

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

**“ANÁLISE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM  
CULTURAS DE *Pestalotiopsis* sp E *Aspergillus aculeatus*”**

**LUIS HENRIQUE RODRIGUES\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de **MESTRE EM QUÍMICA**, na área de concentração **QUÍMICA**.

**Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho**

**\*Bolsista CNPq**

**SÃO CARLOS – SP**

**2006**

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

R696am

Rodrigues, Luis Henrique.

Análise de metabólitos secundários em culturas de *Pestalotiopsis sp* e *Aspergillus aculeatus* / Luis Henrique Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar, 2007.  
93 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Produtos naturais. 2. Fungos endofíticos. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Espectrometria de massas. 5. Metabólitos secundários de fungos. 6. Cromatografia gasosa. I. Título.

CDD: 547.3 (20<sup>a</sup>)

*“Aos meus pais Joaquim e Sonia por tudo que representam para mim”*

*“A toda minha família”*

*Dedico este trabalho a Ana Paula por estar sempre ao meu lado, independente de tudo, sempre me apoiando em tudo àquilo que acreditei e acredito.*

## ***Agradecimentos***

*Primeiramente a Deus, simplesmente pela existência.*

*Ao professor Dr. Edson Rodrigues Filho pelos ensinamentos, apoio, amizade, paciência e pela oportunidade de realizar este trabalho.*

*Aos professores Dr. João Batista Fernandes e Dra. Ângela Regina Araújo pela participação na banca examinadora.*

*A todos os professores do Laboratório de Produtos Naturais (PN), CLAE, RMN e Síntese Orgânica.*

*A todos os meus amigos do laboratório de Espectrometria de Massas (Rodrigo, LF, Gezimar, Bianca, Lú, Renata, Thaís, Lívia,) e ao Afonso, Antónia e Francinete. Agradeço a Taícia pela amizade e ajuda com a impressão.*

*Agradecimentos especiais ao Rodrigo pela participação direta no trabalho, amizade e debates.*

*Aos meus amigos do PN pela colaboração e convívio diário.*

*A todos os amigos dos laboratórios CLAE, Síntese Orgânica e RMN.*

*Aos professores do DQ-UFSCar pelos ensinamentos.*

*Ao corpo técnico do DQ-UFSCar pela constante ajuda.*

*A todos que puderam contribuir para que este trabalho fosse realizado.*

*Ao CNPq pela bolsa concedida.*

*A Fapesp e Capes pelo suporte financeiro.*

## Resumo

Sesquiterpenos da classe dos cariofilenos são compostos químicos já isolados de fungos do gênero *Pestalotiopsis* no nosso grupo de estudos. No presente trabalho foram desenvolvidas metodologias de cultivo e análise de espécies de *Pestalotiopsis*, isoladas das plantas *Pinus taeda*, *Swietenia macrophylla*, e *Khaya invorenses*. Diferentes procedimentos de extração e análise desses extratos, empregando LC/MS e GC/MS, foram otimizados. Esses procedimentos visaram a detecção desses sesquiterpenos sem a necessidade de isolamento. Posteriormente foi delineada uma curva de produção desses compostos variando-se o tempo de cultivo, para posterior quantificação. A produção de compostos voláteis produzidos pelas diferentes espécies de *Pestalotiopsis*, foi avaliada usando a técnica de extração por hidrodestilação (através do extrator de Clevenger). Um sesquiterpeno cariofileno foi o principal composto identificado.

Um outro estudo dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Aspergillus aculeatus*, isolado da planta hospedeira *Melia azedarach*, foi feito tendo como alvo pré-determinado os policetídeos aromáticos diméricos como as Aurasperonas A e B, Fonsesinona A e B, Orlandina e Kotanina. Uma curva de produção desses policetídeos mostrou que os monômeros não são detectados nos tempos iniciais de cultivo, indicando uma rápida dimerização no meio ou a sua biossíntese já na forma dimerizada. Experimentos de biotransformação mostrou que o fungo possui capacidade de modificar certos substratos, quando cultivado em meios artificiais.

## Abstract

Cariophyllene sesquiterpenes are chemical compounds isolated from fungi of the *Pestalotiopsis* genus in early studies developed in our research group. In the present work, a cultivation and analysis methodology were developed for these compounds in *Pestalotiopsis*, isolated from plants *Pinus taeda*, *Swietenia macrophylla* and *Khaya invorenses*. Different procedures were optimized for the extraction and analysis of the extracts employing liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometry techniques (LC/MS and GC/MS). These studies had the intention of to detect the sesquiterpenes in fungal extracts without theirs of isolation, and to check their production profile during a fixed cultivation period. The production of volatile organic compounds by the different species of *Pestalotiospsis* was also evaluated using hydrodistillation in Clevenger apparatus. The sesquiterpene cariophyllene was the main compound identified.

Another study involving the secondary metabolites produced by *Aspergillus aculeatus*, a fungus isolated from the host plant *Melia azedarach*, was carried out. The target compounds in these studies were the dimeric aromatic poliketides Aurasperones A and B, Fonsesinones A and B, Orlandine and Kotanin. A poliketide production curve, obtained using HPLC, showed that the monomers are not detected during the early stage of development, indicating that probably the dimers are rapidly formed by the fungus or they are biosynthesized in the form already dimeric. Experiments of biotransformation showed that fungi possess capacity to modify certain substracts, when cultivated in artificial ways.

## Principais abreviações

AcOEt	-	Acetato de Etila
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	-	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas.
Dicl.	-	Diclorometano
GC/MS	-	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
Hex	-	Hexano
MeOH	-	Metanol
Rf	-	Fator de Retenção
$m/z$	-	Relação massa/carga
UV-Vis	-	Ultravioleta-Visível
L	-	Comprimento
D	-	Diâmetro

## Principais Símbolos

$M^+$	-	Pico do íon molecular
$\lambda$	-	Comprimento de onda

## Lista de Tabelas

TABELA 1	-	Comparação entre as exigências fisiológicas e nutritivas de fungos e bactérias.	7
TABELA 2	-	Curva de produção de Policetídeos por <i>Aspergillus aculeatus</i> .	32
TABELA 3	-	Composição do meio Czapek's.	33
TABELA 4	-	Parâmetros obtidos para a Kotanina	72
TABELA 5	-	Parâmetros obtidos para a Fonsesinona A	73
TABELA 6	-	Parâmetros obtidos para a Fonsesinona B	74
TABELA 7	-	Concentrações dos Policetídeos (valores em µg/Kg arroz)	74

## Lista de Figuras

FIGURA 1	-	Fungos do gênero <i>Pestalotiopsis</i> numa interação com espécie de planta. No detalhe os conídios do fungo.	4
FIGURA 2	-	Diferentes microrganismos que podem interagir endofiticamente com plantas, comparação das dimensões dos microrganismos com uma célula vegetal.	10
FIGURA 3	-	Estrutura Química do Taxol	12
FIGURA 4	-	Três sesquiterpenos cariofilenos.	13
FIGURA 5	-	Policetídeos produzidos por <i>Aspergillus aculeatus</i> .	19

FIGURA 6	-	Policetídeos produzidos por <i>Aspergillus aculeatus</i> (cont.)	20
FIGURA 7	-	Etapas para o isolamento de <i>Pestalotiopsis</i> sp do córtex de <i>Pinus taeda</i>	27
FIGURA 8	-	<i>Pestalotiopsis disseminata</i> em BDA após 7 dias.	28
FIGURA 9	-	<i>Aspergillus aculeatus</i> em BDA após 10 dias	29
FIGURA 10	-	Extrator de Clevenger	31
FIGURA 11	-	1 - $\alpha$ Naftol, 2 - $\beta$ Naftol, 3 - $\alpha$ Naftilamina e 4 – Antraquinona.	33
FIGURA 12	-	Possível sesquiterpeno detectado	55
FIGURA 13	-	Curva de Calibração para a Kotanina	71
FIGURA 14	-	Curva de Calibração para a Fonsesinona A	72
FIGURA 15	-	Curva de Calibração para a Fonsesinona B	73

## Lista de Esquemas

ESQUEMA 1	- Proposta biogenética para Aurasperona A.	18
ESQUEMA 2	- Extração para a detecção de terpenóides em culturas de <i>Pestalotiopsis disseminata</i> .	35
ESQUEMA 3	- Esquema do procedimento de extração de Policetídeos de <i>Aspergillus aculeatus</i> .	37
ESQUEMA 4	- Proposta de Fragmentação para a molécula de taedolidol.	48

## Lista de Cromatogramas

CROMATOGRAMA 1	- Teste para o método com o Gradiente A	44
CROMATOGRAMA 2	- Teste para o método com o Gradiente B	45
CROMATOGRAMA 3	- Cromatograma de Íons Totais (TIC), íon selecionado $m/z$ 281 e $m/z$ 263, do padrão taedolidol, de baixo para cima, respectivamente.	46
CROMATOGRAMA 4	- Cromatograma de Íons Totais (TIC), íon selecionado $m/z$ 281 e $m/z$ 263, para o extrato B535, de baixo para cima, respectivamente.	49
CROMATOGRAMA 5	- Extrato do fungo B53	51
CROMATOGRAMA 6	- Cromatograma GC/MS do controle e do extrato, de cima para baixo, respectivamente.	54

CROMATOGRAMA 7	- Aurasperona A	57
CROMATOGRAMA 8	- Fonsecinona A	58
CROMATOGRAMA 9	- Aurasperona B	59
CROMATOGRAMA 10	- Fonsecinona B	60
CROMATOGRAMA 11	- Kotanina	61
CROMATOGRAMA 12	- Orlandina	62
CROMATOGRAMA 13	- Tempo T0, 1º dia de cultivo.	64
CROMATOGRAMA 14	- T12, 3º dia de cultivo.	64
CROMATOGRAMA 15	- Tempo T13, 4º dia de cultivo.	65
CROMATOGRAMA 16	- Tempo T14, 5º dia e sua ampliação, de cima para baixo, respectivamente.	67
CROMATOGRAMA 17	- Extração após 25 dias de cultivo. O cromatograma e a ampliação, de cima para baixo, respectivamente.	69
CROMATOGRAMA 18	- Amostra controle	75
CROMATOGRAMA 19	- $\alpha$ Naftol	76
CROMATOGRAMA 20	- $\beta$ Naftol	77
CROMATOGRAMA 21	- $\alpha$ Naftilamina	77
CROMATOGRAMA 22	- Antraquinona	78
CROMATOGRAMA 23	- Amostra – fungo + $\alpha$ naftol – extraído com acetato de etila	79
CROMATOGRAMA 24	- Extrato $\beta$ naftol + fungo	80
CROMATOGRAMA 25	- Extrato de $\alpha$ Naftilamina + Fungo	82

**Lista de Espectros**

ESPECTRO 1	-	Espectro de Massas <i>Full Scan</i> para o sesquiterpeno taedolidol.	47
ESPECTRO 2	-	Espectro de Massas <i>Full Scan</i> para o extrato B535	50
ESPECTRO 3	-	Espectro do pico em 37.95 min.	51
ESPECTRO 4	-	Espectro do ergosterol padrão a 247 nm	52
ESPECTRO 5	-	Espectro de EI <sup>+</sup> para o pico de maior intensidade	55
ESPECTRO 6	-	Aurasperona A	57
ESPECTRO 7	-	Fonsecinona A	58
ESPECTRO 8	-	Fonsecinona B	60
ESPECTRO 9	-	Kotanina	61
ESPECTRO 10	-	Orlandina	62
ESPECTRO 11	-	Principais espectros referentes ao Cromatograma 15	66
ESPECTRO 12	-	Espectros referentes ao Cromatograma 16	68
ESPECTRO 13	-	Espectros referentes ao Cromatograma 16	70
ESPECTRO 14	-	Extrato de $\alpha$ Naftol + Fungo	80
ESPECTRO 15	-	Extrato de $\beta$ Naftol + Fungo.	81
ESPECTRO 16	-	Extrato de $\alpha$ Naftilamina + Fungo	82



## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. ASSOCIAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS	2
1.2. FUNGOS	5
1.3. IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS	7
1.4. FUNGOS ENDOFÍTICOS	8
1.5. PRODUÇÃO DE TERPENÓIDES POR <i>Pestalotiopsis</i>	11
1.6. DETECÇÃO DE TERPENÓIDES	14
1.7. O GÊNERO <i>Aspergillus</i>	16
1.8. POLICETÍDEOS PRODUZIDOS POR <i>Aspergillus aculeatus</i>	17
<b>2 – OBJETIVOS</b>	21
<b>3 – PARTE EXPERIMENTAL</b>	23
3.1. MATERIAIS	24
3.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	25
3.3. OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS	27
3.3.1. <i>Pestalotiopsis</i> sp	27
3.3.2. <i>Aspergillus aculeatus</i>	29
3.4. CULTIVO DOS MICRORGANISMOS	30
3.4.1. <i>Pestalotiopsis</i> sp	30
3.4.1.1. Detecção de Terpenóides produzidos por <i>Pestalotiopsis</i> sp.	30
3.4.1.2. Análise de substâncias voláteis produzidos por <i>Pestalotiopsis</i> sp.	30
3.4.2. <i>Aspergillus aculeatus</i>	31
3.4.2.1. Policetídeos produzidos por <i>Aspergillus aculeatus</i>	31
3.4.2.2. Biotransformação de fenóis e análogo por <i>Aspergillus aculeatus</i>	32

3.5. PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	34
3.5.1. <i>Pestalotiopsis</i> sp	34
3.5.1.1. Detecção de Terpenóides produzidos por <i>Pestalotiopsis</i> sp.	34
3.5.1.2. Análise de substâncias voláteis produzidos por <i>Pestalotiopsis</i> sp.	36
3.5.2. <i>Aspergillus aculeatus</i>	36
3.5.2.1. Policetídeos produzidos por <i>Aspergillus aculeatus</i>	36
3.5.2.2. Biotransformação de fenóis e análogos por <i>Aspergillus aculeatus</i>	38
3.6. CONDIÇÕES DE ANÁLISE	39
3.6.1. Detecção de terpenóides produzidos por <i>Pestalotiopsis disseminata</i>	39
3.6.2. Análise de substâncias voláteis produzidos por <i>Pestalotiopsis disseminata</i>	41
3.6.3. Análise de Policetídeos produzidos por <i>Aspergillus aculeatus</i>	42
3.6.4. Análise dos produtos de biotransformação por <i>Aspergillus aculeatus</i>	42
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>43</b>
4.1. DETECÇÃO DE TERPENÓIDES EM CULTURAS DE <i>Pestalotiopsis disseminata</i>	44
4.2. ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR <i>Pestalotiopsis disseminata</i>	53
4.3. PRODUÇÃO DE POLICETÍDEOS POR <i>Aspergillus aculeatus</i>	56
4.3.1. Análise dos padrões	57
4.3.2. Análise qualitativa dos extratos	63
4.3.3. Curva de Produção dos policetídeos	71
4.4. BIOTRANSFORMAÇÃO DE FENÓIS E ANÁLOGOS POR	75

*Aspergillus aculeatus.*

4.4.1. Análise do padrões	76
4.4.2. Análise do Extratos	78
<b>5 – CONCLUSÕES</b>	<b>85</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>89</b>

# **1 – INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. ASSOCIAÇÕES PLANTA-MICROORGANISMOS

As plantas e os microrganismos podem apresentar diferentes tipos de associações. Essas associações podem ser neutras, positivas ou ainda prejudiciais ou negativas. Nas associações baseadas no neutralismo, não é observado nenhum efeito em ambos os indivíduos, pois eles apresentam diferentes necessidades para o seu crescimento (PELCZAR, *et al.*, 1981; AGRIOS, *et al.*, 1988).

Um tipo de associação onde ambos os organismos são beneficiados com a interação é o mutualismo. Como exemplo de mutualismo tem os líquens, que apresentam o aspecto de ser uma única planta, mas são o resultado de uma associação simbiótica entre certas algas com fungos. O fungo adquire das algas certas substâncias necessárias a sua nutrição, como glicose e álcoois poliídricos e fornece para elas algumas propriedades de suas paredes celulares, por exemplo, a capacidade de reter água. Outro exemplo das associações mutualísticas são as associações íntimas entre as raízes de plantas e certos fungos de solo, e são caracterizados por crescimento das hifas dos fungos em raízes, formando as micorrizas. Comensalismo é um tipo de interação onde apenas um dos organismos se beneficia e o outro permanece sem ser afetado, como exemplo é a melhor captação da luz solar, no caso das orquídeas que presas nas árvores, captam melhor a luz do sol. (PELCZAR, *et al.*, 1981).

Essas associações também podem ser prejudiciais, podendo ser exemplificadas por quatro tipos de interações. A primeira é chamada de antagonismo, onde um organismo atinge de maneira adversa o ambiente do outro. Essas interações são importantes do ponto de vista metabólico pois esses organismos podem produzir substâncias como os antibióticos que inibem o desenvolvimento do outro. Esses metabólitos podem ser utilizados para fins práticos.

Quando ambas as populações são afetadas de modo negativo em relação ao crescimento e a sobrevivência, temos um tipo de relação chamada competitismo (Figura 1). Essa competição ocorre principalmente por espaço e nutrientes insuficientes para todas as populações envolvidas. Também pode ocorrer um tipo de associação chamada parasitismo, onde um organismo vive sobre ou dentro do outro e à custa desse organismo hospedeiro, sendo esse último prejudicado no processo. Como exemplo desse tipo de relação tem fungos parasitas que afetam plantas, como alguns fungos do gênero *Alternaria* que podem causar grandes perdas em *Citrus*. Quando esse tipo de relação pode levar um dos organismos a morte, temos o predatismo, que pode ser prejudicial quando o ataque é descontrolado, mas também pode ser um processo natural de controle biológico, o que mantém o equilíbrio ecológico (AGRIOS, *et al.*, 1988).

O conhecimento químico e bioquímico das relações entre plantas e microrganismos apresenta grande importância prática, pois através do conhecimento dos metabólitos envolvidos nessas interações pode-se compreender os processos bioquímicos da associação, possibilitando o controle da produtividade agrícola e também a otimização da produção desses metabólitos que podem apresentar muitas utilidades práticas, principalmente atividades biológicas, como anticâncer, antibiótica, antifúngica entre outras.

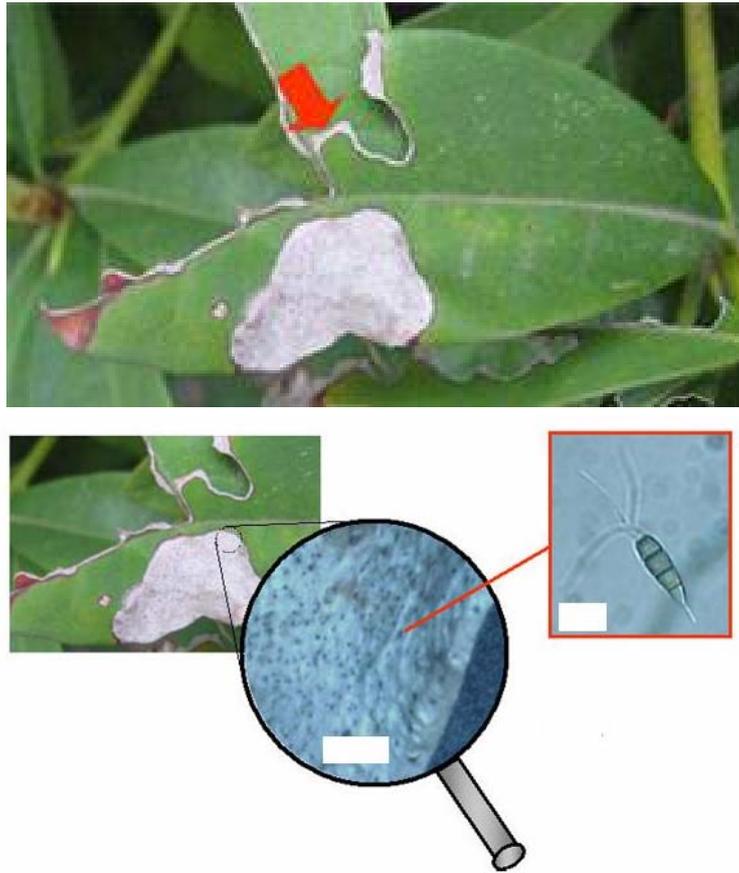


FIGURA 1 – Fungos do gênero *Pestalotiopsis* numa interação com espécie de planta. No detalhe os conídios do fungo ([www.jp-akatsuka.co.jp](http://www.jp-akatsuka.co.jp)).

## 1.2. FUNGOS

Os fungos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos, sendo a forma de nutrição mais comum a absorção (osmose ou difusão). A maioria dos fungos são filamentosos (5 a 10  $\mu\text{m}$  de dimensão transversal). Cada filamento tubular recebe o nome de hifa e o conjunto destas compõe o corpo do fungo, denominado micélio que pode ser uma rede frouxa ou um tecido compacto como nos cogumelos. Mas nem todo fungo é formado por micélios, as leveduras são organismos unicelulares (ALEXOPOULOS, 1996; PELCZAR, 1981).

Os fungos reproduzem-se naturalmente, com poucas exceções, através de esporos. Cada fragmento de um fungo é potencialmente capaz de formar um novo indivíduo. As estruturas reprodutivas são diferentes das estruturas de crescimento (somáticas), poucos fungos podem ser identificados se seus estágios reprodutivos não são disponíveis. Os fungos desenvolvem-se numa ampla faixa de temperatura, com um ótimo desenvolvimento entre 22 e 30 °C para a maioria das espécies. A grande maioria dos fungos se reproduz através de esporos, os quais podem apresentar diferentes formas e podem ser formados de duas maneiras: sexuada e assexuada (PELCZAR, 1981).

Outra característica apresentada pelos fungos é que eles são seres imóveis, mas alguns podem apresentar células reprodutivas móveis. Os fungos apresentam a parede celular constituída por quitina, exceto os fungos pertencentes ao reino Protozoa, que não apresentam parede celular e Cromista, cuja composição da parede celular é de celulose, como nas plantas.

A nutrição e crescimento dos fungos, como mencionado anteriormente, é que todos eles, sem exceção, são heterotróficos, ou seja, não produzem seu próprio alimento. Os fungos obtêm seu alimento

infectando organismos vivos, como parasitas ou simbióticos mutualistas, ou decompondo a matéria orgânica morta, como saprófitos. Outra característica importante dos fungos é que eles são capazes de se desenvolver e reproduzir em meios de cultura artificiais (ALEXOPOULOS, 1996; PELCZAR, 1981).

A disponibilidade de uma fonte de carboidrato (glicose, sacarose, maltose, etc.), permite que os fungos sintetizem suas próprias proteínas utilizando fontes de Nitrogênio inorgânico ou orgânico e sais minerais essenciais para seu crescimento. Pesquisas têm mostrado que os elementos requeridos pela maioria dos fungos são C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fé e Zn.

Os fungos são capazes de decompor e utilizar uma grande variedade de substratos, sendo extremamente eficientes na conversão dos nutrientes em material celular. Se, contudo, houver excesso de material nutritivo, diversos produtos de decomposição podem ser excretados no meio ambiente, enquanto substâncias de reserva (carboidratos e lipídeos) podem acumular-se no micélio.

Ao contrário das bactérias, os fungos preferem o meio ácido para seu crescimento, sendo que o pH ótimo encontrado para a maioria das espécies estudadas até o momento foi em torno de 5,6 como mostra a Tabela 1 (ALEXOPOULOS, 1996).

TABELA 1 – Comparação entre as exigências fisiológicas e nutritivas de fungos e bactérias.

EXIGÊNCIAS	FUNGOS	BACTÉRIAS
pH		
Limites	2 – 9	4 – 9
Ótimo	5,6	6,5 – 7,5
Temperatura		
Limites	0 – 62°C	0 – 79 °C
Ótimo	22 – 30°C	20 – 37 °C
Gases	Aeróbios estritos	Aeróbias – microaerófilas Anaeróbias facultativas Anaeróbias
Luz	Nenhuma	Alguns grupos fotossintéticos
% Carboidrato	4%	0,5 – 1%
Fonte de Carbono	Heterotrófico	Heterotrófico e autotrófico

### 1.3. IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS

Os fungos apresentam grande valor econômico em processos industriais, incluindo a produção de antibióticos e enzimas. Como exemplo da produção de enzimas por fungos temos a produção de Xilanase, uma enzima utilizada principalmente na indústria de papel, que é produzida por *Polyporus tricholoma*.(DEY *et al.*, 1994).

Também podem ser utilizados no controle de patógenos de importância agrícola, no controle de ervas daninhas e algumas espécies são comestíveis. Por outro lado eles são causadores de doenças em plantas e animais, podendo causar perdas consideráveis na agricultura. Os fungos associam-se com plantas em interações benéficas, como as micorrizas, que correspondem às associações entre raízes de plantas e fungos. As associações micorrízicas são importantes para a planta em termos de obtenção de fósforo e outros nutrientes, através das hifas dos fungos. Essas associações podem até proteger as raízes do ataque de patógenos. O fungo

se beneficia pelo fornecimento de carbono orgânico. Os fungos são extremamente diversos podendo estar presentes em substratos orgânicos e inorgânicos. Por isso eles possuem a habilidade de produzir uma variedade de enzimas, toxinas e grandes e diversas classes de metabólitos secundários (RAVEN, EVERT e EICHHORN, 1992). Os exemplos citados não esgotam nem de longe o potencial que os fungos apresentam em biotecnologia. A visão que se pretendeu dar por meio dos exemplos selecionados foi de que a genética, o melhoramento genético e a biotecnologia em fungos, embora já tenham produzido resultados realmente assombrosos, como no caso do melhoramento para produção de antibióticos, ainda têm muito mais a oferecer. É evidente que, no Brasil, um número maior de micologistas, geneticistas de fungos e biólogos moleculares tem que existir para conseguir estudar não só as espécies já conhecidas como também toda a biodiversidade ainda inexplorada no grande reino dos fungos (BINSFELD, 2000).

#### **1.4. FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Fungos endofíticos são aqueles que habitam os tecidos internos dos seus hospedeiros em pelo menos uma etapa de seu ciclo de vida, sem lhes causar sintoma aparente (Figura 2).

Estas interações parecem ser benéficas para ambos os organismos, pois na maioria das plantas habitam espécies endofíticas em praticamente todos os seus órgãos. Nem endófitos, nem epifíticos apresentam haustórios, estrutura comum em fungos patogênicos (PETRINI, 1992).

Em geral as infecções por fungos endofíticos não apresentam sintomas aparentes, podendo estar latentes ou serem assintomáticos. A infecção por endófitos ocorre através das raízes, estômatos ou através de

lesões. Esses fungos podem ser passados para as plantas filhas através da infecção das sementes. Além de fungos, existem bactérias e leveduras endofíticas (FERNANDES & PRICE, 1992, PRESZLER *et al.*,1996).

Fisiologicamente, assume-se que fungos endofíticos utilizam as mesmas armas de um patógeno para penetrar no hospedeiro e que a planta por sua vez responde a esta invasão com suas armas de defesa e de reconhecimento, tornando as infecções endofíticas geralmente localizadas ou seja, o fungo desenvolve-se no local da inoculação, atingindo raramente outras partes da planta. No entanto, existem poucos estudos realizados sobre a fisiologia de interações planta-endofíticos referentes a métodos de penetração, produção de enzimas e fitoormônios (PETRINI, 1996; BACON e HILL citados por SCHULZ *et al.*, 1992).

Um outro aspecto extremamente importante dos fungos endofíticos são os metabólitos secundários produzidos durante a associação. Ultimamente têm se destacado muito as pesquisas com microrganismos na área de produtos naturais, para se entender a fundo as interações entre estes e as plantas e também na busca de novas fontes de produtos naturais, pois esses microrganismos podem produzir uma grande variedade de metabólitos de interesse na agricultura e indústria farmacêutica. Como exemplos desses metabólitos, temos sesquiterpenos, meroterpenos, alcalóides, policetídeos, esteróides, cumarinas e outras classes (PASCHOLATI *et al.*, 1998).

