

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

**“TERPENÓIDES E SEU METABOLISMO EM FUNGOS: UM
ESTUDO DE *Scleroderma* sp. E *Xylaria* sp.”**

Diego Zulkiewicz Gomes*

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 CNPq**

**São Carlos - SP
2014**

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

G633tm

Gomes, Diego Zulkiewicz.

Terpenóides e seu metabolismo em fungos : um estudo de *Scleroderma* sp. e *Xylaria* sp. / Diego Zulkiewicz Gomes. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
132 f.

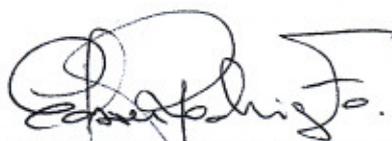
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Biotransformação. 3. Terpenóides. 4. Microorganismos endofíticos. 5. Espectrometria de massas. 6. Produtos naturais. I. Título.

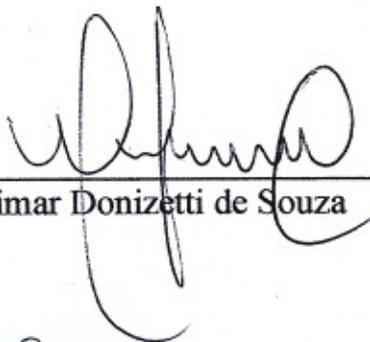
CDD: 547 (20^a)

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

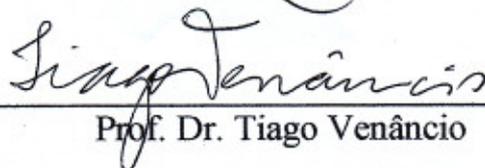
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato **Diego Zulkiewicz Gomes**, realizada em 05 de agosto de 2011:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Dr. Gezimar Donizetti de Souza



Prof. Dr. Tiago Venâncio

Aos meus pais, **Lea Terezinha Zulkiewicz** e **Walter Luis Dias Gomes**, pelo amor, amizade, apoio, incentivo e confiança em todos os momentos e ao meu irmão **Felipe Zulkiewicz Gomes**.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho (Édin)**, do DQ-UFSCar, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, amizade, confiança, inúmeros happy hours com muitas discussões e muita paciência.

A **Dra. Claudia Souza** e ao **Miguel Papai** do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - ipt, pela amizade, confiança e disponibilidade do equipamento de Espectrometria de Massas Agilent Q-TOF para a conclusão deste trabalho.

A todos professores do DQ-UFSCar.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar: **Doraí, Luciana, Paulo e Valdir**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar e suas secretárias, **Ariane, Luciana e Cristina**.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre, do Laboratório de Espectrometria de Massas – UFSCar: **Taícia (Cabeçinha), Gezimar, Marília, Luciana, Thaís (Thata), Zeh, Rodrigo (Rincão), Héctor (Manaus), Livia, Douglas, Cebolinha, Diana, Enzo, Carol, Gabriel e Bianca**. Muito obrigado pela amizade e inúmeras discussões, científicas (e também não tão científicas).

Aos demais amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Laboratório de Síntese Orgânica, Laboratório de Cromatografia Líquida e Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural.

Aos demais amigos do DQ-UFSCar e a toda turma de 2004 do curso de Bacharelado em Química – UFSCar.

Ao **Héctor (Manaus)**, pela amizade e inúmeras discussões de RMN.

Aos amigos **Gezimar** e **Rincão**, pela amizade, ensinamentos, confiança e acreditarem em mim.

A República **EtaNóis**, por ser esta grande família e a base de muito o que sou hoje.

A **Natália Jordão Ferrari**, pela amizade, companheirismo, compreensão, carinho e confidências ao longo da minha graduação e pós-graduação.

A banca examinadora, **Dr. Gezimar Donizetti de Souza** e **Prof. Dr. Tiago Venâncio**, pelas inúmeras e valiosas contribuições nesta dissertação.

A minha família por todo o apoio.

A CNPq, pela bolsa de mestrado concedida e por todo apoio concedido aos nossos laboratórios.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ACN	-	Acetonitrila
BDA	-	Batata, dextrose e ágar
BEA	-	Batata, Steviosídeo e ágar
°C	-	Graus Celsius
CCD	-	Cromatografia de camada delgada
cm	-	Centímetro
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	-	dubleto
dd	-	duplo dubleto
ds	-	duplo septeto
dt	-	duplo tripleto
EI +	-	Ionização por impacto de elétrons em modo positivo
EIC	-	Extracted Ion Chromatogram
ESI +	-	Ionização por electrospray no modo positivo
Extração L-L	-	Extração líquido-líquido
g	-	Gramas
GC/MS	-	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HMBC	-	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	-	Cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos
HSQC	-	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
L	-	Litros
LC/MS	-	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
MeOH	-	Metanol

mg	-	miligramas
min	-	Minutos
mm	-	milímetro
MS	-	<i>Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
[M+H] ⁺	-	Molécula protonada
[M-H ₂ O+H] ⁺	-	Molécula protonada com perda de H ₂ O
[M+Na] ⁺	-	Aduto ou cluster de sódio
[M-2H ₂ O+H] ⁺	-	Molécula protonada com perda de 2 H ₂ O
ODS	-	Octadecilsilano (C-18)
QqQ	-	Analisador de massas tipo triplo quadrupolo
Q-TOF	-	Analisador de massas híbrido quadrupolar com tempo de voo
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	-	Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13
RMN ¹ H	-	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio - 1
rpm	-	Rotações por minuto
s	-	singleto
SPE	-	Extração em fase sólida
t	-	triplete
t _R	-	Tempo de retenção
UV-VIS	-	detector nos comprimentos de onda Ultravioleta/visível.
δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão
μm	-	micrômetros

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1.1 - Principais vantagens na utilização de cultura de células, enzimas na forma isolada ou “pool” de enzimas para reações de biotransformação ²²	9
TABELA 1.2 - Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação realizado ²²	9
TABELA 3.1 - Sequência de eluição para as colunas 1 e 2 de extrato de cravo da Índia.	38
TABELA 3.2 - Ordem de eluição para a coluna cromatográfica (sílica gel) do extrato etanólico de <i>Scleroderma</i> sp.	41
TABELA 3.3 - Ordem de eluição para a coluna cromatográfica com fase estacionária ODS, da fração F80 provenientes da coluna anterior do extrato etanólico de <i>Scleroderma</i> sp.	41
TABELA 3.4 - Ordem de eluição para a coluna cromatográfica (sílica gel) das frações provenientes de coluna ODS anterior, do extrato etanólico de <i>Scleroderma</i> sp.	42
TABELA 3.5 - Ordem de agrupamento das frações provenientes de cromatografia em sílica gel no processo de purificação do extrato etanólico de <i>Scleroderma</i> sp.	42
TABELA 3.6 - Rampa de aquecimento utilizada nas análises em GC-MS.	43
TABELA 3.7 - Composição do meio líquido C'Zapek enriquecido com extrato de levedura utilizado nos experimentos de biotransformação.	46
TABELA 3.8 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando os substratos ácido oleanólico e steviosídeo.	47
TABELA 3.9 - Solventes utilizados em experimentos de biotransformação com objetivo de se determinar melhor metodologia de extração aos substratos ácido oleanólico e steviosídeo.	47

TABELA 3.10 - Método de eluição gradiente utilizado na análise em HPLC-DAD do experimento de biotransformação utilizando o substrato steviosídeo.	48
TABELA 3.11 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando o substrato ácido oleanólico.	49
TABELA 3.12 - Sequencia de eluição em coluna cromatográfica de sílica gel (230-400 Mesh) para purificação do ácido oleanólico.	51
TABELA 3.13 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando o substrato steviosídeo.	52
TABELA 3.14 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando o substrato triterpeno lanostano.	53
TABELA 4.1 - Dados de RMN ¹ H do ácido oleanólico. Comparação entre os dados obtidos (400 MHz, CD ₃ OD) e dados da literatura ⁴⁹ (200 MHz, CDCl ₃).	62
TABELA 4.2 - Glicosídeos presentes no adoçante comercial Stevita ³⁰ . Análise em LC/MS modo positivo.	63
TABELA 4.3 - Tabela de deslocamentos químicos para o Lanosta-8,23-diene-3β,25-diol – triterpeno lanostano 1.	78
TABELA 4.4 - Tabela de deslocamentos químicos para o Lanosta-8,24-diene-3β,23-diol – triterpeno lanostano 2.	87

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1.1 - Representação de micorriza entre <i>Pinus</i> e fungo <i>basidiomiceto</i> . A interação ocorre entre as raízes do pinheiro e as hifas do fungo.	6
FIGURA 1.2 - Representação da interação bioquímica entre fitopatógenos e plantas.	7
FIGURA 1.3 - Caminho de biotransformação do ácido oleanólico por <i>Chaetomium longirostre</i> , havendo lactonização no C-3, com posterior abertura do anel. Em etapa posterior há hidroxilação do C-21 ²⁴	13
FIGURA 1.4 - Biotransformação do ácido eburicoico pelo fungo <i>Glomerella fusarioides</i> via clivagem oxidativa do anel A.	14
FIGURA 1.5 - Biotransformação do ácido oleanólico pelo fungo <i>Nocardia</i> sp. produzindo o metil ester de ácido oleanólico.	14
FIGURA 1.6 - Estrutura molecular do steviosídeo.	15
FIGURA 1.7 - Hidroxilação no C-22 de saponina isolada de <i>Sapindu saponaria</i> por espécie de <i>Xylaria</i> isolada de mesma fonte.	16
FIGURA 1.8 - Espécie de <i>Xylaria</i> (A) utilizada na continuidade dos estudos no grupo LaBioMMi – UFSCar isolada de <i>Cupressus lusitanica</i> (B)	17
FIGURA 1.9 - Estrutura molecular do ácido oleanólico.	18
FIGURA 1.10 - Biossíntese do ácido oleanólico a partir do 2,3-oxidoesqualeno ²⁹ ...	19
FIGURA 1.11 - Estrutura molecular do ácido ursólico.	20
FIGURA 1.12 - Biossíntese do Steviosídeo a partir do Geranilgeranil - difosfato ²⁹ ..	22
FIGURA 1.13 - Estruturas moleculares dos triterpenos lanostanos isolados do fungo <i>Scleroderma</i> sp. Triterpeno lanostanos 1: Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol; Triterpeno lanostanos 2: Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol.	24
FIGURA 1.14 - Biossíntese a partir do 2,3-oxidoesqualeno dos triterpenos lanostanos isolados de <i>Scleroderma</i> sp ²⁹	25
FIGURA 1.15 - Saponinas presentes na <i>Avena sativa</i> . Avenacosídeo A (A) e avenacosídeo B (B).	26

FIGURA 1.16 - Biossíntese, a partir do colesterol, para as saponinas presentes na aveia - Avenacosídeo A e Avenacosídeo B ²⁹	28
FIGURA 1.17 - Hidrólise dos resíduos de açúcar ligados ao C-3 do avenacosídeo B pelas enzimas do micro-organismo <i>Stagonospora avenae</i> . As ordens de clivagem estão numeradas de 1 (primeira) à 4 (última). A unidade de açúcar ligada ao C-26 é hidrolisada enzimaticamente pela planta em resposta a ataques de micro-organismos ou danos.....	29
FIGURA 3.1 - <i>Scleroderma</i> sp. coletado no campus da UFSCar. Foto do basidiomiceto inteiro (A) e com a bolsa micelial cortada (B).....	40
FIGURA 3.2 - Fluxograma para o isolamento de triterpenos lanostanos a partir de <i>Scleroderma</i> sp.	44
FIGURA 3.3 - Fluxograma para experimento de biotransformação do ácido oleanólico: Cultivo do micro-organismo em presença do substrato, extração e purificação.....	50
FIGURA 3.4 - Fluxograma para experimento de biotransformação do Steviosídeo: Cultivo do micro-organismo em presença do substrato, extração e purificação.....	53
FIGURA 3.5 - Fluxograma para experimento de biotransformação dos triterpenos lanostanos isolados de <i>Scleroderma</i> sp.: Cultivo do micro-organismo em presença do substrato, extração e purificação.....	54
FIGURA 3.6 - Fluxograma representando experimento de biotransformação dos avenacosídeos presentes na Aveia. Cultivo, extração e análise em LC/MS.....	56
FIGURA 4.1 - A : Estrutura molecular do eugenol, conhecido também como óleo de cravo; B : CCD do ácido oleanólico isolado de cravo da Índia.....	58
FIGURA 4.2 - Espectro de RMN ¹ H (400 mHz; D ₃ COD) do ácido oleanólico isolado de cravo da Índia.....	59
FIGURA 4.3 - ampliação do espectro de RMN ¹ H (400 mHz; D ₃ COD) do ácido oleanólico para a região dos carbonos metilênicos, metínicos e metílicos. Deslocamento químico para os singletos representados acima e valores das integrais representadas abaixo.	60
FIGURA 4.4 - A : Ampliação do tripleto em δ 5.24, atribuído ao H-12 olefínico do ácido oleanólico em experimento de RMN ¹ H; B : Ácido oleanólico em estrutura	

numerada; C: Ampliação do espectro de RMN ¹ H do ácido oleanólico, observando os sinais na região dos carbonos carbinólicos.....	61
FIGURA 4.5 - Estrutura molecular de diterpeno Kaurano, aglicona do steviosídeo. Para o steviosídeo os substituíntes R1 = 1 unidade de glicose e R2 = 2 unidades de glicose.....	62
FIGURA 4.6 - BPI do adoçante comercial Stevita [®] em experimento de <i>full scan</i> modo positivo de ionização.	64
FIGURA 4.7 - EIC de experimento <i>full scan</i> modo positivo do adoçante comercial Stevita. Íons na forma de [M + Na] ⁺ A: Rebaudiosídeo D (<i>m/z</i> 1152); B: Rebaudiosídeos A e E (<i>m/z</i> 990); C: Rebaudiosídeo C (<i>m/z</i> 974); D: Rebaudiosídeo F (<i>m/z</i> 960); E: Dulcosídeo A (<i>m/z</i> 812); F: Steviolbiosídeo (<i>m/z</i> 666); G: Rebaudiosídeo B e Steviosídeo (<i>m/z</i> 828).	64
FIGURA 4.8 - Espectro de massas do experimento de <i>full scan</i> do adoçante comercial Stevita [®] em 29.98 minutos. Presença dos glicosídeos [M + Na] ⁺ <i>m/z</i> 666, 812, 828, 960, 974, 990 e 1152.....	65
FIGURA 4.9 - EIC sobreposto dos glicosídeos presentes no Stevita [®] , com os valores das áreas de cada banda destacada.	66
FIGURA 4.10 - Espectros de massas obtidos em alta resolução (Q-TOF) para identificação através de massa exata dos glicosídeos presentes no adoçante Stevita [®]	66
FIGURA 4.11 - A: Cromatograma dos triterpenos lanostanos isolados de <i>Scleroderma</i> sp. B: Espectros de massa (<i>full scan</i> ; ESI+) para as bandas em 13,34 e 14,77 min, referentes aos triterpenos lanostanos.....	68
FIGURA 4.12 - Proposta de fragmentação de análise em LC/MS em modo positivo de ionização (FIGURA 4.11), dos triterpenos lanostanos isolados de <i>Scleroderma</i> sp.	69
FIGURA 4.13 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1 isolado de <i>Scleroderma</i> sp e sua estrutura proposta.	70
FIGURA 4.14 - Espectros de RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) (A) e HSQC (B), ampliados para visualização do sinal olefínico (δ 5.61 a δ 5.63), do triterpeno lanostano 1 isolado de <i>Scleroderma</i> sp.	71

FIGURA 4.15 - Acoplamentos dos hidrogênios olefínicos com carbonos a mais de uma ligação de distância. Correlações obtidas em experimento de HMBC.	71
FIGURA 4.16 - Espectros de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do Triterpeno lanostano 1 isolado de <i>Scleroderma</i> sp. A : Ampliação dos acoplamentos de carbonos com os hidrogênios olefínicos. B : Ampliação do acoplamento dos hidrogênios olefínicos com C-26 e C-27 metílicos de δ 29.44 e δ 29.68 respectivamente. ...	72
FIGURA 4.17 - Espectro de RMN ¹³ C (400MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1 isolado de <i>Scleroderma</i> sp.	73
FIGURA 4.18 - Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1 ampliado na região de acoplamento do H-3 com C-2 e C-29 e respectiva representação na estrutura molecular.	74
FIGURA 4.19 - Experimento de COSY (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1 isolado de <i>Scleroderma</i> sp. Destaque para o acoplamento do hidrogênio 3 carbinólico com hidrogênios metilênicos e representação do acoplamento observado.	74
FIGURA 4.20 - Estrutura molecular numerada do triterpeno lanostano 1.	75
FIGURA 4.21 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1 ampliado para visualização dos sinais metílicos com respectivas atribuições e valores de integral.	76
FIGURA 4.22 - A : Representação estrutural do acoplamento das metilas 28 e 29 com C-3. B : Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1 ampliado na região de acoplamentos dos hidrogênios metílicos.	76
FIGURA 4.23 - A : Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 1. ampliado na região de acoplamento das metilas 19 e 30 com os carbonos olefínicos C-9 e C-8 respectivamente. B : Representação estrutural do acoplamento destacado.	77
FIGURA 4.24 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 isolado de <i>Scleroderma</i> sp. e estrutura molecular proposta.	79
FIGURA 4.25 - A : Ampliação do duplo tripleto no RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) atribuído ao H-23 carbinólico da cadeia lateral do triterpeno lanostano 2. B :	

Representação da estrutura proposta com a correlação observada em experimento de COSY (400 MHz; CDCl ₃).....	80
FIGURA 4.26 - A: Espectro de COSY (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2. B: Ampliação com destaque para as correlações do H-23 carbinólico (δ 4.48) da cadeia lateral.....	80
FIGURA 4.27 - A: Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 ampliado na região do H-23 carbinólico da cadeia lateral acoplado com C-24 de δ 133.9. B: Estrutura molecular com representação do acoplamento de H-23 com C-24.....	81
FIGURA 4.28 - A: Ampliação do sinal olefínico com δ 5.21 no espectro de RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2. B: Estrutura com proposta da correlação hidrogênio- hidrogênio referente ao duplo septeto em δ 5.21.....	82
FIGURA 4.29 - A: Espectro de COSY (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 isolado de Scleroderma sp. B: Ampliação na região de acoplamento do H-24 olefínico (duplo septeto) com as duas metilas ligadas ao carbono sp ² da cadeia lateral, H-26 e H-27.	83
FIGURA 4.30 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) para o triterpeno lanostano 2 destacando acoplamento do hidrogênio olefínico com os carbonos correspondentes.	84
FIGURA 4.31 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 ampliado para visualização de todos sinais metílicos (δ 1.8 a δ 0.7) e estrutura molecular proposta numerada.....	84
FIGURA 4.32 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 na região de acoplamento dos hidrogênios metílicos. Destaque para H-26 e H-27 acopladas com C-24 e C-25 olefínicos próximos a δ 130.	85
FIGURA 4.33 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 na região de acoplamento dos hidrogênios metílicos. Destaque para H-29 e H-28 em δ 0.82 e δ 1.01 respectivamente, acopladas com o C-3 carbinólico em δ 79.0.	85
FIGURA 4.34 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl ₃) do triterpeno lanostano 2 na região de acoplamento dos hidrogênios metílicos. Destaque para	

H-19 em δ 0.88 e H-30 em δ 0.99 acoplados respectivamente a C-9 e C-8 olefínicos em torno de δ 134.	86
FIGURA 4.35 - Mecanismo genérico de reação de sililação em álcoois, utilizando BSA ou TMCS.	88
FIGURA 4.36 - Espectros de massas dos triterpenos lanostanos extraídos de <i>Scleroderma</i> sp., obtidos em GC/MS após reação de sililação.	89
FIGURA 4.37 - Proposta de fragmentação para geração do íon m/z 157 no triterpeno lanostano 2.	90
FIGURA 4.38 - Proposta de fragmentação do triterpeno lanostano 1 utilizando ionização por elétrons.	91
FIGURA 4.39 - Proposta de fragmentação do triterpeno lanostano 2 utilizando ionização por elétrons.	92
FIGURA 4.40 - A : Cromatograma com referência na intensidade do pico base (BPI) em experimento de <i>full scan</i> do meio de aveia (branco); B : EIC de m/z 1086, avenacosídeo A na fração controle; C : EIC de m/z 1248, avenacosídeo B na fração controle; D : Espectro de massas para a banda em torno de 28.79 minutos destacando os avenacosídeos A e B com suas respectivas estruturas.	94
FIGURA 4.41 - Análise em LC/MS Q-TOF com ionização ESI + dos avenacosídeos A e B.	95
FIGURA 4.42 - cromatogramas com detector DAD a 210 nm. A : Stevita®; B : Fração SPE-ODS metanol e água (1:1) do extrato de <i>Xylaria</i> em meio sólido BEA; C : Fração SPE-ODS metanol 100%	97
FIGURA 4.43 - CCD das frações correspondentes ao meio de cultivo apenas, após filtração para separação do micélio em experimento de biotransformação do ácido oleanólico. As aplicações de “A” a “E” correspondem as diferentes frações da purificação via cromatografia líquida de bancada. A última aplicação denominada “OA” se refere ao ácido oleanólico isolado de cravo da Índia. As placas são reveladas em vanilina sulfúrica e UV (254 e 365 nm).	100
FIGURA 4.44 - CCD das frações correspondentes ao micélio, após filtração para separação do meio de cultivo do experimento de biotransformação do ácido	

oleanólico. As aplicações de “A” a “E” correspondentes as diferentes frações da purificação via cromatografia líquida de bancada. A última aplicação, à direita, denominada “OA” se refere ao ácido oleanólico. Revelação em vanilina sulfúrica. 101

FIGURA 4.45 - **A:** Cromatograma do íon extraído m/z 439.3571, referente ao ácido oleanólico, do meio líquido de cultivo em experimento de biotransformação deste substrato frente a *Xylaria* sp. **B:** Cromatograma do íon extraído m/z 439.3571, referente ao ácido oleanólico, do micélio do experimento de biotransformação deste substrato frente ao micro-organismo. **C:** Espectro de massas do cromatograma “A” (meio líquido) em 16 minutos. 102

FIGURA 4.46 - CCD das frações purificadas do extrato micelial do experimento de biotransformação do steviosídeo. 103

FIGURA 4.47 - Análise realizada em LC/MS ESI+ (Q-TOF) de fração do experimento de biotransformação do steviosídeo. **A:** EIC sobrepostos da: aglicona do steviosídeo (m/z 319.2272), steviolbiosídeo (m/z 665.3138), steviosídeo (m/z 827.3669) e rebaudiosídeos A e E (m/z 989.4199), com os respectivos valores das áreas das bandas; **B:** Espectro de massas das bandas entre t_R 8.20 e 8.54 min. 105

FIGURA 4.48 - CCD das frações purificadas do meio de cultivo e micélio após experimento de biotransformação dos lanosteróis isolados de *Scleroderma* sp. Frações A-E referente à purificação dos extratos e TL referente aos triterpenos lanostanos isolados. 108

FIGURA 4.49 - EIC do íon m/z 425.3779 - triterpenos lanostanos 1 e 2 – das frações de cultivo da *Xylaria* em presença dos lanosteróis após etapa de purificação. **A:** fração A do meio líquido; **B:** fração C do micélio; **C:** fração C do meio líquido. O intervalo de massa na extração do íon teve variação de 0.0010 unidades de massa, de modo a excluir falsos positivos. 109

FIGURA 4.50 - Espectro de massas, ionização ESI +, das bandas referente aos triterpenos lanostanos 1 e 2, obtidas da amostra do extrato micelial de experimento de biotransformação. **A:** t_R 13.37-13.61; **B:** t_R 13.72-14.03. 109

FIGURA 4.51 - Espectro de massas, ionização ESI +, das bandas referente aos cromatogramas (FIGURA 4.49 A e C) do meio líquido de cultivo da *Xylaria* em

presença dos lanosteróis após etapa de purificação. Evidência para ausência dos triterpenos lanostanos, os quais seriam observados nas formas $[M+Na]^+$ (m/z 465.3699), $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 425.3779) e $[M-2H_2O+H]^+$ (m/z 407.3673). 110

FIGURA 4.52 - Cromatogramas referente ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos presentes na aveia, obtidos a 205 nm utilizando fase estacionária reversa. **A:** Fração controle, ou seja, ausente de micro-organismo; **B:** Fração contendo meio de cultivo e fungo 111

FIGURA 4.53 - Cromatogramas por intensidade do pico base (BPI) referente ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos presentes na aveia. **A:** Meio de aveia e *Xylaria*; **B:** Meio de aveia (controle). 112

FIGURA 4.54 - Cromatogramas de íons selecionados. **A:** EIC m/z 1086 $[M+Na]^+$ (Avenacosídeo A) presente no meio de aveia em t_R 28.84 min; **B:** EIC m/z 1248 $[M+Na]^+$ (Avenacosídeo B) presente no meio em t_R 28.63 min; **C:** EIC m/z 1086 $[M+Na]^+$ ausente no extrato micelial da fração biotransformada; **D:** EIC m/z 1248 $[M+Na]^+$ ausente no extrato micelial da fração biotransformada. 113

FIGURA 4.55 - Cromatogramas referentes ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos A e B com *Xylaria* sp. **A:** EIC íon m/z 924 presente no branco nos t_R 29.09 e 30.23 min; **B:** EIC íon m/z 924 ausente na fração biotransformada; **C:** EIC íon m/z 739 ausente no branco; **D:** EIC íon m/z 739 presente na fração biotransformada no t_R 36.82 min. 114

FIGURA 4.56 - Espectros de massas referentes fração após biotransformação dos avenacosídeos A e B utilizando *Xylaria* sp. **A:** espectro referente banda em 29.09 min, destacada no EIC - íon m/z 924; **B:** espectro referente banda em 30.23 min, destacada no EIC - íon m/z 924; **C:** espectro referente banda em 36.82 min, destacada no EIC - íon m/z 739. 115

FIGURA 4.57 - **A:** EIC m/z 454 em amostra controle de meio líquido de aveia; **B:** EIC m/z 454 em amostra de meio líquido de aveia junto ao micro-organismo *Xylaria* após crescimento de 35 dias; **C:** Espectro de massas da banda em 32.43 minutos referente ao cromatograma B. 115

FIGURA 4.58 - **A:** EIC m/z 547 em amostra de meio líquido de aveia; **B:** EIC m/z 547 em amostra de meio líquido de aveia junto ao micro-organismo *Xylaria* após

crescimento de 35 dias; C : Espectro de massas da banda em 28.83 minutos do cromatograma B.....	116
FIGURA 4.59 - Espectros de massa da banda em 33.7 minutos (FIGURA 4.58) de amostras provenientes de experimento de biotransformação dos avenacosídeos A e B utilizando <i>Xylaria</i> sp. A : amostra de meio líquido de aveia (branco); B : amostra de meio líquido de aveia junto ao micro-organismo <i>Xylaria</i> após crescimento de 35 dias.....	116
FIGURA 4.60 - Proposta para formação dos íons m/z 924 (substrato precursor) e 739 (produto biotransformado) observados em experimento de biotransformação dos Avenacosídeos A e B em presença de <i>Xylaria</i> sp. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.....	117
FIGURA 4.61 - Proposta para bioconversão do precursor m/z 739 com formação do íon m/z 454 (produto biotransformado) observado em experimento de biotransformação dos Avenacosídeos A e B em presença de <i>Xylaria</i> sp. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.....	118
FIGURA 4.62 - Proposta para formação do produto de biotransformação detectado como m/z 547 $[M+H]^+$, observados em experimento de bioconversão dos Avenacosídeos A e B em presença de <i>Xylaria</i> sp. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.	119
FIGURA 4.63 - Cromatogramas referentes ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos A e B com <i>Xylaria</i> sp. A : EIC m/z 452 ausente no branco; B : EIC m/z 450 ausente no branco; C : EIC m/z 452 presente na fração biotransformada em t_R 34.91 min; D : EIC m/z 450 presente na fração biotransformada em t_R 34.55 min.....	120
FIGURA 4.64 - Espectros de massa referentes a fração após biotransformação dos avenacosídeos A e B utilizando <i>Xylaria</i> sp. A : espectro referente banda em t_R 34.91 min do EIC - íon m/z 452; B : espectro referente banda em t_R 34.55 min do EIC - íon m/z 450.	121
FIGURA 4.65 - Proposta de bioconversão formando os íons m/z 452 e m/z 450 pelo micro-organismo <i>Xylaria</i> sp. em experimento de biotransformação dos Avenacosídeos A e B. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.	122

Resumo

TERPENÓIDES E SEU METABOLISMO EM FUNGOS: UM ESTUDO DE *Scleroderma* sp. E *Xylaria* sp. No presente trabalho foram isolados os triterpenos lanostanos Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol e Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol do basidiomiceto *Scleroderma* sp., uma fonte rica em triterpenos e ainda não reportada como produtora destes metabólitos. As estruturas moleculares foram completamente determinadas por RMN 1D e 2D e análises de espectrometria de massas, tendo ainda as fragmentações propostas. Esses e outros substratos foram considerados para o estudo do metabolismo de terpenóides em *Xylaria* sp., um micro-organismo conhecido de pesquisas anteriores do grupo LaBioMMi por viver em mutualismo com *Sapindus saponaria*, uma planta rica em saponinas, que são metabólitos conhecidos pelo potencial antifúngico. Diferentes substratos foram utilizados nos experimentos com o fungo, dentre eles o ácido oleanólico isolado do cravo da Índia (com sua estrutura determinada por RMN ¹H), steviosídeo, proveniente de fonte comercial, avenacosídeos A e B, utilizados sem isolamento prévio a partir da aveia (a qual é uma fonte rica nesses glicosídeos) e os lanosteróis isolados de *Scleroderma* sp. Assim como em seu habitat, a *Xylaria* mostrou grande afinidade pelos glicosídeos, promovendo reações de desglicosilações ou mesmo acumulando-os com diferentes padrões de glicosilação. O ácido oleanólico foi completamente consumido pelo micro-organismo, enquanto que os lanosteróis foram totalmente incorporados ao micélio do fungo. Através de análise em LC/MS de alta resolução com analisador híbrido Q-TOF foi possível determinar com precisão a identidade dos metabólitos utilizados, assim como alguns produtos de biotransformação.

Abstract

TERPENOIDS AND ITS METABOLISM IN FUNGI: A STUDY OF *Scleroderma* sp. AND *Xylaria* sp. In the present work, the lanostane triterpenes Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol and Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol were isolated from the basidiomycete *Scleroderma* sp., an extremely rich source of triterpenes and not yet reported as having it. The molecular structures were completely determined by 1D and 2D NMR and mass spectrometry (MS) analyses with fragmentation mechanisms being also suggested. These and other substrates were considered for terpenoids metabolism study in *Xylaria* sp., a micro-organism known from previous projects, at the research group LaBioMMi, by living in mutuality with *Sapindus saponaria*, a saponins producer plant, known for its antifungal metabolites. Different substrates were considered for fungal experiments, including oleanolic acid, isolated from clove and identified by ^1H NMR, stevioside, obtained from commercial source, avenacosides A and B from oats, used in its natural way (known for being rich in these glycosides) and the previously isolated lanosterols from *Scleroderma* sp. As in their habitat, *Xylaria* fungus has proved to have great glycosides affinity, promoting deglycosylations reactions or even combining them with different sugar patterns. Oleanolic acid was completely consumed by the micro-organism, while lanosterol were fully incorporated into the fungus mycelium. Using high-resolution LC/MS analysis with Q-TOF hybrid analyzer, the metabolites were accurately identified so as some biotransformation products.

Sumário

1	- Introdução	1
1.1	- Micro-organismos endofíticos	2
1.2	- Associação entre plantas e micro-organismos	3
1.3	- Biotransformações – aspectos gerais	8
1.4	- Conservação de micro-organismos endofíticos	11
1.5	- Estudos metabólicos já relatados na literatura	12
1.6	- Seleção do micro-organismo <i>Xylaria</i> para estudo metabólico.....	15
1.7	- Escolha dos substratos utilizados	17
1.7.1	- Acido Oleanólico.....	18
1.7.2	- Steviosídeo	20
1.7.3	- Triterpenos lanostanos	23
1.7.4	- Avenacosídeos A e B	26
2	- Objetivos	31
2.1	- Objetivo geral	32
2.2	- Objetivos detalhados:.....	32
3	- Materiais e métodos	33
3.1	- Equipamentos	34
3.2	- Materiais Cromatográficos	35
3.3	- Reagentes e materiais utilizados	36
3.4	- Obtenção dos Substratos	37
3.4.1	- Ácido Oleanólico.....	37
3.4.2	- Steviosídeo	39
3.4.3	- Triterpenos lanostanos	40
3.4.4	- Avenacosídeos A e B	44

3.5	- Desenvolvimento de metodologias de extração – Ácido oleanólico e Steviosídeo	45
3.6	- Estudo do metabolismo da <i>Xylaria</i> sp. frente aos substratos	49
3.6.1	- Ácido Oleanólico	49
3.6.2	- Steviosídeo	51
3.6.3	- Triterpenos lanostanos	53
3.6.4	- Avenacosídeos	55
4	- Resultados e discussão	57
4.1	- Identificação dos substratos utilizados	58
4.1.1	- Ácido oleanólico	58
4.1.2	- Steviosídeo	62
4.1.3	- Triterpenos lanostanos isolados de <i>Scleroderma</i> sp.	67
4.1.4	- Avenacosídeos A e B	93
4.2	- Desenvolvimento de metodologias de extração – Ácido oleanólico e Steviosídeo	95
4.3	- Estudo do metabolismo da <i>Xylaria</i> sp. frente aos substratos	99
4.3.1	- Ácido oleanólico	99
4.3.2	- Steviosídeo	103
4.3.3	- Triterpenos lanostanos	106
4.3.4	- Avenacosídeos A e B	111
5	- Conclusões	123
6	- Referências Bibliográficas	129

1 - Introdução

1.1 - Micro-organismos endofíticos

A utilização de micro-organismos é uma prática muito antiga, sendo que ainda sem o domínio científico eram utilizados na fermentação de pães, queijos e cerveja¹. Mais tarde, já com certo conhecimento adquirido, a produção de penicilina pelo fungo do gênero *Penicillium* foi essencial na segunda guerra mundial², e a partir desse momento iniciou-se uma busca por metabólitos bioativos provenientes de micro-organismos, visando seu uso como potenciais fármacos. As fontes naturais, em especial os micro-organismos, foram consideradas para este fim devido ao seu enorme potencial. Este ponto na história define o início de numerosas pesquisas a fim de isolar, otimizar a produção e/ou modificar tais compostos.

A grande vantagem em se empregar fontes naturais frente à síntese orgânica é a possibilidade de obter compostos com maior pureza enantiomérica, já que são biossintetizadas por vias enzimáticas³. A utilização de cultura de células vegetais na produção de substâncias de interesse, em substituição ao processo de extração de plantas, proporciona ainda um maior rendimento e viabilidade de obtenção de metabólitos de interesse⁴.

Muito utilizadas são as culturas de micro-organismos, dentre elas os fungos endofíticos são responsáveis pela produção de medicamentos como, por exemplo, a penicilina, amoxicilina e ampicilina. Em particular os fungos denominados endofíticos⁵ (aqueles que habitam o interior das plantas) biossintetizam com bom rendimento diversas classes de metabólitos secundários, como por exemplo, alcalóides, esteróides, terpenóides, isocumarinas, quinonas, lignanas e amidas⁶⁻⁸. Tais metabólitos recebem esta nomenclatura, pois se diferenciam dos primários (em geral macromoléculas), os quais são responsáveis por funções básicas dos organismos vivos. Os metabólitos secundários são, em geral, micromoléculas e tem uma produção e função particular a cada organismo e espécie⁹.

1.2 - Associação entre plantas e micro-organismos

Os micro-organismos endofíticos, citados anteriormente, são um exemplo de associação com plantas. Há diferentes tipos de interações, podendo ser de forma neutra, benéfica ou prejudicial à planta. As associações neutras se caracterizam pela ausência de competição por nutrientes limitantes no meio entre o hospedeiro e o micro-organismo invasor, não havendo prejuízos para nenhuma das espécies; nas associações benéficas, ambos os organismos obtêm vantagens. Exemplo disso é a interação entre plantas e micro-organismos endofíticos, em que este último produz ou induz a produção de metabólitos de grande importância à planta, os quais são responsáveis, por exemplo, pela diminuição de herbivoria e ataque de insetos¹⁰, aumento da tolerância a estresse abiótico e proteção frente a outros micro-organismos. Em troca a planta proporciona nutrientes ao seu invasor, essenciais ao seu metabolismo. Neste caso, a interação entre estes organismos torna-se fundamental ao seu desenvolvimento, já que nenhum deles poderia conseguir tais metabólitos e vantagens sem a presença do outro¹¹. Por último, as associações prejudiciais ou patogênicas, que causam danos ao hospedeiro pela competição no consumo de nutrientes vitais, como minerais, proteínas, hormônios e carboidratos ou pela produção de fitotoxinas, podendo levar a um nível de parasitismo que chega, em alguns casos, a morte do hospedeiro¹².

Classificam-se os micro-organismos quanto ao local de onde são isolados, podendo ser epifítico, que são os que se encontram na parte externa dos tecidos vegetais, ou endofíticos, aqueles que durante toda ou parte de sua vida colonizam os tecidos internos de seus hospedeiros sem lhes causar efeitos patogênicos. Esta é a definição de PETRINI (1992)⁵, a qual é muito bem aceita na comunidade científica. Porém, o termo endofítico não é sinônimo de mutualista, pois um determinado micro-organismo pode estar mutualista por um estágio de sua vida, sendo que uma condição de estresse pode levá-lo a um estado patogênico. Esta perturbação pode ser causada pela falta de nutrientes, pela competição de outro micro-organismo ou qualquer outro fator que modifique o equilíbrio do meio em que vive¹³.

Existem diversas metodologias de isolamento de micro-organismos endofíticos, as quais tem como princípio a garantia que a superfície da planta sadia (uma planta aparentemente sadia tem menor probabilidade de conter fitopatógenos) seja esterilizada a fim de tê-la livre de qualquer epifítico, sendo então incubada em meios de cultivo apropriados ao crescimento das diversas espécies de micro-organismos. Neste trabalho é adotada a metodologia proposta por PETRINI (1992)⁵, que da mesma maneira que a maioria das técnicas não possibilita a distinção de um mutualista e de um patógeno em estado de latência.

Os tipos de associações não são geneticamente definidos, sendo que um fitopatógeno pode sofrer mutações e crescer em associação mutualista por boa parte de sua vida¹⁴. Da mesma maneira, um crescimento descontrolado de um mutualista pode provocar danos ao hospedeiro, sendo necessário um constante controle do desenvolvimento do invasor por parte da planta¹⁵.

Outra maneira de definir um fitopatógeno é através do postulado de Koch¹⁶. De acordo com os estudos de Robert Koch (1880), um organismo somente é considerado patogênico se satisfazer quatro regras elaboradas através de estudos e observações. São elas:

1. O agente causador da enfermidade deve ser comum a todos os casos observados da doença. A partir daí a cultura deve ser isolada em meio de cultivo artificial.
2. O agente causador da doença em questão não pode ser encontrado em indivíduos saudáveis.
3. Uma vez isolado, o agente deve ser capaz de reproduzir a doença em questão, após a sua inoculação em organismos experimentais.
4. O mesmo agente deve poder ser recuperado desses animais experimentalmente infectados e de novo isolado em cultura pura.

Este postulado não satisfaz as condições de todos os organismos patogênicos, havendo algumas limitações. Por exemplo, vírus que são conhecidos patogênicos, não podem ser isolados em meios de cultura puros, pois dependem do

maquinário celular para sobreviverem. Há também organismos que causam patogenia ao se associarem a outros organismos, os quais se forem encontrados sozinhos não fazem mal ao seu hospedeiro. No caso de micro-organismos endofíticos, estes podem causar patogenia ou não, dependendo das condições em que vivem. Diferentes autores fizeram revisões e criaram interpretações próprias com base no postulado de Koch¹⁶. De maneira geral o postulado apresentado deve ser utilizado, acima de tudo, como guia de estudo de fitopatógenos.

A reinoculação de um micro-organismo endofítico numa planta pode causar patogenia. Algumas fitoalexinas são produzidas através da rota metabólica do Shiquimato (ligninas, lignanas, cumarinas, flavonóides, etc) por intermédio da enzima fenil-alanina-amonialiasa (PAL), esta enzima tem sua produção estimulada por este processo de reinoculação¹⁷.

As micorrizas¹⁸ constituem outro tipo de interação simbiótica importante, as quais são definidas como associação de micro-organismos (fungos ou bactérias) com raízes das plantas (FIGURA 1.1). Podem ser classificadas em endomicorrizas ou ectomicorrizas. Nas endomicorrizas, fungos geralmente zigomicetos penetram nas células corticais do hospedeiro, formando arbustos ou rolos. Já os fungos ectomicorrízicos formam uma camada feltrosa sobre as raízes e uma rede ao redor das células corticais¹⁹.

As micorrizas são vantajosas ao desenvolvimento de ambos os organismos, sendo que o fungo recebe carbono orgânico e em troca auxilia a planta na obtenção de fósforo e outros nutrientes. Isto devido às hifas que aumentam a superfície de absorção das raízes²⁰. Assim, esta relação se mostra extremamente importante, por exemplo, em processos de reflorestamento.

Ao tratarmos os micro-organismos endofíticos como uma rica fonte de metabólitos secundários, torna-se interessante a otimização da produção destas substâncias. Isso se torna possível através do conhecimento dos metabólitos envolvidos na interação fungo-planta, o que possibilita a compreensão dos processos bioquímicos da associação e finalmente um maior controle de produção metabólica.

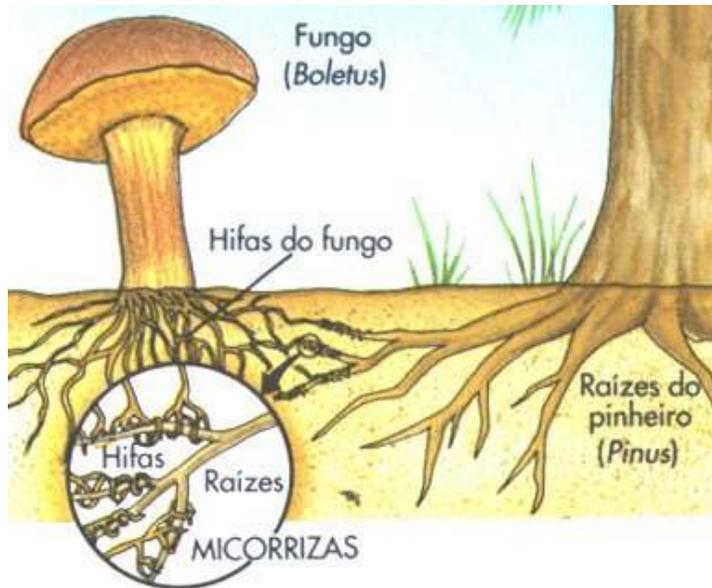


FIGURA 1.1 - Representação de micorriza entre *Pinus* e fungo *basidiomiceto*. A interação ocorre entre as raízes do pinheiro e as hifas do fungo.

A microbiota endofítica de uma planta é característica e fundamental ao controle de pragas e de sua própria manutenção, mesmo no que diz respeito ao controle de fitopatógenos, que poderiam competir por nutrientes essenciais ao hospedeiro.

No momento do ataque de um micro-organismo à planta hospedeira, algumas substâncias sinalizadoras são produzidas pelo fungo e reconhecidas pela planta, fazendo com que sejam impostas barreiras físicas e químicas como meio de defesa, sendo elas acúmulo de ligninas para enrijecimento da parede celular e produção de fitoalexinas, respectivamente. Porém, uma vez que o micro-organismo necessita daquele ambiente para obter nutrientes e sobreviver, este desenvolve mecanismos para conviver com as substâncias produzidas pelas plantas. Este processo pode ocorrer por total degradação das fitoalexinas ou modificações estruturais que as deixem não tóxicas ao micro-organismo, como, por exemplo, hidroxilações, glicosilações ou metilações.

Os metabólitos produzidos pelas plantas, em resposta ao ataque de um invasor, são classificados como secundários, ou seja, não são essenciais à manutenção da vida, como os aminoácidos, carboidratos e lipídios, denominados

metabólitos primários, mas sim biossintetizados de acordo com a necessidade da planta, como uma resposta, por exemplo, a invasão de outros organismos, clima, temperatura ou condições do solo. Este processo de “ataque” e “defesa” estabelece o que podemos chamar de “batalha química” (FIGURA 1.2), deixando sempre uma dúvida sobre a real origem de metabólitos secundários isolados de uma planta.

