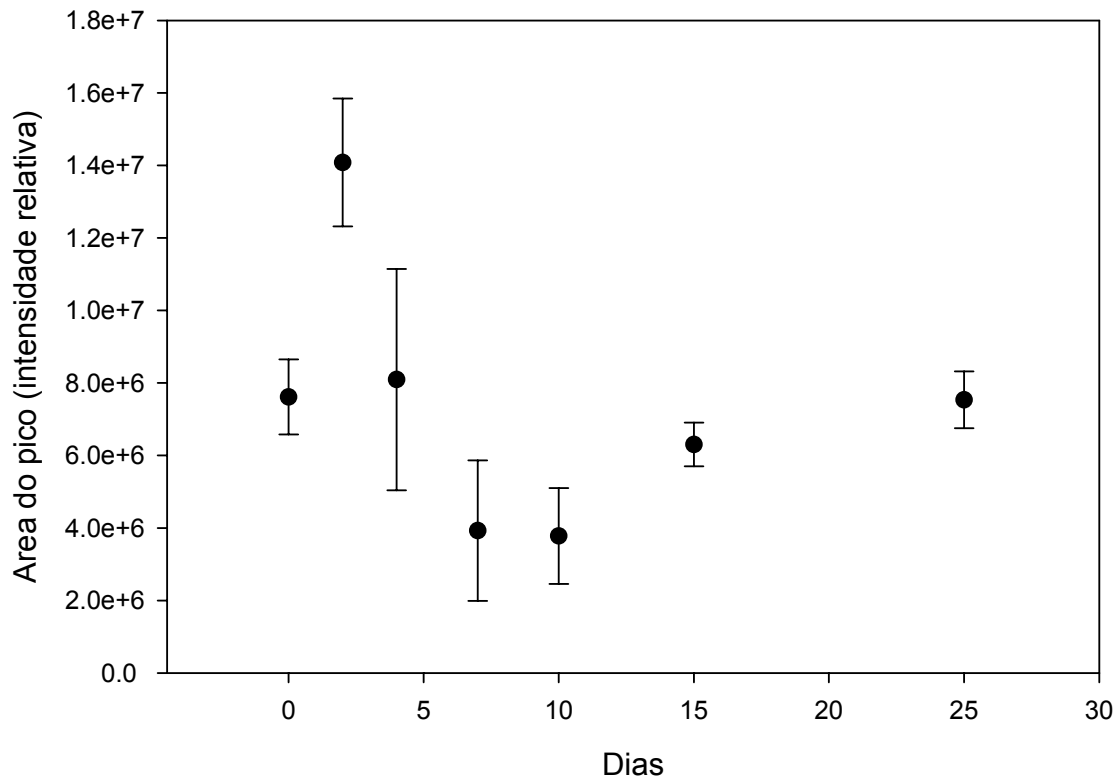


FIGURA 4.82 - Curva de desaparecimento da alizarina durante o cultivo do fungo *P. brasilianum*.

O perfil da curva da Figura 4.82 não foi precisamente o que se esperava como resultado. O ponto do dia 0, por exemplo, deveria ser o de maior área relativa, pois foi o ponto em que o fungo ficou por menos tempo em contato com a alizarina do meio, não havendo tempo suficiente para o consumo deste aditivo. Porém não foi o que se verificou. A região da curva que mostrou um perfil mais adequado foi entre 2 e 10 dias, mesmo assim os erros relativos destes pontos, mostrados pelas barras de erros da Figura, são muito altos, principalmente o do terceiro ponto.

De fato esta foi uma primeira tentativa da realização do estudo de desaparecimento deste substrato. Por esta razão vários erros podem ter sido cometidos e descobertos. A primeira causa possível de erro descoberta foi durante o cultivo do fungo. Ocorreu diferenciação de massa fúngica crescida num mesmo período de tempo, nos diferentes erlenmeyers cultivados, isto é, o metabolismo de cada cultura fúngica estava diferenciado. Outro foi a perda de alizarina devido à sua interação com a vidraria, causando perdas desde o período de cultivo, pois os erlenmeyers onde o meio foi adicionado ficaram com coloração roxeada, mesmo após a lavagem desta vidraria. As vidrarias utilizadas para particionamento e preparo de amostras também ficaram sujas de alizarina, pois ela se ligou fortemente ao vidro. Uma possível solução para esta causa de erro seria utilizar um outro material para manipulação deste extrato, ou mesmo utilizar um vidro previamente lavado, por exemplo, com silicone ou outro material, para diminuir esta forte interação do substrato com o vidro. Um outro possível erro de manipulação foi o uso de algodão para filtragem dos extratos de alizarina ressuspensos, como foi descrito previamente na seção de preparo de amostras. Não é possível prever a quantidade certa de material que se perde durante cada filtragem com algodão.

Ter uma idéia dos possíveis passos a serem aperfeiçoados para o desenvolvimento de um experimento já é uma grande vantagem conseguida com a primeira tentativa realizada.

O extrato fúngico conseguido com o cultivo em alizarina foi reunido e analisado em placa de CCD de fase normal. Comparando o extrato do experimento branco (meio de cultura mais o fungo, sem aditivo), com o padrão de alizarina e o extrato fúngico com alizarina, foi visualizada no extrato com alizarina uma banda de coloração semelhante ao padrão, que não apareceu, por sua vez, no extrato do branco. Esta placa de CCD está mostrada na Figura 4.83 a seguir.

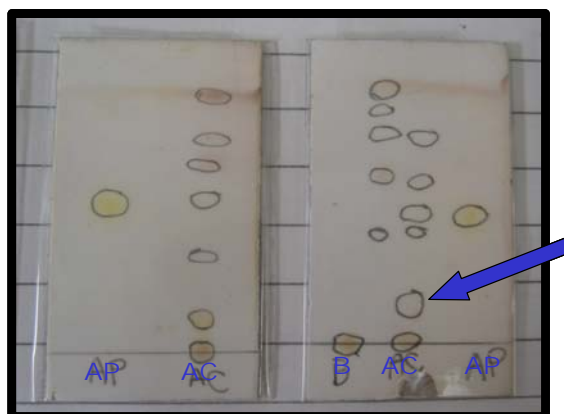


FIGURA 4.83 - Placa de CCD mostrando os perfis de eluição do padrão de alizarina (AP), do experimento branco (B), e do extrato com alizarina (AC).

Após a visualização desta banda cromatográfica intensa no extrato com alizarina, todo o extrato foi separado por CC com fase estacionária de sílica flash, e as frações de interesse conseguidas foram separadas por CCDP.

Algumas frações finais que mostraram uma única banda cromatográfica em placa de CCD foram analisadas posteriormente por RMN. A fração 1-175D, cuja massa total conseguida foi de apenas 3 mg, mostrou resultados interessantes pela análise de RMN ^1H . Seu espectro está ilustrado na Figura 4.84.

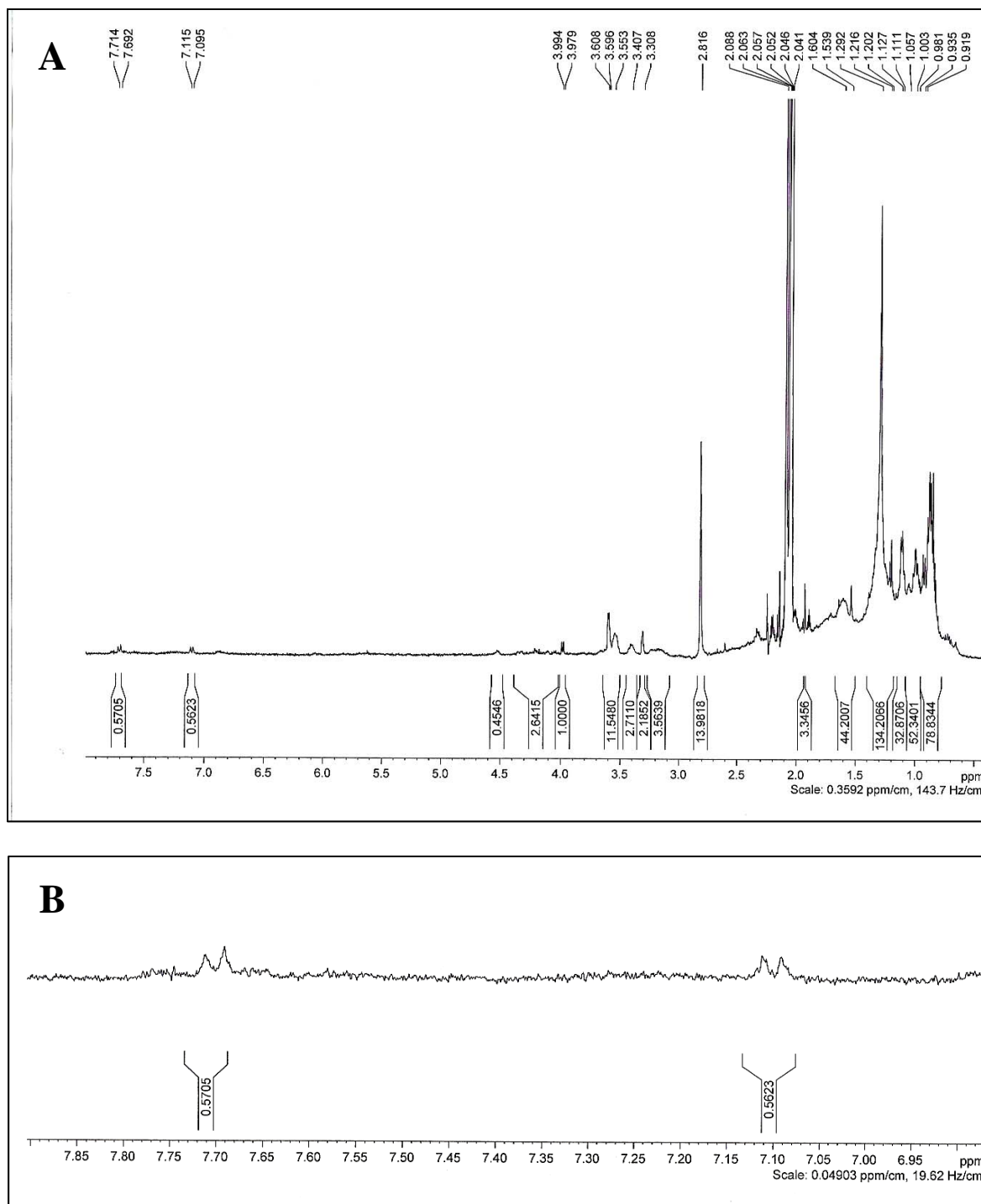


FIGURA 4.84 - Espectro de RMN ^1H da fração 1-175D (400 MHz, acetona- d_6). **(A)** Espectro completo; **(B)** Região entre 7 e 8 ppm ampliada.

O espectro de RMN ^1H da fração 1-175D (Figura 4.84) foi comparado com o espectro de RMN ^1H do padrão comercial de alizarina utilizado nos experimentos, que está ilustrado na Figura 4.85.

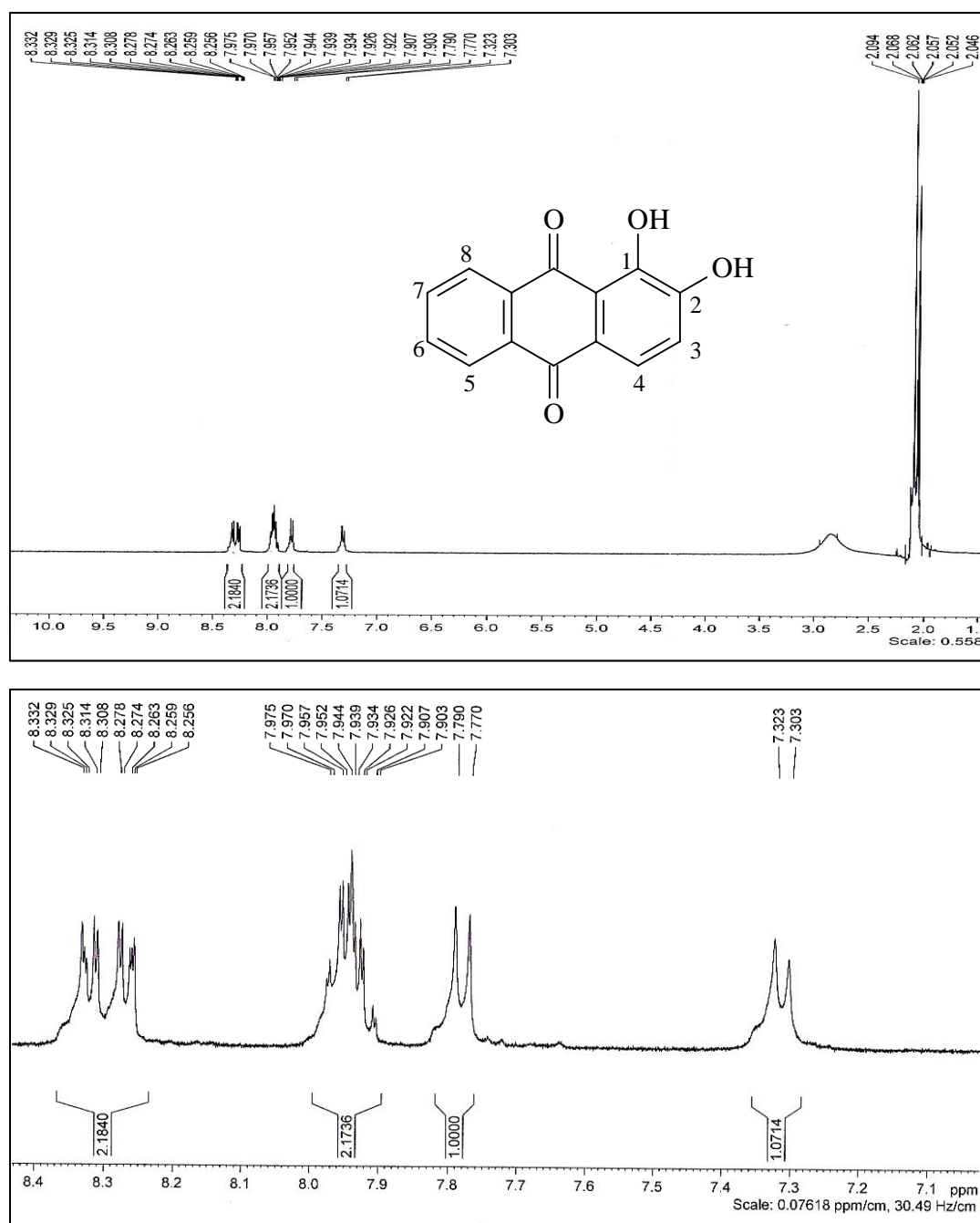


FIGURA 4.85 - Espectro de RMN ^1H da alizarina (400 MHz, acetona- d_6). (A) Espectro completo; (B) Região entre 7 e 8 ppm ampliada.

O espectro da Figura 4.85 apresentou dois dubletos referentes aos hidrogênios H-3 (δ 7,31) e H-4 (δ 7,78), um duplo duplo dubleto correspondente aos hidrogênios H-6 (δ 7,91) e H-7 (δ 7,96) e um duplo dubleto correspondente aos hidrogênios H-5 (δ 8,32) e H-8 (δ 8,27). Estes dados de RMN ^1H para a alizarina foram comparados com os dados da Literatura ^[69].

O espectro de RMN ^1H da fração 1-175D (Figura 4.84) apresentou dois dubletos, cada um integrando para 1 hidrogênio, com deslocamentos químicos de δ 7,70 e δ 7,11. Comparando os sinais destes dois dubletos com os dubletos do espectro de RMN ^1H da alizarina (Figura 4.85), é possível notar uma similaridade em seus deslocamentos químicos. Devido à pequena quantidade de material

conseguido da fração 1-175D, não foi possível realizar outros experimentos para confirmação da estrutura deste composto, que aparece como composto minoritário da mistura, como pode ser confirmado devido à baixa intensidade dos sinais, se comparado com os sinais encontrados na região de δ 0,5 - 2,5 do espectro da Figura 4.84. Não foi possível sua análise por espectrometria de massas também, devido a problemas no aparelho. Desta forma, o que se pode presumir é que se trata de um composto com um anel C semelhante ao da alizarina. Provavelmente, a estrutura da alizarina foi modificada pelo fungo.

