

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

**“ESTUDOS BIOSINTÉTICOS DE AMIDAS BIS-
FENILPROPANOÍDICAS PRODUZIDAS PELO FUNGO *Penicillium
brasilianum*, UM ENDOFÍTICO DE *Melia azedarach*
(MELIACEAE)”.**

TAÍCIA PACHECO FILL*

*** BOLSISTA FAPESP**

**SÃO CARLOS-SP
2009**

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

**“ESTUDOS BIOSINTÉTICOS DE AMIDAS BIS-
FENILPROPANOÍDICAS PRODUZIDAS PELO FUNGO *Penicillium
brasilianum*, UM ENDOFÍTICO DE *Melia azedarach*
(MELIACEAE)”.**

TAÍCIA PACHECO FILL*

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** BOLSISTA FAPESP**

**SÃO CARLOS-SP
2009**

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

F484eb

Fill, Taícia Pacheco.

Estudos biossintéticos de amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum*, um endofítico de *Melia azedarach* (Meliaceae) / Taícia Pacheco Fill. -- São Carlos : UFSCar, 2009.

157 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Biossíntese. 2. Fungos endofíticos. 3. Fenilpropanóide. 4. Espectrometria de massas. 5. Fenilalanina amônia-liase. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

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

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Taicia Pacheco Fill**, realizada em 12 de fevereiro de 2009:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dra. Maria Fatima das G. F. da Silva



Prof. Dra. Maysa Furlan

Agradecimentos especiais

Ao Professor Dr. Edson Rodrigues Filho pela orientação, por estar sempre presente, pelo suporte, respeito e principalmente pela amizade e ótimos anos de convivência.

As Professoras Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Dra. Maysa Furlan pela participação na banca.

Aos meus pais, Lucema e Carlos, pelo apoio em todos os momentos, compreensão, amor, respeito e suporte.

A toda a minha família, especialmente meu irmão, meus avós e minhas tias pelo carinho e força.

Ao Henrique por estar sempre ao meu lado, pela dedicação e amor.

Aos Professores do Depto de Química pelo convívio, amizade e ensinamentos.

A todos os amigos do Depto de Química pela ótima convivência durante todo o período de trabalho.

Ao pessoal do LaBioMMi (Malu, Amanda, Enzo, Victor, Helô, Mari, Florim, Naty, Juliana, Gezimar, Marília, Thais, Rodrigo, Bianca, Mattielo, Ângelo, Diego, Joseph, Cíntia, Diana, Renata). Muito obrigada pelo companheirismo, amizade e valiosas sugestões.

Ao corpo Técnico de Departamento de Química da UFSCar pelo apoio e serviços prestados durante a execução do trabalho.

Ao pessoal de Maringá pela colaboração cedendo as cepas para ensaios antimicrobianos.

Ao Dr. Guilherme Miola Titato pelas análises realizadas no espectrômetro de massas de alta resolução.

A empresa Applied Biosystems, principalmente a Dra. Anna Silvia Marques pela parceria nas análises por espectrometria de massas.

As minhas amigas Lívia, Luciana e Stella por sempre estarem ao meu lado, pelas parcerias nos trabalhos, pelo carinho e respeito.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Química da UFSCar.

À Fapesp pela bolsa concedida.

Sumário

	Pág
1.0 Introdução	1
1.1. Micro-organismos como fonte de metabólitos secundários	2
1.2. Interações entre plantas e fungos	3
1.3. Fenilpropanóides produzidos por fungos	5
1.4. Enzima Fenilalanina Amônioliase (PAL)	6
1.5. Amidas bisfenilpropanoídicas e sua potencialidade como fármacos	9
1.6. Policetídeos da classe GKK1032	12
1.7. Biossíntese dos membros GKK1032	13
1.8. Exigências de crescimento e formulação do meio de cultivo	15
1.9. Otimização da produção de metabólitos secundários	17
1.10. Espectrometria de massas	19
1.10.1. Analisadores de massas	20
1.10.2. Espectrometria de massas tandem	23
1.10.2.a Aquisição no modo <i>full scan</i>	23
1.10.2.b Aquisição no modo MS/MS (experimento de íons produtos).	23
1.10.2.c Aquisição no modo SRM (Selected Monitoring Reaction)	24
2. Objetivos	25
3. Parte Experimental	27
3.1. Equipamentos	28
3.2 Materiais Cromatográficos	29
3.3 Reagentes e materiais utilizados	30
3.4. Parte experimental	31
3.4.1. Cultivo do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	31
3.4.2. Preparo da suspensão de esporos do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	32
3.4.2.a Contagem do número de conídios em placa	32
3.4.3. Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em larga escala visando o estudo químico dos extratos	33
3.4.4. Estudo químico dos extratos de <i>P. brasilianum</i>	34
3.4.5. HPLC analítico e preparativo para isolamento das brasiliamidas e substâncias co-produzidas pelo fungo <i>P. brasilianum</i>	36
3.4.6. Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em meio sólido enriquecido com aminoácido	37
3.4.7. Protocolo de extração em meio sólido para o cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i>	38

3.4.8. Análises otimizadas por HPLC/UV	39
3.4.9. Curva de produção em arroz do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	39
3.4.10. Curva de produção de brasiliamidas em canjica do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	41
3.4.11. Curva de produção em meio líquido do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	42
3.4.12. Quantificação da massa micelial do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	43
3.4.13. Análises das curvas de produção por espectrometria de massas	44
3.4.14. Estudo da influência de aditivos nitrogenados no metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i>	46
3.4.15. Estudo de quantificação das brasiliamidas nos meios de cultura com diferentes composições nitrogenadas	48
3.4.16. Estudo da influência da concentração de L-fenilalanina na produção das amidas bis-fenilpropanoídicas	49
3.4.17. Estudo da adição de L-fenilalanina em diferentes tempos de cultivo do microorganismo <i>P. brasilianum</i>	49
3.4.18. Estudo da biossíntese de fenilpropanóides produzidos pelo fungo <i>P. brasilianum</i>	50
3.4.19. Isolamento da substância brasiliamida A com incorporação isotópica para posteriores análises espectroscópicas	51
3.4.20. Extração da enzima Fenilalanina amônoliase (PAL)	52
3.4.20. Análises de HPLC/UV e espectrometria de massas dos ensaios enzimáticos.	53
3.4.21. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) da substância brasiliamida A (placa de Elisa).	54
3.4.21.1 Ativação das bactérias.	55
3.4.21.2 Padronização das culturas.	56
3.4.21.3. Preparo da amostra.	56
3.4.21.4. Preparo do antibiótico controle.	56
3.4.21.5. Ensaio para medir a MIC.	56
3.4.21.6. Verificação do tipo de atividade	57
3.5. Estudos com o micro-organismo <i>Penicillium</i> sp., isolado como endofítico de <i>Murraya paniculata</i>	58
3.5.1 Cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp.	58
3.5.2. Preparo da solução de esporos e contagem de conídios em placa do fungo <i>Penicillium</i> sp. isolado de <i>Murraya paniculata</i> .	59
3.5.3. Cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. isolado de <i>Murraya paniculata</i> em meio sólido.	59
3.5.4. Cultivo do micro-organismo <i>Penicillium</i> sp. em meio líquido	60
3.5.5. Extração de fase sólida dos extratos do fungo <i>Penicillium</i> sp.	60

3.5.6. Cultivo em canjica do fungo <i>Penicillium</i> sp. isolado de <i>M. paniculata</i>	61
3.5.7. Cultivo do micro-organismo <i>Penicillium</i> sp. em meio líquido com a adição de aminoácidos no meio de cultura.	62
3.5.8. Análise por espectrometria de massas	63
4. Resultados e discussão	65
4.1. Estratégia de estudo	66
4.2. Isolamento e identificação das amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo <i>P. brasilianum</i>.	67
4.2.1. Isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas e substâncias co-produzidas pelo fungo <i>P. brasilianum</i>.	67
4.2.2. Caracterização da substância brasiliamida A	70
4.2.2.a Caracterização da substância brasiliamida A por Ressonância Magnética Nuclear	70
4.2.2.b Estudo de caracterização estrutural por espectrometria de massas da substância brasiliamida A	76
4.2.3. Caracterização estrutural da substância brasiliamida B	84
4.2.3.a Caracterização estrutural da brasiliamida B por espectrometria de massas	84
4.2.3.b Caracterização da substância brasiliamida B por Ressonância Magnética Nuclear	86
4.2.4 Caracterização estrutural das substâncias co-produzidas pelo fungo <i>P. brasilianum</i> (<i>Melia azedarach</i>)	87
4.2.4.a Caracterização estrutural da substância verruculogenina.	87
4.2.4.b Caracterização estrutural do ácido penicílico.	90
4.2.4.c Caracterização estrutural do meroterpenóide neoaustina	92
4.3. Estudo de produção e biossíntese de amidas bis-fenilpropanoídicas	96
4.3.1 Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> com o meio enriquecido com L-fenilalanina	96
4.3.2. Estudo da cinética de produção das amidas bis-fenilpropanoídicas (Curva de produção)	98
4.3.3. Curva de produção em meio Czapek suplementado com o aminoácido L-fenilalanina	104
4.3.4. Estudo da influência de aditivos nitrogenados no metabolismo secundário de <i>P. brasilianum</i>	107
4.3.5. Quantificação da biomassa do fungo <i>P. brasilianum</i> isolado de <i>Melia azedarach</i>	112
4.3.6. Estudo visando à quantificação das amidas bis-fenilpropanoídicas em diferentes meios de cultivo	114
4.3.7. Estudo da influência da concentração de L-fenilalanina na produção das brasiliamidas	118
4.3.8. Estudo da adição de L-fenilalanina em diferentes tempos de	119

cultivo do micro-organismo <i>P. brasilianum</i>	
4.3.9. Estudo da biossíntese das amidas bis- fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo <i>P. brasilianum</i>	121
4.3.10. Ensaio enzimático visando à detecção Fenilalanina amônioliase	134
4.4. Ensaio biológico da substância brasilamida A (Placa de Elisa)	138
4.5. Estudo de amidas produzidas por outra espécie de <i>Penicillium</i>	140
4.5.1 Análises por espectrometria de massas dos extratos obtidos do cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp.	140
4.5.2 Cultivo do micro-organismo <i>Penicillium</i> sp. em meio líquido com a adição de aminoácidos no meio de cultura	146
5. Conclusões	148
6. Bibliografia	151

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
FIGURA 1.1	Estrutura molecular dilactona do ácido diidrocafeico.	6
FIGURA 1.2	Estrutura molecular da 2,5-difenilbenzoquinona, um pigmento fúngico.	6
FIGURA 1.3	Exemplo de fenilpropanóides produzidos pela planta como defesa dos estresses bióticos e abióticos mencionados.	8
FIGURA 1.4	Estruturas moleculares das substâncias brasiliamida A e B respectivamente.	10
FIGURA 1.5	Estruturas moleculares das substâncias C,D e E respectivamente.	11
FIGURA 1.6	Estruturas moleculares dos membros GKK1032.	13
FIGURA 1.7	Incorporação dos precursores na molécula GKK1032 A2.	15
FIGURA 1.8	Diferentes perfis cromatográficos quando o fungo <i>P. brasilianum</i> foi cultivado em diferentes meios de cultura.	18
FIGURA 1.9	Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento.	20
FIGURA 1.10	Representação esquemática de um quadrupolo linear.	22
FIGURA 1.11	Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.	22
FIGURA 1.12	Analisador triplo quadrupolo operado no modo de aquisição <i>full scan</i> .	23
FIGURA 1.13	Analisador triplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “íons produtos”.	23
FIGURA 1.14	Analisador triplo quadrupolo operado no modo de aquisição “SRM”.	24

FIGURA	Placas de Petri contendo o fungo <i>P. brasilianum</i> frente e verso	31
3.4.1	respectivamente.	
FIGURA	Cultivo do micro-organismo <i>P. brasilianum</i> em arroz.	33
3.4.2		
FIGURA	Isolamento da substância brasiliamida A.	35
3.4.3		
FIGURA	HPLC preparativo-SHIMADZU.	37
3.4.4		
FIGURA	Micro-organismo cultivado em arroz enriquecido com o aminoácido	38
3.4.5	Phe	
FIGURA	Procedimento do protocolo de extração em meio sólido.	38
3.4.6		
FIGURA	Cromatógrafo líquido- SHIMADZU.	
3.4.7		39
FIGURA	Esquema da inoculação do fungo <i>P. brasilianum</i> em arroz.	40
3.4.8		
FIGURA	Cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em canjica.	41
3.4.9		
FIGURA	Espectrômetro de massas triplo quadrupolo-WATERS.	44
3.4.10		
FIGURA	Placa de Elisa.	57
3.4.11		
FIGURA	Micro-organismo <i>Penicillium</i> sp. de <i>Murraya paniculata</i>	58
3.5.1		
FIGURA	Cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. em arroz.	59
3.5.2		
FIGURA	Extração em fase sólida.	60
3.5.3		
FIGURA	Cultivo do micro-organismo <i>Penicillium</i> sp. em meio líquido com a	62
3.5.4	adição de aminoácidos no meio.	
FIGURA	Frações reunidas em B39, B45, B55 e B59 respectivamente.	67

4.1		
FIGURA	Cromatogramas obtidos para as análises das frações B39, B45, B55 e B59 no modo isocrático com 45%, 45%, 35% e 35% de ACN respectivamente.	68
4.2		
FIGURA	Cromatogramas obtidos para as frações B39, B45, B55 e B59 nas análises em escala preparativa.	69
4.3		
FIGURA	Espectro de RMN ¹ H para a substância brasiliamida A (400MHz); CDCl ₃ .	71
4.4		
FIGURA	Espectro ampliado da substância brasiliamida A na região desejada.	72
4.5		
FIGURA	Espectro ampliado da substância brasiliamida A na região desejada.	73
4.6		
FIGURA	Espectro de RMN ¹³ C da brasiliamida A (200MHz) CDCl ₃ .	
4.7		74
FIGURA	Proposta estrutural para a substância brasiliamida A.	76
4.8		
FIGURA	Espectro de massas (<i>full scan</i>) no modo de ionização positivo.	77
4.9		
FIGURA	Espectro de massas (<i>full scan</i>) com ionização ESI no modo negativo.	78
4.10		
FIGURA	Espectro de massas de íons produtos nos modos positivo e negativo respectivamente.	
4.11		79
FIGURA	Espectro de massas (<i>full scan</i>) para a substância brasiliamida A no modo positivo de ionização.	82
4.12		
FIGURA	Espectro de íons produtos para a substância brasiliamida A.	
4.13		83
FIGURA	Experimento <i>full scan</i> para a fração B59-21.	
4.14		84
FIGURA	Espectro de íons produtos para o composto brasiliamida B.	85

4.15		
FIGURA	Espectro de RMN ¹ H da brasiliamida B (400MHz- CDCl ₃).	86
4.16		
FIGURA	Estrutura molecular da substância brasiliamida B.	87
4.17		
FIGURA	CCD para as frações 12-25.	88
4.18		
FIGURA	Espectro de RMN ¹ H para a substância verruculogenina (400MHz- CDCl ₃).	88
4.19		
FIGURA	Estrutura molecular para a substância verruculogenina.	
4.20		90
FIGURA	Espectro de RMN ¹ H ácido penicílico (400MHz)- CDCl ₃ .	
4.21		91
FIGURA	Estrutura molecular do ácido penicílico.	92
4.22		
FIGURA	Espectro de RMN ¹ H neoaustina (400MHz)-CDCl ₃ .	
4.23		93
FIGURA	Estrutura molecular do meroterpenóide neoaustina.	
4.24		95
FIGURA	Estrutura molecular para o composto 7-deacetilandibenina.	
4.25		95
FIGURA	Cromatogramas obtidos para os cultivos em arroz (A) e arroz enriquecido com o aminoácido L-fenilalanina (B) respectivamente.	
4.26		97
FIGURA	Espectro de íons produtos no modo positivo de ionização para o aminoácido L-fenilalanina.	
4.27		99
FIGURA	Reprodutibilidade do espectrômetro de massas.	
4.28		99

FIGURA 4.29	Curva de produção obtida para o cultivo do fungo <i>P. brasilianum</i> em arroz (verde) e em arroz suplementado com o aminoácido L-fenilalanina (vermelho).	101
FIGURA 4.30	Curva de produção para a substância brasiliamida B produzida pelo fungo <i>P. brasilianum</i> cultivado em arroz (verde) e arroz suplementado com o aminoácido L-fenilalanina (azul).	102
FIGURA 4.31	Consumo de L-fenilalanina (vermelho) e produção de brasiliamida A (verde).	103
FIGURA 4.32	Curva de produção da substância Brasiliamida A em canjica.	104
FIGURA 4.33	Cromatogramas referentes ao meio líquido de cultivo Czapek sem (A) e com L-Phe (B) respectivamente.	105
FIGURA 4.34	Curva de produção da substância brasiliamida A em meio líquido Czapek.	106
FIGURA 4.35	Curva de produção da substância brasiliamida A em meio líquido Czapek suplementado com L-fenilalanina.	107
FIGURA 4.36	Estruturas moleculares e fotos do micro-organismo cultivado com os diferentes aditivos.	108
FIGURA 4.37	Cromatogramas obtidos dos extratos do cultivo do micro-organismo <i>P. brasilianum</i> com diferentes aditivos nitrogenados.	112
FIGURA 4.38	Quantificação da Biomassa do fungo <i>P. brasilianum</i> quando o meio foi suplementado com os aminoácidos L-fenilalanina (Phe), L-tirosina (Tir) e L-triptofano (Try) respectivamente.	113
FIGURA 4.39	Estrutura molecular do PI utilizado na quantificação.	115

FIGURA 4.40	Espectro de íons produtos do ester etílico de fenilalanina n-acetilado.	115
FIGURA 4.41	Bandas de integração geradas pelo equipamento da substância brasiliamida A e do PI respectivamente.	116
FIGURA 4.42	Curva de calibração para a quantificação de brasiliamida A.	117
FIGURA 4.43	Gráfico que avalia a produção de brasiliamida A nos meios de cultura com a adição de diferentes aditivos.	117
FIGURA 4.44	Gráfico mostra a influência da concentração de L-Phe na produção de brasiliamida A.	119
FIGURA 4.45	Figura mostra a influência da adição de L-Phe em diferentes tempos de cultivo.	120
FIGURA 4.46	Espectro de íons produtos para a [2- ¹³ C]-Phe (A) e para a L-Phe sem marcação (B) respectivamente.	121
FIGURA 4.47	Espectros de íons produtos (A) espectro gerado pelo equipamento que indica modelo isotópico da molécula brasiliamida A (B) espectro de íons produtos da substância brasiliamida A isolada.	123
FIGURA 4.48	Cromatogramas referentes ao padrão isolado de brasiliamida A (A) e ao extrato do cultivo do fungo com [2- ¹³ C]-Phe (B).	124
FIGURA 4.49	Espectros de íons produtos obtidos para o controle (Fungo+L-fenilalanina) (A) e para o extrato com adição de [2- ¹³ C]-Phe (B).	125
FIGURA 4.50	Espectro de massas (<i>full scan</i>) para a substância brasiliamida A padrão e modelo isotópico sugerido pelo software analyst.	126
FIGURA 4.51	Espectro de íons produtos para a substância padrão brasiliamida A.	127

FIGURA 4.52	Espectro de íons produtos para a substância brasiliamida A purificada a partir do extrato com a adição de [2- ¹³ C]-Phe.	127
FIGURA 4.53	Espectros sobrepostos da substância brasiliamida A padrão (vermelho) e da amida enriquecida isotopicamente (azul).	128
FIGURA 4.54	Espectros de íons produtos obtidos para o controle (Fungo+L-fenilalanina) (A) e para o extrato com adição de [2- ¹³ C]-Phe (B).	129
FIGURA 4.55	Espectro de RMN ¹³ C da substância brasiliamida A com enriquecimento, AM 18, (400MHz; CDCl ₃).	130
FIGURA 4.56	Cromatograma obtido para o ácido cinâmico padrão.	135
FIGURA 4.57	Cromatograma obtido para o extrato do protocolo 3 em 30min. Observa-se o produção de ácido cinâmico.	136
FIGURA 4.58	Cromatograma obtido para o protocolo 3 depois de 1h de reação. Observa-se que o ácido cinâmico produzido em 30 min foi degradado.	136
FIGURA 4.59	Espectro de íons produtos obtido no modo negativo de ionização para o ácido cinâmico.	137
FIGURA 4.60	Espectro de ions produtos de <i>m/z</i> 147 referente ao protocolo 3 nos 30 min de reação.	137
FIGURA 4.61	Ensaio de antibiose frente à bactéria <i>Bacillus subtilis</i> .	138
FIGURA 4.62	Determinação da MIC para a substância brasiliamida A.	139
FIGURA 4.63	Atividade bacteriostática da substância brasiliamida A.	140

FIGURA 4.64	Espectro de íons produtos para a substância GKK1032 B no modo negativo.	141
FIGURA 4.65	Proposta de fragmentação para o composto GKK1032 B no modo negativo.	142
FIGURA 4.66	Experimentos de SRM para o extrato de arroz e para o padrão de GKK 1032B respectivamente.	143
FIGURA 4.67	Experimento de SRM para a parte micelial analisada e para o padrão de GKK 1032B respectivamente.	143
FIGURA 4.68	Experimento de SRM para o extrato do filtrado do meio líquido e para o padrão de GKK 1032B respectivamente.	144
FIGURA 4.69	Cromatogramas referentes aos experimentos de íons selecionados e abaixo espectro de íons produtos para cada um dos íons selecionados.	145
FIGURA 4.70	Cromatograma de SRM dos meios de cultura (a) sem adição de aminoácidos, (b) L-fenilalanina e (c) L-tirosina.	147

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
ESQUEMA 4.1 Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida A no modo positivo.	80
ESQUEMA 4.2 Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida A no modo negativo de ionização.	81
ESQUEMA 4.3 Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida B.	85
ESQUEMA 4.4 Formação dos precursores ácido cinâmico e ácido sináptico.	131
ESQUEMA 4.5 Aminoação redutiva dos precursores.	131
ESQUEMA 4.6 Acoplamento dos precursores e formação da brasiliamida A.	132
ESQUEMA 4.7 Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida A enriquecida com ^{13}C no modo positivo.	133
ESQUEMA 4.8 Formação da substância brasiliamida B.	134

LISTA DE TABELAS

		Pag.
TABELA 1.1	Resultados obtidos da investigação da biossíntese do composto GKK1032A2	14
TABELA 1.2	Características de alguns analisadores de massas.	21
TABELA 3.4.1	Ordem do gradiente utilizado e o volume eluído.	34
TABELA 3.4.2	Ordem do gradiente utilizado e o volume eluído.	35
TABELA 3.4.3	Tempos de cultivo do micro-organismo.	40
TABELA 3.4.4	Tempos de cultivo do micro-organismo.	42
TABELA 3.4.5	Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).	44
TABELA 3.4.6	Condições do espectrômetro de massas para (ESI-).	45
TABELA 3.4.7	Condições do espectrômetro de massas para SRM para o aminoácido L-fenilalanina.	46
TABELA 3.4.8	Condições de SRM para a substância brasiliamida A	46
TABELA 3.4.9	Condições do espectrômetro de massas para SRM para o PI.	48
TABELA 3.4.10	Ordem do gradiente utilizado e o volume eluído.	51
TABELA 3.4.11	Condições do espectrômetro de massas para (ESI-).	54
TABELA 3.5.1	Proporção dos eluentes utilizados na SPE.	60
TABELA 3.5.2	Condições do espectrômetro de massas para (ESI-).	63
TABELA 3.5.3	Condições do espectrômetro de massas para SRM.	64
TABELA 4.1	Dados dos deslocamentos químicos para a molécula brasiliamida A isolada no trabalho e dados da literatura respectivamente.	75
TABELA 4.2	Tabela com dados de deslocamento químico para a substância verruculogenina obtidos e dados da literatura	89

	respectivamente.	
TABELA 4.3	Tabela com dados de deslocamento químico para a substância ácido penicílico obtidos e dados da literatura respectivamente.	91
TABELA 4.4	Tabela com dados da substância neoaustina obtidos e dados da literatura.	95
TABELA 4.5	Influência dos aminoácidos na biomassa do micro-organismo.	
		113

ABREVIATURAS

EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por Electrospray)
HPLC-MS	<i>Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
MM	Massa Molar
MS/MS	Espectrometria de Massas Tandem
<i>m/z</i>	Relação massa/ carga
ODS	Octadecilsilano (C-18)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluorácetico
TIC	Total Ion Chromatogram (Cromatograma de Íons Totais)
AcOEt	Acetato de Etila
Hz	Hertz
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	Multiplete
Tr	Tempo de retenção
dd	Duplo dubleto
s	Singleto
t	Triplete
q	Quadruplete
DC	Corrente Contínua
SRM	Selected Reaction Monitoring
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Revoluções por minuto
g	Gramas
L	Litros
mL	Mililitros
MHz	Megahertz
ACN	Acetonitrila

BDA	Batata Dextrose Ágar
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
min	Minuto
ppm	Partes por milhão
UV	Ultravioleta
Phe	L-fenilalanina
Tir	L-Tirosina
Try	L-triptofano
SPE	Extração por fase sólida

Resumo

ESTUDOS BIOSINTÉTICOS DE AMIDAS BIS-FENILPROPANOÍDICAS PRODUZIDAS PELO FUNGO *Penicillium brasilianum*, UM ENDOFÍTICO DE *Melia azedarach*. Foi o título do trabalho no qual foram desenvolvidas metodologias de análise para a investigação da biossíntese de amidas bis-fenilpropanoídicas, pela adição de precursores isotopicamente marcados ao meio de cultura e otimização da produção destas amidas pelo micro-organismo quando submetido à variadas fontes nitrogenadas. As amidas, substâncias relatadas como bons antiparasitários, apresentaram também atividade contra a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*. As metodologias de análise desenvolvidas foram baseadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e técnicas de espectrometria de massas com ionização por *Electrospray* (ESI). A utilização da técnica de cromatografia líquida em escala preparativa permitiu o isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas, brasiliamida A e B e ainda, metabólitos secundários co-produzidos com estes compostos. A utilização do acoplamento entre as metodologias de análise LC/MS permitiu, através de estudos de fragmentação MS/MS, determinar condições otimizadas para a detecção seletiva das amidas nos meios de cultura, enriquecidos com diferentes fontes nitrogenadas. As análises quantitativas por HPLC/UV-MS/MS indicaram que o aminoácido L-fenilalanina intensifica a produção das brasiliamidas no extrato fúngico, e, a partir destes resultados, a rota biossintética dos fenilpropanóides produzidos pelo fungo *P. brasilianum* foi avaliada com a adição de [2-¹³C-Phe]. As análises dos extratos enriquecidos com aminoácido isotopicamente marcado via RMN ¹³C e HPLC/UV-MS, indicaram a incorporação de duas unidades do aminoácido L-fenilalanina na estrutura das brasiliamidas e a rota biossintética foi estabelecida a partir do caminho geral dos fenilpropanóides, metabólitos pouco reportados em fungos. A primeira etapa da rota biossintética foi avaliada usando extratos de ensaios enzimáticos com a enzima Fenilalanina Amônioliase (PAL), onde se visualizou a formação do ácido cinâmico a partir do aminoácido Phe através de monitoramento por HPLC/UV.

Abstract

BIOSYNTHETIC STUDY OF PHENYLPROPANOYL AMIDES PRODUCED BY THE FUNGUS *Penicillium brasilianum*, AN ENDOPHYTE FROM *Melia azedarach*. In the present work it was developed analytical methodologies for investigation of biosynthesis of bis-phenylpropanoyl amides, using labeled precursors in the culture medium. The effect of different nitrogen sources on the bis-phenylpropanoyl amides production was also evaluated. These amides are reported as antiparasitary compounds and they also showed activity against gram-positive *Bacillus subtilis* in bioassays conducted at LaBioMMi (DQ/UFSCar). The analytical methodologies developed were based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry techniques, mainly electrospray ionization (ESI) and MS/MS. Using the methodologies developed for preparative liquid chromatography it were isolated the bis-phenylpropanoyl amides, brasiliamide A and B and other secondary metabolites co-produced. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry techniques allowed fragmentation studies which lead to selective detection experiments of brasiliamides in mediums enhanced with different nitrogen sources. The quantitative analysis (HPLC/UV-MS/MS) indicated great influence of the amino acid L-phenylalanine on the bis-phenylpropanoyl amides production. From these results, the biosynthesis of the phenylpropanoids was investigated using [2-¹³C-Phe]. The RMN ¹³C and HPLC/UV-MS analysis showed the incorporation of two amino acid units on brasiliamides structure formed by the phenylpropanoids pathway, which is uncommon in fungi. The first phenylpropanoid pathway step was evaluated throw using enzymatic extract with Phenylalanine ammoniolyase (PAL). The HPLC/UV analysis indicates the formation of cinnamic acid from L-phenylalanine.

1. INTRODUÇÃO



1.1. Micro-organismos como fonte de metabólitos secundários.

Os micro-organismos são utilizados há muito tempo pelo ser humano, para inúmeras finalidades. Mesmo sem o conhecimento científico, os povos antigos utilizavam a fermentação para a produção de pães, queijos e cerveja (LIMA, 1975). Uma grande evolução no conhecimento científico sobre fermentações e o uso racional dos micro-organismos se deram durante a segunda guerra mundial com a descoberta da penicilina (TURNER, 1975). A partir desta descoberta, os micro-organismos começaram a ser vistos como uma fonte factível de substâncias bioativas, com extremo potencial de uso como fármacos (MASUREKAR, 1992).

A busca por novos produtos de interesse por parte das indústrias farmacêuticas e agroquímicas é um processo que requer continua otimização. Anteriormente, a triagem de 10000 produtos naturais, resultava em um produto comercial. Com o advento da química combinatória essa relação foi alterada. Atualmente, a triagem de 100000 moléculas por dia a partir da utilização da química combinatorial e otimização da triagem de produtos naturais leva a menos de um produto comercial por ano (SCHULZ, 2002). O seu desenvolvimento leva aproximadamente 12 anos e tem custo aproximado de 350 milhões de dólares (GLOER, 1997). Considerando que 6 entre 20 medicamentos mais comumente prescritos possuem origem fúngica e apenas 5% das espécies de fungos são descritas, os fungos oferecem um enorme potencial para a descoberta de novos produtos comerciais (SCHULZ, 2002).

Inúmeros produtos naturais com propriedades terapêuticas foram isolados de espécies de fungos, especialmente agentes quimioterápicos, como penicilinas e cefalosporinas, usadas até hoje como antibióticos; mevinolina, um agente redutor de colesterol, bleomicinas, daunorubicinas e análogos, como agentes antitumorais, entre outros (CAFÊU, 2005).

A resistência que certos micro-organismos criaram aos antibióticos que existem hoje no mercado está levando diversas indústrias farmacêuticas a financiarem a busca de novas substâncias que possam ter potencial como antibióticos (CAFÊU, 2005). Nesse contexto, os produtos naturais continuam a ser muito procurados, como novas fontes de substâncias bioativas, apesar de todo avanço no planejamento racional de fármacos, síntese química e química

combinatória (HARVEY,2000).

Até recentemente, a busca por novos metabólitos de origem fúngica se concentrava principalmente na triagem aleatória dos micro-organismos isolados. Entretanto, atualmente, na otimização da busca de novos metabólitos secundários bioativos, consideram-se relevantes as interações metabólicas entre o fungo e o meio ambiente. É reportado que as interações entre fungos e seus hospedeiros resultam no aumento da produção dos metabólitos secundários sintetizados por estes micro-organismos. Este é um exemplo de triagem inteligente e uma estratégia para a exploração do potencial de produção de metabólitos secundários bioativos que um fungo pode oferecer (SCHULZ, 2002).

Dessa maneira, os fungos endofíticos são uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos, uma vez que crescem nos tecidos internos de plantas (vide definição no item 1.2) e seu crescimento envolve contínua interação metabólica entre fungos e seus hospedeiros.

1.2. Interações entre plantas e fungos.

A associação entre os seres vivos é uma condição vital para aquelas espécies incapazes de conseguir por si próprias os seus meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predatórias. Entre os micro-organismos (vírus, bactérias e fungos), os fungos são aqueles que se encontram mais freqüentemente associados às plantas (ZOBERI, 1972).

Os micro-organismos apresentam diferentes tipos de associações ou interações com as plantas: algumas são neutras, outras benéficas e outras são prejudiciais. As neutras são aquelas, em que ambos os organismos se desenvolvem, mantendo o neutralismo, não há competição por qualquer alimento limitante existente no meio, nem outro tipo de inibição; nas benéficas (simbióticas), ambos obtêm vantagens através da associação, no caso das interações entre plantas e micro-organismos, estes últimos, produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas tais como a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos (SOUZA, 2004). Já as interações prejudiciais ou patogênicas ocorrem quando um organismo atinge o outro

1. Introdução

de modo reverso (PELCZAR, 1981). Este outro tipo de interação pode levar à infecção de plantas por patógenos; isto tem sido reconhecido e considerado há muitos anos como um dos mais altos níveis de parasitismo existentes (MAGNANI 2002).

Atualmente, o estudo de micro-organismos endofíticos tem atraído à atenção de muitos pesquisadores, e vem aumentando expressivamente nos últimos anos, principalmente, com relação aos tipos de associações biológicas a qual estes desenvolvem com seus hospedeiros (STROBEL, 2002).

O termo endofítico, segundo definição recente (STONE, 2000), inclui todos os micro-organismos que durante um período variável do seu ciclo de vida, colonizam os tecidos internos de seus hospedeiros assintomaticamente (ZHANG, 2006). O termo endofítico tem sido muitas vezes utilizado como sinônimo de mutualismo. Os micro-organismos endofíticos são isolados dos tecidos internos do hospedeiro após esterilização da superfície dos mesmos, seguido de incubação sobre uma variedade de meios para estimular o crescimento destes micro-organismos (PETRINI, 1992). No entanto, esta metodologia de isolamento não distingue os micro-organismos patogênicos vivendo em estado de latência, dos micro-organismos mutualísticos.

Existem evidências de micro-organismos associados a plantas encontrados em tecidos fossilizados de folhas, que revelam que as associações endofítico-hospedeiro poderiam ter evoluído através do tempo a partir das primeiras plantas que surgiram na Terra (ZHANG, 2006).

Micro-organismos endofíticos representam um significativo reservatório de diversidade genética e uma fonte importante para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos. Os fungos filamentosos, entre os quais os fungos endofíticos estão incluídos, constituem um grupo de micro-organismos que biossintetizam uma quantidade grande de metabólitos secundários, chegando a alguns casos a uma produção de 73% superior a de outras classes de micro-organismos. (CAFÊU, 2005).

Dentre as classes de metabólitos secundários reportados na literatura produzidos a partir de fungos endofíticos, destacam-se alcalóides, esteróides, terpenóides, derivados de isocumarinas, quinonas, lignanas, amidas, entre outros (ZHANG, 2006).

O conhecimento químico e bioquímico das relações entre plantas e micro-

organismos apresenta grande importância prática, pois através do conhecimento dos metabólitos envolvidos nessas interações podem-se compreender os processos bioquímicos da associação, possibilitando o controle da otimização da produção de metabólitos secundários.

1.3. Fenilpropanóides produzidos por fungos.

Fenilpropanóides, incluindo os flavonóides, eram muitas vezes considerados metabólitos secundários quase exclusivamente produzidos por plantas até a recente descoberta de genes da enzima chalcona sintase (CHS) na espécie de fungo *Aspergillus oryzae* e outras espécies de fungos (SESHIME, 2005). A presença de chalcona-flavanona isomerase (CHI), uma enzima responsável pela ciclização da chalcona em flavanona também foi identificada na espécie *Neurospora crassa* e em algumas leveduras (SESHIME, 2005). As evidências descritas sugerem a existência da rota metabólica para a produção de flavonóides em alguns fungos, assim como verificado em plantas superiores, entretanto, são raros os trabalhos na literatura envolvendo a produção de fenilpropanóides por micro-organismos.

Existem relatos do acúmulo de cinamatos em fungos filamentosos, porém, sua origem, se produzidos pelo micro-organismo ou se é fruto do metabolismo de constituintes do substrato, parece ser dúvida. Um dos primeiros bisfenilpropanóides documentados em fungos, se assemelhando estruturalmente às lignanas, foi a dilactona do ácido diidrocafeico, isolado de *Inonotus sp.* (Figura 1.1). Flavonóides foram obtidos de extratos de espécies de *Aspergillus* (TURNER, 1983). No entanto, nesse caso, esses compostos podem ser originados do metabolismo de constituintes da soja, usada como substrato para cultivo dos micro-organismos. A forma mais comum usada por fungos filamentosos para acumular unidades C-6-C-3, oriundas dos aminoácidos fenilalanina e/ou tirosina, na forma dimérica, é a produção de difenilbenzoquinonas (Figura 1.2). Mas nesses casos, aparentemente não há envolvimento de enzimas similares à PAL. Unidades desses aminoácidos também podem ser incorporadas em outros metabólitos secundários fúngicos se adicionando a fragmentos terpenoídicos ou policetídeos (TURNER, 1983).

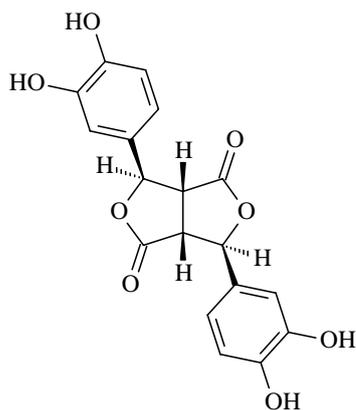
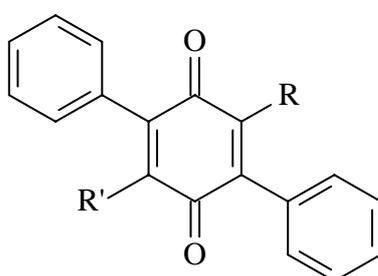


Figura 1.1: Estrutura molecular dilactona do ácido diidrocafeico.



R e R' = H → 2,5-difenilbenzoquinona

Figura 1.2: Estrutura molecular da 2,5-difenilbenzoquinona, um pigmento fúngico.

Por outro lado, estudos genéticos mostraram recentemente que *Aspergillus oryzae* contém os genes responsáveis pela rota fenilpropanoídica, embora estejam silenciados (SESHIME, 2005).

1.4. Enzima Fenilalanina Amônioliase (PAL).

Fenilalanina amônioliase é a primeira enzima chave no metabolismo dos fenilpropanóides, responsável pela catálise da biotransformação do aminoácido L-fenilalanina em trans-ácido cinâmico e amônia, descrita inicialmente em 1961 pelos pesquisadores Koukol e Conn (1961). A rota biossintética envolvendo a produção destes metabólitos secundários é ativa em plantas superiores e está envolvida principalmente em mecanismos de defesa. Em micro-organismos, sabe-se que esta enzima apresenta funções catabólicas, permitindo o uso de L-fenilalanina como fonte de carbono e nitrogênio no metabolismo secundário. Entre os micro-

organismos, a enzima fenilalanina amônia-ase é encontrada abundantemente em leveduras, e, especialmente, em basidiomicetos da família *Rhodotorula*. Foi descrita em um único procarionte conhecido como *Streptomyces*. Entretanto não são encontrados em bactérias e tecidos animais (MACDONALD, 2007).

A enzima PAL representa uma das poucas enzimas não-hidrolíticas que possuem muitas aplicações comerciais, apresentando aplicação industrial na produção de L-fenilalanina (precursor do aspartame) e seu metil éster através de reação fisiológica reversa a partir de ácido cinâmico. A enzima PAL também é extensamente utilizada no tratamento de neoplasmas de ratos (tumores), assim como em análises quantitativas de L-fenilalanina no soro, urina, plasma e outros fluidos biológicos de pacientes com fenilcetonúria. Foi verificado *in vivo* que a enzima PAL pode ser utilizada para converter excessos venenosos de L-fenilalanina no sangue em compostos menos nocivos, no caso o ácido cinâmico e amônia, que são excretados pela urina. Ainda, a enzima PAL tem por finalidade preparar dietas com baixas taxas de fenilalanina (MACDONALD, 2007).

O ácido cinâmico é precursor de inúmeros fenilpropanóides, compostos que possuem esqueleto carbônico C6-C3 e que desempenham muitas funções essenciais como suportes mecânicos (ligninas), como defensores contra estresses bióticos e abióticos (fitoalexinas, antioxidantes, e compostos que absorvem luz UV) e ainda como pigmentos (antocianinas) (YUE, 2007).

Além do importante papel no desenvolvimento das plantas, a enzima PAL é responsável pela resposta a estresses nas plantas. Sua biossíntese é estimulada por ataques de patógenos, tecidos prejudiciais, irradiação UV, baixas temperaturas ou baixos níveis de nitrogênio, fósforo ou ferro. A enzima PAL por estar extensamente presente em plantas e ausente em animais, apresenta-se um alvo promissor para o desenvolvimento de herbicidas e alguns inibidores de crescimento vegetal já vêm sendo desenvolvidos (RITTER, 2004).

A figura 1.3 resume os diferentes fenilpropanóides induzidos em plantas a partir de estresses bióticos e abióticos. Muitos fenilpropanóides induzidos são classificados como fitoalexinas, compostos antimicrobiais sintetizados em resposta ao ataque de um determinado patógeno. Entre as fitoalexinas são descritos pterocarpanas, isoflavanas, isoflavonóides prenilados, stilbenos, cumarinas, 3-deoxiantocianidinas, flavonols, e auronas (DIXON, 1995). Os níveis de concentração

1. Introdução

destes compostos aumentam em torno do local de infecção, e apresentam concentrações tóxicas aos patógenos conforme bioensaios realizados *in vitro* (DIXON, 1995).

O fungo patogênico *Colletotrichum trifolii*, quando presente nas folhas da alfafa, causa a doença Antraquinose, que tem por sintomas a redução das folhagens e baixo crescimento da planta. Quando infectada, a planta se defende pela rápida produção de enzimas da rota biossintética dos fenilpropanóides (PAL, CAH) e conseqüente acúmulo dos isoflavonóides, medicarpina e sativan, exemplos de fitoalexinas produzidas pela planta a partir do ataque do patógeno (SAUNDERS, 2004).

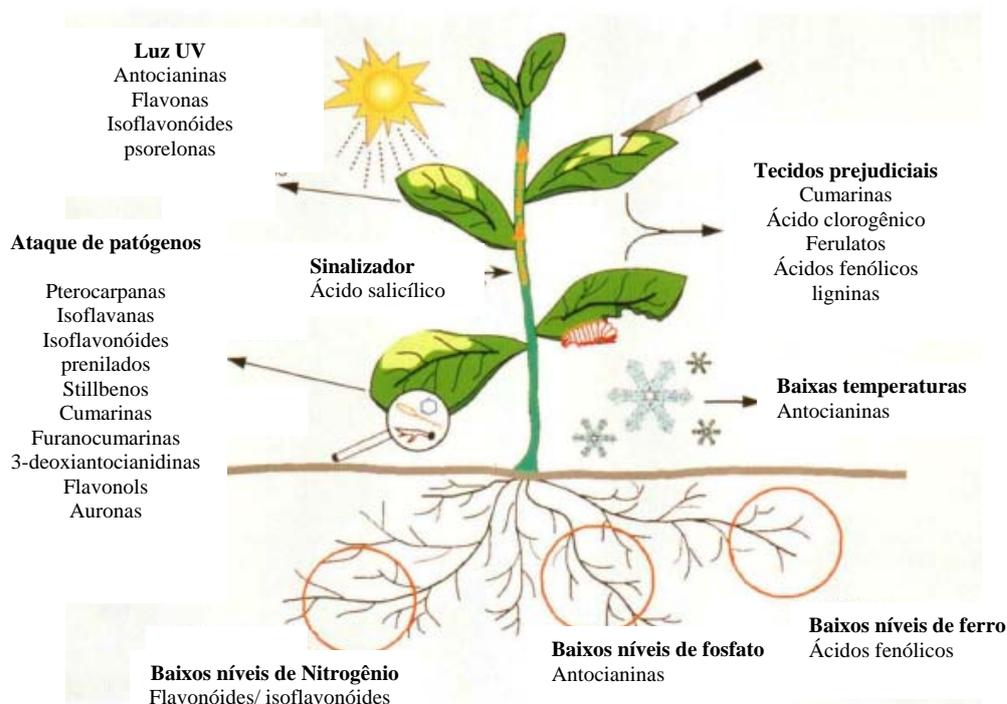


Figura 1.3: Exemplo de fenilpropanóides produzidos pela planta como defesa dos estresses bióticos e abióticos mencionados (DIXON, 1995).

A enzima PAL catalisa a desaminação espontânea e não-oxidativa de L-fenilalanina em trans-ácido cinâmico e amônia. Estudos com o aminoácido L-fenilalanina enriquecidos estereoespecificamente com Deutério (D) no C-3 foi utilizado para a determinação da estereoquímica da reação. Hanson e colaboradores verificaram que o grupo amino no C-2 e o hidrogênio pro-S no C-3 da L-fenilalanina são eliminados de maneira antiperiplanar para gerar o trans-ácido cinâmico. Foi verificado que a enzima PAL não requer cofatores exógenos (MACDONALD, 2007).

A enzima PAL é específica para o aminoácido L-fenilalanina, e alguns casos, L-tirosina. Outros L-aminoácidos não são desaminados pela enzima. (MACDONALD, 2007).

1.5. As amidas bis-fenilpropanoídicas e sua potencialidade como fármacos.

As amidas bisfenilpropanoídicas brasiliamida A e brasiliamida B (Figura 1.4), foram descritas anteriormente, como sendo produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum* (*Penicillium paraherquei*), isolado de amostras de solo no Japão, quando cultivado em okara (resíduo não solúvel do grão de soja), a 25^oC por duas semanas (FUJITA, 2002).

A substância brasiliamida A (**1**) teve sua estrutura elucidada baseada em dados espectrais e evidências químicas, sendo encontrada uma fórmula molecular C₂₄H₂₆N₂O₆. Foram realizados, para este composto, bioensaios contra o bicho-da-seda (*Bombyx mori*) estando este no terceiro estágio larval. Foi observado que essa substância produz convulsão nestes animais. A atividade para esta substância foi avaliada encontrando-se valores de ED₅₀ próximos a 300µg/g (FUJITA, 2002).

Para a substância brasiliamida B (**2**) foi sugerida uma fórmula molecular C₂₄H₂₆N₂O₅ baseada também em dados espectrais e evidências químicas. O espectro de RMN ¹H, apresentou sinais conturbados, sendo alguns duplicados em CDCl₃ a 20^oC. Esse fenômeno foi observado também em diferentes solventes deuterados, como acetona e metanol deuterados. Essas observações levaram os pesquisadores a sugerir que isômeros conformacionais de (**2**) estavam presentes em solução. A substância brasiliamida B também se mostrou ativa contra as larvas

1. Introdução

de *Bombyx mori* provocando convulsão nestas. Encontraram-se valores de ED₅₀ próximos a 50µg/g. (FUJITA, 2002).

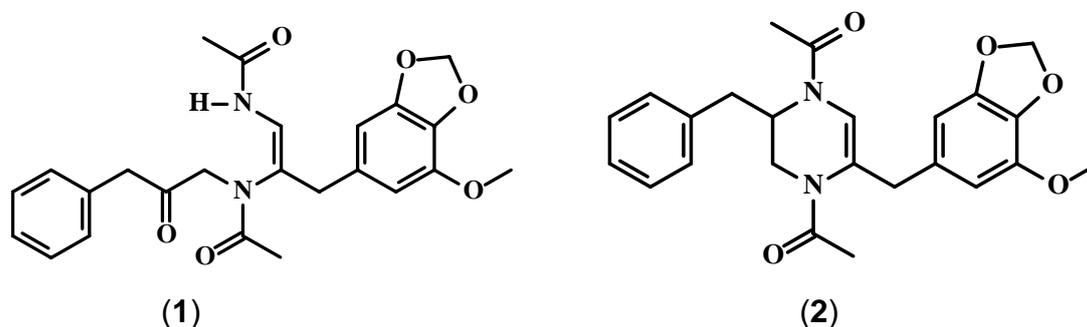


Figura 1.4: Estruturas químicas das substâncias brasiliamida A e B respectivamente.

Fujita (2002) e seus pesquisadores testaram ainda a desidrobrasiliamida B (C₂₄H₂₈N₂O₅) contra as larvas de *Bombyx mori*, substância produzida a partir da hidrogenação da substância (2). Encontraram-se valores de ED₅₀ próximos a 400µg/g.

Era esperado que o grupo funcional responsável pela atividade das brasiliamidas fosse o 3-metóxi-4,5-metilenodioxibenzil, conhecido como grupo piperonil, assim como é reportado para as substâncias miristicina e dilapiole, (substâncias inseticidas) por Lichtenstein (1963). Entretanto, a atividade da desidrobrasiliamida B foi 400µg/g, mais fraca que (2), sugerindo que a ligação dupla no anel tetraidropirazino fosse essencial nessas estruturas (FUJITA, 2002).

Fujita (2002) sugere ainda que as brasiliamidas devam ser classificadas como um novo grupo tremorgênico, uma vez que, não possuem grupos funcionais similares às substâncias conhecidas que tenham atividade parecida contra bicho-da-seda como fumitremorginas, e verruculogenina.

Em 2005, Fujita e colaboradores isolaram três novos compostos, brasiliamida C (3), brasiliamida D (4) e brasiliamida E (5), do fungo *Penicillium brasilianum* quando cultivado em okara, também a 25⁰C por duas semanas. Suas estruturas foram elucidadas com base em dados espectroscópicos e evidências químicas. O espectro de RMN dessas substâncias exibiu uma mistura de dois ou quatro isômeros conformacionais de acordo com a rotação restrita das ligações do grupo

amida em solução. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C foram analisados para o isômero em maior quantidade na temperatura adequada.

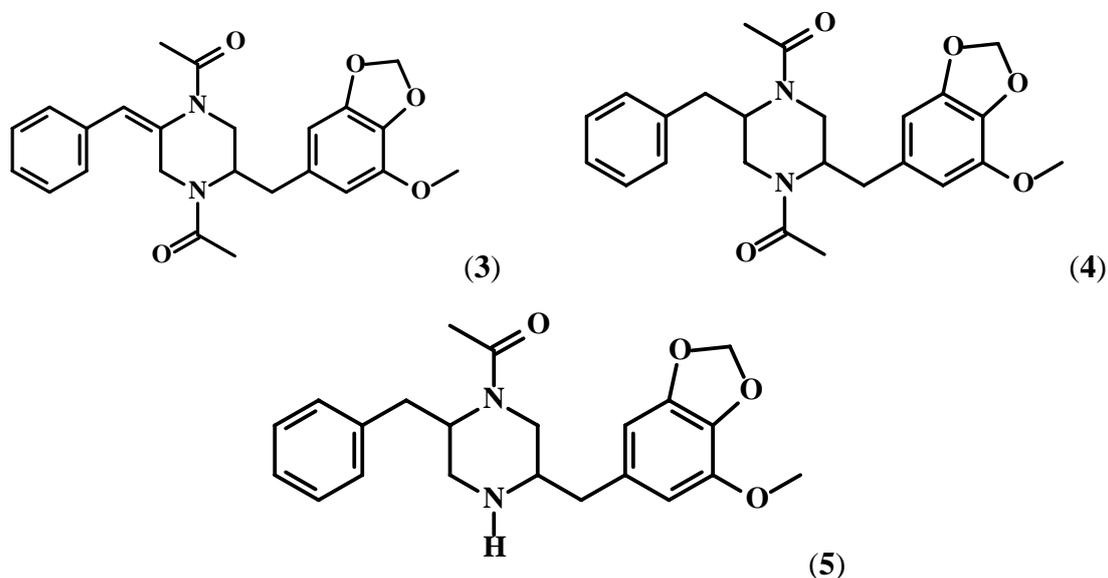


Figura 1.5: Estruturas moleculares das substâncias C, D e E, respectivamente.

