

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

**ANÁLISE DOS CONSTITUINTES FIXOS E
VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Xylaria* E DE
SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS**

FLORISVALDO CLEMENTINO SANTOS FILHO*

*** BOLSISTA CNPq**

SÃO CARLOS-SP

2010

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

**ANÁLISE DOS CONSTITUINTES FIXOS E
VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS
GÊNEROS *Penicillium* E *Xylaria* E DE SUAS
PLANTAS HOSPEDEIRAS**

FLORISVALDO CLEMENTINO SANTOS FILHO*

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 CNPq**

SÃO CARLOS-SP

2010

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

S237ac

Santos Filho, Florisvaldo Clementino.

Análise dos constituintes fixos e voláteis de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e de suas plantas hospedeiras / Florisvaldo Clementino Santos Filho. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
180 f.


Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Fungos endofíticos. 2. Biodiesel. 3. Espectrometria de massas. 4. Compostos orgânicos voláteis. I. Título.

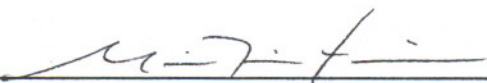
CDD: 547 (20ª)

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

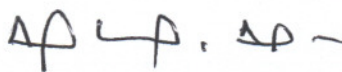
Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato Florisvaldo Clementino Santos Filho, realizada em 08 de outubro de 2010:



Prof. Dr. Edson Ródrigues Filho



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Prof. Dr. Alberto Camilo Alécio

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho pela orientação, paciência, sabedoria, amizade, respeito e apoio durante todo o tempo de trabalho.

A toda minha família, especialmente a minha mãe Ana Amélia, a quem devo tudo em minha vida e formação pessoal, a meu pai Florisvaldo que foi um exemplo de alegria e motivação, e ao meu irmão Renan, pela amizade e apoio em tudo, sem esquecer de meus avós, tios e primos.

Aos amigos do grupo LaBioMMi: Taicia, Luciana, Lívia, Marília, Zé, Diego, Gabriel, Douglas, Diana, Gezimar, Rodrigo, Thaísa, Bianca, Mariana, Enzo, Carol, Natália, Helô 1, Monize, Lilian, Adriana e Helô 2 pela amizade, companheirismo e sugestões,

Aos professores Moacir Forim e Alberto Alécio pela participação na banca.

Aos que, assim como eu, vieram do Piauí no ano de 2008 para fazer pós-graduação nessa terra distante: Thiaguim, Lucas, Jozemir, Márcia, Sâmya e Juliana.

Aos amigos de Campinas Lucas, Thiaguim, Sol, Flamys e Irlene pelas horas divertidas e que faziam lembrar um pouco da nossa terra querida Teresina nos momentos em que tive por lá.

Aos amigos de graduação: Roberto, Helson, Sâmya, Márcia, Lucas, Thiaguim, Renan, Alcides, Jozemir, Juliana, Sandro, Daniel Pitombeira, Andreane, Daniel Brito, Rejane, Arthur e Vicente e vários outros que fazem parte da família Zerokuatros.

Aos demais amigos: Dennys, Vicente, Mateus, Mayla, Mayara, Raíssa, Sue, Andressa, dentre outros pela valiosa amizade e que, mesmo estando em Teresina, sempre me apoiaram, especialmente nos momentos de maior dificuldade.

Aos professores da UFPI, especialmente ao professor Welter pelo apoio e incentivo no início deste mestrado.

Aos professores do Departamento de Química pelos ensinamentos.

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

ABREVIações

ApCI – Atmospheric pressure chemical ionization

ANP – Agência Nacional do Petróleo

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

BOD – *Biologic Oxygen Demand*

GC – *Gas Chromatography*

GC-MS – *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*

CG-FID – *Gas Chromatography – Flame Ionization Detector*

CI – *Chemical Ionization*

Da – Dalton

DCI – *Desorption chemical ionization*

EI – *Electron ionization*

ESI – *ElectroSpray Ionization*

FAB – *Fast Atom Bombardment*

IV – InfraVermelho

KI – Kovats Index

LaBioMMi – Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos

MeOH – Metanol

NICL3 – Não-Identificado de Cupressus lusitanica 3

NICL5 – Não-Identificado de Cupressus lusitanica 5

ppm – partes por milhão

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

SPE – *Solid Phase Extraction*

SIM – *Single Ion Monitoring*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 – Ilustração hipotética da interação bioquímica entre fungos e plantas. (A) o contacto do fungo com a planta induz a biossíntese de fitoalexinas; (B) o fungo detoxifica essas fitoalexinas.....	7
Figura 1-2 – Estrutura do ácido giberélico	10
Figura 1-3 – Estrutura química do Taxol.....	11
Figura 1-4 – Tricocetenos macrocíclicos.....	12
Figura 1-5 – Estruturas moleculares dos meroterpenos isolados de <i>Penicillium brasilianum</i> (1-3) e dos limonóides (4-6) característicos de Meliaceas (Santos, 2004)	13
Figura 1-6 – Brasilamidas obtidas a partir do estudo de biossíntese pelo fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	14
Figura 1-7 – Exemplo de Citocalasina isolada do fungo <i>Xylaria</i> , endofítico isolado de <i>Cupressus lusitanica</i>	14
Figura 1-8 – Esquema de destilação a vapor (hidrodestilação).	18
Figura 1-9 – Esquema geral para extração de compostos voláteis através de headspace dinâmico.....	20
Figura 1-10 – Espécie de laranja, conhecida popularmente como Laranja da terra	22
Figura 1-11 – Mistura de ácidos graxos saturados e insaturados na parede celular (Lenninger, 2000).....	26
Figura 1-12 – Triacilglicerol contendo 3 ácidos graxos diferentes ligado ao glicerol. Na figura, tem-se, respectivamente, Ácido Steárico, Ácido Linoléico e Ácido Palmítico	27
Figura 1-13 – Estruturas químicas dos esteróides: 1) Estigmasterol, comumente encontrado em plantas; 2) Ergosterol, comumente encontrado em fungos.....	28
Figura 1-14 – Reação de transesterificação de óleos vegetais	29
Figura 1-15 – Reações de transesterificação de triglicerídios	31
Figura 1-16 – Mecanismo de reação para transesterificação em catálise básica	31
Figura 1-17 – Formação de ésteres metílicos usando catálise ácida	33
Figura 1-18 – Ácidos graxos produzidos por micro-organismos.....	36

Figura 1-19 – Esquema de um Cromatógrafo em Fase Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas.....	42
Figura 1-20 – Esquema instrumental e teórico do processo ocorrido em uma fonte de ionização por impacto eletrônico (Silverstein, 1998).....	45
Figura 2-1 – Fungos endofíticos estudados neste trabalho	48
Figura 3-1 – Fungos endofíticos estudados	54
Figura 3-2 – Sistema de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger.....	57
Figura 3-3 – Sistema de aeração para a captação de voláteis.	59
Figura 3-4 – Método cromatográfico utilizado na análise por GC-MS para substâncias voláteis	60
Figura 3-5 – Esquema do Protocolo para Extração dos Metabólitos Fixos	62
Figura 3-6 – Método cromatográfico usado no GC-MS para análise de substâncias fixas extraídas a partir da reação de metanólise com o micélio	65
Figura 3-7 – Método cromatográfico usado no GC-FID para análise e quantificação de ésteres metílicos	66
Figura 3-8 – Ensaio antifúngico com óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i>	67
Figura 4-1 – Compostos terpênicos bioativos isolados de micro-organismos associados a plantas	69
Figura 4-2 – <i>Cupressus lusitanica</i> e o fungo endofítico associado <i>Xylaria</i> (NICL3. 71	
Figura 4-3 – Diterpenos isolado de <i>Cupressus lusitanica</i> (Adams, 1997).....	72
Figura 4-4 – Cromatograma de íons totais por GC-MS referente a análise de óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> extraídas pelo método da hidrodestilação.....	72
Figura 4-5 – Cromatograma de íons selecionados da análise do óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> extraídos pelo método da hidrodestilação. a) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 136. b) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 154	73
Figura 4-6 – Cromatograma de íons selecionados do óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> . 1) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 204. 2) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 220. 3) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 272. 4) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 286.....	74
Figura 4-7 – Substâncias voláteis extraídas do óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> pelo método da hidrodestilação.....	78

Figura 4-8 – Cromatograma de óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> . a) <i>Cupressus lusitanica</i> sulamericana. b) <i>Cupressus lusitanica</i> européia (Cheraif, 2007).....	79
Figura 4-9 – Monoterpenos identificados em células elicidadas de <i>Cupressus lusitanica</i> (De Alwis, 2009)	79
Figura 4-10 – Estrutura, Espectro de Massas e Fragmentação do abietadieno	81
Figura 4-11 – Estrutura, Espectro de Massas e Fragmentação do Totarol.....	82
Figura 4-12 – Cromatograma do óleo essencial de <i>Xylaria (NICL3)</i> extraído pelo método da hidrodestilação. 1) Meio líquido CZAPECK´s. 2) Meio sólido arroz.....	83
Figura 4-13 – Diferentes perfis cromatográficos quando o fungo <i>P. brasilianum</i> foi cultivado em diferentes meios de cultura.....	84
Figura 4-14 – Cromatograma de íons selecionados do óleo de <i>Xylaria (NICL3)</i> em meio CZAPECK's selecionados. 1) Íons <i>m/z</i> 204. 2) Íons <i>m/z</i> 220.....	85
Figura 4-15 – Substâncias voláteis identificadas no fungo <i>Xylaria (NICL3)</i> em meio líquido CZAPECK´s extraídas pelo método da hidrodestilação.....	87
Figura 4-16 – Cromatograma de íons totatis do óleo essencial de <i>Xylaria (NICL3)</i> no meio sólido arroz extraído pelo método da hidrodestilação.....	88
Figura 4-17 – Estruturas identificadas no óleo essencial de <i>Xylaria (NICL3)</i> extraídas pelo método da hidrodestilação.....	90
Figura 4-18 – Sesquiterpenos identificados no óleo essencial do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	91
Figura 4-19 – Sesquiterpenos eremophilanos isolados de <i>Xylaria (NICL3)</i> (Amaral,2010)	92
Figura 4-20 – Espectro de massas para a componente no tempo 14,762 minutos..	93
Figura 4-21 – Proposta de fragmentação de sesquiterpenos	94
Figura 4-22 – Compostos identificados em comum para o óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> e o fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	96
Figura 4-23 – Fungo <i>Penicillium griseoroseum</i> , isolado a partir de <i>Coffea arabica</i> .	97
Figura 4-24 – Cromatogramas de óleos essenciais de <i>Penicillium griseoroseum</i> extraídos pelo método da hidrodestilação. 1) Meio Líquido CZAPECKs. 2) Meio sólido arroz.....	97

Figura 4-25 – Cromatograma ampliado na região de 3,00 a 9,00 minutos do óleo essencial de <i>Penicillium griseoroseum</i>	98
Figura 4-26 – Cromatograma e Espectros de Massas do Óleo Essencial de <i>Penicillium griseoroseum</i> . 1) Região do cromatograma com as duas substâncias de interesses. 2) Espectros de massas da banda cromatográfica em 5,43 minutos. 3) Espectro de massas da banda cromatográfica em 5,75 minutos.....	99
Figura 4-27 – 1)Espectros de Massas gerado pela biblioteca do aparelho para as duas substâncias em questão. 2) Estrutura sugerida: Tiglato de Etila	100
Figura 4-28 - Estruturas identificadas de Angeloato de Etila e Tiglato de Etila	100
Figura 4-29 – 1)Proposta de fragmentação da formação de íons do Tiglato de Etila. 2) Proposta de fragmentação da formação de íons do Angeloato de Etila.....	102
Figura 4-30 – Compostos de baixo peso molecular identificados no óleo essencial de <i>Penicillium griseoroseum</i>	103
Figura 4-31 – Cromatogramas para identificação de compostos terpênicos no óleo essencial de <i>Penicillium griseoroseum</i> . 1) Monoterpenos com relação m/z 136. 2) Sesquiterpenos com relação m/z 204. 3) Diterpenos com relação m/z 272.....	104
Figura 4-32 – Compostos identificados por índice de retenção no óleo essencial de <i>Penicillium griseoroseum</i>	106
Figura 4-33 – 1)Espectro de massas da substância em 11,49 minutos. 2) Proposta de fragmentação para a substância identificada	108
Figura 4-34 – Região do Cromatograma onde foram identificado ésteres metílicos. 1) Cromatograma da região da banda em 26,33 minutos. 2) Espectros de massas para a banda em 25,36 minutos. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do aparelho. 4) Estrutura proposta	109
Figura 4-35 – Região do Cromatograma onde foram identificado ésteres metílicos. 1) Cromatograma da região da banda em 26,33 minutos. 2) Espectros de massas para a banda em 25,36 minutos. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do aparelho. 4) Estrutura proposta	111

Figura 4-36 – Proposta de Fragmentação do éster etílico identificado na banda cromatográfica de 26,33 minutos	111
Figura 4-37 – Ésteres metílicos e etílicos identificados no óleo essencial de <i>Penicillium griseoroseum</i> em meio arroz	112
Figura 4-38 – <i>Melia azedarach</i> e o fungo endofítico associado <i>Penicillium brasilianum</i>	113
Figura 4-39 – Cromatograma do óleo essencial extraído de <i>Melia azedarach</i> e <i>Penicillium brasilianum</i> . 1) Cromatograma de óleo essencial extraído dos frutos de <i>Melia azedarach</i> . 2) Cromatograma de óleo essencial extraído das folhas de <i>Melia azedarach</i> . 3) Cromatograma de óleo essencial extraído de <i>Penicillium brasilianum</i> em meio sólido. 4) Cromatograma de óleo essencial extraído de <i>Penicillium brasilianum</i> em meio líquido	113
Figura 4-40 – Sesquiterpenos identificados no óleo essencial de <i>Melia azedarach</i>	115
Figura 4-41 – Cromatograma do óleo essencial de <i>Penicillium brasilianum</i> . 1) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 220. 2) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 204	115
Figura 4-42 – Compostos identificados no óleo essencial de <i>Penicillium brasilianum</i>	119
Figura 4-43 – Compostos identificados em comum para o óleo essencial de <i>Melia azedarach</i> e o fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	121
Figura 4-44 – Gráfico de produção de compostos voláteis pelo fungo <i>Penicillium brasilianum</i> em meio arroz	122
Figura 4-45 – Fungos <i>Xylaria (NICL3)</i> , <i>Penicillium griseoroseum</i> e <i>Penicillium brasilianum</i> submetidos a extração de voláteis por aeração	123
Figura 4-46 – Cromatograma dos extratos voláteis obtidos por aeração dos fungos: 1) <i>Xylaria (NICL3)</i> ; 2) <i>Penicillium griseoroseum</i> ; 3) <i>Penicillium brasilianum</i>	123
Figura 4-47 – Cromatograma do extrato de compostos voláteis por Aeração do fungo <i>Penicillium griseoroseum</i> nos meios: 1) Arroz; 2) Canjica; 3) Trigo	124
Figura 4-48 – 1) Cromatograma da banda em 30,36 minutos. 2) Espectros de massas para a componente da banda. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 4) Estrutura do hidrocarboneto.....	126

Figura 4-49 – Hidrocarbonetos identificados no extrato de compostos voláteis de <i>Penicillium griseoroseum</i>	127
Figura 4-50 – Cromatograma do extrato de compostos voláteis por aeração do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> em: 1) Canjica; 2) Trigo	128
Figura 4-51 – Cromatograma de íons selecionados do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> .1) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 57 referente a hidrocarbonetos. 2) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 204 referente a sesquiterpenos.....	128
Figura 4-52 – Sesquiterpenos identificados no extrato de compostos voláteis de <i>Penicillium brasilianum</i>	129
Figura 4-53 – Hidrocarbonetos identificados no extrato de compostos voláteis do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	130
Figura 4-54 – Formação de ésteres metílicos usando catálise ácida	131
Figura 4-55 – RMN ¹ H do produto de transesterificação ácida do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	132
Figura 4-56 – Estrutura parcial identificada para o produto de transesterificação ácida do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	133
Figura 4-57 – RMN 1H na região de 5,38 do extrato do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	133
Figura 4-58 – Espectro de massas por impacto eletrônico de um composto lipídico do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	134
Figura 4-59 – Proposta de fragmentação de ésteres metílicos de ácidos graxos..	134
Figura 4-60 – Cromatograma para o produto de transesterificação ácida do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i> . 1) Cromatograma de íons <i>m/z</i> 74. 2) Cromatograma de íons totais	137
Figura 4-61 – 1) Espectro de massas da componente no tempo 31,91. 2) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 3) Estrutura do éster metílico	138
Figura 4-62 – Ésteres metílicos do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	138
Figura 4-63 – 1) Cromatograma da região de esteróides. 2) Espectro de massas da componente em 38,07 minutos. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 4) Estrutura proposta para o esteróide. 5) Espectro de massas da componente em 38,45 minutos. 6) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 7) Estrutura proposta para o segundo esteróide.....	141
Figura 4-64 – Proposta de fragmentação para o ergosterol	142

Figura 4-65 – Ésteres metílicos de ácidos graxos e esteróides encontrados no fungo de <i>Xylaria (NICL3)</i>	143
Figura 4-66 – Espectros de RMN ¹ H para os produtos de transesterificação dos fungos do gênero <i>Penicillium</i> . 1) <i>Penicillium PAOE</i> ; 2) <i>Penicillium griseoroseum</i> ; 3) <i>Penicillium brasilianum</i>	144
Figura 4-67 – Espectro de massas da componente no tempo 25,09 minutos do produto de transesterificação do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	145
Figura 4-68 – Cromatograma dos extrato dos produtos de transesterificação dos fungos do gênero <i>Penicillium</i> . 1) <i>Penicillium PAOE</i> ; 2) <i>Penicillium griseoroseum</i> ; 3) <i>Penicillium brasilianum</i>	145
Figura 4-69 – Ésteres metílicos comumente encontrados em fungos do gênero <i>Penicillium</i>	146
Figura 4-70 – Esteróides identificados no produto de transesterificação ácida dos fungos <i>Penicillium brasilianum</i> e <i>Penicillium griseoroseum</i> .1) Esteróide identificado para o fungo <i>Penicillium brasilianum</i> . 2) Proposta de fragmentação do esteróide do fungo <i>Penicillium brasilianum</i> . 3) Esteróide identificado no fungo <i>Penicillium griseoroseum</i> . 4) Proposta de fragmentação do esteróide do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	148
Figura 4-71 – Espectro de RMN 1H dos produtos de transesterificação ácida de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> . 1) <i>Trichoderma harvezionum</i> . 2) <i>Trichoderma T27</i> . 3) <i>Trichoderma T25</i> . 4) <i>Trichoderma T19</i> . 5) <i>Trichoderma T13</i>	149
Figura 4-72 – Cromatograma de íons <i>m/z</i> 74 de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> . 1) <i>Trichoderma harvezionum</i> . 2) <i>Trichoderma T27</i> . 3) <i>Trichoderma T25</i> . 4) <i>Trichoderma T21</i> . 5) <i>Trichoderma T19</i> . 6) <i>Trichoderma T13</i>	150
Figura 4-73 – Cromatograma de íons <i>m/z</i> 74 de fungos do gênero <i>Trichoderma</i> . 1) <i>Trichoderma harvezionum</i> . 2) <i>Trichoderma T25</i> . 3) <i>Trichoderma T21</i> . 4) <i>Trichoderma T19</i> . 5) <i>Trichoderma T13</i>	151
Figura 4-74 – Espectro de massas da componente no tempo de retenção de 31,60 minutos.	152
Figura 4-75 – Proposta de fragmentação de hidrocarbonetos	153
Figura 4-76 – Hidrocarbonetos identificados em fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	153
Figura 4-77 – Cromatograma obtido por GC-FID para os produtos de transesterificação ácida dos fungos endofítico: 1) <i>Xylaria (NICL3)</i> ; 2) <i>Penicillium PAOE</i> ; 3) <i>Penicillium brasilianum</i> ; 4)	

Penicillium griseoroseum; 5) *Trichoderma T19*; 6) *Trichoderma T25*; 7) *Trichoderma T27*; 8) *Trichoderma harvezionum* 157

Figura 4-78 – Fungos endofíticos submetidos ao ensaio antifúngico com o óleo essencial de *Cupressus lusitanica*: 1) *Guignardia sp*; 2) *Xylaria (N1CL3)*; 3) *Xylaria (N1CL5)* 159

Figura 4-79 – Ensaio do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* nas concentrações de 0, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm contra os fungos endofíticos associados: 1) *Xylaria (N1CL3)*; 2) *Guignardia sp*; 3) *Xylaria (N1CL5)* 160

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-1 – Exportações dos óleos essenciais nos anos de 1970 e 2002.....	23
Tabela 1-2 – Conteúdo lipídico de micro-organismos oleaginosos (Vicente, 2010)	34
Tabela 1-3 – Íons característicos de classes e subclasses de compostos orgânicos (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987).....	46
Tabela 4-1 – Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i>	74
Tabela 4-2 – Substâncias identificadas do fungo <i>Xylaria (NICL5)</i> em meio CZAPECK's extraídas pelo método da hidrodestilação	85
Tabela 4-3 – Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i> em meio sólido.....	88
Tabela 4-4 – Dados de Retenção para as substâncias encontradas em comum ao óleo essencial de <i>Cupressus lusitanica</i> e do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	95
Tabela 4-5 – Índices de retenção calculados para o fungo <i>Penicillium griseoroseum</i>	104
Tabela 4-6 – Índices de retenção calculados para o óleo essencial de <i>Melia azedarach</i>	114
Tabela 4-7 – Índices de retenção calculados para o óleo essencial de <i>Penicillium brasilianum</i> em meio arroz	116
Tabela 4-8 – Dados de Retenção para as substâncias encontradas em comum ao óleo essencial de <i>Melia azedarach</i> e do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	120
Tabela 4-9 – Índices de retenção dos compostos sesquiterpênicos no extrato de compostos voláteis do fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	129
Tabela 4-10 – Sinais de RMN ¹ H para o produto de transesterificação do fungo <i>Xylaria (NICL3)</i>	132
Tabela 4-11 – Classificação taxonômica de fungos endofíticos baseados em níveis lipídicos (Stahl, 1996)	136
Tabela 4-12 – Rendimento de transesterificação ácida de fungos endofíticos	155
Tabela 4-13 – Índices de ésteres metílicos de fungos endofíticos	156
Tabela 4-14 – Concentração de Ésteres metílicos de fungos endofíticos	158

Tabela 4-15 – Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* contra fungos endofíticos associado..... 161

ANÁLISE DOS CONSTITUINTES FIXOS E VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Xylaria* E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS. Foi realizado o estudo dos constituintes químicos voláteis e fixos de fungos endofíticos. Para isto, foram utilizados os fungos *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum*, *Xylaria (NICL3)* e conservas de diferentes espécies do gênero *Trichoderma*, além de ser realizado também o estudo de plantas hospedeiras, como *Cupressus lusitanica* e *Melia azedarach*. Através de análises por GC-MS e metodologias de cálculos de índices de retenção, foram identificados monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos nos óleos essenciais tanto da planta como dos fungos endofíticos. Compostos semelhantes ao óleo essencial da planta e microorganismo associados levaram a crer na existência de interações bioquímicas. Reações de transesterificação ácida foi utilizada para extração de compostos lipídicos, que foram identificados, caracterizados e quantificados pelas técnicas de GC-MS, GC-FID e RMN ¹H. Perfis de ésteres metílicos de ácidos graxos diversificados foram encontrados de acordo com a espécie utilizada, levando a montar uma classificação quimio-taxonômica. Dados de quantificação de acordo com a norma EN 14 103 mostraram que dois fungos endofíticos podem ser considerados uma fonte promissora de biocombustíveis. Ensaio anti-fúngicos do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* foram realizados contra fungos endofíticos associados mostrando haver importância dos compostos voláteis na relação planta-microorganismo endofítico.

ANALYSIS OF CONSTITUENTS FIXED AND VOLATILE OF ENDOPHYTIC FUNGI OF THE GENUS *Penicillium* AND *Xylaria* AND THEIR HOST PLANTS. Was

conducted the study of chemical constituents volatiles and fixed of endophytes fungi. For this, we used the *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum*, *Xylaria (NICL3)* and different species of the genus *Trichoderma*, was also carried out a study of host plants, such as *Cupressus lusitanica* and *Melia azedarach*. Through analysis by GC-MS and methodologies for calculations of retention indices were identified monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes in the oils of plant and fungus. Compounds similar to essential oils of plants and associated microorganisms led to believe in the existence of biochemical interactions. Transesterification acid reactions was used for extraction of lipid compounds that were identified, characterized and quantified by techniques GC-MS, ¹H NMR and GC-FID. Profiles of methyl esters of fatty acids were found varied according to the species used, leading to mounting a chemo-taxonomic classification. Data quantification according to EN 14 103 showed that two endophytic fungi can be considered a promising source of biofuels. Anti-fungal assays of essential oil of *Cupressus lusitanica* were performed against endophytes be showing the importance of volatile compounds in the plant-endophytic microorganism.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1– FUNGOS.....	2
1.1.1 – FUNGOS E IMPORTÂNCIA AO HOMEM	3
1.2– INTERAÇÃO PLANTA – MICROORGANISMO.....	4
1.2.1 ASSOCIAÇÃO PLANTA-FUNGO ENDOFÍTICO.....	5
1.3– METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	8
1.3.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VOLÁTEIS	15
1.3.1.1 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	18
1.3.1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	20
1.3.1.3 METABÓLITOS VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	24
1.3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FIXOS.....	25
1.3.2.1 APLICAÇÕES	29
1.3.2.1.1 MECANISMOS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO	31
1.3.3 METABÓLITOS FIXOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	34
1.4– METODOLOGIAS DE ANÁLISE	39
1.4.1 ÍNDICE DE RETENÇÃO	39
1.4.2 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA	43
1.4.2.1 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	44
2 – OBJETIVOS.....	49
3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	52
3.1 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	53

3.2 – MATERIAIS UTILIZADOS.....	54
3.3 – METODOLOGIAS DE TRABALHO UTILIZADAS	55
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 – METABÓLITOS VOLÁTEIS.....	71
4.1.1. – METABÓLITOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS POR HIDRODESTILAÇÃO	72
4.1.1.1 – <i>Cupressus lusitanica</i> e <i>Xylaria (NICL3)</i>	72
4.1.1.2 – <i>Penicillium griseoroseum</i>	97
4.1.1.3 – <i>Penicillium brasilianum</i> e <i>Melia azedarach.</i>	113
4.1.2. – METABÓLITOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS POR AERAÇÃO	123
4.1.2.1. – <i>Penicillium griseoroseum</i>	125
4.1.2.2. – <i>Penicillium brasilianum</i>	128
4.2 – METABÓLITOS FIXOS	132
4.2.1. – <i>Xylaria (NICL3)</i>	139
4.2.2. – Gênero <i>Penicillium</i>	146
4.2.3. – Gênero <i>Trichoderma</i>	151
4.2.4. – Quantificação de Ésteres Metílicos	157
4.3 – ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	163
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	166
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

1- INTRODUÇÃO

1.1. FUNGOS

Os fungos possuem uma grande variedade de formas, comportamentos e ciclos de vidas e, por este motivo, são de difícil definição (Webster, 1989). Entretanto, algumas características biológicas são intrínsecas e bem peculiares como o fato de serem organismos eucarióticos desprovidos de clorofila e heterotróficos. Morfologicamente, são filamentosos e ramificados, onde esses filamentos, denominados também de hifas, apresentam parede celular constituída basicamente por quitina, resultando em uma massa micelial, o qual pode ser de dois tipos bem distintos: ou resulta em um tecido de biomassa bem compacto, como observado para os cogumelos, ou através de uma rede micelial mais maleável e bem frouxa. O sistema reprodutivo é caracterizado por esporulação no meio ambiente, com algumas exceções na natureza (Pelczar, 1997, Tortora *et al.*, 2006, Webster, 1989).

De modo geral, fungos são classificados mediante algumas características, onde as principais são:

- Características dos esporos sexuais e/ou corpos de frutificação durante o ciclo reprodutivo;
- Características morfológicas do micélio e/ou suas células.

Do ponto de vista reprodutivo, em sua maioria, tanto a reprodução sexuada quanto a reprodução assexuada de fungos ocorre por meio da germinação de esporos no ambiente, processo esse conhecido por esporulação. Estes esporos germinados podem sobreviver a períodos extensos de condições drásticas de temperatura, radiação e a compostos tóxicos, o que justifica a disseminação dos fungos em diversos ambientes (Pelczar, 1997, Tortora *et al.*, 2006, Woelken *et al.*, 2003).

Dentre os microorganismos conhecidos, os fungos foram os primeiros a habitar o planeta e se tornaram presentes nos diversos ambientes sendo distribuídos atualmente em todo o planeta.

Além dessas características, os fungos apresentam a capacidade de decompor e utilizar uma grande variedade de substratos, sendo eficientes na conversão de nutrientes em material celular. Em condições de excesso de nutrientes, os diversos produtos de decomposição podem ser excretados ao meio ambiente, enquanto que substâncias de reserva energética, como carboidratos e lipídios, acumulam-se ao redor do micélio (Pelczar, 1997).

1.1.1. FUNGOS E IMPORTÂNCIA AO HOMEM

A compreensão dos mecanismos de ação dos fungos é de extrema importância para os diversos setores da sociedade, uma vez que estes estão envolvidos em uma gama de processos de natureza industrial e farmacêutica, além do uso em indústrias agrotóxicas, na decomposição de matéria orgânica e também no desenvolvimento de patologias de plantas e animais.

De maneira geral, os fungos podem trazer tantos benefícios quanto prejuízos à humanidade. Diversos exemplos dessas relações são conhecidos na sociedade.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é empregada em escala industrial em diversos processos fermentativos, especialmente na produção de vinhos, cervejas e pães (Pelczar, 1997). Na indústria farmacêutica, apresentam uma importância de destaque devido a habilidade de reduzir várias etapas reacionais na síntese de medicamentos. Exemplos não faltam na literatura, como a produção de riboflavina por fermentação através do fungo *Ashbya gossypi* (Pelczar, 1997), além do uso do fungo *Tolyplocadium niveum* na produção de fonte primária de

Cyclosporin®, aplicável em pacientes transplantados evitando a rejeição de órgãos (Adrio *et al*, 2003). Também são usadas diversos fungos como fontes de produtos farmacêuticos, como a penicilina e o Mevacor® (Santos, 1999, Arora, 1992). Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* ocupam uma posição de destaque na produção de compostos farmacêuticos e na produção de enzimas que são importantes para outros tipos de processos, especialmente para processos alimentícios (Pelczar, 1997, Adrio *et al*, 2003).

Quando saprófitas, alguns fungos, como *Rhizopus stolonifer*, decompõem resíduos de plantas e animais, liberando CO₂ na atmosfera e retornando ao solo compostos nitrogenados e outras substâncias que são essenciais para a fertilidade do solo. No entanto, podem causar também prejuízos, já que são capazes de decompor não só matéria orgânica morta, mas também outros materiais, como tecidos, tintas, papelão, ceras, petróleo e madeira. Fora isso, infectam alimentos produzindo micotoxinas que causam problemas de alto valor comercial. Isso ocorre pela habilidade destes organismos crescerem sob condições diversas além de apresentar uma cinética rápida de crescimento (Raven, Evert e Eichhorn, 1992).

Fungos também associam-se a outros organismos, como, por exemplos, as plantas, trazendo interações benéficas, como as micorrizas, ou malélicas, agindo como patógenos.

Além disso, os fungos têm sido alvo de interesse de pesquisa nas diversas áreas da ciência.

1.2. INTERAÇÃO PLANTA – MICROORGANISMO

A associação entre os seres vivos é um\ condição vital para que determinada espécie, incapaz de conseguir por si próprio os seus meios de sobrevivência, possa adquirir suas fontes de energia, incluindo nutrientes e proteção contra predadores. Como já mencionado anteriormente, os fungos podem

apresentar uma rede de relações com outros micro-organismos e/ou organismos superiores, como as plantas, as quais servem como hospedeiros. e onde se encontram mais frequentemente associados (Zoberi, 1972, Black, 2002).

Os micro-organismos apresentam diferentes tipos de associações ou interações com as plantas, podendo ser de natureza neutras, benéficas ou maléficas. As neutras são aquelas onde se observa o crescimento de ambos os organismos, mantendo o neutralismo, sem haver a competição por qualquer alimento e nem haver outro tipo de inibição. As relações benéficas são aquelas conhecidas também por simbióticas que é caracterizada pelo fato de planta e microorganismo obter vantagens através da associação. A maneira da manifestação dessa relação é variada. Um exemplo de uma relação deste tipo são os líquens, que resultam da relação entre fungos e algas. Sabe-se que nesta relação os fungos obtém nutrientes a partir das algas, e estas beneficiam-se pela propriedade das paredes celulares dos fungos capazes de reter água. Além dessa relações simbióticas, podem ocorrer também uma relação de comensalismo, que é caracterizada pelo fato de apenas um organismos se beneficiar em detrimento ao outro (Pelczar, 1997, Souza, 2004). Já as relações maléficas, também conhecida como uma interação patogênica, são definidas pela característica de um organismo atingir o outro de modo reverso (Pelczar, 1981, Agrios, 1988). Este tipo de interação pode levar à infecção de plantas por patógenos, e vem sendo reconhecido e considerado como um dos mais altos níveis de parasitismo existentes (Magnani, 2002).

Uma interação planta-micro-organismo não resulta apenas em patologia. Sendo assim, o estudos de associações e interações envolvendo os micro-organismos é importante para a manutenção do equilíbrio inter-espécies contribuindo para a preservação do meio-ambiente (Campos, 2005).

1.2.1. ASSOCIAÇÃO PLANTA-FUNGO ENDOFÍTICO

No sentido literal, o termo *endofítico* (do grego *endon*, no interior de; *phyton*, planta) significa “dentro da planta”. A aplicação deste termo no meio acadêmico é tão ampla quanto os diversos conceitos existentes na literatura, podendo ser aplicado a bactérias (Morandi, 1996, Kobayashi *et al*, 2000) fungos (Morandi, 1996, Stone, 2000) e algas (Peters, 1991).

O termo *endofítico* foi mencionado inicialmente por DE BARRY (1866) e foi aplicado com a finalidade de fazer uma distinção entre fungos patógenos de plantas. Entretanto, estudos detalhados mostraram que existem alguns patógenos que vivem de forma latente no interior dos tecidos de seu hospedeiros. Esta observação levou Petrini (1992) a definir da forma mais aceita no meio acadêmico que “micro-organismos endofíticos são aqueles que durante seu ciclo de vida colonizam os tecidos internos de seus hospedeiros, sem lhes causar sintomas”. A associação pode ser mutualística ou de latência do patógeno. Acredita-se que estas interações parecem ser benéficas a ambos os organismos, uma vez que plantas apresentam espécies endofíticas espalhadas em todos os seu órgãos.

Apesar disso, a definição de micro-organismos endofíticos é ainda bastante polêmica. Essa definição é frequentemente usada de acordo com as particularidades das áreas de estudos. Muitas áreas usam os termos *endofítico* e *patogênico* para designar dois tipos de associações diferentes.

Conforme a interação é positiva, onde não há desenvolvimentos de sintomas de doenças no hospedeiro na qual é mais comum o uso do termo *endofítico*, ou negativa, com prejuízo para o hospedeiro que é denominada *patogênica* (Saikkonen, 1994, Fellous, 2009).

O grupo LaBioMMi usa o termo *endofítico* para designar o habitat de onde o micro-organismo foi obtido. Usando metodologias que garantam a assepsia da superfície do vegetal, ao inocular esse material em meios de cultura artificiais, os

micro-organismos vivendo no interior (endo) da planta (fito) são obtidos. O termo fitopatógeno deve ser associado a uma consequência negativa (para o hospedeiro) da interação entre a planta e o micro-organismo, porém isso não é verificado somente pela metodologia de isolamento.

As plantas são capazes de responder de diversas maneiras ao ataque por micro-organismos. As maneiras mais conhecidas são o estabelecimento de barreiras físicas (enrijecimento da parede celular com acúmulo de ligninas) e químicas (produção de fitoalexinas). A indução da biossíntese de fitoalexinas é uma das possíveis maneiras para promover o aumento da produção de metabólitos secundários em plantas (Mandal, 2007, Keen, 1982, Paxton, 1981, Desjardins, 1981) Por sua vez, o micro-organismo invasor pode degradar enzimaticamente essas barreiras, estabelecendo uma verdadeira “batalha” química, dificultando a identificação das fitoalexinas como metabólitos finais produzidos pelo hospedeiro (Snyder, 1990, Soby, 1996) (Figura 1.1).

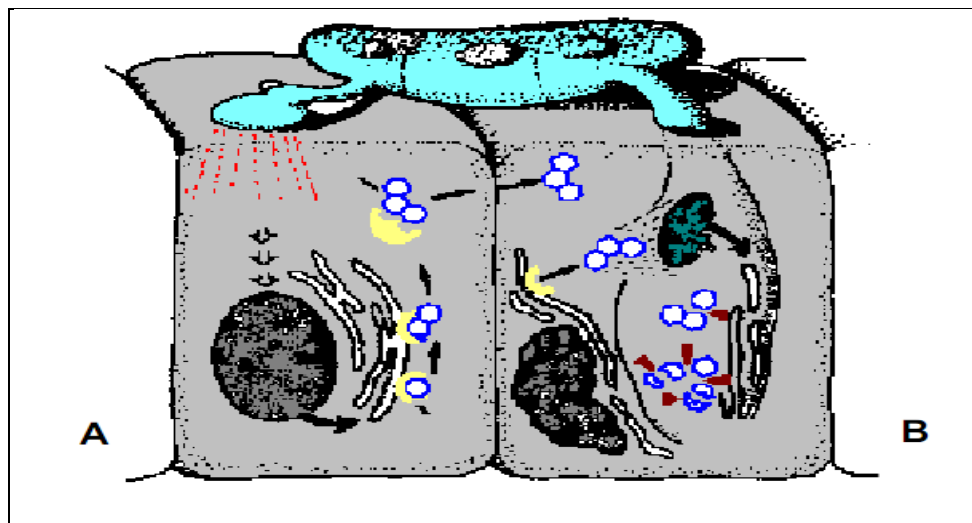


Figura 1-1 - Ilustração hipotética da interação bioquímica entre fungos e plantas. (A) o contacto do fungo com a planta induz a biossíntese de fitoalexinas; (B) o fungo detoxifica essas fitoalexinas.

Fisiologicamente, os fungo endofíticos apresentam e utilizam as mesmas estratégias de penetração ao hospedeiro que os fungos patógenos. A planta responde a invasão com seus mecanismos de defesa e reconhecimento,

tornando as infecções endofíticas localizadas, evitando que atinjam outras partes das plantas (Petrini, 1992, Paschoalati, 1998).

Do ponto de vista taxonômico, as espécies de endofíticos isoladas e identificadas, em sua maioria, são pertencente à classe dos *Ascomycetos*, *Deuteromicetos*, *Basidiomicetos* e *Oomicetos* (Petrini, 1992).

1.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Como fruto da interação mutualística, fungos endofíticos apresentam a capacidade de conferir determinadas vantagens à planta hospedeira. Uma dessas vantagens é de atuar como um armazém de novas substâncias, denominadas de metabólitos secundários, as quais podem apresentar atividades biológicas relevantes (Suryanan, 1998), desempenhando algum papel importante para o hospedeiro associado com alguma função ecológica significativa (Boyle, 2001).

Para muitos micologistas, a produção de metabólitos secundários *in vivo* é de grande importância na interação metabólica entre fungo e a planta hospedeira e demonstram que a colonização endofítica melhora a adaptação ecológica do hospedeiro devido ao aumento da tolerância ao estresse e pela produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana contra fitopatógenos e predadores (Schulz, 2005, Tan, 2001). Além da produção *in vivo*, Demain (1980) sugeriu que os fungos endofíticos apresentam a capacidade de produzir estes mesmos metabólitos secundário *in vitro*, apresentando a mesma função na natureza.

De fato, estudos com metabólitos secundários de micro-organismos endofíticos, especialmente fungos, se tornam importantes por se mostrarem uma fonte simples e segura de compostos que supram a necessidade humana nas mais diversas áreas. Exemplos não faltam: são empregados na indústria farmacêutica, na produção de compostos bioativos, sendo diversos fungos endofíticos responsáveis

pela produção de antibióticos e outros metabólitos secundários com as mais diversificadas propriedades farmacológicas; na indústria agrotóxica são uma importante fonte de compostos capazes de realizar controle de praga e pestes, além de serem bioherbicidas naturais. São fortes biocatalisadores, principalmente em processos “limpos”, defendidos pela química verde, já que muitos destes micro-organismos são utilizados em biorremediação do solos, através de reações bem específicas, possibilitando detoxificação de possíveis poluentes de solos. São uma fonte bastante aplicável em processos biotecnológicos, constantemente sendo importantes ferramentas no estudo de engenharia genética de plantas, atuando como vetores na introdução de novos genes sintéticos que atuem tanto no controle biológico de pragas como no processo de nutrição de planta; além do uso difundido em processos fermentativos de bebidas e alimentos (Strobel, 2004).

O número de fungos endofíticos é inestimável, podendo existir cerca de milhares de espécies distribuídas em cerca de 80 % das plantas vasculares (Strobel, 2004). Os produtos naturais são fontes importantes de novos produtos farmacêuticos (Proudfoot, 2002) e, considerando que cerca de 30 % dos medicamentos são de origem fúngica e que apenas 5 % dos fungos foram descritos na literatura, estes micro-organismos se apresentam como uma fonte potencial de obtenção de novos fármacos.

Outro aspecto interessante à respeito da interação planta – fungo endofítico, o qual está intimamente relacionado com a produção de metabólitos secundários, é o fenômeno conhecido por “Transferência Genética Horizontal”. Definido pela habilidade que alguns fungos endofíticos adquiriram de produzir as mesmas substâncias produzidas pelas plantas e é explicado pela troca de material genético entre células ou genomas não relacionados entre fungo endofítico e planta hospedeira (Brown, 2003). Diversos relatos na literatura vem justificando e dando sustentabilidade a esta teoria.

O fungo *Giberela fugikuroi*, um endofítico, associado a planta *Cucumbita maxima*, produz, assim como a própria planta, diversos derivados do ácido giberélico, ilustrado na Figura 1-2 a seguir. Diversos destes diterpenos são

conhecidos na literatura por apresentar forte atividade hormonal no crescimento de plantas (Alexopoulos, 1996). Hoje é conhecido que fungos produzem uma variedade de giberelinas (Harborne, 1993).

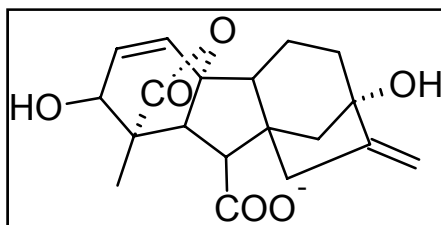


Figura 1-2 - Estrutura do ácido giberélico.

No início da década de 90 foi descoberto que o fungo *Taxomyces andrenae*, um endofítico isolado de *Taxus brevifolia*, produz paclitaxel (Taxol ®) (Figura 1-3) em meio de cultura artificial na ausência de células da planta hospedeira (Stierle, 1995). Essa descoberta causou um forte impacto na comunidade acadêmica devido às fortes propriedades anticancerígenas diferenciadas apresentadas para esse diterpeno. O rendimento obtido de taxol a partir da planta *T. brevifolia* é muito baixo, chegando a ser uma quantidade inferior 0.02 % de material da planta seca. Devido à grande demanda dessa substância, principalmente, por razões ecológicas, a planta não se tornou a fonte mais viável e sustentável para a produção de taxol. Muitas outras espécies de fungos produtores de taxol em rendimentos bastante razoáveis foram isolados dos tecidos de *T. Brevifolia* e também de outras espécies do gênero *Taxus* (Strobel, 1996, Li, 1996).

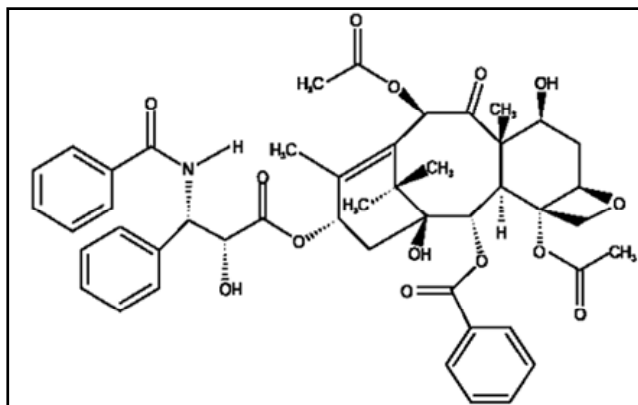


Figura 1-3 - Estrutura química do Taxol.

Há ainda alguns outros dados sobre a biossíntese de taxóides por fungos endofíticos. Por exemplo, o fungo *Periconia sp.*, um endofítico isolado de *Torreya grandifolia*, planta da mesma família do gênero *Taxus*, e que produz taxol quando recém isolado e cultivado em meio artificial. A biossíntese de taxol diminui a medida em que ocorrem sucessivas transferências do fungo de meios de cultura. Entretanto, é reativada com a adição de estimulantes como ácidos carboxílicos e fenóis, sendo o ácido benzóico o melhor estimulante (Li, 1998). Outro fungo, *Pestalotiopsis guepinii*, um endofítico em *Wollemia nobilis*, uma espécie da família ARAUCARIACEAE, não relacionada com *Taxus*, é também produtor de taxol. No mesmo sentido, o fungo *Seimatoantlerium tepuiense gen. nov.* foi relatado recentemente como o primeiro caso de um fungo epifítico produtor de taxol, isolado de *Maguireothamnus speciosus*, uma RUBIACEAE (Strobel, 1997, Strobel, 1999).

De modo reverso, também pode ser observado de transferência genética do fungo para a planta também é observado. Evidências experimentais não faltam na literatura. O exemplo mais conhecido e difundido são os tricotecenos macrocíclicos, cuja estrutura está representada na Figura 1-4 e isolados principalmente da planta *Baccharis megapotamica*, exclusivamente de planta fêmea (Jarvis, 1988). Essas substâncias são conhecidas como micotoxinas produzidas pelas espécies de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Myrothecium*, que podem ser isolados do solo em torno da planta.

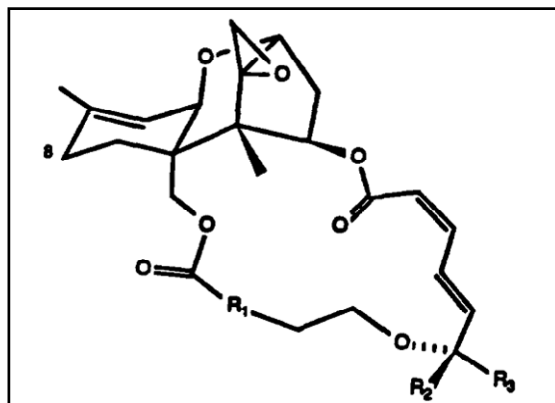


Figura 1-4 - Tricocetenos macrocíclicos.

Ainda não há opinião definida a respeito da origem dessas micotoxinas. Há sugestões de que os fungos do solo produzem os tricotecenos e a planta os absorve. Em favor dessa hipótese, está o fato de que plantas geneticamente relacionadas, *B. megapotamica* macho e *B. dracunculifolia*, não acumulam tricotecenos mesmo quando coletadas na mesma região e em convivência com os fungos produtores (Jarvis, 1987). Por outro lado, a grande quantidade de tricotecenos nos diferentes órgãos da planta tem indicado a planta como a produtora das micotoxinas. Tricotecenos macrocíclicos foram também isolados de outra espécie de *Baccharis* (*B. coridifolia* DC).

Os três casos discutidos acima têm motivado pesquisadores a investigar os mecanismos desse fenômeno bioquímico-ecológico. Embora ainda não seja unanimemente aceito, este fenômeno tem sido interpretado do ponto de vista bioquímico, como sendo uma “transferência genética horizontal” (TGH) entre plantas e fungos (Horr, 1997).

Nos trabalhos que vêm sendo realizados no DQ-UFSCar, visando contribuir para essas investigações, tenta-se encontrar a reprodução desse modelo de associação fungo-planta. Foram escolhidas algumas plantas, sobre as quais sua fitoquímica já foi estudada em considerável extensão. De uma dessas plantas, *Melia azedarach*, uma *Meliaceae*, foi obtida uma larga coleção de fungos endofíticos de seus frutos, folhas, galhos e raízes (Santos, 2003). Os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os que se destacaram como principais hospedeiros

dessa planta. O principal resultado obtido, que possa refletir uma interação genômica entre a planta e o fungo, foi o isolamento e a identificação de meroterpenóides (substâncias que possuem um sistema biossintético misto a partir de unidades terpênicas e policetídicas) de extratos de um fungo endofítico, *Penicillium brasilianum*, em *Melia azedarach*. A semelhança estrutural entre os meroterpenos e os limonóides (Figura 1-5), os quais são substâncias típicas de Meliaceas, é algo destacável. Os limonóides são triterpenóides bastante modificados por oxidações do tipo Baeyer-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 genética (Santos, 2003, Fill, 2009).

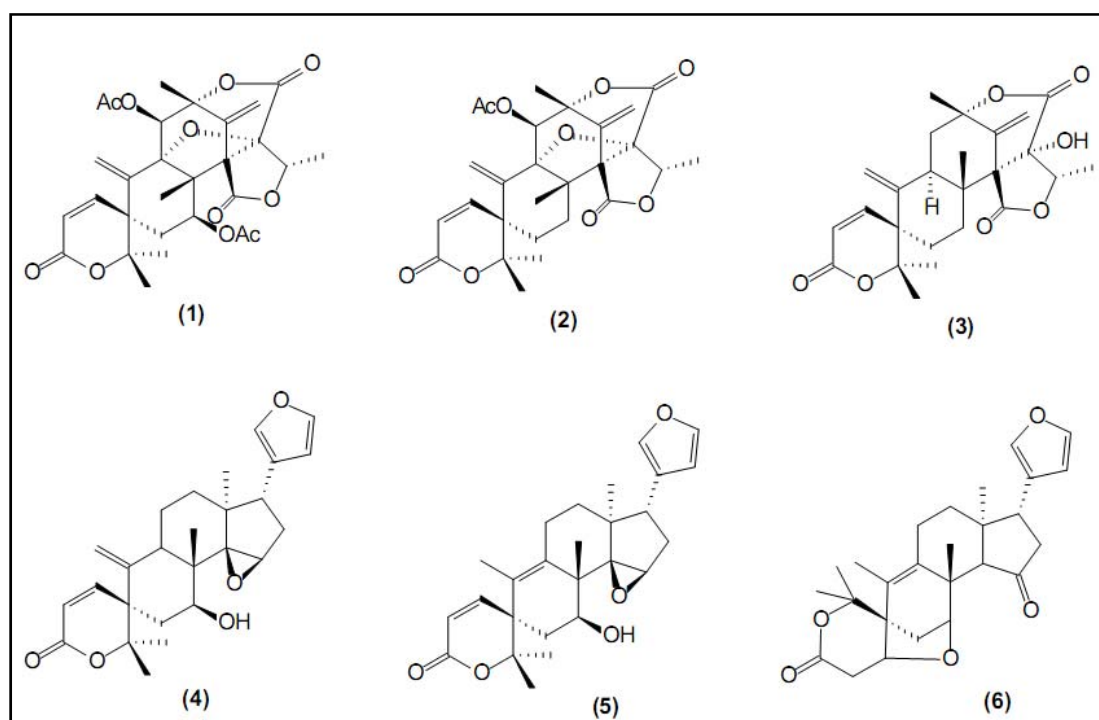


Figura 1-5 - Estruturas moleculares dos meroterpenos isolados de *Penicillium brasilianum* (1-3) e dos limonóides (4-6) característicos de Meliaceas (Santos, 2004).

Além disso, vem sendo realizados trabalhos baseados na investigação da biossíntese de amidas bis-fenilpropanoídicas pela adição aminoácidos ao meio de cultura do fungo *Penicillium brasilianum*. A biossíntese destas substâncias, cujas estruturas estão representadas na Figura 1-6, é importante pelas diversas atividades biológicas relacionadas para este tipo de substância (Fill, 2009).

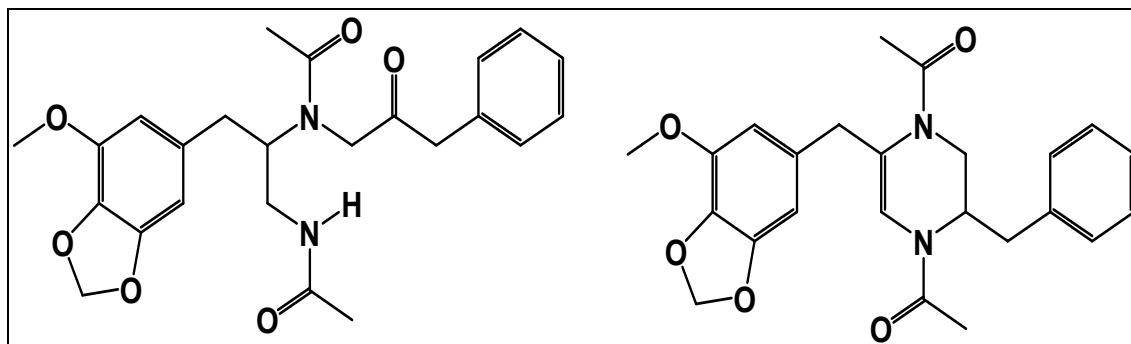


Figura 1-6 - Brasiliamidas obtidas a partir do estudo de biossíntese pelo fungo *Penicillium brasilianum*.

Também foi realizado a identificação de citocalasinas (Figura 1-7), poderosas micotoxinas produzidas por um fungo endofítico da espécie de *Xylaria*, isolado da planta *Cupressus lusitanica*.(Amaral, 2009).

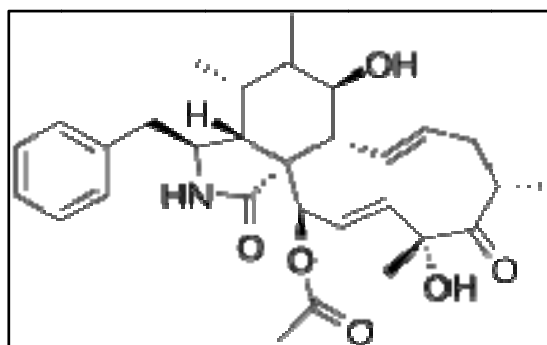


Figura 1-7 - Exemplo de Citocalasina isolada do fungo *Xylaria*, endofítico isolado de *Cupressus lusitanica*.

Dentre as classes de metabólitos secundários conhecidas na literatura, duas delas se mostraram mais importantes na realização deste trabalho:

- 1 – Metabólitos Voláteis, estudados sob a forma de óleo essencial;
- 2 – Metabólitos Fixos, aqueles ligados quimicamente a parede do micélio e extraídos por meio de reações de transesterificação ácida ou básica;

1.3.1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VOLÁTEIS

Dentro das diversas classes de metabólitos secundários existentes, há um grande interesse pela química de metabólitos voláteis. Os metabólitos voláteis são importantes e são definidos como aquelas substâncias com alta pressão de vapor e que são facilmente perceptíveis a órgãos sensoriais, especialmente o olfato. São responsáveis por comunicação química através de moléculas com massa aproximada de 300 Da, facilmente carregadas pela água e pelo ar. Os compostos voláteis são a base das respostas sexuais e comportamentais e são utilizados nas interações entre organismos vivos para aquisição de alimento ou atração do parceiro sexual, em interações sociais diárias, para a demarcação de território, repelência de um inimigo ou outros tipos de perigo. Para os seres humanos, compostos voláteis não veiculam mensagens, mas são utilizados em indústrias de aromatizantes e perfumaria (Turim 1996).

Sob o prisma da ecologia química, os metabólitos voláteis desempenham um papel fundamental e, dentro deste universo, alguns termos foram criados. O mais difundido atualmente é o termo *feromônio*, o qual se refere à compostos químicos que atuam como vetores de comunicação entre indivíduos de mesma espécie (Oldham e Boland, 1996).

Do ponto de vista da química de produtos naturais, os metabólitos voláteis são conhecidos como óleos essenciais e são definidos como substância odoríferas amplamente usadas na indústria de perfumaria, no setor farmacêutico e na área de nutrição (De Castro, 1999).

Estes óleos essenciais são constituídos por uma mistura de, aproximadamente, 200 compostos, os quais são divididos em duas partes. A primeira parte, considerada a mais volátil, constitui cerca de 90 a 95 % do total do óleo essencial e é constituída, basicamente, por monoterpenos e sesquiterpenos e seus derivados oxigenados, podendo apresentar diversas funções como aldeídos, derivados aromáticos, álcoois e ésteres. A segunda parte, considerada a menos

volátil, é constituída por cerca de 5 a 10 % do óleo total e caracteriza-se quimicamente pela presença de compostos de massas moleculares maiores e termicamente mais estáveis, sendo composta por hidrocarbonetos de cadeia longa, ácidos graxos, esteróides, carotenóides, cumarinas e diterpenos. Na fração mais volátil, os terpenos são, em geral, compostos insaturados de fácil decomposição pela ação da luz, do calor e do oxigênio, produzindo compostos indesejáveis, que alteram o aroma original. A fração oxigenada é altamente odorífera e a principal responsável pelos aromas característicos do óleo (De Castro, 1999).

A exploração de óleos essenciais começou, historicamente, no Oriente, vários anos antes de Cristo, tendo bases de produção na Pérsia, Índia, Egito e em outros países da região. No decorrer do tempo surgiram destilarias de óleos essenciais pelo mundo afora, mas somente com o advento da química fina a atividade tomou impulso, permitindo a manipulação de produtos com várias aplicações científicas (Chaves, 1994).

Os óleos essenciais podem ser usados brutos ou como fontes de importantes precursores na síntese orgânica. Neste caso, os óleos que contêm uma porcentagem alta de um único composto são usados para a obtenção de um determinado composto isolado. e localizam-se nos espaços intercelulares ou nas bolsas oleíferas, presentes praticamente em todas as partes da planta, embora cada tipo os possua em regiões definidas: embriões, flores, folhas, cascas, talos, frutas, sementes, madeira, raízes, rizomas e, em algumas árvores, nos exsudatos de óleo-resinosos (Zamboni, 1983).

A principal evidência para a suposição de que os componentes dos óleos essenciais não são fontes importantes de energia para a planta é o fato de que os óleos não são transportados para o caule. Sabe-se que muitos de seus constituintes estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio.

Existem trabalhos demonstrando que a toxicidade de alguns componentes dos óleos voláteis constitui uma proteção contra predadores e

infestantes. Mentol e mentona, por exemplo, são inibidores do crescimento de vários tipos de larvas (Rodrigues & Healey, 1984). Também existem evidências de que alguns insetos utilizam óleos voláteis seqüestrados de plantas para defenderem-se de seus predadores. Assim, os vapores de certas substâncias como citronelal, utilizado por formigas, e α -pineno, utilizados por cupins, podem causar irritação suficiente em um predador para fazê-lo desistir de um ataque (Harbone, 1988).