4.4.1.6 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido 2,5-dihidroxibenzóico

Os últimos seis estudos com substratos foram realizados no mesmo período de tempo, em batelada. Portanto, um novo experimento branco, de cultivo do fungo sem nenhum aditivo, foi utilizado para comparação, visto que é possível ocorrer alguma diferenciação metabólica durante períodos diferentes de cultivo da mesma cepa fúngica.

O próximo experimento analisado foi com o ácido 2,5-dihidroxibenzóico. Os cromatogramas de LC-DAD dos extratos de acetato do branco, do padrão de ácido e do experimento com este aditivo estão mostrados na Figura 4.86 e através dos mesmos é possível visualizar facilmente uma diferenciação entre o perfil cromatográfico do experimento branco (A e B) e do experimento com o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (C e D). As regiões circuladas são onde aparecem as principais modificações.

A Tabela 4.18 apresenta os máximos de absorção de alguns picos eluídos nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.86, tanto do experimento com ácido quanto do branco. Ao contrário do que foi observado em todos os extratos anteriores, desta vez a maioria dos picos possuem perfis de absorção diferenciados, com mais de um máximo de absorção.

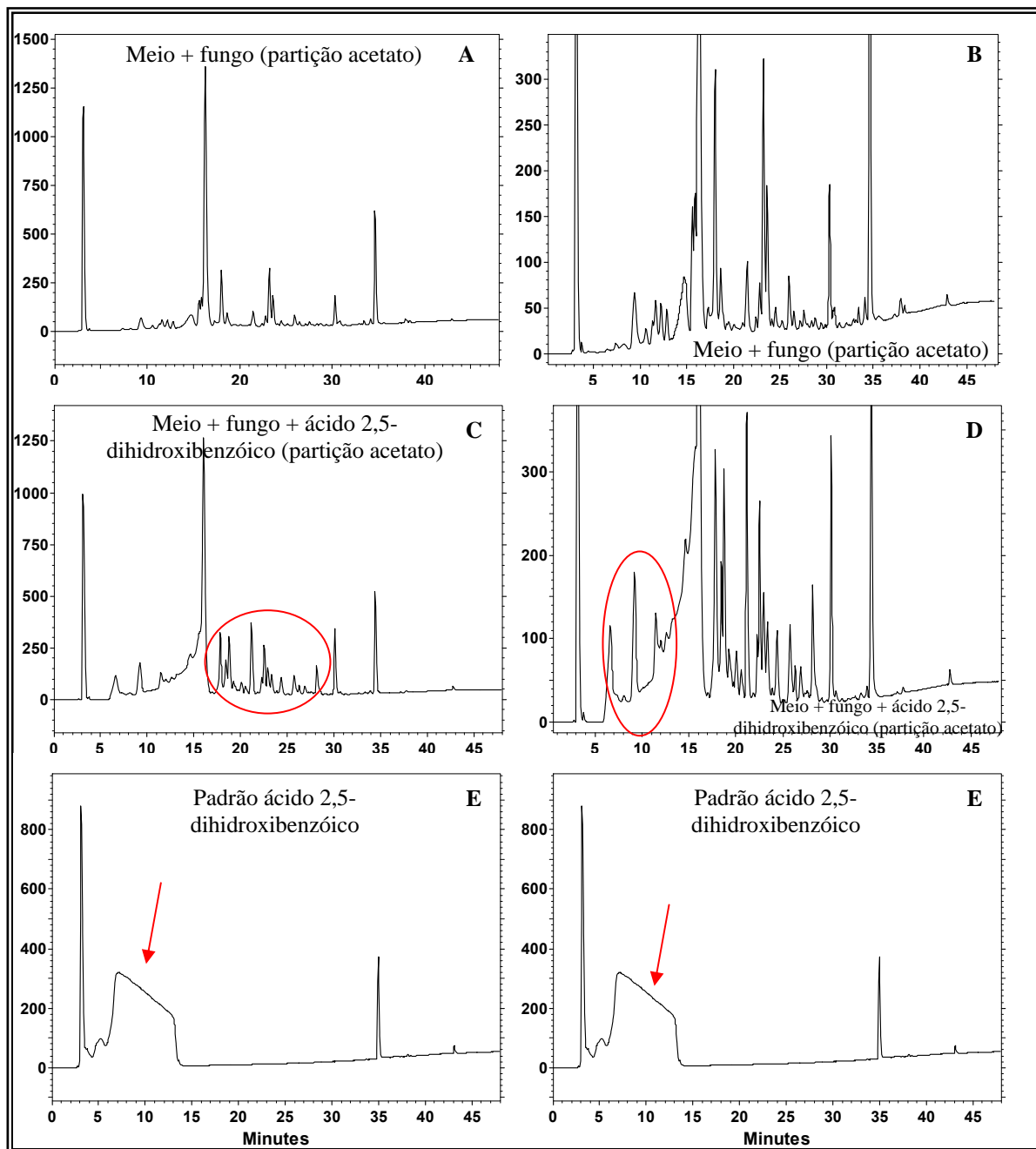


FIGURA 4.86 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,5-dihidroxi benzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,5-dihidroxi benzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.18 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.86, do extrato do meio + ácido 2,5-dihidroxibenzóico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 2,5-dihidroxibenzóico	Meio+fungo	Meio+fungo + ac. 2,5-dihidroxibenzóico	λ_{\max} (nm)
6,60			X	205
7,20	X			210, 230, 320
7,42		X		200, 235
8,09			X	200
8,28		X		200, 220
11,65		X		220, 225, 295
12,00			X	200
12,21		X		200, 225, 295
12,61			X	200
12,81		X		200, 245, 280
15,56			X	210
15,63		X		200, 220, 285
15,90		X		200, 225, 250, 280
16,03			X	210, 290
16,29		X		220, 295
17,28		X		200, 250, 280
17,82			X	200, 225, 250, 290
18,04		X		200, 220, 250, 290
18,42			X	200, 225
18,67		X		200, 220
18,75			X	200, 270
21,47		X		200, 225
22,25			X	200
22,43		X		200
22,51			X	200, 225, 300

O extrato micelial do experimento com ácido 2,5-dihidroxibenzóico foi igualmente analisado por LC-DAD, e comparado com o mesmo extrato do experimento branco (Figura 4.87). Comparando os cromatogramas do branco (A e B) e do experimento com o ácido (C e D), nota-se uma diferença menos marcante entre os dois extratos, se comparados com os extratos de acetato dos mesmos experimentos (Figura 4.86). Porém alguns picos diferentes foram detectados e circutados. Seus máximos de absorção estão apresentados na Tabela 4.19.

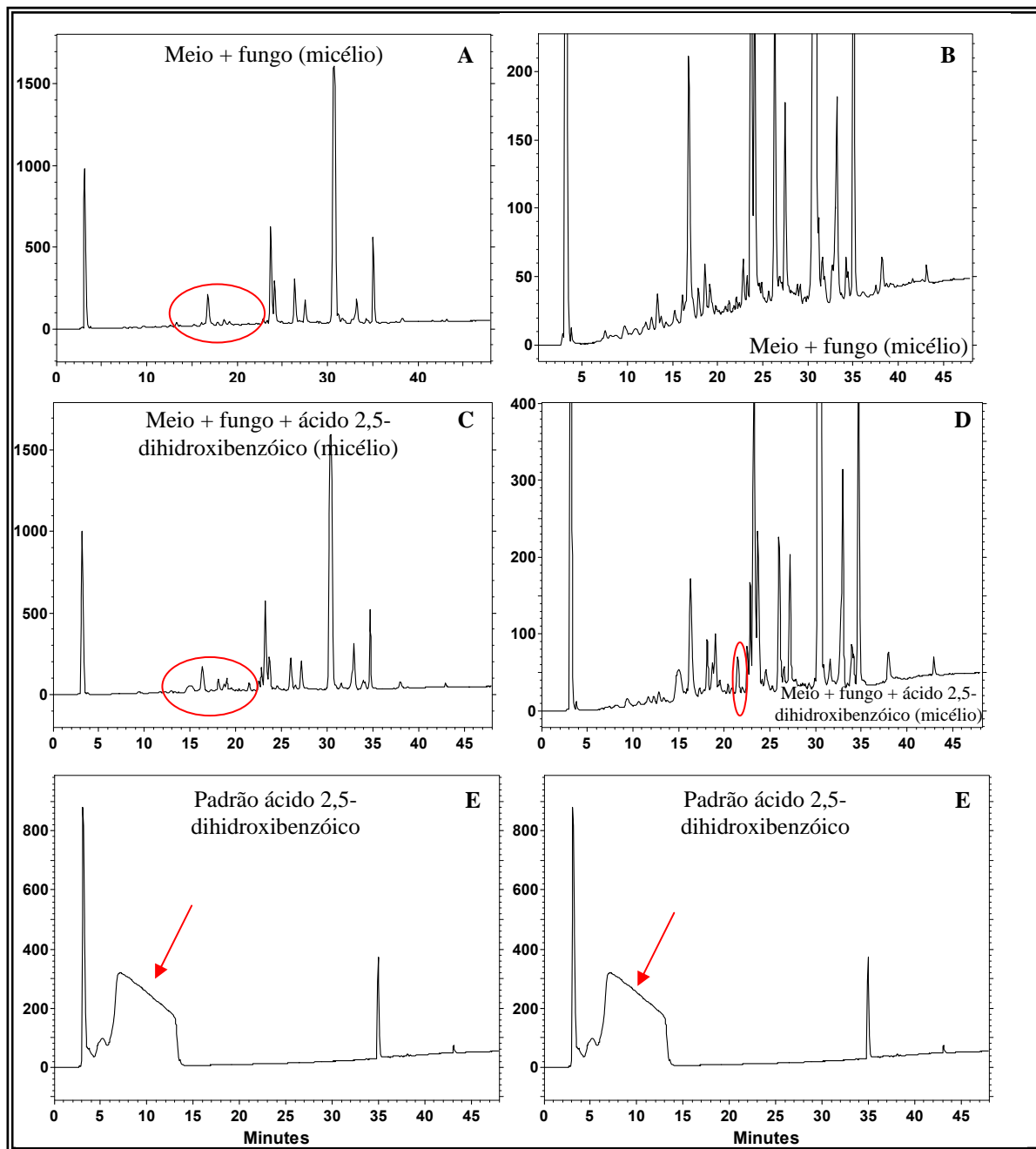


FIGURA 4.87 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,5-dihidroxibenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,5-dihidroxibenzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min^{-1} . Volume de injeção: 20 μL . Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.19 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.87, do extrato do meio + ácido 2,5-dihidroxibenzóico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 2,5-dihidroxibenzóico	Meio+fungo	Meio+fungo + ac. 2,5-dihidroxibenzóico	λ_{\max} (nm)
7,20	X			210, 230, 320
10,30		X		200, 260
10,62			X	200
10,91		X		200
11,38			X	200
11,69			X	200, 220
11,79		X		200, 220
12,04		X		200, 220
12,26			X	200, 220
15,04			X	200
16,32			X	200, 220
16,78		X		200, 220, 290
17,31			X	200, 240, 280
17,85		X		200, 240, 280
21,27		X		200
21,98			X	200

4.4.1.7 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico

Outro derivado de ácido benzóico, o ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico, foi adicionado ao meio de cultura para crescimento do fungo *P. brasilianum*, a fim de se verificar produção de novos compostos pelo fungo e verificar a influência deste aditivo no metabolismo fúngico.

O extrato de acetato deste experimento foi investigado via LC-DAD, e comparado com o extrato de acetato do branco. A Figura 4.88 apresenta estes cromatogramas de forma comparativa, e o cromatograma do padrão de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico.

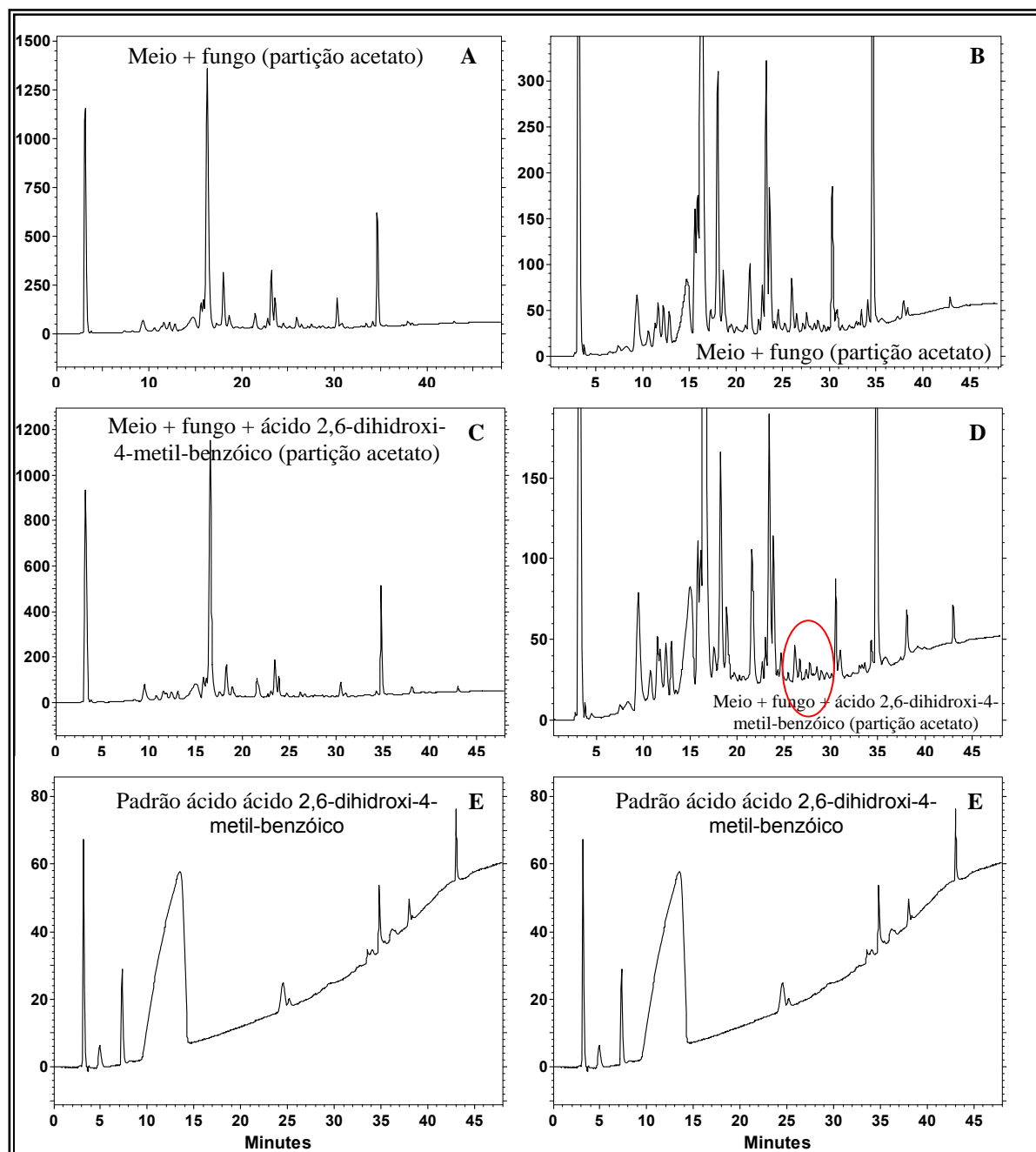


FIGURA 4.88 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min^{-1} . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

O cromatograma do extrato de acetato com ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico (Figura 4.88 C e D) mostraram uma pequena diferenciação em relação ao cromatograma do branco (Figura 4.88 A e B), na região entre 25 e 30 minutos, como mostra a região circulada do cromatograma D. Estas mudanças podem ser melhor analisadas pelos perfis de absorção de cada pico eluído nesta

região, do extrato branco e do extrato com ácido. A Tabela 4.20 apresenta os máximos de absorção de cada pico destas regiões dos cromatogramas.

