

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTRATÉGIAS DE DESREPLICAÇÃO  
APLICADAS AO ESTUDO DA PLANTA  
*Alternanthera brasiliana* E DOS FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS**

**MARÍLIA ALMEIDA TRAPP\***

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

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

\* BOLSISTA FAPESP

**SÃO CARLOS-SP  
2011**

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

T774ed

Trapp, Marília Almeida.

Estratégias de desreplicação aplicadas ao estudo da planta *Alternanthera brasiliana* e dos fungos endofíticos associados / Marília Almeida Trapp. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

172 p.

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

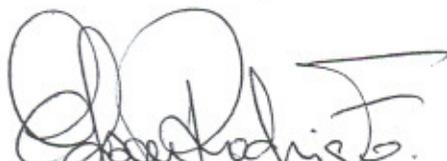
1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Microorganismos endofíticos. 4. Espectrometria de massas. 5. Plantas medicinais. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

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

---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata **Marília Almeida Trapp**, realizada em 24 de fevereiro de 2011:*



---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



---

Profa. Dra. Maria Fatima das G. E. da Silva



---

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr Edson Rodrigues Filho, pela orientação, por toda confiança, respeito, aprendizado e amizade nestes excelentes anos da minha vida. OBRIGADA!

À Profa Dra Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e ao Prof Dr Luiz Alberto Beraldo de Moraes, pela participação na banca.

Agradeço ao meu PAI, que me acompanha e me guia de onde ele estiver, obrigada por nunca me abandonar!!!

À minha mãe, minha avó e meus irmãos, por me ajudarem e me apoiarem em tudo por todos os anos da minha vida.

Ao Gezimar, por esses maravilhosos anos de convivência, conquistas e muitas alegrias. TE AMO MUITO! E Obrigada pelas frutíferas discussões científicas.

Aos meus grandes amigos Thiago, Fábio, Gustavo e Taciane por pela amizade.

Ao colegas do LabBioMMi, Diego, Thaís, Taícia, Luciana, Bianca, Lívia, Zeh, Thaísa, Enzo, Carol, Helo's, Monize, Nat, Gabriel, Diana, Adriana, Liliam, pela contribuição científica, e pelos divertidíssimos *happy hours*.

Aos alunos do CLAE, PN, Síntese e Ressonância pela colaboração. Em especial ao doutorando Eduardo Sanches pela ajuda com as análises de LC-NMR.

Aos professores Profa Dra Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Profa. Dra. Quezia Bezzera Cass e Prof Dr Timothy Brocksom pelo aprendizado durante as disciplinas de Pós Graduação.

.Aos técnicos, Luciana, Doraí, Chisler, Paula e Paulo pelo diversos auxílios durante o desenvolvimento deste projeto.

À empresa ThermoFisher Scientific pelas análises por espectrometria de massas de alta resolução.

A horta municipal de São Carlos por ceder as amostras da planta *Alternanthera* brasiliana.

Aos demais professores, corpo técnico e administrativo do departamento de química da Universidade Federal de São Carlos

A todos que contribuíram com este trabalho.

A FAPESP pela bolsa de mestrado concedida e pelo apoio financeiro nos projetos do grupo.

A CAPES, CNPQ e FINEP pelo apoio financeiro a instituição.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>BDA</b>	Batata Dextrose Ágar
<b>DC</b>	Corrente Continua
<b>dd</b>	duplo dubleto
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionização por <i>Electrospray</i> )
<b>g</b>	Gramas
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
<b>HRMS</b>	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>HPLC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry</i>
<b>HPLC-NMR</b>	<i>Liquid Chromatography coupled to Nuclear Magnetic Ressonance</i>
<b>HPLC-SPE-NMR</b>	<i>Liquid Chromatography coupled to Solid Phase Extraction and Nuclear Magnetic Ressonance</i>
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry</i>
<b>LC-PDA</b>	<i>Liquid Chromatography coupled Photodiode Array Detector</i>
<b>m</b>	Multiplete
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>MS/MS</b>	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<b><i>m/z</i></b>	Relação massa/ carga
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Ressonance</i>

<b>ODS</b>	Octadecilsilano (C-18)
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Chromatogram</i>
<b>Hz</b>	Hertz
<b><math>\delta</math></b>	Deslocamento químico em partes por milhão
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento em Hertz
<b>s</b>	Singleto
<b>t</b>	Tripleto
<b>Tr</b>	Tempo de retenção
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visível
<b>PDA</b>	<i>Photodiode Array</i>
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Metabólitos isolados da <i>A. philoxeroide</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2: Foto ilustrativa de <i>Alternanthera brasiliana</i> no local da colheita.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3: Flavonóis isolados de <i>Alternanthera brasiliana</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 4: Folhas de <i>Alternanthera brasiliana</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 5: Reação de oxidação da resazurina à resorufina .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 6: Teste de antibiose do extrato do caule de <i>Alternanthera</i> e das frações obtidas pela partição líquido-líquido.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 7: Resultado do teste de antibiose para as frações do caule de <i>Alternanthera brasiliana</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 8: Formas de apresentação dos dados de LC-MS. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 9: Escala de cor que representa a intensidade relativa .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 10: Mapa da análise de LC-MS no modo negativo da amostra P<sub>d</sub>_Cau.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 11: Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra P<sub>d</sub>_Cau.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 12: Mapa da análise de LC-MS no modo negativo da amostra P<sub>m</sub>_Cau.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 13: Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra P<sub>m</sub>_Cau.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 14: Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt_Cau_F2 .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 15: Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt_Cau_F3 .....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16: Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt_Cau_F4 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 17: Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt_Cau_F5 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 18: Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F2. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 19: Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F3. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 20: da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F4.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 21: Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F5. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 22: Mapa da análise por LC-PDA Alt_Cau_F2.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 23: Mapa da análise por LC-MS PDA Alt_Cau_F3.....</b>	<b>61</b>

<b>Figura 24: Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F4. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 25: Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F5. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 26: Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F3 (ampliação) .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 27: Análise da fração Alt_Cau_F3 por LC-UV, com <math>\lambda</math> 280nm.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 28: Cromatogramas das frações obtidas a partir de HPLC preparativo .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 29: Mapa a análise de LC-MS no modo negativo da amostra Alt_Cau_F3. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 30: Mapa a análise de LC-MS no modo negativo da amostra Alt_Cau_F3_SP5.</b>	<b>70</b>
<b>Figura 31: Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F3. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 32: Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra Alt_Cau_F3_SP5. ....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 33: Cromatogramas de íons selecionados na amostra Alt_Cau_F3_SP5. Modo negativo <math>m/z</math> :a) 295, c)293 e e) 297 e modo positivo <math>m/z</math> : b)317 c)319 e f)321 .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 34: Espectros de íons produtos no modo negativo dos íon <math>m/z</math>: a) 293, b) 295 e c) 297 .....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 35: Espectros de íons produtos no modo negativo de <math>m/z</math> 295 em diferentes regiões da banda cromatográfica: a) 21,7; b) 22,0 e c) 22,6 minutos.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 36: Espectros de íons produtos no modo negativo de <math>m/z</math> 293 em diferentes regiões da banda cromatográfica: a) 21,0; b) 21,4 e c) 21,8 minutos.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 37: Cromatogramas de íons fragmentos selecionados de <math>m/z</math> 293.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 38: Cromatogramas de .a) PDA e Íons selecionados <math>m/z</math> b) 293; c) 295 e d) 297 para a fraca Alt_Cau_F3_SP5. ....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 39: Cromatogramas a) da análise da LC-UV em 280 da amostra Alt_Cau_F3; b) ampliação da região de interesse.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 40: Espectros de hidrogênio para o Branco, Compostos 3 e Composto 1.....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 41: Espectro de hidrogênio para o Composto 1.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 42: Ampliação do espectro de hidrogênio do Composto 1 de 0.7 a 2,7 Hz. ....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 43: Acoplamentos dos hidrogênios no Composto 1. ....</b>	<b>83</b>

Figura 44: Espectro de íons produto para $m/z$ 293, com tempo de retenção em 13,6 minutos. ....	84
Figura 45: Rearranjo de McLafferty para metilcetonas.....	84
Figura 46: Rearranjo de McLafferty para compostos carboxilados. ....	84
Figura 47: Cromatograma de íons selecionados para $m/z$ 293.....	86
Figura 48: Espectro de íons produto de $m/z$ 293. Referente às bandas a) 12,2 e b) 12,5, c) 17,1 e d) 17,4 minutos .....	87
Figura 49: Espectros de UV dos isômeros com $m/z$ 293. ....	88
Figura 50: Estruturas químicas dos ácidos graxos oxidados e insaturados. ....	88
Figura 51: Espectro de hidrogênio para o composto 3.....	89
Figura 52: Proposta de mecanismo de fragmentação para os isômeros com $m/z$ 293.....	92
Figura 53: Proposta de mecanismo de fragmentação para 9-KODE. ....	94
Figura 54: Cromatograma de íons selecionados para $m/z$ 295.....	95
Figura 55: Espectro de íons produto de $m/z$ 295. Referente às bandas a) 12,2 e b) 12,5, c) 17,1 e d) 17,4 minutos .....	96
Figura 56: Espectros de UV dos isômeros com $m/z$ 293. ....	96
Figura 57: Proposta para a estrutura e mecanismo de fragmentação dos isômeros com $m/z$ 295 com tempo de retenção a) 12,1; b) 12,4 e c) 17,1 minutos.....	98
Figura 58: Espectro de íons produto de $m/z$ 297. Referente às bandas a) 14,7 e b) 15,0 minutos .....	99
Figura 59: Proposta para as estruturas dos isômeros com $m/z$ 297 referentes às bandas cromatográficas em a) 14,7 e b) 15,0 minutos .....	100
Figura 60: Biossíntese dos ceto e hidroxí ácidos graxos .....	101
Figura 61: Fotos do isolamento dos micro-organismos endofíticos presentes na folha de <i>A. brasiliana</i> .....	102
Figura 62: Fotos do isolamento dos micro-organismos endofíticos presentes no caule de <i>A. brasiliana</i> .....	102
Figura 63: Fotos das placas com os micro-organismos no processo de isolamento.....	106
Figura 64: Fotos das placas com os micro-organismos no processo de isolamento.....	106

<b>Figura 65: Fotos das placas com os micro-organismos no processo de isolamento.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 66: Fotos de algumas cepas de micro-organismos isolados de <i>Alternanthera</i>.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 67: Fotos de algumas cepas de micro-organismos isolados de <i>Alternanthera</i>.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 68: Cepas selecionadas para estudo químico e biológico.....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 69: Cultivo dos micro-organismos em meio líquido .....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 70: Cultivo dos micro-organismos em meio sólido .....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 71: Nomenclatura utilizada para identificação das partições dos extratos dos fungos em meio sólido.....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 72: Teste de antibiose das frações do extrato do fungo FE. ....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 73: Mapa da análise de LC-MS do branco de arroz. ....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 74: Mapa da análise de LC-MS do extrato do fungo FE.....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 75: Mapa da fração FE_P2.....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 76: Mapa da fração FE_P3.....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 77: Mapa da amostra FE_P4.....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 78: Mapa da amostra FE_P5.....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 79: Cromatogramas de íon selecionado <math>m/z</math> 807 para as amostras: a) FE_P2; b) FE_P3; c) FE_P4 e d) FE_P5 .....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 80: Espectro de massas referente a banda em 16 minutos da amostra FE_P2 ..</b>	<b>120</b>
<b>Figura 81: Espectro de massas referente a banda em 16 minutos da amostra FE_P2 otimizado para <math>m/z</math> 784.....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 82: Espectro de íon produto dos íons a) <math>m/z</math> 806 e b) <math>m/z</math> 784. ....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 83: Espectro de hidrogênio do composto 1. ....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 84: Espectro de COSY para composto 1.....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 85: Espectro de HMBC para composto 1. ....</b>	<b>124</b>
<b>Figura 86: Espectro de HSQC para o composto 1.....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 87: Ampliação do espectro de HMBC do composto 1. ....</b>	<b>126</b>
<b>Figura 88: Correlações dos experimentos de NMR 2D.....</b>	<b>127</b>

<b>Figura 89: Estrutura química de beauvericina .....</b>	<b>128</b>
<b>Figura 90: Estruturas químicas das beauvericinas encontradas no extrato do fungo FE. .....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 91: Espectro de íons produto para <math>m/z</math> 784,42 (<math>[M+H]^+</math>) referente a Beauvericina. .....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 92: Espectro de íons produto para <math>m/z</math> 770,40 (<math>[M+H]^+</math>) referente a Beauvericina D.....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 93: Espectro de íons produto para <math>m/z</math> 798,43 (<math>[M+H]^+</math>) referente a Beauvericina F. ....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 94: Espectro de íons produto para <math>m/z</math> 756,39 (<math>[M+H]^+</math>) referente o Composto 6. .....</b>	<b>135</b>
<b>Figura 95: Espectro de íons produto do íon para <math>m/z</math> 806,40 (<math>[M+Na]^+</math>) da Beauvericina. .....</b>	<b>136</b>
<b>Figura 96: Espectro de íons produto do íon para <math>m/z</math> 792,38 (<math>[M+Na]^+</math>) da Beauvericina D.....</b>	<b>136</b>
<b>Figura 97: Espectro de íons produto do íon para <math>m/z</math> 758,40 (<math>[M+Na]^+</math>) da Beauvericina E. ....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 98: Espectro de íons produto do íon para <math>m/z</math> 820,42 (<math>[M+Na]^+</math>) da Beauvericina F. ....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 99: Espectro de íons produto do íon para <math>m/z</math> 758,37( <math>[M+Na]^+</math>) do Composto 6. .....</b>	<b>138</b>
<b>Figura 100:Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos .....</b>	<b>139</b>
<b>Figura 101: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos .....</b>	<b>140</b>
<b>Figura 102: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos .....</b>	<b>141</b>
<b>Figura 103: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos .....</b>	<b>142</b>
<b>Figura 104: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos .....</b>	<b>143</b>

<b>Figura 105: Estruturas reprodutivas a) do fungo FE, b) ampliação do item a e c) de diferentes espécies do gênero <i>Fusarium</i>.<sup>45</sup> .....</b>	<b>145</b>
<b>Figura 106: Espectros a) Scan ESI no modo positivo da beauvericina; b) Íons produto de 806 [M+Na]+.....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 107: Gráfico de resíduos e curva de calibração para beauvericina. ....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 108: Cromatograma de SRM para as três transições monitoradas.....</b>	<b>148</b>
<b>Figura 109: Cromatogramas de SRM da análise do extrato de <i>Alternanthera brasiliana</i>. ....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 110: Mapa da análise de LC-MS do extrato do fungo F11 .....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 111: Foto do fungo F11.....</b>	<b>151</b>
<b>Figura 112: Estruturas químicas de alguns compostos da classe das citocalasinas. ....</b>	<b>152</b>
<b>Figura 113: Análise do extrato do fungo F11: a) Cromatograma de íons selecionados <math>m/z</math> 530; b) Espectro de massas da banda em 10.75 minutos.....</b>	<b>153</b>
<b>Figura 114: Análise de uma amostra de citocalasina: a) Cromatograma de íons totais e b) Espectro de massas referente a banda em 10,7 minutos. ....</b>	<b>154</b>
<b>Figura 115: Espectro de íons produto de <math>m/z</math> 530 a) para o padrão de citocalasina D; b). para o extrato do fungo FE .....</b>	<b>154</b>
<b>Figura 116: Cepas de micro-organismos isolados de <i>Alternanthera brasiliana</i>. ....</b>	<b>155</b>
<b>Figura 117: Mapa de LC-PDA da análise do extrato das folhas de <i>Alternanthera</i> .....</b>	<b>156</b>
<b>Figura 118: Espectros de ultravioleta referente às bandas em: a) 9,9; b) 10,53; b) 11,8; c) 12,1; d) 13,0 e f)14,9 minutos .....</b>	<b>157</b>
<b>Figura 119: Estrutura química genérica para betalaínas .....</b>	<b>157</b>
<b>Figura 120: Espectro de ultravioleta das bandas em a) ; b) e c).....</b>	<b>158</b>
<b>Figura 121: Espectro de ultravioleta do ácido cafeico, extraído de WANG (2008).....</b>	<b>158</b>
<b>Figura 122: Cromatogramas de a) Íons totais, b) Íons selecionados para <math>m/z</math> 312 e c) Íons selecionados para <math>m/z</math> 342.....</b>	<b>159</b>
<b>Figura 123: Espectro de massas referente às bandas cromatográfica a) 16,3; b) 18,5. Espectro de íon produto de 312 para as bandas c) 16,3 ; e d)16,5 .....</b>	<b>160</b>

**Figura 124: Espectro de massas referente às bandas cromatográfica a) 17,2; b) 19,4 minutos. Espectro de íon produto de 342 para as bandas c) 17,2; e d)19,4 minutos .....161**

**Figura 125: Estrutura química dos compostos presentes no extrato da planta *Alternanthera brasiliana*. .....162**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1: Solventes utilizados no fracionamento dos extratos da planta. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 2: Gradiente utilizado nas análises de LC-MS, das frações do caule da planta...26</b>	<b>26</b>
<b>Tabela 3: Composição dos meios de cultura utilizados no crescimento dos micro-organismos .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 4: Gradiente utilizado nas análises dos extratos e frações do fungos .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 5: Frações obtidas dos extratos do caule e raiz da <i>Alternanthera brasiliana</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabela 6: Resumo da atividade antibiótica das frações do caule e da raiz na concentração de 0,500 ug/mL.....</b>	<b>44</b>
<b>Tabela 7: Resumo dos íons presentes na região 1 do mapa da análise no modo positivo para a amostra Alt_Cau_F3.....</b>	<b>64</b>
<b>Tabela 8: Valores de volume e massas das frações obtidas pelo fracionamento em HPLC Semi-preparativo e extração em fase sólida .....</b>	<b>67</b>
<b>Tabela 9: Concentração mínima inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da amostra Alt_Cau_F3 .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 10: Relação massa carga nos modos negativo e positivo e massa do compostos. .73</b>	<b>73</b>
<b>Tabela 11: Comparação de alguns sinais no espectro de <sup>1</sup>H NMR para o Composto 1 e dados da literatura. ....</b>	<b>85</b>
<b>Tabela 12: Resumo dos íons produto de para os isômeros com <i>m/z</i> 293.....</b>	<b>90</b>
<b>Tabela 13: Massa em gramas dos extratos fúngicos em meio líquido e meio sólido. ....</b>	<b>111</b>
<b>Tabela 14: Resumo dos dados do teste de antibiose. ....</b>	<b>112</b>
<b>Tabela 15: Resumo dos dados de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a Beauvericina.....</b>	<b>130</b>
<b>Tabela 16: Resumo das outras beauvericinas encontradas no extrato de meio líquido do fungo FE.....</b>	<b>131</b>
<b>Tabela 17: Principais fragmentos dos depsipeptideos detectados no extrato de meio líquido do fungo FE.....</b>	<b>144</b>

**LISTA DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1: Etapas envolvidas no processo de desreplicação .....</b>	<b>8</b>
<b>Esquema 2: Proposta para identificação de compostos bioativos utilizando estratégia de desreplicação. ....</b>	<b>10</b>
<b>Esquema 3: Esquema de partição dos extratos da planta.....</b>	<b>23</b>
<b>Esquema 4: Esquema para fracionamento utilizando HPLC semi-preparativo.....</b>	<b>27</b>
<b>Esquema 5: Extração dos compostos produzidos pelos micro-organismos em meio líquido.....</b>	<b>33</b>
<b>Esquema 6: Esquema de partição dos extratos fúngicos.....</b>	<b>35</b>

**RESUMO**

“ESTRATÉGIAS DE DESREPLICAÇÃO APLICADAS AO ESTUDO DA PLANTA *Alternanthera brasiliana* E DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS”. A planta *Alternanthera brasiliana* é popularmente conhecida por suas diversas atividades biológicas. Assim, o presente trabalho pretende contribuir com o uso de estratégias de desreplicação a fim de estabelecer uma correlação entre os compostos químicos presentes nesta planta e a atividade antibiótica associada a ela. Além disso, essas estratégias de desreplicação foram utilizadas para o estudo dos micro-organismos endofíticos associados a esta planta, uma vez que os metabólitos secundários presentes nos tecidos das plantas muitas vezes são resultado da interação desta planta com diversos fatores presentes em seu *habitat*, e dentre eles a interação com micro-organismos merece destaque. Foram isoladas 50 cepas de micro-organismos endofíticos associados à planta *Alternanthera brasiliana*. O uso de abordagens de *High Throughput Screening* aliadas a técnicas analíticas como LC-PDA-MS, LC-PDA-MS/MS, LC-SPE-NMR e ensaios de antibiose permitiram a identificação dos compostos antibióticos presentes no caule de *A. brasiliana*. Esses compostos pertencem a classe das oxilipinas, dentre os quais se destacam o 13-Z,E-KODE, 13-E,E-KODE, 9-E,Z-KODE e 9-E,E-KODE. Também foram identificados compostos da classe dos depsipeptídeos nos extratos de uma cepa do gênero *Fusarium*, isolada como endofítico de *A. brasiliana*. Dentre os depsipeptídeos encontrados, a beauvericina estava presente em grande quantidade no extrato deste micro-organismo. Este composto, conhecido por suas atividades antibiótica e inseticida, foi encontrado também no extrato da planta, sugerindo que o micro-organismo endofítico poderia estar produzindo compostos desta classe no interior dos tecidos da planta, onde ele está alojado.

**ABSTRACT**

“STUDIES TOWARDS THE DEREPLICATION OF ANTIBIOTIC CONSTITUENTS IN *ALTERNANTHERA BRASILIANA* AND ASSOCIATED MICROORGANISMS.” *Alternanthera brasiliana* is widely used by Brazilian people as a folk medicine for the treatment of numerous diseases. However, little is known about its chemical composition and the microorganisms that live in association with it. This work proposed the use of dereplication strategies to establish a correlation between chemical compounds present in the plant and the antibiotic activity associated with it. These strategies were also used for study endophytic micro-organisms associated with this plant, since the metabolites present in plant tissues are often result of interaction between plants and different factors present in their habitat, such as micro-organisms. 50 strains of endophytic micro-organisms associated to *Alternanthera brasiliana* were isolated. High-Throughput Screening strategies, which involved analytical techniques as LC-PDA-MS, LC-PDA-MS/MS, LC-SPE-NMR and antibiosis assays allowed identification of antibiotic compounds present in the *A. brasiliana* stems. These compounds are member of oxylipins group, among which we highlight the 13-Z,E-KODE, 13-E,E-KODE, 9-E,Z-KODE and 9-E,E-KODE. Furthermore, were identified some depsipeptides compounds produced by a strain of *Fusarium* fungus, isolated as endophyte of *A. brasiliana*. Beauvericin, which is one of these compounds, is known for its antibiotic and insecticide activities. This compound was also found in the plant extracts, suggesting that endophyte microorganism could play a role in producing antibiotic compounds inside plant tissues.

**Sumário**

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. O gênero <i>Alternanthera</i>.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1. <i>Alternanthera brasiliana</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Desreplicação .....</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Materiais e métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1.1. Equipamentos .....	19
3.1.2. Solventes e reagentes .....	20
3.1.3. Materiais.....	21
3.1.3.1. Microbiológicos.....	21
3.1.3.2. Materiais Cromatograficos.....	21
<b>3.2. Procedimento experimental.....</b>	<b>22</b>
3.2.1. Estudo químico e biológico da planta <i>A. brasiliana</i> .....	22
3.2.1.1. Extração dos compostos da planta.....	22
3.2.1.2. Partição e análise dos extratos da planta .....	22
3.2.1.3. Teste de antibiose dos extratos e frações da planta.....	24
3.2.1.4. Análise dos extratos e frações da planta por LC-PDA-MS.....	26
3.2.1.5. Fracionamento das frações ativas da planta.....	26
3.2.1.6. Concentração das frações obtidas por HPLC semi-preparativo ...	27
3.2.1.7. Análise de compostos alvo por LC-SPE-NMR .....	28
3.2.2. Micro-organismos.....	29
3.2.2.1. Isolamento dos micro-organismos.....	29

3.2.2.2. Cultivo dos micro-organismos .....	31
3.2.2.3. Extração dos compostos produzidos pelos micro-organismos .....	32
3.2.2.4. Partição dos extratos dos micro-organismos. ....	34
3.2.2.5. Análise dos extratos por LC-PDA-MS. ....	35
3.2.2.6. Teste de antibiose dos extratos e frações dos micro-organismos endofíticos .....	36
3.2.2.7. Isolamento de compostos presentes nos extratos fungicos por HPLC semi-preparativo. ....	36
3.2.2.8. Análise por NMR 1D e 2D do composto isolado .....	37
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Avaliação biológica e química da planta.....</b>	<b>39</b>
4.1.1. Partição dos extratos da planta .....	39
4.1.2. Análise da atividade biológica dos extratos e das frações da planta	41
4.1.3. Análise das partições do extrato da planta por LC-MS.....	45
4.1.3.1. Análise por LC-MS das frações obtidas pela partição líquido-líquido dos extratos da planta .....	48
4.1.3.2. Análise por LC-MS das frações obtidas pelo fracionamento dos extratos em coluna de placa sinterizada .....	52
4.1.4. Fracionamento da fração Alt_Cau_F3, análise química e biológica das novas frações obtidas .....	65
4.1.4.1. Fracionamento da fração Alt_Cau_F3.....	65
4.1.4.2. Avaliação da atividade antibiótica das frações da amostra Alt_Cau_F3 obtidas por HPLC semi-preparativo .....	67
4.1.4.3. Análise por LC-PDA-MS das frações da amostra Alt_Cau_F3 ...	68

4.1.4.4. Estudo de fragmentação dos compostos da fração Alt_Cau_F3_SP5.....	74
4.1.4.5. Separação dos isômeros .....	77
4.1.4.6. Estudo por LC-SPE-NMR dos ácidos graxos.....	78
<b>4.2. Avaliação química a biológica dos micro-organismos endofíticos</b>	
<b>104</b>	
4.2.1. Isolamento dos micro-organismos endofíticos .....	104
4.2.2. Cultivo dos micro-organismos endofíticos e extração dos metabólitos secundários.....	109
4.2.3. Isolamento dos micro-organismos endofíticos .....	111
4.2.4. Teste de atividade antibiótica.....	112
4.2.5. Análise por LC-PDA-MS.....	113
4.2.6. Análise por NMR 1D e 2D do composto isolado de FE_P2 .....	122
4.2.7. Identificação morfológica do fungo FE.....	144
4.2.8. Análise de beauvericina nos extratos da planta .....	146
<b>4.3. Identificação de outros compostos presentes nos extratos da planta e do fungo F11 .....</b>	<b>149</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>164</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>167</b>

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1.O gênero *Alternanthera*

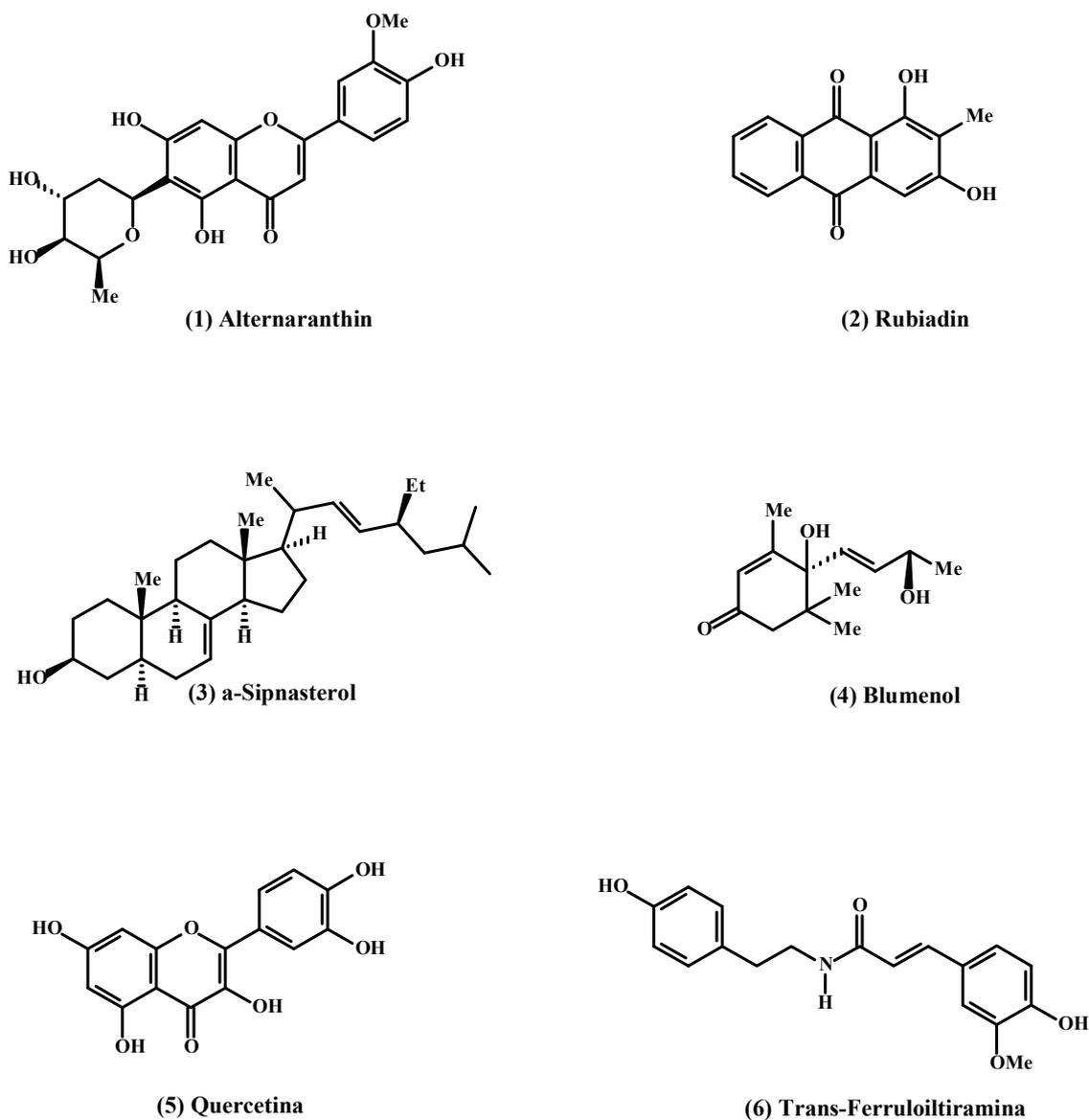
As plantas do gênero *Alternanthera* pertencem a família Amaranthaceae, que compreende a aproximadamente 65 gêneros e 1000 espécies de plantas perenes e anuais, e muitas delas encontram-se em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. Este gênero inclui 80 espécies, das quais 30 ocorrem no Brasil.<sup>1,2</sup>

Pesquisas anteriores demonstraram que algumas espécies deste gênero possuem atividades biológicas, comprovando suas utilizações na medicina popular. Os extratos etanólico e hexânico de *Alternanthera maritima*, por exemplo, apresentaram atividade antimicrobiana principalmente contra bactérias gram-positivas e fungos filamentosos.<sup>3</sup> Já o extrato etanólico da espécie *A. pungens* apresentou atividade diurética<sup>4</sup>, evidenciando a ampla faixa de ação biológica dos constituintes químicos das plantas deste gênero.

Outras atividades biológicas já foram demonstradas para este gênero. Dentre elas pode-se destacar a atividade antioxidante do extrato etanólico de *A. tenella*<sup>5</sup>, atividade antidiarréica do extrato de *A. repens*<sup>6</sup>, e atividade contra hantavirus do extrato que *A. philoxeroide*<sup>7</sup>. Além disso, um dos resultados mais promissores obtidos com o extrato de *A. tenella* esta relacionado à sua capacidade de inibir o desenvolvimento de células tumorais além de proporcionar um aumento do tempo de vida de ratos portadores desse tipo de célula.<sup>8</sup>

As substâncias produzidas por espécies de *Alternanthera*, também têm sido alvo de várias pesquisas. Este gênero tem se mostrado como rica fonte de metabólitos secundários como anthraquinonas,<sup>9</sup>

betaínas,<sup>10</sup> esteróides,<sup>11</sup> flavonóides,<sup>12, 13</sup> saponinas<sup>14</sup> e terpenos<sup>15</sup>. Alguns dos compostos pertencentes a essas classes química são mostrados na **Figura 1**, como o alternanthin (1), isolado de *A. philoxeroide* e que apresenta atividade antitumoral, além do Rubiadin (2),  $\alpha$ -sipnasterol (3), blumenol (4), quercetina (5), e o *trans*-ferruloiltiramina (6).<sup>12, 16</sup>



**Figura 1:** Metabólitos isolados da *A. philoxeroide*.

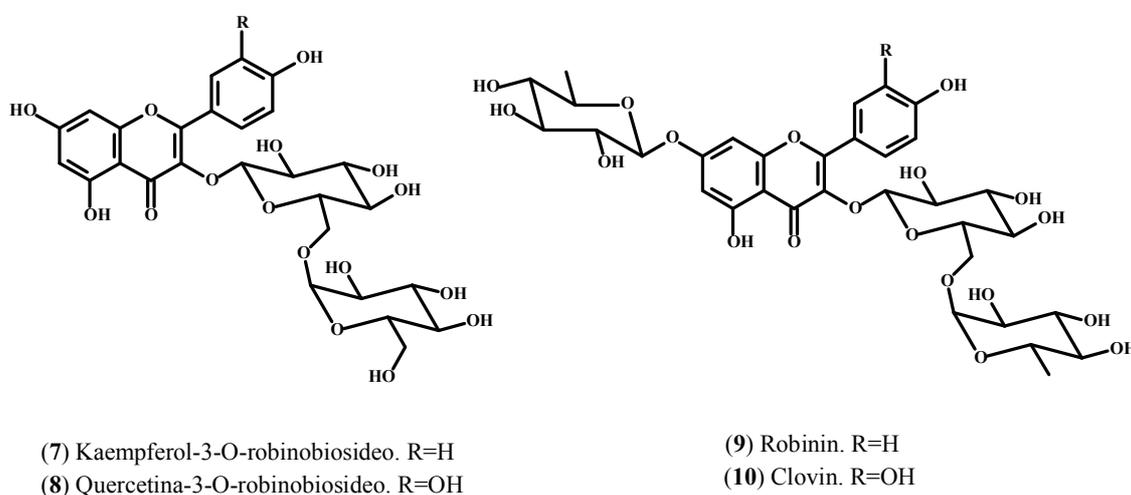
### 1.1.1. *Alternanthera brasiliana*

Dentre todas as espécies de *Alternanthera*, há uma que se destaca por seus diversos usos populares no Brasil: a *Alternanthera brasiliana* (**Figura 2**). Ela é uma planta herbácea de ocorrência em ecossistemas com fisionomias campestres<sup>17</sup>, conhecida popularmente no Brasil como “**penicilina**” e “**terramicina**”. Ela tem sido utilizada por suas propriedades analgésica e antiinflamatória, na cura de cistite, dores de cabeça, estômago, febre, gripes, resfriados, como expectorante e cicatrizante.<sup>18, 19</sup> Quanto aos estudos farmacológicos envolvendo esta planta, foram relatadas atividades analgésica<sup>20</sup>, antiinflamatória,<sup>21</sup> antiproliferativa de linfócitos<sup>22</sup> e a atividade antibiótica semelhante ao cloridrato de tetraciclina, um poderoso antibiótico amplamente comercializado<sup>23</sup>. A *A. brasiliana* apresenta também atividade na síntese do DNA de células infectadas por HIV, causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)<sup>24</sup>. Assim aparentemente sua ação biológica justifica; os diversos nomes populares atribuídos a essa planta e que fazem alusão a medicamentos antibióticos



**Figura 2:** Foto ilustrativa de *Alternanthera brasiliana* no local da colheita.

Entretanto apesar dos diversos usos na medicina popular, e dos vários estudos sobre suas atividades farmacológicas, pouco é conhecido sobre os metabólitos secundários produzidos por essa espécie. Em buscas bibliográficas realizadas recentemente nas bases de dados *SciFinder Scholar* e *ScienceDirect*, poucos artigos relacionados a este tema foram encontrados. O maior destaque é dado aos flavonóides<sup>22</sup>, isolados por Brochado et al, e que são inéditos para o gênero, dentre eles o Kaempferol-3-O-robinobiosídeo (7), Quercetina-3-O-robinobiosídeo (8), robinin (9) e clovin (10), mostrados na **Figura 3**.<sup>22</sup>



**Figura 3:** Flavonóis isolados de *Alternanthera brasiliana*

Além disso, muitas vezes os compostos biologicamente ativos presentes nos tecidos das plantas devem ser vistos como resultado da interação destas fontes com todo o ambiente físico, químico e biológico em que elas estão inseridas. Por exemplo, os compostos encontrados em tecidos de planta não são resultado apenas do metabolismo desta planta isoladamente, mas também de diversos fatores bióticos e abióticos, como condições climáticas, estresse e interações com diversos organismos presentes em seu *habitat*.<sup>25</sup> Dentre estas interações, pode-se destacar aquelas envolvendo os micro-organismos, que podem influenciar bastante

no metabolismo das plantas. Alguns autores, inclusive, reportam que os micro-organismos tiveram um papel importante até mesmo para a adaptação das plantas no ambiente terrestre. Estes micro-organismos estão presentes no solo, no ar e nos tecidos da própria planta, alojando-se na superfície (epifíticos) ou no interior dos mesmos (endofíticos), e podem estabelecer uma relação patogênica ou simbiótica com a planta hospedeira.<sup>26</sup>

Em relação à presença de micro-organismos endofíticos nas plantas do gênero *Alternanthera*, não foram encontrados quaisquer registros, segundo recente pesquisa realizada nas mesmas bases de dados citadas anteriormente. Existem apenas relatos do isolamento de alguns micro-organismos epifíticos em plantas sintomáticas deste gênero. Embora este seja um gênero que aparentemente possui certa resistência a patógenos, há relatos de cepas de *Fusarium* sp. ou *Nimbya alternantherae*, isolados como patógenos de *Alternanthera philoxeroide* e utilizados como controladores biológicos desta espécie<sup>27, 28</sup>.

Assim, a ausência de informações sobre micro-organismos endofíticos isolados de plantas do gênero *Alternanthera*, em especial da espécie *A. brasiliana*. Bem como o pequeno número de trabalhos com relação a composição química desta planta foram os motivos que nos levaram a propor este projeto de pesquisa. Entretanto, ao invés de se utilizar técnicas clássicas de isolamento e identificação de compostos químicos, a abordagem aqui apresentada adotou estratégias de desreplicação para estas análises, o que pode facilitar bastante a identificação de metabólitos produzidos tanto pela planta quanto pelos micro-organismos isolados desta, além de possibilitar a compreensão da origem da atividade biológica da planta. Em seguida serão apresentadas algumas discussões envolvendo estratégias de desreplicação.

## 1.2.Desrepliação

Segundo Cordell e Shin, o processo de desrepliação é a primeira etapa na descoberta de novos medicamentos, e está focado na rápida identificação de compostos biologicamente ativos a partir de fontes naturais<sup>29</sup>. Assim, esse processo é caracterizado pelo conhecimento prévio da amostra tanto do ponto de vista químico, como biológico, antes dos processos clássicos de isolamento e identificação de compostos. Isso permite a análise de um grande número de amostras em um tempo considerado relativamente pequeno quando comparado a outras técnicas de *screening*.<sup>30</sup> Essa estratégia é importante para evitar esforços, desnecessários no processo de isolamento de substâncias, que ao final do estudo, podem não atender aos objetivos do processo de descoberta de novas drogas, caracterizando um desperdício de tempo e recursos. Dessa nos estudos de desrepliação eliminam-se compostos já conhecidos na literatura e que não tem interesse biológico.

Entretanto, originalmente os estudos de desrepliação estavam relacionados à obtenção de informações espectroscópicas, estruturais e biológicas de produtos naturais, frações ou extratos, sem a necessidade de isolamento prévio, além da comparação dos dados obtidos com diversas fontes de informações (bases de dados comerciais ou internas, literatura científica entre outras) determinando as espécies químicas ali presentes e definido as melhores estratégias de análise. A partir deste ponto de vista, essa estratégia pode ser muito interessante para o estudo de compostos químicos presentes em amostras complexas, mesmo que o foco do estudo não seja a descoberta de novas drogas. Assim, as estratégias racionais para a identificação de compostos orgânicos a partir do uso de técnicas espectroscópicas e ensaios biológicos podem ser empregadas nos mais variados estudos quaisquer que sejam seus objetivos, como no estudo

compostos presentes em novas fontes naturais, produtos de biotransformação de micro-organismos, descoberta de compostos envolvidos em interações ecológicas, entre outros.<sup>31</sup>

Os processos de desrepliação podem ser vistos como estratégias globais de estudo e abrangem desde o entendimento do problema a ser solucionado, passando pela definição dos objetivos, e dando início aos estudos de *screening*. Com isso o campo de pesquisa pode ser retringido identificando-se o alvo dos estudos e buscando-se as melhores condições para que estes alvos sejam avaliados de forma efetiva e otimizada. O intuito principal é que estas estratégias diminuam o tempo e aumentem a eficiência do processo de identificação de compostos alvo presentes em amostras complexas, como mostrado no **Esquema 1**.

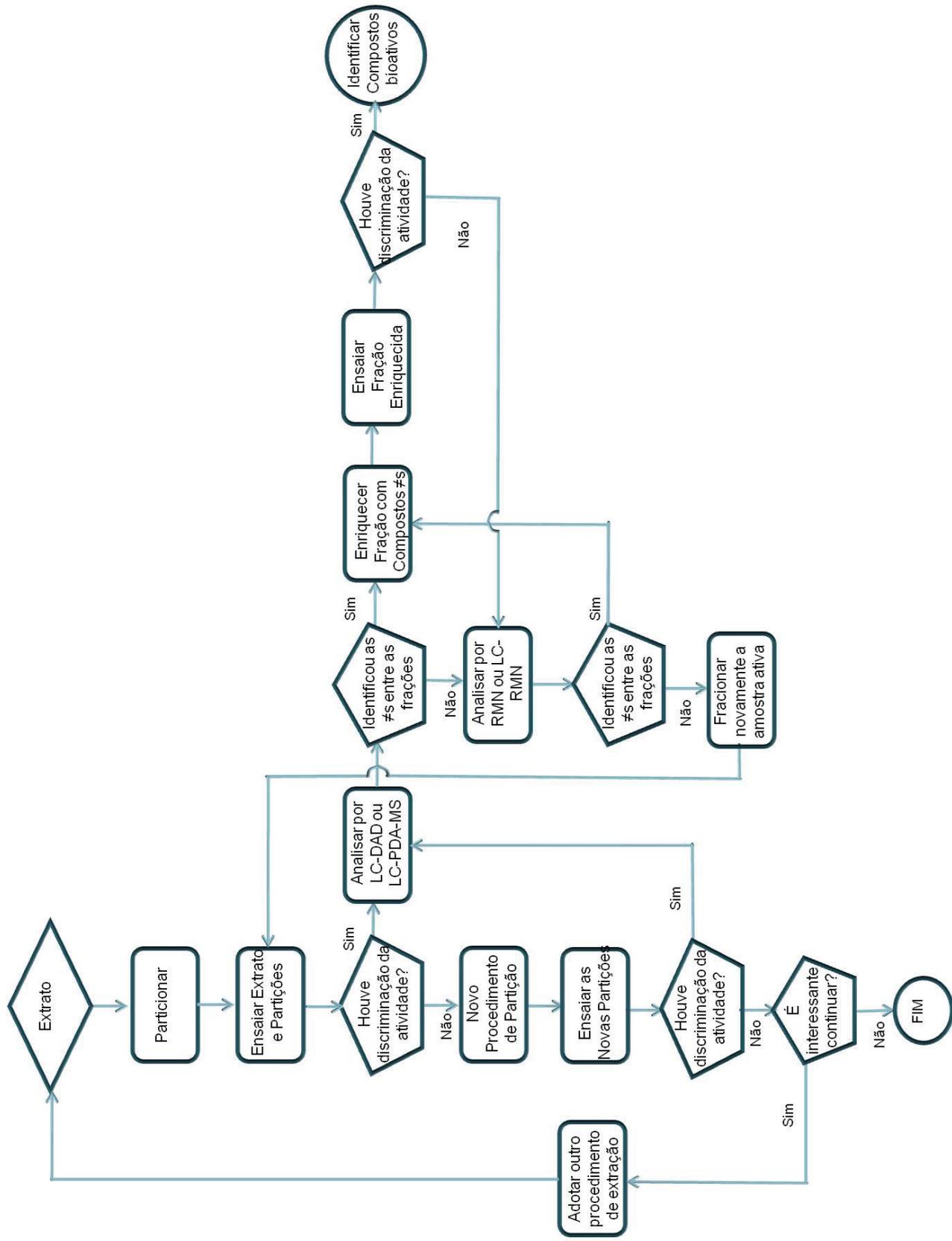


**Esquema 1:** Etapas envolvidas no processo de desrepliação

A partir dessas estratégias, alguns autores como Bradshaw et al, propõem a rápida identificação de sesquiterpenos e alcalóides utilizando análises por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, aliadas a base de dados de produtos naturais<sup>32</sup>. No grupo de pesquisa, onde este trabalho foi desenvolvido, foram realizadas análises de cerca de 30 saponinas e até 63 oligoglicosídeos de sesquiterpenos acíclicos a partir dos extratos do frutos da planta *Sapindus saponaria*, utilizando LC-UV-MS e LC-MS/MS.<sup>33</sup> Nestes casos, as estratégias de desrepliação não foram empregadas como parte da descoberta de novos compostos bioativos. Dessa forma, as análises de atividades biológicas dos extratos não foram realizadas como parte inicial do *screening*, já que o foco destes trabalhos

estava relacionado à busca por determinadas classes de substâncias e não propriamente de compostos ativos. Já Cordell e Shin mostraram diversos estudos de extratos vegetais utilizando um sistema de LC-PDA-MS para a análise e o fracionamento das amostras, onde as bandas eluídas foram coletadas em placas de 96 poços, e posteriormente avaliadas quanto a sua toxicidade.<sup>29</sup> Assim, neste trabalho a análise de citotoxicidade foi o fator determinante para a busca dos compostos a serem estudados.

Na seqüência propõem-se um esquema para a identificação de compostos bioativos a partir de estratégias de desreplicação (**Esquema 2**).



**Esquema 2:** Proposta para identificação de compostos bioativos utilizando estratégia de desreplicação.

Assim, a técnica de desreplicação tem surgido como uma excelente ferramenta para o estudo do metabolismo secundário de plantas e de micro-organismos, fornecendo uma alternativa rápida e eficiente frente às estratégias clássicas envolvidas no estudo de produtos naturais. Neste contexto científico, o presente trabalho inicia o estudo dos micro-organismos endofíticos isolados da espécie *Alternanthera brasiliana*, assim como a investigação dos metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos. Outro ponto relevante do trabalho é a identificação de compostos bioativos que justifiquem os usos populares desta planta, já que até o presente momento nenhum estudo mostrou efetivamente a associação entre as atividades biológicas associadas a planta com compostos presentes em seus tecidos.

Para isso, um fator decisivo no desenvolvimento da estratégia de desreplicação utilizada neste presente estudo foi o uso de técnicas analíticas como LC-MS, LC-UV-MS, LC-NMR, LC-NMR-MS, GC-MS entre outras.

Dentre as técnicas espectroscópicas mais bem estabelecidas para os estudos de desreplicação, principalmente acopladas a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), destaca-se a espectroscopia na região do UV-Vis e a espectrometria de massas. Além disso, devido aos recentes avanços, a técnica de ressonância magnética nuclear tem se tornado uma ferramenta extremamente útil para esses estudos devido às importantes informações estruturais que ela fornece.

O acoplamento entre HPLC e espectroscopia UV-Vis (HPLC-UVVis) é uma das técnicas mais bem estabelecidas em laboratórios de análises químicas, assim como o acoplamento entre cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS), e por isso são muito utilizadas em estudos de produtos naturais. Entretanto, como a maioria das técnicas utilizadas para identificação estrutural elas possuem algumas limitações em relação aos

compostos que são passíveis de análise. Nesse caso eles devem conter grupos que tenham absorção no ultravioleta-visível ou serem volatilizáveis, respectivamente. Isso restringe o campo de estudo dos compostos orgânicos presentes em fontes naturais. Apesar de existirem diversas estratégias que visam contornar essas limitações, como a derivação de compostos com grupos cromóforos, ou tornando-os mais facilmente volatilizáveis (como a silição e metilação), ainda assim compostos muito polares e de difícil derivação não são analisáveis por essas técnicas.

Dessa forma a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (HPLC-MS) permite a análise dos compostos orgânicos que não são analisáveis pelas técnicas anteriores, como os compostos de média a alta polaridade. Esta também é uma técnica já bem estabelecida nos laboratórios de análises químicas, permitindo a análise de uma vasta gama de compostos que grupos relativamente ácidos ou básicos. Além disso, uma das vantagens desta técnica, é que quando são utilizados analisadores de múltiplos estágios que permitem fragmentação dos compostos, é possível a realização de diversos experimentos, além dos experimentos *Full Scan*. Por exemplo os experimentos de Íons Produto, Íons Precursores, Perda Neutra e *Select Reaction Monitoring* (SRM), que juntos fornecem um conjunto de informações bastante útil para estudos de desreplicação.

O experimento de *Full Scan* fornece informações sobre a relação massa/carga dos compostos presentes na amostra, proporcionando uma visão mais geral da composição química destas amostras. Estes experimentos não fornecem muitas informações sobre a estrutura das substâncias, apenas podem revelar se eles possuem grupos ácidos ou básicos que permitem ionização no modo negativo e positivo respectivamente.

A partir dos experimentos de *Full Scan*, é possível realizar experimentos de íons produto, nos quais se obtêm informações sobre o perfil de fragmentação dos analitos, o que representa um auxílio considerável no processo de identificação das classes de compostos presentes na amostra.

Já os experimentos de íon precursor e de perda neutra são úteis na identificação de compostos pertencentes a uma classe específica. Se as moléculas, pertencentes à classe de interesse, possuem um íon fragmento em comum utiliza-se o experimento de íon precursor para identificar quais compostos possuem íon comum à classe de interesse. Entretanto, se o fragmento que caracteriza a classe de compostos em estudo, sai das moléculas na forma neutra (sem carga e, portanto não identificado por MS) então, pode-se utilizar o experimento de perda neutra para identificar os compostos pertencentes a esta classe.

Além de todos os experimentos mencionados anteriormente é possível a realização de um experimento que apresenta maior sensibilidade e seletividade: o *Selected Reaction Monitoring* (SRM). Neste experimento os quadropolos são mantidos estáticos em relações massa/carga ( $m/z$ ) pré estabelecidas, referentes ao íon precursor e a um dos fragmentos do composto que se deseja analisar. Dessa forma como não há varredura de rf e dc em ambos os quadropolos, este experimento apresenta alta sensibilidade. Além disso, ele se torna altamente seletivo, pois detecta, apenas compostos que possuam uma determinada massa e fragmentos com uma  $m/z$  específica.

Apesar da grande versatilidade apresentada pelos experimentos de LC-MS e LC-MS/MS, bastante úteis nos estudos de desrepliação, a informação estrutural fornecida por eles é restrita no que se refere à elucidação estrutural de compostos orgânicos.

Neste contexto a técnica de ressonância magnética nuclear é considerada universal para análise de compostos orgânicos, e fornece informações importantes para a elucidação estrutural. Porém esta técnica apresenta um grande entrave para estudos de produtos naturais, principalmente aqueles presentes em pequenas quantidades na natureza. Isso ocorre pois a utilização de técnicas convencionais de ressonância magnética nuclear requer quantidades relativamente grandes de amostras, usualmente na escala de miligramas, o que muitas vezes dificulta a aplicação desta técnica para estudos de *High Throughput Screening*, onde se trabalha com quantidades muito pequenas e com amostras muito complexas.

Diversos avanços têm tornado a técnica de ressonância magnética nuclear mais compatível com estes estudos, dentre eles a hifenação com métodos de separação, como cromatografia líquida (LC-NMR), O que vem tornando esta técnica mais atrativa na elucidação estrutural de produtos naturais. Apesar dos primeiros relatos de acoplamento LC-NMR datar da década de 70 do século passado ele tem sido utilizado com maior frequência na última década.

Os principais avanços que viabilizaram este acoplamento estão relacionados ao surgimento de equipamentos mais sensíveis, desenvolvimento de seqüências de pulso para supressão do sinal do solvente, sistemas de pré-concentração das amostras, dentre outros. Isso tem feito com que a técnica de LC-NMR, tenha se tornado cada vez mais eficiente e aplicada à determinação estrutural de compostos orgânicos a partir de extratos complexos.<sup>34</sup>

Apesar de todos esses avanços terem tornado a técnica de NMR, bem como a hifenação entre LC e NMR bastante atrativas em estudos de *High throughput screening* é importante considerar, principalmente nos experimentos por LC-SPE-NMR, (uma das formas mais utilizadas atualmente para o acoplamento entre estas técnicas) a necessidade de se ter um detector para a

seleção das bandas cromatográficas de interesse, que serão coletadas nos cartuchos e posteriormente enviadas para o equipamento de NMR através de capilares. Essa necessidade da presença de um detector entre o HPLC e o equipamento de NMR limita um pouco a abrangência desta técnica tornando-a menos universal, uma vez que os detectores comumente utilizados possuem limitação sobre quais compostos podem ser analisados. Por exemplo, detector de PDA, um dos mais utilizados para estudos que envolvam LC-SPE-NMR, permite a análise somente de compostos possuam grupos cromóforos, restringindo o tipo de composto que pode ser analisado por esta técnica. Existem, ainda, diversas abordagens para contornar essas limitações, como o uso de LC-PDA-MS-RMN, mas que não serão apresentadas aqui.

Esses fatores ressaltam a necessidade do uso de um conjunto de técnicas de separação e identificação de compostos nos estudos que envolvem desreplicação de amostras complexas, a fim de se obter um resultado rápido e confiável e com maior número de informações possíveis. No caso deste estudo, utilizou-se a técnica de LC-PDA-MS/MS, para selecionar os compostos de interesse presentes em extratos complexos, e após identificados esses compostos partiu-se para a otimização da separação cromatográfica, análise por LC-SPE-NMR e elucidação estrutural dos mesmos.

## *Objetivos*

---

## 2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho estão relacionados à utilização de estratégias de desreplicação no estudo da planta *Alternanthera brasiliana* e dos microorganismos endofíticos associados a ela como segue:

- ✓ Identificação de compostos presentes nos tecidos da planta que estejam relacionados com a atividade antibiótica relatada para a *Alternanthera brasiliana*;
- ✓ Isolamento dos microorganismos endofíticos associados à planta;
- ✓ Cultivo e análise dos extratos dos microorganismos isolados em busca de compostos bioativos;

# *Parte Experimental*

---

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Equipamentos**

- ✓ **LC-PDA-MS/MS:** Módulo de separação WATERS Alliance 2695; Detector PDA WATERS 2996 e espectrômetro de Massas QuattroLC – MICROMASS, triplo-quadupolo, ESI/APCI;
- ✓ **LC-PDA:** Bombas SHIMADZU LC10AD e LC-8A gradient pumps; Injetor SHIMADZU SIL-10ADVp e Detector PDA SHIMADZU SPD-10A e SPD-6A UV-Vis;
- ✓ **LC-HRMS:** Espectrômetro de massas Velos Orbitrap, ESI.
- ✓ **LC-SPE-NMR:** HPLC Agilent 1200 Series com Bomba quaternária G1311A, Amostrador G1329A e Detector PDA G1315D; Sistema de SPE Prospekt 2 e Magneto Ultra Shield 600 MHz com Crio Sonda Inversa (CTCI) 5mm
- ✓ **Câmara de Fluxo Laminar** Veco VL FS-12M
- ✓ **Autoclave Vertical** Phoenix AV 70 Soc. FABBE 103
- ✓ **Triturador** Turratec Tecnal
- ✓ **pHmetro**
- ✓ **Sonicador** BRANDSON 1510;
- ✓ **Balança analítica** Tecnal
- ✓ **Estufa** Quimis

- ✓ **BOD** (Biochemical – Oxygen – Demand) Technal TE 391
- ✓ **Rotavapor** BÜCHI R-200 com banho de aquecimento BÜCHI B-490 e BÜCHI R-114 com banho de aquecimento BÜCHI B-480
- ✓ Microscopio Nikon

### **3.1.2. Solventes e reagentes**

- ✓ Etanol e acetato de etila grau P.A. (Quimis)
- ✓ Metanol, Acetonitrila grau HPLC (J.T. Backer)
- ✓ DMSO (Vetec)
- ✓ Meio Muller Hinton (Acumedia);
- ✓ Caldo Muller (Hinton Acumedia);
- ✓ Agar bacteriológico (Acumedia)
- ✓ Dextrose
- ✓ Arroz (UncleBens)
- ✓ Tetraciclina;
- ✓ Norfloxacino
- ✓ Corante resazurina

### 3.1.3. Materiais

#### 3.1.3.1. Microbiológicos

- ✓ Placas de 96 poços TPP.
- ✓ Pipetas automáticas multicanal (Gilson (0,5-20  $\mu$ L));
- ✓ Pipetas analíticas Gilson 100-1000 $\mu$ L;
- ✓ Placas de Petri;
- ✓ Lâmina de bisturi;
- ✓ Lâminas e lamínulas;

#### 3.1.3.2. Materiais Cromatograficos

- ✓ Sílica Flash (60-200 mesh);
- ✓ Cartucho de extração em fase sólida C18 Phenomenex
- ✓ Cartucho de extração em fase sólida Hysphere
- ✓ Coluna para HPLC PHENOMENEX Synergy 5 $\mu$  C18(2) 250x46 mm;
- ✓ *Ascentis® Express C18 HPLC*, partícula de 2,7 $\mu$ m, 100x4,6mm
- ✓ coluna Hypersil C18, 5micra 4.6 X 300mm;

## **3.2. Procedimento experimental**

### **3.2.1. Estudo químico e biológico da planta *A. brasiliana***

#### **3.2.1.1. Extração dos compostos da planta**

Para o preparo dos extratos de *Alternanthera brasiliana* coletou-se o caule e a raiz da planta, que foram secos em estufa a 37 °C por 100 horas, e posteriormente triturados utilizando-se um moinho apropriado. Após esta etapa adicionou-se álcool etílico P.A., suficiente para que todo o material ficasse imerso (1L), e manteve-se a extração por 24 horas. Após este período as partes foram separadas por filtração, e a solução concentrada. O mesmo procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes com álcool etílico, e os extratos obtidos foram reunidos. A seguir o procedimento acima foi repetido, porém utilizando-se acetato de etila, como solvente de extração. Ao final, reuniram-se ambos os extratos etanólico e de acetato.

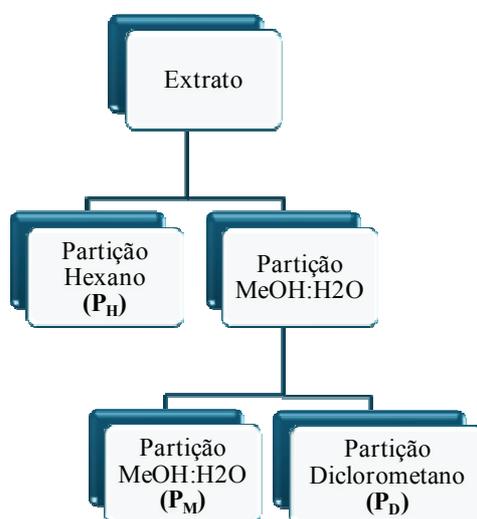
#### **3.2.1.2. Partição e análise dos extratos da planta**

Os extratos da planta foram submetidos a dois diferentes procedimentos de partição que são descritos a seguir

##### **a) Partição líquido-líquido dos extratos da planta**

As partições dos extratos do caule e da raiz da planta foram realizadas utilizando-se 2 g de cada extrato, suspensos em 100mL de uma solução de álcool metílico P.A. e água Milli-Q (1:1). Então adicionou-se 70 mL de hexano P.A e após a agitação em funil de decantação, a fase hexânica foi separada e coletada. Foram realizadas mais duas adições de 70mL de hexano, ao final a três soluções obtidas foram reunidas e o solvente foi evaporado até a secura. A suspensão hidroalcoólica restante foi particionada novamente por mais

três vezes utilizando-se 70 mL de diclorometano em cada partição. As soluções de diclorometano foram reunidas e o solvente evaporado até a secura. Esse procedimento de partição está resumido no **Esquema 3**.



**Esquema 3:** Esquema de partição dos extratos da planta.

Esse procedimento deu origem às partições do extrato do caule ( $P_{H\_Cau}$ ,  $P_{D\_Cau}$  e  $P_{M\_Cau}$ ) e da raiz ( $P_{H\_Raiz}$ ,  $P_{D\_Raiz}$  e  $P_{M\_Raiz}$ ) que foram analisadas por LC-PDA-MS.