A atividade contra *Bombyx mori* foi analisada para as brasiliamidas C, D e E, que apresentaram valores de ED₅₀ de 400µg/g, 400µg/g e 500µg/g respectivamente. A atividade da brasiliamida D e seu isômero geométrico desidrobrasiliamida B se mostraram menores do que a atividade para a substância brasiliamida B, sugerindo novamente que a ligação dupla no anel piperazino é mais significativa que o grupo 3-metóxi-4,5-metilenodioxibenzil. Fujita sugere também, que a atividade convulsiva das brasiliamidas não é afetada pela conformação do anel piperazino ou pela configuração dos substituintes no anel.

Não existem relatos na literatura de análises por espectrometria de massas e estudos de fragmentação das amidas bis-fenilpropanoidicas, assim como não é descrita sua rota biossintética, fato que torna o estudo destas estruturas ainda mais interessante.

1.6. Policetídeos da classe GKK1032

A produção de amidas bis-fenilpropanoídicas foi investigada pela adição de diferentes fontes nitrogenadas ao meio de cultura, no sentido de verificar a influência destes aditivos no metabolismo do micro-organismo *P. brasilianum* e aumento do rendimento da produção das brasiliamidas. A produção das amidas da classe GKK 1032 produzidas pelo fungo *Penicillium* sp. também foram investigadas através da adição de diferentes aminoácidos ao meio de cultura, com o intuito de verificar e comparar a influência e comportamento dos aditivos no metabolismo de diferentes micro-organismos do gênero *Penicillium* (FILL, 2006).

Os policetídeos de origem fúngica constituem uma grande classe de metabólitos secundários, apresentando uma das maiores diversidades estruturais entre os produtos naturais (PASTRE, 2008). A maioria desses compostos é ativa em diversos sistemas biológicos. Portanto, a busca de policetídeos em micro-organismos vem sendo apontada como uma boa estratégia para pesquisas de substâncias bioativas.

GKK1032 A1 (6), A2 (7), A3 (8) e B (9) foram isoladas inicialmente em 2001, pelo grupo de pesquisa Kyowa Hakko de culturas do fungo *Penicillium* sp. (OIKAWA, 2003). As estruturas GKK1032s apresentam atividade antitumoral contra células cancerígenas cervicais, além de atividade antimicrobial contra a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*, uma bactéria que embora não patogênica, é muito similar a *Bacillus cereus*, responsável por diarreias, náuseas e vômitos. As moléculas GKK 1032 A2 (7) e GKK 1032 B(9) foram determinadas através de análises espectrais incluindo diversas técnicas de RMN 1D e 2D. A estrutura proposta para o policetídeo GKK 1032 B (9) foi posteriormente confirmada por análises cristalográficas (OIKAWA, 2003). A diferença nas estruturas destes compostos se localiza apenas no anel contendo o átomo de nitrogênio, o grupo gama lactâmico em GKK 1032 A1 (6), GKK 1032 A2 (7) e GKK1032 A3 (8) é substituído por succimida em GKK 1032 B (9) e a estereoquímica relativa dos dois substituintes é modificada de *cis* em GKK 1032 A1 (6) e GKK 1032 A2 (7) para *trans* em GKK 1032 B (9).

Em 2002, He e colaboradores reportaram o isolamento de um novo agente antimicrobial FO-7711CD6 também de culturas do fungo *Penicillium* sp., e observou-se que a estrutura plana deste composto era idêntica a molécula GKK1032 A2 (7). Posteriormente, pesquisadores reportaram o isolamento das Pirrocidinas A (10) e B

(11) do caldo fermentativo do fungo não identificado LL-Cyan426 que se mostraram ótimos agentes contra bactérias gram-positivas incluindo cepas resistentes.

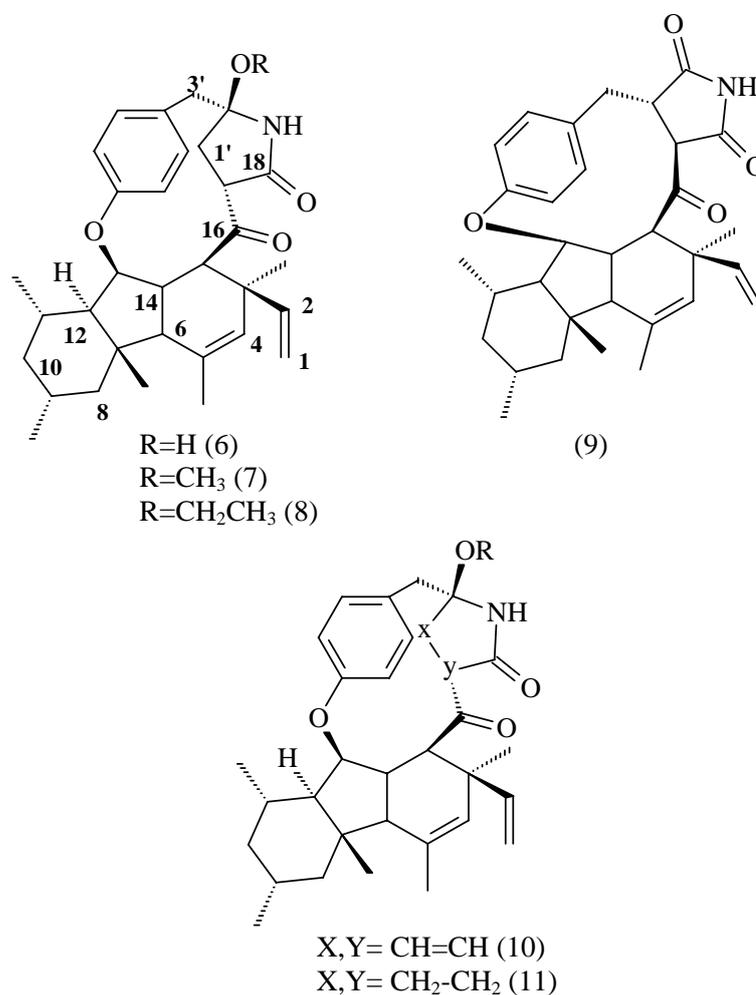


Figura 1.6: Estruturas moleculares dos membros GKK1032.

1.7. Biossíntese dos membros GKK1032.

A biossíntese do agente antitumoral GKK1032A2 foi investigada por Oikawa e colaboradores pela administração de precursores isotopicamente marcados (¹³C, ²H) ao fungo *Penicillium* sp., os resultados obtidos por estes pesquisadores podem ser observados na tabela 1.1 a seguir:

1. Introdução

Tabela 1.1: Resultados obtidos da investigação da biossíntese do composto GKK1032A2 (OIKAWA, 2003)

	δ_c	Enriquecimento [1,2- ^{13}C] acetato	J_{c-c} (Hz) [1,2- ^{13}C]	[1- ^{13}C , $^2\text{H}_3$] acetato (ppm)	Enriquecimento [1- ^{13}C]- L- Tirosina	Enriquecimento L-Metionina [S- $^{13}\text{CH}_3$]
C1	112,0		69			
C2	146,3	3,6	70	0,182		
C3	41,6		42			
C4	130,7	3,2	43			
C5	138,5		41			
C6	53,0	2,9	41			
C7	41,5		35			
C8	49,0	3,5	34			
C9	28,0		33			
C10	45,5	3,5	33			
C11	27,3		35			
C12	60,9	3,9	35			
C13	90,7		36			
C14	50,6	2,1	36			
C15	56,7		39			
C16	200,2	4,0	40			
C17	56,7		45			
C18	171,8	3,2	44			
C1'	33,8				26,2	
C2'	88,8					
C3'	47,0					
C4'	127,9					
C5'a	133,3					
C5'b	131,5					
C6'a	118,8					
C6'b	124,4					
C7'	159,8					
3-Me	25,7					18,1
5-Me	20,9					15,9
7-Me	16,0					13,3
9-Me	22,8					14,8
11-Me	19,8					14,6

Experimentos enriquecendo o meio de cultura com acetato marcado isotopicamente [1- ^{13}C], resultaram em incorporação, e a partir dos dados obtidos pode-se estabelecer a biossíntese do composto via caminho policetídeo. Os enriquecimentos observados nos carbonos C-2, C-4, C-6, C-8, C-10, C-12, C-14, C-16 e C-18 são consistentes com o fato de que uma cadeia linear policetídeo de C-1 à C-18 é construída a partir de nonacetídeos (Tabela 1.1). Confirmação dada pela incorporação com acetato marcado [1-2- ^{13}C]. Os resultados observados no espectro de RMN ^{13}C do enriquecimento do composto indicam ainda nove pares de

sinais acoplados (Tabela 1.1) e estes resultados indicam que estes pares são originados de unidades intactas de acetato.

Para verificar a origem das metilas da estrutura GKK1032A2, experimentos com metionina marcada isotopicamente [$S\text{-}^{13}\text{CH}_3$] foram conduzidos com o microorganismo *Penicillium* sp. Enriquecimentos foram verificados para os carbonos 3-Me, 5-Me, 7-Me, 9-Me e 11-Me (Tabela 1.1).

Finalmente, identificou-se o precursor das unidades remanescentes C-9 como o aminoácido L-tirosina. A proposta foi confirmada pela incorporação deste aminoácido marcado isotopicamente como pode ser observado na tabela 1. Um significativo enriquecimento pôde ser observado para o C-1', indicando que o grupo carboxila da tirosina é condensado com a cadeia policetídica. A incorporação dos precursores pode ser visualizada na figura 1.7.

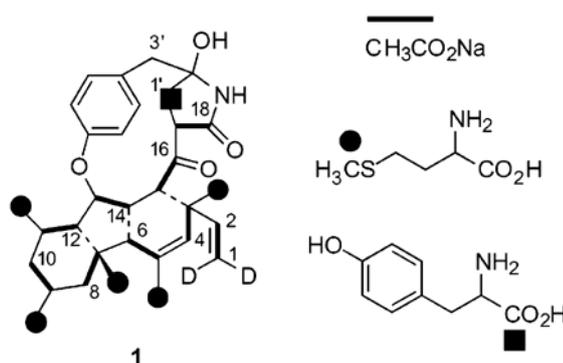


Figura 1.7: Incorporação dos precursores na molécula GKK1032 A2.

1.8. Exigências de crescimento e formulação do meio de cultivo.

O meio utilizado para o cultivo de um determinado micro-organismo necessita conter todos os elementos para que haja crescimento, assim como a produção de metabólitos de interesse. Basicamente há dois grandes grupos de meios de cultura: os meios sintéticos, aqueles cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida. Por outro lado, alguns micro-organismos necessitam de meios enriquecidos. Um exemplo é o extrato de levedura que fornece variedades de vitaminas e aminoácidos, e, neste caso, a composição não é perfeitamente conhecida, e o meio adquire o nome de complexo (LIMA,1975).

1. Introdução

Organismos heterotróficos, diferentemente dos autotróficos que apenas necessitam de CO₂ como fonte de carbono, exigem fontes orgânicas de carbono. Os carboidratos, particularmente a D-glicose, são tradicionalmente usados como fontes de carbono em fermentações. Aminoácidos, lipídios e mesmo polímeros como amido e celulose também podem ser utilizados. Na realidade, qualquer composto orgânico natural e muitos sintéticos podem ser utilizados por micro-organismos. Essa versatilidade é de uma extraordinária importância, permitindo o emprego de microorganismos numa extensa série de transformações úteis para o homem.

O nitrogênio pode ser suprido à maioria dos organismos por meio de amônia ou de seus sais, embora o crescimento possa ser mais rápido quando se utilizam fontes de nitrogênio orgânico. Certos organismos, entretanto, têm exigências absolutas por nitrogênio orgânico. Essas exigências variam desde aminoácidos simples à gama inteira de aminoácidos, assim como de purinas, pirimidinas e vitaminas. O extrato de soja é uma excelente e complexa fonte de nitrogênio, composto principalmente por proteínas e aminoácidos.

Os minerais como o fósforo e magnésio são constituintes particularmente importantes no meio de cultura, visto que estes estão relacionados com todas as reações de transferência de energia envolvendo a adenosina-trifosfato. O cálcio, potássio, enxofre e sódio são encontrados em quantidades significativas na maioria das células, e assim, também devem ser supridos ao meio de cultura. Os micronutrientes ferro, cobalto, cobre e zinco são essenciais, mas estão geralmente presentes como impurezas em outros ingredientes do meio de cultura.

A água é absolutamente indispensável para o crescimento dos micro-organismos. Seu papel é múltiplo. Os micro-organismos se nutrem pela passagem de substâncias em solução através da membrana citoplasmática. Além disso, a água exerce função primordial na regulação da pressão osmótica e, pelo seu elevado calor específico, na regulação térmica (LIMA, 1975).

Os micro-organismos variam ainda, em suas necessidades de oxigênio. Os fungos, algas e algumas bactérias são aeróbios obrigatórios. Isso significa que estes microorganismos exigem a presença de oxigênio livre. O oxigênio funciona como receptor final de hidrogênio nos processos de respiração aeróbica. Ao contrário das bactérias, os fungos preferem meio ácido para o seu desenvolvimento. O pH ótimo para a maioria das espécies estudadas é em torno de 5,6.

1.9. Otimização da produção de metabólitos secundários.

O estudo de micro-organismos tem atraído à atenção de muitos pesquisadores e vem crescendo nos últimos anos principalmente com relação à produção de substâncias biologicamente ativas. As condições de crescimento e modificações genéticas têm sido temas de estudos na tentativa de melhorar os rendimentos da produção de metabólitos secundários (ZHANG, 2006).

Dessa forma, a necessidade de fontes alternativas para substâncias de importância farmacológica, de novas substâncias potencialmente úteis, e a descoberta de novos processos químicos, vem de encontro à química de micro-organismos, e aos estudos de microbiologia molecular (VEERPORTE, 1999). Devido ao pequeno ciclo de vida e a fácil adaptação no meio externo, os micro-organismos fornecem a possibilidade de inúmeras manipulações, visando à otimização da produção de metabólitos secundários (LIMA, 1975).

A otimização da produção dos metabólitos secundários é importante no que se refere à biotecnologia, uma vez que são desejados rendimentos altos a partir de matéria prima abundante, barata, e usando processos ditos “limpos” e de boa viabilidade comercial. Uma abordagem, neste sentido, é a modificação das condições de cultivo e crescimento do micro-organismo. Estas modificações podem ser nos parâmetros físicos como variações nos valores de temperatura, salinidade e alterações de luz. Assim como, nos parâmetros químicos, como alteração dos componentes do meio de cultura, variação na concentração das fontes de nutrientes e a adição de precursores e inibidores da biossíntese de determinados metabólitos secundários de interesse (MIAO, 2006).

Os micro-organismos, por serem de organização relativamente simples, têm um poder grande de multiplicação e adaptação a variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo com a carência ou com o fornecimento de nutrientes ao meio de cultivo. Isso permite uma ampla flexibilidade em sua utilização, podendo-se dizer que é possível induzir micro-organismos a produzir determinadas substâncias de interesse (LIMA, 1975).

De fato, alguns estudos mostram que as alterações das condições do meio de cultura podem alterar completamente o metabolismo de alguns micro-organismos. Esta abordagem pode levar a uma variedade de novos metabólitos secundários

1. Introdução

interessantes a partir de uma única cepa de um micro-organismo. Este estudo vem sendo denominado OSMAC (*One Strain Many Compounds*) (BJORN, 2002).

Estudos realizados no grupo LaBioMMi (FILL, 2006) mostraram que as alterações das condições do meio de cultura modificam o metabolismo do fungo *P. brasilianum*, como no exemplo mostrado na figura 1.8, onde se observa os diferentes perfis cromatográficos apresentados, quando este micro-organismo foi cultivado em diferentes meios de cultura como arroz, canjica, soja e trigo, conforme abordagem OSMAC.

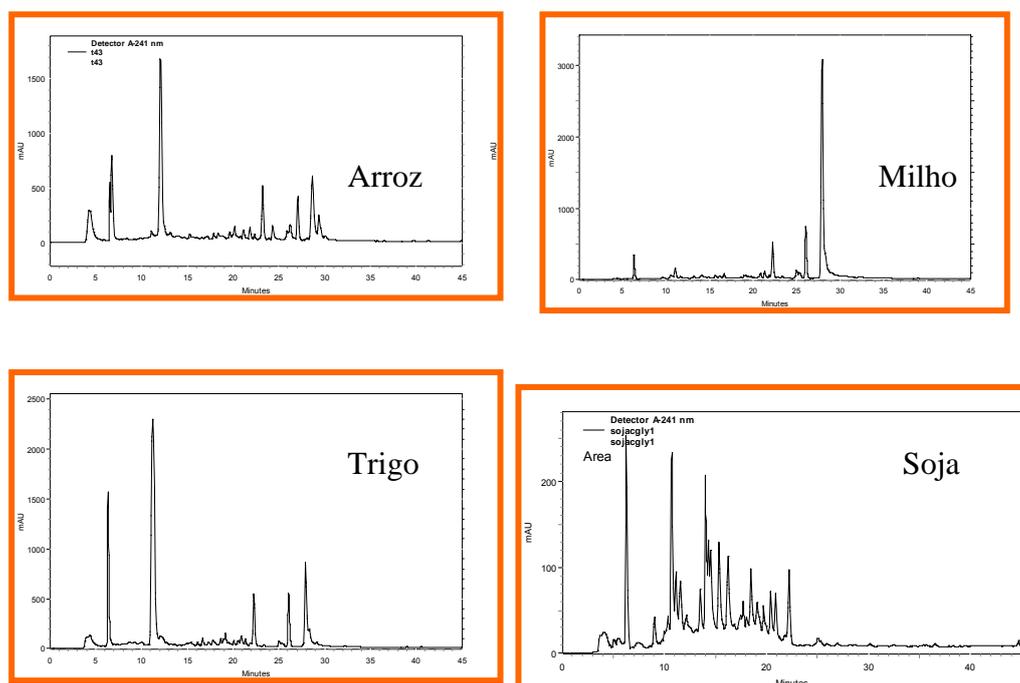


Figura 1.8: Diferentes perfis cromatográficos quando o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em diferentes meios de cultura.

A abordagem OSMAC representa uma ferramenta poderosa para elucidar o metaboloma dos diferentes micro-organismos (detecção e identificação do maior número possível de metabólitos secundários produzidos por um organismo). Embora uma alteração sistemática nos parâmetros de cultivo possa ser aplicada para as várias cepas selecionadas, a abordagem OSMAC é aleatória, não permitindo gerar regras que seriam comuns a todos os micro-organismos, já que cada um terá uma resposta particular determinada pelo seu genoma (BJORN, 2002).

A continuidade da abordagem OSMAC seria a identificação dos genes que estão no comando da indução ou modificação do padrão metabólico. O objetivo

dessa etapa seria avaliar quais são os compostos de um determinado meio de cultura que induziram a biossíntese dos metabólitos desconhecidos identificados.

A abordagem OSMAC poderia, dessa maneira, permitir a revelação de uma diversidade química oculta e verificar a produção de metabólitos secundários determinada por genes silenciosos (BJORN, 2002).

Neste sentido, inúmeros estudos verificaram que a composição do meio de cultura tem grande impacto na produção de metabólitos de origem microbiana (MASUMA, 1986). Masuna e colaboradores (1983) sugerem que altas concentrações de glicose, fosfato e íons amônio atuam como repressores do metabolismo secundário, e inúmeros exemplos de meios de cultura com baixos níveis destes componentes são descritos na literatura (MASUMA, 1983; OMURA, 1982). Comparativamente com este efeito, altas concentrações de íons fosfato são citadas como potenciais indutores da produção de metabólitos de interesse.

A adição de aminoácidos livres no meio de cultura também é descrita na literatura levando a indução de metabólitos secundários de interesse (ZHNER, 1982; KOZLOVSKII, 2006). Entretanto poucos estudos neste sentido foram realizados e são descritos na literatura.

1.10. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas se baseia no princípio de que íons em fase gasosa podem ser direcionados e separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) por campos elétricos e magnéticos. A espectrometria de massas permite a obtenção de informação estrutural a partir da massa molecular e estudos de fragmentação (MS/MS) de uma determinada substância.

Existem diferentes fontes de ionização, diferenciando-se nas principais características, vantagens e limitações. Nas últimas décadas foram desenvolvidas inúmeras técnicas de ionização que permitiram o interfaceamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas, dessa maneira sendo possíveis análises de compostos com baixa pressão de vapor e termicamente instáveis. Anteriormente, estas análises não eram possíveis com a técnica convencional de impacto eletrônico. Estas técnicas realizam a ionização de uma forma branda, ou seja, com pouco excesso de energia interna, reduzindo a fragmentação e obtendo-se o íon molecular do composto (SILVERSTEIN, 1994).

1. Introdução

Nos últimos anos, a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* tem se difundido às mais diversas áreas da ciência (Figura 1.9). A importância desta técnica reflete-se no número crescente de artigos publicados que a utilizam, seja para simples determinação do peso molecular e/ou quantificação de uma substância ou mesmo em estudos de determinação estrutural (CROTTI, 2006).

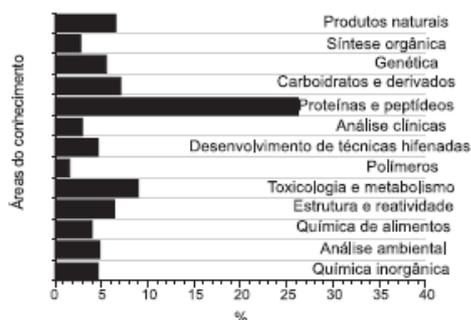


Figura 1.9: Utilização da espectrometria de massas em diferentes áreas do conhecimento.

Nas análises por ESI-MS, inicialmente, a amostra a ser analisada, em solução, é introduzida na fonte de ionização através de um *probe* do espectrômetro de massas que contém em sua extremidade, um capilar de aço inoxidável (com diâmetro interno de aproximadamente 100 μ m). Todo este sistema opera sob um fluxo de fase móvel entre 1 e 1000 μ L/min. Então, é aplicada uma voltagem neste capilar que usualmente varia de 2 a 4 kV, provocando a ionização das moléculas em solução (na forma de $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$). Os íons formados são atraídos para dentro de um cone e, na seqüência, para um cone extrator, ambos operando sob potenciais elétricos inversos à carga dos íons (fonte de ionização em Z). Finalmente, eles são então dirigidos para dentro do analisador de massas, que opera sob alto vácuo ($\sim 10^{-5}$ Torr). (www.spectroscopynow.com)

1.10.1. Analisadores de massas

O analisador de massas é a parte principal de um espectrômetro de massas, pois nele os íons formados na fonte serão separados de acordo com sua relação massa/carga por campos elétricos e/ou magnéticos. Existem vários métodos disponíveis para separar íons com diferentes m/z , e o ideal é que eles sejam capazes de distinguir pequenas diferenças de massas. A capacidade de um espectrômetro de massas em diferenciar massas é normalmente designada em

termos da sua resolução, R , definida como:

$$R = m/\Delta m$$

Onde Δm é a diferença de massa entre dois picos adjacentes que conseguem ser separados (resolvidos) e m é a massa nominal do primeiro pico. Dois picos são considerados resolvidos se a altura do vale entre eles é menor que uma fração determinada das suas alturas (normalmente 10%) (SKOOG, 2002). Existem duas categorias importantes de espectrômetros de massas: os de baixa resolução (resolução unitária) e os de alta resolução. Os instrumentos de baixa resolução são definidos arbitrariamente como aqueles que separam unidades de massa até m/z 2.000 [$R=2000/(2000-1999)=2000$]. Espectros de massas de resolução unitária são obtidos em equipamentos de baixa resolução. Um instrumento é considerado de alta resolução se puder resolver dois íons que diferem em massa por pelo menos uma parte em dez a quinze mil. Esta categoria importante de espectrômetros de massas pode medir a massa de um íon com acurácia suficiente para permitir a determinação de sua composição atômica (SILVERSTEIN, 1994). Os analisadores quadrupolares possuem resolução unitária, e, portanto, diferenciam unidades de massa sem casas decimais. A tabela 1.2 abaixo indica algumas características de alguns analisadores de massas mais comuns nos laboratórios de pesquisa.

Tabela 1.2: Características de alguns analisadores de massas.

Analisador de massas	Extensão de massas	Resolução	Sensibilidade
Setor magnético	1-15.000m/z	0.0001	baixa
Quadrupolo	1-5000m/z	unitária	alta
Íon trap	1-5.000m/z	unitária	alta
TOF(tempo de voo)	ilimitada	0,0001	alta

Os analisadores quadrupolares consistem de quatro hastes metálicas, cilíndricas, arranjadas em intervalos de 90° (Figura 1.10), sujeitas a uma diferença de potencial. Íons atravessam o sistema de análise em direção paralela aos pólos (direção z), porém oscilam de modo complexo nos eixos x e y, devido à aplicação

1. Introdução

simultânea de corrente contínua (dc) de voltagem V_{dc} e radiofrequência (rf) de voltagem V_{rf} aos pólos. Existe uma oscilação estável que faz com que um íon com determinada razão m/z chegue à extremidade do quadrupolo sem tocar os pólos. Dessa maneira, apenas um íon com determinada relação m/z chegarão ao detector em uma determinada condição de V_{rf} e V_{dc} . Os demais íons terão oscilações instáveis, tocarão os pólos e serão destruídos. A varredura de massas é realizada variando-se V_{dc} e V_{rf} e mantendo sua razão constante (SILVERSTEIN, 1994).

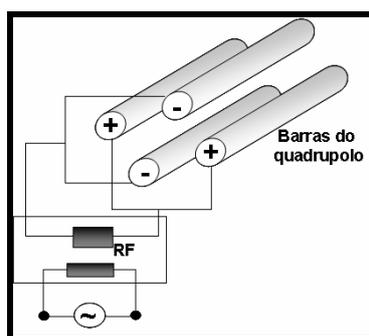


Figura 1.10: Representação esquemática de um quadrupolo linear (www.spectroscopynow.com.br).

Quando se tem dois detectores quadrupolares em linha, interligados por uma cela de colisão (um hexapolo, por exemplo), temos um analisador do tipo triplo-quadrupolo (Figura 1.11). A função da cela de colisão é proporcionar a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, através da colisão com um gás inerte (geralmente argônio) que possui sua energia controlada (MC LAFFERTY, 1993).

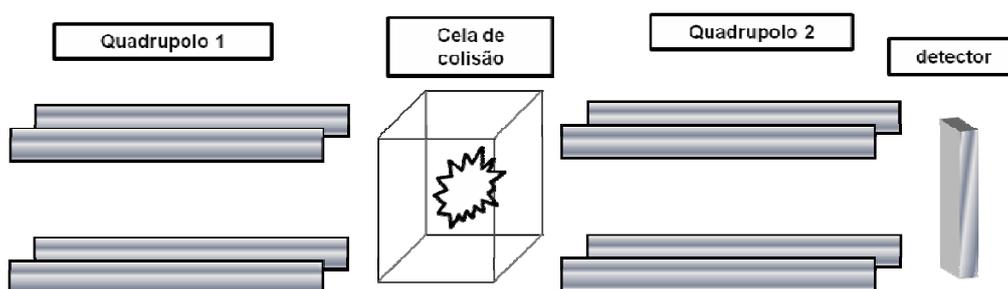


FIGURA 1.11: Esquema de um analisador do tipo triplo quadrupolo.

1.10.2. Espectrometria de massas tandem.

As técnicas de ionização brandas (ESI, MALDI), produzem preferencialmente íons moleculares e adutos, não produzindo quantidade significativa de íons produtos gerados a partir de fragmentação, não fornecendo grande informação estrutural. A ausência de grande informação estrutural nestas formas de ionização impulsionou o desenvolvimento de técnicas para induzir fragmentação dos íons moleculares produzidos por estas técnicas, resultando na espectrometria de massas tandem (MS/MS) (SIUZDAK, 1996).

Alguns experimentos de MS/MS foram realizados durante o desenvolvimento do trabalho e serão especificados nos itens abaixo.

1.10.2.a Aquisição no modo *full scan*

Nas aquisições no modo *full scan* (Figura 1.12), os íons formados na fonte de ionização com determinadas relações massa/carga são filtrados no primeiro quadrupolo (varredura de massas), não sofrem fragmentação na cela de colisão, a qual se apresenta desativada operando somente em radiofrequência, e são analisados no segundo quadrupolo (varredura de massas) (MC LAFFERTY, 1993).

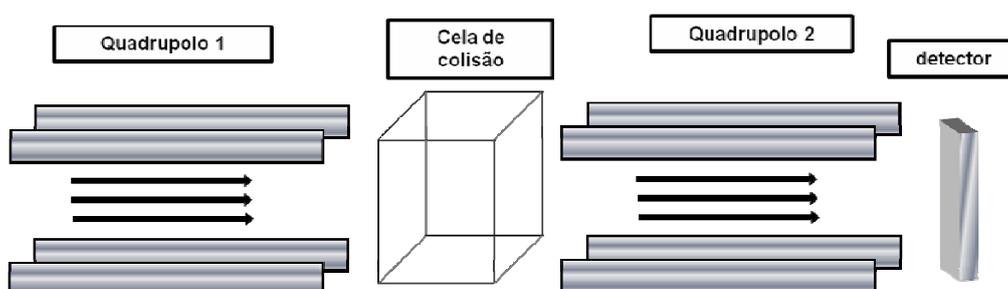


FIGURA 1.12 Analisador triplo quadrupolo operado no modo de aquisição *full scan*.

1.10.2.b Aquisição no modo MS/MS (experimento de íons produtos).

No caso de experimentos de íons produtos, o primeiro quadrupolo é programado de maneira que apenas uma determinada relação m/z passe, filtrando-se todos os demais íons (Figura 1.13). Assim, este íon pode ser fragmentado com

1. Introdução

uma energia conhecida na cela de colisão e todos seus fragmentos podem ser analisados no segundo quadrupolo e direcionados ao detector. Na figura 1.13 é observada uma representação esquemática deste experimento (SIUZDAK, 1996).

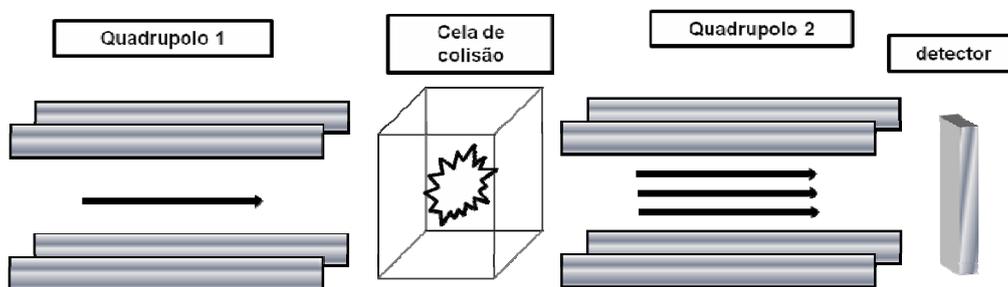


FIGURA 1.13 Analisador triplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “íons produtos”.

1.10.2.c Aquisição no modo SRM (Selected Monitoring Reaction).

Nos experimentos de SRM (Selected Reaction Monitoring) alta seletividade é obtida, uma vez que, ambos os quadrupolos são programados para deixarem passar apenas uma determinada relação massa/carga (Figura 1.14). Assim, podemos analisar um íon oriundo de uma substância em pequenas concentrações, mesmo em uma matriz complexa e sem qualquer resolução cromatográfica, desde que se conheça alguma fragmentação específica do íon precursor (SIUZDAK, 1996).

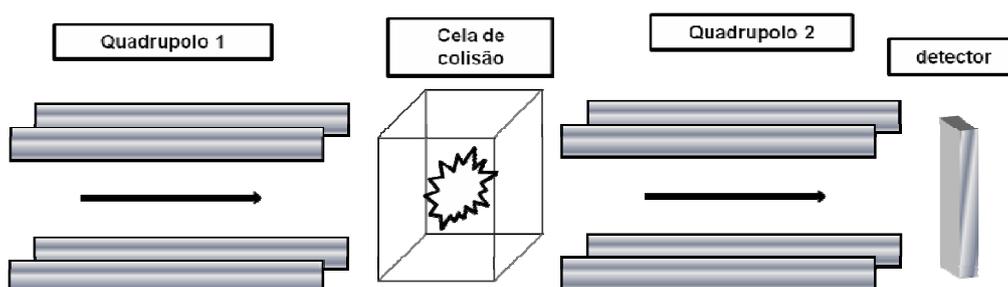


FIGURA 1.14 Analisador triplo quadrupolo operado no modo de aquisição “SRM”.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram:

- Desenvolver metodologias de análise para bis-fenilpropanóides e policetídeos produzidos por fungos do gênero *Penicillium* utilizando padrões e técnicas de espectrometria de massas.
- Estudar a fragmentação dos compostos alvo por *electrospray* (ESI) e decomposição induzida por colisão (CID) e escolher a partir desses dados, os melhores experimentos para a detecção seletiva dessas substâncias nos diferentes meios de cultura.
- Adicionar diferentes fontes nitrogenadas ao meio de cultura nas diferentes fases de crescimento dos fungos, e no tempo ótimo de produção, e verificar a influência destes aditivos no metabolismo secundário dos micro-organismos.
- Estudar a cinética de produção dos bis-fenilpropanóides.
- Estudar a biossíntese dos fenilpropanóides produzidos pelo fungo *Penicillium brasilianum* pela administração de precursores isotopicamente marcados ao meio de cultura e ensaio enzimático.
- Isolar, identificar, caracterizar e bioensaiar os metabólitos secundários de interesse.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. Parte experimental

3.1. Equipamentos

❖ Espectrômetros de RMN

BRUKER ARX 200

BRUKER DPX 400

❖ Espectrômetro de Massas

Espectrômetro de Massas QuattroLC – MICROMASS, triplo-quadupolo, ESI;

Espectrômetro de Massas Híbrido API 3200- Applied Biosystems- Q-trap, ESI;

Espectrômetro de Massas Híbrido – Bruker, Q-TOF, ESI.

❖ Cromatógrafo Líquido (Waters) – Alliance 2695 equipado com:

Detector de UV (PDA) para CLAE Waters 2996

Waters 2695 Separations Module.

❖ Cromatógrafo líquido (SHIMADZU)

Bomba LC10AD gradient pumps, SHIMADZU;

Bomba LC-8A, SHIMADZU;

Detector de UV (PDA) para CLAE SHIMADZU SPD-10A e SPD-6A UV-Vis;

Módulo de comunicação detector/computador em HPLC SHIMADZU CBM-10A
Communication BUS Module;

Injetor para HPLC SHIMADZU Auto Injector SIL-10ADVp.

❖ Evaporadores Rotativos

Rotoevaporador rotativo Tecnal (TE 120)

Rotoevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)

❖ Câmara de Fluxo Laminar

Veco VL FS-12M

❖ Autoclave Vertical

Phoenix AV 70

Soc. FABBE 103

- ❖ Triturador

Turratéc Tecnal

- ❖ pHmetro

Tecnal Tec-3MP

- ❖ Mesa Incubadora Rotativa

Tecnal TE 140

- ❖ Centrífuga

SORVALL MACH GR

- ❖ Sonicador

BRANDSON 1510;

- ❖ Balança analítica

Tecnal

- ❖ Estufa

Quimis

- ❖ BOD (Biochemical – Oxygen – Demand)

Technal TE 391

- ❖ Sonicador de membrana

Fisher Scientific Modelo 500

3.2. Materiais Cromatográficos

- ❖ Suportes para Cromatografia

Sílica gel 70-230 Mesh

Sílica gel 230-400 Mesh

Sílica gel 60 PF 254.

3. Parte experimental

- ❖ Coluna para HPLC PHENOMENEX LUNA Phenyl-hexyl (fase reversa) 250 x 4,6 mm (5 μ);
- ❖ Coluna para HPLC WATERS x-terra Phenyl (fase reversa) 3.0 x 50mm (3,5 μ);
- ❖ Coluna para HPLC PHENOMENEX LUNA C18 (fase reversa)
- ❖ Coluna para HPLC preparativo PHENOMENEX LUNA C18 (fase reversa) 250 x 21,20mm (5 μ de diâmetro de poro);
- ❖ Coluna para HPLC analítico PHENOMENEX Synergi 4u Fusion 250 x 4.6mm (5 μ de diâmetro de poro).

3.3 Reagentes e materiais utilizados

❖ Solventes

Solventes destilados no departamento de química, utilizados em cromatografia de coluna.

Solventes deuterados MERCK® e ALDRICH® (98,0 – 99,9 %), para a obtenção dos espectros de RMN.

Solventes de grau de HPLC Merck® e Aldrich®.

❖ Água purificada em aparelho Milli-Q;

❖ Aminoácidos padrões

L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, L-serina, L-histidina, L-prolina, L-leucina, L-alanina, L-glutamina, Synth®.

❖ Reagentes

ácido antranílico (padrão isolado)

3-metil-5-Pirazolona (padrão isolado)

biotin (padrão isolado)

NH₄NO₃, Synth®.

❖ Antibióticos padrões

vancomicina ABL®.

❖ Meios de cultura para cultivo dos microorganismos

BDA (Agar-Batata-Dextrose);

Arroz parbolizado (*Uncle ben's*®);

Canjica (*Yoki*®);

Caldo Mueller Hinton Difco®;

Ágar Mueller Hinton Acumedia®;

BHI (Infusão Cérebro Coração) Acumedia®.

❖ Tubo padrão de sulfato de bário (Escala de McFarland: 1×10^8 cel/mL).

3.4. Parte experimental

3.4.1. Cultivo do fungo *Penicillium brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

O fungo endofítico *Penicillium brasilianum* (LaBioMMi 024) foi isolado anteriormente do córtex das raízes de *Melia azedarach* no laboratório LaBioMMi do Departamento de Química da UFSCar, por Santos (2003) e conservado no LaBioMMi.

A cepa de *Penicillium brasilianum* foi retirada da micoteca do LaBioMMi, e sua ativação se deu através da inoculação de recortes (0,5 x 0,5cm) do fungo em placas contendo o meio BDA (batata-dextrose-ágar), como pode ser visto na figura 3.4.1. Após o crescimento dos mesmos nas placas de Petri (aproximadamente uma semana), pode-se preparar a suspensão de esporos para os posteriores experimentos com este micro-organismo.

3. Parte experimental

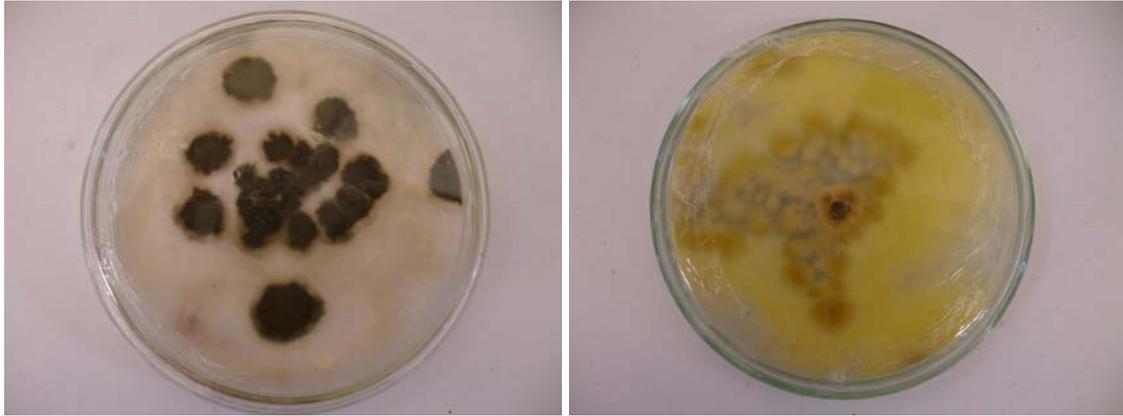


Figura 3.4.1: Placas de petri contendo o fungo *P. brasilianum* frente e verso respectivamente.

3.4.2. Preparo da suspensão de esporos do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

Com o intuito de conhecer o número real de conídios presentes nas alíquotas utilizadas em experimentos posteriores com o fungo *P. brasilianum*, realizou-se uma raspagem dos esporos do micro-organismo, com o auxílio de uma alça de platina, previamente esterilizada (em autoclave vertical durante 40 minutos a temperatura de 121⁰C e 1 atm de pressão) para um tubo de ensaio (tubo 1) contendo 10mL de água destilada, também previamente esterilizado.

3.4.2.a Contagem do número de conídios em placa.

Utilizando-se do método das diluições sucessivas, promoveu-se a diluição de esporos do tubo 1 anteriormente preparado, transferindo-se 1,0mL dessa solução para outro tubo contendo 9,0mL de água destilada estéril (tubo 2). Este procedimento foi repetido até que se obteve uma diluição de 10⁵ vezes (tubo 6), neste último tubo 1,0mL da solução foi descartada.

A seguir, transferiu-se 50µL da suspensão de esporos do tubo 4 (diluição de 10³ vezes) para uma placa de Petri de 9cm de diâmetro contendo meio BDA, espalhando esta alíquota com o auxílio de uma alça de vidro previamente esterilizada. Este procedimento foi realizado em triplicata e as placas incubadas por

48 horas a 35⁰C. Repetiu-se o procedimento descrito para os tubos 5 e 6 (diluições de 10⁴ e 10⁵ vezes respectivamente).

Posterior o período de incubação, realizou-se a contagem do número de conídios presentes nas placas e, após fazer à média das placas de mesma concentração, calculou-se a quantidade real de conídios presente na alíquota adicionada e, conseqüentemente a concentração de células do micro-organismo utilizada nos experimentos.

3.4.3. Cultivo do fungo *P. brasilianum* em larga escala visando o estudo químico dos extratos.

O micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em arroz como meio de cultura para posterior estudo químico do extrato e tentativa de isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas.

Para o cultivo em arroz (Figura 3.4.2) foram utilizados 50 frascos de Erlenmeyers contendo aproximadamente 70g de arroz parbolizado (*Uncle Ben's*®) e 60mL de água destilada autoclavados duas vezes por 40 minutos à temperatura de 121°C e 1 atm de pressão. Pequenos fragmentos do meio BDA contendo micélio e esporos do micro-organismo em estudo foram transferidos assepticamente para 47 dos frascos contendo o substrato esterilizado. Três frascos foram mantidos como controle. Após 20 dias de crescimento a 25°C, o crescimento foi interrompido com a adição de AcOEt e MeOH na proporção 7:3 e a extração (conforme descrito posteriormente no item 3.4.7) foi realizada durante 12 horas à temperatura ambiente e em repouso. Após este período, o material foi separado por filtração a vácuo, obtendo-se o extrato de arroz de *P. brasilianum* (PA1).



Figura 3.4.2: Cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* em arroz.

3. Parte experimental

3.4.4. Estudo químico dos extratos de *P. brasilianum*.

Inicialmente, no intuito de isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas, o extrato obtido a partir do cultivo do fungo em arroz (PA1) foi fracionado empregando uma combinação de técnicas cromatográficas. O extrato PA1 (5,8867g) foi então fracionado em CC ($\phi=6\text{cm}$) e $h=27\text{cm}$ de sílica (Mesh 70-230) e Hex, AcOEt e MeOH foram utilizados como eluentes no modo gradiente, produzindo 30 subfrações (A1 à A30), a coleta foi de 75mL. O gradiente utilizado se encontra descrito na tabela 3.4.1 a seguir.

Tabela 3.4.1: Ordem do gradiente utilizado e o volume eluído.

Eluente(%v/v)	Volume eluído(mL)
Hex:Acetato(50:50)	400
Hex:Acetato(40:60)	400
Hex:Acetato(30:70)	400
Hex:Acetato(20:80)	400
Hex:Acetato(10:90)	400
Acetato(100)	400
Acetato:MeOH(90:10)	400
Acetato:MeOH(85:15)	400
Acetato:MeOH(80:20)	400
Acetato:MeOH(70:30)	400
Acetato:MeOH(50:50)	300
MeOH(100)	500

Em seguida, através de cromatografia em camada delgada (CCD) e RMN ^1H de 200MHz, pôde-se verificar, fazendo-se uma comparação com o R_f e sinais característicos no espectro de RMN da substância padrão, que as substâncias desejadas se encontravam nas frações A15-A27, que foram então reunidas (subfração B).

A subfração B (4,8742g) foi fracionada em CC ($\phi=6\text{cm}$ e $h=27\text{cm}$) com sílica (Mesh 70-230) e hexano, AcOEt e MeOH foram utilizados como eluentes no modo gradiente produzindo 60 subfrações (B1 à B60) coletadas com 75mL. O gradiente utilizado se encontra na tabela 3.4.2 a seguir.

Tabela 3.4.2: Ordem do gradiente utilizado e o volume eluído.

Eluente(%v/v)	Volume eluído(mL)
Hex:Acetato(50:50)	600
Hex:Acetato(40:60)	600
Hex:Acetato(30:70)	600
Hex:Acetato(20:80)	600
Hex:Acetato(10:90)	600
Acetato(100)	600
Acetato:MeOH(90:10)	600
Acetato:MeOH(80:20)	600
Acetato:MeOH(70:30)	600
Acetato:MeOH(50:50)	600
MeOH(100)	1000

Realizaram-se experimentos de RMN ^1H para as subfrações obtidas a partir do fracionamento anterior e as frações de interesse foram submetidas à HPLC preparativo para isolamento.

O procedimento descrito pode ser visualizado no esquema 3.4.1 abaixo.

**Figura 3.4.3:** Isolamento das substâncias brasiliamida A e B.

3. Parte experimental

3.4.5. HPLC analítico e preparativo para isolamento das brasiliamidas e substâncias co-produzidas pelo fungo *P. brasilianum*.

Através de CCD, verificaram-se frações semelhantes que foram reunidas nas frações B45, B59, B55 e B39, e então analisadas.

Inicialmente, foram realizadas análises no HPLC analítico com uma coluna analítica de fase reversa, PHENOMENEX LUNA C18 (250 x 4,6mm I.D., 5 μ de diâmetro de poro), e posteriormente com o auxílio do escalonamento e conseqüente transferência das condições cromatográficas para escala preparativa, partiu-se para o HPLC preparativo e isolamento das brasiliamidas.

Para as análises de HPLC (SHIMADZU) analítico foi utilizado como fase móvel água e acetonitrila.

Os métodos isocráticos testados se encontram abaixo:

Método gradiente: 0-15 min 30% Acetonitrila; 15-30 min 60% Acetonitrila; 30-40 min 80% Acetonitrila; 40-45 min 100% Acetonitrila.

Método 2: isocrático 45% durante 45 minutos

Método 2b: isocrático 45% durante 60 minutos

Método 3: isocrático 40% durante 45 minutos

Método 4: isocrático 35% durante 45 minutos

Método 4b: isocrático 40% durante 60 minutos

Método 5: isocrático 25% durante 45 minutos

Método 6: isocrático 20% durante 45 minutos

Método 7: isocrático 15% durante 45 minutos

A fase móvel foi filtrada e degaseificada por 20 minutos em banho de ultrassom antes de ser utilizada. A velocidade do fluxo utilizada nos experimentos foi de 0,6mL/min e o volume injetado foi de 30 μ L no método utilizado.

Quando as condições do HPLC analítico foram otimizadas para as frações analisadas, partiu-se para o HPLC preparativo (Figura 3.4.4) utilizando-se uma coluna preparativa PHENOMENEX LUNA C18 (250 x 21,20mm I.D., 5 μ de diâmetro de poro), com uma velocidade de fluxo, de acordo com o escalonamento, de 20mL/min.



Figura 3.4.4: HPLC preparativo-SHIMADZU.

3.4.6. Cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio sólido enriquecido com aminoácido.

No intuito de se estudar a influência da adição do aminoácido L-fenilalanina na produção das brasiliamidas, enriqueceu-se o meio de cultura de arroz com este aminoácido. Para isso, pesaram-se 70g de arroz parbolizado (*Uncle Ben's®*) e adicionaram-se 60mL de água destilada em cinco frascos Erlenmeyer de 250mL. Em seguida, adicionou-se a três dos frascos 1g do aminoácido L-fenilalanina (L-Phe) que foram autoclavados durante 15 minutos a 121⁰C e 1 atm de pressão. Em seguida, esporos do micro-organismo em estudo (sob a forma de suspensão de esporos preparada no item 3.4.2) foram transferidos para três dos cinco frascos (Figura 3.4.5), dois foram mantidos como controle. O micro-organismo foi cultivado ainda em arroz sem a adição do aminoácido L-fenilalanina para posterior comparação do metabolismo do micro-organismo.

Todos os frascos foram incubados durante 16 dias a 25⁰C e após este período, a extração foi realizada de acordo com o protocolo de extração otimizado em estudos anteriores, descrito no item 3.4.7 abaixo. Finalmente os extratos foram analisados por HPLC/UV.

3. Parte experimental



Figura 3.4.5: Micro-organismo cultivado em arroz enriquecido com o aminoácido L-Phe.

3.4.7. Protocolo de extração em meio sólido para o cultivo do fungo *P. brasilianum*.

Aos frascos contendo meio sólido a serem extraídos, adicionou-se 70mL de MeOH e 30mL de AcOEt e triturou-se por 3 minutos. A extração foi realizada durante 12 horas. Em seguida, os frascos foram filtrados a vácuo, e o filtrante reservado em etanol. O filtrado obtido foi particionado com acetato de etila (2x 100mL) e a partir da fase orgânica, foram retiradas duas alíquotas de 20mL que posteriormente foram analisadas por HPLC/UV, o restante foi concentrado e armazenado (Figura 3.4.6).

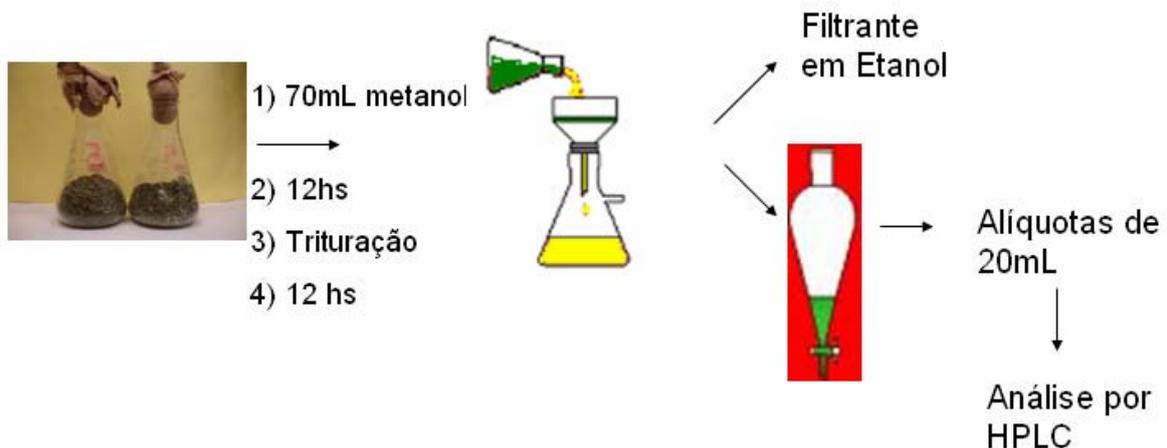


Figura 3.4.6: Procedimento do protocolo de extração em meio sólido.

3.4.8. Análises otimizadas por HPLC/UV.

Para as análises das frações obtidas no item 3.4.6 no HPLC analítico (SHIMADZU), figura 3.4.7, foi utilizada uma coluna de fase reversa, PHENOMENEX LUNA Phenyl-hexyl (250 x 4,6mm I.D., 5 μ de diâmetro de poro) e como fase móvel um gradiente entre água e ACN. O método testado teve uma variação do gradiente da seguinte forma:

Método: 0-15 min 30% ACN; 15-30 min 60% ACN; 30-40 min 80% ACN; 40-45 min 100% ACN.