TABELA 4.20 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.88, do extrato do meio + ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 2,6-dihidroxi-4- metilbenzóico	Meio + fungo	Meio+fungo + ac. 2,6-dihidroxi-4- metilbenzóico	λ_{\max} (nm)
12,94	X			210, 250, 310
25,21			X	200
25,45		X		200
26,15			X	200
26,46		X		210, 225
26,66			X	200
27,10			X	200
27,33			X	200
27,53		X		200, 230
27,74			X	200
28,14			X	200
28,50			X	200
28,95			X	200
29,54			X	200
30,06			X	200
30,68		X		200

O extrato do micélio foi da mesma maneira analisado por LC-DAD e comparado com o extrato micelial do branco (Figura 4.89). A análise dos cromatogramas resultantes mostrou picos diferenciados entre os extratos miceliais do branco e do experimento com ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico, nas regiões circuladas. A análise dos espectros de absorção de cada pico confirmou que apenas nesta região existem alguns poucos picos diferenciados, entre os dois extratos. A Tabela 4.21 traz os máximos de absorção de cada pico eluído nesta região, dos dois extratos comparados, e do padrão de ácido.

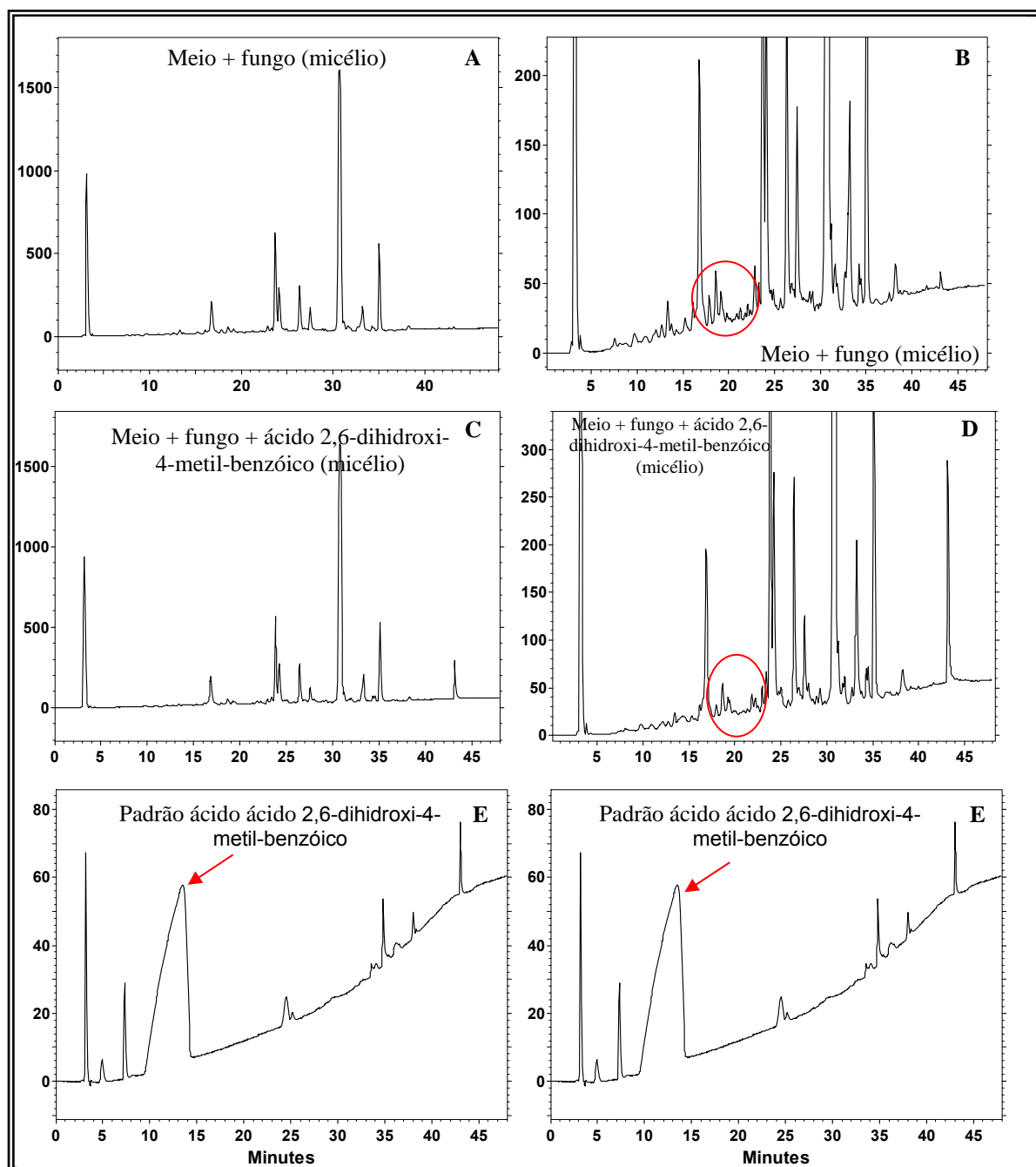


Figura 4.89 - Extratos do micélio. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min^{-1} . Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

Tabela 4.21 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.89, do extrato do meio + ácido 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico	Meio+fungo	Meio+fungo + ac. 2,6-dihidroxi-4-metilbenzóico	λ_{\max} (nm)
12,94	X			210, 250, 310
21,27		X		200
21,35			X	200
21,81		X		200
21,85			X	200
22,09		X		200, 220
22,21			X	200, 220
22,40		X		200
22,95			X	200

4.4.1.8 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico

Outro aditivo, o ácido 3,5-dinitrosalicílico, foi utilizado nestes estudos. O extrato de acetato do cultivo do fungo na presença deste ácido foi analisado e comparado com o extrato do branco. Pelos cromatogramas da Figura 4.90 observa-se que ocorreram algumas mudanças na produção de compostos pelo fungo na presença do ácido também, pois o perfil cromatográfico do extrato do branco (A e B) está ligeiramente diferente em relação ao do extrato com o aditivo (C e D), nas regiões circuladas.

A Tabela 4.22 apresenta os máximos de absorção dos picos cromatográficos diferenciados dos dois extratos de acetato e do padrão de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Mais uma vez nota-se perfis de absorção com mais de um máximo, nos picos destes extratos.

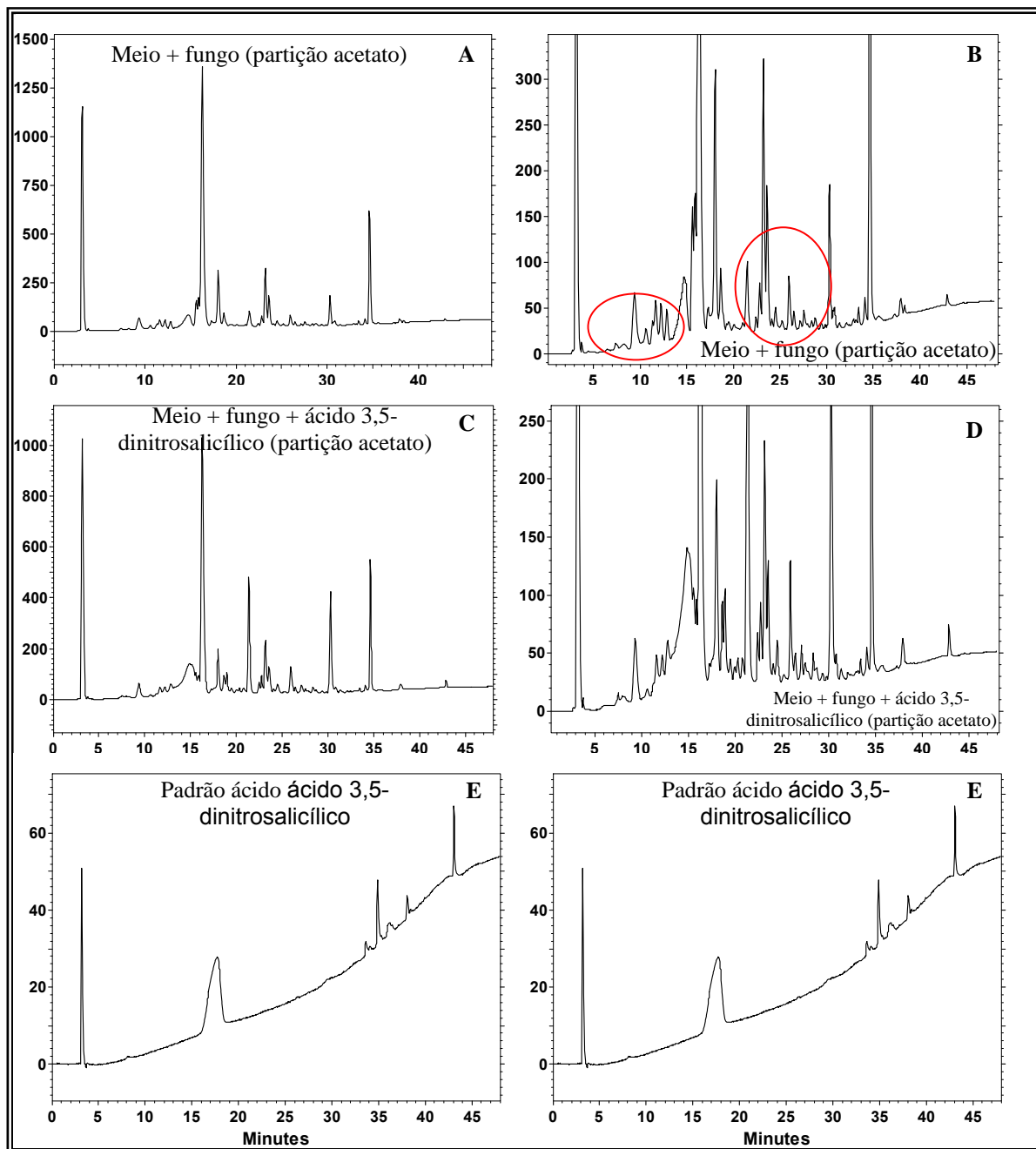


FIGURA 4.90 - Extratos de acetato. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D - cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico. E - cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.22 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.90, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrosalicílico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 3,5-dinitrosalicílico	Meio+ fungo	Meio+fungo + ac. 3,5-dinitrosalicílico	λ_{\max} (nm)
8,09			X	200
8,28		X		200, 220
11,32			X	200, 220
11,33		X		200, 225
11,64			X	200, 225
11,65		X		220, 225, 290
12,19			X	200, 220
12,21		X		200, 220
17,63	X			200, 225, 340
20,31			X	200
20,80			X	200, 330
21,38			X	200
21,47		X		200, 220
28,36		X		200

Assim como nos extratos de acetato, nos cromatogramas dos extratos miceliais do experimento e do branco (Figura 4.91) foram verificados alguns picos diferenciados, provando que a presença do ácido 3,5-dinitrosalicílico durante o crescimento fúngico influenciou de alguma forma o metabolismo da espécie. As análises por HPLC não confirmam as classes dos compostos presentes em cada extrato, porém pelos espectros de absorção é possível verificar que os metabólitos do extrato branco são diferentes dos metabólitos produzidos no meio com ácido (Tabela 4.23).

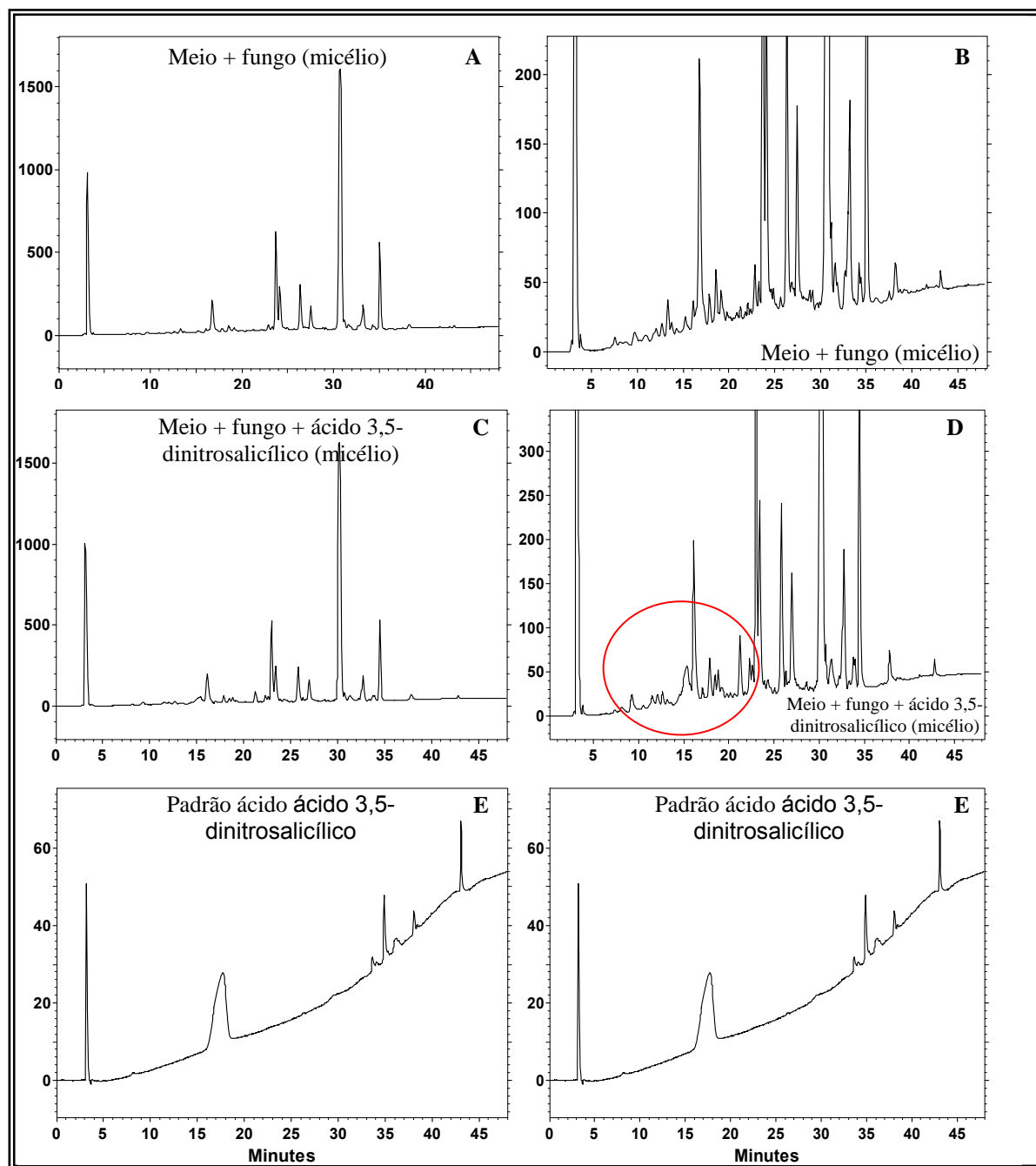


FIGURA 4.91 - Extratos miceliais. A e B - cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrosalicílico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.23 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.91, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrosalicílico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 3,5-dinitrosalicílico	Meio+ fungo	Meio+fungo + ac. 3,5-dinitrosalicílico	λ_{\max} (nm)
8,14			X	200
9,26			X	200,225
9,71		X		200, 220
10,30		X		200, 260
12,65		X		200, 220
12,66			X	200, 245, 280
13,17			X	200, 220
13,33		X		200, 245, 280
15,22		X		200
15,32			X	200
16,09		X		200
17,63	X			200, 225, 340
18,50			X	200, 220
18,79			X	200
20,16			X	200
20,63			X	200
20,85		X		200
21,27		X		200
22,09		X		200, 220
22,58			X	200, 220
23,41			X	200, 225, 275
23,89			X	200

4.4.1.9 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico

Os extratos obtidos através do cultivo de *P. brasilianum* na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico foram investigados por LC-DAD, para se conhecer o perfil cromatográfico dos mesmos. A Figura 4.92 ilustra comparativamente os cromatogramas dos extratos de acetato, do branco e do experimento com o ácido.

