

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

**“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE E  
INDUÇÃO À PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES  
ESPIROQUINAZOLINOS POR *EUPENICILLIUM SP*”**

FABIO ALESSANDRO PROENÇA BARROS\*

Tese apresentada como parte dos requisitos  
para obtenção do título de DOUTOR EM  
CIÊNCIAS, área de concentração:  
QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

\*Bolsista CAPES

SÃO CARLOS – SP

2006

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

B277dm

Barros, Fabio Alessandro Proença.

Desenvolvimento de metodologia de análise e indução à produção de alcalóides espiroquinazolinicos por *Eupenicillium* SP / Fabio Alessandro Proença Barros. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

95 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Alcalóides. 2. Rutacea. I. Título.

CDD: 547.72 (20<sup>a</sup>)

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

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato Fabio Alessandro Proença Barros realizado em 15 de dezembro de 2006:*



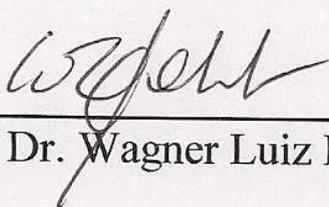
---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



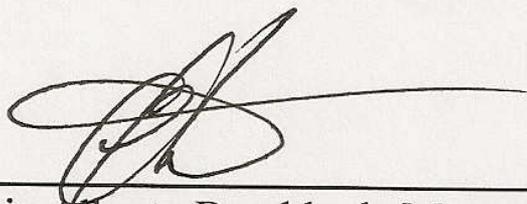
---

Prof. Dr. Eduardo César Meurer



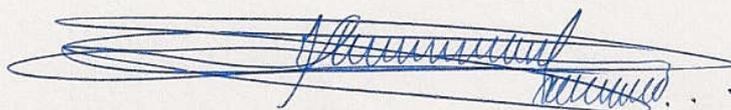
---

Prof. Dr. Wagner Luiz Polito



---

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes



---

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**, pela orientação, ensinamentos, amizade, atenção e constante incentivos.

Ao **Prof. Dr. João Batista Fernandes** e à **Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**, pelos ensinamentos e contribuições na execução deste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Química - em especial às Profas. Dras. **Ursula Brocksom** e **Quezia Cass** - pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais e em especial aos alunos do Laboratório de Bioquímica Micromolecular: **Afonso, Ana Paula, Andrey, Ângela, Antônia, Grace, Gezimar, Francinete, Lucília, Michael, Michele, Regina, Rodrigo, Luciana, Thaisia, Thaís, Renata, Luiz Fernando, Luiz Henrique.**

Aos amigos do laboratório de Síntese Orgânica I e II e demais laboratórios do Departamento de Química pelas contribuições na execução do trabalho e amizade.

Aos amigos do laboratório de RMN pela colaboração na obtenção de alguns espectros.

Ao corpo técnico do Departamento de Química: **Ademir, Doraí, Edilson, Luciana, Marcelo, Paulo, Valdir.**

Às secretarias do Programa de Pós – Graduação do Departamento de Química, **Ariane, Luciani e Cristina**, pela boa vontade.

Aos meus pais: **Luiz e Egi**, pela oportunidade de estudar, pela educação recebida e constante apoio durante todos os dias da minha vida.

Aos meus avós **Luiz S. de Barros** (*in memoriam*), **Maria Aleixo S. de Barros, Jair Proença** (*in memoriam*) e **Maria de Moraes Proença**, pelos exemplos de vida a serem seguidos.

À **Geraldo, Lucy e Eduardo**, pelo apoio incondicional durante todos estes anos de convivência.

Às minhas irmãs **Luciane e Aline**, ao meu cunhado **Rodrigo** e meus sobrinhos **Bruno, Betinho e Mateus** pela amizade e carinho.

À minha família **Gisele, Fabinho e Anna Beatriz**, pelo amor, carinho e atenção que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

A Capes pela bolsa concedida.

## Glossário de siglas utilizadas no texto

### Siglas mantidas em inglês\*:

#### Técnicas e unidades:

APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
Da	Dalton
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
2D NMR	<i>Two Dimension Resonance Magnetic Nuclear</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC/MS	<i>Liquid Chromatography couplet to Mass Spectrometry</i>
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	<i>Mass/charge ratio</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>

\* Algumas siglas foram mantidas em inglês porque várias delas não têm tradução estabelecida para o português, enquanto que outras, apesar de já existir a tradução para o termo, foram mantidas em inglês para manter a uniformidade do texto, evitando o uso de siglas misturando os dois idiomas.

## RESUMO

### **“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE E INDUÇÃO À PRODUÇÃO DE ALCALÓIDES ESPIROQUINAZOLINOS POR *EUPENICILLIUM SP*”**

Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma metodologia de extração, pré-purificação (em fase sólida - SPE) e análise por HPLC-UV-MS/MS de alcalóides espiroquinazolínicos. Esses alcalóides são produzidos, pelo fungo *Eupenicillium sp*, isolado como endofítico de *Murraya paniculata* (RUTACEAE). Quando cultivado em milho e arroz produz alcalóides espiroquinazolinos; os quais exibem importante atividade biológica contra a substância P, envolvida em processos de analgesia. Eles podem nos ajudar a compreender melhor as interações entre a planta e o fungo.

A metodologia analítica desenvolvida foi empregada em experimentos que determinaram a taxa de produção de alcalóides por dias de cultivo, experimentos de investigação da biogênese destes alcalóides por *Eupenicillium sp*. e também foram realizados para induzir o acúmulo dos mesmos.

Foram isolados três novos alcalóides espiroquinazolinos, sendo que suas estruturas foram determinadas por técnicas de RMN 1D e 2D e experimentos de MS e MSMS.

## ABSTRACT

### “METHOD DEVELOPMENT OF ANALYSIS AND INCREASE PRODUCTION OF SPIROQUINAZOLINE ALKALOIDS BY EUPENICILLIUM SP”

It is presented the development of a liquid chromatography-UV-tandem mass spectrometric method for spiroquinazolinic alkaloids analyses in a variety of matrices where the fungus *Eupennicillium* sp. was cultivated. Sample preparation was conducted using a solid-phase extraction strategy. These rare alkaloids were isolated from *Eupenicillium* sp an endophitic fungi obtained from *Murraya paniculata* (RUTACEAE). The fungus when cultivated in corn and rice substrates produces spiroquinazolines alkaloids that exhibit high important activities, mostly analgesic. The structures of these alkaloids are formed by a sequence of amino acids similar to these carbazolic alkaloids produced by *Murraya* plants, which might explain some aspects of the microorganism-plant interaction.

The analytical methodology was used in experiments to determine the amount of these alkaloids produced over cultivation time. Biogenesis investigation was performed to obtain data useful to increase alkaloid production.

Three unprecedented spiroquinazoline alkaloids were identified and characterized using 1D and 2D RMN together with MS and MSMS experiments.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 - Generalidades .....	2
1.2 - Microrganismos endofíticos .....	6
1.3 - Metabolismos secundário dos microrganismos endofíticos .....	8
1.4 - A ordem Rutales e a planta <i>Murraya paniculata</i> .....	9
1.5 - Fungos endofíticos associados à planta <i>Murraya paniculata</i> .....	11
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3 - PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>17</b>
3.1 - Material vegetal .....	18
3.1.1 - Folhas de <i>Murraya paniculata</i> .....	18
3.2 - Fungo. ....	18
3.2.1 - Fungo <i>Eupenicillium</i> sp.....	18
3.3 - Reagentes .....	18
3.3.1 - Suportes para cromatografia .....	18
3.3.2 - Eluentes para cromatografia.....	19
3.3.3 - Solventes para RMN.....	19
3.3.4 - Substâncias utilizadas para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos ...	19
3.4 - Equipamentos utilizados.....	20
3.4.1 - Rotaevaporadores .....	20
3.4.2 - Espectrômetro no infravermelho.....	20
3.4.3 – Espectrômetro de RMN .....	20
3.4.4 - Estufas de secagem e esterilização. ....	20
3.4.5 - Balança analítica .....	20
3.4.6 - Câmara de fluxo laminar.....	20
3.4.7 - Estufa incubadora.....	20
3.4.8 - Autoclave vertical.....	20
3.5 - Métodos.....	21
3.5.1 - Metodologias gerais .....	21

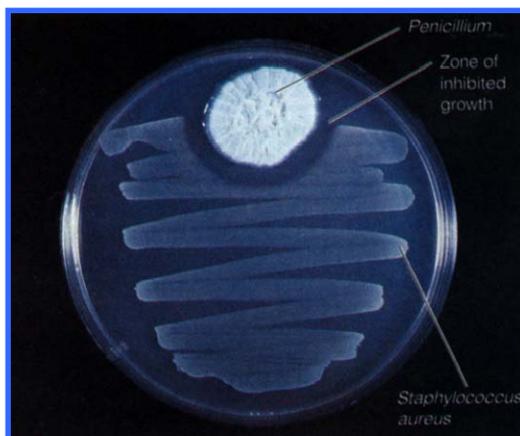
3.5.2 - Preparo do meio BDA.....	21
3.5.3 - Metodologias gerais para os experimentos envolvendo <i>Eupenicillium</i> sp..	22
3.5.4 - Metodologias gerais para análises por HPLC-MS e HPLC-MS/MS.....	22
3.5.5 - Metodologias específicas para o fungo <i>Eupenicillium</i> sp.....	23
3.5.6 - Análise de aminoácidos por CCD.....	23
3.5.7 - Meio de cultura e cultivo do fungo .....	24
3.6 - Obtenção dos extratos.....	25
3.6.1 - Extração de alcalóides espiroquinazolinos .....	25
3.6.2 - Extração de ergosterol .....	25
3.7 - Análise por HPLC/UV. ....	26
3.7.1 - Análise por HPLC/UV do alcalóide alanditripinona.....	26
3.7.2 - Análise por HPLC/UV de Ergosterol.....	26
3.7.3 - Análise por MS/MS do alcalóide alanditripinona .....	27
3.8 - Preparo dos extratos protéicos .....	27
3.8.1 - Preparo do extrato protéico de milho e de folhas de <i>M. paniculata</i> .....	27
3.8.1.1 - Preparo e cultivo de <i>Eupenicillium</i> sp em meio líquido Czapek's enriquecido com extrato protéico do milho e de folhas de <i>M. paniculata</i> .....	28
3.9 - Extração em fase sólida .....	29
3.10 - Indução a produção de alcalóides .....	29
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>31</b>
4.1 - Metabolismo secundário de <i>Murraya paniculata</i> .....	32
4.2 - Determinação estrutural dos alcalóides espiroquinazolinos .....	34
4.2.1 - Determinação estrutural da alanditripinona .....	36
4.2.2 - Determinação estrutural do alcalóide alantrifenona .....	50
4.2.3 - Determinação estrutural do alcalóide alantrifenona B.....	51
4.3 - Análise dos alcalóides espiroquinazolinos por espectrometria de massas (MS) .....	55
4.4 - Metodologia de HPLC/UV. ....	66
4.5 - Extração .....	69
4.6 - Metodologia de SPE .....	70
4.7 - Experimentos que visam à indução da produção de alcalóides.....	71
4.8 - Cultivo do fungo <i>Eupenicillium</i> sp em folhas de <i>M. paniculata</i> .....	74
4.9 - Curvas de crescimento e taxa de produção de alcalóides por <i>Eupenicillium</i> sp.....	81

<b>5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>90</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>91</b>

# *1 - INTRODUÇÃO*

## 1.1 Generalidades.

Mais de 100.000 espécies de fungos foram classificadas morfologicamente. Aproximadamente 10 % destas espécies de fungos obtêm seus nutrientes de associações com outros organismos. De maneira alguma podemos olhar estas associações somente como prejudiciais aos organismos hospedeiros. Os fungos utilizam os nutrientes para produção de estruturas químicas extremamente complexas. Muitos destes compostos têm sido utilizados pela humanidade com as mais diversas aplicações. A observação de Fleming, a respeito do antagonismo entre as culturas de *Penicillium notatum* e *Staphylococcus* sp (Figura 1), resultou na descoberta das penicilinas. Após a descoberta das penicilinas, muitas outras substâncias produzidas por fungos se tornaram fármacos importantes que, na maioria dos casos, são produzidos a partir de meios de cultura simples, como grãos (Tabela 1.1).



**Figura 1.1:** Antagonismo entre as culturas de *Penicillium notatum* e *Staphylococcus* sp que resultou na descoberta das penicilinas (Imagem original Leningher).

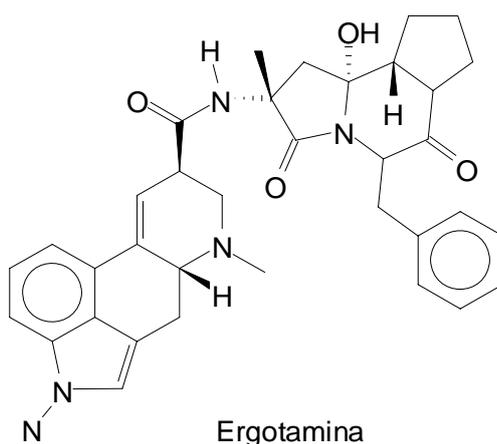
**Tabela 1.1:** Alguns exemplos de compostos produzidos por fungos em meios de cultura simples.

<b>Composto</b>	<b>Fungo</b>	<b>Meio de cultura</b>
penicillina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Milho
cefalosporinas	<i>Cephalosporium</i> spp	
streptomomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Soja
gibberellina	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Diversos Meios
vitamina B12	<i>Streptomyces</i> spp	Milho + Co
Alcalóides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	
Ciclosporina A	<i>Tolypocladium inflatum</i> / <i>Cylindrocarpon lucidum</i>	
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i>	
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i>	Amendoim
Caroteno	<i>Mucor</i> sp	
Piocianina	<i>Pseudomonas</i> spp	
Acido dipicolico	<i>Bacillus spores</i>	

Muitas associações entre plantas e microrganismos são parasitas, levando a diversas doenças. Outras associações são simbioses mutualistas, que trazem benefícios aos hospedeiros (TUNLID & TALBOT, 2002). Associações que por muito tempo tinham sido vistas como prejudiciais ao homem, hoje são vistas como benéficas. Um exemplo claro disso são os alcalóides do Ergot (*Claviceps purpurea*) (Figura 1.2) parasita do trigo. Na idade média, pessoas que consumiam trigo contaminado por este fungo sofriam fortes sintomas de vaso-constricção e alucinação. As atividades vaso-constritoras foram atribuídas aos alcalóides, conhecidos como alcalóides do Ergot. Um exemplo é a Ergotamina (Figura 1.3). Hoje em dia, os alcalóides do ergot são amplamente empregados na medicina moderna, sendo utilizados principalmente em hemorragias graves. Devido à complexidade da sua estrutura molecular, boa parte da produção destes alcalóides é realizada por microrganismos.



**Figura 1.2:** Trigo contaminado com fungo *Claviceps purpurea* (Ergot).



**Figura 1.3:** Ergotamina, alcalóide produzido por *Claviceps purpurea* com atividade vaso constritora utilizado atualmente como fármaco.

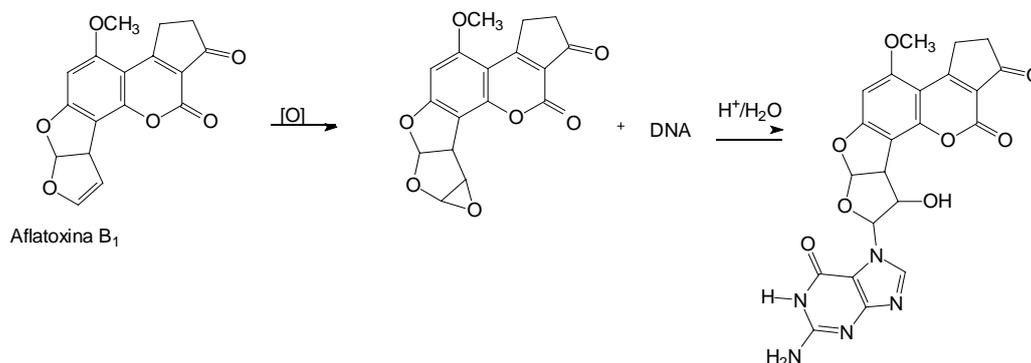
Atualmente, pesquisas genéticas de fungos relacionadas a expressão de enzimas envolvidas em rotas biossintéticas, começam a ser feitas em maior detalhe. WANG *et al.*, 1991, clonaram os genes que codificam para DMATSintase (dimetilalil triptofano sintase), enzima responsável pelo primeiro passo na biossíntese de alcalóides do Ergot (*Gaviceps purpurea*). Esses genes foram posteriormente identificados nos fungos endofíticos *Balansia obtecta* e *Neothyphodium* sp, conhecidos por produzirem ergobalasinina e ergovalinina, respectivamente (AZEVEDO *et al.*, 2000). Outras pesquisas

relatam a indução à produção de alcalóides por *C. purpurea*. Este aumento na produção de alcalóides ocorre pela adição de indutores no meio de cultura. Aminoácidos como triptofano ativam a enzima dimetilalil triptofano sintase, induzindo a produção de alcalóides do ergot (SANCHEZ *et al*, 2002).

Outro fungo que é visto pela sua ação prejudicial é o *Aspergillus flavus* (Figura 1.4). Este fungo e *Aspergillus parasiticus*, são conhecidos por produzirem um grupo de metabólitos conhecidos como Aflatoxinas (VIDYASAGAR, *et al*, 1997). Aflatoxinas são conhecidas pela sua ação carcinogênica, teratogênica e como agentes imuno-supressores. A aflatoxina B1 é o agente cancerígeno natural mais potente que se conhece. Aflatoxina B1 é convertida em sua forma altamente carcinogênica a 8, 9 epoxi-aflatoxina B1 (Esquema 1.1), por enzimas do citocromo P<sub>450</sub> (VIDYASAGAR, *et al*, 1997).



**Figura 1.4:** *Aspergillus flavus*, fungo produtor de Aflatoxinas.



**Esquema 1.1:** Oxidação por enzimas relacionadas ao Citocromo P<sub>450</sub> da Aflatoxina B1 em sua forma altamente carcinogênica a 8, 9 epoxi-aflatoxina B1

A aflatoxina B1, após processo de oxidação fornece como produto a 8, 9 epoxi-aflatoxina B1. Este produto de oxidação reage com moléculas de DNA, promovendo a quebra da cadeia, conseqüentemente, levando a mutações que podem gerar diferentes tipos de câncer. No esquema 1, observa-se um aduto da aflatoxina com uma parte da cadeia de DNA. Este aduto é obtido a partir de uma hidrólise ácida e é utilizado como marcador de mutações causadas por Aflatoxina B1 [(ESSIGMANN, et al, 1977) e (STEVEN, et al., 1988)]. Esta forma de ação destas toxinas, pode futuramente ajudar na compreensão de um fenômeno que ocorre entre associações entre plantas e microrganismos – a transferência genética horizontal. Também pode ajudar a entender um dos mecanismo de defesa das plantas contra a ação de microrganismos, o aumento da ação da enzima fenil alanina amônio oxidase (PAL). Que tem sua ação aumentada, em infecções causadas por microrganismos, levando a uma maior a produção de compostos com conhecida ação anti-oxidante, como flavonóides e cumarinas.

## 1.2 Microrganismos endofíticos

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, ou seja, a maior do planeta, fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas. Por outro lado, as interações entre as plantas e microrganismos já são conhecidas há tempo. Entretanto, com exceção da associação de plantas com fungos micorrízicos diazotróficos da rizosfera,

acreditava-se que estas interações levavam à formação de lesões nos tecidos vegetais. Mais recentemente, vem sendo registrada a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais saudáveis, abrindo novas perspectivas para o estudo da interação planta/microrganismo. Uma parcela dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habita o interior das plantas. São os endofíticos que, segundo PETRINE (1991), colonizam os tecidos saudáveis de partes aéreas da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Este conceito também é estendido aos microrganismos das raízes. Os endofíticos diferem dos epífitos que vivem na superfície dos vegetais.

Entre os microrganismos endofíticos, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas as quais estão associados. Essas associações são bastante estudadas devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas.

Ao contrário, os endofíticos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras. As interações endofítico/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (ARAUJO, 1996; RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993). Exemplo de metabólitos que podem ser induzidos pelos endofíticos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes (CORDEIRO NETO & DIETRICH, 1992). Da parte dos fungos pode-se citar a produção de micotoxinas, metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais (CLAY, 1988; D'MELLO & MACDONALD, 1997). Os fungos endofíticos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (FAHEY, 1988; MURRAY *et al.*, 1992), como agentes inibidores de pragas

e patógenos (VOLKSH *et al.*, 1992; HALLMANN & SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD *et al.*, 1998) e secundários.

### **1.3 Metabolismos secundário dos microrganismos endofíticos.**

Todo organismo que habita, por algum período de tempo em seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, pode ser considerado como endofítico. Os fungos endofíticos vivem em associação com plantas, incluindo árvores, gramíneas, algas musgos e herbáceas (KOING, *et al.*, 1999) esta associação pode ser simbiótica (mutualismo), ou o fungo pode ser um patógeno em um período de latência (PETRINE, *et al.*, 1992). Estimativas recentes sugerem que existam  $1,3 \times 10^6$  espécies de endofíticos vivendo em cerca de 270.000 plantas vasculares conhecidas (BRADY, *et al.*, 1999). Em circunstâncias normais eles vivem no interior da planta hospedeira sem usar nenhum sintoma ou doença. No entanto, os fungos endofíticos podem vir a serem patogênicos quando a planta hospedeira estiver em condição de estresse (KOING, *et al.*, 1999)

Os fungos endofíticos têm se mostrado uma valiosa fonte de metabólitos secundários para uso potencial como antimicrobianos, na biotecnologia e na agricultura. Existem ainda relatos de um possível "aprendizado" da habilidade dos organismos associados para produzir uma mesma classe de substância. Assim, o fungo *Giberela fugiukuori* associado à planta *Cucumbita máxima*, produz derivados do ácido giberélico (MCMILLIAM *et al.*, 1958), um diterpeno com atividade hormonal no crescimento de plantas; a planta *Baccharis megapotanica* (exclusivamente a planta fêmea), associada aos fungos *Fusarium* e *Myrothecium* produzem micotoxinas da classe dos trichotecenos macrocíclicos (JARVIS, *et al.*, 1991); várias espécies de fungos endofíticos em *Taxus brevifolia* (Figura 1.5) (*Taxomyces andrenae*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, etc) produzem Taxol (LI, *et al.*, 1998; SIERLE *et al.*, 1995), um diterpeno com potente atividade anticâncer. Recentemente, foi isolada uma nova espécie *Seimatoantlerium tepuiense*, um fungo produtor de Taxol. Esta espécie de fungo é epifítica em *Maguireothamus speciosus* (Rubiaceae), uma espécie endêmica na Venezuela.

Esses são três exemplos de microrganismos produzindo substâncias que são características de plantas. Este fenômeno ecológico tem sido interpretado do ponto de vista bioquímico, como sendo uma "transferência genética horizontal" entre plantas e fungos (ROHY *et. al.*, 1997), embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam claramente elucidados.



**Figura 1.5:** Detalhes de um galho de *Taxus brevifolia*.

#### **1.4. A ordem Rutales e a planta *Murraya paniculata***

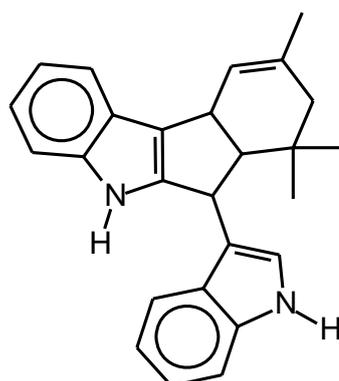
A ordem Rutales é constituída pelas famílias Rutaceae, Cneoraceae, Simaroubaceae, Meliaceae e Burseraceae [ENGLER 1931]. A família Rutaceae é composta de mais de mil e cinqüenta gêneros compreendendo mais de quinze mil espécies, com vasta distribuição nas regiões tropicais e subtropicais e são particularmente abundantes na Austrália, Sul da África e América do Sul (O'SULLIVAN, 1984).

Diversos gêneros dentro dessa família são de importância econômica, com destaque para o gênero *Citrus*, tanto pela produção de frutos como de óleos voláteis (O'SULLIVAN, 1984), especialmente para o Brasil, que é o maior produtor de suco de laranja do mundo, sendo que o estado de São Paulo é responsável por 85% dessa produção (AZEVEDO *et al.*, 2000). Para a indústria farmacêutica, diversos gêneros são importantes, destacando *Pilocarpus* que possui diversas espécies produtoras de pilocarpina, um alcalóide imidazólico utilizado como micótico em oftalmologia. O alcalóide acridônico acronicina, é encontrado em *Acronychia baueri* e possui atividades antitumorais (O'SULLIVAN, 1984). O

gênero *Murraya* é conhecido pela produção de alcalóides do tipo carbazólicos e indólicos (WATERMAN, 1999), que possuem diversas atividades biológicas. Por exemplo, *Murraya euchrestifolia* produz murrayafolina A e murrayaquinonia A como atividades antitumorais (ITOIGAWA, *et al.*, 2000) e *M. paniculata* (Figura 1.6), que produz o alcalóide yuehchukeno (Figura 1.7), o qual possui ação contraceptiva (KONG *et al.*, 1985).