No processo de obtenção dos óleos essenciais, as etapas de isolamento, concentração e purificação são fundamentais tendo em vista o amplo uso destes processos há vários anos. Os processos mais utilizados para a obtenção dos óleos essenciais são baseados no arraste por vapor e/ou extração com solventes orgânicos (Sides, 2000). Atualmente, os métodos industriais para a obtenção dos óleos essenciais são a destilação fracionada a vácuo, a extração seletiva com solvente e a separação baseada em métodos cromatográficos.

A composição dos óleos essenciais depende do método de extração utilizado. Sendo assim, as técnicas utilizadas atualmente oferecem várias vantagens individuais, mas também sofrem de algumas limitações específicas. Um problema comum a qualquer método de extração empregado é a deterioração do aroma do óleo com a produção de substâncias conhecidas como *artefatos* (substâncias conhecidas por não apresentar uma origem natural). Com isso, é aconselhável sempre empregar condições brandas, já que assim evita oxidações, degradações térmicas e/ou alteração químicas.

1.3.1.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Grande parte dos óleos essenciais são preparados usando-se várias técnicas de destilação a vapor, as quais podem ser agrupadas em 2 categorias:

- a) Método direto, também conhecido como o arraste a vapor, e baseia-se no preenchimento de um recipiente com o material a ser extraído e o vapor, que é introduzido na base, mistura-se com os compostos voláteis,
- b) Método indireto, conhecido por hidrodestilação, e baseia-se no preenchimento do material com água e depois se permite o aquecimento até a temperatura de ebulição da água de forma que os compostos orgânicos voláteis são arrastados pelo vapor, o qual é condensado, separando em água e óleo essencial.

Um inconveniente no uso da destilação é que pode ocorrer a decomposição dos compostos termolábeis. Uma solução para este tipo de conveniente é o uso da destilação a vapor à vácuo. A aparelhagem utilizada para uma destilação a vapor está representada na Figura 1-8.

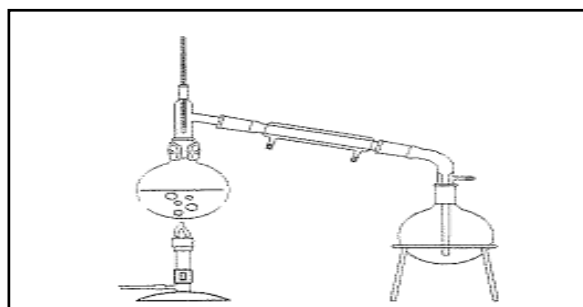


Figura 1-8 - Esquema de destilação a vapor (hidrodestilação).

Alem desses métodos clássicos, uma técnica bem utilizada para a captação de voláteis é aquela em que se baseia na amostragem estática e dinâmica do espaço livre. Os méritos destas técnicas já são reconhecido há algum tempo e, atualmente, tornaram-se o método preferido para a captura de voláteis, principalmente em estudos de ecologia química (Raguso, 1998, Agelopoulos, 1998).

No procedimento original, a amostragem estática do espaço livre (conhecida comumente por “headspace” estático), permite-se que a fase líquida e o vapor de uma amostra entrem em equilíbrio no espaço livre de um recipiente fechado e a uma temperatura controlada e assim um volume pequeno e bem definido deste espaço livre é retirado através de condições especiais e são então

analisados diretamente. Além de fácil e rápido, este método é provavelmente o mais simples, sendo a técnica mais utilizada, principalmente em análises de campos. O principal inconveniente da técnica é a diluição da amostra, o que acarreta perda na sensibilidade da análise. Além disso, há diferenças na composição da fase gasosa e da matriz utilizada.

Outro método conhecido de amostragem do espaço é o conhecido método de amostragem do espaço livre (“*headspace*” dinâmico), que também é conhecido como método de purga e captura, que permite que um gás inerte remova os compostos voláteis da matriz (que seria a purga), onde são arrastados para serem coletados de várias formas (que seria a captura). Neste método, o equilíbrio entre a amostra e o espaço livre é alterado a todo momento e, concentrando os compostos voláteis em um adsorvente, o torna aplicável a uma faixa muito mais ampla de materiais. Os detalhes do procedimento apresentam particularidades de acordo com a o tipo de “*trap*” utilizado, podendo ser criogênico ou com adsorventes.

Neste método, os compostos voláteis podem ser recuperados com bons rendimentos através de dessorção térmica, técnica esta que, embora seja aplicável a vasta quantidade de composto, podem causar mudanças moleculares em composto termolábeis. Outra técnica que pode ser utilizada e é mais viável para extração dos compostos é o uso de dessorção (eluição) com solvente orgânico, que apresenta apenas o inconveniente que é a dependência da polaridade do solvente, que pode causar a perda de alguns compostos voláteis.

A abordagem baseada no “*headspace*” dinâmico apresenta vantagens como o fato dos extratos dos compostos voláteis serem mais limpos se comparado com os extratos obtidos a partir da extração com solvente ou pelos métodos de destilação, facilidade em dessorver os voláteis capturados em polímeros adsorventes porosos diretamente na porta de injeção do cromatógrafo, além de maior flexibilidade em acondicionar as amostras em recipientes de vários tamanhos. A principal crítica a este método é a facilidade de contaminação. A Figura 1-9 ilustra uma extração deste tipo.

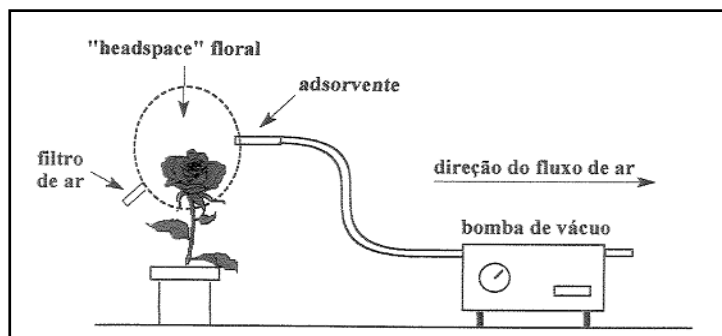


Figura 1-9 - Esquema geral para extração de compostos voláteis através de headspace dinâmico.

1.3.1.2. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Dentre os metabólitos secundários estudados e obtidos a partir da química de produtos naturais, os óleos essenciais apresentam uma posição de destaque no que se refere a propriedade de atividade biológica relacionada aos compostos existentes no óleo. De forma geral, os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica no que se refere como potentes agentes microbianos. Esta propriedade, de certa maneira, representa o que seria uma extensão da própria função que exercem nas plantas, promovendo uma ação de defesa contra bactérias e fungos fitopatogênicos (Janssen, 1987; Silva, 1992).

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações obtidas ou do óleo puro e natural e tem a finalidade de identificar qual ou quais substâncias são responsáveis por algum efeito observado. Trabalhos na literatura, como os realizados por Lobato, (1989) relatam os resultados de ensaio de ação bactericida com cerca de 175 óleos essenciais visando a desinfecção de ambientes domésticos e hospitalares. Entre os grupos de substâncias responsáveis pelas atividades antibacterianas observadas, estão álcoois monoterpênicos, tais como linalol, geraniol

e α -terpineol, além de óxidos como ascaridol e 1,8-cineol. Timol, carvacrol, eugenol e safrol apresentam também elevada atividade biológica.

Normalmente a atividade biológica é atribuída a uma única substância mas há casos em que algum tipo de atividade existe, não pela presença de algum composto isolado, mas sim pela mistura de composto referente ao óleo bruto. Trabalhos na literatura, como o realizado por Lobato (1989), mostram o ensaio para avaliação de atividade antimicrobiana. Neste trabalho, foi descrito ensaios com 14 óleos essenciais contra 9 diferentes tipos de bactérias. Três destes óleos apresentaram atividade, entre eles um proveniente de uma espécie de Piperaceae, *Piper hispidinervium*, cujo principal componente é o safrol. Comprovou-se, após o fracionamento do referido óleo, que o responsável pela atividade bacteriana é o safrol. No entanto, acredita-se que o efeito bacteriano observado esteja sendo potencializado pela presença de pequena quantidade de um derivado de mentol não-identificado, além da presença de δ -elemeno, pois frações que continham esse composto também apresentaram atividade tão boa ou melhor do que as frações referente a presença de safrol. Além disso é citado um grande número de atividade microbiana para α e β -pineno e limoneno (Chalcat, 2000; Neirotti, 1996).

Alguns óleos também apresentam ação anti-inflamatória, que, em muitos casos, é causada pelo metabólito α -bisabolol, principalmente obtido a partir do óleo essencial da camomila (*Matricaria chamomilla*). O rendimento em óleo essencial da camomila é baixo e a concentração de α -bisabolol neste é variável, geralmente entre 0 a 30 % do óleo, o que justifica seu valor comercial elevado. No entanto, estudos revelaram que este constituinte é o principal responsável pela atividade anti-inflamatória observada no óleo essencial (Jellinek, 1984). O α -bisabolol preparado sinteticamente, neste caso como uma mistura racêmica (\pm), também apresenta atividade biológica, no entanto menor que o obtido naturalmente, que é a forma (-). Este composto obtido sinteticamente é mais utilizado na indústria de cosméticos. Para uso específico, o isômero obtido naturalmente, promove melhores resultados, o que justifica a importância deste metabólito (Jellinek, 1984).

Além desse tipo de atividade anti-inflamatória, óleos essenciais também apresentam outro tipo de atividade farmacológica. Recentemente, foi veiculado no programa Globo Repórter a forte e importante atividade biológica apresentada para o óleo essencial de uma espécie de laranja, conhecida popularmente por laranja da terra (Figura 1-10). O uso de 200 kg de fruta, seja a matéria usada a fruta nova ou bagaço, é capaz de produzir cerca de 1 kg de óleo que apresenta diversas aplicações farmacológicas, como o tratamento de úlcera e gastrite, não só no tratamento das lesões no estômago, mas também na melhora dos tecidos internos do órgão, diminuindo em cerca de 75 % a úlcera. Acredita-se que esta impressionante atividade deste óleo no tratamento seja devido a grande diversidade e mistura de monoterpenos presente no óleo essencial. Um resultado importante e promissor dos ensaios realizados com este óleo essencial de laranja da terra é que ele mostra cerca de 60 % mais eficiente que o medicamento sintético. Outros estudos devem ser realizados para a confirmação se realmente esta atividade deve-se pela mistura dos compostos ou se algum composto isolado é responsável por isso (Globo Reporter, 2010).



Figura 1-10 - Espécie de laranja, conhecida popularmente como Laranja da terra.

Óleos essenciais apresentam outros tipos de atividades biológicas, como atividade terapêutica em tratamentos de aromaterapia, atividades antifúngica e antibactericida contra diferentes tipos de fungos e bactérias, atividade anti-séptica, são usados como precursores naturais de outros tipos de compostos, aditivos de alimentos, bebidas e cosméticos, além de atividades anti-inflamatórias, dermatológicas, antidiurética, entre outras (Brito, 2009).

O mercado de óleo essencial no Brasil é bem intenso. Nos últimos 20 anos, observou-se um crescimento quadruplicado, movimentando altos valores agregados aos óleos exportados, chegando a casa dos 27 milhões de dólares anuais. A Tabela 1-1 mostra um resumo da movimentação econômica de óleos essenciais no Brasil em exportações.

Tabela 1-1 - Exportações dos óleos essenciais nos anos de 1970 e 2002

ÓLEO	1970 – EXPORTAÇÕES		2002 – EXPORTAÇÕES	
	US\$	QUANT. (t)	US\$	QUANT. (t)
<i>Mentha arvensis</i>	13.257.000	1.486	321.272	13
Hortelã-pimenta	3.415.984	1.485	54.001	0.588
Pau-rosa	1.290.074	288	1.041.292	23
Laranja	45,310	82	17.177.408	20.342
Demais óleos	8.534.632	2.427	9.272.294	1.351
Total	26.534.000	5.768	27.866.267	21.730

1.3.1.3. METABÓLITOS VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Substâncias voláteis de fungos têm sido amplamente estudadas sob diversos aspectos. Várias espécies de fungos produzem substâncias voláteis específicas, sendo utilizadas como marcadores taxonômicos da espécie, inclusive diferenciando linhagens toxicogênicas de não-toxicogênicas. O crescimento de certos fungos em alimentos, como por exemplo *Aspergillus flavus*, pode provocar grandes prejuízos, manifestados pela deterioração, surgimento de micotoxinas e esporos com grande potencial alergênico. A inalação de esporos de fungos de grãos mofados é perigosa (Rylander, 1986) e investigações tem revelado que voláteis de fungos podem causar danos para a respiração orgânica de seres vivos (Larsen,

1998). Voláteis de fungos são também importantes como aromatizantes de muitos alimentos fermentados (Kinderlerer, 1989).

Os estudos de substâncias voláteis de fungos endofíticos são raros na literatura. Entretanto, os poucos trabalhos existentes mostram que estes microorganismos são uma fonte bem promissora para este tipo de substâncias. O fungo *Muscodor albus* é um endofítico isolado de *Cinnamomum zeylanicum* (Worapong, 2002). Este fungo é um potente inibidor de vários fungos e bactérias pela produção de uma mistura de compostos voláteis. A maioria destes compostos é sintetizada ou adquirida e são formulados até uma mistura artificial. Esta mistura não apenas imita os efeitos antibióticos dos compostos voláteis produzidos pelo fungo mas também é usado para confirmar a identidade da maioria dos compostos voláteis emitido pelo microorganismo (Strobel, 2001). Cada um das cinco classes de compostos voláteis produzido pelo fungo apresentam diversos efeitos antimicrobianos contra fungos e bactérias, mas nenhum dele se mostrou letal. Entretanto, podem causar morte em um vasto numero de plantas e fungos patogênicos, ou mesmo em seres humanos. A classe de compostos inibitórios mais efetivo são os ésteres, onde o acetato de isoamila foi o mais ativo biologicamente. Além disso, a composição do meio de cultura influencia drasticamente no tipo e a concentração dos compostos voláteis que são produzidos (Ezra, 2003). A mistura destes compostos voláteis também pode ser usada para tratamento de sementes, frutas e outras partes das plantas quando armazenadas ou enquanto são transportadas (Worapong, 2002).

Outro fungo produtor de voláteis antibióticos é o fungo *Muscodor roseus*. Obtido de diversas plantas crescente no território norte da Austrália, este fungo é efetivo na causa de inibição e até morte de fungos e bactérias patogênica, assim como o fungo *Muscodor albus* (Worapong, 2002).

Não são apenas fungos endofíticos do gênero *Muscodor* que são capazes de produzir compostos voláteis antibióticos. Um exemplo disso é o fungo *Gliocladium sp.* Os componentes voláteis produzidos por este fungo são totalmente diferentes aos produzidos tanto pelo fungo *M. albus* como pelo fungo *M. roseus* (Strobel, 1997). Os compostos voláteis inibidores mais abundantes do *Gliocladium*

sp. são da classe dos anulenos, que são comumente usado como combustíveis e que foram descoberto como produtos naturais a partir desse fungo (Stinson, 2003). Entretanto, este fungo não apresenta atividade tão boa e satisfatória como os fungos do gênero *Muscodor* (Stinson, 2003).

1.3.2. METABÓLITOS FIXOS

Outra classe de metabólitos secundários importante para o estudo de metabólitos secundários são os conhecido metabólitos fixos. Do ponto de vista de definição, este metabólitos fixos podem ser divididos e classificados em duas formas distintas:

I – os metabólitos fixos que são facilmente extraídos pelo uso de solventes orgânicos, e que fazem a base da Química de produtos naturais;

II – os metabólitos fixos que estão quimicamente ligados a parede celular, onde a Figura 1-11 faz uma representação da disposição destes metabólitos na parede celular.

Considerando esta divisão, o estudo de metabólitos fixos ligados quimicamente à parede celular (que a partir de agora será referido apenas como metabólitos fixos) se mostra importante. Do ponto de vista biológico, estes metabólitos fixos são classificados como compostos lipídicos, que é um grupo de diversos tipos de metabólitos caracterizado de acordo com sua química e apresentam característica física principal a insolubilidade em água. As funções biológicas dos lipídios são diversas assim como sua química. Óleos e gorduras são as principais formas armazenadoras de energia em muitos organismos. Fosfolípidios e esteróides são os elementos estruturais majoritários de membranas biológicas. Outros lipídios, que estão presentes relativamente em pequenas quantidades, apresentam papel crucial em diversos processos biológicos, como cofatores de enzimas, transportadores de elétrons, pigmentos absorvedores de luz, agentes

emulsificantes no trato digestivo, além de serem promissores hormônios e mensageiros intracelulares (Lenninger,2000)

Dentre os metabólitos fixos, os principais são os ácidos graxos, ácidos carboxílicos com cadeia carbônica variando entre 12 e 36 átomos de carbono. Em diversos ácidos graxos, esta cadeia pode ser ramificada e totalmente saturada. Em outros casos, a cadeia pode conter uma ou mais ligações duplas. Os ácidos graxos mais comum ocorrem em uma cadeia de 12 a 24 átomos de carbono, que resulta do processo biosintético deste compostos, o qual envolve a condensação de unidades acetato (Dewick,1997). Em micro-organismos, estes ácidos graxos costumam está dispostos quimicamente ligada a membrana celular, cuja Figura 1-11 mostra uma representação da forma que estão dispostos na membrana celular.

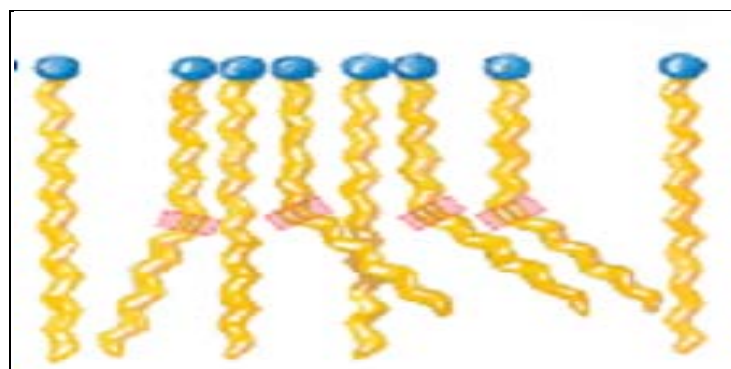


Figura 1-11 - Mistura de ácidos graxos saturados e insaturados na parede celular (Lenninger, 2000).

As propriedades físicas de ácidos graxos, e que pode ser também estendido a compostos lipídicos em geral, são determinadas pelo tamanho da cadeia carbônica e também pelo grau de insaturação. A temperatura ambiente (25 °C), ácidos graxos saturados com cadeia carbônica entre 12 e 24 átomos de carbono apresentam consistência de cera, enquanto os insaturados similares são óleos(Lenninger,2000).

Em vertebrados, os ácidos graxos livres (não esterificados) circulam no sangue ligados covalentemente a uma proteína transportadora, geralmente albumina. No entanto, os ácidos graxos estão presentes no plasma do sangue como

derivados de ácido carboxílico, como ésteres ou amidas. Sem o grupo carboxilato, estes derivados de ácidos graxos são geralmente menos solúveis em água que os ácidos graxos livres. Além de ácidos graxos, há diversas outras classes de compostos, como esteróides, triacilgliceróis e esteróides (Lenninger,2000).

Triacilgliceróis (Figura 1-12) são os compostos lipídicos mais simples e são constituídos por três ésteres de ácidos graxos ligados a molécula de glicerol. Muitos dos triacilgliceróis ocorrem como mistura e podem conter 2 ou mais ácidos graxos diferentes.

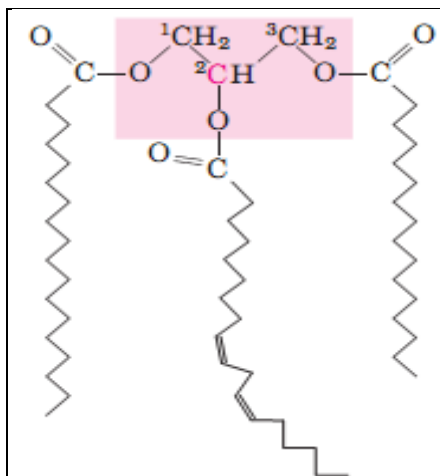


Figura 1-12 - Triacilglicerol contendo 3 ácidos graxos diferentes ligado ao glicerol. Na figura, tem-se, respectivamente, Ácido Steárico, Ácido Linóleico e Ácido Palmítico.

Esteróides são estrutura lipídicas presentes nas membranas de muitas células eucarióticas. A estrutura característica deste tipo de composto é núcleo esteroidal, composto por quatro anéis fundidos, sendo 3 anéis de 6 carbonos e um com 5 átomos de carbono. Este núcleo é planar e é relativamente rígido e os anéis fundidos não permite a rotação sobre ligações C-C. Diversos esteróides são conhecidos. Dentre eles, o colesterol é o esteróides mais comum em tecidos animais. Esteróides similares são encontrados em outros organismos eucarióticos: estigmasterol em plantas e ergosterol em fungos, por exemplo. Bactérias não são capazes de sintetizar esteróides, mas algumas espécies são capazes de incorporar esteróides exógenos em suas membranas (Lenninger, 2000). As estruturas dos esteróides citados estão representadas na Figura 1-13.

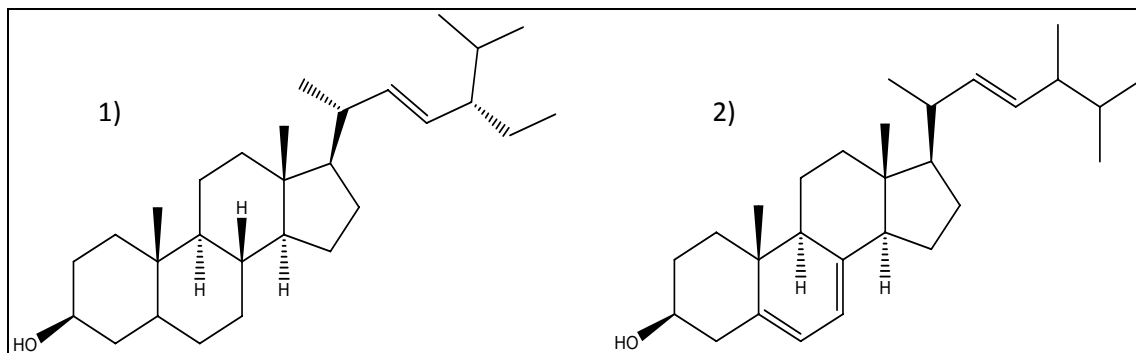


Figura 1-13 – Estruturas químicas dos esteróides: 1) Estigmasterol, comumente encontrado em plantas; 2) Ergosterol, comumente encontrado em fungos.

1.3.2.1. APLICAÇÕES

Compostos lipídicos apresentam uma diversidade de aplicação. No corpo humano, eles tem a principal função de evitar a perda de água pelo organismos, além do valor energético associado a estes compostos (Lenninger, 2000). Dentre as aplicações referentes a estes tipos de compostos, destacam-se a atividade farmacológica e aplicação destinada a produção de biocombustíveis. sob forma de biodiesel, sendo a aplicação mais rentável atualmente em termos do uso de compostos lipídicos.

Biodiesel, do ponto de vista químico, é um biocombustível derivado de monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, provenientes de fontes renováveis (Abreu, 2004), possuindo propriedade físico-químicas similares ao óleo diesel de petróleo. Pelas suas características é um substituto natural ao diesel, podendo ser produzidos a partir de óleos vegetais, gorduras animais e óleos utilizados em frituras de alimentos (Cruz, 2006). Embora alguns autores definam biodiesel como um tipo de biocombustível, outros adotam de forma genérica o termo biodiesel a qualquer tipo de biocombustível que possa substituir o diesel em uma matriz energética. Desta forma, óleos vegetais *in natura*, puros ou em misturas, e bioóleos são também denominados de biodiesel (Ramos, 2003).

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água, podendo ser de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana (Moretto, Fett, 1998).e são, predominantemente, derivados de ácidos graxos saturados e insaturados e apresentam-se na fase líquida à temperatura ambiente.

São produzidos mediante reação de transesterificação entre metanol e diferentes óleos nativos do Brasil, especialmente soja, mamona e algodão (Abreu, 2004). Estes ácidos graxos possuem longas cadeias de carbono, com variado número e posição das ligações duplas nestas cadeias. O óleo necessita de algumas modificações química para ser utilizado nos motores à diesel, tais como transesterificação, emulsificação, esterificação e craqueamento térmico e catalítico. Entre estes processos, a transesterificação e a esterificação são as reações mais importantes para produzir biodiesel (Lang, 2001, Meher, 2006, Oliveira, 2006)..

O biodiesel é normalmente produzido por uma reação catalítica de transesterificação de óleos ou gorduras, produzindo uma mistura de ésteres alquílicos de baixa massa molar, tendo a glicerina como subproduto. A reação de transesterificação de triglicerídeos é representada na Figura 1-14 (Ma, 1999, Fukuda, 2001, Gerpen, 2005).

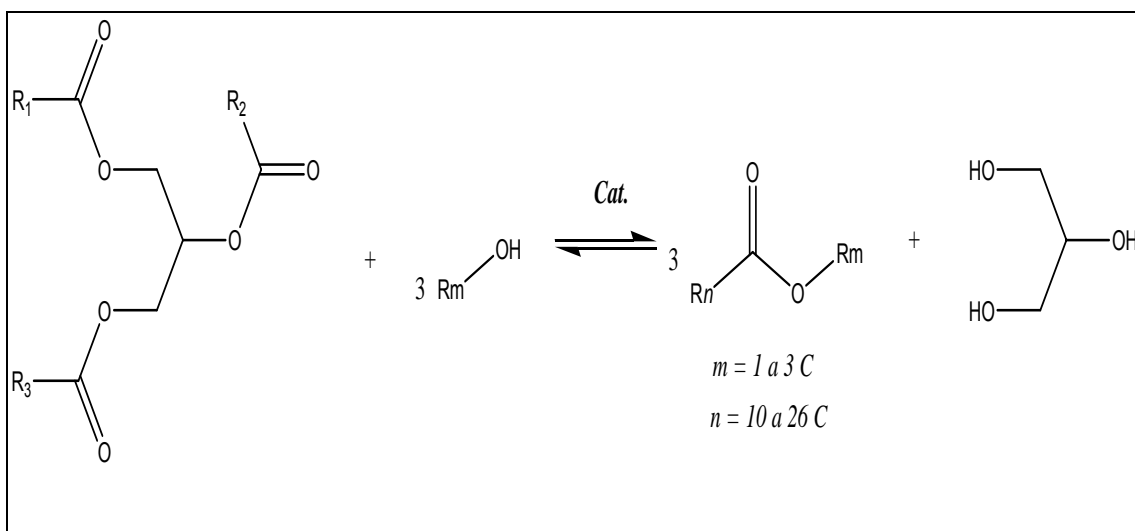


Figura 1-14 - Reação de transesterificação de óleos vegetais.

Somente álcoóis simples, tais como metanol, etanol, propanol e butanol podem ser usados na transesterificação. Segundo a literatura, a produção de biodiesel pelo rota metílica é mais econômica e mais produtiva se comparada com as demais rotas, especialmente a rota etílica. O metanol é mais frequentemente utilizado por razões de natureza física e química (cadeia curta e polaridade). Apesar de muitas pesquisas com Biodiesel atualmente utilizarem o etanol devido a baixa toxicidade e ser proveniente de fontes renováveis (Silva, 2005), todos os países que utilizam biodiesel o faz por via metílica (Santos, 2008).

1.3.2.1.1. MECANISMOS DE REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

A reação de transesterificação é a mais usada para a produção de biodiesel e é composta de três reações consecutivas e reversíveis, nas quais são formados diglicerídeos e monoglicerídeos como intermediários (reações (1), (2) e (3) da Figura 1-15) (Freedman, Butterfield, Pryde, 1986). Além disso, estas reações são realizadas mediante a presença de um catalisador, geralmente ácidos e bases de Bronsted, sendo os principais hidróxidos e alcoóxidos de metais alcalinos e os ácidos sulfúrico, fosfórico e clorídrico (Suarez, 2007).

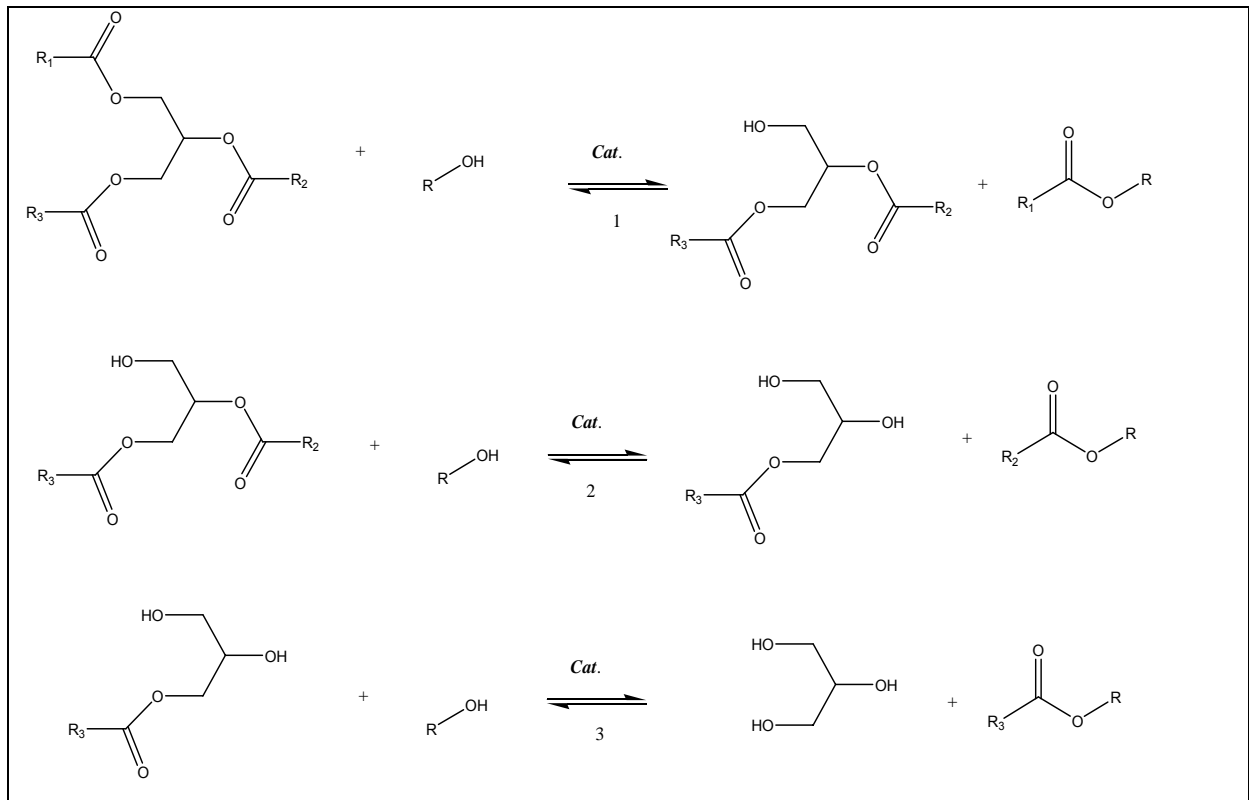


Figura 1-15 - Reações de transesterificação de triglicerídios.

Na Figura 1-16 é mostrado o mecanismo que explica o uso de catalisadores básicos na reação de transesterificação de triglicerídeos (Suarez, 2007).

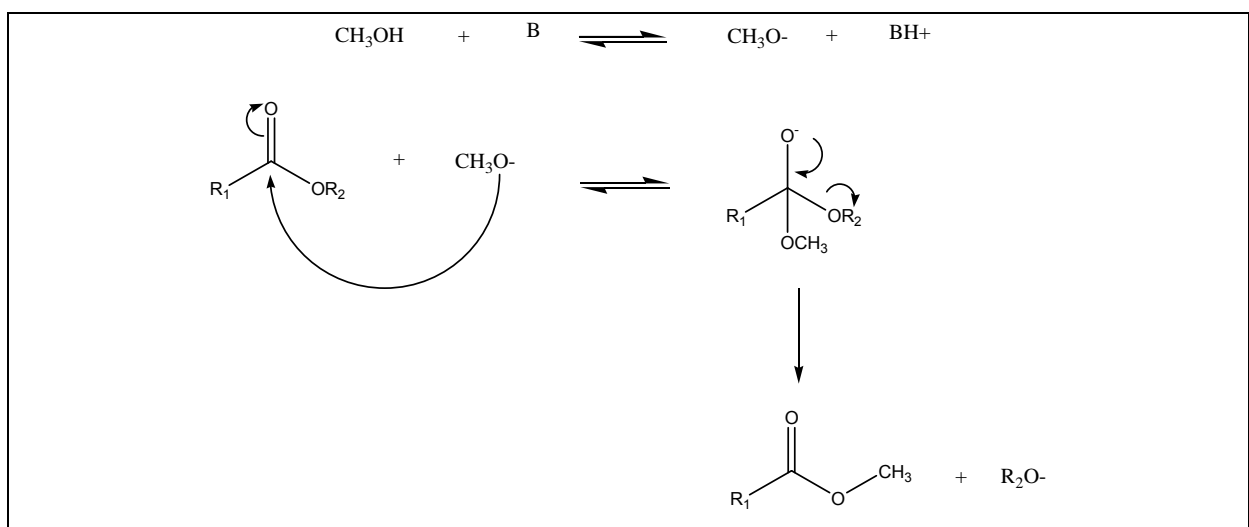


Figura 1-16 - Mecanismo de reação para transesterificação em catálise básica.

A reação ocorre por meio de uma espécie ativa, que é o alcóxido e é formado pela reação do álcool com a base. No caso dos catalisadores serem hidróxidos alcalinos, mais utilizados nas indústrias, forma-se também água que leva a reações secundárias de hidrólise e saponificação, o que justifica os melhores rendimentos (Meneghetti, 2006, Vicente, 2004). Então a carbonila de um triglicerídeo sofre um ataque nucleofílico do alcóxido, levando a formação de um intermediário tetraédrico. Este intermediário sofre uma eliminação formando o éster de ácido graxo e o ânion, o qual regenera a base de partida por meio de desprotonação (Suarez, 2007). Na primeira reação ocorre a formação de um diglicerídeo, onde sofre uma nova reação para a formação de um monoglicerídeo, que por processo similar, forma finalmente a glicerina. O uso de reações de transesterificação em meio básico apresenta inconvenientes, como, por exemplo, a formação de enolatos através da reação do hidrogênio ácido α -carbonílico com a espécie básica, o que diminui o rendimento final da reação.

Além desse tipo de reação em meio básico, utiliza-se ácidos de Bronsted-Lowry como catalisadores, onde os mais usados são os ácido sulfúrico e clorídrico (Schuchardt, Sercheli, Vargas, 1998). A Figura 1-17 mostra o mecanismo que explica a formação dos ésteres metílicos utilizando catálise ácida.

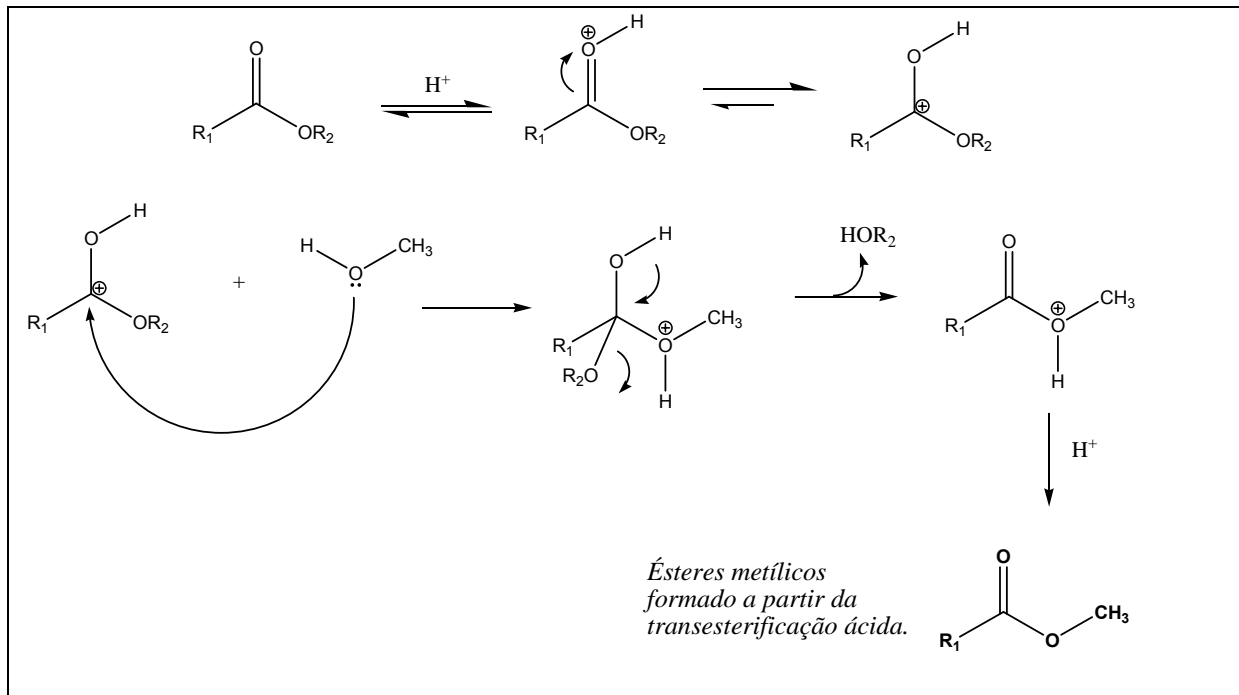


Figura 1-17 - Formação de ésteres metílicos usando catálise ácida.

O mecanismo de formação é explicado através de um ataque eletrofílico da carbonila do triglicerídeo a espécie ácida H^+ , formando uma espécie que, por deslocamento de elétrons, forma um carbocátion. Este carbocátion sofre um ataque nucleofílico de uma molécula de álcool, formando um intermediário tetraédrico. Então ocorre a eliminação de um diglicerídeo e um éster de ácido graxo, juntamente com a regeneração da espécie catiônica. Por processos similares, são formados os monoglicerídeos e a glicerina.

1.3.3. METABÓLITOS FIXOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Como já escrito, grande parte dos metabólitos fixos, aqueles que estão ligados diretamente a parede celular, são de natureza lipídica (Lenninger, 2000). Em micro-organismos, isso não é diferente. Vários micro-organismos oleaginosos, tais como leveduras, fungos, bactérias e microalgas podem acumular alto nível de

lípidos em sua biomassa (Meng, 2009, Chisti, 2007, Illman, 2000, Gouda, 2008, Papanikolaou, 2004, Vicente, 2009). Dentre estes organismos, fungos e leveduras tem sido considerada uma fonte potencial para uma larga produção de compostos lipídicos. A Tabela 1-2 lista um resumo de conteúdo lipídico de alguns micro-organismos.

Tabela 1-2 - Conteúdo lipídico de micro-organismos oleaginosos (Vicente, 2010).

MICRO-ORGANISMOS		CONTEÚDO LIPÍDICO (%)
MICROALGAS	<i>Chlorella vulgaris</i>	40-60
	<i>Chlorella. emersonii</i>	63
	<i>Mannochoris sp.</i>	38-68
	<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
FUNGOS	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
	<i>Cunninghamella echinulata</i>	40-47
	<i>Mortierella isabellina</i>	68-86
	<i>Mucor circinelloides</i>	20
LEVEDURAS	<i>Lypomices starkegi</i>	64
	<i>Rhodotula glutinis</i>	72
BACTÉRIAS	<i>Gordonia sp.</i>	93
	<i>Rhodococcus opacus</i>	96

A produção de lipídios depende de vários fatores como espécie do micro-organismo, pH do meio, tempo, temperatura, aeração, nutrientes, etc. (Arora, 1992, Griffin, 1994).

Os lipídios produzidos pelos fungos podem ser extraídos dependendo de sua complexidade estrutural. Para os lipídios simples, que encontram-se livres no interior das células, os processos de extração incluem a utilização de solventes apolares à frio, como hexano e heptano; enquanto os lipídios mais complexos necessitam de solventes mais polares (Christie, 1989). Às vezes, se faz necessário o uso de processos extrativos ácidos (Christie, 1987).

Por apresentarem uma susceptibilidade relacionada a degradação por enzimas liberadas durante a extração e a instabilidade de suas insaturações por processos de oxidação e temperatura, os cuidados durante os procedimentos de extração e conservação são importantes para a manutenção das estruturas intactas para a análise das mesmas. Entre estes cuidados, pode-se citar o uso de isopropanol (inibidor de atividade enzimática) e a manipulação em atmosferas inertes que podem ajudar na conservação das estruturas lipídicas (Christie, 1989, Arora, 1992).

De forma geral, os micro-organismos são classificados e diferenciados através do estudo microscópico de sua morfologia e estruturas celulares (Silva, 1998), sendo necessário o conhecimento de seus ciclos de vida, incluindo fases de crescimento e reprodução através dos esporos sexuais e assexuais e suas estruturas de suporte (Arora, 1992). Quando não se conhece estas características, torna-se difícil identificar e classificar um determinado microorganismo (Fenselau, 1994).

Como formas alternativas de estudos de micro-organismos, tem-se desenvolvido o estudo de caracterização através de marcadores quimiotaxonômicos (Silva, 1998). Esses marcadores quimiotaxonômicos são substâncias químicas de estrutura definida que podem ser extraídas das células e serem então identificadas por métodos analíticos específicos, variando qualitativamente e quantitativamente entre os diferentes micro-organismos, sendo um importante parâmetro para identificação e classificação taxonômica (Fenselau, 1994, Gunstone, 1995).

Dentre os marcadores quimiotaxonômicos de micro-organismos que se tem estudado, destacam-se a sequência de ácidos nucleicos e de DNA e RNA, os perfis protéico, de lipídeos complexos e de ácidos graxos (Silva, 1998).

Metodologias como a espectrometria de massas tem contribuído para a análise de lipídeos de diferentes populações de micro-organismos. Os procedimentos incluem o isolamento, o tipo de extração e análise do extrato. A identificação se faz pela presença da classe de lipídeos como componentes

majoritários (Fenselau, 1994). Além disso, a quantificação também é importante tanto para diferenciação como para a classificação do microorganismo.

O estudo do perfil dos ácidos graxos livres ou presentes nos glicerídeos também tem larga utilização. Entretanto, apresenta um inconveniente: como são compostos muitos variáveis, a reprodutibilidade depende de um controle das condições de crescimento, tempo de incubação e meio de cultura utilizado, além de ser necessário um método padronizado dos métodos de extração, derivatização e análises (Silva, 1998, Fenselau, 1998, Gunstone, 1995).

Como exemplo, tem-se a diferenças de ácidos graxos presentes nas bactérias, como ácidos graxos cíclicos. Em vários micro-organismos, verifica-se a presença de ácidos graxos poli-insaturados, o que é ausente em bactérias. A Figura 1-18 mostra as diferenciações entre espécies de micro-organismos e o perfil de ácidos graxos presentes em cada tipo (Arora, 1992, Fenselau, 1994).

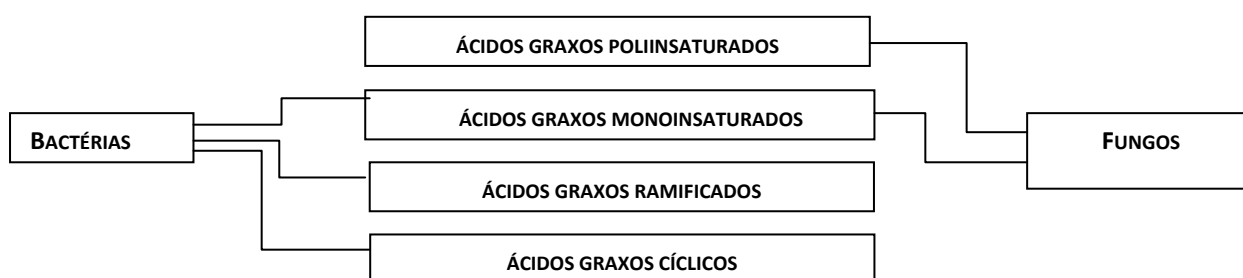


Figura 1-18 – Ácidos graxos produzidos por micro-organismos.

Além disso, a literatura apresenta métodos de classificação e diferenciação pela simples presença ou não de determinados ácidos graxos na composição de micro-organismos (Stahl, 1996).

Em alguns casos, estes compostos são extraídos mediante o uso de reações semelhantes a já discutidas para os metabólitos de plantas: transesterificação em catálise ácida ou básica. Os compostos são então obtidos em forma de ésteres metílico, se usado o metanol como agente transesterificante, ou ésteres etílicos, se for usado etanol (Santos, 2008). Estes ésteres metílicos em micro-organismos, especialmente em fungos endofíticos, vem apresentando

aplicações bem interessantes, além da importância já destacada como marcadores quimiotaxonômicos, diferenciando espécies distintas de fungos (Chen, 2001, Stahl 1996). Algo que vem chamando a atenção é o fato da aplicação como matrizes novas e promissoras em processos que envolvem a produção de biocombustíveis (Vicente, 2010).

A qualidade de um biodiesel depende da composição de ácidos graxos de um determinado material e, conseqüentemente, não é todo micro-organismos que pode ser usado como uma fonte segura para a produção de biodiesel. Uma das vias para gerar micro-organismos com composição lipídica ideal para a produção de biodiesel pode ser feita através da manipulação de genes chaves, que é realizada com o intuito de aumentar o teor de ácidos graxos tornando aplicável para um biodiesel de alta qualidade (Durrett 2008, Pinzi, 2009). Diversos micro-organismos são exemplos do estudo de manipulação gênica para aplicação em biocombustíveis e são citados na literatura. *Mucor circinelloides* foi o primeiro microorganismo estudado com esse intuito (Ratledge, 2004). Com o conhecimento do seu genoma e da manipulação de genes chaves, foi possível descobrir outras espécies, especialmente do gênero *Mucor* (Zhang, 2007). Na grande maioria desses estudos, os compostos lipídicos são obtidos sob forma de ésteres metílicos de ácidos graxos por meio de catálise ácida (Vicente, 2009). Outros estudos mostraram que fungos do gênero *Fusarium* e *Trichoderma* são fontes promissoras como produtores de compostos lipídicos, especialmente ácidos graxos (Chen, 2000).

1.4. METODOLOGIAS DE ANÁLISE

1.4.1. ÍNDICE DE RETENÇÃO

A tecnologia atualmente disponível para o estudo destes tipos de compostos, especialmente substâncias orgânicas voláteis sob forma de óleo essencial, ainda não é suficientemente confiável para uma identificação segura pois há uma grande semelhança entre os espectros de massas para cada componente. Por este motivo, faz-se necessário o uso de ferramentas auxiliares que permitam colaborar na identificação dos compostos. Uma dessas ferramentas auxiliares mais usadas é conhecida como índice de retenção, que usada juntamente com a espectrometria de massas torna-se uma importante parâmetro para a identificação de compostos. Um advento que tornou essas medidas de índices de retenção mais usual e mais confiáveis foi o surgimento das colunas capilares de fase quimicamente ligada. O uso destas colunas tornou a obtenção de cromatogramas em tempos de retenção mais reprodutíveis e possibilitou uma maior confiabilidade das medidas de índices de retenção. Estas medidas podem ser obtidas de duas formas distintas conforme a característica do óleo essencial obtido: se o óleo apresenta uma baixa complexidade e diversidade de compostos, é preferencialmente utilizado o sistema de índice de retenção isotérmico (onde a rampa de aquecimento do cromatógrafo gasoso é realizada a uma temperatura constante); nos casos onde se tem um óleo essencial com uma vasta complexidade e diversidade de compostos, é mais usado o método baseado em uma programação de temperatura linear, pois a comparação com os dados de retenção se torna mais precisa e reprodutível.

Dentre os índices de retenção conhecidos e usados na literatura, o mais usado para substâncias voláteis é o conhecido Índice de Kovats (KI) (Adams, 2001). Inicialmente proposto em 1958, é uma das ferramentas mais usuais e compara dados de retenção de diferentes compostos obtidos por vários autores em

diferentes condições. A relação inicialmente utilizada por Kovats é uma relação logarítmica e utiliza como padrão de referência uma mistura de hidrocarbonetos homólogos de cadeia linear entre 9 e 25 átomos de carbono. O KI pode ser calculado para cada composto presente nos óleos essenciais pela seguinte equação de Adams:

$$KI(x) = 100 \left[\left(\frac{\log RT(x) - \log RT P(z + 1)}{\log RT P(z + 1) - \log RT P(z)} \right) \right]$$

Onde:

- **KI (x)**: Índice de retenção de um composto X;
- **RT (x)**: Tempo de retenção do composto X;
- **RT P(Z)**: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto;
- **RT P(Z+1)**: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto;

No entanto, esta relação apresenta um inconveniente de ser reprodutível apenas em uma condição cromatográfica bem definida e sob condições instrumentais bem específicas, como tipo e tamanho da coluna, condições de aquecimento, vazão de gás e etc. Condições estas que tornam o emprego desta relação limitada.

Posteriormente, modificações foram sendo realizadas nesta relação. E dentro das modificações feitas, a que mostrou melhores parâmetros tornando os dados de retenção mais reprodutíveis e confiáveis para substâncias voláteis foram as modificações feitas por Van den Dool e Kratz (Van den Dool e Kratz, 1963). Esta relação, também baseada no uso de uma mistura de hidrocarbonetos homólogos de cadeia linear entre 9 e 25 átomos de carbono como padrão de referência, é obtida de duas formas conforme o método cromatográfico utilizado, o que torna a escolha do método de análise empregado como uma das etapas fundamentais

A primeira forma de obtenção desta relação é mais utilizada para óleos essenciais de composição menos complexas e é baseada numa relação que é mais empregada para o método de retenção isotérmico, onde a temperatura programada é constante, também baseada numa relação logarítmica: A equação a seguir mostra esta relação:

$$KI(x) = 100[C_n - (C_n - 1)] \times \left[\frac{\log T_x - \log(T_n - 1)}{\log T_n - \log(T_n - 1)} \right] + 100 (C_n - 1)$$

Onde:

- ***KI(x)***: Índice de retenção de um composto X;
- ***T_x***: Tempo de retenção do composto X;
- ***(T_n-1)***: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto X;
- ***T_n***: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto X;
- ***C_n***: Número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois do composto X;
- ***(C_n-1)***: Número de carbonos que elui antes do composto X.

Outro tipo de relação é a que se baseia em um método cromatográfico baseado em programação de temperatura linear, onde é também conhecida como Índice de Retenção Alternativo e é definida de acordo com a seguinte relação, onde a relação deixa de ser logarítmica e é conhecida por Equação de Van den Dool e Kratz:

$$KI = 100[C_n - (C_n - 1)] \times \left[\frac{T_x - (T_n - 1)}{T_n - (T_n - 1)} \right] + 100 (C_n - 1)$$

Onde:

- ***KI(x)***: Índice de retenção de um composto X;
- ***T_x***: Tempo de retenção do composto X;

- **(Tn-1)**: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto X;
- **Tn**: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto X;
- **Cn**: Número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois do composto X;
- **(Cn-1)**: Número de carbonos que elui antes do composto X.

Este tipo de relação se torna bem confiável e obtém índices utilizando tanto colunas apolares (aquelas em que apresentam de 1% a 5% de fase quimicamente ligada) tanto em colunas polares (aquelas que apresentam até 20 % de fase quimicamente ligada), desde que sejam iguais as condições de programação. Estas relações de índices de retenção não são usadas apenas com o uso de hidrocarbonetos lineares como padrão de referência, mas também em outros tipos de compostos como padrões internos, como uma mistura de ésteres etílicos homólogos ou cetonas homólogas. Além disso, diversos compostos podem ser determinados através do uso do cálculo de índice de retenção além dos já tradicionais compostos voláteis e de óleos essenciais, como haletos alifáticos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, monoterpênos, sesquiterpênos e diterpênos, além de outras classes (Kovats, 1958, Kovats, 1959, Van Den Dool e Kratz, 1963, Perry, 1984).

1.4.2. CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Tanto os compostos obtidos para substâncias voláteis sob forma de óleos essenciais como os metabólitos fixos apresentam a característica de serem facilmente volatilizáveis e termicamente estáveis. Estas características tornam estes compostos como os pioneiros no uso da técnica de cromatografia gasosa, permanecendo até os dias atuais como a principal ferramenta dos químicos analíticos desta área. Diversos são os fatores que justificam o uso da técnica de cromatografia gasosa para análise destes compostos, como uma ampla

aplicabilidade, sensibilidade, rapidez nas análises, boa precisão quantitativa e um alto poder de resolução.

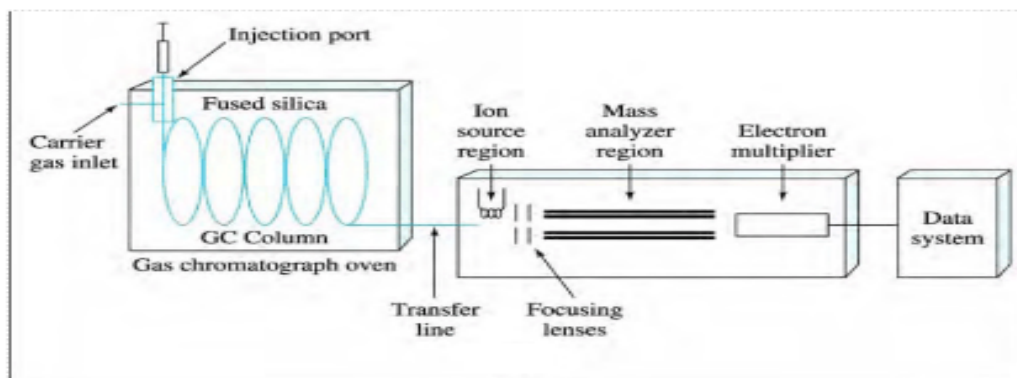


Figura 1-19 - Esquema de um Cromatógrafo em Fase Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas.

O princípio básico de operação de um cromatógrafo em fase gasosa envolve a volatilização de uma amostra no injetor, a separação dos componentes da mistura numa coluna apropriada e a detecção de cada um deles por um detector. Uma característica importante da técnica é o uso de um gás para arrastar a amostra do injetor até o detector passando por uma coluna. Este gás de arraste deve ser inerte e não pode ser adsorvido pela fase estacionária da coluna utilizada. Em geral, os gases são hélio (He), hidrogênio (H₂) e nitrogênio (N₂), sendo o mais utilizado o hélio (He) (Skoog, 2006). O princípio de operação de um cromatógrafo em fase gasosa pode ser observado na Figura 1-19.

Num cromatógrafo em fase gasosa, a etapa de separação dos compostos ocorre dentro de uma coluna aquecida, a qual contém uma fina camada de substância química líquida não volátil, chamada de fase. As colunas capilares empregadas proporcionam poder de resolução e reprodução mais satisfatórios, especialmente para misturas mais complexas de óleos essenciais. Estas colunas são constituídas por sílica pura fundida, garantindo maior eficiência, inércia e longevidade quando comparadas as usadas antigamente, que eram constituídas de vidro. As colunas mais utilizadas, e que são destinadas a aplicações gerais, são as colunas constituídas de dimetilsiloxano (DB-1 ou equivalentes) e as constituídas de 5

% de fenil/ 95 % dimetilsiloxano (DB-5 ou equivalentes), que são um pouco mais polares. Um outro ponto importante nas colunas é a espessura da camada de fase estacionária, onde as que possuem 0,3 µm são as melhores para compostos que apresentam alta temperatura de ebulição enquanto as colunas com fase de 1,0 µm são mais viáveis em apresentar uma melhor retenção para substâncias com temperaturas de ebulição menores.

Além disso, o acoplamento cromatografia gasosa – espectrometria de massas é perfeito devido a diversos fatores. Os sistemas de aquisição de dados em espectrometria de massas junto com as bibliotecas de pesquisas, modelos de reconhecimento e o auxílio software de interpretação espectral são importantes para a determinação e identificação dos compostos, que é realizada a partir de fragmentações que são induzidas pela técnica de ionização baseado em ionização de elétrons (impacto eletrônico).

1.4.2.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica que data do início do século XX, com a descoberta do elétron por Thomson e dos isotópos estáveis por Aston (Watson, 1997).

Ao longo dos tempos, a espectrometria de massas sofreu um grande processo de avanços no que se refere ao desenvolvimento da técnica, podendo analisar uma grande variedade de substâncias orgânicas micromoleculares polares e apolares, macromoléculas, além de substâncias inorgânicas e metálicas. A sensibilidade da técnica permite a análise das amostras em baixas concentrações, na ordem de picomol (pmol) a femtomol (fmol) (Siuzdak, 1996).

O desenvolvimento do uso da técnica de espectrometria de massas foi impulsionado por basicamente 3 fatores:

1. O acoplamento perfeito com técnicas de separação cromatográfica (cromatografia gasosa, líquida e eletroforese);
2. O surgimento e desenvolvimento de novas técnicas de ionização;
3. Desenvolvimento de computadores e aplicativos.

Estas características promovem, em muitos casos, a identificação de substâncias sem a necessidade de isolamento, através da comparação com perfis de fragmentação obtidos de estudos de padrões ou por comparação com bibliotecas digitais que contém os espectros de diversas substâncias.

Entre as técnicas de ionização, as mais comuns são o impacto eletrônico (EI), ionização química (CI), ionização química por dessorção (DCI), bombardeamento com átomo acelerado (FAB), *electrospray* (ESI), ionização química a pressão atmosférica (*ApCI*), entre outras (Murgu, 1998).

Dentre as técnicas descritas acima, a que se mostrou melhor e que foi utilizada no presente trabalho foi a técnica de impacto eletrônico, técnica de ionização clássica dentro da espectrometria de massas, por ser a técnica ideal para gerar ionização nas moléculas estudadas. A ionização ocorre com excesso de energia levando a um alto grau de fragmentação. Além disso, a técnica apresenta um acoplamento perfeito com a cromatografia em fase gasosa (GC-MS), onde podem ser analisadas substâncias de baixa massa molecular (600 Da) e que sejam voláteis ou facilmente volatilizáveis. Às vezes, é necessário o uso de reações de derivatização que possibilitam modificar as características da amostra e torná-la analisável por GC-MS.