A fase móvel foi filtrada e degaseificada por 20 minutos em banho de ultrassom antes de ser utilizada. A velocidade do fluxo foi de 0,6mL/min e o volume injetado foi de 30 μ L no método utilizado.



Figura 3.4.7: Cromatógrafo líquido- SHIMADZU.

3.4.9. Curva de produção em arroz do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

Com o conhecimento de que a adição do aminoácido L-Phe influencia a produção das brasiliamidas, alvo de estudo do presente trabalho, realizou-se uma curva de produção destas substâncias em arroz e neste suplementado com este aminoácido, uma vez que o tempo de cultivo é uma variável para a otimização da produção destas substâncias. Para isso, inicialmente, pesaram-se 30g de arroz parbolizado (*Uncle Ben's®*) em 40 frascos de Erlenmeyer de 125mL e adicionaram-se 26mL de água destilada. Em outros 40 frascos contendo esta proporção de arroz e água destilada, adicionaram-se 25mg do aminoácido L-fenilalanina. Os frascos

3. Parte experimental

foram autoclavados durante 15 minutos à temperatura de 121^oC e 1 atm de pressão. Em seguida, 100µL da solução de esporos do micro-organismo em estudo (tubo dois) descrito no item 3.4.2, foram transferidos assepticamente para os frascos contendo o arroz esterilizado (como esquematizado na figura 3.4.8). Três frascos foram mantidos como controle.

As extrações foram realizadas nos períodos conforme a tabela 3.4.3 abaixo.

Tabela 3.4.3: Tempos de cultivo do micro-organismo.

Amostras	Tempo de cultivo (dias)
To	0
T1	2
T2	4
T3	6
T4	9
T5	12
T6	15
T7	18
T8	23
T9	28
T10	38
T11	48

A extração foi realizada de acordo com o protocolo otimizado anteriormente descrito no item 3.4.7. Entretanto as quantidades de solvente orgânico foram modificadas mantendo-se a proporção descrita, uma vez otimizada. A extração foi realizada adicionando-se 35mL de MeOH e 15mL de AcOEt e a partição líquido-líquido realizada com 30mL de AcOEt. Posteriormente, os extratos foram analisados por HPLC/UV-MS conforme descrito no item 3.4.13.



Figura 3.4.8: Esquema da inoculação do fungo *P. brasilianum* em arroz.

3.4.10. Curva de produção de brasiliamidas em canjica do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

Inicialmente, pesaram-se 30g de canjica (Yoki®) em 40 frascos de Erlenmeyer de 125mL e adicionaram-se 26mL de água destilada. Os frascos foram autoclavados duas vezes por 40 minutos à temperatura de 121⁰C e 1 atm de pressão. Em seguida, 100 μ L da solução de esporos do micro-organismo em estudo (tubo 2) descrito no item 3.4.2 foram transferidos assepticamente para os frascos contendo a canjica esterilizada (Figura 3.4.9). Três frascos foram mantidos como controle. A extração foi realizada de acordo com a tabela 3.4.3 do item 3.4.9 e analisada por HPLC/UV-MS de acordo com as condições descritas em 3.4.13.



Figura 3.4.9: Cultivo do fungo *P. brasilianum* em canjica.

3. Parte experimental

3.4.11. Curva de produção em meio líquido do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

O cultivo em meio líquido do fungo *P. brasilianum* para a construção da curva de crescimento utilizou 80 frascos de Erlenmeyer de 250mL contendo aproximadamente 50mL de meio Czapek que possui a seguinte composição:

Para 1L de água destilada:

- 3,0 g de NaNO₃
- 1,0g de K₂HPO₄
- 0,5g de MgSO₄
- 0,5g de KCl
- 0,01g de FeSO₄
- 30g de glicose

Em 40 dos frascos foram adicionados 25mg de L-Phe e em 40 dos frascos não houve a adição de aminoácido para posterior comparação (controle). Os frascos foram então autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121⁰C a 1 atm de pressão. A extração foi realizada de acordo com a tabela 3.4.4 abaixo:

Tabela 3.4.4: Tempos de cultivo do micro-organismo.

Amostras	Tempo de cultivo (dias)
To	0
T1	3
T2	6
T3	9
T4	12
T5	15
T6	18
T7	23
T8	28
T9	33
T10	38
T11	48

A extração foi realizada adicionando-se 20g de cloreto de sódio aos frascos que foram deixados em repouso durante 12 horas, em seguida, o extrato foi submetido à filtração a vácuo. O filtrado passou por uma partição com Acetato de Etila e a fase orgânica formada foi coletada, e retirou-se desta, alíquotas de 5mL que posteriormente foram analisadas por HPLC/UV-MS, o extrato restante concentrado e guardado.

Ao micélio, adicionaram-se 50mL de EtOH P.A. e, após 12hs, o extrato passou por nova filtração a vácuo. Uma alíquota de 5mL foi retirada para posteriormente ser analisada por HPLC/UV-MS de acordo com as condições otimizadas em 3.4.13.

3.4.12. Quantificação da massa micelial do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

Com o intuito de avaliar o efeito de diferentes aminoácidos no crescimento da biomassa do micro-organismo, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado com diferentes aminoácidos e após extração e quantificação do micélio pode-se verificar a influência de cada um dos aminoácidos no crescimento deste micro-organismo. Para isso, utilizaram-se 15 frascos de Erlenmeyer de 250mL onde foram adicionados 50mL de meio Czapek. Adicionaram-se dessa maneira, 25mg dos aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano em 3 dos frascos respectivamente, e três frascos de Erlenmeyer foram mantidos como controle sem a adição de aminoácidos. Os frascos foram então esterilizados sendo autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121⁰C a 1 atm de pressão. O micro-organismo na forma de suspensão de esporos, conforme descrito no item 3.4.2, foi então inoculado assepticamente. A extração foi realizada durante 12 horas após a adição de NaCl. Após esse período, filtrou-se a vácuo, e o material (micélio) foi colocado na estufa para posterior pesagem e quantificação. O material foi pesado 24 horas depois da filtragem o resultado gerado é a média das triplicatas de cada aminoácido.

3. Parte experimental

3.4.13. Análises das curvas de produção por espectrometria de massas.

Uma vez que não são reportadas na literatura análises por espectrometria de massas das amidas bis-fenilpropanoídicas, foram realizados inúmeros experimentos para a determinação das melhores condições do espectrômetro de massas para estas amidas. Dessa maneira, realizaram-se experimentos de inserção direta nos modos de ionização positivo e negativo, utilizando-se ESI/MS, num espectrômetro triplo quadrupolo-WATERS (Figura 3.4.10).



Figura 3.4.10: Espectrômetro de massas triplo quadrupolo-WATERS.

O fluxo utilizado foi de 0.3 mL/min (ACN) e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi metanol, e as condições para as amidas estão descritas nas Tabelas 3.4.5 e 3.4.6:

Tabela 3.4.5: Condições do espectrômetro de massas para (ESI+).

Temperatura da fonte ($^{\circ}\text{C}$)	50
Temperatura do probe ($^{\circ}\text{C}$)	330
Capilar (kV)	3.88
Cone (V)	11
Extrator (V)	8
Lentes RF (V)	0.57

Tabela 3.4.6: Condições do espectrômetro de massas para (ESI-).

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura do probe (°C)	330
Capilar (kV)	3.53
Cone (V)	42
Extrator (V)	3
Lentes RF (V)	0.69

Estudou-se a fragmentação das amidas por *electrospray* (ESI) e decomposição induzida por colisão (CID) e a partir desses dados, pode-se estabelecer os melhores experimentos para a detecção seletiva dessas substâncias nos meios de cultura. Pôde-se, a partir dos fragmentos observados nos espectros de íons produtos, determinar os canais de SRM tanto para a substância brasiliamida A quanto para o aminoácido L-fenilalanina, com o objetivo de traçar a curva de produção proposta e observar o consumo de L-Phe, mostrando uma possível relação entre estas substâncias no metabolismo do fungo em estudo. As condições utilizadas no HPLC para os experimentos de SRM são citadas abaixo.

Utilizou-se uma coluna cromatográfica X-terra Phenyl hexyl 3,5 μ (3,0x50mm) e ACN e água como eluentes numa proporção 40:60 respectivamente contendo 1% de TFA, a corrida isocrática teve duração de 8 minutos e o fluxo de 0.3mL/min.

A substância brasiliamida A e o aminoácido L-Phe apresentaram diferentes tempos de retenção, e, portanto, foi possível a realização na mesma corrida cromatográfica, duas funções SRM no modo positivo de ionização. Nos três primeiros minutos a função SRM para a L-fenilalanina apresentava dois canais de fragmentação (166-120) e (166-131) e a energia de colisão foi otimizada em 10eV, assim como o Dwell time em 0.5. A segunda função SRM (2-8 min) para a amida apresentava três canais de fragmentação (439-380), (439-338) e (439-205). A energia de colisão também foi otimizada em 10eV através dos experimentos de íons produtos (Tabela 3.4.7).

3. Parte experimental

Tabela 3.4.7: Condições do espectrômetro de massas para SRM para o aminoácido L-fenilalanina.

Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Inter channel- delay (s)	Dwell (s)	Energia de colisão (eV)
166	120	0,03	0,5	10
166	131	0,03	0,5	10

Tabela 3.4.8: Condições de SRM para a substância brasilamida A

Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Inter channel- delay (s)	Dwell (s)	Energia de colisão (eV)
439	380	0,03	0,5	10
439	338	0,03	0,5	10
439	205	0,03	0,5	10

3.4.14. Estudo da influência de aditivos nitrogenados no metabolismo secundário de *P. brasilianum*.

Com o objetivo de verificar a influência de diferentes aditivos nitrogenados no metabolismo secundário do fungo *P. brasilianum* e conseqüente influência na produção das amidas bis-fenilpropanoidicas, o micro-organismo foi cultivado em meio líquido Czapek em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio de cultivo suplementado com 0,15g (concentração de 3g/L) de cada um dos diferentes aditivos nitrogenados citados abaixo:

- ❖ L-fenilalanina
- ❖ L-tirosina
- ❖ L-serina
- ❖ L-histidina
- ❖ L-prolina
- ❖ L-triptofano

- ❖ L-leucina
- ❖ L-alanina
- ❖ L-glutamina
- ❖ ácido antranílico
- ❖ 1-fenil-3-metil-5-pirazolona
- ❖ biotin
- ❖ NH_4NO_3

A composição do meio Czapek utilizada no estudo foi:

Para 1L de água destilada:

- 1,0g de K_2HPO_4
- 0,5g de MgSO_4
- 0,5g de KCl
- 0,01g de FeSO_4
- 30g de glicose

Os frascos foram então autoclavados durante 15 minutos à temperatura de 121°C a 1 atm de pressão, e esporos do micro-organismo (100 μL da suspensão de esporos, item 3.4.2) foram transferidos assepticamente para os frascos. A extração foi realizada após 18 dias de cultivo, adicionando-se etanol ao micélio. Os frascos foram deixados em repouso durante 12 horas à temperatura ambiente e, após este período, filtrados a vácuo. Uma alíquota de 5mL foi retirada do extrato e analisada por HPLC/UV-MS.

As alíquotas (5mL) referentes ao cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* com a adição de diferentes aditivos foram analisadas por HPLC/UV-MS, o gradiente de água e ACN utilizado nas análises é descrito na seção 3.4.8, a vazão utilizada de 0,6mL/min e 20 μL o volume de injeção das amostras que foram ressuspensas em MeOH.

As condições do espectrômetro de massas para as análises são descritas na tabela 3.4.5 do item 3.4.13, as análises foram realizadas no modo positivo de ionização, com varredura de massas em experimentos *full scan* de 200-1200Da.

3. Parte experimental

3.4.15. Estudo de quantificação das brasiliamidas nos meios de cultura com diferentes composições nitrogenadas.

Inicialmente, para a quantificação das amidas bis-fenilpropanoidicas nos diferentes meios de cultura, contendo cada um dos diferentes aditivos nitrogenados, foi utilizado como padrão interno o éster etílico de L-fenilalanina n-acetilado, preparado e purificado no grupo LaBioMMi.

Dessa maneira, construiu-se uma curva de calibração com PI, variando-se a concentração de brasiliamida A (padrão isolado, item 3.4.4), mantendo-se fixa a concentração de PI em 5 µg/mL.

A curva de calibração construída foi analisada por HPLC/UV-MS/MS, utilizando-se uma coluna analítica PHENOMENEX LUNA C18 de 250 x 4,6mm I.D., (5µ de diâmetro de poro) e água e ACN com a adição de 0,1% de TFA como fase móvel em condições isocráticas 1:1, com 15min de tempo de corrida. A vazão utilizada foi de 1mL/min com a utilização de divisor de fluxo (0,3mL/min entrava no espectrômetro de massas) e 20µL foi o volume de injeção utilizado.

As análises foram realizadas por ESI/MS no modo positivo de ionização, as condições da fonte e do analisador otimizadas anteriormente para a substância brasiliamida A são descritas nas tabelas 3.4.5 e 3.4.8 da seção 3.4.13.

Estudou-se a fragmentação do padrão utilizado (éster etílico de fenilalanina n-acetilado) para quantificação por *electrospray* (ESI) e decomposição induzida por colisão (CID) e a partir dos fragmentos observados nos espectros de íons produtos, determinou-se os canais de SRM para este composto, a energia de colisão otimizada e utilizada nos experimentos foi 10eV e o Dwell time otimizado em 0,5. As condições e os canais de SRM utilizados nos experimentos podem ser visualizados na tabela 3.4.9.

Tabela 3.4.9: Condições do espectrômetro de massas para SRM para o PI.

Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Inter channel- delay (s)	Dwell (s)	Energia de colisão (eV)
236	162	0,03	0,5	10
236	120	0,03	0,5	10

3.4.16. Estudo da influência da concentração de L-fenilalanina na produção das amidas bis-fenilpropanoídicas.

Com o objetivo de se conhecer a influência do aminoácido L-fenilalanina na produção das amidas bis-fenilpropanoídicas, variou-se a concentração deste aminoácido adicionado ao meio de cultura.

Para isso, o micro-organismo foi cultivado em meio líquido Czapek, como descrito no item 3.4.14 em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio de cultura e adicionou-se L-fenilalanina nas concentrações descritas: 5g/L; 3g/L; 1g/L; 0,5g/L em triplicata. Em seguida, os meios de cultura preparados com as diferentes concentrações de L-fenilalanina foram autoclavados durante 15 min. à 121°C e 1 atm de pressão. O micro-organismo foi inoculado sob a forma de suspensão de esporos (item 3.4.2) de maneira asséptica.

O micro-organismo foi cultivado durante 18 dias e a extração foi realizada com a adição de etanol ao micélio do micro-organismo, que foi deixado em repouso à temperatura ambiente durante 12 horas, após este período, realizou-se a filtração a vácuo e alíquotas de 5mL foram retiradas e analisadas e quantificadas por HPLC/UV-MS/MS de acordo com as condições otimizadas descritas no item 3.4.15.

3.4.17. Estudo da adição de L-fenilalanina em diferentes tempos de cultivo do micro-organismo *P. brasilianum*.

No intuito de se otimizar o período para adição do aminoácido L-fenilalanina no sentido de se obter máximo rendimento da produção das brasiliamidas, foi proposto um experimento de adição deste aminoácido em diferentes etapas do crescimento do micro-organismo em estudo. O fungo *P. brasilianum* (sob a forma de suspensão de esporos, item 3.4.2) foi cultivado em meio líquido Czapek em frascos Erlenmeyer de 250mL, o aminoácido L-Phe (25mg) foi adicionado em triplicata ao fungo durante a inoculação (0 dias) e depois de 3,6,9,12 e 15 dias de cultivo para posterior comparação. Três frascos foram mantidos como controle sem a adição de L-fenilalanina. Os frascos foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 1 atm de pressão. A extração de todos os frascos foi realizada depois de 18 dias de cultivo adicionando-se EtOH ao micélio do fungo. Alíquotas de 5mL foram

3. Parte experimental

retiradas após etapa de filtração a vácuo, e analisadas e quantificadas por HPLC/UV-MS/MS conforme descrito no item 3.4.15.

3.4.18. Estudo da biossíntese de fenilpropanóides produzidos pelo fungo *P. brasilianum*.

Com o conhecimento de que o aminoácido L-fenilalanina influencia a produção de amidas bis-fenilpropanoidicas, foi proposto um experimento que comprovasse esta influência. Dessa maneira, o micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado com a adição deste aminoácido isotopicamente marcado [2-¹³C]-Phe ao meio de cultura. Para isso, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em meio líquido Czapek com a adição de 25mg de [2-¹³C]-Phe. O meio foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C e 1 atm de pressão e em seguida o micro-organismo foi inoculado na forma de solução de esporos preparada anteriormente (item 3.4.2). A extração foi realizada após 18 dias de crescimento com a adição de EtOH ao micélio do micro-organismo. O extrato gerado (**AM**) foi submetido às análises por HPLC/UV-MS/MS e posterior fracionamento.

Os extratos obtidos a partir do cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* com a adição do aminoácido L-fenilalanina isotopicamente marcado ao meio de cultivo foram analisados por HPLC/UV-MS, utilizando-se uma coluna analítica PHENOMENEX LUNA C18 de 250 x 4,6mm I.D., (5µ de diâmetro de poro) e água e ACN com a adição de 0,1% de TFA como fase móvel. A vazão utilizada foi de 0.3mL/min e 20µL foi o volume de injeção utilizado. O gradiente utilizado nas análises é descrito no item 3.4.8.

Os extratos foram analisados por ESI/MS no modo positivo de ionização e as condições utilizadas e otimizadas anteriormente para a substância brasiliamida A podem ser observadas no item 3.4.13.

3.4.19. Isolamento da substância brasiliamida A com incorporação isotópica para posteriores análises espectroscópicas.

A substância brasiliamida A foi purificada a partir do fracionamento do extrato AM (m= 1,021g) obtido do cultivo do micro-organismo com L-fenilalanina isotopicamente marcada, para isso o extrato foi fracionado em uma coluna de sílica (Mesh 70-230) de 2,5cm de diâmetro e 20 cm de altura, utilizando-se como eluentes Hex, AcOEt e MeOH na ordem e proporção de eluição especificada na tabela 3.4.10 abaixo.

Tabela 3.4.10: Ordem do gradiente utilizado e o volume eluído.

Eluente(%v/v)	Volume eluído(mL)
Hex:Acetato(50:50)	1000
Hex:Acetato(40:60)	1000
Hex:Acetato(30:70)	1000
Hex:Acetato(20:80)	1000
Hex:Acetato(10:90)	1000
Acetato(100)	1000
Acetato:MeOH(90:10)	1000
Acetato:MeOH(80:20)	1000
Acetato:MeOH(70:30)	1000
Acetato:MeOH(50:50)	1000
MeOH(100)	1500

Após a purificação da amida bis-fenilpropanoídica, brasiliamida A (**AM18**) a partir do cultivo do fungo *P. brasilianum* com a adição de L-Phe marcada isotopicamente, esta substância foi analisada por RMN ¹³C de 400MHz e ainda, analisada por espectrometria de massas. As análises foram realizadas em parceria com a empresa Applied Biosystems pela Dra. Anna Silvia Marques e as condições dos parâmetros da fonte de ionização para a realização das análises por ESI no modo positivo, no equipamento híbrido Q-trap são observadas abaixo.

- ❖ Declustering Potential: DP= 30.0 V
- ❖ Entrance Potential: EP= 10.0 V
- ❖ Curtain Gas: 12.0

3. Parte experimental

- ❖ GS1: 20.0
- ❖ GS2: 0.0
- ❖ TEM: 0.0 °C
- ❖ IS: 5500 V
- ❖ Interface Heater: on

3.4.20. Extração da enzima Fenilalanina amônioliase (PAL) e ensaio enzimático.

Devido à falta de informação na literatura relacionada à extração da enzima Fenilalanina-amônioliase de micro-organismos, três diferentes protocolos de cultivo e extração foram realizados e são descritos abaixo:

Protocolo 1: O micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em 5 frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio líquido Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura (esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm de pressão durante 15 min.) sob agitação de 120rpm. Após 5 dias de cultivo a 25°C, os frascos contendo o fungo foram transferidos para frascos para uso em centrífuga, onde foram centrifugados durante 10 minutos à 10000rpm numa temperatura de 10°C. Em seguida, descartou-se o meio líquido e lavou-se o micélio do micro-organismo com 50mL do tampão tris-HCl (pH 8.8). Centrifugou-se novamente à 10°C e 10000rpm e descartou-se a fase líquida. As células remanescentes foram redissolvidas em 50mL de tampão. O extrato preparado foi colocado em gelo e sonicado em sonicador de membrana durante 10 minutos (1 segundo permanecia ligado e 2 segundos desligado, potência de 50%). Novamente o extrato enzimático foi centrifugado. Dessa maneira, obteve-se 5 frascos contendo 50mL de extrato enzimático cada um.

O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se 5mL de extrato enzimático a 5 tubos Falcon e 5mL de L-fenilalanina (2,5mM) em cada tubo. A extração foi realizada depois de 30min, 1h, 2h, 12h e 24h de reação adicionando-se 5mL de HCl para finalizar a reação. Em seguida, com o objetivo de extração do ácido cinâmico, foi adicionado 5mL de reagente álcool e agitou-se o tubo. A formação de ácido cinâmico foi monitorada por HPLC/UV.

Um dos frascos foi mantido como controle sem a adição de L-fenilalanina e um outro frasco foi mantido como controle sem a adição do micro-organismo (tampão e L-fenilalanina).

Protocolo 2: O micro-organismo foi cultivado em 5 frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio líquido Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura sob agitação de 120rpm. Após 5 dias de cultivo a 25°C, os frascos contendo o fungo foram transferidos para frascos para uso em centrífuga, onde foram centrifugados durante 10 minutos à 10000rpm numa temperatura de 10°C. Em seguida, descartou-se o meio líquido e lavou-se com 50mL do tampão tris-HCl (pH 8.8). Centrifugou-se novamente a 10°C e 10000rpm e descartou-se a fase líquida. As células remanescentes foram redissolvidas em 50mL de tampão. Neste protocolo não foi realizada a etapa de sonicação. O ensaio enzimático foi realizado de acordo com o protocolo 1 apresentado. A formação de ácido cinâmico a partir da L-fenilalanina pode ser visualizada a partir de análises por HPLC/UV.

Protocolo 3: O micro-organismo *P. brasilianum* foi cultivado em meio líquido Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura de maneira estática a 25°C durante 5 dias. Em seguida, filtraram-se os frascos e adicionou-se 50mL de tampão tris-HCl. O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se 50mL de L-fenilalanina nos frascos e deixou-se reagindo sob agitação de 120rpm. Um dos frascos durante este processo não foi deixado em agitação, como forma de controle. Em seguida, a reação foi terminada depois de 30 min., 1h, 2h, 12h e 24h transferindo-se 5mL do extrato enzimático já contendo a L-fenilalanina para tubos Falcon e a reação foi terminada adicionando-se HCl. Adicionou-se ainda 5mL de Reagente álcool para extração do ácido cinâmico. A formação do ácido cinâmico a partir do aminoácido testado foi visualizada a partir de análises por HPLC/UV.

3.4.20. Análises de HPLC/UV e espectrometria de Massas dos ensaios enzimáticos.

Para as análises de HPLC analítico (SHIMADZU), para a visualização da formação de ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina, e conseqüente comprovação da produção da enzima PAL pelo micro-organismo *P. brasilianum* item 3.4.19, foi utilizada uma coluna de fase reversa, PHENOMENEX Synergi C18 (250 x

3. Parte experimental

4,6mm I.D., 5µ de diâmetro de poro) e como fase móvel um gradiente entre água e MeOH. O método testado teve uma variação do gradiente da seguinte forma:

Método: 0-30 min 60% MeOH; 30-40 min 90% MeOH; 40-50 min 100% MeOH; 50-60 min 60% MeOH.

A fase móvel foi filtrada e degaseificada por 20 minutos em banho de ultrassom antes de ser utilizada. A velocidade do fluxo foi de 0,6 mL/min e o volume injetado foi de 20µL no método utilizado.

Nas análises por espectrometria de massas, realizaram-se experimentos de inserção direta no modo de ionização negativo, utilizando-se ESI/MS, num espectrômetro triplo quadrupolo-WATERS.

O fluxo utilizado foi de 0.3mL/min (ACN) e o solvente utilizado para dissolução dos extratos foi Reagente álcool, e as condições para o ácido cinâmico estão descritas na Tabela 3.4.11:

Tabela 3.4.11: Condições do espectrômetro de massas para (ESI-).

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura do probe (°C)	330
Capilar (kV)	3.22
Cone (V)	41
Extrator (V)	6
Lentes RF (V)	0.71

3.4.21. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) da substância brasiliamida A (placa de Elisa).

Em estudos anteriores realizados no laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos - LaBioMMi, verificou-se que a substância brasiliamida A apresentava ação contra a bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*, quando realizados testes de triagem, utilizando a metodologia do líquido metabólico, também conhecida como método do filtrado ou para detecção de antibióticos. A

partir de então, esta substância foi novamente ensaiada para se medir a concentração mínima inibitória (MIC) em placa de Elisa.

A bactéria gram-positiva testada *Bacillus subtilis* e outras bactérias foram cedidas pela Universidade Estadual de Maringá.

Prepararam-se cada um dos meios descritos a seguir para a realização dos ensaios antimicrobianos da substância brasiliamida A, e depois de preparados foram autoclavados durante 15 minutos a 121⁰C para garantir total esterilidade dos mesmos.

- **Ágar Mueller Hinton**

Em 250mL de água destilada, dissolveu-se 9,5g de ágar Mueller Hinton.

- **Caldo Mueller Hinton**

Dissolveu-se 10,5g de caldo Mueller Hinton em 50mL de água destilada.

- **BHI (Infuso Cérebro Coração)**

Preparou-se o meio dissolvendo-se 52,0g de BHI para 1L de água destilada.

3.4.21.1 Ativação das bactérias.

Inicialmente, as bactérias foram ativadas em placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo ágar Mueller Hinton, sendo incubadas por um período de 24 horas, a 33°C. Após esse intervalo, transferiu-se cerca de uma colônia de bactéria para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller Hinton, com o auxílio de uma alça de platina devidamente esterilizada. Este tubo, após ser homogeneizado, foi incubado por um período de 24 a 30 horas, a uma temperatura de 33°C.

3. Parte experimental

3.4.21.2 Padronização das culturas.

A bactéria submetida aos ensaios antibacterianos foi padronizada mediante comparação com os padrões da escala de McFarland de turbidez, tendo sido referida a concentração de 1×10^8 cel/mL. Para isso, misturou-se 9,95mL de uma solução de H₂SO₄ 1% e 0,05mL de solução de BaCl₂ 1% para comparação com as soluções bacterianas.

Quando necessário, realizou-se a diluição do tubo contendo a bactéria utilizando solução salina 0,9%.

3.4.21.3. Preparo da amostra.

A partir de 1mg da substância a ser testada, dissolveu-se em 100μL de DMSO, contidos em Eppendorf e agitou-se para homogeneizar a solução. Em seguida, foram adicionados 900μL de caldo Mueller Hinton e agitou-se novamente a solução.

3.4.21.4. Preparo do antibiótico controle.

Para o preparo do antibiótico padrão, preparou-se uma solução de vancomicina 50μg/mL, dissolvidos em DMSO. Em seguida, adicionaram-se 50μL da solução preparada em 950μL de caldo Mueller Hinton.

3.4.21.5. Ensaio para medir a MIC.

Nas placas de Elisa de 96 furos (Figura 3.4.11), foram adicionados 100μL de meio caldo Mueller Hinton em cada uma das cavidades. A seguir, acrescentou-se 100μL da solução da substância brasiliamida A na primeira cavidade das três primeiras colunas da linha A, como observado na figura 21 (colunas 1,2,3) e homogeneizou-se a solução. Após isso foram realizadas diluições sucessivas,

retirando-se 100µL das cavidades 1, 2 e 3 A, transferindo-se esse volume para as cavidades 1,2 e 3B, homogeneizando, repetindo esse procedimento até a penúltima cavidade da placa de Elisa, de onde são retirados 100µL e descartados. A última linha da placa é utilizada como controle do meio usado, não acrescentando nesta, a amostra a ser testada. Nas três próximas colunas (colunas 4, 5, 6), adicionou-se solução de DMSO como controle, também se realizando as diluições sucessivas como descrito. Nas outras três colunas adicionou-se a substância brasilamida A para a verificação do comportamento desta substância durante o teste (controle positivo). E finalmente nas últimas três colunas, adicionou-se a solução do controle padrão do antibiótico vancomicina. Por fim, em cada cavidade foram adicionados 5µL da solução bacteriana com exceção das colunas 7,8 e 9 e incubou-se a placa à 35⁰C por 24 horas. A leitura dos resultados pode ser realizada com o corante TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico).

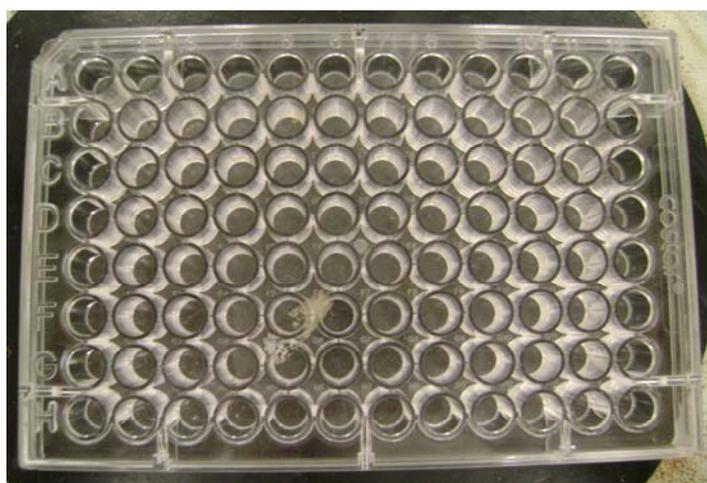


Figura 3.4.11: Placa de Elisa.

3.4.21.6. Verificação do tipo de atividade.

Após verificar a concentração mínima inibitória da substância testada, é necessário saber o tipo de atividade apresentada em cada concentração (bactericida ou bacteriostático). Nas cavidades onde a coloração não se apresentou vermelha devido à ação do corante as bactérias foram reinoculadas em placas de Petri contendo o meio BHI e incubadas por 35⁰C e 24 horas. Onde houve o crescimento

3. Parte experimental

da bactéria, o efeito é denominado bacteriostático, enquanto onde não houve crescimento observado o efeito é conhecido como bactericida.

3.5. Estudos com o micro-organismo *Penicillium* sp., isolado como endofítico de *Murraya paniculata*.

3.5.1 Cultivo do fungo *Penicillium* sp.

O fungo *Penicillium* sp. foi isolado como endofítico, anteriormente de *Murraya paniculata* no laboratório LaBioMMi do Departamento de Química da UFSCar por Marinho (2002).

A cepa de *Penicillium* sp. foi retirada da micoteca do LaBioMMi, e sua ativação se deu através da inoculação de recortes (0,5 x 0,5cm) do fungo em placas contendo o meio BDA (batata-dextrose-agar), procedimento já descrito em 3.4.1, como pode ser visto na figura 3.5.1. Após o crescimento dos mesmos nas placas de Petri (aproximadamente uma semana), pode-se preparar a suspensão de esporos para os posteriores experimentos com este micro-organismo.

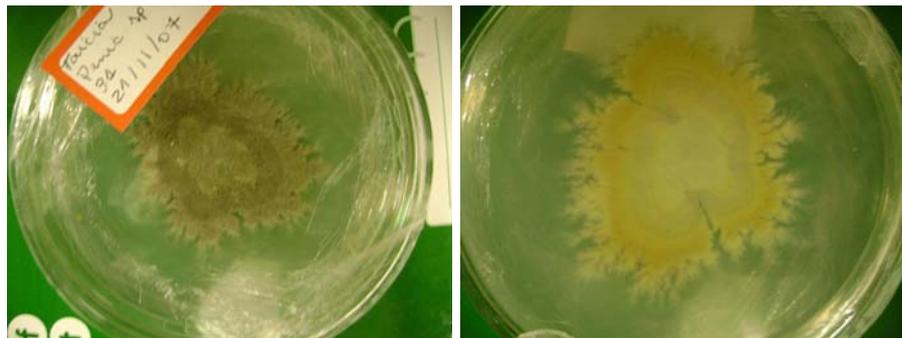


Figura 3.5.1: Micro-organismo *Penicillium* sp. de *Murraya paniculata*.

3.5.2. Preparo da solução de esporos e contagem de conídios em placa do fungo *Penicillium* sp. isolado de *Murraya paniculata*.

Com o intuito de se conhecer o número real de conídios presentes na alíquota utilizada em experimentos com o fungo *Penicillium* sp., preparou-se uma solução de esporos deste micro-organismo seguindo o procedimento descrito no item 3.4.2 já descrito.

3.5.3. Cultivo do fungo *Penicillium* sp. isolado de *Murraya paniculata* em meio sólido.

Para o cultivo em arroz (Figura 3.5.2) foram utilizados cinco frascos de Erlenmeyer de 250mL, contendo aproximadamente 70g de arroz (*Uncle Ben's*®) e 60mL de água destilada autoclavados duas vezes por 40 minutos à temperatura de 121^oC e 1 atm de pressão. Pequenos fragmentos do meio BDA contendo micélio e esporos do micro-organismo *Penicillium* sp. em estudo foram transferidos assepticamente para três dos cinco frascos contendo o arroz esterilizado. Dois dos frascos foram mantidos como controle. Após 22 dias de incubação (25^oC), período em que se observou em estudos anteriores, produção dos policetídeos pelo micro-organismo, realizou-se a extração em cada um dos frascos adicionando-se 100mL de MeOH. Os extratos obtidos foram analisados por HPLC/UV-MS, e as condições são descritas no item 3.5.8 abaixo.



Figura 3.5.2: Cultivo do fungo *Penicillium* sp. em arroz.

3. Parte experimental

3.5.4. Cultivo do micro-organismo *Penicillium* sp. em meio líquido.

O fungo *Penicillium* sp. foi cultivado em três frascos de Erlenmeyer contendo meio Czapek preparado seguindo as proporções descritas no item 3.4.11, entretanto, o meio foi suplementado com 2% de extrato de levedura, dois frascos foram mantidos como controle. Em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121⁰C e 1 atm de pressão. O experimento teve duração de 18 dias e então se adicionou cloreto de sódio. O filtrado foi particionado com AcOEt e ao micélio foi adicionado EtOH grau P.A. Uma alíquota de 5mL foi retirada do particionado e do micélio que foram analisadas por HPLC/UV-MS de acordo com as condições mencionadas em 3.5.8.

3.5.5. Extração de fase sólida dos extratos do fungo *Penicillium* sp.

Com o objetivo da realização de pré-purificação nos extratos do fungo *Penicillium* sp., descritos nos itens 3.5.3 e 3.5.4, realizou-se extração por fase sólida (SPE) dos mesmos como descrito a seguir.

Inicialmente, foram adicionados 5mL de MeOH em cada um dos extratos descritos acima e adicionaram-se 20mL de água milli-Q. Esta suspensão foi submetida a extração de fase sólida (SPE) utilizando um cartucho LC-18 (Strata) PHENOMENEX sob vácuo (Figura 3.5.3). O cartucho foi ativado e em seguida condicionado com 15mL de água milli-Q. As amostras foram filtradas e aplicadas nos cartuchos, a eluição foi realizada seguindo o seguinte gradiente de eluição (tabela 3.5.1).

Tabela 3.5.1: Proporção dos eluentes utilizados na SPE.

Proporção do eluente (%)	Eluentes
9:1	H ₂ O/MeOH
8:2	H ₂ O/MeOH
7:3	H ₂ O/MeOH
6:4	H ₂ O/MeOH
1:1	H ₂ O/MeOH
100	MeOH



Figura 3.5.3: Extração em fase sólida.

Todas as frações obtidas foram analisadas posteriormente por HPLC/UV-MS de acordo com as condições descritas abaixo no item 3.5.8.

3.5.6. Cultivo em canjica do fungo *Penicillium* sp. isolado de *Murraya paniculata*.

Com o objetivo de otimizar o meio de cultura mais adequado para a produção das amidas pelo fungo *Penicillium* sp., este micro-organismo foi também cultivado em canjica, para isso, pesaram-se 90g de canjica (Yoki®) em 5 frascos de Erlenmeyer de 500mL e em seguida adicionou-se 70mL de água destilada. Os frascos foram esterilizados em autoclave seguindo o procedimento para meio sólido (item 3.2.17). Em seguida, 100 μ L da solução de esporos do micro-organismo em estudo (tubo 2) descrito no item 3.2.16 foram transferidos assepticamente para os frascos contendo a canjica esterilizada. Dois dos frascos mantidos como controle. A extração foi realizada depois de 18 dias com 100mL de MeOH, após trituração e extração por 12 horas, realizou-se filtração à vácuo. Os extratos foram analisados por HPLC/UV-MS como descrito em 3.5.8.

3. Parte experimental

3.5.7. Cultivo do micro-organismo *Penicillium* sp. em meio líquido com a adição de aminoácidos no meio de cultura.

Com o intuito de avaliar o efeito dos aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano no metabolismo secundário do fungo *Penicillium* sp. e na produção das amidas, cultivou-se este micro-organismo em meio líquido Czapek descrito no item 3.4.11, suplementado com 2% de extrato de levedura, utilizou-se para isso, 15 frascos de Erlenmeyer de 1000mL onde foram adicionados 300mL de meio em cada um deles.

Em seguida, adicionaram-se 25mg de cada um dos aminoácidos testados em três dos frascos de Erlenmeyer, respectivamente e três foram mantidos como controle sem a adição de aminoácidos (Figura 3.5.4). Os frascos foram então autoclavados por 15 minutos à temperatura de 121^oC a 1 atm de pressão. O micro-organismo foi então inoculado na forma de suspensão de esporos de maneira asséptica. A extração foi realizada depois de 18 dias, durante 12 horas após a adição de NaCl. Após esse período, filtrou-se a vácuo onde o filtrado foi particionado com AcOEt e ao micélio foi adicionado EtOH P.A. Uma alíquota de 5mL foi retirada do particionado e do micélio que foram analisados por HPLC/UV/MS de acordo com as condições mencionadas em 3.5.8.



Figura 3.5.4: Cultivo do micro-organismo *Penicillium* sp. em meio líquido com a adição de aminoácidos no meio.

3.5.8. Análise por espectrometria de massas.

Não existem relatos na literatura de análises destas amidas por espectrometria de massas, o que nos incentivou muito a estudar o comportamento destes compostos frente os diferentes modos de ionização, e ainda, determinar as melhores condições dos diferentes parâmetros do espectrômetro de massas (Tabela 3.5.2).

Inicialmente, com o auxílio do padrão isolado da molécula GKK1032 B, podem-se realizar experimentos de *full scan* e experimentos de íons produtos. As melhores condições para ionização destas moléculas puderam ser obtidas e encontram-se na tabela abaixo. O fluxo utilizado foi de 0.3 mL/min (ACN) e o solvente utilizado nas análises foi metanol.

Tabela 3.5.2: Condições do espectrômetro de massas para (ESI-).

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura do probe (°C)	350
Capilar (kV)	2.70
Cone (V)	47
Extrator (V)	4
Lentes RF (V)	0.72

Estudou-se a fragmentação das amidas por *electrospray* (ESI) e decomposição induzida por colisão (CID) em experimentos de íons produtos e a partir desses dados, pode-se determinar os canais de SRM para a substância GKK1032 B para então identificá-la nos diferentes meios de cultura, onde o fungo *Penicillium* sp. foi cultivado. As condições utilizadas no HPLC para os experimentos de SRM são citadas abaixo.

Utilizou-se uma coluna cromatográfica X-terra Phenyl 3.5 μ (3.0 x 50mm) e utilizou-se acetonitrila como fase móvel. A corrida isocrática teve duração de 10 minutos e o fluxo de 0.2mL/min. As condições utilizadas nos experimentos de SRM podem ser observadas na tabela 3.5.3 abaixo.

3. Parte experimental

Tabela 3.5.3: Condições do espectrômetro de massas para SRM.

Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Inter channel- delay (s)	Dwell (s)	Energia de colisão (eV)
500	394	0,03	0,08	30
500	323	0,03	0,08	30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estratégia de estudo.

O estudo dos extratos do fungo *P. brasilianum* cultivado em arroz como meio de cultura foi realizado utilizando-se diversas técnicas de análise química, como a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas, que tornaram possível a análise de complexas misturas de extratos fúngicos com diferentes composições de meios de cultura. A utilização das técnicas citadas contribuiu muito nos estudos de detecção e caracterização estrutural, principalmente de constituintes em pequenas concentrações nos extratos.

As análises por HPLC/UV permitiram a separação dos componentes dos extratos. Além disso, as análises em escala analítica serviram para otimização dos parâmetros de separação, para posterior transferência dos mesmos para escala preparativa, visando o isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas e co-produtos produzidos pelos micro-organismos em estudo.

O acoplamento entre as técnicas analíticas citadas tornou possível a quantificação das brasiliamidas e outros metabólitos secundários nos extratos, assim como tornou possível a verificação da influência de aditivos nitrogenados no metabolismo de micro-organismos endofíticos do gênero *Penicillium*, uma vez que permitiu que cada banda observada nas análises por HPLC/UV-MS fosse relacionada com seu respectivo espectro de massas. Dessa maneira, verificando as diferenciações nos perfis cromatográficos e conseqüentes diferenciações no metabolismo dos micro-organismos.

As análises por HPLC/UV-MS foram fundamentais nos estudos biossintéticos de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos. Visualiza-se que as análises por HPLC/UV-MS dos extratos com a adição de precursores isotopicamente marcados permitiram a obtenção dos espectros de massas de substâncias com a incorporação dos precursores em estudo. Estas substâncias produzidas em pequenas concentrações muitas vezes não são detectadas com uma boa relação sinal/ruído quando analisadas juntamente com substâncias presentes em alta concentração em análises por inserção direta.

4. Resultados e Discussão

4.2. Isolamento e identificação das amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo *P. brasilianum*.

4.2.1. Isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas e substâncias co-produzidas pelo fungo *P. brasilianum*.

O estudo químico dos extratos do cultivo do fungo *P. brasilianum* em meio de cultura sólido (arroz) identificou inúmeros metabólitos secundários, destacando-se alcalóides, meroterpenos e bis-fenilpropanóides que são posteriormente descritos e caracterizados (item 4.2.4). A produção de amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo micro-organismo em estudo foi particularmente investigada, principalmente devido ao fato de serem metabólitos secundários pouco descritos na literatura, e serem incomuns em micro-organismos, apresentando-se mais comumente em plantas (vide seção 1.3).

Dessa maneira, através do estudo com CCD (Figura 4.1) das frações obtidas do fracionamento do extrato do cultivo do fungo *P. brasilianum* em arroz (descrito em 3.4.4), pode-se verificar frações semelhantes que foram reunidas nas subfrações B39, B45, B55 e B59, como visualizadas na figura 4.1, e então analisadas por HPLC analítico. Uma vez otimizadas as condições de fase estacionária e fase móvel para cada fração, foram submetidas a fracionamento em HPLC preparativo, no intuito de isolamento dos fenilpropanóides e outros metabólitos secundários de interesse.

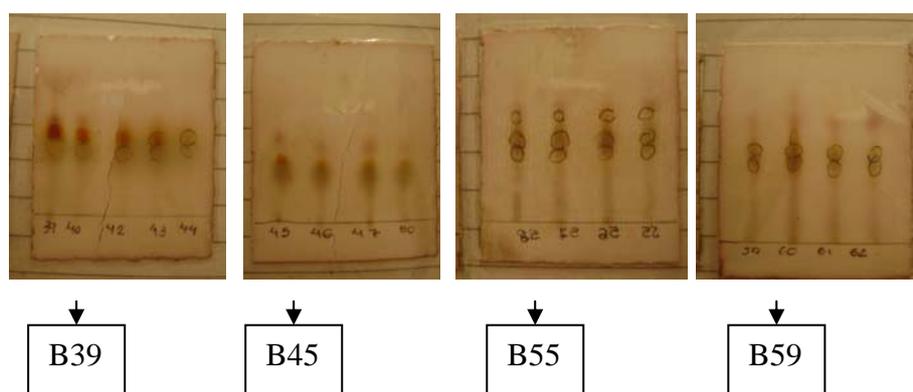


Figura 4.1: Frações reunidas em B39, B45, B55 e B59 respectivamente.

As metodologias de análise por HPLC/UV foram desenvolvidas e otimizadas com o objetivo de se encontrar as melhores condições de separação, no intuito de isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas e co-produtos. Dessa forma, foram

4. Resultados e Discussão

desenvolvidos sistemas de separação utilizando-se uma coluna ODS com eluição isocrática de ACN e água e detecção por UV (211nm) para as análises das frações que quando submetidas à análises por RMN ^1H apresentaram sinais característicos das brasiliamidas, embora em mistura. Os sistemas foram desenvolvidos visando-se a melhor resolução cromatográfica das misturas, no menor tempo de análise visando reprodutibilidade.

Inicialmente foram otimizadas as condições cromatográficas em HPLC analítico para as subfrações B39, B45, B55 e B59, (item 3.4.5). Os cromatogramas referentes aos métodos cromatográficos isocráticos com melhor resolução cromatográfica para isolamento das amidas bis-fenilpropanoídicas e co-produtos podem ser visualizados nas figuras 4.2 abaixo.

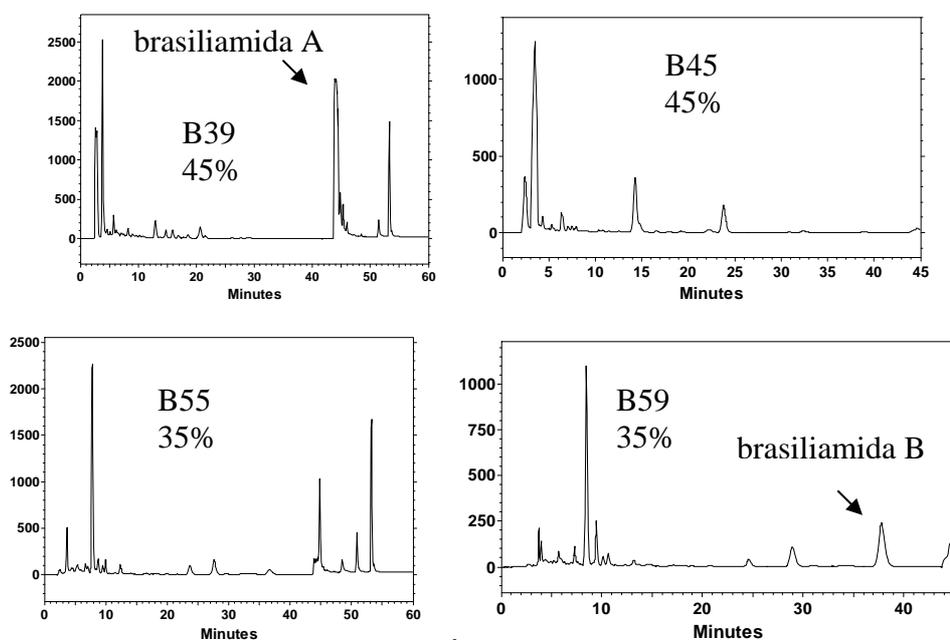


Figura 4.2: Cromatogramas obtidos para as análises das frações B39, B45, B55 e B59 no modo isocrático com 45%, 45%, 35% e 35% de ACN respectivamente.

A partir dos cromatogramas apresentados pode-se estimar as melhores condições cromatográficas para as subfrações B39, B45, B55 e B59. A proporção otimizada dos eluentes ACN e água encontradas foram de 45%, 45%, 35% e 35%, respectivamente. Uma vez otimizadas as condições, partiu-se para isolamento das substâncias de interesse em HPLC preparativo.

4. Resultados e Discussão

Quando se deseja isolar pequenas quantidades de amostra com um grau de pureza alto, trabalha-se em condições analíticas fazendo-se o escalonamento para a separação preparativa. Nestes casos, se utiliza uma coluna semi ou preparativa com o mesmo material da coluna analítica, ou seja, sílica de 5 μ de tamanho de partícula e trabalha-se em sobrecarga para uma maior produtividade (CASS, 2001).

O escalonamento de uma separação analítica para uma separação preparativa pode ser feito usando por base os volumes das colunas analíticas e preparativas. Dessa forma, o fator de escalonamento, S, pôde ser calculado pela seguinte equação:

$$S = \frac{R_p^2 L_p}{R_a^2 L_a} = 20 \text{ mL/min}$$

Em que R_p e R_a são os diâmetros e L_p e L_a , o comprimento das colunas preparativas e analíticas respectivamente.

Os cromatogramas obtidos a partir das análises em HPLC preparativo para as frações B39, B45, B55 e B59 são mostradas na figura 4.3 abaixo.

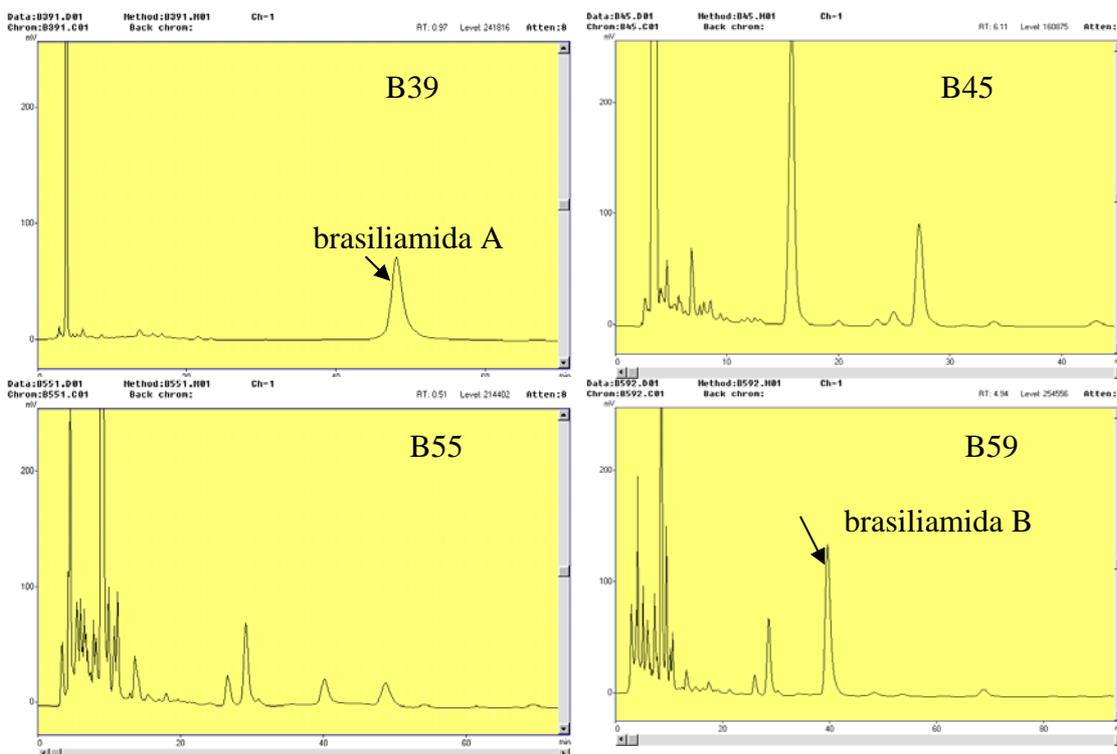


Figura 4.3: Cromatogramas obtidos para as frações B39, B45, B55 e B59 nas análises em escala preparativa.