### **b) Fracionamento dos extratos da planta em coluna cromatográfica**

O segundo procedimento de fracionamento dos extratos do caule e da raiz foi realizado com o auxílio de uma coluna cromatográfica de sílica com placa sinterizada. A eluição foi realizada sob vácuo e os eluentes utilizados são mostrados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Solventes utilizados no fracionamento dos extratos da planta.

Volume	Composição da fase móvel	Proporção dos solventes	Fração originada
200mL	Hexano:Acetato de etila	1:1	F1
200mL	Acetato de etila : Diclorometano	4:1	F2
200mL	Acetato de etila : Diclorometano	1:1	F3
200mL	Acetato de etila : Diclorometano:Metanol	4:1:10%	F4
200mL	Metanol	100%	F5

Após a eluição, os solventes foram evaporados e as frações foram nomeadas conforme a ordem de eluição (**Alt\_F1** até **Alt\_F5**) tanto para a raiz (**Alt\_Raiz\_F1** até **Alt\_Raiz\_F5**) quanto para o caule (**Alt\_Cau\_F1** até **Alt\_Cau\_F5**). Estas amostras foram analisadas química e biologicamente, como descrito a seguir.

### 3.2.1.3. Teste de antibiose dos extratos e frações da planta.

Para avaliar a atividade antibiótica dos extratos e das frações, utilizou-se o teste de micro-diluição em placa de 96 poços, segundo as normas do NCCLS.<sup>35</sup> As bactérias utilizadas para o teste foram: *Escherichia Coli* (ATCC 25922), *Bacillus Subtillis* (ATCC 6623), *Pseudomonas Aeruginosa* (ATCC 15442), *Micrococcus Luteus* (ATCC 9341), *Estafilococos Aureus* (ATCC 25923).

#### ✓ Preparo do inóculo

O inóculo contendo as bactérias foi preparado com culturas de 24 horas, e turvação correspondente a 0,5 na escala McFarland. A turvação foi medida à 625nm e absorvância de 0,08-0,1, utilizando-se um espectrofotômetro de absorvância.

✓ **Preparo das amostras**

As amostras dos extratos e frações foram preparadas pesando-se 1,75 mg de cada amostra a ser testada e adicionando-se 100  $\mu$ L de DMSO P.A. previamente filtrado em membrana 0,22 $\mu$ m. A essa solução adicionou-se 3,2 mL de Meio Muller Hinton esterilizado.

✓ **Preparo das soluções de antibiótico**

Os controles positivos foram preparados utilizando-se 1,3 mg de cada antibiótico (norfloxacino e penicilina), dissolvidos em 1mL de DMSO estéril. Essa solução foi diluída 10 vezes, obtendo-se uma solução concentração de 130ug/mL. Então 100uL desta solução foram transferidos para 3,2 mL de Meio Muller Hinton esterilizado, obtendo-se uma concentração de 4ug/mL como descrito na norma do NCCLS. É importante ressaltar que os antibióticos utilizados correspondem a compostos com pureza de 99,8 % e não a medicamentos comerciais, pois os compostos presentes na formulação destes medicamentos podem alterar o resultados da análise.

✓ **Preparo das placas de ELISA**

Transferiu-se 95 $\mu$ L das soluções contendo amostra para um dos poços da placa de ELISA. Cada amostra foi testada em triplicata para cada bactéria. Além das amostras de extrato e das partições ou frações, foram testados também os controles positivo (tetraciclina e norfloxacino), controle negativo (apenas meio com as bactérias), somente o meio de cultura, e finalmente meio de cultura com DMSO. Então, adicionou-se 5 $\mu$ L da solução de bactéria padronizada, em cada poço das placas que foram incubadas por 20 horas a 37°C. Dessa forma a concentração testada inicialmente de cada extrato ou fração foi de 0,503 mg/mL.

Após o período de incubação, adicionou-se 15µL de corante resazurina a cada poço da placa. Essa solução de corante foi preparada com 1mg de resazurina para 10mL de água destilada. As placas foram incubadas por 30 minutos, e então realizou-se a leitura visual das mesmas.

#### 3.2.1.4. Análise dos extratos e frações da planta por LC-PDA-MS

As análises, por LC-PDA-MS, dos extratos e frações da planta foram realizadas utilizando-se o método de eluição gradiente descrito na **Tabela 2**, com a vazão de fase móvel de 1,0 mL por minuto com divisor de fluxo, onde apenas 100 uL foram direcionados para o espectrômetro de massas (Triploquadrupolo, Quattro LC, Micromass). Para a ionização, utilizou-se a técnica de *electrospray* no modo negativo de ionização, com capilar em 3,5 kV, cone em 35 V e extrator em 5 V e no modo positivo com capilar em 3,7 kV, cone em 25 V e extrator em 4 V, com temperatura de 100°C no bloco da fonte e 300°C no probe de ionização

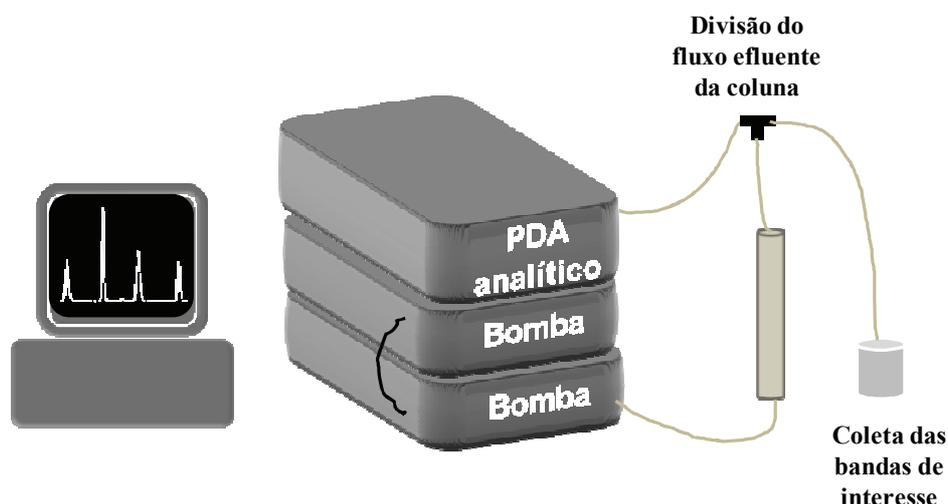
**Tabela 2:** Gradiente utilizado nas análises de LC-MS, das frações do caule da planta.

Tempo/minutos	Água	Metanol	Isopropanol
0	30	70	0
15	10	90	0
30	0	100	0
50	0	50	50
55	0	50	50

#### 3.2.1.5. Fracionamento das frações ativas da planta

As frações da planta que se apresentaram ativas foram fracionadas por HPLC (*High Pressure/Performance Liquid Chromatography*), utilizando-se um coluna Hypersil C18, 5micra 4.6 X 300mm, e o mesmo cromatográfico empregado nas análises por LC-PDA-MS. Entretanto como o fracionamento foi

realizado em escala semi-preparativa a vazão de fase móvel utilizada foi de 3,5 ao invés de 1,0 mL/min. Porém como não havia equipamento disponível, para análises com eluição gradiente em escala semi-preparativa, foi utilizado um equipamento analítico, com algumas adaptações já que a cela do detector não comportaria um fluxo tão grande, por se tratar de um detector analítico. Assim após a saída da coluna foi inserido um divisor de fluxo, sendo apenas 200  $\mu$ L eram enviados para o detector e o restante do fluxo era coletado diretamente, como mostrado no **Esquema 4**. Foi otimizada a diferença entre o tempo em que o composto era detectado gerando um sinal no cromatograma e o tempo que ele começava a sair no ponto de coleta.



**Esquema 4:** Esquema para fracionamento utilizando HPLC semi-preparativo

### 3.2.1.6. Concentração das frações obtidas por HPLC semi-preparativo

O método cromatográfico utilizado para o fracionamento da fração ativa empregou modo reverso de eluição, sendo que as frações coletadas continham grande quantidade de água, o que dificultou a concentração das mesmas. Dessa forma, optou-se por concentrar essas frações utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida (Phenomenex, Strata-X C18, 1g-6mL)

Assim, a cada banda coletada adicionou-se 3 vezes o volume correspondente de água. Esta solução resultante foi transferida para o cartucho de SPE, com fase estacionária ODS, previamente equilibrado e condicionado. Assim após a retenção dos compostos de interesse estes foram eluídos com 6 mL de metanol. Após a evaporação do metanol, sob um fluxo de ar comprimido, obteve-se as frações secas que foram analisadas por LC-PDA-MS, utilizando-se as mesmas condições descritas no **Item 3.2.1.6**. E tiveram sua atividade antibiótica avaliada como descrito no **Item 3.2.1.3**.

### **3.2.1.7. Análise de compostos alvo por LC-SPE-NMR**

Após o estudo bioguiado dos extratos e frações da planta, aliando testes de antibiose com análises de LC-PDA-MS obteve-se um apontamento sobre possíveis compostos bioativos. Então esses possíveis compostos foram analisados por LC-PDA-SPE-NMR. Para tanto, utilizou-se os sistema de LC-SPE-NMR do grupo de produtos naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna Phenomenex *Ascentis® Express C18 HPLC*, partícula de 2,7µm, 100x4,6mm com eluição gradiente e fluxo de 1 mL/min. As bandas de interesse foram trapeadas em cartuchos hysphere (Resina HySphere GP -polydivinyl-benzeno, tamanho de partícula 5-15 µm). Para tanto o fluxo que saía da coluna foi combinado com um fluxo de água três vezes maior, visando uma diminuição da força da fase móvel para que os compostos ficassem retidos no cartucho de SPE. Antes que houvesse o trapeamento dos compostos, os cartuchos foram condicionados com 3 volumes de acetonitrila e equilibrados com 1 volume de água.

Após a retenção dos compostos de interesse os cartuchos foram secos com fluxo de nitrogênio durante 30 minutos. Então cada cartucho foi eluído com 240ul de acetonitrila deuterada, e através de um capilar a amostra foi inserida na sonda (volume da sonda 60 uL com 30uL de volume de observação) para que fossem adquiridos os dados de NMR. Para os experimento de  $^1\text{H}$  foi utilizada a seqüência de pulso com dupla irradiação de sinais : LC1PND12

### **3.2.2. Micro-organismos**

#### **3.2.2.1. Isolamento dos micro-organismos**

O isolamento dos micro-organismos foi realizado a partir das diferentes partes da planta, raiz, caule e folha, que foram coletados na Horta municipal de São Carlos em quatro períodos diferentes: Novembro de 2008, Fevereiro, Abril, Agosto de 2009.

Durante o processo de isolamento foram testados diferentes procedimentos de assepsia, assim como diferentes meios de cultura para o crescimento dos micro-organismos endofíticos, como segue.

#### **a) Assepsia**

Os procedimentos, utilizados para assepsia da superfície das partes da planta, foram realizados utilizando-se etanol (70%), hipoclorito de sódio (4-6%), acetona P.A. e água destilada. Foram utilizados diferentes processos de assepsia, variando-se as soluções nas quais as partes da planta eram imersas bem como o tempo de imersão. O procedimento inicial (A1) adotado para esterilização superficial dos tecidos, envolveu a lavagem das partes a planta com água corrente, e posteriormente em capela de fluxo laminar estéril, estas partes

foram cortadas e imersas em: etanol, água, hipoclorito e água, nesta ordem. Sendo que permaneceram por 30 segundos em cada uma destas soluções.

Outros procedimentos de assepsia foram testados. Sendo que no segundo procedimento (A2) manteve-se a ordem das soluções de assepsia mencionada acima, variando-se apenas o tempo em que as partes da planta eram mantidas imersas no hipoclorito (agente oxidante). Utilizou-se tempos de imersão de 1, 2 e 3 minutos em hipoclorito, mantendo-se os 30 segundos de imersão nas demais soluções.

Em um terceiro procedimento de assepsia, as partes da planta foram imersas em acetona antes das demais soluções esterilizantes, visando remover alguma cera que pudesse estar presente na superfície da planta, impedindo que estas soluções fossem eficientes no processo de assepsia. Neste caso manteve-se a ordem e o tempo de imersão do primeiro procedimento (A1).

Um quarto procedimento adotado para o isolamento dos micro-organismos endofíticos, foi utilizado apenas para as folhas, pois envolvia a esterilização superficial por flambagem e posterior maceração do tecido.

Após os diferentes procedimentos de esterilização, as partes da planta foram transferidas para uma placa de Petri contendo diferentes meios de cultura bem como a última água em que esses fragmentos foram imersos.

**b) Meios utilizados para o crescimento dos micro-organismos:**

Os meios utilizados para o crescimento dos micro-organismos foram Batata/Dextrose/Ágar (BDA), Bennetti e GLM. Todos eles com e sem adição de antibiótico (40ug de tetraciclina /mL de meio de cultura). A composição de cada meio é descrita **Tabela 3**. Todos estes meios foram autoclavados por 15 minutos a 121°C e 1 atm e vertidos em placas de Petri sob condições assépticas.

Durante o período de 3 à 10 dias, a contar da data em que as partes da planta foram colocadas em contato com o meio de cultura, foi realizado um monitoramento visual, logo no início do crescimento dos micro-organismos, estes eram transferidos para outras placas de Petri contendo meio de cultura adequado. Assim após sucessivas repicagens obtiveram-se as cepas puras dos micro-organismos endofíticos de *Alternanthera brasiliana*.

**Tabela 3:** Composição dos meios de cultura utilizados no crescimento dos micro-organismos

Meio	Ingredientes	pH final do meio
<b>BDA</b>	1 L de caldo de batata (200g de batata inglesa cozidas em 1L de água destilada) 15 g de ágar 20g de dextrose	5,8
<b>Bennetti</b>	1g de extrato de levedura 1g de extrato de carne 2g de caseína 10g de dextratose 15 g de ágar 1L de água destilada	7,3
<b>GLM</b>	3g de extrato de malte 3g de extrato de levedura 5g de peptona 10g de dextrose 20g de ágar 1L de água destilada	7,3

### 3.2.2.2. Cultivo dos micro-organismos

A partir dos micro-organismos isolados foram selecionados 5 destes para cultivo em meio sólido e líquido.

#### a) Cultivo em meio líquido

Cada um dos 5 micro-organismos escolhidos para estudo foi cultivado em meio líquido utilizando-se 3 Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50mL de meio Czapeck cada um. Esses frascos foram auto-clavados por 15 minutos à 121°C e 1 atm. Após a esterilização transferiu-se um disco de

aproximadamente 2cm de diâmetro de cada micro-organismo cultivado anteriormente em placa de Petri para estes frascos sob condições assépticas. Estes frascos foram mantidos de forma estática por 21 dias à temperatura ambiente.

**b) Cultivo em meio sólido**

O cultivo em meio sólido foi realizado utilizando-se 3 Erlenmeyers para cada fungo, contendo 70g de arroz e 100mL de água. Esses frascos, contendo o meio, foram auto-clavados duas vezes por 45 minutos com intervalo de 24 horas. Os micro-organismos foram inoculados da mesma maneira descrita para o meio líquido, e mantidos estaticos por 21 dias a temperatura ambiente.

**3.2.2.3. Extração dos compostos produzidos pelos micro-organismos**

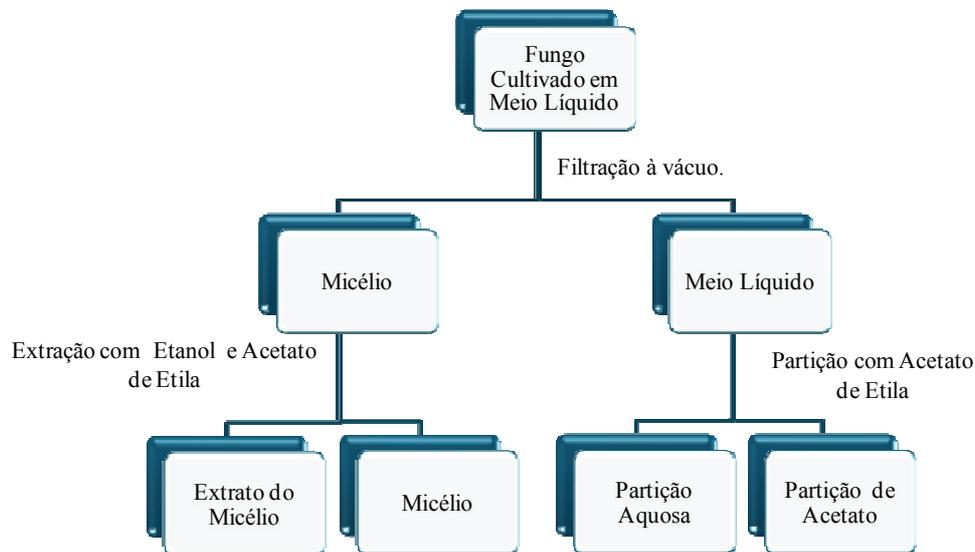
Após o cultivo fúngico os compostos produzidos pelos micro-organismos foram extraídos de acordo com o procedimento descrito abaixo.

**a) Extração dos compostos em meio líquido.**

Para a extração dos compostos de interesse produzidos pelos micro-organismos cultivados em meio líquido, separou-se o micélio do meio de cultura por filtração, e então realizou-se a extração do micélio dos micro-organismos utilizando-se 200 mL de álcool etílico (3 vezes) e 200 mL de acetato de etila (3 vezes). O micélio foi mantido imerso nesses solventes por 24 horas a cada extração. Os solventes foram evaporados até a secura.

Já a extração dos compostos que foram secretados pelos micro-organismos para o meio líquido foi realizada através de partição com 3 volumes

de 50 mL de acetato de etila, separação das fases e evaporação do solvente orgânico até a secura, como mostrado no **Esquema 5**.



**Esquema 5:** Extração dos compostos produzidos pelos micro-organismos em meio líquido

**b) Extração dos compostos em meio sólido.**

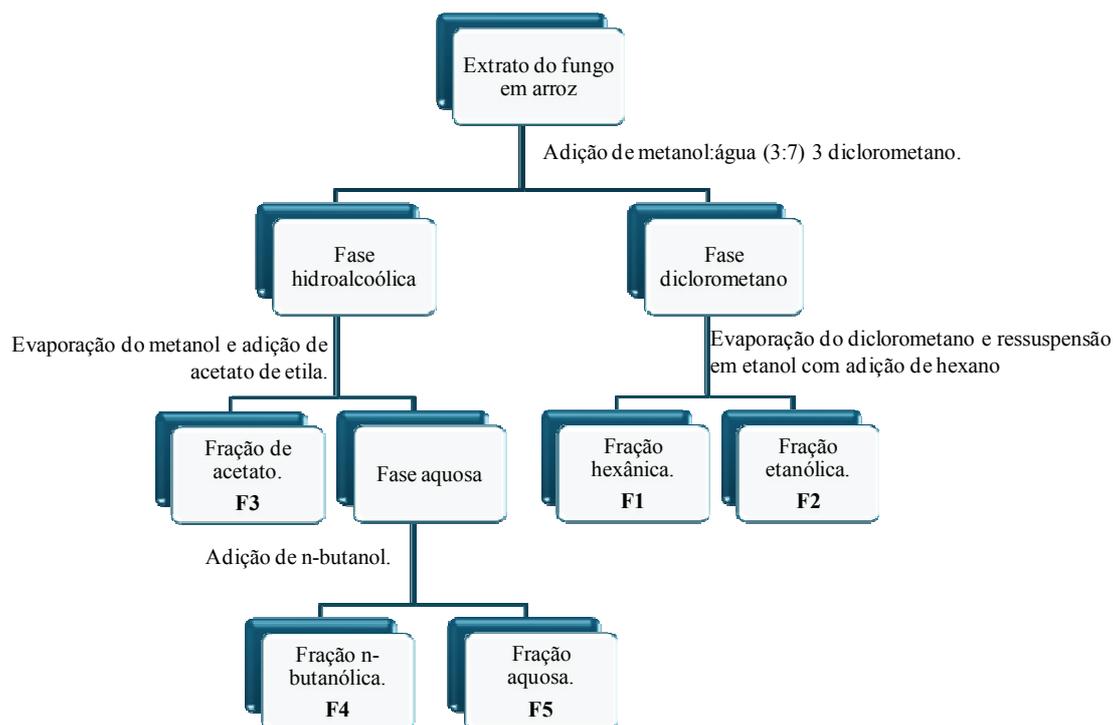
A extração dos compostos produzidos em meio sólido foi realizada pela adição de 150 mL de etanol em cada um dos Erlenmeyers. Posteriormente o conteúdo (arroz+ fungo+solvente adicionado) foi triturado utilizando-se um triturador (Turrtec-Tecnal), a fim de aumentar a eficiência de extração. Após 24 horas o conteúdo foi filtrado a vácuo, e o etanol evaporado até a secura. Repetiu-se o processo de extração com etanol por mais duas vezes. Além disso, foram efetuadas 3 extrações com acetato de etila, da mesma forma como descrito acima para o etanol. Os extratos de etanol e acetato foram reunidos dando origem a um extrato para cada micro-organismo cultivado.

#### **3.2.2.4. Partição dos extratos de meio sólido dos micro-organismos.**

Os extratos dos micro-organismos foram particionados de acordo com o **Esquema 6** mostrado abaixo, onde cerca de 2g de cada extrato do meio sólido foi ressuscitado em 100 mL de uma solução metanol:água (3:7) e transferido para um funil de separação onde foram adicionados 70 mL de diclorometano. Após a separação das fases, repetiu-se a adição de 70mL de diclorometano por mais duas vezes. Obteve-se, então a fase hidroalcoólica e a fase de diclorometano, que foi evaporada até a secura, ressuscitada em 100mL de etanol e transferida para um funil de separação. Adicionou-se 70mL de hexano após a separação das fases, a solução de hexano foi coletada. A adição de hexano foi repetida por mais duas vezes. Essas soluções hexânicas foram reunidas e evaporadas, originando a fração hexânica (**F1**). A solução etanólica também foi evaporada e gerou a fração etanólica (**F2**).

A fase hidroalcoólica foi submetida à evaporação por 30 minutos à -600mmHg, e 50°C para a retirada do álcool. Após esse tempo a solução aquosa restante foi transferida para um funil de separação, onde adicionou-se três alíquotas de 70mL de acetato de etila. Após a separação das fases, coletou-se a solução de acetato de etila que ao final foram reunidas, evaporadas e originaram o fração de acetato (**F3**). A fase aquosa foi particionada por três vezes com 70mL de n-butanol. Tanto a fase aquosa quanto a n-butanólica foram reunidas, evaporadas e geraram as frações n-butanólica (**F4**) e aquosa (**F5**).

Todos os extratos e frações foram analisados por LC-PDA-MS e tiveram sua atividade antibiótica avaliada como descrito a seguir.



**Esquema 6:** Esquema de partição dos extratos fúngicos

### 3.2.2.5. Análise dos extratos por LC-PDA-MS.

Para as análises dos extratos fúngicos e de suas o método cromatográfico foi otimizado e as condições utilizadas foram: Coluna Phenomenex ODS Synergi (250X46mm), fluxo de 1 mL/min, e eluição gradiente como mostrada na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Gradiente utilizado nas análises dos extratos e frações do fungos

Tempo/minutos	Água	Metanol
0	70	30
10	20	80
35	0	100

Para a ionização dos compostos no espectrômetro de massas (Triploquadropolo- Quattro LC- Micromass), utilizou-se a técnica de

*electrospray* no modo negativo de ionização, com capilar em 3,5 kV, cone em 35 V e extrator em 5 V e no modo positivo com capilar em 3,7 kV, cone em 25 V e extrator em 4 V, com temperatura de 100°C no bloco da fonte e 300°C no probe de ionização. No PDA foram monitorados comprimentos de onda entre 200 e 600nm.

#### **3.2.2.6. Teste de antibiose dos extratos e frações dos micro-organismos endofíticos**

Os testes de antibiose, para a avaliação dos extratos e frações dos micro-organismos endofíticos, foram realizados da mesma forma que para os extratos e frações da planta, como descrito no **Item 3.2.1.3**.

#### **3.2.2.7. Isolamento de compostos presentes nos extratos fungicos por HPLC semi-preparativo.**

Para os isolamento dos compostos ativos presentes nos extratos fúngicos utilizou-se uma coluna Phenomenex Synergi 10 µm Fusion-RP 80 Å Column 250 x 21.2 mm, equivalente a coluna analítica utilizada nas análises por LC-PDA-MS. A fase móvel utilizada era composta por 75:25% (metanol:água). Após escalonamento, definiu-se que o fluxo utilizado deveria ser de 21,2mL. Após coletadas as bandas de interesse, o solvente foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador.

### **3.2.2.8. Análise por NMR 1D e 2D do composto isolado**

Após o isolamento realizou-se análise por NMR 1D e 2D, utilizando-se um equipamento de ressonância magnética nuclear de 400MHz. Foi utilizada uma mistura de clorofórmio:metanol como solvente, para a realização dos experimentos.

## ***Resultados e Discussão***

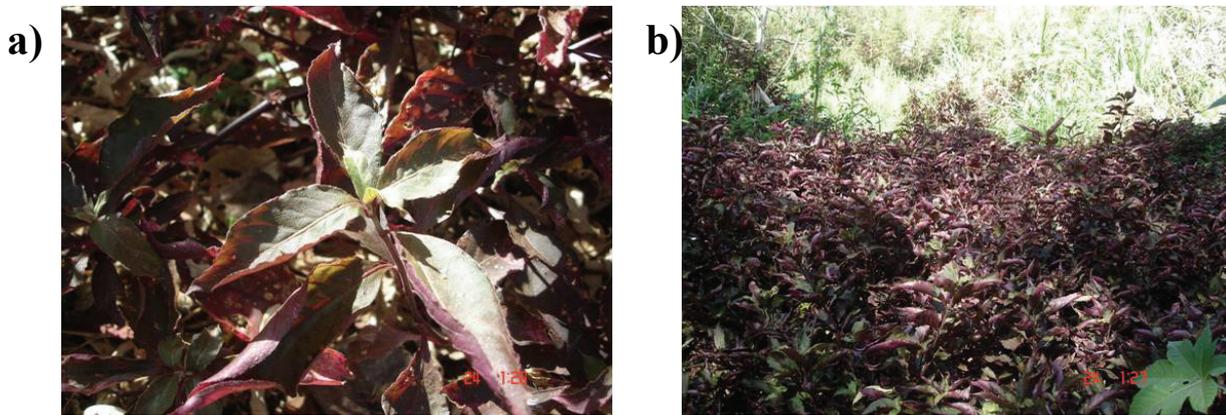
---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação biológica e química da planta

#### 4.1.1. Partição dos extratos da planta

A planta *Alternanthera brasiliana* (**Figura 4a**) foi gentilmente cedida pela horta municipal de São Carlos. Esta planta rasteira encontrava-se em grande quantidade em uma região cercada por mata (**Figura 4b**).



**Figura 4:** Folhas de *Alternanthera brasiliana*.

O estudo dos compostos ativos presentes na planta teve início com o preparo dos extratos da raiz e do caule da planta, como descrito no **Item 3.2.1.1**. Para o caule foram obtidos 403,7 g de massa seca que foram extraídas resultando em 11,2g de extrato, e para a raiz 130,9g de massa seca foram extraídas originando 3,1g de extrato. Os estudos químico e biológico da planta foram realizados para estes órgãos pois não há nenhum relato na literatura sobre qualquer estudo destas partes da planta. Até o momento foram publicados apenas alguns estudos químicos e farmacológicos relacionados às folhas.<sup>20, 22, 24</sup>

Cada um destes extratos foi submetido a dois processos de fracionamento. O primeiro, uma partição líquido-líquido como descrito no **Item 3.2.1.2a)** que originou e 3 partições para cada extrato da planta, nomeadas como: **P<sub>H</sub>\_Cau**, **P<sub>D</sub>\_Cau** e **P<sub>M</sub>\_Cau** para as frações do caule, e **P<sub>H</sub>\_Raiz**, **P<sub>D</sub>\_Raiz** e **P<sub>M</sub>\_Raiz** para as frações da raiz. Neste caso, o objetivo foi a separação dos componentes presentes nos extratos através da diferença de polaridade/hidrofilicidade, de forma simples, e com um reduzido número de frações na tentativa de tornar o processo de desreplicação mais eficiente.

Já na segunda estratégia adotada para o fracionamento dos extratos, utilizou-se uma coluna de fracionamento empacotada com sílica, onde foram obtidas 5 frações para cada extrato (**Alt\_F1** a **Alt\_F5**), como descrito no **Item 3.2.1.2 b**. Neste caso os compostos foram separados de acordo com a migração diferencial que apresentavam durante a eluição, próprio das interações com a fase estacionária (sílica) e os diferentes solventes utilizados como fase móvel.

A **Tabela 5** apresenta um resumo das frações obtidas no processo de partição e de fracionamento dos extratos. Todas estas frações tiveram sua atividade antibiótica avaliada frente às 5 bactérias e foram analisadas por LC-PDA-MS.

**Tabela 5:** Frações obtidas dos extratos do caule e raiz da *Alternanthera brasiliana*

	Caule	Raiz
<b>Partição líquido-líquido</b>	P <sub>H</sub> _Cau, P <sub>D</sub> _Cau e P <sub>M</sub> _Cau	P <sub>H</sub> _Raiz, P <sub>D</sub> _Raiz e P <sub>M</sub> _Raiz
<b>Coluna de sílica</b>	Cau_F1, Cau_F2, Cau_F3, Cau_F4 e Cau_F5	Raiz_F1, Raiz_F2, Raiz_F3, Raiz_F4 e Raiz_F5

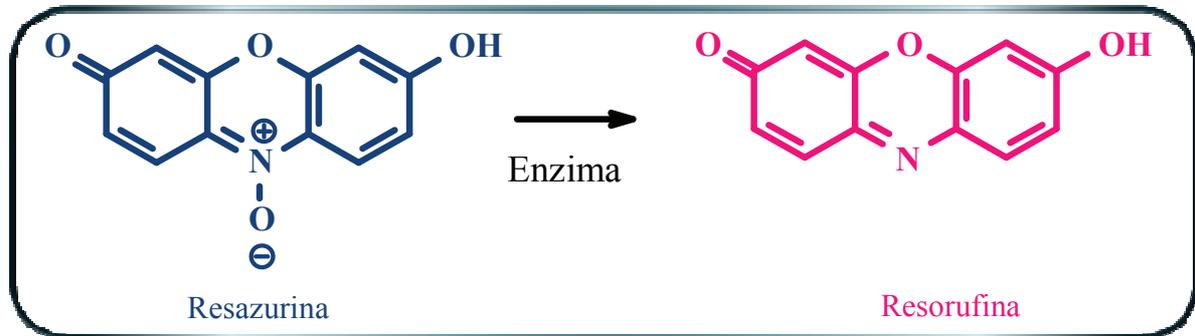
#### 4.1.2. Atividade antibiótica dos extratos e das frações da planta

Os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos foram realizados em nosso laboratório segundo a norma “M7-A6 – Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada—Sexta Edição”, desenvolvida pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e disponibilizada no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Nestes estudos foram empregados testes de microdiluição em caldo como descrito no **Item 3.2.1.3**. Deve-se ressaltar que em todos os testes foram utilizados controles de qualidade positivos e negativos. Os controles de qualidade são fundamentais para assegurar a confiabilidade dos testes de antibiose. Sendo que os controles positivos, garantem que as cepas das bactérias ATCC, utilizadas nos testes, estavam padronizadas quanto a sua sensibilidade a agentes antimicrobianos. Já os controles negativos DMSO 3% e meio atestam a viabilidade das cepas, bem como se o DMSO estaria exercendo alguma influência no crescimento microbiano. Além desses controles em todos os testes utilizou-se um branco contendo apenas meio de cultura, atestando-se a esterilidade do mesmo no decorrer dos experimentos.

O corante resazurina utilizado como indicador da presença/ausência de células viáveis de bactéria atua por um mecanismo de ação redox. Assim, em presença de células vivas, a resazurina é reduzida à resorufina, (**Figura 5**), ocasionando a mudança de coloração da solução de azul para rosa. Essa redução ocorre pela ação de enzimas presentes apenas em células viáveis de bactérias. Assim a mudança de coloração de azul para rosa indica a presença de células viáveis de bactérias, mostrando que a amostra testada não apresenta atividade

antibiótica contra as cepas analisadas. Já a permanência da coloração azul indica que a amostra possui a capacidade de inibir o crescimento bacteriano.

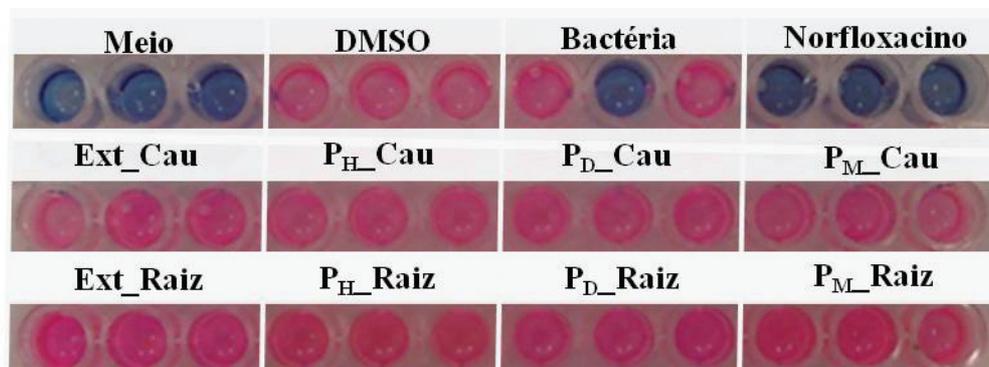


**Figura 5:** Reação de oxidação da resazurina à resorufina

#### a) Estudo da atividade antibiótica das frações obtidas pela partição líquido-líquido dos extratos da planta

A análise da atividade antibiótica das frações obtidas pela partição líquido-líquido dos extratos do caule e da raiz, mostrou que estas frações não apresentaram a capacidade de inibir o crescimento de nenhuma cepas testadas, como esta representado na **Figura 6**, para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Ou seja, para todas as amostras testadas, a presença de células viáveis das bactérias provocou a redução da resazurina para a resorufina, fazendo com que a coloração do meio passasse de azul para rosa. Nesta mesma figura também estão representados os controles de qualidade. A coloração azul nos poços contendo meio sem a adição de células bacterianas indica que este permaneceu estéril durante todo teste. Já os poços contendo DMSO apresentaram o mesmo comportamento que os poços contendo apenas meio e bactéria, confirmando que a quantidade utilizada deste solvente não interferiu no desenvolvimento bacteriano. Por fim, a presença da coloração azul, nos poços de controle positivo (norfloxicino a 4 $\mu$ g/ml, estabelecido pela norma) indica que a sensibilidade, a

agentes antimicrobianos, está dentro da padronização para as cepas ATCC utilizadas.



**Figura 6:** Teste de antibiose do extrato do caule de *Alternanthera* e das frações obtidas pela partição líquido-líquido.

Dessa forma, o método de partição líquido-líquido não foi suficiente para diferenciar a atividade antibiótica das frações obtidas. Porém, o segundo procedimento adotado para o fracionamento dos extratos, utilizando coluna de placa sinterizada apresentou um comportamento bastante promissor como será discutido a seguir.

#### **b) Estudo da atividade antibiótica das frações obtidas a partir do fracionamento dos extratos da planta em coluna de placa sinterizada**

O fracionamento dos extratos do caule e da raiz, descrito no **Item 3.2.1.2.b**, deu origem a cinco frações para cada um destes extratos. Os códigos adotados para estas amostras são mostrados na **Tabela 5**, e os resultados obtidos nos testes de antibiose para estas frações estão resumidos na **Tabela 6**. As frações **Raiz\_F2** e **Raiz\_F5** inibiram o crescimento das cepas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, indicando a presença de compostos ativos

contra bactérias Gram-negativas. Já a fração Raiz\_F4 inibiu o crescimento das cepas de *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*.

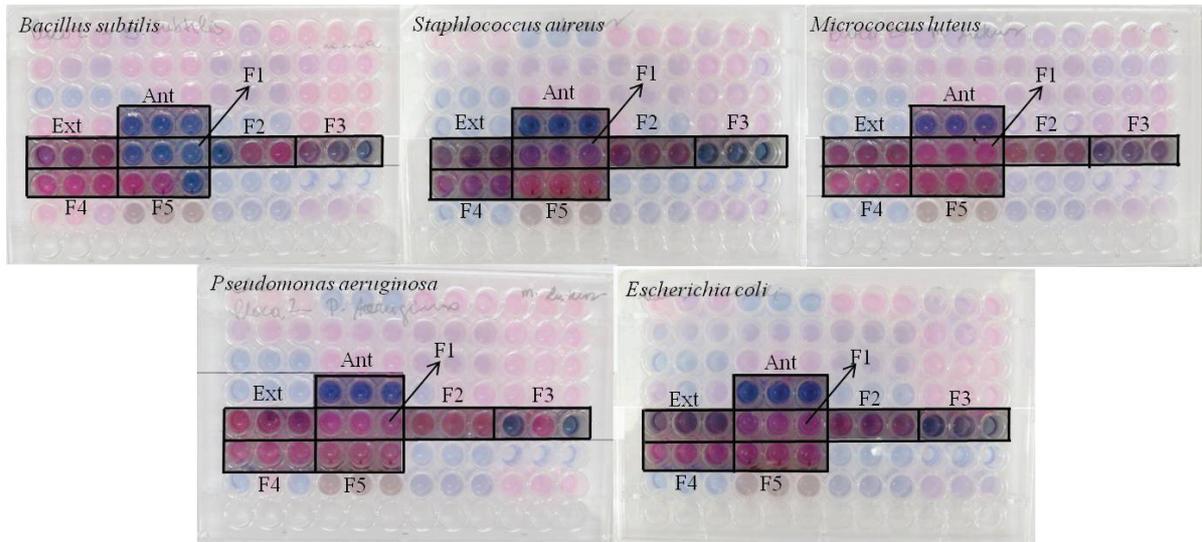
**Tabela 6:** Resumo da atividade antibiótica das frações do caule e da raiz na concentração de 0,500 ug/mL.

	Raiz F1	Raiz F2	Raiz F3	Raiz F4	Raiz F5	Cau F1	Cau F2	Cau F3	Cau F4	Cau F5
<i>Bacillus subtilis</i>								✓		
<i>Escherichia coli</i>		✓			✓			✓	✓	
<i>Micrococcus luteus</i>				✓				✓		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		✓			✓			✓		
<i>Staphylococcus aureus</i>				✓				✓		

Dentre os resultados, apresentados na tabela acima destaca-se a atividade da fração **Cau\_F3**, ativa contra TODAS as bactérias testadas. Isso indica que o procedimento utilizado para fracionamentos dos extratos foi eficiente do ponto de vista biológico, ou seja, mesmo os extratos não apresentando atividade contra as bactérias na concentração testada (0,503ug/mL), como representado na **Figura 6**, uma das frações geradas a partir dele apresentou uma excelente atividade antibiótica. Isso pode ter ocorrido devido a um melhor fracionamento dos compostos presentes nos extratos, o que permitiu o enriquecimento de algumas frações com os compostos biologicamente ativos.

Os dados dos testes de antibiose, obtidos para as frações do caule, estão ilustrados na **Figura 7**, para todas as bactérias utilizadas. Os códigos

**Cau\_F1** à **Cau\_F5** estão representados apenas por **F1-F5**, e os controles positivos estão representados como **Ant** (antibiótico).



**Figura 7:** Resultado do teste de antibiose para as frações do caule de *Alternanthera brasiliana*.

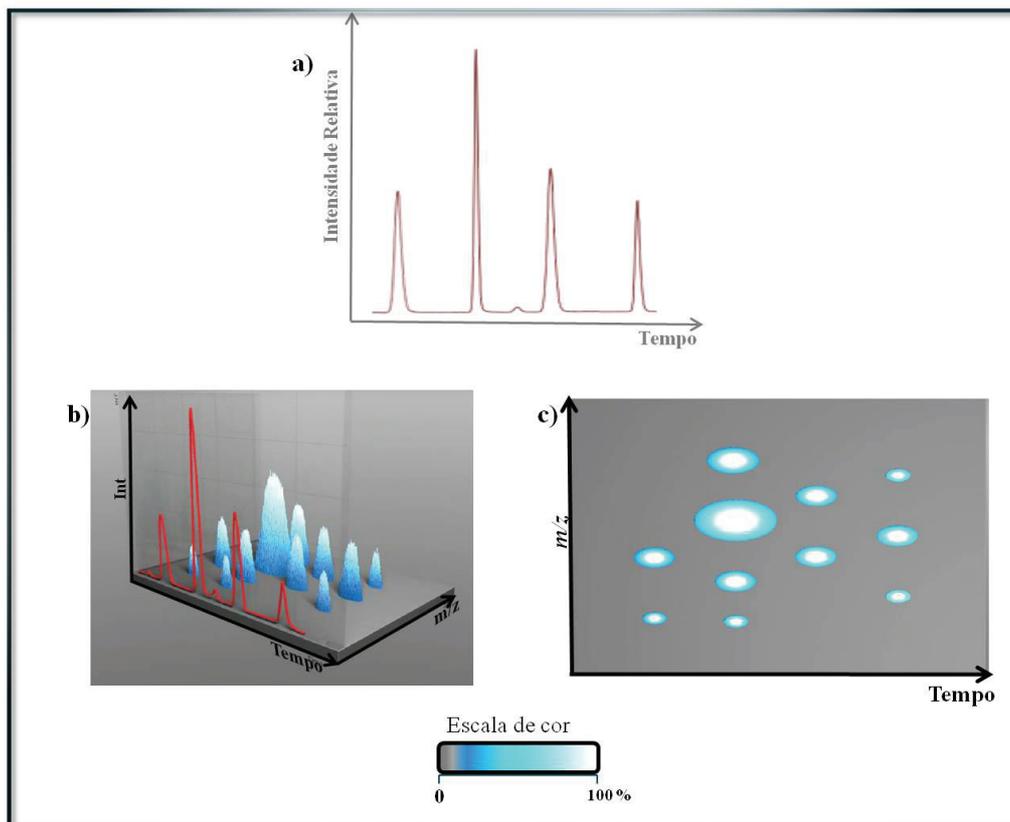
Para avaliar a composição química de cada uma das frações obtidas nos diferentes fracionamentos utilizou-se análise por LC-PAD-MS, cujos resultados são discutidos a seguir.

#### 4.1.3. Análise das partições do extrato da planta por LC-MS

As amostras obtidas a partir dos fracionamentos discutidos anteriormente foram analisadas por LC-PDA-MS. Essa técnica foi utilizada como base deste trabalho, e os dados obtidos nestas análises serão muitas vezes apresentados aqui em formato de mapas.

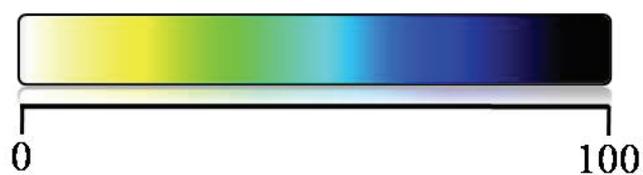
Cada ponto de um cromatograma de íons totais (TIC) obtido em análises por LC-MS representa a somatória da corrente iônica de todos os íons

que atingiram o detector em um determinado instante. Porém, neste conjunto de dados, ou seja no TIC, não há informação sobre as relações massa/carga de cada um desses íons que chegou até o detector (**Figura 8a**). Assim, uma visão mais ampla do resultado de uma análise por LC-MS pode ser obtida a partir de um conjunto tridimensional de dados, como o representado na **Figura 8b**. Onde cada ponto do espaço xyz corresponde a um valor referente às variáveis: tempo de retenção (Tr), intensidade relativa (%) e relação massa/carga ( $m/z$ ), nesta ordem. Dessa forma obtém-se uma visão bastante abrangente da amostra que está sendo analisada. Porém apesar de conter um grande número de informações esta forma da apresentação dos dados de LC-MS é muito difícil de ser analisada para amostras complexas. Uma forma de simplificar a visualização dos dados é realizando-se cortes perpendiculares ao eixo y (intensidade relativa), que resultam em espaços xz (tempo de retenção vs  $m/z$ ) onde a informação de intensidade de cada um dos pontos contidos neste espaço é representada em uma escala de cor, como mostrado na **Figura 8c**.



**Figura 8:** Formas de apresentação dos dados de LC-MS.

Os dados obtidos para as análises de LC-MS das frações de *Alternanthera brasiliana* serão representados seguindo a escala de cor representada na **Figura 9**.



**Figura 9:** Escala de cor que representa a intensidade relativa

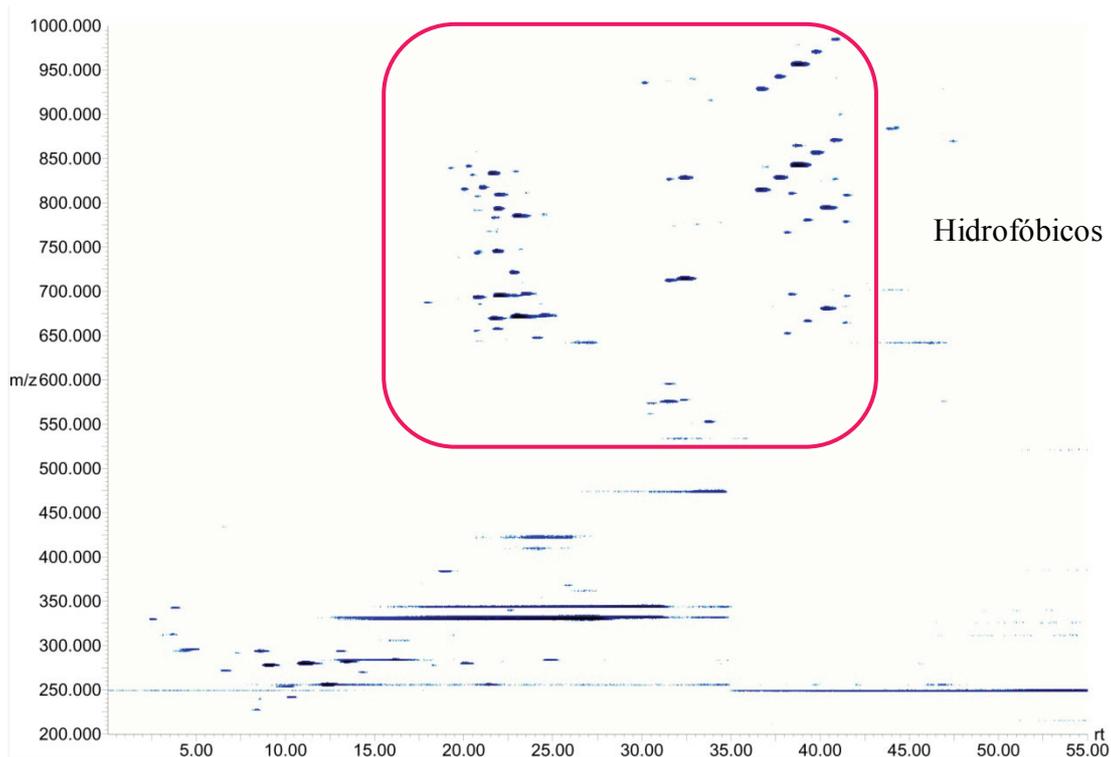
#### 4.1.3.1. Análise por LC-MS das frações obtidas pela partição líquido-líquido dos extratos da planta

Os resultados das análises de LC-MS para as frações obtidas através da partição líquido-líquido dos extratos da planta, serão mostrados aqui apenas para o extrato do caule, já que nenhuma das frações da raiz apresentou resultados interessantes para os estudos de desreplicação. Ou seja nenhuma das frações da raiz se mostrou ativa frente as cepas bacterianas testadas. A fração de hexano não foi analisada por LC-MS, pois esta não representa a melhor técnica de análise para um conjunto de substancias de polaridade tão baixa, pois esses compostos poderiam ter forte interação com a coluna de fase reversa e não serem eluídos. Além da ionização por *electrospray* não ser a técnica de ionização mais adequada para esses compostos.

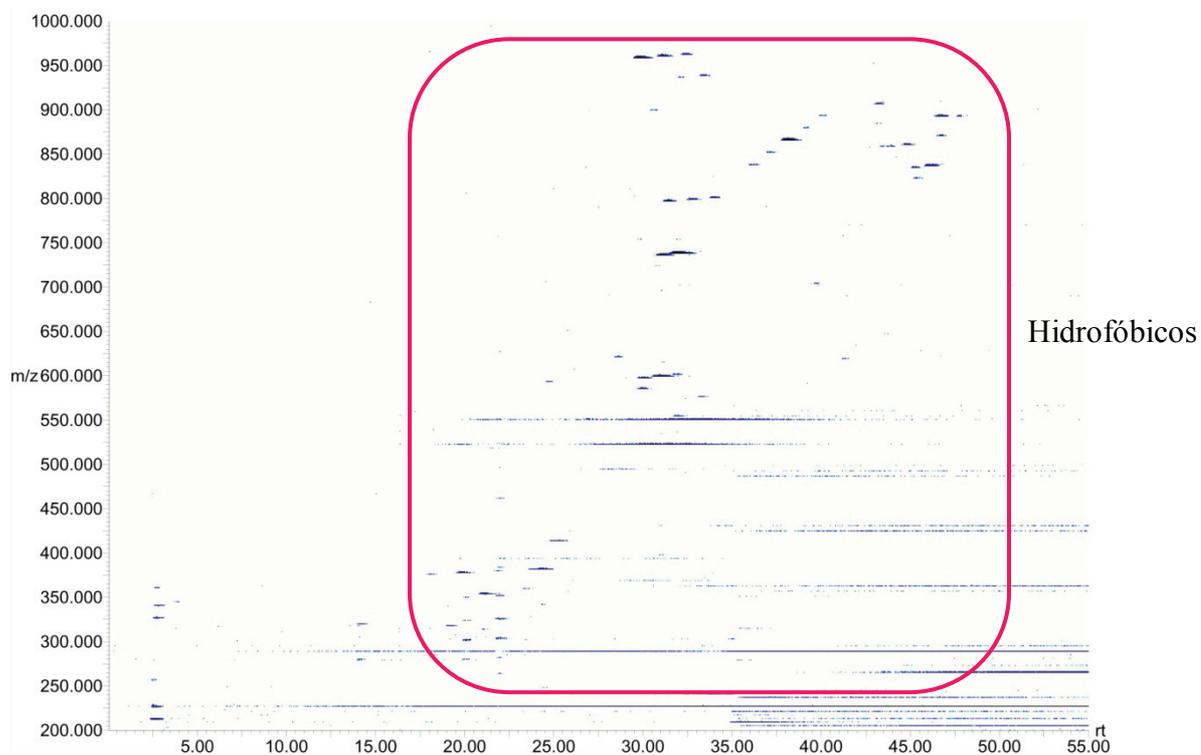
Os mapas obtidos pelas análises de LC-MS, no modo positivo e negativo, para as frações **Cau\_P<sub>D</sub>** e **Cau\_P<sub>M</sub>** são mostrados nas **Figura 10** à **Figura 13**. As **Figuras 10 e 11** ilustram respectivamente as análises no modo negativo e positivo de ionização, da fração de diclorometano (**Cau\_P<sub>D</sub>**), onde verifica-se que esta fração possui uma grande complexidade, com elevado número do compostos que estão distribuídos em ampla faixa de relação massa/carga, entre 500 e 1000 para o modo negativo, e entre 250 e 1000 no modo positivo. Além disso a maioria dos compostos possui um caráter hidrofóbico acentuado, apresentando tempo de retenção a partir de 20 minutos, o que corresponde a 93% de metanol, segundo o método cromatográfico utilizado e descrito na **Tabela 2**.

Já a fração de metanol/água (**Cau\_P<sub>M</sub>**), possui uma menor complexidade, tanto no número de compostos quanto na faixa de *m/z* em que eles se encontram, quando comparada a fração de diclorometano, como pode ser

observado nas **Figuras 12 e 13**. Esse fracionamento desigual dos compostos entre estas as duas frações: metanol/água (Cau\_P<sub>M</sub>) e diclorometano (Cau\_P<sub>D</sub>), deve-se à, relativamente elevada, constante dielétrica do diclorometano (8,9) quando comparado a outros solventes orgânicos como clorofórmio (4,8), éter etílico (4,3) ou acetato de etila (6,0). Assim, os compostos que possuíam algum caráter hidrofóbico se mantiveram na fase de diclorometano, e não na fase metanol:água. Esse fracionamento desigual, e a grande diferença de complexidade destas frações explicam o fato do procedimento de partição líquido-líquido não ter sido suficiente para discriminar os compostos ativos presentes no extrato do caule. Dessa forma, não foi dada continuidade a análise dos compostos presentes nestas frações, e a seguir serão discutidos os resultados obtidos nas análises por LC-MS das frações dos extratos do caule e da raiz obtidas pelo fracionamento em coluna de placa sinterizada.



**Figura 10:** Mapa da análise de LC-MS no modo negativo da amostra Pd\_Cau



**Figura 11:** Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra Pd\_Cau

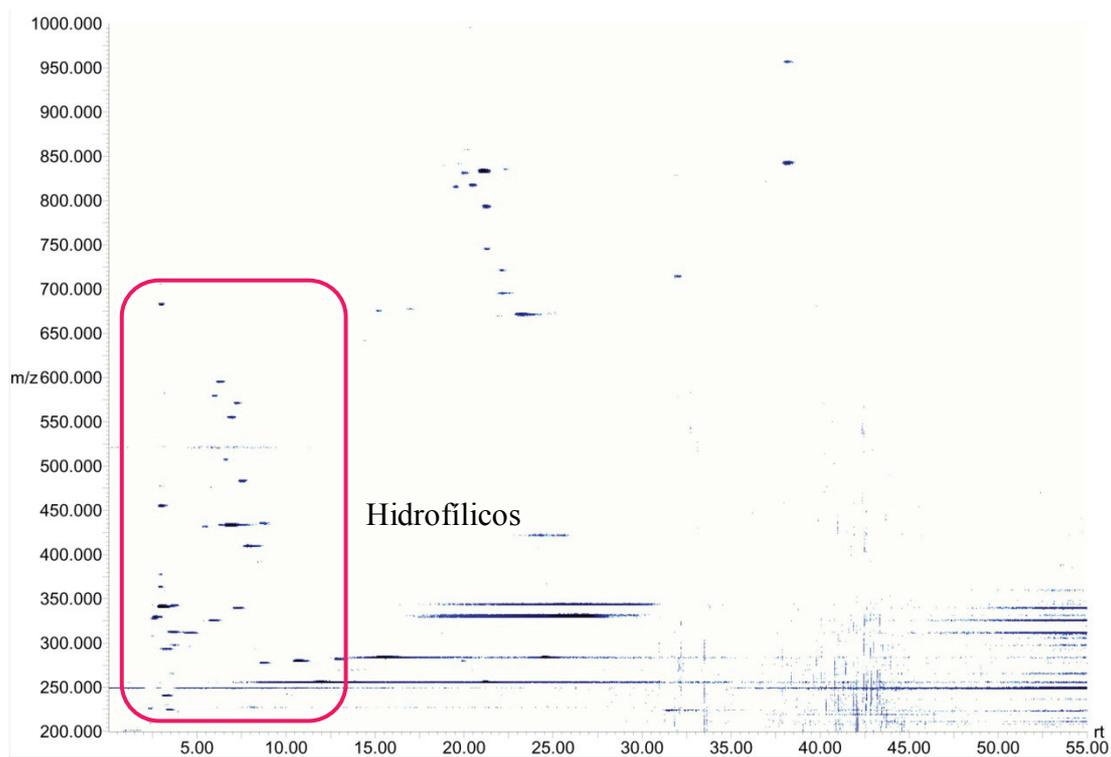


Figura 12: Mapa da análise de LC-MS no modo negativo da amostra P<sub>m</sub>\_Cau

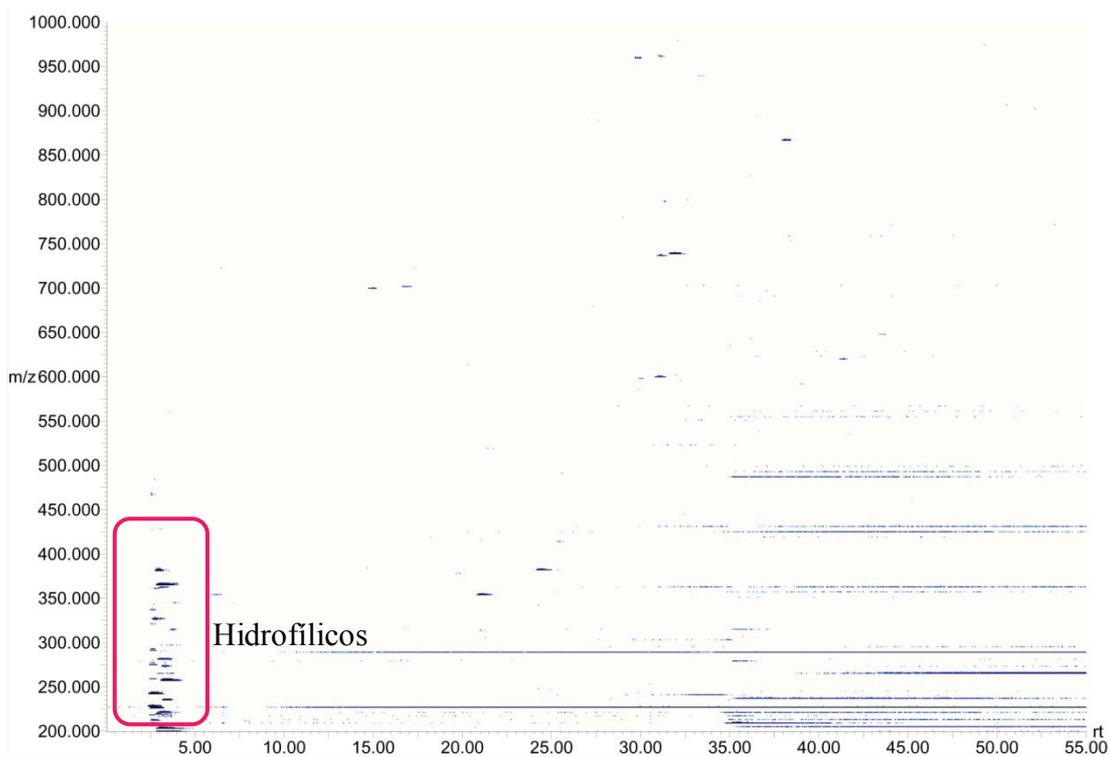


Figura 13: Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra P<sub>m</sub>\_Cau

#### **4.1.3.2. Análise por LC-MS das frações obtidas pelo fracionamento dos extratos em coluna de placa sinterizada**

O procedimento de fracionamento dos extratos com coluna de placa sinterizada, apesar ter gerado um número maior de frações quando comparado ao procedimento de partição líquido-líquido, foi mais eficiente para a discriminação de potenciais compostos ativos, como discutido no **Item 4.1.2.b**. Nesse procedimento os compostos foram separados basicamente pela diferença de polaridade existente entre eles, ou seja, os compostos mais polares que tiveram uma maior interação com a fase estacionária e foram eluídos somente com solventes mais polares.

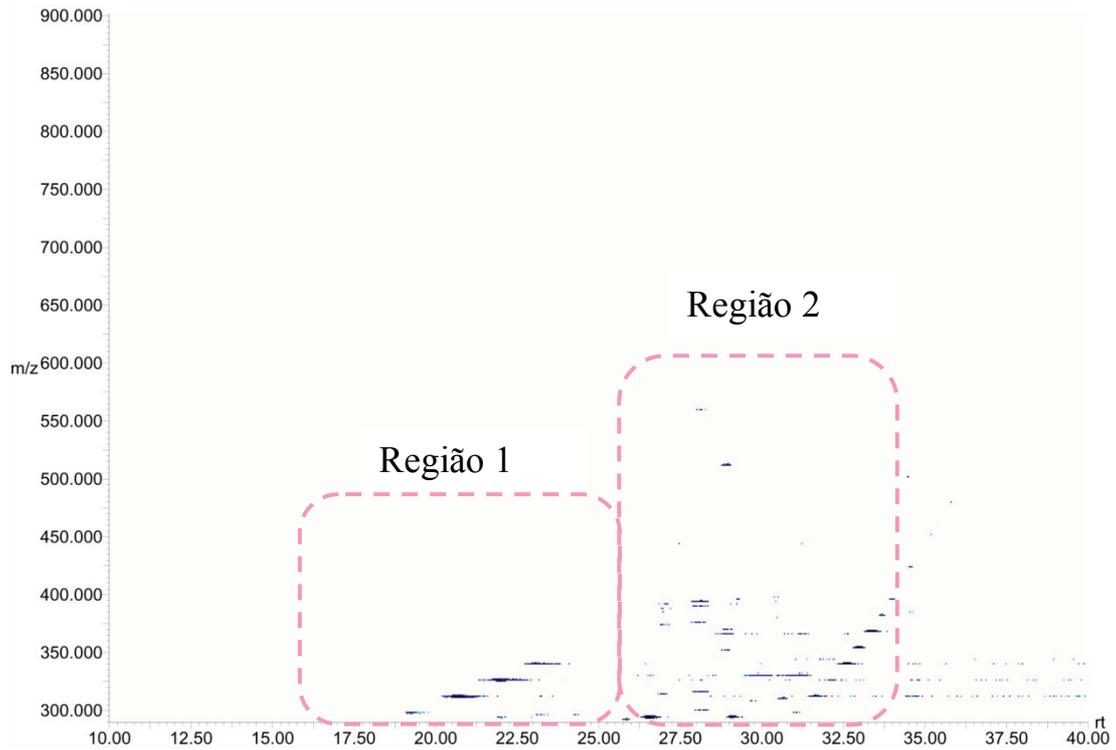
A obtenção e as análises por LC-MS das frações do extrato da planta foram realizadas como descrito no **Item 3.2.1.4**, e os resultados são mostrados a seguir. Apesar deste processo de fracionamento ter gerado frações biologicamente ativas para o extrato da raiz, optou-se iniciar os estudos pelas frações do extrato da planta, pois uma destas frações (**Alt\_Cau\_F3**) apresentou atividade contra todas as bactérias testadas como discutido no **Item 4.1.2b**.