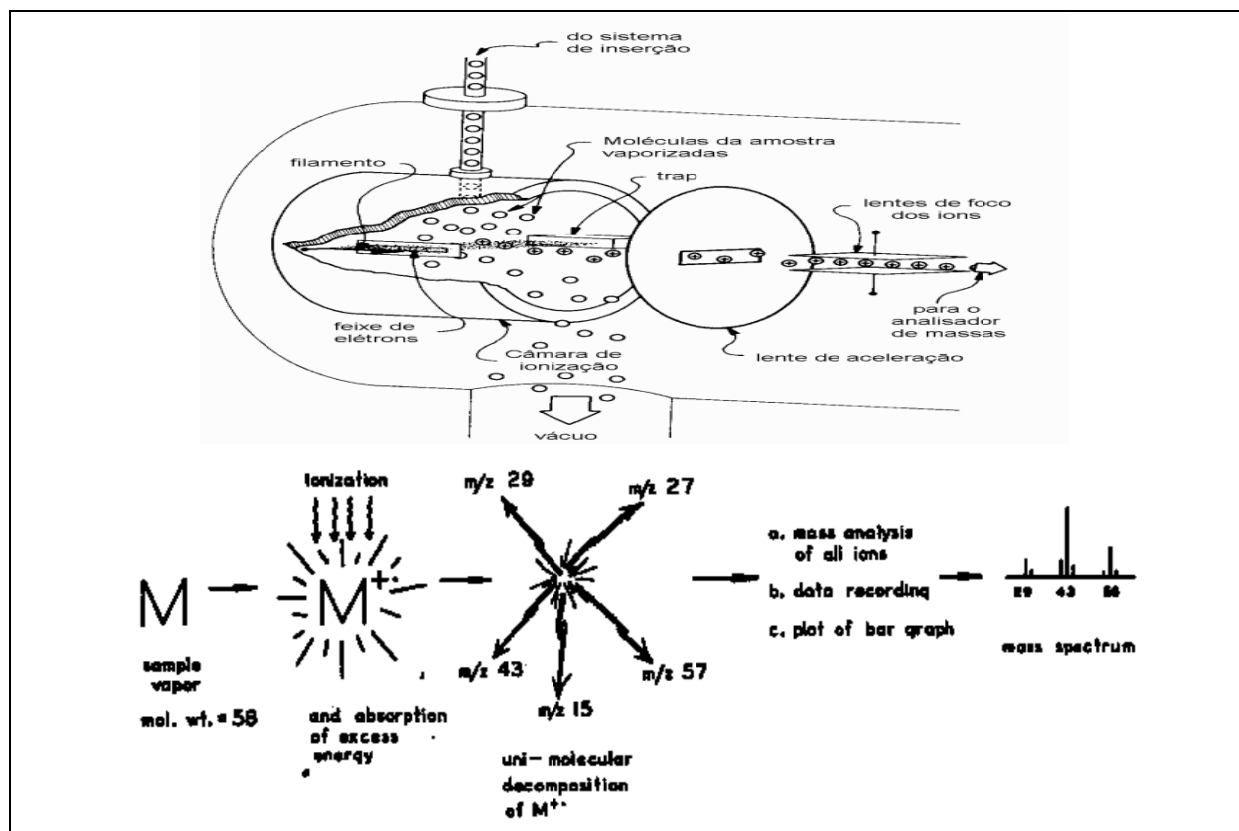


Figura 1-20 – Esquema instrumental e teórico do processo ocorrido em uma fonte de ionização por impacto eletrônico (Silverstein, 1998).

Os compostos são geralmente analisados mediante a Figura 1-20, que pode ser explicada pela seguinte forma: a amostra entra na fonte de ionização por meio do sistema de injeção, que, normalmente, é constituído de uma coluna capilar, onde ocorre a separação dos compostos. Cada composto entra na fonte de ionização separadamente e sofre um bombardeio de elétrons, geralmente causado por um filamento constituído de um metal (geralmente rênio). Ao sofrer o choque, cerca de 5 % são ionizados por meio da retirada de um elétron, os demais são descartados por meio de um sistema de vácuo. Os íons são então levados a um sistema de captura para o analisador, passando antes por dois sistemas de lentes que ajudam a acelerar e focalizar os íons formados e levá-los ao analisador, onde são detectados por meio dos fragmentos formados (Silverstein, 1998)

Uma ferramenta bastante útil para a identificação de substâncias é o método conhecido por monitoramento seletivo de íons (SIM) através da técnica de

espectrometria de massas acoplada à cromatografia em fase gasosa (GC-MS). O uso desta técnica oferece a vantagem de identificar de forma rápida e precisa os componentes minoritários de uma mistura complexa (Velter, 2007), inclusive prevendo problemas de adulteração e possibilitando o uso de marcadores em diversas matrizes, como em fármacos e produtos naturais (Engel, 1987; Rodrigues, 2007).. Através de íons característicos da fragmentação de determinados compostos, pode-se prever a classe e subclasse química a qual são pertencente, tornando a análise mais confiável e facilitando o tratamento de dados. Na química de produtos naturais, diversos compostos podem ter sua classe determinada apenas pela simples presença de um íon molecular e/ou de íons fragmentos, onde a Tabela 1-3 mostra alguns exemplos (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987; Hagen, 1999)

Tabela 1-3 - Íons característicos de classes e subclasses de compostos orgânicos (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987).

Classes e Subclasse de Compostos	Íons Característicos (<i>m/z</i>)
<i>Monoterpenos</i>	136 (M ⁺), 121, 93
<i>Monoterpenos oxigenados</i>	154 (M ⁺), 136, 121, 91
<i>Sesquiterpenos</i>	204 (M ⁺), 189, 161, 91
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>	220 (M ⁺), 205, 159, 91
<i>Diterpenos</i>	272 (M ⁺), 257, 229, 105
<i>Diterpenos oxigenados</i>	286 (M ⁺), 271, 201, 175
<i>Ésteres metílicos de ácidos graxos</i>	74 (BI), 87, 143
<i>Ésteres etílicos de ácidos graxos</i>	88 (BI), 101, 157
<i>Esteróides</i>	432 (M ⁺), 417, 109
<i>Triterpenos lupanos</i>	189 (BI), 121
<i>Triterpenos oleananos</i>	218 (BI)
<i>Hidrocarbonetos saturados</i>	57 (BI)

Legenda: (M⁺) = íon molecular; (BI) = íon base.

2 – OBJETIVOS

O Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos tem como ênfase em seus estudos as interações entre plantas e micro-organismos. Os fungos escolhidos para se realizar esse estudo e desenvolvimento de trabalho foram os fungos *Penicillium brasilianum*, *Penicillium griseoroseum*, *Xylaria (NICL3)* e espécie em conserva de *Trichoderma*, representados na Figura 2-1. O estudo destes fungos é justificado por vários fatores: primeiro, por que são os fungos mais estudados do laboratório e que já se conhece bem grande parte do estudo metabólico deles; segundo, a temática abordada para este estudo é inédita para estes fungos, o que colabora para um maior conhecimento do metabolismo dos mesmos, e por fim, contribuir e melhorar o estudo de metabólitos voláteis e fixos de fungos endofíticos, já que os estudos existentes atualmente são bem poucos, o que torna um promissor campo de estudo e conhecimento.

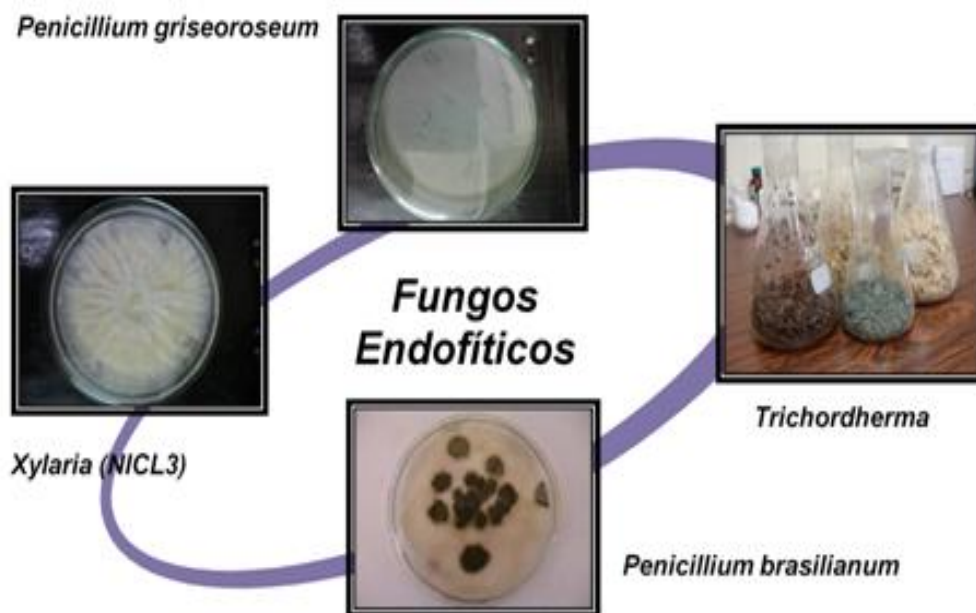


Figura 2-1 - Fungos endofíticos estudados neste trabalho.

Como mencionado anteriormente, no LaBioMMi já vem sendo realizado diversos estudos a respeito de fungos endofíticos. Com este trabalho, pretende-se alcançar os seguintes objetivos listados a seguir:

- Isolamento dos micro-organismos endofíticos;
- Cultivação dos micro-organismos em diferentes meios de cultura com a finalidade de otimizar o melhor meio para a produção de compostos orgânicos voláteis;
- Otimização da extração, filtração e análise das substâncias voláteis extraídas;
- Aplicação das metodologias de análise para identificação dos metabólitos voláteis dos fungos endofíticos e das plantas hospedeiras;
- Desenvolvimento de metodologia de extração dos metabólitos fixos de fungos endofíticos;
- Desenvolvimento e aplicação de metodologias de análise, identificação e quantificação dos metabólitos fixos extraídos dos fungos endofíticos;
- Montar um perfil cromatográfico característico de cada espécie de fungos endofítico;
- Otimizar as condições de análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

a. CROMATÓGRAFO EM FASE GASOSA

As análises por cromatografia em fase gasosa foram realizadas em um cromatógrafo CARLO ERBA GC 8000 series, SHIMADZU GC-17A e SHIMADZU GC 2010 FID.

b. ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Os espectros de massas foram adquiridos em dois equipamentos: o espectrômetro MICROMASS Platform II, e o espectrômetro SHIMADZU GCMS-QP5000, ambos equipados com a interface por impacto eletrônico (EI).

c. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

As análises foram realizadas utilizando duas colunas: uma coluna J&W Scientific DB1 (30 m x 0,25mm x 0,25 µm) para análises de espectrometria de massas (GC-MS); e uma coluna STABLIWAX 20M (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) para análise por ionização e detecção em chama (GC-FID).

d. SOFTWARES UTILIZADOS

Foram utilizados dois softwares conforme o equipamento utilizado: o software MICROMASS MassLynx 2.1 e a Biblioteca de Dados MICROMASS MassLynx Library NIST para os espectros obtidos no equipamento MICROMASS, e o software SHIMADZU CLASS 5000 e a Biblioteca de Dados SHIMADZU Library NIST08.

e. ESPECTRÔMETRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN foram obtidos nos espectrômetros Bruker ARX 200 e AVANCE DRX 400, operando a 4,7 e a 9,4 Tesla, respectivamente.

f. ESTUFAS DE SECAGEM E ESTERILIZAÇÃO

Para secagem de vidrarias e esterilizações de placas de Petri foram utilizadas as estufas FANEM-315 SE.

g. AUTOCLAVES VERTICAIS

Para esterilização de meios de culturas foram utilizados as autoclaves PHOENIX AV 75 e PHOENIX AV 30.

h. CÂMARA DE FLUXO LAMINAR

Os micro-organismos estudados foram manipulados em um fluxo laminar VECO VL FS-12 M.

3.2 – MATERIAIS UTILIZADOS

a. SUPORTE PARA CROMATOGRAFIA

As separações cromatográficas em colunas foram realizadas utilizando como fase estacionárias:

- Sílica gel 60 (70-230 mesh) Merck;
- Sílica gel 60 (230-400 mesh) Merck;

b. CARTUCHO DE EXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA (SPE)

Foram realizadas separações cromatográficas em cartuchos de Extração de Fase Sólida (SPE) SUPELCO SI de 3 mL com e 5 mL com, respectivamente, 500 mg e 1g de sílica como fase estacionária.

c. ELUENTE PARA CROMATOGRAFIA

Nas eluições cromatográficas foram utilizados solventes P.A. (Merck e Synth) e solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar.

d. SOLVENTES UTILIZADOS PARA OBTENÇÃO DE ESPECTROS DE RMN

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando solventes deuterados da Merck e Aldrich (98,0 - 99,9 %).

e. MATERIAIS E REAGENTES PARA MEIO DE CULTURA

Para a produção e preparo dos meios de culturas BDA (batata-dextrose-ágar), CZAPECK's e meio sólidos realizados, foram utilizados os seguintes reagentes e materiais:

- batata
- dextrose
- K_2HPO_4
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
- KCl
- $NaNO_3$
- extrato de levedura
- ágar bacteriológico
- arroz "uncle ben's"
- milho do tipo canjica branca
- trigo

f. PADRÕES INTERNOS UTILIZADOS

Nas análises de GC-MS e GC-FID, foram utilizados os seguintes padrões internos:

- *n*-nonano (C_9H_{20})
- *n*-decano ($C_{10}H_{22}$)
- *n*-nonadecano ($C_{19}H_{40}$)
- *n*-eicosano ($C_{20}H_{42}$)

- *n*-undecano (C₁₁H₂₄)
- *n*-dodecano (C₁₂H₂₆)
- *n*-tridecano (C₁₃H₂₈)
- *n*-tetradecano (C₁₄H₃₀)
- *n*-pentadecano (C₁₅H₃₂)
- *n*-hexadecano (C₁₆H₃₄)
- *n*-heptadecano (C₁₇H₃₆)
- *n*-octadecano (C₁₈H₃₈)
- *n*-heneicosano (C₂₁H₄₄)
- *n*-docosano (C₂₂H₄₆)
- *n*-tricosano (C₂₃H₄₈)
- *n*-tetracosano (C₂₄H₅₀)
- *n*-pentacosano (C₂₅H₅₂)
- heptadecanoato de metila (C₁₈H₃₆O₂)
- miristato de metila (C₁₅H₃₂O₂)
- nervonato de metila (C₂₅H₅₀O₂)

3.3 – METODOLOGIAS DE TRABALHO UTILIZADAS

a. FUNGOS ENDOFÍTICOS ESTUDADOS

Os fungos endofíticos estudados nesse trabalho foram os fungos *Penicillium brasilianum*, *Penicillium griseoroseum*, *Xylaria* (NICL3) e diferentes conservas de fungo *Trichoderma*. Os fungos usados neste trabalho estão ilustrados na Figura 3-1 a seguir.

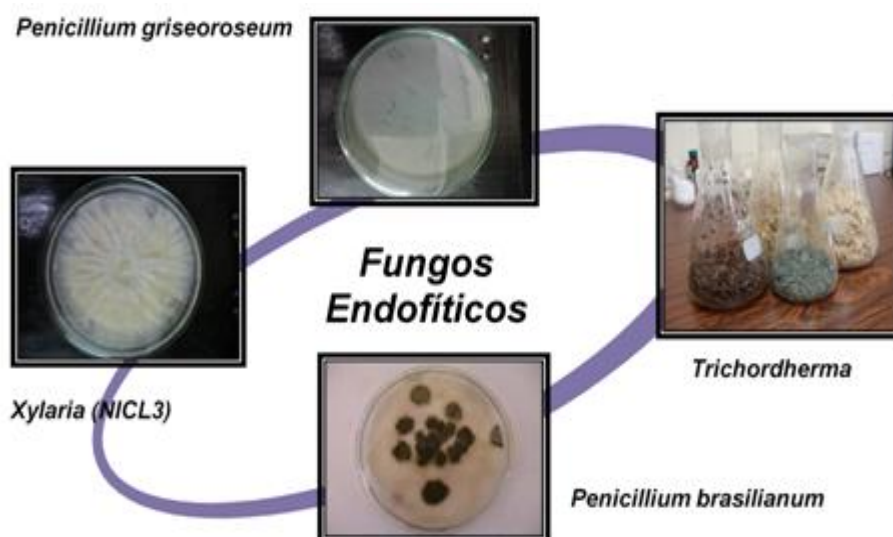


Figura 3-1 - Fungos endofíticos estudados.

b. PREPARO DE PLACAS PARA ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Para o isolamento e cultivo dos fungos *Penicillium brasilianum*, *Penicillium griseoroseum* e *Xylaria (NICL3)* foi utilizada a técnica de inoculação em placas de BDA (batata-dextrose-agar) que baseia-se no uso de 200 gramas de batatas, 40 gramas de dextrose e 15 gramas de ágar para 1 litro de água destilada. A massa de batata é então cozida em água destilada e filtrada, obtendo-se apenas o caldo de infusão. Ao caldo é adicionado água, dextrose e ágar e esterilizado em autoclave por 15 minutos. Após o tempo de esterilização, o meio é manipulado em câmara de fluxo laminar.

Após secagem do meio sobre as placas, o microorganismo é então repicado em um pequeno pedaço de uma placa mais antiga e inoculado no centro de uma placa mais nova. As placas com micro-organismos são então vedadas e armazenadas em estufa do tipo BOD. O tempo de cultivo variou conforme as características de crescimento dos fungos, sendo o período variado entre 8 e 12 dias.

c. PREPARO DE MEIO LÍQUIDO CZAPECK'S ENRIQUECIDO COM EXTRATO DE LEVEDURA

Este meio foi obtido da seguinte forma: em um bequer adicionou-se 3,0 g de NaNO_3 , 1,0 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCL e 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e 1L de água destilada, onde essa mistura foi agitada até ocorrer a completa dissolução dos sais. Em seguida, adicionou-se 30 g de glicose e uma nova agitação foi realizada para dissolução da glicose adicionada. Após isso, adicionou-se 20 g de extrato de levedura e homogeneizou o sistema. Em seguida, transferiu-se cerca de 100 mL para erlenmeyers de 250 mL e armazenou-se em autoclave para esterilização durante 15 minutos. Após esterilizados e resfriados à temperatura

ambiente, os erlenmeyers com meio pronto foram levados a câmara de fluxo laminar previamente esterilizados onde os micro-organismos puderam ser inoculados.

d. HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS DE *Cupressus lusitanicus*

Para este experimento foi coletado cerca de 50 g de folhas de *Cupressus lusitanicus*, Estas folhas foram cortadas em pequenos pedaços e transferidas para um balão de fundo redondo de 2 L, onde adicionou-se 1 L de água destilada. Após isso, adaptou-se um extrator do tipo Clevenger e manteve-se a extração das substancia voláteis por aquecimento do banho de folhas a uma temperatura de 100 °C durante um periodo de 3h. Os compostos orgânicos voláteis eram extraídos com eter etílico, e após o fim da destilação, foi realizado extração líquido-líquido para obtenção do óleo. Após isso, o óleo era armazenado a -22 °C até a realização de análise por GC-MS. A Figura 3-2 ilustra a sistemática utilizada para extração de óleo essencial por hidrodestilação.

e. HIDRODESTILAÇÃO DAS FOLHAS DE *Melia azedarach*

Para este experimento foi coletado cerca de 50 g de folhas e frutos de *Melia azedarach*, Estes materiais foram transferidos para um balão de fundo redondo de 2 L, onde adicionou-se 1 L de água destilada. Após isso, adaptou-se um extrator do tipo Clevenger e manteve-se a extração das substâncias voláteis por aquecimento do banho de folhas e fruto a uma temperatura de 100 °C durante um periodo de 3h. Os compostos orgânicos voláteis eram então extraídos com eter etílico, e após o fim da destilação, foi realizado extração líquido-líquido para obtenção do óleo. Após isso, o óleo era armazenado a -22 °C até a realização de análise por GC-MS.



Figura 3-2 - Sistema de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger.

f. HIDRODESTILAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MEIO LÍQUIDO CZAPECK

Este meio foi obtido da seguinte forma: em um bequer adicionou-se 3,0 g NaNO_3 , 1,0 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de KCL e 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e 1L de água destilada, onde essa mistura foi agitada até ocorrer a completa dissolução dos sais. Em seguida, adicionou-se 30 g de glicose e uma nova agitação foi realizada para dissolução da glicose adicionada. Após isso, adicionou-se 20 g de extrato de levedura e homogeneizou o sistema. Em seguida, transferiu-se cerca de 1 L do meio pronto para balões de fundo redondo de 2 L e armazenou-se em autoclave para esterilização durante 15 minutos. Após esterilizados e resfriados à temperatura ambiente, os balões com meio pronto foram levados a câmara de fluxo laminar previamente esterilizados onde os micro-organismos puderam ser inoculados. a temperatura ambiente e os fungos endofíticos pudessem ser inoculados. Após a inoculação, os fungos foram deixado em crescimento por 14 dias, onde então eram submetidos a hidrodestilação com um aparato de clevenger usando eter etílico para extração das substâncias voláteis. Foi realizado também hidrodestilação apenas do meio CZAPECK's (sem fungo endofítico inoculado) como controle. Após o fim da destilação, os compostos voláteis eram armazenados em freezer a $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ até a realização de análise por GC-MS.

g. HIDRODESTILAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM MEIO SÓLIDO ARROZ

Em balão de fundo redondo de 2L, foi adicionado 270 g de arroz e 250 mL de água destilada. Em seguida, armazenou-se os balões em autoclave para esterilização durante 25 minutos a 120 °C e 1 atm de pressão. Aguardou-se um período de 24 h e realizou-se nova esterilização durante 25 minutos a 120 °C e 1 atm de pressão. Após o período de esterilização, os balões foram levados para a câmara de fluxo laminar onde os fungos puderam ser inoculados e foi deixado em crescimento por um período de 14 dias. Após o período de crescimento, foi adicionado ao balões cerca de 800 mL de água destilada e foi realizada a hidrodestilação usando éter etílico para extração dos compostos voláteis. Após o fim da destilação, os compostos voláteis extraídos foram armazenados em freezer a -22 °C até a realização de análise via GC-MS.

h. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PELO MÉTODO DE AERAÇÃO

Em erlenmeyers de 1000 mL, foi adicionado 100 g de material sólido (arroz, canjica e trigo) e 170 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram então transferidos para autoclave onde foram esterilizados por 25 minutos a 120 °C e 1 atm de pressão. Após um período de 24h, os erlenmeyers foram esterilizados novamente por 25 minutos a 120 °C e 1 atm de pressão. Após isso, os erlenmeyers foram levados a câmara de fluxo laminar onde os fungos foram inoculados e deixado em crescimento por um período de 14 dias a temperatura ambiente e na ausência de luz. Após o crescimento, foi adaptado um sistema onde pode ser passado gás N₂ para arraste das substâncias voláteis e adsorvidos em uma camada de carvão ativo durante 1h. Após esse período, os compostos voláteis foram extraídas com éter etílico ou diclorometano e analisados por GC-MS. Foi usado também erlenmeyers apenas com o meio sólido (arroz, canjica ou milho) como controle. A Figura 3-3 mostra a sistemática usada para realização da extração por aeração.



Figura 3-3 - Sistema de aeração para a captação de voláteis.

Í. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

Para o estudos de substâncias voláteis extraídas tanto de fungos endofíticos como extraídas da planta de *Cupressus lusitanicus* foi utilizado a técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) nas condições ilustradas pela Figura 3-4 a seguir:

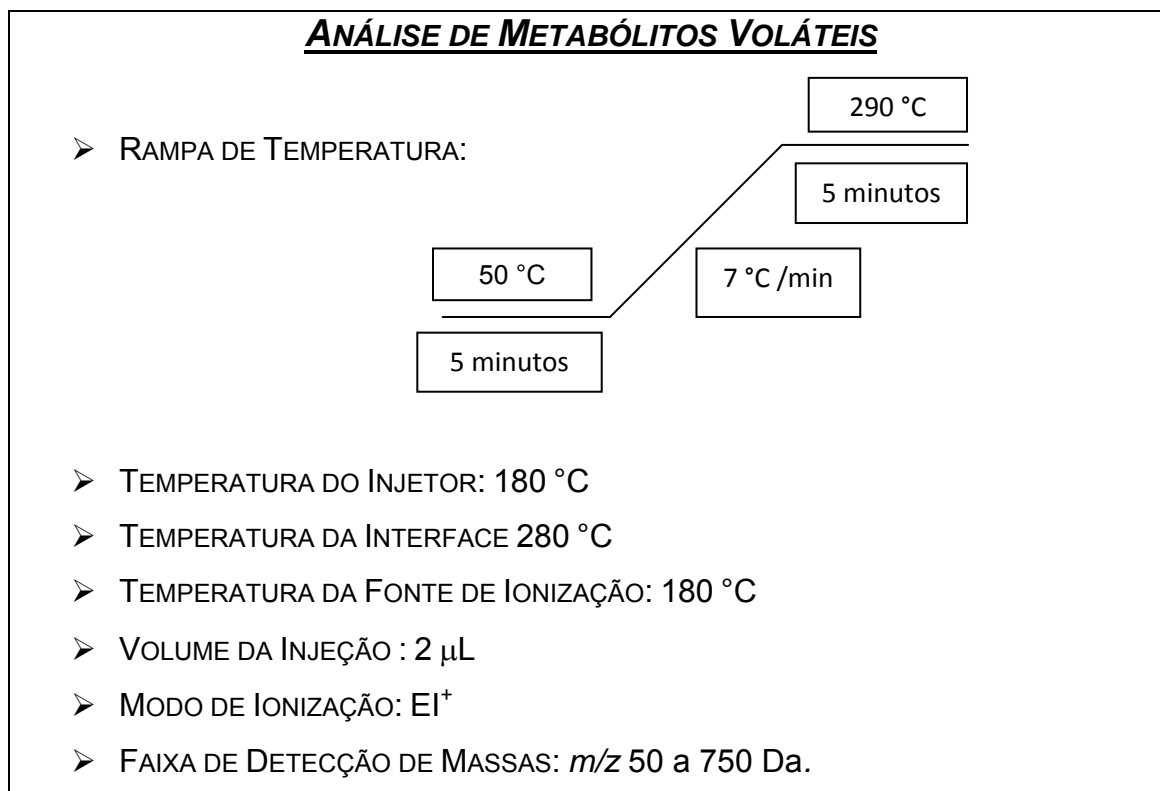


Figura 3-4 - Método cromatográfico utilizado na análise por GC-MS para substâncias voláteis.

j. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FIXOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

O estudo de compostos fixos pode ser realizado de diversas formas. Entretanto, neste trabalho, foi realizada uma metodologia inédita usando reação direta com o micélio de fungos endofíticos. A reação utilizada para este estudo foi a metanólise ácida, onde pretendia-se obter uma variedade de compostos metilados proveniente da parede micelial dos fungos.

O procedimento para reação consistia inicialmente no processo de crescimento do fungo em meio líquido CZAPECK's durante 8 dias. Depois disto, o fungo foi submetido a uma filtração onde ocorria a separação do micélio do meio de cultura. Em cada micélio filtrado, adicionou-se 100 mL de MeOH, deixando em extração por um período de 24 h. Após o período de extração, o fungo foi novamente filtrado, separando o micélio da fase orgânica extraída em metanol. Em seguida, o micélio era deixado em estufa para secagem por um período de 24h.

Com o micélio seco, foi realizada a reação de metanólise ácida. Foi usado a biomassa micelial seca. Adicionou 150 mL de MeOH e 10 mL de HCl_(l) concentrado na mistura reacional que foi deixada em refluxo por 24, sendo filtrada no final. A fase orgânica foi então concentrada em rotaevaporador. O concentrado foi então neutralizado com a adição de gotas de solução saturada de Na₂CO₃. Após isso, o produto reacional foi submetido a uma extração líquido-líquido com água e éter. A fase etérea foi então concentrada em rotaevaporador. O protocolo utilizado para a realização de metanólise ácida com micélio dos fungos endofíticos está representado na Figura 3-5.

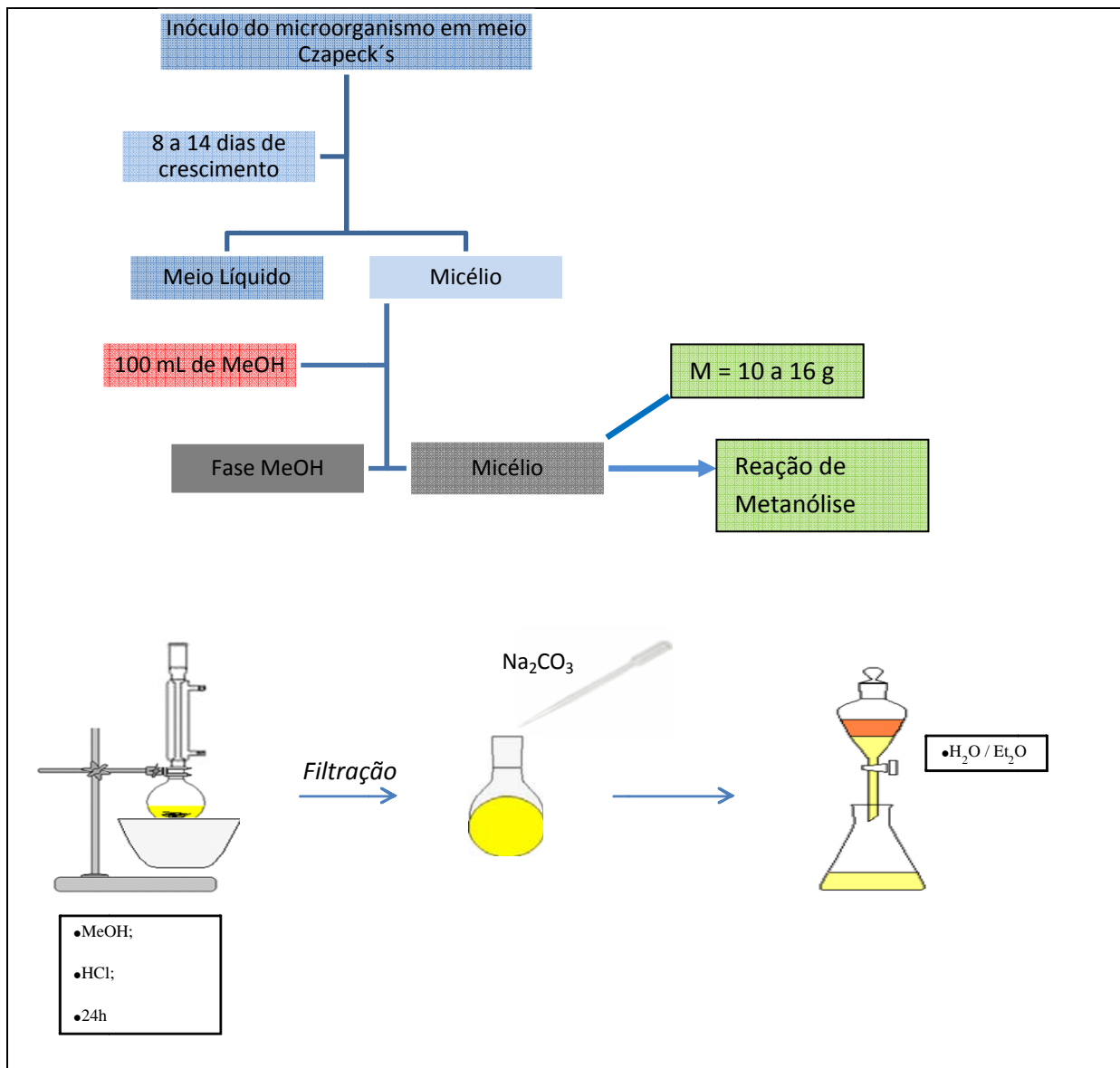


Figura 3-5 - Esquema do Protocolo para Extração dos Metabólitos Fixos

Com esta metodologia, foram realizadas reações com uma diversidade de fungos endofíticos encontrado na micoteca do LaBioMMi (Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos), listados a seguir:

- *Penicillium griseoroseum*;
- *PAOE* (*Penicillium* cultivado em milho);
- *Penicillium brasilianum*;
- *Trichoderma harvezionum*;
- *Xylaria* (NICL3)
- *Trichoderma* T21;

- *Trichoderma* T27;
- *Trichoderma* T19;
- *Trichoderma* T25;
- *Trichoderma* T13.

K. FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Com posse dos extratos obtidos da reação de metanólise ácida em meio ácido, estes foram submetidos a montagem de um perfil cromatográfico baseado num fracionamento por extração por fase sólida (SPE) utilizando cartuchos com fase estacionária sílica-gel. O fracionamento consistiu da separação de uma pequena quantidade de massa (cerca de 15 a 40 mg) de produto obtido proveniente na reação com o micélio. Para a eluição cromatográfica, foi usado uma pequena quantidade de solventes grau HPLC (cerca de 3 a 5 mL dependendo do volume do cartucho usado para o fracionamento). O fracionamento consistiu das seguintes etapas:

- 1) Condicionamento do Cartucho SPE com sílica com Hexano 7 mL.
- 2) Ativação do Cartucho com Diclorometano 7mL.
- 3) Aplicação da Amostra dissolvida em Diclorometano.
- 4) Eluição com 5 mL de :
 - Diclorometano 100%
 - Diclorometano – Éter 9:1
 - Diclorometano – Éter 1:1
 - Éter 100%
 - MeOH 100% (apenas como limpeza e lavagem do cartucho).

OBS: Todos os solventes utilizados para este fracionamento foram solventes grau HPLC.

Este fracionamento foi realizado para todos os produtos de reação obtidos a partir da metanólise ácida com o micélio dos fungos listados anteriormente.

Para análise via GC-MS, os extratos fracionados por SPE foram diluídos até a concentrações na ordem de ng / μ L (ppm).

I. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA – ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA METABÓLITOS FIXOS

Para os estudos de metabólitos fixos extraídas a partir da reação de metanólise com o micélio, foi realizada otimização de um método de separação das substâncias com micro-organismos endofíticos, com a finalidade de realizar um estudo deste metabólitos e aplicar um método satisfatório para análise em GC-MS. A Figura 3-6 ilustra o método utilizado para a análise destas substâncias.

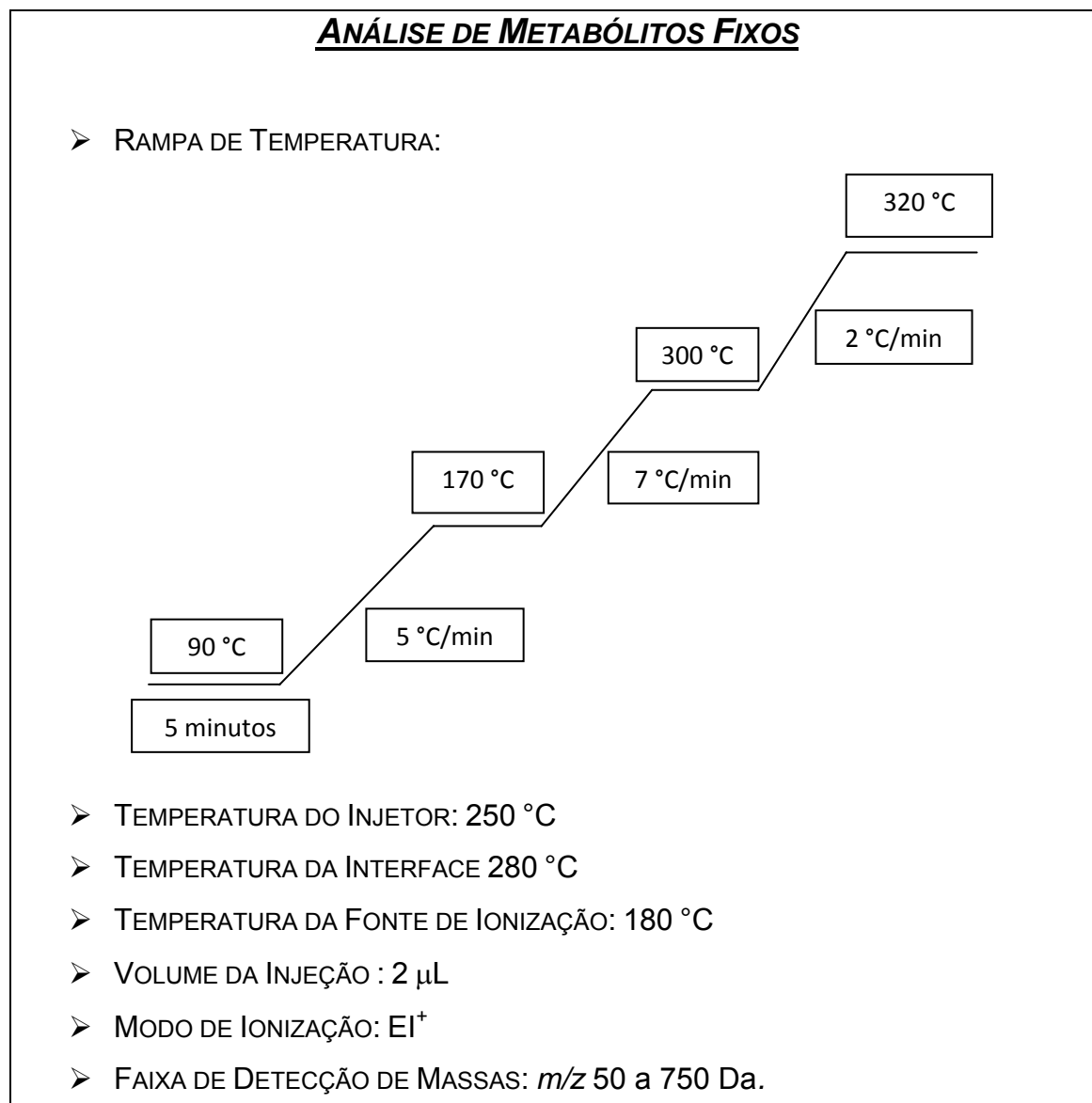


Figura 3-6- Método cromatográfico usado no GC-MS para análise de substâncias fixas extraídas a partir da reação de metanólise com o micélio.

m. QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS POR CG-FID

A quantificação de ésteres metílicos foi realizada seguindo a norma EN 14103 destinada a condições de análise de biodiesel. É utilizado a quantificação comparando a área de todas as bandas cromatográficas existente entre a banda do padrão de miristato de metila (C₁₄) e nervonato de metila (C_{24:1}) em relação a área do padrão de heptadecanoato de metila (C_{17:0}). A análise é realizada de acordo com as seguintes condições representadas pela Figura 3-7.

QUANTIFICAÇÃO DE ÉSTERES METÍLICOS

- RAMPA DE TEMPERATURA:

200 °C

30 minutos

- TEMPERATURA DO INJETOR: 250 °C
➤ TEMPERATURA DE IONIZAÇÃO E DETECÇÃO POR CHAMA: 250 °C
➤ VOLUME DA INJEÇÃO : 1 µL

Figura 3-7 - Método cromatográfico usado no GC-FID para análise e quantificação de ésteres metílicos.

A determinação do conteúdo de ésteres metílicos é feita baseada em uma relação de porcentagem usando a seguinte fórmula:

$$C_{biodiesel} = \frac{(A_t - A_{pi})}{A_{pi}} \times C_{pi}$$

Onde:

- ***A_t*** : Somatório da área total dos picos dos ésteres metílicos entre do padrão de miristato de metila (C₁₄) e nervonato de metila (C_{24:1}) ;
- ***A_{pi}***: Área do pico do ésteres metílico heptadecanoato de metila;
- ***C_{pi}***: Concentração em mg/mL do padrão de heptadecanoato de metila injetado;

n. ENSAIO ANTIFÚNGICO

O óleo essencial obtido da planta *Cupressus lusitanica* foi submetido ao ensaio de inibição antifúngica contra alguns fungos endofíticos isolados a partir da mesma planta. O ensaio consiste da deposição de cerca de 400 µL do óleo dissolvido em etanol em diferentes concentrações:

- 0 ppm de óleo essencial;
- 100 ppm de óleo essencial;
- 250 ppm de óleo essencial;
- 500 ppm de óleo essencial;
- 750 ppm de óleo essencial;
- 1000 ppm de óleo essencial.

A Figura 3-8 ilustra e resume de que forma o ensaio com o óleo essencial de *Cupressus lusitanica* foi realizado.

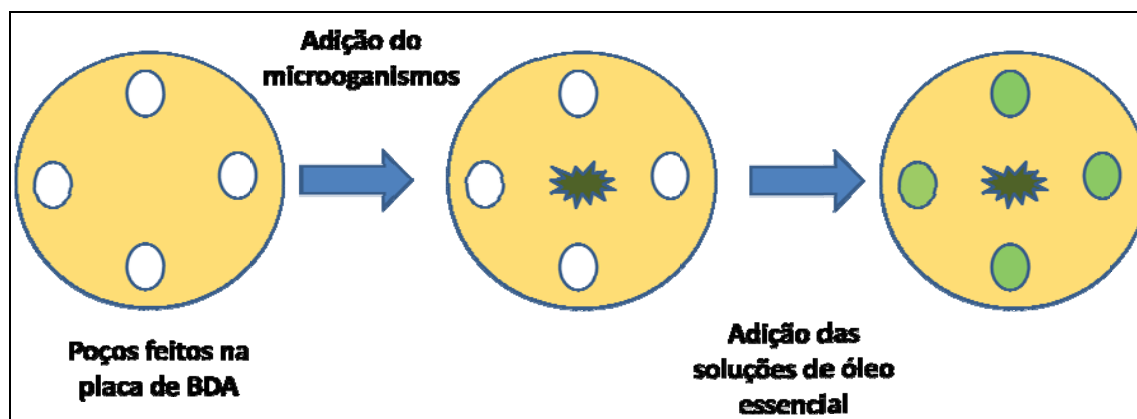


Figura 3-8 - Ensaio antifúngico com óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

Cada concentração era ensaiada em triplicata. A concentração mínima inibitória foi definida como a menor concentração onde se observa inibição satisfatória do crescimento do fungo. O potencial de inibição era calculado mediante o percentual de inibição da maior concentração comparado com o crescimento do fungo na placa controle, que seria aquela onde foi depositado 0 ppm do óleo.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer deste trabalho, um fato que chamou bastante atenção e gerou curiosidade foi a existência e identificação de compostos terpênicos em fungos. Classificados como organismos inferiores, metabólitos encontrados em micro-organismos e em micro-organismos associado a plantas são derivados de uma origem biossintética a partir do caminho policetídeo (Gunatilaka, 2006). De fato, dos diversos produtos naturais caracterizados e isolados a partir de micro-organismos, cerca de 60 %, são metabólitos produzidos a partir da origem biossintética policetídeo, o que contribuiu durante muito tempo para se acreditar que o metabolismo de micro-organismos era exclusivamente do caminho policetídeo. O surgimento de metabólitos em outros caminhos biossintéticos causavam enormes confusões e eram vistos com grandes restrições dentro do meio acadêmico (Manly, 2002; Schmeda-Hirschmann, 2005; Dai, 2001; Krohn, 1997; Parisi, 1993; Kusano, 2000). Entretanto, diversas evidências da literatura, algumas já mostrada neste trabalho, vem mudando esta visão. Dentre as classes de origens biossintética, a classe do caminho mevalonato é a segunda mais predominante no metabolismo de micro-organismos, especialmente aqueles associados a plantas (Kim, 2004; Li, 2001; Harper, 2003). Neste dado, incluem-se sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides e esteróides, com diversas propriedades bioativas, ilustrados na Figura 4-1 (Li, 2001), o que justifica os compostos identificados neste trabalho.

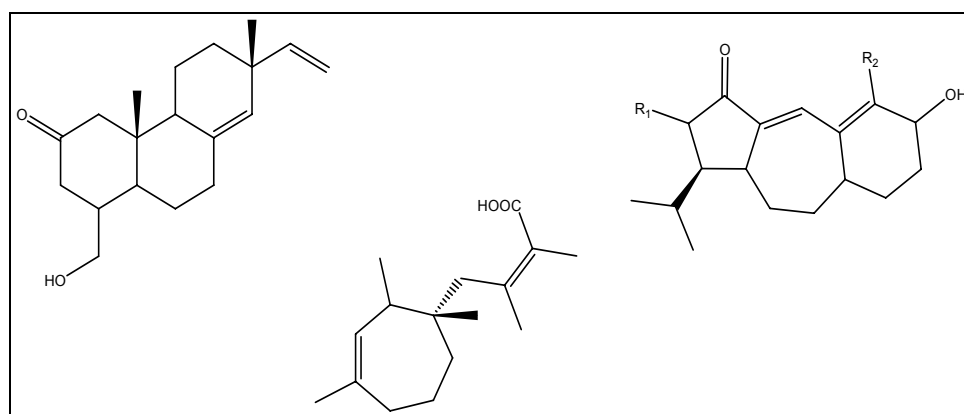


Figura 4-1 - Compostos terpênicos bioativos isolados de micro-organismos associados a plantas.

Sendo assim, o estudo aqui realizado foi dividido em duas partes: a primeira relacionada aos metabólitos voláteis, onde foi subdividida de acordo com o método de extração realizado, e a segunda relacionada aos metabólitos fixos. Por fim, será apresentado o resultado do ensaio anti-fúngico realizado.

4.1 – METABÓLITOS VOLÁTEIS

As análises deste trabalho, foram realizadas em uma rampa de aquecimento linear de temperatura e a identificação dos compostos foi realizada baseada na relação de Van den Dool & Kratz, que é aplicada geralmente para identificação em métodos cromatográficos como o utilizado no trabalho (Van den Dool e Kratz, 1963).

$$KI = 100[C_n - (C_n - 1)] \times \left[\frac{T_x - (T_n - 1)}{T_n - (T_n - 1)} \right] + 100 (C_n - 1)$$

Onde:

- ***KI (x)***: Índice de retenção de um composto X;
- ***T_x***: Tempo de retenção do composto X;
- ***(T_{n-1})***: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto X;
- ***T_n***: Tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto X;
- ***C_n***: Número de carbonos do hidrocarboneto que elui depois do composto X;
- ***(C_{n-1})***: Número de carbonos que elui antes do composto X.

Os resultados aqui mostrados serão mostrados fazendo uma relação entre os fungos endofíticos e sua planta hospedeira.

4.1.1. – METABÓLITOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS POR HIDRODESTILAÇÃO

4.1.1.1 - *Cupressus lusitanica* e *Xylaria* (NICL3)

Inicialmente, foi realizado o estudo do óleo essencial extraído da planta *Cupressus lusitanica* e de um fungo endofítico, identificado como *Xylaria* (NICL3), ilustrados na Figura 4-2.

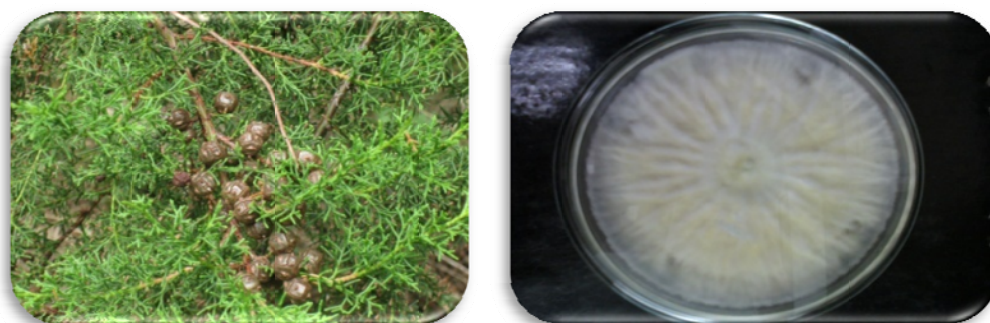


Figura 4-2 - *Cupressus lusitanica* e o fungo endofítico associado *Xylaria* (NICL3)

A planta *Cupressus lusitanica*, comumente conhecido Cipreste Mexicano e Cedro de Portugal, é uma planta da família CUPRESSACEAE nativa da América Central e é uma produtora de uma diversidade de metabólitos secundários, especialmente compostos terpênicos, mostrado na Figura 4-3 (Kuiate, 2006). A ampla utilização de *Cupressus lusitanica* no combate de doença promoveu o interesse de pesquisadores na investigação de sua constituição química. Grande parte dos compostos ativos são diterpenos de diversos esqueletos, como pimaranos, labdanos, abietanos e kauranos, que são os principais responsáveis pela atividade antidermatofítica (Zhao, 2003)

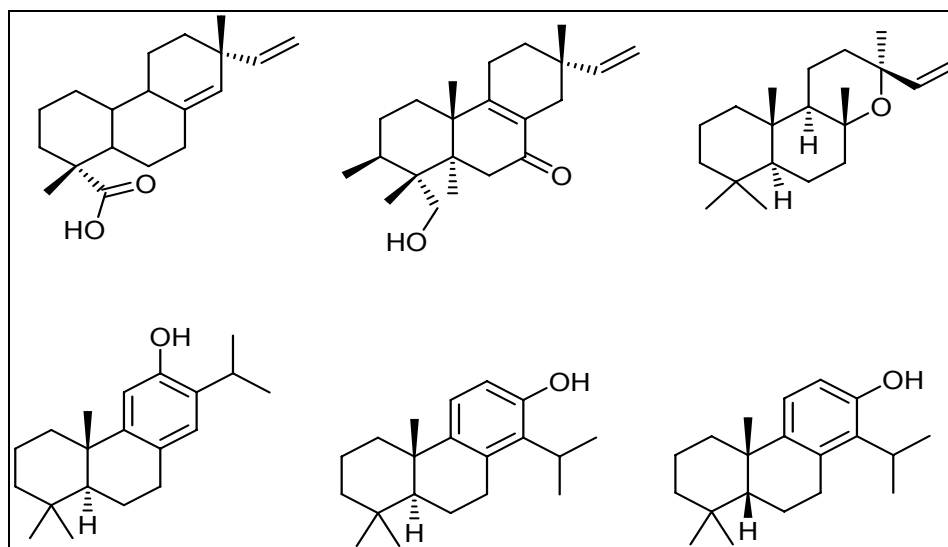


Figura 4-3 - Diterpenos isolado de *Cupressus lusitanica* (Adams, 1997).

A análise do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* por GC-MS mostrou uma complexidade de substâncias aromáticas, conforme observado na Figura 4-4.

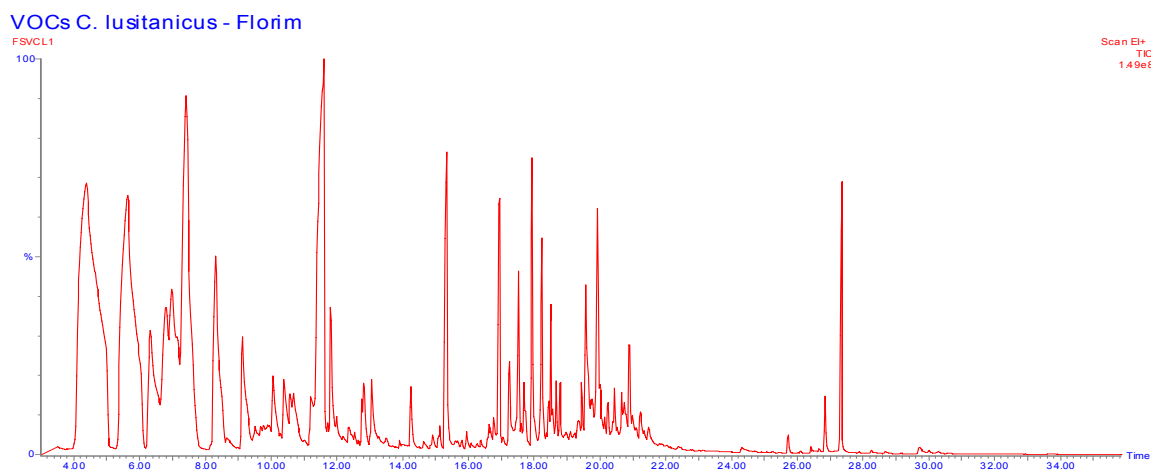


Figura 4-4 - Cromatograma de íons totais por GC-MS referente a análise de óleo essencial de *Cupressus lusitanica* extraídas pelo método da hidrodestilação.

Fazendo uma seleção e filtragem por massas, é possível pré-identificar a que classe pertence determinados compostos, conforme mostra a Tabela 1-3 (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987). Realizando uma seleção de íons de m/z 136 e 154, referente a presença de monoterpenos e monoterpenos oxigenados, é possível

identificar uma mistura de diferentes compostos, mostrado a partir do cromatograma na Figura 4-5 a seguir.

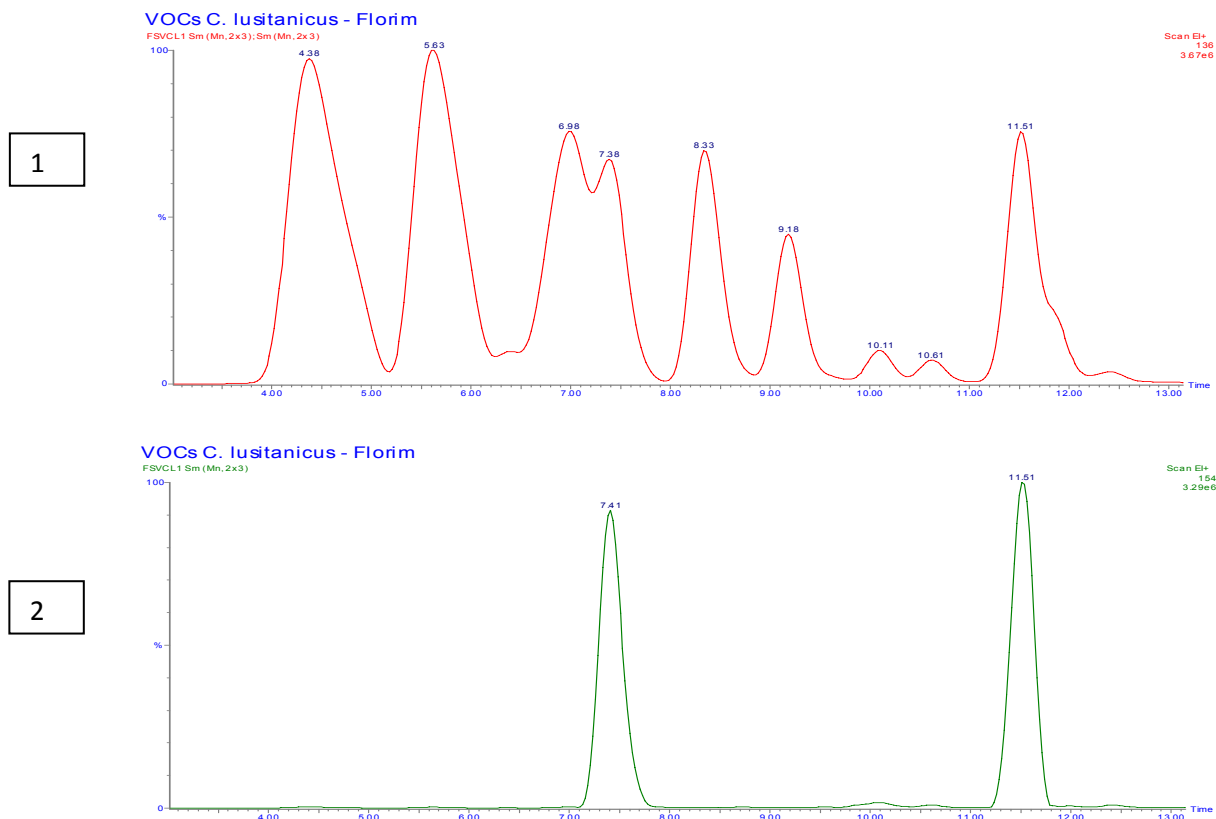


Figura 4-5 - Cromatograma de íons selecionados da análise do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* extraídos pelo método da hidrodestilação. a) Cromatograma de íons m/z 136. b) Cromatograma de íons m/z 154.

Além disso, foi possível identificar outros compostos no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*, como sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, com relação m/z 204 e 220 respectivamente, e diterpenos e diterpenos oxigenados, com relação m/z 272 e 286, conforme mostra a Figura 4-6 (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987).

Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endófitos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras

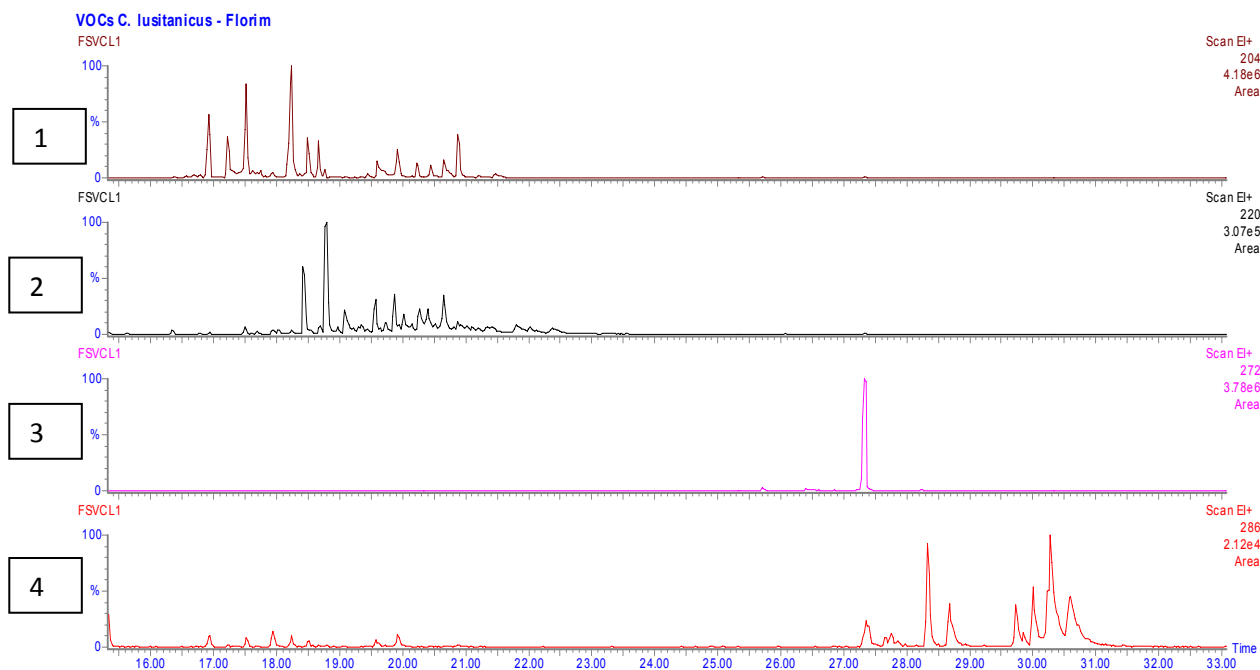


Figura 4-6 – Cromatograma de íons selecionados do óleo essencial de *Cupressus lusitanica*. 1) Cromatograma de íons m/z 204. 2) Cromatograma de íons m/z 220. 3) Cromatograma de íons m/z 272. 4) Cromatograma de íons m/z 286.