**Figura 1.6:** Detalhes de um galho de *Murraya paniculata*.



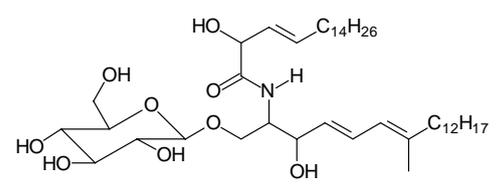
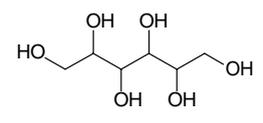
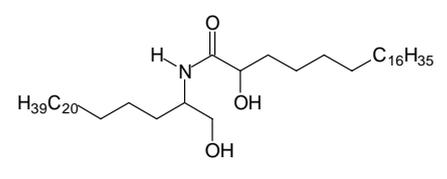
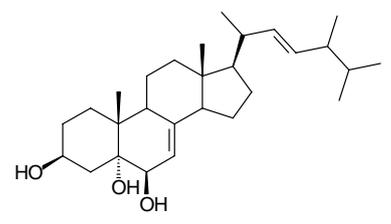
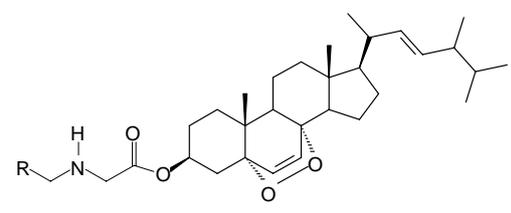
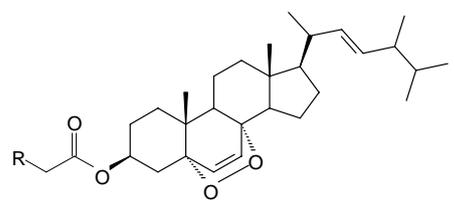
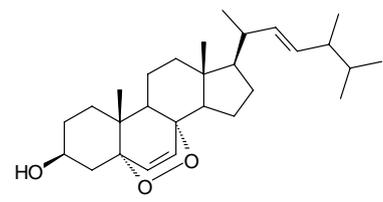
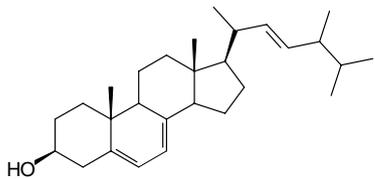
**Figura 1.7:** Estrutura química do alcalóide yuehchukeno, isolado de *Murraya paniculata*

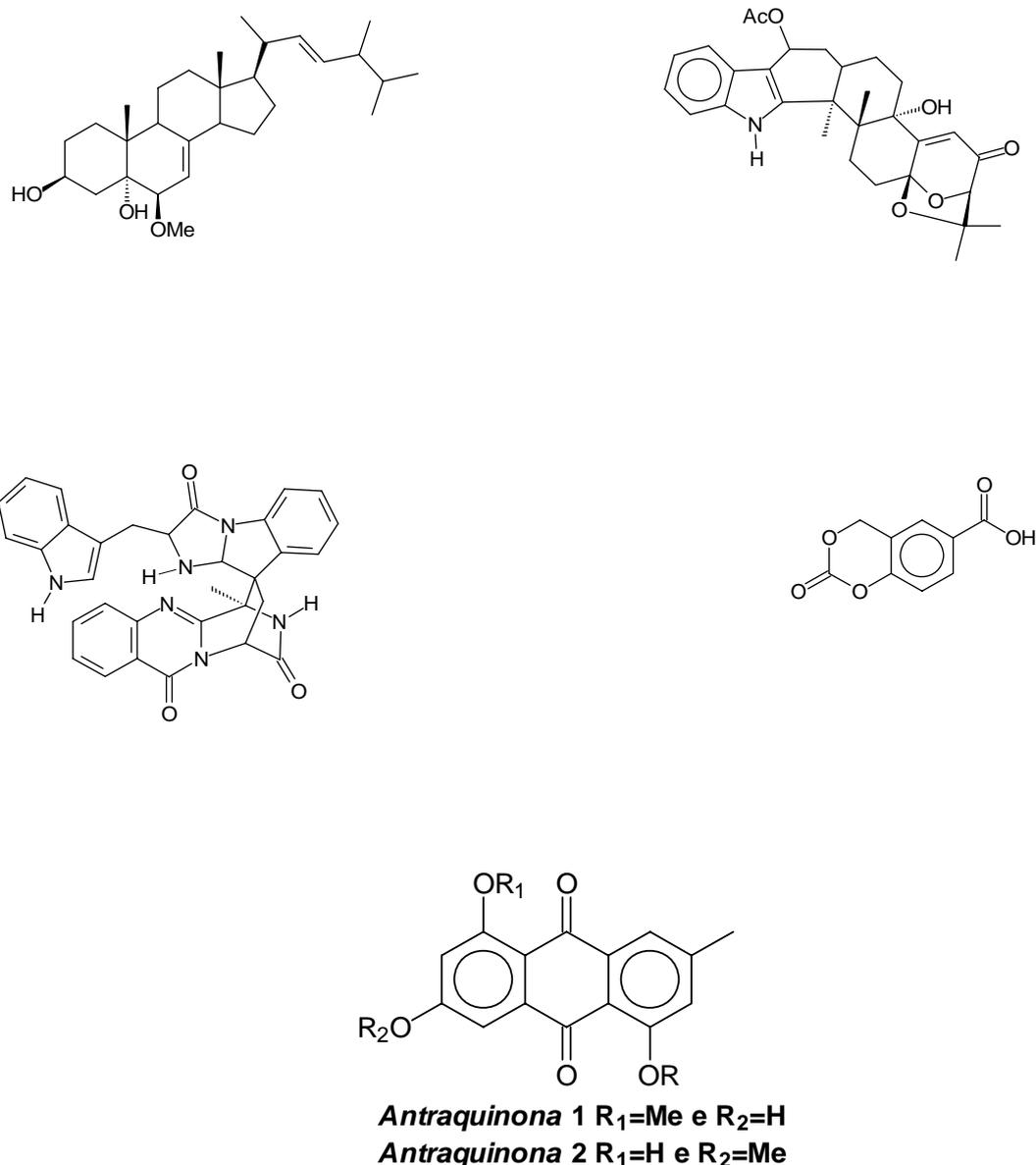
Folhas, cascas, frutos, flores e raízes de *Murraya paniculata* são prescritas na medicina popular chinesa para as mais variadas aplicações. Entretanto, uma das mais importantes é a ação contraceptiva do chá das raízes e do caule utilizados por nativas chinesas. A substância responsável por esta atividade é o alcalóide yuehchukeno (Figura 1.7) (KONG *et al.*, 1985).

Tentativas de identificação desses alcalóides em *Murraya paniculata* coletada em São Carlos (SP) foram mal sucedidas e levaram ao isolamento de cumarinas preniladas e flavonóides polimetoxilados (FERRACIN, 1996). A biogênese de flavonóides, cumarinas (C6-C3) e alcalóides, têm um ponto em comum conforme. A ação da enzima fenilalanina-amônio-liase (PAL) transforma fenilalanina em derivados do ácido cinâmico que leva à formação de cumarinas, flavonóides e lignanas. Por outro lado, o ácido corísmico pode ser transformado em ácido antranílico que levaria ao triptofano, provável precursor desses alcalóides (VOET, 1990). A estrutura final destes alcalóides sugere um indol (triptofano), no entanto a origem destes alcalóides permanece incerta.

### **1.5 Fungos endofíticos associados à planta *Murraya paniculata*.**

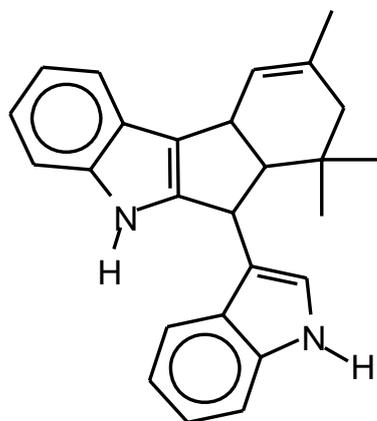
Diversos fungos endofíticos foram isolados de *Murraya paniculata*. O estudo do metabolismo secundário de apenas um deles (*Eupenicillium* sp) (BARROS, 2002) possibilitou o isolamento de diversos esteróides derivados do ergosterol, que segundo a literatura, possuem atividades antitumorais (TAKAKAU, 2001) e anti HIV (EI MEKKAWY, 1998); cerebrosidas, que são compostos relatados na literatura pela sua atividade contra o mal de Parkinson (HSU e TRUK, 2001); compostos do caminho dos policetídeos; alcalóides esteroidais e alcalóides indólicos derivados de um caminho misto entre triptofano e ácido antranílico (Figura 1.8).



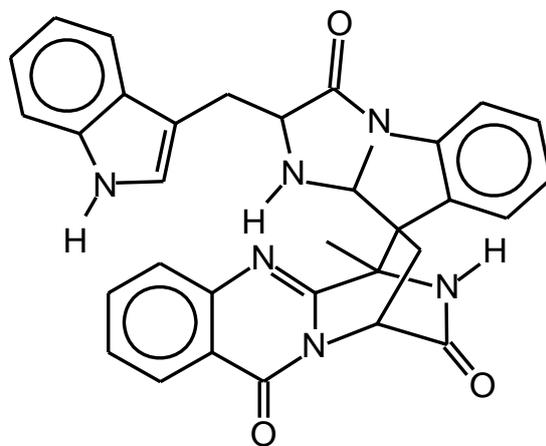


**Figura 1.8:** Substancias isoladas de *Eupenicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata*

Dentre estes compostos produzidos por *Eupenicillium* sp (Figura 1.8), um deles chama atenção devido a sua estrutura complexa. O alcalóide espiroquinazolino alanditripinona é uma estrutura inédita, até então existiam apenas três relatos de alcalóides espiroquinazolinicos na literatura. Mas o mais importante é a sua semelhança com alcalóides de *M. paniculata* (Figura 1.9). Pela comparação do yuehchukeno e alanditripinona utilizam-se do mesmo aminoácido o triptofano para a produção de seu alcalóides. Entender os mecanismos envolvidos na biosíntese de alcalóides espiroquinazolinicos por *Eupenicillium* sp, pode ajudar a compreender a interação entre o fungo e a planta.



yuehchukeno



alanditripinona

**Figura 1,9:** Estrutura do alcalóide yuehchukeno (*Murraya paniculata*) e do alcalóide alanditripinona (*Eupenicillium* sp)

## ***2 – OBJETIVOS***

O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia de HPLC-UV-MS/MS para a análise de alcalóides espiroquinazolinicos produzidos por *Eupenicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). Aplicar a metodologia desenvolvida para a realização de experimentos de indução de produção de alcalóides espiroquinazolinicos por *Eupenicillium* sp. Para tentar se compreender os caminhos biosintéticos utilizados por *Eupenicillium* sp, para a produção destes alcalóides.

***3 - PARTE***  
***EXPERIMENTAL***

### **3.1 - Material vegetal**

#### **3.1.1 – Folhas de *Murraya paniculata*.**

As folhas de *Murraya paniculata* foram coletadas em árvores localizadas no campus da UFSCar. Um ramo da planta, contendo folhas e frutos, foi depositado no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar) sob o nº 005826.

### **3.2 - Fungo**

#### **3.2.1 – Fungo *Eupenicillium* sp.**

O fungo *Eupenicillium* sp foi isolado como endofítico das folhas de *Murraya paniculata*. Uma suspensão aquosa deste fungo foi depositada na micoteca do laboratório de bioquímica micromolecular do DQ-UFSCar, sob nº 00026.

### **3.3 - Reagentes**

#### **3.3.1- Suportes para Cromatografia:**

- Sílica gel 230 -400 Mesh (sílica flash) para cromatografia em coluna (CC)
- Sílica gel 70 -230 Mesh (sílica comum) para cromatografia em coluna (C C).
- Sílica 60 H Mesh para cromatografia em coluna (CC)
- Sílica gel 60 PF254 para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

### **3.3.2 - Eluentes para cromatografia:**

-Foram utilizados solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar .

### **3.3.3 - Solventes para RMN:**

-Solventes deuterados da Merck e Aldrich 98-99,9%.

### **3.3.4 - Substâncias utilizadas para o isolamento e cultivo dos fungos endofíticos:**

-Álcool 70%

-Hipoclorito de Sódio 11 %

-Dextrose -Mallinckrodt .

-Ágar Bacteriológico DIFCO, Henrifarma

-Batata Inglesa

-Sulfato de Potássio -Merck

-Sulfato Ferroso PA -Reagen

-Cloreto de Cálcio -Reagen

-Fosfato de Potássio - Mallinckrodt

-Sulfato Magnoso - Mallinckrodt

-Sulfato de Zinco -Mallinckrodt

-Molibdato de Amônio - Mallinckrodt

-Sulfato de Magnésio -Grupo Química

-Sulfato Cúprico -Cinética Química

### **3.4 - Equipamentos utilizados.**

#### **3.4.1 - Rotaevaporadores:**

-Evaporador Rotativo TECNAL (TE 120)

-Rotavapor Büich 461 -Water Bath (EL 131)

#### **3.4.2 - Espectrofotômetro no infravermelho:**

-Bomem FT/IR

#### **3.4.3 - Espectrômetro de NMR:**

-Brüker ARX -200

#### **3.4.4 - Estufa de secagem e esterilização:**

-Estufa FANEM -315 SE

#### **3.4.5 - Balança analítica:**

-Balança Mettler P136

#### **3.4.6 - Câmara de fluxo laminar:**

-Veco VL FS -12 M

#### **3.4.7 - Estufa incubadora:**

-FANEM 347 CD

#### **3.4.8 - Autoclave Vertical:**

-Phenix AV 75

-Soco FABBE 103

### **3.5 - Métodos.**

#### **3.5.1 - Metodologias Gerais.**

As análises por LC/APCIMSMS, serão feitas utilizando-se uma bomba para cromatografia capilar modelo Phonex 40 -Carlo Erba, acoplada ao espectrômetro de massas Micromass QuattroLC.

O isolamento dos metabólitos de *Eupenicillium* sp foi feito utilizando-se técnicas cromatográficas de bancada e aparelhos de HPLC Shimadzu, com bomba de solventes LC-10, com válvula para reciclos, utilizando-se como detectores índice de refração e ultravioleta com "diode array". A identificação destes metabólitos foi feita utilizando-se técnicas uni e bidimensionais de NMR em aparelhos Brücker (ARX 200 e DRX 400), somadas as técnicas de espectrometria de massas descritas acima.

#### **3.5.2 - Preparação do meio BDA.**

O meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Agar) foi preparado com 300 g de batatas descascadas, cortadas em cubos, 20 g de glicose (Mallinckrodt), 25 g de ágar (Difco) e água destilada. As batatas foram adicionadas a 500 mL de água destilada em copo de Becker de 1 L, em seguidas cozidas em forno de microondas (LG) por um período de 30 min em potência máxima, o caldo foi separado das batatas por filtração. Ao filtrado foi adicionado o agar, dissolvido sob aquecimento, então se acrescentou a glicose. A solução em frasco de erlenmeyer foi esterilizada em autoclave a uma temperatura de 120 °C e pressão de 1,0 atm.

O meio BDA foi colocado em placas de Petri esterilizadas, estando prontas para a inoculação assim que atingiram a temperatura ambiente.

### **3.5.3 - Metodologias gerais para os experimentos envolvendo *Eupenicillium sp.***

Todos os experimentos envolvendo fungos foram realizados em ambiente estéril - capela de fluxo laminar - com todos os frascos e soluções esterilizadas em autoclave a uma temperatura de 120 °C e 1,0 atm de pressão, ou a chama de bico de Bunsen, no caso de pinças, espátulas e hastes de metal.

Os fungos foram inicialmente cultivados em meio BDA. Após uma semana de cultivo, uma pequena parte dos fungos foi retirada dos seus respectivos meios, com um pequeno tubo de vidro (5mm de diâmetro) e transferida para as respectivas soluções de meio de cultura líquido. Os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave e resfriados a temperatura ambiente, antes da inoculação dos microrganismos.

### **3.5.4 - Metodologias gerais para análises por HPLC-MS e HPLC-MS/MS.**

As análises por HPLC/MS e HPLC-MS/MS foram feitas em um sistema Shimadzu para a eluição gradiente, composto por duas bombas LC-10AD, um injetor manual Reodyne (com *loop* de 20 µl) e detector UV foto-diodo SPD-M 10A, controladas por um controlador de sistema SCL-10A. O sistema foi operado e as análises adquiridas e processadas utilizando o programa Shimadzu Class VP 5.0. O sistema de HPLC descrito acima pode ser acoplado a um aparelho de MS Micromass Quattro LC, equipado com triplo quadrupolo e fonte de ionização APCI e ESI. O sistema é operado e as análises adquiridas e processadas utilizando o programa MassLynx 3.5 As análises foram feitas com as amostras

dissolvidas em Metanol ou ACN grau cromatográfico (Mallinckrodt). Os solventes para as análises de MS foram Metanol (Mallinckrodt), ACN (Mallinckrodt) e água purificada em um aparelho Millipore Milli-Q. Esses solventes foram filtrados à pressão reduzida em filtros de Nylon, com diâmetro de poro 45  $\mu\text{m}$  (Supelco). O gás de nebulização e dessolvatação foi o  $\text{N}_2$  (White Martins). Os valores de voltagem na descarga corona, cone e extrator foram otimizados para a amostra padrão e aplicada nas demais análises. Todas as análises APCI/MS foram feitas utilizando um fluxo de  $0,7 \text{ mL min}^{-1}$  e as análises ESI/MS foram feitas utilizando um fluxo de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ .

### **3.5.5 - Metodologias específicas para o fungo *Eupenicillium* sp.**

Utilizando uma cultura de *Eupenicillium* sp em meio BDA (incubada a  $28^\circ \text{C}$  por sete dias) inoculou-se, com o auxílio de uma haste de metal, o fungo aos meios de culturas sólidos (90 g de Milho em 75 ml de água – 100 g de folhas de *M. paniculata* 75 ml de água). A dois dos frascos contendo milho foi adicionado 0,8 g (cada) de Aspartame (Zero Cal®), a outros dois 0,8 g (cada) de glutamato monossódico (Ajinomoto®), estes frascos foram incubados durante 20 dias a uma temperatura de  $28^\circ \text{C}$ . Outros quatro frascos contendo meio de cultura milho foram incubados por um período de 30 dias sob influência do campo magnético gerado pelo aparelho de NMR 200 MHz – um campo magnético 200 vezes maior do que o da Terra. Dois frascos de Erlenmeyer contendo meio de cultura folhas de *M. paniculata*, foram incubados por um período de 30 dias a uma temperatura de  $28^\circ \text{C}$ .

### **3.5.6 - Análise de aminoácidos por CCD**

Seguindo protocolo estabelecido no Departamento de Bioquímica – UFSCar, foi realizada análise de aminoácidos livres das folhas de *M. paniculata*, do milho e do extrato de levedura. Para isso, prepararam-se extratos aquosos de

folhas de *M. paniculata*, de milho e de extrato de levedura. Estes extratos foram analisados por cromatografia de camada delgada de partição, utilizando como suporte, placas de vidro (15x15cm) contendo sílica (0,25 mm de espessura), como sistema líquido-líquido foi utilizado uma mistura *n*-Butanol:Ácido acético:H<sub>2</sub>O em uma proporção de 40:10:50. Foram também analisadas por CCD de partição, soluções com padrões de aminoácidos (Sigma-Aldrich), utilizaram-se os seguintes aminoácidos: triptofano (W), alanina (A), Fenilalanina (F), Leucina (L) e Prolina (P). Após a partição dos extratos na placa cromatográfica, os aminoácidos foram revelados com solução etanólica de ninidrina.

### **3.5.7 Meio de cultura e cultivo do fungo**

O fungo foi cultivado em meio sólido composto de milho com 50% de H<sub>2</sub>O (m/v), foram utilizados 7,200 kg de milho, divididos em 144 frascos de Erlenmeyer de 500 ml, sendo que 96 frascos continham 25 mg de L-Prolina cada. Os frascos foram tampados com tampões de algodão e esterilizados em autoclave. O fungo *Eupenicillium* sp, previamente cultivado em BDA, foi inoculado no meio sólido, foram inoculados 135 frascos de Erlenmeyer contendo meio de cultura, os frascos restantes foram mantidos como branco. A inoculação foi realizada em ambiente estéril; o tampão de algodão foi retirado somente no momento da inoculação e recolocado em seguida. A cada período três dias de cultivo, nove frascos eram retirados, sendo que seis destes eram meios que continham L-Prolina (3 para análise de alcalóides e 3 para análise de ergosterol), os frascos restantes (meio sem adição de L-Prolina) eram utilizados para a análise de ergosterol. Este processo foi realizado por um período de 45 dias.

### **3.6 - Obtenção dos extratos.**

#### **3.6.1 - Extração de alcalóides espiroquinazolinós.**

Após cada período de três dias de cultivo foi adicionado 200 ml de EtOH a três dos frascos contendo *Eupenicillium* sp. A extração foi realizada por um período de 5 min em triturador (Turratec – TECNAL), após este período a torta foi separada do extrato por filtração. Uma alíquota de 10 ml do extrato foi submetida a SPE (cartucho *home made* – ODS:Alumina 1:1 v/v), a fração coletada foi evaporada, fornecendo assim, os pontos para a construção da curva de produção do alcalóide alanditripinona. O restante do extrato foi reunido e concentrado a pressão reduzida em rota evaporador. Após 45 dias, foram obtidos os 15 pontos (em triplicata) utilizados para a curva de produção de alanditripinona.

#### **3.6.2 - Extração de ergosterol.**

Para a curva de crescimento foram utilizados 90 frascos contendo fungo, sendo que 45 destes continham L-Prolina. Os pontos foram coletados a cada período de três dias e sempre em triplicata. A extração foi realizada com alíquotas de 150 ml de CHCl<sub>3</sub> por 5 min em triturador (Turratec – TECNAL), após este período a torta foi separada do extrato por filtração, ao filtrado foi adicionado 150 ml de solução 1 M de KOH (70% EtOH), a reação de saponificação foi mantida a uma temperatura de 90 °C por um período de 30 min sob refluxo. Após a saponificação se procedeu à extração líquido-líquido, utilizando para isso 300 ml de CHCl<sub>3</sub> e 100 ml de H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi concentrada a pressão reduzida em rota evaporador. Após 45 dias, foram obtidos os 15 pontos (em triplicata) utilizados para a curva de produção de ergosterol no meio sólido milho e os 15 pontos (em triplicata) no meio que continha L-Prolina.

### **3.7 - Análise por HPLC/UV**

#### **3.7.1 - Análise por HPLC/UV do alcalóide alanditripinona**

As frações obtidas durante o cultivo do fungo foram dissolvidas em 8 ml de EtOH, analisadas por HPLC/UV em fase reversa (coluna ODS shim-pack 20 cm x 10 mm) em sistema gradiente ACN:H<sub>2</sub>O. As injeções foram realizadas de maneira aleatória, não obedecendo nenhuma regra quando dias de cultivo. Foram também realizadas injeções em triplicata de soluções padrão de alanditripinona para a confecção de uma curva de calibração. As concentrações de solução padrão seguiram protocolo estabelecido no laboratório de HPLC do DQ-UFSCar – 0,1 µl/ml, 0,15 µl/ml, 0,3 µl/ml, 0,6 µl/ml, 1,2 µl/ml e 2,4 µl/ml. O resultado das análises nos permitiram determinar a taxa de produção do alcalóide alanditripinona por *Eupenicillium* sp.

#### **3.7.2 - Análise por HPLC/UV de ergosterol**

Uma amostra padrão de ergosterol foi utilizada para desenvolver uma metodologia de análise por HPLC/UV. Foram testadas sistemas em gradiente com ACN:*i*-Pro, utilizando uma coluna ODS (shim-pack) de 20 cm x 1cm no modo de eluição polar orgânico.

As frações obtidas durante o cultivo do fungo foram dissolvidas em 7 ml de *i*-Propanol, foram retiradas alíquotas de 1 ml e o volume foi completado para 5 ml. As frações foram analisadas por HPLC/UV em modo polar orgânico (coluna ODS shim-pack 20 cm x 10 mm) em sistema gradiente ACN:*i*-Pro desenvolvido com a amostra padrão de ergosterol. As injeções foram realizadas de maneira aleatória, não obedecendo nenhuma regra quando dias de cultivo. Foram também realizadas injeções em triplicata de soluções padrão de ergosterol para a confecção de uma curva de calibração. As concentrações de solução padrão seguiram protocolo estabelecido no laboratório de HPLC do DQ-UFSCar – 0,1

$\mu\text{l/ml}$ , 0,15  $\mu\text{l/ml}$ , 0,3  $\mu\text{l/ml}$ , 0,6  $\mu\text{l/ml}$ , 1,2  $\mu\text{l/ml}$  e 2,4  $\mu\text{l/ml}$ . O resultado das análises nos permitiram determinar a curva de crescimento do fungo *Eupenicillium* sp, cultivado em meio sólido e meio sólido contendo L-Prolina.

### **3.7.3 - Análise por MS/MS do alcalóide alanditripinona**

Para desenvolver a análise por espectrometria de massas seqüencial MS/MS, uma amostra padrão do alcalóide alanditripinona **4** foi utilizada. Os valores de potencial do cone e da descarga corona foram otimizados; a temperatura do bloco da fonte foi mantida a 70 °C, e variou-se a temperatura do *probe* de APCI - de 200 a 400 °C. O gás de colisão utilizado foi o Argônio e a fase móvel MeOH. Foram realizados experimentos de íons filhos de  $m/z$  541, utilizando energia de colisão de 5 a 40 eV. Foram também realizados experimentos de fragmentação na fonte de ionização, visando principalmente os estudar os fragmentos gerados a partir do íon  $m/z$  226.

Foram também realizados experimentos de MS/MS com o alcalóide alanditripinona deuterada. Para a obtenção da alanditripinona deuterada, dissolveu-se uma amostra padrão do alcalóide em MeOD. Os valores de potencial do cone e da descarga corona foram otimizados, utilizou-se como fase móvel ACN - monitoraram-se os íons fragmentos gerados a partir da molécula de alanditripinona ionizada no modo negativo e modo positivo.

## **3.8 – Preparo dos extratos protéicos**

### **3.8.1 - Preparo do extrato protéico do milho e de folhas de *M. paniculata*.**

Foram preparados extratos protéicos do milho e de folhas de *M. paniculata*, esses extratos foram utilizados posteriormente para enriquecer o meio de cultivo líquido Czapke's.

Para o preparo do extrato protéico de milho foram utilizados 186,3 g de milho moído dissolvidos em 175 ml de H<sub>2</sub>O, essa mistura foi triturada em

liquidificador por um período de 5 min e filtrado por gravidade. O filtrado foi centrifugado por 10 min a 25.000 rpm em centrífuga refrigerada a 10 °C. O sobrenadante foi considerado como extrato protéico pelo teste de Bradford (M. M. Bradford 1976). Para o preparo do extrato protéico das folhas de *M. paniculata* foram utilizadas 110,7 g de folhas recém colhidas. Essas folhas foram extraídas com 800 ml de H<sub>2</sub>O em liquidificador por 5 min. O extrato foi separado da torta por filtração e o filtrado foi congelado e liofilizado. Ao extrato liofilizado foram adicionados 50 ml de H<sub>2</sub>O. Esta solução foi centrifugada por 10 min a 25.000 rpm em centrífuga refrigerada a 10 °C. O sobrenadante foi considerado como extrato protéico pelo teste de Bradford (M. M. Bradford 1976).

#### **3.8.1.1 - Preparo e cultivo de *Eupenicillium* sp em meio líquido Czapek's enriquecido com extrato protéico do milho e de folhas de *M.paniculata*.**

Foi preparado 1 litro do meio de cultivo Czapek's com os ingredientes listados na Tabela 3.1. O meio de cultivo foi dividido em 8 frascos de erlemmeyer de 500 ml – 125 ml de meio em cada frasco. A três dos frascos foram adicionados 20 ml de extrato protéico de milho e a outros três foi adicionado 8 ml de extrato protéico de folhas de *M. paniculata*. O sétimo frasco foi mantido como controle e o oitavo como branco. Os frascos foram tampados com tampões de algodão e esterilizados em autoclave. O fungo *Eupenicillium* sp, previamente cultivado em BDA, foi inoculado no meio líquido, foram inoculados 7 frascos de Erlemmeyer contendo meio de cultura, o frasco restante foi mantido como branco. A inoculação foi realizada em ambiente estéril; o tampão de algodão foi retirado somente no momento da inoculação e recolocado em seguida. O fungo será cultivado por um período de 25 dias, após este período serão realizadas análises visando detectar a produção de alcalóides no meio líquido contendo os diferentes extratos protéicos.

Tabela 3.1: Meio Czapek's

Reagentes	Quantidades (g)
NaNO <sub>3</sub>	3,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
Glucose	30
H <sub>2</sub> O (qsp)	1000

### 3.9 - Extração em fase sólida.

Com as condições de HPLC estabelecidas, frascos contendo *Eupenicillium* sp, foram utilizados para obter as melhores condições de extração em fase sólida (SPE) direta dos alcalóides. Foi adicionado a um dos frascos 250 ml de EtOH, o processo de extração foi realizado por um período de 30 min em banho de ultrassom. Foram testadas diversas metodologias utilizando cartuchos ODS (Supeclean LC 18 - Supelco), ativados com ACN 100%, condicionados com H<sub>2</sub>O 100%, eluídos a pressão reduzida em sistemas contendo diferentes proporções de ACN:H<sub>2</sub>O; foram também testados cartuchos SPE (*home made*), feitos com uma mistura ODS:Alumina (1:1) v/v, Floresil e Alumina; os cartuchos não foram ativados nem condicionados e a próprio solvente de extração EtOH foi utilizado para a eluição do cartucho.

