

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

“METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Streptomyces clavuligerus*
ATCC 27064 E FUNGOS ENDOFÍTICOS FILAMENTOSOS”

Diana Jimena López Benavides

**São Carlos - SP
2008**

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

“METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Streptomyces clavuligerus*
ATCC 27064 E FUNGOS ENDOFÍTICOS FILAMENTOSOS”

Diana Jimena López Benavides*

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

Orientador: Edson Rodrigues Filho

*** bolsista Capes**

**São Carlos - SP
2008**

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

L925ms

López Benavides, Diana Jimena.

Metabólitos secundários de *Streptomyces clavuligerus*
ATCC 27064 e fungos endofíticos filamentosos / Diana
Jimena López Benavides. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
102 f.

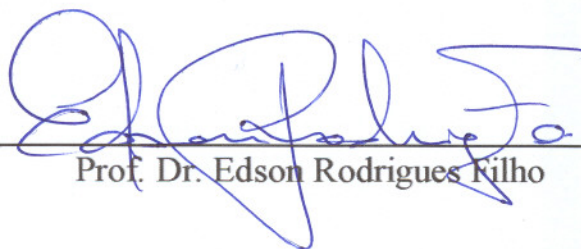
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2008.

1. Metabólitos secundários. 2. *Streptomyces clavuligerus*.
3. Fungos endofíticos. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

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

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado da candidata **Diana Jimena López Benavides**, realizada em 03 de outubro de 2008:*



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Dra. Jaine Honorata Hortolan L. de Oliveira



Profa. Dra. Francinete Ramos Campos

AGRADECIMENTOS

A Deus por manifestar-se em cada momento de minha vida.

À Fernando pelo amor, paciência e apoio.

Ao professor Edson Rodrigues Filho pela orientação neste trabalho e pela formação acadêmica que me foi dada.

Ao professor Carlos Ossamu Hoka pela oportunidade.

À Gi, Danny, Esmeralda e Washington, que acolheram a Fernando e a mim como membros de sua família, aqui no Brasil.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos.

A todos os amigos do Grupo de Produtos Naturais e do Laboratório de Engenharia Bioquímica.

Aos professores do departamento de Química da UFSCar que participaram de minha formação acadêmica.

A toda minha família por seu apoio incondicional.

Finalmente à CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Antibióticos e metabolismo secundário.....	2
1.2. Antibióticos β -lactâmicos	5
1.3. O gênero <i>Streptomyces</i>	8
1.4. A espécie <i>Streptomyces clavuligerus</i>	9
1.5. Biossíntese de Penicilinas e Cefalosporinas	11
1.6. Meios de cultivo para a produção de antibióticos	14
1.7. Os gêneros <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	15
1.8. A Espectrometria de Massas como ferramenta nas análises de metabólitos secundários.....	16
1.8.1. <i>Electrospray</i> como interface em LC/MS	17
1.8.2. Espectrometria de Massas Tandem (MS/MS).....	18
1.8.3. Experimentos de MS/MS	19
2. OBJETIVOS	22
3. PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1. Equipamentos.....	25
3.2. Reagentes e materiais cromatográficos	26
3.3. Cultivo do <i>Streptomyces clavuligerus</i>	27
3.3.1. Experimentos em mesa incubadora rotativa.....	27
3.3.1.1. Etapa de reativação.....	27
3.3.1.2. Etapa de preparação do inóculo	28
3.3.1.3. Etapa de produção	28
3.3.2. Cultivo em bioreatores.....	30
3.3.3. Obtenção dos extratos das culturas de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	31

3.4. Isolamento de metabólitos produzidos por <i>Streptomyces clavuligerus</i>	34
3.5. Cultivo dos fungos endofíticos <i>Penicillium sp</i> , <i>P. brasilianum</i> , <i>P. griseoroseum</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i>	36
3.5.1. Cultivo em meio sólido.....	37
3.5.1.1. Obtenção dos extratos.....	37
3.5.2. Cultivo em meio líquido.....	38
3.5.2.1. Obtenção dos extratos.....	38
3.6. Ensaio antimicrobianos.....	39
3.6.1. Ativação das bactérias	39
3.6.2. Padronização das culturas.....	39
3.6.3. Preparo das amostras	40
3.6.4. Preparo do antibiótico controle.	40
3.6.5. Ensaio preliminar	40
3.7. Análises de compostos β -lactâmicos por espectrometria de massas.....	41
3.7.1. Análises dos antibióticos padrões.....	41
3.7.1.1. Padrões de Penicilinas e Cefalosporinas.....	41
3.7.1.2. Padrão do ácido clavulânico	42
3.7.2. Análises dos extratos.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Cultivo dos microrganismos.....	46
4.2. Substâncias isoladas de <i>Streptomyces clavuligerus</i>	47
4.2.1. Ácido antranílico (SC1).....	48
4.2.2. 7-hidroxi-2-metilcromona (SC2).....	52
4.3. Identificação de Sorbitol nos extratos dos fungos <i>Penicillium brasilianum</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i>	58
4.4. Análises dos padrões β -lactâmicos por espectrometria de massas	60
4.4.1. Análises de Amoxicilina e Penicilina G	61
4.4.2. Análises de Cefoxitina e Cefalosporina C.....	64
4.4.3. Análises do Ácido Clavulânico.....	67
4.4.4. Análises dos padrões por LC/MS.....	68
4.5. Busca de compostos β -lactâmicos nos extratos de <i>Streptomyces</i> <i>clavuligerus</i>	69

4.5.1. Determinação de penicilinas e cefalosporinas.....	70
4.5.1.1. Análise do íon $[M+H]^+$ 447	73
4.5.1.2. Análise do íon $[M+H]^+$ 360	77
4.5.1.3. Análise dos íons m/z 358, m/z 375, m/z 417	81
4.5.2. Determinação de ácido clavulânico	82
4.5.3. Outros íons determinados.....	84
4.6. Busca de compostos β -lactâmicos nos extratos dos fungos: <i>Penicillium sp</i> , <i>P. brasilianum</i> , <i>P. griseoroseum</i> e <i>Aspergillus aculeatus</i>	86
4.6.1. Análises dos espectros de <i>full scan</i> e de íons produtos	86
4.6.2. Análises dos espectros de íons precursores e experimento SRM.....	89
4.7. Resultados dos ensaios antimicrobianos.....	91
5. CONCLUSÕES.....	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

Resumo

Este trabalho descreve a investigação química de uma parte do metabolismo secundário do actinomiceto *Streptomyces clavuligerus* e dos fungos endofíticos filamentosos *Penicillium s.p* isolado de *Murraya paniculata*; *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus aculeatus* isolados de *Melia azedarach* e *Penicillium griseoroseum* isolado dos grãos de *Coffea arabica*. Inicialmente, foram realizados testes preliminares para definir a melhor composição do meio de cultura e as melhores condições de cultivo para *Streptomyces clavuligerus*, já os fungos endofíticos foram cultivados em arroz e em meio líquido Czapek. Dos extratos de *S. clavuligerus* foram identificados, por métodos espectroscópicos de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas, o ácido antranílico e a 7-hidroxi-2-metilcromona. Com o objetivo de determinar a presença de antibióticos β -lactâmicos e outros metabólitos nos extratos foram desenvolvidas metodologias de detecção por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. A identificação das substâncias foi feita com base no estudo de padrões comerciais e levantamento bibliográfico. Estas metodologias se mostraram eficientes na análise deste tipo de substâncias e permitiu a detecção de antibióticos β -lactâmicos como a penicilina N, a cefamicina C, a deacetoxicefalosporina C e o ácido clavulânico nos extratos de *S. clavuligerus*. Estas metodologias foram aplicadas nas análises dos extratos fúngicos onde foi identificado o ácido 6-aminopenicilânico, precursor da penicilina G e metabólitos não β -lactâmicos como os nucleotídeos timina e adenosina.

Abstract

This work describes the investigation of part of the secondary metabolism of actinomicete *Streptomyces clavuligerus* and endophytic filamentous fungus *Penicillium sp* isolated from *Murraya paniculata*; *Penicillium brasilianum* and *Aspergillus aculeatus* isolated from *Melia azedarach* and *Penicillium griseoroseum* isolated from the grains of *Coffea arabica*. Preliminary tests were realized to define the best composition of medium culture and the best condition of cultivation *Streptomyces clavuligerus*. On the other hand, the endophytic fungus were cultivated in rice and Czapec'k (medium liquid). The anthranilic acid and the 7-hydroxy-2-methyl-chromone were identified from the extracts of *S. clavuligerus* by spectroscopic methods 1D e 2D NMR and mass spectrometry. Methodologies of analysis for detection of β -lactam antibiotics were developed by liquid chromatography combined with mass spectrometry. The identification was based on studies of standard compounds and comparison with literature data. These methodologies were efficient in the analysis of this type of substances and they allowed the detection and identification of β -lactam antibiotics such as the penicillin N, the cephamycin C, deacetoxy-cephalosporin C and the clavulanic acid in small amounts in *S. clavuligerus* the extracts. In the endophytic fungus extracts were possible to identify the 6-aminopenicillanic acid, precursor of the penicillin G and metabolites no β -lactams as nucleotides thymine and adenine.

LISTA DE FIGURAS

		Pag.
FIGURA 1.1	Núcleo das Penicilinas (a) e Cefalosporinas (b).....	5
FIGURA 1.2	Reação de hidrólise de uma penicilina genérica.....	8
FIGURA 1.3	Reação de hidrólise de uma cefalosporina genérica.....	8
FIGURA 1.4	Antibióticos produzidos por <i>Streptomyces clavuligerus</i>	10
FIGURA 1.5	Biossíntese de Penicilina G, Cefalosporina C e Cefamicina C....	13
FIGURA 1.6	Esquema de um analisador de duplo quadrupolo.....	19
FIGURA 1.7	Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição “full scan”.....	19
FIGURA 1.8	Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “íons produtos”.....	20
FIGURA 1.9	Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “íons precursores”.....	20
FIGURA 1.10	Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “perda de moléculas neutras”.....	21
FIGURA 1.11	Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “SRM”.....	21
FIGURA 4.1	Espectro de RMN ¹ H obtido para SC1 (Metanol- <i>d</i> , 400MHz).....	50
FIGURA 4.2	Experimento de HSQC de SC1 (Metanol- <i>d</i> , 400MHz).....	51
FIGURA 4.3	Experimento de HMBC de SC1 (Metanol- <i>d</i> , 400MHz).....	52
FIGURA 4.4	Espectro de RMN ¹ H de SC2 (clorofórmio- <i>d</i> , 400MHz).....	55
FIGURA 4.5	Experimento de HSQC de SC2 (clorofórmio- <i>d</i> , 400MHz).....	56
FIGURA 4.6	Espectro de massas do SC2 obtido via ESI ⁺	56
FIGURA 4.7	Experimento de HMBC de SC2 (clorofórmio- <i>d</i> , 400MHz).....	57
FIGURA 4.8	Experimento COSY do SC2 (clorofórmio- <i>d</i> , 400MHz).....	58
FIGURA 4.9	Espectro de RMN ¹ H do sorbitol (<i>D</i> ₂ <i>O</i> , 400 MHz).....	59
FIGURA 4.10	Espectro de RMN ¹³ C do sorbitol (<i>D</i> ₂ <i>O</i> , 50 MHz).....	59
FIGURA 4.11	Estruturas de antibióticos padrões estudados: Penicilinas (17 e 18), Cefalosporinas (19 e 20) e Clavama (1).....	61
FIGURA 4.12	Espectro de íons produtos de amoxicilina obtido via ESI ⁺	62
FIGURA 4.13	Espectro de íons produtos de penicilina G obtido via ESI ⁺	62
FIGURA 4.14	Principais fragmentações da amoxicilina (17).....	63

FIGURA 4.15	Principais fragmentações da penicilina G (18).....	64
FIGURA 4.16	Espectro de <i>full scan</i> de cefoxitina.....	65
FIGURA 4.17	Espectro de íons produtos da cefalosporina C, obtido via ESI ⁺ .	65
FIGURA 4.18	Principais fragmentações da cefalosporina C (20).....	66
FIGURA 4.19	Espectro de íons produtos do ácido clavulânico obtido via ESI ⁻	67
FIGURA 4.20	Principais fragmentações do ácido clavulânico.....	68
FIGURA 4.21	Cromatograma de íons selecionados dos padrões de antibióticos.....	69
FIGURA 4.22	Experimento de íons precursores de <i>m/z</i> 160.....	70
FIGURA 4.23	Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> 262 e <i>m/z</i> 286.....	71
FIGURA 4.24	Cromatograma de íons selecionados do extrato bruto BCCII.....	72
FIGURA 4.25	Cromatograma de íons selecionados do extrato bruto MIV.....	73
FIGURA 4.26	Comparação estrutural entre a cefalosporina C e a cefamicina C.....	74
FIGURA 4.27	Espectro de íons produtos [M+H] ⁺ 447. Obtido via ESI ⁺	74
FIGURA 4.28	Proposta de fragmentação [M+H] ⁺ 447.....	75
FIGURA 4.29	Experimento de SRM. (a) Extrato BCCII (b) Extrato MIV.....	76
FIGURA 4.30	(a) Cromatograma de íons selecionados. (b) Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> 360 (Tr 11.98 min.) (c) Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> 360 (Tr 32.22 min.).....	78
FIGURA 4.31	Proposta de fragmentação do íon <i>m/z</i> 360 (Baseado no espectro b).....	79
FIGURA 4.32	Proposta de fragmentação do íon <i>m/z</i> 360 (Baseado no espectro c).....	80
FIGURA 4.33	Estruturas de cefalosporinas presentes na biossíntese de cefamicina C em <i>S. clavuligerus</i>	81
FIGURA 4.34	Experimento SRM dos extratos (a) MII-E1 e (b) MII-E3.....	83
FIGURA 4.35	Experimento SRM dos extratos (a) MIII (b) MIII-E3.....	83
FIGURA 4.36	Cromatograma de íons selecionados do extrato MII-E2.....	84
FIGURA 4.37	Substâncias não β-lactâmicas detectadas por ESI ⁺	85
FIGURA 4.38	Espectro de íons produtos de <i>m/z</i> 229; <i>m/z</i> 197; <i>m/z</i> 261 e <i>m/z</i> 245.....	85

FIGURA 4.39	Cromatogramas de íons totais (TIC) e de íons selecionados de: (a) Extrato PG3 (b) Extrato SP1 (c) Extrato PB1 e (d) Extrato AA1.....	87
FIGURA 4.40	Substâncias identificadas por LC/MS nos extratos dos fungos endofíticos.....	88
FIGURA 4.41	Espectros de íons produtos de m/z 217, m/z 259 e m/z 268.....	88
FIGURA 4.42	Espectros de íons precursores de m/z 160 de: (a) Extrato PG3 (b) Extrato AA1 (c) Extrato SP1.....	90
FIGURA 4.43	(a) Cromatograma de íons selecionados m/z 252. (b) Espectro de íons produtos de penicilina G (c) Espectro de íons produtos de m/z 252.....	90
FIGURA 4.44	Experimento SRM para penicilina G (a) Extrato SP1 (b) Extrato PB3.....	91

LISTA DE ESQUEMAS

	Pag.	
ESQUEMA 3.1	Processo de extração e partição dos cultivos obtidos em biorreator (BCCI) e em mesa incubadora rotativa (M I).....	32
ESQUEMA 3.2	Processo de extração e partição do cultivo obtido em mesa incubadora rotativa (M II).....	33
ESQUEMA 3.3	Processo de extração e partição do cultivo obtido em mesa incubadora rotativa (M III).....	34
ESQUEMA 3.4	Fracionamento do extrato BCCI-E2.....	35
ESQUEMA 3.5	Fracionamento do extrato M1-E1.....	36

LISTA DE TABELAS

		Pag.
TABELA 1.1	Espécies produtoras de antibióticos.....	3
TABELA 1.2	Estruturas químicas básicas de antibióticos β -lactâmicos e principais espécies produtoras.....	6
TABELA 3.1	Composição dos meios de reativação e do inóculo.....	28
TABELA 3.2	Composição dos meios de produção usados em incubador rotativo para <i>S. clavuligerus</i>	29
TABELA 3.3	Composição dos meios de produção usados nas fermentações em biorreator para <i>S. clavuligerus</i>	31
TABELA 3.4	Rendimentos dos extratos. Cultivos em meio sólido.....	37
TABELA 3.5	Meio de cultura Czapek'k enriquecido com 2% de extrato de levedura.....	38
TABELA 3.6	Rendimentos dos extratos. Cultivos em meio líquido.....	39
TABELA 3.7	Condições do espectrômetro de massas para compostos da classe das penicilinas e cefalosporinas. ESI (+).....	42
TABELA 3.8	Condições utilizadas nas análises por LC/MS.....	42
TABELA 3.9	Condições do espectrômetro de massas para o ácido clavulânico. ESI.....	43
TABELA 3.10	Condições de SRM para o ácido clavulânico.....	43
TABELA 3.11	Condições de SRM para penicilina G.....	44
TABELA 3.12	Condições de SRM para cefalosporina C.....	44
TABELA 4.1	Dados espectroscópicos para SC1.....	49
TABELA 4.2	Dados espectroscópicos para SC2.....	53
TABELA 4.3	Resultados do ensaio antibacteriano. Valores da medida do halo de inibição.....	92

ABREVIATURAS

EM	Espectrometria de Massas
ESI	Electrospray Ionization (Ionização por Electrospray)
LC/MS	Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
MM	Massa Molar
MS/MS	Espectrometria de Massas Tandem
<i>m/z</i>	Relação massa/ carga
ODS	Octadecilsilano (C-18)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluoracético
TIC	Total Ion Chromatogram (Cromatograma de Íons Totais)
AcOEt	Acetato de Etila
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Bond Correlation
Hz	Hertz
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hertz
<i>m</i>	Multiplete
Tr	Tempo de retenção
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
<i>s</i>	Singuleto
<i>t</i>	Triplete
<i>q</i>	Quadruplete
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
API	Atmospheric Pressure ionization
MALDI	Matrix – assisted laser desorption/ionization
DC	Corrente Continua
SRM	Selected Reaction Monitoring
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

rpm	Revoluções por minuto
g	Gramas
L	Litros
mL	Mililitros
MHz	Megahertz
Da	Dalton

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antibióticos e metabolismo secundário.

Os actinomicetos (bactérias filamentosas Gram-Positivas) e os fungos filamentosos são os principais produtores de metabólitos secundários no mundo microbiano, microrganismos endofíticos, que por definição, são microrganismos que colonizam tecidos internos de plantas sem causar efeitos negativos são relativamente pouco estudados como potencial fonte de novos produtos naturais para a exploração médica e comercial (Challis e Hopwood, 2003). Frequentemente cada espécie de microrganismo produz mais de um metabólito secundário, sendo algumas espécies grandes produtoras de compostos com diferentes estruturas e atividades biológicas (Demain, 1998). Os metabólitos secundários microbiais são moléculas, que possuem uma grande variedade de estruturas químicas complexas as quais são produzidas pelos microrganismos logo que a fase de crescimento esteja completa (Phaff, 1981).

A necessidade da descoberta e utilização de compostos com atividade biológica, que acresçam a qualidade de vida em todos os aspectos da condição humana é preponderante. A resistência das bactérias às drogas e o aumento da incidência de doenças bacterianas, virais e fúngicas enfatizam a necessidade de investigar a produção microbiana de novos compostos bioativos. Os metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos constituem a interface química entre eles e o resto do mundo vivente. O alcance das possíveis interações (antagônicas, sinérgicas, etc.) entre os microrganismos e outros sistemas existentes através de seus metabólitos é enorme, e, as mesmas são uma fonte inesgotável para a obtenção de novos compostos ativos (Brizuela *et al.*, 1998). Atualmente, o estudo destas interações tem possibilitado o conhecimento de um grande número de substâncias de origem microbiana com importantes atividades biológicas, dentre as quais se encontram: os inibidores enzimáticos, antibióticos, pigmentos, toxinas, feromônios, praguicidas, agentes antitumorais e promotores de crescimento de animais e plantas, entre outras.

Embora estes compostos não atuem diretamente no metabolismo energético nem no crescimento celular, contribuem seguramente para a sobrevivência do microrganismo, já que inibem a ação de competidores que possam ocupar o mesmo nicho ecológico (Phaff, 1981).

Dos metabólitos secundários produzidos industrialmente, provavelmente os mais importantes são os antibióticos, obtidos principalmente de fungos filamentosos e bactérias do grupo dos actinomicetos. Na tabela 1.1 é observada a importância dos grupos microbianos na produção de antibióticos.

TABELA 1.1. Espécies produtoras de antibióticos.

Espécies	% de antibióticos descritos
Líquens e Algas	0.8
Fungos	
<i>Penicillium</i>	4.1
<i>Aspergillus</i>	3.0
<i>Fusarium</i>	1.2
<i>Cefalosporium</i>	0.8
Outros fungos	5.4
Basidiomicetos e Ascomicetos	5.0
Bactérias	
<i>Pseudomonadaceae</i>	1.3
<i>Bacillaceae</i>	7.0
Outras eubactérias	1.7
Actinomicetos	69.7

(Lereau e Bouix, 2000)

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos, que inibem o processo de crescimento de outros organismos, inclusive quando utilizados em baixas concentrações. Eles possuem como propriedade comum a atividade

bactericida, quando eliminam as bactérias, provocando a destruição da parede bacteriana, e bacteriostática, quando detêm o crescimento das bactérias, deixando ao sistema imunológico a tarefa de eliminar a infecção (Walsh, 2003).

Durante milhares de anos a medicina popular utilizou carne, queijo e pão mofado para curar as feridas, contudo somente em 1929 Alexander Fleming observou que o fungo *Penicillium notatum* produzia uma substância capaz de inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus*. A partir dessa observação inicial, constatou-se que o caldo de cultura do fungo era inibidor e mesmo bactericida para muitos microrganismos patogênicos comuns. A substância, devido a sua origem, foi denominada penicilina (Fonseca, 1984).

A penicilina foi o primeiro antibiótico de interesse produzido industrialmente durante a Segunda Guerra Mundial. Na década de 50, foram isolados e utilizados clinicamente outros tipos de antibióticos como a estreptomicina, o cloranfenicol e a tetraciclina. Nas décadas seguintes, com o avanço tecnológico dos processos de fermentação e das novas técnicas de síntese química e enzimática de medicamentos, novos antibióticos foram desenvolvidos tais como as cefaloporinas e as penicilinas semi-sintéticas. Muitos antibióticos descobertos até os anos 70 foram produzidos industrialmente e serviram como base para a síntese de novos compostos com propriedades antimicrobianas semelhantes, através de modificações químicas (Pelaéz, 2006).

Atualmente são conhecidos vários compostos com atividade antibacteriana que podem ser classificados de acordo com sua estrutura química. O grupo mais utilizado até hoje é aquele que apresenta o anel β -lactâmico devido a sua eficiência contra várias infecções bacterianas e poucos efeitos colaterais (Baggaley *et al.*, 1997).

1.2. Antibióticos β -lactâmicos

A família dos antibióticos β -lactâmicos constitui o grupo mais importante dentre esses fármacos, tanto no que diz respeito a sua utilização clínica, quanto do ponto de vista econômico (Ghosh *et al.*, 1996). Cerca de 60% do total de antibióticos produzidos no mundo correspondem a compostos β -lactâmicos, eles fazem parte dos antimicrobianos que inibem a síntese da parede celular das bactérias ocasionando a morte celular (Mayer *et al.*, 1996).

Esta família de antibióticos é dividida em cinco grupos principais de acordo com suas características estruturais; Penams, Cefems, Clavams, Carbapenems, e Monolactams (TABELA 1.2). Todos estes compostos, com exceção dos monobactâmicos, são formados por um sistema bicíclico de anéis. As penicilinas e cefalosporinas são os mais efetivos de todos os agentes terapêuticos para o controle de doenças infecciosas. A estrutura básica das penicilinas é o ácido 6-amino-penicilânico (6-APA) constituído de dois anéis: o anel β -lactâmico (I) e o anel tiazolidínico (II). Esta estrutura, comum a todas as penicilinas, possui uma parte variável acilada na posição 6 (FIGURA 1.1a). As cefalosporinas possuem como núcleo básico o ácido 7-amino-cefalosporânico que consiste de um anel dihidrotiazino (III) ligado ao anel β -lactâmico (FIGURA 1.1b). As diferentes cefalosporinas são obtidas pela modificação das cadeias laterais aos radicais ligados nos carbonos 3 e 7 da molécula. As cefalosporinas que possuem uma metoxila na posição 7 são chamadas de cefamicinas (Crueger e Crueger, 1990).

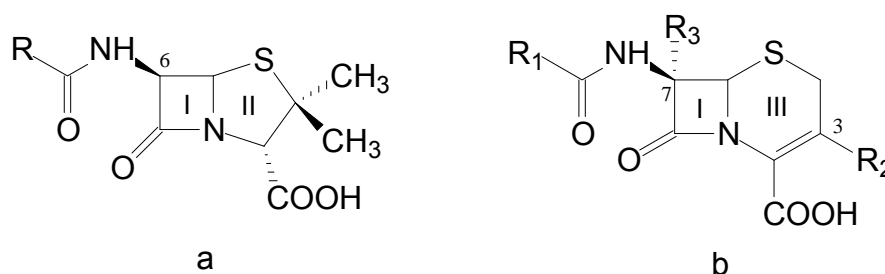
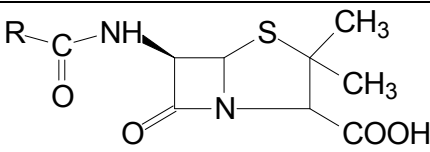
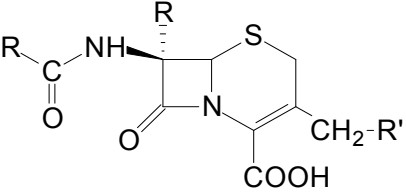
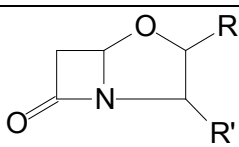
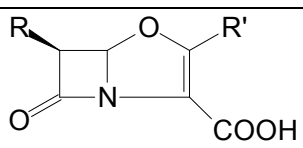
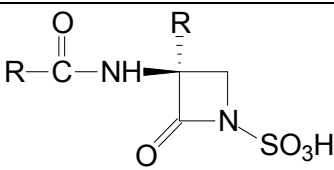
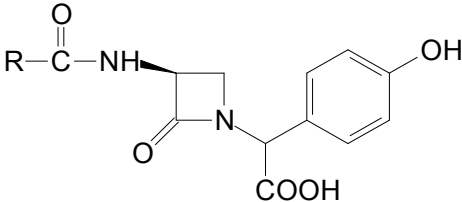


FIGURA 1.1 Núcleo das Penicilinas (a), e Cefalosporinas (b).

TABELA 1.2 Estruturas químicas básicas de antibióticos β -lactâmicos e principais espécies produtoras.

Estruturas Químicas Básicas	Antibióticos	Principais Espécies Produtoras
 <p>Penem</p>	Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
 <p>Ceph-3-em</p>	Cefalosporinas	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i> <i>Nocardia lactamdurans</i>
 <p>Clavam</p>	Ácido Clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
 <p>Carbapenem</p>	Tienamicinas Ácidos Olivânicos	<i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i>
	Monobactâmicos	<i>Gluconobacter sp.</i> <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Acetobacter sp.</i> <i>Flexibacter sp.</i>
 <p>Monolactam</p>	Nocardicinas	<i>Nocardia uniformis</i>

(Aharonowitz *et al.*, 1992)

Os antibióticos β -lactâmicos exercem seus efeitos letais através da interferência na maquinaria metabólica, responsável pelo crescimento e desenvolvimento da parede celular bacteriana (Charnas e Knowles, 1981), inibindo a formação da camada peptidoglicana, interferindo na função de várias enzimas de síntese (transpeptidases) e ainda aumentando a atividade das autolisinas que são responsáveis pela lise da célula. A camada peptidoglicana é essencial para a sobrevivência da bactéria em meios hipotônicos, a danificação desta camada resulta na perda da rigidez e como consequência da resistência mecânica da parede bacteriana se produz o rompimento da estrutura celular (Madigan *et al.*, 1997). Como as células de mamíferos não possuem esse componente de parede celular, os antibióticos β -lactâmicos geralmente têm uma razão entre efeito terapêutico e efeito tóxico muito favorável (Pitarch *et al.*, 1998).

O uso contínuo e indiscriminado de antibióticos, desde suas primeiras aplicações clínicas, somada à evolução natural de defesa dos organismos às condições ambientais, têm sido as principais causas da crescente resistência bacteriana àqueles agentes. Esta resistência a antibióticos prejudica o efeito clínico das terapias empregadas em termos de altas taxas de morbidez e mortalidade, e acaba aumentando os custos com seguros de saúde devido a longos períodos em hospitalizações e a administração de drogas alternativas de alto custo (Essack *et al.*, 2001).

A maior causa de resistência a antibióticos β -lactâmicos é a existência das enzimas β -lactamases produzidas principalmente por linhagens de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Staphylococcus* que atuam hidrolisando a ligação C-N do anel β -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas (Cole *et al.*, 1985), resultando na inativação do produto e gerando um composto sem ação bactericida (Essack *et al.*, 2001). Impedindo a ação dos antibióticos devido à formação de compostos inativos como o ácido penicilóico e o ácido cefalospórico respectivamente (FIGURA 1.2 E 1.3) (Charnas e Knowles, 1981).

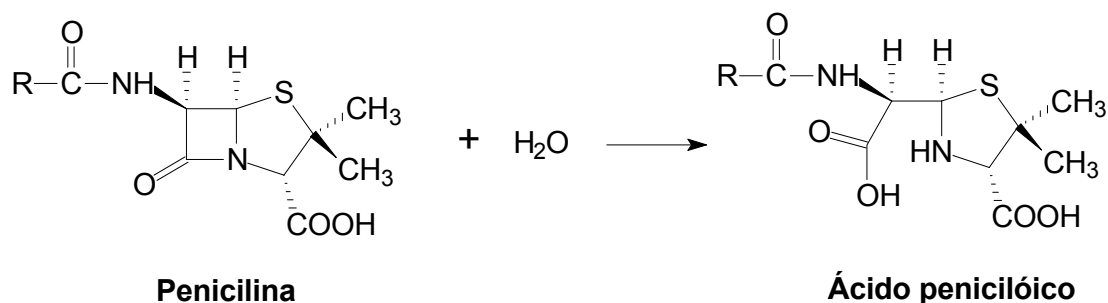


FIGURA 1.2 Reação de hidrólise de uma penicilina genérica.