A identificação destes compostos foi realizada por meio do cálculo de índice de Kovats, por meio do uso da equação de Van den Dool & Kratz, cujo índices de cada componente estão listados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1 - Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICE DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
1	4.38	978,1	979	1
2	5.63	1038,1	1037	2
3	6.33	1068,8	1063	3
4	6.81	1089,9	1088	4
5	6.98	1097,3	1096	5
6	7.41	1114,0	1117	6
7	8.31	1148,1	1144	7
8	8.63	1160,2	1158	8
9	9.13	1179,1	1180	9
10	9.51	1193,5	1194	10
11	9.68	1200,0	1200	11
12	9.88	1207,3	1208	12
13	10.06	1214,0	1215	13

Cont. Tabela 4-1 - Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

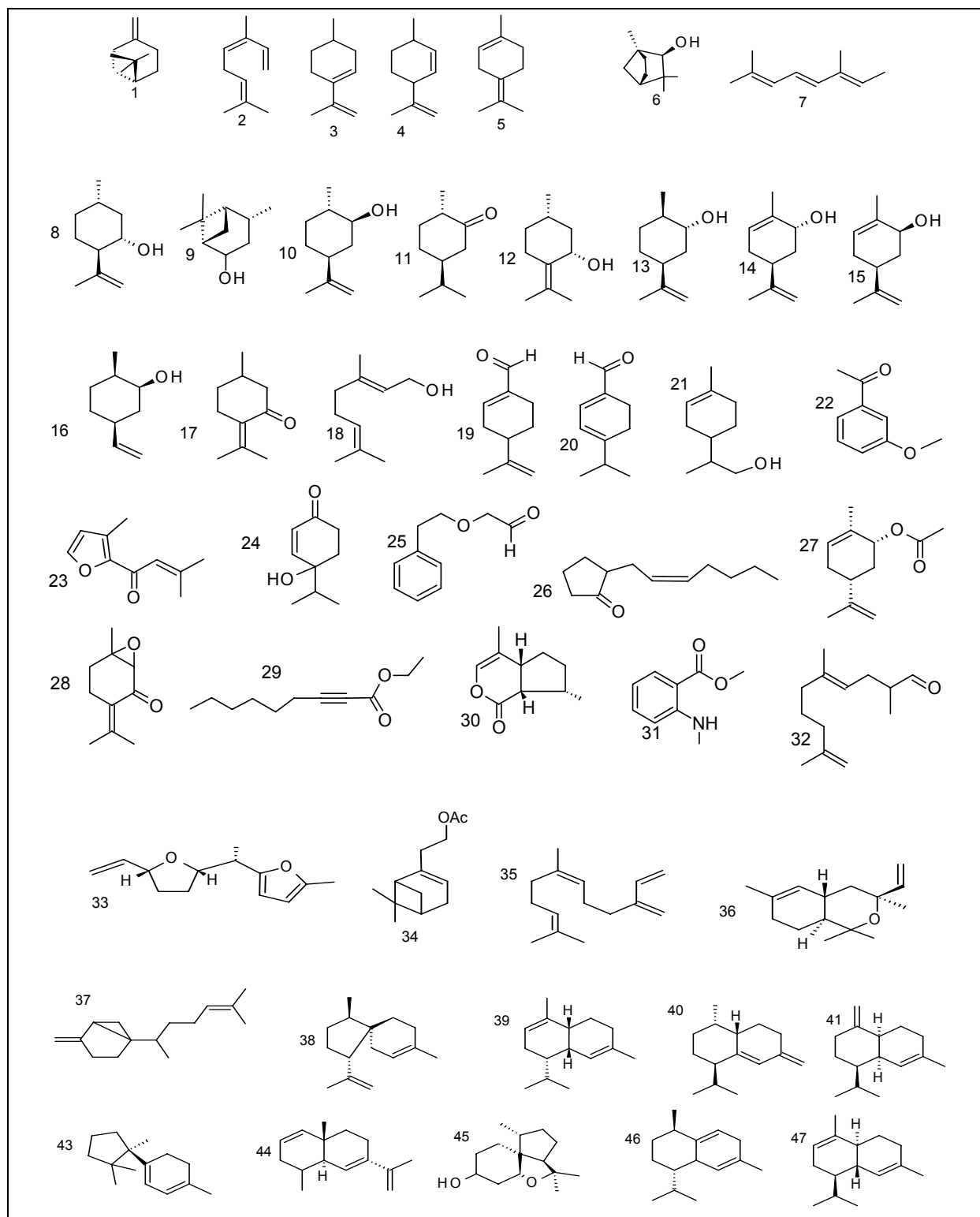
14	10.28	1222,1	1217	14
15	10.38	1225,8	1129	15
16	10.58	1233,2	1230	16
17	10.68	1236,9	1237	17
18	11.61	1271,2	1267	18
19	11.81	1278,5	1272	19
20	11.98	1284,2	1285	20
21	12.36	1298,8	1290	21
22	12.53	1305,1	1299	22
23	12.76	1313,6	1310	23
24	12.81	1315,7	1316	24
25	13.06	1324,7	1327	25
26	13.28	1332,8	1329	26
27	13.91	1356,0	1355	27
28	14.26	1369,0	1369	28
29	14.64	1383,0	1383	29
30	14.91	1392,9	1387	30
31	15.14	1401,5	1402	31
32	15.34	1409,2	1410	32
33	15.61	1418,8	1416	33
34	15.81	1426,1	1423	34
35	16.26	1444,7	1443	35
36	16.39	1449,8	1447	36
37	16.77	1461,6	1460	37
38	16.94	1467,8	1466	38
39	17.24	1482,6	1485	39
40	17.52	1493,4	1494	40
41	17.62	1497,3	1496	41
42	17.69	1500,0	1504	42
43	17.94	1510,0	1512	43
44	18.24	1522,0	1522	44
45	18.44	1530,0	1532	45
46	18.49	1532,0	1535	46
47	18.67	1539,2	1539	47
48	18.80	1544,4	1544	48
49	19.34	1566,0	1567	49
50	19.45	1570,4	1572	50
51	19.57	1575,2	1573	51
52	19.72	1581,2	1576	52
53	19.77	1583,2	1583	53
54	19.92	1589,2	1587	54
55	20.25	1602,5	1601	55
56	20.45	1611,0	1608	56
55	20.52	1613,9	1613	55
58	20.65	1619,4	1619	58

Cont. Tabela 4-1 - Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

59	20.75	1623,7	1624	59
60	20.90	1630,0	1629	60
61	21.22	1643,6	1643	61
62	21.35	1649,1	1648	62
63	21.47	1654,2	1658	63
64	22.02	1677,5	1680	64
65	22.40	1693,6	1690	65
66	24.90	1804,6	1813	66
67	25.25	1820,8	1815	67
68	25.48	1831,4	1840	68
69	25.72	1842,6	1850	69
70	26.10	1860,2	1870	70
71	26.40	1874,0	1894	71
72	26.65	1884,9	1900	72
73	26.85	1885,6	1934	73
74	27.35	1918,6	1962	74
75	28.25	1961,7	2057	75
76	28.33	1965,5	2088	76
77	29.15	2005,2	2154	77
78	29.70	2030,1	2270	78
79	30.00	2049,2	2344	79
80	30.28	2063,8	2446	80
81	30.60	2080,4	2456	81

Para a identificação das substâncias extraídas, cada pico foi processado gerando um espectro de massas por EI⁺, onde se comparou com a biblioteca do aparelho e com os biblioteca de substâncias voláteis (Adams, 2001). Os compostos identificados estão listado a seguir, conforme mostra a Figura 4-7.

Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endófitos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras



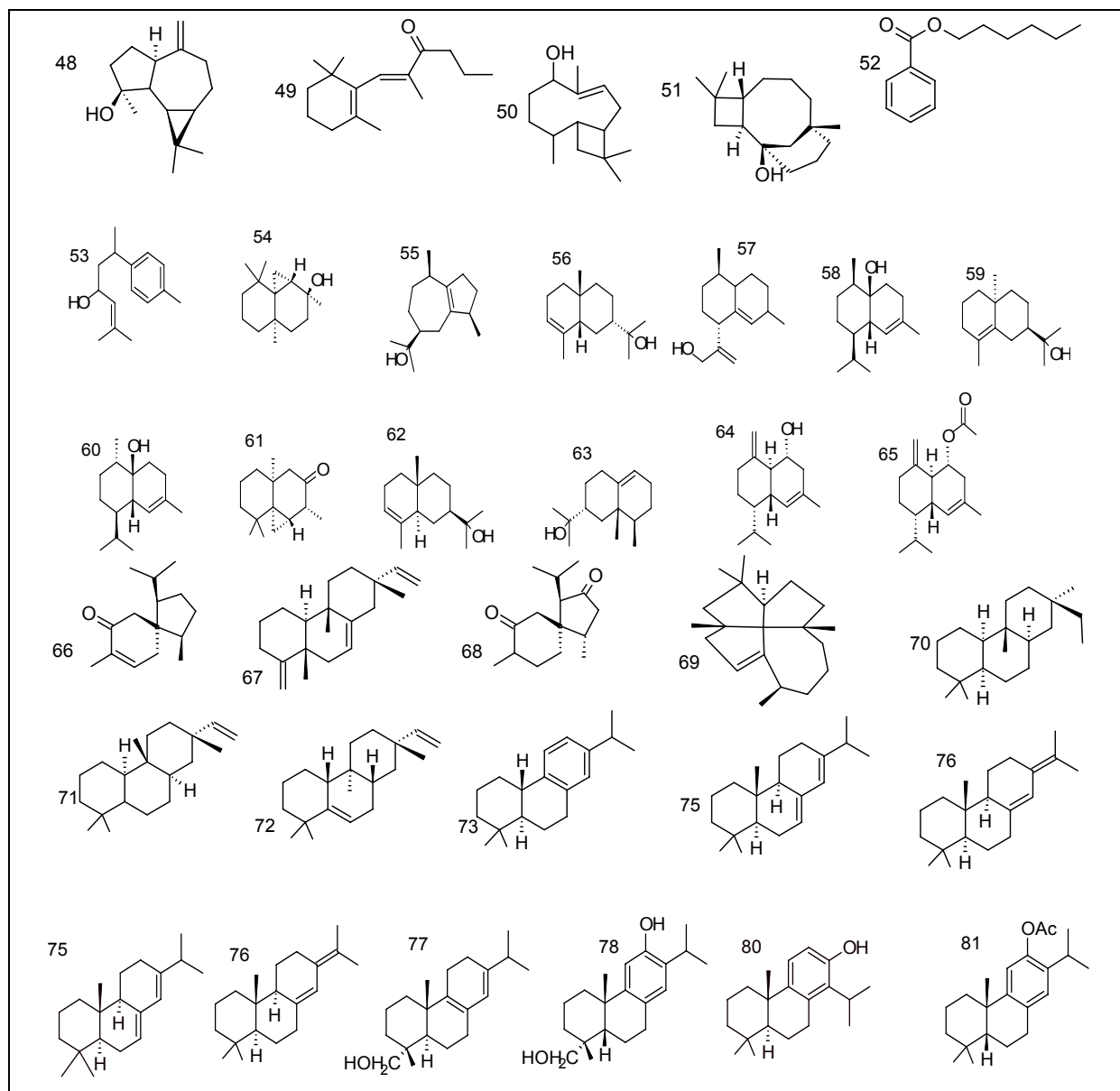


Figura 4-7 - Substâncias voláteis extraídas do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* pelo método da hidrodestilação.

O perfil cromatográfico das substâncias identificadas no óleo de *Cupressus lusitanica* se mostrou importante em diversos compactos e diversos artigos na literatura evidenciam isso. A primeira característica importante é a comparação entre os óleos essenciais extraídas em diferentes lugares, mostrado pela Figura 4-8. Isto pode ser explicado através das condições climáticas e de solo onde a planta foi extraída, evidenciando assim que fatores externos modificam o metabolismo da planta (Cheraif, 2007).

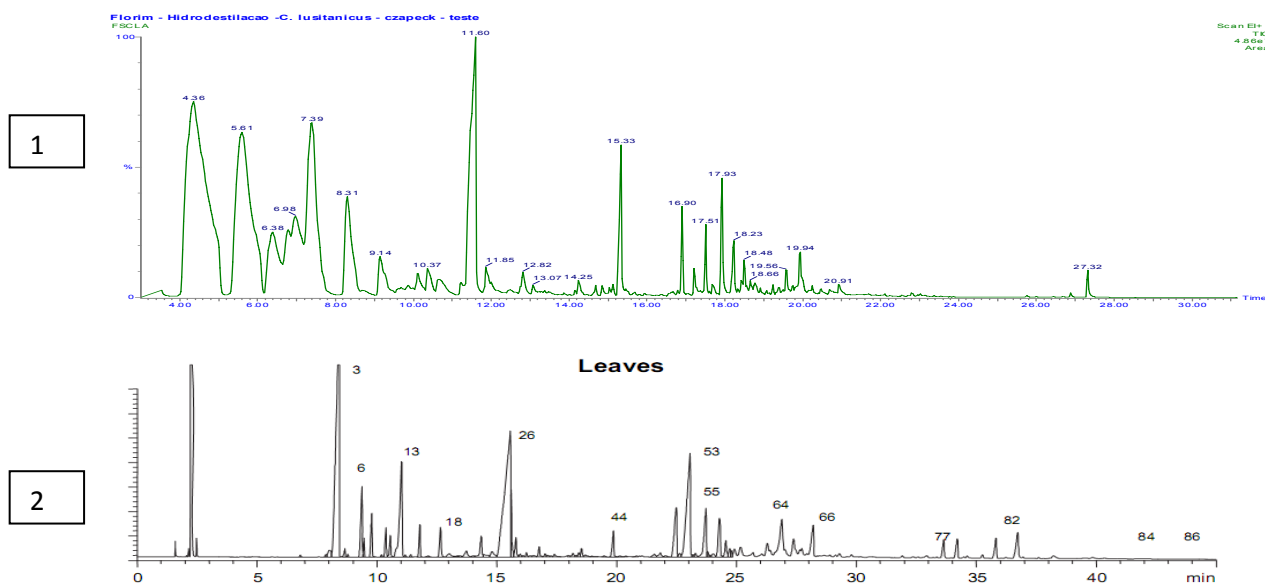


Figura 4-8 - Cromatograma de óleo essencial de *Cupressus lusitanica*. a) *Cupressus lusitanica* sulamericana. b) *Cupressus lusitanica* européia (Cheraif, 2007).

Outro dado importante foi a detecção dos monoterpenos existentes no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*, conforme mostra a Figura 4-9. Em trabalhos de tratamentos com elicitador fúngico em cultura de células de *Cupressus lusitanica*, os resultados indicaram que a mistura de monoterpenos voláteis e não voláteis é responsável pelo primeiro mecanismo de defesa da planta contra patógenos, mostrando a importância da produção destes compostos para a planta (De Alwis, 2009).

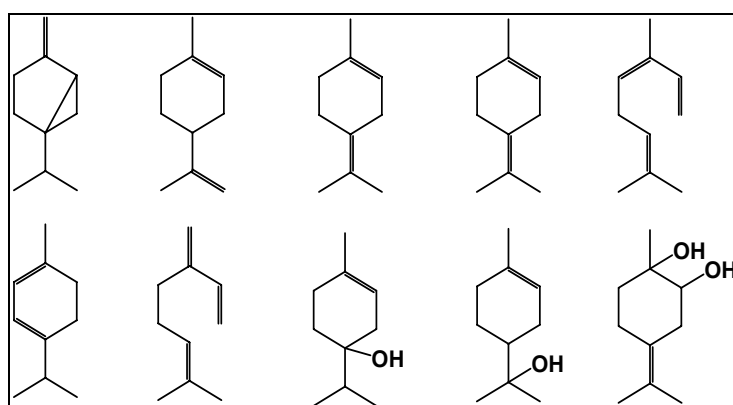
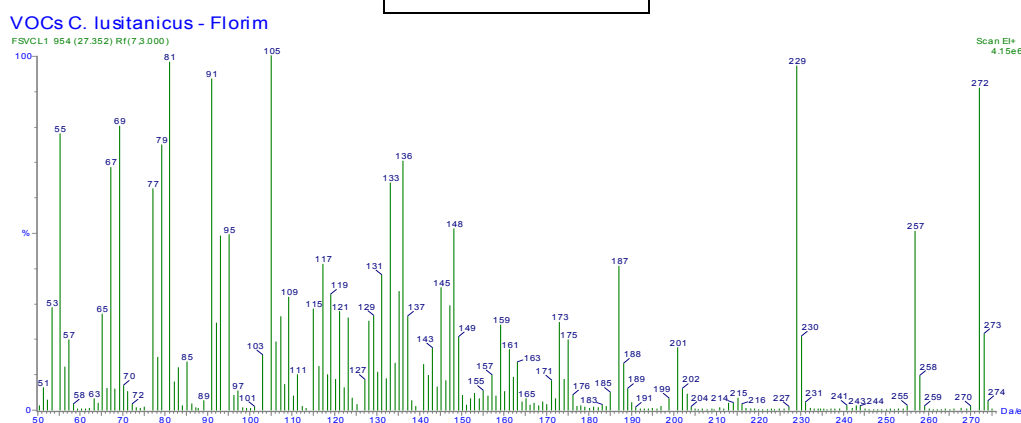
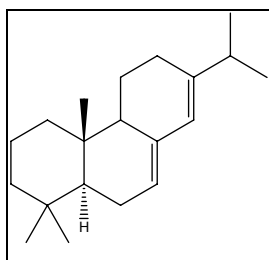


Figura 4-9 - Monoterpenos identificados em células elicidadas de *Cupressus lusitanica* (De Alwis, 2009).

O óleo essencial é um importante fator para a caracterização quimiotaxonomica do gênero *Cupressus*. Um exemplo disso é a diferenciação entre duas espécies de *Cupressus*: *Cupressus lusitanica*, conhecida popularmente como Cipreste Mexicano ou Cedro de Portugal, e *Cupressus sempervirens*, conhecida como Cipreste Italiano ou Cedro bastardo. A constituição química do óleos essenciais das plantas é bem diferente e as propriedades biológicas também são diversificada. Esta diversificação de atividades é justificada principalmente pela presença de 2 diterpenos no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*, que confere melhor bioatividade (Barletta, 1996). O primeiro diterpeno importante presente no óleo essencial de *Cupressus lusitanica* é o abietadieno, (Figura 4-10) que é um potente composto com propriedades antifúngica e antimicrobiana, especialmente contra bactérias gram-positivas, além de conferir propriedades terapêuticas, como anti-stress (Keeling, 2006; Lee, 2006).



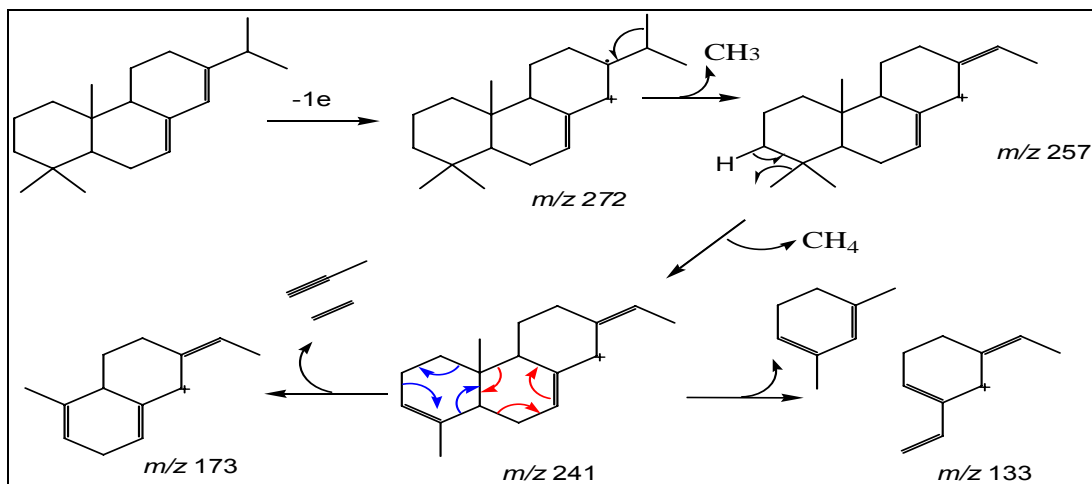


Figura 4-10 – Estrutura, Espectro de Massas e Fragmentação do abietadieno.

O outro diterpeno é o totarol, (Figura 4-11) um importante composto com potente atividade antibacteriana e propriedades anti-oxidante, além de possuir ação anti-radicais livres. É usado também em diversas propriedades dermatológicas e higiênicas, onde atua como tratamento de acne e eliminação das bactérias causadores de cárie dentária. É um fitoquímico ativo contra *Staphylococcus aureus*, um dos principais causadores de infecções hospitalares e bastante resistente contra penicilina e outros antibióticos derivados. É também um potente antifúngico, o que explica a resistência da madeira do pinheiro contra a ação de fungos, além de ser anti-inflamatório e anticancerígeno, atuando na inibição do desenvolvimentos de células cancerígenas, especialmente às de câncer de pele (Hanson, 2002; Apsimon, 1992; Ying, 1991; Jiang, 2002; Pinto, 1988).

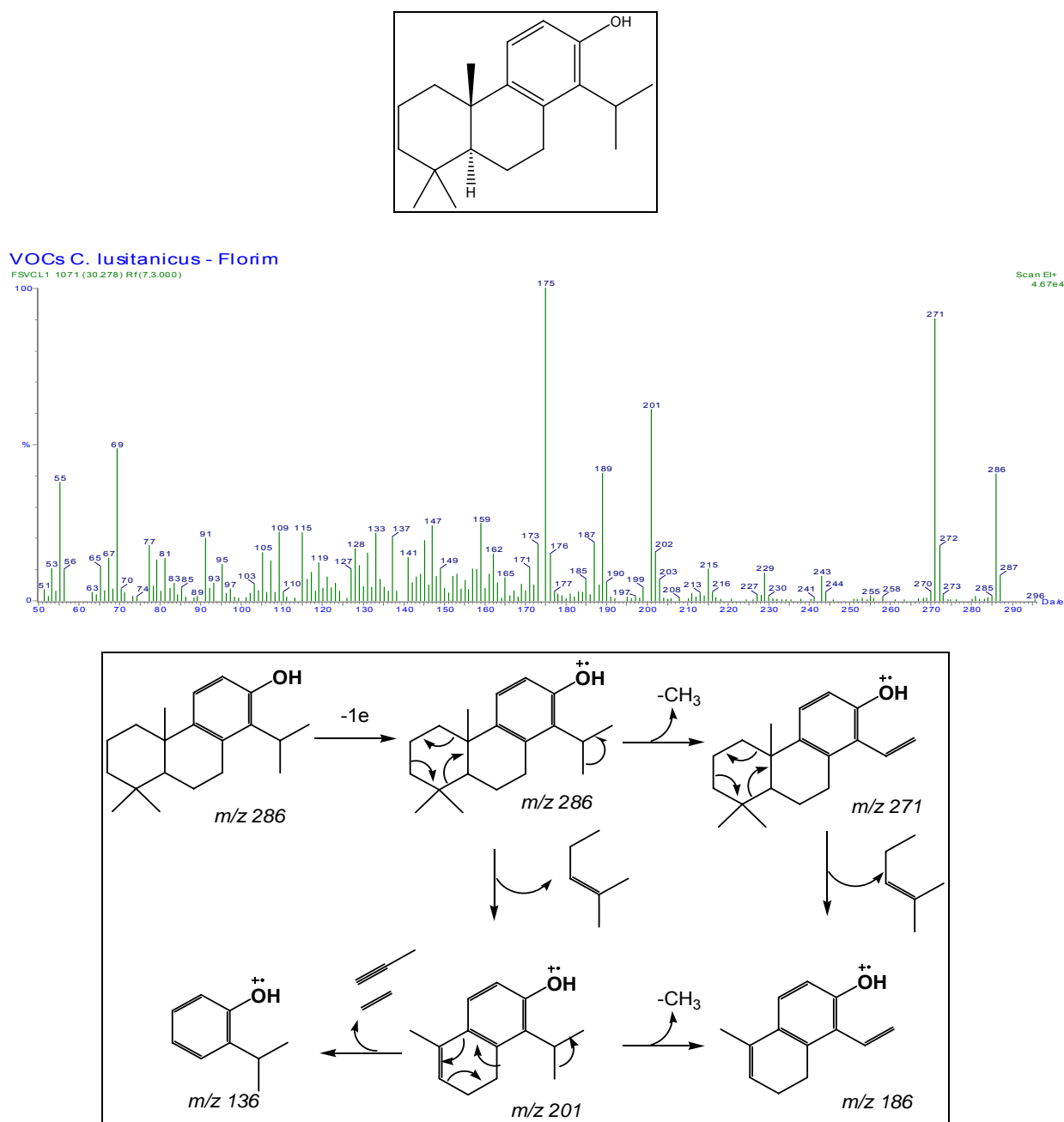


Figura 4-11 – Estrutura, Espectro de Massas e Fragmentação do Totarol.

Adicionalmente, foi realizada a identificação dos constituintes do óleo essencial do fungo endofítico, identificado como *Xylaria (NICL3)* e isolado das folhas de *Cupressus lusitanica*, cultivados em dois meios de cultura distintos: o meio líquido CZAPECK's e o meio sólido arroz. Os cromatogramas estão representados na Figura 4-12

VOCs *Xylaria* (NICL5) - injeção após secagem em capela - Florim

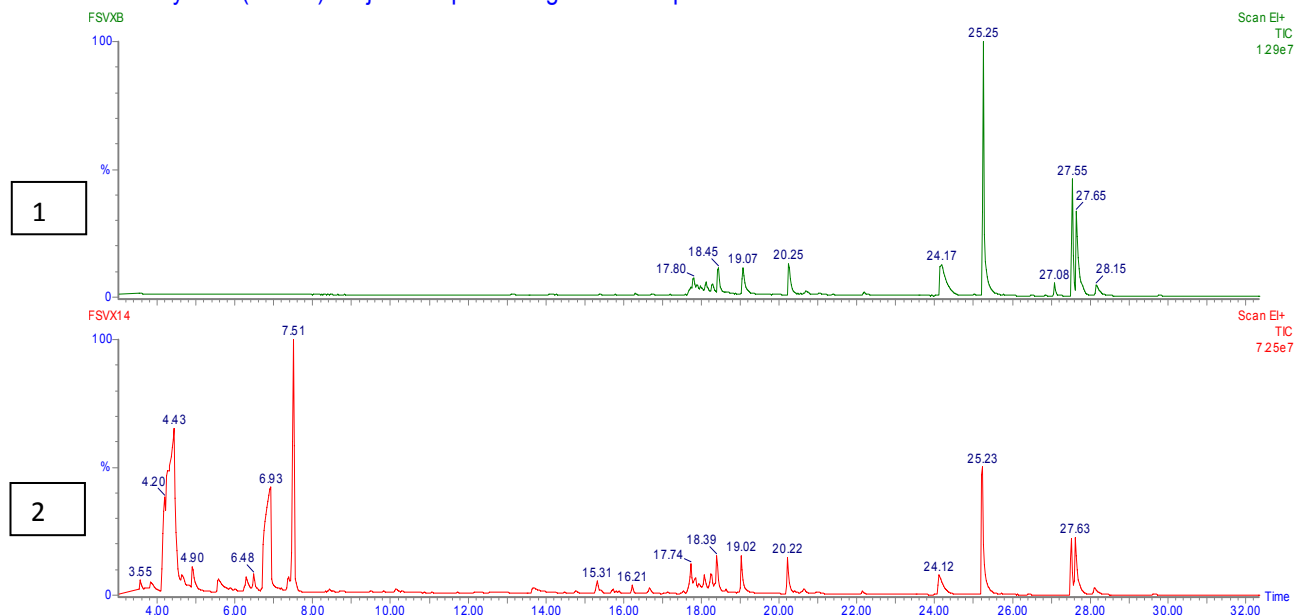


Figura 4-12 - Cromatograma do óleo essencial de *Xylaria* (NICL3) extraído pelo método da hidrodestilação. 1) Meio líquido CZAPECK's. 2) Meio sólido arroz.

A partir dos dados cromatográfico, pode-se verificar que a composição do meio de cultura a que o fungo é submetido gera modificações significativas no metabolismo do fungo. Esse fato observado vem sendo evidenciado em diversos estudos na literatura. Alguns estudos mostram que as alterações das condições do meio de cultura podem alterar completamente o metabolismo de alguns microorganismos (Figura 4-13). Esta abordagem pode levar a uma variedade de novos metabólitos secundários (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*, onde se observa os diferentes perfis cromatográficos para este microorganismo cultivado em diferentes meios de cultura como arroz, canjica, soja e trigo

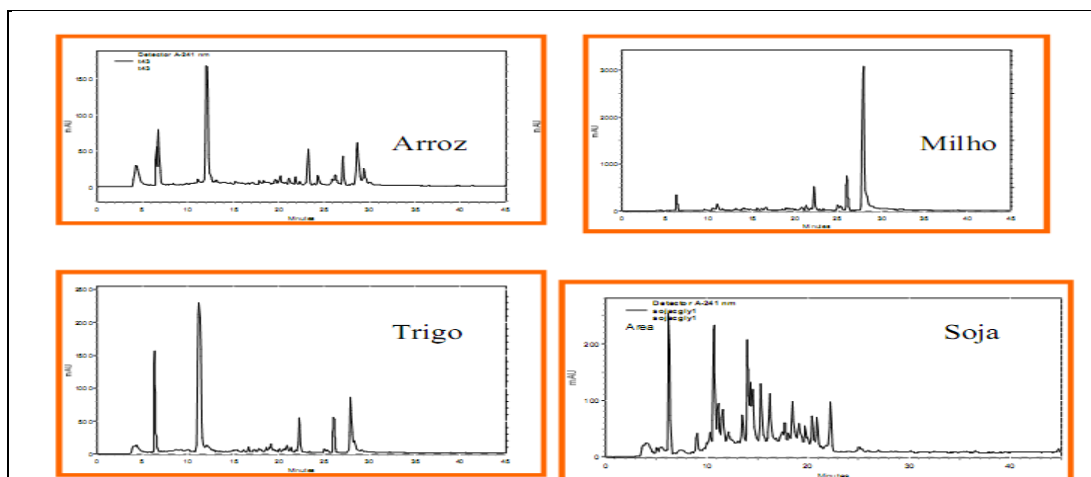


Figura 4-13 - Diferentes perfis cromatográficos quando o fungo *P. brasilianum* foi cultivado em diferentes meios de cultura.

A abordagem de modificações nas condições de cultura do micro-organismo representa uma ferramenta poderosa para elucidar o metaboloma dos diferentes micro-organismos. Isto inclui a detecção e identificação do maior número possível de metabólitos secundários produzidos. Embora uma alteração sistemática nos parâmetros de cultivo possa ser aplicada para vários micro-organismos, a abordagem 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).

Na abordagem do óleo essencial do fungo endofítico *Xylaria* (NICL3) em meio CZAPECK's e meio sólido, as modificações e características de cada meio causaram modificações no metabolismo do fungo, o que pode ser justificado pelas fontes de nutrientes utilizadas.

No óleo essencial do fungo *Xylaria* (NICL3) de meio líquido CZAPECK's foi possível identificar uma diversidade de compostos sesquiterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados, através de relações m/z 204 e 220, respectivamente, ilustrado na Figura 4-14.

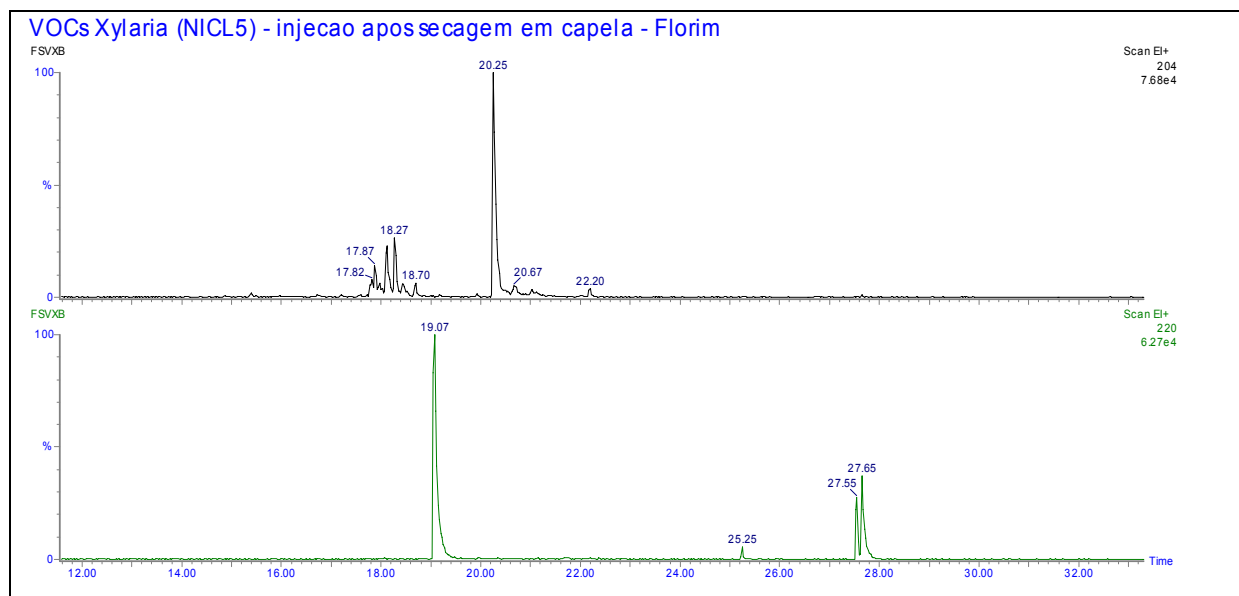


Figura 4-14 - Cromatograma de íons selecionados do óleo de *Xylaria* (NICL3) em meio CZAPECK's selecionados. 1) Íons m/z 204. 2) Íons m/z 220.

Através do cálculo de índice de Kovats e comparação da biblioteca de massas, foi possível identificar a misturas de sesquiterpenos no óleo essencial de *Xylaria* (NICL3), sendo representados na Tabela 4-2.

Tabela 4-2 - Substâncias identificadas do fungo *Xylaria* (NICL5) em meio CZAPECK's extraídas pelo método da hidrodestilação.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICES DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICES DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
1	15.39	1411,6	1412	1
2	15.75	1424,7	1420	2
3	15.79	1427,2	1431	3
4	15.89	1432,8	1434	4
5	16.21	1442,2	1443	5
6	16.66	1460,8	1463	6
7	16.90	1469,8	1467	7
8	17.16	1477,4	1477	8
9	17.54	1494,6	1494	9
10	17.73	1502,5	1502	10
11	17.84	1510,8	1512	11
12	18.15	1515,7	1515	12

Cont. Tabela 4-2 – Substâncias identificadas do fungo *Xylaria (NICL5)* em meio CZAPECK's extraídas pelo método da hidrodestilação.

13	18.22	1522,4	1522	13
14	18.32	1528,9	1531	14
15	18.64	1538,5	1539	15
16	19.03	1553,6	1552	16
17	19.83	1588,4	1587	17
18	20.28	1601,8	1598	18
19	20.66	1618,6	1620	19
20	20.98	1633,2	1630	20
21	22.18	1682,0	1682	21
22	25.25	1920,4	-	22
23	27.22	2096,4	-	23
24	27.65	2102,8	-	24
25	28.14	2150,6	-	25

Com posse dos dados de índices de Kovats e bibliotecas de massas do equipamento, as substâncias foram identificadas, cuja substâncias estão representadas na Figura 4-15 a seguir.

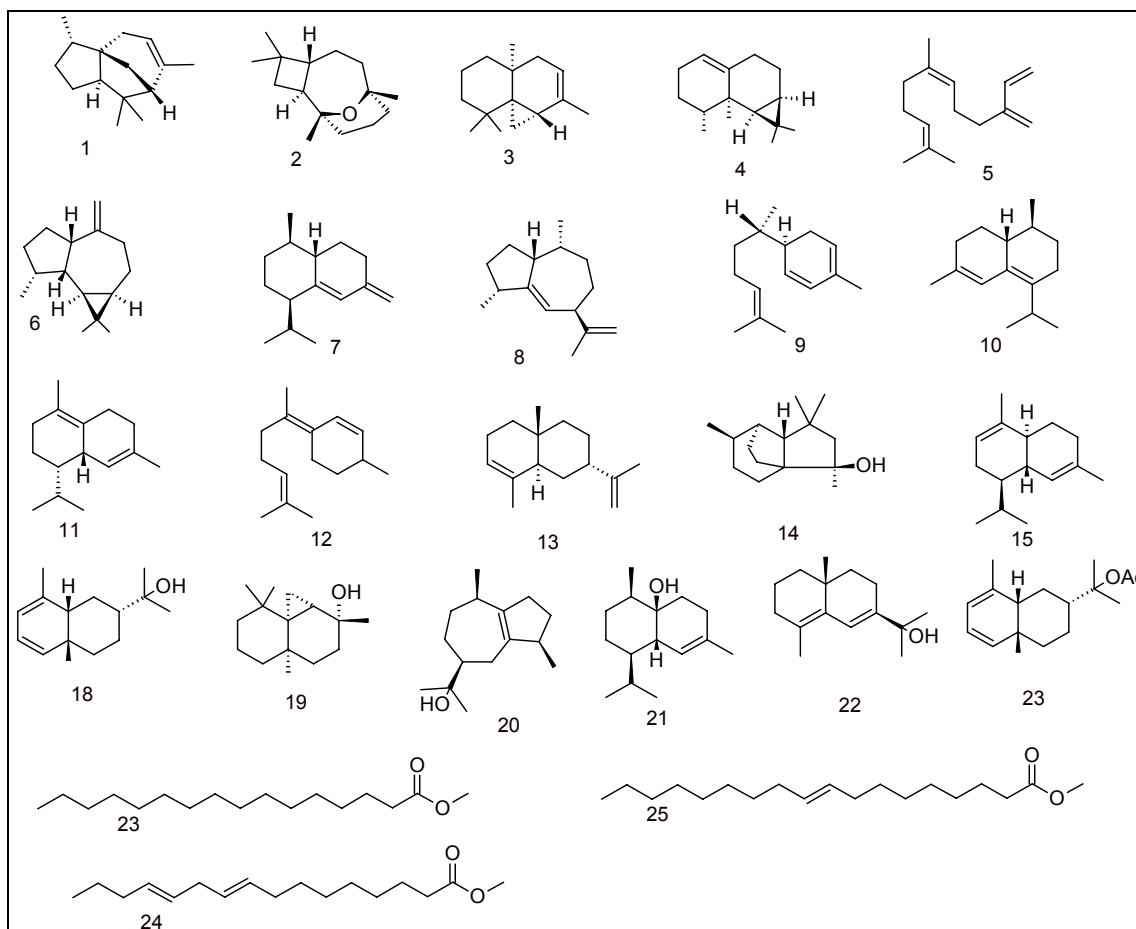


Figura 4-15 - Substâncias voláteis identificadas no fungo *Xylaria* (NICL3) em meio líquido CZAPECK's extraídas pelo método da hidrodestilação.

A hidrodestilação do fungo *Xylaria* (NICL3) por meio sólido mostrou uma composição maior de compostos se comparado com a extração dos compostos realizado no meio CZAPECK's (Figura 4-16). Isto pode ser explicado pela fonte mais elaborada de carbono do meio arroz, que pode causar mudanças no metabolismo do fungo, fazendo produzir outros tipos de compostos.

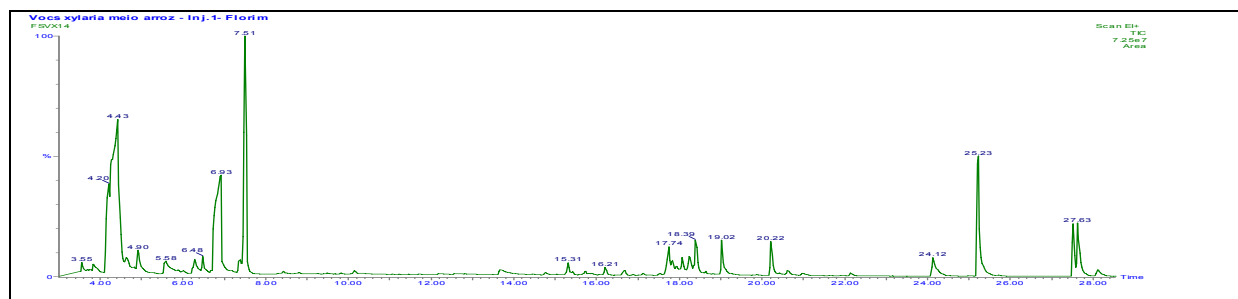


Figura 4-16 - Cromatograma de íons totatis do óleo essencial de *Xylaria* (NICL3) no meio sólido arroz extraído pelo método da hidrodestilação.

Baseando-se na mesma forma que foi realizada o tratamento dos dados do cromatograma dos óleos essenciais de *Cupressus lusitanica* e do óleo essencial de *Xylaria* (NICL3) em meio líquido, foi realizado o tratamento dos dados dos óleo essencial extraído de *Xylaria* (NICL3) em meio sólido. Cálculos de índices de retenção de Kovats e comparação com bibliotecas de massas possibilitaram identificar as substâncias presente no óleo essencial do fungo *Xylaria* (NICL3) em meio sólido. A Tabela 4-3 resume os índices calculados para este óleo.

Tabela 4-3 - Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial do fungo *Xylaria* (NICL3) em meio sólido.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICE DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
1	4.20	967,8	967	1
2	4.42	981,0	976	2
3	4.90	1006,1	1002	3
4	5.58	1035,9	1034	4
5	6.28	1066,6	1064	5
6	6.48	1075,4	1080	6
7	6.93	1095,1	1093	7
8	7.38	1112,8	1117	8
9	7.51	1120,6	1122	9
10	8.43	1152,6	1152	10
11	8.81	1167,0	1166	11
12	9.26	1184,0	1184	12
13	9.48	1192,4	1193	13
14	9.83	1205,5	1197	14
15	10.13	1210,6	1205	15
16	12.21	1293,3	1293	16

Cont. Tabela 4-3 - Índice de Kovats para os compostos presentes no óleo essencial do fungo *Xylaria* (NICL3) em meio sólido.

17	13.66	1336,8	1330	17
18	14.46	1376,8	1376	18
19	14.76	1389,4	1390	19
20	15.31	1408,4	1408	20
21	15.41	1411,9	1412	21
22	15.74	1424,7	1421	22
23	15.81	1427,4	1431	23
24	15.89	1432,5	1434	24
25	16.21	1442,8	1443	25
26	16.66	1460,2	1460	26
27	16.89	1469,1	1467	27
28	17.12	1477,9	1477	28
29	17.54	1494,2	1494	29
30	17.74	1502,0	1502	30
31	17.84	1510,0	1512	31
32	18.07	1515,2	1515	32
33	18.24	1522,0	1522	33
34	18.34	1528,0	1531	34
35	18.64	1538,0	1539	35
36	19.02	1553,2	1552	36
37	19.89	1588,0	1587	37
38	20.22	1601,2	1601	38
39	20.62	1618,2	1619	39
40	20.95	1633,8	1632	40
41	22.14	1682,6	1682	41
42	25.22	1920,6	-	42
43	27.25	2096,2	-	43
44	27.63	2102,2	-	44
45	28.10	2150,2	-	45
46	29.63	2030,5	2030	46

Através da comparação de dados de espectrometria de massas tanto com a biblioteca do aparelho como com a biblioteca de substâncias voláteis (Adams, 1995), pode-se confirmar as substâncias identificadas, cujas estruturas identificadas estão representadas na Figura 4-17.

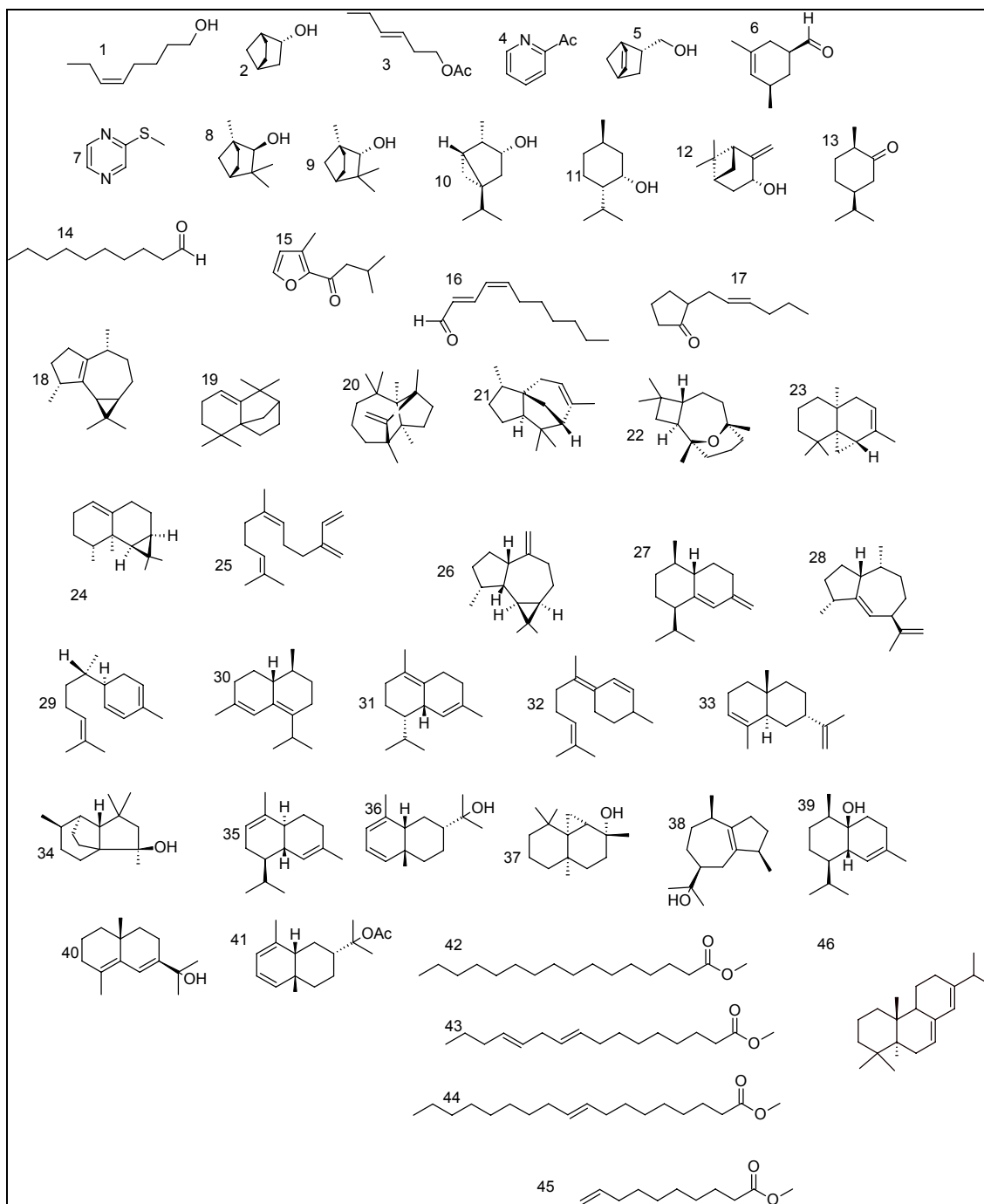


Figura 4-17 - Estruturas identificadas no óleo essencial de *Xylaria* (NICL3) extraídas pelo método da hidrodestilação.

O estudo de óleos essenciais extraídos a partir de plantas, especialmente plantas aromáticas, é um estudo bem difundido e vem sendo umas das áreas mais estudadas dentro da Química de Produtos Naturais, sendo justificado pela variedade de aplicações e usos nas diversas áreas que supram a

necessidade humana (Moyler, 1997). Dentre elas, pode ser citada, além da atividade terapêutica, atividades antifúngicas (Tavares *et al*, 2008), antibactericidas (Firas, 2008), antibióticas (Rodrigues *et al*, 2009), dermatológicas (Comai *et al*, 2010), anti-inflamatórias (Guerrini *et al*, 2009) e citotóxicas (Conforti *et al*, 2009; Loizzo *et al*, 2010). Entretanto, estudos de óleos essenciais em outros organismos é ainda um estudo relativamente novo, já que não há muitos relatos na literatura que tratem a respeito disso. Sendo assim, os micro-organismos apresentam-se como uma fonte promissora para estudos relativo a temática de óleos essenciais (Strobel, 2004).

Como mostrado nos dados de identificação das substâncias, observa-se que o fungo de *Xylaria* (*NICL3*) um forte produtor de compostos sesquiterpênicos, onde alguns deles estão representados na Figura 4-18.

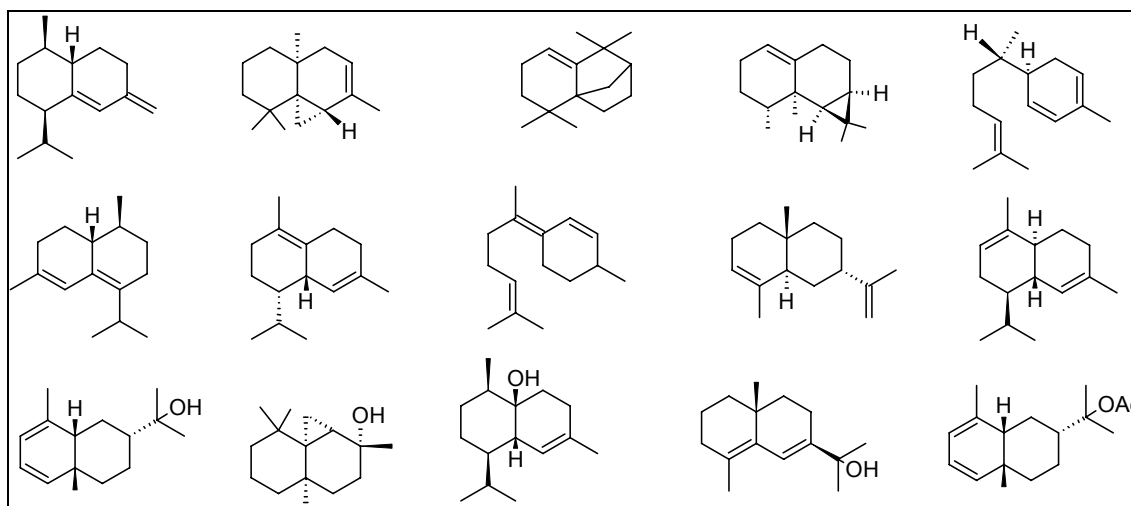


Figura 4-18 - Sesquiterpenos identificados no óleo essencial do fungo *Xylaria* (*NICL3*).

As espécies de fungos endofíticos *Xylaria* são conhecidas como produtores de metabólitos secundários, incluindo isocumarina (Tansuwan *et al*, 2007; Pongcharoen, *et al*, 2007), citocalasinas (Pongcharoen, *et al*, 2007; Espada *et al*, 1997; Abate *et al*, 1997), xantonas (Healy *et al*, 2004), xylocetais (Lin *et al*, 2001; Xiabo *et al*, 2006; Liu *et al*, 2006) e sesquiterpenos (McDonald *et al*, 2004) que contribuem para a sua classificação e identificação neste gênero. A produção destes terpenóides corrobora para classificar o fungo na família Xylariaceae.

Em trabalhos anteriores do grupo LaBioMMi, foi realizado o estudo do metabolismo deste fungo, onde já foi reportados o isolamento e a caracterização por meio de técnicas espectroscópicas (EM, RMN ^1H e ^{13}C , IV) de alguns sesquiterpenos eremophilanos isolados do mesmo fungo. (Amaral,2010).

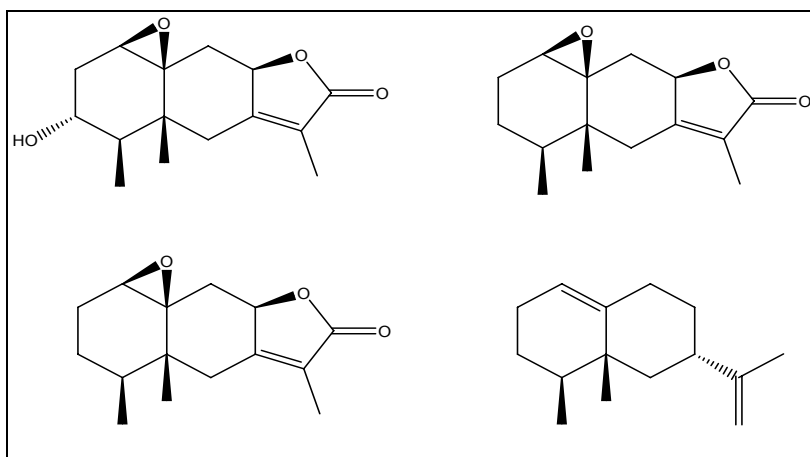


Figura 4-19 - Sesquiterpenos eremophilanos isolados de *Xylaria* (NICL3) (Amaral,2010).

Este tipo de esqueleto sesquiterpênico é muito semelhante ao esqueleto dos sesquiterpenos identificados através de cálculos de índice de retenção de substâncias voláteis. Este dado leva a crer na hipótese que o uso de cálculos de índice de retenção se mostrou uma ferramenta confiável para a detecção dos compostos no óleo essencial extraídos a partir deste fungos.

Além disso, sesquiterpenos apresentam um processo fragmentativo bem parecido e semelhantes entre as estruturas identificadas. O espectro na Figura 4-20 a seguir ilustra bem isso.

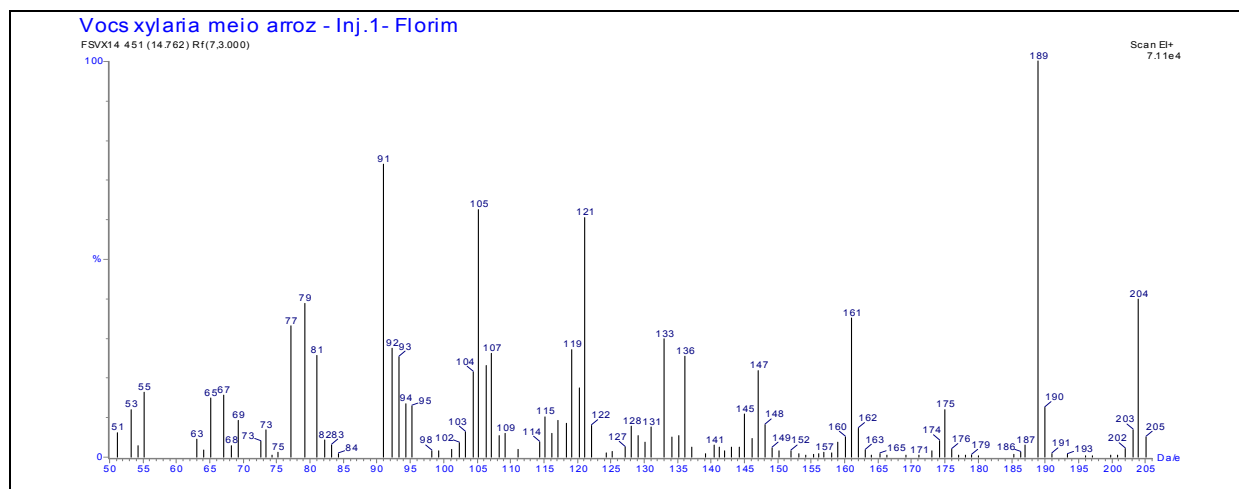


Figura 4-20 - Espectro de massas para a componente no tempo 14,762 minutos.

O espectro de massas mostrado acima é um típico espectro do que seria um composto sesquiterpênico. A relação m/z 204 é uma massa típica de um hidrocarboneto sesquiterpênico, conforme mostra a Tabela 1-3 (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987). Através da análise do espectro de massas é possível identificar a perda de 15 Da que seria referente a perda de um radical metila. Além disso, ocorrem outras perdas de unidade de massa que se referem a rearranjos, mas o que caracteriza ainda mais são as sucessivas perdas de 14 Da que se referem a perdas sucessivas de grupos metilênicos (CH_2). O mecanismo de fragmentação na Figura 4-21 mostrado a seguir ilustra o que seria a fragmentação geral de sesquiterpenos.

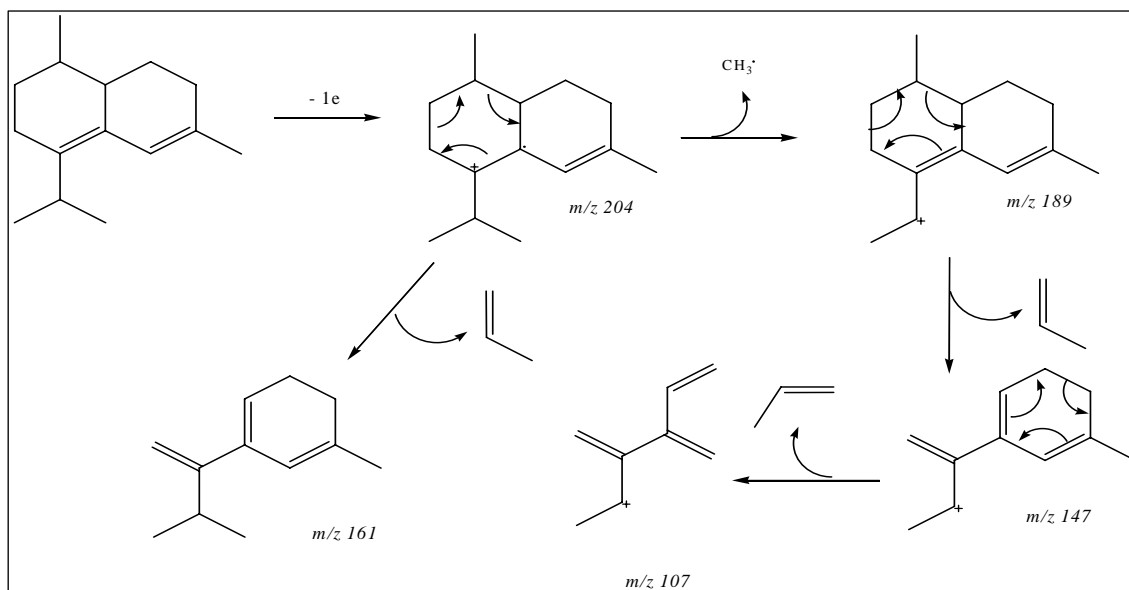


Figura 4-21 - Proposta de fragmentação de sesquiterpenos.

Além de compostos sesquiterpênicos, foi também identificado compostos diterpênicos no óleo essencial de *Xylaria* (NICL3) crescido em meio sólido, sendo a primeira vez que é reportado a identificação de diterpenos neste fungo *Xylaria* (NICL3). As características deste composto já foram discutidas e apresentadas durante a discussão do óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

Uma característica interessante observada para fungos endofíticos são as relações que podem apresentar com as plantas hospedeiras. Uma teoria vem sido levantada a respeito desta relação é conhecida como “Transferência Genética Horizontal” e é definida como a habilidade que micro-organismos endofítico e planta tem de copiar o código genético um do outro e assim produzir metabólitos secundários em comum. Diversos relatos na literatura vem dando sustentabilidade a esta teoria. Alguns exemplos desta teoria foram mostrados durante a introdução deste trabalho (Horr, 1997).

Um fato interessante obtido durante a realização deste trabalho foi a identificação de substâncias tanto no óleo essencial de *Cupressus lusitanica* como no óleo essencial do fungo endofítico, isolado desta planta, *Xylaria* (NICL3). A Tabela 4-4 lista os dados de retenção dos compostos encontrados em comum tanto para o óleo essencial de *Cupressus lusitanica* e do fungo *Xylaria* (NICL3).

Tabela 4-4 - Dados de Retenção para as substâncias encontradas em comum ao óleo essencial de *Cupressus lusitanica* e do fungo *Xylaria* (NICL3).

SUBSTÂNCIAS	<i>Cupressus lusitanica</i>		<i>Xylaria</i> em meio líquido		<i>Xylaria</i> em meio sólido	
	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS (KI)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS (KI)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS (KI)
1	7.41	1114,0	7.51	1116,0	-	-
2	9.68	1200,0	9.48	1199,2	-	-
3	12.76	1313,6	10.13	1210,6	-	-
4	16.26	1444,7	16.21	1442,8	16.21	1442,8
5	17.52	1493,4	17.49	1492,1	17.49	1492,1
6	18.24	1522,0	18.24	1522,0	18.24	1522,0
7	18.67	1539,2	18.64	1539,0	18.64	1539,0
8	19.92	1589,2	19.89	1589,0	19.89	1589,0
9	20.25	1602,5	20.22	1601,2	20.22	1601,2
10	21.35	1649,1	21.31	1648,6	21.31	1648,6
11	26.65	1884,9	26.75	1886,9	26.80	1887,9

A partir dos dados de retenção acima, as estruturas foram identificadas e mostradas na Figura 4-22.

