

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

**“ESTUDO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS NOS  
FUNGOS ENDOFÍTICOS *Penicillium brasilianum* E  
*Penicillium griseoroseum*”**

**José Vinícius da Silva\***

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

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

**\* BOLSISTA CNPq**

**São Carlos - SP  
2011**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar

S586ea Silva, José Vinícius da.  
Estudo de alterações metabólicas nos fungos endofíticos  
*Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum* / José  
Vinícius da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
142 p.

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

1. Produtos naturais. 2. *Penicillium brasilianum*. 3.  
*Penicillium griseoroseum*. 4. Halogenação. 5. Alterações  
metabólicas. I. Título.

CDD: 547.3 (20ª)

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

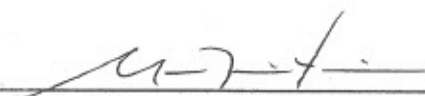
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato José Vinícius da Silva, realizada em 26 de agosto de 2011:*



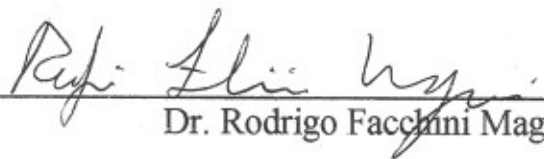
---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



---

Dr. Rodrigo Facchini Magnani

*“I am among those who think science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.”*  
*Marie Curie*



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pelos ensinamentos, convivência, amizade e pela confiança neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira pela valiosa colaboração na síntese da hidroxí-indanona.

To Dr. Dhooge Liene for the support on LC-SPE-NMR analysis.

Aos meus pais, José Roberto e Sônia, por sempre me ensinarem a ser uma pessoa íntegra, pelo amor e suporte em todos os momentos.

A minha irmã, Liliane, pela amizade e companheirismo desde pequenos.

A toda minha família, que mesmo distante estava sempre presente.

A minha primeira “família” em São Carlos, Ricardo e Bruno, por me ajudarem a não desistir.

A todos os amigos que fiz em São Carlos durante 6 anos.

A família LaBioMMi (Enzo, Carol Santos, Naty, Helô 1, Helô 2 (Hyper), Monize, Carol Lúcia, Verônica, Léo, Thaísa, Gabriel, Diego, Marília, Lívia, Luciana, Taícia, Diana e Gezimar) pela ajuda, discussões científicas, amizade e por fazer cada dia mais divertido.

Ao Diogo, Leo, Fabio, Gustavo e Thiaguinho, pelos anos morando juntos.

A Taciane, Amanda, Cíntia, Marina (Garça), Malu, Bianca e Héctor pelos bons papos, conselhos, risadas e amizade.

A Livia, Luciana, Taicia e Thaísa pelas valiosas discussões deste trabalho e espectrometria de massas.

Aos amigos da Química<sup>05</sup> pelos ótimos anos de convivência na graduação.

Ao Dr. Rodrigo Facchini Magnani e Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pela participação na banca examinadora.

Aos professores e amigos do Laboratório de Produtos Naturais – DQ-UFSCar.

Aos demais professores do DQ-UFSCar pelos ensinamentos durante a graduação e pós graduação, em especial à Profa. Dra. Rose Maria Carlos pelas conversas e amizade.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar, especialmente Luciana Vizotto, pelos serviços prestados durante a execução deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos órgãos de fomento (FAPESP, CAPES e FINEP) pelo suporte financeiro.

## LISTA DE ABREVIACÕES

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata-dextrose-ágar
d	Dubleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
EI	<i>Electronic Impact</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
GC/MS	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
Hex	Hexano
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
HPLC-SPE-NMR	<i>Liquid Chromatography coupled to Solid Phase Extraction and Nuclear Magnetic Resonance</i>
Hz	<i>Hertz</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamento

LaBioMMi	Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos
L	<i>Litros</i>
m	multiplete
<i>m/z</i>	<i>Relação massa/carga</i>
MeOH	Metanol
MHz	<i>Megahertz</i>
mL	Mililitros
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ODS	Octadecilsilano (C-18)
<i>OSMAC</i>	<i>One Strain Many Compounds</i>
PDA	<i>Photodiode Array</i>
<i>s</i>	Singleto
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
<i>t</i>	Triplete
TIC	<i>Total Ions Chromatogram</i>

TLC

*Thin Layer  
Chromatography*

t.r.

tempo de retenção

UV

Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diterpeno paclitaxel, isolado e <i>Taxus brevifolia</i> .....	3
Figura 2: Estrutura geral das penicilinas.....	4
Figura 3: Estrutura das chaetoglobosinas 540, e chaetoglobosina 542, respectivamente.....	8
Figura 4: Sesquiterpenos produzidos por <i>Coriolus consors</i> .....	9
Figura 5: Estrutura de metabólitos halogenados: vancomicina (A), rebecamicina (B), e salinosporamida A (C).....	10
Figura 6: Estrutura tridimensional da CPO interagindo com 1,2-ciclopentanodiona.....	14
Figura 7: Hipótese de uma reação de halogenação via formação de um intermediário reativo, quando este metabólito está ligado a algum complexo enzimático.....	15
Figura 8: Metabólitos isolados de <i>Fusarium tricinctum</i> cultivado em meio artificial suplementado com $\text{CaBr}_2$ .....	16
Figura 9: Metabólitos secundários de <i>Penicillium brasilianum</i> , neoaustina (meroterpeno) e brasiliamida A, respectivamente.....	17
Figura 10: Gráfico do crescimento micelial de <i>Penicillium brasilianum</i> com a adição de $\text{NH}_4\text{Cl}$ . (A) controle, (B) 19 mg/L, (C) 190 mg/L, (D) 19 g/L, (E) 190 g/L.....	45
Figura 11: Gráfico do crescimento micelial de <i>Penicillium brasilianum</i> com a adição de $\text{NH}_4\text{Br}$ . (A) controle, (B) 65 mg/L, (C) 650 mg/L, (D) 6,5 g/L, (E) 65 g/L. ....	45
Figura 12: Cromatograma dos padrões sulfanilamida, flavona e dodecanofenona. Monitoramento do cromatograma em 254 nm.....	47
Figura 13: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de $\text{NH}_4\text{Cl}$ ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D).....	48
Figura 14: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de $\text{NH}_4\text{Cl}$ ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D).....	48
Figura 15: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de $\text{NH}_4\text{Br}$ ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E).....	50

Figura 16: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de NH <sub>4</sub> Br ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E).....	51
Figura 17: Comparação do perfil morfológico do controle com a variação dos sais quando foram adicionados ao meio: (A) Controle, (B) CaCl <sub>2</sub> , (C) CoCl <sub>2</sub> , (D) CuCl <sub>2</sub> , (E) FeCl <sub>3</sub> , (F) KCl, (G) MgCl <sub>2</sub> , (H) NaCl, (I) NiCl <sub>3</sub> , respectivamente.....	52
Figura 18: Gráfico do crescimento micelial de <i>Penicillium brasilianum</i> com a adição de alguns sais. (A) controle, (B) CaCl <sub>2</sub> , (C) FeCl <sub>3</sub> , (D) KCl, (E) NaCl e (F) MgCl <sub>2</sub> .....	53
Figura 19: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de sais variando o cátion ao meio de cultura: Ca (B), Fe (C), K(D), Mg (E) e Na (F).....	54
Figura 20: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de sais variando o cátion ao meio de cultura: Ca (B), Fe (C), K(D), Mg (E) e Na (F).....	55
Figura 21: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de sal marinho RED SEA <sup>®</sup> ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 165 g/L (B), 33 g/L (C) e 3,3 g/L (D).....	57
Figura 22: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de sal marinho RED SEA <sup>®</sup> ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 165 g/L (B), 33 g/L (C) e 3,3 g/L (D).....	58
Figura 23: Cromatograma do extrato com adição de CaCl <sub>2</sub> .....	59
Figura 24: Espectro de 1H para a substância <b>1</b> . (600 MHz, MeOD).....	60
Figura 25: Espectro e correlações de HMBC da substância <b>1</b> .....	61
Figura 26: Correlações de HMBC para os hidrogênios aromáticos da substância <b>1</b> .....	62
Figura 27: Espectro de HSQC da substância <b>1</b> .....	63
Figura 28: Correlações de HMBC para o grupo ligado ao anel aromático na substância <b>1</b> .....	63
Figura 29: Cromatograma da substância <b>1</b> .....	64
Figura 30: Espectros de ultravioleta para as substâncias com t.r. 15,30 (A) e 17,52 (B) minutos.....	65

Figura 31: Espectro de massas no modo full scan para a substância <b>1</b> .....	65
Figura 32: Esqueleto parcial para a substância <b>1</b> .....	66
Figura 33: Estrutura proposta para a substância <b>1</b> .....	67
Figura 34: Espectro de íons fragmentos para a substância com $m/z$ 428 (A) e $m/z$ 430 (B).....	68
Figura 35: Cromatograma da amostra relacionada ao experimento de variação dos cátions no meio de cultura contendo $\text{FeCl}_3$ . Monitoramento em 254 nm.....	69
Figura 36: Espectro de $^1\text{H}$ NMR da banda recolhida pelo sistema LC-SPE (substância <b>2</b> ).....	70
Figura 37: Espectro de HSQC para a substância <b>2</b> .....	71
Figura 38: Correlações de HMBC para parte da estrutura da substância <b>2</b> .....	71
Figura 39: Espectro de HMBC da substância <b>2</b> .....	72
Figura 40: Espectro de massas no modo full scan para a substância <b>2</b> .....	72
Figura 41: Estrutura parcial para a substância <b>2</b> .....	73
Figura 42: Metabólito secundário da classe dos alcalóides quinolínicos....	73
Figura 43: Estrutura proposta para o metil-4-oxo-dihidroquinolina-3-carboxilato ( <b>2</b> ).....	74
Figura 44: Estrutura da penicínolina, isolada de uma espécie endofítica de <i>Penicillium</i> .....	74
Figura 45: Espectro de $^1\text{H}$ NMR da substância <b>3</b> (400 MHz em $\text{CDCl}_3$ )....	77
Figura 46: Espectro de HSQC para a substância <b>3</b> .....	78
Figura 47: Espectro de íons produtos para a substância <b>3</b> .....	78
Figura 48: Espectro de HMBC da substância <b>3</b> .....	79
Figura 49: Correlações de HMBC para a substância <b>3</b> .....	79
Figura 50: Estrutura proposta para a substância <b>3</b> .....	79
Figura 51: Espectro de $^1\text{H}$ NMR para a substância <b>4</b> (400 MHz em MeOD).....	81
Figura 52: Espectro de HSQC da substância <b>4</b> .....	82
Figura 53: Espectro de COSY da substância <b>4</b> .....	83



Figura 54: Espectro de HMBC da substância <b>4</b> . .....	83
Figura 55: Correlações de COSY e HMBC para a substância <b>4</b> .....	84
Figura 56: Espectro de massas <i>full scan</i> no modo positivo e espectro de ultravioleta para a substância <b>4</b> .....	84
Figura 57: Estrutura proposta para a substância <b>4</b> .....	85
Figura 58: Espectro de íons produtos para as substâncias <b>4</b> e <b>5</b> , respectivamente.....	87
Figura 59: A-D: Espectro de íons produtos para os ácidos tetrônicos encontrados. E: Cromatogramas de íons selecionados ( <i>m/z</i> 123 e 141) para os compostos encontrados no extrato de acetato de etila de <i>Penicillium griseoroseum</i> .....	89
Figura 60: Estruturas propostas para os compostos <b>6</b> e <b>7</b> detectados nos extratos de <i>Penicillium griseoroseum</i> .....	90
Figura 61: Gráfico do crescimento micelial de <i>Penicillium griseoroseum</i> com a adição de NH <sub>4</sub> Cl. (A) controle, (B) 19 mg/L, (C) 190 mg/L, (D) 19 g/L, (E) 190 g/L.....	92
Figura 62: Gráfico do crescimento micelial de <i>Penicillium griseoroseum</i> com a adição de NH <sub>4</sub> Br. (A) controle, (B) 65 mg/L, (C) 650 mg/L, (D) 6,5 g/L, (E) 65 g/L.....	92
Figura 63: Cromatogramas comparativos do micélio do controle (A), com a adição de NH <sub>4</sub> Cl ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D).....	93
Figura 64: Cromatogramas comparativos do meio líquido do controle (A), com adição de NH <sub>4</sub> Cl ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D).....	94
Figura 65: Cromatogramas comparativos do micélio do controle (A), com a adição de NH <sub>4</sub> Br ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E).....	95
Figura 66: Cromatogramas comparativos do meio líquido do controle (A), com a adição de NH <sub>4</sub> Br ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E).....	96
Figura 67: Cromatograma da fração PG65ML_A.....	97
Figura 68: Ampliação do cromatograma da fração PG65ML_A analisada por GC/MS.....	98

Figura 69: Espectro de massa para a substância em 28,6 minutos.....	98
Figura 70: Estrutura proposta para substância ( <b>8</b> ) em 28,6 minutos.....	99
Figura 71: Espectro de massa da substância com tempo de retenção de 25 minutos.....	101
Figura 72: Estrutura proposta para a substância <b>9</b> .....	101
Figura 73: Espectro de massa para a substância com tempo de retenção de 30 minutos.....	102
Figura 74: Estrutura proposta para a substância <b>10</b> com tempo de retenção de 30 minutos.....	102
Figura 75: Estrutura das brasiliamidas A, B e F, respectivamente isoladas de <i>Penicillium brasilianum</i> .....	105
Figura 76: (A) Cromatograma de ultravioleta e (B) Cromatograma de íons totais (TIC) da fração PGML65_E dos extratos de <i>Penicillium griseoroseum</i> .....	106
Figura 77: Espectro de massa no modo <i>full scan</i> e de ultravioleta para a banda em 27,78 minutos.....	107
Figura 78: Espectro de massa no modo <i>full scan</i> e de ultravioleta para a banda em 31,33 minutos. ....	107
Figura 79: Cromatograma da fração PG65ML_E.....	108
Figura 80: Espectro de <sup>1</sup> H NMR da substância <b>11</b> . (MeOD, 600 MHz)..	109
Figura 81: Espectro de HSQC da substância <b>11</b> .....	110
Figura 82: Espectro de HMBC da substância <b>11</b> .....	110
Figura 83: Estrutura parcial para a substância <b>11</b> .....	111
Figura 84: Estrutura proposta para a substância <b>12</b> (Roquefortina C).....	113
Figura 85: Espectro de <sup>1</sup> H da substância <b>12</b> . (600 MHz, MeOD).....	115
Figura 86: Espectro de HSQC da substância <b>12</b> .....	116
Figura 87: Espectro de HMBC da substância <b>12</b> .....	116
Figura 88: Correlações de HMBC para a substância bromada ( <b>12</b> ).....	117
Figura 89: Estrutura proposta para a substância <b>12</b> .....	117
Figura 90: Espectro de massas full scan da banda cromatográfica em 22 minutos.....	121

Figura 91: Espectro de massas simulado para o composto biotransformado.....	122
Figura 92: Espectro de <sup>1</sup> H NMR para a 3-hidroxi-1-indanona isolada de <i>Penicillium brasilianum</i> . (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	125
FIGURA 93: Cromatograma de íons totais da 3-hidroxi-1-indanona após etapas de purificação da síntese (A). Espectro de massas no modo full scan para a banda em 22 minutos (B).....	126
Figura 94: Cromatograma da 3-hidroxi-1-indanona sintetizada.....	127
Figura 95: Cromatograma da 3-hidroxi-1-indanona isolada de <i>P. brasilianum</i> .....	128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela com enzimas responsáveis pela halogenação de metabólitos secundários já reportadas na literatura.....	12
Tabela 2: Método cromatográfico utilizado nas análises do extrato obtido do meio líquido.....	30
Tabela 3: Método cromatográfico utilizado na análise do extrato do micélio.....	30
Tabela 4: Condições do espectrômetro de massas para ESI <sup>+</sup> .....	31
Tabela 5: Composição da fase móvel utilizada na separação dos extratos em larga escala.....	33
Tabela 6: Condições cromatográficas para análise dos extratos em larga escala.....	34
Tabela 7: Condições do espectrômetro de massas utilizando EI <sup>+</sup> .....	34
Tabela 8: Composição da fase móvel utilizada para pré-purificação do extrato obtido do meio líquido.....	36
Tabela 9: Condições cromatográficas para análise dos extratos em larga escala.....	40
Tabela 10: Condições do espectrômetro de massas utilizando EI <sup>+</sup> .....	40
Tabela 11: Comparação entre os dados de <sup>1</sup> H NMR da substância <b>2</b> com uma simulação.....	75

Tabela 12: Dados de  $^1\text{H}$  NMR da roquefortina C da literatura (1) e isolada de *P. griseoroseum* (2).....112

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Proposta catalítica para halogenação utilizando CPO dependente do grupo heme.....	13
Esquema 2: Esquemática da reação de halogenação realizada por <i>Penicillium brasilianum</i> .....	18
Esquema 3: Proposta biossintética para a formação do esqueleto de alcalóides quinolínicos.....	75
Esquema 4: Proposta de fragmentação para o diclavatol.....	80
Esquema 4: Proposta de fragmentação de ácidos tetrônicos para os íons em comum $m/z$ 141 e $m/z$ 123.....	87
Esquema 5: Rota biossintética para a formação de alguns ácidos tetrônicos isolados de fungos.....	88
Esquema 6: Proposta de fragmentação para a substância <b>8</b> de $m/z$ 230....	100
Esquema 7: Formação dos precursores ácido cinâmico e ácido sináptico	103
Esquema 8: Proposta biogenética para a formação da roquefortina C, glandicolinas A e B e oxalina.....	114
Esquema 9: Mecanismo proposto para a formação do 7-clorotriptofano.	119
Esquema 10: Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona.....	120
Esquema 11: Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona na presença de $\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	123
Esquema 12: Biotransformação da 1-indanona por <i>Penicillium brasilianum</i> .....	124
Esquema 13: Possível formação da 3-hidroxi-1-indanona a partir da 3-bromo-1-indanona.....	127

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Procedimento utilizado para o experimento de biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona e do 3',4',5'-ácido trimetoxibenzóico na presença de sais halogenados.....	38
Fluxograma 2: Procedimento de cultivo, extração e isolamento da 3'-hidroxi indanona a partir da 1-indanona.....	39

## RESUMO

### “ESTUDO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS NOS FUNGOS ENDOFÍTICOS *Penicillium brasilianum* E *Penicillium griseoroseum*”.

Os microorganismos, por serem de organização relativamente simples, têm um poder de grande adaptação a variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo com a carência ou com o fornecimento de nutrientes ao meio de cultivo. Isso permite uma ampla flexibilidade em sua utilização, podendo-se induzir microorganismos a produzir determinadas substâncias de interesse. Esta abordagem pode levar a uma variedade de novos metabólitos secundários interessantes a partir de uma única cepa de um microorganismo. Este estudo vem sendo denominado de abordagem OSMAC (*One Strain Many Compounds*), a qual foi utilizada no presente trabalho com dois fungos do gênero *Penicillium*. Foi verificado que ao modificar o meio de cultura com  $\text{FeCl}_3$  durante o crescimento de *P. brasilianum* houve a produção de um alcalóide isoquinolínico, enquanto com a adição de  $\text{CaCl}_2$  houve a produção de outro alcalóide pertencente à classe dos alcalóides tremogênicos. Com relação ao fungo *P. griseoroseum*, foi isolado um metabólito halogenado (roquefortina C contendo um átomo de bromo) quando ao meio de cultura foi adicionado  $\text{NH}_4\text{Br}$ . As substâncias isoladas foram analisadas por técnicas espectroscópicas. Também foram detectados por GC/MS mais três compostos fenólicos contendo átomos de bromo em sua estrutura. O metabolismo secundário de *P. griseoroseum* foi analisado e foram isolados policetídeos pertencentes à classe dos ácidos tetrônicos e um dímero do clavatul, inédito na literatura. Análises por LC/MS-MS detectaram outros ácidos tetrônicos presentes no extrato de acetato de etila.

## ABSTRACT

**“STUDIES RELATED TO METABOLISM MODIFICATION WITH ENDOPHYTIC FUNGI *Penicillium brasilianum* AND *Penicillium griseoroseum*.”** Microorganisms, known as being relatively simple, have shown a great adaptation power to different nutritional situations by changing their metabolism with lack or supply of nutrients in the culture medium. This feature allows a wide range of the use of microorganisms to produce metabolites with several interests. This study has been named *OSMAC (One Strain Many Compounds)* approach, which was applied in this study by using two fungi from *Penicillium* genus. Through culture medium modification with  $\text{FeCl}_3$  during growth of *P. brasilianum*, it was able to produce isoquinolinic alkaloid. On the other hand, the addition of  $\text{CaCl}_2$ , another alkaloid belonging to tremogenic class was isolated and analysed by spectroscopic methods. When *P. griseoroseum* was cultivated with  $\text{NH}_4\text{Br}$ , it was observed the production of a halogenated secondary metabolite, which was not reported before (brominated roquefortine C). Analyses by GC/MS led to detect three phenolic compounds with bromine atoms in its structure. The secondary metabolites of *P. griseoroseum* with no modification in the culture medium were studied and three metabolites were isolated. Two of them belong to the tetronic acid class and the other one was isolated as a dimer from clavatul. Analyses by LC/ MS-MS were able to identify other tetronic acids in the ethyl acetate extract from *P. griseoroseum*.

## SUMÁRIO

1.1	GRUPO LaBioMMi E MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	2
1.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FÚNGICOS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS. ....	4
1.3	ABORDAGEM OSMAC.....	6
1.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS HALOGENADOS.....	9
1.5	ABORDAGEM OSMAC NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS HALOGENADOS. ....	15
1.6	MOTIVAÇÃO PARA O ESTUDO COM OS FUNGOS ENDOFÍTICOS <i>Penicillium brasilinaum</i> E <i>Penicillium griseoroseum</i> . ...	17
2.1	OBJETIVOS .....	20
3.1	EQUIPAMENTOS .....	22
3.2	MATERIAS CROMATOGRÁFICOS .....	23
3.3	REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS .....	23
3.3.1	SOLVENTES .....	23
3.3.2	REAGENTES.....	24
3.3.3	MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO DOS MICROORGANISMOS .....	24
3.4	PARTE EXPERIMENTAL.....	24
3.4.1	CULTIVO DOS FUNGOS <i>Penicillium brasilianum</i> E <i>Penicillium griseoroseum</i> , ISOLADOS DE <i>Melia azedarach</i> E <i>Coffea arabica</i> , RESPECTIVAMENTE.....	24
3.4.2	EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM OS FUNGOS <i>P. brasilianum</i> E <i>P. griseoroseum</i> . ....	25
3.4.2.1	ADIÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO (NH <sub>4</sub> Cl) E BROMETO DE AMÔNIO (NH <sub>4</sub> Br) AO MEIO DE CULTURA. ....	25
3.4.2.2	ADIÇÃO DE SAIS CONTENDO O ÍON CLORETO.....	27
3.4.2.3	ADIÇÃO DE SAL MARINHO RED SEA <sup>®</sup> AO MEIO DE CULTURA. ....	27



3.4.2.4	ADIÇÃO DE $\alpha$ -HALOÁCIDOS AO MEIO DE CULTURA.	28
3.4.3	EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENAOS AO MEIO DE CULTURA COM O FUNGO <i>P. griseoroseum</i> .....	29
3.4.4	ANÁLISES POR HPLC/PDA E HPLC/PDA-MS DOS EXPERIMENTOS INICIAIS UTILIZANDO OS FUNGOS <i>P. brasilianum</i> E <i>P. griseoroseum</i> com diferentes aditivos halogenados....	29
3.4.5	ANÁLISE E ISOLAMENTO POR LC-SPE-NMR DO EXPERIMENTO RELACIONADO À ADIÇÃO DE FeCl <sub>3</sub> AO MEIO DE CULTURA. ....	31
3.4.6	CULTIVO EM LARGA ESCALA DOS EXPERIMENTOS COM MODIFICAÇÕES METABÓLICAS NOS FUNGOS <i>P. brasilianum</i> E <i>P. griseoroseum</i> . ....	32
3.4.7	TRATAMENTO INICIAL DOS EXTRATOS OBTIDOS EM LARGA ESCALA VISANDO O ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS. ....	32
3.4.8	ANÁLISE POR HPLC/PDA-MS DOS EXTRATOS EM LARGA ESCALA. ....	33
3.4.9	ANÁLISES POR GC/MS DOS EXTRATOS EM LARGA ESCALA.....	34
3.4.10	ANÁLISE POR HPLC/PDA-MS DOS EXTRATOS EM LARGA ESCALA. ....	34
3.4.11	ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS DE INTERESSE POR HPLC/UV EM ESCALA PREPARATIVA.....	35
3.4.12	EXPERIMENTOS PARA ANÁLISE E ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Penicillium griseoroseum</i> .....	35
3.4.13	BIOTRANSFORMAÇÃO DA 2',4',6'-TRIMETOXIACETOFENONA.....	36
3.4.14	BIOTRANSFORMAÇÃO DA 1-INDANONA POR <i>Penicillium brasilianum</i> . ....	38
3.4.15	OBTENÇÃO DA 3-HIDROXI-1-INDANONA VIA SÍNTESE ORGÂNICA. ....	39

3.4.16	ANÁLISE POR GC/MS DOS PRODUTOS DE REAÇÃO DA 1-INDANONA.....	39
3.4.17	ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA 3-HIDROXI-1-INDANONA.....	40
3.4.18	TESTE DE ANTIBIOSE PARA OS METABÓLITOS ISOLADOS DE <i>P. griseoroseum</i> .....	40
3.4.18.1	ATIVACÃO DAS BACTÉRIAS.....	41
3.4.18.2	PADRONIZAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS.....	41
3.4.18.3	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	41
3.4.18.4	TESTE ANTIBACTERIANO.....	42
4.1	<i>Penicillium brasilianum</i> .....	44
4.1.1	EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM O FUNGO <i>Penicillium brasilianum</i> .....	44
4.1.1.1	ADIÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO E BROMETO DE AMÔNIO AO MEIO DE CULTURA.....	44
4.1.2	VARIAÇÃO DE SAIS CONTENDO O ÂNION CLORETO.....	52
4.1.2.1	ESTUDO DA TOLERÂNCIA DO CRESCIMENTO MICELIAL.....	52
4.1.2.2	ANÁLISES POR HPLC/PDA.....	53
4.1.3	ADIÇÃO DE SAL MARINHO RED SEA®.....	56
4.1.3.1	ANÁLISE POR HPLC/PDA.....	56
4.1.4	ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS DE INTERESSE POR HPLC/UV EM ESCALA PREPARATIVA.....	58
4.1.4.1	ISOLAMENTO EM LARGA ESCALA DO EXPERIMENTO DE ADIÇÃO DE CaCl <sub>2</sub> AO MEIO DE CULTURA.....	59
4.1.4.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1.....	60
4.1.5	ANÁLISE, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR LC-SPE-NMR.....	69

4.1.5.1	ANÁLISE E ISOLAMENTO DO EXTRATO CONTENDO FeCl <sub>3</sub> AO MEIO DE CULTURA.....	69
4.1.5.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 2. 69	
4.2	<i>Penicillium griseoroseum</i> .....	76
4.2.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR <i>Penicillium griseoroseum</i> .....	76
4.3	EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM O FUNGO <i>Penicillium griseoroseum</i> .....	91
4.3.1	ADIÇÃO DE NH <sub>4</sub> Cl E NH <sub>4</sub> Br AO MEIO DE CULTURA.....	91
4.3.1.1	ESTUDO DA TOLERÂNCIA DO CRESCIMENTO FRENTE À ADIÇÃO DE NH <sub>4</sub> Cl E NH <sub>4</sub> Br. ....	91
4.3.1.2	ANÁLISE POR HPLC/PDA DAS MODIFICAÇÕES METABÓLICAS EM <i>P. griseoroseum</i> QUANDO SUBMETIDO ÀS VARIAÇÕES NOS MEIOS DE CULTURA. ....	93
4.3.1.3	ANÁLISE POR GC/MS DAS FRAÇÕES DE MENOR POLARIDADE DOS EXTRATOS OBTIDOS EM LARGA ESCALA DE <i>P. griseoroseum</i> .....	97
4.3.1.4	ANÁLISE POR HPLC/PDA/MS-MS DAS FRAÇÕES DE <i>P. griseoroseum</i> .....	105
4.4	ENSAIO BIOLÓGICO REALIZADO COM OS ÁCIDOS TETRÔNICOS E O DICLAVATOL.....	119
4.5	BIOTRANSFORMAÇÃO DE SUBSTRATOS POLIMETOXILADOS. ....	120
4.6	HIDROXILAÇÃO DA 1-INDANONA POR <i>P. brasilianum</i> .....	123
4.6.1	ISOLAMENTO DA 3-HIDROXI-1-INDANONA PRODUZIDA POR <i>Penicillium brasilianum</i> .....	124
4.6.2	SÍNTESE DA 3-HIDROXI-1-INDANONA A PARTIR DA 1-INDANONA.....	125
4.6.3	ANÁLISE POR HPLC/PDA DA 3-HIDROXI-1-INDANONA. 127	
5.1	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	131

6.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	134
-----	----------------------------------	-----

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 GRUPO LaBioMMi E MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS.**

Há 15 anos, o Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMi) tem focado na pesquisa da associação quimio-ecológica entre plantas e seus microorganismos endofíticos associados. Desta intrigante batalha química e bioquímica o grupo se interessa no estudo de fenômenos de interação entre ambas as espécies, como possíveis mecanismos de defesa ocasionados pela associação como visualizar as interações genéticas no nível micromolecular e também a produção de compostos secretados pelos endófitos e suas atividades biológicas correspondentes.

De Barry (1866) foi quem mencionou o termo endofítico pela primeira vez, com a finalidade de distingui-los dos patógenos de plantas. Estudos mais detalhados mostraram que determinados patógenos vivem de forma latente no interior dos tecidos de seus hospedeiros e, esta observação, levou PETRINI (1991) a expandir a definição de endofíticos para incluir todos aqueles organismos que, durante determinado período de suas vidas, colonizam seus hospedeiros (plantas) sem causar sintomas visíveis de doenças.

KULDAU e YATES (2000) admitem a hipótese de que a infecção assintomática de um endofítico depende não somente de adaptações de um hospedeiro em particular e, sim da capacidade de virulência do endofítico, da resposta de defesa do hospedeiro e das condições ambientais. Por exemplo, o inóculo de um endofítico (o qual não causa sintomas de patogenicidade) em hospedeiro sob estresse ambiental, causará sintomas de doença. O grau de virulência não está associado ao gênero ou a espécie, porém se o fungo for isolado como endofítico, isso não exclui a possibilidade deste se tornar patogênico.

No âmbito de interações genéticas entre as espécies obtendo respostas no nível micromolecular está relacionado à produção de metabólitos secundários, uma vez que alguns endofíticos adquiriram a habilidade de produzir as mesmas substâncias produzidas pela planta. Este fenômeno é denominado transferência genética horizontal, a qual consiste na troca de material genético entre células ou genomas não relacionados (BROWN, 2003).

Em 1995, foi relatado que o fungo *Taxomyces andreae*, isolado como endofítico em *Taxus brevifolia*, produz o paclitaxel (Taxol®) (Figura 1). Este fato causou grande impacto na comunidade científica devido às propriedades anticancerígenas diferenciadas desse diterpeno. O rendimento do taxol em *T. brevifolia* é muito pequeno, entre 0,0001% a 0,008% da planta seca, e devido a grande demanda dessa substância o fungo apresenta-se como um promissora fonte do diterpeno (YUAN *et al.*, 2006). Muitas outras espécies de fungos produtores de taxol foram isolados de *T. brevifolia* (STIERLE e STROBEL, 1995) e também de outras espécies da *Taxus* (STROBEL, 1996, 1996a), além de outras plantas como a *Seimatoantlerium tepuiense* (STROBEL, *et al.*, 1999).

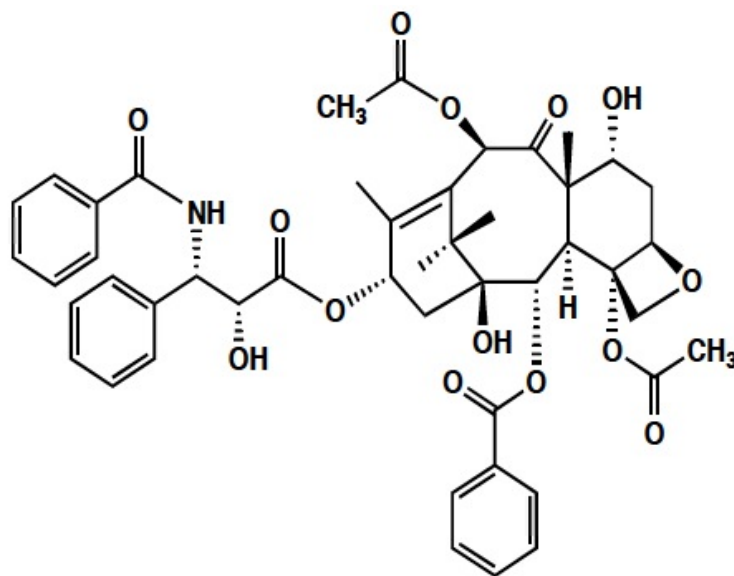


Figura 1: Diterpeno paclitaxel, isolado e *Taxus brevifolia*.

Outros exemplos mais recentes são a produção do inibidor da síntese de RNA, a camptotecina (PURI *et al.*, 2005), por um fungo do gênero *Phycomyces* associado à *Nothapodytes foetida*, do anticancerígeno podofilotoxina por *Phialocephala fortinii* e *P. hexandrum* (EYBERGER *et al.*, 2006) e também a produção de hipericina (KUSARI, *et al.*, 2008), com uma extensa variedade de atividades biológicas, por um fungo endofítico isolado de *Hypericum perforatum*.

## 1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FÚNGICOS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.

A utilização de microrganismos pelo ser humano por diversos fatores tem sido relatada há muito tempo. Mesmo sem o conhecimento científico, utilizava-se a fermentação para a produção de pães, queijos e cerveja (LIMA, 1975). O uso racional de microrganismos como fonte de produtos ativos se deu na Segunda Guerra Mundial com a descoberta da penicilina (Figura 2), isolada do fungo *Penicillium notatum* (TURNER, 1975). A partir de então, os microrganismos começaram a ser vistos como fonte de possíveis substâncias bioativas com extremo potencial antibiótico, agroquímico, imunossupressor, anticâncer, e antiparasitários (GUNATILAKA, 2006).

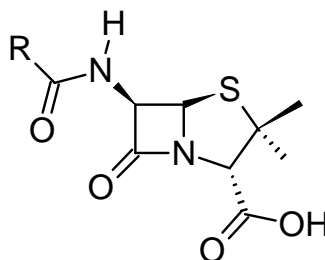


Figura 2: Estrutura geral das penicilinas.



A resistência de bactérias aos fármacos já comercializados, os problemas recorrentes de imunossupressão e o aumento de infecções fúngicas na população tem tornado a busca por estes metabólitos interessante, uma vez que atualmente os candidatos a fármacos devem ser mais ativos em menores concentrações, seus metabólitos não devem ser tóxicos ao organismo e possuírem um impacto menos nocivo ao meio ambiente. (STROBEL, 2004)

Diversos grupos de pesquisa ao redor do globo vem buscando novos antibióticos, agentes quimioterapêuticos e produtos agroquímicos que sejam altamente eficientes, de baixa toxicidade, e que causem reduzido impacto ambiental. Essas pesquisas são conduzidas pela resistência adquirida de microorganismos (*Estafilococcus*, *Micobacteria* e *Streptococcus*), além da introdução, na população humana, de doenças como a AIDS, problemas respiratórios severos e outras patologias devido à baixa imunidade, as quais requerem a descoberta e desenvolvimento de novas drogas para combatê-las (STROBEL e DAISE, 2003). Devido à falta de segurança e problemas ambientais, muitos agentes agroquímicos sintéticos foram removidos do mercado; isto criou a necessidade de se encontrar mecanismos alternativos de controle do crescimento de pestes e patógenos na agricultura (DEMAIN, 2000). Novos produtos naturais provenientes de microorganismos oferecem oportunidade de inovação na descoberta de medicamentos e agroquímicos.

Os produtos naturais são importantes fontes de novos produtos farmacêuticos (PROUDFOOT, 2002) e considerando-se que 6 dos 20 medicamentos mais freqüentemente prescritos são de origem fúngica (ex: equinocandina, mevilonina, mutasteína, ciclosporina, cefalosporina), e que apenas 5% dos fungos foram descritos, estes organismos oferecem um

enorme potencial para obtenção de novos fármacos (GLOER, 1997, HAWKSWORTH, 1991, 2001).

### **1.3 ABORDAGEM OSMAC**

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

De acordo com LIMA, 1975 os microorganismos, por serem de organização relativamente simples, têm um poder grande de multiplicação e adaptação a variadas situações nutricionais, modificando seu metabolismo com a carência ou com o fornecimento de nutrientes ao meio de cultivo. Isso permite uma ampla flexibilidade em sua utilização, podendo-se dizer que é possível induzir microorganismos a produzir determinadas substâncias de interesse. De fato, alguns estudos mostram que as alterações das condições do meio de cultura podem alterar completamente o metabolismo de alguns microorganismos. Esta abordagem pode levar a uma variedade de novos metabólitos secundários interessantes a partir de uma única cepa de um microorganismo. Este

estudo vem sendo denominado OSMAC (*One Strain Many Compounds*). (BJORN, 2002)

A abordagem OSMAC representa uma ferramenta poderosa para elucidar o metaboloma dos diferentes microorganismos (detecção e identificação do maior número possível de metabólitos secundários produzidos por um organismo). Embora uma alteração sistemática nos parâmetros de cultivo possa ser aplicada para as várias cepas selecionadas, a abordagem OSMAC é aleatória, não permitindo gerar regras que seriam comuns a todos os micro-organismos, já que cada um terá uma resposta particular determinada pelo seu genoma. (GROSS, 2007) A continuidade da abordagem OSMAC seria a identificação dos genes que estão no comando da indução ou modificação do padrão metabólico. O objetivo dessa etapa seria avaliar quais são os compostos de um determinado meio de cultura induziram a biossíntese dos metabólitos desconhecidos identificados. (BJORN *et.al.*, 2002)

Todos os organismos vivos apresentam a possibilidade de interagir com o meio ambiente através de mecanismos até hoje não conhecidos, que resultam em diferentes expressões de certos genes e conseqüentemente em um diferente metaboloma. O principal objetivo desta abordagem seria identificar estes mecanismos, por exemplo, pelo uso de ferramentas importantes como a bioinformática e sofisticados métodos analíticos e bioquímicos. A abordagem OSMAC poderia, dessa maneira, permitir a revelação de uma diversidade química oculta e verificar a produção de metabólitos secundários determinada por genes silenciosos. Neste sentido, inúmeros estudos verificaram que a composição do meio de cultura tem grande impacto na produção de metabólitos de origem microbiana (BJORN, 2002). MASUNA *et. al.* 1983 sugerem que altas concentrações de glicose, fosfato e ions amônio atuam como repressores do metabolismo secundário, e inúmeros exemplos de meios de cultura com baixos níveis

destes componentes são descritos na literatura. Comparativamente com este efeito, altas concentrações de íons fosfato são citadas como potenciais indutores da produção de metabólitos de interesse. ZHELIFINOVA *et al*, 2008, promoveram o estudo da adição de nutrientes ao meio de cultura para a produção das piscarininas A e B por *Penicillium piscarium*. A produção destes metabólitos é aumentada quando se adiciona ao inóculo uma maior quantidade de conídios. Ao adicionar sais minerais ao meio, sua produção é diminuída duas vezes. A biossíntese do alcalóide é suprimida quando o manitol era substituído por glicose, ou quando metais eram adicionados ao meio de cultura.

Estudos recentes utilizando a abordagem OSMAC levaram a produção de chaetoglobosinas inéditas ao adicionarem ao meio de cultivo água do mar e inibidores da actina em fungo isolado de ambiente terrestre. CHRISTIAN (2005) relatou que o mesmo microorganismo foi isolado de um ambiente marinho e que a modificação no meio de crescimento poderia levar à produção de metabólitos secundários semelhantes aos dos encontrados no microorganismo marinho. O fungo *Phomopsis leptostromiformis* foi capaz de produzir as chaetoglobosinas já relatadas para o mesmo microorganismo e outras altamente oxigenadas, mostradas na Figura 3.

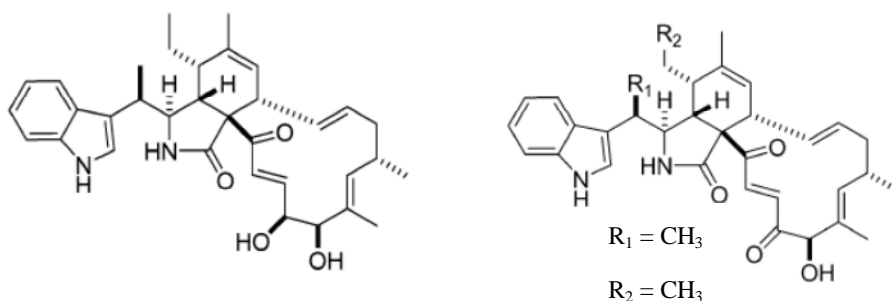


Figura 3: Estrutura das chaetoglobosinas 540, e chaetoglobosina 542, respectivamente.