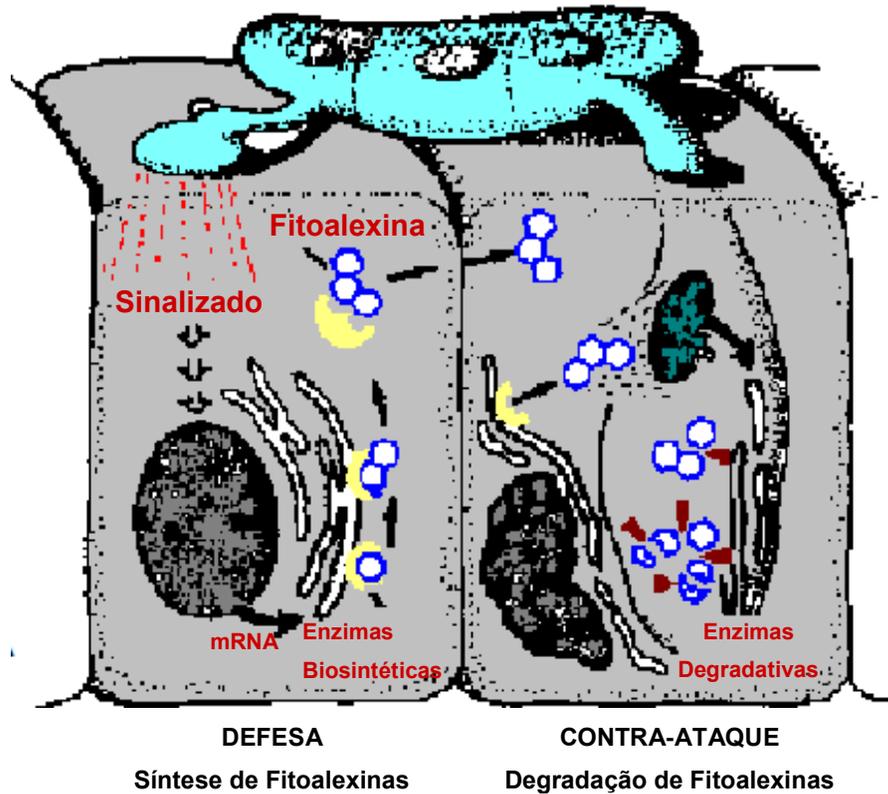


FIGURA 1.2 - Representação da interação bioquímica entre fitopatógenos e plantas.

Ao se avaliar uma interação patogênica é provável que o micro-organismo invasor seja capaz de biossintetizar fitotoxinas *in situ* que inibem o desenvolvimento das plantas. Da mesma forma, uma associação mutualista é viabilizada por substâncias específicas produzidas pelo micro-organismo invasor. São os chamados metabólitos terciários, ou seja, substâncias encontradas nas plantas, provenientes de fontes externas e que podem ser responsáveis pela regulação do mutualismo entre as espécies. Diferem dos metabólitos secundários,

pois estes, apesar de também não serem necessários à vida diária das plantas, são produzidos por elas.

Considerando que sempre pode haver intervenção de um micro-organismo nos metabólitos secundários de uma planta, fica muitas vezes difícil de afirmar a real origem de uma substância. Ela pode ser fruto de biossíntese pura da planta, do micro-organismo ou ter sido produzida pela planta e modificada pelo micro-organismo, de modo a permitir o desenvolvimento mútuo.

É nesta ideia de utilizar o metabolismo de um micro-organismo previamente selecionado para realizar modificações em diferentes substratos que se baseia a biotransformação. Geralmente são utilizadas substâncias provenientes de fontes naturais como precursores. Como veremos a seguir, a biotransformação é também uma ferramenta importante para que possamos compreender melhor a relação planta-micro-organismo. A partir dos substratos produzidos pela planta e fungo, podem-se prever os tipos de enzimas envolvidas na reação e assim compreender a relação bioquímica entre as duas espécies.

1.3 - Biotransformações – aspectos gerais

Biotransformação é o nome que se dá ao processo de conversão de um substrato por um agente biológico envolvendo um número limitado de etapas²¹. Neste tipo de reação as enzimas têm o papel principal na bioconversão, podendo ser utilizadas na forma isolada ou em uma cultura de células que conterá uma diversificada quantidade de enzimas. A utilização da enzima na sua forma isolada permite um maior rendimento de reação e maior facilidade de purificação do produto final; em contrapartida sua utilização dependente de cofatores, temperatura e pH ideais, o que muitas vezes pode deixar o processo mais caro, comparado à utilização de células em crescimento. A TABELA 1.1 resume as principais vantagens ao utilizar cultura de células, enzimas isoladas ou “pool” de enzimas para reações de biotransformações.

TABELA 1.1 - Principais vantagens na utilização de cultura de células, enzimas na forma isolada ou “pool” de enzimas para reações de biotransformação²².

Cultura de células	Enzima isolada	“Pool” de enzimas
Sistema multi-enzimático de fácil formação.	Maior rendimento para um produto específico.	Bom rendimento para uma maior variedade de substratos.
Rápido crescimento	Produto mais facilmente isolado.	Produto mais facilmente isolado
Não necessita cofatores adicionais, já que estão todos contidos na própria célula.	Meio reacional mais limpo ao comparar com cultura de células.	Meio reacional mais limpo ao comparar com cultura de células
Baixo custo de obtenção, manutenção e utilização.	Alta especificidade	

Cada tipo de enzima irá catalisar reações diferentes, sendo que esta característica as coloca em diferentes grupos de classificação. A TABELA 1.2 relaciona as diferentes classes de enzimas com o tipo de reação que catalisam.

TABELA 1.2 - Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação realizado²².

Classes de enzimas	Reação catalisada
Oxidoredutases	Transferência de elétrons
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Hidrólise
Liases	Adição de grupos a ligação dupla e vice-versa
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligação com clivagem de ATP

Os processos biológicos são definidos de acordo com a complexidade do substrato e número de etapas biológicas realizadas. A definição mais simples é a fermentação, que implica na transformação de fontes de carbono, como açúcares e metanol em produtos alvos mais complexos utilizando cultura de células em crescimento. Ao utilizar este mesmo processo, porém com substratos de partida definidos, tem-se a fermentação precursora. Exemplo desta é a produção de pães, queijos e cerveja, que antigamente já era muito explorada, porém sem conhecimento científico do processo. Uma definição mais precisa é a biotransformação, em que

são feitas transformações de precursores conhecidos em uma série de etapas definidas, não sendo todas necessariamente conhecidas, para um produto alvo, podendo ser utilizadas enzimas isoladas ou cultura de células. De modo geral todas essas definições se resumem ao termo biocatálise.

Usando a síntese orgânica clássica como comparação, o uso da biotransformação se justifica em termos práticos, ecológicos e financeiros. Como o próprio nome já diz, faz uso de processos biológicos, mais especificadamente de enzimas, as quais proporcionam enorme enantio, régio e estereosseletividade. Tais propriedades podem ser obtidas através de síntese orgânica. Porém, requerem muitas vezes diversas etapas, que envolvem proteção e desproteção de grupos funcionais, consumindo quantidade apreciável de solventes, reagentes e tempo, muitas vezes resultando em altos custos e baixo rendimento. A enzima possui um sítio ativo que guia sua ação a um determinado grupo, região ou conformação da molécula.

Frente à necessidade de diversas etapas em síntese clássica e a alta quantidade de solvente utilizada, a biotransformação é também uma forma ecologicamente correta de se realizar reações, visto que o meio de cultivo é geralmente aquoso e o resíduo de micro-organismos gerado é totalmente biodegradável. Além disso, a temperatura e pH de reação são em geral amenas, pois a maioria dos micro-organismos não se desenvolve em condições extremas de cultivo.

Na biotransformação utilizando cultura de células de micro-organismos, o procedimento envolve a obtenção e manutenção do micro-organismo para posterior cultivo em presença do substrato de interesse. O micro-organismo pode ser selecionado através de busca na literatura por estudos semelhantes ou pelo processo de screening, ou seja, testar diversas cepas frente a substratos de interesse, buscando resultados específicos que indiquem a presença das enzimas chave, de acordo com o interesse do pesquisador. Este processo de isolamento pode ser guiado pelas próprias fontes de obtenção dos substratos utilizados. Devemos considerar que uma planta possui micro-organismos mutualistas que convivem com os metabólitos ali presentes, assim deve-se esperar dos organismos invasores uma tolerância a esses metabólitos ou a capacidade de metabolizá-los e modifica-los de modo a não prejudicar nenhum dos organismos.

Como mencionado anteriormente, além dos interesses acadêmicos, há ainda interesses para a indústria, como por exemplo, a farmacêutica e de biotecnologia. Os fungos endofíticos compreendem um grupo pouco estudado e apresentam grande potencial para produção de fármacos ou pró-fármacos, como antibióticos, estatinas (agentes redutores de colesterol sanguíneo) e imunossupressores. Além disso, são potenciais produtores de enzimas e metabólitos secundários de alto valor comercial, tornando-se extremamente atrativos ao considerarmos o baixo custo de manutenção e cultivo das cepas para realizar as reações. Finalmente, não demandam solventes nem reagentes específicos resultando em menor custo e praticidade quando comparados à síntese orgânica clássica.

1.4 - Conservação de micro-organismos endofíticos

Os métodos de conservação de micro-organismos podem ser de curto, médio e longo prazo e se baseiam na transição reversível de um estado de biose, ou seja, um estado vital ativo, a um estado de anabiose (estado vital inativo) ou de hipobiose (estado de baixa atividade). São mais eficientes os métodos que fazem transição para o estado anabiótico, que são os métodos de conservação para longo prazo.

O repique contínuo é uma técnica de curto prazo comumente utilizada, ideal para utilização constante da cepa, possibilitando a preservação por um prazo de em média 30 dias. Porém, é passível de mutações a cada novo crescimento do micro-organismo e contaminações, principalmente devido à necessidade constante de manuseio, devendo sempre haver uma forma alternativa de preservação. Métodos de médio prazo têm como objetivo atingir a hipobiose do micro-organismo e são muito utilizados, possibilitando conservação por até sete anos dependendo da espécie e metodologia adotada. São exemplos à conservação em água estéril (método de Castelani), conservação em óleo mineral, congelamento comum e secagem. Finalmente como exemplo de técnicas de conservação em longo prazo

tem-se a liofilização, congelamento em ultrafreezer e criopreservação em nitrogênio líquido, devendo os dois últimos utilizarem crioprotetores para não lisar as células que estarão sendo armazenadas²³.

Muitos compostos podem ser obtidos diretamente das plantas ou mesmo através de síntese orgânica, porém a produção utilizando micro-organismos oferece algumas vantagens. O rendimento é um fator determinante, visto que a alta razão superfície/ volume em cultivos de micro-organismos possibilita uma rápida incorporação dos nutrientes, metabolismo e biossíntese. Também, a fácil adaptação permite o cultivo em diferentes meios artificiais, gerando uma versatilidade nos experimentos em relação aos custos de produção. Mas, o que realmente atrai os pesquisadores é a grande quantidade de enzimas que as diferentes espécies podem proporcionar, fazendo deste um mercado extremamente rico a ser explorado.

Os estudos realizados no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) têm foco nos micro-organismos endofíticos de modo a melhor compreender a relação existente entre a planta e o fungo. A biotransformação além de gerar interesses comerciais como descoberta de enzimas e melhoria de atividade em substâncias é uma excelente ferramenta para estudo, já que através dos metabólitos produzidos e/ou modificados por cada organismo pode-se compreender melhor a relação bioquímica entre as espécies.

1.5 - Estudos metabólicos já relatados na literatura

Há na literatura muitos estudos de biotransformação utilizando fungos endofíticos e substratos terpenoídicos, como oleananos, lanostanos e terpenos glicosilados.

Shirane e colaboradores (1996) descrevem a utilização do *Chaetomium longirostre* para a obtenção de derivados oxigenados de triterpenos pentacíclicos. Dois exemplos relatados são a clivagem do anel A e hidroxilação do ácido oleanólico. A proposta biossintética é baseada na detecção de uma lactona de 7

membros, a qual sugere oxidação tipo Baeyer-Villiger na cetona derivada da hidroxila ligada ao carbono 3, seguida de hidrólise da lactona resultante. A FIGURA 1.3 representa a proposta de biotransformação, sendo que a hidroxilação do C-21 ocorre em etapa posterior à clivagem do anel A²⁴.

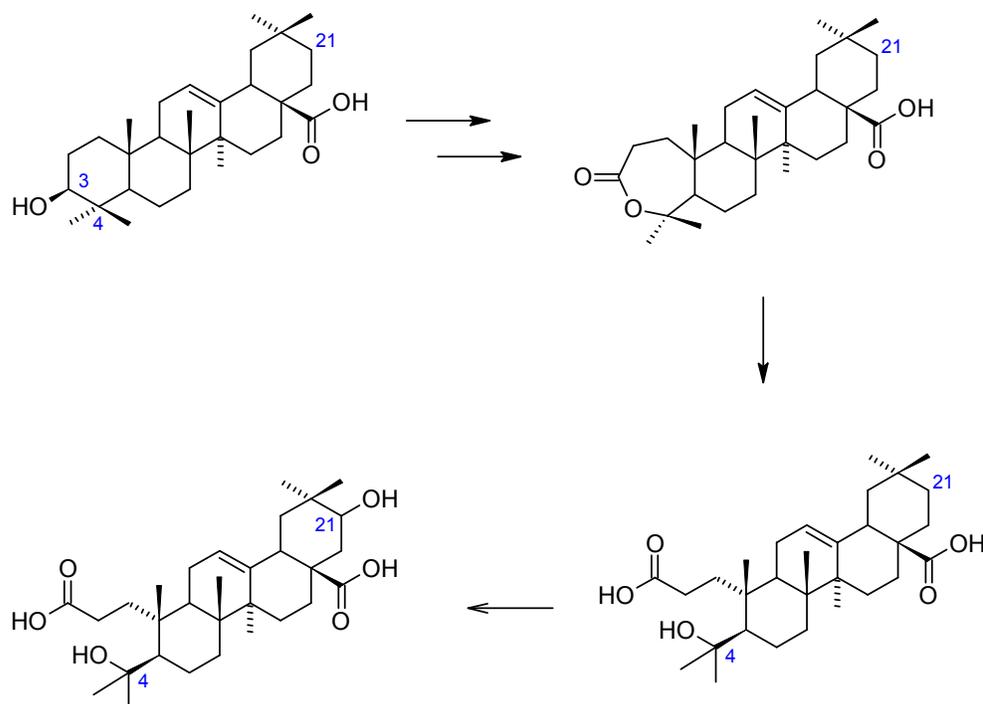


FIGURA 1.3 - Caminho de biotransformação do ácido oleanólico por *Chaetomium longirostre*, havendo lactonização no C-3, com posterior abertura do anel. Em etapa posterior há hidroxilação do C-21²⁴.

Analogamente ao ácido oleanólico, foi a algum tempo relatada a biotransformação do triterpeno lanostano ácido eburicóico também com clivagem do anel A, em mecanismos que sugerem a ação de enzimas Baeyer-Villigerases²⁴ (FIGURA 1.4).

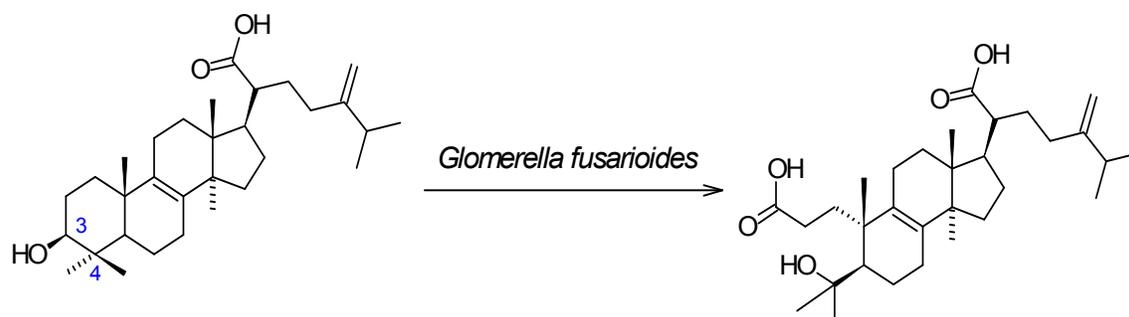


FIGURA 1.4 - Biotransformação do ácido eburicoico pelo fungo *Glomerella fusarioides* via clivagem oxidativa do anel A.

Em estudos mais recentes verificou-se a formação do metil éster de ácido oleanólico pelo fungo *Nocardia* sp. utilizando ácido oleanólico como substrato inicial²⁵ (FIGURA 1.5).

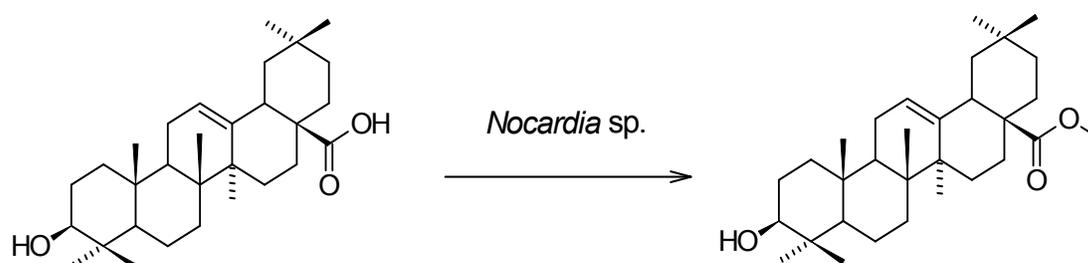


FIGURA 1.5 - Biotransformação do ácido oleanólico pelo fungo *Nocardia* sp. produzindo o metil éster de ácido oleanólico.

Outro terpeno ao qual têm-se dispensado grande atenção é o Steviosídeo, um glicosídeo de aglicona diterpênica da classe dos kauranos (FIGURA 1.6), isolado da planta *Stevia rebaudiana*, um tipo de arbusto pertencente a família dos crisântemos. Esta substância vem sendo utilizada como adoçante natural, sendo que o poder adoçante do extrato da planta chega a ser de 70 a 400 vezes maior que o açúcar comum. Outras características de conhecimento popular são ausência de calorias, inibição da formação de placa e cárie dentária além de não causar diabetes. Estes pontos proporcionam grande ascensão neste mercado, atraíndo a atenção de muitos pesquisadores. O estudo feito em 2007 por B.H. de Oliveira et al.

²⁶ mostrou uma desglicosilação gradativa realizada pelo micro-organismo *Gibberella fujikuroi*. Porém o resultado final do metabolismo do fungo utilizado foi o acúmulo dos produtos Rebaudiosídeos A e B, também encontrados em menor quantidade no extrato de *Stevia rebaudiana*, indicando transferência de resíduos de glucose de uma molécula para outra.

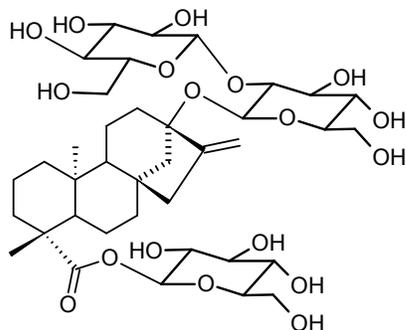


FIGURA 1.6 - Estrutura molecular do steviosídeo.

Resultados como os ilustrados anteriormente é que proporcionam grandes incentivos ao contínuo estudo dessa ferramenta tão poderosa que é a biotransformação. O conhecimento da relação bioquímica entre espécies tão íntimas pode proporcionar muitos avanços em áreas como a biotecnologia, principalmente com relação à melhora de atividade biológica em potenciais fármacos e melhora de rendimento produtivo.

1.6 - Seleção do micro-organismo *Xylaria* para estudo metabólico

O fungo endofítico do gênero *Xylaria* foi alvo de estudos em trabalhos anteriores do grupo LaBioMMi - UFSCar, sendo obtidos resultados interessantes, os quais mereciam continuidade nos estudos. Amaral e colaboradores (2008)²⁷, isolaram o micro-organismo endofítico *Xylaria* dos frutos de *Sapindus saponária*, uma planta que apresenta alta concentração de saponinas nos frutos. Essas substâncias são

conhecidas principalmente pela atividade antifúngica, o que torna extremamente curiosa a capacidade de mutualismo planta-fungo neste ambiente aparentemente inóspito ao fungo. Apenas este resultado pode nos dar algumas pistas sobre a capacidade enzimática do endofítico isolado, ou seja, capacidade de metabolizar saponinas, tornando-as não tóxicas ao seu metabolismo e desenvolvimento.

Em um trabalho anterior do grupo LaBioMMi realizado por MURGU e colaboradores (2008)²⁸ foi confirmada esta capacidade de biotransformar saponinas. Do mesmo fruto onde foi isolada a espécie de *Xylaria* foi obtida uma saponina de esqueleto triterpênico, a qual foi colocada em meio de cultivo contendo o fungo. Este por sua vez, adicionou uma hidroxila ao C-22 da aglicona (FIGURA 1.7). Essa observação mostrou a capacidade do sistema enzimático que este micro-organismo possui de metabolizar saponinas (geralmente tóxicas a fungos), justificando o mutualismo existente em ambiente rico nesta substância.

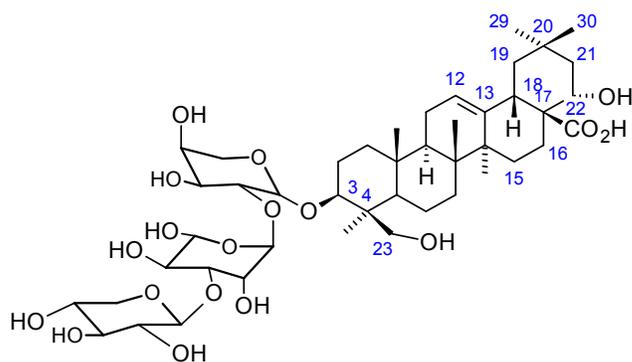


FIGURA 1.7 - Hidroxilação no C-22 de saponina isolada de *Sapindu saponaria* por espécie de *Xylaria* isolada de mesma fonte.

Os estudos com *Xylaria* tiveram continuidade no grupo LaBioMMi – UFSCar, porém utilizando outra cepa (FIGURA 1.8 – A), a qual foi isolada de *Cupressus lusitanica* (FIGURA 1.8 – B), uma árvore popularmente conhecida como “pinheirinho” que é muito utilizada como cerca viva e para a produção de madeira.

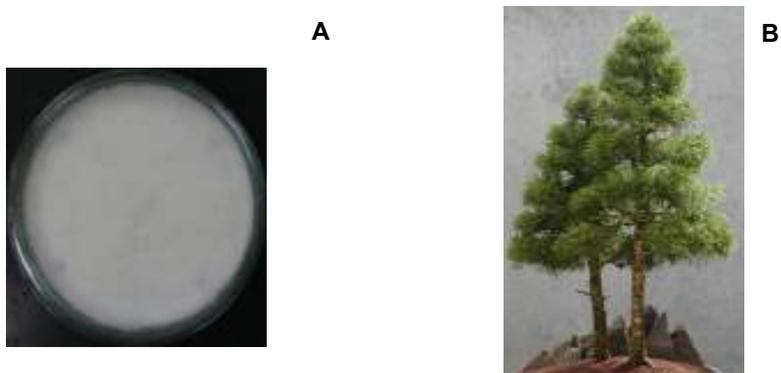


FIGURA 1.8 - Espécie de *Xylaria* (A) utilizada na continuidade dos estudos no grupo LaBioMMi – UFSCar isolada de *Cupressus lusitanica* (B)

Anteriormente foi verificada a capacidade de uma espécie de *Xylaria* em metabolizar as saponinas encontradas em seu habitat natural. Assim, com uma nova espécie isolada de outro hospedeiro, esta característica é verificada. Além disso, investigar a seletividade de reconhecimento desse tipo de estrutura pelo micro-organismo, ou seja, se é seletivo a apenas um tipo de saponina ou classe terpênica.

1.7 - Escolha dos substratos utilizados

Conhecendo-se a capacidade de metabolizar saponinas pela *Xylaria*, decidiu-se verificar as particularidades desta propriedade. Diferentes substratos foram selecionados e adicionados ao micro-organismo em crescimento. Em geral, os substratos são de esqueleto terpênico, com ou sem glicosilações. A seguir estão descritas e justificadas cada uma das substâncias utilizadas nos experimentos.

1.7.1 - Acido Oleanólico

No estudo de biotransformação do ácido oleanólico (FIGURA 1.9) é utilizado o fungo endofítico *Xylaria*, o qual já tem estudada biotransformação da saponina contida nos frutos de *Sapindu saponaria*. Experimentos utilizando a aglicona somariam importantes informações a respeito do metabolismo da *Xylaria*. Porém a hederagenina não é facilmente obtida de fontes naturais. Como alternativa utilizou-se ácido oleanólico, o qual possui grande semelhança estrutural, mesma rota biossintética (FIGURA 1.10), diferindo apenas pela ausência da hidroxila ligada ao C-23.

A partir do 2,3-oxidoesqualeno em conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco é obtido o cátion damarenil. Na sequência há expansão do anel com mudança do carbocátion terciário para secundário, formando o cátion baccharenil. O carbocátion secundário é menos estabilizado ao compararmos ao terciário, porém a reação é justificada pela rápida assistência do par de elétrons da ligação dupla na cadeia lateral ao carbono eletrodeficiente, formando um novo anel de cinco membros – cátion lupanil. Este sofre nova expansão de anel tendo o carbocátion secundário formado estabilizado por sucessivas migrações de hidreto e formação de instauração entre os carbonos 12 e 13. Esta última etapa gera a β -amirina, precursor direto do ácido oleanólico, sendo que o substrato de interesse é formado após a última etapa de oxidação.

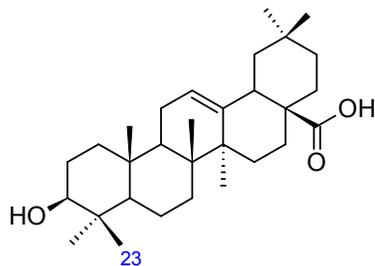


FIGURA 1.9 - Estrutura molecular do ácido oleanólico.

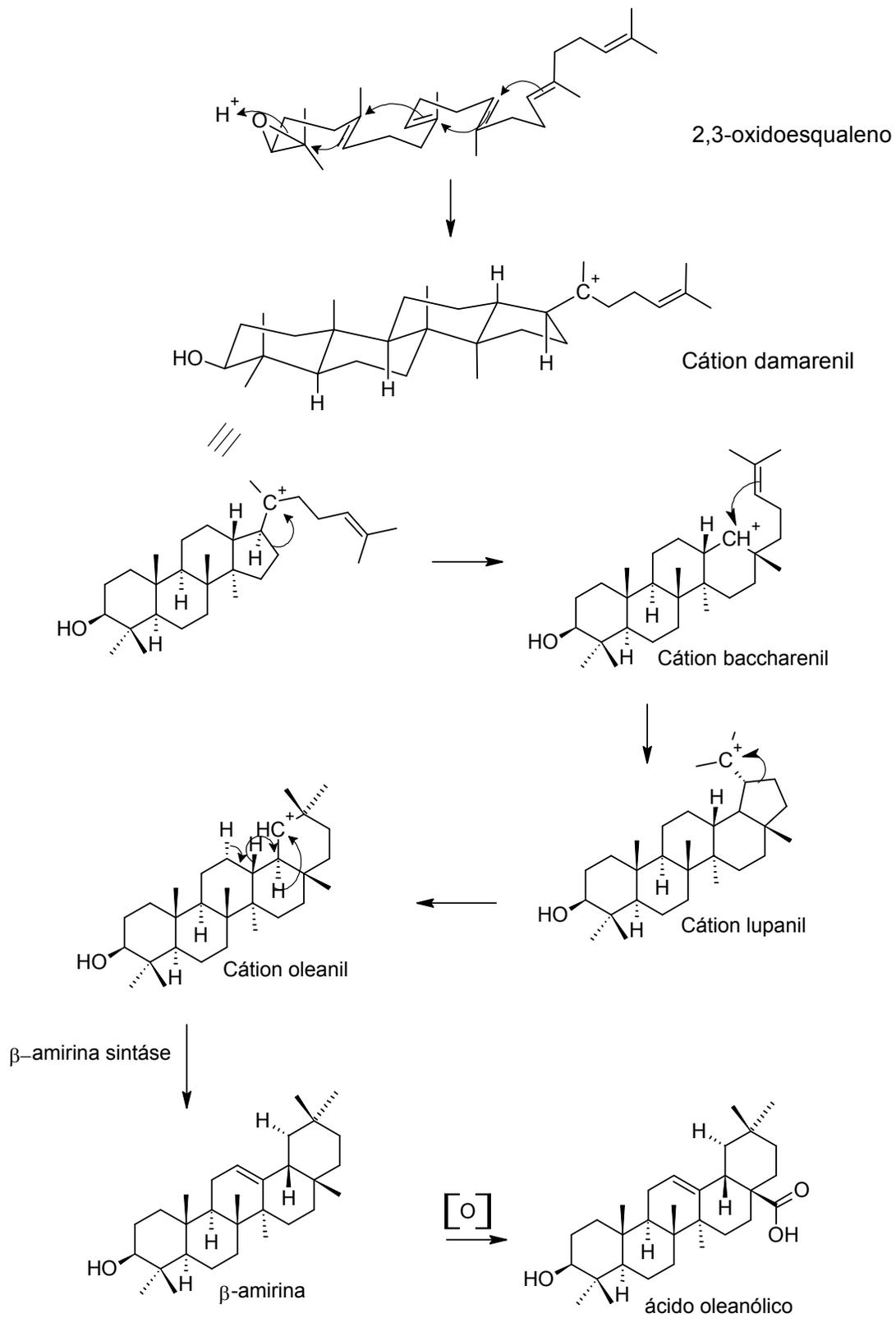


FIGURA 1.10 - Biossíntese do ácido oleanólico a partir do 2,3-oxidoesqualeno²⁹.

Foi necessária escolha cuidadosa de uma fonte natural deste composto, visto que a maioria das espécies de plantas que contem ácido oleanólico, contem também ácido ursólico (FIGURA 1.11) associado em grande quantidade.

A fonte natural considerada ideal para obtenção do substrato foi o cravo-da-índia, pois possui grande quantidade da substância de interesse e principalmente pela ausência do isômero citado anteriormente, o qual poderia dificultar o isolamento do triterpeno alvo.

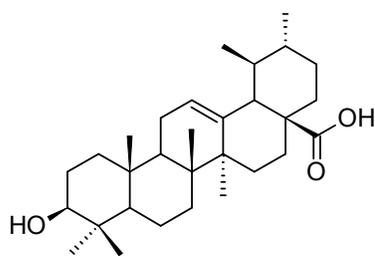


FIGURA 1.11 - Estrutura molecular do ácido ursólico

Além desta molécula, outras são utilizadas neste trabalho para que se conheça melhor esta relação, ainda pouco explorada, entre planta e micro-organismo endofítico. Como exposto anteriormente, a estratégia deverá seguir por substâncias que possuem alguma característica em comum, como glicosilações ou classe do esqueleto principal, de modo a buscar os pontos onde possa haver alguma seletividade por parte do metabolismo do fungo.

1.7.2 - Steviosídeo

Este diterpeno glicosilado, como mencionado anteriormente, é amplamente utilizado como adoçante natural, trazendo a proposta de não conter calorias como o açúcar natural, e ser uma opção ao aspartame³⁰. Apesar de ser comercializado faz algum tempo há estudos em que é relatada toxicidade da

aglicona³⁰⁻³³, indicando ser carcinogênica. Dessa forma, maior atenção deve ser dada se relatada produção da aglicona por micro-organismos, investigando as condições responsáveis por esta bioconversão de modo a prevenir formação de derivados tóxicos nos produtos comercializados. O estudo do comportamento metabólico da *Xylaria* frente ao esteviosídeo torna-se uma importante contribuição aos avanços científicos nesta área.

O Steviol é precursor do Steviosídeo, sendo a biossíntese iniciada a partir do geranylgeranyl-difosfato (FIGURA 1.12). A protonação da dupla ligação gera um carbocátion terciário, o qual permite uma série de ciclizações concertadas e termina na perda de um novo próton. Na sequência a saída do grupo OPP gera uma dupla ligação terminal, que para estabilizar o carbocátion forma um biciclo dando origem ao cátion beyerani. Porém este cátion tem sua carga localizada em carbono secundário, impulsionando assim uma migração de ligação sigma e formação de carga positiva com presença de três grupos ligados estabilizando esta deficiência eletrônica. Este processo seguido da perda de um próton para formação da olefina terminal, é que forma o esqueleto básico do steviosídeo, sendo as etapas subsequentes oxidações e glicosilações³⁴.

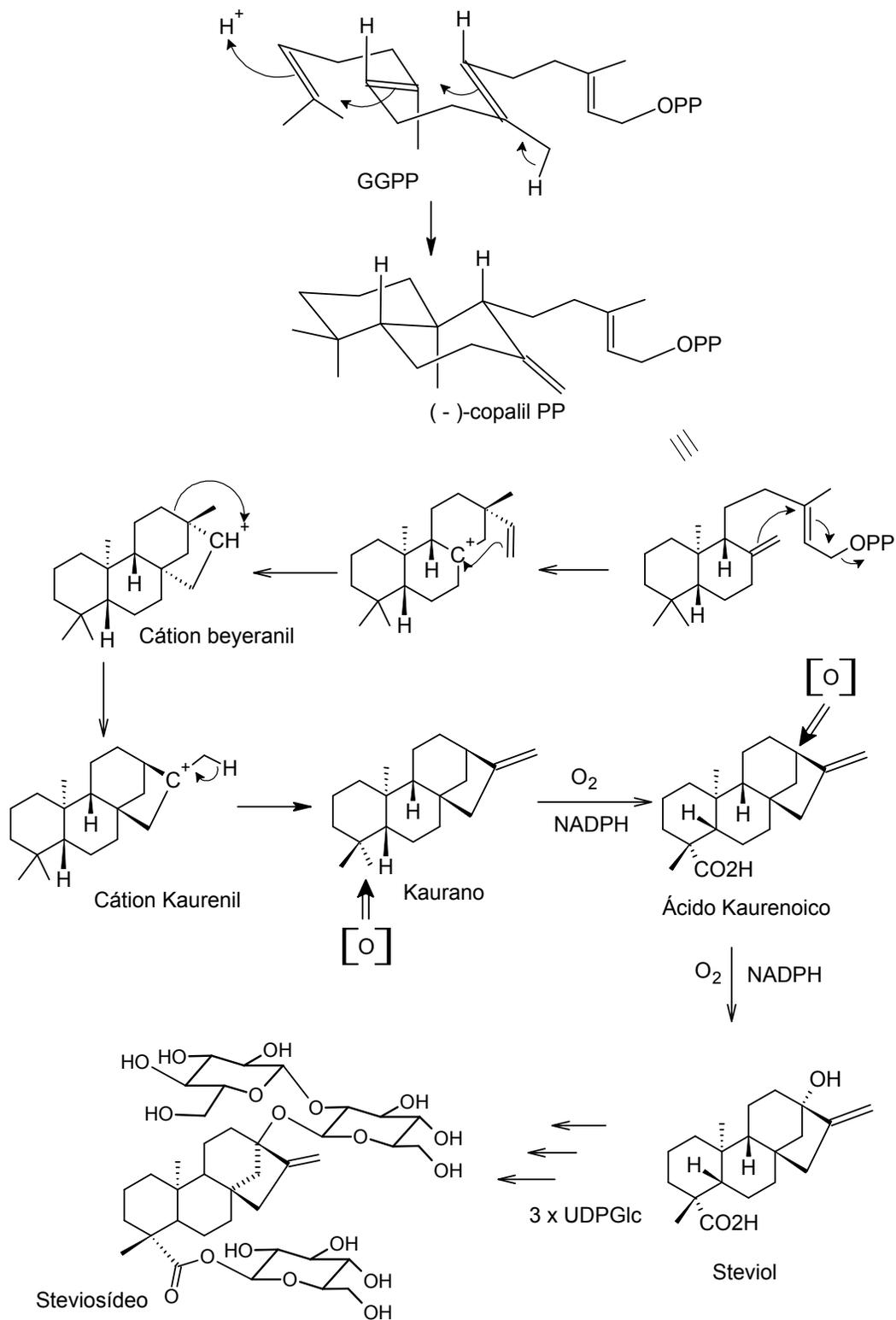


FIGURA 1.12 - Biossíntese do Steviosídeo a partir do Geranilgeranil - difosfato²⁹.

1.7.3 - Triterpenos lanostanos

Em trabalho anterior feito pelo grupo LaBioMMi, foram isolados triterpenos lanostanos do corpo de frutificação do fungo *Pisolithus tinctorius*³⁵, o qual pertence à classe dos Basidiomycetes e a família Sclerodermataceae. Este fungo é obtido em lugares próximos às espécies vegetais do gênero *Eucalyptus* formando ectomicorrizas, uma relação mutualista entre fungos e raízes de plantas de extrema importância que proporciona à planta hospedeira uma melhor absorção de sais minerais³⁶ e produção de fitohormônios que estimulam o crescimento³⁷.

Além disso, exercem um papel de proteção ao hospedeiro contra alguns micro-organismos fitopatogênicos, sendo que sua atividade antifúngica foi constatada no trabalho de Tsantrizos e Kope (1991)³⁸. Devido a essas propriedades, este tipo de fungo é muito utilizado em programas de reflorestamento ambiental.

O metabolismo secundário de fungos formadores de micorrizas é composto por substâncias como ácido pulvínico e ergosterol, além de triterpenos³⁹, os quais podem possuir atividade antiviral, imunossupressora, anti-inflamatória e citotóxica. Levando em conta a importância ambiental da espécie e a necessidade de avançar os estudos já realizados com *Pisolithus tinctorius*, decidiu-se estudar o *Scleroderma* sp., o qual pertence à mesma família do *P. tinctorius*, porém encontra-se normalmente em associação simbiótica com raízes de *Pinus*. Sobre esta outra espécie há ainda poucos estudos na literatura, o que justifica a preocupação em conhecer melhor esse basidiomycete.

O *Scleroderma* sp. possui grande quantidade de triterpenos lanostanos ainda pouco estudados, dos quais o Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol e o Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol (FIGURA 1.13) são encontrados em grande quantidade neste fungo.

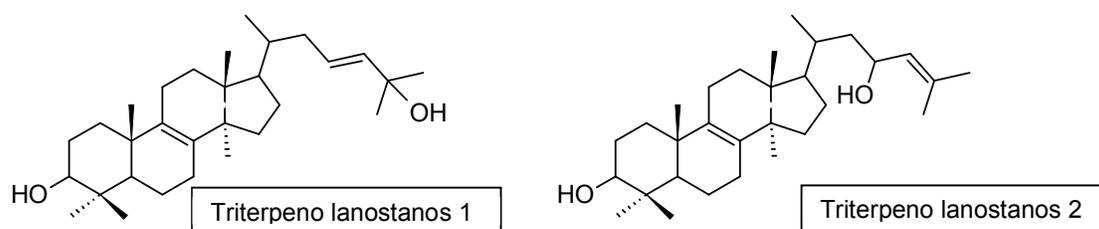


FIGURA 1.13 - Estruturas moleculares dos triterpenos lanostanos isolados do fungo *Scleroderma sp.* Triterpeno lanostanos 1: Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol; Triterpeno lanostanos 2: Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol.

Ao analisarmos do ponto de vista biossintético, veremos que os triterpenos lanostanos isolados partem do mesmo precursor que o ácido oleanólico, o 2,3-oxidoesqualeno, porém numa conformação cadeira-barco-cadeira-barco. Esta conformação irá permitir a sequência de reações e migrações que irá gerar o lanosterol, precursor mais próximo das substâncias obtidas (FIGURA 1.14).

A pesquisa desta classe de compostos frente à *Xylaria sp.* pode somar muitas informações sobre o metabolismo existente desse fungo frente aos triterpenos, possibilitando maior entendimento quanto as enzimas presentes, abrindo caminho para novas pesquisas visando, por exemplo, aumento de atividade de potenciais fármacos. No caso dos triterpenos lanostanos em questão, a pouca quantidade de estudos realizados torna-se ainda um incentivo a utilização deste substrato em experimentos de biotransformação.

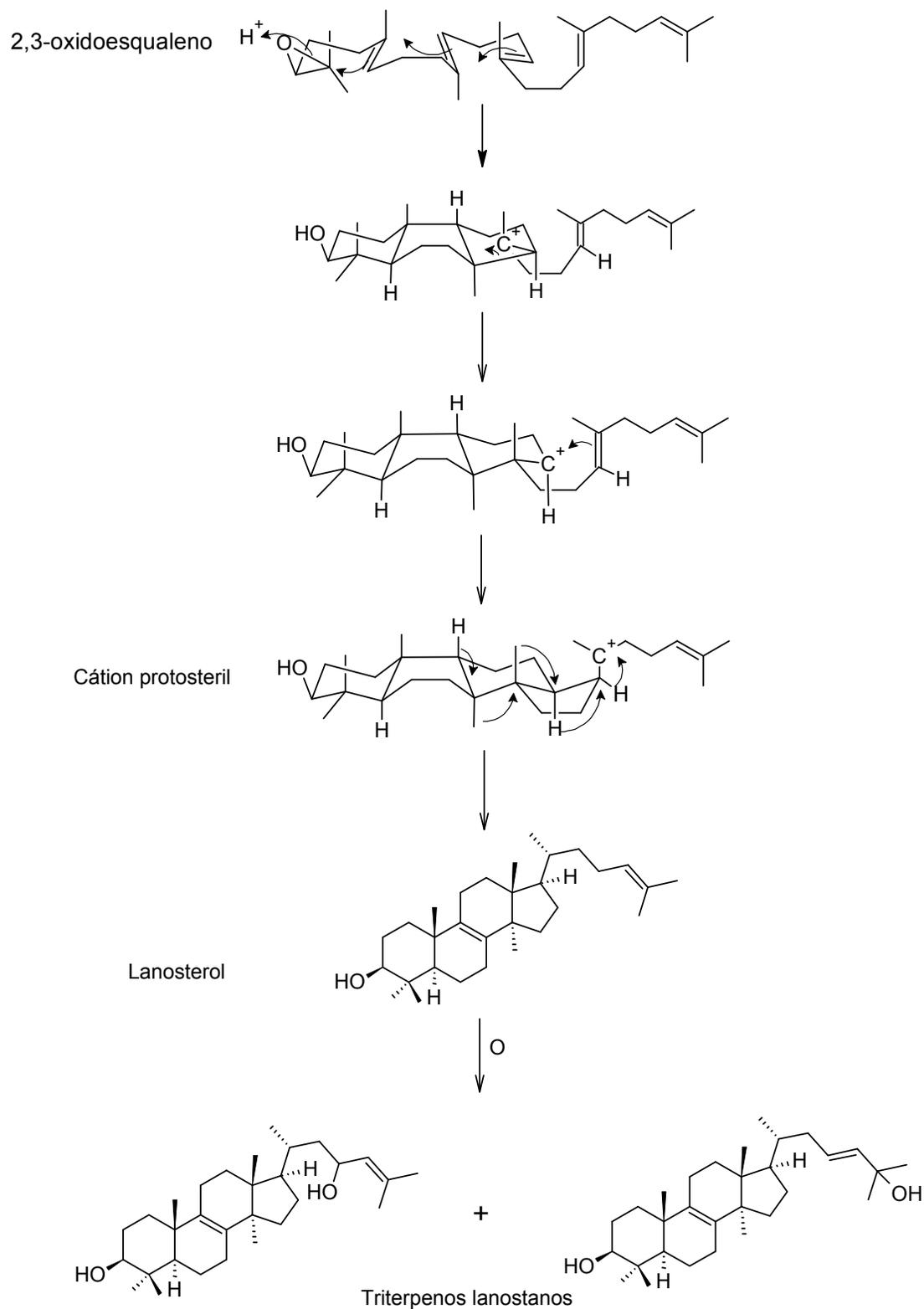


FIGURA 1.14 - Biossíntese a partir do 2,3-oxidosqualeno dos triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp²⁹.

1.7.4 - Avenacosídeos A e B

Os avenacosídeos são metabólitos secundários encontrados na aveia, uma planta pertencente à família *Poaceae* e gênero *avena*, a qual tem aproximadamente 450 espécies, sendo as mais cultivadas a *Avena sativa* e *Avena byzantina*. Este cereal diferentemente de outras plantas produz dois tipos diferentes de saponinas. Nas raízes são encontradas avenacinas, uma série de quatro saponinas triterpênicas com aglicona diferentes entre elas, porém idêntico padrão de glicosilação ligados ao C-3. Já nas folhas são encontrados os avenacosídeos A e B (FIGURA 1.15), de esqueleto esteroidal idêntico e padrão de glicosilação em C-26 e C-3 diferindo em uma única unidade de açúcar ligada ao C-3 da aglicona ⁴⁰.

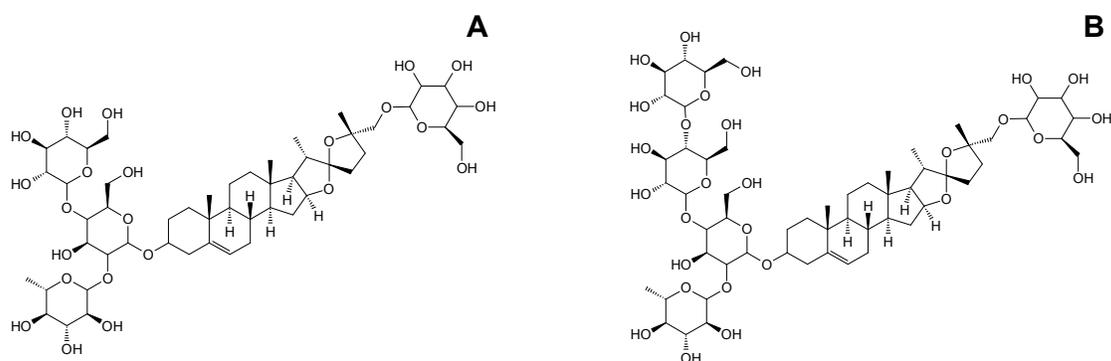


FIGURA 1.15 - Saponinas presentes na *Avena sativa*. Avenacosídeo A (A) e avenacosídeo B (B).

A biossíntese dos avenacosídeos A e B (FIGURA 1.16) deriva de um esqueleto esteroidal de 27 carbonos, o colesterol, em que a cadeia lateral é convertida em uma estrutura espirocetal. A produção dos Avenacosídeos parte de oxidações nos C-16, C-22 e C-26 do colesterol, seguido de nova oxidação em C-22 com formação de cetona. O ataque da hidroxila ligada ao C-16 à carbonila em C-22, forma a estrutura cíclica de 5 membros, com o heteroátomo oxigênio.

