

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

*“O uso da RMN na caracterização e quantificação de
metabólitos produzidos por microorganismos com potencial
biotecnológico”*

Ângela Maria Montes Peral Valente

SÃO CARLOS – SP

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“O uso da RMN na caracterização e quantificação de metabólitos produzidos por microorganismos com potencial biotecnológico”

Ângela Maria Montes Peral Valente

Tese apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR EM QUÍMICA**.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira
Co-orientador: Dr Itamar Soares de Melo

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

V154ur

Valente, Ângela Maria Montes Peral.

O uso da RMN na caracterização e quantificação de metabólitos produzidos por microorganismos com potencial biotecnológico / Ângela Maria Montes Peral Valente. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

156 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Ácido micofenólico. 3. Penicillium. 4. Fermentação. I. Título.

CDD: 543.0877 (20^a)

Dedico

Aos meu marido João, aos meus filhos João Paulo, Marina e João Gabriel . Aos meus pais Manoel e Clair, à minha sogra Gerci, aos meus irmãos Manoel e Lucimara e toda à minha família pelo amor e carinho em todos os momentos da minha VIDA.

Homenageio

Meu filho João Mateus, mesmo estando ao lado de "DEUS", está presente em todos os momentos da minha VIDA.

Ofereço

*Ao meu netinho Lucca um presente de “Deus” na minha
VIDA.*

Agradecimentos

A Deus por sua presença constante em minha vida.

Ao professor Dr. Antonio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos/SP pela orientação, amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo Laboratório de Microbiologia Ambiental Embrapa Meio Ambiente - Jaguariúna/SP pela orientação, amizade e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Drs Alcindo A. dos Santos, Antonio Aparecido Mozeto, João Batista Fernandes, Maria Fátima das Graças F. da Silva, Massami Yakashiro, Edson Rodrigues Filho, Quezia Bezerra Cass e Dulce Helena Ferreira de Souza do Departamento de Química da Universidade de São Carlos/SP e demais professores pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos meus amigos Andersson, Ana Paula, Elisangela, Cris, Francinete, Lica, Margareth e Regina por fazer parte da minha VIDA

Aos colegas do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Andersson, Cristina, Elisangela Leila, Luciano, Lucinéia, Regina, Vladimir, Valmir, Katyúscya, Maiara, Mário, Walmir e Gláucia pela amizade e pelos bons momentos durante estes quatro anos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente, Flávia, Marise e Aldo.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais, Laboratório de RMN do DQ da UFSCar e demais laboratórios do Departamento de Química da Universidade de São Carlos/SP, pela convivência durante a execução deste trabalho.

Ao corpo Técnico do Departamento de Química da UFSCar, Luciana, Paulo, Valdir e Dorai pelo apoio e serviços prestados durante a execução do trabalho.

Ao corpo Técnico do Laboratório de Microbiologia Meio Ambiente da Embrapa-Jaguariúna/SP, João Luiz, Roseli, Rosângela, Márcia e Elke, sempre dispostos a ajudar e pelo excelente profissionalismo.

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas Andrey, Afonso, Antonia, Fábio, Francinete, Gesimar, Grace, Maria Lucília, Murgo, Ana Paula, Andréia, Pericles, Regina e Rodrigo pela amizade e pelos bons momentos durante estes anos.

A Dirigente de Ensino Elin de Freitas Monte Claro Vasconcellos, Supervisores de Ensino, João Miguel Gasolli e colegas da Diretoria de Ensino de Mogi Mirim, Sílvia, Solange, Fátima e Carlos.

Ao Dirigente de Ensino José Carlos Pereira, Supervisores de Ensino, Cristina Pirajá, e Márcia Belli e colegas da Diretoria de Ensino de São João da Boa Vista, Mariângela, Solange, Edson, Fabiana e Ana Cláudia.

Aos amigos de Águas da Prata, Marcos, Sílvia, Helinho, Ana Célia, Josué, Tércio, Luthi, Gisela, Maria de Lourdes, Elaine, Maria Alice e Idacarmem.

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFSCar e ao corpo técnico e administrativo, pela oportunidade de realização deste trabalho, apoio e serviços prestados.

A CAPES/CNPQ/FAPESP pela contribuição com recursos financeiros o que possibilitou a execução deste trabalho.

A secretaria de Educação do Estado de São Paulo

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

Principais Abreviações

aq - Aquisition time (Tempo de aquisição)

d - *Dubleto*

d1 – Intervalo de relaxação

d8 - Tempo de mistura para evolução do NOE

dd - *Duplo-dubleto*

ddd - *Duplo-duplo-dubleto*

dl - *Dubleto largo*

DMSO - Dimetilsulfóxido

dtd - *Duplo-triplo-dubleto*

EM - Espectrometria de massas

EM/EM - Espectrometria de massas - utilizando o recurso *Tandem*

ESI - *Eletrospray*

F1 – eixo vertical no espectro bi-dimensional

F2 - eixo horizontal no espectro bi-dimensional

FID – *Free Induction Decay* (Decaimento Livre provocado por Indução)

*g*COSY - Correlation Spectroscopy – with field gradient

*g*HMBC - Heteronuclear multiple bond correlation - with field gradient

*g*HSQC - Heteronuclear single quantum coherence - with field gradient

Hz - Hertz

J - Constante de acoplamento (em Hertz)

lb – *Line broadning* (menor distância em Hertz considerada durante uma multiplicação matemática)

m - *Multiplete*

m/z - Relação massa/carga

MeOH - Metanol

MHz - Mega-Hertz

NOE – *Nuclear Overhauser effect* (efeito nuclear Overhauser)

ns – Número de *scans* (aquisições)

p1 – pulso de 90° com alta potência aplicado no canal f1

PI9 – Potência do pulso utilizada para a irradiação do sinal do solvente

RMN ¹³C - Ressonância magnética nuclear de carbono-13

RMN ¹H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s - Singleto

SI (1) – número de pontos utilizado no processamento do espectro ao longo de F1

SI (2) - número de pontos utilizado no processamento do espectro ao longo de F2

s/ -Singleto largo

SWH – *Spectral Width* (Janela spectral em Hertz)

T₁ – tempo de relaxação longitudinal (spin-rede)

td – *Time Domain* (número de pontos utilizados na aquisição do espectro 1D)

TD1 – número de experimentos ao longo de F1

TD2 - número de experimentos ao longo de F2

TMS - Tetrametilsilano

Lista de Tabelas

| | | |
|-------------------|--|----|
| TABELA 3.5.1-1: | Cultivo em meio Czapek utilizando o <i>P. sp. Catl1.1</i> para construção da curva de produção da citrinina | 26 |
| TABELA 3.5.1-2: | Extrações realizadas (pH 7,8 e pH 3) durante o período de 20 dias de fermentação utilizando o fungo <i>P. sp. Catl1.1</i> | 27 |
| TABELA 3.6.1-1: | Concentrações dos extratos do fungo <i>Penicillium. sp. Catl1.1</i> obtidos em pH 3 para curva de calibração | 31 |
| TABELA 3.8.1-1: | Composição das águas minerais e do meio Czapek | 36 |
| TABELA 3.10.5-1: | Cultivo em meio Czapek utilizando <i>P. sp. Casp5</i> para construção da curva de produção de ácido micofenólico | 42 |
| TABELA 3.10.5-2: | Extrações realizadas em pH 3 durante o período de 20 dias de fermentação por <i>P.sp. Casp5</i> | 43 |
| TABELA 3.10.9-1: | Concentrações dos extratos em pH 3 do fungo <i>Penicillium sp. Casp5</i> para construção da curva de calibração | 45 |
| TABELA 4.1.3-1: | Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, gHSQC, gHMBC do extrato obtido em pH 3 (citrinina) dissolvido em CDCl_3 | 62 |
| TABELA 4.1.4.2-1: | Massas de extratos obtidas de 50 mL de filtrado após acidificação para pH 3 | 66 |
| TABELA 4.1.4.5-1: | Produção de citrinina no extrato em pH 3 por <i>Penicillium sp. Catl1.1</i> para o período de fermentação de 20 dias | 80 |
| TABELA 4.1.4.7-1: | Concentrações de citrinina no extrato do <i>Penicillium sp. Catl1.1</i> calculadas através da fórmula descrita no item 4.1.4.6 pág.81. | 84 |
| TABELA 4.1.5.1-1: | Massas de extratos obtidos em pH 3 (citrinina) nos diferentes tempos de esterilização e modelos de autoclave | 86 |
| TABELA 4.1.5.2-1: | Massas dos extratos em pH 7,8 produzidos pelo fungo <i>Penicillium sp. Catl1.1</i> , quando o meio de cultura foi esterilizado em 10, 15 e 20 min. autoclave horizontal e 15 min. na autoclave vertical) | 87 |
| TABELA 4.1.6.1-1: | Composição das águas minerais e do meio Czapek | 91 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| TABELA 4.1.6.1-2: | Massas de extratos obtidos em pH 7,8 do cultivo por <i>P. sp. Catl1.1</i> quando cultivado em águas minerais e diferentes formas de inóculo | 92 |
| TABELA 4.1.6.2-1: | Massas dos extratos em pH 3 obtidas do cultivo por <i>P.sp. Catl1.1</i> em águas minerais e diferentes formas de inoculação | 93 |
| TABELA 4.1.6.2-2: | Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, <i>gHSQC</i> , <i>gHMBC</i> (4Hz) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 103 |
| Tabela 4.1.6.2-3: | Prpriedades físicas da citrinina e da citrinina metoxilada (epímeros) | 104 |
| TABELA 4.1.6.2-4: | Atividade citotóxica das substâncias produzidas por fungo <i>Penicillium sp. Catl1.1</i> . Os resultados estão apresentados com IC_{50} (concentração que inibe 50%) e intervalos de confiança | 107 |
| TABELA 4.2.1.1-1: | Massas de extratos obtidas em 50 mL de filtrado acidificado para pH 3 | 112 |
| TABELA 4.2.1.4-1: | Concentrações do ácido micofenólico no extrato em pH 3 do <i>Penicillium sp. Casp5</i> no período de 20 dias de fermentação | 119 |
| TABELA 4.2.1.4-2: | Concentrações do ácido micofenólico no extrato 0bitido em pH 3 utilizando o fungo <i>Penicillium sp. Casp5</i> calculado através da fórmula descrita no item 4.2.1.4, pág.116 | 122 |
| TABELA 4.3.1-1: | Identificação das actinobactérias endofíticos de milho quanto ao perfil de ácidos graxos da membrana celular | 126 |
| TABELA 4.3.2-1: | Interação <i>in vitro</i> de <i>S. violaceusniger violaceusniger</i> de milho com <i>P. aphanidermatum</i> , <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> , <i>P. parasitica</i> e <i>F. Moniliforme</i> (COSTA, 2005) | 127 |
| TABELA 4.3.4.1-1: | Deslocamentos químicos em ppm de RMN de ^1H , ^{13}C (SONG <i>et al</i> , 2006) para a prodigiosina | 144 |
| TABELA 4.3.4.1-2: | Deslocamentos químicos em ppm de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, <i>gHSQC</i> , <i>gHMBC</i> , <i>gCOSY</i> e ^1H - ^{15}N <i>gHMBC</i> | 145 |

Lista de Figuras

| | | |
|-----------------|--|----|
| FIGURA 1.1-1: | Estruturas de um fungo vistas através de microscópio eletrônico (MEV). Notam-se filamentos (hifas) e corpos esféricos que são os esporos vegetativos ou conídio | 3 |
| FIGURA 1.2-1: | Microfotografia de <i>Penicillium</i> sp. 1 - hifa; 2 - conidióforo; 3 - fiálide; 4 - conídio; 5 – septo | 5 |
| FIGURA 1.2.1-1: | Estrutura da citrinina no equilíbrio dinâmico | 6 |
| FIGURA 1.2.1-2: | Estruturas da citrinina; citrinina H1 e citrinina H2 | 8 |
| FIGURA 1.2.2-1: | (A) Estrutura do ácido micofenólico proposta inicialmente (1933); (B) Estrutura correta do ácido micofenólico (1952) | 9 |
| FIGURA 1.2.2-2: | Estrutura do Micofenolato Mofetil (MMF) | 10 |
| FIGURA 1.3-1: | Seqüência de pulso (<i>Inversion Recovery</i>) | 12 |
| FIGURA 1.3-2: | Processo de inversão e recuperação (<i>Inversion Recovery</i>) | 12 |
| FIGURA 1.4.1-1: | Estruturas de prodigininas produzidas por actinobactérias | 15 |
| FIGURA 4.1.1-1: | Placa-1 (1 min. álc. 70%, 4 min. hipoclorito, 1 min álc. 70% e 1 min. água); Placa-2 (1 min. álc.70%, 3 min. hipoclorito, 1 min álc. 70% e 1 min. água); Placa-3 (1 min. álcool 70%, 2 min. hipoclorito, 1 min álc. 70% e 1 min. água); Placa-4 (1 min. álc. 70%, 1 min. hipoclorito, 1 min álc. 70% e 1 min. água); Placa-5 (1 min. álc. 70% e 1 min. água) e Placa-6 (lavagem em álc.70%, hipoclorito 2%, álc. 70% e água) | 56 |
| FIGURA 4.1.1-2: | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 56 |
| FIGURA 4.1.1-3: | Estrutura filamentosa do <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 (Microscopia Eletrônica de Varredura) | 57 |
| FIGURA 4.1.1-4: | Fermentação (7 dias) do fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 em meio Czapek | 57 |
| FIGURA 4.1.2-1: | (A) Extrato obtido em pH 7,8 (mistura de substâncias; (B) extrato obtido em pH 3 (citrinina pura) | 58 |
| FIGURA 4.1.3-1: | Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) | 59 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| FIGURA 4.1.3-2: | Espectro de RMH de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 ; 100MHz) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) | 59 |
| FIGURA 4.1.3-3: | Espectro de <i>g</i> HSQC (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) | 60 |
| FIGURA 4.1.3-4: | Espectro de <i>g</i> HMBC (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) | 61 |
| FIGURA 4.1.3-5: | Equilíbrio dinâmico deslocado no sentido da forma <i>p</i> -quinona e correlações encontradas no experimento de <i>g</i> HMBC | 61 |
| FIGURA 4.1.3-6: | Espectro de massas <i>full-scan</i> do extrato obtido em pH 3 (citrinina) em acetonitrila por <i>Electrospray</i> (ESI), no modo negativo de ionização | 63 |
| FIGURA 4.1.4.3-1: | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato em pH 1 (citrinina precipitada) | 67 |
| FIGURA 4.1.4.3-2: | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato em pH 3 (citrinina) | 67 |
| FIGURA 4.1.4.4-1: | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) da citrinina em baixas temperaturas | 69 |
| FIGURA 4.1.4.4-2: | Espectro de <i>g</i> HMBC (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) à 213 K e à 298 K | 70 |
| FIGURA 4.1.4.4-3: | Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD) da citrinina à baixas temperaturas | 71 |
| FIGURA 4.1.4.4-4: | Adição nucleofílica do tipo 1,4 de Michael na forma isomérica <i>o</i> -quinona | 72 |
| FIGURA 4.1.4.4-5: | Espectro de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$; 3:1) do extrato em pH 3 | 73 |
| FIGURA 4.1.4.4-6: | Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) do extrato em pH 3 (citrinina): A (1 ^o dia, 298 K); B (3 ^o dia, 298 K) e C (3 ^o dia, 323 K) | 74 |
| FIGURA 4.1.4.4-7: | Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) da citrinina à 298 K | 75 |
| FIGURA 4.1.4.4-8: | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) à 298K | 76 |
| FIGURA 4.1.4.5-1: | Áreas das integrais da citrinina e da DMF no espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 | 77 |
| FIGURA 4.1.4.5-2: | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 para o tempo de fermentação zero | 78 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| FIGURA 4.1.4.5-3: | Espectro RMN ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 com 2 e 4 dias de fermentação | 79 |
| FIGURA 4.1.4.5-4: | Curva de produção de citrinina no extrato obtido em pH 3 para o fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 | 81 |
| Figura 4.1.4.6-1: | Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) mostrando a área das integrais da citrinina DMF (padrão) | 82 |
| FIGURA 4.1.4.7-1: | Curva de calibração da citrinina com padronização interna | 83 |
| FIGURA 4.1.5.1-1: | Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) obtidos de extratos em pH 3 (citrinina) quando esterilizados por 10, 15 e 20 min. na autoclave horizontal e 15 minutos na autoclave vertical. | 84 |
| FIGURA 4.1.5.2-1: | Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos obtidos em pH 7,8, para o meio de cultivo esterilizado por 10, 15 e 20 min. e 15 min. nas autoclaves horizontal e vertical | 89 |
| FIGURA 4.1.5.2-2: | Ampliação de regiões do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) | 89 |
| FIGURA 4.1.6.1-2: | Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos obtidos em pH 3 do cultivo do <i>P. sp. Cat1.1</i> em águas minerais e em meio Czapek | 90 |
| FIGURA 4.1.6.1-2: | Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos obtidos em pH 7,8 do cultivo por <i>P. sp. Cat1.1</i> na água Platina (3 discos e 20 μL) | 91 |
| FIGURA 4.1.6.2-1: | Espectros de RMN ^1H (CDCl_3) do extrato em pH 3 obtido do cultivo em águas minerais utilizando 20 μL de suspensão de esporos na inoculação | 94 |
| FIGURA 4.1.6.2-2: | Espectros de RMN ^1H (CDCl_3) do extrato pH 3 obtidos do cultivo do <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 em águas minerais utilizando 3 discos na inoculação | 95 |
| FIGURA 4.1.6.2-3: | Espectros de RMN ^1H (CDCl_3) dos extratos obtido em pH 3 do cultivo do fungo <i>P. sp. Cat1.1</i> em águas das fontes Santa Júlia e Platina | 97 |
| FIGURA 4.1.6.2-4: | Espectro de RMN de ^1H (298 K) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 98 |
| FIGURA 4.1.6.2-5: | Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (298 K) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 98 |
| FIGURA 4.1.6.2-6: | Espectro de ^{13}C (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 99 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| FIGURA 4.1.6.2-7: | Espectro de <i>g</i> COSY (CD ₃ OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 100 |
| FIGURA 4.1.6.2-8: | Espectro de <i>g</i> HSQC (CD ₃ OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 100 |
| FIGURA 4.1.6.2-9: | Espectro de <i>g</i> HMBC (8Hz) (CD ₃ OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros) | 101 |
| FIGURA 4.1.6.2-10: | Espectro de <i>g</i> HMBC (4Hz) das duas formas isoméricas da citrinina metoxilada (epímeros) e dissolvida em CD ₃ OD | 101 |
| FIGURA 4.1.6.2-11: | Reação de adição do tipo 1,4 de Michael (reversível) | 104 |
| FIGURA 4.1.6.2-12: | Espectro de massas da citrinina metoxilada ou epímeros dissolvida em metanol | 105 |
| FIGURA 4.1.6.2-13: | Espectro de massas da citrinina metoxilada ou epímeros dissolvida em acetonitrila | 106 |
| FIGURA 4.2-1: | Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do fungo <i>Penicillium</i> sp. Casp | 109 |
| FIGURA 4.2-2: | Microfotografia do fungo <i>Penicillium</i> sp. Casp5 | 110 |
| FIGURA 4.2.1.2-1: | Espectros de RMN de ¹ H do extrato obtido em pH 7,0 e em pH 3,0 (CDCl ₃) | 113 |
| FIGURA 4.2.1.3-1: | Estruturas do ácido micofenólico e da DMF com os sinais dos hidrogênios utilizados nas integrais circulados | 114 |
| FIGURA 4.2.1.3-2: | Espectros RMN de ¹ H dos extratos obtidos em pH 3 com 2 dias e 8 dias de fermentação para o ácido micofenólico (CDCl ₃) | 115 |
| FIGURA 4.2.1.3-3: | Área das integrais do ácido micofenólico e da DMF no espectro de RMN de ¹ H do extrato em pH 3 por <i>Penicillium</i> sp. Casp5 (CDCl ₃) | 116 |
| Figura 4.1.4.6-1: | Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃) da área das integrais do ácido micofenólico e da DMF (padrão) | 117 |
| FIGURA 4.2.1.4-1: | Curva de produção do ácido micofenólico para o <i>Penicillium</i> sp. Casp5 para o período de 20 dias de fermentação | 120 |
| FIGURA 4.2.2.1-1: | Curva de calibração do ácido micofenólico do extrato fúngico obtido em pH 3 com padronização interna (DMF) | 122 |
| FIGURA 4.3.1-1: | Colônia das aticnobactéria (<i>Streptomyces violaceusniger violaceusniger</i>) | 125 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| FIGURA 4.3.1-2: | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do <i>S. violaceusniger violaceusniger</i> | 125 |
| FIGURA 4.3.2-1: | Inibição do desenvolvimento do fitopatógeno: A) isolado endofítico 14f1d/2 inibindo <i>F. moniliforme</i> ; B) placa controle, somente o fungo | 127 |
| FIGURA 4.3.3-1: | Eficiência do extrato <i>S. violaceusniger violaceusniger</i> . Placa de Petri à esquerda evidenciando a inibição do fungo <i>P. aphanidermatum</i> pelo metabólito extraído e, placa da direita, controle (somente o solvente) (COSTA, 2005) | 128 |
| FIGURA 4.3.4-1: | Coluna Sephadex-LH 20 do extrato 14f1d/2 (dicloro/metanol, 1:1) | 129 |
| FIGURA 4.3.4.1-1: | Espectro de RMN de ^1H da prodiginina com as integrais dos sinais (CDCl_3) | 130 |
| FIGURA 4.3.4.1-2: | Espectro de RMN de ^1H da prodiginina com regiões ampliadas (CDCl_3) | 131 |
| FIGURA 4.3.4.1-3: | Espectro de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (100 MHz) da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 131 |
| FIGURA 4.3.4.1-4: | Espectro de gHSQC da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 132 |
| FIGURA 4.3.4.1-5: | Espectro de DEPT-135 da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 133 |
| FIGURA 4.3.4.1-6: | Espectro de gHMBC da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 134 |
| FIGURA 4.3.4.1-7: | Principais correlações do gHMBC da prodiginina | 134 |
| FIGURA 4.3.4.1-8: | Espectro de gCOSY da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 135 |
| FIGURA 4.3.4.1-9: | Ampliações do espectro de gCOSY da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 136 |
| FIGURA 4.3.4.1-10: | Principais correlações do gCOSY da prodiginina | 137 |
| FIGURA 4.3.4.1-11: | Espectro de $^1\text{H}^{15}\text{N}$ gHMBC ($^3J_{\text{NH}}$) da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 138 |
| FIGURA 4.3.4.1-12: | Espectro de gNOESY-1D da prodiginina dissolvida em CDCl_3 | 139 |
| FIGURA 4.3.4.1-13: | Correlações do gNOESY-1D | 140 |
| Figura 4.3.4.1-14: | Estrutura da prodiginina em representação 3D (ACD/3D Viewer) | 140 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| FIGURA 4.3.4.1-15: | Espectro de Massas (<i>Full scan</i>) via <i>Elestrospray</i> modo positivo (ESI ⁺) | 141 |
| FIGURA 4.3.4.1-16: | Espectro de MS/MS para <i>m/z</i> 422,2987 via ESI, modo positivo | 142 |
| FIGURA 4.3.4.1-17: | Estrutura da prodigiosina (SONG <i>et al</i> , 2006) | 143 |
| FIGURA 4.3.4.1-18: | Estrutura da nova prodiginina | 143 |

Lista de Fluxogramas

| | | |
|----------------------|---|----|
| FLUXOGRAMA 3.5.1-1: | Procedimentos experimentais para extração da citrinina o cultivo em meio CzapeK utilizando o fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 | 27 |
| FLUXOGRAMA 3.7-1: | Procedimentos experimentais para extração de metabólitos em pH 7,8 e pH 3 do cultivo do fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 | 35 |
| FLUXOGRAMA 3.8.2-1: | Procedimentos experimentais para extração de metabólitos produzidos no cultivo em águas minerais utilizando o fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 | 37 |
| FLUXOGRAMA 3.8.2-2: | Procedimentos experimentais para isolamento da citrinina metoxilada (epímeros) | 38 |
| FLUXOGRAMA 3.10.5-1: | Procedimentos experimentais para extração do ácido micofenólico | 43 |

Lista de Gráficos

| | | |
|--------------------|--|----|
| GRÁFICO 4.1.5.1-1: | Produção média de extratos em pH 3 (citrinina) produzido pelo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 nos diferentes tempos de esterilização e diferentes autoclaves. | 86 |
| GRÁFICO 4.1.5.2-1: | Massas de extratos obtidos em pH 7,8 produzidos pelo fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 para os diferentes tempos de esterilização nos diferentes modelos de autoclave. | 88 |
| GRÁFICO 4.1.6.1-1: | Produção de extratos obtidos em pH 7,8 do cultivo por <i>P.</i> sp. Cat1.1 cultivado em águas minerais e diferentes formas de inoculação (3 discos e 20 □L) | 92 |
| GRÁFICO 4.1.6.2-1: | Produção de extratos obtidos em pH 3 do cultivo do <i>P.</i> sp. Cat1.1 cultivado em águas minerais e Czapek nas diferentes formas de inoculação (3 discos e 20 □L) | 93 |
| GRÁFICO 4.1.6.2-2: | Produção de extrato obtidos em pH 3 e pH 7,8 | 96 |

Sumário

| | |
|---|-------------|
| Resumo..... | xxv |
| Abstract..... | xxvi |
| 1 – Introdução..... | 1 |
| 1.1 – Microorganismos..... | 2 |
| 1.2 – O gênero <i>Penicillium</i> e seus metabólitos secundários..... | 5 |
| 1.2.1 – Citrinina..... | 6 |
| 1.2.2 – Ácido micofenólico..... | 9 |
| 1.3 - Quantificação de substâncias por RMN de ¹ H..... | 11 |
| 1.4 – Actinobactéria..... | 13 |
| 1.4.1- Prodiginina..... | 14 |
| 2 – Objetivos..... | 16 |
| 2.1 – Objetivos principais..... | 17 |
| 3 – Experimental..... | 19 |
| 3.1 - Isolamento, cultivo e identificação do fungo..... | 19 |
| 3.1.1 – Equipamentos..... | 19 |
| 3.1.2 – Materiais..... | 19 |
| 3.1.3 - Meios e Reagentes..... | 19 |
| 3.1.3.1 – Reagentes..... | 19 |
| 3.1.3.2 – Meios de cultura..... | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.2 – Isolamento, identificação e quantificação das substâncias..... | 21 |
| 3.2.1 – Materiais e Equipamentos..... | 21 |
| 3.2.1.1 – Equipamentos..... | 21 |
| 3.2.1.2 – Materiais (Vidrarias)..... | 22 |
| 3.2.1.3 - Meios e Reagentes..... | 22 |
| 3.3 - Processo de isolamento do fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 é constituído de duas etapas:..... | 22 |
| 3.3.1 - Primeira etapa - coleta do material..... | 22 |
| 3.3.2 - Segunda etapa - isolamento do fungo..... | 23 |
| 3.3.3 - Identificação do fungo..... | 24 |
| 3.3.4 - Cultivo do fungo e isolamento da citrinina..... | 24 |
| 3.3.5 – Análise de Ressonância Magnética Nuclear..... | 25 |
| 3.3.5.1 - Parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos de RMN para a citrinina..... | 25 |
| 3.4 – Análises de EM..... | 26 |
| 3.5 - Cultivo do <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 para curva de produção da citrinina..... | 26 |
| 3.5.1 – Cultivo e extração..... | 26 |
| 3.5.2 – Padronização para quantificação da citrinina..... | 29 |
| 3.5.2.1 – Extração..... | 29 |
| 3.5.2.2 – Volumes de padrão interno (DMF) e de clorofórmio deuterado (CDCl ₃) utilizados no preparo das para as análises de RMN de ¹ H para quantificação da citrinina..... | 29 |
| 3.5.2.3 - Preparo das amostras..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.2.4 – Ressonância magnética nuclear para quantificação da citrinina no extrato do <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1..... | 30 |
| 3.5.2.4.1 – Estimativa de T ₁ | 31 |
| 3.5.2.5 - Cálculo da concentração da DMF..... | 31 |
| 3.5.2.6 – Cálculo da concentração da citrinina no extrato de <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 em pH 3..... | 32 |
| 3.6 – Curva de calibração para o extrato de <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1 em pH 3..... | 32 |
| 3.6.1 - Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ¹ H..... | 33 |
| 3.6.2 – Verificação de substâncias que podem interferir nas medidas quantitativas..... | 33 |
| 3.6.3 – Análise da citrinina em diferentes solventes e temperaturas..... | 34 |
| 3.6.3.1 – Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros da citrinina em diferentes solventes e temperaturas..... | 34 |
| 3.7 – Avaliação da produção de metabólitos do <i>Penicillium</i> Cat1.1, quando o meio de cultura foi esterilizado nas autoclaves vertical e horizontal..... | 35 |
| 3.8 – Avaliação de diferentes formas de inoculação na produção de metabólitos produzidos pelo <i>Penicillium</i> Cat1.1 quando cultivados em águas minerais..... | 37 |
| 3.8.1 – Cultivo..... | 37 |
| 3.8.2 – Extração..... | 38 |
| 3.8.3 - Espectrometria de Massas..... | 39 |
| 3.9 - Citotoxicidade <i>in vitro</i> da citrinina e da citrinina metoxilada (epímeros)..... | 40 |
| 3.9.1 – Material..... | 40 |
| 3.9.2 – Método..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 3.9.3 - Análise Estatística..... | 41 |
| 3.10 - <i>Penicillium</i> sp. Casp5..... | 41 |
| 3.10.1 - Primeira etapa - coleta do material..... | 41 |
| 3.10.2 - Segunda etapa - isolamento do fungo..... | 42 |
| 3.10.3 - Identificação do fungo..... | 42 |
| 3.10.4 – Cultivo e isolamento de substâncias do <i>Penicillium</i> sp. Casp5..... | 42 |
| 3.10.5 - Cultivo do <i>Penicillium</i> sp. Casp5 para curva de produção do ácido micofenólico)..... | 43 |
| 3.10.6 – Ressonância magnética nuclear para quantificação do ácido micofenólico..... | 45 |
| 3.10.6.1 – Estimativa de T_1 | 45 |
| 3.10.7. – Cálculo da concentração da DMF..... | 45 |
| 3.10.8 – Cálculo da concentração de ácido micofenólico no extrato do <i>Penicillium</i> sp. Casp5 em pH 3..... | 45 |
| 3.10.9. – Curva de calibração para o extrato de <i>Penicillium</i> sp. Casp5 em pH 3..... | 46 |
| 3.10.10 – Substâncias que podem interferir nas medidas quantitativas..... | 47 |
| 3.10.11 – Análises do ácido micofenólico em diferentes solventes e diferente temperaturas..... | 47 |
| 3.11 – Isolamento da Actinobactéria..... | 48 |
| 3.11.1 - Identificação do Actinobactéria..... | 48 |
| 3.11.2 - Interação entre actinobactéria e fungos fitopatogênicos..... | 49 |
| 3.11.3 - Produção de metabólitos secundários e sua atividade contra fitopatógenos..... | 49 |
| 3.11.4 – Isolamento da substância ativa do extrato 14f1d/2..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 3.11.5 - Ressonância magnética nuclear para prodiginina..... | 50 |
| 3.11.6 – Espectrometria de massas..... | 52 |
| 4 - Resultados e Discussões..... | 53 |
| 4.1 – <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1..... | 54 |
| 4.1.1 - Isolamento e identificação do fungo..... | 55 |
| 4.1.2 – Processo de isolamento da citrinina..... | 58 |
| 4.1.3 – Identificação estrutural da citrinina..... | 58 |
| 4.1.4 – Quantificação da citrinina por RMN de ¹ H..... | 63 |
| 4.1.4.1 – Volume de filtrado para extração..... | 64 |
| 4.1.4.2 - Volume de solvente utilizado nas extrações..... | 64 |
| 4.1.4.3 - Determinação do pH ideal para a extração..... | 66 |
| 4.1.4.4 – Avaliação da citrinina em diferentes solventes e temperaturas..... | 68 |
| 4.1.4.5 – Curva de produção de citrina utilizando o fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1..... | 76 |
| 4.1.4.5 – Curva de produção de citrina utilizando o fungo <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1..... | 76 |
| 4.1.4.6 - Cálculo da concentração da citrinina no extrato em pH 3..... | 81 |
| 4.1.4.7 – Curva de calibração..... | 83 |
| 4.1.5 – Avaliação da produção de metabólitos por <i>Penicillium</i> sp. Cat1.1, quando o meio de cultura foi esterilizado por 10, 15 e 20 minutos (autoclave horizontal) e 15 minutos (autoclave vertical)..... | 84 |
| 4.1.5.1 – Avaliação dos espectros de RMN de ¹ H do extrato obtido em pH 3..... | 84 |
| 4.1.5.2 - Avaliação dos espectros de RMN de ¹ H do extrato obtido em pH 7,8..... | 87 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.6 – Avaliação dos diferentes tipos de inóculo com a produção de metabólitos por <i>Penicillium</i> sp. Cat11.1 quando cultivados em águas minerais..... | 90 |
| 4.1.6.1 - Avaliação dos espectros de RMN de ¹ H dos extratos obtidos em pH 7..... | 90 |
| 4.1.6.2 – Avaliação dos espectros de RMN de ¹ H dos extrato obtidos em pH 3..... | 93 |
| 4.1.8 - Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 106 |
| 4.2 – <i>Penicillium</i> Casp5..... | 102 |
| 4.2.1 - Quantificação do ácido micofenólico no extrato fúngico por RMN de ¹ H..... | 111 |
| 4.2.1.1 - Fixar um volume de filtrado para realização da extração..... | 112 |
| 4.2.1.2 - Determinação do pH ideal para extração..... | 113 |
| 4.2.1.3 - Metodologia de quantificação por RMN de ¹ H..... | 114 |
| 4.2.1.4 - Cálculo da concentração do ácido micofenólico no extrato obtido em pH 3..... | 116 |
| 4.3 - <i>Streptomyces violaceusniger violaceusniger</i>..... | 124 |
| 4.3.1 – Isolamento, identificação da espécie..... | 125 |
| 4.3.2 – Avaliação da interação entre o <i>Streptomyces violaceusniger violaceusniger</i> e fungos patógenos (<i>P. aphanidermatum</i>)..... | 126 |
| 4.3.3 – Atividade biológica do extrato 14f1d/2..... | 128 |
| 4.3.4 – Extrato 14f1d/2..... | 129 |
| 4.3.4.1 - Identificação da substância 14f1d/2-42..... | 129 |
| 5 - Conclusões e Perspectivas..... | 147 |
| 6 - Referências Bibliográficas..... | 151 |

Resumo

O USO DA RMN NA CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO. Atualmente, os microrganismos são responsáveis pela produção de vários antibióticos, imunossupressores e anti-tumorais, além de serem importantíssimos em processos industriais. O presente trabalho descreve os processos de produção e isolamento da citrinina (234,6 mg/L) e do ácido micofenólico (371,2 mg/L) com alto grau de pureza no processo de extração de uma fermentação de 8 e 12 dias respectivamente de um cultivo em meio líquido Czapek enriquecido com 0,2 % de extrato de levedura utilizando os fungos *Penicillium* Cat1.1 e *Penicillium* sp. Casp5, isolados do *Coffea arabica* L. após assepsia, bem como, o desenvolvimento de uma metodologia de quantificação por RMN. Adicionalmente, neste trabalho foi feito o isolamento e a elucidação de um alcalóide inédito da classe das prodigininas (antibiótico oligopirrol-pigmentado) com modificação no anel C, a partir de um extrato produzido pela actinobactéria *Streptomyces violaceusniger violaceusniger*, isolado como endofítica de folhas de milho (*Zea mays* L.) e identificado por Costa (2005). Este antibiótico foi capaz de inibir o crescimento de fitopatógenos de interesse econômico tais como: *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora parasitica* e *Fusarium moniliforme*. Portanto, através dos resultados obtidos durante a execução deste trabalho, pode-se concluir que a Ressonância Magnética Nuclear, além de se apresentar como uma técnica analítica eficiente na quantificação da citrinina e do ácido micofenólico no extrato fúngico, foi fundamental no monitoramento e otimização das condições de extração durante o período de 20 dias de fermentação. Assim, a RMN é uma técnica que poderá ser utilizada na otimização de processos de produção de substâncias produzidas por microorganismos em escala industrial.

Abstract

THE USE OF NMR IN THE CHARACTERIZATION AND QUANTIFICATION OF METABOLITES PRODUCED BY MICROORGANISMS WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL.

Nowadays, the microorganisms are responsible for the production of several antibiotics, immunosuppressant and anti-tumors, furthermore they are extremely important in industrial process. This work describes the production process and the isolation of the citrinin (234,6 mg/L) and of the mycophenolic acid (371,2 mg/L) with high purity levels in the process of extraction of a fermentation of 8 and 12 days respectively of a cultivation in liquid in Czapek medium enriched with 0,2% of extract of yeast utilizing the fungi *Penicillium* Cat1.1 and *Penicillium* sp. Casp5, isolated of the *Coffea arabica* L. after asepsis, as well, the development of an analytical methodology to quantify this compounds using the NMR. Additionally, on this work, we describe the isolation and the structural elucidation of an new alkaloid from prodiginine class with modification on ring (C), from an extract produced by *Streptomyces violaceusniger violaceusniger* actinomycete, isolated as an endophyte from *Zea mays* L. leaves and identified by Costa (2005), which was able to inhibit the growing of phytopatogens with economic value (*Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora parasitica* e *Fusarium moniliforme*). Therefore, Finally, due to the results obtained during the execution of this work, is able to conclude that the Nuclear Magnetic Resonance, beyond be presented like an efficient analytic technique in the quantification of the citrinin and of the mycophenolic acid in the extract fungi, was fundamental in the monitoring and optimization of the conditions of extraction during the period of 20 days of fermentation. Like this, to NMR is a technique that will be utilized in the process production and optimization of the substances produced by microorganisms in industrial scale.



1 - Introdução

1 – Introdução

1.1 - Microorganismos

Os microorganismos habitam a Terra há mais de quatro bilhões de anos, sendo que menos de 5% deles são conhecidos e as suas funções são menos conhecidas ainda, mesmo com o emprego das técnicas modernas da biologia molecular (MELO *et al.*, 2002).

“Microorganismo” é o nome genérico para todos os organismos invisíveis a olho nu (os maiores podem ser vistos apenas como pontinhos, com luz adequada e por quem tem boa visão). Normalmente, são menores que 0,1 mm. Incluem bactérias, algas cianofíceas, protozoários, muitos fungos e líquens, e vírus. Muitos vírus e bactérias aquáticas são menores que um milésimo de milímetro (<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/frameset/thomas.htm>).

Os fungos, também chamados de bolores, mofos ou cogumelos, estão presentes nas nossas atividades diárias. Tal a importância dos fungos que hoje constituem um reino à parte, lado a lado com os reinos vegetal e animal. Em geral, eles apresentam filamentos, as chamadas hifas, com paredes rijas, ricas em quitina; têm características heterotróficas, isto é, não possuem clorofila e, portanto, necessitam de material orgânico para viver, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes graças à presença de enzimas que são produzidas por eles e que degradam produtos como, por exemplo, celulose e amido. Os fungos são eucarióticos, isto é, possuem um núcleo típico no interior de suas células, comparável ao das plantas e animais. Reproduzem-se por via sexual ou assexual, portanto, possuem divisões celulares do tipo mitose e meiose, tendo sempre como produto final os esporos que são órgãos de reprodução, resistência e disseminação (FIGURA 1.1-1). O reino dos fungos é um dos mais numerosos, estima-se que existam pelo 1.500.000 espécies no mundo, o que seria, mais do que todas as espécies vegetais e animais somadas, excluindo-se os insetos. Atualmente, cerca de 70.000 espécies de fungos foram descritas, ou seja, menos de 5%. Se nesses cinco por cento de espécies, já existem muitas de grande importância, como as que são utilizadas na fabricação de alimentos, incluindo bebidas, de ácidos orgânicos,

de fármacos e inúmeros outros produtos, e pode-se imaginar o que se espera com a descoberta de novas espécies com distintas propriedades potencialmente de valor biotecnológico (<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/melhor/mhr004.htm>)

A identificação dos fungos é baseada quase que exclusivamente em sua morfologia tanto macro como microscopicamente. Como eles habitam os mais variados substratos, apresentam em decorrência, uma sucessão de tipos morfológicos, dos mais simples aos mais complexos. O seu enquadramento taxonômico é regido pelo Código Internacional de Nomenclatura Botânica e os níveis taxonômicos gerais são: Reino: Fungi; Divisão: Eumycota; Subdivisão: Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina, Deuteromycotina e Basidiomycotina; Classe: Sufixo Mycetes; Ordem: Sufixo Ales; Família: Sufixo Aceae (www.icb.usp.br/~crpmicol/materiais/apostila_fungos.pdf).

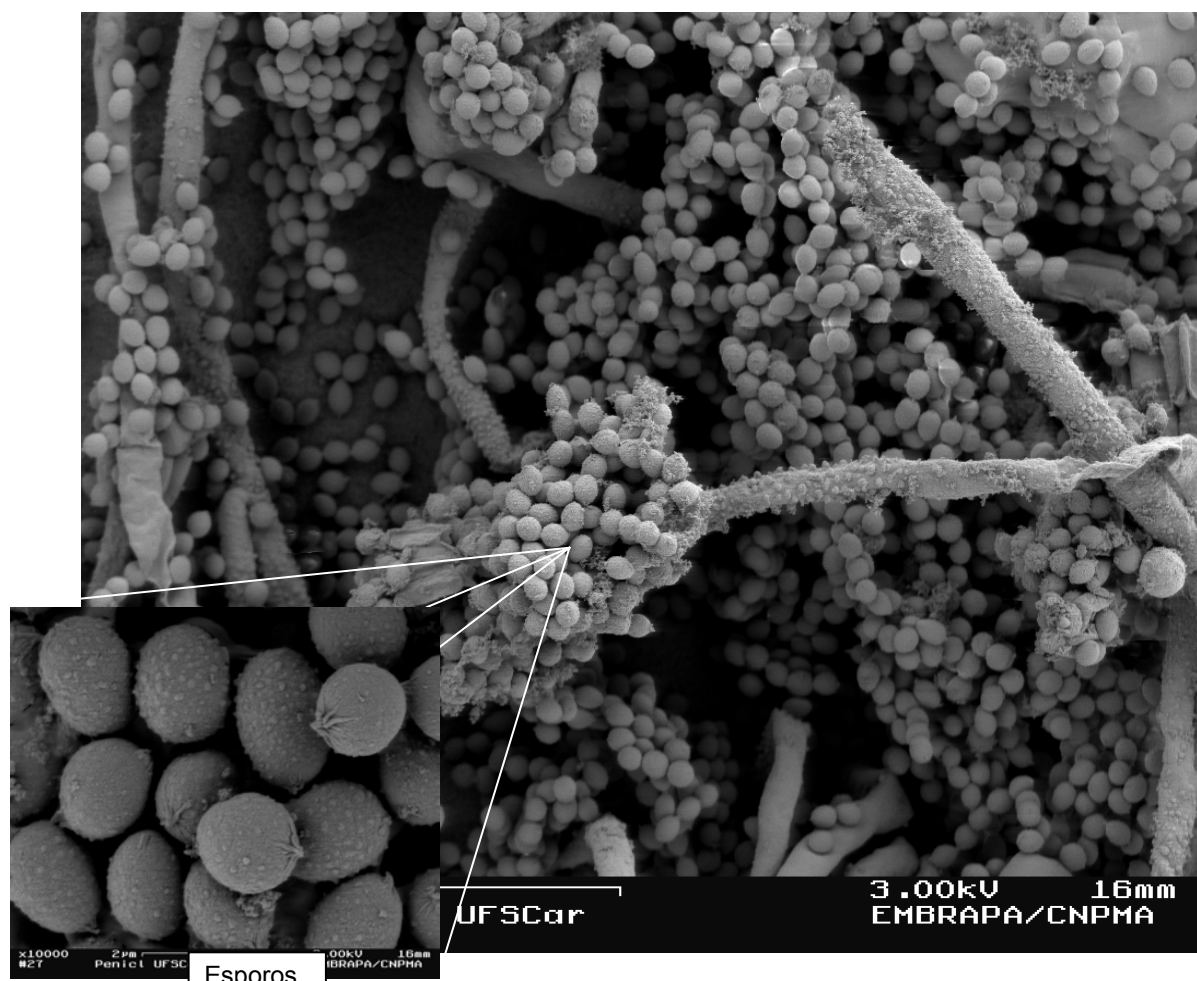


FIGURA 1.1-1: Estruturas de um fungo vistas através de microscópio eletrônico (MEV). Notam-se filamentos (hifas) e corpos esféricos que são os esporos vegetativos ou conídio

Os fungos associados às plantas podem ser epifíticos, quando habitam a superfície dos vegetais e endofíticos, quando habitam o interior das plantas, podendo exibir diferentes tipos de associações ou interações: neutras ou simbióticas e patogênicas (PELCZAR *et al.*, 1980).

Atualmente, o estudo de microorganismos endofíticos tem atraído muito a atenção da comunidade científica, principalmente em relação aos tipos de associações que eles desenvolvem com os seus hospedeiros (STROBEL, 2002).

Segundo Petrini (1991), os microorganismos endofíticos são aqueles que habitam, durante um período do seu ciclo vital, o interior de um vegetal, sem causar, aparentemente, nenhum dano a esse vegetal. Estes microorganismos apresentam uma grande diversidade genética, são importantíssimos na manutenção dos ecossistemas, além de serem produtores de metabólitos secundários, tais como: antibióticos, pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, agentes anti-tumorais, feromônios e promotores de crescimento de animais e plantas (DEMAIN, 1992).

A produção de metabólitos secundários por fungos vem despertando muito interesse pelas indústrias agro-químicas e farmacêuticas (ROBINSON, 1988), pois estas produzem medicamentos comercialmente importantes, tais como as ciclosporinas que são co-administradas com outros fármacos imunossupressores para prevenir a rejeição do órgão transplantado. A produção destes metabólitos pode variar de acordo com os fatores físico-químicos, que são envolvidos na sua produção tais como: oxigênio (oxigenação durante a fermentação no modo estático ou com agitação), temperatura, concentrações de fosfato e íons metálicos (DEMAIN, 1968; WEINBERG, 1970). Um mesmo microorganismo pode produzir ou não um determinado metabólito pela simples variação do meio de cultivo. A potencialização de uma substância de interesse também é dependente desses mesmos fatores (GRIFFIN, 1994). A limitação de nutrientes no meio de cultivo na presença de fontes de carbono em excesso, estimula a produção de metabólitos secundários por microorganismos (GRIFFIN, 1994).

1.2 – O gênero *Penicillium* e seus metabólitos secundários

Penicillium é um gênero de fungos, o mofo comum do pão, que cresce em matéria orgânica morta, como queijo, cereais ou fruta. Várias espécies produzem bactericidas (antibióticos) que permitem ao fungo competir com bactérias saprófitas pelo alimento. A importância destes fungos na alimentação humana e animal se deve ao fato deles poderem causar deterioração do alimento e produzir toxinas (PITT AND LEISTNER, 1991). Este gênero caracteriza-se por formar conídios com uma estrutura semelhante a um pincel que termina em células conidiógenas, chamadas fiáldes. Os conidióforos do gênero *Penicillium* podem apresentar ramificações que se juntam formando verticilos. Quando apresenta um único verticilo de fiáldes, o pincel é monoverticilado. Os bivertecilados possuem dois níveis de ramificação e os terverticilados podem apresentar três e às vezes quatro níveis de ramificação (FIGURA 1.2-1) (WEBSTER, 1986).

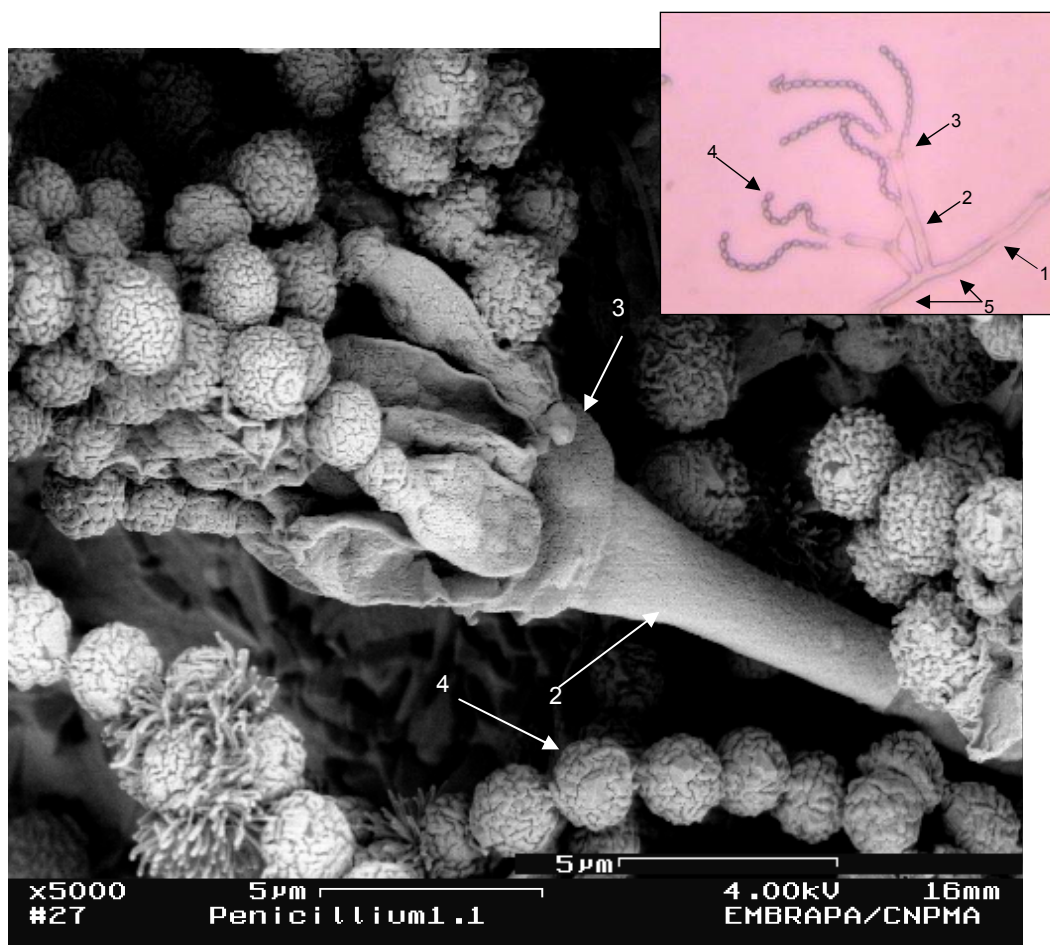


FIGURA 1.2-1: Microfotografia de *Penicillium* sp. 1 - hifa; 2 - conidióforo; 3 - fiálide; 4 - conídio; 5 - septo

1.2.1 - Citrinina

A citrinina [ácido (3*R*-4*S*)-4,6-diidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3*H*-2-benzopirano-7-carboxílico)] é uma micotoxina de ocorrência comum produzida por várias espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, principalmente o *Penicillium citrinum* (POUPKO *et al.*, 1997).

Quando ela é ingerida por animais e humanos pode causar uma degeneração renal. Esta micotoxina pode ser encontrada em grãos (milho, cevada, trigo (na farinha), centeio, arroz, amendoim), frutas (maçã, pêssego, pêra), em gêneros alimentícios e fluidos biológicos (XU *et al.*, 2006).

Atualmente, a citrinina tem despertado grande interesse. Além de ser um contaminante de alimentos, que está diretamente relacionada com a saúde pública, ela ainda apresenta atividades antibióticas, antifúngica e antiprotozoária e por apresentar um sistema adequado para estudo de biossíntese com marcação isotópica. Entretanto, não é utilizada em seres humanos devido a sua alta toxicidade, especialmente hepática e renal (POUPKO *et al.*, 1997).

A estrutura da citrinina (FIGURA 1.2.1-1), inclusive, a configuração absoluta de seus centros assimétricos foram determinados há muitos anos. Mas o problema do equilíbrio tautomérico entre as duas formas isomérica em solução, até agora não foi bem estabelecido, embora é sabido que este equilíbrio seja favorecido para o sentido da forma *p*-quinona (POUPKO *et al.*, 1997).

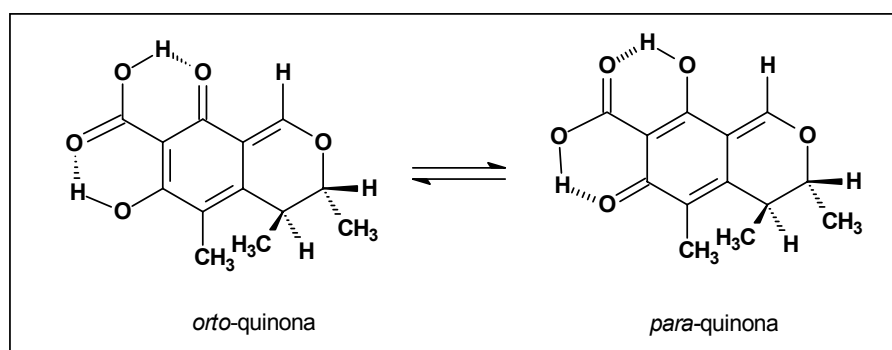


FIGURA 1.2.1-1: Estrutura da citrinina no equilíbrio dinâmico

O mesmo problema tem sido observado para a citrinina no estado sólido e, através de extensivas medidas de raio-X em diferentes temperaturas

concluiu-se que, ela cristaliza numa estrutura desordenada e, que os dois tautômeros existem em equilíbrio no estado sólido, sendo que a forma *p*-quinona é favorecida a baixas temperaturas (POUPKO *et al.*, 1997).

Devido à natureza comum de fungos no ambiente, a citrinina e outras micotoxinas são contaminantes comuns em alimentos. Como ela é um contaminante de alimentos, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de evitar a entrada direta ou indireta desta micotoxina nos alimentos consumidos *in natura*, como as frutas, os grãos e produtos industrializados. Devido à importância desta micotoxina em relação à saúde pública, vários métodos de desintoxicação são relatados durante processamento dos alimentos, tais como: decomposição térmica com diminuição da toxicidade – aquecendo-se a citrinina a 130°C na presença de uma pequena quantidade de água ocorreu uma diminuição significativa em sua toxicidade, ao passo que, aquecendo-a de 140°C ou à 150°C levou a formação de compostos altamente tóxicos (KITABATAKE *et al.*, 1991; TRIVEDI *et al.* 1993). No entanto, o aquecimento à 100°C, também pode ocorrer a formação da citrinina H1, que ocorre com a reação entre duas moléculas de citrinina e uma molécula de água, a qual apresenta uma toxicidade maior em relação a própria citrinina (TRIVEDI, *et al.* 1993). Já a decomposição da citrinina aquecida à 140°C em água levou ao isolamento da citrinina H2 [3-(3,5-dihidroxi-2-metilfenil)- 2-formiloxi-butano], que apresenta uma citotoxicidade diminuída. (HIROTA *et al.* , 2002) (FIGURA 1.2.1-2).

A concentração de citrinina em *Monascus* é dramaticamente diminuída após fervura em água por 20 minutos, podendo chegar a 50% (SHU & LIN, 2002). Todos estes relatados mostram, que a citrinina é uma substância muito instável e *termo-label* em solução aquosa. Além disso, estudos mostram que a sua instabilidade é afetada também pela composição de solventes usados no preparo de amostras e na fase móvel para análises em HPLC, e solução normal de citrinina (XU *et al.*, 2003). O sucesso do HPLC depende de cuidados e precauções de modo que a degradação não ocorra durante a análise e além disso, assegurar que o sistema de coluna e solvente forneça uma separação eficiente e a uma boa forma do pico. Sob melhores condições, concentrações menores que 10 ppb de citrinina podem ser detectadas em extratos do cereais por HPLC (EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK).

Até agora, os métodos mais comumente utilizados para analisar a citrinina são: CCD; HPLC, LC/MS e GC/MS.

Assim, uma das medidas mais eficientes para proteger a saúde pública e promover o comércio internacional, é estabelecer níveis reguladores razoáveis desta toxina internacionalmente. Atualmente, há a necessidade de se desenvolver uma metodologia reproduzível, sensível e rápida para detecção e/ou quantificação da citrinina em alimentos. No entanto, um método de análise para detectar a citrinina em alimentos contaminados ainda é um desafio, a sua toxicidade sua instabilidade e a co-ocorrência com outras micotoxinas (XU *et al.*, 2006).

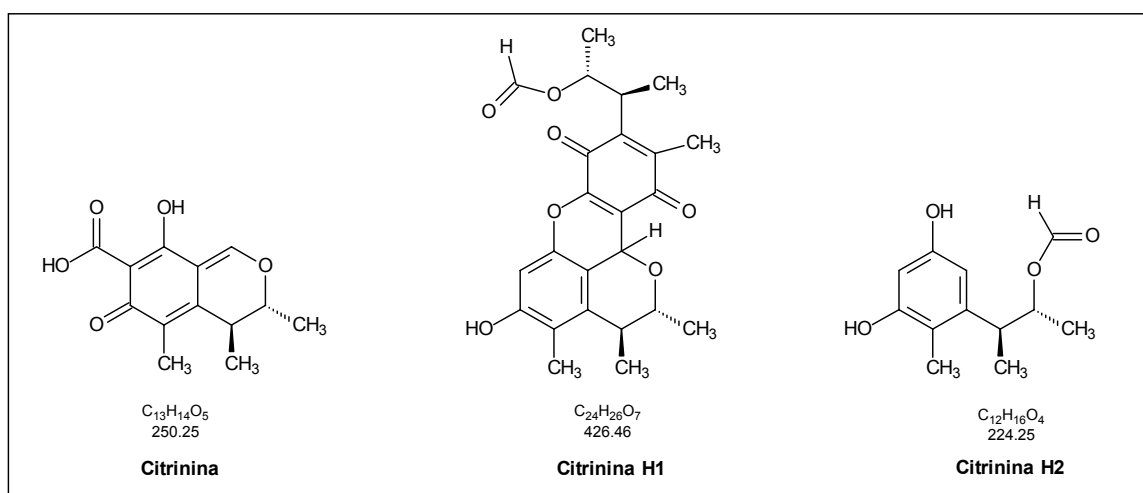


FIGURA 1.2.1-2: Estruturas da citrinina; citrinina H1 e citrinina H2

1.2.2 – Ácido micofenólico

O ácido micofenólico [ácido-6-(4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidroisobenfurano-5-il)-4-metil-hex-4-enóico], foi detectado pela primeira vez numa fermentação de *Penicillium glaucum* por GOSIO, em 1896, sendo obtido em forma de agulhas brancas, ponto de fusão 140 °C e com fórmula molecular C₁₇H₂₀O₆ [ALSBERG & BLACK (1913) *apud* CLUTTERBUCK *et al.* (1932)].

Em 1933, CLUTTERBUCK & RAISTRICK estudaram a constituição molecular da substância (FIGURA 1.2.2-1A), porém sua estrutura foi completamente

elucidada somente em 1952 por BIRKINSHAW *et al.* (FIGURA 1.2.2-1B) e somente em 2000, ZUNIGA conseguiu obter o seu raio-X.

Subseqüentemente, o ácido micofenólico foi isolado, segundo TURNER & ALDRIDGE (1983), em *Verticiclادella abientina*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium paxilli*, *Penicillium roquefort*, *Penicillium bruneostoloniferum* e *Septoria nodorum*.

SADHUKHAN *et al.*, em 1999, isolaram e quantificaram o ácido micofenólico produzido em fermentação no estado sólido (trigo), utilizando o *Penicillium brevi-compactum*. Este fungo foi cultivado variando-se os nutrientes, e o ácido foi quantificado em vários dias de incubação pela técnica de HPLC.

Em 2003, o ácido micofenólico foi isolado de uma fermentação de 20 dias utilizando *Penicillium* Catl 2.3 isolado do café beneficiado após assepsia. (Valente, 2003).