### 3.10 - Indução a produção de alcalóides.

Com as condições de SPE e HPLC/UV estabelecidas testou-se indutores a produção enzimática. Diversos compostos candidatos a indutores a produção enzimática foram testados (Tabela 3.2). Esses compostos foram adicionados aos meios de cultura sólidos (milho com 10% de água). O fungo *Eupenicillium* sp foi inoculado nestes meios e foi cultivado por um período de 20 dias.

**Tabela 3.2:** Compostos candidatos a indutores a produção de alcolóides.

<b>Frasco</b>	<b>Indutor</b>	<b>Massa (mg)</b>
1	Ácido antranílico	50
2	Ácido antranílico	50
3	Ácido salicílico	50
4	Ácido salicílico	50
5	Glutamato de sódio	50
6	Glutamato de sódio	50
7	L-Prolina	50
8	L-Prolina	50
9	Branco	-
10	Branco	-

# 4. Resultados e Discussões

#### 4.1 – Metabolismo secundário de *Murraya paniculata*

Plantas do gênero *Murraya* são originárias do sul da Ásia. Extratos das folhas e das cascas têm sido utilizados na medicina popular como anestésico, anestesia local, tratamento de eczema, reumatismo, dor abdominal, dor de estômago, dor de dente, diarreia, edema, trombose, expectorante, anticonvulsivantes e agentes desintoxicante.

Os constituintes químicos do gênero *Murraya* tem sido extensivamente investigados desde 1965, aparentemente, em sua maioria, as plantas do gênero *Murraya* são ricas em flavonoides e cumarinas, contendo pouco ou nenhum alcalóide carbazólico. No entanto, algumas plantas do gênero *Murraya* que produzem alcalóides carbazólicos em grande quantidade, raramente produzem cumarinas e flavonóides. (WU, T. S. *et al.*, 1996).

Ecologicamente, plantas como *M. exotica* e *M. paniculata*, são ricas em flavonóides e cumarinas, mas não produzem alcalóides carbazólicos como algumas outras plantas do gênero *Murraya*, que são ricas em alcalóides carbazólicos, mas não produzem flavonóides e cumarinas. Por esta razão, Tanaka propôs dividir o gênero *Murraya* em dois outros: *Murraya* e *Begera*. Esta nova classificação engloba tanto características morfológicas como químicas. (WU, T. S. *et al.*, 1996).

Esta aparente distinção da produção de alcalóides, cumarinas e flavonóides por plantas do gênero *Murraya*, pode estar relacionado a um aumento da atividade da enzima Fenilalaninamonioliase (PAL). Esta enzima é responsável pela conversão do aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico (Esquema 1). Este desvio da rota biossintética, levando a produção de flavonóides e cumarinas e não de alcalóides, pode ser causada por infecções por microrganismos. Um dos mecanismos de defesa de plantas contra a infecção por microrganismos é exatamente aumento da ação da PAL (WALTON, 1996).

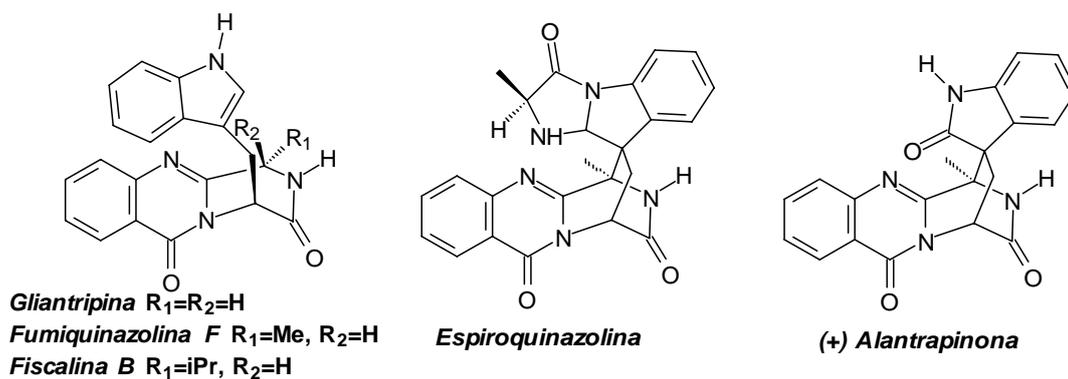


O fungo *Eupenicillium* sp, isolado de *Murraya paniculata*, quando cultivado em condições estéreis em meio sólido (arroz e milho), produz alcalóides espiroquinazolinós (BARROS E RODRIGUES-FILHO, 2004). Quatro alcalóides espiroquinazolinós foram isolados de *Eupenicillium* sp, suas estruturas foram determinadas através de extensivos estudos de RMN e MS.

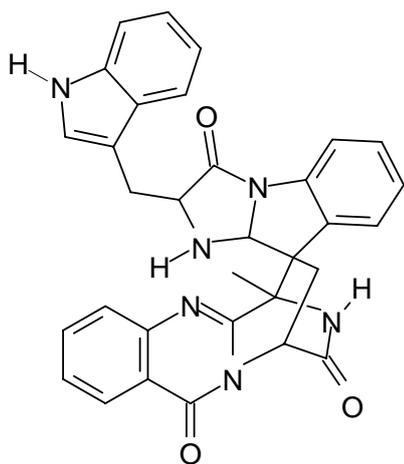
#### 4.2 - Determinação estrutural dos alcalóides espiroquinazolinós

Os alcalóides do tipo espiroquinazolinós não podem ser considerados dentro de uma classe, pois existem, até o presente momento, somente três exemplos desses alcalóides descritos na literatura [(LARSEN, *et al.*, 1998); (HEREDIA *et al.*, 2001) e (HART *et al.*, 1999)]. Estes alcalóides são considerados, devido a sua provável rota biossintética, dentro do sistema pirazino[2,1-b]quinazolino-3,6-diona, que está presente em diversos produtos naturais que, em muitos casos, exibem atividades biológicas interessantes. Dentre estes alcalóides, se pode citar: a Gliatripina, a fumiquinazolina F, a fiscalina B, a alantripinona e a espiroquinazolina.

As principais características observadas por espectrometria de RMN  $^1\text{H}$  para os alcalóides espiroquinazolinós são: a ausência ou pequeno número de sinais de hidrogênios na região dos metilênicos em contraste com o grande número de sinais de deslocamento químico presente na região dos aromáticos.

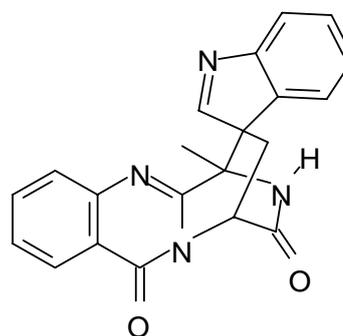


Do extrato obtido para o fungo cultivado em milho foi isolado quatro alcalóides com esqueleto do tipo espiroquinazolino, as determinações estruturais serão discutida a seguir. Mais dois outros foram identificados apenas por MS e considerações biosintéticas.



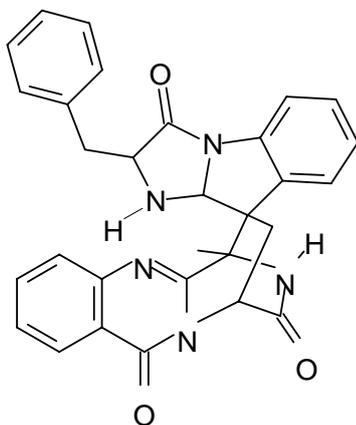
**Alanditripinona (4)**

$C_{32}H_{25}N_5O_4$   
542.58



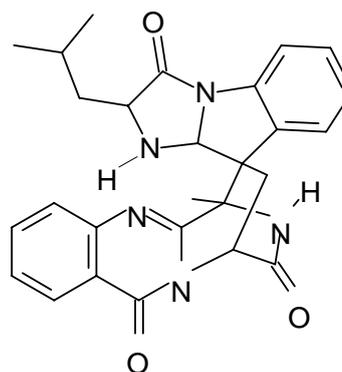
**Alantripinona B**

$C_{21}H_{16}N_4O_2$   
356.38



**Alantrifenona (7)**

$C_{30}H_{25}N_5O_3$   
503.56



**Alantrileunona**

$C_{27}H_{27}N_5O_3$   
469.54

#### 4.2.1 - Determinação estrutural da alanditripinona (4)

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 4.1 e 4.2) de **4** apresentou sinais para doze hidrogênios aromáticos, dois H carbinólicos, cinco metilênicos/metínicos e um singlete característico de uma metila.

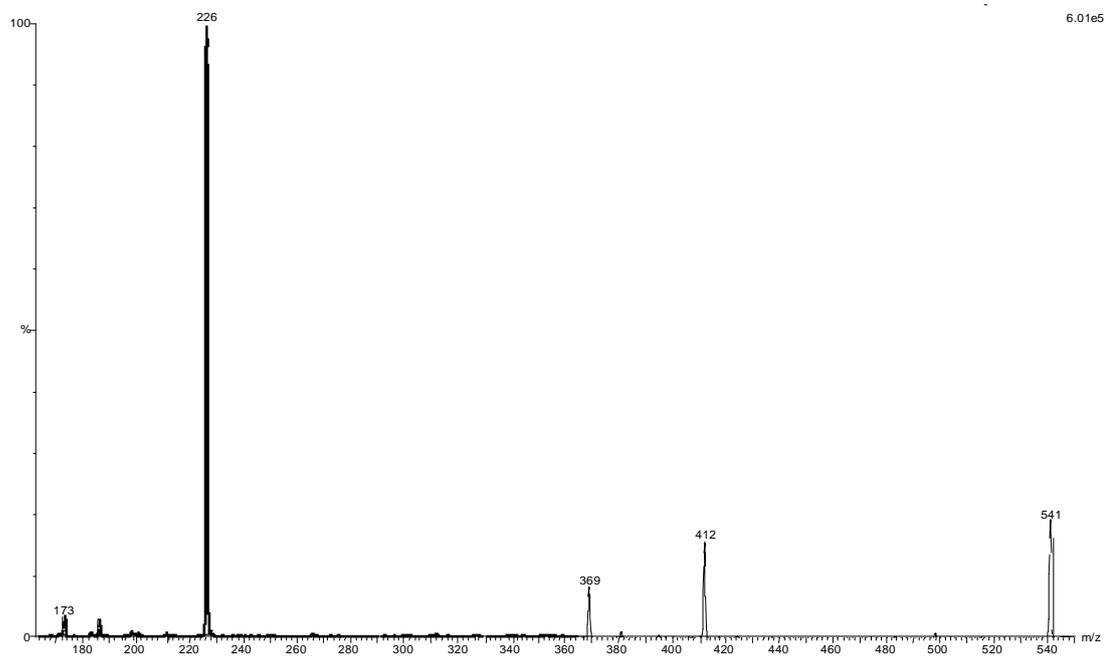
As correlações observadas pelo COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (Figuras 4.3 e 4.4) mostram a presença de três anéis aromáticos *orto* substituídos e duas seqüências CH-CH<sub>2</sub> indicando a presença de dois fragmentos, provavelmente, derivados do aminoácido triptofano.

Os sinais de deslocamento químico de hidrogênios aromáticos ( $\delta$  8,28; 7,59; 7,85 e 7,70) desprotegidos indicam a presença de um fragmento, provavelmente, derivado do ácido antranílico.

O pico  $[\text{M}-\text{H}^+]$  ( $m/z$  541) obtido no espectro de massas (modo ES<sup>-</sup>) confirmou a fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> para **4**, que é condizente com o esquema de fragmentação proposto (Esquema 4.2).

Através de um levantamento bibliográfico sobre alcalóides de fungos, observou-se que haviam dois relatos na literatura sobre alcalóides com esqueletos do tipo espiroquinazolino: a espiroquinazolina (*Aspergillus flavips*) e a alantripinona (*Penicillium thymicola*) (LARSEN, *et al*,1998).

A comparação com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (obtidos a partir de correlações observadas nos espectros de HSQC e HMBC – Figuras 4.5; 4.6 e 4.7; 4.8) com os dados descritos na literatura para alantripinona (LARSEN, *et al*,1998) revelou grandes coincidências (Tabelas 4.1 e 4.2), apesar da diferença do solvente utilizado para a realização dos experimentos [**4** – CDCl<sub>3</sub> e Alantripinona – CD<sub>3</sub>CN-dmso-d<sub>6</sub> (10:1)]. Porém, **4** possui um fragmento a mais, derivado do triptofano, que a Alantripinona.



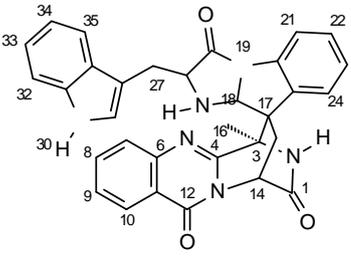
**Figura 4.0:** Espectro de massas dos íons produtos de  $m/z$  541.

**Tabela 4.1:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) de **4** em  $\text{CDCl}_3$ , e a comparação com a literatura em  $\text{CD}_3\text{CN-dmsO-d}_6$  (10:1) (LARSEN, *et al.*, 1998).

	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ Para <b>4</b>	Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ para a Alantripinona Descritos na literatura (LARSEN)
2	7,76	8,63 (sl)
7	7,70 (d) J = 8,08	7,68(ddd) J=7,1; 1,2 e 0,5
8	7,85 (dd) J = 6,09 e 7,09	7,85(ddd) J=7,1; 7,1 e 1,7
9	7,59 (dd) J = 7,7 e 7,13	7,58(ddd) J=7,1; 7,1 e 1,2
10	8,28 (d) J = 7,06	8,19(ddd) J=7,1; 7,1 e 0,5
14	5,66	5,58(ddd) J=3,6; 2,0 e 2,0
15a	3,19	2,41 (dd) J=14,4 e 2,0
15b	1,85	2,53 (dd) J=14,4 e 3,6
16	1,55 (s)	1,19 (s)
18	5,04 (s)	-
21	7,53 (d) J = e 7,7	6,95 (d) J=7,5
22	7,32 (dd) J = 6,09 e 7,09	7,31 (td) J=7,05 e 0,9
23	7,14 (dd) J = 6,78 e 7,48	7,11 (td) J=7,05 e 0,9
24	7,43 (d) J = 7,6	7,18 (dd) J=7,05 e 0,9
27	3,91 (sl)	-
28	3,10 (dd) e 3,02 (dd)	-
29	6,53 (sl)	-
30	7,75 (sl)	-
33	7,26 (dd) J = 7,7 e 6,14	-
34	6,99 (dd) J = 7,09 e 7,09	-
35	7,11 (d) J = 6,6	-
36	7,23 (d) J = 8,29	-

Constante de acoplamento J em Hz.

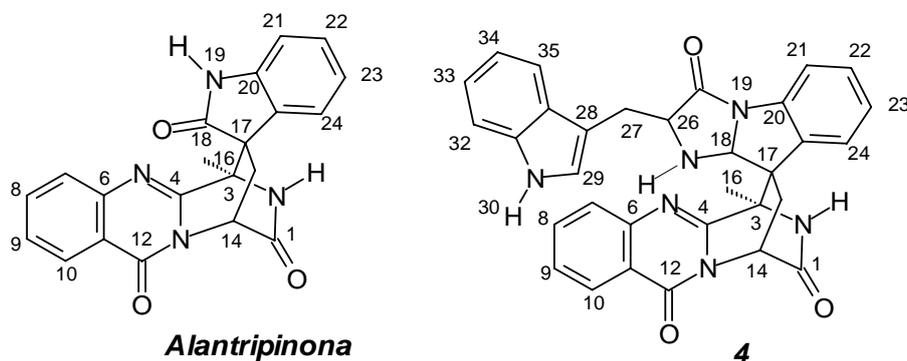
**Tabela 4.2:** Dados de  $^{13}\text{C}$  (obtidos a partir de experimentos bidimensionais de RMN – HMBC e HSQC) de **4** em  $\text{CDCl}_3$ , e a comparação com a literatura em  $\text{CD}_3\text{CN-dmsO-d}_6$  (10:1) (LARSEN, *et al*, 1998).

	químicos de $^{13}\text{C}$ Para <b>4</b>	químicos de $^{13}\text{C}$ para a Alantripinona Descritos na literatura (LARSEN)
		
1	174,8	169,5
3	65,0	61,9
4	155,2	152,7
6	149,8	146,9
7	127,6	127,2
8	134,6	134,0
9	127,5	126,5
10	127,0	126,0
11	123,7	120,2
12	161,0	158,4
14	52,1	51,8
15	33,0	35,9
16	15,0	12,8
17	55,0	54,7
18	80,0	176,6
20	141,0	142,4
21	116,3	109,5
22	128,0	128,8
23	121,0	122,0
24	124,2	123,6
25	139,1	129,8
26	174,5	-
27	63,0	-
28	26,0	-
29	123,2	-
30	-	-
32	139,3	-
33	128,0	-
34	118,1	-
35	126,5	-
36	111,3	-
37	141,2	-

No espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **4** observou-se H-2 ( $\delta$  7,76) e H-14 ( $\delta$  5,66) acoplam em "W", assim como relatado na literatura para a Alantripinona (LARSEN, *et al*, 1998), e o H-14 acopla com H-15a ( $\delta$  3,19) que, por sua vez, acopla com H-15b ( $\delta$  1,85) fechando um dos sistemas CH-CH<sub>2</sub> de um esqueleto triptofano.

A localização de H-10 ( $\delta$  8,28) foi possível através da análise dos espectros de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HMBC de **4** em conjunto com os dados descritos na literatura para a Alantripinona (LARSEN *et al*, 1998). No espectro de RMN  $^1\text{H}$  observou-se um sinal em  $\delta$  8,28 (H-10) referente a um hidrogênio que correlaciona com C-12 ( $\delta$  161,0), C-6 ( $\delta$  149,8) e C-8 (134,6) (correlações observadas por HMBC). Com a localização de H-10 foi possível localizar H-9 ( $\delta$  7,59) que, por sua vez, permitiu a localização de H-8 ( $\delta$  7,85) e, conseqüentemente, H-7 ( $\delta$  7,70) por correlações observadas no espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **4**. Com os dados, acima mencionados, obtidos através da análise dos espectros de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HMBC em conjunto com os dados descritos na literatura (LARSEN, *et al.*, 1998) permitiram a localização do fragmento derivado do ácido antranílico.

As correlações observadas no espectro de HMBC em conjunto com os dados descritos na literatura para a Alantripinona (LARSEN *et al.*, 1998) permitiram a localização dos átomos ao redor do centro espiro em C-17 ( $\delta$  55,0). O sinal referente a H-14 ( $\delta$  5,66) correlaciona com C-1 ( $\delta$  174,8) e com C-4 ( $\delta$  155,2); o sinal da metila -16 ( $\delta$  1,55) correlaciona com C-4 ( $\delta$  155,2) e com C-17 ( $\delta$  55,0); o sinal referente a H-2 ( $\delta$  7,76) correlaciona com C-3 ( $\delta$  65,0); H-15a ( $\delta$  3,91) correlaciona com C-18 ( $\delta$  80,0) e com C-1 ( $\delta$  174,8) e H-15b ( $\delta$  1,85) correlaciona com C-3 ( $\delta$  65,0), pelos acoplamentos observados no espectro de HMBC.



O sinal referente a H-27 ( $\delta$  3,91) possibilitou a localização de H-28a ( $\delta$  3,10) e H-28b ( $\delta$  3,02) pelas correlações observadas no espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de **4** fechando o segundo sistema CH-CH<sub>2</sub> de um esqueleto triptofano.

O sinal referente a H-29 ( $\delta$  6,53) possibilitou a localização de H-30 ( $\delta$  7,75) reforçando a presença do segundo esqueleto triptofano.

Considerações biossintéticas foram feitas para a determinação estrutural de **4**. A grande coincidência nos valores dos deslocamentos químicos apresentados (Tabela 4.1 e 4.2) para a substância **4** em relação a alantripinona leva a supor que este último possa ser um intermediário biossintético para a substância **4** (Esquema 4.3). A alantripinona reduzida em C-18 poderia reagir, nesta mesma posição e em C-19, com uma molécula do aminoácido triptofano levando a **4**.

Com a observação dos espectros de correlações, homo e hetero nucleares, foi possível a atribuição de praticamente todos os hidrogênios e carbonos de **4**. Vale ressaltar que não foi encontrada nenhuma estrutura similar à proposta para a substância **4**, descrita na literatura, sendo esta uma estrutura inédita. Este alcalóide foi denominado segundo a sua rota biossintética como alanditripinona, isto é, a estrutura possui uma unidade de alanina e duas de triptofano.

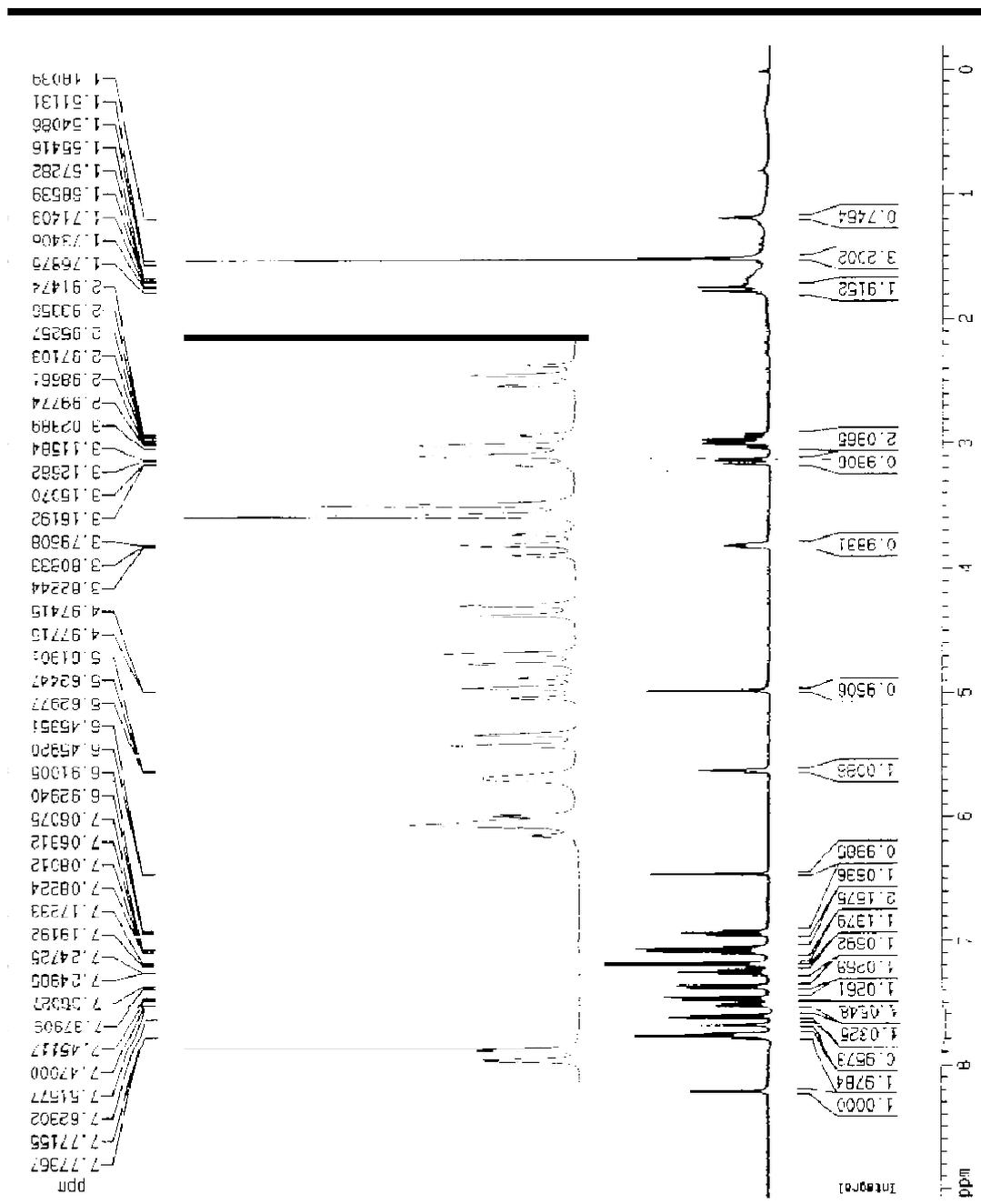


Figura 4.1: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da alanditripona 4 ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz)



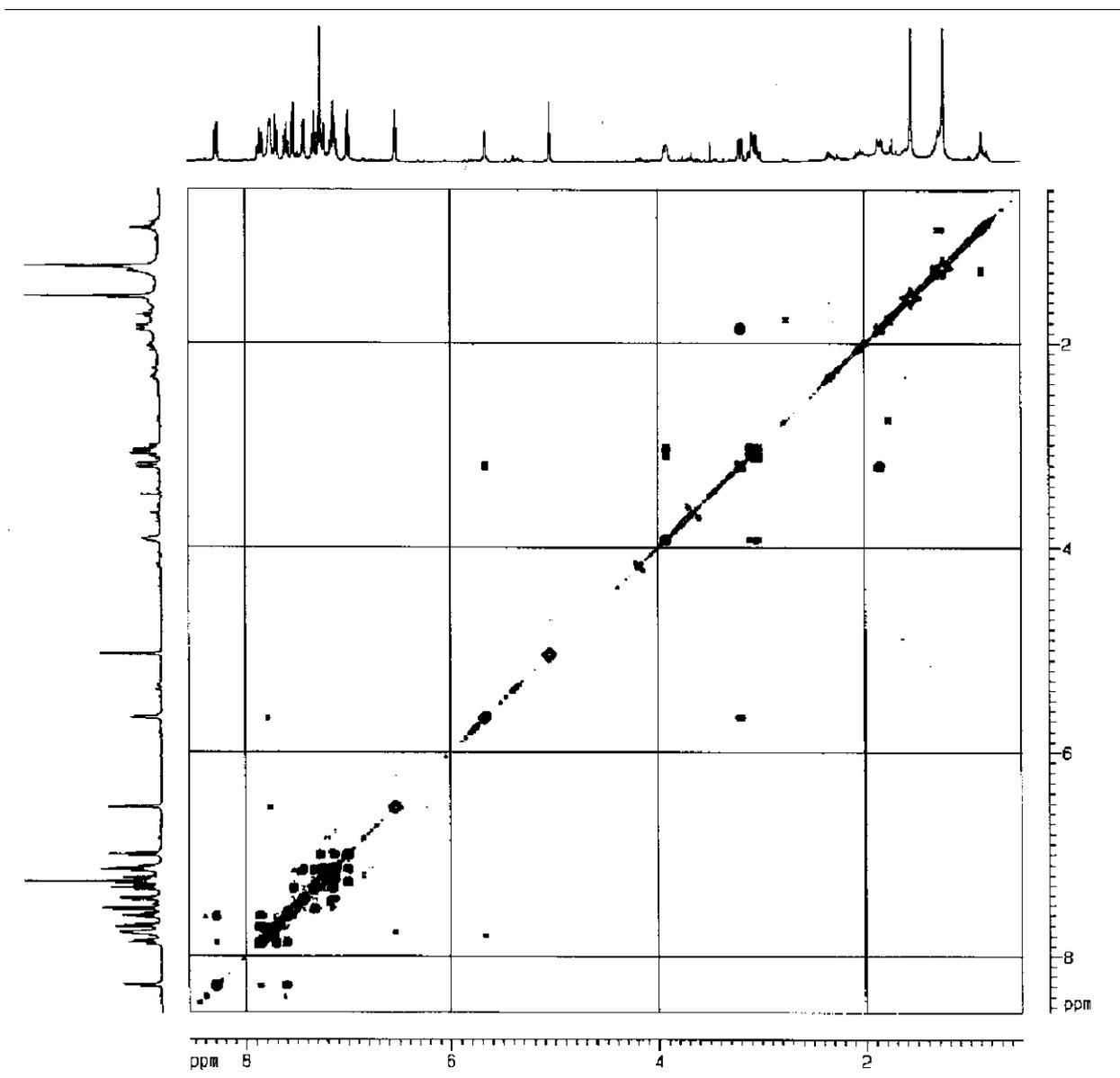


Figura 4.3: Espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da alanditripona 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