*Coriolus consors* isolado de fonte terrestre passou a produzir uma série de sesquiterpenos (Figura 4) quando foi cultivado em meio artificial contendo água do mar, porém não há relatos deste mesmo microorganismo se desenvolvendo em ambiente marinho. (WANG, 2008)

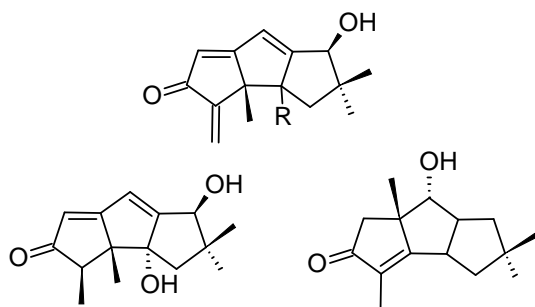


Figura 4: Sesquiterpenos produzidos por *Coriolus consors*.

Outra possibilidade na abordagem OSMAC, seria a modificação metabólica por meio de estímulos bióticos, ou seja, a presença de um ou mais microorganismos se desenvolvendo concomitantemente ao que se deseja estudar o metabolismo secundário.

CUETO, *et.al.* 2001 relatou a produção de um novo metabólito secundário halogenado com grande potencial antibiótico, pestalone, quando *Pestalotia sp.* cresceu na presença de uma bactéria de origem marinha ainda não conhecida.

#### 1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS HALOGENADOS

Compostos isolados de fontes naturais contendo ligações carbono – halogênio são conhecidos por possuírem uma grande variedade de atividades biológicas. Por um bom tempo, a produção de metabólitos

halogenados por organismos vivos era relacionada a um acontecimento não usual (van PÉE, 1996). Atualmente, são conhecidos mais de 4500 compostos organohalogenados produzidos das mais diversas fontes terrestres e marinhas, sejam eles fungos, bactérias e organismos superiores. (GRIBBLE, 2003). Exemplos de produtos naturais halogenados incluem agentes anti-câncer como a  $\beta$ -lactona salinosporamida A, rebecamicina, e alguns antibióticos como vancomicina, clorotetraciclina e clorofenicol. (FENICAL AND JENSEN, 2006)

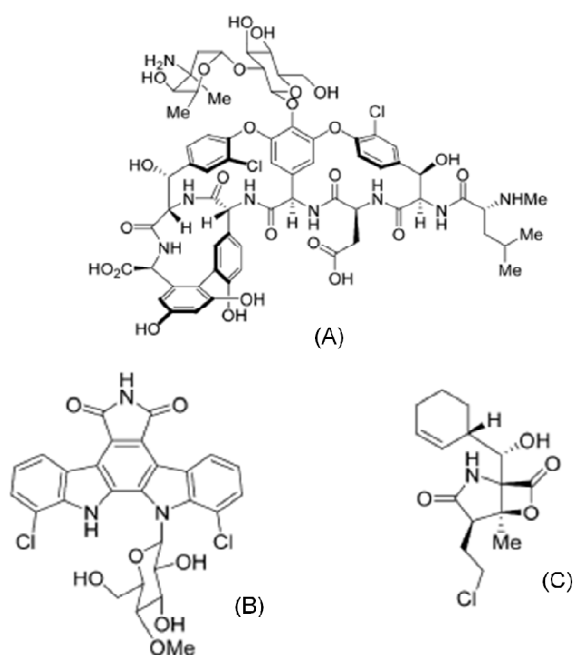


Figura 5: Estrutura de metabólitos halogenados: vancomicina (A), rebecamicina (B), e salinosporamida A (C).

A biossíntese deste tipo de substâncias tem intrigado cientistas por décadas, devido ao seu vasto espectro de atividades biológicas já reportadas na literatura. Os primeiros estudos envolvendo a biossíntese destes metabólitos ocorreram na década de 60, quando a enzima cloroperoxidase (CPO) ferro contendo porfirina (heme) foi isolada do fungo terrestre

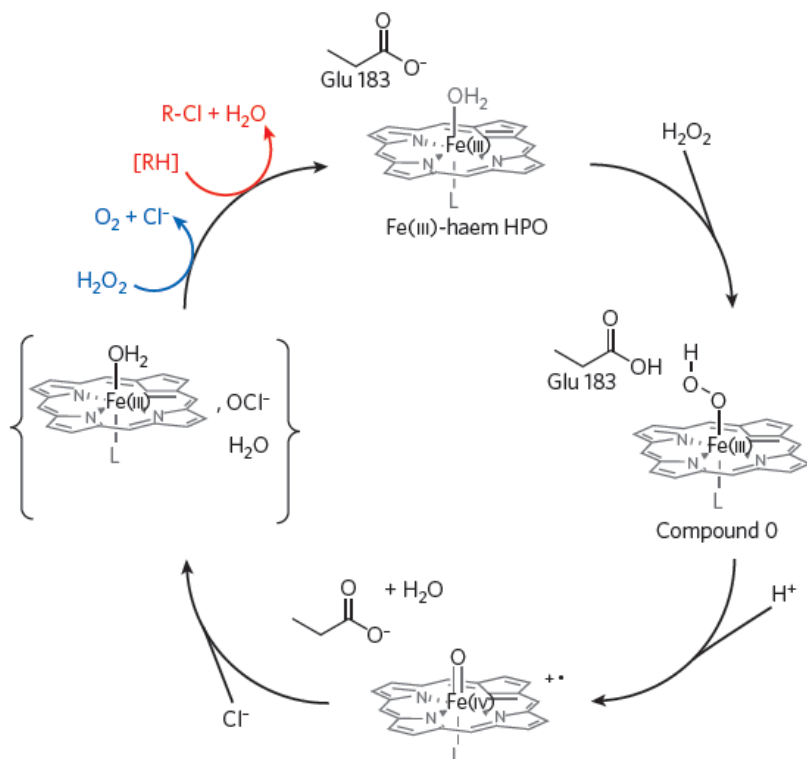
*Caldariomyces fumago*, produtor da caldariomicina (BUTLER, 2009). A partir de então, foram encontradas novas enzimas responsáveis pela produção de produtos naturais halogenados. A tabela abaixo (Tabela 1) mostra trabalhos referentes à atividade de algumas enzimas capazes de introduzir átomos de halogênios em produtos naturais (DRENNAN, 2009).

Tabela 1: Enzimas responsáveis pela halogenação de metabólitos secundários já reportadas na literatura. (BUTLER, *et. al.* 2009)

	FORMA PROPOSTA DO HALOGÊNIO ATIVO	EXIGÊNCIAS PARA O SUBSTRATO	EXIGÊNCIAS DO COFATOR E CO- SUBSTRATO
haloperoxidase dependente do grupo heme	X <sup>+</sup>	aromático, rico em elétrons;	grupo heme, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ;
haloperoxidase dependente de vanádio	X <sup>+</sup>	aromático, rico em elétrons;	vanadato, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ;
halogenase dependente de flavina	X <sup>+</sup>	aromático, rico em elétrons;	FADH <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> ;
halogenases não dependente do grupo heme	X <sup>·</sup>	alifático, inativo;	Fe(II), O <sub>2</sub> , α-cetoglutarato
halogenases nucleofílicas	X <sup>-</sup>	eletrofílico, bom grupo abandonador	



Os mecanismos de ação enzimática para reações de halogenação em produtos naturais já são bem descritos na literatura (BUTLER, *et. al.*, 2009). O Esquema 1 mostra o ciclo catalítico da enzima CPO (dependente do grupo heme) citada na maioria dos trabalhos como responsável pela maioria das reações de halogenação. (BUTLER, 2009, CHEN, 2008)



Esquema 1: Proposta catalítica para halogenação utilizando CPO dependente do grupo heme.

O pH para reações de halogenação em CPO geralmente é de 2,7. Entretanto, na ausência de íons cloreto esta enzima é responsável por inúmeras reações de oxidação em pH neutro. (CHEN, *et. al.*, 2008)

O grupo heme funciona como um centro redox. Peróxido de hidrogênio oxida o grupo heme com Fe (III), formando o composto Fe(IV)-oxo que possui uma tempo de meia vida muito curto. Fe(IV)-oxo oxida

íons cloreto por dois elétrons restaurando o centro Fe(III)-heme. A espécie  $\text{OCl}^-$  pode halogenar o substrato orgânico ou reagir com um segundo equivalente de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produzindo  $\text{O}_2$  no estado singlete. Estudos espectroscópicos e cinéticos revelaram que a espécie intermediária  $\text{OCl}^-$  se encontra presa no sítio ativo da enzima e que a halogenação ocorre realmente no sítio ativo da enzima. A Figura 6, mostra a estrutura tridimensional da CPO isolada da *Caldariomyces fumago* interagindo com 1,3-ciclopentanodiona. (CHEN, *et. al.*, 2008)

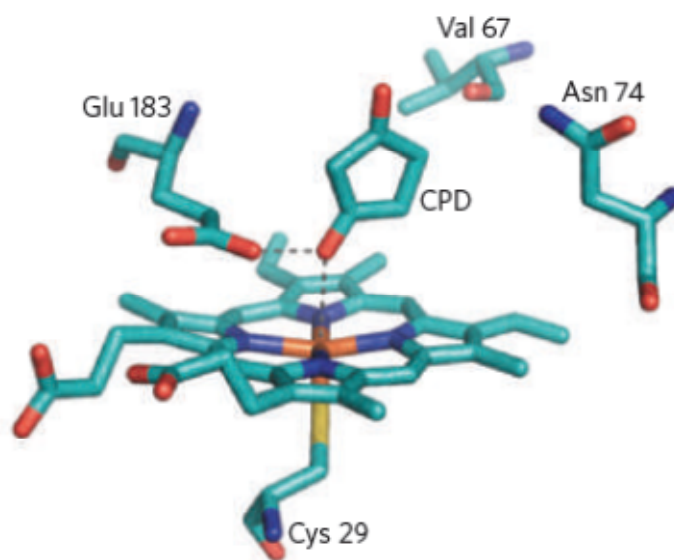


Figura 6: Estrutura tridimensional da CPO interagindo com 1,2-ciclopentanodiona.

A produção de metabólitos secundários halogenados parece ocorrer via enzimática, uma vez que para muitos deles já existem trabalhos mostrando quais enzimas foram ativas e o mecanismo utilizado para tal reação. Entretanto, a possibilidade de ocorrência de uma halogenação sem que haja a ação de uma enzima também deve ser levada em consideração.

Durante a biossíntese de muitos produtos naturais há a formação de intermediários reativos, sejam eles carbocátions, carbânions, espécies radicalares, entre outros. Sabendo-se que em solução aquosa temos a presença de alguns ânions, para este trabalho íons halogenetos, estes podem agir como nucleófilos e atacar alguns carbocátions formados, já que para ocorrer a biossíntese de alguns metabólitos, estes devem estar ligados a complexos enzimáticos, porém seus intermediários reativos devem estar “livres” para que a reação possa dar continuidade. Um exemplo hipotético é mostrado na Figura 7.

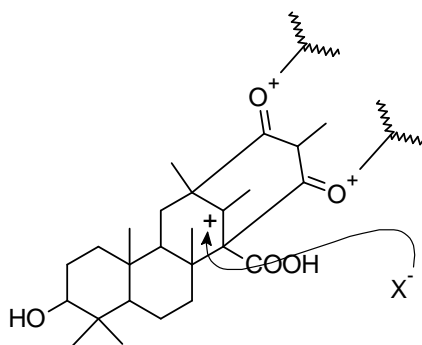


Figura 7: Hipótese de uma reação de halogenação via formação de um intermediário reativo, quando este metabólito está ligado a algum complexo enzimático.

### **1.5 ABORDAGEM OSMAC NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS HALOGENADOS.**

Poucos trabalhos na literatura relatam a indução metabólica para a produção de produtos naturais halogenados. Todos os trabalhos relacionados a este tipo de modificação metabólica são realizados quando o microorganismo em estudo é isolado de origem marinha. NENKEP, 2010,

observou a produção de piranopiranonas (Figura 8) halogenadas ao adicionar ao meio de cultura  $\text{CaBr}_2$  (50mM). Estes metabólitos apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*.

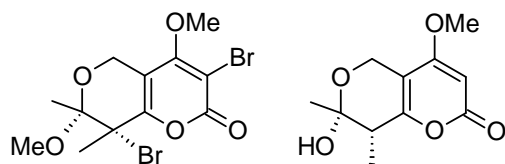


Figura 8: Metabólitos isolados de *Fusarium tricinctum* cultivado em meio artificial suplementado com  $\text{CaBr}_2$ .

A modificação do meio de cultura com adição de sais halogenados, não leva somente a produção de metabólitos secundários halogenados, mas também pode levar a produção de novas substâncias devido ao stress causado pela concentração destes aditivos. BALTRUSCHAT, *et.al.*(2008) relata o aumento da produção de ácido ascórbico e outras substâncias antioxidantes no metabolismo de *Penicillium indica*, um endofítico de *Hordeum vulgare*, ao ser cultivado em altas concentrações de NaCl.

A influência dos diferentes aditivos pode indicar que substâncias halogenadas possam agir na ativação e desativação de enzimas e ainda possam agir na regulação de determinadas rotas biossintéticas de metabólitos secundários. A identificação dos compostos "induzidos" pelas diferentes composições de halogenetos usados nos meios de cultivos seria de considerável interesse na produção de novos metabólitos secundários de acordo com a abordagem OSMAC. Este estudo mostra-se bastante interessante no sentido de buscar possíveis substâncias inéditas e com alto potencial de atividade biológica, quanto no entendimento do caminho biossintético utilizado pelo fungo para a produção de substâncias halogenadas, que comparadas aos metabólitos secundários de

microrganismos terrestres ocorrem em menor proporção do que as não halogenadas.

## 1.6 MOTIVAÇÃO PARA O ESTUDO COM OS FUNGOS ENDOFÍTICOS *Penicillium brasilianum* E *Penicillium griseoroseum*.

Para que se possam avaliar as possíveis modificações ocorridas no metabolismo secundário de um organismo é necessário que se conheça seu metabolismo sem a adição de suplementos. O fungo *Penicillium brasilianum*, isolado de *Melia azedarach*, é um dos fungos mais estudados pelo LaBioMMi, ou seja, seus constituintes químicos já estão muito bem conhecidos (FILL, 2009).

Dentre os metabólitos secundários já isolados se encontram uma diversidade de meroterpenos, de origem biossintética mista e com semelhanças estruturais com os limonóides encontrados em seu hospedeiro, amidas bisfenilpropanoídicas (brasiliamidas) (FILL, 2009), com origem no caminho dos fenilpropanóides, alcalóides tremorgênicos como verruculogenina, ácido penicílico, entre outros (SANTOS, 2003). A estrutura de alguns destes metabólitos são mostrados na Figura 9.

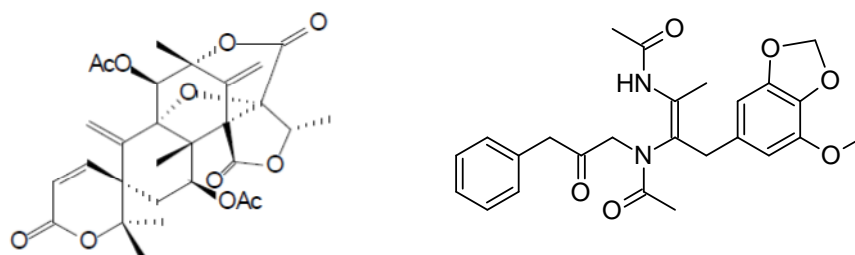
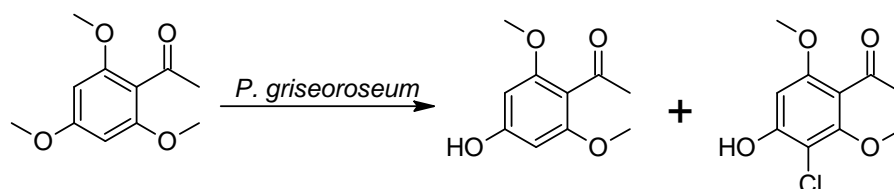


Figura 9: Metabólitos secundários de *Penicillium brasilianum*, neoaustrina (meroterpeno) e brasiliamida A, respectivamente.

Para o fungo *Penicillium griseoroseum*, isolado dos frutos verdes de *Coffea arabica*, não há estudos químicos de seu metabolismo secundário, mas este foi escolhido para o presente trabalho de modificações metabólicas por ser capaz de halogenar a 2',6'-dimetoxi,4'-hidroxi-acetofenona. Conforme observado por SILVA (2009) (Esquema 2).



Esquema 2: Esquemática da reação de halogenação realizada por *Penicillium griseoroseum*.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a alteração metabólica de fungos endofíticos (*Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum*) submetidos a variações na composição de nutrientes halogenados.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Produzir, isolar, identificar e bioensaiar os metabólitos secundários de *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium brasilianum*;
- ✓ Adicionar diferentes fontes halogenadas ao meio de cultura nas diferentes fases de crescimento dos fungos, e no tempo ótimo de produção, e verificar a influência destes aditivos no metabolismo secundário dos microorganismos;
- ✓ Verificar as melhores condições de cultivo, extração e pré-purificação dos compostos;
- ✓ Isolar, identificar e bioensaiar os metabólitos cuja produção foi otimizada;
- ✓ Verificar reações de biotransformação na presença de aditivos halogenados;



## **3. EXPERIMENTAL**

### 3.1 EQUIPAMENTOS

- ✓ Espectrômetros de RMN Bruker 600 MHz, 14,1 Tesla e 400 MHz, 9,4 Tesla.
- ✓ Cromatógrafo a líquido acoplado ao sistema de SPE e NMR: HPLC Agilent 1220 Series com bomba quaternária G1311A, Auto injetor G1329A e Detector PDA G1315D; Sistema de SPE Prospekt 2 e Magneto UltraShield 600 MHz com crio sonda inversa 5mm.
- ✓ Espectrômetro de Massas SHIMADZU QP2010 Plus (quadrupolo) equipado com uma fonte de EI, acoplado a um cromatógrafo a gás SHIMADZU QP2010; e o espectrômetro MICROMASS Quattro LC (triplo quadrupolo) equipado com uma fonte ESI/APCI “Z spray”, utilizado em inserção direta e acoplado ao cromatógrafo a líquido WATERS Alliance 2695.
- ✓ Cromatógrafo a Líquido WATERS Alliance 2695, equipado com um detector de UV WATERS 2996 *Photo Diode Array*.
- ✓ Cromatógrafo a Líquido SHIMADZU LC-10AD, equipado com um detector de UV SHIMADZU SPD-M10Avp *diode array*, Auto injetor SHIMADZU SIL-10Advp e Sistema de controle SHIMADZU SCL-10<sup>a</sup>
- ✓ Cromatógrafo a Líquido (SHIMADZU) modo preparativo Bomba LC-6AD SHIMADZU, equipado com Detector UV SPD-10AV SHIMADZU; Controladora SCL-10A SHIMADZU; Injetor manual SIL-10ADVp.
- ✓ Evaporadores Rotativos BUCHI R-200 com banho de aquecimento BUCH B-490 e BUCHI R-114 com banho de aquecimento BUCHI B-480
- ✓ Câmara de Fluxo Laminar VECO VL FS – 12M.
- ✓ Autoclaves Verticais PHOENIX AV 75 e AV 30.
- ✓ Mesa Incubadora Rotativa com controle de temperatura TECNAL
- ✓ Balança Analítica TECNAL

- ✓ Estufa FANEM-315 SE.
- ✓ Sonicador de Membrana BRANDSON 1510

### **3.2 MATERIAS CROMATOGRÁFICOS**

- ✓ Suportes para Cromatografia
- ✓ Sílica Gel (70-230 Mesh) Merck;
- ✓ Sílica Gel (230-400 Mesh) Merck;
- ✓ Sílica Gel 60 PF 254
- ✓ Coluna para HPLC PHENOMENEX<sup>®</sup> LUNA Phenyl-Hexyl (fase reversa) 250 x 4,6 mm (5µm de diâmetro de partícula)
- ✓ Coluna para HPLC PHENOMENEX<sup>®</sup> LUNA Synergi (fase reversa) 4 m Fusion 250 x 4.6 mm d.i. 5µm de diâmetro de partícula)
- ✓ Coluna cromatográfica para cromatografia líquida de alta pressão em modo preparativo: ODS, Shim-Pack,, Tamanho 250 x 21,20mm (10µm de diâmetro de partícula).

### **3.3 REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS**

#### **3.3.1 SOLVENTES**

- ✓ Solventes destilados no Departamento de Química para uso em cromatografia de coluna
- ✓ Solventes de grau HPLC Merck<sup>®</sup> e Aldrich<sup>®</sup> (Acetonitrila, Diclorometano, Hexano, Isopropanol e Metanol)
- ✓ Solventes deuterados MERCK<sup>®</sup> e ALDRICH<sup>®</sup> (98,0 - 99,0%), para obtenção dos espectros de RMN
- ✓ Água purificada em sistema Milli-Q;

### 3.3.2 REAGENTES

- ✓ Brometo de amônio (NH<sub>4</sub>Br), Synth<sup>®</sup>; cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl), Synth<sup>®</sup>; Sal Marinho RED SEA<sup>®</sup>, ácido tricloroacético; ácido cloroacético; cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>), cloreto de cobre (CuCl<sub>2</sub>), cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de níquel (NiCl<sub>3</sub>), Synth<sup>®</sup>.

### 3.3.3 MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVO DOS MICROORGANISMOS

- ✓ BDA (Agar-Batata-Dextrose)
- ✓ Caldo Mueller Hinton DIFCO<sup>®</sup>;
- ✓ Ágar Mueller Hinton ACUMEDIA<sup>®</sup>
- ✓ Tubo padrão de sulfato de bário (Escala de McFarland: 1x10<sup>8</sup> células/mL).

## 3.4 PARTE EXPERIMENTAL

### 3.4.1 CULTIVO DOS FUNGOS *Penicillium brasilianum* E *Penicillium griseoroseum*, ISOLADOS DE *Melia azedarach* E *Coffea arabica*, RESPECTIVAMENTE.

O fungo endofítico *Penicillium brasilianum* foi isolado do córtex das raízes de *Melia azedarach* por Santos (2003) e conservado na micoteca do LaBioMMi (LaBioMMi 024). O endófito *Penicillium griseoroseum* foi isolado dos frutos verdes de *Coffea arabica* por Valente (2003) e posteriormente conservado.

A ativação das cepas obtidas ocorreu através da inoculação de recortes (0,5 x 0,5cm) dos fungos em placas contendo o meio BDA (batata-

dextrose-ágar). Após o desenvolvimento dos mesmos nestas placas (aproximadamente sete dias), pôde-se preparar a suspensão de esporos para posteriores experimentos com estes microorganismos. Para a realização dos experimentos os microorganismos foram cultivados em meio líquido.

*Meio líquido Czapek's enriquecido com 2% de extrato de levedura:* em um Erlenmeyer foram adicionados 3,0 g de  $\text{NaNO}_3$ ; 1,0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g de  $\text{KCl}$  e 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 1 L de água destilada. Agitou-se até a completa dissolução dos sais. Em seguida adicionou-se 30 g de glicose e manteve-se a agitação. Adicionou-se por fim 20 g de extrato de levedura. Homogeneizada a solução, autoclavou-se a mesma por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm de pressão. Após a esterilização do material de cultivo os microorganismos puderam ser inoculados. O tempo de cultivo dos mesmos variou conforme o experimento realizado.

### **3.4.2 EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM OS FUNGOS *P. brasilianum* E *P. griseoroseum*.**

#### **3.4.2.1 ADIÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) E BROMETO DE AMÔNIO ( $\text{NH}_4\text{Br}$ ) AO MEIO DE CULTURA.**

Com o objetivo de estudar a alteração metabólica do fungo *P. brasilianum*, enriqueceu-se o meio preparado como descrito no item X com a adição destes sais. Para isso, após a dissolução do meio de cultura foram adicionados 9,5 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 3,25 g de  $\text{NH}_4\text{Br}$ , afim de se obter concentrações de 190 g/L e 65 g/L, respectivamente. Foram preparados meios de cultivo com concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  variando suas concentrações de 190 g/L a 190 mg/L diminuindo dez vezes a concentração deste e de 65 g/L a 65 mg/L para  $\text{NH}_4\text{Br}$ , utilizando-se a mesma variação de

concentração. A escolha destas concentrações foi feita de acordo com o que é relatado de íons cloreto e brometo nos oceanos: íons cloreto são encontrados na proporção de 19 g/L, enquanto íons brometo são encontrados na concentração de 65 mg/L. Após a autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados 100 µL de uma suspensão de esporos preparada previamente, sem a contagem do número de esporos presentes na suspensão. Todos os frascos foram incubados durante 15 dias a 25°C de maneira estática.

Após o período de incubação, o crescimento do fungo foi interrompido com a filtração do micélio formado e posterior extração do meio líquido e do micélio.

As extrações ocorreram da seguinte forma:

Meio Líquido: Após a filtração do micélio, o filtrado foi extraído com acetato de etila por duas vezes (2x 50 mL). Em seguida, o extrato foi concentrado e armazenado para análises posteriores.

Micélio: Após a filtração a vácuo, o micélio foi seco em estufa a 70°C por 24 horas. Após este período, a massa micelial já seca foi pesada para um estudo da tolerância do crescimento micelial do microorganismo frente à adição dos sais. Em seguida, o micélio foi triturado e extraído com etanol (100 mL) por 24 horas. Após este período, foram recolhidas alíquotas de 10 mL. O extrato em etanol foi concentrado juntamente com as alíquotas obtidas e armazenados para análises posteriores.

Todo o experimento foi realizado em triplicata e comparado com o crescimento do fungo sem a adição dos sais, chamado de controle.

Para o estudo de tolerância do crescimento de *Penicillium brasilianum* frente à adição destes sais foi realizada a média da micelial seca com a triplicata e seu desvio padrão foi calculado.

#### **3.4.2.2 ADIÇÃO DE SAIS CONTENDO O ÍON CLORETO.**

Este experimento teve como objetivo estudar a interferência da adição de alguns sais halogenados no crescimento do fungo *P. brasilianum* quando estes sais eram diferenciados pelos seus cátions. Os sais adicionados ao meio de cultura, separadamente, foram: CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, NiCl<sub>3</sub>. O meio de cultura utilizado foi Czapek's com 2% de extrato de levedura e a concentração de sal utilizada foi de 19 g/L. Após a autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados 100 µL de uma suspensão de esporos preparada previamente, sem a contagem do número de esporos presentes na suspensão. Todos os frascos foram incubados durante 15 dias a 25°C de maneira estática.

Após 15 dias de cultivo o crescimento do microorganismo foi interrompido com a filtração do micélio e posterior extração do mesmo e do meio líquido, conforme descrito no item 3.4.2.1.

#### **3.4.2.3 ADIÇÃO DE SAL MARINHO RED SEA<sup>®</sup> AO MEIO DE CULTURA.**

Para simular a concentração de sais existentes no ambiente marinho, foi utilizado o sal comercial RED SEA<sup>®</sup>. As condições de cultivo e de análise dos extratos obtidos do meio líquido e do micélio foram similares as do item 3.4.2.1. As concentrações deste sal utilizadas no experimento foram de 330 g/L a 3,3 g/L diluindo de 10 em 10 vezes, uma vez que a concentração de sais solúveis na água do mar é de 33 g/L. Após a

autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos preparada previamente, sem a contagem do número de esporos presentes na suspensão. Todos os frascos foram incubados durante 15 dias a 25°C de maneira estática.

A análise da massa micelial seca para verificação da tolerância do crescimento do fungo frente à adição deste sal foi feita, utilizando o mesmo procedimento do item 3.4.2.1.

#### **3.4.2.4 ADIÇÃO DE $\alpha$ -HALOÁCIDOS AO MEIO DE CULTURA.**

Uma vez que os experimentos de adição de substratos ao meio de cultura tinham sido realizados somente com aditivos inorgânicos, resolveu-se testar a adição de ácidos orgânicos ao meio de cultura para verificação de possíveis modificações metabólicas. Assim como os demais experimentos, as condições de cultivo e de análise dos extratos obtidos foram semelhantes ao item 3.4.2.1. As concentrações testadas para o ácido tricloroacético e ácido cloroacético foram de 2 mol/L, 1 mol/L, 0,5 mol/L e 0,1 mol/L. Após a autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos preparada previamente, sem a contagem do número de esporos presentes na suspensão. Todos os frascos foram incubados durante 15 dias a 25°C de maneira estática.

Estudos de tolerância do crescimento da massa micelial frente aos aditivos foram realizados conforme o item 3.4.2.1, sempre comparadas a um controle.



### **3.4.3 EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM O FUNGO *P. griseoroseum*.**

Para o endófito isolado de *Coffea arabica* foram realizados os seguintes experimentos iniciais:

Adição de NH<sub>4</sub>Br e NH<sub>4</sub>Cl ao meio de cultura;

Adição de sais contendo o ânion cloreto.

### **3.4.4 ANÁLISES POR HPLC/PDA E HPLC/PDA-MS DOS EXPERIMENTOS INICIAIS UTILIZANDO OS FUNGOS *P. brasilianum* E *P. griseoroseum* com diferentes aditivos halogenados.**

As análises iniciais para a detecção de possíveis diferenciações metabólicas foram realizadas por HPLC/PDA. O método descrito na tabelas 2 e 3 foi utilizado em todas as análises cromatográficas para o meio líquido. Ambos os solventes utilizados (água e metanol) continham em sua composição 0,1% de ácido trifluoracético. A coluna analítica utilizada nas análises foi PHENOMENEX LUNA C18 de 250 x 4,6 mm I.D. (5 µm de diâmetro de poro) com uma vazão de 0,7 mL/min e 20 µL foi o volume de injeção utilizado. Com relação à análise do micélio as condições cromatográficas permaneceram semelhantes com exceção do método de eluição do extrato obtido, que é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Eluição gradiente utilizado nas análises do extrato obtido do meio líquido.

Tempo (min)	% MeOH
0	30
15	60
25	60
40	80
45	100

Tabela 3: Eluição gradiente utilizado na análise do extrato do micélio.

Tempo (min)	% MeOH
0	30
15	60
30	80
40	100
45	100

Nas análises por HPLC/PDA houve a adição de três padrões juntamente aos extratos. Os padrões injetados foram sulfanilamida, flavona e dodecanofenona. Ao extrato preparado para análise por HPLC-PDA foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo os padrões citados na concentração de  $9,9 \times 10^{-4}$  mmol/L.

Após análises preliminares por HPLC/PDA, se tornou necessária utilizar uma técnica com maior sensibilidade, uma vez que as modificações metabólicas poderiam ocorrer em concentrações menores quando comparadas aos metabólitos secundários já produzidos pelos

microorganismos ou os metabólitos formados não possuísem grupos cromóforos capazes de absorver nas regiões do ultravioleta e do visível. Assim, decidiu-se então utilizar a técnica de cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas como detector (LC/MS). As condições do espectrômetro de massas estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4: Condições do espectrômetro de massas para ESI<sup>+</sup>.

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura de dessolvatação (°C)	250
Capilar (kV)	3,74
Cone (V)	31
Extrator (V)	5
Lentes RF (V)	0,66

### **3.4.5 ANÁLISE E ISOLAMENTO POR LC-SPE-NMR DO EXPERIMENTO RELACIONADO À ADIÇÃO DE FeCl<sub>3</sub> AO MEIO DE CULTURA.**

Após análises iniciais de possíveis modificações metabólicas por HPLC/PDA e HPLC/PDA-MS julgou-se interessante que alguns extratos obtidos fossem analisados por HPLC-SPE-NMR pertencente ao Grupo de Produtos Naturais/DQ-UFSCar.

Para a separação cromatográfica, utilizou-se uma coluna Coluna para HPLC PHENOMENEX LUNA Phenyl-Hexyl 250 x 4,6 mm (5µm de diâmetro de partícula) com eluição gradiente e uma vazão de 1 mL/min. O gradiente utilizado na eluição dos compostos foi o mesmo apresentado na Tabela 2 utilizando como solvente orgânico acetonitrila sem a presença de modificador da fase móvel. A banda de interesse foi trapeada em cartuchos

de SPE em fase reversa (C-18). Antes do trapeamento da banda, o cartucho foi condicionado com três volumes de acetonitrila e equilibrado com um volume de água.

Após a retenção do composto de interesse o cartucho foi seco com um fluxo de nitrogênio durante 30 minutos. Então cada cartucho foi eluído com 240 µL de acetonitrila deuterada e por meio de um capilar a amostra foi analisada por NMR.

#### **3.4.6 CULTIVO EM LARGA ESCALA DOS EXPERIMENTOS COM MODIFICAÇÕES METABÓLICAS NOS FUNGOS *P. brasilianum* E *P. griseoeroseum*.**

O meio de cultivo utilizado para os experimentos em larga escala foi o mesmo utilizado para os estudos iniciais de modificação metabólica (item 3.4.2.1). Em cada experimento foram utilizados 3L de meio de cultura. Após a autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados 100 µL de uma suspensão de esporos preparada previamente, sem a contagem do número de esporos presentes na suspensão. Todos os frascos foram incubados durante 15 dias a 25°C de maneira estática.

Após 15 dias de cultivo o crescimento do fungo foi interrompido com a filtração do micélio e extração do meio líquido com AcOEt (3x). O micélio foi seco em estufa a 70°C por 24h e em seguida extraído com EtOH (1L) por 24h. Os solventes foram evaporados até a secura.

#### **3.4.7 TRATAMENTO INICIAL DOS EXTRATOS OBTIDOS EM LARGA ESCALA VISANDO O ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.**

Para todos os experimentos realizados em larga escala foi realizada uma separação inicial dos extratos por meio de uma pré-purificação em

coluna à vácuo utilizando sílica flash como fase estacionária e modo de eluição gradiente. A Tabela 5 mostra a composição da fase móvel e os códigos dados às frações após a eluição dos extratos. A quantidade utilizada de cada eluente foi de 750mL.

Tabela 5: Composição da fase móvel utilizada na separação dos extratos em larga escala.

Eluente	Proporção	Código
Hex:DCM	1:1	A
DCM	100%	B
DCM:AcOEt	7:3	C
AcOEt	100%	D
AcOEt:MeOH	7:3	E
AcOEt:MeOH	3:7	F
MeOH	100%	G

### **3.4.8 ANÁLISE POR HPLC/PDA-MS DOS EXTRATOS EM LARGA ESCALA.**

Com a separação inicial dos extratos, pôde-se então analisar os já fracionados anteriormente. Para isso, uma coluna PHENOMENEX LUNA Phenyl-Hexyl 250 x 4,6 mm (5µm de diâmetro de partícula) e uma vazão de 0,7 mL/min com 20 µL de volume de injeção foram utilizados para análise cromatográfica. O método cromatográfico de eluição é o mesmo encontrado nas Tabelas 2 e 3, sendo acetonitrila o solvente orgânico e sem adição de modificadores químicos na fase móvel. Para o espectrômetro de massas, as condições de análise se encontram na Tabela 4, com exceção da temperatura do bloco da fonte que se encontrava a 85°C.

### 3.4.9 ANÁLISES POR GC/MS DOS EXTRATOS EM LARGA ESCALA.

Algumas das frações de menor polaridade obtidas da coluna à vácuo foram submetidas à análise por GC/MS em uma coluna RTX 5MS. O gás de arraste utilizado como fase móvel foi nitrogênio. As condições do cromatógrafo são apresentadas na Tabela 6. As condições no espectrômetro de massas são mostradas na Tabela 7:

Tabela 6: Gradiente de temperatura para análises por GC dos extratos em larga escala.

Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo
-	70	3
4	150	0
2	190	0
5	310	3

Tabela 7: Condições do espectrômetro de massas utilizando EI<sup>+</sup>.

Temperatura da interface	250 °C
Temperatura da fonte	200 °C
Energia de ionização	70 eV

### 3.4.10 ANÁLISE POR HPLC/PDA-MS DOS EXTRATOS EM LARGA ESCALA.

Para os extratos com media e alta polaridade, suas frações foram analisadas por LC/MS nas mesmas condições que as utilizadas no item 3.4.4.

#### **3.4.11 ISOLAMENTO DOS METABÓLITOS DE INTERESSE POR HPLC/UV EM ESCALA PREPARATIVA.**

Para o isolamento dos metabólitos mais interessantes foi utilizado um sistema de cromatografia a líquido em escala preparativa e a eluição destes compostos ocorreu de forma isocrática.

Para a substância **1** (alcalóide) foi utilizada uma fase móvel de 20% de MeOH com uma vazão de 15 mL/min no comprimento de onda a 230 nm. Estas duas substâncias foram isoladas de *Penicillium brasilianum*. Para o isolamento das substâncias **14** e **15**, que foram isoladas de *Penicillium griseoroseum*, as condições utilizadas foram uma fase móvel de 50% de ACN com uma vazão de 5 mL/min no comprimento de onda 325 nm.

#### **3.4.12 EXPERIMENTOS PARA ANÁLISE E ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Penicillium griseoroseum*.**

Para o crescimento do fungo foram utilizados 8L do meio de cultivo Czapek's com 2% de extrato de levedura, conforme descrito no item 3.4.2.1. Após a autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados 5 pedaços do fungo em cada frasco. Todos os frascos foram incubados durante 30 dias a 25°C de maneira estática.

Após 30 dias o crescimento do microorganismo foi interrompido pela filtração do micélio que, em seguida, foi extraído com AcOEt e n-BuOH, enquanto o micélio foi extraído com EtOH.

Após a obtenção dos extratos, o obtido do meio líquido foi submetido à uma coluna filtrante utilizando sílica flash como fase estacionária e a Tabela 8 apresenta a composição da fase móvel utilizada.

Tabela 8: Composição da fase móvel utilizada para pré-purificação do extrato obtido do meio líquido.

Eluente	Proporção	Código
Hex	100%	A
Hex:DCM	1:1	B
DCM	100%	C
DCM:MeOH	9:1	D
DCM:MeOH	7:3	E
DCM:MeOH	1:1	F
MeOH:DCM	7:3	G
MeOH	100%	H

Em seguida, as frações C e D (Tabela 8) foram reunidas e submetidas à separação cromatográfica utilizando uma coluna Sephadex LH-20 com MeOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 9:1, obtendo-se 30 frações. As frações 12, 13 e 14 foram reunidas e cromatografadas sílica gel com DCM, acetona e MeOH (9:1:0) até MeOH (100%) para o isolamento do composto **5** (12 mg). As frações 15 e 16 passaram pelo mesmo processo para se obter o composto **6** (9 mg). Para a obtenção do composto **7** (13 mg), a fração 27 obtida da separação por Sephadex-LH20 foi submetida à cromatografia à líquido em escala preparativa utilizando como fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30) com uma vazão de 12 mL/min no comprimento de onda 340 nm.

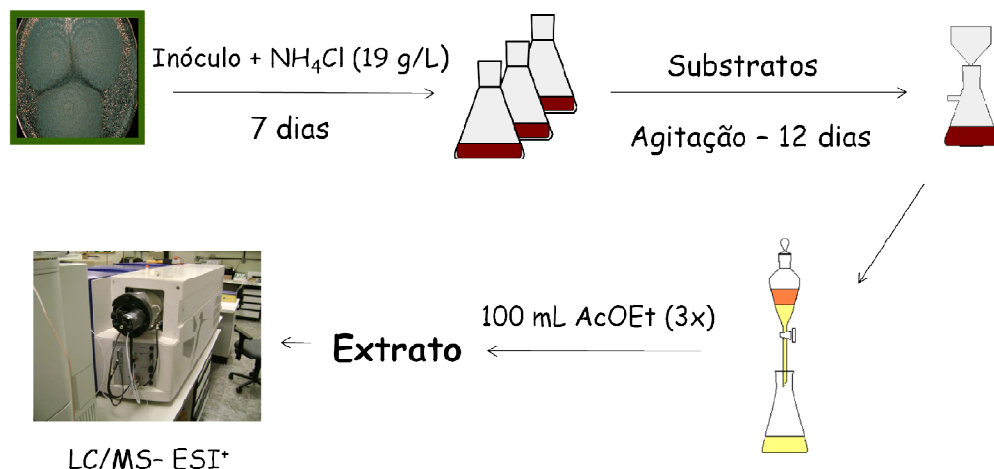
### 3.4.13 BIOTRANSFORMAÇÃO DA 2',4',6'-TRIMETOXI ACETOFENONA E 3',4',5'-ÁCIDOTRIMETOXI BENZÓICO

Como relatado anteriormente por Silva, *et. al.* (2009) o fungo *Penicillium griseoroseum* foi capaz de halogenar a 2',4',6'-



trimetoxiacetofenona na posição 5'. Assim, para verificar se a halogenação ocorreria em outras posições do substrato, resolveu-se aumentar a concentração de íons cloreto e introduzir íons brometo ao meio de cultura para verificar o comportamento do microorganismo nesta reação de biotransformação. A composição do meio de cultura foi a mesma que está relatada por da Silva, B. F. em sua tese de doutorado, com exceção da concentração de íons cloreto ( $[\text{NH}_4\text{Cl}] = 19 \text{ g/L}$ ) e de íons brometo ( $[\text{NH}_4\text{Br}] = 65 \text{ g/L}$ ). Após a autoclavagem do meio já contendo os aditivos, foram inoculados  $100 \mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos preparada previamente, sem a contagem do número de esporos presentes na suspensão. Após 7 dias de crescimento do fungo, foram adicionados ao meio de cultura os substratos a serem testados na concentração de 20 mg por frasco. Frascos contendo somente o fungo e fungo com substrato sem adição de sais halogenados foram realizados para um controle da reação de biotransformação e a influência do metabolismo secundário na presença de sais halogenados, respectivamente. Todos os frascos foram incubados durante 7 dias de maneira estática e após a adição dos substratos foram mantidos sob agitação a 120 rpm a  $25^\circ\text{C}$ .