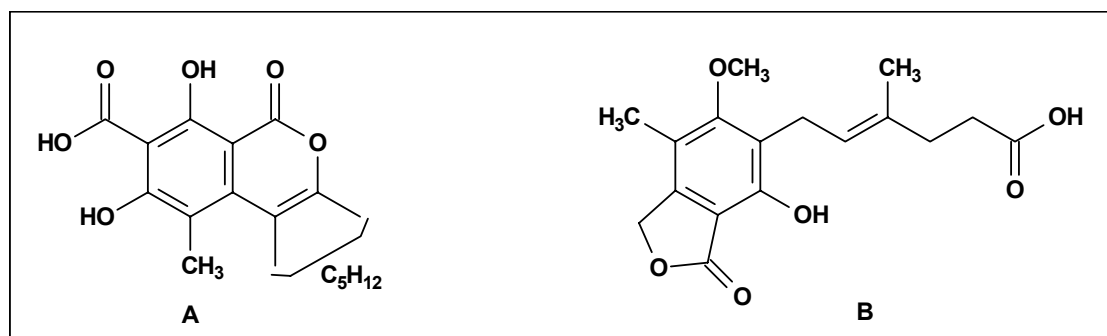


FIGURA 1.2.2-1: (A) Estrutura do ácido micofenólico proposta inicialmente (1933); (B) Estrutura correta do ácido micofenólico (1952)

O ácido micofenólico apresenta várias atividades biológicas: como atividade anti-bacteriana (ABRAHAM, 1945), anti-fúngica (GILLIVER, 1946), anti-viral (ANDO *et al.*, 1968; WILLIAMS *et al.*, 1968), anti-tumoral (ANDO *et al.*, 1968) anti-psoriática (JONES *et al.*, 1975) e imunossupressora (MITSUI & SUZUKI, 1969). Somente em 1982, que o ácido micofenólico começou a ser considerado como um agente imunossupressor.

Com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade, foi desenvolvido o éster do ácido micofenólico, o micofenolato mofetil (MMF) (FIGURA 1.2.2-2, que apresenta os mesmos efeitos farmacológicos, porém, com uma biodisponibilidade

duas vezes maior. Em 1987, RANDALL MORRIS da Universidade de Stanford começou a utilizar o fármaco em transplantes com sucesso. Na década de 90, surgiram os primeiros resultados do uso de MMF em transplante renal, com sucesso. O micofenolato mofetil é comercializado pela ROCHE com o nome comercial de CellCept®. A sua aprovação pelo FDA nos Estados Unidos ocorreu em 1995, para uso em pacientes submetidos a transplante renal (NORONHA *et al.*, 1997).

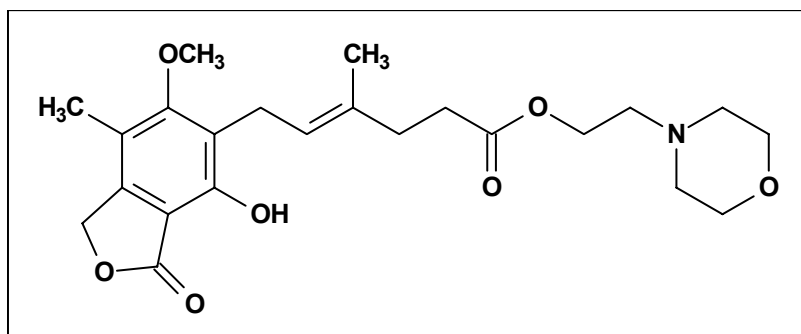


FIGURA 1.2.2-2: Estrutura do Micofenolato Mofetil (MMF)

A sua administração em doses razoavelmente grandes tem efeitos colaterais mínimos. O mecanismo de ação do ácido micofenólico deve-se à inibição da Inosina Monofosfato Dehidrogenase (IMD), importante enzima na síntese de inosina monofosfato, um precursor de purinas (PANKIEWICZ, 1997). O ácido micofenólico também inibe a proliferação de linfócitos, células de extrema importância na resposta imune. Este efeito repressor do sistema imune do ácido micofenólico foi muito importante no tratamento de rejeição de órgão após a cirurgia de transplante (SADHUKHAN *et al.*, 1999).

1.3 - Quantificação de substâncias por RMN de ^1H

A ressonância magnética nuclear, apesar de não ser uma técnica comumente utilizada para quantificação, devido a sua sensibilidade, quando

comparada com outras técnicas como, por exemplo, a espectrometria de massas. No entanto, vem se destacando, devido ao fato que qualquer molécula que contenha um ou mais átomos com momento magnético diferente de zero pode ser detectada na RMN, desde que apresentem os isótopos ^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P . Os sinais da RMN são caracterizados pelos seus deslocamentos químicos, intensidade, multiplicidade e por algumas propriedades de relaxação fornecendo, portanto, informações sobre o ambiente em que se encontra o núcleo. Desta forma, um espectro de RMN contém uma gama de informações sobre a molécula detectada, que pode ser utilizada tanto na identificação, quanto na quantificação de metabólitos de amostras provenientes de sistemas biológicos. Assim, a RMN é uma técnica que apresenta uma grande versatilidade uma vez que se trata de uma técnica não destrutiva, sendo possível a obtenção de espectros em suspensão, tecidos intactos ou até mesmo da planta como um todo, além do emprego de extratos ou metabólitos pré-purificados ou não (RATCLIFFE *et al*, 2001).

Na quantificação de substâncias por RMN de ^1H , os espectros devem ser obtidos com uma boa relação sinal/ruído. Além disso, ao quantificar uma substância, outros aspectos devem ser considerados, como: o tempo de relaxação dos núcleos (t_1) e o tempo de espera entre uma aquisição (d_1) e outra. Para que isso ocorra é necessário o conhecimento prévio do valor de T_1 (tempo de relaxação longitudinal) para a amostra em questão (CLARIDGE, 1999).

Para o conhecimento prévio de T_1 , primeiramente deve-se considerar o tempo de relaxação para os vários núcleos, de maneira que o tempo de espera entre uma aquisição e outra seja suficiente para que todos os núcleos voltem a condição inicial. Quando o tempo de espera for relativamente curto entre uma aquisição e outra, ou seja, o tempo de espera não foi suficiente para que todos os núcleos voltem, ocorrem perturbações nas intensidades relativas dos sinais no espectro. Deste modo, o tempo de espera entre cada aquisição deve ser de cinco vezes o tempo de relaxação longitudinal (T_1) do núcleo mais lento. Portanto, é necessário um conhecimento prévio do valor de T_1 para a substância de interesse (CLARIDGE, 1999).

O valor de T_1 é estimado pelo método de inversão e recuperação (*Inversion Recovery*). Na verdade, não se consegue o valor absoluto, apenas uma estimativa que na maioria das vezes é o suficiente. A seqüência em si consiste em dois pulsos: primeiro, aplica-se um pulso de 180 graus no eixo (x), que faz com que

a magnetização, que está na direção do eixo (+z), desloque para no eixo (-z), ocorrendo uma simples inversão. Espera-se um tempo (t), e em seguida aplica-se um pulso de 90 graus, que impedirá que a magnetização volte para o eixo (+z) e vá para o eixo (-y) (FIGURA 1.3-1 e FIGURA 1.3-2).

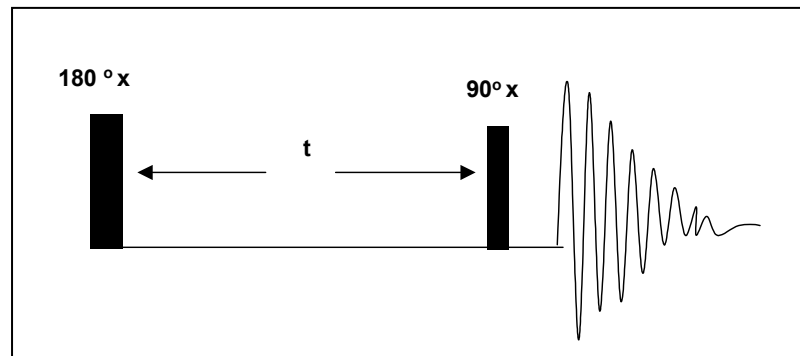


FIGURA 1.3-1: Seqüência de pulso (*Inversion Recovery*)

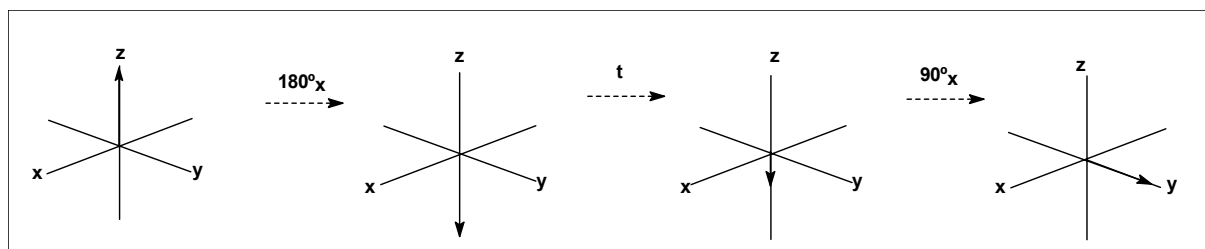


FIGURA 1.3-2: Processo de inversão e recuperação (*Inversion Recovery*)

Outro aspecto importante é a área de integração, que deve ser livre da sobreposição de sinais, além da obtenção de uma linha de base sem deformações, o que pode comprometer a integração (CLARIDGE, 1999).

Após a aquisição dos dados, os cuidados no processamento do espectro também são imprescindíveis. O processamento está relacionado, dentre outras coisas, com a razão sinal/ruído, que pode ser melhorada multiplicando-se o espectro por uma função exponencial.

O processamento pode ser realizado com ou sem *zero-filling*, ou seja, o valor de SI utilizado no processamento pode ser maior ou igual ao valor utilizado na aquisição ($SI \geq TD$), ajudando, deste modo, na definição da linha de base.

A fase do espectro também é muito importante, pois ela pode alterar a intensidade da integral, como também os seus limites, já que a integral deve cobrir 99% do pico (CLARIDGE, 1999).

Outro aspecto importante é a distância em ppm entre o sinal (pico) de interesse e o sinal do padrão interno. Se eles ficarem muito distantes, as imperfeições na fase, mesmo após a sua correção, poderão levar a grandes erros nas medidas quantitativas (CLARIDGE, 1999).

Uma vez desenvolvido um método de análise cromatográfica, é importante fazer a validação do mesmo para avaliar se fornece resultados confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente. A validação consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com precisão e exatidão consideradas satisfatórias. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. Os parâmetros geralmente envolvidos no método de validação de métodos analíticos são curva analítica, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez (RIBANI *et al*, 2004).

1.4 - Actinobactéria

As actinobactérias compreendem um grupo heterogêneo de bactérias filamentosas, que filogeneticamente pertencem ao ramo das bactérias *Gram-positivas* com alto teor de G+C (CHATER & HOPWOOD, 1984). Neste grupo, estão incluídos gêneros com diferentes características morfológicas, como o *Micrococcus*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, que se reproduzem por fissão binária. *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*, apresentam micélio substratal rudimentar seguido de fragmentação, denominados actinomicetos nocardioformes. No outro extremo está o grupo esporoactinomicetos, que engloba os *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, que apresentam uma rede de micélio aéreo bem desenvolvida, diferenciada em estruturas especializadas como artrósporos em cadeia observados em *Streptomyces*, esporos em vesículas como em *Actinoplanes* e *Streptosporangium* e endosporos em *Thermoactinomyces* (CHATER & HOPWOOD, 1993; CROSS, 1989; LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1981).

Entre as bactérias, a ordem Actinomycetales é a única que produz compostos bioativos de importância comercial (ARAÚJO, 1998). Pertencente a esta ordem, os actinomicetos são os principais responsáveis pela produção de metabólitos secundários, tais como: antitumorais, antielmínticos, antifúngicos, herbicidas ou agentes farmacologicamente ativos (ARAÚJO, 2002).

1.4.1- Prodiginina

As prodigininas pertencem a uma grande família de antibióticos oligopirrol pigmentados com alto potencial medicinal, como: imunossupressores e agentes antitumorais, que são produzidos por vários actinomicetos e outras eubactérias (CERDENO *et al.*, 2001). Além dessas atividades, estes antibióticos têm um amplo alcance contra bactérias, protozoários e em fungos patogênicos, mas não são utilizados devido a sua toxicidade (FURSTNER, 2003; CERDENO *et al.*, 2001). O interesse no desenvolvimento de drogas do tipo prodiginina como agente antitumoral e imunossupressor tem sido estimulado nos últimos anos por vários fatores. As prodigininas de cadeia ramificada (alquilprodigininas) produzida por *Streptomyces coelicolor*, apresentam um potencial melhorado na sua atividade imunossupressora e antitumoral (MO *et al.*, 2005). A undecilprodiginina, prodiginina de cadeia ramificada (FIGURA 1.4.1-1-IV) é a estrutura mais estudada dessa classe de compostos e, estudos mostram que ela é gerada através de múltiplas unidades de acetato, assim como, unidades de prolina, glicina, e serina (WASSERMAM *et al.*, 1973; WASSERMAM *et al.*, 1974).

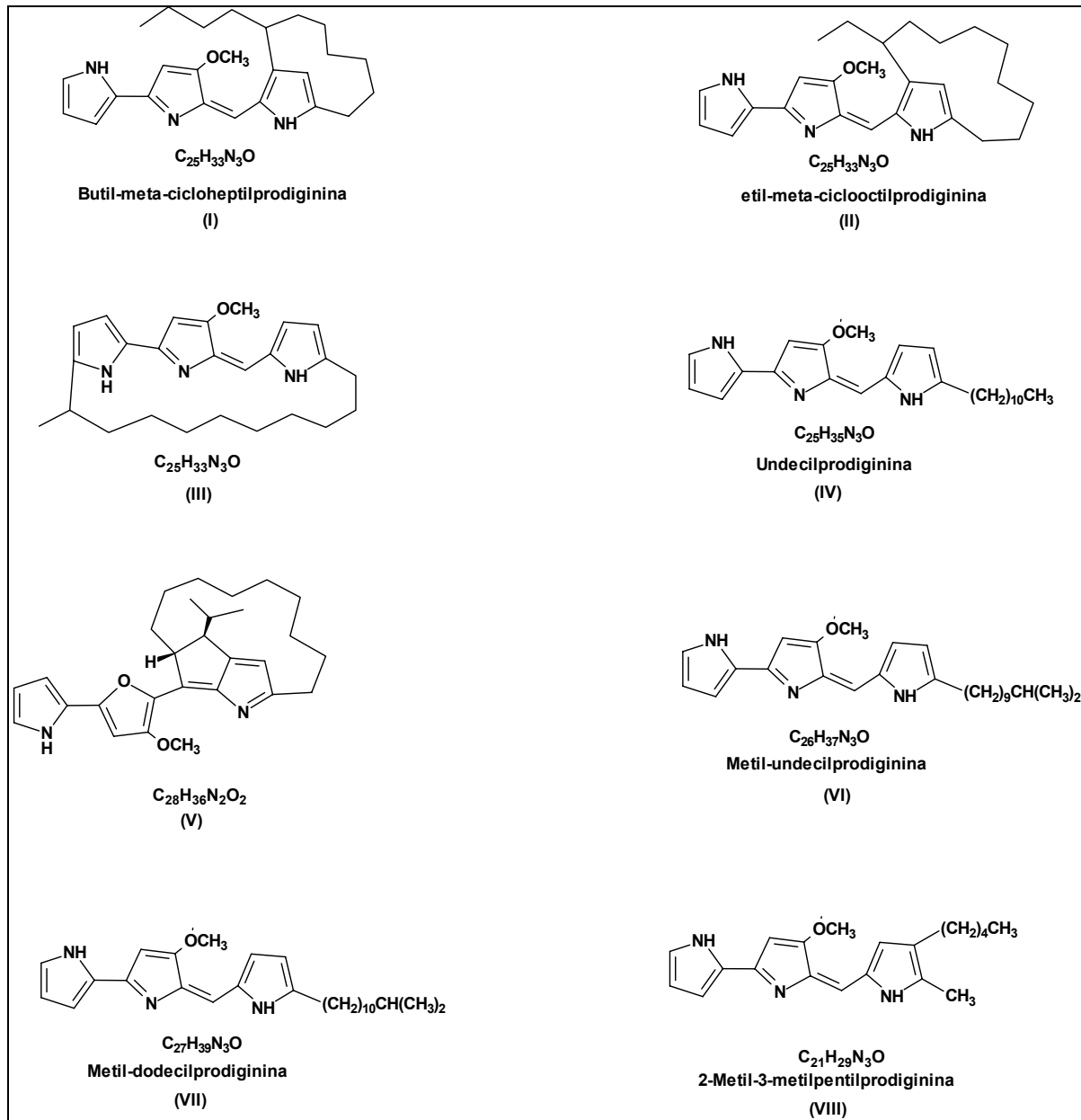


FIGURA 1.4.1-1: Estruturas de prodigininas produzidas por actinobactéria



2 - Objetivos

2.1 – Objetivos principais

O presente trabalho teve como objetivos:

1 – Desenvolver um método analítico de quantificação da citrinina por RMN de ^1H , rápido e eficiente para otimização da produção da substância utilizando o *Penicillium* sp. Cat11.1.

2 - Desenvolver um método analítico de quantificação para o ácido micofenólico por RMN de ^1H , rápido e eficiente para otimização da produção da substância utilizando o *Penicillium* sp.Casp5.

3 – Isolar e elucidar a estrutura da substância ativa do extrato com atividade fungicida da actinobactéria *Streptomyces violaceusniger violaceusniger*, isolado, identificado, cultivado pelo Ms Francisco Gheler Costa – EMBRAPA – Meio Ambiente – Jaguariúna – SP.



3 - Experimental

3.1 - Isolamento, cultivo e identificação do fungo

3.1.1 – Equipamentos

- Agitador Vortex
- Autoclave horizontal Market Forge Sterimatic
- Autoclave vertical Phoenix AV 75
- Balança semi-analítica
- Digital Scannig Electron Microscope LEO 982, Modelo DSM 982 Gemini, Zeiss-Leica, Alemanha. Secagem EMITECH modelo K850
- Estufa de esterilização FANEM – 315 SE
- Metalização EMITEC modelo K550

3.1.2 – Materiais

- Alça de platina
- Becker de 100 mL
- Cortador de 3 cm de diâmetro
- Erlenmeyer de 500 mL
- Pinça
- Placas de Petri de 9 cm de diâmetro esterilizadas por 2 horas a 180°C

3.1.3 - Meios e Reagentes

3.1.3.1 – Reagentes

- Ágar bacteriológico – DIFCO, Henrifarma
- Água destilada

- Álcool 70%
- Extrato de Levedura - Acumedia
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - PA- Reagen
- Glucose – Sigma
- Hipoclorito 11%
- Hipoclorito 2%
- K_2HPO_4 – Mallinckrodt
- KCl – Sigma
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Mallinckrodt
- NaNO_3 – Mallinckrodt
- Sulfato de estreptomicina – obtido de farmácia de manipulação

3.1.3.2 – Meios de cultura

- BDA: (Dextrose; Caldo de Batata, Agar; Sulfato de Estreptomicina)
- Meio de cultura – Czapek enriquecido com 0,2% de extrato de levedura: [NaNO_3 (3,0 g/L); K_2HPO_4 (1,0 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L); KCl (0,5 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L); Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L) e água destilada].
- Meio de cultura Juventude: água mineral “Fonte Juventude”; Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L).
- Meio de cultura Paiol: água mineral “Fonte Paiol”; Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L).
- Meio de cultura Platina: água mineral “Fonte Platina”; Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L).
- Meio de cultura Santa Júlia: água mineral “Fonte Santa Júlia”; Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L).
- Meio de cultura Vilela: água mineral “Fonte Vilela”; Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L).

- Meio de cultura Vitória: água mineral “Fonte Vitória”; Glucose (10,0 g/L); Extrato de Levedura (8 g/L).

3.2 – Isolamento, identificação e quantificação das substâncias

3.2.1 – Materiais e Equipamentos

3.2.1.1 – Equipamentos

- Câmara de fluxo laminar: As manipulações dos microorganismos foram realizadas em um fluxo laminar da VECO VL FS-12M.
- Câmara objetiva Sony - Cyber-Shot – 3,2 mega pixels
- Espectrômetro de RMN Bruker DRX 400 9,4 Tesla
- Evaporador rotativo TECNAL (TE 120)
- *Flame Ionization Detector* (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas *ChemStation A.09.01 [1206]* e *MIDI Sherlock Microbial Identification System 4.0*.
- Micromass Quattro LC-triple quadrupole instrument (Manchester, UK) equipado com uma fonte SI/APCI “Z-spray” utilizado em inserção direta.
- Microscópio “*field emission*” de varredura Gemini Leo 982 Leica Zeiss.
- Pipetador: Boeco
- Rotavapor Büchi – (EL 431)

3.2.1.2 – Materiais (Vidrarias)

- Balão de fundo redondo: 500 mL
- Becker: 500 mL
- Erlenmeyers: 300 e 500 mL
- Funil de separação: 500 mL
- Pipeta de Pasteur
- Proveta
- Tubos de RMN: 5 mm (diâmetro)

3.2.1.3 - Meios e Reagentes

- Diclorometano destilado no Departamento de Química da UFScar
- HCl – Merck
- Solventes deuterados da Merck e Aldrich (RMN) pureza isotópica de 98,00 - 99,99%.
- Suportes cromatográficos: Sephadex LH-20, para cromatografia em coluna (CC); Sílica gel 230-400 *mesh* (sílica para coluna tipo *flash*), para cromatografia em coluna (CC).

3.3 - Processo de isolamento do fungo *Penicillium* sp. Cat11.1 é constituído de duas etapas:

3.3.1 - Primeira etapa - coleta do material

Os frutos do café foram colhidos no estágio cereja, secos em terreiro e beneficiados na Fazenda Nossa Senhora Aparecida - Águas da Prata – SP em julho de 2001, sendo armazenados em frascos de plásticos em temperatura ambiente.

Em novembro de 2004 foram levados para o Laboratório de

Microbiologia Ambiental (Embrapa Meio Ambiente) onde foram inoculados. Sementes ou cotilédones (sem nenhum corte) foram plaqueados em placas de Petri com BDA (item 3.1.3.2) em diferentes tempos de esterilização. A esterilização seguiu a seguinte ordem de imersão: placa-6 (1 min. em álcool 70%, 4 min. hipoclorito 2%, 1 min. álcool 70% e finalmente 1 minuto em água destilada); placa-5 (1 min. em álcool 70%, 3 min. hipoclorito 2%, 1 min. álcool 70% e 1 minuto em água destilada); placa-4 (1 min. em álcool 70%, 2 min. hipoclorito 2%, 1 min. álcool 70% e 1 minuto em água destilada); placa-3 (1 min. em álcool 70%, 1 min. hipoclorito 2%, 1 min. álcool 70% e 1 minuto em água destilada); placa-2 (1 min. em álcool 70%, 1 min. hipoclorito 2%, 1 min. álcool 70% e 1 minuto em água destilada); placa-1 (lavagem em álcool 70%, hipoclorito 2%, álcool 70% e em água destilada), e em seguida, os frutos foram colocados dentro das placas com o meio de cultura (BDA). Todas as lavagens foram feitas em câmara de fluxo. As placas inoculadas foram colocadas em uma sala de incubação (temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

3.3.2 - Segunda etapa - isolamento do fungo

Esta etapa consistiu em isolar os fungos que cresceram dos frutos. De várias placas inoculadas, com diferentes tempos de esterilização, somente em uma delas (maior tempo de esterilização, descrito acima) cresceu o fungo Cat1.1. Desta placa, foi retirado um pedaço da sua extremidade e colocado no centro de uma nova placa com meio BDA (item 3.1.3.2, pág. 20). Após 5 dias de incubação esta placa foi repicada em 3 placas e estas foram colocadas na sala de incubação para crescimento do fungo por 5 dias, e em seguida eles foram conservados em meio castelani [água destilada autoclavada por 20 minutos a 1 atm, e em seguida coloca-se 5 discos de 0,3 cm de diâmetro do fungo plaqueado em BDA (3 a 5 dias de incubação)]. Todo o processo é realizado em câmara de fluxo laminar e em seguida os vidros (penicilina) são lacrados e conservados a 5°C .

3.3.3 - Identificação do fungo

O fungo Cat1.1 foi identificado por microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Microscopia da Embrapa. Através desta técnica, foi possível identificá-lo até gênero.

As amostras (micélio) foram pré-fixadas em glutaraldeído 2% e lavadas com tampão fosfato de sódio 0,10 M três vezes por 10 minutos. Em seguida, foram fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% por 30 minutos e lavadas novamente com tampão fosfato de sódio 0,10 M. Após a lavagem com o tampão foi feita uma desidratação em série crescente com acetona (25, 35, 50, 70, 80, 90%), 10 minutos cada e 1 hora com acetona 100%. As amostras foram secas em ponto crítico (Emitech), metalizadas (metalizador Emitech) com ouro por 3 minutos com 30 mA e observadas em um microscópio “*field emission*” de varredura Gemini Leo 982 Leica Zeiss do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente.

O fungo Cat1.1 pertence ao gênero *Penicillium* e sua espécie será identificada através do seqüenciamento de DNA na Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).

3.3.4 - Cultivo do fungo e isolamento da citrinina

O *Penicillium* sp. Cat1.1 foi cultivado em Erlenmeyer (500 mL) com 200 mL de meio Czapek autoclavado por 15 minutos à 120°C. Após o meio atingir a temperatura ambiente fez-se a inoculação do fungo com 3 discos (0,3 cm de diâmetro) em Erlenmeyer e, em seguida, foi levado à sala de incubação (25°C) por 8 dias no modo estático. Depois do período de incubação, realizou-se uma filtração comum (algodão) para separação do micélio e o meio líquido (filtrado).

O filtrado foi submetido a duas extrações, sendo que a primeira extração consistiu numa extração líquido/líquido com diclorometano (2 x 200 mL), no pH em que se encontrava o meio de cultura (pH = 7,80), onde obteve-se uma mistura de substâncias, e quando analisada por RMN de ^1H não apresentou nenhum sinal referente a citrinina no espectro. A segunda extração consistiu em

acidificar a fase aquosa para pH 3 (com HCl) e, após 1 hora e 30 minutos realizou-se uma nova extração com diclorometano (4 x 200 mL). A fase orgânica foi concentrada no rota-evaporador e analisada por RMN e EM.

3.3.5 – Análise de Ressonância Magnética Nuclear

Todas as medidas foram realizadas em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio e 100,63 MHz para a frequência do carbono), utilizando sondas de 5 mm com detecção direta e detecção inversa (BBI) e gradiente de campo na direção do eixo z.

3.3.5.1 - Parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos de RMN para a Citrinina

A citrinina foi preparada em clorofórmio deuterado (CDCl_3) utilizando o TMS como padrão interno.

Para aquisição do espectro de RMN de ^1H foi utilizada a seqüência de pulso (zg). O tempo de espera para iniciar a aquisição (d1) foi de 1,00 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 8,50 μs . A largura espectral (SWH) utilizada foi de 7440 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 4,40 s e foram acumulados (ns) 16 FIDs. Após a aquisição do experimento o processamento foi realizado com *zero-filling* ($\text{SI} \geq \text{TD}$) de 64 K.

O espectro de RMN de ^{13}C foi adquirido utilizando a seqüência de pulso (zgpg30). O tempo de espera antes de uma aquisição (d1) foi de 0,10 s e a duração do pulso (p1) foi de 6,00 μs . A largura espectral (SWH) utilizada foi de 27027 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 0,61 s e foram acumulados (ns) 6112 FIDs. Após a aquisição dos experimentos o processamento foi realizado com *zero-filling* ($\text{SI} \geq \text{TD}$) de 32 K e multiplicação exponencial (lb) de 3,00 Hz.

O espectro de *g*HSQC foi obtido empregando-se a seqüência de pulso

inv4gplrnd, com larguras espectrais (SWH) de 7440 Hz em F_2 e (SWH) de 22136 Hz em F_1 , tempo de aquisição (aq) de 0,14 s, tempo de espera antes de cada aquisição (d1) de 1,20 s. Foram acumulados (ns) 4 FIDs para cada experimento e realizados 256 experimentos no eixo F_1 . No processamento foram utilizados com 1024 (SI) pontos no eixo F_1 , 2048 (SI) pontos no eixo F_2 .

O espectro de gHMBC foi obtido empregando-se a seqüência de pulso inv4gplrnd, com larguras espectrais (SWH) de 7440 Hz em F_2 e (SWH) de 25155 Hz em F_1 , tempo de aquisição (aq) de 0,14 s, tempo de espera antes de cada aquisição (d1) de 1,20 s, tempo de espera para observação da constante de acoplamento à longa distância (d6) de 62,5 ms. Foram acumulados (ns) 16 FIDs para cada experimento e realizados 222 (TD1) experimentos no eixo F_1 . No processamento foram utilizados com 1024 (SI) pontos no eixo F_1 , 2048 (SI) pontos no eixo F_2 .

3.4 – Análises de EM

A citrinina foi analisada por espectrometria de massas utilizando-se um *probe* de ESI, no modo negativo de ionização no equipamento descrito no item 3.2.1.1, pág 21.

3.5 - Cultivo do *Penicillium* sp. Cat1.1 para curva de produção da citrinina

3.5.1 – Cultivo e extração

Após a otimização das condições de extração e isolamento da citrinina, o *Penicillium* sp. Cat1.1 foi cultivado em frasco (300 mL) com 150 mL de meio Czapek autoclavados por 15 minutos à 120°C. Após o meio atingir a temperatura ambiente fez-se a inoculação do fungo (plaqueado em BDA por 5 dias) com 3 discos (0,3 cm de diâmetro), e em seguida, foi levado à sala de incubação

(25°C) por um período de 20 dias no modo estático. Depois do período de incubação, realizou-se uma filtração comum (algodão) para separação do micélio e o meio líquido (filtrado). O filtrado foi submetido a duas extrações, sendo que a primeira extração consistiu numa extração líquido/líquido com diclorometano (2 x 200 mL), no pH em que se encontrava (pH = 7.80). A fase orgânica foi concentrada em rota-evaporador e em seguida analisada por RMN de ^1H , na qual obteve-se uma mistura de substâncias. A segunda extração consistiu em acidificar a fase aquosa para pH 3 (HCl), e após 1 hora e 30 minutos realizou-se uma nova extração com diclorometano (4 x 200 mL). A fase orgânica foi concentrada no rota-evaporador e analisada por RMN de ^1H , obtendo-se a citrinina com alto grau de pureza. A metodologia de cultivo e extração estão representadas na TABELA 3.5.1-1. A extrações foram iniciadas no tempo de fermentação de zero hora e realizada a cada 24 horas para as 3 primeiras extrações, e após 4 dias de fermentação a cada 96 horas. No entanto, nas 3 primeiras extrações foi preciso ajustar o pH do filtrado para 7,80 (NH_4OH) porque o pH nestes três primeiros períodos de fermentação estava em torno de 7, sendo que para o 4º dia de fermentação também foi necessário o ajuste de pH e a partir do 8º dia de fermentação as extrações foram realizadas no pH em que se encontrava o filtrado de acordo com a TABELA 3.5.1-2.

Todas as amostras foram pesadas e 3 amostras, uma de cada frasco retirados nos seus respectivos dias de fermentação foram analisadas e quantificadas por RMN de ^1H .

As amostras dos extratos em pH 3 foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) para as análises de RMN de ^1H como descrita no item 3.5.2.3 pág. 30.

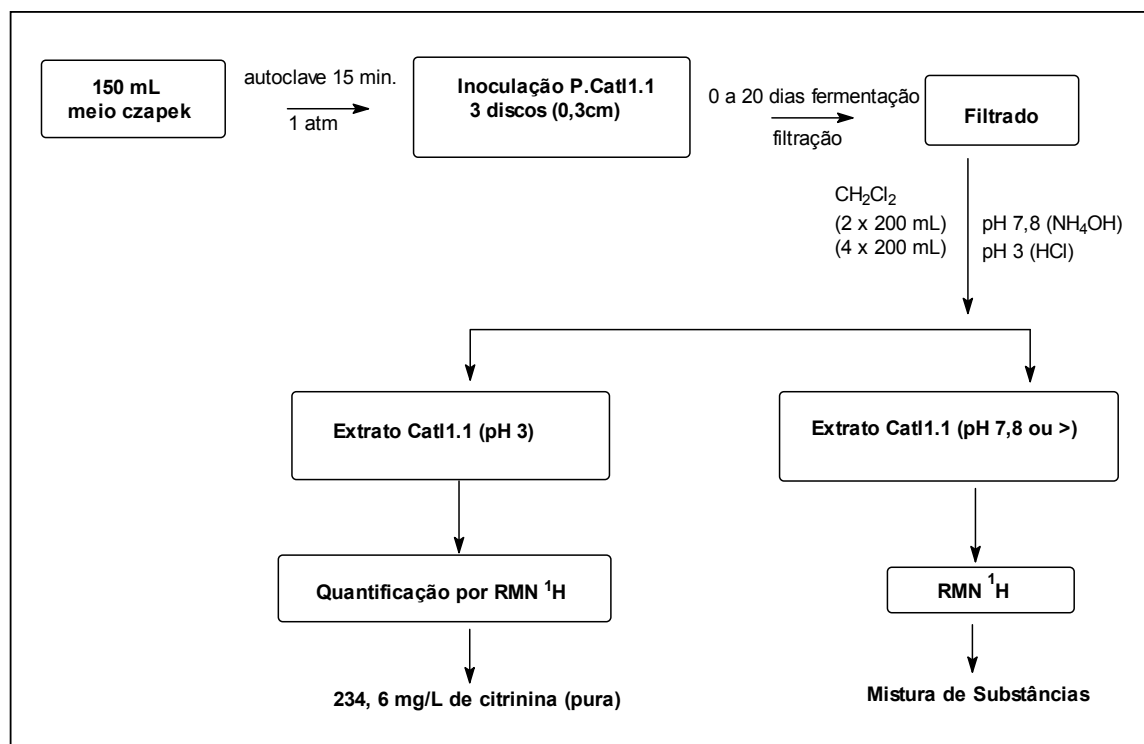
TABELA 3.5.1-1. Cultivo em meio Czapek utilizando o *Penicillium* sp. Cat1.1 para construção da curva de produção da citrinina

| <i>Penicillium</i> sp. | Nº de frascos (300 mL) | Nº de frascos Segurança | Vol. meio cultural/ frascos | Concentração inóculo/frasco | Total frascos |
|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Cat1 1.1 | 24 | 6 | 150 mL | 2 discos (0.3 cm Ø) | 30 |

TABELA 3.5.1-2. Extrações realizadas (pH 7,8 e pH 3) durante o período de 20 dias de fermentação utilizando o fungo *P. sp* Cat1.1

| <i>Penicillium</i> | Fermentação retiradas | Total frascos/ retirados | Vol. filtrado pH 3 (triplicata) | Total amostras/pH 3 |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|
| | Zero hora (pH 7,00) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 24 horas (pH 6,96) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 48 horas (pH 7,00) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 4 dias (pH 7,30) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| Cat1 1.1 | 8 dias (pH 7,80) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 12 dias (7,98) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 16 dias (8,10) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 20 dias (pH 8,6) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| Total | | 24frascos | 3200 mL | 72 |

* amostras pH 7,8 não foram utilizadas para quantificação

FLUXOGRAMA 3.5.1-1: Procedimentos experimentais para extração da citrinina o cultivo em meio Czapek utilizando o fungo *Penicillium sp.* Cat1.1

3.5.2 – Padronização para quantificação da citrinina

3.5.2.1 – Extração

O volume de filtrado utilizado nas extrações foi fixado em 50 mL. As extrações foram feitas em dois pHs diferentes, a primeira em pH 7,8 (pH do meio) com diclorometano (2 x 200 mL). Após a primeira extração a fase aquosa foi acidificada para pH 3 com HCl e, realiza-se a segunda extração com diclorometano (4 x 200 mL). Para as medidas quantitativas somente foram utilizados os extratos em pH 3. Deste modo, a extração foi padronização da seguinte forma:

- volume de filtrado = 50 mL
- pH de extração = 3
- volume de diclorometano = 800 mL

3.5.2.2 – Volumes de padrão interno (DMF) e de clorofórmio deuterado (CDCl_3) utilizados no preparo das para as análises de RMN de ^1H para quantificação da citrinina

O padrão interno utilizado para as análises de RMN de ^1H foi a N,N-Dimetilformamida (DMF) numa concentração de 33,3 %. Esta concentração foi obtida através da diluição da DMF (99,8%) em clorofórmio deuterado numa proporção de 2 mL de CDCl_3 /1mL DMF (99,8%).

As amostras de extratos fúngico foram dissolvidas em 1 mL (pipeta analítica) de clorofórmio deuterado (CDCl_3) com TMS (utilizado como referência interna), e em seguida foi adicionado em cada tubo de ressonância (5 mm) 10 μL da solução de DMF (33,3%) com uma pipeta analítica.

O volume de padrão interno utilizado em cada amostra foi padronização da seguinte forma:

- $V_{\text{DMF } 33,3\%} = 10 \text{ mL}$
- $V_{\text{CDCl}_3} = 1 \text{ mL}$

3.5.2.3 - Preparo das amostras

As amostras do extrato do *Penicillium* sp. Cat11.1 em pH 3 (mg) foram dissolvidas em 1 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) e em seguida colocou-se 10 μL da solução de DMF a 33,3 %.

O preparo das amostras foi feito no momento da realização dos experimentos de RMN de ^1H , numa sala a temperatura de 20°C para evitar a evaporação do solvente que, poderia comprometer seriamente o resultado final das análises.

3.5.2.4 – Ressonância magnética nuclear para quantificação da citrinina no extrato do *Penicillium* sp. Cat11.1

Todas as medidas foram realizadas em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio), utilizando uma sonda de 5 mm com detecção inversa (BBI) e gradiente de campo na direção do eixo z.

O processamento dos espectros foram realizados utilizando um software da Bruker.

Para aquisição dos espectros de RMN de ^1H foi utilizada a sequência de pulso (zg). O tempo de espera antes de cada aquisição (d1) foi de 1,00 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 8,50 μs . A largura espectral (SWH) utilizada foi de 7353 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 4,46 s e foram acumulados (ns) 16 FIDs. Após a aquisição o processamento foi realizado com *zero-filling* ($\text{SI} \geq \text{TD}$) de 64 K e fez-se a calibração em relação ao TMS (zero), a correção da fase, a correção da linha de base e também a mesma ampliação para todos os espectros para realização da integração dos sinais.

Para citrinina foi integrado o sinal do hidrogênio olefínico em δ 8,23 ppm (H-1) e para a DMF o sinal do hidrogênio do grupo aldeído em δ 7,98 ppm, sendo que o próprio equipamento fixa um valor unitário para a integral do mesmo.

3.5.2.4.1 – Estimativa de T_1

Para realização das medidas quantitativas foi feita uma estimativa do tempo de relaxação longitudinal T_1 para a citrinina e para a DMF. Experimentalmente obteve-se um tempo de relaxação (t) de 0,3 s para o núcleo mais lento. Este tempo encontrado foi aplicado na fórmula:

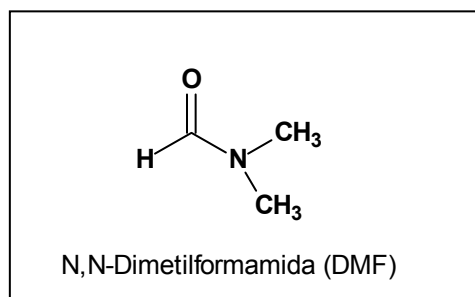
$$T_1 = t_{\text{obtido}} \times 1,443 \text{ (Logaritmo neperiano 2)}$$

$$T_1 = 0,3 \text{ s} \times 1,443 \cong 0,4329 \text{ s}$$

$$5 T_1 = 2,1645 \text{ s}$$

Este valor de T_1 (estimado, significa que a somatória de d_1 (tempo de espera antes da aquisição) mais o tempo de aquisição (aq) tem que ser igual a $5 T_1$ ($5 T_1 = d_1 + aq$) Portanto, serão necessários no mínimo 2,17 s para que todos os núcleos voltem para a condição inicial.

3.5.2.5 - Cálculo da concentração da DMF



DMF = C_3H_7NO (99,8%)

[DMF] = 33,3 % (diluuição – clorofórmio/DMF – 2:1)

Volume DMF utilizado/ tubo = $3,33 \times 10^{-3}$ mL

$d_{\text{DMF}} = 1,03$ g/mL

Massa (10 μL de DMF) = $3,43 \times 10^{-3}$ g

MM DMF = 73,10 g/mol

Mol (DMF) = $0,4703 \times 10^{-3}$ /mL

3.5.2.6 – Cálculo da concentração da citrinina no extrato de *Penicillium* sp. Cat1.1 em pH 3

O cálculo da concentração em mg/mL da citrinina no extrato fúngico foi feito utilizando-se a fórmula abaixo:

$$[\text{Substância}] = [\text{DMF}] (\text{mol/mL}) \frac{N_{\text{DMF}} \times A_{\text{Substância}}}{N_{\text{Substância}} \times A_{\text{DMF}}} \times MM_{\text{Substância}} (\text{mg/mol})$$

Onde:

[DMF] = concentração da DMF mol/mL

N_{DMF} = nº de hidrogênio da DMF utilizado na integral

$A_{\text{substância}}$ = integral da substância no espectro de RMN de ^1H

$N_{\text{substância}}$ = nº de hidrogênio da substância utilizado na integral

A_{DMF} = integral da DMF no espectro de RMN de ^1H .

$MM_{\text{substância}}$ = massa molar da substância em mg/mol

3.6 – Curva de calibração para o extrato de *Penicillium* sp. Cat1.1 em pH 3

Para a construção da curva de calibração foi preparada uma solução analítica estoque (solução mãe) de 20 mg/mL de extrato em pH 3 (citrinina) dissolvida em diclorometano deuterado (CDCl_3). A partir desta solução mãe, por diluições, preparou-se as 7 amostras com diferentes concentrações (20,0; 17,0; 14,0; 11,0; 8,0; 5,0 e 2,0 mg/mL). Estas diluições estão apresentadas na TABELA 3.6.1-1.

As amostras foram preparadas no momento das análises, a temperatura de 20°C. Em cada tubo de ressonância (5 mm de diâmetro), contendo 1 mL de solução de extrato em pH 3 (citrinina) em clorofórmio deuterado (CDCl_3), e em seguida foi adicionado 10 μL de DMF (N,N-dimetilformamida a 33,3%) e o TMS como referência interna. Todas as amostras foram analisadas no mesmo dia, mesmo analista e mesmo equipamento.

TABELA 3.6.1-1: Concentrações dos extratos do fungo *Penicillium*. sp. Cat11.1 obtidos em pH 3 para curva de calibração

| Curva | [extrato <i>P. sp</i> Cat11 em pH 3] em mg/mL | V(A) Volume solução mãe (mL) | V(B) Volume CDCl_3 | V(F) Volume final (mL) |
|---------|---|------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Ponto 1 | 20,00 | 1,00 | - | 1,00 |
| Ponto 2 | 17,00 | 0,85 | 0,15 | 1,00 |
| Ponto 3 | 14,00 | 0,70 | 0,30 | 1,00 |
| Ponto 4 | 11,00 | 0,55 | 0,45 | 1,00 |
| Ponto 5 | 8,00 | 0,40 | 0,60 | 1,00 |
| Ponto 6 | 5,00 | 0,25 | 0,75 | 1,00 |
| Ponto7 | 2,00 | 0,10 | 0,90 | 1,00 |

3.6.1 Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H

Os espectros foram adquiridos com a seqüência de pulso (zg) e após o seu processamento, o sinal do hidrogênio H-1 da citrinina em δ 8,23 ppm foi integrado com relação ao hidrogênio aldeído da DMF em δ 7,89 ppm, que foi calibrado em 1. Com os valores das integrais da citrinina obtidos nos espectros de RMN de ^1H *versus* a concentração de citrinina conhecida foi construída a curva de calibração.

Todos os espectros foram processados no software da BRUKER.

3.6.2 – Verificação de substâncias que podem interferir nas medidas quantitativas

A presença de alguma substância que possa estar em baixo dos sinais utilizados nas integrais que, podem interferir nas medidas quantitativas da citrinina foi verificada através determinação do pH ideal para a extração.

3.6.3 – Análise da citrinina em diferentes solventes e temperaturas

Adicionalmente, foram realizados experimentos com o extrato do *Penicillium* sp. Cat11.1 em pH 3, ou seja, a citrinina com alto grau de pureza obtida nessa extração. Este extrato foi dissolvido em diferentes solventes tais como: CDCl_3 , CD_3OD , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ (3:1) e DMSO_{d-6} , devido a sua reatividade. Além dessas análises, em diferentes solventes, os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em diferentes temperaturas, em função do equilíbrio dinâmico entre as duas formas isoméricas, a *o*-quinona e a *p*-quinona.

3.6.3.1 – Parâmetros de aquisição e processamento dos espectros da citrinina em diferentes solventes e temperaturas

Os espectros de RMN de ^1H das amostras do extrato fúngico em pH 3 (citrinina) em clorofórmio (CDCl_3) foram adquiridos às temperaturas de 283 à 213 K, utilizando a seqüência de pulso (zg). O tempo antes da aquisição (d1) foi de 1,00 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 8,50 μs , com uma largura espectral (SWH) de 7440 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 4,40 s e foram acumulados (ns) 8 FIDs para cada experimento. Após a aquisição dos experimentos o processamento foi realizado com zero *filling* ($\text{SI} \geq \text{TD}$) de 64 K.

Para aquisição dos espectros de RMN de ^1H da citrinina (pH 3) em metanol (CD_3OD) às temperaturas de 283 à 233 foi utilizada a seqüência de pulso com pré-saturação (zgcpr) e potência de pré-saturação (pl9) de 60 db. O tempo de espera antes da aquisição (d1) foi de 1,00 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 8,50 μs . Para aquisição do espectro foi utilizada uma largura espectral (SWH) utilizada foi de 5144 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 6,40 s e foram acumulados (ns) 32 FIDs. Após a aquisição dos experimentos o processamento foi realizado com *zero-filling* ($\text{SI} \geq \text{TD}$) de 64 K e multiplicação exponencial (lb) de 0,3 Hz.

Para a amostra do extrato fúngico (citrinina) em pH 3 dissolvida em $\text{DMSO}-d_6$ os espectros foram adquiridos nas temperaturas de 298 à 323 K foi

utilizada a seqüência de pulso (zg), o tempo de espera antes da aquisição (p1) de 1,50 s e a duração do pulso (p1) de 8,50 μ s. Para aquisição do espectro foi utilizada uma largura espectral (SWH) de 8013 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 4,09 s e foram acumulados (ns) 32 FIDs. Após a aquisição dos experimentos o processamento foi realizado com *zero-filling* ($SI \geq TD$) de 64 K e multiplicação exponencial (lb) de 0,30 Hz.

3.7 – Avaliação da produção de metabólitos do *Penicillium* Cat11.1, quando o meio de cultura foi esterilizado nas autoclaves vertical e horizontal

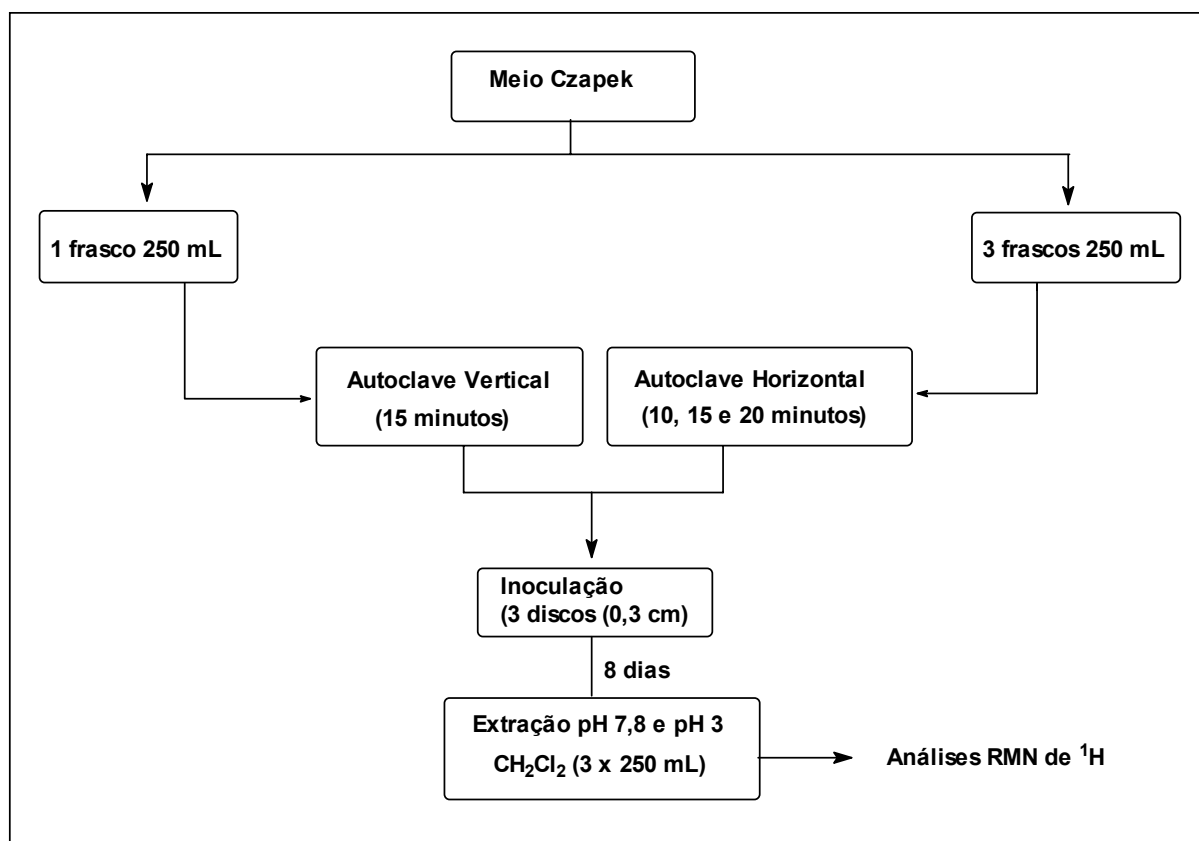
Na Embrapa, todos os meios de culturas são autoclavados por 20 minutos na autoclave horizontal (automática).

Quando o meio de cultivo (Czapek) foi esterilizado por 20 minutos na autoclave horizontal, ao retirar os frascos, observou-se um precipitado no fundo. O precipitado poderia ser os sais hidratados utilizados no meio de cultura que, com o aumento de uma dada temperatura diminui a solubilidade, além de, a quantidade precipitada ser bem maior do que a quantidade desses sais no meio, quando o meio esfria, este precipitado não desaparece (item 3.1.3.2 pág. 20). Além do precipitado, também foi observado que o meio adquiriu uma cor amarelo intenso (caramelizado). Depois do período de fermentação, o precipitado (cristais) ainda permanece no meio de cultura e, também se mostrou insolúvel em metanol, diclorometano e DMSO após a sua separação do meio de cultura através de uma filtração. No entanto, este precipitado não ocorre quando o meio é esterilizado por 15 minutos na autoclave vertical (manual). Devido a estas observações, resolveu-se avaliar se esse precipitado influencia, ou não, a produção de extratos obtidos em pH 7,8 e pH 3 de uma fermentação utilizando o *Penicillium* sp. Cat11.1.

Para esta avaliação o *Penicillium* sp. Cat11.1 foi cultivado em Erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de meio Czapek (item 3.1.3.2 pág. 20) esterilizado por 15 minutos na autoclave vertical (triplicata) e por 10, 15 e 20 minutos na autoclave horizontal (triplicata). A inoculação foi feita com 3 discos (0,3

cm de diâmetro) e incubados por 8 dias a temperatura ambiente. Após o período de fermentação o micélio foi separado do filtrado por uma filtração comum. O filtrado foi submetido a duas extrações, sendo que a primeira foi realizada em pH 7,8 (pH este em que se encontrava o meio de cultura) com diclorometano (3 x 250 mL). Após a primeira extração, acidificou-se a fase aquosa para pH 3 com HCl e realizou-se uma segunda extração, também com diclorometano (3 x 250 mL). No extrato em pH 7,8 foi obtida uma mistura de substâncias. No extrato Nesta em pH 3 foi obtida a citrinina com alto grau de pureza para todos os tempos de autoclavagem, tanto para a autoclave vertical como para a horizontal, porém massas diferentes.

Para as análises de RMN de ^1H , as amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e com adição de TMS como referência interna. Os procedimentos experimentais estão descritos no FLUXOGRAMA 3.7-1.



FLUXOGRAMA 3.7-1: Procedimentos experimentais para extração de metabólitos em pH 7,8 e pH 3 do cultivo do fungo *Penicillium* sp. Cat11.1

3.8 – Avaliação de diferentes formas de inoculação na produção de metabólitos produzidos pelo *Penicillium* Cat11.1 quando cultivados em águas minerais

3.8.1 – Cultivo

Neste trabalho, o *Penicillium* sp. Cat11.1 foi cultivado em águas minerais (Fontes: Juventude, Paiol, Platina, Santa Júlia, Vilela e Vitória; TABELA 3.8.1-1), sendo que o meio de cultura foi denominado de acordo com os nomes das fontes (item 3.1.3.2, pág. 20 e 21) e em meio Czapek (item 3.1.3.2, pág. 20) autoclavados na autoclave vertical por 15 minutos. A inoculação foi feita com de duas maneiras, uma com 20 μ L de suspensão de esporos e a outra com 3 discos (0,3 cm de diâmetro). O objetivo deste cultivo foi avaliar a influência da composição química das águas com as formas de inoculação em relação a produção de citrinina. A composição das águas minerais e do meio Czapek estão representadas na TABELA 3.8.1-1.

No cultivo foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL com 250 mL de água mineral, acrescido de glucose e extrato de levedura, inoculados 2 frascos, um com 20 μ L de suspensão de esporos e outro com 3 discos do *Penicillium* Cat11.1, incubados por 7 dias a temperatura ambiente.

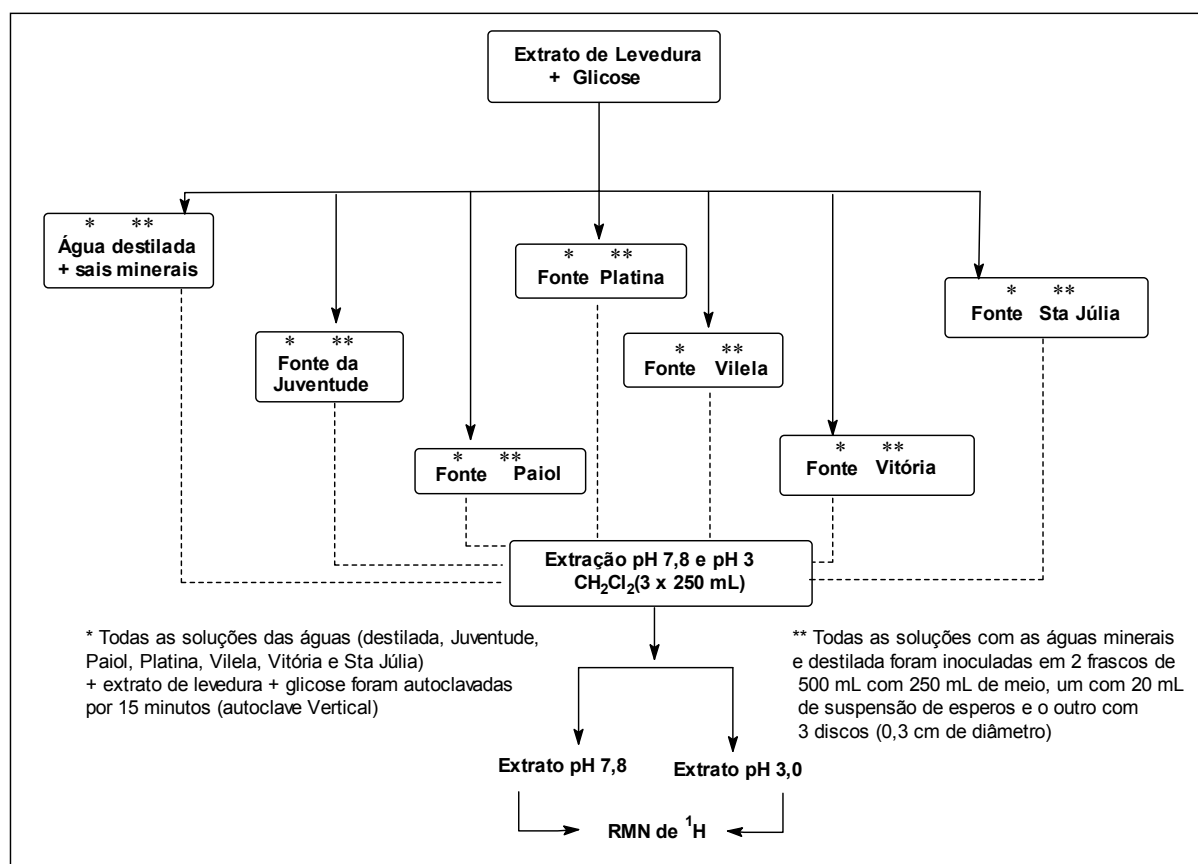
TABELA 3.8.1-1: Composição das águas minerais e do meio Czapek

| | Ca | Cu | Fe | K | Mg | Na | S | Si | Sr |
|------------------|-------|----|------|--------|-------|--------|-------|-------|------|
| Sta Júlia | 3,66 | 0 | 0 | 1,30 | 1,17 | 2,24 | 0 | 1,57 | 0,10 |
| Vilella | 0,51 | 0 | 0 | 1,38 | 0,08 | 1,89 | 0 | 4,53 | 0,07 |
| Platina | 5,53 | 0 | 0 | 3,38 | 1,04 | 40,64 | 9,74 | 28,00 | 0,89 |
| Paiol | 2,46 | 0 | 0 | 7,43 | 1,98 | 115,18 | 46,00 | 17,19 | 0,66 |
| Vitória | 11,04 | 0 | 0,01 | 10,41 | 6,65 | 118,20 | 61,46 | 18,65 | 0,88 |
| Juventude | 10,21 | 0 | 0 | 9,39 | 7,58 | 124,72 | 68,93 | 22,34 | 1,12 |
| Czapek | 0 | 0 | 2,01 | 710,03 | 48,78 | 811,18 | 66,04 | 0 | 0 |

* Concentração dos elementos em mg/L

3.8.2 – Extração

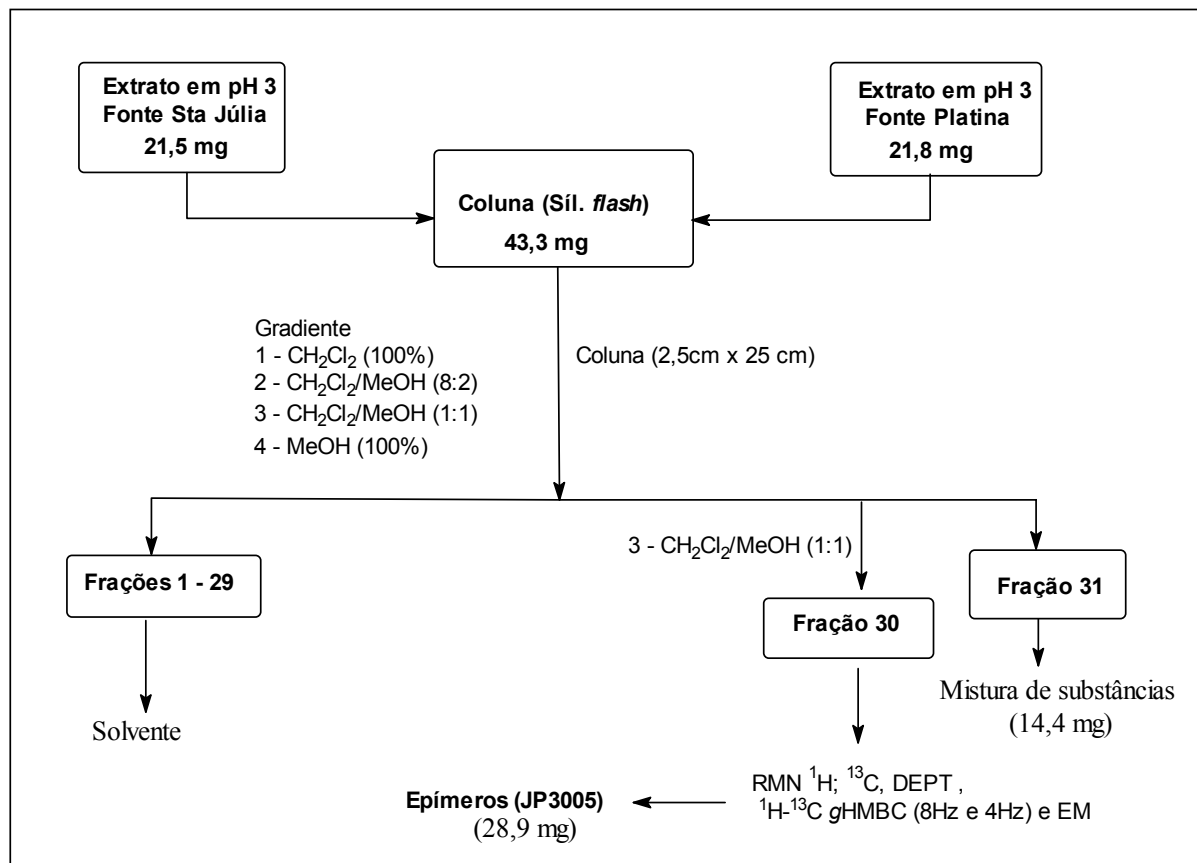
Após o término do período de incubação, separou-se o filtrado do micélio através de uma filtração comum. O filtrado foi submetido a duas extrações com pHs diferentes [pH 7,8 (pH em que se encontrava o meio de cultura com 7 dias de fermentação) e pH 3]. As extrações foram realizadas de acordo com o FLUXOGRAMA 3.8.2-1.