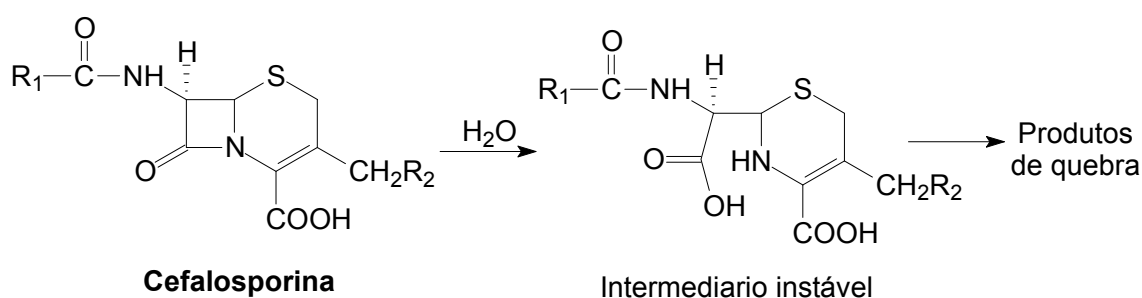


FIGURA 1.3 Reação de hidrólise de uma cefalosporina genérica.

Para resolver esse problema foram desenvolvidos antibióticos mais potentes contra a ação das β -lactamases, os quais foram obtidos por alteração da cadeia lateral da penicilina G e da cefalosporina C, através do uso de métodos químicos associados à fermentação tradicional (Baggaley *et al.*, 1997). Durante as pesquisas em busca desses novos antibióticos foram isolados microrganismos capazes de produzir inibidores de β -lactamases, como o actinomiceto *Streptomyces clavuligerus* (Coleman *et al.*, 1994) capaz de produzir o ácido clavulânico que tem se mostrado eficiente na luta contra a resistência bacteriana (Brown *et al.*, 1979).

1.3. O gênero *Streptomyces*

De cerca de 12.000 antibióticos conhecidos, estima-se que 160 são ou têm sido usados para uso clínico humano onde os microrganismos do gênero *Streptomyces* são responsáveis por cerca de 55 % destes antibióticos comercialmente disponíveis (Champness, 2000).

Streptomyces é um gênero de bactérias Gram-positivas que crescem em solos, pântanos, e habitats de litorais marinhos (Omura *et al.*, 2001). São protistas

inferiores, classificados como eubactérias com organização filamentosa muitas vezes ramificada, ao contrário dos fungos, são organismos procarióticos em sua grande maioria aeróbios (Stanier *et al.*, 1969). O processo único de crescimento requer a coordenação especializada do metabolismo o qual é mais complexo que para outras bactérias Gram-positivas. A propriedade mais interessante dos *Streptomyces* é sua habilidade para produzir metabólitos secundários inclusive antibióticos e muitos outros compostos bioativos de grande diversidade estrutural (Tanaka e Omura, 1993).

Muitos são os critérios utilizados para a classificação de *Streptomyces*, sendo os principais relacionados à morfologia das cadeias de esporos, cor da massa de esporos, pigmentação do substrato micelial, pigmentos difusíveis, atividade antimicrobiana, atividade enzimática, resistência a antibióticos e uso das fontes de carbono e nitrogênio (Dary *et al.*, 1999).

Algumas espécies de *Streptomyces* constituem um grupo de microrganismos muito promissores nos processos de triagem de novos antibióticos β -lactâmicos e compostos com atividade anti- β -lactamases, entre eles se encontra o *S. clavuligerus*.

1.4. A espécie *Streptomyces clavuligerus*

Em 1971, Higgens e Kastner do laboratório de pesquisa Lilly descreveram um estreptomiceto isolado de uma amostra de solo da América do Sul, o qual ficou conhecido como produtor de novos antibióticos, qualificado como uma nova espécie chamada *Streptomyces clavuligerus* (Butterworth, 1984).

Os microrganismos desta espécie se caracterizam por serem aeróbios estritos, primeiramente habitantes do solo, e morfologicamente semelhantes aos fungos. *Streptomyces clavuligerus* é importante do ponto de vista industrial, atualmente sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 21 metabólitos secundários, incluindo vários antibióticos β -lactâmicos como a cefamicina C, penicilina N e deacetoxicefalosporina C (Nagarajan *et al.*, 1971; Liras e Martin, 2005); também, é

reconhecido por produzir alguns compostos do tipo clavama (FIGURA 1.4a) com propriedades antibacterianas e antifúngicas (Liras e Martin, 1989). Além disso, algumas linhagens desta espécie produzem antibióticos não β -lactâmicos como a holomicina, a N-propionilholotina e a tunicamicina (FIGURA 1.4c) (Okamura *et al.*, 1977; Kening e Reading, 1979).

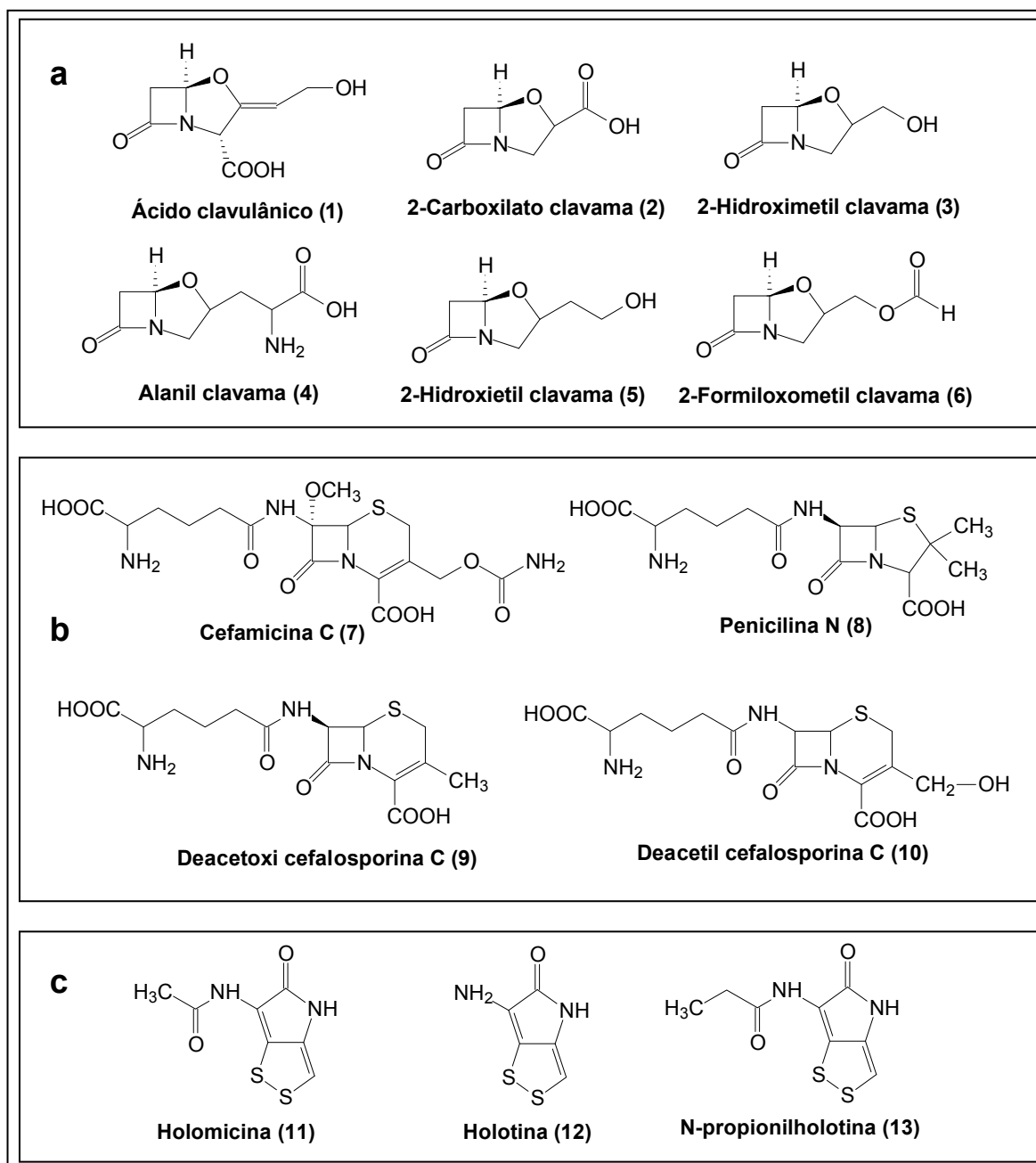


FIGURA 1.4 (a) Antibióticos tipo Clavama; (b) Antibióticos β -lactâmicos; (c) Antibióticos tipo Pirrotina, produzidos por *Streptomyces clavuligerus* (Elson *et al.*, 1988).

O mais importante metabólito comercial produzido por este microrganismo é o ácido clavulânico; este composto possui uma fraca atividade antibacteriana, embora seja um potente inibidor de β -lactamases (Brown *et al.*, 1976). Sua utilização clínica é realizada em conjunto com um antibiótico β -lactâmico convencional, que possui maior ação antibacteriana, mesmo que seja sensível às β -lactamases (Baggaley *et al.*, 1997). Esta combinação apresenta um amplo espectro bactericida a qual é utilizada a mais de 20 anos e ainda com grandes resultados. (Buynak, 2006).

1.5. Biossíntese de Penicilinas e Cefalosporinas.

Os fungos filamentosos produzem somente antibióticos β -lactâmicos como penicilinas ou cefalosporinas, já os actínios sintetizam uma variedade de estruturas β -lactâmicas incluindo cefalosporinas, cefamicinas, clavamas entre outras (Liras, 1999). Na figura 1.5 é apresentada a rota biossintética de cefamicinas e penicilinas em alguns microrganismos.

A biossíntese se inicia com a formação da estrutura básica do núcleo β -lactâmico a partir de três aminoácidos: o ácido L- α -aminoadípico (L- α -AAA), a L-cisteína e a L-valina, que ativados por ATP são condensados e forma o tripeptídeo δ -L- α -aminoadipil-L-cisteína-D-valina (ACV); a enzima responsável por este passo é a ACV sintetase. Na segunda etapa do processo, catalisado pela isopenicilina N sintetase, ocorre o fechamento oxidativo do tripeptídeo, formando um anel com estrutura bicíclica característico das penicilinas. O produto formado é a isopenicilina N (IPN) que possui fraca atividade antibiótica, mas é o primeiro intermediário bioativo a partir do qual divergem as vias de biossíntese de penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas; esta reação é catalisada pela isopenicilina N sintetase. No processo final da biossíntese de penicilinas, o lado hidrofílico da IPN que corresponde ao L- α -AAA, é modificado por um grupo hidrofóbico acilo. Em culturas de *Penicillium chrysogenum* esta reação é catalisada pela enzima isopenicilina N aciltransferase formando a penicilina G (Brakhage, 1998).

O primeiro passo que compromete a produção de cefalosporinas é a isomerização da IPN ao enantiômero D, que corresponde à penicilina N, esta reação é catalisada pela IPN epimerase. A penicilina N é o precursor de antibióticos como as cefamicinas e cefalosporinas (Brakhage, 1998). A seguir o anel tiazolidínico de cinco membros da penicilina N é expandido a um anel diidrotiazino de seis membros comum a todas as cefalosporinas e forma a deacetoxicefalosporina C (DAOC). Esta reação é levada a cabo pela DAOC sintetase. No passo seguinte, a metila em C-3 da DAOC é hidrolisada e oxidada para formar deacetylcefalosporina C (DAC) (Liras, 1999).

Na última etapa da biossíntese da cefalosporina C, o grupo acetila é transferido desde a acetil-CoA à hidroxila da DAC, reação catalisada pela DAC acetil transferase. Já cefalosporinas que possuem uma metoxila no C-7 (cefamicinas) são formadas através de uma reação catalisada pela enzima DAC-carbamoil transferase em *S. clavuligerus* a qual transfere o grupo carbamoil à DAC para produzir o O-carbamoil-DAC (OCDAC); seguidamente C-7 é hidroxilada pela ação de OCDAC hidrolase. No passo final da biossíntese de cefamicina C, a hidroxila em C-7 é metilada; em *S. clavuligerus* e *N. lactamdurans* esta reação é catalisada pela cefamicina C sintetase (Brakhage, 1998).

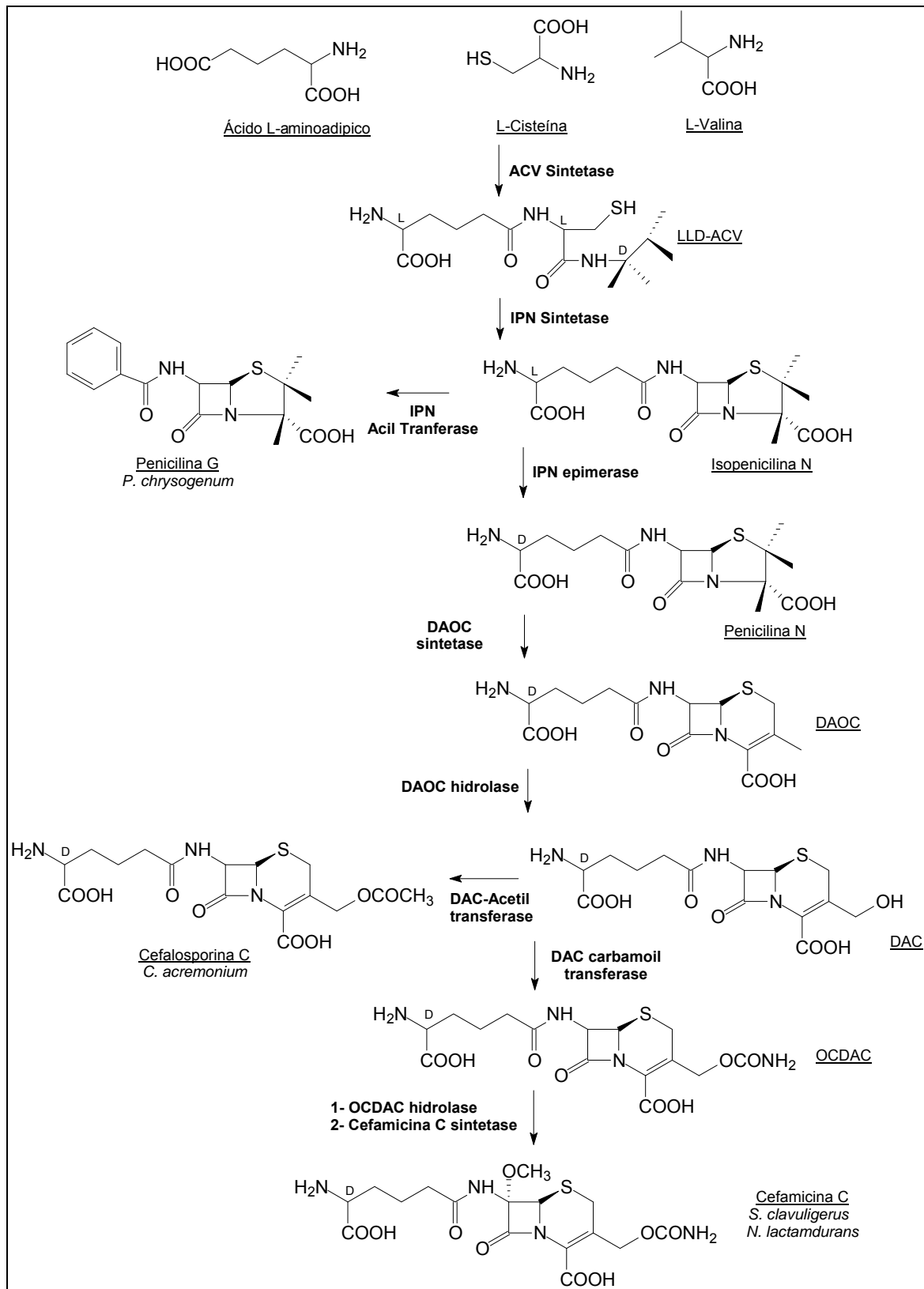


FIGURA 1.5 Biossíntese de Penicilina G, Cefalosporina C e Cefamicina C (Brakhage, 1998).

1.6. Meios de cultivo para a produção de antibióticos.

O crescente interesse do mercado por vários produtos biotecnológicos dentre os quais se destacam os antibióticos β -lactâmicos tem provocado grandes investimentos no aperfeiçoamento de métodos de produção e recuperação desses produtos, visto que essa recuperação equivale a cerca de 50% do total dos custos de produção do antibiótico (Ghosh *et al.*, 1996).

O fator que controla o início da biossíntese de antibióticos é provavelmente a deficiência de um ou mais componentes limitantes do crescimento. Os microrganismos parecem ser programados para produzir antibióticos apenas quando diminui a velocidade específica do crescimento. Em ambientes ricos tais como, o intestino de mamíferos, a produção de antibióticos por microrganismos não é necessária desde que haja alimento disponível para todas as espécies presentes. Entretanto, em muitos ambientes naturais como solo e água, os nutrientes são limitantes para o crescimento microbiano e a produção de antibióticos é uma alternativa para a sobrevivência (Martin e Demain, 1980).

Os principais nutrientes necessários para o crescimento, manutenção e biossíntese de produtos de interesse por microrganismos aeróbios são: carbono, nitrogênio, potássio, fósforo, enxofre e oxigênio correspondendo entre 80 e 90% do material celular (Moo-Young *et al.*, 1995). Em fermentações industriais as fontes de nitrogênio utilizadas nos meios de cultura para a produção de compostos β -lactâmicos são provenientes de matérias primas vegetais baratas que rendem altas produtividades. Este rendimento, porém, é influenciado por fatores de disponibilidade e qualidade de lotes de matéria prima. Assim uma alternativa para esta situação é a utilização de meios quimicamente definidos, que permitem obter resultados mais reprodutíveis e consistentes, além de facilitarem as etapas de recuperação e purificação dos produtos de interesse (Kieser *et al.*, 2000).

Normalmente os microrganismos do gênero *Streptomyces* utilizam diversas fontes de carbono, no entanto *S. clavuligerus* é uma exceção, pois apresenta importantes

limitações metabólicas, crescendo de maneira eficiente em meio de cultura contendo glicerol, maltose ou amido como únicas fontes de carbono.

A regulação biossintética de compostos β -lactâmicos em *S. clavuligerus* pode ser influenciada pela natureza e concentração das fontes de carbono e nitrogênio entre outros. Enquanto o uso de glicerol resulta em maiores crescimentos e produção de ácido clavulânico, o amido e a lisina promovem a formação de compostos cefâmicos e menor rendimento celular (Romero *et al.*, 1984, Ibrahimi *et al.*, 1988). As fontes de nitrogênio geralmente consistem de sais de amônio ou compostos orgânicos, com destaque para aminoácidos simples ou aqueles provenientes da peptona e da farinha de soja ou seu extrato (Butterworth, 1984; Lee e Ho, 1996; Kim *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Deste modo, a modificação da composição do meio de cultura possibilita a formação de diversas classes de metabólitos secundários.

1.7. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

Dentre os microrganismos que acumulam substâncias bioativas, os fungos e os actinomicetos destacam-se pela quantidade de produtos farmacêuticos de uso corrente na medicina. Os fungos filamentosos, onde os endofíticos estão incluídos, formam um grupo de microrganismos que biossintetizam uma quantidade fantástica de metabólitos secundários, chegando, em casos especiais, a uma produção 73% superior a de outras classes de microrganismos (Dreyfuss *et al.*, 1994). Sendo, portanto, uma fonte potencial de substâncias de interesse farmacológico.

Em meio da grande variedade de espécies produtoras de substâncias antibacterianas destacam-se os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* como produtores de importantes grupos de antibióticos. O gênero *Penicillium* foi descrito pela primeira vez por Link em 1809. As espécies que incluem o gênero *Penicillium* são ubíquas, de ampla distribuição por todo o mundo e consideradas saprófitas. Muitas delas crescem no solo ou em matéria orgânica em decomposição (Pitt, 1979).

Como outros gêneros de fungos microscópicos as espécies do gênero *Penicillium*, compartilham muitas rotas metabólicas com animais e plantas, possuem a

capacidade de sintetizar metabólitos muito complexos como as benzodiazepinas (Bringmann e Mader, 1995), além de produzir outras substâncias como alcalóides, meroterpenos, policetídeos, terpenóides, esteróides e aminoácidos entre outros (Santos, 2003).

O primeiro e principal uso industrial de algumas espécies de *Penicillium* tem sido na produção de penicilina desde o descobrimento deste metabólito por Alexander Fleming (Pitt, 1979). Hoje são utilizadas diferentes cepas de *Penicillium* em processos industriais na produção do antibiótico. Do mesmo modo, algumas espécies do gênero *Aspergillus* são importantes produtoras de antibióticos (Lereau e Bouix, 2000), assim como de outras classes de substâncias dentre as que se encontram os alcalóides indólicos, policetídeos, dicetopiperazinas, terpenos, meroterpenos entre outros (Campos, 2005).

Aspergillus é um gênero de Hyphomycetes com aproximadamente 150 espécies reconhecidas. Membros deste gênero ocorrem em uma variedade de habitats, embora sejam comuns como saprófitas do solo, alimentos e produtos alimentícios estocados e vegetação em decomposição. No entanto algumas espécies parasitam insetos, plantas e animais, inclusive o homem. (Teixeira *et al.*, 1994).

1.8. A espectrometria de massas como ferramenta nas análises de metabólitos secundários.

O principal obstáculo na descoberta de novos metabólitos secundários produzidos por microrganismos é a dificuldade de distinguir a fração produtiva entre muitas culturas improdutivas. Enquanto os métodos tradicionais de cultivo e análises, como também as estratégias mais novas, têm pretendido conhecer novos metabólitos secundários, todas elas estão limitadas pelo grande número de amostras que devem ser avaliadas antes que conclusões significativas possam ser feitas sobre a efetividade de uma metodologia na produção de metabólitos secundários (Zahn *et al.*, 2001). No entanto, algumas técnicas rápidas de análises como a espectrometria de massas acoplada a um método cromatográfico vêm sendo

empregadas para a caracterização dessas substâncias em misturas complexas sem a necessidade do isolamento do produto de interesse.

Nas últimas décadas foram desenvolvidas várias técnicas de ionização que permitiram o interfaceamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas e a análise de substâncias com baixa pressão de vapor e termicamente lábeis, o que não era possível com a técnica convencional de impacto eletrônico. Estas técnicas realizam a ionização de uma forma branda, ou seja, com pouco excesso de energia interna, reduzindo a fragmentação e tornando o íon molecular o pico base na maioria dos casos (Murgo, 1998).

Neste trabalho foi utilizada a técnica de ionização por *Electrospray* (ESI) a qual é diferente da maioria das outras técnicas pelo fato de ser feita a pressão atmosférica, onde os íons são direcionados à região de alto vácuo e analisados. A técnica ESI apresenta alta sensibilidade e capacidade de produzir íons moleculares varrendo compostos de baixa massa molecular até biopolímeros, de elevada massa molecular, permitindo que as interações não covalentes entre moléculas que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa e, como o aquecimento não é aplicado diretamente na amostra, permite a análise de substâncias muito polares e lábeis (Thompson, 1998).

Os melhores resultados analíticos são, em geral, obtidos para moléculas iônicas em solução e onde os íons observados na fase gasosa são uma representação qualitativa dos íons na solução da amostra original, retendo aspectos da sua estrutura e associações não covalentes. Em princípio, todas as moléculas que podem ser carregadas são acessíveis a uma análise por ESI/MS.

1.8.1. *Electrospray* como interface em LC/MS

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (GC/MS) é considerada uma técnica analítica adequada para a análise de misturas complexas, mesmo que limitada por ser aplicável apenas a moléculas relativamente voláteis e termicamente estáveis. O acoplamento entre a cromatografia líquida e a

espectrometria de massas (LC/MS) foi desenvolvido para a análise de compostos sem estas características. Dentre as interfaces desenvolvidas, a interface a pressão atmosférica (API) quando operada no modo *electrospray* possui um grande potencial para a análise de uma variedade de moléculas com uma vasta gama de massas moleculares com alto grau de sensibilidade. A ionização por *electrospray* requer um fornecimento constante de líquido e é por isso facilmente acoplada a um sistema de separação, tal como um cromatógrafo líquido.

Um espectro de ESI apresenta geralmente o íon molecular e seus adutos ($[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$) como principais íons do espectro, fornecendo como informação principal a massa molar da substância, com pouca informação estrutural devido á ausência de fragmentação; para resolver este problema foi desenvolvida a espectrometria de massas *tandem* (Murgo, 1998).

1.8.2. Espectrometria de Massas *Tandem* (MS/MS).

A Espectrometria de Massas *Tandem* (MS/MS) foi desenvolvida para complementar as técnicas de ionização ESI, APCI e MALDI no sentido de proporcionar fragmentação aos íons originados, oferecendo assim, informação estrutural.

Num experimento MS/MS é selecionado um íon específico numa mistura de íons, proporcionando a fragmentação do mesmo, gerando assim íons produtos cujo espectro de massas é característico da estrutura do íon precursor (McLafferty, 1993; Siuzdak, 1996). Alguns dos experimentos MS/MS serão desenvolvidos no trabalho, portanto, para uma melhor compreensão, eles serão apresentados aqui.

Entre os analisadores de massas que podem ser utilizados em MS/MS o analisador de duplo quadrupolo apresenta várias vantagens em custos e aplicações. O analisador de duplo quadrupolo é formado por dois quadrupolos ligados em série a uma cela de colisão, como mostra a figura 1.6. Um quadrupolo consiste em quatro barras paralelas, arranjadas em dois pares opostos onde é aplicada uma corrente contínua (DC) a qual se superpõe um potencial de radiofreqüência; a aplicação

destas duas voltagens afeta a trajetória centralizada dos íons. Ao variar a corrente, somente íons com uma razão m/z determinada irão atravessar no centro do quadrupolo, enquanto que os outros íons serão desviados da trajetória central (Siuzdak, 1996).

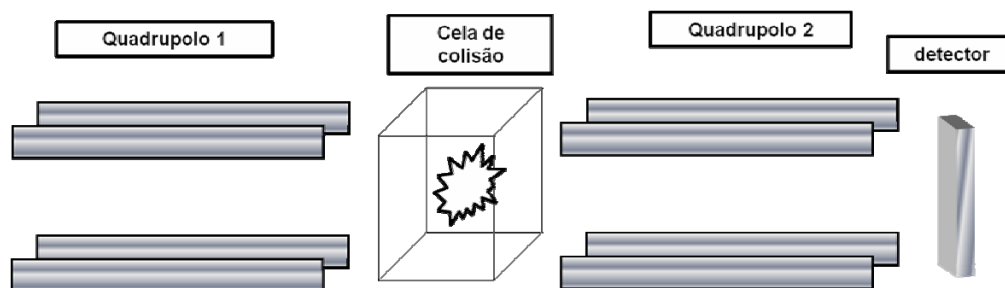


FIGURA 1.6 Esquema de um analisador de duplo quadrupolo.

1.8.3. Experimentos de MS/MS.

a) Aquisição no modo *full scan*.

Quando a aquisição é feita no modo *full scan* (FIGURA 1.7), os íons de uma dada relação massa/carga são filtrados no primeiro quadrupolo, que opera em radiofrequência e voltagem de corrente direta. Estes íons passam intactos pela câmara de colisão a qual estará desativada e pelo segundo quadrupolo, que opera somente em radiofrequência (McLafferty, 1993; Siuzdak, 1996). No espectro de massas são observadas as moléculas ionizadas e seus adutos, que poderão ser selecionados e fragmentados.

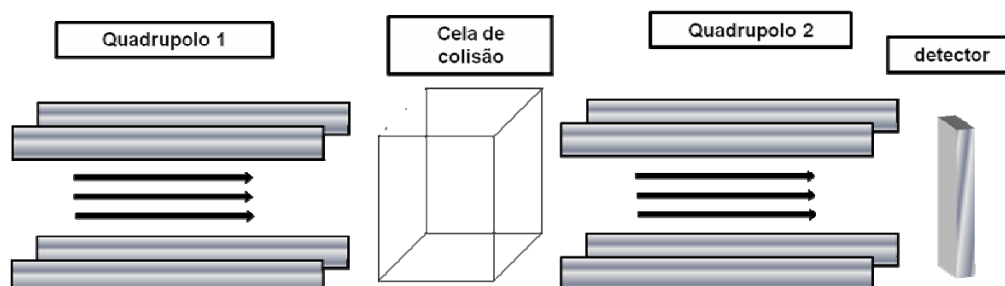


FIGURA 1.7 Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição “*full scan*”.

b) Experimento de íons produtos.

Neste experimento o íon de interesse observado no espectro de *full scan* poderá ser fragmentado, e a partir das análises destes fragmentos é possível obter informação estrutural. O primeiro quadrupolo, operado à radiofrequência e voltagens de corrente direta fixas, permite somente a passagem dos íons com uma determinada relação massa/carga, os quais são dirigidos à cela de colisão onde o gás introduzido geralmente argônio produz a fragmentação destes íons. Os fragmentos gerados são analisados no segundo quadrupolo e direcionados ao detector (Siuzdak, 1996). Na figura 1.8 é observada uma representação esquemática deste experimento.

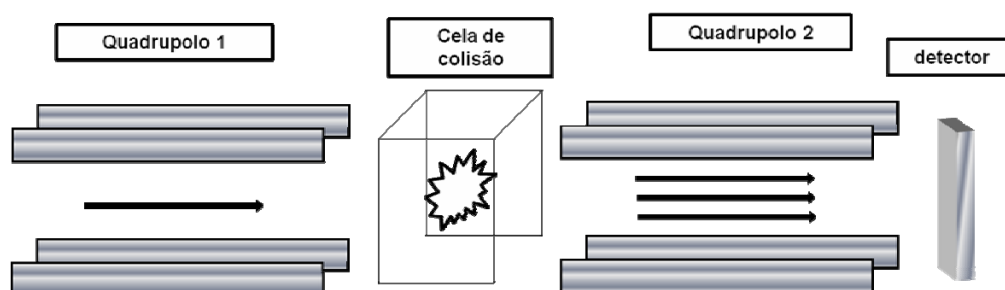


FIGURA 1.8 Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “íons produtos”.

c) Experimento de íons precursores.

Neste experimento todos os íons são analisados no primeiro quadrupolo, que opera no modo de varredura. Estes íons são fragmentados na cela de colisão e somente são escaneados no segundo quadrupolo aqueles íons que geram fragmentos de uma determinada relação massa/carga, este quadrupolo deverá estar operando em radiofrequência e voltagens de corrente direta fixas (Strege, 1999).

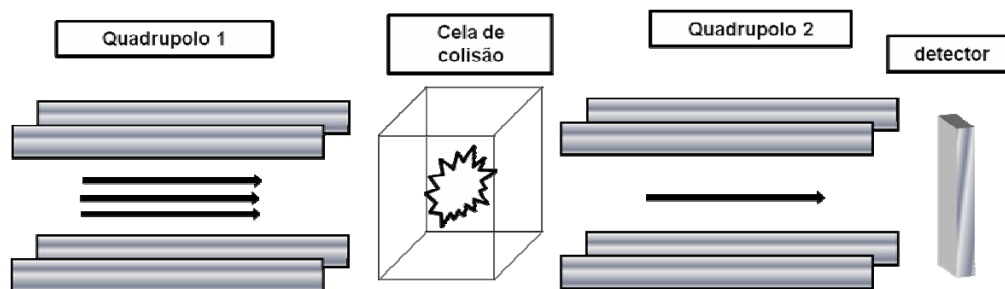


FIGURA 1.9 Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição “íons precursores”.

d) Experimento de perda de moléculas neutras.