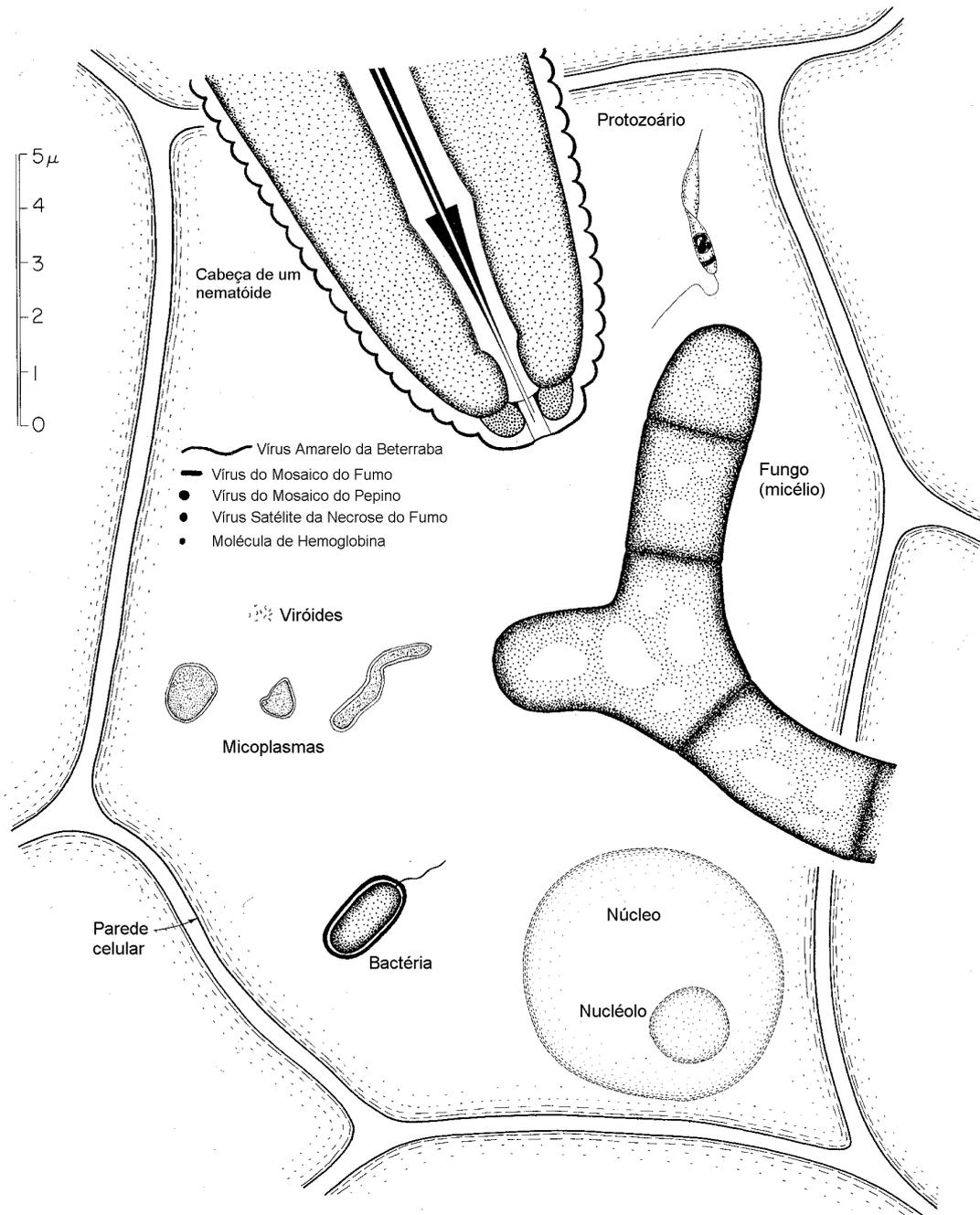


FIGURA 2 – Diferentes microrganismos que podem interagir endofiticamente com plantas, comparação das dimensões dos microrganismos com uma célula vegetal (adaptado de AGRIOS, 1988).

## 1.5 – PRODUÇÃO DE TERPENÓIDES POR *Pestalotiopsis*

Fungos do gênero *Pestalotiopsis* são comumente encontrados como parasitas ou endofíticos de plantas, são pertencentes a classe dos Ascomicetos e em geral a identificação das espécies é muito difícil, devido a similaridade dos conídios. Fungos desse gênero têm sido alvo de estudo nos últimos anos, por serem bons produtores de metabólitos secundários com potencial atividade biológica, principalmente terpenóides, como sesquiterpenos, e também compostos da classe do taxanos.

O Taxol, cujo nome comercial é paclitaxel, é um diterpeno polifuncionalizado que apresenta atividade anticâncer (Figura 3).

Esse composto foi primeiramente isolado, há mais de 34 anos, da planta *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971). Em 1993 STIERLE e STROBEL verificaram a produção de Taxol por fungos da espécie *Taxomices andrenae*, isolados de *Taxus brevifolia*. Em 1997 STROBEL et al. também verificaram a produção de taxol por *Pestalotiopsis guepinii*, isolados de *Taxus wollemi* uma araucária de ocorrência canadense. Como essa espécie de pinho não produzia taxol, isso evidencia que o fungo pode ter adquirido a habilidade de produzir o taxol habitando uma planta produtora. Neste mesmo trabalho verificaram-se por microscopia eletrônica que os esporos do fungo estavam presentes nas penas de uma espécie de pássaro que vive na araucária, evidenciando que o fungo interage fortemente com as superfícies hidrofóbicas da planta e também com os pássaros que nela habitam.

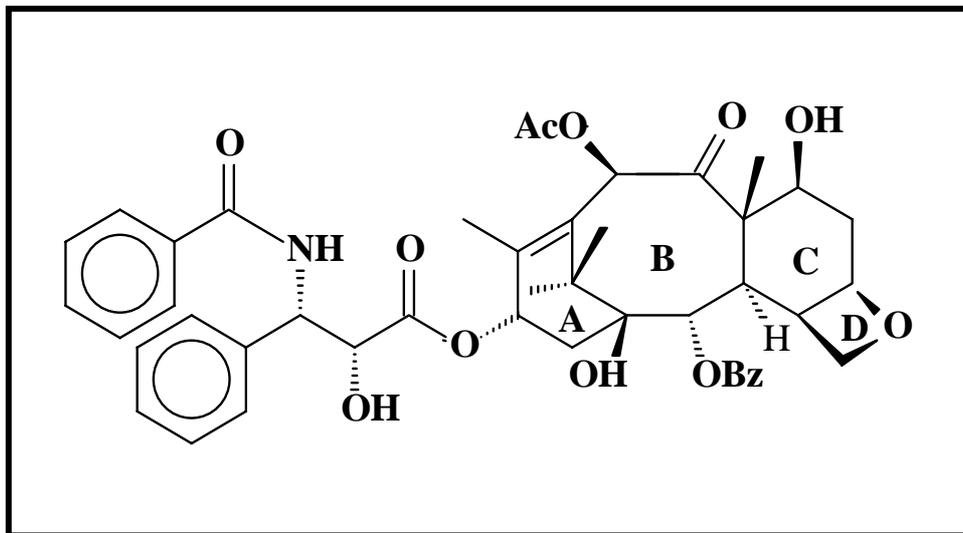


FIGURA 3 - Estrutura Química do Taxol

A produção de taxol por microorganismos ainda é questionada por muitos pesquisadores. Um dos argumentos usados nesse questionamento é que o taxol é o único diterpeno taxano obtido das culturas dos microorganismos testados. Nos organismos vivos, as vias de biossíntese de metabólitos secundários, em geral levam à produção de vários membros de uma classe de substâncias e não a um único representante de uma classe. Até o momento, só foram feitos estudos visando a detecção específica de taxol em culturas de microorganismos, sem a preocupação de analisar seus análogos biossintéticos.

O taxol possui um esqueleto terpênico. A produção de determinados terpenoídes por espécies de *Pestalotiopsis* pode ser um possível marcador das espécies produtoras de Taxol. Em 1997 PULIC *et al.* estudaram os metabólitos secundários produzidos por espécies de *Pestalotiopsis* sp. obtidos de *Taxus brevifolia* e verificaram a produção de sesquiterpenos cariofilenos altamente funcionalizados. Esses cariofilenos apresentaram atividade imunossupressora. Aparentemente, há uma correlação entre presença dos sesquiterpenos cariofilenos e a ocorrência de taxol em espécies de *Pestalotiopsis*.

Em 2003 MAGNANI *et al.* também verificaram a produção, isolamento e identificação de três novos sesquiterpenos cariofilenos (ver estrutura abaixo por espécies de *Pestalotiopsis disseminata* isolados de *Pinus taeda*. Esses sesquiterpenos possuíam atividade imunossupressora e sua estrutura bem oxidada e os compostos foram nomeados Pestalotiopsolide A, Taedolidol e 6-epitaedolidol (Figura 4).

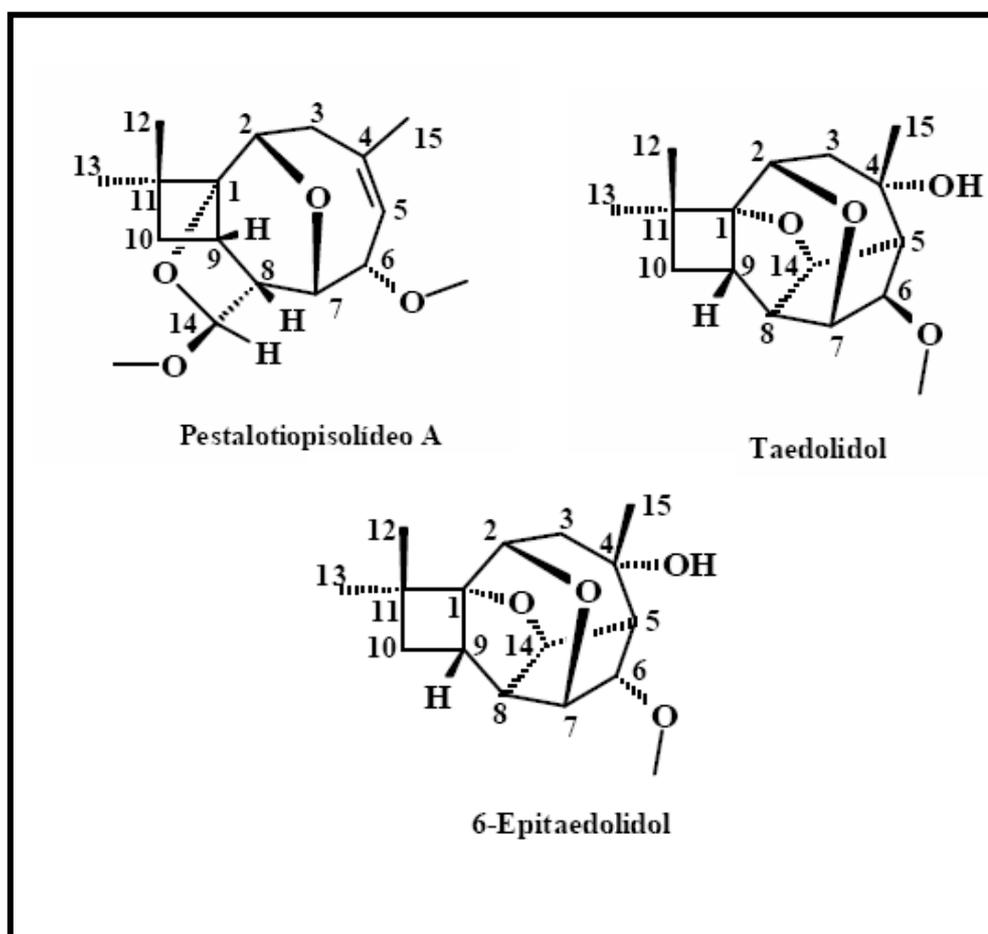


FIGURA 4 - Três sesquiterpenos cariofilenos isolados e identificados (MAGNANI *et al.*, 2003).

## 1.6 – DETECÇÃO DE TERPENÓIDES

Os métodos mais empregados atualmente para a análise de terpenóides são Cromatografia Líquida (HPLC) e RMN. Porém, a Cromatografia Gasosa (GC) também têm se destacado e é grande o número de trabalhos que utilizam essa técnica na análise de sesquiterpenos, diterpenos, monoterpenos. Também é grande o número de trabalhos que utilizam GC/MS na análise de metabólitos secundários produzidos por fungos. Neste trabalho será estudada a produção de sesquiterpenos por espécies de *Pestalotiopsis* sp e sua detecção será feita por técnicas de LC/MS (para os compostos fixos) e GC/MS (para os compostos voláteis).

As substâncias voláteis produzidas por fungos têm sido bastante estudadas devido a grandes aplicações que essas substâncias apresentam, como marcadores taxonômicos, aromatizantes, subprodutos de fermentação, como CO<sub>2</sub> e etanol. Como exemplo temos a ampla fabricação de bebidas etanólicas onde se utilizam leveduras e fungos para fermentação (STROBEL *et al.*, 2002).

A análise de substâncias voláteis é feita principalmente por Cromatografia Gasosa, onde a amostra é volatilizada no injetor e separada na coluna, sendo um pré-requisito justamente a volatilidade do analito, ou seja os compostos devem apresentar baixo ponto de ebulição (SKOOG *et al.*, 1992).

As técnicas acopladas de GC/MS hoje são amplamente utilizadas para a detecção e elucidação estrutural de compostos voláteis, possuindo amplas bibliotecas de espectros de massas onde os analitos podem ser comparados e possivelmente identificados. Em GC/MS a fonte de ionização mais utilizada é a de impacto eletrônico. Nesta técnica a amostra proveniente do GC já se encontra vaporizada e é inserida na câmara de ionização onde é bombardeada por um feixe de elétrons de alta energia que

quebram as ligações dos analitos, fragmentando-os e esses fragmentos são focalizados para um setor de análise que separa-os de acordo com sua relação  $m/z$ . (SKOOG *et al.*, 1992).

Os estudos envolvendo metabólitos voláteis de fungos empregam-se, na maioria dos artigos verificados, as extrações por Micro Extração em Fase Sólida (SPME), onde fibras recobertas por material polimérico são colocadas em contato com os compostos voláteis e por processos de adsorção, os analitos ficam aderidos na fibra e logo após são desorvidos no injetor do GC. Essa técnica apresenta a vantagem de ser altamente seletiva. Outras técnicas de extração de voláteis também têm sido empregadas, como a Hidrodestilação: nesta técnica, através de um extrator de Clevenger acoplado a um condensador, os voláteis são separados e posteriormente analisados por GC. Há também como técnicas de extração a destilação a vapor e extração com fluido supercrítico. Neste trabalho serão utilizadas as duas primeiras técnicas, visando a detecção e identificação de terpenóides voláteis, principalmente cariofilenos e taxóides pouco funcionalizados (STROBEL *et al.*, 1995).

## 1.7 - O GÊNERO *Aspergillus*

Fungos do gênero *Aspergillus* ocorrem em uma variedade de *habitats*, embora sejam comuns como saprófitos de solos, alimentos e outros produtos estocados e vegetação em decomposição. No entanto algumas espécies parasitam insetos, plantas e animais, inclusive o homem. Algumas espécies também têm bastante utilidade na fabricação de alimentos fermentados, como fonte de enzimas das quais a Alfa-Amilase e a Alfa-Galactosidase. Por outro lado, algumas espécies produzem poderosas toxinas que afetam e provocam grandes perdas na agricultura e em alimentos (TEIXEIRA *et al.*, 1994; BUCHI *et al.*, 1971).

Uma grande variedade de micotoxinas tem sido isolada de espécies de *Aspergillus* e essas micotoxinas apresentam uma grande diversidade estrutural e pertencem a grupos químicos bastante diversificados bem como seus efeitos tóxicos. Mas nem todos os metabólitos que os fungos desse gênero produzem são micotoxinas. Uma grande parte dessas substâncias apresenta atividade antibiótica, antifúngica e inseticida.

Dentre os metabólitos produzidos por *Aspergillus* já identificados destacam-se alcalóides indólicos, policetídeos, dicetopiperazinas, terpenos, meroterpenos, entre outros.

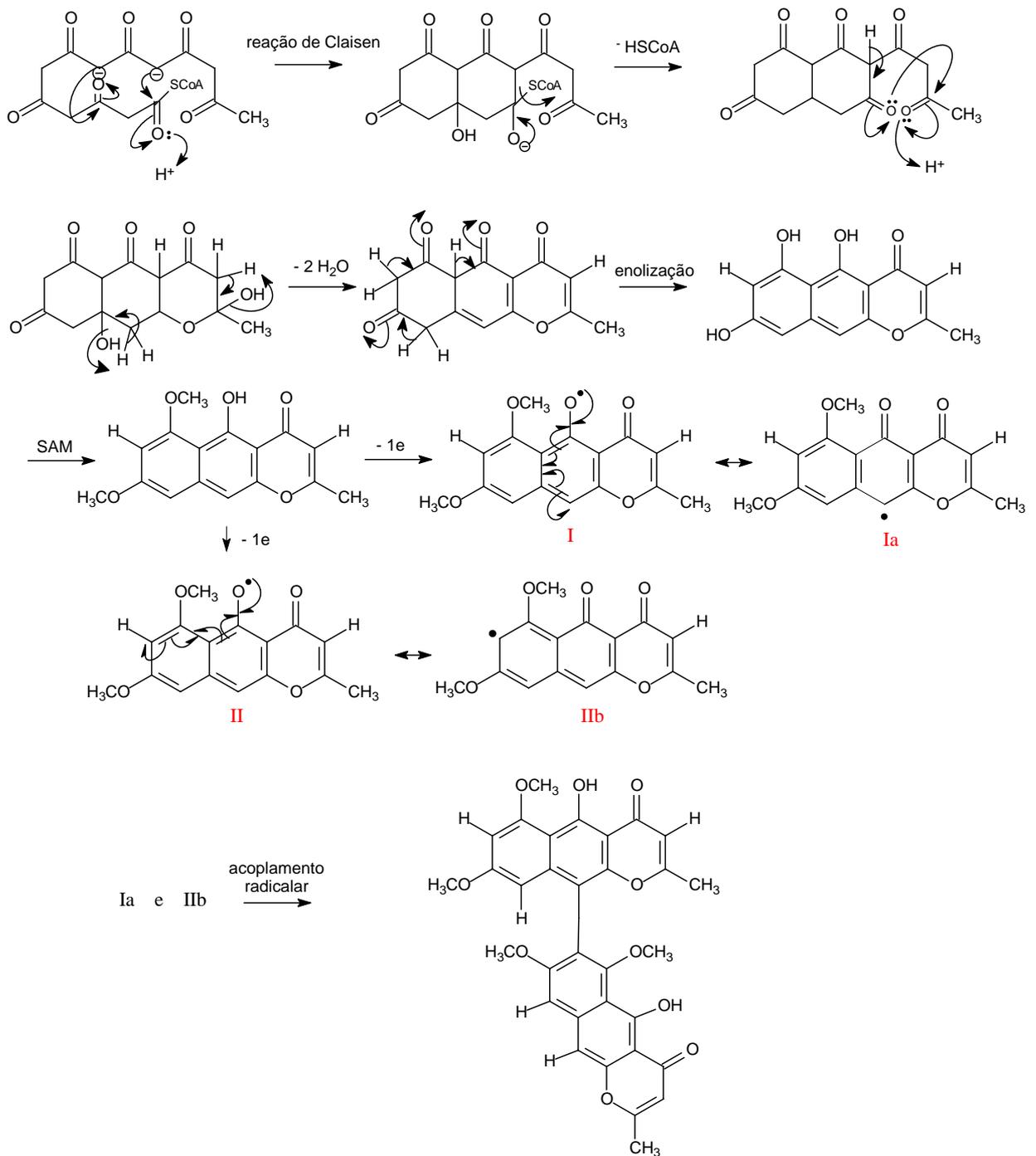
## 1.8. – POLICETÍDEOS PRODUZIDOS POR *Aspergillus aculeatus*

Através de estudos da interação de plantas da família *Meliaceae* com microrganismos endofíticos, a espécie *Aspergillus aculeatus* foi isolado das folhas de *Melia azedarach* e depositado na Micoteca do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (SANTOS *et al.*, 2003).

Essa espécie vem mostrando ser uma fonte muito rica de metabólitos secundários. Através do estudo químico dessa espécie cultivada em diferentes meio de cultura (arroz, trigo e meio líquido), foram isolados policetídeos que se encontravam na forma de dímeros como a Aurasperona A, Aurasperona B, Fonsecinona A, Fonsecinona B, Orlandina e Kotanina (Figura 5 e 6) (CAMPOS *et al.*, 2004). Os policetídeos apresentam atividades antibiótica e anticâncer.

Uma curva de produção desses policetídeos *versus* tempo de cultivo mostrou que os policetídeos diméricos atingem um máximo de concentração aos c.a. 25 dias. No entanto, de maneira surpreendente, não foram detectados os monômeros no meio de cultura na fase inicial de crescimento do microorganismo. Conforme o esquema de origem biossintética (Esquema 1) para esses compostos, os dímeros são formados via acoplamento radicalar de duas unidades policetídicadas menores. Em algum momento, essas unidades deveriam estar presentes no meio de cultura (CAMPOS *et al.*, 2003).

Neste trabalho, o fungo foi cultivado em arroz e extraído em intervalos de tempo menores que aqueles realizados em trabalhos anteriores (CAMPOS *et al.*, 2003).



ESQUEMA 1: Proposta biogénica para aurasperona A.

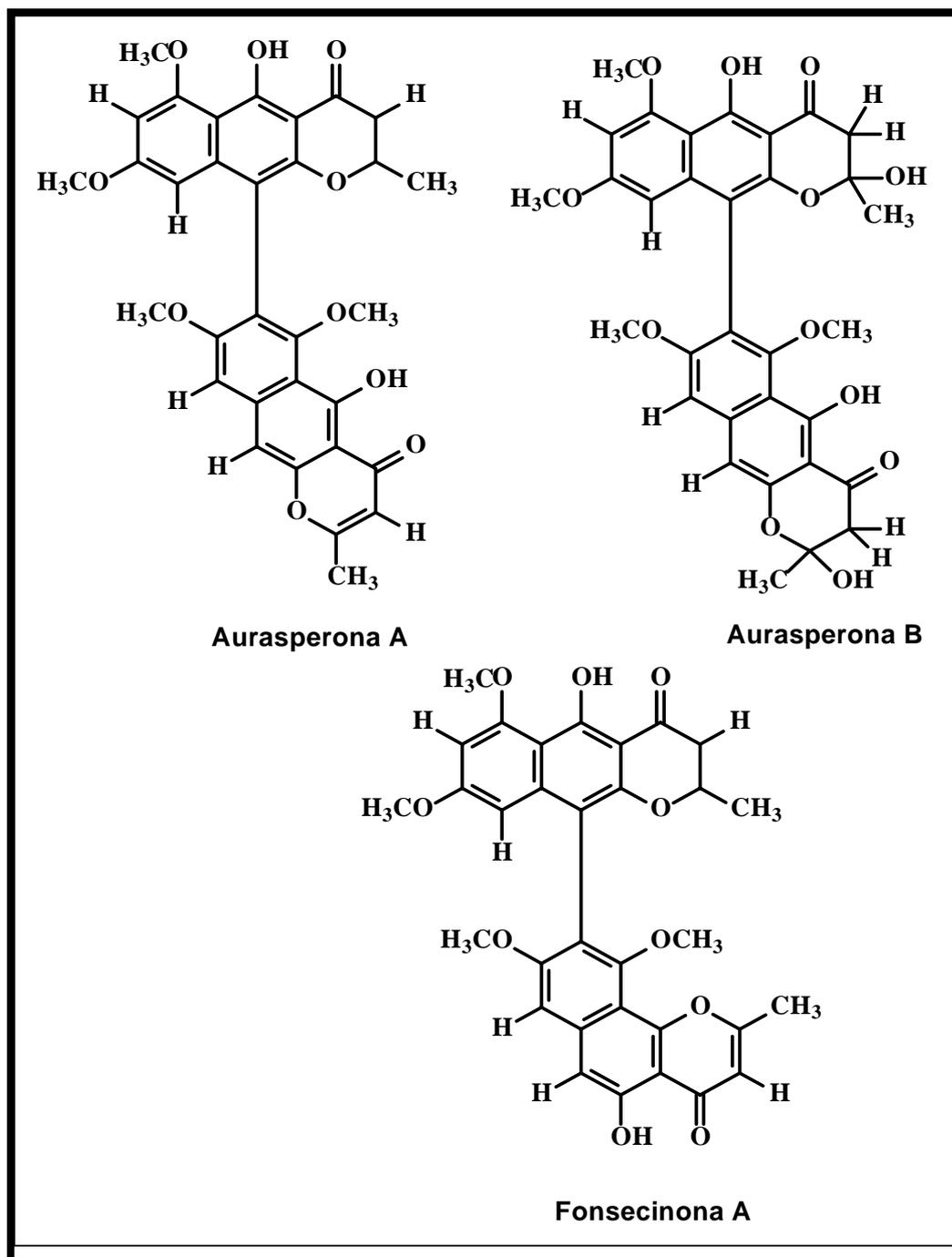


FIGURA 5 – Policetídeos produzidos por *Aspergillus aculeatus*

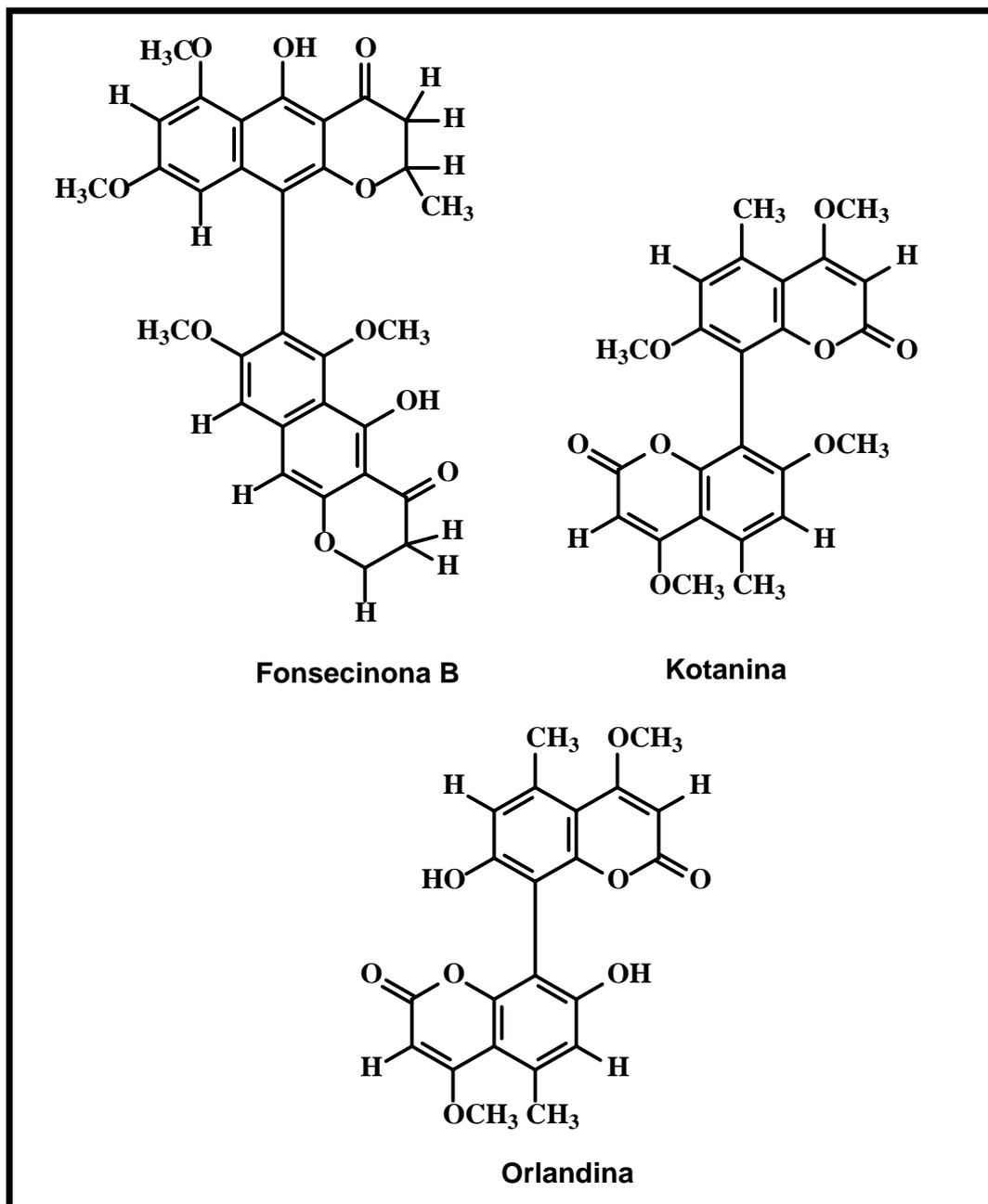


FIGURA 6 – (CONTINUAÇÃO) Policetídeos produzidos por *Aspergillus aculeatus*

## **2 – OBJETIVOS**

---

Os objetivos deste trabalho foram estudar a produção de terpenóides por espécies de *Pestalotiopsis* e analisar a produção de policetídeos por *Aspergillus aculeatus*. No caso dos terpenóides de *Pestalotiopsis*, os compostos foram investigados em extratos de compostos fixos apolares, visando encontrar terpenóides esterificados, esteróides e compostos voláteis. Diferentes linhagens de *Pestalotiopsis*, isoladas de diferentes plantas, sendo que as duas principais são o endofítico isolado de *Pinus taeda* e outro de *Khaya invorensis*. A técnica de análise empregada para os metabólitos mais polares foi Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC/MS) com Ionização a Pressão Atmosférica (APCI) e para análise dos compostos voláteis empregou-se a Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS).

Para o estudo com *Aspergillus aculeatus*, cultivou-se o fungo em arroz por diferentes tempos (curva de produção) para detectar e quantificar a produção de policetídeos dímeros pelo fungo, bem como a tentativa de detectar os monômeros produzidos na fase inicial do desenvolvimento do microrganismo. Também foram realizados experimentos de biotransformação de fenóis e análogos pelo *Aspergillus aculeatus*, para verificar a capacidade de transformação de certas substâncias pelo fungo, mostrando se o fungo pode ou não estar transformando os monômeros em polímeros nas fases iniciais do seu desenvolvimento.

Nos experimentos com *Aspergillus aculeatus* utilizou-se como técnica de análise a Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).

## **3 – PARTE EXPERIMENTAL**

---

### **3.1 – MATERIAIS**

#### **a) Suportes para cromatografia:**

- Sílica gel 70 – 230 mesh (Sílica comum), para cromatografia em coluna (Funil de placa Sinterizada).

#### **b) Eluentes para cromatografia:**

- Foram utilizados solventes comerciais, destilados no DQ-UFSCar.
- Em alguns casos foram usados solventes PA da Merck, Synth, Vetex, Reagen e outros.
- Solventes de grau HPLC Merck, Aldrich, e outros foram utilizados nas análises de HPLC, GC/MS e HPLC/MS.