FLUXOGRAMA 3.8.2-1: Procedimentos experimentais para extração de metabólitos produzidos no cultivo em águas minerais utilizando o fungo *Penicillium* sp. Cat1.1

Os extratos das fontes Santa Júlia e Platina no espectro de RMN de ¹H apresentaram os sinais da citrinina e de uma outra substância em pequena quantidade, por esse motivo, foram reunidos e submetido, a um fracionamento por cromatografia de coluna. A coluna foi inicialmente eluída em diclorometano (500 mL), sendo que o extrato ficou totalmente retido, deste modo, passou-se a eluição para um sistema de gradiente (500 mL). Da fração 1 a 29 o extrato ficou retido, pois

essas frações quando analisadas por CCD (cromatografia de camada delgada) tinham somente solvente. Na fração 30, a qual foi coletada 500 mL foi isolada uma substância pura que foi analisada por RMN e EM. Todos os procedimentos da cromatografia estão descritos FLUXOGRAMA 3.8.2-2.



FLUXOGRAMA 3.8.2-2: Procedimentos experimentais para isolamento da citrinina metoxilada (epímeros)

3.8.3 - Espectrometria de Massas

A citrinina metoxilada (epímeros) foi analisada por espectrometria de massas utilizando um *probe* de ESI, no modo negativo de ionização em acetonitrila no equipamento descrito no item 3.2.1.1 pág. 21.

3.9 - Citotoxicidade *in vitro* da citrinina e da citrinina metoxilada (epímeros)

Os ensaios foram feitos Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 CEP: 60.430-270 - Fortaleza – Ceará – Brasil - Email: cpeessoa@ufc.br; lvcosta@secrel.com.br Pesquisadores Responsáveis: Dra. Cláudia do Ó Pessoa, Dr. Manoel Odorico de Moraes, Dra. Letícia Veras Lotufo e Gardenia C. Gadelha Militão (doutorado).

3.9.1 – Material

Células: As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (mama - humano), HCT-8 (cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e HL60 (leucemia promielocítica), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras de citrinina e citrinina metoxilada (epímeros) foram diluídas em DMSO puro estéril. As substâncias puras foram testadas nas concentrações de 25 µg/mL até 0,04 µg/mL.

3.9.2 – Método

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosman (1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas

mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células das linhagens tumorais foram plaqueadas nas seguintes concentrações: $0,1 \times 10^6$ células/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295; $0,7 \times 10^5$ células/mL para a linhagem HCT-8 e $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HL60. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste período de incubação, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por mais 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

3.9.3 - Análise Estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

3.10 - *Penicillium* sp.Casp5

3.10.1 - Primeira etapa - coleta do material

A coleta do material foi realizada como descrita no item 3.3.1. pág. 22. Os frutos foram plaqueados em placas de Petri com BDA (item 3.1.3.2, pág. 20). A esterilização dos grãos de café seguiu a seguinte ordem de imersão: 5 segundos em um Becker de 100 mL com álcool 70%, na seqüência, passa-se os grãos de café por uma solução de hipoclorito 2% e finalmente por 1 minuto em água destilada e, em seguida eles são colocados dentro das placas com o meio de cultura (BDA). Todas as lavagens foram feitas em câmara de fluxo laminar. As placas inoculadas com os frutos foram colocadas em uma sala de incubação (temperatura de 25°C \pm 1°C).

3.10.2 - Segunda etapa - isolamento do fungo

A etapa de isolamento do *Penicillium* sp. Casp5 seguiu a mesma metodologia descrita no item 3.3.2.pág. 23.

3.10.3 - Identificação do fungo

O fungo Casp5 foi identificado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia da Embrapa. Através desta técnica, foi possível identificá-lo somente até gênero como descrito no item 3.3.3 pág. 24, e sua espécie será identificada através do seqüenciamento de DNA na ESALQ/USP.

3.10.4 – Cultivo e isolamento de substâncias do *Penicillium* sp. Casp5

O *Penicillium* sp. Casp5 foi cultivado em Erlenmeyer (500 mL) com 200 mL de meio Czapek (item 3.1.3.2, pág. 20) autoclavado por 15 minutos a 1 atm. Após o meio atingir a temperatura ambiente, fez-se a inoculação do fungo com 3 discos (0,3 cm de diâmetro) por Erlenmeyer e, em seguida, levados à sala de incubação (25°C) por 12 dias no modo estático. Após o período de incubação, realizou-se uma filtração comum (algodão) para separação do micélio e o meio líquido (filtrado)

Foram realizadas duas metodologias para a extração (padronização para quantificação) sendo que:

A primeira metodologia consistiu em duas extrações, sendo que a primeira foi realizada em pH 7 (pH em que se encontra o filtrado) com diclorometano (3 x 200 mL) e, em seguida acidifica a fase aquosa para pH 3 (HCl) e fez-se uma segunda extração com diclorometano (3 x 200 mL). As fases orgânicas foram concentradas e analisadas por RMN de ¹H.

A segunda metodologia foi somente uma otimização da primeira, sendo que, primeiramente fez-se uma acidificação do filtrado para pH 3 e realizou-se a extração com diclorometano (3 x 200 mL).

3.10.5 - Cultivo do *Penicillium* sp. Casp5 para curva de produção do ácido micofenólico)

Após a otimização das condições de extração e isolamento do ácido micofenólico, o *Penicillium* sp. Casp5 foi cultivado em frascos de 300 mL com 150 mL de meio Czapek autoclavado por 15 minutos à 120°C. Após o meio atingir a temperatura ambiente fez-se a inoculação do fungo (plaqueado em BDA por 5 dias) com 3 discos (0,3 cm de diâmetro), e em seguida, foi levado à sala de incubação (25°C) por 20 dias no modo estático (TABELA 3.10.5-1).

Depois do período de incubação, realizou-se uma filtração comum (algodão) para separação do micélio e o meio líquido (filtrado). O filtrado foi acidificado para pH 3 e submetido a uma extração líquido/líquido com diclorometano (2 x 300 mL). A fase orgânica foi concentrada em rota-evaporador e em seguida analisada por RMN de ^1H , o ácido micofenólico com alto grau de pureza. As extrações seguiram a metodologia descrita acima e foi iniciada no tempo de fermentação de zero hora e realizada a cada 24 horas, e após 4 dias de fermentação a cada 96 horas. Nas 8 extrações o pH do filtrado foi ajustado para 3,0 utilizando o HCl. Esta acidificação foi feita independente do pH em que se encontrava o meio de cultura como estão representados na TABELA 3.10.5-2.

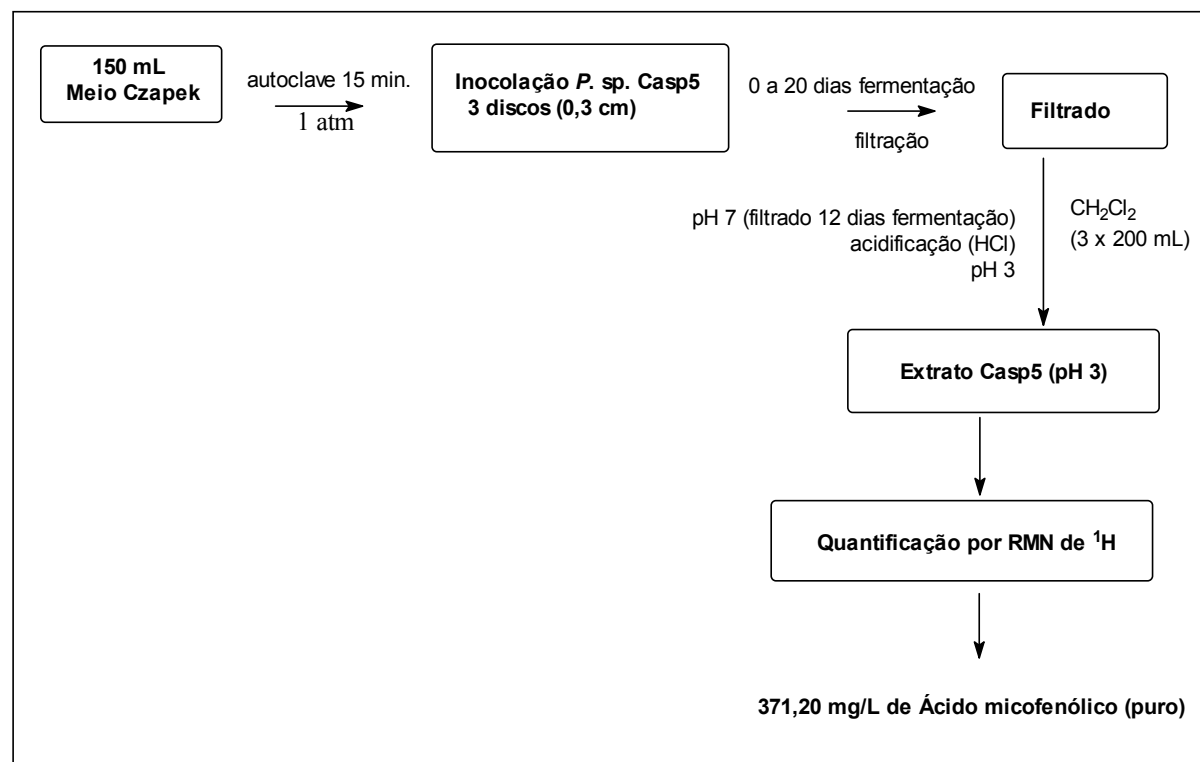
O FLUXOGRAMA 3.10.5-1 apresenta os precedimentos experimentais para a obtenção do ácido micofenólico puro no processo de extração.

TABELA 3.10.5-1: Cultivo em meio Czapek utilizando *P. sp. Casp5* para construção da curva de produção de ácido micofenólico

| <i>Penicillium</i> | Nº de frascos (300 mL) | Nº de frascos Segurança | Vol. meio cultura/ frascos | Concentração inóculo/frasco | Total frascos |
|--------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------|
| Casp5 | 24 | 6 | 150 mL | 2 discos (0.3 cm Ø) | 30 |

TABELA 3.10.5-2: Extrações realizadas em pH 3 durante o período de 20 dias de fermentação por *P.sp. Casp5*

| <i>Penicillium</i> | Fermentação retiradas | Total frascos/ retirados | Vol. filtrado pH 3 (triplicata) | Total amostras/pH 3 |
|--------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------------|
| | Zero hora (pH 7,01) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 24 horas (pH 6,98) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 48 horas (pH 6,70) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 4 dias (pH 6,41) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| Casp5 | 8 dias (pH 6,8) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 12 dias (7,0) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 16 dias (pH 7,89) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| | 20 dias (pH 8,6) | 3 frascos | 3 x 50 mL | 9 |
| Total | | 24frascos | 3200 mL | 72 |



FLUXOGRAMA 3.10.5-1: Procedimentos experimentais para extração do ácido micofenólico

3.10.6 – Ressonância magnética nuclear para quantificação do ácido micofenólico

Todas as medidas foram realizadas em um equipamento de 9.4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio), Marca Bruker, modelo DRX400 utilizando uma sonda de 5 mm com detecção inversa (BBI) e gradiente de campo na direção do eixo z.

Para aquisição dos espectros de RMN de ^1H foi utilizada a seqüência de pulso (zg). O tempo de espera antes da aquisição (d1) foi de 1,00 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 8,50 μs . Os espectros foram adquiridos com uma largura espectral (SWH) de 4.112 Hz, o tempo de aquisição (aq) de 7,97 s e foram acumulados (ns) 16 FIDs.

3.10.6.1 – Estimativa de T_1

A estimativa de T_1 (tempo de relaxação longitudinal) para o ácido micofenólico foi feita utilizando a mesma fórmula descrita no item 3.5.2.4.1, pág 31. O valor de $5 T_1$ foi igual a 2,17 s.

3.10.7. – Cálculo da concentração da DMF

O cálculo da concentração do padrão interno DMF foi realizado como descrito no item 3.5.2.5, pág.31.

3.10.8 – Cálculo da concentração de ácido micofenólico no extrato do *Penicillium* sp. Casp5 em pH 3

O cálculo da concentração em mg/mL do ácido micofenólico foi feito

utilizando-se a fórmula descrita no item 3.5.2.6; pág. 32.

3.10.9. – Curva de calibração para o extrato de *Penicillium* sp. Casp5 em pH 3

Para construção da curva de calibração do extrato em pH 3, preparou-se 7 concentrações diferentes, em triplicata, a partir de uma solução mãe (solução estoque) com uma concentração de 20 mg/mL de extrato do *Penicillium* sp. Casp5 em pH 3. As outras 6 amostras com concentrações diferentes foram obtidas através de diluições com clorofórmio deuterado (CDCl_3), que estão apresentadas na TABELA 3.10.9.-1.

TABELA 3.10.9-1: Concentrações dos extratos em pH 3 do fungo *Penicillium* sp.Casp5 para construção da curva de calibração

| Curva | [extrato do <i>P. sp.</i> Cat11.1 em pH3] em mg/mL | V(A) Volume solução mãe (mL) | V(B) Volume CDCl_3 (mL) | V(F) Volume final (mL) |
|---------|--|------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| Ponto 1 | 20,00 | 1,00 | - | 1,00 |
| Ponto 2 | 17,00 | 0,85 | 0,15 | 1,00 |
| Ponto 3 | 14,00 | 0,70 | 0,30 | 1,00 |
| Ponto 4 | 11,00 | 0,55 | 0,45 | 1,00 |
| Ponto 5 | 8,00 | 0,40 | 0,60 | 1,00 |
| Ponto 6 | 5,00 | 0,25 | 0,75 | 1,00 |
| Ponto7 | 2,00 | 0,1 | 0,90 | 1,00 |

As amostras foram preparadas no momento das análises, em temperatura de 20°C. Em cada tubo de ressonância, contendo 1 mL de solução de do extrato fúngico em pH 3 em clorofórmio deuterado (CDCl_3), e em seguida foi

adicionado 10 μ L de DMF (N,N-dimetilformamida a 33,3%) e o TMS como referência interna. Todas as amostras foram analisadas no mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento.

Os espectros foram adquiridos com a seqüência de pulso (zg) e após o seu processamento, o sinal do hidrogênio H-6 (*dublete*) do ácido micofenólico em δ 3,39 ppm foi integrado com relação a metila da DMF em δ 2,98 ppm, e que foi calibrado em 1. Após a aquisição o processamento foi realizado com *zero-filling* ($SI \geq TD$) de 64 K e fez-se a calibração em relação ao TMS (zero), a correção da fase, a correção da linha de base e também a mesma ampliação para todos os espectros para realização da integração dos sinais.

Através da razão entre as integrais do ácido micofenólico com as integrais da DMF (padrão interno) obtidas nos espectros de RMN de 1H com as 7 concentrações conhecidas do extrato do *Penicillium* sp. Casp5 e analisadas por RMN de 1H foi construída a curva de calibração para o ácido micofenólico.

3.10.10 – Substâncias que podem interferir nas medidas quantitativas

A presença de outras substâncias que podem interferir nas medidas quantitativas do ácido micofenólico foi verificada através das extrações em diferentes pHs como descrito no item 3.6.2, pág. 33.

3.10.11 – Análises do ácido micofenólico em diferentes solventes e diferente temperaturas

Adicionalmente, foram realizados experimentos com o extrato fúngico, contendo o ácido micofenólico dissolvido em diferentes solventes ($CDCl_3$, CD_3OD e $DMSO-d_6$).

Para aquisição e processamento dos espectros de RMN de ^1H foram utilizados os mesmos parâmetros descritos no item 3.6.3.1, pág. 34.

3.11 – Isolamento da Actinobactéria

A actinobactéria (*Streptomyces violaceusniger violaceusniger*) foi isolada como endofítica de folhas de milho (*Zea mays* L.) e identificado pelo Ms Francisco Gheler Costa, 2005 (Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente – Jaguariúna SP). Além do isolamento e identificação o Francisco fez o cultivo, a extração de metabólitos e os testes biológicos com a actinobactéria.

3.11.1 - Identificação do Actinobactéria

A identificação da actinobactéria foi feita pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME- *Fatty Acid Methyl Ester*). Para isso, foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector *Flame Ionization Detector* (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas *ChemStation* A.09.01 [1206] e *MIDI Sherlock Microbial Identification System* 4.0.

O tempo de duração do experimento foi de 20,7 minutos. O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contêm comprimento, área de picos e tempo de retenção nomeados. O resultado final é apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microorganismo (COSTA, 2005).

3.11.2 - Interação entre actinobactéria e fungos fitopatogênicos

Para a avaliação da interação entre actinobactéria endofítica e fungos fitopatogênicos, foram utilizados *Fusarium moniliforme*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora parasítica* adquiridos na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente – Jaguariúna - SP. Discos de 5 mm de diâmetro foram retirados da borda da colônia ativa dos fungos fitopatogênicos a serem testados e colocados sobre meio de cultura BDA (item 3.1.3.2) contido em placas de Petri, distanciados 30 mm de uma risca feita com a alça de platina contendo o Actinobactéria a ser testado. As placas foram incubadas a 28 °C até que a colônia do fungo contido na placa testemunha (sem o Actinobactéria) encostasse na borda da placa de Petri (COSTA, 2005).

3.11.3 - Produção de metabólitos secundários e sua atividade contra fitopatógenos

Para este teste foram utilizados os isolados que apresentaram, no teste de interação, o maior índice de antagonismo contra os fitopatógenos. As actinobactéria foram cultivados, sob agitação (150 rpm), em 500 mL de meio de cultura BDA (item 3.1.3.2 pág. 20) a 28 °C por 7 dias. Depois de filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 foi misturado ao filtrado cerca de 10 - 30 % do volume de acetato de etila (separação da fase aquosa e orgânica). Com o auxílio de um funil de separação foi separada a fase orgânica. A operação foi repetida três vezes, aproveitando o filtrado que foi extraído com nova quantidade do solvente. Devido à presença de umidade em solvente após a extração, secou-se com sulfato de sódio anidro. Realizou-se outra filtragem e a remoção do solvente procedeu-se sob pressão reduzida em evaporador rotativo. O resíduo (metabólito) no fundo do balão foi removido e armazenado a 4 °C (MELO & SANHUEZA, 1995).

Para testar a eficiência dos metabólitos extraídos das actinobactéria foram adicionados 40 µL do metabólito dissolvido em solvente em discos de 5 mm

de diâmetro, feitos com papel de filtro. Após evaporação do solvente, os discos foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e, então, foram adicionados discos de 5 mm de diâmetro contendo o fitopatógeno. A eficiência dos metabólitos foi evidenciada pela redução do crescimento micelial do fitopatógeno comparada com o tratamento controle.

Como controle, discos somente com o solvente evaporado foram colocados em placas de Petri com o fitopatógeno. As placas foram mantidas a 28 °C por 5 dias e a avaliação foi feita evidenciando o halo de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno (COSTA, 2005).

3.11.4 – Isolamento da substância ativa do extrato 14f1d/2

O extrato 14f1d/2 foi levado para o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar e analisado por RMN de ^1H e, em seguida foi submetido a uma cromatografia em coluna Sephadex LH-20, com uma altura de 50 cm e diâmetro interno de 3,5 cm, utilizando-se o metanol/diclorometano (1:1) como eluente. Foram obtidas 62 frações, sendo que fração 42 foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, $g\text{COSY}$, $g\text{HSQC}$, $g\text{HMBC}$, ^1H - ^{15}N $g\text{HMBC}$, NOESY-1D e EM, sendo identificada como uma prodiginina (5 mg).

3.11.5 - Ressonância magnética nuclear para prodiginina

A amostra de prodiginina foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) utilizando o TMS como padrão interno.

Todas as medidas foram realizadas em um equipamento de 9.4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio e 100,63 MHz para o carbono), Marca Bruker, modelo DRX400 utilizando uma sonda de 5 mm com detecção direta (BBO) e uma com detecção inversa (BBI) e gradiente de campo na direção do eixo z.

Para aquisição dos espectros de RMN de ^1H foi utilizada a seqüência

de pulso (zg). O tempo de espera antes da aquisição (d1) foi de 1,20 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 8,50 μ s. Os espectros foram adquiridos com uma largura espectral (SWH) de 6410 Hz, o tempo de aquisição (aq) de 5,11 s e foram acumulados (ns) 32 FIDs. O processamento do espectro após a aquisição foi realizado com *zero-filling* ($SI \geq TD$) de 64 K.

Para aquisição do espectro de RMN de ^{13}C foi utilizada a seqüência de pulso zgpg30. O tempo de espera antes da aquisição (d1) foi de 0,10 s e a duração do pulso (p1) para o hidrogênio foi de 6,00 μ s. A largura espectral (SWH) utilizada foi de 27027 Hz, e o tempo de aquisição (aq) foi de 0,61 s e foram acumulados (ns) 48604 FIDs. Após a aquisição do experimento o processamento foi realizado com *zero-filling* ($SI \geq TD$) de 62 K e multiplicação exponencial (lb) de 3,00 Hz.

Para aquisição do espectro de DEPT-135 foi utilizada a seqüência de pulso dept135. A largura espectral (SWH) utilizada foi de 31847 Hz, o tempo de espera antes da aquisição (d1) foi de 1,00 s e o tempo de aquisição (aq) foi de 0,50 s e foram acumulados (ns) 25360 FIDs. Após a aquisição do experimento o processamento foi realizado com *zero-filling* ($SI \geq TD$) de 32 K e multiplicação exponencial (lb) de 3,00 Hz.

O espectro de gCOSY foi obtido empregando-se o programa de cosygs com 4 K de pontos digitalizados em F_2 (TDF2), larguras espectrais (SWH) de 6410 Hz em F_2 e de 6410 Hz em F_1 , tempo de aquisição (aq) de 0,32 s, tempo de espera antes da aquisição (d1) de 2,0 s. Foram acumulados 16 FIDs para cada experimento e realizados (TD1) 203 experimentos no eixo F_1 . No processamento foram utilizados com 1024 pontos no eixo F_1 , 1024 pontos no eixo F_2 .

O espectro de gHSQC foi obtido empregando-se o programa de pulso invietgssi com 4096 pontos digitalizados em F_2 (TDF2), larguras espectrais (SWH) de 6410 Hz em F_2 e de 27027 Hz em F_1 , tempo de aquisição (aq) de 0,32 s, tempo de espera antes da aquisição (d1) de 1,20 s. Foram acumulados 44 FIDs para cada experimento e realizados (TD1) 256 experimentos no eixo F_1 . No processamento foram utilizados 1024 pontos no eixo F_1 , 1024 pontos no eixo F_2 .

O espectro de gHMBC foi obtido empregando-se o programa de pulso inv4gplrnd com 4096 pontos digitalizados em F_2 (TDF2), larguras espectrais (SWH) de 6410,27 Hz em F_2 e de 25155,80 Hz em F_1 , tempo de aquisição (aq) de 0,32 s,

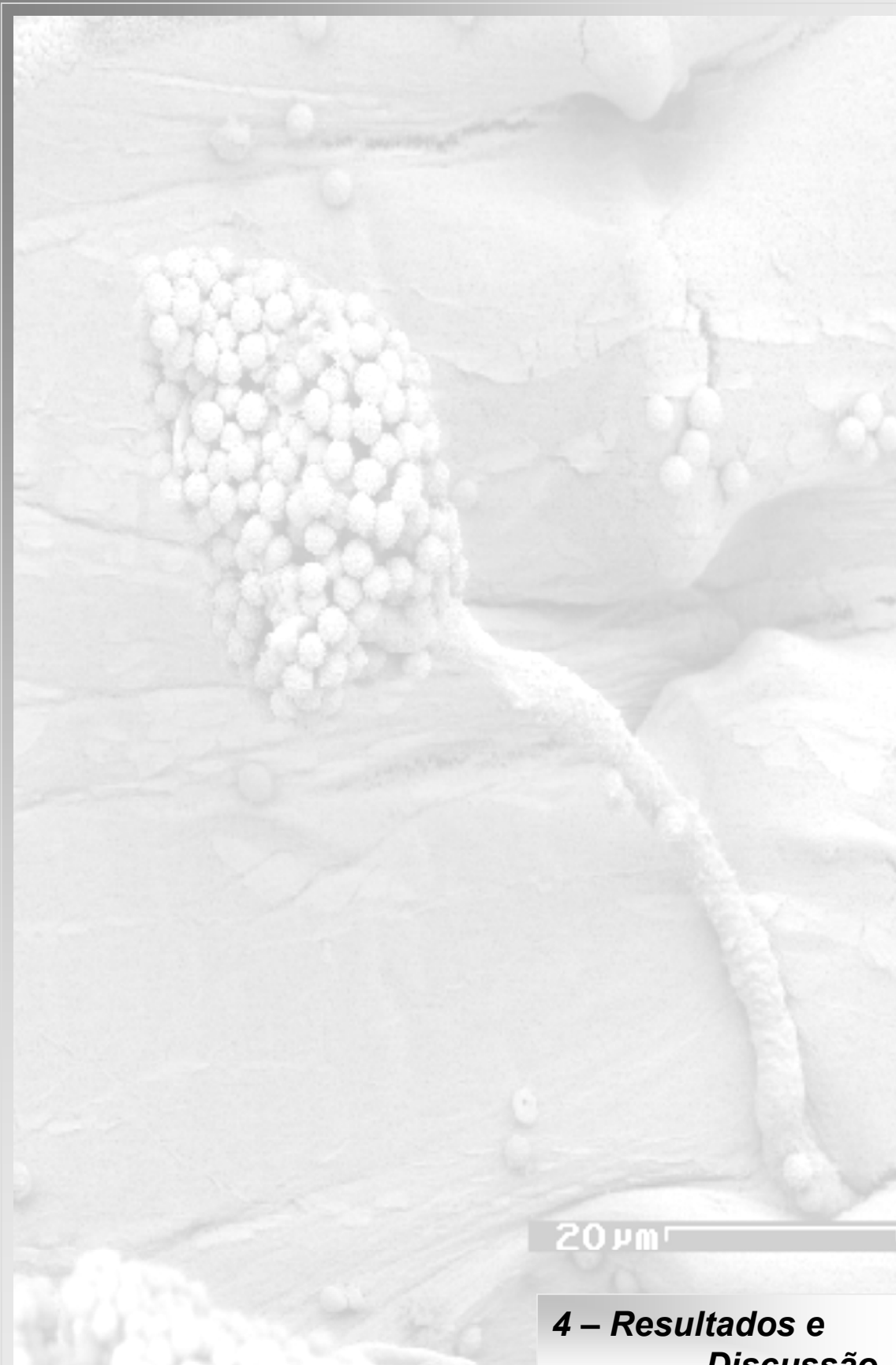
tempo de espera antes da aquisição (d1) de 1,20 s. Foram acumulados 80 FIDs para cada experimento e realizados 256 experimentos no eixo F_1 . No processamento foram utilizados 2048 pontos no eixo F_2 e 1024 pontos no eixo F_1 .

O espectro de $^1\text{Hx}^{15}\text{N}$ gHMBC foi obtido empregando-se o programa de pulso inv4gplrnd com 2048 pontos digitalizados em F_2 (TDF2), larguras espectrais (SWH) de 6868 Hz em F_2 e 24330 Hz em F_1 , tempo de aquisição (aq) de 0,15 s, tempo de espera antes da aquisição (d1) de 2,00 s. Foram acumulados 190 FIDs para cada experimento e realizados (TD1) 121 experimentos no eixo F_1 . No processamento foram utilizados 1024 pontos no eixo F_1 , 1024 pontos no eixo F_2 .

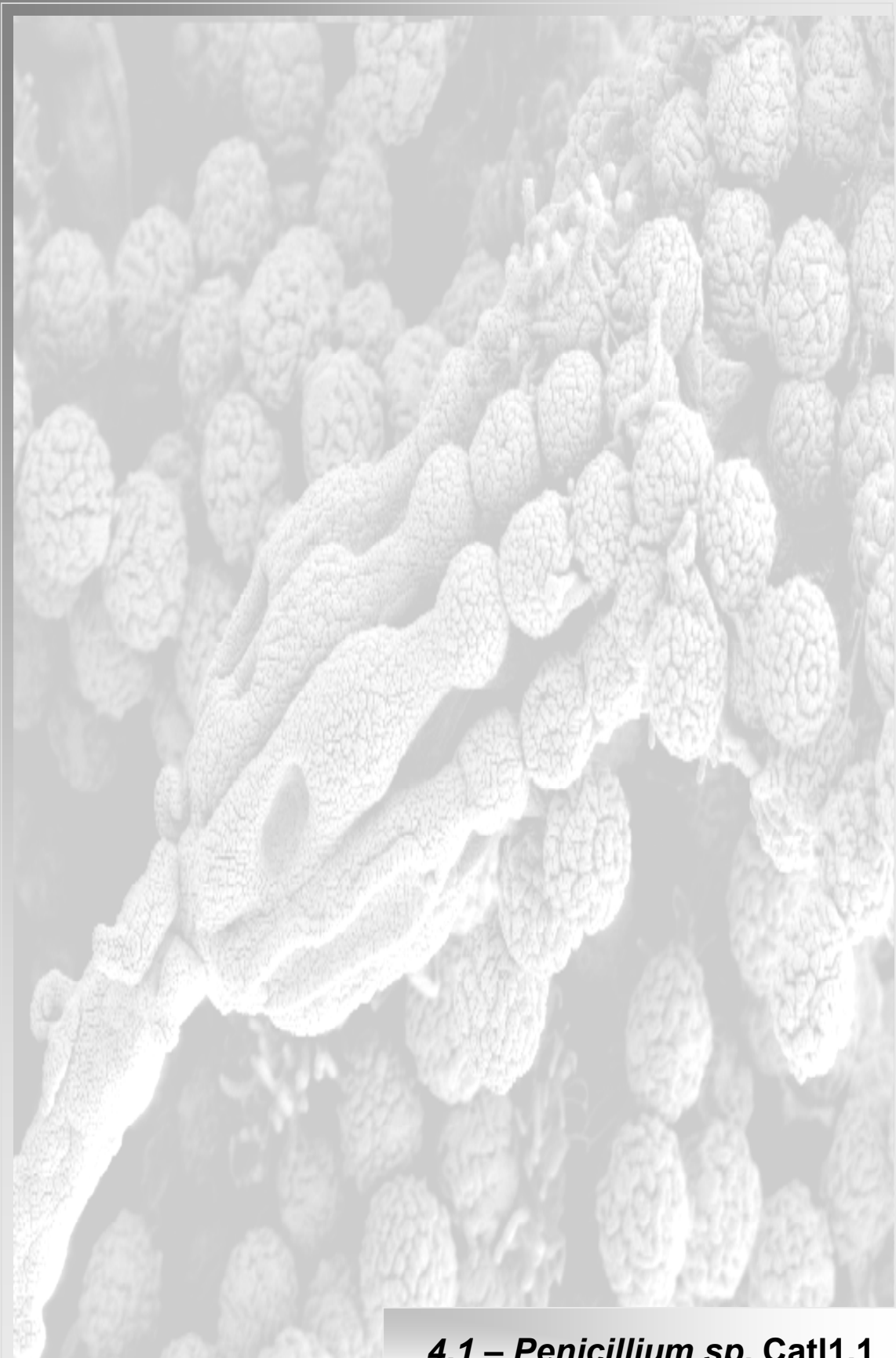
Os experimentos de efeito nuclear Overhauser foram obtidos através da excitação seletiva dos sinais, usando a seqüência de pulsos 1D “*double pulsed field gradient spin-echo* (DPFGSE)-NOE”. Os espectros de RMN 1D gNOE foram adquiridos com 512 transientes, janela espectral de 6313 Hz (~16 ppm) e 32 K pontos, tempo de mistura de 500 ms e tempo de relaxação de 2,00 s. Os espectros foram processados com 32K pontos usando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 1 Hz.

3.11.6 – Espectrometria de massas

A prodiginina foi analisada por espectrometria de massas utilizando um *probe* de ESI, no modo positivo de ionização.



**4 – Resultados e
Discussão**



4.1 – *Penicillium sp. Cat11.1*

4.1 – *Penicillium* sp. Cat1.1

4.1.1 - Isolamento e identificação do fungo

Utilizando a metodologia descrita por ARAÚJO *et al.* (2001) foi isolado da semente do café beneficiado (*Coffea arabica* L.), o fungo *Penicillium* sp. Cat1.1. Das seis placas inoculadas (FIGURA 4.1.1-1) foram isolados três fungos:

Na placa-6 (com menor tempo de esterilização) cresceu apenas um fungo de superfície (epifítico) porque o tempo de esterilização não foi suficiente para eliminá-lo. Este tempo de esterilização não foi suficiente, porque este mesmo fungo também cresceu nas placas que foram inoculadas com a água utilizada na lavagem final das 6 placas.

Nas placas, com tempo intermediário de esterilização (placas 3, 4, 5), não houve crescimento de nenhum fungo, porque o tempo de esterilização foi suficiente para eliminar os fungos de superfície (epifíticos).

Na placa-1, com maior tempo de esterilização, houve o crescimento de dois fungos (quanto maior o tempo de esterilização menor possibilidade de crescimento de microrganismos). Este isolamento na placa-1 pode ser justificado pelo fato do grão de café ser recoberto por uma membrana (porcentagem de umidade do café armazenado é em torno de 11%), e esta somente se desfaz com o maior tempo de exposição em hipoclorito.

O fungo de coloração verde isolado desta placa foi identificado até o gênero por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FIGURA 4.1.1-2), sendo pertencente ao gênero *Penicillium*. As imagens da FIGURA 4.1.1-3 mostram a estrutura filamentosa do fungo que é caracterizado por formar conídios com uma estrutura ramificada semelhante a um pincel e os esporos apresentam uma superfície rugosa (WEBSTER, 1986).

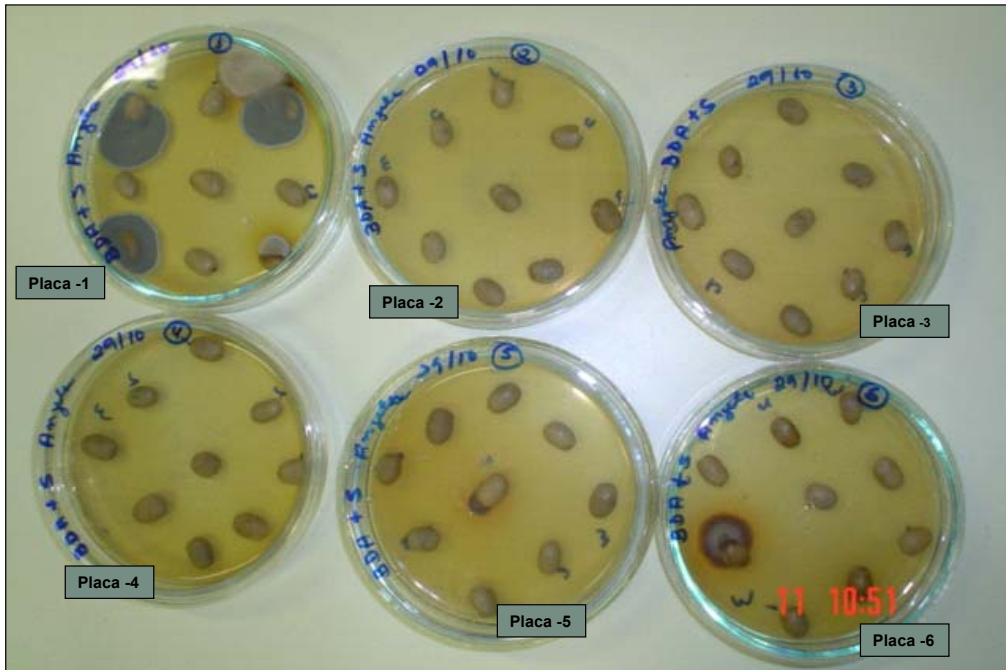


FIGURA 4.1.1-1: Placa-1 (1 min. álcool 70%, 4 min. hipoclorito, 1 min álcool 70% e 1 min. água); Placa-2 (1 min. álcool 70%, 3 min. hipoclorito, 1 min álcool 70% e 1 min. água); Placa-3 (1 min. álcool 70%, 2 min. hipoclorito, 1 min álcool 70% e 1 min. água); Placa-4 (1 min. álcool 70%, 1 min. hipoclorito, 1 min álcool 70% e 1 min. água); Placa-5 (1 min. álcool 70% e 1 min. água) e Placa-6 (lavagem em álcool 70%, hipoclorito 2%, álcool 70% e água)



FIGURA 4.1.1-2: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

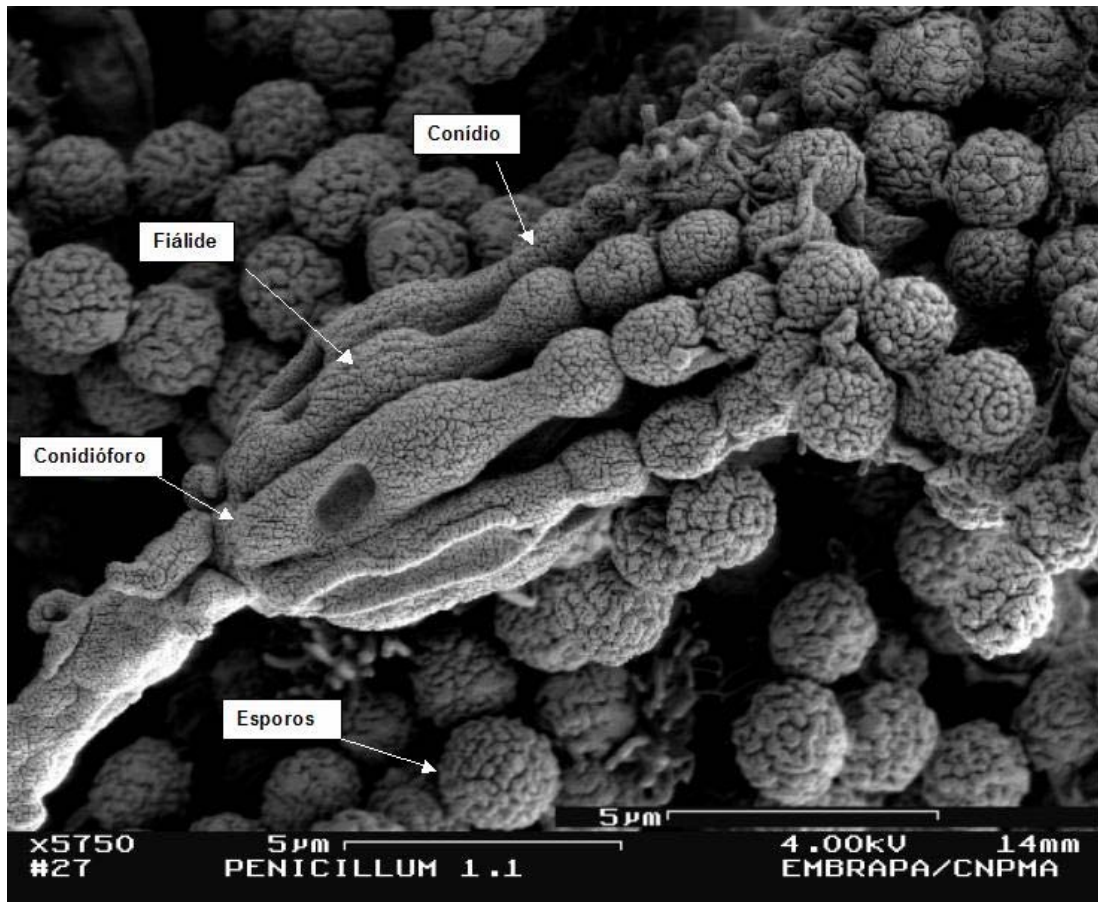


FIGURA 4.1.1-3: Estrutura filamentososa do *Penicillium sp. Cat1.1* (Microscopia Eletrônica de Varredura)

O fungo *Penicillium* denominado Cat1.1 foi cultivado em Czapek (SEÇÃO 3 item 3.1.3.2 pág. 20) e após 7 dias de fermentação (FIGURA 4.1.1-4) obteve-se, no processo de extração, a citrinina pura.



FIGURA 4.1.1-4: Fermentação (7 dias) do fungo *Penicillium sp. Cat1.1* em meio Czapek

4.1.2 – Processo de isolamento da citrinina

A FIGURA 4.1.2-1(A) mostra o extrato obtido em pH 7,80 concentrado, que analisado por RMN de ^1H apresenta uma mistura de substâncias. Já o extrato obtido em pH 3 de coloração amarela fosforescente, quando concentrado, logo após a retirada do balão do rota-evaporador ocorre a formação de círculos, como pode ser visto na FIGURA 4.1.2.1(B). O extrato obtido em pH 3 foi analisado por RMN de ^1H e apresentou uma única substância (citrinina).

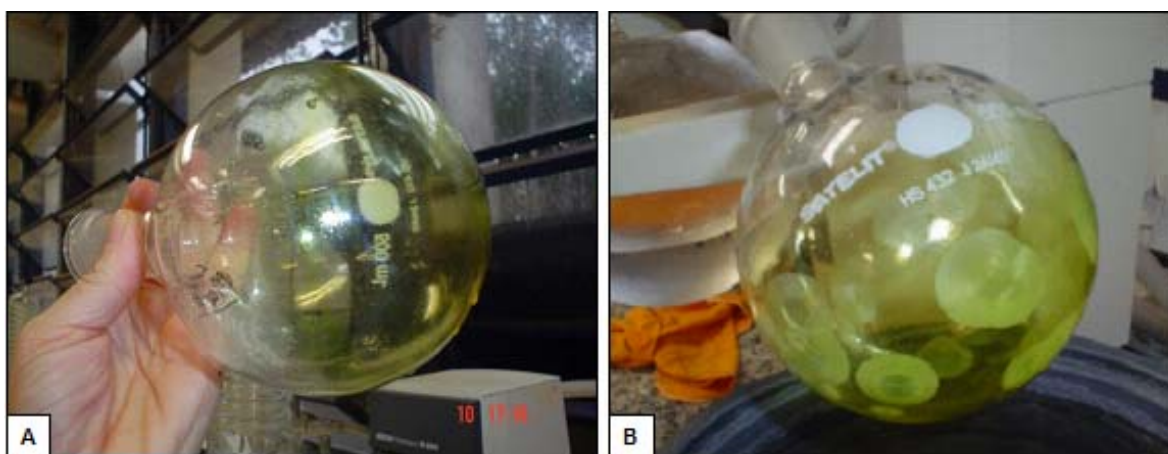


FIGURA 4.1.2-1: (A) Extrato obtido em pH 7,8 (mistura de substâncias; (B) extrato obtido em pH 3 (citrinina pura)

4.1.3 – Identificação estrutural da citrinina

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.1.3-1) do extrato obtido em pH 3, apresentou sinais de hidrogênios metílicos em δ 1,23 ppm (3H, *dublete*, $J = 7,23$ Hz), δ 1,35 ppm (3H, *dublete*, $J = 6,70$ Hz) e δ 2,02 ppm (3H, *singleto*), três sinais de hidrogênios metínicos em δ 2,99 ppm (1H, *quadruplete largo*, $J = 7,20$ Hz), δ 4,78 ppm (1H, *duplo-quadruplete*, $J = 6,70$ Hz e $J = 0,90$ Hz) e δ 8,25 ppm (1H, *singleto*), além de dois sinais de hidroxilas queladas em δ 15,12 ppm (1H, *singleto*) e δ 15,90 ppm (1H, *singleto*).

No espectro de RMN de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 4.1.3-2), apareceram 13 sinais de carbonos, sendo o sinal em δ 81,7 ppm (C-3) típico de carbono carbinólico.

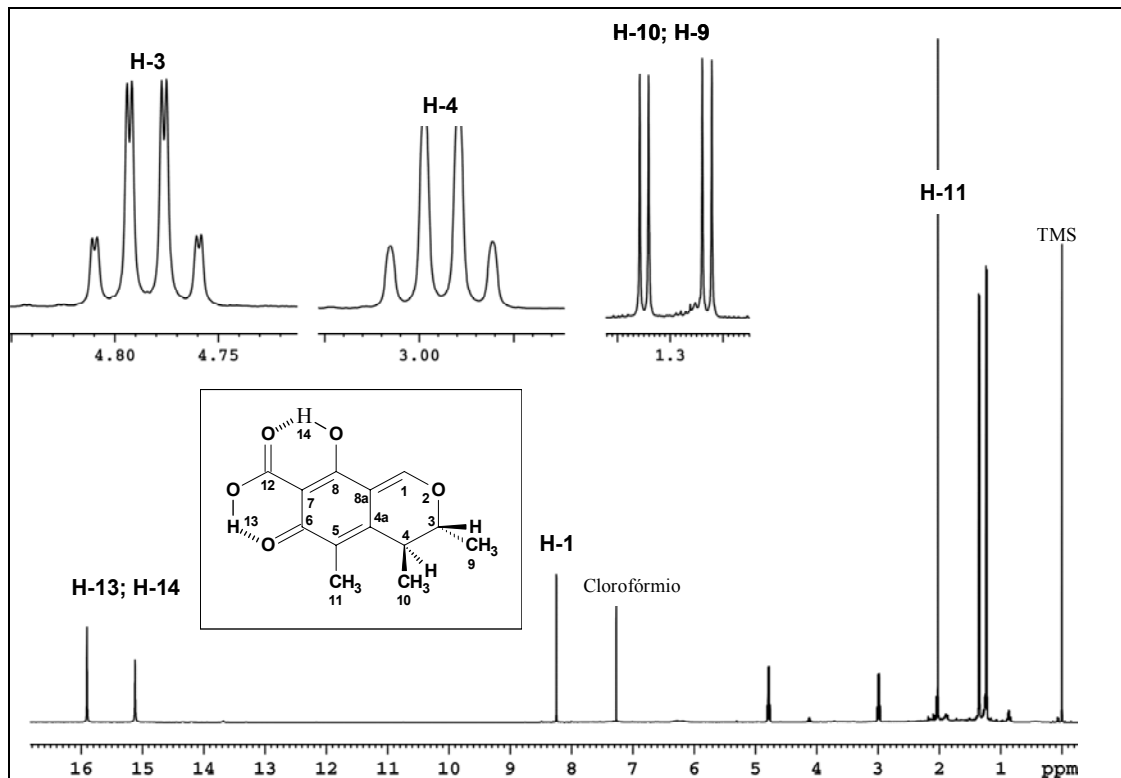


FIGURA 4.1.3-1: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina)

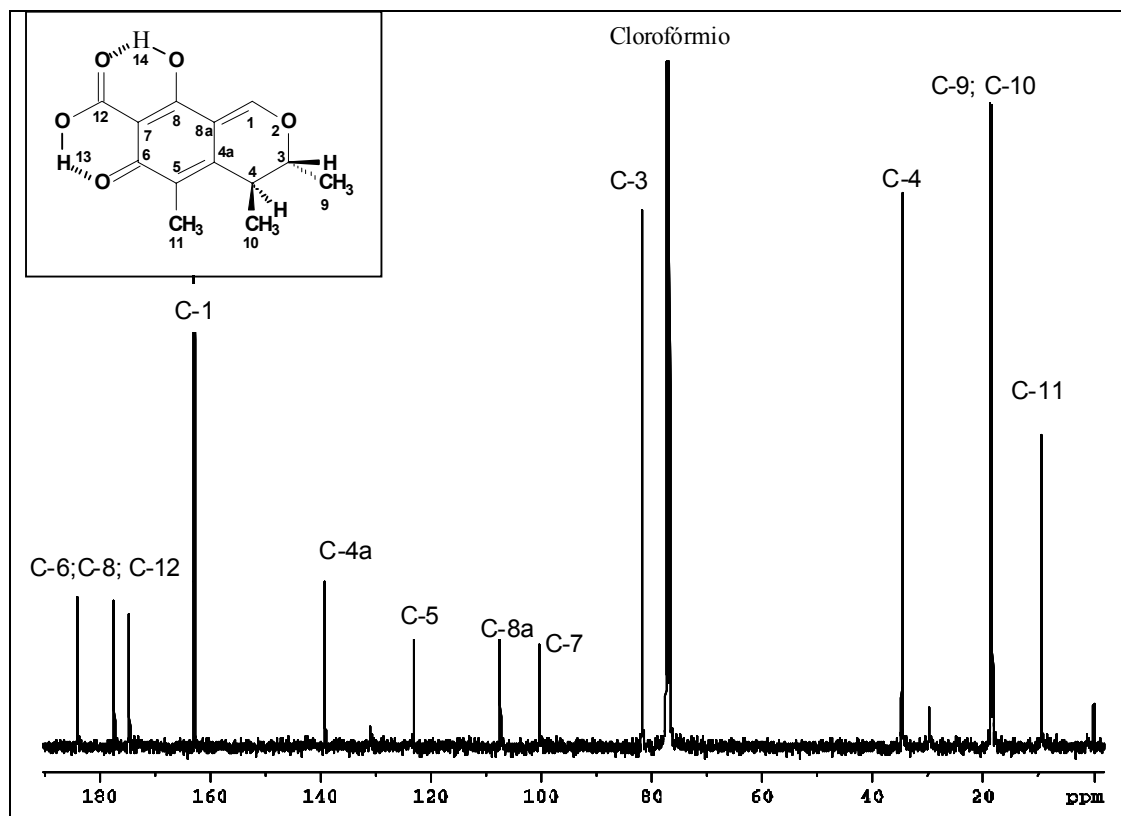


FIGURA 4.1.3-2: Espectro de RMH de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CDCl_3 ; 100MHz) do extrato obtido em pH 3 (citrinina)

Todos os sinais de hidrogênios, observados no espectro de RMN de ^1H , foram correlacionados aos respectivos carbonos no espectro de correlação bidimensional gHSQC (FIGURA 4.1.3-3), em que foi possível atribuir os sinais referentes aos carbonos metínicos e metílicos. Já os carbonos não ligados a hidrogênios foram corretamente atribuídos pelas correlações observadas no gHMBC (FIGURA 4.1.3-4). As correlações principais encontradas no gHMBC estão apresentadas na FIGURA 4.1.3-5.

Todos os dados obtidos através de experimentos de RMN estão apresentados na TABELA 4.1.3-1.

Através dos dados espectrais conclui-se que a substância trata-se do ácido (3R-4S)-4,6-dihidro-8-hidroxi-3,4,6-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-carboxílico, conhecida usualmente como citrinina. O nome e a numeração do composto foram atribuídos segundo a literatura (POUPKO *et al.*, 1997).

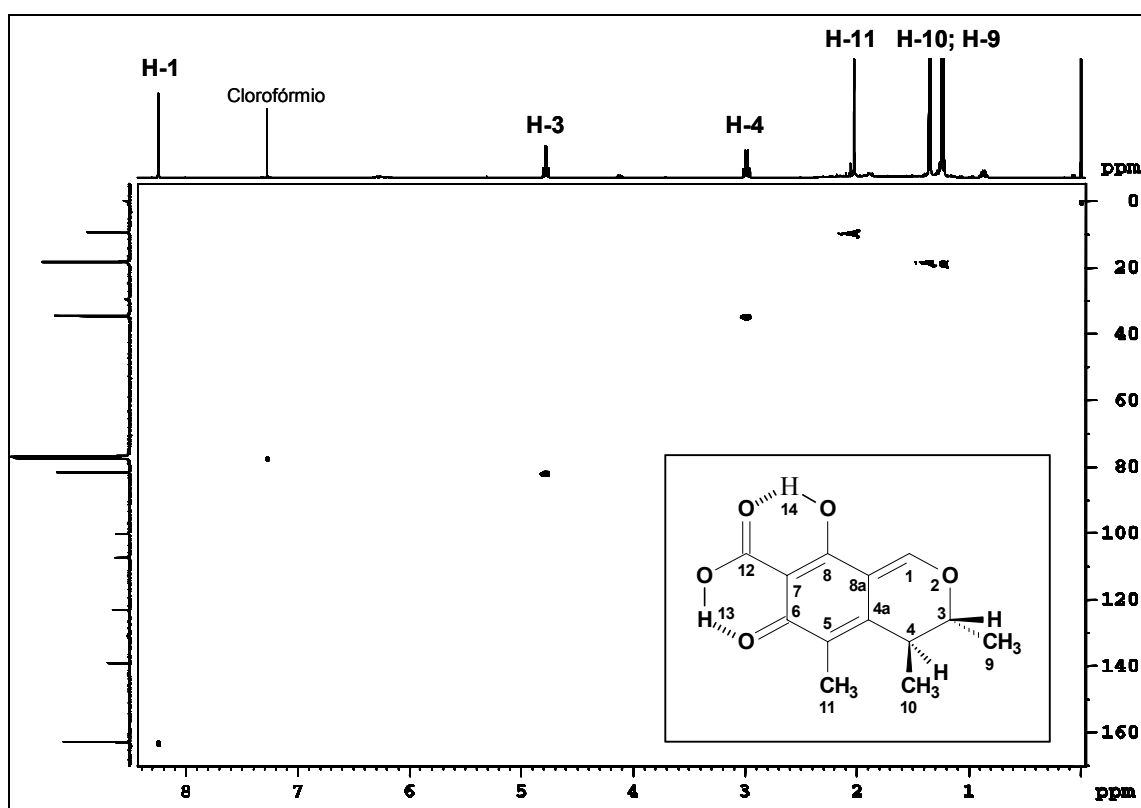


FIGURA 4.1.3-3: Espectro de gHSQC (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina)

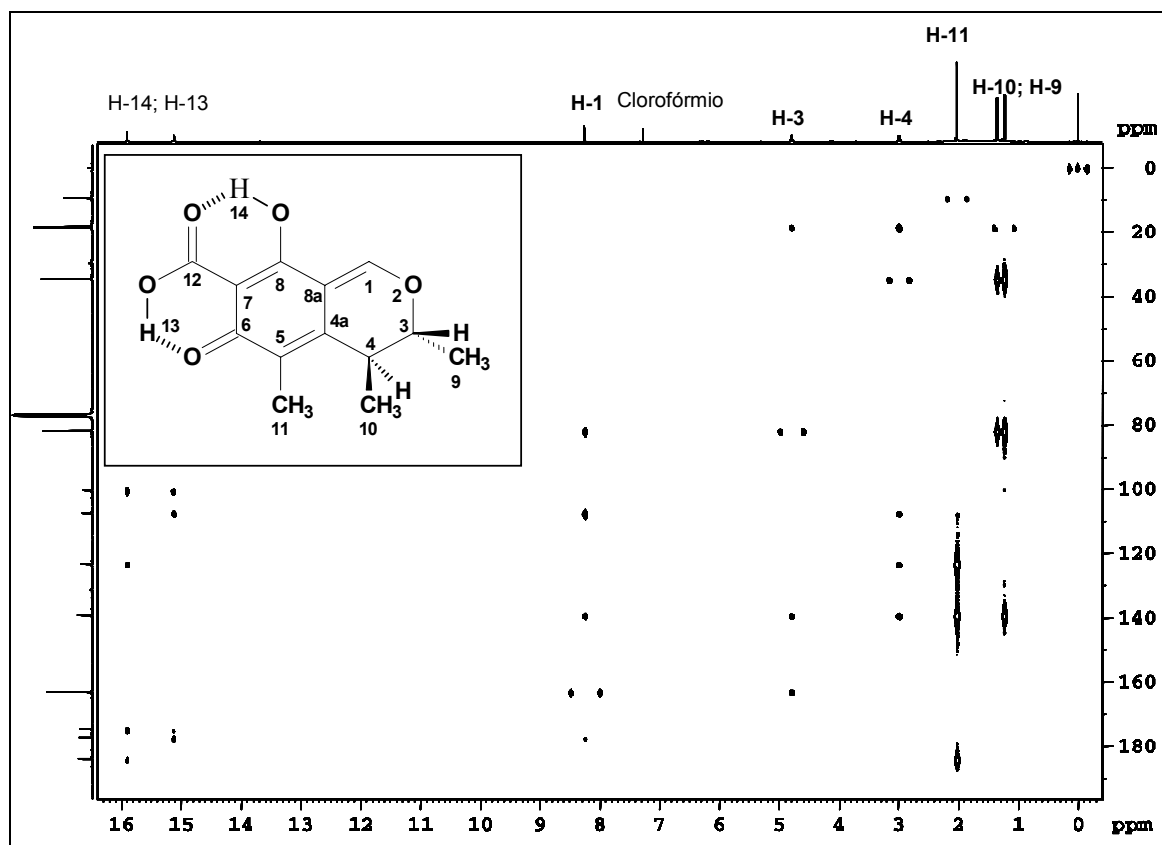


FIGURA 4.1.3-4: Espectro de *gHMBC* (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina)

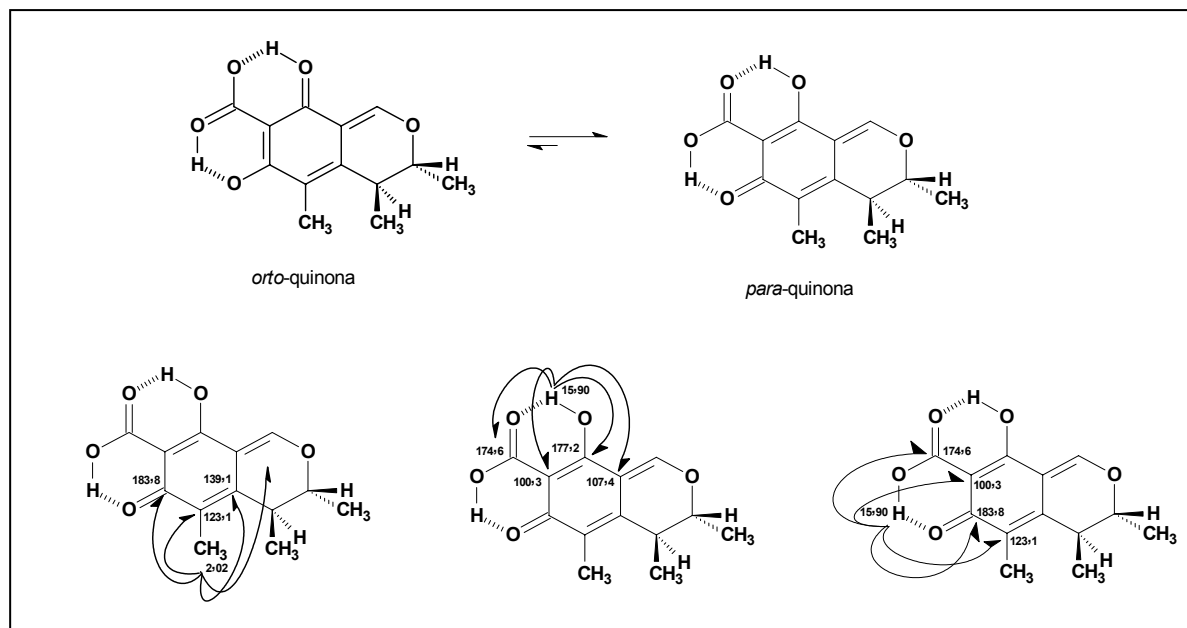


FIGURA 4.1.3-5: Equilíbrio dinâmico deslocado no sentido da forma *p*-quinona e correlações encontradas no experimento de *gHMBC*

TABELA 4.1.3-1: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$, gHSQC, gHMBC do extrato obtido em pH 3 (citrinina) dissolvido em CDCl_3 .

| Posição | $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\} \delta$ | RMN de $^1\text{H} \delta$ | gHSQC | gHMBC |
|---------|--------------------------------------|----------------------------|-------|-----------------------------------|
| 1 | 162,9 | 8,25 (s) | 162,9 | 81,7; 107,1; 139,1; 177,2 |
| 3 | 81,7 | 4,78 (dq; J=6,70; J=0,90) | 81,7 | 18,3; 139,1; 162,9 |
| 4 | 34,6 | 2,99 (q largo; J=7,20) | 34,6 | 18,5; 107,1; 123,1; 139,1 |
| 4a | 139,1 | - | - | - |
| 5 | 123,1 | - | - | - |
| 6 | 183,4 | - | - | - |
| 7 | 100,3 | - | - | - |
| 8 | 177,2 | - | - | - |
| 8a | 107,1 | - | - | - |
| 9 | 18,5 | 1,23 (d; J = 7,20 Hz) | 18,5 | 34,6; 81,7; 107,1, 139,1 |
| 10 | 18,3 | 1,35 (d; J = 6,70 Hz) | | 34,6; 81,7 |
| 11 | 9,5 | 2,02 (s) | 9,5 | 107,1; 123,1; 139,1; 162,9; 183,8 |
| 12 | 174,6 | - | - | - |
| 13 | - | 15,90 (s) | -OH | 100,3; 123,1; 174,6; 183,8 |
| 14 | - | 15,12 (s) | -OH | 100,3; 107,1; 174,6; 177,4 |

Para o experimento de massas a amostra de citrinina foi dissolvida em acetonitrila, porque ela reage com metanol produzindo *adutos*. Estes *adutos* é produzido por uma reação de adição nucleofílica do tipo 1,4 de Michael na forma isomérica *orto*-quinona. Esta reação é reversível e o equilíbrio é favorecido para a produção da forma isomérica *para*-quinona (POUPKO *et al.*, 1997).