Neste experimento (FIGURA 1.10), o primeiro e o segundo quadrupolo operam em sincronia, ambos no modo de varredura. Cada íon transmitido pelo primeiro quadrupolo é fragmentado na cela de colisão e analisado no segundo quadrupolo, onde as diferenças de massas são estabelecidas. Os íons que apresentarem a perda neutra de uma determinada massa pré- especificada são registrados no detector. (Strege, 1999).

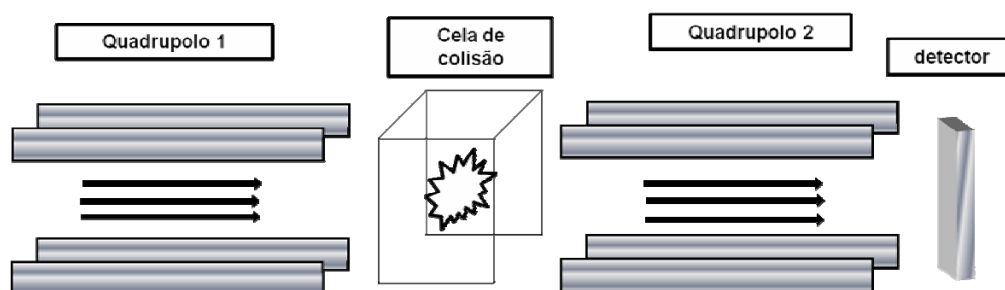


FIGURA 1.10 Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição de “perda de moléculas neutras”.

e) Experimento “Selected Reaction Monitoring” (SRM).

O experimento “SRM” é o de maior seletividade, neste, (FIGURA 1.11) o primeiro e segundo quadrupolo são operados em radiofrequência e voltagens de corrente direta fixas. O primeiro quadrupolo escaneia íons de uma relação massa/carga determinada, estes íons serão fragmentados na cela de colisão e analisados no segundo quadrupolo (Strege, 1999).

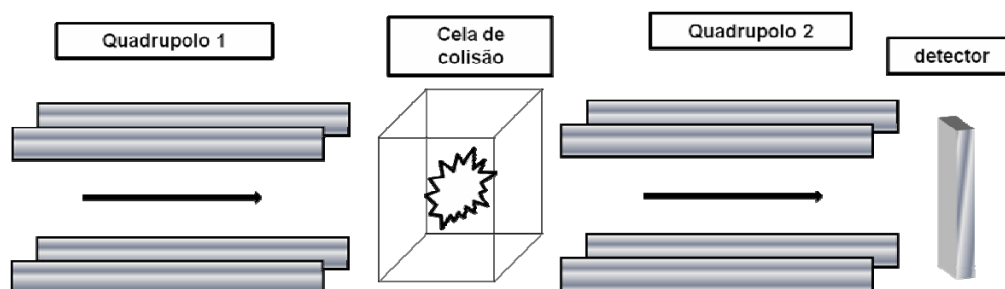


FIGURA 1.11 Analisador de duplo quadrupolo operado no modo de aquisição “SRM”.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram:

- Desenvolver metodologias de análise para antibióticos β -lactâmicos utilizando padrões e técnicas de espectrometria de massas.
- Determinar a presença de antibióticos β -lactâmicos e de outros metabólitos nos caldos de fermentação de *Streptomyces clavuligerus* e em cultivos dos fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, mediante técnicas de espectrometria de massas acoplada ou não a cromatografia líquida.
- Isolar e caracterizar metabólitos secundários das culturas de *Streptomyces clavuligerus* por diferentes métodos analíticos e cromatográficos.
- Estudar a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de antibióticos β -lactâmicos por *Streptomyces clavuligerus* em mesa incubadora rotativa.
- Verificar as atividades antibacterianas dos extratos e frações dos fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* e do actinomiceto *Streptomyces clavuligerus*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos

- ❖ Espectrômetros de RMN

BRUKER ARX 200

BRUKER ARX 400

- ❖ Espectrômetro de Massas

Equipamento Quattro LC – Micromass, triple quadrupole

- ❖ Cromatógrafo Líquido (Waters)

Detector de UV (PDA) para CLAE Waters 2996

Waters 2695 Separations Module.

- ❖ Evaporadores Rotativos

Rotoevaporador rotativo Tecnal (TE 120)

Rotoevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)

- ❖ Câmara de Fluxo Laminar

Veco VL FS-12M

- ❖ Autoclave Vertical

Phoenix AV 70

Soc. FABBE 103

- ❖ Triturador

Turratec Tecnal

- ❖ pHmetro

Tecnal Tec-3MP

- ❖ Ultrafreezer

Bio-Freezer Forma Scientific Temperatura -50 °C.

- ❖ Biorreator Convencional

Bioflo III da New Brunswick

- ❖ Mesa Incubadora Rotativa

Tecnal TE 140

- ❖ Centrífuga

Volcon Technologies

- ❖ Concentrador Centrífugo a Vácuo (Speedvac)

Thermo Scientific

3.2. Reagentes e materiais cromatográficos

- ❖ Suportes para Cromatografia

Sílica gel 70-230 Mesh

Lipophilic Sephadex LH-20 (Sigma)

Sílica gel 230-400 Mesh

Sílica gel 60 PF 254.

- ❖ Coluna Waters Spherisorb®S3 ODS 1 (2.0mm x 100 mm).

- ❖ Solventes

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

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

Solventes de grau de HPLC Merck e Aldrich.

- ❖ Antibióticos Padrões

Penicilina G, Amoxicilina, Cefalosporina C, Cefoxitina, Ácido clavulânico adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.3. Cultivo do *Streptomyces clavuligerus*.

Com a intenção de testar a produção de metabólitos secundários em diferentes condições de cultivo, foram realizados ensaios em mesa incubadora rotativa e em biorreator convencional. Nos ensaios em incubador rotativo foram usados substratos solúveis nos meios de cultura e nos cultivos em biorreator foram usados substratos complexos como principais componentes do meio.

A cepa ATCC 27064 do *Streptomyces clavuligerus* foi cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, na forma de micélios liofilizados. Após reidratação das células e reativação em meio apropriado (TABELA 3.1), alíquotas da suspensão micelial (~3,5 mL) com uma concentração celular de 1.4×10^{-3} , foram distribuídas em criotubos e conservadas a -70 °C em solução de glicerol a 20% v/v.

3.3.1. Experimentos em mesa incubadora rotativa

Os procedimentos utilizados nesta secção do trabalho tiveram como base os estudos realizados por Rosa (2002) e a composição dos meios de cultura foi baseada nos estudos realizados por Sperandei (2003). Os cultivos foram desenvolvidos em três etapas:

3.3.1.1. Etapa de reativação

Na etapa de reativação, um erlenmeyer de 500 mL ou 1000 mL que continha 50 mL de meio de reativação (MR, TABELA 3.1) previamente esterilizado, foi inoculado com um criotubo (3.5 mL). O erlenmeyer foi mantido em incubador rotativo por 24 horas, a temperatura ambiente e 130 rpm.

3.3.1.2. Etapa de preparação do inóculo

Na etapa de preparação do inóculo, dois erlenmeyers de 500 mL ou 1000 mL que continham 50 mL do meio de inoculação (MIn, TABELA 3.1) previamente esterilizados, foram inoculados com 5 mL da suspensão de células obtida na etapa de reativação. Os erlenmeyers eram mantidos em incubador rotativo por 24 horas, a temperatura ambiente e 130 rpm.

3.3.1.3. Etapa de produção

Na etapa de produção, oito erlenmeyers de 500 mL ou 1000 mL previamente esterilizados que continham 45 mL do meio de produção (TABELA 3.2), foram inoculados com 5 mL da suspensão de células obtida na etapa do inóculo. Os erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo entre 94 e 130 horas, a temperatura ambiente e 130 rpm.

TABELA 3.1 Composição dos meios de reativação e do inóculo.

Composição	Meio de reativação g/L	Meio do inóculo g/L
	MR	MIn
Peptona bacteriológica	10	10
Extrato de malte	10	-
Glicerol	15	20
Extrato de levedura	1.0	1.0
KH ₂ PO ₄	2.5	2.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75	0.75
MOPS ⁽¹⁾	21	21
Solução de sais ⁽²⁾	1mL	1 mL
Ajuste do pH com NaOH	pH 6.9±0.2	pH 6.9±0.2

(1) Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

(2) Composição: MnSO₄. H₂O (1.0 g/L), FeSO₄. 7H₂O (1.0 g/L), ZnSO₄. 7H₂O (1.0 g/L).

Com a finalidade de conhecer a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de metabólitos secundários, foram testados diferentes substratos sintéticos

nos meios de cultura (TABELA 3.2). Estes meios menos complexos compostos por substâncias quimicamente definidas, facilitam as análises principalmente por espectrometria de massas devido ao menor número de interferências provenientes dos meios de cultura.

Foram testadas as melhores condições de: tempo de cultivo, capacidade dos erlenmeyers, e a quantidade do meio de cultura adicionado nos mesmos. Já o pH do meio de cultura foi mantido em todas as etapas de 6.9 a 7.1 através da adição de tampão MOPS, tal como descrito anteriormente. Para cada um dos ensaios foi feito um controle.

TABELA 3.2 Composição dos meios de produção usados em incubador rotativo para *S. clavuligerus*.

Composição (Meio solúvel)	Meio I g/L M I	Meio II g/L M II	Meio III g/L M III	Meio IV g/L M IV
Triptona	15	15	-	-
Soytone	-	-	15	15
Amido	15	-	-	15
Extrato de malte	10	10	10	10
Glicerol	-	15	15	-
Extrato de levedura	1.0	1.0	1.0	1.0
KH ₂ PO ₄	0.8	0.8	0.8	0.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.75	0.75	0.75	0.75
Lisina	-	-	-	3.0
CaCl ₂	0.4	0.4	0.4	0.4
MOPS ⁽¹⁾	21	21	21	21
Solução de sais ⁽²⁾	1 mL	1mL	1 mL	1 mL
Ajuste do pH com NaOH	pH 6.9±0.2	pH 6.9±0.2	pH 6.9±0.2	pH 6.9±0.2
Tempo de cultivo	94 horas	94 horas	120 horas	120 horas

(1) Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

(2) Composição: MnSO₄. H₂O (1.0 g/L), FeSO₄. 7H₂O (1.0 g/L), ZnSO₄. 7H₂O (1.0 g/L).

3.3.2. Cultivo em biorreatores

Com o objetivo de produzir cultivos em escala maior, foram realizados ensaios em biorreator convencional de bancada tipo tanque agitado e aerado, modelo Bioflo III da New Brunswick, disponível no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar; Este fermentador possui uma capacidade de 5 litros de volume útil e se encontra equipado com controle de temperatura, agitação aeração, eletrodos de pH e de oxigênio dissolvido, bem como de fluxômetro de massa e registrador dos gases de saída (CO_2 e O_2) para o acompanhamento da velocidade de respiração do microrganismo.

As etapas de reativação e de preparo do inóculo seguiram o mesmo procedimento dos cultivos em mesa incubadora rotativa, diferenciando-se somente na etapa de produção que é realizada no fermentador, no qual foi controlada a temperatura em 28 °C, a agitação em 800 rpm e a aeração em 0.5 vvm. O controle de pH em 6.8 foi feito a través da adição de ácido (4M HCl) e base (1M NaOH).

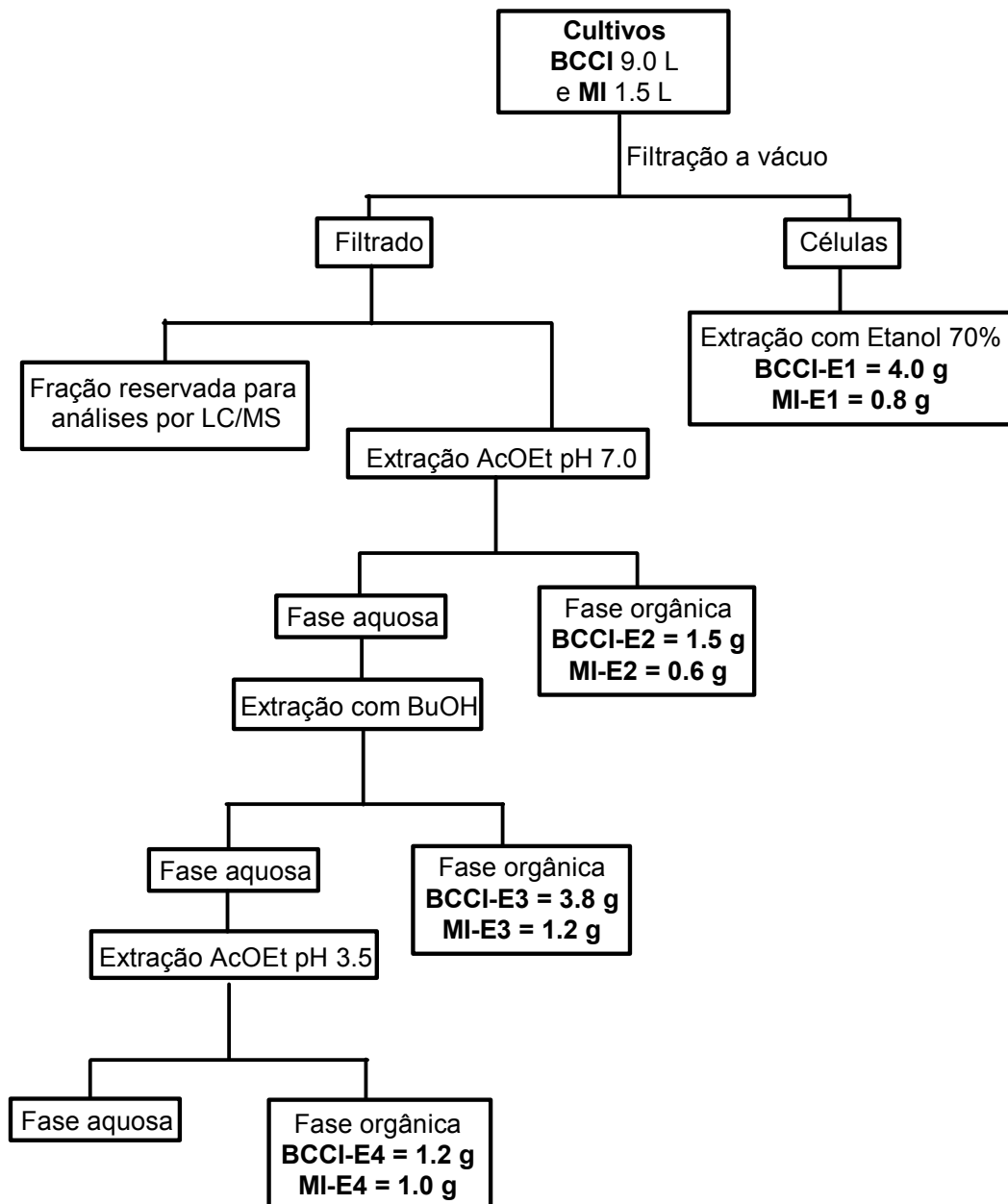
Os cultivos em biorreator de linhagens de *Streptomyces clavuligerus* foram feitos em meios de cultura complexos, os quais são quimicamente indefinidos provenientes de fontes de origem vegetal. Estes substratos geralmente garantem uma maior produção de metabólitos secundários possibilitando o isolamento dos compostos e a sua determinação estrutural. A composição dos meios de cultura esta descrita na tabela 3.3.

TABELA 3.3 Composição dos meios de produção usados nas fermentações em biorreator para *S. clavuligerus*.

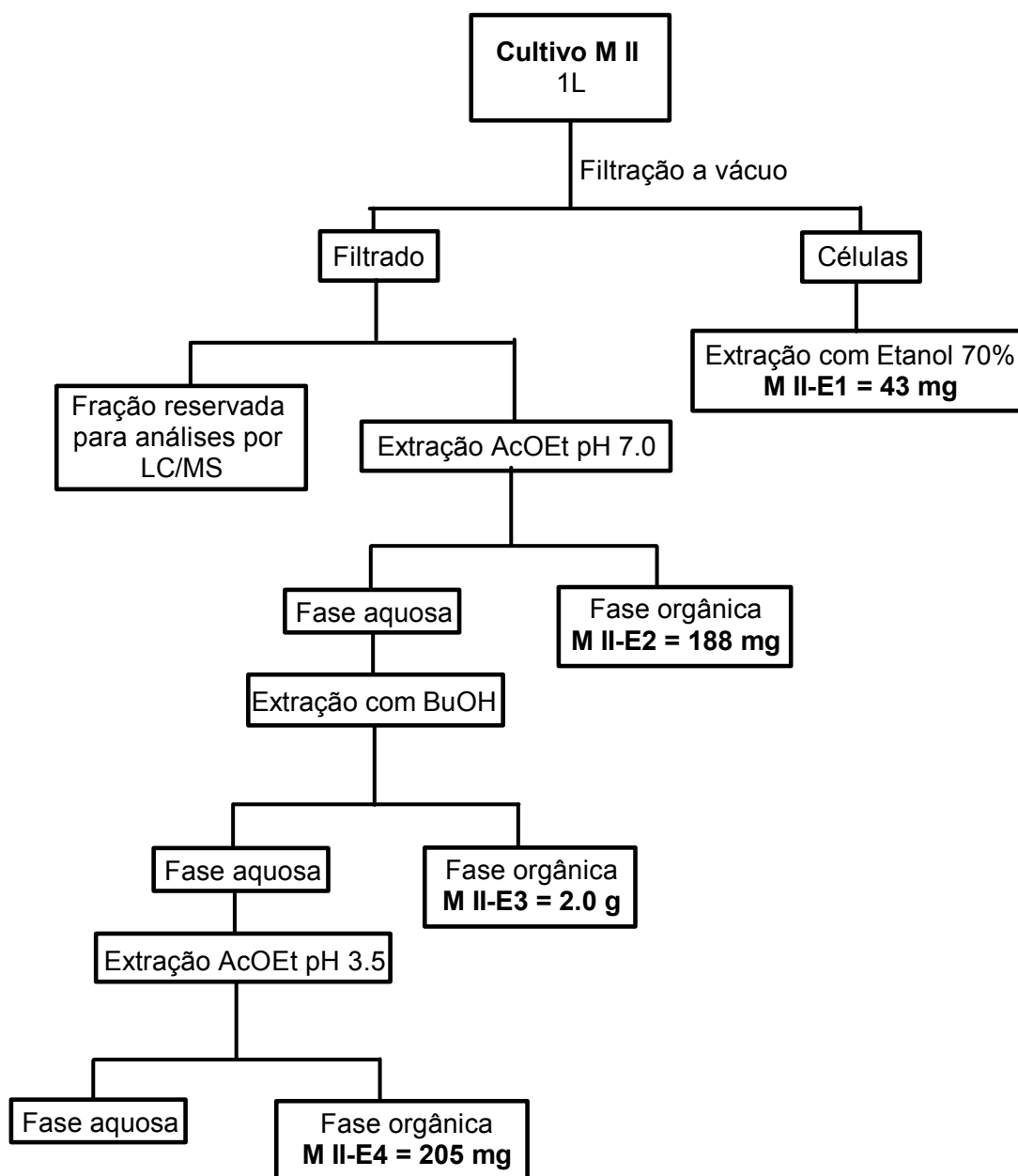
Composição	Meio BCCI g/L	Meio BCCII g/L
Farinha de soja	20	-
Caseína hidrolisada	10	10
Extrato de levedura	1.0	1.0
Extrato de carne	1.0	-
Lisina	1.0	3.0
Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	5.0	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄	0.5	0.5
Amido	-	15
Farinha de algodão	-	20
Óleo de soja	7.0	-

3.3.3. Obtenção dos extratos das culturas de *Streptomyces clavuligerus*

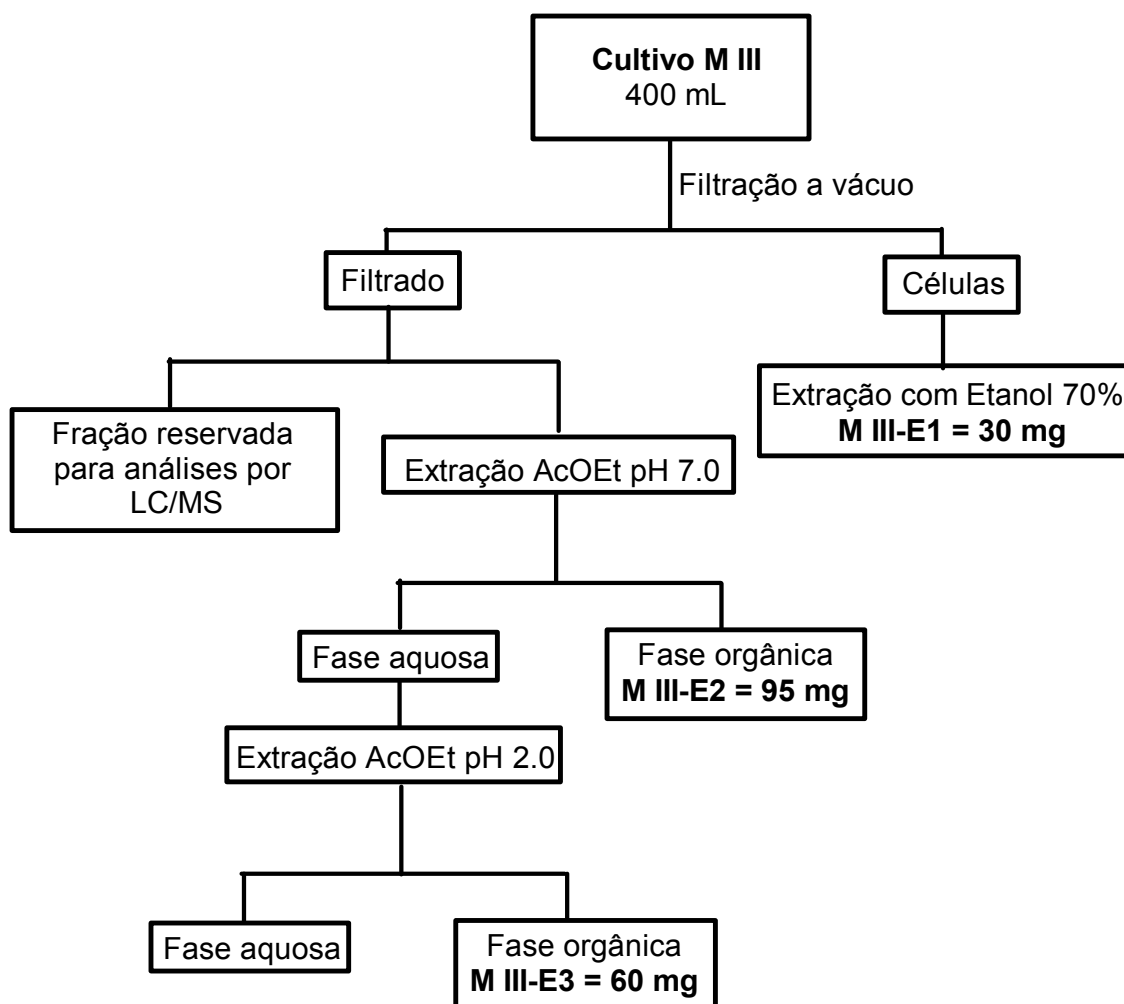
Com o objetivo de avaliar o comportamento químico dos constituintes nos meios de cultura fermentados, após a secagem foram feitas diversas extrações contínuas com solventes orgânicos, a pH neutro e ácido, segundo os esquemas representados a seguir (ESQUEMAS 3.1, 3.2 e 3.3). As frações obtidas foram usadas nas análises para o isolamento de metabólitos secundários sendo reservada uma parte do extrato bruto para as análises por LC/MS e os ensaios antimicrobianos.



ESQUEMA 3.1 Processo de extração e partição dos cultivos obtidos em biorreator (BCCI) e em mesa incubadora rotativa (M I).



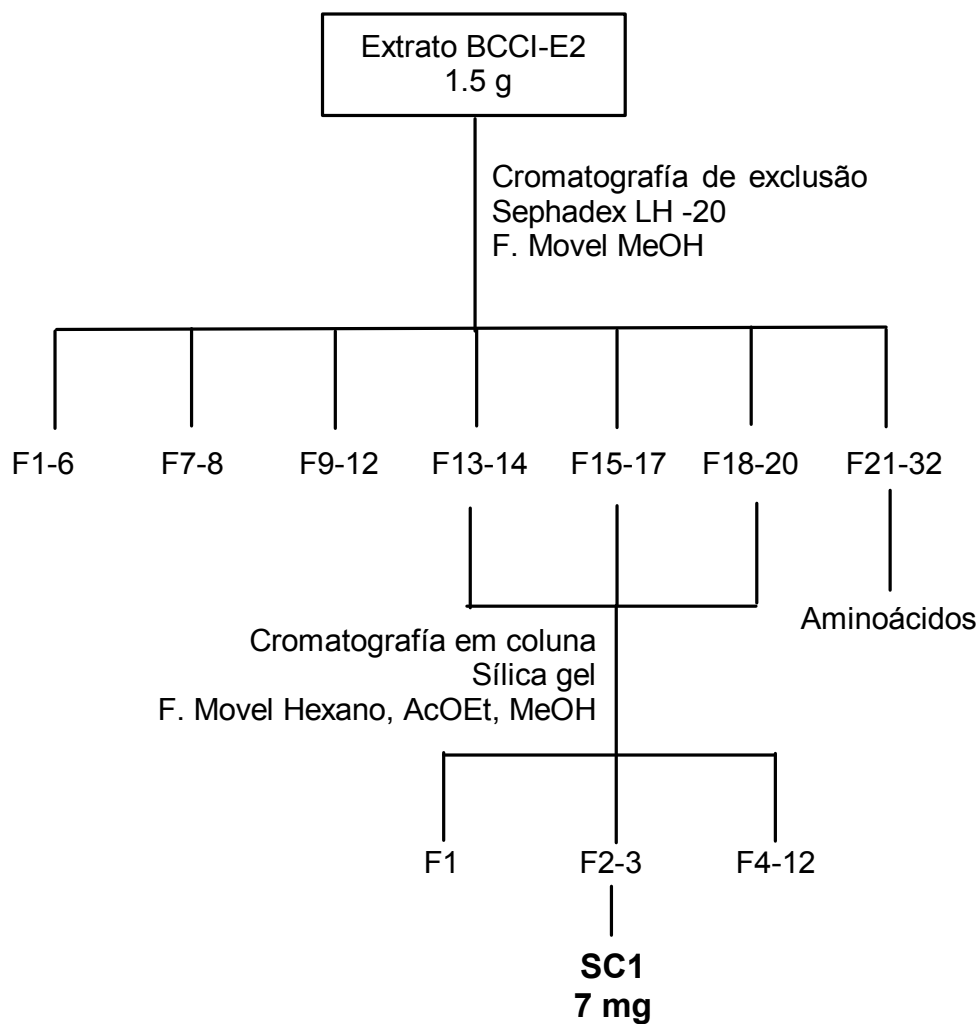
ESQUEMA 3.2 Processo de extração e partição do cultivo obtido em mesa incubadora rotativa (M II).



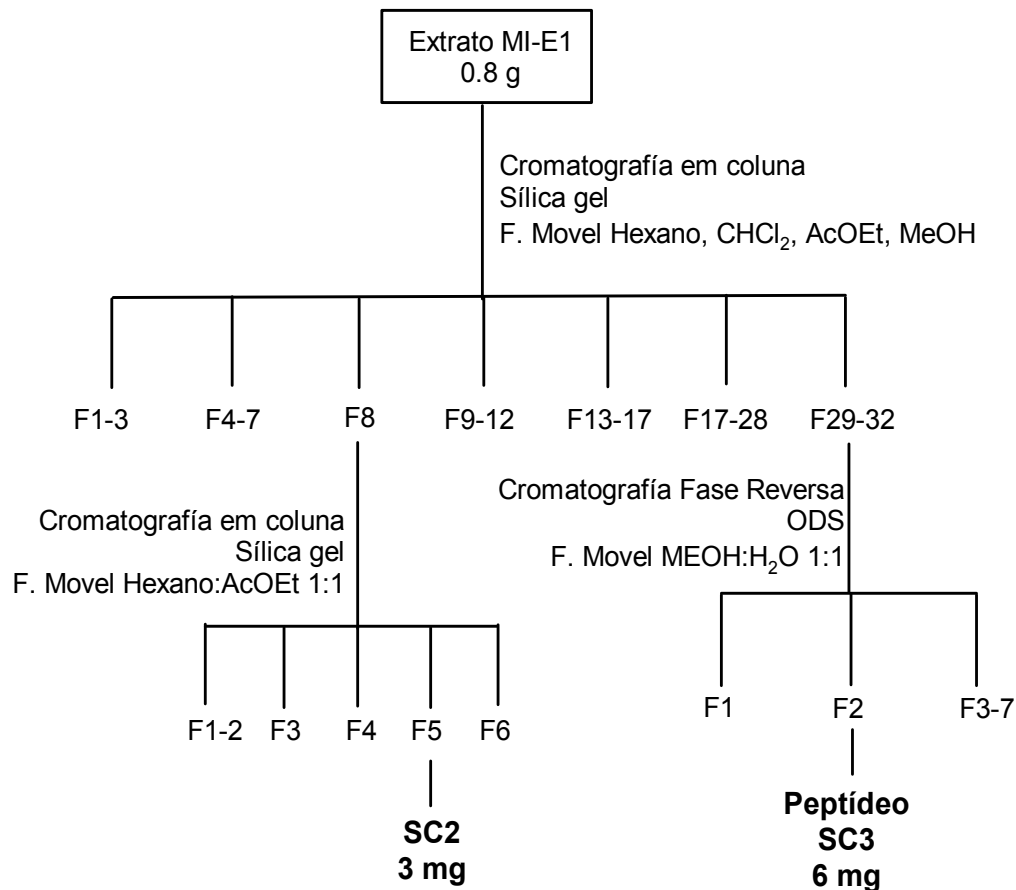
ESQUEMA 3.3 Processo de extração e partição do cultivo obtido em mesa incubadora rotativa (M III).

3.4. Isolamento de metabólitos produzidos por *Streptomyces clavuligerus*.

Os extratos obtidos segundo procedimento anteriormente descrito, foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Com base nas apreciações, todos os extratos foram fracionados, entretanto, somente dos extratos BCCI-E2 e MI-E1, foi possível isolar substâncias puras. Os fluxogramas de extração são descritos nos esquemas 3.4 e 3.5; as substâncias puras são destacadas em negrito.