#### **c) Meios de cultura utilizados para o cultivo dos fungos *Pestalotiopsis disseminata* e *Aspergillus aculeatus*:**

Para o cultivo dos fungos, empregou-se Ágar, Batata, Dextrose (BDA) e meio de cultura sólidos arroz parbolizado (*Uncle ben's*).

## **3.2 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS**

### **a) Rotoevaporadores**

- Evaporador Rotativo TECNAL (TE 120)
- Rotavapor Büchi 461 – Water Bath (EL 131)

### **b) Cromatógrafo a gás:**

- Fisons GC 8000 series

### **c) Coluna para GC:**

- J & W Scientific DB 35MS L = 30 m, I.D = 0, 25 mm, Film = 0,15  $\mu$ m

### **d) Cromatógrafo Líquido**

- Bomba Shimadzu LC-10A, Auto injetor Shimadzu SIL-10AD, Detector *diode array* (DAD) Shimadzu-M10A.

### **e) Coluna para HPLC**

- Sinergi Fusion C<sub>18</sub> 250 x 4.6 mm e 4  $\mu$ m

### **d) Espectrômetro de Massas**

- VG Plataform II para os experimentos de IE, GC/MS
- MICROMASS Quattro LC para os experimentos de LC/MS

**e) Estufa de secagem e esterilização**

- FANEN – 315 SE

**f) Balança analítica**

- Mettler P163

**g) Câmara de fluxo laminar**

- Veco VL FS – 12M

**h) Estufa incubadora**

- FANEM 347 CD

**i) Autoclave vertical**

- Phoenix AV 75

### 3.3 – OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

#### 3.3.1 – *Pestalotiopsis* sp

O fungo *Pestalotiopsis* sp foi isolado do córtex do tronco de *Pinus taeda*. (MAGNANI *et al.*, 2003). O córtex foi isolado das plantas encontradas no Bosque do Departamento de Química da UFSCar. Em seguida, esterilizado de acordo com os procedimentos descritos na literatura (ISAAC, 1992; PETRINI, 1992 & SCHULZ, 1998).

Após isso o isolamento do fungo foi feito como descrito na Figura 5 e cultivado em meio Batata, Agar e Dextrose (BDA). O fungo também foi identificado por microscopia eletrônica *como Pestalotiopsis disseminata* e codificado como B5-3 (FIGURAS 7 e 8).

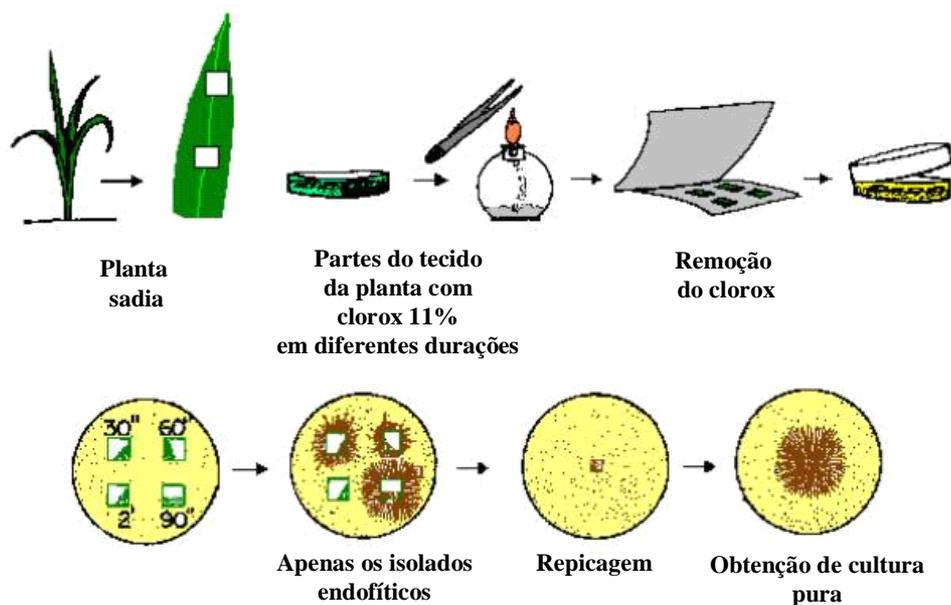


FIGURA 7 – Etapas para o isolamento de *Pestalotiopsis disseminata* do córtex de *Pinus taeda* (MAGNANI *et al.*, 2003).

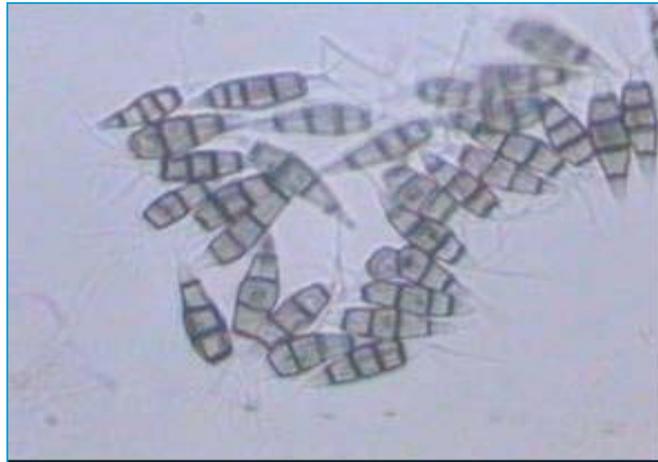


FIGURA 8 – *Pestalotiopsis disseminata* em BDA após 7 dias (acima e o detalhe dos conídios abaixo).

### 3.3.2 – *Aspergillus aculeatus*

O fungo endofítico *A. aculeatus* foi obtido da micoteca do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UFSCar, onde se encontra conservado sob o código LaBioMi 001 (SANTOS *et al.*, 2003). O fungo foi inoculado em BDA e cultivado por sete dias a 25°C (Figura 9).



FIGURA 9 – *Aspergillus aculeatus* em BDA após 10 dias

## **3.4 - CULTIVO DOS MICRORGANISMOS**

### **3.4.1 – *Pestalotiopsis disseminata***

#### **3.4.1.1 - Detecção de Terpenóides produzidos por *Pestalotiopsis disseminata*.**

Para os experimentos de detecção de terpenóides, o fungo foi cultivado em arroz parbolizado (*uncle ben's*) após sete dias de cultivo em BDA. Utilizou-se 50 g de arroz e 42 mL de água destilada em frascos erlenmeyers de 250 mL. Após esterilização do meio (autoclavagem a 120°C e 1 atm por duas vezes em um intervalo de 24 horas), foram inoculados três fragmentos do BDA com o fungo e o sistema foi incubado sob proteção da luz por 20 dias a 25°C.

Neste experimento empregou-se 10 frascos para cultivo, sendo um deles sem a inoculação, para controle. Esta espécie foi identificada como *Pestalotiopsis disseminata* e codificada como B5-3.

#### **3.4.1.2 – Produção de compostos voláteis produzidos por *Pestalotiopsis disseminata*.**

Os experimentos de análise de voláteis foi feito utilizando-se um balão de duas bocas, de 2000 mL e um extrator de Clevenger como mostrado na Figura 10. Ao balão, adicionou-se 270 g de arroz parbolizado (*uncle ben's*) e 225 mL de água destilada. O sistema foi autoclavado a 120°C e 1 atm duas vezes em um intervalo de 24 horas. Após isso, inoculou-se fragmentos de BDA contendo o fungo e incubou-se o sistema sob abrigo da luz por 20 dias.

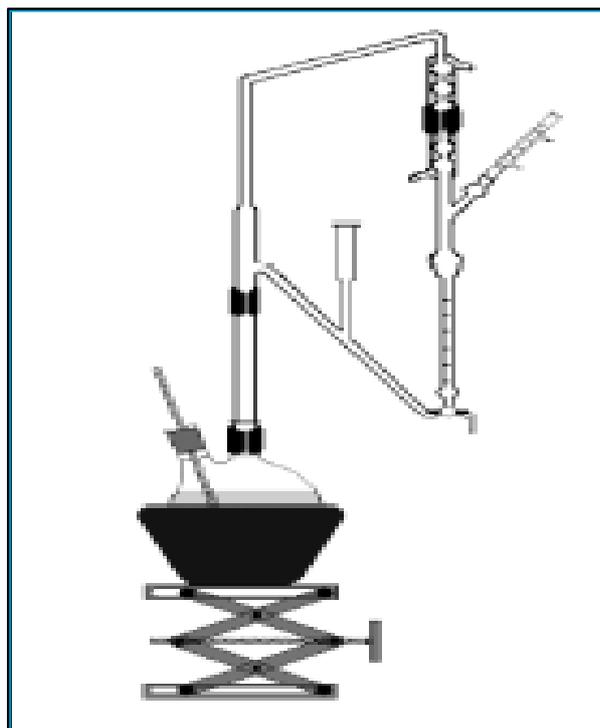


FIGURA 10 – Extrator de Clevenger ([www.oleosessenciais.com.br](http://www.oleosessenciais.com.br)).

### 3.4.2 – *Aspergillus aculeatus*

#### 3.4.2.1 – Produção de Policetídeos produzidos por *Aspergillus aculeatus*

Neste caso o objetivo foi obter uma curva de produção dos policetídeos produzidos, empregando-se tempos de extração diferentes daqueles empregados em experimentos anteriores (CAMPOS *et al.*, 2003). Anteriormente empregaram-se tempos de extração que variavam de 5 a 20 dias, e neste experimento foi empregado tempos de extração que variou de 0 a 7 dias. O fungo *Aspergillus aculeatus* foi cultivado em arroz parbolizado (*uncle ben's*) contendo 50 g de arroz e 42 mL de água destilada, O sistema foi autoclavado duas vezes a 120°C e 1 atm em intervalo de 24 horas. Após isso, fragmentos do BDA contendo o fungo foram inoculados no sistema e incubou-se. As extrações ocorriam nos horários indicados na Tabela 2. O experimento foi realizado em triplicata.

TABELA 2– Curva de produção de Policetídeos por *Aspergillus aculeatus*.

1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia	25° dia
8 : 30	8 : 30	8 : 30	8 : 30	8 : 30	8 : 30	8 : 30	8 : 30
11 : 30	14 : 30	18 : 30	18 : 30	18 : 30			
14 : 30	20 : 30						
18 : 30							
22 : 30							

### 3.4.2.2 – Biotransformação de fenóis e análogos por *Aspergillus aculeatus*

Para o cultivo do fungo utilizou-se o meio Czapek's contendo 2% de extrato de levedura. (TABELA 3). Todos os componentes foram dissolvidos em 100 mL e distribuídos em 15 frascos de Erlenmeyers (250 mL). Adicionou-se os padrões  $\alpha$ -Naftol,  $\alpha$ -Naftilamina,  $\beta$ -Naftol e Antraquinona (Figura 11) nos frascos e autoclavou-se todos os frascos a 120°C e 1 atm por 15 minutos. Após o sistema esfriar completamente, inoculou-se 5 fragmentos do BDA contendo o fungo em cada frasco. Após isso o sistema foi colocado sob agitação em mesa agitadora a 120 rpm por 18 dias.

TABELA 3 - Composição do meio Czapek's

Componente	Quantidade (g)
Dextrose	15
NaNO <sub>3</sub>	3
MgSO <sub>4</sub>	0,75
KCl	0,75
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
FeSO <sub>4</sub>	0,015
H <sub>2</sub> O	1,5 L
Extrato de Levedura	30

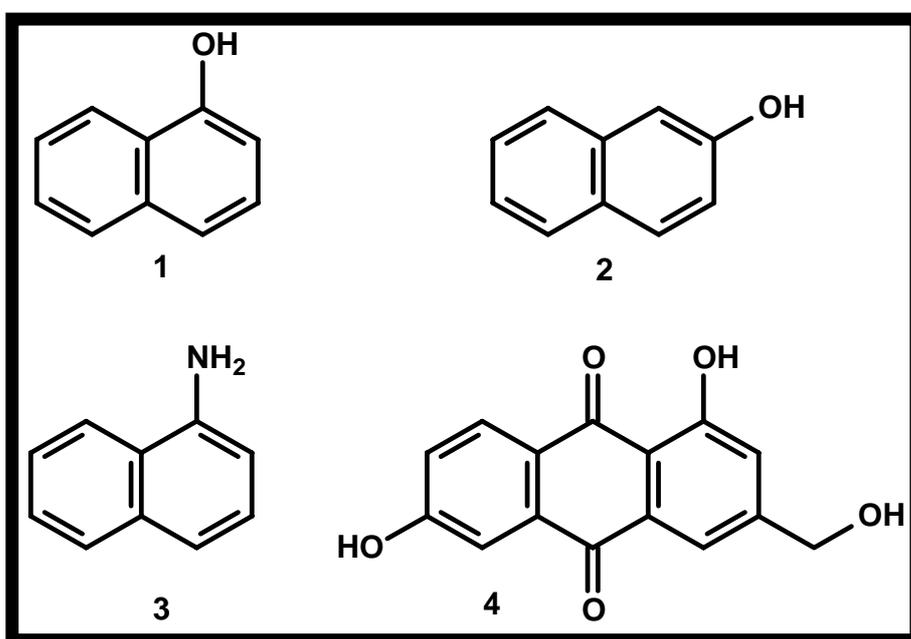


FIGURA 11 – 1 - α Naftol 2 - β Naftol 3 - α Naftilamina 4 - Antraquinona

## 3.5 – PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

### 3.5.1 – *Pestalotiopsis disseminata*

#### 3.5.1.1 - Produção de Terpenóides por *Pestalotiopsis disseminata*

Após interrupção do crescimento do fungo, adicionou-se 200 mL de metanol aos frascos e extraiu-se por 3 horas. Após isso o sistema foi moído no triturador e filtrado. Com o filtrado, foi feita concentração em rotoevaporador.

Em seguida a amostra foi fracionada em funil de placa sinterizada, empregando sílica comum como fase estacionária. As características da coluna e do sistema sistema cromatográfico foram:

L = 60 cm

D = 5 cm

m (sílica) = 257,4 g

V total (eluente) = 1000 mL

Sistema de Eluentes empregado:

1 – Hexano 100%

2 – Dicloro/Hexano 1:1

3 – Dicloro/Hexano 7:3

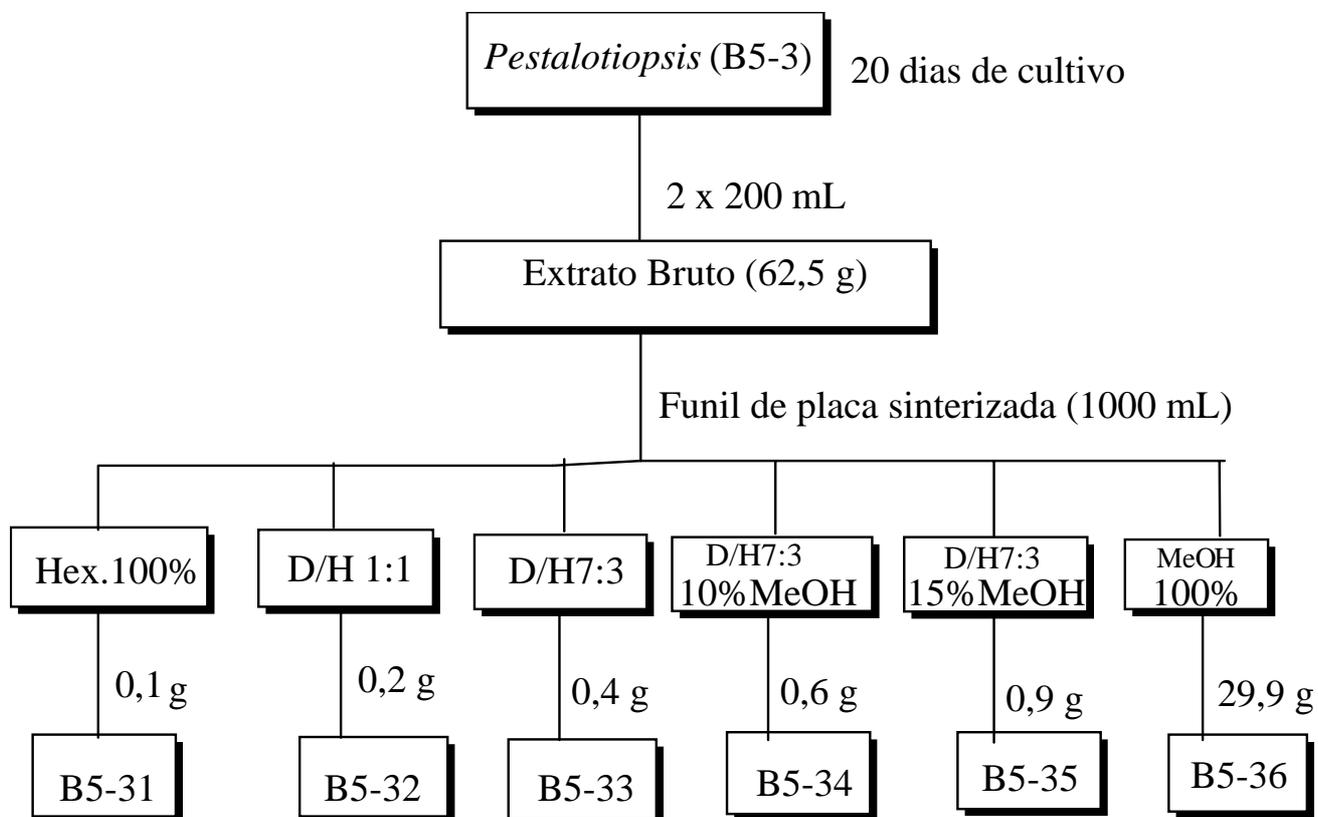
4 – Dicloro/ Hexano 7:3 + 10% MeOH

5 – Dicloro/Hexano 7:3 + 15% de MeOH

6 – Metanol 100%

Após 20 dias de cultivo e 2 extrações de 200 mL com Metanol, fracionou-se o sistema em Coluna com Funil de placa sinterizada

e volume de eluente de 1000 mL. O Esquema 2 simplifica as etapas de extração e fracionamento.



ESQUEMA 2 – Extração para a detecção de terpenóides em culturas de *Pestalotiopsis disseminata*

### **3.5.1.2 – Análise de substâncias voláteis produzidos por *Pestalotiopsis disseminata***

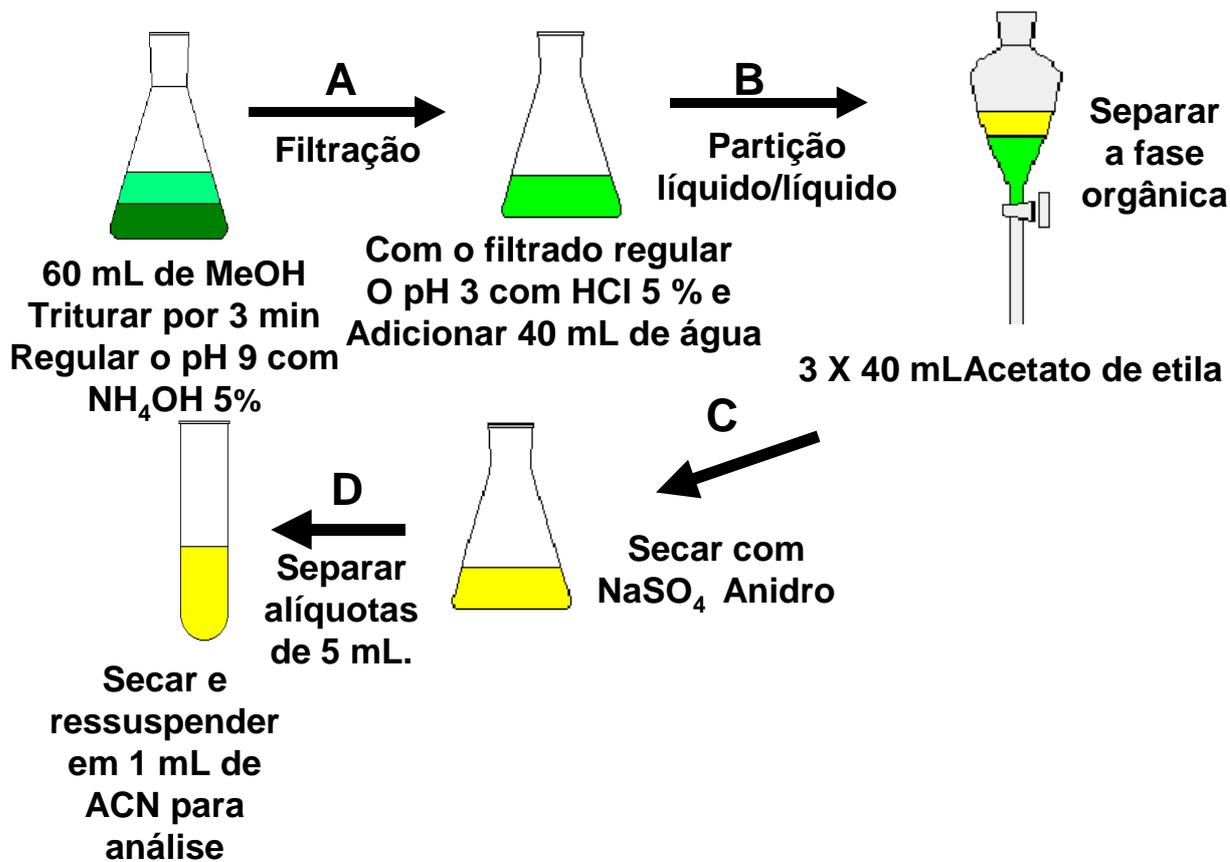
Após o cultivo do fungo por 20 dias, adicionou-se 600 mL de água ao sistema e acoplou-se o balão ao extrator de clewenger. O sistema foi mantido a 100°C por 4 horas sob refluxo, e o óleo obtido foi extraído com éter etílico. Após isso a amostra foi congelada a -10°C para posterior injeção direta no sistema GC/MS.

### **3.5.2 – *Aspergillus aculeatus***

#### **3.5.2.1 – Policetídeos produzidos por *Aspergillus aculeatus***

Após os tempos de cultivo estabelecidos na tabela 2, adicionou-se 60 mL de metanol aos frascos e extraiu-se por 12 horas. Em seguida o sistema foi basificado para pH 9 com NH<sub>4</sub>OH 5 % e filtrado. Com o filtrado acidificou-se para pH 3 com HCl 5 % e efetuou-se partições líquido/líquido com Acetato de Etila, empregando-se 3 x 40 mL para as extrações.

Em seguida adicionou-se Sulfato de Sódio Anidro para secar e filtrou-se o sistema. Com o filtrado, separou-se alíquotas de 5 e 15 mL que após a evaporação total do solvente foram congeladas a -10°C. Para injeção no HPLC as amostras foram re-suspendidas em 1 mL de Acetonitrila. Um esquema simplificado das etapas de cultivo e extração encontra-se no Esquema 3.



ESQUEMA 3 – Esquema do procedimento de extração de Policetídeos de *Aspergillus aculeatus*.

### **3.5.2.2 – Biotransformação de fenóis e análogos por *Aspergillus aculeatus***

Após o cultivo do fungo no meio Czapek's, os frascos foram filtrados e os semelhantes foram reunidos através de comparação por Cromatografia em Camada Delgada. Realizou-se primeiramente uma partição com acetato de etila. Em seguida com a fase aquosa remanescente basificou-se a solução (pH 10) e extraiu-se com acetato de etila. Novamente, com a solução aquosa inverteu-se o pH para 2 (HCl) e realizou-se extração com acetato de etila.

### 3.6 – CONDIÇÕES DE ANÁLISE

#### 3.6.1 – Detecção de terpenóides produzidos por *Pestalotiopsis disseminata*

Para os experimentos de detecção de terpenóides em culturas de *Pestalotiopsis disseminata* empregou-se dois métodos para HPLC, denominados Gradiente A e Gradiente B. As condições para cada método foram:

##### **Gradiente A**

Coluna: Sinergi Fusion C<sub>18</sub> 250 x 4.6 mm e 4 µm

Bomba A : Acetonitrila/ Água 9:1

Bomba B: Isopropanol

V injeção = 20 µL

Fluxo = 0,7 mL/min

Gradiente

t (min)	%B
0	5
15	10
30	60
40	85

## Gradiente B

Coluna: Sinergi Fusion C<sub>18</sub> 250 x 4.6 mm e 4 µm

Bomba A : Acetonitrila/ Água 9:1

Bomba B: Isopropanol

V injeção = 20 µL

Fluxo = 0,7 mL/min

Gradiente

t (min)	%B
0	20
15	30
30	60
40	90

Para os experimentos de LC/MS, empregou-se o método B do HPLC, com as seguintes condições do espectrômetro de massas:

Modo de ionização: APCI modo positivo

Corona: 330 kV

Cone: 48 V

T fonte: 130°C

T probe APCI = 300°C

### 3.6.2 – Análise de substâncias voláteis produzidos por *Pestalotiopsis disseminata*

Para as análises dos compostos voláteis empregou-se um sistema GC/MS Fisons GC 8000 Series acoplado a um VG PLATFORM, as condições de análise empregadas foram:

Modo de ionização: EI<sup>+</sup> 70 eV.

Coluna: DB 35MS L = 30 m, I.D = 0,25 mm, Film = 0,15 µm

T injetor = 260°C

V injeção = 1 µL

A Programação de temperatura foi a seguinte:

Iniciou-se em 85°C por 5 min e variou-se a temperatura em 8°C/min até 280°C ficando nessa temperatura por 4min. Em seguida variou-se a temperatura a 5°C/min até 325°C.

t (min)	°C/min	T (°C)
5	0	85
4	8	280
	5	325

### 3.6.3 – Análise de Policetídeos produzidos por *Aspergillus aculeatus*

Para as análises em HPLC empregou-se as seguintes condições:

Coluna: Sinergi Fusion C<sub>18</sub> 250 x 4.6 mm e 4 µm

Bomba A : Acetonitrila/ Água 9:1

Bomba B: Isopropanol

V injeção = 20 µL

Fluxo = 1 mL/min

Gradiente :

t (min)	% B
0	25
50	100

### 3.6.4 – Análise dos produtos de biotransformação por *Aspergillus aculeatus*

Neste experimento, as condições de análise por HPLC foram semelhantes ao experimento de análise de policetídeos.

Coluna: Sinergi Fusion C<sub>18</sub> 250 x 4.6 mm e 4 µm

Bomba A : Acetonitrila/ Água 9:1

Bomba B: Isopropanol

V injeção = 20 µL

Fluxo = 1 mL/min

Gradiente:

t (min)	% B
0	25
50	100

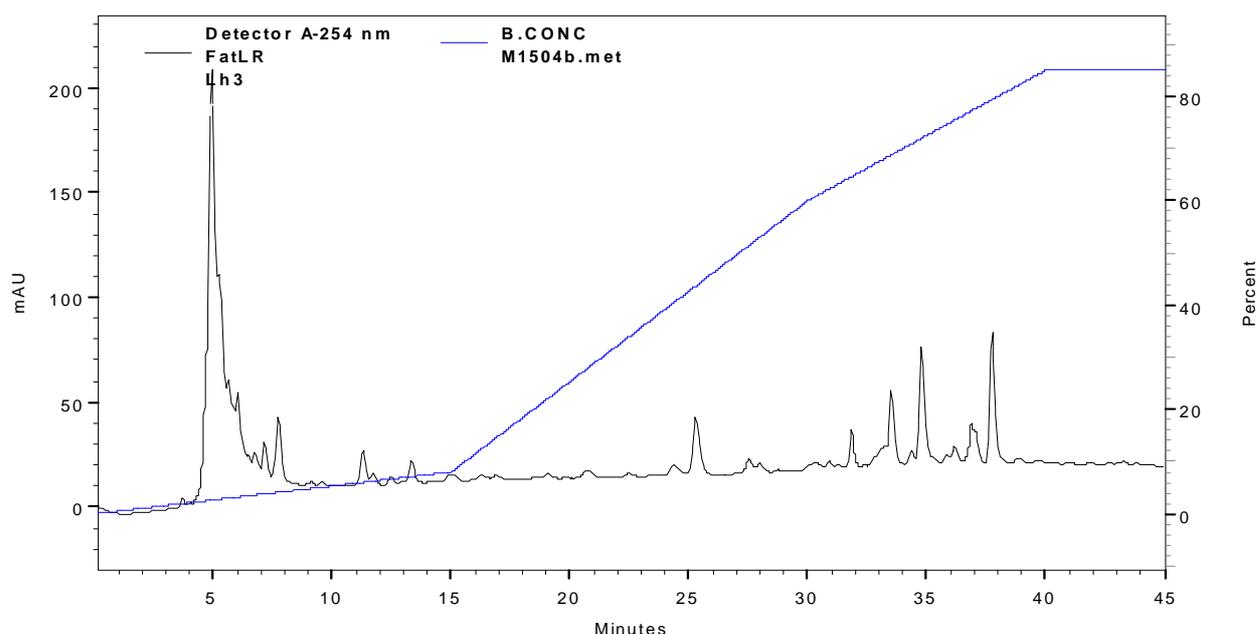
## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES**

---

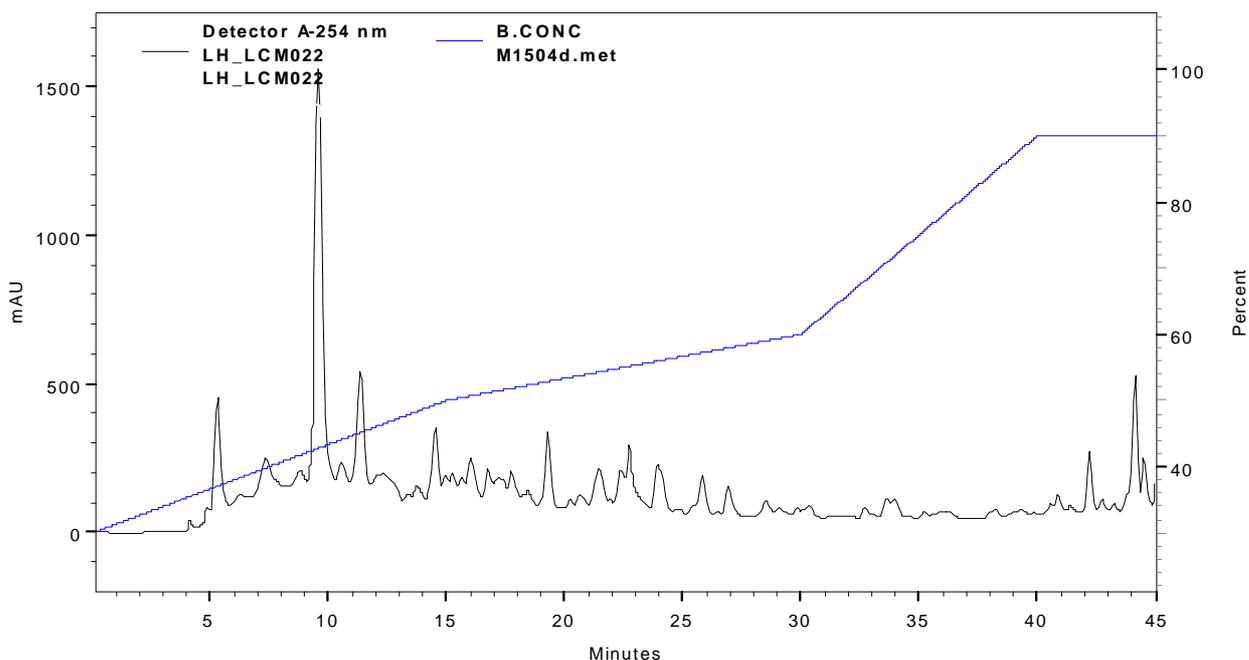
## 4.1 – DETECÇÃO DE TERPENÓIDES EM CULTURAS DE *Pestalotiopsis disseminata*

Dentre as frações obtidas, a fração B5-35 (p. 35) foi à escolhida para as análises de HPLC. Essa escolha ocorreu através de análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), onde verificamos que esta fração apresentava “manchas” muito parecidas com a do padrão (Taedolidol), tanto na cor da mancha, como no seu Rf. O sesquiterpeno Taedolidol foi o escolhido para as análises devido a sua disponibilidade no laboratório e informações de espectro de massas obtidas em experimentos anteriores (MAGNANI *et al.*, 2003).