4. Resultados e Discussão

Visualizam-se nos cromatogramas das subfrações B39 e B59 o isolamento das amidas bis-fenilpropanoidicas, brasiliamida A e B respectivamente, conforme assinalado nos cromatogramas apresentados (Figura 4.3). A caracterização estrutural destas moléculas é descrita respectivamente nos itens 4.2.2. e 4.2.3 posteriores.

Observa-se a partir da comparação dos cromatogramas obtidos das análises em condições analíticas e preparativas que houve reprodução, como esperado, uma vez que foi utilizada uma vazão de 20mL/min calculada de acordo com escalonamento e foram utilizadas colunas de mesmo material de empacotamento e condições otimizadas de proporção de fase móvel.

As frações obtidas do fracionamento em HPLC preparativo foram em seguida analisadas por HPLC/UV-MS, e identificou-se a produção de metabólitos secundários co-produzidos às amidas bis-fenilpropanoidicas como se observa no item 4.3.4.

4.2.2. Caracterização da substância brasiliamida A.

4.2.2.a Caracterização da substância brasiliamida A por Ressonância Magnética Nuclear.

A partir do cultivo do fungo *P. brasilianum* em arroz isolou-se a substância brasiliamida A de acordo com o procedimento descrito nas seções 3.4.4 e 3.4.5, para a realização de estudos de caracterização estrutural e posterior ensaio biológico. Esta substância foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C e teve seus dados comparados com a literatura. O espectro de RMN ^1H encontra-se na figura 4.4 abaixo.

4. Resultados e Discussão

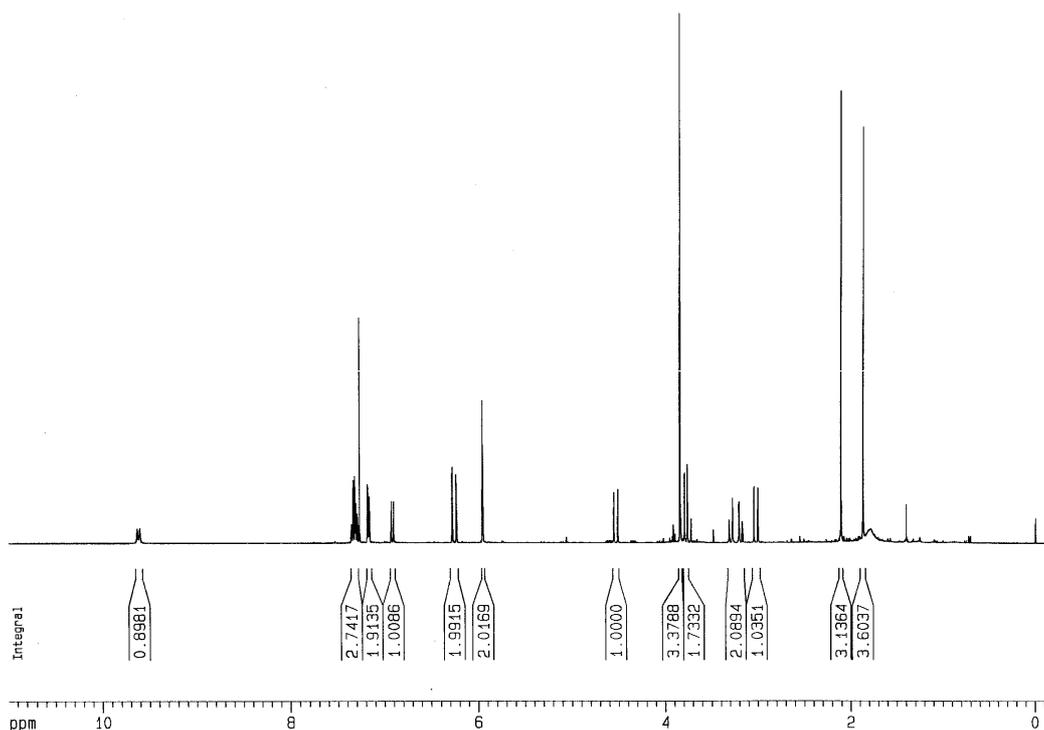


Figura 4.4: Espectro de RMN ^1H para a substância brasiliamida A (400MHz); CDCl_3 .

Os sinais observados no espectro de RMN ^1H revelaram a presença de um anel aromático 1,2,3,5-tetrasubstituído, como indica os sinais de hidrogênios aromáticos H-2 em δ 6,23 e constante de acoplamento 1,4Hz e H-6 em δ 6,28 e constante de acoplamento 1,4Hz. Esse valor de constante de acoplamento indica acoplamento meta entre estes hidrogênios, resultado também coerente com o valor da integral (1,9915).

Observa-se também a presença dos hidrogênios metilenodioxílicos (dubleto), H-20a em δ 5,96 e constante de acoplamento 1,4Hz e H-20b em δ 5,95 e constante de acoplamento 1,4Hz, o valor da integral também é coerente nesse caso. Além disso, pode-se observar um sinal de um hidrogênio olefínico (H-1') em δ 6,92 (dubleto) com constante de acoplamento 10,4Hz. Os sinais para os hidrogênios 2,6,1' e 20 podem ser melhor observados na figura 4.5, que representa o espectro da substância ampliado na região desejada.

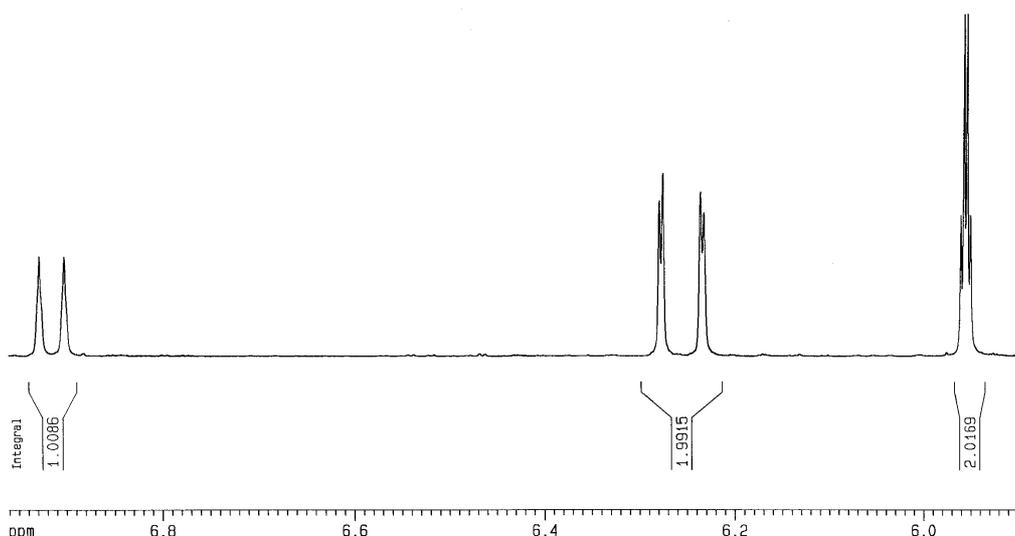


Figura 4.5: Espectro ampliado na região desejada da substância brasiliamida A.

Pode-se observar ainda, a presença dos hidrogênios metoxílicos (H-19), que tem por sinal um singlete, uma vez que estes hidrogênios não acoplam com outros hidrogênios, em δ 3,85, com um valor de integral 3,3788, caracterizando-se o grupo CH_3 ligado ao oxigênio. Além disso, o espectro de RMN ^1H mostrou sinais para um grupo metileno (CH_2) H-7a e, H-7b em δ 3,19 e δ 3,29 respectivamente, com constante de acoplamento 14,8Hz e valor de integral, 2,084.

Os sinais em δ 4,53 ($J= 17,2\text{Hz}$) e δ 3,02 ($J= 17,2\text{Hz}$) referem-se aos H-10a e H-10b, que apresentam valores de deslocamentos químicos muito diferentes, devido a carbonila desblindar o hidrogênio H-10a. Os H-12a e H-12b também puderam ser observados em δ 3,76 e δ 3,79, referentes aos hidrogênios dos grupos metilenos. Os sinais referentes aos hidrogênios acima podem ser observados na figura 4.6 do espectro ampliado na região desejada.

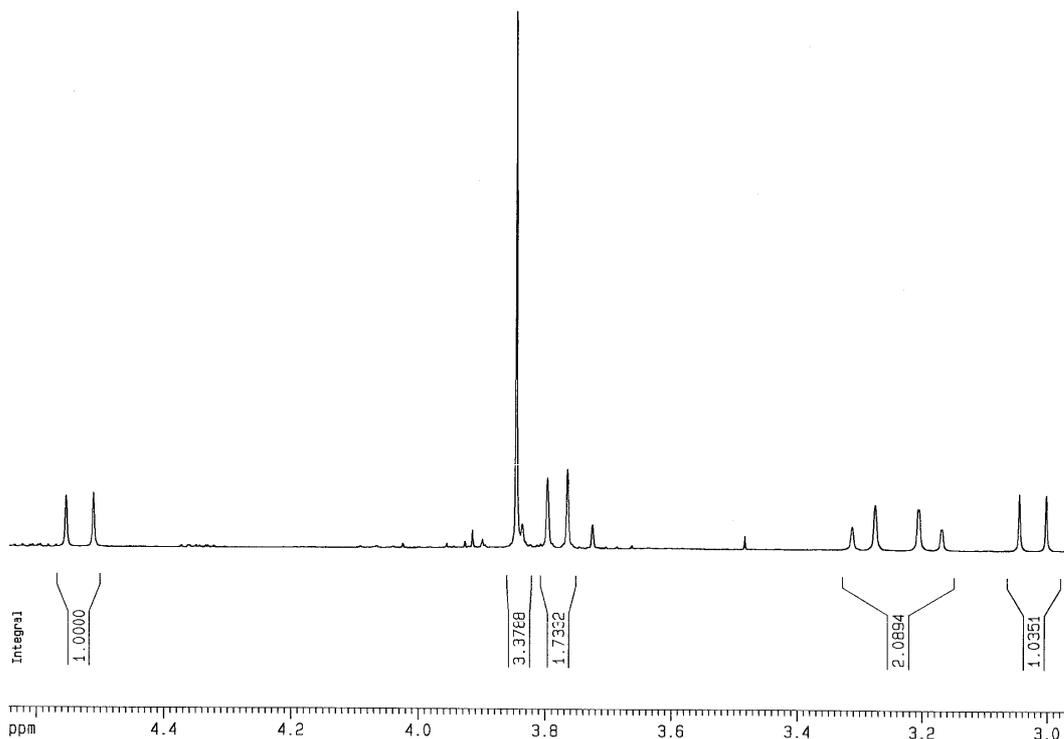


Figura 4.6 Espectro ampliado na região desejada da substância brasiliamida A.

Os sinais remanescentes do espectro de RMN ¹H sugeriram a presença de um anel monossustituído, já os singletos em δ 2,11 e δ 1,87, onde o valor da integral foi de 3,136 e 3,603 respectivamente são responsáveis pelos hidrogênios dos grupos acetil H-4' e H-2' respectivamente.

Observa-se ainda o sinal desblindado do próton referente ao grupo amida em δ 9,62 com constante de acoplamento 10,4Hz.

Com o intuito de melhor contribuir para o estudo da caracterização da estrutura da substância brasiliamida A, realizou-se um experimento de RMN ¹³C. O espectro pode ser observado na figura 4.7 abaixo:

4. Resultados e Discussão

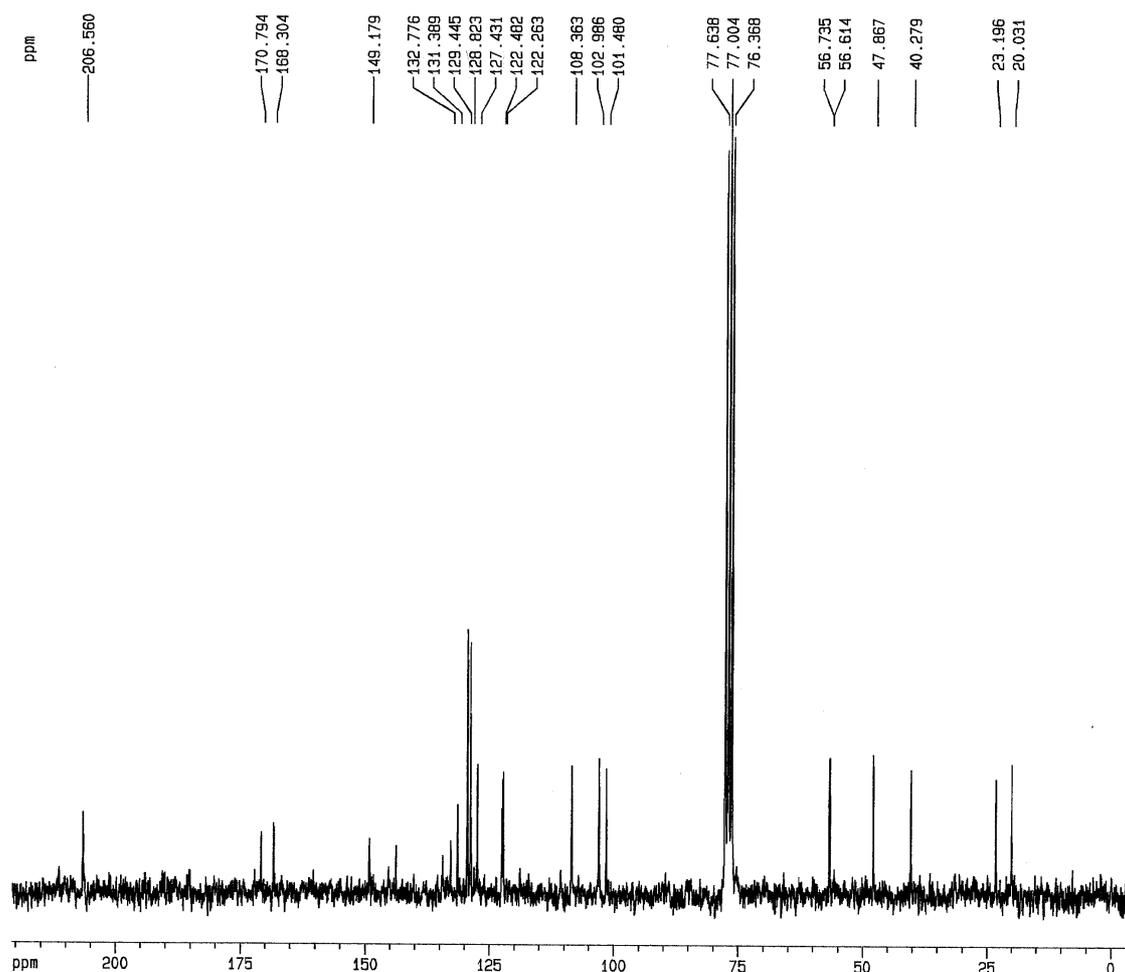


Figura 4.7: Espectro de RMN ^{13}C da brasiliamida A (200MHz) CDCl_3 .

Os sinais observados no espectro de RMN ^{13}C apresentado (Figura 4.7) revelaram a presença de dois anéis aromáticos, um anel monossustituído, C-16 em δ 127,4; C-15 e C-17 δ 128,8; C-14, C-16 δ 129,4; C-13 δ 132,8 e um anel 1,2,3,5-tetrassustituído, sendo três dos carbonos ligados à heteroátomos, nesse caso o oxigênio, C-6 em δ 102,9; C-2 δ 108,4; C-1 δ 131,4; C-4 δ 134,8; C-3 δ 143,8; C-5 δ 149,2. Observa-se também uma dupla ligação trissustituída, C-1' em δ 122,3 e C-8 δ 122,5.

O espectro de RMN ^{13}C ainda indicou a presença de três carbonilas, carbonila de cetona C-11 em δ 206,6 e duas carbonilas de amida, C-3' e C-1'' δ 168,3; 170,8 respectivamente.

Os estudos de caracterização estrutural da substância brasiliamida A a partir dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e da comparação com os dados da literatura pode-se propor a estrutura da brasiliamida A, como observado na figura 4.8. A tabela 4.1

4. Resultados e Discussão

mostra os valores de deslocamentos químicos para a estrutura da brasiliamida A comparados com dados da literatura (FUJITA,2002).

Tabela 4.1: Dados dos deslocamentos químicos para a molécula brasiliamida A isolada no trabalho e dados da literatura respectivamente (FUJITA, 2002).

Posição brasiliamida A	RMN ¹³ C	RMN ¹ H (int; mult.; J - Hz)	Posição Literatura	RMN ¹³ C	RMN ¹ H (int; mult.; J - Hz)
1	131,4		1	131,4	
2	108,4	6,23 (1H; d; 1,4)	2	108,2	6,23 (1H; d; 1,5)
3	143,8		3	143,8	
4	134,8		4	134,3	
5	149,2		5	149,1	
6	103,0	6,28 (1H; d; 1,4)	6	103,1	6,28 (1H; d; 1,5)
7	40,3	3,19 (1H; d; 14,8)	7	40,3	3,19(1H; d; 14,7)
		3,29 (1H; d; 14,8)			3,29(1H; d; 14,7)
8	122,5		8	122,5	
10	56,6	4,53 (1H; d; 17,2)	10	56,6	4,53(1H; d; 17,4)
		3,02 (1H; d; 17,2)			3,02(1H; d; 17,4)
11	206,6		11	206,6	
12	47,9	3,76 (1H; d; 16,2)	12	47,9	3,75(1H; d; 16,2)
		3,80 (1H; d; 16,2)			3,81(1H; d; 16,2)
13	132,8		13	132,8	
14,18	129,4	7,17 (2H; m)	14,18	129,5	7,17 (2H; m)
15,17	128,8	7,34 (3H; m)	15,17	128,8	7,33 (2H; m)
16	127,4		16	127,4	7,29 (1H; m)
19	56,7	3,85 (3H; s)	19	56,7	3,84 (3H; s)
20	101,5	5,96 (1H; d; 1,4)	20	101,5	5,95 (1H; d; 1,5)
		5,95 (1H; d; 1,4)			5,96 (1H; d; 1,5)
1'	122,3	6,91 (1H; d; 10,4)	1'	122,2	6,92(1H; d; 10,7)
3'	168,3		3'	168,3	
4'	23,2	2,11 (3H; s)	4'	23,2	2,11 (3H; s)
1''	170,8		1''	170,8	
2''	20,0	1,87 (3H; s)	2''	20,1	1,87 (3H; s)
2'-NH		9,62 (1H; d; 10,4)	2'-NH		9,62(1H; d; 10,7)

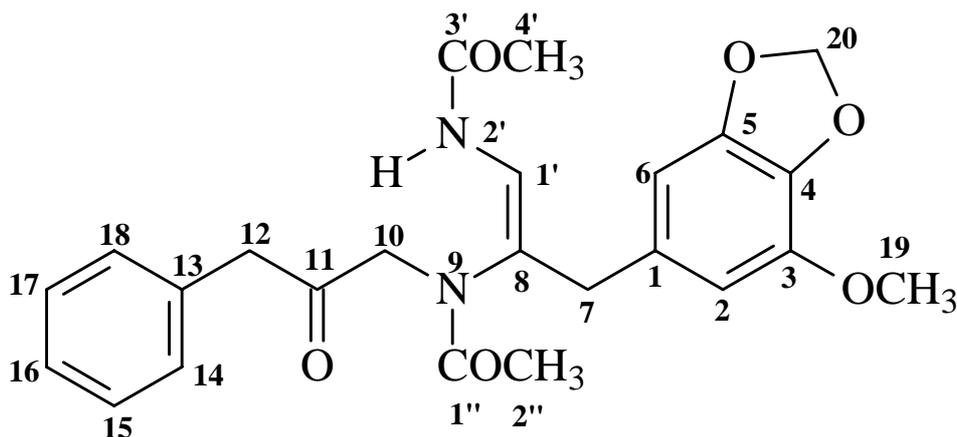


Figura 4.8: Proposta estrutural para a substância brasiliamida A.

4.2.2.b Estudo de caracterização estrutural por espectrometria de massas da substância brasiliamida A.

Várias informações sobre a estrutura química das amidas bis-fenilpropanoídicas podem ser obtidas por espectrometria de massas. Em experimentos MS (*full scan*), a principal informação é a respeito da massa molar de uma substância, a partir do íon molecular protonado, no caso do modo positivo de ionização, e desprotonado, no caso do modo negativo de ionização e pode ser confirmada pela presença de adutos, de sódio e potássio principalmente. A presença destes adutos gera uma informação segura a respeito da massa molar da substância, pois estes adutos dificilmente sofrem alguma fragmentação, mesmo em MS/MS com altas energias de colisão (MURGU, 2002). Desta forma, o pico do íon molecular protonado ou desprotonado é observado junto com estes adutos, enquanto que eventuais picos relativos a fragmentos formados durante a ionização não ocorrem junto à adutos.

Os experimentos de MS/MS podem fornecer informações a respeito da estrutura molecular de amidas bis-fenilpropanoídicas e outros metabólitos secundários através de estudos de fragmentação. Dessa maneira, seleciona-se o íon molecular protonado ou desprotonado no primeiro quadrupolo de acordo com o modo de ionização estabelecido, fragmentando-os na câmara de colisão com o gás de colisão (Ar) e uma energia suficiente para induzir a fragmentação. Os fragmentos são analisados no segundo quadrupolo para gerar o espectro de MS/MS.

4. Resultados e Discussão

Não existem relatos na literatura, assim como não são descritos estudos das amidas bis-fenilpropanoídicas (brasiliamidas) por espectrometria de massas. A partir deste dado, foram realizados experimentos no sentido de se determinar melhores condições de análises e ionização dos compostos em estudo. Inicialmente, foram realizados experimentos de *full scan* no modo positivo de ionização para a substância padrão brasiliamida A (ESI/MS), produzida pelo micro-organismo *P. brasilianum* (*Melia azedarach*). O espectro de massas (*full scan*) no modo positivo pode ser observado na figura 4.9 abaixo.

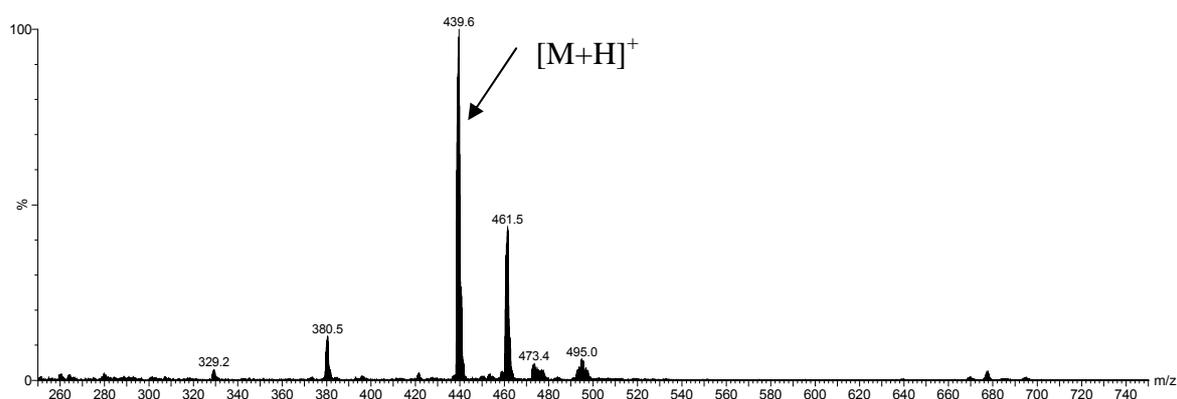


Figura 4.9: Espectro de massas (*full scan*) no modo de ionização positivo.

Observa-se no espectro de massas o íon com relação m/z 439, referente ao íon $[M+H]^+$, assim como o íon m/z 462 referente ao aduto formado com o íon sódio ($[M+Na]^+$), que está presente nas vidrarias em geral. A formação deste íon é mais um indicativo da confirmação da substância brasiliamida A como mencionado anteriormente.

Em seguida, foram realizados experimentos de *full scan* no modo negativo de ionização, para, ao comparar com o modo de ionização positivo se pudesse verificar o melhor modo de ionização das brasiliamidas, e em seguida realizar experimentos de íon produtos e estudos de fragmentação. Observa-se na figura 4.10 abaixo, o íon $[M+H]^-$ (m/z 437), observa-se ainda, que o espectro de massas apresenta muitos picos referentes a possíveis fragmentações na fonte do espectrômetro de massas ou impurezas presentes.

4. Resultados e Discussão

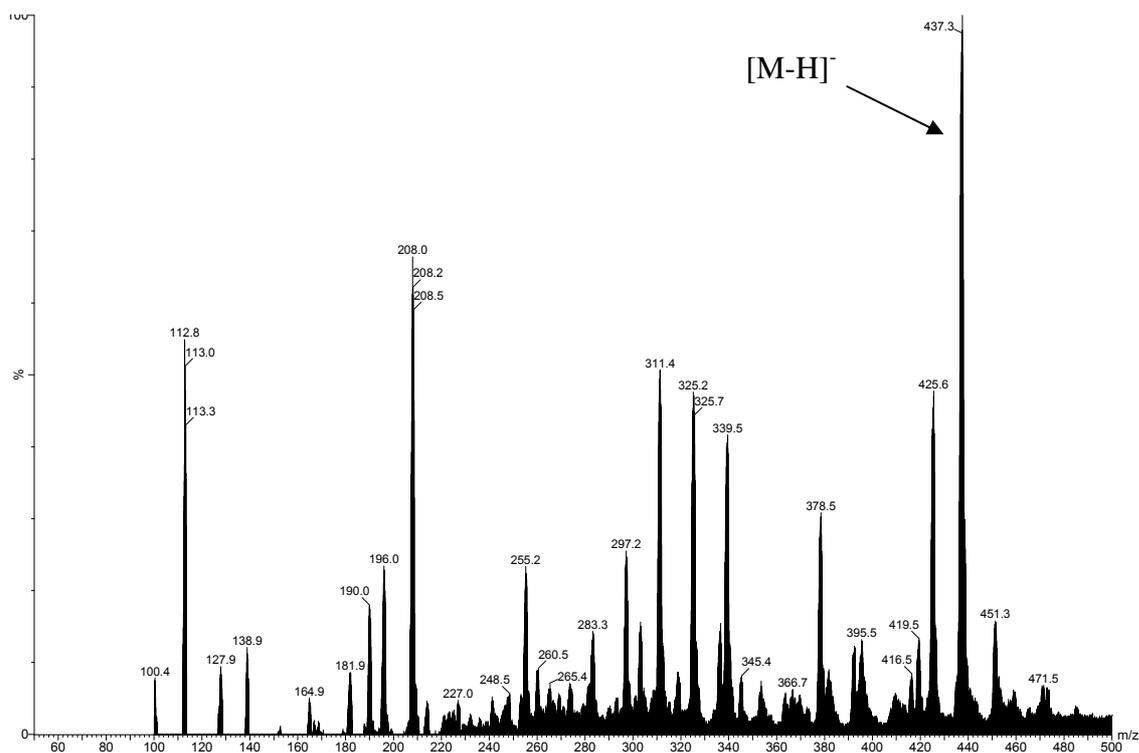


Figura 4.10: Espectro de Massas (*full scan*) com ionização ESI no modo negativo.

A partir dos espectros de massas *full scan* analisados da substância brasiliamida A obtidos, verifica-se que a substância se ioniza bem em ambos os modos de ionização. Foram realizados, dessa maneira, experimentos de íons produtos, para estudo de fragmentação e caracterização estrutural das brasiliamidas.

No caso do modo positivo de ionização, realizou-se o experimento de íons produtos selecionando-se no primeiro quadrupolo a relação m/z 439, obtendo-se assim os íons produtos da molécula em estudo, analisados então no segundo quadrupolo (Figura 4.11). Já nos experimentos de íons produtos no modo negativo de ionização, selecionou-se a m/z 437 no primeiro quadrupolo como observado na figura 4.11.

4. Resultados e Discussão

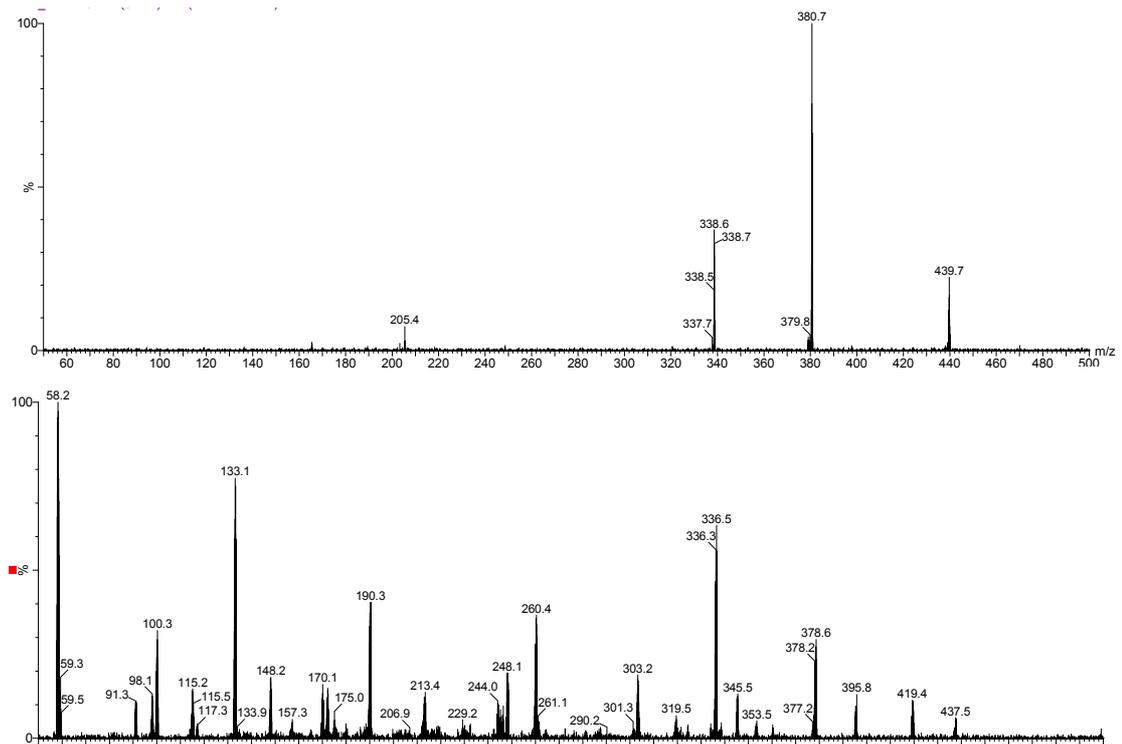
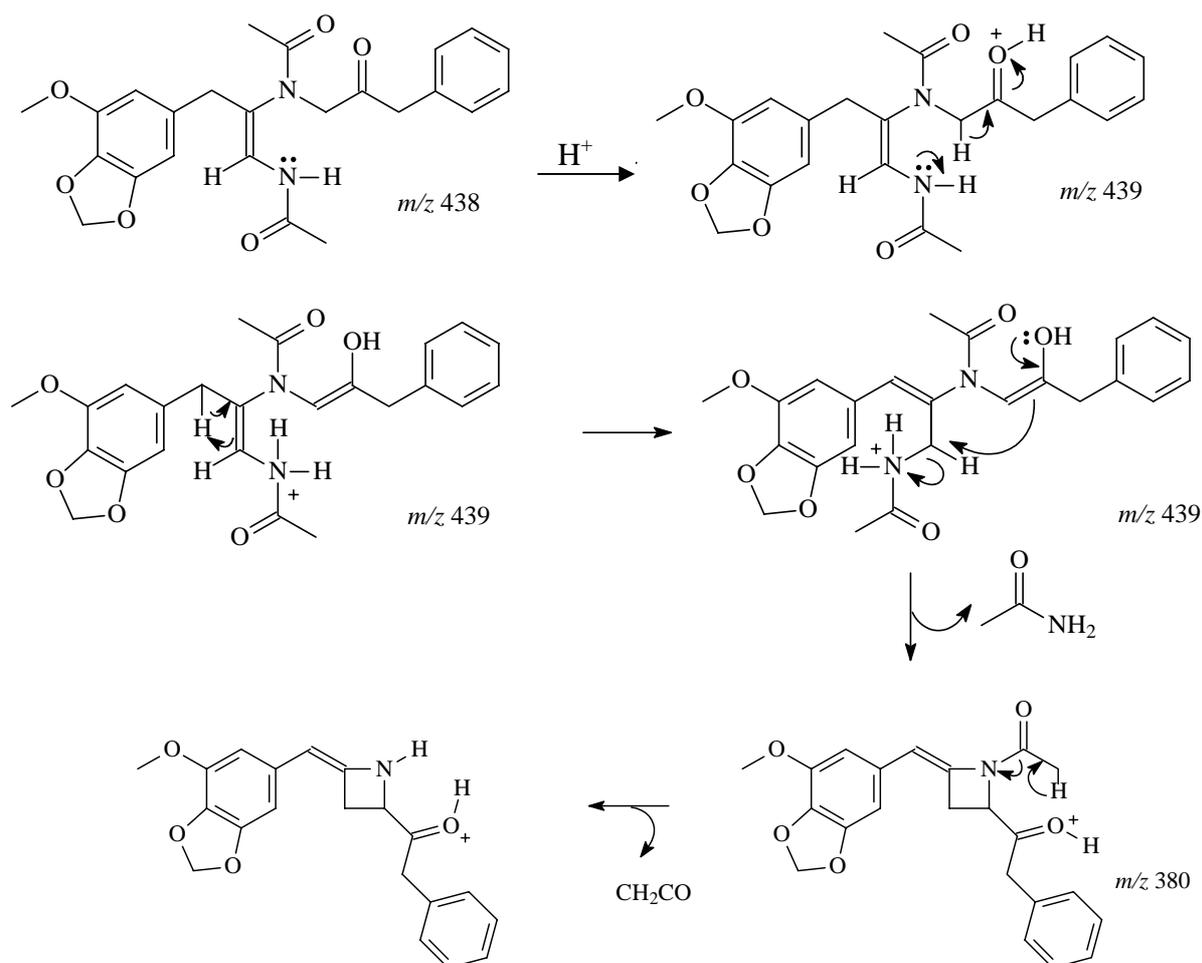


Figura 4.11: Espectro de massas de íons produtos nos modos positivo e negativo respectivamente.

A partir do espectro de íons produtos visualizado na figura 4.11, foi proposto um mecanismo de fragmentação para a substância brasiliamida A quando ionizada no modo positivo, como pode ser observado no esquema 4.1 abaixo.

4. Resultados e Discussão

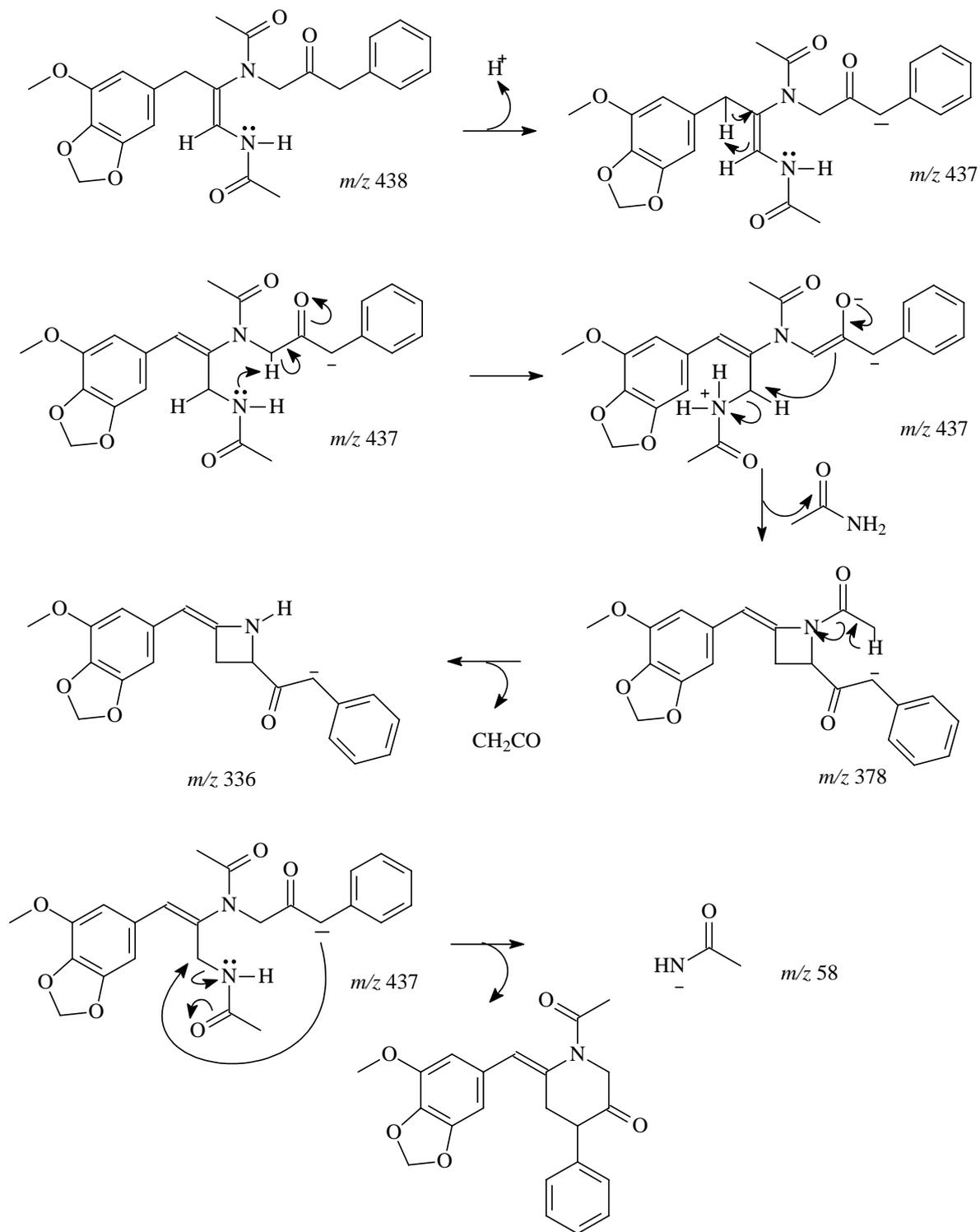


Esquema 4.1: Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida A no modo positivo.

A proposta de fragmentação para a molécula brasiliamida A no modo positivo de ionização, baseou-se na protonação da carbonila como observado no esquema 4.1 acima. Em seguida, o átomo de nitrogênio abstrai um próton e ocorre a isomerização da ligação dupla como é observado. A perda do grupo (C₂H₅NO) levando a formação de um anel de quatro membros é observada no espectro sendo referente à *m/z* 380 (pico base do espectro), este fragmento depois de um possível rearranjo 1,3 leva a formação do íon *m/z* 338.

Analisando o espectro de íons produtos da substância brasiliamida A no modo negativo de ionização (Figura 4.11), propôs-se o mecanismo referente à fragmentação da substância brasiliamida A no modo negativo como se visualiza no esquema 4.2.

4. Resultados e Discussão



Esquema 4.2: Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida A no modo negativo de ionização.

4. Resultados e Discussão

No modo negativo de ionização, uma possível proposta de fragmentação seria inicialmente a desprotonação no carbono α -carbonílico, e após isomerização da ligação dupla e abstração do próton pelo átomo de nitrogênio, ocorre a perda do grupo (C_2H_5NO), levando a formação de um anel de quatro membros, referente à relação m/z 378. Este fragmento depois de um possível rearranjo 1,3 leva a formação do íon m/z 336. A formação do pico base (m/z 58), foi proposta como observado na figura acima, onde ocorre a ciclização em um anel de seis membros.

Finalmente, foram realizados experimentos num espectrômetro de massas Q-TOF de alta resolução (USP-SC) para o composto em estudo. Um equipamento Q-TOF tem resolução de 0,0001 (vide seção 1.10) e dessa maneira, separa unidades de massas com casas decimais.

Inicialmente foram realizados experimentos de MS (*full scan*) no intuito de obtenção da massa molecular da substância analisada e confirmação da produção da substância brasiliamida A pelo micro-organismo. Como se observa no espectro de massas obtido pelas análises (Figura 4.12), a relação m/z para o pico do íon molecular protonado foi de 439,1879, coerente com o valor calculado 439,1877. Desta maneira, comprova-se a presença da substância brasiliamida A esta presente na amostra.

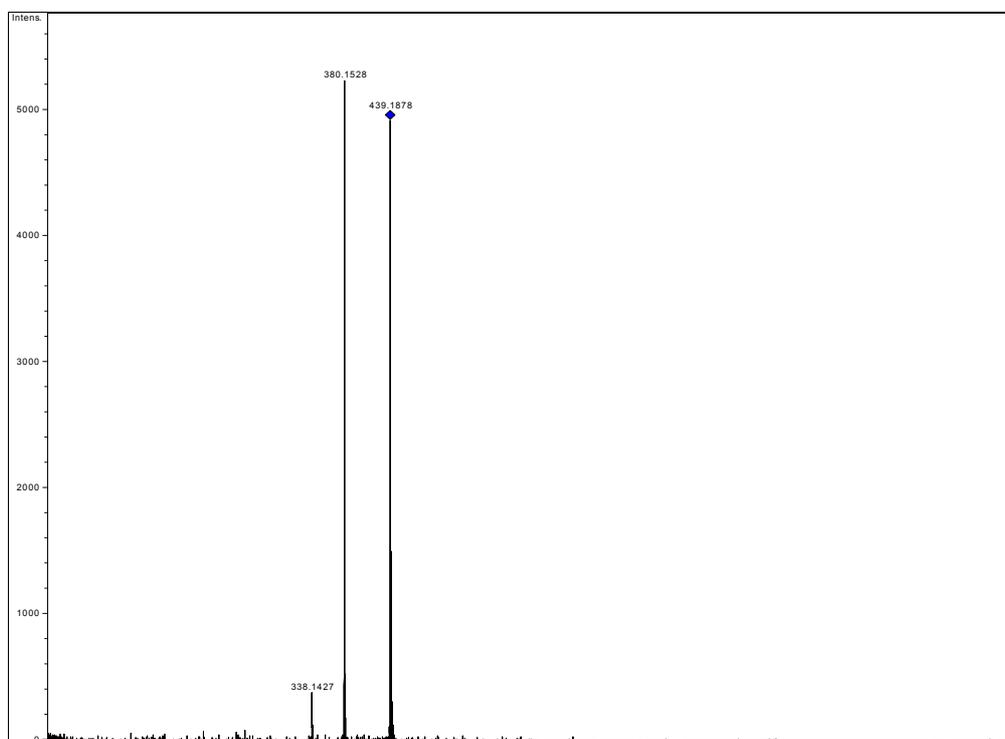


Figura 4.12: Espectro de massas (*full scan*) para a substância brasiliamida A no modo positivo de ionização.

4. Resultados e Discussão

Foram realizados ainda experimentos de íons produtos (Figura 4.13) no sentido de estudar a fragmentação da substância brasiliamida A e verificar a viabilidade do mecanismo de fragmentação proposto anteriormente no modo positivo de ionização para este composto.

De acordo com a proposta de fragmentação anterior da substância brasiliamida A no modo positivo de ionização (Esquema 4.1) verifica-se no mecanismo proposto, a perda neutra do grupo C_2H_5NO a partir do íon molecular protonado (439,1879), o íon gerado a partir deste mecanismo proposto, o pico base, apresenta no espectro de massas de íons produtos relação m/z 380,1455, este fragmento quando calculado leva ao íon 380,1497. Assim como o próximo passo da proposta de fragmentação, um rearranjo 1,3, leva ao íon observado no espectro de massas com relação m/z 338,1402 e o fragmento calculado possui massa 338,1392. O espectro obtido num espectrômetro de massas de alta resolução leva a conclusão de que o mecanismo de fragmentação proposto é coerente com os íons observados no espectro de MS/MS e a substância brasiliamida A foi produzida pelo fungo *P. brasilianum* e caracterizada.

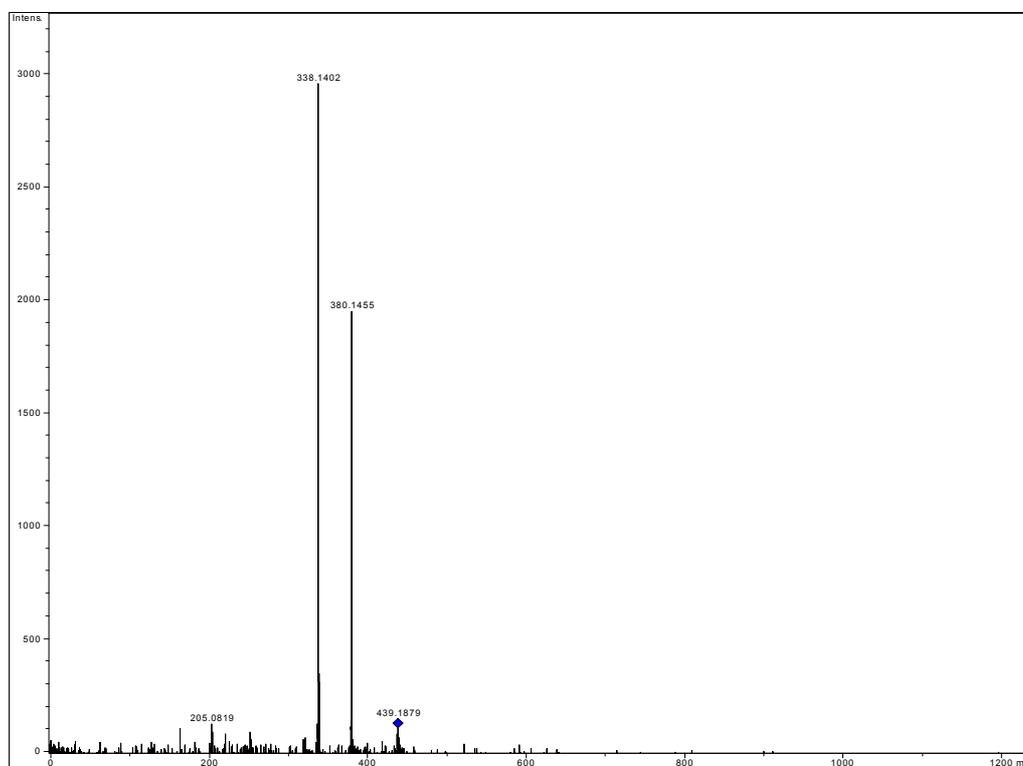


Figura 4.13: Espectro de íons produtos para a substância brasiliamida A.

4. Resultados e Discussão

Os estudos de fragmentação da substância brasiliamida A somados aos dados de Ressonância magnética nuclear analisados (item 4.2.2a) e os dados obtidos nas análises de MS de alta resolução, confirmam a estrutura molecular do composto (Figura 4.8) e completam a caracterização estrutural da substância.

A partir dos estudos de fragmentação propostos para a substância brasiliamida A, estudos de detecção seletiva em diferentes meios de cultura, ou seja, diferentes tipos de matrizes complexas puderam ser realizados.

4.2.3. Caracterização estrutural da substância brasiliamida B.

4.2.3.a Caracterização estrutural da brasiliamida B por espectrometria de massas.

No intuito de se visualizar a produção da amida bis-fenilpropanoídica, brasiliamida B (FUJITA, 2002), de massa molecular 422, foram realizadas análises por ESI/MS no modo positivo de ionização das frações purificadas no HPLC preparativo e após inúmeras análises pode-se observar a presença deste composto.

Na figura 4.14 observa-se o espectro de *full scan* no modo positivo de ionização da fração 21 obtida após fracionamento de B59 em HPLC preparativo. Visualiza-se no espectro, o íon molecular protonado referente à substância brasiliamida B de relação m/z 423 e o aduto de sódio de relação m/z 445 que representa mais um indicativo da formação deste composto. Em seguida, foram realizados experimentos de íons produtos no intuito de estudar o mecanismo de fragmentação. O espectro obtido pode ser observado na figura 4.15. As condições utilizadas no experimento para o espectrômetro de massas são as mesmas utilizadas no item 3.4.13 otimizadas para a substância brasiliamida A, uma vez que as moléculas são da mesma classe química e possuem as mesmas condições de ionização e fragmentação.

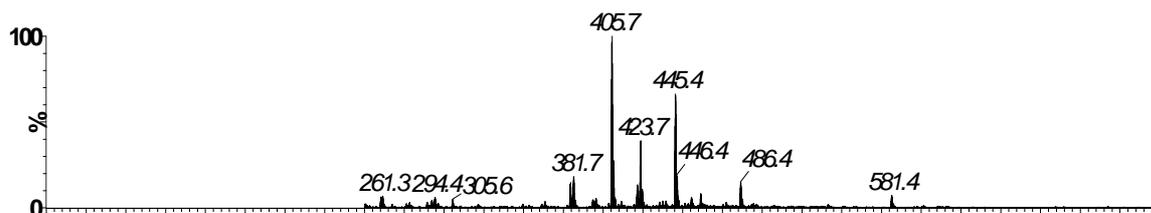


Figura 4.14: Experimento *full scan* para a fração B59-21.

4. Resultados e Discussão

A partir dos fragmentos visualizados no espectro de íons produtos da substância brasiliamida B (Figura 4.15), foi proposto um mecanismo de fragmentação como pode ser observado no esquema 4.3 abaixo:

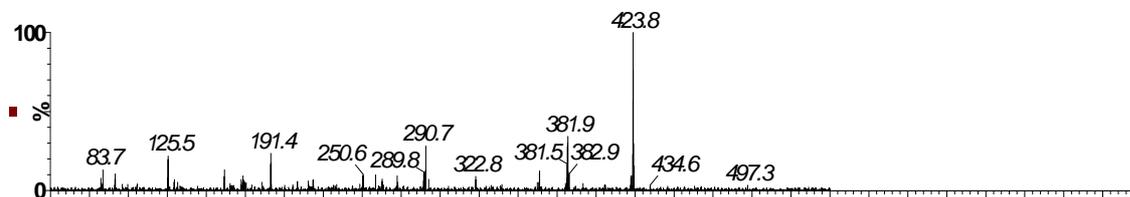
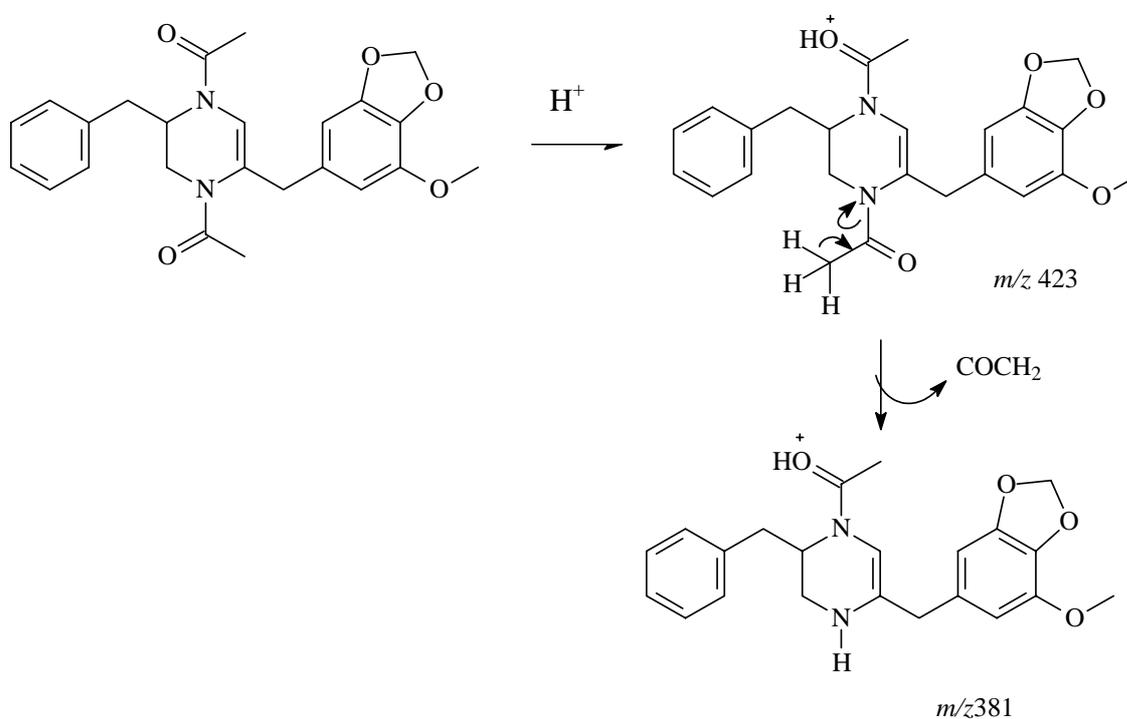


Figura 4.15: Espectro de íons produtos para o composto brasiliamida B.