ESQUEMA 3.4 Fracionamento do extrato BCCI-E2.



ESQUEMA 3.5 Fracionamento do extrato M1-E1

3.5. Cultivo dos fungos endofíticos *Penicillium s.p*, *P. brasilianum*, *P. griseoroseum* e *Aspergillus aculeatus*

Com o intuito de determinar a presença de compostos β -lactâmicos, os fungos endofíticos, obtidos da micoteca do laboratório LaBioMMi: *Penicillium s.p* isolado de *Murraya paniculata*, *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus aculeatus* isolados *Melia azedarach* e *Penicillium griseoroseum* isolado dos grãos de *Coffea arabica*, foram inoculados e reativados em meio de cultura BDA (Batata, dextrose, Ágar), utilizando a técnica de semeadura em superfície, durante sete dias a 25°C. Após serem reativados, os fungos foram inoculados em dois meios de cultura diferentes em pequena escala: Meio sólido arroz (Uncle Bens) e meio líquido Czapeck's.

3.5.1. Cultivo em meio sólido

O cultivo dos fungos em meio sólido foi feito em arroz parbolizado (Uncle Bens). A 3 erlenmeyers de 500 mL foram adicionados 75 mL de água destilada e 90 g de arroz, em seguida os erlenmeyers foram autoclavados duas vezes por 40 minutos a 121 °C e 1 atm. num intervalo de 24 horas, após do período de esterilização, 100 µl de solução de esporos do fungo em estudo foram transferidos assepticamente para cada erlenmeyer. Os erlenmeyers foram mantidos estáticos, protegidos da luz e a temperatura ambiente por 20 dias. Foram empregados três frascos como controle.

3.5.1.1. Obtenção dos extratos

Após do período de cultivo, o crescimento do microrganismo foi interrompido com a adição de 100 mL de metanol. A mistura foi triturada e deixada em repouso por 24 horas, e posteriormente o micélio foi filtrado a vácuo. O filtrado foi concentrado em concentrador centrífugo a temperatura ambiente, garantindo a conservação dos compostos de interesse nos extratos. Este procedimento foi repetido por três dias consecutivos. Uma segunda extração com metanol:água 3:7 foi realizada seguindo o mesmo processo anteriormente descrito. Os procedimentos de cultivo e extração foram feitos separadamente e de igual forma para cada um dos quatro fungos em estudo. Na tabela 3.4 são apresentados os rendimentos dos extratos obtidos por fungo.

TABELA 3.4 Rendimentos dos extratos. Cultivos em meio sólido.

Espécie	Extrato Metanólico g/(Código)	Extrato MeOH:H₂O g/(Código)
<i>Penicillium s.p</i>	1.7 (SP1)	0.9 (SP2)
<i>Penicillium brasilianum</i>	1.4 (PB1)	0.79 (PB2)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	2.3 (AA1)	1.1 (AA2)
<i>Penicillium griseoroseum</i>	1.8 (PG1)	0.5 (PG2)

3.5.2. Cultivo em meio líquido

Os cultivos em meio líquido foram feitos em meio Czapek'k enriquecido com 2% de extrato de levedura. Inicialmente, 3 erlenmeyers com 150 mL do meio de cultura Czapek'k foram autoclavados a 121 °C e 1 atm. por 20 minutos. Após da esterilização, 100µl de solução de esporos previamente preparada foram adicionados a cada frasco. Os erlenmeyers foram mantidos estáticos, protegidos da luz e a temperatura ambiente por 18 dias. Adicionalmente três frascos foram mantidos como controle.

TABELA 3.5 Meio de cultura Czapek'k enriquecido com 2% de extrato de levedura.

Reagentes	g/L de água
NaNO ₃	3.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Glicose	30
Extrato de levedura	20

3.5.2.1. Obtenção dos extratos

Após o período de crescimento o micélio produzido em cada erlenmeyer foi filtrado, triturado e extraído com etanol 70%; a fase aquosa foi concentrada em concentrador centrífugo a temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram conservados em freezer e usados nas análises por espectrometria de massas. Os procedimentos de cultivo e extração foram feitos separadamente e de igual forma para cada um dos quatro fungos em estudo. Os rendimentos dos extratos obtidos por fungo são apresentados na tabela 3.6.

TABELA 3.6 Rendimentos dos extratos. Cultivos em meio líquido.

Espécie	Extrato bruto filtrado g/(Código)	Extrato bruto micelial g/(Código)
<i>Penicillium s.p</i>	3.5 (SP3)	1.9 (SP4)
<i>Penicillium brasilianum</i>	4.3 (PB3)	2.2 (PB4)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	4.5 (AA3)	3.6 (AA4)
<i>Penicillium griseoroseum</i>	2.9 (PG3)	2.0 (PG4)

3.6. Ensaios antimicrobianos

Com a finalidade de testar as propriedades antimicrobianas dos extratos, foram utilizadas as bactérias Gram Positivas *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* e a bactéria Gram Negativa *Escherichia coli* na realização dos ensaios biológicos.

3.6.1. Ativação das bactérias

As bactérias testadas nos ensaios foram ativadas em placa de Petri de 9 cm de diâmetro contendo Ágar Muller Hinton devidamente esterilizado (9.5 g em 250 mL de água), por um período de 24 horas a 33 °C. Após esse intervalo transferiu-se cerca de uma colônia de cada bactéria para tubos contendo 3 mL de caldo Muller Hinton (10.5 g em 50 mL de água), com o auxílio de uma alça de platina devidamente esterilizada. Estes tubos após serem homogeneizados, foram incubados por um período de 24 a 30 horas, a uma temperatura de 33 °C. Suas concentrações foram padronizadas frente a escala de McFarland de turbidez padrão para se obter uma cultura com aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônias).

3.6.2. Padronização das culturas

Primeiramente preparou-se uma solução de sulfato de bário numa concentração referente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para se obter essa concentração foi necessário fazer uma mistura das soluções de H₂SO₄ 1% (9,95 mL) e BaCl₂ 1% (0,05mL). Feito isso se comparou o grau de turbidez do tubo de ensaio contendo a bactéria com o do

padrão contendo sulfato de bário. Com essa padronização o tubo contendo a bactéria apresentará uma concentração aproximadamente de $1,0 \times 10^8$ UFC. Quando necessário, realizou-se a diluição do tubo contendo a bactéria utilizando solução salina estéril 0,9%.

3.6.3. Preparo das amostras

Os extratos testados foram dissolvidos em DMSO, em tubo de Eppendorf, e agitados em agitador de tubos para homogeneizar a solução. A concentração das amostras foi de 3000 $\mu\text{g/mL}$.

3.6.4. Preparo do antibiótico controle

Foi usada tetraciclina como antibiótico padrão, preparada numa concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, dissolvida em DMSO.

3.6.5. Ensaio preliminar (nome da metodologia)

Em placas petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BHI (52 g em 1L de água) inoculou-se as bactérias testes através da técnica de semeadura em superfície. Em cada placa foram feitos nove furos com o auxílio de um tubo de vidro. Em cada furo foi acrescentado 50 μL dos extratos a serem testadas na concentração de 3 mg/mL e deixaram-se as placas a 37 °C por um período de 24 a 48 horas para crescimento das bactérias. Após esse período observou-se quais extratos tinham sido ativos através da formação do halo de inibição. Cada extrato foi testado em triplicata, e foi determinada a média da medida do diâmetro do halo de inibição dos extratos ativos.

3.7. Análises de compostos β -lactâmicos por espectrometria de massas

Embora existam na literatura reportes de análises para compostos β -lactâmicos por espectrometria de massas, estes só se restringem à determinação das massas moleculares destes compostos, principalmente em análises de fluidos biológicos e leite. Com o objetivo de estudar em detalhe as características de fragmentação de alguns antibióticos β -lactâmicos, foram analisados alguns padrões comerciais de compostos β -lactâmicos. Após a otimização das condições experimentais, foram analisados os extratos obtidos a partir dos cultivos dos microrganismos na procura destes compostos, utilizando experimentos de *full-scan*, íons produtos, íons precursores e de SRM (Selected Reaction Monitoring).

3.7.1. Análises dos antibióticos padrões.

Foram preparados numa concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em metanol:água 2:8 os padrões comerciais de amoxicilina, penicilina G, cefalosporina C, cefoxitina e o ácido clavulânico; estas soluções foram analisados num equipamento MICROMASS QUATRO II mediante a técnica de ionização por *electrospray*.

3.7.1.1 Padrões de Penicilinas e Cefalosporinas

As moléculas da classe das cefalosporinas e penicilinas foram analisadas no modo positivo de ionização; as condições experimentais são descritas nas tabelas 3.7. Embora as análises por espectrometria de massas *tandem* não requeiram uma ótima separação cromatográfica, com o objetivo de aumentar a sensibilidade dos diferentes métodos empregados foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; onde foi usada como fase estacionária uma coluna Waters Spherisorb®S3 ODS 1 (2.0mm x 100 mm) e como fase móvel uma variação do gradiente apresentado na tabela 3.8.

TABELA 3.7 Condições do espectrômetro de massas para compostos da classe das penicilinas e cefalosporinas. ESI (+).

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura do probe (°C)	350
Capilar (kV)	3.05
Cone (V)	17
Extrator (V)	8
Lentes RF (V)	0.70

TABELA 3.8 Condições utilizadas nas análises por LC/MS.

Tempo (Min.)	H ₂ O + 0,1%TFA (%)	MeOH + 0,1%TFA (%)
0.00	90	10
10	80	20
20	70	30
30	60	40
40	40	60
45	0.0	100
50	0.0	100
55	90	10
65	90	10

* TFA = Ácido trifluoroacético.

3.7.1.2. Padrão do ácido clavulânico

As análises do ácido clavulânico foram realizadas no modo negativo de ionização por inserção direta numa concentração de 50 µg/mL. As condições experimentais das análises estão descritas na tabela 3.9.

TABELA 3.9 Condições do espectrômetro de massas para o ácido clavulânico. ESI⁻

Temperatura da fonte (°C)	50
Temperatura do probe (°C)	350
Capilar (kV)	3.15
Cone (V)	32
Extrator (V)	11
Lentes RF (V)	0.70

3.7.2. Análises dos extratos

Após estudo das fragmentações dos compostos β -lactâmicos analisados por *electrospray* (ESI), pode-se estabelecer os melhores experimentos para a detecção seletiva dessas substâncias nos meios de cultura. A partir dos fragmentos observados nos espectros de íons produtos, foi possível determinar os canais de SRM para as substâncias de interesse e as melhores condições de análise para os experimentos de íons precursores.

Inicialmente foram pesados 50 mg de cada um dos extratos, após serem diluídos em 4 mL de MeOH:H₂O 2:8, a solução obtida foi sonicada por 5 minutos e centrifugada por 20 minutos mais; o sobrenadante foi filtrado e reservado para as análises. A obtenção dos espectros por *full scan*, íons produtos e íons precursores, foi feita de acordo com as condições estabelecidas para os padrões. As condições utilizadas nos experimentos de SRM são citadas nas tabelas 3.10, 3.11 e 3.12.

TABELA 3.10 Condições de SRM para o ácido clavulânico.

Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Íon Produto (<i>m/z</i>)	Energia de Colisão (eV)
198	136	7.0
198	108	7.0

TABELA 3.11 Condições de SRM para penicilina G.

Íon Precursor	Íon Produto	Energia de Colisão
(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(<i>eV</i>)
335	160	15.0
335	176	15.0

TABELA 3.12 Condições de SRM para cefalosporina C

Íon Precursor	Íon Produto	Energia de Colisão
(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	(<i>eV</i>)
416	143	20.0
416	312	20.0

Na tentativa de determinar a presença de alguns compostos produzidos pelos microrganismos diferentes dos padrões previamente analisados, foi usada a ferramenta de monitoramento de íons. Nos extratos onde estas substâncias foram detectadas, foram realizados experimentos de SRM e de íons produtos. As análises são descritas na seção 4 página 69.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultivos dos microrganismos

Streptomyces clavuligerus é um microrganismo reconhecido por produzir diferentes classes de metabólitos secundários como foi descrito anteriormente dentro dos quais se destacam os antibióticos β -lactâmicos. A formulação adequada do meio de cultura principal deve favorecer o processo como um todo (bom crescimento e produção) e determinará a classe de compostos a serem produzidos. As composições dos meios utilizados no presente trabalho foram elaboradas levando-se em consideração as seguintes informações da literatura e proposições:

- O glicerol é a fonte de carbono e energia mais adequada para o cultivo de *S. clavuligerus* (Kieser *et al.*, 2000), porém, concentrações acima de 165 mM no meio fermentativo podem inibir a produção de ácido clavulânico (Romero *et al.*, 1984).
- Fontes orgânicas de nitrogênio como aminoácidos, farinhas de soja, milho ou algodão e/ou extratos protéicos vegetais, são mais adequadas ao desenvolvimento celular do que as fontes inorgânicas como os sais de amônio (Kieser *et al.*, 2000; Trovatti, 2001).
- Para não haver limitação pelo oxigênio dissolvido nos frascos, a fermentação foi feita em frascos de 1L sob agitação.
- Finalmente, a utilização do tampão biológico MOPS permitiu manter o pH em 6,9 +/- 0,2 durante todas as fermentações, evitando uma possível degradação dos compostos principalmente do ácido clavulânico, uma vez que este composto é muito susceptível à degradação em valores $7,5 < \text{pH} < 6,0$ (Bersanetti *et al.*, 2005).

Os cultivos iniciais foram feitos para otimizar as condições de cultivo. Primeiramente foi observado que a velocidade de agitação influenciava o crescimento do microrganismo nas etapas de reativação e do inóculo, onde a menores velocidades de aeração o crescimento celular foi mais lento ou não ocorria. Foi determinado 130 rpm como a menor velocidade no incubador rotativo a ser utilizada.

Num teste posterior, foi diminuída a concentração das células a serem inoculadas de 1.4×10^{-3} , contidas num criotubo de 3.5 mL, para 7.0×10^{-4} e 1.0×10^{-3} ; e foram eliminadas as etapas de reativação e do inóculo, desta forma, a inoculação foi feita diretamente no meio de produção. As observações demonstraram que a diminuição da concentração celular no inóculo influenciava na formação de “Pellets” (aglomerados de células) o que prejudica a síntese de metabólitos secundários, segundo estudos realizados previamente (Sanchez e Brana, 1996), porém, foram conservadas todas as etapas do cultivo e foi mantida a concentração inicial celular a ser inoculada.

Foi possível observar nos cultivos o bom desenvolvimento celular quando foram usados erlenmeyers de 1 litro com um volume não maior que 50 mL do meio de cultura e Soytone (Hidrolisado protéico de soja) como fonte de nitrogênio. Foram realizados alguns testes usando meio de cultura sólido (milho) enriquecido com o meio de cultura III em condições de fermentação estáticas, mas não foi observado nenhum crescimento celular.

A realização dos cultivos dos fungos endofíticos foi feita em meios de cultura convencionais sob parâmetros padronizados e amplamente usados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos onde o crescimento ocorreu sem dificuldades.

4.2. Substâncias isoladas de *Streptomyces clavuligerus*

Dos extratos obtidos dos cultivos de *S. clavuligerus* foram isolados: o ácido antranílico (14) e a 7-Hidroxi-2 metilcromona (15). A elucidação estrutural destas substâncias foi feita por experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C de 1D e 2D e por Espectrometria de Massas.

4.2.1. Ácido antranílico (SC1)

Esta substância foi isolada a partir do extrato BCCI-E2 como cristais amarelos que apresentavam uma mancha de coloração amarela na placa CCDA quando revelada com vanilina. No espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.1) são observados sinais típicos de um sistema aromático dissubstituído com hidrogênios *orto* relacionados. Observou-se quatro sinais, cada um integrando com um hidrogênio; em δ 7,8 (*ddd*, $J = 8,2; 1,6$ e $0,8$ Hz) um sinal duplo quarteto com constantes de acoplamento que sugerem que estejam *orto-meta* relacionados; em δ 7,22 (*ddd*, $J = 8,0; 5,6$ e $1,2$ Hz) com constantes de acoplamento referentes a hidrogênios *orto* e *meta* relacionados; em δ 6,73 (*ddd*, $J = 8,2; 1,2$ e $0,8$ Hz) e em δ 6,56 (*ddd*, $J = 8,0; 7,4$ e $1,6$ Hz) ambos os sinais com acoplamentos referentes a hidrogênios *orto* e *meta* relacionados.

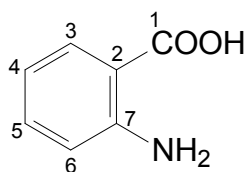
No experimento de HSQC (FIGURA 4.2) foram observadas as correlações para cada hidrogênio presente na molécula com o carbono aromático, estas correlações são apresentadas na tabela 4.1. A partir do experimento de HMBC (FIGURA 4.3) foi possível determinar a existência de sete carbonos que confirmam a presença de um anel aromático e um carbono carboxílico localizado em δ 172 que correlaciona com o hidrogênio em δ 7,8 (H-3); é possível observar também as correlações do carbono aromático substituído localizado em δ 153 com os hidrogênios em δ 7,8 (H-3) e δ 7,22 (H-4); a correlação do carbono em δ 135 com o hidrogênio em δ 7,8 (H-3) assim como a correlação do carbono em δ 118 com o hidrogênio em δ 6,56 (H-5) e a correlação do carbono aromático substituído em δ 112 correlacionando com os hidrogênios localizados em δ 6,73 e δ 6,56. Os dados obtidos foram coincidentes com os reportados na literatura para o ácido antranílico (14).

TABELA 4.1 Dados espectroscópicos para SC1.

N° de Carbono	RMN ¹ H δ (mult., J em Hz)	HSQC δ	RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) δ Lit. Osborne e Goolamani, 2000
C1		172 ^a	
C2		153 ^a	
C3	7,8 (ddd, 8,2; 1,6 e 0,8)	132	7,82
C4	7,22 (ddd, 8,0; 5,6 e 1,2)	135	7,30
C5	6,56 (ddd, 8,0; 7,4 e 1,6)	116	6,58
C6	6,73 (ddd, 8,2; 1,2 e 0,8)	118	6,82
C7		112 ^a	

^a Dados adquiridos do experimento HMBC

Esta substância foi comparada com o padrão e foi observada como uma mancha amarela em CCDA quando revelada com vanilina nos extratos BCCI-E4, MII-E2, MII-E4, MIII-E2 e MIII-E2 dos cultivos de *S. clavuligerus*. Este composto está presente no metabolismo secundário de microrganismos como precursor na síntese de pigmentos.



Ácido antranílico (14)

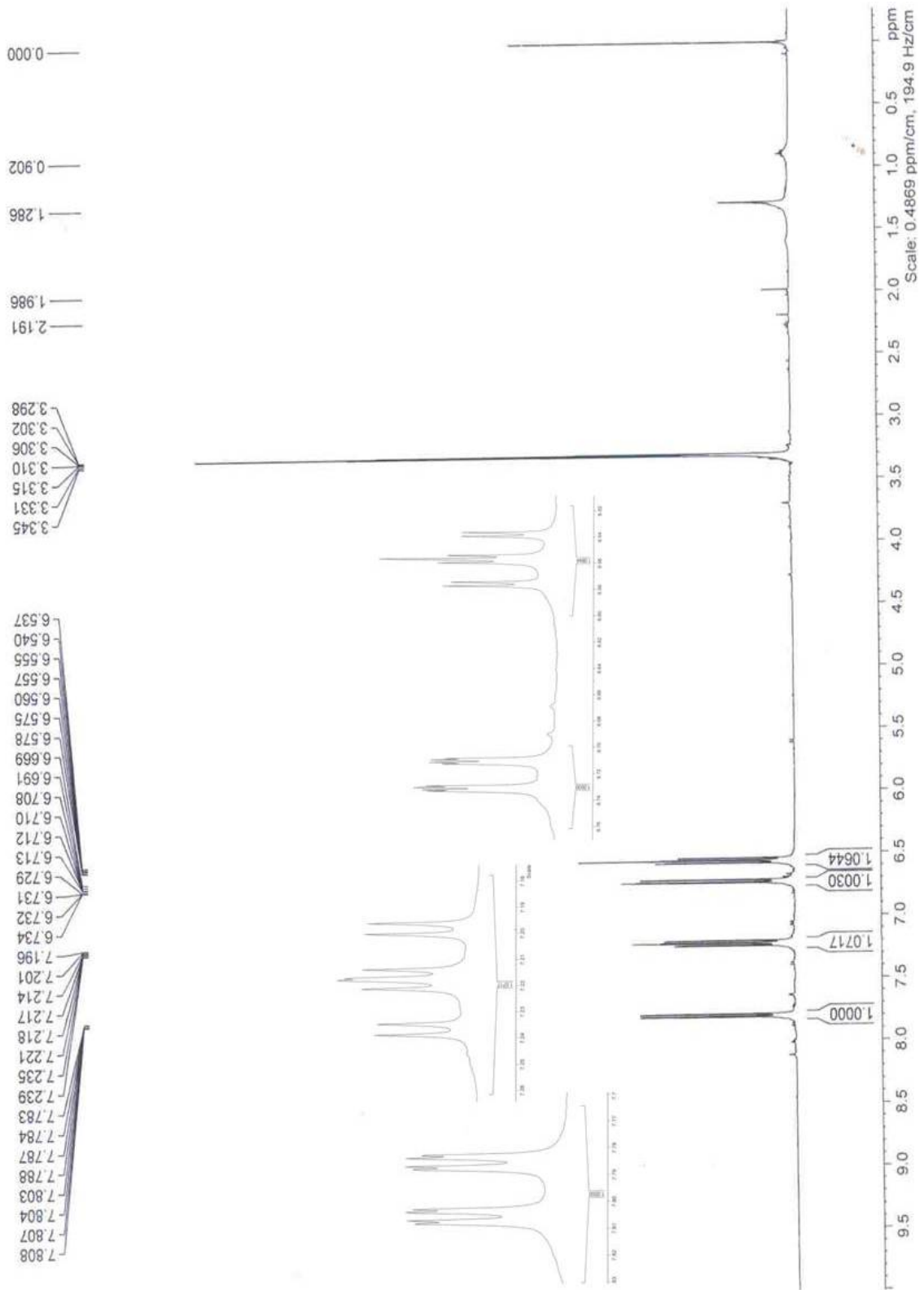


FIGURA 4.1 Espectro de RMN ^1H obtido para SC1 (Metanol- d_4 , 400MHz).

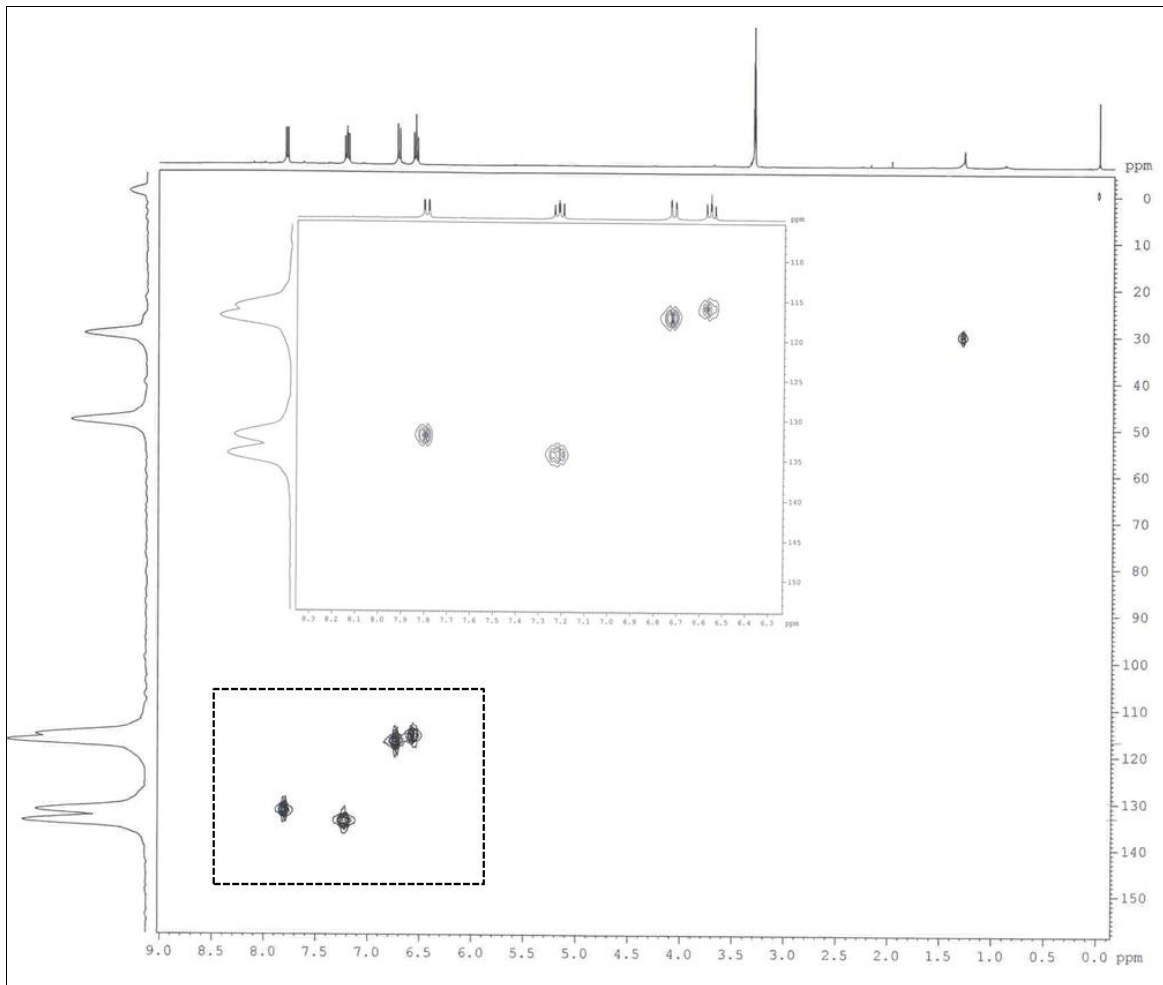


FIGURA 4.2 Experimento de HSQC de SC1 (Metanol- d_4 , 400MHz).

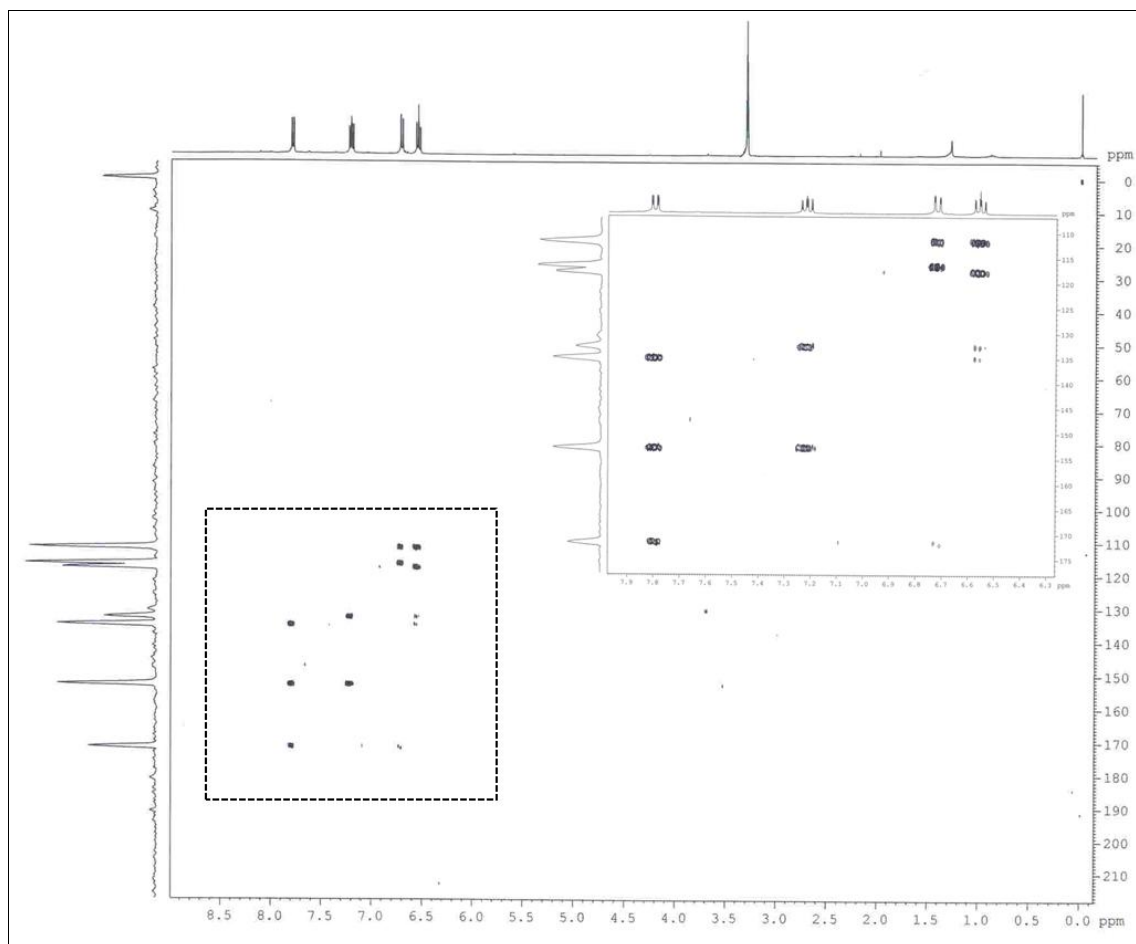


FIGURA 4.3 Experimento de HMBC de SC1 (Metanol- d_4 , 400MHz).

4.2.2. 7-Hidroxi-2-metilcromona (SC2)

Esta substância foi isolada do extrato M1-E1 através de métodos clássicos de cromatografia, o qual revelava vermelho em CCDA quando usado vanilina como solução reveladora. O espectro de RMN ^1H (FIGURA 4.4) para esta molécula mostrou quatro sinais na região aromática: em δ 7,47 (*d*, $J = 8,0$ Hz) com uma constante de acoplamento referente ao hidrogênio *orto* relacionado, em δ 6,86 (*dd*, $J = 8,0$ e $2,4$ Hz) com J referentes a hidrogênios na posição *orto* e *meta* relacionados; em δ 6,83 (*d*, $J = 2,4$ Hz) o sinal correlaciona com um hidrogênio *meta* relacionado e em δ 6,13 (*q*, $J = 1,2$) o hidrogênio apresenta uma correlação a longa distância com os hidrogênios da metila. Cada sinal desta região integra para um hidrogênio o que caracteriza uma molécula altamente substituída. Além disso, é observado um sinal

em δ 2,4 (*d*, $J = 1,2$) que integra para três hidrogênios e que acopla com o hidrogênio aromático em δ 6,13. No experimento de HSQC (FIGURA 4.5) foi possível observar cinco sinais de carbonos que correlacionam com os seus respectivos hidrogênios, os dados são apresentados na tabela 4.2.