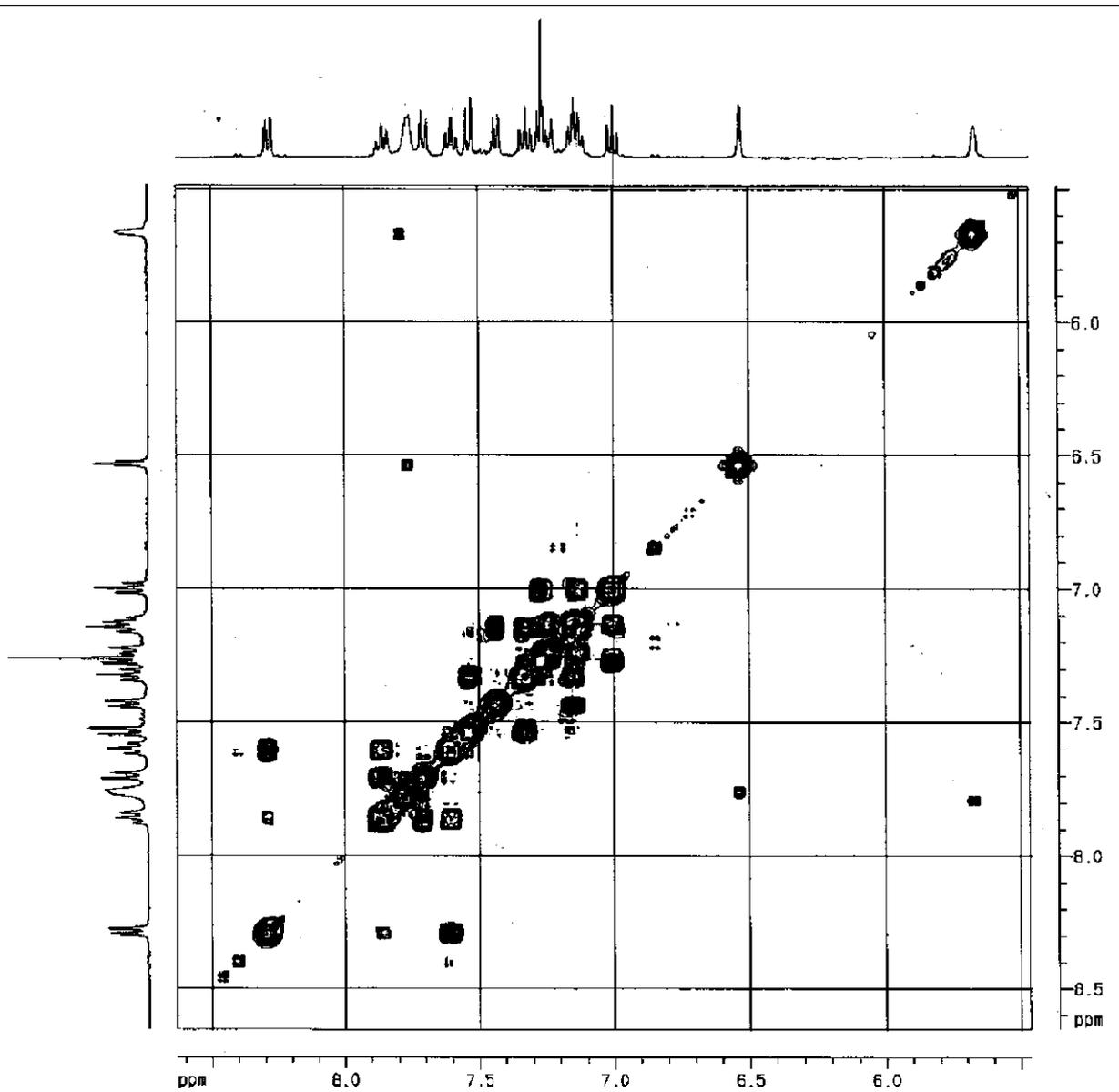


Figura 4.4: Ampliação no espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da alanditripinona **4** ( $\text{CDCl}_3$  400 MHz)

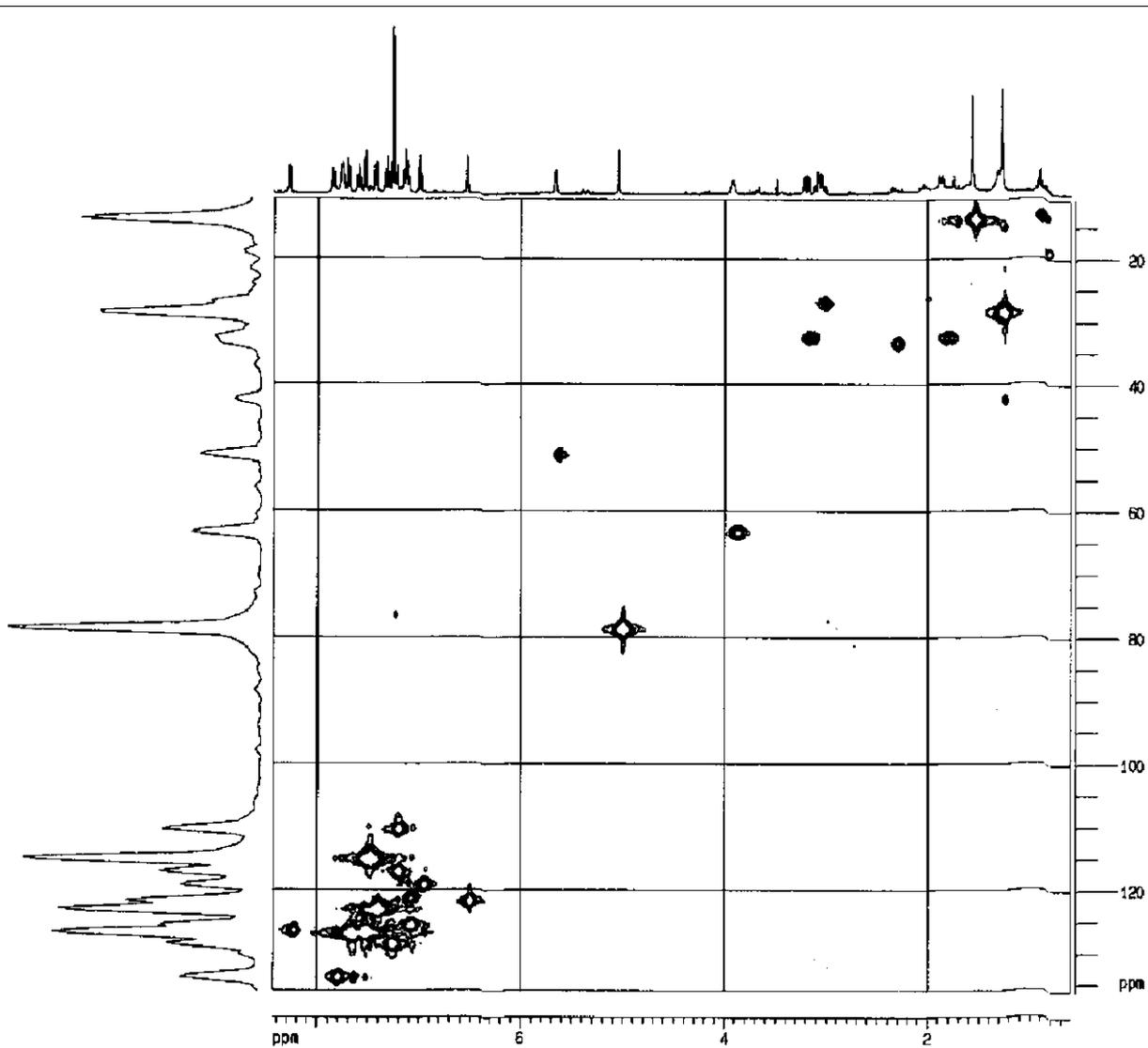


Figura 4.5: Espectro de HSQC da alanditripona 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

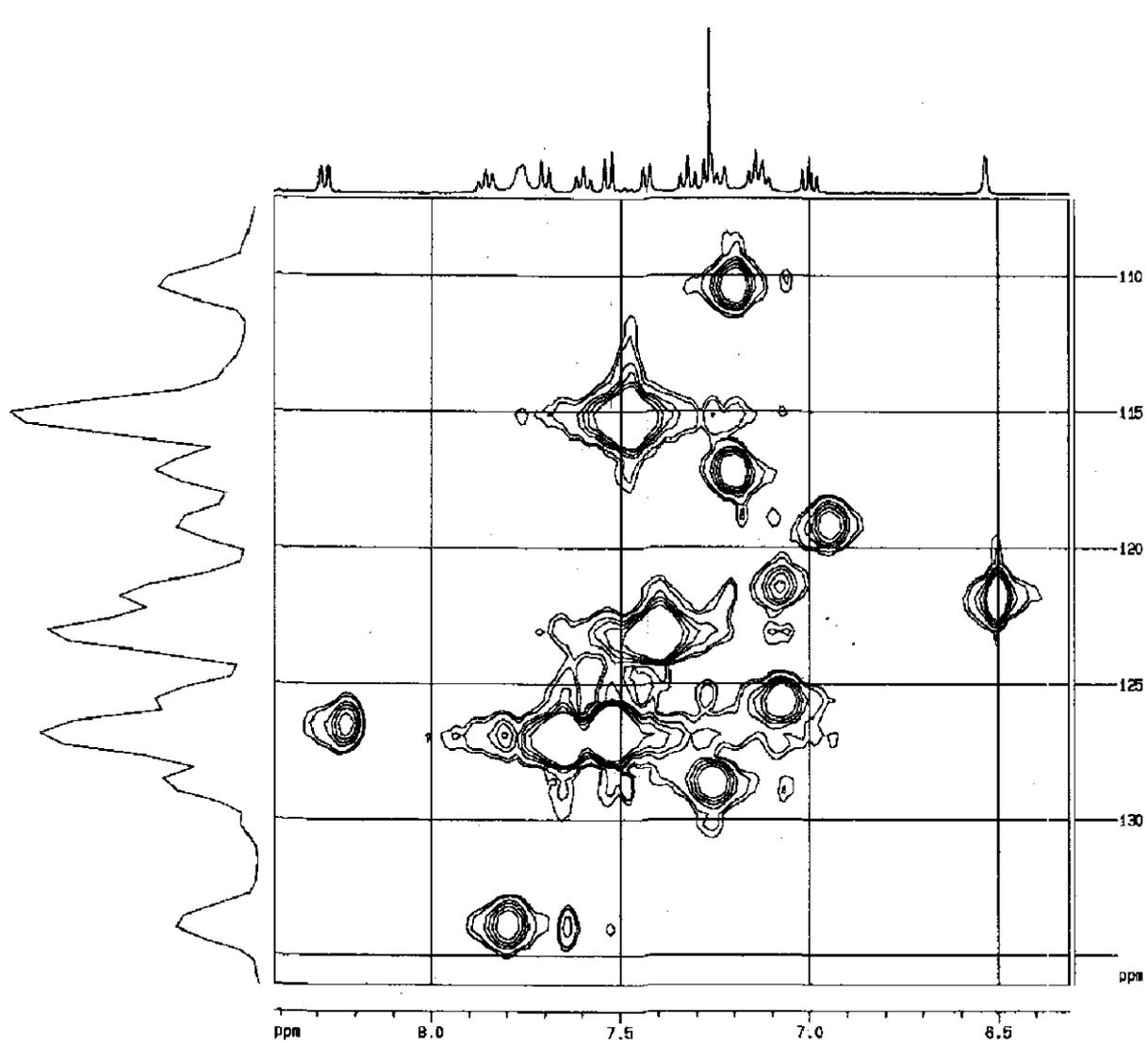


Figura 4.6: Ampliação para o espectro da alanditripinona 4 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

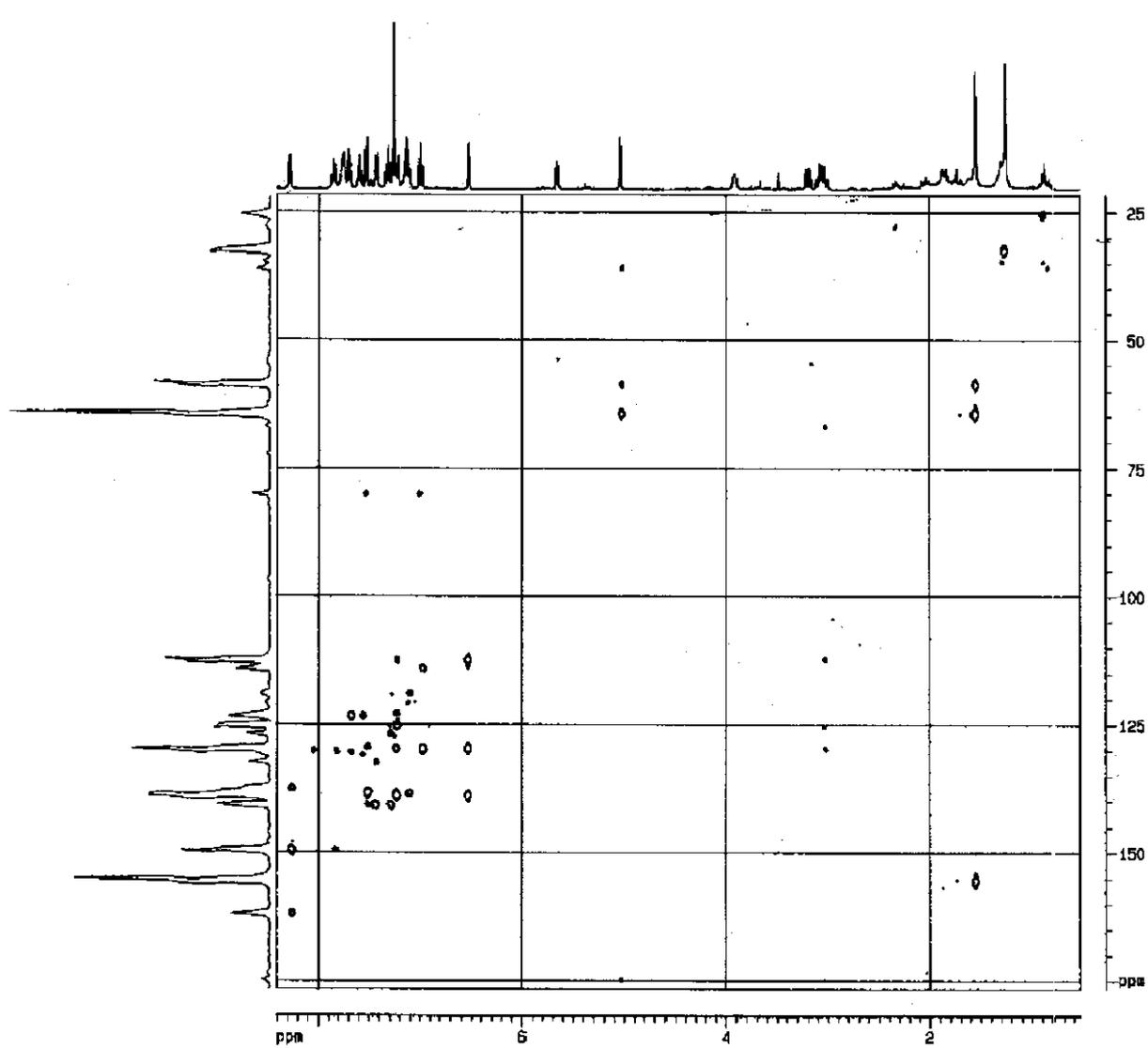


Figura 4.7: Espectro de HMBC da alanditriponona 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

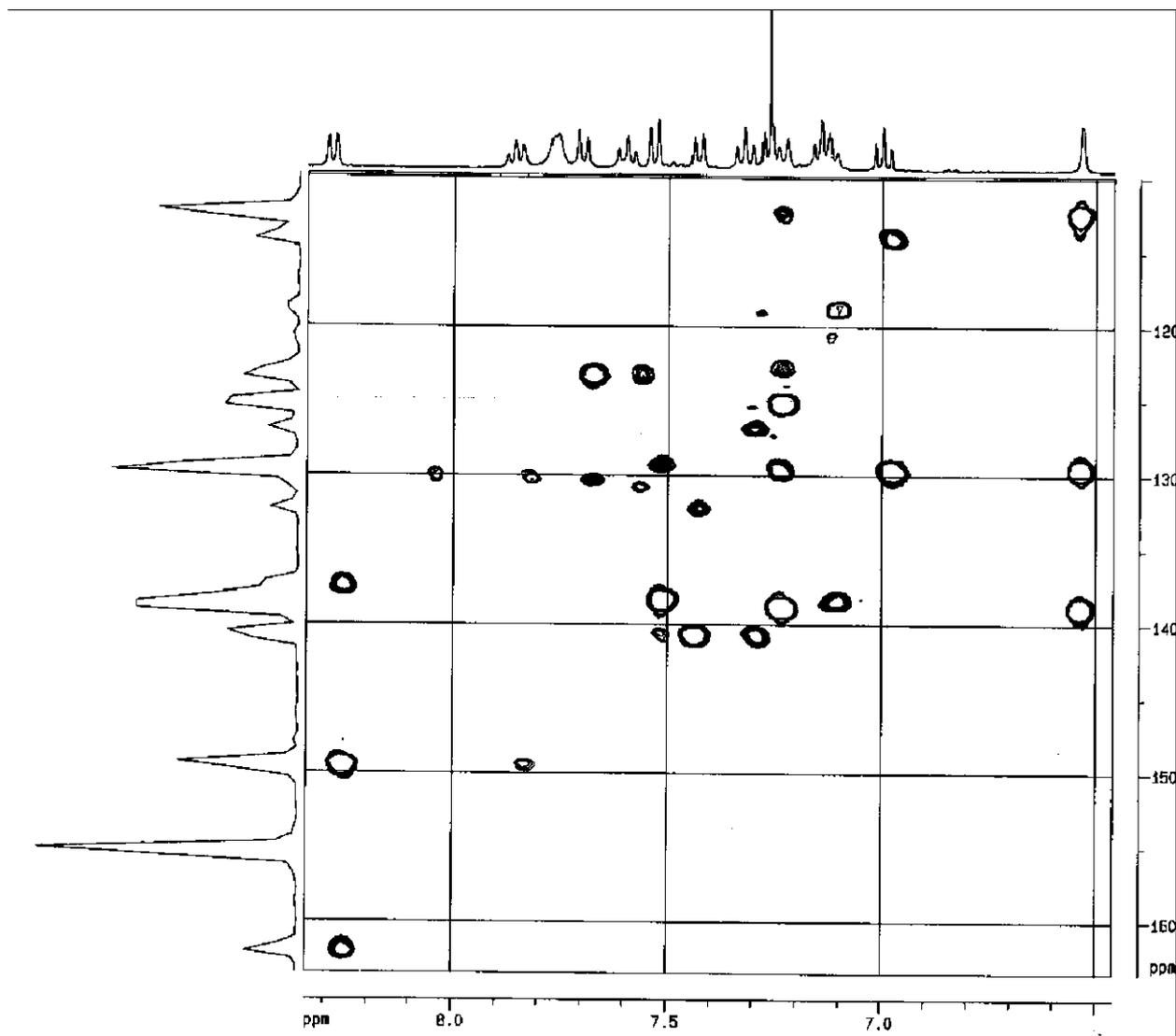


Figura 4.8: Ampliação para o espectro de HMBC da alanditripinona 4 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

As informações geradas a partir da interpretação do espectro da alanditripinona (**4**), assim como os dados da literatura para a alantripinona (**1**) foram utilizadas para a determinação estrutural dos alcalóides **7**, **5** e **9** por RMN.

#### **4.2.2 – Determinação estrutural do alcalóide alantrifenona (7).**

O espectro de massas do alcalóide **7** tem o pico base o mesmo pico da molécula ionizada  $[M-H]^-$  502, o qual associado com os dados de RNM, nos fornecem a fórmula molecular  $C_{30}H_{25}N_5O_3$  (503 Da). Em experimentos de espectrometria de massas seqüencial, o íon  $m/z$  502 produz, a uma energia de colisão de 15 eV, o íon de  $m/z$  226. A alanditripinona **4**, sob as mesmas condições no espectrômetro de massas, também produz o íon fragmento de  $m/z$  226. A diferença de massa entre o alcalóide **4** (542 Da) e **7** (503 Da) observada pelos experimentos de MS é a mesma diferença de massa entre o triptofano e a fenilalanina (39 Da). Nos dados gerados a partir dos experimentos de RMN (Tabela 4.3). Observa-se um carbono metilênico em ( $\delta$  37,8) e um conjunto de cinco hidrogênios aromáticos correlacionados, indicando um anel aromático monossustituído ( $\delta$  6,80; 7,02 e 7,10), estes dados confirmam a presença de um resíduo de fenilalanina na estrutura do composto **7**. Os hidrogênios metilênicos [H28a ( $\delta$  2,89, dd) e H28b ( $\delta$  2,92, ddd)] formam um sistema de spin ABX com H27 ( $\delta$  3,86, m), indicando que temos um análogo da alantripinona **1**, com uma unidade de fenilalanina a mais. As correlações observadas no HMBC de H18 ( $\delta$  4,99) com C26 ( $\delta$  173,2) e C27 ( $\delta$  64,3) confirmam a estrutura proposta. Seguindo a mesma nomenclatura da alantripinona **1**, e da alanditripinona **4**, este novo alcalóide foi nomeado alantrifenona **7**.

#### **4.2.3 – Determinação estrutural do alcalóide alantripinona B (5).**

O alcalóide **5**, possui fórmula molecular  $C_{21}H_{16}N_4O_2$ , que foi determinada pelo espectro de massas ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  355) em conjunto com os dados gerados a partir dos espectros de RMN. A diferença de massa entre o alcalóide **5** (356 Da) com a alantripinona **1** (372 Da), é de 16 Da, sugerindo que a diferença entre esses dois alcalóides seja um átomo de oxigênio. Uma inspeção detalhada nos dados gerados a partir dos experimentos de RMN (Tabela 4.4), principalmente nos dados de COSY, HSQC e HMBC, mostram que temos apenas dois anéis aromáticos 1,2-dissubstituídos. Os anéis são resíduos do ácido antranílico e do triptofano. Estes dados juntos com os dados de MS, indicam que este composto é um tripeptídeo, formado pelo ácido antranílico, a alanina e o triptofano, como o observado para a alantripinona (**1**). Mas com uma diferença neste caso não observamos o carbono da lactama no espectro de  $^{13}C$  RM, mas temos a presença de um CH de carbono  $sp^2$  ( $\delta$  111,0; 1H a  $\delta$  7,26). A presença desta dupla ligação entre C,N produz uma forte desproteção nos H da metila 16 ( $\delta$  2,24, s). Este novo alcalóide foi nomeado como alantripinona B, devido a sua semelhança estrutural com a alantripinona **1**.

**Tabela 4.3.** Dados de RMN para os alcalóides **4 e 7**.

Posição	Alanditripinona (4)			Alanditripenona (7)		
	<sup>1</sup> H (δ) (J=Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC	<sup>1</sup> H (δ) (J=Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC
1	-	174.8	-	-	170.2	-
2	7.76	-	65.0; 55.0	-	-	-
3	-	65.0	-	-	63.3	-
4	-	155.2	-	-	155.2	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	149.8	-	-	147.1	-
7	7.70 d (8.1)	127.6	127.5; 123.7	7.82 d (7.8)	127.1	120.3
8	7.85 ddd (6.1; 7.1; 1.5)	134.6	149.8; 127.5	7.90 ddd (7.5; 7.2; 1.3)	134.0	147.1; 127.1
9	7.59 ddd (7.7; 7.1; 1.0)	127.5	134.6; 123.7	7.60 dd (7.2; 7.2)	127.0	120.6; 126.2
10	8.28 dd (7.1; 1.2)	127.0	149.8; 134.6; 161.0	8.27 d (7.2)	126.2	147.1; 162.4
11	-	123.7	-	-	120.3	-
12	-	161.0	-	-	162.4	-
13	-	-	-	-	-	-
14	5.66 d (2.3)	52.1	112.5; 139.3	5.69 br	53.0	-
15	3.19 dd (14.0; 4.5)	33.0	174.8	3.28 dd (14.2; 4.3)	33.0	170.2
15	1.85 d (14.0)	33.0	-	1.80 d (14.5)	33.0	-
16	1.55 s	15.0	174.8	1.57 s	14.3	63.3; 55.8
17	-	55.0	-	-	55.8	-
18	5.04 s	80.0	174.5	4.99 s	77.5	173.2; 64.3
19	-	-	-	-	-	-
20	-	141.0	-	-	139.0	-
21	7.53 d (7.7)	116.3	141.0; 139.1; 128.0	7.60 d (7.2)	115.0	135.0; 126.0
22	7.32 ddd (6.1; 7.1; 1.0)	128.0	141.0; 124.2	7.36 dd (7.1; 7.6)	128.4	139.0
23	7.14 ddd (6.8; 7.5; 1.0)	121.0	139.1; 116.3	7.18 dd (7.5; 7.3)	126.0	128.4
24	7.43 d (7.6)	124.2	141.0	7.43 d (7.6)	123.2	139.0; 123.2
25	-	139.1	-	-	135.0	-
26	-	174.5	-	-	173.2	-
27	3.91 br s	63.0	-	3.86 br s	64.3	-
28	3.10 dd (4.5; 15.0)	26.0	174.5; 112.5; 63.0	2.89 dd (7.7; 14.5)	37.8	128.4
28	3.02 dd (7.5; 15.0)	26.0	174.5; 112.5; 63.0	2.92 ddd (3.82; 14.5; 1.3)	37.8	128.4
29	-	112.5	-	-	135.6	-
30	6.53 br s	123.2	139.3; 112.5	6.80 d (7.3)	128.4	128.2; 127.0
31	7.75 br s	-	139.3; 128.0; 112.5	7.02 dd (7.5; 7.4)	128.2	127.0; 128.4; 135.6
32	-	139.3	-	7.10 dd (7.3; 7.5)	127.0	128.2
33	7.26 ddd (7.7; 6.1; 1.0)	128.0	141.2; 126.5; 118.1	7.02 dd (7.5; 7.4)	128.2	127.0; 128.4; 135.6
34	6.99 dd (8.1; 7.7)	118.1	139.3	6.80 d (7.3)	128.4	128.2; 127.0
35	7.11 d (6.6)	126.5	111.3; 128.0; 141.2	-	-	-
36	7.23 d (8.1)	111.3	139.3	-	-	-
37	-	141.2	-	-	-	-

O espectro de massas (APCI) do composto **9**, apresenta  $[M-H]^-$  a  $m/z$  468 que sugere juntamente com os dados de RMN uma fórmula molecular  $C_{27}H_{27}N_5O_3$ , 469 Da. Este composto tem como base o esqueleto da alantripinona **1**, formada de três resíduos de aminoácidos. Os dados de  $^1H$  RMN, do composto **9** contem um par de dubletos para metilas em  $\delta$  0,67 e 0,59, as quais acoplam com hidrogênio do CH em  $\delta$  1,33. Por sua vez esse H acopla com um metileno diastereoisotópico em  $\delta$  1,71 e 1,26, que corresponde a um grupo iso-propil terminal na estrutura do alcalóide **9**. A análise das correlações do espectro de COSY [H27 ( $\delta$  3,55) com H18 ( $\delta$  5,42)] e HMBC [H18 ( $\delta$  5,42) com C26 ( $\delta$  170,0); H27 ( $\delta$  3,55) com C26 ( $\delta$  170,0) e C28 ( $\delta$  33,0)], indicam que a leucina é o quarto resíduo de aminoácido que compõem a estrutura do alcalóide **9**. Esta estrutura proposta por RMN esta de acordo com os dados de MS, que mostram que a diferença entre as massas dos alcalóides alanditripinona **4** (542 Da) e alantrileunona **9** (469 Da) é a mesma diferença das massas da leucina e do triptofano (73 Da). Este alcalóide assim como os demais alcalóides de *Eupenicillium* sp foram nomeados de acordo com os aminoácidos que o formam.