Na sequência ocorre glicosilação do C-26, oxidação no C-25 e perda da hidroxila ligada ao C-22, sendo que esta última se dá pela captura de um próton do meio. Esta perda de água causa uma deficiência eletrônica que é momentaneamente estabilizada pelo par de elétrons do oxigênio α ao carbono com

caráter positivo (C-22). Esta deficiência eletrônica é então estabilizada pelo ataque da hidroxila ligada ao C-25, deslocando novamente o par de elétrons para o oxigênio e formando o segundo ciclo de 5 membros em estrutura espiro. Finalmente, sucessivas glicosilações formam os Avenacosídeos A e B.

As saponinas esteroidais possuem propriedades biológicas similares às saponinas triterpênicas como, por exemplo, a atividade surfactante, sendo muito encontradas em famílias de monocotiledôneas. Há diversos relatos dos benefícios proporcionados pela aveia, sendo alguns de cunho científico como a aplicação do extrato alcoólico como um dissuasivo ao tabagismo⁴¹, e outros que são ainda apenas crenças populares, sendo citada ação antitumoral, antiespasmódico, demulcente, diurético, estimulante e tônico⁴². Diferentemente da aglicona do esteviosídeo, não há pesquisas até o momento relatando a toxicidade ou estudos clínicos com a aglicona dos avenacosídeos (nuatigenina)⁴³.

Com tantos relatos na cultura popular ou em pesquisas de maior credibilidade, torna-se interessante o estudo dos avenacosídeos A e B, inserindo-os no objetivo deste trabalho, ou seja, utilizando as saponinas da aveia em experimentos de biotransformação de modo a testar a seletividade do micro-organismo para este substrato.

Em situações normais os avenacosídeos são armazenados nos vacúolos das células da epiderme da folha de aveia e nesta forma são inativos. Em resposta a algum ataque ou ferimento, a planta produz enzimaticamente uma forma ativa através de desglicosilação do C-26, produzindo 26 desglucoavenacosídeos (26-DGAS). As cadeias de açúcar ligadas ao carbono 3 são responsáveis pela ação antifúngica das saponinas da aveia, sendo que a remoção de uma única unidade de glicose reduz fortemente a atividade biológica desta substância.

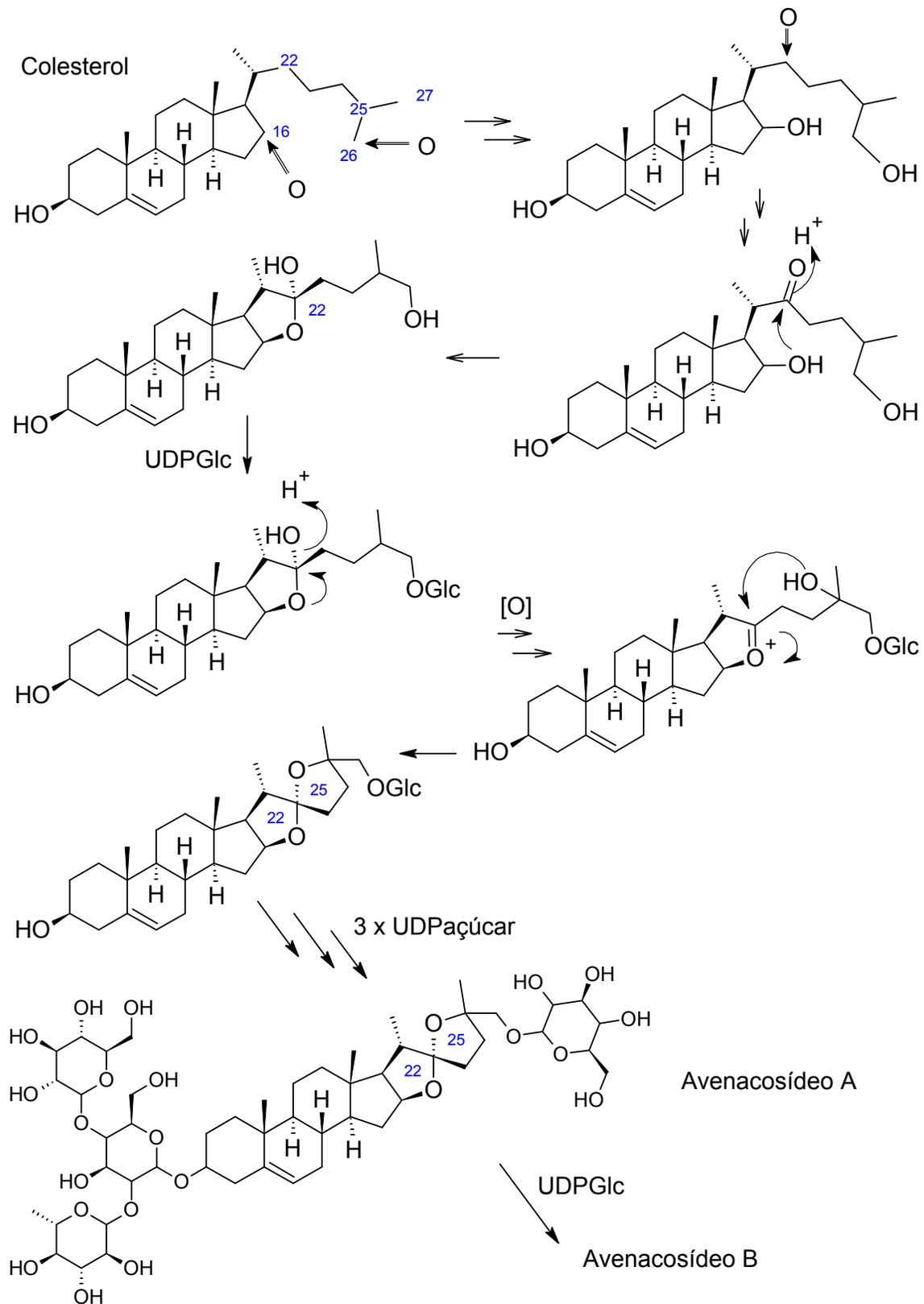


FIGURA 1.16 - Biossíntese, a partir do colesterol, para as saponinas presentes na aveia - Avenacosídeo A e Avenacosídeo B²⁹

Morrissey e colaboradores (2000)⁴⁴ mostraram clivagem enzimática de unidades de açúcar ligadas ao C-3 dos avenacosídeos, pelos fungos *Drechslera avenacea* e *Stagonospora avenae* presente nas folhas da aveia⁴⁴, mostrando a capacidade desses micro-organismos em detoxificar essas saponinas para que possam viver em mutualismo neste ambiente hostil (FIGURA 1.17).

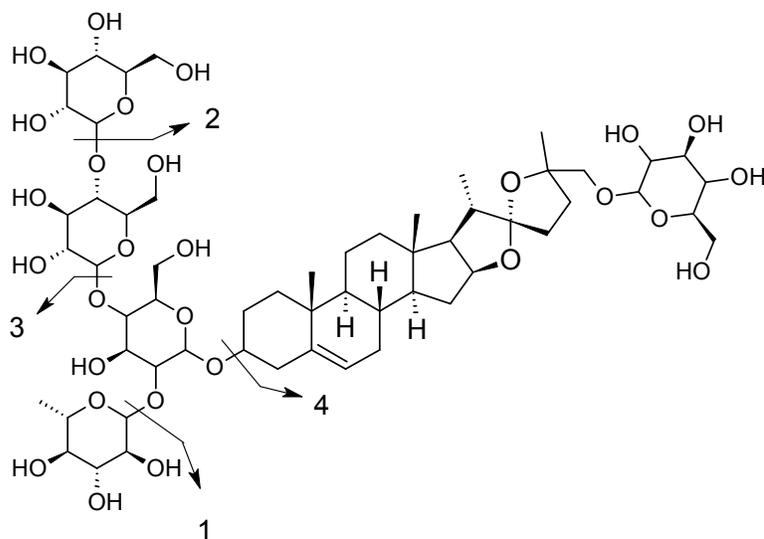


FIGURA 1.17 - Hidrólise dos resíduos de açúcar ligados ao C-3 do avenacosídeo B pelas enzimas do micro-organismo *Stagonospora avenae*. As ordens de clivagem estão numeradas de 1 (primeira) à 4 (última). A unidade de açúcar ligada ao C-26 é hidrolisada enzimaticamente pela planta em resposta a ataques de micro-organismos ou danos.

O micro-organismo *Xylaria*, como descrito anteriormente, tem relatada atividade contra algumas saponinas específicas, as quais tem potencial antifúngico por definição. Dessa forma, a verificação da capacidade desse mesmo micro-organismo em metabolizar outra classe de substância com característica antifúngica e que tem já reportada sua degradação através de outros micro-organismos, torna os estudos interessantes à pesquisa científica.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Estudo do metabolismo de terpenóides no micro-organismo endofítico do gênero *Xylaria*, de modo a melhor compreender a correlação existente entre a planta e o fungo.

2.2 - Objetivos detalhados:

- Isolar através de técnicas cromatográficas, identificar e caracterizar novos triterpenos de *Scleroderma* sp., através das técnicas de RMN e espectrometria de massas
- Desenvolver metodologias de extração e análises via HPLC-DAD e LC/MS de produtos oriundos do metabolismo de terpenóides em *Xylaria* sp.
- Adicionar diferentes terpenóides ao meio de cultivo de *Xylaria* sp., de modo a verificar a seletividade do micro-organismo frente aos substratos.
- Estudar em especial, o comportamento do fungo junto à saponinas, levando em consideração que já é relatada biotransformação de saponina triterpênica por outra espécie de *Xylaria*.
- Identificar possíveis produtos de biotransformação, a partir dos diferentes substratos administrados ao meio de cultivo do micro-organismo.

3 - Materiais e métodos

3.1 - Equipamentos

a) Espectrômetros de RMN:

- BRUKER ARX 200;
- BRUKER DRX 400.

b) Espectrômetros de Massas:

- MICROMASS QuattroLC, (triplo-quadrupolo);
- Agilent Q-TOF 6510

c) HPLC

- Waters Alliance 2695: Detector de UV (PDA) para HPLC Waters 2996 e Waters 2695 Separations Module.
- SHIMADZU: controladora SCL-10Avp, bombas LC-10AD e LC-10ADvp, auto injetor SIL-10ADvp, detector SPD-M10Avp PDA e degaseificador DGU-14A.
- Agilent 1200 series: Detector de UV (PDA), bomba quaternária, degaseificador, auto injetor com controle de temperatura e forno para coluna.

d) Evaporadores Rotativos:

- Rotaevaporador Tecnal (TE 120)
- Rotaevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)

e) Câmara de Fluxo Laminar:

- Veco VL FS-12M;
- Pachane.

f) Autoclave Vertical:

- Phoenix AV 70;

- Phoenix AV 75;

- g) Triturador Turratec Tecnal;

- h) Mesa Incubadora Rotativa Tecnal TE 140;

- i) Banho de ultrasom BRANDSON 1510;

- j) Balança analítica Tecnal;

- k) Estufa de secagem Quimis;

- l) BOD (Biochemical – Oxygen – Demand) Technal TE 391;

3.2 - Materiais Cromatográficos

- a) Suportes para Cromatografia:
 - Sílica gel 70-230 Mesh
 - Sílica gel 230-400 Mesh
 - ODS
 - Sephadex™

- b) Colunas cromatográficas:
 - PHENOMENEX Synergi 4 μ Fusion 250 x 4.6mm (5 μ de diâmetro de poro);

- Agilent Extend C-18 5 μ 2.1x150 mm

c) Cartucho de SPE Supelco C-18 – 500 mg/ 6 mL;

3.3 - Reagentes e materiais utilizados

a) Solventes:

- Solventes destilados no departamento de química, utilizados em cromatografia de coluna de bancada;
- Solventes grau HPLC Merck®, Aldrich®, Tedia e JT Baker
- Solventes PA Merck, Synth, Vetex, Reagen e outros
- Solventes deuterados MERCK® e ALDRICH® (98,0 – 99,9 %), para a obtenção dos espectros de RMN.
- Água purificada em aparelho Milli-Q;

b) Meios de cultura:

- BDA (Batata inglesa, Dextrose e Agar);
- BEA (Batata inglesa, Stevita® e Agar)
- C'zapek:
 - ✓ Sucrose
 - ✓ NaNO₃
 - ✓ MgSO₄·7H₂O
 - ✓ KCl
 - ✓ FeSO₄·7H₂O
 - ✓ K₂HPO₄
 - ✓ Agar
 - ✓ Extrato de Levedura

c) Papel de filtro:

- JProLab, JP40 Quantitativo $\varnothing = 12.5$ cm
- INLAB tipo 10, porosidade 3,0 μm

d) Tubo padrão de sulfato de bário (Escala de McFarland: 1 x 10⁸ cel/mL)

3.4 - Obtenção dos Substratos

3.4.1 - Ácido Oleanólico

Para a extração de ácido oleanólico foi utilizado cravo da Índia moído, adquirido já nesta forma no comércio da cidade de São Carlos-SP.

Dois quilos do material foram extraídos em 600 mL de metanol e acetato de etila (3:7) por 6 vezes. Após concentrar todo extrato bruto em evaporador rotativo, o resíduo obtido foi lavado por 3 vezes com 200 mL de éter de petróleo, uma mistura de hidrocarbonetos, como hexano, 2-metilpentano, heptano e pentano.

Em uma segunda etapa, o extrato foi purificado em duas colunas cromatográficas de bancada, com filtro de placa sinterizada, utilizando sílica gel 230-400 Mesh e pressão negativa. Utilizaram-se colunas de 7,5 cm de diâmetro e 25 cm de altura de sílica. A eluição foi feita de forma gradiente da menor para maior polaridade de solventes (TABELA 3.1):

TABELA 3.1 - Sequência de eluição para as colunas 1 e 2 de extrato de cravo da Índia.

Coluna 1		
Volume de solvente (mL)	Tipo de solvente	Proporção
3000	Hexano : Acetato de etila	9 : 1
9000	Hexano : Acetato de etila	3 : 2
500	Hexano : Acetato de etila	1 : 1
1000	Hexano : Acetato de etila	2 : 3
500	Hexano : Acetato de etila	1 : 9
3000	Metanol	100%

Coluna 2		
5000	Hexano : Acetato de etila	9 : 1
9000	Hexano : Acetato de etila	3 : 2
3500	Metanol	100 %

Da coluna 1 foram obtidas 42 frações e da coluna 2 apenas 18 frações, as quais foram concentradas em evaporador rotativo e analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) em fase normal.

As frações 6 a 11 da coluna 2 foram unidas e aplicadas em nova coluna de bancada nas seguintes condições:

- Fase estacionária: sílica gel 230-400 Mesh
- Altura de sílica: 29 cm
- Diâmetro da coluna: 5 cm
- Massa aplicada de amostra: 2,7418 g
- Eluição em modo gradiente: hexano e acetato de etila com 3% de ácido fórmico, sendo a proporção inicial 8:2.

Obtiveram-se 131 novas frações, as quais também foram monitoradas por CCD em fase normal. As frações 18 e 19 foram juntadas e analisadas em RMN ¹H, possibilitando a determinação estrutural do ácido oleanólico.

3.4.2 - Steviosídeo

O Steviosídeo foi utilizado em sua forma comercial – adoçante Stevita® – sem previa purificação. Dentre as opções disponíveis no mercado optou-se pelo pó, já que não possui o sal potássico do ácido 2,4 hexadienóico, mais conhecido como sorbato de potássio, um fungicida e bactericida presente no adoçante líquido que poderia interferir no desenvolvimento do micro-organismo durante o experimento.

A análise do material para identificação do glicosídeo de interesse foi feita por LC/MS *full scan* ionização ESI +, utilizando equipamento QqQ e também Q-TOF (alta resolução) de acordo com as condições abaixo:

- LC/MS (QqQ):
 - Coluna: PHENOMENEX Synergi 4 μ Fusion 250 x 4.6mm – ODS;
 - Fase móvel: Metanol e água com 0,1% de ácido fórmico;
 - Eluição gradiente exploratória;
 - Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo em 0,3 mL/min para o MS.

- LC/MS (Q-TOF):
 - Coluna: Agilent Extend C-18 5 μ 2.1x150 mm
 - Fase móvel: Metanol e água com 0,1% de ácido fórmico;
 - Eluição gradiente exploratória;
 - Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo em 0,3 mL/min para o MS.

3.4.3 - Triterpenos lanostanos

O fungo basidiomiceto, *Scleroderma* sp. foi coletado no campus da UFSCar após longos períodos de chuva seguidos de sol. Este cenário é propício ao nascimento de *Scleroderma* sp. em grande quantidade com interação mutualista com *Pinus*.

O fungo coletado foi seccionado e a bolsa micelial, uma espécie de casca, separada de seu micélio, uma massa preta com aspecto de pó (FIGURA 3.1). Apenas a parte externa foi utilizada para extração de metabólitos.



FIGURA 3.1 - *Scleroderma* sp. coletado no campus da UFSCar. Foto do basidiomiceto inteiro (A) e com a bolsa micelial cortada (B).

Esta casca foi previamente moída em triturador e 81 g do pó obtido foram extraídos em metanol em banho ultrassônico, filtrados e o extrato concentrado em evaporador rotativo. A massa obtida foi redissolvida em 700 mL de etanol e particionada em funil de separação com mais 700 mL de hexano. As frações foram novamente concentradas em rota-evaporador obtendo-se 2,7 g de extrato hexânico e 14,7 g de extrato etanólico.

O extrato etanólico foi submetido à cromatografia líquida de bancada em fase estacionária normal nas seguintes condições:

- sílica gel 230-400 Mesh;
- Diâmetro da coluna – 3,0 cm;

- Altura de sílica – 40,5 cm;
- Eluentes (TABELA 3.2)

TABELA 3.2 - Ordem de eluição para a coluna cromatográfica (sílica gel) do extrato etanólico de Scleroderma sp.

Eluentes		
Volume de solvente (mL)	Tipo de solvente	Proporção
500	Hexano	
400	Hexano : Acetato de etila	85 : 15
200	Hexano : Acetato de etila : Metanol	84 : 14 : 2
200	Hexano : Acetato de etila : Metanol	80 : 18 : 2
300	Hexano : Acetato de etila : Metanol	78 : 20 : 2
300	Hexano : Acetato de etila : Metanol	76 : 21 : 3
300	Hexano : Acetato de etila : Metanol	60 : 37 : 2

Foram obtidas 124 frações, das quais foram selecionadas as F80 e F75 para nova etapa cromatográfica utilizando fase estacionária reversa octadecilsilano (ODS) e por exclusão (Sephadex) respectivamente, nas seguintes condições:

- F80 – fase reversa ODS:
 - Diâmetro da coluna: 2 cm;
 - Altura de sílica: 80 cm;
 - Eluentes (TABELA 3.3):

TABELA 3.3 - Ordem de eluição para a coluna cromatográfica com fase estacionária ODS, da fração F80 provenientes da coluna anterior do extrato etanólico de Scleroderma sp.

Eluentes		
Volume de solvente (mL)	Tipo de solvente	Proporção
200	Acetonitrila	
300	Acetonitrila : Isopropanol	99 : 1
300	Acetonitrila : Isopropanol	98 : 2
200	Acetonitrila : Isopropanol	97 : 3
100	Acetonitrila : Isopropanol	95 : 5
300	Metanol	

- F75 – Sephadex:
 - Diâmetro da coluna: 2 cm;
 - Altura de fase estacionária: 80 cm;
 - Eluente: Metanol.

Foram obtidas 56 frações da coluna ODS e 25 da coluna Sephadex. Destas, as frações 29, 36 e 42 provenientes da cromatografia em fase reversa foram unidas e reaplicadas em coluna de bancada de sílica gel (230-400 Mesh) nas seguintes condições:

- Diâmetro da coluna: 3,0 cm;
- Altura de fase estacionária: 80,0 cm;
- Eluentes (TABELA 3.4):

TABELA 3.4 - Ordem de eluição para a coluna cromatográfica (sílica gel) das frações provenientes de coluna ODS anterior, do extrato etanólico de *Scleroderma* sp.

Eluentes		
Volume de solvente (mL)	Tipo de solvente	Proporção
1500	Hexano : acetato de etila	90 : 10
500	Hexano : acetato de etila	88 : 12
500	Hexano : acetato de etila	85 : 15
500	Hexano : acetato de etila	83 : 17
2000	Hexano : acetato de etila	80 : 20
500	Hexano : acetato de etila	70 : 30

Desta última etapa de purificação foram obtidas 173 frações agrupadas como segue (TABELA 3.5):

TABELA 3.5 - Ordem de agrupamento das frações provenientes de cromatografia em sílica gel no processo de purificação do extrato etanólico de *Scleroderma* sp.

Nova nomenclatura	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Frações agrupadas	60 a 113	114 a 124	125 a 131	132 a 144	145 a 160	161 a 173

As frações F2 e F5, devido aos resultados apresentados em análise por CCD, foram selecionadas para análises via RMN - ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC -, LC-MS, LC-MS/MS e GC-MS. As análises em GC-MS foram realizadas nas seguintes condições:

- Temperatura do injetor: 250 °C
- Coluna: DB-1
- Ionização por EI modo positivo;
- Rampa de temperatura: TABELA 3.6.

TABELA 3.6 - Rampa de aquecimento utilizada nas análises em GC-MS.

Taxa de aquecimento	Temperatura (°C)	Tempo de espera
-	220,0	3,00
4,00	310,0	4,50

Para as análises em LC-MS, seguiram-se as condições abaixo descritas:

- Coluna: PHENOMENEX Synergi 4 μ Fusion 250 x 4.6mm – ODS;
- Fase móvel: Metanol e água com 0,1% de ácido fórmico;
- Eluição gradiente exploratória;
- Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo em 0,3 mL/min para o MS.
- Ionização ESI +

As interpretações, as quais são discutidas no próximo tópico, levaram à determinação estrutura de dois triterpenos lanostanos, posteriormente utilizados em experimentos de biotransformação com o micro-organismo *Xylaria* sp.

Etapas de purificação também foram aplicadas ao extrato hexânico da partição líquido-líquido inicial, através de cromatografia líquida de bancada, porém ênfase maior foi dada a fração etanólica devido aos resultados encontrados após as primeiras etapas cromatográficas realizadas. O fluxograma resumido é apresentado na FIGURA 3.2.

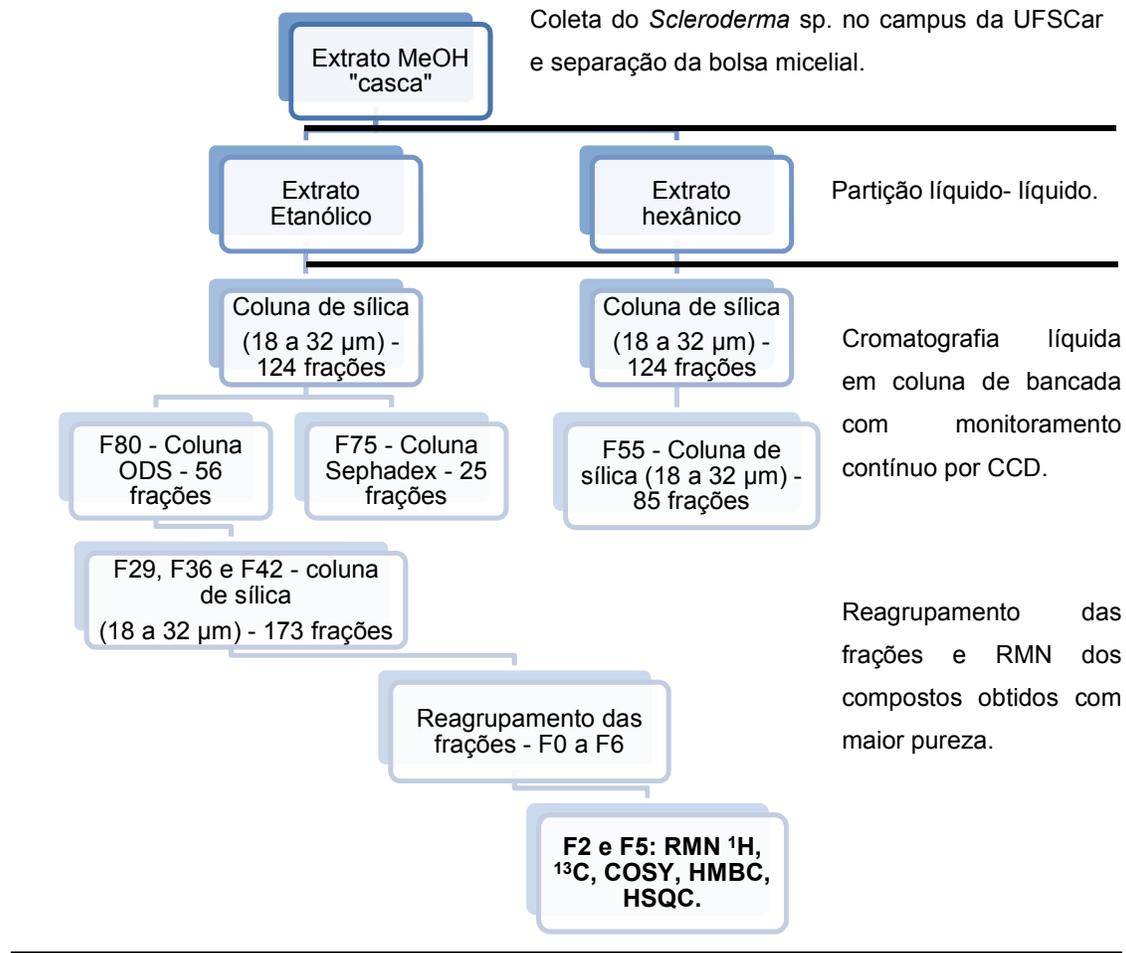


FIGURA 3.2 - Fluxograma para o isolamento de triterpenos lanostanos a partir de *Scleroderma* sp.

3.4.4 - Avenacosídeos A e B

Os experimentos utilizando Avenacosídeos A e B como substratos foram realizados utilizando sua matriz bruta sem purificação ou tratamento prévio. A aveia é uma fonte rica nestes dois metabólitos e também um ótimo meio de cultivo para micro-organismos. Sendo assim, um meio de crescimento apenas de aveia e água foi ideal para o objetivo proposto, possibilitando monitoramento dos glicosídeos de interesse durante o experimento com poucos interferentes, já que não foi acrescido nenhum outro tipo de fonte de carbono para o cultivo.

Para identificação dos substratos alvo, foram realizadas análises em LC/MS QQQ e Q-TOF, ambas com ionização ESI+, nas seguintes condições:

- LC-MS (QqQ):
 - Coluna: PHENOMENEX Synergi 4 μ Fusion 250 x 4.6mm – ODS;
 - Fase móvel: Metanol e água com 0,1% de ácido fórmico;
 - Eluição gradiente exploratória;
 - Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo em 0,3 mL/min para o MS.

- LC-MS (Q/TOF):
 - Coluna: Agilent Extend C-18 5 μ 2.1x150 mm
 - Fase móvel: Metanol e água com 0,1% de ácido fórmico;
 - Eluição gradiente exploratória;
 - Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo em 0,3 mL/min para o MS.

3.5 - Desenvolvimento de metodologias de extração – Ácido oleanólico e Steviosídeo

O primeiro passo, antes de iniciar os experimentos com os metabólicos, foi um estudo da eficiência de várias metodologias de extração e purificação dos extratos contendo os substratos de interesse. Muitas vezes, os resultados de um experimento podem ficar mascarados em pequenos detalhes experimentais, como a recuperação ineficiente dos metabólitos, acusando falsos negativos.

Foram feitos testes utilizando diferentes maneiras de se abordar a matriz analisada, aplicando-se metodologias diferentes, mais adequadas às peculiaridades de cada substância.

Para este estudo realizaram-se experimentos iniciais de biotransformação com cada um dos substratos, ácido oleanólico e steviosídeo, adicionando-os junto ao meio de cultivo e micro-organismo (*Xylaria* sp.) selecionados.

Optou-se apenas pelo meio líquido C'Zapek enriquecido com extrato de levedura (TABELA 3.7) para os estudos metabólicos, considerando-o completo para o desenvolvimento do fungo. Contém sucrose como fonte de carbono para a síntese de moléculas orgânicas e obtenção de energia, nitrato de sódio como fonte de nitrogênio para a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos, macronutrientes como enxofre, fósforo, magnésio e potássio e micronutrientes como cloro e ferro que são essenciais para as funções bioquímicas do micro-organismo.

Ainda, este meio possui extrato de levedura, que é mais uma fonte de nitrogênio e fonte de proteínas, aminoácidos livres e vitaminas (principalmente do complexo B), as quais são importantes cofatores nas reações bioquímicas.

TABELA 3.7 - Composição do meio líquido C'Zapek enriquecido com extrato de levedura utilizado nos experimentos de biotransformação.

Quantidade	Componente
1000 mL	Água destilada
30 g	Sucrose
3,0 g	NaNO ₃
0,50 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O
0,50 g	KCl
0,01 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O
1,0 g	K ₂ HPO ₄
15,0 g	Agar
5,0 g	Extrato de levedura

Foram preparados 1200 mL de meio, divididos em 18 frascos de Erlenmeyers de 250 mL com porções de 60 mL cada (TABELA 3.8). Estes, foram autoclavados por 15 minutos a 121°C e levados em fluxo laminar previamente esterilizado pra que resfriassem, possibilitando a manipulação e inoculação do micro-organismo, assim como a adição de 5 mg de cada substrato aos frascos de Erlenmeyers correspondentes.

TABELA 3.8 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando os substratos ácido oleanólico e steviosídeo.

Quantidade de frascos de Erlenmeyers	Composição dos frascos
3	Meio de cultivo
3	Meio de cultivo + ácido oleanólico
3	Meio de cultivo + steviosídeo
3	Meio de cultivo + Fungo
3	Meio de cultivo + fungo + ácido oleanólico
3	Meio de cultivo + fungo + steviosídeo

Tampados com algodão hidrofóbico, foram mantidos em crescimento em agitação constante por 21 dias, intervalo este que foi determinado observando a evolução de crescimento e consumo do meio pelo fungo. Passado esse período, iniciaram-se os procedimentos de extração, os quais foram diferentes para cada replicata de cada substrato.

Os protocolos de extração foram similares, variando apenas o solvente utilizado em cada caso (TABELA 3.9). Inicialmente o micélio foi separado do meio líquido através de filtração. Ao micélio foi adicionado 40 mL de solvente, deixando-o em ultrassom por 30 minutos. Já à fase aquosa fez-se extração líquido-líquido (3x40mL), secando a fase orgânica obtida com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Ao final concentraram-se as fases orgânicas em rota evaporador.

TABELA 3.9 - Solventes utilizados em experimentos de biotransformação com objetivo de se determinar melhor metodologia de extração aos substratos ácido oleanólico e steviosídeo.

	Micélio	Meio líquido
Ácido Oleanólico	Etanol	Acetato de Etila
	Acetato de Etila	Acetato de Etila
	n-butanol	n-butanol
Steviosídeo	Metanol	Acetato de Etila
	Etanol	Acetato de Etila
	Acetona	n-butanol
Meio e Meio + Fungo		Acetato de Etila
	Acetato de Etila	Acetato de Etila n-butanol

Ao steviosídeo foi aplicado ainda um novo procedimento, em que o fungo *Xylaria* sp é cultivado em placa de Petri com meio sólido composto por batata, Stevita® e ágar (BEA), de acordo com os procedimentos de repicagem de micro-organismos abordados anteriormente.

No momento em que o fungo atingiu crescimento igual à área da placa de Petri, foram selecionadas duas cepas para extração. Removeu-se completamente o material das placas, moeu-os e deixou-os em ultrassom em presença de metanol e água (7:3) por 10 minutos. O extrato obtido foi então filtrado e concentrado em evaporador rotativo.

A massa obtida foi purificada através de extração em fase sólida (SPE) ODS, eluindo o cartucho como segue:

- 3 mL água e metanol (9:1)
- 3 mL água e metanol (1:1)
- 3 mL metanol (100%)

Para avaliar a eficiência da metodologia de extração aplicada, foram feitas análises em HPLC-DAD em modo reverso, sendo que neste momento escolheu-se também o método cromatográfico mais adequado à análise dos metabólitos. Utilizaram-se as seguintes condições cromatográficas:

- Coluna Phenomenex Synergi 4 µm Fusion – RP 80^a (25 cm x 4,5 mm);
- Fase Móvel: água e Acetonitrila, ambos com 1% de ácido fórmico;
- Eluição gradiente exploratória;
- Vazão: 0,7 mL/ min

Ao analisarmos os cromatogramas determinou-se um método gradiente de eluição que abrangesse os metabólitos produzidos pelo micro-organismo oriundos ou não do steviosídeo e a substância de referência, a qual é o próprio adoçante comercial Stevita® (TABELA 3.10).

TABELA 3.10 - Método de eluição gradiente utilizado na análise em HPLC-DAD do experimento de biotransformação utilizando o substrato steviosídeo.

Tempo (min)	0.01	35.00	35.01	38.00	38.01	50.00	50.01
% de ACN em H₂O	20	80	100	100	20	20	20

3.6 - Estudo do metabolismo da *Xylaria* sp. frente aos substratos

3.6.1 - Ácido Oleanólico

O experimento de biotransformação do ácido oleanólico foi realizado cultivando o micro-organismo *Xylaria* sp. em meio líquido C'Zapek enriquecido com extrato de levedura, junto ao substrato.

Foram preparados 2080 mL de meio divididos em 26 Erlenmeyers contendo 80 mL cada (TABELA 3.11). Previamente autoclavados a 121° C por 15 minutos foram levados à câmara de fluxo laminar, onde se adicionou o inóculo mantido em meio BDA e 50 mg do substrato de interesse ao meio de cultivo já a temperatura ambiente.

TABELA 3.11 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando o substrato ácido oleanólico.

Quantidade de frascos de Erlenmeyers	Composição dos frascos
5	Meio de cultivo
2	Meio de cultivo + ácido oleanólico
4	Meio de cultivo + Fungo
15	Meio de cultivo + fungo + ácido oleanólico

O ácido oleanólico não foi autoclavado. Porém, para adição no meio de crescimento, foi dissolvido na mínima quantidade possível de etanol e filtrado em membrana Millipore estéril de 0.22 µm, impedindo a passagem de esporos e bactérias.

O experimento permaneceu em crescimento sob agitação constante a 120 rpm durante 25 dias, ao tempo em que foi filtrado e as frações equivalentes unidas para uma só extração. O meio líquido foi completamente liofilizado, já o micélio foi extraído com etanol (2 vezes) em ultrassom por 30 minutos, sendo utilizado em cada extração um volume de solvente equivalente à metade do volume

de meio obtido. O extrato obtido foi então concentrado em evaporador rotativo. A FIGURA 3.3 resume o procedimento adotado neste experimento.

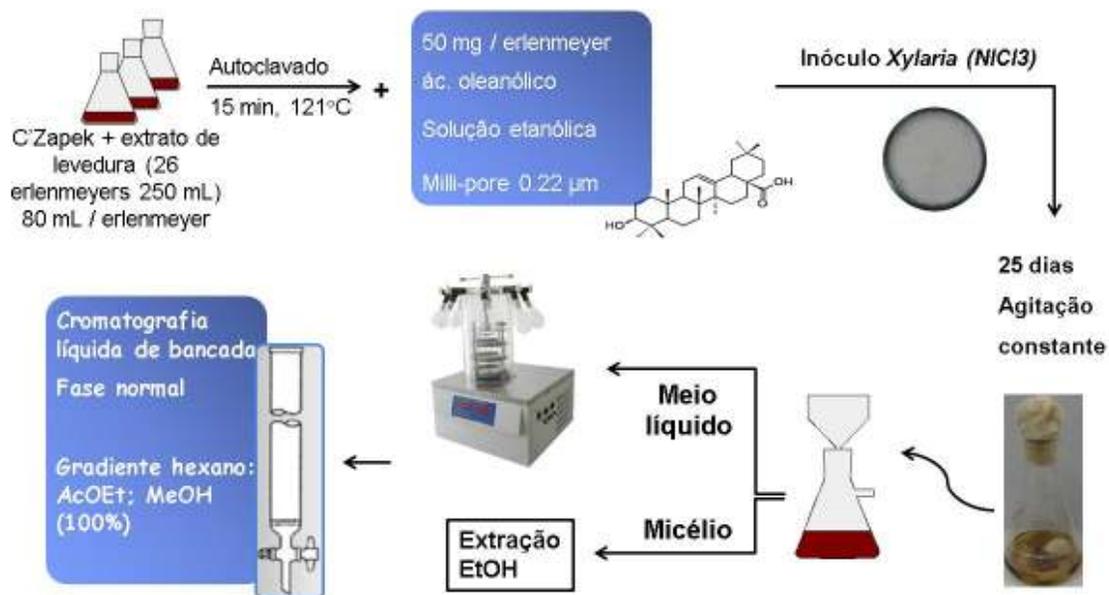


FIGURA 3.3 - Fluxograma para experimento de biotransformação do ácido oleanólico: Cultivo do micro-organismo em presença do substrato, extração e purificação.

3.6.1.1 - Purificação via cromatografia

Os extratos obtidos foram submetidos à cromatografia líquida em coluna de bancada nas seguintes condições:

- Sílica gel 230-400 Mesh
- Altura de sílica: 10 cm
- Diâmetro da coluna: 3 cm
- Eluição gradiente (TABELA 3.12);

TABELA 3.12 - Sequencia de eluição em coluna cromatográfica de sílica gel (230-400 Mesh) para purificação do ácido oleanólico.

Fração	Eluente
A	Hexano : Acetato de etila (7 : 3)
B	Hexano : Acetato de etila (1 : 1)
C	100% Acetato de etila
D	Acetato de Etila : Metanol (1 : 1)
E	100% Metanol

O monitoramento desta etapa foi realizado por CCD fase normal, eluída com a mistura equivalente de hexano e acetato de etila. Em um segundo momento fez-se análises em LC/MS (Q-TOF) *full scan* nas seguintes condições:

- Coluna Agilent Extend C-18
- Fase móvel: metanol - água com 0,1% de ácido fórmico;
- Eluição gradiente exploratória;
- Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo passando 0,3 mL/min no MS.
- Ionização ESI +.

3.6.2 - Steviosídeo

No procedimento de biotransformação do steviosídeo (FIGURA 3.4) foram adotadas as mesmas condições de cultivo em experimento com ácido oleanólico, dividindo o meio em 60 Erlenmeyers contendo 80 mL de meio cada (TABELA 3.13). O steviosídeo utilizado, em forma de pó, foi adicionado na quantidade de 80 mg a cada frasco, considerando a quantidade real de steviosídeo no adoçante (7%). Dessa forma, adicionou-se 1,143 g do adoçante comercial a cada frasco do experimento.

TABELA 3.13 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando o substrato steviosídeo.

Quantidade de frascos de Erlenmeyers	Composição dos frascos
15	Meio de cultivo
15	Meio de cultivo + steviosídeo
15	Meio de cultivo + Fungo
15	Meio de cultivo + fungo + Steviosídeo

O experimento permaneceu em crescimento sob agitação constante a 120 rpm durante 45 dias, ao tempo em que foi filtrado e as frações equivalentes unidas para extração. O meio líquido foi completamente liofilizado, já o micélio foi extraído em metanol-água (7:3) (2 X 600mL) em ultrassom por 30 minutos.

Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo e purificados via cromatografia líquida de bancada utilizando as mesmas condições às adotadas em experimento com ácido oleanólico (pag. 50). As frações desta etapa foram denominadas A, B, C, D e E, monitoradas por CCD fase normal e analisadas em LC/MS (Q-TOF) com ionização ESI + nas seguintes condições cromatográficas:

- Coluna Agilent Extend C-18;
- Vazão para o HPLC 0,6 mL/min e vazão para o MS 0,3 mL/min;
- Eluentes metanol – água com 0,1% de ácido fórmico;
- Eluição gradiente exploratória;

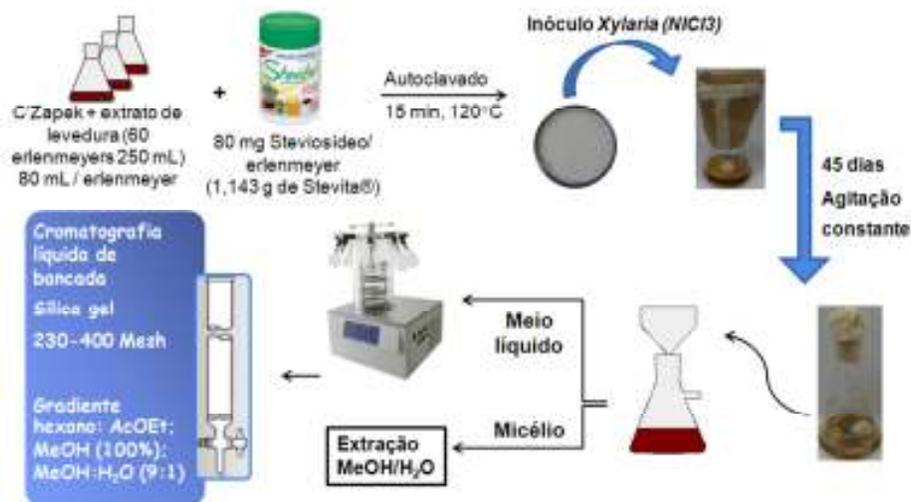


FIGURA 3.4 - Fluxograma para experimento de biotransformação do Steviosídeo: Cultivo do micro-organismo em presença do substrato, extração e purificação.

3.6.3 - Triterpenos lanostanos

Cultivado nas mesmas condições que os experimentos descritos com os demais substratos, o estudo dos triterpenos lanostanos frente ao metabolismo do micro-organismo *Xylaria* sp. foi realizado em 15 Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de meio líquido C'Zapek e 5 mg da mistura de lanosteróis isolada cada (TABELA 3.14). Neste ensaio, o substrato foi adicionado após dissolução em etanol e filtragem em Milli-pore 0.22 µm, sem etapa de autoclavagem.

TABELA 3.14 - Divisão dos frascos de Erlenmeyers no experimento de biotransformação utilizando o substrato triterpeno lanostano.

Quantidade de frascos de Erlenmeyers	Composição dos frascos
2	Meio de cultivo
2	Meio de cultivo + triterpenos lanostanos
5	Meio de cultivo + Fungo
8	Meio de cultivo + fungo + triterpenos lanostanos

O cultivo seguiu em agitação constante por 25 dias, ao tempo em que o experimento foi filtrado e as frações equivalentes juntadas. O micélio foi extraído nos seguintes solventes:

- Acetato de etila;
- Etanol;
- Etanol e água (9:1).

Foram aplicadas duas extrações com 350 mL, sob ultrassom, a cada solvente relacionado, concentrando as frações em evaporador rotativo ao final.

Ao meio líquido foi feita extração líquido-líquido com acetato de etila por duas vezes, rotaevaporando ao final. A fase aquosa restante foi liofilizada e reservada. Utilizando as mesmas condições que os demais experimentos descritos (pag. 50) fez-se a purificação dos extratos em cromatografia líquida de bancada. O procedimento completo é resumido na FIGURA 3.5.

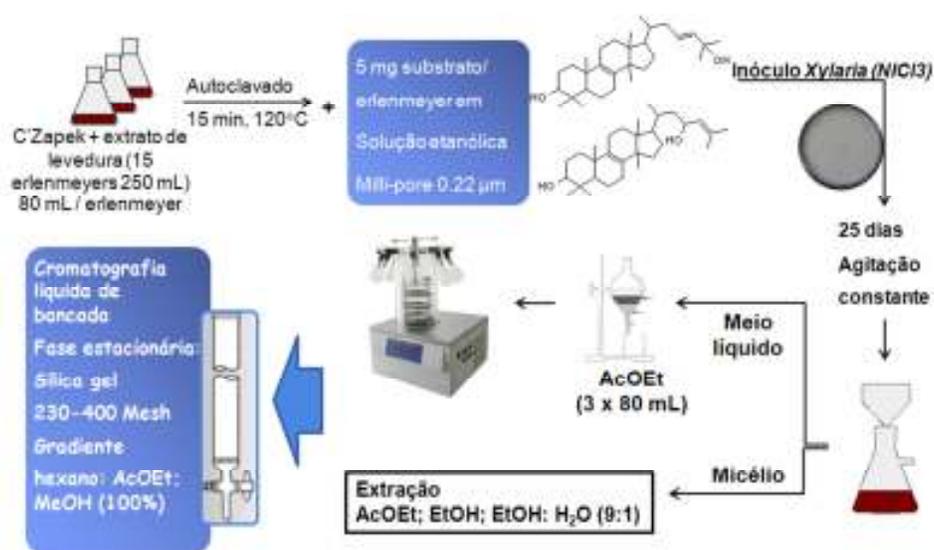


FIGURA 3.5 - Fluxograma para experimento de biotransformação dos triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp.: Cultivo do micro-organismo em presença do substrato, extração e purificação.

Foram obtidas novas frações do procedimento de purificação denominadas A, B, C, D e E, as quais foram analisadas por CCD fase normal e LC/MS Q-TOF nas seguintes condições:

- Coluna Agilent Extend C-18
- Fase móvel: metanol - água com 0,1% de ácido fórmico;
- Eluição gradiente exploratória;
- Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo passando 0,3 mL/min no MS.
- Ionização ESI +;
- Análise em *full scan*.

3.6.4 - Avenacosídeos

A biotransformação dos avenacosídeos foi realizada com meio de cultivo composto apenas de aveia e água, sendo que o substrato a ser monitorado já está naturalmente presente no meio.

Para esse experimento dissolveu-se 120 g de aveia moída em 1,4 L de água destilada. Esta quantidade foi dividida em 4 porções de 350 mL em Erlenmeyers de 1L devidamente tampados. Estes, após autoclavados a 121°C por 15 min foram levados ao fluxo laminar previamente esterilizado para adição do inóculo de *Xylaria* sp. (NICI 5), sendo uma fração deixada sem o micro-organismo como controle do experimento.