O esquema abaixo ilustra o esquema experimental utilizado para a realização do experimento.



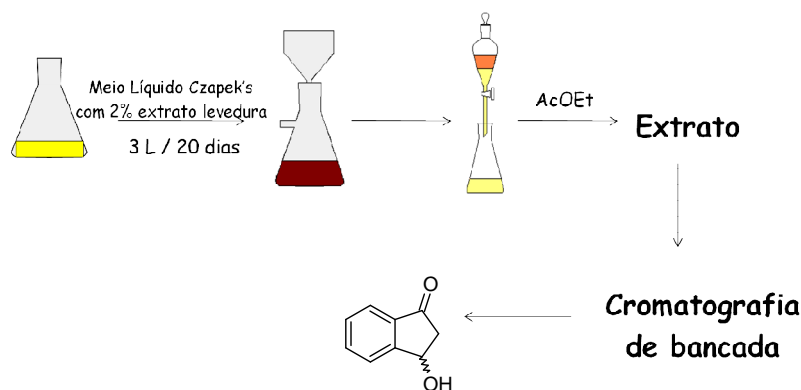
Fluxograma 1: Procedimento utilizado para o experimento de biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona e do 3',4',5'-ácido trimetoxibenzóico na presença de sais halogenados.

Para testar a especificidade do substrato com relação às reações de halogenação, foi adicionado ao meio de cultura o 3',4',5'-ácido trimetoxibenzóico nas mesmas condições da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona com adição dos sais halogenados nas mesmas concentrações.

As condições utilizadas para análise por HPLC-PDA/MS foram as mesmas utilizadas no item 3.4.4.

#### 3.4.14 BIOTRANSFORMAÇÃO DA 1-INDANONA POR *Penicillium brasilianum*.

O procedimento utilizado para a biotransformação da 1-indanona foi o mesmo adotado por da Silva *et. al.* (2009) em sua tese de doutorado, que está representado no esquema abaixo (Fluxograma 2).



Fluxograma 2: Procedimento de cultivo, extração e isolamento da 3'-hidroxi indanona a partir da 1-indanona.

### 3.4.15 OBTENÇÃO DA 3-HIDROXI-1-INDANONA VIA SÍNTESE ORGÂNICA.

A primeira etapa da reação para obtenção da 3'-hidroxi indanona foi inicializada com a adição de 1g de 1-indanona (7,57 mmol) em um balão de fundo redondo contendo 50 mL de água destilada. A esta suspensão, foram adicionados 1,33g (7,57 mmol) de N-bromosuccinamida. Esta mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente sob a irradiação de uma lâmpada incandescente de 40W. Após duas horas de reação, a mistura foi extraída com AcOEt (2x 25 mL) e foi obtido, assim, o extrato da reação. O produto bromado foi purificado por técnicas cromatográficas utilizando sílica flash como fase estacionária e uma mistura de hexano e éter etílico (70:30) como fase móvel.

### 3.4.16 ANÁLISE POR GC/MS DOS PRODUTOS DE REAÇÃO DA 1-INDANONA.

Após a obtenção da 3'-hidroxi indanona via síntese orgânica e via biotransformação, estas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à um espectrômetro de massas. As condições cromatográficas e

condições do espectrômetro de massas são mostradas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente.

Tabela 9: Condições cromatográficas para análise dos extratos em larga escala.

Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo
-	80	3
4	250	3

Tabela 10: Condições do espectrômetro de massas utilizando EI<sup>+</sup>.

Temperatura da interface	250 °C
Temperatura da fonte	200 °C
Energia de ionização	70 eV

#### **3.4.17 ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA 3-HIDROXI-1-INDANONA.**

As análises para estudo do excesso enantiomérico foram realizadas por HPLC SHIMADZU equipado com detector de PDA. A coluna utilizada foi Chiralcel OD-H (250 x 4.60 mm, 5µm tamanho da partícula), com uma vazão de 0,8 mL/min e um modo de eluição isocrático utilizando hexano e isopropanol (80:20) como fase móvel e o comprimento de onda a 254 nm.

#### **3.4.18 TESTE DE ANTIBIOSE PARA OS METABÓLITOS ISOLADOS DE *P. griseoroseum*.**

O teste de antibiose foi realizado com os metabólitos secundários isolados de *Penicillium griseoroseum* (substâncias **5** a **7**) utilizando o

método de diluição em caldo (microdiluição). Os procedimentos realizados são detalhados a seguir.

#### **3.4.18.1 ATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS.**

As bactérias conservadas a baixas temperaturas (geladeira) foram ativadas em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton, sendo incubadas por um período de 24 horas, a 33°C. As bactérias testadas foram: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativas), *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus Aureus* e *Micrococcus luteus* (gram positivas). Após esse intervalo, transferiu-se cerca de uma colônia de bactéria para um tubo contendo 3mL de caldo Mueller Hinton, com o auxílio de uma alça de platina estéril. Após a homogeneização do conteúdo do tubo, este foi incubado por cerca de 24 horas, a 33°C, até o momento da realização do teste.

#### **3.4.18.2 PADRONIZAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS.**

As bactérias utilizadas para o ensaio foram padronizadas a uma concentração de  $1 \times 10^8$  cel/mL, mediante comparação com padrão da escala de McFarland de turbidez. Para a obtenção do padrão, misturou-se 9,95 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% e 0,05 mL de solução de BaCl<sub>2</sub> 1% . Quando necessário, diluições foram realizadas em meio Mueller Hinton a fim de se obter as concentrações de células desejadas.

#### **3.4.18.3 PREPARO DAS AMOSTRAS.**

Uma solução estoque em DMSO, de 3mg/mL foi inicialmente preparada para cada substância testada. Trabalhou-se com diluições

sucessivas para a obtenção das concentrações de interesse para a realização do teste.

#### **3.4.18.4      TESTE ANTIBACTERIANO.**

Os ensaios antibacterianos foram realizados aplicando-se os testes de susceptibilidade para determinação da concentração mínima inibitória, segundo as normas descritas pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 2005, tradução ANVISA Norma M100-S15.

Os testes foram realizados em placas de ELISA, contendo 96 poços, através de diluições sucessivas em triplicata das substâncias puras e dos antibióticos de referência em caldo Mueller Hinton. As substâncias foram transferidas para as placas de ELISA em 2 µL de DMSO no primeiro poço, acrescentando-se posteriormente 93 µL de caldo e 5µL da solução bacteriana padronizada, de tal forma que a concentração inicial da substância testada foi de 250µg/mL. Posteriormente realizou-se diluições sucessivas de um poço para outro a fim de obter as concentrações até 0,0025 µg/mL. Foram utilizadas soluções de antibiótico comerciais de mesma concentração inicial, sendo a vancomicina aplicada nos testes para *Pseudomonas aeruginosa* e tetraciclina para as demais bactérias. Um controle positivo contendo apenas caldo com células bacterianas e um controle negativo, contendo apenas caldo de cultivo foram aplicados em todos os testes. Como controle em relação à atividade do solvente DMSO, foi utilizada uma linha de poços (linha G), contendo apenas DMSO (4%) e caldo com células bacterianas.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## **4.1 *Penicillium brasilianum***

### **4.1.1 EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM O FUNGO *Penicillium brasilianum*.**

#### **4.1.1.1 ADIÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO E BROMETO DE AMÔNIO AO MEIO DE CULTURA.**

##### **4.1.1.1.1 ESTUDO DA TOLERÂNCIA DO CRESCIMENTO DO MICROORGANISMO FRENTE À ADIÇÃO DE $\text{NH}_4\text{Cl}$ E $\text{NH}_4\text{Br}$ .**

Na tentativa de verificar se a adição de alguns sais halogenados em algumas concentrações definidas inibiria ou aumentaria o crescimento micelial dos fungos estudados realizou-se o estudo em triplicata para cada concentração estudada e a Figura 10 mostra o gráfico referente ao crescimento do microorganismo nestes meios.

Para cada ponto, foi calculada a média da triplicata e o desvio padrão de cada concentração. Não serão apresentados os cálculos de desvio padrão, pois estes se mostraram inferiores a 4%.



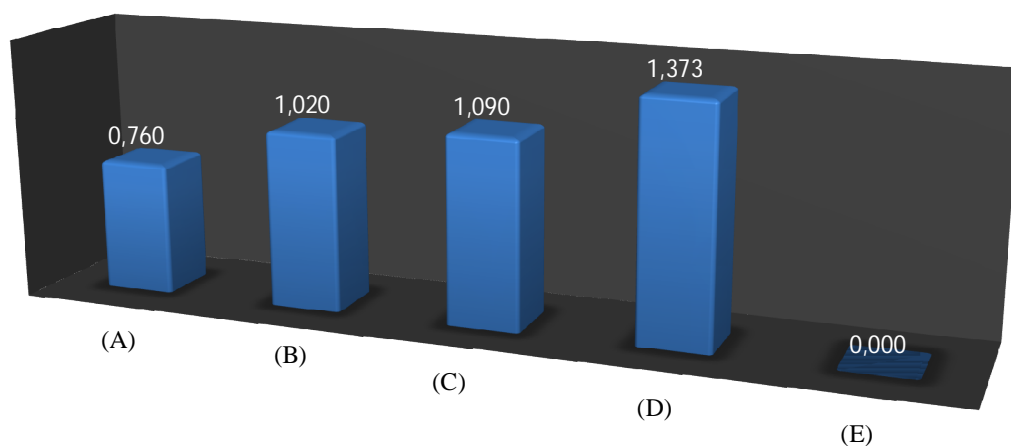


Figura 10: Gráfico do crescimento micelial em gramas, de *Penicillium brasilianum* com a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . (A) controle, (B) 19 mg/L, (C) 190 mg/L, (D) 19 g/L, (E) 190 g/L.

O mesmo foi feito para o experimento com adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultura, como mostra a Figura 11.

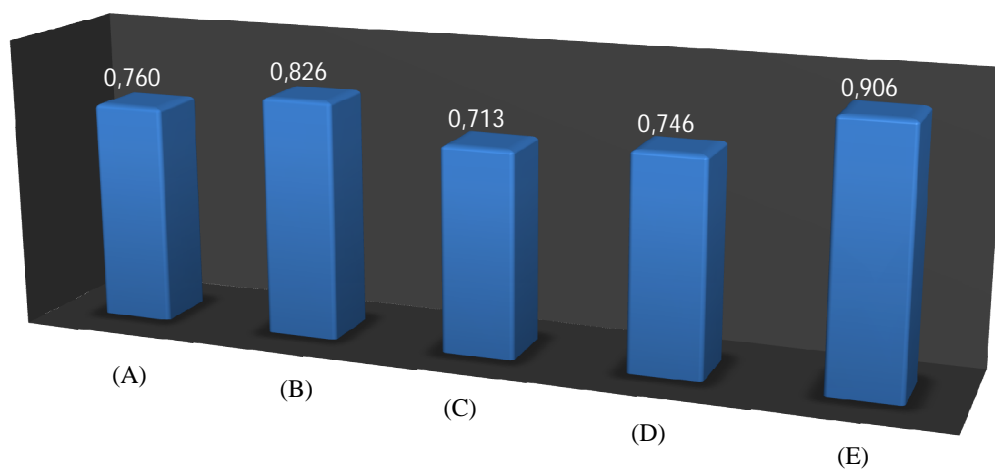


Figura 11: Gráfico do crescimento micelial em gramas, de *Penicillium brasilianum* com a adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$ . (A) controle, (B) 65 mg/L, (C) 650 mg/L, (D) 6,5 g/L, (E) 65 g/L.

Como se pode observar nos gráficos acima, a concentração em que houve um incremento no crescimento da massa micelial ocorreu com a

adição de uma maior concentração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Br}$ . O seguinte fato é explicado pelo aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultura, que é um elemento essencial ao crescimento de células animais, na síntese do DNA e RNA, síntese de ATP e principalmente para sintetizar os grupos amino presentes nos aminoácidos constituintes das proteínas. (TORTORA, *et.al.*, 2006)

A presença de íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no meio de cultura é considerada tóxica para microorganismos. Entretanto, em meio líquido ocorre a dissociação deste íon levando a formação de amônia ( $\text{NH}_3$ ) que é utilizada pelas células após sua transformação em glutamato e glutamina. A utilização pela célula de uma ou outra substância como fonte de nitrogênio depende de indutores e inibidores da regulação gênica. (YIGITOGLU E MCNELL, 1992).

Quando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na concentração de 190 g/L foi adicionado ao meio de cultura, houve a inibição total do crescimento do microorganismo. Uma suposição a ser feita seria que a grande concentração de íons cloreto no meio de cultura seria responsável por esta inibição, uma vez que a concentração de nitrogênio poderia não ser inibitória para o crescimento do microorganismo.

#### **4.1.1.2 ANÁLISE POR HPLC/PDA DAS MODIFICAÇÕES METABÓLICAS DE *Penicillium brasilianum* FRENTE À ADIÇÃO DE $\text{NH}_4\text{Cl}$ E $\text{NH}_4\text{Br}$ .**

A análise dos extratos com os padrões adicionados se fez necessária para julgar se bandas cromatográficas com tempos de retenção diferentes do controle seriam alguma modificação em um metabólito já produzido pelo microorganismo ou se esta diferença de tempo de retenção seria um problema relacionado às condições cromatográficas. O cromatograma referente à análise somente dos padrões é mostrado na Figura 12.

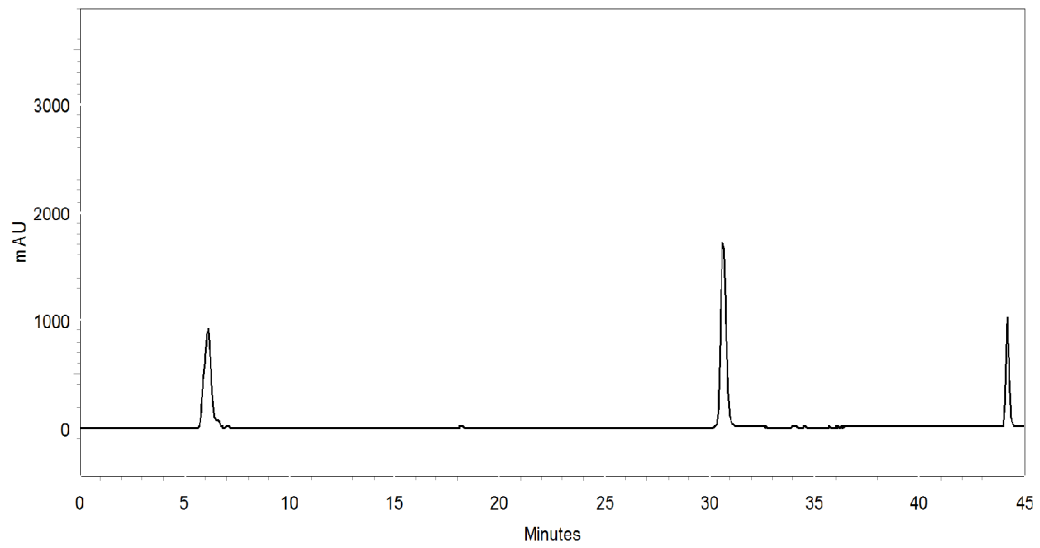


Figura 12: Cromatograma dos padrões sulfanilamida (5,2 min), flavona (30,8 min) e dodecanofenona (44,7 min). Monitoramento do cromatograma em 254 nm.

Dos experimentos de adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ao meio de cultura, foram obtidos os seguintes cromatogramas do extrato do micélio, são ilustrados na Figura 13.

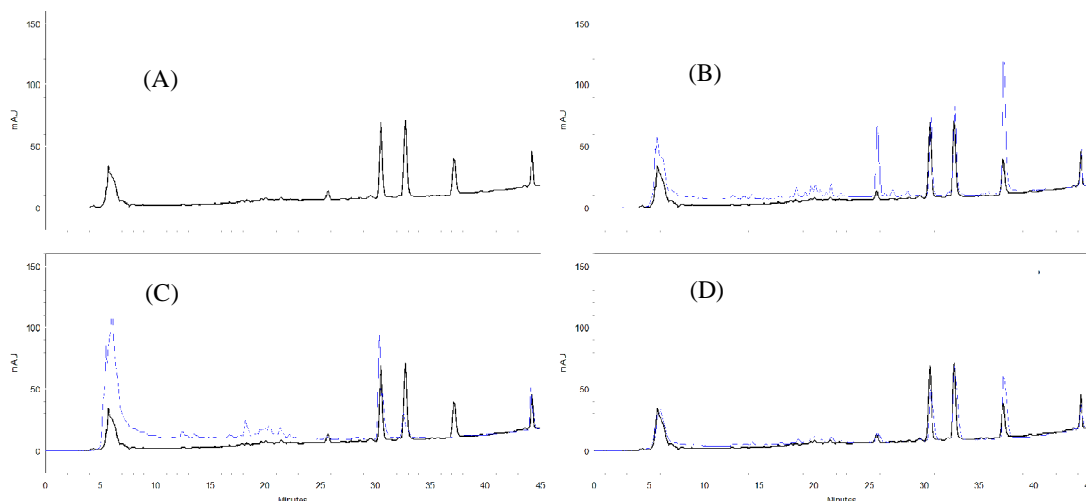


Figura 13: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de NH<sub>4</sub>Cl ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D). (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de NH<sub>4</sub>Cl. Monitoramento em 254 nm.

Com relação ao meio líquido, foram obtidos os cromatogramas representados na Figura 14.

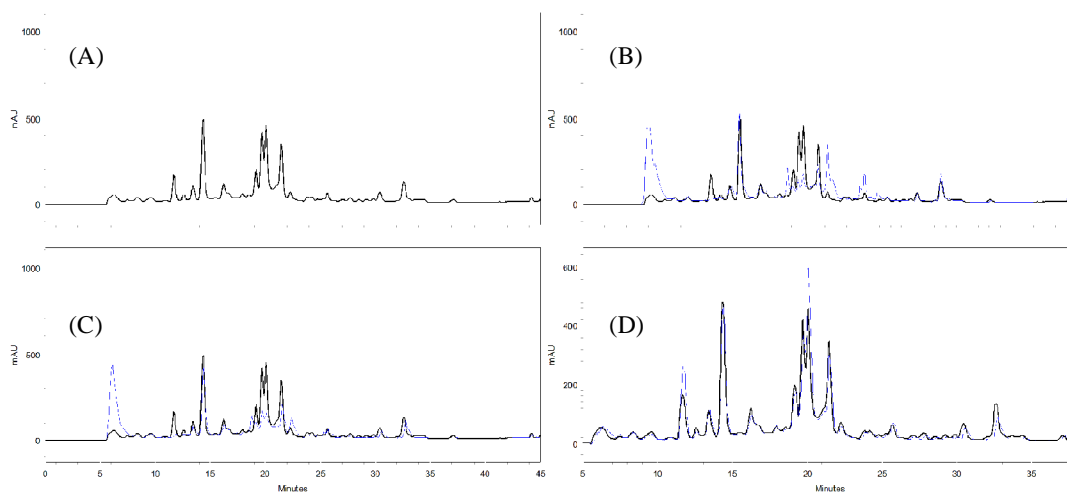


Figura 14: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de NH<sub>4</sub>Cl ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D). (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de NH<sub>4</sub>Cl. Monitoramento em 254 nm.

Como esperado, modificações no metabolismo secundário de *Penicillium brasilianum* puderam ser observadas ao serem adicionados aditivos halogenados, porém os compostos apresentaram uma intensidade baixa, quando comparadas com os metabólitos já conhecidos do fungo. O aumento, a diminuição e até mesmo o desaparecimento de algumas bandas cromatográficas mostraram que o fungo foi capaz de modificar seu metabolismo secundário pela adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . O aparecimento de bandas se mostrou mais pronunciável quando foram analisados os extratos provenientes do micélio. Verifica-se também que as modificações ocorreram em concentrações superiores a 1,9 g/L.

Ao analisarmos a variação da concentração de  $\text{NH}_4\text{Br}$  no crescimento de *Penicillium brasilianum*, observamos que ocorreram mudanças similares quando foram testadas as concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . As modificações ocorreram na mesma faixa de polaridade (de 15 a 30 minutos), como observadas na Figura 14. Os cromatogramas referentes às modificações metabólicas quando adicionadas variadas concentrações de  $\text{NH}_4\text{Br}$  são mostrados na Figura 15.

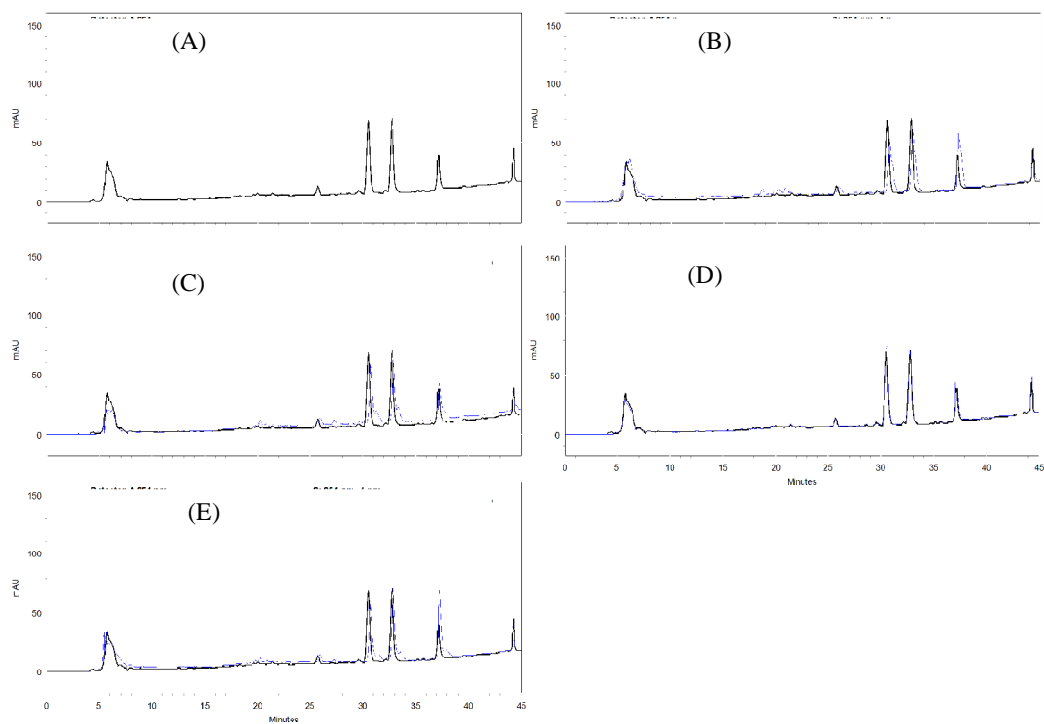


Figura 15: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E). (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Monitoramento em 254 nm.

Os cromatogramas são mostrados na Figura 16, quando os extratos obtidos do meio líquido foram analisados.

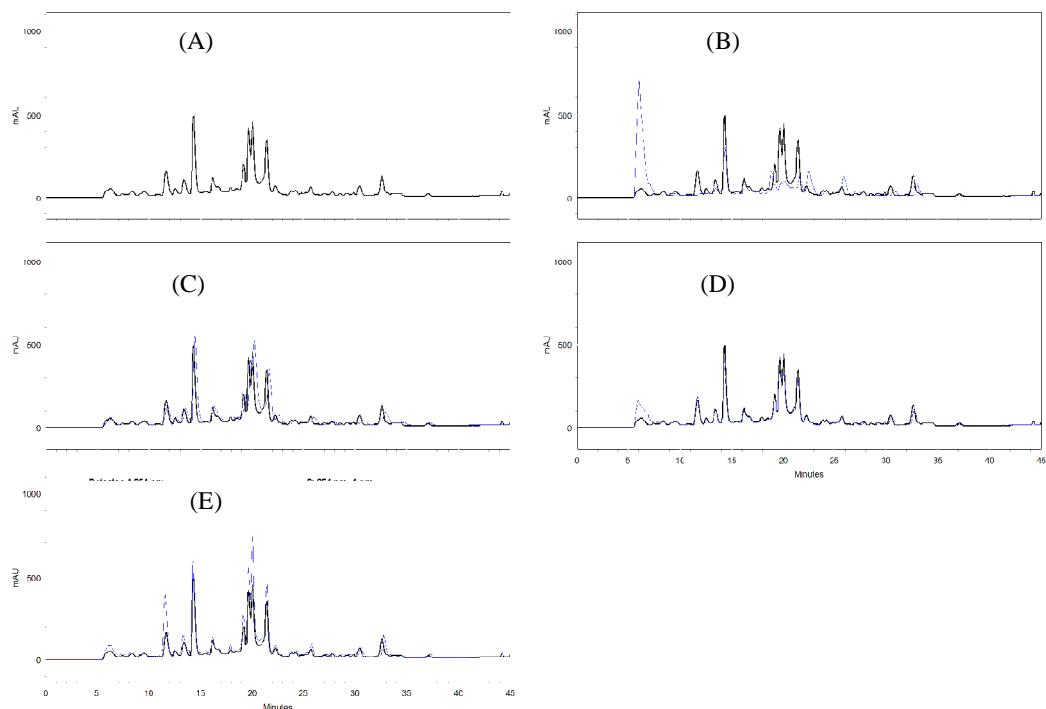


Figura 16: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E). (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Monitoramento em 254 nm.

As mudanças metabólicas ocorreram preferencialmente nos experimentos de adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  a partir de 6,5 g/L. Nas concentrações restantes testadas, não foram observadas modificações no metabolismo secundário, no aumento ou diminuição da intensidade de bandas cromatográficas já relatadas como substâncias já produzidas pelo fungo.

Para os experimentos de adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultivo de *Penicillium brasilianum* foram observadas pequenas modificações decorrentes dos cromatogramas analisados e decidiu-se então realizar um cultivo em larga escala para uma análise mais minuciosa e um possível isolamento dos metabólitos relacionados às modificações metabólicas.

#### 4.1.2 VARIAÇÃO DE SAIS CONTENDO O ÂNION CLORETO.

O experimento de variação de sais halogenados fixando o ânion cloreto mostrou um crescimento micelial diferenciado, tanto em sua massa micelial formada quanto na morfologia apresentada para cada sal. A Figura 17 apresenta a morfologia do crescimento do microorganismo e a visualização do meio de cultura, onde não houve o crescimento do mesmo.

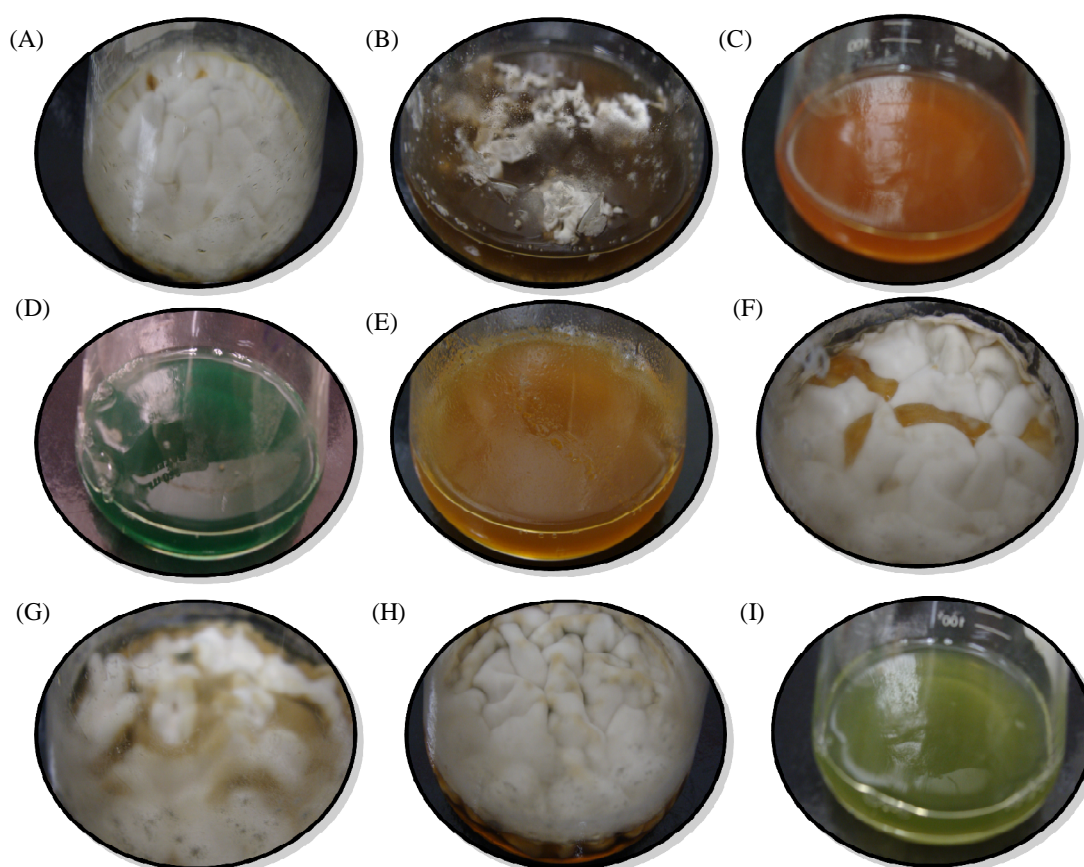


Figura 17: Comparação do perfil morfológico do controle com a variação dos sais quando foram adicionados ao meio: (A) Controle, (B)  $\text{CaCl}_2$ , (C)  $\text{CoCl}_2$ , (D)  $\text{CuCl}_2$ , (E)  $\text{FeCl}_3$ , (F)  $\text{KCl}$ , (G)  $\text{MgCl}_2$ , (H)  $\text{NaCl}$ , (I)  $\text{NiCl}_3$ , respectivamente, na concentração de 19 g/L.

##### 4.1.2.1 ESTUDO DA TOLERÂNCIA DO CRESCIMENTO MICELIAL.

Após 15 dias de crescimento, foi realizado o estudo de medida da massa micelial para estudos da tolerância do fungo com relação à adição



dos sais halogenados. A partir das medidas foi obtido o gráfico representado na Figura 18.

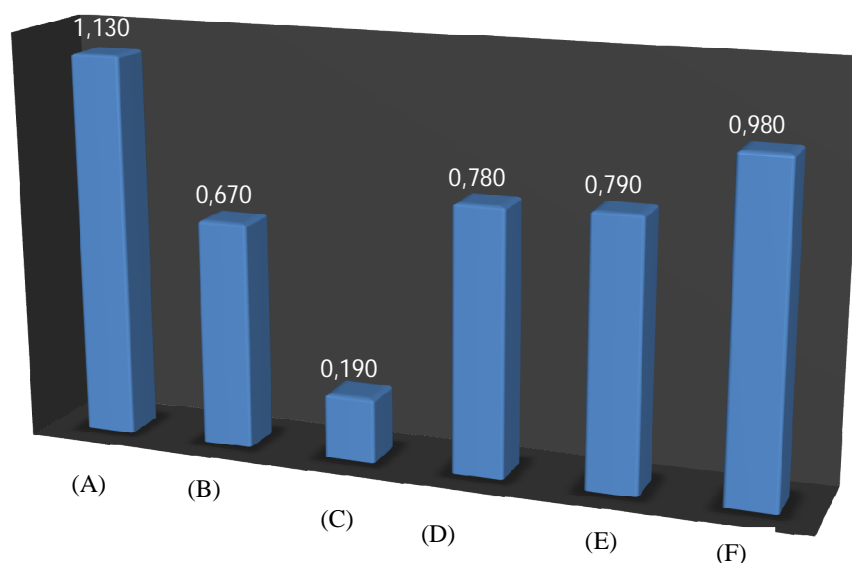


Figura 18: Gráfico do crescimento micelial em gramas, de *Penicillium brasilianum* com a adição de alguns sais. (A) controle, (B) CaCl<sub>2</sub>, (C) FeCl<sub>3</sub>, (D) KCl, (E) NaCl e (F) MgCl<sub>2</sub>.

De acordo com o gráfico acima, observa-se uma inibição do crescimento do fungo quando foram adicionados ao meio de cultura os sais contendo o ânion cloreto. Este menor crescimento pode ser explicado pela alta concentração de sais utilizada nos experimentos, principalmente quando se utiliza alguns cátions que devem ser utilizados em concentrações baixas, conhecidos como elementos traços essenciais ao crescimento de organismos. Isto pode ser inferido, pois quando foi adicionado NH<sub>4</sub>Cl até a concentração de 19 g/L houve um aumento da massa micelial, mostrando que a presença de íons cloreto não interferem no crescimento.

#### **4.1.2.2 ANÁLISES POR HPLC/PDA DO EXPERIMENTO COM A VARIAÇÃO DOS CÁTIOS NO MEIO DE CULTURA.**

Com relação ao perfil cromatográfico, foram realizadas análises iniciais por HPLC/PDA para verificar possíveis modificações metabólicas. As figuras abaixo mostram os cromatogramas do experimento.

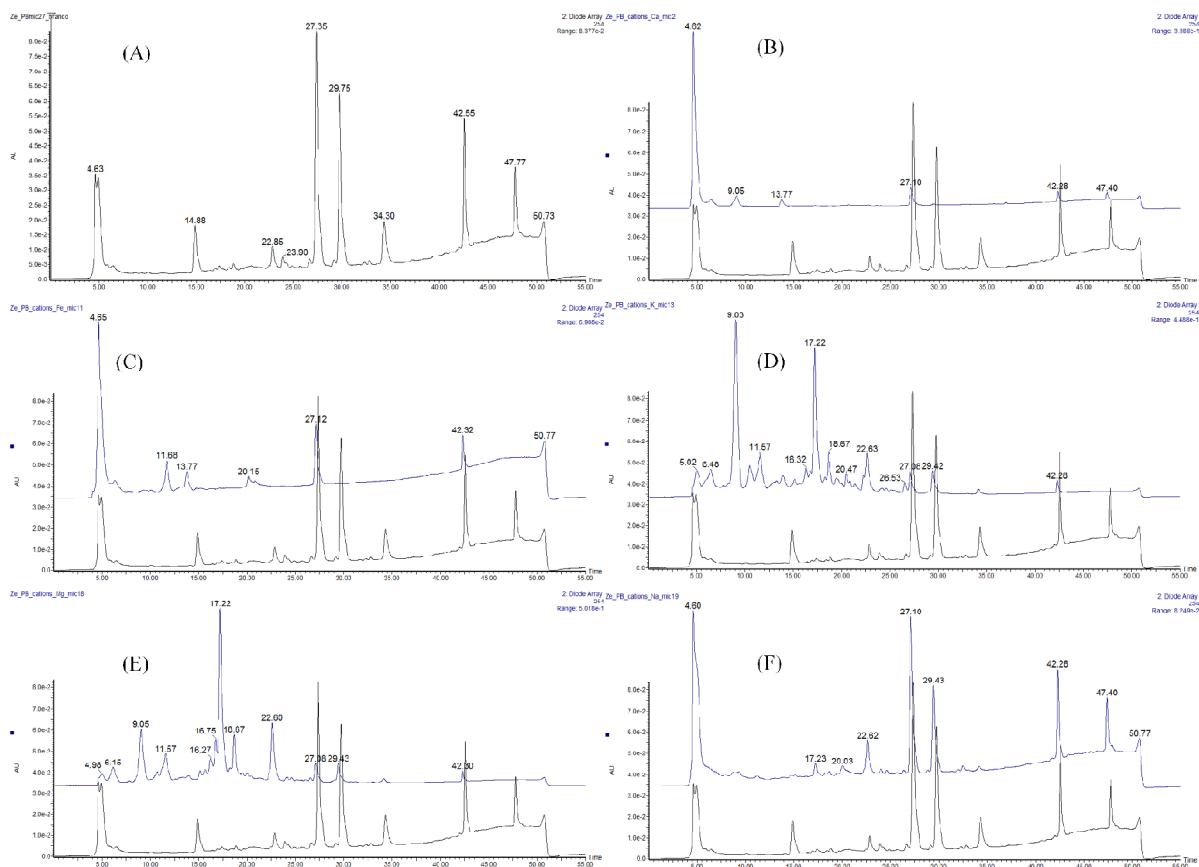


Figura 19: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de sais variando o cátion ao meio de cultura: Ca (B), Fe (C), K(D), Mg (E) e Na (F). (----). Monitoramento em 254 nm.

Observa-se nos cromatogramas comparados ao controle uma diferenciação no metabolismo secundário muito interessante ao utilizarmos NaCl, FeCl<sub>3</sub> e MgCl<sub>2</sub>. Aparentemente as bandas que surgiram com a adição dos sais não estão relacionadas com a presença de íons cloreto no meio, mas sim pela presença do cátion, visto que estas não possuem o mesmo tempo de retenção para o mesmo método cromatográfico.

Os cromatogramas para a análise do meio líquido são mostrados na Figura 20.

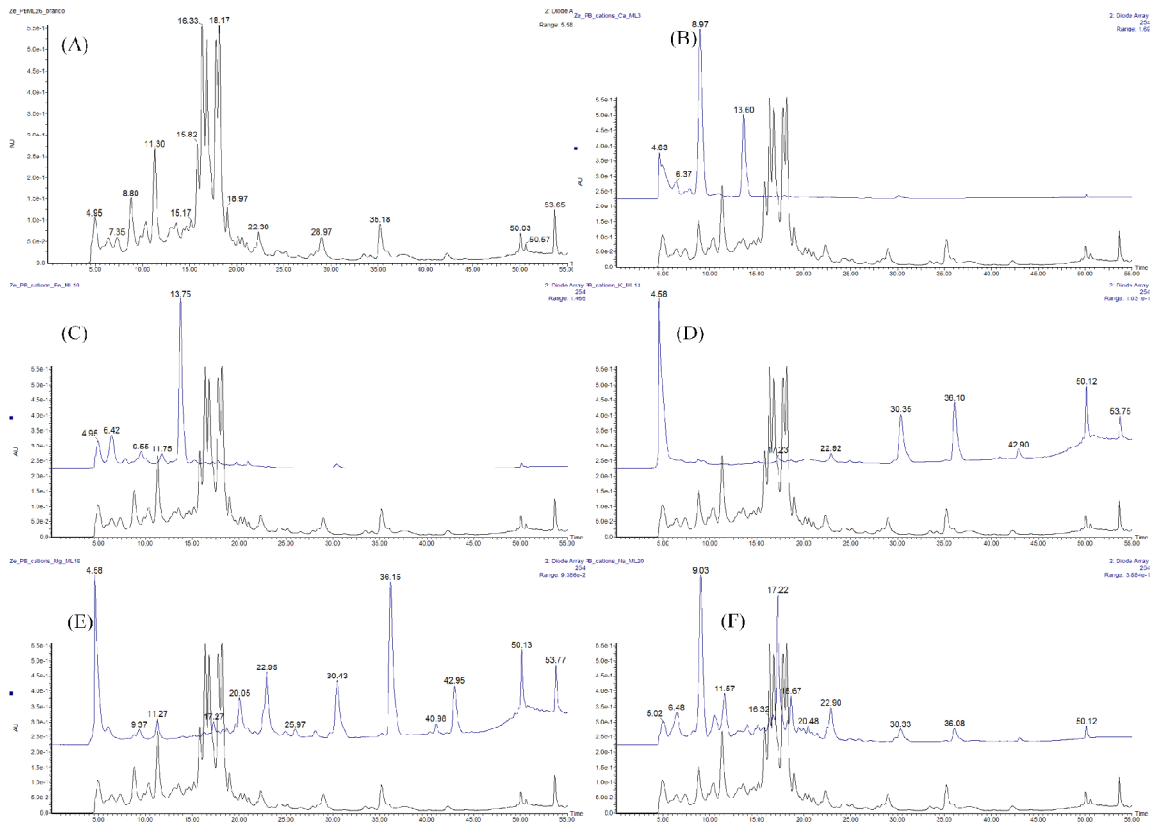


Figura 20: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de sais variando o cátion ao meio de cultura: Ca (B), Fe (C), K(D), Mg (E) e Na (F). (----). Monitoramento em 254 nm.