Comparando os cromatogramas A e B do extrato branco com os cromatogramas C e D do extrato do experimento com ácido, não existem diferenças nítidas entre eles. Porém, analisando os espectros de absorção de cada pico cromatográfico, foi possível encontrar alguma diferença entre os dois extratos na região circulada, do cromatograma B. A Tabela 4.24 apresenta os máximos de absorção destes picos em questão, e também do extrato com substrato.

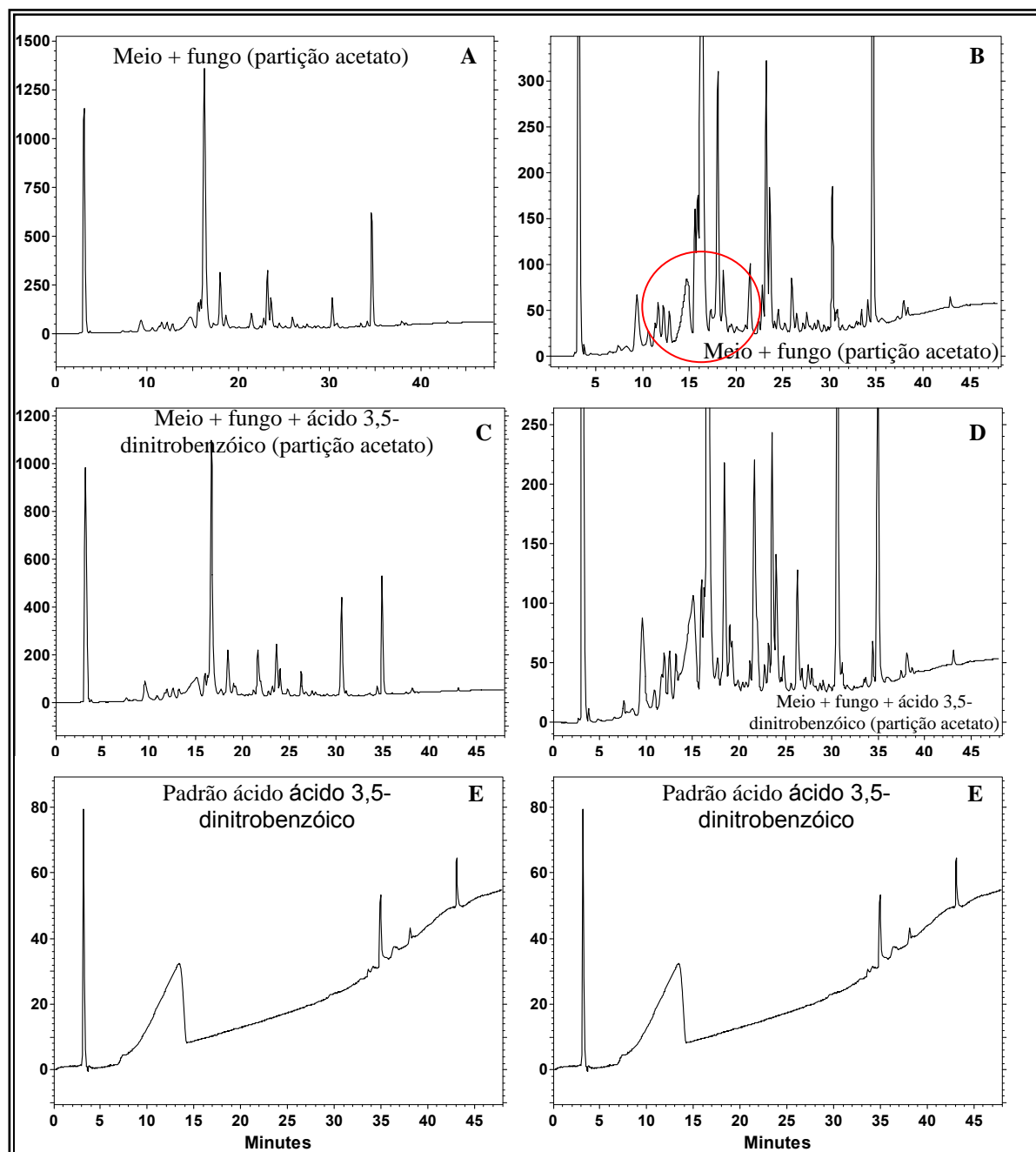


FIGURA 4.92 - Extratos de acetato. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrobenzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

TABELA 4.24 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.92, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrobenzóico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 3,5-dinitrobenzóico	Meio+fungo	Meio+fungo + ac. 3,5-dinitrobenzóico	λ_{\max} (nm)
13,26	X			200, 240
15,93		X		200, 225, 250, 280
20,41			X	200
20,75			X	200
21,16			X	200, 330
21,65			X	200
22,43		X		200,
22,76			X	200
22,79		X		200, 220
23,22			X	200, 225

O extrato micelial do experimento com ácido 3,5-dinitrobenzóico também foi analisado por LC-DAD, e seu cromatograma se encontra ilustrado na Figura 4.93. A diferenciação entre os extratos miceliais do branco (A e B) e do experimento com ácido 3,5-dinitrobenzóico (C e D) não foi muito grande. As diferenças entre estas amostras só são mais nítidas com a análise dos espectros de absorção de cada pico cromatográfico. Na Tabela 4.25 estão organizados os máximos de absorção dos picos que se mostraram diferenciados, entre os dois extratos em questão, e também do padrão de ácido 3,5-dinitrobenzóico.

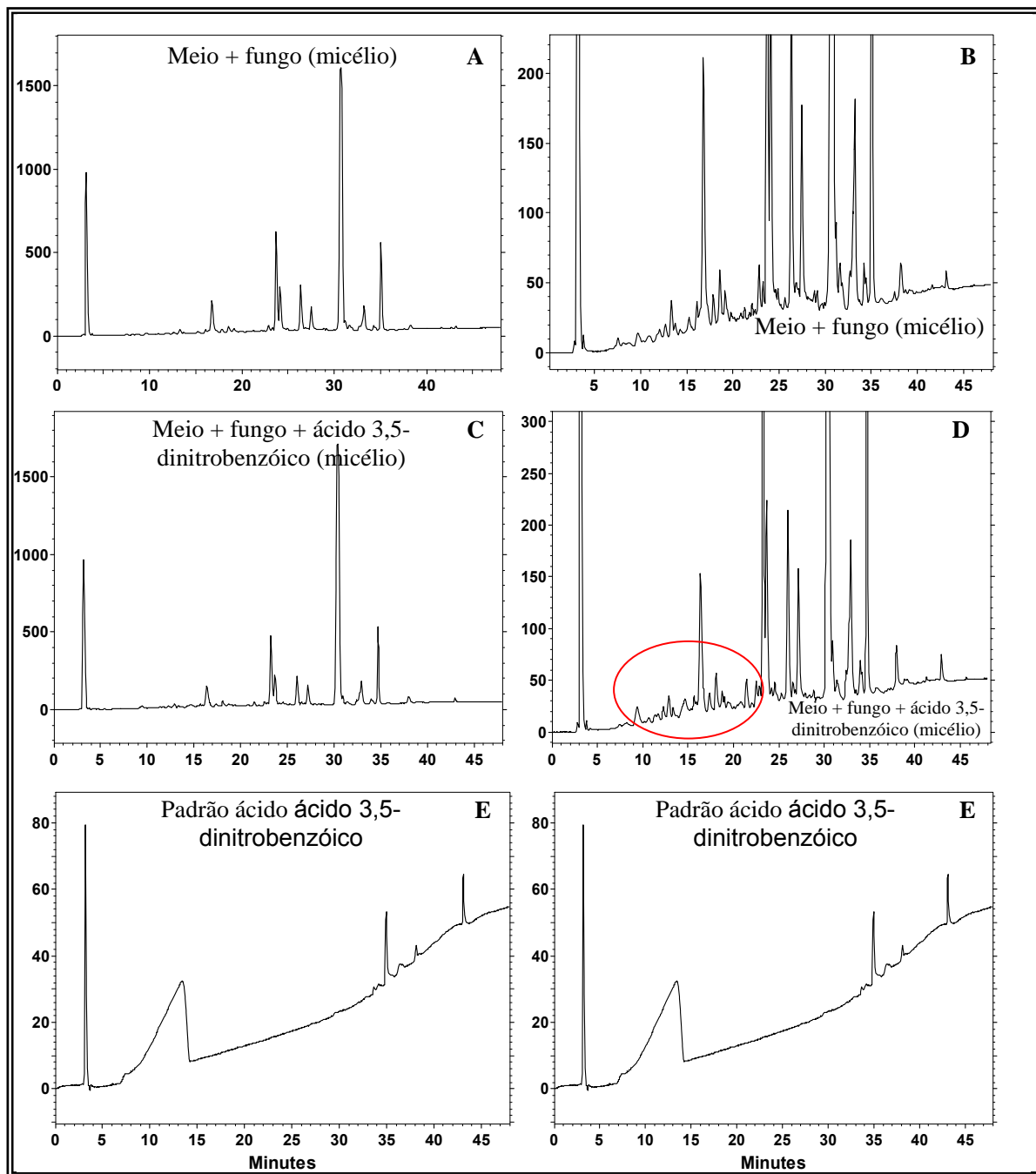


FIGURA 4.93 - Extratos miceliais. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido 3,5-dinitrobenzóico. E – cromatograma do padrão de ácido 3,5-dinitrobenzóico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

Tabela 4.25 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.93, do extrato do meio + ácido 3,5-dinitrobenzóico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. 3,5-dinitrobenzóico	Meio+fungo	Meio+fungo + ac. 3,5-dinitrobenzóico	λ_{\max} (nm)
8,23			X	200
10,22			X	200
10,30		X		200, 260
13,26	X			200, 240
16,36			X	200, 210, 280
19,01			X	200
21,27		X		200
21,96			X	200
22,09		X		200, 220

4.4.1.10 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de ácido ferúlico

Os extratos do experimento com ácido ferúlico foram analisados por LC-DAD, a fim de se verificar alguma diferenciação entre seus perfis cromatográficos e os dos extratos brancos. A Figura 4.94 mostra comparativamente os extratos de acetato do experimento com aditivo e do branco, assim como o cromatograma do padrão de ácido ferúlico. Comparando os cromatogramas A e B do extrato branco com os cromatogramas C e D do experimento com ácido ferúlico, observa-se nitidamente dois picos diferentes no cromatograma D, que estão circulados. Seus tempos de retenção são 6,70 e 28,36 minutos. Seus máximos de absorção estão apresentados na Tabela 4.26 a seguir, juntamente com os máximos de outros picos que também se mostraram diferenciados, entre os extratos analisados.

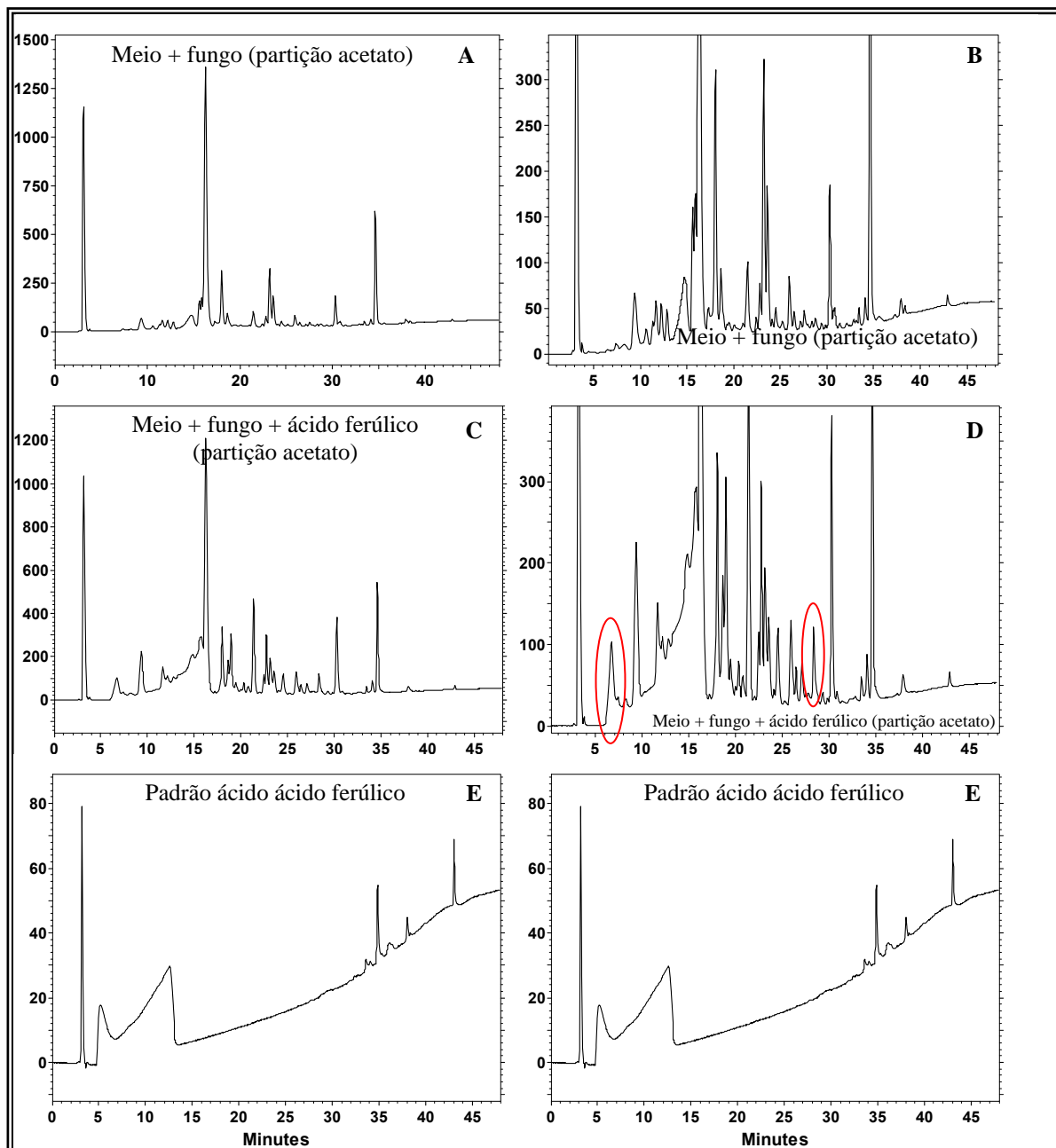


Figura 4.94 - Extratos de acetato. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido ferúlico. E – cromatograma do padrão de ácido ferúlico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

Tabela 4.26 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.94, do extrato do meio + ácido ferúlico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. ferúlico	Meio+ fungo	Meio+fungo + ac. ferúlico	λ_{\max} (nm)
5,16	X			200, 225, 280, 310
6,70			X	210
7,42			X	200, 235
7,42		X		200, 235
8,19			X	200
8,28		X		200, 220
10,61		X		200
11,65		X		220, 225, 290
12,16			X	200
12,21		X		200, 225, 290
12,81			X	200
12,81		X		210, 245, 280
15,64		X		200, 220, 285
15,74			X	210
15,93		X		200, 225, 250, 280
18,94			X	210, 260
28,36			X	210, 220, 250, 290

O extrato micelial do experimento com ácido ferúlico também foi analisado por LC-DAD (Figura 4.95), e comparado com o mesmo extrato do experimento branco. Os cromatogramas dos extratos miceliais do branco (A e B) e do experimento com ácido ferúlico (C e D) mostraram alguma diferenciação nos perfis cromatográficos, na região entre 8 e 23 minutos circulada no cromatograma D, porém nada se pode falar a respeito da classe dos compostos detectados nestas análises. A Tabela 4.27 a seguir exhibe os máximos de absorção dos picos cromatográfico eluídos nesta região.