Os Cromatogramas 1 e 2 a seguir mostram as análises feitas com o extrato para o desenvolvimento do melhor método: Gradiente A ou Gradiente B. Os Cromatogramas foram obtidos em 254 nm pois este comprimento de onda foi o mais adequado quanto a visualização dos picos e intensidade das absorções.



CROMATOGRAMA 1 – Teste para o método com o Gradiente A



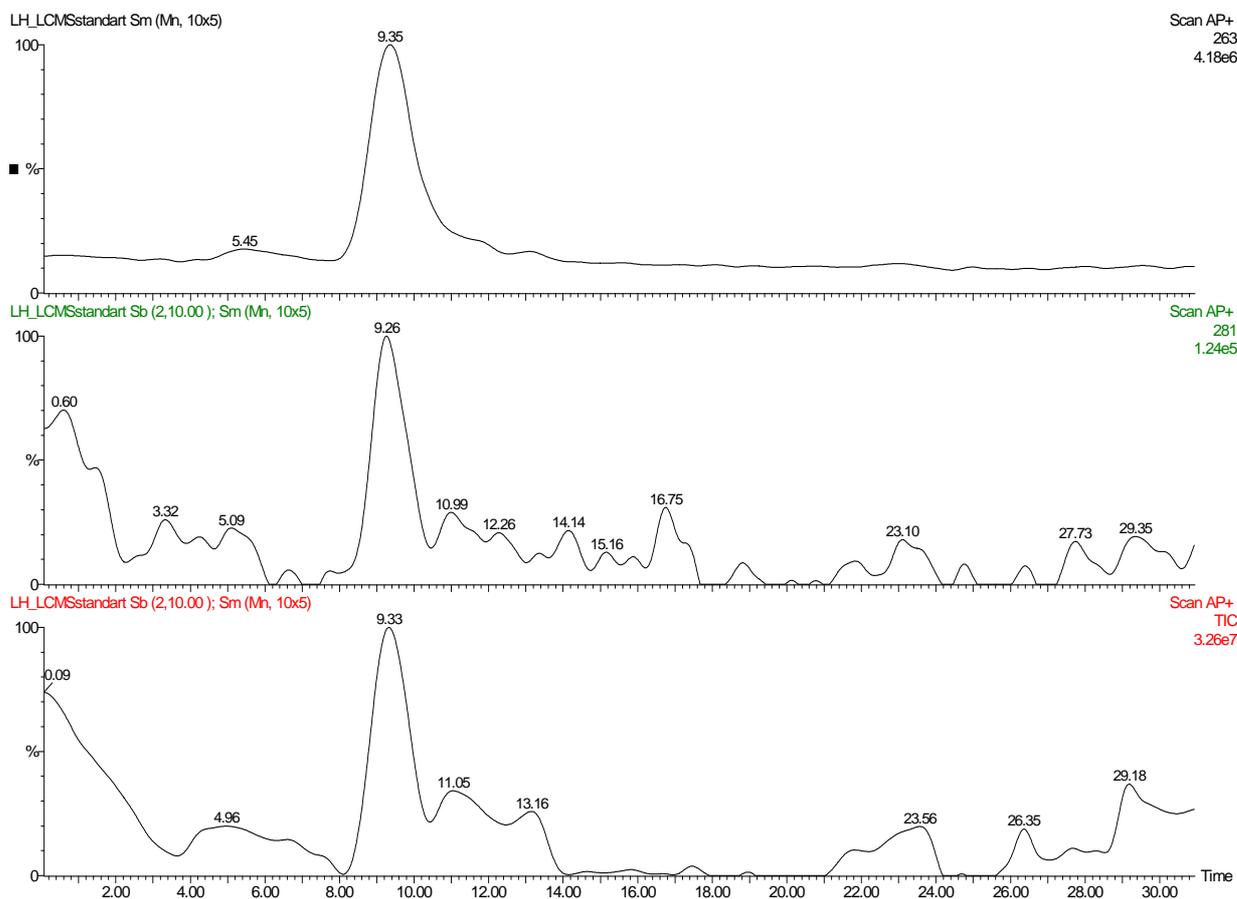
## CROMATOGRAMA 2 – Teste para o método com o Gradiente B

Observando os dois cromatogramas podemos observar que o Cromatograma 2 apresentou melhor resolução, tanto para os compostos mais polares que eluem no começo da corrida como para os compostos com polaridade menor que vão eluindo em tempos de retenção maiores. Com isso, o gradiente B foi escolhido para ser utilizado nos experimentos de LC/MS.

As injeções no HPLC do padrão Taedolidol não apresentaram resultados favoráveis, o que já era de se esperar, pois esse sesquiterpeno não possui uma boa absorbância no Uv, mesmo em 254 nm onde a intensidade de todos os picos do cromatograma são maiores, não é suficiente para uma boa detecção.

Para detectar esse sesquiterpeno, utilizamos os experimentos de LC/MS que neste caso foram bastante favoráveis, pois foi possível identificarmos a banda cromatográfica referente ao composto padrão, além de boa resolução na análise dos extratos.

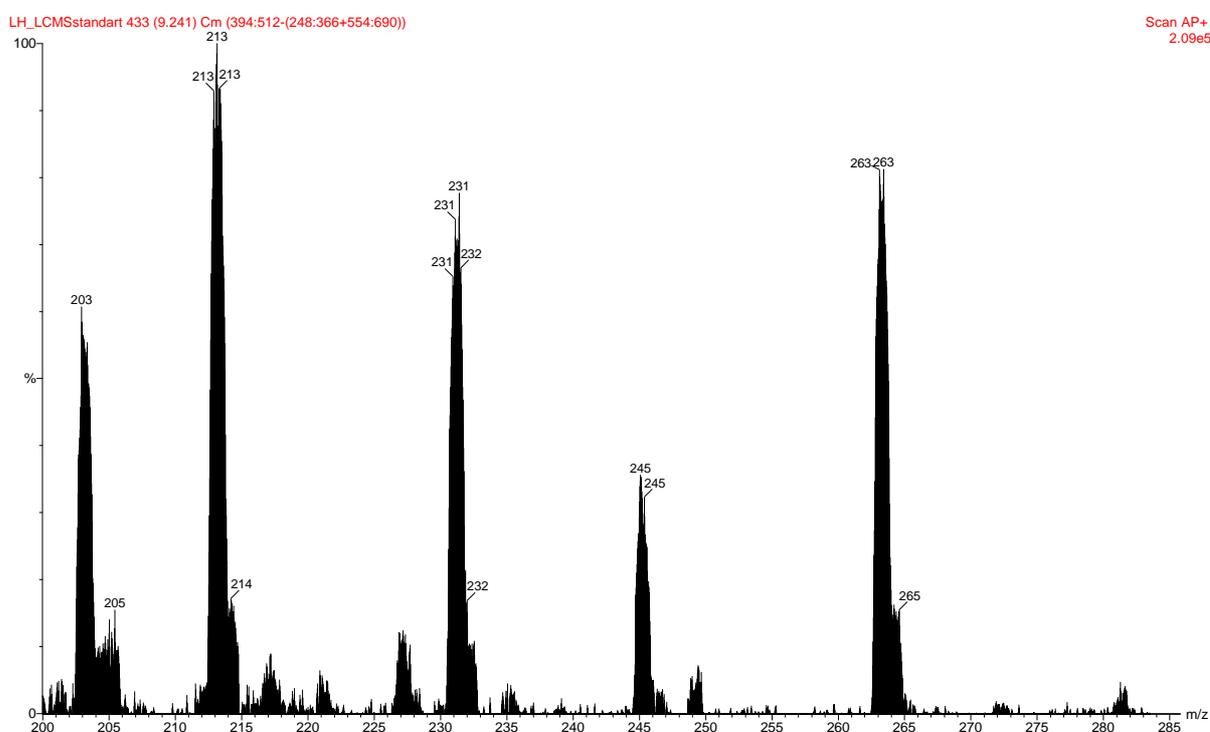
O Cromatograma 3 mostra os experimento de LC/MS para o sesquiterpeno padrão taedolidol, onde podemos verificar pelo Cromatograma de Íons Totais (TIC) que o padrão elui em aproximadamente 9.33 min.



CROMATOGRAMA 3 – Cromatograma de Íons Totais (TIC), íon selecionado  $m/z$  281 e  $m/z$  263, do padrão taedolidol, de baixo para cima, respectivamente.

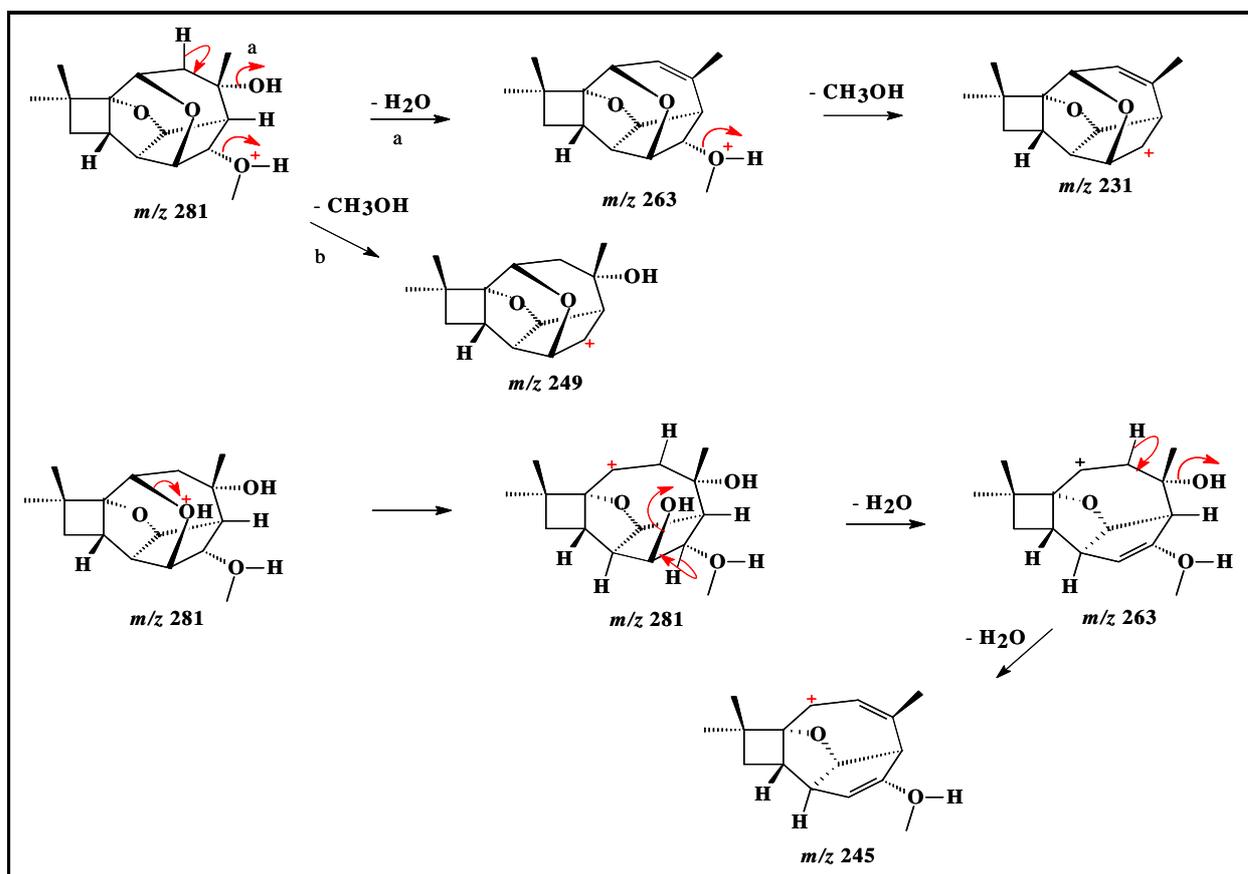
Através da seleção dos íons,  $m/z$  281, podemos verificar que o cromatograma apresenta também o tempo de retenção de aproximadamente 9.3 min, confirmando a presença desse íon e para o íon selecionado  $m/z$  263, verificou-se a banda cromatográfica com tempo de retenção aproximadamente 9.3 min, também confirmando a presença desse íon.

Nestas análises de LC/MS foram feitos experimentos de *Full Scan* e não experimentos de MS/MS, para que pudéssemos detectar os íons filhos de um determinado íon, mas o composto apresentou uma fragmentação na fonte e com isso foi possível obtermos o espectro de massas para o padrão taedolidol. Com base em experimentos anteriores (MAGNANI *et al.*, 2003) confirmamos que os íons com  $m/z$  abaixo de 281 (íon pseudo molecular  $MH^+$ ) são fragmentos desse íon de  $m/z$  281 (Espectro 1).



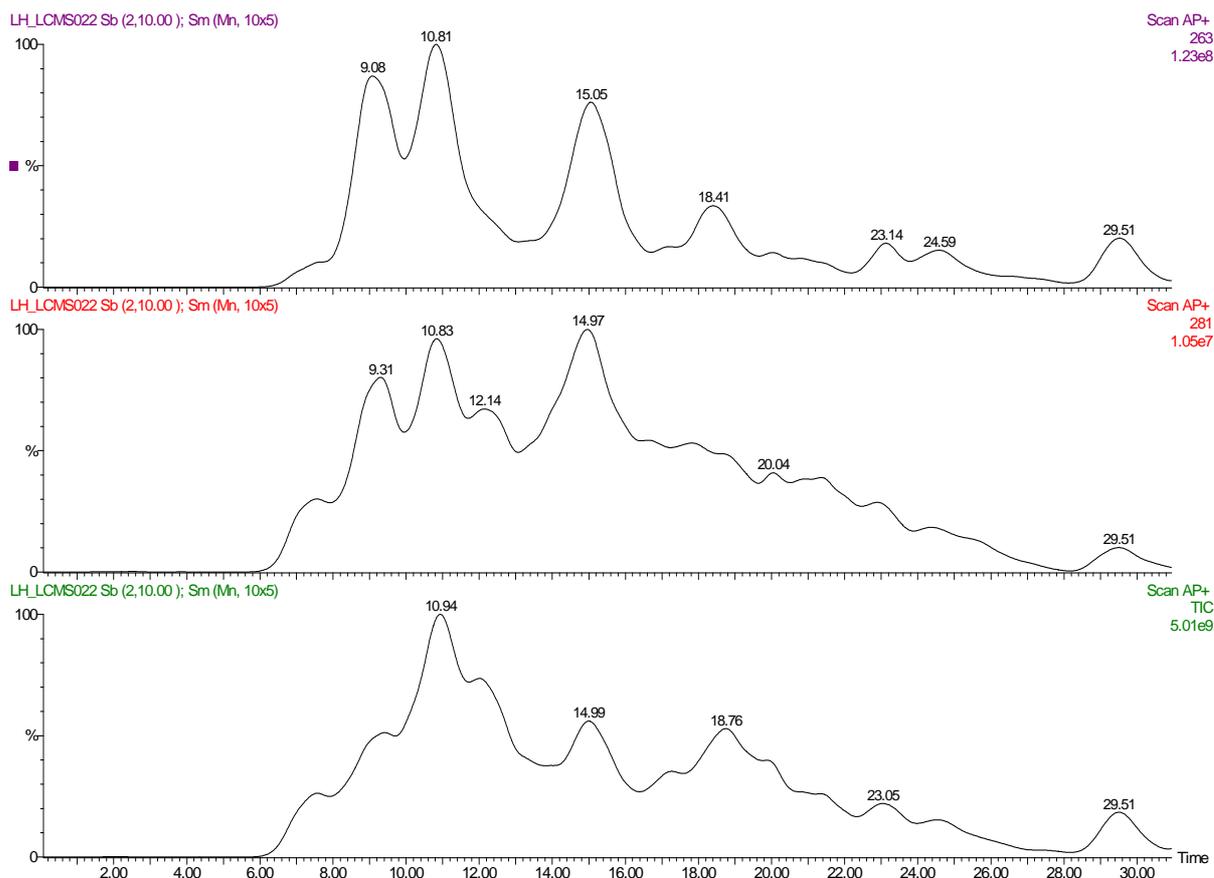
ESPECTRO 1 – Espectro de Massas *Full Scan* para o sesquiterpeno taedolidol.

Para confirmar a identidade de cada um desses picos do espectro de massas, foi feito o estudo de fragmentação para a molécula de taedolidol, para confirmar que o espectro de massas é referente ao sesquiterpeno em questão, como mostra o Esquema 4.



ESQUEMA 4 – Proposta de Fragmentação para a molécula de taedolidol.

Através dos resultados obtidos com o padrão, podemos fazer a comparação com a injeção dos extratos, como mostrado no Cromatograma 4.



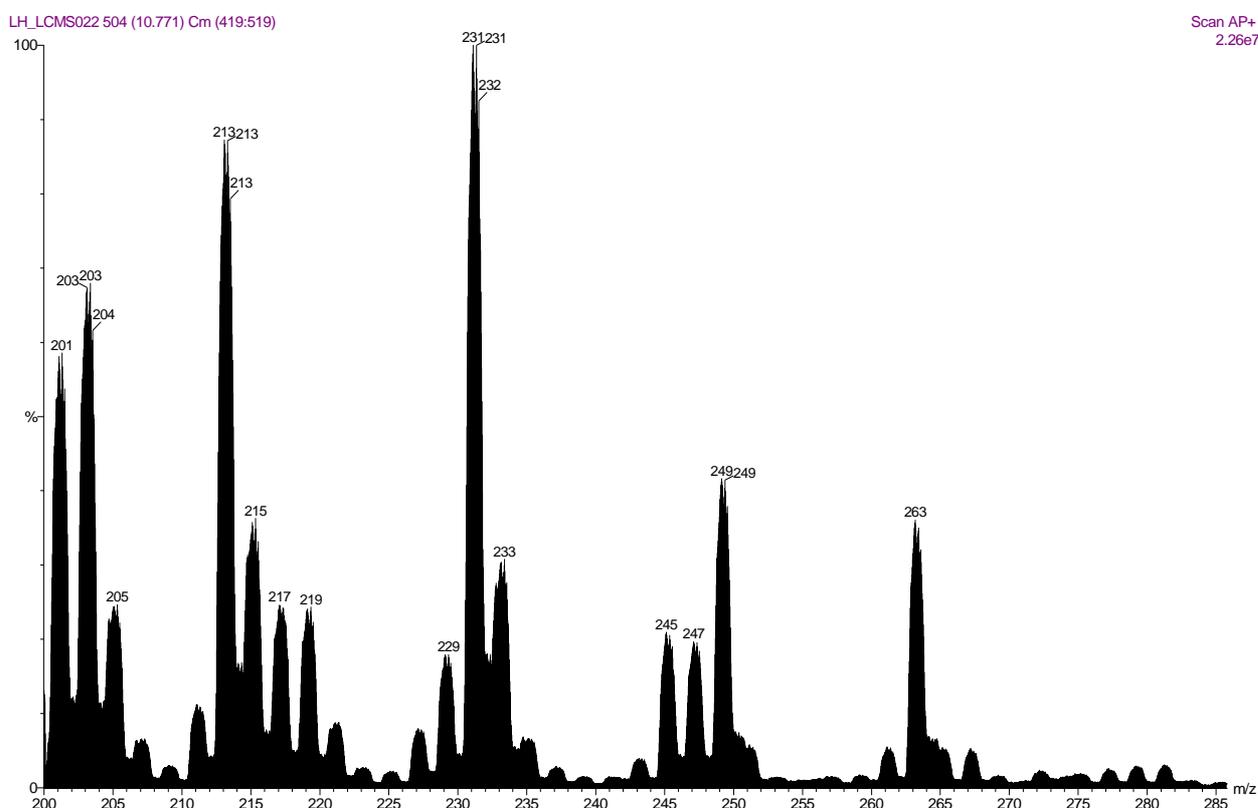
CROMATOGRAMA 4 – Cromatograma de Íons Totais (TIC), íon selecionado  $m/z$  281 e  $m/z$  263, para o extrato B535, de baixo para cima, respectivamente.

Observando os cromatogramas de LC/MS para o extratos e comparando com o do padrão, podemos afirmar que o sesquiterpeno taedolidol está presente no extrato obtido. Isso é confirmado pelo tempo de retenção (9.5 min) obtido para o pico presente no cromatograma de HPLC do extrato (Cromatograma 4) e também o tempo de retenção obtido para o TIC do extrato. Também o cromatograma de íons selecionados para o extrato mostrou a presença dos íons de  $m/z$  281 e 263 o que está de acordo com a mesma análise feita para o padrão.

Podemos observar pelo Cromatograma do extrato que além do pico de tempo de retenção aproximadamente 9.5 min, também temos outros

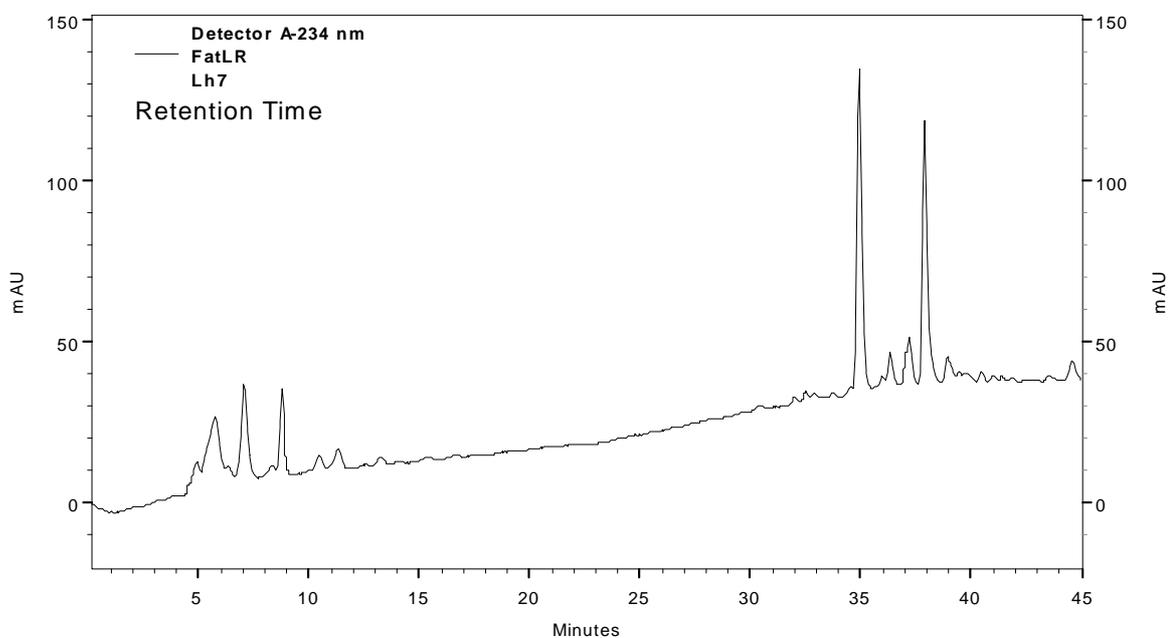
picos presentes, mostrando que além do taedolidol outros compostos estão presentes. Esses compostos certamente são outros sesquiterpenos cariofilenos e também outras classes de compostos, isso pode ser verificado tanto nos cromatogramas de HPLC quanto nos experimentos de LC/MS.

A confirmação da presença de taedolidol no extrato é feita na análise do espectro de massas do extrato para o pico de 9.3 min. O Espectro 2 mostra a semelhança com o espectro 1, confirmando a identidade do composto.

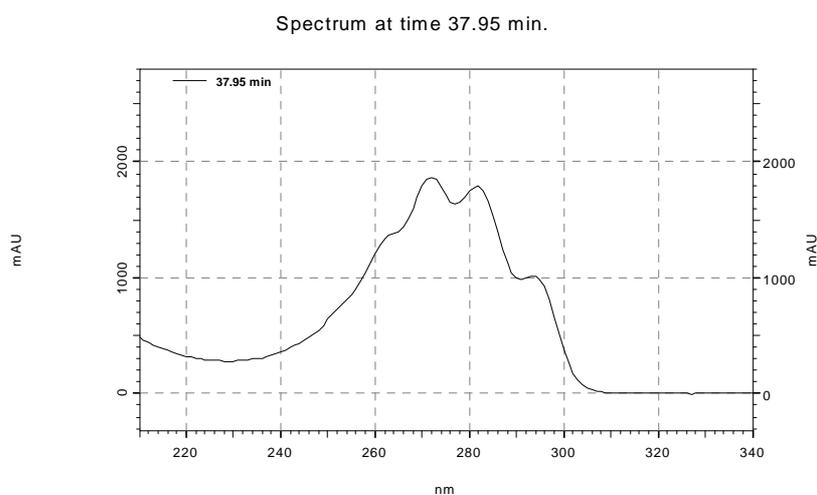


ESPECTRO 2 - Espectro de Massas *Full Scan* para o extrato B535

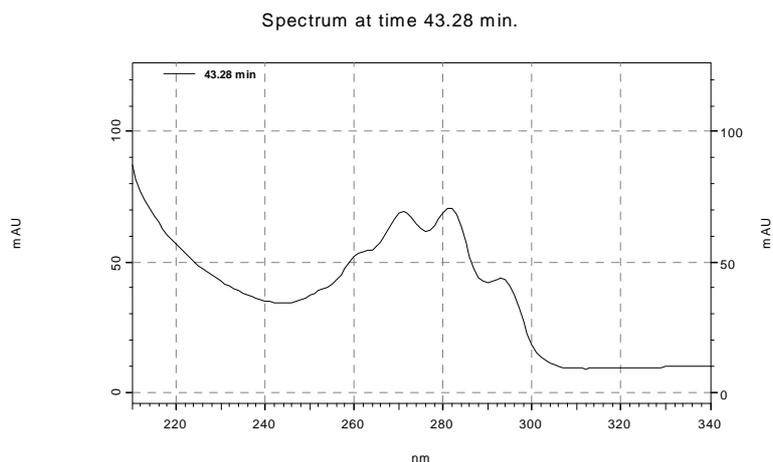
Através dos mesmos extratos obtidos para a identificação de terpenóides, foi possível identificarmos esteróides presentes nos extratos, nos quais o ergosterol foi identificado através da comparação com o padrão (Cromatograma 5).



CROMATOGRAMA 5 – Extrato do fungo B53



ESPECTRO 3 – Espectro do pico em 37.95 min.



#### ESPECTRO 4 – Espectro do ergosterol padrão

Observamos que o espectro do ergosterol consultado na biblioteca de espectros é muito parecido com o espectro do pico em 37.95 min obtido do extrato do fungo *Pestalotiopsis disseminata*. Isso mostra a capacidade do fungo em produzir esteróides, sendo que os picos que aparecem próximos ao ergosterol podem ser outros esteróides, devido a grande semelhança nos tempos de retenção. Apenas com a injeção de padrões ou comparação com espectros de UV-vis pode ser confirmada a identidade desses compostos. O tempo de retenção obtido para o ergosterol nos experimentos anteriores foi diferente do obtido neste experimento, pois as condições cromatográficas foram diferentes. Mas como o espectro não se altera, a comparação mostrou que nos extratos havia a presença de ergosterol em concentração significativa, verificada pela alta absorbância.