Diferentemente dos cromatogramas de UV obtidos para o micélio, percebe-se alguma semelhança entre os tempos de retenção das bandas para alguns extratos, como a banda cromatográfica em 13 minutos para  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ . Se este fato for comprovado, provavelmente a presença de íons cloreto no meio líquido ativou algum sistema enzimático capaz de utilizar este íon como algum tipo de cofator para a biossíntese de algumas moléculas, ou a presença de íon cloreto apenas causou um “stress” no microorganismo, levando à produção de metabólitos secundários responsáveis pela defesa do mesmo. Como podemos observar, não houve o crescimento micelial quando foram utilizados como suplementos os sais contendo os cátions  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Ni}^{3+}$ . Entretanto, é mostrado na

Figura 20 que houve modificação no metabolismo secundário de *Penicillium brasilianum* quando adicionado ao meio de cultura  $\text{FeCl}_3$ , mesmo não havendo o crescimento aparente do microorganismo.

A concentração utilizada neste experimento foi de 19 g/L para todos os sais. A inibição do crescimento quando adicionados os suplementos pode estar relacionada com a concentração utilizada dos mesmos. Tsuyuki *et al.*,(2011) mostrou que a adição de  $\text{CoCl}_2$  em uma concentração inferior a 30  $\mu\text{M}$  levou a uma maior produção de 3-acetildeoxinivalenol sem haver o aumento de massa micelial e produção de ergosterol em *Fusarium graminearum*.

A presença de cloreto de cobalto aumentou a concentração de mRNA dos genes responsáveis pela produção destes metabólitos (*Tri4*, *Tri6* relacionados à formação dos tricotecenos e *HMGS* e *HMGR* relacionados à rota do mevalonato). (TSUYUKI, *et. al.*, 2011)

### **4.1.3 ADIÇÃO DE SAL MARINHO RED SEA<sup>®</sup>.**

#### **4.1.3.1 ANÁLISE POR HPLC/PDA.**

Após a obtenção dos extratos do micélio e do meio líquido nas concentrações já estabelecidas no item X foram realizadas as análises iniciais por HPLC/DAD, cujos cromatogramas são mostrados na Figura 21.

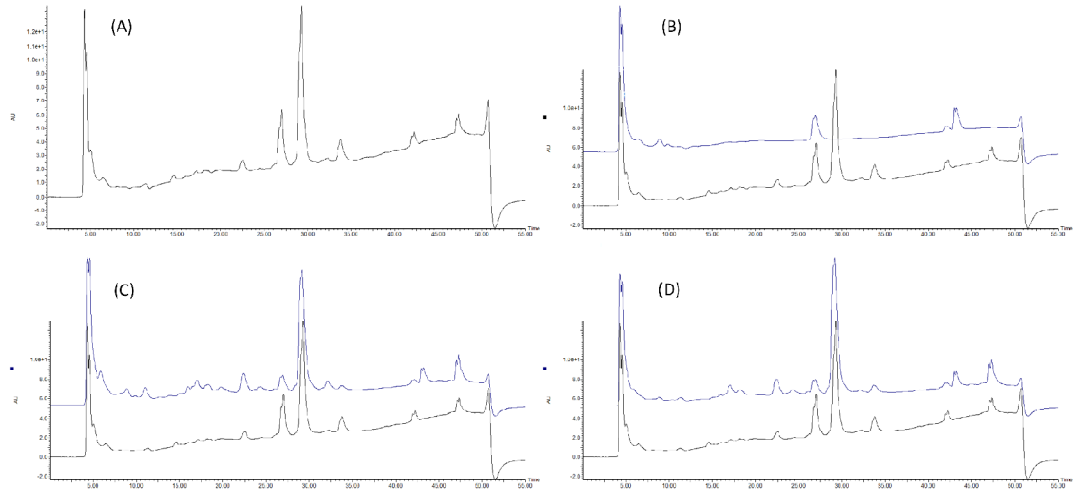


Figura 21: Cromatogramas do micélio do controle (A) comparados com a adição de sal marinho RED SEA<sup>®</sup> ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 165 g/L (B), 33 g/L (C) e 3,3 g/L (D) (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de sal marinho. Monitoramento em 254 nm.

Com relação ao meio líquido, os cromatogramas podem ser observados na Figura 22.

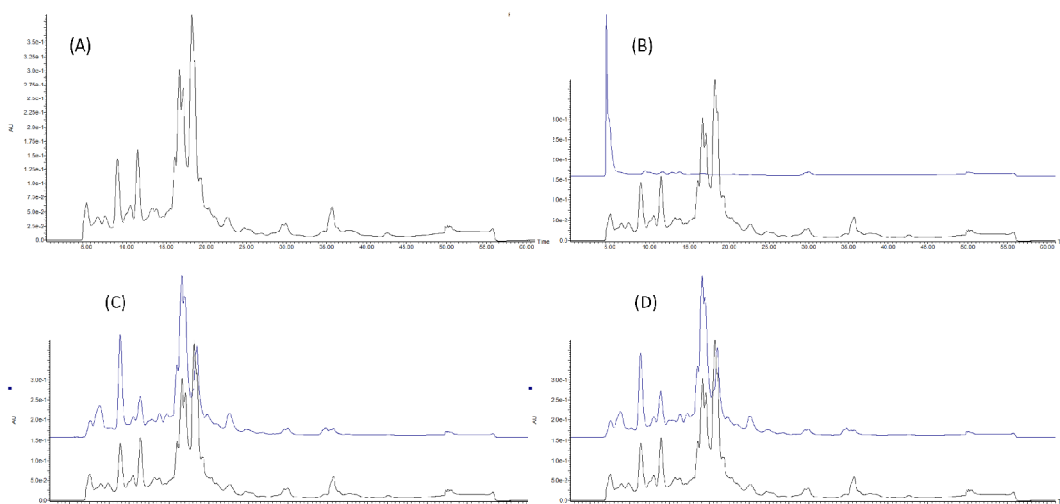


Figura 22: Cromatogramas do meio líquido do controle (A) comparados com a adição de sal marinho RED SEA<sup>®</sup> ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 165 g/L (B), 33 g/L (C) e 3,3 g/L (D) (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de sal marinho. Monitoramento em 254 nm.

Como se pode observar nos cromatogramas, as modificações no metabolismo secundário ocorridas com a adição de sal marinho ocorreram nos extratos obtidos do micélio. O surgimento de algumas bandas cromatográficas em regiões mais polares do cromatograma (10 a 25 minutos) mostra que algumas modificações nas rotas metabólicas possam ter ocorrido.

#### **4.1.4 ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS DE INTERESSE POR HPLC/UV EM ESCALA PREPARATIVA.**

#### 4.1.4.1 ISOLAMENTO EM LARGA ESCALA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS REFERENTES AO EXPERIMENTO DE ADIÇÃO DE $\text{CaCl}_2$ AO MEIO DE CULTURA.

Como citado no item 4.1.2.2, os experimentos com a variação dos cátions se mostraram bastante promissores com relação ao isolamento de metabólitos secundários diferenciados. O extrato com  $\text{CaCl}_2$  foi submetido ao isolamento por HPLC no modo preparativo, e o cromatograma obtido para este extrato é mostrado na Figura 23.

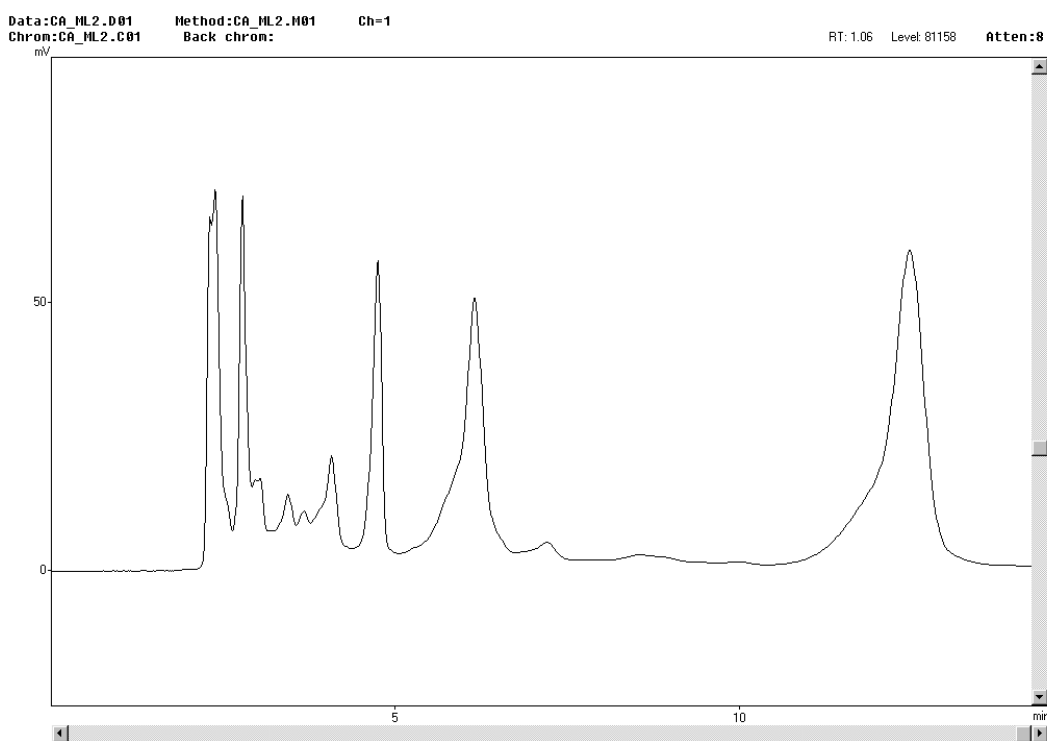
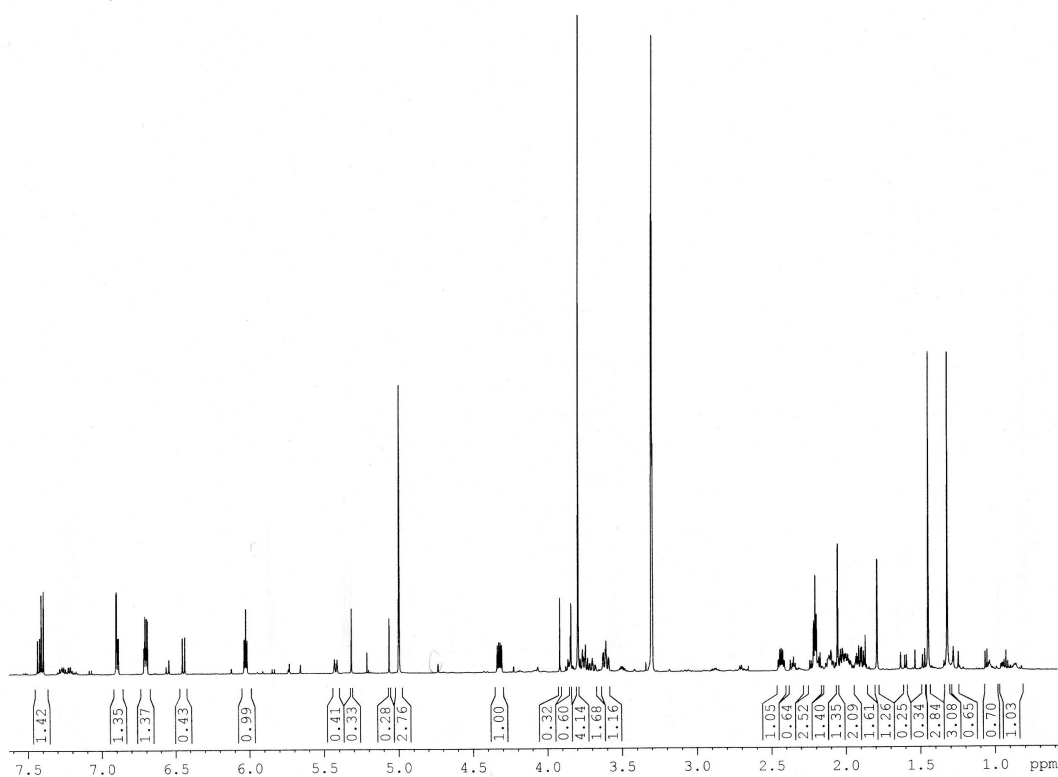


Figura 23: Cromatograma do extrato com adição de  $\text{CaCl}_2$ .

As bandas mostradas na figura acima foram recolhidas e analisadas por NMR e LC/MS. A banda em 4,78 minutos forneceu a substância **1**, isolada de *Penicillium brasilianum* quando  $\text{CaCl}_2$  foi adicionado ao meio de cultura.

#### 4.1.4.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 1.

A substância **1** foi obtida na forma de um sólido amarelado. O espectro de  $^1\text{H}$  NMR (Figura 24) apresentou sinais relacionados a hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,41 (1H, d,  $J = 9$  Hz), 6,89 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz) e 6,71 (1H, dd,  $J = 2,4$  e 9 Hz) sugerindo um anel trissubstituído. O experimento de HSQC mostrou as correlações com os seguintes carbonos:  $\delta$  7,41 – 119, 6,89 – 96 e  $\delta$  6,71 – 110. A Figura 25 mostra as correlações



de HMBC para os hidrogênios aromáticos.

Figura 24: Espectro de  $^1\text{H}$  para a substância **1**. (600 MHz, MeOD)



Pelo espectro de HMBC (Figura 25) foi possível verificar a correlação de um hidrogênio carbinólico em  $\delta$  5,1, que acopla com o  $\delta$  71 no HSQC, com os carbonos em:  $\delta$  136, 122, 109, e 89, de acordo com a Figura 26.

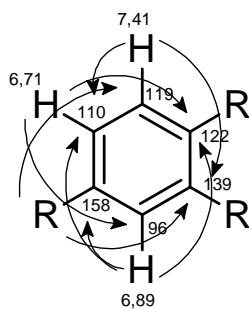
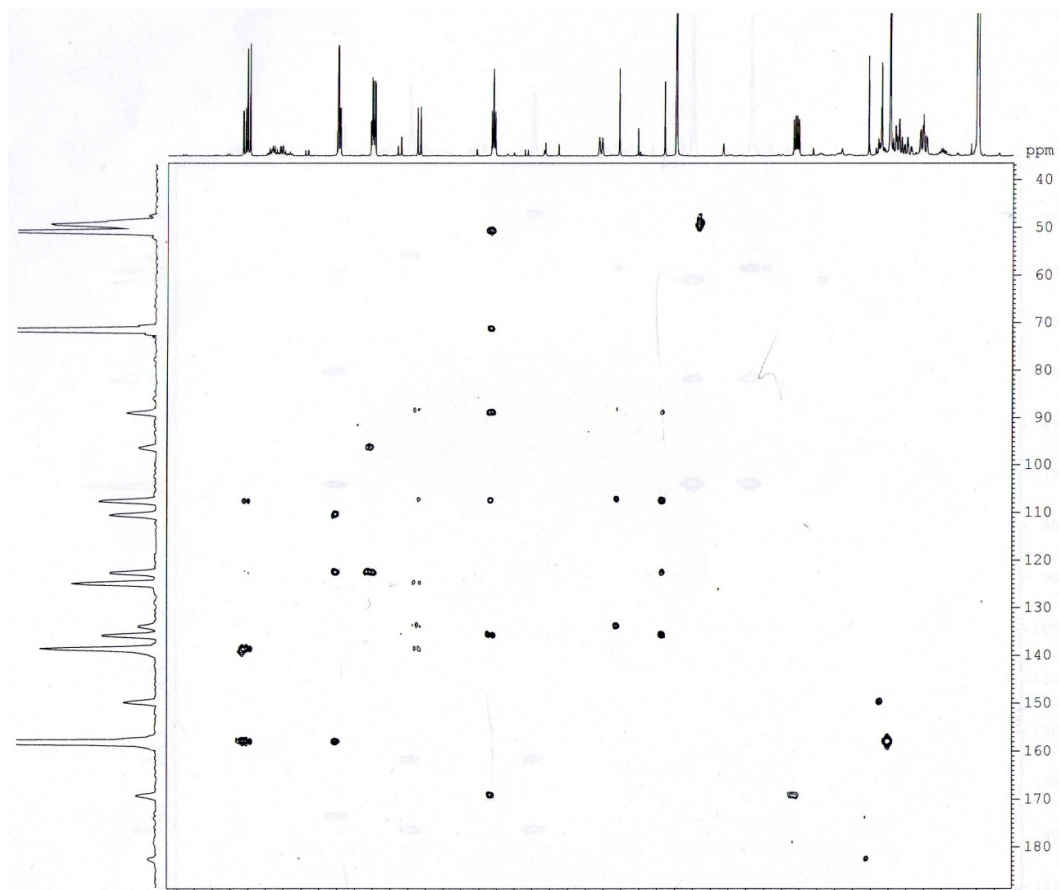


Figura 25: Espectro e correlações de HMBC para os hidrogênios aromáticos da substância **1**.

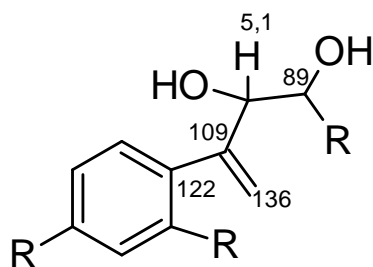


Figura 26: Correlações de HMBC para o grupo ligado ao anel aromático na substância **1**.

A presença de um sinal em  $\delta$  6,1 (1H, t,  $J = 5,4$  Hz) que no espectro de HSQC (Figura 27) acopla com um carbono em  $\delta$  47 e também no espectro de HMBC acopla com carbonos em  $\delta$  136, 109, 89, 71 e 50. Pelo espectro de HMBC observa-se o acoplamento de hidrogênios metílicos com um carbono carbinólico em  $\delta$  71, caracterizando uma unidade isoprenila hidroxilada.

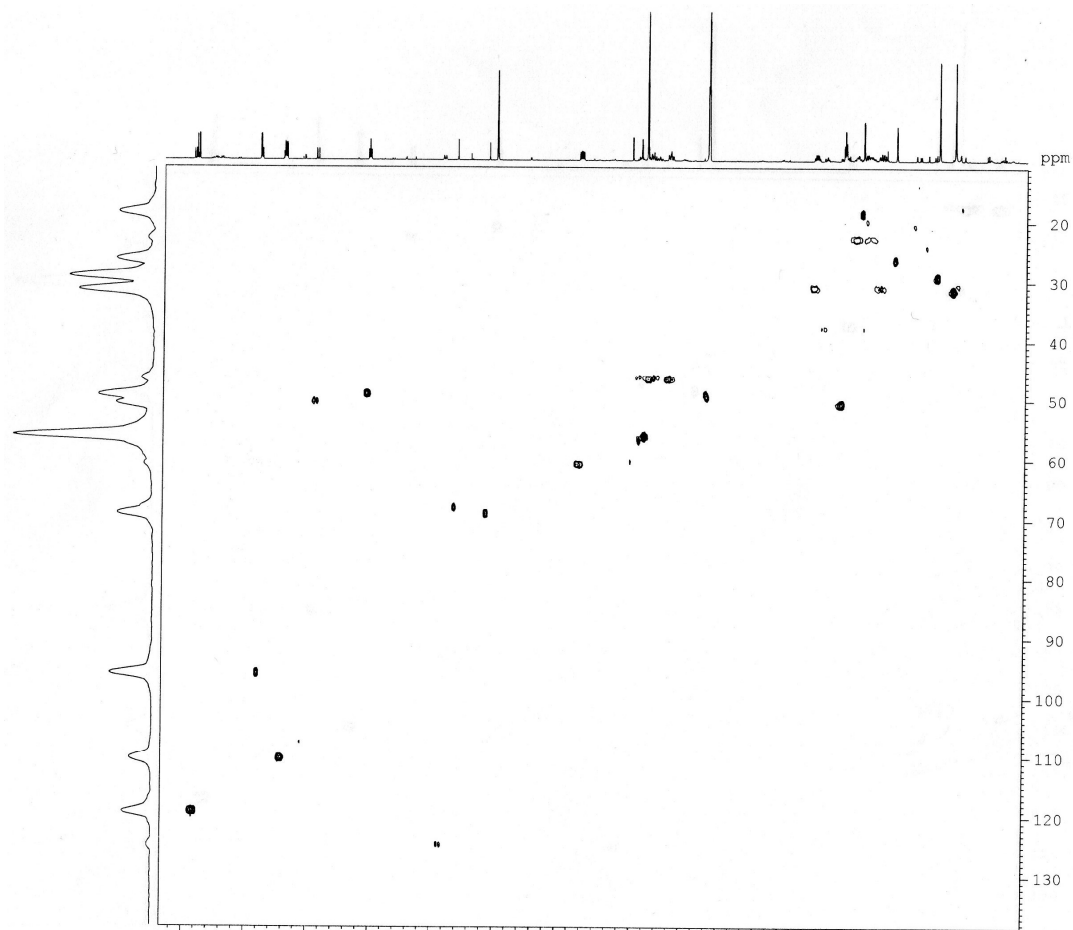


Figura 27: Espectro de HSQC da substância **1**.

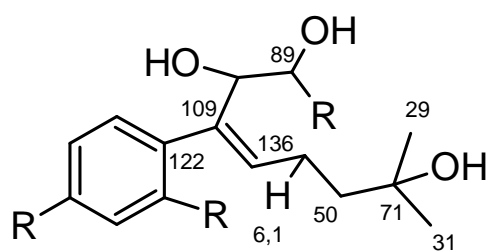


Figura 28: Correlações de HMBC para o grupo ligado ao anel aromático na substância **1**.

Análises por LC-MS/MS foram realizadas para esta amostra e o cromatograma de ultravioleta é mostrado na Figura 29.

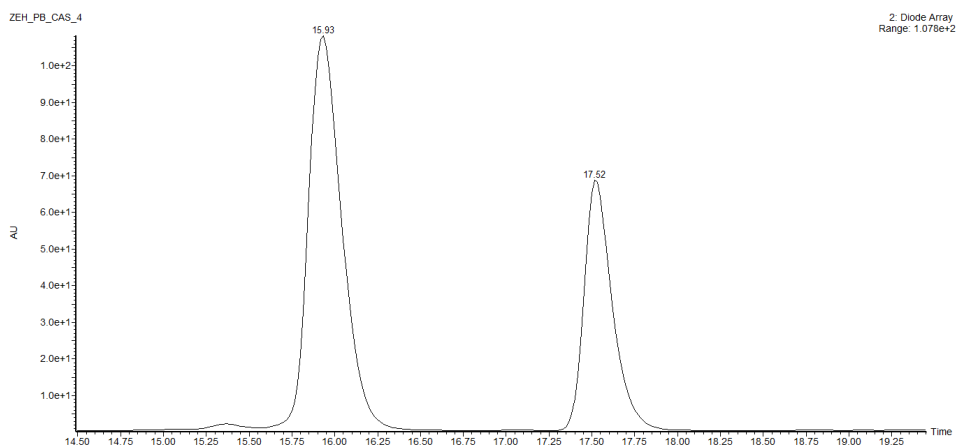


Figura 29: Cromatograma de UV da substância **1**.

Como observado na Figura 29, a substância **1** isolada não se encontrava totalmente pura e sim em uma mistura, possuindo uma substância majoritária. Os espectros de UV das duas bandas cromatográficas são mostrados abaixo, na Figura 30.

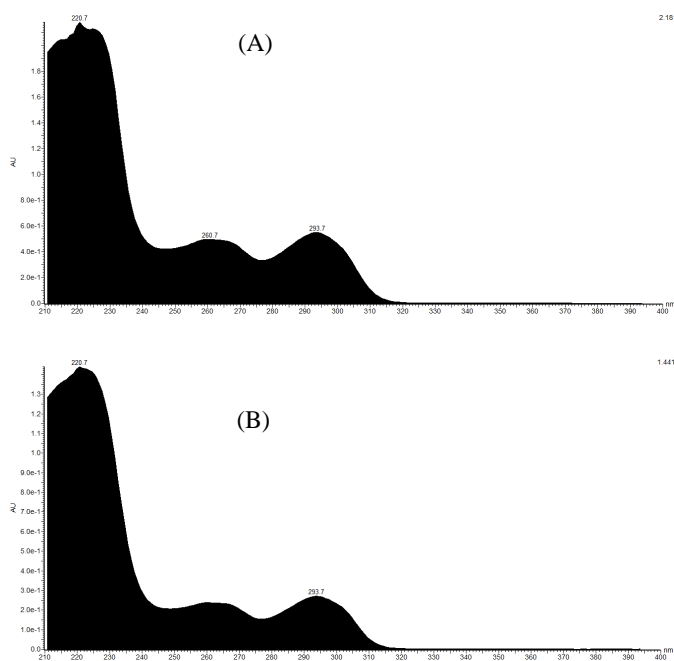


Figura 30: Espectros de ultravioleta para as substâncias com t.r. 15,30 (A) e 17,52 (B) minutos.

O espectro de massas no modo *full scan* é mostrado na Figura 29.

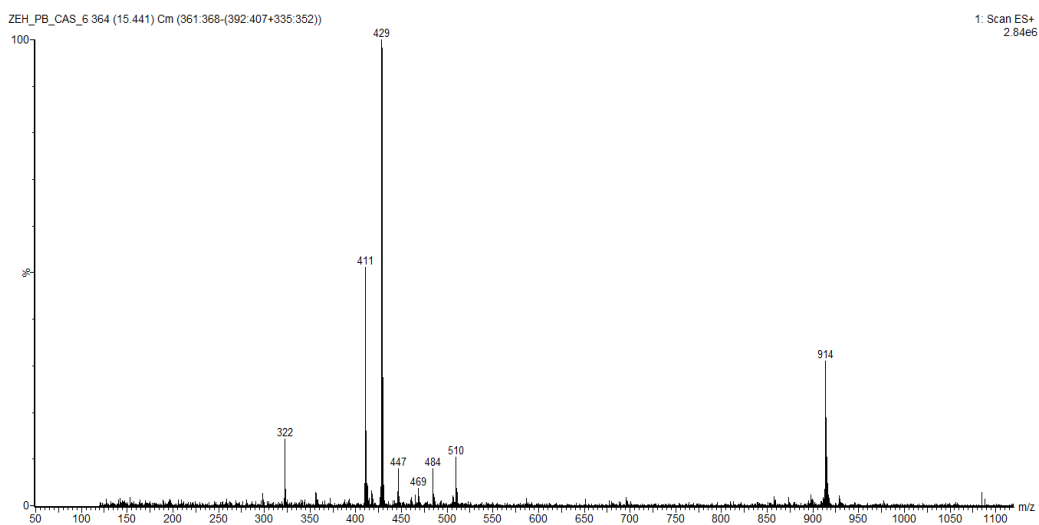


Figura 31: Espectro de massas no modo *full scan* para a substância 1.

De acordo com a Figura 31, observa-se o íon *quasi*-molecular em  $m/z$  430  $[M+H]^+$ , fornecendo a massa molecular (429 Da) da banda cromatográfica em 15,30 minutos. Como a massa é ímpar, existe um

número ímpar de átomos de nitrogênio na molécula. Assim, espera-se para a estrutura parcial que o grupo R ligado ao anel aromático seja na verdade um átomo de nitrogênio de uma unidade do aminoácido triptofano, o qual é muito usual para metabólitos secundários fúngicos, e que normalmente estão associados a núcleos dicetopiperazínicos. O esqueleto parcial da estrutura é mostrado na Figura 32.

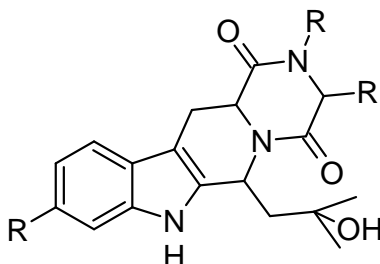


Figura 32: Esqueleto parcial para a substância **1**.

Pelo espectro de  $^1\text{H}$  NMR nota-se a presença de um sinal em  $\delta$  3,7 integrando para 3H, característicos de grupos metoxilas. Pelo HMBC encontra-se a correlação deste sinal com um em  $\delta$  158, caracterizando o terceiro grupo substituinte do anel aromático.

A partir daí, a diferença de massa entra a estrutura proposta até o momento e a massa observada de 429 Da é de 40 Da. Pelo espectro de HMBC é possível verificar a presença de sinais de hidrogênios metilênicos acoplado entre si e com carbonos carbonílicos e carbonos ligados a grupamentos amida. Assim, a estrutura proposta para a substância **1** é mostrada na Figura 33.

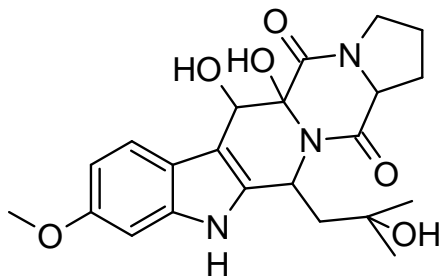


Figura 33: Estrutura proposta para a substância **1**.

Outros metabólitos secundários isolados de *Penicillium brasilianum* apresentam o núcleo, os quais são alcalóides pertencentes à classe dos alcalóides tremorgênicos, a qual verruculogenina é um exemplo desta classe.

Este metabólito, conhecido como verruculogenina TR-2 já foi isolado de *Penicillium brasilianum* (FILL, submetido), não sendo considerado um metabólito secundário procedente dos experimentos de modificação metabólica. Esta substância é facilmente detectada em experimentos sem adição de suplementos de cultura, entretanto a segunda substância de  $m/z$  428 não é encontrada no controle, sendo um possível metabólito oriundo dos experimentos de modificação metabólica.

A substância **1** apresentava uma mistura cujos espectros de UV eram idênticos, revelando que possivelmente os dois metabólitos fossem da mesma classe de produtos naturais. O espectro de massas para a banda cromatográfica em 17,52 minutos apresentou o íon *quasi*-molecular em  $m/z$  428  $[M+H]^+$ , mostrando uma diferença de duas unidades de massa para a outra banda cromatográfica.

Nas análises dos íons fragmentos realizadas por LC-MS/MS (Figura 34) verificou-se uma diferença de duas unidades de massas em alguns dos fragmentos gerados pelo equipamento.

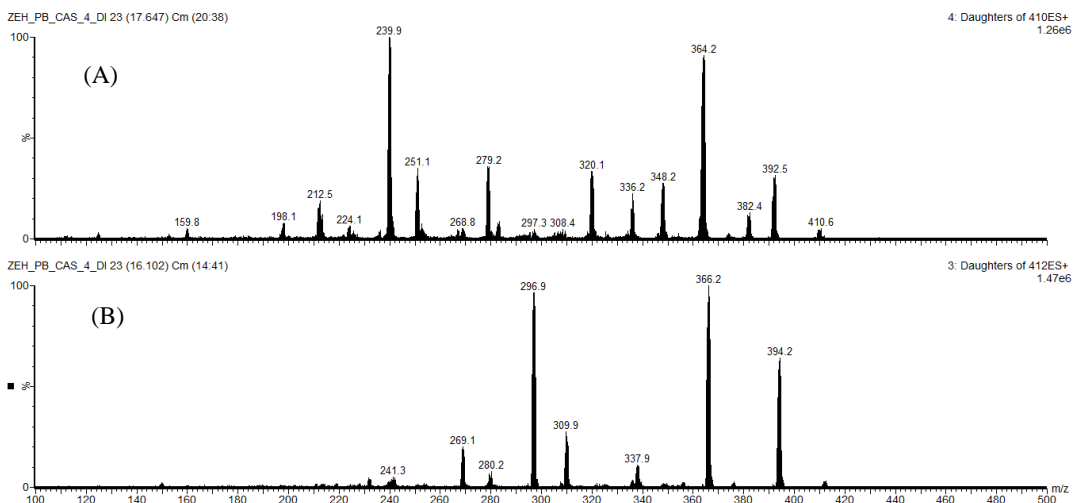


Figura 34: Espectro de íons fragmentos para a substância com  $m/z$  428 (A) e  $m/z$  430 (B).

Pelos espectros de NMR em 1D e 2D não foi possível detectar qual seria a estrutura deste segundo metabólito, uma vez que desta mistura a substância majoritária seria a a verruculogenina TR-2 (substância **1**). Algumas propostas para a determinação da diferença de duas unidades de massa entre as duas substâncias podem ser feitas com base no espectro de ultravioleta. Como não houve modificações na absorção na região do ultravioleta, não seria possível ocorrer o deslocamento dos grupos cromóforos, ou até mesmo a inserção de novos grupos que comprometam o espectro de absorção eletrônica. Portanto, não seria possível ocorrer reduções nos carbonos  $\alpha$  ao esqueleto dicetopiperazínico. Uma possível explicação seria a modificação no grupo isoprenila hidroxilado. Pela diferença de somente duas unidades de massa, pode-se propor a formação de um grupo epóxido na prenila, fazendo com que seja possível a formação de  $m/z$  428 e não haja modificações no espectro de ultravioleta. Para que se confirme a modificação ocorrida de apenas duas unidades de massa, deve-se isolar a substância resultante dos experimentos de modificação



metabólica e, assim realizar análises por NMR e LC-MS para determinação completa da nova estrutura produzida por *Penicillium brasilianum*.

#### 4.1.5 ANÁLISE, ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS POR LC-SPE-NMR.

##### 4.1.5.1 ANÁLISE E ISOLAMENTO DO EXTRATO CONTENDO $\text{FeCl}_3$ AO MEIO DE CULTURA.

O extrato do meio líquido relacionado às modificações metabólicas contendo  $\text{FeCl}_3$  foi analisado pela técnica de LC-SPE-NMR. A Figura 35 mostra o cromatograma de UV obtido para esta amostra.

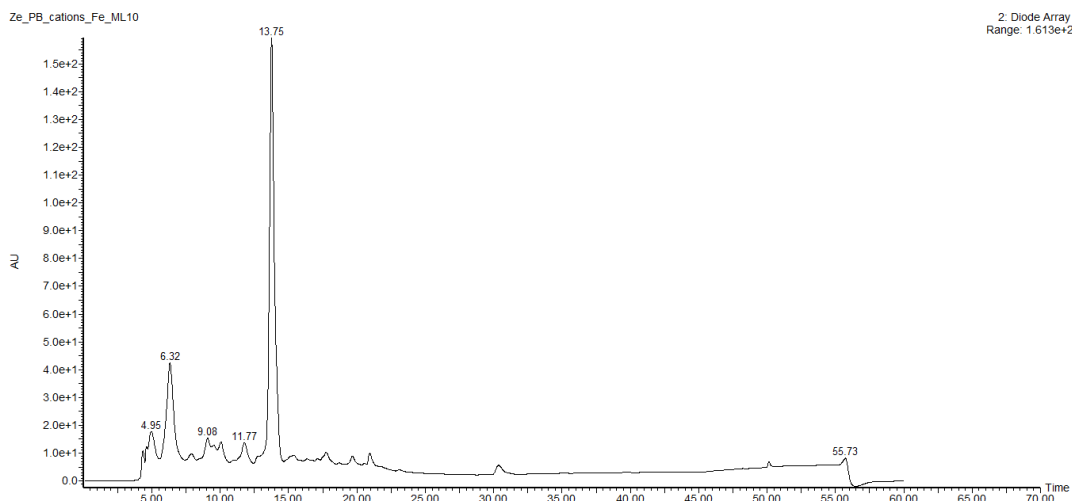


Figura 35: Cromatograma da amostra relacionada ao experimento de variação dos cátions no meio de cultura contendo  $\text{FeCl}_3$ . Monitoramento em 254 nm.

##### 4.1.5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 2.

Após o trapeamento e eluição da banda de interesse (13,75 minutos) (substância 2), esta foi analisada por NMR 1D e 2D. A Figura 36 mostra seu espectro de  $^1\text{H}$  NMR.

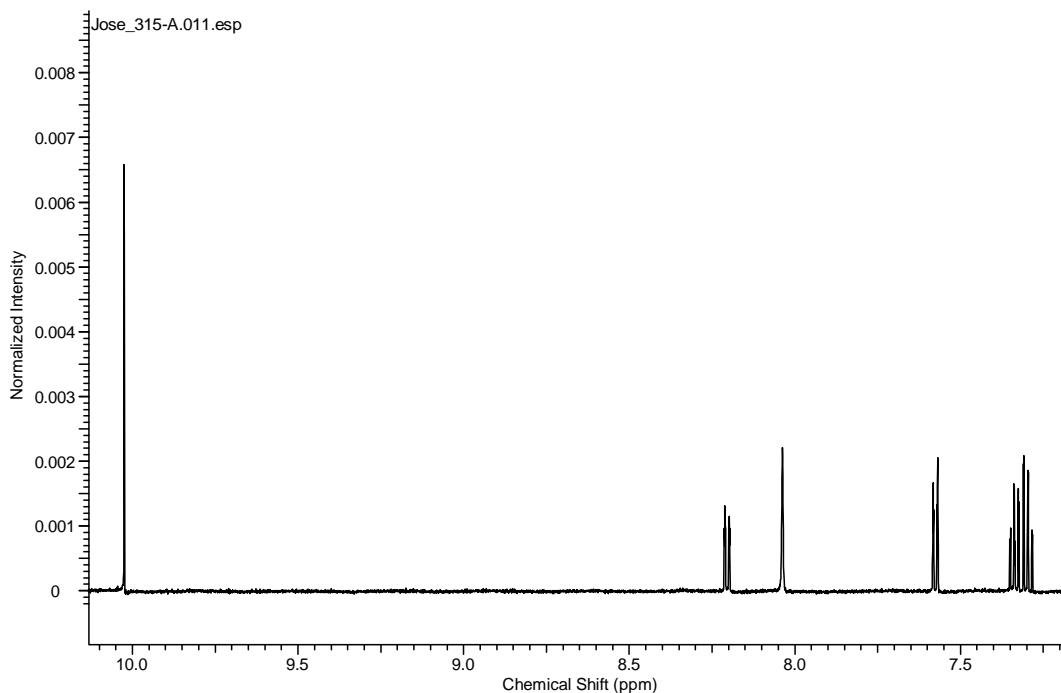


Figura 36: Espectro de  $^1\text{H}$  NMR da banda recolhida pelo sistema LC-SPE (substância **2**).

De acordo com o espectro de hidrogênio, foram observados sinais somente na região a partir de  $\delta$  7, região característica de hidrogênios aromáticos e hidrogênios ligados a grupos retiradores de elétrons. Pela integração, há somente cinco átomos de hidrogênio na molécula. Seus deslocamentos químicos são: d 9,9 (1H, s), 8,17 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz), 8,01 (1H, s), 7,54 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz), 7,30 (1H, dt,  $J = 1,2$  e 6,9 Hz) e 7,26 (1H, dt,  $J = 1,2$  e 6,9 Hz)

Analisando os espectros de HSQC (Figura 37), foram correlacionados os seguintes sinais:  $\delta$  8,17 – 122;  $\delta$  7,54 – 113;  $\delta$  7,30 – 125;  $\delta$  7,26 – 123. As correlações de HMBC são mostradas na Figura 38. Estas correlações mostram que há um anel aromático dissubstituído.

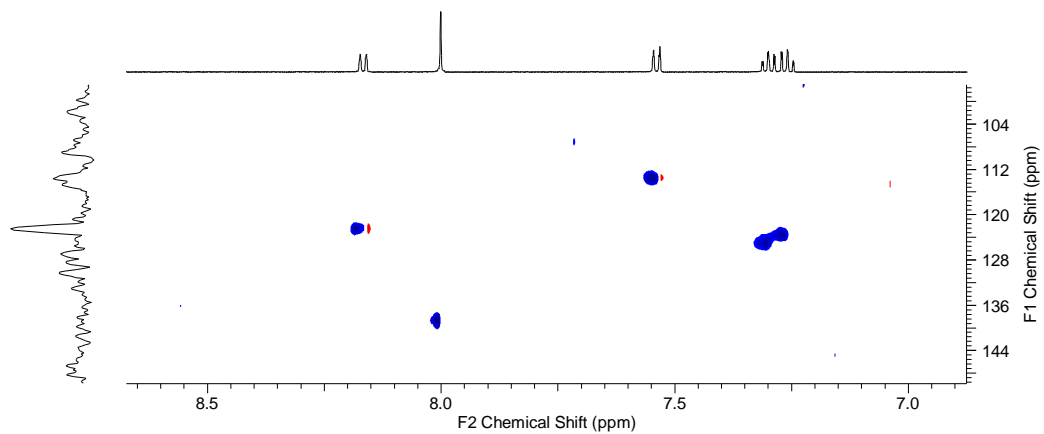


Figura 37: Espectro de HSQC para a substância **2**.

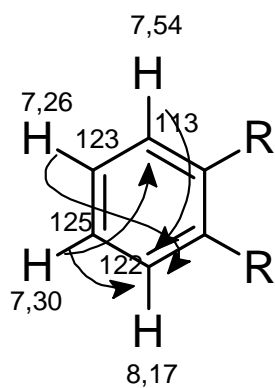


Figura 38: Correlações de HMBC para parte da estrutura da substância **2**.