Após 35 dias de crescimento estático cada fração foi filtrada, separando o meio líquido da massa micelial do fungo. Do meio fez-se extração líquido-líquido com acetato de etila (3 X 80 mL), já o micélio foi extraído com etanol por 24 horas (FIGURA 3.6). Cada fração foi investigada via LC-UV e LC/MS nas condições abaixo relacionadas:

- Coluna PHENOMENEX Synergi Fusion C-18
- Fase móvel: metanol - água com 0,1% de ácido fórmico;

- Eluição gradiente exploratória;
- Vazão: 0,6 mL/min no HPLC com divisor de fluxo passando 0,3 mL/min no MS.
- Ionização ESI +;
- Análise em *full scan*.

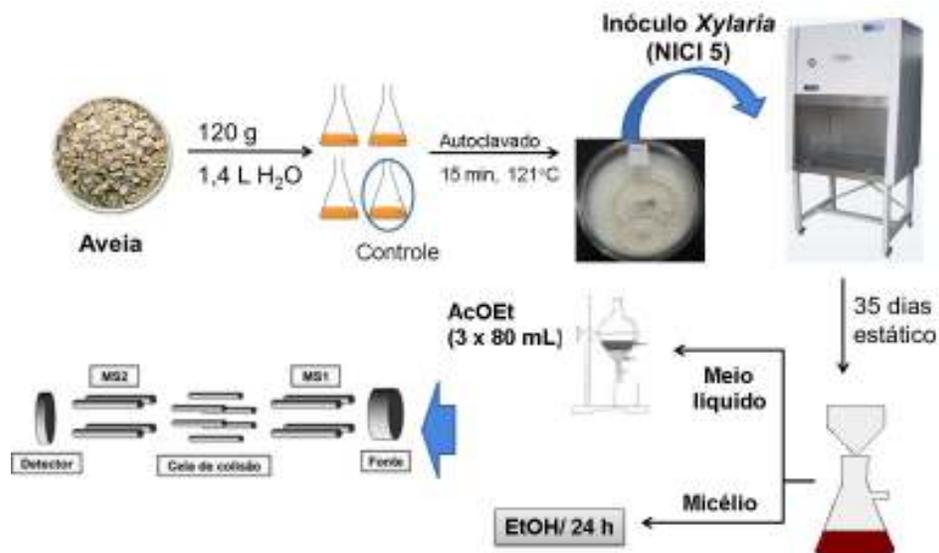


FIGURA 3.6 - Fluxograma representando experimento de biotransformação dos avenacosídeos presentes na Aveia. Cultivo, extração e análise em LC/MS.

4 - Resultados e discussão

4.1 - Identificação dos substratos utilizados

4.1.1 - Ácido oleanólico

O extrato inicial obtido apresentou cor marrom escura e cheiro característico devido à grande concentração de eugenol (FIGURA 4.1-A), conhecido também como óleo de cravo e um dos compostos majoritários no extrato.

A primeira etapa de purificação consistiu na lavagem do extrato bruto com éter de petróleo, solubilizando majoritariamente o eugenol e deixando o ácido oleanólico precipitado. Dessa forma foi possível concentrar maior quantidade da substância de interesse. Com as demais etapas cromatográficas obteve-se o composto isolado, o qual foi monitorado por CCD (FIGURA 4.1-B).

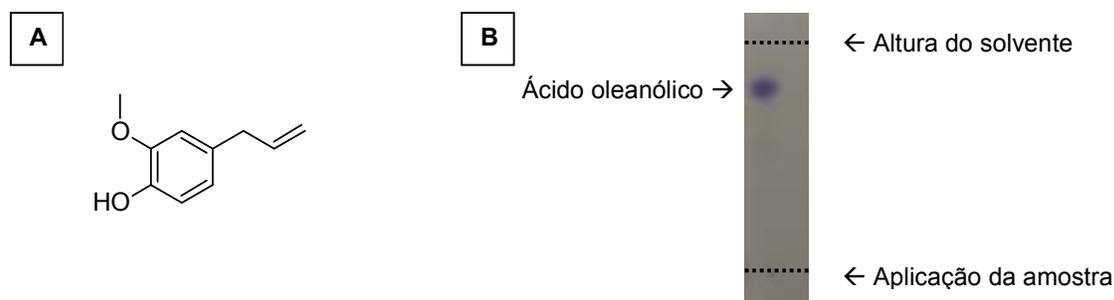


FIGURA 4.1 - **A**: Estrutura molecular do eugenol, conhecido também como óleo de cravo; **B**: CCD do ácido oleanólico isolado de cravo da Índia.

A caracterização foi feita por RMN ¹H (FIGURA 4.2), fazendo-se interpretações dos sinais obtidos principalmente por comparação com dados da literatura⁴⁵⁻⁴⁸. No grupo LaBioMMi, Eugênio (2008)⁴⁹ isolou e caracterizou esta mesma molécula anteriormente em trabalho de mestrado, o qual foi referência principal para as atribuições apresentadas.

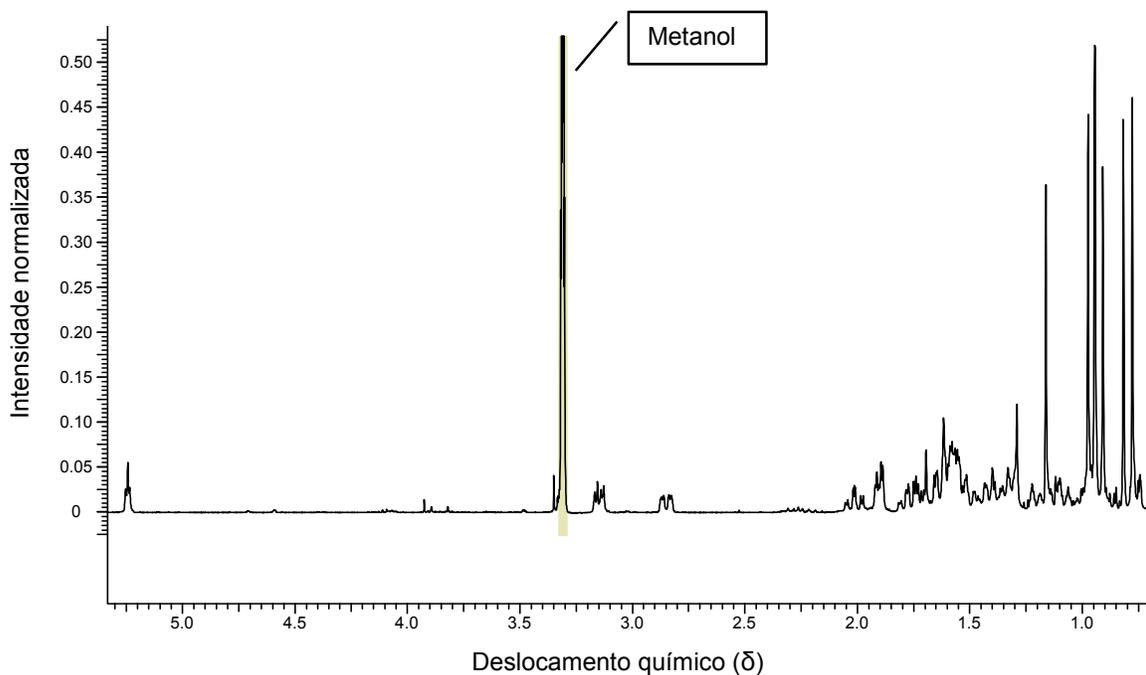


FIGURA 4.2 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz; D₃COD) do ácido oleanólico isolado de cravo da Índia.

Uma análise detalhada do RMN ¹H é dificultada pelo grande congestionamento de sinais entre δ 1.2 e δ 2.0, ainda assim a obtenção de um espectro limpo com sinais bem definidos reflete a pureza do composto isolado e proporciona informações características de triterpenos que possibilitam a determinação estrutural sem maiores problemas ao fazermos uso da literatura para comparação.

A quantidade de singletos na região de hidrogênios metílicos e os multipletos com maior deslocamento químico, referente aos hidrogênios olefínicos e carbinólicos são sinais determinantes à atribuição da molécula em questão.

Iniciando a análise pela região dos hidrogênios metílicos (FIGURA 4.3), o número de singletos entre δ 0.7 e δ 1.2 corresponde exatamente ao número de metilas do ácido oleanólico, sendo necessária atenção ao sinal em δ 0.944, o qual corresponde a duas metilas sobrepostas, confirmado pelo valor da integral próximo a 6. Nesta figura observam-se ainda sinais entre δ 2.1 e δ 1.2, atribuídos aos hidrogênios metilênicos e metínicos do triterpeno em questão.

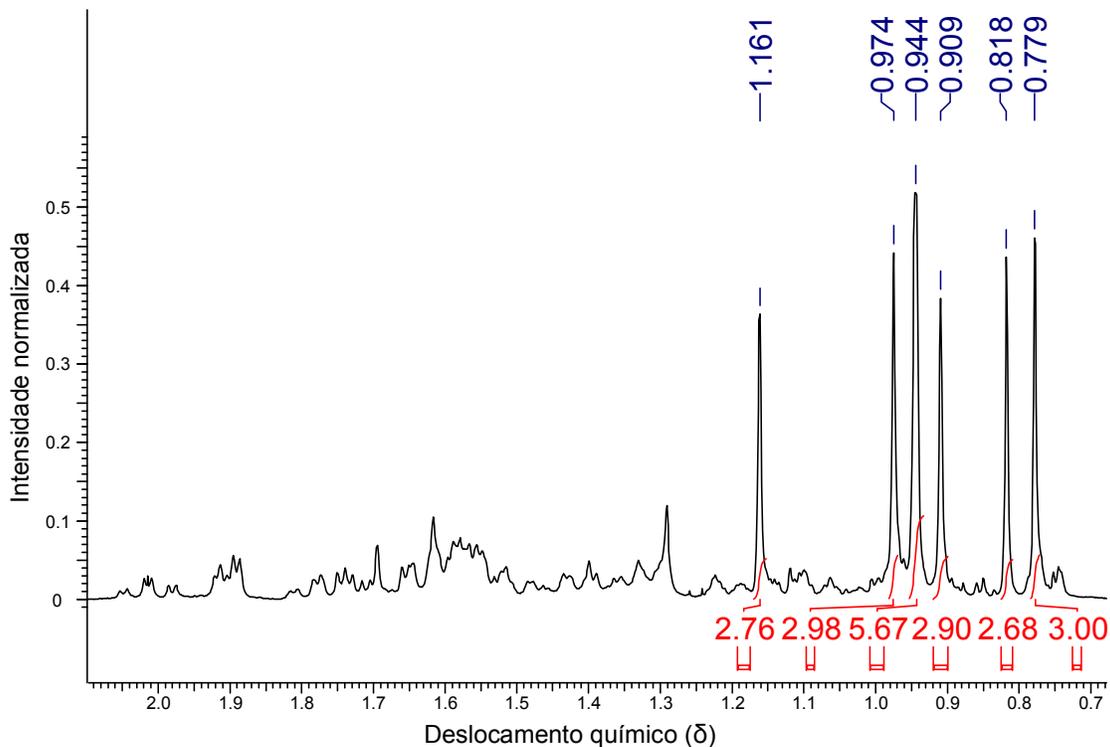


FIGURA 4.3 - ampliação do espectro de RMN ¹H (400 MHz; D₃COD) do ácido oleanólico para a região dos carbonos metilênicos, metínicos e metílicos. Deslocamento químico para os singletos representados acima e valores das integrais representadas abaixo.

Ao ampliar o sinal em δ 5.24 (FIGURA 4.4-A), observamos um tripleto bem definido, atribuído ao H-12 olefínico (FIGURA 4.4-B). A presença de uma única olefina na estrutura deve mesmo gerar apenas um sinal bem desblindado no espectro.

Na região de δ 3.15 o dd observado (FIGURA 4.4-C) é atribuído a H-3 carbinólico. Este é um sinal característico de triterpenos, uma vez que a hidroxila é proveniente da biossíntese desta classe de compostos.

A multiplicidade observada é corresponde ao acoplamento com os H-2, os quais não são quimicamente equivalentes, justificando o dd ao invés de um tripleto (t). Já o dd em δ 2.85 foi atribuído ao H-18^{24,45,46,50}.

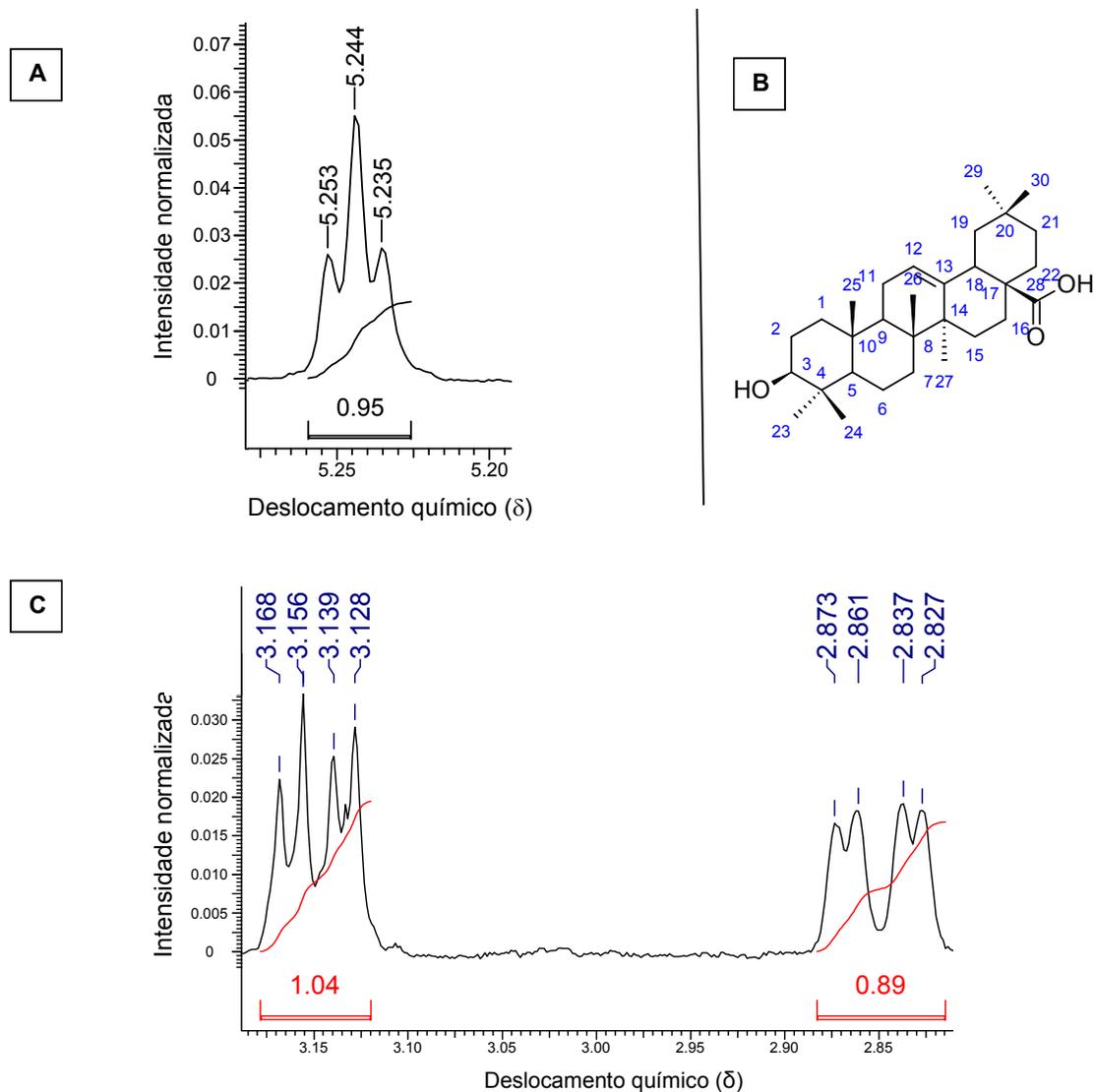


FIGURA 4.4 - **A**: Ampliação do tripleto em δ 5.24, atribuído ao H-12 olefínico do ácido oleanólico em experimento de RMN ^1H ; **B**: Ácido oleanólico em estrutura numerada; **C**: Ampliação do espectro de RMN ^1H do ácido oleanólico, observando os sinais na região dos carbonos carbinólicos.

Estudos envolvendo ácido oleanólico já são bem explorados na literatura, sendo que, de acordo com as interpretações e comparações feitas às bases de informação científica⁵¹, pode-se inferir com segurança as atribuições realizadas. Os dados de RMN ^1H foram comparados com estudo anterior realizado no LaBioMMi em que já fora identificado o analito em questão (TABELA 4.1).

TABELA 4.1 - Dados de RMN ^1H do ácido oleanólico. Comparação entre os dados obtidos (400 MHz, CD_3OD) e dados da literatura⁴⁹ (200 MHz, CDCl_3).

Hidrogênio	δ ^1H ; multiplicidade; J (Hz)	δ ^1H ; multiplicidade - literatura ⁴⁹
3	3,15 (dd; J1= 4,6 Hz; J2= 11,4 Hz)	3,22 (m)
12	5,244 (t; J1= J2= 3,6 Hz)	5,27 (t)
18	2,85 (dd; J1= 4,4 Hz; J2= 14,0 Hz)	2,83 (dd)
23	0,974 (s)	1,13 (s)
24	0,944 (s)	0,93 (s)
25	0,779 (s)	0,76 (s)
26	0,944 (s)	0,95 (s)
27	1,161 (s)	1,27 (s)
29	0,818 (s)	0,78 (s)
30	0,909 (s)	0,91 (s)

4.1.2 - Steviosídeo

O steviosídeo comercial utilizado possui em sua formulação 7% de Steviosídeo e 93% de lactose. Sabe-se que o extrato da folha de *Stevia rebaudiana* possui certa diversidade de glicosídeos, sendo eles de mesma aglicona, um Diterpeno Kaurano, (FIGURA 4.5) e diferentes padrões de glicosilações.

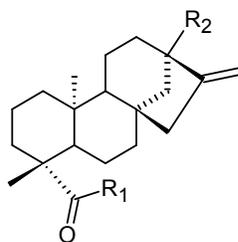


FIGURA 4.5 - Estrutura molecular de diterpeno Kaurano, aglicona do steviosídeo. Para o steviosídeo os substituintes R_1 = 1 unidade de glicose e R_2 = 2 unidades de glicose.

O steviosídeo é uma saponina bidesmosídica composta por um monossacarídeo em R_1 e dissacarídeo em R_2 formados por unidades de glicose. As

demais variações dos glicosídeos encontrados nas folhas de *Stevia* estão relacionadas na TABELA 4.2.

Para verificar a presença dos glicosídeos mencionados no produto comercial Stevita[®] fez-se análise em LC/MS *full scan* no modo positivo de ionização. No cromatograma obtido (FIGURA 4.6) é detectada uma grande mistura de substâncias. Ao analisar os cromatogramas de íons extraídos foi possível verificar a presença de todas as espécies relacionadas na TABELA 4.2, as quais foram detectadas sempre como adutos de sódio $[M+Na]^+$ (FIGURA 4.7). O espectro de massas em torno de 29 minutos concentra todos esses glicosídeos encontrados no adoçante Stevita[®] (FIGURA 4.8).

TABELA 4.2 - Glicosídeos presentes no adoçante comercial Stevita³⁰. Análise em LC/MS modo positivo.

Glicosídeo	R ₁	R ₂	<i>m/z</i> [M+ Na] ⁺
Steviolbiosídeo	H	β-Glc-β-Glc (2-1)	666
Dulcosídeo A	β-Glc	β-Glc-α-Rha (2-1)	812
Steviosídeo	β-Glc	β-Glc-β-Glc (2-1)	828
Rebaudiosídeo B	H	β-Glc-β-Glc (2-1); β-Glc (3-1)	828
Rebaudiosídeo F	β-Glc	β-Glc-β-Xyl (2-1); β-Glc (3-1)	960
Rebaudiosídeo C	β-Glc	β-Glc-α-Rha (2-1); β-Glc (3-1)	974
Rebaudiosídeo A	β-Glc	β-Glc-β-Glc (2-1); β-Glc (3-1)	990
Rebaudiosídeo E	β-Glc-β-Glc (2-1)	β-Glc-β-Glc (2-1)	990
Rebaudiosídeo D	β-Glc-β-Glc (2-1)	β-Glc-β-Glc (2-1); β-Glc (3-1)	1152

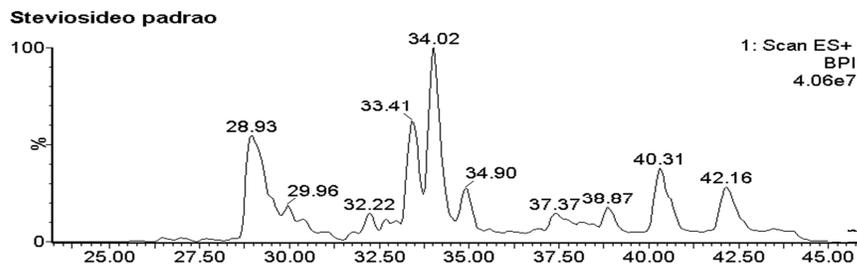


FIGURA 4.6 - BPI do adoçante comercial Stevita® em experimento de *full scan* modo positivo de ionização.

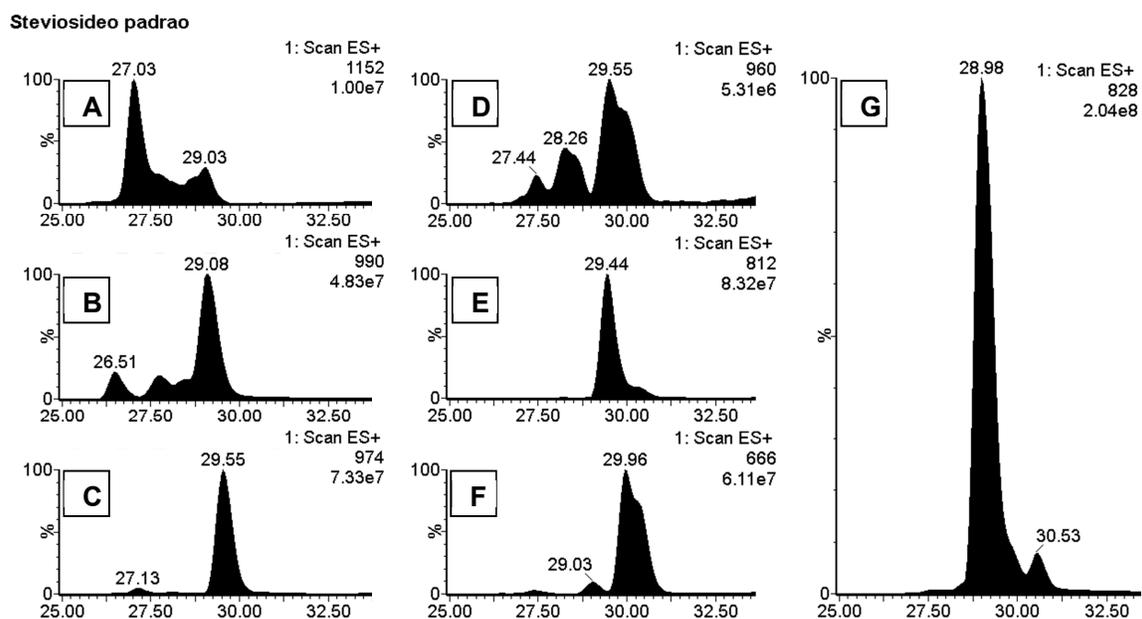


FIGURA 4.7 - EIC de experimento *full scan* modo positivo do adoçante comercial Stevita. Íons na forma de $[M + Na]^+$ **A**: Rebaudiosídeo D (m/z 1152); **B**: Rebaudiosídeos A e E (m/z 990); **C**: Rebaudiosídeo C (m/z 974); **D**: Rebaudiosídeo F (m/z 960); **E**: Dulcosídeo A (m/z 812); **F**: Steviolbiosídeo (m/z 666); **G**: Rebaudiosídeo B e Steviosídeo (m/z 828).

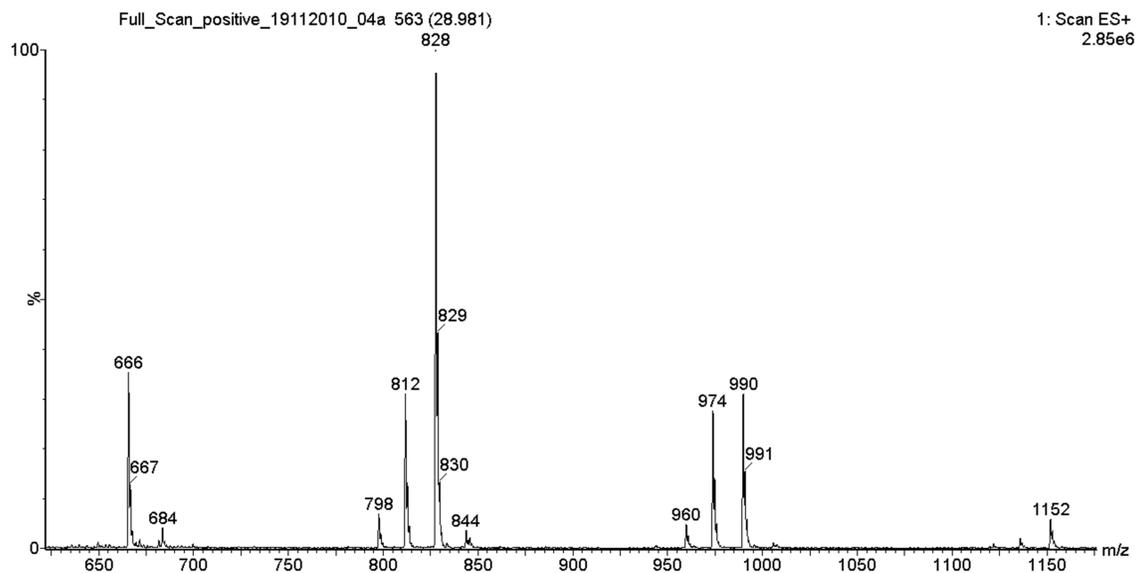


FIGURA 4.8 - Espectro de massas do experimento de *full scan* do adoçante comercial Stevita® em 29.98 minutos. Presença dos glicosídeos $[M + Na]^+$ m/z 666, 812, 828, 960, 974, 990 e 1152.

A identificação dos glicosídeos presentes no substrato de referência utilizado foi realizada também através de análise em LC/MS (ESI +) com alta resolução de massa. Com esta técnica foi possível, através da massa exata, afirmar com maior certeza a presença dos glicosídeos mencionados. A FIGURA 4.9 representa o EIC de todos os glicosídeos sobrepostos com as respectivas áreas e relação massa/carga indicadas. Com esta ilustração podemos mais uma vez verificar a presença majoritária do steviosídeo comparado ao restante das espécies plotadas.

Nos espectros de massas (FIGURA 4.10), obtidos em analisador híbrido Q-TOF, determinou-se a massa exata de cada glicosídeo presente, os quais são monocarregados, visto que o intervalo de um isótopo a outro é exatamente 1,00 unidade de massa. Cada elemento possui um defeito de massa devido a contribuição de seus isótopos, ou seja, nenhum átomo possui massa unitária com exceção do ^{12}C – por convenção. Dessa forma, a mensuração de massa suficientemente precisa (dentro de $\sim 0,0001$ Da) pode identificar a composição elemental⁵². O software Agilent Masshunter® utilizado para o processamento dos dados em alta resolução permite a verificação deste perfil isotópico correlacionando com a fórmula molecular mais provável. Utilizando essa informação como referência, assim como dados da literatura³⁰, foi possível identificar os glicosídeos presentes no adoçante Stevita.

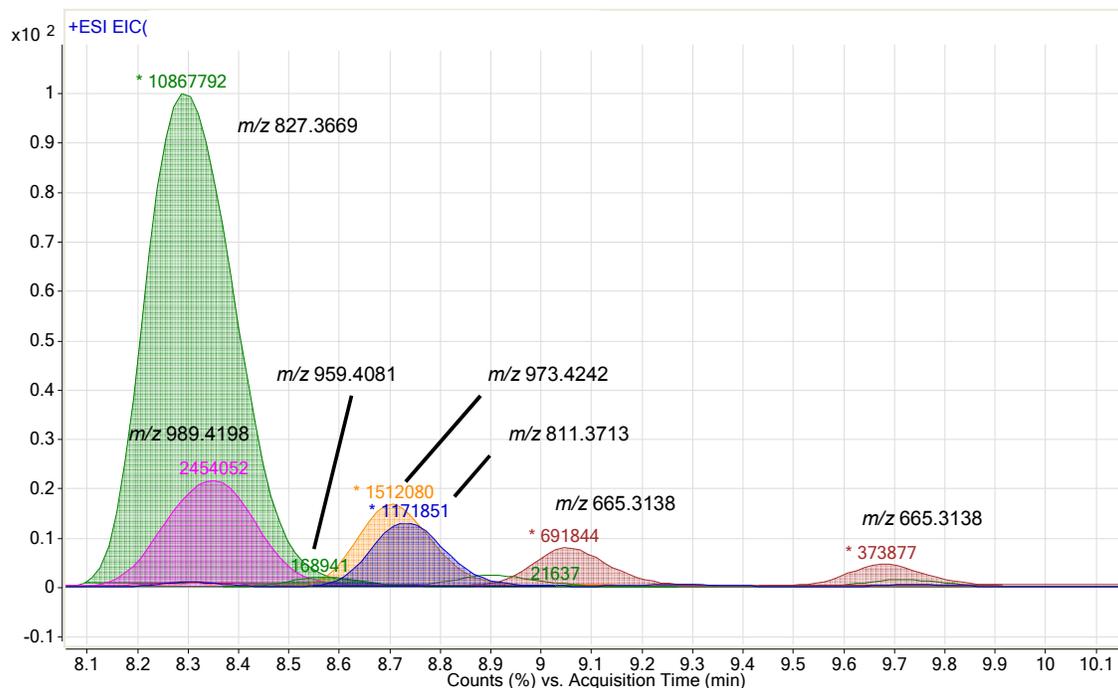


FIGURA 4.9 - EIC sobreposto dos glicosídeos presentes no Stevita®, com os valores das áreas de cada banda destacada.

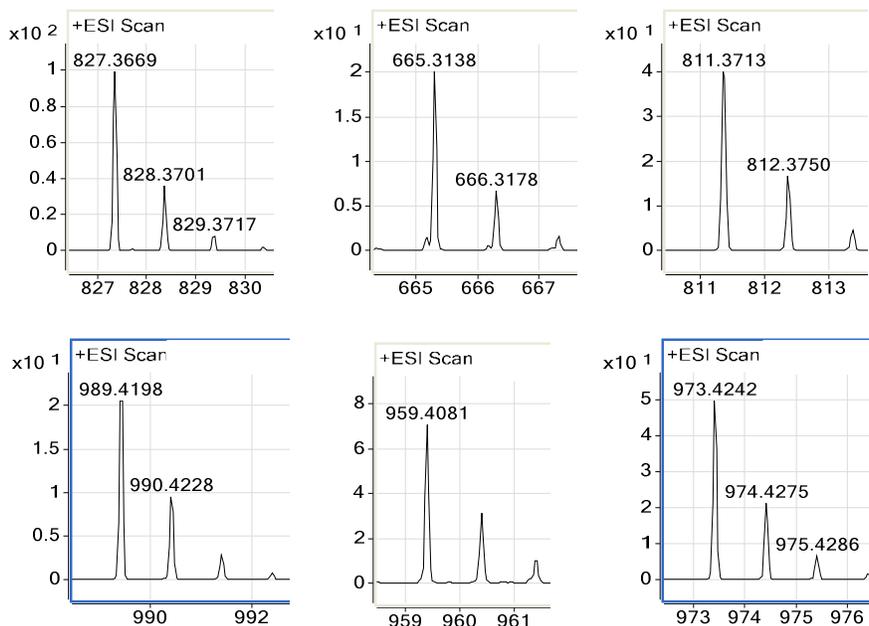


FIGURA 4.10 - Espectros de massas obtidos em alta resolução (Q-TOF) para identificação através de massa exata dos glicosídeos presentes no adoçante Stevita®.

4.1.3 - Triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp.

Os triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp. foram identificados em sua maior parte por Ressonância Magnética Nuclear, através da interpretação dos espectros e comparação com dados da literatura⁵³, além da utilização de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para confirmação através do perfil de fragmentação de cada molécula.

As dificuldades encontradas na purificação, a qual fez necessária diversas etapas, se deram devido à grande semelhança estrutural das substâncias isoladas, as quais se tratavam de isômeros estruturais, de acordo com análise em LC/MS realizada (FIGURA 4.11). Devido às propriedades físico-químicas muito semelhantes, os tempos de retenção eram sempre muito próximos, dificultando a separação cromatográfica.

A partir da análise em LC/MS *full scan* (ESI+), verificou-se que as substâncias isoladas da bolsa micelial do fungo *Scleroderma* sp se tratavam realmente de isômeros estruturais, apresentando mesmo perfil no espectro de massas. O íon fragmento proveniente de primeira desidratação m/z 425.6 é resultado da perda de uma molécula de água na fonte de ionização da hidroxila da cadeia lateral localizada em diferentes posições em cada isômero. Devido ao efeito mesomérico na ramificação esta hidroxila deixa facilmente a molécula, seguida da hidroxila ligado ao C-3 que gera o íon m/z 407.6 (FIGURA 4.12).

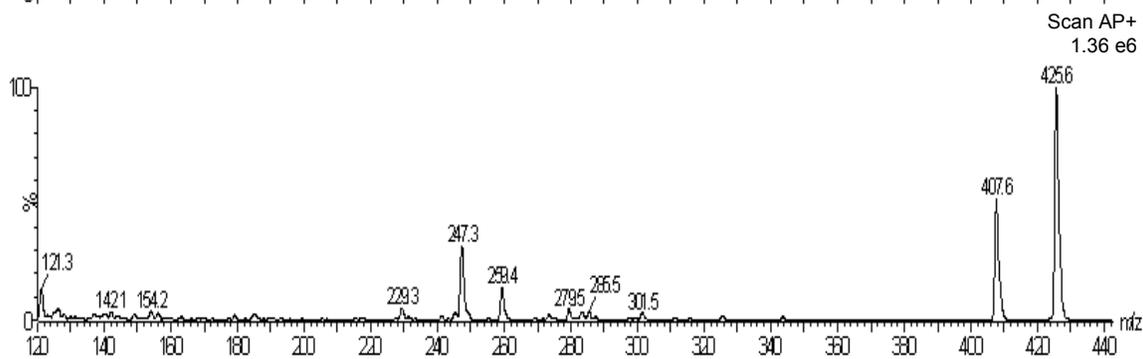
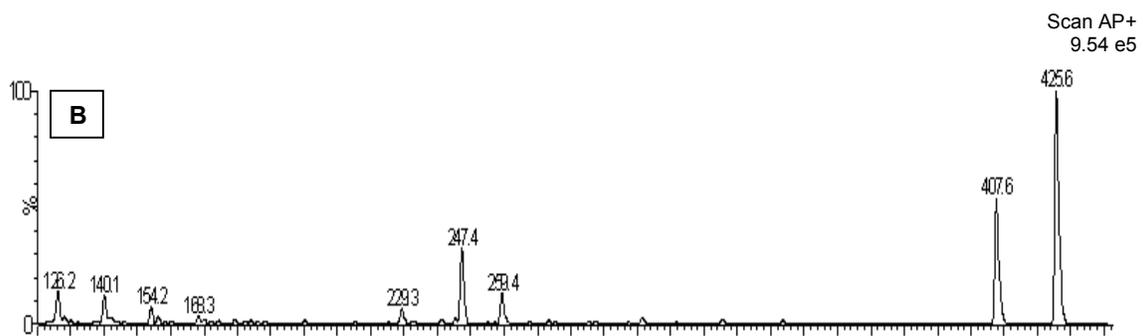
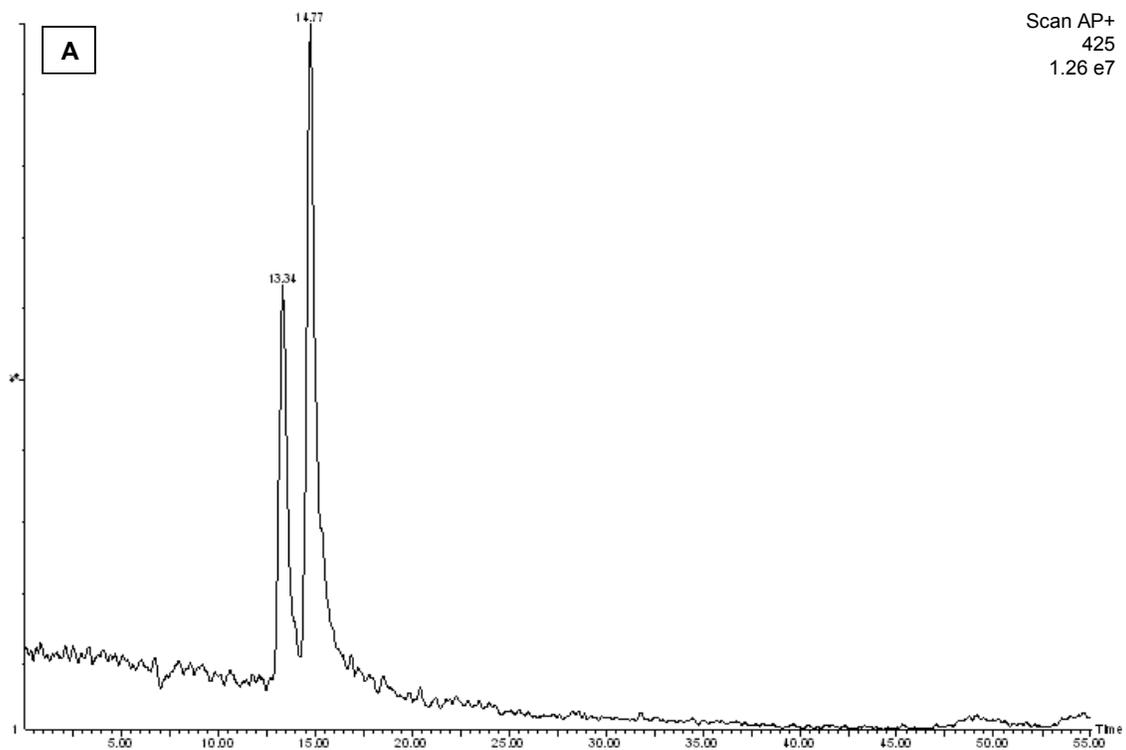


FIGURA 4.11 - **A**: Cromatograma dos triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp. **B**: Espectros de massa (*full scan*; ESI+) para as bandas em 13,34 e 14,77 min, referentes aos triterpenos lanostanos.

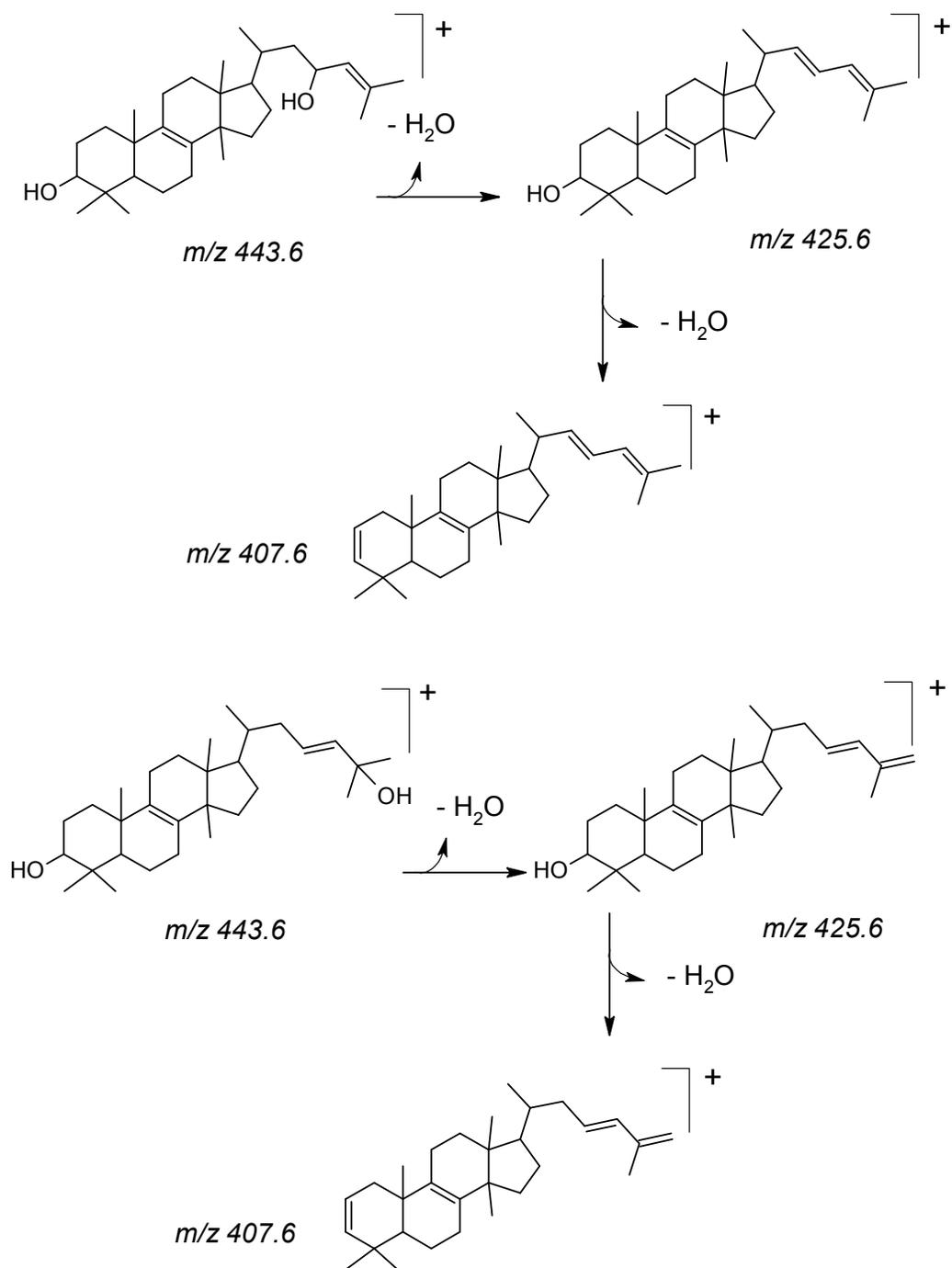


FIGURA 4.12 - Proposta de fragmentação de análise em LC/MS em modo positivo de ionização (FIGURA 4.11), dos triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp.

4.1.3.1 - Triterpeno lanostano 1 (Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol)

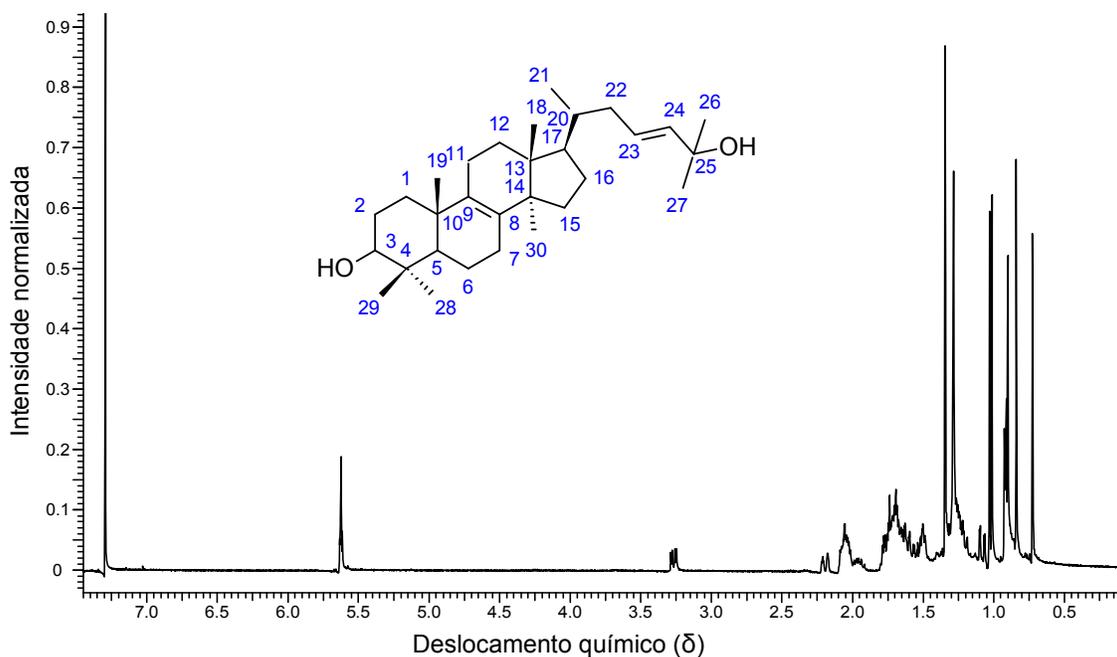


FIGURA 4.13 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz; CDCl₃) do triterpeno lanostano 1 isolado de *Scleroderma* sp e sua estrutura proposta.

Ao analisarmos o espectro de RMN ¹H do primeiro composto, denominado triterpeno lanostano 1, observa-se um espectro limpo e sinais bem definidos, evidenciando a pureza do composto isolado (FIGURA 4.13).

O sinal entre δ 5.61 e δ 5.63 corresponde aos hidrogênios olefínicos H-23 e H-24. Ao ampliar esta região do espectro e analisar o experimento de HSQC também ampliado (FIGURA 4.14), podemos atribuir com segurança este sinal como dois multipletos sobrepostos, em que os hidrogênios correspondentes estão ligados em carbonos distintos bem desblindados no espectro com δ 125,56 e δ 139,44.

A partir de experimento de HMBC determinaram-se os acoplamentos dos hidrogênios olefínico com carbonos a mais de uma ligação de distância (FIGURA 4.15).