Os estudos por LC-MS, frações do extrato do caule da planta foram realizados no modo negativo e positivo de ionização. A análise dos resultados foi realizada pela comparação dados no modo negativo de todas as frações e depois dos dados no modo positivo.

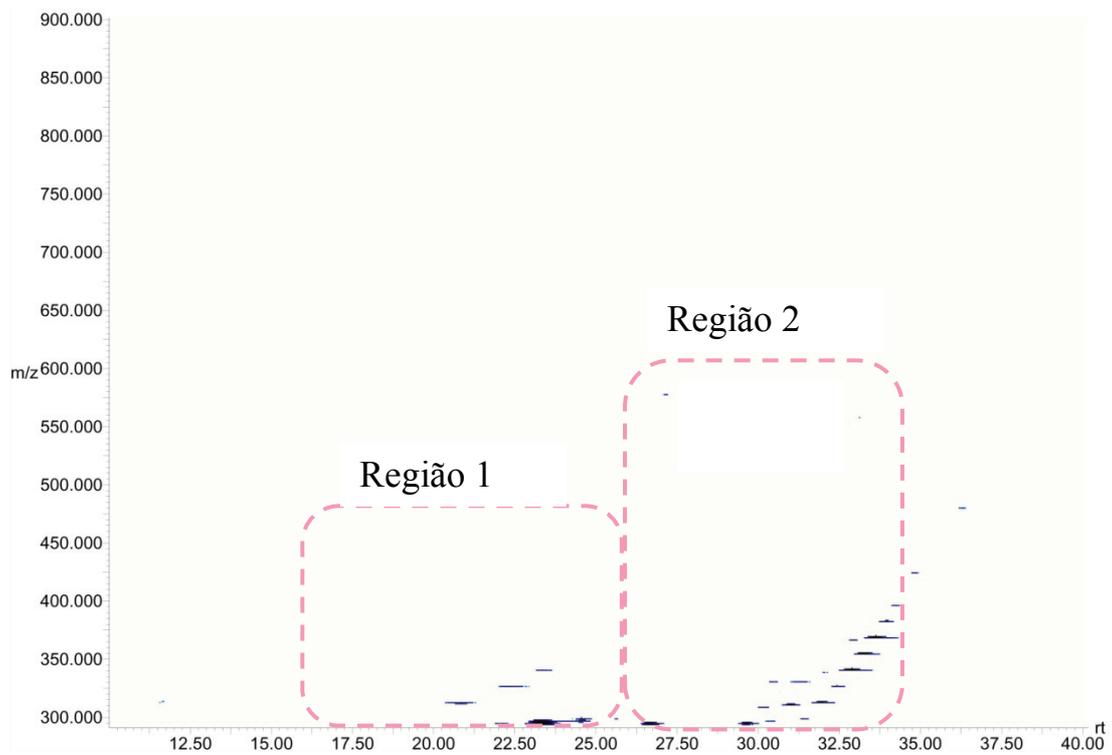
Assim, como na análise das partições líquido-líquido, não foi analisada a fração mais apolar (**Alt\_Cau\_F1**) obtida por este fracionamento, já que cromatografia líquida de fase reversa e ionização por ESI não representam a melhor forma de análise para compostos com características tão apolares.

Algumas regiões dos mapas obtidos para as análises no modo negativo estão destacadas para facilitar a discussão e análise dos dados. Assim inicialmente a fração alvo será **Alt\_Cau\_F3**, mostrada na **Figura 15**, que apresentou uma excelente atividade antibiótica. O objetivo da comparação, entre os dados de LC-MS das frações é identificar quais os possíveis compostos, presentes na fração **Alt\_Cau\_F3** que são responsáveis pela atividade antibiótica apresentada por esta fração.

Ao comparar-se a fração **Alt\_Cau\_F3** (**Figura 15**), com a fração **Alt\_Cau\_F2** (**Figura 14**), a diferença mais significativa é a presença de alguns íons com  $m/z$  na faixa de 300 presentes na fração **Alt\_Cau\_F3** que não aparecem na fração **Alt\_Cau\_F2** (região destacada como 1 nos mapas). Já na região marcada como 2 não existem diferenças significativas entre estas frações.



**Figura 14:** Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt\_Cau\_F2



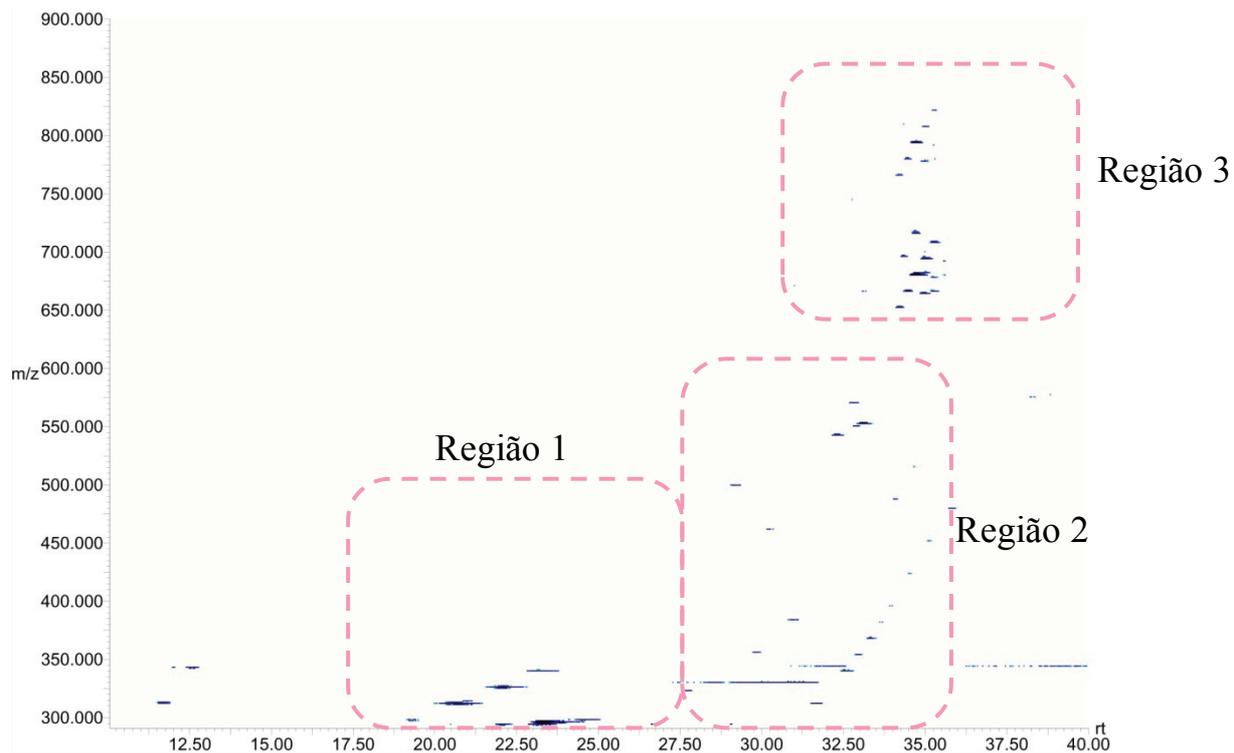
**Figura 15:** Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt\_Cau\_F3

A fração **Alt\_Cau\_F4 (Figura 16)**, que não possui atividade antibiótica contra nenhuma das bactérias testadas, como mostrado na **Tabela 6**, também apresentou os íons mencionados anteriormente. O que poderia sugerir que eles não apresentam correlação com a atividade da fração **Alt\_CauF3**. Porém, aparentemente a fração **Alt\_Cau\_F4 (Figura 16)** é mais complexa que a fração **Alt\_Cau\_F3 (Figura 15)**, já que ela apresenta um maior número de sinais no mapa de LC-MS quando comparada a esta última. Dessa forma, estes compostos com  $m/z$  em torno de 300 e tempo de retenção de aproximadamente 23 minutos, estariam presentes em menor quantidade em uma dada massa da fração **Alt\_Cau\_F4** quando comparada a mesma massa de fração **Alt\_Cau\_F3**, e assim, durante os testes de antibiose não estariam em concentração suficiente na fração **Alt\_Cau\_F4** para inibir o desenvolvimento das bactérias testadas.

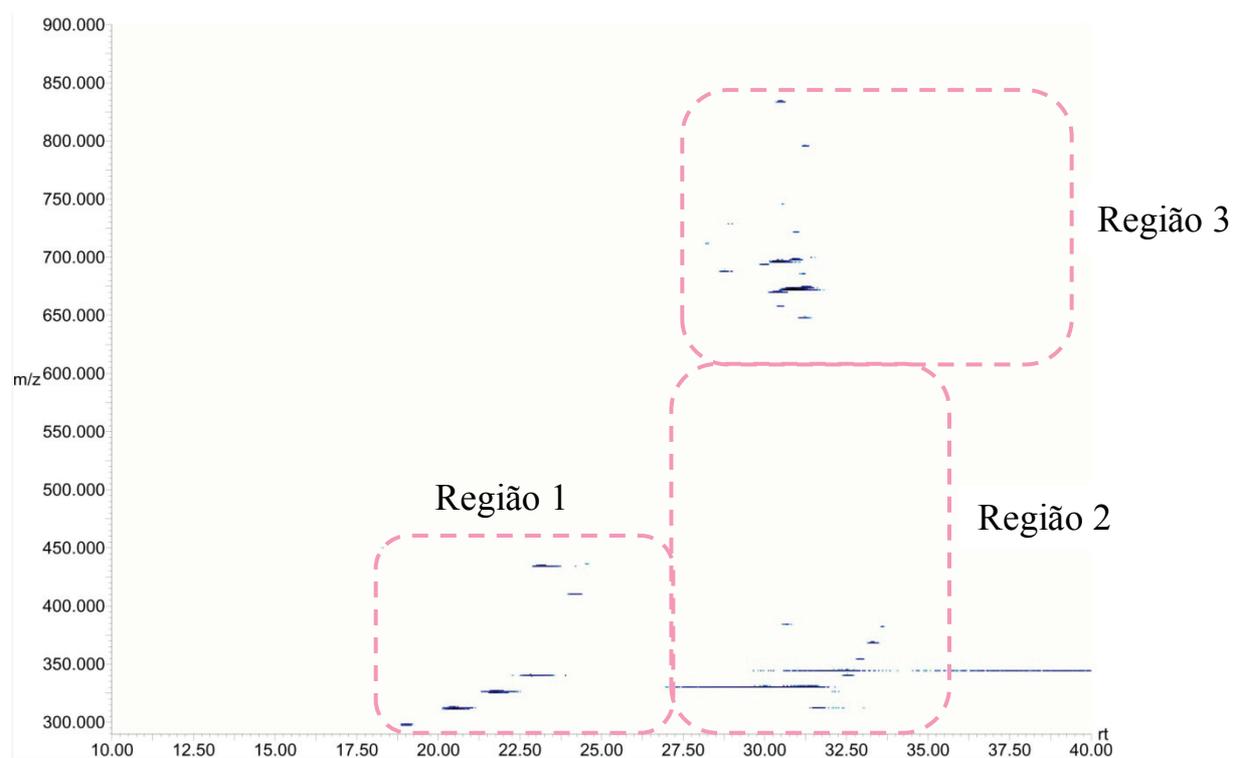
Estes íons com  $m/z$  em torno de 300 e tempo de retenção próximo de 23 minutos não estão presentes na fração **Alt\_Cau\_F5**, como mostrado na **Figura 17**.

É importante ressaltar que nenhuma técnica de detecção é abrangente o suficiente para analisar todos os compostos presentes em uma determinada amostra. Assim, até este momento da discussão dos resultados das análises de LC-MS, assumir que uma fração é mais complexa que outra, significa que determinada amostra possui um maior número de compostos ionizáveis por ESI no modo negativo.

Porém, neste estudo de desreplicação foi utilizado um conjunto de técnicas de detecção para que se tivesse o maior número possível de informações sobre as amostras antes de concluir quais os potenciais compostos alvo. Dessa forma, a seguir serão discutidos os dados de LC-MS no modo positivo de ionização, bem como mapas dos dados de LC-PDA.



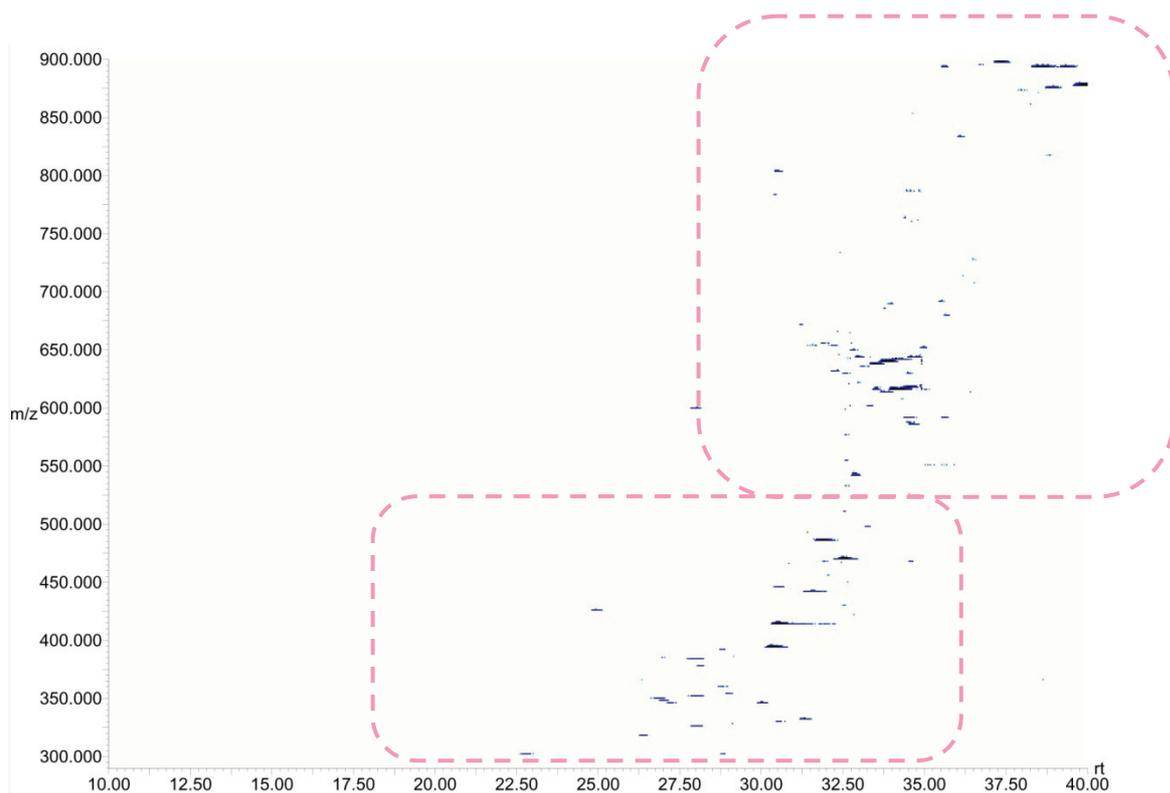
**Figura 16:** Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt\_Cau\_F4



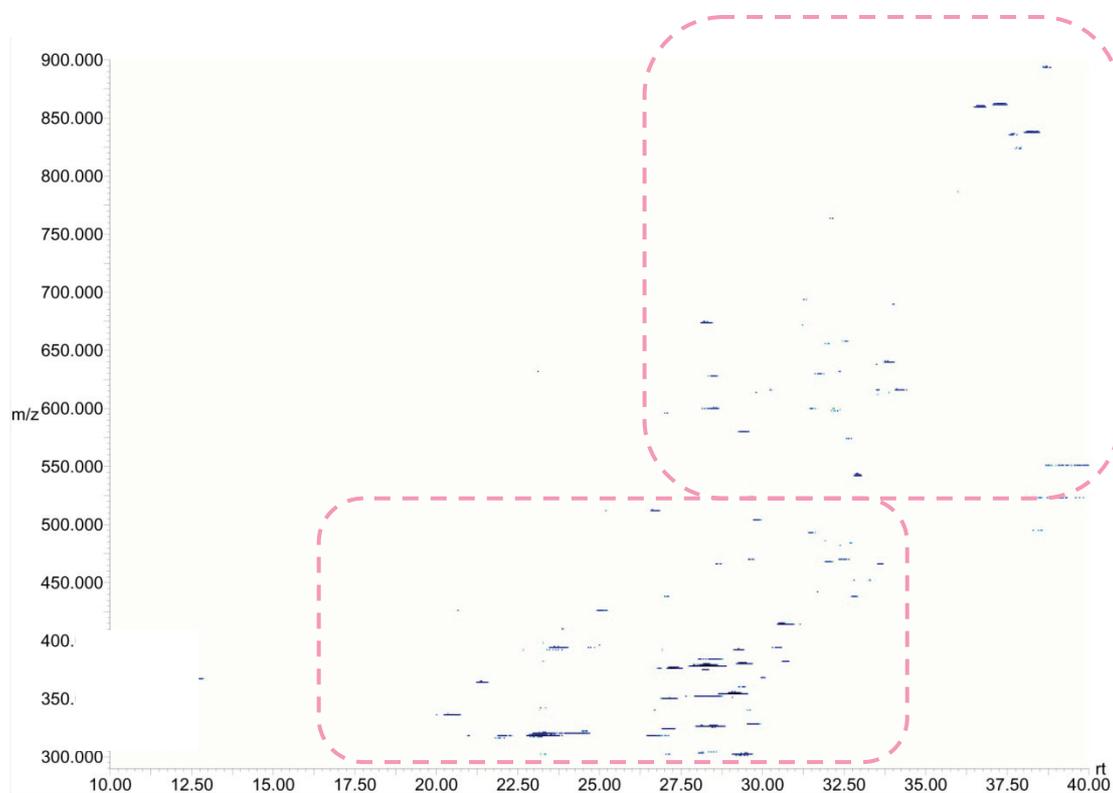
**Figura 17:** Mapa da análise por LC-MS no modo negativo da amostra Alt\_Cau\_F5

Para a análise dos dados de LC-MS no modo positivo das frações do caule utilizou-se a mesma estratégia que para o modo negativo, ou seja buscou-se identificar as diferenças entre a fração **Alt\_Cau\_F3** (biologicamente ativa) e as demais. Para, facilitar a discussão foram destacadas 2 regiões nos mapas destas amostras, nomeadas por 1 e 2. A fração **Alt\_Cau\_F3** (**Figura 19**) contém um maior número de íons na região 1 quando comparada às frações **Alt\_Cau\_F2** (**Figura 18**) e **Alt\_Cau\_F5** (**Figura 21**). Ao comparar as frações **Alt\_Cau\_F4** (**Figura 20**) e **Alt\_cau\_F3** observa-se que ambas possuem um grande número de íons nesta região. Porém, no geral primeira o mapa da fração **Alt\_Cau\_F4** apresenta um maior número de sinais quando comparado ao da fração **Alt\_Cau\_F3**.

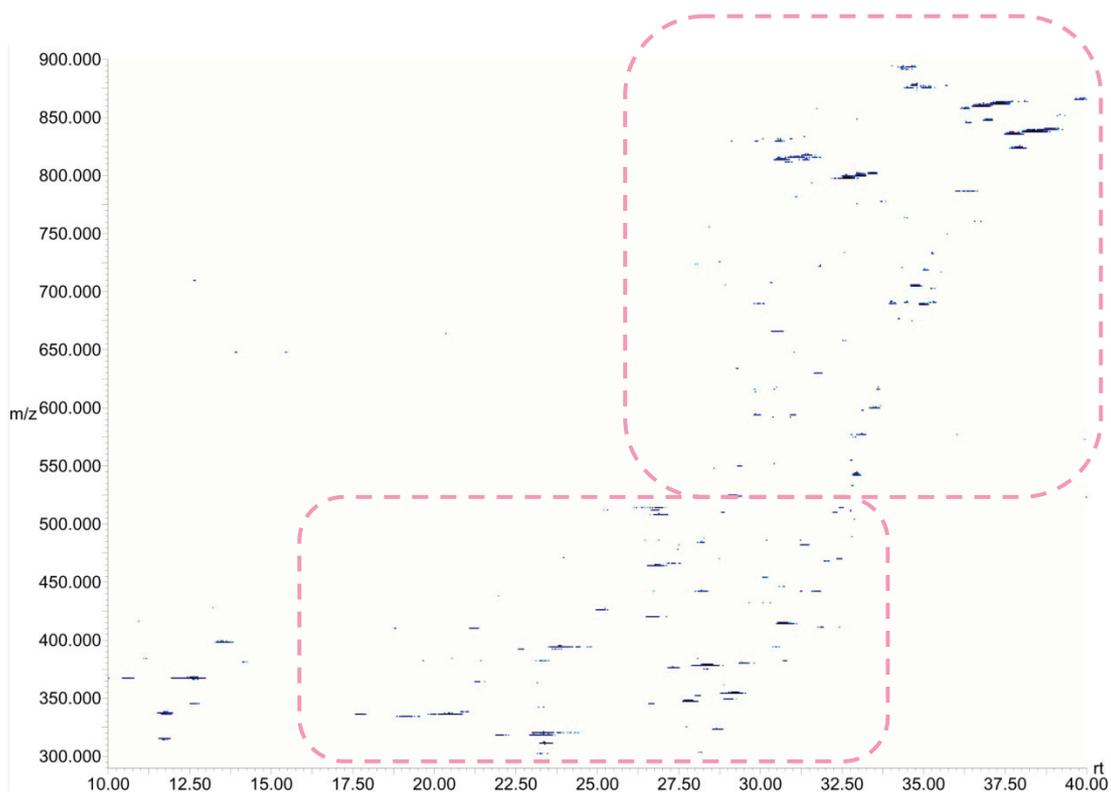
As análises por LC-MS no modo positivo e negativo, mostram que a fração **Alt\_Cau\_F4** possui um maior número de compostos ionizáveis em ambos os modos de ionização quando comparada a fração **Alt\_Cau\_F3**, sugerindo maior complexidade da fração **Alt\_Cau\_F4**. Estes compostos que tornam a amostra **Alt\_Cau\_F4** mais complexa estão presentes na região com  $m/z$  entre 600 e 900 e tempo de retenção entre 30 e 40 minutos, e estão presentes nos dois modos de ionização para esta fração (**Figura 20** e **Figura 16**). As análises de LC-PDA reforçam ainda mais a hipótese que de fração **Alt\_Cau\_F4** ser mais complexa que a **Alt\_Cau\_F3**, e serão discutidos a seguir.



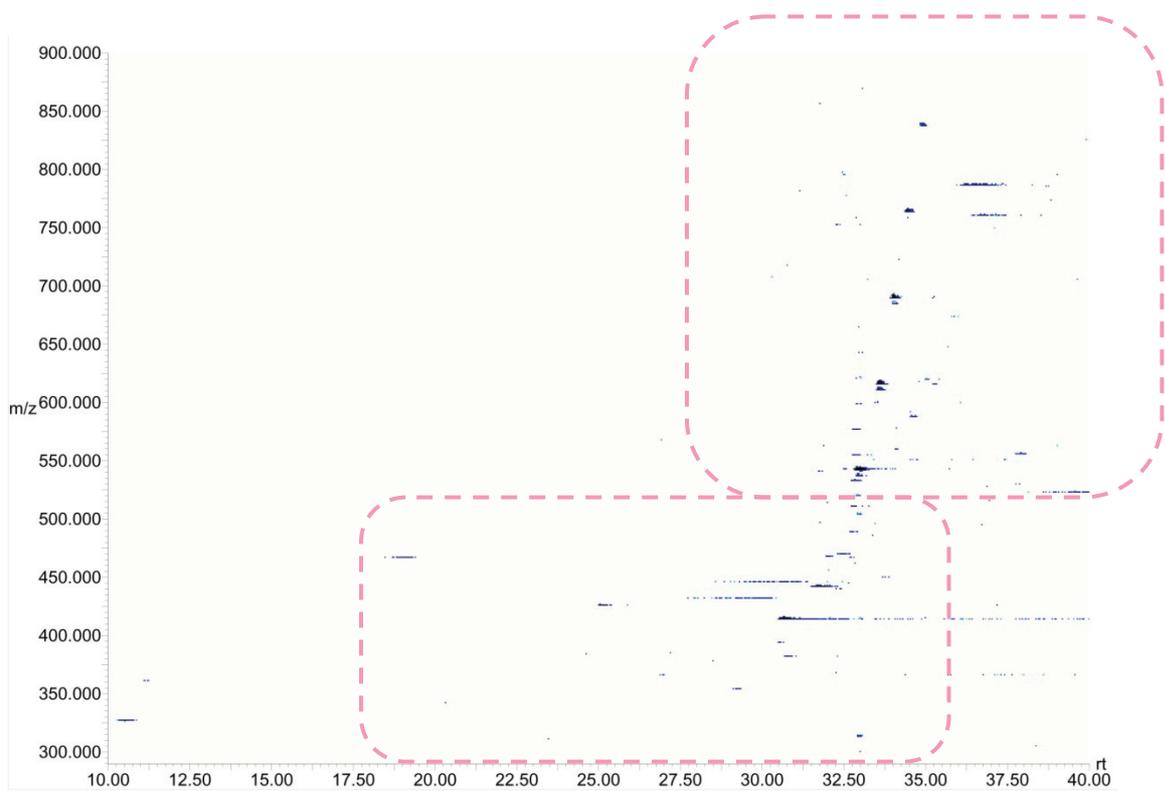
**Figura 18:** Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt\_Cau\_F2.



**Figura 19:** Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra Alt\_Cau\_F3.



**Figura 20:** da análise por LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F4**.

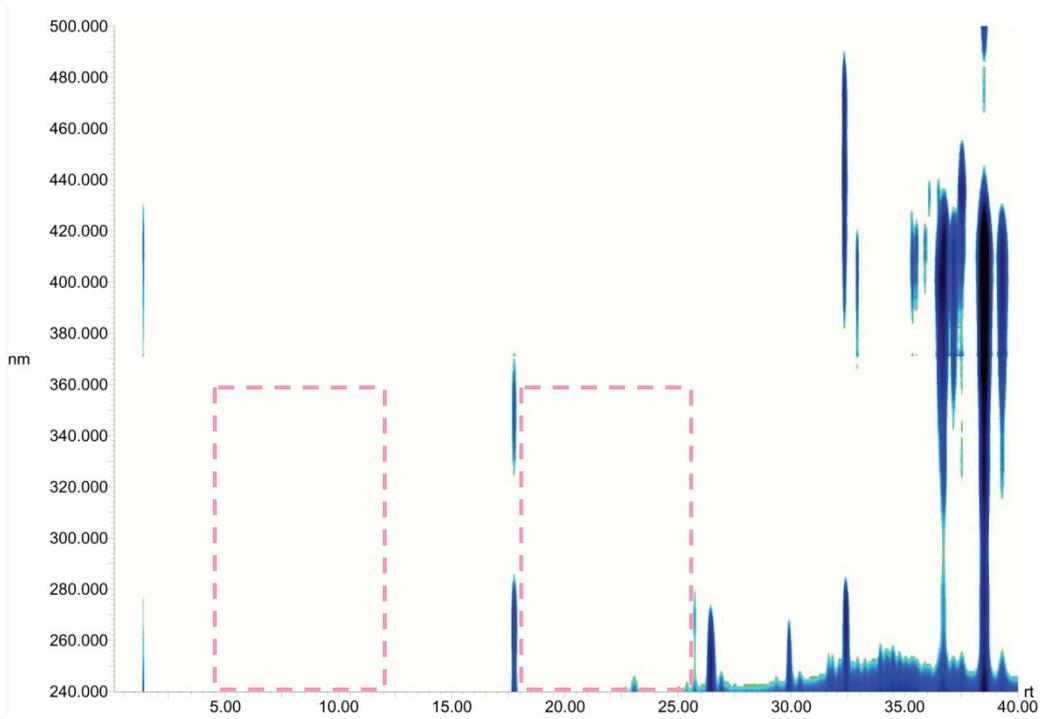


**Figura 21:** Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F5**.

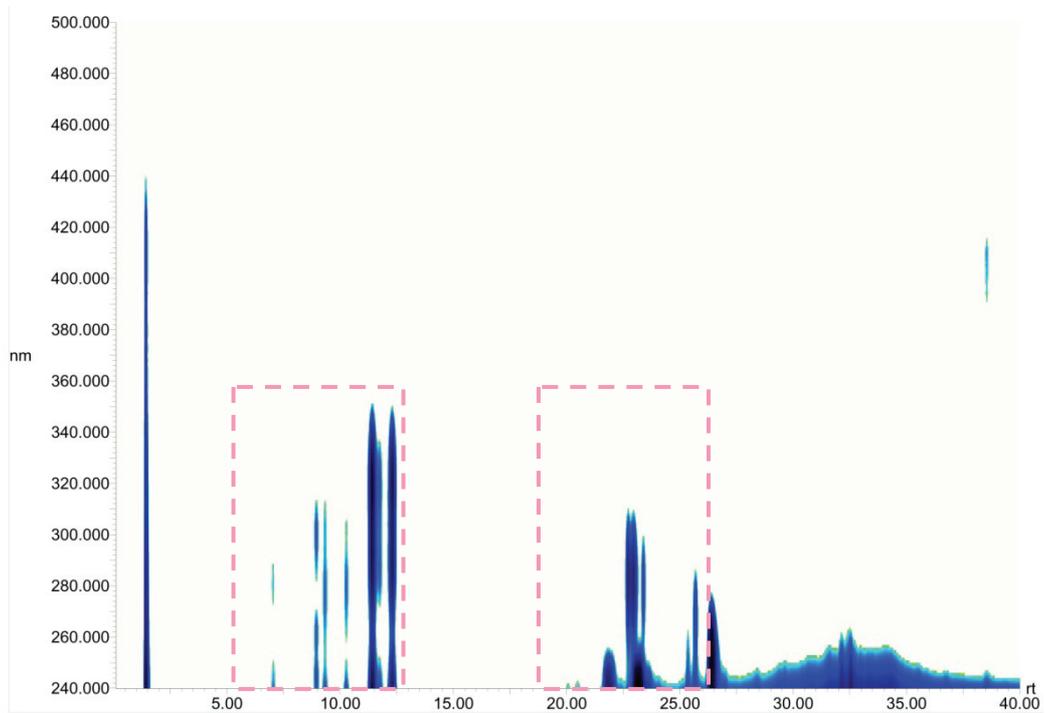
As **Figuras 22 à 25**, representam os mapas das análises de LC-PDA para as frações do extrato do caule da planta. Esses dados foram obtidos juntamente com as análises por LC-MS, e foram realizadas como descrito no **Item 3.2.1.4**. Pela hifenação do HPLC com o detector de PDA e o espectrômetro de massas, em uma mesma análise obtiveram-se dados de absorção no UV-Vis e MS (LC-PDA-MS).

Da mesma forma que os mapas obtidos por LC-MS, onde o eixo x representa tempo de retenção e o eixo y  $m/z$ , os mapas obtidos por LC-PDA são compostos por tempo de retenção (eixo x) vs comprimento de onda (eixo y) e a intensidade relativa de cada ponto é dada pela escala de cor. Esses dados são de grande utilidade para uma visão mais geral da amostra que esta sendo analisada.

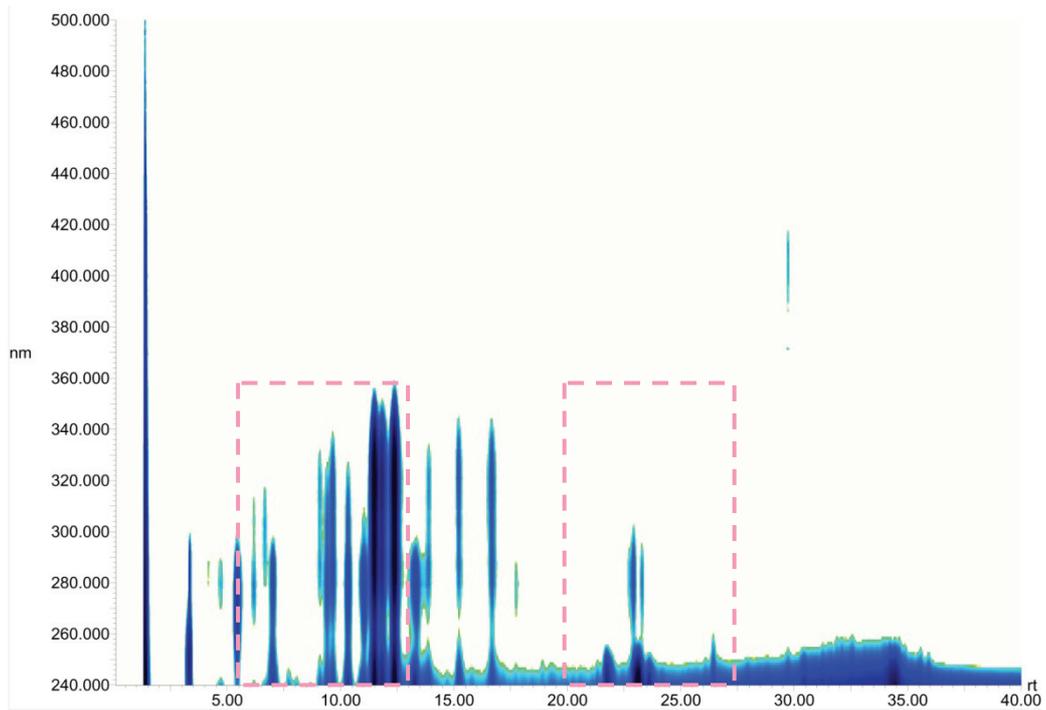
Comparando-se os mapas, observa-se que a amostra **Alt\_Cau\_F3 (Figura 23)** possui dois conjuntos de compostos, um com caráter mais hidrofílico ( $T_R$  entre 6 e 14 minutos) e outro mais hidrofóbico ( $T_R$  entre 20 e 27 minutos). Já as frações **Alt\_Cau\_F2 (Figura 22)** e **Alt\_Cau\_F5 (Figura 25)** praticamente não possuem sinais nestas faixas de tempo de retenção. A fração **Alt\_Cau\_F4 (Figura 24)** possui sinais com tempo de retenção principalmente até 17 minutos. Dessa forma os compostos com tempo de retenção entre 20 e 27 minutos, mencionados acima estão presentes principalmente na **Alt\_Cau\_F3**, sugerindo uma relação entre estes compostos e a atividade apresentada por esta fração. Os de LC-PDA mostram, também que a fração **Alt\_Cau\_F4** possui um número de compostos ainda maior do que se esperava pelas análises de LC-ESI-MS. Ou seja estão presentes nesta fração compostos entre 0 e 17 minutos (**Figura 24**) que não possuem uma ionização tão eficiente quanto outros presentes nesta amostra e não geram sinais nos mapas das análises por LC-MS no modo positivo ou negativo (**Figura 16 e 21**) mas possuem uma considerável absorção na região do ultravioleta (entre 240 e 360nm).



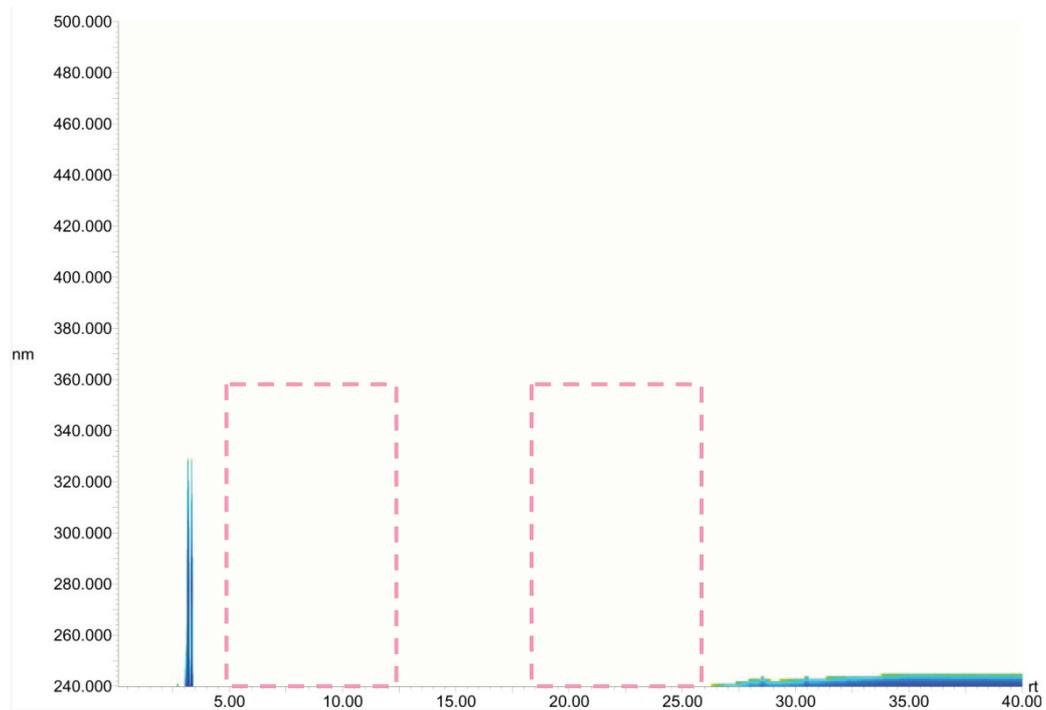
**Figura 22:** Mapa da análise por LC-PDA Alt\_Cau\_F2.



**Figura 23:** Mapa da análise por LC-MS PDA Alt\_Cau\_F3.

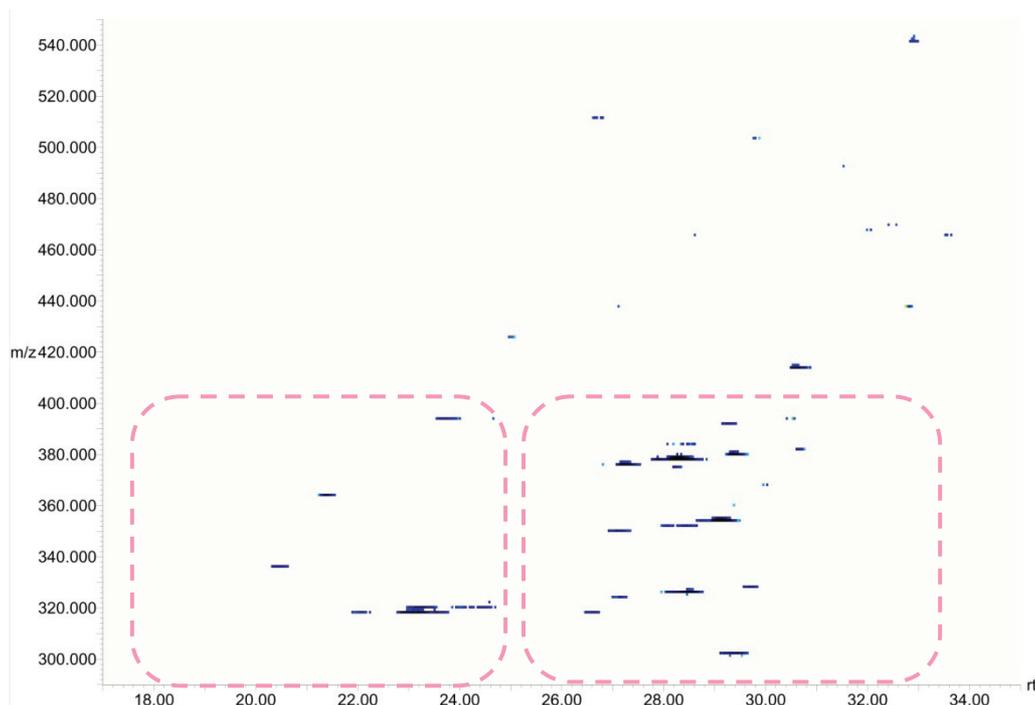


**Figura 24:** Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F4**.



**Figura 25:** Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F5**.

O conjunto de dados obtidos pelas análises de LC-PDA-MS no modo positivo e negativo indica que os compostos com tempo de retenção entre 20 e 30 minutos, presente na fração **Alt\_Cau\_F3** poderiam estar relacionados com a atividade antibiótica desta fração, uma vez que estão presentes em maior quantidade nesta do que nas outras frações. A **Figura 26** é uma ampliação da região 1 do mapa da análise no modo positivo da fração **Alt\_Cau\_F3**, e a **Tabela 7** resume a relação massa carga destes íons no modo positivo e os íons correspondentes que foram identificados no modo negativo, além do tempo de retenção de cada um deles. Todos os íons encontrados no modo negativo correspondem à  $m/z$  do modo positivo menos 24 unidades, o que sugere que os íons no modo positivo referem-se aos adutos de sódio das moléculas em questão.



**Figura 26:** Mapa da análise por LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F3** (ampliação)

**Tabela 7:** Resumo dos íons presentes na região 1 do mapa da análise no modo positivo para a amostra Alt\_Cau\_F3.

Tempo de retenção /min	<i>m/z</i> no modo positivo	<i>m/z</i> no modo negativo
20,3	335	311,5
21,4	363	-
23,2	317	293,5
23,6	393	-
23,6 e 24,5	319	295,6
24,6 e 25,6	321	297,6
27,1	323	-
27,1	349	-
27,2	375	-
28,3	377	-
28,3	327	-
28,5	325	-
29,1	353	-
29,3	379	-
29,5	301	-
29,3	391	-
30,6	413	-

Assim, a partir de todos os discutidos até o momento partiu-se para um novo fracionamento de fração **Alt\_Cau\_F3** utilizando-se cromatografia líquida em escala semi-preparativa a fim de obter uma fração ainda mais rica nestes compostos que a **Alt\_Cau\_F3**.

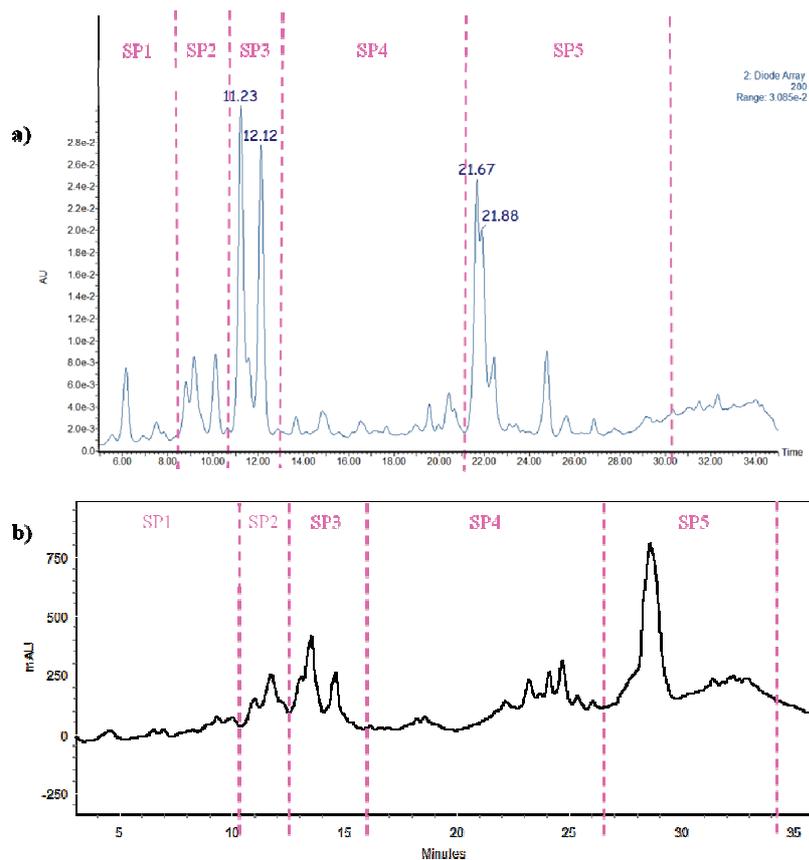
#### **4.1.4. Fracionamento da fração Alt\_Cau\_F3, análise química e biológica das novas frações obtidas**

##### **4.1.4.1. Fracionamento da fração Alt\_Cau\_F3**

O fracionamento da fração **Alt\_Cau\_F3** foi realizado como descrito no **Item 4.1.4.1**. Para isso utilizou-se HPLC em escala semi-preparativa, a fim de otimizar o processo de desreplicação. Este procedimento foi proposto, levando-se em consideração a pequena quantidade de material necessária e o conhecimento prévio sobre comportamento cromatográfico em fase reversa dos compostos alvo, obtidos pelas análises em escala analítica realizadas anteriormente.

Entretanto, como não havia coluna cromatográfica com mesma fase estacionária da coluna analítica (utilizada nas análises por LC-PDA-MS) que possibilitasse o estudo em escala semi-preparativa, optou-se utilizar uma coluna com fase estacionária Hypersil C18. Apesar do mecanismo de separação (hidrofobicidade), e o tamanho de partícula destas duas fases serem os mesmos e todos os parâmetros cromatográficos terem sido otimizados para a separação em escala semi-preparativa (fluxo da fase móvel, quantidade de amostra, etc.) a separação cromatográfica obtida estas análises foi diferente, como pode ser visto pela comparação dos cromatogramas da **Figura 27**.

Nesta figura estão representados os cromatogramas com comprimento de onda em 280nm obtidos nas análises analítica (**Figura 27a**) e semi-preparativa (**Figura 27b**), e estão selecionadas as regiões referentes às frações coletadas durante a eluição dos compostos na análise em escala semi-preparativa (**Figura 27b**) além dos períodos correspondentes no cromatograma da escala analítica (**Figura 27a**).



**Figura 27:** Análise da fração Alt\_Cau\_F3 por LC-UV, com  $\lambda$  280nm.

Após a obtenção da 5 frações (SP1-SP5) procedeu-se como descrito no **Item 3.2.1.6** para a concentração das amostras, utilizando-se SPE. E para que os compostos de interesse ficassem retidos no cartucho de extração em fase sólida, à cada fração coletada adicionou-se 3 vezes o volume de água para diminuir da força do solvente. Após a retenção dos compostos nos cartuchos contendo fase estacionária ODS, os mesmos foram eluídos com metanol, e secos com fluxo de ar. Os dados de volume, volume de água adicionado e massa de cada fração estão descritos na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Valores de volume e massas das frações obtidas pelo fracionamento em HPLC Semi-preparativo e extração em fase sólida

Fração	Volume coletado	Volume de água adicionado	Massa da fração seca
SP2	5,8 mL	17,4 mL	>1mg
SP3	8,1mL	24.3 mL	5mg
SP4	24,1 mL	72,3 mL	6mg
SP5	18,4 mL	49,2 mL	12mg

Após o fracionamento todas as frações tiveram sua atividade antibiótica avaliada.

#### 4.1.4.2. Avaliação da atividade antibiótica das frações da amostra Alt\_Cau\_F3 obtidas por HLC semi-preparativo

A análise da atividade antibiótica das frações foi realizada como descrito no **Item 3.2.1.3**, e os resultados estão resumidos na **Tabela 9**. Estes testes foram realizados com duas concentrações diferentes das amostras, pois neste ponto o número de frações a ser analisado é reduzido, viabilizando testes com diferentes concentrações. Foram ensaiadas 7 amostras: **Alt\_Cau\_F3\_SP2** a **Alt\_Cau\_F3\_SP5**, a fração de onde elas foram originadas **Alt\_Cau\_F3**, além de **Alt\_Cau\_F2** e **Alt\_Cau\_F4**. A amostra **Alt\_Cau\_F3\_SP1** não foi testada devido a pequena massa obtida.

Este processo de fracionamento foi eficiente para enriquecer uma fração com os compostos ativos, pois a fração **Alt\_Cau\_F3\_SP5** apresentou uma concentração mínima inibitória 5 vezes menor que a fração **Alt\_Cau\_F3** de onde ela é proveniente, como destacado na **Tabela 9**.

**Tabela 9:** Concentração mínima inibitória das frações obtidas pelo fracionamento da amostra Alt\_Cau\_F3

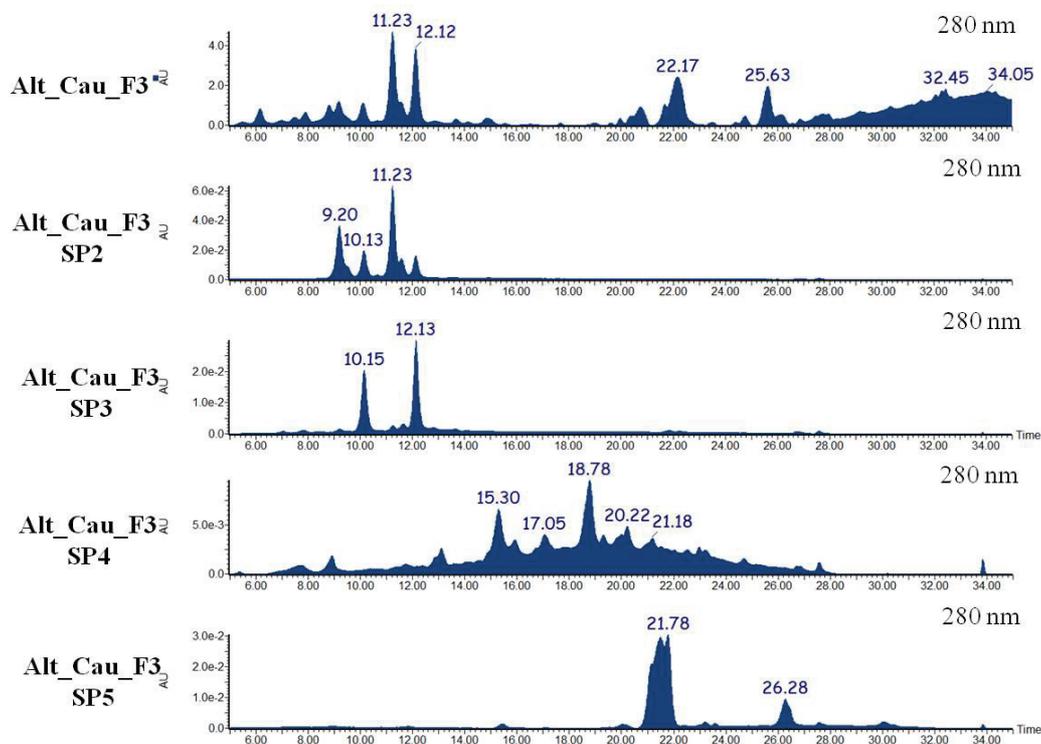
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Alt_Cau_F3 SP2	-	-	-	-	-
Alt_Cau_F3 SP3	-	-	-	-	-
Alt_Cau_F3 SP4	500	500	500	500	500
Alt_Cau_F3 SP5	100	100	100	100	100
Alt_Cau_F2	-	-	-	-	-
Alt_Cau_F3	500	500	500	500	500
Alt_Cau_F4	-	500	-	-	-

Com a informação de que os compostos ativos estão presentes em uma maior proporção na fração **Alt\_Cau\_F3\_SP5**, partiu-se para a análise por LC-PDA-MS desta e das outras frações obtidas neste processo de fracionamento, e comparação destes dados com os outros dados obtidos anteriormente.

#### 4.1.4.3. Análise por LC-PDA-MS das frações da amostra **Alt\_Cau\_F3**

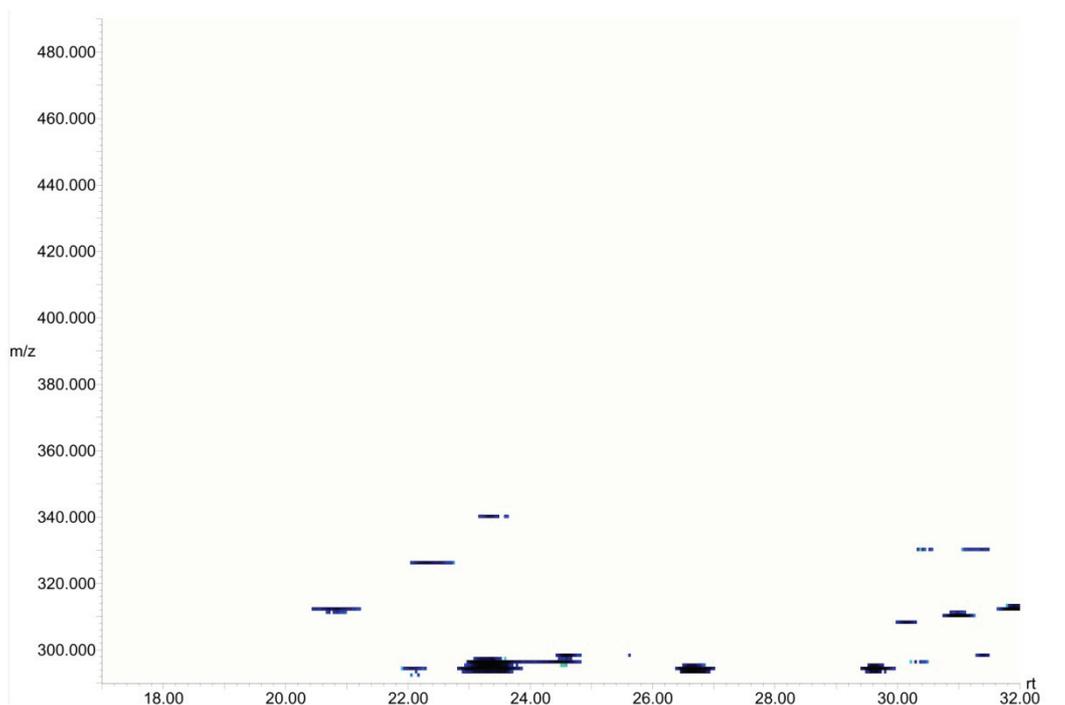
A comparação entre os cromatogramas de LC-PDA das frações obtidas por HPLC semi-preparativo (**Figura 28**) mostram que o fracionamento foi eficiente para separar compostos por diferença de hidrofiliicidade. Entretanto pode-se observar uma diferença de seletividade entre as fases estacionárias das colunas analítica e semi-preparativa. Ou seja a fração **Alt\_Cau\_F3\_SP2** foi eluída antes da fração **Alt\_Cau\_F3\_SP3** na coluna semi-preparativa, mas nem todos os compostos presentes nesta amostra são eluídos antes, na coluna

analítica quando comparados aos compostos presentes na amostra **Alt\_Cau\_F3\_SP3**.

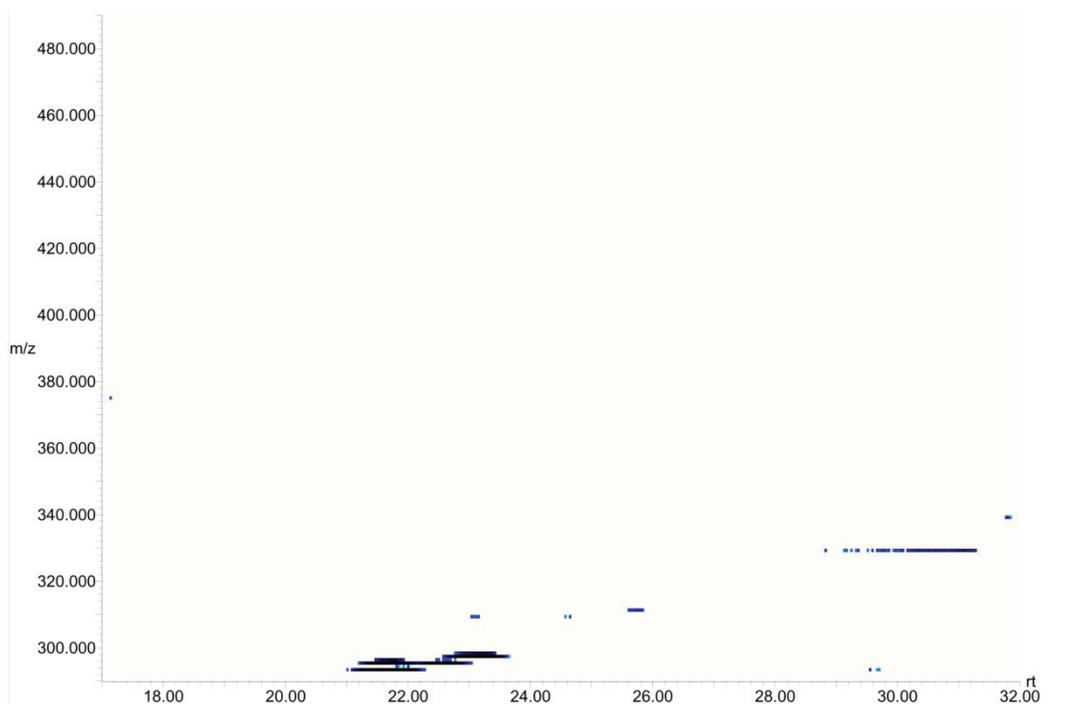


**Figura 28:** Cromatogramas das frações obtidas a partir de HPLC preparativo

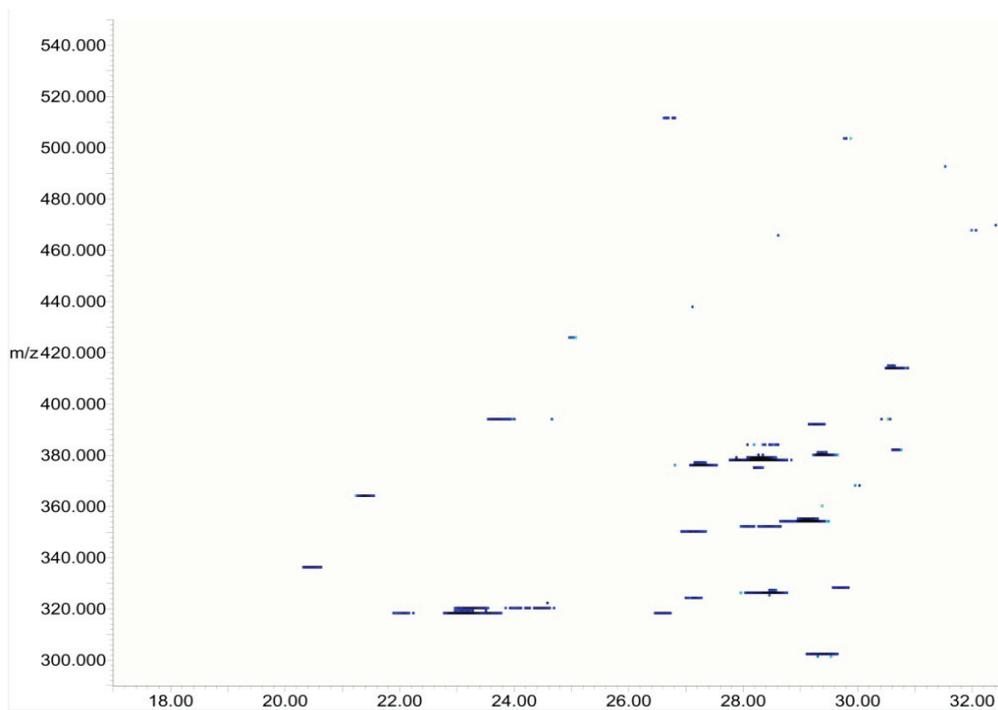
Porém o enfoque para os estudos de desreplicação será dado à fração **Alt\_Cau\_F3\_SP5** já que esta apresentou a melhor atividade antibiótica. Pelos cromatogramas de UV em 280nm, mostrados na figura acima, pode-se observar que esta fração foi enriquecida com os compostos com tempo de retenção entre 20 e 30 minutos. O que, confirmaria as proposições anteriores de que esses compostos estariam relacionados com a atividade antibiótica da planta. O enriquecimento da fração **Alt\_Cau\_F3\_SP5** com os compostos em torno de 22 minutos pode ser confirmado pela comparação dos mapas das análises LC-MS das frações **Alt\_Cau\_F3** e **Alt\_Cau\_F3\_SP5** no modo negativo (**Figuras 29 e 30**) e no modo positivo de ionização (**Figuras 31 e 32**).