O espectro de HMBC é mostrado na Figura 39.

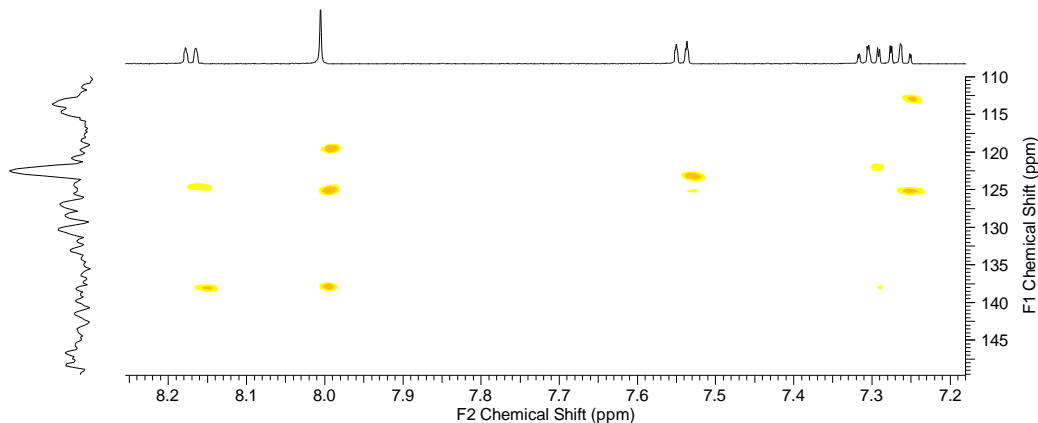


Figura 39: Espectro de HMBC da substância **2**.

Nos espectros de NMR em 2D, não foi possível obter mais correlações para esta substância. Sendo assim, foram realizados experimentos de LC/MS para verificar qual seria a massa do composto. A Figura 40 mostra o espectro de massas no modo *full scan* para a substância **2**.

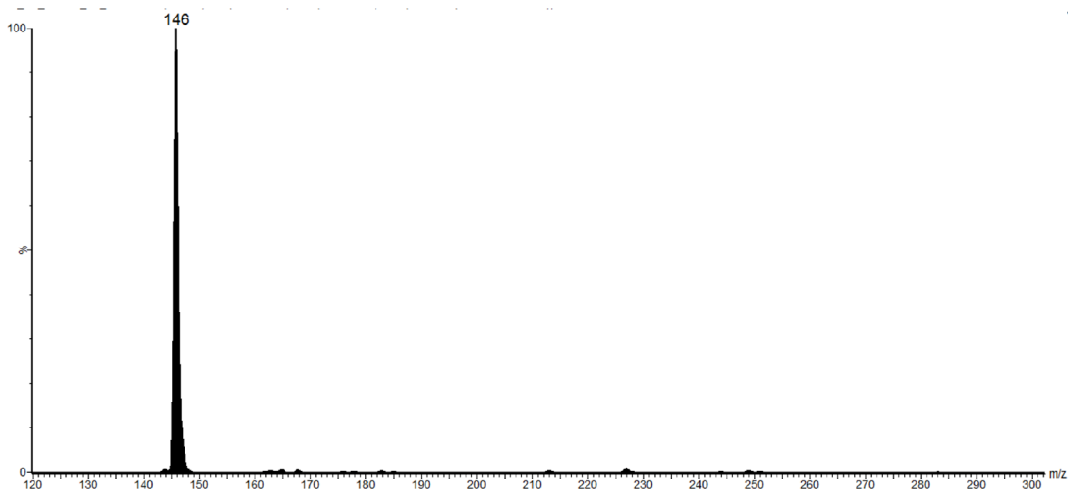


Figura 40: Espectro de massas no modo full scan para a substância **2**.

De acordo com o íon obtido,  $m/z$  146, a massa sendo ímpar é possível um dos átomos presentes na molécula seja de nitrogênio. Como os outros sinais ainda eram muito desblindados, foi proposta a seguinte estrutura parcial, de acordo com a Figura 41.

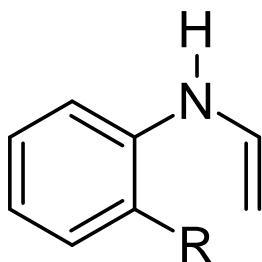


Figura 41: Estrutura parcial para a substância **2**.

Os outros dois sinais de hidrogênio foram atribuídos da seguinte maneira: N-H  $\delta$  9,9 (1H, s) e  $\delta$  8,01 (1H, s) para o carbono  $\alpha$  ao nitrogênio.

Na literatura, há relatos de alcalóides do tipo quinolínicos (ALBARICI, 2010; SHAO, 2010) que possuem um esqueleto básico como o apresentado na Figura 42.

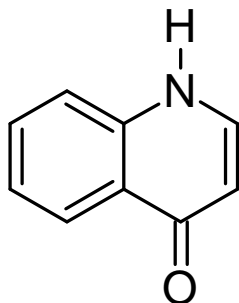


Figura 42: Metabólito secundário da classe dos alcalóides quinolínicos.

Assim, a substância **2** possui o mesmo esqueleto básico dos alcalóides quinolínicos. Uma diferença da substância isolada (**2**) de *Penicillium brasilianum* seria a ausência de sinais de hidrogênio  $\alpha$  a carbonila. Uma possível substituição deste átomo seria pela presença de um grupo carboxila, que possivelmente não foi detectado nos experimentos de LC-MS devido à sua fácil descarboxilação. A estrutura do alcalóide quinolínico (substância **2**) isolado de *P. brasilianum* é mostrada na Figura 43.

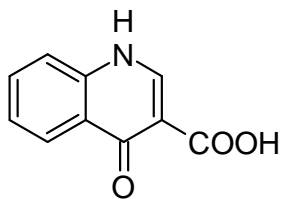


Figura 43: Estrutura proposta para o metil-4-oxo-dihidroquinolina-3-carboxilato (**2**).

SHAO (2010) relatou o isolamento da penicinolina de uma espécie endofítica de *Penicillium*, a qual possui atividade citotóxica. O composto metil-4-oxo-dihidroquinolina-3-carboxilato foi isolado também como possível precursor da penicinolina, cuja estrutura é mostrada na Figura 44.

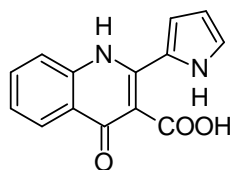


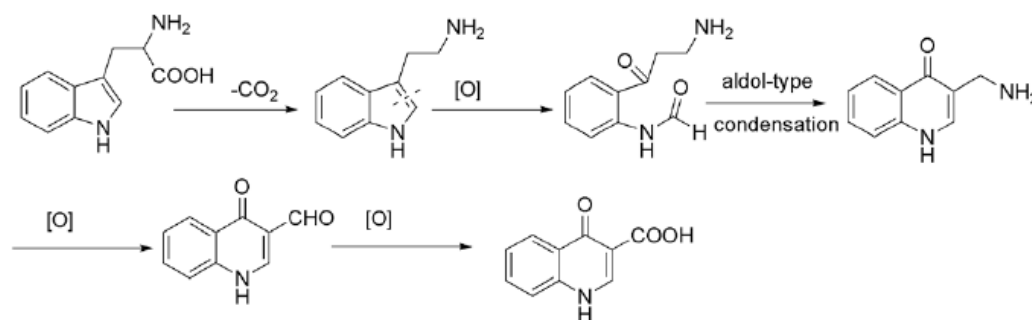
Figura 44: Estrutura da penicinolina, isolada de uma espécie endofítica de *Penicillium*.

A comparação entre os dados do alcalóide isolado e a mesma estrutura simulada pelo programa ACDLab são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Comparação entre os dados de  $^1\text{H}$  NMR da substância **2** com uma simulação.(ACD Labs HNMR)

Posição	Substância <b>2</b> ( $\delta$ )	Simulação ( $\delta$ )
2	8,01 (1H, s)	8,50
5	8,17 (1H, d, $J = 7,8$ Hz),	8,38
6	7,30 (1H, dt, $J = 1,2$ e $6,9$ Hz)	7,42
7	7,26 (1H, dt, $J = 1,1$ e $9,6$ Hz)	7,40
8	7,54 (1H, d, $J = 7,8$ Hz)	7,65

A proposta biossintética para os alcalóides quinolínicos é mostrada no Esquema 3.



Esquema 3: Proposta biossintética para a formação do esqueleto de alcalóides quinolínicos.

Até o momento, foram estudadas poucos extratos obtidos dos experimentos de modificação metabólica com *Penicillium brasilianum*. Estudos posteriores deverão ser realizados para descobrir a diversidade química oculta neste microorganismo.

## 4.2 *Penicillium griseoroseum*

### 4.2.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRODUZIDOS POR *Penicillium griseoroseum*.

Para que se possa estudar a abordagem OSMAC para modificação no metabolismo secundário de certos microorganismos, é necessário que se conheça então as substâncias produzidas pelo fungo a ser estudado.

Com relação ao endofítico *Penicillium griseoroseum* isolado dos frutos verdes de *Coffea arabica*, não há estudo químico de seu metabolismo secundário. Há na literatura um grande estudo de seu potencial biotecnológico para obtenção e uso de suas enzimas já conhecidas e descritas. Este trabalho também visa colaborar para um maior entendimento de suas micromoléculas e as rotas biossintéticas utilizadas pelo fungo para a produção das mesmas.

Inicialmente foram isolados os metabólitos secundários majoritários de *Penicillium griseoreoseum* para posteriores experimentos utilizando a abordagem OSMAC com este microorganismo.

Após as etapas de purificação dos extratos foram obtidas as substâncias **3**, **4** e **5**.

A substância **3** foi obtida como um pó amorfo amarelo. Seu espectro de  $^1\text{H}$  NMR apresentou somente singletos com deslocamentos químicos similares ao do produto natural identificado como clavatul (SILVA, *et. al*, 2010, como mostrado na Figura 45.



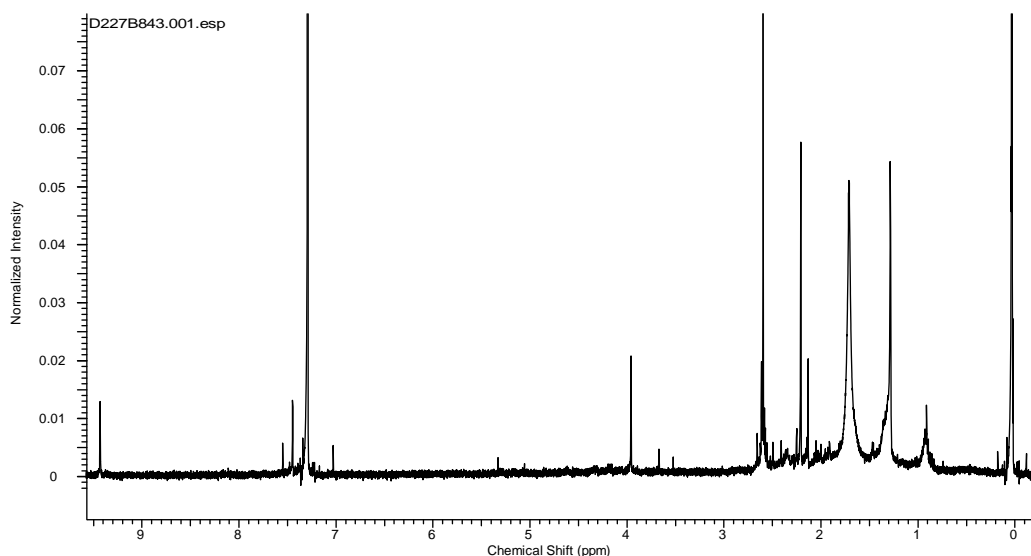


Figura 45: Espectro de  $^1\text{H}$  NMR da substância **3** (400 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ).

A diferença para o espectro do clavatul se dá na presença de sinais em  $\delta$  2,11 (3H) e  $\delta$  3,89 (2H). Os outros sinais 2,53 (3H, s, H-1), 7,38 (1H, s, H-8), 3,89 (2H, s, H-9), 2,15 (3H, s, H-10), 9,38 (1H, s, H-4'), 9,38 (1H, s, H-6') possuem o mesmo valor de  $\delta$  e a mesma multiplicidade para os sinais do clavatul, já isolado de *Penicillium griseoroseum* (SILVA, 2010). Pelo espectro de HSQC foram encontradas correlações entre  $\delta$  2,59 e  $\delta$  17,4,  $\delta$  3,89 e  $\delta$  31,4,  $\delta$  7,38 e  $\delta$  132,1, conforme a figura 46. Ao analisarmos **5** utilizando a técnica de LC/MS com o experimento de *full scan* foi observada uma massa de 343 no modo negativo, nos dando uma possível massa molecular de 344 Da. Pelo fato desta substância possuir sinais característicos do clavatul, esperava-se que esta possuísse uma massa molecular próxima da massa do clavatul. Então, ao realizar experimentos de LC/MS-MS foi obtido o espectro de íons produto, como mostra a Figura 47.

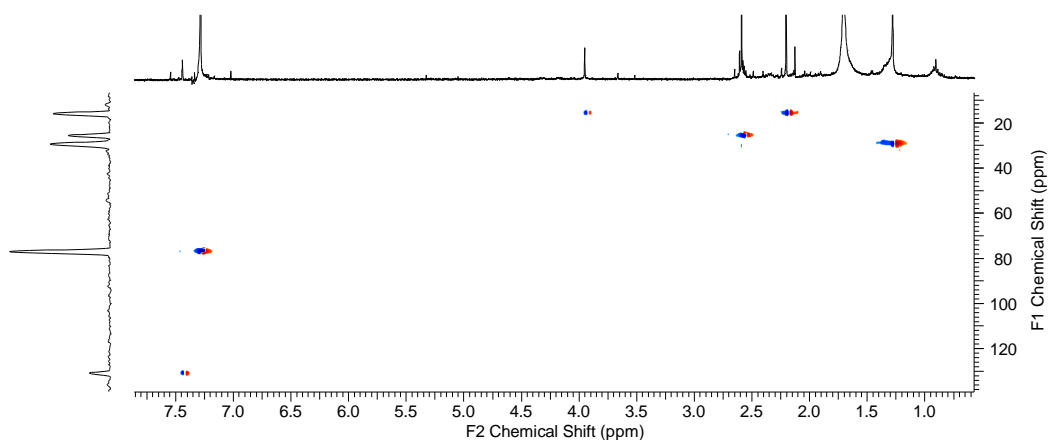


Figura 46: Espectro de HSQC para a substância **3**.

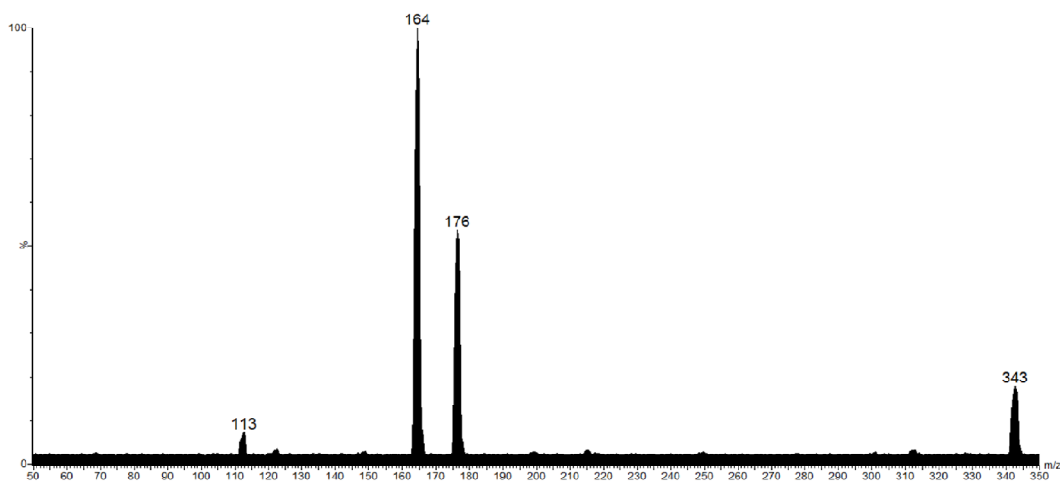


Figura 47: Espectro de íons produtos para a substância **3**.

De acordo com a figura acima, a partir da massa  $m/z$  343 foram obtidos dois fragmentos majoritários, que se aproximam da massa do clavatul ( $m/z$  176 e  $m/z$  164).

O espectro de HMBC e as correlações de HMBC são mostradas na Figura 48 e 49, respectivamente.

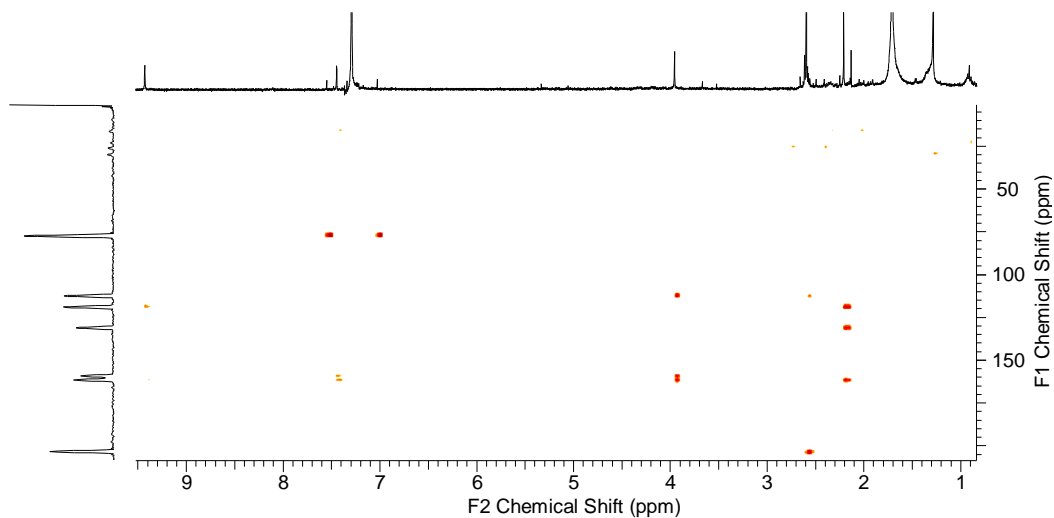


Figura 48: Espectro de HMBC da substância **3**.

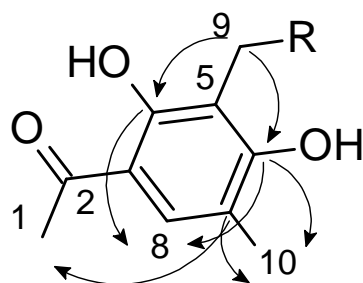


Figura 49: Correlações de HMBC para a substância **3**.

O íon de  $m/z$  343 se tornou um indício de que a substância isolada seria algum tipo de dímero do clavatul, pois ao ser fragmentada sua massa se aproximou à massa de um monômero do clavatul. Assim, a partir das informações obtidos dos experimentos de MS/MS e das correlações de HMBC e HSQC foi proposta a seguinte estrutura para a substância **3**, conforme visualizado na Figura 50.

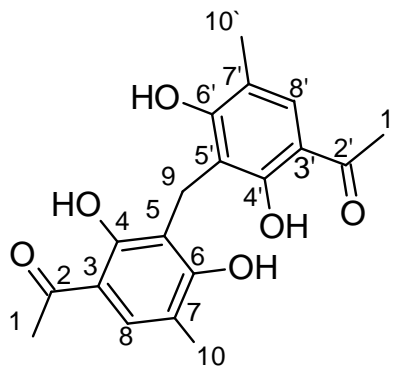
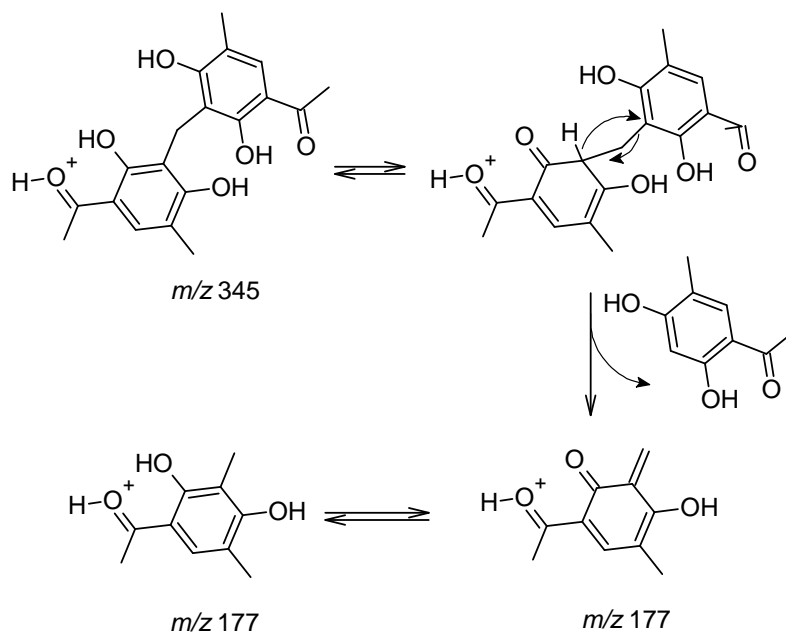


Figura 50: Estrutura proposta para a substância **3**.

Para comprovar a formação de um dímero do clavatul, que será chamado de diclavatul, é mostrado no Esquema 4 uma proposta de fragmentação para este íon.



Esquema 4: Proposta de fragmentação para o diclavatul.

Como se pode observar no Esquema 4, ocorre inicialmente a formação do enolato, desestabilizando o anel aromático, com conseqüente rearranjo do [1,3] de hidrogênio para a formação de  $m/z$  177, justificando a dimerização do clavatul por *Penicillium griseoroseum*.

Em outro trabalho realizado pelo grupo, foi constatada a biotransformação da 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavonona pelo mesmo microorganismo que foi capaz de adicionar ao flavonóide uma molécula de clavatul formando uma ligação C-C cujos mecanismos de formação ainda não são bem conhecidos (SILVA, 2010).

Do ponto de vista biossintético, clavatul é oriundo dos policetideos, sendo suas metilas C-9 e C-10 provenientes da enzima S-adenosilmetionina (SAM). A formação do diclavatul deve ocorrer com o ataque nucleofílico

de C-5' em C-9 quando este ainda não está transferido totalmente para a parte aromática. Isso só é possível se estas metilações ocorressem simultaneamente à ação da enzima poliketídeo sintase (PKS) com as moléculas de clavatul muito próximas dos sítios ativos das enzimas.

Esta dimerização é interessante do ponto de vista enzimático, pois como descrito pelo grupo a polimetoxi flavanona ou até mesmo outros substratos exógenos podem atuar como uma segunda unidade capaz de formar ligações C-C.

As outras substâncias isoladas identificadas como **4** e **5** apresentaram o aspecto de um pó branco. Foram realizados experimentos de NMR 1D e 2D como também análises por LC/PDA-MS e LC/PDA-MS/MS. A partir dos experimentos de  $^1\text{H}$  NMR obteve-se o espectro que é mostrado na Figura 51.

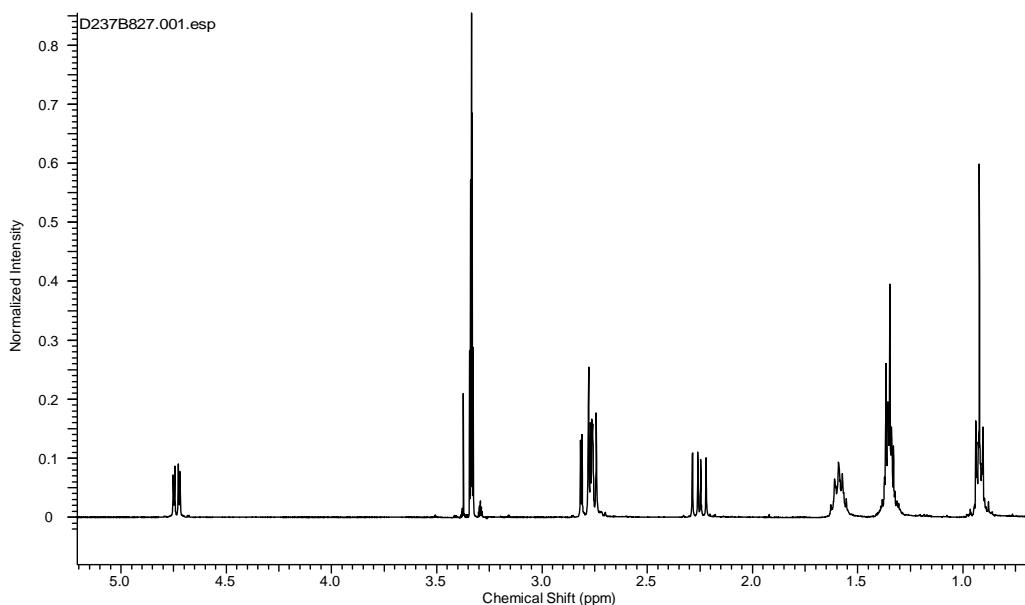


Figura 51: Espectro de  $^1\text{H}$  NMR para a substância **4** (400 MHz, MeOD).

Para esta molécula foram observados os seguintes sinais no espectro de hidrogênio:  $\delta$  4,70 (1H, dd,  $J = 3,2$  Hz e 10,4 Hz); 2,22 (2H, dd,  $J = 8$

Hz, 14 Hz, H-7), 1,55 (2H, m, H-8), 1,32 (4H, m, H-9, H-10), 0,90 (3H, t,  $J = 7$  Hz, H-11), 2,81 (1H, d,  $J = 3,2$  Hz, H-12a) e 2,76 (1H, m, H-12b).

Para o espectro de  $^{13}\text{C}$  foram observados sinais equivalentes a 12 átomos de carbono: 178,2 (C-2), 97,5 (C-3), 199,0 (C-4), 81,0 (C-5), 198,9 (C-6), 41,0 (C-7), 27,0 (C-8), 33,0 (C-9), 24,2 (C-10), 14,0 (C-11), 42,0 (C-12), 180,0 (C-13). A estes sinais podem ser atribuídos deslocamento químicos em regiões de carbonos metílicos, metilênicos, carbonílicos e carboxílicos.

De acordo com os sinais obtidos nos espectros de carbono e hidrogênio e das correlações de HSQC podemos verificar a presença de hidrogênios metílicos (H-11 e C-11), metilênicos (H-10 e C-10, H-9 e C-9, H-8 e C-8,),  $\alpha$ -carbonílicos (H-7 e C-7),  $\alpha$ -carboxílicos (H12a e H-12b e C-12) e hidrogênio de anel furano (H-5 e C-5). A presença de carbonos carbonílicos e carboxílicos também foram correlacionados no espectro de HSQC, conforme mostra a Figura 52.

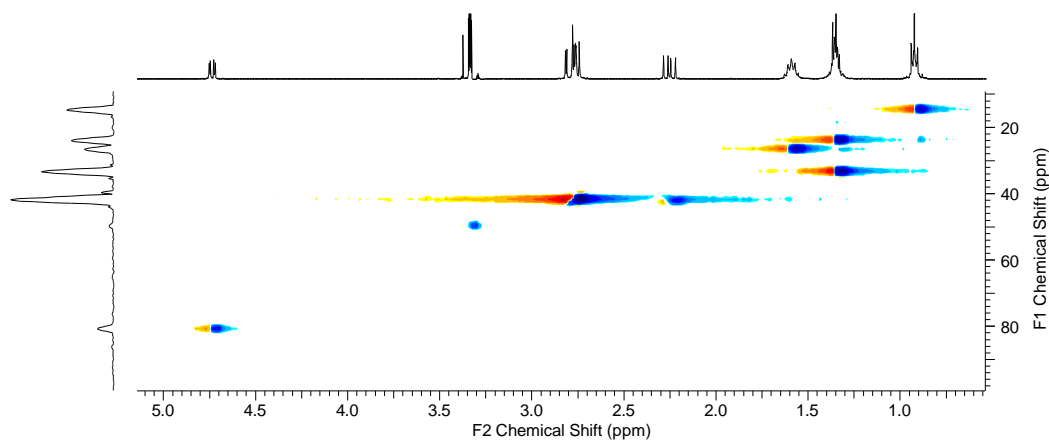


Figura 52: Espectro de HSQC da substância **4**.

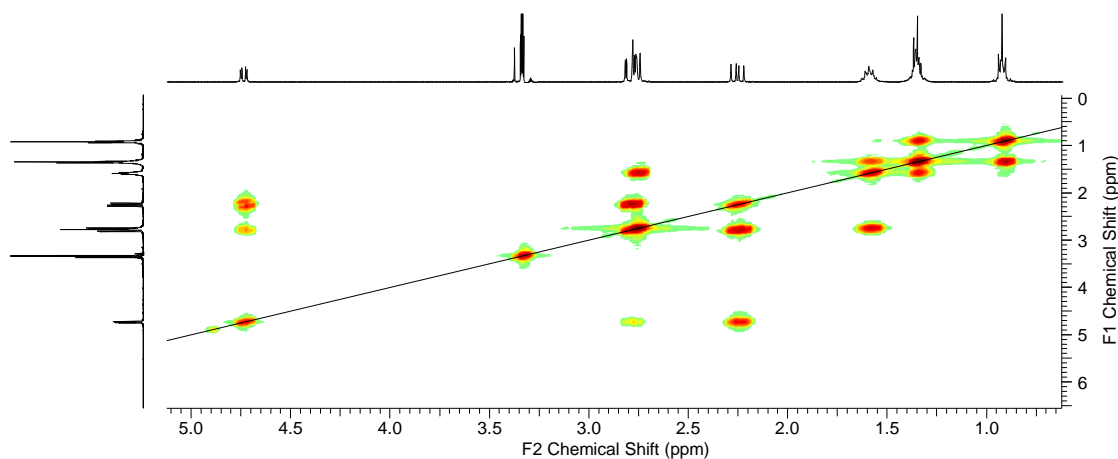


Figura 53: Espectro de COSY da substância **4**.

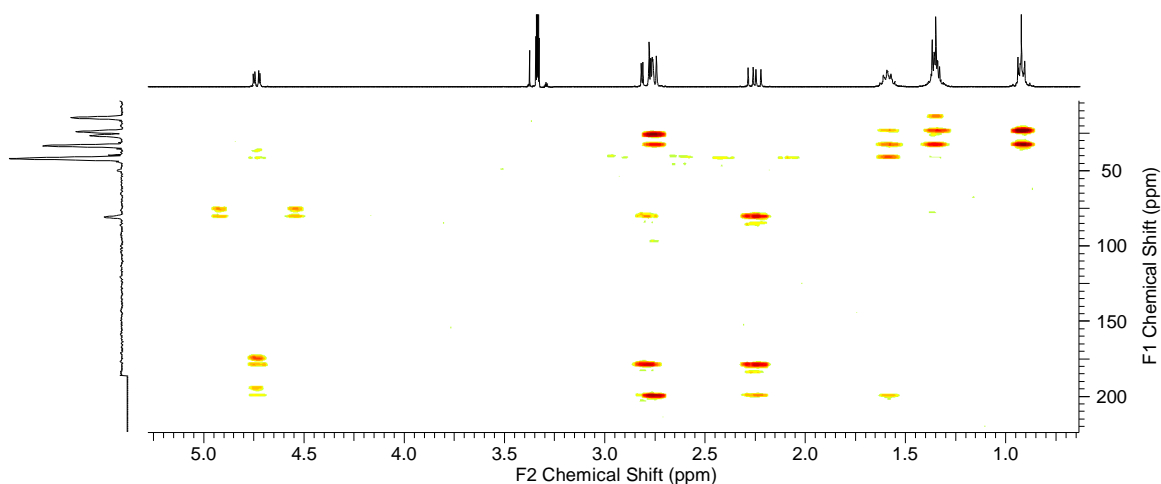


Figura 54: Espectro de HMBC da substância **4**.

A partir das correlações de HMBC podemos notar correlações entre hidrogênios diastereotópicos entre H-12a, H-12b e C-12, H-12a com C-3, C-5 e H-12b com C-2, C-3, C-5. H-12 se correlaciona também com C-6 devido a um acoplamento em W. Essas correlações e as correlações de COSY são mostradas na Figura 55.

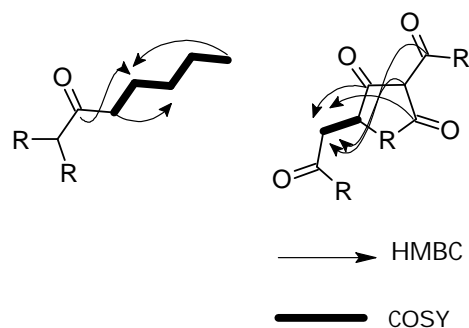


Figura 55: Correlações de COSY e HMBC para a substância **4**.

Para esta substância isolada foram realizados experimento de LC/MS e LC/MS-MS para se obter algumas mais informações estruturais deste composto. A figura 56 apresenta o espectro de *full scan* para o metabólito isolado e juntamente com seu espectro de ultravioleta.

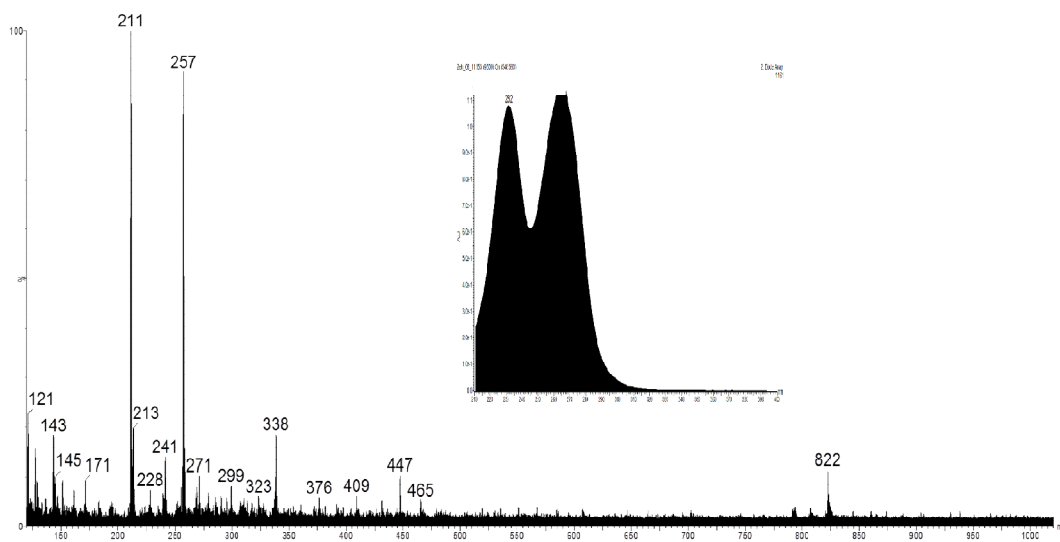


Figura 56: Espectro de massas *full scan* no modo positivo e espectro de ultravioleta para a substância **4**.

De acordo com o espectro de massas, podem-se observar duas possíveis massas para o metabólito isolado  $m/z$  257 e  $m/z$  211. De acordo com os dados de NMR atribuiu-se então para esta substância a massa de 256 Da.



O espectro de íons produtos para  $m/z$  257 mostrou uma perda de 18 Da, referente ao pico de  $[M+H-H_2O]^+$ . Também é possível notar a perda de 46 Da, referente a perda de  $CO_2$  e mais duas unidade de massa. Comprova-se então que a molécula possui um grupo carboxílico. A partir das informações acima, propõe-se a seguinte estrutura para o metabólito isolado na Figura 57, já descrito na literatura como ácido viridicático.

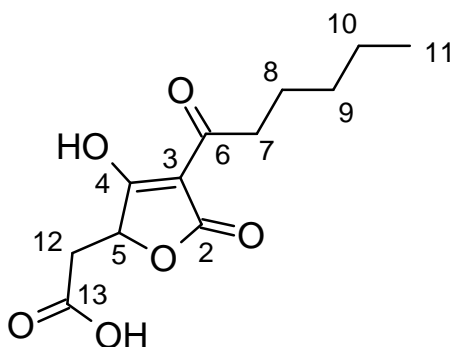


Figura 57: Estrutura proposta para a substância **4**.

O outro metabólito secundário isolado de *Penicillium griseoroseum* (substância **5**) possui um espectro de  $^1H$  NMR muito semelhante ao do ácido viridicático. Seu espectro de ultravioleta também possui as mesmas bandas de absorção nos mesmos comprimentos de onda característicos da substância **4** (232 e 267 nm).

Dos dados de  $^1H$  NMR, pode-se notar a presença dos sinais em 4,60 (1H, m, H-5), 1,45 (2H, m, H-7), 2,93 (2H, m, H-8), 3,47 (1H, m, H-9), 1,76 (1H, m, H-10a), 1,63 (1H, m, H-10b), 0,92 (3H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-11), 1,37 (3H, d,  $J = 6.8$  Hz, H-12). Nota-se diferença de sinais com relação a hidrogênios diastereotópicos (H-10a e H-10b) e a diferença de deslocamento químico no H-5.

Os dados de  $^{13}\text{C}$  NMR mostraram sinais referentes a somente 11 átomos de carbono: 176,0 (C-2), 97,1 (C-3), 202,3 (C-4), 79,2 (C-5), 201,5 (C-6), 31,5 (C-7), 36,3 (C-8), 74,0 (C-9), 33,5 (C-10), 11,4 (C-11), 17,9 (C-12).

Como para o ácido viridicático, nota-se a presença de hidrogênios e carbonos característicos com sinais metílicos, metilênicos,  $\alpha$ -carbonílicos, carbonos carbonílicos e característicos de um anel lactona, como citado para o metabólito **4**.

A diferença entre os dois compostos se dá na presença de um sinal em  $\delta$  3,47 referente à 1H no H-9, podendo este estar ligado a um carbono ligado a um grupo carbinólico. Outra diferença é notada no H-12 com  $\delta$  1,37 referente à 3H como sendo uma metila terminal.

As correlações de HMBC entre a cadeia acíclica e o anel furano foram também encontradas para a substância **7**, e a estrutura proposta é mostrada na Figura 58.

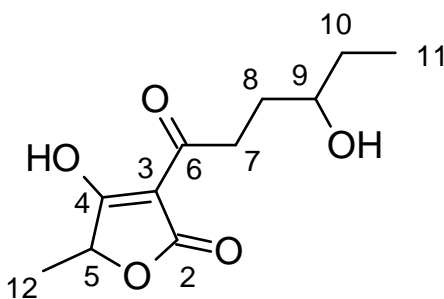


Figura 58: Estrutura proposta para a substância **5**.

Ao analisarmos os espectros de íons produtos para as substâncias **4** e **5**, observamos íons em comum para esta classe de metabólitos secundários. Os espectros e a proposta de fragmentação para esta classe são mostrados na Figura 58 e no Esquema 4.