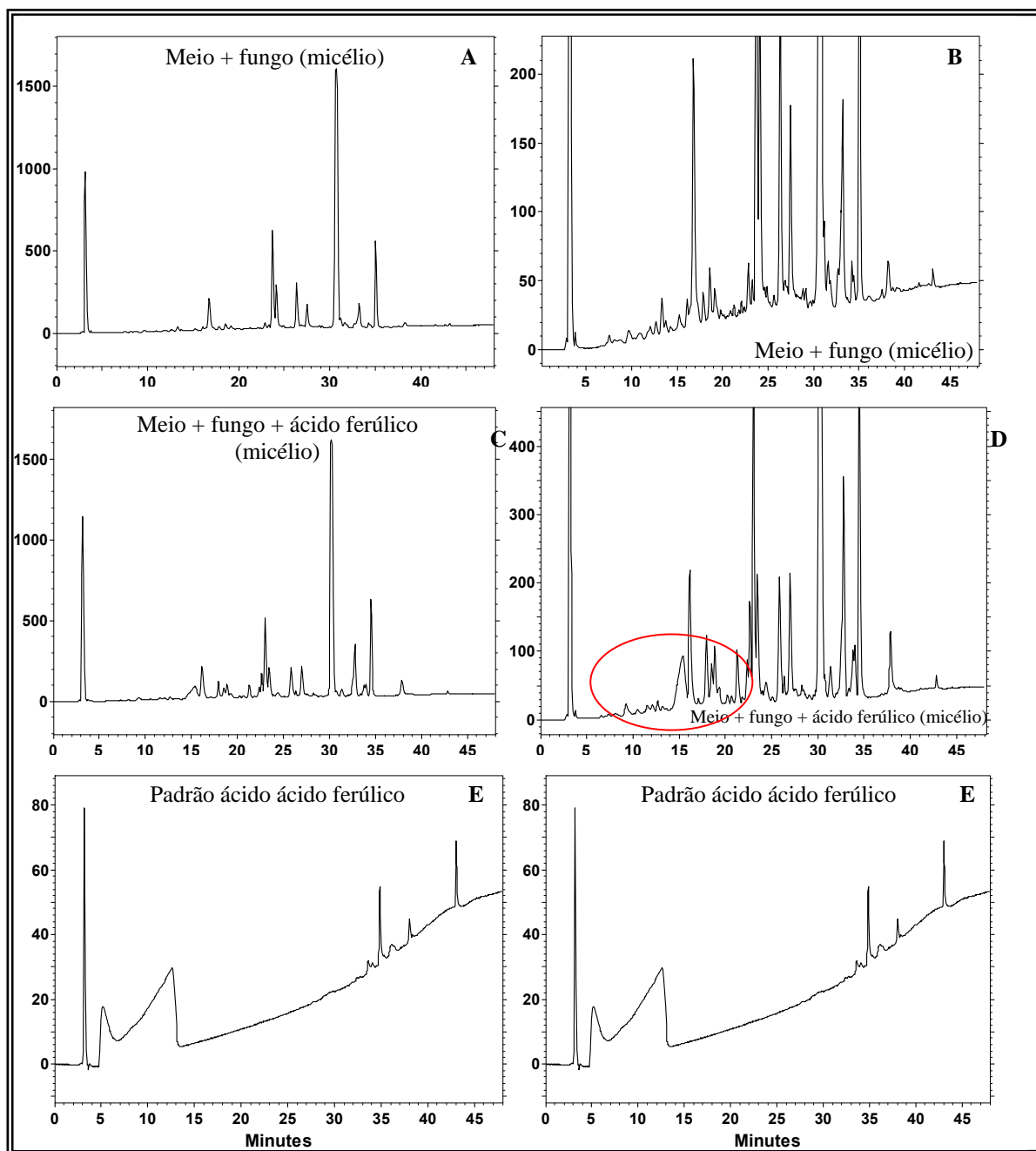


FIGURA 4.95 - Extratos miceliais. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de ácido ferúlico. E – cromatograma do padrão de ácido ferúlico. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

Tabela 4.27 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.95, do extrato do meio + ácido ferúlico e do branco.

t_R (min)	Padrão ac. ferúlico	Meio+ fungo	Meio+fungo + ac. ferúlico	λ_{\max} (nm)
5,16	X			200, 215, 280, 310
8,16			X	200
10,30		X		210, 260
10,54			X	200
10,91		X		200
15,36			X	200
16,78		X		200, 220, 290
17,93			X	200, 225, 250, 285
21,83			X	200
23,45			X	210, 225

4.4.1.11 - Estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de 2',4',6'-trihidroxiacetofena

O último aditivo estudado foi a 2',4',6'-trihidroxiacetofena. O cromatograma de LC-DAD do extrato de acetato deste experimento está mostrado na Figura 4.96, junto com o extrato de acetato do branco e o cromatograma do padrão. Comparando os cromatogramas dos extratos do branco (A e B) e do experimento com a acetofenona (C e D), é possível notar alguma diferenciação na região circulada do cromatograma D. Este fato pode ser mais facilmente verificado com a análise dos máximos de absorção de cada pico cromatográfico. A Tabela 4.28 apresenta estes dados de absorção do padrão de acetofenona, do extrato branco e do extrato com acetofenona.

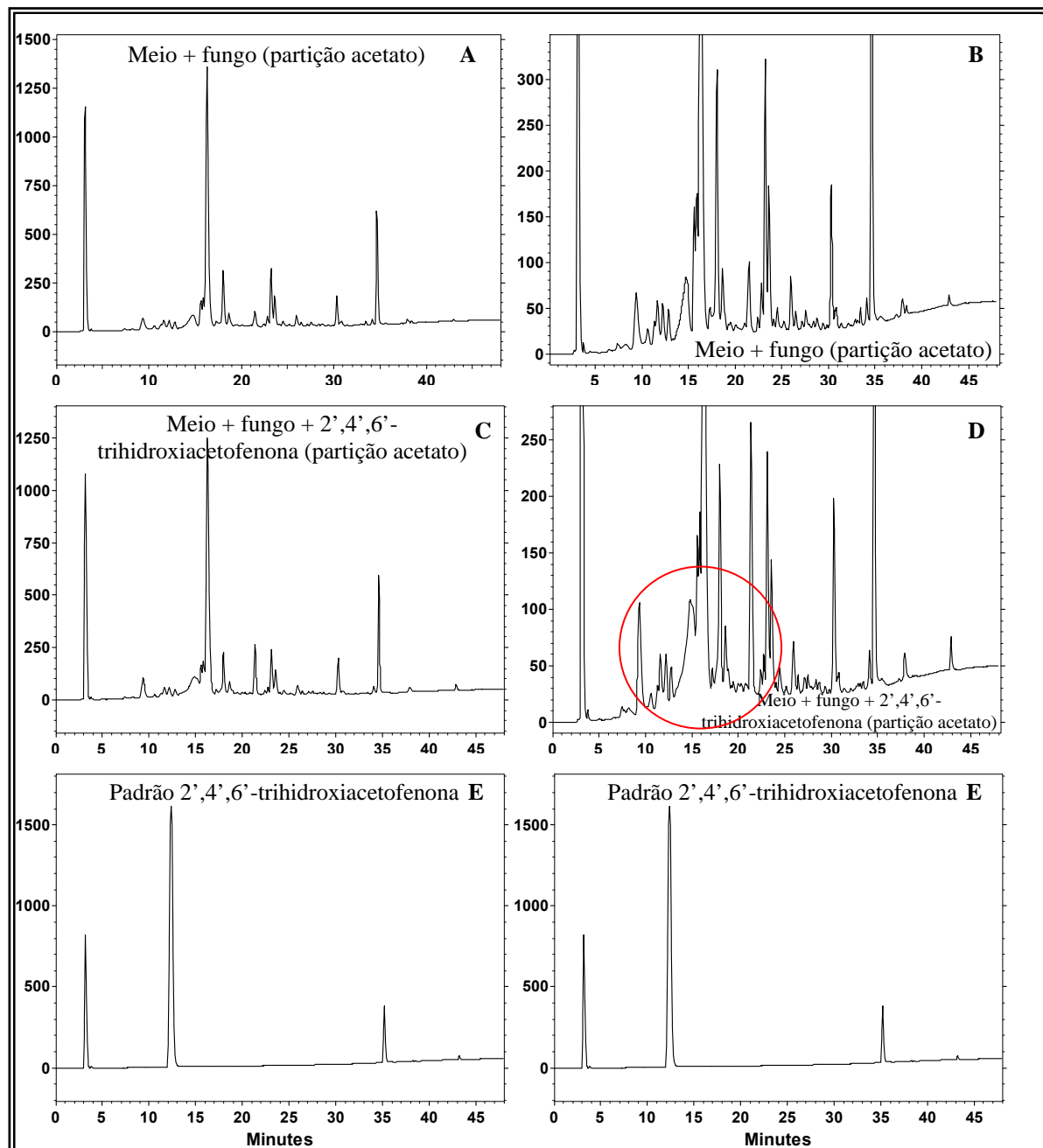


Figura 4.96 - Extratos de acetato. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de 2',4',6'-trihidroxiacetofena. E – cromatograma do padrão de 2',4',6'-trihidroxiacetofena. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

Tabela 4.28 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.96, do extrato do meio 2',4',6'-trihidroxiacetofena e do branco.

t_R (min)	Padrão 2',4',6'-trihidroxiacetofena	Meio+fungo	Meio+fungo + 2',4',6'-trihidroxiacetofena	λ_{\max} (nm)
7,71			X	200, 220
11,63			X	200, 225, 295
11,65		X		200, 225, 295
12,37	X			220, 290
18,91			X	200
19,47			X	200
19,99			X	200
20,07		X		200
20,29			X	200
20,81			X	200
21,32			X	200
21,47		X		200, 225
22,43		X		200
22,42			X	200

O extrato do micélio com acetofenona também foi analisado via LC-DAD, e seu cromatograma comparado com o do experimento branco (Figura 4.97). A região circulada do cromatograma D é onde se encontram as principais diferenciações entre o extrato do branco (A e B) e o extrato do experimento com o aditivo. A Tabela 4.29 apresenta os máximos de absorção dos picos eluídos nesta região, dos cromatogramas B e D, e do padrão de acetofenona.

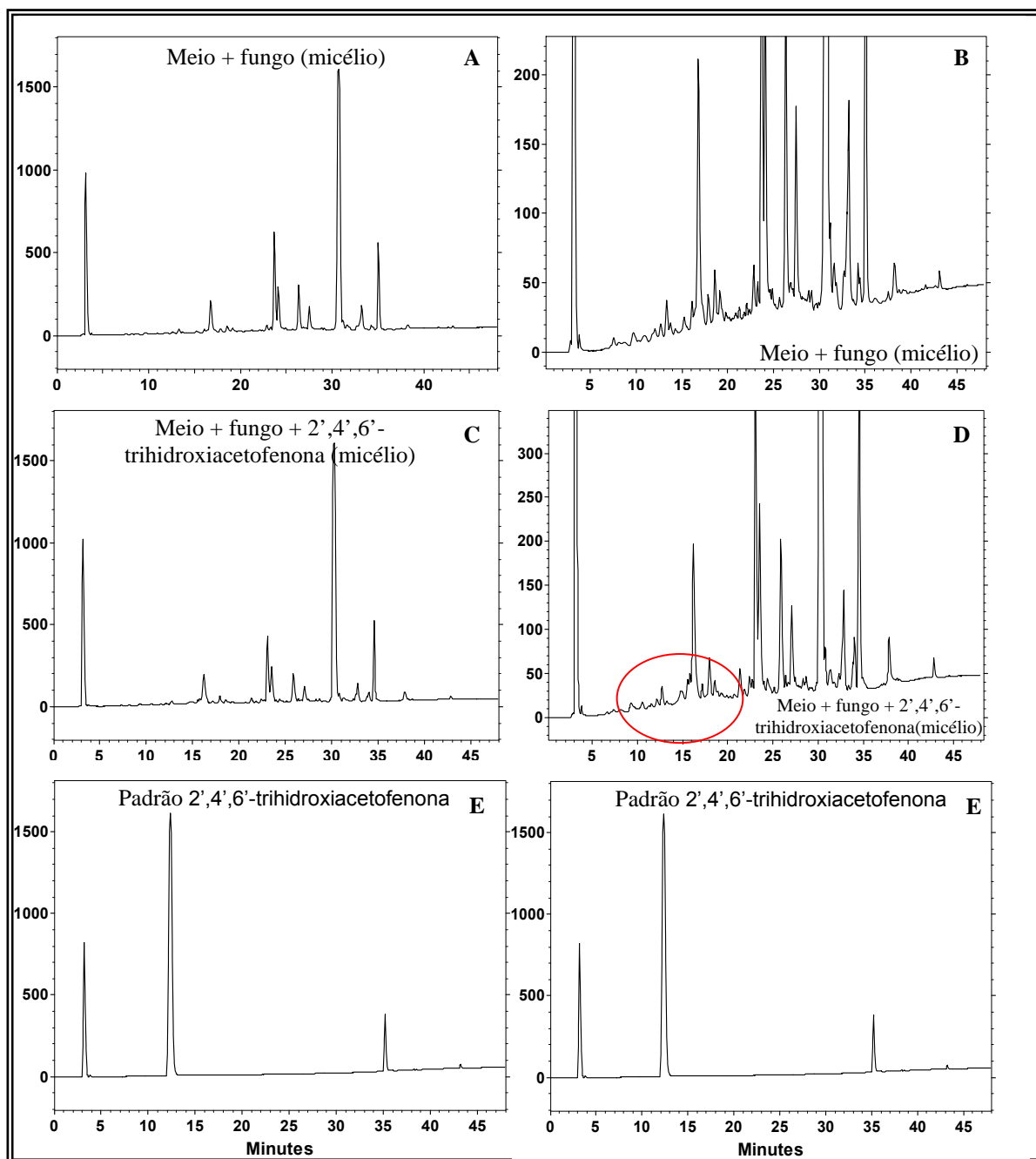


Figura 4.97 - Extratos miceliais. A e B cromatogramas completo e expandido do extrato branco. C e D – cromatogramas completo e expandido do extrato fúngico na presença de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona. E – cromatograma do padrão de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 20 μ L. Monitoramento em 216 nm.

Tabela 4.29 - λ_{\max} dos picos presentes nas regiões circuladas dos cromatogramas da Figura 4.97, do extrato do meio 2',4',6'-trihidroxiacetofena e do branco.

t_R (min)	Padrão 2',4',6'-trihidroxiacetofena	Meio+fungo	Meio+fungo + 2',4',6'-trihidroxiacetofena	λ_{\max} (nm)
7,06			X	200, 220
8,11			X	200
9,32			X	200, 225
9,71		X		200, 220
10,30		X		200, 260
11,24			X	200
11,57			X	200, 220
11,79		X		200, 220
12,04		X		200, 220
12,15			X	200, 220
12,37	X			220, 290
12,65		X		200, 220
15,79			X	200, 220, 250, 280
21,27				200, 330

4.4.2 - Análises por HPLC-APCI-MS e HPLC-APCI-MS-MS

Todos os extratos fúngicos obtidos durante o estudo metabólico de *P. brasilianum* na presença de substratos exógenos foram avaliados quanto à presença dos meroterpenos de interesse, por HPLC-APCI-MS e HPLC-APCI-MS-MS, ambas no modo positivo de ionização. Estas análises foram realizadas após as de HPLC-DAD. O experimento de HPLC-APCI-MS-MS realizado foi o de monitoramento selecionado de reação (SRM), com cinco canais de monitoramento. Foram monitoradas as transições: 415 – 365, 427 – 329, 461 – 393, 499 – 457 e 557 – 479. Estas transições são relativas aos principais fragmentos dos meroterpenos PSP-13, PSP-8, PSP-9, PSP-6 e PSP-3 (ver páginas 94 a 98). O experimento de SRM certifica a existência ou não dos compostos em questão monitorados, visto que detecta o composto por seu tempo de retenção, sua massa molecular total e por seu padrão de fragmentação.