Esquema 4.3: Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida B.

A proposta de fragmentação da substância brasiliamida B ionizada no modo positivo, se baseia inicialmente na protonação da carbonila, conforme observado no esquema 4.3 acima, seguido de perda neutra do grupo $COCH_2$ de acordo com o mecanismo proposto, levando a formação do íon com relação m/z 381.

4.2.3.b Caracterização da substância brasiliamida B por Ressonância Magnética Nuclear.

O espectro de RMN ^1H para a fração B59-21 encontra-se na figura 4.16 abaixo.

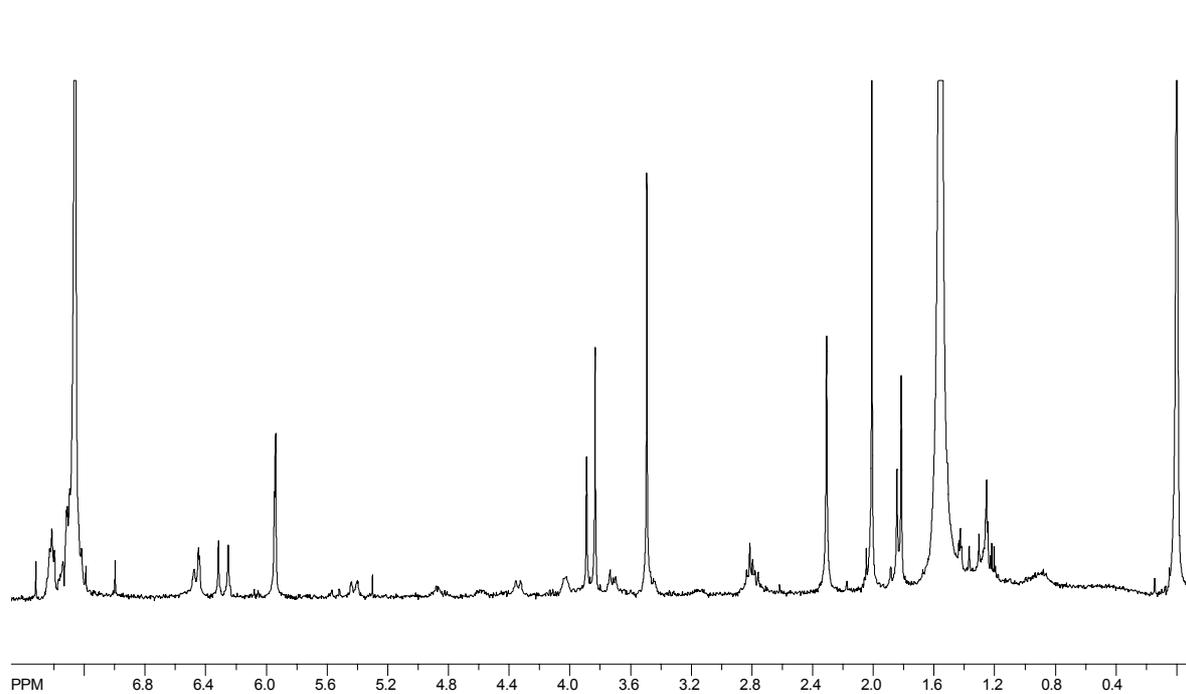


Figura 4.16: Espectro de RMN ^1H da brasiliamida B (400MHz- CDCl_3).

Os sinais observados no espectro de RMN ^1H referente à substância brasiliamida B, revelou a presença de um anel aromático 1,2,3,5-tetrasubstituído, indicado pelos sinais de hidrogênios aromáticos H-2 em δ 6,31 e H-6 em δ 6,32. Observa-se também a presença dos hidrogênios metilenodioxílicos, H-20 em δ 5,94 (singlete). Além disso, pode-se observar o sinal de um hidrogênio olefínico (H1') em δ 6,25 (singlete), este sinal observado no espectro é o principal indicativo da presença da substância brasiliamida B.

Pode-se observar ainda, a presença dos hidrogênios do grupo metoxílico (H-19), que tem por sinal um singlete, uma vez que estes hidrogênios não acoplam com outros hidrogênios, em δ 3,89.

Os sinais remanescentes do espectro de RMN ^1H na região de anéis aromáticos sugeriram a presença de um anel monossubstituído, já os singletos em δ 2,30 e δ 1,81, são referentes aos hidrogênios dos grupos acetil H-4' e H-2' respectivamente.

4. Resultados e Discussão

Devido a pouca massa obtida para a fração B59-21, pouca resolução foi obtida no experimento de RMN ^1H e outros experimentos de RMN não puderam ser realizados. Entretanto devido aos experimentos de espectrometria de massas, onde se observa a presença da massa molecular 422 para este composto e fragmentação característica da classe das amidas bis-fenilpropanoídicas, e ainda sinais característicos desta molécula, pode-se concluir que a substância na fração B59-21 refere-se ao composto brasiliamida B (Figura 4.17). Os dados da literatura reforçam as afirmações.

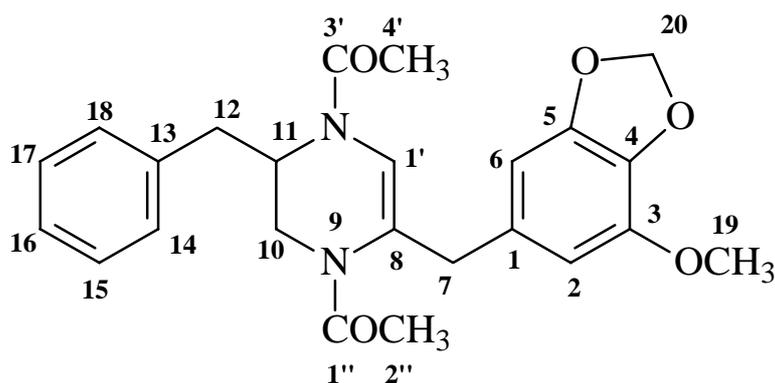


Figura 4.17: Estrutura molecular da substância brasiliamida B.

4.2.4 Caracterização estrutural das substâncias co-produzidas pelo fungo *P. brasilianum* (*Melia azedarach*).

4.2.4.a Caracterização estrutural da substância verruculogenina.

As frações A12-A25 obtidas a partir do fracionamento do extrato do cultivo do fungo *P. brasilianum* em arroz (PA1) foram submetidas à cromatografia em camada delgada e a grande produção deste composto nos levou a identificá-lo através de experimentos de RMN ^1H . As frações podem ser observadas na figura 4.18. Os sinais no espectro de RMN ^1H podem ser visualizados na figura 4.19.

4. Resultados e Discussão

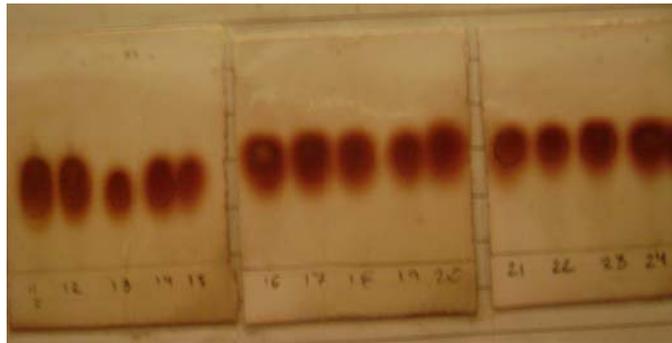


Figura 4.18: CCD para as frações 12-25.

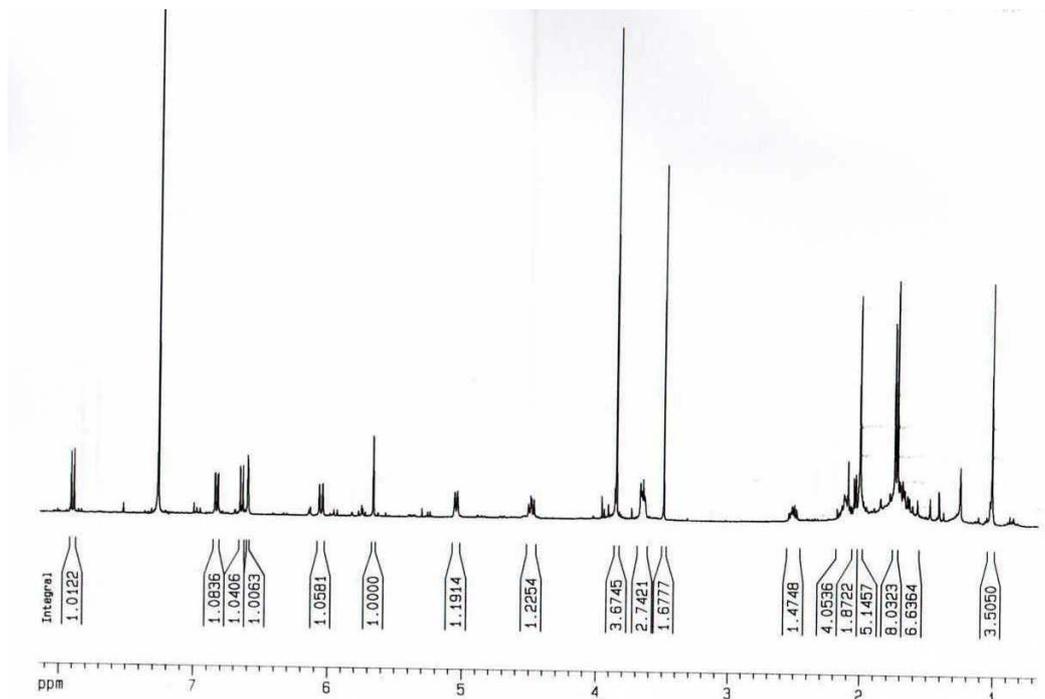


Figura 4.19: Espectro de RMN ^1H para a substância verruculogenina (400MHz- CDCl_3).

Os dados obtidos a partir dos experimentos de RMN ^1H assim como a comparação com os dados da literatura levaram a identificação do composto, como o alcalóide verruculogenina, isolado anteriormente por Santos (2002) a partir deste mesmo micro-organismo. Os dados estão reunidos na tabela 4.2, a seguir.

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.2: Tabela com dados de deslocamento químico para a substância verruculogenina obtidos e dados da literatura (SANTOS,2003) respectivamente.

Posição verruculogenina	H(ppm) Mult; J -Hz	Posição	H(ppm) Literatura
2		2	
3		3	
4	7,90 (d; 8,7)	4	7,89 d
5	6,93 (dd; 8,7; 2,2)	5	6,82 dd
6		6	
7	6,60 (d; 2,2)	7	6,59 d
8		8	
9		9	
10	5,66 (s)	10	5,65 s
11		11	
13		13	
14	4,49 (dd; 9,6; 7,0)	14	4,48 dd
15	2,50 m	15	2,49 m
	2,06 m		2,06 m
16	2,09 m	16	2,09 m
	1,97 m		1,96 m
17	3,65 (dt; 7,6)	17	3,64 dt
19		19	
20	6,05 (d; 10,0)	20	6,05 d
21	2,033 sl	21	2,03 sl
	1,68 (dd; 10,0; 3,3)		1,68 dd
22		22	
23	1,73 s	23	1,72 s
24	1,01 s	24	1,01s
25	6,64 (d; 8,1)	25	6,65 d
26	5,05 (dt; 8,1; 1,3; 1.3)	26	5,04 dt
27		27	
28	2,00 (d; 1,2)	28	2,00 d
29	1,73 (d; 1,2)	29	1,73 d
O-CH ₃	3,849 s	O-CH ₃	3,84 s

4. Resultados e Discussão

A partir dos dados de RMN ^1H e comparação com os dados da literatura, a estrutura molecular da verruculogenina foi proposta e, pela coincidência dos sinais observados no espectro de RMN ^1H comparado aos sinais visualizados na literatura, a estereoquímica foi proposta para a molécula que pode ser observada na figura 4.20 abaixo.

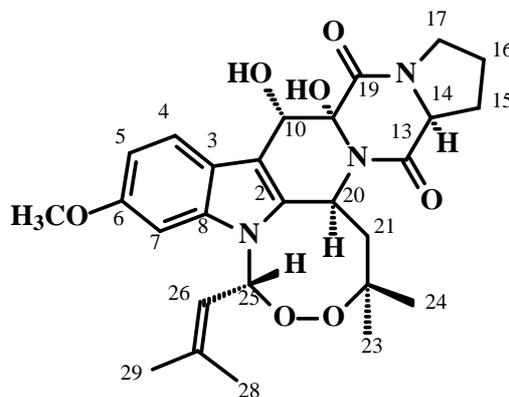


Figura 4.20: Estrutura molecular para a substância verruculogenina.

O alcalóide verruculogenina pertence a uma classe de substâncias tremorgênicas, que são constituídas de unidades de triptofano, prolina, mevalonatos e de oxigênio (SANTOS, 2003), e seu principal papel é causar desordens neurológicas em animais vertebrados. Essa micotoxina pode ser encontrada nos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

Devido ao fato deste alcalóide ser isolado em grandes quantidades e em diferentes meios de cultura utilizados (SANTOS, 2003), Santos, sugere que este metabólito poderia ser utilizado como um marcador quimiossistemático para esse fungo ou pelo menos para o gênero *Penicillium*.

4.2.4.b Caracterização estrutural do metabólito ácido penicílico.

Outro metabólito secundário foi isolado a partir das frações obtidas no item 3.4.5, e analisado por RMN ^1H , os dados foram comparados com os dados na literatura (Tabela 4.3). O espectro de RMN ^1H obtido observados na figura 4.21 abaixo:

4. Resultados e Discussão

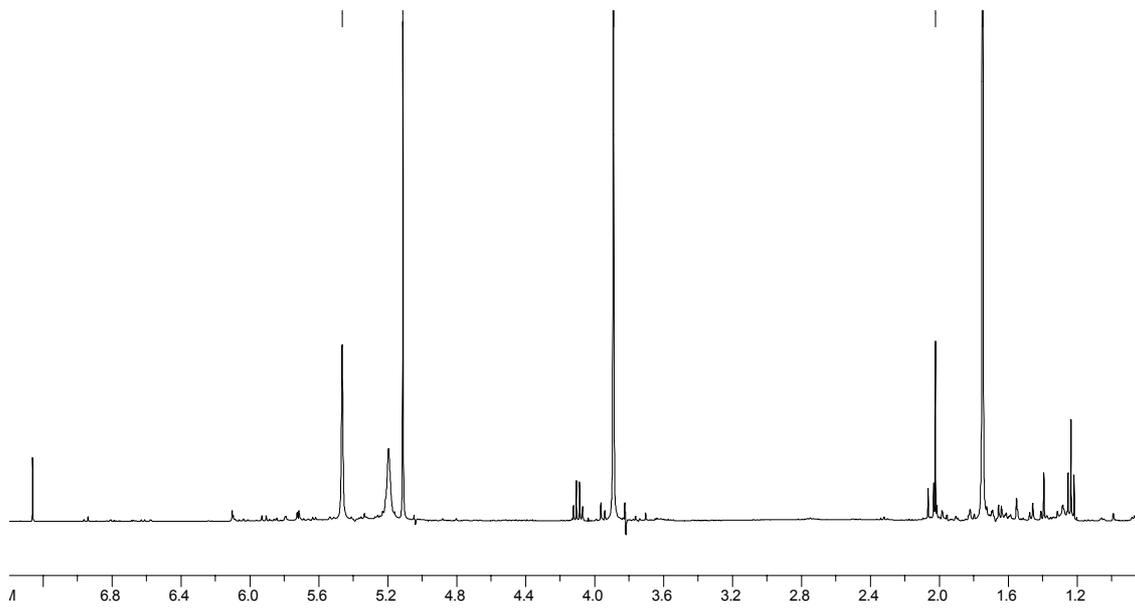


Figura 4.21: Espectro de RMN ^1H do ácido penicílico (400MHz)- CDCl_3 .

Tabela 4.3: Tabela com dados de deslocamento químico para a substância ácido penicílico obtidos e dados da literatura (SANTOS,2003) respectivamente.

Posição Ácido penicílico	H (ppm)	Posição Literatura	H(ppm)
2	-	2	-
3	5.49 s	3	5.49s
4	-	4	-
5	-	5	-
6	-	6	-
7	5.14 s	7	5.11s
	5.14 s		5.11s
6-Me	1.77 s	6-Me	1,75 s
O-Me	3.91 s	O-Me	3.89 s
OH	5.22 sl	OH	5,22 sl

A análise comparativa dos dados obtidos com os dados da literatura (Tabela 4.3) indicou que o composto é uma micotoxina e pôde ser identificado como o composto ácido penicílico (ácido 3-metoxi-5metil-4-oxo-2,5-hexadienóico em equilíbrio tautomérico com a sua lactona), um metabólito secundário também isolado

4. Resultados e Discussão

de *P. brasilianum* em estudos anteriores por Santos (2003). A estrutura molecular do ácido penicílico pode ser observado na figura 4.22 abaixo.

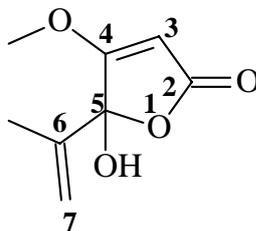


Figura 4.22: Estrutura química da lactona do ácido penicílico.

O ácido penicílico foi isolado inicialmente em 1913 de *Penicillium puberulum*, e é um produto natural com atividade carcinogênica (COLE e COX), que apresenta também atividade antibiótica e anti-HIV.

4.2.4.c Caracterização estrutural do meroterpenóide neoaustina.

Outra fração foi analisada por RMN ^1H e em comparação com os dados obtidos da literatura, o composto pode ser identificado como o meroterpeno neoaustina. Este meroterpeno foi cristalizado e teve sua estrutura confirmada através de dados cristalográficos (FILL, 2009). O espectro de RMN ^1H pode ser observado na figura 4.23.

O termo meroterpeno foi utilizado inicialmente por CORNFORTH em 1968 para descrever metabólitos secundários com uma biogênese mista, sendo parte policetídic e parte terpenoídica. Os meroterpenos vêm sendo isolados por uma grande variedade de fungos e organismos marinhos.

A substância neoaustina e uma série de outros meroterpenos foram isolados anteriormente por Santos (2003), a partir do fungo *P. brasilianum* isolado como endofítico de *Melia azedarach*, uma Meliaceae.

Neste trabalho, fato interessante é a semelhança estrutural entre os meroterpenos e os limonóides, os quais são substâncias típicas de Meliaceas. Os limonóides são triterpenóides bastante modificados por oxidações do tipo Bayer-Villiger, sendo essa a principal semelhança estrutural com os meroterpenóides, o que leva a supor que o sistema enzimático usado pelos dois organismos tem a mesma origem, e que possa eventualmente refletir interação genômica entre a planta e o fungo.

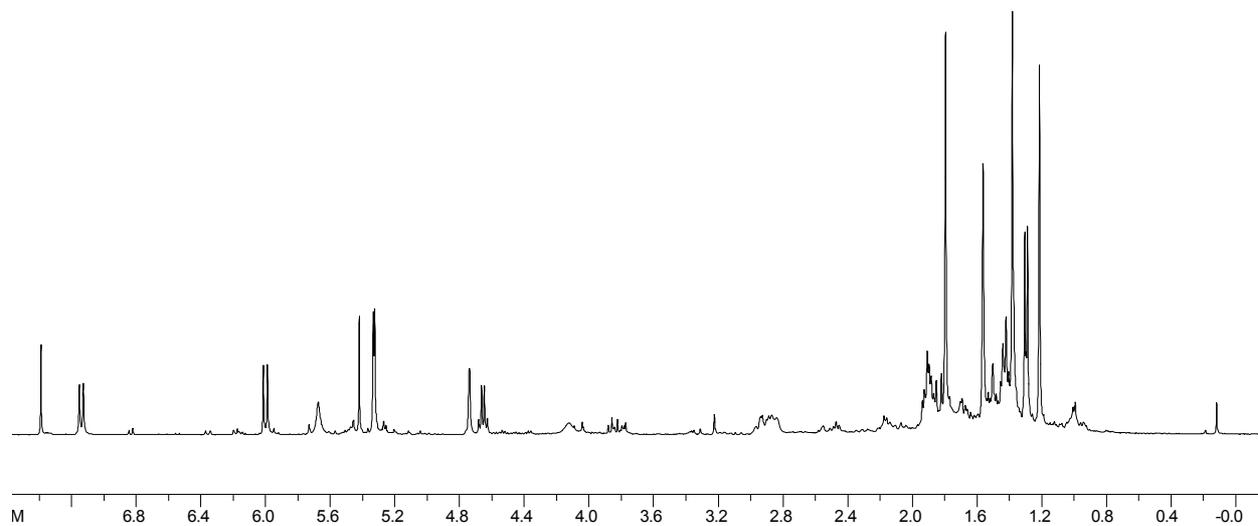


Figura 4.23: Espectro de RMN ^1H da neoastina (400MHz)- CDCl_3 .

Os dados de RMN ^1H para o meroterpeno neoastina, assim como a comparação com os dados obtidos na literatura podem ser observados na tabela 4.4 abaixo.

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.4: Tabela com dados da substância neoastina obtidos e dados da literatura (SANTOS,2003).

Posição -neoastina	H(ppm) Mult; J-Hz	Posição- Literatura	H(ppm)
1	7.14 (d; 10.0)	1	7.14 d
2	5.88 (d; 10.0)	2	5.90 d
3	-	3	-
4	-	4	-
5	-	5	-
6	2.92 m	6	2,9 m
	1.73 m		1,7 m
7	1.58 (dd; 13,8; 5,0)	7	1,66 dd
	1.78 m		1,79 m
8	-	8	-
9	2.90 m	9	2,9 m
10	-	10	-
11	1.67m	11	1,6 m
	1,77m		1,8 m
12	1.08 s	12	1.2 s
13	5.52 s	13	5,42 s
	4.63 s		4,74 s
14	1,70 s	14	1,6 s
15	1,46 s	15	1,45 s
1'	5.20 s	1'	5,33 s
	5.15 s		5,32 s
2'	-	2'	-
3'	-	3'	-
4'	-	4'	-
5'	4,56 (q; 7,0)	5'	4,64 q
6'	-	6'	-
7'	-	7'	-
8'	-	8'	-
9'	1,24 s	9'	1,28 s
10'	1,18 (d; 7,0)	10'	1,21 d
CH ₃ CO (11)	-	CH ₃ CO (11)	-
CH ₃ CO (7)	-	CH ₃ CO (7)	-
CH ₃ CO (8')	-	CH ₃ CO (8')	-
OH	3,9 sl	OH	4,1 sl

4. Resultados e Discussão

A partir dos dados observados no espectro de RMN ^1H e coincidência dos dados comparados com a literatura, a estrutura molecular e a estereoquímica foram propostas, como observado na figura 4.24 abaixo.

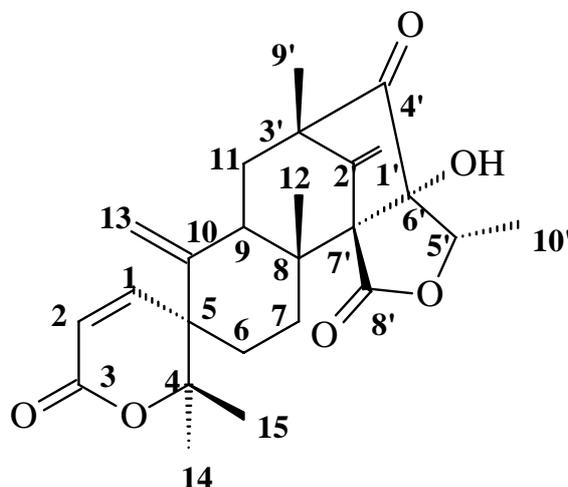


Figura 4.24: Estrutura molecular do meroterpenóide neoaustina.

Esta substância neo-austina quando testada frente formigas *Atta sexdens rubropilosa* apresentou atividade inseticida (SANTOS, 2003).

Em estudos anteriores (FILL, 2007) isolaram-se diferentes meroterpenos, como os limonóides são substâncias conhecidas pelas suas atividades inseticidas, isso motivou ao teste da atividade dos meroterpenos contra insetos, obtendo-se resultados positivos no mosquito vetor da dengue, *Aedes aegypti*. Entre outras substâncias isoladas do fungo estudado, a 7-deacetilandibenina (Figura 4.25) mostrou-se um potente larvicida para esse mosquito.

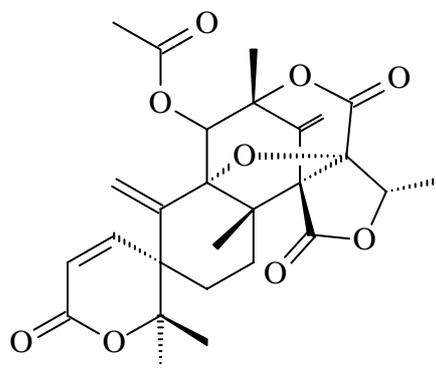


Figura 4.25: Estrutura molecular para o composto 7-deacetilandibenina.

4.3. Estudo de produção e biossíntese de amidas bis-fenilpropanoídicas.

4.3.1 Cultivo do fungo *P. brasilianum* com o meio enriquecido com L-fenilalanina.

O controle sobre a biossíntese de metabólitos secundários é de considerável interesse tanto para a ciência pura quanto para a biotecnologia. Entretanto muitos aspectos deste controle continuam incompreendidos. Em particular, pouco se sabe sobre a regulação da produção de metabólitos secundários com fontes nitrogenadas como íons amônio e aminoácidos. Atualmente, muitos progressos na produção de substâncias biologicamente ativas como antibióticos, hormônios e alcalóides tem sido possíveis devido ao conhecimento da bioquímica e fisiologia dos organismos produtores, assim como do conhecimento dos mecanismos envolvidos em suas rotas biossintéticas (KOZLOVSKII, 2006).

Neste sentido, com o objetivo de otimizar a produção das amidas bis-fenilpropanoídicas, compostos com interessantes atividades biológicas, e estudar o comportamento da produção destes compostos frente à adição de aminoácidos ao meio de cultura, a influência das fontes nitrogenadas na produção da substância brasiliamida A foi investigada.

Para estudarmos a interferência de aminoácidos na produção da substância brasiliamida A no meio de cultura, foi adicionado 1g do aminoácido L-fenilalanina no meio de arroz e após 16 dias de cultivo, o extrato obtido foi analisado por HPLC/UV como descrito no item 3.4.8.

Quando comparados os cromatogramas referentes ao cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* sem a adição deste aminoácido (Figura 4.26 A), e com a adição de L-Phe (Figura 4.26 B), o cromatograma da figura 4.26 A mostrou um perfil cromatográfico semelhante à figura 4.26 B, porém a produção da substância brasiliamida A foi acentuada. Este resultado nos sugere que o micro-organismo poderia utilizar este aminoácido em seu metabolismo ou poderia incorporar esse aminoácido na produção dessas amidas, fato que pode ser observado na figura 4.26 abaixo.

4. Resultados e Discussão

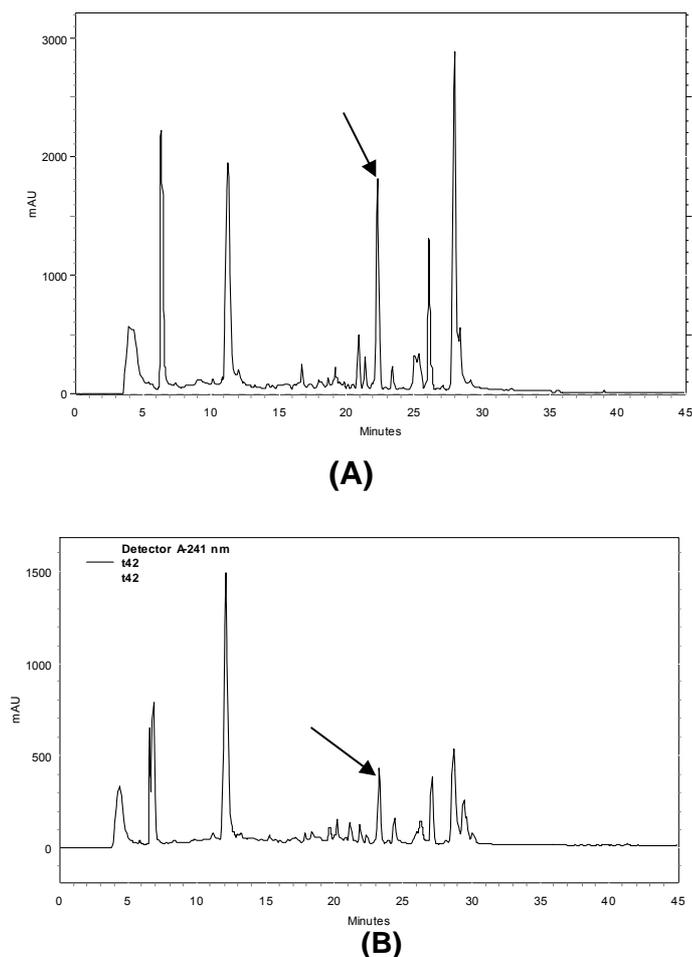


Figura 4.26: Cromatogramas obtidos para os cultivos em arroz (A) e arroz enriquecido com o aminoácido L-fenilalanina (B) respectivamente, a substância brasiliamida A é assinalada.

Pesquisadores têm realizado estudos da adição de aminoácidos no meio de cultura para verificar a influência no crescimento de micro-organismos e em seu metabolismo. O fungo *Penicillium citrinum*, fungo característico pela produção dos alcalóides agroclavina-1 e epoxiagroclavina-1, assim como, dos alcalóides quinolínicos quinocitrinina A e quinocitrinina têm sido estudado neste sentido (KOZLOVSKII,2006). Estes metabólitos secundários são sintetizados a partir dos precursores ácido antracílico e L-triptofano. A L-isoleucina também pode servir como precursor da substância quinocitrinina A. Durante o estudo, foram adicionados os aminoácidos L-triptofano, L-leucina, L-isoleucina, durante a inoculação e fase estacionária do micro-organismo. Quando os aminoácidos L-triptofano e L-leucina foram adicionados durante a inoculação, não se verificou influência no crescimento microbiano e na síntese de alcalóides. Por outro lado, a adição de L-isoleucina fez aumentar a biomassa do micro-organismo. Quando os aminoácidos foram adicionados na fase estacionária, o aminoácido L-triptofano estimulou a síntese de

4. Resultados e Discussão

ambos os alcalóides e quinocitrininas. A leucina quando adicionada durante a fase estacionária não influenciou a síntese de alcalóides, mas inibiu a síntese de quinocitrininas. Já a L-isoleucina inibiu a síntese dos alcalóides e das quinocitrininas. Este estudo nos mostra a importância do estudo de aminoácidos e outros precursores no metabolismo de alguns micro-organismos, assim como na produção de interessantes metabólitos secundários.

Os estudos da adição de aminoácidos precursores ao meio de cultivo indicam que os precursores dos metabólitos secundários muitas vezes não induzem a produção direta dos compostos em estudo. Em estudos anteriores, realizados no grupo LaBioMMi por Barros (2005), o fungo *Eupenicillium* sp, isolado como endofítico de *Murraya paniculata*, produziu 4 novos alcalóides espiroquinazolinicos (BARROS, 2005). Estudos preliminares pareceram indicar que a adição de possíveis aminoácidos precursores ao meio de cultivo, como ácido antranílico, L-triptofano, e L-Phe não induziram a produção destes alcalóides. O único aminoácido que adicionado ao meio de cultivo parece levar a um aumento da produção dos alcalóides é a L-prolina, que embora não faça parte da estrutura dos alcalóides, está presente em muitas proteases fúngicas (BARROS, 2005). Dessa maneira, estudos são imprescindíveis na otimização de metabólitos secundários.

4.3.2. Estudo da cinética de produção das amidas bis-fenilpropanoídicas (Curva de produção).

Uma vez otimizadas as condições de ionização e fragmentação para as análises da substância brasiliamida A por espectrometria de massas (item 4.2.2.b), partiu-se para estudos de detecção seletiva deste composto nos extratos do cultivo do micro-organismo com diferentes tempos de extração para construção da curva de produção de amidas bis-fenilpropanoídicas em arroz.

O consumo do aminoácido adicionado também foi avaliado, para verificar uma possível relação entre o consumo de L-Phe e conseqüente produção de amidas bis-fenilpropanoídicas. Dessa maneira, para que se pudessem realizar experimentos de SRM para o aminoácido L-fenilalanina, inicialmente foram realizados experimentos de íons produtos no modo positivo de ionização para o padrão deste composto, nas mesmas condições otimizadas para os fenilpropanóides em estudo. O espectro obtido pode ser observado na figura 4.27 abaixo:

4. Resultados e Discussão

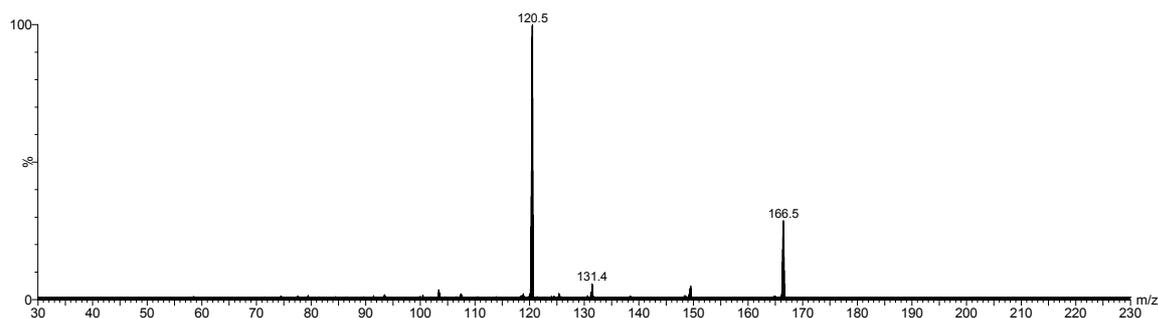


Figura 4.27: Espectro de íons produtos no modo positivo de ionização para o aminoácido L-fenilalanina.

Dessa maneira, pôde-se, a partir dos fragmentos observados nos espectros de íons produtos de ambos os compostos, determinar os canais de SRM tanto para a substância brasiliamida A quanto para o aminoácido L-fenilalanina (166 > 120). Ainda com a utilização dos padrões, testou-se a reprodutibilidade do espectrômetro de massas, verificando em diferentes análises, os tempos de retenção para os compostos, observando-se que sempre se mantinham e, portanto, apresentavam reprodutibilidade (Figura 4.28). Os canais de SRM utilizados nos experimentos são descritos no item 3.4.13.

As condições cromatográficas foram cuidadosamente estabelecidas, visando resolução cromatográfica, menores tempos de análises e reprodutibilidade. Utilizou-se para isso, uma coluna analítica X-terra Phenyl-hexyl de 3.0 x 50mm, no intuito de se otimizar o tempo da corrida cromatográfica, devido à grande quantidade de amostras a serem analisadas. O modo de eluição isocrático foi importante no sentido de não ocorrer modificação na ionização dos compostos analisados de acordo com a composição da fase móvel.

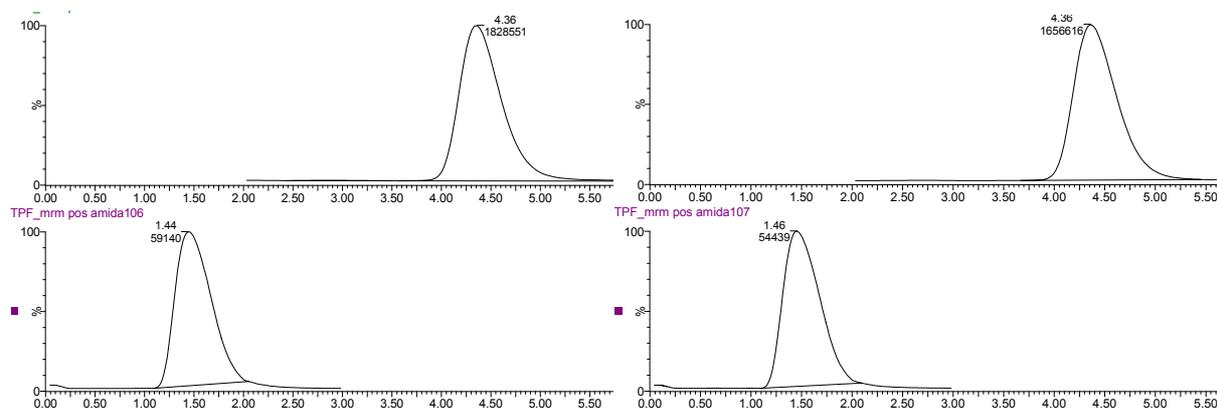


Figura 4.28: Análises por HPLC/UV-MS para verificar a reprodutibilidade do experimento.

4. Resultados e Discussão

Otimizadas todas as condições, os extratos referentes ao experimento de curva de produção puderam ser analisados e a curva delineada conforme observada na figura 4.29.

O ciclo de vida da maioria dos fungos contém quatro fases características. Após uma rápida multiplicação celular (fase “lag”), há uma fase de crescimento exponencial, seguida de uma fase estacionária e outra de decaimento. Em geral, na fase de crescimento estacionário, a produção de metabólitos secundários é maximizada. A fase de crescimento exponencial é caracterizada pela biossíntese de metabólitos primários. Embora o formato dessa curva sempre se mantenha o mesmo, as inclinações das fases lag/exponencial, bem como a extensão da fase estacionária e o início do decaimento são uma característica de cada micro-organismo e variam com o substrato utilizado. Portanto, se estamos interessados em otimizações de condições para a produção de metabólitos secundários, neste caso, as amidas bis-fenilpropanoídicas, essas curvas devem ser investigadas para cada caso.

Os extratos de arroz apresentaram, conforme análises por HPLC/UV-MS/MS, o aminoácido L-fenilalanina endógeno, isso quer dizer que este faz parte da composição do meio de cultura arroz, dessa maneira, a quantidade de L-Phe visualizada nos experimentos de detecção seletiva é resultado do aminoácido constituinte do arroz e do aminoácido exógeno adicionado.

Foram obtidos os cromatogramas de íons totais para os extratos do fungo quando cultivados em arroz com a adição de aminoácido e ainda os cromatogramas obtidos quando este fungo foi cultivado em arroz sem a suplementação deste aminoácido. A partir das áreas obtidas por integração das bandas referentes à substância brasiliamida A e do aminoácido L-Phe nos cromatogramas de íons totais, a curva de produção da substância brasiliamida A pode ser delineada e é observada na figura 4.29 abaixo.

4. Resultados e Discussão

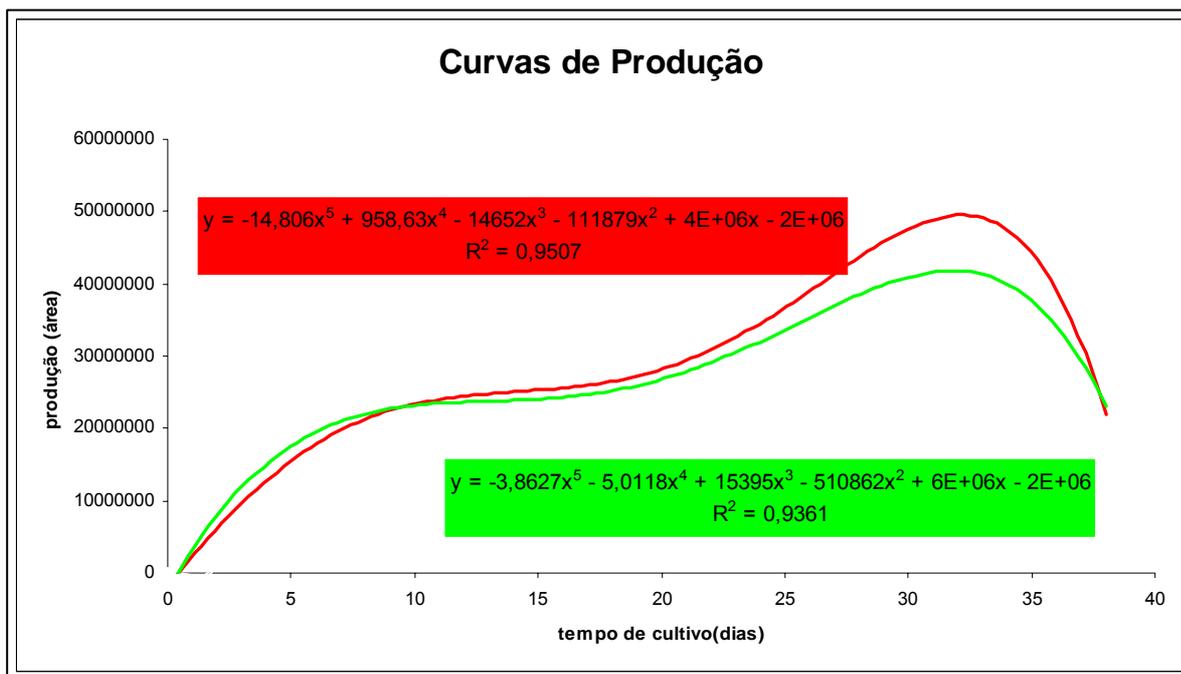


Figura 4.29: Curva de produção de brasiliamida A obtida para o cultivo do fungo *P. brasilianum* em arroz (verde) e em arroz suplementado com o aminoácido L-fenilalanina (vermelho).

Analisando-se a curva de produção em arroz (Figura 4.29-verde), verifica-se que a substância tem sua máxima produção em 33 dias, sendo este o melhor tempo de cultivo para que esta substância pudesse ser extraída. Os dados ressaltam que a produção desta substância começa no segundo dia de cultivo. Observa-se que a adição de L-fenilalanina ao meio de cultivo, aumenta a produção da amida (mostrado em vermelho), levando a conclusão mais uma vez de que o micro-organismo poderia utilizar esse aminoácido em seu metabolismo ou poderia incorporar esse aminoácido na produção destes compostos. Os resultados descritos levam a afirmar que a quantidade produzida da substância brasiliamida A é muito dependente de fontes de aminoácidos, neste caso a L-fenilalanina.

A produção da substância brasiliamida B também foi avaliada segundo experimentos de SRM para este composto. A cinética de produção da substância brasiliamida B pode ser visualizada na figura 4.30 abaixo.

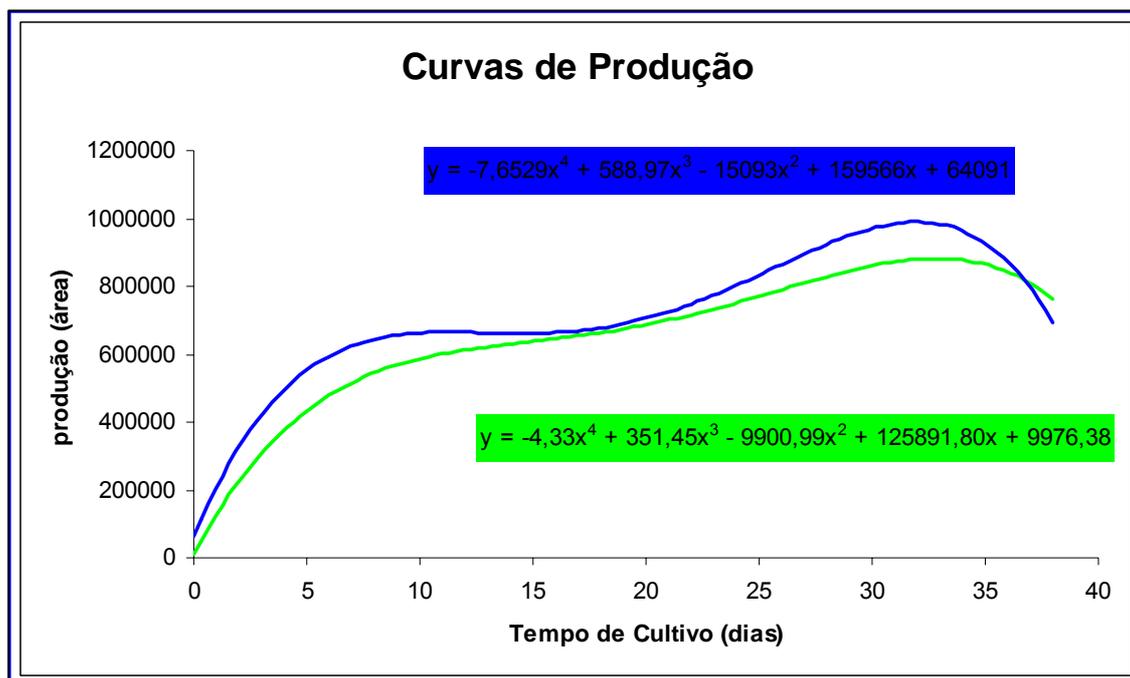


Figura 4.30: Curva de produção para a substância brasiliamida B produzida pelo fungo *P. brasilianum* cultivado em arroz (verde) e arroz suplementado com o aminoácido L-fenilalanina (azul).

De acordo com o gráfico apresentado visualiza-se que a produção da substância brasiliamida B pelo micro-organismo *P. brasilianum* possui mesmo comportamento que a amida A (Figura 4.29). Ressalta-se que o aminoácido L-fenilalanina exerce influência sobre a produção das amidas bis-fenilpropanoídicas como visualizado em azul no gráfico, aumentando a produção destes compostos.

No gráfico apresentado na figura 4.31 abaixo se visualiza o consumo do aminoácido L-fenilalanina (vermelho) e produção da substância brasiliamida A (verde), concluindo-se que este aminoácido participa na produção desta substância, uma vez que esta sendo consumido, ao mesmo tempo em que a produção de brasiliamida aumenta.

4. Resultados e Discussão

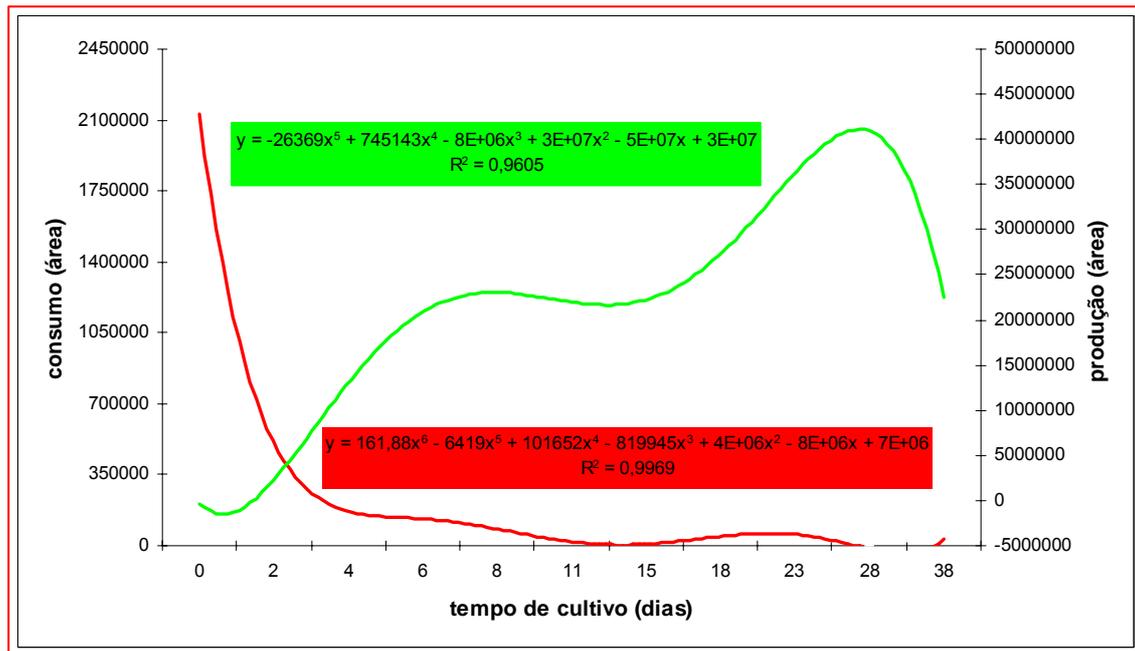


Figura 4.31: Consumo de L-fenilalanina (vermelho) e produção de brasiliamida A (verde).

Dessa maneira, o tempo de cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* cultivado em arroz visando à produção das substâncias brasiliamida A e B pôde ser otimizado, no sentido de se obter o tempo onde há maximização da produção dos compostos de interesse.

Realizou-se ainda, o cultivo do fungo *P. brasilianum* em canjica com extrações em diferentes dias (conforme descrito no item 3.4.10) para também delineamento da curva de produção e posterior comparação com a curva de produção em arroz, no intuito de verificar a influência do meio de cultura na produção da substância brasiliamida A. O gráfico obtido pode ser observado na figura 4.32 a seguir.



Figura 4.32: Curva de produção da substância brasiliamida A em canjica.

Observa-se na curva de produção delineada a partir das análises obtidas por HPLC/UV-MS/MS que o composto em estudo começa a ser produzido, também em canjica, nos dois primeiros dias de cultivo. Outra característica apresentada no gráfico analisado é o acúmulo de brasiliamida A nos últimos dias de cultivo, diferentemente da curva obtida para o fungo cultivado em arroz. Dessa maneira, a curva não apresenta queda da concentração desta substância como observado em arroz. A comparação das curvas nos diferentes meios é um indicativo da influência do meio de cultivo no metabolismo dos micro-organismos.

4.3.3. Curva de produção em meio Czapek suplementado com o aminoácido L-fenilalanina.

Análises por HPLC/UV realizadas anteriormente referentes ao cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* em meio líquido Czapek e neste meio suplementado com o aminoácido L-fenilalanina levaram a mesma conclusão dos itens acima, como pode ser observado nos cromatogramas na figura 4.33. Visualiza-se maior produção de brasiliamida A quando adicionado este aminoácido no meio de cultura líquido. Dessa maneira, no intuito de verificar a cinética de produção da substância brasiliamida A no meio de cultura líquido Czapek e neste meio de cultura com a adição do aminoácido L-fenilalanina, realizou-se uma curva de produção da substância brasiliamida A, a partir das análises por HPLC/UV-MS/MS.