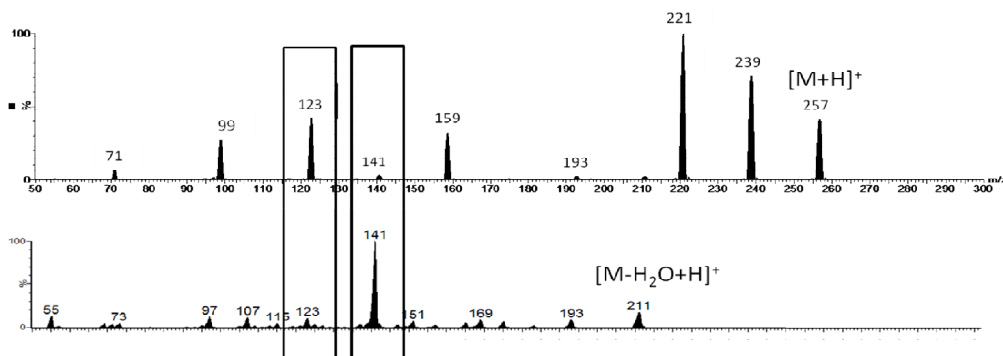
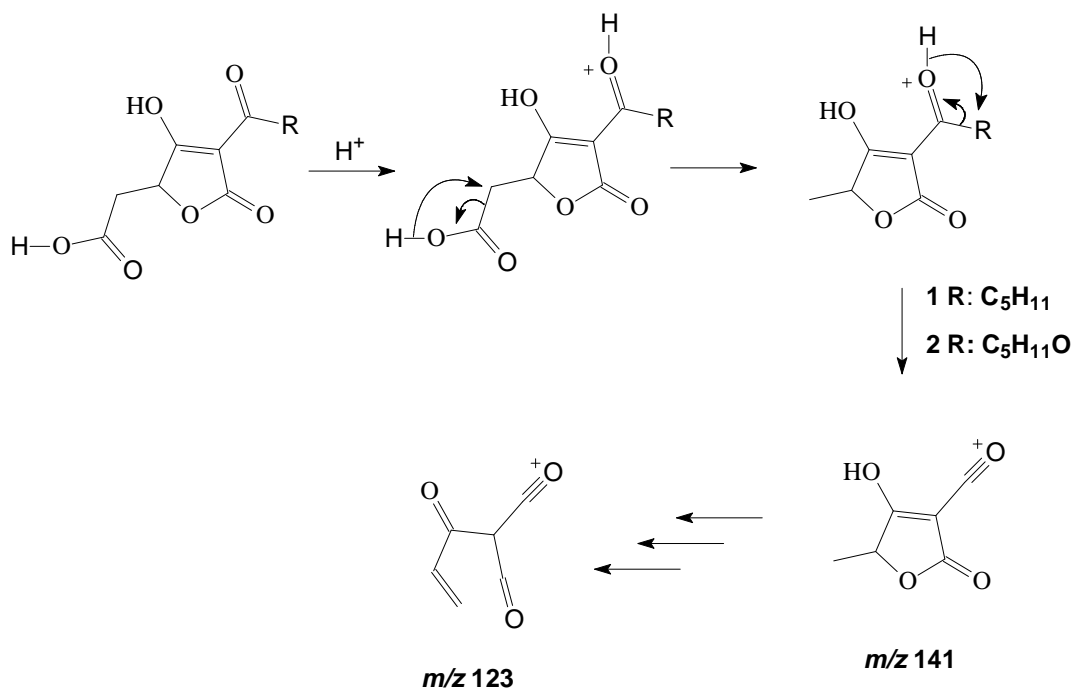


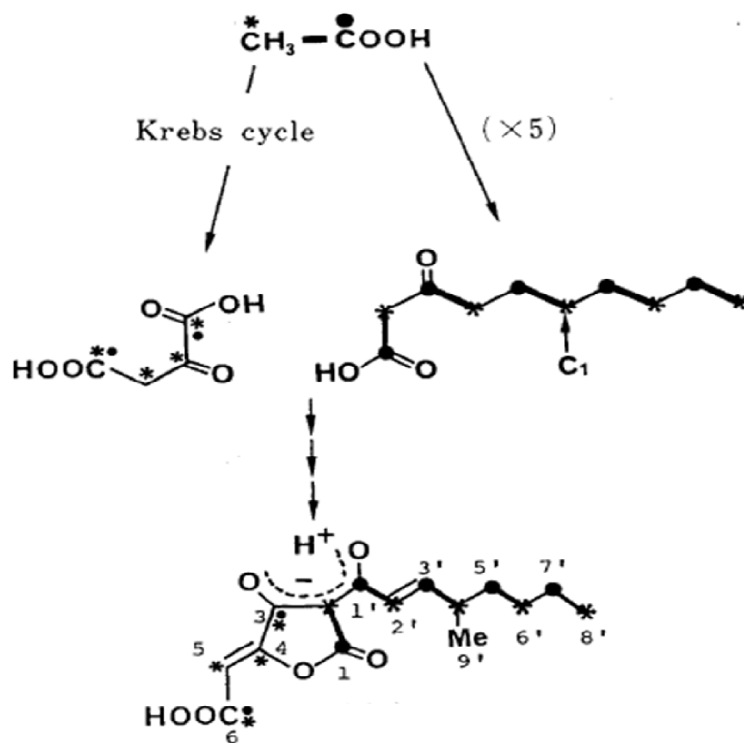
Figura 58: Espectro de íons produtos para as substâncias **4** e **5**, respectivamente.



Esquema 4: Proposta de fragmentação de ácidos tetrônicos para os íons em comum *m/z* 141 e *m/z* 123.

A biossíntese de ácidos tetrônicos fúngicos é estabelecida por dois caminhos. Uma rota seria uma clivagem oxidativa de um precursor aromático originado dos policetídeos e a outra seria a condensação de um policetídeos (C6) com um ácido dicarboxílico (C4) proveniente do ciclo de Krebs (provavelmente oxaloacetato). Experimentos de marcação isotópica

com acetato de sódio [ $1-^{13}\text{C}$ ], [ $2-^{13}\text{C}$ ], [ $1,2-^{13}\text{C}$ ] levaram a seguinte proposta biossintética, de acordo com o Esquema 5. Segundo ARAI *et. al* (1989), as possíveis metilações que possam ocorrer na cadeia lateral destes metabólitos são provenientes da ação da enzima SAM.



Esquema 5: Rota biossintética para a formação de alguns ácidos tetrônicos isolados de fungos (ARAI, *et. al.* 1989).

Algumas análises também foram realizadas com o propósito de identificar outros possíveis ácidos tetrônicos em extratos de *Penicillium griseoroseum*. Como visualizado pelos espectros de íons produzidos para as substâncias **4** e **5** os metabólitos possuem íons em comum, sendo eles  $m/z$  141 e  $m/z$  123. Assim, foram realizados experimentos de íons precursores por LC/MS-MS para verificar outros possíveis ácidos tetrônicos.

Das análises realizadas, foram encontrados mais dois possíveis ácidos tetrônicos nos extratos de *Penicillium griseoroseum*, sendo estes  $m/z$  255 e

$m/z$  271. Seus espectros de massas com os possíveis íons protonados são mostrados na Figura 59.

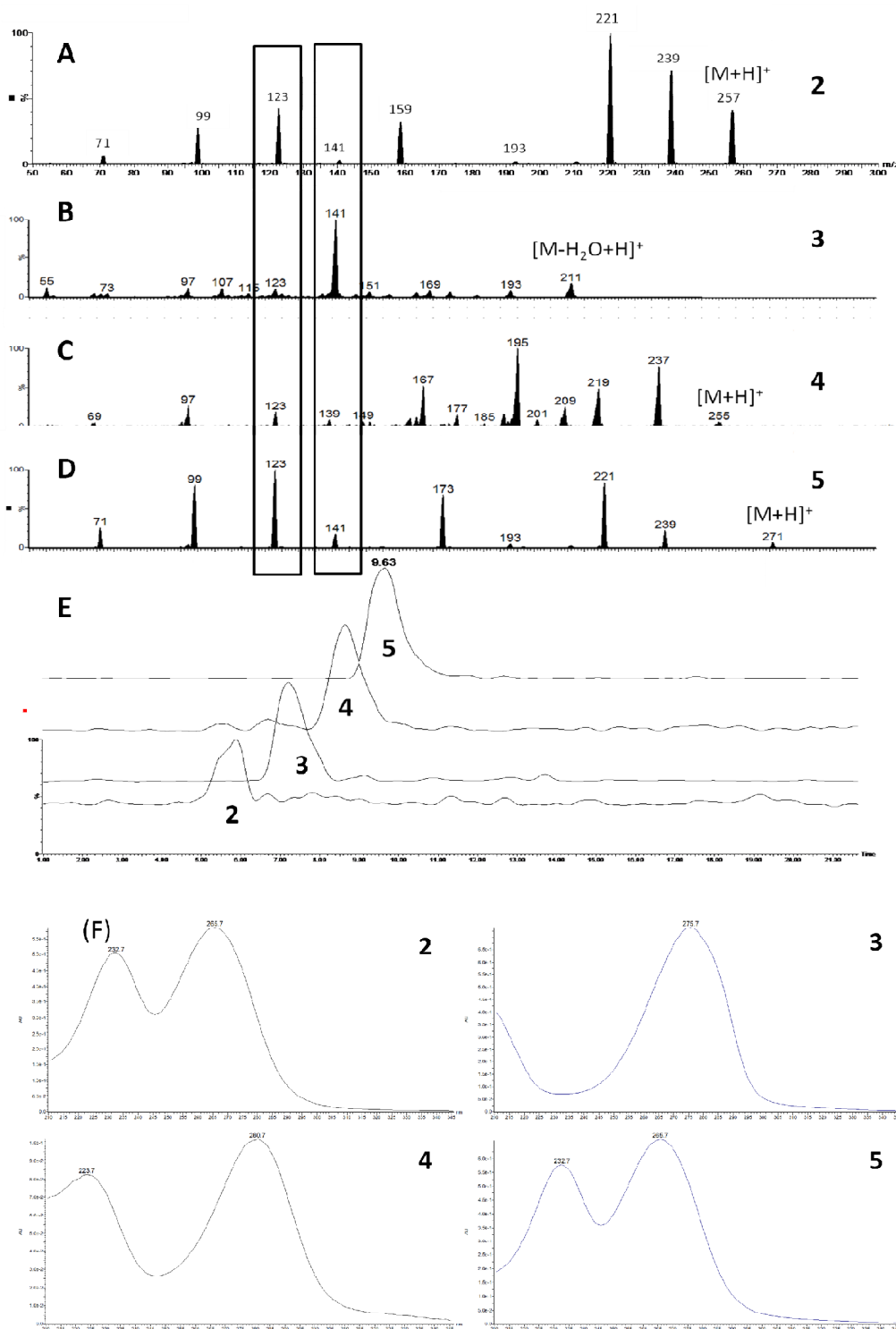


Figura 59: A-D: Espectro de íons produtos para os ácidos tetrônicos encontrados. E: Cromatogramas de íons selecionados ( $m/z$  123 e 141) para

os compostos encontrados no extrato de acetato de etila de *Penicillium griseoroseum*. F: Espectros de UV das substâncias 2, 3, 4 e 5.

De acordo com os espectros de íons precursores e de ultravioleta, os compostos de massa 254 Da e 270 Da são pertencentes da classe dos ácidos tetrônicos. O composto de massa 270 Da possui um íon de  $m/z$  239 indicando uma perda de metanol ( $[M-CH_3OH+H]^+$ ). Com esta informação e com um maior tempo de retenção em uma coluna de fase reversa, pode-se concluir que o composto seria um éster metílico do ácido viridicático (**4**).

Para o composto de massa 254 Da, observa-se uma diminuição de duas unidades de massa comparado com **4**. Seu espectro de íons produtos mostra que o íon  $m/z$  141 também possui duas unidades de massa a menos que **4**. Esta diferença pode ser atribuída a um grupo carboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado ligado ao anel lactônico no ácido viridicático. Assim, as estruturas propostas para as substâncias de massa 270 Da (substância **6**) e 254 Da (substância **7**) são mostradas na Figura 60. Buscando estes compostos na literatura, observou-se que não há relatos destes compostos isolados de fontes naturais.

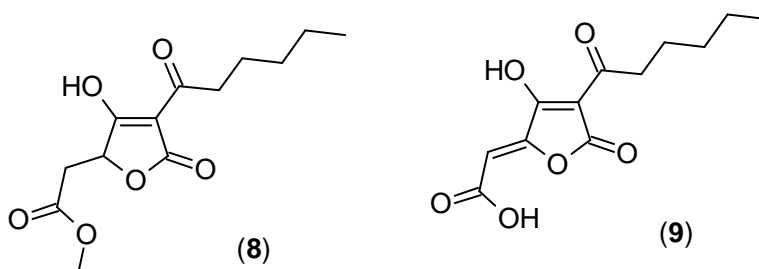


Figura 60: Estruturas propostas para os compostos **6** e **7** detectados nos extratos de *Penicillium griseoroseum*.

A publicação deste trabalho relacionado ao isolamento de metabólitos secundários de *Penicillium griseoroseum* já foi submetida à aprovação de uma revista científica.

Até o presente momento, estes são os metabólitos secundários isolados de *Penicillium griseoroseum*. Sua composição química é muito vasta e estudos posteriores relativos à produção destas substâncias devem ser continuados.

### **4.3 EXPERIMENTOS DE ADIÇÃO DE SUBSTRATOS HALOGENADOS AO MEIO DE CULTURA COM O FUNGO *Penicillium griseoroseum*.**

#### **4.3.1 ADIÇÃO DE $\text{NH}_4\text{Cl}$ E $\text{NH}_4\text{Br}$ AO MEIO DE CULTURA.**

##### **4.3.1.1 ESTUDO DA TOLERÂNCIA DO CRESCIMENTO FRENTE À ADIÇÃO DE $\text{NH}_4\text{Cl}$ E $\text{NH}_4\text{Br}$ .**

Como realizado para *P. brasilianum* foram realizados estudos para verificar a concentração ideal para um maior crescimento micelial quando adicionados ao meio de cultura  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Br}$ . A Figura 61 mostra este gráfico comparativo entre as concentrações com  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

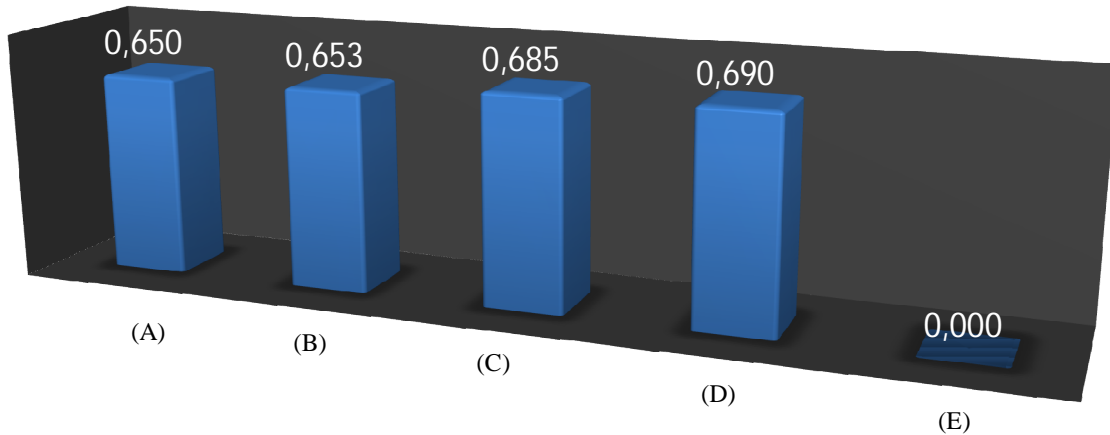


Figura 61: Gráfico do crescimento micelial em gramas, de *Penicillium griseoroseum* com a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . (A) controle, (B) 19 mg/L, (C) 190 mg/L, (D) 19 g/L, (E) 190 g/L.

O gráfico de tolerância quando adicionado  $\text{NH}_4\text{Br}$  é apresentado na Figura 62.

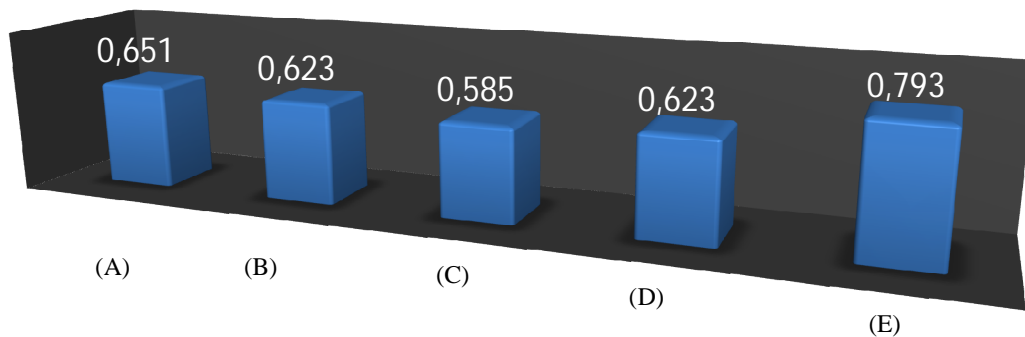


Figura 62: Gráfico do crescimento micelial em gramas, de *Penicillium griseoroseum* com a adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$ . (A) controle, (B) 65 mg/L, (C) 650 mg/L, (D) 6,5 g/L, (E) 65 g/L.



Como se pode observar com a adição de suplementos ao meio de cultura, o aumento da massa micelial não foi tão pronunciado para nenhum dos dois aditivos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Br}$ ) quando estes foram comparados ao controle. Com exceção de  $[\text{NH}_4\text{Cl}] = 190 \text{ g/L}$ , houve o crescimento do microorganismo para todas as concentrações utilizadas neste experimento.

#### 4.3.1.2 ANÁLISE POR HPLC/PDA DAS MODIFICAÇÕES METABÓLICAS EM *P. griseoroseum* QUANDO SUBMETIDO ÀS VARIAÇÕES NOS MEIOS DE CULTURA.

Após os estudos de tolerância do crescimento micelial, os extratos obtidos foram analisados inicialmente por HPLC/PDA para verificar a diferenciação no metabolismo secundário. A Figura 63 mostra os cromatogramas comparativos dos extratos do micélio quando adicionado  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ao meio de cultura.

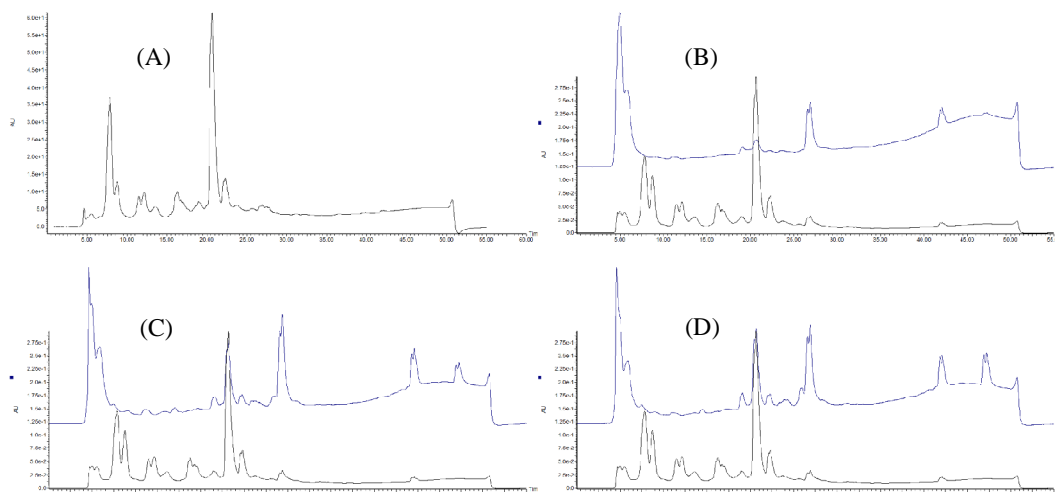


Figura 63: Cromatogramas comparativos do micélio do controle (A), com a adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D). (-----) Cromatogramas dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Monitoramento em 254 nm.

A Figura 64 mostra as análises cromatográficas para os extratos do meio líquido.

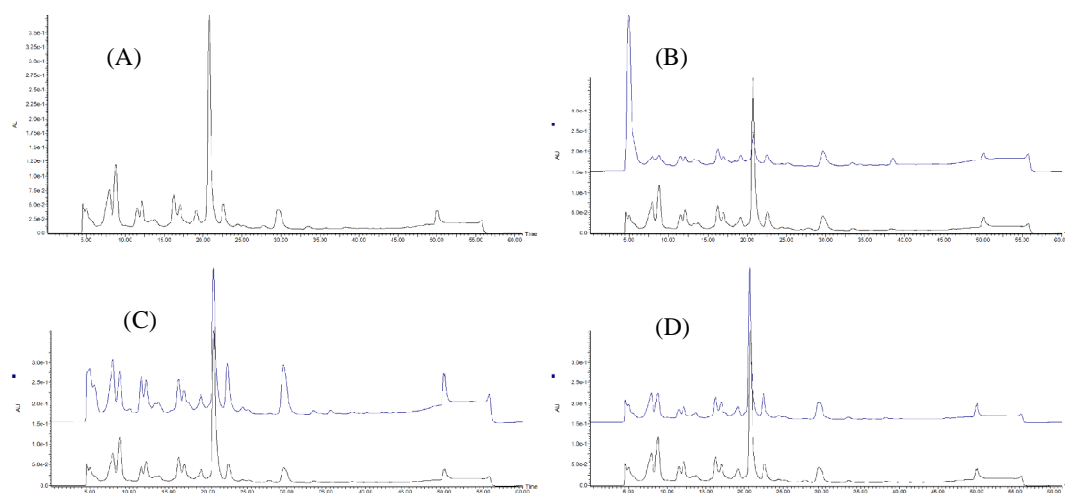


Figura 64: Cromatogramas comparativos do meio líquido do controle (A), com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 19 g/L (B), 1,9 g/L (C) e 190 mg/L (D). (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Monitoramento em 254 nm.

De acordo com os cromatogramas mostrados nas figuras acima, observa-se que as modificações metabólicas não foram significativas aparentemente. Como ocorrido para o fungo *Penicillium brasilianum*, estas modificações podem ter ocorrido em pequenas concentrações que não seriam detectadas por HPLC/PDA. O aumento e a diminuição da intensidade de algumas bandas já presentes no controle também foram detectados, principalmente uma maior intensidade das bandas em menores concentrações.

Quanto aos extratos obtidos dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultura, foram obtidos os cromatogramas do micélio, na Figura 65.

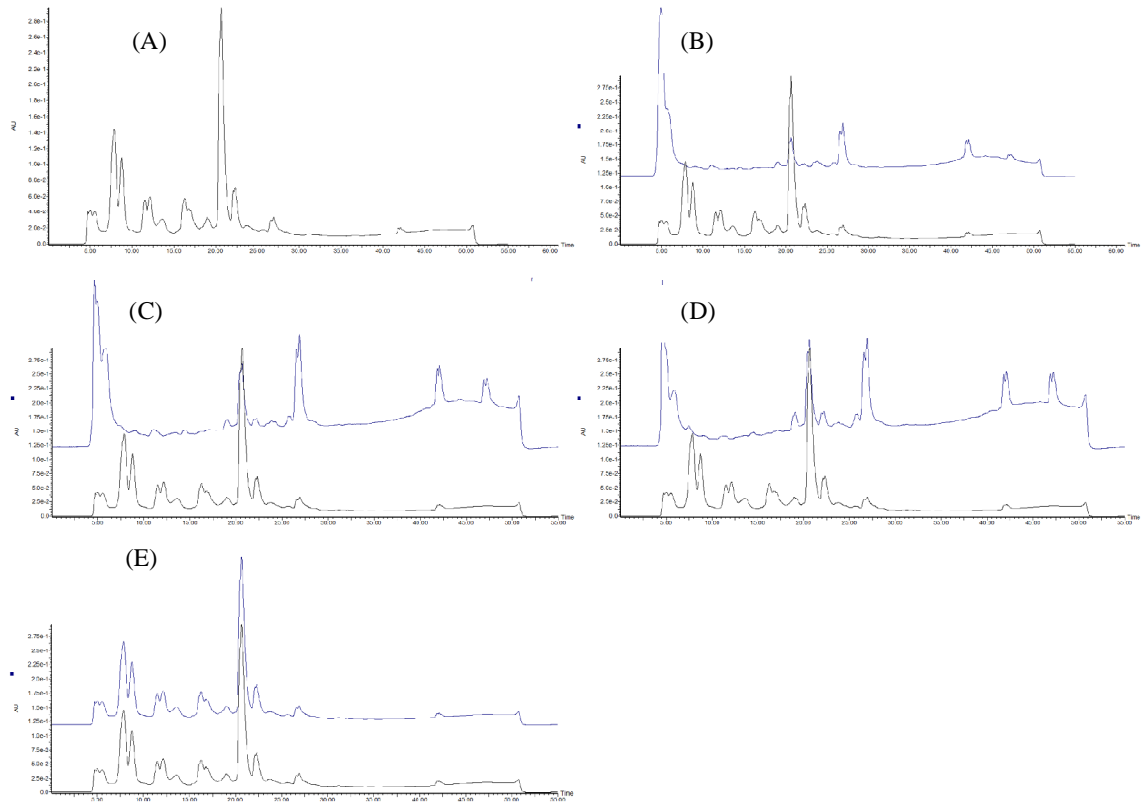


Figura 65: Cromatogramas comparativos do micélio do controle (A), com a adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E). (-----) Cromatogramas dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$ . Monitoramento em 254 nm.

Os extratos do meio líquido foram submetidos a análises cromatográficas, e seus cromatogramas são mostrados na Figura 66.

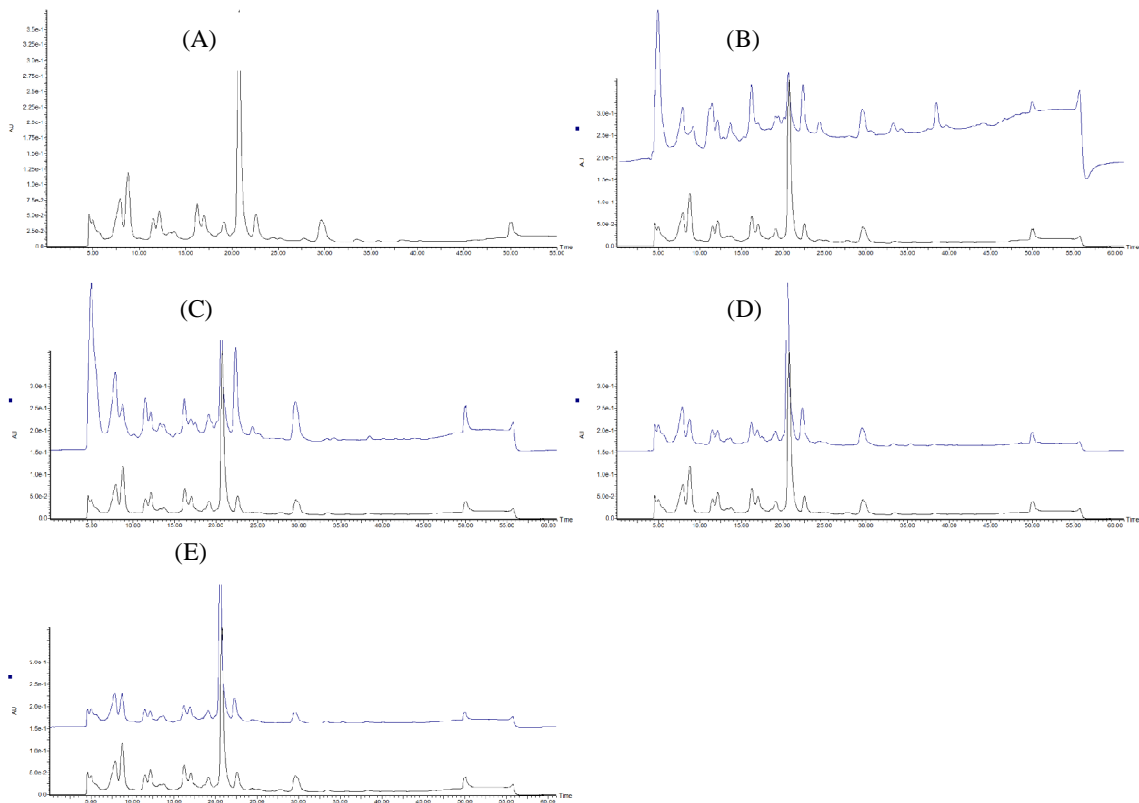


Figura 66: Cromatogramas comparativos do meio líquido do controle (A), com a adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  ao meio de cultura, nas seguintes concentrações: 65 g/L (B), 6,5 g/L (C) e 650 mg/L (D) e 65 mg/L (E). (----) Cromatogramas dos experimentos com adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$ . Monitoramento em 254 nm.

Observa-se nos cromatogramas acima o que foi observado para todos os outros experimentos, ou seja, uma modificação metabólica com intensidades de absorção muito pouco intensas pouco significativas.

Experimentos utilizando o endófito *Penicillium griseoroseum*, mostraram que as modificações no metabolismo secundário do mesmo foram encontradas em regiões mais apolares dos cromatogramas, visto que a coluna utilizada nas análises era de fase reversa. O oposto foi verificado para *Penicillium brasilianum* cujas diferenciações foram observadas em regiões de maior polaridade dos cromatogramas.

#### 4.3.1.3 ANÁLISE POR GC/MS DAS FRAÇÕES DE MENOR POLARIDADE DOS EXTRATOS OBTIDOS EM LARGA ESCALA DE *P. griseoroseum*.

Como citado acima no item 4.3.1.2, foram observadas modificações no metabolismo secundário de *Penicillium griseoroseum* em regiões mais apolares dos cromatogramas mostrados na Figura 65 e 66. Assim, fez-se necessária a utilização da técnica de GC/MS para verificar as possíveis modificações nestes extratos. Os extratos previamente purificados por coluna a vácuo foram analisados por GC/MS foram obtidos do experimento de adição de  $[\text{NH}_4\text{Br}] = 65 \text{ g/L}$  com o extrato do meio líquido.

A partir destas análises, a Figura 67 mostra o cromatograma da fração PG65ML\_A que foi obtida após a eluição em fase normal de Hex:DCM na proporção de 1:1 ( vide Tabela 5).

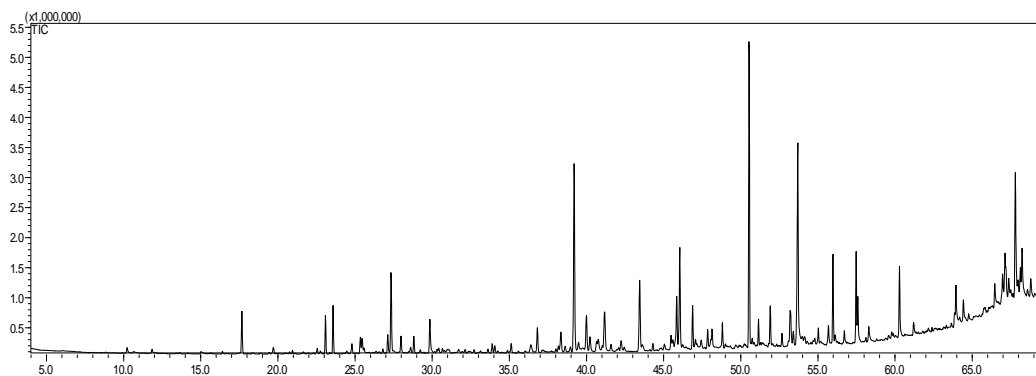


Figura 67: Cromatograma da fração PG65ML\_A.

Através da comparação do cromatograma com o controle, podem-se observar algumas bandas diferenciadas na região de 24 a 30 minutos. A figura 68 mostra uma ampliação desta região do cromatograma.

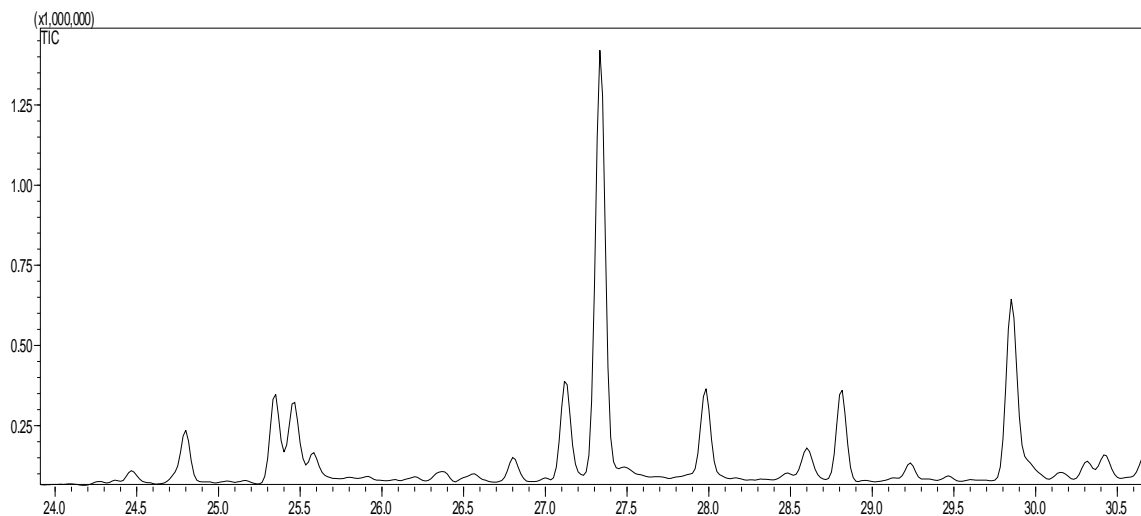


Figura 68: Ampliação do cromatograma da fração PG65ML\_A analisada por GC/MS.

Desta região do cromatograma, as bandas foram processadas com o auxílio do software GCMSSolutions (SHIMADZU) e as bandas em 24,9, 28,6 e 29,8 minutos apresentaram um perfil isotópico interessante, muito similar ao perfil de uma molécula contendo um átomo de bromo ( $M+2$  possui intensidade de 98% quando comparado com  $M$ ) (SILVERSTEIN, 2007). O espectro de massa para a substância em 28,6 minutos é mostrado na Figura 69.

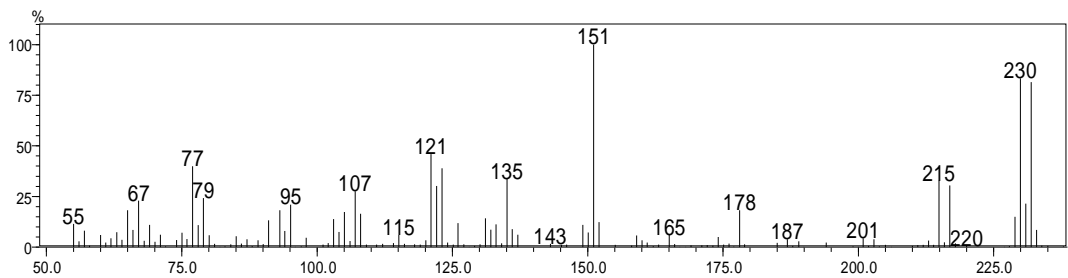


Figura 69: Espectro de massa para a substância em 28,6 minutos.

De acordo com o espectro de massa, observa-se o íon  $[M^+]$  230 correspondente à massa do composto. Observa-se também uma perda de 15 Da, relativo à perda de um grupo metil. A diferença de massa entre  $m/z$  230

e  $m/z$  151 é de 79 Da, que corresponde à massa de um átomo de Br, levando ao pico base do espectro de massa. Comparando o espectro da Figura 69 com o da biblioteca do equipamento, foi sugerida a estrutura para o composto bromado na Figura 70.

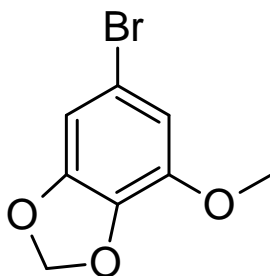
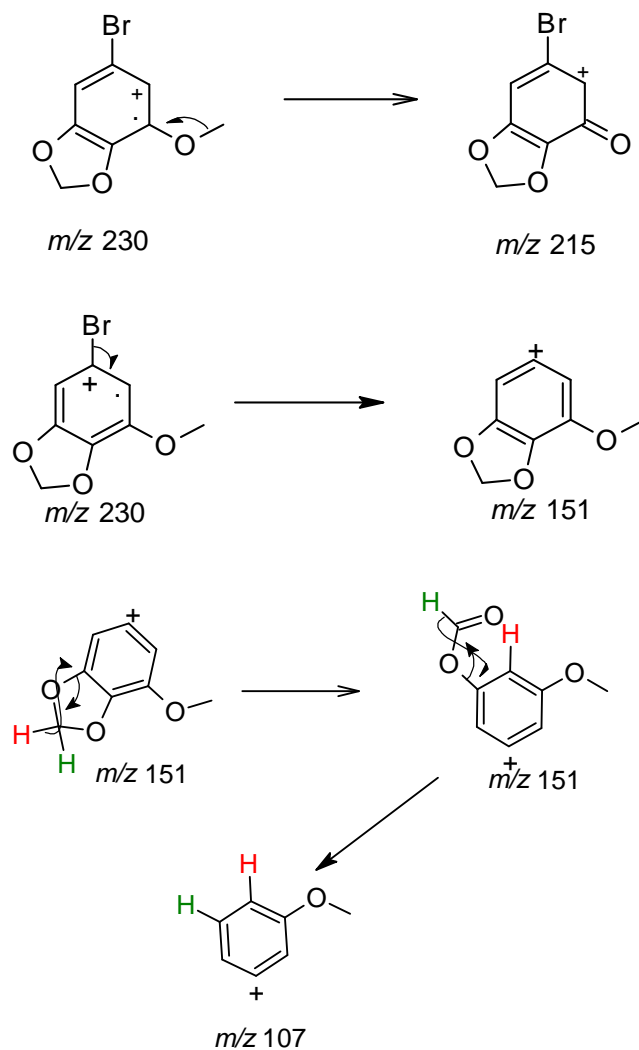


Figura 70: Estrutura proposta para substância (**8**) em 28,6 minutos.

Para comprovar a estrutura da molécula, o Esquema 6 mostra uma proposta de fragmentação para a substância **8**.



Esquema 6: Proposta de fragmentação para a substância **8** de  $m/z$  230.

A outra banda cromatográfica em 24,9 minutos possui um espectro de massa muito semelhante ao da substância **8**. O espectro é mostrado na Figura 71.



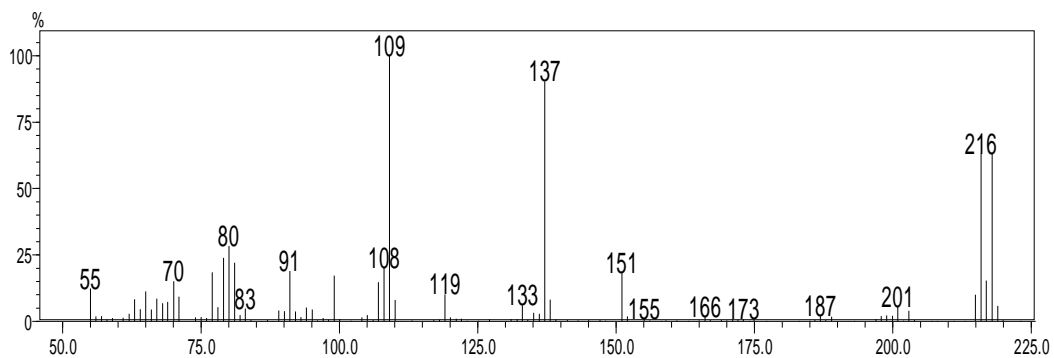


Figura 71: Espectro de massa da substância com tempo de retenção de 24,9 minutos.

Pode-se observar o íon molecular  $[M^+]$  de  $m/z$  216 e a perda de um átomo de Br (79 unidades de massa) levando ao íon de  $m/z$  137. A estrutura proposta pela biblioteca para a substância **9** é mostrada na Figura 72.

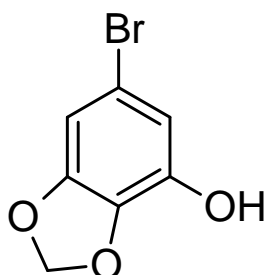


Figura 72: Estrutura proposta para a substância **9**.

A diferença entre as substâncias **8** e **9** é dada pela presença da metoxila em **8**, enquanto em **9** existe uma hidroxila ligada ao anel aromático.

Para a banda cromatográfica em 30 minutos, o espectro de massa é mostrado na Figura 73.

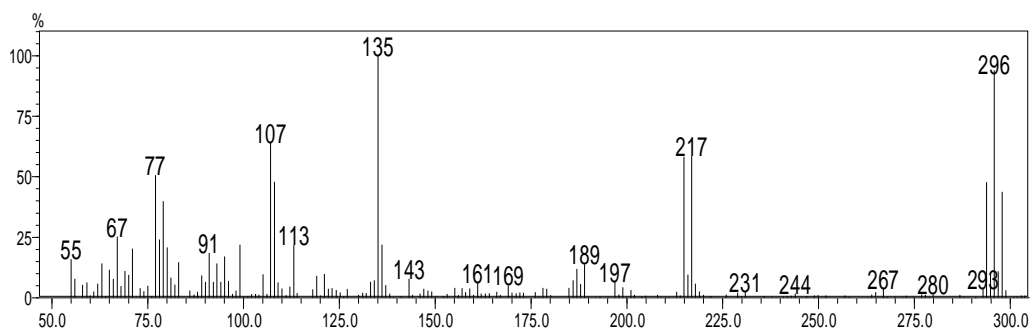


Figura 73: Espectro de massa para a substância com tempo de retenção de 39,8 minutos.

O espectro de massa possui o íon  $m/z$  296 como íon molecular  $[M^+]$ , que possivelmente possui perfil isotópico para uma molécula com dois átomos de Br (SILVERSTEIN, 2007). Observa-se também que o íon  $m/z$  279 ainda possui perfil isotópico para um átomo de Br, e que a diferença entre esses dois picos é exatamente a perda de 79 Da. O íon  $m/z$  217 possui um perfil de fragmentação muito semelhante ao da substância **9**. Assim, para a substância **10**, propõe-se a mesma estrutura com a adição de um átomo de Br na molécula. Sua estrutura é mostrada na Figura 74.