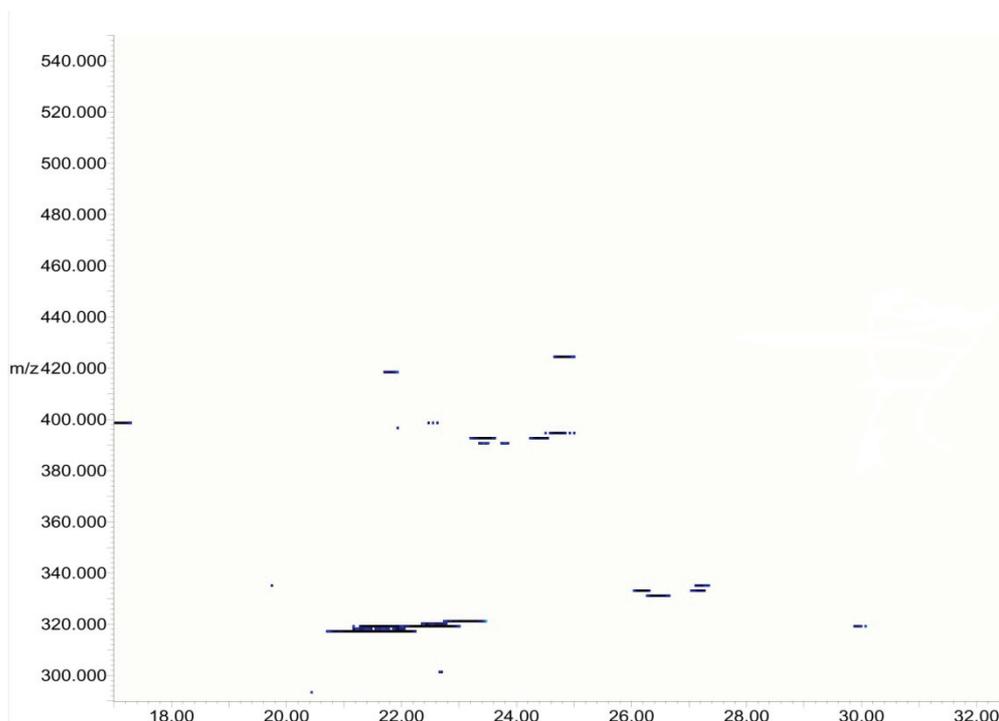
**Figura 29:** Mapa a análise de LC-MS no modo negativo da amostra *Alt\_Cau\_F3*.



**Figura 30:** Mapa a análise de LC-MS no modo negativo da amostra *Alt\_Cau\_F3\_SP5*.



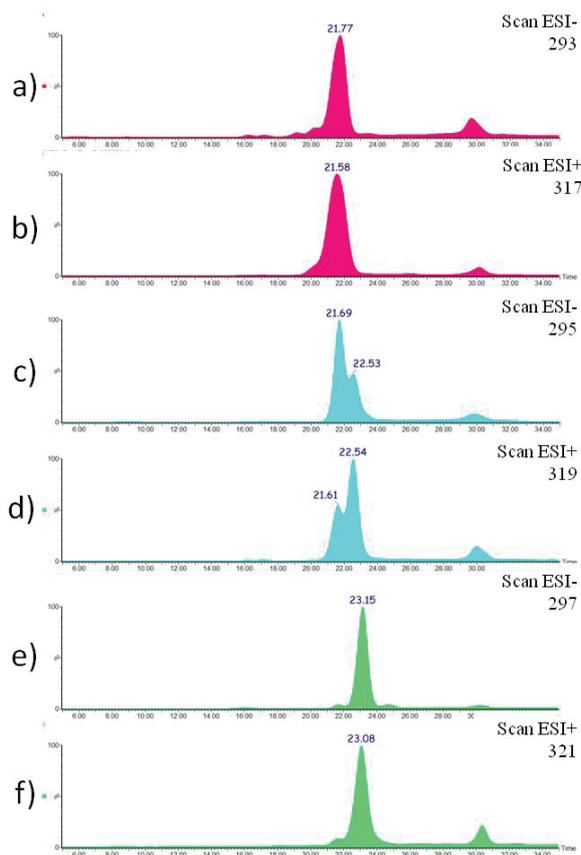
**Figura 31:** Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F3**.



**Figura 32:** Mapa da análise de LC-MS no modo positivo da amostra **Alt\_Cau\_F3\_SP5**.

Esses compostos são bastante sensíveis a pequenas variações nas condições cromatográficas como: temperatura, pH da fase móvel e até mesmo no tempo de condicionamento da coluna. Dessa forma há um desvio de dois minutos entre o tempo de retenção destes compostos nas análises da fração **Alt\_Cau\_F3** e **Alt\_Cau\_SP5**, pois estas frações foram analisadas em períodos diferentes. Alguma alteração nas condições cromatográficas ocasionou esta diferença no tempo de retenção destes compostos. Assim, as informações cromatográficas, juntamente com os dados de espectrometria de massas e absorção no UV-Vis auxiliaram na identificação destes compostos.

Essas ampliações dos mapas de LC-MS no modo positivo e negativo das amostras **Alt\_Cau\_F3** e **Alt\_Cau\_F3\_SP5** mostram que houve um enriquecimento desta última com compostos com  $m/z$  em torno de 290 no modo negativo e 320 no modo positivo. Como mostrado na **Tabela 7**, esses íons devem ser relativos aos mesmos compostos, sendo que os íons no modo positivo correspondem ao aduto de sódio de cada molécula e no modo negativo à molécula deprotonada. A **Figura 33** representa os cromatogramas de íons selecionados para estes íons, no modo negativo e positivo respectivamente, sendo que os íons no modo positivo ( $[M+Na]^+$ ) e no modo negativo ( $[M-H]^-$ ) possuem o mesmo tempo de retenção comprovando que devem estar relacionados aos mesmos compostos.



**Figura 33:** Cromatogramas de íons selecionados na amostra Alt\_Cau\_F3\_SP5. Modo negativo  $m/z$  :a) 295, c)293 e e) 297 e modo positivo  $m/z$  : b)317 c)319 e f)321

A **Tabela 10** resume o tempo de retenção médio, a relação massa carga nos dois modos de ionização e a massa dos compostos. A partir destes dados, iniciaram-se os estudos de fragmentação para elucidação estrutural destes compostos.

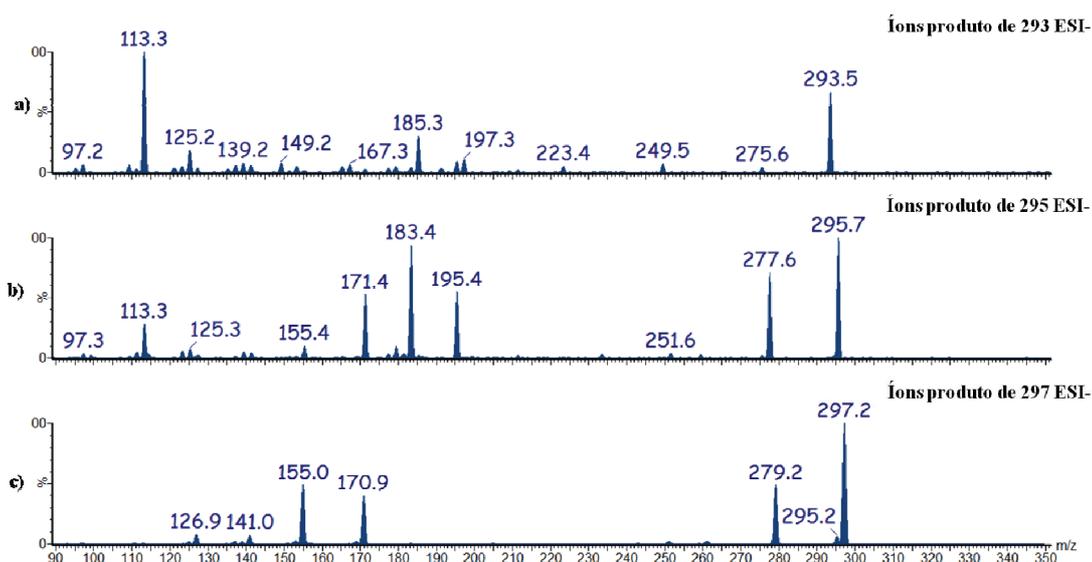
**Tabela 10:** Relação massa carga nos modos negativo e positivo e massa do compostos.

Tempo de retenção (médio)	$m/z$ no modo negativo. $[M-H]^-$	$m/z$ no modo positivo $[M+Na]^+$	Massa do composto. (g/mol)
21,6	293	317	294
22,0	295	319	296
23,1	297	321	298

#### 4.1.4.4. Estudo de fragmentação dos compostos da fração Alt\_Cau\_F3\_SP5

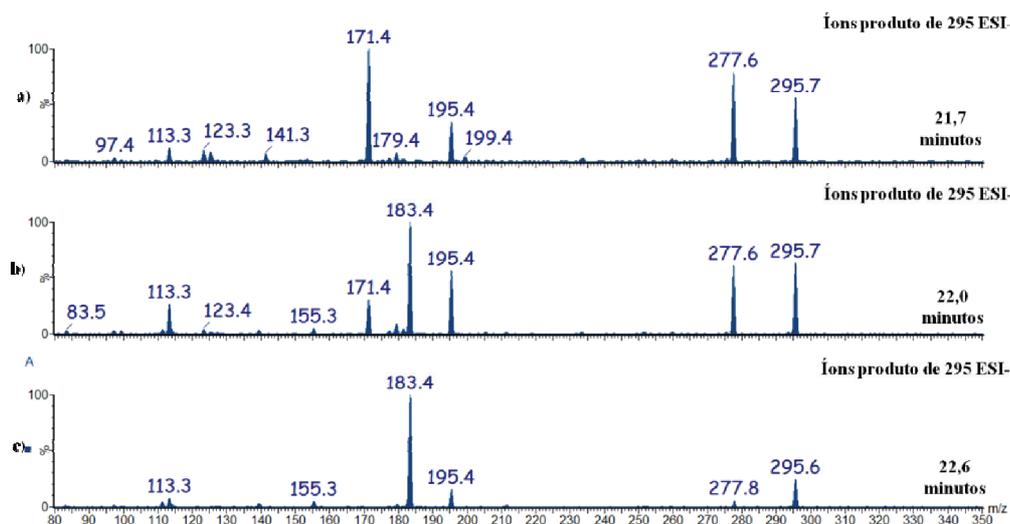
O estudo de fragmentação desses compostos foi realizado no modo de ionização negativo, pois como discutido anteriormente os íons presentes no modo positivo correspondem aos adutos de sódio e não ao íon protonado. Esses adutos geralmente apresentam uma difícil fragmentação e, neste caso, contribuem pouco para a elucidação estrutural das moléculas.

Na **Figura 34** são mostrados os espectros de íons produtos obtidos para os íons  $m/z$  293, 295 e 297 respectivamente. Devido ao semelhante comportamento cromatográfico, espectrométrico e perfil de fragmentação apresentados por esses íons, pode-se inferir que eles pertencem a uma mesma classe de compostos, e possivelmente a diferença entre eles é a presença/ausência de insaturações. Isso pode ser evidenciado pela diferença de massa de 2 Da que se mantém em alguns dos fragmentos, como  $m/z$  277 e 279 ou  $m/z$  183 e 185, respectivamente.



**Figura 34:** Espectros de íons produtos no modo negativo dos íon  $m/z$ : a) 293, b) 295 e c) 297

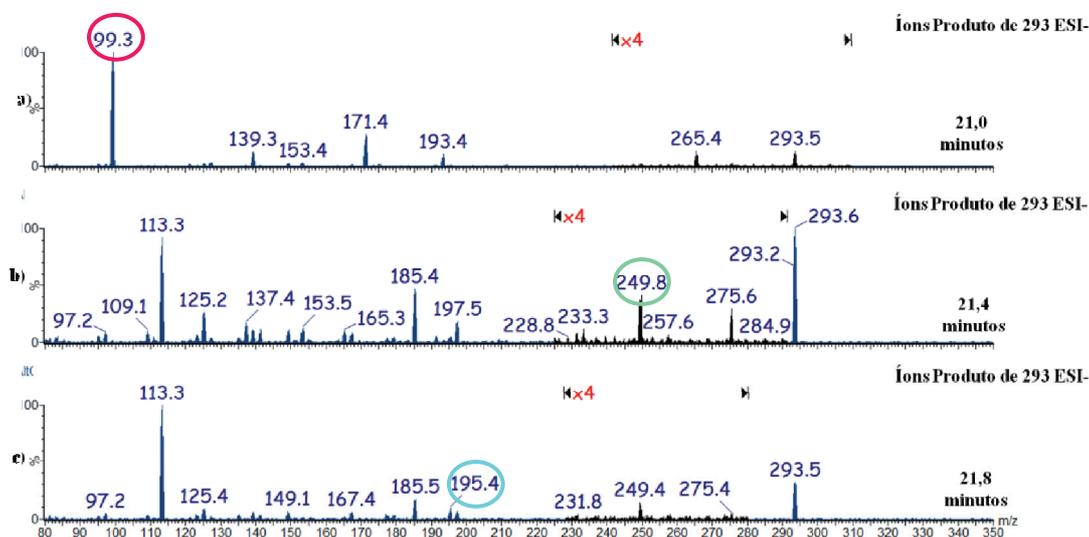
No cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  295 (**Figura 33 c e d**), observa-se que existem pelo menos dois isômeros com essa relação massa carga que possuem um comportamento cromatográfico ligeiramente diferente, originando duas bandas que não são totalmente separadas neste método cromatográfico ( $Tr= 21,7$ e  $Tr=22,5$  minutos). Entretanto, ao analisarem-se os espectros de íons produto, em diferentes regiões destas bandas, observa-se a presença ao menos de três diferentes perfis de espectros de íons produtos para  $m/z$  295. Esses espectros de íons produto são mostrados na **Figura 35**, onde destaca-se o tempo de retenção referente a de cada um deles. Isso sugere que a banda referente a  $m/z$  295 é formada por pelo menos três isômeros que possuem diferentes perfis de fragmentação.



**Figura 35:** Espectros de íons produtos no modo negativo de  $m/z$  295 em diferentes regiões da banda cromatográfica: a) 21,7; b) 22,0 e c) 22,6 minutos.

O mesmo ocorre para o íon  $m/z$  293, porém a separação dos isômeros é mesmo eficiente que para o íon  $m/z$  295. Assim o cromatograma de íon selecionado para  $m/z$  293 apresenta uma única banda cromatográfica (**Figura 33a**). Entretanto, cada região desta banda possui um perfil diferente

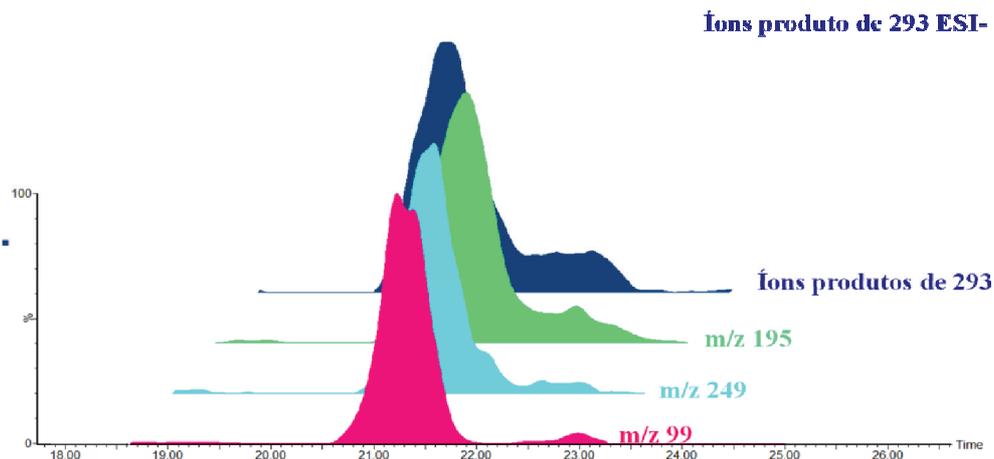
para o espectro de íons produto, como mostrado na **Figura 36**. E alguns íons como  $m/z$  99,3; 249,8 e 195,4 são produtos de apenas um dos isômeros



**Figura 36:** Espectros de íons produtos no modo negativo de  $m/z$  293 em diferentes regiões da banda cromatográfica: a) 21,0; b) 21,4 e c) 21,8 minutos.

Ao processar os cromatograma de íons produto, selecionando cada um destes íons fragmento ( $m/z$  99,3; 249,8 e 195,4) obtêm-se 3 bandas cromatográficas com ligeira diferença no tempo de retenção, sugerindo a existência de ao menos 3 isômero de  $m/z$  293 com diferentes perfis de fragmentação. A somatória destas três bandas resulta na área da banda cromatográfica dos fragmentos de  $m/z$  293, como mostrado na **Figura 37**.

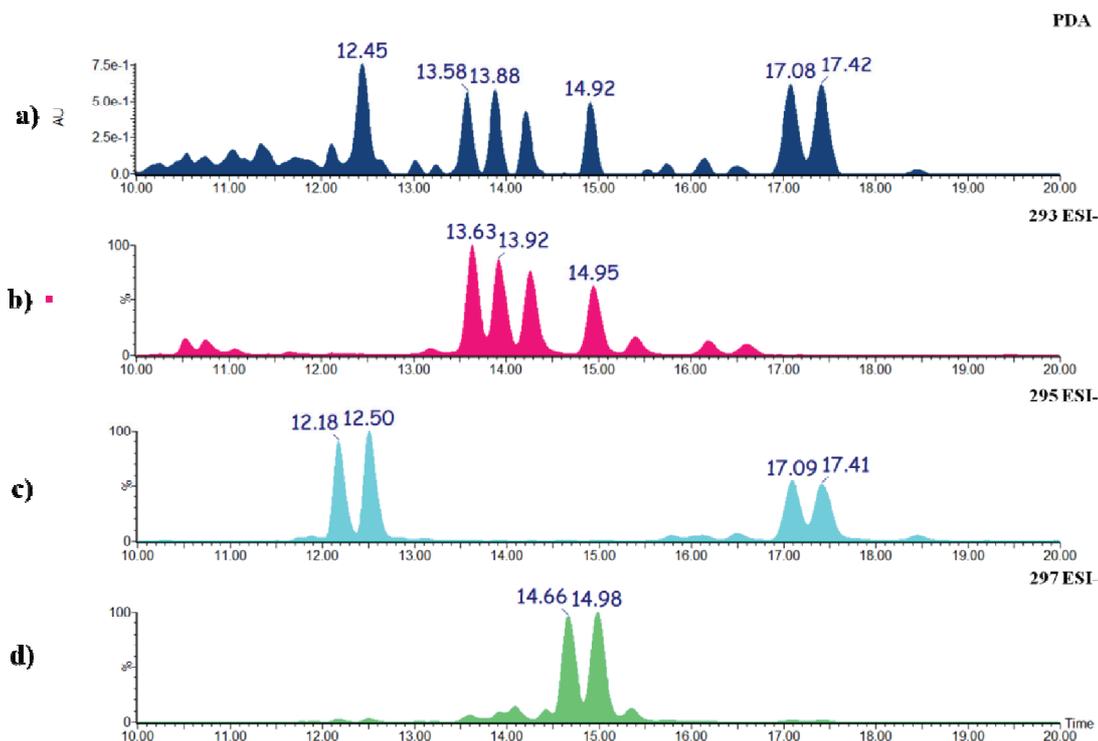
Para se obter um espectro de íons produto de cada isômero separadamente, foi necessário otimizar o método cromatográfico para melhorar a separação entre eles. A discussão envolvendo esta otimização esta apresentada a seguir.



**Figura 37:** Cromatogramas de íons fragmentos selecionados de  $m/z$  293.

#### 4.1.4.5. Separação dos isômeros

São muitos os fatores que influenciam uma separação cromatográfica de compostos orgânicos, entre eles o tamanho da coluna cromatográfica, o tamanho das partículas, a seletividade da fase estacionária, as diversas interações com a fase móvel, entre outros. Após a otimização do método cromatográfico obteve-se melhor separação cromatográfica para os compostos alvo neste estudo, utilizando-se uma coluna *Ascentis® Express C18 HPLC*, partícula de 2,7 $\mu$ m, 100x4,6mm e acetonitrila como modificador orgânico na fase móvel. Os cromatogramas de íons selecionados representados na **Figura 38** mostram a separação cromatográfica obtida para os diferentes isômeros, de cada um dos três íons em estudo  $m/z$  293, 295 e 297, utilizando-se as condições descritas acima. Sendo a **Figura 38 a)** referente ao cromatograma de PDA da análise da fração **Alt\_Cau\_F3\_SP5** e as demais referentes aos cromatogramas de íons selecionados para  $m/z$  293, 295 e 297 respectivamente, nesta mesma amostra.



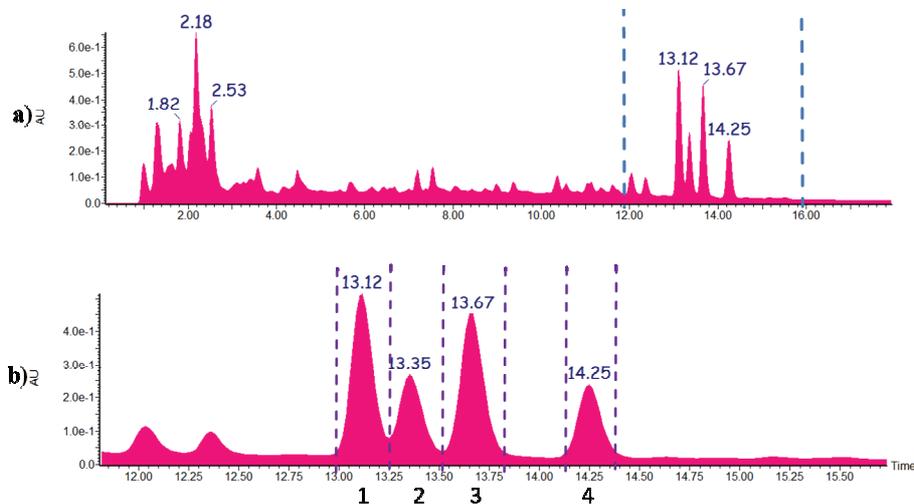
**Figura 38:** Cromatogramas de .a) PDA e Íons selecionados  $m/z$  b) 293; c) 295 e d) 297 para a fração Alt\_Cau\_F3\_SP5.

A partir da separação dos isômeros foi possível obter os espectros de íons produto, e de absorção no UV-Vis de cada um deles. Além disso, o uso da técnica de LC-SPE-NMR possibilitou a aquisição de espectro de  $^1\text{H}$  para algumas das bandas cromatográficas. Esses experimentos foram de grande importância para a elucidação estrutural dos compostos. Conferindo grande eficiência para o processo de desrepliação proposto neste trabalho.

#### 4.1.4.6. Estudo por LC-SPE-NMR dos compostos presentes na fração Alt\_Cau\_F3\_SP5

Como discutido no **Item 3.2.1.7**, as análises utilizando LC-SPE-NMR tiveram início com a seleção das bandas cromatográficas de interesse a partir de um cromatograma de LC-UV. Os compostos presentes nestas bandas

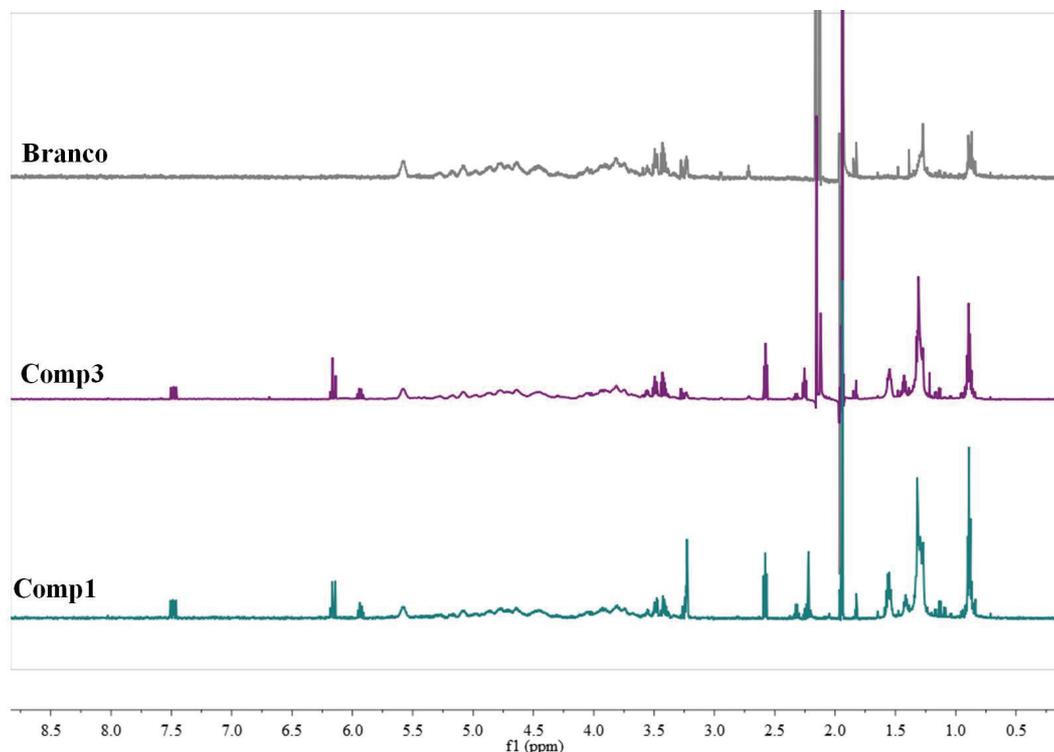
foram trapeados em cartuchos de extração em fase sólida, que foram secos e posteriormente eluídos para aquisição dos dados de NMR  $^1\text{H}$ . Na **Figura 39** são mostrados: o cromatograma da amostra **Alt\_Cau\_F3**, em 280nm e a ampliação da região referente aos compostos que foram selecionados para as análises por LC-SPE-NMR. No item **b** desta figura estão destacadas as regiões trapeadas nos cartuchos de extração em fase sólida (SPE). Essas quatro bandas correspondem aos isômeros com  $m/z$  293, como pode ser visto pela comparação com a **Figura 38b**).



**Figura 39:** Cromatogramas a) da análise da LC-UV em 280 da amostra **Alt\_Cau\_F3**; b) ampliação da região de interesse.

Até o momento apenas as bandas em 13,12 e 13,67 minutos foram analisadas. Pois os cartuchos de SPE apresentavam muitos interferentes como pode ser observado pela comparação dos espectros de hidrogênios presentes na **Figura 40**. Nesta figura são mostrados os espectros de hidrogênio dos compostos 1 e 3 ( $T_r=13,12$  e  $13,67$  minutos) bem como um espectro branco (resultante da eluição de um cartucho que não continha amostra). Praticamente todos os sinais na região entre 3,5 e 5,5 ppm e, alguns na região próxima à 1,5 ppm que aparecem nos espectros dos **Compostos 1** e **3** são referentes às

impurezas contidas no cartucho de SPE, pois também estão presentes na análise do branco.

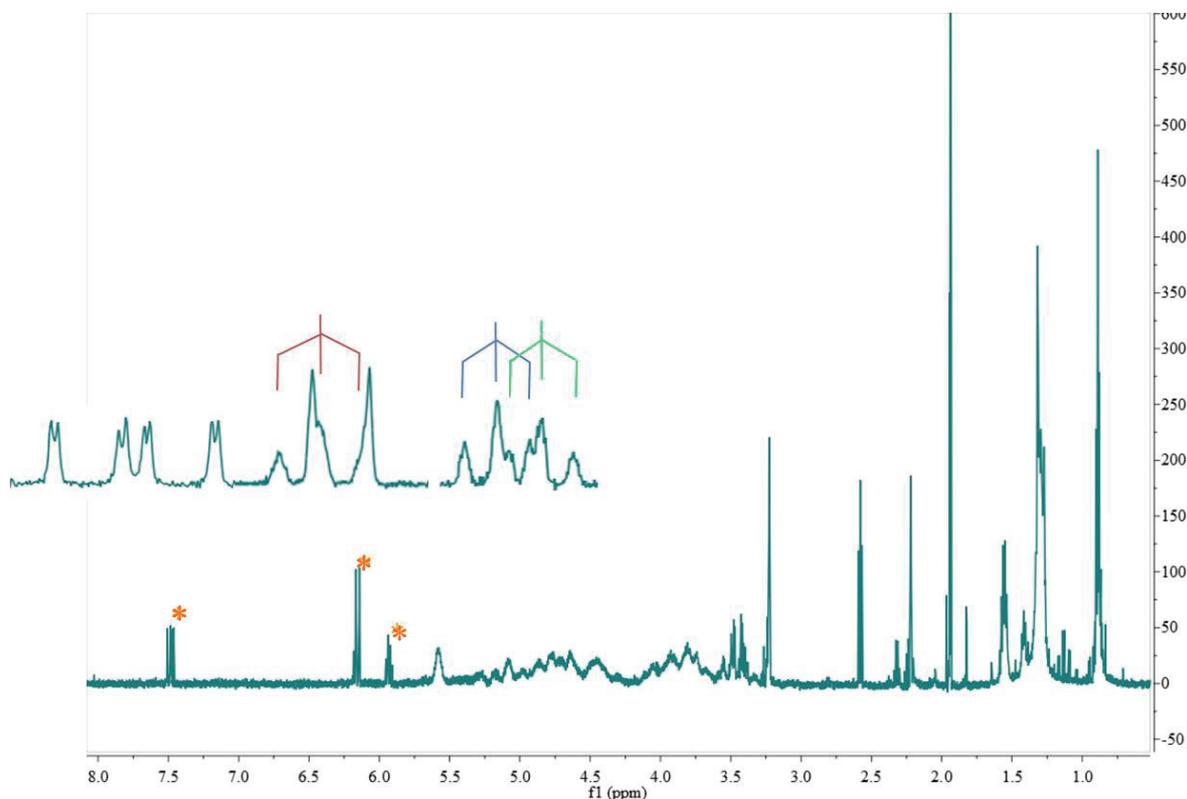


**Figura 40:** Espectros de hidrogênio para o **Branco**, **Compostos 3** e **Composto 1**.

O perfil do espectro de NMR  $^1\text{H}$  para os **Compostos 1** e **3** são bastante parecidos, com sinais entre 5,8 e 7,7 ppm, sugerindo a presença de hidrogênios ligados a carbonos  $sp^2$ , além de vários sinais na região mais blindada do espectro, relacionados aos hidrogênios alifáticos.

No espectro de hidrogênio do **Composto1** (**Figura 41**) o sinal mais desblindado é um duplo duplo dubleto em 7,52 ppm que integra para 1 hidrogênio ( $J= 15,8; 11,1$  e  $1,0$  Hz). O deslocamento químico e a constante de acoplamento de 15,8 Hz sugerem que este hidrogênio Hb esteja ligado a um carbono  $sp^2$  que faz parte de uma ligação dupla com geometria trans, e provavelmente seja vizinho a outra ligação dupla com geometria cis

(Figura 43a). Isso justificaria as outras duas constantes de acoplamento 11,1 Hz (acoplamento a duas ligações) e 1,0 Hz (acoplamento de H a 3 ligações).



**Figura 41:** Espectro de hidrogênio para o Composto 1

O próximo sinal destacado na **Figura 41**, é na verdade, uma sobreposição de dois sinais: um dubleto ( $J= 15,8$  Hz em 6,2 ppm) e um triplete. Possivelmente o dubleto corresponde ao Ha (**Figura 43 b**) que acopla com Hb, com uma constante de volta de 15,8 Hz. Dessa forma o carbono ao qual o hidrogênio Ha esta ligado não deve ter outros hidrogênio em sua vizinhança já que Ha acopla apenas com Hb, resultando neste dubleto. Além disso, este carbono deve estar ligado a um grupo retirador de densidade eletrônica, o que justificaria os sinais referentes a Ha e Hb serem tão desblindados.

O triplete com  $J=11,1$  Hz deve ser correspondente ao Hc, que está ligado a um carbono  $sp^2$  de uma ligação dupla cis, pois este hidrogênio acoplaria

à 3 ligações com Hd e Hb (**Figura 43c**) com a mesma constante de 11,1 Hz, característica de ligações duplas cis.

Ao se observar o sinal mais blindado desta região, um duplo tripleto em 5,95 ppm referente ao Hd observa-se que as constantes de acoplamento são iguais a 8 e 11,1Hz, dessa forma fica evidente que a geometria da ligação dupla entre o C<sub>d</sub> e C<sub>c</sub> é cis pois Hd acopla com Hc com uma constante de 11Hz característica desta geometria. Além disso, Hd acopla com outros dois hidrogênios equivalentes magneticamente, gerando um tripleto com constante 8Hz. (**Figura 43 d**)

A **Figura 42** destaca a região mais blindada do espectro, onde observa-se a presença de um tripleto em que integra para 2 hidrogênios com  $\delta$  2,57 ppm e  $J=7,4$  Hz, referente aos hidrogênios  $\alpha$  carbonílicos que acoplam apenas com os dois hidrogênios do carbono vizinho (**Figura 43 e**). Além disso, é possível observar apenas um tripleto como sinal mais blindado do espectro que está sobreposto a outros sinais presentes nesta região, sugerindo a presença de apenas uma metila na molécula.

Os demais sinais presentes no espectro de H<sup>1</sup> NMR não contribuem muito para a elucidação estrutural da molécula, pois apresentam-se sobrepostos, entre si ou com sinais de impurezas do cartucho. Assim para a obtenção de mais informações estruturais, partiu-se para análise dos espectros de íons produto desta molécula, como discutido a seguir.

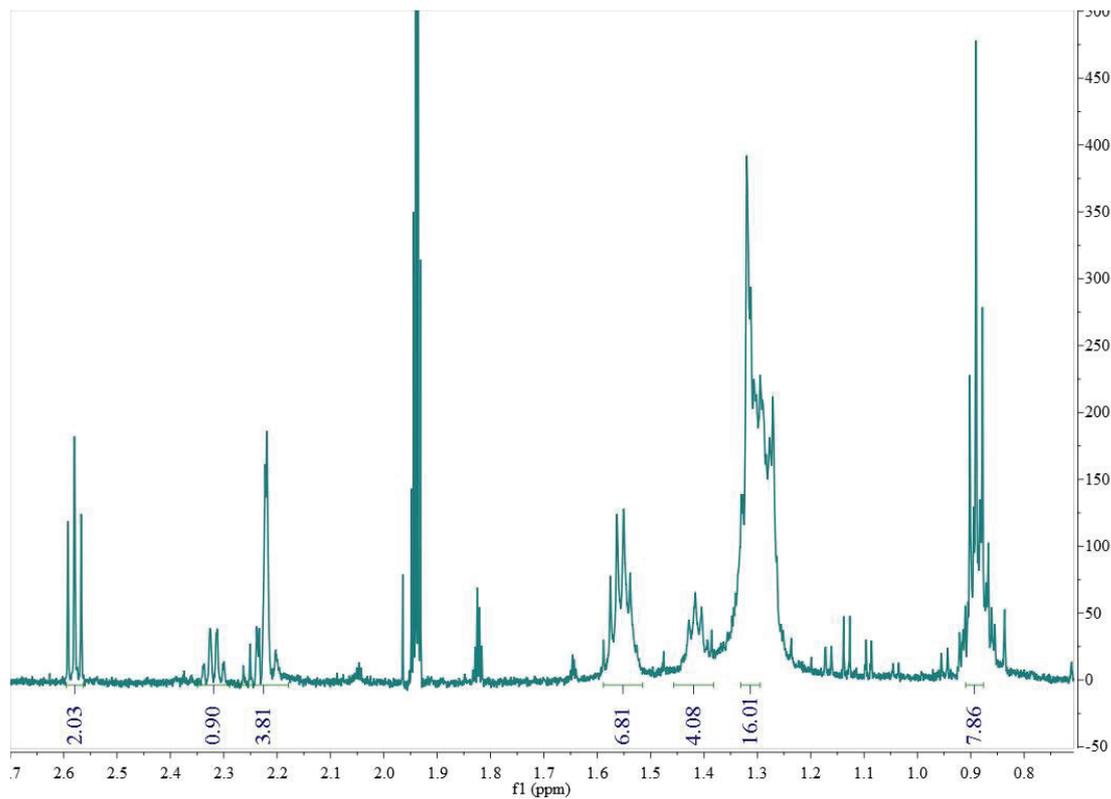


Figura 42: Ampliação do espectro de hidrogênio do Composto 1 de 0,7 a 2,7 Hz.

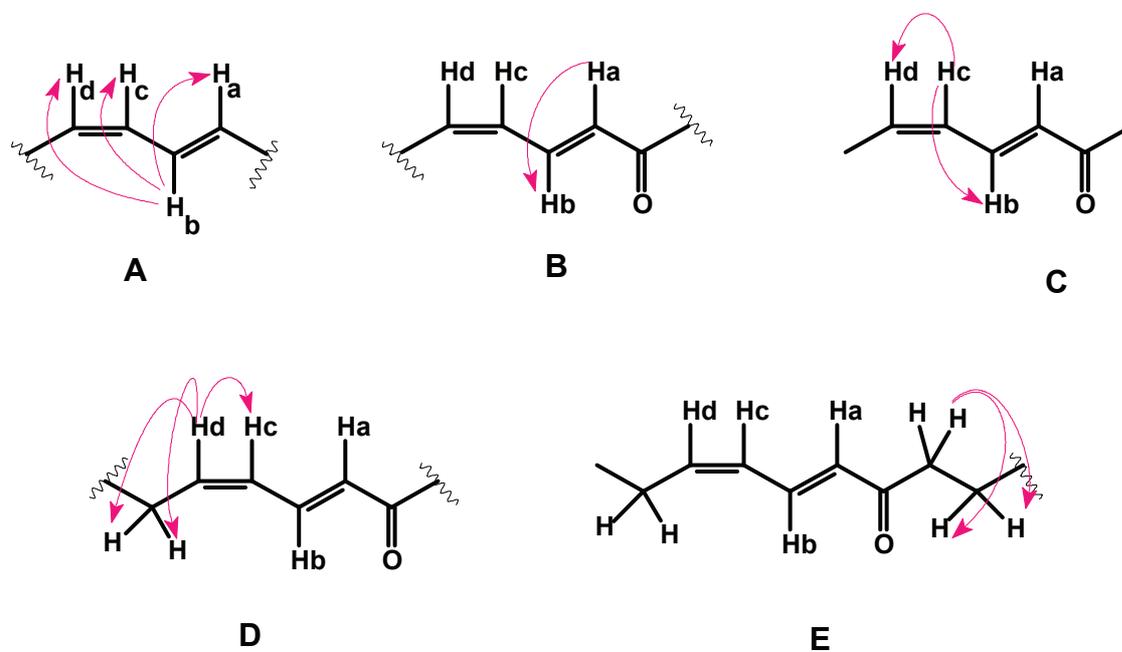
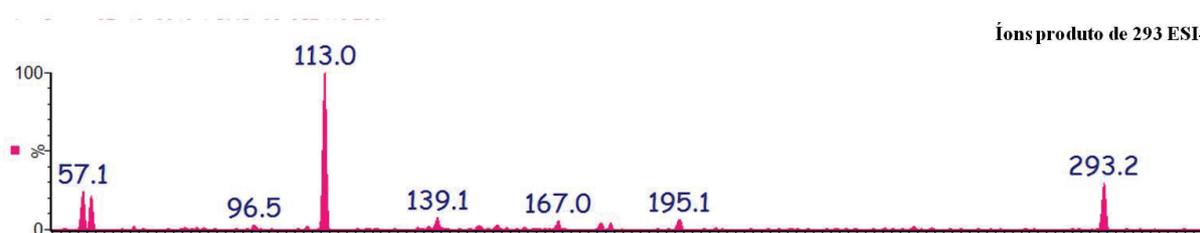
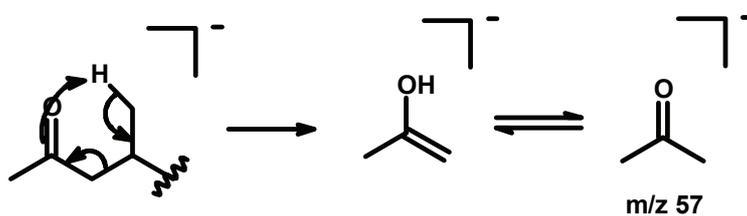


Figura 43: Acoplamentos dos hidrogênios no Composto 1.

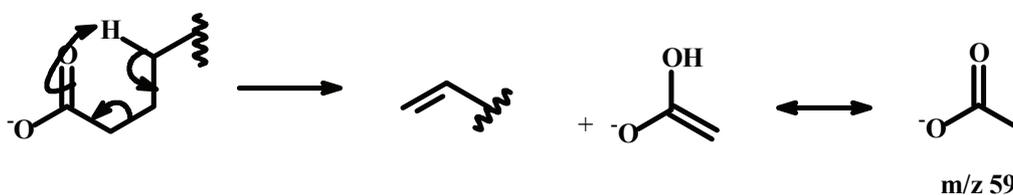
O espectro de íons produto referente a este composto é mostrado na **Figura 44**. A presença do íon  $m/z$  57 reforça proposição de que existe uma cetona na molécula. Pois este íon deve ser gerado após fragmentação do composto por rearranjo de Mc Lafferty, que origina a 2-propanona, como mostrado na **Figura 45**. Além disso, a presença do íon  $m/z$  59 sugere a presença de uma carboxila na molécula, que após rearranjo de McLafferty gera o íon correspondente ao ácido acético como no mecanismo mostrado na **Figura 46**.



**Figura 44:** Espectro de íons produto para  $m/z$  293, com tempo de retenção em 13,6 minutos.



**Figura 45:** Rearranjo de McLafferty para metilcetonas.



**Figura 46:** Rearranjo de McLafferty para compostos carboxilados.

Estes dados sugerem que existam pelo menos 3 oxigênios na molécula: 2 pertencentes à carboxila e um à carbonila de cetona. Assim, a partir dos de espectrometria de massas aliados aos dados de ressonância magnética nuclear, uma das formulas moleculares possíveis para este composto poderia ser  $C_{18}H_{30}O_3$ . O que indica que ele deve ser um derivado oxidado do ácido linoléico ( $C_{18}H_{32}O_2$ ). Esses derivados são conhecidos como KODE (**K**eto **O**ctadecanoic **A**cid). A comparação dos dados de ressonância obtidos para este composto com os dados da literatura sugerem que ele é bastante semelhante ao 13 Z,E-KODE ou 9-Z,E-KODE como mostrado na **Tabela 11**. As posições  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\gamma$  correspondem, respectivamente aos hidrogênios  $H_a$ ,  $H_b$ ,  $H_c$  e  $H_d$  da discussão anterior dos dados de  $^1H$  NMR para este composto.

**Tabela 11:** Comparação de alguns sinais no espectro de  $^1H$  NMR para o Composto 1 e dados da literatura. (N.I. Não identificado)

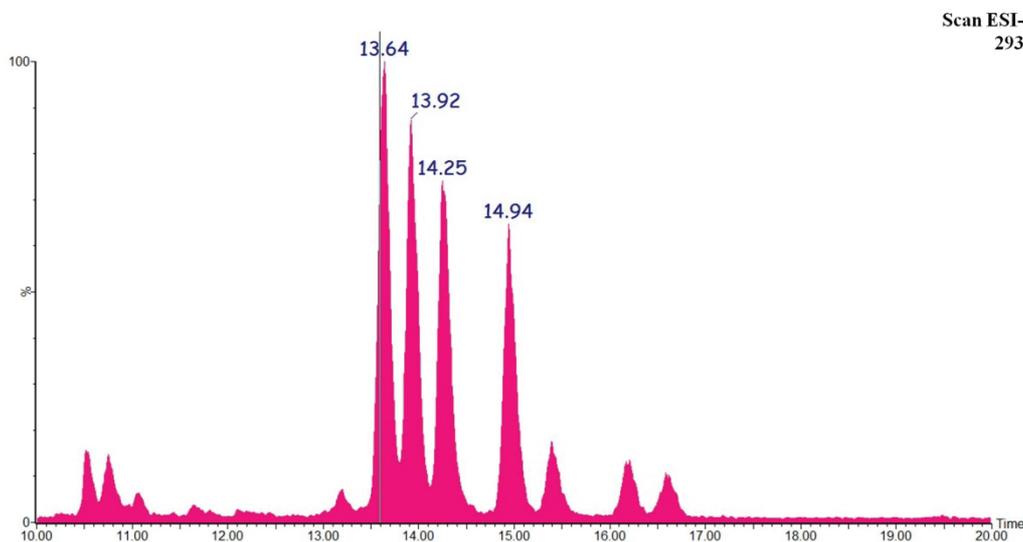
Posição em relação a cetona	Composto 1	13-Z,E KODE	13-E,E KODE	9-E,Z KODE	9-E,E KODE
	Valores Obtidos	Referência			
$H_a$	6,20 d (15,2)	6,19 d (15,2)	6,08 d (15,2)	6,16 d (15,2)	6,19 d (15,2)
$H_b$	7,50 ddd (0,8; 11,1 e 15,2)	7,50 dd (11,5 e 15,2)	7,13 dd (11,5 e 15,2)	7,49 ddd (0,7; 11,5 e 15,2)	7,13 dd (11,5 e 15,2)
$H_\delta$	6, 16 t (11,1)	6,12 dd (11,5 e 10,4)	6,14-6,18 m	6,12 dd (11,4 e 10,9)	6,15-6,19 m
$H_\gamma$	5,95 dt (8,3 e 11,1)	5,91 dt (8,3 e 10,4)	6,14-6,18 m	5,91 dt (8,0 e 10,9)	6,15-6,19 m
$H_2C-CO$	2,54 t(7,4) N.I.	2,54 t(7,2) 2,35 t(7,5)	2,54 t(7,2) 2,35 t(7,5)	2,55 t(7,4) 2,34 t(7,5)	2,54 t(7,2) 2,35 t(7,5)
$H_2C=C$	2,32 m	2,30 m	2,30 m	2,30 m	2,30 m

A única diferença significativa entre os dados obtidos para o **Composto 1** e os dados publicados nesta referência é o sinal do  $H_\delta$ , que para o **Composto 1** aparece como um tripleto, ou seja, as constantes de acoplamento

deste H $\delta$  com os H $\beta$  e H $\gamma$  são iguais a 11,1Hz, já para os dados deste artigos essas constantes correspondem à 11,5 e 10,4 respectivamente. O artigo publicado Iacazio (2003) reporta um tripleto para o sinal do H $\delta$  do ácido 13-Z,E-KODE, mas não traz dados para o 9-Z,E-KODE, não sendo possível apenas com estes dados afirmar a qual destes isômeros o **Composto 1** se assemelha.<sup>36</sup>

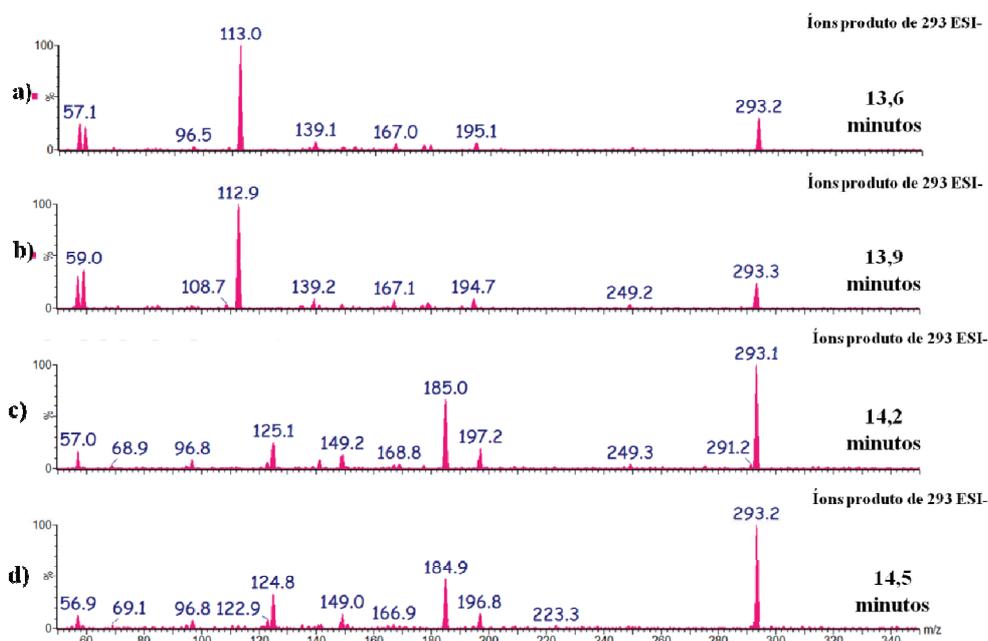
Geralmente os ácidos 9 e 13 KODE aparecem juntos em fontes naturais e são produzidos a partir da oxidação do ácido linoleico por diferentes rotas enzimáticas. A diferenciação entre eles pode ser feita pelo perfil do espectro de íons produto, pois enquanto que para o 13-KODE o principal fragmento é o íon  $m/z$  113 para o 9-KODE o íon mais abundante no espectro de íons produto é o  $m/z$  185.

Como discutido anteriormente, e pode ver visto no cromatograma de íons selecionados (**Figura 47**) existem pelo menos 4 isômeros para o íon  $m/z$  293 nesta amostra.



**Figura 47:** Cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  293.

As **Figuras 48 e 49** mostram os espectros de íons produto e de absorção no UV para cada uma das quatro bandas principais presentes no cromatograma de íon selecionados para  $m/z$  293. Pode-se observar a presença de dois perfis nos espectros de íons produto, ou seja um que apresenta como fragmento principal o íons  $m/z$  113 (**Figura 48 a e b**), e outro que possui os íons  $m/z$  185 e  $m/z$  125 como fragmentos majoritários (**Figura 48 c e d**), sugerindo a presença de dois isômeros espaciais do 13-KODE e dois do 9-KODE. Possivelmente essa isomeria espacial esta relacionada as geometria das ligações duplas, que podem ser E,E ou E,Z, como mostrado na **Figura 50**. Pois os quatro isômeros possuem, praticamente a mesma absorção no espectro de ultravioleta, sugerindo que todos eles possuem ligações duplas conjugadas.



**Figura 48:** Espectro de íons produto de  $m/z$  293. Referente às bandas a) 13,6 e b) 13,9, c) 14,2 e d) 14,9 minutos

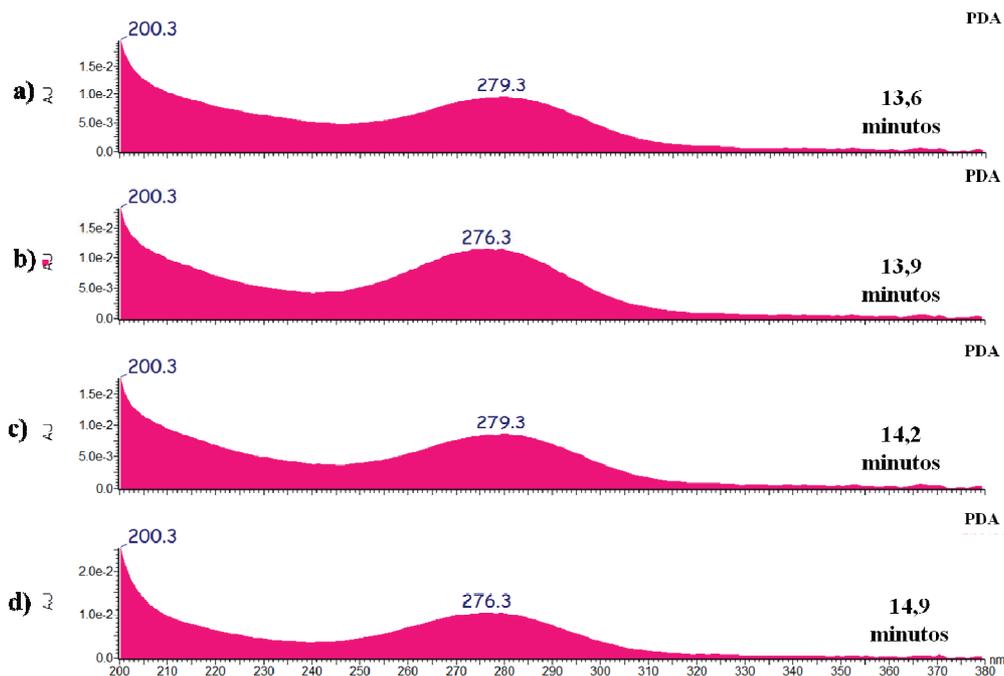


Figura 49: Espectros de UV dos isômeros com  $m/z$  293.

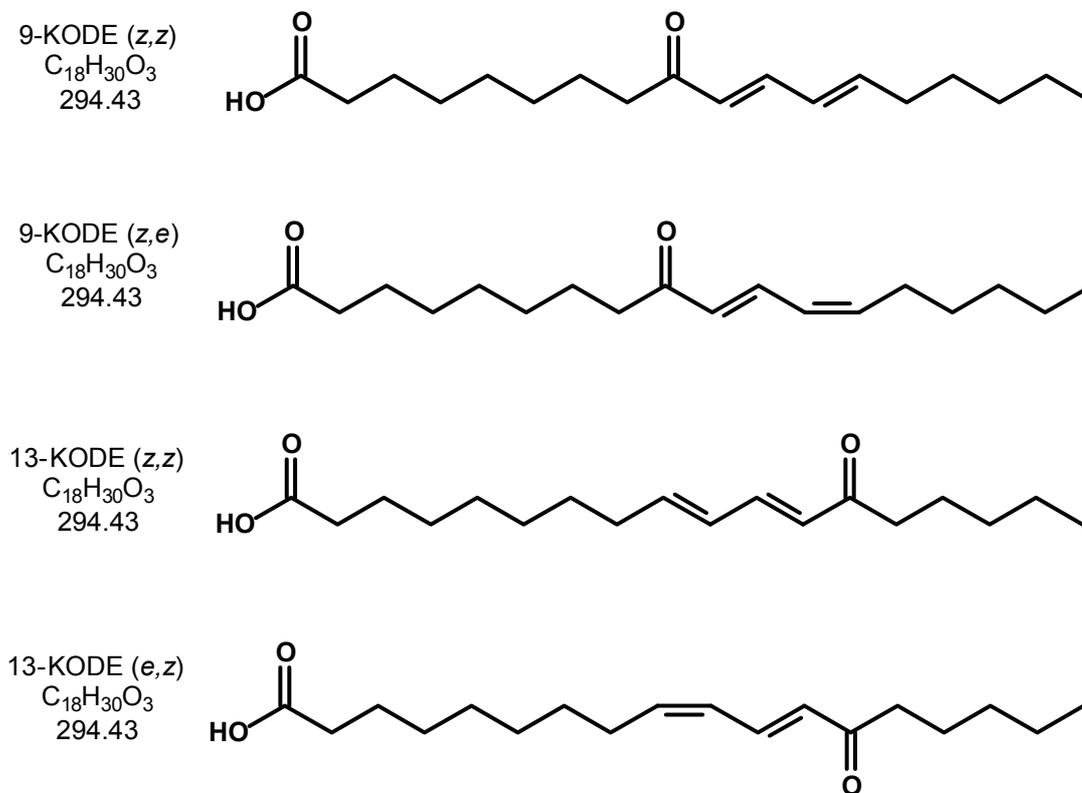
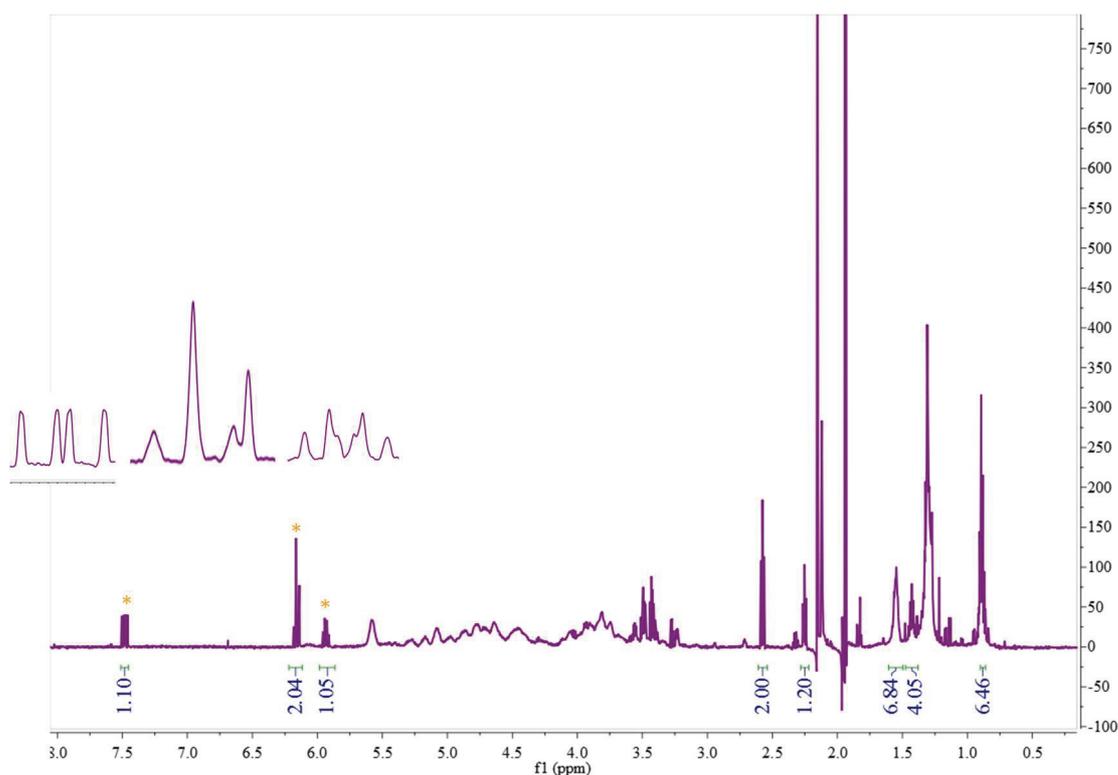


Figura 50: Estruturas químicas dos ácidos graxos oxidados e insaturados.

A banda em 13,6 minutos também foi analisada por NMR  $^1\text{H}$ , e o espectro de hidrogênio é mostrado na **Figura 51**. Apesar do *shimming* utilizado neste experimento não está tão bem ajustado quanto para a amostra anterior, como pode-se observar pela simetria dos sinais apresentados neste espectro, os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos obtidos para a banda em 13,2 minutos. Assim, a diferença entre esses compostos não deve ser a geometria da ligação dupla, já que isto iria interferir no acoplamento dos hidrogênios ligados aos carbonos  $sp^2$ . Dessa forma a modificação deve estar relacionada posição da carbonila, como havia sido sugerido pelo perfil dos espectros de íons produto.



**Figura 51:** Espectro de hidrogênio para o composto 3

Na **Tabela 12**, que resume os principais íons produto para os estereoisômeros de 9 e 13-KODE relatados na literatura, é possível observar que estes dados são bastante semelhantes aos obtidos nos espectros de íons produto para os quatro isômeros com  $m/z$  293, mostrados na **Figura 48**. Basicamente

existem dois perfis de fragmentação diferentes um deles para os isômeros 13-KODE e outro para os isômeros do 9-KODE. Ou seja a geometria das ligações duplas praticamente não interfere no perfil de fragmentação desses compostos.

**Tabela 12:** Resumo dos íons produto de para os isômeros com  $m/z$  293<sup>37</sup>

13-Z,E-KODE	13-E,E-KODE	9-Z,E-KODE	9-E,E-KODE
293(100)	293(100)	293(100)	293(100)
249(8)	249(8)	249(3)	249(3)
195(16)	195(10)	197(11)	197(9)
179(13)	179(5)	185(37)	185(37)
167(13)	167(12)	149(5)	149(5)
139(6)	139(3)	141(5)	141(6)
113(82)	113(76)	125(20)	125(18)
		123(5)	123(4)

Baseando nos dados de ressonância, perfil de fragmentação e dados da literatura<sup>37</sup> propos-se que as bandas cromatográficas em 13,6 e 13,9 minutos são referentes ao 13-Z,E-KODE e 13-E,E-KODE respectivamente. Enquanto que as bandas em 14,2 e 14,9 minutos correspondem a 9-E,Z-KODE e 9-E,E-KODE como representado na **Figura 50**. A seguir são mostradas propostas de mecanismos de fragmentação que levariam a formação dos principais íons presentes no espectro de íons produto para os 13 e 9-KODE.