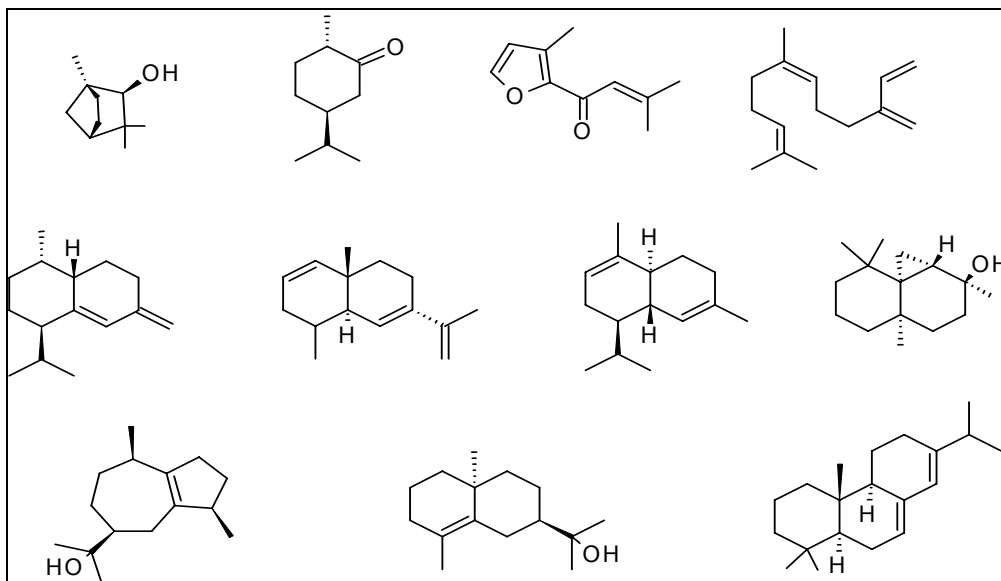


Figura 4-22 - Compostos identificados em comum para o óleo essencial de *Cupressus lusitanica* e o fungo *Xylaria* (N1CL3).

A identificação destes compostos tanto no óleo essencial da planta como do fungo levaram a acreditar na existência de uma interação a nível bioquímico planta-micro-organismos endofíticos. Este tipo de fato já foi encontrado em experimentos realizados em trabalhos anteriores do grupo LaBioMMi (Pereira, 2004)

4.1.1.2 – *Penicillium griseoroseum*

Outro fungo submetido a estudo de substâncias voláteis foi o fungo identificado como *Penicillium griseoroseum*, isolado das folhas de café (*Coffea arabica*), representado na Figura 4-23. Poucos trabalhos vêm sendo realizados com este fungo. Dessa maneira, não há indicativos claros sobre sua forma de associação com a planta nem sobre sua maneira de lidar com constituintes químicos do hospedeiro (Silva, 2009).

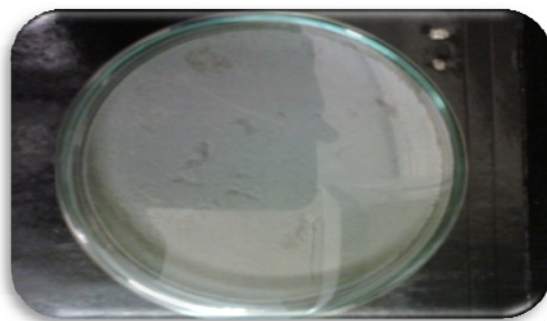


Figura 4-23 - Fungo *Penicillium griseoroseum*, isolado a partir de *Coffea arabica*.

A extração de óleo essencial deste fungo, assim como para o fungo *Xylaria* (NICL3), foi realizada por hidrodestilação utilizando meio líquido CZAPEC4K's e meio sólido arroz, cujos cromatogramas mostrados na Figura 4-24 representam o extrato de óleo essencial obtido.

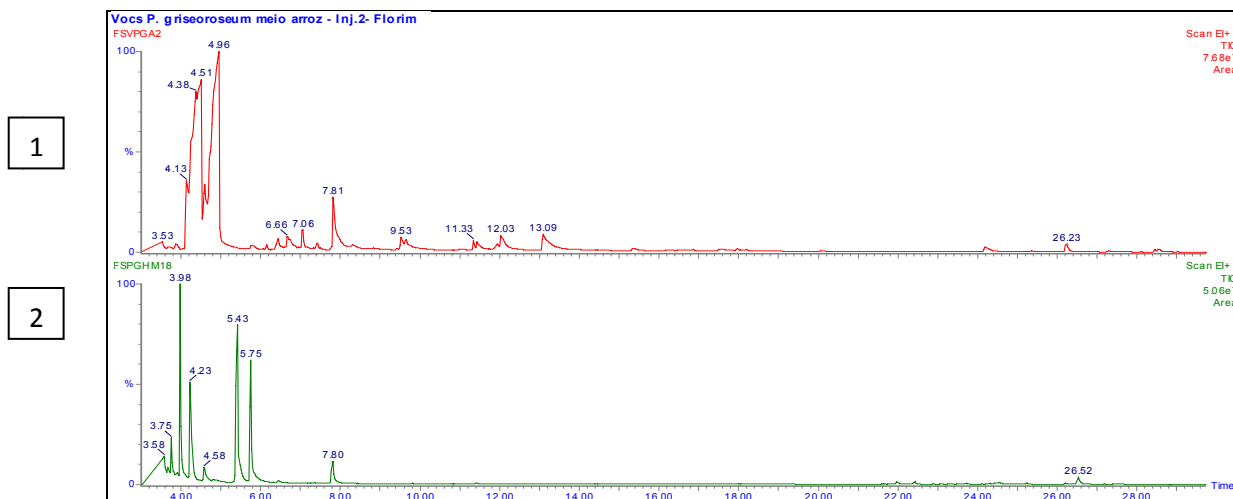


Figura 4-24 - Cromatogramas de óleos essenciais de *Penicillium griseoroseum* extraídos pelo método da hidrodestilação. 1) Meio Líquido CZAPECKs. 2) Meio sólido arroz.

Conforme já observado para o fungo *Xylaria* (NICL3), diferenças entre os óleos essenciais do fungo em diferentes meios de cultivos. Além disso, foi observado compostos de baixo peso molecular extraídos em ambos os meios. Por este fungos apresentar um odor característico, acredita-se que estas substâncias de baixo peso molecular sejam as responsáveis pelo odor característico.

Índices de retenção também foram calculados para as substâncias presentes nos óleos essenciais de *Penicillium griseoroseum*. Entretanto, nem todas foram confirmadas por índices de retenção e comparada com a biblioteca de substâncias voláteis. As estruturas identificadas foram confirmadas através da comparação com espectros da biblioteca NIST do aparelho.

O óleo essencial extraído do meio CZAPECKs pode ser dividido em duas partes. A primeira parte constituída de compostos de baixo peso molecular, ilustrado pela zona ampliada do cromatograma mostrado na Figura 4-25 seguir.

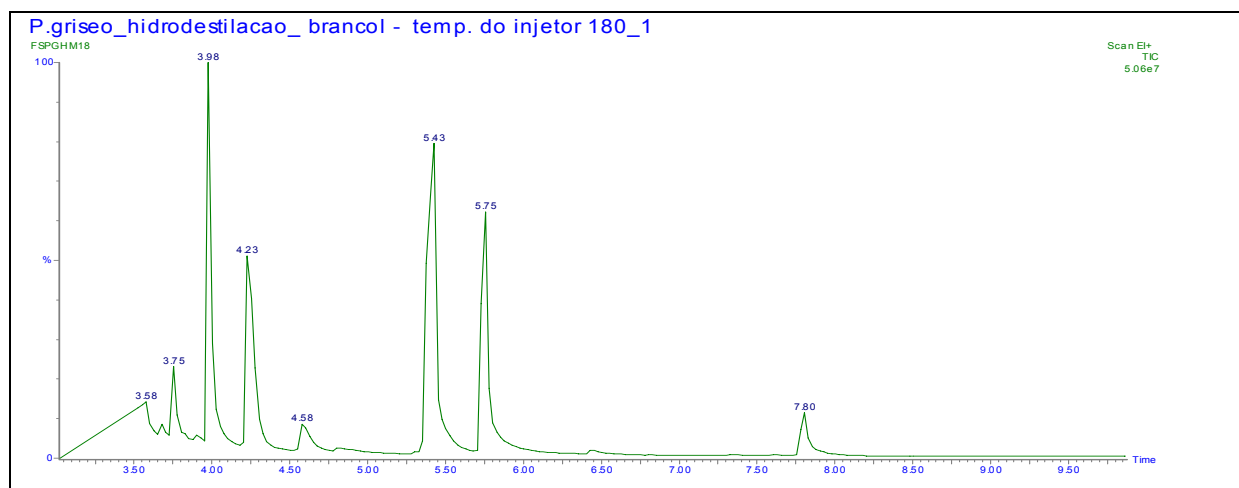


Figura 4-25 - Cromatograma ampliado na região de 3,00 a 9,00 minutos do óleo essencial de *Penicillium griseoroseum*.

Apesar dos cálculos de índices de retenção, estes compostos, cujas bandas cromatográficas listadas acima na Figura 4-25, não puderam ser identificados apenas por seus índices de Kovats. Nessa região foram identificados 9 compostos cujo índices de Kovats não apresentavam correlações com espectros de massas. Entretanto, o uso da biblioteca do aparelho possibilitou identificar quais seriam estes 9 compostos. Dentre os 9 compostos identificados, dois deles se mostraram mais interessantes, cuja bandas cromatográficas, conforme mostra a Figura 4-26, apresentaram tempo de retenção de 5,43 e 5,75 minutos, cujos espectros de massas estão representados na Figura 4-26 a seguir.

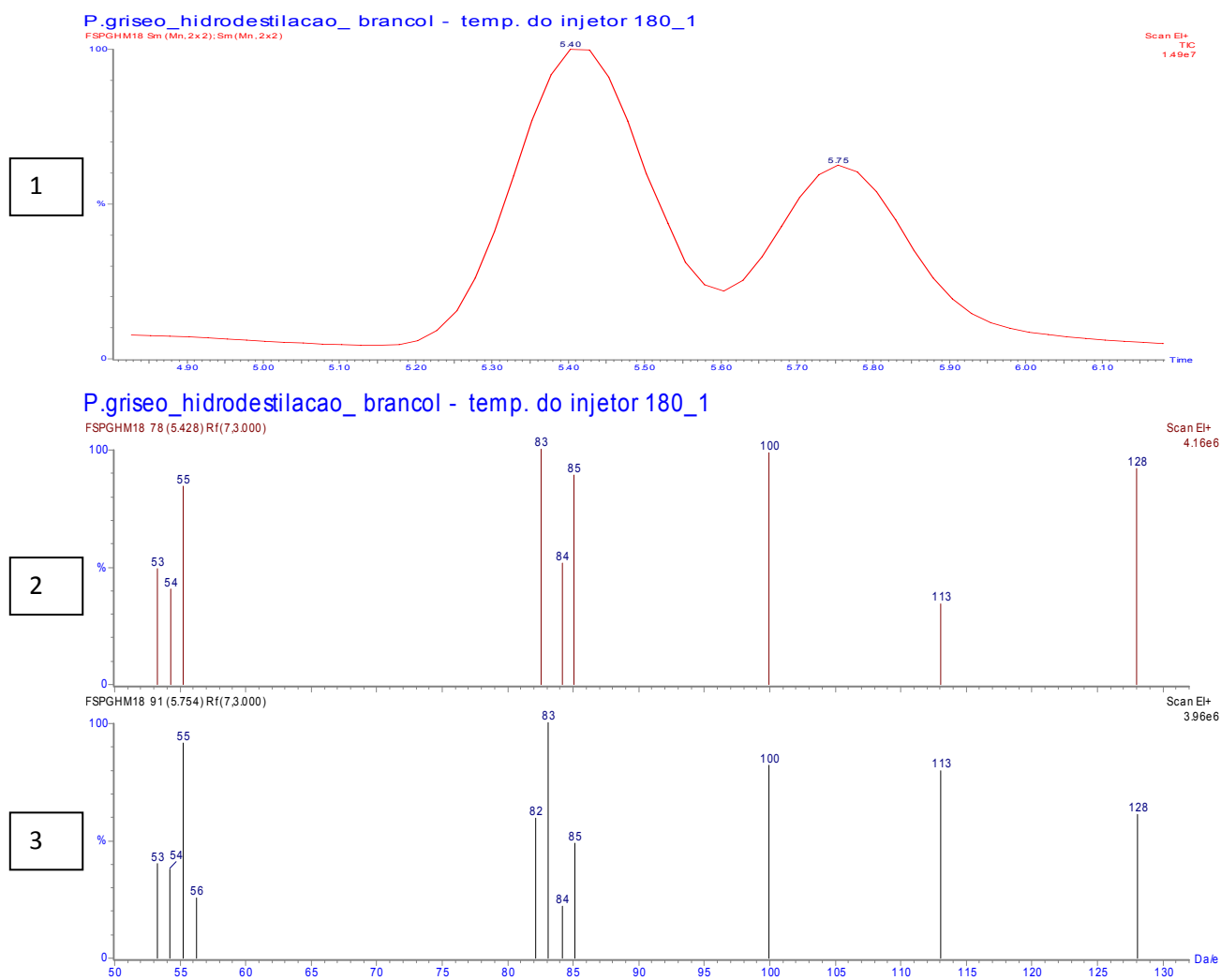


Figura 4-26 - Cromatograma e Espectros de Massas do Óleo Essencial de *Penicillium griseoroseum*. 1) Região do cromatograma com as duas substâncias de interesses. 2) Espectros de massas da banda cromatográfica em 5,43 minutos. 3) Espectro de massas da banda cromatográfica em 5,75 minutos.

Conforme observado na Figura 4-o acima, os espectros de massas, apesar de apresentarem tempos de retenção bem diferentes, todavia são muitos semelhantes. Através da biblioteca do aparelho, estas duas bandas foram atribuídas serem referentes a presença de Tiglato de Etila, o que é mostrado na Figura 4-27 a seguir.

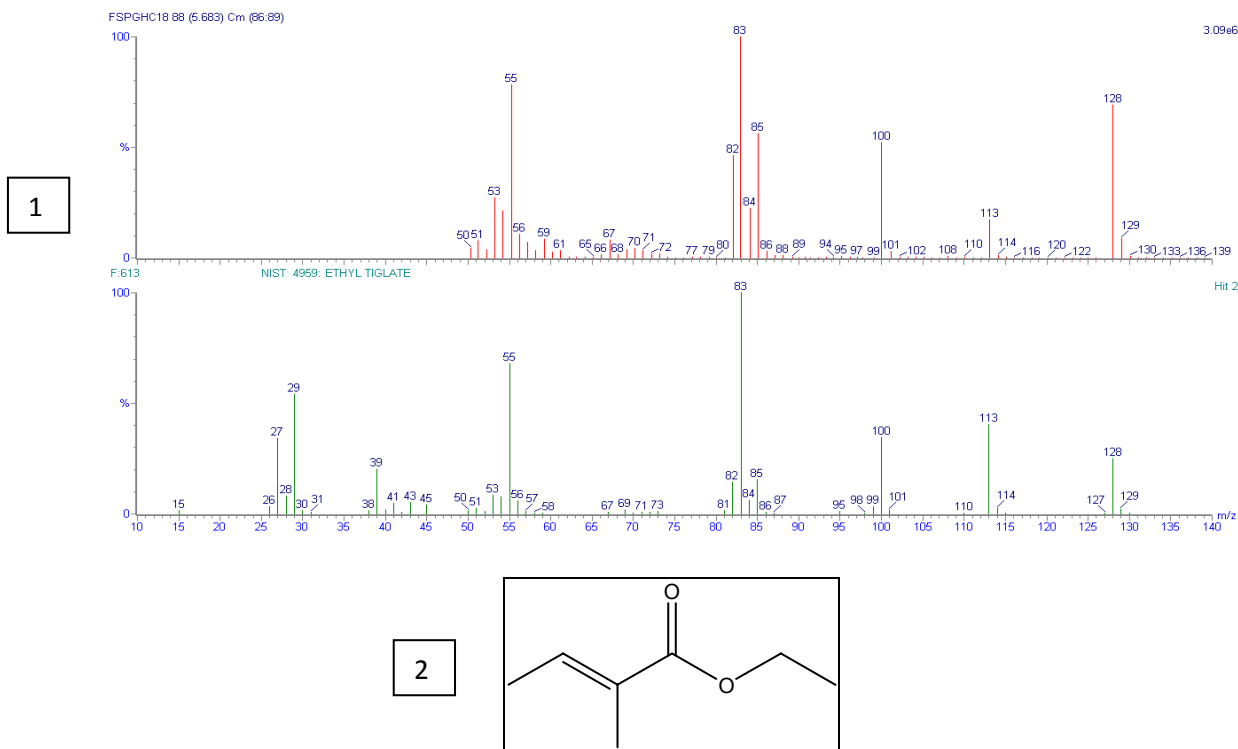


Figura 4-27 – 1) Espectros de Massas gerado pela biblioteca do aparelho para as duas substâncias em questão. 2) Estrutura sugerida: Tiglato de Etila.

Dados na literatura sugeriram explicações para este fenômeno. Sabe-se na literatura que espectros de massas de alcenos *cis* e *trans* gerados por impacto eletrônico são semelhantes e não diferem em nada em termos de íons gerados, apenas na intensidade do íons (McLafferty, 1993). Esta informação levou a sugerir que na verdade estas duas substâncias tratam-se de dois isômeros *cis-trans* da substância citada, sendo conhecidas como Tiglato de Etila e Angeloato de Etila, mostradas na Figura 4-28.

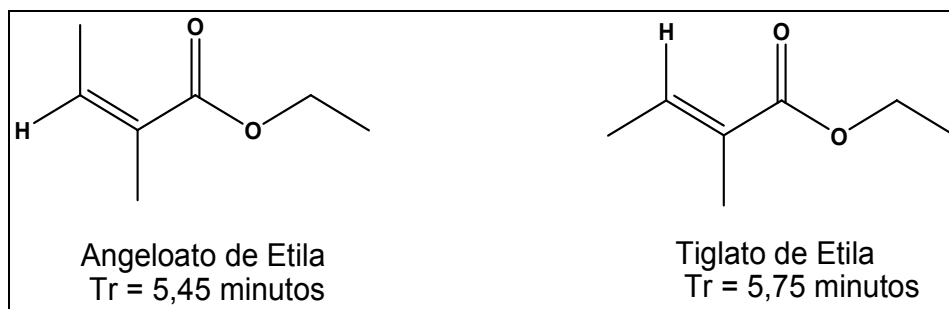


Figura 4-28 - Estruturas identificadas de Angeloato de Etila e Tiglato de Etila.

Os tempos de retenção atribuídos e justificados através da intensidade do íon de relação m/z 113. O tiglato de etila apresenta um β -hidrogênio *cis* a carbonila que pode formar uma ligação de hidrogênio com a carbonila. No Angeloato de Etila, o β -hidrogênio encontra-se na posição *trans* a carbonila, o que dificultaria a formação desta ligação de hidrogênio. A formação desta ligação de hidrogênio tornaria este íon de m/z 113 mais estável no tiglato de etila do que no angeloato de etila.

Tiglato e angeloato de Etila são substâncias que até agora não haviam sido reportadas para fungos. Essas substâncias são encontradas em materiais em putrefação. Podem ser produzidos a partir de esterificação de seus ácidos análogos com etanol. Além disso são substâncias que apresentam atividade biológica no sentido de causar efeitos irritantes em tecidos ulcerados e escamosos em coelhos e ratos. Também é a primeira vez que estas substâncias são encontradas como substâncias voláteis (1988). Na Figura 4-29 a seguir são apresentadas propostas de fragmentação referentes a formação dos íons.

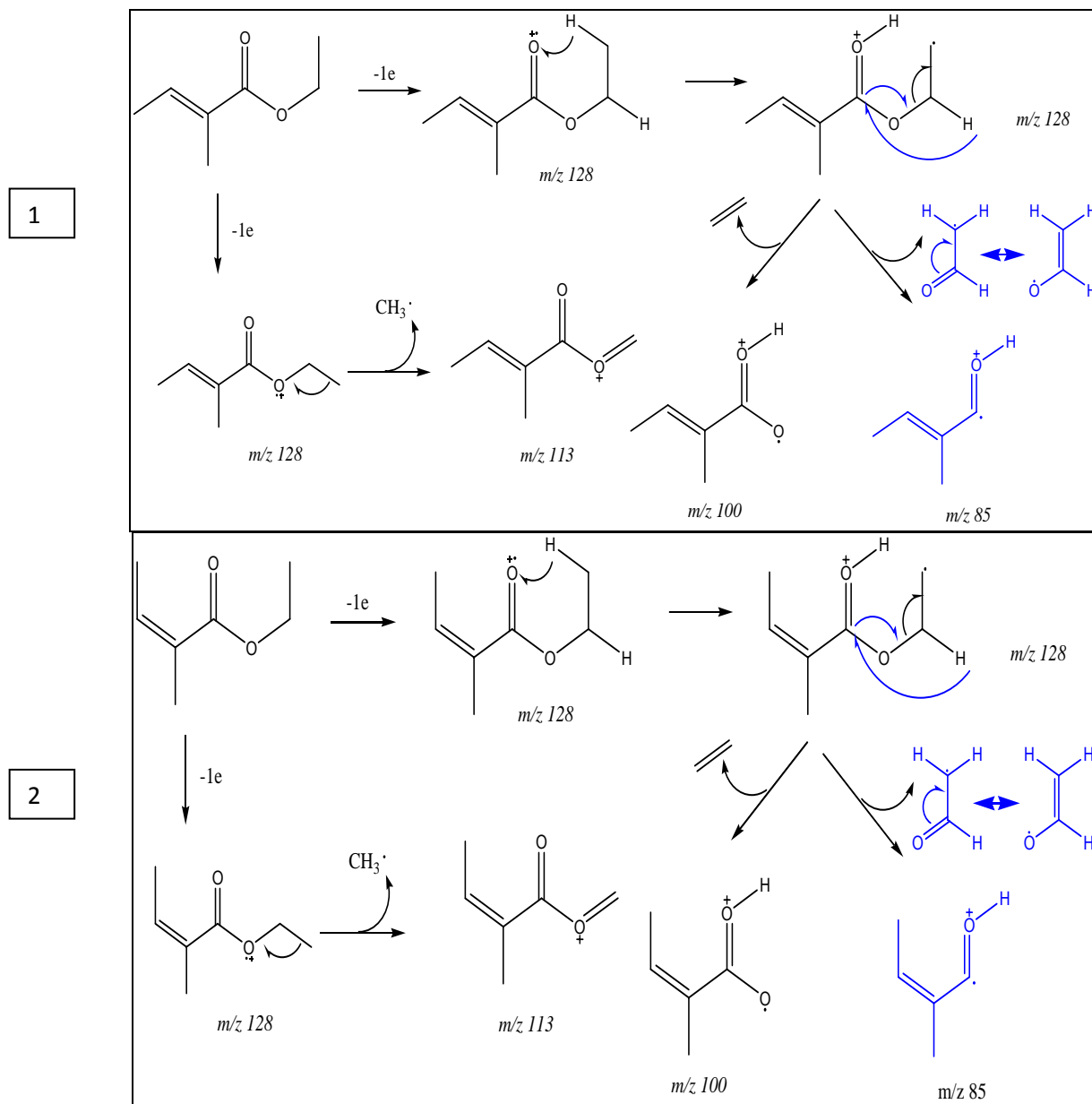


Figura 4-29 - 1) Proposta de fragmentação da formação de íons do Tiglato de Etila. 2) Proposta de fragmentação da formação de íons do Angeloato de Etila.

Além desses compostos, foram identificados outros compostos de baixo peso molecular, cujas estruturas estão representadas a seguir.

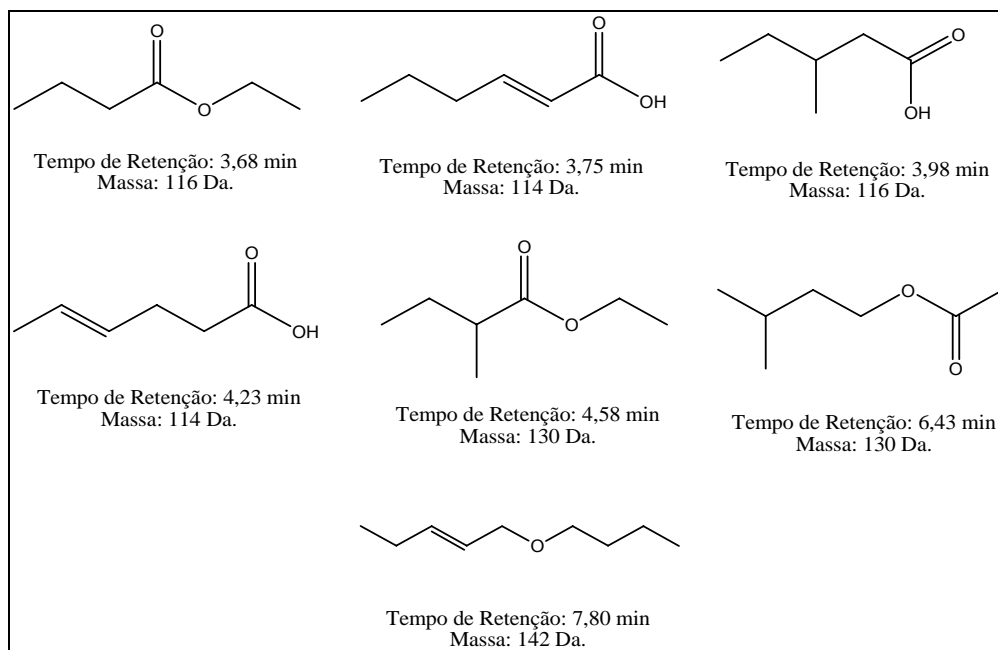


Figura 4-30 - Compostos de baixo peso molecular identificados no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum*.

Demais compostos também puderam ser identificados no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum* em meio líquido. Monoterpenos (de relação m/z 136), sesquiterpenos (de relação m/z 204) e, principalmente, diterpenos (de relação m/z 272) foram identificados (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987). A Figura 4-31 a seguir resume os compostos identificados.

Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endofíticos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras

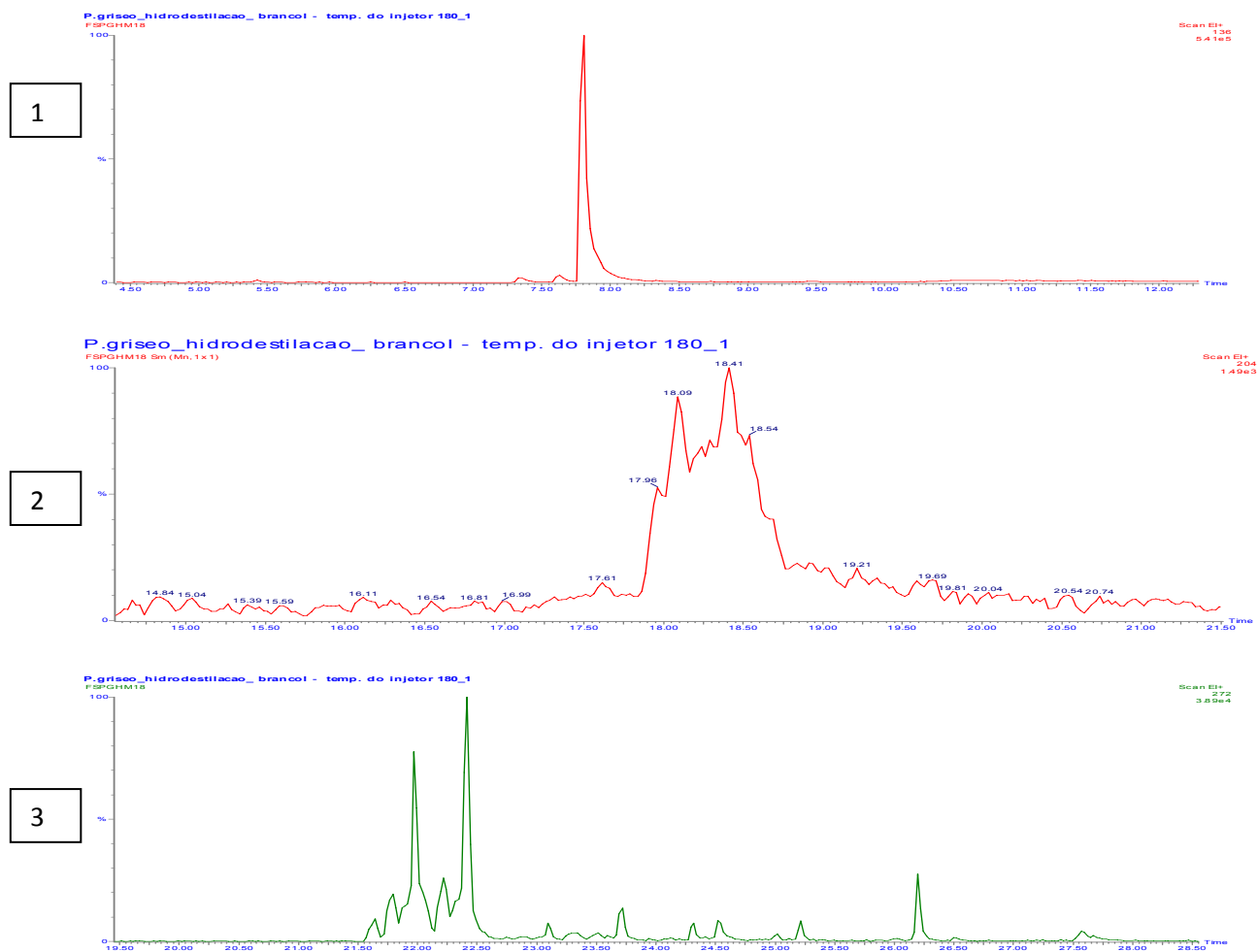


Figura 4-31 - Cromatogramas para identificação de compostos terpênicos no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum*. 1) Monoterpenos com relação m/z 136. 2) Sesquiterpenos com relação m/z 204. 3) Diterpenos com relação m/z 272.

A partir dos dados de tempos de retenção, também foi realizado cálculos de índices de retenção, que estão apresentados na Tabela 4-5 a seguir.

Tabela 4-5- Índices de retenção calculados para o fungo *Penicillium griseoroseum*.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICE DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
1	11.49	1266,7	1266	1
2	17.94	1510,0	1510	2
3	18.09	1516,6	1516	3
4	18.21	1520,8	1520	4
5	18.26	1522,8	1522	5

Cont. Tabela 4-5- Índices de retenção calculados para o fungo *Penicillium griseoroseum*.

6	18.41	1528,8	1528	6
7	21.64	1661,4	1661	7
8	21.79	1667,9	1667	8
9	21.97	1675,4	1675	9
10	22.22	1686,0	1680	10
11	22.42	1694,9	1694	11
12	23.12	1725,3	1725	12
13	23.29	1732,8	1732	13
14	23.52	1743,1	1743	14
15	23.72	1752,0	1752	15
16	24.32	1778,6	1778	16
17	24.54	1788,4	1788	17
18	25.02	1810,1	1810	18
19	25.22	1819,1	1819	19
20	26.19	1864,3	1864	20
21	26.37	1872,6	1872	21
22	26.52	1879,6	1879	22
23	27.17	1910,0	1910	23
24	27.42	1922,0	1922	24
25	27.57	1929,1	1929	25

Os compostos foram então identificados por comparação de bibliotecas de massas tanto do aparelho como de índices de Kovats, possibilitando identificar as estruturas presentes. A Figura 4-32 a seguir mostra as estruturas identificadas presentes no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum*.

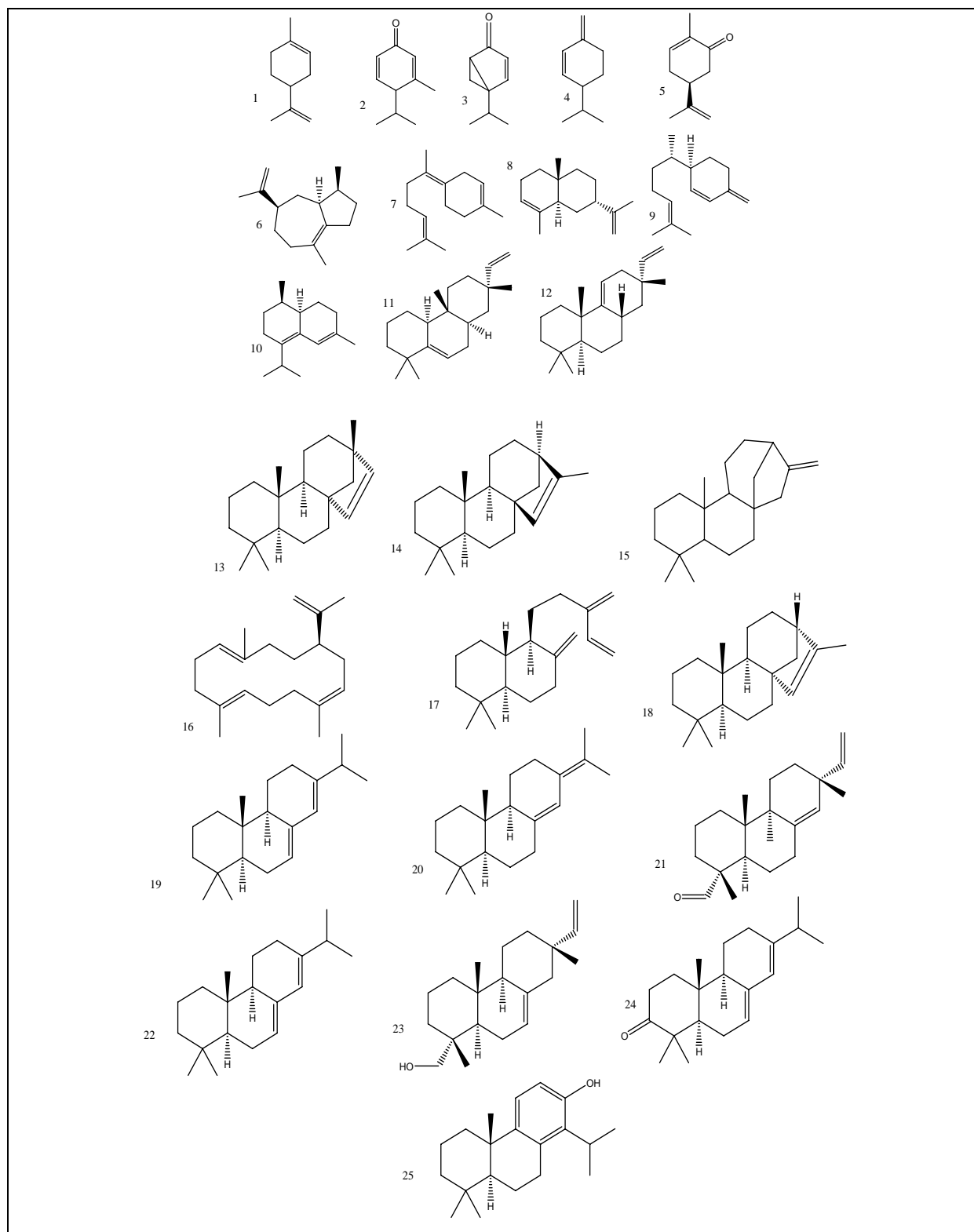


Figura 4-32 - Compostos identificados por índice de retenção no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum*.

O que chamou atenção na análise deste óleo essencial foi a identificação de uma mistura de compostos diterpênicos. São raros trabalhos na literatura, estudos relacionados a óleos essenciais que apresentam uma complexidade de compostos diterpênicos como este fungo. Como este fungo é um dos mais recentes no laboratório, são poucos os trabalhos relacionados a seu metabolismo foram realizados. Esta foi a primeira vez que estes terpenos vem sido reportados para este fungos. Dados da literatura mostram que diterpenos são compostos que apresentam uma extensiva e diversas lista de atividades biológicas (Li, 1992), o que leva a acreditar na hipótese que o óleo essencial deste fungo possa apresentar atividade semelhantes ou até melhores que diterpenos isolados. Para confirmar este fato, ensaios de atividades biológicas devem ser realizados.

Os espectros de massas apresentados para os diterpenos identificados no óleo apresentaram uma semelhança muito grande a nível de padrão de fragmentação, o que leva a crer que o mecanismo fragmentativo é semelhante ao já mostrados anteriormente, apenas com diferenças em termos da posição da perda de água.

Monoterpenos identificados também mostraram semelhanças no seu padrão de fragmentação. O monoterpeno identificado no tempo de 11,49 minutos foi identificado com um índice de retenção de Kovats 1266.7 apresenta o seguinte espectro de massas e padrão de fragmentação, representado pela Figura 4-33:

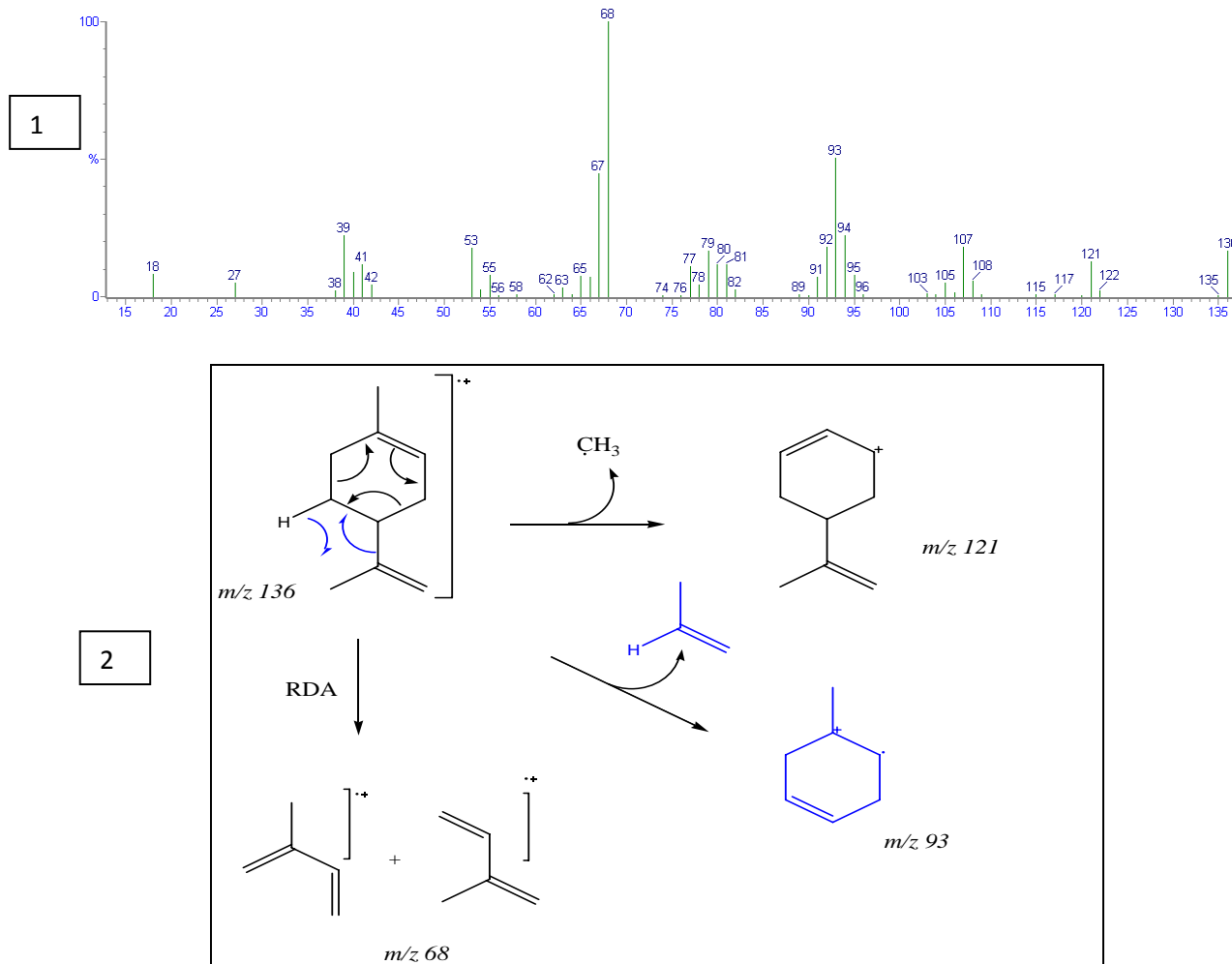


Figura 4-33 - 1) Espectro de massas da substância em 11,49 minutos. 2) Proposta de fragmentação para a substância identificada.

Por meio dos mecanismos de fragmentação pode-se justificar a estabilidade dos íons formados. O pico do íon base m/z 68 é formado por um rearranjo do tipo Retro-Diels-Alder. Este rearranjo gera duas estruturas conjugadas idênticas. Esta conjugação confere à estrutura uma alta estabilidade, o que justificaria o fato do íon m/z 68 ser o íon base.

Substâncias semelhantes foram encontradas no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum* em meio sólido. Diferenças foram encontradas em termos de concentração das substâncias, onde o Tiglato de Etila e Angeloato de Etila se apresentaram em altas proporções. No extrato do óleo essencial de *Penicillium*

Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endófitos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras

griseoroseum em meio sólido, também puderam ser identificados ésteres metílicos e etílicos.

Um exemplo de éster metílico identificados é a banda em 25,36 minutos, cuja região do cromatograma está mostrada no cromatograma e espectros de massas são mostrados na Figura 4-34 a seguir.

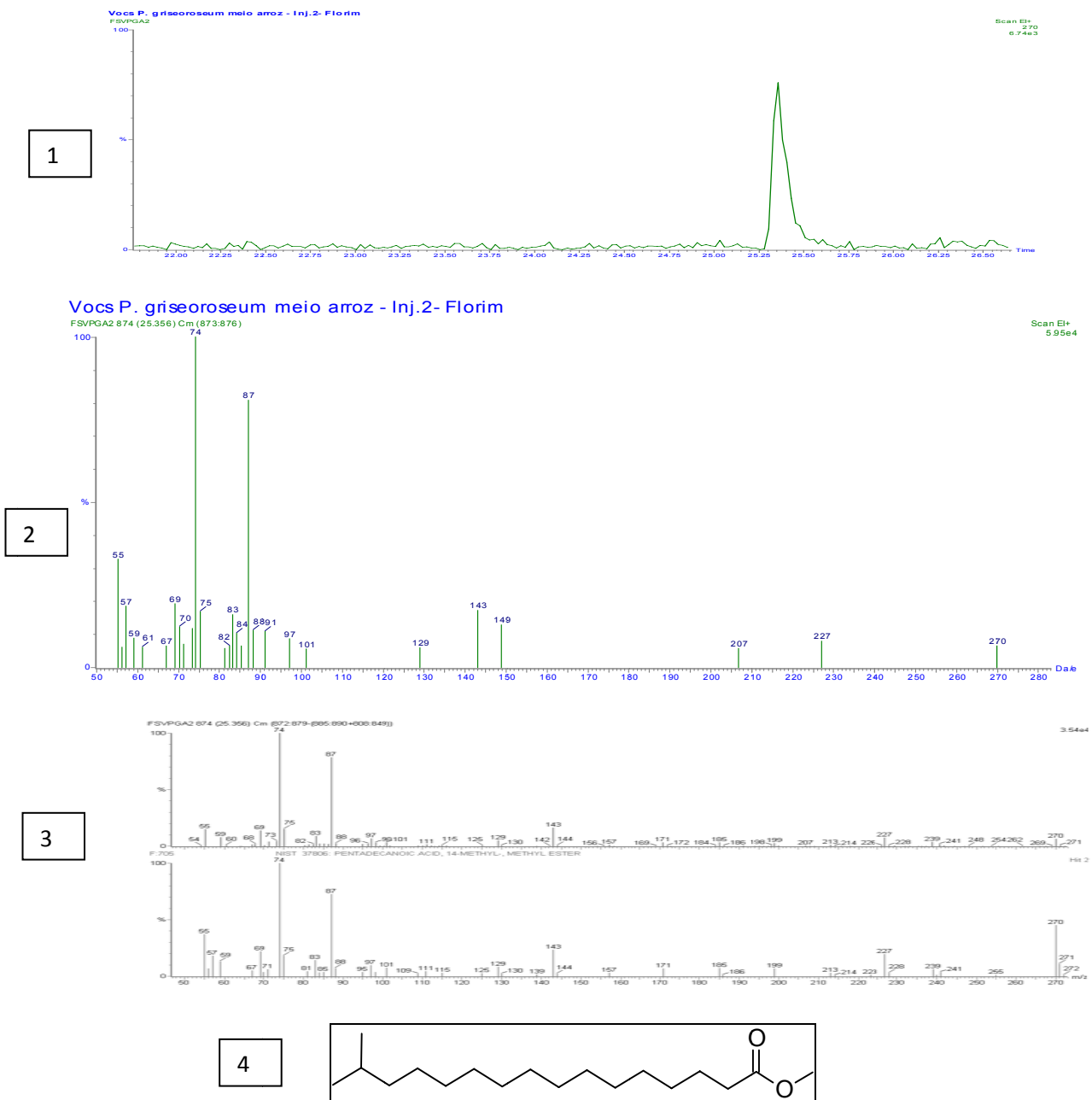


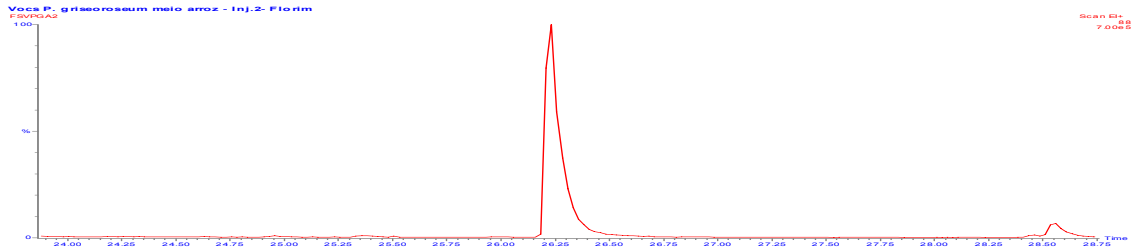
Figura 4-34 - Região do Cromatograma onde foram identificados ésteres metílicos. 1) Cromatograma da região da banda em 26,33 minutos. 2) Espectros de massas para a banda em

Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endófitos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras

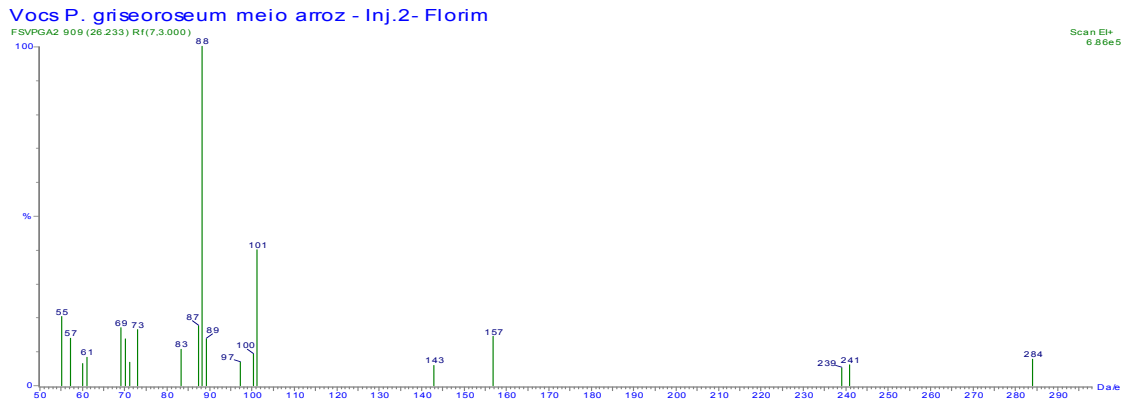
25,36 minutos. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do aparelho. 4) Estrutura proposta.

Além de ésteres metílicos, foram identificados ésteres etílicos, como o apresentado na banda em 26,33 minutos, cujo cromatograma e espectros de massas são mostrados na Figura 4-35 a seguir.

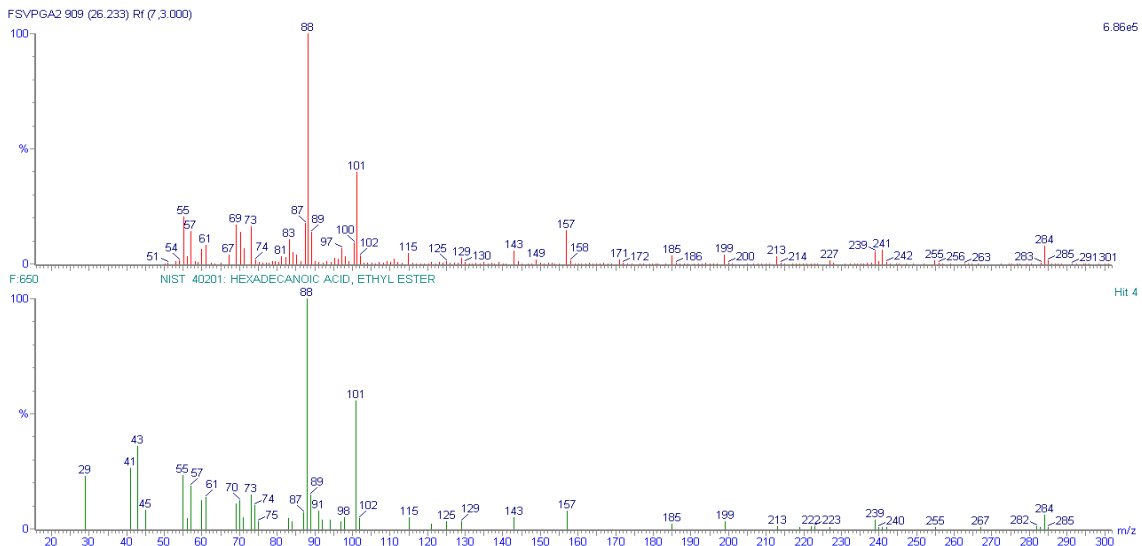
1



2



3



4

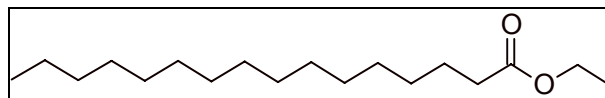


Figura 4-35 - Região do Cromatograma onde foram identificado ésteres metílicos. 1) Cromatograma da região da banda em 26,33 minutos. 2) Espectros de massas para a banda em 25,36 minutos. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do aparelho. 4) Estrutura proposta.

Ésteres etílicos sofrem um processo de fragmentação bem característico, que é representado na Figura 4-36 a seguir.

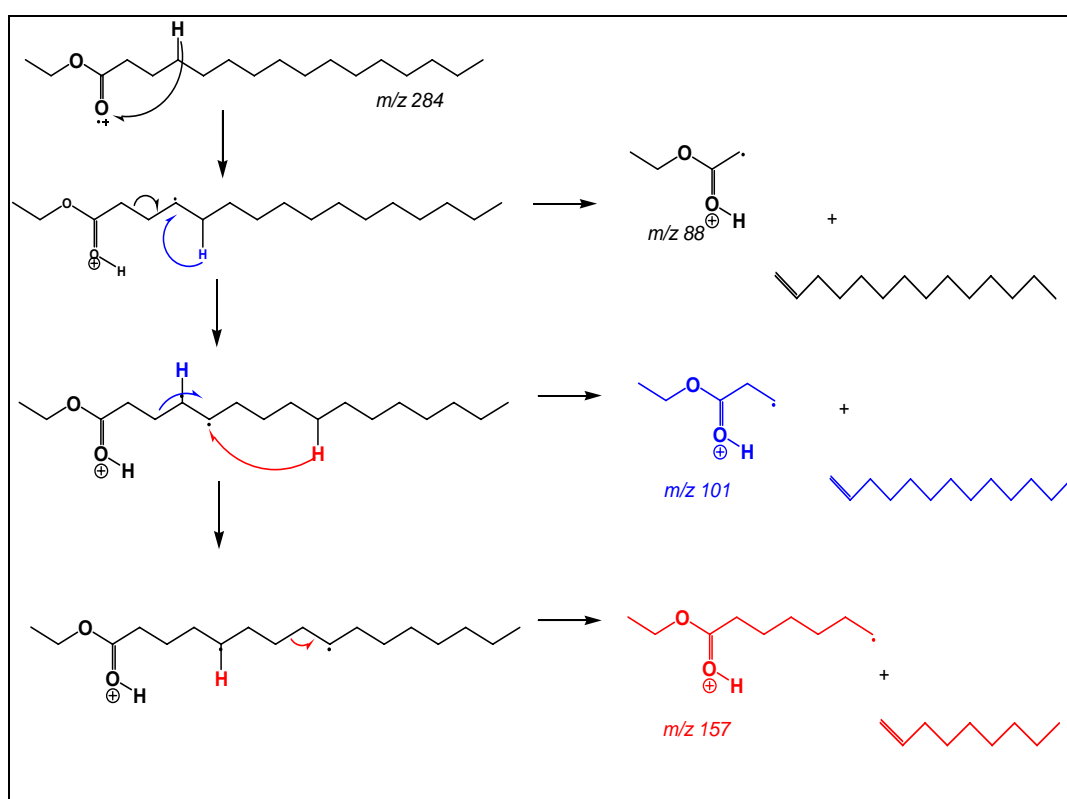


Figura 4-36 – Proposta de Fragmentação do éster etílico identificado na banda cromatográfica de 26,33 minutos.

O mecanismo de fragmentação é explicado da seguinte forma: inicialmente ocorre a ionização da carbonila. Nessa etapa, ocorre um rearranjo do tipo McLafferty onde o hidrogênio γ migra para a carbonila e ocorre a subsequente clivagem da ligação α - β , formando o íon m/z 88 como íon base. Numa segunda

etapa, ao migrar o hidrogênio γ , ocorre um rearranjo de hidrogênio do tipo 1,2 e clivagem homolítica da ligação adjacente, o que explicaria a formação do íon m/z 101. Numa terceira etapa, ocorreria um rearranjo de hidrogênio do tipo 1,6 e clivagem homolítica da ligação adjacente, o que justificaria a formação do íon m/z 157.

Outros ésteres metílicos e etílicos em menores concentrações também foram identificados no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum* em meio arroz. A Figura 4-37 a seguir lista estes ésteres identificados no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum*.

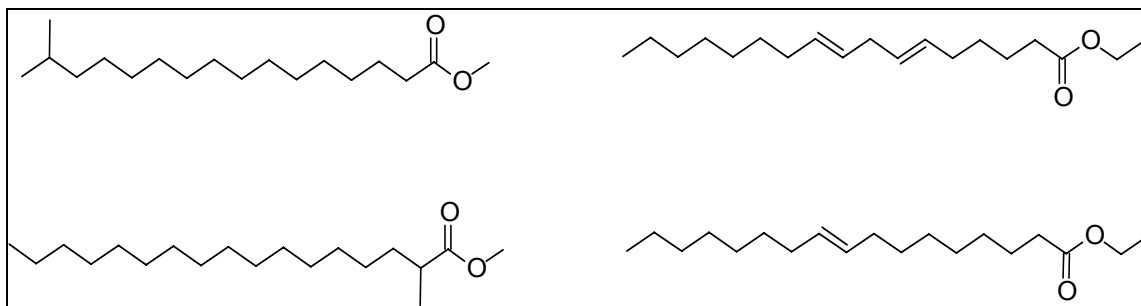


Figura 4-37 - Ésteres metílicos e etílicos identificados no óleo essencial de *Penicillium griseoroseum* em meio arroz.

4.1.1.3 – *Penicillium brasilianum* e *Melia azedarach*

Foi realizado o monitoramento do óleo essencial de *Melia azedarach* a partir de suas folhas e frutos e do fungo endofítico associado *Penicillium brasilianum*. Estes organismos estão ilustrado na Figura 4-38.



Figura 4-38 - *Melia azedarach* e o fungo endofítico associado *Penicillium brasilianum*.

Sendo assim, foi realizada a extração de óleo essencial das folhas e frutos de *Melia azedarach* e do fungo *Penicillium brasilianum* em meio líquido e sólido, cujos cromatogramas apresentados na Figura 4-39 abaixo representam as análises destes óleos essenciais extraídos.

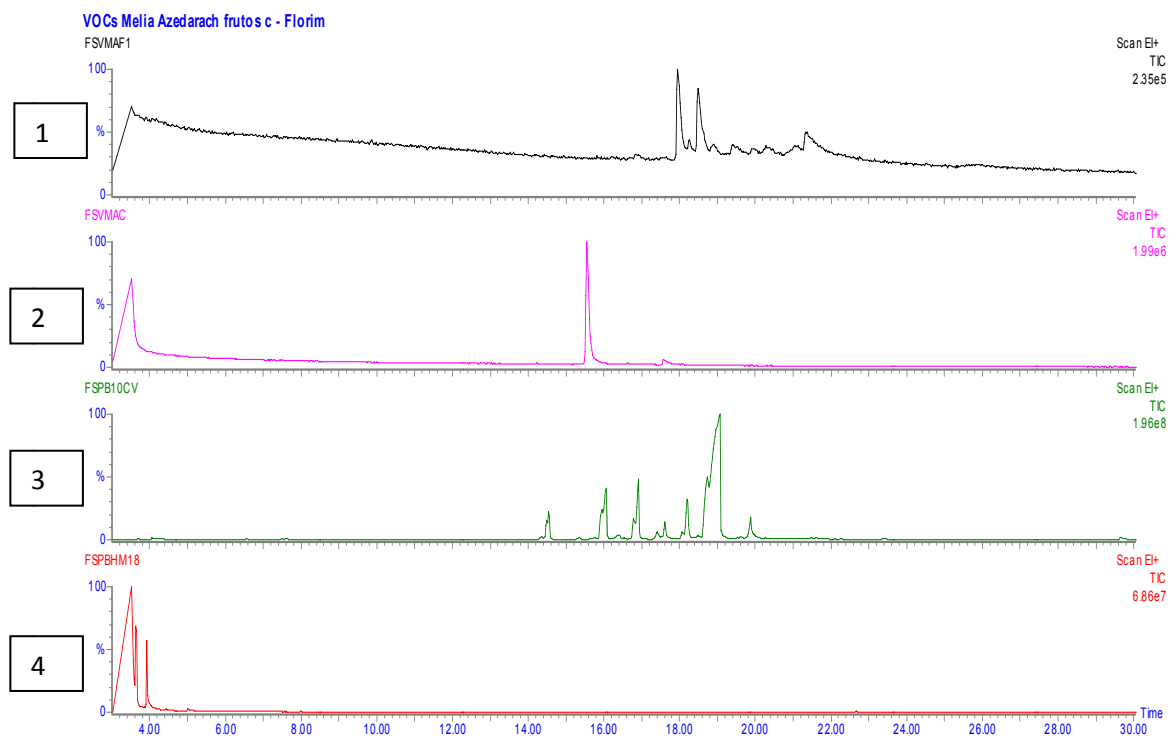


Figura 4-39 - Cromatograma do óleo essencial extraído de *Melia azedarach* e *Penicillium brasilianum*. 1) Cromatograma de óleo essencial extraído dos frutos de *Melia azedarach*. 2) Cromatograma de óleo essencial extraído das folhas de *Melia azedarach*. 3) Cromatograma de óleo essencial extraído de *Penicillium brasilianum* em meio sólido. 4) Cromatograma de óleo essencial extraído de *Penicillium brasilianum* em meio líquido.