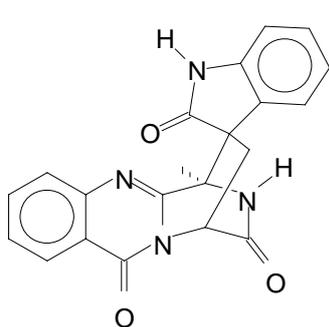
**Tabela 4.4.** Dados de RMN para os alcalóides **5 e 9**.

Posição	Alantripinona B (5)			Alantrileunona (6).		
	<sup>1</sup> H (δ) (J=Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC	<sup>1</sup> H (δ) (J=Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC
1	-	170.2	-	-	172.3	-
2	8.58 br	-	-	7.56 br	-	63.1; 55.8
3	-	62.0	-	-	63.1	-
4	-	153.4	-	-	154.3	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	146.3	-	-	150.1	-
7	7.59 d (8.0)	127.5	127.5; 120.0	7.73 d (7.7)	127.5	134.0; 123.7
8	7.67 dd (8.0; 7.3)	134.7	146.3; 126.5	7.80 dd (7.0; 7.7)	134.0	150.1
9	7.43 dd (7.5; 7.3)	127.2	134.7; 120.0	7.53 dd (7.0; 7.8)	127.0	134.0; 123.7
10	8.23 d (7.5)	126.5	160.3; 134.7; 146.3	8.34 d (7.8)	126.2	150.1; 134.0; 161.3
11	-	120.0	-	-	123.7	-
12	-	160.3	-	-	161.3	-
13	-	-	-	-	-	-
14	6.02 br	53.2	-	5.77 br	52.3	154.3; 172.3
15	3.50 d (13.0)	25.0	111.0	3.10 dd (13.9; 4.2)	25.0	172.3
15	3.36 dd (13.0; 4.3)	25.0	170.2; 111.0	1.83 d (13.9)	25.0	63.1
16	2.24 s	17.0	153.4; 132.3; 55.0	1.77 s	17.7	150.1; 55.8
17	-	55.0	-	-	55.8	-
18	7.26 s	111.0	62.0	5.42 br	79.8	170.0
19	-	-	-	-	-	-
20	-	127.0	-	-	139.5	-
21	7.33 d (7.0)	122.0	132.3	7.50 d (7.3)	116.5	139.5
22	7.04 dd (7.0; 7.2)	119.0	127.0; 117.0	7.23 dd (7.3; 7.5)	128.0	139.5; 125.5
23	7.14 dd (7.7; 7.2)	122.5	119.0	7.20 dd (7.7; 7.5)	125.5	116.5; 136.3
24	7.30 d (7.8)	117.0	127.0	7.32 d (7.8)	128.3	136.3
25	-	132.3	-	-	136.3	-
26	-	-	-	-	170.0	-
27	-	-	-	3.55 m	62.0	33.0; 170.0
28	-	-	-	1.71 m	33.0	22.0; 28.0; 62.0
28	-	-	-	1.25 m	33.0	28.0; 62.0
29	-	-	-	1.33 m	28.0	22.0; 62.0
30	-	-	-	0.67 d (6.4)	22.0	33.0
31	-	-	-	0.59 d (6.4)	22.0	28.0; 62.0
32	-	-	-	0.87	-	-

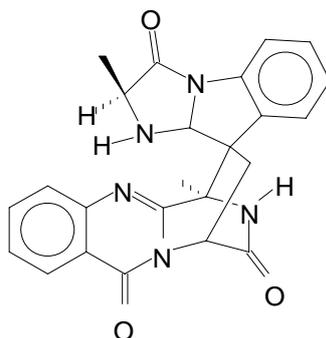
Os alcalóides espiroquinazolinos produzidos por *Eupenicillium* sp são o principal alvo deste estudo. Como os extratos de plantas do gênero *Murraya*, os alcalóides espiroquinazolinos possuem atividades analgésicas no sistema gastro intestinal. Frações de extrato de *Eupenicillium* sp, ricas em alcalóides espiroquinazolinos, estão sendo testadas em processos inflamatórios induzidos experimentalmente em ratos. Os resultados desses ensaios são promissores e indicam que um novo medicamento realmente ativo contra inflamações no sistema digestivo pode surgir a partir destes estudos. A idéia de testar estes extratos contra a substancia P, surgiu devido a relatos da atividade do alcalóide espiroquinazolina (BARROW, *et al*; 1994). A substância P é a responsável pela

sinalização do processo inflamatório do sistema intestinal, não existe no mercado um medicamento realmente eficaz contra doenças intestinais.

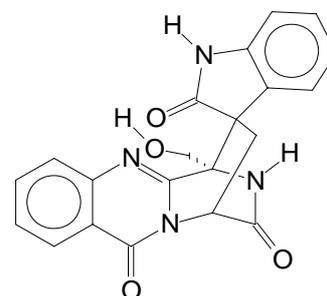
Por outro lado, alcalóides espiroquinazolinóis são raros, até o início dos estudos de *Eupenicillium* sp, somente três alcalóides desta classe haviam sido relatados na literatura: A alantripinona (1), a spiroquinazolina e Serantripinona (3) [(LARSEN, *et al.*, 1998); (HEREDIA *et al.*, 2001) e (HART *et al.*, 1999)].



Alantripinona (1)



Spiroquinazolina (2)



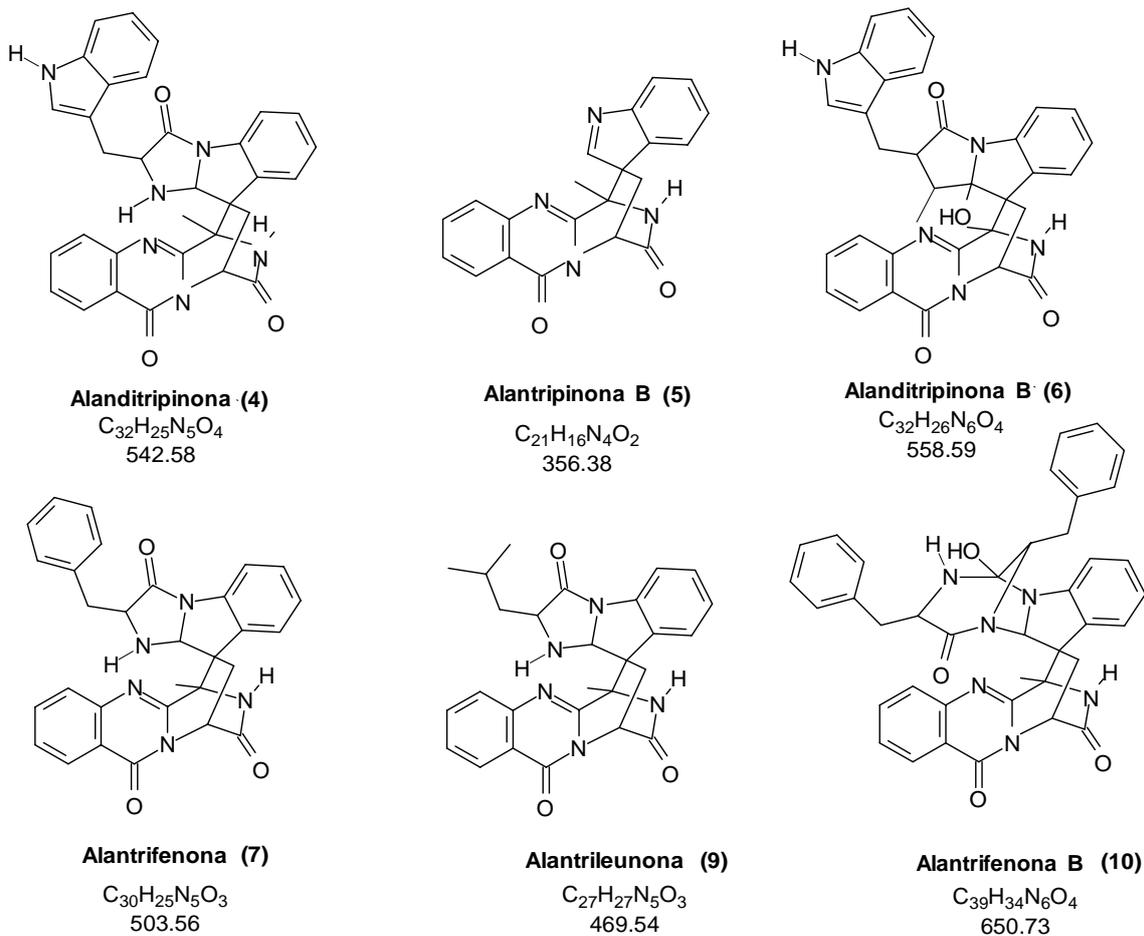
Serantripinona (3)

Para se induzir um aumento substancial na produção de alcalóides espiroquinazolinóis por *Eupenicillium* sp. Foi necessária uma maneira eficiente de estimar a produção destes alcalóides pelo fungo. O modo mais rápido e eficiente de quantificação de alcalóides é o da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. O primeiro passo para se desenvolver uma metodologia de análise por HPLC-MS/MS, foi se entender o comportamento destes alcalóides no espectrômetro de massas.

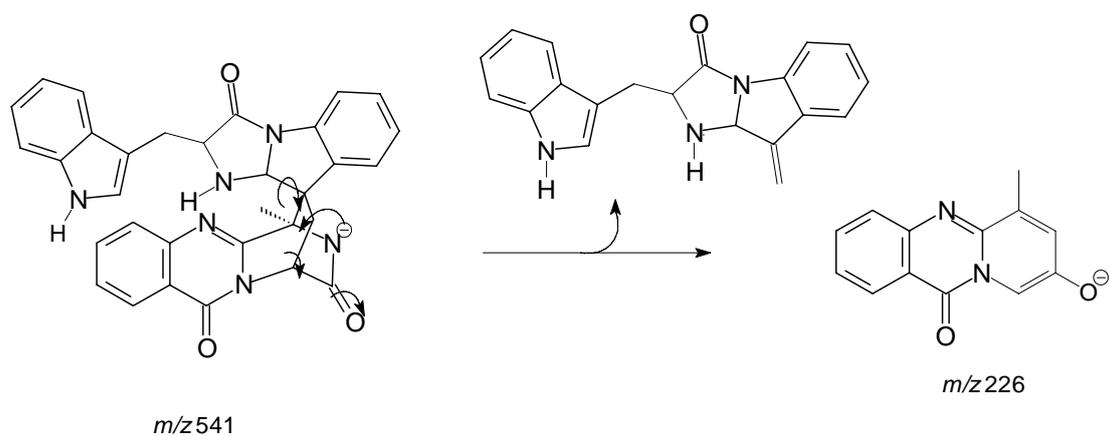
#### **4.3 Análise dos alcalóides espiroquinazolinóis por espectrometria de massas (MS)**

O primeiro passo para a análise de qualquer substância por espectrometria de massas (MS) é a escolha do modo de ionização. Alcalóides como compostos básicos, possuem vários sítios para a protonação. Portanto, a escolha óbvia é a análise no modo positivo. O segundo passo é a escolha da interface, ESI ou APCI.

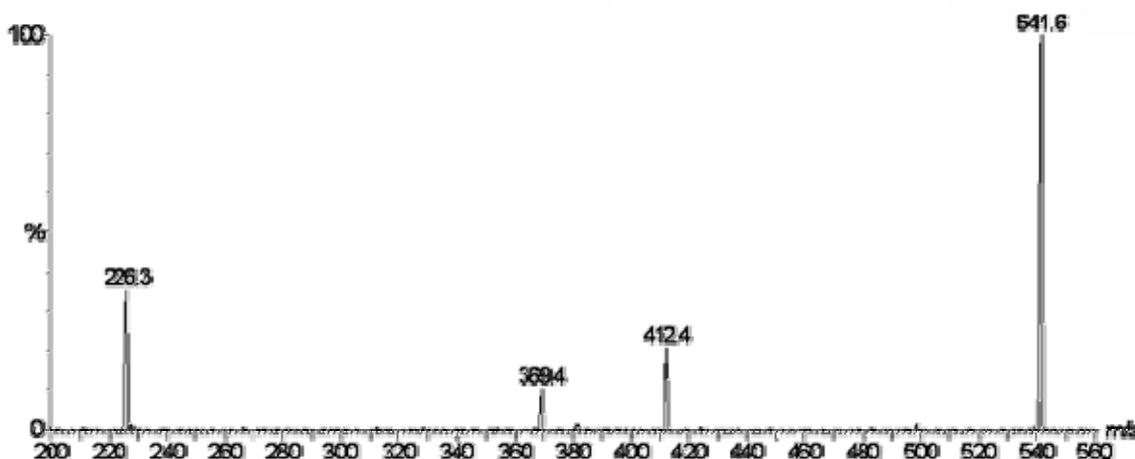
A metodologia de análise por MS foi feita pensando no acoplamento entre HPLC-MS/MS e a hipótese da utilização de divisor de fluxo foi descartada devido à baixa precisão do sistema disponível no laboratório para este uso. Resolveu-se então trabalhar com APCI, devido a se poder trabalhar com maiores fluxos de HPLC. A alanditripinona **4** (Figura 4.9) foi analisada por APCI, buscando um comportamento padrão de fragmentação para esta classe de alcalóides. As análises foram feitas no modo de ionização positivo e negativo. Devido a principal característica da estrutura, o biciclo com o sistema spiro, a ionização no modo negativo favorece a formação do íon fragmento de  $m/z$  226. Dependendo das condições de análise utilizadas, principalmente a energia de colisão o íon  $m/z$  226 é o pico base do espectro de massas (Figura 4.10). Este íon é formado pela pseudo-retro Diels-Alder no anel spiro (Esquema 4.2).



**Figura 4.9:** Estruturas dos alcalóides espiroquinazolinos produzidos por *Eupenicillium* sp.

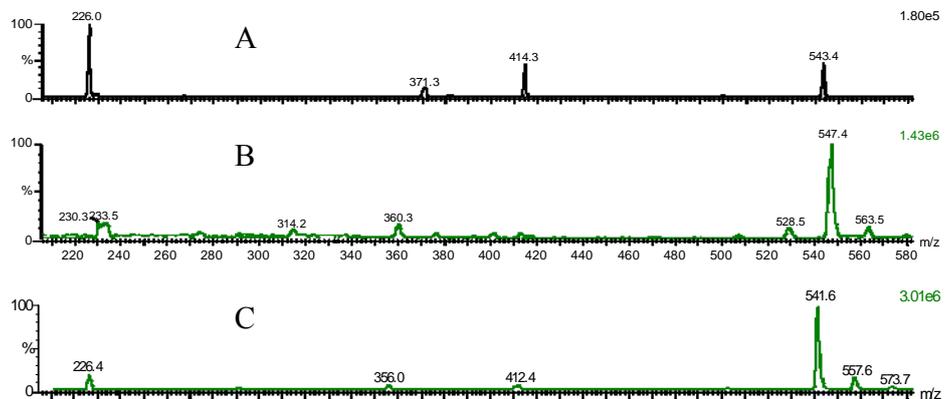


**Esquema 4.2)** Proposta de Fragmentação para o íon  $m/z$  542 gerando o íon  $m/z$  226

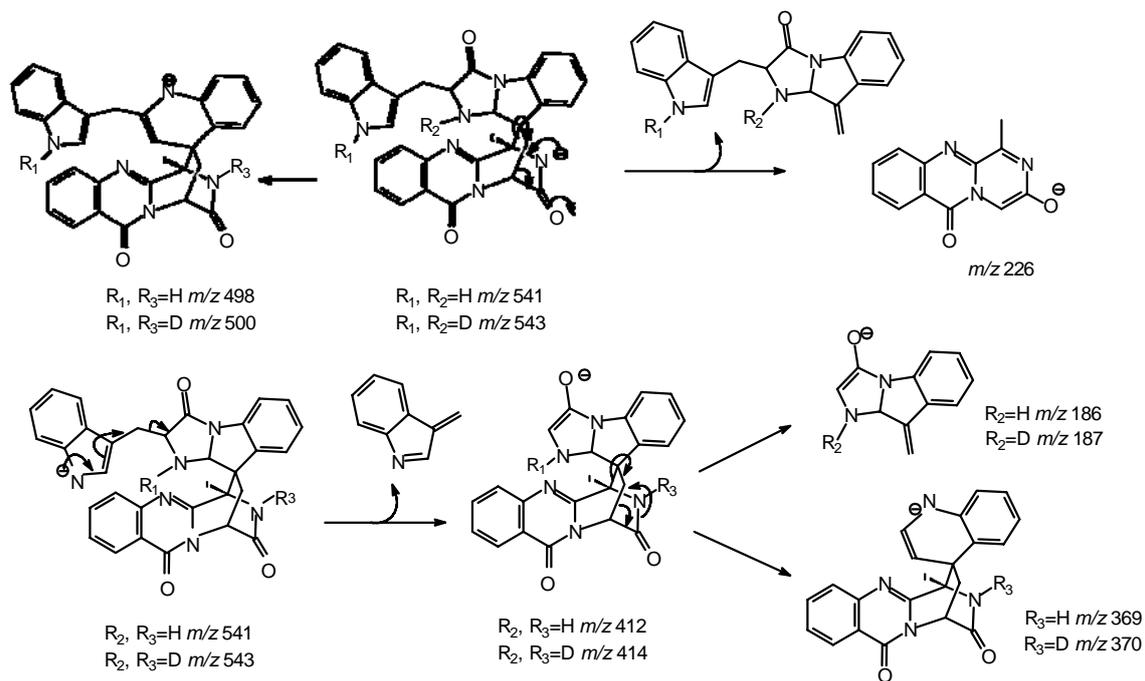


**Figura 4.10:** Espectro de MS/MS (energia de colisão 20 eV) do alcalóide alanditripinona **4**, APCI negativo

Este mecanismo de fragmentação foi confirmado pelos experimentos de espectrometria de massas realizados com uma solução de alanditripinona em MeOD. Estes experimentos realizados nos modos positivo e negativo confirmam o mecanismo de fragmentação proposto. Todos os NH presentes na alanditripinona são substituídos por ND. Os experimentos de MS realizados para alanditripinona **4**, no modo positivo e no modo negativo (Figura 4.11), possibilitaram observar que o alcalóide alanditripinona incorpora três deutérios. No modo positivo, o íon gerado a partir da alanditripinona (MM 542 g/mol) possui massa de  $[M+D]^+$  547, ou seja, foram incorporados três deutérios a molécula e mais um para a ionização, totalizando a diferença de massa observada. E no modo negativo o íon formado possui massa de  $[M-D]^-$  543, ou seja, três átomos de deutério são incorporados e um é perdido na ionização. Analisando os íons formados foi possível confirmar o mecanismo de fragmentação proposto (Esquema 4.4).

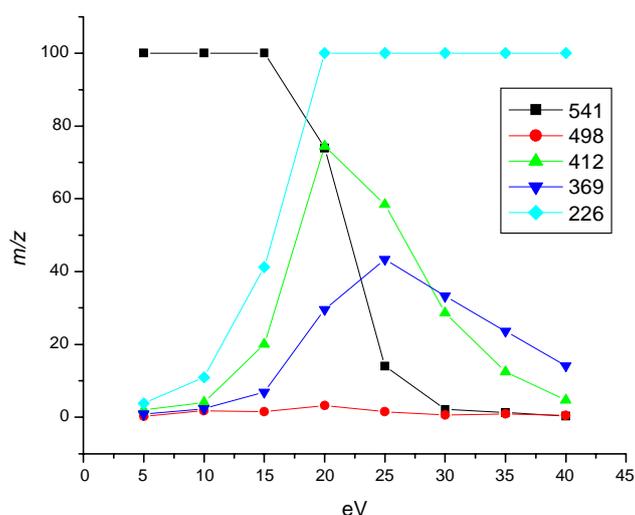


**Figura 4.11:** (A) Espectro de massas do alcalóide Alanditripinona deuterada (APCI – modo negativo); (B) Espectro de massas do alcalóide Alanditripinona deuterada (APCI – modo positivo); (C) Espectro de massas do alcalóide Alanditripinona (APCI – modo negativo)



**Esquema 4.4:** mecanismo de fragmentação proposto para alanditripinona (4). APCI modo negativo. Energia de colisão 20 eV.

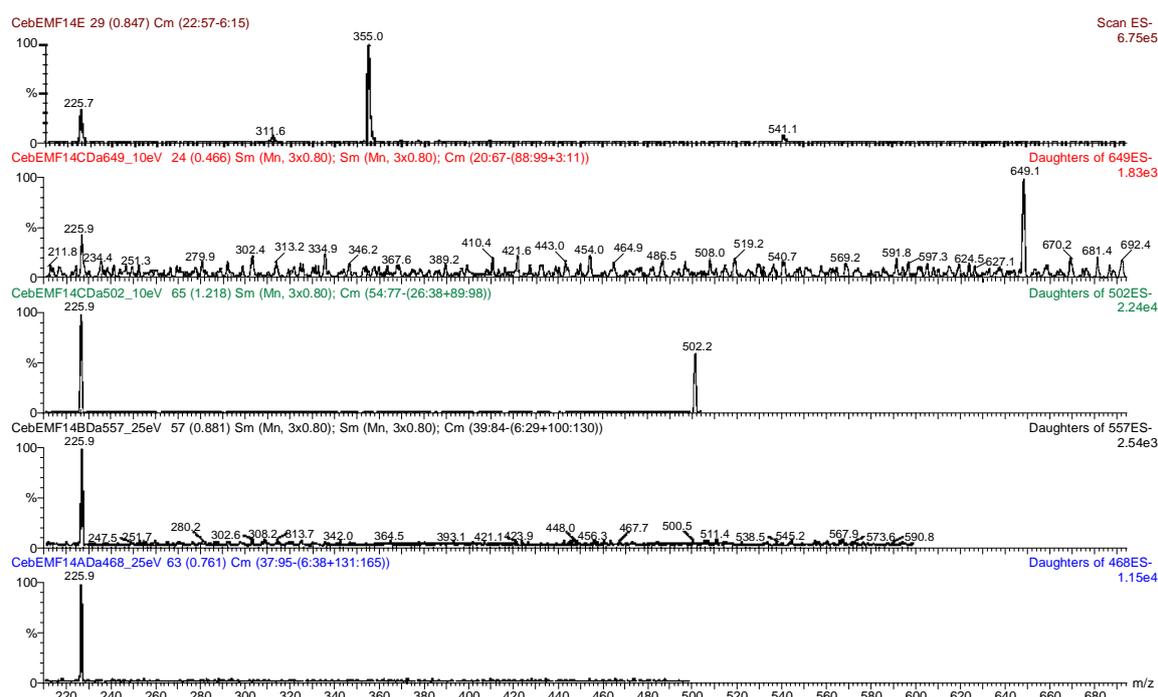
Para otimizar as condições de análise por espectrometria de massas seqüencial (MS/MS) dos alcalóides espiroquinazolinos, realizou-se um estudo das condições de ionização e fragmentação da alanditripinona (**4**). Várias temperaturas foram utilizadas para a análise de íons fragmentos gerados a partir da molécula desprotonada  $[M-H]^-$  541. Durante estes experimentos foi observando a variação na intensidade dos fragmentos gerados em diversas energias de colisão (Figura 4.12).



**Figura 4.12:** Variação da intensidade dos íons filhos de  $[M-H]^-$  541 com a energia de colisão (Temperatura do *probe* de APCI – 400 °C)

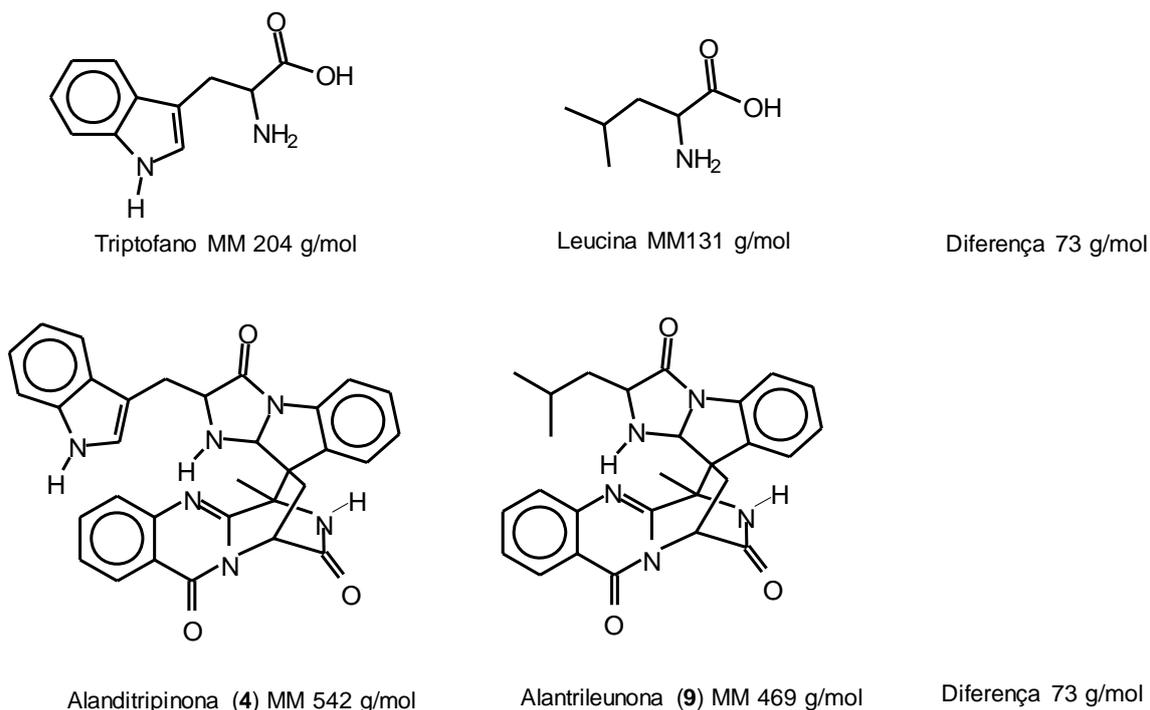
No gráfico da Figura 4 é fácil entender o comportamento de  $m/z$  541 e 226, quanto maior a energia de fragmentação menos íons de  $m/z$  541 temos e mais  $m/z$  226. Outro íon que tem comportamento estável é o  $m/z$  498, mostrando que a sua formação é praticamente independente da energia de colisão. Os íons que mais chamam a atenção são os  $m/z$  412 e 364 que tem aumento de intensidade até 20 eV no caso do 412 e 25 eV no caso do 264, acima destas energias de colisão estes íons tem um decréscimo de intensidade. A explicação para este fato é que acima desta energia de colisão estes íons se fragmentam gerando o íon  $m/z$  226. Este fator é a característica mais importante na análise dos alcalóides espiroquinazolinos por MS. A estrutura do íon  $m/z$  226 esta dentro do sistema pirazino[2,1-b] quinazolino-3,6-diona, que está presente em diversos produtos

naturais, que em muitos casos, exibem atividades biológicas interessantes. A realização de experimentos de MS/MS buscou íons precursoros de  $m/z$  226, possibilitou a identificação das moléculas que geram os íons  $m/z$  542, 355, 557, 502, 468 e 649 – que foram atribuídos aos compostos mostrados na Figura 4.9. Os Espectros de MSMS para os alcalóides espiroquinazolinicos são apresentados na Figura 4.13.