Como já discutido anteriormente o principal fragmento presentes no espectro de íons produto dos estereoisômeros de 13-KODE, é o íon  $m/z$  113. Como mostrado na **Figura 52 a**, a proposta para a formação deste íon envolve a porção do final da cadeia, ao invés da porção do ácido. Esta proposta surgiu a partir da observação dos dados obtidos por OLIW (2006), onde a fragmentação do 13-KODE deutero nas posições 9, 10 e 12 levava a formação do íon  $m/z$  114 ao invés de 113.<sup>38</sup> Ou seja apenas um dos três deutérios da molécula foi incorporado ao fragmento. Dessa forma, o rearranjo de hidrogênio não deve

envolver os hidrogênios/deutérios das posições 11 e 12. Pois senão, haveria o aumento de mais de uma unidade de massa no fragmento. Assim um rearranjo [1,5] de hidrogênio, com posterior retro Diels Alder, justificaria este aumento de apenas uma unidade observada no fragmento com  $m/z$  113 relatado por OLIW (2006), já que apenas o deutério presente na posição 12 permaneceria no fragmento. Além disso esse mecanismo de fragmentação proposto leva a formação de uma cetona, o que após um rearranjo de McLafferty (**Figura 45**) leva a formação o íon  $m/z$  57 que aparece espectro de íons produto desta substância.

Além disso, a relação  $m/z$  de outros íons fragmento também foram alteradas quando a molécula de 13-KODE foi marcada isotopicamente. O íon  $m/z$  195 passou a  $m/z$  198, sendo, os três deutérios se foram incorporados a esse fragmento. Assim a **Figura 52b**) mostra uma proposta de fragmentação que leva ao íon  $m/z$  195 e é coerente com esta observação, onde os hidrogênios/deutérios ligados aos carbonos 9, 11 e 12 se mantêm na molécula.

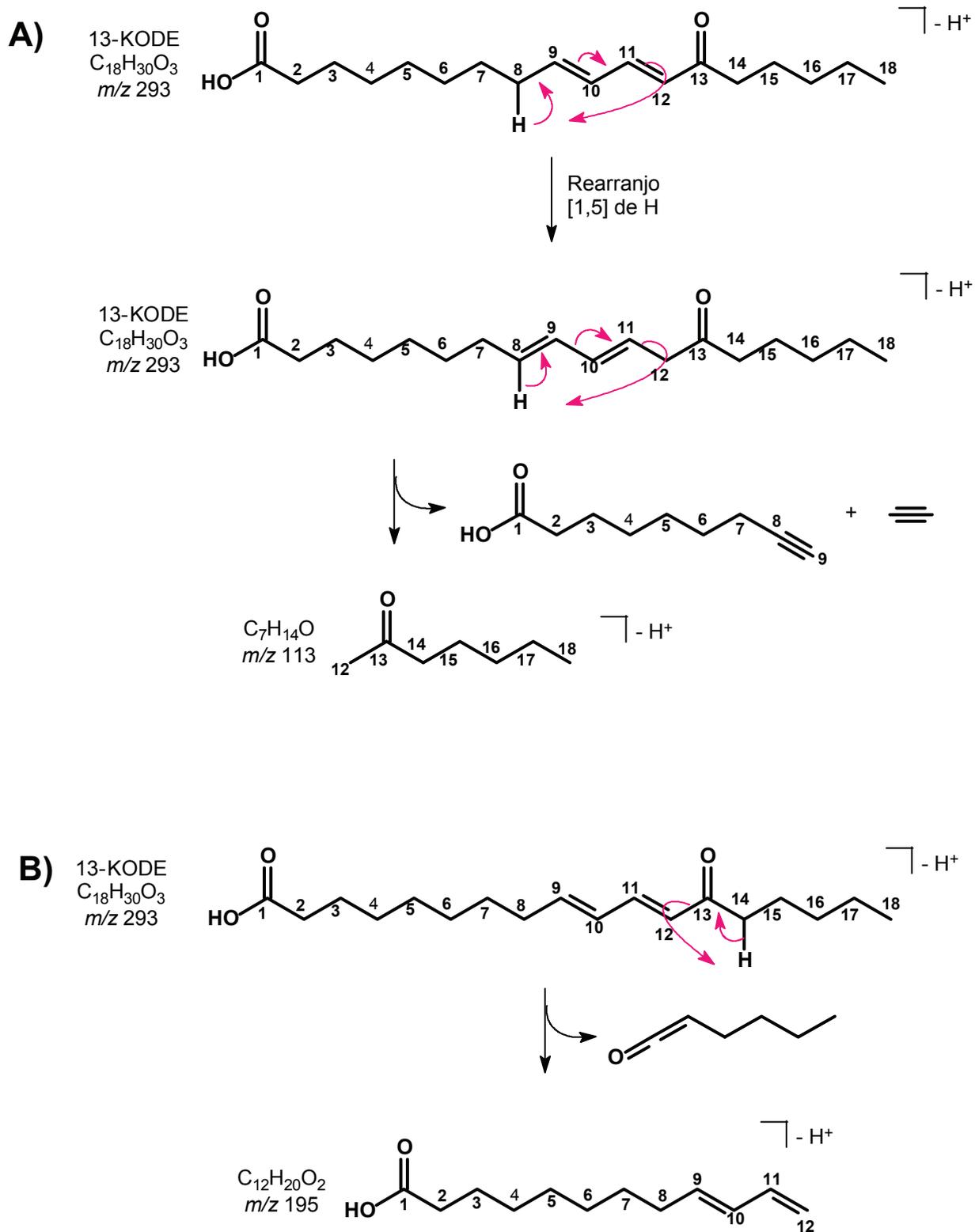


Figura 52: Proposta de mecanismo de fragmentação para os isômeros com  $m/z$  293.

O mesmo estudo de marcação isotópica foi feito para o 9-KODE, e as posições marcadas com deutério foram 10, 12 e 13. Dessa forma as principais diferenças no espectro de íons produto foram:  $m/z$  185 para  $m/z$  186,  $m/z$  197 para  $m/z$  198 e  $m/z$  149 para  $m/z$  151, respectivamente. O mecanismo proposto na **Figura 53 a**, envolve um rearranjo [1,5] de hidrogênio, seguido de uma retro Diels Alder, o que leva a formação do principal fragmento presente no espectro,  $m/z$  185. O fragmento gerado por este mecanismo, possui apenas o deutério da posição 10, justificando o aumento de uma unidade de massa do fragmento na molécula marcada. A **Figura 53 b** mostra a proposta do mecanismo de fragmentação que leva a formação do íon  $m/z$  197. Esse mecanismo é coerente com os dados de marcação isotópica obtidos por OLIW, onde o fragmento  $m/z$  197 sofre o aumento de uma unidade quando é gerado a partir da molécula marcada. Assim apenas o deutério da posição 10 permanece no fragmento gerado pelo mecanismo proposto.

Para a elucidação estrutural completa destes compostos outros experimentos deverão ser realizados, como experimentos de NMR em duas dimensões, além de espectrometria de massas de alta resolução para auxiliar na identificação dos fragmentos gerados. Porém, os resultados aqui apresentados indicam fortemente que estes compostos referem-se aos estereoisômeros de 13 e 9-KODE.

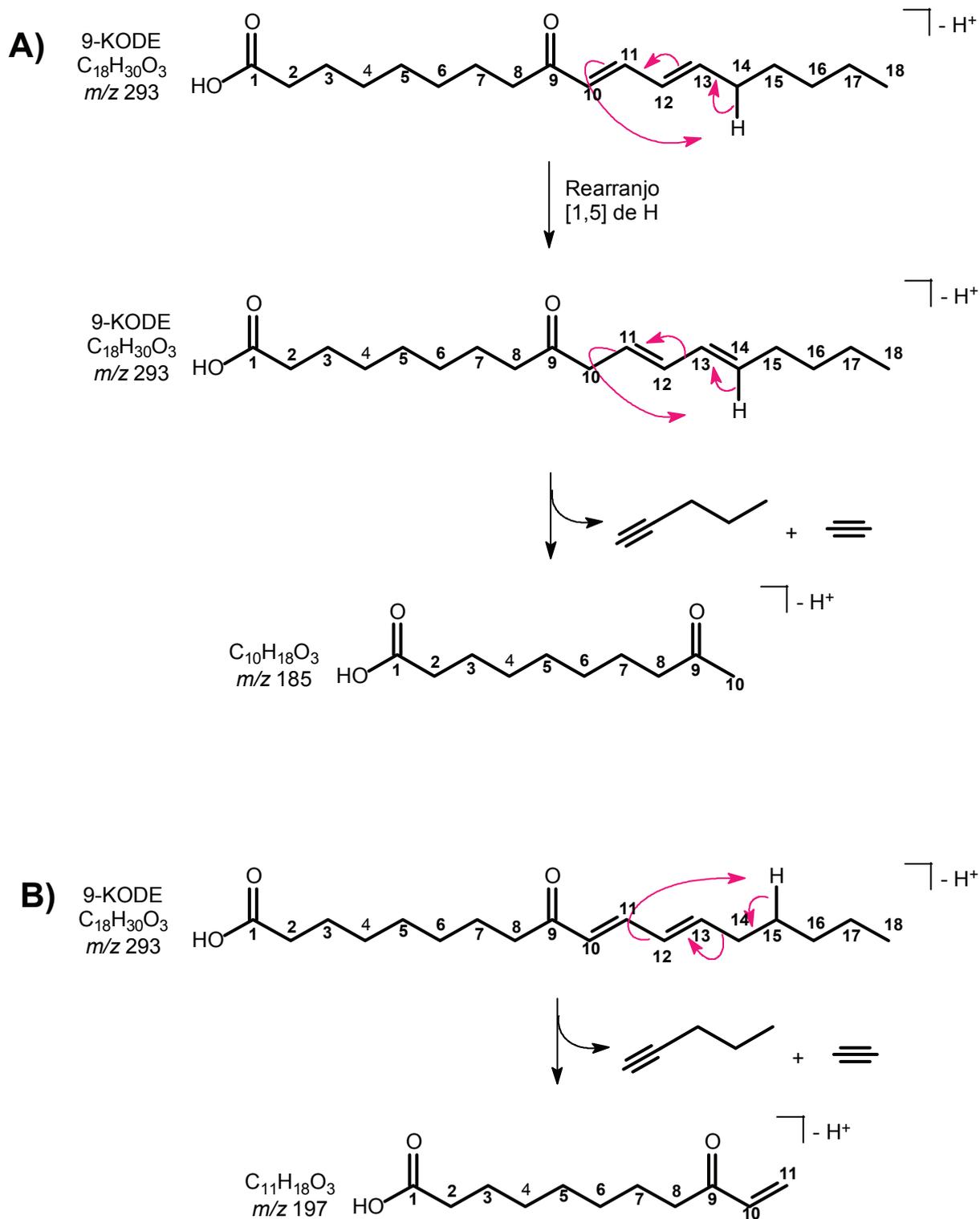
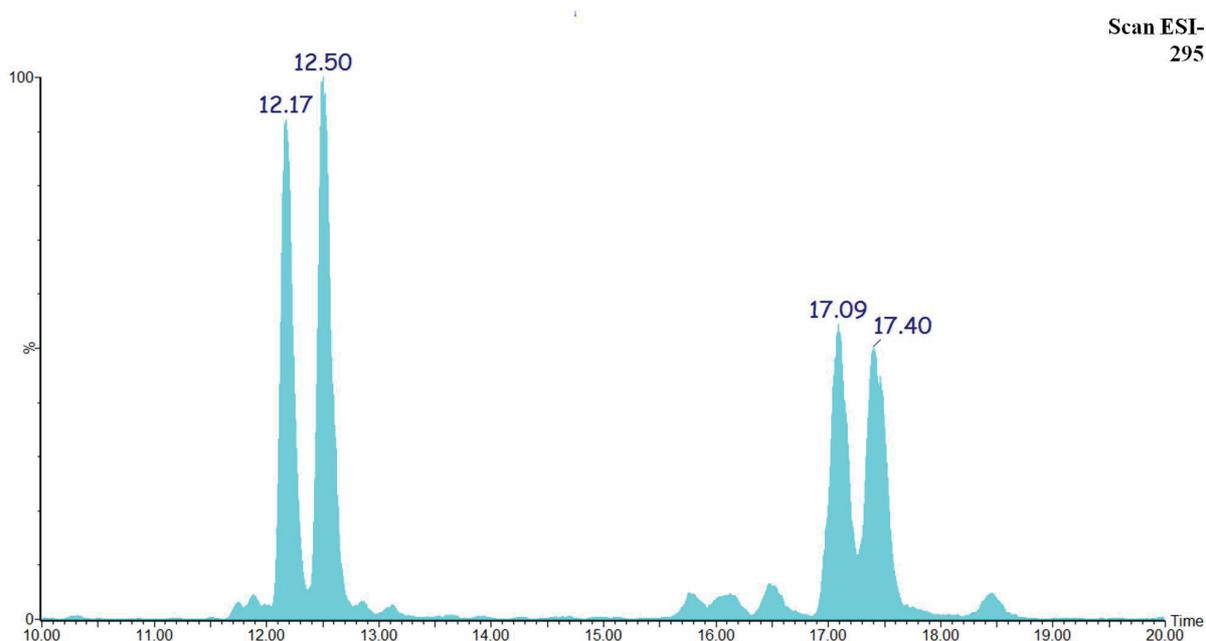


Figura 53: Proposta de mecanismo de fragmentação para 9-KODE.

Além dos íons com  $m/z$  293, a amostra **Alt\_F3\_SP5**, que apresentou uma excelente atividade antibiótica, é bastante rica outros compostos com  $m/z$  295 e 297 como discutido anteriormente. A **Figura 54** mostra o cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  295, com 4 bandas majoritárias.



**Figura 54:** Cromatograma de íons selecionados para  $m/z$  295.

Na **Figura 55** estão representados os espectros de íons produto de  $m/z$  295 para as quatro principais bandas presentes no cromatograma acima. E a **Figura 56** mostra os espectros de absorção no ultravioleta correspondente a estas bandas. Vale ressaltar que para propor estas estruturas foram considerados os dados de íons produto, ultra-violeta bem como a biossíntese dos ácidos graxos oxidados e poliinsaturados.

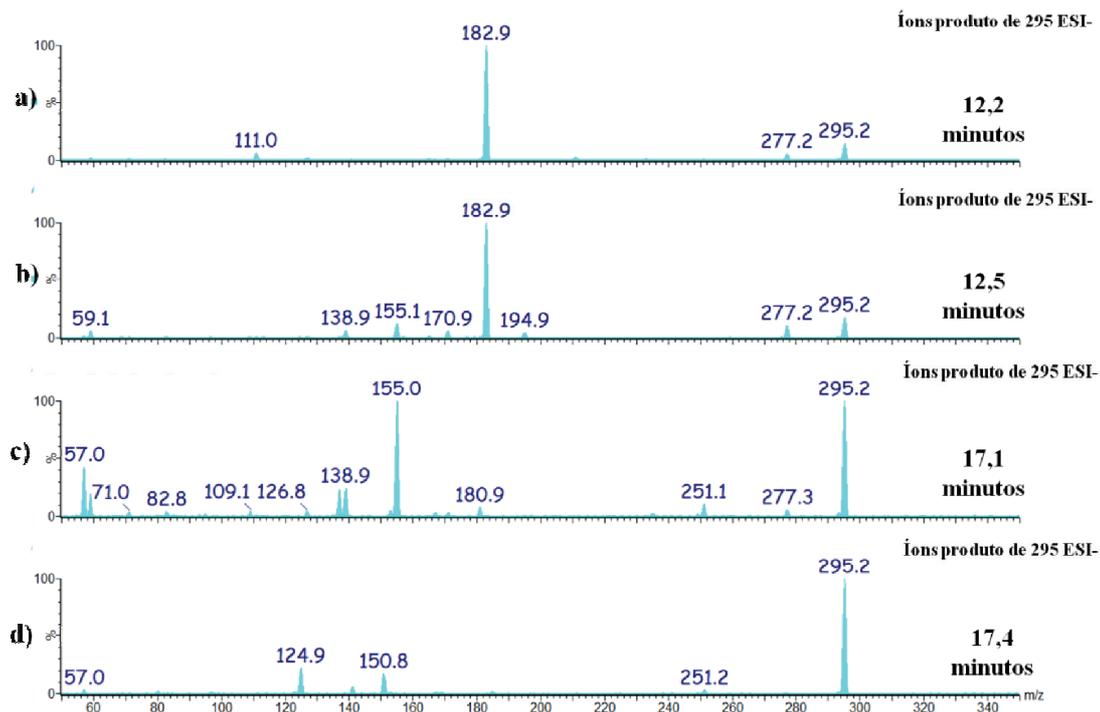


Figura 55: Espectro de íons produto de  $m/z$  295. Referente às bandas a) 12,2 e b) 12,5, c) 17,1 e d) 17,4 minutos

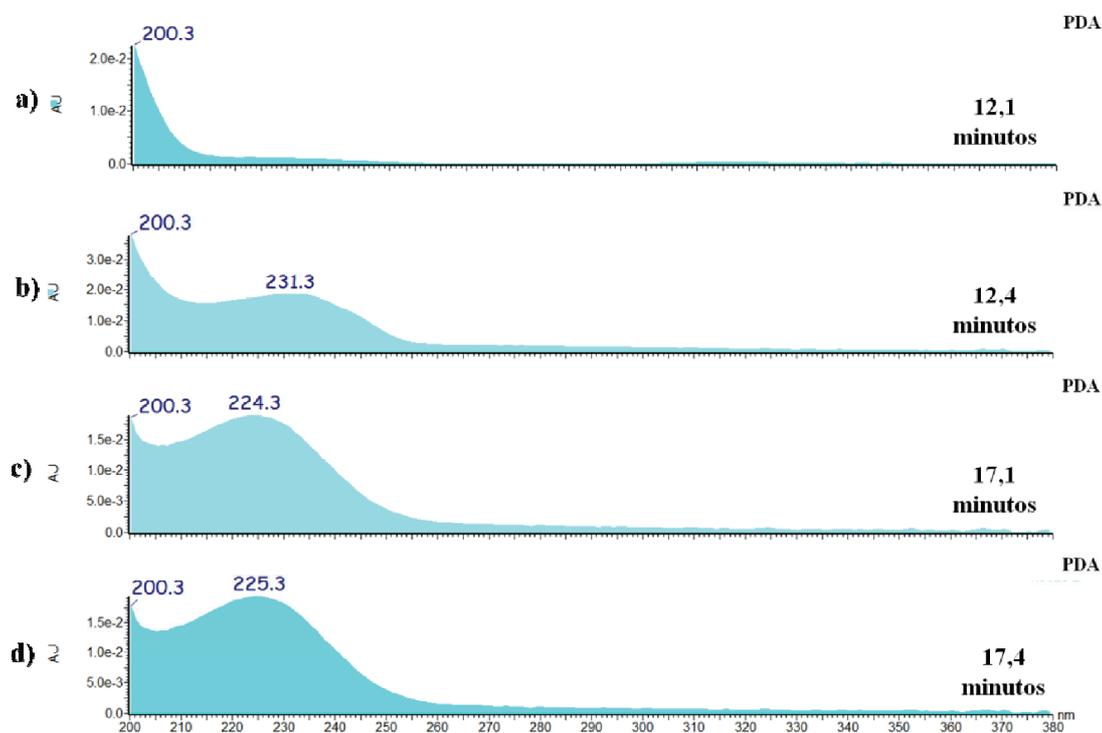


Figura 56: Espectros de UV dos isômeros com  $m/z$  293.

O composto referente à banda em 12,2 minutos possui absorção apenas na região abaixo de 200 nm, o que sugere que este composto não possui ligações duplas conjugadas, diferentemente dos demais isômeros com  $m/z$  295. Porém, o perfil de fragmentação deste composto é bastante semelhante ao composto com  $T_r = 12,4$  minutos. Baseando-se no perfil de fragmentação de hidróxi e ceto ácidos graxos, foi possível propor as estruturas químicas, bem como o mecanismo que levaria a formação dos íons presentes nos espectros de íons produto de cada banda.

Na **Figura 57a** são apresentadas: a estrutura química, proposta para o composto com tempo de retenção de 12,2 minutos e o mecanismo de fragmentação do mesmo. Ou seja o ácido 10-Hidroxiocetadecanóico, que após a clivagem da ligação C-C entre os carbonos  $sp^2$  e o carbono ligado a hidroxila, gera o íon  $m/z$  183. Já para o composto referente à banda em 12,4 minutos propôs-se a fórmula estrutural mostrada na **Figura 57b**, que após um rearranjo 1,3 de hidrogênio, sofre novo rearranjo 1,5 de hidrogênio com clivagem das ligações entre os carbonos C13-C14 e C11-C12, levando a formação do íon  $m/z$  183.

Para o composto referente a banda cromatográfica em 17,1 minutos, propôs-se a fórmula estrutural mostrada na **Figura 57c**, onde um rearranjo de McLafferty leva a formação de dois dos principais íons presentes no espectro de íons produto deste composto.

Esses mecanismos, bem como a fórmula estrutural dos compostos são apenas sugestões iniciais. Para determiná-los com segurança outros experimentos serão feitos, como massas de alta resolução e principalmente experimentos de NMR de 1 e 2 dimensões.

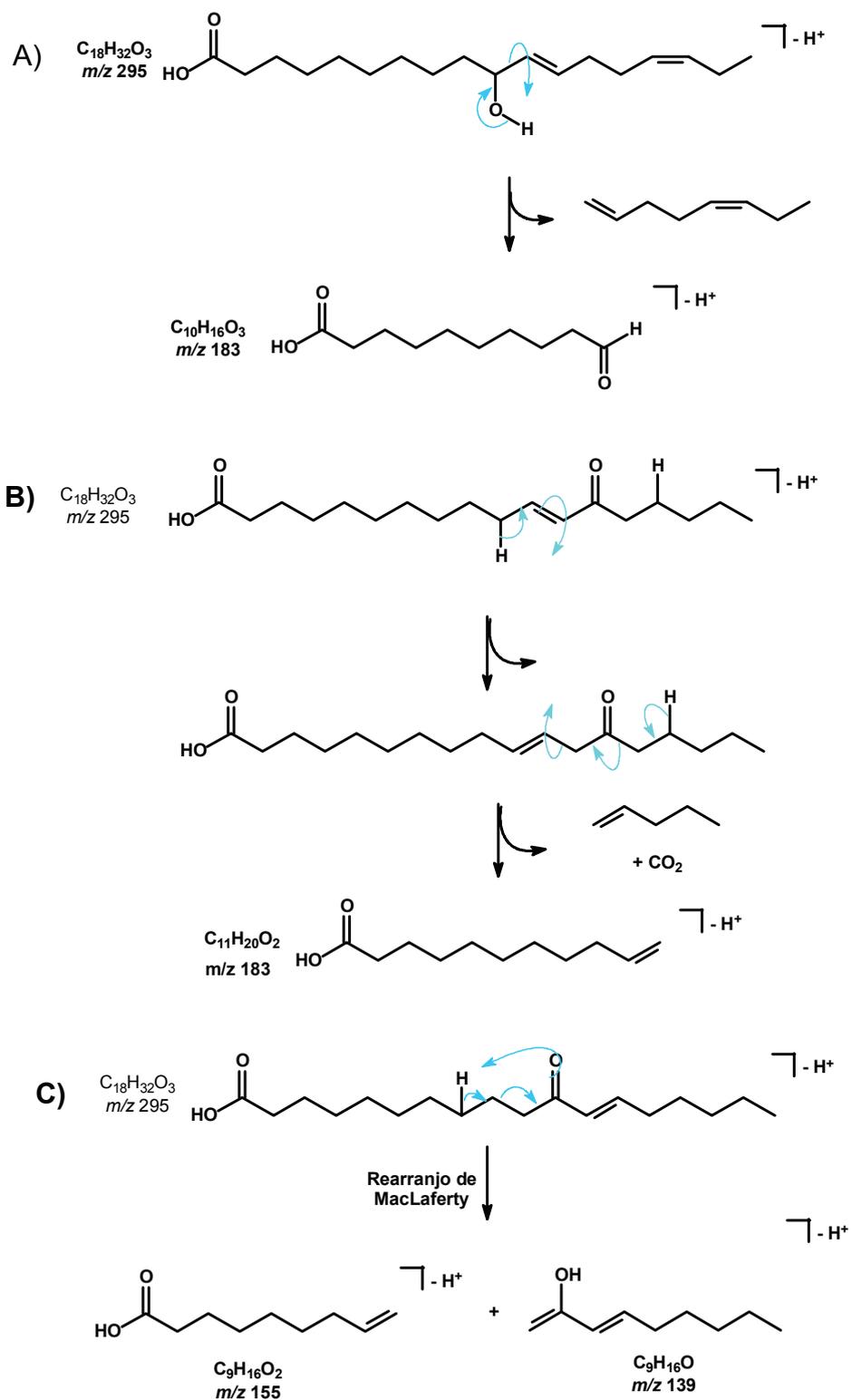
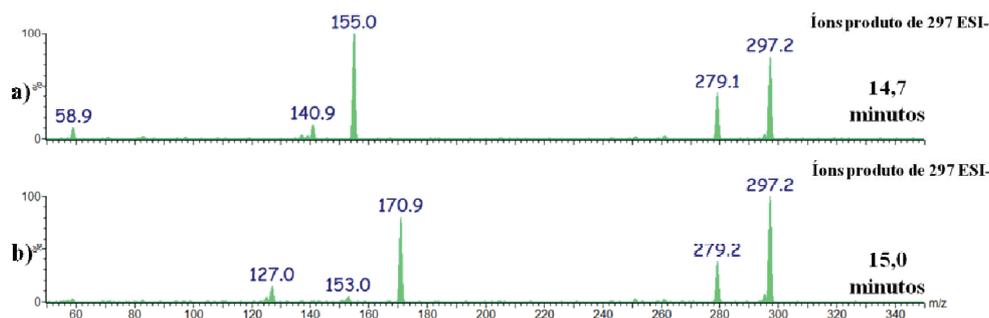


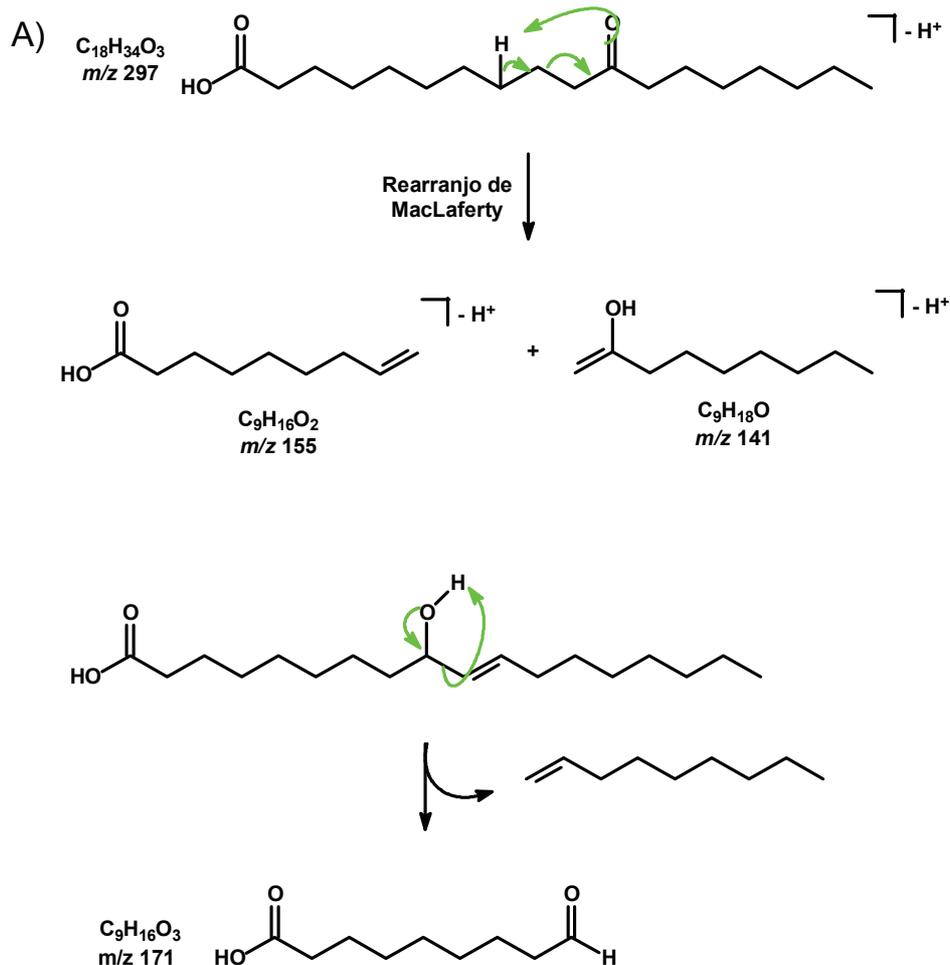
Figura 57: Proposta para a estrutura e mecanismo de fragmentação dos isômeros com  $m/z$  295 com tempo de retenção a) 12,1; b) 12,4 e c) 17,1 minutos.

Já os isômeros com  $m/z$  297 não apresentam absorção no ultravioleta, e provavelmente também não possuem ligações duplas conjugadas. Baseando-se nos íons presentes nos espectros de íons produto destes isômeros (**Figura 58**) propôs-se, as formulas estruturais e os mecanismos de fragmentação para estes compostos (**Figura 59**)



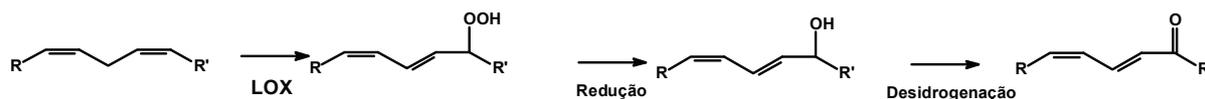
**Figura 58:** Espectro de íons produto de  $m/z$  297. Referente às bandas a) 14,7 e b) 15,0 minutos

A **Figura 59a**, mostra a proposta da estrutura química para o composto com tempo de retenção em 14,7 minutos, que após sofrer um rearranjo de McLafferty leva a formação dos dois principais fragmentos presentes no espectro de íons produto para este composto ( $m/z$  155 e  $m/z$  141). Já na **Figura 59b**, estão representadas a estrutura do composto com tempo de retenção de 15,0 minutos, e o mecanismo de fragmentação da mesma. A estrutura proposta para este composto é bem parecida com aquela proposta para o composto com  $m/z$  295 e tempo de retenção 12,1 minutos. Ou seja, ambos são ácidos octadecanóicos hidroxilados, assim o mecanismo de fragmentação proposto na **Figura 59b**, é equivalente ao mecanismo mostrado na **Figura 57a**.



**Figura 59:** Proposta para as estruturas dos isômeros com  $m/z$  297 referentes às bandas cromatográficas em **a)** 14,7 e **b)** 15,0 minutos

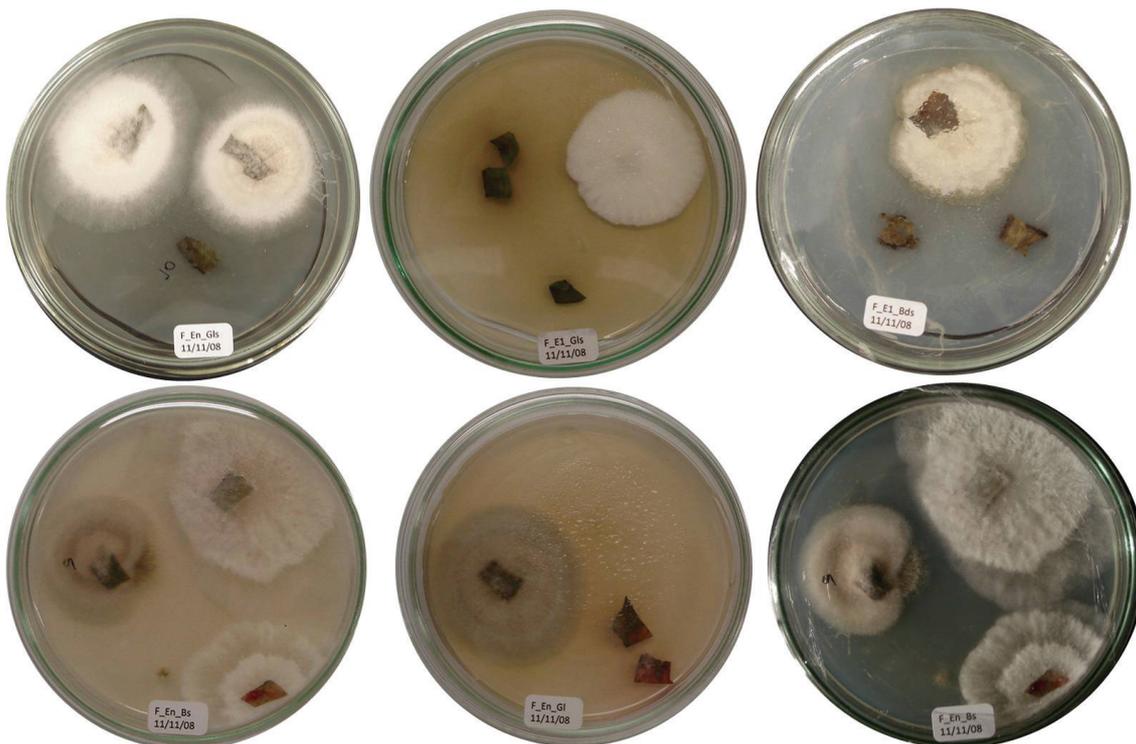
Esses compostos, que fazem parte da classe das oxilipinas, podem ser biossintetizados por rotas metabólicas, catalisadas por diferentes enzimas como lipoxigenases (LOX), cicloxigenases e citocromo P450. A biossíntese dos ceto e hidroxí ácidos graxos ocorre a partir de ácidos graxos insaturados, que são transformados em hidroperóxidos pela ação de lipoxigenases (LOX) e posteriormente reduzidos a hidróxidos que, pela ação de desidrogenases, são levados aos cetodienos, como representado na **Figura 60**.<sup>39, 40</sup>



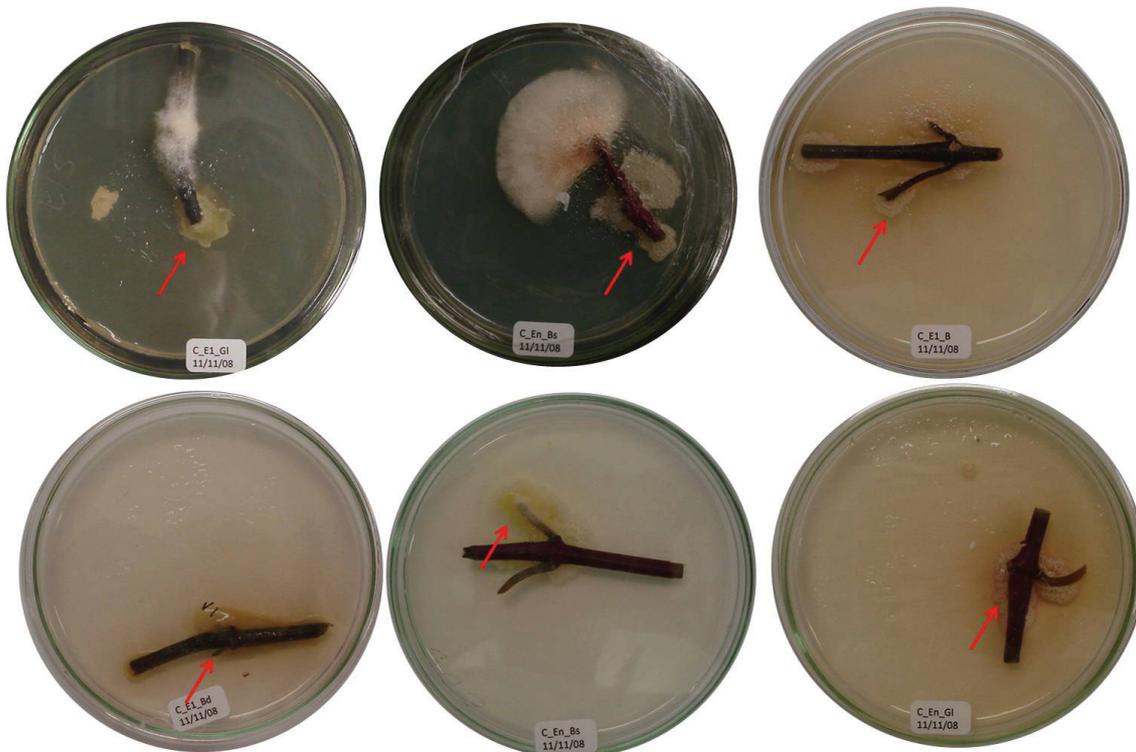
**Figura 60:** Biossíntese dos ceto e hidroxi ácidos graxos

A ação de lipoxigenases assim como as peroxidações de lipídeos e produção de oxilipinas parecem estar associadas a patogêneses, infecções e elecitação de plantas. Em 2000, por exemplo Vollenweider et. al., mostrou haver um acúmulo de 9 e 13-KODE em *Arabidopsis thaliana* após a infecção desta por *Pseudomonas syringae*.<sup>41 e 39</sup> Dessa forma os ceto e hidroxi ácidos graxos discutidos anteriormente e que provavelmente conferem a atividade antibiótica do extrato do caule de *Alternanthera brasiliana*, poderiam também estar relacionados a uma situação de estresse desta planta. Ou seja poderiam estar sendo produzidos em resposta ao ataque da planta por bactérias. Essa suposição pode ter correlação com uma observação feita durante o isolamento de micro-organismos endofíticos desta planta.

Como será discutido a seguir, muitos micro-organismos endofíticos foram isolados de todas as partes da planta, raiz, caule e folha. Porém em grande parte dos processos de isolamento de micro-organismos da região do caule observou-se o crescimento predominantemente de bactérias enquanto que nas outras partes da planta ocorreu predominantemente o crescimento de fungos filamentosos. Como pode ser visto pela comparação das **Figuras 61 e 62**.



**Figura 61:** Fotos do isolamento dos micro-organismos endofíticos presentes na folha de *A. brasiliana*.



**Figura 62:** Fotos do isolamento dos micro-organismos endofíticos presentes no caule de *A. brasiliana*.

Assim, a interação destas bactérias, presentes no caule, com a planta poderia ter estimulado a produção dos ceto e hidroxí-ácidos graxos, que se mantêm concentrados na região onde há maior presença de bactérias. Isso porque, estes compostos podem atuar como ativadores de genes como GST1 que contribuem para a morte celular. Portanto, a translocação destas substâncias para as demais partes da planta deve ser pequena, pois se isso ocorresse poderiam causar danos e até a morte de células saudáveis.<sup>39, 41, 42</sup> Dessa forma, os extratos da raiz, que não apresentaram atividade antibiótica, poderiam não conter estes compostos ou ainda eles estarem em quantidades baixas, que não foram suficientes para inibir o crescimento das bactérias nos testes de susceptibilidade.

Outra possibilidade para explicar a presença desses hidroxí e ceto ácidos graxos nos extratos da planta é que estes poderiam ser gerados pela biotransformação de ácidos graxos produzidos pela planta ou mesmo serem produzidos por essas bactérias endofíticas.

De fato o objetivo deste trabalho não é o estudo das interações planta/micro-organismos, mas esses dados abrem um vasto leque de estudo, visando verificar se existe alguma relação entre fatores de estresse e a síntese destes compostos, na planta *Alternanthera brasiliana*. Bem como, se eles possuem alguma atividade inibitória contra os micro-organismos presentes na planta, e se eles realmente se encontram em quantidades diferentes nas determinadas partes da planta.

Além disso, é necessária a identificação inequívoca destes compostos, bem como identificar se a ação antibiótica observada é proporcionada por apenas um desses ceto/hidroxí ácidos graxos, ou se existe algum efeito sinérgico entre eles. Para isso, esses compostos precisam ser isolados e ensaiados separadamente contra as bactérias utilizadas neste estudo.

A seguir serão discutidos os resultados obtidos para o estudo dos micro-organismos endofíticos associados à planta *Alternanthera brasiliana*.

## **4.2. Avaliação química e biológica dos micro-organismos endofíticos**

### **4.2.1. Isolamento dos micro-organismos endofíticos**

Como mencionado no **Item 3.2.2.1**, diferentes processos de assepsia, e diferentes meio de cultura foram utilizados para o isolamento dos micro-organismos, em quatro períodos distintos. Durante os diferentes processos de assepsia utilizou-se álcool etílico 70%, ao invés de álcool etílico P.A. ou 96%, para evitar a desidratação da parede celular dos micro-organismos epifíticos, permitindo que o álcool penetrasse nas células ocasionando a desnaturação das proteínas presentes dentro no interior das mesmas e inviabilizando-as, impedindo desta forma que os micro-organismos presentes na superfície das partes da planta se desenvolvessem. Além disso, em alguns procedimentos utilizou-se acetona na primeira etapa de assepsia, para verificar se alguma cera que pudesse haver na superfície dos tecidos da planta estaria prejudicando a assepsia com os agentes esterilizantes (etanol e hipoclorito de sódio). Durante o processo de isolamento, observou-se que o método de maceração, utilizado para a exposição das células dos tecidos internos das plantas favoreceu o crescimento de bactérias. Isso pode ter ocorrido devido às bactérias, normalmente, apresentarem uma velocidade de crescimento superior a dos fungos e, como ao macerar os tecidos as células de bactérias são expostas a uma grande quantidade de nutrientes e se desenvolvem rapidamente enquanto que o crescimento dos fungos, que é mais lento, pode ser dificultado.

O isolamento foi realizado em quatro diferentes amostragens para verificar quais micro-organismos recorrentemente seriam isolados desta planta. Assim, após esses isolamentos, catalogou-se 50 cepas de micro-organismos que foram isolados em mais de um período. Dessa forma, tem-se maior chance que os micro-organismos isolados realmente representem a população continuamente presente nesta planta, pois estes micro-organismos puderam ser isolados como endofíticos de *Alternanthera brasiliana* em diferentes condições ambientais. Esses micro-organismos foram catalogados com os códigos de F01 à F41 para os micro-organismos das três primeiras amostragens e de FA à FI, para os micro-organismos do último isolamento.

As **Figuras 63 à 65** ilustram a primeira etapa de isolamento dos micro-organismos, ou seja, o crescimento dos micro-organismos endofíticos a partir dos tecidos da planta que foram esterilizados superficialmente e depositados sobre diferentes meios de cultura.

A última água em que cada um desses fragmentos da planta foi imerso, também foi adicionada a uma placa contendo meio de cultura e incubada, para verificar se mesmo após o processo de assepsia haveria a presença de células de algum micro-organismo na superfície dos tecidos. Porém não houve crescimento de nenhum micro-organismo com morfologia semelhante aos mostrados nestas figuras, exceto o mostrado na **Figura 64e**, que aparecem distribuídos na placa, de coloração esverdeada. Assim esta placa foi descartada.

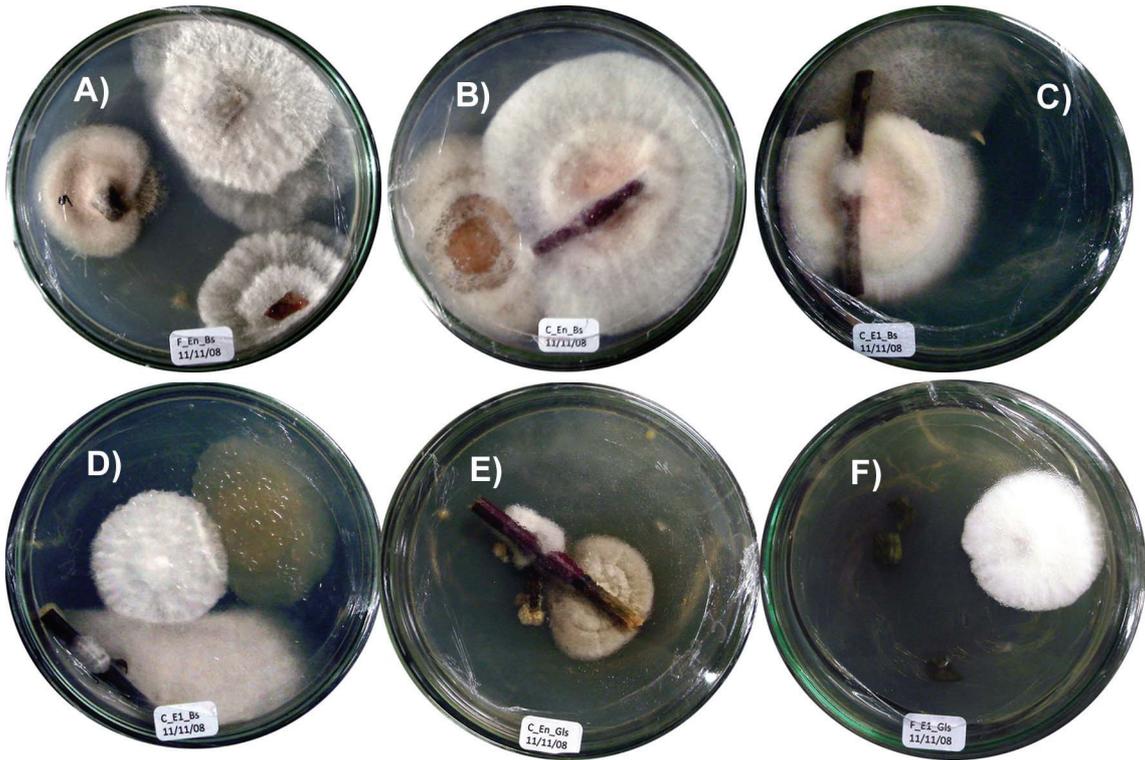


Figura 63: Fotos das placas com os micro-organismos no processo de isolamento.

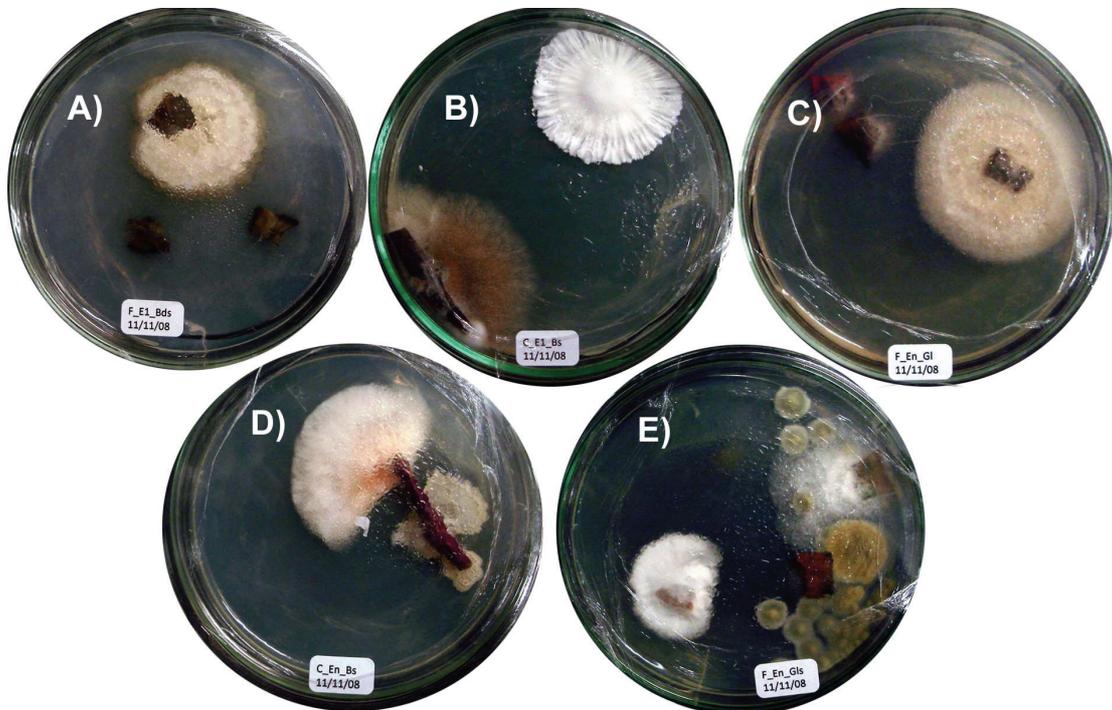
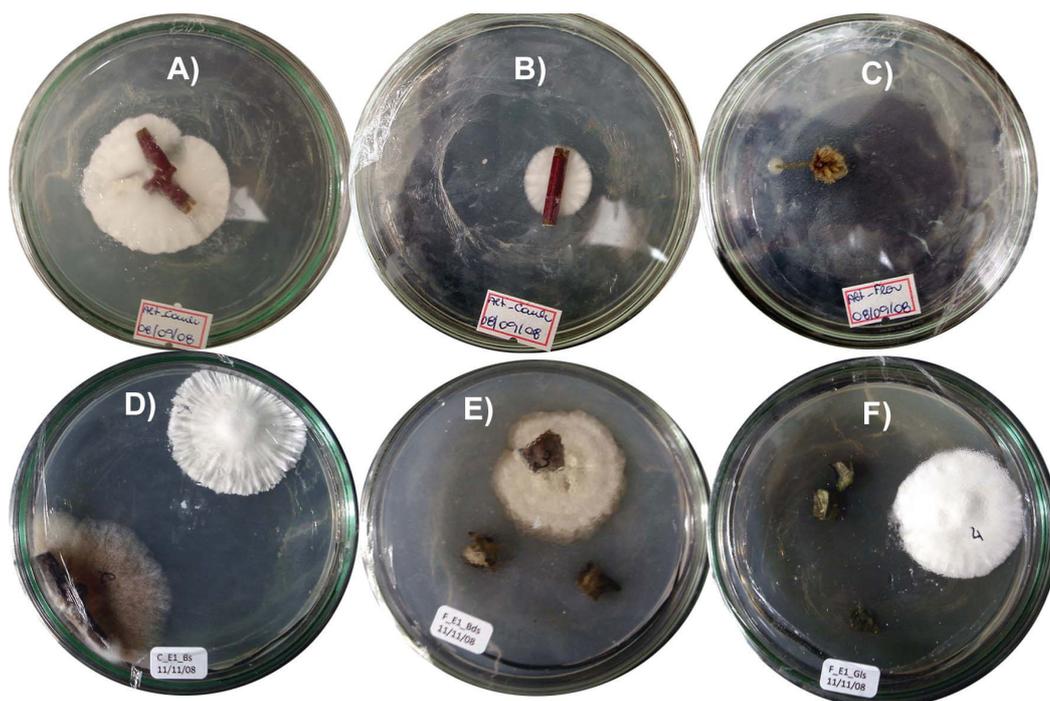


Figura 64: Fotos das placas com os micro-organismos no processo de isolamento.



**Figura 65:** Fotos das placas com os micro-organismos no processo de isolamento.

Após o início do crescimento, os micro-organismos foram transferidos para outras placas contendo meio de cultura e, após sucessivos repiques obtiveram-se as cepas purificadas. Algumas das cepas isoladas são mostradas nas **Figura 66 e 67**. Já a **Figura 68** mostra as 5 cepas (**F04, F11, F15, F31 e FE**) selecionadas para estudo químico e biológico, sendo que todas eram morfológicamente diferentes mas cada uma assemelhava-se com um grupo de cepas isoladas. Morfológicamente, a cepa F11 assemelha-se aos fungos do gênero *Xylaria*, bastante estudados em nosso grupo, enquanto que o fungo FE é bastante semelhante ao gênero *Fusarium*. Não foi possível inferir a morfologia das outras cepas visualmente.

Como o objetivo deste trabalho está voltado para os micro-organismos endofíticos produtores de compostos antibióticos, a identificação morfológica mais detalhada só será feita para aquelas cepas que se mostrarem potenciais produtoras de compostos ativos.

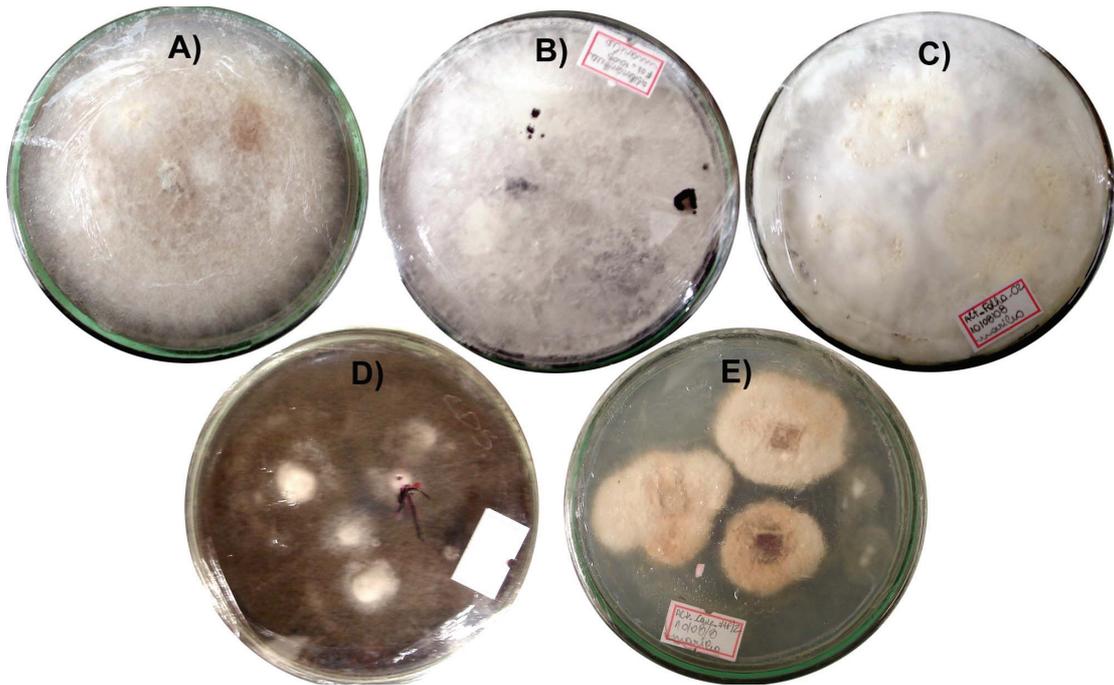


Figura 66: Fotos de cepas de micro-organismos isolados de *Alternanthera brasiliana*.

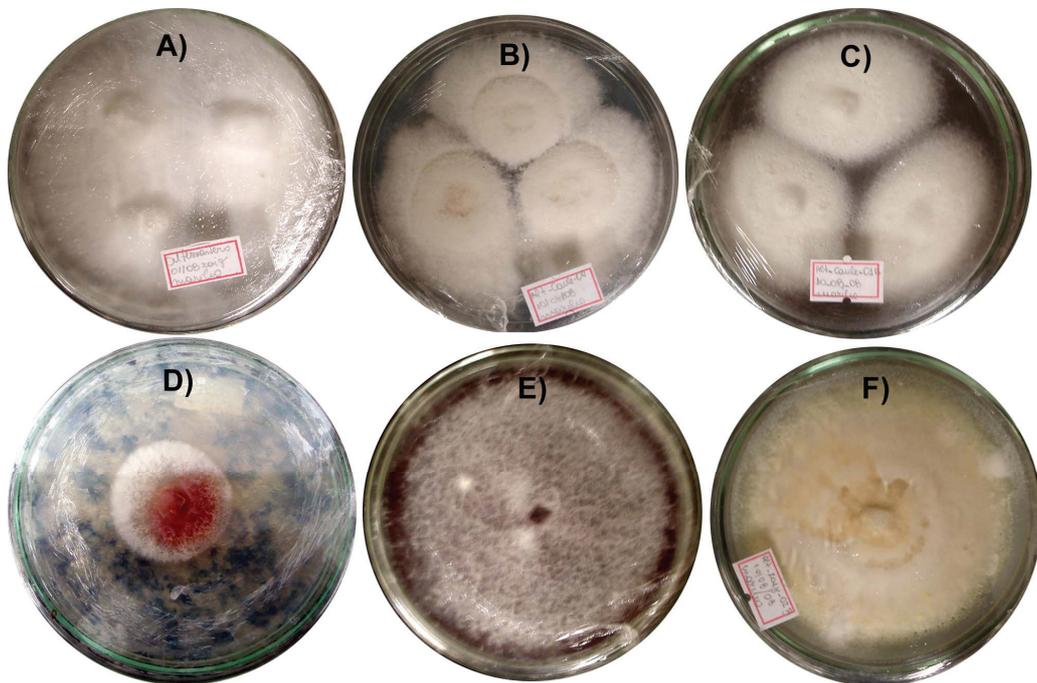


Figura 67: Fotos de cepas de micro-organismos isolados de *Alternanthera brasiliana*.

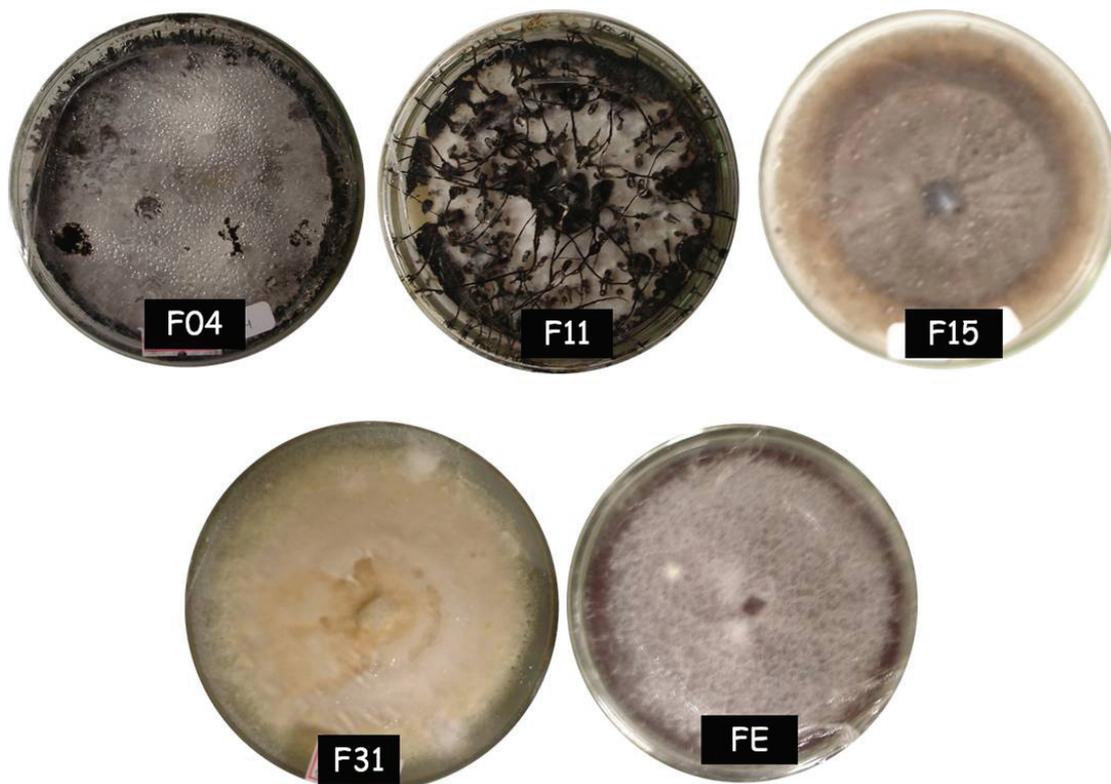


Figura 68: Cepas selecionadas para estudo químico e biológico.

#### 4.2.2. Cultivo dos micro-organismos endofíticos e extração dos metabólitos secundários

O cultivo dos micro-organismos foi realizado tanto em meio líquido (Czapeck) quanto em meio sólido (Arroz) e estão ilustrados nas Figuras 69 e 70. Sendo que na Figura 69 as letras de a à f correspondem respectivamente à: Branco, F04, F11, F15, F31 e FE. Já na Figura 70 os itens de a à e correspondem aos fungos F04, F11, F15, F31 e FE, respectivamente. A massa dos extratos obtidos de cada cepa em cada meio esta representada na Tabela 13.