4. Resultados e Discussão

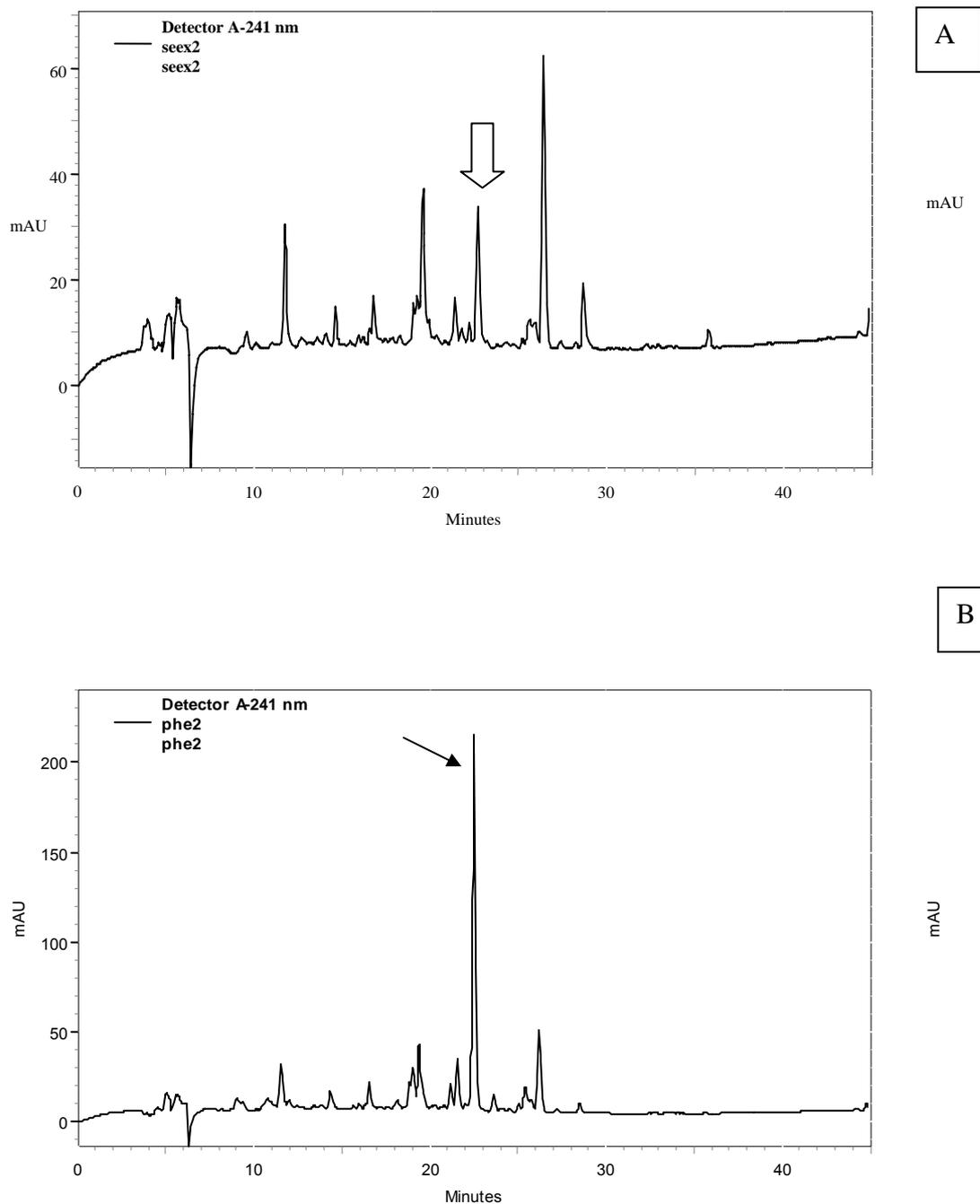


Figura 4.33: Cromatogramas referentes ao meio líquido de cultivo Czapek sem (A) e com L-Phe (B) respectivamente. A substância brasiliamida A é assinalada.

A partir das áreas obtidas conforme integração das bandas cromatográficas relativas à substância brasiliamida A nos cromatogramas de íons totais (TIC) dos extratos referentes ao cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* com diferentes tempos de extração, pôde-se delinear a curva de produção de brasiliamida A em meio líquido Czapek e ainda, em meio Czapek suplementado com o aminoácido L-fenilalanina. As curvas obtidas podem ser observadas nas figuras 4.34 e 4.35 abaixo.

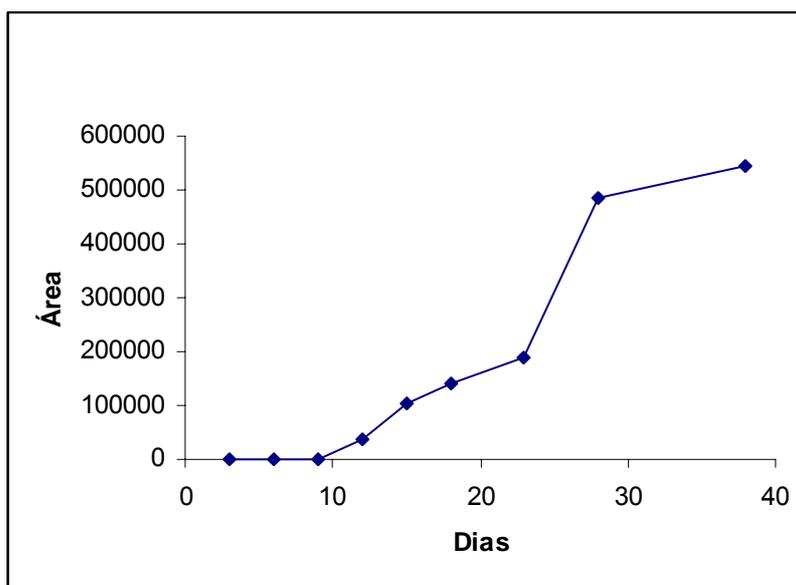


Figura 4.34: Curva de produção da substância brasiliamida A em meio líquido Czapek.

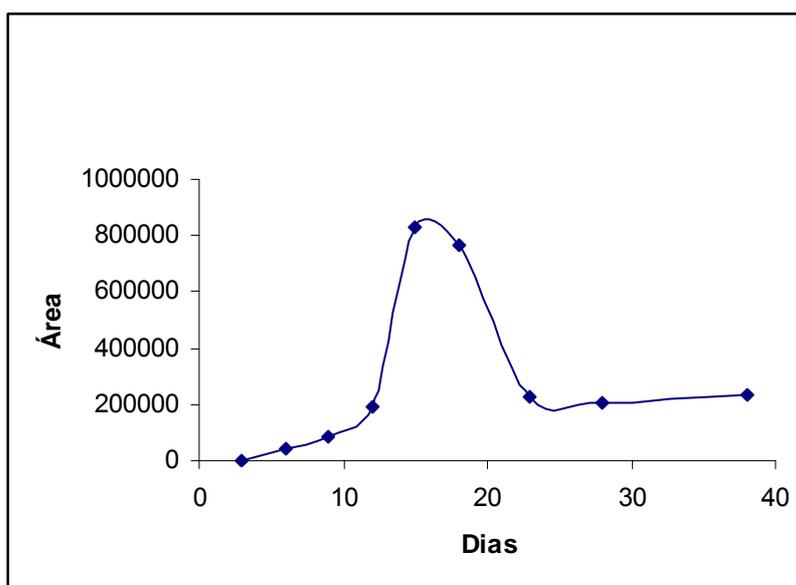


Figura 4.35: Curva de produção da substância brasiliamida A em meio líquido Czapek suplementado com L-fenilalanina.

Observa-se nos gráficos apresentados que o metabolismo do micro-organismo *P. brasilianum* é completamente modificado com a adição do aminoácido L-fenilalanina ao meio de cultura. Observa-se que a máxima produção de brasiliamida A em meio Czapek (Figura 4.34) ocorre nos últimos dias de cultivo, enquanto que os extratos do cultivo com a adição de L-Phe ao meio de cultura, a máxima produção ocorre em 15 dias de cultivo, seguida de decaimento da produção.

4. Resultados e Discussão

Outra característica das curvas de produção apresentadas é a maior produção de brasiliamida A no meio de cultura com a adição do aminoácido L-Phe, quando se comparam as áreas nos gráficos apresentados. Resultado indica uma possível relação entre o aminoácido L-fenilalanina e a produção de brasiliamida, conforme outros resultados apresentados.

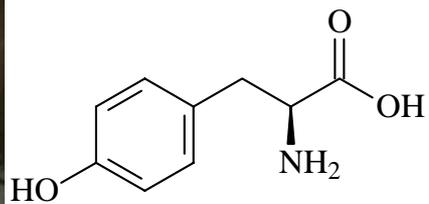
O aminoácido L-fenilalanina foi avaliado a partir de experimentos de SRM, conforme descritos na seção 3.4.13. O micro-organismo em meio de cultura líquido Czapek, sintetiza o aminoácido L-fenilalanina no seu metabolismo a partir do 12º dia de cultivo, para conseqüente produção das amidas bis-fenilpropanoidicas. Este resultado é um possível indicativo da diferenciação da cinética de produção da substância brasiliamida A observada nas curvas de produção apresentadas anteriormente (Figuras 4.34 e 4.35).

4.3.4. Estudo da influência de aditivos nitrogenados no metabolismo secundário de *P. brasilianum*.

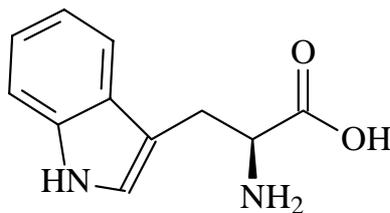
Estudos mostram que alterações das condições do meio de cultura podem alterar completamente o metabolismo dos micro-organismos. Esta abordagem conhecida como OSMAC (*One Strain Many Compounds*) pode levar a uma variedade de novos metabólitos secundários interessantes a partir de uma única cepa de um micro-organismo.

Neste sentido, para verificar a influência de diferentes aditivos nitrogenados no metabolismo secundário do fungo *P. brasilianum*, adicionou-se diferentes tipos de aminoácidos e outros compostos nitrogenados ao meio de cultivo. As estruturas moleculares, assim como a morfologia do micro-organismo cultivado com os diferentes aditivos nitrogenados que foram adicionados podem ser visualizadas na figura 4.36 abaixo.

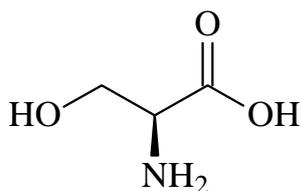
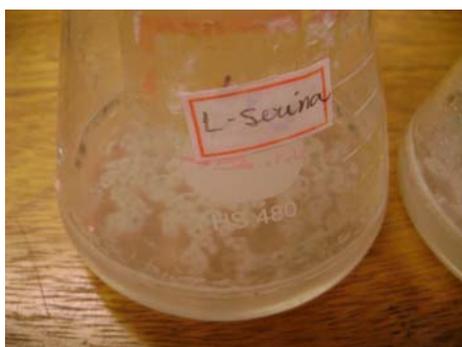
4. Resultados e Discussão



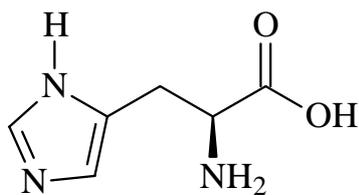
L-tirosina



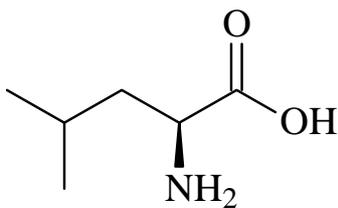
L-triptofano



L-serina



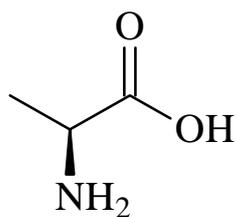
L-histidina



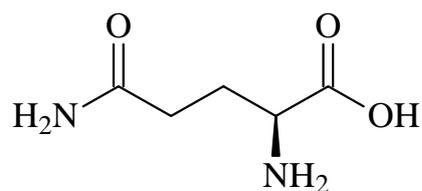
L-leucina

Figura 4.36: Estruturas químicas dos aditivos nitrogenados e fotos do micro-organismo cultivado com estes diferentes aditivos.

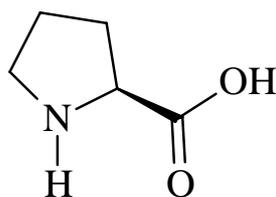
4. Resultados e Discussão



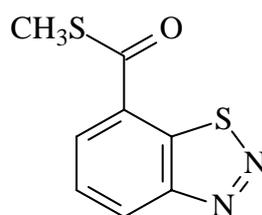
L-alanina



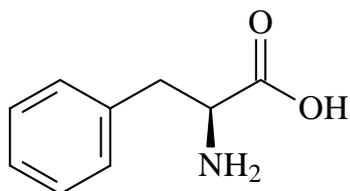
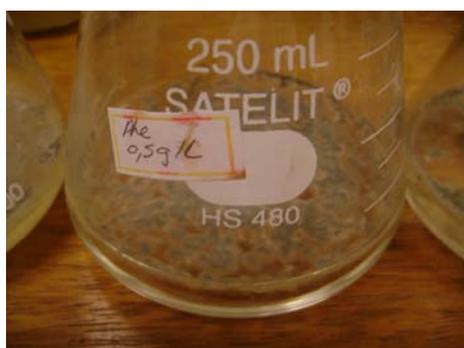
L-glutamina



L-prolina



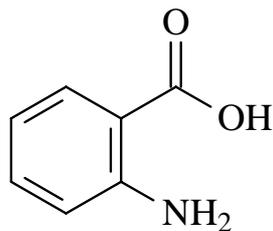
Biotin



L-fenilalanina

Figura 4.36 Continuação.

4. Resultados e Discussão



Ácido antranílico



NH_4NO_3

Figura 4.36: Continuação.

Observa-se na figura 4.36 acima que a morfologia do micro-organismo, a maneira como ele cresce e se desenvolve, é completamente modificada pela influência dos diferentes aditivos nitrogenados adicionados ao meio de cultivo. Ressalta-se ainda que alguns dos aditivos adicionados ao meio de cultura tiveram efeito inibitório frente o crescimento do fungo *P.brasilianum*, como foi o caso do ácido antranílico e biotin (Figura 4.36).

Na figura 4.37 abaixo se observa os diferentes perfis cromatográficos obtidos pelas análises dos extratos referentes ao cultivo do fungo com a adição dos aditivos nitrogenados. O estudo mostrou completa modificação do metabolismo secundário do micro-organismo, conforme indicado pelas análises por HPLC/UV-MS, embora nenhum metabólito secundário tenha sido isolado e definitivamente identificado por outras técnicas espectroscópicas.

4. Resultados e Discussão

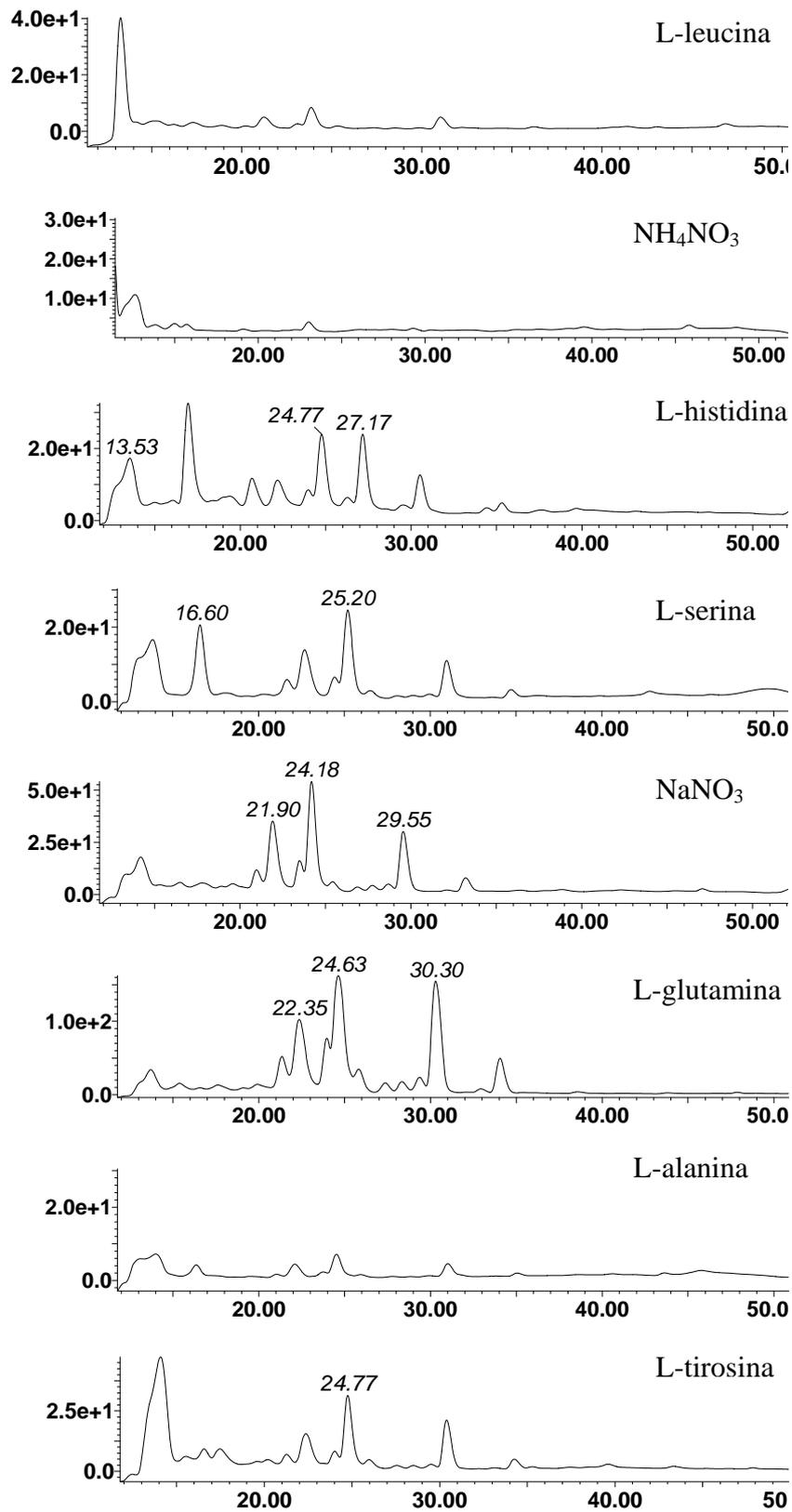


Figura 4.37: Cromatogramas obtidos dos extratos do cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* com diferentes aditivos nitrogenados.

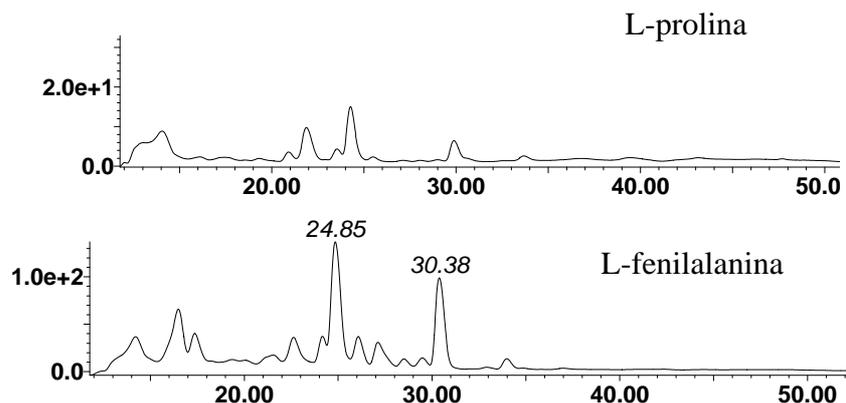


Figura 4.37: Continuação

As análises por HPLC/UV-MS indicaram a presença da produção de diferentes metabólitos secundários com a adição de determinados aditivos ao meio de cultura que não são visualizados nos extratos de outros meios (Figura 4.37), de acordo com a abordagem OSMAC descrita (seção 1.9), onde diferentes bandas cromatográficas são visualizadas na comparação dos extratos obtidos do cultivo com diferentes fontes nitrogenadas. A concentração das substâncias produzidas pelo micro-organismo também é muito influenciada de acordo com o composto nitrogenado adicionado. A influência dos diferentes aditivos no metabolismo secundário do micro-organismo parece indicar que substâncias nitrogenadas possam agir na ativação e desativação de enzimas e ainda possam agir na regulação de determinadas rotas biossintéticas de metabólitos secundários. A identificação dos compostos "induzidos" pelas diferentes composições de aminoácidos usados nos meios de cultivos seria de considerável interesse na produção de novos metabólitos secundários de acordo com a abordagem OSMAC.

4.3.5. Quantificação da biomassa do fungo *P. brasilianum* isolado de *Melia azedarach*.

Com o intuito de avaliar o efeito de diferentes aminoácidos no crescimento da biomassa do micro-organismo, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado com cada um dos aminoácidos (L-fenilalanina, L-triptofano e L-tirosina) e a biomassa pode ser quantificada (Tabela 4.5), para se verificar a influência de cada um dos aminoácidos no crescimento deste micro-organismo.

4. Resultados e Discussão

Tabela 4.5: Influência dos aa na biomassa do micro-organismo.

Experimentos	Biomassa obtida (médias)
Meio sem aa	0,418
Meio+ L-fenilalanina	0,461
Meio+L-tirosina	0,428
Meio+ L-triptofano	0,423

Verifica-se que a adição de aminoácidos ao meio de cultura influencia no crescimento da biomassa, quando se compara o crescimento do fungo sem adição de aminoácidos. Entretanto, quando os experimentos são comparados no gráfico da figura 4.38 abaixo, observa-se que a L-fenilalanina influencia de maneira mais intensa na biomassa do micro-organismo, ou seja, aumento da biomassa deste fungo.

O resultado observado no gráfico (Figura 4.38) significa que o micélio é formado em maior quantidade quando é adicionado L-Phe ao meio de cultura, fato importante quando se verifica que as amidas bis-fenilpropanoidicas são formadas no micélio. Dessa maneira, maior quantidade de micélio significa maior concentração de brasiliamidas produzida.

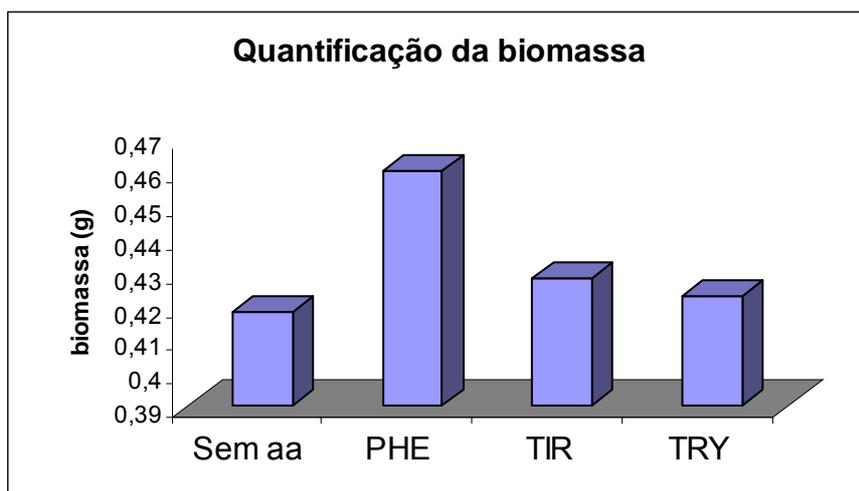


Figura 4.38: Quantificação da Biomassa do fungo *P. brasilianum* quando o meio foi suplementado com os aminoácidos L-fenilalanina (Phe), L-tirosina (Tir) e L-triptofano (Try) respectivamente.

4. Resultados e Discussão

4.3.6. Estudo visando à quantificação das amidas bis-fenilpropanoídicas em diferentes meios de cultivo.

O método de quantificação escolhido foi o do padrão interno, devido ao fato do procedimento de preparação de amostra envolver várias etapas, nas quais podem ocorrer perdas que levem a erros na quantificação. O padrão interno é adicionado em concentração conhecida à amostra a ser quantificada, e a quantificação é feita considerando-se a relação padrão/analito. Desta forma, excluindo-se erros na etapa de pesagem do material.

Estudos de quantificação de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos são dificultados uma vez que se lida com uma matriz viva, que é modificada durante todo o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo. A adição de padrão interno durante a inoculação levaria a biotransformação do PI pelo micro-organismo, consumo deste composto como fonte de nutrientes e conseqüentemente na sua inutilização, dessa maneira, nos estudos de quantificação realizados no presente trabalho, o PI é adicionado posterior ao crescimento do fungo.

A adição dos diferentes aditivos nitrogenados influenciou de maneira direta a produção das brasiliamidas nos meios de cultura, como observado nos cromatogramas referentes às análises por HPLC/UV-MS dos extratos do cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* com a adição de diferentes aditivos nitrogenados (seção 4.3.2). Dessa maneira, a concentração destas substâncias nos meios com a adição dos diferentes aditivos foi investigada através da realização de uma curva de calibração com padrão interno.

No caso, o padrão interno utilizado no trabalho foi o éster etílico de fenilalanina n-acetilado (Figura 4.39) preparado por um aluno de iniciação científica do grupo LaBioMMi (Victor Ulian Antunes), a partir do aminoácido L-fenilalanina. Esse padrão foi escolhido devido às suas características fundamentais apresentadas para sua utilização como padrão interno. Entre estas características, apresentou uma banda cromatográfica bem resolvida, sem interferentes; além disso, apresentou tempo de retenção próximo ao do metabólito a quantificar. O padrão interno apresentou ionização similar à substância brasiliamida A nos parâmetros estabelecidos para este composto no espectrômetro de massas, uma característica importante quando se quantifica metabólitos por espectrometria de massas.

4. Resultados e Discussão

Verificou-se que não é produzido na amostra original a ser quantificada, isto é, não é produzido pelo micro-organismo como metabólito secundário. Apresentou estabilidade frente às condições de eluentes e fase estacionária utilizadas. Apresentou alto grau de pureza devido aos processos cromatográficos aos quais foram submetidos.

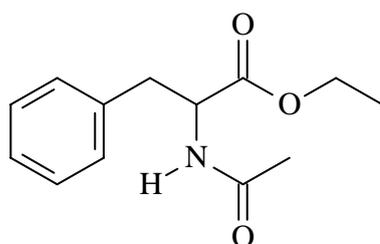


Figura 4.39: Estrutura molecular do PI utilizado na quantificação.

Para a construção da curva de calibração o padrão interno foi submetido a análises por ESI/MS/MS, as condições referentes às análises são descritas na seção 3.4.15. Foram realizados inicialmente experimentos de íons produtos (Figura 4.40) para, a partir do estudo de fragmentação, determinar os canais de SRM para o composto para posterior quantificação no espectrômetro de massas.

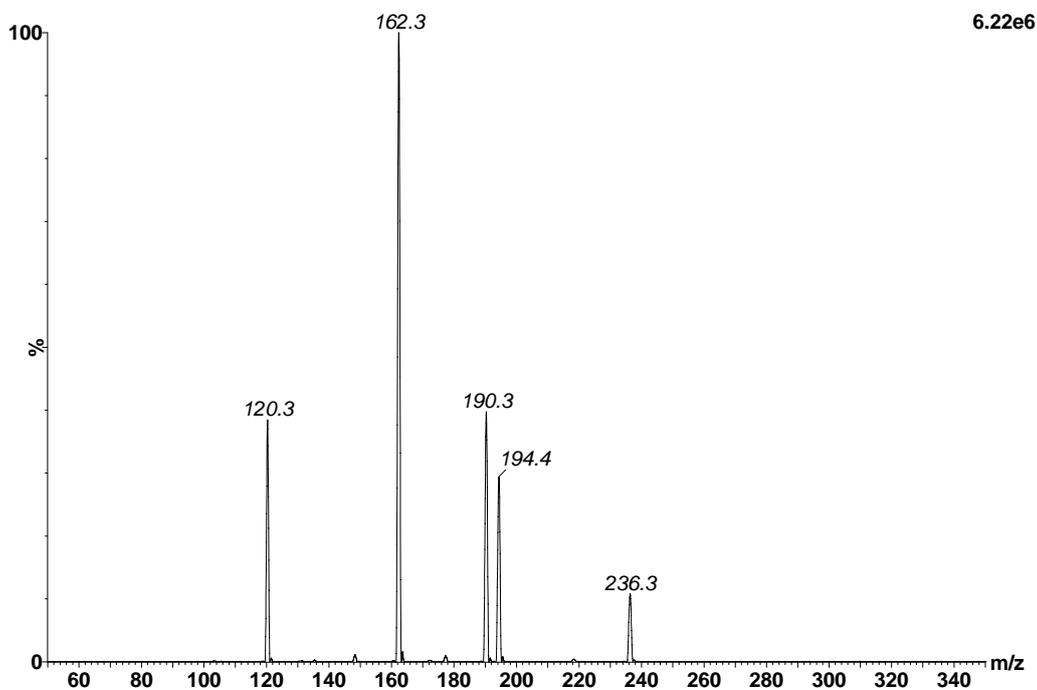


Figura 4.40: Espectro de íons produtos do ester etílico de fenilalanina n-acetilado.

4. Resultados e Discussão

Uma vez obtido o espectro de íons produtos do padrão interno, pode-se determinar o canal de SRM (236 > 120) para posterior quantificação das brasiliamidas. O canal de SRM utilizado para a quantificação das brasiliamidas foi 439 > 380.

A construção da curva de calibração (Figura 4.42) foi realizada mantendo-se fixa a concentração do padrão interno em 5 µg/mL, variando-se a concentração do analito a ser quantificado. A curva foi construída com os valores de áreas e concentrações gerados a partir da integração das bandas referentes à brasiliamida A e ao padrão interno no equipamento (Figura 4.41). A curva visualizada na figura abaixo apresentou boa linearidade ($R^2=0,998$).

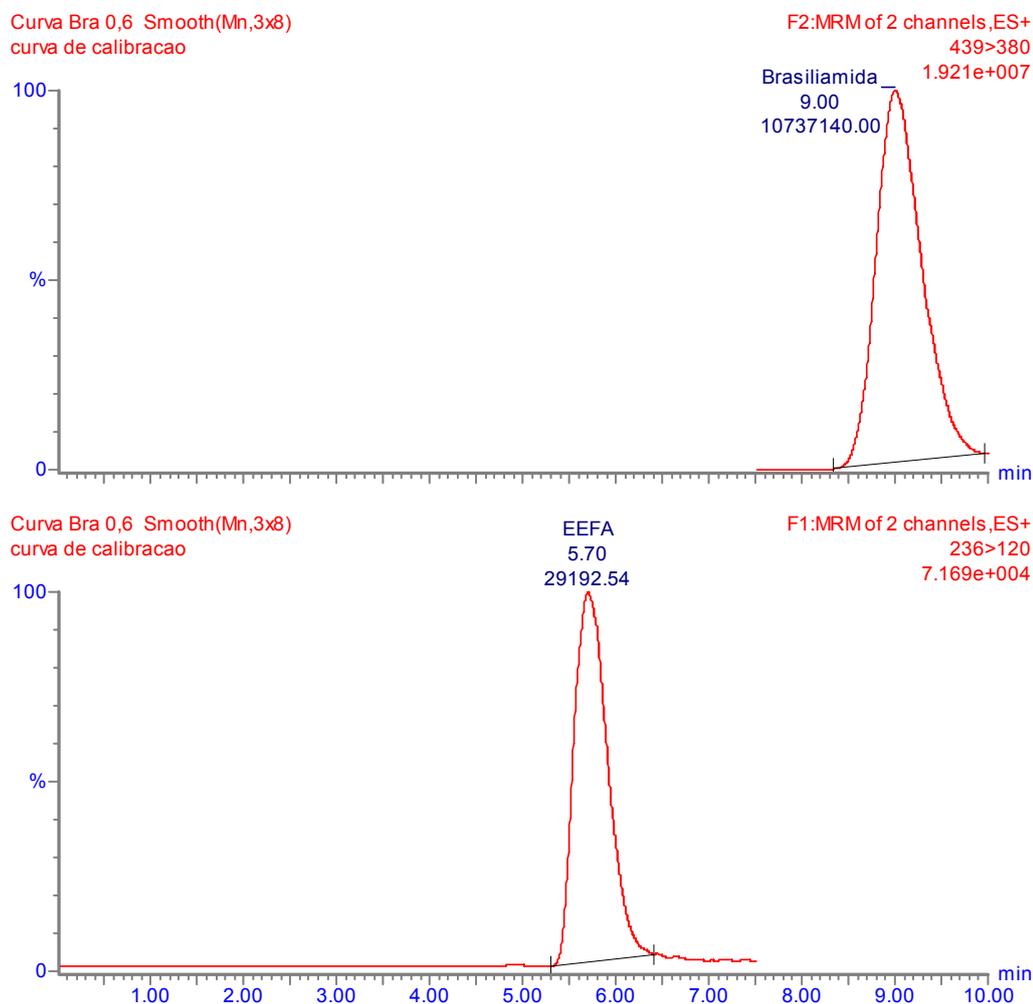


Figura 4.41: Bandas de integração geradas pelo equipamento da substância brasiliamida A e do PI respectivamente.

4. Resultados e Discussão

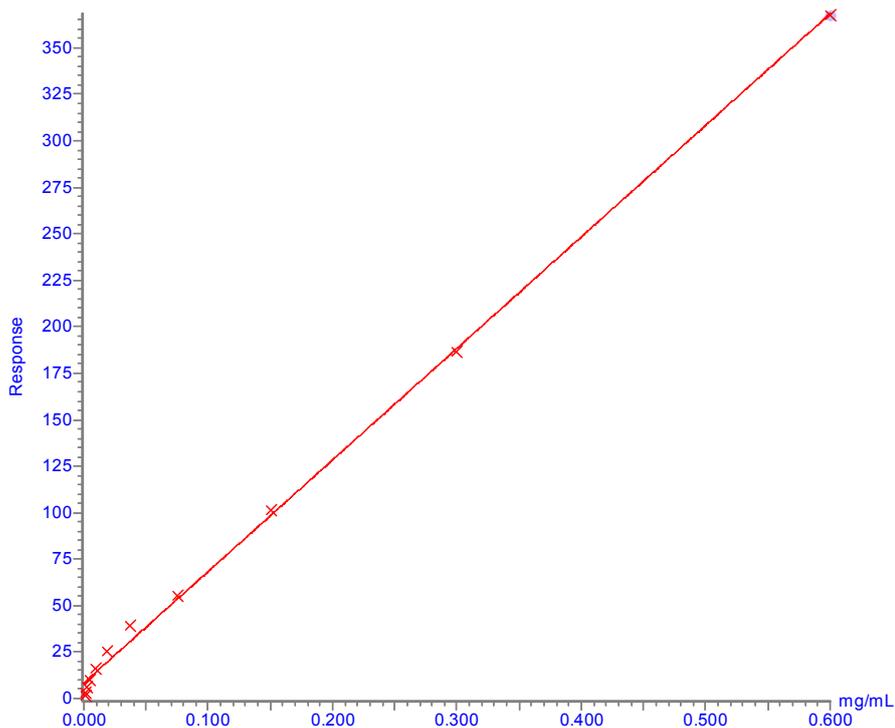


Figura 4.42: Curva de calibração para a quantificação de brasiliamida A.

A partir da curva de calibração construída estimou-se a concentração da amida nos diferentes meios de cultura com a adição dos aditivos. O gráfico mostrado na figura 4.43 abaixo mostra a variação na produção de brasiliamida A com a adição de diferentes fontes nitrogenadas.

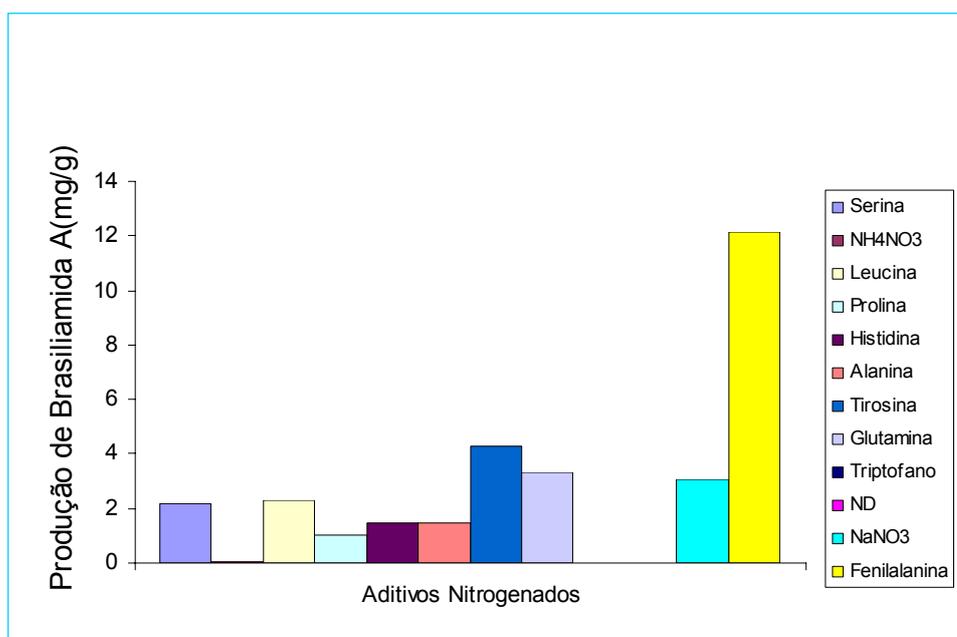


Figura 4.43: Gráfico que avalia a produção de brasiliamida A nos meios de cultura com a adição de diferentes aditivos.

4. Resultados e Discussão

Observa-se a influência de cada um dos aditivos nitrogenados testados na produção de brasiliamida A (a produção é observada no gráfico em mg/g de fonte de carbono presente no meio de cultura), sendo esta influência muito diferente em cada caso (Figura 4.43). Visualiza-se que o aminoácido L-fenilalanina possui grande influência e intensificou a produção de brasiliamida A como observado em amarelo no gráfico. Alguns aditivos não influenciaram a produção deste composto, como o L-triptofano e a L-prolina quando comparados ao cultivo do micro-organismo na ausência de nutrientes nitrogenados (ND). Dessa maneira, a otimização destes metabólitos secundários fica evidente com a adição de L-Phe no meio de cultivo. A influência do aminoácido L-Phe é mais um indicativo da influência deste aminoácido na rota biossintética das amidas bis-fenilpropanoidicas.

4.3.7. Estudo da influência da concentração de L-fenilalanina na produção das brasiliamidas.

Uma vez conhecida a influência do aminoácido L-fenilalanina no aumento da produção das brasiliamidas, foram adicionadas diferentes concentrações deste aminoácido ao meio de cultura, na tentativa de otimizar a produção das amidas bis-fenilpropanoidicas e dessa forma, verificar a concentração de L-fenilalanina que possui maior influência na produção dos compostos de interesse.

Foram testadas as concentrações de 0,5; 1; 3; 5 e 10g/L de meio de cultura Czapek, conforme descrito na seção 3.4.16. A concentração de brasiliamida A foi avaliada conforme a curva de calibração construída no item 4.3.4 com padrão interno. Os resultados são visualizados na figura 4.44 abaixo.

4. Resultados e Discussão

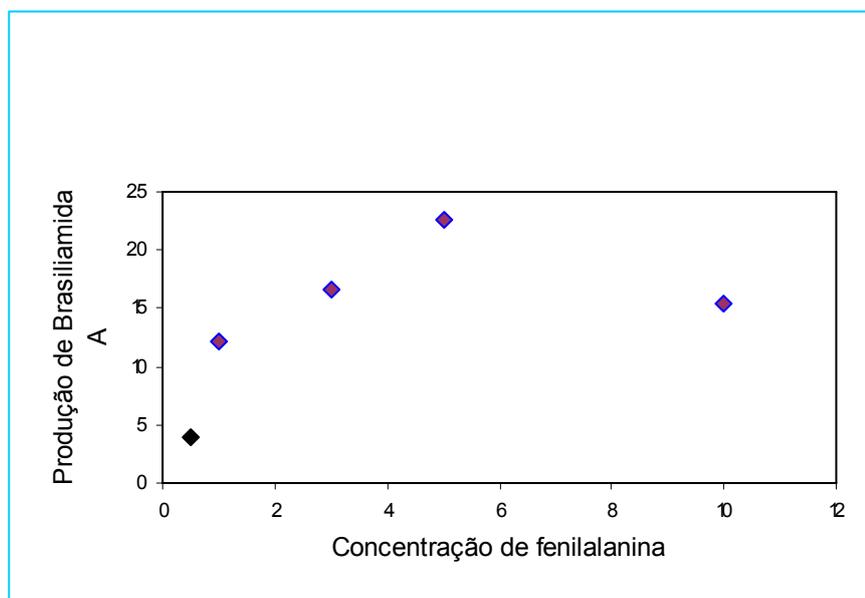


Figura 4.44: Gráfico mostra a influência da concentração de L-Phe na produção de brasiliamida A.

O gráfico mostra a influência da concentração de L-fenilalanina adicionada ao meio de cultura na produção da substância brasiliamida A. Observa-se que o aumento de L-Phe no meio de cultivo aumenta proporcionalmente a produção de amida produzida pelo micro-organismo. Entretanto, quando a concentração de L-Phe adicionada é de 10g/L, observa-se queda da produção da substância brasiliamida A e dessa maneira, a dependência do aminoácido L-fenilalanina na produção da amida não é linear. Esta queda pode ser referente à inibição de determinadas enzimas responsáveis pela biossíntese das amidas bis-fenilpropanoidicas.

4.3.8. Estudo da adição de L-fenilalanina em diferentes tempos de cultivo do micro-organismo *P. brasilianum*.

No intuito de se otimizar o período para adição do aminoácido L-fenilalanina ao meio de cultura no sentido de se obter máximo rendimento da produção das brasiliamidas, foi proposto um experimento de adição deste aminoácido em diferentes etapas do crescimento do micro-organismo em estudo (Figura 4.45). Com este objetivo, o fungo *P. brasilianum* foi cultivado sem a adição de aminoácido como

4. Resultados e Discussão

forma de controle, para posterior comparação e cultivado adicionando-se L-Phe depois de 3,6,9,12 e 15 dias de cultivo (seção 3.4.17).

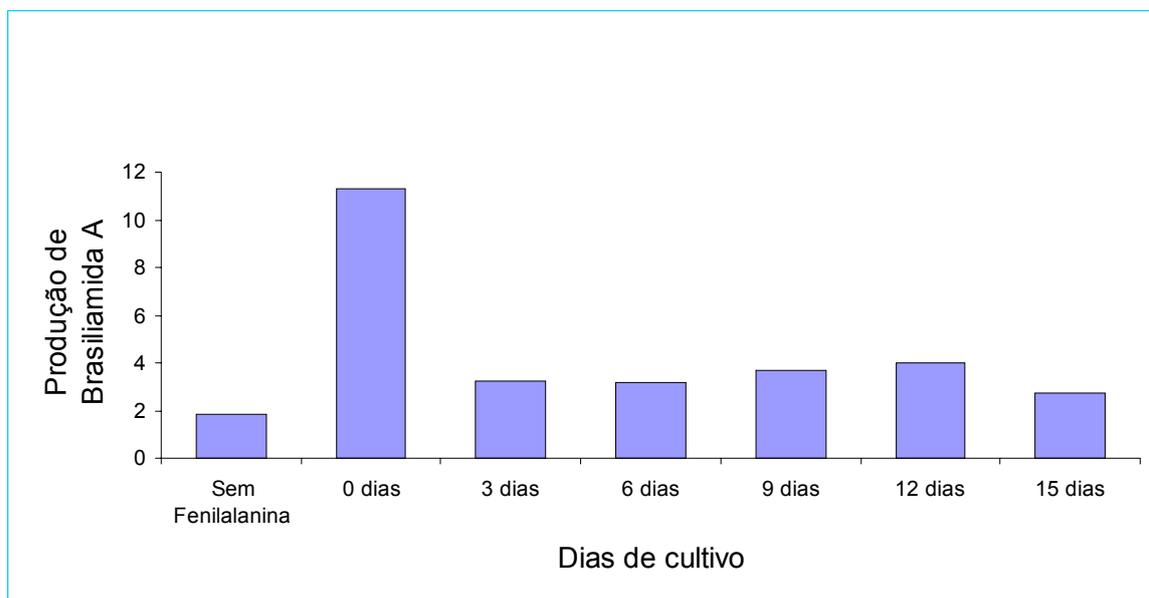


Figura 4.45: Figura mostra a influência da adição de L-Phe em diferentes tempos de cultivo.

Observa-se que a adição de L-fenilalanina durante a inoculação do micro-organismo é o melhor período para a adição do aminoácido para máxima produção das substâncias de interesse, uma primeira hipótese seria a maior absorção deste aminoácido pelo micro-organismo.

Outra observação obtida a partir do gráfico apresentado é o aumento da produção da substância brasilamida A quando adicionado o aminoácido L-Phe ao meio de cultura, em diferentes etapas do cultivo do fungo, quando comparado ao controle sem a adição do aminoácido, resultado que indica a relação entre este aminoácido e a produção de brasilamidas.

Desta maneira, determinou-se o melhor tempo de cultivo para a adição do aminoácido L-Phe para aumento da produção das brasilamidas, aumento do rendimento, para em seguida, adicionar o aminoácido isotopicamente marcado [2-¹³C] –Phe ao meio de cultivo para estudo da biossíntese dos fenilpropanóides.

4. Resultados e Discussão

4.3.9. Estudo da biossíntese das amidas bis- fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo *P. brasilianum*.

Os resultados anteriormente descritos indicam que o aminoácido L-fenilalanina está intimamente ligado à produção das amidas bis-fenilpropanoídicas. Com o objetivo de verificar esta influência e estudar a biossíntese destes compostos, adicionou-se o aminoácido isotopicamente marcado [2-¹³C]-Phe ao meio de cultura do fungo *P. brasilianum* e os extratos obtidos analisados por HPLC/UV-MS.

Inicialmente, para o estudo da biossíntese dos fenilpropanóides produzidos pelo micro-organismo, foram realizados experimentos de ESI/MS/MS por inserção direta, como observado na figura 4.46 para o aminoácido marcado isotopicamente [2-¹³C]-Phe (Figura 4.46 B), e para o aminoácido L-Phe sem marcação isotópica (Figura 4.46 A), no intuito de se verificar a resolução unitária (vide seção 1.10.1) do espectrômetro de massas triplo quadrupolo (MICROMASS) utilizado nas análises.

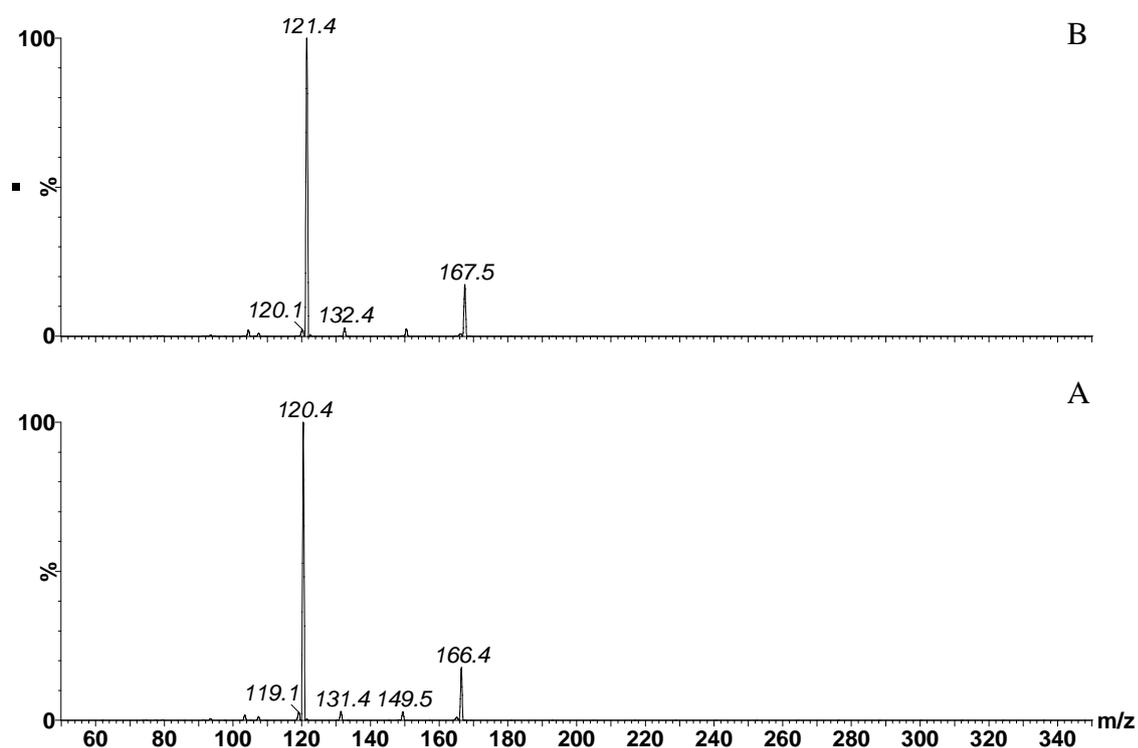


Figura 4.46: Espectro de íons produtos para a [2-¹³C]-Phe (A) e para a L-Phe sem marcação (B) respectivamente.

A partir dos experimentos apresentados, observa-se no espectro do experimento de íons produtos no modo positivo de ionização do aminoácido L-Phe sem marcação isotópica (Figura 4.46) o pico do íon molecular protonado com m/z

4. Resultados e Discussão

166 levando, com uma energia de colisão otimizada de 10eV, ao fragmento de relação m/z 120. Já quando se observa o espectro referente ao aminoácido [2-¹³C]-Phe marcado isotopicamente, visualiza-se um pico referente ao íon molecular protonado com relação m/z 167 e fragmento gerado nas mesmas condições de relação m/z 121, de acordo com o esperado, verificando a resolução unitária dos analisadores quadrupolares de acordo com a tabela 1.2 apresentada na seção 1.10.1.

Analisando-se os espectros de massas visualizados na figura 4.46, referentes ao aminoácido L-Phe e [2-¹³C]-Phe e verificando-se a diferença de unidades de massa encontrada entre estes espectros, fica claro a atuação da ferramenta espectrometria de massas na elucidação da rota biossintética de metabólitos secundários produzidos por micro-organismos. Uma vez que o metabólito secundário estudado é detectado com unidades a mais de massa com relação ao padrão sem enriquecimento isotópico, o precursor em estudo foi incorporado.

Em estudos por espectrometria de massas, cada um dos elementos apresenta isótopos menos abundantes que levam a íons $[M+H+1]^+$ e $[M+H+2]^+$ no espectro de massas. Neste sentido, existe uma ferramenta no software (masslinx 4.1) que gera o espectro de massas com a proporção isotópica da fórmula molecular inicial apresentada. Essa ferramenta foi importante no estudo de biossíntese das amidas bis-fenilpropanoidicas, e o espectro visualizado na figura 4.47A foi gerado a partir da fórmula molecular da substância brasiliamida A (C₂₄H₂₆N₂O₆).

Quando se compara o espectro de massas gerado pelo equipamento que apresenta o modelo isotópico sugerido pelo software (Figura 4.47 A) com o espectro de massas do padrão isolado da substância brasiliamida A (Figura 4.47 B), observa-se que a amida isolada apresenta o modelo isotópico sugerido pelo software do equipamento, conforme esperado.