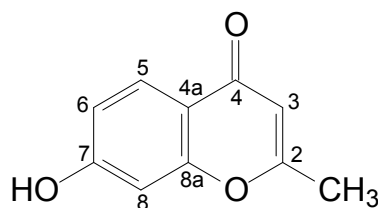
TABELA 4.2 Dados espectroscópicos para SC2

N° de carbono	RMN ¹ H δ (<i>mult.</i> , J em Hz)	HSQC δ	RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) δ Lit. Yu et al., 2004
C2		153,0 ^a	
C3	6,13 (<i>q</i> , 1,2)	111,7	6,10 (<i>s</i>)
C4		ND	
C4a		155,0 ^a	
C5	7,47 (<i>d</i> , 8,0)	125,8	7,43 (<i>d</i> , $J = 8,4$ Hz)
C6	6,86 (<i>dd</i> , 8,0 e 2,4)	103,5	6,87 (<i>dd</i> , $J = 2,1; 8,4$ Hz)
C7		ND	
C8	6,83 (<i>d</i> , 2,4)	112,9	6,81 (<i>d</i> , $J = 2,1$ Hz)
C8a		159,5 ^a	
-CH ₃	2,4 (<i>d</i> , 1,2)	18,5	2,33 (<i>s</i>)

^a Dados adquiridos do experimento de HMBC.

ND: Não detectado.

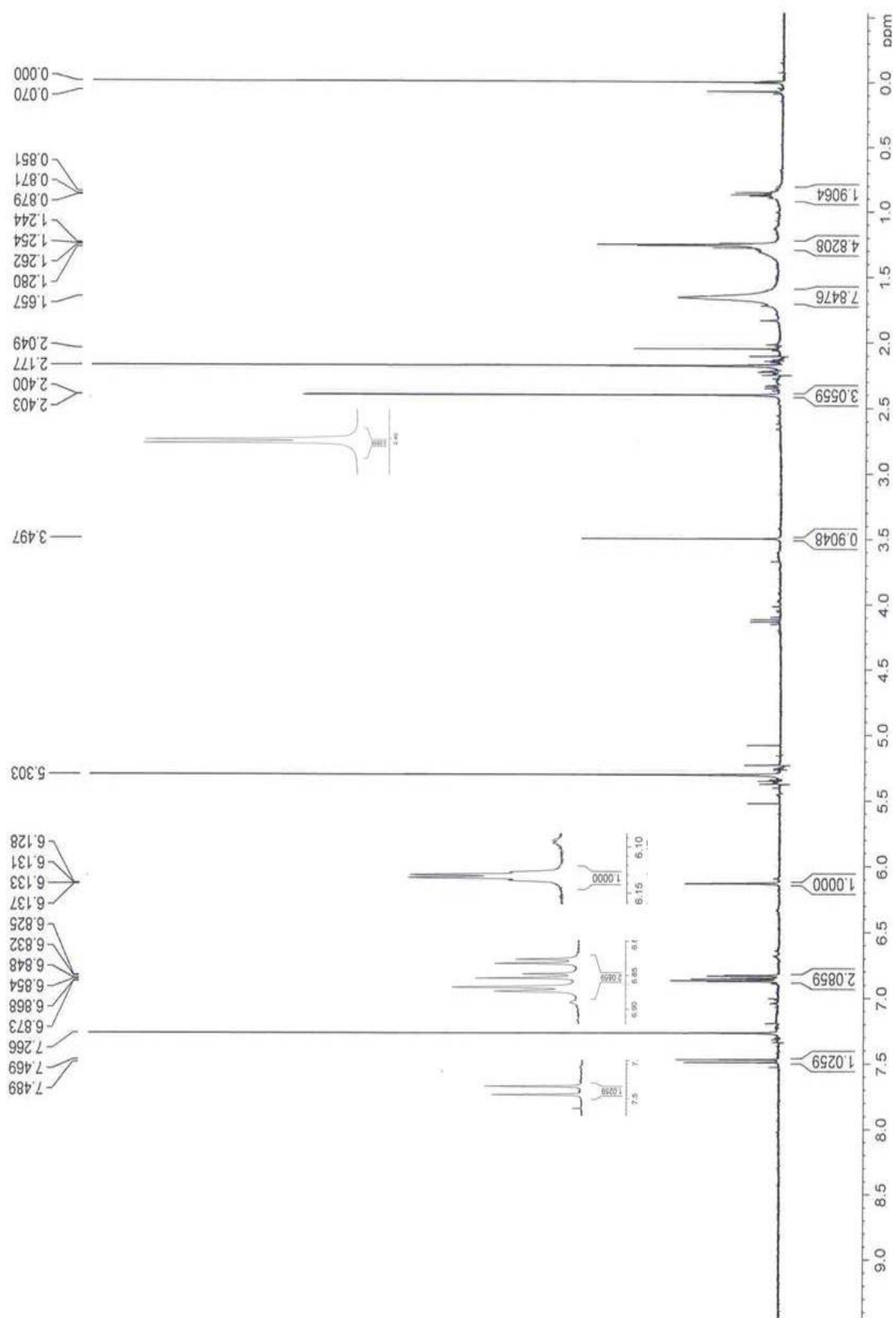
O experimento de massas realizado, através da técnica de ionização por *electrospray* no modo positivo, mostrou o íon molecular em m/z 177 $[M+H]^+$ e o íon em m/z 199 $[M+Na]^+$ correspondente ao aduto de sódio (FIGURA 4.6). Através das análises dos espectros junto à comparação dos dados da literatura, foi possível propor a fórmula molecular do composto como C₁₀H₈O₃ e sugerir a seguinte estrutura para SC2.

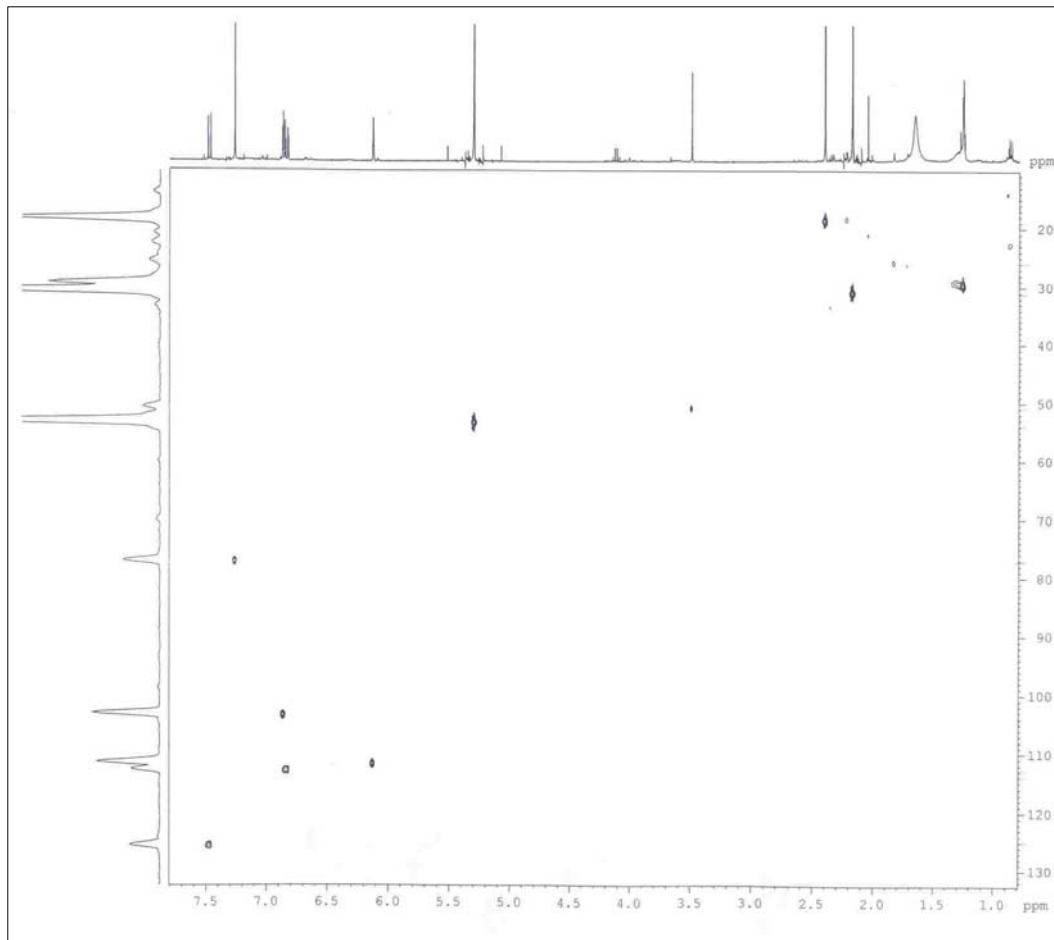
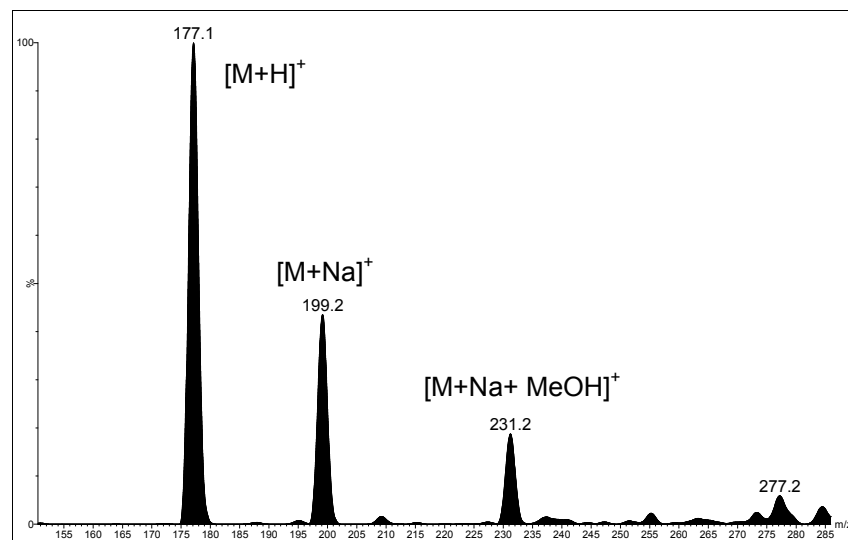


7-Hidroxi -2-metilcromona (15)

Os experimentos bidimensionais de HMBC (FIGURA 4.7) e COSY (FIGURA 4.8) foram úteis na confirmação da estrutura. No experimento de HMBC é possível observar a correlação do carbono em δ 159,5 (C-8a) com o hidrogênio em δ 7,47 (H-5), este além correlaciona com o carbono em δ 155 (C-4a). O carbono 4a correlaciona também com o hidrogênio em δ 6,86 (H-6). Foi observada a correlação dos hidrogênios da metila com o carbono em δ 153,0 (C-2) ao qual se encontra diretamente ligada e com o carbono adjacente em δ 111,7 (C-3). Finalmente, observam-se as correlações do carbono em δ 112,9 (C-8) com os hidrogênios em δ 6,13 (H-3) e com os hidrogênios da metila em δ 2,4. No entanto, no experimento de COSY é possível observar duas correlações simples, a primeira com uma constante de acoplamento de 8,0 Hz referente a um acoplamento *orto* entre os hidrogênios H-5 e H-6 localizados em δ 7,47 e δ 6,83 respectivamente; e a segunda entre o hidrogênio H-3 em δ 6,13 e os hidrogênios da metila em δ 2,4, com uma constante de acoplamento de longa distância de 1,2 Hz.

Este composto tem sido isolado exclusivamente de plantas, pertencentes principalmente às espécies de *Cassia* e é o primeiro relato como metabólito produzido por *Streptomyces clavuligerus*. Esta substância é um importante precursor de compostos derivados de cromonas que são destacados por serem inibidores do vírus do HIV (Yu *et al.*; 2004).

FIGURA 4.4 Espectro de RMN ^1H de SC2 (clorofórmio- d_3 , 400MHz).

FIGURA 4.5 Experimento de HSQC de SC2 (clorofórmio- d_3 , 400MHz).FIGURA 4.6 Espectro de massas do SC2 obtido via ESI⁺

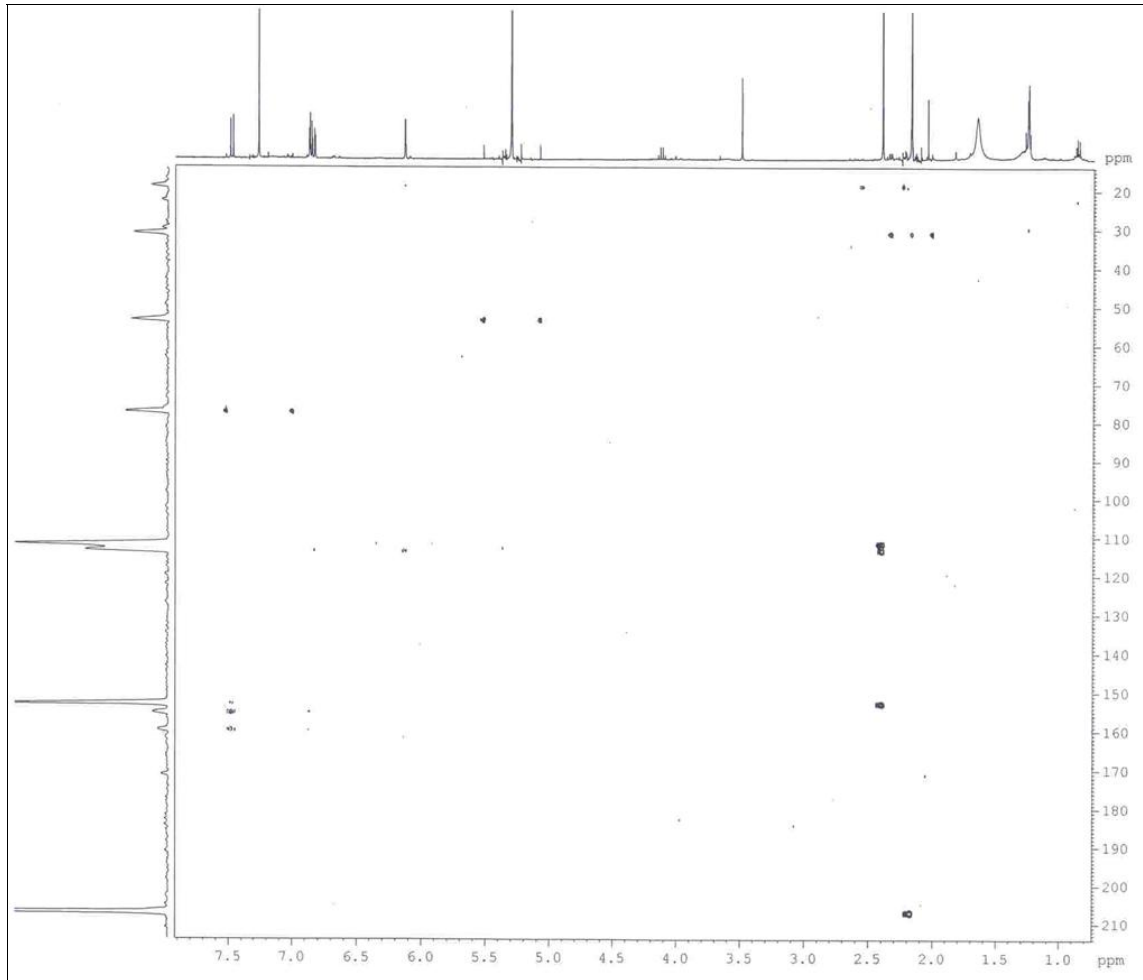


FIGURA 4.7 Experimento de HMBC de SC2 (clorofórmio- d_3 , 400MHz).

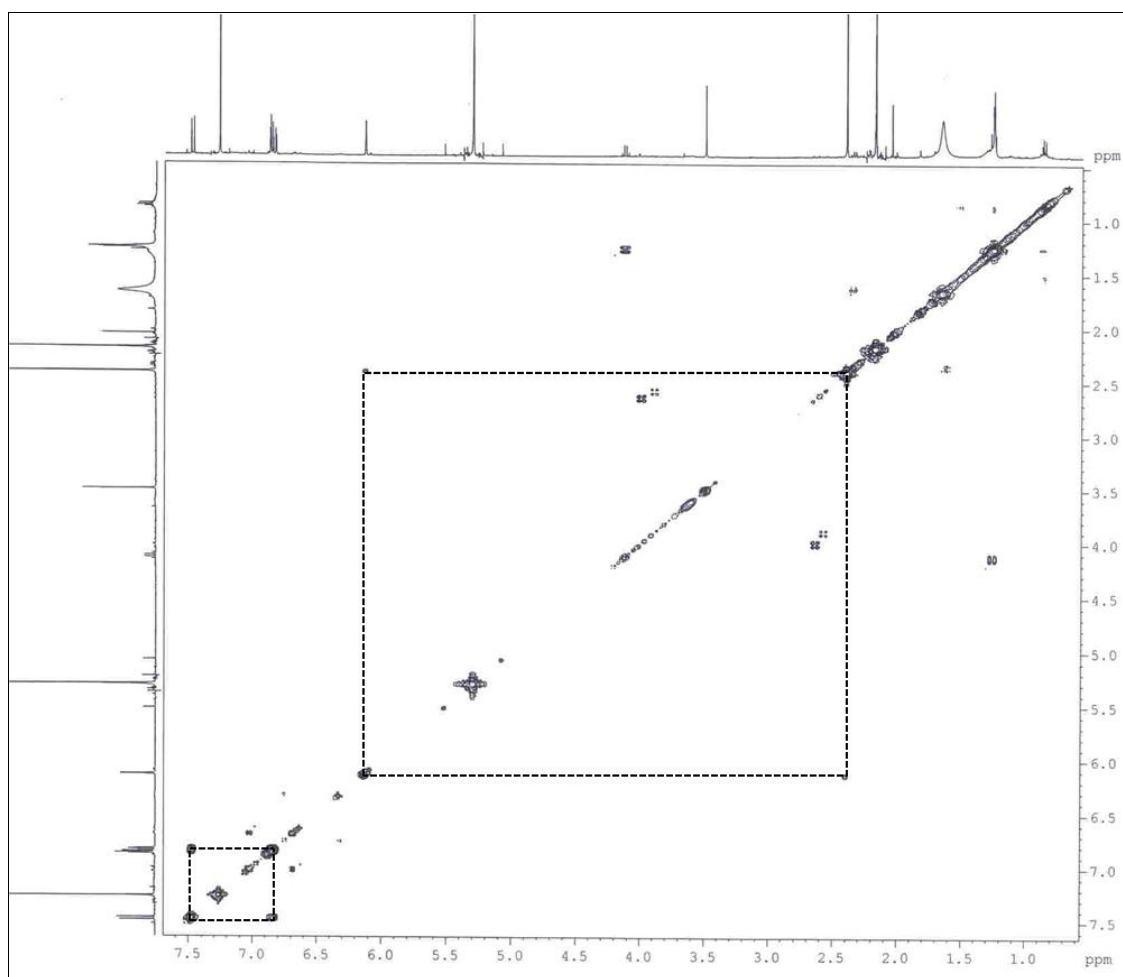
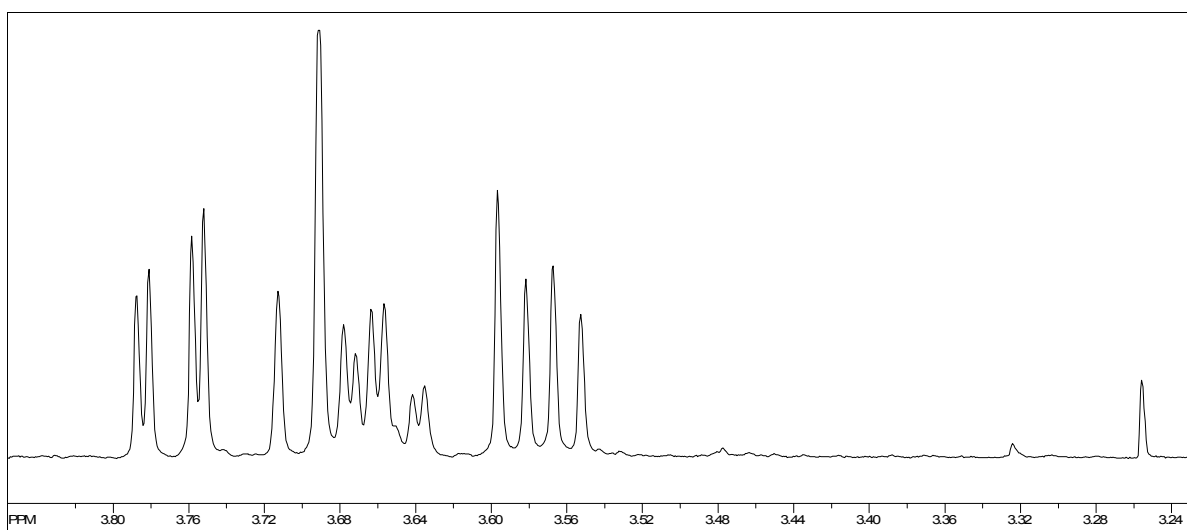


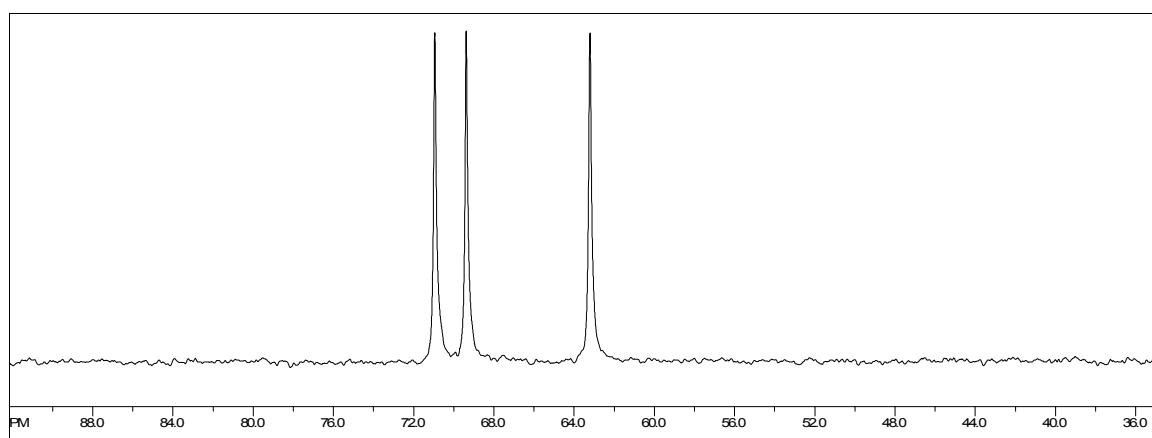
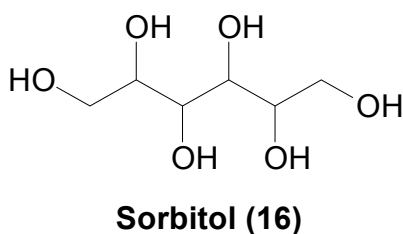
FIGURA 4.8 Experimento de COSY do SC2 (clorofórmio- d_3 , 400MHz).

4.3. Identificação de sorbitol nos extratos dos fungos: *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus aculeatus*.

Dos extratos metanólicos destes fungos cultivados em arroz foi obtido o sorbitol como um precipitado branco solúvel em água (15 mg do extrato do *Penicillium brasilianum* e 7 mg do extrato do *Aspergillus aculeatus*). A elucidação estrutural foi feita por RMN de ^1H e de ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H são observados os sinais que caracterizam o sorbitol (16) na região entre δ 3,50 e 3,80 como um multipeto (FIGURA 4.9), estes sinais são atribuídos aos hidrogênios carbinólicos.

FIGURA 4.9 Espectro de RMN de ^1H do sorbitol (D_2O , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 4.10) observou-se três sinais em δ 63,2; δ 69,4 e δ 70, referentes a carbonos carbinólicos. As análises dos dados obtidos confirmam a estrutura do sorbitol (16) o qual é um poliol com um centro de simetria o que justifica a presença de apenas três sinais no espectro de RMN de ^{13}C .

FIGURA 4.10 Espectro de RMN de ^{13}C do sorbitol (D_2O , 50 MHz).

4.4. Análises dos padrões β -lactâmicos por espectrometria de massas.

Este estudo teve como finalidade avaliar e comparar o comportamento químico das substâncias padrões quando submetidas à análise por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* sendo esta técnica a mais adequada por se tratar de substâncias de alta polaridade, e de fácil ionização. As análises foram feitas num equipamento MICROMASS QUATTRO II nas condições descritas na seção experimental.

Neste trabalho foram utilizados os antibióticos comerciais Amoxicilina (17), Penicilina G (18), Cefoxitina (19), Cefalosporina C (20) e o ácido clavulânico (1). A estrutura química, a fórmula molecular e a massa molar destas substâncias são mostradas na figura 4.11. As quais estão classificadas de acordo com seu núcleo químico básico.

Inicialmente os padrões foram analisados por inserção direta no modo positivo e negativo de ionização. Devido à presença de pelo menos um ácido carboxílico na molécula, os antibióticos podem ser desprotonados e os íons negativos podem ser analisados por MS. Já no modo positivo de ionização, os grupos básicos presentes nas moléculas facilmente aceitam um próton e igualmente podem ser analisadas por espectrometria de massas.

A partir dos espectros de íons produtos e também de dados da literatura foram feitas propostas de caminhos de fragmentação dos compostos β -lactâmicos padrões. Este estudo teve como objetivo verificar características de fragmentação que fossem comuns à classe. As análises foram realizadas de maneira comparativa, de forma que os mecanismos propostos pudessem ser reforçados pela observação de rotas de fragmentação semelhantes em substâncias com semelhanças estruturais. De maneira geral foi observado nos espectros de íons produtos que os padrões estudados apresentam mais de um caminho de fragmentação sendo muitas vezes bastante difícil propor a formação dos íons. Algumas das fragmentações propostas foram baseadas em dados descritos na literatura, principalmente nos trabalhos de

Straub *et al.* (1993), Nägele (2005), Seifar *et al.* (2008) e Reyns *et al.* (2007), e puderam ser complementadas de acordo com os resultados obtidos.

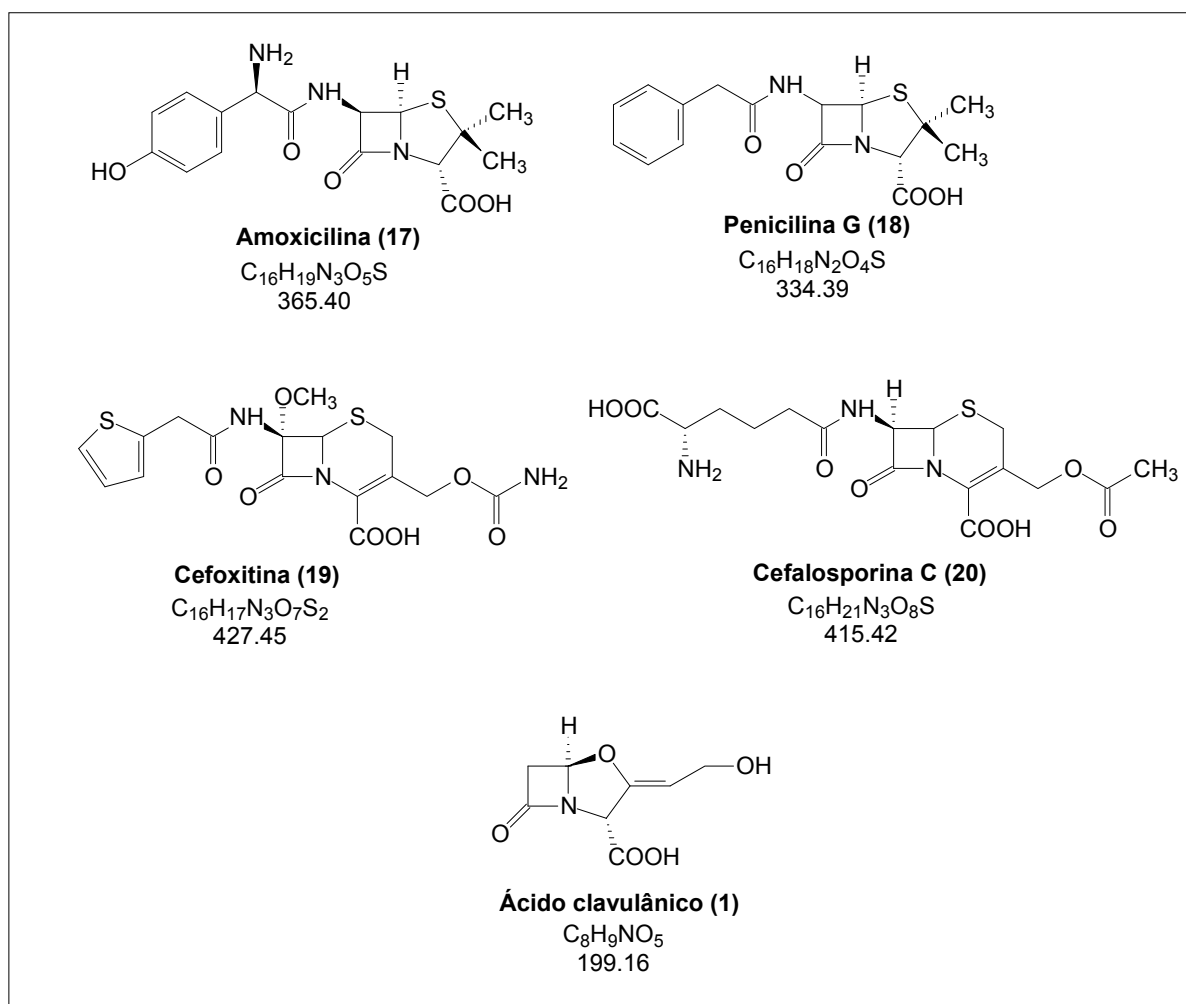


FIGURA 4.11 Estruturas de antibióticos padrões estudados: Penicilinas (17 e 18), Cefalosporinas (19 e 20) e o Ácido clavulânico (1).

4.4.1. Análises de Amoxicilina (17) e Penicilina G (18).

Em geral, os espectros de *full scan* e íons produtos obtidos no modo negativo de ionização mostraram baixa sensibilidade e baixo grau de fragmentação quando comparados com os espectros obtidos no modo positivo. Portanto, os íons foram fragmentados usando um probe de *electrospray* no modo positivo de ionização com energia de colisão de 5 a 20 eV, nas condições descritas na secção 3.7 página 41.