Os únicos extratos em que foram detectados os meroterpenos monitorados foram naqueles produzidos na presença de ácido ferúlico (extratos de acetato e micelial) (Figuras 4.98 e 4.99). Os picos assinalados com flechas, apresentados nos cromatogramas das Figuras 4.100 e 4.101 revelam a presença dos meroterpenos PSP-8 e PSP-3 nestes extratos. Como estes meroterpenos foram detectados via SRM, é muito improvável que se tratem de outras classes de compostos.

Nos extratos com outros substratos exógenos nenhum meroterpeno foi detectado, inclusive os brancos foram analisados, e nenhum íon característico destas substâncias foi encontrado. Desta forma, não se pode afirmar que o fungo *P.*

brasilianum deixou de produzir os meroterpenos por razão da influência destes aditivos no meio.

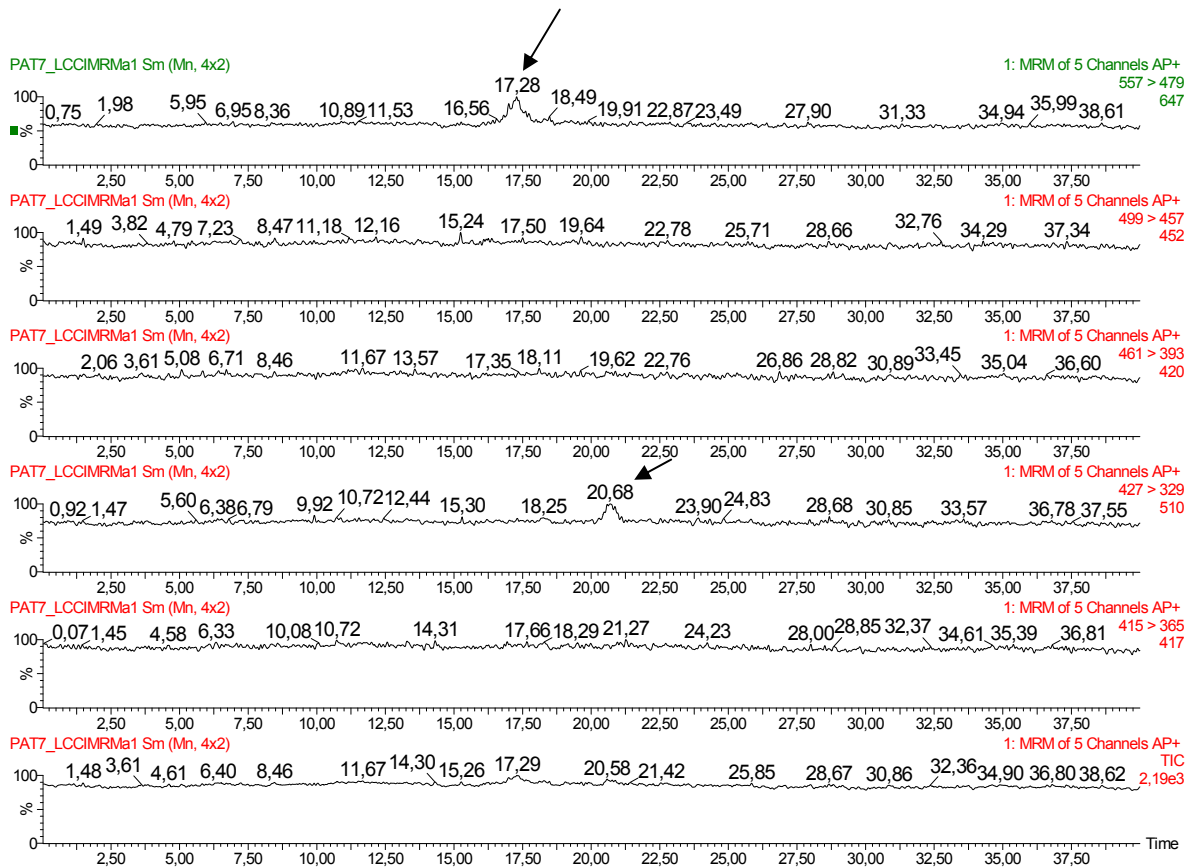


Figura 4.98 - Cromatogramas do experimento de SRM com o extrato de acetato do experimento com ácido ferúlico. Transições monitoradas: 415 - 365, 427 - 329, 461 - 393, 499 - 457 e 557 - 479.

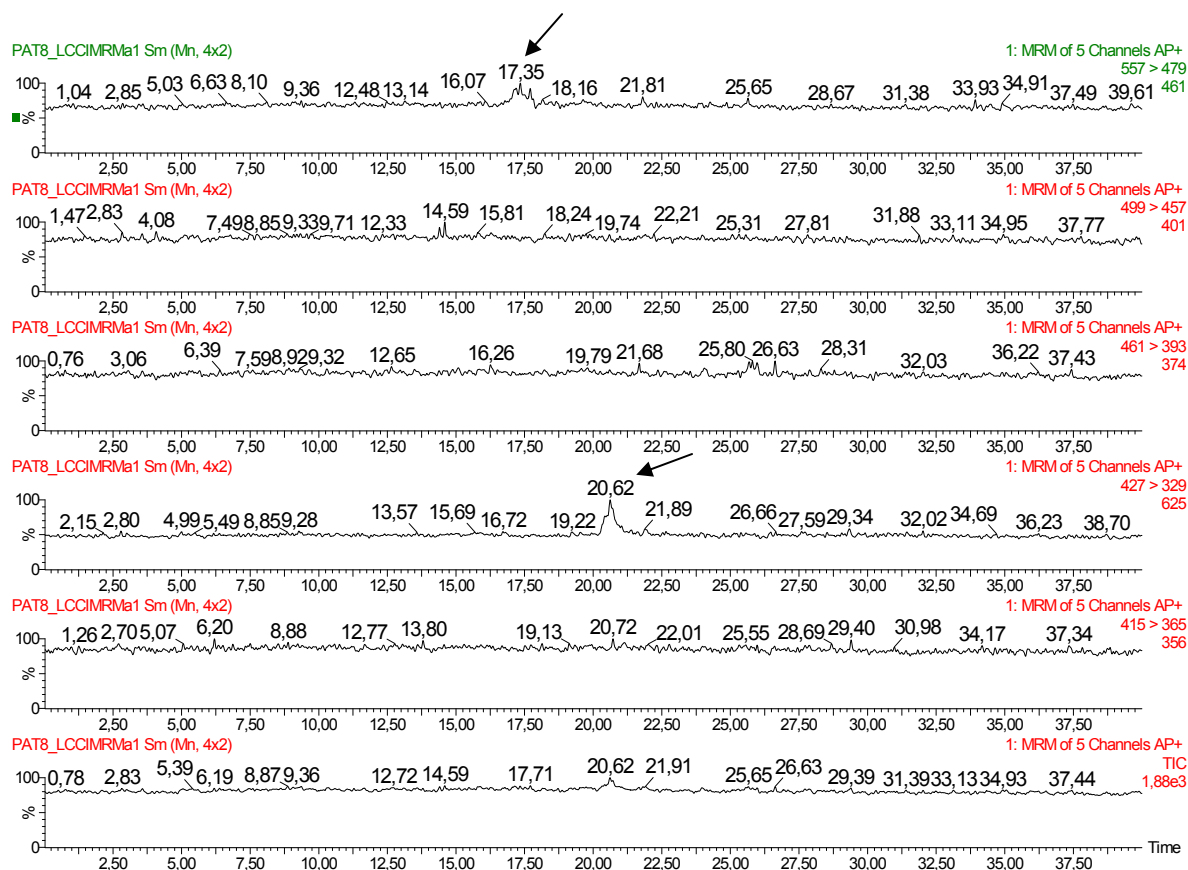


FIGURA 4.99 – Cromatogramas do experimento de SRM com o extrato micelial do experimento com ácido ferúlico. Transições monitoradas: 415 - 365, 427 – 329, 461 – 393, 499 – 457 e 557 – 479.

4.4.3 - Discussões sobre o estudo do metabolismo secundário de *P.brasilianum* na presença de aditivos exógenos

Conforme reportado no início da seção 4.4, os objetivos principais desta parte do trabalho com os substratos foram verificar se estas substâncias poderiam ser utilizadas pelo fungo para produção de meroterpenos, e também estudar uma possível biotransformação na estrutura do substrato, realizada pelo fungo *P. brasilianum*, além de verificar a influência de cada aditivo na diferenciação metabólica do fungo. Inicialmente todos os extratos produzidos com os aditivos foram investigados por LC-DAD, e foi concluído que todos os aditivos causaram alguma mudança no perfil metabólico do fungo, visto que os extratos produzidos na presença destes eram diferentes, isto é, possuíam outros compostos além dos encontrados no extrato do experimento sem aditivos (branco). Os perfis de absorção de cada pico cromatográfico foram investigados, confirmando este fato. Entretanto, as análises por LC-DAD não possibilitaram informações adicionais como, por exemplo, de que estrutura se tratava cada composto produzido.

Ácidos fenólicos são metabólitos secundários de plantas. Eles estão conectados a diversas funções, como síntese de proteínas, atividade enzimática, fotossíntese, crescimento da planta entre outros. Vários ácidos benzóicos são conhecidos por terem a função de compostos defensivos frente um ataque de microorganismos, ou de serem acumulados nos tecidos das plantas sob condições

de stress. Entre esses ácidos, estão o ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido p-hidroxibenzóico, entre outros. Algumas antraquinonas são sintetizadas, também, após o contato da planta com eliciadores bióticos, e elas têm função de fitoalexinas. Ainda, algumas plantas, na presença de eliciadores, produzem triterpenos, como o ácido oleanólico e ursólico [70-74]. Provavelmente, o fato dos aditivos escolhidos no estudo terem sido adicionados no meio de cultura fúngico, pode ter sinalizado alguma resposta metabólica do microorganismo, como uma defesa contra fitoalexinas ou outras respostas do meio frente a presença deste fungo. Uma hipótese para a modificação no perfil cromatográfico destes diferentes extratos, em relação ao branco, seria essa: a produção de compostos pelo fungo que agiriam como uma defesa deste microorganismo contra o “ataque” do seu hospedeiro, no caso, um ataque artificial, ocasionado pela adição destes substratos ao meio de cultura do fungo.

A investigação sobre a produção de meroterpenos pelo fungo nestes meios de cultura com os aditivos foi realizada somente em relação aos padrões previamente isolados de culturas de *P. brasilianum* [46], e não em relação a novos meroterpenos que poderiam ter sido produzidos pela incorporação destes substratos na estrutura meroterpenoídica. E foi constatado que os meroterpenos conhecidos não foram encontrados nem no branco nem nos extratos com os aditivos, exceto nos extratos fúngicos do experimento com ácido ferúlico. Não se pode concluir que a não produção dos meroterpenos nos outros aditivos tenha sido influenciada pelos substratos exógenos adicionados ao meio, visto que os extratos do experimento branco não mostraram também a presença dos mesmos. O fato da detecção dos meroterpenos PSP-3 e PSP-8 nos extratos do experimento com ácido ferúlico indica que este ácido teve influência sobre a produção destes compostos de alguma forma, pois foi o único experimento que mostrou estes resultados.

Estes estudos não puderam ser aprofundados e concluídos em razão de alguns problemas acontecidos com o espectrômetro de massas do nosso laboratório. Este aparelho ficou parado durante aproximadamente 11 meses, devido a um problema na bomba de vácuo, e afetou o desenvolvimento dos trabalhos do grupo. Após seu conserto, então, vários usuários precisaram utilizá-lo, congestionando a rotina de análises, visto que se trata de um aparelho multi-usuário.

4.5 - Estudo dos limonóides nos extratos de *Melia azedarach*

Foi realizada uma análise para detecção de limonóides nos mesmos tecidos de *M. azedarach* em que se isolou os diversos fungos mostrados na seção 4.1 (página 33). A intenção desta análise foi verificar se, no período de isolamento dos fungos, estava ocorrendo a produção de limonóides pela planta, e comparar estes resultados com os da análise da produção de meroterpenos pelo fungo isolado destes mesmos tecidos (Seção 4.6 seguinte). Se ambos os resultados fossem positivos, algumas indagações poderiam ser realizadas como, por exemplo, se houve realmente troca de material genético neste período, ou se a não produção de limonóides pela planta no determinado período de coleta implicaria também na não produção de meroterpenos pelo fungo endofítico isolado.

Os extratos etanólicos da epiderme e do córtex de *M. azedarach* foram analisados por LC-APCI-MS a fim de se detectar íons de valores de m/z iguais aos dos limonóides produzidos por esta espécie. Pelas análises de *full scan* realizadas procurou-se encontrar íons de m/z 721 e 533, relativos às moléculas protonadas dos

limonóides L1 e L2 respectivamente, cujas estruturas moleculares estão ilustradas na Figura 4.100.

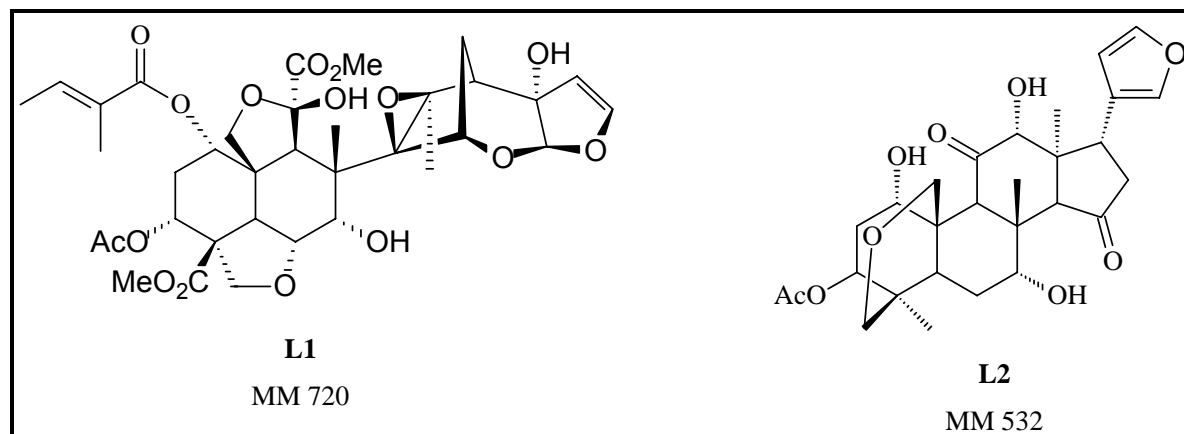


FIGURA 4.100 - Estruturas moleculares dos limonóides L1 e L2.

A Figura 4.101 mostra os espectros de íons selecionados das análises de *full scan* dos extratos etanólicos da epiderme e do córtex de *M. azedarach*.