4. Resultados e Discussão

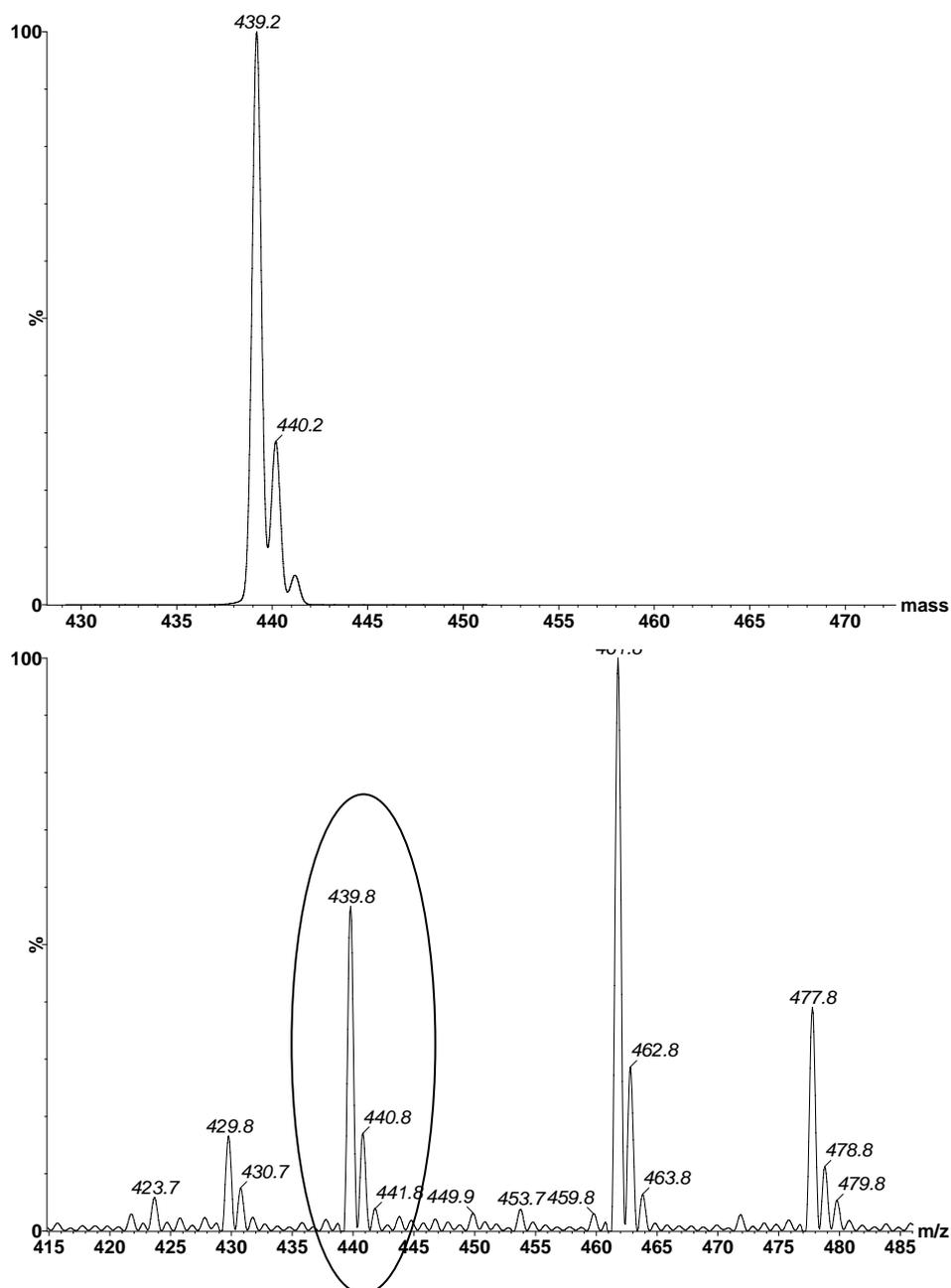


Figura 4.47: Espectros de íons produtos (A) espectro gerado pelo equipamento que indica modelo isotópico da molécula brasiliamida A (B) espectro de íons produtos da substância brasiliamida A isolada.

Com o objetivo de visualizar a incorporação do precursor [2-¹³C]-Phe na produção das brasiliamidas, foram realizadas análises por HPLC/UV-MS do extrato do cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* em meio líquido Czapek com a adição do aminoácido isotopicamente marcado. Inicialmente, foram realizadas análises por HPLC/UV-MS do padrão de brasiliamida A, isolado anteriormente, e, uma vez otimizadas as condições cromatográficas no sentido de se obter melhor resolução, os extratos enriquecidos isotopicamente foram analisados.

4. Resultados e Discussão

A comparação dos cromatogramas visualizados na figura 4.48 do padrão isolado de brasiliamida A (Figura 4.48 A) e do extrato fúngico com a adição do precursor marcado (Figura 4.48 B), indicam que a substância brasiliamida A foi produzida pelo micro-organismo nos extratos enriquecidos com [2-¹³C]-Phe. Verifica-se nos cromatogramas as bandas cromatográficas com mesmo tempo de retenção e espectros de UV similares.

O extrato do cultivo do micro-organismo referente ao controle (branco) também foi analisado por HPLC/UV-MS nas mesmas condições otimizadas para o padrão isolado, e comparado com o extrato enriquecido com [2-¹³C]-Phe. Em ambos, foi verificada a produção da substância brasiliamida A, como esperado. Dessa maneira, os espectros de massas referentes à substância em estudo foram obtidos a partir das bandas cromatográficas referentes à substância brasiliamida A nos cromatogramas (Figura 4.49), com o objetivo de visualizar a incorporação isotópica na substância brasiliamida A, a partir da comparação com o modelo isotópico simulado pelo software do equipamento para a substância padrão em estudo (Figura 4.47).

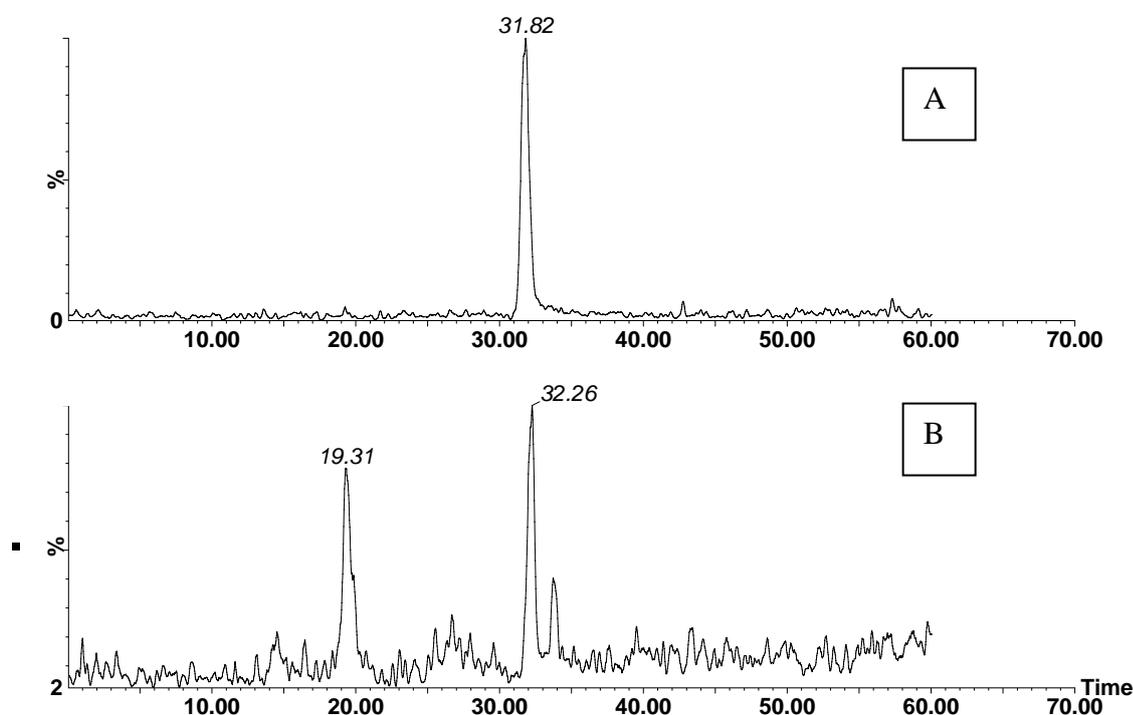


Figura 4.48: Cromatogramas referentes ao padrão isolado de brasiliamida A (A) e ao extrato do cultivo do fungo com [2-¹³C]-Phe (B).

4. Resultados e Discussão

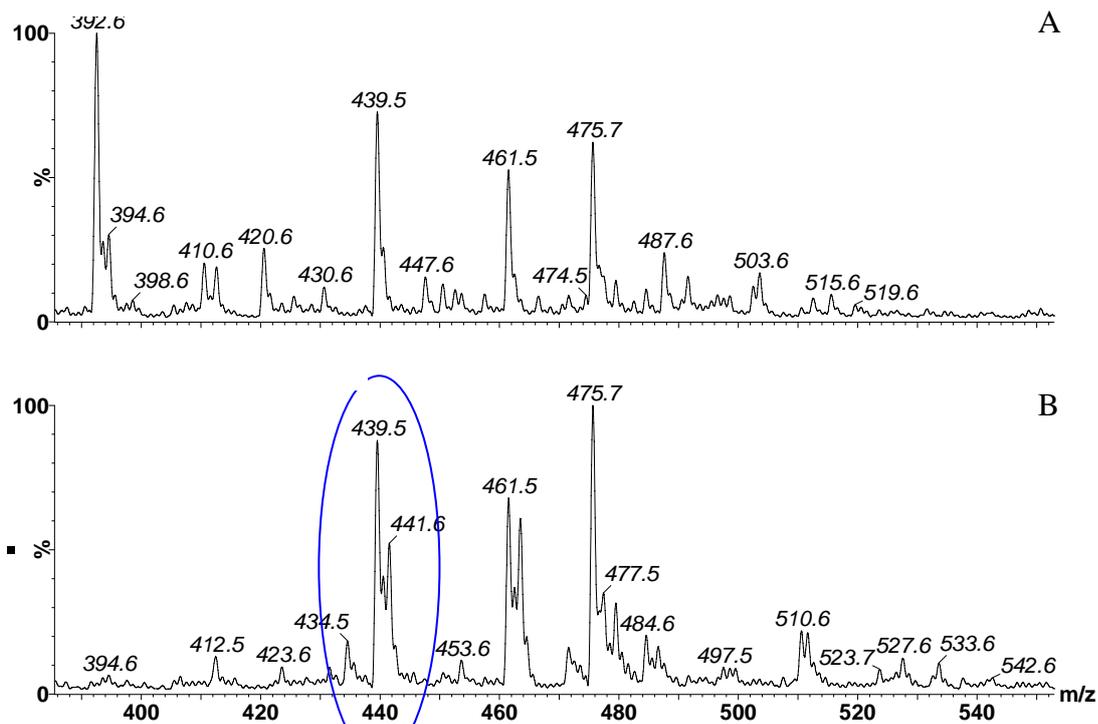


Figura 4.49: Espectros de íons produtos obtidos para o controle (Fungo+L-fenilalanina) (A) e para o extrato com adição de [2-¹³C]-Phe (B).

Observa-se nos espectros de massas processados a partir das bandas cromatográficas referentes à substância brasiliamida A (Figura 4.48), que no extrato referente ao controle (micro-organismo cultivado com a adição de Phe não enriquecida isotopicamente - Figura 4.48 A) que a substância brasiliamida A apresenta modelo isotópico semelhante ao sugerido pelo software do equipamento, como indicado anteriormente. Por outro lado, o espectro referente ao extrato do cultivo do fungo com a adição de [2-¹³C]-Phe (Figura 4.48 B), tem o pico com relação *m/z* 441 acentuado no espectro. O resultado comprova dessa maneira, a incorporação de duas unidades do aminoácido [2-¹³C]-Phe na produção das amidas bis-fenilpropanoídicas sugerindo a rota biossintética destes metabólitos secundários a partir do caminho dos fenilpropanóides.

Em seguida, experimentos de íons produtos foram realizados para a substância brasiliamida A produzida a partir do cultivo do fungo com a adição de [2-¹³C]-Phe e purificada segundo técnicas de cromatografia convencionais (item 3.4.19). A substância brasiliamida A padrão, isolada anteriormente sem enriquecimento isotópico também foi analisada para posterior comparação. (Figura 4.50).

4. Resultados e Discussão

As análises foram realizadas num equipamento híbrido Q-trap por apresentar maior sensibilidade e maior resolução quando comparado a um equipamento triplo-quadrupolo. Nos equipamentos com analisadores Q-trap lineares existe uma função conhecida como *enhanced MS*, sendo possível o aprisionamento dos íons obtidos a partir da fragmentação do íon precursor no trap (segundo quadrupolo), levando a uma sensibilidade 500 vezes maior que os equipamentos com analisadores quadrupolares comuns. As condições utilizadas nos experimentos podem ser visualizadas na seção 3.4.19.

Inicialmente, foram realizados experimentos de MS (*full scan*) para a substância brasiliamida A padrão. A distribuição isotópica deste composto determinada pela fórmula molecular também foi verificada pelo software Analyst (Applied Biosystems) como observado na figura 4.50 abaixo. Verifica-se que a substância padrão segue o modelo isotópico sugerido pelo software do equipamento, como verificado anteriormente.

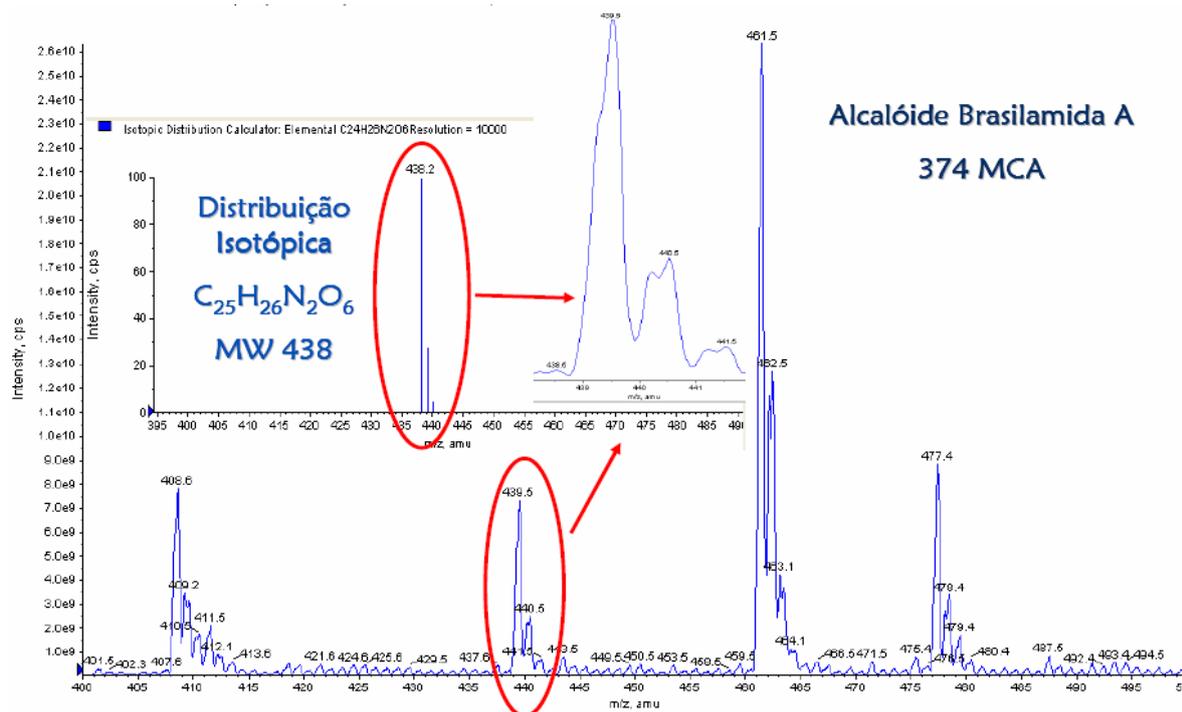


Figura 4.50: Espectro de massas (*full scan*) para a substância brasiliamida A padrão e modelo isotópico sugerido pelo software analyst.

Em seguida, foram realizados experimentos de MS/MS (íons produtos) para a substância padrão para posterior comparação com a amida isolada do extrato enriquecido isotopicamente. O espectro pode ser observado na figura 4.51 abaixo.

4. Resultados e Discussão

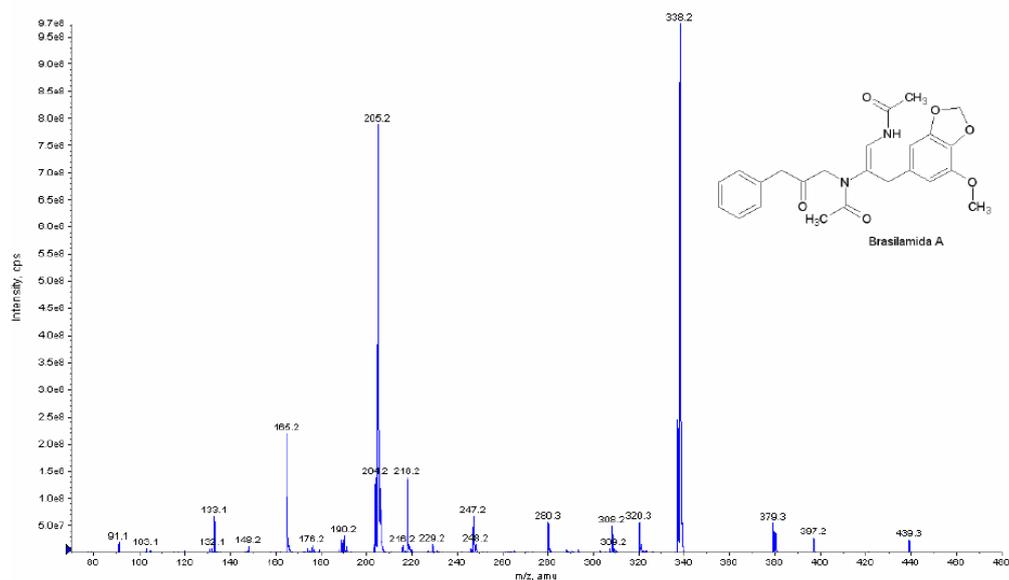


Figura 4.51: Espectro de íons produtos para a substância padrão brasiliamida A.

A brasiliamida A (AM 18) purificada a partir do extrato com a adição do aminoácido isotopicamente marcado também foi analisada por ESI/MS/MS (*Enhanced MS*) para verificação da incorporação de unidades do aminoácido L-Phe na estrutura da substância brasiliamida A e o espectro de íons produtos pode ser observado abaixo (Figura 4.52).

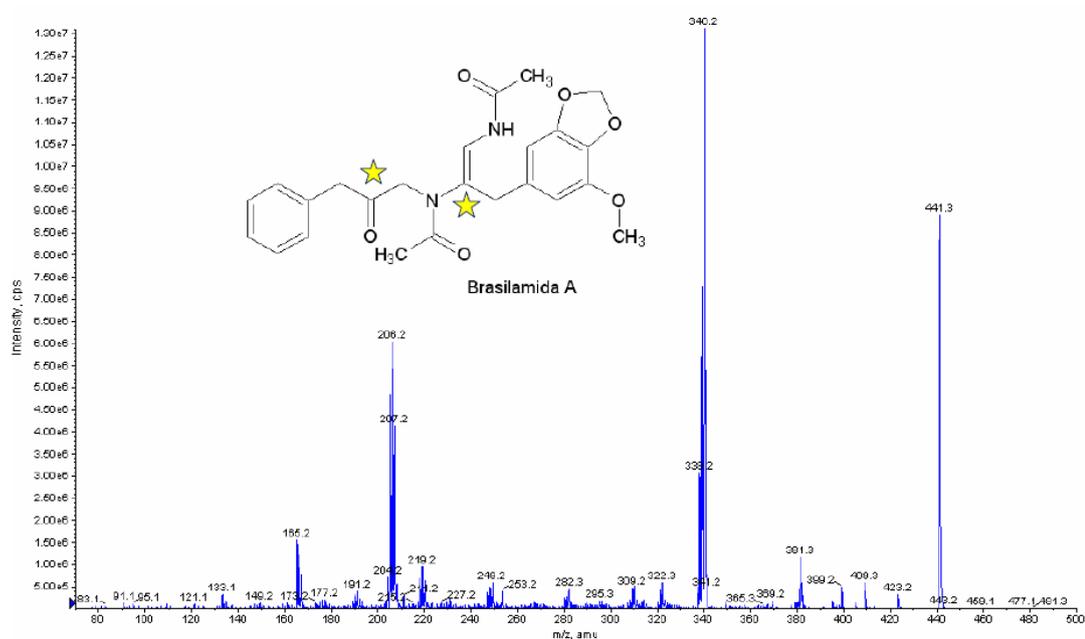


Figura 4.52: Espectro de íons produtos para a substância brasiliamida A purificada a partir do extrato com a adição de $[2-^{13}\text{C}]$ -Phe.

4. Resultados e Discussão

Na figura 4.53 observa-se os espectros de íons produtos sobrepostos obtidos para a brasiliamida A padrão e para a amida purificada a partir do extrato com a adição de $[2-^{13}\text{C}]\text{-Phe}$. Visualiza-se na sobreposição dos espectros das duas amidas que os fragmentos observados no espectro da amida enriquecida possuem sempre a diferença de 2 unidades de massa deslocadas da substância brasiliamida A padrão. Dessa maneira, mostrando efetivamente que houve a incorporação de duas unidades do aminoácido L-Phe.

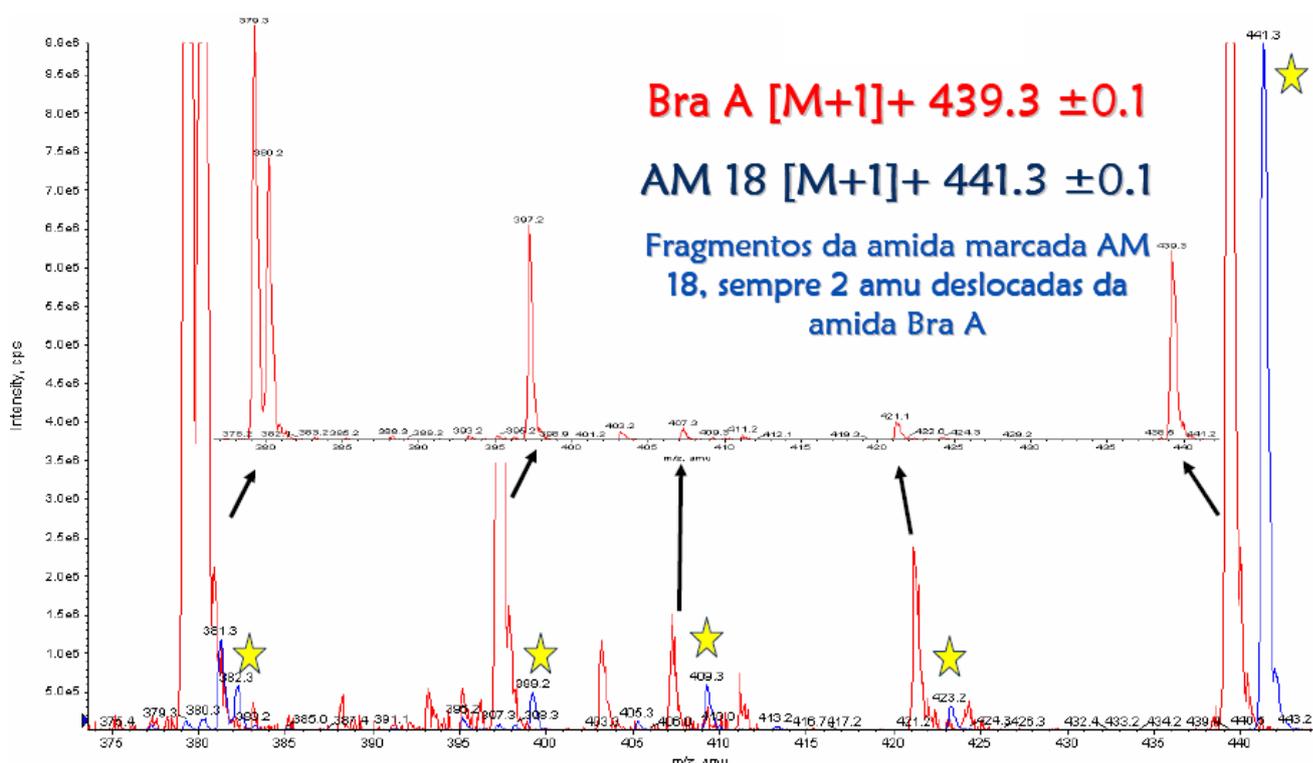


Figura 4.53: Espectros sobrepostos da substância brasiliamida A padrão (vermelho) e da amida enriquecida isotopicamente (azul).

A biossíntese da substância brasiliamida B também foi investigada por experimentos de HPLC/UV-MS e foi verificado que assim como a substância brasiliamida A, é formada a partir de duas unidades do aminoácido L-fenilalanina, como se observa na figura 4.54 abaixo. Visualiza-se o aumento da intensidade do pico de m/z 425, apresentando também duas unidades a mais de massa que o pico do íon molecular protonado (m/z 423).

4. Resultados e Discussão

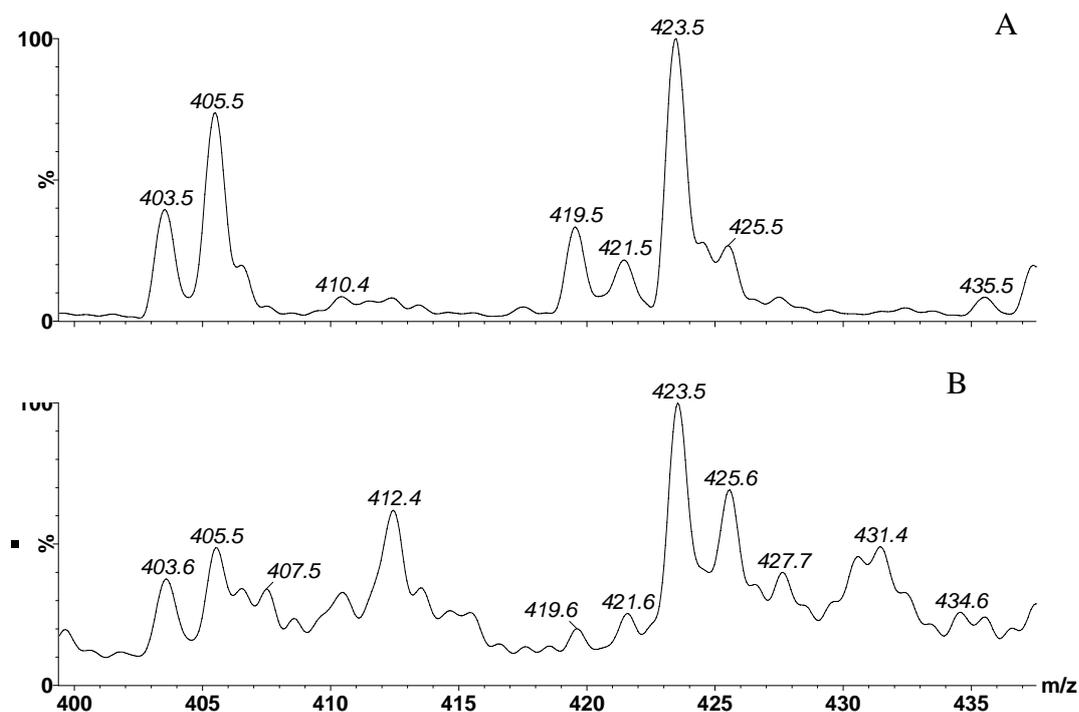


Figura 4.54: Espectros de íons produtos obtidos para o controle (Fungo+L-fenilalanina) (A) e para o extrato com adição de [2-¹³C]-Phe (B).

Os experimentos por HPLC/UV-MS se mostraram eficientes na visualização da incorporação de precursores isotopicamente marcados na biossíntese de metabólitos secundários. A partir dos experimentos realizados, visualizou-se a rota biossintética das brasilamidas a partir de duas unidades do aminoácido L-fenilalanina.

Com o conhecimento adquirido nos experimentos por HPLC/UV-MS, a substância brasilamida A foi isolada (item 3.4.19) no intuito da realização de experimentos por RMN ¹³C para a visualização dos carbonos que foram marcados isotopicamente na estrutura das brasilamidas.

Em estudos biossintéticos de metabólitos secundários por espectrometria de massas, os experimentos de íons produtos (MS/MS) podem ter a energia de ionização controlada gerando íons fragmentos, os quais podem ser ou não derivados da parte da molécula contendo isótopos pesados (precursor marcado). Em princípio, a técnica de espectrometria de massas diferencia metabólitos com incorporação de precursores isotopicamente marcados, daqueles que não foram formados a partir dos precursores em estudo. Entretanto muitas vezes não é possível especificar qual posição em particular foi enriquecida isotopicamente.

Neste sentido, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear vem completar as informações obtidas nos experimentos por espectrometria de massas. A partir de

4. Resultados e Discussão

experimentos de RMN ^{13}C de amostras obtidas de experimentos com a adição de precursores isotopicamente marcados, importantes informações a respeito das relações entre precursor-produto são visualizadas. Uma vez que um determinado sinal de carbono do composto é visualizado com maior intensidade, claramente este resultado indica uma posição onde o precursor em estudo foi incorporado.

A partir do cultivo do micro-organismo *P. brasilianum* em meio líquido Czapek com a adição de L-fenilalanina isotopicamente marcada, isolou-se a substância brasiliamida A após processos cromatográficos. Em seguida este composto foi submetido a análises por RMN ^{13}C (o espectro é visualizado na figura 4.55).

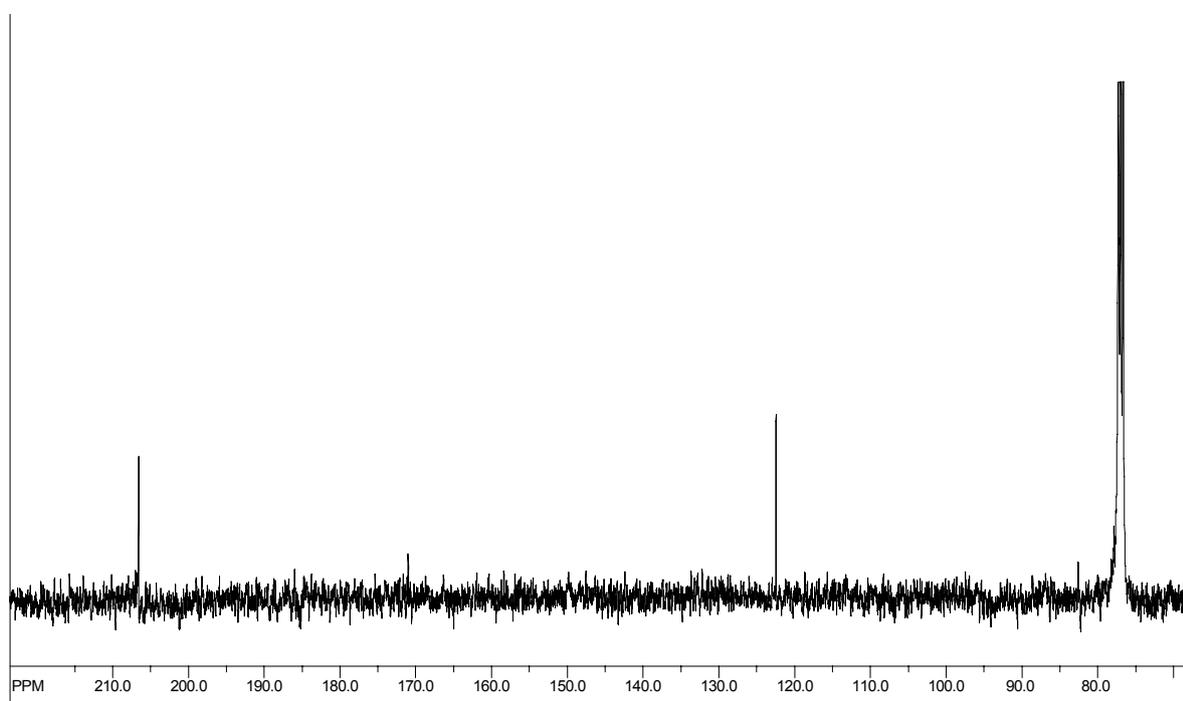
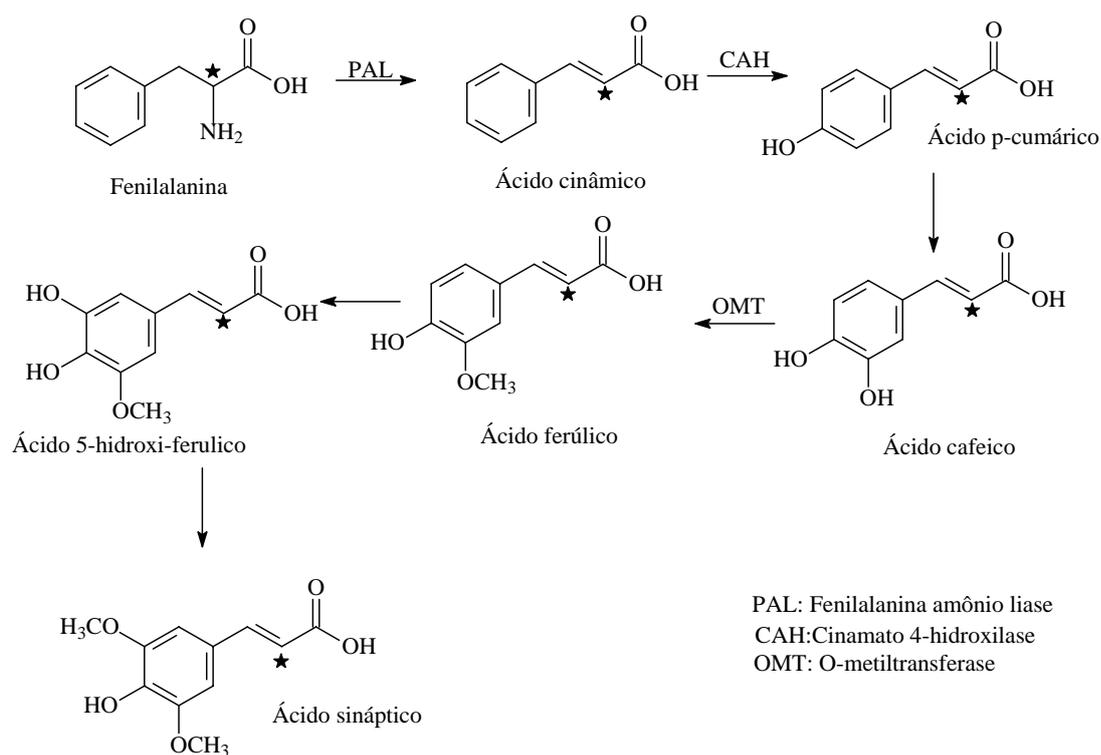


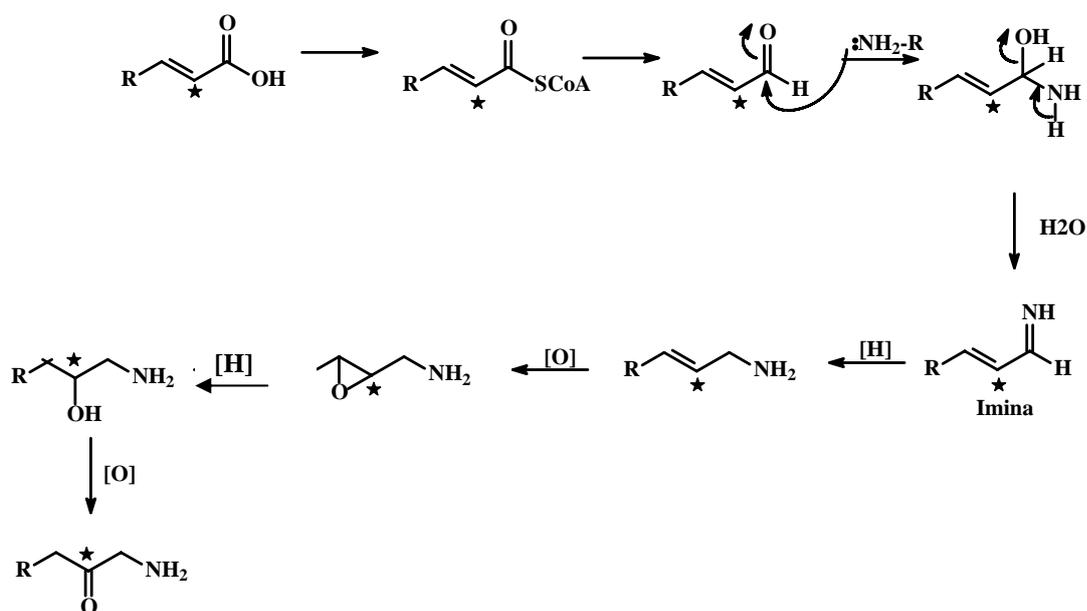
Figura 4.55: Espectro de RMN ^{13}C da substância brasiliamida A com enriquecimento, AM 18, (400MHz; CDCl_3).

Observa-se no espectro de RMN ^{13}C a intensificação dos sinais dos carbonos C-8 (δ 122,5) e C-11 (δ 206,6) da estrutura molecular da substância brasiliamida A (Figura 4.8). A proposta biossintética sugerida com base nos resultados obtidos pelos experimentos de espectrometria de massas e RMN ^{13}C para a substância brasiliamida A pode ser observada nos esquemas apresentados abaixo (Esquemas 4.4, 4.5 e 4.6), os carbonos isotopicamente marcados são assinalados na figura durante toda a rota biossintética proposta.

4. Resultados e Discussão

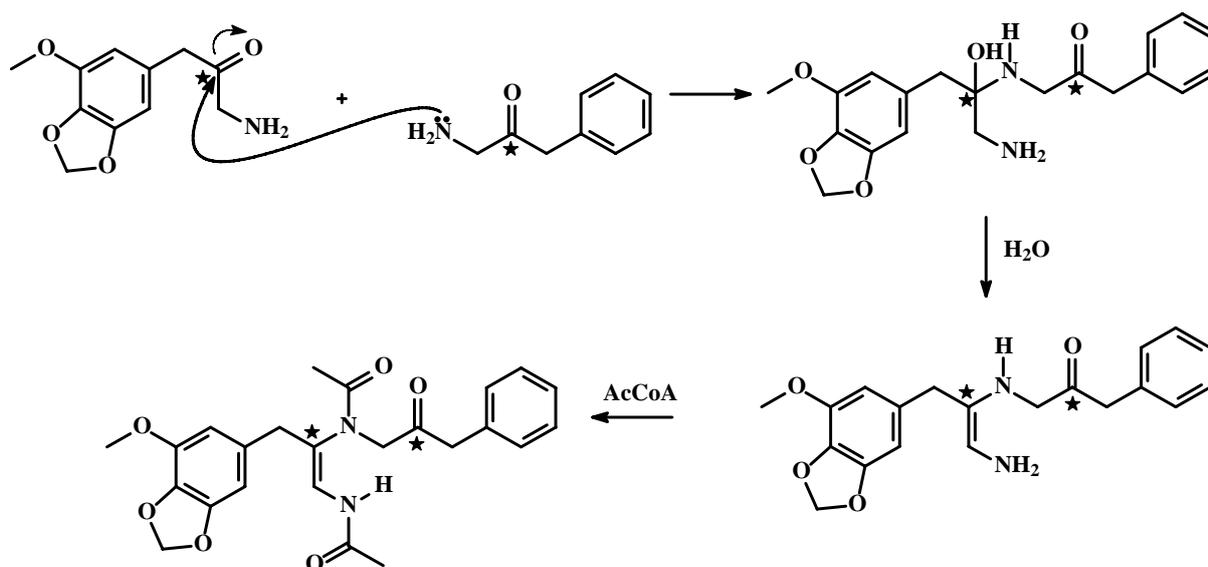


Esquema 4.4: Formação dos precursores ácido cinâmico e ácido sináptico (RITTER, 2004).



Esquema 4.5: Aaminação redutiva dos precursores.

4. Resultados e Discussão

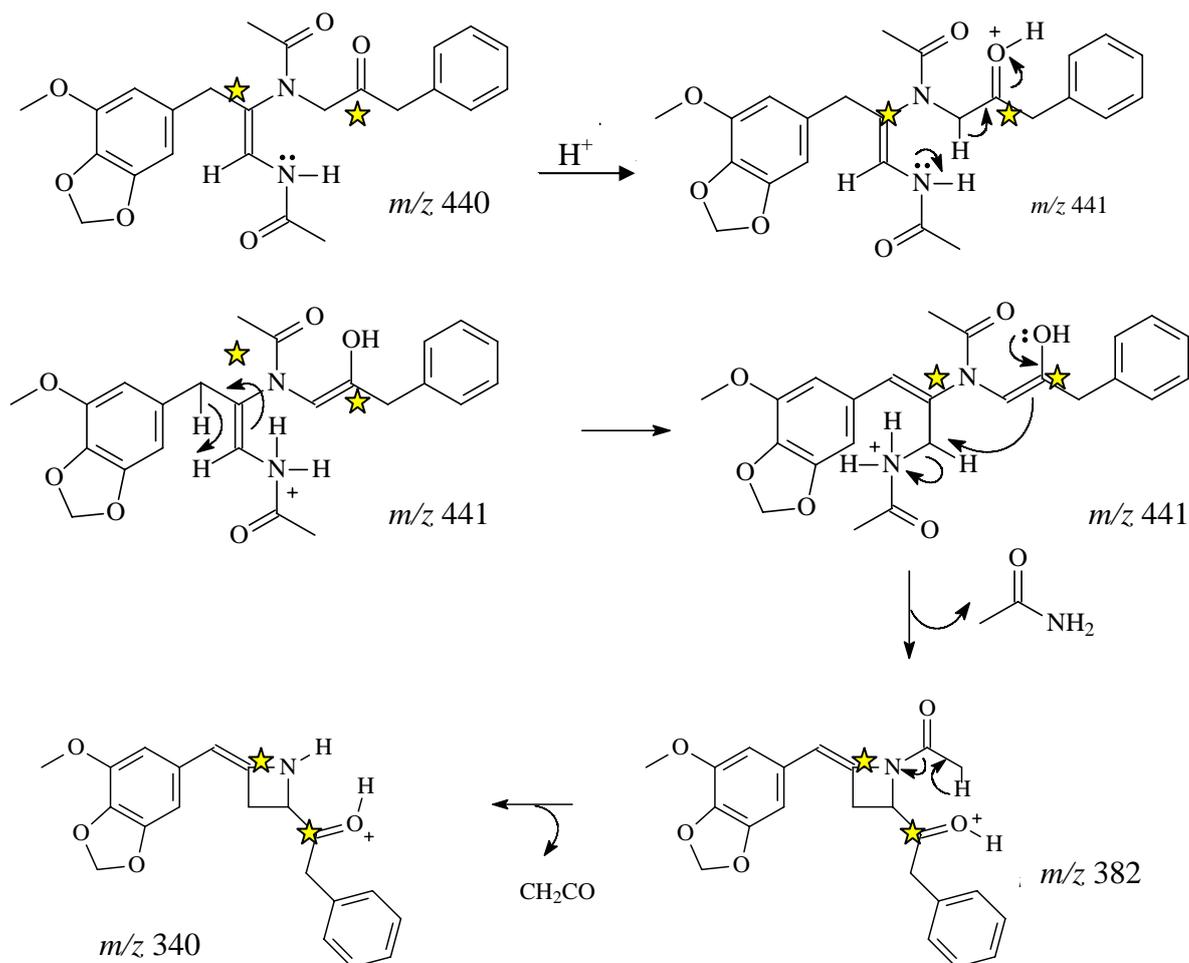


Esquema 4.6: Acoplamento dos precursores e formação da brasiliamida A.

A rota biossintética da substância brasiliamida A parece ocorrer através do caminho geral dos fenilpropanóides, os quais contêm boa parte das enzimas caracterizadas. O primeiro passo seria a formação do ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina via a ação da enzima Fenilalanina-amônioliase (PAL), dessa maneira, coerente com os resultados observados nos experimentos por HPLC/UV-MS. Os passos posteriores à formação dos esqueletos precursores (ácido cinâmico e ácido sináptico) são conseqüência de uma aminação redutiva, com formação de imina, conforme observado nos esquemas apresentados, seguida de reações de oxidação e redução. Finalmente os precursores que foram formados (esquema 4.6) se condensam através de um ataque nucleofílico à carbonila deficiente em elétrons com conseqüente eliminação de água. Enzimas acetil-Coa são responsáveis pela acetilação nos átomos de nitrogênio, levando a estrutura molecular da substância brasiliamida A apresentada.

Quando analisado, o mecanismo de fragmentação para a substância brasiliamida A com incorporação isotópica (Esquema 4.7), visualiza-se que os fragmentos estão de acordo com a rota biossintética estabelecida nos esquemas apresentados. Os carbonos enriquecidos são assinalados no esquema de fragmentação.

4. Resultados e Discussão

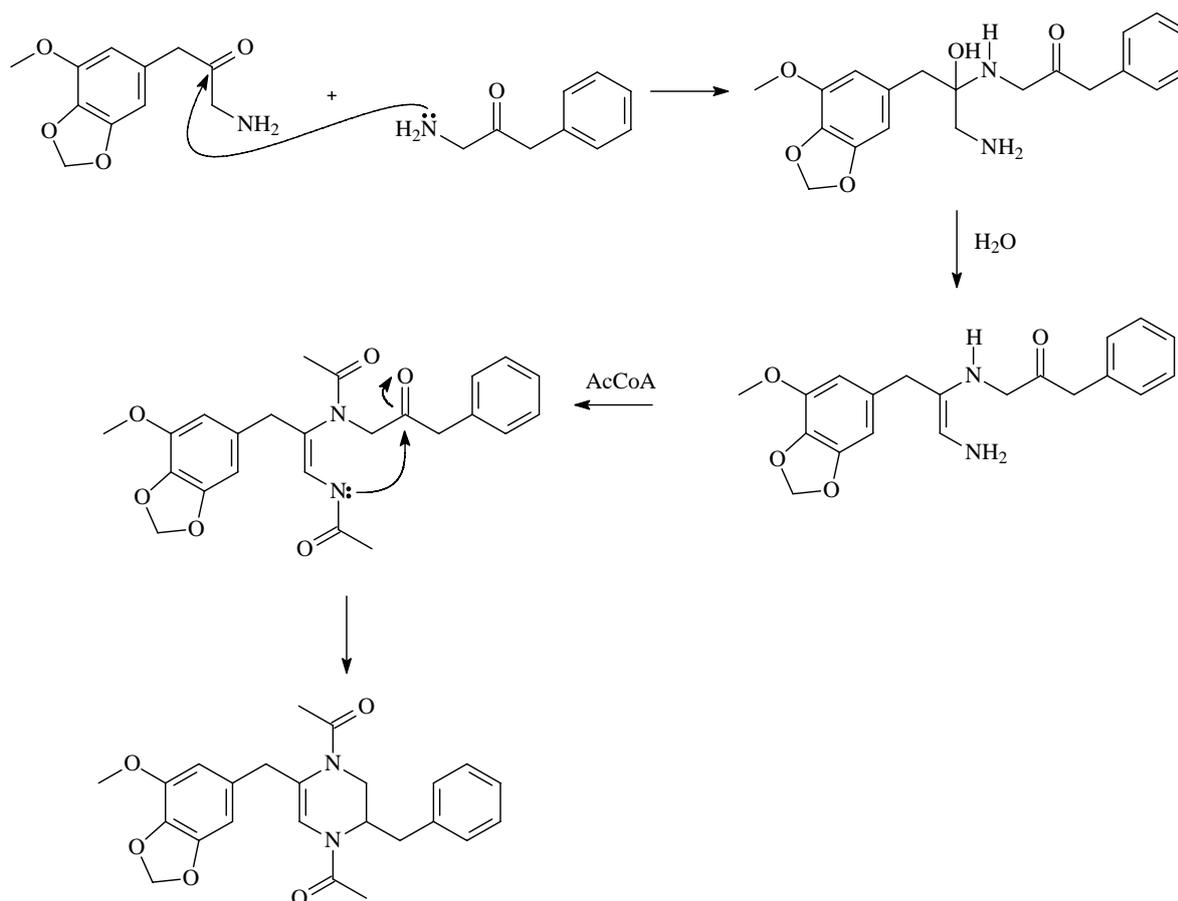


Esquema 4.7: Proposta de fragmentação para a substância brasiliamida A enriquecida com ¹³C no modo positivo.

Visualiza-se no esquema 4.7 que os carbonos enriquecidos da substância brasiliamida A são mantidos durante o mecanismo de fragmentação, a molécula não sofre clivagem nas ligações com estes átomos. Desta maneira a proposta de fragmentação é coerente com o espectro de íons produtos de AM 18, que visualiza 2 unidades de massas a mais que a molécula de brasiliamida A padrão.

Embora a substância brasiliamida B não tenha sido isolada dos extratos suplementados com o aminoácido L-fenilalanina marcado isotopicamente, foi proposta uma rota biogenética baseada nos dados de RMN ¹³C referentes à substância brasiliamida A e aos dados de espectrometria de massas. O esquema 4.8 mostra o acoplamento dos precursores ácido cinâmico e ácido sináptico para formação da brasiliamida B.

4. Resultados e Discussão



Esquema 4.8: Formação da substância bromilamida B.

4.3.10. Ensaio enzimático visando à detecção Fenilalanina amônioliase (PAL).

O micro-organismo *P. brasilianum* mostrou-se apto na produção de metabólitos secundários que tem sua rota biossintética derivada do caminho dos fenilpropanóides, metabólitos pouco comuns em micro-organismos. Para avaliar a ação da enzima fenilalanina amônioliase (PAL) e comprovação da rota biossintética estabelecida anteriormente (item 4.3.7) foram realizados ensaios enzimáticos conforme descrito no item 3.4.20 e a produção de ácido cinâmico a partir do aminoácido fenilalanina monitorados por HPLC/UV.

Uma vez desconhecido o comportamento da enzima em estudo, diferentes protocolos foram estabelecidos para extração enzimática. O primeiro destes protocolos estabeleceu o crescimento do micro-organismo sob agitação (120rpm) e após 5 dias de cultivo, o extrato foi centrifugado e as células remanescentes foram ressuspensas em tampão tris-HCl (pH 8.8), o extrato foi centrifugado novamente e sonicado em sonificador de membrana. O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se 5mL de extrato enzimático a 5 tubos Falcon e 5mL de L-fenilalanina

4. Resultados e Discussão

(2,5mM) em cada tubo. A extração foi realizada depois de 30min, 1h, 2h, 12h e 24h de reação adicionando-se 5mL de HCl para finalizar a reação em cada tubo. Em seguida foi adicionado 5mL de reagente álcool para extração do ácido cinâmico e depois de agitação, uma alíquota foi analisada por HPLC/UV e HPLC/UV-MS.

O protocolo 2 se diferencia do 1, pois não passou pelo sonicador, avaliando-se dessa forma a potencia do sonicador no rompimento das células do micro-organismo. Já no protocolo 3, o micro-organismo foi cultivado de maneira estática, no sentido de se avaliar o comportamento do micro-organismo e produção enzimática sem agitação e conseqüentemente, com uma demanda menor de oxigênio. O ensaio enzimático com adição de L-fenilalanina ao extrato enzimático e extração do ácido cinâmico com reagente álcool foram semelhantes ao protocolo 1.

Inicialmente foram estabelecidas as condições cromatográficas para o ácido cinâmico padrão (figura 4.55), numa coluna PHENOMENEX Synergi C18 utilizando-se como eluentes o MeOH e água, e o monitoramento do ácido cinâmico por UV se deu em 254 nm.

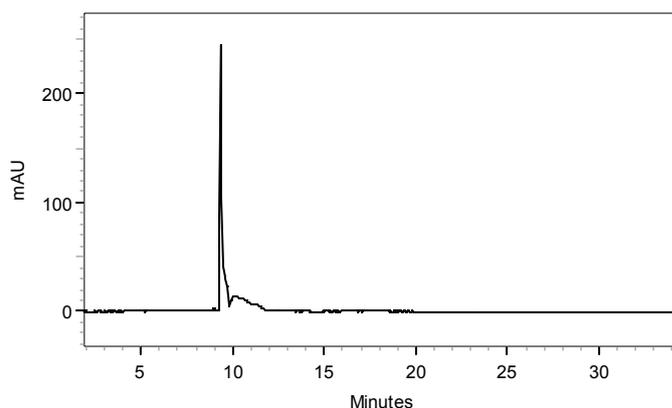


Figura 4.56: Cromatograma obtido para o ácido cinâmico padrão.