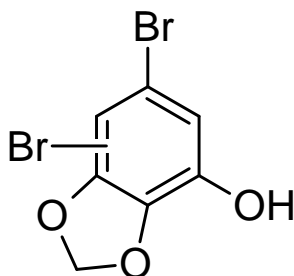
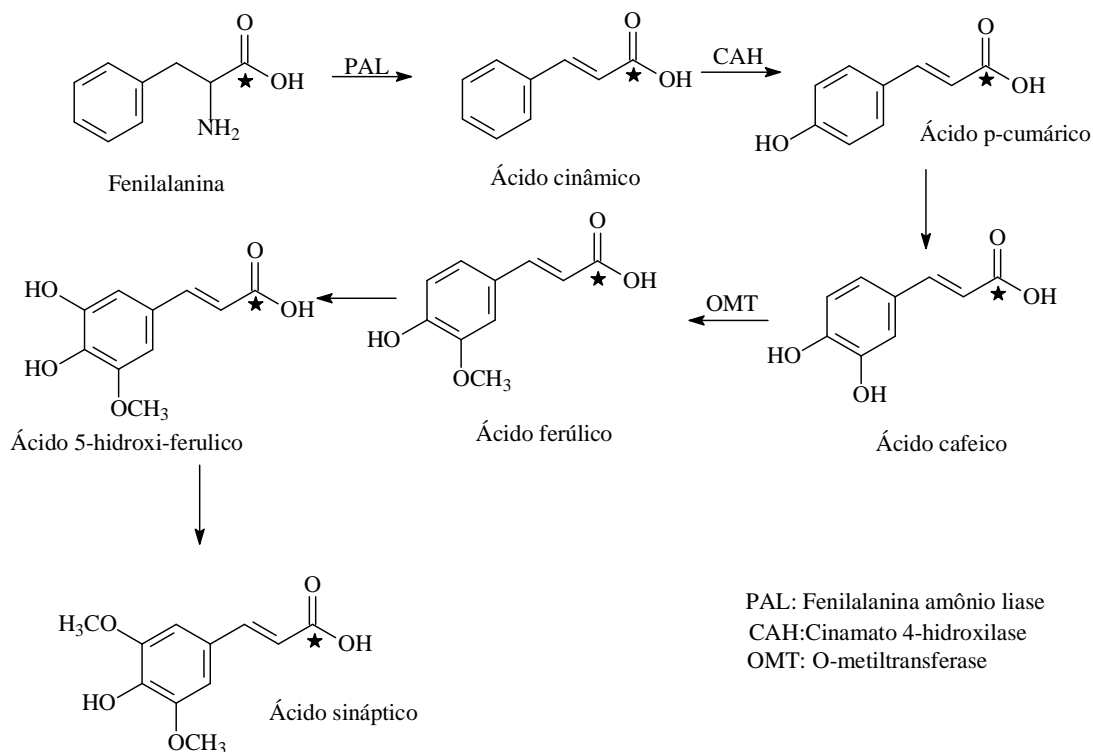


Figura 74: Estrutura proposta para a substância **10** com tempo de retenção de 29,8 minutos.

As substâncias **8**, **9** e **10** não foram isoladas e sim, detectadas por GC/MS. Em etapas futuras do trabalho, se faz necessário o isolamento destes metabólitos para confirmação de suas estruturas, tanto quanto a posição do segundo átomo de bromo em **10**.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos relatando as enzimas responsáveis pela halogenação de metabólitos secundários. Assim, a bromação das substâncias citadas acima pode seguir caminhos diferentes, dependendo de quais genes foram ativados para a expressão de proteínas responsáveis pelas reações de halogenação quando ao meio de cultura foi adicionado  $\text{NH}_4\text{Br}$ . (DRENNAN, 2009)

A biossíntese destes metabólitos, provavelmente segue a rota dos fenilpropanóides, devido à presença do grupo metilenodioxí formado pela ação da enzima fenilalanina-amoniliase (PAL) convertendo o aminoácido fenilalanina em ácido cinâmico. A maioria das enzimas ativas neste caminho está praticamente caracterizada. O esquema para a formação do ácido sináptico (precursor do grupo metoxipiperonil) é mostrado a seguir.



Esquema 7: Formação dos precursores ácido cinâmico e ácido sináptico (RITTER, 2004).

Um fato intrigante com relação à produção de metabólitos secundários com o grupo metilenodioxi seria que estes metabólitos são conhecidos por serem predominantemente metabólitos produzidos por plantas com ação fungicida. São relatados na literatura que após o ataque de patógenos as plantas começam a produzir substâncias da classe dos fenilpropanóides como resposta defensiva. Assim, seria de se esperar que fungos, conhecidos como seres inferiores, não possuíssem sistema enzimático capaz de produzir determinadas substâncias.

A presença de outros metabólitos fúngicos com o grupo metilenodioxi, apesar de ser incomum, foi relatada por Fujita *et.al.* na produção de uma série de brasiliamidas (Figura 75) produzidas por *Penicillium brasilianum*. FILL *et. al.*(2010) comprovou por meio de estudos de marcação isotópica utilizando as técnicas de NMR e LC/MS-MS que o caminho biossintético utilizado pelo fungo endofítico seria justamente a rota enzimática utilizada pelas plantas, que seria possível se ocorresse trocas genéticas entre a planta e seu hospedeiro.

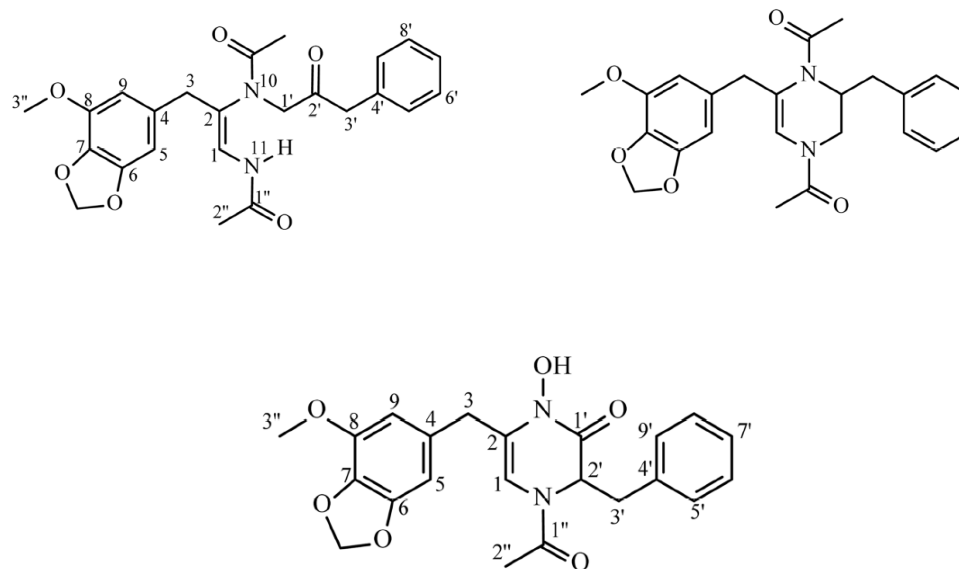


Figura 75: Estrutura das brasiliamidas A, B e F, respectivamente isoladas de *Penicillium brasilianum* (FILL, 2009).

Após as análises por GC/MS das frações mais apolares do extrato de *Penicillium griseoroseum*, passou-se então a buscar por outros possíveis metabólitos halogenados em frações de maior polaridade do extrato obtido em larga escala.

#### 4.3.1.4 ANÁLISE POR HPLC/PDA/MS-MS DAS FRAÇÕES DE *P. griseoroseum*.

As análises por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas foram realizadas para as frações de maior polaridade dos extratos obtidos em larga escala quando adicionado ao meio de cultura  $[\text{NH}_4\text{Br}] = 65 \text{ g/L}$ .

A fração E (AcOEt:MeOH, 7:3) (Tabela 5) do extrato em larga escala apresentou algumas bandas cromatográficas cujos espectros de massa possuíam a proporção isotópica de  $[\text{M}+2]^+$  em  $\text{ESI}^+$  que são observadas quando se possui um átomo de bromo na molécula. Estas bandas são mostradas na Figura 76.

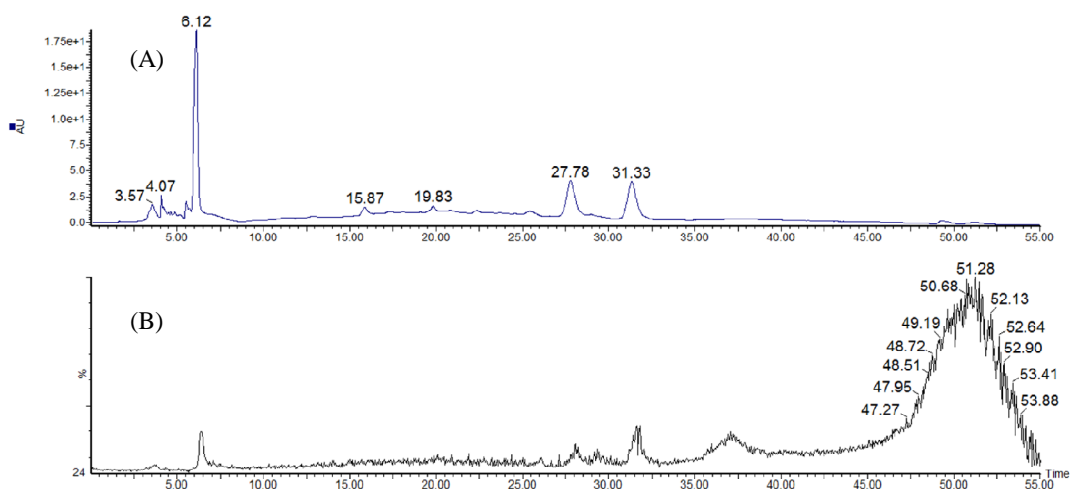


Figura 76: (A) Cromatograma de ultravioleta e (B) Cromatograma de íons totais (TIC) da fração PGML65\_E dos extratos de *Penicillium griseoroseum*.

As bandas em 27,78 e 31,33 minutos foram as de maior interesse por apresentarem os íons  $m/z$  391 e 468, respectivamente. A banda em 27,78 minutos, na verdade, não é uma substância proveniente dos estudos de modificações metabólicas, e sim um metabólito secundário de *Penicillium griseoroseum* que ainda não havia sido isolada. A banda com  $[M+H]^+$  468 possui o perfil isotópico para um átomo de bromo na molécula, fornecendo o íon  $[M+H+2]^+$  470 com 98% de abundância. Os espectros de massa no modo *full scan* e os espectros de ultravioleta para as bandas em questão são mostrados nas Figuras 77 e 78, respectivamente.

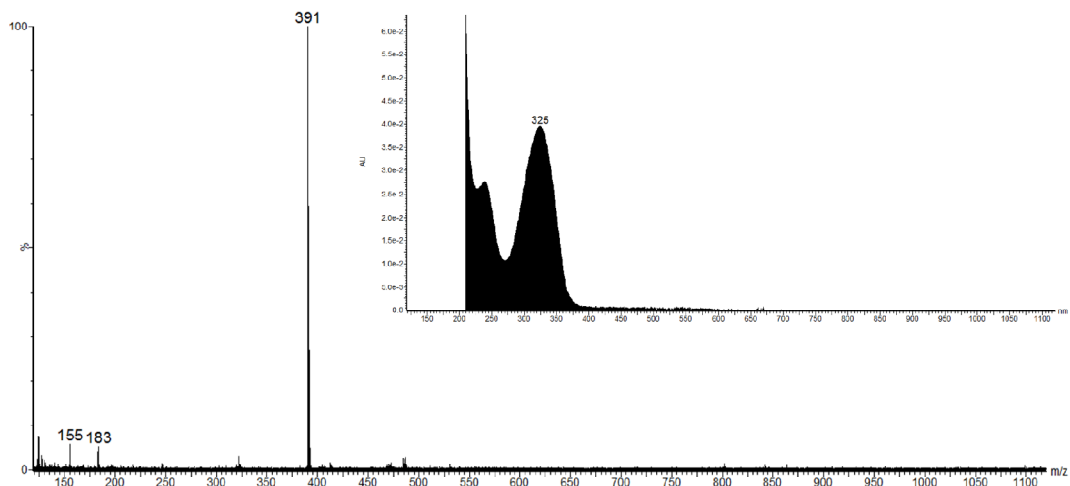


Figura 77: Espectro de massa no modo *full scan* e de ultravioleta para a banda em 27,78 minutos.

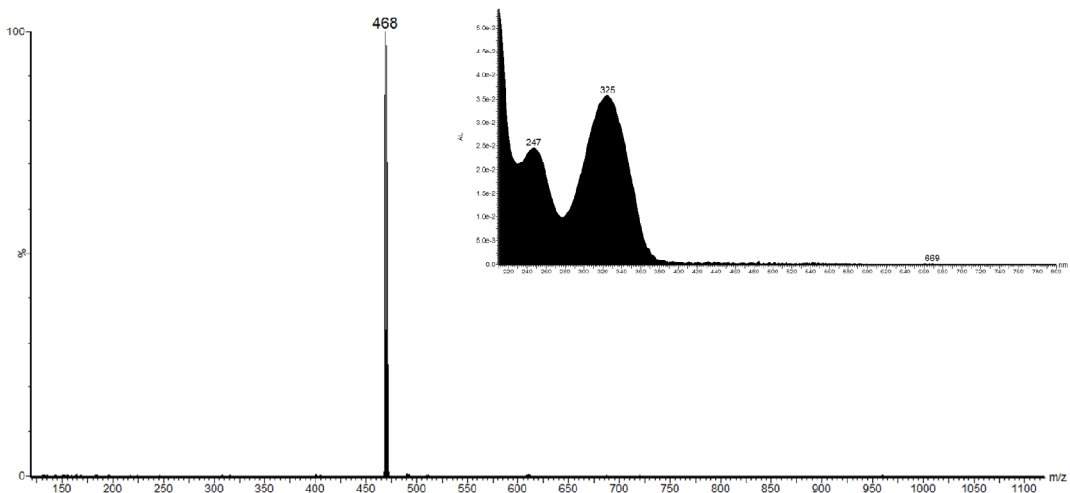


Figura 78: Espectro de massa no modo *full scan* e de ultravioleta para a banda em 31,33 minutos.

Analisando os espectros de ultravioleta, observa-se que as duas substâncias possivelmente são da mesma classe de metabólitos secundários. Com relação às massas, nota-se também que a diferença entre as duas substâncias é de 77 Da, ou seja, aproximadamente a massa de um átomo de Br. O espectro de íons produtos das substâncias encontradas nesta fração

será apresentado posteriormente na determinação estrutural das substâncias.

Apesar do metabólito em 27,78 minutos não ser resultante dos experimentos com suplementação de aditivos halogenados ao meio de cultura, sua determinação estrutural será mostrada aqui para futuras comparações com o metabólito halogenado encontrado.

Após a detecção destes metabólitos, foi realizado o isolamento dos mesmos por HPLC no modo preparativo e o cromatograma de ultravioleta é mostrado na Figura 79.

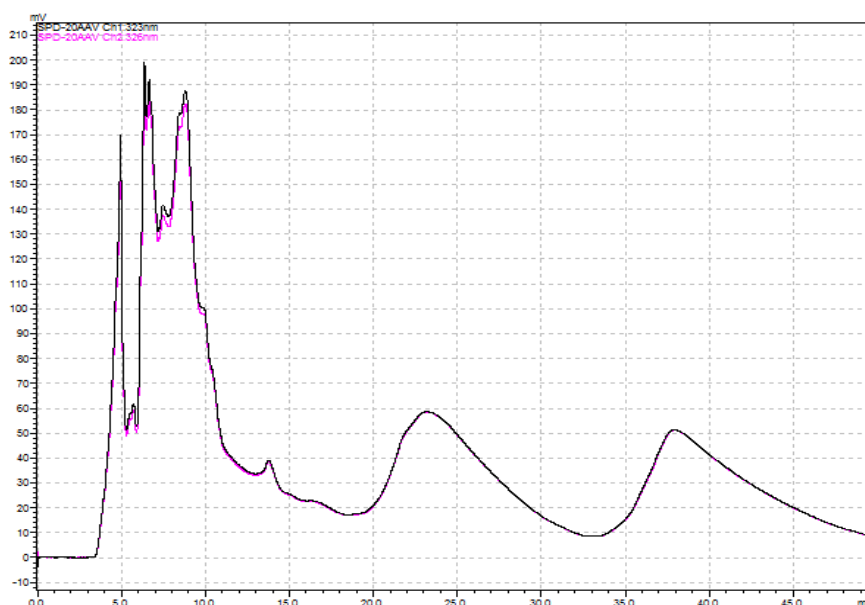


Figura 79: Cromatograma da fração PG65ML\_E.

Após o isolamento das duas substâncias de interesse, o metabólito com tempo de retenção em 27,78 minutos (substância **11**) foi submetido às análises de  $^1\text{H}$  NMR, cujo espectro é mostrado na Figura 80.



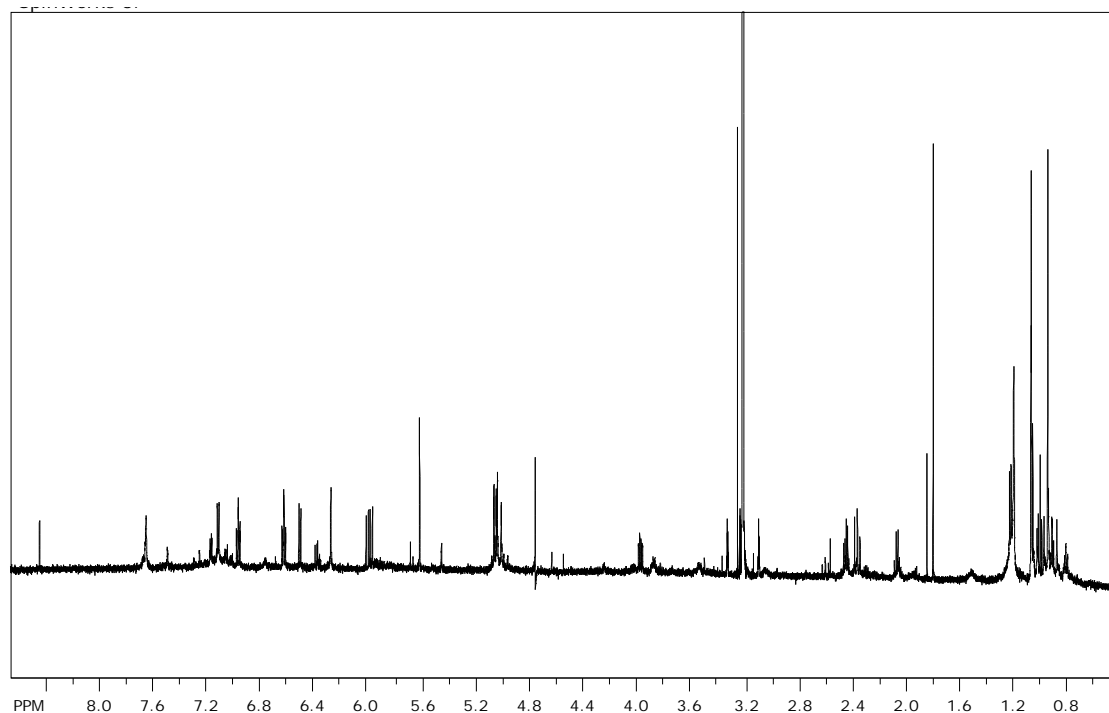


Figura 80: Espectro de  $^1\text{H}$  NMR da substância **11**. (MeOD, 600 MHz)

De acordo com o espectro, observa-se na região de aromáticos os seguintes sinais:  $\delta$  7,12 (1 H, d,  $J = 7,2$  Hz, H-7), 6,97 (1 H, t,  $J = 7,6$  Hz, H-9), 6,63 (1 H, t,  $J = 7,6$  Hz, H-8), 6,51 (1 H, d,  $J = 7,6$  Hz, H-10).

No espectro de HSQC, foram encontradas as seguintes correlações para os hidrogênios citados acima:  $\delta$  7,66 -  $\delta$  137,3; 7,12 - 125,8; 6,97 - 129,6; 6,63 - 119,2; 6,51 - 109,6. No espectro de HMBC foram encontradas as correlações entre os hidrogênios em  $\delta$  7,12 e  $\delta$  150 e 129;  $\delta$  6,96 e  $\delta$  125 e 150;  $\delta$  6,63 e  $\delta$  128 e 109;  $\delta$  6,51 e  $\delta$  128 e 119. O espectro de HSQC e HMBS são mostrados nas Figuras 81 e 82, respectivamente.

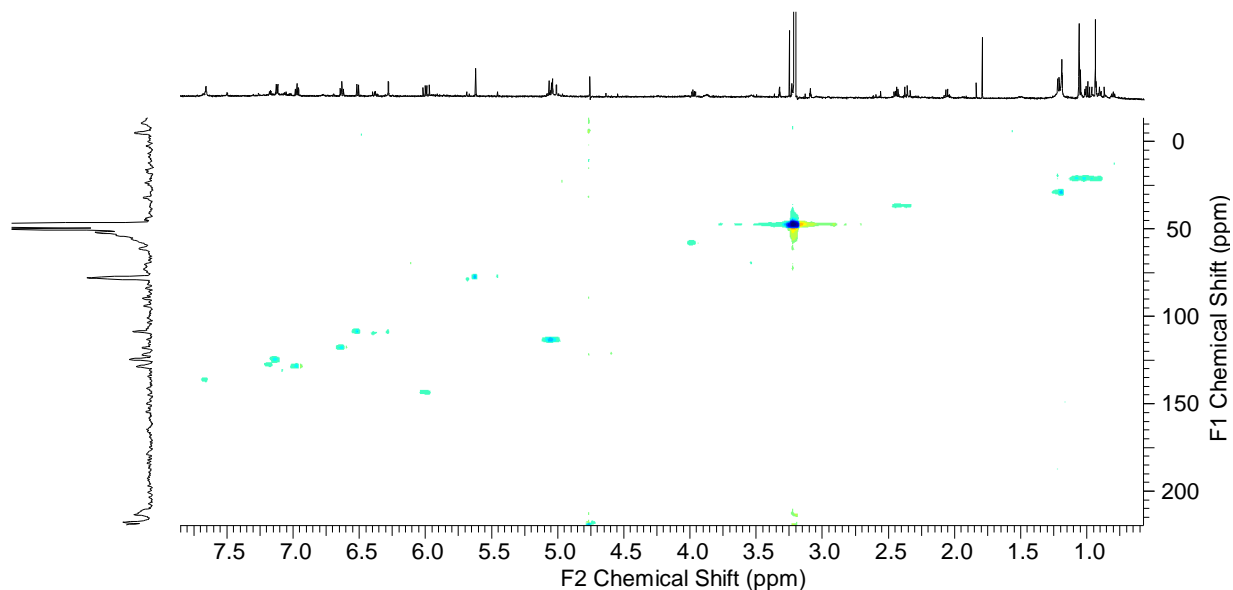


Figura 81: Espectro de HSQC da substância **11**.

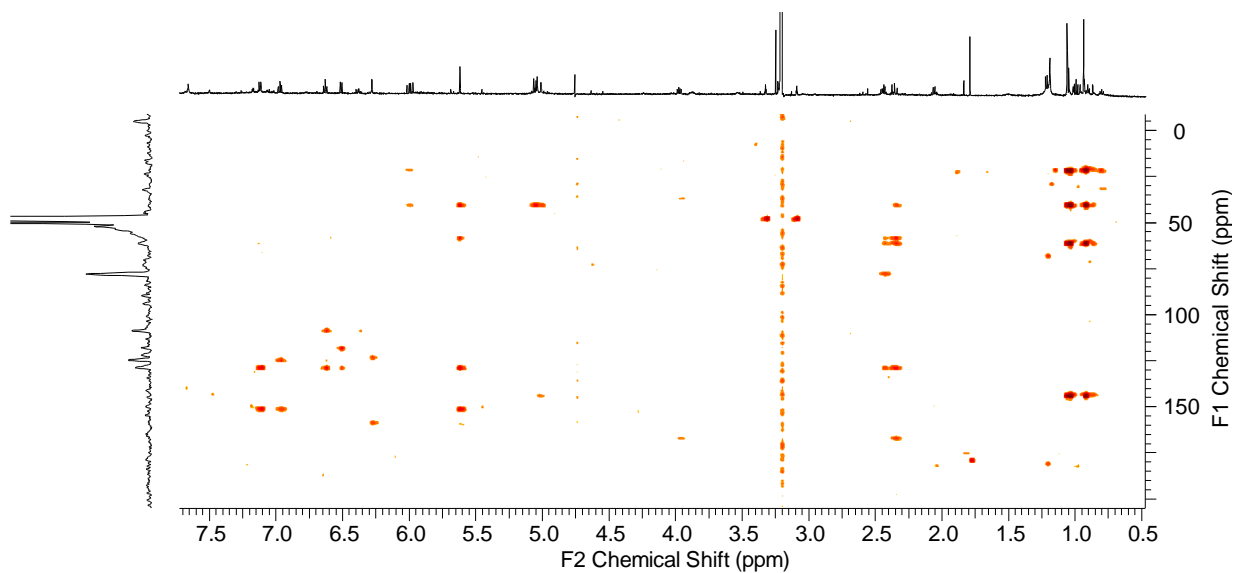


Figura 82: Espectro de HMBC da substância **11**.

Em função destes dados, pode-se propor uma um anel aromático dissubstituído, sendo um deles um heteroátomo devido ao deslocamento de um carbono em  $\delta$  109, característico de C-C-R.

A partir dos dados apresentados, propõe-se a seguinte estrutura parcial na Figura 83.

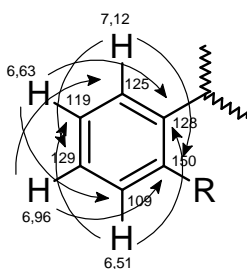


Figura 83: Estrutura parcial para a substância **11**.

O espectro de massas para a substância **11** apresentou o íon  $m/z$  391 sugerindo que este heteroátomo possa ser um átomo de nitrogênio, uma vez que o erro esperado para cada íon pelo equipamento é de 0,6 unidades de massa. Considerando que o heteroátomo seja o nitrogênio, o metabólito isolado seria um derivado do aminoácido triptofano.

Pelos dados de HMBC pode-se correlacionar hidrogênios olefínicos com carbonos metílicos caracterizando uma unidade isoprenila. O hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,00 correlaciona com  $\delta$  30,5 e 22,7, confirmando a natureza desse grupo.

Unidades de triptofano com grupos isoprenila são uma característica de metabólitos fúngicos pertencentes à classe das roquefortinas.

Baseando-se nos dados da literatura e nos dados obtidos por espectrometria de massas propõe-se que a substância isolada seja a roquefortina C. Através da comparação dos dados de NMR com os dados da literatura, foi possível confirmar a natureza do metabólito. A Tabela 12 apresenta a comparação entre os dados de hidrogênio para a roquefortina C descrita na literatura e os dados obtidos da substância **11**.

Tabela 12: Dados de  $^1\text{H}$  NMR da roquefortina C da literatura (1) e isolada de *P. griseoroseum* (2) (VLEGGGAAR, *et. al.* 1980).

Posição	1	2
3		3,96 (m)
5	6,33 (1H, s)	5,67 (1H, s)
7	7,19 (1H, d, $J = 7,2$ Hz)	7,12 (d, $J = 7,2$ Hz)
8	6,61 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)	6,63 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)
9	7,11 (1H, t, $J = 7,6$ Hz)	6,96 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)
10	6,78 (1H, t, $J = 7,6$ Hz)	6,51 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)
13	-	6,00 (m)
14	-	5,07 (m)
14a	-	-
15	1,04 (3H, s)	1,02 (3H, s)
16	1,16 (3H, s)	1,18 (3H, s)
3'	5,65 (1H, s)	
5'		6,96 (1H, s)
7'	7,70 (1H, s)	7,65 (1H, s)

De acordo com os dados obtidos por meio dos experimentos de NMR em uma e duas dimensões e da comparação dos mesmos com os encontrados na literatura, propõe-se a estrutura mostrada na Figura 84 para a substância **11**, conhecida como Roquefortina C.

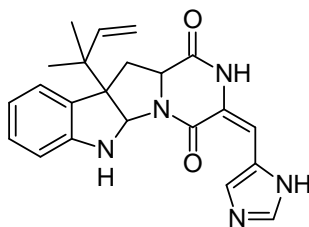
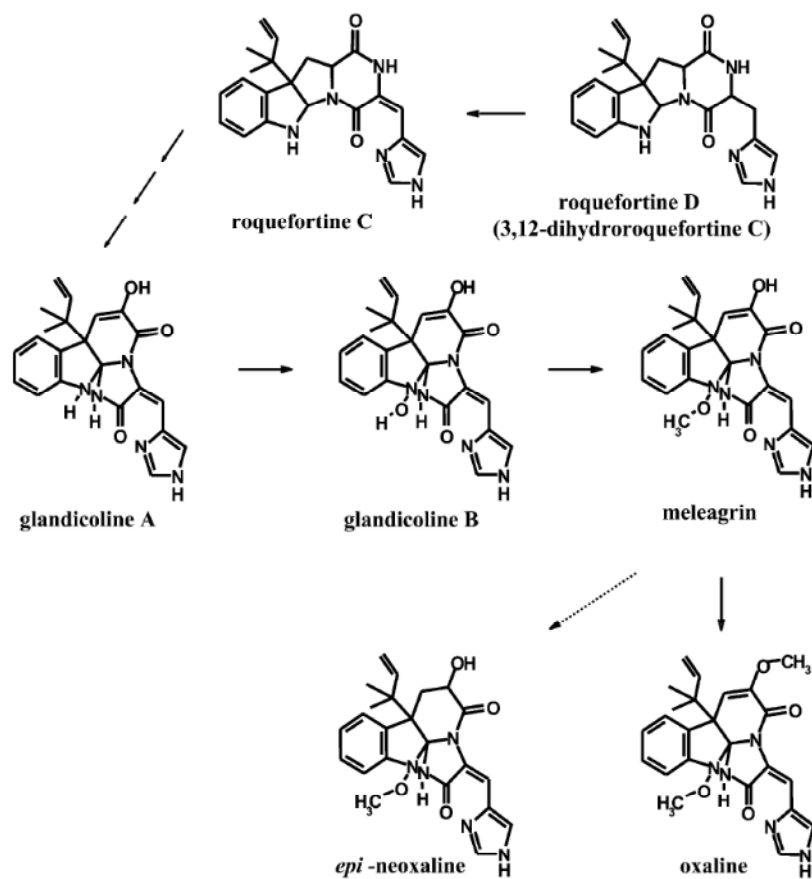


Figura 84: Estrutura proposta para a substância **14** (Roquefortina C).

Roquefortina C é um metabólito secundário comum encontrado para o gênero *Penicillium*, isolado pela primeira vez de *Penicillium roqueforti*. É conhecido como micotoxina, mas é relatado como um interessante metabólito com atividade antibiótica e neurotrópica. Devido à sua alta toxicidade como micotoxina, na literatura se encontram estudos relacionados com o *screening* de linhagens de *P. roqueforti* para minimizar a produção deste metabólito. (FERNÁNDEZ-BODEGA, 2009)

A biossíntese deste alcalóide dicetopiperazínico é derivada do aminoácido triptofano, histidina e dimetilalil pirofosfato (OHMOMO, *et. al.*, 1979; OVERY, 2005). Os metabólitos dihidrohistidil-triptofanil-dicetopiperazina e 3,12-dihidroroquefortina (roquefortina D) são os precursores para a roquefortina C (OVERY, 2005). Experimentos de marcação com  $^{14}\text{C}$  mostraram que a substância **11** é precursora das glandicolinas A e B, como da meleagrina e da oxalina, conhecidas também por suas atividades biológicas já relatadas (FERNANDEZ-BODEGA, 2009). Um esquema relacionado à formação destes metabólitos é mostrado no Esquema 8.



Esquema 8: Proposta biogenética para a formação da roquefortina C, glandicolinas A e B e oxalina.

A segundasubstância da fração PG65ML\_E com tempo de retenção em 31,33 minutos, a qual apresentava um espectro de ultravioleta semelhante ao da roquefortina C foi isolada e seu espectro de  $^1\text{H}$  NMR (Figura 85) se mostrou muito semelhante ao da substância **11**, com exceção de um sinal em  $\delta$  6,63 que desapareceu e, conseqüentemente, houve uma diferenciação na multiplicidade dos sinais relacionados aos hidrogênios do anel aromático.

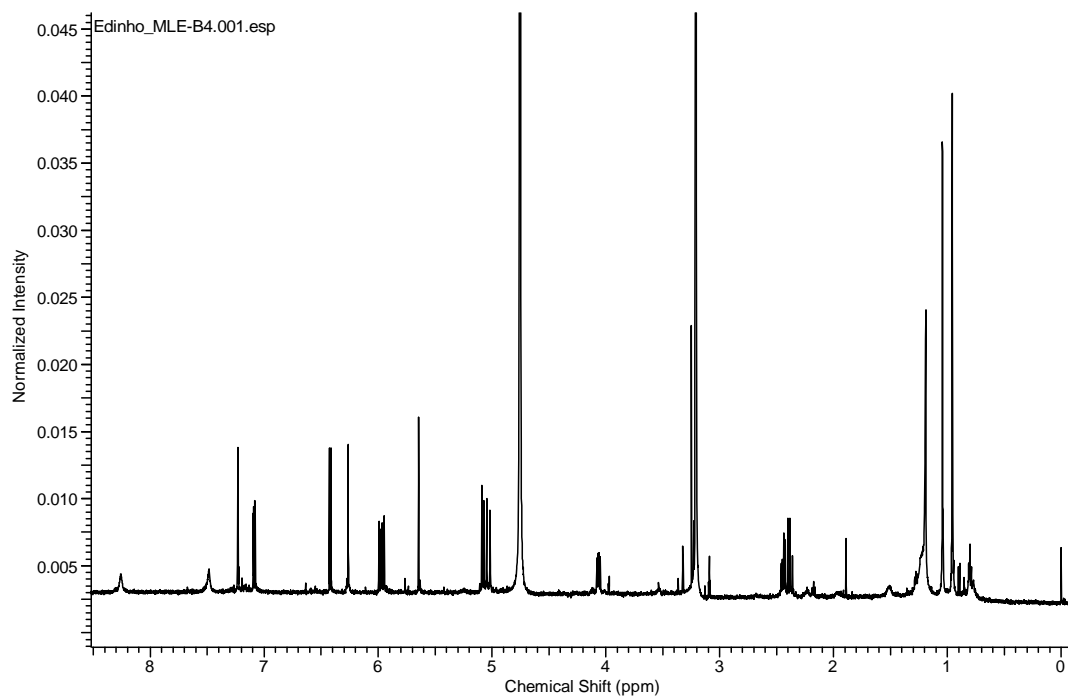


Figura 85: Espectro de  $^1\text{H}$  da substância **12**. (600 MHz, MeOD)

Os sinais de  $^1\text{H}$  obtidos para esta amostra foram os mesmos que para a substância **11**, com exceção dos sinais na região de hidrogênios aromáticos. De acordo com os sinais obtidos  $\delta$  7,23 (1H, d,  $J = 2,1$  Hz), 7,09 (1H, dd,  $J = 1,8$  Hz e 6,3 Hz) e 6,4 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz) há somente três átomos de hidrogênios aromáticos que se correlacionam pelo espectro de HSQC da seguinte forma:  $\delta$  7,23 – 129;  $\delta$  7,09 – 132 e  $\delta$  6,4 – 107. Estas correlações estão em total acordo com as apresentadas para a roquefortina C. O espectro de HSQC é mostrado na Figura 86.

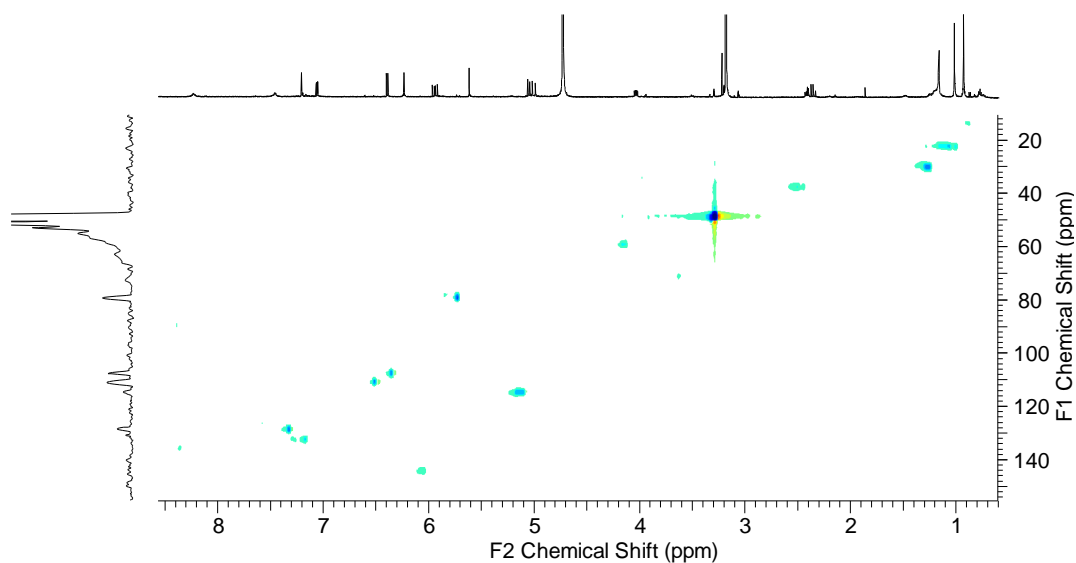


Figura 86: Espectro de HSQC da substância **12**.

As diferenças surgem também no espectro de HMBC (Figura 87), onde há a correlação desses hidrogênios com um carbono em  $\delta$  109. A Figura 88 mostra as correlações para o sistema aromático da substância bromada.

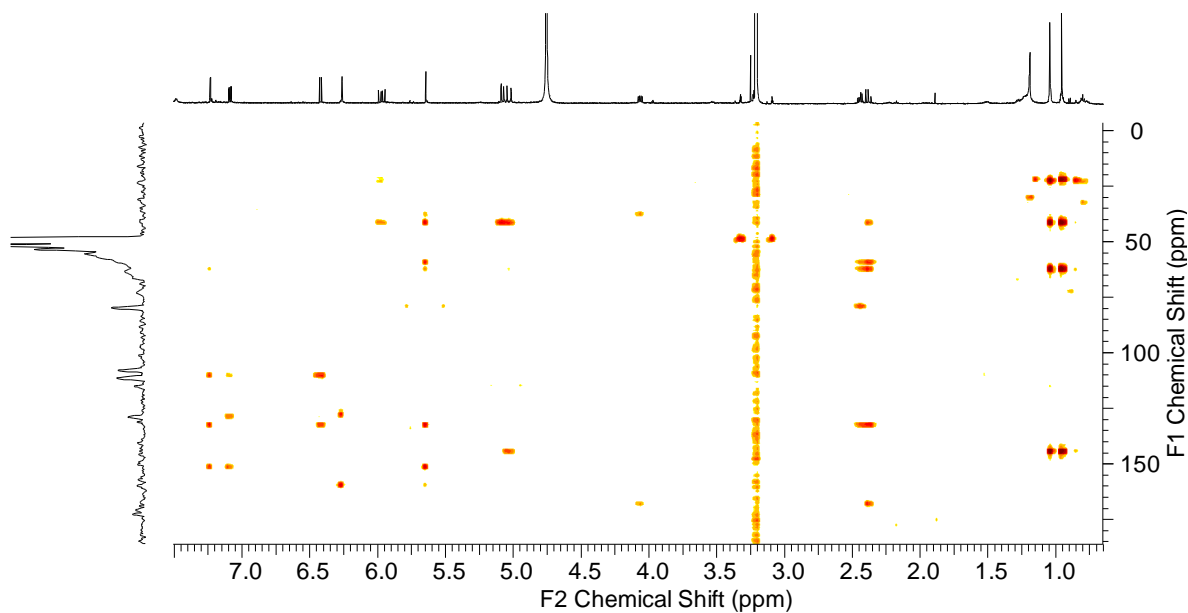


Figura 87: Espectro de HMBC da substância **12**.



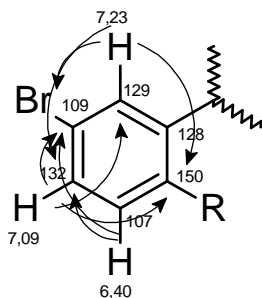


Figura 88: Correlações de HMBC para a substância bromada (**12**).

Assim, com os dados obtidos e comparados com a substância **11**, propõe-se então a seguinte estrutura para a substância **12**, mostrada na Figura 89.

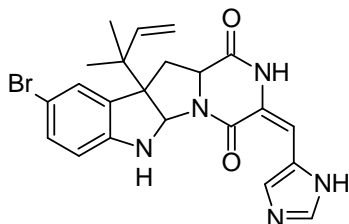


Figura 89: Estrutura proposta para a substância **12**.

Como se pode notar pelos dados de NMR a única diferença é o átomo de bromo na molécula no anel aromático pertencente ao aminoácido triptofano.

Nas análises de GC/MS dos extratos de menor polaridade também foram detectadas substâncias contendo átomos de bromo em suas estruturas, mostrando que o fungo *Penicillium griseoroseum* é capaz de halogenar seus metabólitos secundários, ou possivelmente ser induzido a novas rotas biossintéticas quando ao seu meio de crescimento são adicionados suplementos diferenciados.