O experimento de massas *full scan* (FIGURA 4.1.3-6) foi adquirido, no modo negativo de ionização, utilizando um *probe* de ionização por *Electrospray* (ESI), o qual apresentou o íon molecular m/z 249 $[\text{M}-\text{H}]^-$, referente à desprotonação da citrinina e o *aduto* da acetonitrila, o íon m/z 276 $[\text{250}+\text{HCN}-\text{H}]^-$, além de outros picos.

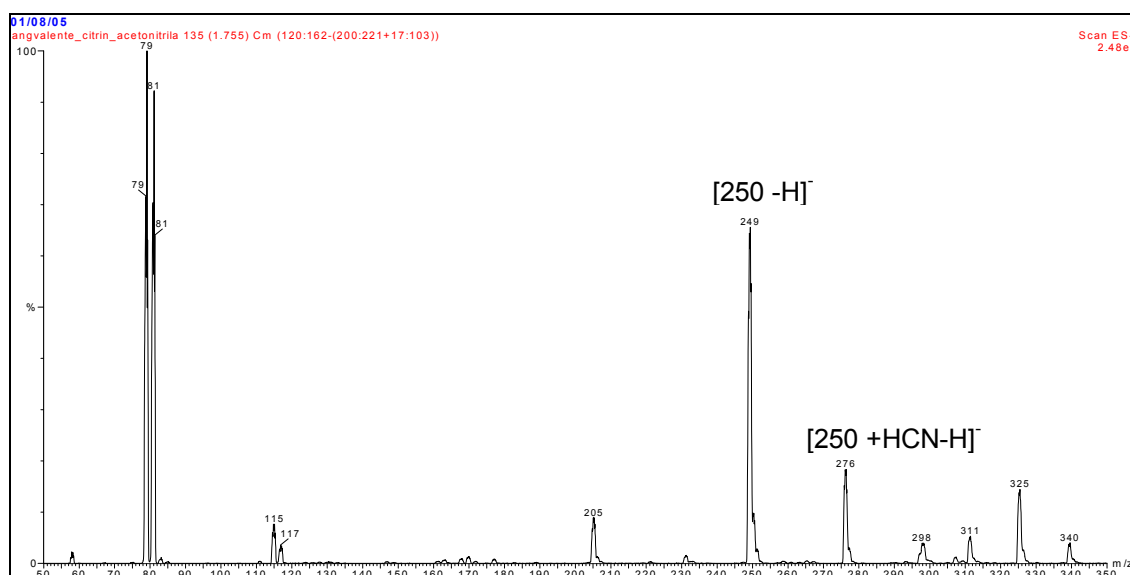


FIGURA 4.1.3-6: Espectro de massas *full-scan* do extrato obtido em pH 3 (citrinina) em acetonitrila por *Electrospray* (ESI), no modo negativo de ionização

4.1.4 – Quantificação da citrinina por RMN de ^1H

A citrinina é um micotoxina produzida por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Ela é um contaminante natural de alimentos e esta relacionada com a saúde pública. Devido, a sua alta toxicidade em humanos e animais, várias metodologias de quantificação para esta micotoxina tem sido desenvolvida. Isto, leva a necessidade de se desenvolver uma metodologia de produção para esta micotoxina, para ser utilizada como padrão em análises em alimentos contaminados, principalmente para análises por HPLC.

Deste modo, o fungo *Penicillium sp. Cat1.1* apresenta algumas características importantes de interesse biotecnológico tais como:

- Liberação da citrinina para o meio líquido;
- Produção da citrinina em grande quantidade;
- Em pH 3 é a única substância miscível em diclorometano presente no meio de cultivo, ou seja, o isolamento da substância já ocorre na etapa de extração.

Devido a estas características podemos enumerar algumas vantagens no processo de produção e isolamento da citrinina utilizando o fungo *Penicillium Cat1.1*:

- A produção da citrinina se dá em apenas em uma fermentação
- O processo de isolamento da citrinina é muito simples e não requer nenhuma técnica cromatográfica.
- A utilização de um único solvente orgânico (diclorometano) no processo de extração facilita a sua recuperação.

Devido, a importância desta micotoxina este trabalho teve como objetivo principal quantificá-la no extrato fúngico. Para a quantificação dela no extrato foi necessário estabelecer alguns critérios na metodologia da extração tais como:

4.1.4.1 – Volume de filtrado para extração

Fixar um volume de filtrado que contenha uma massa de citrinina razoável para realização dos experimentos de RMN, devido ao RMN ser pouco sensível em relação a outras técnicas utilizadas para quantificação. O volume foi fixado em 50 mL de filtrado, porque a massa de extrato obtida é suficiente para a realização dos experimentos.

4.1.4.2 - Volume de solvente utilizado nas extrações

Na extração líquido/líquido normalmente utiliza-se um volume entre o solvente orgânico e a fase aquosa numa proporção de 3:1 (v/v), garantindo deste modo o máximo de extrato. No caso da citrinina, esta relação de 3:1 não foi suficiente. Assim, foi necessário aumentar esta proporção para 4:1 (v/v), sendo que esta foi determinada após várias extrações, todas elas em triplicatas. Embora, esta proporção não tenha sido suficiente para uma extração próxima de 100 %, ela foi utilizada mesmo assim, devido aos experimentos serem quantitativos. Durante, a

otimização das condições de extração, tivemos um problema com as massas de extratos obtidas de 50 mL de filtrado (fase aquosa do mesmo frasco), que foram muito diferentes uma das outras, como por exemplo, (V(A) 6,91 mg, V(B) 17,50 mg e V(C) 13,30 mg, o que levou a realização de várias extrações. Estas extrações foram feitas, variando-se o tempo de realização da extração após a acidificação e mantendo-se o volume de 50 mL de filtrado. A extração foi iniciada após 1 hora e 30 minutos depois da acidificação da fase aquosa para pH 3 e as outras com um intervalo de 3 horas cada.

Nessas extrações, obteve-se massas próximas para as triplicatas. O que poderia justificar o ocorrido nas primeiras extrações de acordo com EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK é que, a citrinina forma complexos quelados com metais, tais como o ferro e o titânio etc., e como o meio de cultura utilizado contém ferro (SEÇÃO 3, item 3.1.3.2 pág.20), isto poderia estar ocorrendo. Nesta situação, provavelmente as moléculas de citrinina em solução aquosa, que estão na forma de sais no momento da acidificação, passam rapidamente para a forma ácida, enquanto que, as que estão em forma de complexos com metais como o ferro não passam imediatamente para a forma ácida. Conclui-se, então, que na acidificação estes complexos provavelmente não são desfeitos imediatamente, necessitando, de um certo tempo para que isso aconteça.

As massas de extratos obtidas de 50 mL de filtrado nas extrações realizadas em diferentes tempos após a acidificação para pH 3 estão representadas na TABELA 4.1.4.2-1.

TABELA 4.1.4.2-1: Massas de extratos obtidas de 50 mL de filtrado após acidificação para pH 3

| Amostra | Extração após acidificação em horas | Massa em mg/50 mL de filtrado (meio de cultura) |
|---------|-------------------------------------|---|
| 1 A | 1 h e 30 min. | 12,84 |
| 1 B | 1 h e 30 min. | 13,19 |
| 1 C | 1 h e 30 min. | 13,37 |
| 2 A | 3 hs | 11,30 |
| 2 B | 3 hs | 11,01 |
| 2 C | 3 hs | 11,35 |
| 3 A | 6 hs | 10,54 |
| 3 B | 6 hs | 10,78 |
| 3 C | 6 hs | 9,90 |
| 4 A | 9 hs | 9,65 |
| 4 B | 9 hs | 10,06 |
| 4 C | 9 hs | 10,59 |

4.1.4.3 - Determinação do pH ideal para a extração

A determinação do pH ideal (filtrado) para a extração da citrinina foi otimizada através de experimentos de RMN de ^1H , obtidos de extratos em diferentes pHs (SEÇÃO 3, item 3.3.4 pág. 24). No espectro de RMN de ^1H do “precipitado de citrinina” obtido em pH 1 (FIGURA 4.1.4.3-1), observa-se que a citrinina está praticamente pura, apresentando apenas um sinal (*singleto* largo) próximo a δ 1,50 ppm, o que não interferiria nas medidas quantitativas, mas a quantidade do precipitado foi muito pequena (0,2 mg), sendo que para aquisição deste espectro foi necessário fazer a supressão do solvente.

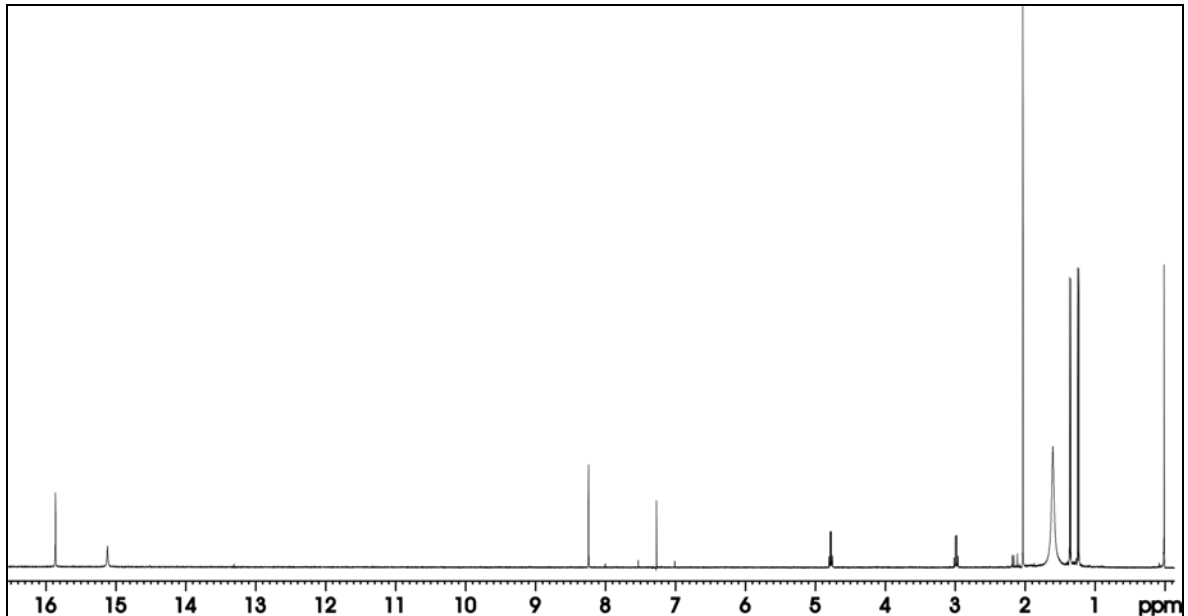


FIGURA 4.1.4.3-1: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato em pH 1 (citrinina precipitada)

Já o espectro de RMN de ^1H do extrato obtido em pH 3 (FIGURA 4.1.4.3-2), com 8 dias de fermentação, observa-se a substância praticamente pura, e em quantidade adequada para a obtenção das medidas quantitativas, não sendo necessário a supressão do sinal do solvente.

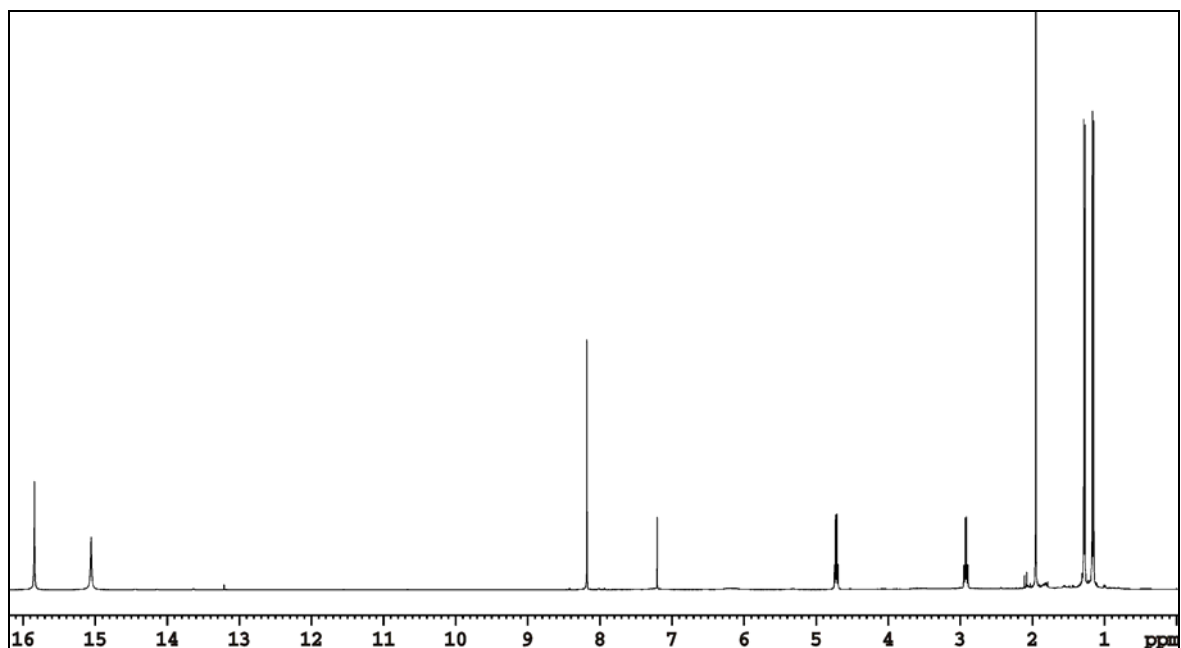


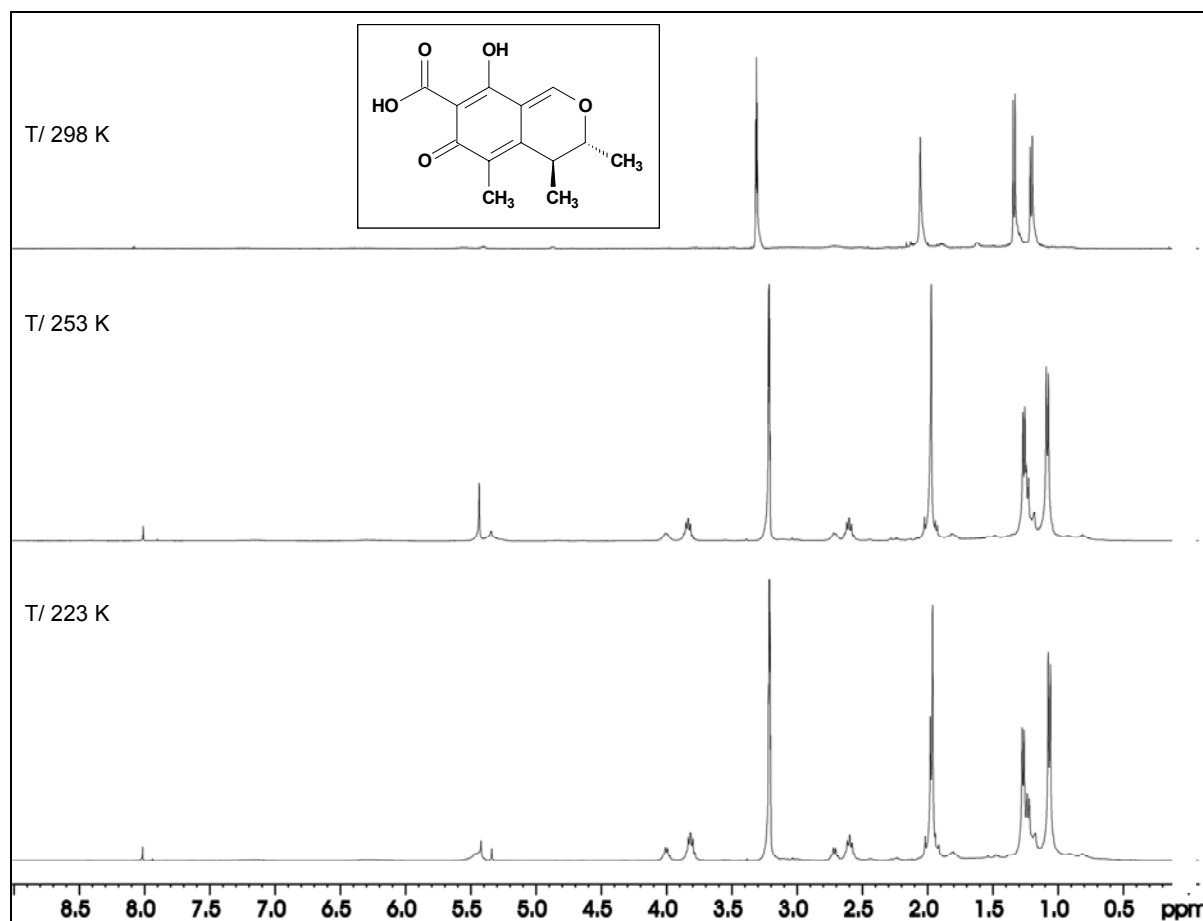
FIGURA 4.1.4.3-2: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato em pH 3 (citrinina)

4.1.4.4 – Avaliação da citrinina em diferentes solventes e temperaturas

A citrinina cristaliza numa estrutura desordenada devido às duas formas tautoméricas, a *p*-quinona e a *o*-quinona, num equilíbrio dinâmico até mesmo no estado sólido. Em solução, este equilíbrio é extremamente rápido, menor que a escala de tempo de RMN ($> 10^6 \text{ s}^{-1}$) (POUKO & DESTRO, 1997). Além disso, estudos mostram que ela, também é afetada pela temperatura e pela composição de solventes usados na preparação de amostras para análises de RMN (XU *et al.*, 2003).

Na FIGURA 4.1.4.4-1 estão apresentados os espectros de RMN de ^1H da citrinina em clorofórmio adquiridos nas temperaturas de 283 K, 253 K e 213 K. Nos espectros em baixas temperaturas, foi possível observar que, à medida que a temperatura diminui, há um aumento na intensidade dos sinais referentes às hidroxilas queladas em δ 15,12 e δ 15,90 ppm, devido a menor movimentação da molécula e, conseqüentemente, uma maior efetividade das ligações de hidrogênio.

Nas temperaturas de 298 K e 213 K foi obtido o experimento de *g*HMBC, o qual apresenta as correlações da citrinina compatíveis com a sua forma isomérica mais estável, a *p*-quinona (FIGURA 4.1.4.4-2).

FIGURA 4.1.4.4-1: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) da citrinina em baixas temperaturas

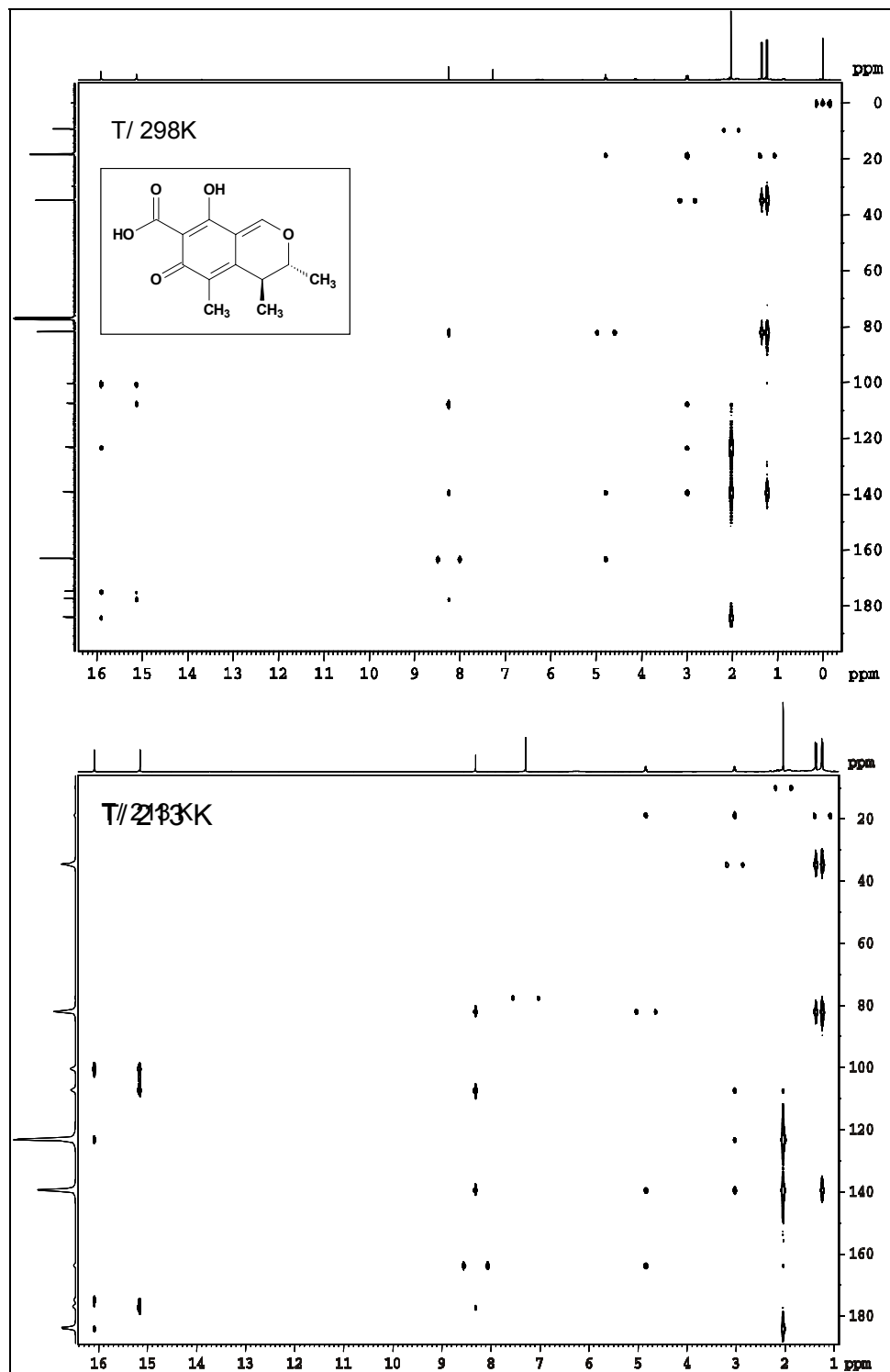


FIGURA 4.1.4.4-2: Espectro de gHMBC (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) à 213 K e à 298 K

Quando a amostra do extrato em pH 3 (citrinina) foi dissolvida em metanol deuterado (CD_3OD) e analisada por RMN de ^1H a 298 K (FIGURA 4.1.4.4-3), o espectro foi drasticamente modificado, sendo observado somente os sinais das

metilas. No entanto, quando ele é adquirido a partir de 253 K, são observados os sinais dos hidrogênios H-3 e H-4 duplicados, do H-1 em δ 8,25 ppm, além de dois sinais adicionais na região de δ 5,0 a δ 5,5 ppm. Esta duplicação dos sinais, bem como os sinais adicionais são devidos a transformação química que a molécula da citrinina sofre. Esta reação que ocorre com a citrinina é reversível, e seria uma adição nucleofílica do tipo 1,4 de Michael na forma tautomérica *o*-quinona, produzindo duas formas isomérica bem definidas, em função da adição de álcool à dupla ligação em *cis* ou *trans* a metila-10 (FIGURA 4.1.4.4-4). O sinal da metoxila não aparece no espectro porque a adição, na verdade, é com $-\text{OCD}_3$ (metoxila deuterada) e não com $-\text{OCH}_3$. De acordo com POUKO *et al.*(1997), no experimento RMN de ^{13}C , o sinal do carbono da metoxila em CD_3OD é fraco, devido a falta de aumento provocado pelo efeito nuclear *Overhauser* dos três hidrogênios deuterados do grupo $-\text{OCD}_3$. Portanto, a citrinina em solução de CD_3OD , reage somente com na forma *o*-quinona, e como podemos observar o sinal em torno de δ 8 ppm nos espectros às temperatura de 253 e 223 K, o qual é referente ao H-1 da forma *p*-quinona, que não sofre adição.

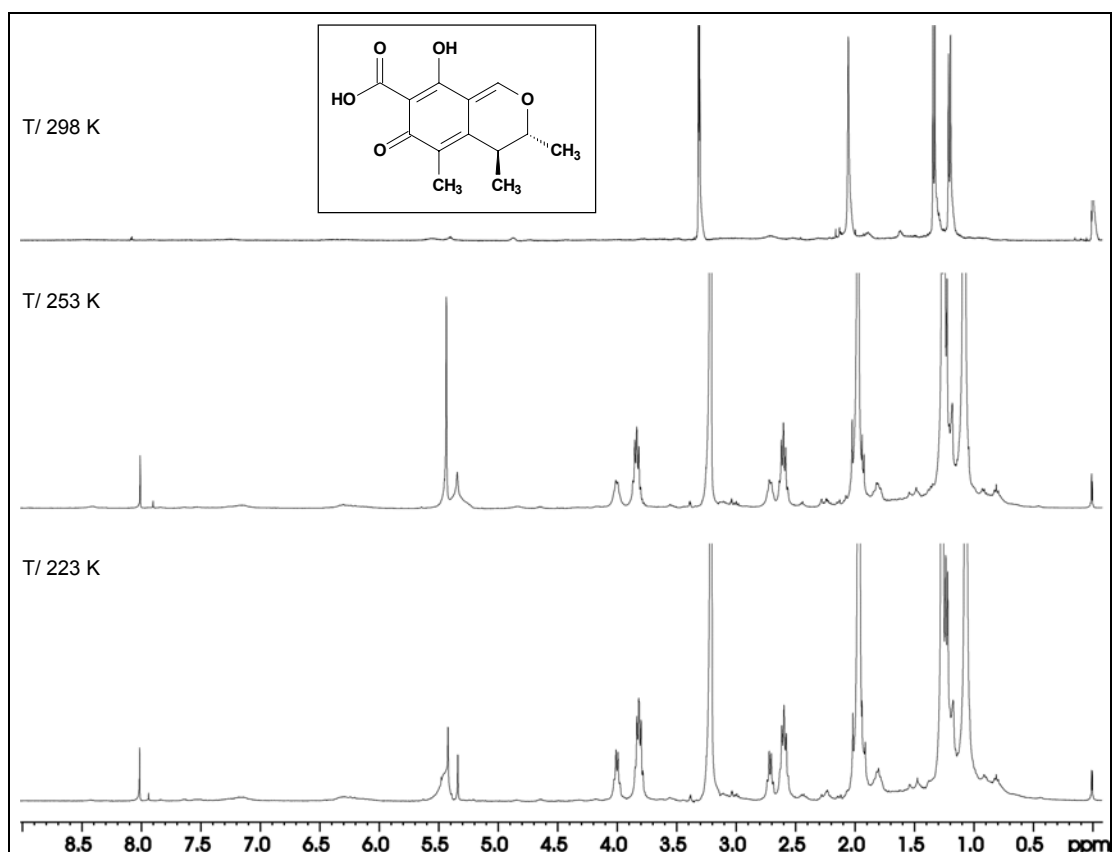


FIGURA 4.1.4.4-3: Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD) da citrinina à baixas temperaturas

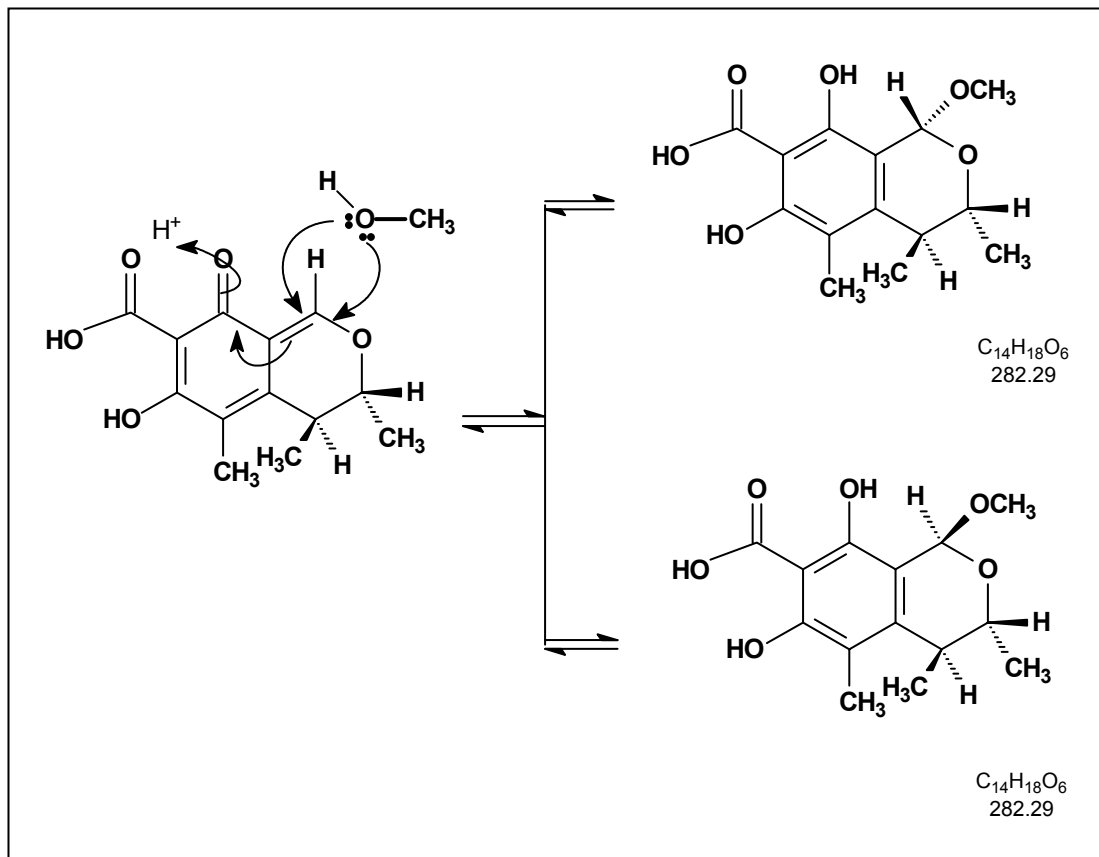


FIGURA 4.1.4.4-4: Adição nucleofílica do tipo 1,4 de Michael na forma isomérica o-quinona

Adicionalmente, quando a amostra de extrato em pH 3 foi dissolvida em CD₃OD/CDCl₃ (3:1) e o espectro adquirido à 298 K, observa-se o *singleto* em δ 8,23 ppm numa intensidade muito pequena e um *multiplete* adicional em δ 5,38 ppm e um *singleto* do lado do sinal do metanol em δ 3,31 ppm (FIGURA 4.1.4.4-5).

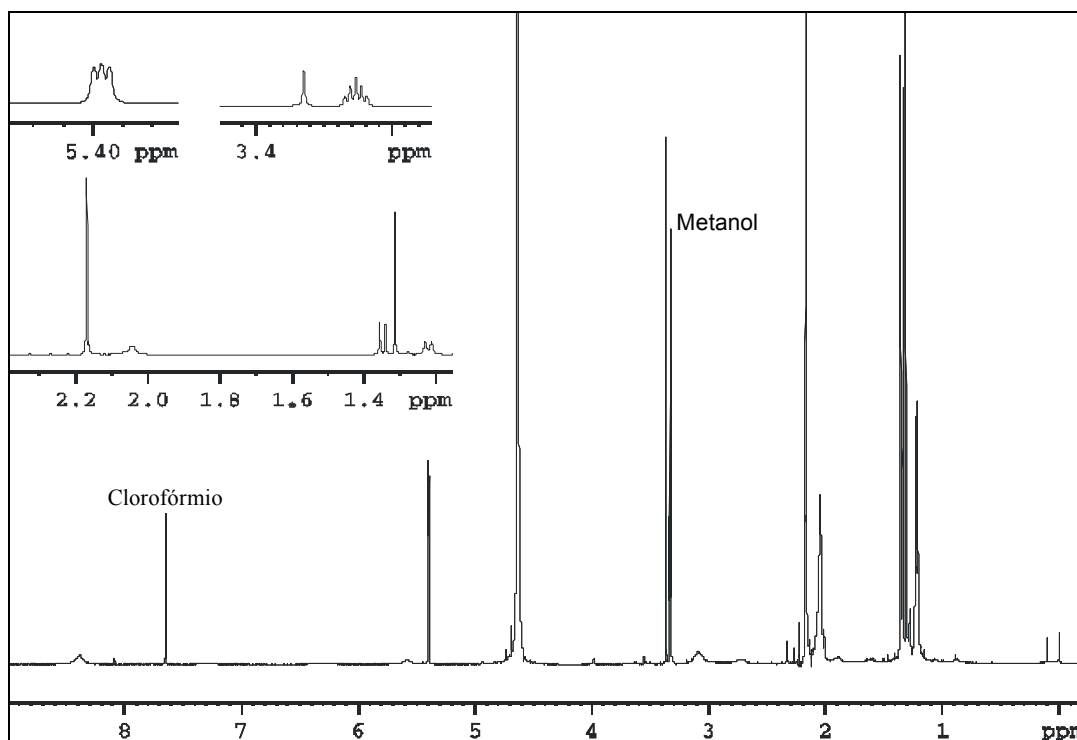


FIGURA 4.1.4.4-5: Espectro de RMN de ¹H (CD₃OD/CDCl₃; 3:1) do extrato em pH 3

Quando o extrato em pH 3 (citrinina) foi dissolvido em DMSO-d₆ e em seguida analisado por RMN de ¹H (FIGURA 4.1.4.4-6 A), não foi observado nenhuma diferença no espectro com relação ao espectro obtido quando ela (citrinina) foi dissolvida em CDCl₃ (FIGURA 4.1.3, pág. 59). Porém, após 3 dias, esta mesma amostra (guardada na geladeira) foi analisada novamente por RMN de ¹H (FIGURA 4.1.4.4-6 B), onde observou-se que, os sinais em δ 8,50 e δ 2,00 ppm tiveram suas intensidades diminuídas em comparação com a do 1^o dia. Além disso, também observou-se dois sinais adicionais, um em δ 8,25 ppm e outro em δ 2,10 ppm referentes ao hidrogênio H-1 e a metila CH₃-10 da forma *o*-quinona. Portanto, no espectro de 3 dias (298 K), têm-se as duas formas tautomérica da citrinina, a *o*-quinona e a *p*-quinona, sendo que o equilíbrio é deslocado no sentido de produção da *o*-quinona, e com o aumento de temperatura (FIGURA 4.1.4.4-6 C) este, é ainda mais favorecido. Enquanto que, no espectro do 1^o dia, tinha-se o equilíbrio totalmente deslocado para a formação da *p*-quinona.

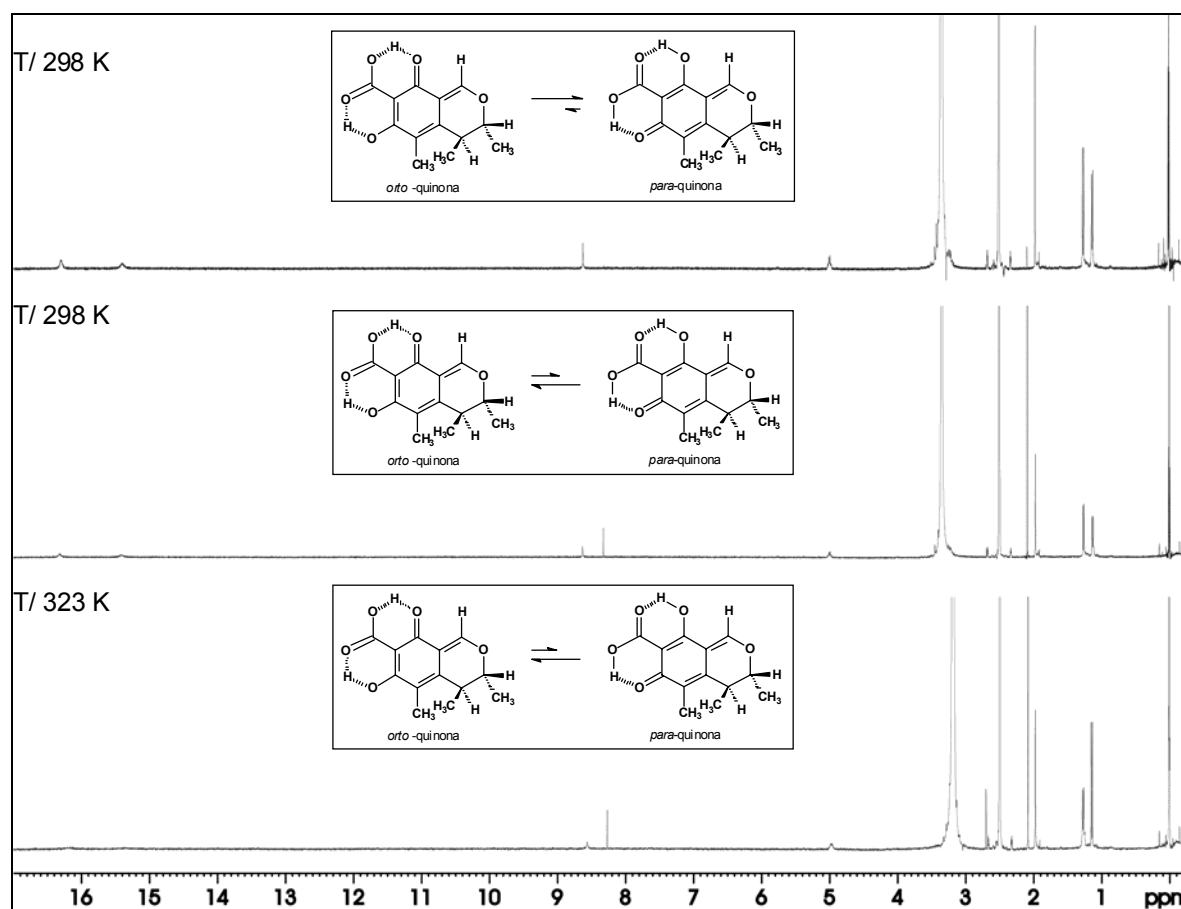


FIGURA 4.1.4.4-6: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) do extrato em pH 3 (citrinina): A (1 $^\circ$ dia, 298 K); B (3 $^\circ$ dia, 298 K) e C (3 $^\circ$ dia, 323 K)

Esta mesma amostra, foi analisada após 1 ano e meio, e no espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.1.4.4-7) observou-se, além das duas formas tautoméricas, uma outra substância, também nas duas formas isomérica, produzidas pela adição de água contida no DMSO- d_6 . Esta reação, provavelmente foi produzida da mesma forma como descrita para a adição de CD_3OD (FIGURA 4.1.4.4-4 pág. 72), só que neste caso, ocorreu a adição de H_2O .

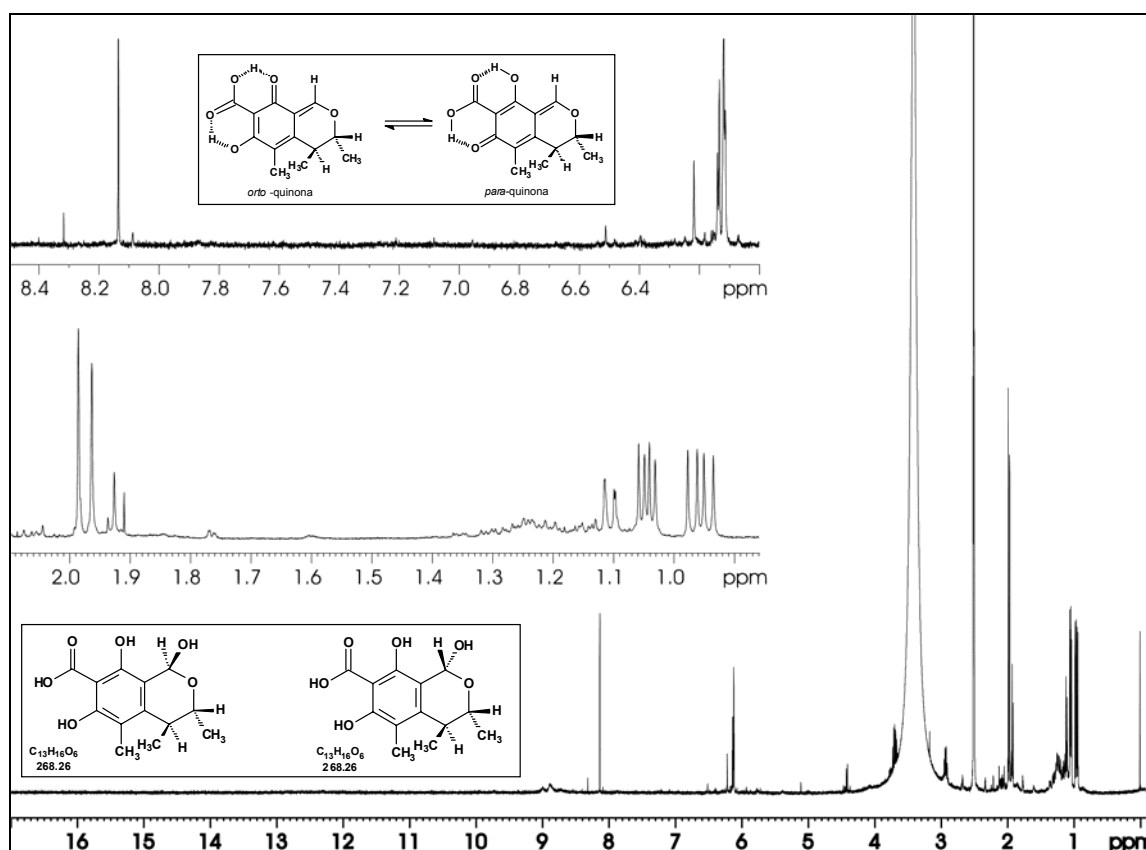


FIGURA 4.1.4.4-7: Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) da citrinina à 298 K

Através destes resultados, podemos concluir que a citrinina, não sofre nenhuma interferência nos sinais, especificamente, no *singleto* em δ 8,23 ppm (utilizado na medida quantitativa), mesmos com variações de temperatura, quando a amostra foi dissolvida em CDCl_3 . O mesmo, não acontece quando, a amostra foi dissolvida em CD_3OD , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ (3:1) e em DMSO-d_6 .

O hidrogênio olefínico em δ 8,23 ppm (H-1) da citrinina, utilizado nas medidas quantitativas, apresenta-se na forma de *singleto*, tanto nas análises normais, quanto nas análises com a adição do padrão (DMF) em CDCl_3 (FIGURA 4.1.4.4-8).

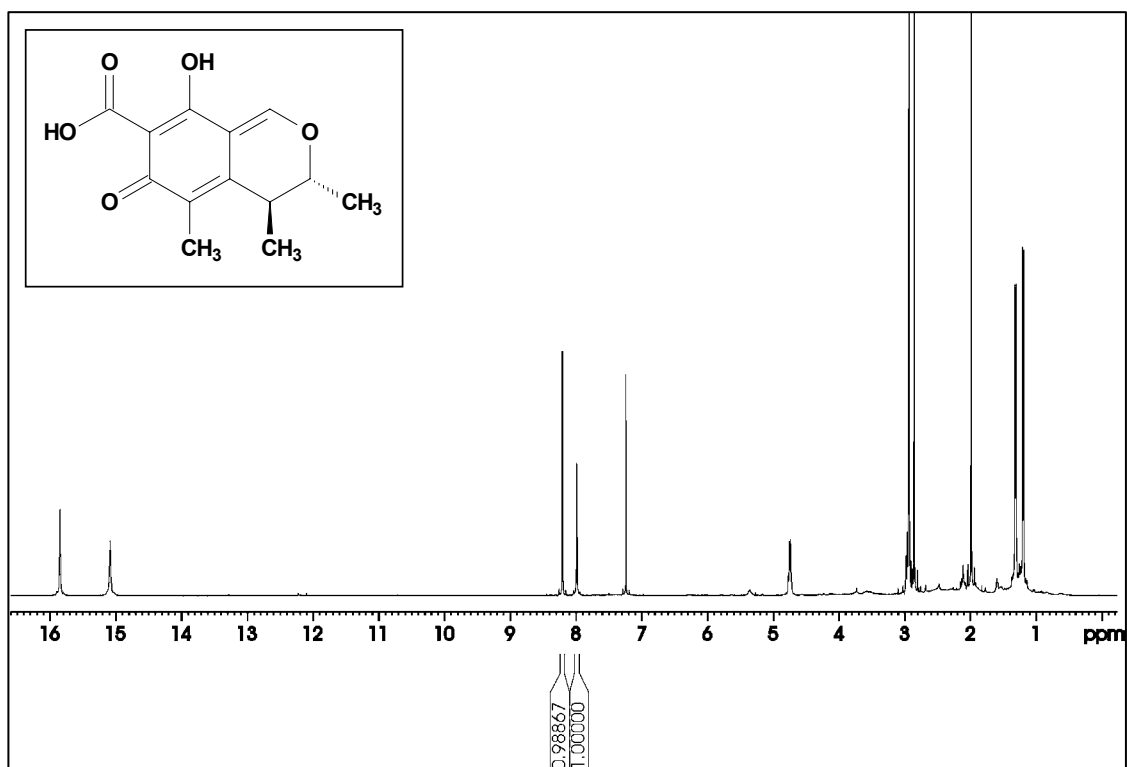


FIGURA 4.1.4.4.-8: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3 (citrinina) à 298K

4.1.4.5 – Curva de produção de citrina utilizando o fungo *Penicillium sp. Cat11.1*

4.1.4.5.1 – Quantificação da citrinina no extrato em pH 3 de *Penicillium sp. Cat11.1* no período de 20 dias de fermentação

A quantificação da citrinina no extrato fúngico (pH 3) foi feita através do método da integração, utilizando um padrão interno. A substância utilizada como padrão foi a DMF (N,N-dimetilformamida), além dela, não apresentar sobreposição com sinais da citrinina no espectro, ela não reage com a substância de interesse e não é volátil.

O modo como a amostra de extrato em pH 3 de *Penicillium sp. Cat11.1* foi preparada para as análises de quantificação, bem como a adição do padrão interno e o TMS (referência interna) estão descritas na SEÇÃO 3, item 3.5.2.3 pág.30.

No espectro de RMN de ^1H , a substância padrão apresentou três sinais, sendo um em δ 7,89 ppm, sinal referente ao hidrogênio do grupo aldeído, e os outros dois sinais em δ 2,98 e δ 2,88 ppm, referentes as duas metilas. O hidrogênio do grupo aldeído encontra-se numa região do espectro próximo ao hidrogênio olefínico da citrinina, que está em δ 8,23 ppm. Esta proximidade é muito relevante, pois estando em frequências próximas, eles sofrem uma correção de fase muito semelhante, diminuindo erros no processamento (medida da integral).

O espectro de RMN de ^1H da citrinina (FIGURA 4.1.4.5-1) mostra as áreas das integrais dos hidrogênios da DMF (δ 7,98 ppm) e da citrinina (δ 8,23 ppm).

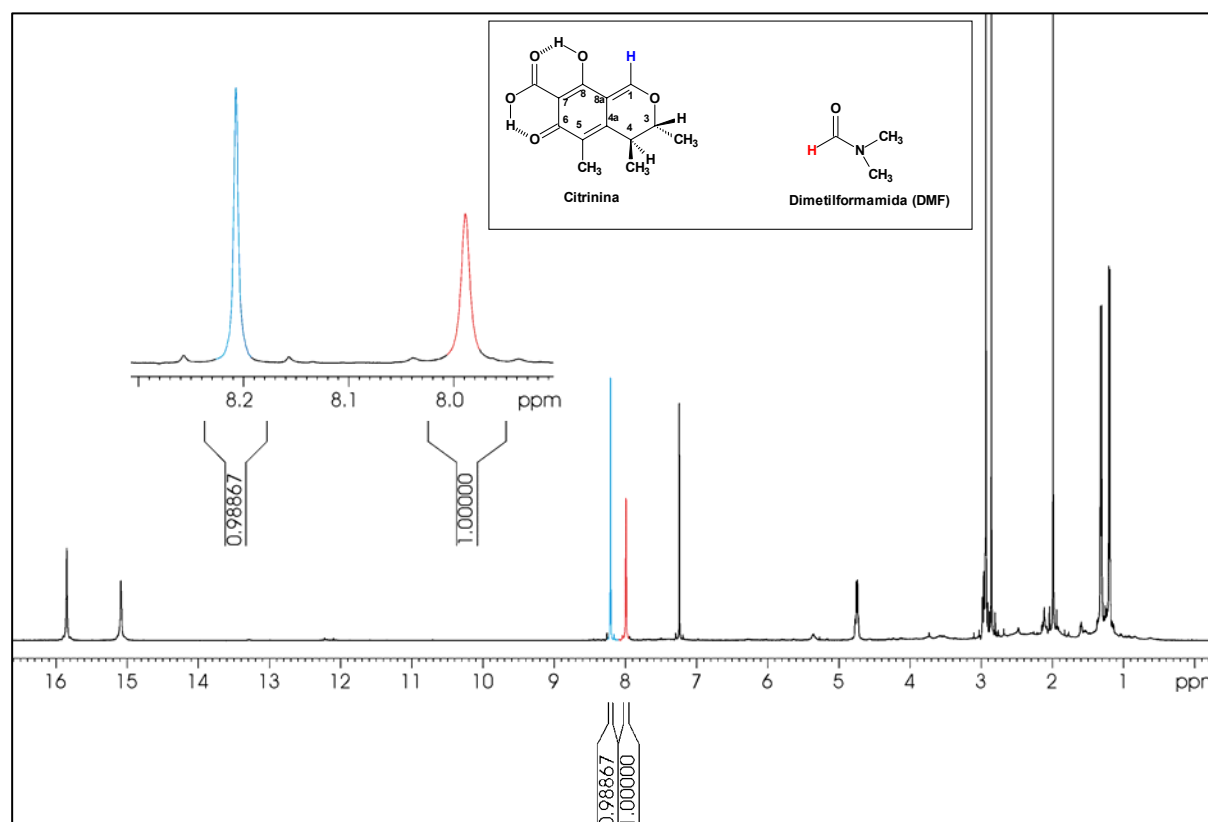


FIGURA 4.1.4.5-1: Áreas das integrais da citrinina e da DMF no espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) do extrato obtido em pH 3

No espectro de RMN de ^1H do extrato em pH 3 para o tempo de fermentação zero (FIGURA 4.1.4.5-2) foi possível observar sinais referentes aos aminoácidos (extrato de levedura) e os sinais em δ 4,30 e δ 5,15 ppm referentes a α -glucose e β -glucose, indicando que não há nenhum sinal referente a citrinina. Este

espectro foi utilizado, como padrão para comparação com os outros obtidos em diferentes períodos de fermentação, mostrando quanto tempo o fungo leva para metabolizar as substâncias presentes no meio de cultivo.

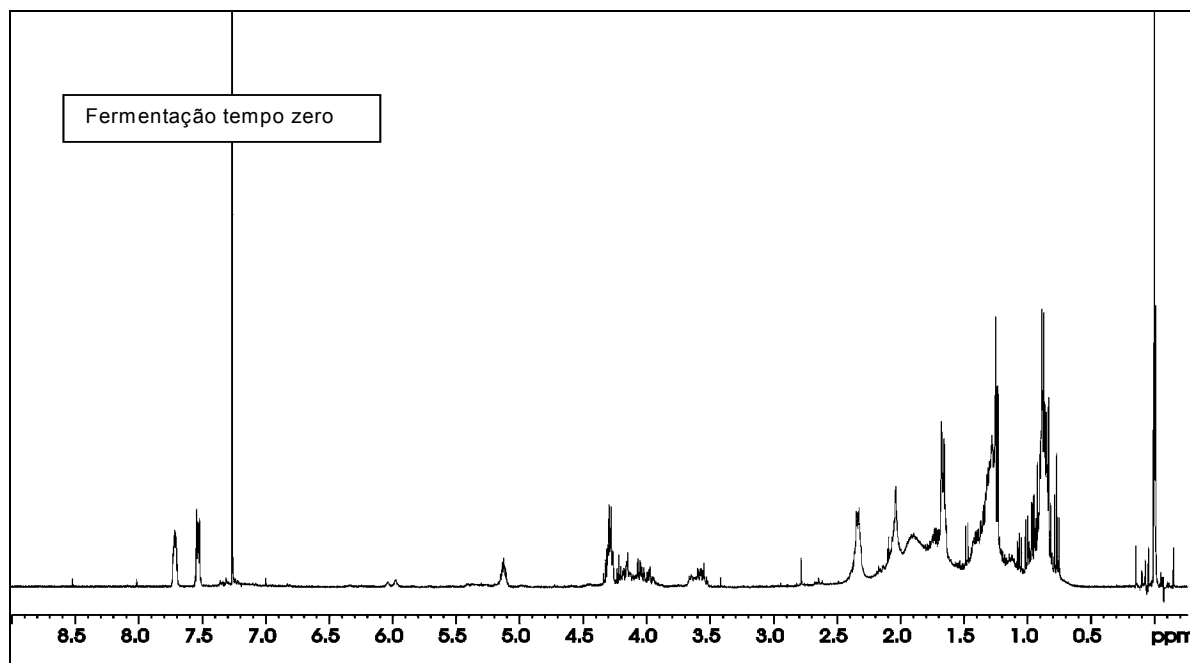


FIGURA 4.1.4.5-2: Espectro de RMN de ^1H (CDCl₃) do extrato obtido em pH 3 para o tempo de fermentação zero

A quantificação somente da citrinina no extrato fúngico somente foi iniciada com 4 dias de fermentação, porque com 2 dias, a substância ainda não tinha sido produzida, o que foi comprovado através do espectro de RMN ^1H realizado no segundo dia, que mostrou sinais do clorofórmio em δ 7,23 ppm, da N,N-dimetilformamida (DMF) em δ 7,98, δ 2,97 e δ 2,88 ppm e outros sinais na região de δ 1,00 a δ 2,2 ppm, que são referentes a componentes do meio de cultura. Já no espectro de 4 dias de fermentação observou-se o sinal do clorofórmio em δ 7,23 ppm, os sinais da DMF em δ 7,98, δ 2,97 e δ 2,88 ppm e os sinais referentes à molécula de citrinina (FIGURA 4.1.4.5-3).

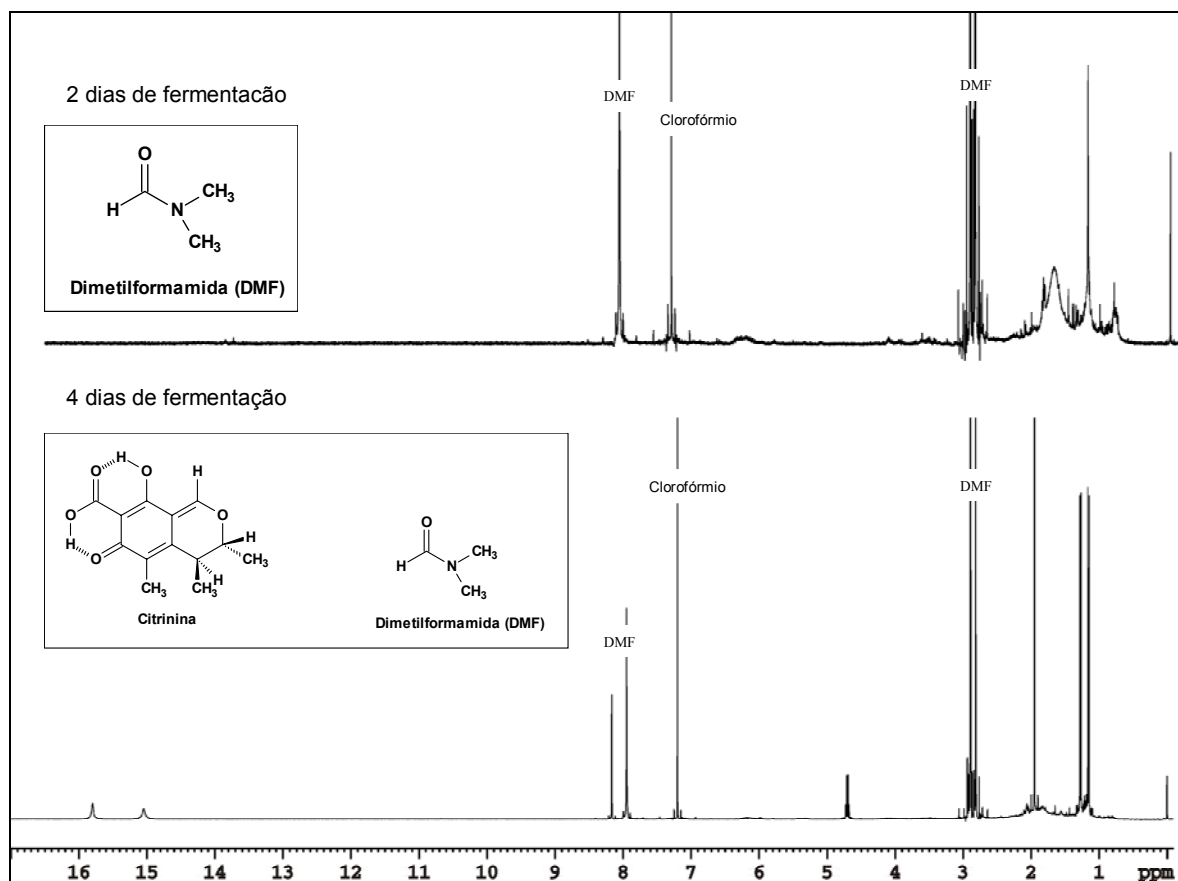


FIGURA 4.1.4.5-3: Espectro RMN ¹H (CDCl₃) do extrato obtido em pH 3 com 2 e 4 dias de fermentação

A concentração da citrinina no extrato em pH 3 encontrada por RMN de ¹H com 4, 8, 12, 16 e 20 dias de fermentação e a quantidade de extrato obtidos nos diferentes tempos de fermentação estão representados na TABELA 4.1.4.5-1. Na Tabela, pode-se observar que, a máxima produção de citrinina se deu com 8 dias de fermentação, sendo que no intervalo de 8 a 12 dias, a produção foi mantida praticamente a mesma e a partir do 12^o dia, foi observada uma queda na produção do metabólito. Esta diminuição na concentração provavelmente acontece, porque o fungo passa a metabolizar a citrinina como fonte de carbono para sua sobrevivência.