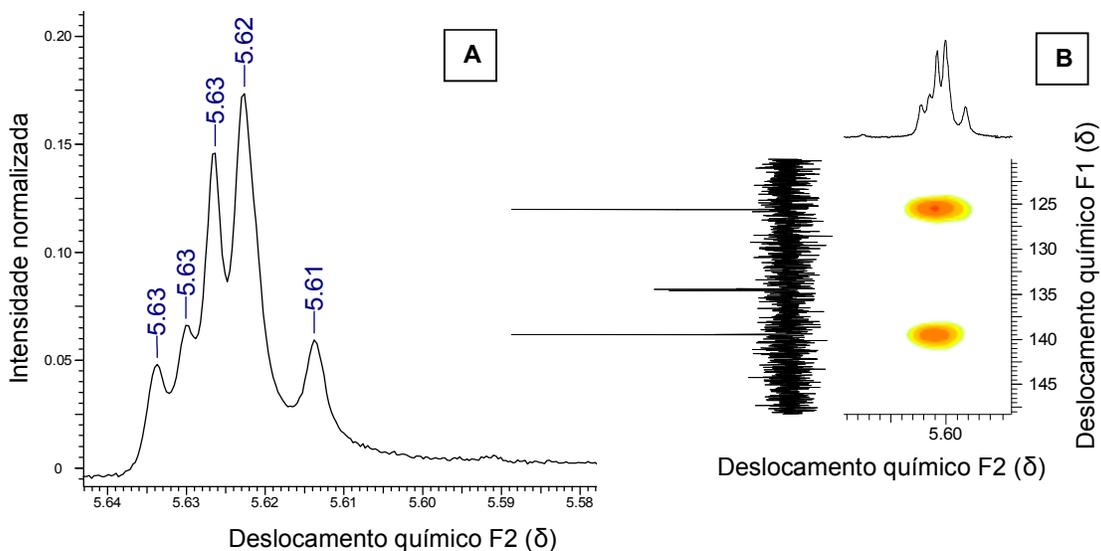


FIGURA 4.14 - Espectros de RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) (A) e HSQC (B), ampliados para visualização do sinal olefínico (δ 5.61 a δ 5.63), do triterpeno lanostano 1 isolado de *Scleroderma* sp.

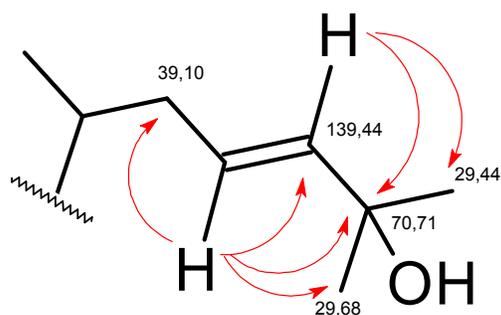


FIGURA 4.15 - Acoplamentos dos hidrogênios olefínicos com carbonos a mais de uma ligação de distância. Correlações obtidas em experimento de HMBC.

No espectro de HMBC ampliado (FIGURA 4.16 – A), observam-se dois carbonos, acoplados aos H-23 e H-24, com maior deslocamento químico que os demais. Trata-se do C-24 olefínico com δ 139,44 acoplado ao H-23 e do C-25 carbinólico com δ 70,71 acoplado ao H-23 e H-24. Na região dos carbonos metilênicos H-23 acopla com C-22 (δ 39,10) vizinho a olefina. Na região dos carbonos metílicos, menos deslocados no espectro, H-23 acopla com C-27 (δ 29,68) e H-24 acopla com C-26 (δ 29,44).

Observando a ampliação deste último acoplamento no espectro de HMBC (FIGURA 4.16 - B) é visível a diferenciação de C-26 e C-27 acoplados a hidrogênios distintos.

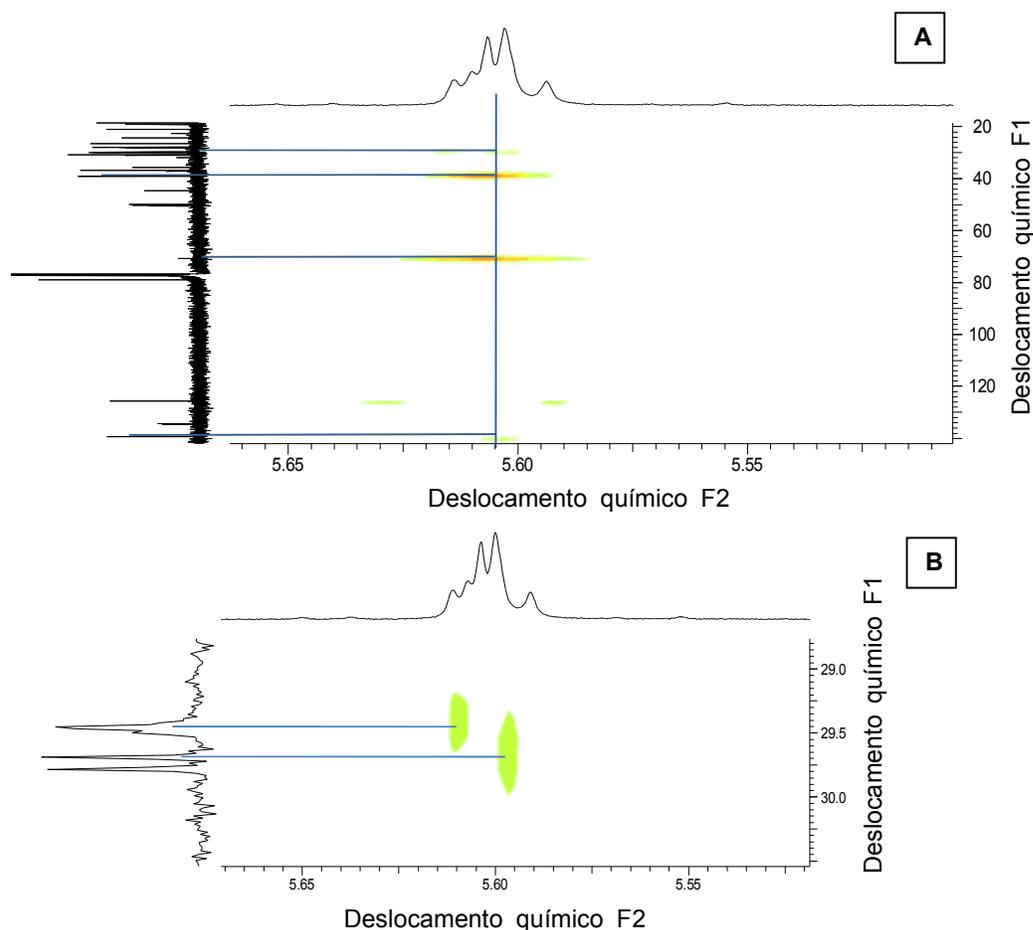


FIGURA 4.16 - Espectros de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do Triterpeno lanostano 1 isolado de *Scleroderma* sp. **A**: Ampliação dos acoplamentos de carbonos com os hidrogênios olefínicos. **B**: Ampliação do acoplamento dos hidrogênios olefínicos com C-26 e C-27 metílicos de δ 29.44 e δ 29.68 respectivamente.

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.17) os 4 sinais com maior deslocamento químico, confirmam a hipótese da presença de duas duplas ligações nesta estrutura, uma endógena ao esqueleto terpenoídico correspondente a C-8 (δ 134.57) e C-9 (δ 134.42), característica em triterpenos lanostanos e outra da cadeia lateral, correspondente a C-23 (δ 125.56) e C-24 (δ 139.44).

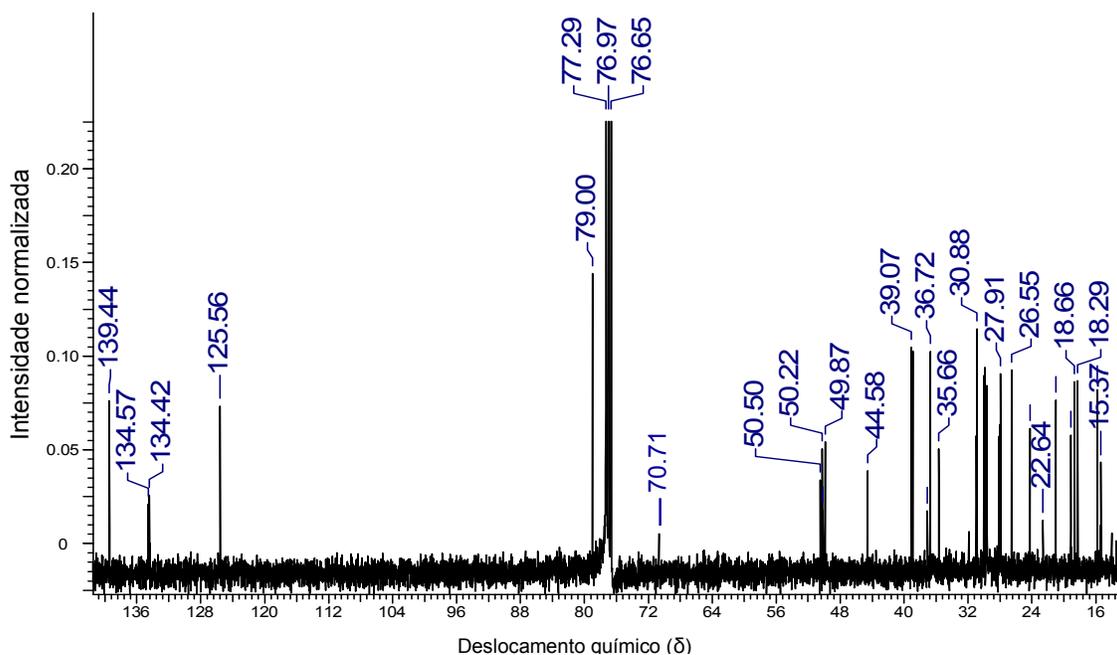


FIGURA 4.17 - Espectro de RMN ^{13}C (400MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 1 isolado de *Scleroderma* sp.

Os sinais carbinólicos com δ 70.71 e δ 79.00 são atribuídos respectivamente ao C-25 e C-3, esse último característico em triterpenos, proveniente da biossíntese desta classe de compostos (FIGURA 1.14).

No RMN ^1H deste triterpeno lanostano 1 há apenas um sinal carbinólico atribuído a H-3, devendo a hidroxila proposta na cadeia lateral não gerar sinal no espectro, por não possuir hidrogênio ligado ao carbono correspondente. De acordo com os dados observados, o duplo dubleto em torno do δ 3.25, referente ao H-3 carbinólico, acopla com C-2 (δ 27.91) e C-29 (δ 15.37) (FIGURA 4.18).

Também em experimento de COSY verificamos acoplamento de H-3 com H-2 metilênicos em uma região mais congestionada do espectro, em torno do δ 1.6, justificando o duplo dubleto apresentado (FIGURA 4.19).

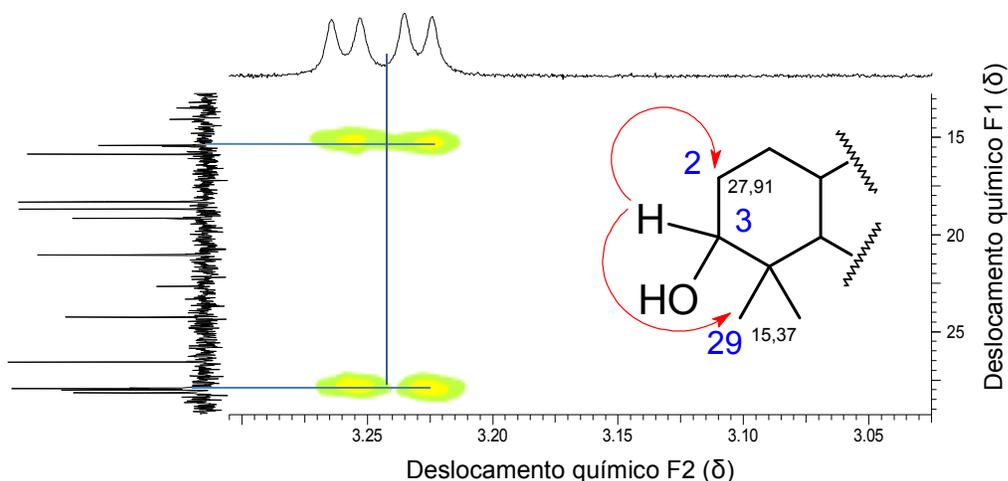


FIGURA 4.18 - Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 1 ampliado na região de acoplamento do H-3 com C-2 e C-29 e respectiva representação na estrutura molecular.

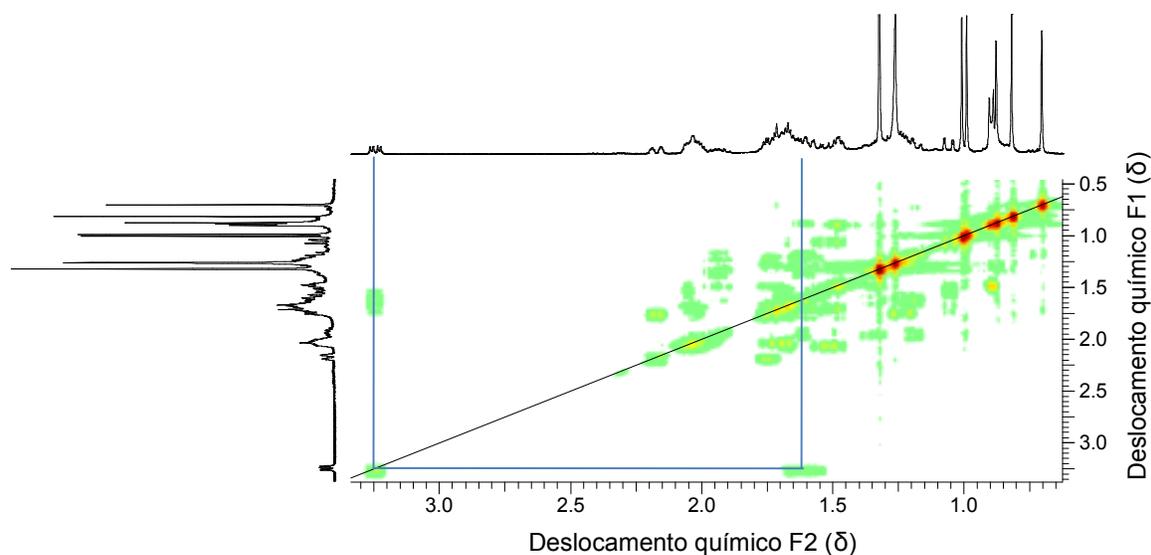


FIGURA 4.19 - Experimento de COSY (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 1 isolado de *Scleroderma* sp. Destaque para o acoplamento do hidrogênio 3 carbinólico com hidrogênios metilênicos e representação do acoplamento observado.

Também decisivos para a caracterização de triterpenos, são os sinais metílicos. Para esta classe de composto a quantidade de singletos nesta região do espectro de RMN ^1H (δ 0 a 1.4 aproximadamente) equivale ao número de metilas (FIGURA 4.20). Ao ampliarmos o espectro do triterpeno lanostano 1 comprova-se

esta equivalência com detalhe apenas para os valores das integrais dos sinais em δ 1.34 e δ 1.28 para 6 hidrogênios cada. Estes, não correspondem a metilas sobrepostas, mas sim a uma sobreposição com sinais metilênicos (FIGURA 4.21).

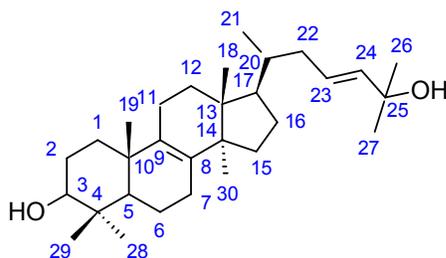


FIGURA 4.20 - Estrutura molecular numerada do triterpeno lanostano 1.

As duas metilas com maior deslocamento químico que as demais (δ 1.34 e δ 1.28) são atribuídas a H-26 e H-27. Estas são fortemente desblindadas por estarem ligadas ao carbono carbinólico da cadeia lateral.

As metilas 28 e 29, próximas ao C-3 carbinólico, são atribuídas respectivamente os singletos com δ 1.03 e δ 0.84 de acordo com experimento de HMBC que mostra acoplamento destas com C-3 (δ 79,0) (FIGURA 4.22).

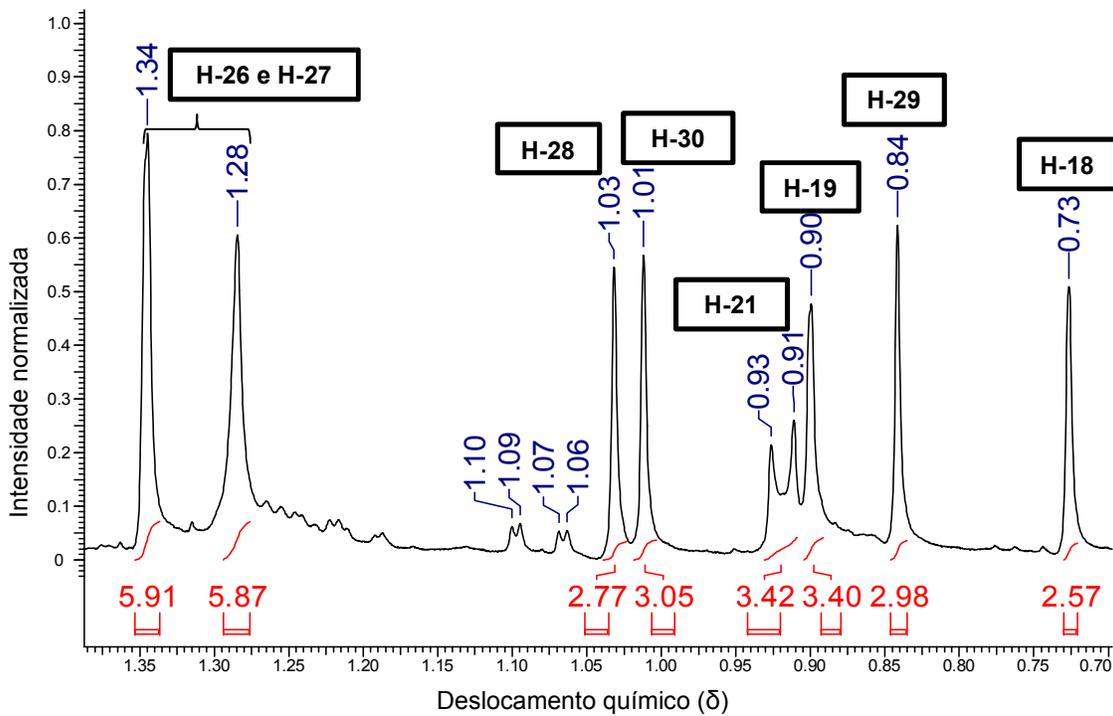


FIGURA 4.21 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 1 ampliado para visualização dos sinais metílicos com respectivas atribuições e valores de integral.

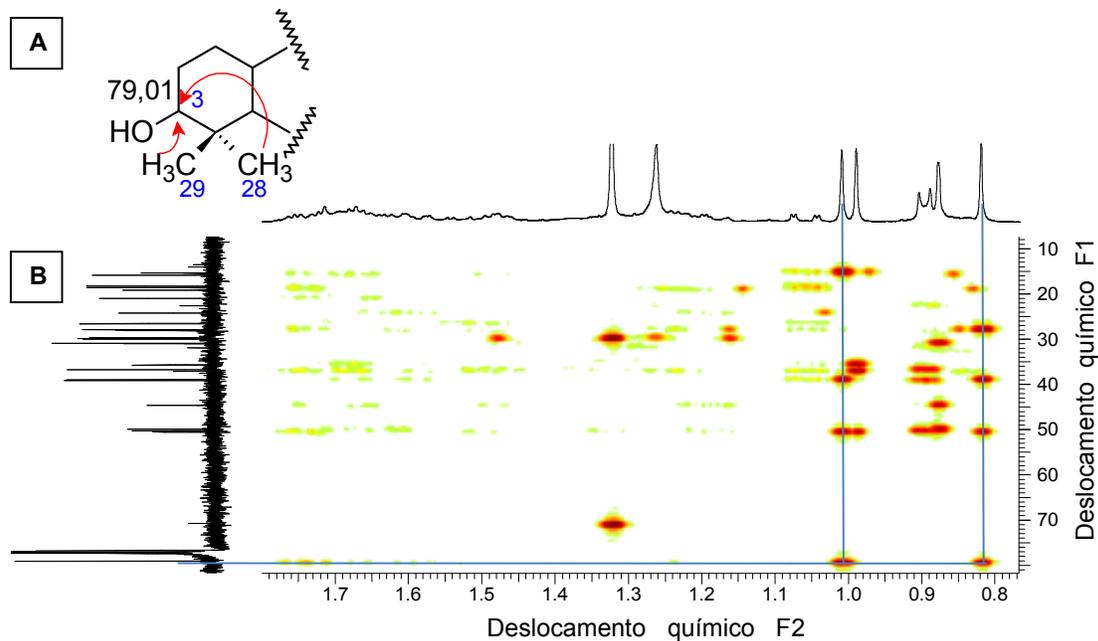


FIGURA 4.22 - **A:** Representação estrutural do acoplamento das metilas 28 e 29 com C-3. **B:** Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 1 ampliado na região de acoplamentos dos hidrogênios metílicos.

Também através da correlação HMBC determinou-se H-19 em δ 0.90 acoplada a C-9 em δ 134.42 e H-30 em δ 1.01 acoplada a C-8 em δ 134.57 (FIGURA 4.23).

Na estrutura molecular do triterpeno lanostano 1 (FIGURA 4.20), a metila 21, atribuída ao dubleto em δ 0.91 a 0.93 no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.21), é a única capaz de gerar este tipo de multiplicidade por possuir um hidrogênio ligado ao mesmo carbono.

Finalmente, a metila 18 foi atribuída no espectro de RMN ^1H como o singlete com δ 0.73. Este é o sinal mais blindado do espectro, pois é a metila mais afastada de grupos com alta densidade eletrônica, sendo o seu ambiente químico muito pouco afetado.

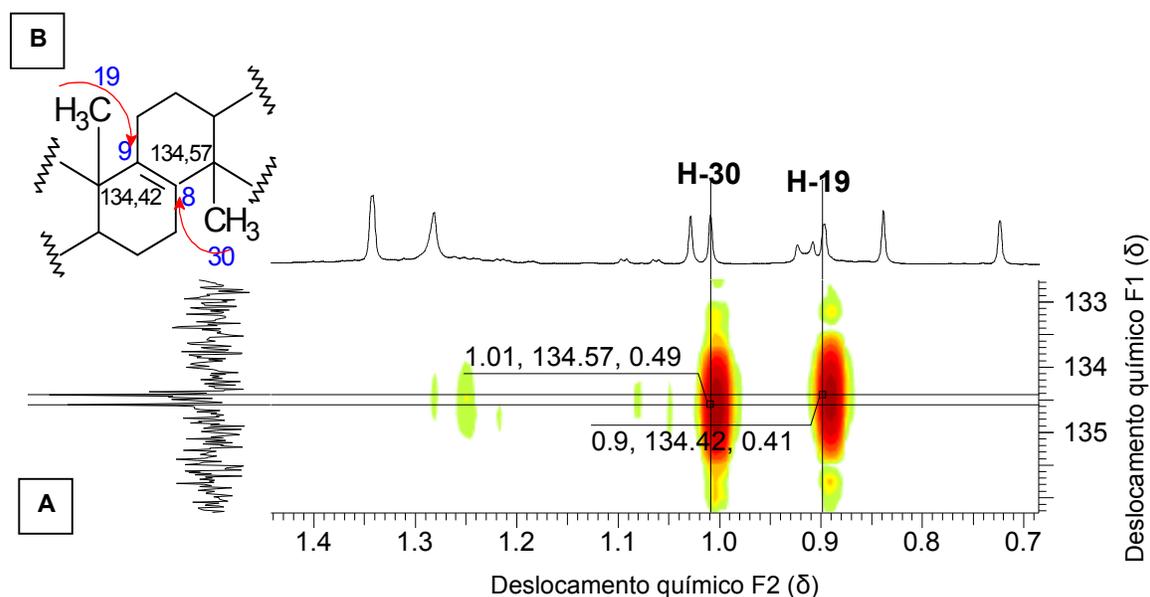


FIGURA 4.23 - A: Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 1. ampliado na região de acoplamento das metilas 19 e 30 com os carbonos olefínicos C-9 e C-8 respectivamente. B: Representação estrutural do acoplamento destacado.

Através da análise dos experimentos de RMN aqui descritos foi possível a atribuição dos sinais para o Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol – triterpeno lanostano 1 (TABELA 4.3).

TABELA 4.3 - Tabela de deslocamentos químicos para o Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol – triterpeno lanostano 1.

Carbono	δ ¹ H	δ ¹³ C	HMBC	COSY
1		35,66		
2		27,91		
3	3,25 (dd, J ₁ =4,4 Hz; J ₂ =11,4 Hz)	79,01	C-2; C-29	δ 1,6
4		38,92		
5		50,51		
6		18,29		
7		27,88		
8		134,57		
9		134,42		
10		37,09		
11		21,03		
12		30,87		
13		44,59		
14		49,89		
15		29,67		
16		27,92		
17		50,22		
18	0,73 (s)	15,83	C-12; C-13; C-14; C-17	
19	0,90 (s)	19,13	C-5; C-9; C-12	
20	2,15 (m)	36,72	C-23; C-24	
21	0,92 (d, J=6 Hz)	18,65	C-17; C-20; C-22	
22	1,06 (dd, J ₁ =2Hz; J ₂ =12,2 Hz)	39,10	C-20; C-21	
23	5,62 (m)	125,56	C-22; C-24; C-25; C-27	H-20; δ 1,6
24	5,62 (m)	139,44	C-25; C-26	
25		70,71		
26	1,34 (s)	29,44	C-23; C-24; C-25; C-27	
27	1,28 (s)	29,68	C-26	
28	1,03 (s)	28,14	C-3; C-4; C-5; C-29	
29	0,84 (s)	15,37	C-3; C-4; C-5; C-28	
30	1,01 (s)	24,24	C-8; C-14	

4.1.3.2 - Triterpeno lanostano 2 (Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol)

A estrutura proposta para o triterpeno lanostano 2 difere apenas pela posição da olefina e hidroxila da cadeia lateral. No espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.24) a principal diferença que notamos é o sinal em δ 4.48 correspondentes ao hidrogênio carbinólico da cadeia lateral, o qual na estrutura proposta para o triterpeno lanostano 1 não gerava sinal de acoplamento no espectro por não possuir hidrogênio diretamente ligado ao carbono carbinólico da ramificação.

O duplo tripleto de δ 4.48 (FIGURA 4.25 - A) é atribuído ao H-23 carbinólico, sendo a multiplicidade observada devido ao acoplamento com H-24 olefínico e H-22 metilênicos (FIGURA 4.25 - B). Esta proposta pode ser confirmada no experimento de COSY (FIGURA 4.26), onde são observadas tais correlações.

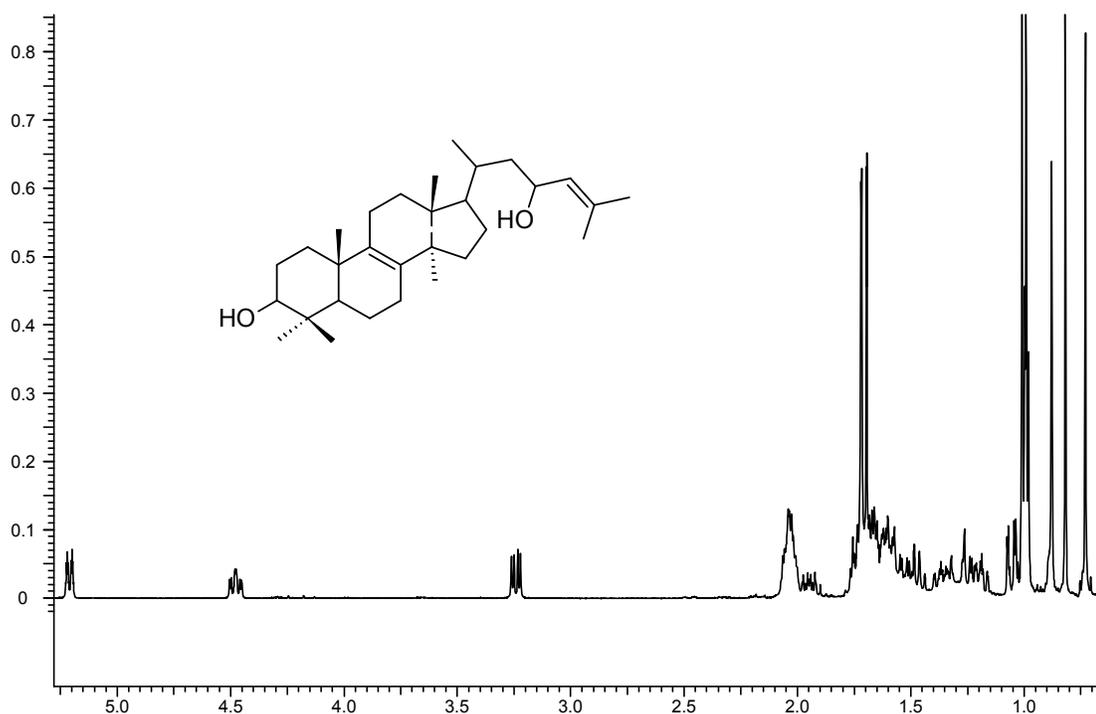


FIGURA 4.24 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 isolado de *Scleroderma* sp. e estrutura molecular proposta.

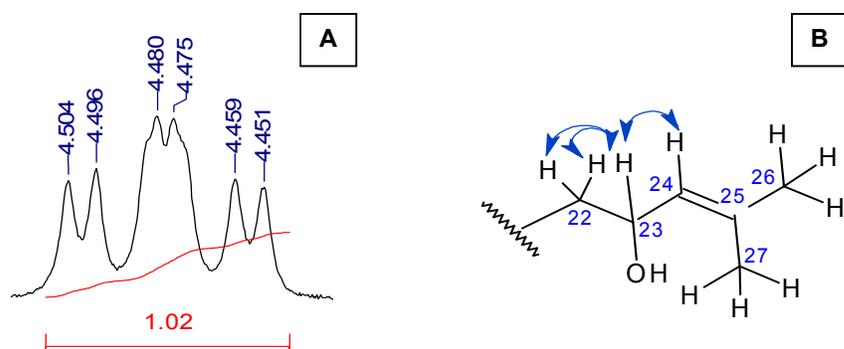


FIGURA 4.25 - **A:** Ampliação do duplo tripleto no RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) atribuído ao H-23 carbinólico da cadeia lateral do triterpeno lanostano 2. **B:** Representação da estrutura proposta com a correlação observada em experimento de COSY (400 MHz; CDCl_3).

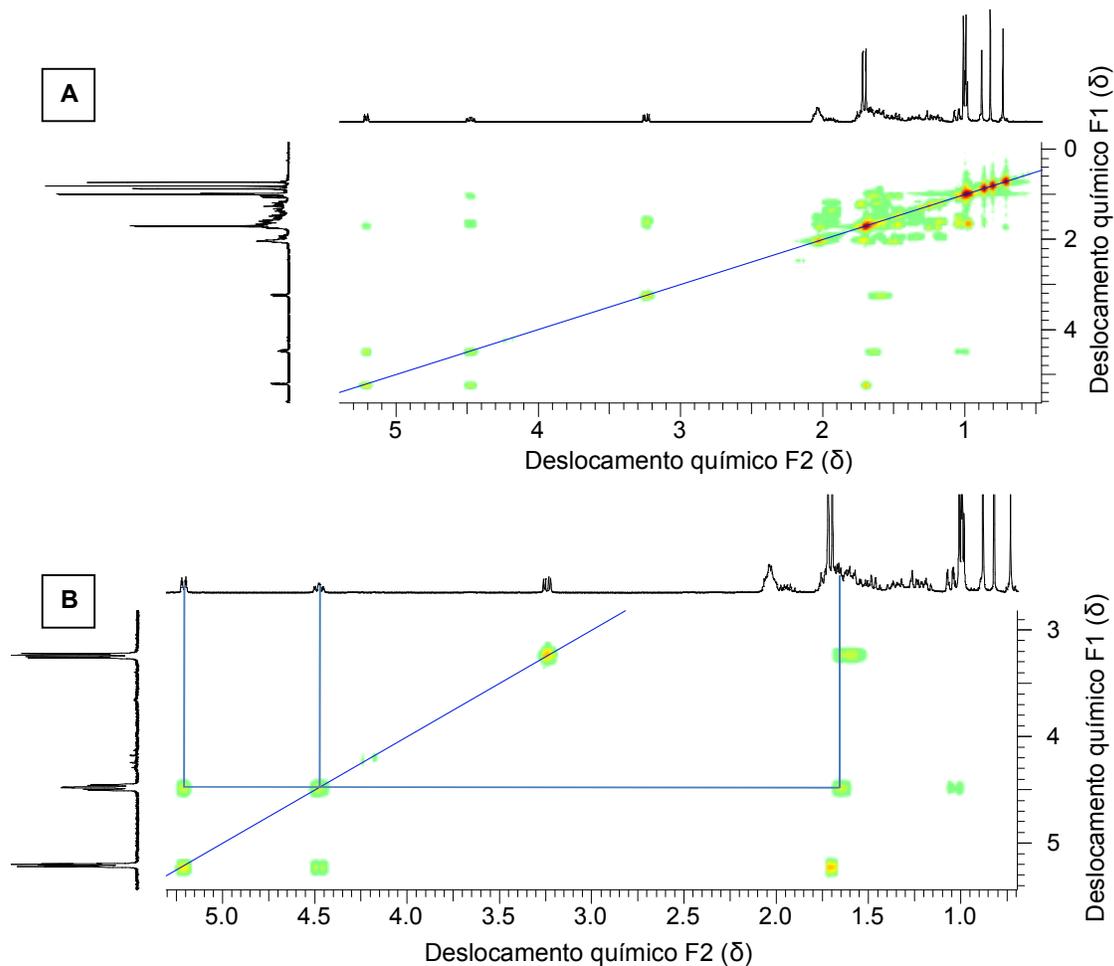


FIGURA 4.26 - **A:** Espectro de COSY (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2. **B:** Ampliação com destaque para as correlações do H-23 carbinólico (δ 4.48) da cadeia lateral.

Na ampliação do espectro de HMBC do triterpeno lanostano 2 (FIGURA 4.27 - A) o H-23 carbinólico da cadeia lateral acopla com C-24, bastante desblindado no espectro (FIGURA 4.27 - B). Esta última informação fortalece a proposta para a estrutura do triterpeno lanostano 2, em que a hidroxila deve ser vizinha a olefina na cadeia lateral.

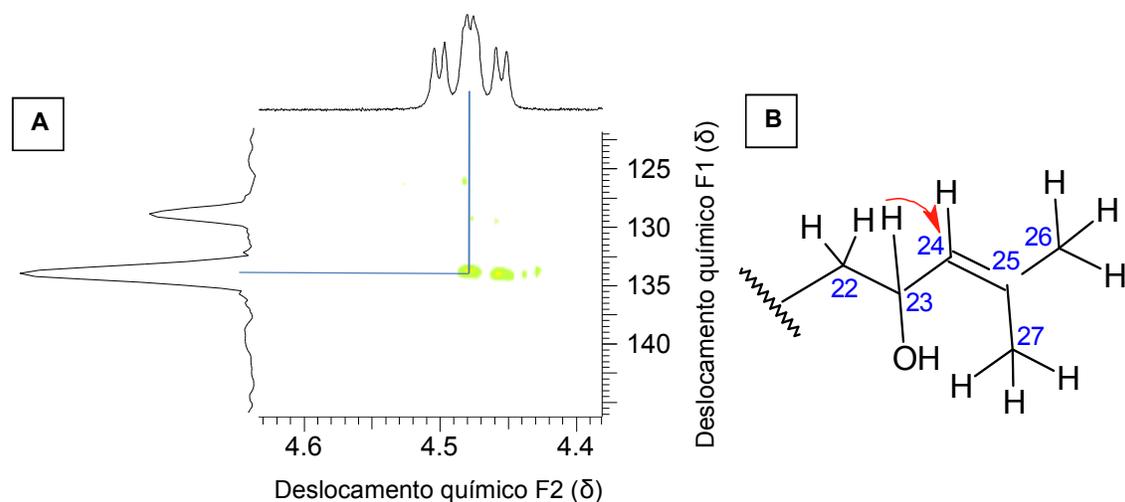


FIGURA 4.27 - **A**: Espectro de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 ampliado na região do H-23 carbinólico da cadeia lateral acoplado com C-24 de δ 133.9. **B**: Estrutura molecular com representação do acoplamento de H-23 com C-24.

Passando para a análise do H-24 olefínico em δ 5.21, observamos um duplo septeto, com integral para 1 hidrogênio, ao ampliarmos o sinal no espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.28 - A). A multiplicidade observada se deve ao acoplamento com as metilas H-26 e H-27 vizinhas à olefina e com o H-23 carbinólico (FIGURA 4.28 - B).

Este acoplamento pode ser claramente observado ao analisarmos o experimento de COSY para esta substância (FIGURA 4.29 - A). Na ampliação fica claro que há acoplamento do H-24 com duas metilas diferentes, mais deslocadas no espectro que as demais metilas (FIGURA 4.29 - B), o que sugere duas metilas vizinhas a olefina. Ao compararmos a proposta estrutural do triterpeno lanostano 2 com o triterpeno lanostano 1, as principais diferenças no espectro de RMN ^1H são os

sinais de metila fortemente desblindados, vizinhos a olefina e o sinal do H-23 carbinólico em δ 4.48.

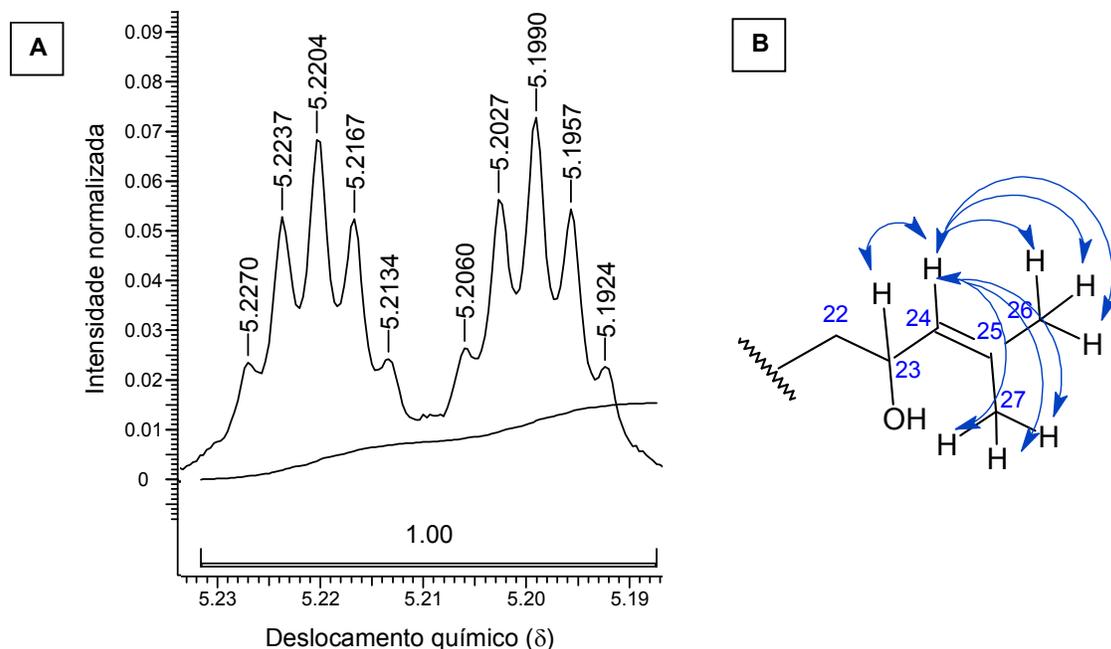


FIGURA 4.28 - **A:** Ampliação do sinal olefínico com δ 5.21 no espectro de RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2. **B:** Estrutura com proposta da correlação hidrogênio- hidrogênio referente ao duplo septeto em δ 5.21.

No experimento de HMBC, onde o hidrogênio acopla com carbonos a mais de uma ligação de distância, observa-se acoplamento do H-24 com um carbono metilênico em torno de δ 26.0 e com um carbono metílico em torno de δ 18, atribuído aos C-22 e C-26 respectivamente (FIGURA 4.30).

O sinal de hidrogênio carbinólico entre δ 3.22 e 3.26 é atribuído ao H-3 da mesma forma que no triterpeno lanostano 1.

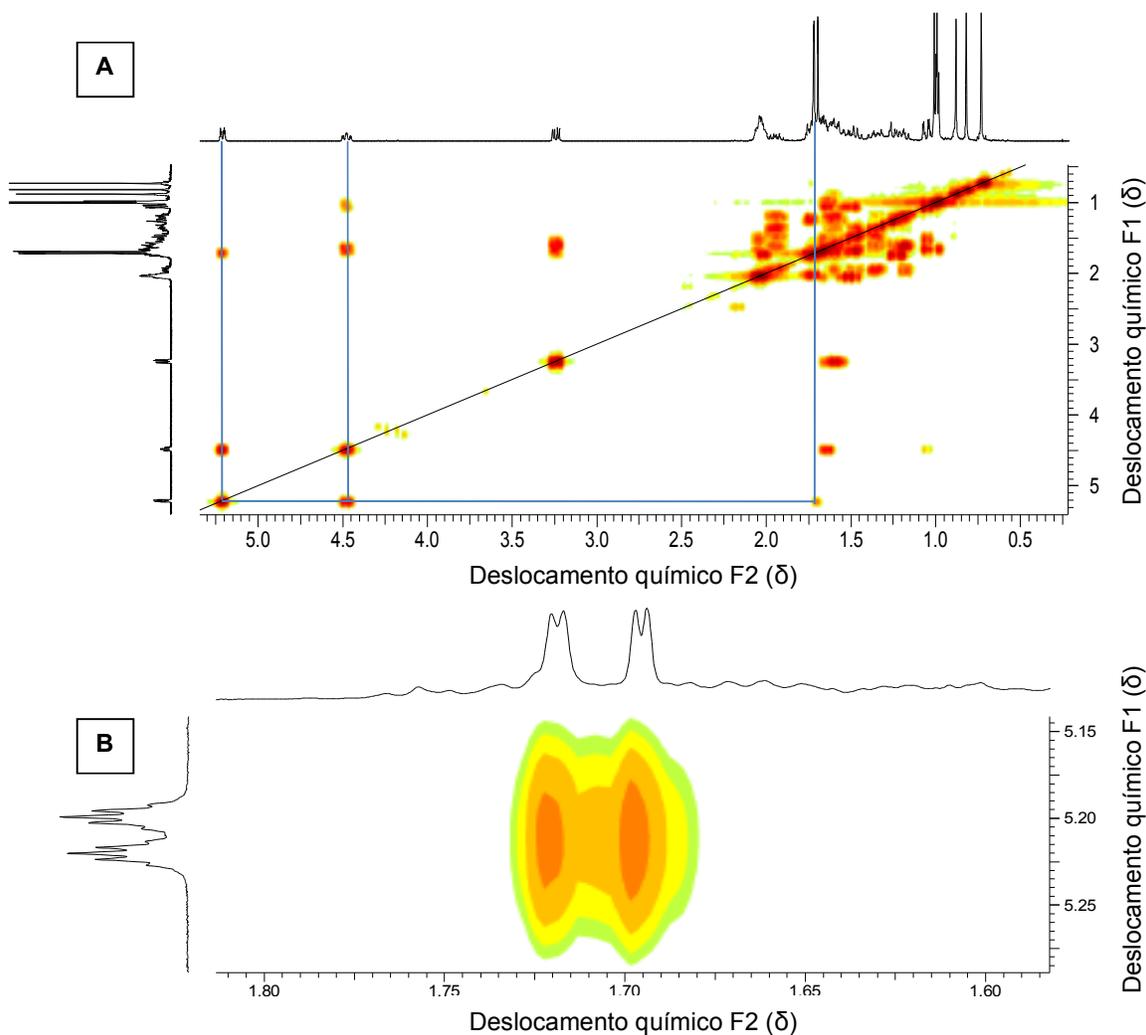


FIGURA 4.29 - **A**: Espectro de COSY (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 isolado de *Scleroderma* sp. **B**: Ampliação na região de acoplamento do H-24 olefínico (duplo septeto) com as duas metilas ligadas ao carbono sp^2 da cadeia lateral, H-26 e H-27.

De acordo com as interpretações já realizadas, atribuiu-se os sinais em torno de δ 1.7 às metilas 26 e 27 (FIGURA 4.31). Estas desdobram em dois dubletos, devido ao acoplamento com o H-24 olefínico (FIGURA 4.29). Também através do espectro de HMBC podemos visualizar o acoplamento de H-26 e H-27 com os C-24 e C-25, os quais são bem desblindados no espectro (FIGURA 4.32).