Através dos dados cromatográficos para os óleos essenciais de *Penicillium brasilianum* e *Melia azedarach*, observa-se que estes não são fontes promissoras de óleos essenciais em termos de complexidade de componentes, já que apresentaram uma baixa diversidade de compostos, exceto pela extração do óleo de *Penicillium brasilianum* em meio arroz, que apresentou uma diversidade satisfatória de compostos. O óleo essencial do fungo extraído a partir do meio líquido não apresentou compostos voláteis em sua composição

Apesar disso, foi realizada a identificação conforme a metodologia utilizada para os óleos anteriores, utilizando cálculos de índices de retenção e comparação com bibliotecas específicas.

Inicialmente foi realizado cálculos de índices de retenção para o óleo essencial das folhas e do frutos de *Melia azedarach*, planta hospedeira do fungo *Penicillium brasilianum*, onde os dados calculados estão listados na Tabela 4-6 a seguir.

Tabela 4-6 - Índices de retenção calculados para o óleo essencial de *Melia azedarach*.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICE DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
Óleo essencial das folhas de <i>Melia azedarach</i>				
1	15.56	1432,4	1431	1
2	17.56	1493,1	1493	2
Óleo essencial dos frutos de <i>Melia azedarach</i>				
3	17.93	1520,0	1510	3
4	18.23	1532,0	1532	4
5	18.48	1555,2	1550	5

Com os dados de retenção para cada uma das bandas identificadas, foi possível realizar a identificação dos compostos presentes no óleo essencial como pertencentes a classe dos sesquiterpenos, mostrado na Figura 4-40 abaixo.

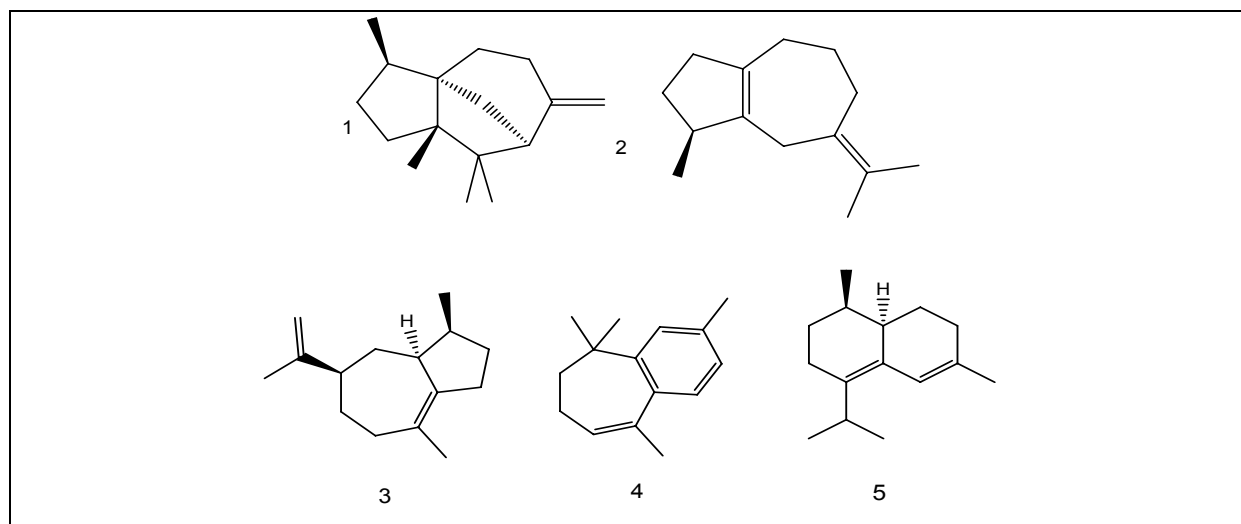


Figura 4-40 –Sesquiterpenos identificados no óleo essencial de *Melia azedarach*.

Com isso, foi realizado também a identificação através de cálculo de retenção do óleo essencial de *Penicillium brasilianum* em meio sólido, onde a Tabela 4-6 e Figura 4-1 resumem os dados cromatográficos e de retenção.

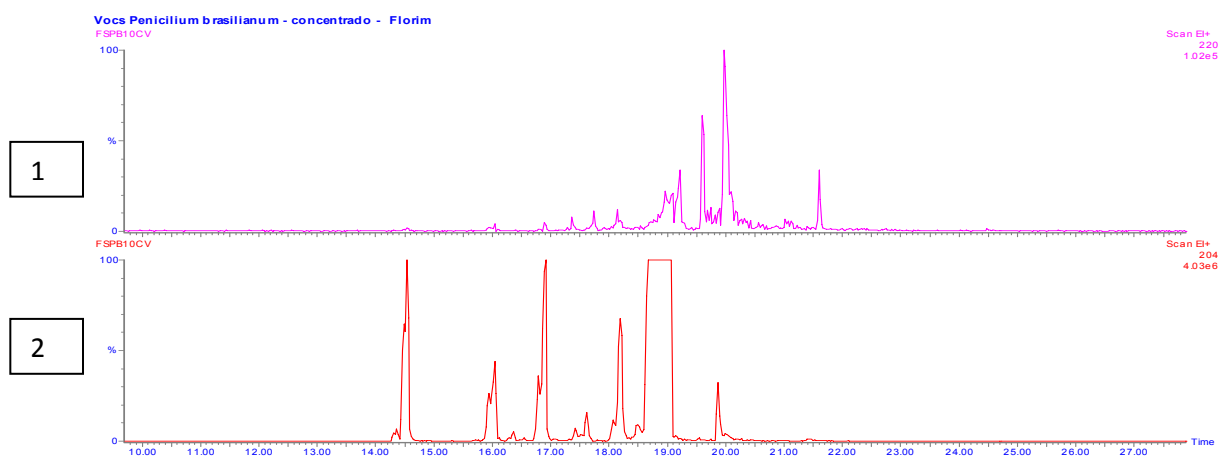


Figura 4-41 - Cromatograma do óleo essencial de *Penicillium brasilianum*. 1) Cromatograma de íons m/z 220. 2) Cromatograma de íons m/z 204.

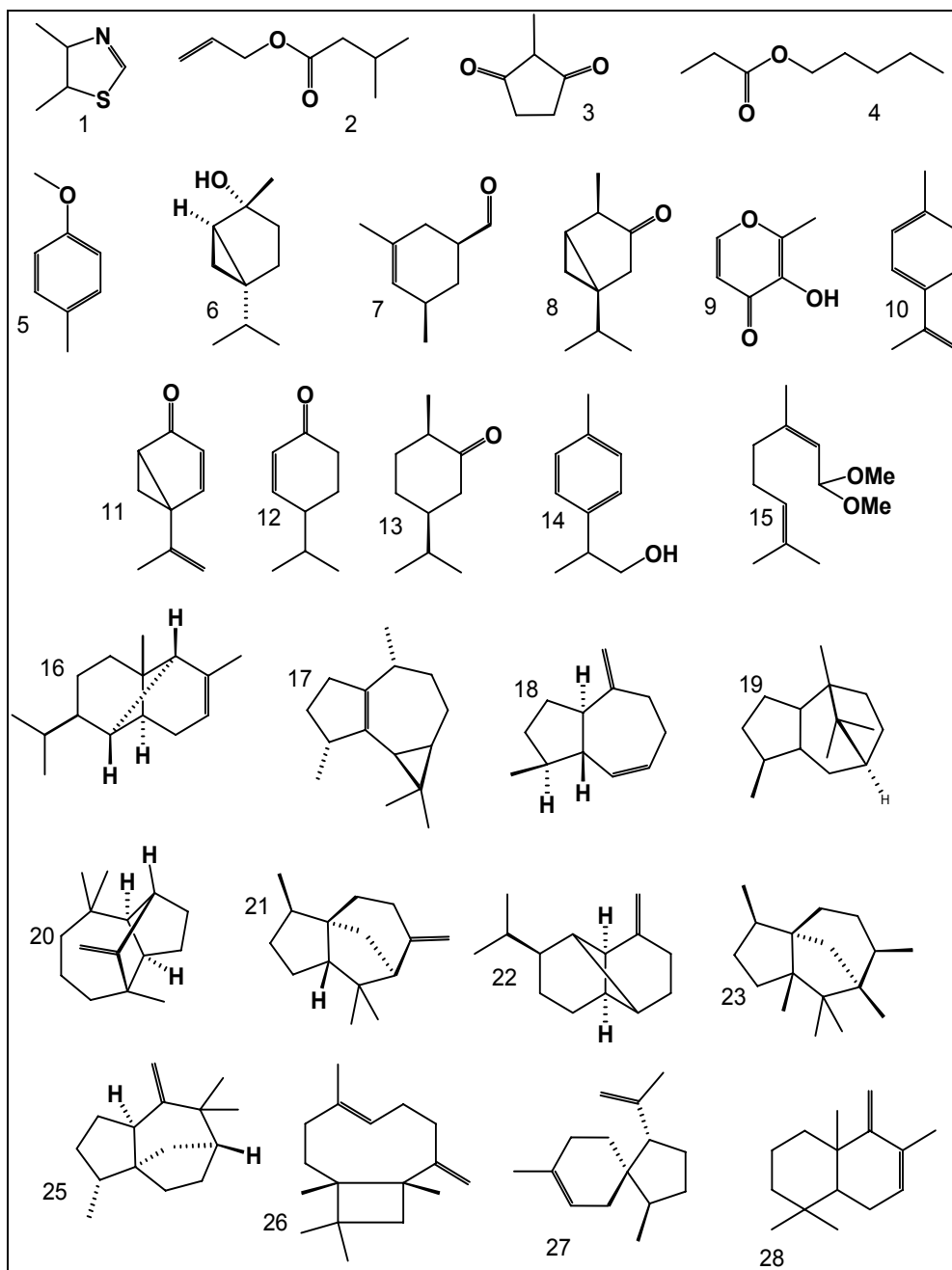
Tabela 4-7 - Índices de retenção calculados para o óleo essencial de *Penicillium brasilianum* em meio arroz.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICE DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
1	3.66	936,7	935	1
2	3.87	948,8	938	2
3	4.05	959,1	952	3
4	4.93	1008,1	1007	4
5	5.25	1022,3	1021	5
6	6.40	1072,8	1070	6
7	6.58	1080,7	1080	7
8	7.10	1102,2	1102	8
9	7.25	1107,9	1108	9
10	7.48	1108,7	1110	10
11	7.61	1121,5	1121	11
12	9.33	1186,7	1186	12
13	9.51	1193,5	1193	13
14	9.88	1207,3	1205	14
15	12.88	1318,0	1318	15
16	14.31	1370,8	1370	16
17	14.36	1372,7	1373	17
18	14.49	1377,4	1378	18
19	14.54	1379,3	1381	19
20	15.33	1408,8	1408	20
21	15.76	1425,4	1421	21
22	15.94	1432,4	1432	22
23	16.07	1437,4	1441	23
24	16.29	1445,9	1446	24
25	16.39	1449,8	1450	25
26	16.54	1455,5	1455	26
27	16.79	1465,2	1466	27
28	16.92	1470,2	1471	28
29	17.42	1489,5	1473	29
30	17.62	1497,2	1497	30
31	18.07	1515,2	1510	31
32	18.19	1520,0	1517	32
33	18.39	1528,0	1530	33
34	18.74	1542,0	1543	34
35	19.07	1555,2	1560	35
36	19.52	1573,2	1575	36
37	19.62	1577,2	1578	37
38	19.87	1587,2	1588	38
39	19.97	1591,2	1598	39
40	20.27	1603,3	1601	40
41	20.47	1611,8	1614	41
42	20.74	1623,3	1623	42

Cont. Tabela 4-7 - Índices de retenção calculados para o óleo essencial de *Penicillium brasilianum* em meio arroz

43	21.02	1635,1	1631	43
44	21.30	1647,0	1650	44
45	21.47	1654,2	1652	45
46	21.60	1659,7	1659	46
47	21.90	1672,4	1672	47
48	22.12	1681,7	1683	48
49	22.27	1688,1	1690	49
50	22.54	1699,5	1702	50
51	22.62	1703,1	1705	51
52	22.70	1706,3	1710	52

Cada componente foi identificada a partir da comparação dos dados de retenção com bibliotecas específicas, onde as estruturas identificadas estão representadas na Figura 4-42.



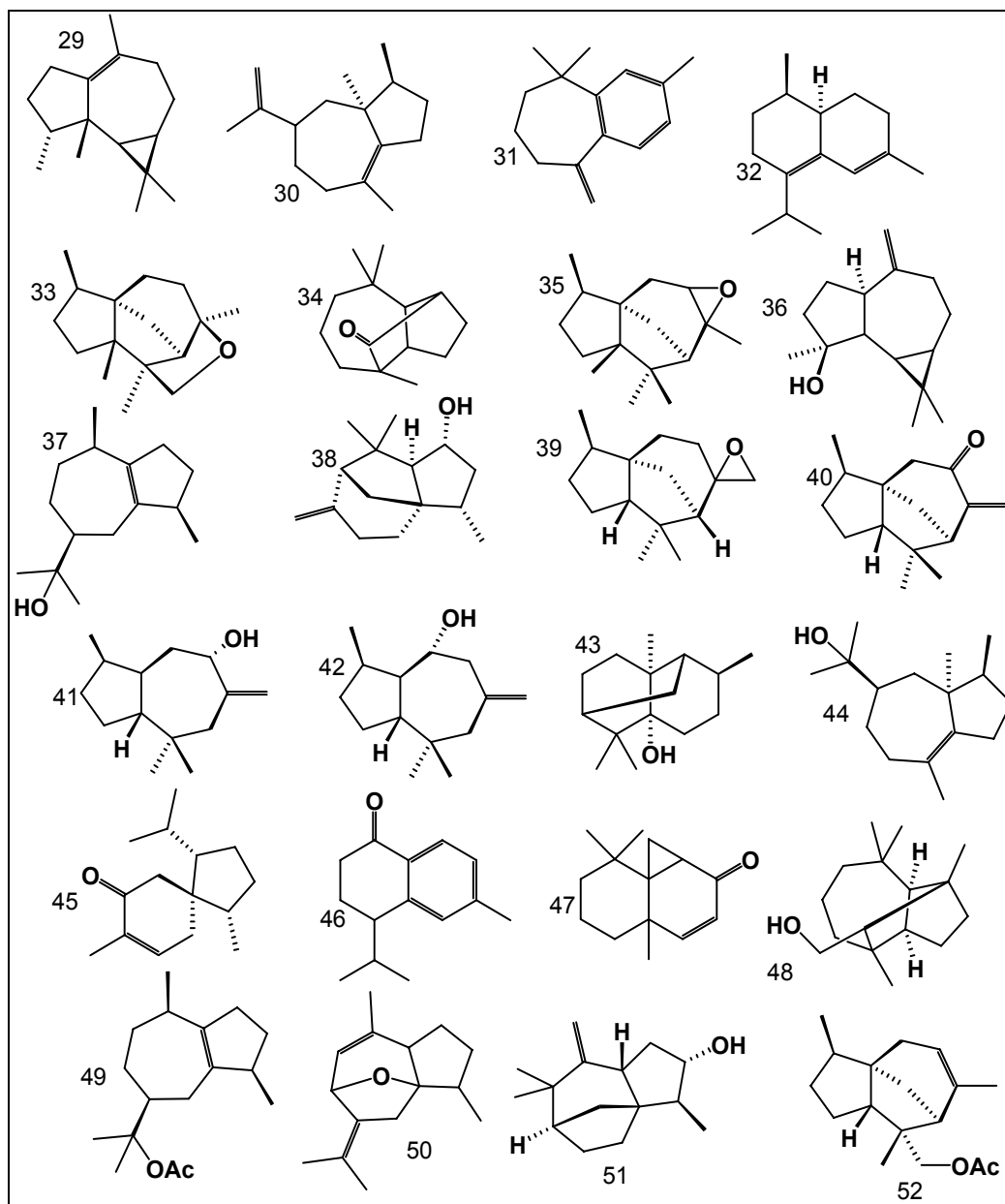


Figura 4-42 - Compostos identificados no óleo essencial de *Penicillium brasilianum*.

A identificação dos compostos a partir dos dados de retenção e dados de espectros de massas permitiu identificar compostos com diferenças estruturais se comparado com os compostos identificados no óleo essencial de *Cupressus lusitanica*, *Xylaria* (NICL3) e *Penicillium griseoroseum*.

Os sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, de relação m/z 204 e 220 (Bienman, 1962; Budkiewicz, 1987) respectivamente, identificados no óleo de

Penicillium brasilianum apresentaram um esqueleto carbônico formado por dois anéis fundidos, o primeiro anel de 7 átomos de carbono e o segundo por 5 átomos de carbono, enquanto os sesquiterpenos identificados nos demais óleos apresentaram um esqueleto carbônico por dois anéis de seis fundidos. Este tipo de observação permite então assim criar uma classificação taxonômica a partir dos compostos identificados em seus óleos essenciais.

Da mesma forma que foi identificada no óleo essencial de *Cupressus lusitanica* e *Xylaria* (NICL3), compostos iguais foram identificados tanto para o óleo essencial de *Penicillium brasilianum* e das folhas e frutos de *Melia azedarach*, cujos dados estão apresentados na Tabela 4-8 e Figura 4-43 a seguir.

Tabela 4-8 - Dados de Retenção para as substâncias encontradas em comum ao óleo essencial de *Melia azedarach* e do fungo *Penicillium brasilianum*.

SUBSTÂNCIAS	Folhas de <i>Melia azedarach</i>		Frutos de <i>Melia azedarach</i>		<i>Penicillium brasilianum</i>	
	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS (KI)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS (KI)	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS (KI)
1	15.56	1432,4	-	-	15.76	1425,4
2	17.56	1493,1	-	-	16.39	1449,8
3	-	-	17.93	1520,0	17.62	1497,2
4	-	-	18.23	1532,0	18.07	1515,2
5	-	-	18.48	1555,2	18.19	1520,0

Sendo assim, acredita-se também que ocorra uma interação bioquímica entre planta e microorganismo, o que justificaria o fato de se encontrar estes compostos tanto no óleo essencial da planta como no do fungo.

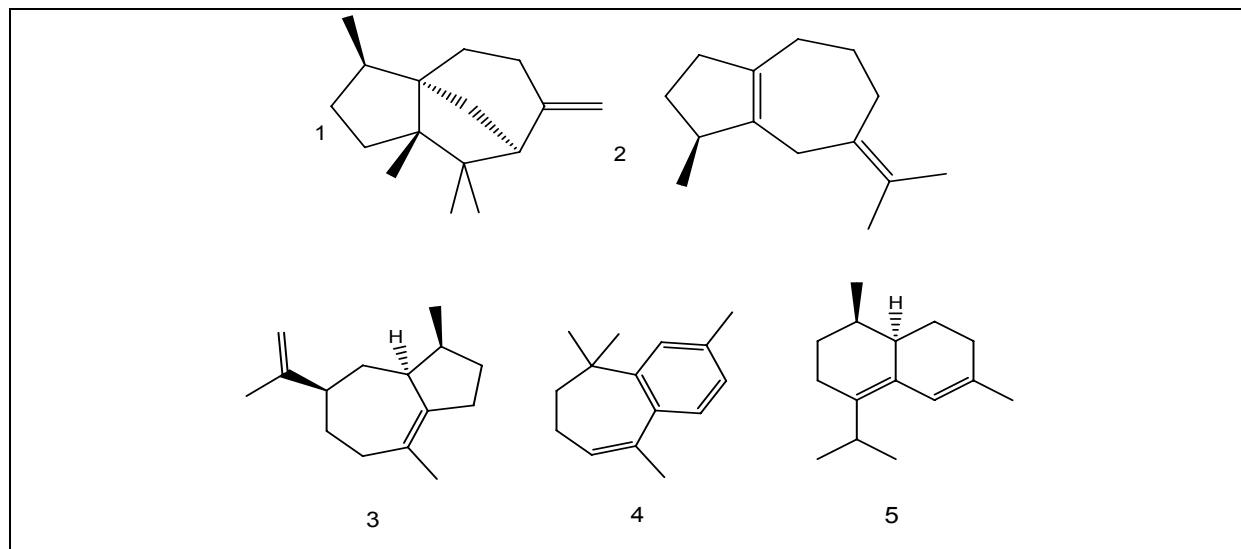


Figura 4-43- Compostos identificados em comum para o óleo essencial de *Melia azedarach* e o fungo *Penicillium brasilianum*.

Foi realizado também um estudo cinético de extração de voláteis do fungo *Penicillium brasilianum* em meio arroz a fim de se determinar o tempo ótimo para extração. Este estudo foi realizado em triplicata e foram coletados pontos no tempo de 5 em 5 dias a partir da inoculação do micélio. O gráfico a seguir mostra que o tempo ótimo para a extração foi em 10 dias, já que a concentração e área relativa se mostraram superiores em relação aos tempos de 5 e 15 dias .

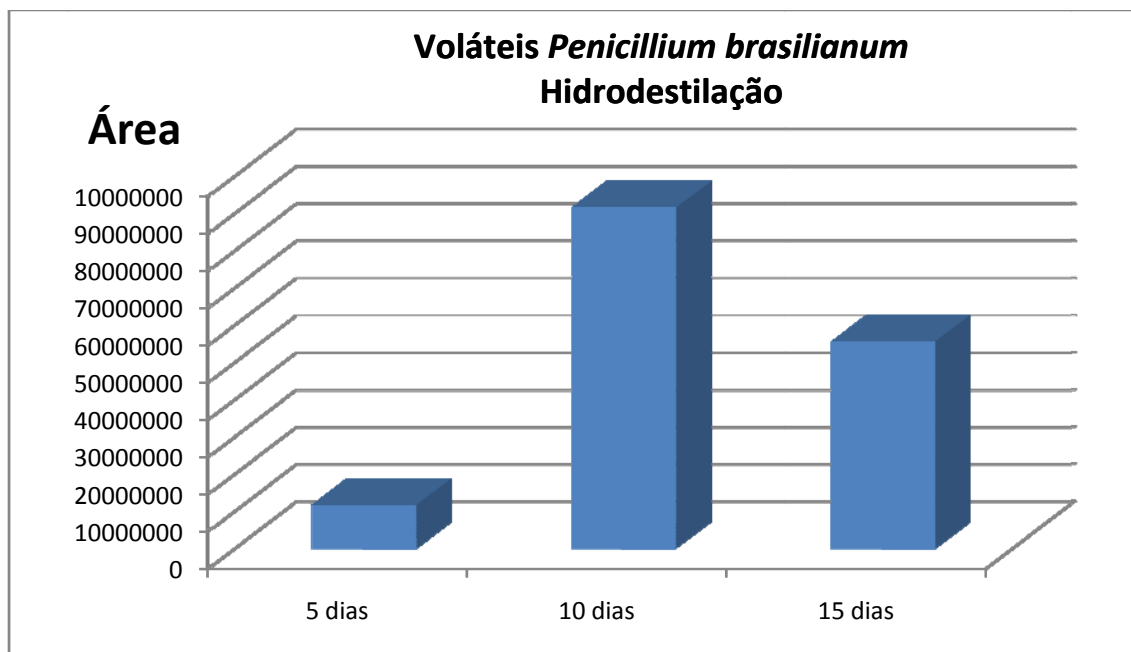


Figura 4-44 - Gráfico de produção de compostos voláteis pelo fungo *Penicillium brasilianum* em meio arroz.

Dessa maneira, também observa-se que no intervalo de tempo de 5 a 10 dias há um aumento na taxa de produção de compostos voláteis, e a partir do tempo de 11 dias há uma queda na taxa de produção de compostos voláteis.

4.1.2. – METABÓLITOS VOLÁTEIS EXTRAÍDOS POR AERAÇÃO

Outra técnica utilizada para a captação de voláteis foi a técnica conhecida por aeração, uma espécie de “*headspace*” dinâmico que consiste na passagem de um ar inerte através de um analito e captação dos voláteis em um adsorvente específico, geralmente um carvão ativo ou polímero específicos. Neste trabalho, foi utilizado carvão ativo por diversos fatores como preço e disponibilidade. Os voláteis são então desorvidos do adsorvente por eluição com solvente orgânico, geralmente éter etílico. Esta técnica foi então aplicada para monitoramento dos

fungos *Penicillium griseoreum*, *Penicillium brasilianum* e *Xylaria* (NICL3) em diferentes meios sólidos (arroz, trigo e canjica).

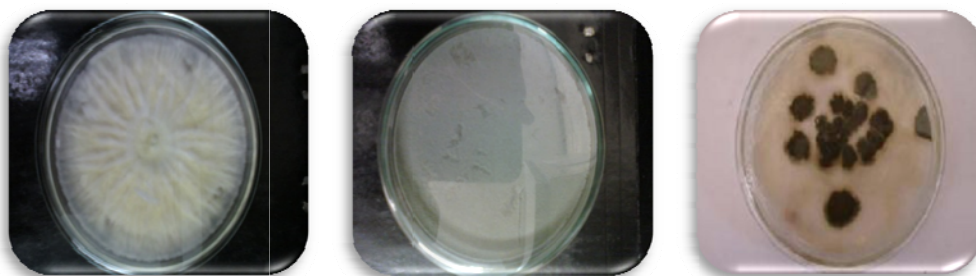


Figura 4-45 - Fungos *Xylaria* (NICL3), *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium brasilianum* submetidos a extração de voláteis por aeração.

O monitoramento dos extratos voláteis por aeração dos fungos *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum* e *Xylaria* (NICL3) por GC-MS mostraram características que variaram de acordo com o fungo e sua característica de reprodução. Os cromatogramas na Figura 4-46 a seguir ilustram os extratos voláteis obtidos para os fungos.



Figura 4-46 - Cromatograma dos extratos voláteis obtidos por aeração dos fungos: 1) *Xylaria* (NICL3); 2) *Penicillium griseoroseum*; 3) *Penicillium brasilianum*.

A partir dos dados de cromatografia, observa-se que o fungo *Xylaria* (NICL3) não apresentou compostos voláteis que pudessem ser atribuídos à esta

técnica, enquanto os fungos *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium brasilianum* apresentaram uma diversidade de compostos. Isto pode ser justificado devido as características de reprodução dos fungos. Os fungos do gênero *Penicillium* apresentam como característica reprodutiva a produção de esporos, o que facilitaria a propagação de substâncias voláteis no ambiente.

4.1.2.1. – *Penicillium griseoroseum*

A extração de compostos voláteis por aeração foi realizada também em diferentes meios, com o objetivo de avaliar como o meio utilizado influenciaria na produção dos compostos voláteis. Para isso, foi então utilizado três meio sólidos distintos: meio arroz, meio trigo e meio canjica. Os cromatogramas apresentados na Figura 4-47 a seguir mostram os extratos obtidos para a extração dos compostos voláteis do fungo *Penicillium griseoroseum* nos diferentes meios utilizados.

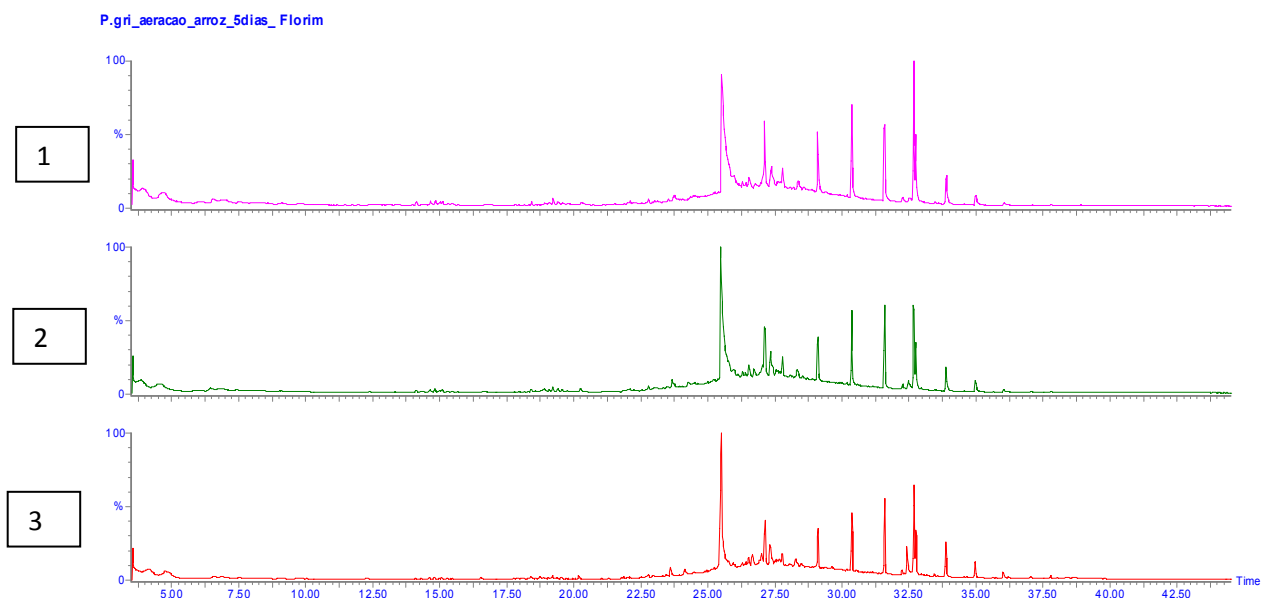
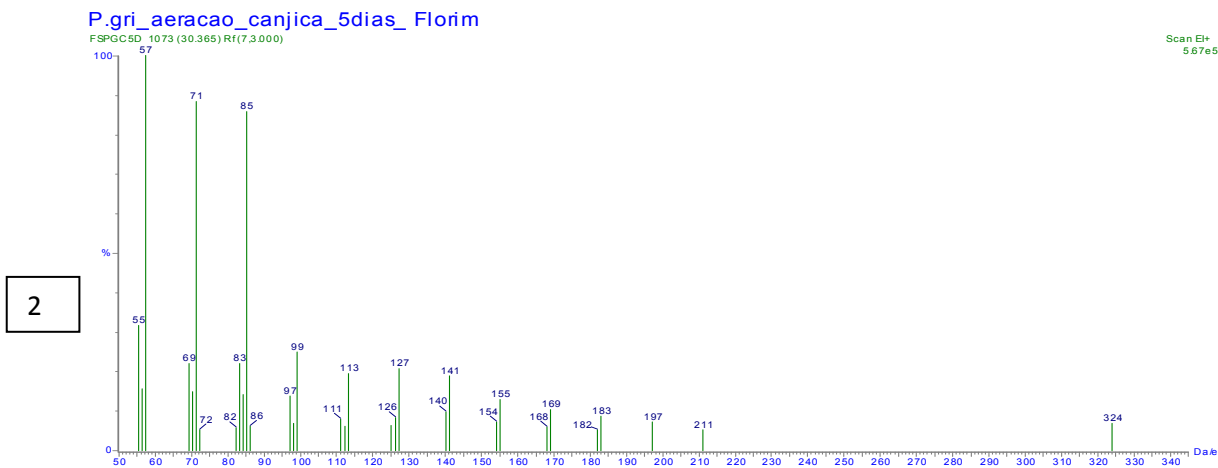
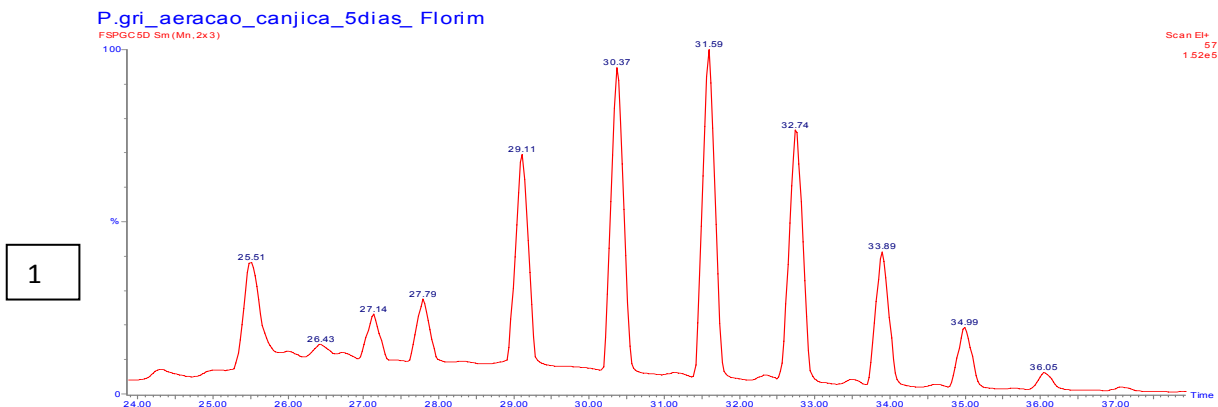


Figura 4-47 - Cromatograma do extrato de compostos voláteis por Aeração do fungo *Penicillium griseoroseum* nos meios : 1) Arroz; 2) Canjica; 3) Trigo.

Conforme mostra os dados de cromatografia, observa-se que o meio utilizado não influenciou no tipo dos compostos voláteis produzidos, o que leva a crer os compostos produzidos são uma característica própria do fungo. Os tipos de compostos produzidos também foram bem diferentes do observado no óleo essencial, sendo, predominantemente, compostos por hidrocarbonetos. Um exemplo disso é a banda no tempo 30,36 minutos, cuja região do cromatograma e espectro de massas estão representados na Figura 4-48 a seguir.



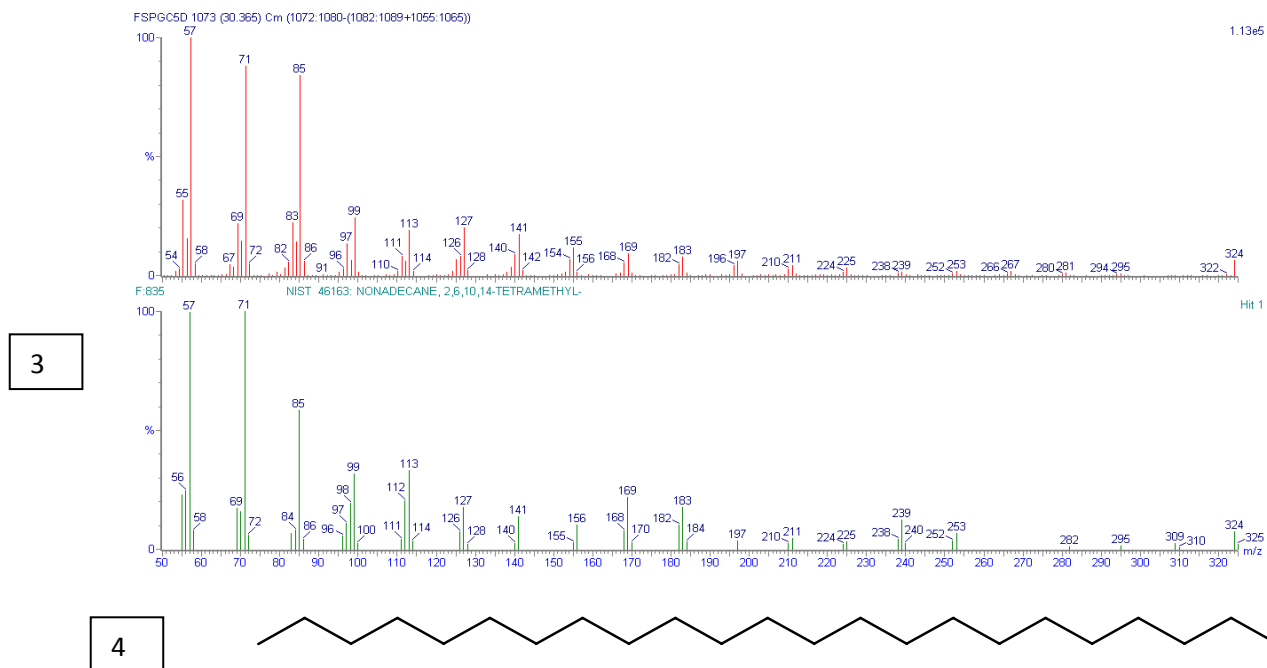


Figura 4-48 - 1) Cromatograma da banda em 30,36 minutos. 2) Espectros de massas para a componente da banda. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 4) Estrutura do hidrocarboneto.

Outros hidrocarbonetos foram identificados no extrato de compostos voláteis do fungo *Penicillium griseoroseum*, cuja estruturas estão representadas na Figura 4-49 a seguir.

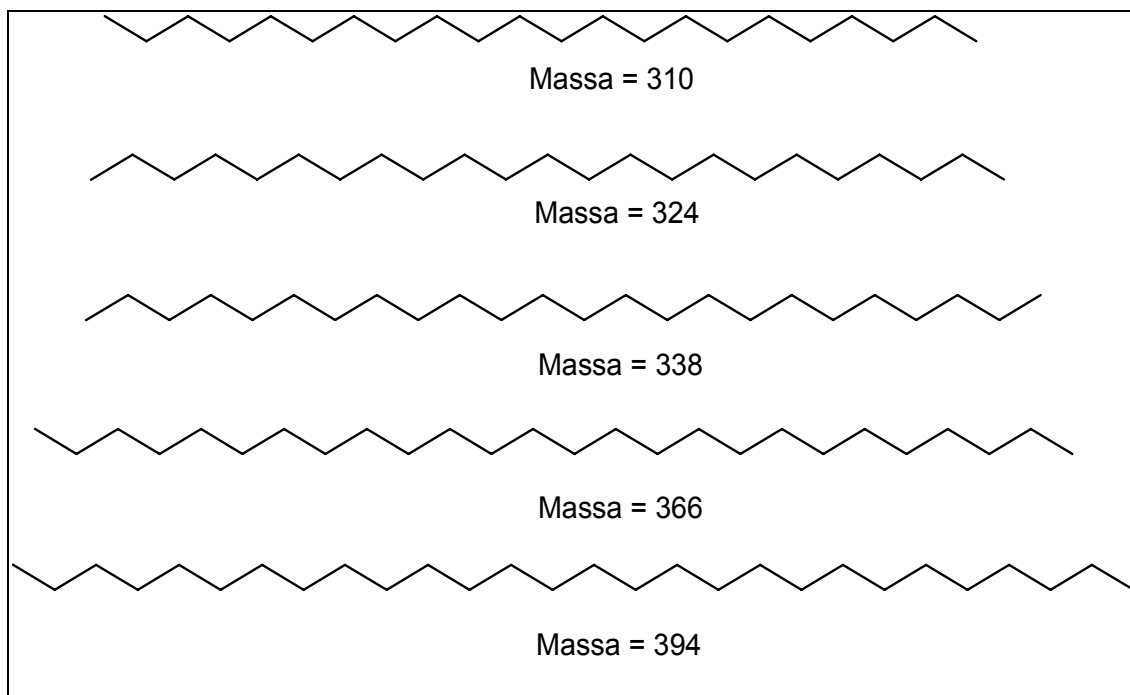


Figura 4-49 - Hidrocarbonetos identificados no extrato de compostos voláteis de *Penicillium griseoroseum*.

A identificação de hidrocarbonetos condiz com estudos realizados anteriormente dentro do LaBioMMi. O mesmo tipo de estudo foi realizado para fungos *Arpegillus flavus* e *Nigrospora sp* que mostraram, em sua constituição, uma mistura de hidrocarbonetos homólogos, além de compostos fenólicos (Pereira, 2004). Este tipo de observação condiz com o que foi encontrado para este fungo.

4.1.2.2. – *Penicillium brasilianum*

A mesma abordagem de extração utilizada para o fungo *Penicillium griseoroseum* foi utilizada para o fungo *Penicillium brasilianum*. A extração de compostos voláteis em meio sólido como canjica e trigo foi realizada. Os cromatogramas na Figura 4-50 mostram a composição do extrato de compostos voláteis deste fungo.

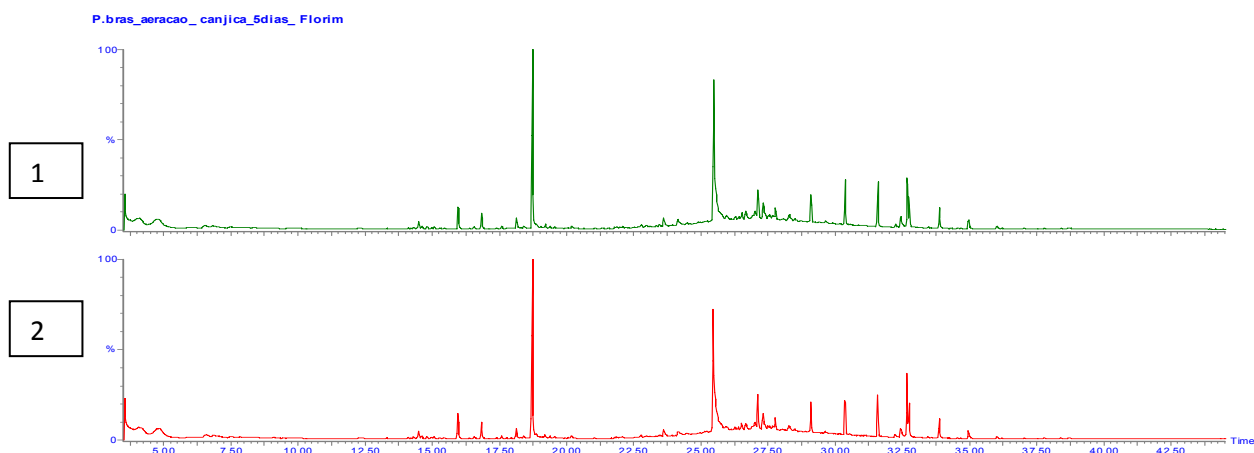


Figura 4-50 - Cromatograma do extrato de compostos voláteis por aeração do fungo *Penicillium brasilianum* em: 1) Canjica; 2) Trigo.

Como já observado para o fungo *Penicillium griseoroseum*, o meio utilizado não mostrou influência no extrato dos compostos voláteis do fungo *Penicillium brasilianum*. Diferenciações foram encontradas no tipo de compostos obtidos. Neste fungo, foram encontrados sesquiterpenos, de relação m/z 204, e hidrocarbonetos, de relação m/z 57 de íon base. Os cromatogramas na Figura 4-51 representam a região onde os compostos foram identificados.

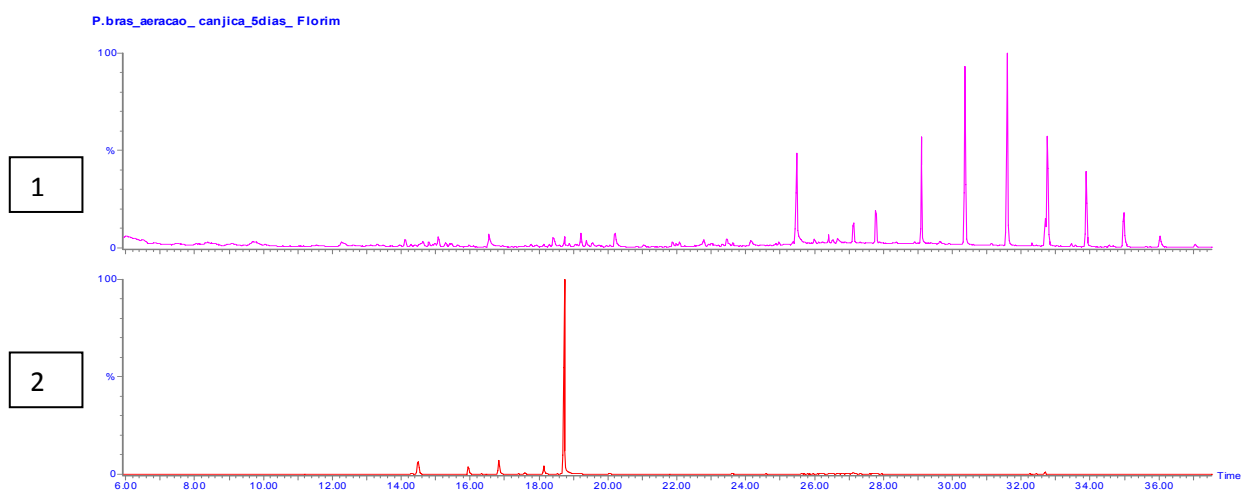


Figura 4-51 - Cromatograma de íons selecionados do fungo *Penicillium brasilianum*. 1) Cromatograma de íons m/z 57 referente a hidrocarbonetos. 2) Cromatograma de íons m/z 204 referente a sesquiterpenos.

Os compostos sesquiterpênicos foram identificados por meio de cálculo de índices de retenção de Kovats, onde a Tabela 4-9 e Figura 4-52 resumem os compostos identificados e estruturas identificadas abaixo.

Tabela 4-9 - Índices de retenção dos compostos sesquiterpênicos no extrato de compostos voláteis do fungo *Penicillium brasilianum*.

BANDA CROMATOGRÁFICA	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	ÍNDICE DE KOVATS CALCULADO	ÍNDICE DE KOVATS TEÓRICO	SUBSTÂNCIAS
1	14.50	1376,7	1377	1
2	15.95	1432,8	1432	2
3	16.83	1455,9	1460	3
4	17.58	1495,3	1490	4
5	18.13	1517,2	1520	5
6	18.73	1541,2	1550	6

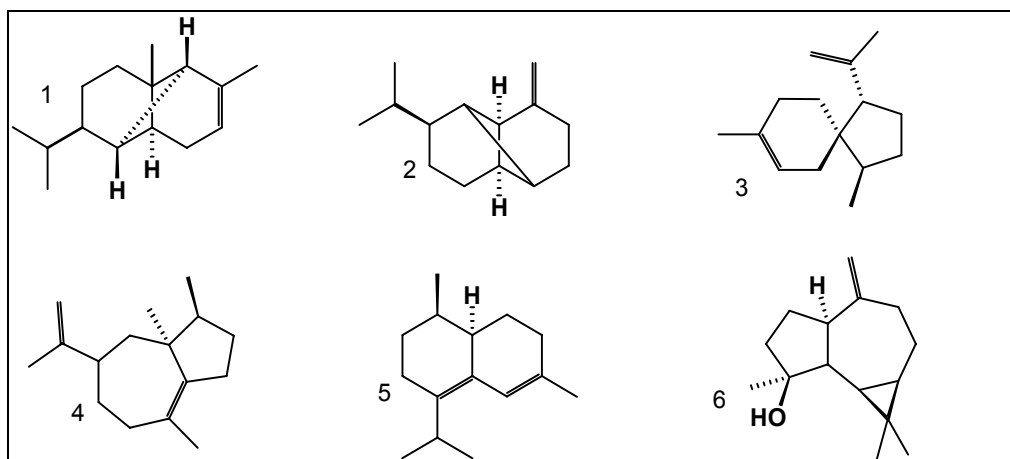


Figura 4-52 - Sesquiterpenos identificados no extrato de compostos voláteis de *Penicillium brasilianum*.

A identificação de compostos sesquiterpênicos em extrações por aerações é inédita. Nos trabalhos anteriores, dentro do grupo LaBioMMi, não foram identificados sesquiterpenos em outros fungos, o que mostra a importância do uso desta técnica para a caracterização de compostos voláteis. Os hidrocarbonetos identificados estão listados na Figura 4-53.

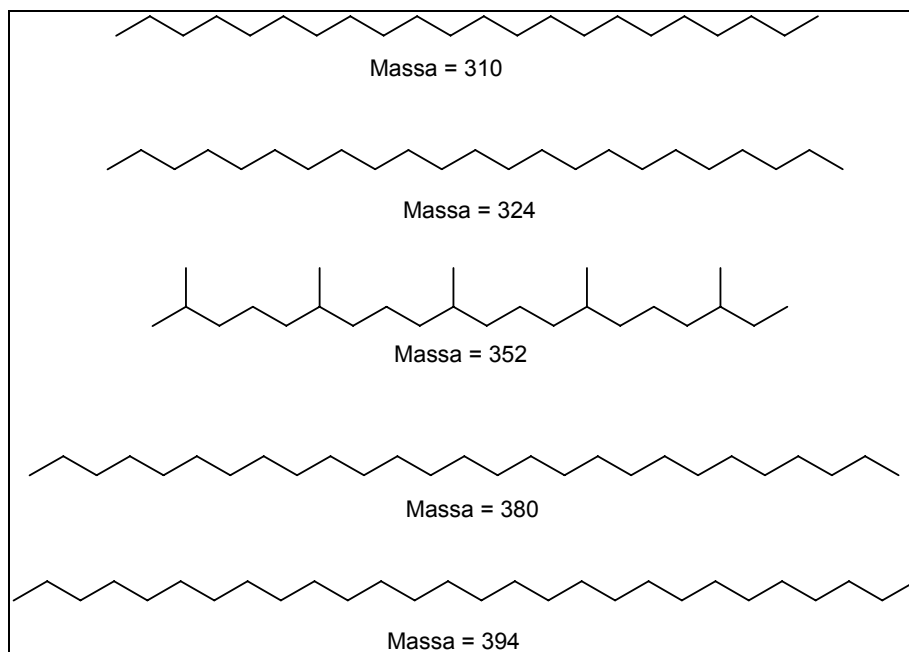


Figura 4-53 - Hidrocarbonetos identificados no extrato de compostos voláteis do fungo *Penicillium brasilianum*.

4.2 – METABÓLITOS FIXOS

Outro alvo de estudo deste trabalho foi a extração dos metabólitos fixos, que nesse trabalho foram definidos como aqueles metabólitos secundários que estão ligados quimicamente a parede micelial dos fungos. Nesta etapa do trabalho, foram utilizados para este estudo os fungo *Penicillium brasilianum*, *Penicillium griseoroseum*, *Xylaria (NICL3)* e várias conservas de diferentes espécies de *Trichoderma*.

Grande partes dos metabólitos fixos são de natureza lipídica (Lenninger, 2000). Em micro-organismos, isso não é diferente. Vários micro-organismos oleaginosos, tais como leveduras, fungos, bactérias e microalgas podem acumular alto nível de lípideos em sua biomassa (Meng, 2009, Chisti, 2007, Illman, 2000, Gouda, 2008, Papanikolaou, 2004, Vicente, 2009). Dentre estes

organismos, fungos e leveduras tem sido considerado uma fonte potencial para uma larga produção de compostos lipídicos.

Na maioria dos casos, o óleo de micro-organismos está na forma de triglicérides, que são também o principal componente de óleos vegetais e gorduras animais. Geralmente, a reação de transesterificação é realizada com metanol na presença de um catalisador básico (por exemplo, hidróxido de de sódio ou potássio ou Metóxido de sódio). No entanto, o uso de catalisadores básicos na transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais, levanta várias desvantagens, tais como baixo rendimento na produção de compostos lipídicos e complicações nas etapas de purificação e separação devido à formação de sabão nas reações de neutralização (Vicente, 2004). No entanto, isto pode ser resolvido com o uso de catalisadores ácidos, como ácido clorídrico e ácido sulfúrico. A catálise ácida em presença de metanol produz uma grande quantidade de ésteres metílicos, aumentando a produção de biodiesel (Formo, 1954). Neste trabalho, a reação de transesterificação foi realizada na presença de metanol e ácido clorídrico, representado na Figura 4-54.

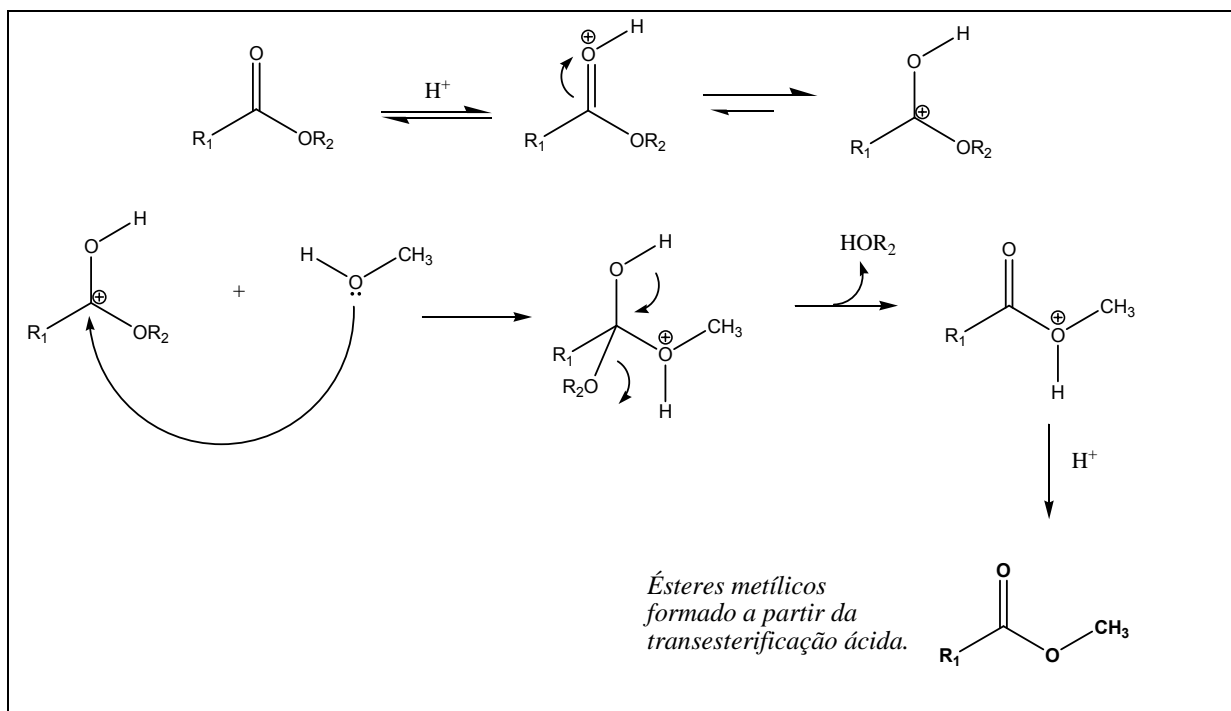


Figura 4-54 - Formação de ésteres metílicos usando catálise ácida.

Os extratos de produtos de reação de transesterificação em meio ácido foram analisados por técnica cromatográficas, como GC-MS e GC-FID, e técnicas espectroscópica, como RMN ^1H .

Inicialmente os extratos foram submetidos a análise de RMN ^1H , para que pudessem ser caracterizados. O espectro de ressonância para o extrato do produto de transesterificação ácida do fungo *Xylaria* (NICL3) está representado na Figura 4-55 a seguir.

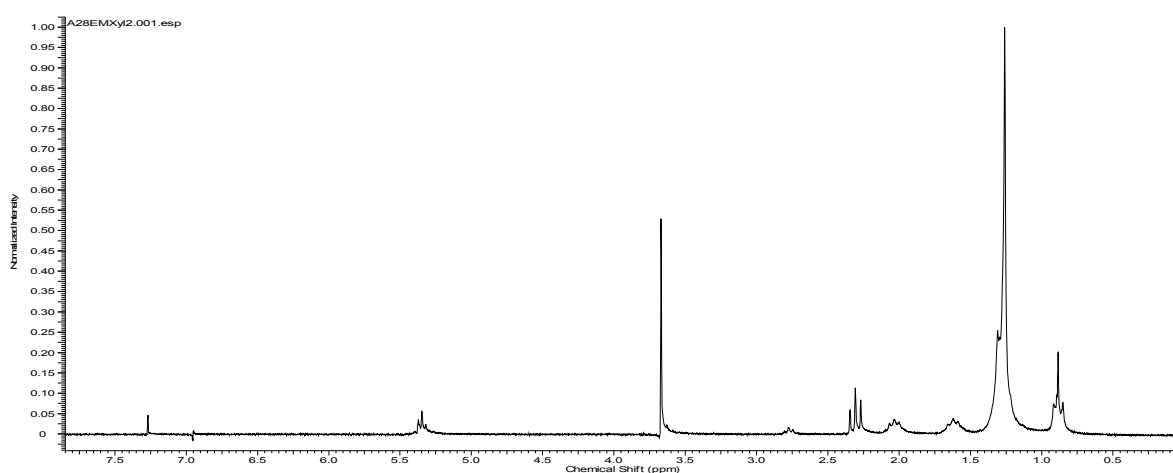


Figura 4-55 - RMN ^1H do produto de transesterificação ácida do fungo *Xylaria* (NICL3).

A presença do singlete em δ 3,58 é referente a presença de hidrogênios metoxílicos. O tripleto em δ 0,86 ocorre pela presença de hidrogênios metílicos terminais, singletos em δ 1,58 e 1,29 justificam a presença de hidrogênios metilênicos. O tripleto em δ 2,25 refere-se a hidrogênios metilênicos α -carbonílicos.

Tabela 4-10 - Sinais de RMN ^1H para o produto de transesterificação do fungo *Xylaria* (NICL3).

H	δ (ppm)	Multiplicidade
1	0,86	Tripleto
2	1,29	Singlete
3	1,58	Singlete
4	2,25	Tripleto
5	3,58	Singlete

Esses sinais levaram a montar a seguinte estrutura parcial, referente a ésteres metílicos de ácidos graxos, mostrados na Figura 4-56.

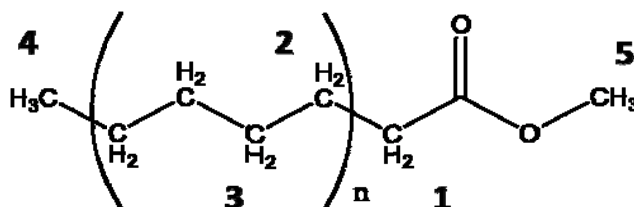


Figura 4-56 – Estrutura parcial identificada para o produto de transesterificação ácida do fungo *Xylaria* (NICL3).

Além desses sinais, foi possível identificar um multipletto na região de δ 5,38, conforme mostra a Figura 4-57 referente a presença de hidrogênios de ligação dupla, o que confirma a presença de compostos insaturados no produto reacional.

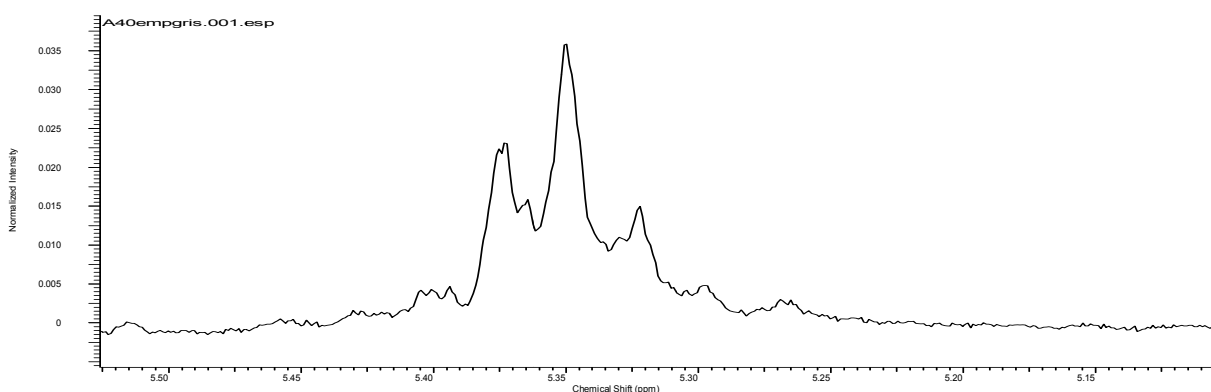


Figura 4-57 - RMN 1H na região de 5,38 do extrato do fungo *Xylaria* (NICL3)

Dados de espectrometria de massas confirmaram esta estrutura a partir de íons diagnósticos, conforme mostra o espectro a seguir.