A concentração de citrinina encontrada no extrato em pH 3 por RMN de ¹H em relação a massa de extrato obtida em pH3 (x 100), levam a porcentagem de citrinina presente no extrato fúngico. Analisando-se estas porcentagens (média das triplicas), as quais apresentaram uma variação de 95% a 98% para o período de 20 dias de fermentação. Esta variação pode ser atribuída a vários itens como:

retirada das amostras do balão porque, cada amostra quantificada por RMN de ^1H , ou seja, cada amostra em triplicata como, por exemplo, 4 A, 4 B e 4 C, são relativas às três extrações em pH 3 de 3 frascos com 50 mL de filtrado cada um, após 1 hora e 30 minutos da acidificação; pesagem dos vidros (pesagem inicial e final) e no preparo da amostra. No entanto, estas porcentagens mostram a eficiência da metodologia de extração, na qual obteve-se a citrinina pura.

TABELA 4.1.4.5-1: Produção de citrinina no extrato em pH 3 por *Penicillium sp. Cat11.1* para o período de fermentação de 20 dias

| Amostras | Tempo Fermentação (27°C) | Área integrais Citrinina (H-1) | [citrinina] RMN de ^1H mg/mL | mg/50 mL (filtrado) | % citrinina no extrato Cat1 1.1 (média triplicatas) |
|----------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---|
| 4 A | 4 dias | 0,27519 | 3,24 | 3,43 | |
| 4 B | 4 dias | 0,27532 | 3,24 | 3,42 | 95% |
| 4 C | 4 dias | 0,27639 | 3,25 | 3,45 | |
| 8 A | 8 dias | 0,99434 | 11,70 | 11,95 | |
| 8 B | 8 dias | 0,99048 | 11,66 | 11,99 | 98% |
| 8 C | 8 dias | 1,0041 | 11,82 | 12,14 | |
| 12 A | 12 dias | 0,98238 | 11,56 | 12,17 | |
| 12 B | 12 dias | 0,98215 | 11,56 | 12,05 | 96% |
| 12 C | 12 dias | 0,98867 | 11,64 | 12,20 | |
| 16 A | 16 dias | 0,78215 | 9,21 | 9,57 | |
| 16 B | 16 dias | 0,78591 | 9,25 | 9,60 | 96% |
| 16 C | 16 dias | 0,78183 | 9,20 | 9,54 | |
| 20 A | 20 dias | 0,58238 | 6,85 | 7,23 | |
| 20 B | 20 dias | 0,59215 | 6,97 | 7,35 | 96% |
| 20 C | 20 dias | 0,58695 | 6,91 | 7,29 | |

As concentrações de citrinina encontradas por RMN (média das triplicatas) para o período de 20 dias de fermentação foram utilizadas para a construção de uma curva de produção da substância utilizando o fungo *Penicillium sp. Cat1.1* (FIGURA 4.1.4.5-4). Analisando a curva, observa-se que a máxima produção se deu com 8 dias de fermentação, porém a diferença de produção entre 8 e 12 dias foi muito pequena. Portanto, pode-se concluir que a máxima produção deve estar entre esse período de fermentação, ou seja, com 10 dias, que poderia ser comprovado com retiradas com um intervalo menor, a cada 2 dias.

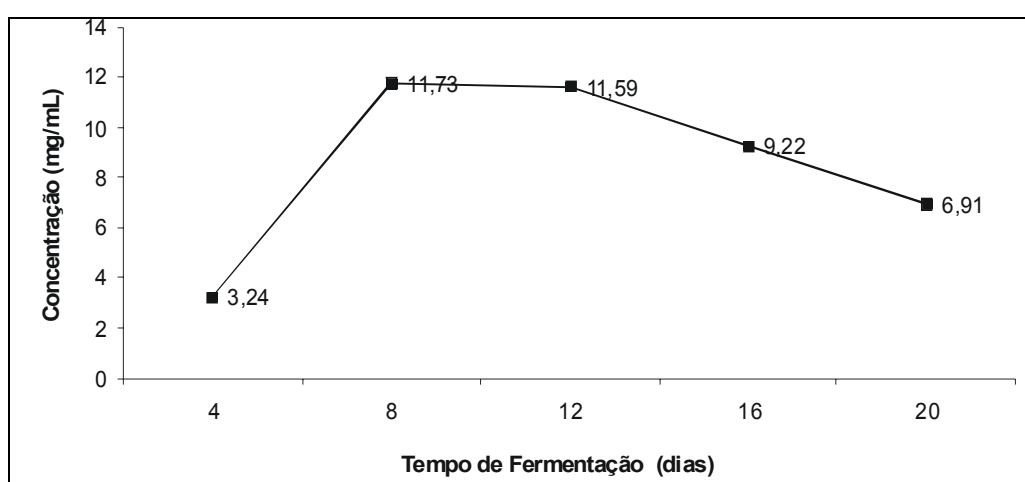


FIGURA 4.1.4.5-4: Curva de produção de citrinina no extrato obtido em pH 3 para o fungo *Penicillium sp. Cat1.1*

4.1.4.6 - Cálculo da concentração da citrinina no extrato em pH 3

O cálculo da concentração da citrinina em mg/mL foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{citrinina}] = [\text{DMF}] (\text{mol/mL}) \frac{N_{\text{DMF}} \times A_{\text{citrinina}} \times MM_{\text{citrinina}}}{N_{\text{citrinina}} \times A_{\text{DMF}}}$$

A Figura 4.1.4.6-1 mostra a área das integrais do hidrogênio aldeído da DMF (calibrado em 1) e do hidrogênio olefínico da citrinina(H-1), as quais foram utilizadas no exemplo do cálculo da concentração a seguir:

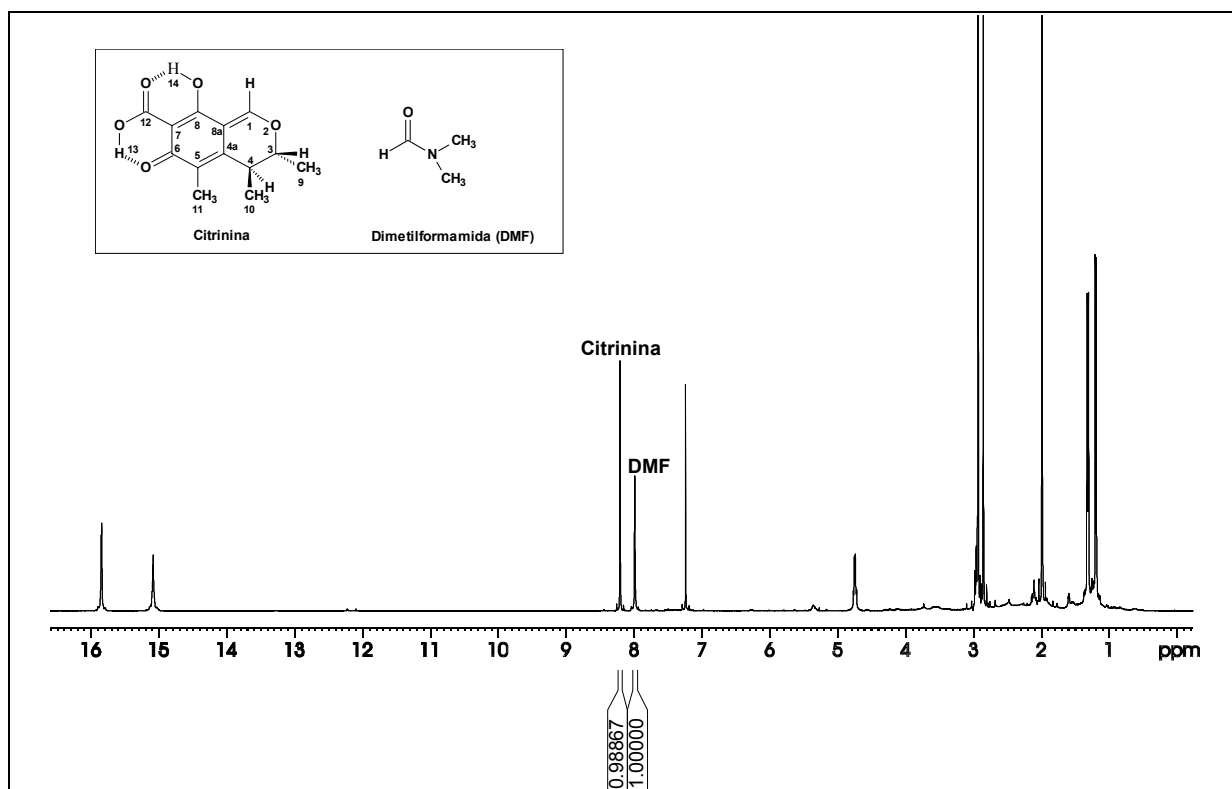


Figura 4.1.4.6-1: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) mostrando a área das integrais da citrinina e da DMF (padrão)

$$[\text{DMF}] = 0,04703 \times 10^{-3} \text{ mol/mL}$$

$$N_{\text{DMF}} = 1$$

$$A_{\text{DMF}} = 1 \text{ (calibrada pelo equipamento)}$$

$$A_{\text{citrinina}} = 0,98867$$

$$N_{\text{citrinina}} = 1$$

$$MM_{\text{citrinina}} = 250.250,00 \text{ mg/mol}$$

$$[\text{citrinina}] = \frac{0,04703 \times 10^{-3} \times 1 \times A_{\text{citrinina}} \times 250.250,00}{1 \times 1}$$

$$[\text{citrinina}] = 11,76926 \times A_{\text{citrinina}}$$

$$[\text{citrinina}] = 11,63591 \text{ mg/mL}$$

Como o número de mols da DMF, a massa molar da citrinina e o número de hidrogênios das duas substâncias são constantes, podemos escrever a fórmula da seguinte maneira:

$$[\text{citrinina}] = 11,76926 \times A_{\text{citrinina}}$$

A concentração de citrinina encontrado foi de 11,64 mg/mL.

4.1.4.7 – Curva de calibração

Na análise de quantificação da citrinina no extrato em pH 3 por *Penicillium sp. Cat1.1* para a construção da curva de calibração foi utilizado o método de padronização interna, na qual comparou-se a área da integral do sinal do H-1 da citrinina que é calculada em relação à área do sinal do hidrogênio do grupo aldeído da DMF (padrão) calibrado em 1,00000 pelo próprio equipamento.

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas sete amostras com concentrações diferentes a partir de uma solução estoque ou solução mãe do extrato em pH 3 (citrinina), cuja concentração foi de 20 mg/mL. As outras seis amostras foram obtidas através de diluições (SEÇÃO 3, item 3.6.1; TABELA 3.6-1 pág.33).

A curva de calibração para a citrinina foi obtida através da razão entre a área das integrais da citrinina (média das triplicatas) e área das integrais da DMF (1,0000) das sete amostras em concentrações diferentes *versus* as concentrações de citrinina presente no extrato em pH 3 em mg/mL (FIGURA 4.1.4.7-1).

Analisando a curva de calibração observa-se que razão entre estas áreas aumentam proporcionalmente com aumento da concentração da mesma. Esta proporcionalidade ou linearidade é dada pelo coeficiente de correlação da reta que foi de 0,99984.

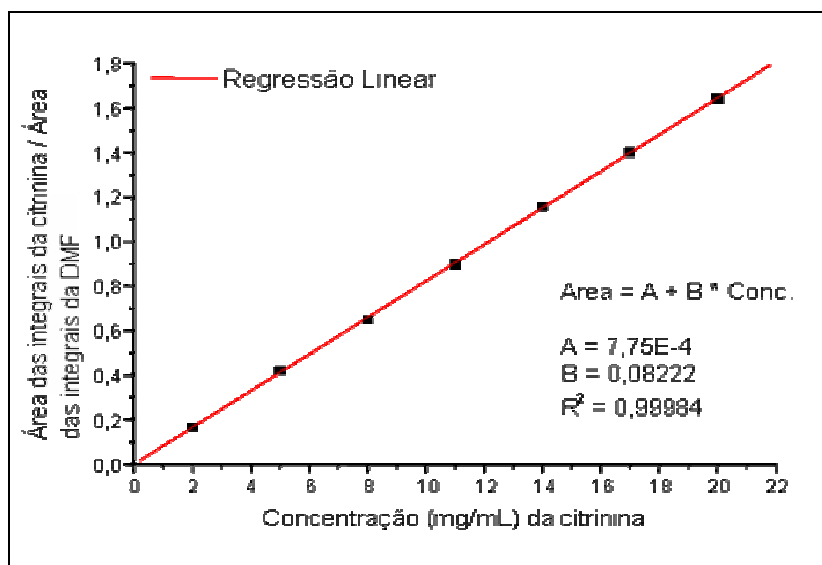


FIGURA 4.1.4.7-1: Curva de calibração da citrinina com padronização interna

Através do coeficiente de linearidade da curva de calibração, conclui-se que a concentração da citrinina no extrato obtido em pH 3 por *Penicillium sp. Cat1.1* pode ser calculada através da equação da reta ou pela fórmula descrita no item 4.1.4.6 pág. 81.

As concentrações de citrinina (médias das triplicatas) obtidas através da fórmula para as sete concentrações diferentes que foram utilizadas para a construção da curva de produção estão representadas na (TABELA 4.1.4.7-1).

TABELA 4.1.4.7-1: Concentrações de citrinina no extrato do *Penicillium sp. Cat1.1* calculadas através da fórmula descrita no item 4.1.4.6 pág.81.

| Pontos | [extrato pH 3] <i>P. sp. Cat1.1</i> | Integral H-1 citrinina | [citrinina] RMN de ¹ H (mg/mL) | % citrinina extrato pH3 <i>P. sp. Cat1.1</i>) |
|---------|--|---------------------------|--|---|
| Ponto 1 | 2 mg/mL | 0,1648 | 1,94 | 97% |
| Ponto 2 | 5 mg/mL | 0,4205 | 4,92 | 98% |
| Ponto 3 | 8 mg/mL | 0,6498 | 7,63 | 96% |
| Ponto 4 | 11 mg/mL | 0,8995 | 10,59 | 96% |
| Ponto 5 | 14 mg/mL | 1,1579 | 13,63 | 97% |
| Ponto 6 | 17 mg/mL | 1,4025 | 16,50 | 97% |
| Ponto 7 | 20 mg/mL | 1,6423 | 19,33 | 97% |

4.1.5 – Avaliação da produção de metabólitos por *Penicillium sp. Cat1.1*, quando o meio de cultura foi esterilizado por 10, 15 e 20 minutos (autoclave horizontal) e 15 minutos (autoclave vertical)

4.1.5.1 – Avaliação dos espectros de RMN de ¹H do extrato obtido em pH 3

Os espectros de RMN de ¹H dos extratos obtidos em pH 3 mostra a citrinina pura (FIGURA 4.1.5.1-1), para tempos de esterilização de 10, 15 e 20 e 15 minutos minutos na autoclaves horizontal e vertical repectivamente.).

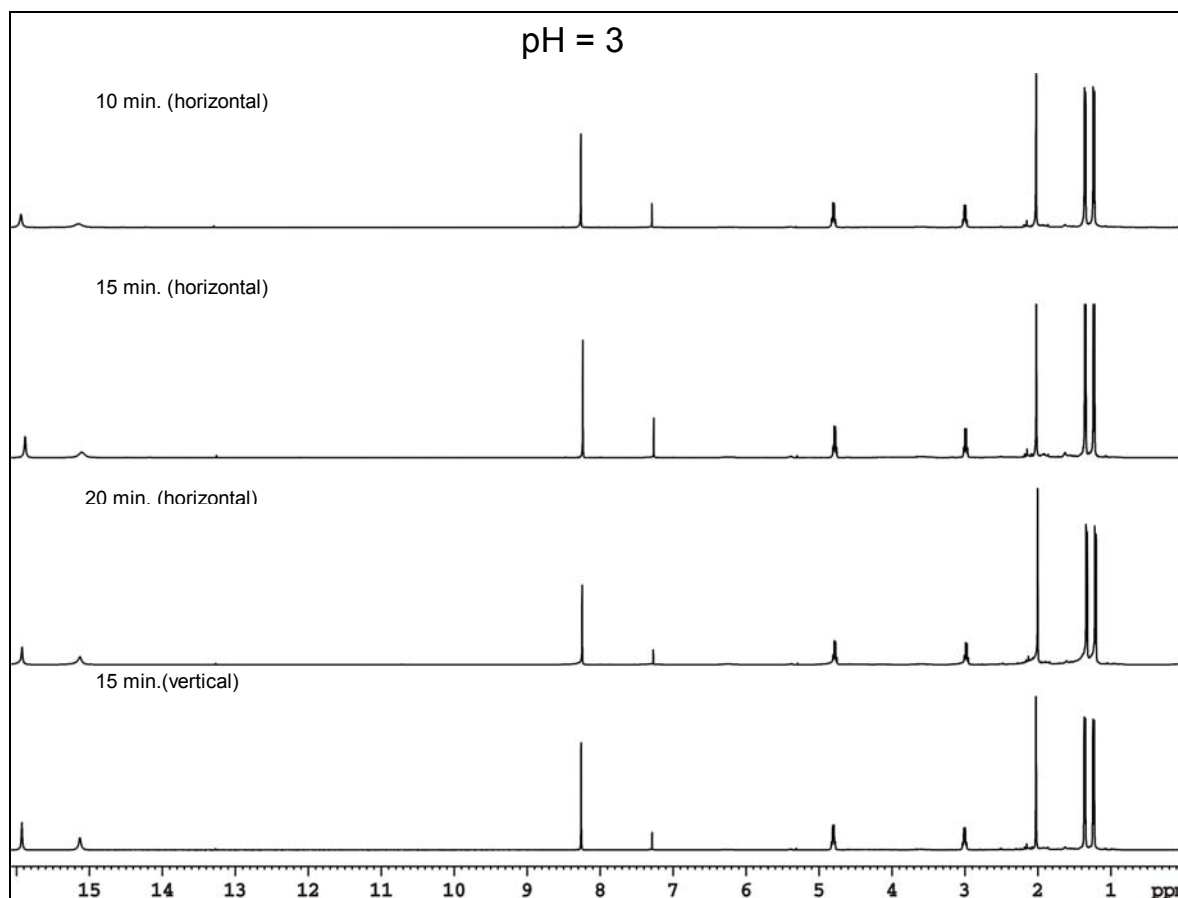


FIGURA 4.1.5.1-1: Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) obtidos de extratos em pH 3 (citrinina) quando esterilizados por 10, 15 e 20 min. na autoclave horizontal e 15 minutos na autoclave vertical.

A única diferença observada neste experimento foi a massa obtida para tempos de esterilização de 10 e 15 minutos (praticamente a mesma), enquanto que, para 20 minutos houve uma redução na produção em torno de 27%, quando o meio foi esterilizado na autoclave horizontal. É importante, ressaltar que a quantidade de “precipitado” observado no meio de cultivo após o processo de esterilização é visualmente mesma, para os três tempos de autoclavagem, sendo que o meio esterilizado por 20 minutos apresentou uma coloração mais intensa.

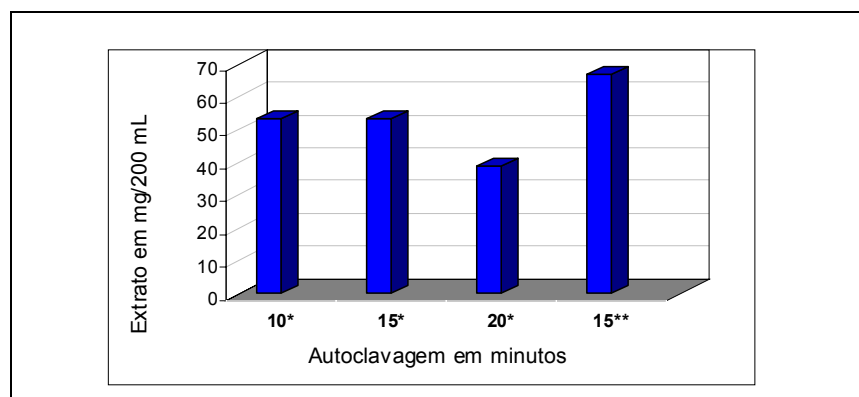
Comparando-se os tempos de esterilização de 15 minutos para os dois modelos de autoclave (horizontal, vertical), obteve-se uma produção de extrato em pH 3 (citrinina) 20% maior para o modelo vertical. Esta diferença, na produção do metabólito pode ser atribuída à pressão atingida nos dois modelos de autoclave, visto que, a pressão e a temperatura na horizontal (1 atm; 120°C) mantêm-se

inalteradas durante o processo, enquanto que, na autoclave vertical, a pressão não é mantida à 1 atm durante todo tempo de esterilização, conseqüentemente, o meio é esterilizado a uma temperatura inferior a 120°C. Este precipitado observado no meio de cultivo após o processo de esterilização na autoclave horizontal, poderia ser justificado pela degradação do mesmo, quando exposto a uma temperatura de 120°C.

As massas de extratos obtidas em pH 3 (citrinina) quando o meio de cultivo foi esterilizado em diferentes tempos e diferentes modelos de autoclave estão representadas na TABELA 4.1.5.1-1 e no GRÁFICO 4.1.5.1-2

TABELA 4.1.5.1-1: Massas de extratos obtidos em pH 3 (citrinina) nos diferentes tempos de esterilização e modelos de autoclave

| Modelo | Extrato pH3 | Extrato pH 3 | Extrato pH3 |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Autoclave/ tempo de esterilização | mg/200 mL de meio (A) | mg/200 mL de meio (B) | mg/200 mL de meio (C) |
| Horizontal 10 min. | 53,2 | 54,8 | 51,8 |
| Horizontal 15 min. | 53,4 | 54,4 | 55,4 |
| Horizontal 20 min. | 38,8 | 35,5 | 32,7 |
| Vertical 15 min. | 66,75 | 67,20 | 65,54 |



* Autoclave horizontal; ** Autoclave vertical

GRÁFICO 4.1.5.1-1: Produção média de extratos em pH 3 (citrinina) produzido pelo *Penicillium sp. Cat1.1* nos diferentes tempos de esterilização e diferentes autoclaves.

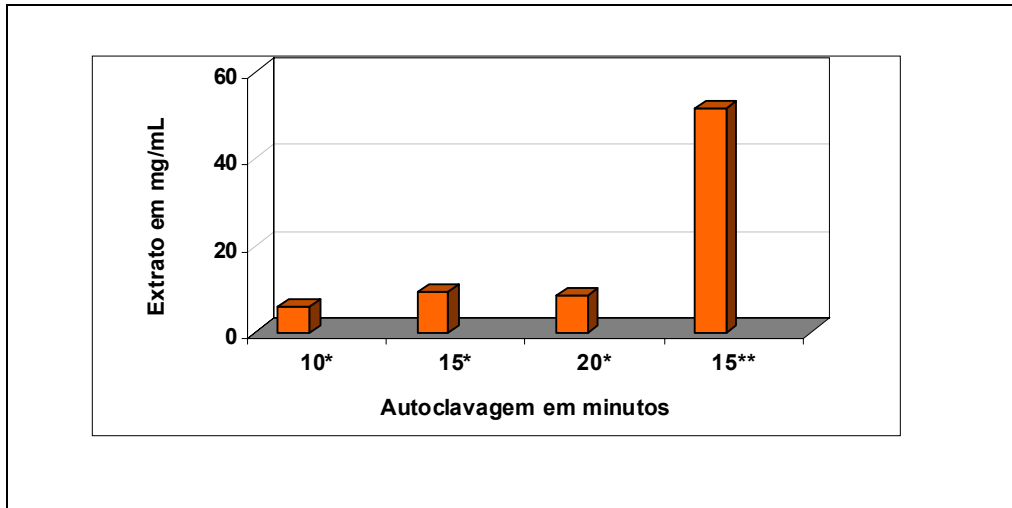
4.1.5.2 - Avaliação dos espectros de RMN de ^1H do extrato obtido em pH 7,8

As massas dos extratos obtidas em pH 7,8 para os diferentes tempos de esterilização foram semelhantes quando o meio de cultivo foi esterilizado por 10, 15 e 20 minutos na autoclave horizontal. Já a massa de extrato obtida quando o meio de cultivo foi esterilizado por 15 minutos na autoclave vertical, foi 80% maior em relação às massas encontradas para os meios autoclavados na horizontal nos três diferentes tempos de esterilização. Estas diferenças podem ser atribuídas ao “precipitado” formado no meio após a esterilização do meio de cultura. Este precipitado, pode ser o resultado da degradação da glicose e/ou de proteínas (extrato de levedura), que o fungo não consegue metabolizar.

O “precipitado” foi retirado do frasco por filtração, logo após o meio atingir a temperatura ambiente, e este, não foi analisado por RMN devido a sua insolubilidade nos solventes orgânicos (CDCl_3 , CD_3OD e $\text{DMSO-}d_6$). As massas de extratos obtidas em pH 7,8 (mistura de substâncias) estão apresentadas na TABELA 4.1.5.2-1 e no GRÁFICO 4.1.5.2-1) a seguir.

TABELA 4.1.5.2-1: Massas dos extratos em pH 7,8 produzidos pelo fungo *Penicillium sp. Cat1.1*, quando o meio de cultura foi esterilizado em 10, 15 e 20 min. autoclave horizontal e 15 min. na autoclave vertical).

| Modelo | Extrato pH 7,8 | Extrato pH 7,8 | Extrato pH 7,8 |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Autoclave/ tempo de esterilização | mg/200 mL de meio | mg/200 mL de meio | mg/200 mL de meio |
| | (A) | (B) | (C) |
| Horizontal 10 min. | 6,4 | 6,0 | 5,6 |
| Horizontal 15 min. | 9,7 | 9,6 | 9,2 |
| Horizontal 20 min. | 8,5 | 8,7 | 8,2 |
| Vertical 15 min. | 51,4 | 51,9 | 52,0 |



* Autoclave horizontal; ** Autoclave vertical

GRÁFICO 4.1.5.2-1: Massas de extratos obtidos em pH 7,8 produzidos pelo fungo *Penicillium sp. Cat1.1* para os diferentes tempos de esterilização nos diferentes modelos de autoclave.

Nos espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos em pH 7,8, observou-se uma grande semelhança entre eles, quando os meios de cultivo foram esterilizados por 10, 15 e 20 minutos na autoclave horizontal. Entretanto, comparando-se os espectros obtidos de extratos em pH 7,8, quando o meios de cultura foram esterilizados na autoclave horizontal por 10, 15 e 20 minutos com o espectro do extrato obtido do meio de cultivo esterilizado por 15 minutos na autoclave vertical, observou-se algumas diferenças nas concentrações e tipo de substâncias no extrato (FIGURA 4.1.6.2-1). Estas observações são mais visualizadas na ampliação do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.1.6.2-2) na região de δ 9,00 a δ 10,00 ppm e δ 2,00 a δ 2,50 ppm. Através destes dados, podemos concluir que, a temperatura atingida pelo meio de cultivo durante o processo de esterilização pode influenciar tanto na quantidade de metabólitos, quanto no tipo de substâncias produzidas pelo fungo, uma vez que os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos com a mesma concentração, mesmos parâmetros de aquisição e processamento.

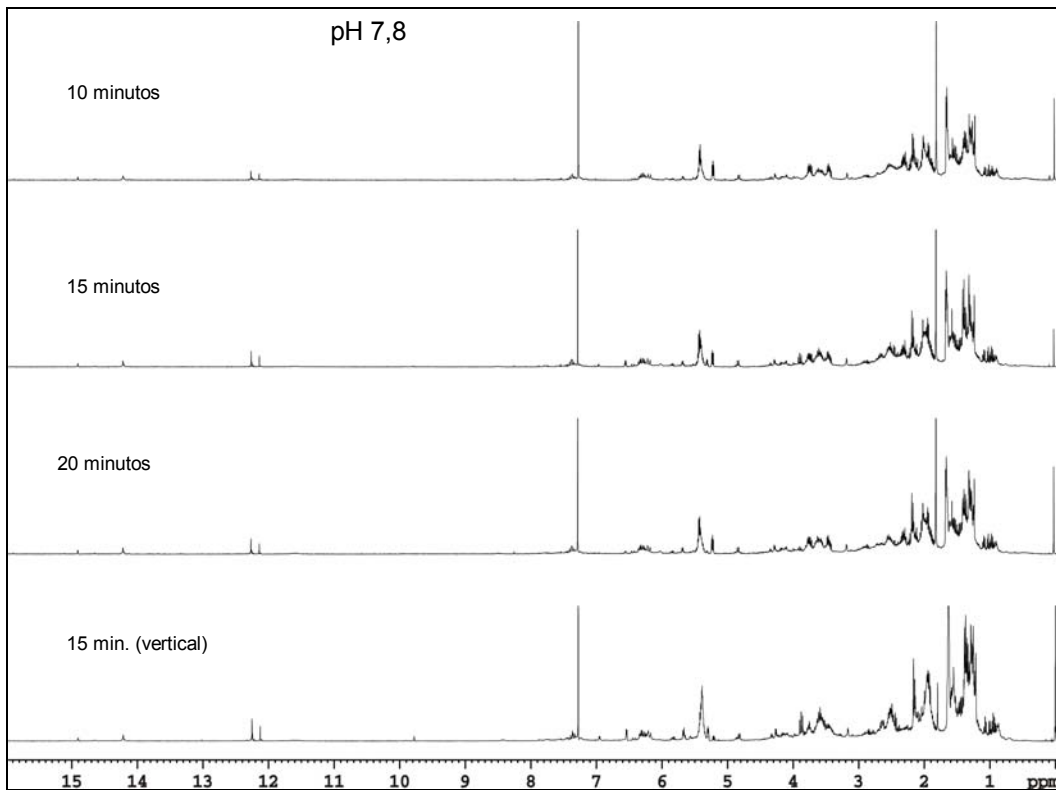


FIGURA 4.1.5.2-1: Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos obtidos em pH 7,8, para o meio de cultivo esterilizado por 10, 15 e 20 min. e 15 min. nas autoclaves horizontal e vertical

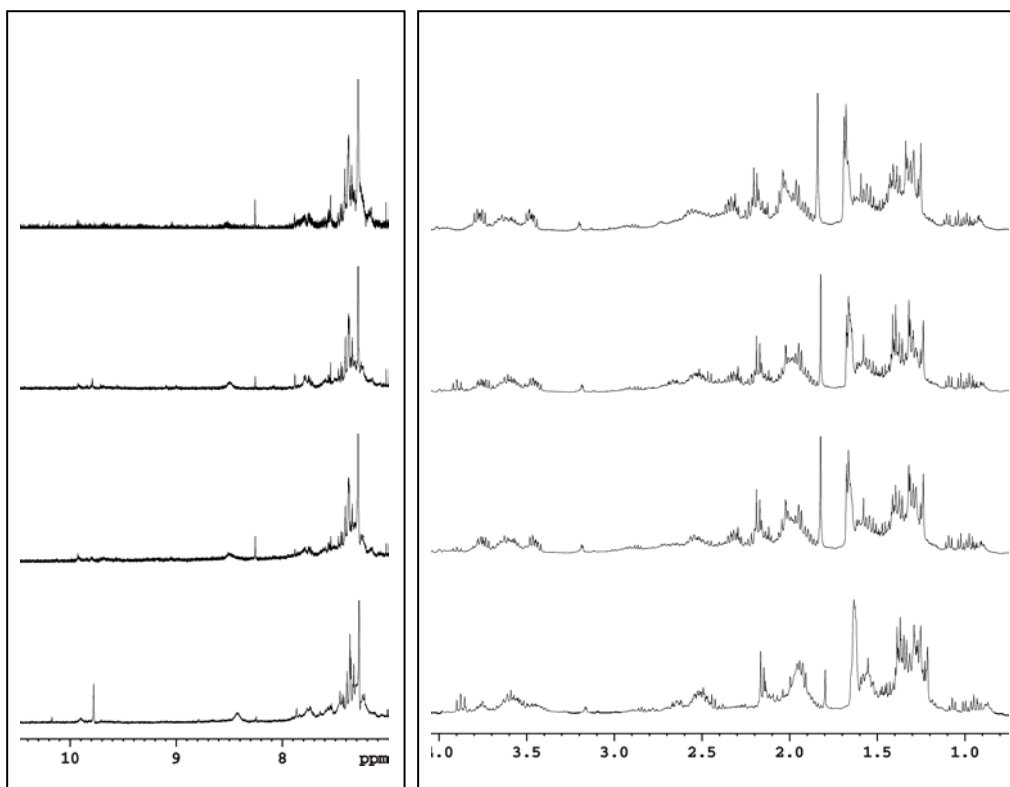


FIGURA 4.1.5.2-2: Ampliação de regiões do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3)

4.1.6 – Avaliação dos diferentes tipos de inóculo com a produção de metabólitos por *Penicillium sp. Cat1.1* quando cultivados em águas minerais

4.1.6.1 - Avaliação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos em pH 7

Nos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 4.1.6.1-1.) dos extratos em pH 7,8 (concentração de 2,0 mg/mL) obtidos em diferentes águas, pode-se observar substâncias em concentrações diferentes, bem como, substâncias diferentes. Estas diferenças observadas podem ser atribuídas, à concentração dos elementos químicos nas águas (TABELA 4.1.6.1-1), visto que, a glicose e o extrato de levedura no meio de cultura foram iguais para todas elas como descrito na SEÇÃO 3 item 3.1.3.2 pág. 20 e 21.

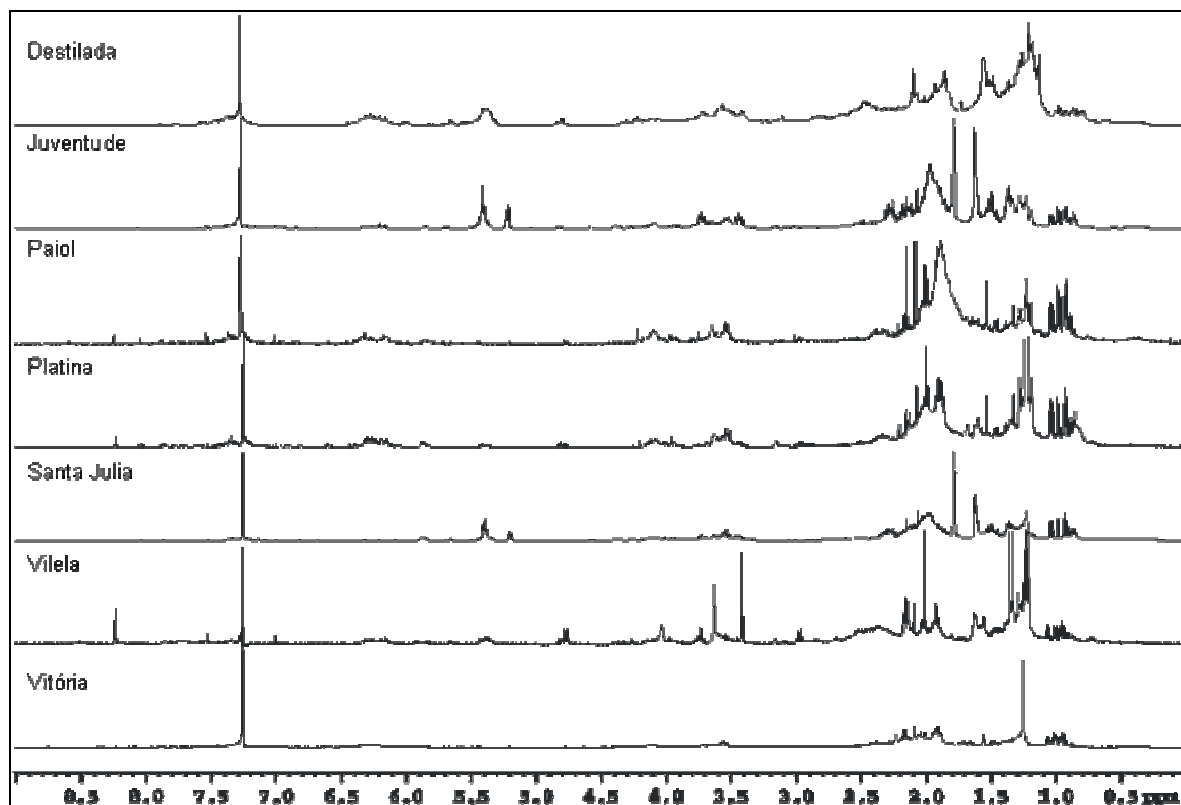


FIGURA 4.1.6.1-2: Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos obtidos em pH 3 do cultivo do *P. sp. Cat1.1* em águas minerais e em meio Czapek

TABELA 4.1.6.1-1: Composição das águas minerais e do meio Czapek

| | Ca | Cu | Fe | K | Mg | Na | S | Si | Sr |
|------------------|-------|----|------|--------|-------|--------|-------|-------|------|
| Sta Júlia | 3,66 | 0 | 0 | 1,30 | 1,17 | 2,24 | 0 | 1,57 | 0,10 |
| Vilella | 0,51 | 0 | 0 | 1,38 | 0,08 | 1,89 | 0 | 4,53 | 0,07 |
| Platina | 5,53 | 0 | 0 | 3,38 | 1,04 | 40,64 | 9,74 | 28,00 | 0,89 |
| Paíol | 2,46 | 0 | 0 | 7,43 | 1,98 | 115,18 | 46,00 | 17,19 | 0,66 |
| Vitória | 11,04 | 0 | 0,01 | 10,41 | 6,65 | 118,20 | 61,46 | 18,65 | 0,88 |
| Juventude | 10,21 | 0 | 0 | 9,39 | 7,58 | 124,72 | 68,93 | 22,34 | 1,12 |
| Czapek | 0 | 0 | 2,01 | 710,03 | 48,78 | 811,18 | 66,04 | 0 | 0 |

* concentração dos elementos em mg/L

Analisando os espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos em pH 3 do cultivo por *Penicillium sp. Cat1.1* em águas minerais com diferentes tipos de inóculo [(3 discos e 20 μL de suspensão de esporos), (inóculo foi obtido da mesma placa e com 5 dias de incubação)] (FIGURA 4.1.6.1-2), não observou-se nenhuma diferença entre eles. No entanto, as massas de extratos obtidas foram diferentes tanto para as águas, quanto para as formas de inóculo.

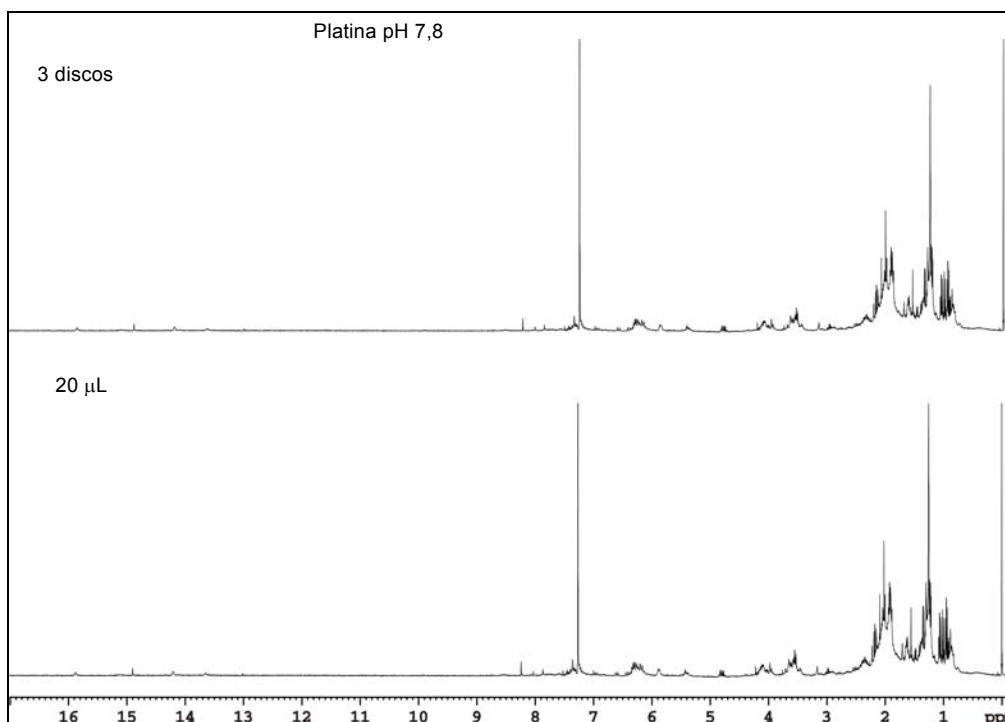


FIGURA 4.1.6.1-2: Espectros de RMN de ^1H (CDCl_3) dos extratos obtidos em pH 7,8 do cultivo por *P. sp. Cat1.1* na água Platina (3 discos e 20 μL)

As massas de extratos obtidas em pH 3 obtidos em pH 7,8 quando o fungo *P. sp. Cat1.1* foi cultivado na águas minerais e Czapek para as diferentes formas de inóculo (3 discos e 20 μ L de suspensão de esporos) estão representadas na TABELA 4.1.6.1-2 e no GRÁFICO 4.1.6.1-1

TABELA 4.1.6.1-2: Massas de extratos obtidos em pH 7,8 do cultivo por *P. sp. Cat1.1* quando cultivado em águas minerais e diferentes formas de inóculo

| Águas | Massas de extratos (mg) obtidos em pH 7,8 em 200 mL de meio de cultura | |
|-----------|--|---|
| | Forma de inóculo 3 discos | Forma de inóculo 20 μ L de suspensão |
| Destilada | 11,20 | 10,30 |
| Juventude | 6,60 | 4,10 |
| Paíol | 3,40 | 4,40 |
| Platina | 5,70 | 5,50 |
| Sta Júlia | 8,10 | 4,10 |
| Villela | 4,20 | 6,10 |
| Vitória | 3,70 | 2,10 |

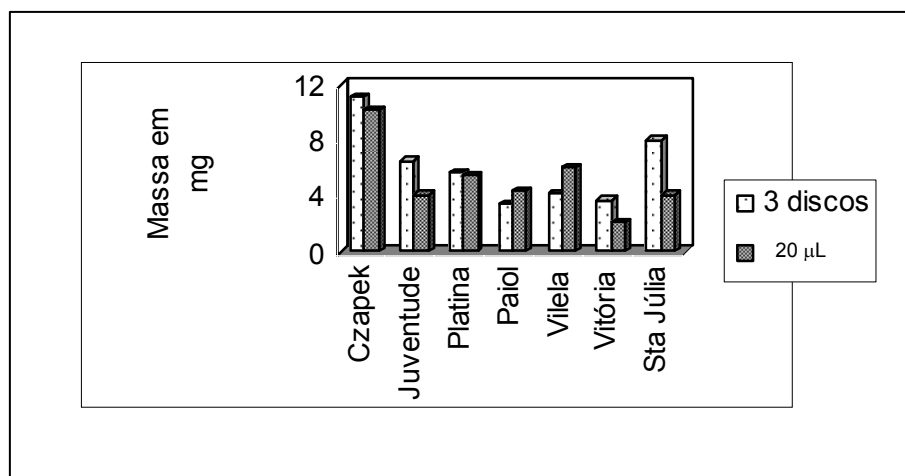


GRÁFICO 4.1.6.1-1: Produção de extratos obtidos em pH 7,8 do cultivo por *P. sp. Cat1.1* cultivado em águas minerais e diferentes formas de inoculação (3 discos e 20 μ L)

4.1.6.2 – Avaliação dos espectros de RMN de ^1H dos extrato obtidos em pH 3

Experimentalmente, obteve-se massas diferentes tanto para as águas, quanto para as concentrações de inóculo, principalmente para a fonte juventude, platina e vilela. As massas obtidas estão representadas no GRÁFICO 4.1.6.2-1 e na TABELA 4.1.6.2-1.

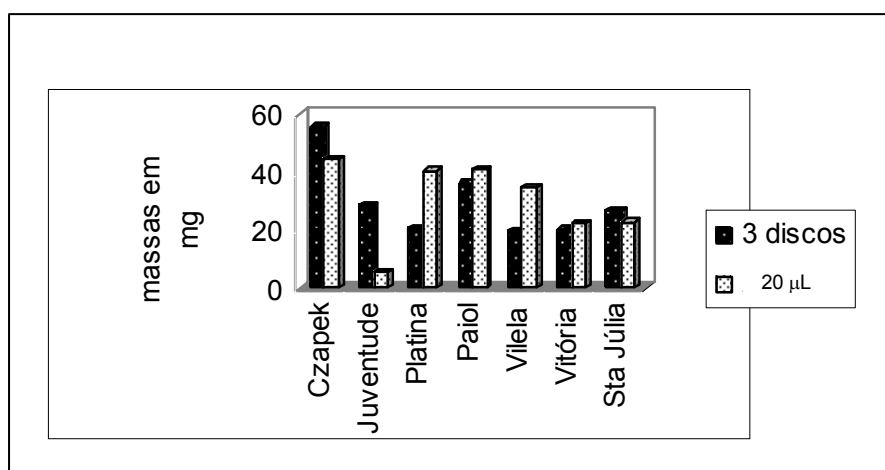


GRÁFICO 4.1.6.2-1: Produção de extratos obtidos em pH 3 do cultivo do *P. sp. Cat11.1* cultivado em águas minerais e Czapek nas diferentes formas de inoculação (3 discos e 20 µL)

TABELA 4.1.6.2-1: Massas dos extratos em pH 3 obtidas do cultivo por *P.sp. Cat11.1* em águas minerais e diferentes formas de inoculação

| Águas | mg/200 mL de meio de cultura | |
|-----------|------------------------------|-----------------|
| | 3 discos(inóculo) | 20 µL (inóculo) |
| Destilada | 55,90 | 44,5 |
| Juventude | 28,90 | 5,30 |
| Paiol | 36,40 | 40,90 |
| Platina | 20,50 | 40,60 |
| Sta Júlia | 26,99 | 22,80 |
| Villela | 20,00 | 34,90 |
| Vitória | 20,10 | 22,50 |

Nos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 4.1.6.2-1) dos extratos obtidos em pH 3 com inoculação de 20 μL de suspensão de esporos, observou-se que nas águas destilada (Czapek, Paiol, Platina, Santa Júlia e Vilela), o extrato contém a citrinina praticamente pura, enquanto que, nas fontes Juventude e Vitória, observa-se outras substâncias em misturas.

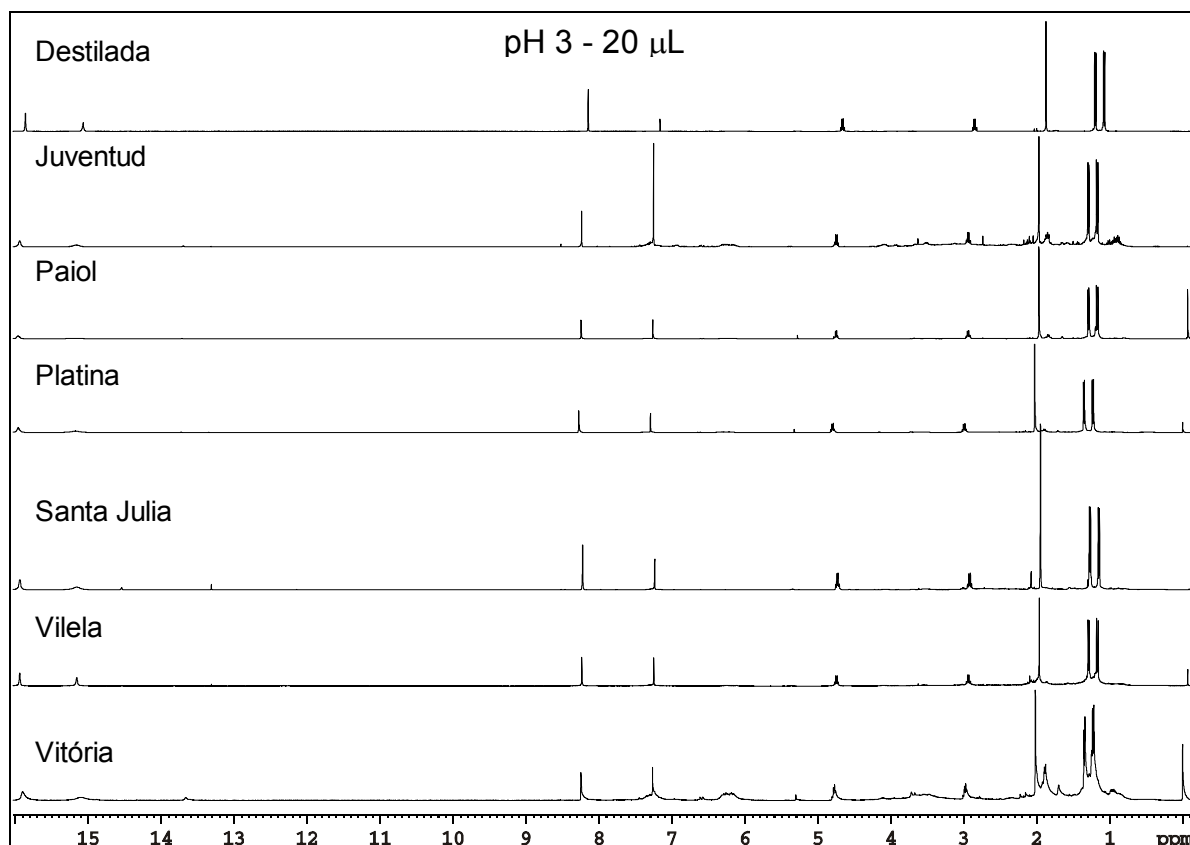


FIGURA 4.1.6.2-1: Espectros de RMN ^1H (CDCl_3) do extrato em pH 3 obtido do cultivo em águas minerais utilizando 20 mL de suspensão de esporos na inoculação

Nos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 4.1.6.2-2) do extrato obtido em pH 3, utilizando 3 discos na inoculação, utilizando águas minerais e Czapek observou-se a citrinina praticamente pura.

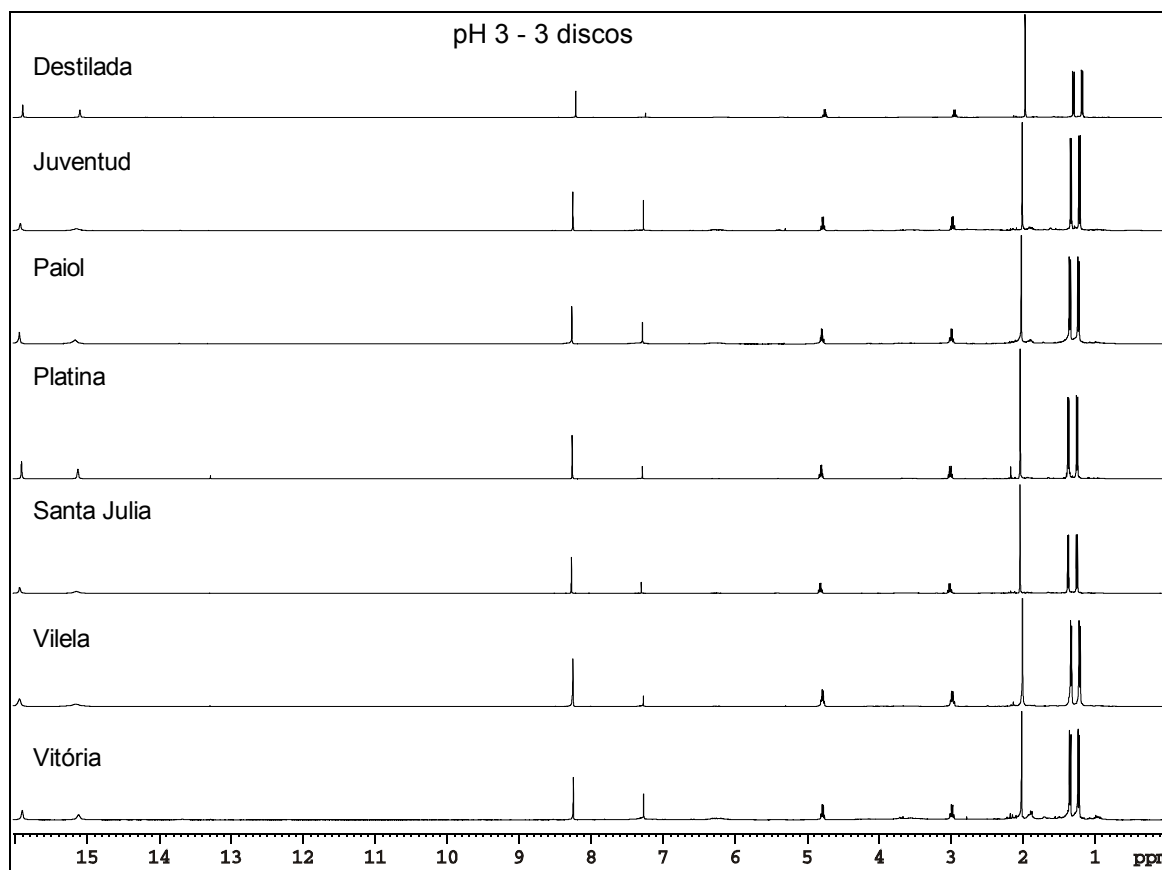


FIGURA 4.1.6.2-2: Espectros de RMN ¹H (CDCl₃) do extrato pH 3 obtidos do cultivo do *Penicillium sp. Cat1.1* em águas minerais utilizando 3 discos na inoculação

Quando, comparou-se as massas obtidas nos extrato em pH 3 do cultivo por *Penicillium sp. Cat1.1* em águas minerais e destilada (Czapek) com as duas formas de inoculação, estas foram bem diferentes. No entanto, quando comparou-se as massas obtidas nos extrato em pH 7,8 do cultivo do fungo *Penicillium sp. Cat1.1*, utilizando 3 discos e 20 µL de suspensão de esporos na inoculação, observou-se que as diferenças entre as massas de extratos produzidas não são relevantes. Estas diferenças e semelhanças nas massas obtidas do cultivo do fungo em águas minerais podem ser observadas no GRÁFICO 4.1.6.2-2.

Analisando o gráfico das massas obtidas em pH 3 podemos observar que a maior produção de extrato em pH 3 do cultivo do fungo foi na águas destilada com adição de sais minerais, glicose e extrato de levedura, ou seja, o meio Czapek, inoculada com 3 discos. No entanto, se observar a massa de extrato obtida em pH 3, foi muito próxima quando utilizou-se 20 µL de suspensão de esporos para as

águas Czapek, Platina e Paiol.

Estas massas, com valores próximos obtidos para tais cultivos, torna-se relevante no desenvolvimento de um processo de produção de citrinina utilizando o *Penicillium sp. Cat1.1* para ser utilizada como padrão em análises de alimentos contaminados por esta micotoxina, diminuindo o custo de produção e a mão de obra no preparo do meio de cultura.

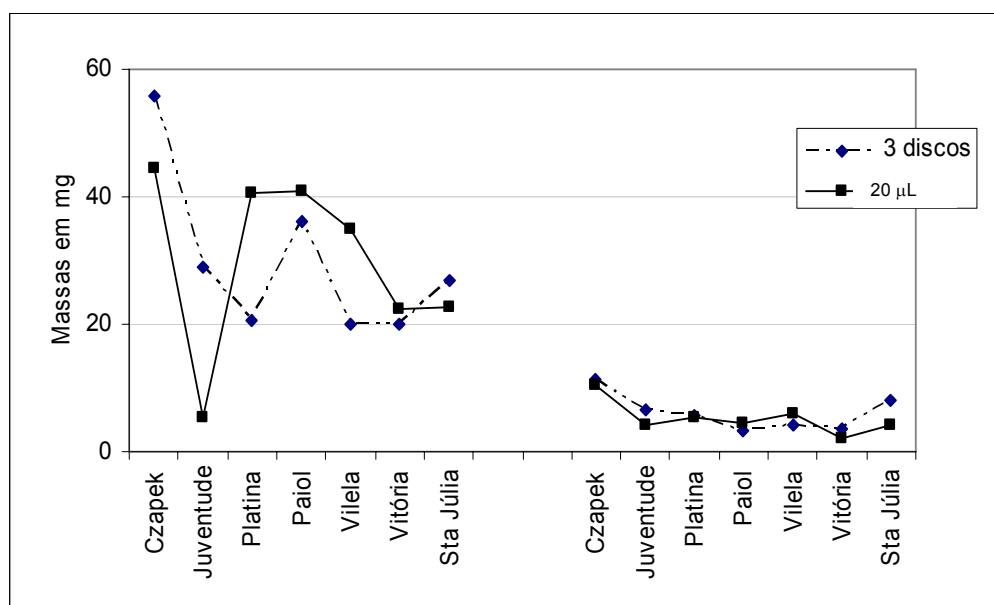


GRÁFICO 4.1.6.2-2: Produção de extrato obtidos em pH 3 e pH 7,8

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos obtidos em pH 3 das águas das fontes Santa Júlia e Platina (20 μL de solução de esporos e 3 discos, FIGURA 4.1.6.2-3), apresentaram os sinais referentes a citrinina e uma outra substância em pequena quantidade, que poderia ser um intermediário da rota biosintética da mesma. Devido a essa semelhança, o extrato obtido em pH 3 do cultivo por *P. Cat1.1* nas águas das duas fontes foram reunidos e submetido a uma separação por cromatografia de coluna como descrito na parte experimental SEÇÃO 3, FLUXOGRAMA 3.8.2-2 pág. 39.

Na fração 30, eluída com doclorometano/ metanol (1:1) isolou-se uma substância sólida de coloração marrom denomina da JP3005. Foram realizados experimentos de RMN e EM na determinação estrutural da substância.

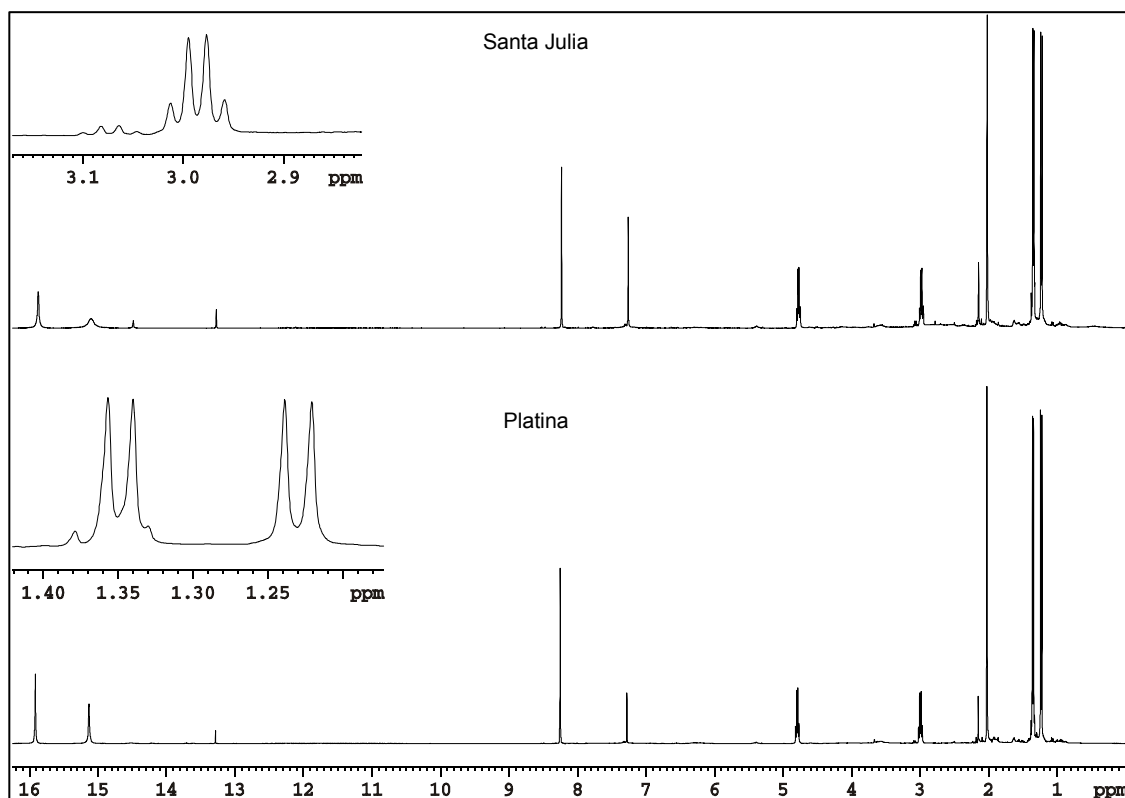


FIGURA 4.1.6.2-3: Espectros de RMN ^1H (CDCl_3) dos extratos obtido em pH 3 do cultivo do fungo *P. sp. Cat1.1* em águas das fontes Santa Júlia e Platina

O espectro de RMN de ^1H da substância JP3005 apresentou sinais referentes a citrinina, porém duplicados, o desaparecimento do H-1 em δ 8,25 ppm e o aparecimento de dois sinais adicionais na região de δ 5,00 a δ 6,00 ppm. Esta duplicação dos sinais mostra que ocorreu uma reação da citrinina com o solvente durante a cromatografia. Segundo POUPKO *et al.* (1997), a citrinina na forma o-quinona sofre adição nucleofílica do tipo 1,4 de Michael em solução com metanol e composição de metanol/diclorometano, e que esta reação é reversível, porque na verdade o produto de reação é um *aduto* formado pelo solvente utilizado no preparo da amostra para análises de RMN. Além disso, os sinais deste *aduto* somente aparecem nas duas formas isoméricas bem definidas nas análises de RMN de ^1H e ^{13}C a -60°C . No entanto, o espectro de RMN de ^1H da JP3005 foi adquirido a temperatura ambiente (298 K) e em metanol deuterado (CD_3OD), podendo ser comparado com os espectros da citrinina preparada em metanol, ou seja, dissolvida em metanol deuterado e adquiridos nas temperaturas de 298 K, 253 K e 223 K mostrados no item 4.1.4, FIGURA 4.1.4.4-3, pág. 71.