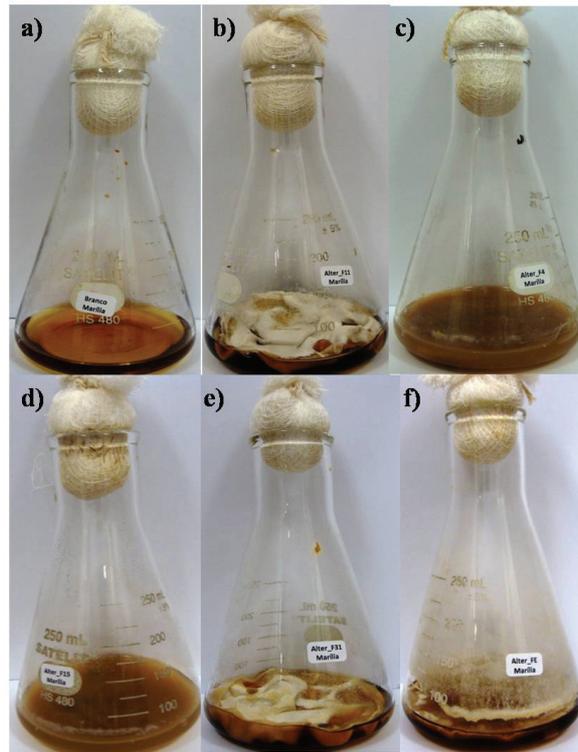


Figura 69: Cultivo dos micro-organismos em meio líquido

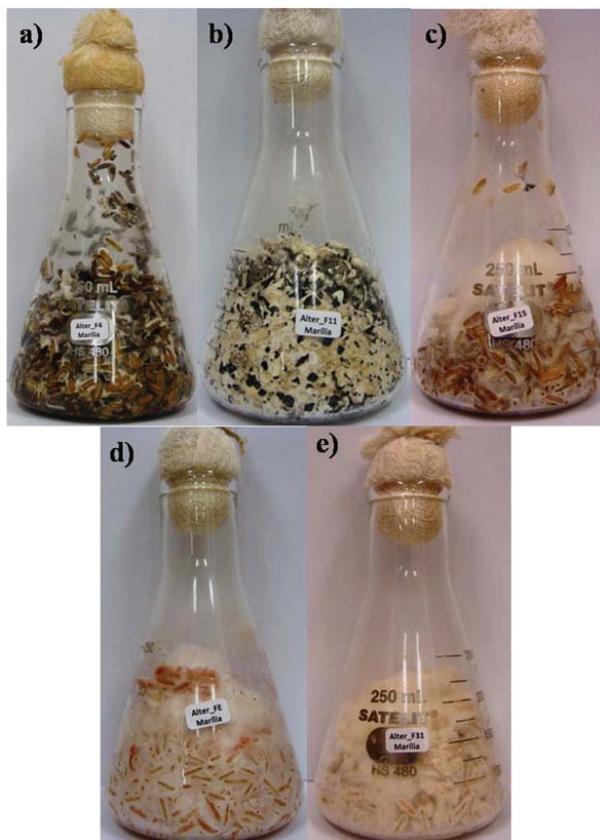


Figura 70: Cultivo dos micro-organismos em meio sólido

**Tabela 13:** Massa em gramas dos extratos fúngicos em meio líquido e meio sólido.

Cepa Fúngica	Meio líquido/g	Meio sólido/g
<b>F04</b>	0,35	4,5
<b>F11</b>	0,27	3,5
<b>F15</b>	0,34	3,0
<b>F31</b>	1,0	4,9
<b>FE</b>	0,34	5,5

#### 4.2.3. Isolamento dos micro-organismos endofíticos

Como a massa dos extratos obtidos era relativamente pequena, e o método de fracionamento que foi eficiente para os extratos da planta envolvia coluna de sílica, o que poderia acarretar em perda de amostra, optou-se inicialmente por um método de partição líquido-líquido diferente daquele utilizado para a planta, já que este não havia sido eficiente para discriminar frações mais ricas em compostos biologicamente ativos. Dessa forma, iniciou-se o processo de partição com os extratos de arroz utilizando-se o método descrito no **Item 3.2.2.4.**, que resultou em 5 partições para o extrato de cada fungo. Essas frações foram nomeadas como mostrado na **Figura 71**, ou seja, FX\_PY, onde X representa o número ou letra com o qual o micro-organismo foi catalogado, e Y representa o número da partição (mostrado no **Esquema 6**). Essas partições e os extratos a partir do qual elas foram obtidas foram analisados por LC-PDA-MS e avaliados quanto a sua atividade antibiótica.

**Figura 71:** Nomenclatura utilizada para identificação das partições dos extratos dos fungos em meio sólido.

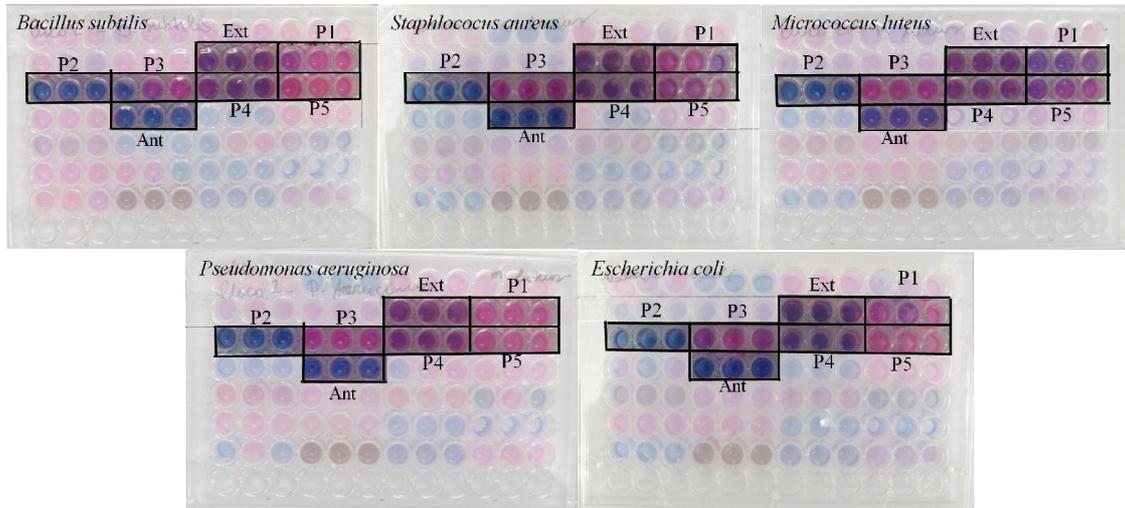
#### 4.2.4. Teste de atividade antibiótica

Os testes de susceptibilidade foram realizados da mesma forma que para as amostras da planta e os dados relevantes estão resumidos na **Tabela 14**. Todas as frações foram testadas, inclusive uma amostra contendo apenas o extrato de arroz (branco) e nesta tabela são mostradas apenas aquelas que apresentaram alguma atividade antibiótica.

**Tabela 14:** Resumo dos dados do teste de antibiose.

	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<b>F04_P1</b>					+
<b>F04_Ext</b>					+
<b>F04_P2</b>					+
<b>F04_P2</b>				+	
<b>F31_P1</b>				+	
<b>FE_P2</b>	+	+	+	+	+

Destaca-se o resultado obtido para a fração P2 do fungo FE (**FE\_P2**) cuja, a origem pode ser observada no esquema de partição descrito no **Item 3.2.2.4**. Assim, os resultados obtidos no teste de antibiose para as frações do extrato do fungo FE podem ser vistos na **Figura 72**. Observa-se que a atividade da fração FE\_P2 foi semelhante a do controle positivo, para TODAS as bactérias, o que a torna uma fração bastante interessante do ponto de vista das estratégias de desrepliação. Esta e todas as frações obtidas pelo fracionamento dos extratos fúngicos foram analisadas por LC-PDA-MS



**Figura 72:** Teste de antibiose das frações do extrato do fungo FE.

#### 4.2.5. Análise por LC-PDA-MS.

As análises por LC-MS foram realizadas utilizando-se um método cromatográfico otimizado, já que devido ao grande número de frações a serem analisadas (aproximadamente 36 incluindo extratos e partições da planta e do fungo), a diminuição no tempo de análise de cada amostra, resulta em uma economia bastante relevante no final de todas as análises, desde que, a eficiência na separação seja mantida. Assim, após a otimização chegou-se ao método cromatográfico descrito no **Item 3.2.2.5**, onde o tempo total de análise, incluindo o recondicionamento da coluna é de 60 minutos.

Nas **Figuras 73 e 74** são mostrados os mapas das análises dos extratos de arroz (branco) e do fungo FE, no modo positivo. Como observado nestes mapas, os compostos estão bem distribuídos durante todo tempo de análise, indicando que este método é eficiente para análise destas amostras.

Grande parte dos compostos, presentes no extrato do fungo FE são semelhantes aos presentes na amostra do branco. Isso pode ser observado comparando-se os mapas dos extratos de arroz (**Figura 73**), e do FE (**Figura**

74). Mostrando que este meio pode ser considerado um meio relativamente sujo para o cultivo de micro-organismos. Porém, este é um meio bastante rico e que muitas vezes estimula a produção de compostos que não seriam produzidos em meio contendo menos nutrientes, o que o torna atrativo para o estudo de metabolitos secundários de micro-organismos.

Entretanto, no extrato **FE (Figura 74)** existem alguns sinais que não estão presentes no branco, sendo, portanto relativos aos possíveis íons de interesse deste estudo. Estes íons estão destacados na **Figura 74**, e referem-se às relações  $m/z$  807 e  $m/z$  804.

Para saber se esses íons estariam relacionados com a atividade antibiótica apresentada pela fração **FE\_P2**, foram realizadas as análises das partições do extrato do fungo **FE**. Os mapas referente às análises das partições **FE\_P2** à **FE\_P5** são mostradas nas **Figuras 75** à **78**.

Assim como para as partições e frações da planta, a partição mais apolar obtida para o extrato do fungo **FE** não foi analisada por LC-ESI-MS, pois, como mencionado anteriormente esta técnica não é a mais adequada para as análises de compostos com um caráter apolar muito pronunciado.

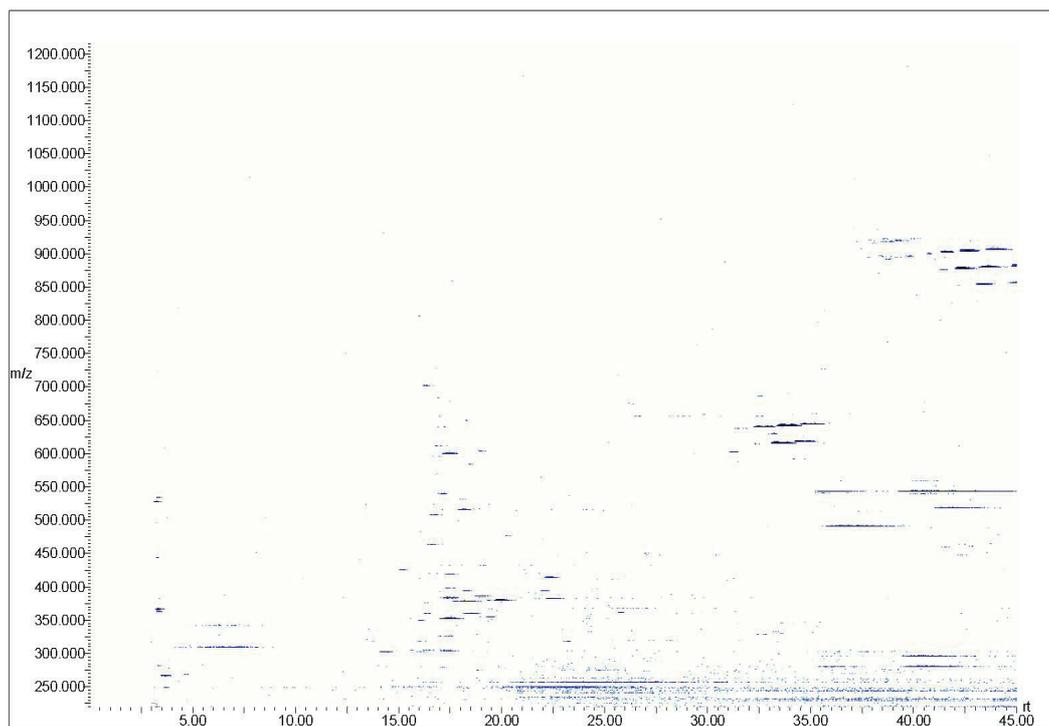


Figura 73: Mapa da análise de LC-MS do branco de arroz.

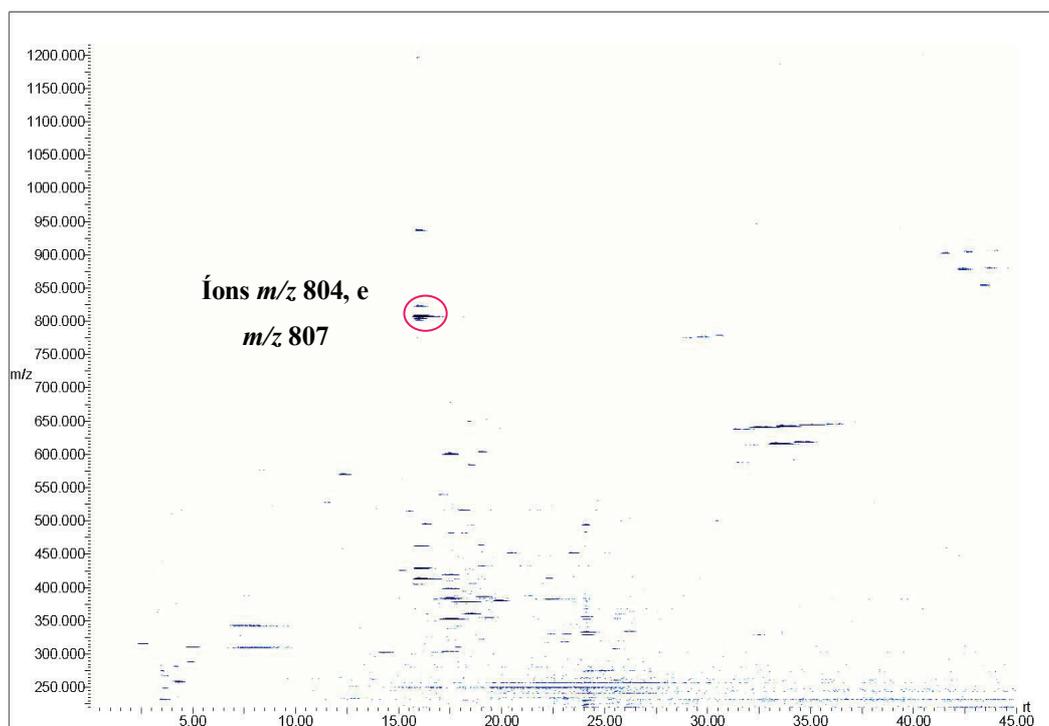
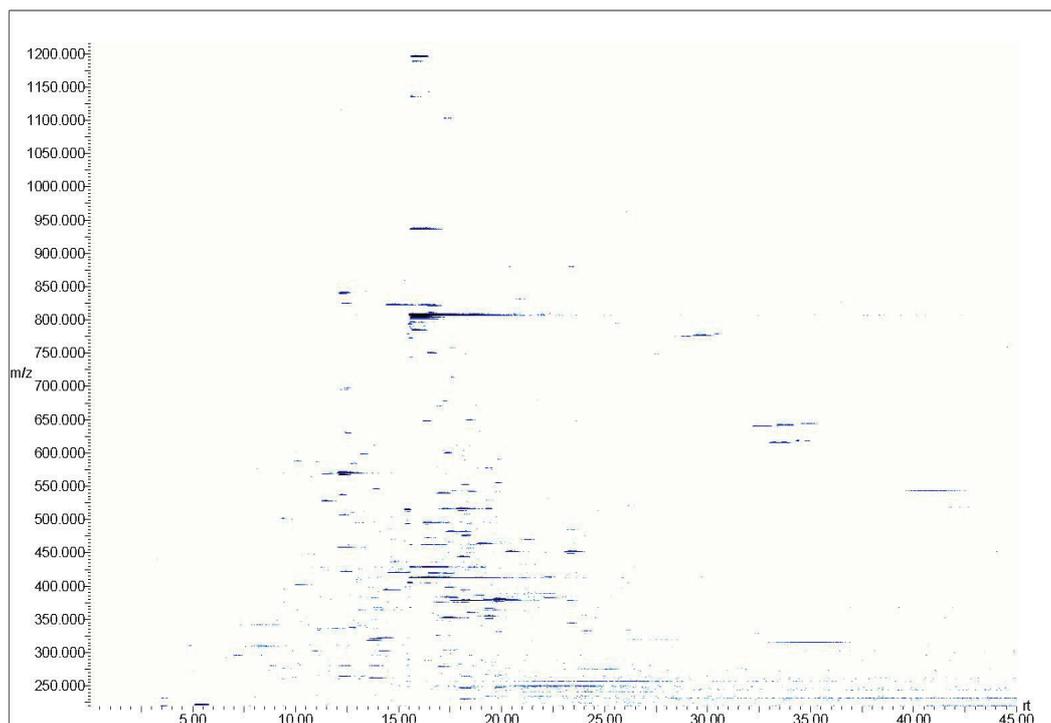
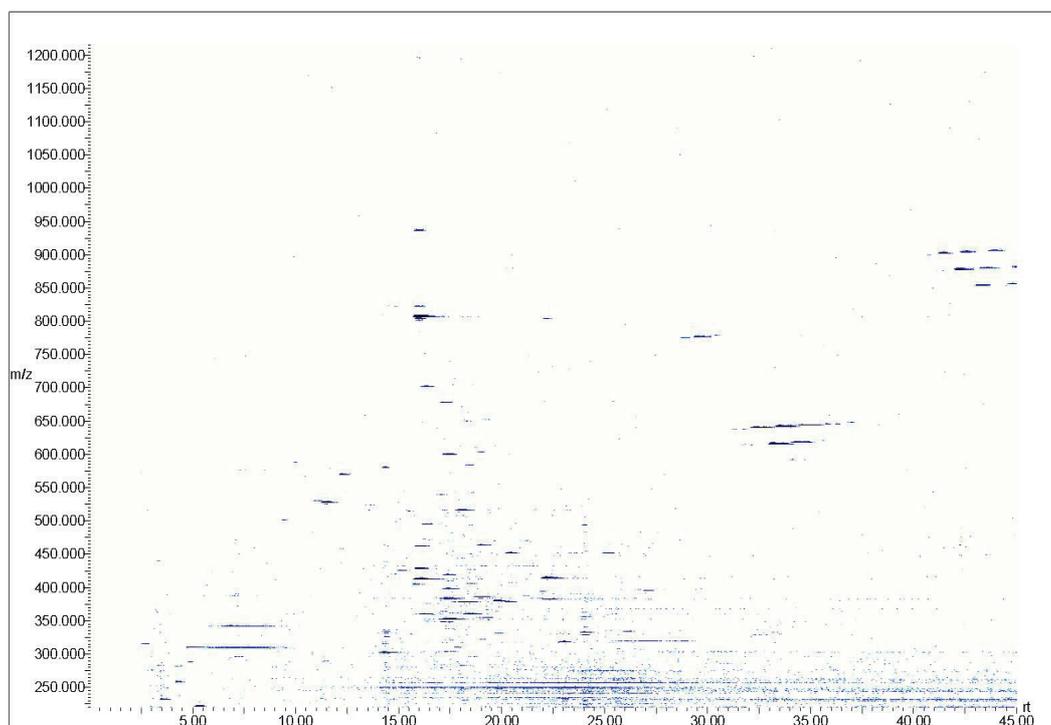


Figura 74: Mapa da análise de LC-MS do extrato do fungo FE.



**Figura 75:** Mapa da fração FE\_P2.



**Figura 76:** Mapa da fração FE\_P3

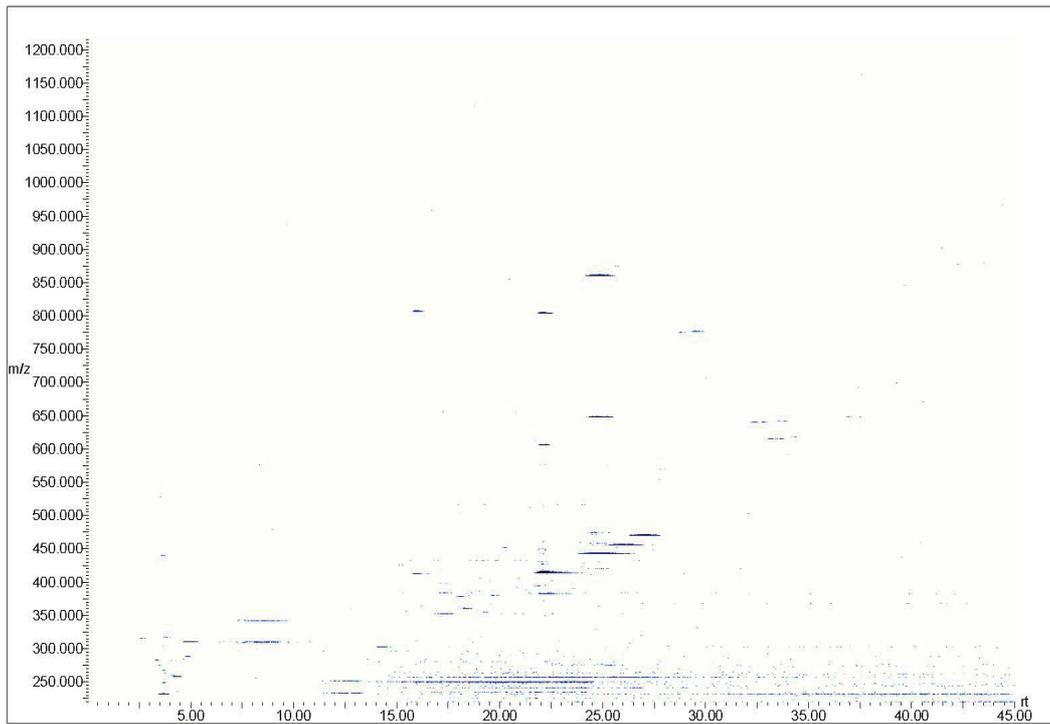


Figura 77: Mapa da amostra FE\_P4

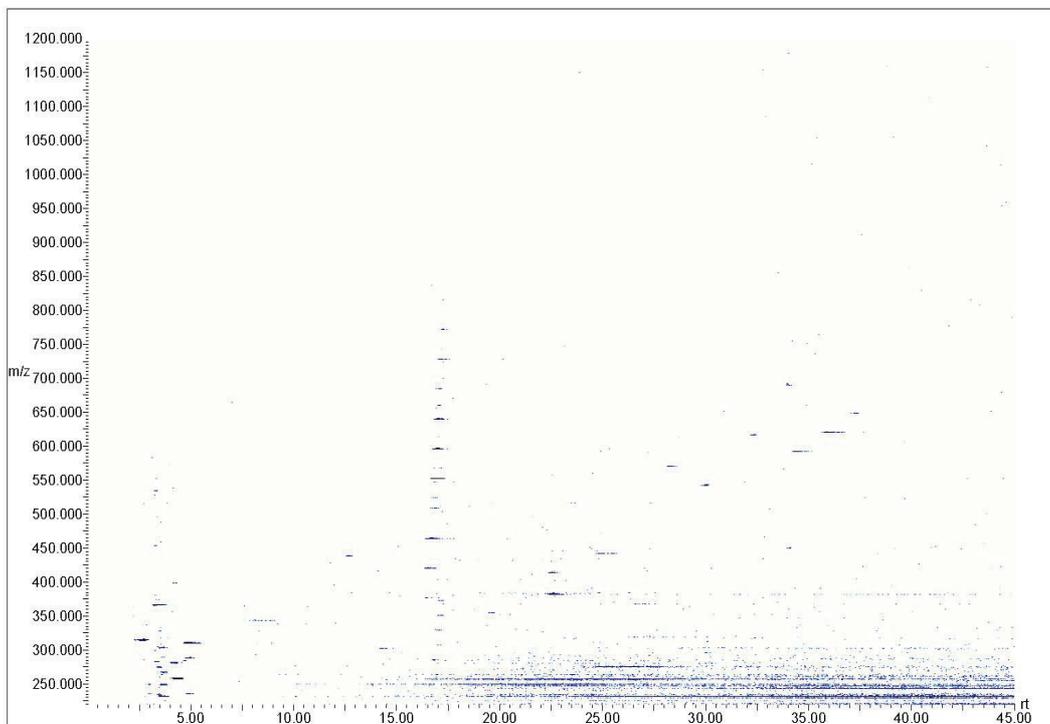
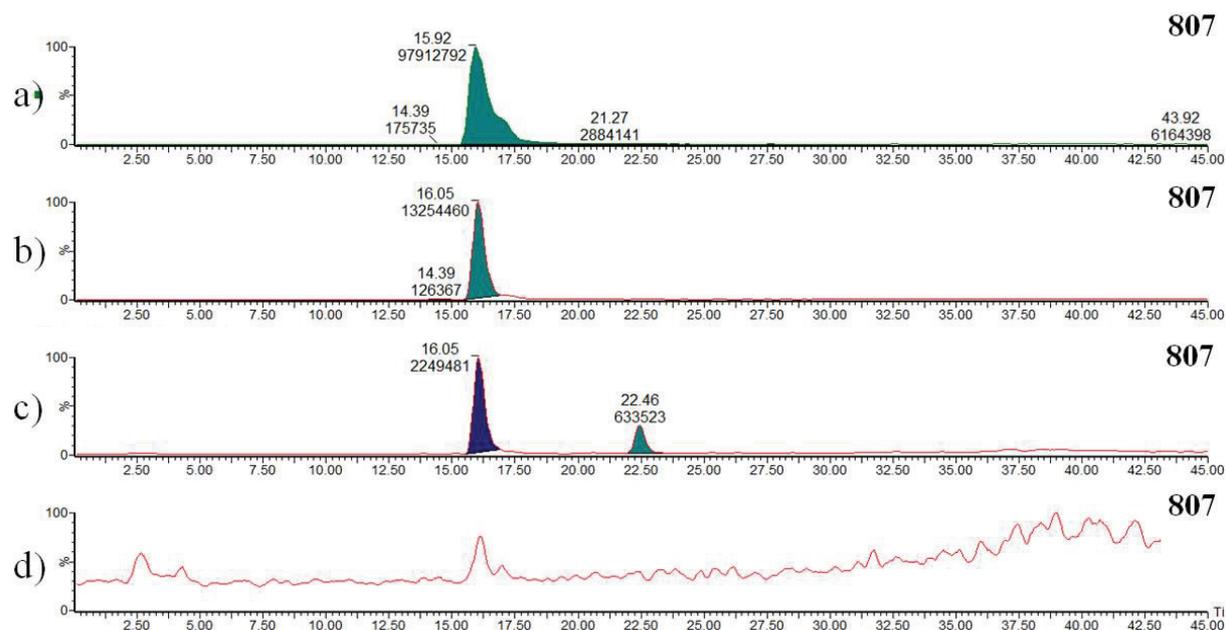


Figura 78: Mapa da amostra FE\_P5

Assim, como na discussão dos resultados obtidos para a planta, o objetivo principal do uso de técnicas como LC-ESI-MS, nestes estudos de desreplicação é determinar quais os compostos presentes na amostra biologicamente ativa (**FE\_P2**) estariam relacionados com a atividade desta fração. Ou seja, quais compostos estão presentes apenas ou majoritariamente na amostra ativa. Neste caso, os mapas mostram que a amostra **FE\_P2** é bastante rica em alguns compostos com  $m/z$  em torno de 800, (principalmente  $m/z$  807) quando comparada as demais frações do extrato do fungo FE. Isso pode ser observado, na **Figura 79**, com a comparação dos cromatogramas de íons selecionados para o íon  $m/z$  807, nas diferentes frações do extrato do fungo FE.

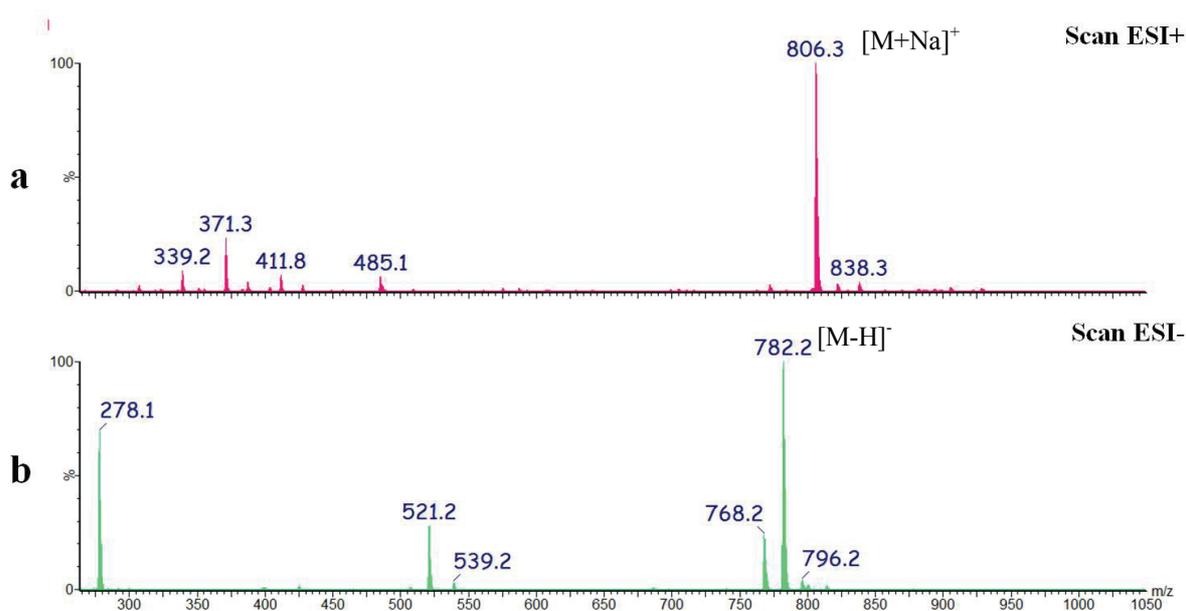
Seguindo o mesmo raciocínio que na discussão feita para as amostras da planta, apesar de todas as frações do fungo FE estarem na mesma concentração para as análises de LC-MS, estas análises não foram realizadas com rigor analítico necessário para afirmar qual a precisão dessas áreas, e quanto elas realmente refletem a quantidade de compostos presentes em cada amostra, apenas realizou-se injeções em triplicatas de cada amostra. Porém, como a diferença entre essas áreas é de pelo menos uma ordem de grandeza, pode-se estabelecer um paralelo entre a área e a quantidade do composto presente nas amostras.

Esses dados fornecem indícios de que este composto pode estar relacionado à excelente atividade antibiótica apresentada pela fração **FE\_P2**, já que pelos valores das áreas, mostrados na **Figura 79**, o íon  $m/z$  807 esta presente em uma quantidade pelo menos 7 vezes maior nesta amostra que nas demais.

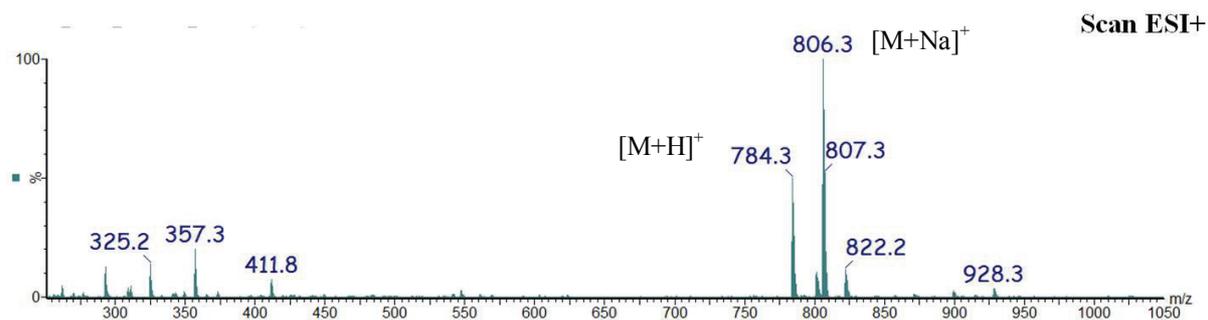


**Figura 79:** Cromatogramas de íon selecionado  $m/z$  807 para as amostras: a) FE\_P2; b) FE\_P3; c) FE\_P4 e d) FE\_P5

A **Figura 80** mostra os espectros de massas desta banda em 16,0 minutos nos dois modos de ionização (positivo e negativo). E a partir destes espectros pode-se inferir que a massa deste composto deve ser 783 Da. Assim o íon  $m/z$  806, no modo positivo corresponde a  $[M+Na]^+$  enquanto que no modo negativo  $m/z$  782 refere-se a molécula deprotonada  $[M-H]^-$ . Dessa forma o íon protonado dessa molécula deveria ser  $m/z$  784, mas nestas condições de análise praticamente não aparece espectro de massas. Após otimizadas as condições de ionização obteve-se o espectro de massas no modo positivo mostrado na **Figura 81**, onde pode-se observar a presença do íon  $m/z$  784 referente a molécula protonada  $[M+H]^+$ .

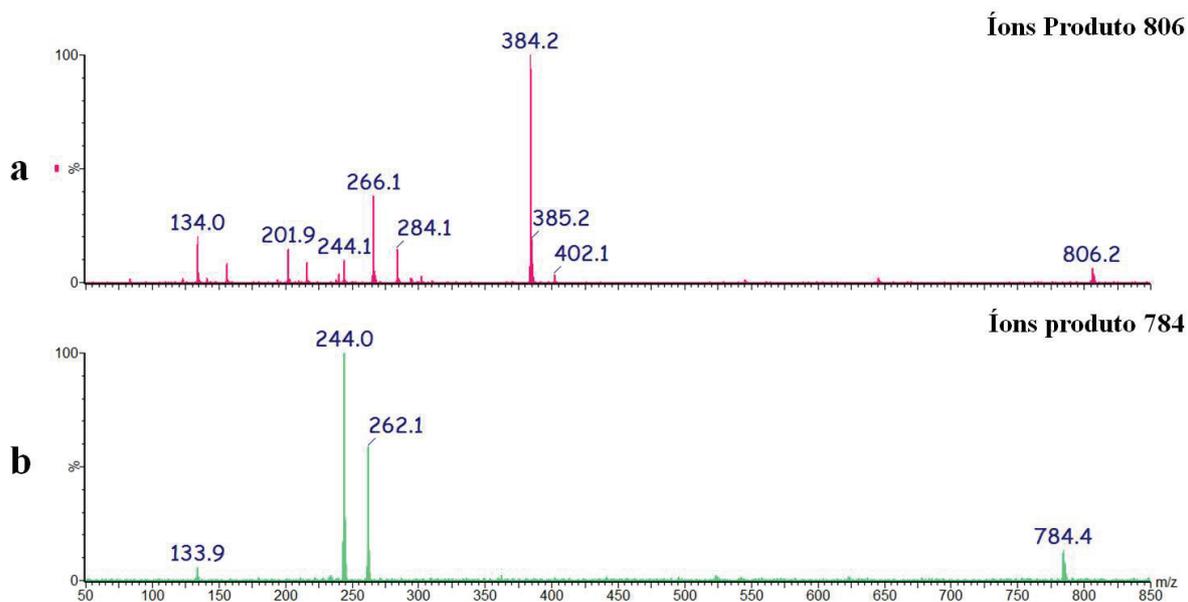


**Figura 80:** Espectro de massas referente a banda em 16 minutos da amostra FE\_P2



**Figura 81:** Espectro de massas referente a banda em 16 minutos da amostra FE\_P2 otimizado para  $m/z$  784

Os dois íons  $m/z$  784 e  $m/z$  806, referentes ao composto com tempo de retenção de 16 minutos foram fragmentados e os espectros de íons produto são mostrados na **Figura 82**.



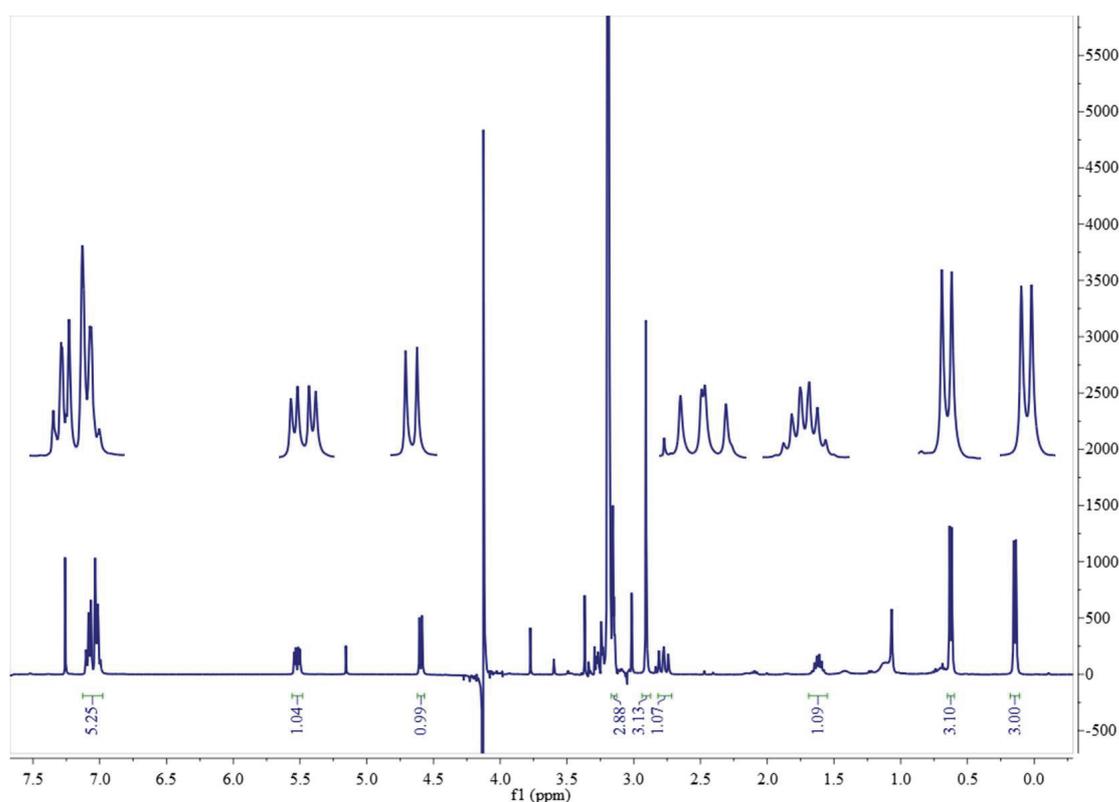
**Figura 82:** Espectro de íon produto dos íons a)  $m/z$  806 e b)  $m/z$  784.

No espectro de íons produto de  $m/z$  784( $[M+H]^+$ ), os fragmentos mais intensos são  $m/z$  244 e  $m/z$  262, sendo a diferença entre eles 18 unidades, sugerindo a presença de oxigênios na molécula. Além disso o íon  $m/z$  262 (no modo positivo) refere-se a uma parte da molécula com massa 261 Da. Se essa massa for multiplicada por 3, o resultado é 783 Da, exatamente a massa estimada para o composto. Isso sugere que esta seja uma molécula que possui 3 grupos com mesma massa. Outra observação importante é que ela possui grande afinidade por sódio, já que foi bastante difícil otimizar as condições para detectar o íon  $m/z$  784 ( $[M+H]^+$ ). Como esta molécula estava presente em grande quantidade na fração **FE\_P2**, partiu-se para o isolamento dela utilizando-se HPLC em escala preparativa, segundo as condições descritas no **Item 3.2.2.7**.

A partir deste experimento foi possível isolar 5,0 mg deste composto, o qual foi analisado por NMR 1D e 2D.

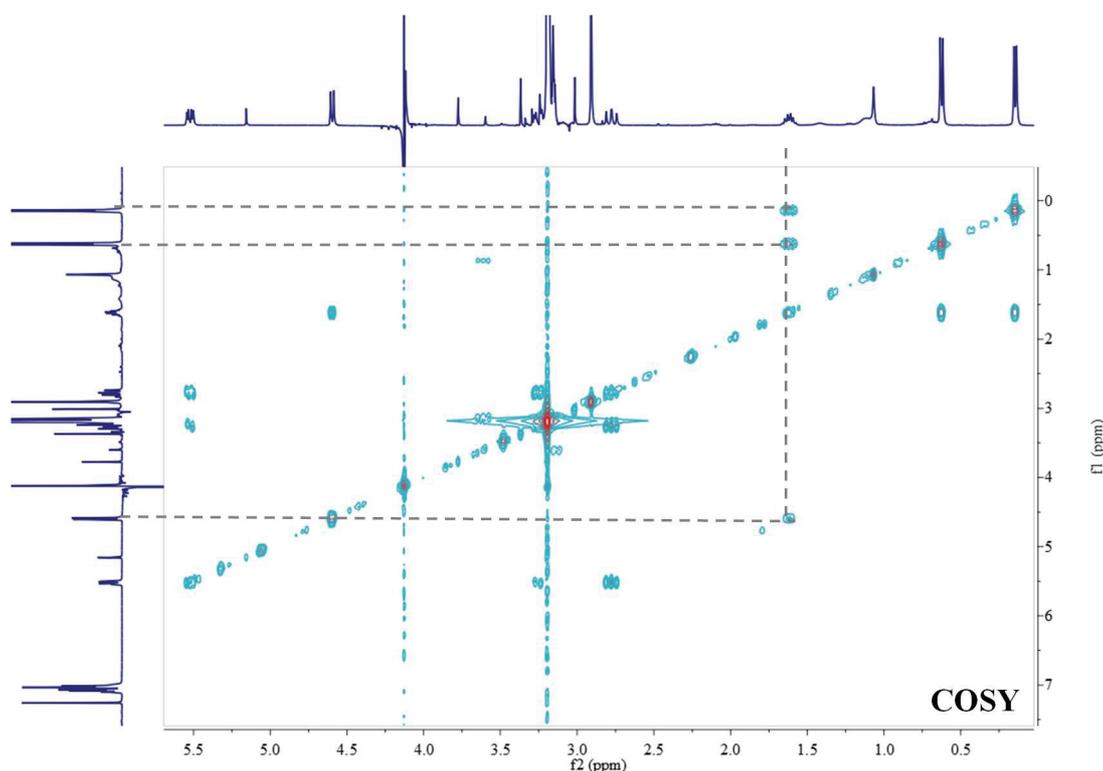
#### 4.2.6. Análise por NMR 1D e 2D do composto isolado de FE\_P2

Os experimentos de NMR foram realizados em um equipamento de 400MHz, como descrito no **Item 3.2.2.8**. No espectro de hidrogênio (**Figura 83**) a presença de dois dubletos (d) bastante blindados com  $\delta$  0,15 e 0,62 e  $J$  6,9Hz e 6,6 Hz respectivamente, que integram para 3 H cada além de um multipletto em  $\delta$  1,62 com integral para 1H, sugerem a presença de um grupo isopropil na molécula.



**Figura 83:** Espectro de hidrogênio do composto 1.

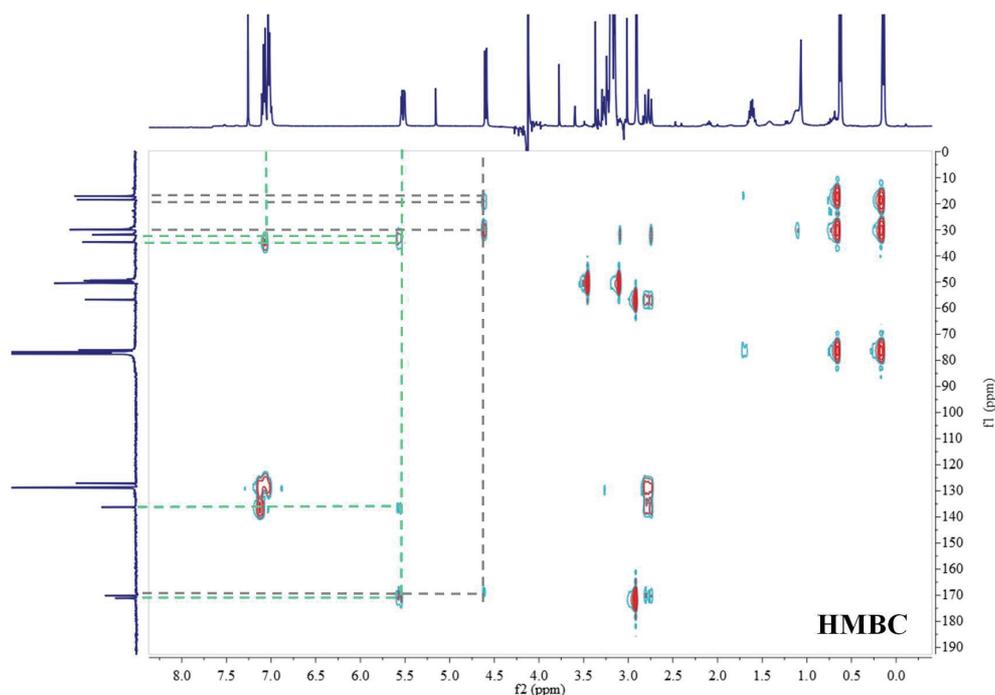
A presença do grupo isopropil pode ser confirmada pelo espectro de COSY (**Figura 84**) onde os sinais das metilas correlacionam com o octapleto em  $\delta$  1,62. Este por sua vez correlaciona com o dupletto em  $\delta$  4,59 ( $J$  8Hz) que integra para 1 hidrogênio (**Figura 88 a**).



**Figura 84:** Espectro de COSY para Composto 1.

As correlações deste hidrogênio ( $\delta$  4,59) a duas ou mais ligações estão destacadas nos espectros de HMBC (**Figura 85**), pelas linhas cinzas. Onde ele correlaciona com os dois carbonos das metilas em  $\delta$  18,5 e 17,0, com um carbono em  $\delta$  29,7 e com um sinal em  $\delta$  170, sugerindo a presença de uma carboxila em sua vizinhança, (**Figura 88 b**). Entretanto o carbono em que este hidrogênio esta ligado possui um deslocamento químico de  $\delta$  76,0, sugerindo que haja outro grupo retirador de elétrons ligado a ele além da carboxila. Pois carbonos  $\alpha$  carboxílicos geralmente apresentam um  $\delta$  em torno de 20-30, enquanto que este é bem mais desblindado ( $\delta$  76,0). Dessa forma o grupo retirador de elétrons poderia ser um oxigênio diretamente ligado diretamente a este carbono. Isso porque carbonos ligados diretamente a oxigênio têm deslocamento químico entre  $\delta$  50-70, dependendo do grupo funcional de que este heteroátomo faz parte.

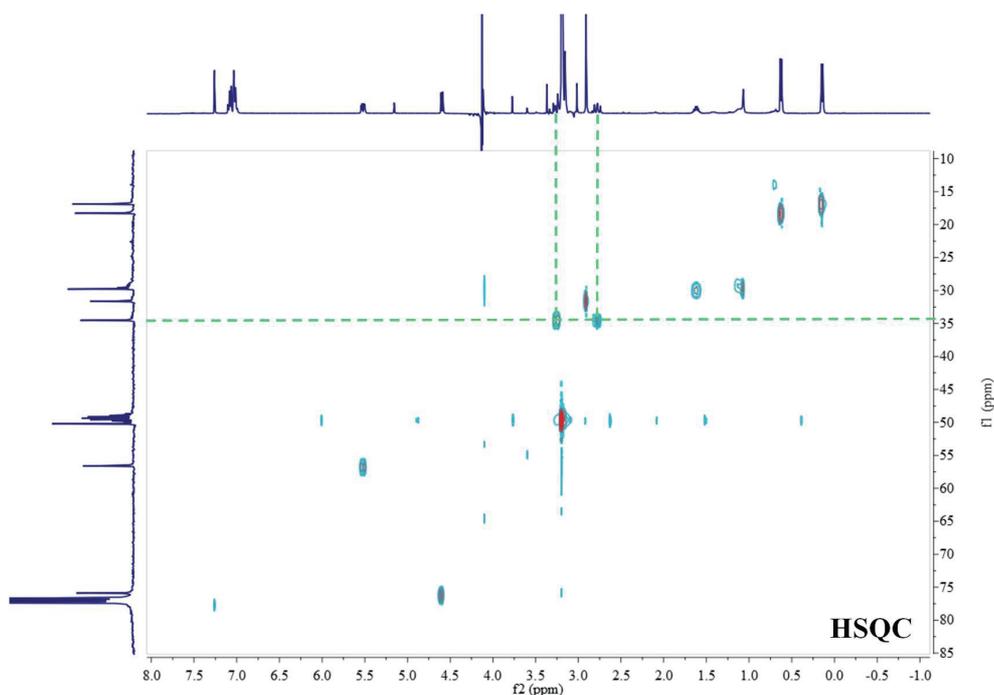
A partir do espectro de HSCQ determinou-se os descolamentos dos carbonos aos quais estes hidrogênios estavam ligados, a **Figura 88c** mostra este fragmento sugerido para a molécula com os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos.



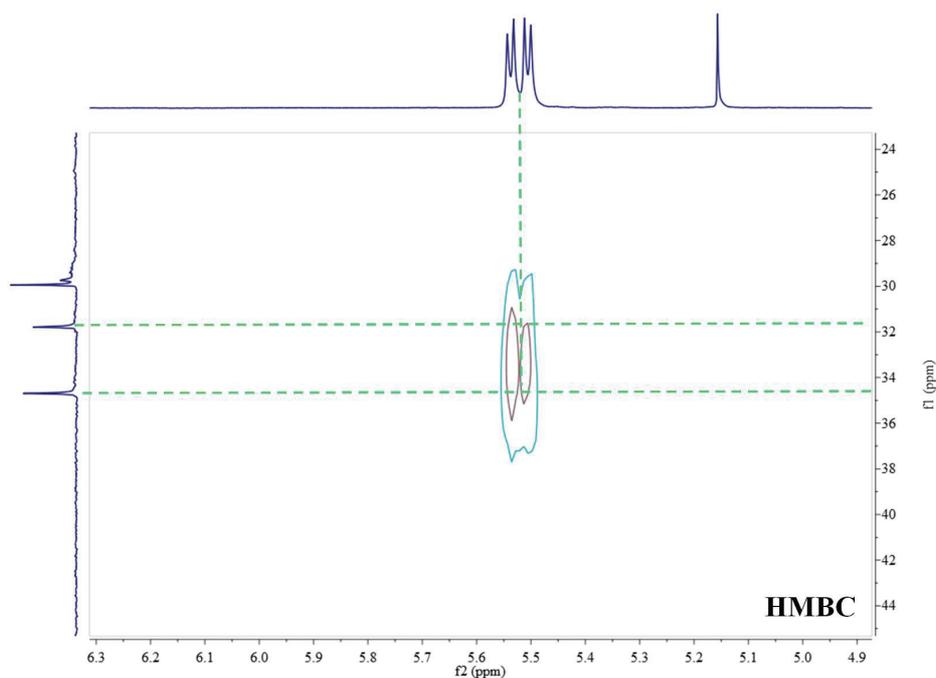
**Figura 85:** Espectro de HMBC para composto 1.

Outra parte da molécula está relacionada aos sinais aromáticos com  $\delta$  6,98-7,12 que integram para 5 hidrogênios, sugerindo que não há substituição no anel. Entretanto, como os sinais estão sobrepostos não é possível confirmar esta suposição pela multiplicidade dos mesmos. As correlações destes hidrogênios à duas ou mais ligações, são mostradas no espectro de HMBC pelas linhas verdes (**Figura 85**), onde pode-se observar que eles correlacionam com um carbono em  $\delta$  34,7 (**Figura 88 d**). Este carbono acopla com dois sinais diferentes no espectro de HSQC (**Figura 86**), um duplo dubleto (dd) com  $\delta$  2,78 (J 16,0 e 12,9Hz) que integra para 1 H, e um outro sinal em  $\delta$  3.26 que está encoberto pelo sinal do metanol (**Figura 88 d**). O carbono ( $\delta$  34,7) também acopla no espectro de HMBC (**Figura 85**) com um duplo dubleto em  $\delta$  5,52 (J

12,4 e 4 ppm) que integra para 1H. Este hidrogênio, por sua vez acopla no HMBC (**Figura 85**) com um sinal em  $\delta$  171 (C-O), com o carbono em  $\delta$  136 do anel aromático e com dois carbonos na região de  $\delta$  30 (**Figura 88 e**). A **Figura 87** mostra uma ampliação do espectro de HMBC que confirma o acoplamento deste dd com os dois sinais na região de  $\delta$  30.



**Figura 86:** Espectro de HSQC para o composto 1.



**Figura 87:** Ampliação do espectro de HMBC do composto 1.

Um desses carbonos ( $\delta$  34,7) encontra-se  $\alpha$  ao anel aromático (**Figura 88 f**) e o outro em  $\delta$  31,8 acopla no HSCQ com um singlete em  $\delta$  2,78 que integra para 3H. Este sinal sugere a presença de uma metila ligada a um átomo eletronegativo devido ao elevado deslocamento químico apresentado por ele (**Figura 88f**). Assim, a proposta para os dois fragmentos desta molécula são mostrados na **Figura 88c e f**. Esses fragmentos correspondem aos resíduos dos aminoácidos valina e fenilalanina N-metilada, sugerindo que o composto seja semelhante a um peptídeo, constituído apenas por esses dois resíduos de aminoácidos, já que não há outros sinais nos espectros de ressonância que justifiquem a presença de outros grupos na molécula.

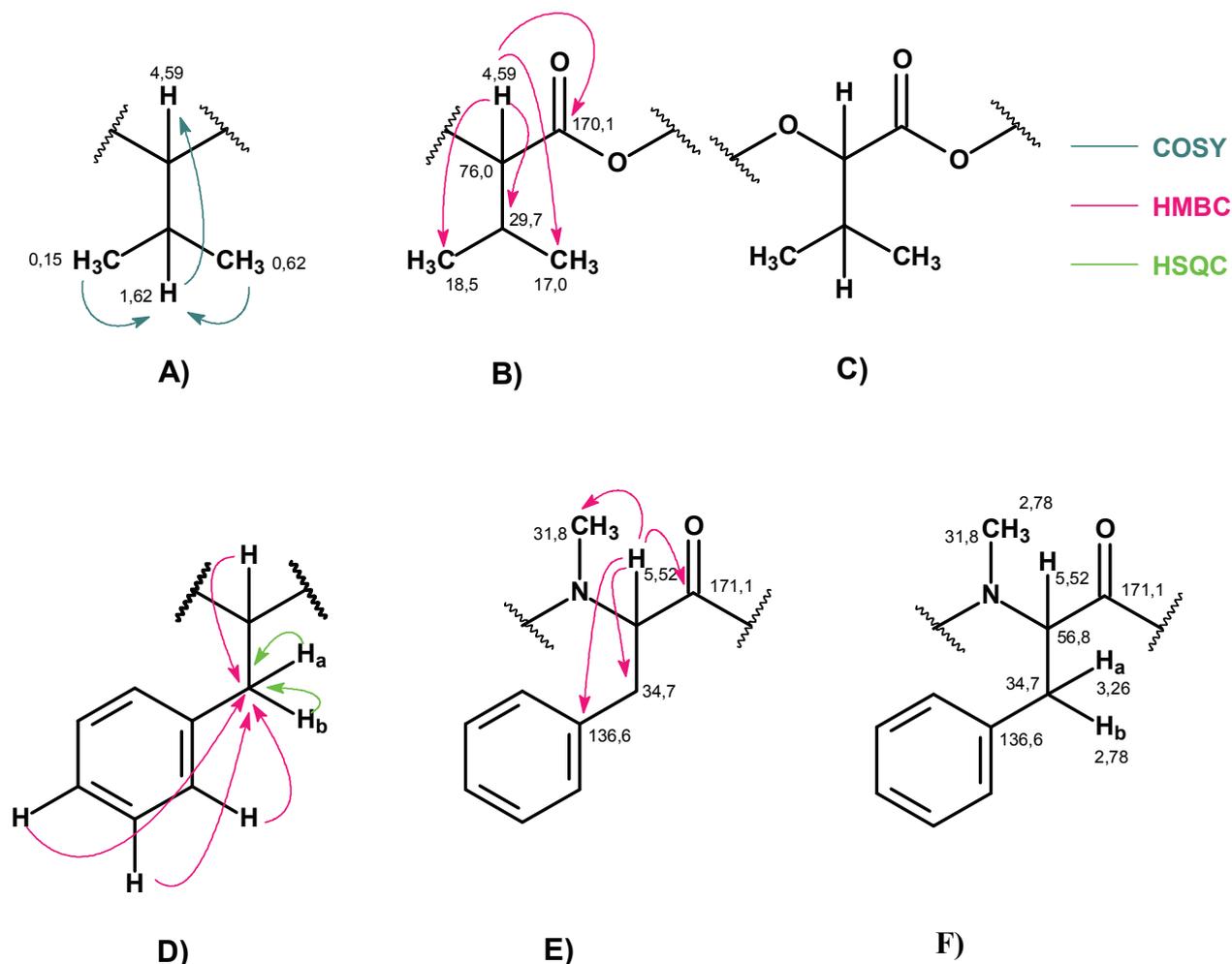
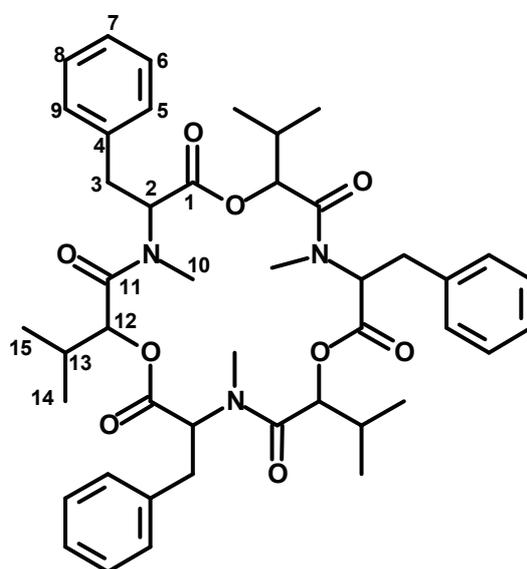


Figura 88: Correlações dos experimentos de NMR 2D.

Como discutido anteriormente, os dados obtidos por espectrometria de massas indicam que a massa deste composto deve ser 783 Da, sugerindo que ele seja análogo a um peptídeo com a junção destes dois resíduos de aminoácido de forma simétrica. Já que não há outros sinais no espectro de NMR que justifiquem a presença de outros grupos na molécula.

Como a massa molecular é ímpar, pela regra do nitrogênio, o número de átomos de nitrogênio presentes na molécula deve ser ímpar também. Assim, para que haja coerência entre os dados de massas e de ressonância, a junção entre os dipeptídeos (phe-val) deve ser feita através de ligações de éster e a molécula deve ser cíclica.

Estes compostos onde algumas ligações amídicas são substituídas por ligações de éster, são conhecidos como depsipeptídeos. Assim, os dados aqui apresentados sugerem que o **composto 1** pertence a esta classe, mais especificamente a molécula de beauvericina (**Figura 89**), uma substância bastante relatada na literatura por suas propriedades antibióticas, e que foi isolada pela primeira vez de fungos entomopatogênicos como, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus*.<sup>43, 44</sup> Além disso, essa substância também foi detectada em diferentes espécies de *Fusarium*.<sup>45</sup>



**Figura 89:** Estrutura química de beauvericina

A **Tabela 15** mostra a comparação dos dados de ressonância obtidos para a beauvericina isolada com aqueles presentes na literatura<sup>46</sup>. Os dados reportados na literatura foram obtidos em clorofórmio, enquanto o experimento para a beauvericina isolada foi realizado em mistura de clorofórmio:metanol, dessa forma existem algumas diferenças entre os deslocamentos químico desses sinais.

Entretanto, os valores para os hidrogênios da posição 3 são muito discrepantes entre os dados obtidos e aqueles da literatura. Pelos dados obtidos

os dois hidrogênios da posição 3 são magneticamente diferentes e correspondem aos sinais em  $\delta$  2,78 e 3,24ppm, o primeiro deles, um duplo dubleto que integra para 1hidrogenio, e outro que não foi possível definir a multiplicidade pois esta sobre o sinal do solvente. Como o H2 (**Figura 89**) só acopla com esses dois hidrogênios ligados ao carbono 3, se a multiplicidade deste sinal é um duplo dubleto isso indica que os dois hidrogênios da posição 3 são magneticamente diferentes. O que é coerente com os dados encontrados no experimento de  $^1\text{H}$  realizado neste estudo, resumidos na **Tabela 11**.

Dessa forma, é possível que haja algum equívoco nos dados publicados na literatura já que, nestes dados os hidrogênios da posição 3 geram um único sinal no espectro que integra para dois hidrogênio. Mostrando que eles são magneticamente equivalentes. Assim este sinal relativo aos hidrogênios da posição 3 deveria ser um dubleto, já que eles acoplam apenas com o hidrogênio ligado ao carbono 2. (**Figura 89**). Porém neste artigo e reporta o sinal referente aos hidrogênios da posição 3 como um duplodubleto (dd).

Os dados de massas para este composto também se assemelham aos presentes da literatura, sendo  $m/z$  244 e  $m/z$  262, os principais fragmentos para o íon protonado além dos íons  $m/z$  623, 523 e 362.<sup>47</sup>

Assim, sabendo-se que o fungo FE é produtor de depsipeptídeos, o extrato deste fungo em meio líquido foi analisado por LC-MS/MS de alta resolução utilizando-se um analisador Orbitrap, em busca de outros compostos desta classe. A utilização de um equipamento de alta resolução e exatidão de massas auxiliam bastante na confirmação da fórmula molecular dos compostos presentes na amostra bem como de seus fragmentos. Foi escolhido o meio líquido para esta análise, pois é um meio mais limpo que o meio de arroz apresentando menos interferentes.