Estes dois compostos 17 e 18 apresentam estruturas bastante semelhantes onde a diferença entre eles ocorre na cadeia lateral ligada ao ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), comum a todas as penicilinas. As figuras 4.12 e 4.13 apresentam os respectivos espectros de íons produtos obtidos para estes padrões.

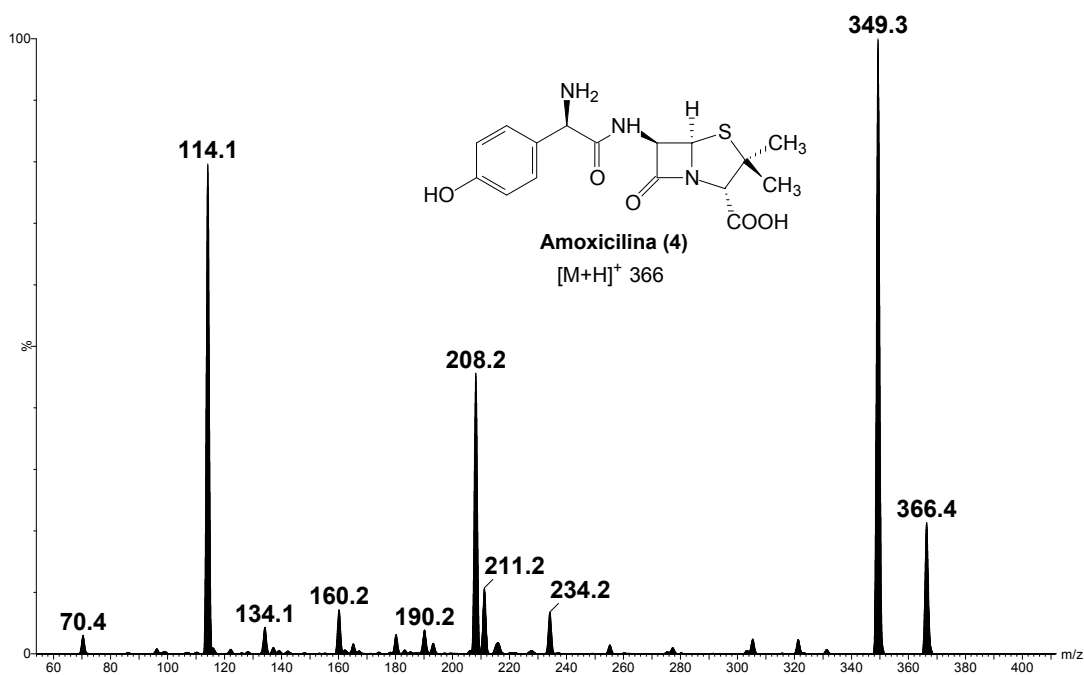


FIGURA 4.12 Espectro de íons produtos de amoxicilina obtido via ESI⁺.

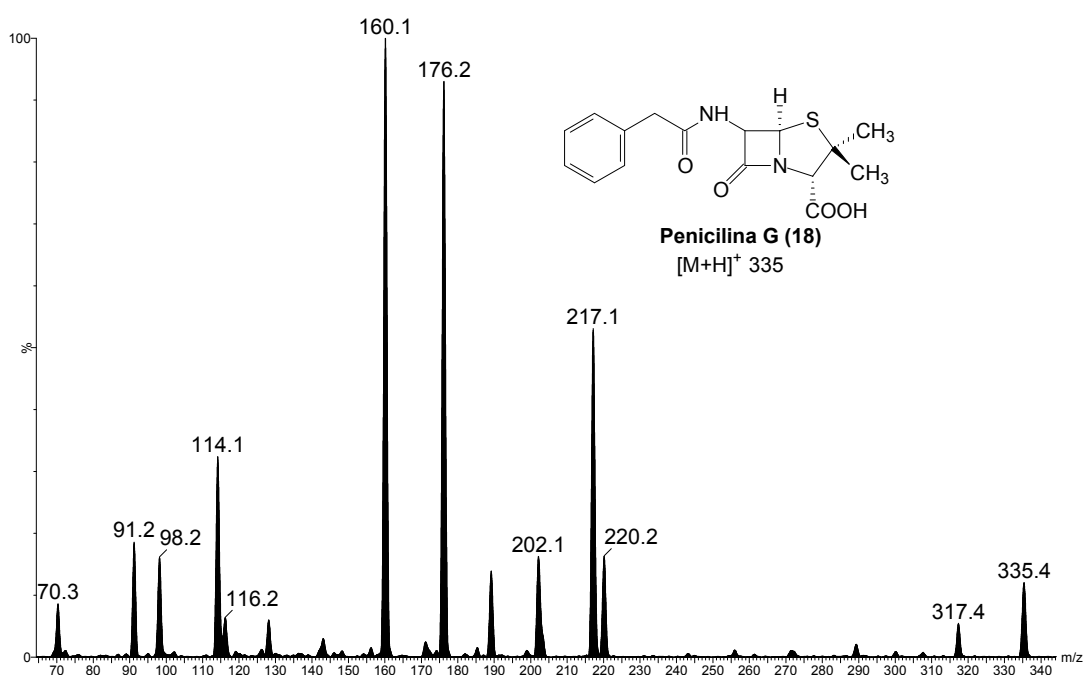


FIGURA 4.13 Espectro de íons produtos de penicilina G obtido via ESI⁺.

Estes espectros mostram dois íons comuns a m/z 160 e a m/z 114. O íon em m/z 160 é formado pela quebra do anel β -lactâmico mediante um movimento do tipo retro cicloadição quando a carga se encontra sobre o nitrogênio do anel tiazolidino, a subsequente eliminação de ácido fórmico (m/z 46) produz o íon em m/z 114 (FIGURAS 4.14 e 4.15). Com base nestas informações e em dados reportados na literatura (Nägele, 2005), foram considerados estes íons como característicos dos compostos β -lactâmicos da classe das penicilinas. Deste modo, foram feitas análises de íons precursores de m/z 160 nos extratos obtidos dos microrganismos na procura desta classe de compostos. Os mecanismos de fragmentação propostos dos principais íons formados são apresentados nas figuras 4.14 e 4.15.

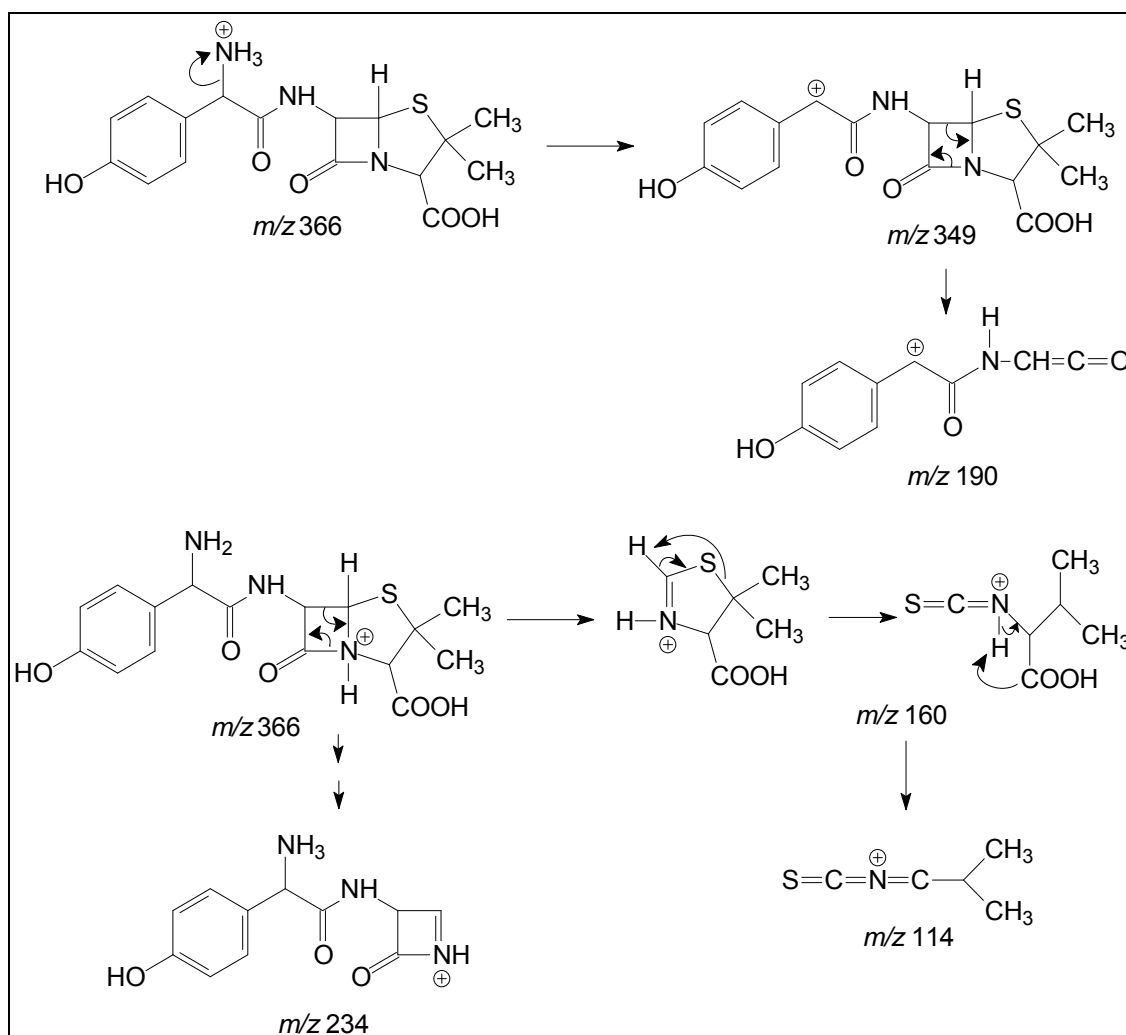


FIGURA 4.14 Principais fragmentações da amoxicilina (17).

No espectro de íons produtos da amoxicilina o pico base em m/z 349 é formado pela perda de amônia a partir da molécula protonada; a quebra do anel β -lactâmico a partir do íon em m/z 349 produz o íon em m/z 190. Os íons em m/z 208 e m/z 70.4 não são atribuídos, porém se encontram em estudo.

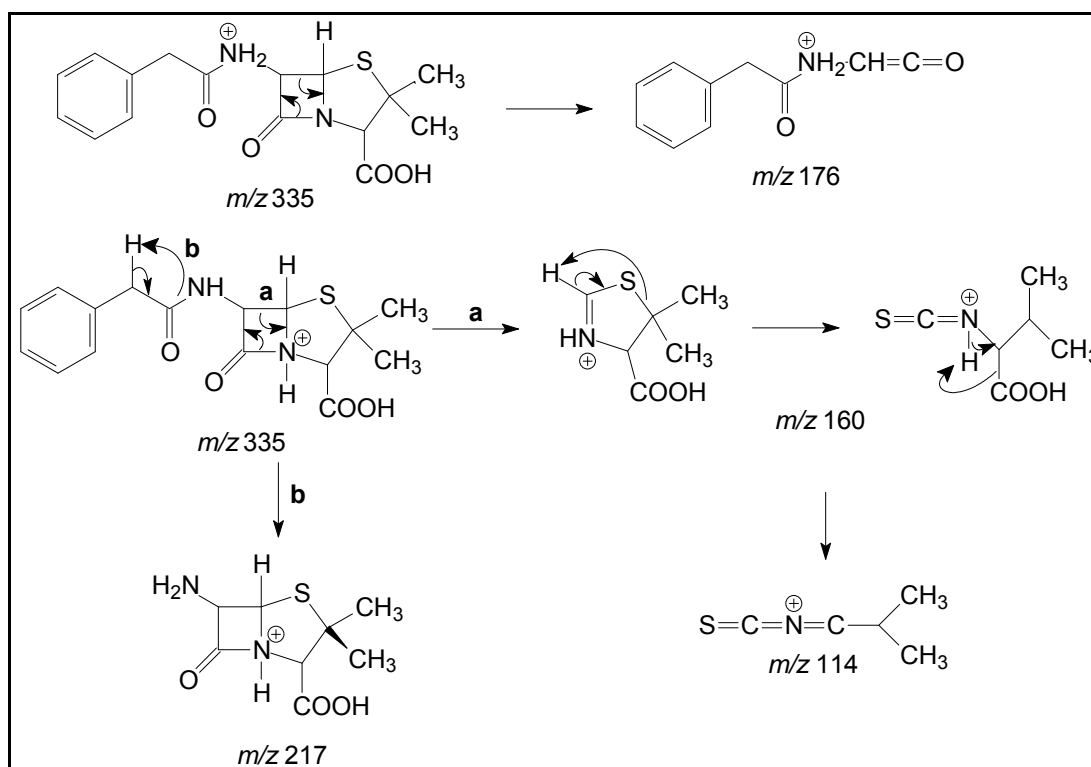


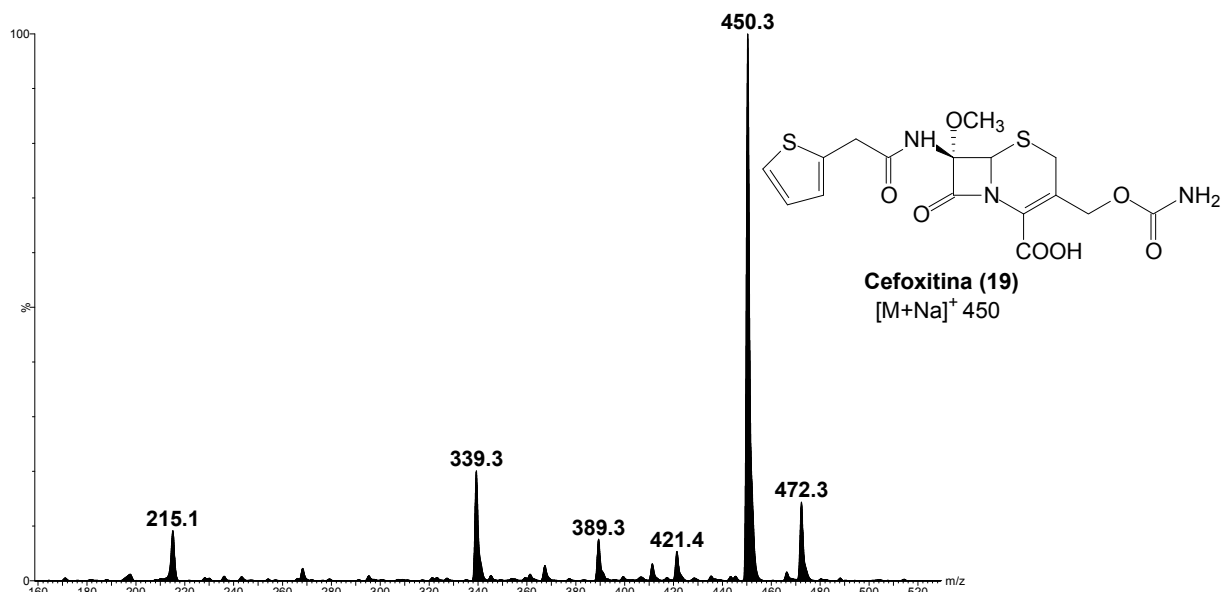
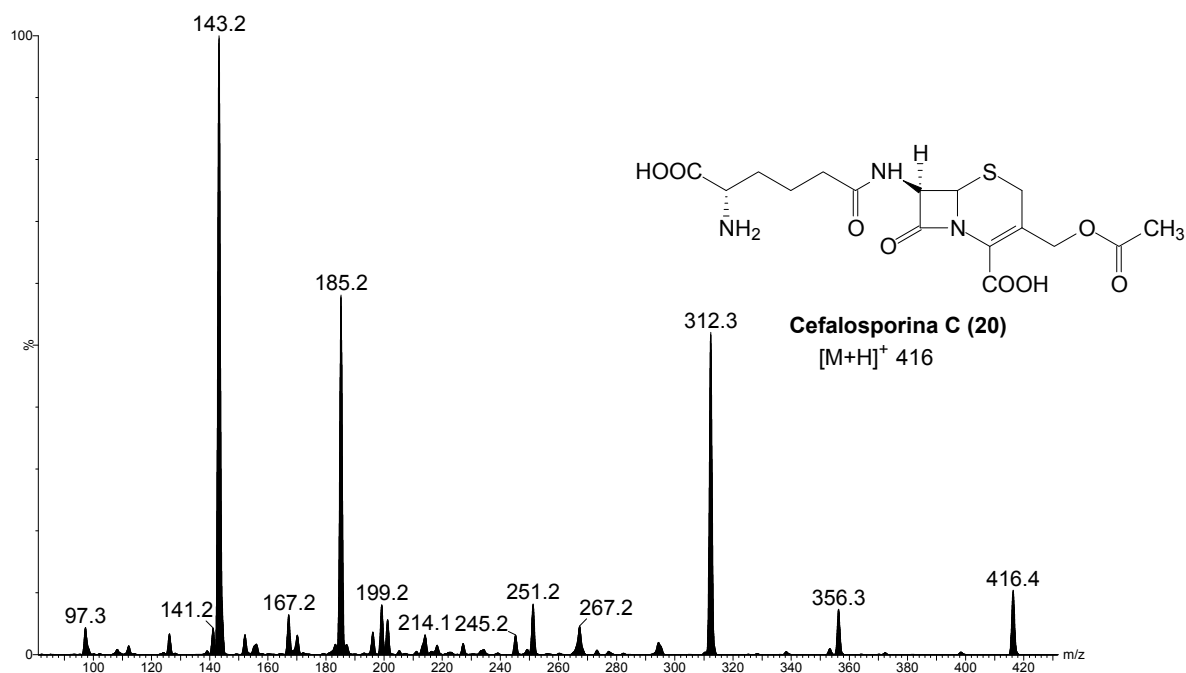
FIGURA 4.15 Principais fragmentações da penicilina G (18).

No espectro da penicilina G é observado o íon em m/z 176 formado pela clivagem do anel β -lactâmico. A fragmentação da cadeia lateral através da quebra da ligação peptídica forma o íon em m/z 217. (FIGURA 4.15)

4.4.2. Análises de Cefoxitina (19) e Cefalosporina C (20).

Do mesmo modo que nas análises de penicilinas, os espectros de *full scan* e íons produtos obtidos no modo negativo de ionização mostraram baixa sensibilidade e baixo grau de fragmentação quando comparados com os espectros obtidos no modo positivo. Portanto, os íons foram fragmentados usando um probe de *electrospray* no modo positivo de ionização com energia de colisão de 5 a 20 eV, nas condições descritas na secção experimental 3.7, pagina 41.

No espectro de *full scan* da cefoxitina (19) não foi possível observar o íon $[M+H]^+$ 428 que corresponderia à molécula protonada, no entanto, foi observado um pico intenso em m/z 450 que corresponde ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ (FIGURA 4.16). Devido à alta estabilidade deste íon não foi possível obter o espectro de íons produtos para este composto. As análises da cefalosporina C (20) sob as mesmas condições de ionização utilizadas na cefoxitina proporcionaram o espectro de íons produtos apresentado na figura 4.17.

FIGURA 4.16 Espectro de *full scan* de cefoxitina.FIGURA 4.17 Espectro de íons produtos da cefalosporina C, obtido via ESI⁺

A figura 4.18 mostra o mecanismo de fragmentação proposto para a molécula. Inicialmente é observada a saída de ácido acético formando o íon m/z 356; este íon após a perda de CO_2 produz o íon em m/z 312, em seguida através do rearranjo 1-4 de hidrogênio se produz a perda da cadeia lateral ligada ao anel β -lactâmico e forma o íon em m/z 152. O íon a m/z 267 é formado a partir do íon m/z 356 através da fragmentação da cadeia lateral do peptídeo. Um dos mecanismos que podem explicar a formação do pico base em m/z 143 é por meio da clivagem do tipo retro Diels Alder do anel diidrotiazino a partir da molécula protonada. Os íons m/z 185 e m/z 97 não foram atribuídos e se encontram em estudo.

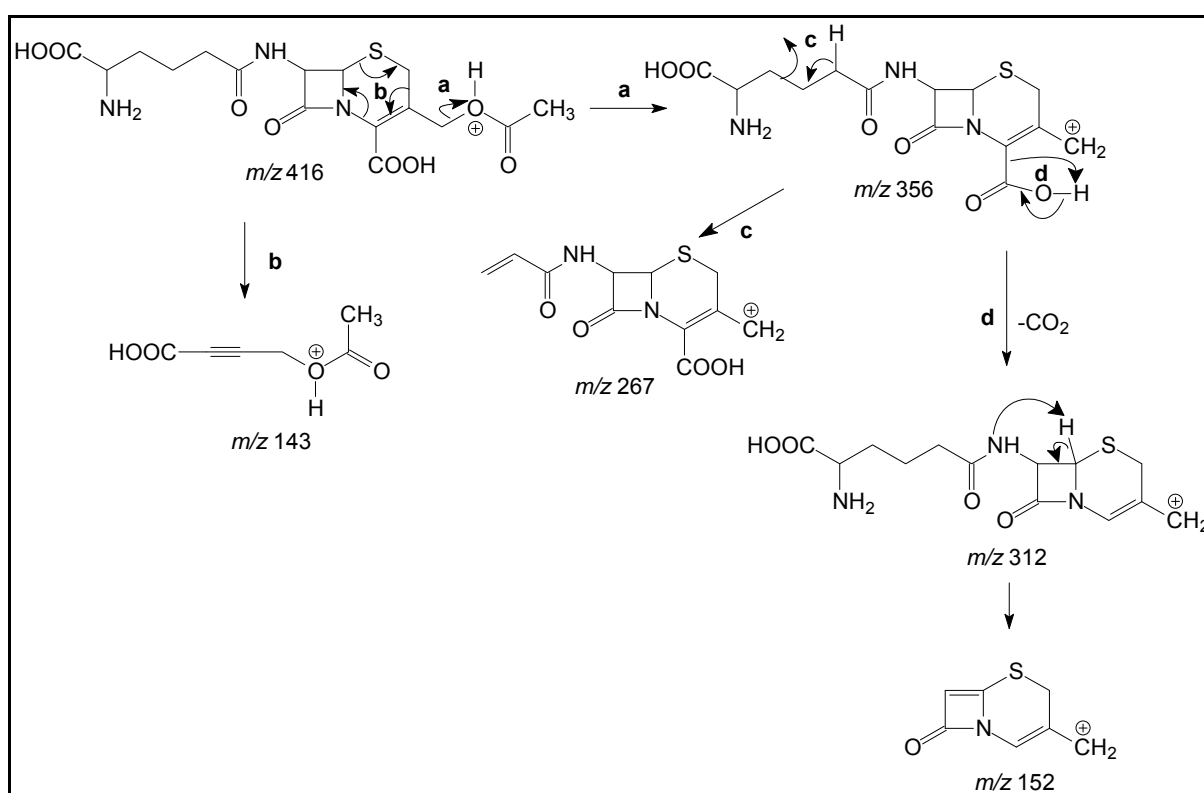


FIGURA 4.18 Principais fragmentações da cefalosporina C (20).

Embora a cefoxitina (19) e a cefalosporina C (20) possuam como núcleo comum o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) característico das cefalosporinas e cefamicinas, não foi possível propor um padrão de fragmentação para esta classe de substâncias. Considerando a importância da detecção e determinação de cefalosporina e cefamicina C nos extratos de *Streptomyces clavuligerus*, foi adotada como base a relação estrutural existente entre a cefalosporina C e a cefamicina C na procura desta última nos extratos.

4.4.3. Análises de Ácido clavulânico (1)

As análises do ácido clavulânico por *Electrospray* no modo positivo de ionização mostraram espectros com baixa sensibilidade e menor grau de fragmentação quando comparados com os espectros obtidos no modo negativo. Portanto, as análises foram feitas utilizando o probe de *electrospray* no modo negativo de ionização com energia de colisão de 5 eV, nas condições descritas na secção experimental. Na figura 4.19 é observado o espectro de íons produtos adquirido nas análises.

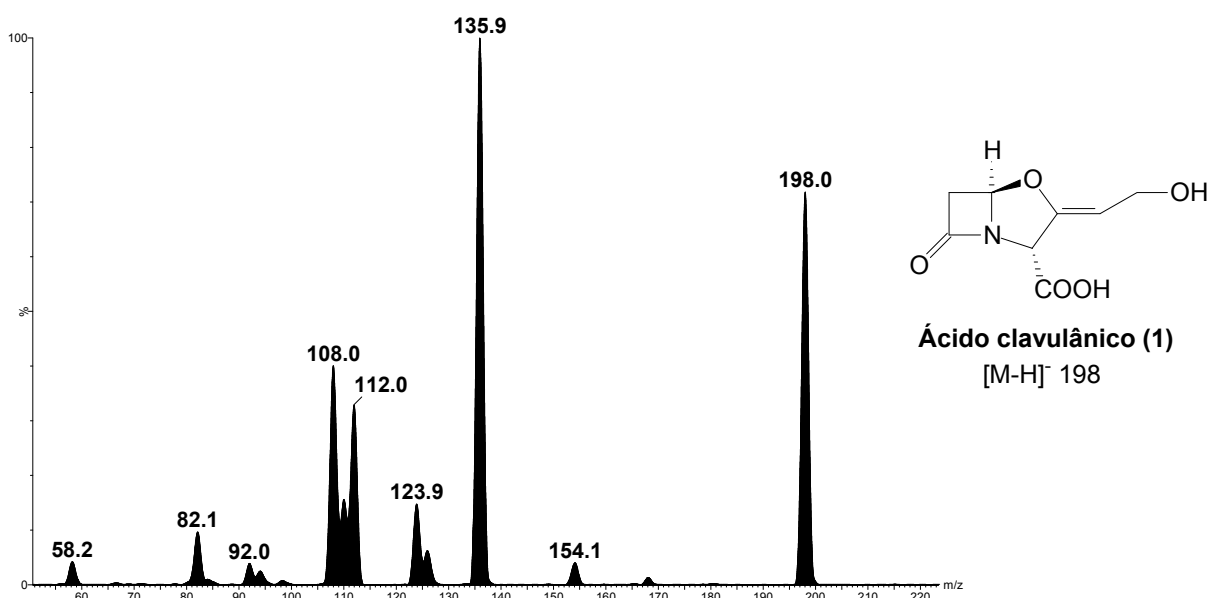


FIGURA 4.19 Espectro de íons produtos do ácido clavulânico obtido via ESI⁻

A proposta de fragmentação para o ácido clavulânico explica a eliminação inicial de CO₂ e a formação do íon em m/z 154, seguida da perda de uma molécula de água formando o íon m/z 136. O íon em m/z 154 produz também os íons em m/z 124 e m/z 112, o primeiro é formado por meio de um rearranjo 1-4 de hidrogênio seguido da eliminação de CH₂=O, e o segundo se forma pela clivagem do anel β-lactâmico quando a carga se encontra suportada sobre o anel oxazolidino, a partir deste íon (m/z 112) ocorre a eliminação de CH₂=O e forma o íon m/z 82. O íon m/z 108 foi atribuído segundo Reyns (2007). Na figura 4.20 são observadas as rotas de fragmentação propostas para esta molécula.

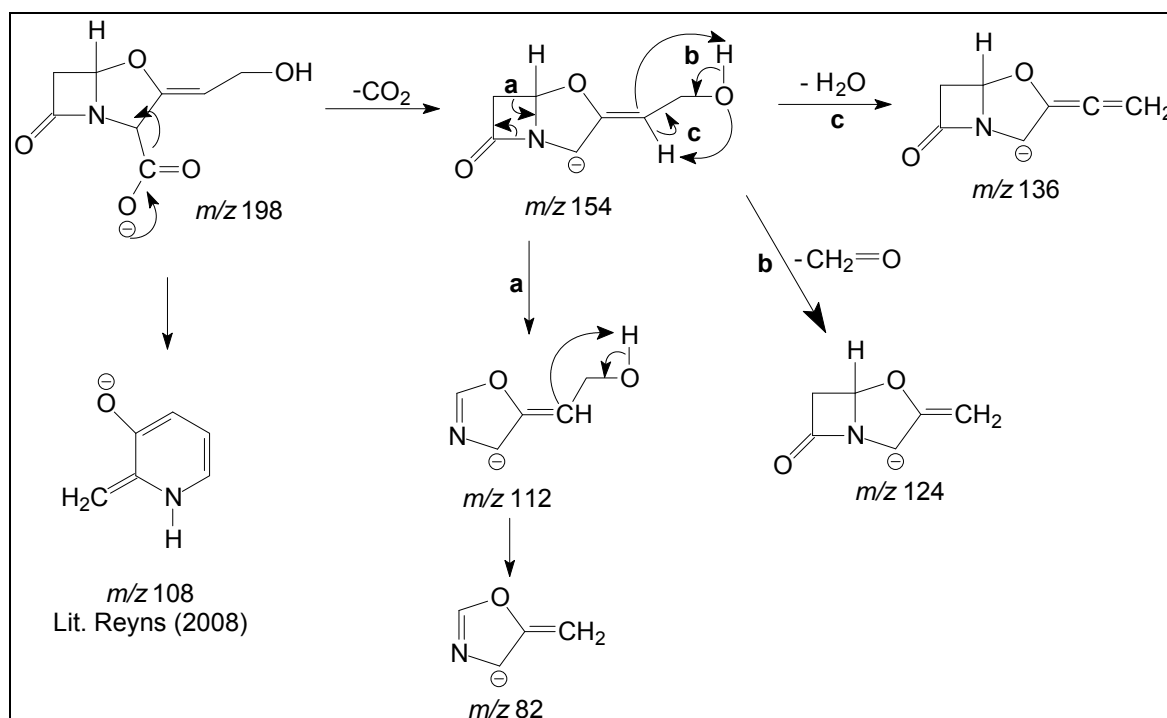


FIGURA 4.20 Principais fragmentações do ácido clavulânico.

Com base nas observações de estabilidade e intensidade dos íons são sugeridos os íons m/z 136 e m/z 108 para o monitoramento nos experimentos de SRM, na procura deste composto nos extratos.

4.4.4. Análises dos padrões por LC/MS

Uma vez otimizados os parâmetros no espectrômetro de massas foram realizados alguns testes utilizando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, com a finalidade de aumentar a sensibilidade das análises. Amoxicilina (17) penicilina G (18), e cefalosporina C (20), foram testadas por LC/MS segundo as condições descritas na seção experimental. Os cromatogramas de íons selecionados obtidos dos padrões 17, 18 e 20 injetados separadamente são mostrados na figura 4.21; neles se observa uma separação satisfatória das bandas de absorção com tempos de retenção de 13.56, 18.92 e 9.89 min. respectivamente.