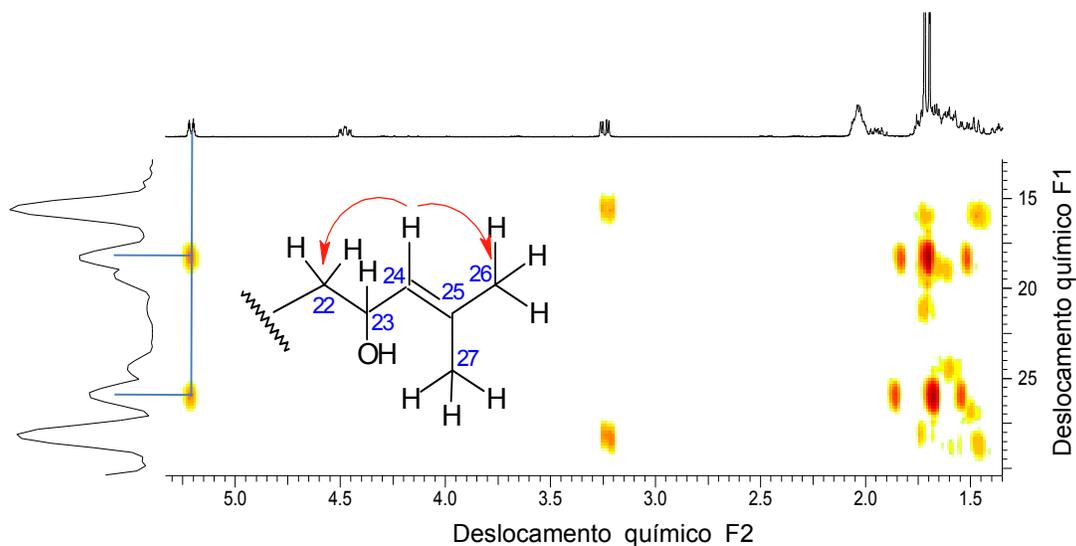


FIGURA 4.30 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl_3) para o triterpeno lanostano 2 destacando acoplamento do hidrogênio olefínico com os carbonos correspondentes.

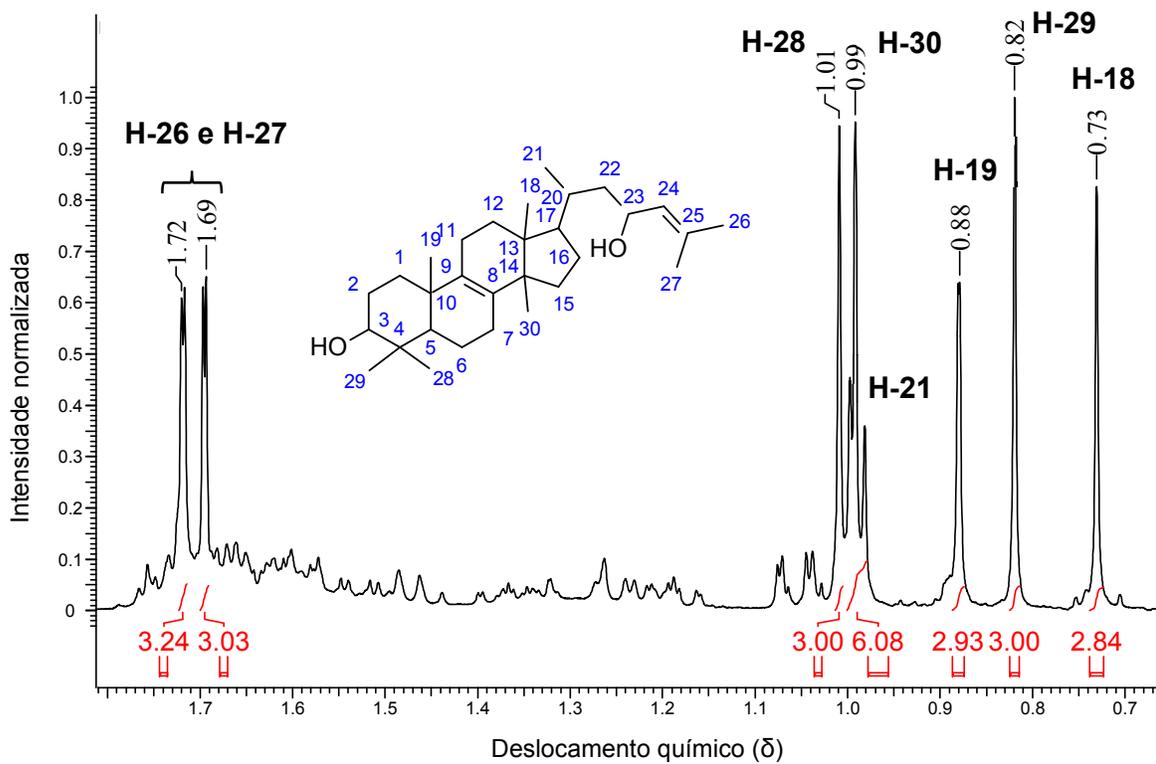


FIGURA 4.31 - Espectro de RMN ^1H (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 ampliado para visualização de todos sinais metílicos (δ 1.8 a δ 0.7) e estrutura molecular proposta numerada.

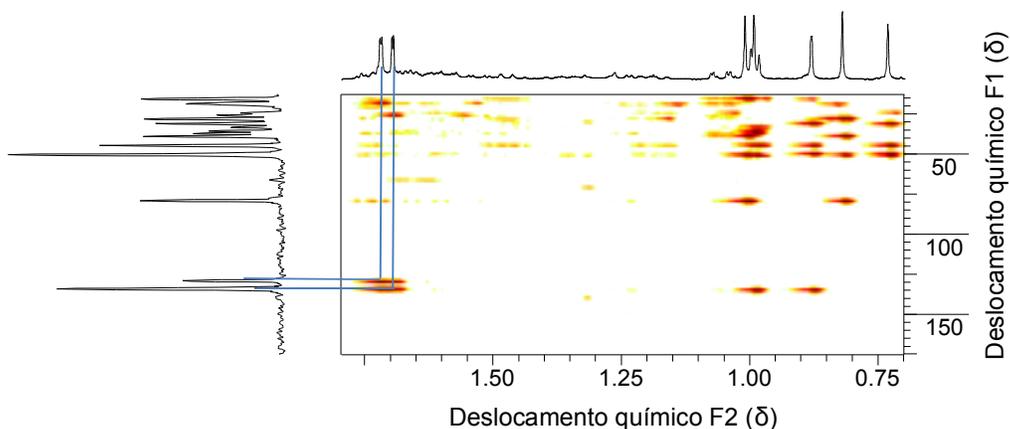


FIGURA 4.32 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 na região de acoplamento dos hidrogênios metílicos. Destaque para H-26 e H-27 acopladas com C-24 e C-25 olefínicos próximos a δ 130.

Os singletos em δ 0.82 e δ 1.01 foram atribuídos às metilas 29 e 28 respectivamente. Assim como no triterpeno lanostano 1, as correlações de H-28 e H-29 com C-3 são claramente observadas no experimento de HMBC (FIGURA 4.33).

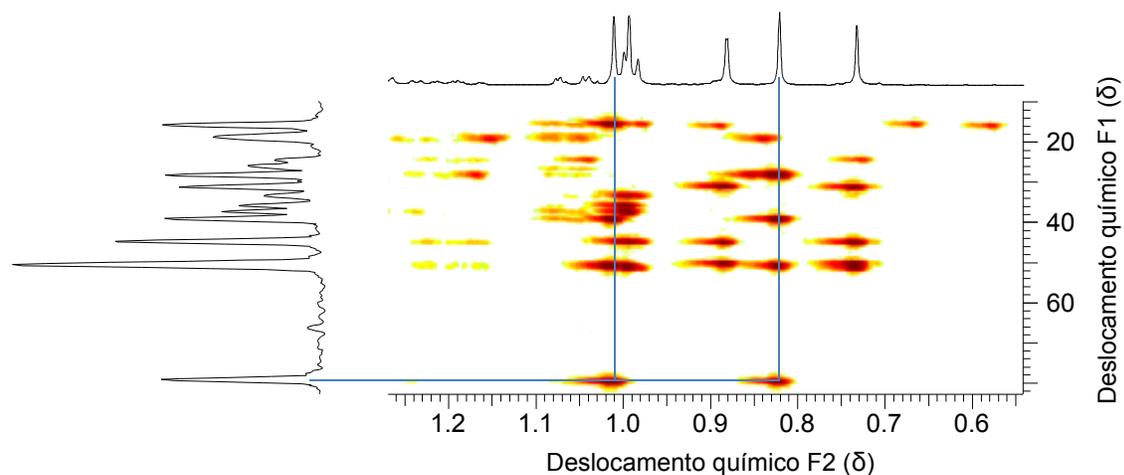


FIGURA 4.33 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 na região de acoplamento dos hidrogênios metílicos. Destaque para H-29 e H-28 em δ 0.82 e δ 1.01 respectivamente, acopladas com o C-3 carbinólico em δ 79.0.

Da mesma forma que no triterpeno lanostano 1, as metilas 19 e 30 acoplam respectivamente com C-9 e C-8 olefínicos em torno de δ 134 (FIGURA 4.34) e a metila 21 é atribuída ao dubleto em δ 0.99. No esqueleto lanostanico há uma única metila com multiplicidade característica de dubleto devido ao H-20 que permite acoplamento no RMN ^1H .

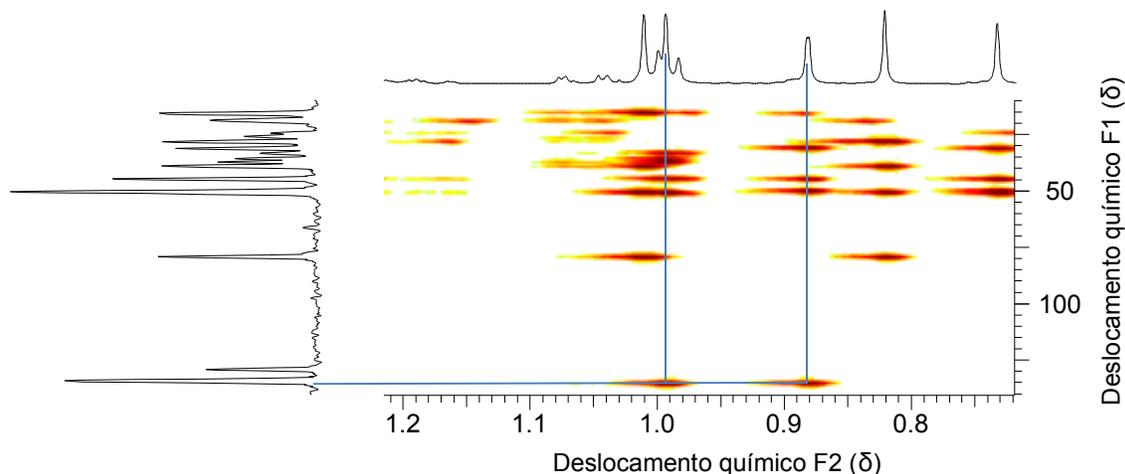


FIGURA 4.34 - Ampliação do experimento de HMBC (400 MHz; CDCl_3) do triterpeno lanostano 2 na região de acoplamento dos hidrogênios metílicos. Destaque para H-19 em δ 0.88 e H-30 em δ 0.99 acoplados respectivamente a C-9 e C-8 olefínicos em torno de δ 134.

Finalmente, H-18 foi atribuído ao singlete em δ 0.73, acoplando no HMBC apenas na região de carbonos metilênicos e metínicos, os quais podem ser observados na FIGURA 4.33 para o sinal mais blindado do espectro.

Através da análise dos experimentos de RMN aqui descritos foi possível a atribuição dos sinais para o Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol – triterpeno lanostano 2 (TABELA 4.4).

TABELA 4.4 - Tabela de deslocamentos químicos para o Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol – triterpeno lanostano 2.

Carbono	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	COSY
1		35,3		
2		27,9		
3	3,23 (dd; J1= 4,4Hz; J2= 11,6 Hz)	79,0	C-2; C-29	δ 1,6
4	-	38,9		
5		51,0		
6		18,9		
7		27,7		
8	-	134,5		
9	-	134,2		
10	-	37,3		
11		21,5		
12		31,0		
13	-	44,2		
14	-	50,0		
15		29,8		
16		27,9		
17	1,063 (d; J1 = 2 Hz)	49,6	C-21	
18	0,73 (s)	15,8	C-12; C-13; C-14; C-17	
19	0,88 (s)	20,2	C-5; C-9; C-12; C-29	
20	1,032 (d; J1 = 2,4 Hz)	45	C-21	
21	0,99 (d; J = 6,4 Hz)	19,1	C-20	
22		26		
23	4,48 (dt; J1 = 2,8 Hz; J2 = 8,6 Hz; J3 = 9,1 Hz)	66,5		H-22; H-24
24	5,21 (dsep; J1 = 1,2 Hz; J2 = J3 = J4 = 1,4 Hz; J5 = 8,4 Hz)	133,9		H-23; H-26; H-27
25	-	129		
26	1,69 (d; J = 1,2 Hz)	18	C-24; C-25; C-27	
27	1,72 (d; J = 1,6 Hz)	26	C-24; C-25; C-26	
28	1,01 (s)	28,1	C-3; C-4; C-5; C-29	
29	0,82 (s)	15,5	C-3; C-4; C-5; C-28	
30	0,99 (s)	24,5	C-8; C-13; C-14	

4.1.3.3 - Análises por GC/MS

Para análise em GC/MS foi necessário derivatizar a amostra em uma reação de sililação, ou seja, substituindo o hidrogênio das hidroxilas pelo grupo trimetilsilano. Este novo grupo adicionado proporciona maior volatilidade, menor polaridade e maior estabilidade térmica a molécula a ser analisada.

A derivatização dos triterpenos lanostanos foi feita adicionando uma mistura de BSA (N,O-bis(trimetilsilil)acetamida) e TMCS (trimetilclorosilano) (5:1), utilizando piridina como catalizador. A reação é iniciada pelo ataque nucleofílico da hidroxila ao grupo trimetilsilano, gerando um estado de transição bimolecular (SN_2), etapa esta determinante na velocidade da reação. Esta etapa é reversível, devendo o grupo abandonador possuir maior basicidade ao grupo que ele substitui para ser favorável. Por fim o grupo abandonador capta o hidrogênio do meio formando HX, que na reação com TMCS é HCl (FIGURA 4.35). A piridina funciona como acceptora de HCl, acelerando a reação devido ao deslocamento do equilíbrio químico.

A substituição em um grupo funcional pelo TMS segue a seguinte ordem de preferência: álcool > fenol > ácido carboxílico > amina > amida. O impedimento estérico é também determinante para a facilidade de reação, sendo que álcoois primários são mais susceptíveis a reagir que secundários e terciários, assim como aminas primárias a aminas secundárias.

A reação foi mantida em banho de aquecimento por 30 min, sendo adicionado ao final do processo 1 mL de ciclohexano e 1 mL de água Milli-Q, de modo a extrair os compostos de interesse na fase orgânica, minimizando interferentes.

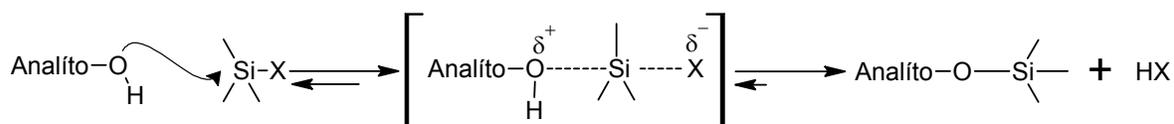


FIGURA 4.35 - Mecanismo genérico de reação de sililação em álcoois, utilizando BSA ou TMCS.

O espectro de massas obtido para as duas espécies contém exatamente os mesmos íons, porém em diferentes intensidades (FIGURA 4.36). Esta diferença de intensidade está diretamente ligada à capacidade de ionização e estabilidade dos íons formados.

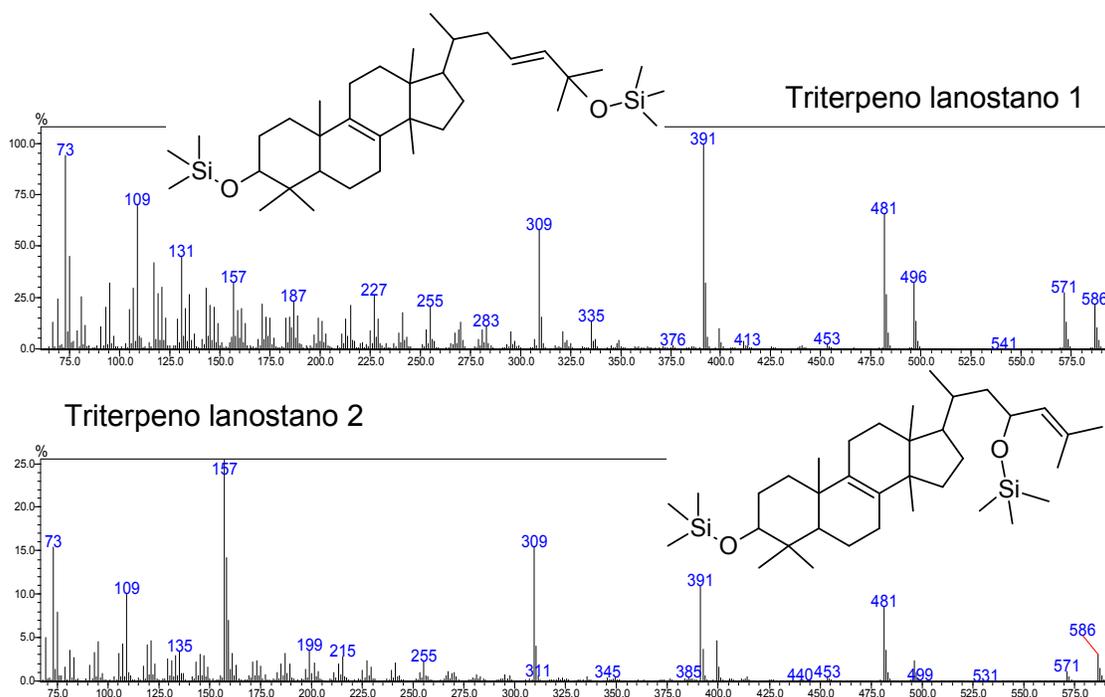


FIGURA 4.36 - Espectros de massas dos triterpenos lanostanos extraídos de *Scleroderma* sp., obtidos em GC/MS após reação de silição.

No triterpeno lanostano 2, a proposta de fragmentação para a formação do íon m/z 157, pico base do espectro, justifica a maior estabilidade da espécie por se tratar de um carbocátion terciário (FIGURA 4.37).

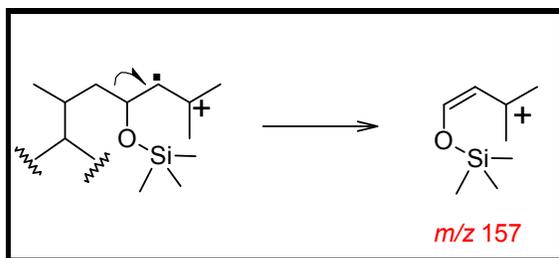


FIGURA 4.37 - Proposta de fragmentação para geração do íon m/z 157 no triterpeno lanostano 2.

O íon m/z 157 formado a partir do triterpeno lanostano 1 é um carbocátion primário. Devido sua menor estabilidade resulta em um pico menos intenso que o pico base deste espectro de massas, como apresentado na proposta de fragmentação (FIGURA 4.38). Esta informação é determinante para diferenciação dos isômeros em estudo.

A formação dos íons m/z 496 a partir de m/z 586, m/z 481 a partir de m/z 571 e m/z 391 a partir de m/z 481 ocorrem, em ambos os substratos, pela saída do grupo trimetilsilano ao captar o hidrogênio α ao carbono carbinólico, com consequente formação de dupla ligação pelo par de elétrons antes compartilhado pelo hidrogênio (FIGURA 4.38 e FIGURA 4.39).

Ao localizar a carga positiva em C-8 é proposta a perda da metila ligada a C-14 através de mecanismo radicalar, sendo observados os íons m/z 571 e m/z 481.

Outros fragmentos são observados, os quais alguns deles são muito comuns em triterpenos, como a abertura do anel "A" através do mecanismo de fragmentação retro Diels-Alder, gerando o íon m/z 309. Também característico a classe dos lanostanos está a formação do íon m/z 109 pela saída da cadeia lateral e posteriormente do grupo trimetilsilano em mecanismo radicalar, havendo grande estabilidade no carbocátion formado devido ao efeito mesomérico do fragmento formado, sendo que uma das estruturas canônicas acomoda em maior parte do tempo a carga positiva por se tratar de carbocátion terciário.

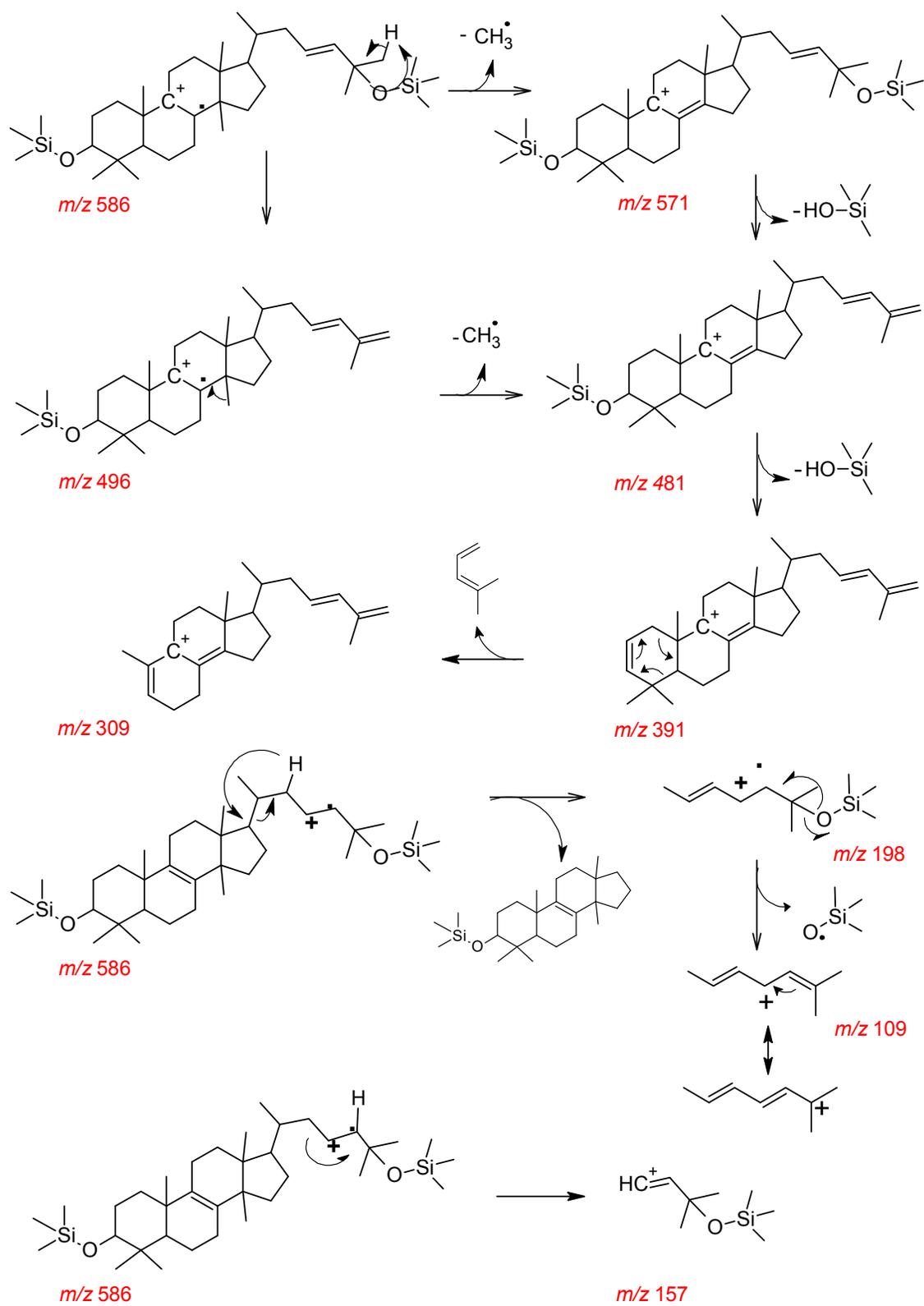


FIGURA 4.38 - Proposta de fragmentação do triterpene lanostano 1 utilizando ionização por elétrons.

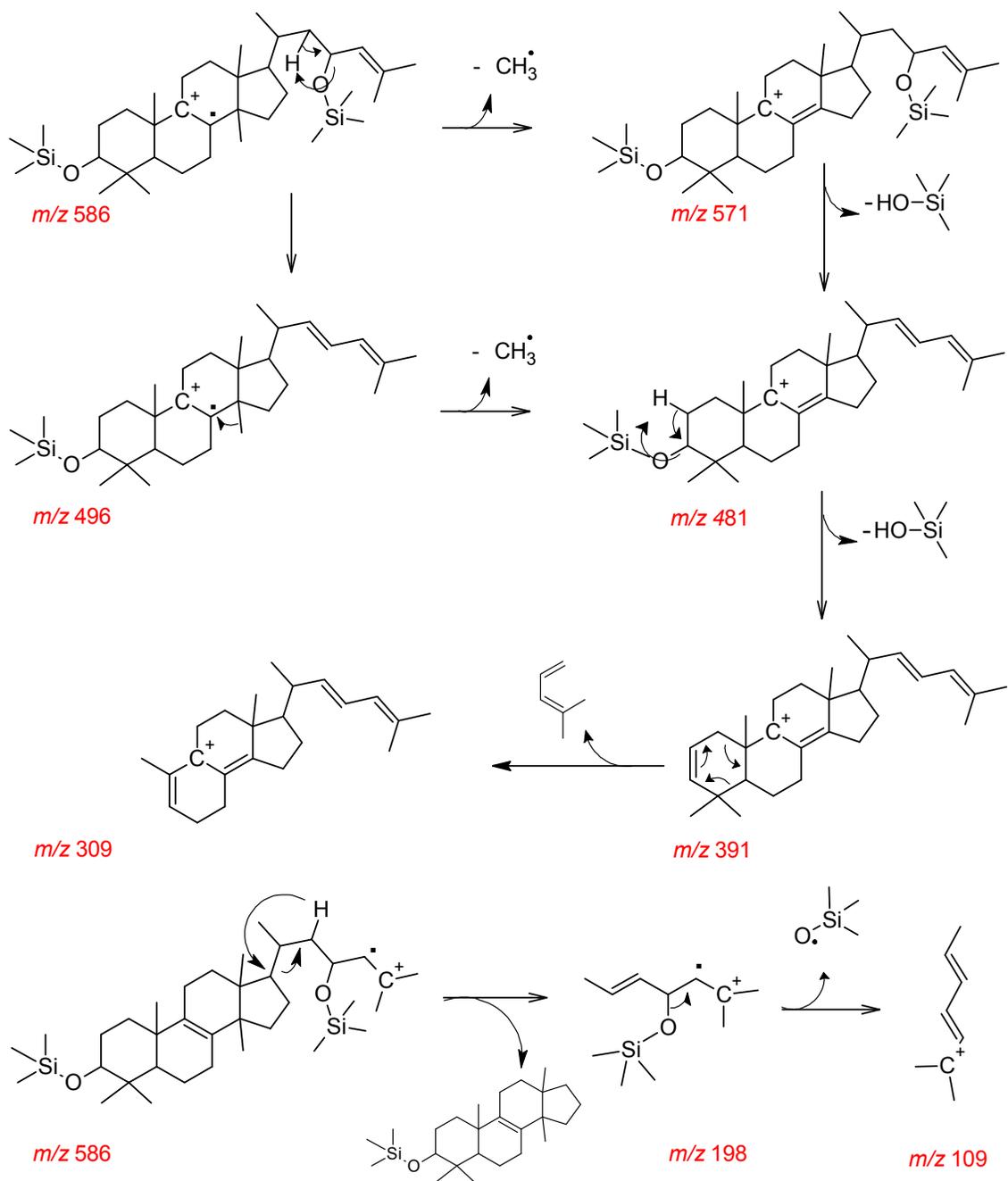


FIGURA 4.39 - Proposta de fragmentação do triterpeno lanostano 2 utilizando ionização por elétrons.

De modo geral, as fragmentações propostas a cada lanosterol apresentam grande semelhança, com variações apenas na cadeia lateral. Dentre os íons observados a formação do íon m/z 157 é decisiva para a atribuição da estrutura molecular ao espectro de massas correspondente.

O isolamento e caracterização dos lanosteróis aqui descritos são de grande interesse, uma vez que não há muitos relatos na literatura a respeito desses metabólitos. Entwistle e Pratt (1968)⁵⁴ foram os primeiros a documentar o isolamento de Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol, ao qual deram continuidade aos estudos nos anos de 1969⁵⁵ e 1973⁵⁶, determinando a configuração absoluta e formação de produtos oriundos ao tratamento ácido do metabólito. No ano de 1976, Vrkoc e colaboradores⁵⁷ relataram pela primeira vez o isolamento do Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol, sendo que nos anos subsequentes poucos estudos foram publicados sobre estes dois terpenóides^{53,58,59}.

A escolha do *Scleroderma* sp. como fonte na busca por metabólitos de interesse teve como base a pouca quantidade de estudos focados e ele e uma pesquisa anteriormente realizada pelo grupo LaBioMMi, em que foram isolados triterpenos lanostanos de *Pisolithus tinctorius*, um basidiomiceto que, assim como o *Scleroderma*, também realiza ectomicorrizas com espécies de *Pinus*.

4.1.4 - Avenacosídeos A e B

Para a identificação dos substratos fez-se experimentos em LC-MS (triplo quadrupolo), monitorando os glicosídeos de interesse através dos EIC. A presença dos substratos na aveia é abundante, como observado nos cromatogramas e espectros de massas obtidos (FIGURA 4.40) e a diferença de massa entre os avenacosídeos A e B é exatamente uma unidade de glicose (162 Da).

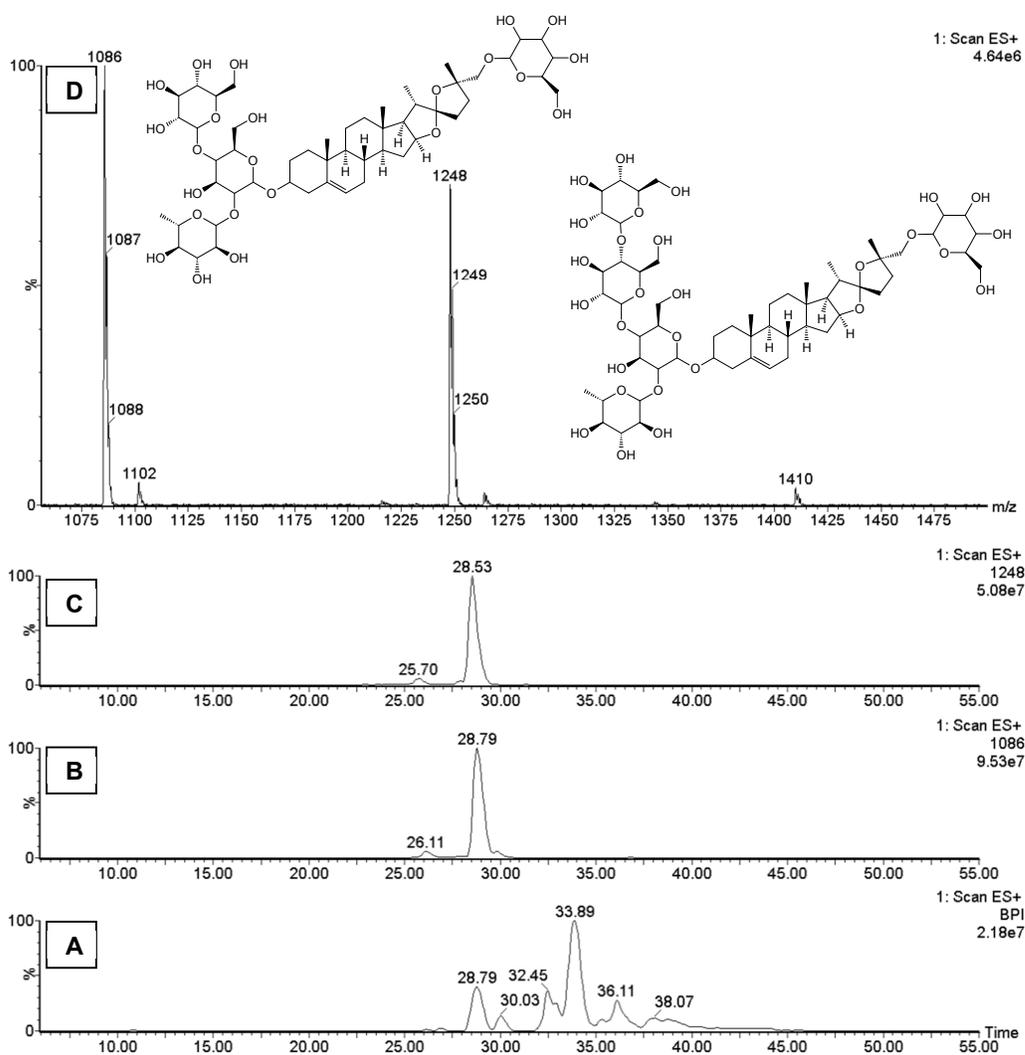


FIGURA 4.40 - **A**: Cromatograma com referência na intensidade do pico base (BPI) em experimento de *full scan* do meio de aveia (branco); **B**: EIC de m/z 1086, avenacosídeo A na fração controle; **C**: EIC de m/z 1248, avenacosídeo B na fração controle; **D**: Espectro de massas para a banda em torno de 28.79 minutos destacando os avenacosídeos A e B com suas respectivas estruturas.

Como forma de confirmar a identificação dos avenacosídeos A e B, fez-se análise de massas em alta resolução (Q-TOF), obtendo com isso a massa exata dos substratos monitorados no experimento de estudo metabólito de *Xylaria* cultivada em meio de aveia. Os espectros (FIGURA 4.41) foram obtidos utilizando ionização ESI+. A informação de massa exata, assim como a proporção dos isótopos de uma molécula, possibilita a determinação de fórmulas elementares através de ferramentas estatísticas do software de processamento de dados Agilent

MassHunter. O perfil isotópico, assim como a massa exata são uma assinatura da molécula, conferindo segurança na inferência realizada.

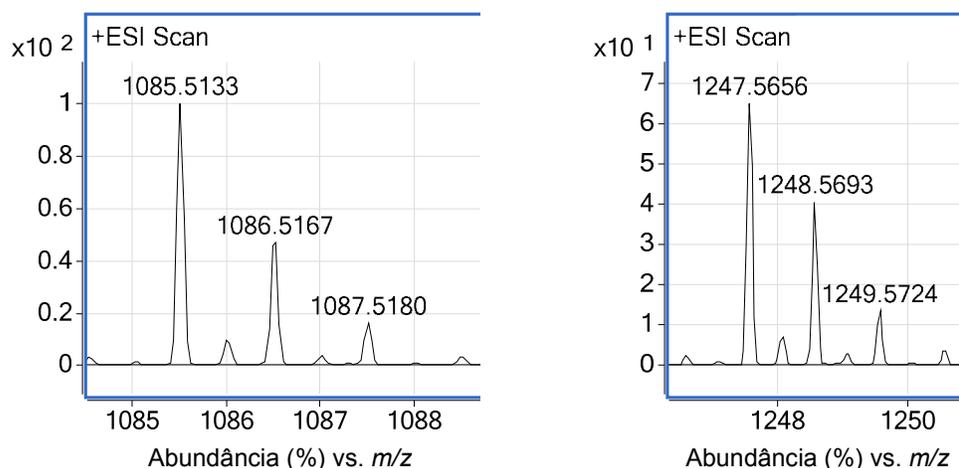


FIGURA 4.41 - Análise em LC/MS Q-TOF com ionização ESI + dos avenacosídeos A e B.

Os metabólitos utilizados nos experimentos de biotransformação com *Xylaria* sp. foram todos identificados e caracterizados. Porém, antes da realização dos experimentos foi necessário desenvolver as metodologias de extração, de modo a obter os produtos de biotransformação com maior rendimento. Garantindo um bom rendimento dos produtos de bioconversão, torna-se mais fácil a otimização do processo e obtenção de resultados satisfatórios.

4.2 - Desenvolvimento de metodologias de extração – Ácido oleanólico e Steviosídeo

O micélio e o meio de cultivo de cada experimento foram separados por filtração e submetidos a protocolos diferenciados de extração. Esta foi uma primeira etapa de segregação e purificação das matrizes.

Dentre as metodologias testadas, o etanol proporcionou a melhor resposta à recuperação de ácido oleanólico do micélio ao comparar com os demais solventes aplicados, sendo, portanto, selecionado para experimentos posteriores em maior escala. Já o meio líquido não obteve resultados satisfatórios nos procedimentos de extrações líquido-líquidos adotados, havendo preferência pelo uso total do caldo através de liofilização deste com posterior purificação via cromatografia líquida de bancada, utilizando sílica gel 230-400 Mesh. Dessa forma, a perda no meio líquido de produtos oriundos do metabolismo do fungo é minimizada.

No experimento preliminar envolvendo o steviosídeo não foi possível observar metabólitos oriundos do metabolismo do fungo em nenhuma das frações – micélio e meio líquido – quando observados em detector de DAD acoplado ao HPLC, portanto, da mesma forma que o ácido oleanólico, a liofilização do meio líquido foi utilizada nos experimentos seguintes.

Para se determinar a metodologia de extração da massa micelial do experimento contendo steviosídeo, novos testes foram considerados utilizando meio sólido BEA em placa de Petri. De acordo com os cromatogramas obtidos (FIGURA 4.42), definiu-se a extração do micélio em metanol e água (7:3) apropriada aos demais estudos do substrato em questão.

O método cromatográfico para análise das frações provenientes do experimento com ácido oleanólico foi exploratório, em que se inicia com um eluente fraco, variando gradativamente até o mais forte. A grande diversidade de metabólitos produzidos ou transformados pelo fungo exige esta abordagem no HPLC, de modo que haja resolução cromatográfica entre as bandas. Para o steviosídeo não foi diferente, ao qual para proporcionar comparação válida entre as diferentes frações fez necessário um método com início em 20% e término em 100% de acetonitrila em água.

O experimento cultivado em meio sólido BEA resultou em três diferentes amostras após tratamento em SPE-ODS. Destas, apenas a fração eluída com metanol água 1:1 e a eluída somente com metanol continham metabólitos detectáveis em UV-Vis, entretanto com t_R muito distintos uns aos outros. Já a amostra de referência - Stevita[®] - apresentou t_R intermediário às anteriores (FIGURA

4.42), fato este determinante à escolha do método de análise descrito (TABELA 3.10).

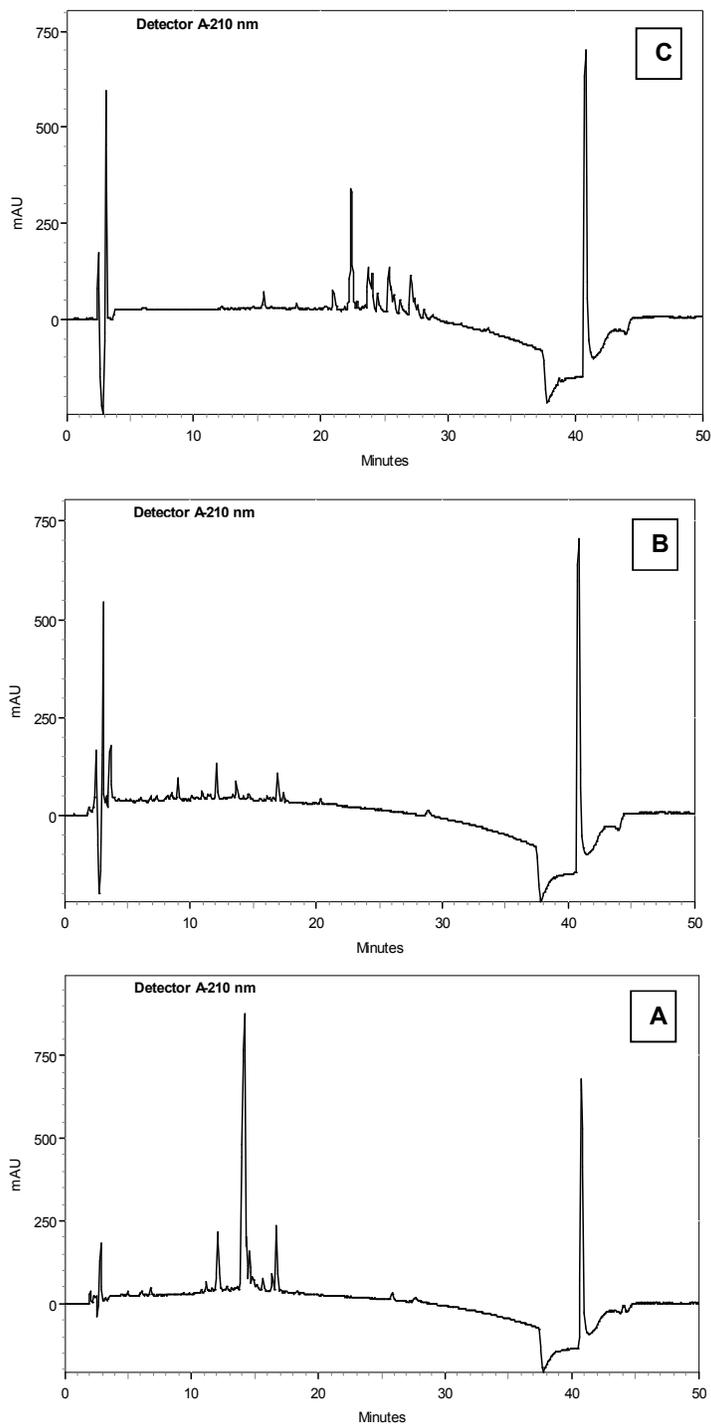


FIGURA 4.42 - cromatogramas com detector DAD a 210 nm. **A:** Stevita[®]; **B:** Fração SPE-ODS metanol e água (1:1) do extrato de *Xylaria* em meio sólido BEA; **C:** Fração SPE-ODS metanol 100%

Este estudo de caráter preliminar para seleção da metodologia de extração mais adequada proporcionou os primeiros indícios sobre os produtos biotransformados de steviosídeo.

Na fração SPE-ODS metanol e água (1:1) deste experimento (FIGURA 4.42-B) é observada uma banda em torno de 9 min, a qual inexistente no padrão de Stevita[®] (FIGURA 4.42-A). Isto indica a produção de um derivado de maior polaridade, como por exemplo, uma molécula mais hidroxilada ou mais glicosilada.

Outra observação importante é referente a banda correspondente ao Steviosídeo, em torno de 13 min, a qual diminuiu consideravelmente ao compararmos as demais bandas no mesmo espectro (FIGURA 4.42-B) às bandas do padrão Stevita. Estas relações são observadas em experimentos posteriores analisados através de espectrometria de massas em analisador de alta resolução (Q-TOF) (4.3.2), o qual irá confirmar a produção de Rebaudiosídeos A e E e consumo de Steviosídeo.

Outro resultado obtido neste experimento é a banda em torno de 22 min. na fração SPE-ODS metanol 100% (FIGURA 4.42-C), correspondente a um composto com menor polaridade que o steviosídeo e conseqüentemente maior tempo de retenção. Uma banda com maior tempo de retenção que o steviosídeo foi, também, observada em experimento posterior analisado em espectrômetro de massas (Q-TOF). Nesta ocasião constatou-se a produção de steviolbiosídeo na fração biotransformada, o qual é exatamente o steviosídeo com uma unidade de glicose a menos, o que justifica a menor polaridade do composto.

4.3 - Estudo do metabolismo da *Xylaria* sp. frente aos substratos

4.3.1 - Ácido oleanólico

Os extratos provenientes do meio líquido e micélio do experimento de biotransformação geraram 5 fração, denominadas A, B, C, D e E, após purificação via cromatografia líquida de bancada. Estas foram analisadas por CCD, utilizando como referência o próprio padrão de ácido oleanólico, isolado de cravo da Índia, o qual foi denominado OA. As placas de CCD foram reveladas em luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e em vanilina-sulfúrica seguido de aquecimento. A luz UV excita as espécies, que se tornam fluorescentes nesses comprimentos de onda. Já a vanilina sulfúrica é um adsorvente impregnado com agente fluorescente que possibilita a visualização das substâncias que normalmente não são excitadas pela baixa energia do comprimento de onda na região do UV.

Nos produtos observados através das CCD realizadas (FIGURA 4.43) a fração “A”, proveniente do extrato do meio líquido do cultivo do fungo em presença do substrato, apresenta as diferenças mais visíveis em relação à mesma fração oriunda do meio de cultivo apenas, e do meio com o micro-organismo, ausentes do substrato. Além do analito que aparenta ser o próprio substrato utilizado, o qual aparece em tempo de retenção inalterado, é possível detectar outros compostos de maior polaridade, ou seja, menor tempo de retenção. De fato, reações enzimáticas como, por exemplo, hidroxilações ou glicosilações, as quais aumentam a polaridade da substância, são esperadas para este micro-organismo, havendo sido relatadas em trabalhos anteriores do grupo LaBioMMi^{28,60}.