Tabela 15: Resumo dos dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a Beauvericina.

Posição	Referencia <sup>46</sup>		Valores Obtidos	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	169,7		170,1	
2	57,2	<b>5,52</b> (1H, dd) ( <i>J</i> 11,49 e 4,9)	56,8	<b>5,52</b> (1H, dd) ( <i>J</i> 12,8 e 4,8)
3	34,7	<b>3,38</b> (2H, dd) ( <i>J</i> 14,6 e 4,9)	34,7	<b>2,78</b> (1H, dd) ( <i>J</i> 12,8 e 14,8) <b>3,26</b> (1H, dd.) ( <i>J</i> 4,8 e 14,8)
4	136,6	-	136,2	-
5	128,8	<b>7,18-7,35</b> (1H, m)	128,6	<b>6,98-7,12</b> (1H,m)
6	128,6	<b>7,18-7,35</b> (1H, m)	128,8	<b>6,98-7,12</b> (1H,m)
7	126,8	<b>7,18-7,35</b> (1H, m)	127,10	<b>6,98-7,12</b> (1H,m)
8	128,6	<b>7,18-7,35</b> (1H, m)	128,8	<b>6,98-7,12</b> (1H,m)
9	128,8	<b>7,18-7,35</b> (1H, m)	128,6	<b>6,98-7,12</b> (1H,m)
10	32,2	<b>3,01</b> (3H, s)	31,7	<b>2,91</b> (3H, 1s)
11	169,9	-	171,1	-
12	75,6	<b>4,90</b> (1H, d) ( <i>J</i> 8,5)	76,0	<b>4,59</b> (1H, d) ( <i>J</i> 8,1)
13	29,7	<b>2,0</b> (1H, m)	29,9	<b>1,62</b> (1H, o) ( <i>J</i> 6,8)
14	18,7	<b>0,42</b> (3H, d) ( <i>J</i> 6,9)	18,5	<b>0,15</b> (3H, d) ( <i>J</i> 6,9)
15	17,3	<b>0,80</b> (3H, d) ( <i>J</i> 6,6)	17,0	<b>0,62</b> (3H, d) ( <i>J</i> 6,6)

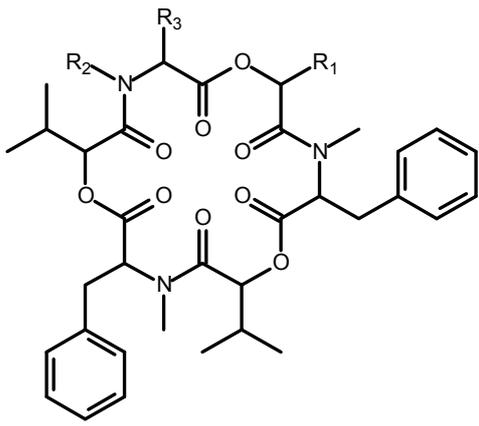
Nas análises por espectrometria de massas de alta resolução outros depsipectídeos análogos a beauvericina foram detectados, dentre eles a beauvericina D, E e F além de um composto onde um aminoácido valina foi

substituído por alanina, e que não foi relatado ainda na literatura. A **Tabela 16** mostra as relações  $m/z$  obtidas no equipamento de alta resolução e exatidão, bem como o tempo de retenção, a fórmula molecular teórica para estes íons e o desvio de massa entre o valor obtido e o valor teórico para a fórmula molecular proposta.

**Tabela 16:** Resumo das outras beauvericinas encontradas no extrato de meio líquido do fungo FE.

Composto	Fórmula para o íon	$m/z$ medido	$m/z$ teórico ( $\Delta/ppm$ )	Tempo de retenção /min
<b>Beauvericina</b>	$C_{45}H_{58}N_3O_9$	784,418	784,416 (1,32)	42,4
<b>Beauvericina D</b>	$C_{44}H_{56}N_3O_9$	770,399	770,414 (2,50)	41,1
<b>Beauvericina E</b>	$C_{41}H_{58}N_3O_9$	736,417	736,417 (0,575)	41,3
<b>Beauvericina F</b>	$C_{46}H_{60}N_3O_9$	798,432	798,432 (0,127)	43,7
<b>Composto 6</b>	$C_{43}H_{54}N_3O_9$	756,384	756,385 (1,81)	40,6

A **Figura 89** mostra a fórmula estrutural da beauvericina, onde as porções referentes aos resíduos de dois aminoácidos foram substituídas por R1 e R3, bem como o grupo ligado ao nitrogênio por R2. Pois esses grupos são os que mudam nos compostos identificados no extrato do fungo **FE**. Além disso, nesta figura são mostrados os grupos R para cada um destes compostos bem como a relação massa/carga para os íons protonados e com aduto de sódio.



The image shows the chemical structure of Beauvericin, a cyclic heptapeptide. It consists of a seven-membered ring with two nitrogen atoms and four carbonyl groups. The substituents are: R1 on the nitrogen at position 1, R2 on the nitrogen at position 4, and R3 on the carbon at position 5. The ring is substituted with a benzyl group at position 2, an isopropyl group at position 3, and another benzyl group at position 6.

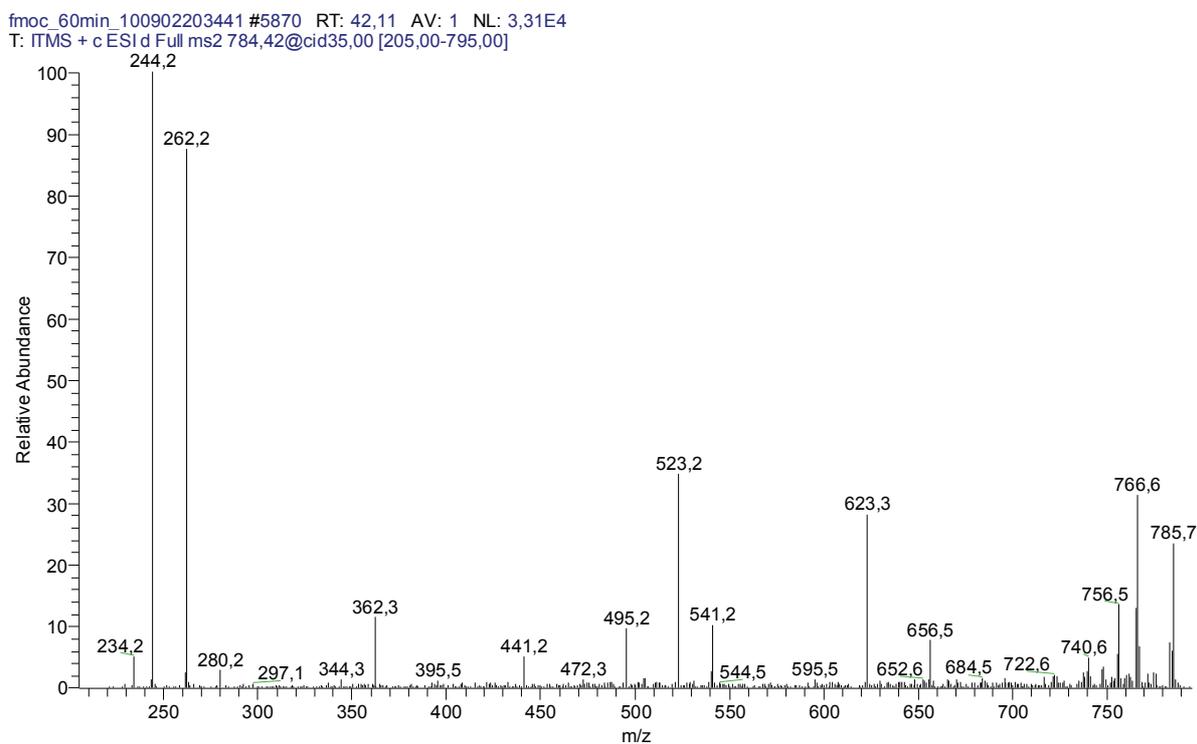
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
<b>Beauveracin</b>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	784	806
<b>Beauveracin D</b>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—H	—CH <sub>2</sub> Ph	770	792
<b>Beauveracin E</b>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	736	758
<b>Beauveracin F</b>	—CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	798	820
<b>Compound 6</b>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	756	778

**Figura 90:** Estruturas químicas das beauvericinas encontradas no extrato do fungo FE.

As estruturas das outras beauvericinas foram propostas a partir da massa exata, dados da literatura e pelo perfil dos espectros de íons produto destes compostos. Os experimentos de íons produto foram realizados tanto para os íons dos compostos protonados como para os adutos de sódio. Como eles foram feitos na empresa *ThermoFisher Scientific*, em uma demonstração do equipamento *Orbitrap*, os parâmetros de ionização, fragmentação e outros não foram otimizados para esta classe de compostos. Assim os espectros de íons produto não foram obtidos com alta resolução e exatidão de massa, pois *set-up* adotado para estas análises tinha como objetivo fragmentar o maior número de íons presentes na amostra. Para isso o tempo de aquisição de cada espectro de íons produto foi bem pequeno para que fossem obtidos o maior número de espectros possíveis. Assim, como no analisador de Orbitrap, a resolução está diretamente relacionada com o tempo de aquisição de cada ciclo, ou seja, com o tempo que os íons permanecem no orbitrap, os experimentos de íons produto

não foram adquiridos com alta resolução e exatidão de massa, e dessa forma não foi possível calcular fórmula molecular exata para esses fragmentos.

Entretanto, é possível atribuir que estes íons pertencem a uma mesma classe de compostos devido às semelhanças no tempo de retenção, abundante formação de adutos apresentadas por eles, bem como um mesmo perfil de fragmentação dos íons protonados e dos adutos de sódio. As **Figuras 91 à 94** mostram os espectros de íon produto do íon protonado para a **beauvericina**, **beauvericina D**, **beauvericina F**, e **composto 6**, o íon protonado da **beauvericina E** ( $m/z$  736) não foi fragmentado nesta análise. Pode-se observar que o perfil destes espectros de íons produto é bastante semelhante. Ou seja, os íons mais intensos dos espectros de íons produto, para a molécula protonada, possuem  $m/z$  na faixa de 250, além de alguns outros íons menos abundantes com  $m/z$  entre 500 e 600.



**Figura 91:** Espectro de íons produto para  $m/z$  784,42 ( $[M+H]^+$ ) referente a **Beauvericina**.

fmoc\_60min\_100902203441 #5732 RT: 41,25 AV: 1 NL: 2,37E4  
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 770,40@cid35,00 [200,00-785,00]

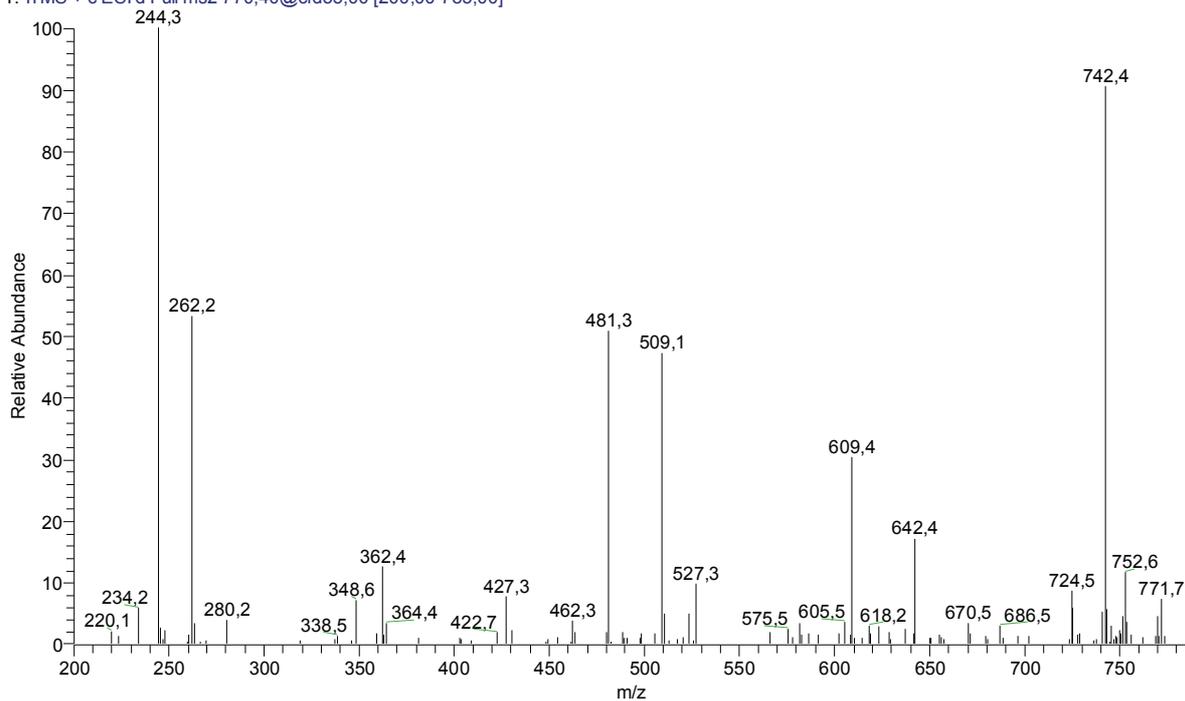


Figura 92: Espectro de íons produto para  $m/z$  770,40 ( $[M+H]^+$ ) referente a **Beauvericina D**.

fmoc\_60min\_100902203441 #6140 RT: 43,72 AV: 1 NL: 6,49E3  
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 798,43@cid35,00 [205,00-810,00]

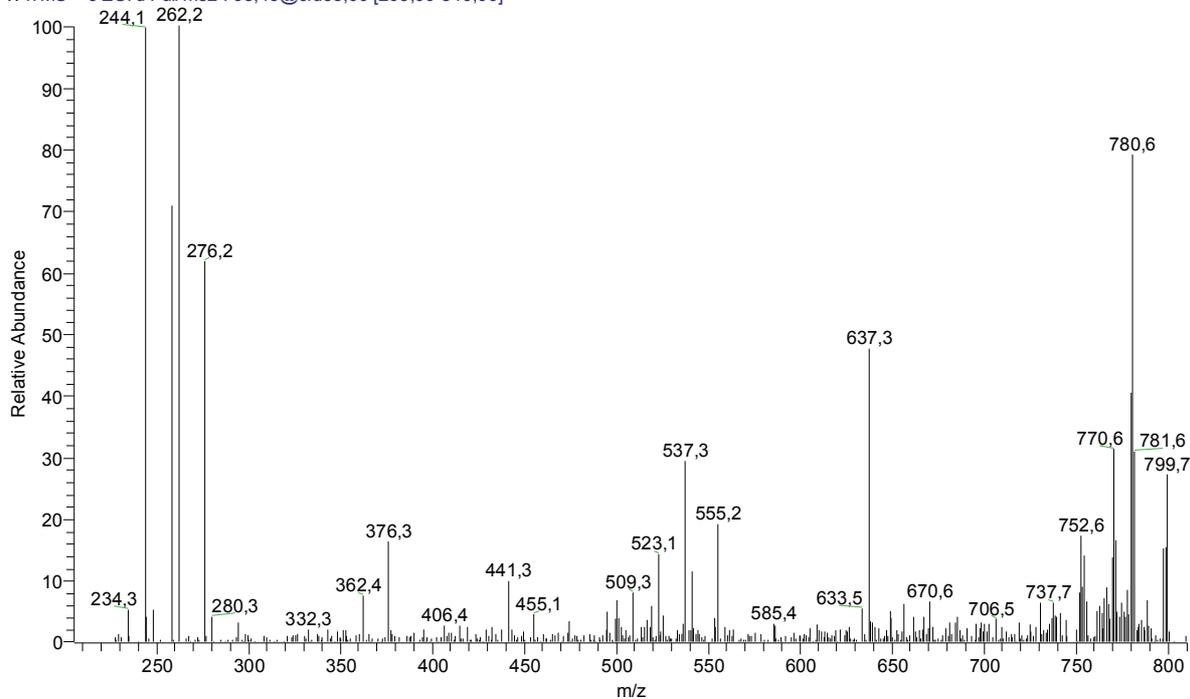
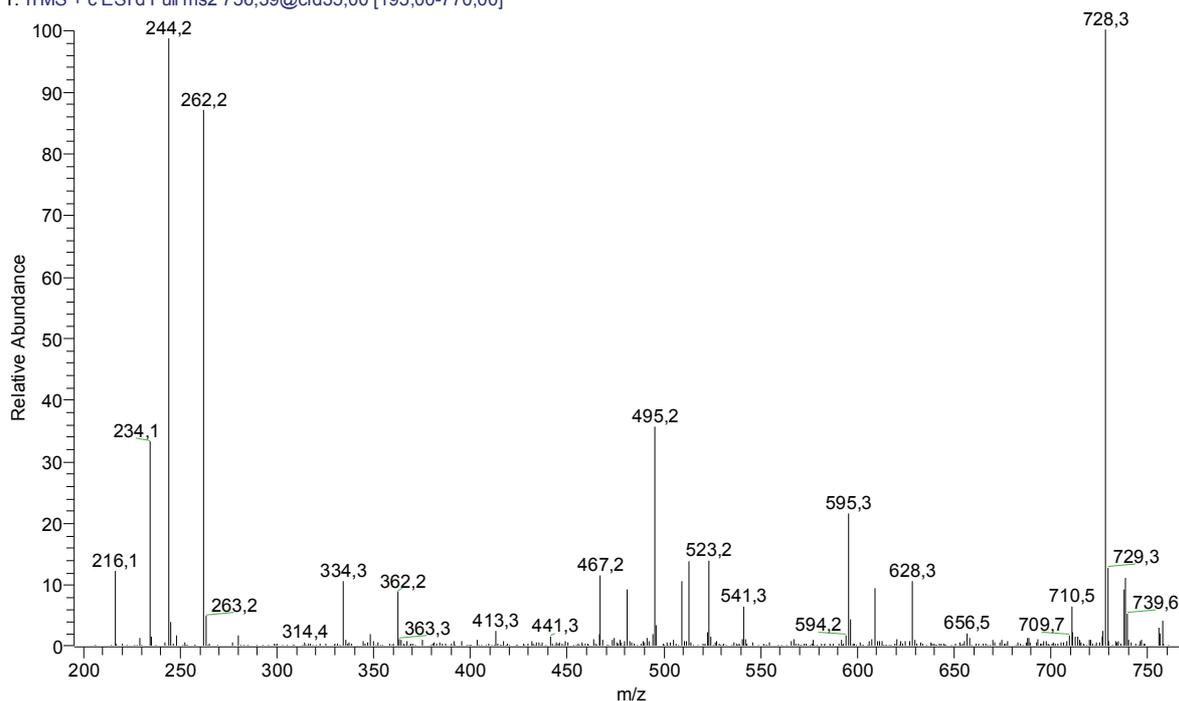


Figura 93: Espectro de íons produto para  $m/z$  798,43 ( $[M+H]^+$ ) referente a **Beauvericina F**.

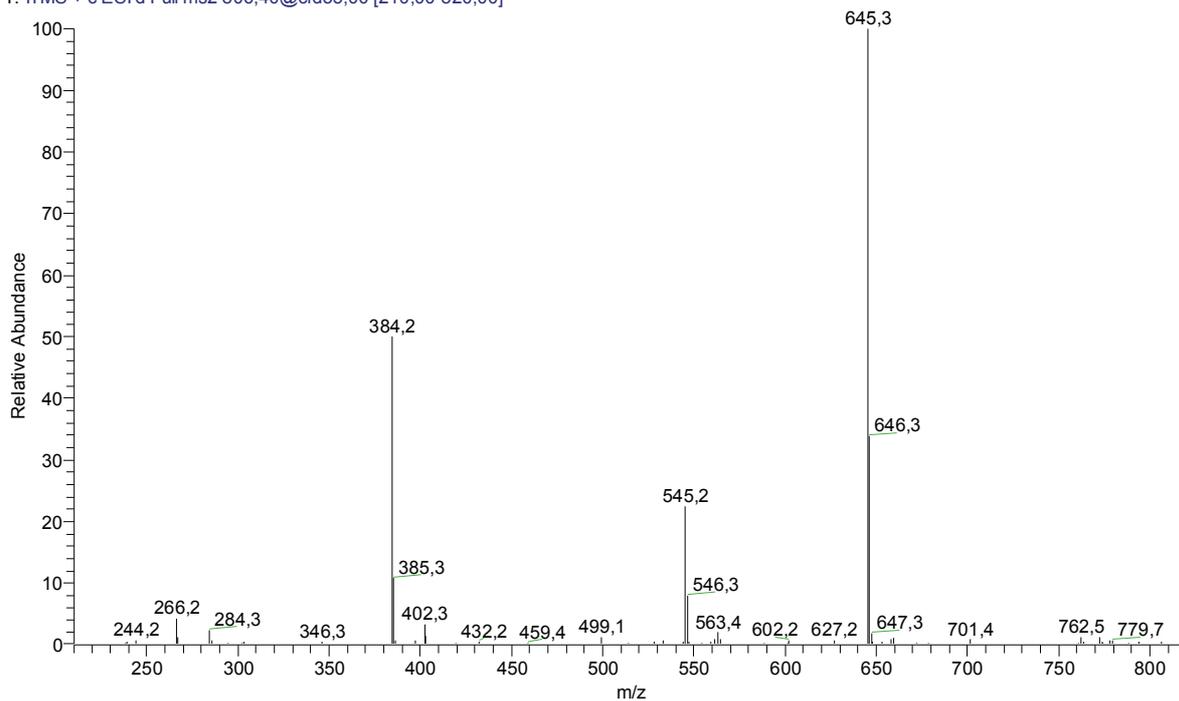
fmoc\_60min\_100902203441 #5638 RT: 40,66 AV: 1 NL: 3,42E4  
T: ITMS + c ESI d Full ms2 756,39@cid35,00 [195,00-770,00]



**Figura 94:** Espectro de íons produto para  $m/z$  756,39 ( $[M+H]^+$ ) referente o **Composto 6**.

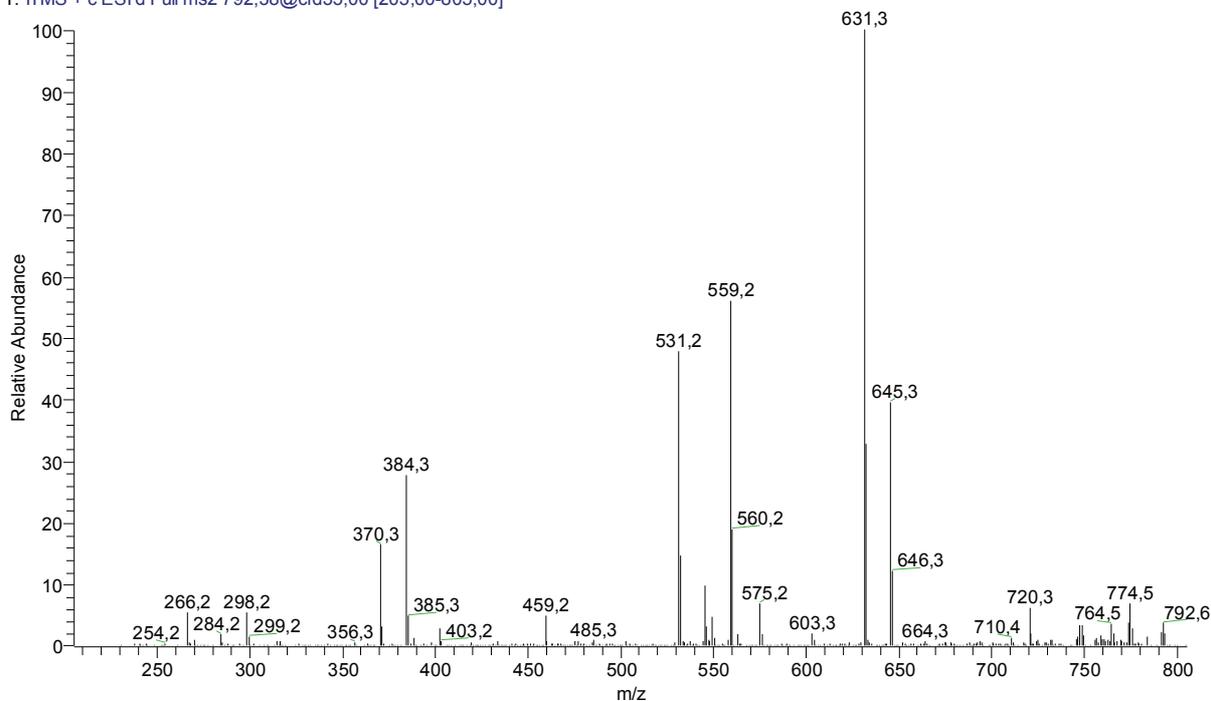
Os espectros de íons produto dos adutos de sódio destes compostos são mostrados na **Figuras 95 a 99**, e também apresentam um perfil bastante semelhante entre si: um conjunto de íon com  $m/z$  em torno de 350 à 400, outro em torno de 550, e por fim um próximo a 650. Assim esses perfis de fragmentação podem auxiliar na confirmação da estrutura destes compostos. A seguir são propostos alguns fragmentos para esta classe.

fmoc\_60min\_100902203441 #5942 RT: 42,53 AV: 1 NL: 1,68E6  
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 806,40@cid35,00 [210,00-820,00]



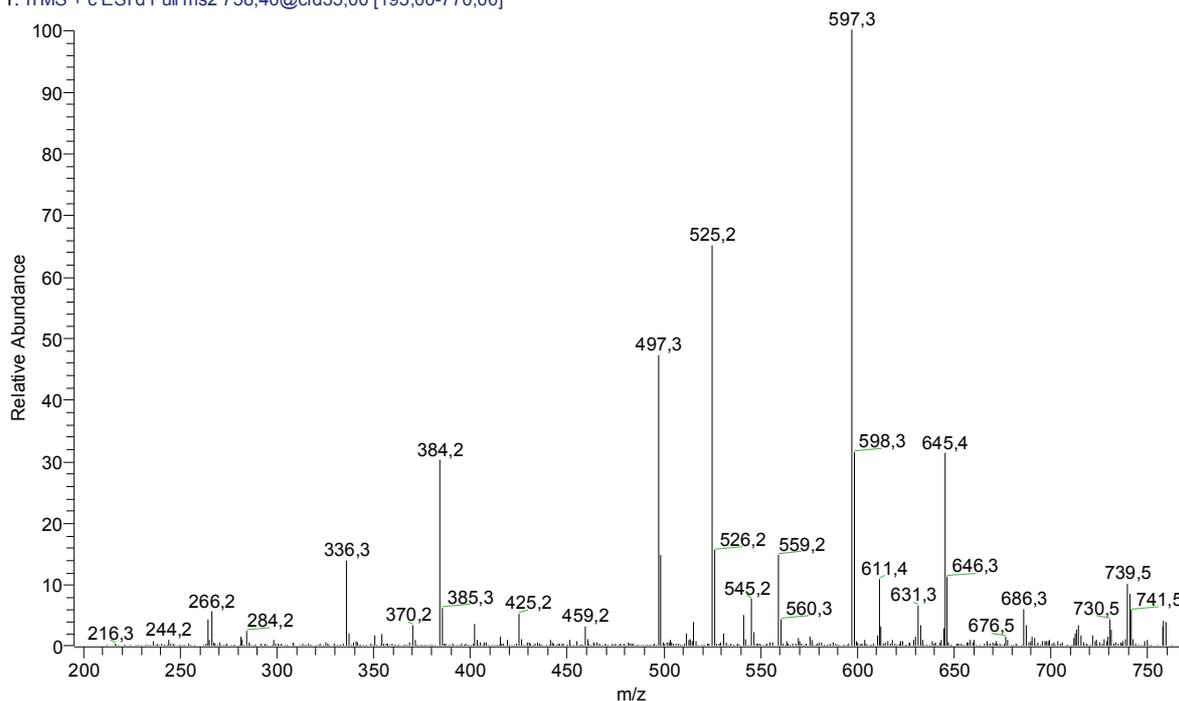
**Figura 95:** Espectro de íons produto do íon para  $m/z$  806,40 ( $[M+Na]^+$ ) da Beauvericina.

fmoc\_60min\_100902203441 #5714 RT: 41,14 AV: 1 NL: 4,43E4  
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 792,38@cid35,00 [205,00-805,00]



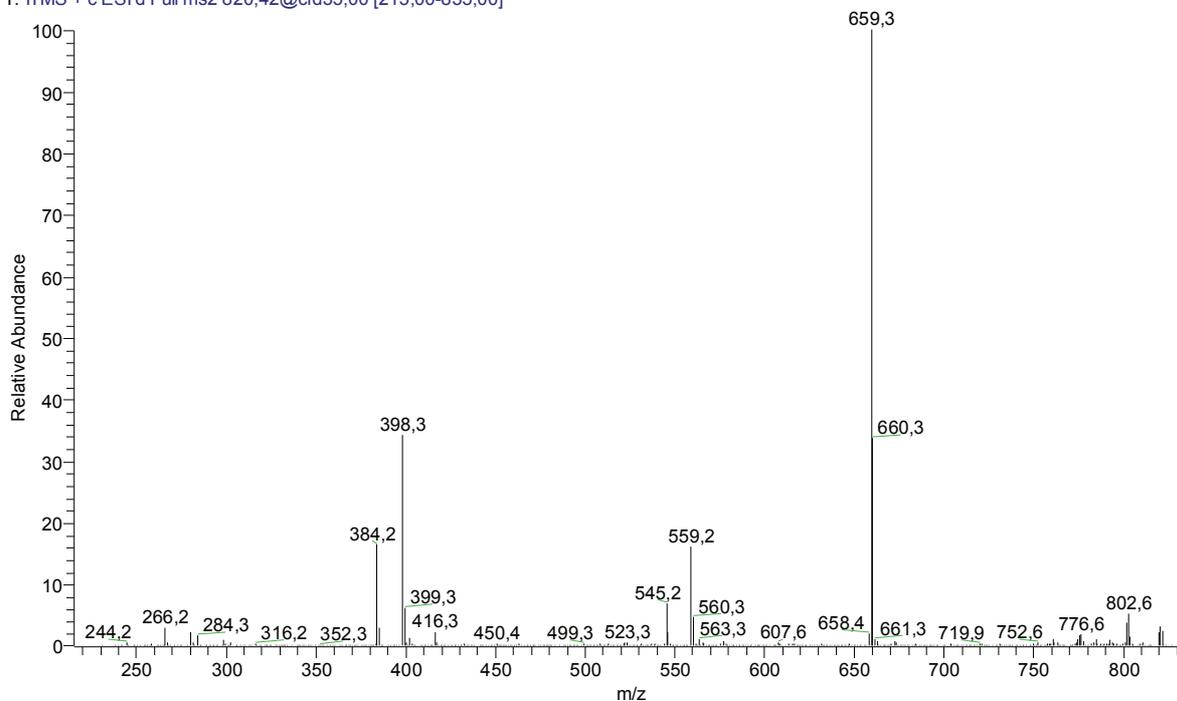
**Figura 96:** Espectro de íons produto do íon para  $m/z$  792,38 ( $[M+Na]^+$ ) da Beauvericina D.

fmoc\_60min\_100902203441 #5716 RT: 41,14 AV: 1 NL: 3,87E4  
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 758,40@cid35,00 [195,00-770,00]



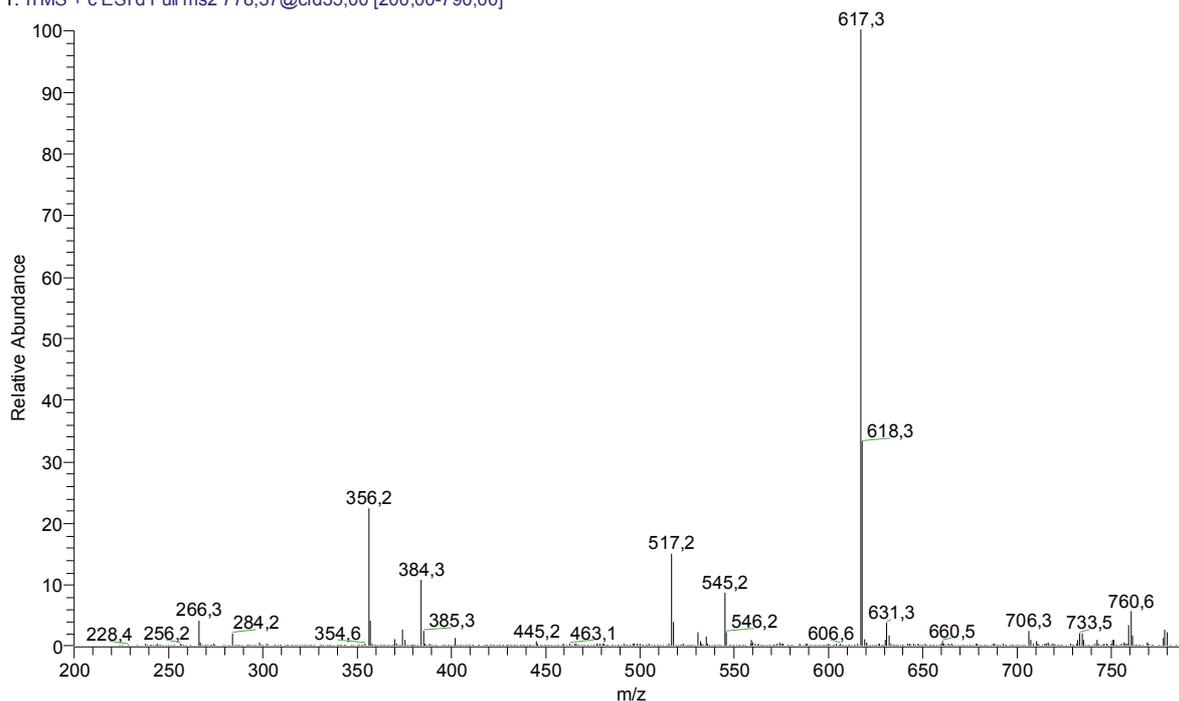
**Figura 97:** Espectro de íons produto do íon para  $m/z$  758,40 ( $[M+Na]^+$ ) da Beauvericina E.

fmoc\_60min\_100902203441 #6134 RT: 43,68 AV: 1 NL: 6,57E4  
 T: ITMS + c ESI d Full ms2 820,42@cid35,00 [215,00-835,00]



**Figura 98:** Espectro de íons produto do íon para  $m/z$  820,42 ( $[M+Na]^+$ ) da Beauvericina F.

fmoc\_60min\_100902203441 #5620 RT: 40,55 AV: 1 NL: 9,36E4  
T: ITMS + c ESI d Full ms2 778,37@cid35,00 [200,00-790,00]



**Figura 99:** Espectro de íons produto do íon para  $m/z$  758,37 ( $[M+Na]^+$ ) do Composto 6.

Como o núcleo central de todos esses compostos é semelhante ao da beauvericina, para propor a fragmentação dos análogos, as ramificações de dois dos aminoácidos foram substituídas por R1 e R3, assim como a metila ligada a um dos nitrogênios por R2, pois esses grupos representam as variações entre estes análogos. Então o mecanismo foi feito de forma genérica e as tabelas contidas nestas figuras representam as relações massa/carga para cada fragmento de cada um dos compostos.

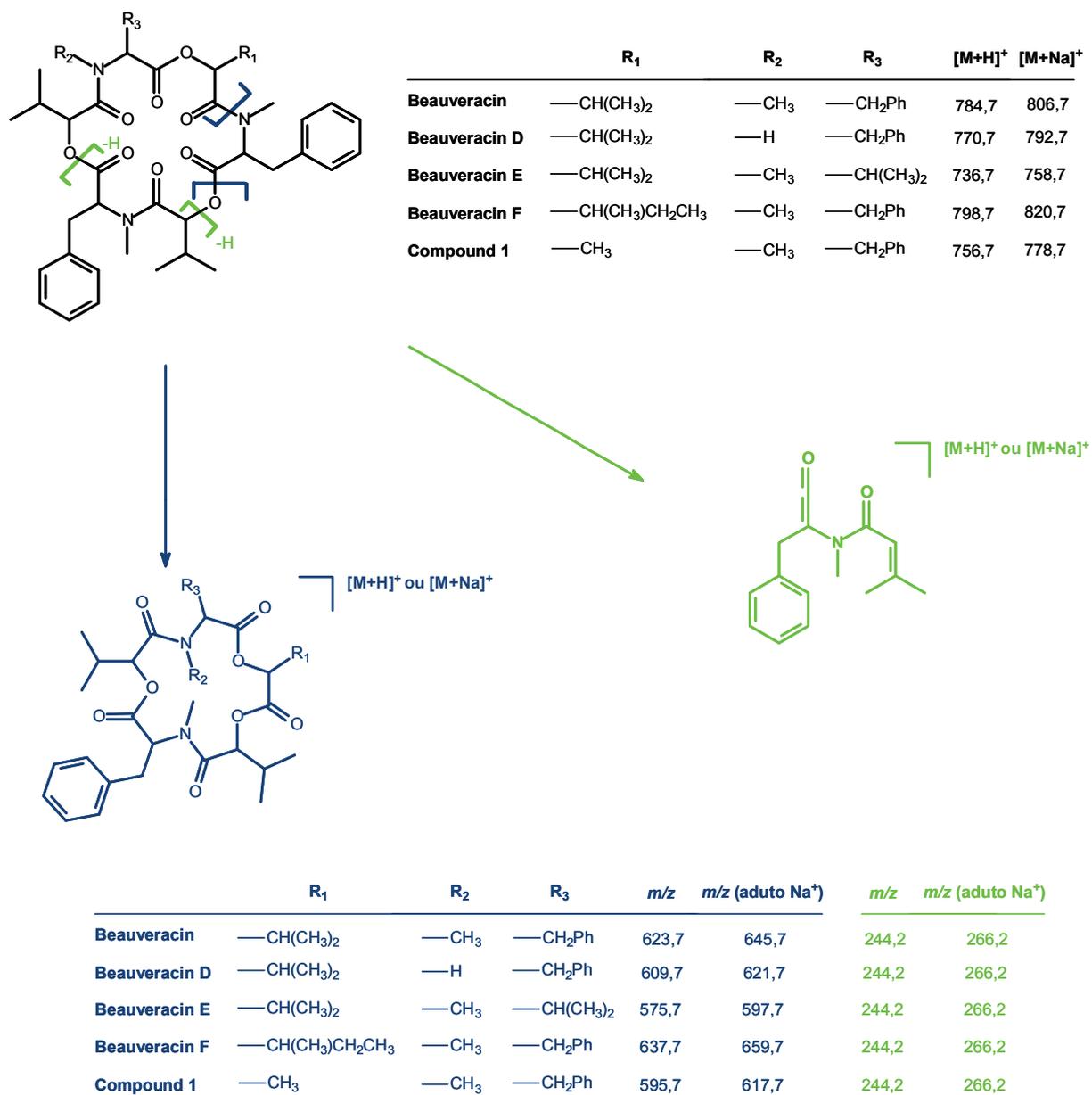


Figura 100: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos

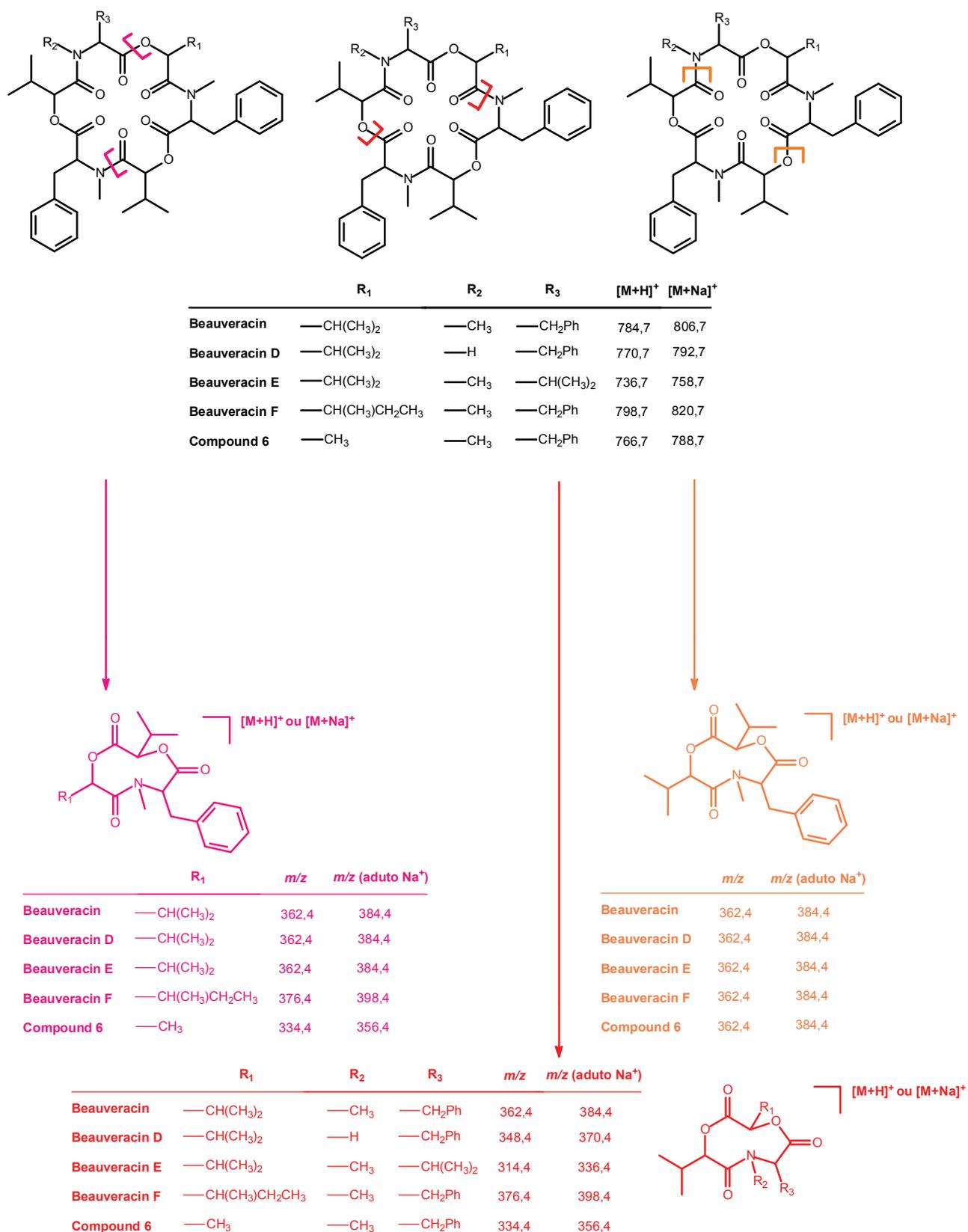
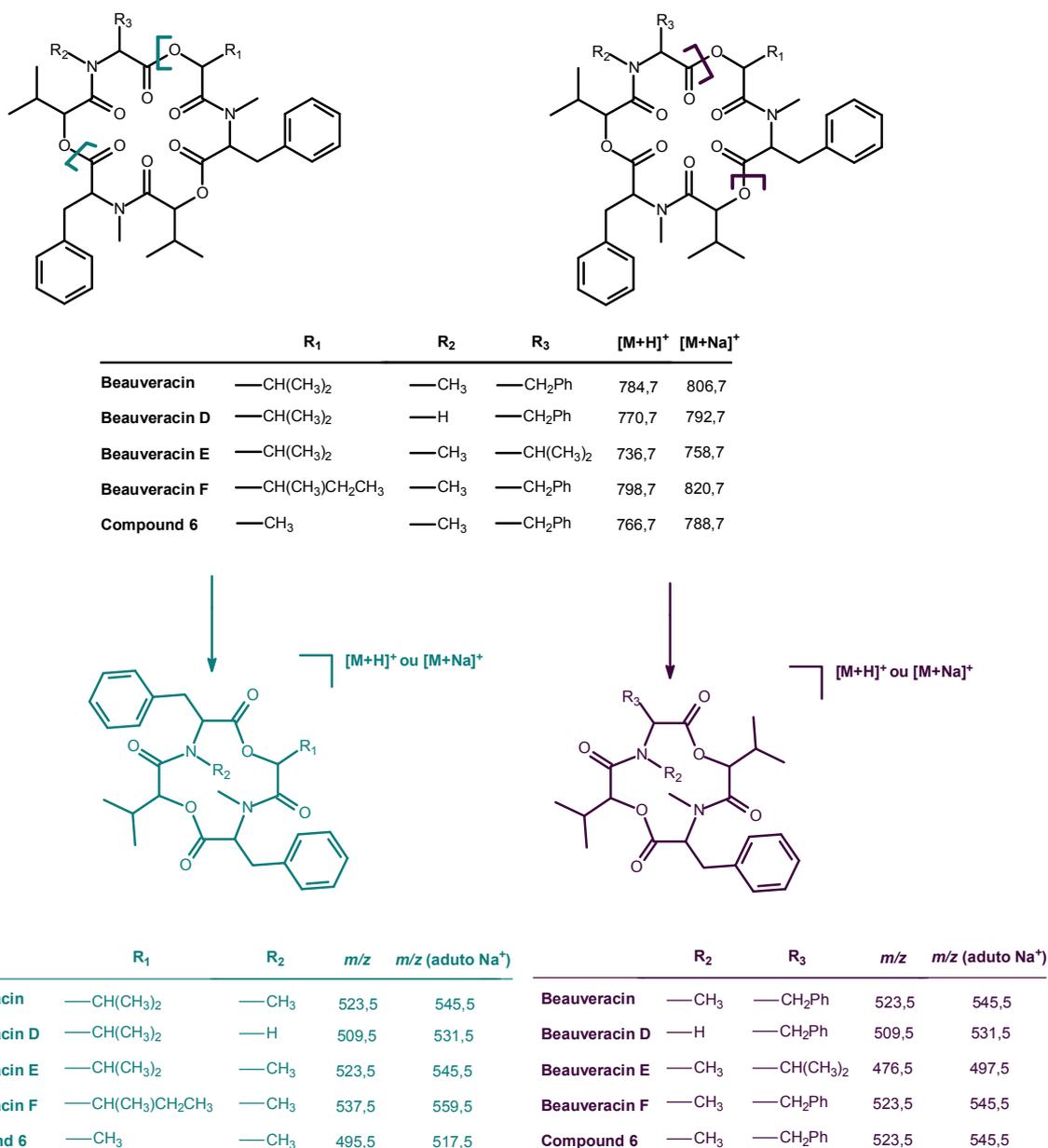


Figura 101: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos



**Figura 102:** Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos

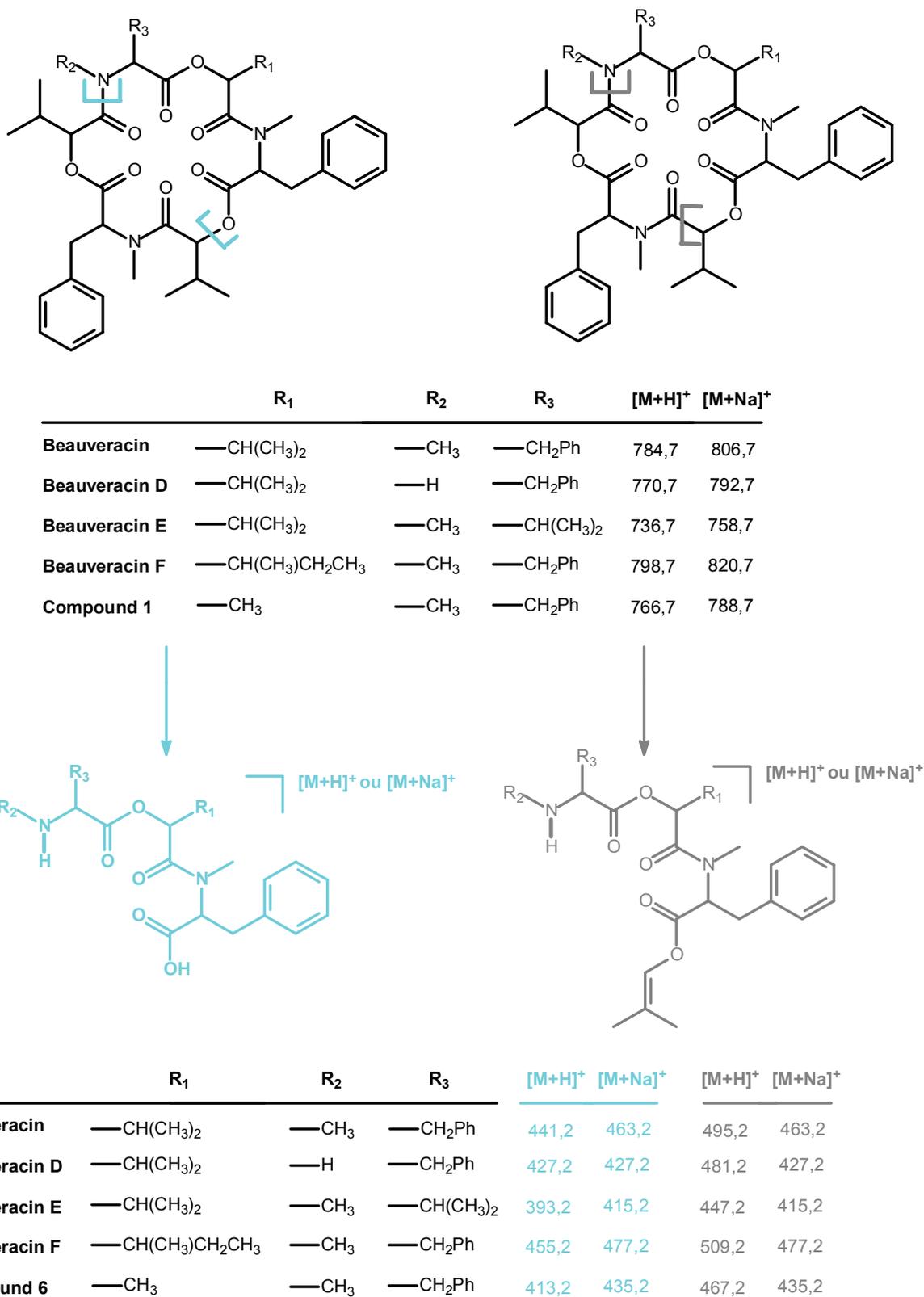
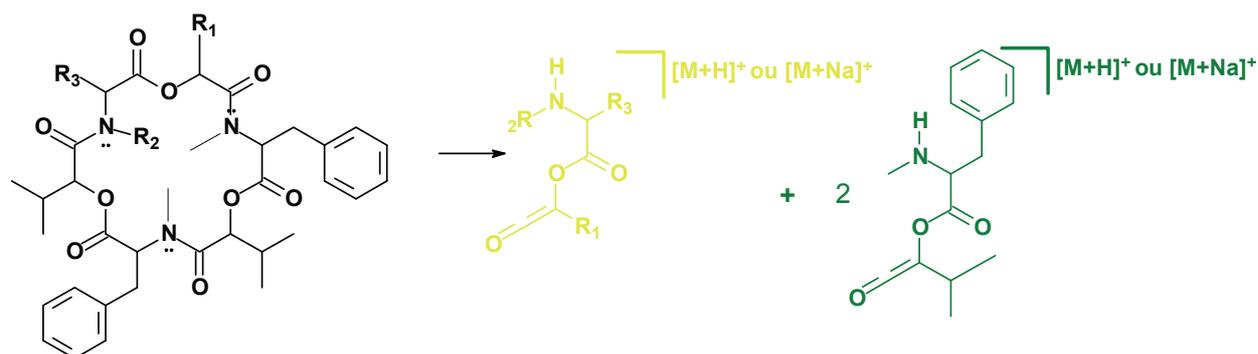


Figura 103: Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>
Beauveracin	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	262,3	284,3	262,3	284,3
Beauveracin D	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—H	—CH <sub>2</sub> Ph	248,3	260,3	262,3	284,3
Beauveracin E	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	214,3	236,3	262,3	284,3
Beauveracin F	—CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	276,3	288,3	262,3	284,3
Compound 1	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>3</sub>	—CH <sub>2</sub> Ph	234,3	256,3	262,3	284,3

**Figura 104:** Proposta do mecanismo de fragmentação para a beauvericina seus análogos

A **Tabela 17** resume os principais fragmentos presentes nos espectros de íons produto destes compostos. As cores de cada íon representam por qual mecanismo mostrado anteriormente eles são gerados para cada composto. Isso mostra que os 9 mecanismos propostos anteriormente justificam os principais fragmentos presentes nos espectros de íons produto para todas formulas estruturais propostas para os compostos detectados no extrato de meio líquido do fungo FE.

Sabendo que o fungo FE, é um bom produtor de compostos da classe dos depsipeptídeos, conhecidos por suas atividade biológicas, partiu-se para a identificação do gênero deste micro-organismo.

**Tabela 17:** Principais fragmentos dos depsipeptídeos detectados no extrato de meio líquido do fungo FE.

Beauv (783 Da)		Beauv D (769 Da)		Beauv E (735 Da)		Beuv F (797 Da)		Comp 1 (755 Da)	
<b>784</b>	<b>806</b>	<b>770</b>	<b>792</b>	<b>736</b>	<b>758</b>	<b>798</b>	<b>820</b>	<b>756</b>	<b>778</b>
M+H	M+Na	M+H	M+Na	M+H	M+Na	M+H	M+Na	M+H	M+Na
766	-	752	-	NF	-	780	-	738	-
756	-	742	-	NF	-	770	-	728	-
623	645	609	631	NF	597	637	659	595	617
523	545	509	531	NF	497	537	559	495	517
523	545	509	531	NF	497	523	545	523	545
441	-	427	-	NF	-	455	-	467	-
495	-	481	-	NF	-	509	-	413	-
362	384	362	384	NF	384	376	398	334	356
362	384	348	370	NF	336	376	398	334	356
362	384	362	384	NF	384	362	384	362	384
262	-	262	-	NF	-	262	-	262	-
-	-	-	-	NF	-	276	-	234	-
244	-	244	-	NF	-	244	-	244	-

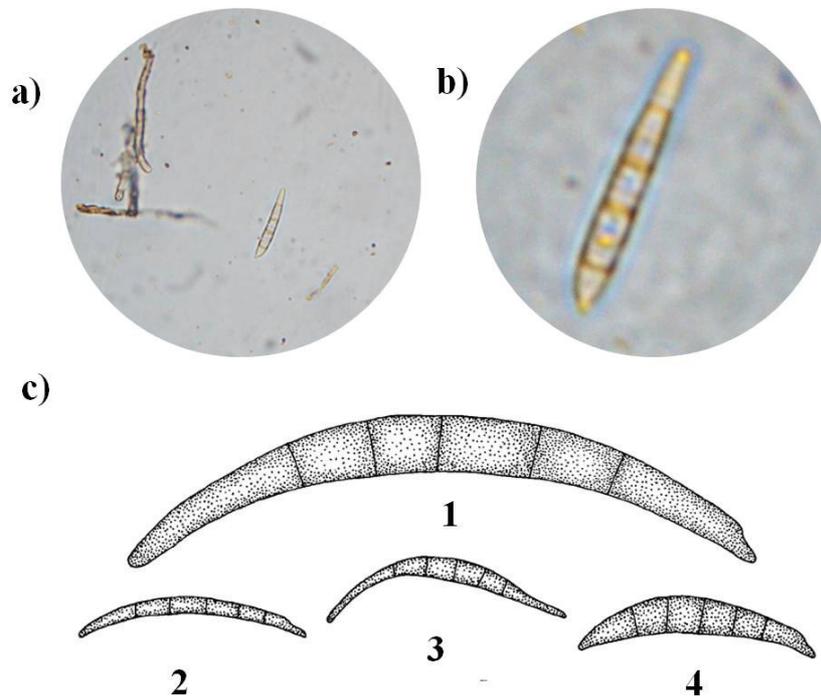
#### 4.2.7. Identificação morfológica do fungo FE

Através da observação macroscópica da cultura do fungo FE, propôs-se que este fungo pertenceria ao gênero *Fusarium* devido à produção de um pigmento vermelho, característico de algumas espécies deste gênero. Porém, para se obter mais informações sobre a morfologia deste fungo partiu-se para a análise microscópica do mesmo a fim de se observar as estruturas reprodutoras (principalmente macroconídeos) bastante característico deste gênero.

Após vários cultivos em diferentes meios, obteve-se uma cultura produtora destas estruturas de reprodução, que podem ser observadas na **Figura 105a**, com ampliação na **Figura 105b**. Já na **Figura 105c**, são mostrados os macroconídeos para diferentes espécies de *Fusarium*, como publicado no livro “the *Fusarium* Laboratory Manual”, e que se assemelham bastante com os presentes no fungo FE.<sup>48</sup> Além disso, várias espécies de *Fusarium* são conhecidamente produtoras de beauvericina, composto produzido

em grande quantidade pelo fungo FE isolado como endofítico da planta *Alternanthera brasiliana*. Esses dados reforçam a proposta inicial de que este fungo pertence ao gênero *Fusarium*. A identificação da espécie deste micro-organismo está sendo feita através de estudos moleculares, pelo Prof. Dr. André Rodrigues da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Assim sabendo que o fungo FE, isolado como endofítico de *Alternanthera brasiliana*, é um bom produtor de depsipeptídeos, compostos bastante conhecidos por sua atividade antibiótica, partiu-se para a análise do extrato da planta a fim de verificar se a beauvericina, principal depsipeptídeo encontrado nos extratos deste micro-organismo, estaria sendo produzida por ele dentro dos tecidos da planta.



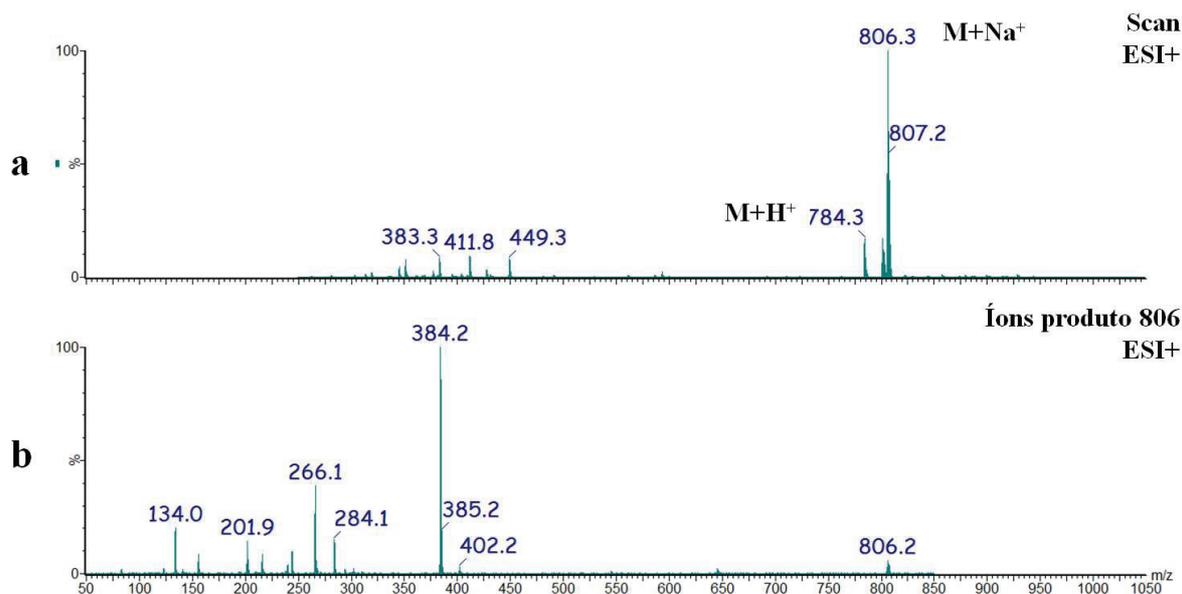
**Figura 105:** Estruturas reprodutivas a) do fungo FE, b) ampliação do item a e c) de diferentes espécies do gênero *Fusarium*.<sup>48</sup>

#### 4.2.8. Análise de beauvericina nos extratos da planta

Para verificar a presença ou a ausência de beauvericina nos tecidos da planta, foram utilizados experimentos de *Selected Reaction Monitoring* (SRM). Neste experimento cada um dos analisadores (quadrupolos) é ajustado para que permita a passagem de apenas uma dada relação massa/carga. Ou seja, o primeiro analisador permite a passagem de íons que possuam  $m/z$  igual a do composto que está sendo analisado. E o segundo analisador permite a passagem de íons apenas com  $m/z$  igual a um dos fragmentos deste composto. Os compostos que possuem uma mesma  $m/z$  à da molécula de interesse passarão pelo primeiro quadrupolo e também serão fragmentados na cela de colisão mas se não possuem um fragmento igual ao molécula de interesse, este fragmento não passará pelo segundo analisador não atingindo o detector o que não produz sinal cromatograma de SRM.