Em seguida, depois de otimizadas as condições cromatográficas, foram analisados os extratos referentes aos diferentes protocolos de extração e ensaios enzimáticos. Os extratos referentes aos protocolos 1 e 2 com o micro-organismo crescendo sob agitação não levou a produção de ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina, talvez devido a grande demanda de oxigênio no meio de cultura favorecer a formação de oxigenases. Entretanto, quando o micro-organismo é cultivado de maneira estática, observa-se a produção de ácido cinâmico como observado no cromatograma apresentado na figura 4.56 abaixo. Outra consideração importante observada é o tempo de reação enzimática, a fenilalanina foi convertida

4. Resultados e Discussão

em ácido cinâmico pela enzima Fenilalanina amônioliase (PAL) em 30 minutos de reação, após este período, ou seja, nas extrações depois de 1h, 2h, 12h e 24h não se observaram a formação do ácido cinâmico, houve a degradação deste composto (Figura 4.57).

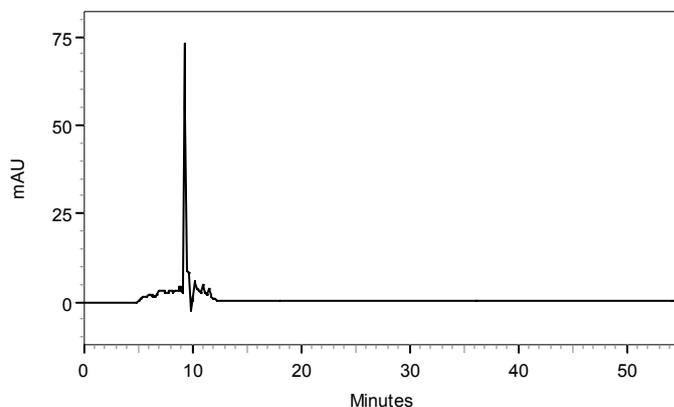


Figura 4.57: Cromatograma obtido para o extrato do protocolo 3 em 30min. Observa-se o produção de ácido cinâmico.

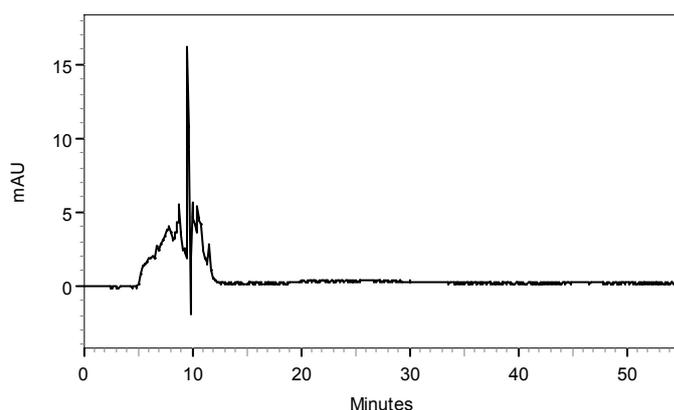


Figura 4.58: Cromatograma obtido para o protocolo 3 depois de 1h de reação. Observa-se que o ácido cinâmico produzido em 30 min foi degradado.

Dessa maneira, visualizam-se no metabolismo do micro-organismo *P. brasilianum* a produção da enzima fenilalanina amônioliase (PAL) e conseqüente formação de fenilpropanóides pelo micro-organismo. A rota biossintética das brasiliamidas fica estabelecida pelo caminho geral dos fenilpropanóides.

Foram realizados ainda, experimentos para verificar a produção de ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina por HPLC/UV-MS. Inicialmente foram realizadas análises para o ácido cinâmico padrão de massa molecular 148, dessa maneira, visualiza-se no espectro de íons produtos no modo negativo de ionização o

4. Resultados e Discussão

pico do íon molecular desprotonado com m/z 147, como visualizado no espectro apresentado na figura 4.58 abaixo, referente à análise do padrão.

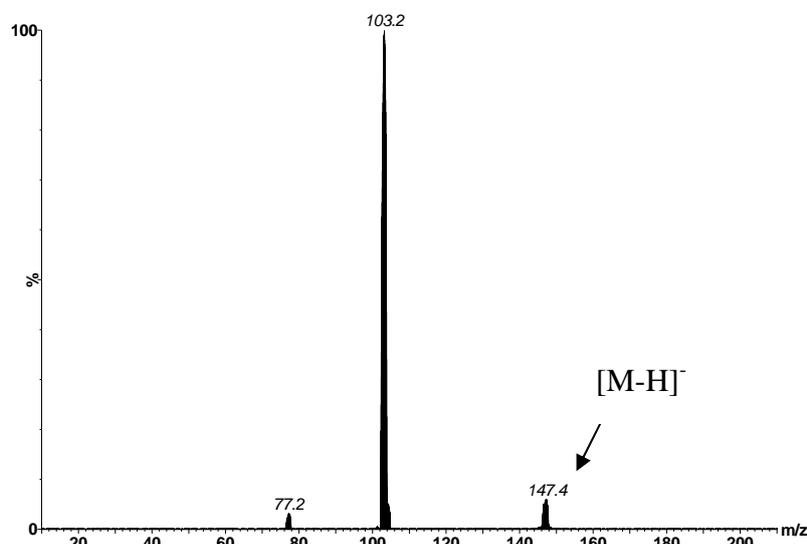


Figura 4.59: Espectro de íons produtos obtido no modo negativo de ionização para o ácido cinâmico.

Em seguida, depois de otimizadas as condições de ionização para o ácido cinâmico, os extratos referentes aos ensaios enzimáticos (Protocolos 1,2 e 3) foram analisados por MS/MS (Figura 4.59) observa-se a formação de ácido cinâmico apenas nos ensaios referentes ao protocolo 3, onde o micro-organismo foi cultivado de maneira estática. A reação enzimática ocorreu nos primeiros 30 minutos de reação, como verificado anteriormente.

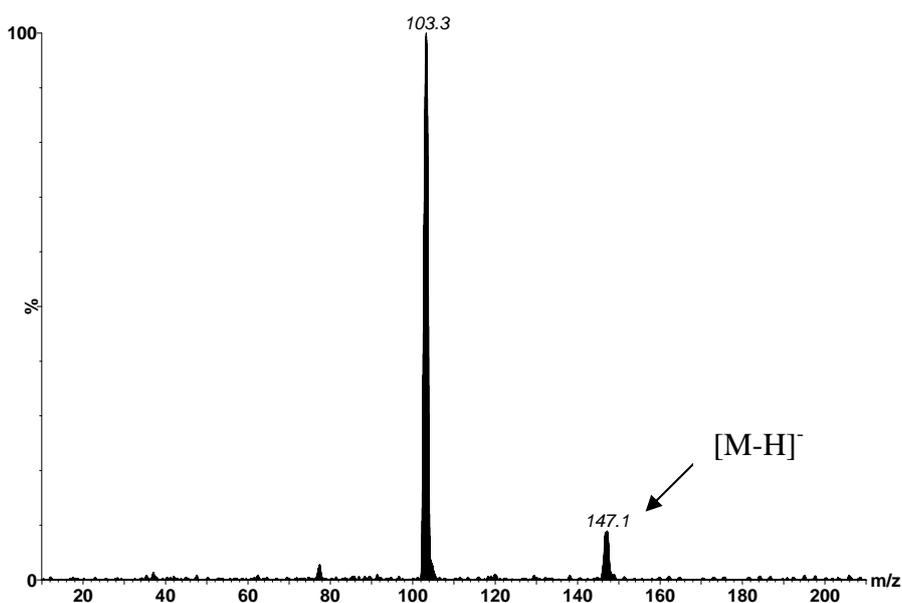


Figura 4.60: Espectro de íons produtos de m/z 147 referente ao protocolo 3 nos 30 min de reação.

4. Resultados e Discussão

As análises por MS/MS dos ensaios enzimáticos indicaram a formação de ácido cinâmico a partir do aminoácido L-fenilalanina, assim como verificado nas análises por HPLC/UV, comprovando a produção da enzima PAL pelo fungo *P. brasilianum*.

4.4. Ensaio biológico da substância brasiliamida A (Placa de Elisa).

A substância brasiliamida A isolada como metabólito secundário do fungo *P. brasilianum* foi ensaiada anteriormente frente à bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*, neste caso, fez-se um ensaio preliminar em placa de Petri contendo meio BHI mais a bactéria teste, onde se adicionou a substância na concentração de 1mg/mL. Esta substância apresentou halo de inibição como mostrado na figura 4.60, e em seguida foi ensaiada em placa de Elisa para se determinar a concentração mínima inibitória deste composto (MIC).



Figura 4.61: Ensaio de antibiose frente à bactéria *Bacillus subtilis*.

O aparecimento de turvação nas cavidades da placa de Elisa indica crescimento da bactéria e conseqüente ausência de atividade por parte da substância. Por outro lado, a ausência de turvação indica alguma atividade, bactericida ou bacteriostática, para a confirmação da atividade adicionou-se o corante TTC a 2% em cada cavidade, o aparecimento de coloração vermelha indica o crescimento de bactéria, portanto, sem ação. Onde não houve o aparecimento de coloração fez-se semeadura em placas de Petri contendo meio BHI para confirmar a atividade por parte da substância, que pode ser bacteriostática, onde a substância apenas inibe o crescimento das colônias, mas retirada às bactérias da presença

4. Resultados e Discussão

desta substância elas voltam a se multiplicar, ou bactericida, onde a substância causa morte das bactérias.

O experimento pode ser observado abaixo (Figura 4.61), e a concentração mínima inibitória para a substância brasiliamida A pode ser verificada como 250µg/mL frente a bactéria *Bacillus subtilis*. Observa-se nas placas de Petri obtidas da semeadura, que esta substância apresenta atividade bacteriostática, uma vez que as bactérias voltam a se multiplicar (Figura 4.62).

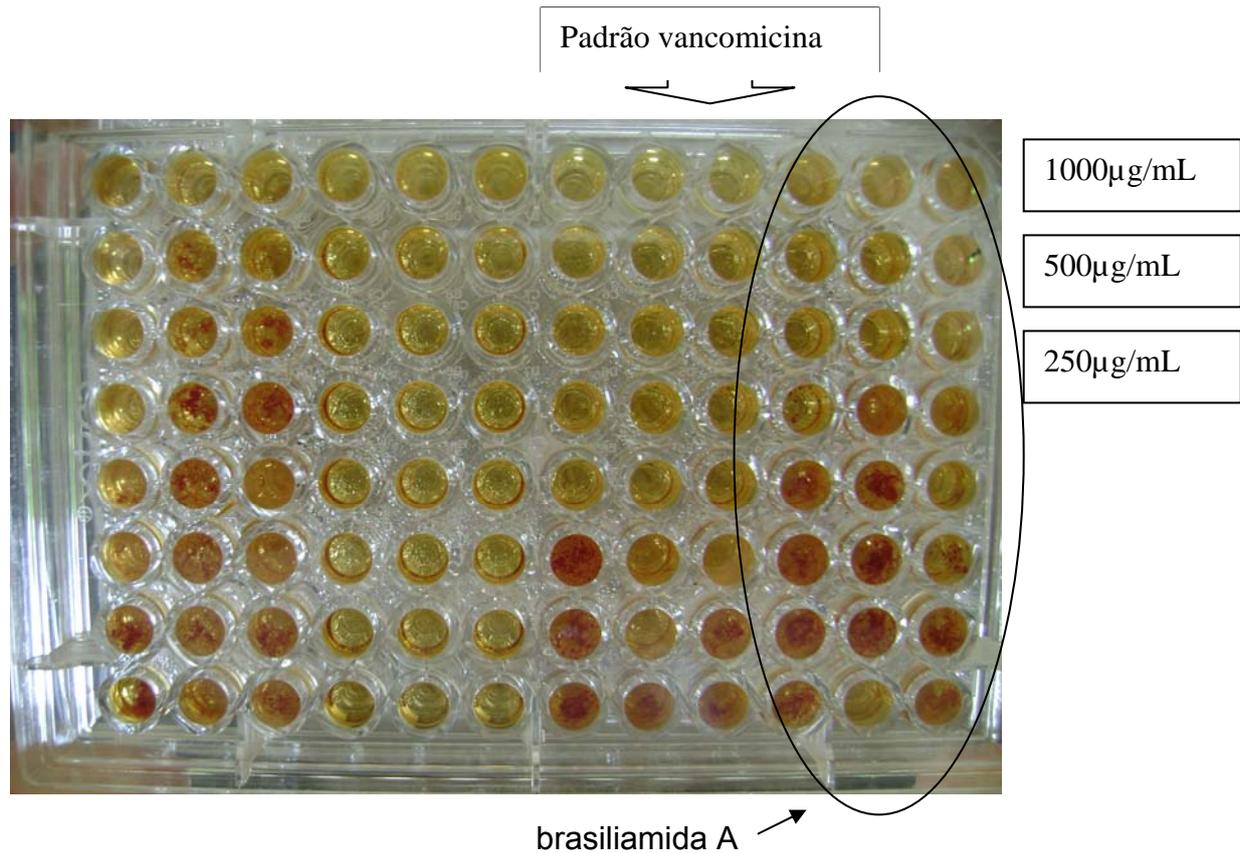


Figura 4.62: Determinação da MIC para a substância brasiliamida A.

4. Resultados e Discussão



Figura 4.63: Atividade bacteriostática da substância brasiliamida A.

Embora a atividade encontrada para a substância brasiliamida A seja baixa, inúmeras modificações estruturais podem ser realizadas no intuito de aumentá-la, e dessa maneira, esta substância poderia sugerir ou inspirar a síntese de outros compostos antimicrobianos.

4.5. Estudo de amidas produzidas por outra espécie de *Penicillium*.

4.5.1 Análises por espectrometria de massas dos extratos obtidos do cultivo do fungo *Penicillium* sp.

Como dito anteriormente, depois de inúmeras buscas no Sci finder, verificou-se que não existem relatos na literatura de análises deste grupo de substâncias (GKK1032s), por Espectrometria de massas. Existem apenas trabalhos relacionados ao isolamento e caracterização desta classe de substâncias. Em estudos anteriores, realizados no grupo LaBioMMi por Marinho (2002), verificou-se a produção da substância GKK 1032 B pelo micro-organismo *Penicillium* sp. e foram realizados trabalhos iniciais envolvendo este composto. Neste sentido, na primeira etapa do trabalho, foram realizados experimentos de *full scan* na tentativa de se determinar as melhores condições nas análises. Uma vez determinadas, partiu-se para experimentos de íons produtos (Figura 4.63) para o estudo de fragmentação destes compostos por *electrospray* (ESI) no modo negativo e decomposição induzida por

4. Resultados e Discussão

colisão (CID). A partir desses dados, pôdem-se determinar os parâmetros para os experimentos de SRM na tentativa de identificar a substância GKK1032 B nos extratos obtidos do cultivo do fungo nos meios de cultura arroz e Czapek, que foram pré-purificados através de SPE com os eluentes descritos em 3.5.5.

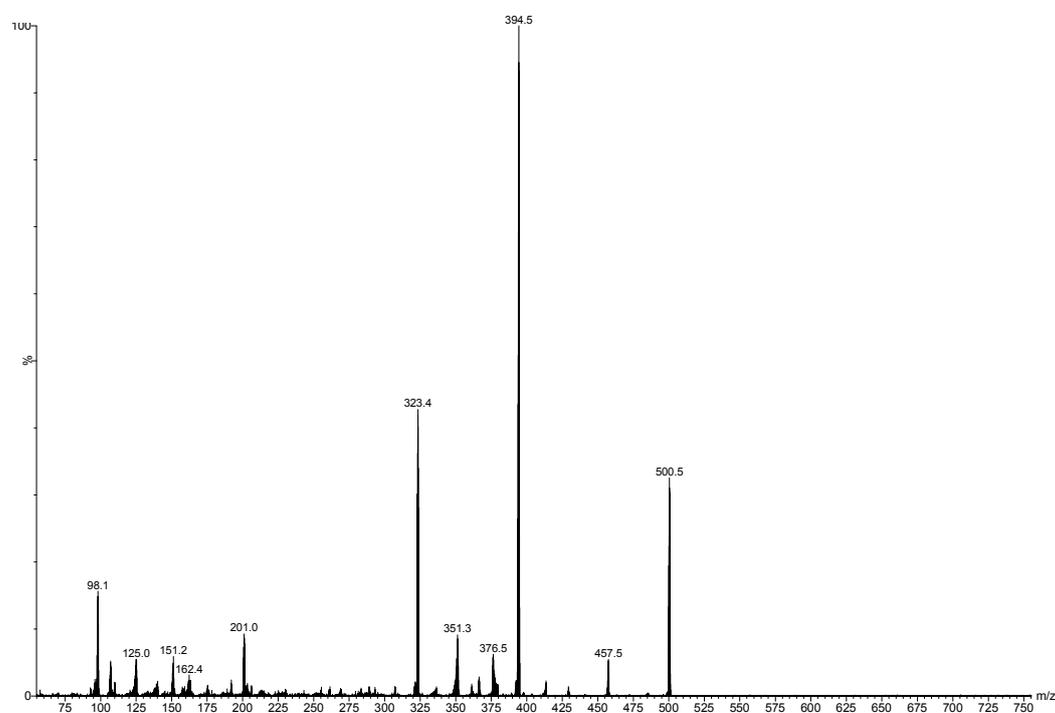


Figura 4.64: Espectro de íons produtos para a substância GKK1032 B no modo negativo.

A proposta de fragmentação para a molécula GKK1032B no modo negativo de ionização pode ser verificada na figura 4.64 abaixo:

4. Resultados e Discussão

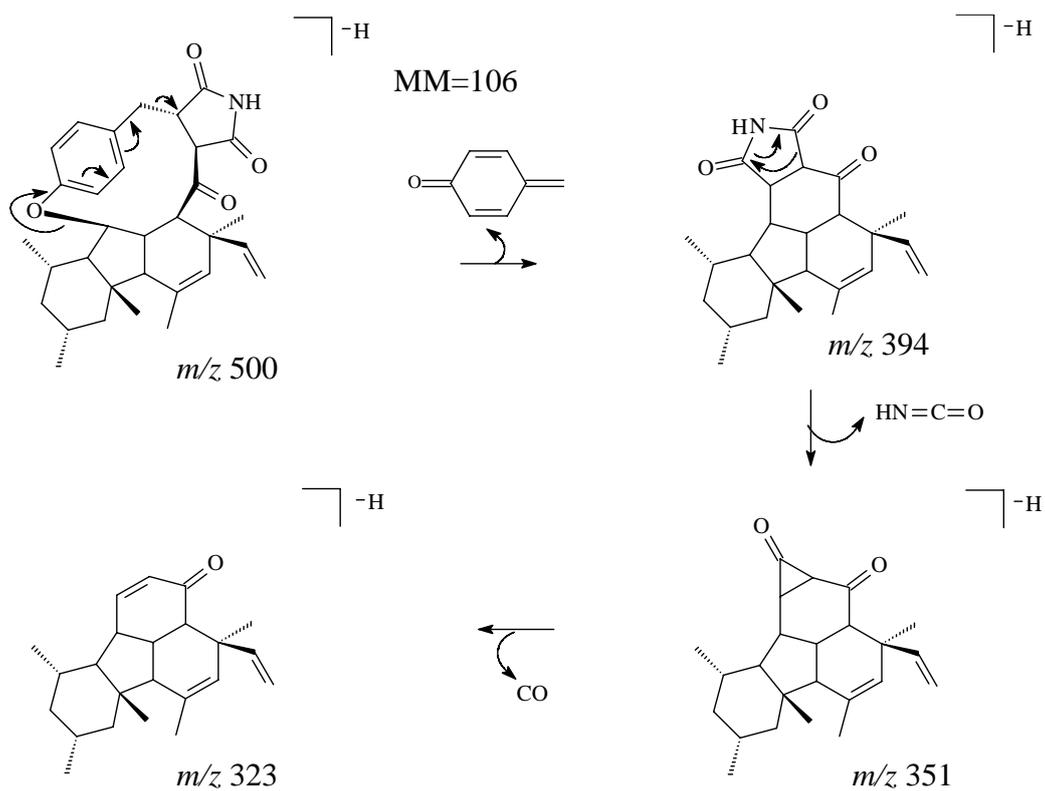


Figura 4.65: Proposta de fragmentação para o composto GKK1032 B no modo negativo.

Para verificar a viabilidade do micro-organismo em estudo e a produção de GKK1032 B nos diferentes meios de cultura, realizaram-se experimentos de SRM para detectá-la nos extratos. As análises dos extratos de arroz, filtrado obtido por filtração a vácuo do meio Czapek e ainda a parte etanólica do micélio são observadas nas figuras 4.65, 4.66 e 4.67 abaixo:

4. Resultados e Discussão

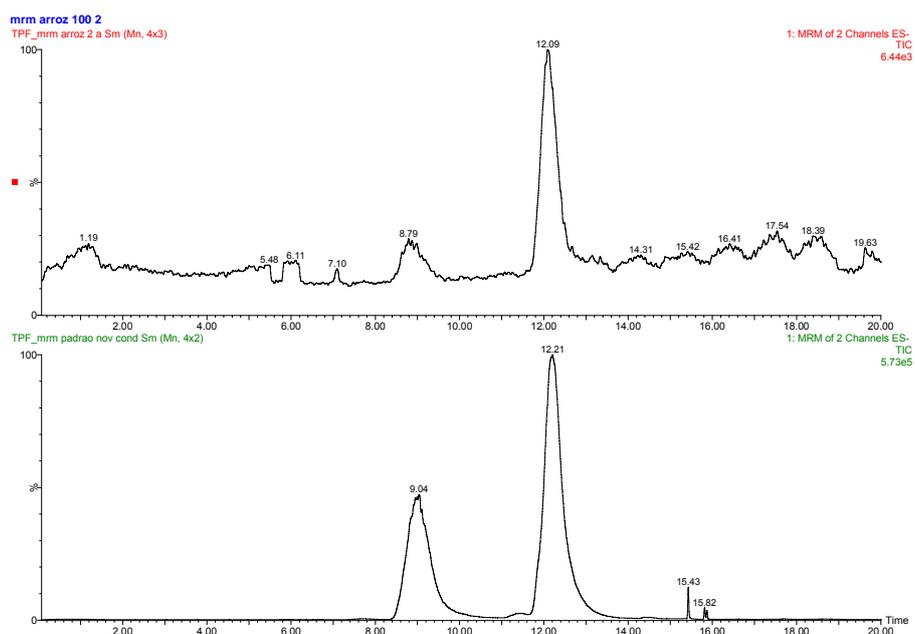


Figura 4.66: Experimentos de SRM para o extrato de arroz e para o padrão de GKK 1032B respectivamente.

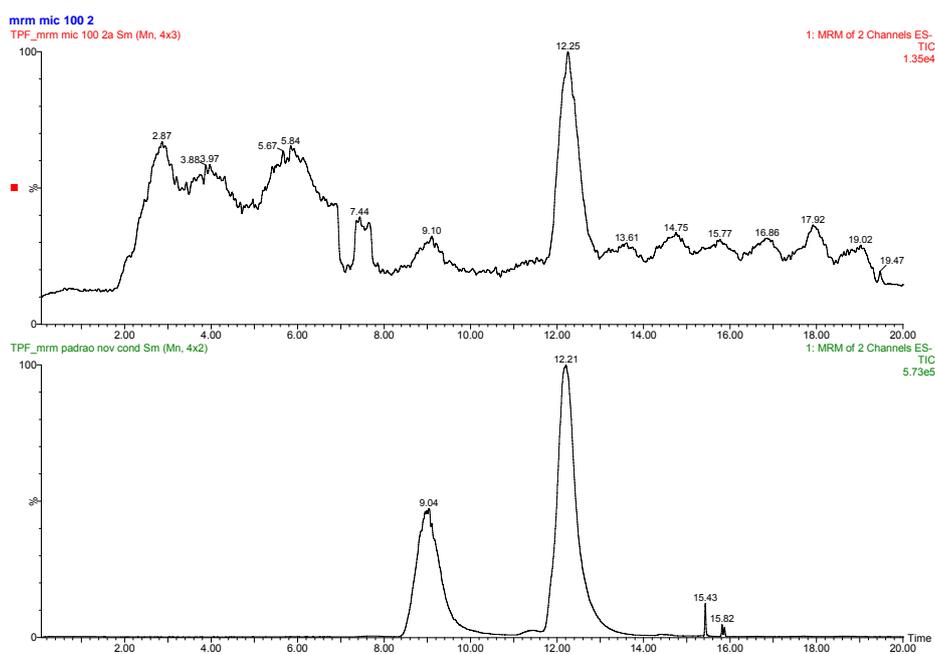


Figura 4.67: Experimento de SRM para a parte micelial analisada e para o padrão de GKK 1032B respectivamente.

4. Resultados e Discussão

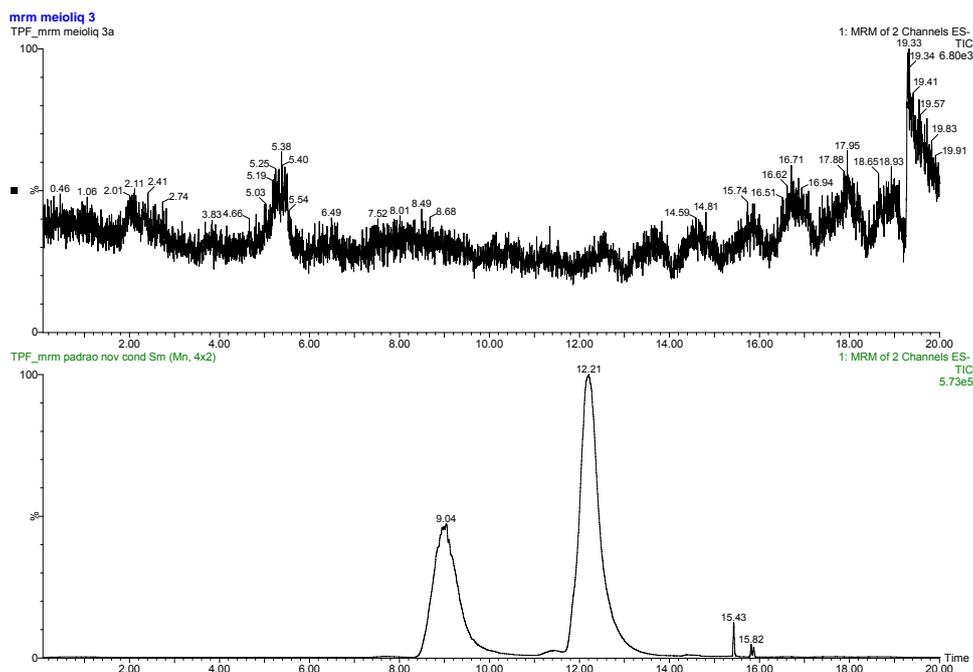


Figura 4.68: Experimento de SRM para o extrato do filtrado do meio líquido e para o padrão de GKK 1032B respectivamente.

Como pode ser observado nas figuras acima, o fungo *Penicillium* sp., foi apto na produção da substância GKK1032 B nos meios de cultura arroz e na parte micelial, quando este foi cultivado em meio líquido. Entretanto, a molécula GKK1032 B não foi observada no extrato do filtrado (Figura 4.67). A substância em estudo apenas foi verificada nos extratos que foram eluídos com 100% de MeOH na pré-purificação realizada em SPE, isto devido a baixa polaridade deste composto.

Observa-se nos cromatogramas tanto no padrão, quanto nos meios de cultura analisados, obtidos a partir dos experimentos de SRM, a presença de duas bandas cromatográficas, isso se deve provavelmente à presença de um possível isômero da molécula GKK1032 B. Esta observação se baseia no fato destas bandas cromatográficas possuírem tempos de retenção distintos, enquanto apresentam a mesma massa molecular e mesma fragmentação.

Na tentativa de verificar a presença de outros compostos com estruturas similares (GKK1032s), analisou-se com mais atenção à amostra padrão da substância GKK1032 B, realizando-se experimentos de *full scan* e íons produtos. Os resultados obtidos encontram-se na figura 4.68 abaixo:

4. Resultados e Discussão

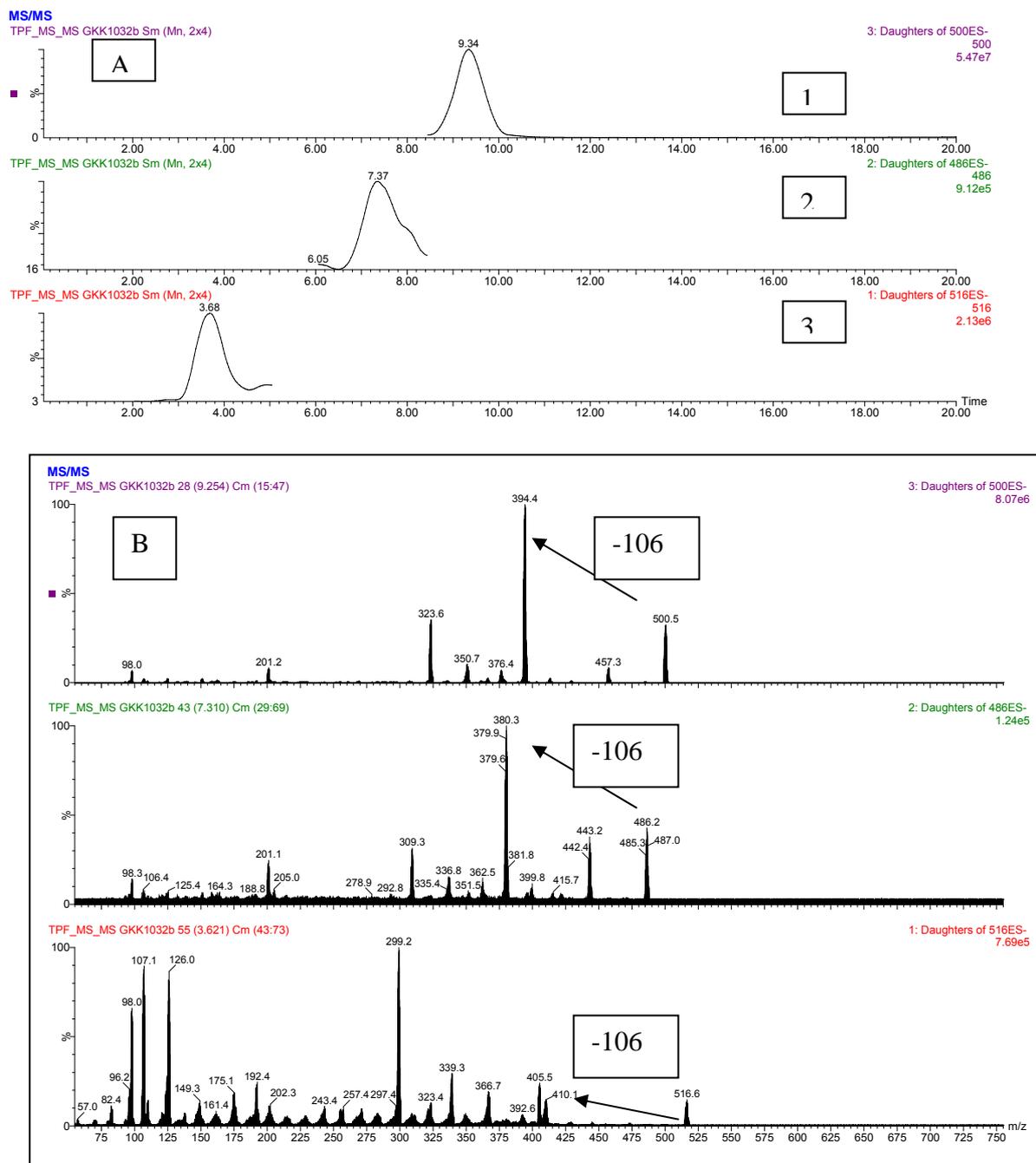


Figura 4.69: Cromatogramas referentes aos experimentos de íons selecionados e abaixo espectro de íons produtos para cada um dos íons selecionados.

Em A observa-se os cromatogramas de íons selecionados, onde em 1, o íon selecionado foi o m/z 500, que corresponde à substância GKK1032 B, em 2 selecionou-se o íon m/z 486, e em 3 selecionou-se o íon m/z 516. Quando se analisa o espectro de íons produtos da molécula GKK1032 B e os espectros de íons produtos para os íons selecionados m/z 486 e m/z 516, verificam-se a mesma perda característica do composto GKK1032 B (Eliminação de 106 unidades de massa).

4. Resultados e Discussão

Indicando semelhanças nos mecanismos de fragmentação, o que poderia sugerir que estes compostos possam ser da mesma classe GKK1032, sendo correspondentes às moléculas GKK1032 A₁ e Pirrocidina A, que apresentam as massas moleculares 517 e 487 respectivamente (item 1.6).

4.5.2 Cultivo do micro-organismo *Penicillium* sp. em meio líquido com a adição de aminoácidos no meio de cultura.

Estudos visando à indução da biossíntese de metabólitos secundários foram realizados no trabalho com o objetivo de otimização de metabólitos bioativos. Neste caso, avaliam-se as mudanças no metabolismo do micro-organismo pela adição de aminoácidos e outras fontes nitrogenadas ao meio de cultura.

Dessa maneira, o estudo do efeito dos aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina, no metabolismo secundário do fungo *Penicillium* sp., e na produção dos policetídeos da classe GKK 1032, foi realizado cultivando-se este micro-organismo em meio líquido Czapek com a adição de 25 mg de cada um dos aminoácidos testados em frascos de Erlenmeyer. Três frascos foram mantidos como controle sem a adição de aminoácidos. Os extratos foram analisados por HPLC/UV-MS/MS com ionização por *Eletrospray* no modo positivo.

Verificou-se por MS/MS a influência dos aminoácidos testados na produção da substância GKK1032 B (Figura 4.69), e um possível isômero da mesma classe, pelo fungo endofítico *Penicillium* sp., observa-se nos cromatogramas obtidos com detecção por SRM que a adição de ambos os aminoácidos ao meio de cultura aumenta a produção destes compostos, fato comprovado pelo aumento das áreas dos picos analisados nos cromatogramas, sugerindo-nos que o micro-organismo poderia utilizar estes aminoácidos em seu metabolismo ou incorporá-los na produção destes policetídeos.

4. Resultados e Discussão

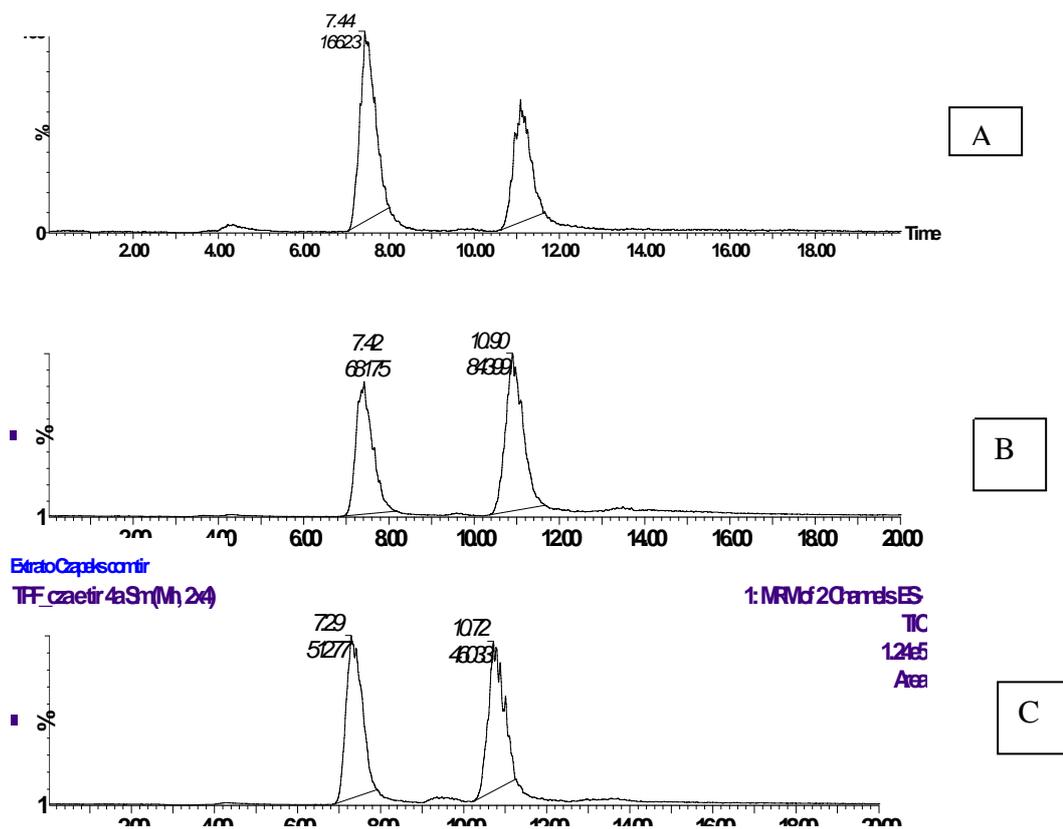


Figura 4.70: Cromatograma de SRM dos meios de cultura (a) sem adição de aminoácidos, (b) L-fenilalanina e (c) L-tirosina.

5. CONCLUSÕES

Concluiu-se através dos estudos de biossíntese das amidas bis-fenilpropanoídicas através da adição de L-fenilalanina isotopicamente marcada ao meio de cultivo, que o fungo *Penicillium brasilianum* produz metabólitos secundários via caminho dos fenilpropanóides, metabólitos raros em microorganismos que apresentam inúmeras atividades biológicas. O primeiro passo da rota biossintética foi avaliado via ensaios enzimáticos da enzima Fenilalanina amônioliase (PAL), e o micro-organismo mostrou grande grau de conversão do aminoácido L-fenilalanina em ácido cinâmico. A enzima PAL apresenta inúmeras aplicações comerciais e devido ao pequeno ciclo de vida e a fácil adaptação dos micro-organismos em diferentes meios, a produção de PAL pelo fungo é muito interessante.

As amidas bis-fenilpropanoídicas, brasiliamida A e B, foram isoladas a partir do extrato fúngico e apresentaram atividade contra a bactéria *Bacillus subtilis* em ensaios realizados durante o trabalho (MIC=250µg/mL). Outros metabólitos secundários co-produzidos as brasiliamidas foram isolados e identificados como o alcalóide verruculogenina, o ácido penicílico e meroterpenos inseticidas.

Através dos estudos da otimização dos parâmetros de cultivo do fungo *Penicillium brasilianum* concluiu-se que a máxima produção de brasiliamida A ocorre aos trinta e três dias de cultivo e o início da produção se dá nos dois primeiros dias de experimento. Verificou-se que o aminoácido L-fenilalanina influencia na produção das amidas aumentando a concentração destas no meio de cultura. Concluiu-se que a adição do aminoácido L-fenilalanina durante a inoculação do micro-organismo aumentam o rendimento da produção de brasiliamida A no meio e a concentração ótima do aminoácido no meio de cultura é de 5g/L.

Verificou-se a viabilidade do micro-organismo *Penicillium* sp. isolado de *Murraya paniculata* em produzir os compostos da classe GKK1032. Através das análises dos extratos observa-se que o micro-organismo foi apto na produção da substância GKK1032 B assim como outros policetídeos da classe GKK1032. Concluiu-se que a produção dos policetídeos pelo micro-organismo é dependente da adição de aminoácidos ao meio de cultura.

6. Bibliografia

6. Bibliografia

6- Bibliografia

AGRIOS, G.N. Plant Pathology, 3rd edition. Academic Press, New York, 1989.

BACHER, M., HOFER, O., BRADER, G., VAJRODAYA, S., GREGER, H. "Thapsakins: possible biogenetic intermediates towards insecticidal cyclopenta[b]benzofurans from *Aglaia edulis*" *Phytochemistry* **52**: 253-263, 1999.

BARROS, F.A.P. RODRIGUES E. F^o, "Four spiroquinazoline alkaloids from *Eupenicillium* sp. isolated as an endophytic fungus from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae)". *Biochemical Systematics and Ecology* **33** (2005) 257–268, 2005.

BJORN, H., BETHE, B., ZEECK, A., "Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity" *ChemBioChem* **3**: 619 – 627, 2002.

CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, L.H.; BOLZANI, V.S. "Antifungal compounds of *Xylaria* sp., an endophytic fungus isolated from *Palicourea marcgravii*" *Química Nova*, **28**, 2005.

CAMPOS, F.R., "Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* E *Microspora* sp. Isolados como microorganismos endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)" UFSCAR, 2005, Tese de doutorado, São Carlos.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação. 1. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77 p.

CROTTI, A. E. M., VESSECCHI, R., CALLEGARI, J.L., LOPES, N.P., "Espectrometria de massas com ionização por "ELECTROSPRAY": Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular", *Quim. Nova* **29**, No. 2, 287-292, 2006.

6. Bibliografia

- CRUEGER, W & CRUEGER, A. *A Textbook of Industrial Microbiology*, 1984.
- DIXON, R.A., PAIVA, N.L., "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism", *The Plant Cell* **7**: 1085-1097, 1995.
- EICKMAN, N., CLARDY, J., COLE, R.J. & KIRKSEY, J.W. "Structure of Fumitremorgin" *Tetrahedron Letters*, **12**:1051-1054, 1975.
- FILL, T. P., PEREIRA, G.K., SANTOS, R.M.G., RODRIGUES F^o, E. "Four Additional Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp Found in Association with *Melia azedarach*: Possible Biosynthetic Intermediates to Austin" *Z. Naturforsch.*, **62b**, 1035 – 1044, 2007.
- FILL, T. P.; Rodrigues-Filho, E.; MAGANHI, S. H., ZUCKERMAN, J.; "Preaustinoid A a meroterpene produced by *Penicillium* sp", *Acta Crystallographica*, **E65**, o221, 2009.
- FILL, T.P., Relatório científico (bolsa FAPESP, 2005-2006, PN 2005/02955-1).
- FUJITA, T., MAKISHIMA, D., AKIYAMA, K. & HAYASHI, H. "New convulsive Coumpounds, Brasiliamides A and B, from *penicillium brasilianum* Batista JV-379" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66** (8):1697-1705, 2002.
- FUJITA, T., HAYASHI, H., "New Brasiliamide Congeners: Brasiliamides C,D and E form from *penicillium brasilianum* Batista JV-379" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68** (4):820-826, 2004.
- GLOER, J. B., Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In *The Mycota. Vol. IV. Environmental and Microbial Relationships* (D. T. Wicklow & B. E. Soderstrom, eds): 249±268. Springer-Verlag, New York, 1997.

6. Bibliografia

- GRAYER, R.J.&KOKUBON, T. "Plant Fungal Interactions: The search for Phytoalexins and Other Antifungal Compounds from Higher Plants" *Phytochemistry*. **56**: 253-263,2001.
- HARBORNE, J.B. & TOMAS-BARBERAN, F. A. *Ecological Chemistry and Biochemistry of plants terpenoids*. 1st ed. Oxford, Claredon Press, 1991.
- HARVEY, A., "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products" *Drug. Discov. Today.*, **5**(7): 294-300, 2000.
- HE, H. Y.; YANG, H. Y.; BIGELIS, R.; SOLUM, E. H.; GREENSTEIN, M.; CARTER, G. T. *Tetrahedron Lett.* 2002, **43**, 1633-1636.
- KEEN, N.T.; HOLLIDAY M.J, & YOSHIKAWA, M. " Effects os Glyphosate on Glyceollin Production and the Expression of resistance to *Phytophthora megasperma* Fsp Glycina in Soybean" *Phytophatology*, **72** (11):1467-1470,1982.
- KOUKOL, J., CONN, E.E., "Metabolism of aromatic compounds in higher plants: IV Purification and properties of phenylalanine deaminase of *Hurden vulgare*" *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692-2698.
- KOZLOVSKII, A. G., ZHELIFONOVA, V. P., ANTIPOVA T. V., "The effect of some amino acids on the growth and biosynthesis of ergot alkaloids and quinocitrinis in the fungus penicillium citrinum" *Microbiology* **75**, 3, 279-285, 2006.
- LEE, B.H., CLOTHIER, M.F., "C24 and C25 substitutes marcfortine derivates" *Bioorganic & Med. Chemistry Letters*, **8**: 3415-3418, 1998.
- LICHTENSTEIN, E.P., CASIDA, J.E., "Myristicin, an inseticide and synergist occurring naturally in the edible parts of parsnips" *J.Agric. Food Chem.*, **11**: 410-415, 1981.

6. Bibliografia

- LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia: Tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blucher, 1975 p. 1-18.
- MACDONALD, M.J., D'CUNHA, J.B., "A modern view of phenylalanine ammoniolyase", *Biochem. cell biol.* **85**, 273-282, 2007.
- MAGNANI, R. F. "Contribuições ao entendimento do conceito de microrganismos endofíticos: biotransformação de ácido abiético por *Fusarium graminearum*; estudo químico de *Pestalopsis* sp.; e estudo da doença pinta-preta em *Citrus* causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*" UFSCar, 2002, Dissertação de Mestrado, São Carlos.
- MARINHO, A.M.R. "Investigação química e propriedades biológicas dos extratos do fungo *Penicillium janthinellum* associado como endofítico aos frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE)" UFSCAR, 2002, Dissertação de mestrado, São Carlos.
- MASUMA, R., TANAKA, Y., TANAKA, H., OMURA, S., "Production of nanomycin and other antibiotics by phosphate-depressed fermentation using phosphate-trapping agents". *J. Antibiot.*, **39**, 1557 – 1564, 1986.
- MASUMA, R., TANAKA, Y., OMURA, S., "Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic", *J. Ferment. Technol.*, **61**, 607 – 614, 1983.
- MASUREKAR, P. S. IN: FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. *Biotechnology of filamentous fungi: technology and products*. Boston: *Butterworth-Heinemann* p. 241-301, 1992.
- MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. *Interpretation of mass spectra*. California: University Science Books, 1993.

6. Bibliografia

- MIAO, L., KWONG, T.F.N., QIAN, P.Y., "Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium* c.f. *Saccharicola*", *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 1063–1073, 2006.
- MURGU,M. "Saponinas e glicosídeos de *Sapindus saponaria*: Metodologias de análise por espectrometria de massas e relação com fungos endofíticos" UFSCar, 2002, Tese de doutorado, São Carlos, pp. 132.
- NOSOV, A. M. "Functions of plant secondary metabolites *in vivo* and *in vitro*". *Russian Journal of Plant Phisiology*, **41** (6): 767-771, 1994.
- NUGROHO, B.W., EDRADA,R.A.,"An insecticidal rocaglamide derivatives and related compounds from *Aglaia odorata* (Meliaceae)", *Phytochemistry* **51**:367-376, 1999.
- OIKAWA, H., "Biosynthesis of Structurally Unique Fungal Metabolite GKK1032A2: Indication of Novel Carbocyclic Formation Mechanism in Polyketide Biosynthesis" *J. Org. Chem.* 2003, **68**, 3552-3557.
- OMURA, S., IWAI, Y., "OM-704A, a new antibiotic active against Gram-positive bacteria produced by *Streptomyces* sp.", *J. Antibiot.*, **35**, 1425 – 1429, 1982.
- PASTRE, R., MARINHO, A. R., RODRIGUES Fº, E. "Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* E *Murraya paniculata*" *Quim. Nova* **30**, No. 8, 1867-1871, 2007.
- PELCZAR,M.;REID,R.&CHAN,E.C.S. *Microbiologia*. Vol.1 e 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.

6. Bibliografia

- RITTER, H., SCHULZ, G. E., “Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase”, *The Plant Cell*, **16**, 3426–3436, 2004.
- SAUNDERS, J.A., O’NEILL, N.R., “The characterization of defense responses to fungal infection in alfalfa”, *BioControl*. **49**: 715–728, 2004.
- SANTOS, R. M. G. “Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)”. UFSCar, 2003, Tese de Doutorado, São Carlos.
- SCHULZ, B., BOYLE C., DRAEGER, S., ROMMERT A., KROHN K., “Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites”, *Mycol. Res.*, **106** (9), 996-1004, 2002.
- SESHIME, Y., JUVVADI, P. R., FUJII, I., KITAMOTO, K.; “Genomic evidences for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **337**, 747–751, 2005.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER,G.C., MORRIL,T.C.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, Wiley & Sons. 5ª. edição. 1994, p. 85-120.
- SIUZDAK, G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego: Academic Press, 1996.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F., J., NIEMAN, T., A., Princípios de Análise instrumental. Porto Alegre, Bookman. 5ª edição. 2002, p.445-474.
- SOUZA, A.Q.L., SOUZA, A.D.L., ASTOLFI, S., PINHEIRO, M.L.B., SARQUIS, M.I.M., PEREIRA, J.O., “Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham” *Acta Amazônica*, **34**(2): 185 – 195, 2004.

6. Bibliografia

- STIERLE, A., STROBEL, G. "The Search for a Taxol-producing microorganism among the Endophytic Fungi of the pacific Yew, *Taxus brevifolia*" *Journal of natural products*, **58**(9): 1315-1324,1995.
- STONE, J. K. BACON, C.W., White, J. F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined, ed. C. W. Bacon and J. F. White, Jr., M. Dekker, Inc., New York, 2000, pp. 3–5.
- STROBEL, G., HESS, W.M., FORD, E., SIDHU, R.S. & YANG, X. "Taxol from Fungal Endophytes and the Issue of Biodiversity" *Journal of Industrial Microbiology & Biothechnology*, **17**(5-6): 417-423, 1996.
- STROBEL, G. "Microbial gifts from rain forests". *Canadian Journal Plant Pathology*, **24**: 14-20, 2002.
- SURYNARAYANAN, T.S.; KUMARESAN, V.& JOHSON, J.A. "Foliar Fungal Endophytes from Two Species of the Mangrove *Rhizophora*" *Canadian Journal of microbiology*, **44**: 1003-1006,1998.
- TAYLOR, D.A.H. "The Chemistry of the limonoids from meliaceae". *Prod.Chem.Org.Nat.Prod.*, **45**: 1-102,1984.
- TURNER, W.B. "Commercially important Secondary Metabolites" IN:Smith,J.E& Berry, D.K.; "*The Filamentous Fungi,Industrial Mycology*". Wiley I: 1975,p.122-142.
- TURNER, W.B., ALDRIDGE, D.C., *Fungal Metabolites II*. Academic Press, London, 1983.
- TURNER, W. B. "Commercially Important Secondary Metabolites" IN: Smith, J. E. & Berry, D. K.; "*The Filamentous Fungi, Industrial Mycology*". Wiley 1: 1975, p. 122-142.

6. Bibliografia

VERPOORTE, R., van der HEIJDEN, R., ten HOOPEN, H. J. G. & MEMELINK, J. "Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathway for production of fine chemicals". *Biotechnology Letters*, **21** (6): 467-479, 1999.

YUE, H., YUAN, Q., WANG, W., "Purification of phenylalanine ammonia-lyase in PEG1000/Na₂SO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction", *Biochemical Engineering Journal* **37**: 231–237, 2007.

ZHANG, H. W., SONG, Y.C., TAN, R.X., "Biology and chemistry of endophytes", *Nat. Prod. Rep.*, **23**: 753–771, 2006.

ZHNER, H., KURTH, R., in *Overproduction of Microbial Products* (Eds.: V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek), Academic Press, London, 1982, pp. 167 - 179.

ZOBERI, M.H." *Tropical Macrofungi*. 1st ed. London, The MacMillian Press, 1972.