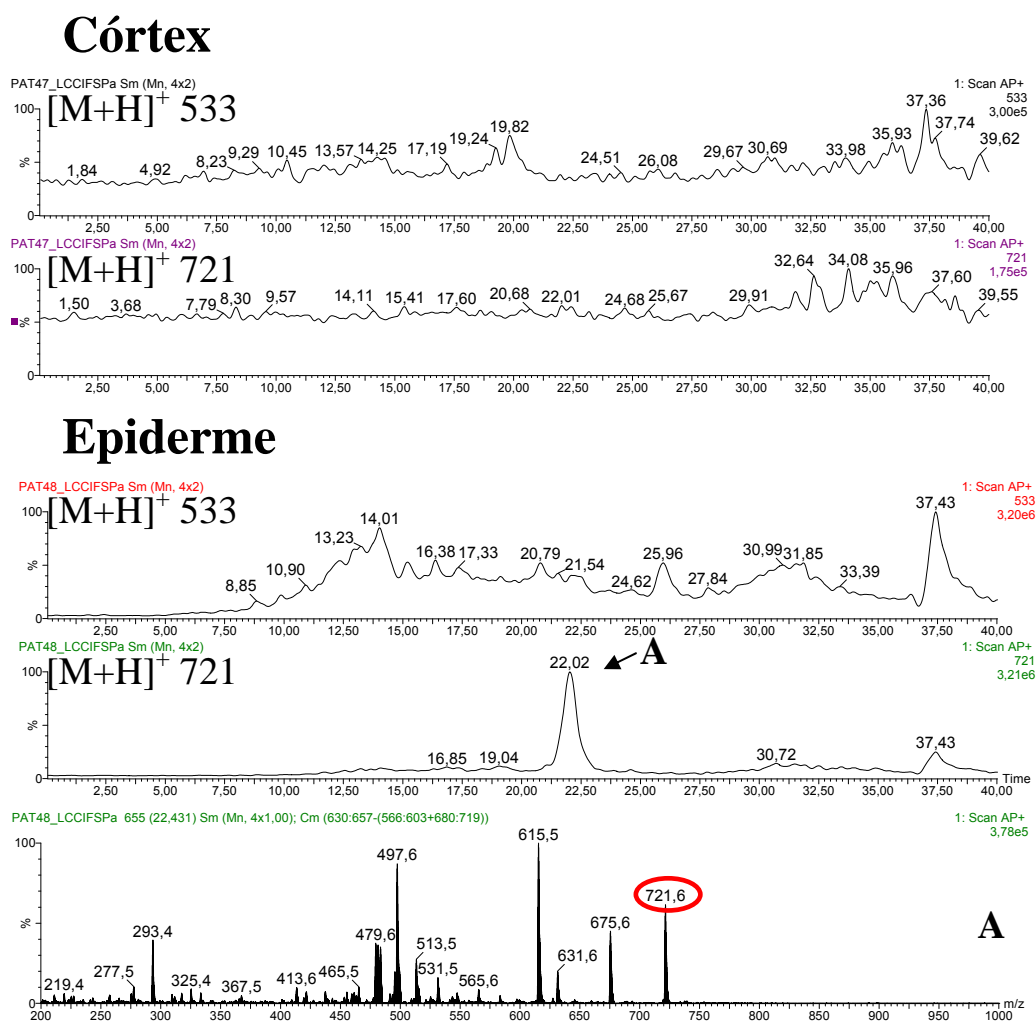


FIGURA 4.101 - Cromatogramas de íons selecionados dos extratos da epiderme e do córtex de *M. azedarach*. Ionização por APCI⁺.

Pela Figura 4.101, pode-se notar um pico bastante intenso no cromatograma de íons selecionados [M+H]⁺ 721, do extrato da epiderme da planta, e seu espectro de massas (A) apresentou um pico relativo ao íon de *m/z* 721, que está circulado. Este íon pode indicar a presença do limonóide L1 neste extrato.

O limonóide L1 é a azadiractina, geralmente encontrada em plantas da família Meliaceae e que é conhecida por suas propriedades inseticidas^[50,51].

4.6 - Análise do extrato fúngico da cepa isolada de *Melia azedarach*, cultivada em arroz

A cepa isolada de *Melia azedarach* foi cultivada em arroz a fim de verificar se ela era capaz de produzir meroterpenos, da mesma forma que a espécie *P. brasilianum*. Esta cepa mostrou uma forma de desenvolvimento e coloração bastante semelhantes à da cepa de *P. brasilianum*, por isso o interesse neste estudo.

A Figura 4.102 mostra os cromatogramas de LC-DAD do extrato desta cepa em arroz, utilizando como fase estacionária uma coluna C-18, acoplada a uma coluna-guarda de C-18, e como método cromatográfico o método 4, descrito na seção 3.9.1.

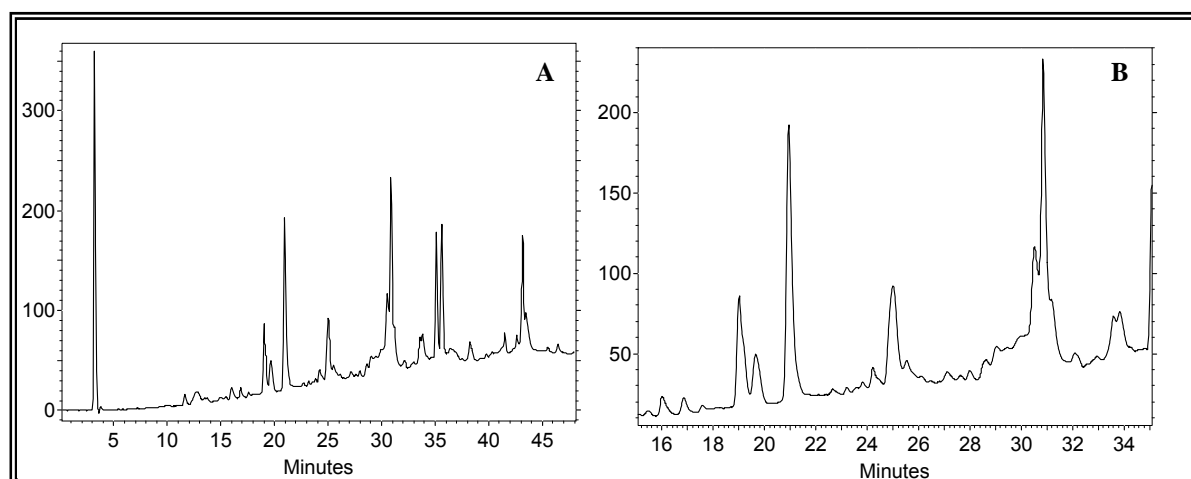


FIGURA 4.102 - Cromatograma do extrato da cepa isolada de *Melia azedarach*, cultivada em arroz. Fase estacionária: Luna 5 μ C-18(2) 100A acoplada a uma coluna guarda de ODS. Bomba A: água. Bomba B: metanol. Eluição gradiente (método 4): 40% a 100% B por 38 minutos. Vazão: 1,0 mL min⁻¹. Volume de injeção: 5 μ L. Monitoramento em 216 nm. (A) cromatograma mostrando toda a análise, (B) região de eluição dos meroterpenos expandida.

Analisando os cromatogramas A e B da Figura 4.102 é possível notar a presença de alguns picos cromatográficos na região de eluição dos meroterpenos de interesse (entre 20 e 30 minutos). A análise dos espectros de absorção destes picos cromatográficos (Figura 4.103) permite uma melhor conclusão sobre a característica estrutural destes compostos eluídos entre 20 e 30 minutos.

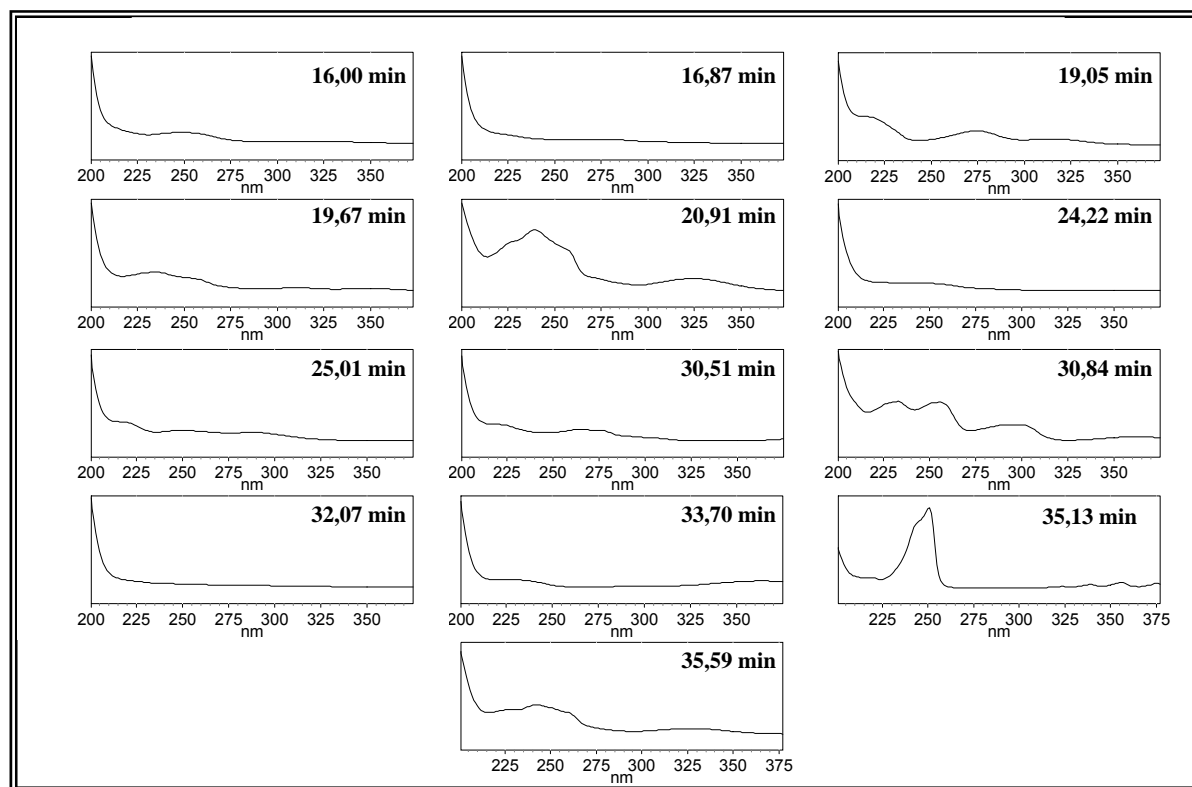


FIGURA 4.103 - Espectros de absorção no ultravioleta dos picos cromatográficos eluídos entre 15 e 35 minutos, do extrato da cepa isolada de *Melia azedarach*, ilustrados na Figura 4.102B.

Observando os espectros de UV da Figura 4.103, e comparando com os espectros de UV dos padrões de meroterpenos PSP-3, PSP-4, PSP-6, PSP-8, PSP-9 e PSP-13, mostrados na Figura 4.8 (página 41), é possível notar que alguns dos espectros da Figura 4.103 são semelhantes aos dos meroterpenos citados (os de t_r 16,87; 24,22; 25,01; 30,51; 32,07 e 33,70 minutos), porém os tempos de retenção destes picos não correspondem aos dos padrões analisados.

Para se conhecer as massas das substâncias presentes neste extrato, realizou-se uma análise de *full scan*, com ionização no modo positivo. O método cromatográfico utilizado para esta análise foi o mesmo das outras análises por LC-APCI-MS (seção 3.9.1). Os cromatogramas de íons selecionados desta análise estão mostrados na Figura 4.104.

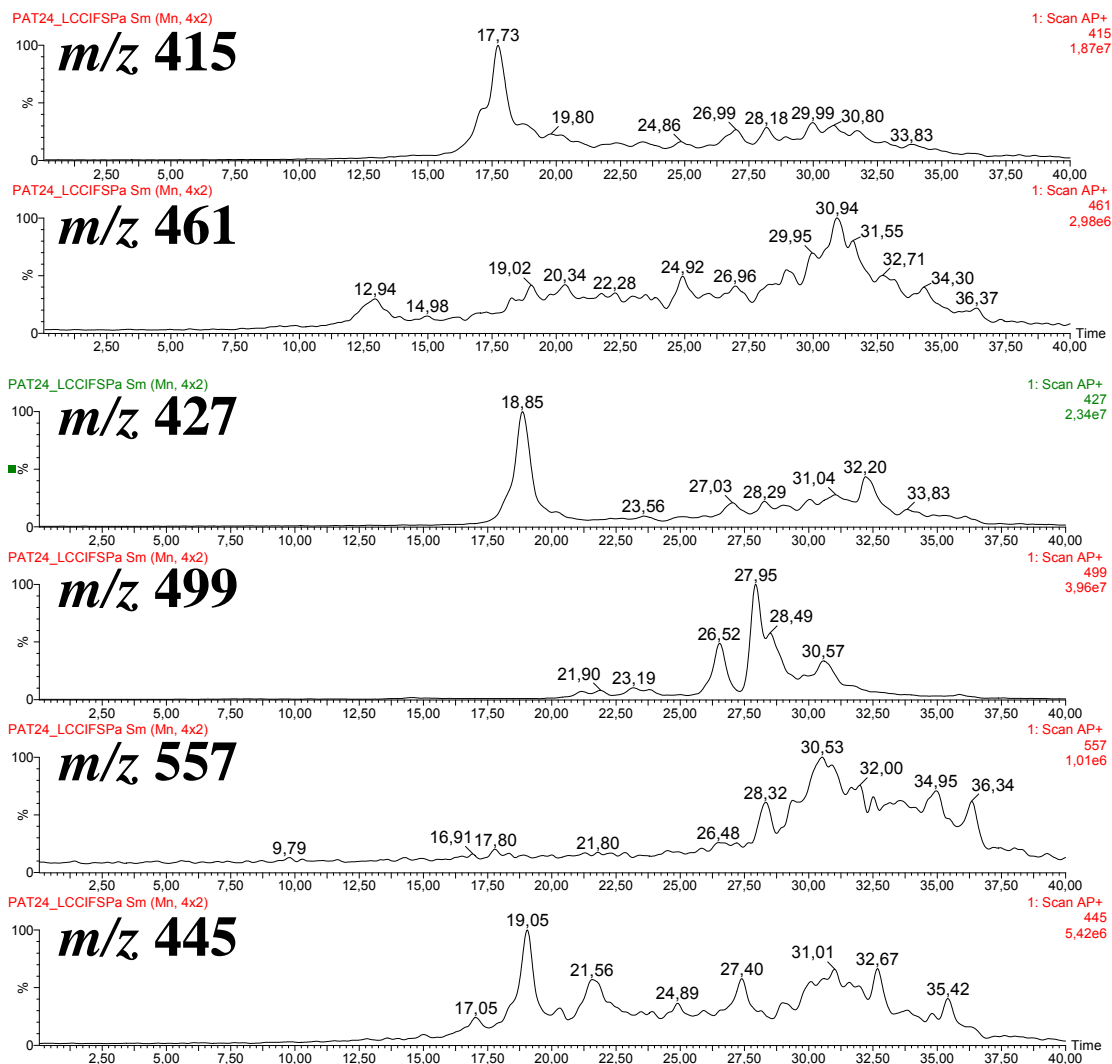


FIGURA 4.104 - Cromatogramas de íons selecionados das massas dos meroterpenos encontradas no extrato da cepa isolada de *Melia azedarach* cultivada em arroz. Ionização por APCI⁺.

Comparando os tempos de retenção dos picos detectados nos cromatogramas da Figura 4.104 com os tempos de retenção encontrados para os padrões de meroterpenos analisados pelo mesmo método cromatográfico (Tabela 4.4, página 98), pode-se concluir que estes picos não se referem às moléculas dos padrões protonadas, e sim a outros íons. Portanto, pode-se dizer que esta cepa não produziu os meroterpenos de interesse no meio de arroz (em concentrações detectáveis pelo método utilizado). Vários fatores podem explicar a não produção de meroterpenos por este fungo, entre eles, as condições de cultivo no período de estudo (temperatura, luz entre outras) ou até mesmo o fato de este fungo não ser realmente da espécie *P. brasilianum*.