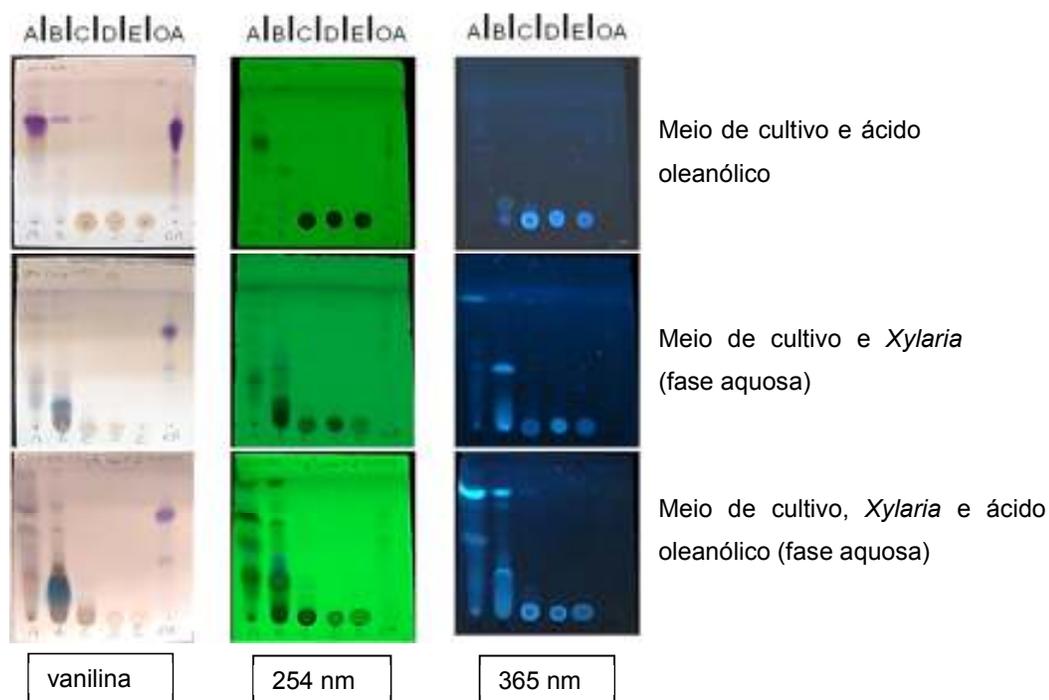


FIGURA 4.43 - CCD das frações correspondentes ao meio de cultivo apenas, após filtração para separação do micélio em experimento de biotransformação do ácido oleanólico. As aplicações de “A” a “E” correspondem as diferentes frações da purificação via cromatografia líquida de bancada. A última aplicação denominada “OA” se refere ao ácido oleanólico isolado de cravo da Índia. As placas são reveladas em vanilina sulfúrica e UV (254 e 365 nm).

O extrato micelial indica, através de CCD, maior diferença na fração “B” proveniente da etapa de purificação. Visualmente, há compostos com polaridade ligeiramente menor que o ácido oleanólico, aparecendo em maiores tempos de retenção (FIGURA 4.44).

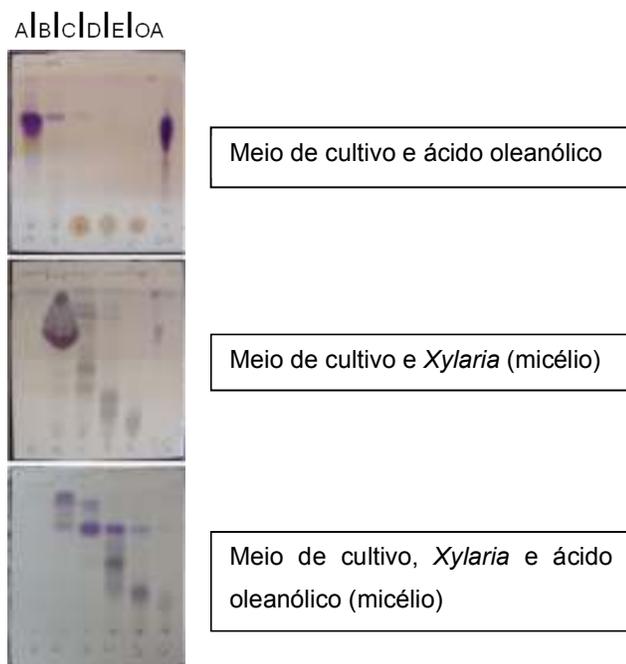


FIGURA 4.44 - CCD das frações correspondentes ao micélio, após filtração para separação do meio de cultivo do experimento de biotransformação do ácido oleanólico. As aplicações de “A” a “E” correspondentes as diferentes frações da purificação via cromatografia líquida de bancada. A última aplicação, à direita, denominada “OA” se refere ao ácido oleanólico. Revelação em vanilina sulfúrica.

As frações foram analisadas em LC/MS (Q-TOF; APCI+) para verificação das mudanças metabólicas ocorridas.

O consumo do substrato pelo micro-organismo foi praticamente total. Após crescimento do fungo em presença do substrato, este não foi detectado no micélio, sendo encontrado apenas em traços no meio de cultivo líquido do experimento. O cromatograma do meio líquido contém uma banda em 16 minutos referente ao ácido oleanólico com relação sinal ruído igual a 26.2 (FIGURA 4.45-A), o qual é observado no espectro de massas correspondente com m/z 439.3622 (FIGURA 4.45-C). No cromatograma do micélio não é observada banda correspondente a substância (FIGURA 4.45-B).

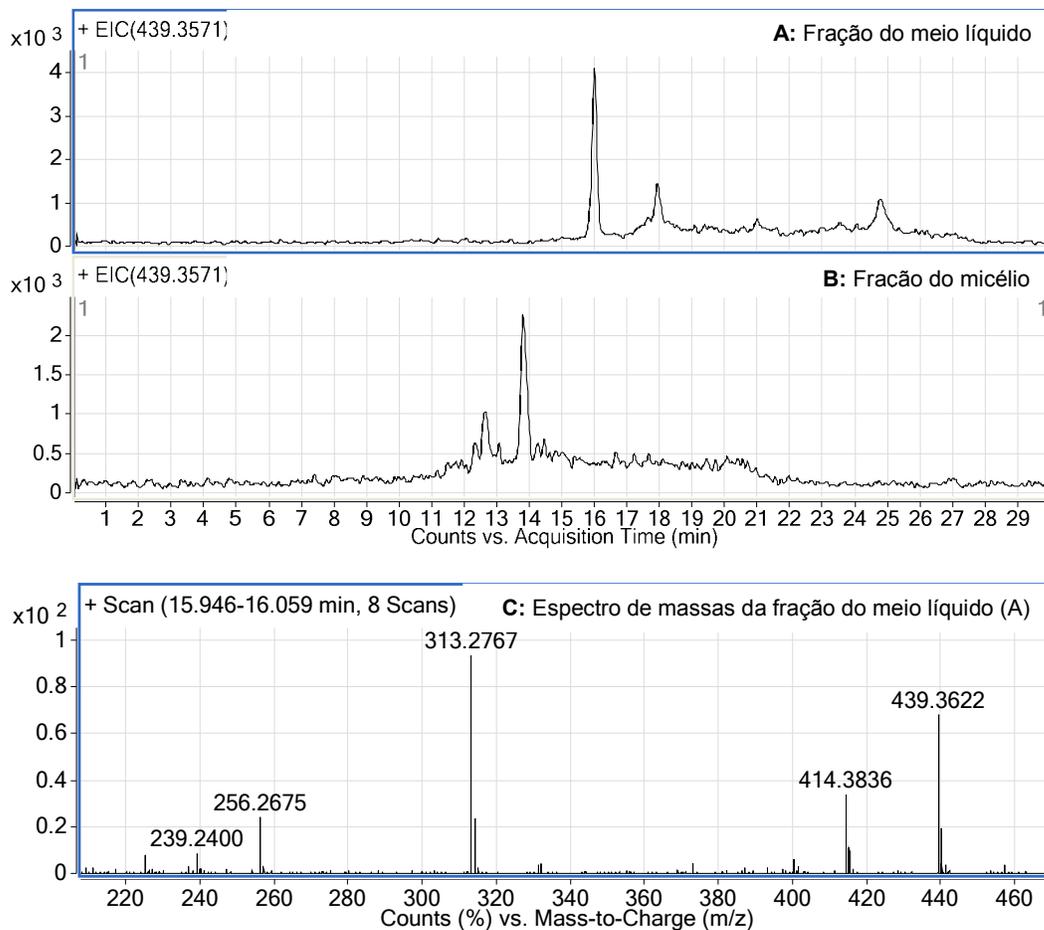


FIGURA 4.45 - **A**: Cromatograma do íon extraído m/z 439.3571, referente ao ácido oleanólico, do meio líquido de cultivo em experimento de biotransformação deste substrato frente a *Xylaria* sp. **B**: Cromatograma do íon extraído m/z 439.3571, referente ao ácido oleanólico, do micélio do experimento de biotransformação deste substrato frente ao micro-organismo. **C**: Espectro de massas do cromatograma "A" (meio líquido) em 16 minutos.

Apesar de observado consumo do substrato via CCD e aparente mudança metabólica, não foram detectados via LC-MS produtos de biotransformação usuais, como os derivados glicosilados, hidroxilados ou metilados ou mesmo com perda de hidroxila, carboxila ou metila. É possível que o sistema enzimático da *Xylaria* tenha biotransformado o substrato em outro produto ou ainda que tenha usado o substrato em sua totalidade como fonte de carbono para manutenção de seu metabolismo. Estas opções são possíveis se pensarmos que um micro-organismo possui várias rotas enzimáticas, as quais são ativadas ou

silenciadas de acordo com as condições de cultivo, necessidades metabólicas da espécie ou mesmo por algum stress causado⁶¹⁻⁶³.

4.3.2 - Steviosídeo

Após o período de cultivo da *Xylaria* junto ao adoçante Stevita[®], fez-se purificação via cromatografia líquida de bancada (fase normal), gerando com isso 5 novas frações nomeadas de A a E, as quais foram analisadas em CCD, também em fase normal, junto ao padrão steviosídeo (FIGURA 4.46). A fração C apresentou diferenças mais aparentes ao compará-la com a fração equivalente do fungo cultivado em ausência de steviosídeo.



FIGURA 4.46 - CCD das frações purificadas do extrato micelial do experimento de biotransformação do steviosídeo.

No extrato micelial, as frações C e D foram juntadas, denominando-se deste ponto em diante CD, sendo comparadas com o experimento controle e as demais amostras provenientes do micélio do fungo (A, B e E). No branco, como esperado, não foi detectado nenhum glicosídeo similar ao steviosídeo.

Ao analisarmos esta fração CD via LC/MS (Q-TOF) (ESI+), foi constatado o consumo do steviosídeo e produção da aglicona (m/z 319.2272), steviolbiosídeo (m/z 665.3138) e dos rebaudiosídeos A e E (m/z 989.4198). Através dos EIC sobrepostos desta fração para as espécies mencionadas e os respectivos valores de área das bandas (FIGURA 4.47-A) observa-se que a área da banda referente aos rebaudiosídeos é mais expressiva que a correspondente ao steviosídeo.

Comparando com a análise da referência Stevita[®], o EIC dos glicosídeos sobrepostos apresenta área de banda do steviosídeo em torno de 4 a 5 vezes maior que os rebaudiosídeos, o perfil inverso ao apresentado na amostra biotransformada. A intensidade dos íons é relativa ao número de íons que chegam ao detector, o que não somente corresponde a quantidade desta molécula na amostra, mas também a facilidade de ionização da mesma. Ao compararmos glicosídeos de estruturas semelhantes espera-se um potencial de ionização também parecido entre as espécies, não descartando assim a intensidade dos íons como relativa à proporção entre eles na amostra.

Para esta comparação foram consideradas as mesmas condições de análise em LC/MS. Foram testadas diversas condições de ionização por electrospray para confirmar o resultado observado. Esta otimização foi necessária, pois dependendo dos valores ajustados aos diferentes parâmetros da fonte, pode haver fragmentação antes do íon entrar no primeiro analisador. Estas fragmentações na fonte podem mascarar resultados, gerando falsos íons moleculares. Um exemplo clássico é a perda de hidroxilas em forma de água, o qual é demonstrado nesse trabalho nas análises de LC/MS dos triterpenos lanostanos isolados de *Scleroderma* sp. (FIGURA 4.11 e FIGURA 4.12). Nos triterpenos lanostanos aqui expostos apenas é observado o íon molecular protonado após a perda de uma molécula de água.

Como os resultados mostram diferentes formas de moléculas glicosiladas, foi necessário eliminar a possibilidade de haver perda de glicose no momento da ionização, o que traria dúvida às conclusões obtidas.

Ao extrairmos o espectro de massas da banda em torno de 8.4 min (FIGURA 4.47-B) da amostra CD, observamos a diferença na abundância das

espécies acima mencionadas, com exceção do steviolbiosídeo que possui t_R em torno de 9.1 minutos.

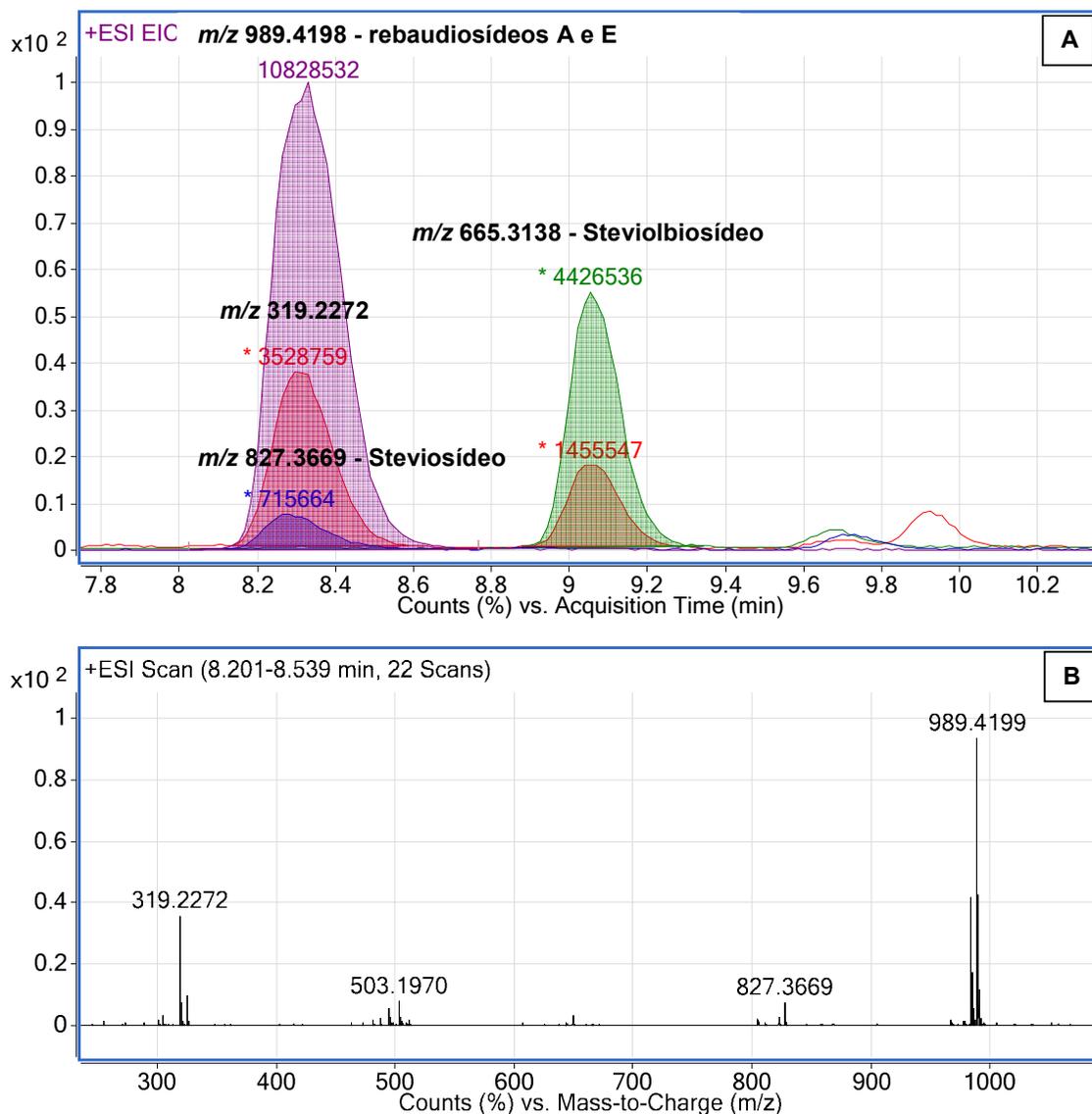


FIGURA 4.47 - Análise realizada em LC/MS ESI+ (Q-TOF) de fração do experimento de biotransformação do steviosídeo. **A:** EIC sobrepostos da: aglicona do steviosídeo (m/z 319.2272), steviolbiosídeo (m/z 665.3138), steviosídeo (m/z 827.3669) e rebaudiosídeos A e E (m/z 989.4199), com os respectivos valores das áreas das bandas; **B:** Espectro de massas das bandas entre t_R 8.20 e 8.54 min.

Da mesma forma que os rebaudiosídeos, o steviolbiosídeo, íon de m/z 665.3138, também apresentou grande diferença em comparação ao steviosídeo de

m/z 827.3669. Na referência o steviosídeo tem área da banda quase 16 vezes maior, enquanto que na amostra biotransformada esta relação se inverte para cerca de 6 vezes maior quantidade de steviolbiosídeo.

A hipótese de esta fração haver apenas concentrado os glicosídeos mencionados nas proporções descritas foi descartada, uma vez que apareceram apenas em traços ou, na maioria das vezes, não foram detectados nas demais frações.

A produção da aglicona (m/z 319.2272), Steviolbiosídeo (m/z 665.3138) e rebaudiosídeos A e E (m/z 989.4198) foram as principais biotransformações encontradas. Estes produtos aparecem concomitantemente à diminuição de steviosídeo, tendo como base de comparação a área da banda para cada íon isolado nos cromatogramas. Estes resultados são consistentes com os obtidos nos estudos preliminares de desenvolvimento de metodologias de extração, em que o cromatograma da fração SPE-ODS metanol: água (FIGURA 4.42-B) apresentou uma banda em menor tempo de retenção (9 min) e diminuição significativa da banda referente ao steviosídeo (13,5 min), quando comparado ao cromatograma apenas do Stevita[®] (FIGURA 4.42-A). Da mesma forma, o cromatograma da fração SPE-ODS metanol 100% (FIGURA 4.42-C) apresentou uma banda em maior tempo de retenção (22 min), que indica ser o steviolbiosídeo e que não aparece no cromatograma do Stevita[®] (FIGURA 4.42-A).

Os Rebaudiosídeos A e E, por terem maior número de unidades glicosídicas ligadas ao esqueleto Kaurano quando comparados ao Steviosídeo, devem possuir menor tempo de retenção ao ser analisados em fase reversa, já o steviolbiosídeo deve possuir maior tempo de retenção. Esta colocação é coerente com as observações acima apresentadas.

4.3.3 - Triterpenos lanostanos

A partir da extração e purificação do meio líquido e micélio provenientes do experimento de estudo de metabolismo da *Xylaria* junto aos triterpenos lanostanos 1 e 2 foram obtidas 5 novas frações para cada extrato, as quais foram monitoradas primeiramente via CCD fase normal (FIGURA 4.48). Algumas dessas frações apresentaram diferenças visíveis nas placas de sílica, como a fração A proveniente do meio líquido e a fração C proveniente do micélio.

Após esta etapa, análises em LC/MS (Q-TOF) de todas as frações, constataram que os lanosteróis não haviam sido completamente consumidos pelo micro-organismo, porém foram totalmente incorporados ao micélio, sendo detectados apenas neste extrato.

Ao analisarmos o íon extraído correspondente aos lanosteróis $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 425.3778) nas frações A e C do meio líquido e na fração C do micélio (FIGURA 4.49) fica clara esta observação. No método cromatográfico utilizado os triterpenos lanostanos tem t_R entre 13 e 14 minutos e não são detectado nas demais amostras do meio líquido, aparecendo em traços ou em baixa intensidade em outras amostras do micélio.

No espectro de massas *full scan* dos lanosteróis (FIGURA 4.50), a obtenção da massa exata e padrão isotópico característico confirmam a identidade dos íons, sendo detectadas as seguintes espécies:

- $[M+Na]^+$ — m/z 465.3699
- $[M-H_2O+H]^+$ — m/z 425.3779
- $[M-2H_2O+H]^+$ — m/z 407.3673

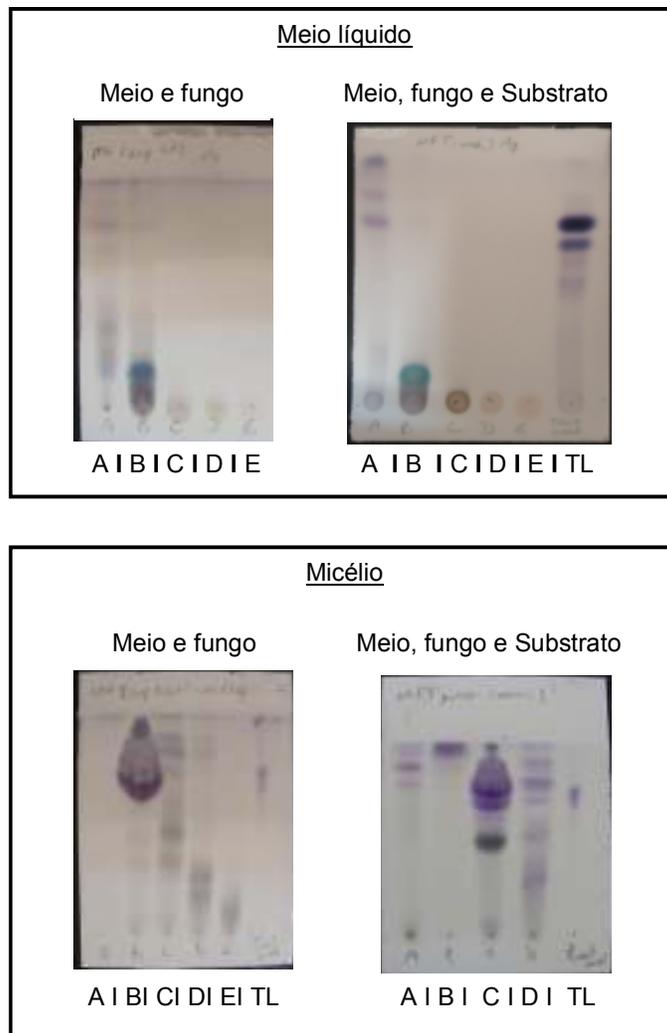


FIGURA 4.48 - CCD das frações purificadas do meio de cultivo e micélio após experimento de biotransformação dos lanosteróis isolados de *Scleroderma* sp. Frações A-E referente à purificação dos extratos e TL referente aos triterpenos lanostanos isolados.

O fato de observarmos o íon molecular apenas como aduto de sódio se deve a labilidade da hidroxila da cadeia lateral, que abandona a molécula em forma de água facilmente, ainda na fonte de ionização. Com a formação de adutos, o íon torna-se mais estável, permitindo que parte deles alcance o detector em sua forma molecular $[M+Na]^+$. Os íons formados por adição de um próton chegam ao detector perdendo uma ou até mesmo as duas hidroxilas, sendo este segundo caso com menor probabilidade, de acordo com a intensidade dos íons observada nos espectros apresentados (FIGURA 4.50).

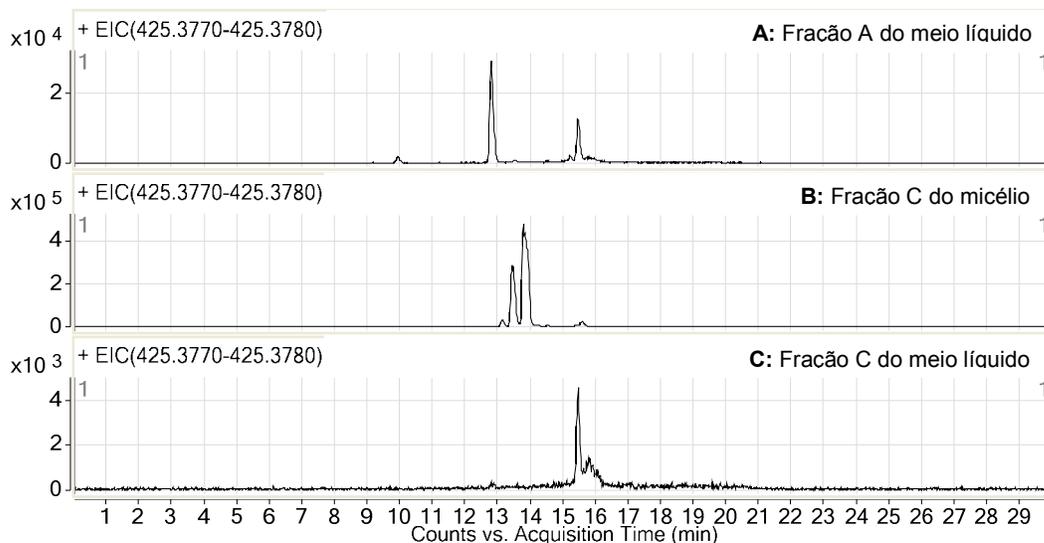


FIGURA 4.49 - EIC do íon m/z 425.3779 - triterpenos lanostanos 1 e 2 – das frações de cultivo da *Xylaria* em presença dos lanosteróis após etapa de purificação. **A:** fração A do meio líquido; **B:** fração C do micélio; **C:** fração C do meio líquido. O intervalo de massa na extração do íon teve variação de 0.0010 unidades de massa, de modo a excluir falsos positivos.

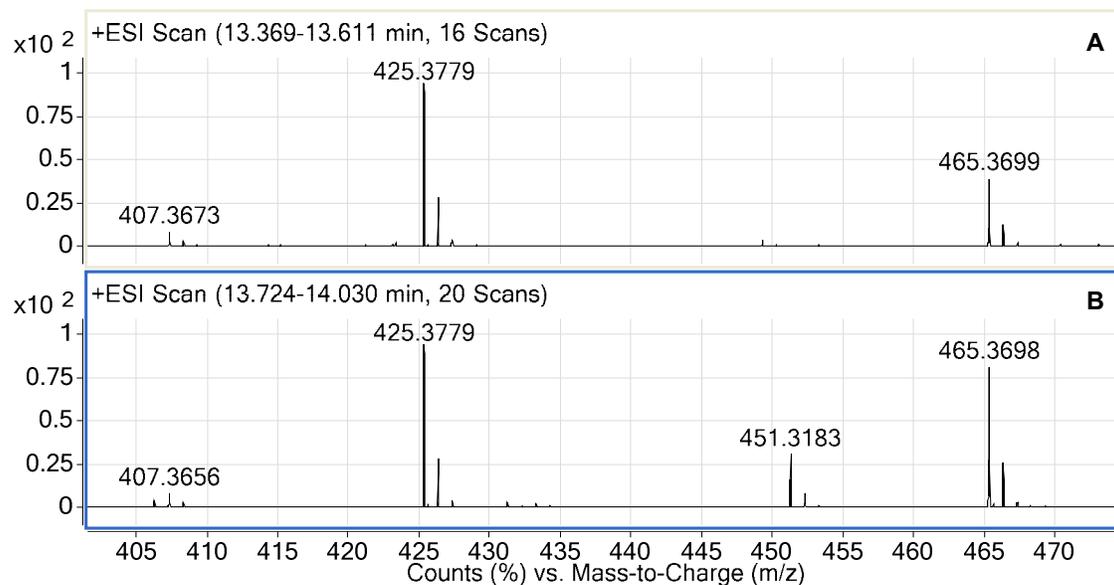


FIGURA 4.50 - Espectro de massas, ionização ESI +, das bandas referente aos triterpenos lanostanos 1 e 2, obtidas da amostra do extrato micelial de experimento de biotransformação. **A:** t_R 13.37-13.61; **B:** t_R 13.72-14.03.

Nos cromatogramas do íon extraído m/z 425.3779 - triterpenos lanostanos 1 e 2 -, referente ao meio líquido, apresentados (FIGURA 4.49), são observadas bandas entre 12 e 16 minutos. Entretanto, estas não correspondem aos triterpenos lanostanos. Os lanosteróis isolados de *Scleroderma* sp. são detectados concomitantemente nas formas $[M+Na]^+$ (m/z 465.3699), $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 425.3779) e $[M-2H_2O+H]^+$ (m/z 407.3673), o que não é observado para estas bandas, de acordo com os respectivos espectros de massas ilustrados na FIGURA 4.51.

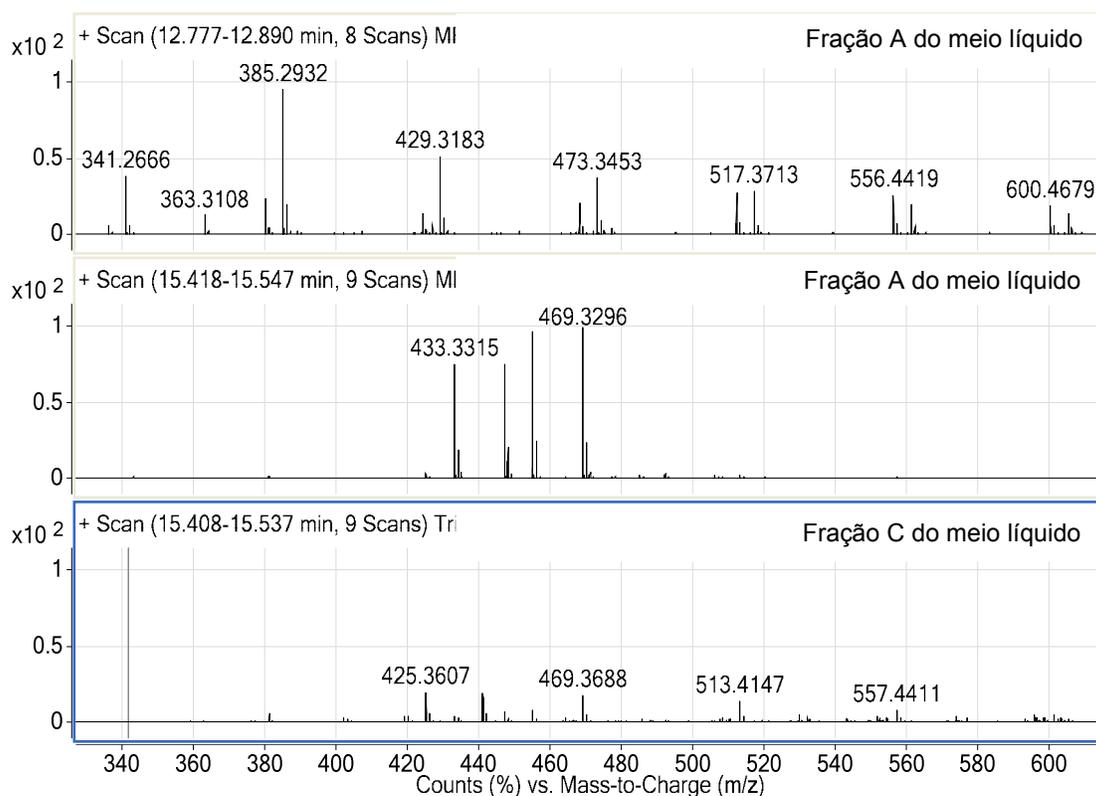


FIGURA 4.51 - Espectro de massas, ionização ESI +, das bandas referente aos cromatogramas (FIGURA 4.49 A e C) do meio líquido de cultivo da *Xylaria* em presença dos lanosteróis após etapa de purificação. Evidência para ausência dos triterpenos lanostanos, os quais seriam observados nas formas $[M+Na]^+$ (m/z 465.3699), $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 425.3779) e $[M-2H_2O+H]^+$ (m/z 407.3673).

Apesar das sutis diferenças observadas por cromatografia de camada delgada, não foram detectados produtos de biotransformação nas análises por espectrometria de massas. Aparentemente este substrato não causou perturbação ao metabolismo do fungo, o qual apresentou crescimento normal em sua presença.

4.3.4 - Avenacosídeos A e B

Com objetivo de visualizar as diferenças mais marcantes, as frações oriundas dos extratos biotransformados e não biotransformados (branco) em experimento com os avenacosídeos A e B foram submetidas à análise em HPLC-DAD com detector a 205 nm.

O experimento contendo *Xylaria* na presença do meio de aveia apresentou em seu cromatograma, bandas entre 30 e 35 minutos não observadas no experimento controle (FIGURA 4.52). Esta informação foi suficiente para levarmos o estudo à próxima etapa, ou seja, análises em LC/MS triplo quadrupolo.

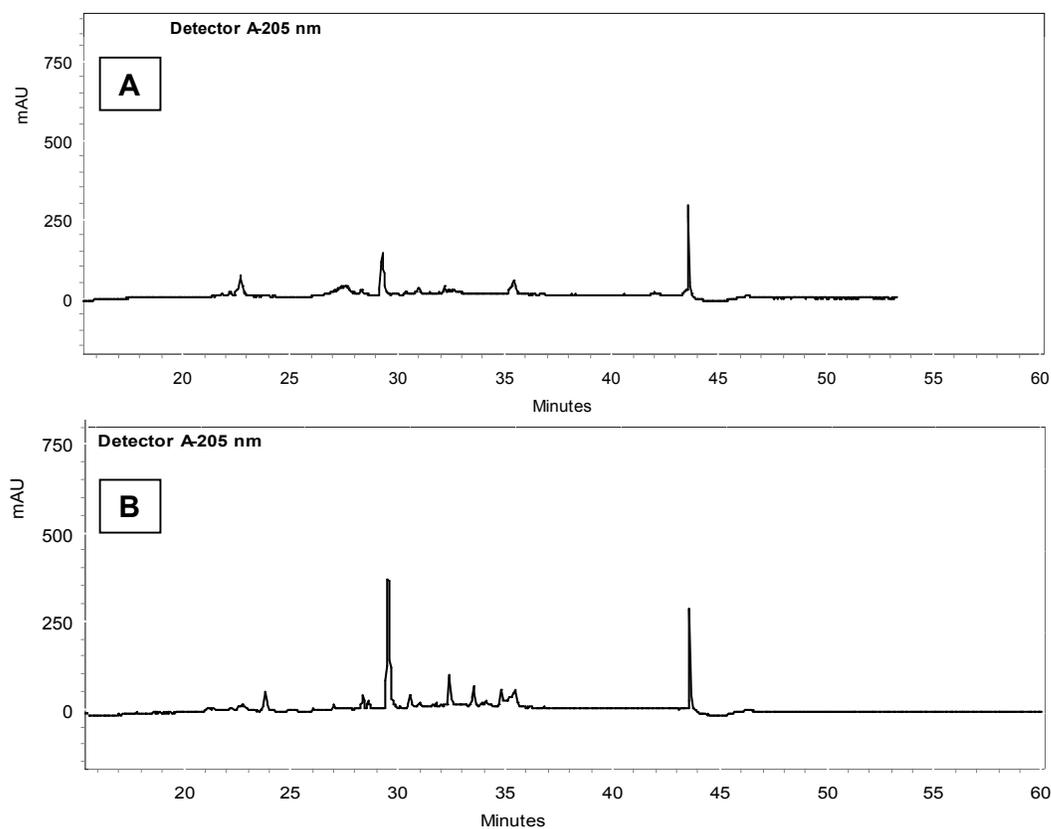


FIGURA 4.52 - Cromatogramas referente ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos presentes na aveia, obtidos a 205 nm utilizando fase estacionária reversa. **A:** Fração controle, ou seja, ausente de micro-organismo; **B:** Fração contendo meio de cultivo e fungo

Ao comparar o cromatograma BPI obtido em análise por LC/MS da fração controle com a fração contendo o micro-organismo, vemos novamente diferentes bandas em cada uma das frações, indicando o consumo e produção de metabólitos pelo fungo (FIGURA 4.53).

Ao selecionarmos os íons referentes ao Avenacosídeo A, m/z 1086 $[M+Na]^+$, e Avenacosídeo B, m/z 1248 $[M+Na]^+$, no experimento de biotransformação, verificamos que houve total consumo destes por parte do micro-organismo (FIGURA 4.54). As bandas correspondentes aos glicosídeos em questão são visualizadas nos tempos de retenção 28.84 e 28.63 minutos, de acordo com os EIC correspondentes (FIGURA 4.54).

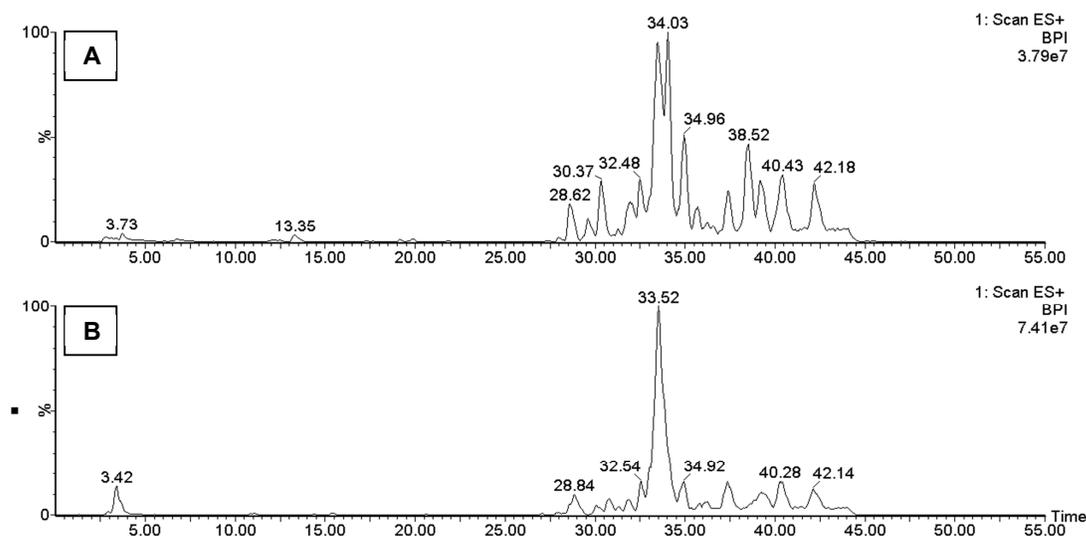


FIGURA 4.53 - Cromatogramas por intensidade do pico base (BPI) referente ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos presentes na aveia. **A:** Meio de aveia e *Xylaria*; **B:** Meio de aveia (controle).

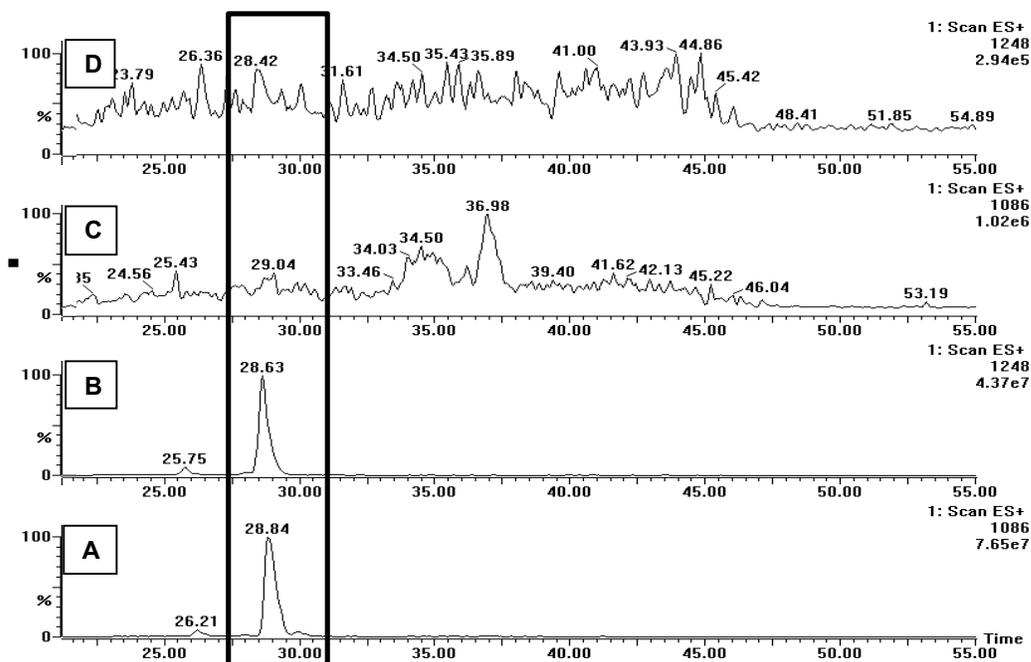


FIGURA 4.54 - Cromatogramas de íons selecionados. **A:** EIC m/z 1086 $[M+Na]^+$ (Avenacosídeo A) presente no meio de aveia em t_R 28.84 min; **B:** EIC m/z 1248 $[M+Na]^+$ (Avenacosídeo B) presente no meio em t_R 28.63 min; **C:** EIC m/z 1086 $[M+Na]^+$ ausente no extrato micelial da fração biotransformada; **D:** EIC m/z 1248 $[M+Na]^+$ ausente no extrato micelial da fração biotransformada.

A forma ativa dos avenacosídeos, 26-DGAS, é encontrada apenas na fração controle, ausente do micro-organismo. Ao analisarmos os EIC, verificamos que o íon m/z 924 (26-DGAS) é totalmente consumido pela *Xylaria* e m/z 739 passa a ser observado (FIGURA 4.55) em um tempo de retenção maior, o que pode significar uma perda de glicose deixando a molécula menos polar e conseqüentemente com maior interação com a fase estacionária da coluna. Nos espectros de massas das bandas em questão os íons são observados não concomitantemente (FIGURA 4.56), de modo que m/z 739 pode ser proveniente da desglicosilação de m/z 924 (FIGURA 4.60). Esta hipótese é coerente à relação usualmente encontrada entre plantas e micro-organismos endofíticos, em que o fungo é obrigado a modificar as fitoalexinas do meio para que possa viver em mutualismo. No caso dos avenacosídeos, a retirada de uma ou mais unidades de glicose ligadas ao C-3 modifica de forma significativa a ação antifúngica do metabólito⁴⁴.

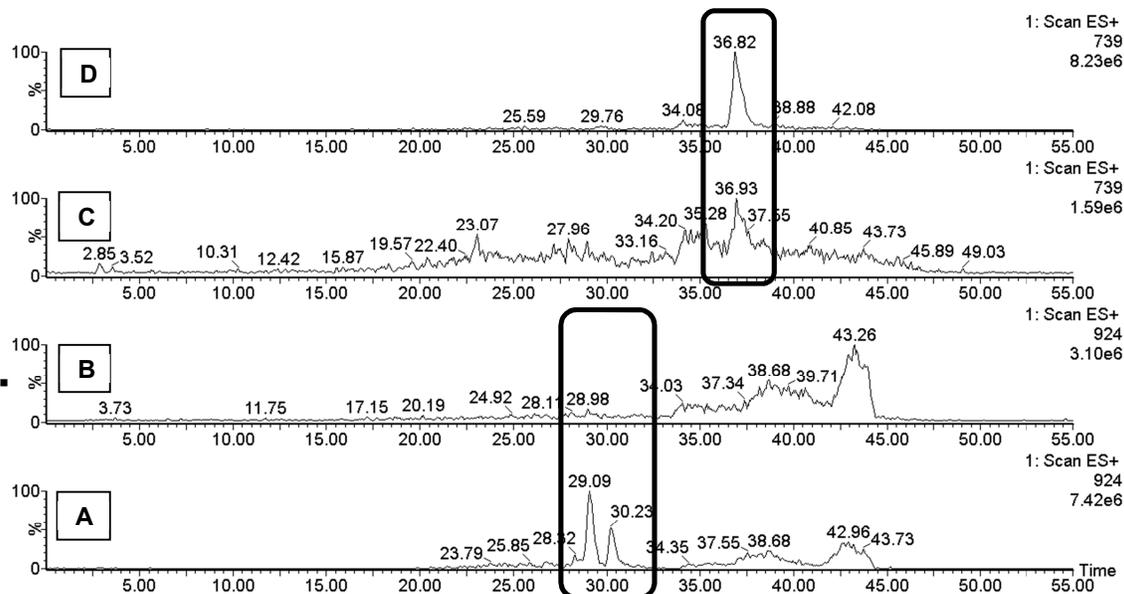


FIGURA 4.55 - Cromatogramas referentes ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos A e B com *Xylaria* sp. **A:** EIC íon m/z 924 presente no branco nos t_R 29.09 e 30.23 min; **B:** EIC íon m/z 924 ausente na fração biotransformada; **C:** EIC íon m/z 739 ausente no branco; **D:** EIC íon m/z 739 presente na fração biotransformada no t_R 36.82 min.

Através de sucessivas desglicosilações é proposta a formação da aglicona, m/z 454 $[M+Na]^+$ (FIGURA 4.61), pelo micro-organismo. Este íon é observado no EIC da fração após crescimento do fungo sendo totalmente ausente no branco (FIGURA 4.57), em que há apenas ruídos muito próximos à linha de base e que não correspondem ao íon de interesse.

Também encontrado apenas na fração após metabolismo do agente de biotransformação, o íon m/z 547 co-elui ao íon m/z 431, correspondente a aglicona do avenacosídeo, como pode ser observado no espectro de massas extraído da banda em 28.83 min do EIC correspondente (FIGURA 4.58). As bandas em 33.73 minutos não contem o íon de interesse, sendo que em seus espectros de massa (FIGURA 4.59) é visualizado apenas um tipo de polietoxi, ou seja, com repetição de 44 unidades de massa entre os íons detectados⁶⁴. A proposta para formação de m/z 547 (FIGURA 4.62) parte de m/z 739, com perda de formol, antes ligado a C-25, e perda da unidade de glicose diretamente ligada a aglicona, ao invés da glicose terminal. Esta proposta foi anteriormente explorada no grupo LaBioMMi por Magnani (2002)¹² em sua dissertação de mestrado, sendo, porém, observada em flavonoide.