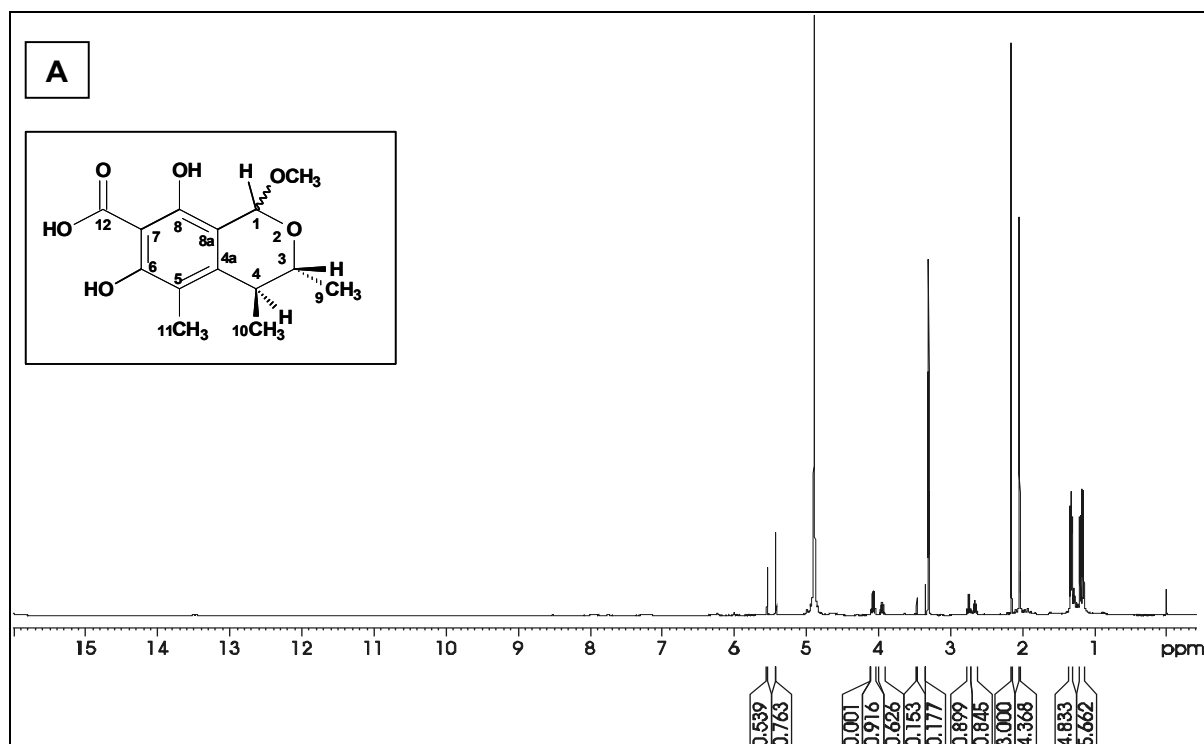


FIGURA 4.1.6.2-4: Espectro de RMN de ^1H (298 K) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros)

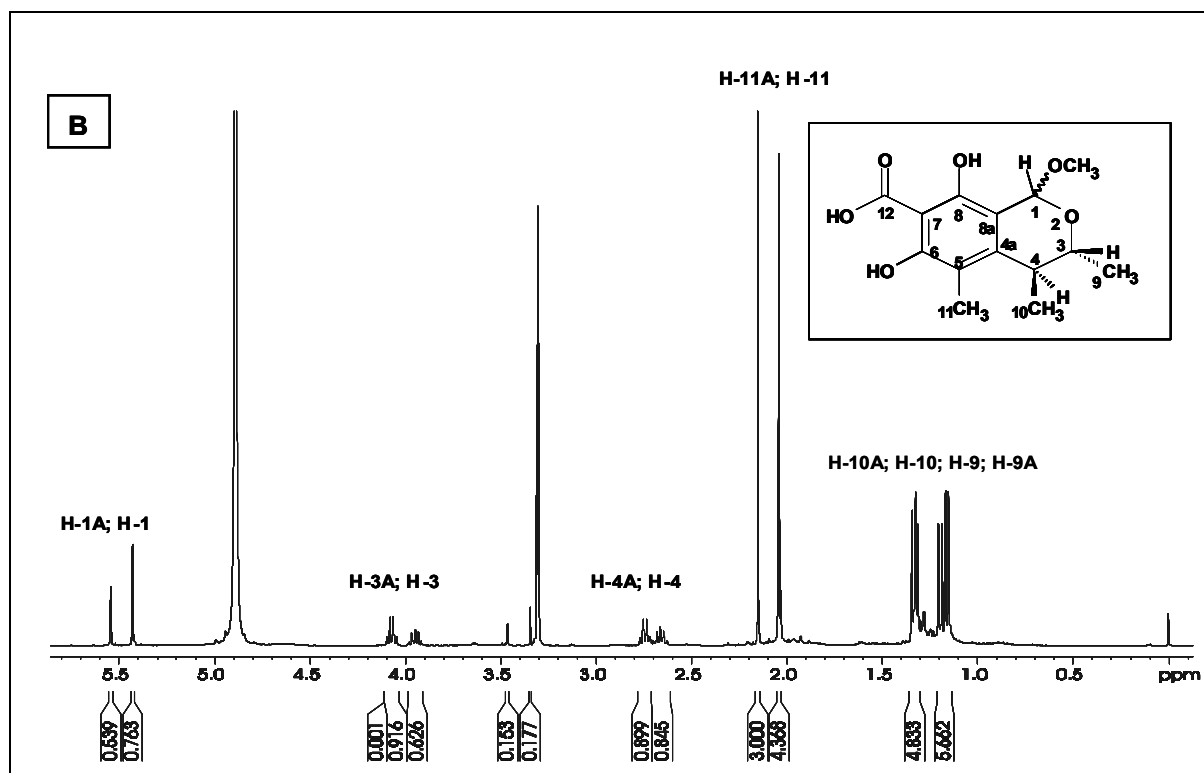


FIGURA 4.1.6.2-5: Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (298 K) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros)

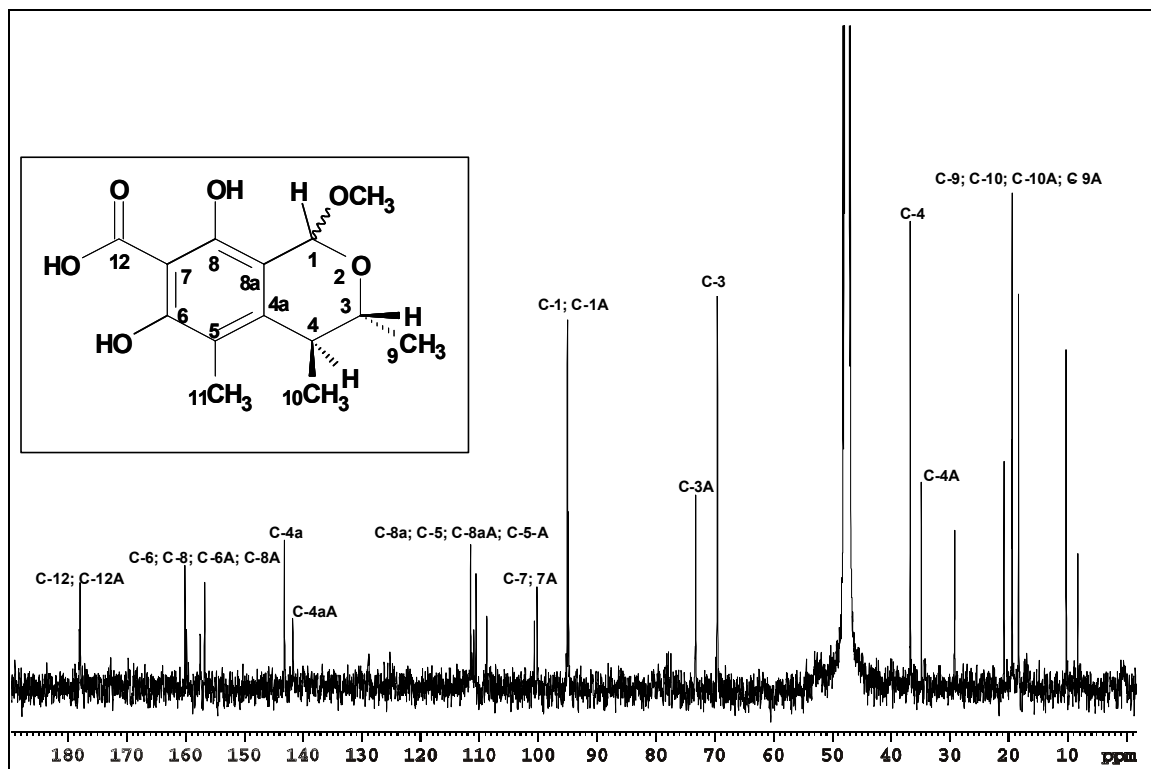


FIGURA 4.1.6.2-6: Espectro de ^{13}C (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinitina metoxilada (epímeros)

No espectro de $g\text{COSY}$ (FIGURA 4.1.6.2-7) aparecem somente as correlações dos hidrogênios H-3, H-4, H-9, H-10 para as duas formas isoméricas.

Todos os sinais de hidrogênios, observados no espectro de RMN de ^1H , foram correlacionados aos respectivos carbonos no espectro de correlação bidimensional $g\text{HSQC}$ (FIGURA 4.1.6.2-8), em que foi possível atribuir os sinais referentes aos carbonos metínicos e metílicos. Já os carbonos não ligados a hidrogênios foram observados no espectro de correlação $g\text{HMBC}$ com constante de acoplamento de 8 Hz (FIGURA 4.1.6.2-9). O carbono referente a metoxila foi atribuído através do $g\text{HMBC}$ com uma constante de acoplamento de 4 Hz (FIGURA 4.1.6.2-10).

Todos os dados obtidos nos experimentos de RMN estão apresentados na TABELA 4.1.6.2-2.

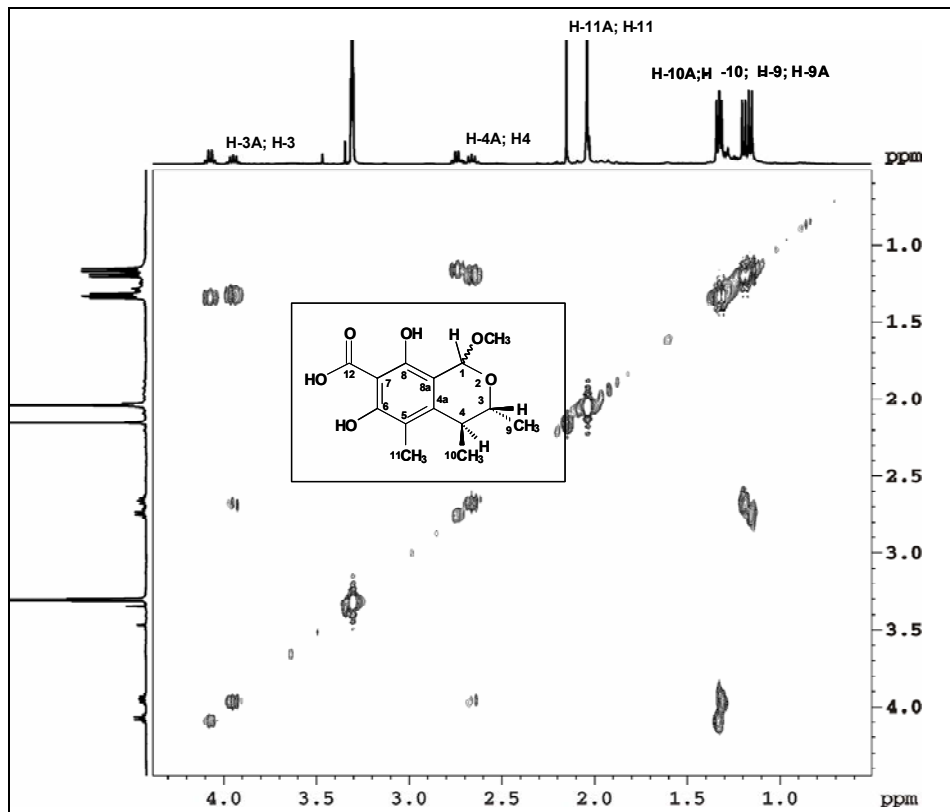


FIGURA 4.1.6.2-7: Espectro de *g*COSY (CD₃OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros)

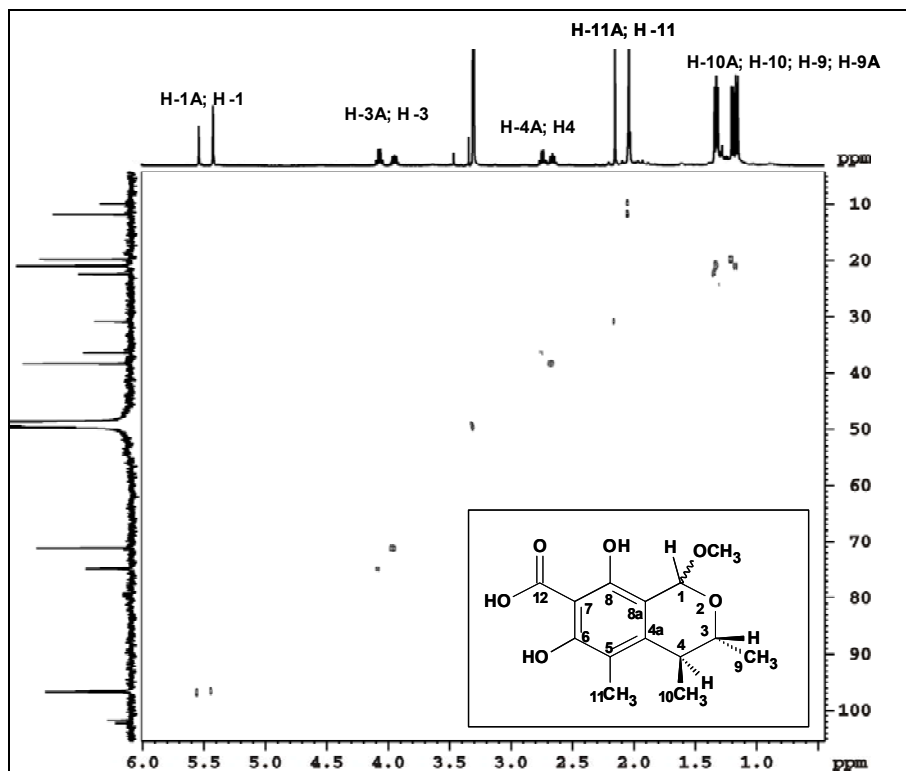


FIGURA 4.1.6.2-8: Espectro de *g*HSQC (CD₃OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros)

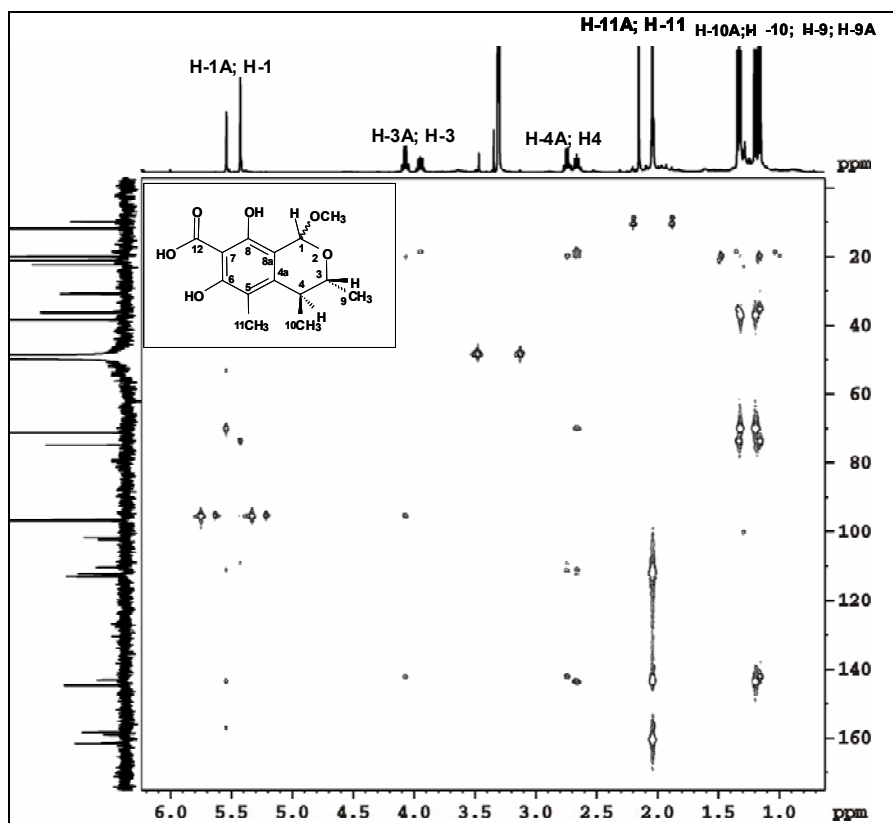


FIGURA 4.1.6.2-9: Espectro de gHMBC (8Hz) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros)

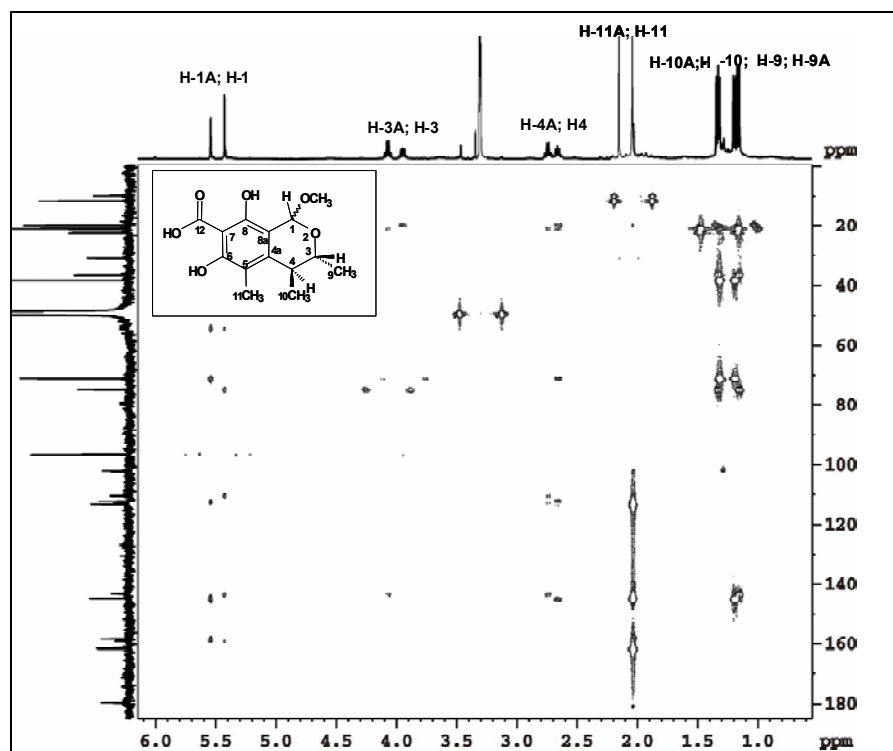


FIGURA 4.1.6.2-10: Espectro de gHMBC (4Hz) das duas formas isoméricas da citrinina metoxilada (epímeros) e dissolvida em CD_3OD

Através dos dados espectrais obtidos foi possível confirmar que a citrinina sofreu uma transformação durante a cromatografia em coluna, visto que, ela reage com metanol e composição de metanol/diclorometano. Esta transformação, foi uma reação de adição nucleofílica do tipo 1,4 de Michael, porque transformou um hidrogênio olefínico em alifático. A produção da citrinina metoxilada em duas formas isoméricas (epímeros), deve-se ao fato de que esta adição pode ocorrer tanto em *cis*, como em *trans* em relação a metila-10. A reação está representada no item 4.1.4.4, FIGURA 4.1.4.4-2 pág.72.

A citrinina metoxilada ou epímeros, obtida através da cromatografia em coluna, apresenta algumas propriedades física diferentes da citrinina tais como: solubilidade, cor, cristalização (Tabela 4.1.6.2-3)

TABELA 4.1.6.2-2: Dados de RMN de ^1H e de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, gHSQC, gHMBC (4Hz) (CD_3OD) das duas formas isomérica da citrinina metoxilada (epímeros)

| Posição | ^{13}C | ^1H | gHSQC | gHMBC 4Hz | gCOSY |
|---------|--------------------|-----------------------|-------|--|------------|
| 1 | 97,0 CH | 5,54 s | 97,0- | 54,5; 71,2; 113,2; 144,8; 158,2 | - |
| 3 | 71,2 CH | 3,95 (q; J = 6,90 Hz) | 71,2 | 19,8; 97,0 | 2,66; 1,32 |
| 4 | 38,4 CH | 2,66 (q; J = 6,90 Hz) | 38,4 | 19,8; 21,0; 71,2; 112,2; 113,1; 144,8 | 1,21 |
| 4a | 144,8 | - | - | - | - |
| 5 | 113,1 | - | - | - | - |
| 6 | 161,6 | - | - | - | - |
| 7 | 101,8 | - | - | - | - |
| 8 | 158,2 | - | - | - | - |
| 8a | 112,2 | - | - | - | - |
| 9 | 19,8 CH_3 | 1,21 (d, J = 6,90 Hz) | 19,8 | 38,2; 71,0, 144,8 | 2,66 |
| 10 | 21,0 CH_3 | 1,32 (d, J = 6,90 Hz) | 21,0 | 38,2; 71,0 | 3,95 |
| 11 | 9,8 CH_3 | 2,04 s | 9,8 | 113,1; 144,8; 161,6 | |
| 12 | 178 | - | - | - | - |
| 1A | 96,5 CH | 5,42 s | 96,5 | 54,5; 74,9; 112,2; 143,3 | |
| 3A | 74,9 CH | 4,07 (q; J = 6,90 Hz) | 74,9 | 21,0; 96,5; 143,2 | 1,34 |
| 4A | 36,4 CH | 2,74 (q; J = 6,90 Hz) | 36,4 | 21,0; 110,3; 112,2; 143,2 | 1,16 |
| 4aA | 143,2 | - | 143,2 | - | - |
| 5A | 113,1 | - | 113,1 | - | - |
| 6A | 161,2 | - | 161,2 | - | - |
| 7A | 101,4 | - | 101,4 | - | - |
| 8A | 158,8 | - | 158,8 | - | - |
| 8aA | 112,2 | - | 112,2 | - | - |
| 9A | 21,0 CH_3 | 1,16 (d, J = 6,90 Hz) | 21,0 | 36,4; 74,9; 143,2 | 2,74 |
| 10A | 22,3 CH_3 | 1,34 (d, J = 6,90 Hz) | 22,3 | 36,2; 74,9 | 4,07 |
| 11A | 11,8 CH_3 | 2,04 s | 1,8 | 113,1; 144,8; 161,6 | - |
| 12A | 178 | - | - | - | - |

Tabela 4.1.6.2-3: Prpriedades físicas da citrinina e da citrinina metoxilada (epímeros)

| Substância | Solubilidade | Côr | Cristalização |
|---|---|---------|-----------------|
| Citrinina | Solúvel - (CDCl ₃), diclorometano, acetonitrila | amarelo | forma de agulha |
| Citrinina metoxilada ou epímeros | Insolúvel -(CDCl ₃), diclorometano, acetonitrila | marrom | não cristaliza |

De acordo com a literatura, a citrinina sofre reação de adição do tipo 1,4 de Michael, quando dissolvida em CD₃OD e composição de CD₃OD/CDCl₃ em análises de RMN, produzindo *adutos* nas duas formas isoméricas bem definidas, quando analisadas por RMN à -60°C. Esta reação é reversível (POUPKO *et al.*,1997), portanto, ao se evaporar o solvente os *adutos* do solvente voltam para a condição da citrinina normal (FIGURA 4.1.4.6.2-11).

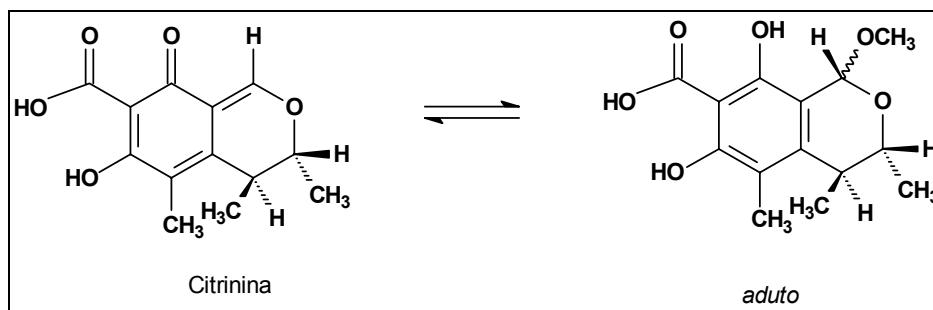


FIGURA 4.1.4.6.2-11: Reação de adição do tipo 1,4 de Michael (reversível)

Para confirmar que se a substância JP3005 denominada citrinina metoxilada (epímeros) não é um *aduto* do metanol nas análises de RMN, foram feitos experimentos de massas com ela dissolvida em metanol e em acetonitrila. Apesar da substância, ser praticamente insolúvel em acetonitrila, o experimento foi realizado, já que para as análises de massas, a concentração pode ser em torno de nanogramas. Este experimento confirmou que a substância ou as duas formas isoméricas da citrinina metoxilada (epímeros) são estáveis e não um *aduto* do

solvente.

O espectro de EM (FIGURA 4.1.6.2-12) em metanol, obtido por ionização por *Electrospray*, no modo negativo mostra o íon m/z 281 $[M-H]^-$. Este íon poderia ser um *aduto* do metanol, correspondente a massa da citrinina mais uma molécula de álcool $[M+32-H]^-$.

O espectro de massas em acetonitrila (FIGURA 4.1.6.2-13), também obtido por ionização por *Electrospray*, no modo negativo mostra o íon m/z 281 $[M-H]^-$. O íon molecular aparece no espectro numa intensidade muito baixa, devido à pequena concentração. O íon m/z 276 é um *aduto* da acetonitrila, que também aparece no espectro da citrinina em acetonitrila no item 4.1.3, FIGURA 4.1.3-5 pág.63.

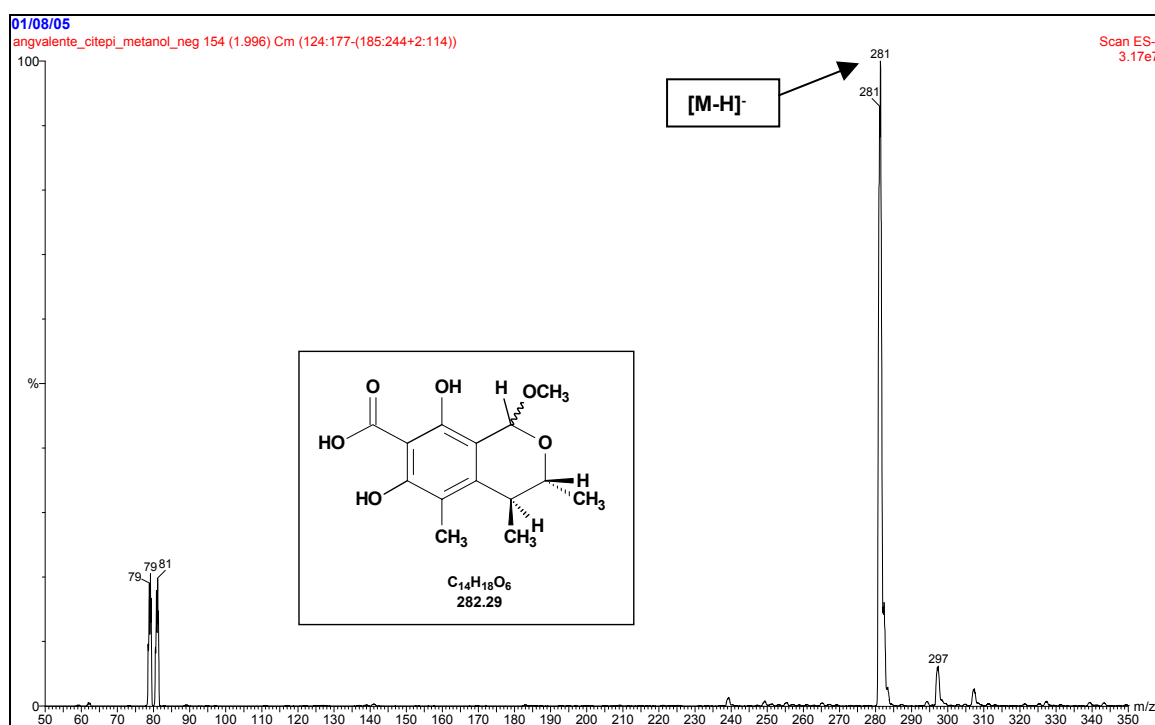


FIGURA 4.1.6.2-12: Espectro de massas da citrinina metoxilada ou epímeros dissolvida em metanol

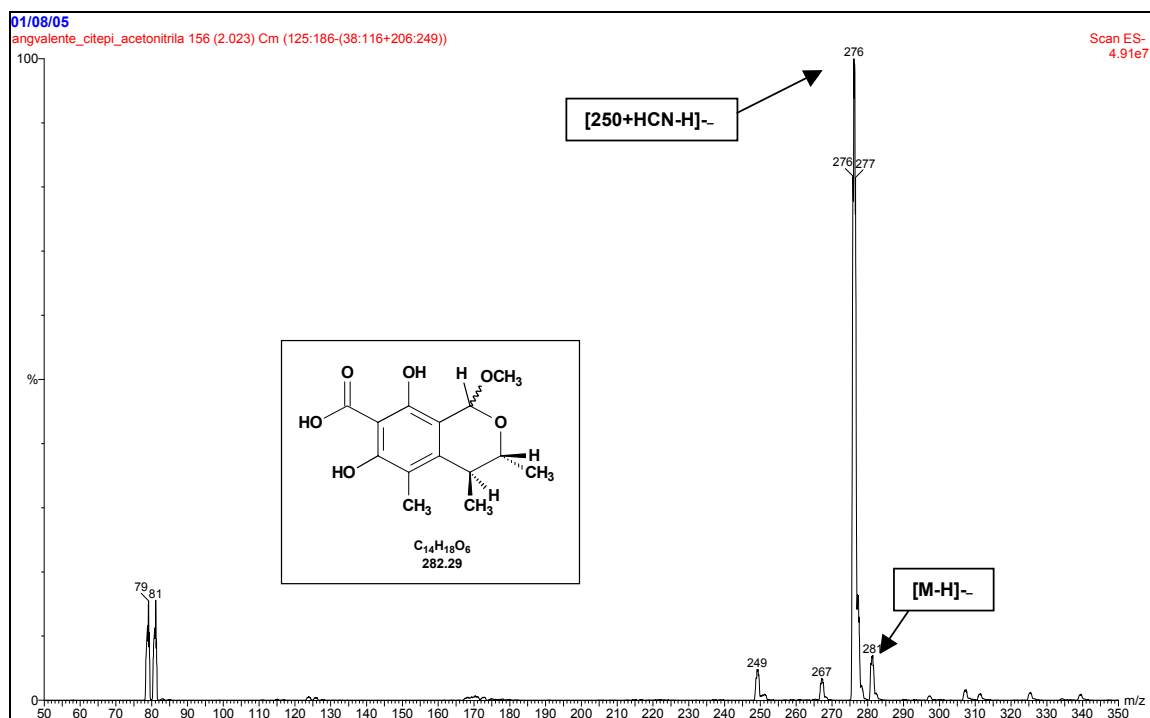


FIGURA 4.1.6.2-13: Espectro de massas da citrinina metoxilada ou epímeros dissolvida em acetonitrila

Portanto, através dos dados obtidos nos experimentos de RMN, juntamente com os de espectrometria massas, conclui-se que as formas isoméricas da citrinina metoxilada ou epímeros são estáveis e nunca foram descritos na literatura.

Os nomes dos epímeros foram atribuídos de acordo com substâncias semelhantes da literatura e seguindo as regras de nomenclatura da IUPAC: ácido (3*R*-4*S*)-4,6-dihidro-1*H*(*R*)-metoxi-6,8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3*H*-2-benzopirano-7-carboxílico] e ácido (3*R*-4*S*)-4,6-dihidro-1*H*(*S*)-metoxi-6,8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3*H*-2-benzopirano-7-carboxílico.

4.1.8 - Teste de citotoxicidade *in vitro*

O teste de citotoxicidade *in vitro* foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

A citrinina apresentou fraca atividade citotóxica, enquanto que, a citrinina metoxilada (epímeros) não apresentou atividade citotóxica. Para um composto ser considerado ativo, este deve apresentar IC₅₀ inferior a 4 µg/mL em todas as linhagens testadas. A atividade citotóxica das amostras está apresentada na TABELA 4.1.6.2-4, com suas respectivas IC₅₀ (concentração que causa 50% de inibição) e intervalos de confiança. Portanto, nenhuma das duas substâncias testadas apresentou potencial antitumoral (MOSSMAN, 1983; SKEHAN, 1990; BERRIDGE, 1996).

TABELA 4.1.6.2-4: Atividade citotóxica das substâncias produzidas por fungo *Penicillium sp. Cat1.1*. Os resultados estão apresentados com IC₅₀ (concentração que inibe 50%) e intervalos de confiança

| Amostra | MDAMB 435 | HL60 | HCT-8 | SF 295 |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | IC₅₀ | IC₅₀ | IC₅₀ | IC₅₀ |
| Citrinina | 9,7 (8,0-11,8) | 10,48 (8,6-12,8) | 3,0 (1,2-7,7) | 17,4 (14,8-20,5) |
| Citrinina metoxilada | >25 | >25 | >25 | >25 |

* concentração em µg/mL



4.2 – *Penicillium sp. Casp5*

4.2 – *Penicillium* sp. Casp5

O fungo denominado Casp5 foi isolado do café em coco após assepsia e identificado até gênero por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FIGURA 4.2-1) como pertencente ao gênero *Penicillium* no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa – Meio Ambiente – Jaguariúna/SP.

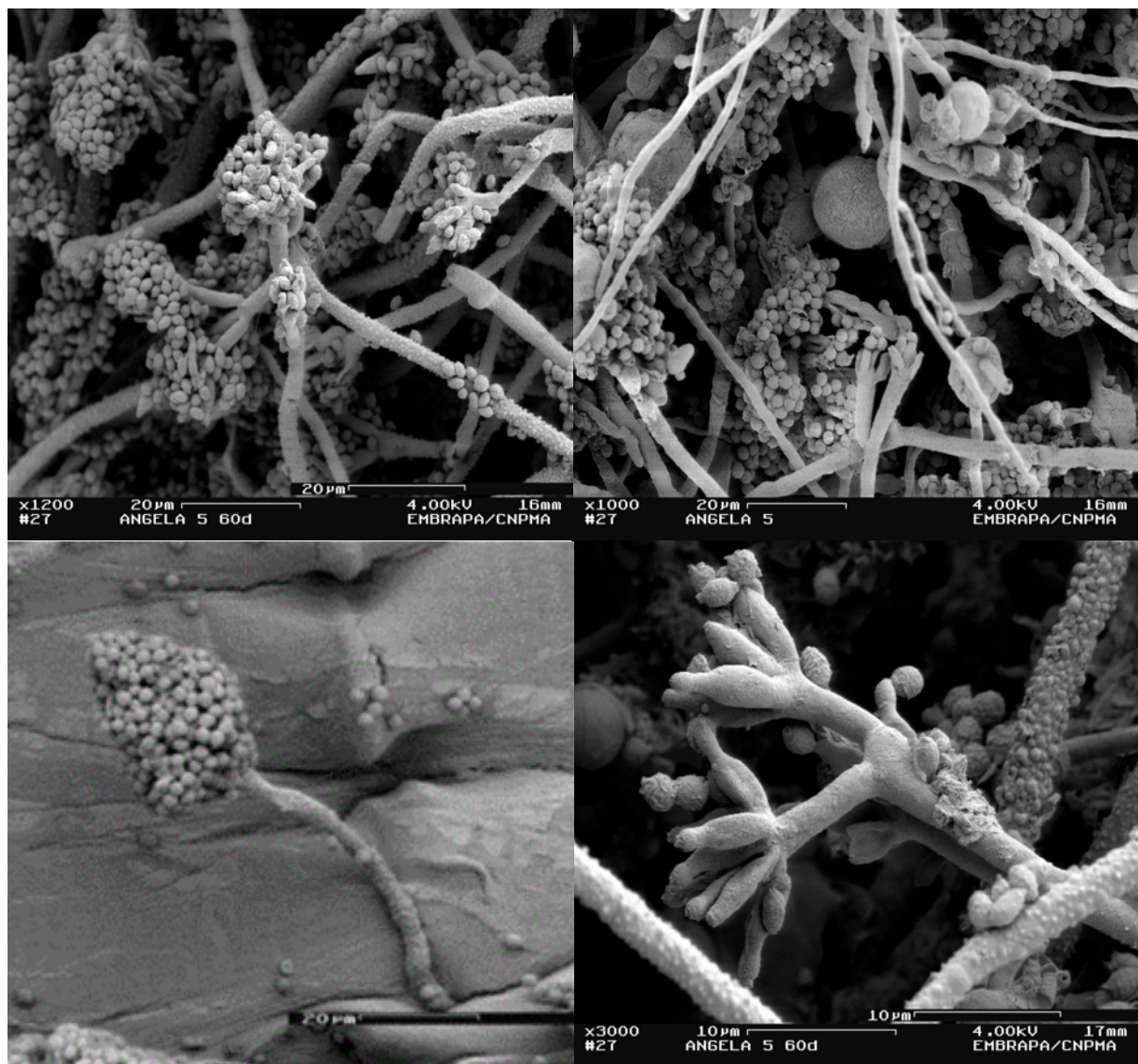


FIGURA 4.2-1: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do fungo *Penicillium* sp. Casp5

A imagem mostra a estrutura filamentosa do fungo que é caracterizado por formar conídios, que apresentam uma estrutura ramificada semelhante a um pincel (BRADBURY, 1986). Na microfotografia podemos observar que os esporos apresentam uma superfície rugosa e hifas lisas e rugosas (FIGURA 4.2-2)

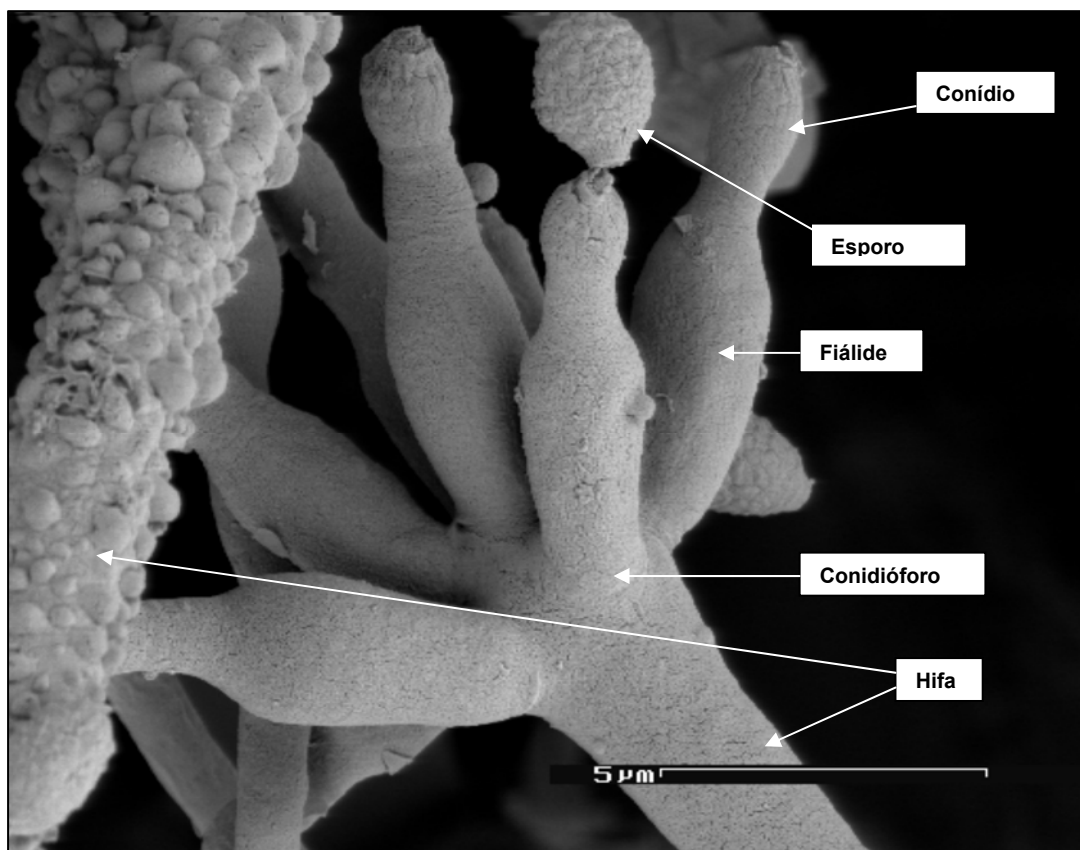


FIGURA 4.2-2: Microfotografia do fungo *Penicillium* sp. Casp5

O fungo *Penicillium* sp. Casp5 foi cultivado em meio Czapek (SEÇÃO 3, item 3.1.3.2 pág. 20.), e após 7 dias de fermentação, na extração obtida em pH 3 com diclorometano obteve-se o ácido micofenólico puro com alto grau de pureza no processo de extração.

O ácido micofenólico é um imunossupressor produzido por várias espécies do gênero *Penicillium*. Ele é o princípio ativo do micofenolato mofetil (MMF) comercializado pela ROCHE do Brasil com o nome de Cell Cept®.

Assim, o fungo *Penicillium* sp. Casp 5 apresenta potencial biotecnológico.

4.2.1 - Quantificação do ácido micofenólico no extrato fúngico por RMN de ^1H

Devido à importância do ácido micofenólico, há uma necessidade contínua na busca de novas metodologias de produção para esta substância.

O fungo *Penicillium* sp. Casp5 produz, além de produzir o ácido micofenólico, o que lhe confere potencial biotecnológico, ainda apresenta características relevantes para a indústria tais como:

- Libera o ácido micofenólico para o meio de cultivo;
- Produz a substância em grande quantidade e com alto grau de pureza;
- Na extração obtida em pH 3 é a única substância miscível em diclorometano presente no meio de cultivo, ou seja, o isolamento da substância já ocorre na etapa de extração.

Devido, a estas características podemos enumerar algumas vantagens no processo de produção e isolamento do ácido micofenólico utilizando o fungo *Penicillium* sp. Casp5

- A produção da citrinina se dá em apenas em uma fermentação
- O processo de isolamento da citrinina é muito simples e não requer nenhuma técnica cromatográfica.
- A utilização de um único solvente orgânico (diclorometano) no processo de extração facilita a sua recuperação.

Devido, a importância do ácido micofenólico este trabalho teve como objetivo principal quantificá-lo no extrato fúngico. Para a sua quantificação no extrato foi necessário estabelecer alguns critérios na metodologia da extração tais como:

4.2.1.1 - Fixar um volume de filtrado para realização da extração

Na extração foi utilizado 50 mL de filtrado, porque este volume contém uma massa suficiente para as análises quantitativas por RMN. Para o ácido micofenólico também foram feitas várias extrações, em triplicata, e em tempos diferentes após a acidificação para pH 3 do meio de cultivo. Os resultados mostraram que independente do tempo da acidificação obteve-se massas de extratos (mg) próximas para todas as amostras obtidas de 50 mL de filtrado. Estes resultados mostram a eficiência da metodologia de extração desenvolvida para o ácido micofenólico (TABELA 4.2.1.1-1). Portanto, a extração pode ser feita em seguida a acidificação do filtrado de acordo com os resultados obtidos, o que não acontece no caso da extração da citrinina como descrita no item 4.1.4.2 pág. 64.

TABELA 4.2.1.1-1: Massas de extratos obtidas em 50 mL de filtrado acidificado para pH 3

| Extração Volume = 50 mL | Extração após acidificação | Massa em mg/50 mL de filtrado (meio de cultura) |
|-------------------------|----------------------------|---|
| 1 A | 1 h e 30 min. | 13,57 |
| 1 B | 1 h e 30 min. | 14,08 |
| 1 C | 1 h e 30 min. | 12,94 |
| 2 A | 3 hs | 14,86 |
| 2 B | 3 hs | 15,38 |
| 2 C | 3 hs | 16,11 |
| 3 A | 6 hs | 15,36 |
| 3 B | 6 hs | 14,20 |
| 3 C | 6 hs | 13,89 |
| 4 A | 9 hs | 14,53 |
| 4 B | 9 hs | 13,73 |
| 4 C | 9 hs | 14,80 |

4.2.1.2 - Determinação do pH ideal para extração

O espectro de RMN de ^1H da extrato obtido em pH 7 (FIGURA 4.2.1.2-1) apresentou sinais referentes ao ácido micofenólico, substância majoritária e outras substâncias em quantidades muito pequena., mas como em medidas quantitativas por RMN, os espectros devem ser livres de qualquer ruído, principalmente próximos aos sinais que vão ser utilizados na integração, assim, o extrato em pH 7 não foi utilizado nas medidas. Já o espectro de RMN de ^1H obtido da extração em pH 3 (FIGURA 4.2.1.2-1), o qual foi utilizado para as medidas quantitativas pois, este apresentou somente os sinais referentes ao ácido micofenólico, livre de qualquer ruído.

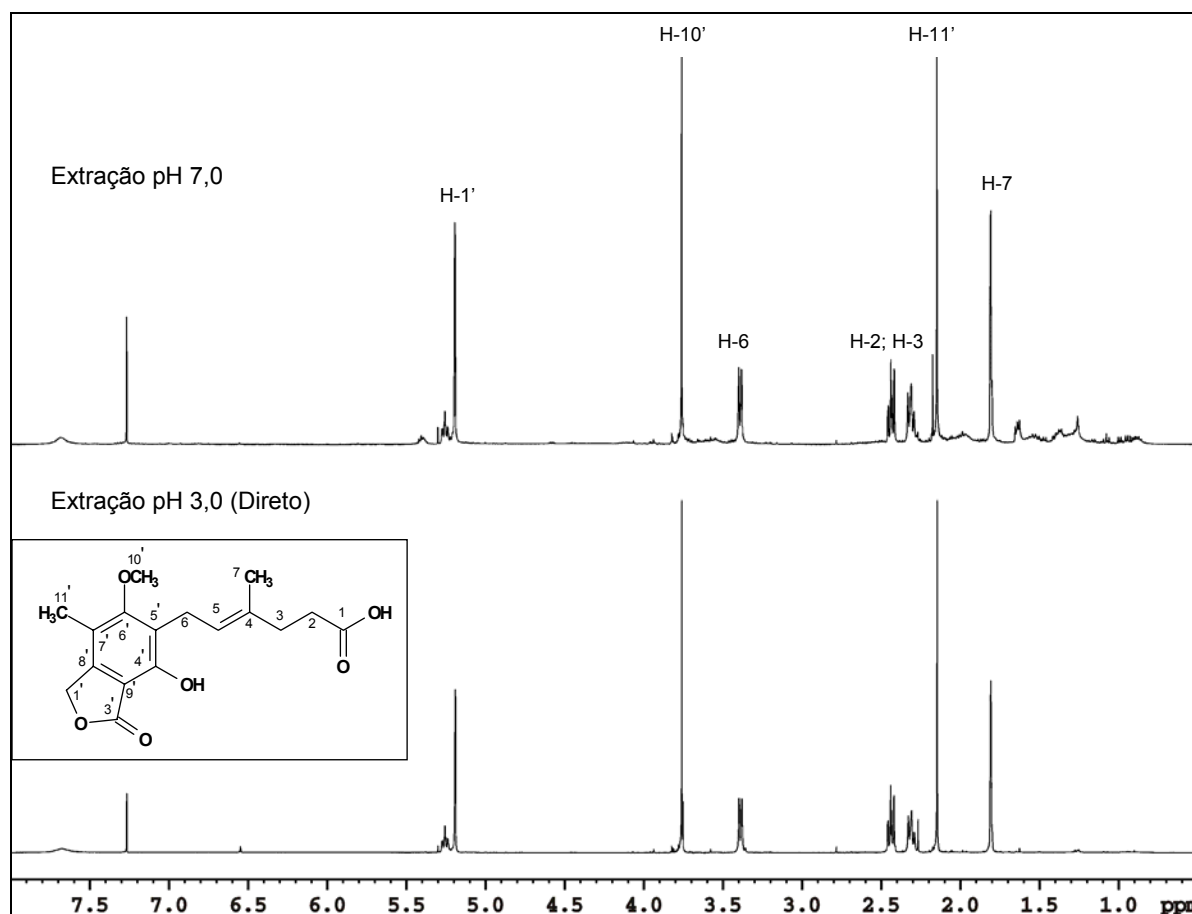


FIGURA 4.2.1.2-1: Espectros de RMN de ^1H do extrato obtido em pH 7,0 e em pH 3,0 (CDCl_3)

4.2.1.3 - Metodologia de quantificação por RMN de ^1H

A quantificação do ácido micofenólico no extrato fúngico foi feita através da área de integração dos sinais, utilizando-se a DMF como padrão interno. As amostras foram preparadas utilizando a mesma metodologia descrita na SEÇÃO 3 no item 3.5.2.3, pág.30.

Nas medidas quantitativas, foram integrados os seguintes sinais: para o ácido micofenólico o sinal integrado foi o H-6 (*dubleto*) em δ 3,39 ppm e da DMF (padrão) foi integrado o sinal da metila em δ 2,98 ppm. Nas integrais foram utilizados o *dubleto* do ácido micofenólico e a metila da DMF, devido a sua proximidade no espectro de RMN, além de não apresentarem nenhum sinal entre eles (FIGURA 4.2.1.3-1). A proximidade entre os sinais é muito importante, pois, estes sinais estando próximos sofrem uma correção da linha de base muito semelhante. Estes cuidados devem ser levados em consideração para não comprometer as medidas quantitativas. Além desses fatores ou cuidados, um outro, importantíssimo, a ser considerado é a estimativa de tempo de relaxação dos núcleos, ou seja, a relaxação longitudinal (T_1) para a substância a ser quantificada, no caso, o ácido micofenólico. A estimativa de (T_1) para o ácido micofenólico e DMF (padrão) foi feito utilizando a metodologia descrita na SEÇÃO 3, item 3.5.2.4.1, pág.31.

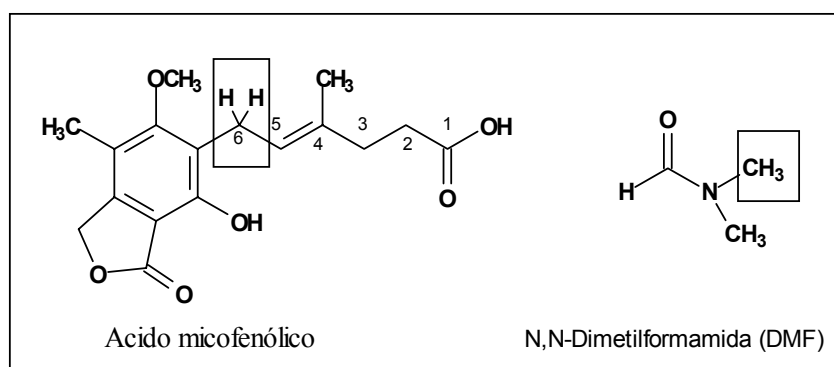


FIGURA 4.2.1.3-1: Estruturas do ácido micofenólico e da DMF com os sinais dos hidrogênios utilizados nas integrais circulosados

A quantificação do ácido micofenólico foi iniciada com 2 dias de fermentação (FIGURA 4.2.1.3-1), porque com esse período de fermentação já foi possível observar os sinais referentes a substância que, estão representados em

vermelho no espectro. Além dos sinais do ácido micofenólico, também observou-se outros sinais como: da N,N-dimetilformamida (padrão), os quais estão discriminados no espectro e sinais referentes a componentes do meio de cultura que, ainda, não haviam sido metabolizado pelo fungo. Já no espectro de RMN de ^1H para 8 dias de fermentação, cujo espectro está representado também na FIGURA 4.2.1.3-2, no qual foram observados somente sinais do ácido micofenólico (vermelho) e da DMF (padrão), assim como do clorofórmio.

O espectro de RMN de ^1H representado na FIGURA 4.2.1.3-3 mostra a área da integral do sinal em δ 3,39 ppm (H-6) do ácido micofenólico (azul), que apresenta-se como um *dubleto* com uma constante de acoplamento de 6,8 Hz e a área da integral do sinal em δ 2,98 ppm (*singlete*) para a metila da N,N-dimetilformamida (vermelho).

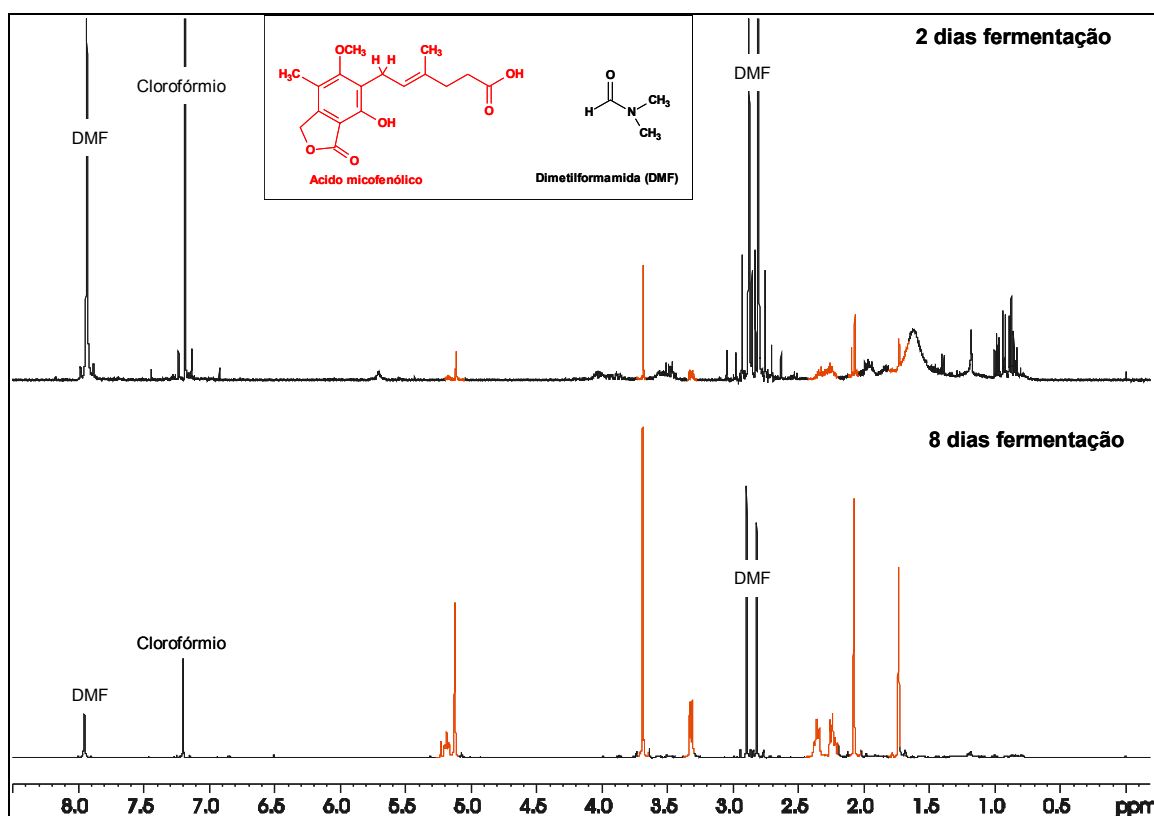


FIGURA 4.2.1.3-2: Espectros RMN de ^1H dos extratos obtidos em pH 3 com 2 dias e 8 dias de fermentação para o ácido micofenólico (CDCl_3)

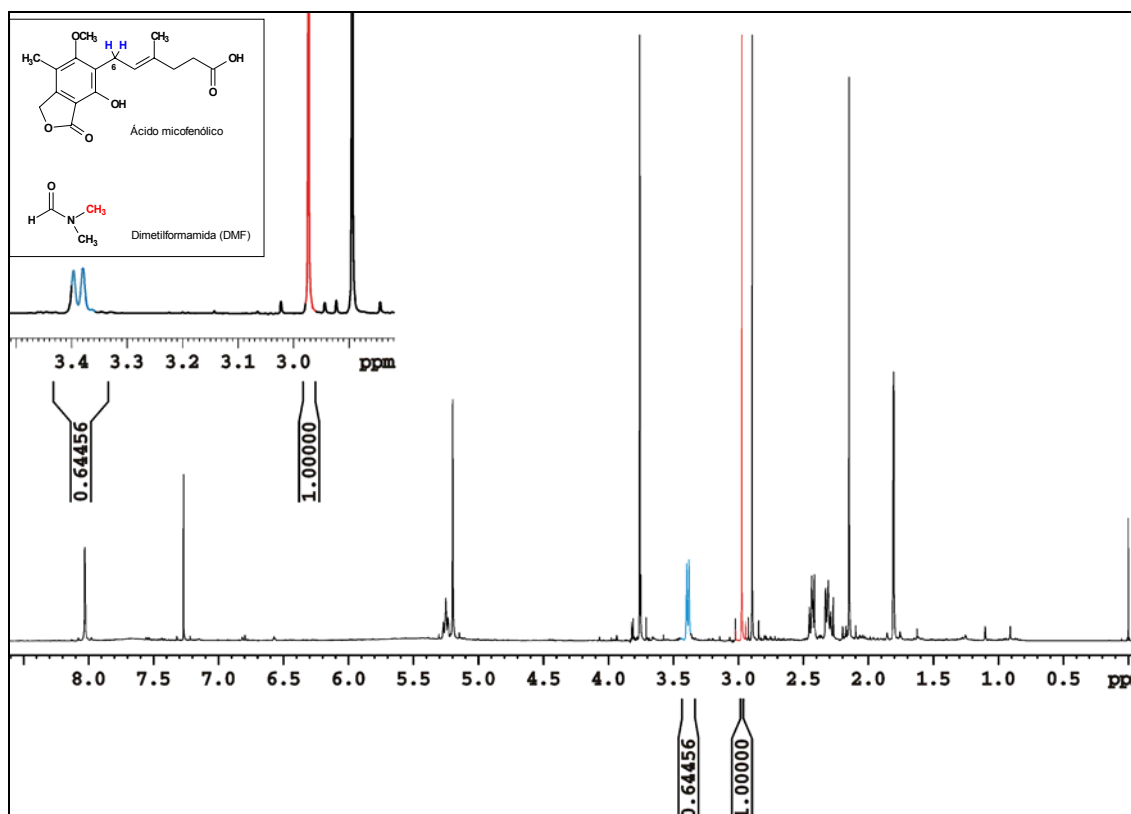


FIGURA 4.2.1.3-3: Área das integrais do ácido micofenólico e da DMF no espectro de RMN de ¹H do extrato em pH 3 por *Penicillium* sp. Casp5 (CDCl₃)

4.2.1.4 - Cálculo da concentração do ácido micofenólico no extrato obtido em pH 3

Para o cálculo das concentrações do ácido micofenólico no extrato fúngico (pH 3) em mg/mL foi utilizada a seguinte fórmula:

$$[\text{ác. micofenólico}] = [\text{DMF}]_{\text{mol/mL}} \frac{N_{\text{DMF}} \times A_{\text{ác. micofenólico}} \times MM_{\text{ác. micofenólico}}(\text{mg/mol})}{N_{\text{ác. micofenólico}} \times A_{\text{DMF}}}$$

Onde:

[DMF] = Concentração da DMF mol/mL

N_{DMF} = n° de hidrogênio da N,N-dimetilformamida utilizado na integral (vermelho)

$A_{\text{ác. micofenólico}}$ = integral do H-6 em δ 3,39 ppm do ácido micofenólico no espectro de RMN de ¹H

$N_{\text{ác. micofenólico}}$ = n° de hidrogênio do ácido micofenólico utilizado na integral (azul)

A_{DMF} = integral da metila em δ 2,98 ppm da DMF no espectro de RMN de ¹H, calibrado em 1.