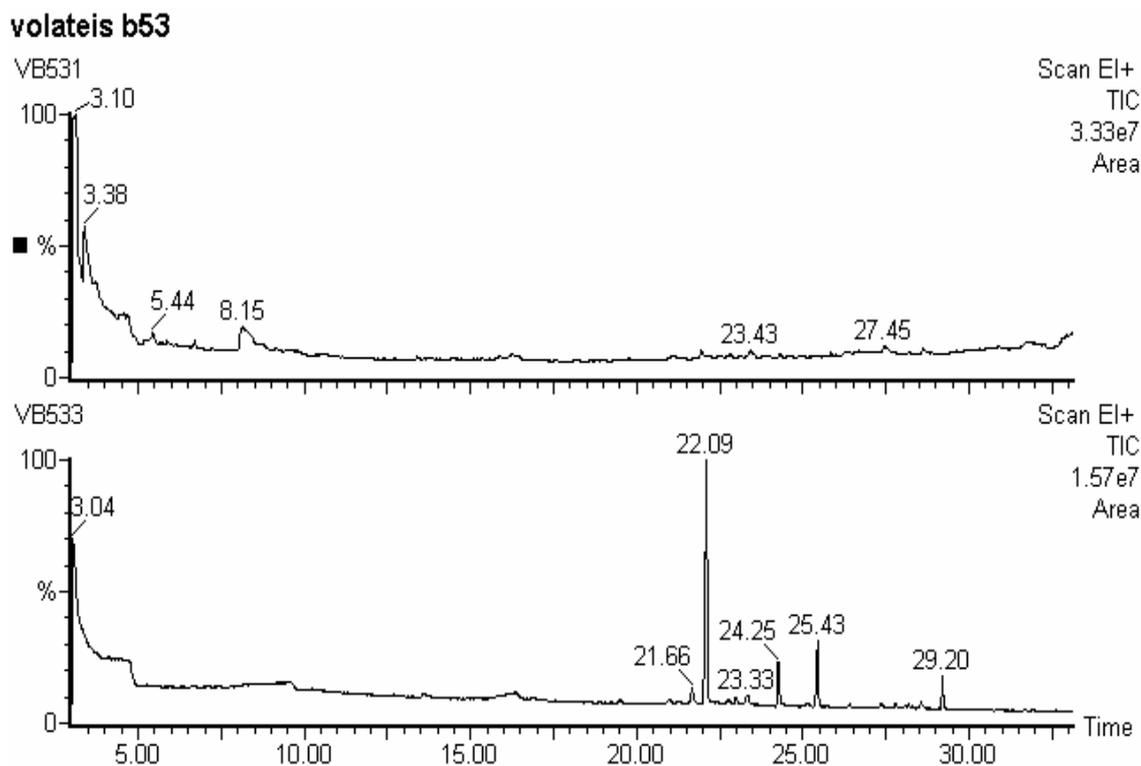
## **4.2 –ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS PRODUZIDAS POR *Pestalotiopsis disseminata***

A pesquisa bibliográfica para a análise de substâncias voláteis produzidas por *Pestalotiopsis disseminata* não apresentou nenhum trabalho e todas as condições e métodos tiveram que ser testados sem nenhuma referência para este fungo. As análises por GC/MS dos extratos obtidos com os experimentos de cleverger mostrou que o fungo *Pestalotiopsis disseminata* produz uma quantidade grande de compostos voláteis.

A comparação do extrato com o controle (apenas o meio de cultura) mostra que a maior parte dos compostos voláteis detectados são produzidos pelo fungo, pois o cromatograma do extrato apresenta uma série de picos enquanto o do controle não apresenta esses picos (Cromatograma 6).

Podemos observar pelo cromatograma do extrato que na faixa de tempo de retenção de 20 min até 30 min, alguns picos bem intensos aparecem no cromatograma o que não ocorre com o cromatograma do controle.

Esses picos certamente são compostos voláteis produzidos pelo fungo e a identidade desses compostos deve ser feita com a injeção de padrões para comparação dos tempos de retenção, cálculos de Index de Kovat's, análise do espectro de massas para estudos de fragmentação e comparação com bibliotecas padrões, como a NIST, que fornece uma comparação com um banco de dados e fornece a semelhança do espectro adquirido com o de padrões catalogados.



CROMATOGRAMA 6 – Cromatograma GC/MS do controle e do extrato, de cima para baixo, respectivamente.

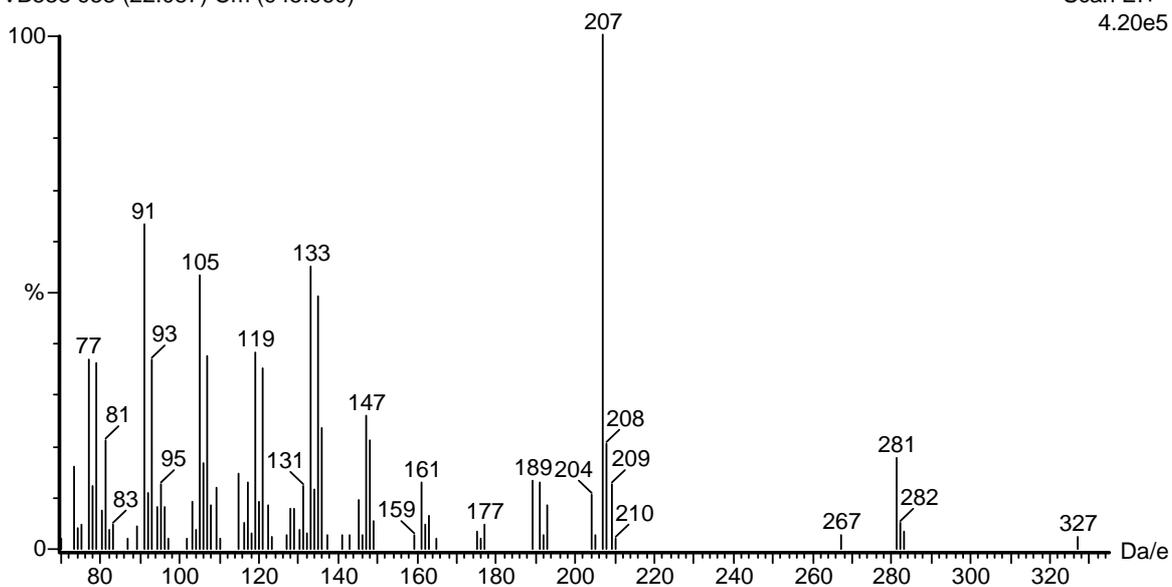
Neste trabalho só foi possível ainda a comparação com a biblioteca NIST que nas condições empregadas no experimento nos forneceu um sesquiterpeno como possível volátil presente na cultura de *Pestalotiopsis disseminata*, extraído com o extrator de clevenger.

O espectro de massas EI<sup>+</sup> (Espectro 5) foi obtido do pico que apresentou maior intensidade no cromatograma.

**volateis b53**

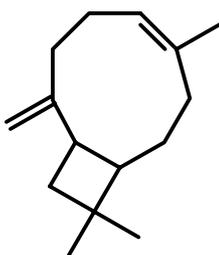
VB533 953 (22.087) Cm (945:960)

Scan EI+  
4.20e5



**ESPECTRO 5 – Espectro de EI<sup>+</sup> para o pico de maior intensidade**

A comparação do Espectro 5 com a biblioteca de dados NIST forneceu através da comparação com o banco de dados, o sesquiterpeno de MM = 204 e estrutura mostrado na Figura 15.



**FIGURA 12 – Possível sesquiterpeno detectado**

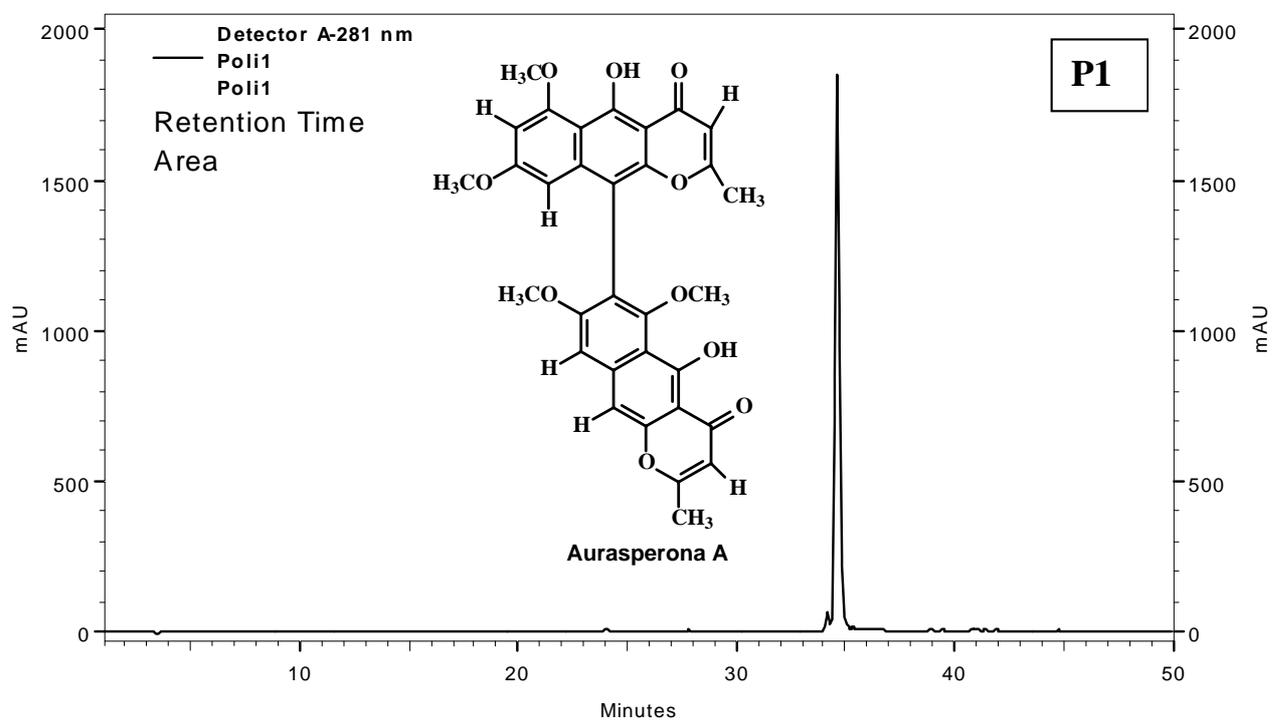
### 4.3 – PRODUÇÃO DE POLICETÍDEOS POR *Aspergillus aculeatus*

Neste experimento nosso objetivo é identificar os possíveis monômeros dos policetídeos que são produzidos por *Aspergillus aculeatus* mas para isso faz se necessário que tenhamos uma metodologia para os dímeros. Os resultados de HPLC da injeção dos padrões dímeros para os seis policetídeos, nomeados de P1, P2, P3, P4, P5 e P6 estão indicados nos cromatogramas de 7 a 12 e seus respectivos espectros de Uv – Vis mostrados nos espectros de 6 a 10.

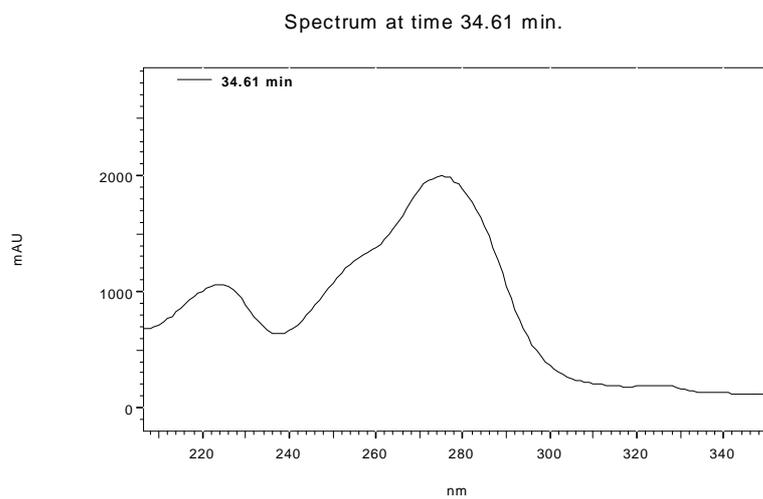
Através da injeção dos padrões e comparação de seus tempos de retenção e espectros de Uv-Vis com o dos extratos, foi possível detectar 5 policetídeos nos extratos. Foram os policetídeos Aurasperona (P1), Fonsesinona A (P3), Fonsesinona B (P4), Kotanina (P5) e Orlandina (P6). Apenas a Aurasperona B não foi possível ser detectada, pois o cromatograma do padrão apresentou muitos contaminantes. Ainda na análise qualitativa, a identificação dos dímeros só ocorreu a partir do 4º dia, pois os cromatogramas em tempos menores que o 4º dia não apresentava os picos referentes ao dímeros.

A curva de produção dos policetídeos só foi possível ser construída para 3 deles, a Fonsesinona A, Fonsesinona B e Kotanina, pois os outros policetídeos apresentaram desvios na curva de calibração e portanto não puderam ser quantificados.

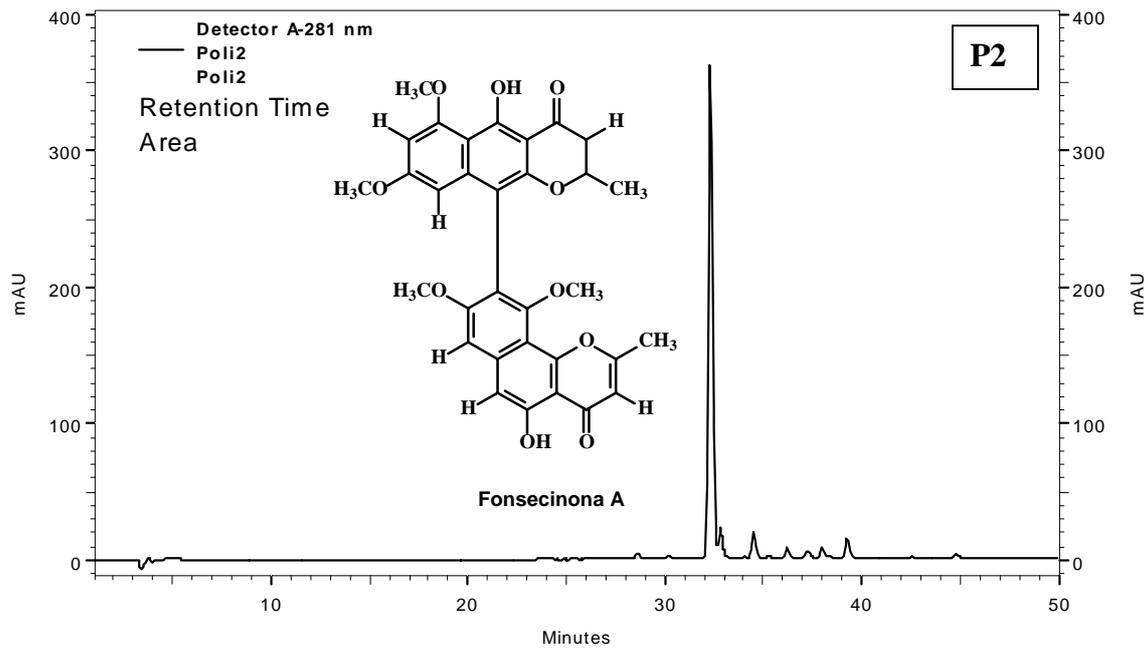
### 4.3.1 - Análise dos padrões



CROMATOGRAMA 7 – Aurasperona A

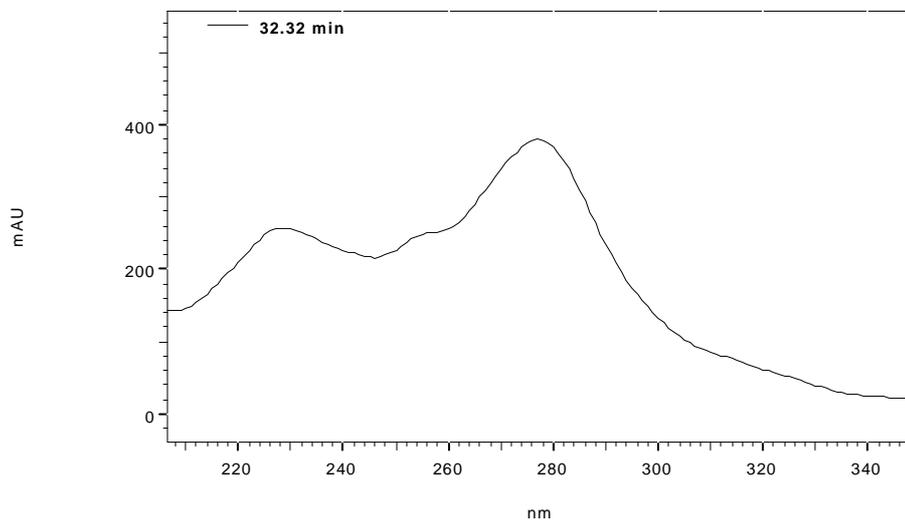


ESPECTRO 6 – Aurasperona A

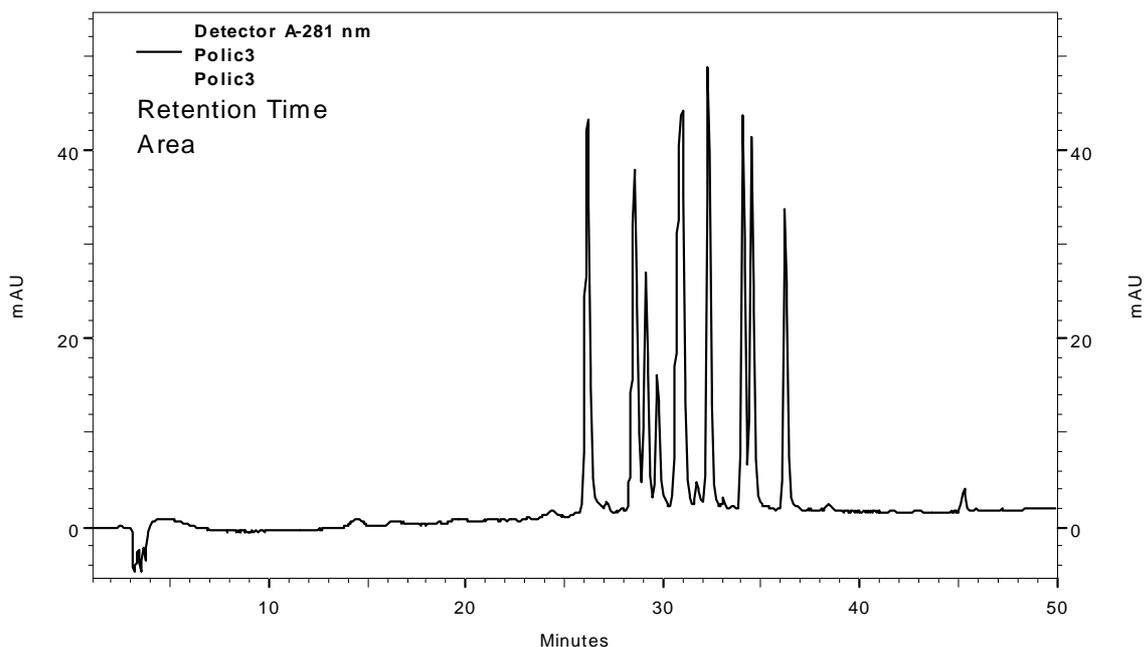


CROMATOGRAMA 8 – Foncecinona A

Spectrum at time 32.32 min.



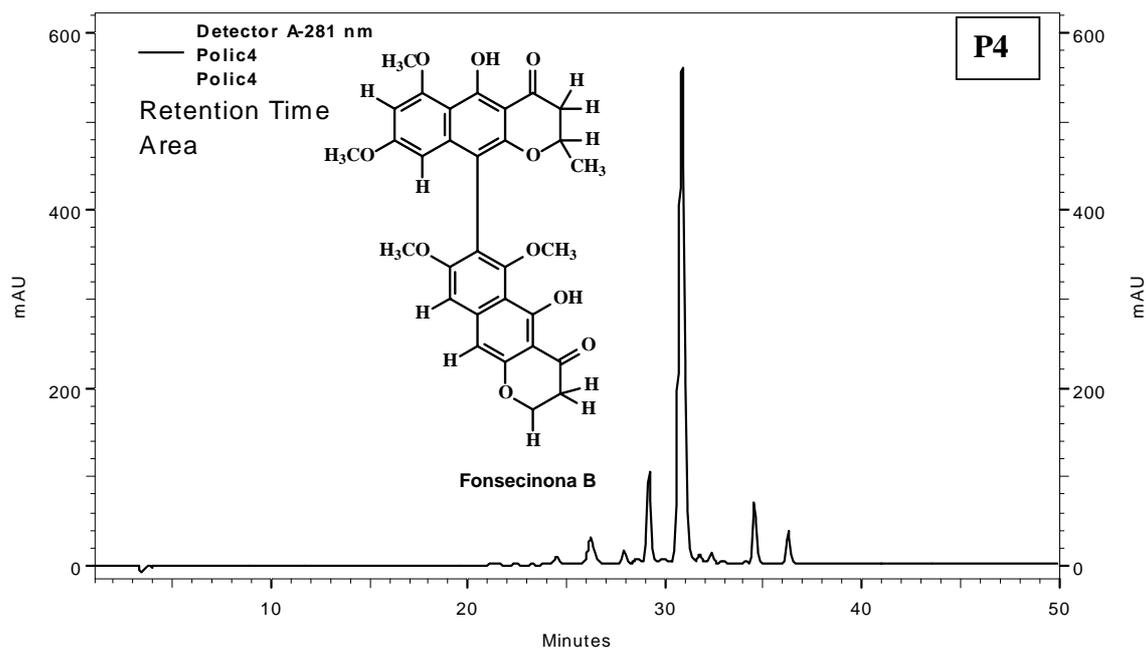
ESPECTRO 7 – Foncecinona A



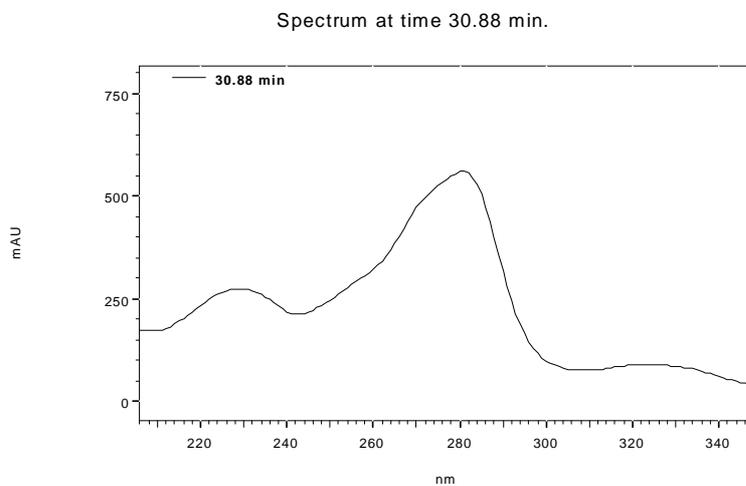
### CROMATOGRAMA 9 – Aurasperona B

Podemos observar pelo Cromatograma 9 que o padrão não encontra-se puro, cada um desses picos apresentavam um espectro diferente. Isto pode ser conseqüência de contaminações, degradação do padrão, irregularidades na estocagem, purificação irregular e outra série de fatores visto que este e os outros policetídeos foram isolados em experimentos anteriores (CAMPOS *et al.*, 2003).

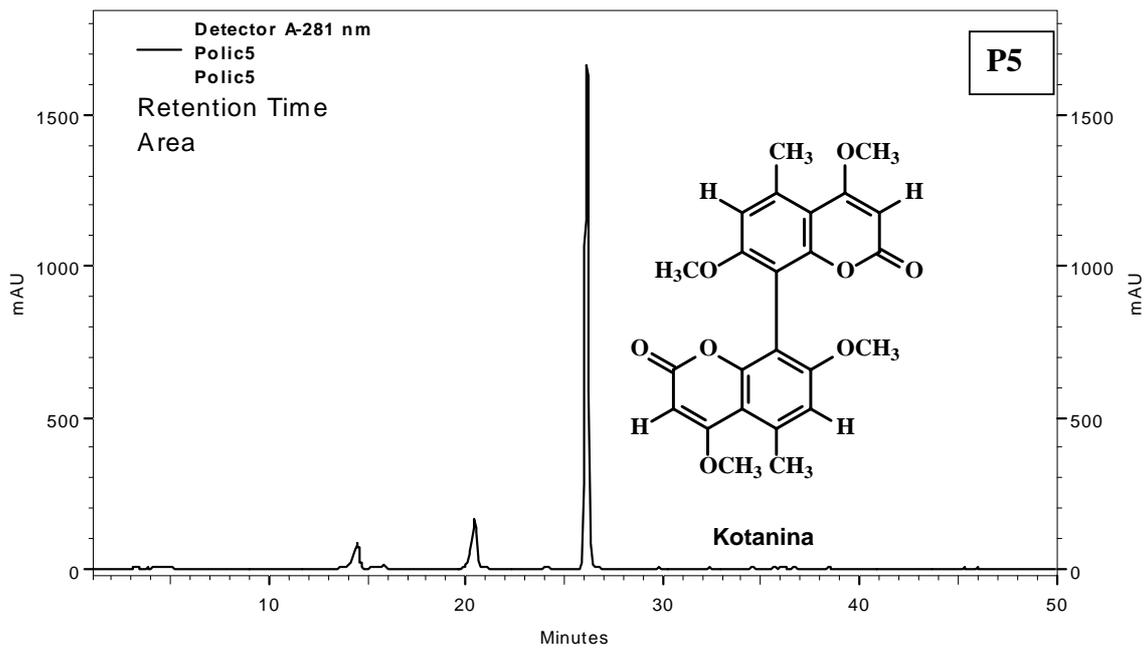
Por causa disso, a Aurasperona B não pode ser identificada e tampouco quantificada, necessitando uma verificação mais cuidadosa da natureza dos picos presentes no cromatograma dessa substância, para que se tenha uma certificação de qual desses picos trata-se deste policetídeo.



**CROMATOGRAMA 10 – Fonsecainona B**

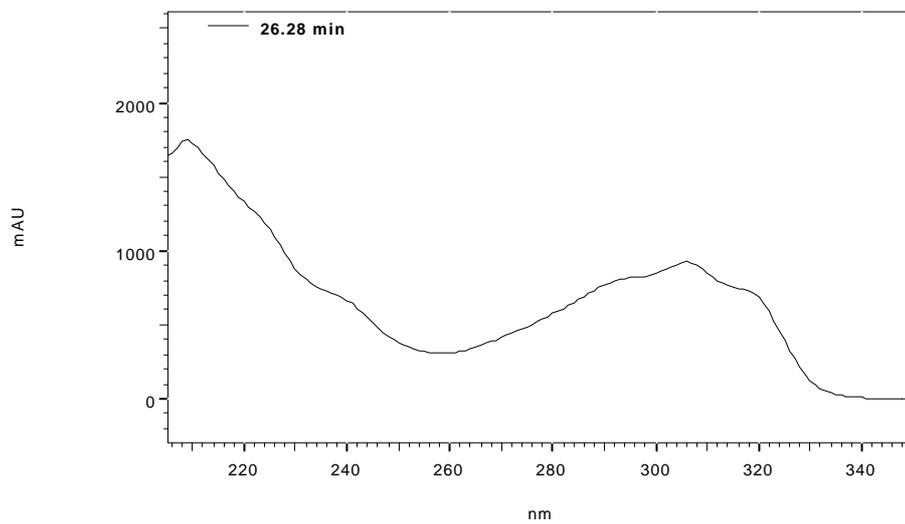


**ESPECTRO 8 – Fonsecainona B**

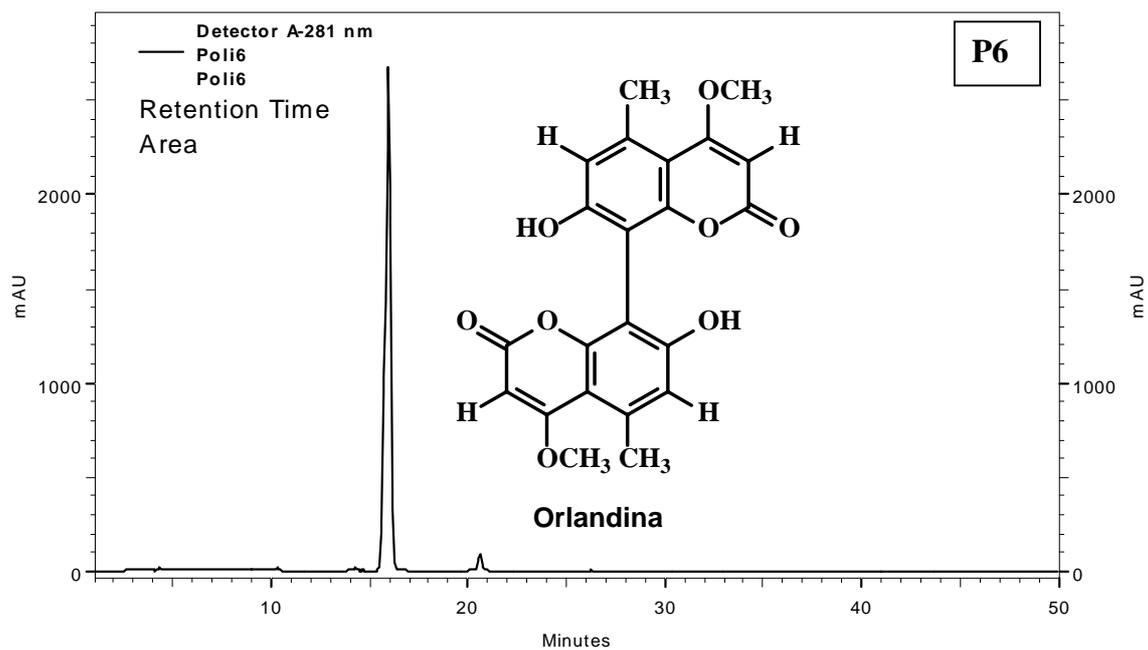


CROMATOGRAMA 11 – Kotanina

Spectrum at time 26.28 min.