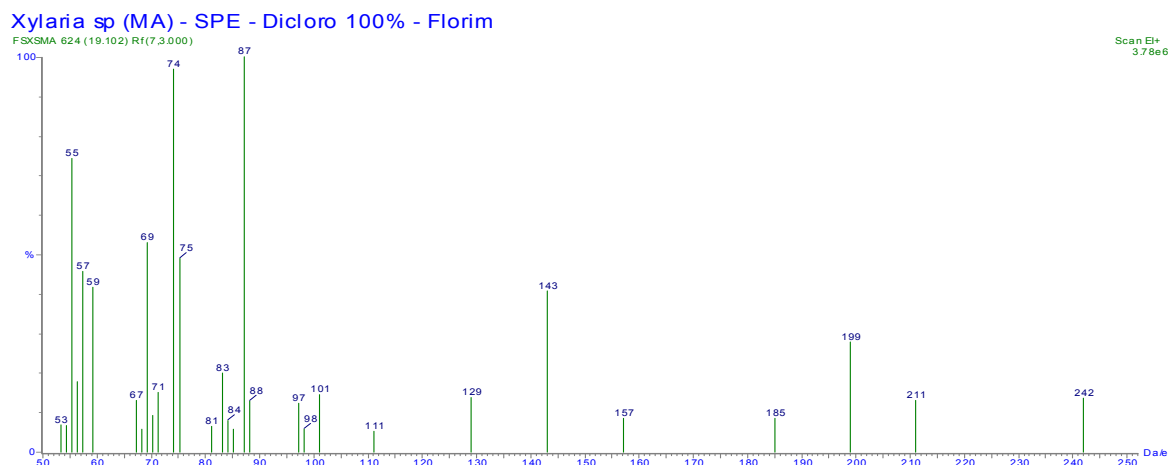


Figura 4-58 - Espectro de massas por impacto eletrônico de um composto lipídico do fungo *Xylaria* (NICL3).

Por meio da análise de espectrometria de massas por impacto eletrônico, foi possível confirmar que as estruturas realmente se tratavam de ésteres metílicos. A presença dos íons de m/z 74, 87 e 143 são característicos da fragmentação por impacto eletrônico de ésteres metílicos (McLafferty, 1993). A proposta de mecanismo de fragmentação está mostrada na Figura 4-59.

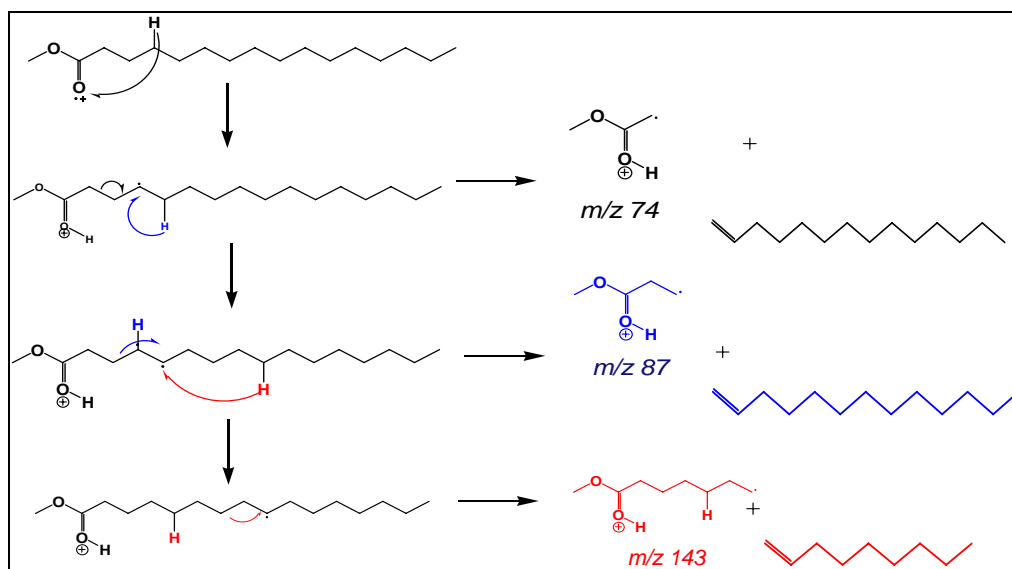


Figura 4-59 - Proposta de fragmentação de ésteres metílicos de ácidos graxos.

O mecanismo de fragmentação é justificado inicialmente pela ionização da carbonila. Nessa etapa, ocorre um rearranjo do tipo MacLafferty onde o

hidrogênio γ migra para a carbonila e ocorre a subsequente clivagem da ligação α - β , formando o íon m/z 74 como íon base. Numa segunda etapa, ao migrar o hidrogênio γ , ocorre um rearranjo de hidrogênio do tipo 1,2 e clivagem homolítica da ligação adjacente, o que explicaria a formação do íon m/z 87. Numa terceira etapa, ocorreria um rearranjo de hidrogênio do tipo 1,6 e clivagem homolítica da ligação adjacente, o que justificaria a formação do íon m/z 143

O mesmo padrão de espectro de RMN ^1H foi obtido para os demais fungos que foram submetidos a reação de transesterificação ácida do micélio, o que mostra que a reação foi eficiente para a extração dos compostos lipídicos da parede micelial.

Por se tratar de uma mistura reacional, estes compostos lipídicos foram obtidos em forma de mistura. Esta mistura variava de micélio para micélio já que os níveis de lípidios de microorganismos variam conforme o gênero e a espécie. Este é um importante parâmetro para classificação taxonômica de micro-organismos. Perfis e concentração de ésteres metílicos são utilizados como classificadores taxonômicos, conforme mostra a Tabela 4-11 (Stahl, 1996)

Tabela 4-11 - Classificação taxonômica de fungos endofíticos baseados em níveis lipídicos (Stahl, 1996)

Fungos	% do conteúdo de ácido graxo total					
	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C18:0
<i>Pythium sp.</i>	0,38	7,37	-	13,07	14,93	1,42
<i>Cunninghamella elegans</i>	-	1,02	-	19,73	1,56	3,40
<i>Montirella isabelina</i>	-	1,44	-	24,78	4,77	1,57
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	1,14	0,48	21,01	0,60	9,19
<i>Chaetium perlucidum</i>	-	-	0,42	18,95	T	6,76
<i>Emericella spectabilis</i>	-	T	16,0	0,45	-	4,53
<i>Cyathus sterococus</i>	-	0,33	0,61	15,66	2,08	2,15
<i>Gleophyllum traebum</i>	-	0,31	14,57	-	-	2,57
<i>Aspergillus alliaceus</i>	-	-	15,74	-	-	5,32
<i>Penicillium paraherquei</i>	0,29	0,80	13,73	0,46	2,42	3,30
<i>Penicillium restrictum</i>	0,34	0,22	19,52	0,34	0,43	7,23
<i>Penicillium simplicissimum</i>	0,49	0,61	16,93	0,39	0,77	5,90

Legenda: T= quantidades traços, - = não determinado.

Outra característica dos compostos lipídicos é a que se refere a seu alto valor energético. Mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos são importantes, especialmente na área de biocombustíveis, já que são a forma química característica do biodiesel. Sendo assim, este trabalho também remete a produção de biodiesel a partir de uma fonte relativamente nova, que seria os micro-organismos endofíticos.

A seguir serão discutidos os perfis cromatográficos dos fungos que foram submetidos a extração de compostos lipídicos por transesterificação ácida.

4.2.1. – *Xylaria* (NICL3)

O fungo de *Xylaria* (NICL3), com os dados de ressonância foram mostrados anteriormente, foi o fungo que apresentou os maiores níveis de

compostos lipídicos ligados a parede micelial. O cromatograma na Figura 4-60 mostra o perfil químico dos compostos lipídicos extraídos.

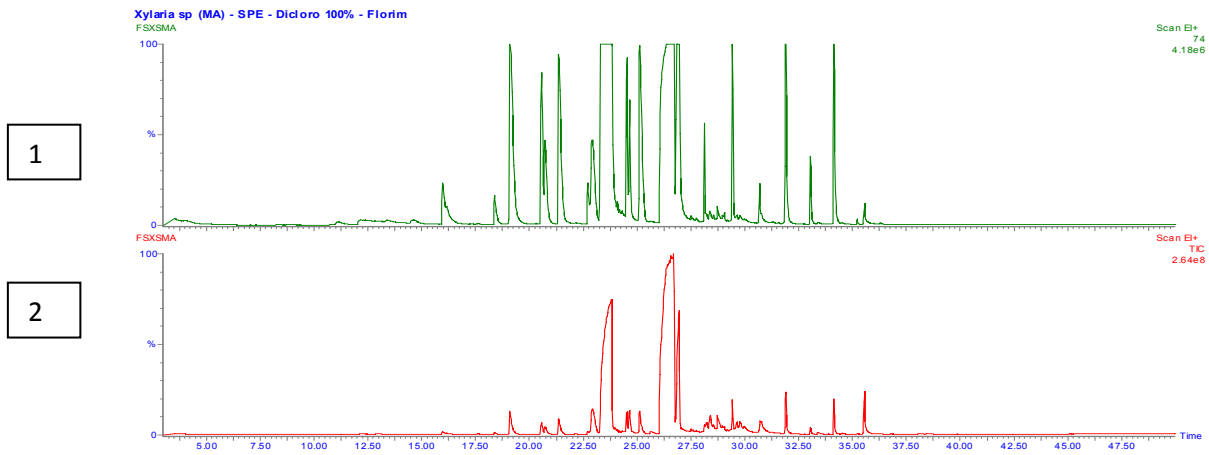
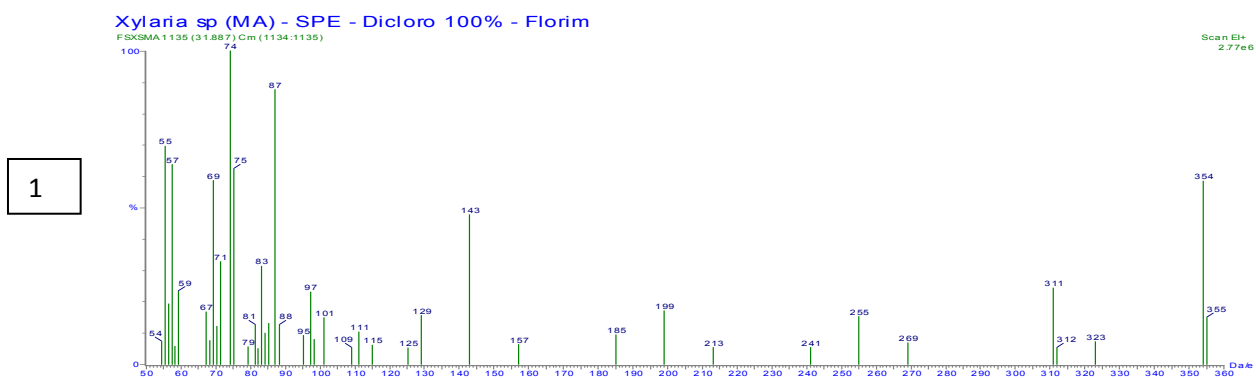


Figura 4-60 - Cromatograma para o produto de transesterificação ácida do fungo *Xylaria* (*NICL3*). 1) Cromatograma de íons m/z 74. 2) Cromatograma de íons totais.

Os cromatogramas acima mostram que grande parte dos compostos identificados são ésteres metílicos de ácidos graxos, através da relação m/z 74, íons base de ésteres metílicos. Diversos ésteres metílicos fazem parte do produto de transesterificação, como os representado na Figura 4-61.



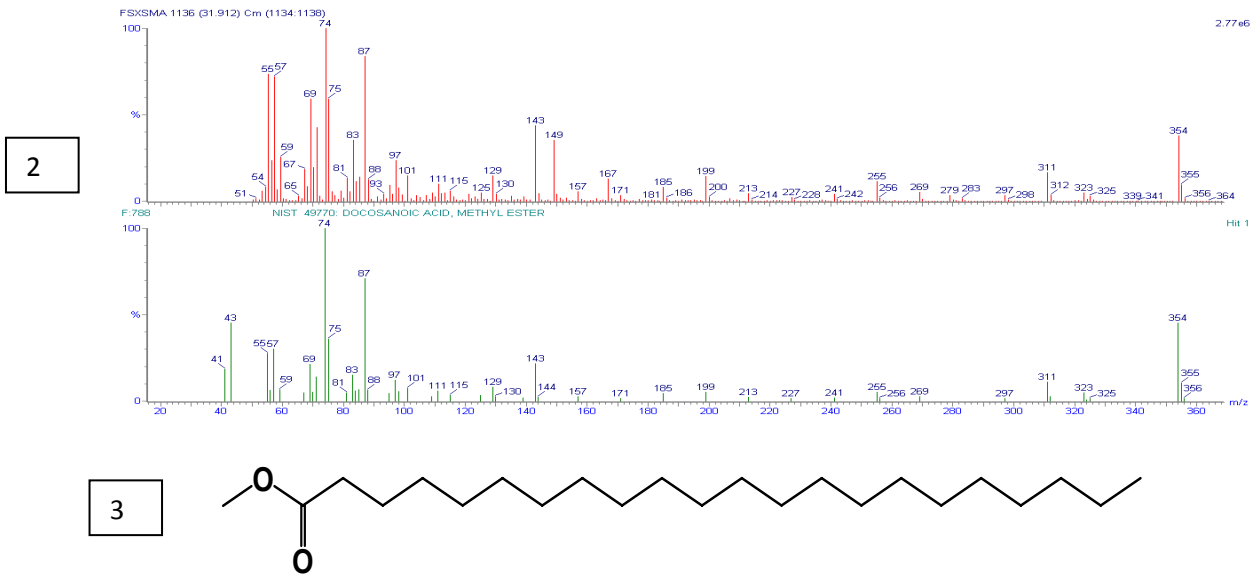


Figura 4-61 – 1) Espectro de massas da componente no tempo 31,91. 2) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 3) Estrutura do éster metílico.

No extrato de produto de transesterificação deste fungo, observa-se que os ésteres metílico são de ésteres de alta massa molecular, com mais de 300 Da.

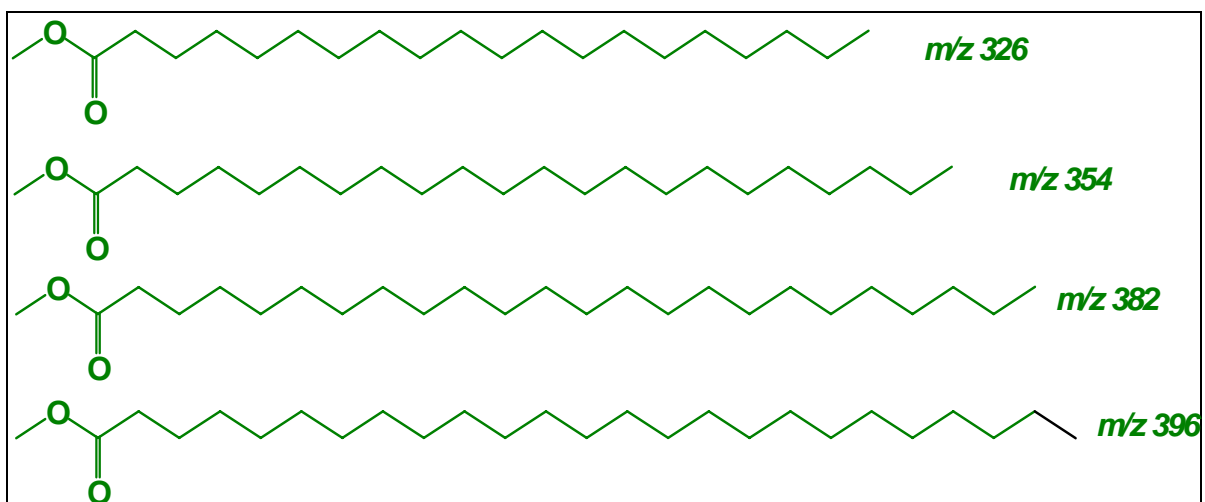
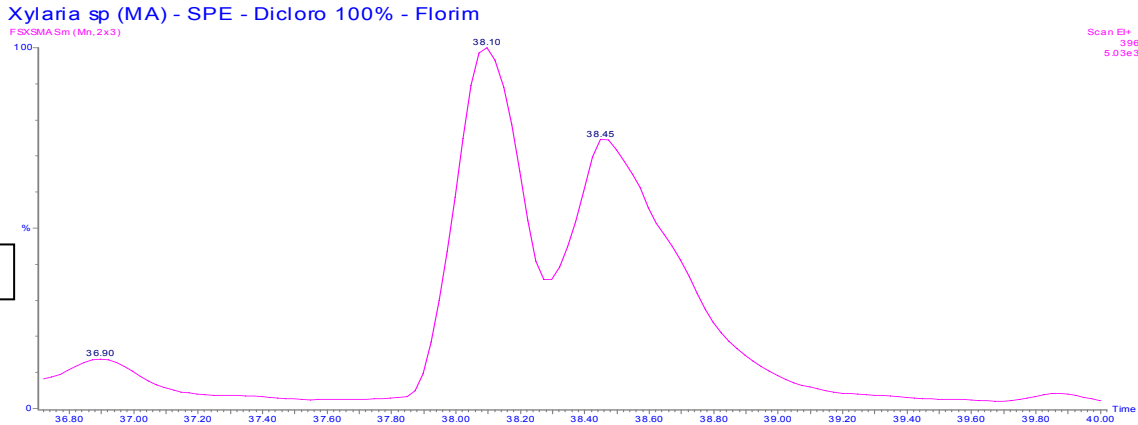


Figura 4-62 - Ésteres metílicos do fungo *Xylaria* (N1CL3).

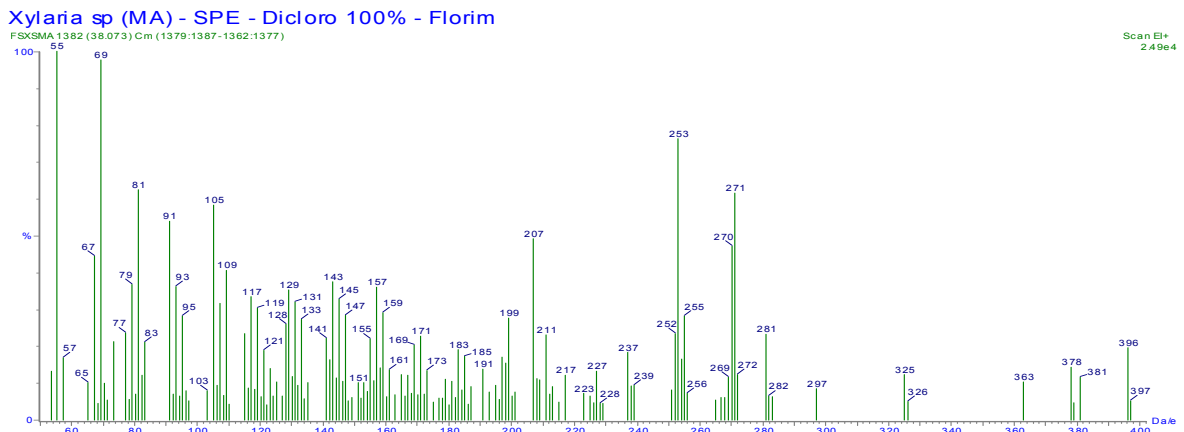
Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endófitos dos Gêneros Penicillium e Xylaria e suas Plantas Hospedeiras

Além de ésteres metílicos foi possível identificar outros compostos lipídicos, como esteróides, referentes a bandas 38,07 e 38, 44 minutos, cujas bandas do cromatograma estão representadas na Figura 4-63.

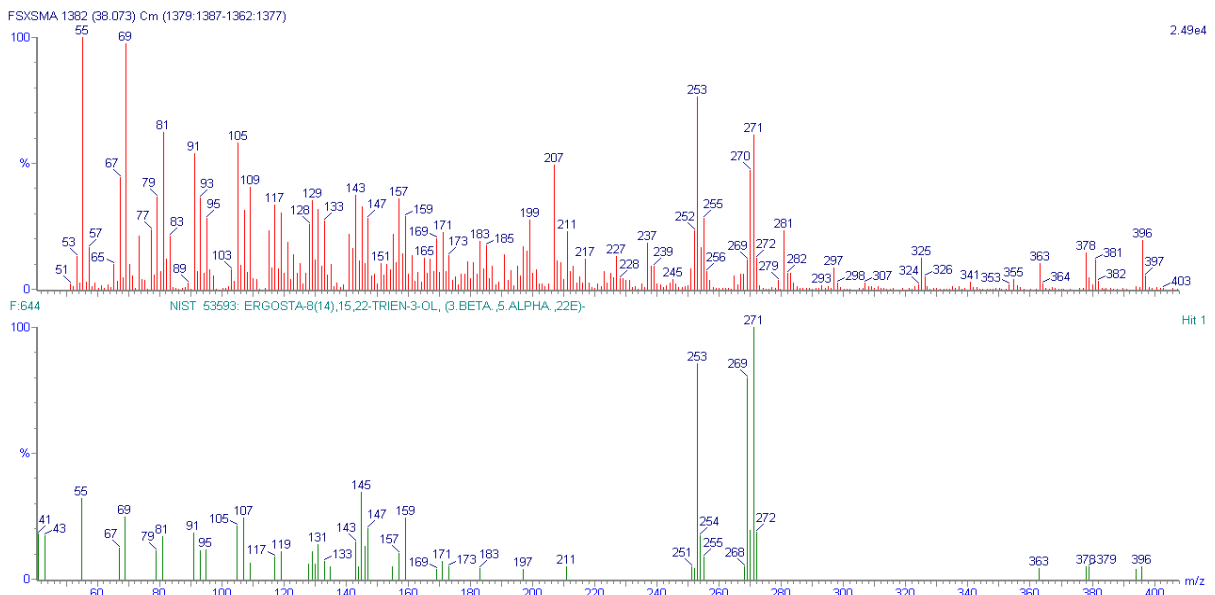
1



2

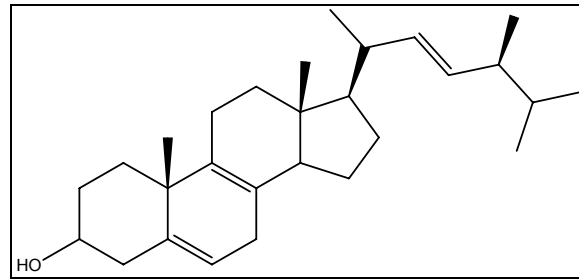


3

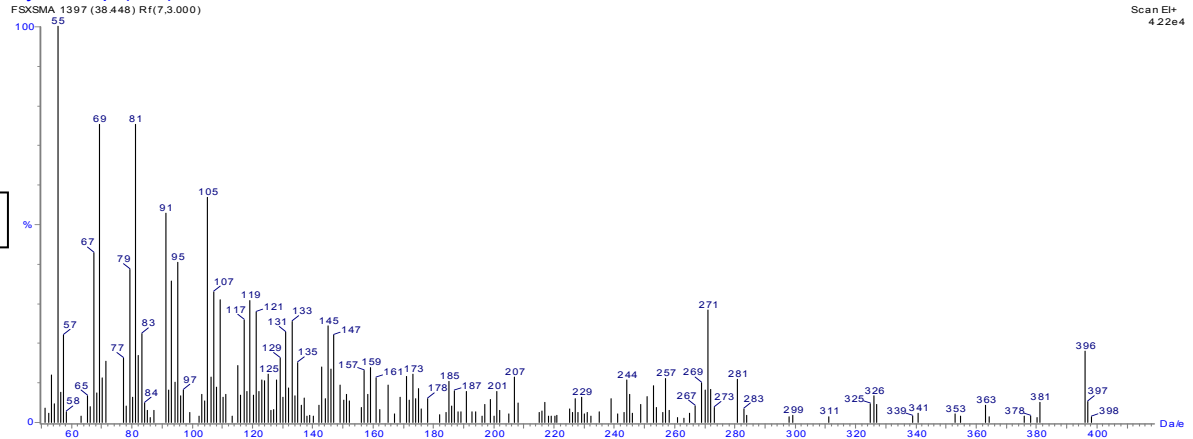


Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endófitos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras

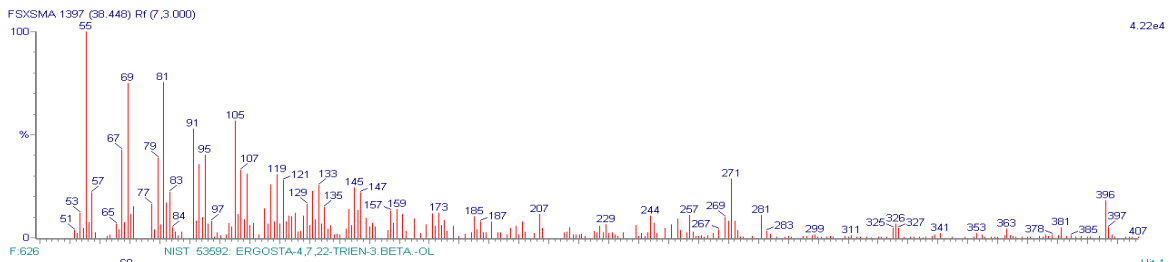
4



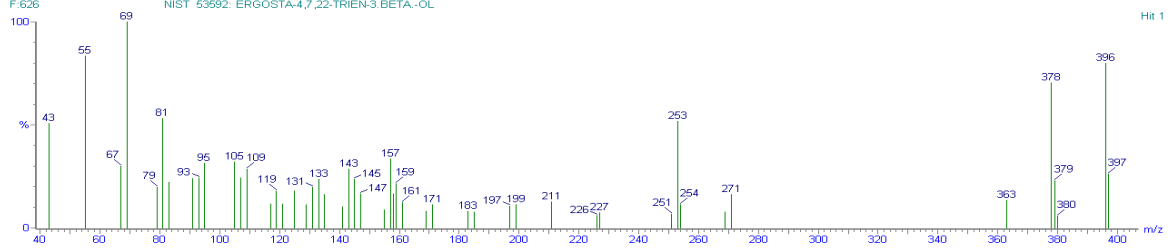
Xylaria sp (MA) - SPE - Dicloro 100% - Florim



5



6



7

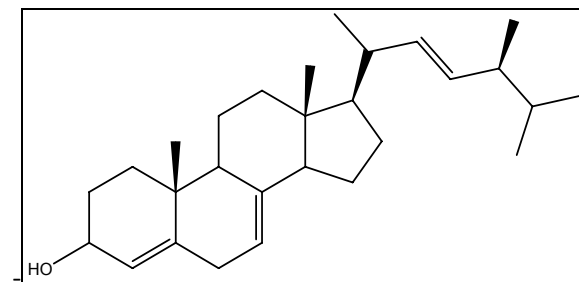


Figura 4-63 – 1) Cromatograma da região de esteróides. 2) Espectro de massas da componente em 38,07 minutos. 3) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 4) Estrutura proposta para o esteróide. 5) Espectro de massas da componente em 38,45 minutos. 6) Espectro de massas gerado pela biblioteca do equipamento. 7) Estrutura proposta para o segundo esteróide.

Esteróides são compostos lipídicos de alto valor energético associados a parede de plantas, animais e microorganismos (LENNINGER, 2000). Um dos esteróides identificados é o ergosterol, que é considerado um marcador químio-taxonomico, geralmente associado a micro-organismos, especialmente fungos endofíticos. Estes compostos apresentam uma fragmentação bem característica, cujo mecanismo está representado na Figura 4-64.

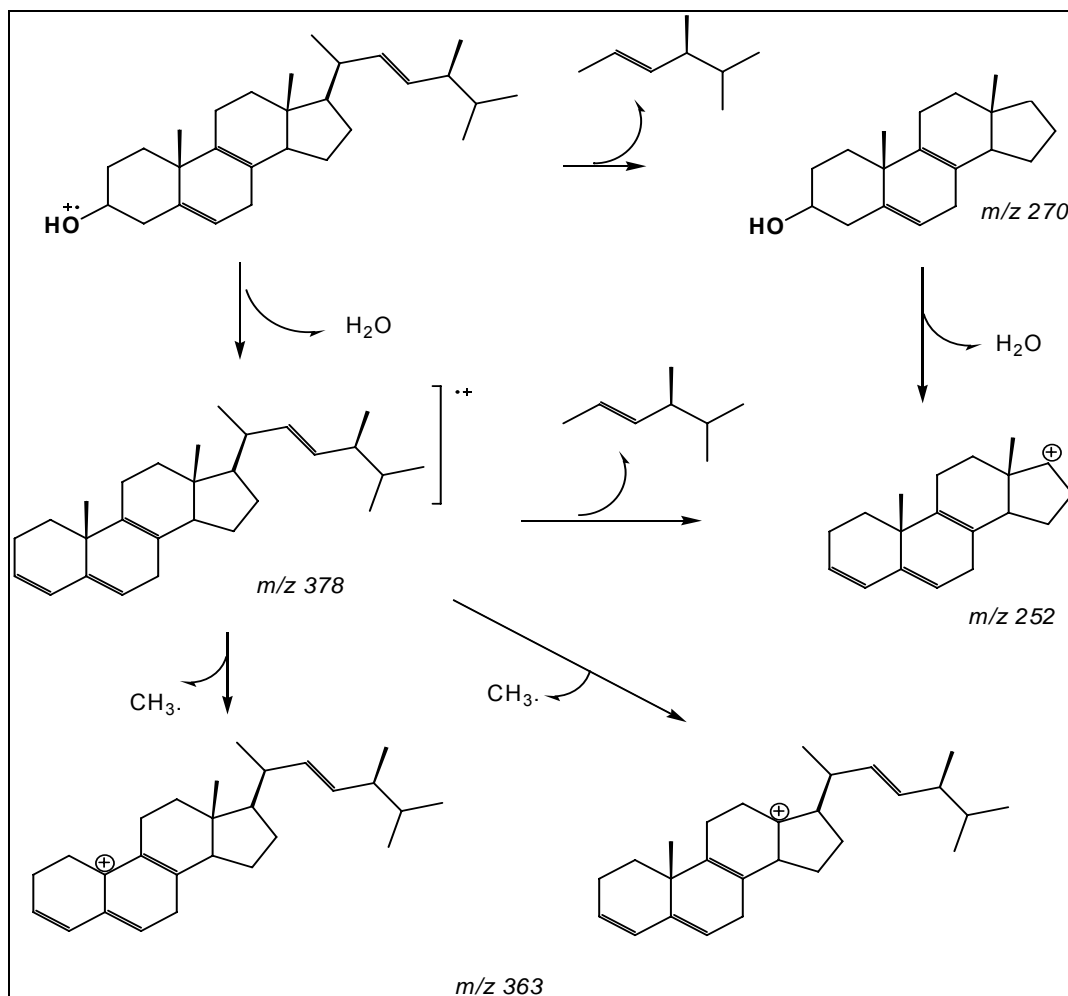


Figura 4-64 - Proposta de fragmentação para o ergosterol.

Dessa forma, foram identificados ésteres metílicos de alto peso molecular e esteróides para o fungo *Xylaria* (NICL3), onde a Figura 4-65 a seguir ilustra alguns destes compostos identificados.

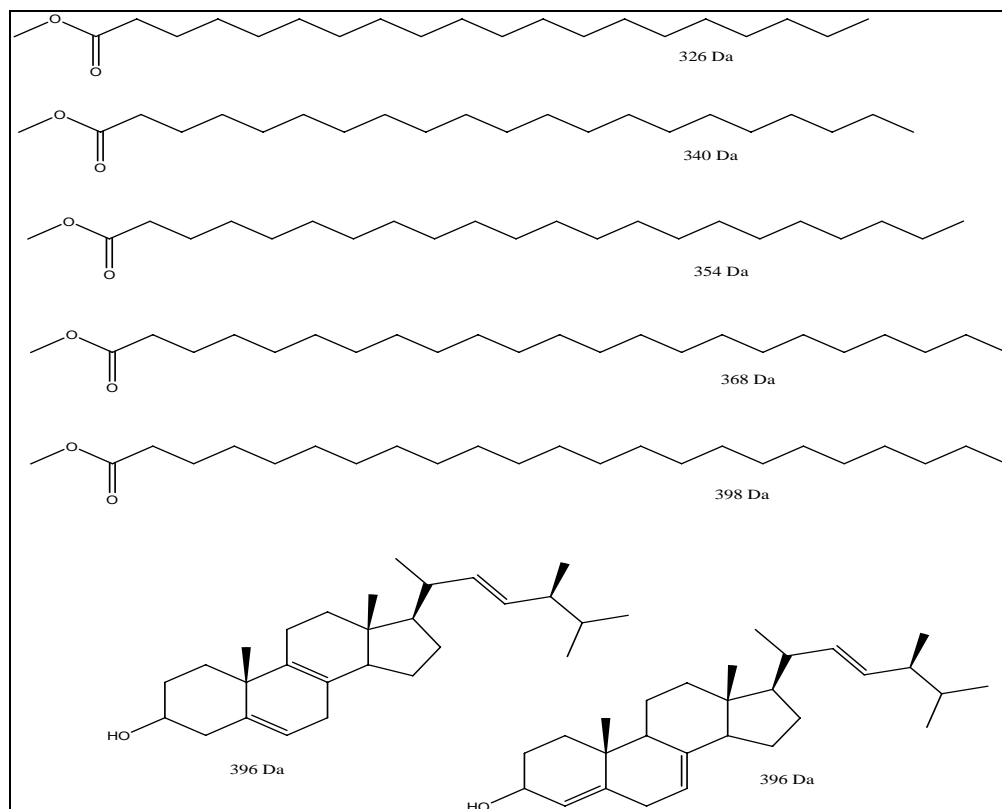


Figura 4-65 - Ésteres metílicos de ácidos graxos e esteróides encontrados no fungo de *Xylaria* (N1CL3).

4.2.2. – Gênero *Penicillium*

O estudo de transesterificação ácida também foi realizado com fungos endófitos do gênero *Penicillium*. Os fungos *Penicillium griseoroseum*, *Penicillium brasilianum* e *Penicillium PAOE* foram submetidos a reação de transesterificação com metanol na presença de ácido. As análises de RMN ^1H mostraram o mesmo perfil de espectro ao que foi apresentado ao fungo de *Xylaria* (N1CL3), o que mostra a Figura 4-66.

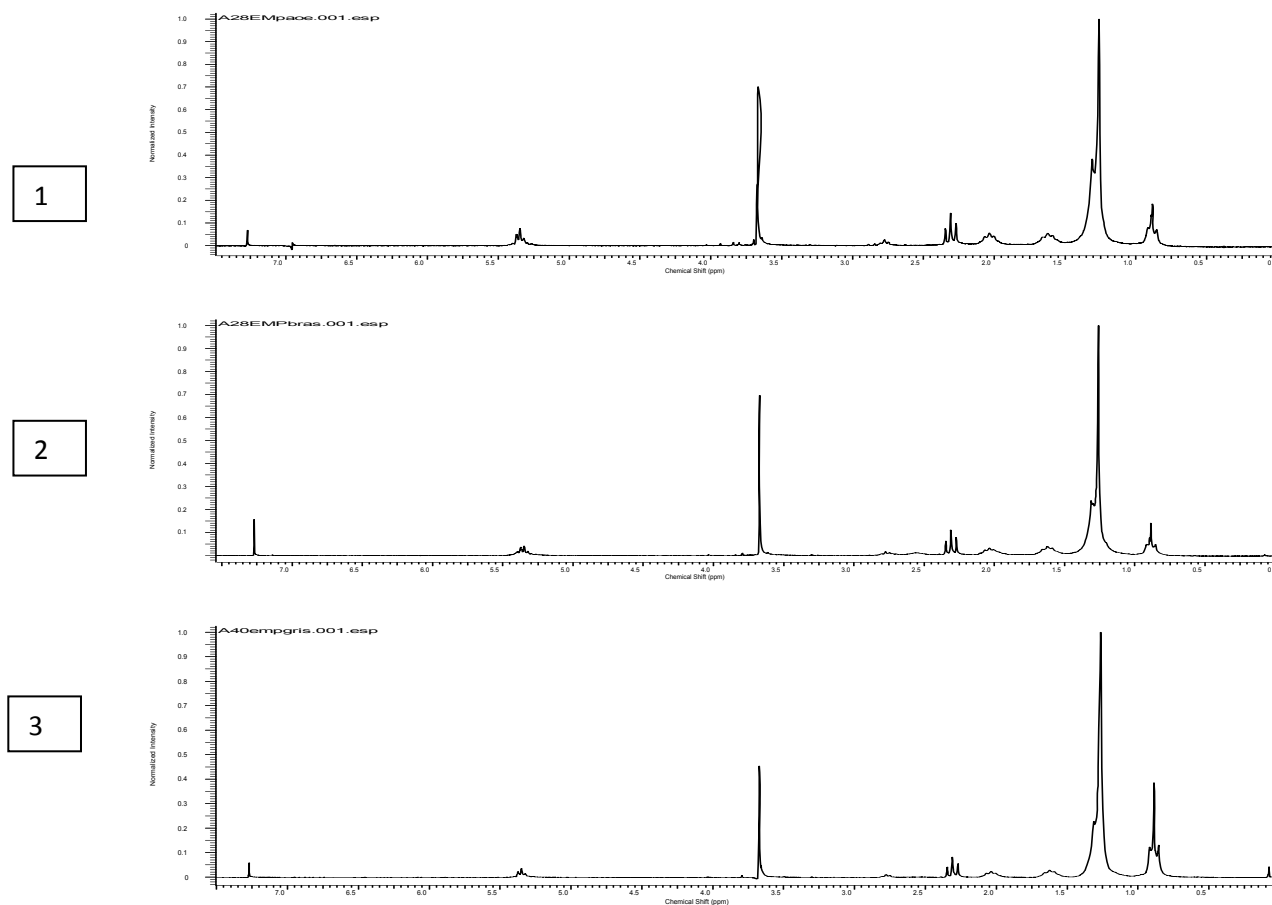


Figura 4-66 - Espectros de RMN ¹H para os produtos de transesterificação dos fungos do gênero *Penicillium*. 1) *Penicillium* PAOE; 2) *Penicillium* griseoroseum; 3) *Penicillium* brasilianum.

Este tipo de perfil de espectro de RMN ¹H mostra que os compostos obtidos são predominantemente ésteres metílicos de ácidos graxos, como já identificado no fungo de *Xylaria* (NICL3).

Os dados de espectrometria de massas por impacto eletrônico, confirmaram a predominância de ésteres metílicos nos extratos de produtos de transesterificação ácida dos fungos do gênero *Penicillium*. Íons *m/z* 74, 87 e 143 se apresentaram constantes nas bandas cromatográficas, como mostra um dos espectros de massas da componente do fungo *Penicillium* brasilianum.

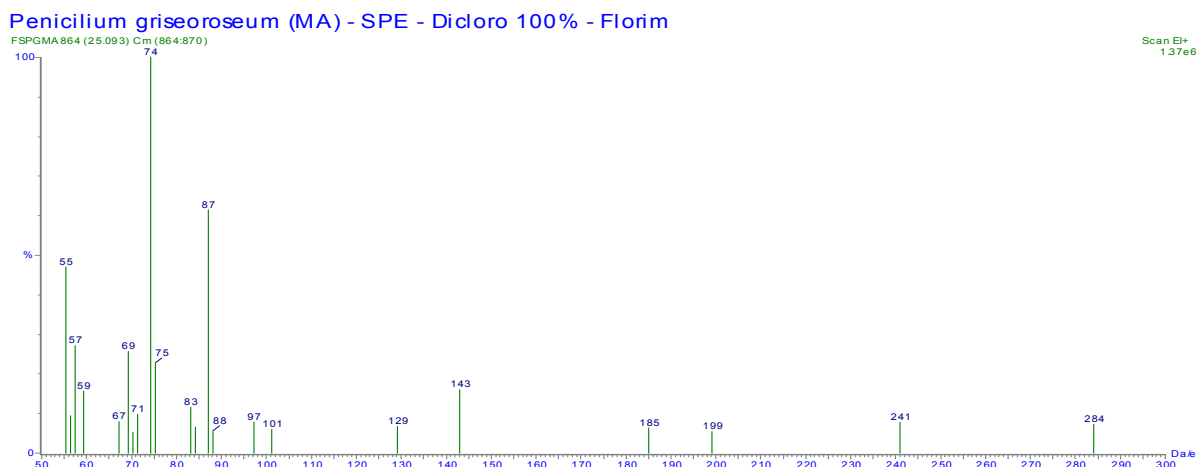


Figura 4-67 - Espectro de massas da componente no tempo 25,09 minutos do produto de transesterificação do fungo *Penicillium brasilianum*.

Dados de cromatografia permitiram ver de que forma estes ésteres metílicos de ácidos graxos estão dispostos em cada fungo, conforme Figura 4-68. A análise seletiva para de íons m/z 74, íons base de ésteres metílicos de ácidos graxos, mostram as diferenças entre as espécies.

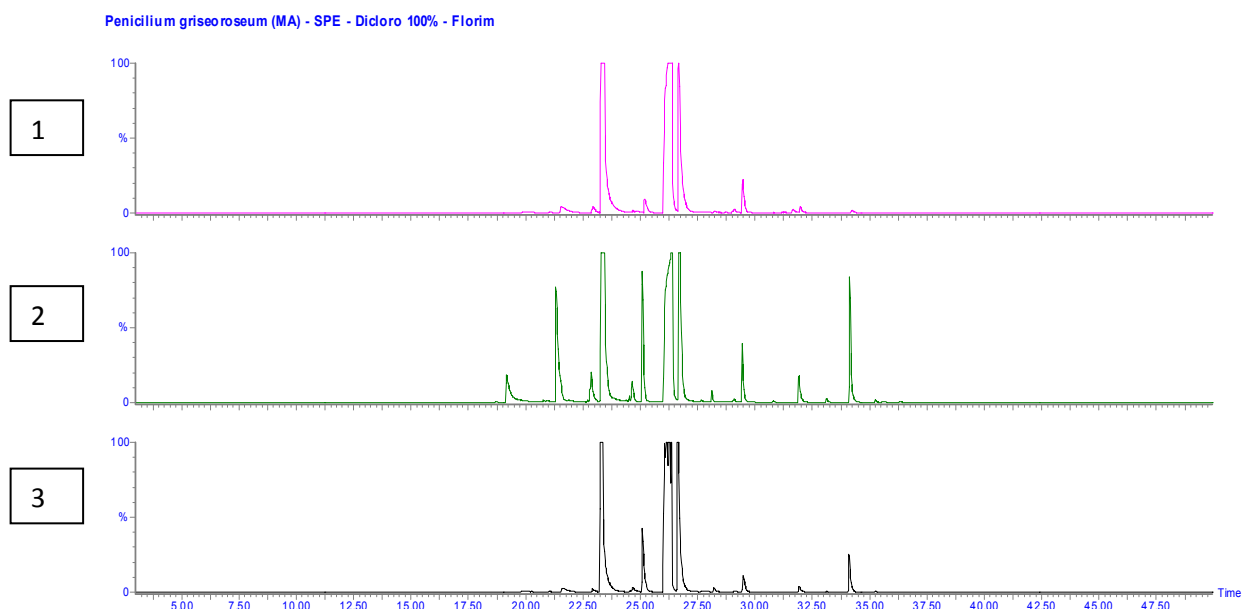


Figura 4-68 - Cromatograma dos extrato dos produtos de transesterificação dos fungos do gênero *Penicillium*. 1) *Penicillium PAOE*; 2) *Penicillium griseoroseum*; 3) *Penicillium brasilianum*.

Diferenças foram encontradas em termos de níveis e tipos de ésteres metílicos de ácidos graxos entre as espécies dos fungos *Penicillium*. Estas diferenças permitem fazer uma classificação quimiotaxonômica baseada nos ésteres metílicos identificados (Figura 4-69).

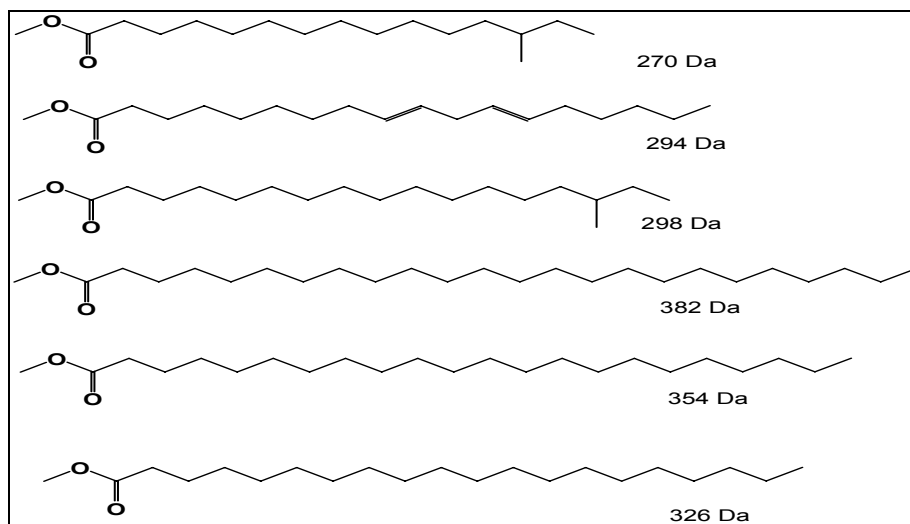
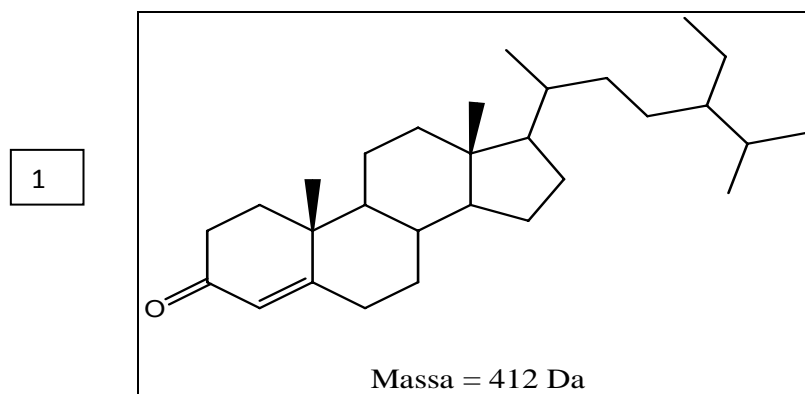
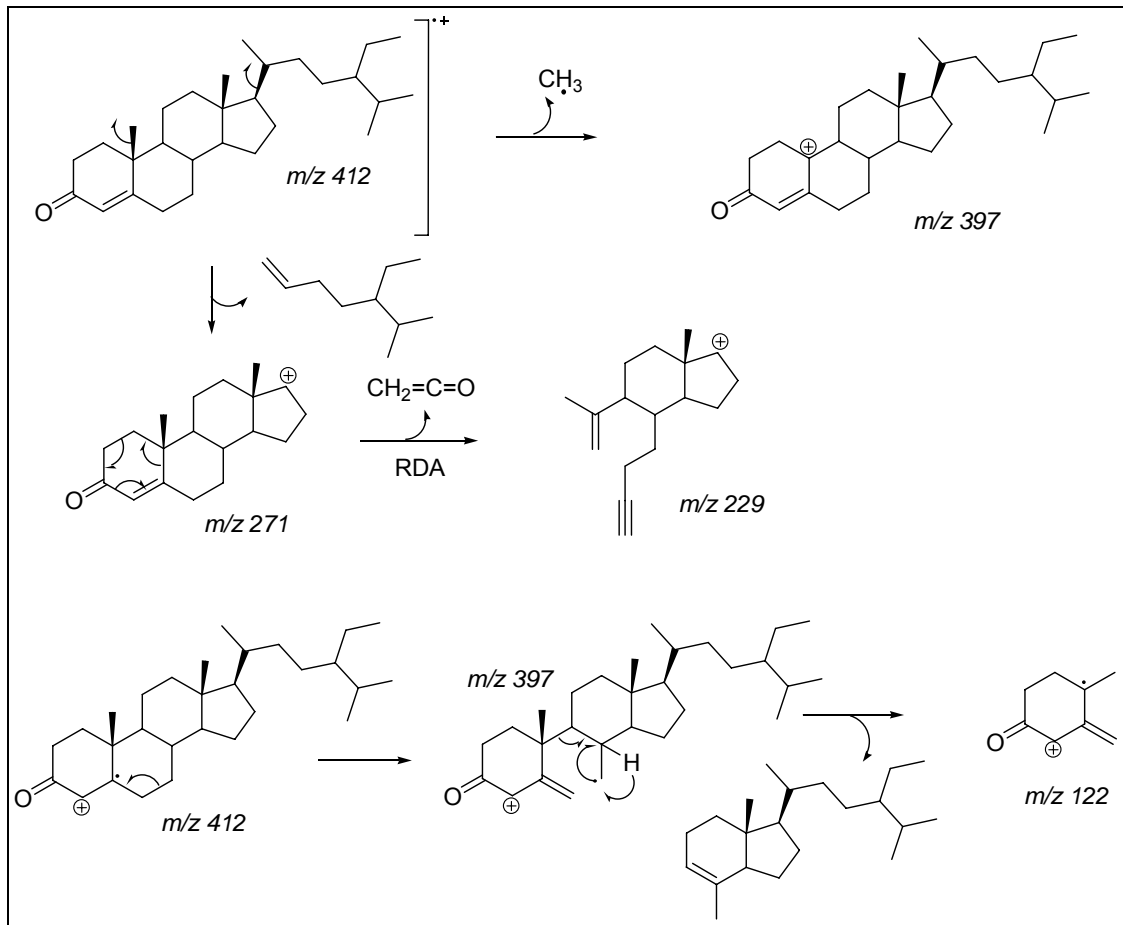


Figura 4-69 - Ésteres metílicos comumente encontrados em fungos do gênero *Penicillium*.

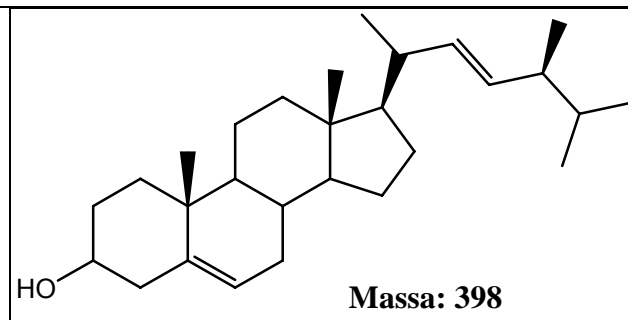
Esteróides também foram encontrados nos fungos *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium brasilianum*, mostrados na Figura 4-70 a seguir com suas respectivas propostas de fragmentação.



2



3



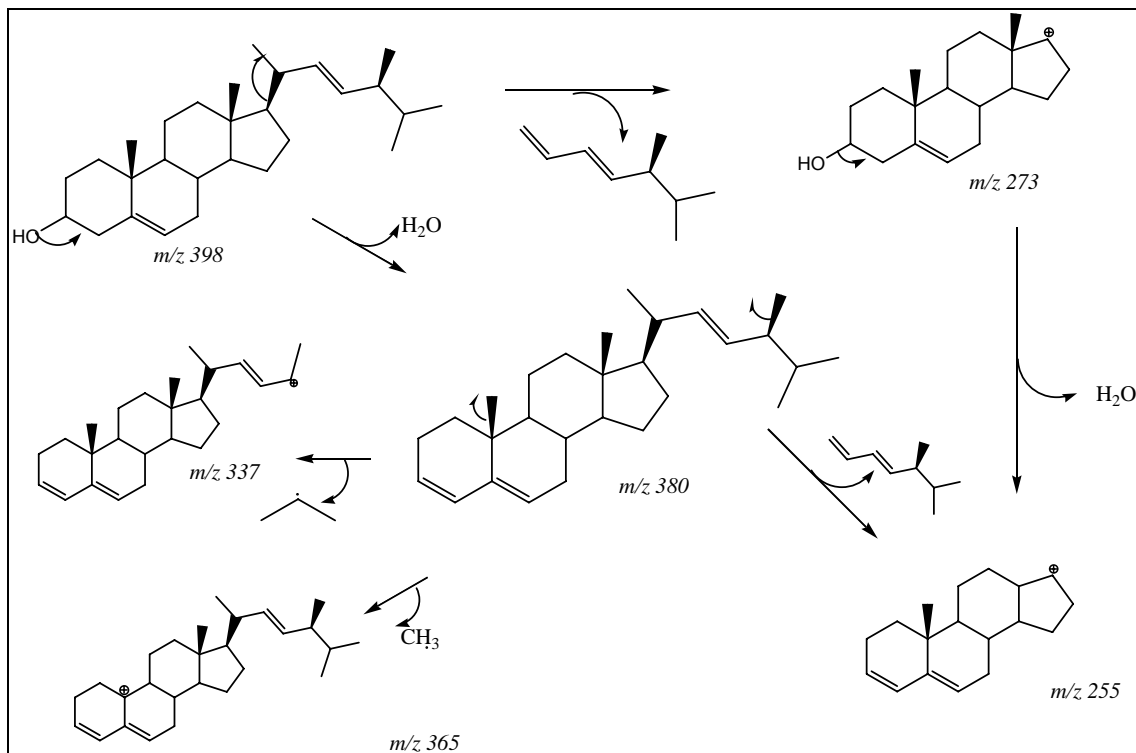


Figura 4-70 - Esteróides identificados no produto de transesterificação ácida dos fungos *Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum*. 1) Esteróide identificado para o fungo *Penicillium brasilianum*. 2) Proposta de fragmentação do esteróide do fungo *Penicillium brasilianum*. 3) Esteróide identificado no fungo *Penicillium griseoroseum*. 4) Proposta de fragmentação do esteróide do fungo *Penicillium brasilianum*.

4.2.3. – Gênero *Trichoderma*

Fungos do gênero *Trichoderma* também foram submetidos a reação de transesterificação ácida para extração de compostos lipídicos. Para isto, foram usados conservas em meios sólidos dos fungos *Trichoderma harvezionum*, *Trichoderma* T27, *Trichoderma* T25, *Trichoderma* T21, *Trichoderma* T19 e *Trichoderma* T13, onde os espectros de RMN ^1H (Figura 4-71) mostram o perfil semelhante aos já identificados para os demais fungos.

Análise dos Constituintes Fixos e Voláteis de Fungos Endoófitos dos Gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e suas Plantas Hospedeiras

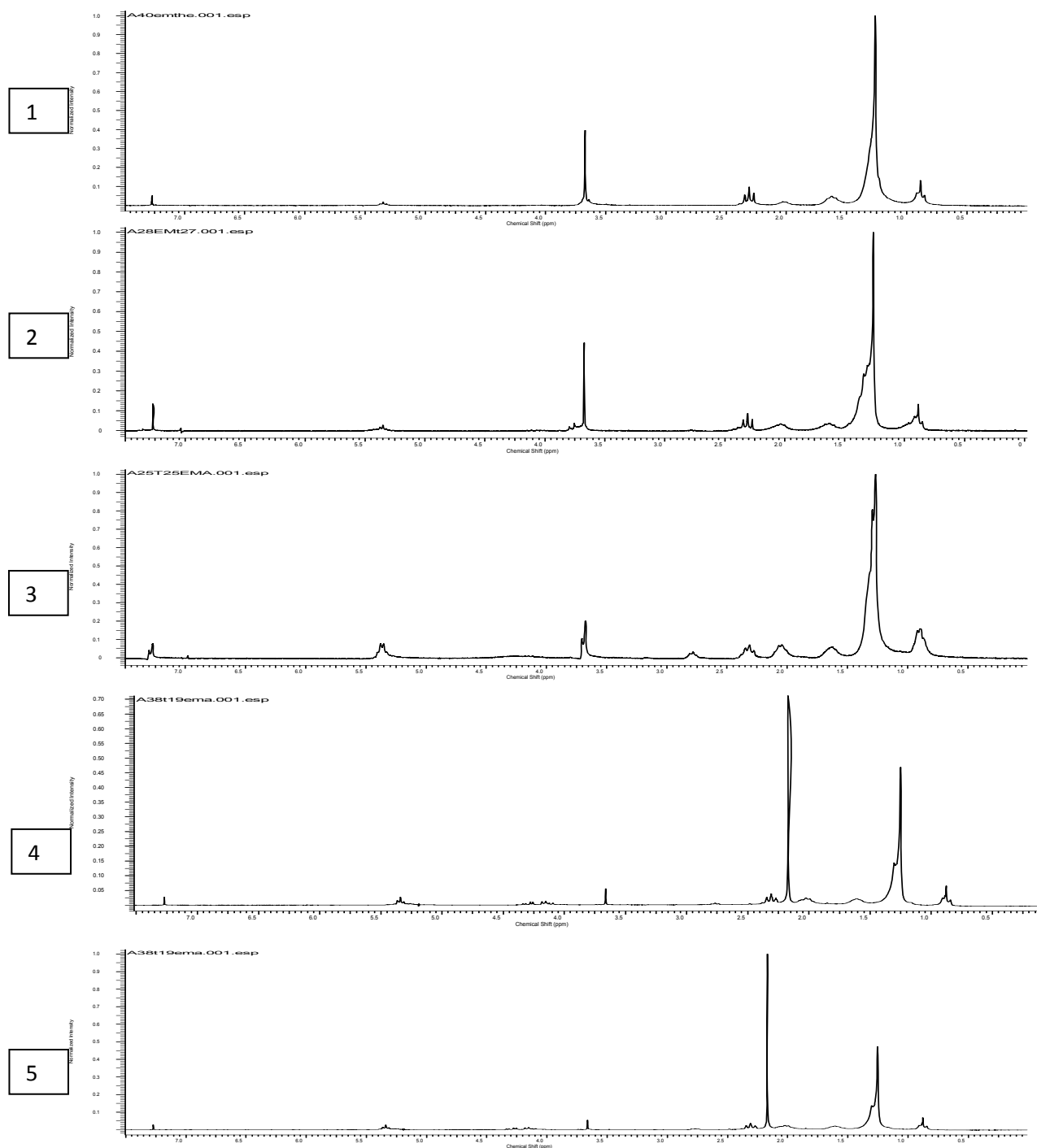


Figura 4-71 - Espectro de RMN 1H dos produtos de transesterificação ácida de fungos do gênero *Trichoderma*. 1) *Trichoderma harvezionum*. 2) *Trichoderma* T27. 3) *Trichoderma* T25. 4) *Trichoderma* T19. 5) *Trichoderma* T13.

Dados cromatográficos indicam que a composição de compostos lipídicos na parede micelial são bem baixas em termos de concentração e variedade de ésteres metílicos de ácidos graxos. Os cromatogramas de íons m/z 74 a seguir

ilustram essa observação em termos dos compostos lipídicos dos fungos deste gênero, conforme mostra a Figura 4-72.