MM = Massa molar do ácido micofenólico (mg/mol)

A Figura 4.2.1.4-1 mostra a área das integrais da metila da DMF em vermelho (calibrado em 1,0000) e do hidrogênio metilênico do ácido micofenólico (azul) que, foram utilizadas no exemplo do cálculo da concentração a seguir:

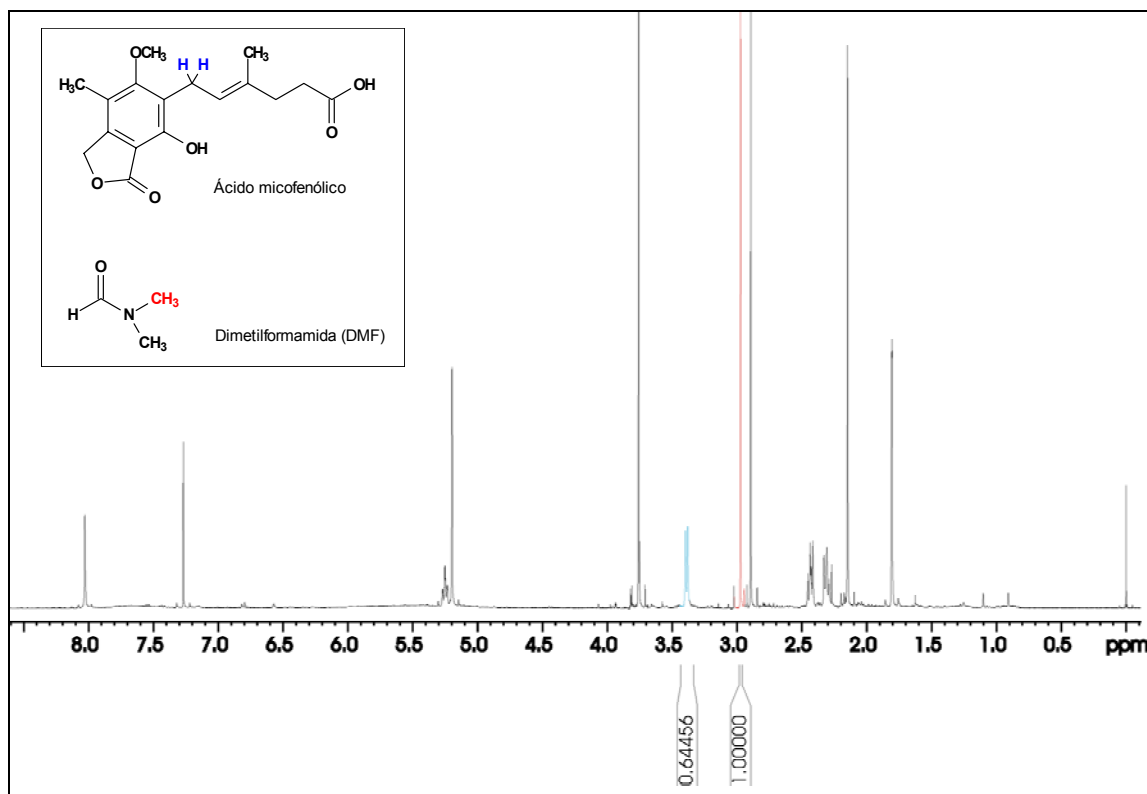


Figura 4.1.4.6-1: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) da área das integrais do ácido micofenólico e da DMF (padrão)

Onde:

$$[\text{DMF}] = 0,04703 \times 10^{-3} \text{ mol/mL}$$

$$N_{\text{DMF}} = 3$$

$$A_{\text{DMF}} = 1$$

$$A_{\text{ác. micofenólico}} = 0,64456$$

$$N_{\text{ác. micofenólico}} = 2$$

$$MM_{\text{ác. micofenólico}} = 320.340,00 \text{ mg/mol}$$

$$[\text{ác. micofenólico}] = \frac{0,04703 \times 10^{-3} \times 3 \times A_{\text{ác. micofenólico}} \times 320.340,00}{2 \times 1}$$

$$[\text{ác. micofenólico}] = \frac{0,00004703 \times 3 \times 0,64456 \times 320.340,00}{2}$$

$$[\text{ác. micofenólico}] = 14,57 \text{ mg/mL}$$

Como a massa molar do ácido micofenólico e o número de hidrogênios da DMF e do ácido micofenólico são constantes, pode-se escrever a fórmula da seguinte maneira:

$$[\text{Ác. micofenólico}] = 22,59839 \times A_{\text{ác. micofenólico}} \text{ (mg/mL)}$$

As concentrações de ácido micofenólico encontradas no extrato fúngico obtido em pH 3 por RMN de ^1H com 2, 4, 8, 12, 16 e 20 dias de fermentação e as massas de extratos em pH 3 obtidas da extração de 50 mL de filtrado estão representados na TABELA 4.2.1.4-1.

Através das concentrações calculadas por RMN de ^1H que, estão apresentadas na TABELA 4.2.1.4-1, observa-se que a máxima produção de ácido micofenólico se deu com 12 dias de fermentação (amostras 4 A, 4B e 4C), e a partir desse período de fermentação houve uma queda bastante acentuada na produção do metabólito. Uma das hipóteses para esta diminuição do metabólito seria que o fungo, a partir desse período passa a consumir o ácido micofenólico como fonte de carbono para sua sobrevivência.

Ainda com relação aos dados apresentados da TABELA 4.2.1.4-1, na última coluna, observa-se que a razão entre a concentração de ácido micofenólico no extrato obtido em pH 3 por RMN de ^1H , utilizando a fórmula apresentada no item 4.2.1.4, pág. 116 e a massa do mesmo extrato fúngico obtido de 50 mL de filtrado (pesada em balança analítica), mostra que a concentração do ácido micofenólico presente no extrato fúngico foi acima de 92 %, obtendo-se deste modo, a substância pura e com alto grau de pureza no processo de extração. Entretanto, quando comparou-se as concentrações obtidas para todas as amostras obtidas no período de 20 dias de fermentação (em triplicata), estas apresentaram uma concentração com variação de 92 a 94 % de ácido micofenólico no extrato, o que foi bastante razoável se levar em consideração que, as três amostras (extrato fúngico) preparadas, ou seja, as triplicatas, foram preparadas com as massas obtidas de três volumes de 50 mL de filtrado (mesmo frasco de fermentação) para as análises de quantificação. Portanto, para cada tempo de fermentação foram feitas, três extrações de 50 mL de filtrado cada, três retiradas de massas de três balões do rota

evaporador e, ainda, a pesagem inicial dos três frascos (vidrinhos) vazios e a final com a amostra. Adicionalmente, devemos evidenciar que a concentração encontrada para 2 dias de fermentação não foi considerada na avaliação, devido à presença de componentes do meio de cultivo.

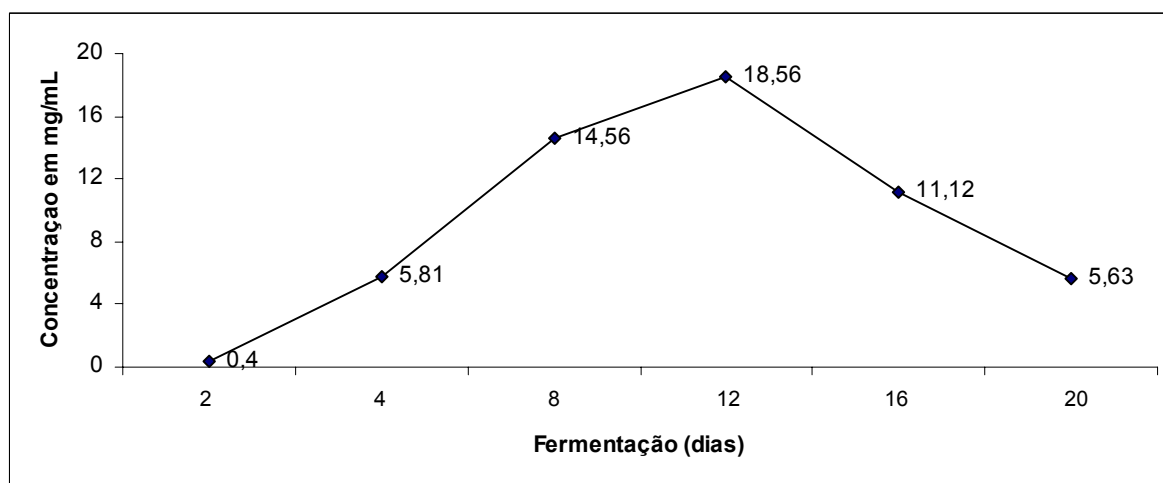
TABELA 4.2.1.4-1: Concentrações do ácido micofenólico no extrato em pH 3 do *Penicillium* sp. *Casp5* no período de 20 dias de fermentação

| Amostr as | Tempo Fermentação (27°C) | Integral CH ₂ | [ac.mico] RMN de ¹ H mg/mL | Filtrado mg/50 mL | % ac. mico extrato Casp5 (média das triplicatas) |
|--------------|--------------------------------|-----------------------------|---|----------------------|--|
| 1 A | 2 dias | 0,01722 | 0,40 | 5,68 | |
| 1 B | 2 dias | 0,01726 | 0,40 | 5,72 | 7 % |
| 1 C | 2 dias | 0,01728 | 0,40 | 5,71 | |
| 2 A | 4 dias | 0,35454 | 5,81 | 6,37 | |
| 2 B | 4 dias | 0,35398 | 5,81 | 6,29 | 92 % |
| 2 C | 4 dias | 0,35087 | 5,82 | 6,24 | |
| 3 A | 8 dias | 0,89767 | 14,51 | 15,69 | |
| 3 B | 8 dias | 0,89890 | 14,46 | 15,78 | 93 % |
| 3 C | 8 dias | 0,90022 | 14,56 | 15,59 | |
| 4 A | 12 dias | 1,19230 | 18,54 | 19,97 | |
| 4 B | 12 dias | 1,19100 | 18,57 | 19,95 | 92 % |
| 4 C | 12, dias | 1,19030 | 18,56 | 20,04 | |
| 5 A | 16 dias | 0,71394 | 11,13 | 12,15 | |
| 5 B | 16 dias | 0,70652 | 11,12 | 11,96 | 92 % |
| 5 C | 16 dias | 0,70704 | 11,19 | 11,99 | |
| 6 A | 20 dias | 0,38605 | 5,79 | 6,29 | |
| 6 B | 20 dias | 0,38176 | 5,63 | 6,02 | 94 % |
| 6 C | 20 dias | 0,38382 | 5,67 | 6,06 | |

Através das médias das concentrações do ácido micofenólico obtidas por RMN de ¹H nos diferentes dias de fermentação representadas na TABELA

4.2.1.4-1, foi construída uma curva de produção do ácido micofenólico pelo fungo *Penicillium* sp. Casp5 (FIGURA 4.2.1.4-1) em função do tempo de fermentação, na qual observa-se uma certa proporcionalidade, tanto para o intervalo de 2 a 12 dias de fermentação, quando ocorre o aumento de produção do metabólito, quanto para a diminuição desse metabólito a partir do 12º dia de fermentação.

Através das concentrações obtidas por RMN de ^1H para os diferentes tempos de fermentação, obteve-se a maior produção do metabólito para 12 dias de (18,56 mg/50mL). Conclui-se, portanto que, a produção do ácido micofenólico pelo *Penicillium* sp. Casp5 seria de 371,2 mg/L de meio de cultivo.



Para avaliar a metodologia de quantificação utilizada para determinar a produção do ácido micofenólico no extrato fúngico em função do tempo de fermentação, ou seja, a curva de produção do ácido micofenólico utilizando o fungo *Penicillium* sp. Casp5, foi construída uma curva de calibração. Para esta curva, foram preparadas sete amostras do extrato fúngico obtidas em pH 3 em concentrações conhecidas, a partir de uma solução mãe com 7 dias de fermentação. A solução mãe foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) com uma concentração de 20 mg/mL e as outras seis amostras foram obtidas através de diluições de acordo com a metodologia descrita na SEÇÃO 3, item 3.6 , pág..33.

Todos os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos e processados como descrito na SEÇÃO 3 item 3.6.3.1 pág.34 no mesmo dia, no mesmo

equipamento e pelo mesmo operador. Além dos parâmetros de processamento, a área das integrais foram medidas com os espectros, calibrados em relação ao TMS (zero), com a mesma correção da linha de base e mesma ampliação. A área da integral do sinal do ácido micofenólico é calculada em relação a área da integral da DMF, que é igual a 1,0000 (um). Este valor 1,0000 para a área do sinal da DMF é calibrado pelo próprio equipamento.

Para a obtenção da curva de calibração foi utilizada a média das integrais (triplicatas) para 7 pontos (amostras), sendo que, o eixo vertical do gráfico representa a razão entre a área das integrais do ácido micofenólico e a área das integrais da DMF (padrão interno) que, no caso da RMN, este valor é sempre igual a 1,0000 (um) *versus* a concentração do ácido micofenólico no extrato fúngico obtido em pH 3 utilizando o fungo *Penicillium* sp. Casp5 no cultivo. A curva de calibração apresentou uma boa proporcionalidade, com um coeficiente de correlação igual a 0,99932 (FIGURA 4.2.2.1-1).

A curva de calibração, mostrou que o ácido micofenólico pode ser quantificado no extrato fúngico em concentrações de 2 a 20 mg/mL, em função do coeficiente de correlação obtido ser > 0,99.

Adicionalmente, a concentração para os 7 pontos da curva de calibração do ácido micofenólico foi calculada através da fórmula descrita no item 4.2.1.4, pág 116.

A TABELA 4.2.1.4-1 mostra a concentração dos 7 pontos da curva de calibração calculados pela fórmula.

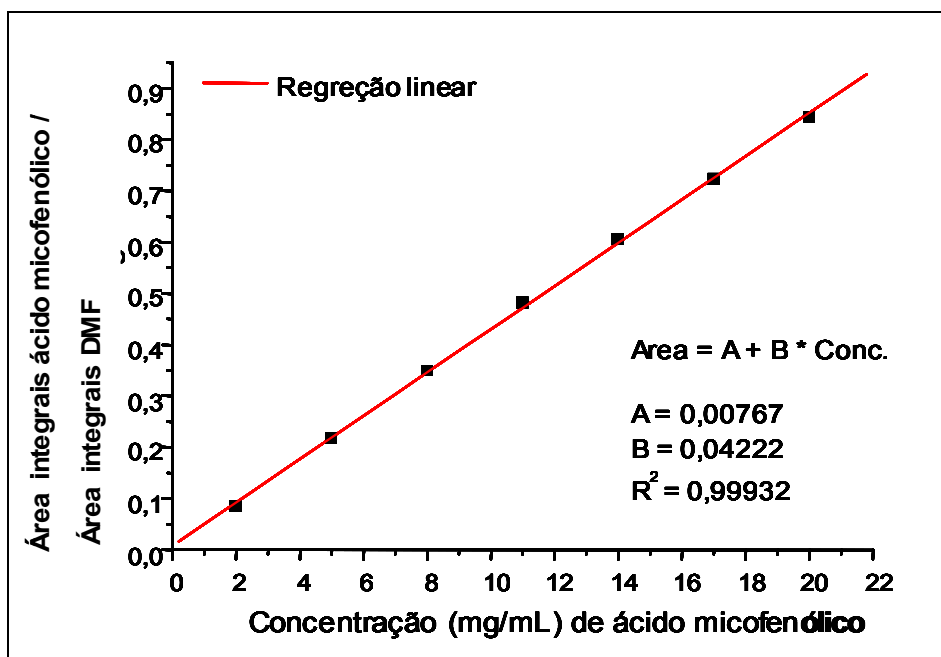


FIGURA 4.2.2.1-1: Curva de calibração do ácido micofenólico do extrato fúngico obtido em pH 3 com padronização interna (DMF)

TABELA 4.2.1.4-2: Concentrações do ácido micofenólico no extrato obtido em pH 3 utilizando o fungo *Penicillium* sp. Casp5 calculado através da fórmula descrita no item 4.2.1.4, pág.116

| Pontos | [extrato <i>P. sp.</i> Casp5] | Integral CH ₂ | [ác.mico] (Fórmula) | % ác. mico extrato <i>P. Casp5</i> (média triplicatas) |
|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------------|---|
| RMN de ¹ H mg/mL | | | | |
| Ponto 1 | 2 mg/mL | 0,0852 | 1,93 | 96% |
| Ponto 2 | 5 mg/mL | 0,2172 | 4,91 | 98 % |
| Ponto 3 | 8 mg/mL | 0,3480 | 7,86 | 98 % |
| Ponto 4 | 11 mg/mL | 0,4801 | 10,84 | 98% |
| Ponto 5 | 14 mg/mL | 0,6064 | 13,70 | 98% |
| Ponto 6 | 17 mg/mL | 0,7233 | 16,35 | 96% |
| Ponto 7 | 20 mg/mL | 0,8448 | 19,10 | 96% |

Através dos resultados obtidos pela curva de calibração (linearidade) e pela fórmula, podemos concluir que o método desenvolvido para a quantificação do ácido micofenólico no extrato fúngico obtido em pH 3 por RMN de ^1H foi capaz de reproduzir resultados proporcionais às concentrações do mesmo, conferindo, portanto, confiabilidade ao método.

Deste modo, a RMN mostrou-se uma técnica analítica eficiente, para quantificação do ácido micofenólico no extrato fungico em pH 3, obtido de uma fermentação utilizando o *Penicillium* sp. Casp5.



**4.3 - *Streptomyces violaceusniger*
*violaceusniger***

4.3 – *Streptomyces violaceusniger violaceusniger*

4.3.1 – Isolamento, identificação da espécie

O actinobactéria *Streptomyces violaceusniger violaceusniger* foi isolada como endofítica das folhas de plantas de milho (*Zea mays* L.) (FIGURA 4.3.1-1), pelo Ms. Francisco Gheler Costa, 2005. Ele foi identificado pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (FIGURA 4.3.1-2).



FIGURA 4.3.1-1: Colônia da aticnobactéria (*Streptomyces violaceusniger violaceusniger*)

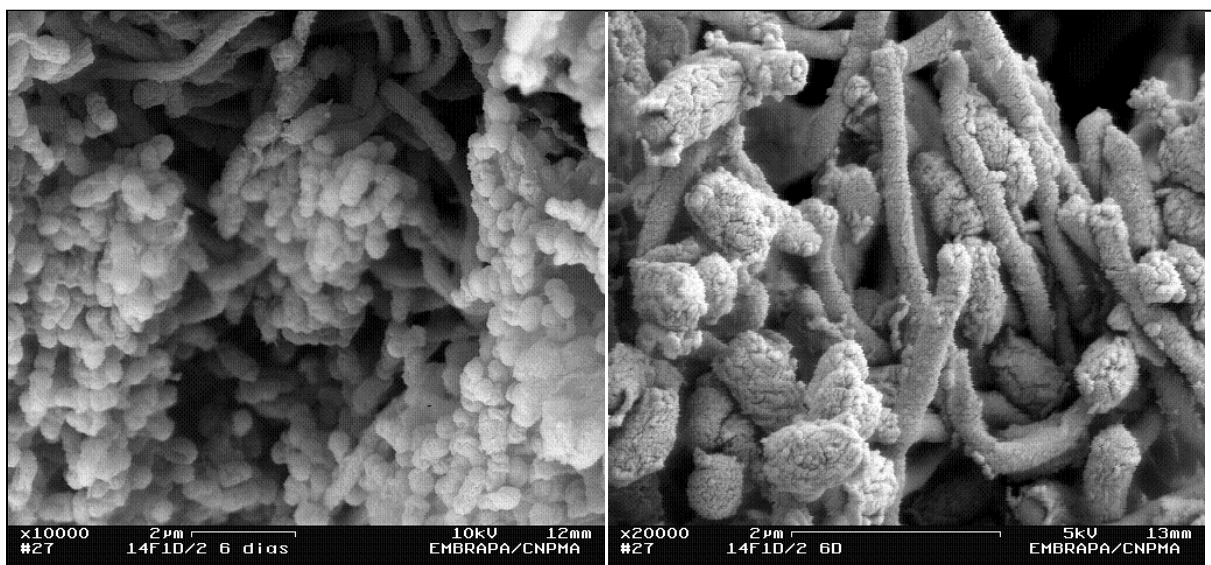


FIGURA 4.3.1-2: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do *S. violaceusniger violaceusniger*

Os resultados obtidos na identificação das actinobactérias pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) estão representados na Tabela 4.3.1-1.

TABELA 4.3.1-1 - Identificação das actinobactérias endofíticas de milho quanto ao perfil de ácidos graxos da membrana celular

| Código | Identificação | Índice de similaridade* | Matriz de isolamento |
|---------|---|-------------------------|----------------------|
| 9R11 | <i>Streptomyces violaceusniger</i> <i>violaceusniger</i> | 41,0% | Raiz |
| 14F1D/1 | <i>Streptomyces violaceusniger</i> <i>violaceusniger</i> | 50,2% | Folha |
| 14F1D/2 | <i>Streptomyces violaceusniger</i> <i>violaceusniger</i> | 68,3% | Folha |

* O índice de similaridade é o parâmetro de semelhança entre a amostra e a biblioteca ACTINO quanto à comparação do perfil de ácidos graxos. Foi aceito como um resultado aceitável similaridade acima de 30% (MISKO AND GERMIDA, 2002).

Segundo COSTA (2005), a espécie já foi isolada de raízes *Paraserianthes falcataria*, uma angiosperma tropical (SEMBIRING *et al.*, 2000), e seus metabólitos são eficientes no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em bananeiras (GETHA & VIKINESWARY, 2002), *Rhizoctonia wirestem* em couve-flor (HANCOCK, 1998), *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia homeocarpa* em grama (TREJO *et al.*, 1998a), *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., já foi descrito como produtor de quitinases, celulases, xilanases e peroxidases (TREJO *et al.*, 1998b). *Rhizoctonia wirestem* também foi controlada por *Streptomyces halstedii scabies* em couve-flor (HANCOCK, 1998).

4.3.2 – Avaliação da interação entre o *Streptomyces violaceusniger violaceusniger* e fungos patógenos (*P. aphanidermatum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *P. parasitica* e *F. Moniliforme*)

Vários fatores bioquímicos, biológicos e ecológicos podem estar envolvidos na interação de microrganismos endofíticos e patógenos de culturas de importância agrícola.

Costa, 2005 observou nos ensaios realizados *in vitro*, que 55%, 62,5%, 47,5%, 90% e 77,5% das actinobactérias isoladas foram capazes de inibir o crescimento de *P. aphanidermatum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *P. parasitica* e *F. Moniliforme*. Esta inibição foi caracterizada pela redução do crescimento do patógeno (FIGURA 4.3.2-1). Estes resultados mostram que as actinobactérias avaliadas produziram algum tipo de substância antagonista ao patógeno reduzindo o seu crescimento.

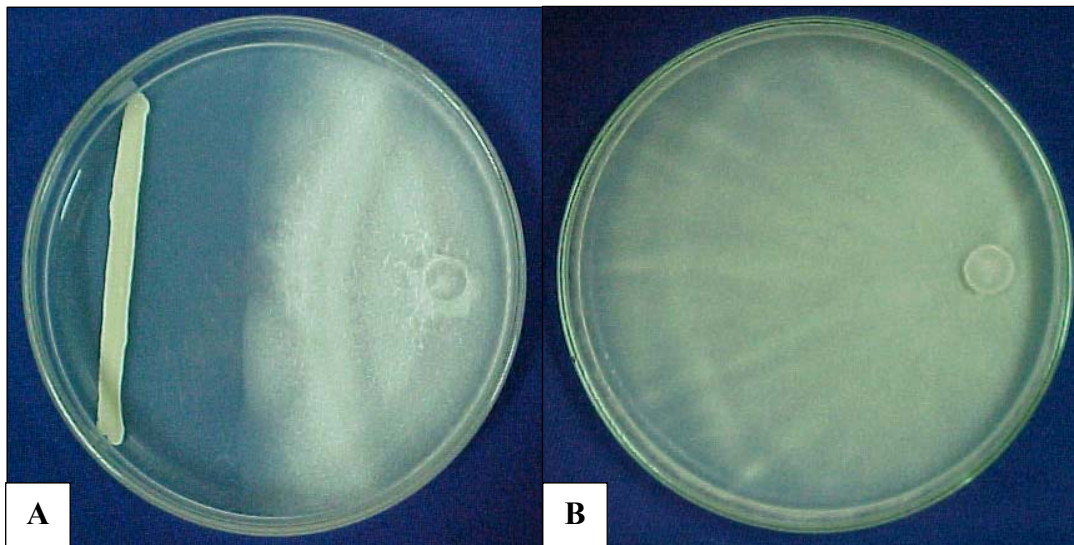


FIGURA 4.3.2-1: Inibição do desenvolvimento do fitopatógeno: A) isolado endofítico 14f1d/2 inibindo *F. moniliforme*; B) placa controle, somente o fungo.

A TABELA 4.3.2-1 mostra o antagonismo do *Streptomyces violaceusniger violaceusniger* frente aos patógenos adquiridos na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente – Jaguariúna-SP.

TABELA 4.3.2-1: Interação *in vitro* de *S. violaceusniger violaceusniger* de milho com *P. aphanidermatum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, *P. parasitica* e *F. Moniliforme* (COSTA, 2005)

| Actinobactérias Endofíticos | <i>Pythium</i> <i>aphanidermatum</i> | <i>Rhizoctonia</i> <i>solani</i> | <i>Sclerotinia</i> <i>sclerotiorum</i> | <i>Phytophthora</i> <i>parasitica</i> | <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> |
|--------------------------------|---|-------------------------------------|---|--|---------------------------------------|
| 14F1D/2 | + | + | + | + | + |

+ inibição do fungo; - não observada inibição

4.3.3 – Atividade biológica do extrato 14f1d/2

A maioria das actinobactérias, embora elas apresentem enzimas que estão envolvidas com a supressão de fitopatógenos, também produzem metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos.

O extrato do isolado 14f1d/2 foi capaz de inibir o crescimento de *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora parasitica* e *Fusarium moniliforme*, diferenciando do tratamento controle em que havia somente o solvente (COSTA, 2005) (FIGURA 4.3.3-1).

Costa, 2005 ainda cita que metabólitos secundários produzidos por actinobactérias, principalmente os do gênero *Streptomyces*, são capazes de inibir o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos (KOLOMLETTS, 1999; BERG *et al.*, 2001) e também controlar plantas daninhas, atuando como bioerbicidas (LEE *et al.*, 2003).

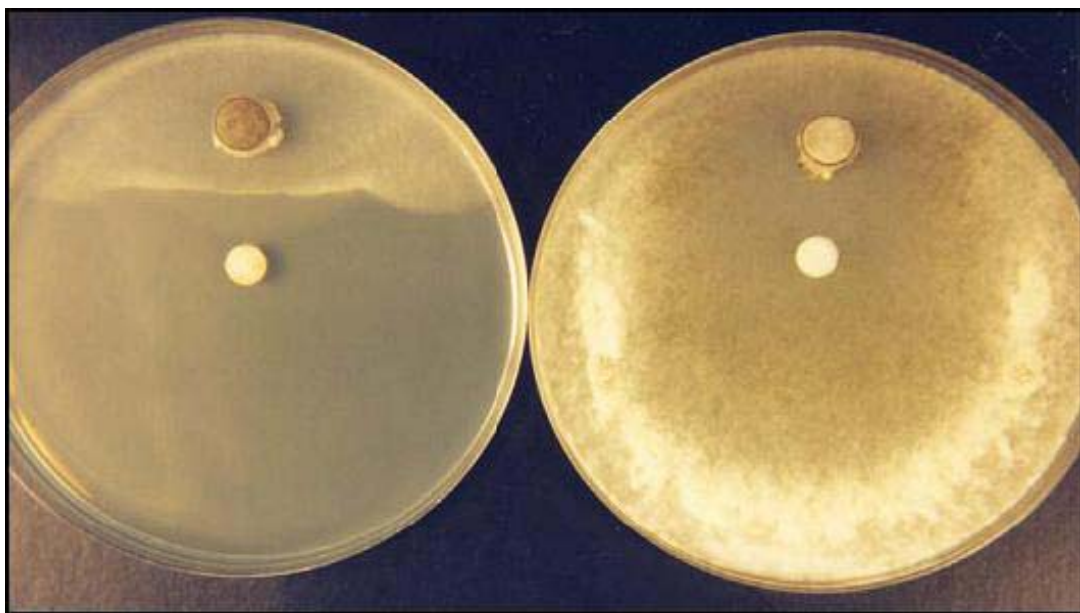


FIGURA 4.3.3-1: Eficiência do extrato *S. violaceusniger violaceusniger*. Placa de Petri à esquerda evidenciando a inibição do fungo *P. aphanidermatum* pelo metabólito extraído e, placa da direita, controle (somente o solvente) (COSTA, 2005)

4.3.4 – Extrato 14f1d/2

Devido aos resultados obtidos nos experimentos com a interação antagônica da actinobactéria frente a fitopatógenos e o teste de atividade biológica do extrato do *Streptomyces violaceusniger violaceusniger* feitos por COSTA, 2005, o extrato 14f1d/2 foi levado para o Laboratório de RMN da UFSCar e foi submetido a uma cromatografia por coluna Sephadex LH-20 (SEÇÃO 3, item 3.11.4 pág.50). A coluna, além de apresentar uma separação em cores (justifica o nome da técnica de cromatografia), também apresentou uma boa separação de compostos como, por exemplo, nas frações de 1 a 5 foi isolado um triglicérideo e na faixa de coloração roxo, fração 42 (reunião de 42, 43, 44 e 45) foi isolada uma substância da classe das prodigininas (5 mg). A fotografia da coluna esta representada na FIGURA 4.3.4-1.



FIGURA 4.3.4-1: Coluna Sephadex-LH 20 do extrato 14f1d/2 (dicloro/metanol, 1:1)

4.3.4.1 - Identificação da substância 14f1d/2-42

O espectro de RMN de ^1H apresentou três *singletos* largos de hidrogênios ácidos em δ 12,70 ppm (1H; s/) N-H¹ do anel **B**, δ 12,57 ppm (1 H; s/) N-

H^{1''} do anel **A**, e δ 12,51 ppm (1H; s/l) N-H^{1'} do anel **C** (FIGURA 4.3.4.1-1). Nas regiões de aromáticos e olefínicos, ele apresentou seis sinais diferentes para cada CH, sendo um *singleto* em δ 6,99 ppm (1H), referente ao hidrogênio sp² (H-6'), dois *dubletos* (*d*) em δ 6,03 ppm (1H; ³J = 1,90 Hz) e δ 6,19 ppm (1H; ³J = 1,90 Hz), referentes aos hidrogênios H-3'e H-2'', os outros três como *duplo-duplo -dubletos* em δ 7,16 ppm (H-5; *ddd*; J = 1,30; 2,70 e 3,90 Hz), δ 6,85 ppm (H-4; *ddd*; (J = 1,40; 2,50 e 3,80 Hz) e δ 6,28 ppm (H-3; *ddd*; (J = 2,30; 2,40 e 3,90 Hz). Todos os sinais apresentaram suas constantes de acoplamento menores que quatro Hertz (< 4Hz), característicos para heterocíclicos de cinco membros (Pirróis). Na região alifática exibiu dois *multipletos* (*m*) em δ 3,08 a δ 3,20 ppm e δ 2,63 a δ 2,75 ppm, referentes aos hidrogênios H-7''a H-7''b (CH₂), um *multipletos* (*m*) em δ 2,40 a δ 2,50 ppm referente ao H-5'' (CH) do anel **C**, vários *multipletos* (*m*), referentes aos 18 hidrogênios metilênicos (9 CH₂) entre δ 1,80 e δ 0,10 ppm, e dois *tripletos* referentes as metilas terminais observadas em δ 0,82 e δ 0,81 ppm para as duas cadeias laterais, uma de C₉H₂₀ e a outra de C₃H₈. Os sinais de baixa intensidade podem ser vistos no espectro com algumas regiões ampliadas na FIGURA 4.3.4.1-2.

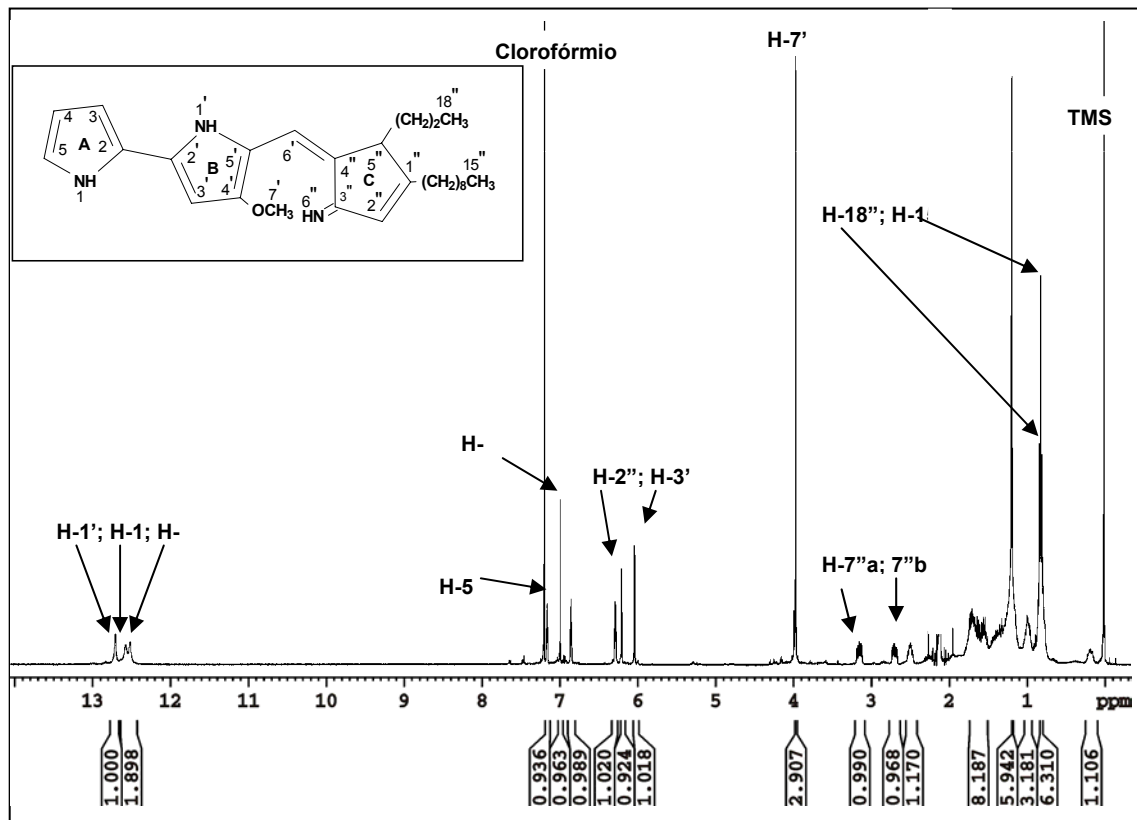


FIGURA 4.3.4.1-1: Espectro de RMN de ¹H da prodiginina com as integrais dos sinais (CDCl₃)

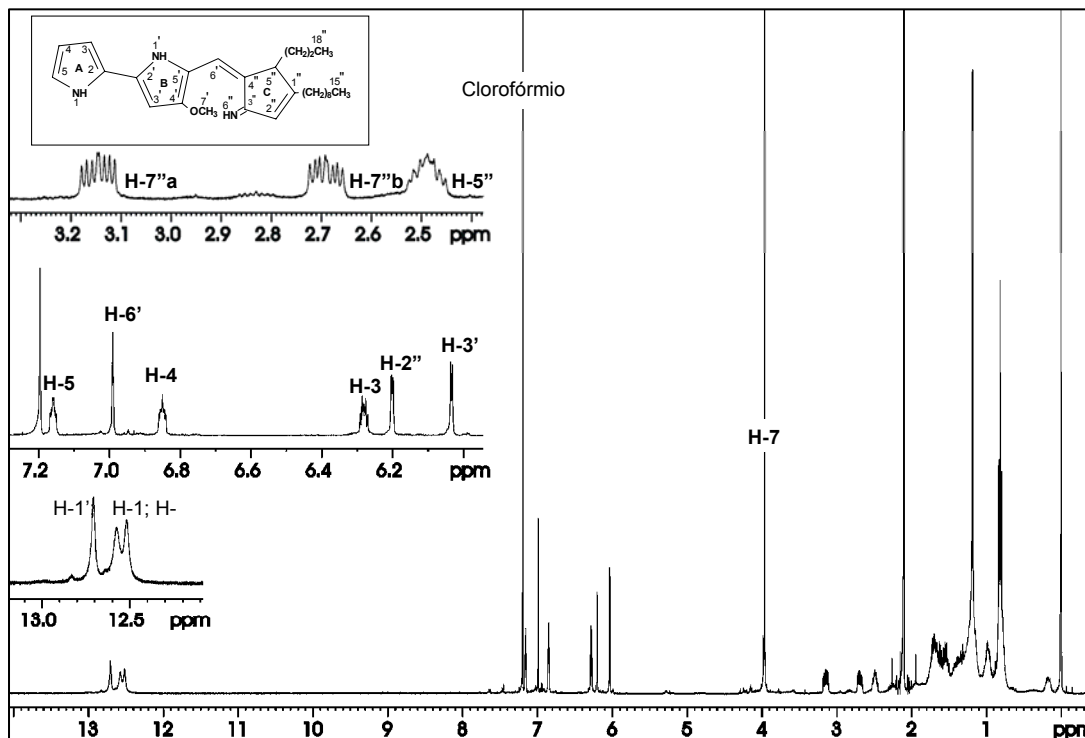


FIGURA 4.3.4.1-2: Espectro de RMN de ^1H da prodiginina com regiões ampliadas (CDCl_3)

O espectro de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (FIGURA 4.3.4.1-3) apresentou 27 carbonos, sendo 3 sp^3 , referentes as duas metilas e um da metoxila, 6 carbonos sp^2 referentes 5 carbonos aromáticos, 1 olefínico e 1 CH do anel imina (anel C). Os 7 carbonos quaternários (sp) também foram observados no espectro.

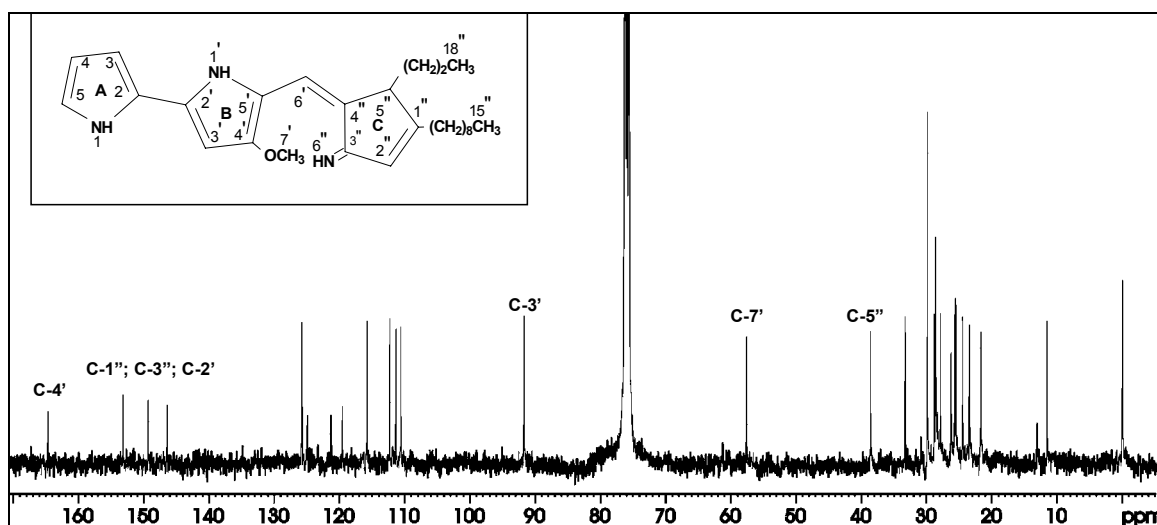


FIGURA 4.3.4.1-3: Espectro de $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ (100 MHz) da prodiginina dissolva em CDCl_3

O valores dos deslocamentos dos carbonos ligados diretamente a hidrogênios, foram atribuídos de acordo com o experimento de *g*HSQC (FIGURA 4.3.4.2-4), sendo eles δ 125,8 ppm (C-5), δ 115,3 ppm (C-4) e δ 110,6 ppm (C-3) do anel pirrólico **A**, δ 91,7 ppm (C-3'), em δ 57,7 ppm (metoxila) do anel pirrólico **B**, em δ 112,3 ppm (C-6'') (olefínico) e, em δ 111,4 ppm (C-2'') e o C-5'' em 38,6 do anel imina **C**. A obtenção do H-4'' referente ao CH do anel **C**, só foi possível através do experimento de DEPT-135 (FIGURA 4.3.4.1-5). Este CH é o que esta diferenciando a estrutura da prodiginina-14f1d/2-42 das estruturas das prodigininas encontradas na literatura.

Os carbonos das cadeias laterais C_9H_{20} e C_3H_8 também foram obtidos através do *g*HSQC, mas as posições dos carbonos ao longo da cadeia serão discutidos através dos experimentos *g*HMBC, *g*COSY e *g*NOE-1D, devido aos seus deslocamentos químicos serem muito próximos.

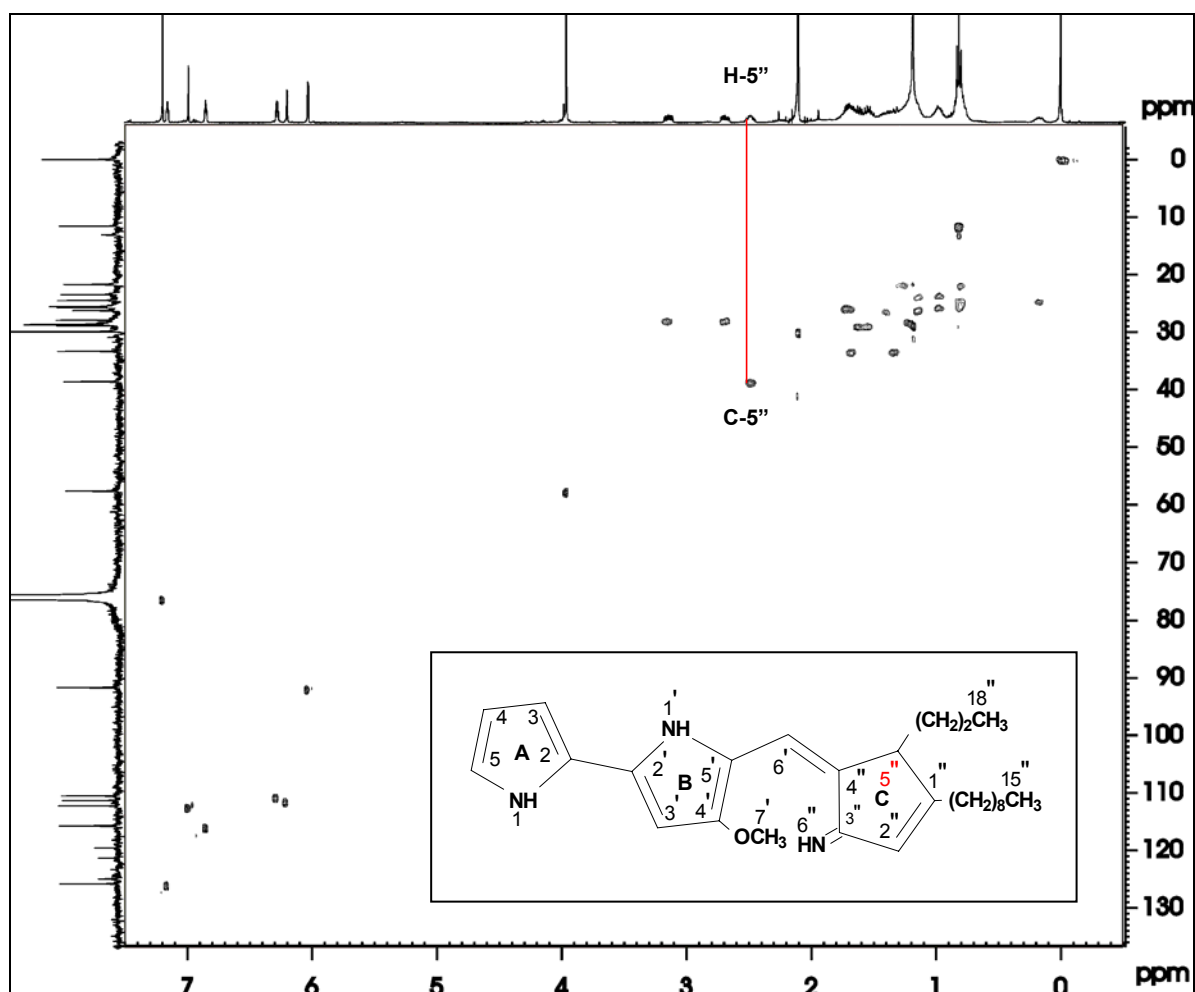


FIGURA 4.3.4.1-4: Espectro de *g*HSQC da prodiginina dissolvida em $CDCl_3$

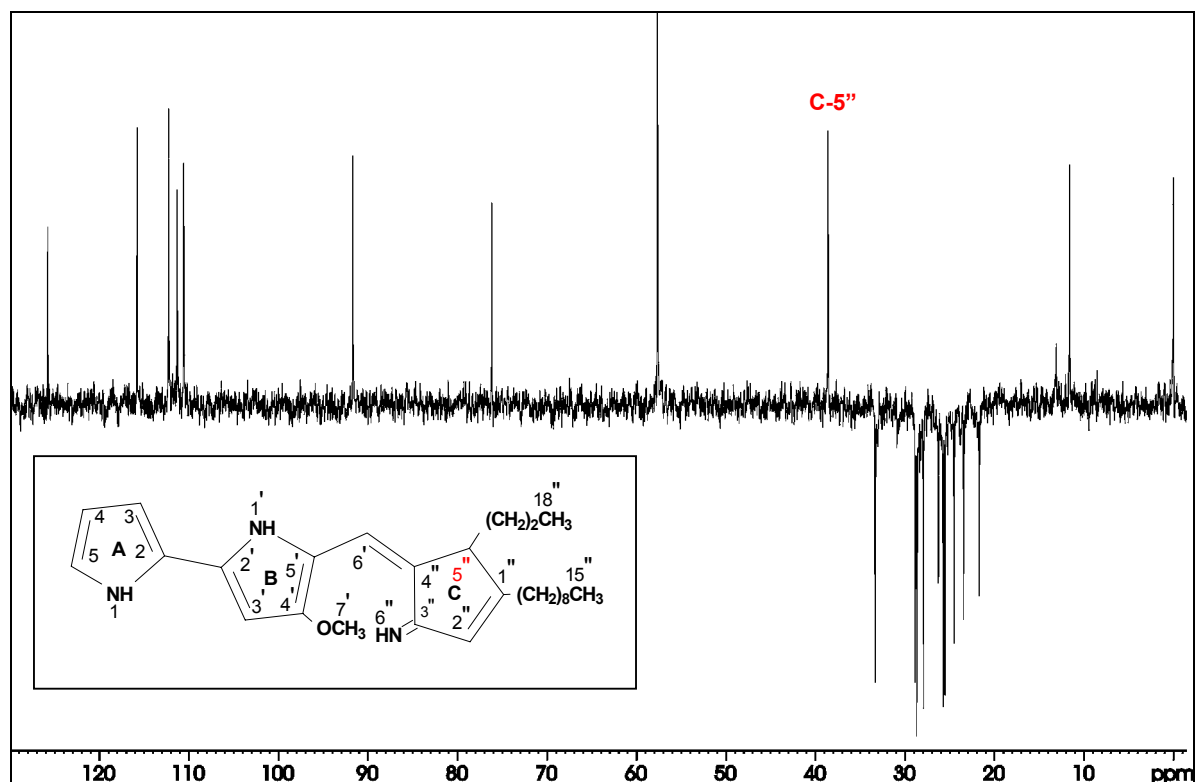


FIGURA 4.3.4.1-5: Espectro de DEPT-135 da prodiginina dissolvida em CDCl_3

No experimento de gHMBC o H-1' (FIGURA 4.3.4.1-6), o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel **B** apresentou correlação com o carbono em δ 164,7 ppm (C-4', anel **B**) e a metoxila em δ 3,96 ppm com o carbono em δ 164,7 ppm (C-4' anel **B**). As principais correlações estão representadas na FIGURA 4.3.4.1-7.

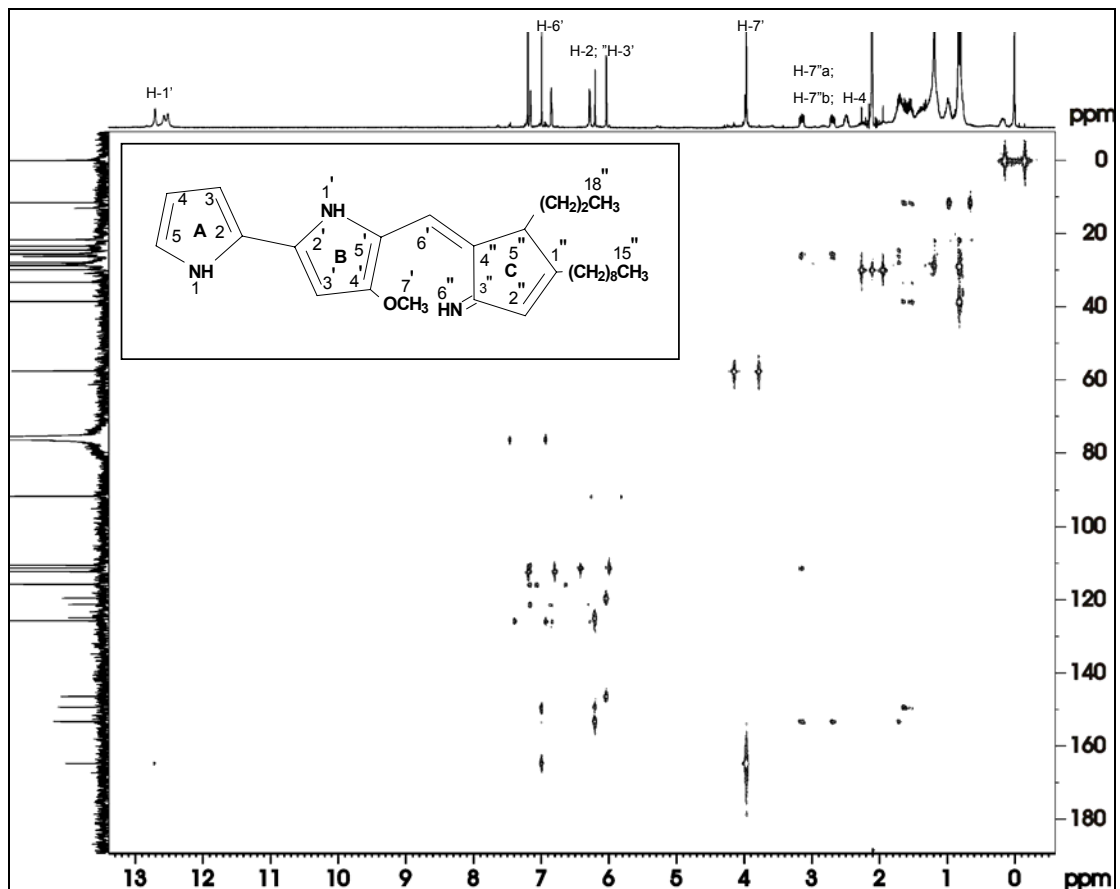


FIGURA 4.3.4.1-6: Espectro de gHMBC da prodiginina dissolvida em CDCl_3

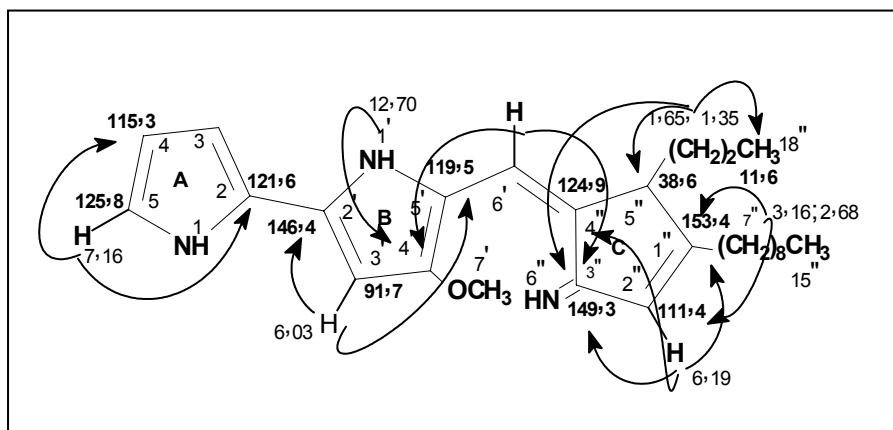


FIGURA 4.3.4.1-7: Principais correlações do gHMBC da prodiginina

Através do espectro de gCOSY (FIGURA 4.3.4.1-8 e 4.3.4.1-9) pode-se observar as principais correlações homonucleares $^1\text{Hx}^1\text{H}$. No espectro foram

observadas as seguintes correlações para o anel **A**: para o H-5 (δ 7,16 ppm) com os hidrogênios H-1 (N-H) em δ 12,57 ppm, com o H-3 (δ 6,86 ppm); para o H-1 em δ 12,57 ppm observou-se correlações com H-5 (δ 7,16 ppm) e com H-3 (δ 6,86 ppm); para o H-4 (δ 6,28 ppm) foi observado correlações tanto com o H-5 (δ 7,16 ppm) quanto para o H-3 (δ 6,86 ppm) e, ainda, com o hidrogênio ligado ao nitrogênio (H-1, δ 12,57 ppm); já para o H-3 (δ 6,86 ppm) observou-se também correlações com o H-4 em 6,28 ppm e com o H-1 em δ 12,57 ppm. Para o anel **B** observou-se somente uma correlação entre os hidrogênios H-3' (δ 6,03 ppm) com o H-1' (NH-1', δ 12,70 ppm). No anel **C** foram observados as correlações entre H-6'' (δ 6,19 ppm) com o H-1'' (NH-1'', δ 12,51 ppm), o H5'' (δ 2,48 ppm) com os H-16''a e b (δ 1,65 e δ 1,35 ppm) e com o H-17'' a e b (δ 1,63 e δ 1,55 ppm).

Adicionalmente, nas cadeias laterais foi possível atribuir algumas correlações, apesar da maioria delas estarem sobrepostas. Os H-16'' a e b (δ 1,65 e δ 1,35 ppm) correlacionam-se com o H-5'' em δ 2,48 ppm; o H-17'' a e b (δ 1,63 e δ 1,55 ppm) correlacionam-se com a metila H-18'' (0,82 ppm). As correlações estão apresentadas na FIGURA 4.3.4.1-10

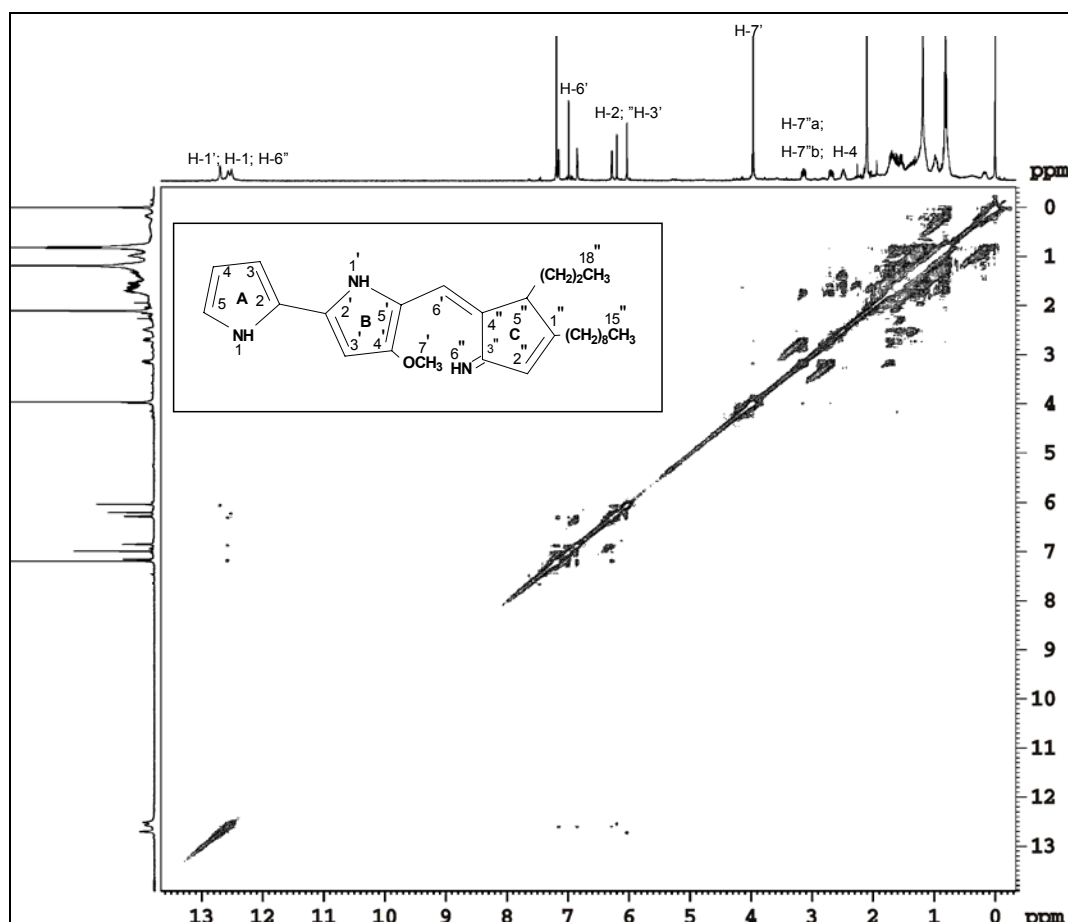


FIGURA 4.3.4.1-8: Espectro de gCOSY da prodiginina dissolvida em CDCl_3

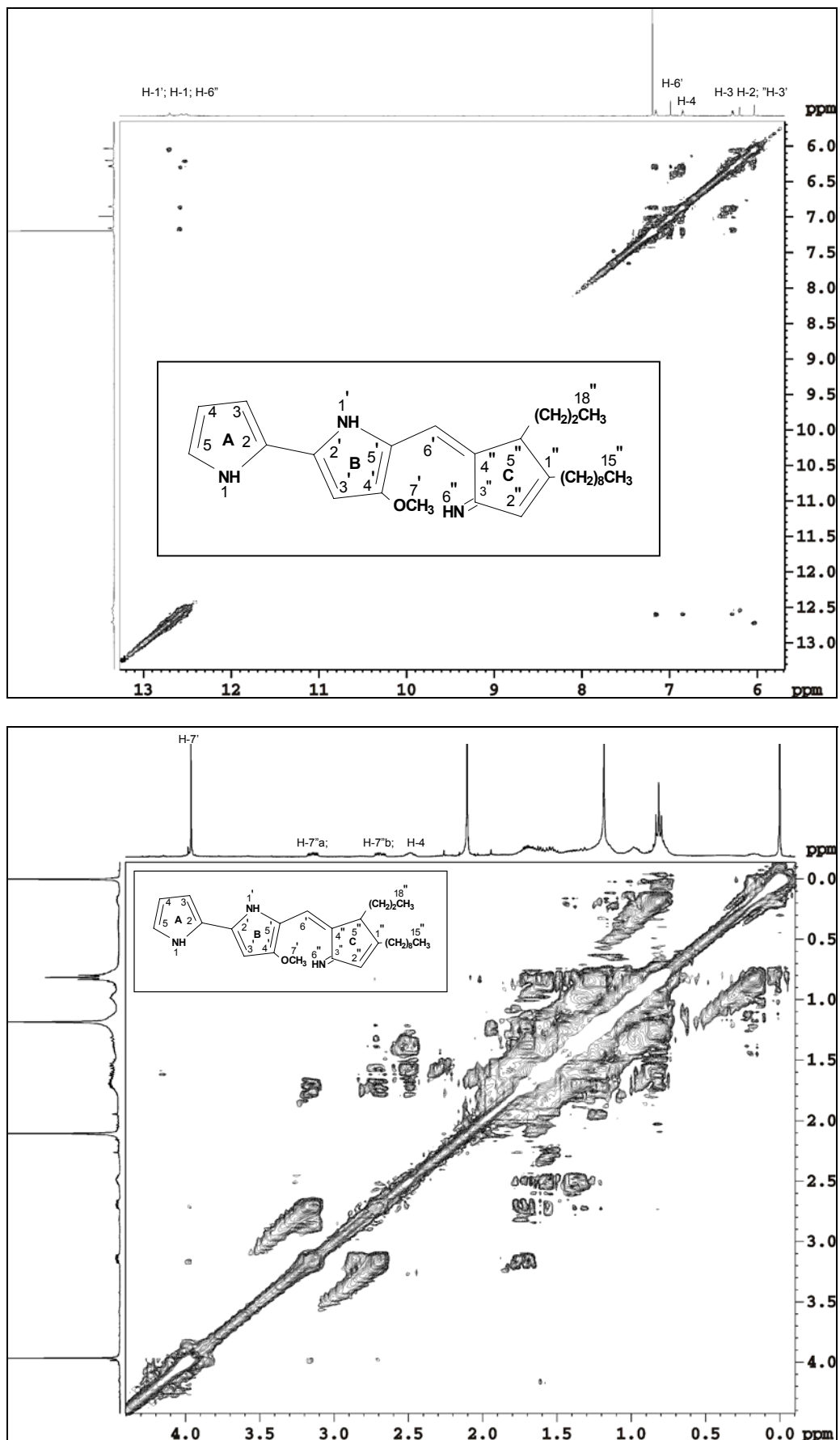


FIGURA 4.3.4.1-9: Ampliações do espectro de gCOSY da prodiginina dissolvida em CDCl₃

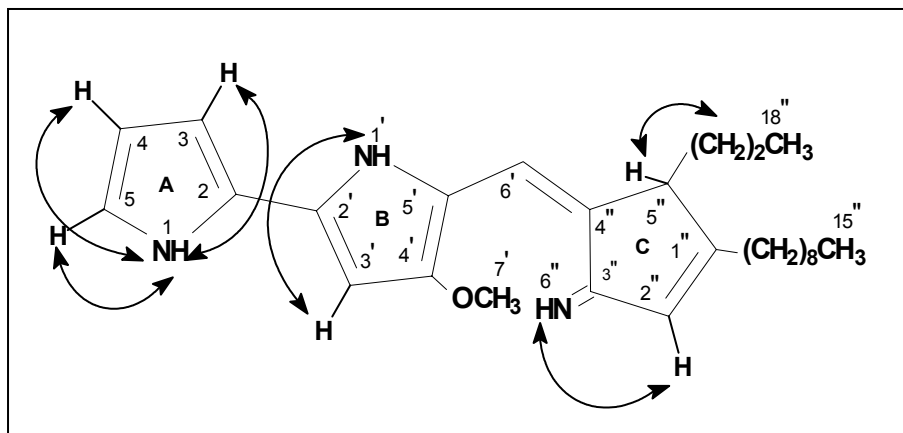


FIGURA 4.3.4.1-10: Principais correlações do gCOSY da prodiginina

As posições das cadeias laterais no anel **C**, bem como a posição do carbono ligado ao nitrogênio no mesmo anel foram confirmadas pelo experimento de $^1\text{H}\times^{15}\text{N}$ gHMBC ($^3J_{\text{NH}}$) (FIGURA 4.3.4.1-11). O espectro apresentou três correlações entre os hidrogênios H-3' (anel **B**, δ 6,03 ppm) com o nitrogênio em δ 157,6 ppm (anel **C**), H-6' (olefínico em δ 6,99 ppm) com o nitrogênio do anel **B** em δ 157,6 ppm e com o nitrogênio do anel **C** em δ 133,6 ppm e finalmente o H-2'' (anel **C**, δ 6,19 ppm) correlacionou-se com o nitrogênio em δ 133,6 ppm, também no anel **C**. Entretanto, este espectro não apresentou nenhuma correlação de hidrogênios com o nitrogênio do anel **A** como esperado.