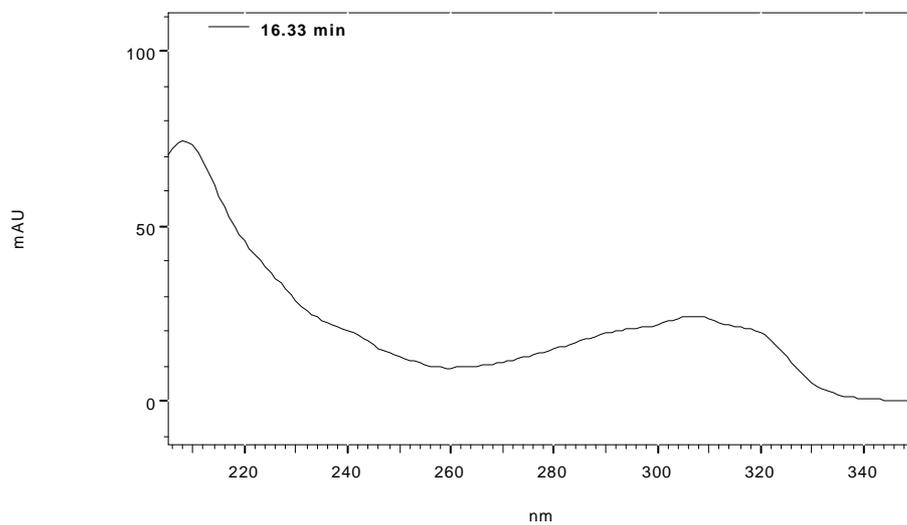


ESPECTRO 9 – Kotanina



CROMATOGRAMA 12 – Orlandina

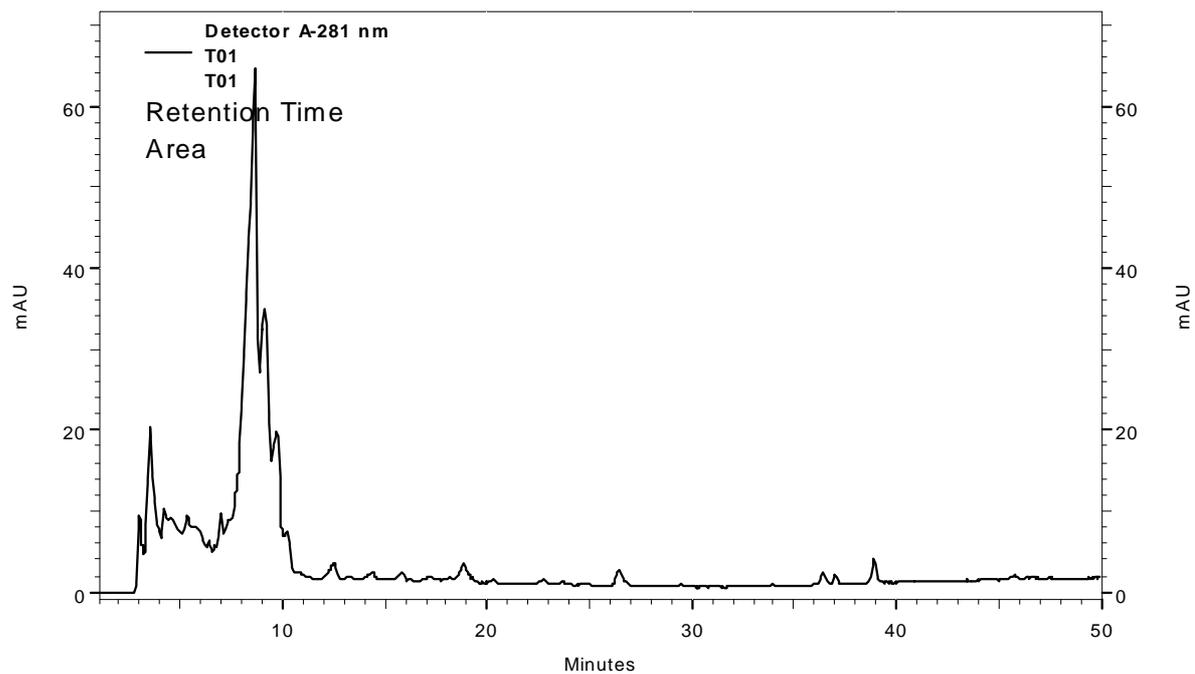
Spectrum at time 16.33 min.



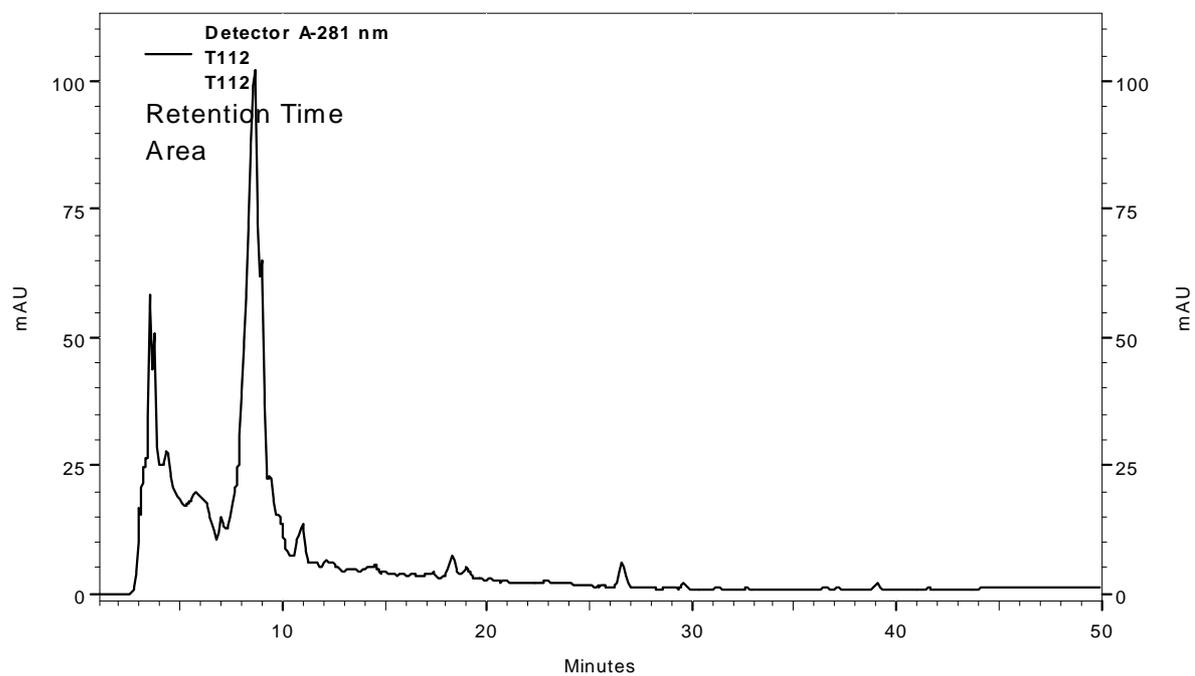
ESPECTRO 10 - Orlandina

### 4.3.2 – Análise qualitativa dos extratos

Através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros verificamos a presença dos policetídeos nos extratos. Do 1º dia até o 4º dia não pudemos detectar os policetídeos, pois verificamos nos Cromatogramas 13 e 14 substâncias com tempos de retenção diferentes daqueles apresentado pelos padrões, além do espectro de Uv-Vis não ser igual. Os picos que aparecem nos cromatogramas do 1º dia até o 4º dia não foram identificados, pois apenas o tempo de retenção e o espectro não foi suficiente para identificarmos as substâncias. Esses picos podem ser os monômeros, mas essa confirmação só poderia ser feita através de experimentos de LC/MS onde verificaríamos uma massa molecular com a metade daquela apresentada pelos dímeros e aí confirmaríamos a presença dos monômeros. Outra alternativa seria a injeção de padrões com estrutura muito parecida com os monômeros e posterior comparação de seus tempos de retenção e espectros de Uv-Vis. Também a utilização de experimentos de RMN poderia contribuir para a confirmação da presença de monômeros ou não. Até o momento não pudemos realizar esses experimentos e apenas sabemos que existem outros compostos nos extratos, além dos dímeros. Os Cromatogramas 15 e 16 mostram que a detecção dos dímeros apenas ocorre a partir do o 4º dia de cultivo.



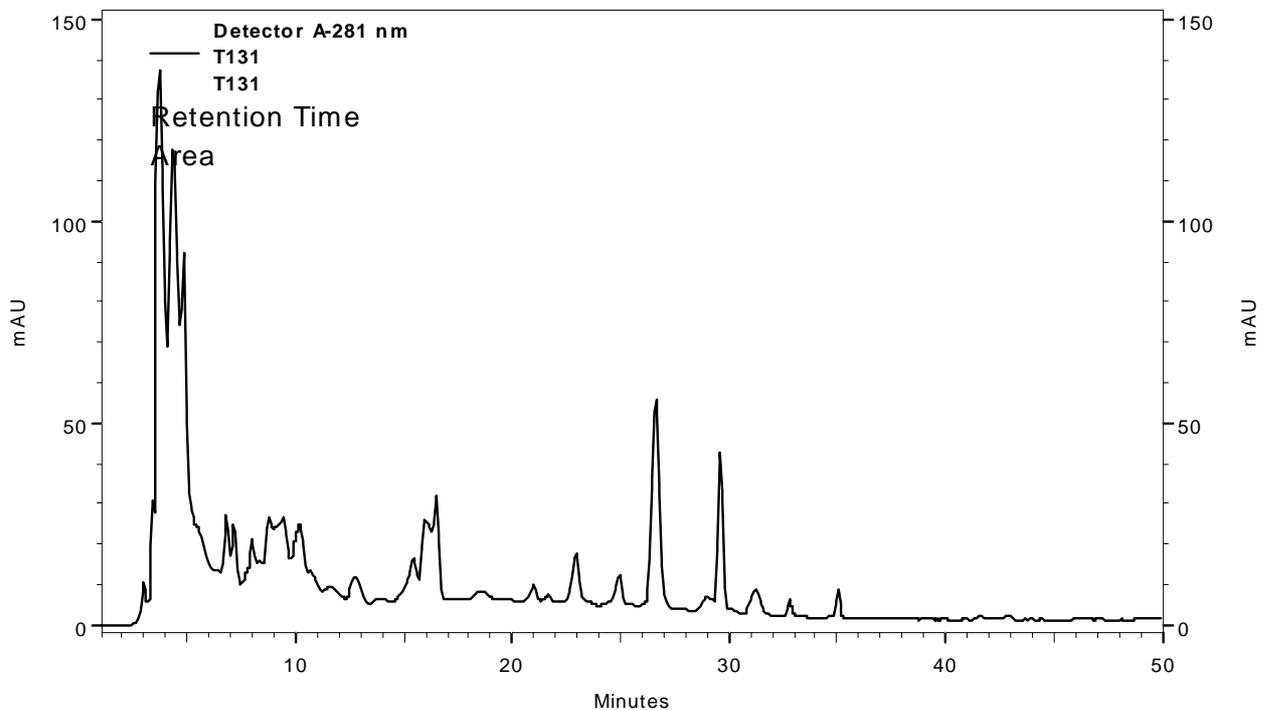
CROMATOGRAMA 13 – Tempo T0, 1° dia de cultivo



CROMATOGRAMA 14 – T12, 3° dia de cultivo.

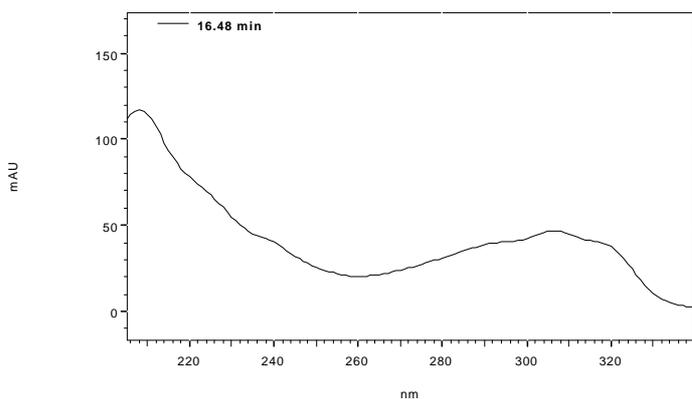
Os cromatogramas referentes ao tempos T1 ao T11 ou seja do 1° ao 3° dia apresentaram muita semelhança, com uma quantidade pequena de picos na região dos tempos de retenção do dímeros, apenas uma pico em aproximadamente 26 min, mas o espectro de Uv-Vis não apresentou boa resolução e não podemos afirmar que este pico refere-se a Kotanina.

A partir do 4° dia os picos que aparecem mostram espectros idênticos aqueles dos padrões, além dos tempos de retenção também serem semelhantes. O cromatogramas referem-se ao tempos do 4° ao 7° dia acompanhados dos respectivos espectros do principais picos.

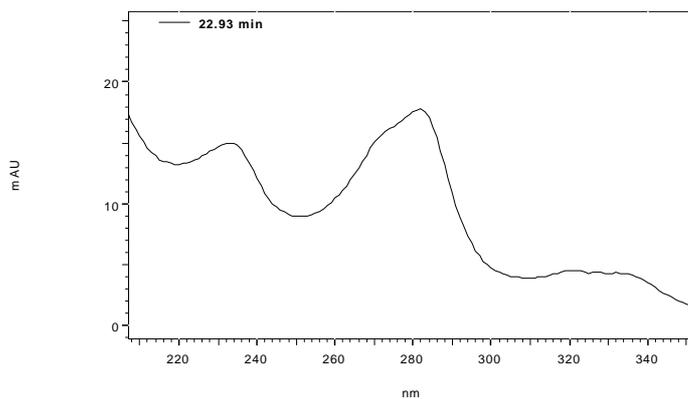


CROMATOGRAMA 15 – Tempo T13, 4° dia de cultivo

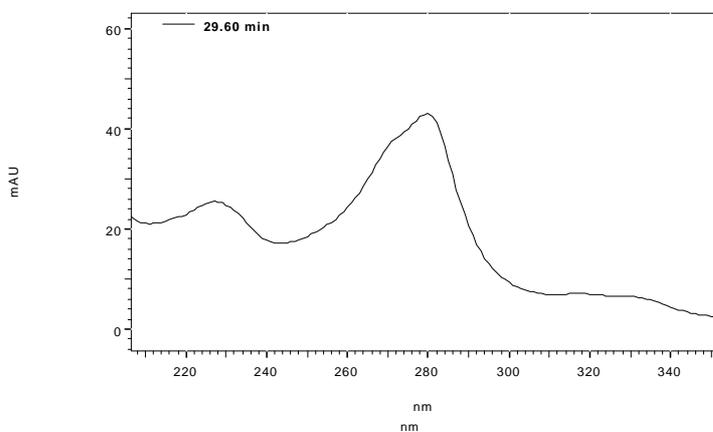
Spectrum at time 16.48 min.



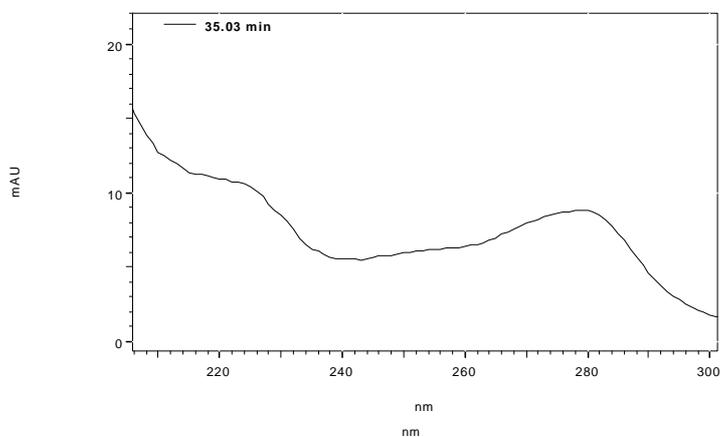
Spectrum at time 22.93 min.



Spectrum at time 29.60 min.

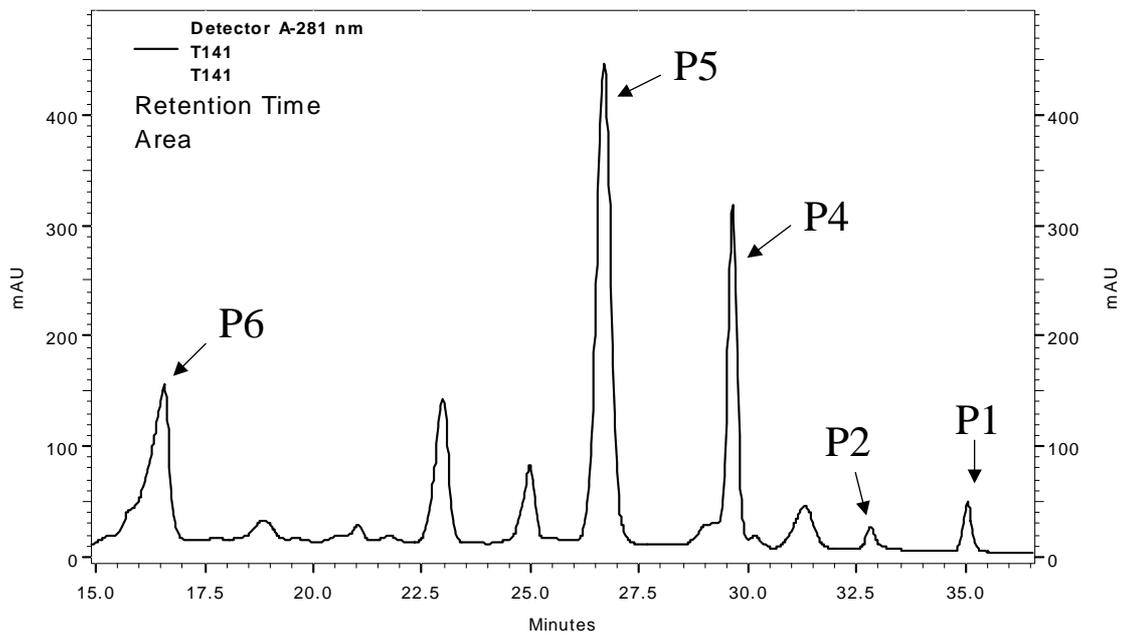
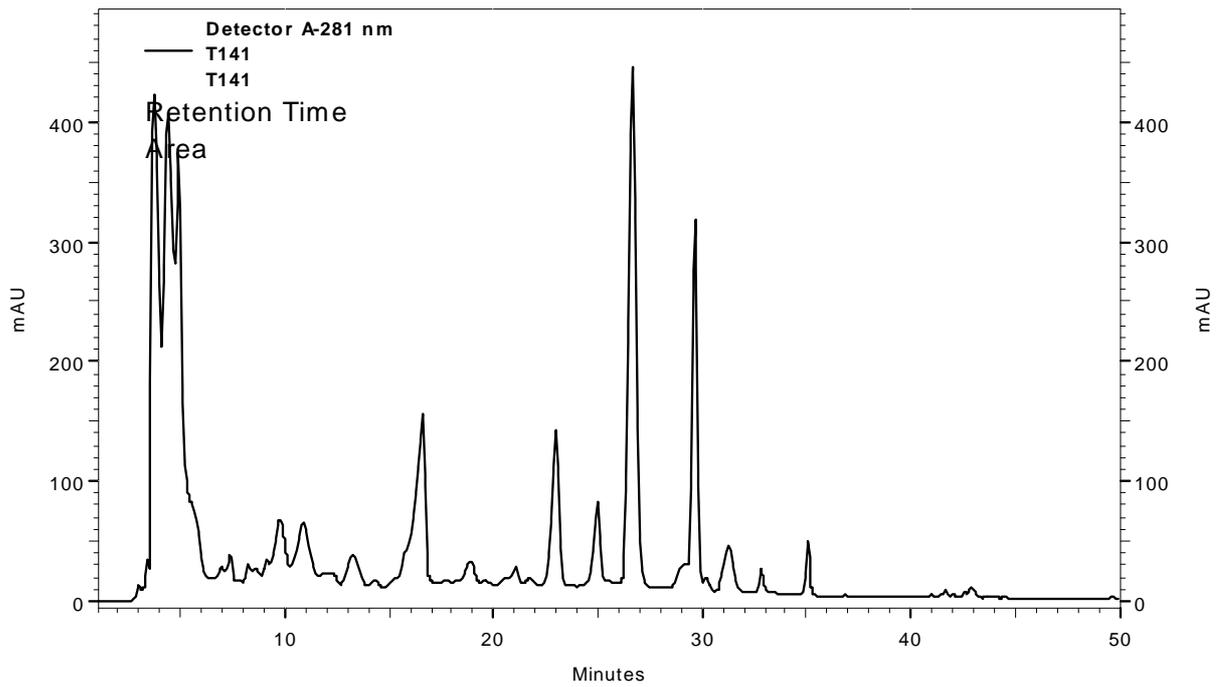


Spectrum at time 35.03 min.



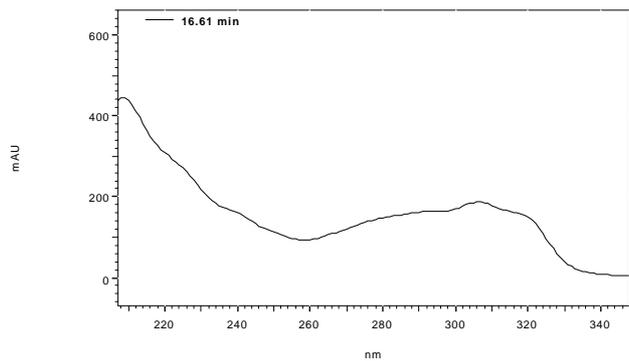
## ESPECTRO 11 – Principais espectros referentes ao Cromatograma 15

A partir do 5º dia, os cromatogramas apresentaram uma resolução muito boa como mostra o Cromatograma 16 e os espectros, os policetídeos estão indicados pelos seus respectivos números.

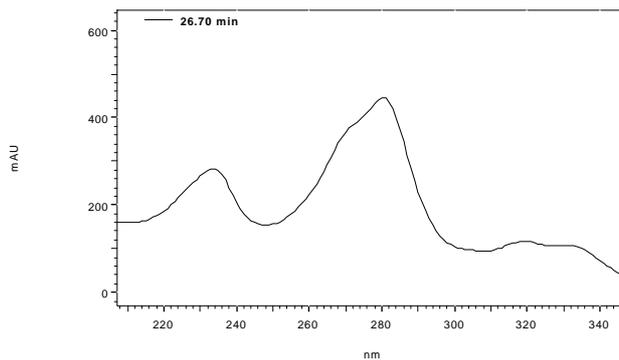


CROMATOGRAMA 16 – Tempo T14, 5° dia e sua ampliação, de cima para baixo, respectivamente.

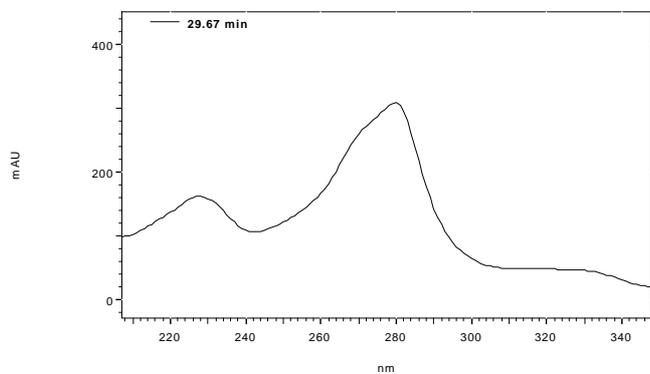
Spectrum at time 16.61 min.



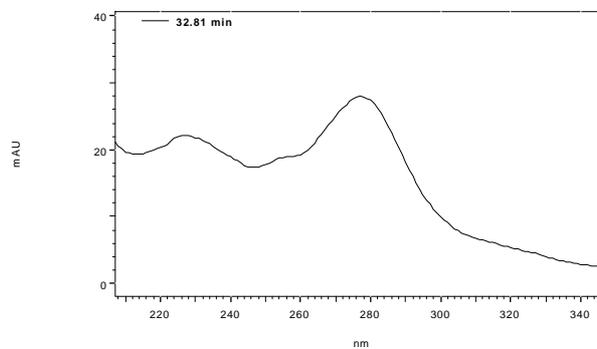
Spectrum at time 26.70 min.



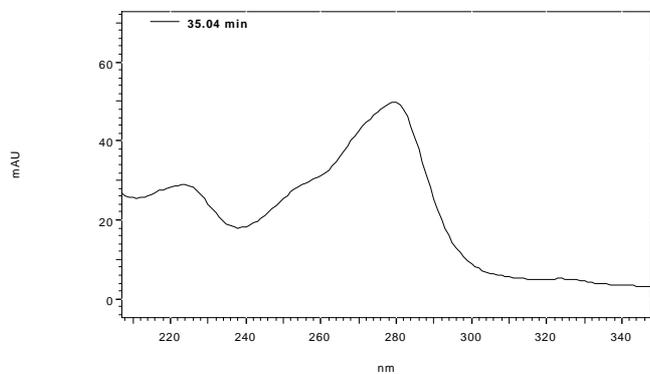
Spectrum at time 29.67 min.



Spectrum at time 32.81 min.

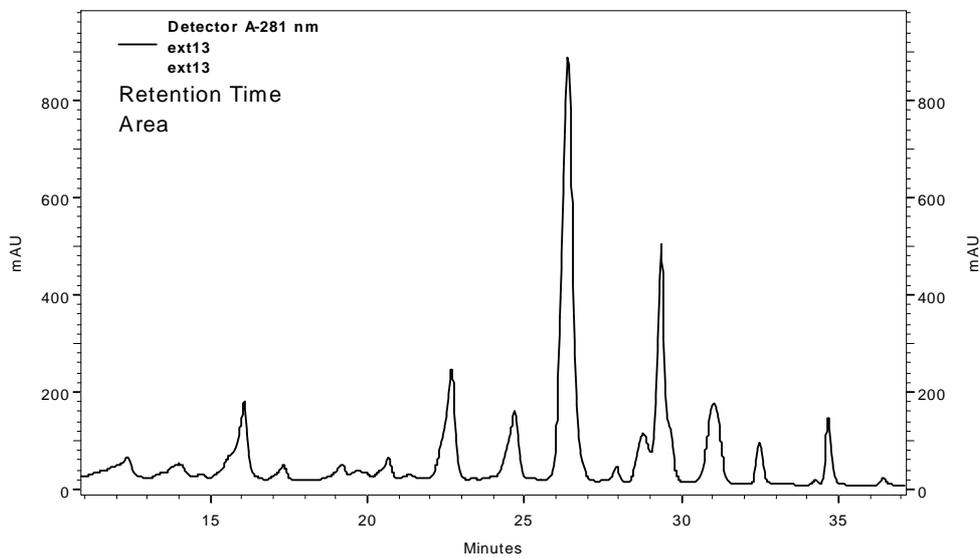
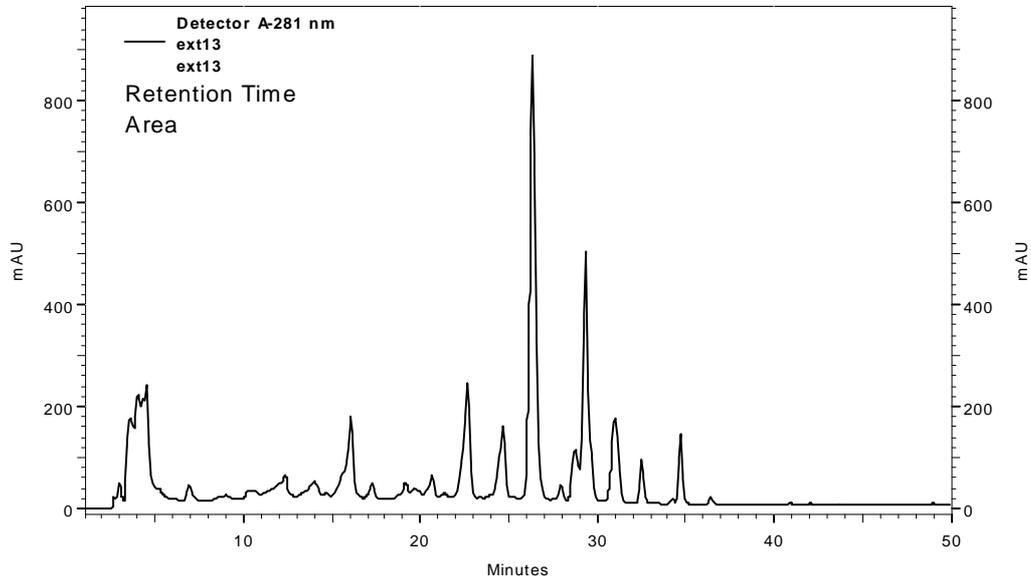


Spectrum at time 35.04 min.