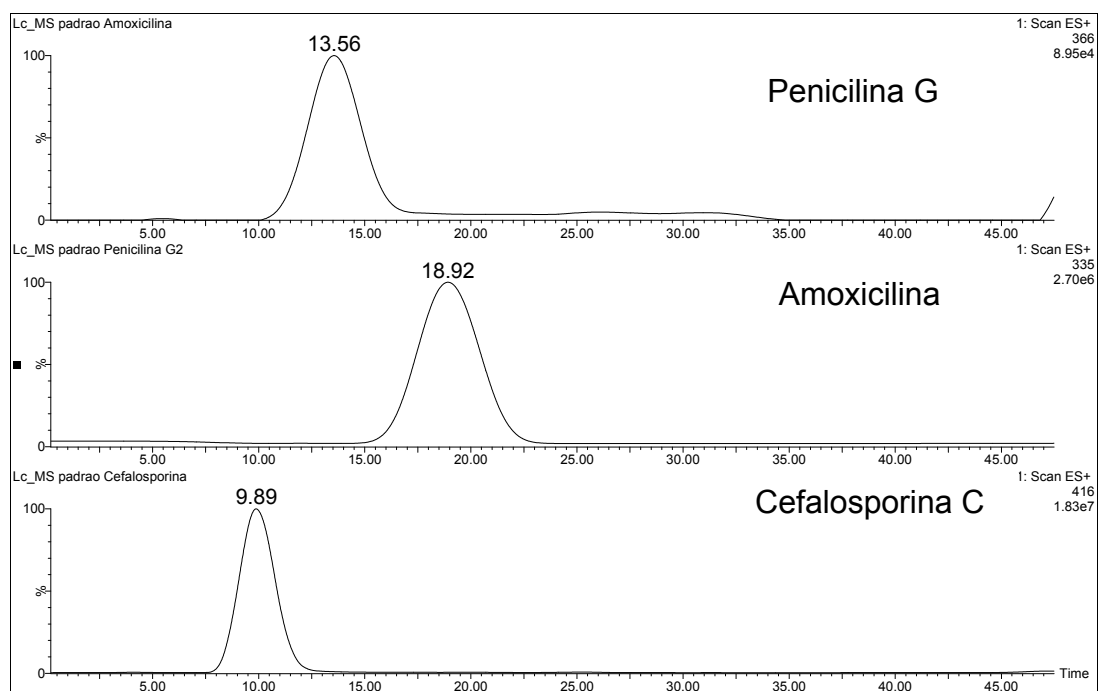


FIGURA 4.21 Cromatograma de íons selecionados dos padrões de antibióticos.

Os estudos de LC/MS dos padrões tornaram-se viáveis para a confirmação de estruturas idênticas a esses padrões presentes nos extratos, bem como para diferenciar substâncias que apresentem tempos de retenção muito próximos, mas com diferentes caminhos de fragmentação e/ou massa molar.

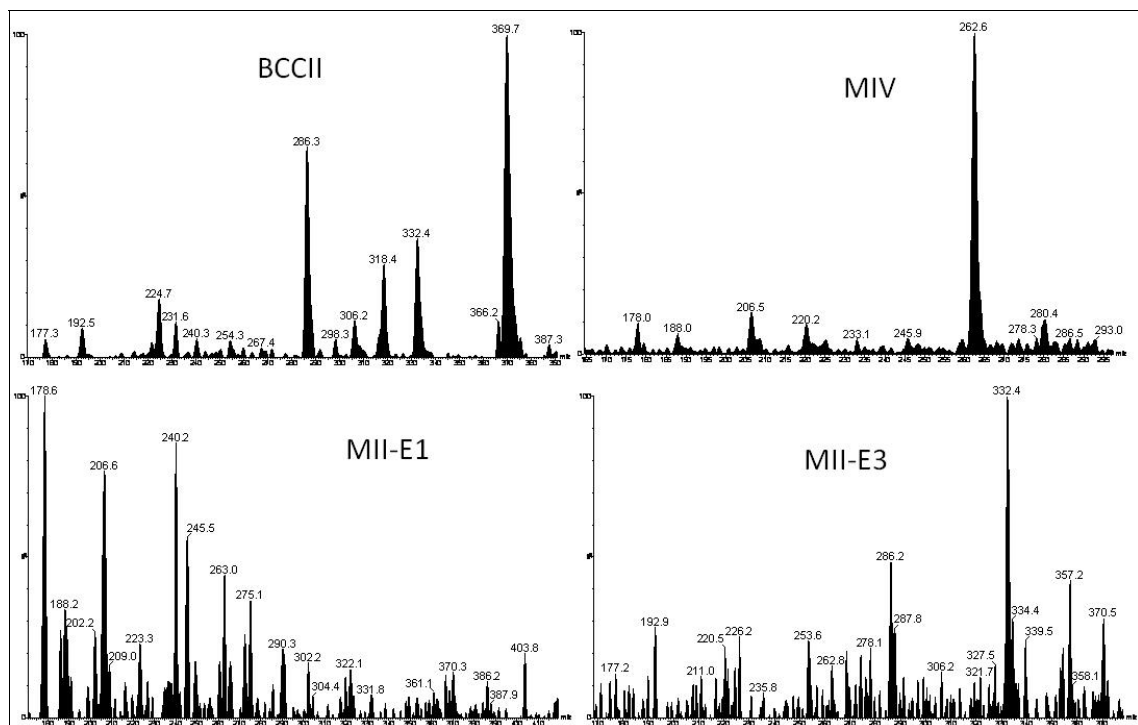
As condições estabelecidas para este tipo de ensaio não foram adequadas para as análises do ácido clavulânico, conseqüentemente para a determinação deste composto nos extratos as análises foram feitas somente por inserção direta.

4.5. Busca de compostos β -lactâmicos nos extratos de *Streptomyces clavuligerus*.

Em geral, os cromatogramas de *full scan* obtidos das análises dos extratos não apresentaram sinais evidentes correspondentes às massas molares dos compostos padrões, foi preciso o uso da ferramenta de monitoramento de íons e a realização de experimentos de íons produtos, íons precursores e de SRM para a confirmação dos dados.

4.5.1. Determinação de penicilinas e cefalosporinas.

Foram feitas análises para cada um dos extratos por inserção direta no modo positivo de ionização e por LC/MS na procura de compostos β -lactâmicos da classe das penicilinas e cefalosporinas. Por meio do uso da ferramenta de monitoramento de íons, foram procurados nos espectros íons que correspondessem aos padrões estudados, mas não foi identificada nenhuma destas substâncias nas amostras analisadas, confirmando o reportado na literatura. Não obstante, este microrganismo é conhecido por produzir algumas penicilinas e cefalosporinas, porém foi realizado inicialmente o experimento de íons precursores de m/z 160 na procura de penicilinas. Na figura 4.22 são apresentados os espectros dos extratos que mostraram resultados promissórios.

FIGURA 4.22 Experimento de íons precursores de m/z 160

Contudo, os espectros de íons precursores somente fornecem a massa molar dos constituintes do extrato, o que dificulta uma atribuição segura no caso das análises dessas substâncias em misturas complexas; procede-se então à utilização do recurso *tandem*, onde são obtidos os espectros de íons produtos para cada uma das massas selecionados. Na figura 4.23 são apresentados os espectros de íons

produtos de alguns dos íons observados nos espectros de íons precursores, os demais íons não foram apresentados porque não foi obtido nenhum tipo de fragmentação nas condições de análise utilizadas.

Após análise por comparação com os padrões dos tempos de retenção e das rotas de fragmentação, foi concluído que, as massas obtidas nos espectros de íons precursores de m/z 160 não correspondem a substâncias da classe das penicilinas.

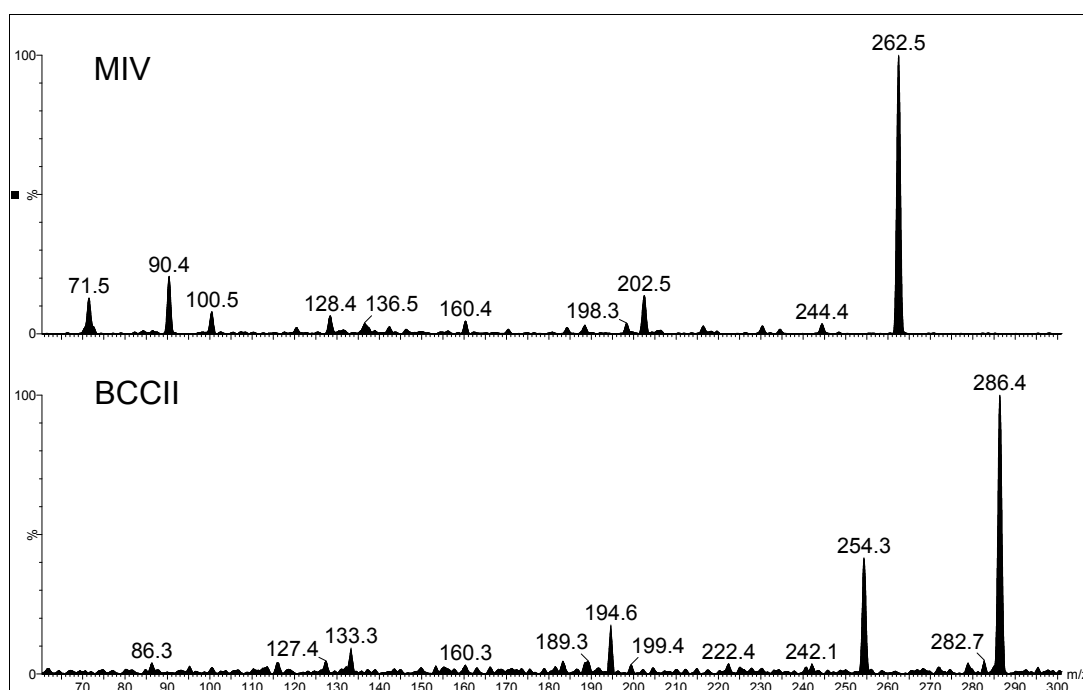


Figura 4.23 Espectro de íons produtos de m/z 262 (Extrato MIV) e m/z 286 (Extrato BCCII).

Com o intuito de procurar íons de penicilinas e cefalosporinas previamente isoladas das culturas deste microrganismo foi utilizada a ferramenta de monitoramento de íons nos cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos das análises. Desta maneira, nos extratos sem partição BCCII e MIV foram observados íons que correspondiam à cefamicina C $[M+H]^+$ 447 e seus precursores biossintéticos tais como a penicilina N $[M+H]^+$ 360; deacetilcefalosporina C $[M+H]^+$ 375, deacetoxicefalosporina C $[M+H]^+$ 358 e carbamoil deacetoxicefalosporina C $[M+H]^+$ 417. Os cromatogramas de íons selecionados obtidos destas análises são mostrados nas figuras 4.24 e 4.25 respectivamente.

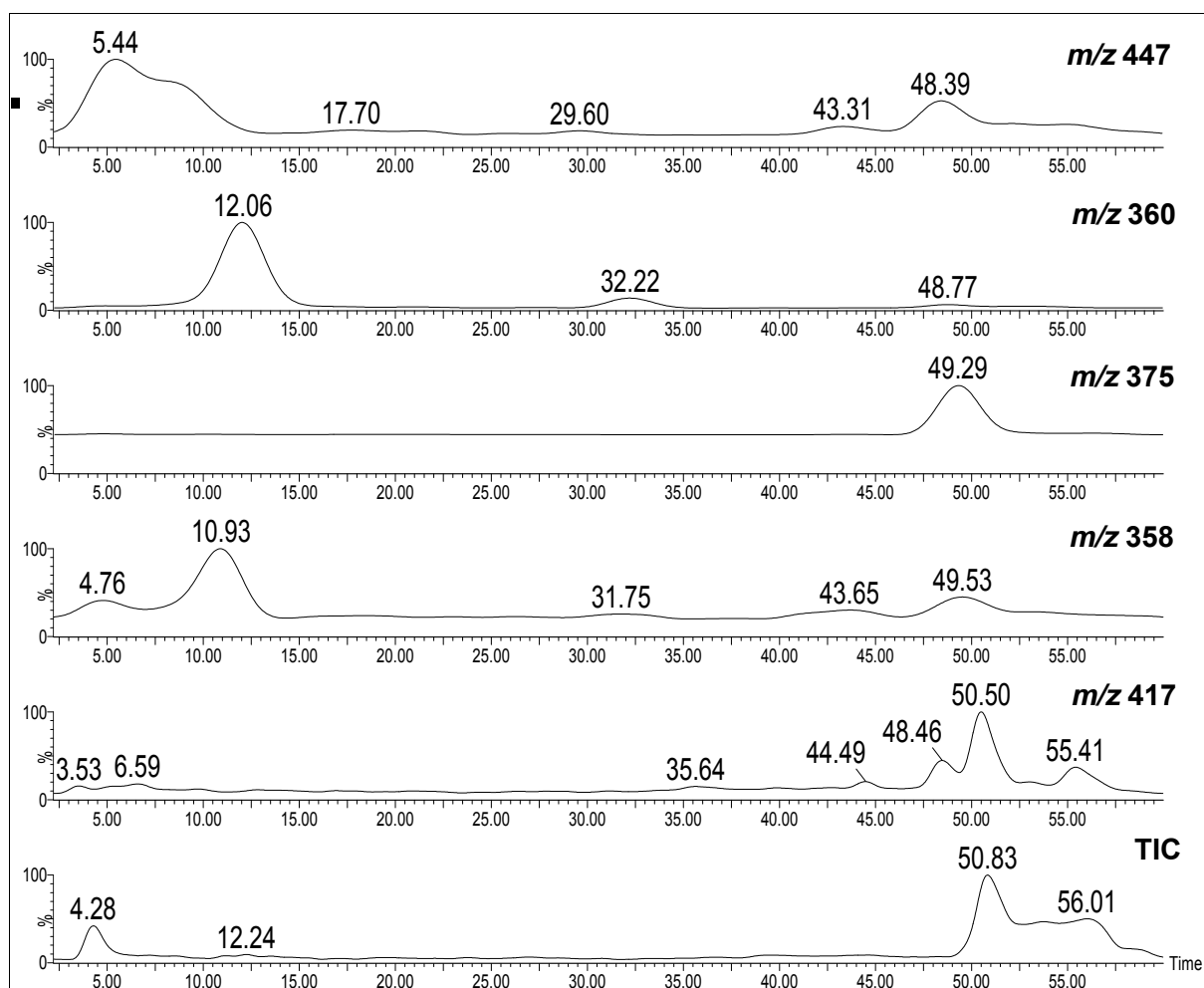


FIGURA 4.24 Cromatograma de íons selecionados do extrato bruto BCCII.

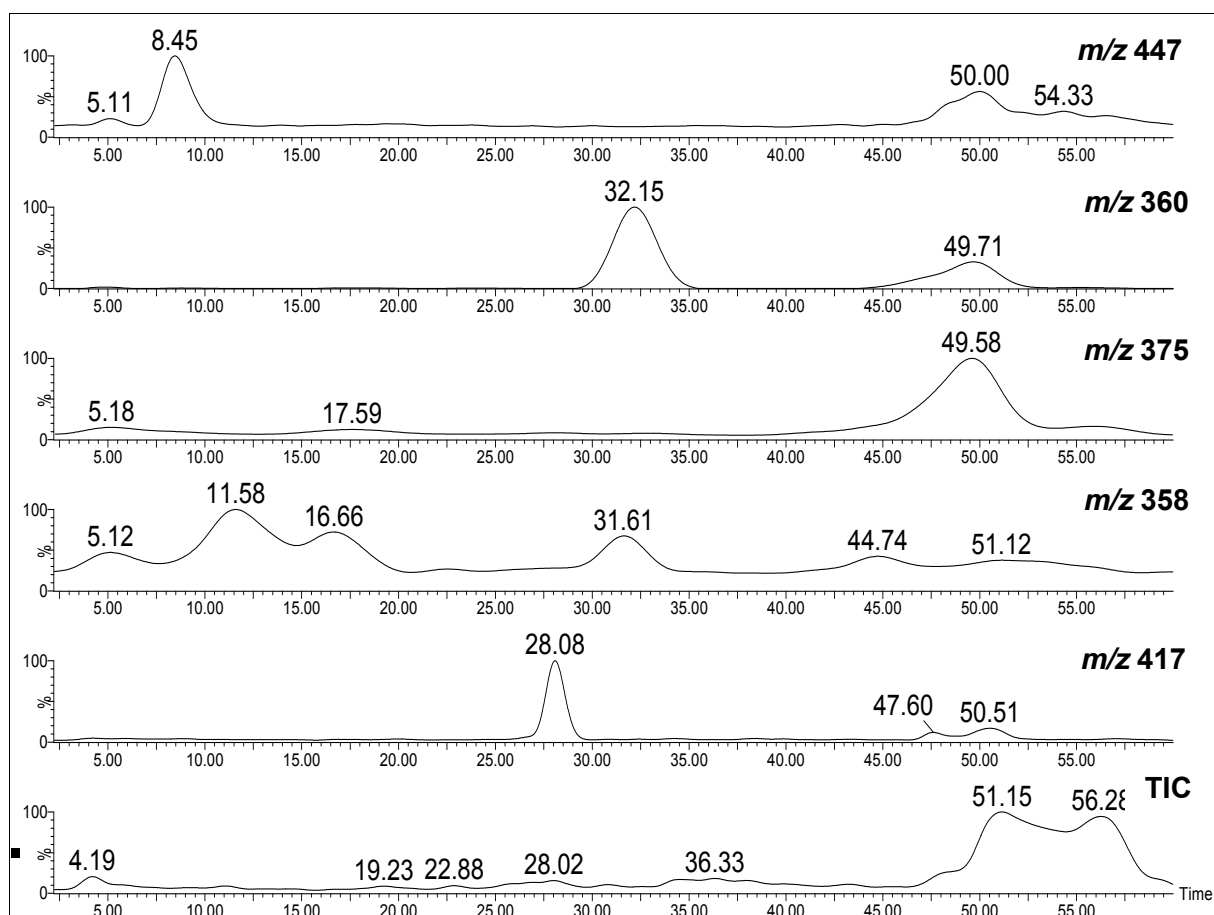


FIGURA 4.25 Cromatograma de íons selecionados do extrato bruto MIV.

Como pode ser observado nos cromatogramas de íons selecionados apresentados (Figura 4.24 e 4.25), para alguns íons várias bandas de absorção são registrados em tempos de retenção diferentes. Procede-se então à utilização do recurso *tandem*, onde são obtidos os espectros de íons produtos para cada uma das massas selecionadas em cada um dos tempos de retenção onde houve absorção. Apesar de não contar com o padrão para comparação do espectro e tempo de retenção se têm várias evidências da presença da cefamicina C (7), da penicilina N (8) e da deacetoxicefalosporina C (9) nos extratos. A análise estrutural e a proposta de fragmentação para cada íon é apresentada a seguir.

4.5.1.1 Análises do íon $[M+H]^+$ 447

O íon $[M+H]^+$ 447 sugere uma substância de massa molar 446 Da coincidente com a massa da cefamicina C; este composto tem sido previamente isolado de *S.*

clavuligerus (Nagarajan *et al.* 1971), e, devido à inexistência de um padrão comercialmente disponível sua determinação vêm sendo feita principalmente através do método de bioensaio, o qual utiliza um microrganismo sensível e sua atividade é determinada em relação a outro composto com bioatividade e estrutura química semelhantes, como a cefalosporina C (Yegneswaran *et al.*, 1988).

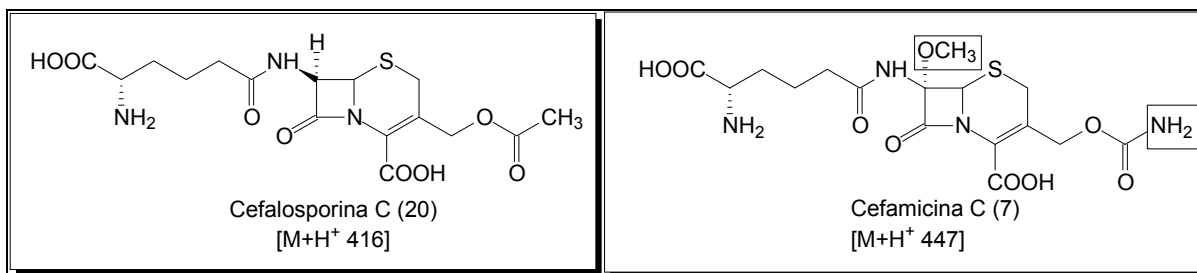


FIGURA 4.26 Comparação estrutural entre a cefalosporina C e a cefamicina C.

Deste modo, nas análises por LC/MS é possível comparar o tempo de eluição e o espectro de íons produtos da cefalosporina C (FIGURA 4.17) com o espectro de íons produtos de [M+H]⁺ 447 apresentado na figura 4.27, obtido dos extratos BCCII e MIV (tr 8.9 - 9.1 min.). A comparação dos dois espectros mostra algumas semelhanças como o pico base a *m/z* 143 e o íon *m/z* 97.

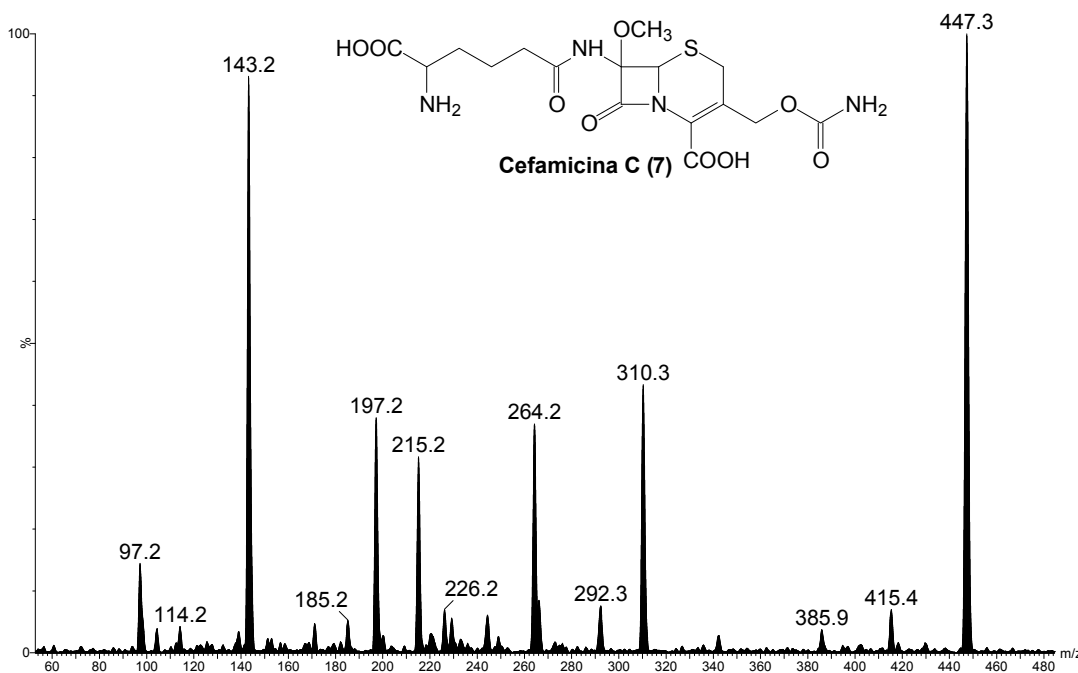


FIGURA 4.27. Espectro de íons produtos [M+H]⁺ 447. Obtido via ESI⁺

Baseado nas informações do espectro é possível propor o mecanismo de fragmentação para esta estrutura o qual se inicia com a eliminação da amida que substitui o anel diidrotiazino, formando o íon m/z 386, este íon através da eliminação de CO_2 forma o íon m/z 342, o qual por meio da perda de metanol produz o íon m/z 310. O íon m/z 264 se forma a partir do íon m/z 310 por meio da eliminação de ácido fórmico. A molécula protonada pode sofrer diretamente a perda de uma unidade de metanol e produzir o íon m/z 415. Embora, os demais íons incluindo o pico base m/z 143 e o íon m/z 97 não foram determinados e se encontrem em estudo, evidências como; a massa molar, o tempo de retenção e o padrão de fragmentação anteriormente descrito sugerem que o íon detectado a m/z 447 corresponde à cefamicina C.

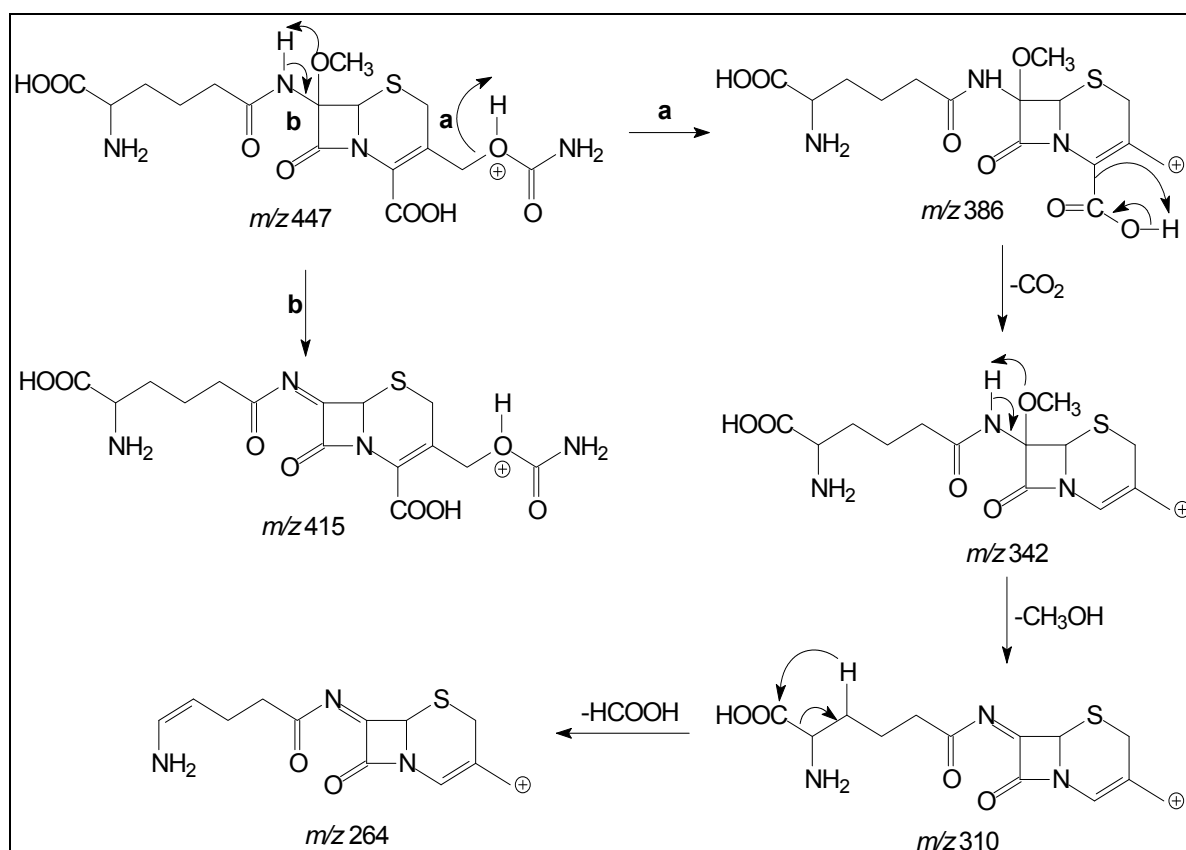


FIGURA 4.28. Proposta de fragmentação $[\text{M}+\text{H}]^+$ 447.

Para verificar a presença desta substância nos outros extratos mesmo em baixa concentração foi usada a técnica SRM (Selected Reaction Monitoring) na qual foram

monitorados os íons m/z 447 (ion molecular) e m/z 310 e m/z 143 (íons produtos) devido a sua maior estabilidade.

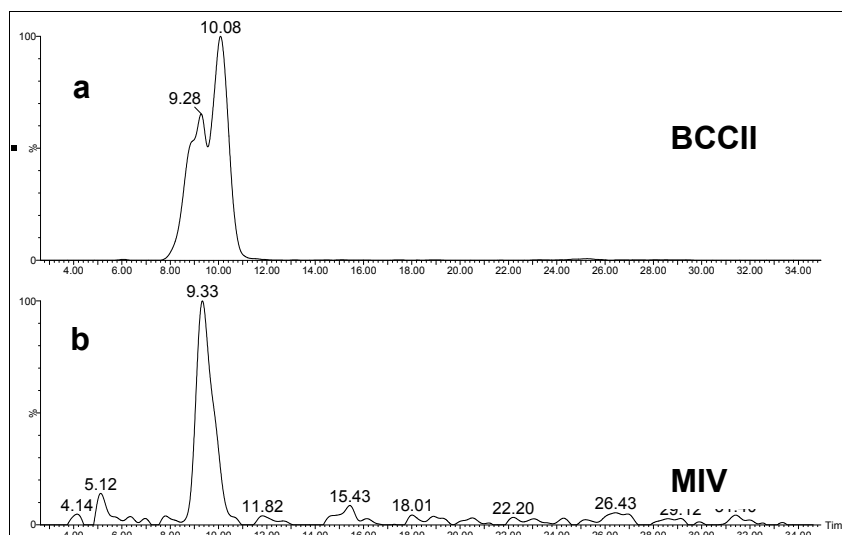


FIGURA 4.29 Experimento de SRM. (a) Extrato BCCII (b) Extrato MIV.

Na figura 4.29 são apresentados os resultados obtidos neste experimento. No cromatograma (a) referente ao extrato BCCII é possível observar a presença de duas bandas que correspondem a dois compostos de massa molecular m/z 447 e com fragmentações semelhantes, possivelmente se tratando de compostos isoméricos. Devido à falta de resolução das bandas não foi possível obter os espectros de íons produtos que corresponderiam a cada absorção. No entanto no cromatograma (b) referente ao extrato MIV é possível observar somente uma banda de absorção. Esta diferença evidencia a influência da composição do meio de cultura assim como também a forma de cultivo, sendo que o extrato BCCII foi obtido dos cultivos em meios complexos e o extrato MIV foi obtido dos cultivos em incubador rotativo em meios de cultura solúveis.

Nos outros extratos que foram analisados não foi detectado nenhum sinal que pudesse determinar a presença da cefamicina C, o qual sugere que meios de cultura que contêm amido e lisina promovem a formação de cefamicina C em cultivos de *Streptomyces clavuligerus*.

4.5.1.2 Análise do íon $[M+H]^+$ 360

O íon $[M+H]^+$ 360 evidencia a presença de uma substância de massa molar de 359 Da, que corresponde com a massa molar da penicilina N, embora não se dispõem de padrão para comparação, as análises por LC/MS mostram algumas evidências da presença desta substância em alguns extratos, além do fato de ser um composto que está presente na biossíntese de penicilinas e cefalosporinas em *S. clavuligerus*.