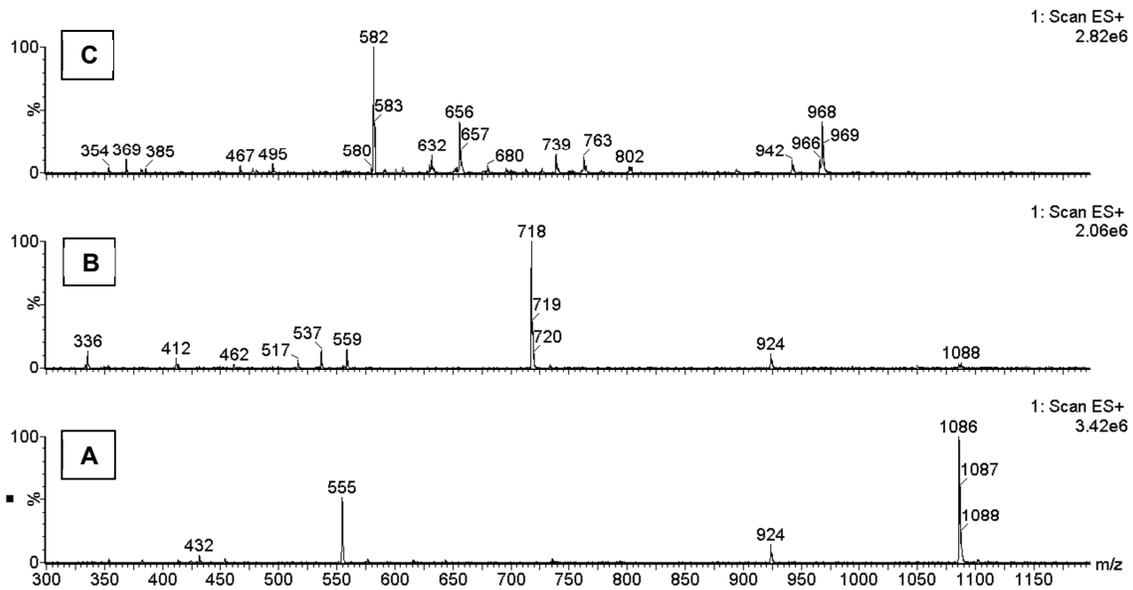


FIGURA 4.56 - Espectros de massas referentes fração após biotransformação dos avenacósidos A e B utilizando *Xylaria* sp. **A**: espectro referente banda em 29.09 min, destacada no EIC - íon m/z 924; **B**: espectro referente banda em 30.23 min, destacada no EIC - íon m/z 924; **C**: espectro referente banda em 36.82 min, destacada no EIC - íon m/z 739.

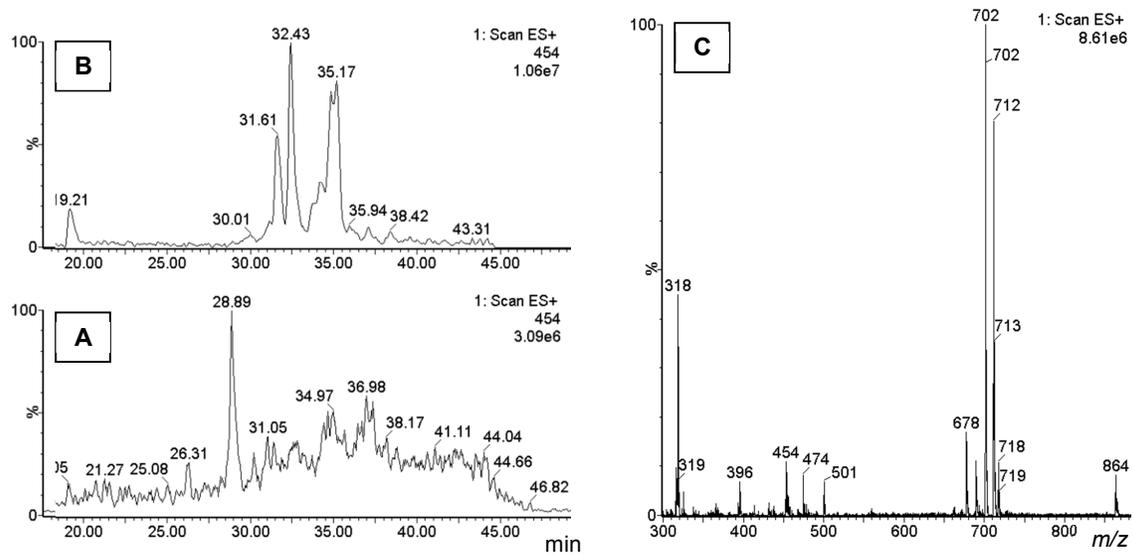


FIGURA 4.57 - **A**: EIC m/z 454 em amostra controle de meio líquido de aveia; **B**: EIC m/z 454 em amostra de meio líquido de aveia junto ao micro-organismo *Xylaria* após crescimento de 35 dias; **C**: Espectro de massas da banda em 32.43 minutos referente ao cromatograma B.

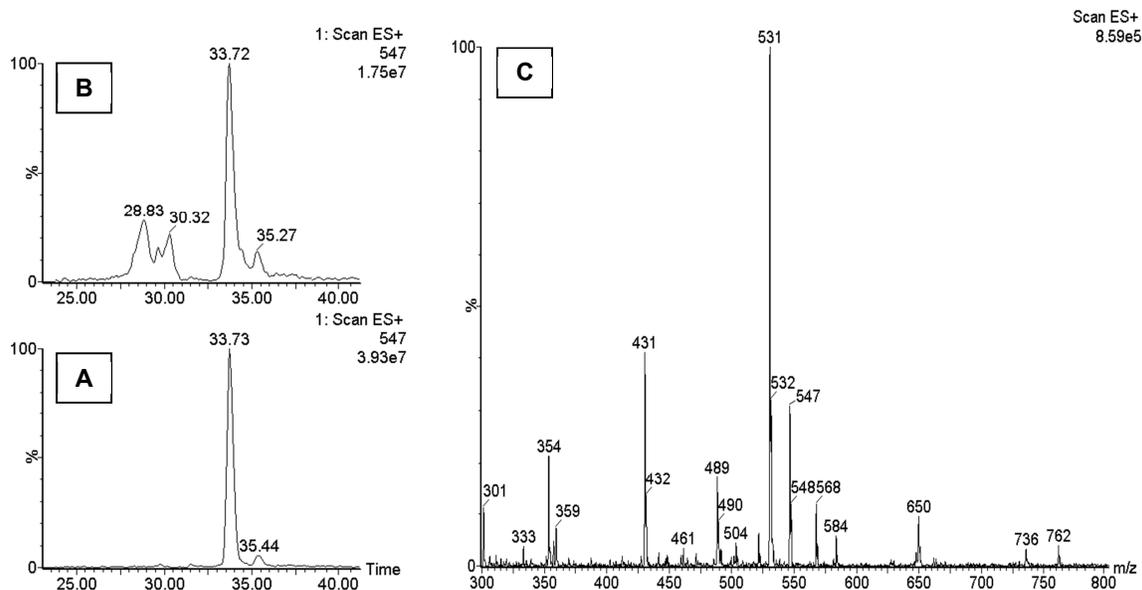


FIGURA 4.58 - **A:** EIC m/z 547 em amostra de meio líquido de aveia; **B:** EIC m/z 547 em amostra de meio líquido de aveia junto ao micro-organismo *Xylaria* após crescimento de 35 dias; **C:** Espectro de massas da banda em 28.83 minutos do cromatograma B.

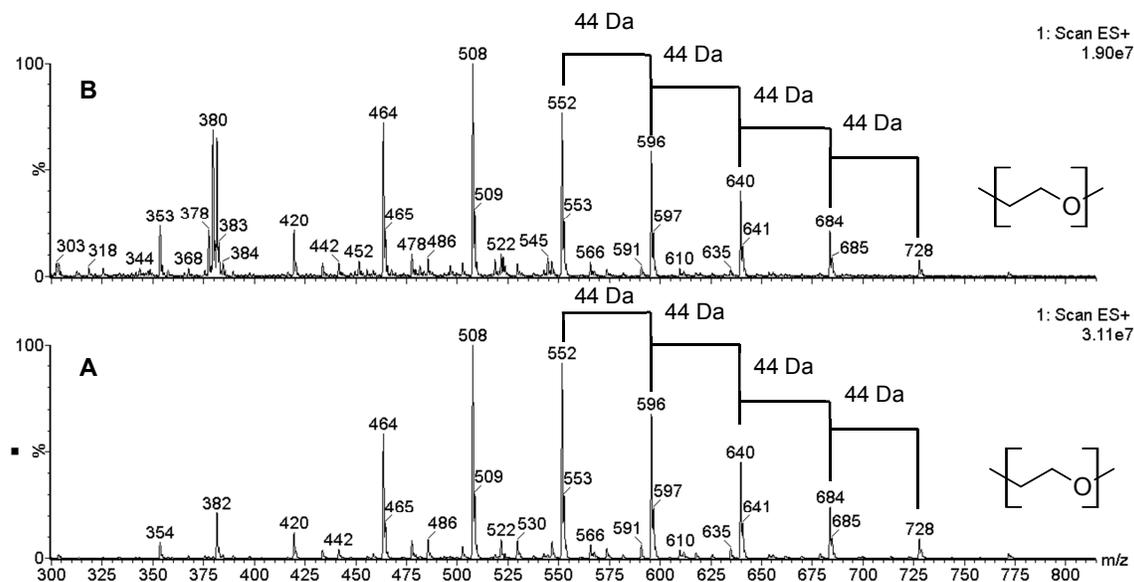


FIGURA 4.59 - Espectros de massa da banda em 33.7 minutos (FIGURA 4.58) de amostras provenientes de experimento de biotransformação dos avenacosídeos A e B utilizando *Xylaria* sp. **A:** amostra de meio líquido de aveia (branco); **B:** amostra de meio líquido de aveia junto ao micro-organismo *Xylaria* após crescimento de 35 dias.

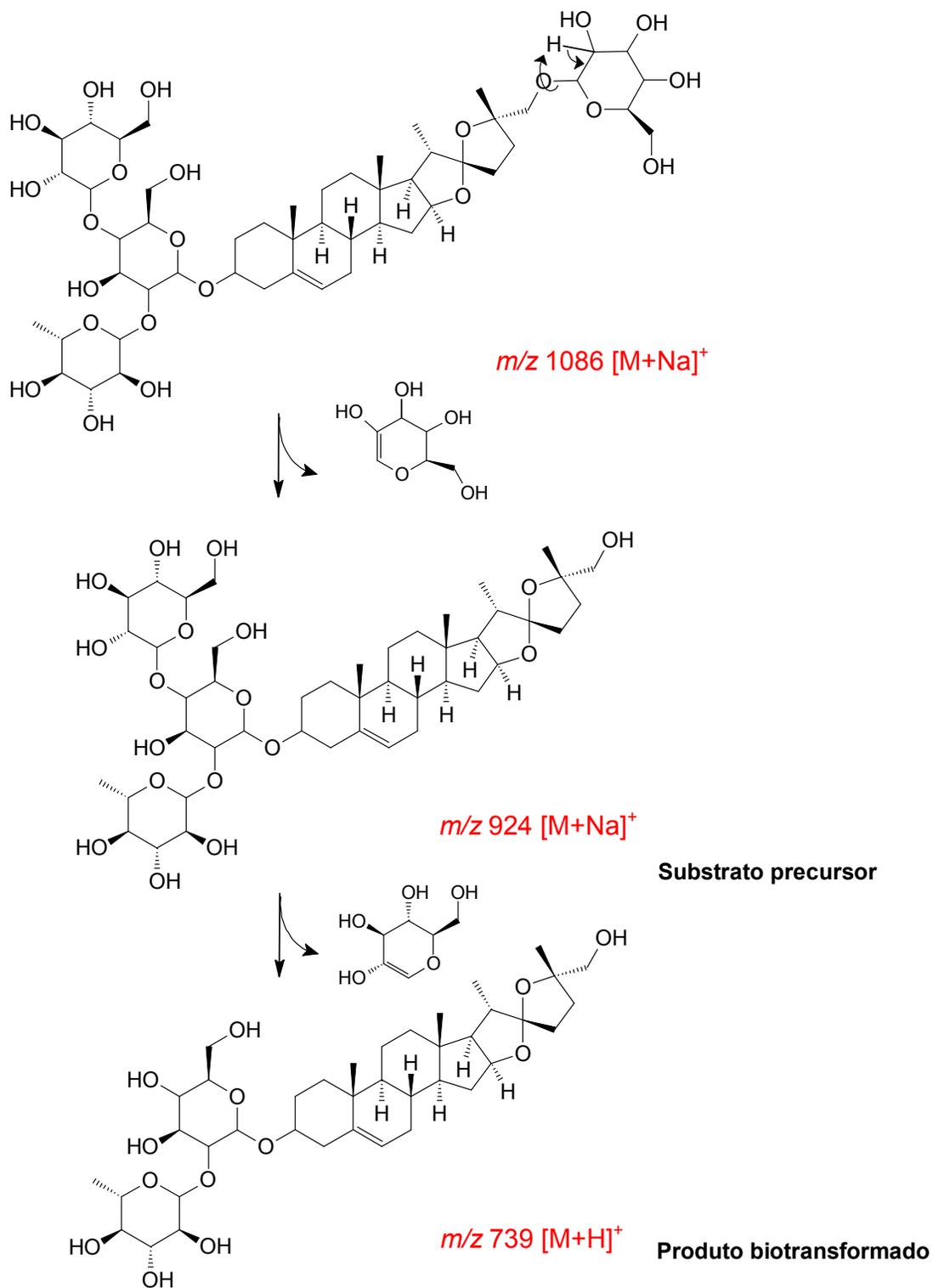


FIGURA 4.60 - Proposta para formação dos íons m/z 924 (substrato precursor) e 739 (produto biotransformado) observados em experimento de biotransformação dos Avenacosídeos A e B em presença de *Xylaria* sp. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.

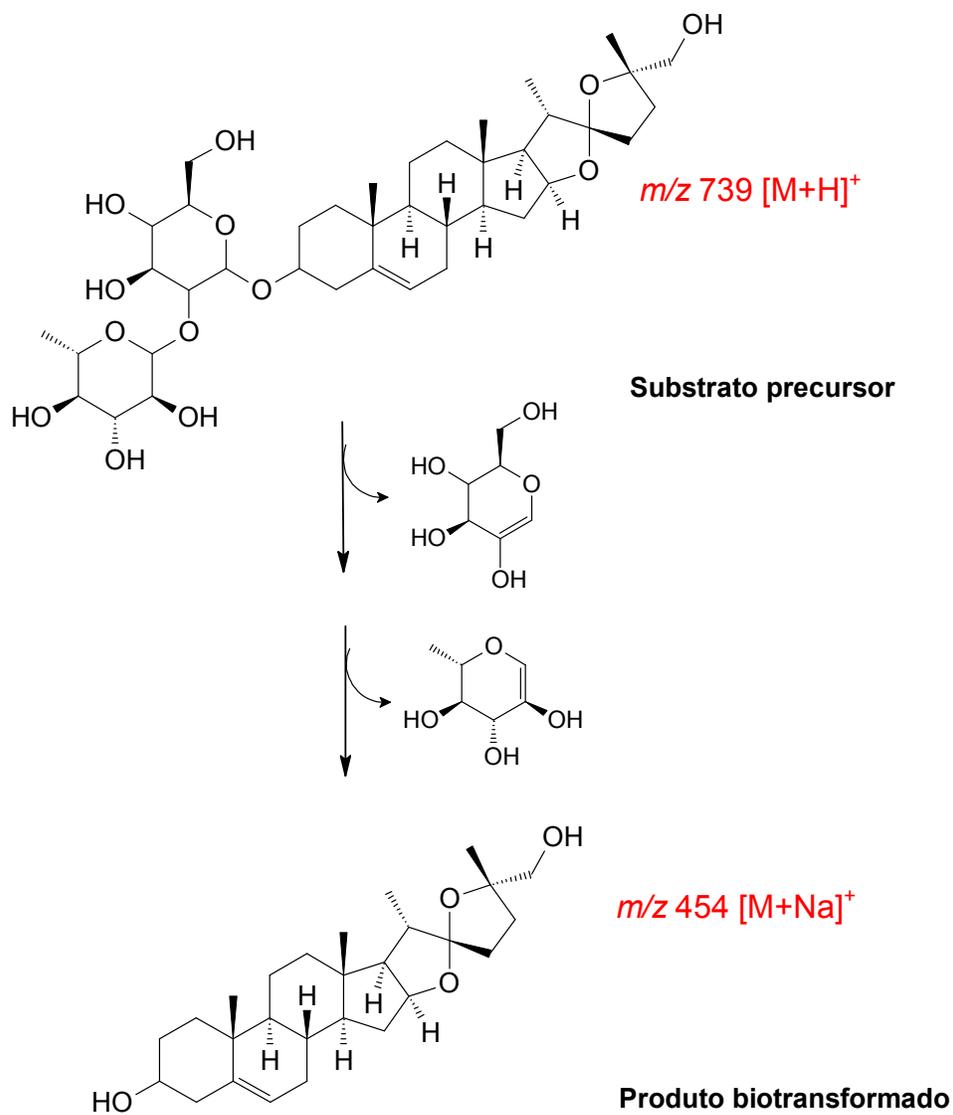


FIGURA 4.61 - Proposta para bioconversão do precursor m/z 739 com formação do íon m/z 454 (produto biotransformado) observado em experimento de biotransformação dos Avenacosídeos A e B em presença de *Xylaria* sp. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.

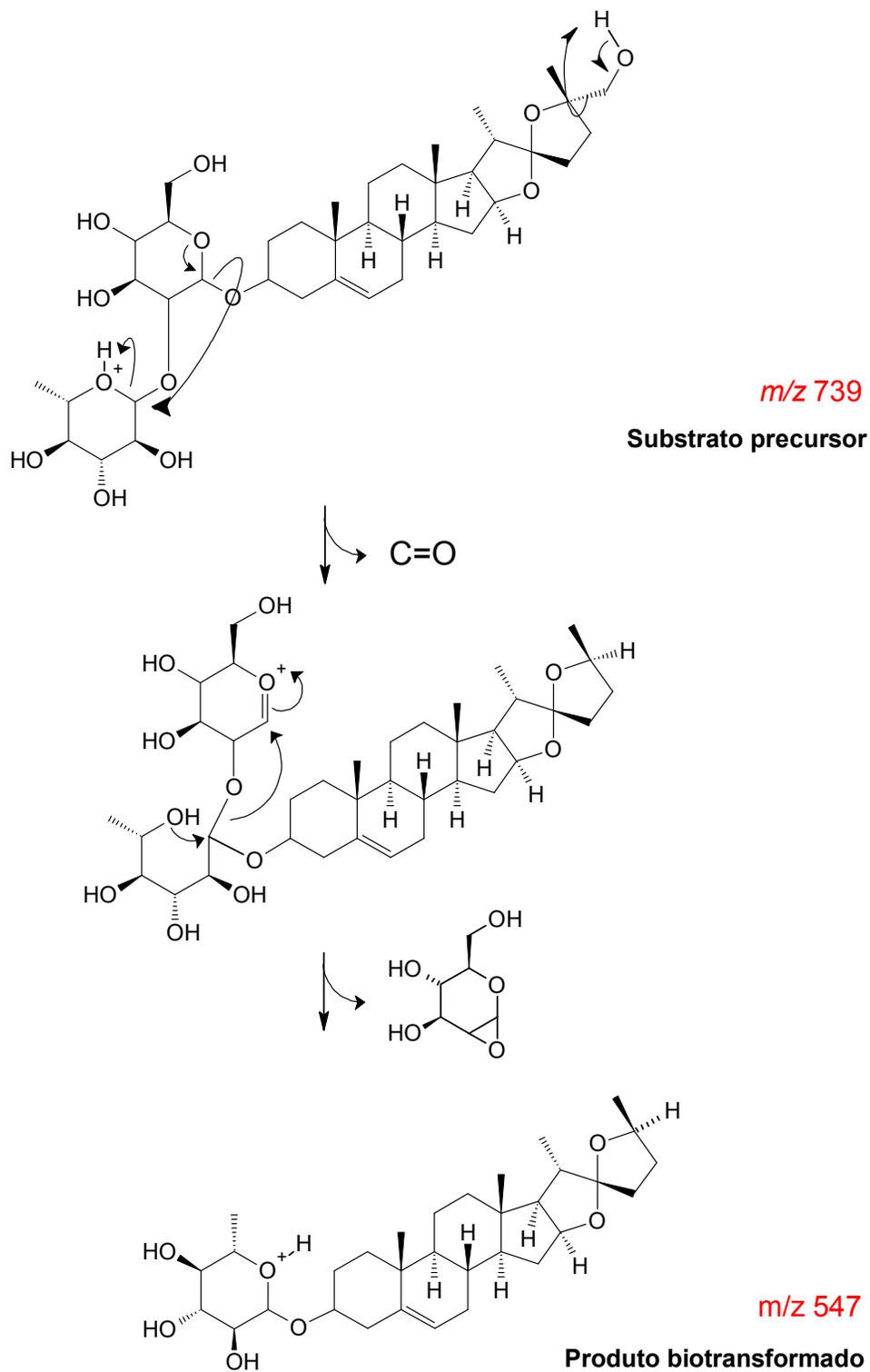


FIGURA 4.62 - Proposta para formação do produto de biotransformação detectado como m/z 547 $[M+H]^+$, observados em experimento de bioconversão dos Avenacosídeos A e B em presença de *Xylaria* sp. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.

Ao buscar os metabólitos biotransformados, oriundos de desglicosilações do substrato inicial, notou-se a diferença de duas unidades de massa à aglicona, m/z 454 $[M+Na]^+$, sendo detectados os íons m/z 452 e 450 (FIGURA 4.65), assumidos como produtos de bioconversão.

Propõe-se que a espécie m/z 454 tenha as hidroxilas ligadas ao C-3 e C-26 oxidadas a cetona, gerando os produtos m/z 452 e 450, os quais são observados apenas no EIC da fração biotransformada (FIGURA 4.63), respectivamente em 34.91 min e 34.55 min. As demais bandas em torno de 33.15 minutos correspondem a interferentes polietoxilados, como observado no espectro de massa da FIGURA 4.59.

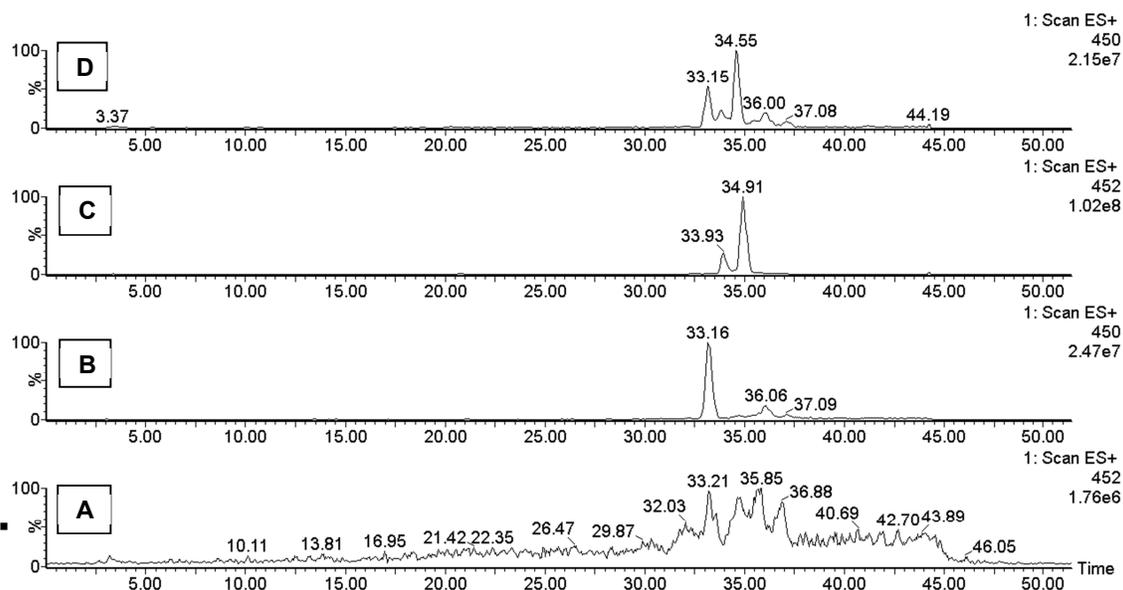


FIGURA 4.63 - Cromatogramas referentes ao experimento de biotransformação dos avenacosídeos A e B com *Xylaria* sp. **A:** EIC m/z 452 ausente no branco; **B:** EIC m/z 450 ausente no branco; **C:** EIC m/z 452 presente na fração biotransformada em t_R 34.91 min; **D:** EIC m/z 450 presente na fração biotransformada em t_R 34.55 min.

No espectro de massa extraído das bandas correspondentes aos íons m/z 452 e 450 (FIGURA 4.64) é confirmada a presença dos mesmos, tendo na proposta a aglicona como precursora direta (FIGURA 4.65).

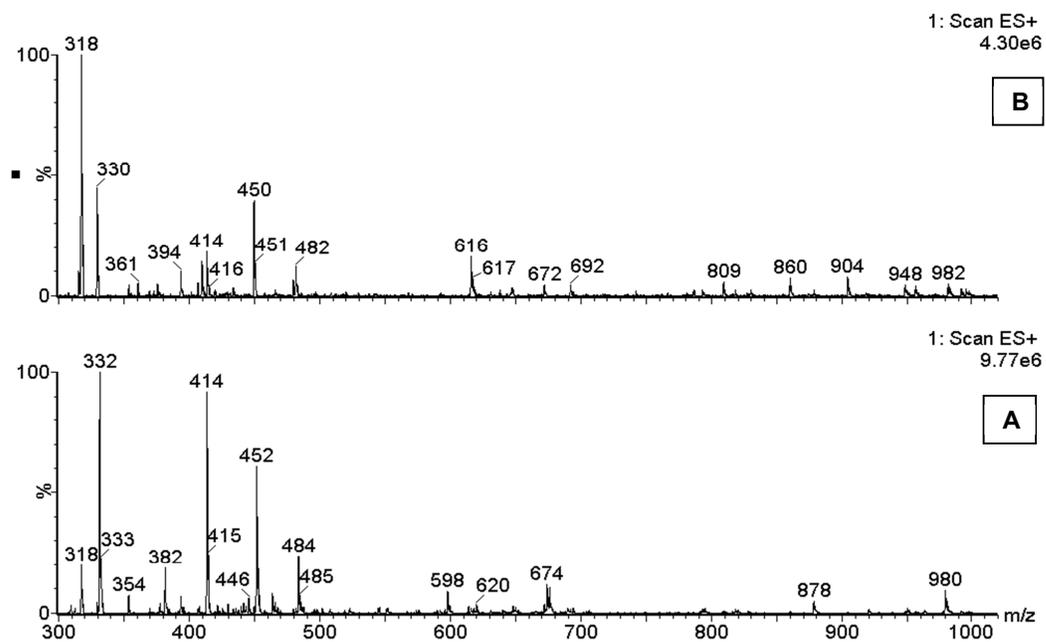


FIGURA 4.64 - Espectros de massa referentes a fração após biotransformação dos avenacosídeos A e B utilizando *Xylaria* sp. **A**: espectro referente banda em t_R 34.91 min do EIC - íon m/z 452; **B**: espectro referente banda em t_R 34.55 min do EIC - íon m/z 450.

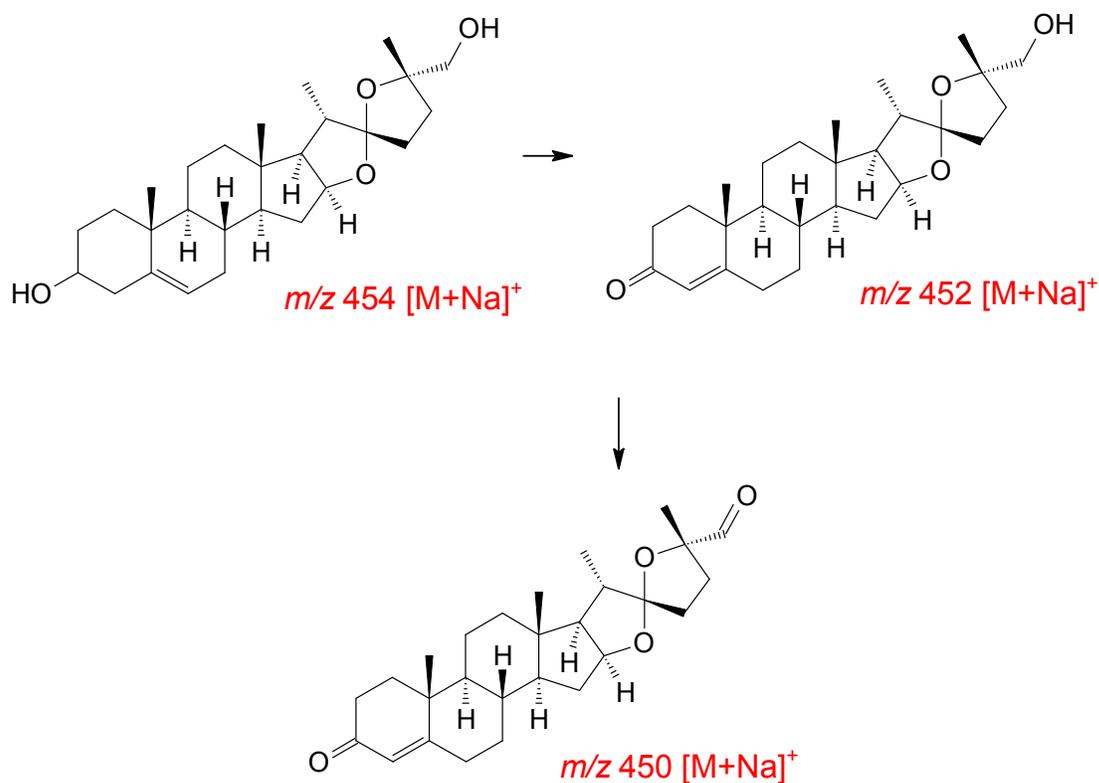


FIGURA 4.65 - Proposta de bioconversão formando os íons m/z 452 e m/z 450 pelo micro-organismo *Xylaria* sp. em experimento de biotransformação dos Avenacosídeos A e B. Análise realizada em LC/MS modo positivo de ionização.

A presença de enzimas desidrogenases e glucogenases em micro-organismos é conhecida, sendo que a ação destas em avenacosídeos é também já reportada na literatura^{44,65-67}. Dentre as modificações estruturais realizadas pela *Xylaria* aos avenacosídeos, as desglicosilações estão de acordo com a necessidade de sobrevivência do fungo, uma vez que a retirada de uma única unidade de açúcar permite o convívio com as saponinas. Este é, portanto um resultado esperado se considerarmos o estudo anteriormente desenvolvido pelo grupo LaBioMMi, em que se relata o isolamento da *Xylaria* de um habitat rico em saponinas²⁷, ou seja, hostil ao micro-organismo. A formação de cetonas sugere a presença de desidrogenases, as quais seriam responsáveis pela conversão das hidroxilas da aglicona.

5 - Conclusões

Neste trabalho foram identificados os seguintes compostos, alguns deles isolados de fontes naturais, os quais foram utilizados como substratos em experimentos de biotransformação:

- **ácido oleanólico:** Isolado de cravo da Índia e identificado por RMN ^1H com comparações às bases de informações científicas⁵¹ e também com estudo anterior realizado no LaBioMMi em que este analito foi já identificado.
- **Steviosídeo:** O esteviosídeo não foi isolado, mas obtido de fonte comercial – a partir do adoçante Stevita®. Com análises em LC/MS *full scan* e ionização por *electrospray* no modo positivo foi possível identificar os glicosídeos presentes, os quais constituem uma mistura de substâncias com esqueleto diterpênico Kaurano e diferentes padrões de glicosilação. Os glicosídeos identificados são Steviolbiosídeo, Dulcosídeo A, Steviosídeo e os Rebaudiosídeos A, B, C, D, E e F, estando o Steviosídeo em quantidade majoritária.
- **Triterpenos lanostanos:** A partir do basidiomiceto *Scleroderma* sp. foram isolados 2 triterpenos lanostanos isômeros, os quais foram analisados e identificados pelas técnicas GC-MS, LC-MS e RMN. A diferenciação entre os isômeros foi realizada por RMN e confirmada com GC-MS, sendo que o estudo por RMN conteve os experimentos de H^1 , C^{13} , COSY, HMBC, HSQC e DEPT 135. Os triterpenos isolados, caracterizados e utilizados neste estudo são: Lanosta-8,23-diene-3 β ,25-diol – triterpeno lanostano 1 e Lanosta-8,24-diene-3 β ,23-diol – triterpeno lanostano 2. Até o início deste trabalho estas duas moléculas haviam sido citadas em pouquíssimos trabalhos científicos^{54-59,68}, o que foi um grande estímulo a sua utilização como substrato de biotransformação.

- **Avenacosídeos A e B:** Estes substratos também não foram isolados, mas obtidos de fonte natural (aveia) e utilizados a partir de sua matriz. Os avenacosídeos A e B foram identificados através de experimentos de LC-MS em alta resolução (Q-TOF) com ionização por *electrospray* em modo positivo.

Desenvolvimento de metodologia de extração – Ácido oleanólico e Steviosídeo.

Neste estudo inicial verificou-se que o etanol proporcionou a melhor resposta à recuperação de ácido oleanólico do micélio ao comparar com demais solventes aplicados. Já no meio líquido não foi observada boa recuperação deste substrato, sendo adotada metodologia de liofilização total do caldo e posterior *clean-up* via cromatografia líquida de bancada (sílica gel 230-400 Mesh).

Para o micélio do Steviosídeo definiu-se a extração (em meio BEA) em metanol e água (7:3). Para o meio líquido foi adotada a mesma estratégia de liofilização e *clean-up* utilizada para o ácido oleanólico.

Nas análises em HPLC-DAD utilizando fase estacionária reversa, um método tipo gradiente exploratório acetonitrila-água proporcionou melhor comparação entre os resultados, uma vez que foram detectados metabólitos com maior e menor polaridade que os substratos iniciais. Nestes primeiros ensaios constatou-se a formação de compostos de biotransformação com menor polaridade que o Steviosídeo, sugerindo uma desglicosilação, posteriormente confirmada em experimentos de LC-MS.

Estudo do metabolismo da *Xylaria* sp. frente aos substratos

Ácido oleanólico

Ao analisar o experimento por cromatografia de camada delgada foram observadas diferenças metabólicas, quando comparadas às frações controles, tanto no meio líquido de cultivo, quanto no micélio do micro-organismo. O meio líquido apresentou compostos de maior polaridade, ou seja, menor tempo de retenção que o padrão de ácido oleanólico, enquanto no extrato micelial aparecem compostos com polaridade ligeiramente menor que o substrato de referência, ou seja, com maior tempo de retenção.

Apesar de observada aparente mudança metabólica via CCD, não foram detectados, em experimentos de LC-MS, produtos de biotransformação usuais, como os derivados glicosilados, hidroxilados ou metilados ou mesmo com perda de hidroxila, carboxila ou metila. Nas análises de cromatografia líquida acoplada a massas constatou-se ausência de ácido oleanólico no micélio do fungo e apenas traços desta substância no meio de cultivo.

Steviosídeo

Após o cultivo da *Xylaria* sp. em presença de Stevita[®] - adoçante comercial com quantidade majoritária de Steviosídeo - verificou-se significativas mudanças no perfil dos glicosídeos presentes. O Steviosídeo, um diterpeno glicosilado, foi consumido, enquanto outros glicosídeos, já presentes em menor quantidade no adoçante, foram detectados em maior quantidade, sendo eles a aglicona (m/z 319.2272), Steviolbiosídeo (m/z 665.3138) e rebaudiosídeos A e E (m/z 989.4198).

Foi utilizada como base de comparação a área da banda para cada íon isolado nos cromatogramas. Os rebaudiosídeos A e E apresentaram área de banda em torno de 4 a 5 vezes maior que o steviosídeo após metabolismos do fungo em presença deste substrato, sendo este o perfil inverso que o observado na referência Stevita[®]. Já na comparação com o steviolbiosídeo, este aparece com área de banda cerca de 6 vezes maior que o steviosídeo, enquanto que na referência esta relação era de quase 16 vezes maior para o steviosídeo.

Triterpenos lanostanos

Análises em LC/MS (Q-TOF) de todas as frações, constataram que os lanosteróis não foram completamente consumidos pelo micro-organismo, porém foram totalmente incorporados ao micélio, sendo detectados apenas neste extrato concomitantemente nas formas $[M+Na]^+$ (m/z 465.3699), $[M-H_2O+H]^+$ (m/z 425.3779) e $[M-2H_2O+H]^+$ (m/z 407.3673), sendo o íon protonado com perda de uma molécula de água majoritário.

Apesar das sutis diferenças observadas por cromatografia de camada delgada, não foram detectados produtos de biotransformação nas análises por espectrometria de massas. Aparentemente este substrato não causou perturbação ao metabolismo do fungo, o qual apresentou crescimento normal em sua presença.

Avenacosídeos A e B

No estudo com o Avenacosídeo A, m/z 1086 $[M+Na]^+$, e Avenacosídeo B, m/z 1248 $[M+Na]^+$ verificou-se total consumo destes por parte do micro-organismo e ausência dos produtos de biotransformação detectados na fração controle. Além dos avenacosídeos, está presente na aveia a forma ativa (antifúngica) dos

avenacosídeos (26-DGAS; m/z 924), sendo esta também totalmente consumida pelo fungo. O consumo deste é observado concomitante à detecção nos extratos após biotransformação de m/z 739 em um tempo de retenção maior que o 26-DGAS. Este aumento de tempo de retenção é associado a perda de glicose, o que diminui sua polaridade e aumenta o tempo de retenção em fase reversa.

O íon m/z 739 é também proposto como precursor para a formação de m/z 547, havendo para isso uma perda de formol ligado a C-25 e perda da unidade de glicose diretamente ligada a aglicona, ao invés da glicose terminal¹².

A aglicona, m/z 454 $[M+Na]^+$, é outro produto de biotransformação encontrado, sendo a mesma precursora para m/z 452 e m/z 450 a partir da oxidação das hidroxilas C-3 e C-26 a cetonas.

6 - Referências Bibliográficas

- (1) LIMA, U. D. A. A., E., BORZANI, W. *Biotechnologia: Tecnologia das fermentações.*; 1 ed.; Edgard Blucher: São Paulo, 1975; Vol. 1.
- (2) TURNER, W. B. S., J.E & Berry, D.K. In *The Filamentous Fungi: Industrial Mycology*; Edward Arnold Ltd.: Londres, 1975; Vol. 1, p 122-142.
- (3) Borges, K.; Borges, W.; Pupo, M.; Bonato, P. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *77*, 669-674.
- (4) Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; ten Hoopen, H. J. G.; Memelink, J. *Biotechnology Letters* **1999**, *21*, 467-479.
- (5) Petrini, O.; Sieber, T. N.; Toti, L.; Viret, O. *Natural Toxins* **1993**, *1*, 185-196.
- (6) Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. *ChemInform* **2007**, *38*, no-no.
- (7) Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 257-268.
- (8) Gunatilaka, A. A. L. *Journal of Natural Products* **2006**, *69*, 509-526.
- (9) Nosov, A. M. *Russian Journal of Plant Physiology* **1994**, *41*, 767 - 771.
- (10) Tintjer, T.; Rudgers, J. A. *New Phytologist* **2006**, *170*, 513-521.
- (11) Souza, A. Q. L. d.; Souza, A. D. L. o. d.; Astolfi Filho, S.; Pinheiro, M. L. c. B. m.; Sarquis, M. I. d. M.; Pereira, J. O. *Acta Amazonica* **2004**, *34*, 185-195.
- (12) MAGNANI, R. F. Dissertação de mestrado, UFSCar, 2002.
- (13) Kemp, M. S.; Burden, R. S. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1261-1269.
- (14) Kogel, K.-H.; Franken, P.; Hüchelhoven, R. *Current Opinion in Plant Biology* **2006**, *9*, 358-363.
- (15) Chapela, I. H. *New Phytologist* **1989**, *113*, 65-75.
- (16) Fredericks, D.; Relman, D. *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9*, 18-33.
- (17) Yoshioka, H.; Tomonori, S.; Kawamata, S.; Nasu, K.; Yamada, T.; Ichinose, Y.; Oku, H. *Plant and Cell Physiology* **1992**, *33*, 201-204.
- (18) Filho, M. T.; Krügener, T. L. *Série Técnica* **1982**, *3*, 32.
- (19) Raven, P. H.; Ray, F. E.; Eichhorn, S. E. *Biologia Vegetal*; 5 ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1992.
- (20) Agrios, G. N. *Plant Pathology*; 3 ed.; Academic Press: Nova Iorque, 1988.
- (21) Singer, A. C.; Crowley, D. E.; Thompson, I. P. *Trends in Biotechnology* **2003**, *21*, 123-130.
- (22) Bastos, D. Z. L. Doctorate, Universidade Federal do Paraná, 2005.
- (23) ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. d. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. *Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos*; 1 ed.; ESALQ/USP: Piracicaba, 2002; Vol. 1.
- (24) Shirane, N.; Hashimoto, Y.; Ueda, K.; Takenaka, H.; Katoh, K. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 99-104.
- (25) Zhang, J.; Cheng, Z.-H.; Yu, B.-Y.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X. *Tetrahedron Letters* **2005**, *46*, 2337-2340.
- (26) de Oliveira, B. H.; Packer, J. F.; Chimelli, M.; de Jesus, D. A. *Journal of Biotechnology* **2007**, *131*, 92-96.
- (27) Amaral, L.; Murgu, M.; Rodrigues-Fo, E.; de Souza, A.; de Moura Sarquis, M. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, *24*, 1341-1348.
- (28) Murgu, M.; Santos, L. F. A.; Souza, G. D. d.; Daolio, C.; Schneider, B.; Ferreira, A. G.; Rodrigues-Filho, E. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2008**, *19*, 831-835.
- (29) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products*; John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- (30) Geuns, J. M. C. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 913-921.

- (31) Brusick, D. J. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, S83-S91.
- (32) Nunes, A. P. M.; Ferreira-Machado, S. C.; Nunes, R. M.; Dantas, F. J. S.; De Mattos, J. C. P.; Caldeira-de-Araújo, A. *Food and Chemical Toxicology* **2007**, *45*, 662-666.
- (33) Renwick, A. G.; Tarka, S. M. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, S70-S74.
- (34) Brandle, J. E.; Telmer, P. G. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1855-1863.
- (35) Zamuner, M. L. I. M.; Cortez, D. g. A. G.; Dias Filho, B. P.; Lima, M. I. s. S.; Rodrigues-Filho, E. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, *16*, 863-867.
- (36) Baumert, A.; Schumann, B.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Strack, D. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 499-504.
- (37) Arshad, M.; Frankenberger, W. T. *Plant and Soil* **1991**, *133*, 1-8.
- (38) Tsantrizos, Y. S.; Kope, H. H.; Fortin, J. A.; Ogilvie, K. K. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1113-1118.
- (39) Zamuner, M. L. M. Tese de Doutorado, UFSCar, 2002.
- (40) Lu, Y.; Luo, J.; Kong, L. *Phytochemistry*, *72*, 668-673.
- (41) Bye, C.; Fowle, A. S. E.; Letley, E.; Wilkinson, S. *Nature* **1974**, *252*, 580-581.
- (42) Duke, J. A. In *NewCROPS web site* 1983.
- (43) www.nextbio.com/b/search/ov/nuatigenin?id=478437&type=compound; NextBio: acessado 17/07/2012.
- (44) Morrissey, J. P.; Wubben, J. P.; Osbourn, A. E. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2000**, *13*, 1041-1052.
- (45) Gohari, A.; Saeidnia, S.; Hadjiakhoondi, A.; Abdoullahi, M.; Nezafati, M. *Journal of Medicinal Plants* **2009**, *8*, 5.
- (46) Marquina, S.; Maldonado, N.; Luisa Garduño-Ramírez, M.; Aranda, E.; Luisa Villarreal, M.; Navarro, V.; Bye, R.; Delgado, G.; Alvarez, L. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 93-97.
- (47) Marqui, S. R. d.; Lemos, R. B.; Santos, L. Á.; Castro-Gamboa, I.; Cavalheiro, A. J.; Bolzani, V. d. S.; Silva, D. H. S.; Scorzoni, L.; Fusco-Almeida, A. M.; Mendes-Giannini, M. J. S.; Young, M. C. M.; Torres, L. M. B. *Química Nova* **2008**, *31*, 828-831.
- (48) Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2003**, *41*, 636-638.
- (49) Eugênio, P. F. M. Dissertação de Mestrado, UFSCar, 2008.
- (50) He-jiao, H.; Kui-wu, W.; Bin, W.; Cui-rong, S.; Yuan-jiang, P. *Journal of Zhejiang University - Science B* **2005**, *6*, 719-721.
- (51) Uddin, G.; Waliullah; Siddiqui, B. S.; Alam, M.; Sadat, A.; Uddin, A. A. a. *Middle East Journal of Scientific Research* **2011**, *8*, 7.
- (52) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L. *Annual Review of Analytical Chemistry* **2008**, *1*, 579-599.
- (53) Leong, Y.-W.; Harrison, L. J. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 849-857.
- (54) Entwistle, N.; Pratt, A. D. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 3949-3953.
- (55) Entwistle, N.; Pratt, A. D. *Tetrahedron* **1969**, *25*, 1449-1451.
- (56) Entwistle, N.; Pratt, A. D. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1973**, 1235-1239.
- (57) Vrkoc, J.; Budesínský, M.; Dolejs, L. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1782-1784.
- (58) Compagnone, R. S.; Suarez, A. C.; Leitao, S. G.; Delle Monache, F. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 6-10.

- (59) Nakamura, S.; Iwami, J.; Matsuda, H.; Mizuno, S.; Yoshikawa, M. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2443-2450.
- (60) RODRIGUES-F^O. E.; SILVA, B. F. In *Biocatálise e Biotransformação - fundamentos e aplicações*; MARSAIOLI, A. J., PORTO, A. L. M., Ed.; Schoba: Salto, 2010; Vol. 1, p 338.
- (61) Zhi-lin, Y.; Chuan-chao, D.; Lian-qing, C. *African Journal of Biotechnology* **2007**, *6*.
- (62) Zhenhua, X.; Dongmei, G.; Xiuli, S.; Ying, X.
- (63) Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rammert, A.-K.; Krohn, K. *Mycological Research* **2002**, *106*, 996-1004.
- (64) LANKMAYR, E.; SOCHER, G.; Rissler, K.; WALTER, U. *Tenside, surfactants, detergents* **2001**, *38*, 80-85.
- (65) Nisius, A. *Planta* **1988**, *173*, 474-481.
- (66) Osbourn, A. E. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1-4.
- (67) Wang, F.-Q.; Li, B.; Wang, W.; Zhang, C.-G.; Wei, D.-Z. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *77*, 771-777.
- (68) Leong, Y.-W.; Harrison, L. J. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 849-857.