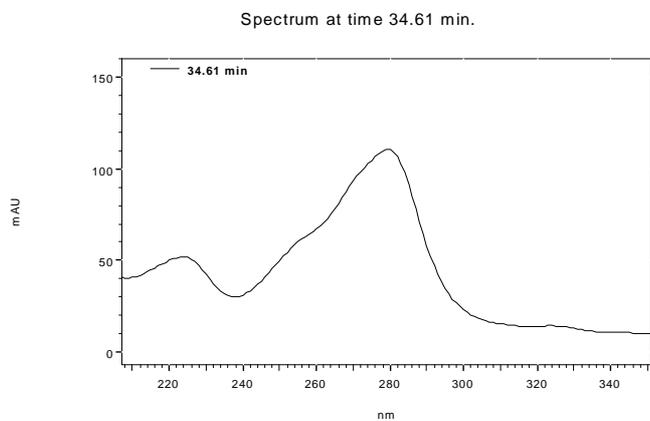
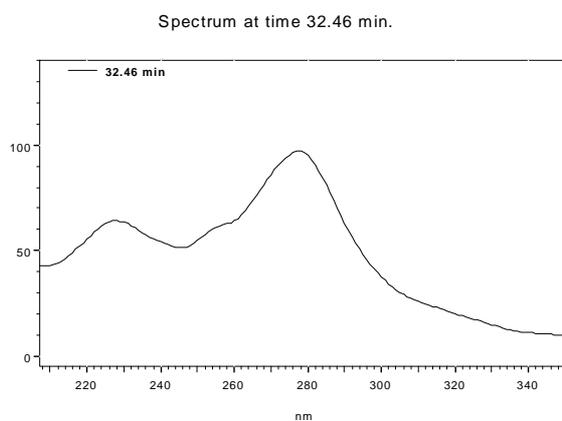
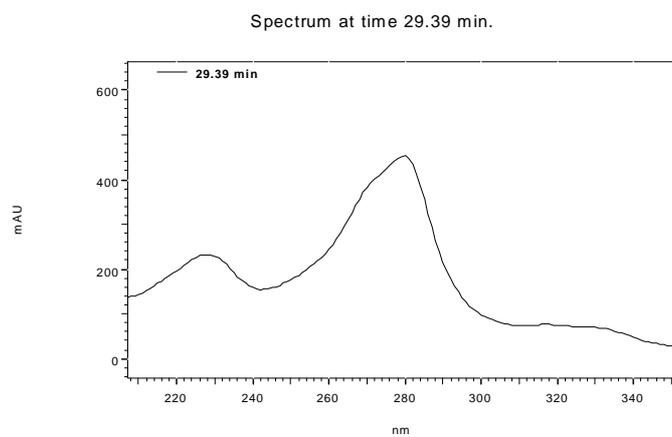
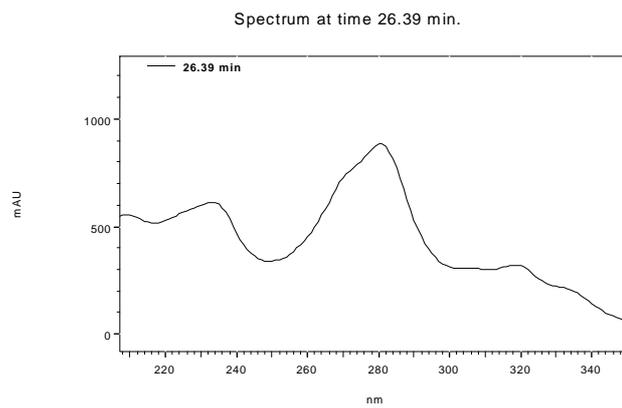
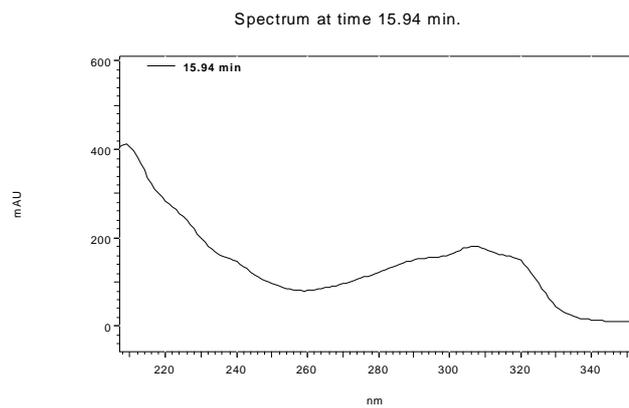


## ESPECTRO 12 – Espectros referentes ao Cromatograma 16

Também foi realizado um experimento com extração após 25 dias de cultivo, e o resultado encontra-se no Cromatograma 17 e os espectros no Espectro 10.



CROMATOGRAMA 17 – Extração após 25 dias de cultivo. O cromatograma e a ampliação, de cima para baixo, respectivamente.



## ESPECTRO 13 – Espectros referentes ao Cromatograma 16

Através da comparação feita dos tempos de retenção e dos espectros de UV-Vis dos padrões com os extratos, foi possível detectar nos extratos a Aurasperona A, Fonsesinona A, Fonsesinona B, Kotanina e Orlandina.

Por apresentar irregularidades na linearidade, bem como na curva de calibração, apenas a Fonsesinona A e B e Kotanina puderam ser quantificadas.

### 4.3.3 – Curva de Produção dos policetídeos

Através da construção das curvas de calibração dos padrões, foi possível estimarmos as concentrações dos três policetídeos nos diferentes tempos de cultivo, do 4º ao 25º dia.

As curvas de calibração para os policetídeos Fonsesinona A e B e Kotanina encontram-se a seguir:

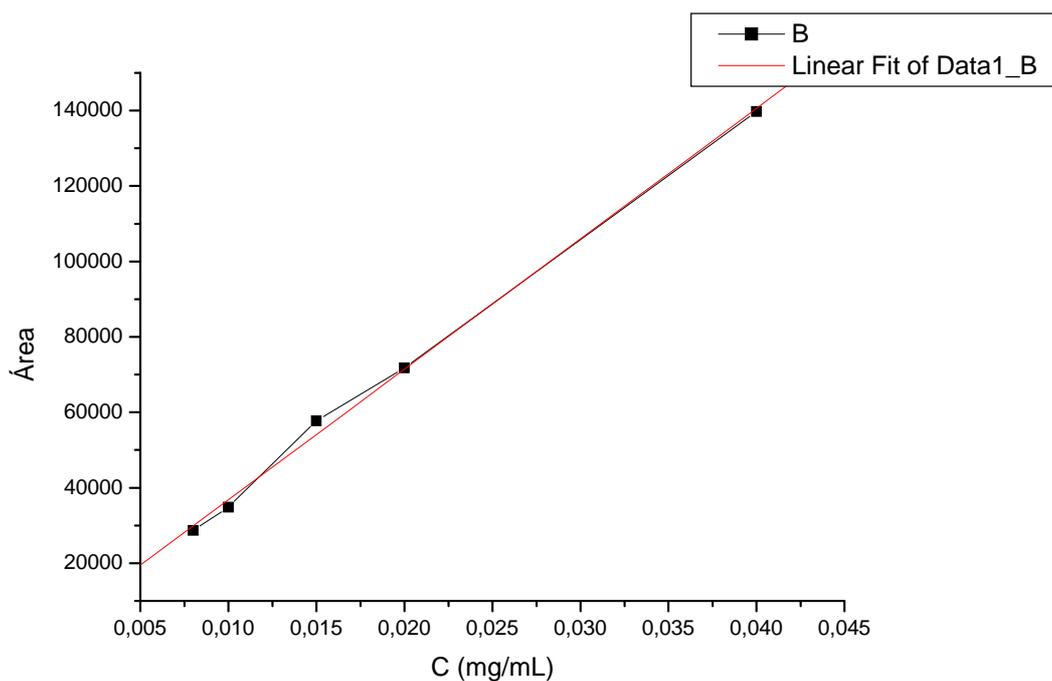


FIGURA 13 – Curva de Calibração para a Kotanina

Os parâmetros obtidos para a Kotanina estão na Tabela 4

TABELA 4 – Parâmetros obtidos para a Kotanina

A	B	R
-3301,4611	4,97565E7	0,99576

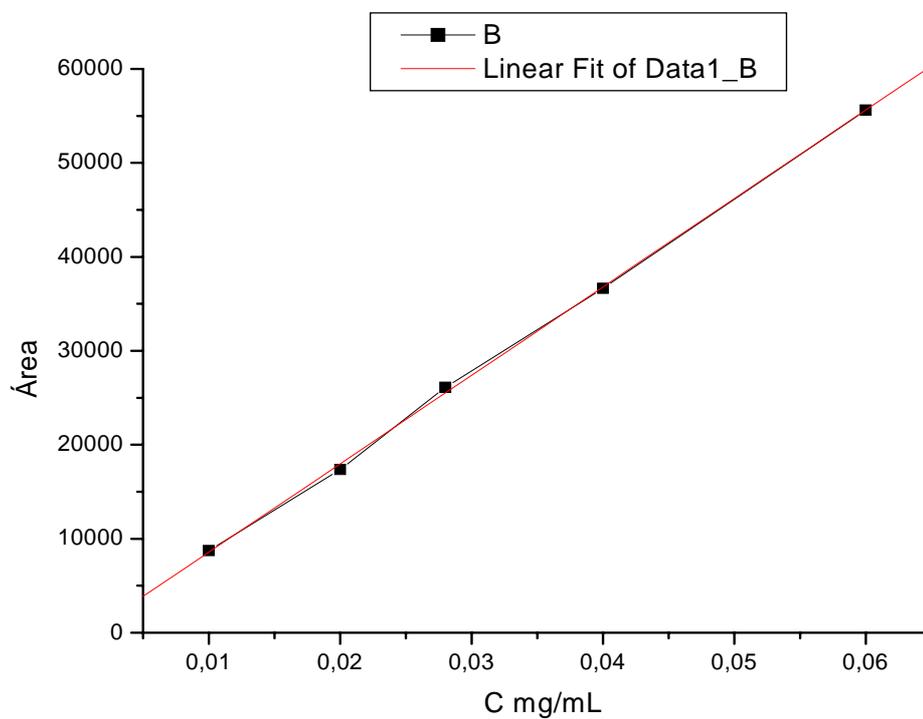


FIGURA 14 – Curva de Calibração para a Fonsesinona A

Os parâmetros obtidos para a Fonsesinona A estão na Tabela 4

TABELA 5 – Parâmetros obtidos para a Fonsesinona A

A	B	R
-852,42941	941272,95601	0,99969

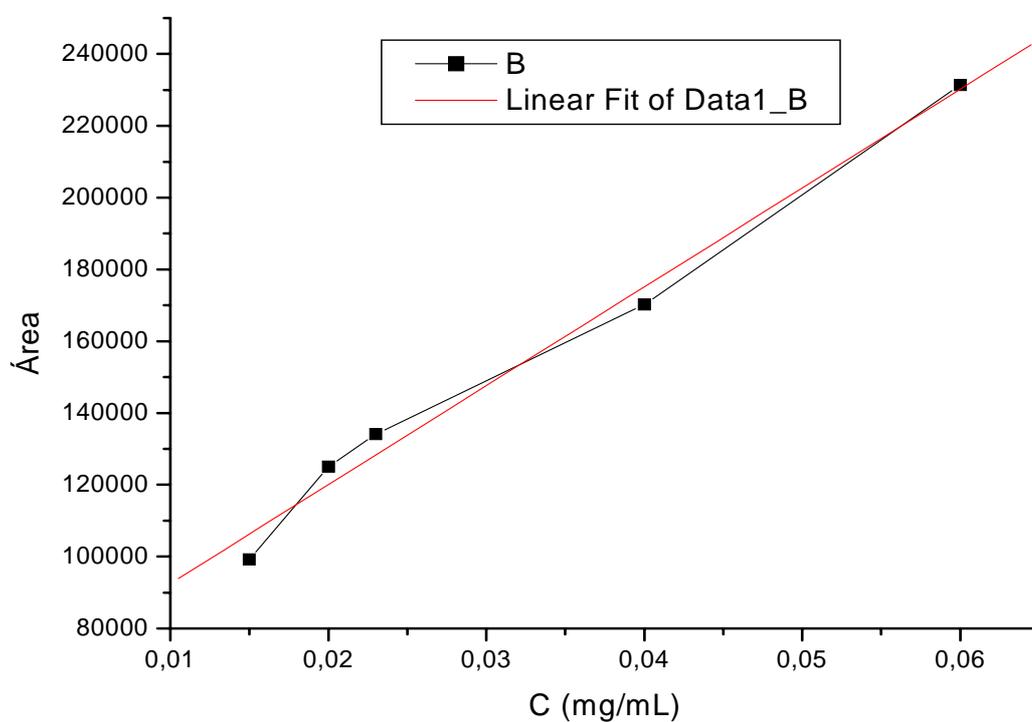


FIGURA 15 – Curva de Calibração para a Fonsesinona B

Os parâmetros obtidos para a Fonsesinona B estão na Tabela 5

TABELA 6 – Parâmetros obtidos para a Fonsesinona B

A	B	R
64985,62771	2,75394E6	0,99352

Depois de estabelecidos esses parâmetros foi feita à estimativa da concentração dos policetídeos nos diferentes tempos. Considera-se como uma estimativa, pois não foram feitos ainda os ensaios para a validação do método, ou seja: Ensaios de recuperação, robustez, limite de detecção, limite de quantificação e todos os parâmetros para validar a metodologia, com isso poderíamos calcular a concentração exata dos policetídeos nos extratos. como mostrado na Tabela 6.

TABELA 7 - Concentrações dos Policetídeos (valores em µg/Kg arroz)

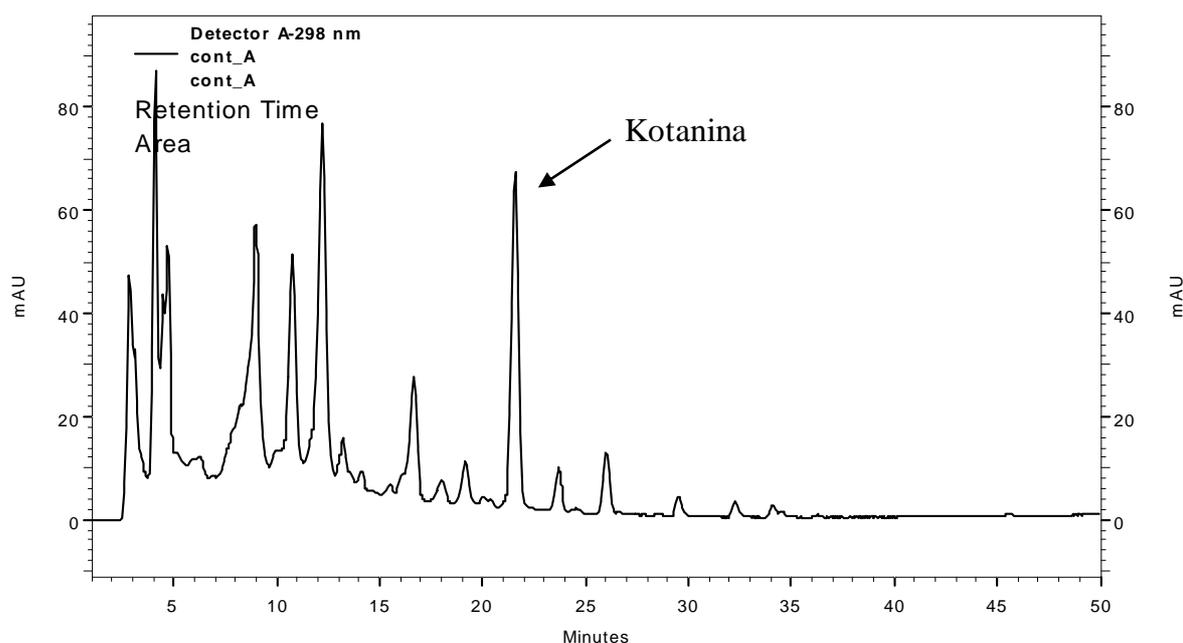
	T 12	T 13	T 14	Ext 25
Fonsecinona A		130,89	40,32	565,77
Fonsecinona B	5,28	195,79	185,13	800,88
Kotanina	163,39	1466	3003,64	2985,64

Analisando a tabela podemos verificar oscilações nas concentrações para os três policetídeos, de aumento e queda na concentração com o tempo, apenas a Kotanina que apresentou aumento linear na concentração com o tempo. Isso pode ser considerado como um processo metabólico do fungo, que pode estar utilizando esse policetídeo em seus processos catabólicos, ou seja, após produzir a substância no processo metabólico, o fungo atinge o estágio anabólico onde a concentração da substância tende a ficar constante. Quando se atinge o processo catabólito o fungo pode estar utilizando o metabólito em outras

reações e depois passa a produzi-lo novamente. Isso certamente provoca as oscilações nas concentrações com o passar do tempo.

### 4.3 – BIOTRANSFORMAÇÃO DE FENÓIS E ANÁLOGOS POR *Aspergillus aculeatus*

Os resultados verificados para a análise de policetídeos por *Aspergillus aculeatus* mostrou a capacidade desse fungo em polimerizar substâncias, pois nas condições empregas só conseguimos detectar e quantificar os dímeros, não sendo possível encontrar os monômeros. Experimentos de biotransformação com esse fungo mostraram que esse fungo foi capaz de modificar a estrutura de alguns fenóis e análogos. Os principal parâmetro verificado para a transformação foi o tempo de retenção apresentado pela substância padrão, comparado ao tempo de retenção quando a substância fica em contato com o fungo durante seu crescimento. A seguir temos o cromatograma controle, apenas o fungo no meio de cultura, sem as substâncias adicionadas.

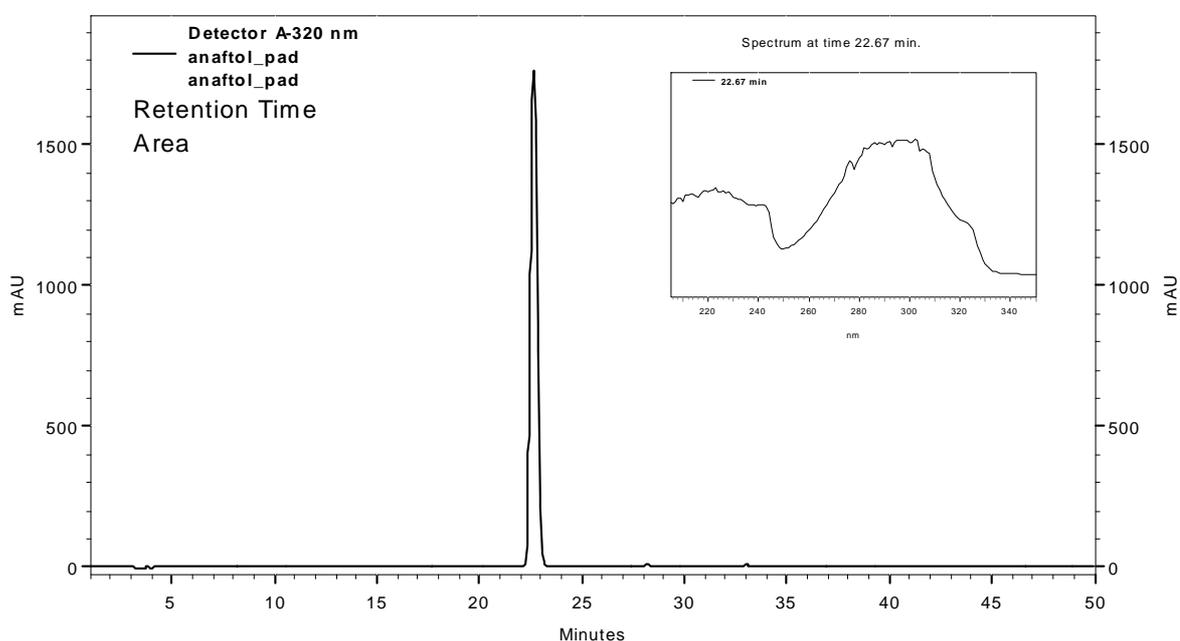


CROMATOGRAMA 18 – Amostra controle

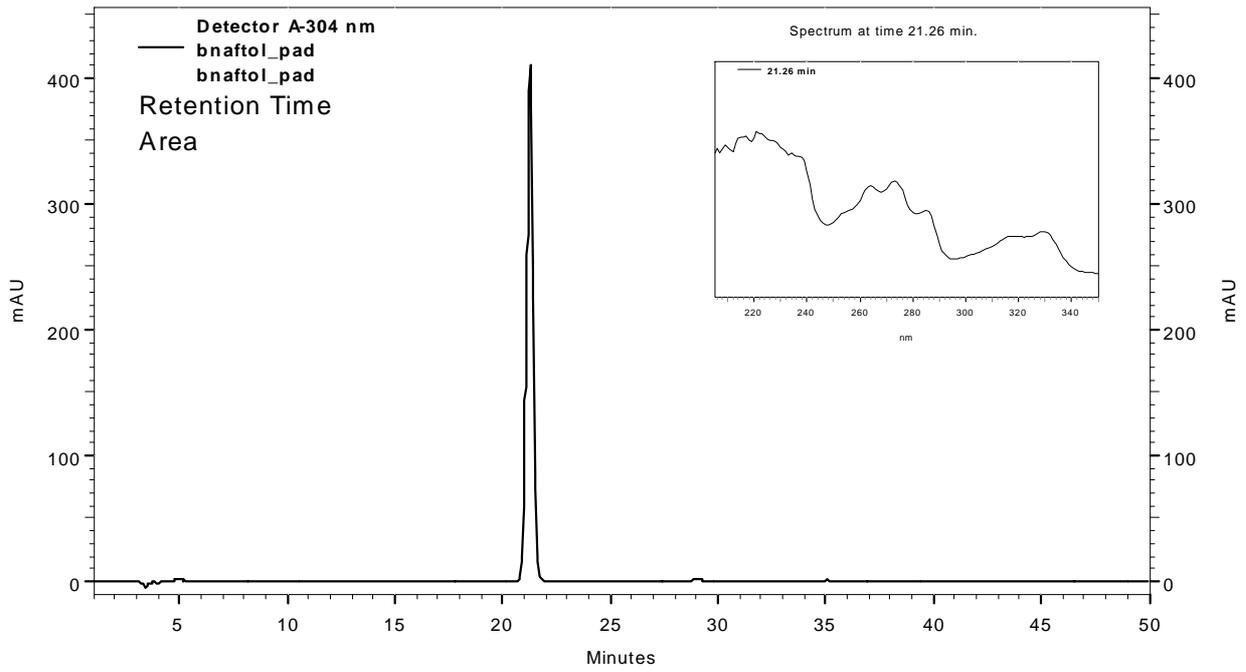
Podemos observar no cromatograma que o fungo produz muitas substâncias, evidenciados pelo número de picos que aparecem no cromatograma. Pode-se verificar a presença de Kotanina, o policetídeo também identificado e quantificado no experimento anterior, mas cultivado em meio arroz. Isto mostra que o *Aspergillus* pode produzir policetídeos tanto em meio sólido como em meio líquido. Para as análises separamos o experimento em análise dos padrões e análise do extratos.

### 4.3.1 – Análise do padrões

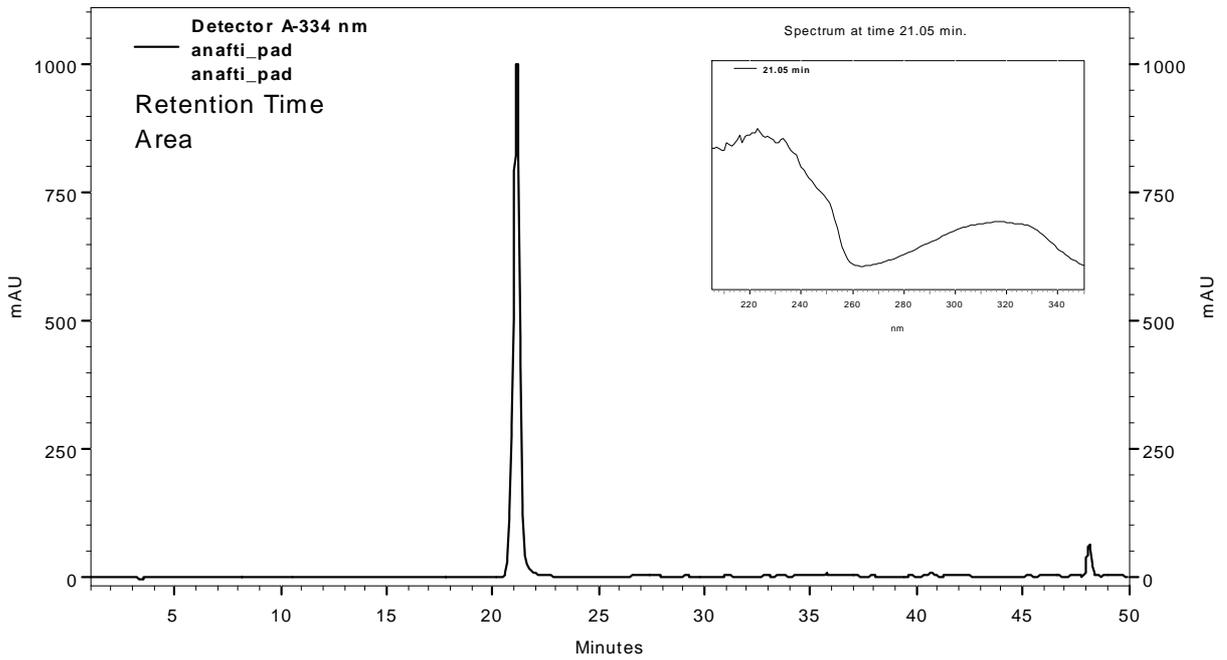
Os padrões empregados nas análise foram Antraquinona,  $\alpha$  e  $\beta$  Naftol e Naftilamina. Essas substâncias apresentaram os seguintes perfis cromatográficos:



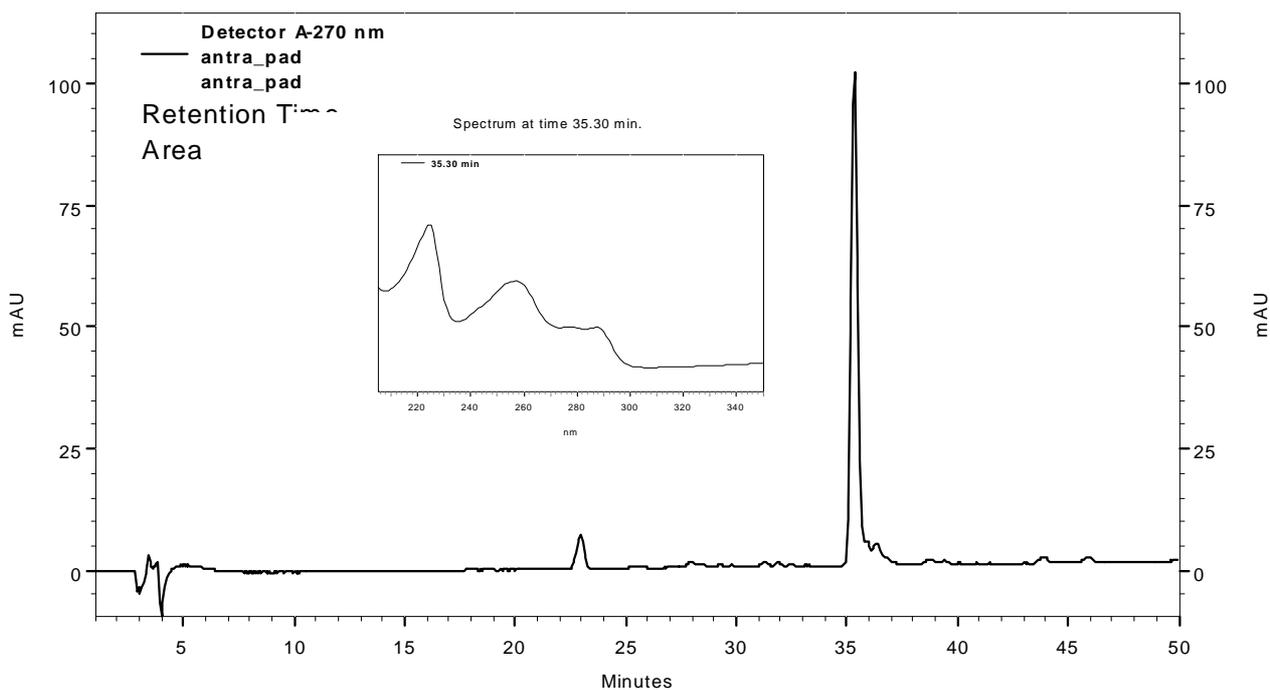
CROMATOGRAMA 19 -  $\alpha$  Naftol



CROMATOGRAMA 20 -  $\beta$  Naftol



CROMATOGRAMA 21 -  $\alpha$  Naftilamina



## CROMATOGRAMA 22 – Antraquinona

O método cromatográfico mostrou-se bastante adequado para a análise desses padrões, destacando a diferença nos espectros de UV-Vis apresentado pelo  $\alpha$  Naftol e o  $\beta$  Naftol, que embora sejam isômeros, seus espectros são completamente diferentes e seus tempos de retenção são bastante próximos.