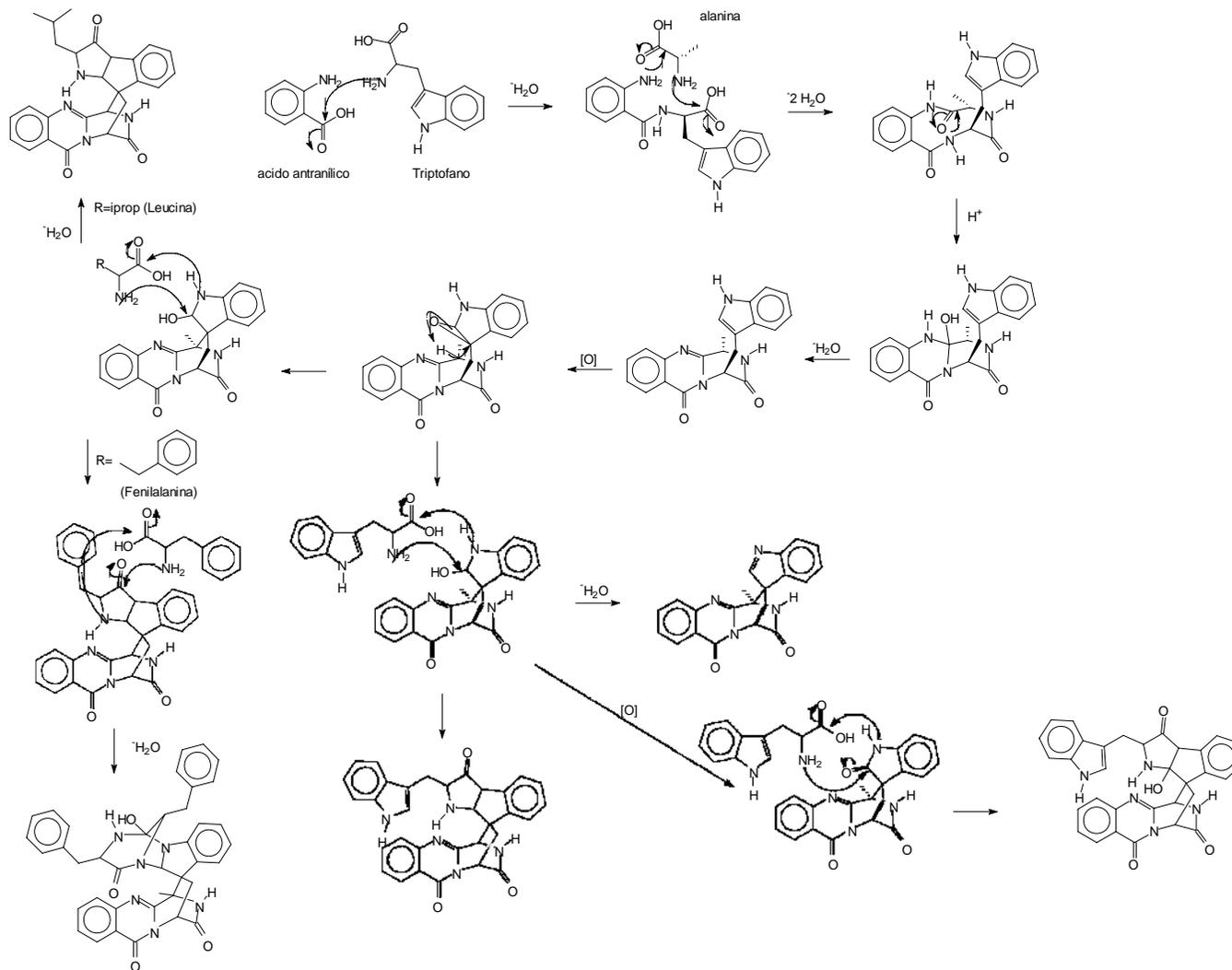
**Figura 4.13:** Espectros de massas sequencial para os alcalóides: (A) Alanditripinona **4**; (B) Alandifenona B **10**; (C) Alantrifenona **7**; (D) Alanditripinona B **6**; (E) Alantrileunona **9**.

Observando a diferença de massas entre estes íons, conclui-se que são as mesmas diferenças entre as massas dos aminoácidos que diferem em suas estruturas. Ou seja, a diferença de massas entre a alanditripinona (**4**) e a alantrileunona (**9**) é a mesma diferença entre a massa do aminoácido triptofano (**W**) e do aminoácido leucina (**L**) (Figura 4.14). Observando a provável rota biosintética destes alcalóides (Esquema 4.3) pode se observar que eles são formados pela junção de diferentes aminoácidos.

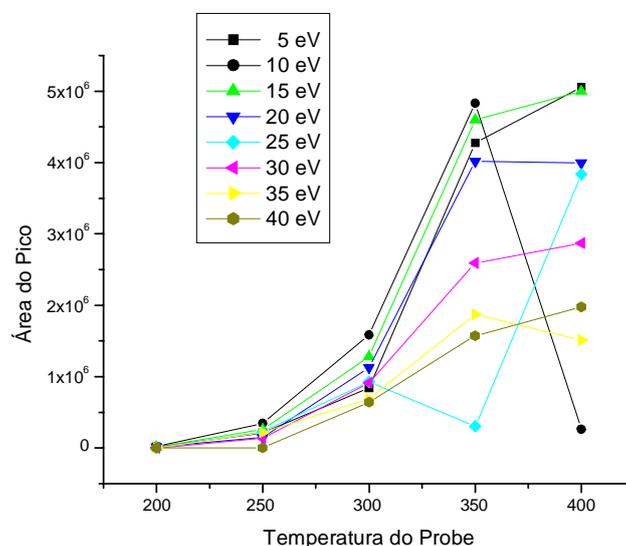


**Figura 4.14:** Diferença de massa entre os alcalóides espiroquinazolinós, comparação com a diferença de massas dos aminoácidos que diferem na estrutura.

Com os mecanismos de fragmentação estabelecidos foi possível otimizar as condições de detecção. Foram então realizadas injeções seqüenciais nas quais se buscava um aumento de sensibilidade do método. Com o acoplamento do HPLC, trabalhamos com altos fluxos de solvente na fonte de ionização. Portanto, um dos fatores que mais influenciam na sensibilidade do método é a temperatura do gás de desolvatação. Com temperaturas maiores, promovemos uma melhor “vaporização” das moléculas vindas do HPLC. Esse aumento de temperatura tem limite, temperaturas muito altas podem promover a fragmentação na própria fonte de ionização e conseqüentemente perda de sensibilidade. Pelos gráficos obtidos pode se concluir que não há diferenças consideráveis na intensidade dos fragmentos com a variação da temperatura. Por outro lado, a intensidade dos picos nos cromatogramas de íons totais (TIC) variou intensamente com a temperatura (Figura 4.15). Com os resultados obtidos foi possível se estabelecer as melhores condições para os experimentos de LC/MS e LC/MS/MS

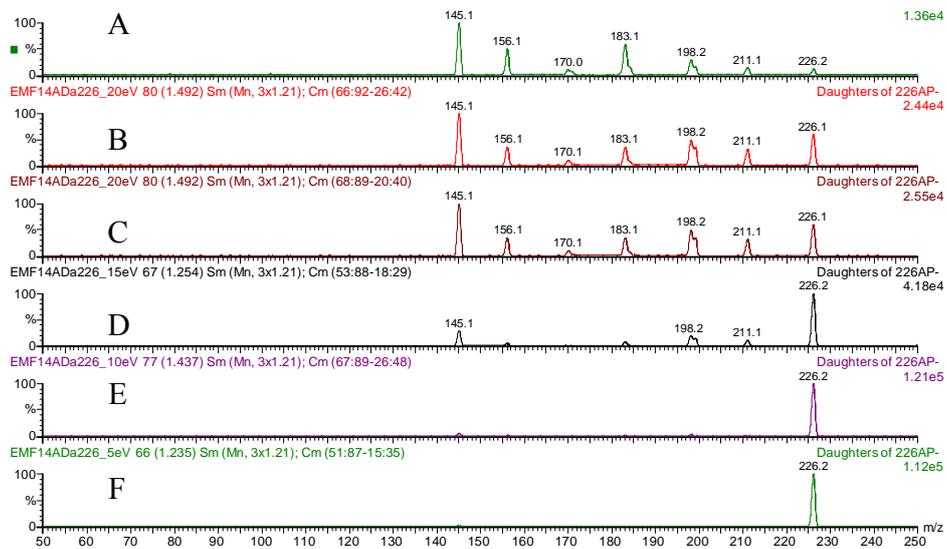


**Esquema 4.3:** Proposta biosintética para os alcalóides espiroquinazolinos produzidos por *Eupenicillium* sp.

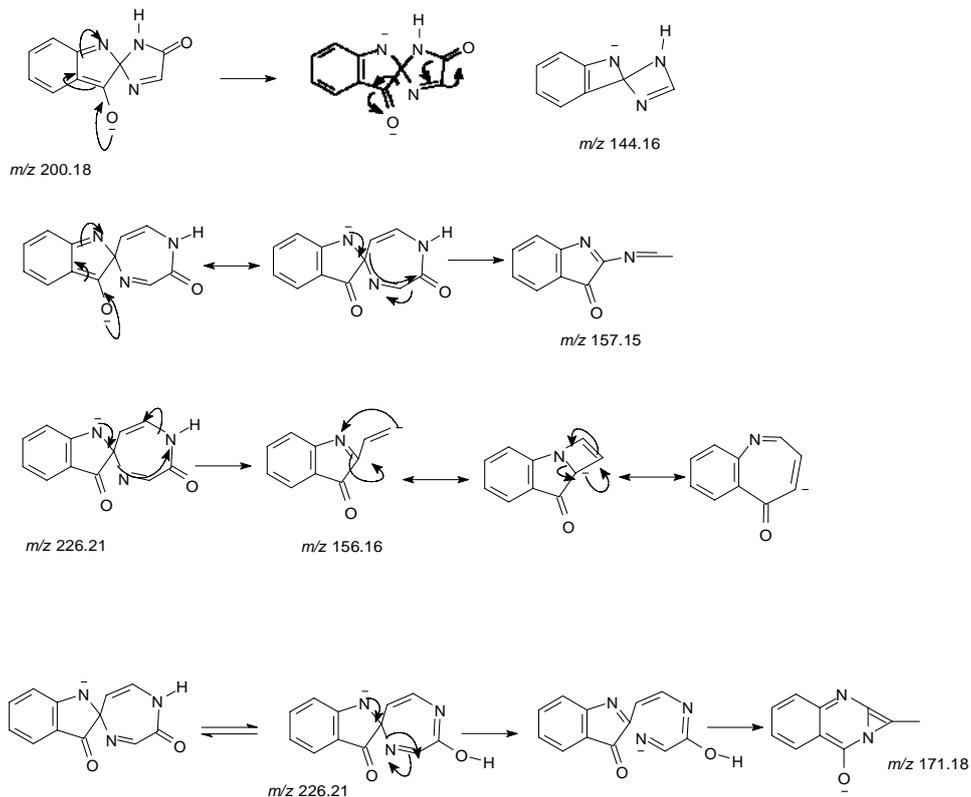


**Figura 4.15:** Variação intensidade dos picos nos cromatogramas de íons totais (TIC) com a temperatura.

Para uma melhor compreensão dos mecanismos de fragmentação e do comportamento dos íons gerados a partir da alanditripinona, foram realizados experimentos de fragmentação do íon  $m/z$  226 na fonte de ionização. Grande quantidade de informação é gerada quando se fragmenta o íon  $m/z$  226 (Figura 4.16). Este íon é comum a todos os alcalóides espiroquinazolinolinos produzidos por *Eupenicillium* sp. Portanto, conhecer os fragmentos gerados a partir de  $m/z$  226 pode ser importante para se realizar o monitoramento dos alcalóides produzidos por *Eupenicillium* sp. O mecanismo de fragmentação proposto para alguns dos íons obtidos a partir de  $m/z$  226 é mostrado na Figura 4.17.



**Figura 4.16:** Experimentos de fragmentação do íon de  $m/z$  226 com energias de colisão variada (A) 30 eV; (B) 25 eV; (C) 20 eV; (D) 15 eV; (E) 10 eV; (F) 5 eV.



**Figura 4.17:** Alguns fragmentos propostos para os experimentos de íons produzidos de  $m/z$  226.

#### **4.4 - Metodologia de HPLC/UV**

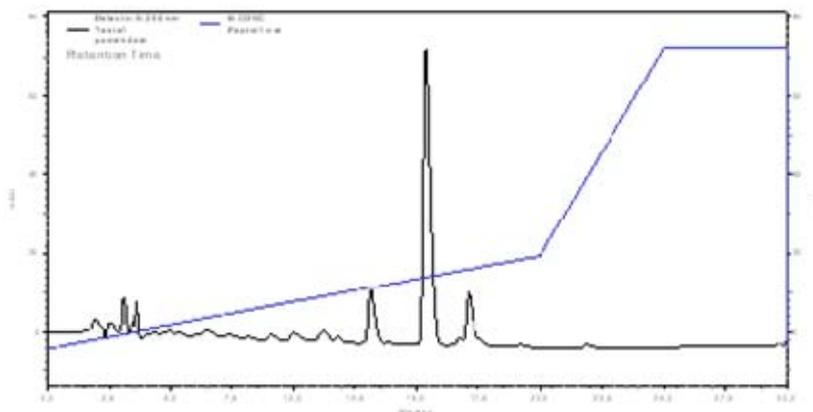
Com as condições de análise por MS estabelecidas foram determinadas às condições de análise por HPLC-UV. As metodologias de análise por HPLC foram desenvolvidas com o objetivo de otimizar as condições de separação de alcalóides para análises qualitativas e quantitativas dos extratos. A análise dos alcalóides deve ser feita utilizando-se gradientes com acetonitrila e água, para facilitar o posterior acoplamento com o MS. Os alcalóides espiroquinazolinos apresentam bons cromóforos, e a detecção deve ser feita em comprimentos de onda, entre 226 e 254 nm. Estes comprimentos de onda foram determinados através da realização de espectros de UV dos alcalóides espiroquinazolinos. Nesta região do UV, todos os solventes comuns para fase reversa que podem ser utilizados, o que permite a opção de troca de solvente, fato que facilitou a otimização da metodologia. Utilizou-se ainda a eluição em modo gradiente, onde a taxa de variação da composição de solventes foi otimizada para ajustar o tempo de retenção e a separação dos constituintes analisados. O sistema de separação por HPLC/UV apresentou algumas desvantagens. Entre elas, está o problema de linha de base, sendo que os picos de substâncias minoritárias não são observados, mas quando se utiliza o acoplamento com MS, seus espectros de massas podem ser obtidos sem maiores problemas. Por outro lado, os sistemas desenvolvidos em escala analítica com detecção por UV podem ser utilizados em HPLC preparativo, que dispõe do mesmo sistema de detecção. Dê-se de que se tenha coluna em escala preparativa com recheios iguais aos da coluna analítica.

Dessa forma, sistemas de separação utilizando-se uma coluna de ODS com eluição gradiente de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O e detecção por UV (226 nm) foram testados para análises do extrato bruto e também para frações do mesmo. Esses sistemas foram desenvolvidos visando-se a melhor resolução cromatográfica das misturas, no menor tempo de análise, em análises reprodutivas. Vários sistemas foram testados para se encontrar as melhores condições de separação, sendo os principais pontos que tiveram de ser otimizados foram a composição inicial de solvente e a taxa de variação da composição pelo tempo.

Uma fração rica em alcalóides espiroquinazolinos foi submetida à análise por HPLC/UV. O sistema escolhido utiliza o gradiente mostrado na Tabela 4.5 com uma coluna ODS (shim-pack) de 20 cm x 1cm. A Figura 4.18 mostra o cromatograma obtido para o método otimizado. Observa-se o alcalóide alanditripinona como composto majororitário (tr 15,6 min).

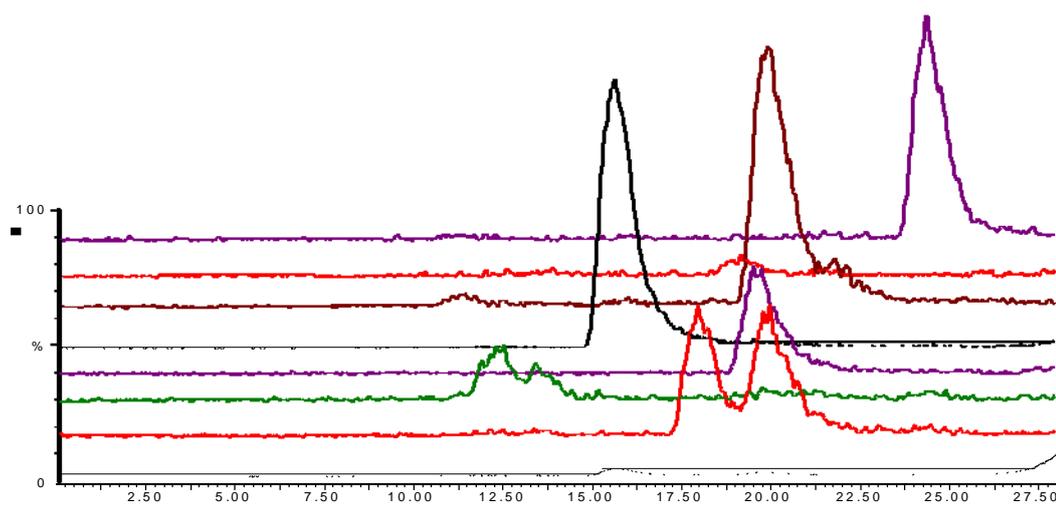
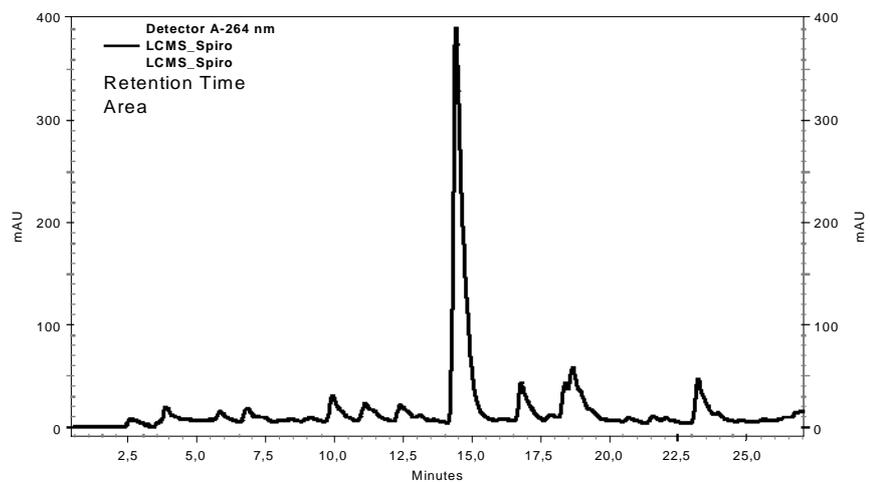
**Tabela 4.5:** Gradiente utilizado para análise de Alcalóides espiroquinazolinos

Tempo (min)	Proporção de ACN em H <sub>2</sub> O (%)
0	35
10	45
20	55
25	100
30	35

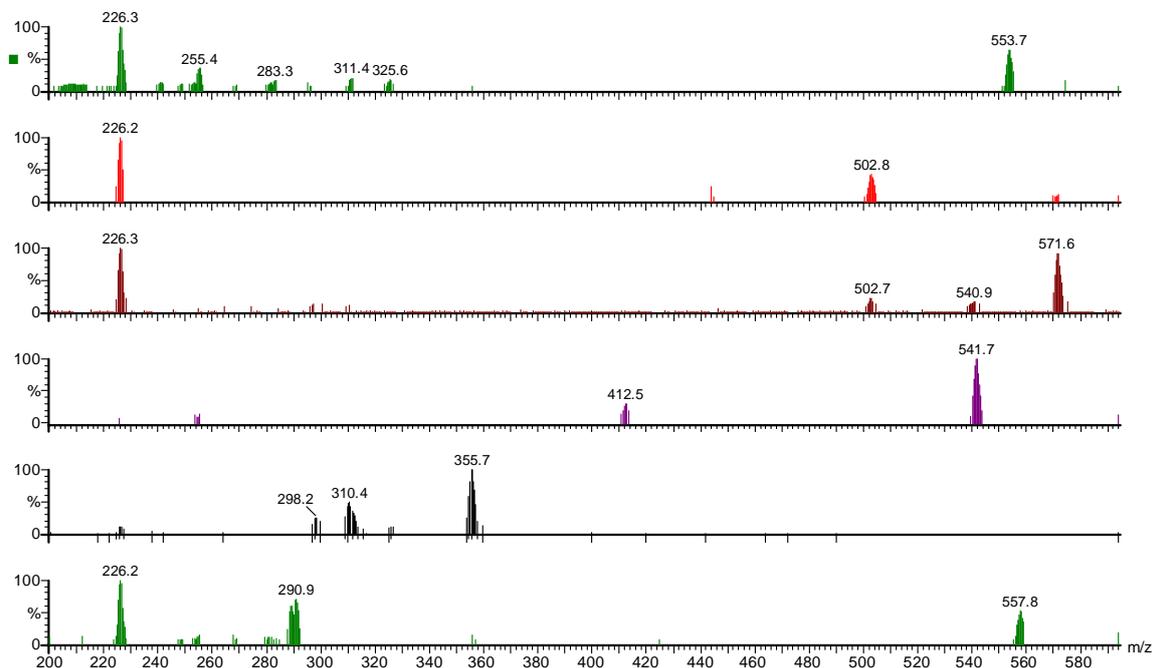


**Figura 4.18:** Cromatograma obtido para um mistura de alcalóides espiroquinazolinos. Sistema de solventes utilizado: ACN:H<sub>2</sub>O em gradiente, fase móvel utilizada ODS (20 cm x 1cm).

Com as metodologias de HPLC-UV-MS/MS estabelecidas foi realizada a primeira análise hifenada dos alcalóides espiroquinazolinos (Figura 4.19).



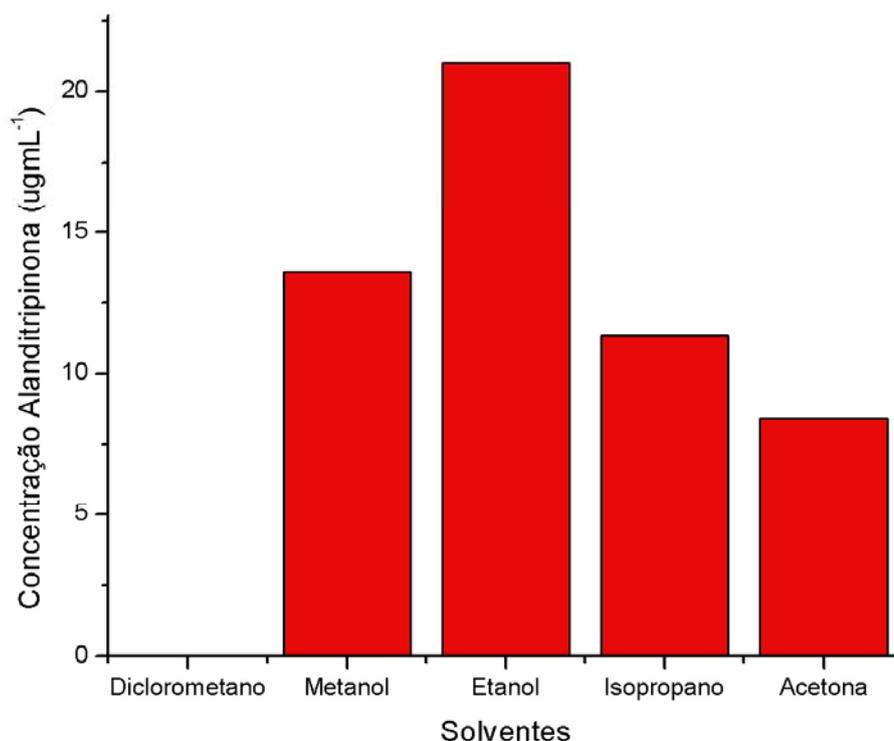
**Figura 19:** Cromatograma de HPLC-UV e HPLC-MSMS obtido para uma mistura de alcaloides espiroquinazolinicos.



**Figura 20:** Espectros de massas obtidos a partir do cromatograma de HPLC-MS/MS, mostrado acima.

#### 4.5 - Extração

Com a metodologia de HPLC-UV estabelecida, utilizaram-se frascos de erlenmeyer contendo *Eupenicillium sp* cultivado em milho para se estabelecer o melhor solvente de extração. Foram testados diclorometano, metanol, etanol, isopropanol e acetona. Acetato de etila havia sido testado durante estudos realizados no mestrado e hexano foi evitado devido a já conhecida alta produção de óleo nos meios de cultura contendo milho e arroz. Pelo gráfico apresentado na (Figura 4.21) observa-se claramente que o melhor solvente para a extração é o etanol. Este fato é importante por vários aspectos. O etanol é um solvente barato, é fungistático, isto é, inibe o crescimento do microrganismo durante o procedimento de extração. Estes fatores contribuem para uma possível produção em grande escala dos alcalóides espiroquinazolinós.



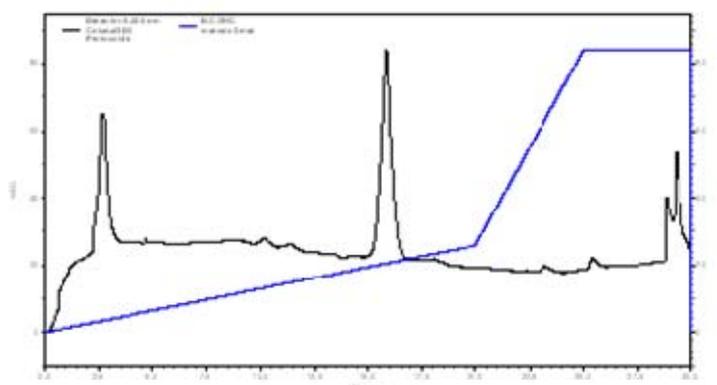
**Figura 4.21:** Extração de alanditripinona em diferentes solventes.