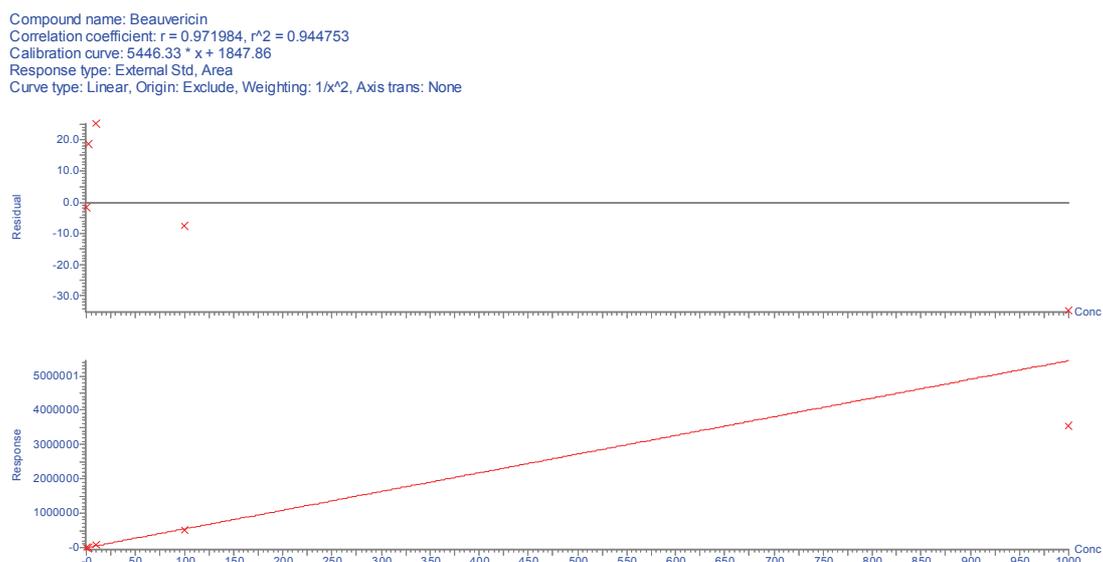
Assim a partir do espectro de *Full Scan* e do espectro de íons produto da beauvericina (**Figura 106 a e b**) foram selecionadas três transições para análises do extrato e das frações da planta por SRM. Como nas condições de análise utilizadas o íon precursor mais abundante para a beauvericina foi o íon  $[M+Na]^+$ , as transições foram selecionadas a partir dos fragmentos deste íon e não do íon  $[M+H]^+$ . As três transições selecionadas foram:  $806,2 \rightarrow 384,0$ ;  $806,2 \rightarrow 265,8$  e  $806,2 \rightarrow 645,1$ . E neste experimento foi utilizada um energia de colisão igual a 45.

Foram selecionadas três transições para aumentar ainda mais a seletividade do experimento de SRM, ou seja, diminuindo a possibilidade de haver outros íons com mesma relação massa carga da beauvericina e mesmo fragmento sendo detectado e resultando em um falso positivo. A curva de calibração foi feita com os dados obtidos para o primeiro canal ( $806,2 \rightarrow 384,0$ ), os outros dois foram utilizados para confirmação.



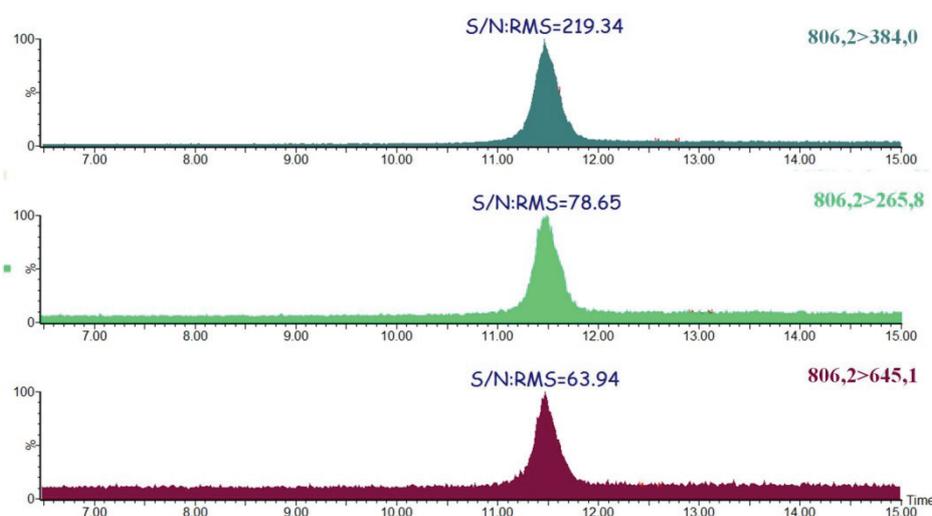
**Figura 106:** Espectros a) Scan ESI no modo positivo da beauvericina; b) Íons produto de 806 [M+Na]<sup>+</sup>

A curva de calibração foi feita com 5 pontos ( 0,2; 1; 10; 100 e 1000ng/ml) e o coeficiente de correlação obtido foi de 0,97 como pode ser observado na (**Figura 107**) onde estão representados o gráfico de resíduos e a curva de calibração. A partir desta curva fez-se a estimativa da quantidade de beauvericina no extrato e nas frações da planta.



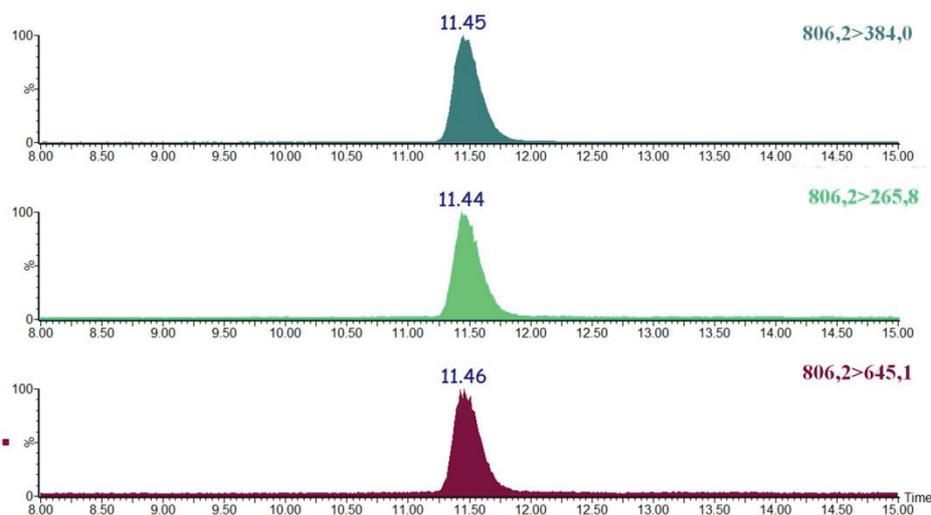
**Figura 107:** Gráfico de resíduos e curva de calibração para beauvericina.

O limite de detecção para este método foi de 0,15 ng/ml, ou seja concentração na qual a relação sinal ruído, da transição menos intensa é igual a 10. A **Figura 108** mostra a relação sinal ruído das 3 transições para o ponto 1ng/ml. Assim a relação sinal/ruído da transição 806,2→645,1 foi de 64, ou seja o limite de detecção deve estar em um concentração aproximadamente 6,4 vezes menor que 1ng/mL.



**Figura 108:** Cromatograma de SRM para as três transições monitoradas

Foi detectada a presença de beauvericina no extrato de etanol/acetato da planta na concentração de aproximadamente 10ppm. A **Figura 109** mostra os cromatogramas de SRM, das transições analisadas para o extrato da planta, onde é possível verificar a presença das três transições da beauvericina no extrato de planta. Sugerindo que o micro-organismo FE isolado como endofítico de *Alternanthera brasiliiana* pode estar produzindo este composto, que é conhecido por suas atividades antibióticas e inseticida dentro dos tecidos da planta.



**Figura 109:** Cromatogramas de SRM da análise do extrato de *Alternanthera brasiliana*.

Além das análises de desreplicação focadas em compostos bioativos presentes na planta *Alternanthera brasiliana*, e produzidos por fungos endofíticos isolados da mesma, iniciou-se o estudo de outros compostos presentes nesta planta e nos fungos endofíticos associados a ela, como será discutido a seguir.

### **4.3. Identificação de outros compostos presentes nos extratos da planta e do fungo F11**

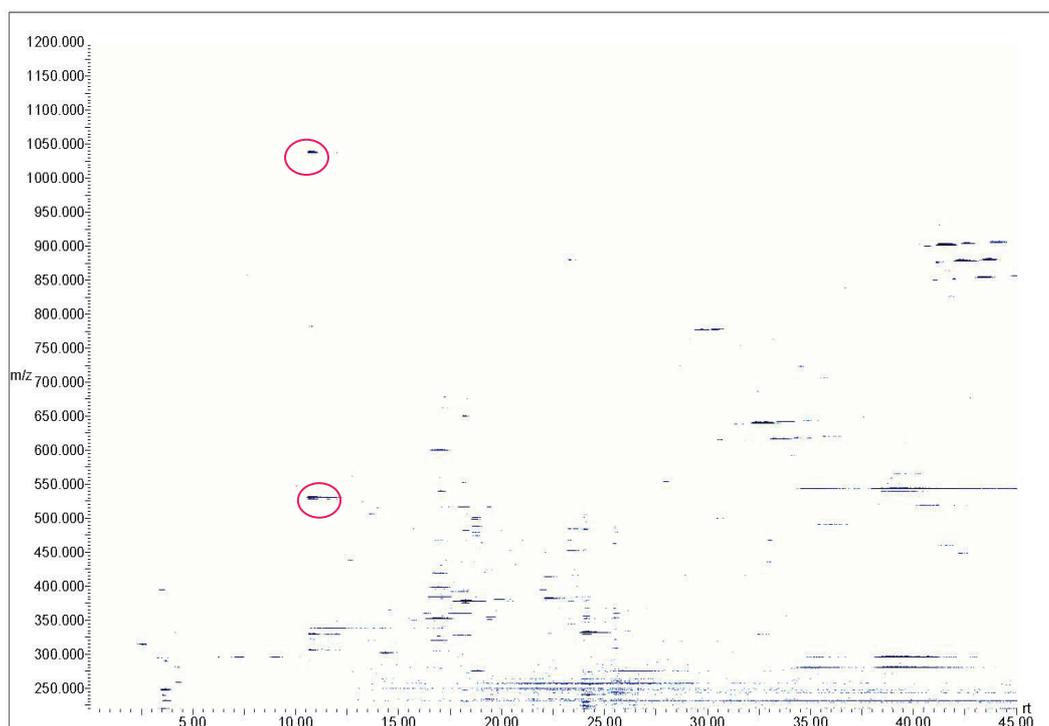
Como mostrado anteriormente, a planta *Alternanthera brasiliana* é pouco estudada quase não havendo relatos sobre a identificação metabólitos secundários presentes em nesta planta, bem como nenhum relato de fungos endofíticos associados a ela foi encontrado durante o levantamento bibliográfico realizado em diversas bases de dados. Assim, além dos estudos de identificação de compostos bioativos presentes na planta e nos fungos endofíticos, outras análises preliminares foram realizadas com os extratos da planta e dos demais fungos cultivados, a fim de se obter informações sobre os compostos presentes nestas fontes. A seguir são mostrados os resultados obtidos, que apesar de

preliminares podem servir como base para a continuação dos estudos químico, biológico e da micro-biota associada a esta planta.

### ✓ Análise do extrato do fungo F11

Na análise do extrato de meio sólido do fungo F11 dois sinais se destacam no mapa mostrado na **Figura 110**, estes sinais são referentes aos íons  $m/z$  530 e  $m/z$  1038.

Como mostrado na **Figura 111** a morfologia deste fungo F11, é bem característica do gênero *Xylaria*, principalmente pela presença dos ascocarpos, com a base preta a o topo branco. Outros fungos deste gênero já foram estudados no nosso grupo e algumas cepas mostraram-se boas produtoras de compostos da classe das citocalasinas.<sup>49</sup>



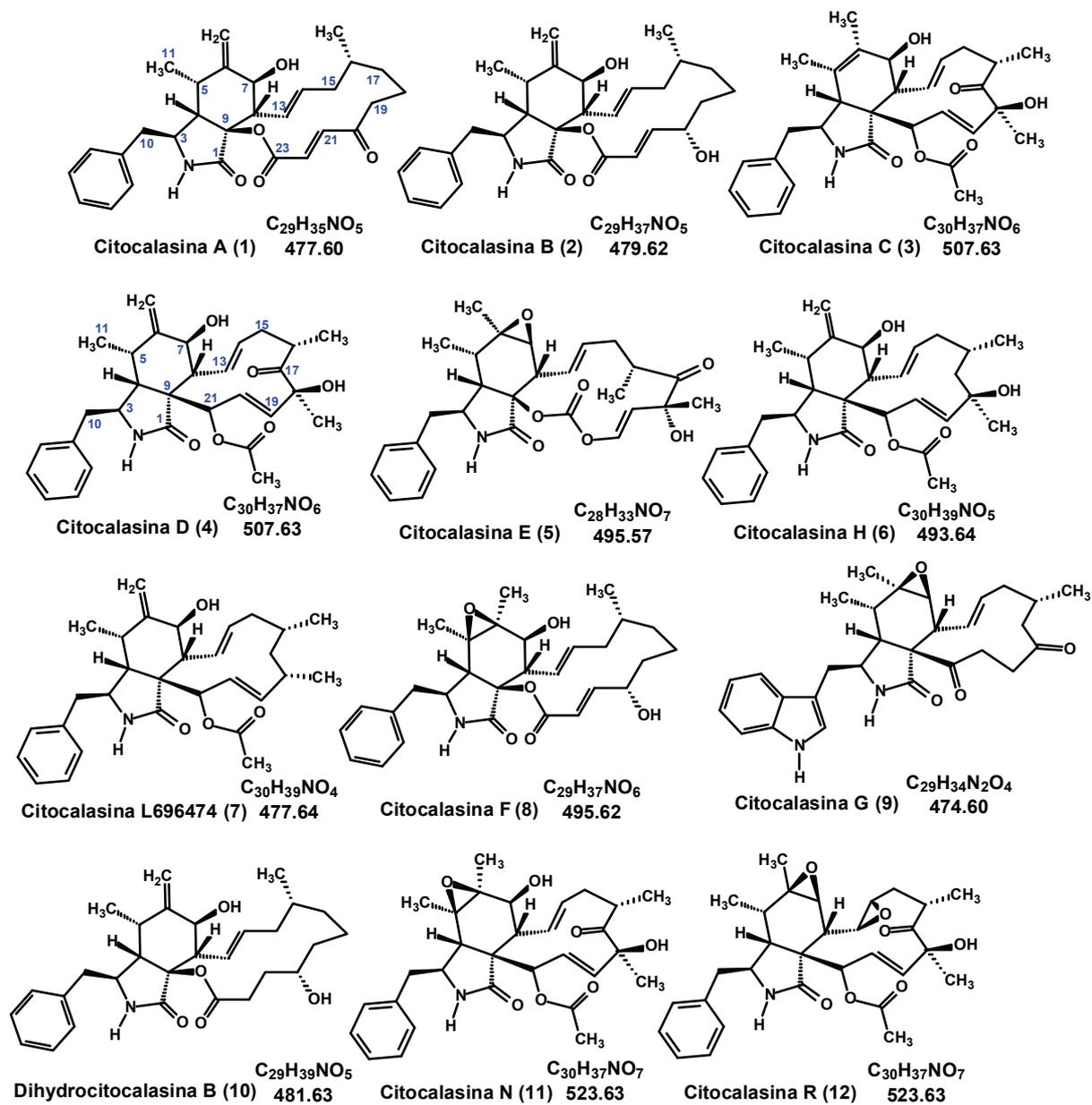
**Figura 110:** Mapa da análise de LC-MS do extrato do fungo F11



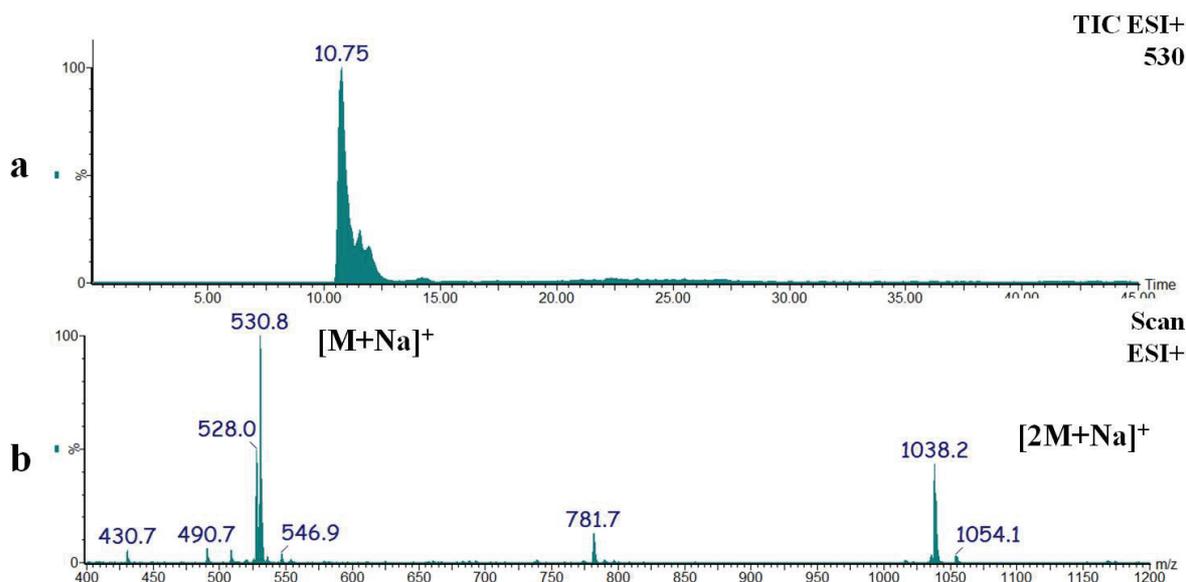
**Figura 111:** Foto do fungo F11

Essas informações aliadas aos íons em destaque no mapa, sugerem que estes compostos produzidos pelo fungo **F11**, pertençam à classe, das citocalasinas, cuja alguns deles são mostrados na **Figura 112**.

Assim, analisando-se o cromatograma de íons selecionados para o íons  $m/z$  530 (**Figura 113a**) e o espectro de massas (**Figura 113b**) referente à banda presente neste cromatograma, observa-se além do íon  $m/z$  530 a presença do íon  $m/z$  1038. Possivelmente esses íons sejam referentes ao aduto de sódio da molécula de massa 507 Da e de um cluster de duas moléculas com átomo sódio  $[2M+Na]^+$ , respectivamente. Assim este composto pode ser um dos isômeros das citocalasinas C ou D, mostradas na **Figura 112**.

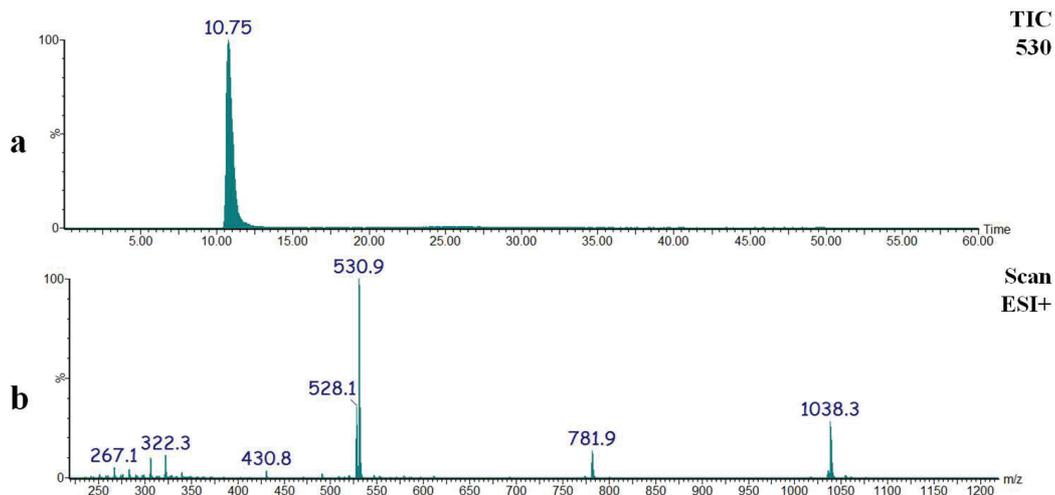


**Figura 112:** Estruturas químicas de alguns compostos da classe das citocalasinas.



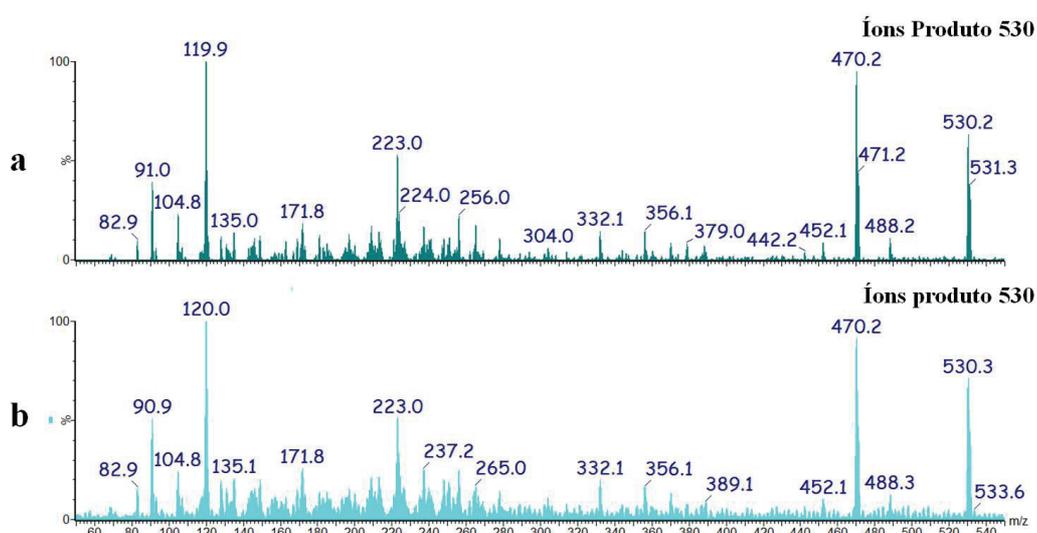
**Figura 113:** Análise do extrato do fungo F11: a) Cromatograma de íons selecionados  $m/z$  530; b) Espectro de massas da banda em 10.75 minutos.

Para avaliar esta proposta, realizou-se análise de uma amostra de citocalasina D utilizando-se as mesmas condições cromatográficas e de ionização que as empregadas nas análises dos extratos fúngicos. O cromatograma de íons totais (TIC) referente a esta análise são mostrados na **Figura 114<sup>a</sup>**. Já a **Figura 114<sup>b</sup>** representa o espectro de massas referente à banda em 10,7 minutos. A grande semelhança entre o tempo de retenção e o espectro de massas das duas amostras (do extrato do fungo F11 e da amostra de citocalasina) reforça a proposta que o composto referente a banda em 10,7 minutos, presente no cromatograma do extrato do fungo F11, pode ser um dos isômeros das citocalasinas de massa 507,8 Da. Além disso, o íon em  $m/z$  1038 poderia ser o aduto de sódio do cluster de duas moléculas desta citocalasina ( $507,8 + 507,8 + 23 = 1038,6$ ), como discutido anteriormente.



**Figura 114:** Análise de uma amostra de citocalasina: a) Cromatograma de íons totais e b) Espectro de massas referente a banda em 10,7 minutos.

Os espectros de íons produto de  $m/z$  530 ( $[M+Na]^+$ ), para o padrão e para o composto presente o extrato do fungo **F11** são mostrados na **Figura 115 a e b** respectivamente. Apesar dos espectros se apresentarem bem ruidosos, próprio da fragmentação da maioria dos adutos de sódio, o perfil dos fragmentos é bastante semelhante entre eles, sugerindo que o composto presente no extrato do fungo **F11** seja a citocalasina D. O que poderá ser comprovado através de experimentos de ressonância magnética nuclear.



**Figura 115:** Espectro de íons produto de  $m/z$  530 a) para o padrão de citocalasina D; b). para o extrato do fungo FE

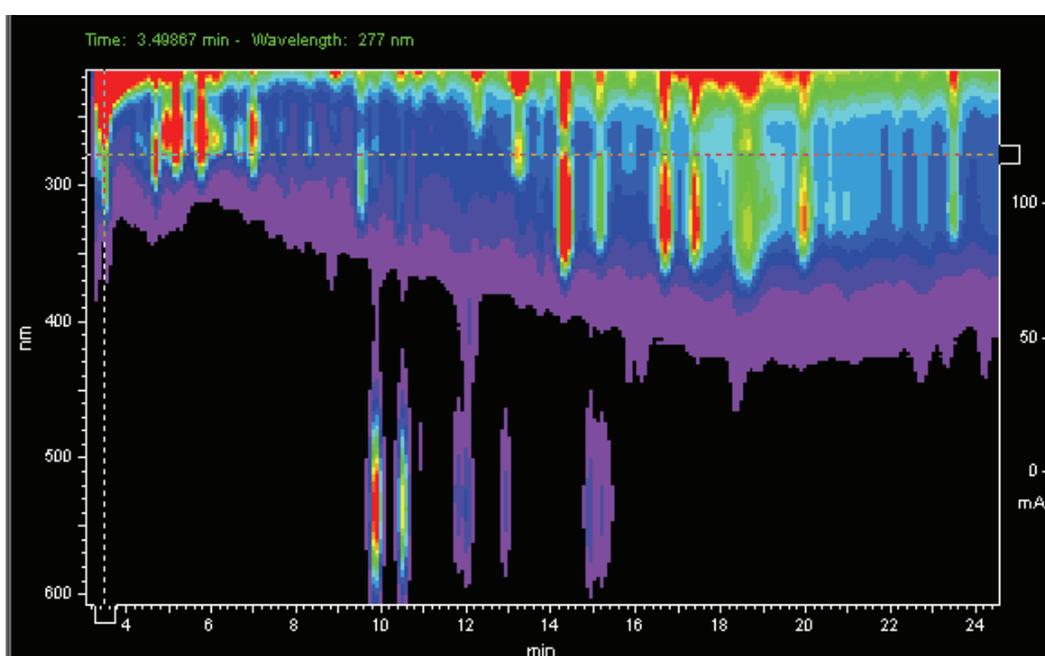
Outros fungos morfologicamente semelhantes ao gênero *Xylaria*, foram isolados como endofíticos de *Alternanthera brasiliana* (**Figura 116**), em estudos posteriores serão avaliadas a produção de compostos da classe das citocalasinas por estes organismos, bem como a busca destes compostos nos tecidos da planta.

Sendo esta, uma planta utilizada na medicina popular é de grande interesse conhecer quais compostos estão presentes em seus tecidos, não só aqueles biossintetizados por ela como também aqueles resultante das interações ecológicas das quais ela faz parte. Isso porque, esses metabólitos podem ter diversos papéis biológicos como no caso dos depsipeptídeos que apresentam atividade antibiótica, de algumas citocalasinas que apresentam atividade antifúngica ou mesmo de outros compostos que apresentem alguma toxicidade para o homem.



**Figura 116:** Cepas de micro-organismos isolados de *Alternanthera brasiliana*.

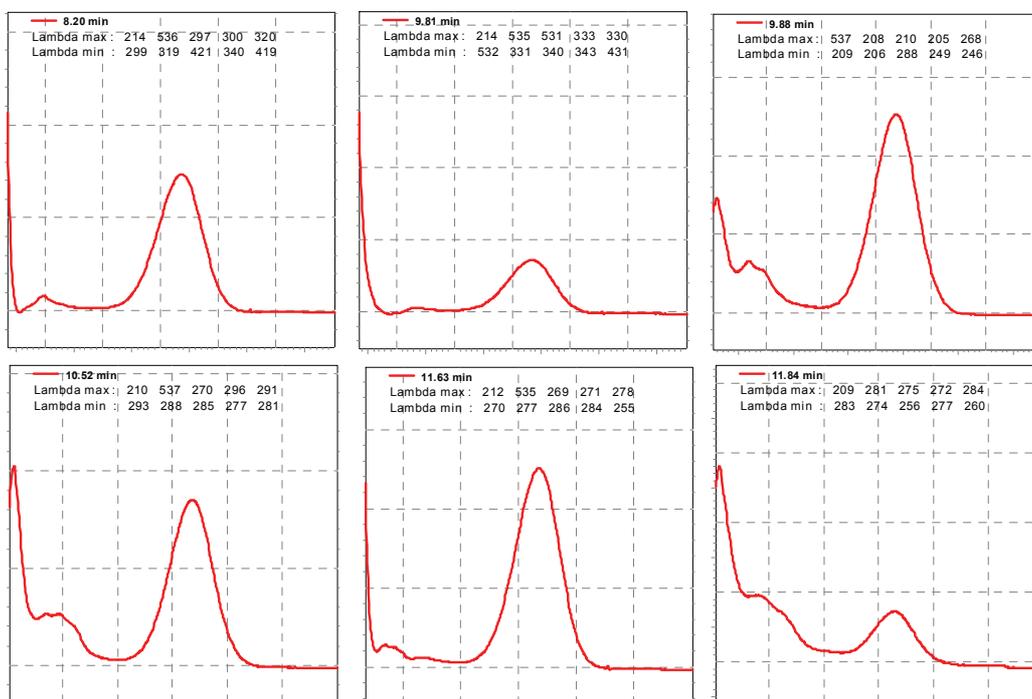
Nesse sentido, iniciou-se um estudo preliminar a fim de identificar algumas classes de compostos presentes na planta. Esse estudo foi realizado por LC-PDA, como e o mapa da análise do extrato das folhas é mostrado na **Figura 117**. No intervalo entre 9 e 16 minutos observa-se a presença de compostos que possuem absorção entre 500 e 600nm, que são bastante hidrofílicos, já que eluem entre 20 e 30% de modificador orgânico. Isso se for adicionado ácido à fase móvel, pois se as análises forem feitas na ausência de ácido estes compostos são eluídos no tempo morto do método.



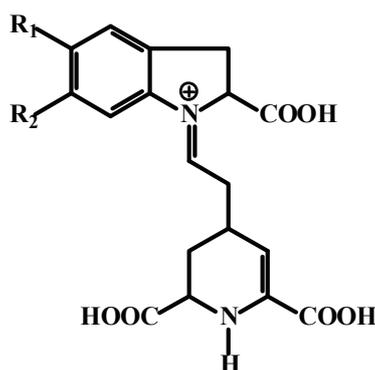
**Figura 117:** Mapa de LC-PDA da análise do extrato das folhas de *Alternanthera*

Assim, o comportamento cromatográfico destes compostos, aliados aos espectros de ultravioleta destas bandas (**Figura 118**), sugerem que eles sejam compostos semelhantes a betalainas (**Figura 119**), que geralmente apresentam uma banda na em torno de 280 nm e outra entre 500-550 nm, e são bastante hidrofílicos.<sup>10, 50, 51</sup> Além disso, em presença de ácido o equilíbrio de ionização dos grupos carboxílicos fica deslocado no sentido que estes se mantenham não ionizados, o que diminui a hidrofílicidade destes compostos

aumentando sua retenção no modo reverso de eluição, o que é bastante coerente com os dados obtidos nestas análises.



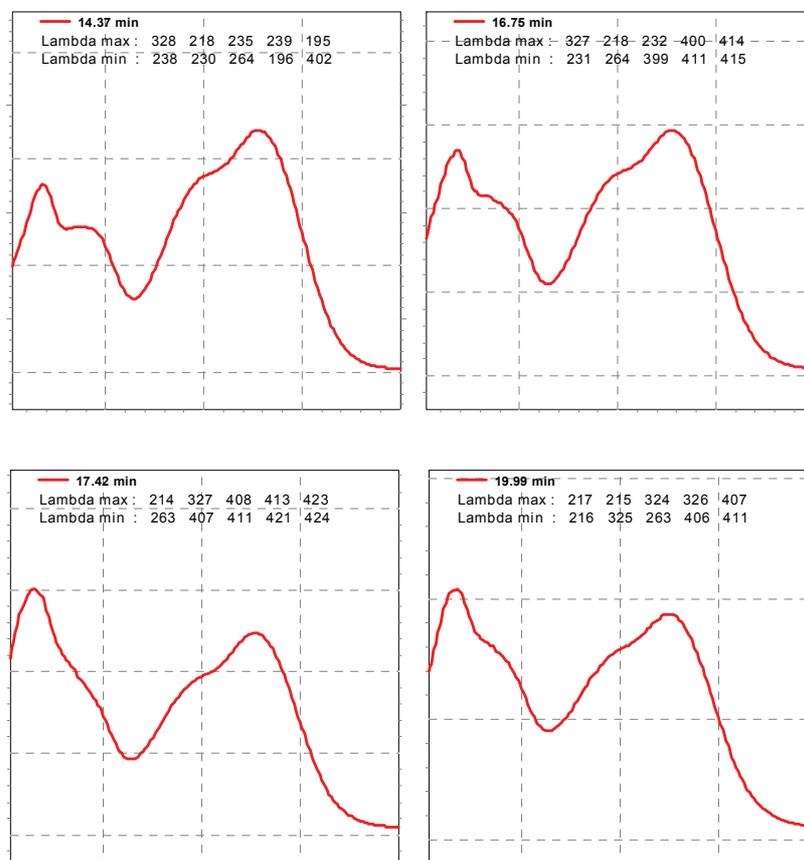
**Figura 118:** Espectros de ultravioleta referente às bandas em: a) 9,9; b) 10,53; b) 11,8; c) 12,1; d) 13,0 e f) 14,9 minutos



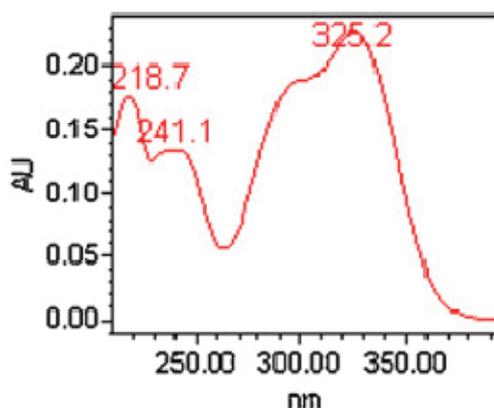
**Figura 119:** Estrutura química genérica para betalainas

Os compostos que eluem entre 16 e 20 minutos possuem o perfil de absorção no ultravioleta bastante semelhante ao do ácido cafeico, ou ferúlico. Os

espectros de ultravioleta para estas bandas são mostrados na **Figura 120**, e podem ser comparados com o espectro do ácido cafeico extraído de WANG (2008) apresentado na **Figura 121**.<sup>52</sup>

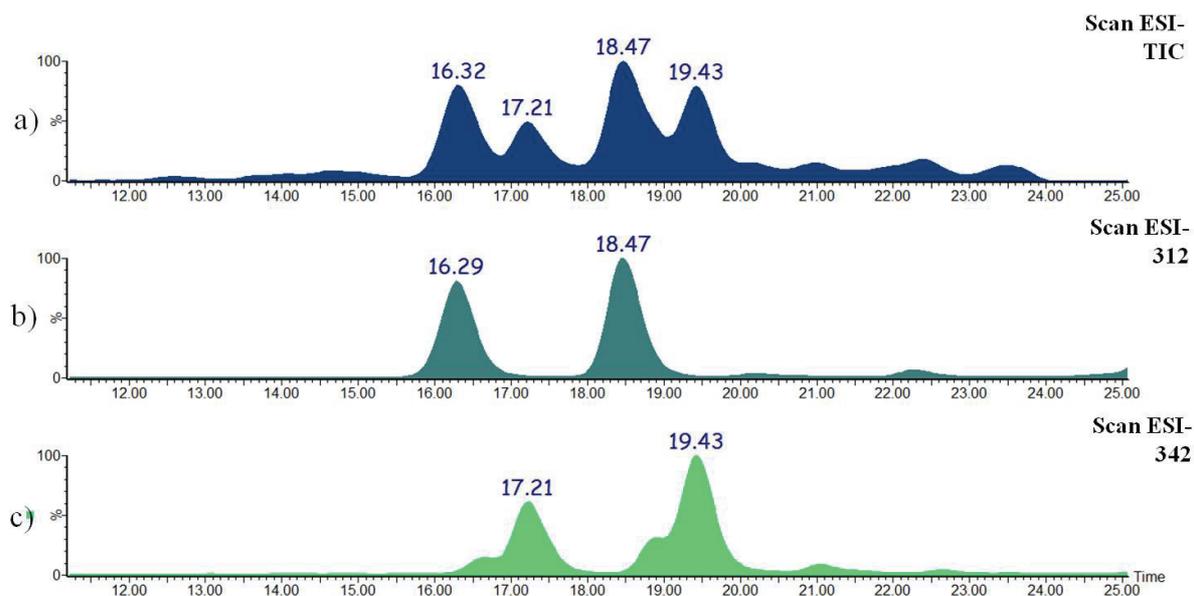


**Figura 120:** Espectro de ultravioleta das bandas em a) ; b) e c)



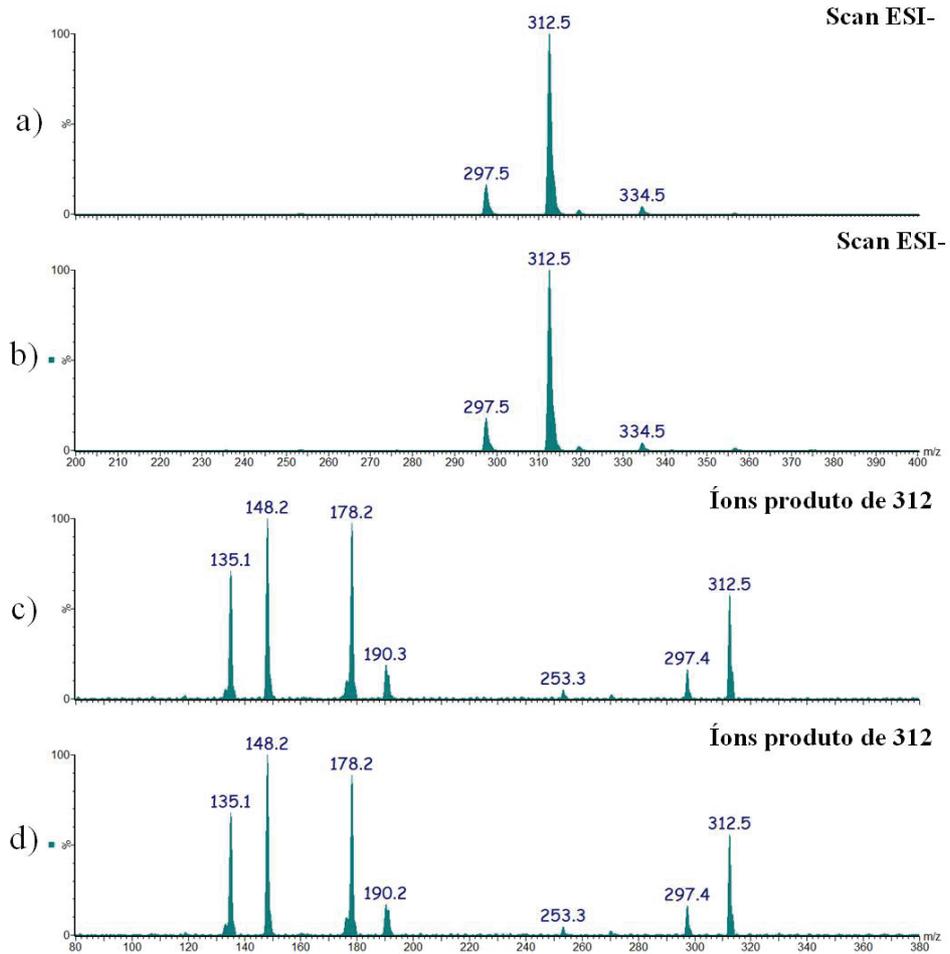
**Figura 121:** Espectro de ultravioleta do ácido cafeico, extraído de WANG (2008).

Esses compostos foram analisados também por espectrometria de massas, e a **Figura 122a** mostra o cromatograma de íons totais referente às bandas entre 16 e 20 minutos. As bandas em 16,3 e 18,5 minutos estão relacionadas aos compostos com  $m/z$  312, enquanto que as bandas em 17,2 e 19,4 minutos referem-se a compostos com  $m/z$  342, como pode ser observado nos cromatogramas de íons selecionados das **Figura 122 b e c**.

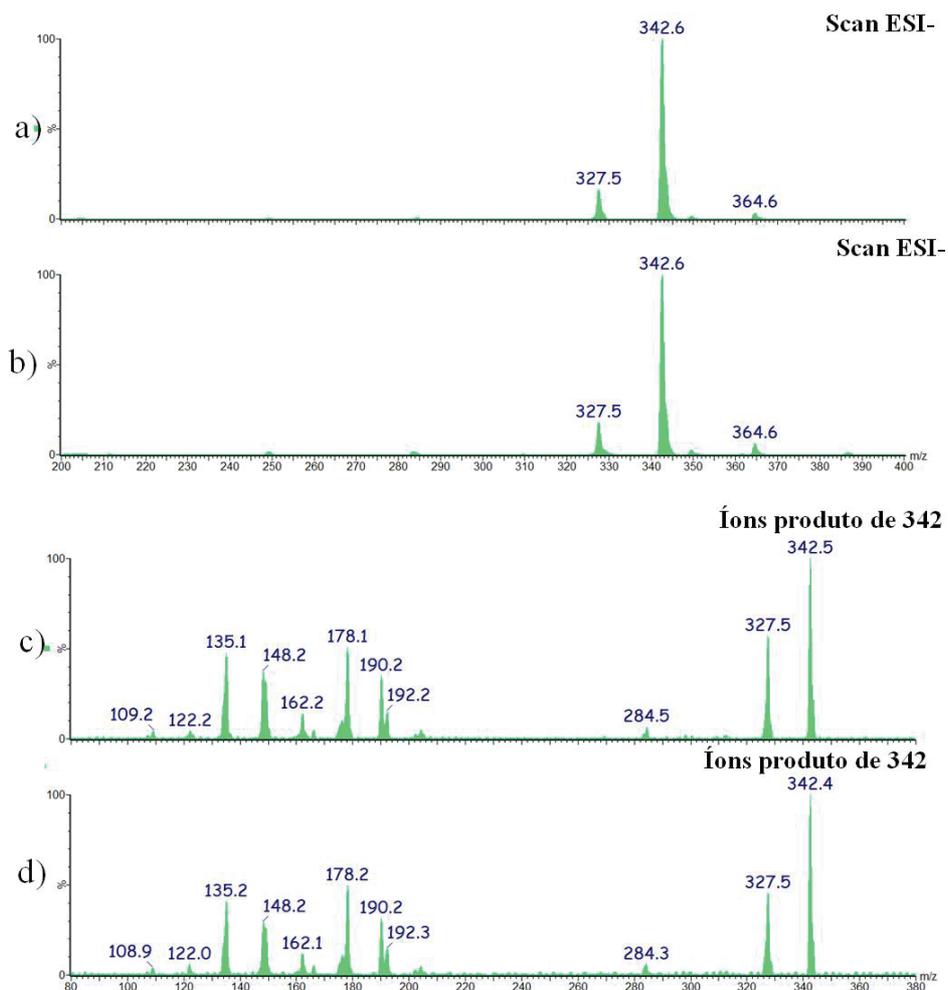


**Figura 122:** Cromatogramas de a) Íons totais, b) Íons selecionados para  $m/z$  312 e c) Íons selecionados para  $m/z$  342.

Os espectros de massas dessas bandas estão representados na **Figuras 122 e 123**, juntamente com os espectros de íons produto de cada um deles. Os espectros de íons produto dos isômeros são idênticos, sugerindo que a isomeria seja apenas espacial, o que geralmente interfere pouco no perfil de fragmentação dos compostos. Além disso, grande parte dos fragmentos presentes nos espectros de íons produto para  $m/z$  312 e  $m/z$  342 são os mesmos, sugerindo que haja uma porção semelhante na estrutura desses compostos.



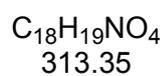
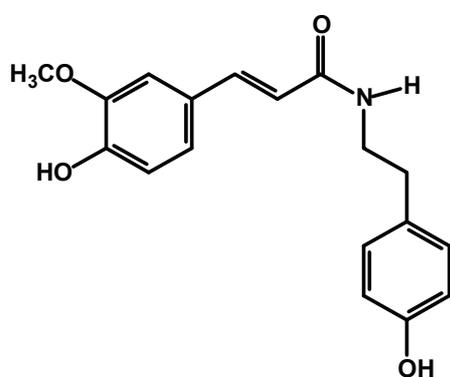
**Figura 123:** Espectro de massas referente às bandas cromatográfica a) 16,3; b) 18,5. Espectro de íon produto de 312 para as bandas c) 16,3 ; e d)16,5



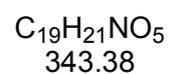
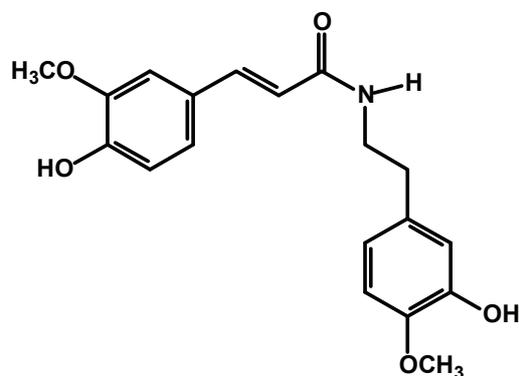
**Figura 124:** Espectro de massas referente às bandas cromatográfica a) 17,2; b) 19,4 minutos. Espectro de íon produto de 342 para as bandas c) 17,2; e d) 19,4 minutos

Como já mencionado anteriormente, os dados de ultravioleta, sugerem que estas substâncias possuem uma parte semelhante aos ácidos cafeico ou ácido ferúlico. Isso aliado aos dados obtidos por espectrometria de massas levaram a propor as estruturas apresentadas na **Figura 125.**, para estas moléculas. Ou seja derivados do ácido ferúlico que possuem 1 átomo de nitrogênio em suas estrutura, o que justifica as massas ímpares encontradas para estes compostos (313 e 343 Da). Além disso os dados de fragmentação são bastante semelhantes aos dados da literatura para estes compostos, onde os principais fragmentos correspondem a porção do ácido fumárico, com os íon  $m/z$  148, 135 e 178.<sup>53-55</sup> Experimentos de NMR devem ser realizados para confirmar

as estruturas destes compostos e as diferenças existentes entre os dois isômeros da cada relação massa carga.



*N-trans*-Feruloiltiramina



*N-trans*-Feruloil-homovanililamina

**Figura 125:** Estrutura química dos compostos presentes no extrato da planta *Alternanthera brasiliana*.

## ***Considerações Finais***

---

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias de desreplicação adotadas neste trabalho se mostraram muito eficientes na identificação dos compostos antibióticos presentes no caule da planta *Alternanthera brasiliana*, bem como nos extratos dos fungos endofíticos associados a ela.

O uso de técnicas analíticas como LC-PDA-MS/MS, LC-HRMS e LC-SPE-NMR foi crucial para o sucesso destes estudos de desreplicação, e estas técnicas contribuíram de diversas formas para as análises químicas dos compostos presentes nestes extratos. Além disso, o uso de mapas para representar os dados obtidos nas análises por LC-PDA-MS possibilitou uma visão ampla da constituição química das amostras analisadas, o que permitiu inferir quais os compostos presentes predominantemente nas amostras biologicamente ativas, poderiam estar de alguma maneira relacionados com atividade antibiótica.

Após a determinação dos compostos alvo, o estudo de elucidação estrutural foi desenvolvido de forma focada, rápida e eficiente. Para isso foram utilizados experimentos de íons produto, bem como análises por NMR, ou LC-SPE-NMR. A técnica de LC-SPE-NMR proporcionou um significativo aumento na eficiência da elucidação estrutural dos compostos orgânicos presentes nos extratos da planta, pois alia as importantes contribuições para elucidação fornecidas pela técnica de ressonância magnética nuclear com a versatilidade proporcionada pela HPLC nas análises de amostras complexas.

Dessa forma os dados obtidos permitiram associar um conjunto de oxilipinas à atividade antibiótica da planta *Alternanthera brasiliana*. Dentre os quais destacam-se: 9-E,E-KODE, 9-E,Z-KODE, 13-E,E-KODE, 13-Z,E-KODE, entre outros, que serão caracterizados completamente em breve. Estes compostos, que geralmente estão associados a patogêneses, estresse e elicitação

de plantas, poderiam ter alguma correlação com o grande número de bactérias endofíticas isoladas do caule desta planta e poderiam estar sendo produzidos como uma resposta a presença destes micro-organismos.

Na análise dos extratos de um dos micro-organismos endofíticos isolados de *A. brasiliiana*, o uso de LC-HRMS possibilitou a identificação de diversos depsipeptídeos. Dentre os quais, destaca-se a beauvericina, produzida em grande quantidade por este micro-organismo endofítico e que possui marcante atividade antibiótica já relatada. Além disso, este composto também foi detectado nos extratos da planta através de experimentos de SRM. Esse fato sugere que o micro-organismo endofítico deve estar produzindo depsipeptídeos no interior dos tecidos da planta.

Assim, os dados aqui obtidos indicam que os fungos endofíticos podem ter algum papel relevante na atribuição da atividade antibiótica desta planta. Além disso, estes compostos podem ter algum papel na interação da planta com outros micro-organismos presentes em seu *habitat*, já que possuem efeitos antibióticos e inseticidas.

Com isso, as estratégias de desreplicação se mostraram bastante eficientes não só na identificação de compostos bioativos presentes na planta, ou nos extratos fúngicos, mas também forneceram um conjunto de informações que podem auxiliar na compreensão do papel químico e biológico existente entre a planta a planta *Alternanthera brasiliiana* e seus micro-organismos endofíticos. Esses resultados abrem um leque para novos estudos envolvendo as interações ecológicas entre esta planta e os micro-organismos associados a ela.

## Referências Bibliográficas

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siqueira, J. C. d., AMARANTHACEAE: PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ASPECTOS COMPARATIVOS DOS GÊNEROS AFRICANOS E SULAMERICANOS. *Pesquisa Botânica* **2004**, *55*, 177-185.
2. Siqueira, J. C. d., Fitogeografia das Amaranthaceae Brasileiras. *Pesquisa Botânica* **1994/1995**, *45*, 5-21.
3. Salvador, M. J.; Pereira, P. S.; Franca, S. C.; Candido, R. C.; Ito, I. Y.; Dias, D. A., Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adult plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). *Brazilian Journal of Microbiology* **2004**, *35*, (1-2), 131-136.
4. Calderon, C. P.; Aseff, S. B. G.; Fuentes, L. B., Evaluation of diuretic activity of *Alternanthera pungens* extract in rats. *Phytotherapy Research* **1997**, *11*, (8), 606-608.
5. Salvador, M. J.; Ferreira, E. O.; Mertens-Talcott, S. U.; deCastro, W. V.; Butterweck, V.; Derendorf, H.; Dias, D. A., Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Antioxidant Flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z. Naturforsch C* **2006**, *61*, 19-25.
6. Zavala, M. A.; Perez, S.; Perez, C.; Vargas, R.; Perez, R. M., Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. *Journal of Ethnopharmacology* **1998**, *61*, (1), 41-47.
7. Hou, W.; Yang, Z.; Mao, L.; Li, J.; Xiao, H.; Cheng, L.; Zhou, J., *Chinese pharmaceutical journal* **2006**, *41*, (22), 1713.
8. Guerra, R. N. M.; Pereira, H. A. W.; Silveira, L. M. S.; Olea, R. S. G., Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2003**, *36*, (9), 1215-1219.
9. Zhang, H.-L.; Zhang, Q.-W.; Zhang, X.-Q.; Ye, W.-C.; Wang, Y.-T., Chemical constituents from the roots of *Morinda officinalis*. *Zhongguo Tianran Yaowu* **8**, (3), 192-195.
10. Blunden, G.; Yang, M. H.; Janicsak, G.; Mathe, I.; Carabot-Cuervo, A., Betaine distribution in the Amaranthaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **1999**, *27*, (1), 87-92.

11. Patterson, G. W.; Xu, S.; Salt, T. A., STEROLS OF CARYOPHYLLALES WITH EMPHASIS ON AMARANTHACEAE. *Phytochemistry* **1991**, 30, (2), 523-526.
12. Zhou, B. N.; Blasko, G.; Cordell, G. A., ALTERNANTHIN, A C-GLYCOSYLATED FLAVONOID FROM ALTERNANTHERA-PHILOXEROIDES. *Phytochemistry* **1988**, 27, (11), 3633-3636.
13. Sahu, B. R.; Chakrabarty, A., A Flavone Glycoside, Robinitin-7-O-?-D-Glucopyranoside from *Alternanthera sessilis* *Asian Journal of Chemistry* **1993**, 5, (4), 1148-1150.
14. Penders, A.; Kapundu, M.; Delaude, C., STRUCTURE OF PRINCIPAL SAPONIN OF ALTERNANTHERA-SESSILIS. *Bulletin Des Societes Chimiques Belges* **1992**, 101, (3), 227-232.
15. Sanoko, R.; Speranza, G.; Pizza, C.; De Tommasi, N., Triterpene saponins from *Alternanthera repens*. *Phytochemistry* **1999**, 51, (8), 1043-1047.
16. Fan, W.-Q.; Xiong, M.-X.; Ma, Z.; Li, Q.-Y.; Liu, Y.-W., Chemical constituents of *Alternanthera philoxeroides*. *Zhongguo Tianran Yaowu* **2008**, 6, (2), 112-115.
17. Reitz, P. R., *Amarantáceas: Flora Ilustrada Catarinense*. Atheneu: São Paulo, 1972.
18. Vendruscolo, G. S.; Mentz, L. A., Estudo da concordância das citações de uso e importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* **2006**, 20, (2), 367-382.
19. Agra, M. F.; deFreitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M., Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, 17, (1), 114-140.
20. Macedo, A. F.; Barbosa, N. C.; Esquibel, M. A.; Souza, M. M.; Cechinel, V., Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. *Pharmazie* **1999**, 54, (10), 776-777.
21. Delaporte, R. H.; Sánchez, G. M.; Cuéllar, A. A.; deMello, J. C. P., Control de Calidad y Actividad Antiinflamatoria de las Drogas Vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold." *Acta Farm. Bonaerense* **2001**, 20, (1), 39-46.
22. Brochado, C. O.; Almeida, A. P.; Barreto, B. P.; Costa, L. P.; Ribeiro, L. S.; Pereira, R. L. C.; Koatz, V. L. G.; Costa, S. S., Flavonol Robinobiosides and

- Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation In Vitro. *Journal Brazilian Chemical Society* **2003**, 14, (3), 449-451.
23. Caetano, N.; Saraiva, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pimentel, M. C. B.; Maia, M. B. S., Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2002**, 12, (supl), 132-135.
24. Lagrota, M. H. C.; Wigg, M. D.; Santos, M. M. G.; Miranda, M.; Camara, F. P.; Couceiro, J.; Costa, S. S., INHIBITORY ACTIVITY OF EXTRACTS OF ALTERNANTHERA-BRASILIANA (AMARANTHACEAE) AGAINST THE HERPES-SIMPLEX VIRUS. *Phytotherapy Research* **1994**, 8, (6), 358-361.
25. Jones, J. D. G.; Dangl, J. L., The plant immune system. *Nature* **2006**, 444, (7117), 323-329.
26. Petrini, O.; Siebert, T. N.; Toti, L.; Viret, O., Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* **1992**, 1, 185\_196.
27. Tan, W. Z.; Li, Q. J.; Qing, L., Biological control of alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp. *Biocontrol* **2002**, 47, (4), 463-479.
28. Pomella, A. W. V.; Barreto, R. W.; Charudattan, R., *Nimbya alternantherae* a potential biocontrol agent for alligatorweed, *Alternanthera philoxeroides*. *Biocontrol* **2007**, 52, (2), 271-288.
29. Cordell, G. A.; Shin, Y. G., Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. *Pure and Applied Chemistry* **1999**, 71, (6), 1089-1094.
30. Dieckmann, R.; Graeber, I.; Kaesler, I.; Szewzyk, U.; von Dohren, H., Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, 67, (4), 539-548.
31. Sarker, S. D. L., Z.; Gray, A. I., *Natural Products Isolation*. 2nd ed.; Totowa- Nova Jersey, 2005.
32. Bradshaw, J.; Butina, D.; Dunn, A. J.; Green, R. H.; Hajek, M.; Jones, M. M.; Lindon, J. C.; Sidebottom, P. J., A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. *Journal of Natural Products* **2001**, 64, (12), 1541-1544.

33. Murgu, M.; Rodrigues, E., Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2006**, 17, (7), 1281-1290.
34. Silva Elipe, M. V., Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 497, (1-2), 1-25.
35. NCCLS, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard—Sixth Edition. . In *M7-A6*, NCCLS, Ed. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
36. Iacazio, G., Easy access to various natural keto polyunsaturated fatty acids and their corresponding racemic alcohols. *Chemistry and Physics of Lipids* **2003**, 125, (2), 115-121.
37. Dufour, C.; Loonis, M., Regio- and stereoselective oxidation of linoleic acid bound to serum albumin: identification by ESI-mass spectrometry and NMR of the oxidation products. *Chemistry and Physics of Lipids* **2005**, 138, (1-2), 60-68.
38. Oliw, E. H.; Garscha, U.; Nilsson, T.; Cristea, M., Payne rearrangement during analysis of epoxyalcohols of linoleic and [ $\alpha$ ]-linolenic acids by normal phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2006**, 354, (1), 111-126.
39. Weber, H., Fatty acid-derived signals in plants. *Trends in Plant Science* **2002**, 7, (5), 217-224.
40. Chechetkin, I. R.; Medvedeva, N. V.; Grechkin, A. N., The novel pathway for ketodiene oxylipin biosynthesis in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tubers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2004**, 1686, (1-2), 7-14.
41. Vollenweider, S.; Weber, H.; Stolz, S.; Chételat, A.; Farmer, E. E., Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* **2000**, 24, (4), 467-476.
42. Blée, E., Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **2002**, 7, (7), 315-322.
43. Logrieco, A.; Moretti, A.; Castella, G.; Kostecki, M.; Golinski, P.; Ritieni, A.; Chelkowski, J., Beauvericin Production by *Fusarium* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, (8), 3084-3088.

44. Hamill, R. L.; Higgens, C. E.; Boaz, H. E.; Gorman, M., The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to. *Tetrahedron Letters* **1969**, 10, (49), 4255-4258.
45. Gupta, S.; Krasnoff, S. B.; Underwood, N. L.; Renwick, J. A. A.; Roberts, D. W., Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia* **1991**, 115, (3), 185-189.
46. Song, H.-H.; Ahn, J.-H.; Lim, Y. H.; Lee, C., Analysis of beauvericin and unusual enniatins co-produced by *Fusarium oxysporum* FB1501 (KFCC 11363P). *J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 16, (7), 1111-1119.
47. Sewram, V.; Nieuwoudt, T. W.; Marasas, W. F. O.; Shephard, G. S.; Ritieni, A., Determination of the *Fusarium* mycotoxins, fusaproliferin and beauvericin by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1999**, 858, (2), 175-185.
48. Leslie, J. F. a. S., B.A., *the Fusarium Laboratory Manual*. BlackWell Publishing: Oxford, UK, 2006.
49. Amaral, L. S. Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica* Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
50. Castellar, R.; Obán, J. M.; Alacid, M.; Fernández-López, J. A., Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, (9), 2772-2776.
51. Stintzing, F. C.; Trichterborn, J.; Carle, R., Characterisation of anthocyanin-betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry* **2006**, 94, (2), 296-309.
52. Wang, Z.; Wang, J.; Sun, Y.; Li, S.; Wang, H., Purification of caffeic acid, chlorogenic acid and luteolin from *Caulis Lonicerae* by high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology* **2008**, 63, (3), 721-724.
53. Biesaga, M.; Pyrzynska, K., Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216, (38), 6620-6626.
54. Pedersen, H. A.; Steffensen, S. K.; Christophersen, C.; Mortensen, A. G.; Jørgensen, L. N.; Niveyro, S.; de Troiani, R. M.; Rodríguez-Enríquez, R. J.; Barba-de la Rosa, A. P.; Fomsgaard, I. S., Synthesis and Quantitation of Six

Phenolic Amides in *Amaranthus* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, (10), 6306-6311.

55. Rodríguez-Medina, I. C.; Beltrán-Debón, R.; Molina, V. M.; Alonso-Villaverde, C.; Joven, J.; Menéndez, J. A.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A., Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. *Journal of Separation Science* **2009**, 32, (20), 3441-3448.