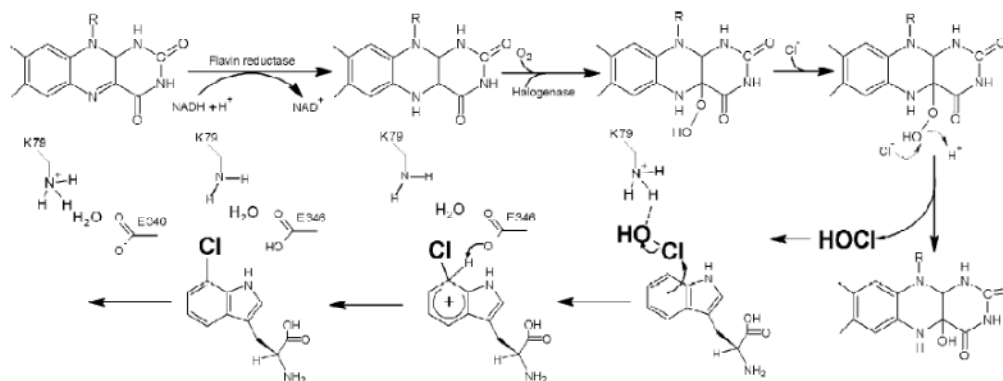
A halogenação da roquefortina C parece ser inédita na literatura e estudos relacionados ao aumento ou diminuição de suas atividades biológicas devem ser realizados, pois como mencionado no capítulo de

Introdução, metabólitos secundários halogenados são conhecidos por possuírem um amplo espectro de atividades biológicas.

Ainda não foi possível detectar se o mecanismo de bromação realizado por *P. griseoroseum* ocorre de forma enzimática ou pela formação de um intermediário reativo. Estudos posteriores deverão ser realizados para esta verificação.

A halogenação ocorreu na posição 5 do triptofano. Na literatura se encontram diversos trabalhos relacionados às enzimas ativas para a formação de metabólitos contendo átomos de cloro na posição 7 deste aminoácido, porém não há relatos de estudos com relação à ação enzimática em substâncias com um átomo de bromo na posição 5 do triptofano.

Metabólitos secundários halogenados com alto valor agregado, como a rebecamicina (potente agente anti-cancerígeno) tem sua biossíntese estudada há muito tempo. Um dos passos estudados, seria a cloração do triptofano pela ação da enzima RebH, uma flavina dependente que necessita como co-fatores FADH<sub>2</sub>, íons cloreto e oxigênio. A reação do FADH<sub>2</sub> com o oxigênio no sítio ativo da enzima leva a formação de um intermediário 4- $\alpha$ -hidroperoxiflavina (FAD-4 $\alpha$ -OOH) que reagirá com Cl<sup>-</sup> para formar HOCl. A enzima K79 fornece uma ligação de hidrogênio para o substrato HOCl para ocorrer um melhor posicionamento do hipoclorito para reagir com triptofano na posição 7. Durante a aproximação de HOCl com o triptofano (intermediário de Wheland) a adição eletrofílica é estabilizada por um resíduo de glutamato que desprotona o intermediário, levando a formação do 7-clorotriptofano (CHEN, 2008). O esquema para a formação do 7-clorotriptofano é mostrado abaixo.



Esquema 9: Mecanismo proposto para a formação do 7-clorotriptofano.

A halogenação na posição 5 do triptofano é interessante como um precursor do 5-hidroxitriptofano (5-HTP) o qual é um componente de muitas drogas antidepressivas. Sua obtenção é feita por meio da extração de folhas de uma planta africana *Griffonia simplicifolia*. Outra alternativa seria a expressão de genes responsáveis pela produção deste metabólito em organismos geneticamente modificados, porém este possui um rendimento muito baixo. *Penicillium griseoroseum* se mostrou um interessante organismo capaz de halogenar a posição 5. Após a obtenção do 5-bromotriptofano, uma substituição nucleofílica seria o suficiente para a obtenção do 5-HTP (CHEN, 2008).

#### 4.4 ENSAIO BIOLÓGICO REALIZADO COM OS ÁCIDOS TETRÔNICOS E O DICLAVATOL.

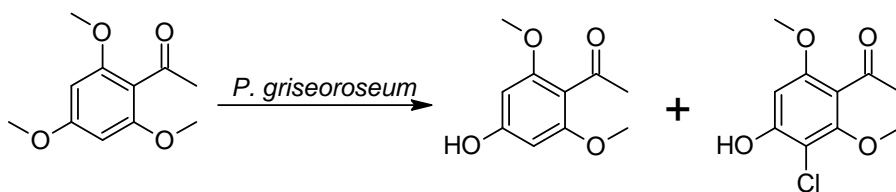
Diclavatul, ácido viridicático e ácido terrétrico isolados como metabólitos secundários de *Penicillium griseoroseum* foram ensaiados frente às bactérias descritas no item 3.4.18, porém nenhuma das substâncias testadas apresentaram atividade nas concentrações testadas.

Ácidos tetrônicos são conhecidos por possuírem atividade antibiótica relevante, porém o número de carbonos na cadeia lateral pode influenciar

na mesma. Assim, os metabólitos isolados que possuem uma cadeia lateral com apenas seis átomos de carbono podem não ter sido ativos contra as bactérias patogênicas testadas.

#### 4.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE SUBSTRATOS POLIMETOXILADOS.

A inspiração para o estudo de modificações metabólicas utilizando fontes halogenadas com *Penicillium griseoroseum* partiu do trabalho de Silva (2009), onde o mesmo fungo foi capaz de biotransformar e halogenar um substrato exógeno ao seu metabolismo, de acordo com o Esquema 10.



Esquema 10: Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona.

Assim, foram testados os seguintes substratos: 2',4',6'-trimetoxiacetofenona e 3',4',5'-ácido trimetoxibenzóico, com adição de  $\text{NH}_4\text{Br}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , nas concentrações de 65 g/L e 19 g/L, respectivamente com o objetivo de ocorrer possíveis reações de bromação e com o aumento da concentração de halogênios no meio de cultura, aumentaria a possibilidade de outras reações de halogenações em posições permitidas sinteticamente ou enzimaticamente.

Após a obtenção dos extratos, estes foram analisados por HPLC-PDA/MS, uma vez que o detector de massa é mais sensível e os substratos possivelmente possam possuir proporção isotópica com relação aos átomos de halogênios ( $M+2 = 33\%$  para Cl e  $M+2 = 98\%$  para Br).

Com a análise das bandas cromatográficas do experimento de biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  no meio de cultura, observou-se que uma delas com tempo de retenção em 22 minutos apresentava um espectro de massa com uma proporção isotópica de  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$  bem interessante. O espectro de massas no modo *full scan* para a banda em questão é mostrado na Figura 90.

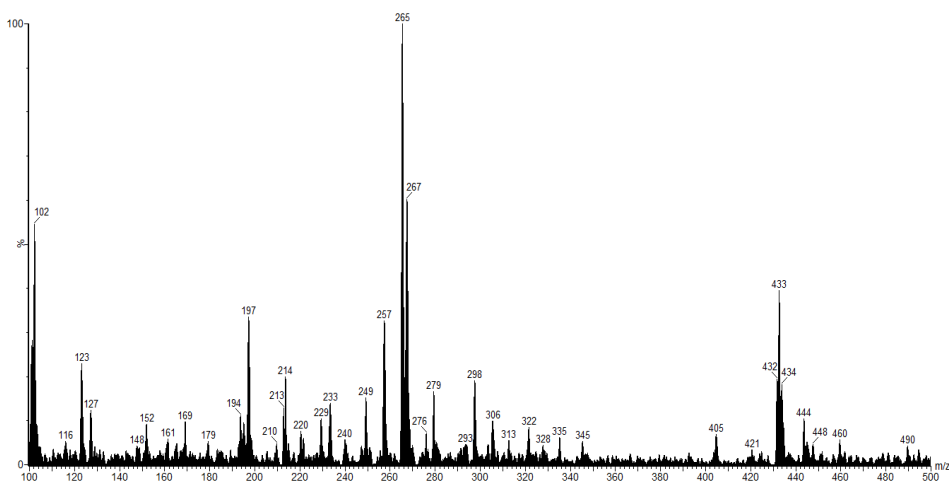


Figura 90: Espectro de massas *full scan* da banda cromatográfica em 22 minutos.

Na figura 90, observa-se que existe uma proporção isotópica para o íon  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$  mas a intensidade observada não era esperada para substâncias contendo um átomo de cloro. Como a massa do substrato inicial é de 210 Da e observamos uma massa de 264 Da, nota-se uma diferença de 54 unidades de massa. Como no trabalho realizado anteriormente pelo grupo o microorganismo realizou a halogenação após a desmetilação de uma das metoxilas (SILVA, 2009), imagina-se que o mesmo tenha ocorrido novamente. Assim, a massa do composto desmetilado em uma posição seria de 196 Da. Da diferença entre 264 e 196

se obtêm 68 unidades de massa, que é compatível com a substituição de dois átomos de hidrogênio por dois átomos de cloro.

Para verificar se a proporção isotópica quando dois átomos de cloro estão ligados a um substrato, utilizou-se o software *MassLynx 4.1* para uma simulação do espectro de massas do produto desmetilado com dois átomos de cloro. O espectro de massas simulado é mostrado a seguir na Figura 91.

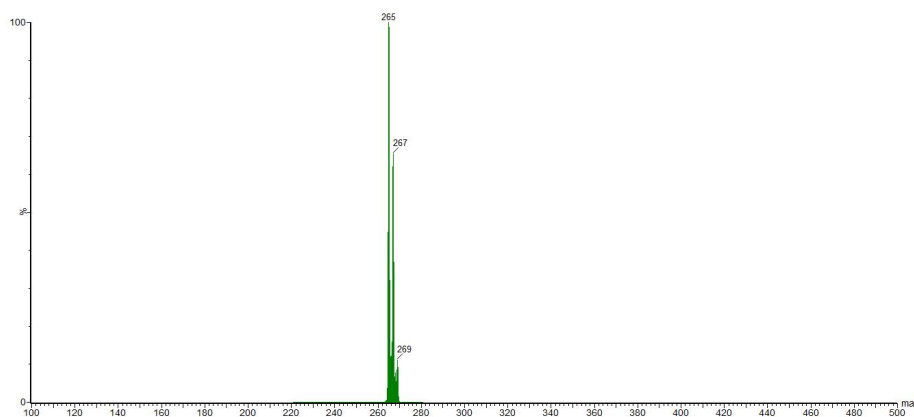
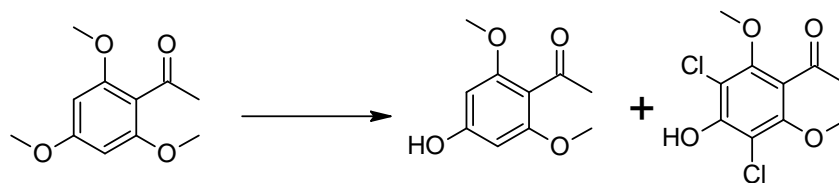


Figura 91: Espectro de massas simulado para o composto biotransformado.

Conforme observado, *Penicillium griseoroseum* possivelmente foi capaz de substituir dois átomos de hidrogênio por cloro, como mostrado pela proporção isotópica encontrada para o íon  $[M+H]^+$  265. Estudos posteriores para o isolamento deste produto deverão ser realizados para melhor confirmação dos dados. O Esquema 11 apresenta uma representação dos produtos de biotransformação encontrados para 2',4',6'-trimetoxiacetofenona na presença de  $NH_4Cl$ . Este tipo de halogenação no anel aromático é muito interessante para a produção de flavonóides halogenados no anel C.



Esquema 11: Biotransformação da 2',4',6'-trimetoxiacetofenona na presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Apesar da simplicidade estrutural também são inéditos na literatura, como produtos de biotransformação.

As análises dos extratos do mesmo substrato na presença de  $\text{NH}_4\text{Br}$  não apresentaram modificações aparentes com relação ao aparecimento de bandas com proporções isotópicas interessantes. O único produto observado foi a desmetilação na posição 4' do substrato. Esta diferenciação entre os átomos de halogênio é muito interessante e pode ser estudada.

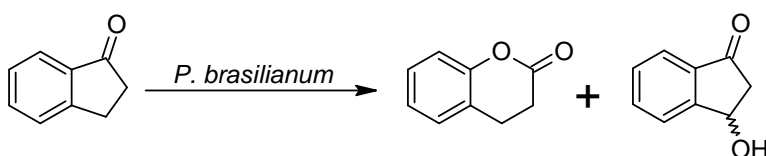
Com relação ao substrato 3',4',5'-ácido trimetoxibenzóico na presença de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_4\text{Br}$  não foram observados produtos de biotransformação para nenhum dos experimentos realizados. A proximidade dos grupos metoxi na molécula pode ter levado a uma não aproximação do sítio ativo da enzima para que ocorressem as transformações. Pode-se presumir também que o substrato exógeno não tenha sido tóxico ao microorganismo fazendo com que o sistema enzimático responsável pela modificação da substância não fosse ativado.

#### 4.6 HIDROXILAÇÃO DA 1-INDANONA POR *P. brasilianum*.

Em paralelo aos estudos de halogenação de metabólitos secundários utilizando a abordagem OSMAC e reações de biotransformação foram realizados outros estudos visando entender se o mecanismo de hidroxilação

da 1-indanona produzida por *Penicillium brasilianum* ocorria de forma enzimática ou não.

No trabalho realizado por Silva (2009) em sua tese de Doutorado, foi verificado que o fungo *P. brasilianum* era capaz de biotransformar a 1-indanona, levando a alguns produtos sendo um deles uma dihidrocumarina e o outro a 3-hidroxi-1-indanona. O Esquema 12 mostra uma ilustração destes produtos de biotransformação.



Esquema 12: Biotransformação da 1-indanona por *Penicillium brasilianum*.

Este estudo teve por objetivo verificar se o produto hidroxilado era um produto de biotransformação ou somente um produto de reação do meio de cultura com o substrato adicionado durante o crescimento do microorganismo.

Para atingir este objetivo, foi necessária a síntese da 3-hidroxi-1-indanona e o isolamento da mesma produzida pelo fungo.

#### **4.6.1 ISOLAMENTO DA 3-HIDROXI-1-INDANONA PRODUZIDA POR *Penicillium brasilianum*.**

Após as etapas de isolamento, a indanona hidroxilada foi obtida na forma de um sólido amarelo escuro e submetida a experimentos de  $^1\text{H}$  NMR, que foram comparados com o mesmo metabólito isolado por Silva (2009). Os sinais atribuídos para a amostra foram sinais de aromáticos em  $\delta$  7,76, 7,72, 7,70 e 7,50,  $\delta$  5,45 (dd,  $J = 2,9$  e 6,8Hz),  $\delta$  3,1 (dd,  $J = 6,8$  e



19Hz) e  $\delta$  2,6 (dd,  $J = 2,9$  e 19Hz). O espectro de  $^1\text{H}$  NMR é mostrado na Figura 92.

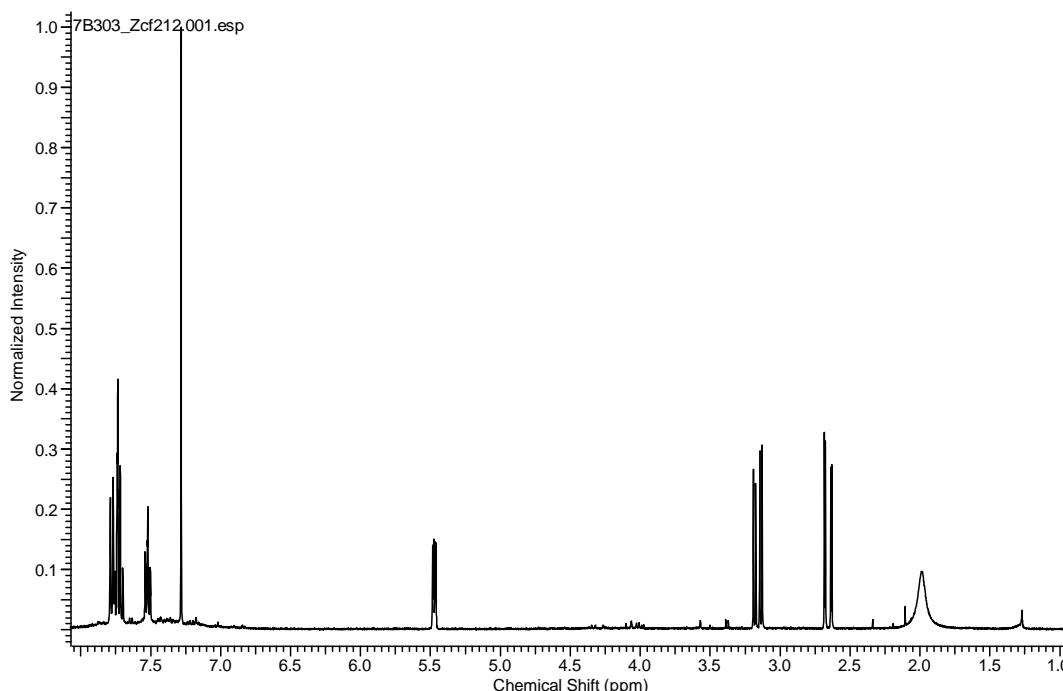


Figura 92: Espectro de  $^1\text{H}$  NMR para a 3-hidroxi-1-indanona isolada de *Penicillium brasilianum*. ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

#### 4.6.2 SÍNTESE DA 3-HIDROXI-1-INDANONA A PARTIR DA 1-INDANONA.

A primeira etapa da síntese seria a bromação da 1-indanona a partir de uma reação radicalar deste com N-bromosuccinamida (NBS). Após a obtenção do extrato da reação, esta foi analisada por GC/MS e um dos produtos obtidos foi a 3-bromo-1-indanona pela confirmação da massa com o íon  $m/z$  211 e seu  $[\text{M}+2]^+$  com proporção isotópica de 98%. Para dar continuidade à reação, o extrato foi submetido a sucessivas etapas de purificação. Uma das frações que se mostrou mais pura pelas análises por TLC foi analisada por GC/MS novamente e  $^1\text{H}$  NMR. Surpreendentemente, nesta fração foi encontrado o íon  $m/z$  148, correspondente a 3-hidroxi-1-indanona. As análises por  $^1\text{H}$  NMR também apresentaram sinais idênticos aos encontrados para a indanona hidroxilada isolada de *P. brasilianum*. O

cromatograma de íons totais e o espectro de massas da fração contendo a 3-hidroxi-1-indanona é mostrado na Figura 93.

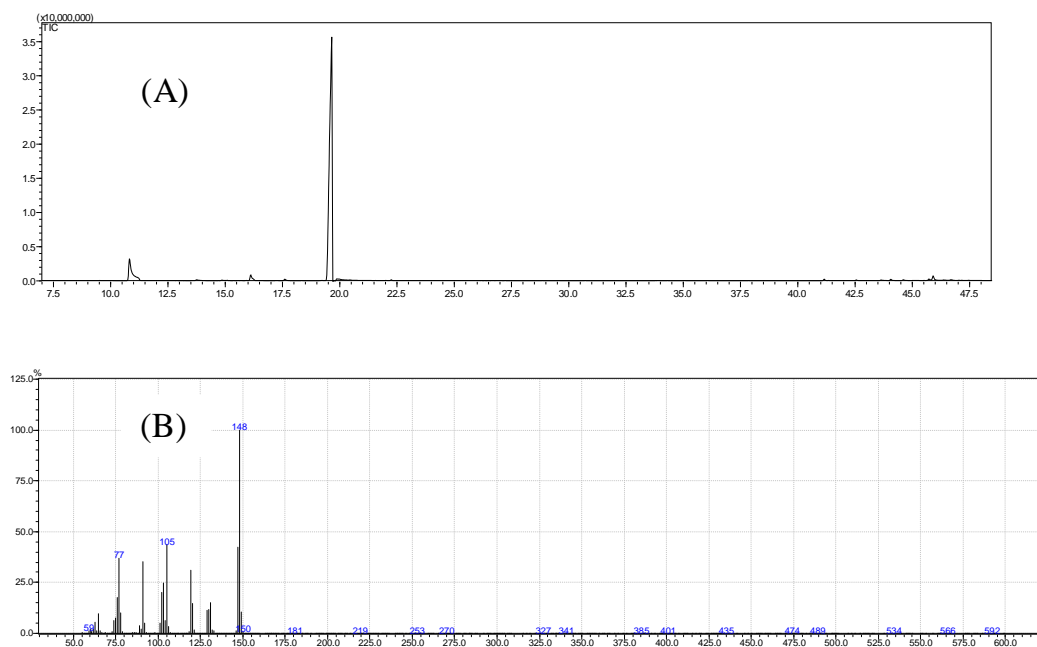
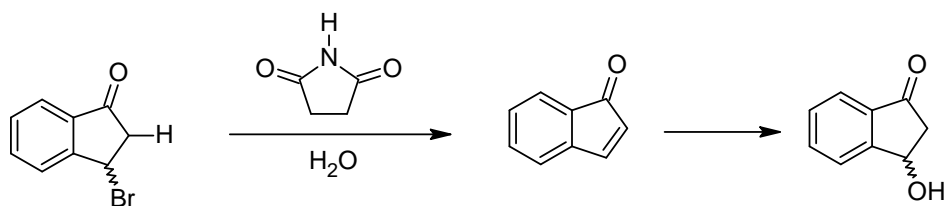


FIGURA 93: Cromatograma de íons totais da 3-hidroxi-1-indanona após etapas de purificação da síntese (A). Espectro de massas no modo *full scan* para a banda em 22 minutos (B).

Uma justificativa para a obtenção do produto hidroxilado seria a presença de água residual proveniente dos solventes destilados utilizados no processo de purificação e a presença de N-succinimida (base resultante da reação radicalar da indanona com NBS), levando a uma desidratação no carbono benzílico. Este produto reduzido foi detectado por GC/MS através da presença do íon  $m/z$  130. Na presença de água, ocorre a hidratação do produto reduzido, levando a formação da 3-hidroxi-1-indanona, de acordo com o Esquema 13.



Esquema 13: Possível formação da 3-hidroxi-1-indanona a partir da 3-bromo-1-indanona.

Com a obtenção da 3-hidroxi-1-indanona produzida por *P. brasilianum* e a sintética, foram realizadas as análises por HPLC/PDA quiral para o estudo do excesso enantiomérico dos produtos.

#### 4.6.3 ANÁLISE POR HPLC/PDA DA 3-HIDROXI-1-INDANONA.

O produto hidroxilado obtido via sintética foi analisado por cromatografia líquida em uma coluna de fase quiral. Como o esperado obteve-se uma mistura enantiomérica de 1:1, conforme mostra a Figura 94.

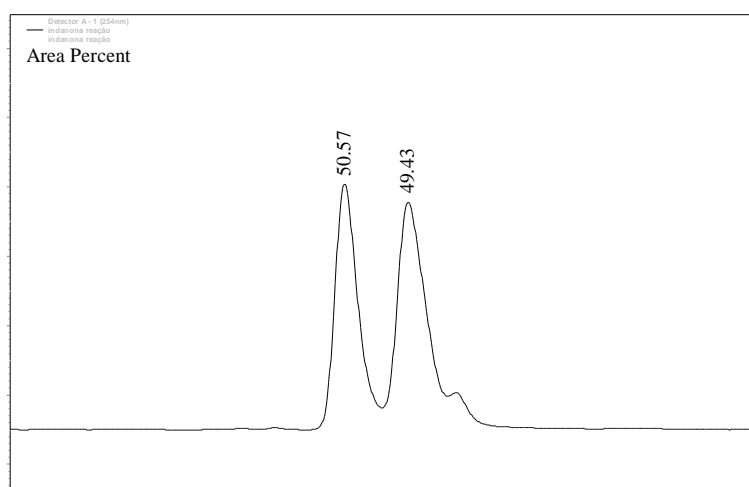


Figura 94: Cromatograma da 3-hidroxi-1-indanona sintetizada.

Para o produto de biotransformação, esperava-se que se a reação ocorresse via hidroxilação enzimática ocorreria um excesso enantiomérico, o que de fato foi observado levando a uma proporção de 1:9, conforme mostra a Figura 95.

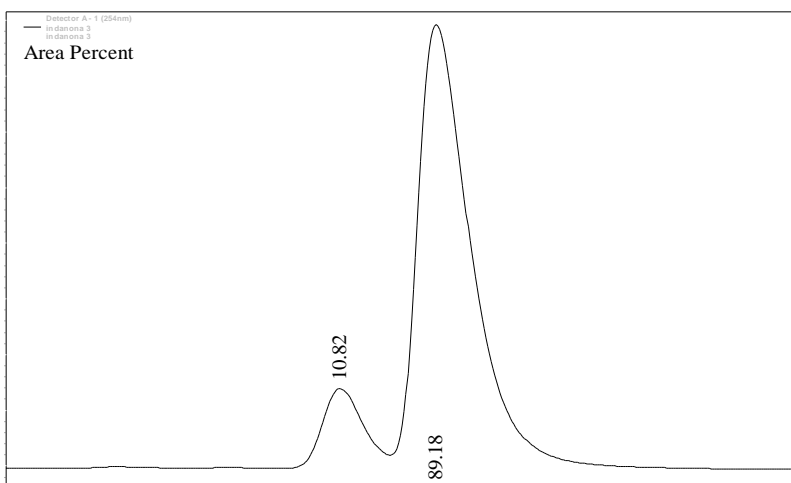


Figura 95: Cromatograma da 3-hidroxi-1-indanona isolada de *P. brasilianum*.

O excesso enantiomérico para esta substância foi calculado em 78%. A atividade ótica da mesma substância também foi medida, fornecendo um  $[\alpha]_D^{25} = -14.7^\circ$ , mostrando que o fungo produz majoritariamente o isômero (-). Estes dados confirmam que a hidroxilação na posição 3 da indanona ocorre de forma enzimática quando 1-indanona é adicionada ao meio de cultura.

RESNICK *et. al.*(1994) descreveram a biotransformação da 1-indanona e 2-indanona em hidroxi-indanona com cepas bacterianas capazes de expressar naftalenodioxigenases (NDO) e toluenodioxigenases. *Pseudomonas sp.* expressando NDO foram capazes de oxidar 1-indanona em 3-hidroxi-1-indanona (91%) e 2-hidroxi-1-indanona (9%). (R)-3-hidroxi-1-indanona foi formada em excesso entantiomérico de 62% (R:S,

81:19), enquanto 2-hidroxi-1-indanona foi obtida em forma de racemato. Com relação à enzima purificada NDO, a oxidação de ocorreu da mesma forma para as duas indanonas. Resnick também avaliou a oxidação de 1- e 2-indanona na presença de [ $^{18}\text{O}$ ] indicando que os produtos hidroxilados foram formados pela incorporação de um único átomo de oxigênio molecular e não pela dioxigenação das cetonas quando ocorre o equilíbrio tautomérico.

O trabalho envolvendo a biotransformação da indanona em dihidrocumarina e 3-hidroxi-1-indanona foi submetido à uma revista científica para avaliação.

## **5.CONCLUSÕES**

## 5.1 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram realizados estudos relacionados às modificações metabólicas por fungos endofíticos quando submetidos à variações no meio de cultura. Assim sendo, para o fungo *Penicillium brasilianum* foram isolados um metabólito secundário, oriundo da modificação metabólica e uma mistura de dois alcalóides tremorgênicos, sendo um resultante da modificação do meio de cultura e outro já isolado (verruculogenina TR-2) em condições normais estabelecidas pelo grupo LaBioMMi. Com a mistura das duas substâncias não foi possível determinar a modificação no metabolismo, mas suposições foram feitas. Posteriores análises deverão ser feitas para determinação desta estrutura.

Os extratos relacionados aos outros experimentos (variação dos cátions, sal marinho e  $\alpha$ -haloácidos) são promissores na busca de novos metabólitos secundários ainda não relatados para esta espécie de *Penicillium*.

Para o fungo *Penicillium griseoroseum*, foram isoladas substâncias da classe dos ácidos tetrônicos (ácido viridicático e ácido terrétrico), diclavatol, e roquefortina C. Também foram detectados por meio de análises por HPLC-PDA-MS/MS dois ácidos tetrônicos nos extratos de acetato de etila. Estes dois metabólitos, juntamente com o diclavatol, parecem ser inéditos.

Com relação às alterações metabólicas provocadas pela adição de sais halogenados no meio de cultura, foram detectadas por GC/MS três substâncias contendo bromo em sua constituição, sendo que uma delas foi relatada como possuindo dois átomos de bromo em sua estrutura. Em

frações de polaridade mais elevada, foi isolada a roquefortina C bromada, que até o presente momento é inédita na literatura.

Ácido viridicático, ácido terrétrico e diclavatol foram investigados quanto à atividade antibacteriana. Nenhum dos compostos apresentou atividade frente à concentração testada.

Em trabalhos paralelos, foi verificado que o fungo *Penicillium griseoroseum* é capaz de halogenar substratos biotransformado, levando a formação da 2',6'-dimetoxi,3',5'-dicloro,4'-hidroxi-acetofenona, quando o meio é suplementado com NH<sub>4</sub>Cl na concentração de 19 g/L. A halogenação não foi confirmada quando foi adicionado NH<sub>4</sub>Br na concentração de 65 g/L. Ácido 3',4',5'- trimetoxibenzóico foi utilizado como substrato para as mesmas reações de biotransformação, porém nenhum produto foi detectado.

3-hidroxi-1-indanona foi isolada de *Penicillium brasilianum* como produto de biotransformação e sua síntese foi realizada. O excesso enantiomérico para a substância produzida pelo fungo foi de 78%, enquanto houve uma mistura racêmica para o produto da reação, conforme o esperado. A atividade ótica do produto enzimática foi avaliada, concluindo que *Penicillium brasilianum* ao hidroxilar a 1-indanona produz majoritariamente o enantiômero (-).

A proposta de trabalho utilizada neste projeto é inovadora no ponto de vista científico. A descoberta de novos metabólitos secundários, halogenados ou não, e as rotas biossintéticas utilizadas para a produção dos mesmos é de interesse acadêmico e industrial. Este trabalho permitiu o início de investigações sobre a indução de possíveis genes silenciados relacionados à reações de halogenação para a descoberta de produtos naturais e enzimas.



## **6.REFERÊNCIAS**

## 6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, K., MIYAJIMA, H., MUSHIRODA, T., YAMAMOTO, Y.. “Metabolites of *Penicillium italicum* WEHMER: Isolation and structures of new metabolites including naturally occurring 4-ylidene-acyltetronic acids, icalicinic acid and italicic acid”. *Chem, Pharm. Bull*, **37** (12), 3229-3235, 1989.

BALTRUSCHAT, H., FODOR, J., HARRACH, B. D., *et. al.*. “Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants”. *New Phytologist*, **180**, 501-510, 2008.

BARRY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Mycomycetum: II.**, Leipzig, Engelman,1966.

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

BROWN, J. R. “Ancient horizontal gene transfer.” *Nature Reviews Genetics*, **4**, 121-132, 2003

BUTLER, A., SANDY, M.. “Mechanistic considerations of halogenating enzymes”. *Nature*, 460, 848-854, 2009.

CHEN, X., van PÉE, K. H.. “Catalytic mechanisms, basic roles, and biotechnological and environmental significance of halogenating enzymes”. *Acta Biochimica Biophysica Sin*, **40** (3), 183-193, 2008.

CHRISTIAN, E.O., COMPTON, J., CHRISTIAN, K.R., MOOBERRY, S.L., VALERIOTE, F.A., CREWS, F.. “Using Jasplakinolide to turn on pathways that enable the isolation of chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi*.”. *Journal of Natural Products*, **68**, 1592-1597, 2005.

CUETO, M., JENSEN, P. R., KAUFFMAN, C., FENICAL, W., LOBKOVSKY, E., CLARDY, J.. “Pestalone, a New Antibiotic Produced by a Marine Fungus in Response to Bacterial Challenge”. *Journal of Natural Products*, 64 (11), 1444-1446, 2001.

DEMAIN, A. L. “**Microbial natural products: a past with a future.**” 2000, p. 3.16. In S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), “**Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries**”. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, United Kingdom.

DRENNAN, C. L., BLASIAK, L. C., “Structural Perspective on Enzymatic Halogenation”, *Accounts of Chemical Research*, **42**, 147-155, 2009.  
endophytes fungus from *Nathapodytes foetida* that produces camptotecin.”

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. “Endophyte fungal from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin.” *Journal of Natural Products*, **69** (8), 1121-1124, 2006

FENICAL, W., AND JENSEN, P.R., “Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria”, *Nature Chemistry Biology*, **2**, 666–673, 2006.

FERNÁNDEZ-BODEGA, M. A., MAURIZ, E., GÓMEZ, A., MARTÍN, J. F., “Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses”. *International Journal of Food Microbiology*, **136**, 18-25, 2009.

FILL, T. P. SILVA, B. F., RODRIGUES-FILHO, E.. “Biosynthesis of Phenylpropanoid Amides by an Endophytic *Penicillium brasilianum* Found in Root Bark of *Melia azedarach*”. *Journal of Microbial Biotechnology*, **20** (3), 622-629, 2010.

FILL, T. P., “*Estudos biossintéticos de amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo Penicillium brasilianum, um endofítico de Melia azedarach (Meliaceae)*”. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

FILL, T., P., ASENHA, H. B. R., MARQUES, A. S., RODRIGUES FILHO, E., “Time course production of indole alkaloids by an endophytic strain of *Penicillium brasilianum* cultivated in rice”, submetido.

FUJIMORI, D. G., WALSH, C., T.. “What’s new in enzymatic halogenations”. *Current Opinion in Chemical Biology*, **11**, 553-560, 2007.

GLOWE, J. B.. “Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products”. **The Mycota**, vol. IV, Springer Verlag, New York, 249-268, 1997.

GRIBBLE, W. G., “**The Handbook of Environmental Chemistry**”, vol.3, Part P, p.1-15, 2003.

GROOS, H.. “Strategies to unravel the function of orphan biosynthesis pathways: recent examples and future prospects”. *Applied Microbiology Research*, **75**, 267-277, 2007

GUANATILAKA, A. A. L., “Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence” *Journal of Natural Products*, **69** (3), 509-526, 2006.

HAWKSWORTH, D. L. “The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited”. *Mycological Research*, **105**, 1422-1431, 2001.

HAWKSWORTH, D. L..”The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation”. *Mycological Research*, **95**, 641-655, 1991. *Journal of Natural Products*, **68**, (12), 1717-1719, 2005.

KULDAU, G. A., YATES, I. E. “Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants.” *Microbial Endophytes*, New York and Basel, 85-120, 2000.

KUZARI, S., LAMSHOFT M., ZÛHLKE, SPITELLER, M. “An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin”. *Journal of Natural products*, in press.

LI MIAO, KWONG T.F.N., PEI-YUAN QIAN.. “Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrimum* c.f. *saccharicola*.” *Applied Microbiology Biotechnology*. **72**, 1063–1073, 2006.

LIMA,U.A., AQUARONE, E., BORZANI,W." **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**". São Paulo: Edgard Blucher, 1975 p. 1-18.

MASUMA, R., TANAKA, Y., OMURA, S., “Bioconversion and biosynthesis of macrolide antibiotics. XXVII. Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and its significance in the study of biosynthetic regulation of the antibiotic”, *Journal of Fermentation Technology*. **61**, 607 - 614, 1983.

NAYAR, M. N. S., SUTAR, C. V., BHAN, M. K.. “Alkaloids of the stem bark of *Hesperethusa crenulata* , **10** (11), 2843-2844, 1971.

NENKEP, V., YUN, K., ZHANG, D., CHOI, D., H., KANG, J. S., SON, B. W.. “Induced Production of Bromomethylchlamydosporols A and B from the Marine-Derived Fungus *Fusarium tricinctum*”. *Journal of Natural Products*, in press.

OVERY, D. P., NIELSEN, K. F., SMEDSGAARD, J.. “Roquefortine/oxaline biosynthesis pathway metabolites in *Penicillium ser*.

Corymbifera: in planta production and implications for competitive fitness”. *Journal of Chemical Ecology*, **31** (10), 2373-2390, 2005.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves. Microbiol Ecology of leaves**, Springer Verlag, New York, 179-197, 1991

PROUDFOOT, J. R.. “Drugs, leads and drug-likeness: an analyses of some  
PURI, S. C., VERMA, V., AMNA, T., QAZI, G. N., SPITELLER, M. “An recently launched drugs.” *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, **12**, 1647- 1650, 2002.

RESNICK, S.M., TOROK, D., S., LEE, K., BRAND, J., M., GIBSON, D., T., “Regiospecific and stereoselective hydroxylation of 1-indanone and 2-indanone by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase”, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(9), 3323-3328, 1994.

SANTOS, M.R.G. dos. “Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium moniliforme* Isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae)” Tese( Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, **2003**.

SHANGGUAN, N., HEHRE, W. J., OHLINGER, W. S., *et. al.*. “The Total Synthesis of Roquefortine C and a Rationale for the Thermodynamic Stability of Isoroquefortine C over Roquefortine C”. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 6281-6287, 2008.

SHAO, C. L., WANG, C. Y. GU, Y. C., *et. al.*. “Penicinoline, a new pyrrolyl 4-quinolinone alkaloid with an unprecedented ring system from an

endophytic fungus *Penicillium sp.*” *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20, 3284-3286, 2010.

SILVA, B. F., & Rodrigues-Filho, E., Production of a benzylated flavonoid from 5,7,3',4',5'-pentamethoxyflavanone by *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, **67**,184-188, 2010.

SILVA, B. F., “Estudo do potencial enzimático de microorganismos endofíticos para a biotransformação de produtos naturais e sintéticos”. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, 2009.

SILVERSTEIN, R. M., KIEMLE, D. J., WEBSTER, F. X., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Editora LTC, Sétima Edição, 2007.

STROBEL, G. DAISE, B. “Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67** (4), 491- 502, 2003

STROBEL, G., DAISY, B., CASTILLO, U., HARPER, J. “Natural products from endophytic microorganisms.” *Journal of Natural Products*, **67**, 257-268, 2004.

STROBEL, G., FORD, E., LI, J., SEARS, J., SIDHU, R. S., HESS, W. M. “*Seimatoantlerium tepuiense* gen, nov., a unique epiphytic fungus producing taxol from the *Venezuelan Guyana*.” *Systematic and applied Microbiology*, **220**, 426-427, 1999.



STROBEL, G., HESS, W. M., FORD, E., SIDHU, R. S., YANG, X. “Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **17**:(5-6), 417-423, 1996a

STROBEL, G., YANG, X. S., SEARS, J., KRAMER, R., SIDHU, R. S., HESS, W. M. “Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*.” *Microbiology-UK*, **142**, 435, 1996.

TAMBURINI, E., MASTROMEI, G.. “Do bacterial cryptic genes really exist?”, *Research in Microbiology*, **151**, 179-182, 2000.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R. e CASE, C. L. **Microbiologia**. Artimed Editora S.A. Porto Alegre, 2006.

TSUYUKI, R., YOSHINARI, T., SAKAMOTO, N., et. al.. “Enhancement of Trichothecene Production in *Fusarium graminearum* by Cobalt Chloride”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, in press.

TURNER, W. B. “**Commercially Important Secondary Metabolites**” IN: Smith, J. E. & Berry, D. K.; “**The Filamentous Fungi, Industrial Mycology**”. Wiley 1: 1975, p. 122-142.

van PÉE, K.H.. “Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria”, *Annual Review of Microbiology*. **50**, 375–399, 1996.

VLEGGAR, R., WESSELS, P., L., “Stereochemistry of the dehydrogenation of (2*S*)-histidine in the biosynthesis of roquefortine and oxaline”, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **4**, 160-162, 1980.

WANG, G. Y. S., ABRELL, L. M., AVELAR, A., CREWS, P.. “New hirsutane based sesquiterpenes from salt water cultures of a marine sponge-derived fungus and the terrestrial fungus *Coriolus consors*”. *Tetrahedron*, **54** (26), 7335-7342, 1998.

YIGITOGU M., MCNELL B.. “Ammonium ion & citric acid supplementation in batch cultures of *Apergillus niger* B 60”. *Biotechnology Letters*, **14**,831-836, 1992.

YUAN, J., JIAN-NAN, B., BING, Y., XU-DONG, Z. “Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of Taxol.” *Chinese Journal of Biotechnology*, **22**:(1), 1-6, 2006

ZHELIFONOVA, V.P., MAIER, A., KOZLOVSKII, A.G., “Effect of various factors on the biosynthesis of piscarinines, secondary metabolites of the fungus *Penicillium piscarium* Westling”. *Applied Biochemistry and Microbiology*. **44** (6), 608–612, 2008.

<[http://www.oceanografia.ufba.br/ftp/Introducao\\_Oceanografia/quimica\\_1\\_van.pdf](http://www.oceanografia.ufba.br/ftp/Introducao_Oceanografia/quimica_1_van.pdf)>. Acesso em Agosto/2009.