#### **4.6 - Metodologia de SPE.**

Com as condições de HPLC e de extração estabelecidas, frascos contendo *Eupenicillium* sp cultivado em milho, foram utilizados para obter as melhores condições de SPE dos alcalóides. Foram testadas diversas metodologias utilizando cartuchos ODS Supelco, eluídos a pressão reduzida em sistemas de ACN:H<sub>2</sub>O. A primeira metodologia de SPE testada mostrou pouco eficiente para a extração de alcalóides. Uma nova metodologia foi testada, repetiu-se o procedimento de extração com EtOH, mas desta vez utilizou-se cartuchos de SPE *home made*, feitos com uma mistura ODS:Alumina (1:1) v/v, os cartuchos não necessitam ser condicionados e o próprio solvente de extração EtOH é utilizado para a eluição do cartucho. Desta vez, no entanto, a metodologia se mostrou

bastante eficiente para a extração dos alcalóides. A Figura 4.22 mostra o cromatograma obtido por HPLC/UV, podemos ver claramente que o composto majoritário é o alcalóide espiroquinazolino alanditripinona – dado fornecido pela comparação com o tempo retenção e pelo espectro de ultravioleta do padrão.

A etapa de pré-purificação dos extratos anterior às análises tem como objetivo, além de realizar uma filtração, retirar da amostra substâncias apolares e macromoléculas (proteínas, celulose). Estas impurezas são prejudiciais aos filtros (*check valves*) e a coluna de HPLC (ODS), e esta limpeza do extrato permite que se prolongue o tempo de vida e eficiência do sistema e coluna de HPLC. Essa etapa permite também o enriquecimento de alcalóides em relação aos demais compostos produzidos por *Eupenicillium* sp. Essa pré-purificação é feita por extração em fase sólida, utilizando-se cartuchos de ODS:Alumina (1:1) v/v, como o cartucho de SPE é possui ODS, mesma fase estacionária da coluna, pode se garantir que nenhuma substância prejudicial a coluna esteja presente na solução analisada.



**Figura 4.22:** Cromatograma obtido para SPE feita em cartucho home made ODS:Alumina (1:1).

#### **4.7- Experimentos que visam à indução da produção de alcalóides.**

Com as metodologias de extração por SPE e de HPLC-MS/MS, otimizadas se deu inicio aos experimentos para indução da produção de alcalóides.

As condições de SPE e HPLC/UV estabelecidas permitiram a busca por indutores a produção de alcalóides espiroquinazolinos. Diversos compostos candidatos a indutores a produção de alcalóides foram testados (Tabela 4.6). Esses compostos foram adicionados aos meios de cultura compostos por milho e água. O fungo *Eupenicillium* sp foi inoculado nestes meios. Após o cultivo realizou-se a extração, a pré-purificação por SPE e a análise por HPLC/UV.

Observou-se o aumento da produção do alcalóide alanditripinona (tr 15,6”) no meio onde foi adicionado L-Prolina. Praticamente, o dobro da quantidade de alanditripinona produzida no controle (fungo cultivado sem adição de indutor). Lembrando que todas as extrações foram feitas da mesma maneira, o aumento da produção de alcalóides no meio contendo L-Prolina, pode significar uma possível indução a produção de alcalóides. Como a L-prolina é um aminoácido que esta presente em diversas proteínas que fazem parte de paredes celulares de diversos organismos, o fungo *Eupenicillium* sp pode estar reconhecendo esse aminoácido como um possível “inimigo” e aumentar a sua produção de alcalóides.

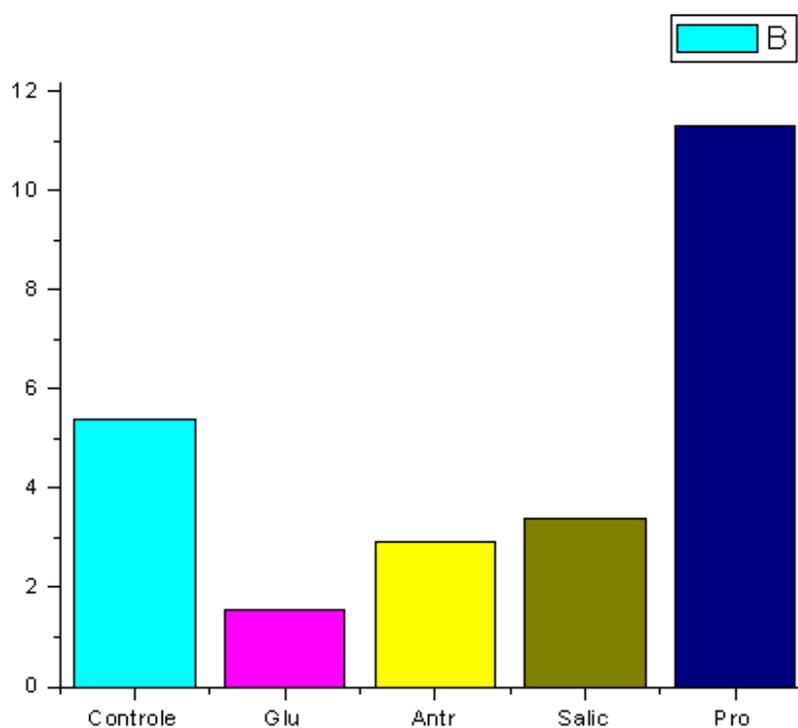
Experimentos de indução a produção de alcalóides pela adição de um dipeptídeo metilado (Aspartame) e o ácido glutâmico, também foram realizados. Os extratos obtidos foram analisados por HPLC-UV-MS/MS.

Aparentemente, tanto o ácido glutâmico quanto o Aspartame foram totalmente consumidos. Pela comparação dos cromatogramas dos extratos com os substratos em matriz – branco.

É observado o aumento de concentração do alcalóide espiroquinazolino de tr 15,6 min ( $m/z$  542) no meio em que foi adicionado aspartame. Como o objetivo da análise foi somente observar o comportamento de *Eupenicillium* sp frente a peptídeos, não a quantificação dos produtos formados. Não se tomou a medida necessária para quantificar os alcalóides, mas foram utilizadas as mesmas massas de compostos e os mesmos volumes de solventes em todas as análises.

**Tabela 4.6:** Quantificação do alcalóide alanditripinona em extratos de *Eupenicillium* sp

Indutor	[alanditripinone] ( $\mu\text{g/g}$ )
Fungo <i>Eupenicillium</i> sp	5,40
Glutamato de sódio	1,55
Ácido Antranílico	2,90
Ácido Salicílico	3,40
L-Prolina	11,30
Aspartame	6,57
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	10,25



**Figura 4.23:** Comparação da produção de alanditripinona nos meios com diferentes indutores.

Fungos ascomicetos como *Eupenicillium shearii* e *Eupenicillium crustaceum*, são conhecidos pela produção de alcalóides com atividades antialimentares quando estão sob condições adversas. O fungo *Eupenicillium shearii* produz alcalóides indólicos chamados Shearinines A-C, quando passa por períodos no solo com baixa humidade (BELOFSKY E GLOER, 1995). Estes alcalóides os protegem contra ataques de insetos fungíferos (WANG, et al, 1995). Utilizando esta mesma idéia o fungo *Eupenicillium* sp, um Ascomiceto foi cultivado em milho, sob a ação de um forte campo magnético. Os frascos contendo meio de cultura foram cultivados abaixo do magneto de um aparelho de RMN. Ao mesmo tempo, *Eupenicillium* sp foi cultivado no Laboratório de bioquímica micromolecular nas condições previamente estabelecidas.

Detectou-se um aumento da produção do alcalóide alanditripinona em relação ao fungo cultivado em condições normais. Este fato é importante, sabemos agora que existe um aumento na produção de alcalóides sob condições adversas de cultivo.

#### **4.8 - Cultivo do fungo *Eupenicillium* sp em folhas de *M. paniculata*.**

Pela estrutura dos alcalóides espiroquinazolinicos, pode se supor que os alcalóides produzidos por *Eupenicillium* sp tem uma origem biossintética mista entre triptofano, ácido antranílico e alanina. Como esses aminoácidos são necessários para a biossíntese dos alcalóides carbazolicos de *M. paniculata*. Investigou-se a hipótese que o fungo possa estar seqüestrando aminoácidos livres da planta para o seu próprio metabolismo. Realizaram-se, então experimentos para a averiguação do pressuposto acima, que levaram a detecção de alcalóides produzidos pelo fungo quando cultivado com folhas de *M. paniculata* como única fonte de carbono.

O extrato obtido foi submetido à filtração em funil de placa sinterizada e as frações obtidas analisadas por CCD utilizando reagente de Dragen Dorff como revelador. A fração que apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragen Dorff foi submetida a análise por HPLC-MS/MS. A análise por

HPLC-MSMS possibilitou a detecção do alcalóide espiroquinazolino que gera o ion  $m/z$  542.

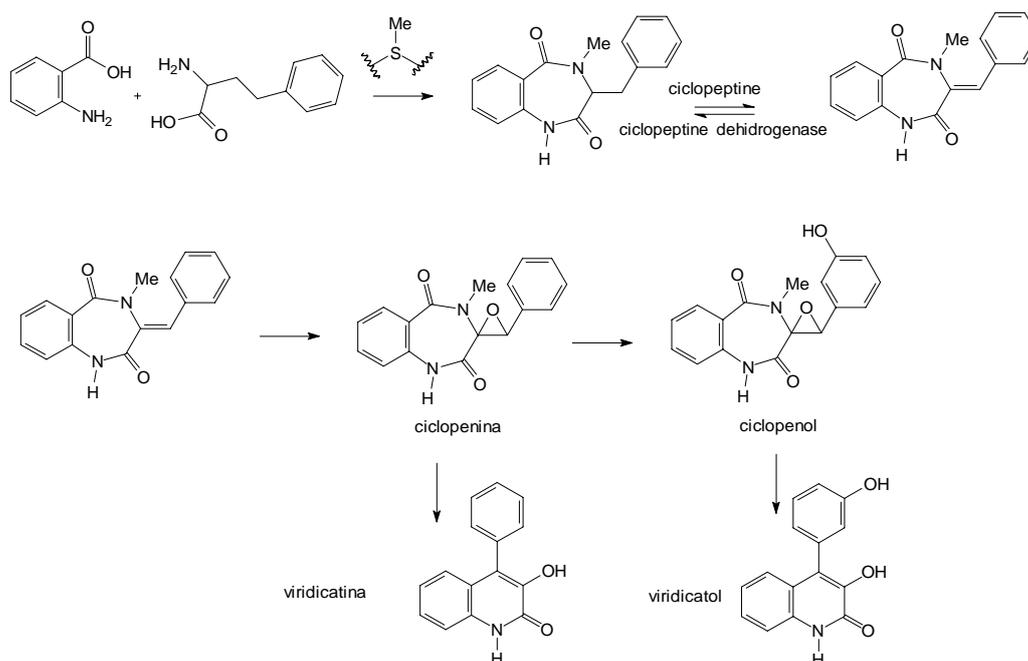
No estudo realizado durante o mestrado demonstrou-se que a planta *M. paniculata* é infectada por diversos microrganismos. A perda de habilidade de produção de alcalóides por *M. paniculata* foi relacionada com a produção de alcalóides por *Eupenicillium* sp. Pela rota biossintética proposta para os alcalóides espiroquinazolinicos (Esquema 4.3), o fungo poderia estar seqüestrando aminoácidos de *M. paniculata* para utilizá-los como precursores de seus alcalóides.

Foi constatado que *Eupenicillium* sp produz alcalóides em Arroz e Milho, mas não em meio Czapek's enriquecido com extrato de levedura. Observou-se que *Eupenicillium* sp é também capaz de produzir alcalóides espiroquinazolinicos utilizando somente as folhas de *M. paniculata* como substrato. Estes fatos nos permitiram supor que os aminoácidos presentes nas folhas de *M. paniculata*, no Milho e no Arroz levam a produção de alcalóides espiroquinazolinicos, ao passo que os aminoácidos presentes no extrato de levedura não. Portanto, a análise de aminoácidos nos diferentes substratos deveria revelar um perfil similar para o Milho, o a Arroz e para as folhas de *M. paniculata* e um perfil completamente diferente para o extrato de levedura. O resultado obtido pela análise de CCD de partição foi justamente o oposto ao esperado. O substrato que melhor se adaptava a produção de alcalóides deveria ser extrato de levedura, já que este contém o maior número de aminoácidos livres utilizados para a produção de alcalóides.

Outro fato instigante foi constatado, o experimento de adição de ácido antranílico no meio de cultura de *Eupenicillium* sp fez com que a produção de alcalóide alanditripinona fosse menor em relação ao controle. Era de se esperar justamente o contrário, já que este substrato está presente na estrutura dos alcalóides espiroquinazolinicos (Figura 4.9). Ao passo que a adição do aminoácido (AA) L-Prolina (AA que não faz parte da estrutura do alcalóide alanditripinona) ao meio de cultura de *Eupenicillium* sp, causou um incremento de mais de 100% na produção de alanditripinona em relação ao controle (fungo *Eupenicillium* sp cultivado em meio milho). Estes fatos nos fizeram reformular a

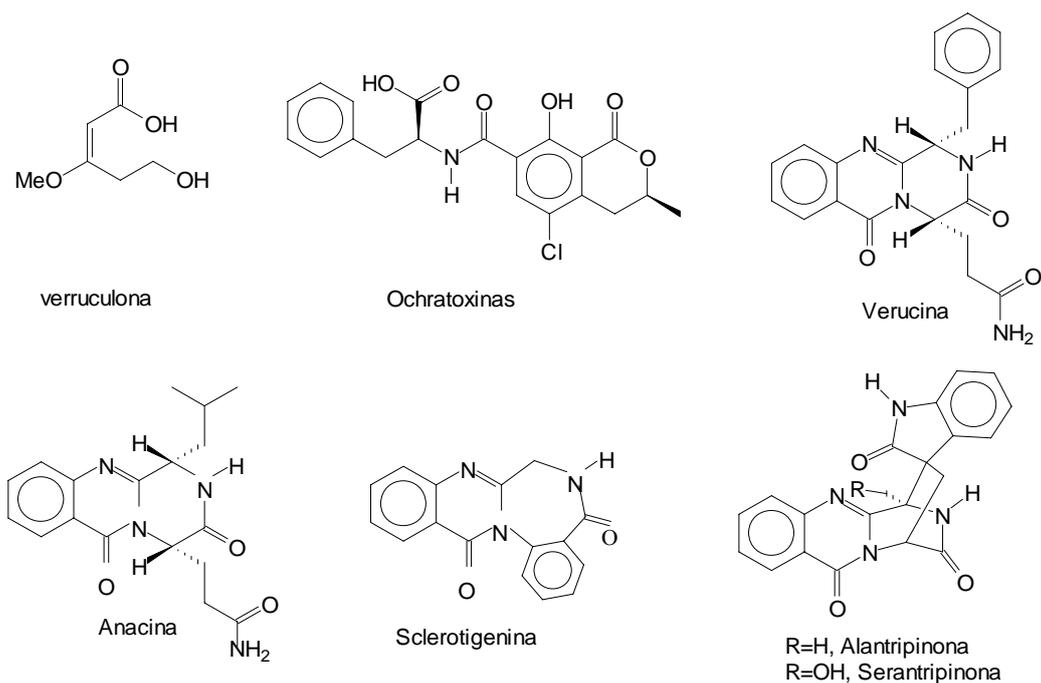
nossa proposta biossintética para a produção de alcalóide espiroquinazolinos por *Eupenicillium* sp (Figura 4.4). Por esta nova hipótese, o fungo *Eupenicillium* sp, não utiliza AA livres para a produção de alcalóides, mas sim peptídeos com as seqüências específicas para a produção dos diversos alcalóides espiroquinazolinos. Portanto, a primeira etapa da biosíntese de alcalóides espiroquinazolinos deve ser a ação de proteases. Estas enzimas devem “quebrar” as proteínas nos peptídeos específicos para a produção dos alcalóides. O aumento de produção de alcalóides no meio de cultura onde é adicionado o AA L-Prolina pode estar relacionado ao fato que as proteases – possivelmente necessárias para a produção de alcalóides espiroquinazolinos - possuem um alto teor de L prolina em sua estrutura (<http://bioquimica.ffcmpa.tche.br/enzimas>). Portanto, a etapa determinante para a produção de alcalóides pode ser a ação das proteases.

Essa nova hipótese é reforçada por relatos de enzimas relacionadas a fungos do gênero *Penicillium*, convertem, de maneira reversível, peptídeos em alcalóides. (ZENDEM, *et al.*,1982; RICHTER & LUCKNER, 1976) Durante a Idiofase, uma das fases de crescimento do fungo *Penicillium cyclopium*, há um grande aumento da atividade das enzimas relacionadas à produção de alcalóides (RICHTER & LUCKNER, 1976). Estes alcalóides sofrem um aumento de produção pelo ácido úrico (HELBIG, *et al*, 2002) (Figura 4.24).



**Figura 4.24:** Conversão de peptídeos em alcalóides por *Penicillium cyclopium*.

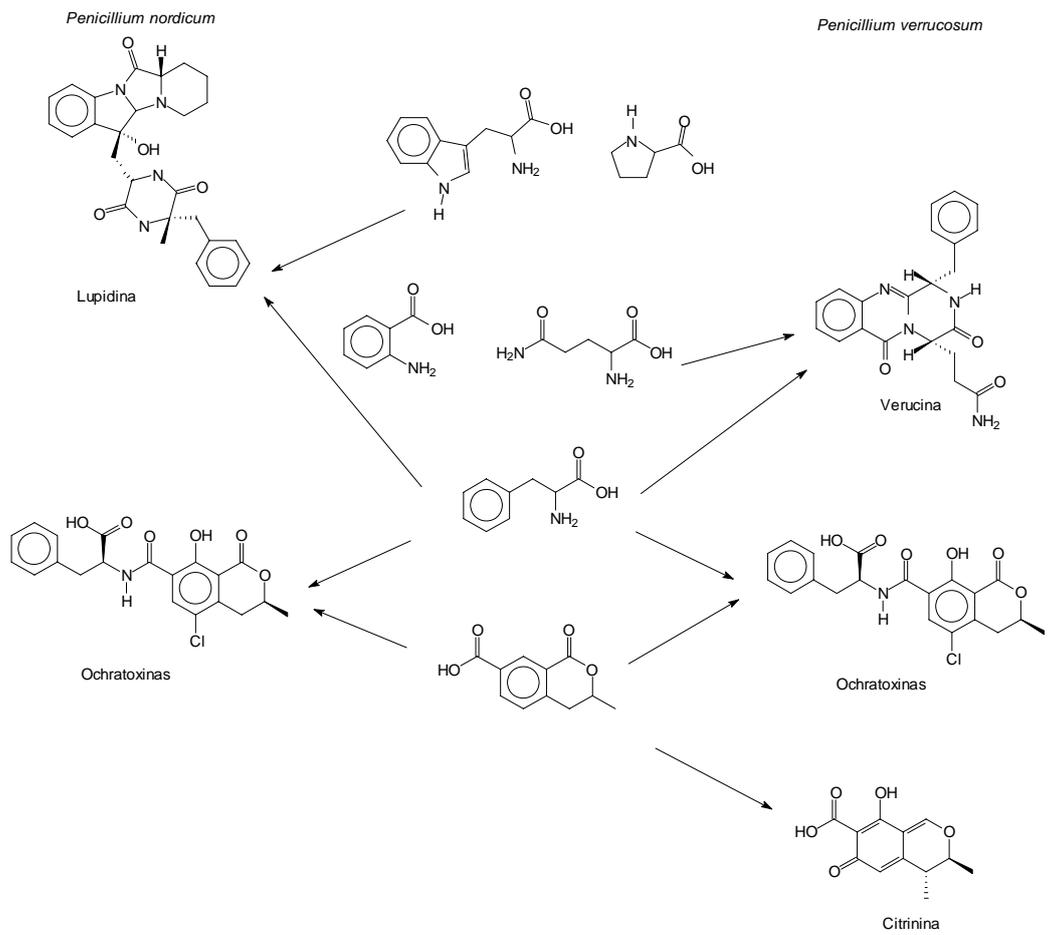
A idéia de comparar o metabolismo de fungos do gênero *Penicillium* com fungos do gênero *Eupenicillium* não vem por acaso. *Eupenicillium* é um gênero de fungo gerado a partir de uma fase assexuada de *Penicillium*. Larsen e colaboradores propuseram uma classificação química de fungos do gênero *Penicillium* de acordo com a sua produção de metabólitos. Nesta classificação, foram analisadas 48 espécies diferentes de fungos do gênero *Penicillium*. Todas as 48 cepas produziram verruculoninas, 36 produziram Ochratoxina A, 23 produziram verrucina, 24 produziram anacinas, 11 produziram sclerotigenina e 4 produziram alantripinona e serantripinona (Figura 4.25).



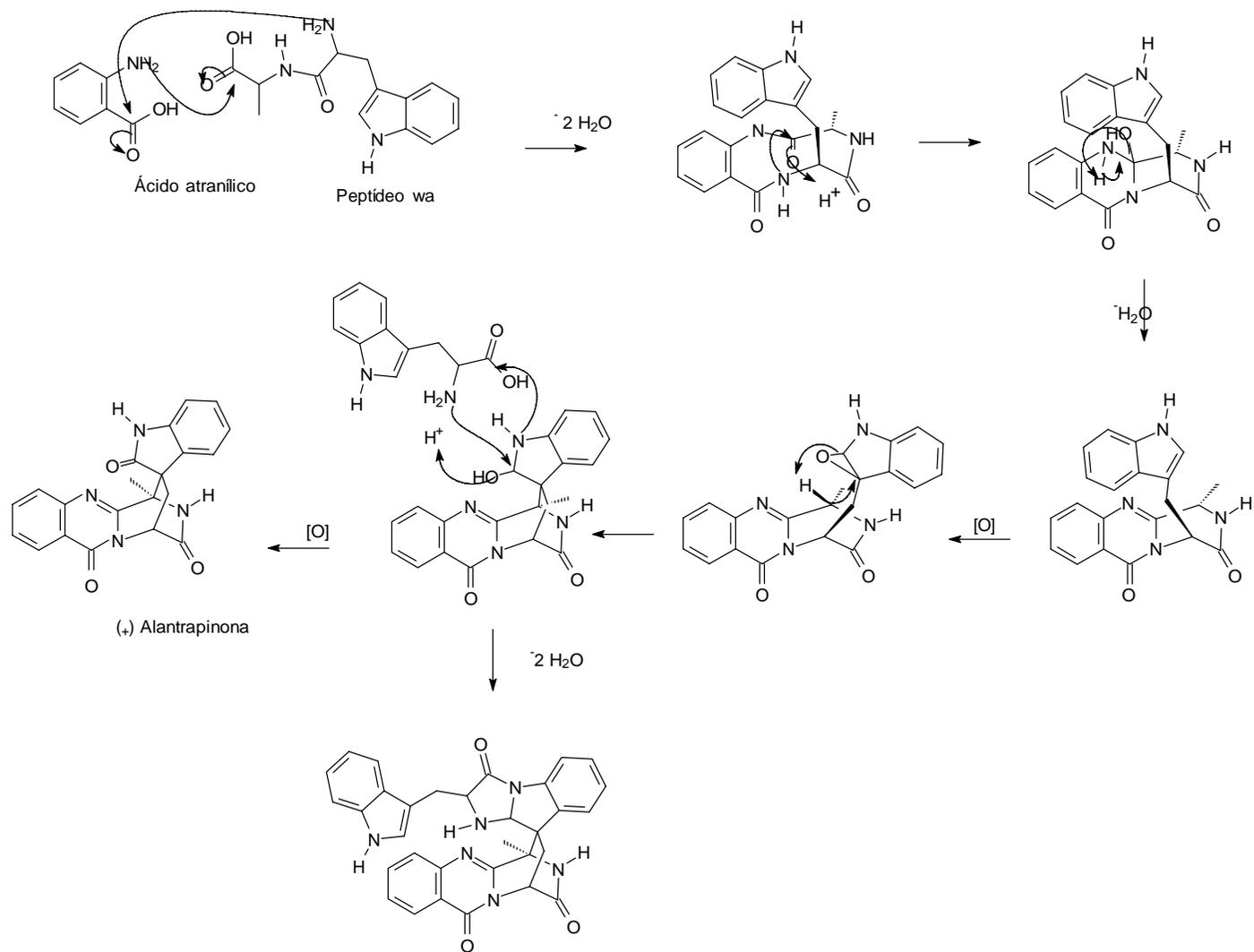
**Figura 4.25:** Compostos produzidos por fungos do gênero *Penicillium*.

Como conclusão deste trabalho Larsen e colaboradores propuseram que os fungos do gênero *Penicillium* utilizam rotas biosintéticas, onde aminoácidos específicos são utilizados para a produção de alcalóides (Esquema 4). Observando as estruturas dos compostos verrucina, anacina, alantripinona e serantripinona (Figura ww). Fica muito clara a semelhança entre estes compostos e os alcalóides espiroquinazolinóis.

A princípio a idéia de que alcalóides espiroquinazolinóis são produzidos a partir de aminoácidos não pode ser totalmente abandonada. A realização de experimentos de cultivo de *Eupenicillium* sp, em meios ricos em proteínas, pode nos esclarecer indicar qual rota é utilizada para a produção dos alcalóides. Antes de realizar estes experimentos, devemos conhecer a taxa de produção de alcalóides espiroquinazolinóis por *Eupenicillium* sp. Assim podemos otimizar o período de cultivo nos meios enriquecidos com proteínas, evitando assim falsos negativos nas análises realizadas.



**Esquema 4.5:** Biosíntese de alcalóides por fungos do gênero *Penicillium* (LARSEN, et al, 2002)



Esquema 4.4: Proposta biossintética para o alcalóides alanditripinona, a partir de peptídeos.

#### **4.9 - Curvas de crescimento e taxa de produção de alcalóides por *Eupenicillium* sp**

Conhecer a taxa de produção de alcalóides por *Eupenicillium* sp, assim a curva de crescimento, é muito importante para compreender a rota biosintética de alcalóides espiroquinazolinos.

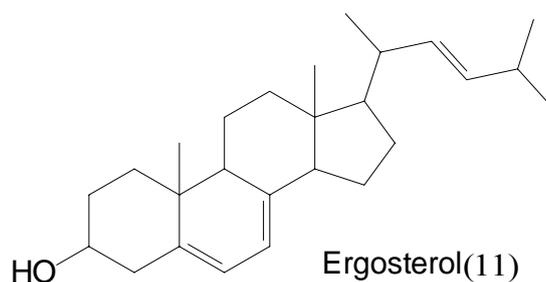
As curvas de crescimento dos microrganismos seguem um padrão de fases distintas: a fase Lag, a fase exponencial ou fase log, a fase de declínio, a fase estacionária (idiofase) e a fase de lise. Curvas de crescimento geralmente tem um formato em “S” (Figura 4.26). A fase Lag ocorre quando o microrganismo é introduzido em um novo meio. Geralmente, nesta fase os microrganismos sintetizam novas enzimas para poder utilizar os substratos do meio de cultura. Muitos microrganismos têm suas fases Lag reduzidas – portanto, maior taxa de crescimento - fornecendo no meio de cultura, intermediários para o seu metabolismo, vitaminas e aminoácidos. A principal diferença observada entre o crescimento de *Eupenicillium* sp no meio milho e no meio milho contendo L-Prolina, foi a redução da fase Lag. No meio de cultura contendo L-Prolina (Figura 4).