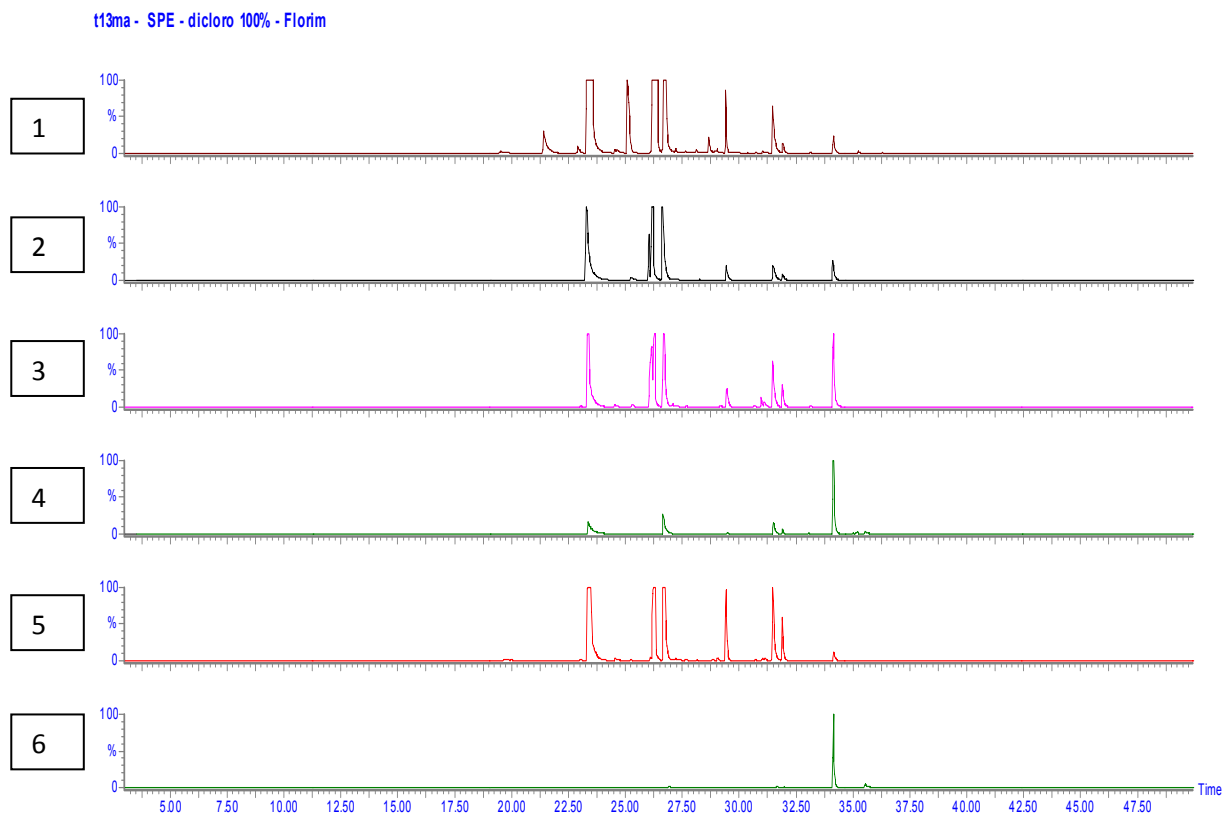


Figura 4-72. - Cromatograma de íons m/z 74 de fungos do gênero *Trichoderma*. 1) *Trichoderma harvezionum*. 2) *Trichoderma T27*. 3) *Trichoderma T25*. 4) *Trichoderma T21*. 5) *Trichoderma T19*. 6) *Trichoderma T13*.

Além desse tipo de compostos, foram identificados uma mistura de hidrocarbonetos homólogos em algumas espécies dos fungos deste gênero. Os cromatogramas de íons m/z 57 (Figura 4-73), íons base em espectros de massas de hidrocarbonetos, mostra essas misturas de hidrocarbonetos homólogos em diferentes espécies do fungo *Trichoderma*.

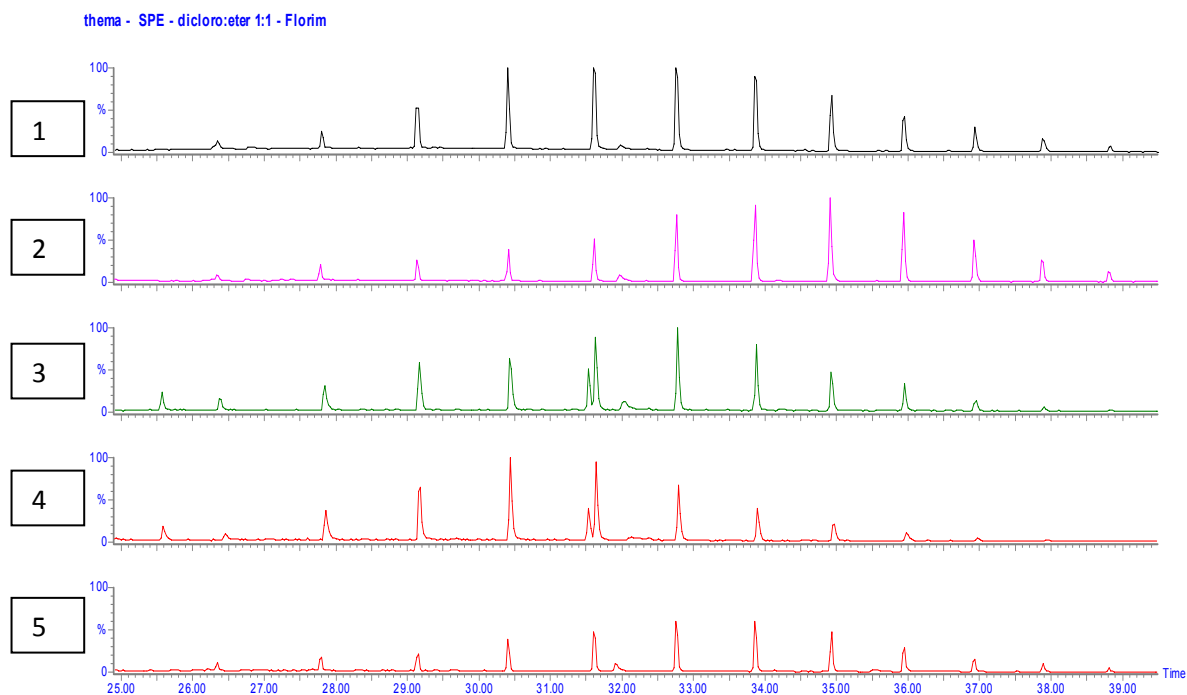


Figura 4-73 - Cromatograma de íons m/z 74 de fungos do gênero *Trichoderma*. 1) *Trichoderma harvezionum*. 2) *Trichoderma T25*. 3) *Trichoderma T21*. 4) *Trichoderma T19*. 5) *Trichoderma T13*.

A identificação de misturas de hidrocarbonetos homólogos nos fungos de gênero *Trichoderma*, inicialmente, causou espanto, já que através dos mecanismos de reação de transesterificação ácida com metanol e ácido clorídrico não há justificativa que expliquem a extração deste tipo de compostos. A única justificativa plausível é a ocorrência de algumas falhas durante o processo de extração. Estes fungos estavam disponíveis na micoteca do LaBioMMi sob forma de conservas sólidas. Estas conservas sólidas foram submetidas diretamente à reação de transesterificação ácida, sem passar pela etapa de pré-extração em metanol. Acredita-se então que estes hidrocarbonetos fosse extraídos durante a reação por não passar por esta etapa e, durante a partição com éter etílico, eram levados a fase apolar, onde seriam detectados na análises por GC-MS.

Um exemplo de hidrocarboneto identificado nos fungos do gênero *Trichoderma* é o correspondente a banda cromatográfica no tempo de retenção de 31,60 minutos, cujo espectro de massas está representado na Figura 4-74 a seguir.

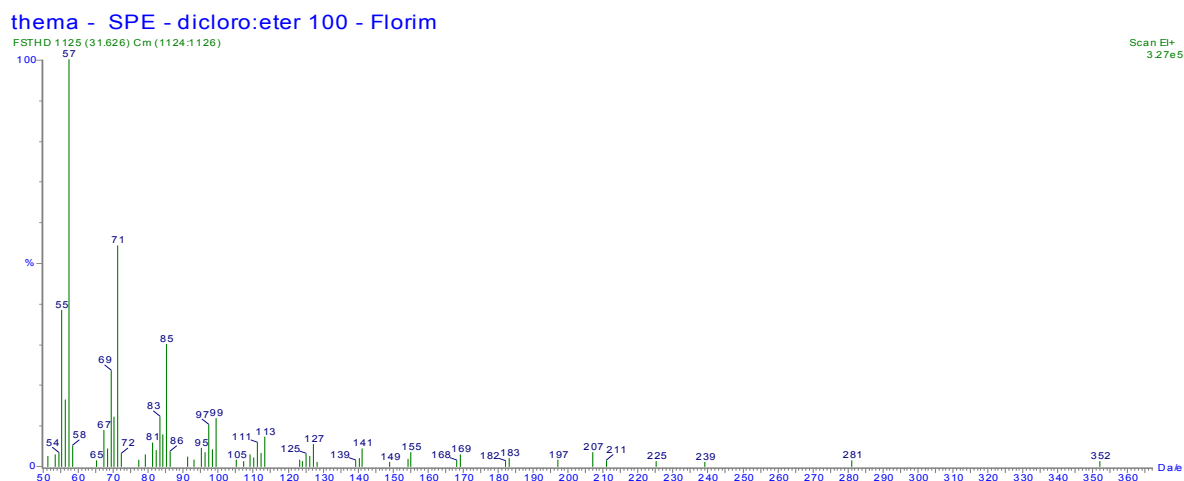


Figura 4-74 - Espectro de massas da componente no tempo de retenção de 31,60 minutos.

Hidrocarbonetos exibem uma tendência de sofrer rearranjos aleatórios em que as posições dos átomos de hidrogênio e o arranjo da cadeia carbônica sofrem modificações. Isto é mais acentuado em alcanos, em que ionização de ligações σ seguida pela clivagem da ligação C-C produzem íons de alquila. Espectros de massas de hidrocarbonetos são bem característico a apresentam como característica fundamental uma espécie de curva logarítmica. Suas fragmentações são regidas por clivagem homolíticas de ligações sigmas, conforme mostra a Figura 4-75.

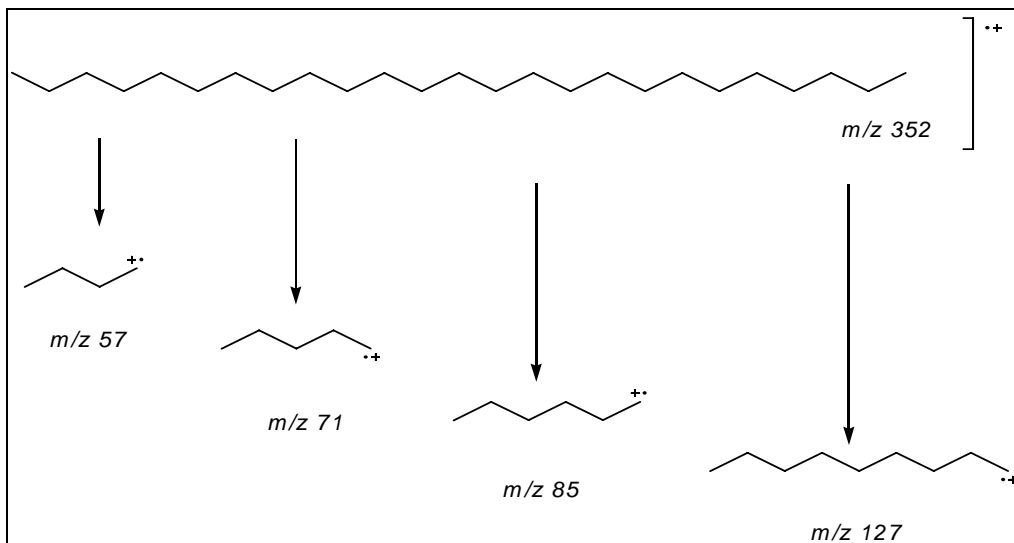


Figura 4-75 - Proposta de fragmentação de hidrocarbonetos.

Os hidrocarbonetos identificados no fungos do gênero de *Trichoderma* estão listado na Figura 4-76.

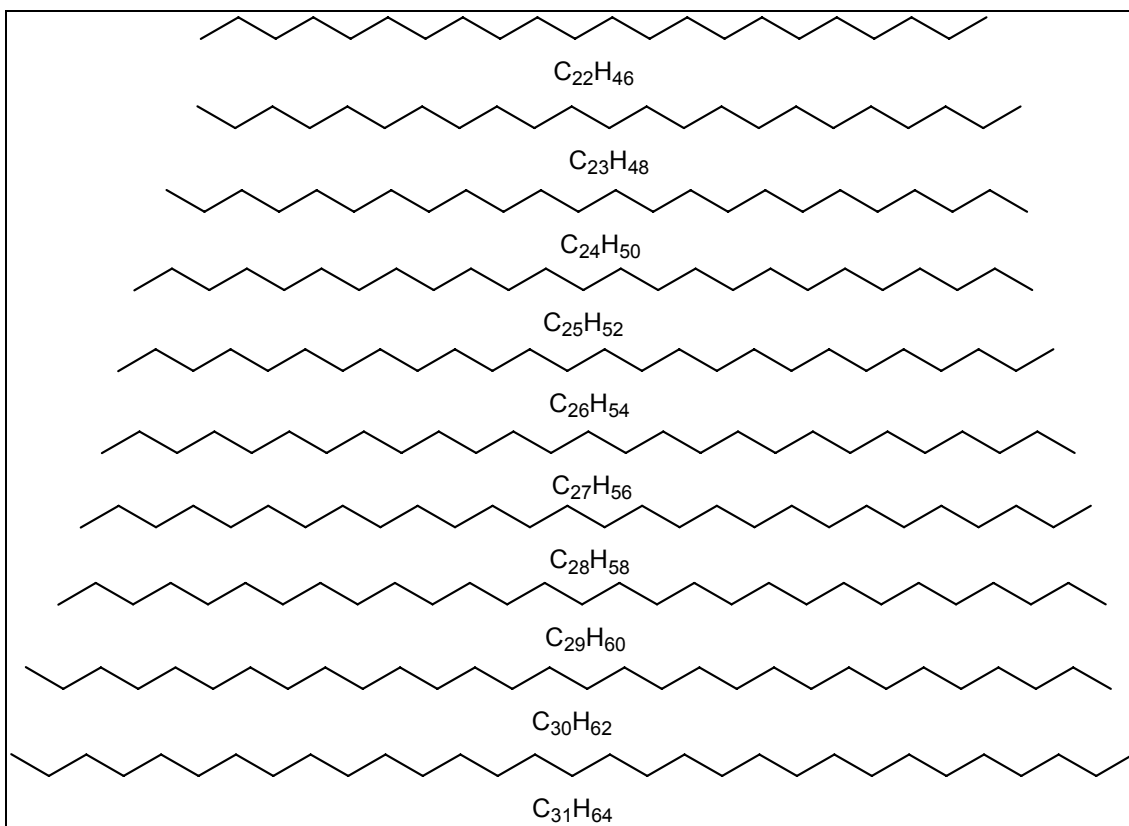


Figura 4-76 - Hidrocarbonetos identificados em fungos do gênero *Trichoderma*.

4.2.4. – Quantificação de Ésteres Metílicos

Foi realizado também a quantificação de ésteres metílicos de ácidos dos fungos *Penicillium brasilianum*, *Penicillium griseoroseum*, *Xylaria (NICL3)* e as conservas de diferentes espécies do gênero *Trichoderma* que foram submetidos a reação de transesterificação ácida.

Sabe-se, atualmente, que estes ésteres metílicos em micro-organismos, especialmente em fungos endofíticos, vem apresentando aplicações bem interessantes, além da importância já destacada como marcadores quimiotaxonômicos, diferenciando espécies distintas de fungos (Chen, 2001, Stahl 1996). Algo que vem chamando bastante atenção é o fato da aplicação como matrizes novas e promissoras em processos que envolvem a produção de biocombustíveis (Vicente, 2010)

Apesar da diversidade de matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel, até 2008 ele era obtido principalmente a partir de plantas oleaginosas, como soja e mamona, ou por gordura animal. Além disso, a produção vem crescendo muito, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, causando em alguns casos impactos no ecossistemas.

A Agência Nacional de Petróleo (ANP), órgão nacional responsável pela regulamentação de leis e normas sobre combustíveis no Brasil, vem publicando resoluções e leis que regulamentam a caracterização e a comercialização do biodiesel. A Resolução 42 regulamenta as técnicas analíticas para a caracterização do biodiesel (Durrett, 2008). Entre as propriedades, a resolução determinava a quantificação do teor de ésteres graxos sem fixar valor mínimo. O método cromatográfico com padronização interna e calibração por um ponto, descrito na norma europeia EN 14 103, foi adotado como técnica quantitativa (Li, 2008).

Diversas técnicas tem sido empregadas na determinação do teor de ésteres em biodiesel. Cromatografia gasosa com detector por ionização em chama

(GC-FID), Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e RMN ¹³C) são alguns dos exemplos mais usados (Meher, 2006; Chisti, 2007; Illman, 2000). Dentre as técnicas utilizadas, a norma europeia EN 14 103 indica a cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID) com o uso de padrão interno e quantificação por um ponto. Geralmente, utiliza-se o heptadecanoato de metila como padrão interno e o método quantifica ésteres metílicos com cadeia de 14 a 24 átomos de carbonos, saturados ou insaturados (Meng, 2009).

Em termos de rendimentos reacionais, observa-se variação entre as espécies de fungos utilizadas para a reação de transesterificação ácida. A Tabela 4-12 lista os rendimentos em termos de massa do produtos de transterificação ácida.

Tabela 4-12 - Rendimento de transesterificação ácida de fungos endofíticos.

<i>Fungos endofíticos</i>	<i>Massa Micelial (g)</i>	<i>Massa de Produto (g)</i>
<i>Xylaria (NICL3)</i>	14	1,32
<i>Penicillium PAOE</i>	12	1,15
<i>Penicillium brasilianum</i>	14	1,20
<i>Penicillium griseoroseum</i>	14	1,45
<i>Trichoderma T19</i>	12	0,85
<i>Trichoderma T25</i>	12	0,95
<i>Trichoderma T27</i>	12	1,31
<i>Trichoderma harvezionum</i>	12	1,10

A análise através de GC-MS foi possível identificar alguns ésteres obtidos a partir de amostras de fungos endofíticos e compará-lo com base nos níveis encontrados em cada um dos micro-organismos. Foram identificado ésteres metílicos do ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico nos produtos de transesterificação ácida com os fungos endofíticos estudados. Estes ésteres metílicos de ácidos graxos são considerado o mais importante ésteres metílicos

presentes em biocombustíveis (Helwani, 2009). Além disso, estes níveis foram comparados a biodiesel de soja, um dos biocombustíveis mais empregados atualmente (Helwani, 2009). A Tabela 4-13 apresenta as características de ésteres metílicos de diferentes espécies de fungos endofíticos.

Tabela 4-13 – Índices de ésteres metílicos de fungos endofíticos.

Fungos Endofíticos	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (%)				
	Palmítico (C16:0)	Estearico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoléico (C18:2)	Linolênico (C18:3)
<i>Xylaria (NICL3)</i>	15,50	8,76	26,50	49,58	7,78
<i>Penicillium (PAOE)</i>	33,25	5,20	13,80	43,51	2,94
<i>Penicillium brasilianum</i>	26,40	6,04	13,90	44,60	0,94
<i>Penicillium griseoroseum</i>	29,90	7,58	10,10	29,45	2,10
<i>Trichoderma T19</i>	53,05	–	10,66	1,41	0,92
<i>Trichoderma T 25</i>	31,20	3,39	28,55	23,33	4,73
<i>Trichoderma T27</i>	30,94	1,59	21,74	13,00	0,34
Soja	11,29	3,54	22,45	54,62	8,11

Entre as amostras de fungos endofíticos, existem alguns fungos, que foram identificados como uma fonte promissora de ésteres metílicos, com concentrações similares de ésteres metílicos de biodiesel de soja. Variações no teor de ésteres metílicos são observados para as diferentes espécies de fungos endofíticos, sendo utilizado como um importante classificador taxonômico de micro-organismos (Chen, 2001). O fungo endofítico identificado como *Xylaria (NICL3)* apresentou teores de ésteres metílicos semelhante ao encontrado na soja, o que indica que poder apresentar características semelhantes de um biocombustível produzido a partir de uma fonte vegetal. O fungo *Penicillium (PAOE)* também apresentou concentrações próximas do valor ao observado para biodiesel de soja. Nesse sentido, a busca de linhagens específicas deste fungos endofíticos podem apresentar promissoras fontes de biocombustível.

A quantificação dos ésteres metílicos foi realizada de acordo com a Norma Européia EN 14 103 a qual aconselha que a quantificação dos ésteres metílicos deve ser realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), utilizando padrão interno e quantificação por um ponto. Para essas condições, o cromatograma é integrada no intervalo 1,0-20,0 minutos, correspondente ao tempo de retenção de miristato de metila (C 14:0) e nervonate metila (C 24:1), respectivamente. Esta área abrange os picos de maior parte dos ésteres metílicos de ácidos graxos e é considerado o intervalo ideal para a compostos de biodiesel.

A Figura 4-77 mostra os cromatogramas e região de integração para a quantificação dos ésteres metílicos dos fungos endofíticos.

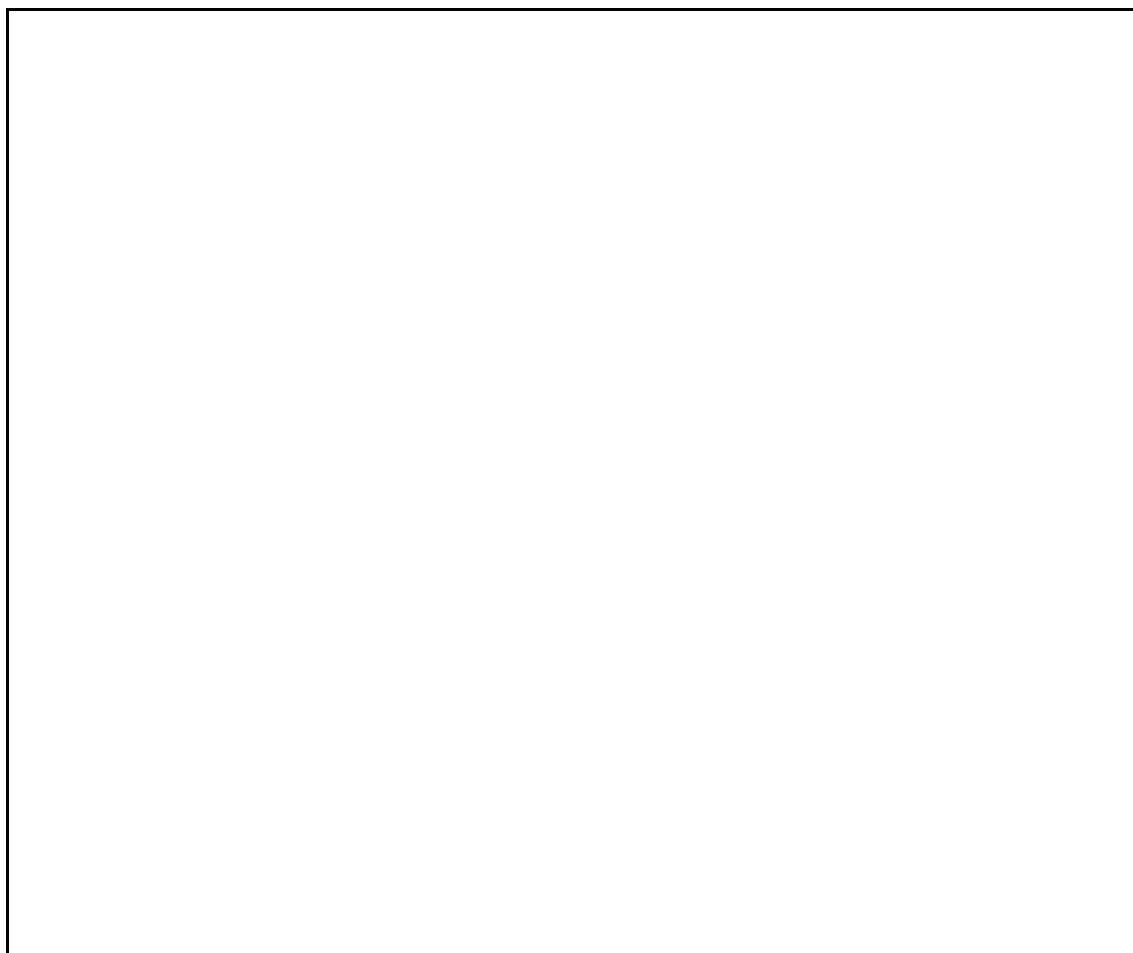


Figura 4-77 – Cromatograma obtido por GC-FID para os produtos de transesterificação ácida dos fungos endofítico: 1) *Xylaria (NICL3)*; 2) *Penicillium PAOE*; 3) *Penicillium brasilianum*; 4)

Penicillium griseoroseum; 5) *Trichodherma T19*; 6) *Trichodherma T25*; 7) *Trichodherma T27*; 8) *Trichodherma harvezionum*.

A quantificação das amostra dos fungos endofíticos está representada na Tabela 4-14 e foi comparada em relação ao biodiesel de soja, considerado um dos melhores biodiesel obtido a partir de fonte vegetal.

Tabela 4-14 – Concentração de Ésteres metílicos de fungos endofíticos.

<i>Fungos endofíticos</i>	<i>Concentração de ésteres mélicos (%)</i>
<i>Xylaria (NICL3)</i>	91,0
<i>Penicillium PAOE</i>	83,1
<i>Penicillium brasilianum</i>	50,8
<i>Penicillium griseoroseum</i>	40,5
<i>Trichodherma T19</i>	67,8
<i>Trichodherma T25</i>	11,6
<i>Trichodherma T27</i>	40,1
<i>Trichodherma harvezionum</i>	40,4
Biodiesel de soja	90,7

De acordo com a norma europeia EN 14 103, para uma determinada matriz ser considerada um biodiesel, ela precisa apresentar concentração de ésteres metílicos superiores a 90 %. A partir dos dados da Tabela 4-10, observa-se que a grande maioria dos fungos endofíticos não apresentaram uma concentração de ésteres metílicos suficientemente satisfatória para serem considerados biocombustíveis. Entretanto, um fungo xylarioso, identificado como *Xylaria (NICL3)*, apresentou uma concentração bem elevada e próxima do que seria aquela esperada para um biodiesel ideal e pode ser perfeitamente aplicado em biocombustíveis. Este fato mostra que a metodologia utilizada foi efetiva para extração de ésteres metílicos de fungos endofíticos e motiva este tipo de estudos em fungos com essa característica xylariosa (não produtor de esporos).

4.3 – ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os óleos essenciais são conhecidos por terem uso e aplicações em diversas atividades biológicas em busca de satisfazer as necessidades humanas (Moyler, 1997). Entre estes estão antifúngicos (Tavares *et al*, 2008), antibacteriana (Firas, 2008), antibiótico (Rodrigues *et al*, 2009), dermatológicas (Comai *et al*, 2010), anti-inflamatórios (Guerrini *et al*, 2009) e citotóxica (Conforti *et al*, 2009; Loizzo *et al*, 2010).

Das atividades anti-fúngicas já realizadas para diversos óleos essenciais, o que chama atenção é que cerca de 90 % são realizado com micro-organismos que habitariam as plantas de formas externas, ou seja, seriam mais comumente utilizadas aos fungos epifíticos.

Sendo assim, neste trabalho, foi então realizado o estudo de ensaio antifúngico do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* frente a três fungos endofíticos associados a esta planta: *Xylaria* (NICL3), *Guignardia sp* e *Xylaria* (NICL5), ilustrado na Figura 4-78. Este é o primeiro ensaio anti-fúngico que é realizado contra fungos endofíticos associados a uma determinada planta.



Figura 4-78 - Fungos endofíticos submetidos ao ensaio antifúngico com o óleo essencial de *Cupressus lusitanica*: 1) *Guignardia sp*; 2) *Xylaria* (NICL3); 3) *Xylaria* (NICL5).

Vale ressaltar que este ensaio não foi realizado com o objetivo de buscar óleos essenciais que apresentassem forte atividade anti-fúngica mas sim de entender melhor como o óleo essencial de *Cupressus lusitanica* influencia na relação

planta-fungos endofíticos frente a seus fungos associados. Dados publicados na literatura mostram que monoterpenos voláteis são os primeiros mecanismos de defesa da planta *Cupressus lusitanica* frente ao ataque de fungos patogênicos. Esta observação motiva e justifica ainda mais a realização deste ensaio. O resultado deste ensaio está mostrado na Figura 4-79.

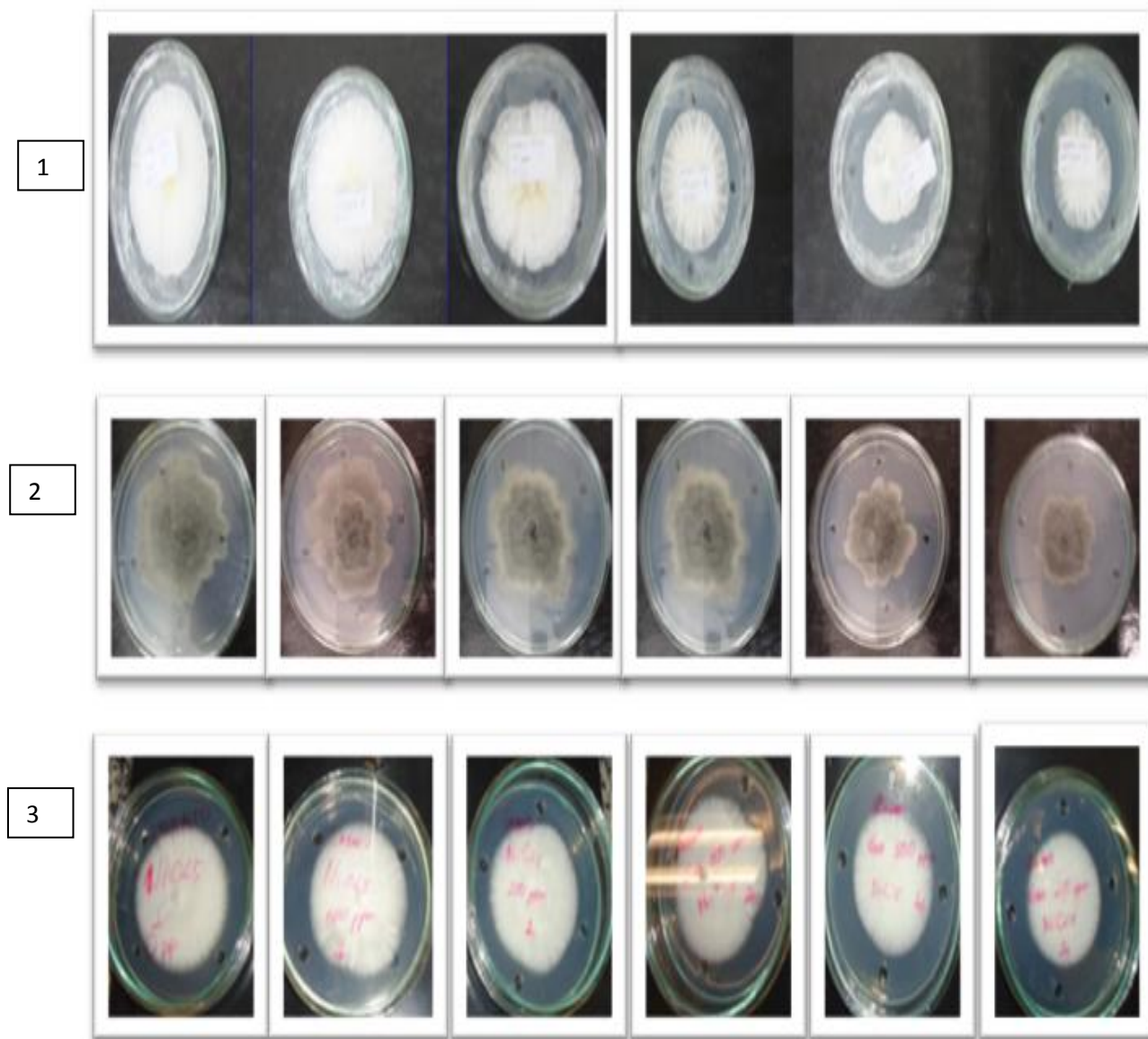


Figura 4-79 - Ensaio do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* nas concentrações de 0, 100, 250, 500, 750, 1000 ppm contra os fungos endofíticos associados: 1) *Xylaria* (NICL3); 2) *Guignardia* sp; 3) *Xylaria* (NICL5).

A Tabela 4-15 resume os dados obtidos no teste antifúngica contra *Xylaria* (NICL3), *Guignardia sp* e *Xylaria* (NICL5) em termos de concentração mínima inibitória e potencial de inibição do óleo essencial de *Cupressus lusitanica*.

Tabela 4-15 – Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* contra fungos endofíticos associado.

<i>Fungos Endofítico</i>	<i>Concentração Mínima Inibitória (ppm)</i>	<i>Potencial de Inibição (%)</i>
<i>Xylaria</i> (NICL3)	500	68,0
<i>Guignardia sp</i>	250	70,2
<i>Xylaria</i> (NICL5)	250	65,0

Segundo os resultados apresentados na Tabela 4-13, o óleo essencial de *Cupressus lusitanica* mostrou moderada atividade contra o crescimento de fungos endofíticos associados. Isto seria um forte indício de que os compostos voláteis do óleo essencial seria importante no controle do crescimento de micro-organismos nos tecidos internos da planta. Relatos da literatura mostram que monoterpenos voláteis são importantes e atuam como os mecanismos primários de defesa da planta contra as invasões patogênicas (Alwis *et al*, 2009). Isto confirma a hipótese de que os compostos voláteis são importantes para as interações bioquímicas desta planta.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram estudados metabólitos secundários voláteis e fixos de quatro gêneros de fungos endofíticos e duas plantas hospedeiras: os fungos *Xylaria* (N1CL3), endofítico associado da planta *Cupressus lusitanica*, *Penicillium brasilianum*, endofítico associado a *Melia azedarach*, *Penicillium griseoroseum* e conservas de diferentes espécies de fungos *Trichoderma*.

As técnicas de identificação por índice de retenção de Kovats e CG-EM se mostraram importantes para a identificação dos metabólitos secundários voláteis e fixos dos micro-organismos e plantas.

O óleo essencial de *Cupressus lusitanica* mostrou uma constituição diversificada de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos que, de acordo com dados na literatura, apresentam importância nas interações biológicas da planta.

O óleo essencial do fungo *Xylaria* (N1CL3) apresentou diversidade de sesquiterpenos que mostraram estruturas condizentes com trabalhos anteriores dentro do grupo LaBioMMi.

Compostos semelhantes foram encontrados no óleo essencial de e *Cupressus lusitanica*, o que leva a acreditar na ocorrência de interações bioquímicas entre planta e microorganismo.

O óleo essencial de *Penicillium griseoroseum* mostrou uma composição de compostos de baixo peso molecular e de uma mistura variada de diterpenos, reportados pela primeira vez para este fungo.

O óleo essencial de *Penicillium brasilianum* apresentou em sua constituição sesquiterpenos diferenciados, alguns deles identificados no óleo essencial de *Melia azedarach*, o que sugere interações bioquímicas entre planta e microorganismo.

A técnica de aeração foi capaz de identificar sesquiterpenos e hidrocarbonetos homólogos para os fungos *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium brasilianum*. O fungo *Xylaria* (N1CL3) não apresentou compostos identificáveis através desta técnica.

Os metabólitos secundários fixos foram extraídos a partir de reação de transesterificação ácida onde mostraram um perfil de compostos lipídicos diversificado conforme gênero e espécie. Dentre os compostos lipídicos, foram identificados ésteres metílicos de ácidos graxos e esteróides. Perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos é usado como marcador quimiotaxonômico de fungos endofíticos.

Ésteres metílicos de ácidos graxos são compostos predominantes em biocombustíveis. Foi realizada a quantificação de ésteres metílicos de ácido graxos de acordo com a norma europeia EN 14 103 através do uso de GC-FID. Alguns fungos endofíticos (*Xylaria* (NICL3) e *Penicillium* PAOE) se mostraram fontes promissoras de biocombustíveis de acordo com a norma.

O ensaio antifúngico do óleo essencial de *Cupressus lusitanica* frente aos fungos endofíticos associados *Xylaria* (NICL3), *Guignardia* sp e *Xylaria* (NICL5) mostraram que o óleo essencial apresenta influência no controle do crescimento dos micro-organismos nos tecidos internos das planta. Dados na literatura dão suporte a esta idéia. Este foi o primeiro ensaio antifúngico de óleo essencial contra fungos endofíticos associados.

Com este trabalho, espera-se contribuir com a química dos organismos estudados, já que os estudos des metabólitos secundários voláteis e fixos é inédito para este micro-organismos dentro dos trabalhos já realizados no grupo LaBioMMi.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate, D., W.-R. Abraham, et al. (1997). "Cytochalasins and phytotoxins from the fungus *Xylaria obovata*." Phytochemistry **44**(8): 1443-1448.
- Abreu, F. R., D. G. Lima, et al. (2004). "Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols." Journal of Molecular Catalysis A: Chemical **209**(1-2): 29-33.
- Adams, R. P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry. Allured, Carol Stream, IL, USA.
- Adrio, J. L., Demain, A. L. *Fungal biotechnonology*. Int. Microbiology, 6,191-199, 2003.
- Agelopoulos, N. G. and J. A. Pickett (1998). "Headspace Analysis in Chemical Ecology: Effects of Different Sampling Methods on Ratios of Volatile Compounds Present in Headspace Samples." Journal of Chemical Ecology **24**(7): 1161-1172.
- Al-Bayati, F. A. (2008). "Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts." Journal of Ethnopharmacology **116**(3): 403-406.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C.W., Blackwell, M. Introductory mycology, 4th ed. USA, John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- Amaral, L. S. Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica*./ Luciana da Silva Amaral – São Carlos: UFSCar, 2009
- Amaral, Luciana S.; Rodrigues-Filho, Edson. "Two novel eremophilane sesquiterpenes from an endophytic Xylariaceous fungus isolated from leaves of *Cupressus lusitanica*". J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 21, n. 8, 2010 .
- Arora, D.K.; Elander, R.P.; Mukerji, K.G. et al. Handbook of Applied Mycology, Fungal Biotechnology. Marcel Dekker, INC. New York: (1992).

- Barletta, B., R. Tinghino, et al. (1998). "Arizona cypress (*Cupressus arizonia*) pollen allergens. Identification of crossreactive periodate-resistant and -sensitive epitopes with monoclonal antibodies." Allergy **53**(6): 586-593.
- Barry, A. *Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Mycomycetum: II.*, Leipzig, Engelmann, 1966
- Bienemann, K. (1962). *Mass Spectrometry, Applications to Organic Chemistry*. New York: McGraw Hill.
- Bode, H. B., B. Bethe, et al. (2002). "Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity." ChemBioChem **3**(7): 619-627.
- Boyle, C., Gotz, M., Dammann-Tugend, U., Schulz, B. "Endophyte-host interactions III. Local vs systemic colonization". Symbiosis, **31**, 259-281, 2001
- Brito, A. R. M. S.; Nunes, D. S.. *Ethnopharmacology and the sustainable development of new plant-derived drugs*. Ciência e Cultura, v. 49, n. 5/6, p. 402-408, 1997
- Brown, J. R. "Ancient horizontal gene transfer". Nature Reviews Genetics, **4**, 121-132, 2003.
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., and Williams, D. H. (1967). "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Vols. I and II. San Francisco: Holden-Day.
- 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.
- Chalcat, J. C.; Chiron, F.; Garry, R.; Lacoste, J.; Sautou, V. "Photochemical hydroperoxidation of terpenes. Antimicrobial activity of α -pinene, β -pinene and limonene hydroperoxides". Journal Essential Oil Research, v. 12, n. 1, p. 125-134, 2000.

- Chen, J., H. Ferris, et al. (2001). "Fatty acid composition and dynamics of selected fungal-feeding nematodes and fungi." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **130**(2): 135-144.
- CHEN, W., E. WANG, et al. (1995). "Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a Moderately and Slowly Growing Root Nodule Bacterium Isolated from an Arid Saline Environment in Xinjiang, People's Republic of China." Int J Syst Bacteriol **45**(1): 153-159
- Chéraif, I., H. Ben Jannet, et al. (2007). "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cupressus arizonica* Greene." Biochemical Systematics and Ecology **35**(12): 813-820.
- Chisti, Y. "Biodiesel from microalgae." Biotechnology Advances **25**(3): 294-306..
- Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and Lipids: A practical guide*. Dundee: The oily Press Ltd.
- Christie, W.W.; Noble, R.C.; Davies, G. "Phospholipids in milk and dairy products". Journal of the Society of Dairy Technology, v.40, p. 10 -12, 1987.
- Comai, S., S. Dall'Acqua, et al. (2010). "Essential oil of *Lindera neesiana* fruit: Chemical analysis and its potential use in topical applications." Fitoterapia **81**(1): 11-16
- Conforti, F., F. Menichini, et al. (2009). "Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area." Food Chemistry **116**(4): 898-905
- Cruz, Rosenira Serpa da et al. Biodiesel: uma nova realidade energética no Brasil. Bahia *Análise & Dados*, Salvador: SEI, v. 16, n. 1, p. 97-106, jun. 2006.
- Dai, J.-R., B. K. Carté, et al. (2000). "Circumdatin G, a New Alkaloid from the Fungus *Aspergillus ochraceus*." Journal of Natural Products **64**(1): 125-126.

- De Alwis, R., K. Fujita, et al. (2009). "Volatile and non-volatile monoterpenes produced by elicitor-stimulated *Cupressus lusitanica* cultured cells." Journal of Plant Physiology **166**(7): 720-728.
- De Alwis, R., K. Fujita, et al. (2009). "Volatile and non-volatile monoterpenes produced by elicitor-stimulated *Cupressus lusitanica* cultured cells." Journal of Plant Physiology **166**(7): 720-728.
- Demain, A. L..Do antibiotics function in nature?.. Search, **11**, 148-151, 1980
- Desjardins, A. E.; Spencer, G. F.; Plattner, R. D. & Beremand, M. N. "Furanocoumarin phytoalexins, trichothecene toxins, and infection of *Pastinaca sativa* by *Fusarium sporotrichioides*". Phytopathology, **79**(2): 170, 1989.
- Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, Chichester, 1st edn.,1997
- Durrett, T. P., C. Benning, et al. (2008). "Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels." The Plant Journal **54**(4): 593-607.
- Engel, T.M., et al., "Screening of Semivolatile Organic Compounds for Extractability and Aqueous Stability by SW-846, Method 3510," Contract 68-03-3224, U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH. June 5, 1987.
- Espada, A., A. Rivera-Sagredo, et al. (1997). "New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*." Tetrahedron **53**(18): 6485-6492.
- Ethyl tiglate. Food and Chemical Toxicology **26**(4): 321-321.
- Ezra, D. and G. A. Strobel (2003). "Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*." Plant Science **165**(6): 1229-1238
- Fellous, S. and L. Salvaudon (2009). "How can your parasites become your allies?" Trends in Parasitology **25**(2): 62-66
- Fenselau C. Mass spectrometry for the characterization of microorganisms. ACS symposium series. Washington: ACS;1994. p.541.

- Fill, T. P. Estudos biossintéticos de amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum*, um endofítico de *Melia azedarach* (Meliaceae) / Taícia Pacheco Fill. – São Carlos : UFSCar, 2009.
- Fill, T.P., Relatório científico (bolsa FAPESP, 2005-2006, PN 2005/02955-1).
- Formo, M. (1954). "Ester reactions of fatty materials." Journal of the American Oil Chemists' Society **31**(11): 548-559.
- Freedman, B., R. Butterfield, et al. (1986). "Transesterification kinetics of soybean oil 1." Journal of the American Oil Chemists' Society **63**(10): 1375-1380
- Fukuda, H., A. Kondo, et al. (2001). "Biodiesel fuel production by transesterification of oils." Journal of Bioscience and Bioengineering **92**(5): 405-416.
- Gerpen, J. V. (2005). "Biodiesel processing and production." Fuel Processing Technology **86**(10): 1097-1107.
- Globo Reporter, 2010. *Óleo de laranja da terra ajuda a tratar úlcera e gastrite*. Disponível em <<http://g1.globo.com/globo-reporter/noticia/2010/05/oleo-de-laranja-da-terra-ajuda-tratar-ulcera-e-gastrite.html>>. Acessado: 28 maio.2010.
- Gouda, M., S. Omar, et al. (2008). "Single cell oil production by *Gordonia* sp. DG using agro-industrial wastes." World Journal of Microbiology and Biotechnology **24**(9): 1703-1711.
- Griffin, D.H. *Fungal Physiology*. New York: Wiley-Liss, 1994.
- Guerrini, A., G. Sacchetti, et al. (2009). "Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador." Environmental Toxicology and Pharmacology **27**(1): 39-48.
- Gunstone, F. D.; Harwood, J. L.; Padley, F. B. Marine oils: fish and whale oils. In: Gunstone, F.D. *The lipid handbook*. London: Chapman & Hall, 1994. cap.3, p.167-171.

- Hagen, T. and M. S. Korson (1999). "Quantification of glutaric acid by isotope dilution mass spectrometry for patients with glutaric acidemia type I: selected ion monitoring vs. selected ion storage." Clinica Chimica Acta **282**(1-2): 185-195
- Harbone, J. B., Introduction to ecological biochemistry. 3a Ed. London: Academic, 1988.
- Harborne, J. B. (1999). "The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants." Biochemical Systematics and Ecology **27**(4): 335-367
- Harper, J. K., A. M. Arif, et al. (2003). "Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities." Tetrahedron **59**(14): 2471-2476.
- Healy, P. C., A. Hocking, et al. (2004). "Xanthones from a microfungus of the genus *Xylaria*." Phytochemistry **65**(16): 2373-2378.
- Helwani, Z., M. R. Othman, et al. (2009). "Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review." Fuel Processing Technology **90**(12): 1502-1514.
- Illman, A. M., A. H. Scragg, et al. (2000). "Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium." Enzyme and Microbial Technology **27**(8): 631-635.
- Janssen, A. M.; Scheffer, J. J.; Boerheim-Svendsen, A. "Antimicrobials activities of essential oils". Pharm. Week, v. 9, p. 193-197, 1987.
- Jellinek, J. S. "α-Bisabolol: An anti-inflammatory agent for skin care products". Dragoco report, v. 31, p. 127-133, 1984.
- Keeling, C. I. and J. Bohlmann (2006). "Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens*." New Phytologist **170**(4): 657-675

- Kim, S., D.-S. Shin, et al. (2004). "Periconicins, Two New Fusicoccane Diterpenes Produced by an Endophytic Fungus Periconia sp. with Antibacterial Activity." Journal of Natural Products **67**(3): 448-450.
- Kinderlerer J. L. and B. Kellard. (1984). "Ketonic rancidity in coconut due to xerophilic fungi". Phytochemistry **23**:2847-2849
- Kobayashi, D. Y., Palumbo, J. D. .*Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In Microbiol Endophyte* (C. W. Bacon, J. F. White), Marcel Dekker, New York, 2000.
- Kováts, E. (1958). "Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone." Helvetica Chimica Acta **41**(7): 1915-1932.
- Kuate, J., Bessire J. M., Vilarem, G., Zollo, P. H. A. "Chemical composition and antidermatophitic properties of essential oils from leaves, flowers and fruits of Cupressus lusitanica Mill. from Cameroon". Journal of Ethnopharmacology, **103**, 160-165, 2006
- Lang, X. et al. "Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils". Bioresource Technology. Lincoln, NE, Vol. 80, p.53-62, 2001.
- Larsen, O. T. and J. C. Frisvad. (1999). "Characterization of volatile metabolites from 47 Penicillium taxa". Mycological Research **99**:1153-1166
- Lehninger. Principles of Biochemistry, Eds: Nelson D.L. & Cox, M.M., 3ª edição, Worth Publishers, 2000 - capítulo 2, Células.
- Li, J. Y. and G. A. Strobel (2001). "Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus Pestalotiopsis jesteri." Phytochemistry **57**(2): 261-265.
- Li, Q., W. Du, et al. (2008). "Perspectives of microbial oils for biodiesel production." Applied Microbiology and Biotechnology **80**(5): 749-756.

- Li, W., Y. Li, et al. (1992). "Studies on Macrocyclic Diterpenoids(VI)." *Synthetic Communications*: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry **22**(6): 817 - 822.
- Lin, Y., X. Wu, et al. (2001). "Five Unique Compounds: Xyloketal from Mangrove Fungus Xylaria sp. from the South China Sea Coast." The Journal of Organic Chemistry **66**(19): 6252-6256.
- Lobato, A. M.; Ribeiro, A.; Pinheiro, M. F. S.; Maia, J. G. S. "Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia". Acta Amazônica, v. 19, p. 355-363, 1989.
- Loizzo, M. R., F. Menichini, et al. (2009). "Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils." Food Chemistry **117**(1): 174-180.
- Luque de Castro, M. D., M. M. Jiménez-Carmona, et al. (1999). "Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants." TrAC Trends in Analytical Chemistry **18**(11): 708-716.
- Ma, F. and M. A. Hanna (1999). "Biodiesel production: a review." Bioresource Technology **70**(1): 1-15.
- 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
- Mandal, S. and A. Mitra "Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors." Physiological and Molecular Plant Pathology **71**(4-6): 201-209.
- Manly, S.P.; Padmanabha, R.; Lowe, S.E. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 190, HighThrough put Screening: Methods and Protocols;

- McDonald, L. A., L. R. Barbieri, et al. (2004). "07H239-A, a New Cytotoxic Eremophilane Sesquiterpene from the Marine-Derived Xylariaceous Fungus LL-07H239." Journal of Natural Products **67**(9): 1565-1567.
- Mclafferty, Fred W.; Turecek, Frantisek. Interpretation of mass spectra. 4 ed. Sausalito: University Science Books, c1993. 371 p. ISBN 0-935702-25-3.
- Meher, L. C., D. Vidya Sagar, et al. (2006). "Technical aspects of biodiesel production by transesterification--a review." Renewable and Sustainable Energy Reviews **10**(3): 248-268.
- Meneghetti, S., M. Meneghetti, et al. (2006). "Ethanolysis of castor and cottonseed oil: A systematic study using classical catalysts." Journal of the American Oil Chemists' Society **83**(9): 819-822.
- Meng, X., J. Yang, et al. (2009). "Biodiesel production from oleaginous microorganisms." Renewable Energy **34**(1): 1-5.
- Morandi, D. (1996). "Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control." Plant and Soil **185**(2): 241-251.
- Moretto, E.; Fett, R. Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos, São Paulo: Livraria Varela, 1998.
- Moyler, D. A. "Analysis of industrial essential oils. Some practical experiences of reporting integrators in industrial essential oil analysis"., Proc. Anal. Div. Chem.Soc, 1977, (10), 306-308.
- Murgu, M.; "Estudo de metodologias analíticas para quassinóides: espectrometria de massas e cromatografia." Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, Brasil,, 1998.
- Neirotti, E.; Moscatelli, M.; Tiscornia, S. Antimicrobial activity of limonene. Arq. Biol. Tecnol., v. 39, n. 2, p. 233-237, 1996.

- Oliveira, L. S., A. S. Franca, et al. (2006). "Proximate composition and fatty acids profile of green and roasted defective coffee beans." LWT - Food Science and Technology **39**(3): 235-239.
- Papanikolaou, S., M. Komaitis, et al. (2004). "Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media." Bioresource Technology **95**(3): 287-291
- Parisi, A., M. Piattelli, et al. (1993). "Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*." Phytochemistry **32**(4): 865-867
- Paschoalati, S. F., Stangarlin, J. R., Leite, B., Schan-Estrada, K.R. F.. "Mecanismos de patogenicidade em fungos". Revisão Anual de Patologia de Plantas, **6**, 1-47, 1998
- Pelczar, M.; Chan, E. C. S. Krieg, N. R. *Microbiologia*. Vol 1 e 2. 2a edição, São Paulo, Makron Books, 1997.
- Pereira, Grace Kelli. Aspectos químicos da interação de *Murraya paniculata* (Rutaceae) com microorganismos endofíticos. São Carlos: UFSCar, 2004. 208 p.
- Petrini, O.; Sieber, T. N.; Toti, L.; Viret, O. "Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi" Natural Toxins, **1**: 185-196, 1992.
- Pinzi, S., I. L. Garcia, et al. (2009). "The Ideal Vegetable Oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications." Energy & Fuels **23**(5): 2325-2341.
- Proudfoot, J. R. (2002). "Drugs, leads, and drug-likeness: an analysis of some recently launched drugs." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **12**(12): 1647-1650.
- Ramos, L.P.; Domingos, A.K.; Kucek, K.T.; Wilhelm, H.M. "Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil". Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento, v.31, p.28-37, 2003
- Ratledge, C. (2004). "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production." Biochimie **86**(11): 807-815.

- Raven, P.H.; RAY, F.E. Eichhorn, S.E. – *Biologia vegetal*. 5e, Guanabara Koogan S.A., 1992.
- Rodrigues, E.; Healey, P. L. *Biology and chemistry of plant trichomes*. New York: Plenum, 1984.
- Rodrigues, F. F. G., J. G. M. Costa, et al. (2009). "Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*." *Phytomedicine* **16**(11): 1052-1055.
- Rodrigues, M. V. N., F. G. R. Reyes, et al. (2007). "GC-MS determination of organochlorine pesticides in medicinal plants harvested in Brazil." *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18**: 135-142
- Rohr, J. (1997). "Biosynthesis of Taxol." *Angewandte Chemie International Edition in English* **36**(20): 2190-2195.
- Saikkonen, K., P. Wäli, et al. (2004). "Evolution of endophyte-plant symbioses." *Trends in Plant Science* **9**(6): 275-280.
- Santos, N. A. Propriedades termooxidativas e de fluxo de Biodiesel de Babaçu – *Orbignya Phalerata*. João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPB, 2008. Dissertação de mestrado, 159p.
- Santos, R. M. G. *Interação planta-microrganismos: o papel de metabólitos secundários na interação de Melia azedarach com fungos filamentosos*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 1999. Dissertação de mestrado.
- Schmeda-Hirschmann, G., E. Hormazabal, et al. (2005). "Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm <i>Prumnopitys andina</i> (Lleuque)." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**(1): 27-32
- Schulz, B., A.-K. Römmert, et al. (1999). "The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?" *Mycological Research* **103**(10): 1275-1283.

- Sides, A., K. Robards, et al. (2000). "Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods." TrAC Trends in Analytical Chemistry **19**(5): 322-329.
- Silva, Bianca Ferreira da . Estudo do potencial enzimático de micro-organismos endofíticos para a biotransformação de produtos naturais e análogos sintéticos. São Carlos: UFSCar, 2009. 187 p.
- Silva, Fernando Carvalho e LACERDA, Fabielly Barbosa. Estudo e otimização do processo de Biodiesel etílico, obtido pela transesterificação do óleo vegetal de Babaçu (*Orbignya Martiana*). Monografia graduação. Universidade Federal do Maranhão. 2004.
- Silva, J.A. Microrganismos patogênicos em carne de frango. Revista Higiene Alimentar – v.58, p1-4, 1998.
- Silverstein, R. M.; Webster, F. X. 1998. Spectrometric Identification of Organic Compounds, Wiley, New York, 6th ed.
- Siuzdak, G. 1996. Mass Spectrometry for Biotechnology. 1.ed. Academic Press. 161p.
- Skoog, D. A.; West, M.D.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. Fundamentos de Química Analítica, Ed. Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2006.
- Snyder, B. A. & Nicholson, R. L. "Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress". Science, **248**: 1637, 1990.
- Sousa, A. H.; Maracajá, P. B.; Silva, R. M. A.; Moura, A. M. N.; Andrade, W. G. Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, v. 5, n. 2, 2005.
- Souza, A. Q. L., Souza, A. L. A. Q., Astolfi Filho, S., Pinheiro, M. L.B., Sarquis, M. I., Pereira, J. O. *Atividade antimicrobiana de fungos isolados de plantas tóxicas da*

Amazônia: Palicourea longiflora (Aubl.) Rich e Strychnos cogens Bethan.. Acta Amazônia, 34:(2), 185-186, 2004

- Stierle, A., G. Strobel, et al. (1995). "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
- Stinson, M., D. Ezra, et al. (2003). "An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds." Plant Science **165**(4): 913-922.
- Stone, J. K., Bacon, C. W., White, J. F. .*An overview of endophytic microbes: endophytism defined.. In Microbial Endophytes* (C. W. Bacon & J. F. White, eds): 3.30. Marcel Dekker, New York, 2000.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. ."Natural products from endophytic microorganisms". Journal of Natural Products, **67**, 257-268, 2004.
- Suarez, P. A. Z.; Meneghetti, S. M. P.; Meneghetti, M. R.; Wolf, C. R. "Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica." Química Nova, **30**, 3, 667, 2007.
- 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
- Tan, R. X. and W. X. Zou (2001). "Endophytes: a rich source of functional metabolites." Natural Product Reports **18**(4): 448-459.
- Tansuwan, S., S. Pornpakakul, et al. (2007). "Antimalarial Benzoquinones from an Endophytic Fungus, *Xylaria* sp." Journal of Natural Products **70**(10): 1620-1623.
- Tavares, A. C., M. J. Gonçalves, et al. (2008). "Essential oil of *Daucus carota* subsp. *halophilus*: Composition, antifungal activity and cytotoxicity." Journal of Ethnopharmacology **119**(1): 129-134.
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C.L. *Microbiologia*. 8a edição, São Paulo, Artmed, 2006.

- Turbyville, T. J., E. M. K. Wijeratne, et al. (2006). "Search for Hsp90 Inhibitors with Potential Anticancer Activity: Isolation and SAR Studies of Radicol and Monocillin I from Two Plant-Associated Fungi of the Sonoran Desert1." Journal of Natural Products **69**(2): 178-184
- van Den Dool, H. and P. Dec. Kratz (1963). "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography." Journal of Chromatography A **11**: 463-471.
- Vetter, W. and S. Thurnhofer (2007). "Analysis of fatty acids by mass spectrometry in the selected ion monitoring mode." Lipid Technology **19**(8): 184-186
- Vicente, G., L. F. Bautista, et al. (2009). "Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus." Biochemical Engineering Journal **48**(1): 22-27.
- Vicente, G., M. Martínez, et al. (2004). "Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems." Bioresource Technology **92**(3): 297-305.
- Vicente, G., Martínez M., Araci J.. "Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems". Bioresource Technology, 2004; 92: 297-305.
- Watson, J. T. Introduction to Mass Spectrometry. Philadelphia. Lippincott – Raven, 1997, 496p
- Webster, J. *Introduction to fungi*. 2nd edition. Oxford, Cambridge University Press, 1989
- Wehrli, A. and E. Kováts (1959). "Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 3: Berechnung der Retentionsindices aliphatischer, alicyclischer und aromatischer Verbindungen." Helvetica Chimica Acta **42**(7): 2709-2736.
- WM Chen, S Laevens, TM Lee, T Coenye, P De Vos, M Mergeay, and P Vandamme "Ralstonia taiwanensis sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa

- species and sputum of a cystic fibrosis patient". Int J Syst Evol Microbiol **51**: 1729-1735.
- Wolken, W. A. M.; Tramper J.; Werf, M. J. "What can spores do for us?" TRENDS in Biotechnology, 21(8), 2003, 338-46
 - Worapong, J.; Strobel, G.A.; Ford, E.J.;Li, J.Y.;Baird, G.;Hess, W.M. Mycotaxon 2001, 79,67- 79.
 - Worapong,J.; Strobel, G.A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Baird, G.; Hess, W.M. Mycotaxon 2002, 81,463 475.
 - Xiaobo, Z., W. haiying, et al. (2006). "Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from Xylaria sp. 2508 using response surface methodology." Process Biochemistry **41**(2): 293-298.
 - Zamboni, S. Óleos Essenciais. Revista Brasileira de Química. XCV, v. 11, n. 575, p. 106-110, 1983.
 - Zhang, Y., H. Peng, et al. (2008). "Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles." Journal of Colloid and Interface Science **325**(2): 371-376.
 - Zhao, J. and K. Sakai (2003). "Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujaplicin biosynthesis in Cupressus lusitanica cell cultures." Journal of Experimental Botany **54**(383): 647-656.