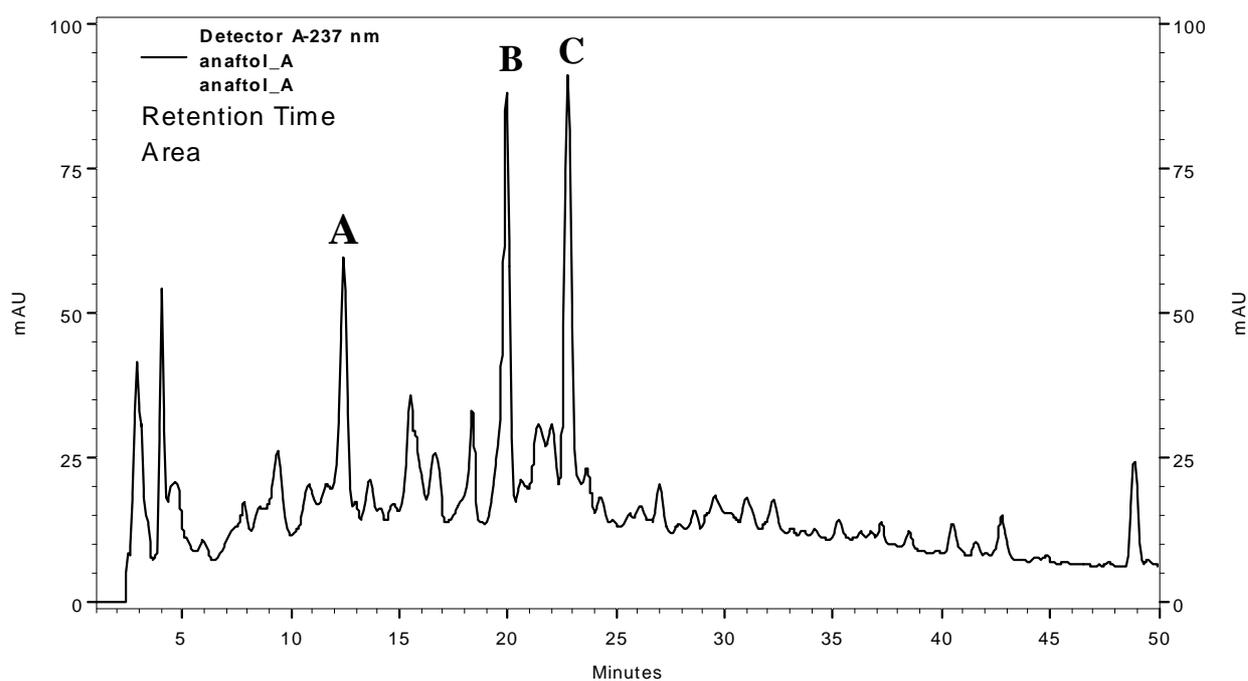
### 4.3.2 – Análise do Extratos

Os cromatogramas dos extratos contendo o fungo + substância foram comparados com os padrões através dos tempos de retenção e espectros de Uv-Vis.

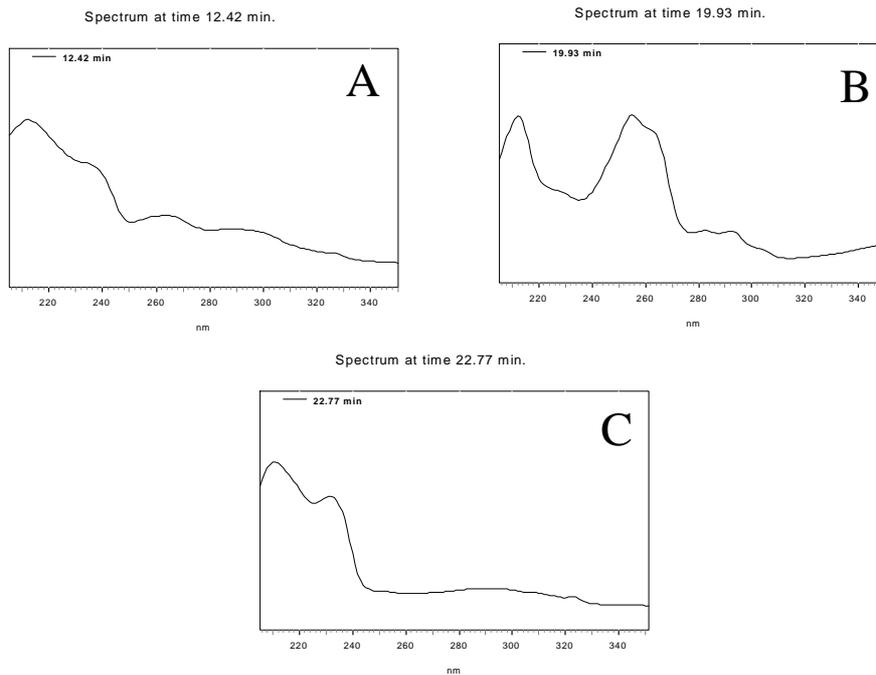
Através das análises dos Cromatogramas, podemos ver pelo Cromatograma 23 que o  $\alpha$ -naftol não foi detectado no extrato através do espectro de Uv-Vis, mas no cromatograma do extrato temos um pico com tempo de retenção igual ao do  $\alpha$ -naftol, isso mostra que o substrato pode

estar sendo modificado pelo fungo. Com relação ao  $\beta$ -naftol e  $\alpha$ -naftilamina, os picos dos extratos que apresentavam tempos de retenção próximos aos desses compostos, mostrou espectros de UV bastante diferentes daqueles dos padrões (ver Cromatogramas 24 e 25). Isso certamente pode significar que os compostos sofreram biotransformações, pois os mesmos não foram detectados no cromatograma do controle, que apresenta uma quantidade menor de picos.

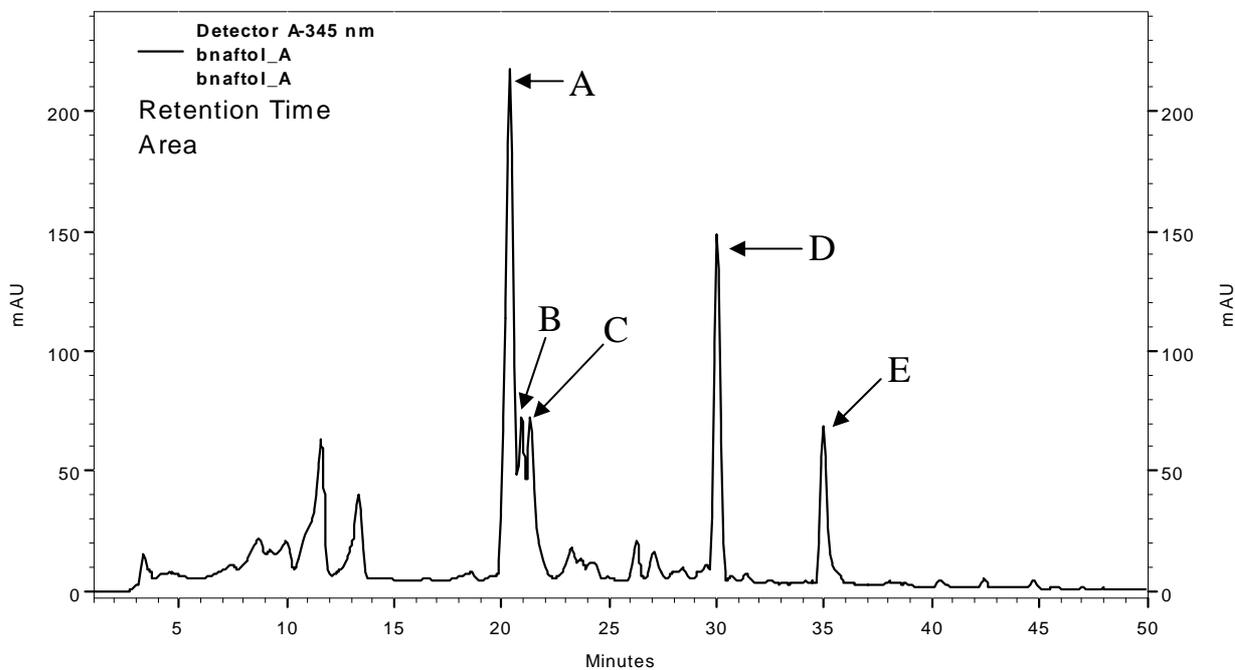
A substância antraquinona foi detectada nos extratos, e apresentou o mesmo tempo de retenção e espectro de UV do padrão, mostrando que certamente não houve a transformação pelo fungo (Cromatograma 26).



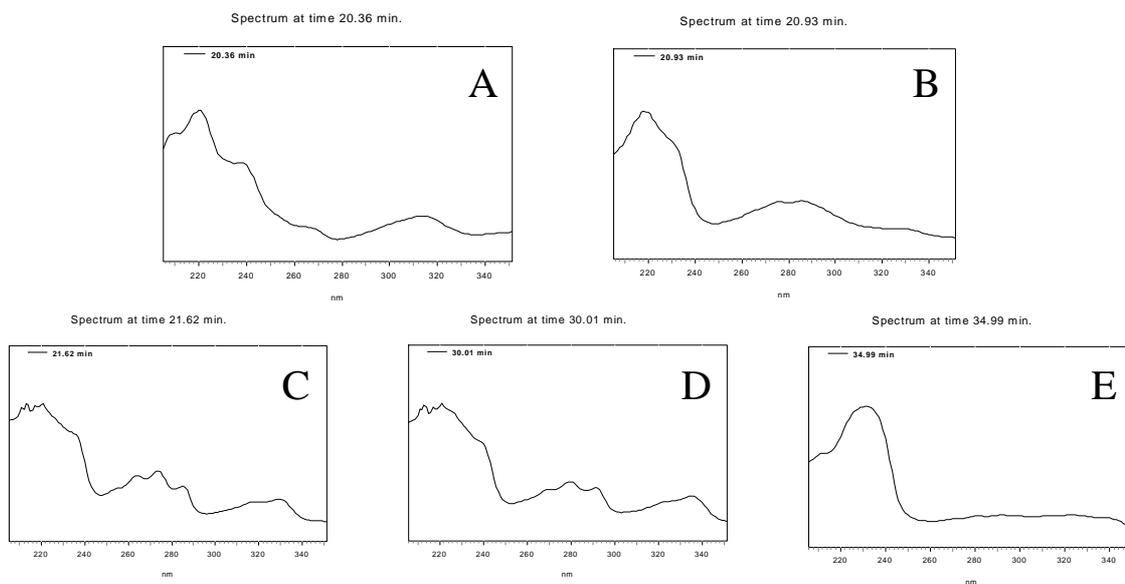
CROMATOGRAMA 23 - Amostra – fungo +  $\alpha$  naftol – extraído com acetato de etila



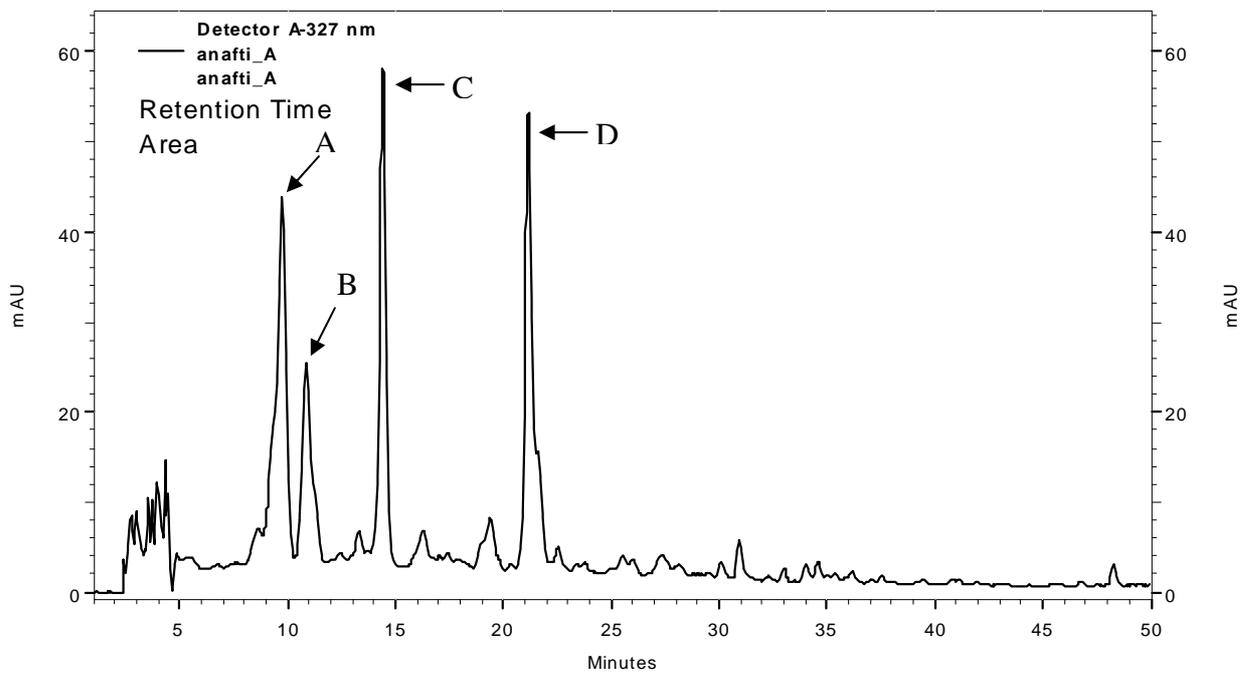
ESPECTRO 14 – Extrato de  $\alpha$  Naftol + Fungo



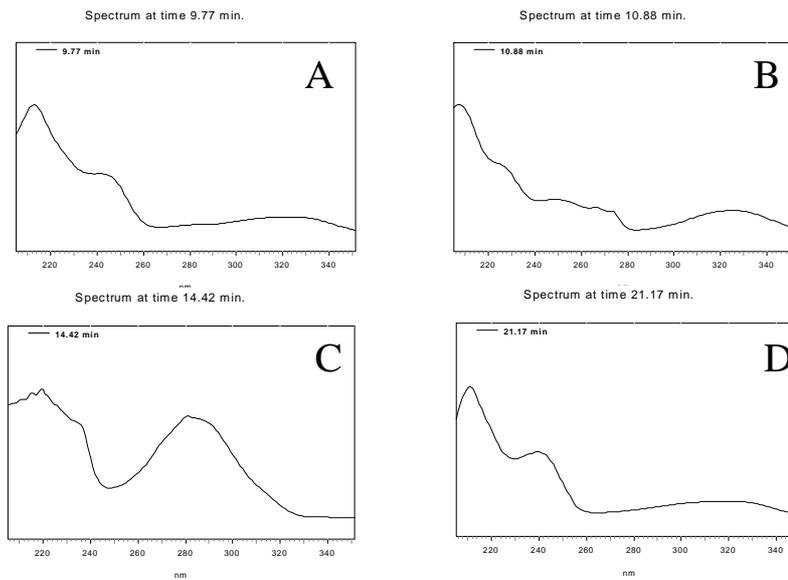
CROMATOGRAMA 24 - Extrato  $\beta$  naftol + fungo



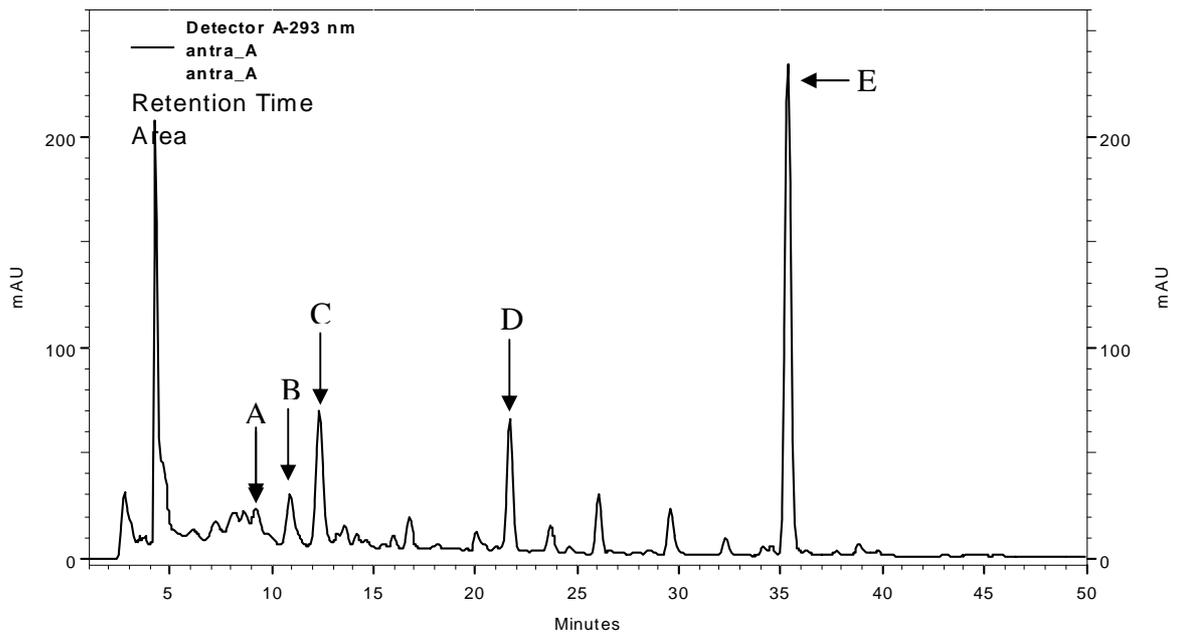
ESPECTRO 15 – Extrato de  $\beta$  Naftol + Fungo.



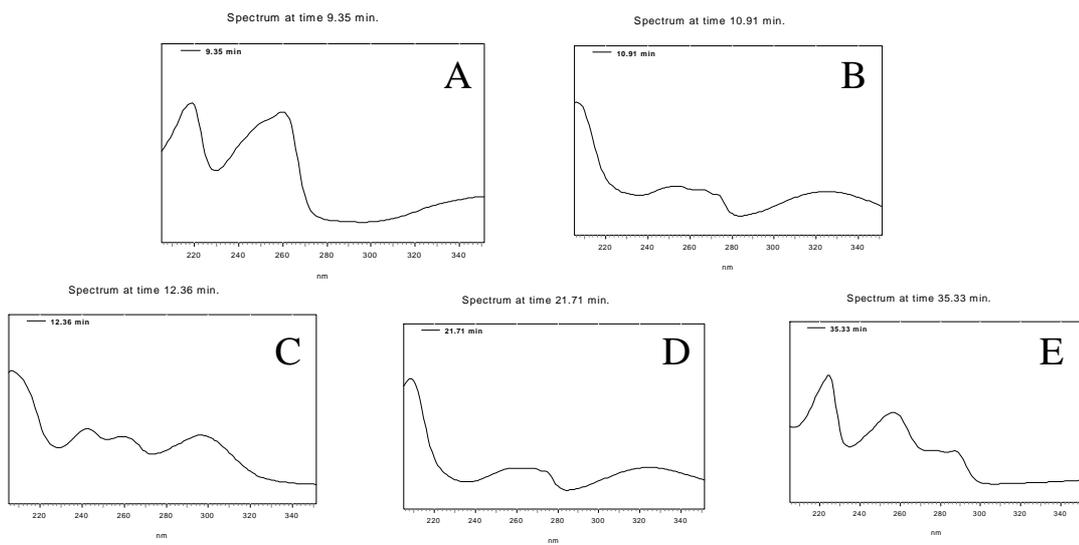
CROMATOGRAMA 25 – Extrato de  $\alpha$  Naftilamina + Fungo



ESPECTRO 16 – Extrato de  $\alpha$  Naftilamina + Fungo



CROMATOGRAMA 26 – Extrato Antraquinona + Fungo



ESPECTRO 17 - Extrato Antraquinona + Fungo

Esses experimentos de biotransformação mostraram que os espectros de Uv-Vis e a Absorbância de alguns dos compostos padrões, sofreram modificações, conseqüentemente a estrutura química dos compostos também se modificou. Essas mudanças mostram a capacidade do fungo *Aspergillus aculeatus* em modificar a estrutura de certas substâncias para ser utilizado em alguma etapa de seu metabolismo.

Para que a biotransformação possa ser entendida em detalhes, experimentos de RMN e Espectrometria de Massas poderia nos mostrar como as substâncias se modificaram, que funções químicas foram transformadas e quais as características dos compostos formados. Entretanto essas análises cromatográficas servem como uma ferramenta muito útil para verificarmos quais compostos podem ser transformados e também para otimizar as condições de cultivo e posteriormente detectarmos e elucidarmos a estrutura dos novos compostos formados na biotransformação.

## **5 – CONCLUSÕES**

---

Através dos experimentos para a detecção de terpenóides por *Pestalotiopsis disseminata*, foi possível detectarmos a presença do sesquiterpeno Taedolidol nos extratos do microrganismo cultivado em arroz, o que já é um diferencial de experimentos anteriores onde o composto foi isolado de meio líquido enriquecido com açúcares e sais. O interesse nessa classe de compostos se dá no sentido deles apresentarem grande atividade imunossupressora e ser possíveis marcadores de espécies de *Pestalotiopsis* capazes de produzir Taxol.

A metodologia de análise utilizando HPLC não se mostrou muito eficiente devido a baixa absorção do composto no UV, mas através de experimentos de LC/MS foi possível detectarmos o composto, através de seu espectro de massas, pois mesmo realizando experimentos de *Full Scan*, o taedolidol se fragmenta na fonte de APCI e assim obtemos seu espectro de massas, e a comparação dos espectros de massas do padrão com o dos extratos nos fornece a informação de que o Taedolidol está presente no extrato.

O estudo das fragmentações do composto nos forneceu uma comprovação da maioria dos picos apresentados no espectro de massas, com isso podemos confirmar a presença do composto no extrato através do estudo da fragmentação, que confirma a presença de cada um dos íons formados durante a análise do HPLC/MS.

Esse método de detecção de terpenóides pode ser uma grande ferramenta de análise para detectarmos outros sesquiterpenos e até taxanos, como o taxol, sem a necessidade de isolamento, apenas com etapas simples de extração e análise. Isso pode contribuir muito para o estudo de metabólitos de fungos, pois pode servir como ferramenta para marcar espécies de *Pestalotiopsis* produtoras de terpenóides e com isso chegar às espécies possíveis produtoras de taxol.

O estudo de outras espécies de *Pestalotiopsis* servirá para que possamos aplicar o método para diferenciar espécies produtoras de determinados sesquiterpenos e classificar a espécie como possível produtora de taxol.

Os experimentos de detecção de substâncias voláteis produzidos por *Pestalotiopsis disseminata* mostrou que o fungo é potencial produtor de substâncias voláteis, evidenciado pelos picos apresentados nos cromatogramas do extratos comparado com o controle, onde não ficou evidenciado a presença de compostos voláteis, nas condições de análise empregadas. Mas a identificação das substâncias ainda precisa ser feita, através de injeção de padrões e Index de Kovats, além de estudos de fragmentação. Na literatura não há nenhum relato do estudo de voláteis de *Pestalotiopsis*, portanto estes experimentos servem de ponto de partida para outros experimentos, inclusive com outras técnicas de extração, além do extrator de clewenger, a Aeração e a Micro Extração em Fase Sólida (SPME) podem ser testadas para a detecção rápida de substâncias voláteis.

O estudo com *Aspergillus aculeatus* mostrou mais uma vez que o fungo produz policetídeos, mas conseguimos detectar e quantificar os policetídeos em tempos de cultivo menor que aquele apresentado em experimentos anteriores. Os monômeros não foram detectados, embora os cromatogramas apresentassem picos não identificados, podendo ser os monômeros. Experimentos de LC/MS poderia confirmar a presença ou não dos monômeros. A curva de produção comprovou as fases de crescimento do fungo através da quantificação dos policetídeos nas diferentes fases. No metabolismo, as substâncias são produzidas, no anabolismo, ocorre uma estabilização da produção dos metabólitos e a fase de catabolismo, quando o fungo começa a consumir esses metabólitos para outros processos, isto justifica a oscilação nas concentrações dos policetídeos ao longo do tempo.

Os experimentos de biotransformação com *Aspergillus aculeatus* mostrou que esse fungo possui a capacidade de transformar substratos, mostradas pelas modificações nos tempos de retenção e espectros de alguns fenóis e análogos, isso pode justificar o processo de polimerização dos policetídeos em determinada fase do metabolismo do fungo.

Finalmente todos esses estudos com metabólitos secundários de fungos endofíticos contribui para um melhor entendimentos das relações ecológicas desses fungos com as plantas de onde foram isolados como endofíticos, pois verificamos que o fungo quando encontra-se em associação com a planta produz um determinado metabólito ou transforma um determinado metabólito e isso continua a ocorrer quando o fungo é isolado e cultivado em meios artificiais, isso pode mostrar que o fungo adquiriu a capacidade de produzir aquelas substâncias e a carga genética da planta foi transferida para o fungo e vice versa, a chamada transferência genética horizontal pode estar ocorrendo.

Todas essas afirmações necessitam de estudos mais detalhados para que essas relações possam ser entendidas de uma maneira mais específica, através de uma comparação de diversos experimentos já realizados e novos experimentos possam ser confrontados para que o conhecimento dos microrganismos endofíticos possa crescer e contribuir muito para as pesquisas visando melhorar a qualidade de vida e também para a contribuição científica

## **6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 3<sup>a</sup> ed. Nova York, Academic Press, 1988.
- ALEXOPOULOS, C. J.& MIMS, C. W. *Introductory Mycology*. 4<sup>a</sup> ed. Nova York, J. Wiley & Sons, 1996.
- BINSFELD, P.C.; WINGENDER, R.; SCHNABL, H. *Theoretical and Applied Genetics*, **12** (3): 263-272 (2000).
- BUCHI, G.; KLAUBERT, D.H.; SHANK, R.C. “Structure and synthesis of kotanin and desmethylkotanin, metabolites of *Aspergillus glaucus*”. . *The Journal of organic chemistry*, **36** (8): 1143-7 (1971).
- CAMPOS, F. R. “Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microbispora* sp. isolados como microrganismos endofíticos de *Melia azedarach* (Meliácea).” São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 282p.
- CAMPOS, F. R.; BARISON, A., DAOLIO, C.; FERREIRA, A.G.; FILHO, E.R. “Complete 1H and 13C NMR assignments of aurasperone A and fonsecinone A, two bis-naphthopyrones produced by *Aspergillus aculeatus*.” *Magnetic Resonance in Chemistry*. **43** (11), 962-965 (2005).
- DEY, S.; MAITI, T.K.; BHATTACHARYA, B.C. “Production of some extracelular enzymes by a lignin peroxidase-producing brown rot fungus, *Polyporus ostreiformis*, and its comparative abilities for lignin degradation and dye decolorization”. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, (11), 4216-4218 (1994).

- EVERT, D.R.; RETNAYAKE, S. "Bioactive constituents from the twigs of *Asimina parviflora*." *Journal of natural product*. **55** (10) 1462-7 (1992).
- HAVEN, P.H.; RAY, F.E.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. 5<sup>a</sup> ed, Guanabara Koogan S.A., 1992.
- MAGNANI, R.F.; FILHO, E.R.; *et al.* "Three highly oxygenated caryophyllene sesquiterpenes from *Pestalotiopsis* sp., a fungus isolated from bark of *Pinus taeda*". *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **58** (5/6): 319-324 (2003).
- PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; LEITE. B. "Mecanismos de patogenicidade em fungos." *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. **6**: 1-47 (1998)
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. *Microbiologia*. **1,2**: São Paulo, Mc Graw-Hill, 1981.
- PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. "Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, **1**: 185-196 (1992),
- PETRINI, O.; KUHLS, K.; "Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93** (15): 7755-7760 (1996).

- PULIC, M.; FUMIO, S.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; YOSHIDA, S. “Metabolites of Endophytic Fungi of *Taxus brevifolia*: the First Highly Functionalized Humulane of Fungal Origin”. *Journal of Chemical Research*, 378-379 (1997).
- PULIC, M.; FUMIO, S.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; YOSHIDA, S. “Metabolites of *Pestalotiopsis* sp. Endophytic fungi of *Taxus brevifolia*.”. *Phytochemistry*, **46** (2): 313-319 (1997).
- SANTOS, M. R. G. “Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2003. Tese de Doutorado, 432p.
- SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U.; BOLYLE, C. “Endophytic-Host Interactions II. Defining Symbiosis of the Endophytic-Host Interaction”. *Symbiosis*, **25**: 213-227 (1998).
- SKOOG, D.A & LEARY, J.J. *Principles of Instrumental Analysis*. 4<sup>a</sup> ed. Fort Worth, Saunders College Publishing, 1992.
- STIERLE, A.; STROBEL, G. A. “Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew”. *Science*, **260**: 214-216 (1993).
- STIERLE, A.; STROBEL, G. A. “The Search for a Taxol-Production Microorganism Among the Endophytic Fungi of the Pacific Yew, *Taxus brevifolia*”. *Journal of Natural Products*, **58** (9): 1315-1324 (1995).

- STROBEL, G. A., YAN, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; *et al.* “Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an Endophytic Fungus of *Taxus wallachiana*”. *Microbiology*, **142**: 435-440 (1996).
- STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E.. “Taxol from Fungal Endophytes and the issue of Biodiversity”. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **17** (5-6): 417-423 (1996).
- STROBEL, G.A.; HESS, W. M.; LI, J. Y.; *et al.* *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the *wollemi pine*, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botany*, **45** (6): 1073-1082 (1997).
- STROBEL, G.A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D. M. “Isopestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, Possessing Antifungal and Antioxidant Activities”. *Phytochemistry*, **60**: 179-183 (2002).
- TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, M. J. S.; LUNA, E. A. “Taxonomia de *Aspergillus*. *Rev. U. A. Série: Ciências da Saúde*, **3** (1/2): 13-26 (1994).
- WANI, M.C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGOON, P. & MCPHAIL, A. T. “Plant Antitumor Agents. The Isolation and Structure of Taxol, a novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*”. *Journal of the American Chemical Society*, **93** (9): 2325-2327 (1971).