A fase Log ou fase exponencial é onde ocorre o crescimento do fungo. Os fungos crescem via extensão das hifas (Figura 4.27). O crescimento dos fungos é possibilitado pelas vesículas de transporte que levam os nutrientes para as extremidades em crescimento. Em alguns casos os fungo podem “crescer” em um meio sem utilizar novas fontes de substratos. Isso é possível porque os fungos digerem partes velhas de suas hifas e transportam os nutrientes para as partes em crescimento. Também na fase log pode se observar diferenças entre o desenvolvimento do fungo *Eupenicillium* sp cultivado em meio contendo L-Prolina e no meio contendo somente milho. Podemos observar que o fungo cultivado em meio contendo L-Prolina tem a fase log aumentada se comparada ao fungo cultivado em meio milho (Figura 4.28). Já os processos que levam ao metabólitos secundários são rotas biossintéticas que não estão envolvidas no crescimento das células e usualmente ocorrem quando as células param de crescer – fase

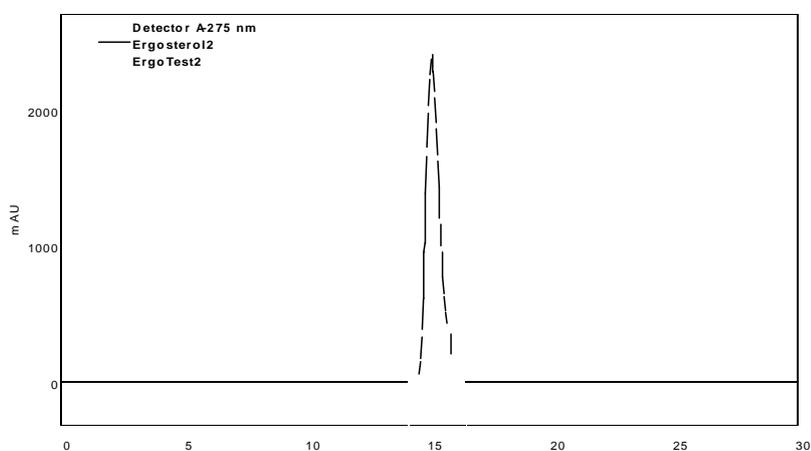
estacionária ou idiofase. A gráfico da taxa de produção de alanditripinona/dias de cultivo (Figura 4.29) mostra que a produção de alcalóide ocorre durante praticamente todo o período de cultivo, tendo um aumento exponencial entre vigésimo e o quadragésimo dia de cultivo. O Máximo da produção ocorre no quadragésimo segundo dia de cultivo, alcançando a marca de 144,56 mg de alanditripinona por kg de milho. A partir do quadragésimo quinto dia podemos observar uma tendência de decréscimo na produção de alanditripinona. Este fato pode indicar uma inibição em *feedback* das enzimas que iniciam a rota de produção de alcalóides ou o fungo pode estar entrando na fase de lise e utilizando os alcalóides para “crescer” em um meio sem mais nutrientes. Para investigar essa hipótese foi realizado experimento em que o fungo *Eupenicillium* sp foi cultivado por um período de 60 dias. Neste experimento observa-se que a produção de alanditripinona permanece praticamente constante no período entre 45 e 60 dias. Indicando que o fungo permanece na fase estacionaria, antes de iniciar a fase de declínio (*lysis*). Frascos contendo *Eupenicillium* sp cultivados em milho também foram analisados como controle. Observa-se que a produção de alanditripinona é apenas 15 % menor que a encontrada no meio milho com a adição de L-Prolina. Este fato não nos possibilita tirar muitas conclusões, devido a não termos resultados iniciais do cultivo de *Eupenicillium* sp para se comparar.

Determinar a taxa de crescimento de fungos é uma necessidade em diversas áreas da ciência. Áreas como agricultura, engenharia de alimentos, ecologia, determinam a taxa de crescimento de fungos para as mais diversas aplicações. O método mais utilizado para se determinar a taxa de crescimento de fungos é o acompanhamento do peso seco. Este procedimento consiste em pesar a massa fungica seca e construir, a partir de varias medições, a curva de crescimento do fungo. A determinação da taxa de crescimento dos fungos pela determinação da massa seca, é uma metodologia trabalhosa e demorada. Na literatura encontramos métodos onde determinam a taxa de crescimento de fungos de maneira mais rápida e eficiente. Métodos que envolvem voltametria cíclica e análise de ergosterol estão entre as mais citadas (SUBRAHMANYAM, et al, 2001). No entanto, os métodos de análise de ergosterol (11)(Figura 4.30),

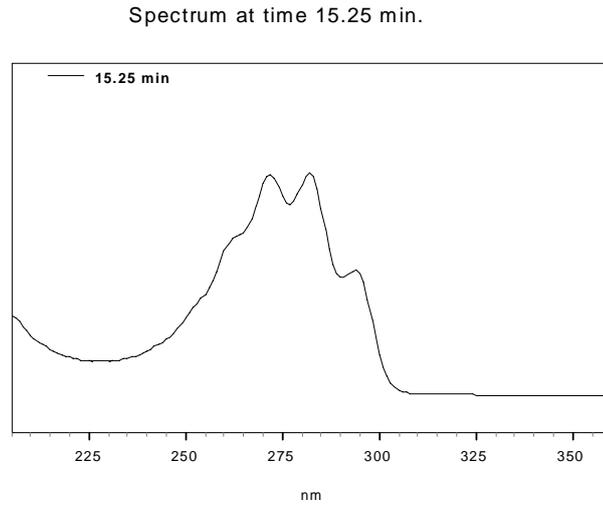
utilizam como solvente de extração o metanol. Uma grande parte dos esteróides - como o ergosterol - presente na parede celular dos fungos, estão esterificados com ácidos graxos de cadeia longa. Metanol não é um bom solvente para a extração. Portanto, para determinar a taxa de crescimento de *Eupenicillium* sp, foi desenvolvida uma metodologia de extração e análise de ergosterol total, por HPLC-UV. A Figura bb, mostra o cromatograma e o espectro de UV obtidos.



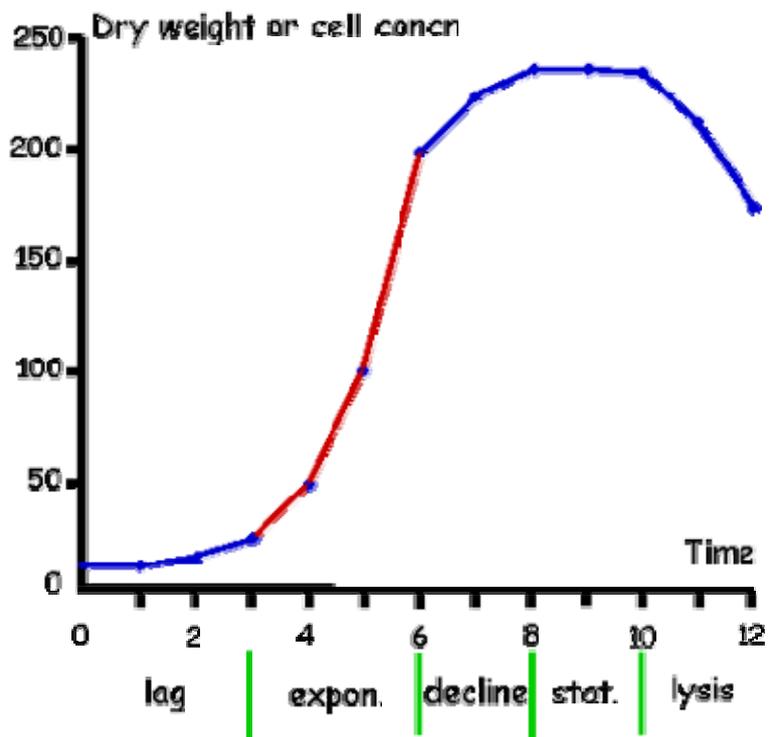
**Figura 4.30:** Estrutura do ergosterol, principal esteróide de fungos.



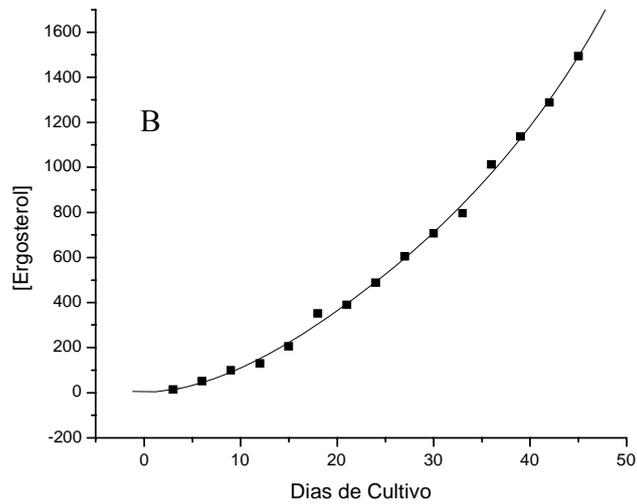
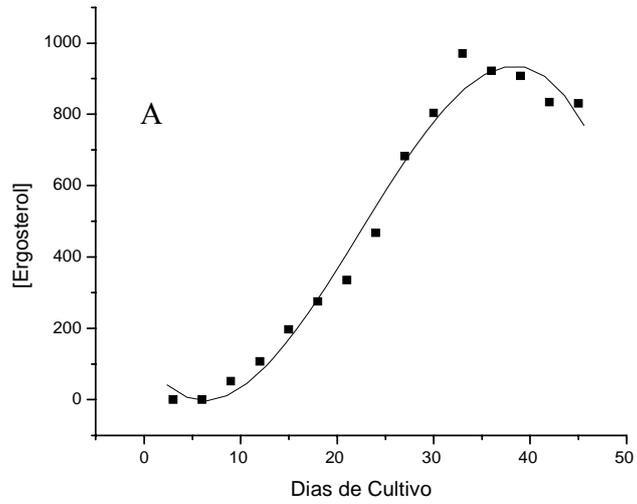
**Figura 4.31:** Cromatograma de uma amostra padrão de ergosterol detecção 275 nm



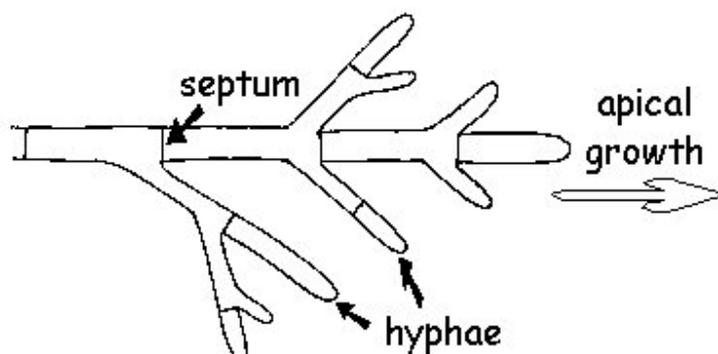
**Figura 4.32:** Espectro de UV para o ergosterol.



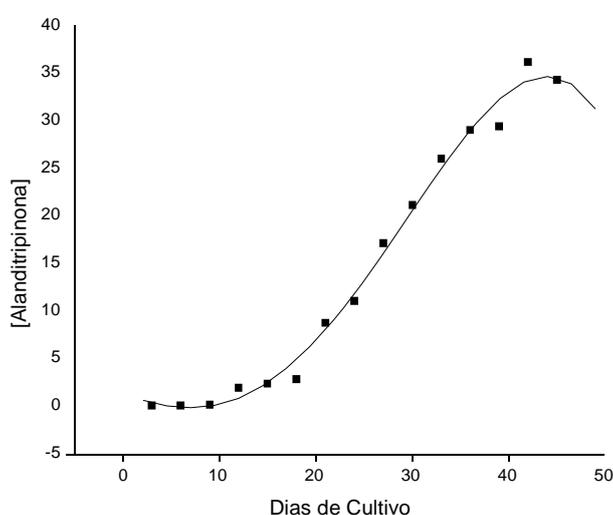
**Figura 4.26:** Perfil padrão de uma curva de crescimento para microrganismos



**Figura 4.28:** A) Curva de crescimento de *Eupenicillium* sp em meio sólido milho  
 (B) Curva de crescimento de *Eupenicillium* sp em meio sólido milho com a adição de L-Prolina.



**Figura 4.27:** Desenho esquemático de uma hifa.



**Figura 4.29:** Produção de Alanditripinona x dias de cultivo de *Eupenicillium* sp cultivado em milho com a adição de L-Prolina.

Os resultados alcançados com as curvas de crescimento, possibilitam investigar a hipótese formulada anteriormente. *Eupenicillium* sp realmente utiliza pequenos peptídeos para a produção de alcalóides espiroquinazolinicos. Para investigar esta possibilidade, foi realizado o cultivo do fungo em meio líquido Czapk's enriquecido com extratos protéicos de milho e de folhas de *M. paniculata*. Por estes experimentos pode-se observar que a produção de alcalóides foi muito menor que a esperada. Houve a produção de alcalóides, mas como se forneceu ao fungo uma quantidade de proteína concentrada. Esperava-se um incremento na produção de alcalóides. Então resolveu investigar a produção de alcalóides em

outros meios de cultura, reconhecidamente ricos em proteínas. O fungo foi cultivado em meio composto basicamente em extrato de soja, meio Czapeck's enriquecido com zeína (principal proteína isolada do milho) e glutem. O meio líquido foi mantido sob agitação durante o cultivo. Um fato que chamou muito a atenção foi o baixo crescimento do fungo no meio composto basicamente pelo extrato de soja. A massa fungica observada é bem menor que nos outros meios de cultura. Aparentemente a soja possui algum composto que inibe o crescimento de *Eupenicillium* sp. Apesar desta aparente inibição foi possível se detectar a presença de alanditripinona no meio soja. Obtemos uma produção de aproximadamente 3,6 mg/L de cultura. O fato inesperado foi a não produção de alcalóides espiroquinazolinicos nos meios contendo zeína e glutem. Se *Eupenicillium* sp, produz alcalóides a partir de peptídeos presentes no milho, espera-se que a produção de alcalóides sofra um grande incremento em meio enriquecido de proteínas do milho. Dois caminhos principais podem ser tomados para explicar este fato. O fungo não produz alcalóides a partir de peptídeos, isso seria uma resposta imediata, mas errada. Nos experimentos onde se cultivou *Eupenicillium* sp em proteínas isoladas de milho e de *Murraya paniculata*, foi detectado o alcalóide alanditripinona (4). Mas é importante ressaltar que nestes experimentos o fungo foi cultivado em meio BDA enriquecido com extratos de proteínas. Portanto, o outro caminho a ser investigado é a composição do meio Czapeck's. Algum fator do meio de cultura pode inibir a produção de alcalóides espiroquinazolinicos por *Eupenicillium* sp. Para investigar essa hipótese, recorreu-se à literatura.

Voltando um pouco, observando a classificação quimio taxonômica de fungos do gênero *Penicillium* (LARSEN, et al, 2002). Vemos os fungos do gênero *Penicillium* estão classificados em quatro grupos que possuem uma rota biosintética alternativa que utiliza ácido antranílico/glutamina e triptofano e homoprolina para a produção de alcalóides (Esquema 4.5).

Se observarmos a biosíntese do ácido antranílico, veremos que temos duas principais rotas, a que depende de  $\text{NH}_3$  e a dependente de glutamina. (ROMERO, et al, 1995).

Realizamos experimentos que nos informam quais das rotas biosintéticas o fungo *Eupenicillium* sp utiliza para a produção de alcalóides espiroquinazolinicos. Os resultados obtidos para o cultivo de *Eupenicillium* sp em meio enriquecido com glutamina e meio contendo  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . O resultado obtido foi um aumento da produção de alcalóides no meio de cultivo que contém  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e um decréscimo na produção no meio enriquecido com Glutamina. Isso pode ser interpretado de diferentes formas. A primeira e mais óbvia é que a produção de ácido antranílico por *Eupenicillium* sp é dependente de  $\text{NH}_3$ . Uma outra possibilidade é a inibição em *feedback* do ácido antranílico, devido ao excesso de glutamina no meio de cultura.

Outro fato importante a ser considerado é maior produção de alcalóides em meios a base de cereais (milho e arroz) e não produção de alcalóides em meio Czpak's enriquecido com extrato de levedura. Uma das principais enzimas envolvidas na síntese de ácido antranílico e conseqüentemente triptofano é a antranilato sintase. Esta enzima tem sido alvo de diversos estudos, tem purificado esta enzima de arroz e milho (ROMERO, et al, 1995).

Apesar da vida biológica média das proteínas (enzimas) ser curta (ex.: albumina plasmática, 20 a 25 dias), as proteínas se degradam e estruturam novamente de maneira constante nos seres vivos. O fungo *Eupenicillium* sp pode estar utilizando estas antranilato sintases presentes no milho e no arroz para a produção de alcalóides espiroquinazolinicos.

Quando as antranilato sintases participam da produção de triptofano, estas enzimas podem ser inibidas pela presença de triptofano no meio de cultura. As antranilato sintases são dependentes de Glutamina. Podemos ter o seu sítio ativo, inativados (inibido pela glutamina) ou compostos análogos a glutamina.

A inativação é aumentada pela presença de  $\text{Mg}^{2+}$  e antagonizada por glutamina. Isso pode explicar a não produção de alcalóides espiroquinazolinicos no meio Czpek's (meio de cultura), já que encontramos sais de Mg (meia grama por litro) no meio Czapck's.

O ácido corísmico também pode influenciar na produção de ácido antranílico. Um experimento importante para tentar compreender a biosíntese de

alcalóides espiroquinazolinos foi à adição de L-Prol no meio de cultura feito a base de milho. Segundo Romero, a L-prolina pode ser convertida em ácido glutâmico e posteriormente a ácido antranílico, levando no final da rota biosintética a produção de alcalóides espiroquinazolinos.

Um fato é que a produção de alcalóides espiroquinazolinos, esta relacionada a meio de cultura contendo milho. Pelos resultados dos experimentos realizados, existem fortes indícios da participação no início do processo da enzima antranilato sintase.

## 5 - Considerações finais

Muito, caminhos estão abertos para se compreender como o fungo *Eupenicillium* sp produz alcalóides espiroquinazolinos. Compreender a interação de microrganismos endofíticos com plantas superiores, tem mostrado não ser apenas de valor ecológico. Os resultados obtidos da investigação dessas interações. Estão muito além de se isolar e identificar metabólitos. Entender o porque e como estes metabólitos são produzidos, passam a ser extremamente importante para que estudos como esses, contribuam de maneira mais efetiva para uma química mais limpa e adequada às necessidades do meio ambiente. Se compreendermos a linguagem química e bioquímica que microrganismos endofíticos utilizam com seus hospedeiros, podemos produzir fármacos mais eficientes e específicos. Ou seja, a linguagem química é universal, entender os mecanismos de ataque e defesa entre os organismos, irá contribuir de maneira única para vida como um todo.

Químicos sintéticos como *Eupenicillium* sp, não são raros na natureza, devem servir de exemplo para nós que buscamos o conhecimento. Não devemos apenas utiliza-los como fonte de metabólitos de alto valor agregado. Isso seria apenas utilizar 1% do potencial que os microrganismos tem a nos oferecer. A busca do saber como *Eupenicillium* sp produz estas estruturas tão complexas apenas começou. Nos forneceu informações preciosas, mas tem muito ainda a dar. Os estudos com *Eupenicillium* sp, estão em continuidade pelo grupo do Prof Dr Edson Rodrigues Filho. Com certeza muito ainda vai ser descoberto deste microrganismo.

## 6 - Referências bibliográficas.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Entophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, **3**(1): 40-65,2000.

ALLEVI, P.; LONGO, A.; ANASTASIA, M. Synthesis of two analogues of brassinolide, possible plant growth promoting steroids. *Tetrahedron*,**55**(13): 4167-4176,1999.

BANERJI, B.; NIGAM, S. K. Wood constituents of Meliaceae: a review. *Fitoterapia*, **55**(1):3-36,1984.

BARLOW, P. W. An Introduction to Gravity Perception in Plants and Fungi -A Multiplicity of Mechanisms. *Advances in Space Research*, **17**: 69 -72, 1996.

BARROS, F. A. P. Metabólitos Secundários de *Eupenicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *M. paniculata* (RUTACEAE). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar -2002. Dissertação de Mestrado.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, **66**: 101-107, 1998.

BENNET, J. W., LASURE, L. L. Gene Manipulations in Fungi. *Academic Press*, New York, 358-401, 1985.

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

CHAMPAGNE, D. E., KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, **31**: 377 -394,1992.

CHANG, S. T., HAYES, W. A. The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms. *Academic Press*, New York, p. 819, 1978

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, **55**: 463-480, 2000.

COOKE, R., KUNTZ, I. D. Properties of Water in Biological-Systems. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. **3**: 95-126, 1974.

DAVIS, D. N.; Cole, R. J.; DORNER, J. W.; WEETE, J. D.; BACKMAN, P. A., Steroid metabolites of *Acremonium coenophialum*, an Endophyte of Tall Fescue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**: 105-108, 1986.

DONADIO, S.; STAVER, M. J.; McALPINE, J. B.; SWANSON, S.; KATZ, L. *Science*, **252**: 675, 1991.

EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M. R.; NAKAMURA, N.; TEZUKA, Y.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T. Anti-HIV and anti-HIV-1-Protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*. **49**:(6)1651-1657, 1998.

ENGLER, A. Rutaceae. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.) Die Natürlichen Pflanzenfamilien. 2.ed. Leipzig: 1931. **19**: p.187-359.

GERIS, R. M. S. *Metabolismo secundário de fungos endofíticos associados a Melia azedarach*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2003. Tese de doutorado.

GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial Enzymology*, 28 ed. Stockton Press, New York, 1996.

HART, D. J.; MAGOMEDOV, N. Synthesis of (-)-alantrypinone. *Tetrahedron Letters*, **40**: 5429-5432, 1999.

HASLAM, E. *Shickimic acid: Metabolism and Metabolites*, ed. John Wiley & Sons, New York, p. 276-289, 1993.

HASHIMOTO, T.; YAMADA, Y. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **45**: 257-285, 1994.

HAUDENSCHILD, C.; HATERMANN, M. Inhibition of sterol biosynthesis during elicitor-induced accumulation of furanocumarins in parsley cell suspension cultures. *Phytochemistry*, **40**: 1117-1124, 1995.

HEREDIA, M. L.; CUESTA, E.; AVENDAÑO, C. Nucleophilic additions to (4S)-alkylidene-2,4-dihydro-1Hpyrazino[2,1-b]quinazoline-3,6-diones. *Tetrahedron* **57**: 1987-1994, 2001.

HESSENLTINE, C. W. *Annual Review Microbiology*. **37**: 575-592, 1983.

HOLLAND, H. L. Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts. *Steroids* **64**: 178-186, 1999.

HSU, F.; TURK, J.; Structural determination of glycosphingolipids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisional-activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **12**: 61-79, 2001.

ITOIGAWA, M.; KASHIWADA, Y.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; TACHIBANA, Y.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H; Antitumor agents. 203. Carbazole alkaloid murrayaquinone A and related synthetic carbazolequinones as cytotoxic agents. *Journal of Natural Products*. **63**:(7), 893-897, 2000.

JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Natural Products, Complexity and Evolution. New York: Plenum Press, pp. 265-293, 1996.

KÖING, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H.J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Genticulol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. *Journal of Natural Products*. **62**: 155-157, 1999.

KATAYAMA, K.; KOBAYASHI, T.; OIKAWA, H.; HONMA, M.; ICHIHARA, A. Enzymatic activity nad partial purification of solanapyrone synthase: first enzyme catalyzing Diels-Alder reaction. *Biochimica et biophysica Acta*. **1384**: (2), 387-395, 1998.

LACAZ, Carlos da Silva; MINAMI, Paulo S.; PURCHIO, Adhemar. O grande mundo dos fungos. São Paulo: *Polígono*, 1970. 255 p.

LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K.;FRISVAD, J.C.; CHRISTOPHERSEN, C.; UV-guided isolation of alantrypinone, a novel *Penicillium* alkaloid. *Journal of Natural Products*. **61**: 1154-1157, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry, 28 edition, Worth Publishers, Inc., New York, 134 -198, 1993.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformation in Organic Chemistry. *Bioresource Technology*. **74**: 49-62, 2000.

LUTMAN, B. F. *Microbiology*. NewYork: McGraw Hill, 1929.

LI J. Y.; SIDHU R. S.; FORD E. J.; LONG D. M.; HESS W. M. ; STROBEL G. A.; The induction of taxol production in the endophytic fungus - *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **20**: 259-264, 1998.

MacMILLAN, J. e SUTER, P.J. *Naturwissenschaften*, **45**:(46) 1958.

MORAES, A. M. L.; BORBA, C. M.; COSTA, G. L.; RODRIGUES, K.; SARQUIS, M. I. M. Fungos: Ferramentas na Saúde Pública [www.biotechnologia.com.br/bion\\_b.htm](http://www.biotechnologia.com.br/bion_b.htm).

MIHOVILOVIC, M. D.; MÜLLER, B.; MARGARET, M. K.; STEWART, J. D.; FROHLICH, J.; STANETTY, P.; SPREITZER, H. Baeyer -Villinger oxidations of representative heterocyclic ketones by whole cells of engineered *Escherichia coli* expressing cyclohexanone monooxygenase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **11**:(4-6), 349-353, 2001.

MURGU, M. "Saponinas e Glicosídeos de *Sapindus saponaria*: Metodologias de Análise por Espectrometria de Massas e Relação com Fungos Endofíticos. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2003. Tese de doutorado.

O'SULLIVAN, J. J.; *Phytochemical and Chemotaxonomic Studies in Zanthoxylum* (RUTACEAE). Department of Food and Nutritional Sciences, University College Cork, 1984. Tesis.

PENNINGTON, T. D., STYLES, B. T. A generic monograph of Meliaceae. *Blumea*, **22**:(2), 419 -540,1975.

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

PITT, A. R. Application of electrospray mass spectrometry in biology. *Natural Product Reports*, **15**:(1) 59-72, 1998.

ROHY, J. A. Biosynthesis of taxol. *Chem.int. Ed. Engl.* **36**:(20), 2190-2194,1997.

RESING, K. A.; AHN, N. G. Applications of mass spectrometry to signal transduction *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. **71**:(3-4), 501-523, 1999.

SHREVE, R. N.; BRINK Jr, J. A. *Indústrias de Processos Químicos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 4ed. 469-472, 1977.

SIERLE, A.; e STROBET, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Natural Products*, **58**:(9), 1315-1324,1995.

SIMPSON, T. J.; Studies on fungal metabolites. Part 1. The structures of andibenins-A and -C, and andilesins-A, -B, and -C, meroterpenoids from *Aspergillus varicolor*. *Journal Chemical Society, Perkin Trans. 1*: 2118-2121,1979.

STARRATT, A. N. *Phytochemistry*. **15**: 2002-2003, 1976.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, D. Isolation of an antitumor ompound from *Agaricus blazei Murill* and its mechanism of action. *Biochemical and Molecular Action of Nutrients*, **131**: 1409-1413, 2001.

TAYLOR, O. A. H. The chemistry of limonoids from Meliaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. **45**: 1 -102, 1984.