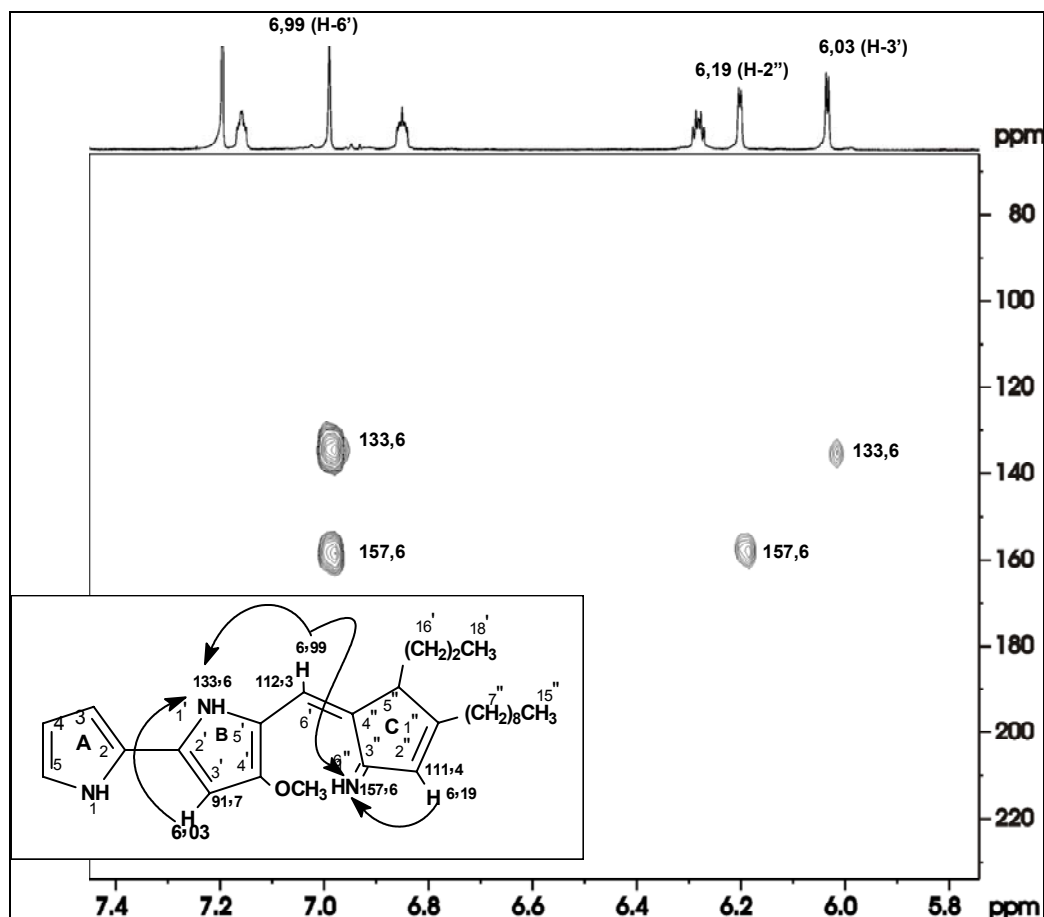


FIGURA 4.3.4.1-11: Espectro de $^1\text{H}\times^{15}\text{N}$ gHMBC ($^3J_{\text{NH}}$) da prodiginina dissolvida em CDCl_3

Adicionalmente, as posições das cadeias laterais (C_3H_8 e C_8H_{18}), do carbono ligado a nitrogênio (C-3'') e do H-6'' do anel **C** foram confirmadas através do experimento de gNOESY-1D.

No experimento de gNOESY-1D, cujo espectro esta representado na FIGURA 4.3.4.1-12 a irradiação foi feita selecionando-se a frequência em δ 2,48 ppm, referente ao hidrogênio H-5'' (anel **C**), observando-se NOE com o hidrogênio olefínico H-6' (δ 6,99 ppm) e com a metila em δ 0,82 ppm (H-18''), definindo, deste modo, a posição da cadeia lateral C_3H_8 . Quando, irradiou-se a metoxila com frequência em δ 3,96 ppm, referente ao H-7' (anel **B**), foi observado NOE com o hidrogênio metilênico em δ 1,72 ppm referente ao H-8'' da cadeia lateral C_8H_{18} . Já o hidrogênio em δ 6,99 ppm (H-6') quando irradiado apresentou NOE com o H-5'' (δ 2,48 ppm, anel **C**), confirmando o NOE, quando este foi irradiado. Quando, o sinal em δ 7,16 ppm, referente ao H-5 (anel **A**) foi irradiado, observou-se NOE em H-4 (δ

6,28 ppm, anel **A**) e também com o H-1 (N-H, δ 15,57 ppm, anel **A**). Esta correlação do H-5 do anel **A** com o hidrogênio ligado ao nitrogênio, confirma a correlação observada no experimento de gCOSY.

Através dos resultados obtidos nos experimentos pôde-se concluir que, a posição das cadeias laterais, bem como, a posição do carbono 3'' no anel **C**, só foram possíveis através do efeito nuclear *Overhauser*, sem o qual, seria muito difícil a determinação do anel **C**, visto que, este apresenta um modificação em relação aos encontrados na literatura.

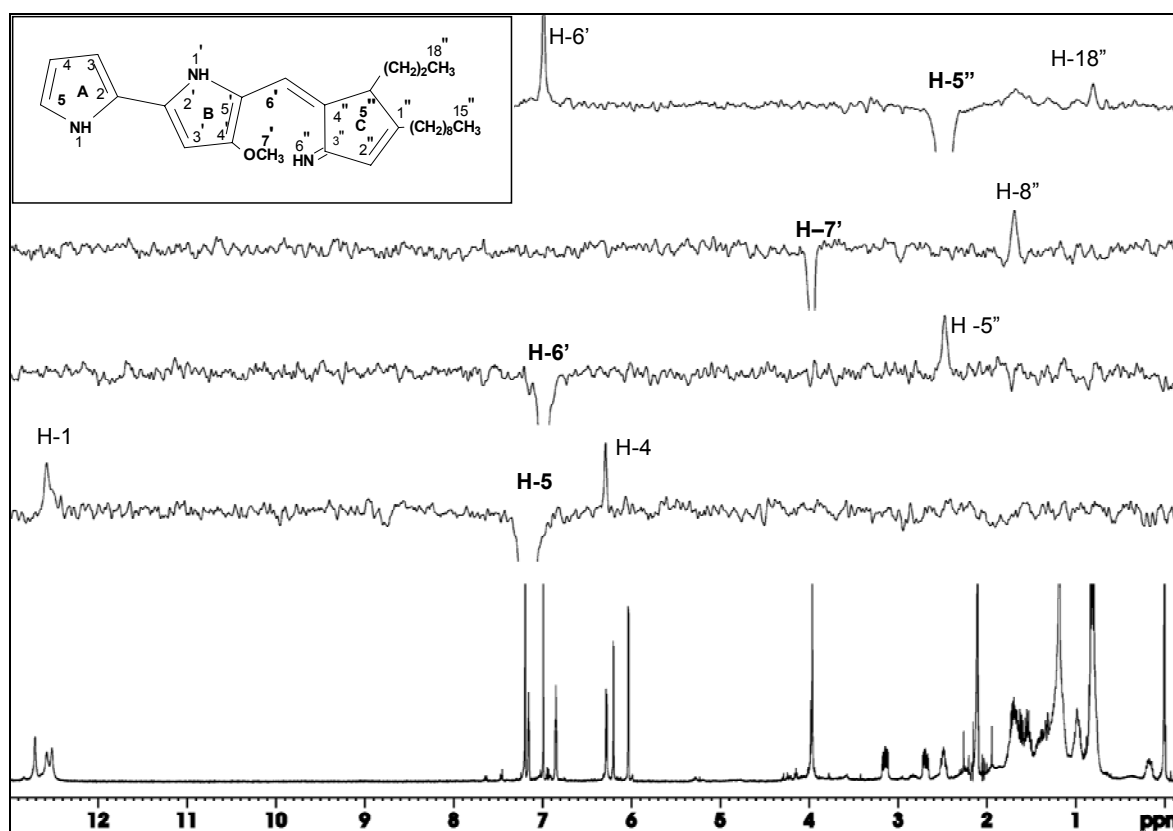


FIGURA 4.3.4.1-12: Espectro de gNOESY-1D da prodiginina dissolvida em CDCl_3

As correlações observadas no experimento de gNOESY-1D estão representadas na FIGURA 4.3.4.1-13 e a estrutura em representação 3D na FIGURA 4.3.4.1-14.

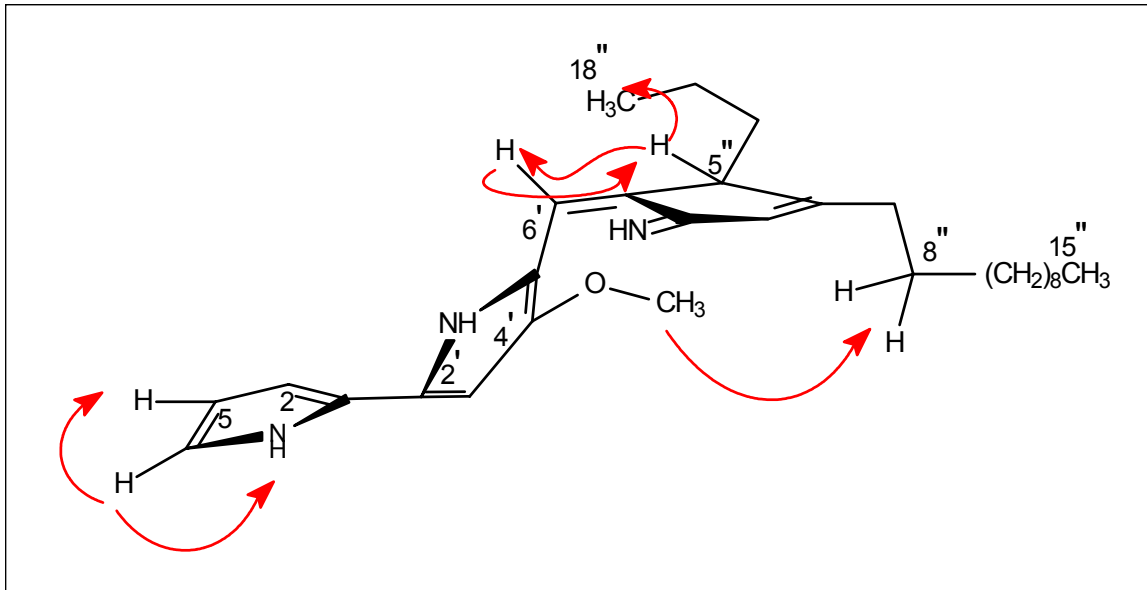


FIGURA 4.3.4.1-13: Correlações do gNOESY-1D

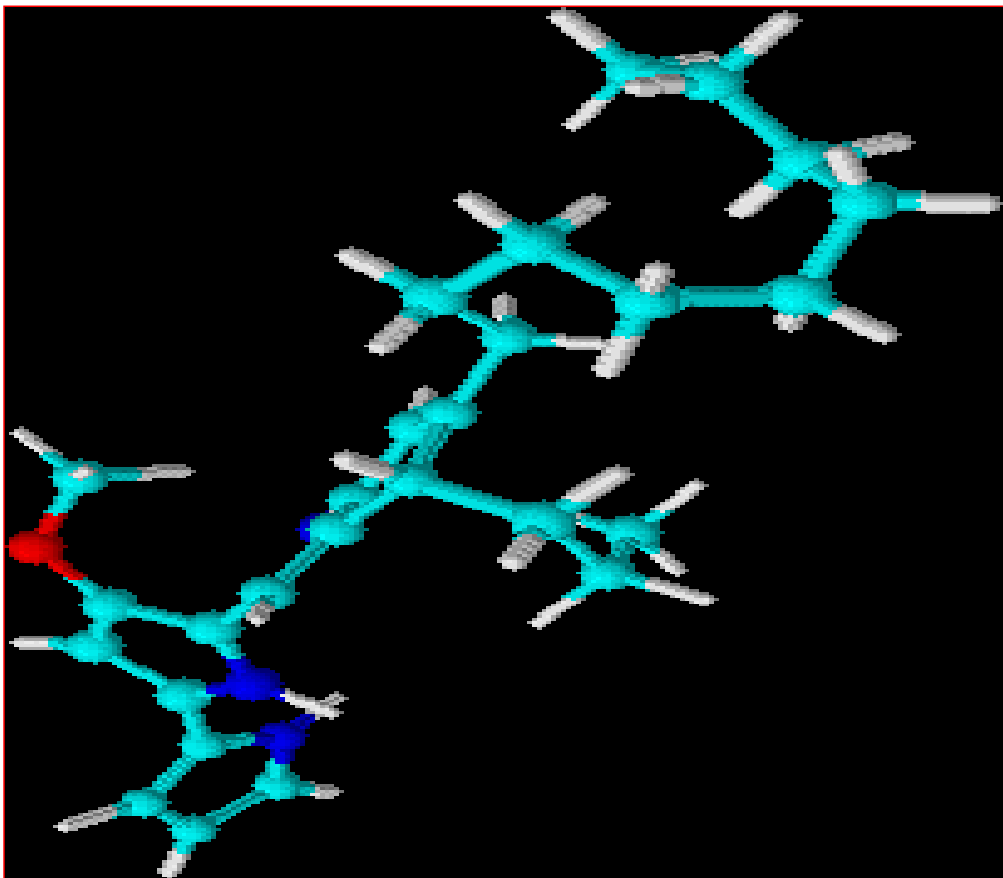


Figura 4.3.4.1-14: Estrutura da prodiginina em representação 3D (ACD/3D Viewer)

A estrutura da prodiginina foi confirmada por experimentos de espectrofotometria massas, utilizando um probe de *eletrospray*, no modo positivo de ionização (FIGURA 4.3.4.1-15), que apresentou o pico do íon molecular íon m/z 422,3049 $[M+H]^+$, indicando a fórmula molecular $C_{27}H_{39}N_3O$. Essa relação massa/carga *par* (m/z 422,3049) confirma a presença de nitrogênio na molécula.

No experimento de MS/MS foi observado dois íons m/z 407,2987 $[M+H-15]^+$ em 100% (pico base), correspondente a perda de uma metila e o íon m/z 392,2501 $[M+1-30]^+$, referente a perda uma molécula de etano (FIGURA 4.3.4.1-16).

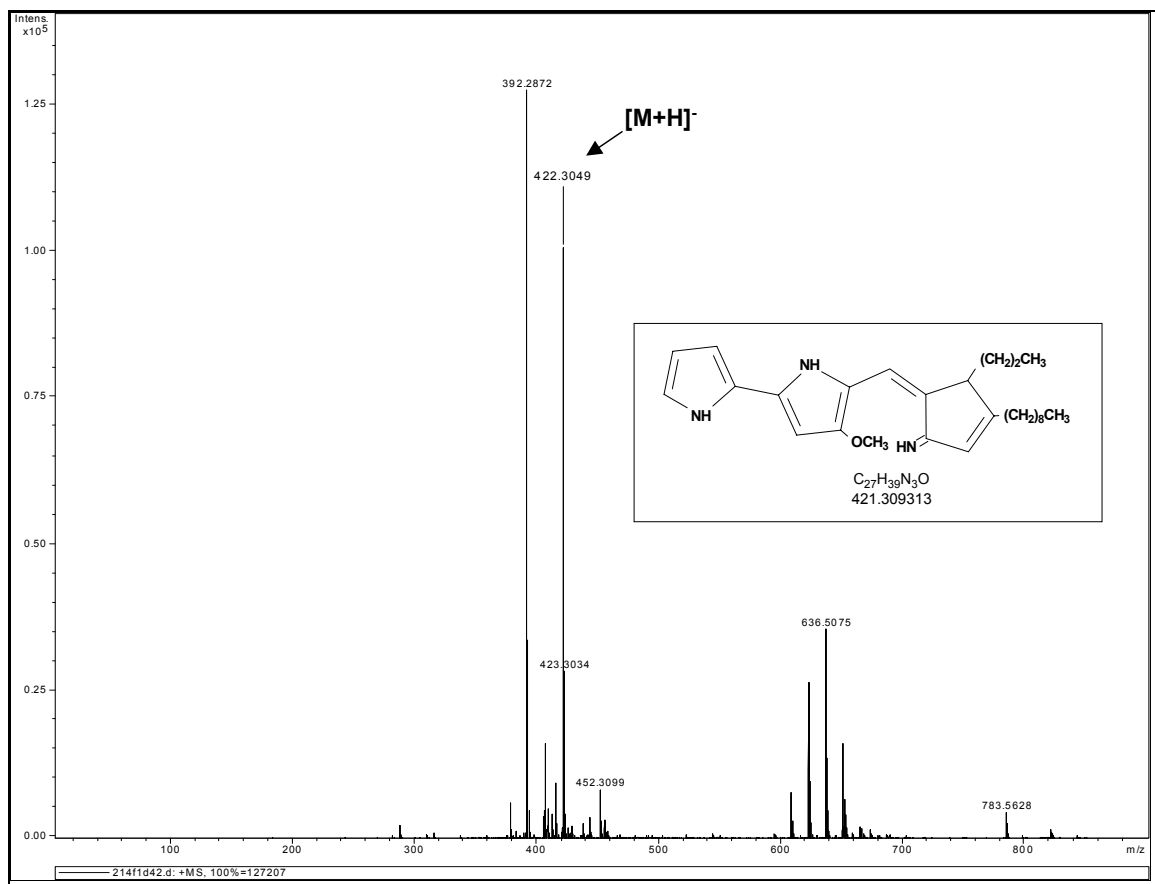


FIGURA 4.3.4.1-15: Espectro de Massas (*Full scan*) via *Elestrospray* modo positivo (ESI⁺)

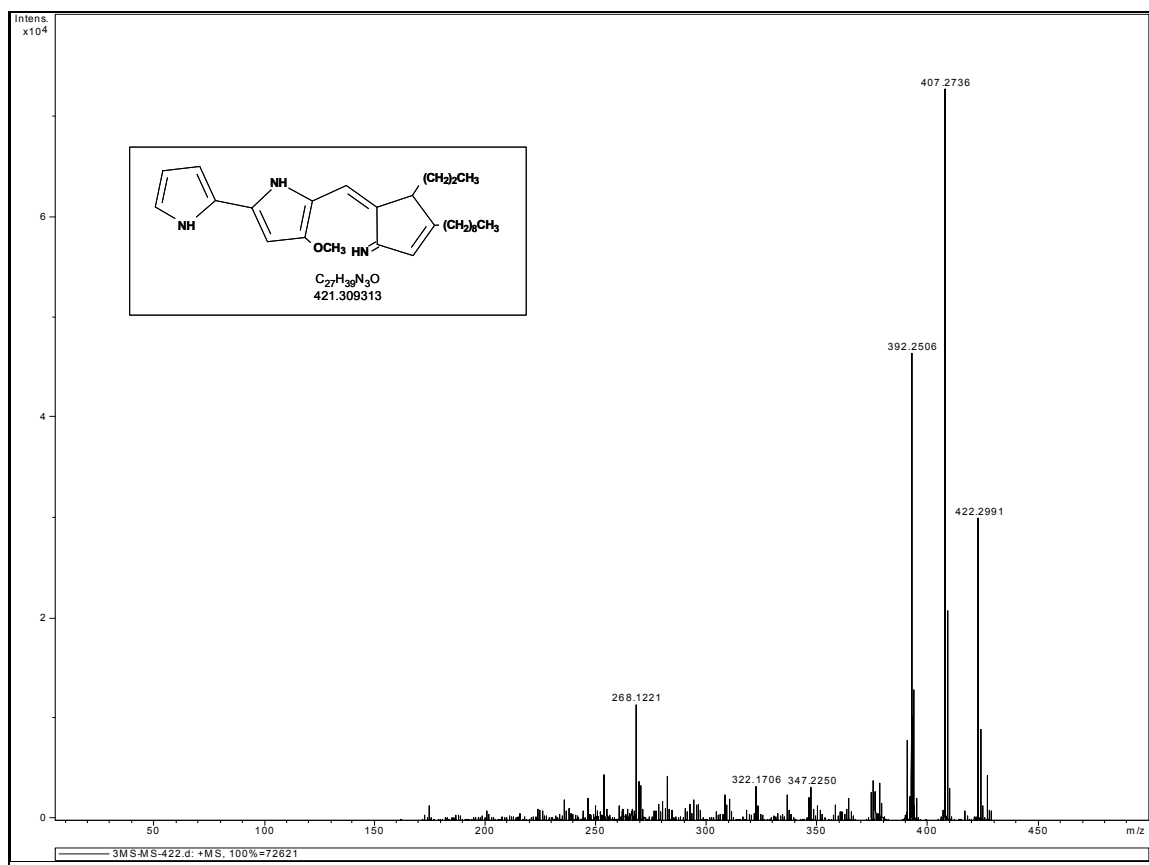


FIGURA 4.3.4.1-16: Espectro de MS/MS para m/z 422,2987 via ESI, modo positivo

Através das correlações obtidas nos experimentos do *g*COSY e *g*NOESY-1D foi possível atribuir o H-1 (H-N) do anel **A**, porque no experimento de ¹H-¹⁵N *g*HMBC (comentado anteriormente), não apresentou nenhum hidrogênio correlacionando com o nitrogênio do anel **A**. Como a estrutura proposta para a nova prodiginina apresenta o anel **A**, sem nenhuma modificação, em comparação com os dados encontrados na literatura (SONG *et al.*, 2006) para os hidrogênios aromáticos e para o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel **A** (FIGURA 4.3.4.1-17) foi possível confirmar a estrutura para a substância 14f1d/242 (FIGURA 4.3.4.1-18).

A substância isolada pertence a uma classe especial de alcalóides conhecidos como prodigininas. As prodigininas pertencem a uma grande família de antibióticos oligopirrol pigmentado com alto potencial medicinal como imunossupressores e agentes antitumorais, que são produzidos por vários actinobactérias e outras eubactérias (CERDENO *et al.*, 2001).

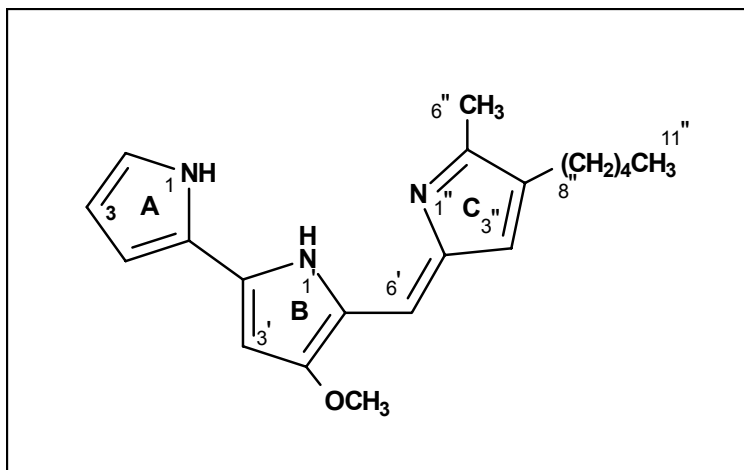
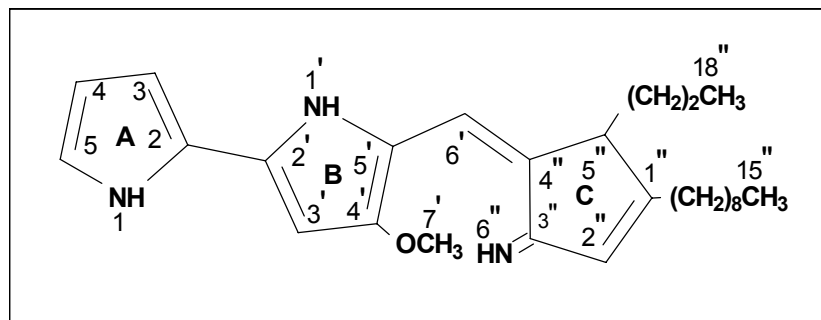
FIGURA 4.3.4.1-17: Estrutura da Prodigiosina (SONG *et al*, 2006)

FIGURA 4.3.4.1-18: Estrutura da nova prodiginina

Os deslocamentos químicos da prodigiosina (prodiginina) da literatura e os deslocamentos químicos da substância 14f1d/242 estão apresentados na TABELA 4.3.4.1-1 e TABELA 4.3.4.1-2 respectivamente.

TABELA 4.3.4.1-1: Deslocamentos químicos em ppm de RMN de ^1H , ^{13}C (SONG *et al*, 2006) para a prodigiosina

| Posição | $\bar{\delta}$ RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}$ (ppm) | $\bar{\delta}$ RMN ^1H (ppm) |
|---------|--|---------------------------------------|
| 1 | - | 12,57 (<i>sl</i>) |
| 2 | 127,21(CH) | 7,26 (<i>m</i>) |
| 3 | 111,97 (CH) | 6,39 (<i>m</i>) |
| 4 | 117,26 (CH) | 6,95 (<i>m</i>) |
| 5 | 122,52 (C) | - |
| 1' | - | 12,70 (<i>sl</i>) |
| 2' | 147,98 (C) | - |
| 3' | 93,7 (CH) | 6,11 (<i>d</i>) |
| 4' | 166,02 (C) | - |
| 5' | 120,97 (C) | - |
| 6' | 116,29 (CH) | 6,99 (<i>m</i>) |
| 7' | 58,95 (OCH ₃) | 4,04 (<i>s</i>) |
| 2" | 125,42 (C) | - |
| 3" | 128,67CH | 6,71 (<i>dl</i>) |
| 4" | 128,77 (C) | - |
| 5" | 120,97(C) | - |
| 6" | 12,69 CH ₃ | 2,58 (<i>s</i>) |
| 7" | 25,58 (CH ₂) | 2,44 (<i>t</i>) |
| 8" | 30,05 (CH ₂) | 1,59 (<i>m</i>) |
| 9" | 31,68 (CH ₂) | 1,31 (<i>m</i>) |
| 10" | 22,24 CH ₂ | 1,34 (<i>m</i>) |
| 11" | 14,24 CH ₃ | 0,93 (<i>t</i>) |

TABELA 4.3.4.1-2: Deslocamentos químicos em ppm de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, gHSQC, gHMBC, gCOSY e ^1H - ^{15}N gHMBC

| Átomo | δ RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT-135}(\text{ppm})$ | δ RMN ^1H (ppm) | gHSQC | gHMBC | gCOSY | $^1\text{H}^{15}\text{N}$ gHMBC | gNOE-1D |
|---------|--|---------------------------------|-------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------|
| 1 | - | 12,57 (<i>sl</i>) | - | - | 6,28; 6,86; 7,16 | - | - |
| 2 | 121,3 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 115,3 (CH) | 6,86 (<i>m</i>) | 115,3 | 121,3; | 6,28 12,57 | - | - |
| 4 | 110,6 (CH) | 6,28 (<i>m</i>) | 110,6 | 125,8; | 6,86; 7,16; 12,57; | - | - |
| 5 | 125,8 (CH) | 7,16 (<i>m</i>) | 125,8 | 115,3; 121,3; | 6,28;12,57 | - | 12,57; 6,28 |
| 1' | - | 12,70 (<i>sl</i>) | - | 164,7 | 6,03 | - | - |
| 2' | 146,4 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 3' | 91,7 (CH) | 6,03 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz) | 91,7 | 119,5; 146,4 | 12,70 | 133,6 | - |
| 4' | 164,7 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 5' | 119,5 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 6' | 112,3 (CH) | 6,99 (<i>m</i>) | 112,3 | 149,3; 164,7 | - | 133,6; 157,6 | 2,48 |
| 7' | 57,7 (OCH ₃) | 3,96 (<i>s</i>) | 57,7 | 164,7 | - | - | 1,72 |
| 1'' | 153,2 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 2'' | 111,4 (CH) | 6,19 (<i>d</i> ; $J = 1,8$ Hz) | 111,4 | 124,9; 149,3; 153,2 | 12,51 | 157,6 | - |
| 3'' | 149,3 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 4'' | 124,9 (C) | - | - | - | - | - | - |
| 5'' | 38,6 (CH) | 2,48 (<i>m</i>) | 38,6 | - | 1,35; 1,55 | - | 6,99; 0,82 |
| 6'' N-H | - | 12,51(<i>sl</i>) | - | - | -6,19 | - | - |
| 7''a | | 3,16 (<i>m</i>) | | 25,7; 26,3; 111,4; 153,2 | 2,69; 1,72 | - | - |
| 7''b | 27,9 (CH ₂) | 2,69 (<i>m</i>) | 27,9 | 25,7; 26,3; 153,2 | 3,16; 1,72 | - | - |
| 8'' | 25,7 (CH ₂) | 1,72 (<i>m</i>) | 25,7 | 24,5; 27,9, 153,4 | 2,69; 3,16 | - | - |
| 9'' | 26,3 (CH ₂) | 1,16 | 26,3 | 21,7; 23,5; | 1,193 | - | - |
| 10''a | 24,5 (CH ₂) | 0,82 | 24,5 | 28,7; 21,7 | - | - | - |
| 10''b | | 0,19 | | | | | |
| 11''a | 21,7 (CH ₂) | 1,27 | 21,7 | 26,3 | 0,82 | - | - |
| 11''b | | 0,815 | | | | | |
| 12''a | 23,5 (CH ₂) | 1,14 (<i>m</i>) | 23,5 | - | 0,82 | - | - |
| 12''b | | 0,98(<i>m</i>) | | | | | |
| 13'' | 28,7 (CH ₂) | 1,19 (<i>m</i>) | 28,7 | 21,7; 23,5; 24,5; | - | - | - |
| 14'' | 25,5 (CH ₂) | 0,98 (<i>m</i>) | 25,5 | - | - | - | - |
| 15'' | 13,1 (CH ₃) | 0,82 (<i>t</i>) | 13,1 | 21,7 | 0,193 | - | - |
| 16''a | 33,4 (CH ₂) | 1,65 (<i>m</i>) | 33,4 | 11,6; 38,6; | - | - | - |
| 16''b | | 1,35 (<i>m</i>) | | 149,3; | | | |
| 17''a | | 1,63 (<i>m</i>) | 28,9 | 11,6; 38,6, | 0,81 | - | - |
| 17''b | 28,9 (CH ₂) | 1,55(<i>m</i>) | - | 149,3; 33,4 | 0,81 | - | - |
| 18'' | 11,6(CH ₃) | 0,81 (<i>t</i>) | 11,6 | 28,9; 38,9 | - | - | - |

A substância 14f1d/242 apresenta dois anéis pirrólicos **A** e **B** como descrito na literatura, porém no anel **C**, ela apresenta uma modificação em comparação as substâncias desta classe de antibióticos (FIGURA 4.3.4.1-19).

Portanto, através dos dados obtidos nos experimentos de RMN, juntamente com os dados da literatura, conclui-se que a substância é inédita e o seu nome foi atribuído de acordo com dados da literatura para o anel **A** e **B** e o anel **C** seguindo regras da IUPAC [2,2'-Bi-1,1'-H-pirrol-4-metoxi-5[(6''H-3''-imina-1''-nonil-5''-propil-4''H-pirrol-) metil].

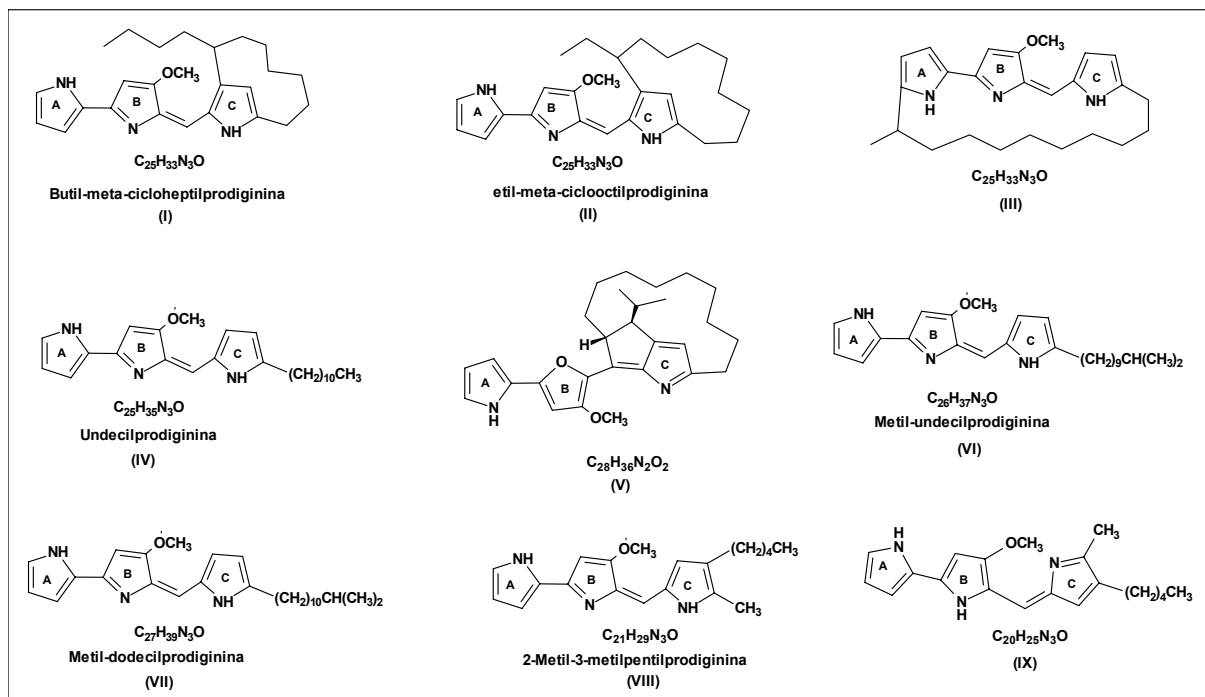
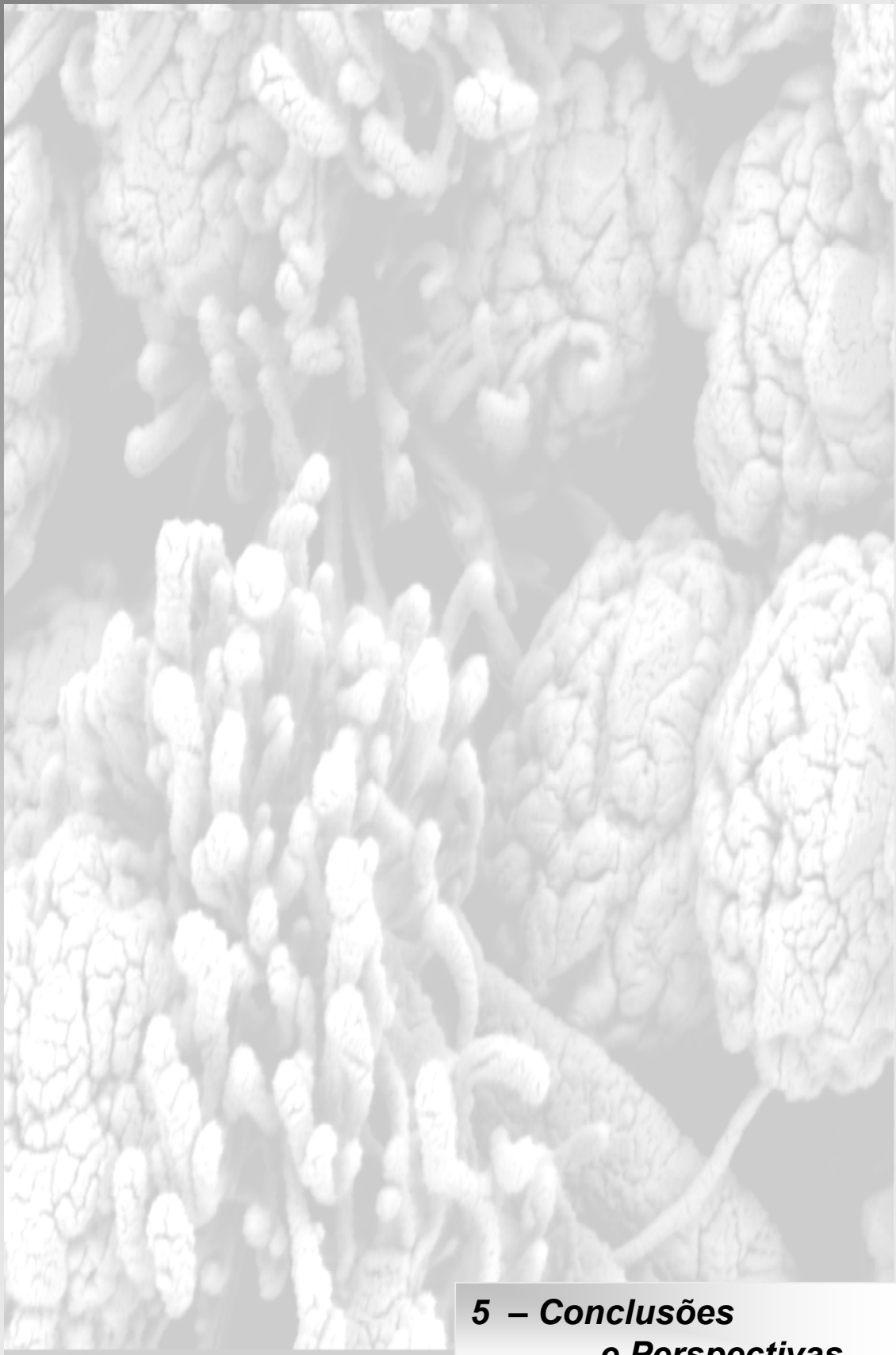


FIGURA 4.3.4.1-19: Estruturas de algumas prodigininas produzidas por actinobactérias



**5 – Conclusões
e Perspectivas**

5 – Conclusões e Perspectivas

As espécies dos fungos Cat1.1 e Casp5 do gênero *Penicillium*, apresentam potencial biotecnológico, porque produzem a citrinina e o ácido micofenólico. Além disso, apresentam características importantes de interesse das indústrias tais como: produzem as substâncias em grande quantidade, liberam as substâncias para o meio líquido, tornando, deste modo, o processo de extração muito simples e rápido, sendo necessário apenas uma otimização do pH para sua realização.

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho nos permite concluir que, a Ressonância Magnética Nuclear apresenta um grande potencial para quantificação de substâncias produzidas por microrganismos, bem como, na otimização das condições físicas e químicas do meio de cultura e da extração.

A técnica de RMN, além de mostrar-se eficiente para a quantificação da citrinina e do ácido micofenólico, apresenta algumas vantagens sobre as outras técnicas utilizadas como, o tempo de aquisição dos experimentos é muito rápido em relação as demais, a quantificação da substância foi feita sem nenhuma manipulação ou purificação da amostra, apenas uma otimização no pH do meio de cultivo para as extrações. Esta técnica permitiu ainda, o acompanhamento de todo o processo de produção desses metabólitos, como a composição do meio de cultura, o consumo da glicose e do extrato de levedura pelo fungo durante o período de fermentação, o início e a máxima produção do metabólito secundário e o momento em que o fungo passa a metabolizar a substância produzida como fonte de carbono. Adicionalmente, os experimentos com a citrinina dissolvida em diferentes solventes e os espectros adquiridos em diversas temperaturas, além de mostrar a influência desta, nas ligações de hidrogênios e no equilíbrio dinâmico das formas *o*-quinina e *p*-quinona, fornecendo subsídios para credibilidade do método de quantificação da mesma.

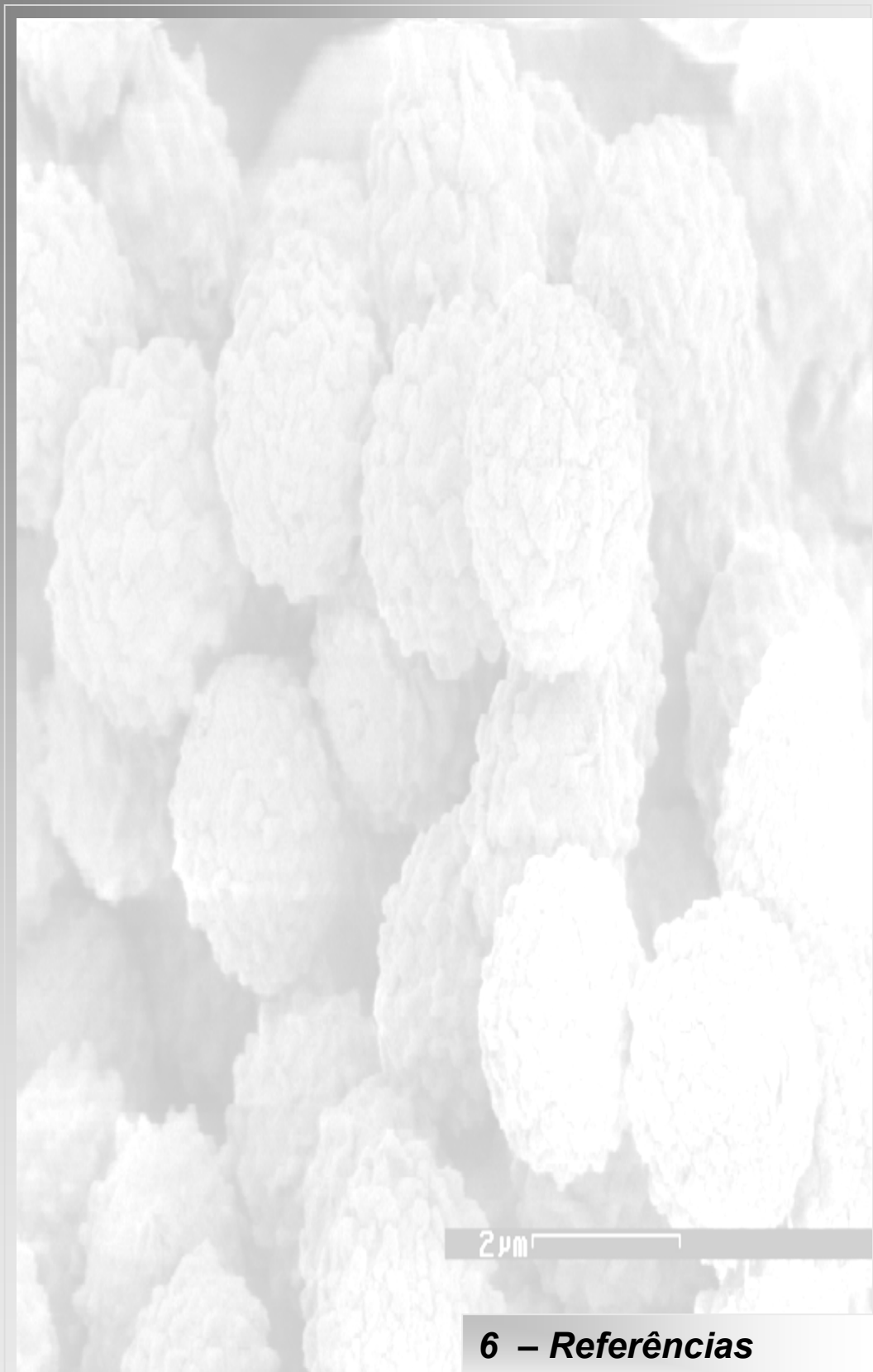
Quanto aos experimentos de RMN realizados com o objetivo de avaliar a influência do tempo de esterilização do meio de cultivo e o modelo de autoclave, foi observado importante contribuição para a otimização de produção de metabólitos.

Os resultados obtidos dos experimentos de RMN de ^1H do cultivo do fungo *Penicillium* sp. Cat11.1 utilizando águas minerais, mostram a possibilidade de utilização de algumas destas águas para produção da citrinina, ao invés da água destilada com adição de minerais, o que levaria a uma redução no custo de produção e tempo de preparo do meio.

Através dos experimentos de RMN foi possível atribuir todos os deslocamentos dos carbonos e dos hidrogênios das duas formas isoméricas da citrinina metoxilada. Os resultados obtidos dos experimentos de RMN, aliada a técnica de EM e do teste citotóxico *in vitro*, confirmou que os isômeros da citrinina metoxilada são estáveis e, provavelmente foram produzidos na cromatografia de coluna e não em solução (metanol) durante as análises de RMN, como descrito na literatura.

Os experimentos de RMN foram suficientes para elucidação da estrutura da nova prodiginina com modificação no anel **C**. Entretanto, os experimentos do *g*NOESY-1D foram fundamentais na determinação das posições das cadeias laterais e do carbono ligado ao nitrogênio no anel **C**.

De maneira geral, após a obtenção dos resultados, podemos concluir que a RMN é uma técnica que poderá ser utilizada na quantificação da citrinina e do ácido micofenólico visando uma otimização da produção em escala industrial, bem como na obtenção de um mutante dos fungos *Penicillium* sp. Cat11.1 e *Penicillium* Casp5, devido à importância destas substâncias para a indústria farmacêutica.



**6 – Referências
Bibliográficas**

6 – Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E.P. “The effect mycophenolic acid on the growth of *staphylococcus aureus* in heart broth V”. *The Journal of Antibiotics* **39**: 398-408, 1945.

ANDO, K.; SUZUKI S.I; TAMURA, G.; ARIMA, K. “Antiviral activity of mycophenolic acid studies on antiviral and antitumor antibiotics IV”. *The Journal of Antibiotics*, **21** (11): 649-652, 1968.

ARAUJO, J. M. “Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos”. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998, 352 p.

ARAUJO, J. M. “Genética e melhoramento de *Streptomyces*”. In: MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 223-244, 2002.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; McCOY, K. D.; WANG, R. “The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*”. **4**: 14-19, 1996.

BIRKINSSHAW J. H.; RAISTRICK, H.; ROSS, D.J. “Studies in Biochemistry of Micro-organisms”. *Biochemical Journal* **50**: 630-634, 1952.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G., “Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação”. São Carlos, Editora da UFSCar, 2001, 77 p.

CERDENO, A. M.; BIBB, M. J.; CHARLIS, G. L. “Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coecoler* A3 (2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes”. *Chemistry & Biology*. **8**: 817-829, 2001.

CHATER, K F. & HOPWOOD, D A. “*Streptomyces*”. In: Sonenshein A L, HOCH J A, LOSICK R., editors. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 83–89, 1993.

CHATER, K. F. & HOPWOOD, D. A. *Streptomyces* genetics. In: GOODFELLOW, M.; MERDASK, M.; WILLIAMS, T. *The Biology of Actinomycetes*. London, UK: Academic Press, 229-286, 1984.

CLARIDGE, T.D.W. "High-resolution NMR techniques in organic chemistry". *Tetrahedron Organic Chemistry Series*, Oxford, Pergamon Press, vol. **19**, 1999, 382 p.

CLUTTERBUCK, P. W. & RAISTRICK, H. *Journal of Biochemistry*. **27**: 643-654, 1933.

CLUTTERBUCK, P. W.; Oxford, A. E.; RAISTRICK, h.; SMITH, G. "Studies in the biochemistry of microorganisms XXIV. The metabolic products of the *Penicillium Brevi-compactum* series". *Biochemical Journal*, 1442-1458, 1932.

COSTA, F. G. "Potencial Biotecnológico de Actinomicetos Endofíticos de Milho" (*Zea mays* L.). São Paulo - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/Instituto de Pesquisas Tecnológica, 2005, Dissertação de Mestrado, 89 p.

CROSS, T. "Growth and examination of actinomycetes: some guidelines". In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Willians & Wilkins, **4**: 2340-2343, 1989.

DEMAIN, A. I. "Regulatory mechanisms and the industrial production of microbial metabolites". *Lloydia*, **31**: 395-418, 1968.

DEMAIN, A. I. "Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry". In: SECONDARY metabolites: their function and evolution. Chichester: J. Wiley, (Ciba Foundation Symposium, **171**: 3-23, 1992.

EUROPEAN MYCOTOXIN AWARENESS NETWORK - BASIC FACT SHEET 9 CITRININ. www.lfra.co.uk/eman2/fsheet9.asp, agosto, 2007.

GERBER, N. N. "Prodigiosin-like pigments CRC Crit". *Review Microbiology*, **3**: 469-485, 1975.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S. "Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4": Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **28**: 303-310, 2002.

GILLIVER, K. "The inhibitory action of antibiotics on plant pathogenic bacteria and fungi". *Annals of Botany*, N.S. **10** (39): 271-282, 1946.

GRIFFIN, P. B. & THOMAS N. H. "The Negritos: Disappearing hunter-gatherers of

Southeast Asia". In Göran Burenhult (ed.), *The Illustrated history of humankind*, 5: Traditional peoples today,. New York: Harper Collins and American Museum of Natural History, 1994, 71p.

HANCOCK, J.; MAGYAROSY, A.; BECKER, J. O.; KOIKE, S.; MAY, D.; POINAR, E. "Role of soil microbial community in suppression of *Rhizoctonia stem* rot cauliflower": final report december 1998.

HIROTA, M., MENTA, A. B., YONEYAMA, K.; KITABATAKE, N. A. "major decomposition product, citrinin H₂, from citrinin on heating with Moisture". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **66** (1): 206–210, 2002.

JONES, E. L.; EPINETTE, W. W., HACKNEY, V. C.; MENENDEZ, L.; FROST, P. "Treatment of psoriasis with oral mycophenolic acid". *The Journal of Investigative Dermatology*, **65** (6): 537-542, 1975.

KITABATAKE, N.; TRIVEDI, A. B.; DOI, E. "Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** (12): 2240–2244, 1991.

KOLOMLET, E. I. "Isolation and characteristic of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces flavescens*". *Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi Seryya Biyalagichnykh Navuk*, **4**: 44-48, 1999.

LECHEVALIER, H. A. & LECHEVALIER, M. P. "Introduction of the order Actinomycetales". In: STARR, M. P.; STOLP, H.; TRUPER, H. G.; BALOW, A.; SCHLEGEL, H. G. *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin: Springer Verlag, **2**: 1915-2123, 1981.

LEE, H. B.; KIM, C. J.; KIM, J. S.; HONG, K. S.; CHO, K. Y. A. "bleaching herbicidal activity of methoxyhygromycin (MHM) produced by an actinomycete strain *Streptomyces* sp. 8E-12". *Letters in Applied Microbiology*. **36**: 387-391, 2003.

MELO, I. S. de. Recursos Genéticos Microbianos. In: MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2-48, 2002.

MELO, I. S. de; SANHUEZA, R. M. V. *Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: manual técnico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 72, 1995.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. "Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola". *FEBS Microbiology Ecology*, **42**: 399-407, 2002.

MITSUI, A. & SUZUKI S. "Immunosuppressive effect of mycophenolic acid". *The Journal of Antibiotics*, **22** (8): 358-363, 1969.

MO, S. J.; KIM, B. S.; REYNOLDS, K. A., "Production of Branched-Chain Alkylprodiginines in *Streptomyces coelicolor* by Replacement of the 3-Ketoacyl ACP Synthase III Initiation Enzyme, RedP". *Chemistry & Biology*, **12** (2): 191-200, 2005.

MOSSMAN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal Immunology Methods*, **65**: 55-63, 1983.

PANKIEWICZ, K. W. N. "Analogues Designed as Potential Anticancer Agents. Quest for Selective Inhibition of Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH)". *Pharmacology. Ther.*, **75**: 1-12, 1997.

PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. **1**: São Paulo, McGraw-Hill, 1980.

PETRINI, O. "Fungal endophyte of tree leaves". In: Andrews, J., Hirano, S. S. (eds) *Microbial Ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag, 1991, 185-197.

PITT, J.I. & LEISTNER L. "Toxicogenic *Penicillium* species. en: Mycotoxins and Animal Foods". SMITH J. E., HENDERSON R. S., editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, 81-99, 1991.

POUPKO, R.; LUZ, Z. & DESTRO, R. "Carbon-13 NMR of the Solid State and in Solutions". *Journal of Physical Chemistry*, **101**: 5097-5102, 1997.

RATCLIFFE, R. G. ROSCHER, A., SACHAR-HILL, Y. "Plant RMN spectroscopy". *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **39**(4): 267-300, 2001

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. "Quantificação de sulfadimetoxina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência". *Química. Nova*, **27**, 771, **2004**.

ROBINSON, J. A. "Enzymes of secondary metabolism in microorganisms". *Chemical Society Reviews*, **17**: 383-452, 1988.

SADHUKHAN, A. K.; MURTHY, R. M.V., KUMAR, A. R., MOHAN, E.V.S., VANDANA, G., BHAR, C.; RAO, K. V. "Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology". *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **22**: 33–38, 1999.

SEMBIRING, L.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. "Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*". *Antonie van Leeuwenhoek.*, **78**: 353-366, 2000.

SHU, P. Y., & LIN, C. H. "Simple and sensitive determination of citrinin in monascus by GC-selected ion monitoring mass spectrometry". *Analytical Sciences*, **18**: (3), 283–287, 2002.

SKEHAN , P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening". *Journal of the National Cancer Institute*, **82** (13): 1107-1112, 1990.

SONG, M. J.; BAE, J.; LEE, D. S.; KIM, C. H.; KIM, J. S.; KIM, S. W. and HONG, S. "In Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101** (2): 157-161, 2006.

STROBEL, G. "Microbial Gifts from Rain Forests". *Canadian Journal Plant Pathology*, **24**: 14-20, 2002.

TREJO, E., S. R.; PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, D. L. "Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **21**: 81-90, 1998.

TRIVEDI, A. B., DOI, E., & KITABATAKE, N. "Toxic compounds formed on prolonged heating of citrinin under watery conditions". *Journal of Food Science*, **58** (1): 229–231, 1993.

TRIVEDI, A. B., HIROTA, M., DOI, E., & KITABATAKE, N. "Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water". *Journal of the Chemical Society-Perkin Transaction I*, 2167–2171, 1993.

TURNER, W. B.; ALDRIDGE, D.C. "Fungal metabolites II". *Imperial Chemical Industries, PLC, Pharmaceuticals*, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, England, Academic PRESS, 1983, 631 p.

VALENTE, A. M. M. P. "Análise de componentes fixos em frutos de *Coffea arabica* L. e dos seus produtos de fermentação". São Carlos - UFSCar, Programa de Pós-Graduação em Química 2003. Dissertação de Mestrado, 189 p.

WASSERMAN, H. H., SHAW, C. K.; SYKES, R. J. "The biosynthesis of metacycloprodigiosin and undecyl prodigiosin". *Tetrahedron Letters*. **33**, 2787–2790, 1974.

WEBSTER J."Introduction to fungi", 2º ed. Cambridge University Press, 1986.

WEINBERG, E.D.,"Biosynthesis of secondary metabolite: roles of trace metals". *Advanced Microbial Physiology*. **4**: 1-44, 1970.

WILLIAMS, R. H.; LIVELY, D. H. and DELONG, D. C.; LINE J. C.; SWEENEY, M.J.; POORE G. A. and LARSEN, S.H. "Mycophenolic acid: antiviral and antitumor properties". *The Journal of Antibiotics*, **21** (7): 463-464, 1968.

WILLIAMSON, N. R.; FINERAN, P. C.; LEEPER, F. J.; SALMOND, G. P. C. "*Nature Reviews Microbiology*". **4**, 887-899, 2006.

XU, B. J., WANG, Q. J., LEE, J. H., JIA, X. Q., & SUNG, C. K. "HPLC Analysis of citrinin In red yeast rice". *Food Science and Biotechnology*, **12** (4): 376–380, 2003.

XU, B-J.; JIA, X-Q.; GU, .-J.; SUNG, C-K. "Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin". *Food Control*, **17**: 271-285, 2006.

ZÚNICA. A. C.; VILLARREAL, N.Z.; LUNCA, A.G; DOMINGUES, J.D. and PÉREZ, G.E. "Crystal structure of mycophenolic acid: 6-(4-hydroxy-6-methoxy-7-methyl-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-yl)-4-methyl-hex-4-enoic acid". *Analytical Sciences*, **16**: 783-784, 2000.