5 - Conclusões

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que as técnicas de LC-MS e LC-MS-MS permitiram a análise de meroterpenos em matrizes complexas, sem a necessidade de um tratamento de amostras demorado e complexo. A técnica de ionização por APCI se mostrou mais adequada para estes compostos, garantindo uma melhora considerável na sensibilidade das análises.

Todos os meios de cultura testados para cultivo de *P. brasilianum* permitiram o crescimento da massa fúngica e produção dos metabólitos de interesse, exceto no meio de Czapeck. Porém, nos meios sólidos de arroz, milho e trigo, os picos cromatográficos detectados tiveram maior intensidade, nas análises por LC-DAD. E nas análises por LC-ESI-MS, foi possível detectar os meroterpenos nestes extratos de meios sólidos também, provavelmente devido à maior concentração dos metabólitos fúngicos de interesse nestes extratos. Entretanto, estes meios sólidos possuem um perfil muito mais complexo que os meios líquidos, devido à maior quantidade de substâncias neles presentes.

Todos os substratos exógenos estudados mostraram interferir no metabolismo fúngico, porém os extratos do experimento com alizarina foi o que mais se mostrou diferente em relação ao branco. Por esta razão, seu extrato foi reunido e submetido a uma separação por CC e CCDP. Uma das frações conseguidas após este tratamento do extrato, a fração 1-175D, apresentou em seu espectro de RMN ^1H dois dubletos com deslocamentos químicos de δ 7,70 e δ 7,11, e por isso acredita-se que na estrutura deste composto exista um anel semelhante ao anel C da alizarina. Provavelmente, devido a uma modificação estrutural da alizarina realizada pelo fungo. Posteriormente serão realizadas análises por massas para se determinar a massa molecular deste composto, e também para se conhecer seu padrão de fragmentação.

Os únicos extratos dos experimentos com aditivos nos quais foram detectados meroterpenos (PSP-3 e PSP-8) ou compostos com estruturas muito semelhantes a eles foi nos extratos com ácido ferúlico. Este é um resultado muito interessante e, provavelmente trará informações valiosas a respeito da biossíntese destes meroterpenos.

6 - Bibliografias

1. JACKSON, A. O.; TAYLOR, C. B. "Plant-microbe interactions: life and death at the interface". *The Plant Cell*, **8**: 1651-1668, 1996.
2. D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. "Micotoxins". *Animal Feed Science Technology*, **69**: 155-166, 1997.
3. BEZERRA, V. S. "Toxinas em alimentos". *Ciência Hoje*, **38(228)**: 62-3, 2006.
4. PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. "Microorganismos endofíticos". *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, **29**: 62-71, 2002.
5. REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. "Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis". *Science*, **298**: 1581, 2002.
6. CLAY, K.; SCHARDL, C. "Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses". *The American Naturalist* **160**: S99-S127, 2002.
7. MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P. "Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance". *Crop Science* **40**: 923-940, 2000.
8. PAWLOWISKI, K.; BISSELING, T. "Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What are the shared features?" *The Plant Cell* **8(10)**: 1899-1913, 1996.
9. STOWE, B. B.; YAMAKI, T. "The History and Physiological Action of the Gibberelins". *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **8**: 181-216, 1957.
10. WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGOON, P.; MCPHAIL, A. T. "Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*". *Journal of the American Chemical Society*, **93(9)**: 2325-2327, 1971.
11. STROBEL, G.; YAN, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; RAJINDER, SIDHU, R. J.; HESS, W. M. "Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an Endophytic Fungus of *Taxus wallachiana*". *Microbiology*, **142**: 435-440, 1996.
12. STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. "Taxol and taxane production by *Taxomices andreana*, an endophytic fungus of Pacific Yew". *Science* **260**: 214-216, 1993.
13. Turner, W. B. "Commercially Important Secondary Metabolites" IN: Smith, J. E. & Berry, D. K.; "The Filamentous Fungi, Industrial Mycology". Wiley 1: 1975, p. 122-142.
14. BASHYAL, B.; LI, J. Y.; STROBEL, G.; HESS, W. M.; SIDHU, R. "Seimatoantlerium nepalense, an Endophytic Taxol Producing Coelomycete from Himalaya Yew (*Taxus wallachiana*)". *Mycotaxon*, **72**: 33-42, 1999.
15. PURI, S.; NAZIR, A.; CHAWLA, R. "The Endophytic Fungus *Trametes hirsuta* as a Novel Alternative Source of Podophylotoxin and Related Aryl Tetralin Lignans". *Journal of biotechnology* **122(4)**: 494-510, 2006.
16. Eyberger, A.M., Dondapati, R., Porter, J.R., "Two Endophyte Fungal Isolates from *Podophyllum peltatum* Produce Podophyllotoxin". *Journal of natural products* **69(8)**, 1121-1124, 2006.
17. PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia*. 3ª ed. V. 1. São Paulo, Makron Books do Brasil, 1997.
18. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª ed. São Paulo, Pearson Education do Brasil, 2004.
19. WALKER, T. S. *Microbiologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro, Revinter Ltda, 2002.

20. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6ª ed. Porto Alegre, Artmed, 2000.
21. RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. 6ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 2001.
22. PALM, M. E. "Sistemática de Fungos, biodiversidade e desenvolvimento sustentável". IN: *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, LUZ, W. C. Ed. Passo Fundo, Revisão Anual de Patologia de Plantas, Vol. 4, 1996.
23. PETRINI, C.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET,.; "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, **1**: 185-196, 1992.
24. AZEVEDO, J. L. "Recombinações em fungos filamentosos". IN: *Genética Molecular e de microorganismos*. COSTA, S. O. P. Coord. São Paulo, Manole, 1987.
25. CARROL, G. "Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont". *Ecology*, **69**(1): 2-9, 1988.
26. BACON, C. W.; HINTON, D. M."Symptomless Endophytic Colonization of Maize by *Fusarium moliniforme*". *Canadian Journal of Botany*, **74**: 1195-1202, 1996.
27. PETRINI, O. "Fungal endophyte of tree leaves" IN: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. *Microbial Ecology of Leaves*. Springs Verlag, New York, 1991.
28. ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKYSOBRAL, J.; LAVACA, P. T. "Manual: Isolamento de Microorganismos Endofíticos". CALQ, Piracicaba, 2002.
29. GAO, L.; SUN, M. H.; LIU, X. Z.; CHE, Y. S. "Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi". *Mycological Research III*: 87-92, 2007.
30. BOYLE, D. "Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other White-rot fungi in wood". *Soil biof. biochem.* **6**(30): 817-823, 1998.
31. PARDO, E.; LAGUNAS, U.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J., MARIN, S. "Influence of water activity and temperature on conidial germination and mycelial growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* on grape juice synthetic medium". *Predictive models. Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 1681-1686, 2005.
32. FU, S. Y.; YU, H.; BUSWELL, J. A. "Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*". *FEMS Microbiology Letters* **147**: 133-137, 1997.
33. CORNFORTH, J. W. "Terpenoids Biosynthesis". *Chemistry in Britain*, **4**(1):102-106, 1968.
34. SIMPSON, T. J. "Applications of Multinuclear NMR to Structural and Biosynthetic Studies of Polyketide Microbial Metabolites". *Chemical Society Reviews*, **16**: 123-160, 1987.
35. KALAITZIS, J. A.; HAMANO, Y.; NILSEN, G.; MOORE, B. S. "Biosynthesis and Structural Reision of Neomarinone". *Organic Letters*, **23**(5): 4449-4452, 2003.
36. MUHLBAUER, A.; BEYER, J.; STEGLICH, W. "The Biosynthesis of the Fungal Meroterpenoids Boviquinone-3 and -4 Follows Two Different Pathways". *Tetrahedron Letters*, **39**: 5167-5170, 1998.
37. LIU, H.; SIEGEL, D. R.; DANISHEFSKY, S. J. "Studies Directed Toward the Synthesis of Terreulactone A: Rapid Construction of the A, B, C Rings". *Organic Letters*, **3**(8): 423-425, 2006.
38. CUETO, M.; MACMILLAN, J. B.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. "Tropolactones

- A-D, four Meroterpenoids from a Marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*". *Phytochemistry*, **67**: 1826-1831, 2006.
39. SHIOMI, K.; TOMODA, H.; OTOGURO, K.; OMURA, S. "Meroterpens with Various Biological Activities Produced by Fungi". *Pure Appl. Chem.* **6**(71): 1059-1064, 1999.
 40. KOSEMURA, S. "Meroterpenoids from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200 Hybrid". *Tetrahedron* **59**: 5055-5072, 2003.
 41. ASHTON, C. H. "Pharmacology and Effectes of *Cannabis*: a Brief Review". *British Journal of Psychiatry*, **178**: 101-106, 2001.
 42. IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTTETTMANN, K. "Antifungal and Larvicidal Meroterpenoids Naphtoquinones and a Naphtoxirene from the Roots of *Cordia linnaei*". *Phytochemistry*, **47**(5): 729-734, 1998.
 43. SIMPSON, T. J. "Application of isotopic methods to secondary metabolic pathways". *Topics in Current Chemistry*, **195**: 1-48, 1998.
 44. SIMPSON, T. J.; AHMED, S. A.; MCINTYRE, C. R.; SCOTT, F. E.; SADLER, I. H. "Biosynthesis of polyketide-terpenoid (meroterpenoid) metabolites andibenin B and andilesin A in *Aspergillus variegator*". *Tetrahedron*, **53**(11): 4013-4034, 1997.
 45. SIMPSON, T. J.; STENZEL, D. J. "Biosynthesis of Austin, a Polyketide-terpenoid Metabolite of *Aspergillus ustus*", *Journal of Chemical Society, Chemical communication*, 1042-1043, 1981.
 46. SANTOS, R. M. G. "Metabolismo Secundário dos Fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moliniforme* Isolados como Endofíticos de *Melia azedarach* (Meliceae)". São Carlos, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar. Tese de doutorado, 2003.
 47. SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-F^o, E. "Meroterpenes from *Penicillium* sp with *Melia azedarach*". *Phytochemistry*, **61**, 907-912, 2002.
 48. SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-F^o, E. "Structures of meroterpenes produced by *Penicillium* sp, an endophytic fungus found associate with *Melia azedarach*". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14**(5): 722-727, 2003.
 49. SANTOS, R. M. G., RODRIGUES-F^o, E. "Structures of meroterpenes produced by *Penicillium* sp, an endophytic fungus found associate with *Melia azedarach*". *Naturstorff*, 2003.
 50. PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T. "A generic monography of the Meliaceae". *Blumea*, **22**: 419-540, 1975.
 51. NAKATANI, M.; JAMES, J. C.; NAKANISHI, K. "Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the southern army worm". *Journal of the American Chemical Society*, **103**: 1228-1230, 1981.
 52. WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. "Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales". Academic Press, Londres, 1983.
 53. MOODLEY, V. E.; MULHOLLAND, D. A.; RAYNOR, M. W. "Micellar electrokinetic capillary chromatography of limonoids glucosides from citrus seeds". *Journal of Chromatography A*, **718**: 187-193, 1995.
 54. NETO, J. O.; AGOSTINHO, S. M. M.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; PINHEIRO, A. L.; VILELA, E. F. "Limonoids from seeds of *Toona ciliata* and their chemosystematic significance". *Phytochemistry*, **38**(2): 397-401, 1995.
 55. HOPWOOD, D. A. "Genetic contributions to understanding polyketide synthases". *Chemical Reviews*, **97**: 2465-2497, 1997.
 56. SURYAWANSHI, S.; MEHROTRA, N.; ASTHANA, R. K., GUPATI, R. C. "Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometric Study and Analysis of

- Xanthone and Secoiridoid Glycoside Composition of *Swertia Chirata*, a Potent Antidiabetic”. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**: 3761-3768, 2006.
57. SHI, Q.; YAN, S.; LIANG, M.; YANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, W. “Simultaneous Determination of Eight Components in *Radix tinosporae* by High-performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array Detector and Electrospray Tandem Mass Spectrometry”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **43**: 994-999, 2007.
 58. MURGU, M. “Saponinas e glicosídeos de *Sapindus saponaria*: metodologias de análises por espectrometria de massas e relação com fungos endofíticos”. SÃO CARLOS, Programa de Pós-graduação em Química – UFSCar, 1998. Tese de doutorado.
 59. SANTOS, R. M. G.; “Análise de meroterpenos e dos genes envolvidos na biossíntese de Baeyer-Villigerases em espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*”. SÃO CARLOS, 2004. Relatório de atividades de pós-doutorado.
 60. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. 3^a ed. New York, John Wiley, 1997.
 61. ANTONOVICH, R. S.; KELLER, P.R.; “Applicability of mass spectrometry to detect coeluting impurities in high-performance liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A*, **971**: 159–171, 2002.
 62. SHIBANO, M.; LIN, A.; ITOKAWA, H.; LEE, K. “Separation and Characterization of Active Flavonolignans of *Silybum marianum* by Liquid Chromatography Connected with Hybrid Ion-Trap and Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC–MS/IT-TOF)”. *Journal of Natural. Products*, **70**: 1424–1428, 2007.
 63. ROGATSKY, E.; STEIN, D. “Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development”. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **16**: 1757–1759, 2005.
 64. SOUVERAIN, S.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. “Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures”. *Journal of Chromatography A*, **1058**: 61-66, 2004.
 65. TAYLOR, P. J. “Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry”. *Clinical Biochemistry* **38**: 328– 334, 2005.
 66. CHEXAL, K. K.; SPRINGER, J. P.; CLARDY, J.; COLE, R. J.; KIRKSEY, J. W.; DORNER, J. W.; CUTLER, H. G.; STRAWTER, B. J. “Austin, a novel Polyisoprenoid Mycotoxin from *Aspergillus ustus*”. *Journal of the American Chemical Society*, **98**(21): 6748-6750, 1976.
 67. <https://sec.sbg.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0214-1.pdf>. Acesso em 25/11/07.
 68. ADESINA, S. K.; REISCH, J. “A Triterpenoid Glycoside from *Tetrapleura Tetráptera* Fruit”. *Phytochemistry* **12**(24): 3003-3006, 1985.
 69. SIDDIQUI, B. S.; SATTAR, A.; AHMAD, F.; SABIRA, B. “Isolation and Structural Elucidation of Chemical Constituents from the Fruits of *Morinda citrifolia* Linn”. *Archives of Pharmaceutical Research* **8**(30): 919-923, 2007.
 70. SOBOLEV, .S.; HORN, B. W.; POTTER, T. L.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. “Production of Stilbenoids and Phenolic Acids by the Peanut Plant at Early Stages of Growth”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 3505-3511, 2006.
 71. VALDIVIA, A. C. R.; HEIJDEN, R. V. D.; VERPOORTE, R.; CAMARA, B. “Purification and Characterization of two isoforms of isopentenyl-diphosphate

- Isomerase from Elicitor-treated *Cinchona robusta* cells". *Eur. J. Biochem.* **249**: 161-170, 1997.
72. CHUNG, M.; KIM, J. J.; LIM, J. D.; YU, C. Y.; KIM, S. H.; HAHN, S. J. "Comparison of Resveratrol, SOD Activity, Phenolic Compounds and Free Amino Acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress". *Environmental and Experimental Botany*, **56**: 44-53, 2006.
73. PLUMBE, A. M.; WILLMER, C. M. "Phytoalexins, Water-stress and Stomata III. The Effects of Some Phenolics, Fatty Acids and Some Other Compounds on Stomatal Responses", *New Phytol.* **103**: 17-22, 1986.
74. HEIJDEN, R. V. D.; THRELFALL, D. R.; VERPOORTE, R.; WHITEHEAD, I. M. "Regulation and Enzimology of Pentacyclic Triterpenoid Phytoalexin Biosynthesis in Cell Suspension Cultures of *Tabernaemontana divaricata*". *Phytochemistry* **11**(28): 2981-2988, 1989.