Portanto, empregando os mesmos critérios usados nas análises do íon m/z 447, inicialmente, foram obtidos os espectros de íons produtos em diferentes tempos de retenção em que o íon aparece (FIGURAS 4.24 e 4.25), seguidamente foi determinado o espectro de íons produtos que provavelmente corresponde à penicilina N e baseado neste espectro foi proposta uma rota de fragmentação. Finalmente foram realizados os experimentos de SRM com o objetivo de confirmar a presença deste íon em outros extratos. Das análises do extrato BCCII foram obtidos dois espectros de íons produtos que correspondem ao íon m/z 360 em diferentes tempos de retenção (FIGURA 4.30 b e c), no entanto, do extrato MIV foi obtido somente o espectro (c).

A comparação destes dois espectros sugere que além de possuir a mesma massa molar, estas duas substâncias possuem características estruturais semelhantes, formando íons produtos da mesma massa e possivelmente se trate de compostos isoméricos.

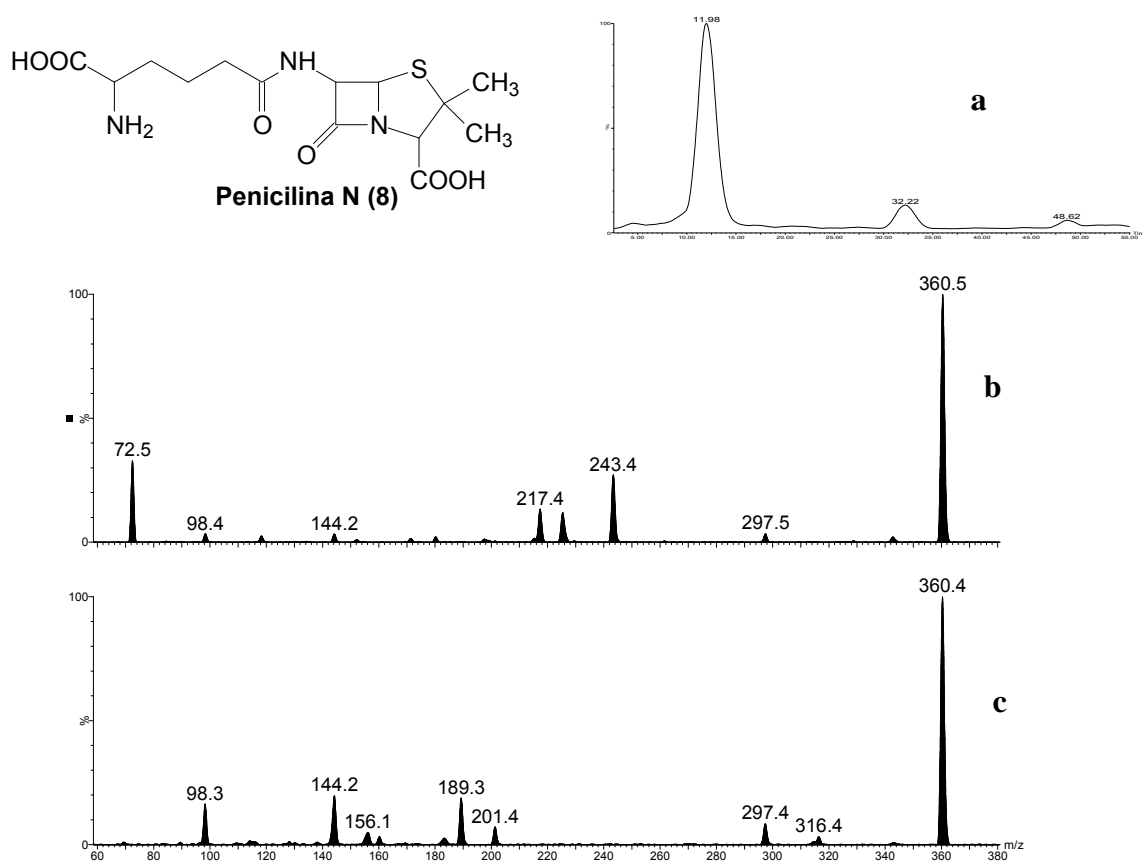


FIGURA 4.30 (a) Cromatograma de íons selecionados. (b) Espectro de íons produtos de m/z 360 (Tr 11.98 min.) (c) Espectro de íons produtos de m/z 360 (Tr 32.22 min.).

A figura 4.31 descreve a rota de fragmentação proposta para alguns dos íons formados baseada no espectro b; porém a fragmentação proposta na figura 4.32 foi baseada no espectro c. Os principais íons observados no espectro da figura 4.30b são produzidos a partir da cadeia lateral do anel β -lactâmico, principalmente pela quebra da ligação peptídica, o íon em m/z 72 é formado pela perda de ácido fórmico a partir do íon m/z 118 produzido a partir da cadeia lateral do anel β -lactâmico.

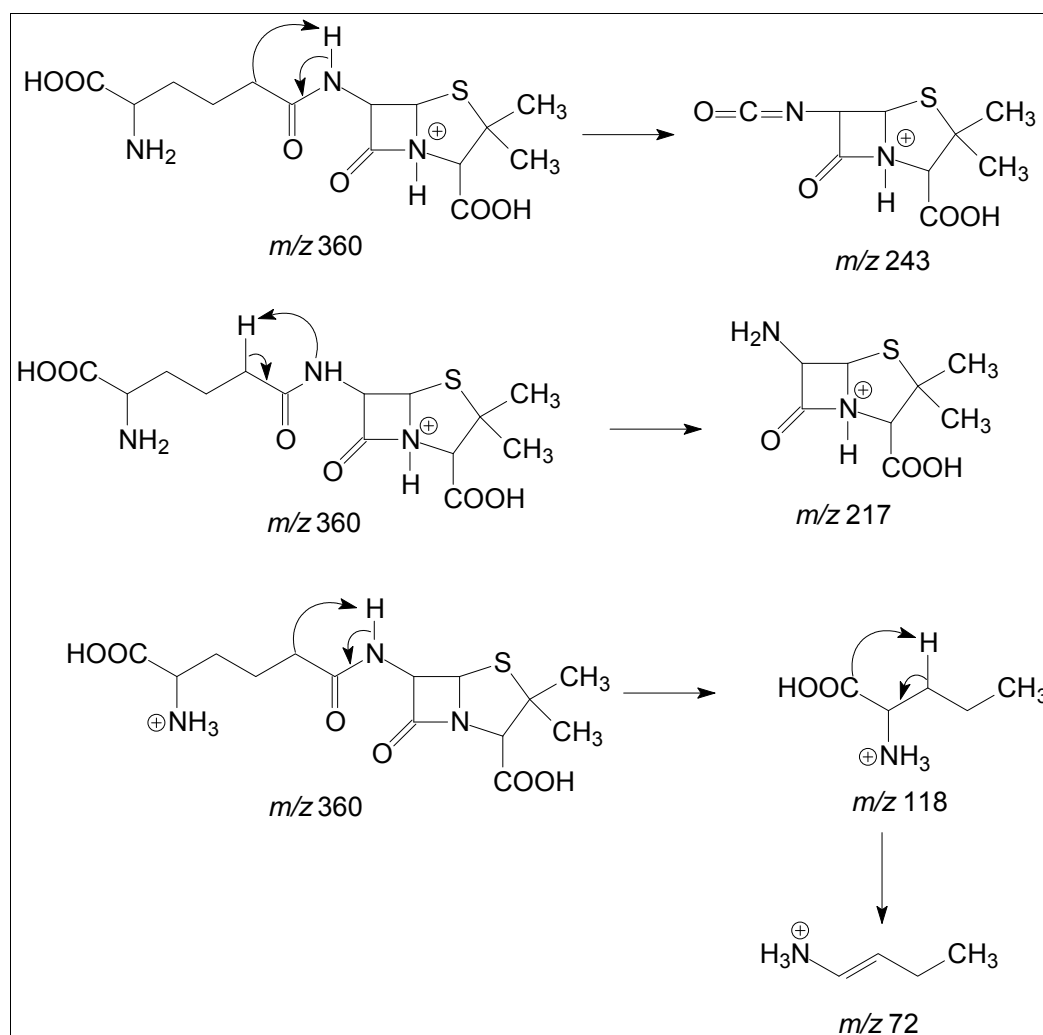


FIGURA 4.31 Proposta de fragmentação do íon m/z 360 (Baseado no espectro b).

Do mesmo modo, os íons presentes no espectro da figura 4.30c são formados a partir da perda de moléculas neutras da cadeia lateral peptídica. É assim como o íon m/z 201 é formado pela clivagem do anel β -lactâmico quando a carga está sobre o nitrogênio da amina. A partir deste íon e por meio da quebra da ligação peptídica é formado o íon m/z 144, o qual através da eliminação de ácido fórmico produz o íon m/z 98. A eliminação direta de CO_2 a partir da molécula protonada produz o íon em m/z 316 (FIGURA 4.32).

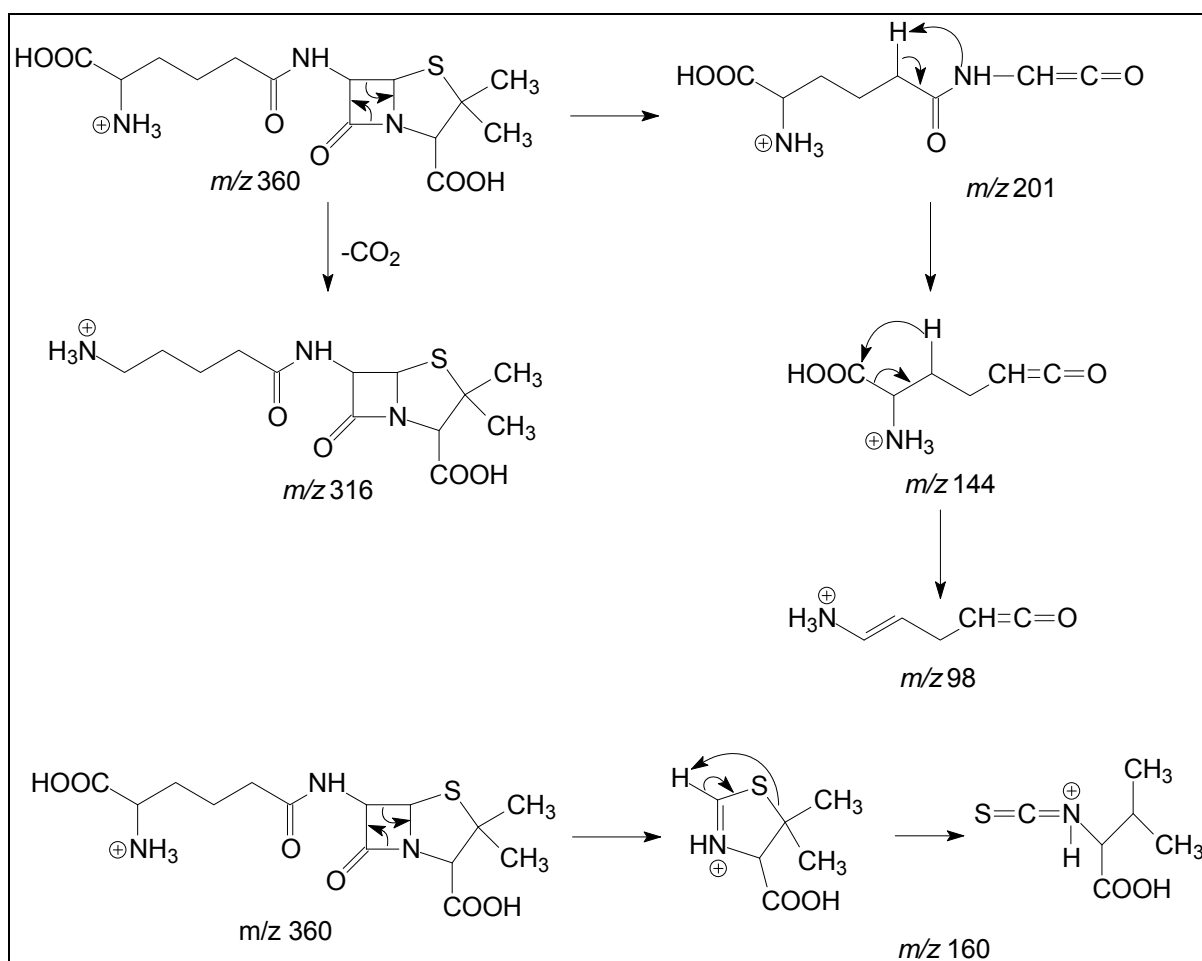


FIGURA 4.32 Proposta de fragmentação do íon m/z 360 (Baseado no espectro c).

Além disso, é possível observar neste espectro que o íon m/z 160, característico das penicilinas analisadas, aparece com uma pequena porcentagem de abundância; este fato, e a não presença do íon m/z 114 têm varias explicações; a primeira delas é que a energia de ionização não foi suficiente para a formação destes íons, evidenciado pela alta porcentagem do íon molecular no espectro. Outra explicação pode ser que as principais fragmentações nesta molécula ocorrem na cadeia lateral do composto, a qual é diferente dos compostos padrões.

Para os experimentos SRM foram monitorados os íons m/z 360 (íon molecular) e os íons produtos m/z 144 e m/z 98, estes experimentos não mostraram a presença desta substância em outros extratos analisados.

4.5.1.3 Análise dos íons m/z 358, m/z 375, m/z 417

A presença dos íons m/z 358, m/z 375, m/z 414 sugerem substâncias de massa molar 357, 374 e de 416 Da. respectivamente nos extratos. Estas massas correspondem a compostos β -lactâmicos presentes na biossíntese da cefamicina C em *S. clavuligerus* e são apresentadas na figura 4.33.

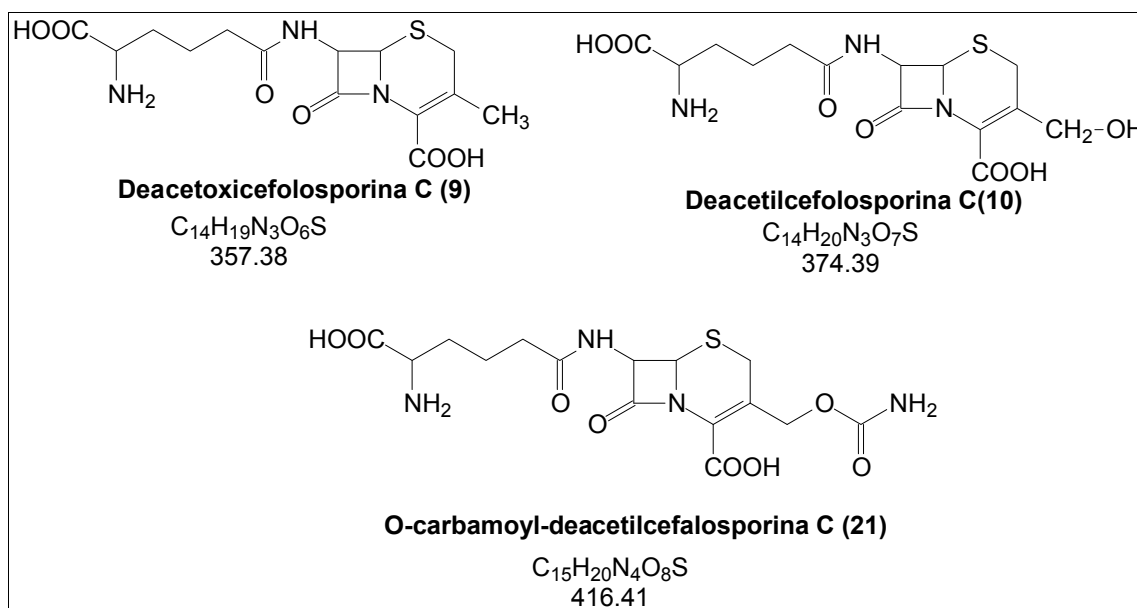


FIGURA 4.33 Estruturas de cefalosporinas presentes na biossíntese de cefamicina C em *S. clavuligerus*.

As análises dos espectros de íons produtos produzidos pelos íons m/z 374 e m/z 417 concluirão que estes íons não correspondem aos compostos deacetilcefalosporina C e O-carbamoyl deacetilcefamicina C respectivamente. Além disso, o tempo de retenção observado de 49 min. e 28.08 min. respectivamente não são comparáveis com compostos da classe das cefalosporinas. No entanto, o tempo de retenção observado para o íon m/z 358 (tr 10.9 – 11.6) nos extratos BCCII e MIV pode ser comparável ao da cefalosporina C, embora, não se dispõem do espectro de íons produtos devido a energia de colisão que não foi suficiente para a fragmentação da molécula, o dado da massa molar, o tempo de retenção e o fato de ser um composto previamente identificado em *S. clavuligerus*, são indícios da presença de deacetoxicefalosporina C nos extratos.

Nos outros extratos analisados não foi determinada a presença de compostos da classe das penicilinas, isso indica a ineficiência dos métodos de extração com solventes orgânicos devido a que somente foram detectadas estas substâncias na fração aquosa bruta dos extratos. Além disso, dos meios de cultura testados; o meio IV e o meio BCCII se mostraram como os mais eficientes na produção de cefamicina C.

4.5.2. Determinação de ácido clavulânico

As análises para a determinação do ácido clavulânico por espectrometria de massas foram feitas por inserção direta através da técnica de ionização por *electrospray* no modo negativo (ESI⁻), as condições do equipamento foram otimizadas por meio da análise do padrão e estão descritas na seção experimental.

Inicialmente foram adquiridos os espectros de *full scan* onde não foi observado o íon molecular, do mesmo modo, não foi possível obter o espectro de íons produtos através de experimentos MS/MS, fato que pode ser explicado pela baixa concentração da substância nos extratos e em alguns casos pelos íons interferentes no meio. Para contornar este problema foi necessário o uso da técnica SRM na determinação do composto nos extratos. Deste modo, foram monitorados os íons m/z 198 (íon molecular), m/z 108 e m/z 136 (íons produtos), selecionados pela estabilidade observada nas análises do padrão.

Os primeiros resultados são destacados na figura 4.34 e fazem referência à determinação do ácido clavulânico nos extratos MII-E1 (a) e MII-E3 (b), deste modo pode ser demonstrado que o meio de cultura MII o qual continha triptona como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono, favorece a produção de ácido clavulânico. Outro resultado interessante é a determinação do metabólito no extrato das células (MII-E1) embora, presente em menor quantidade quando comparado ao extrato MII-E3.

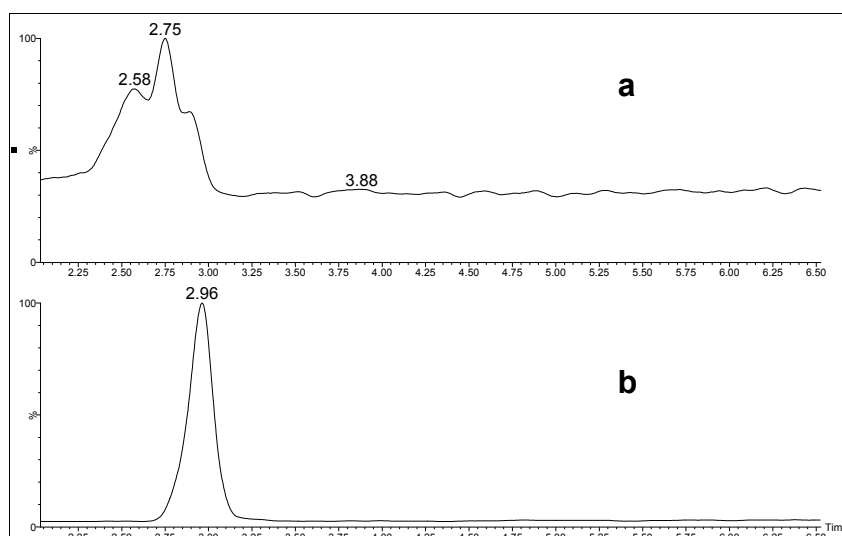


FIGURA 4.34 Experimento SRM dos extratos (a) MII-E1 e (b) MII-E3

Num segundo resultado (FIGURA 4.35) é possível observar a presença do metabólito no extrato bruto MIII (a) e no extrato MIII-E3 (b). Dos cromatogramas obtidos é possível inferir que a extração com acetato de etila a pH 2 não resulta muito eficiente comparada com a quantidade de composto presente no extrato bruto; sugerindo assim, a rápida degradação do composto em meio ácido. Além disso, foi evidenciado que a utilização de soytone como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono nos meios de cultivo também favorecem a produção de ácido clavulânico em culturas de *S. clavuligerus*.

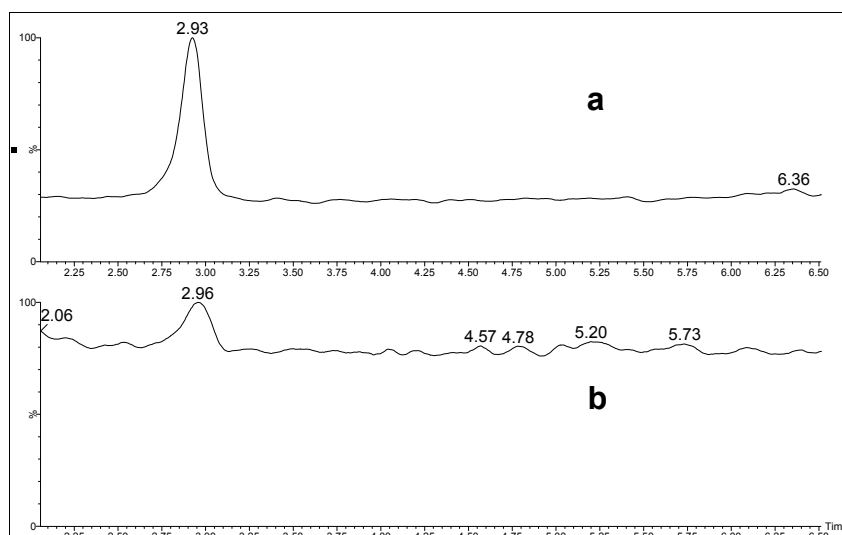


FIGURA 4.35 Experimento SRM dos extratos (a) MIII (b) MIII-E3

Os resultados das análises dos extratos obtidos dos cultivos suplementados com amido e lisina não demonstraram a presença deste metabólito através dos experimentos de SRM.

4.5.3. Outros íons determinados.

A análise dos extratos MII-E2 e MIII-E2 por LC/MS através da ferramenta de íons selecionados permitiu a detecção de alguns compostos não β -lactâmicos que fazem parte do metabolismo secundário de *S. clavuligerus* (FIGURA 4.36). Foram detectados: a N-propionilholotina, a 3-etil – 2,5-bis(2-hidroxietil)pirazina, o ácido 8-hidroxicapilânico e a uridina (FIGURA 4.37). Embora, não se dispõem de padrão para estas substâncias para se comparar os espectros e os tempos de retenção; evidências como a massa molar determinada por meio do íon molecular observado, assim como também o fato de serem produtos conhecidos do metabolismo secundário do microrganismo demonstram a presença dos compostos nos extratos.

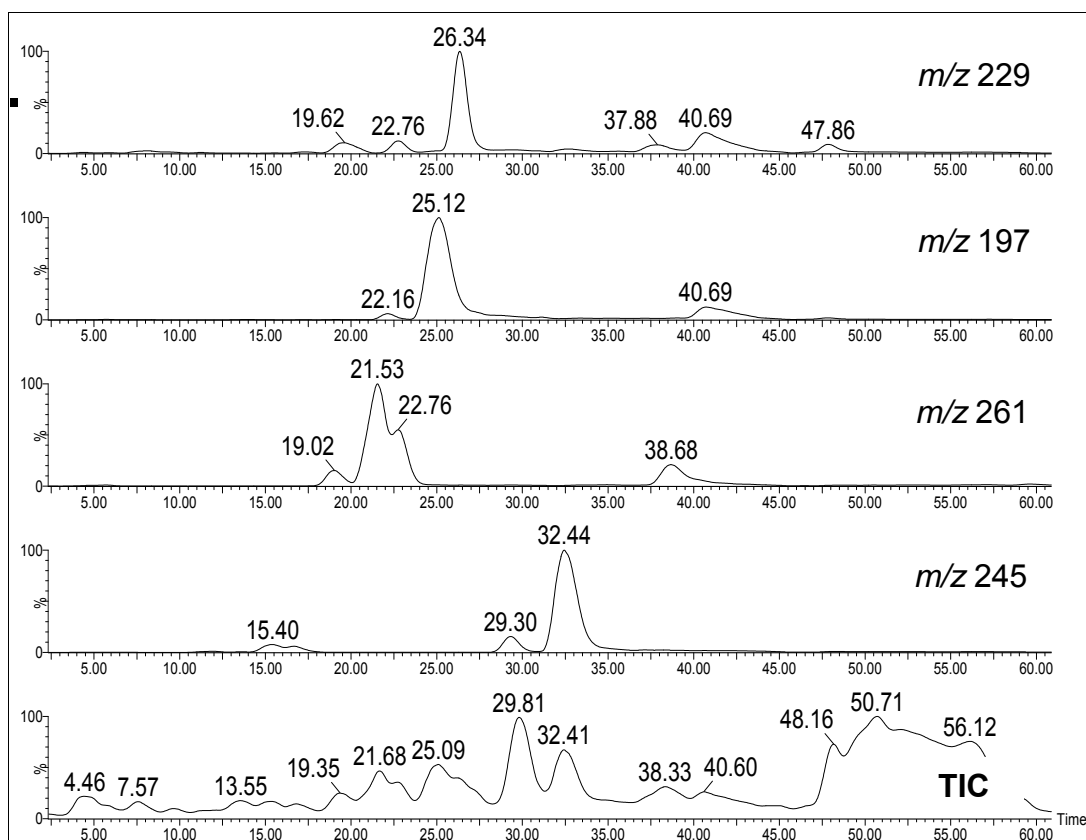
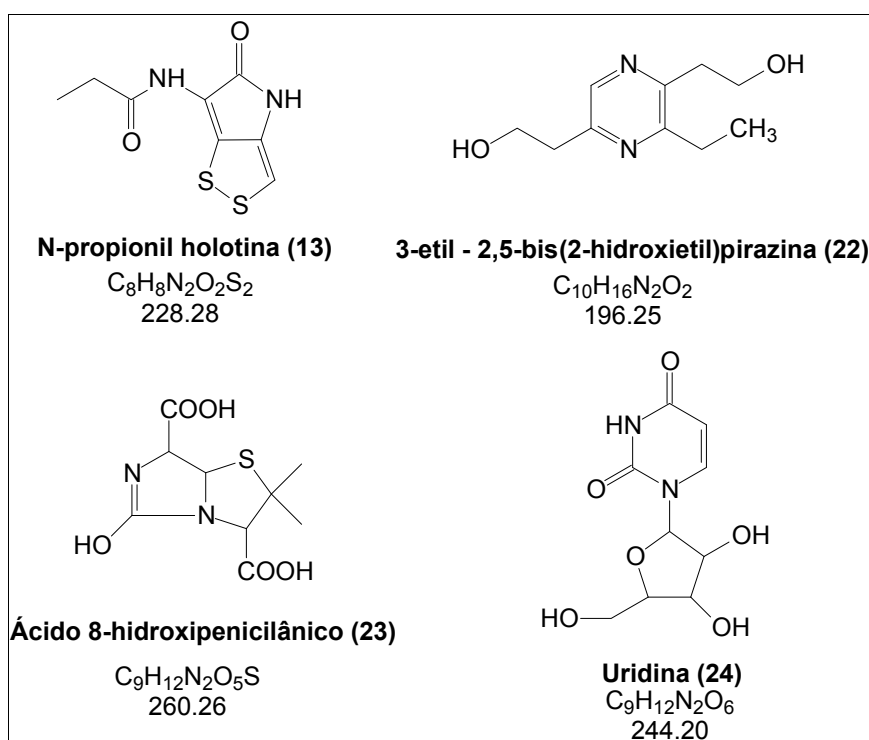
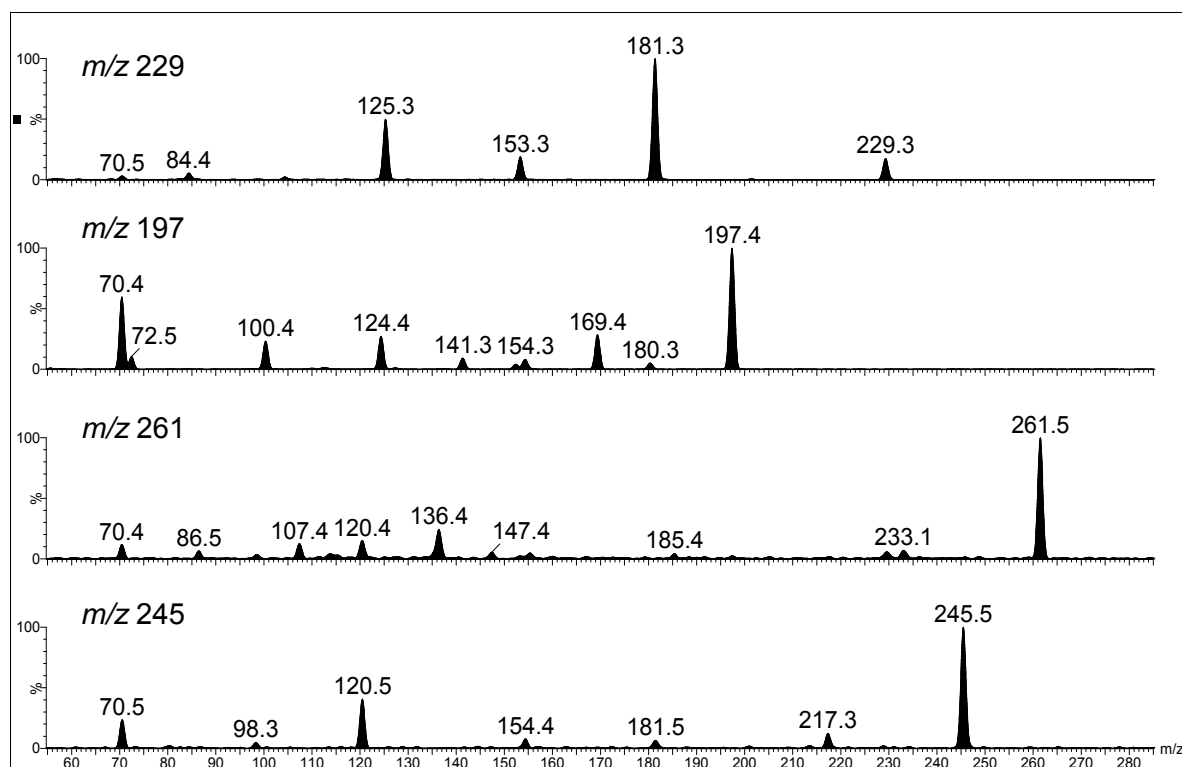


FIGURA 4.36 Cromatograma de íons selecionados do extrato MII-E2.

FIGURA 4.37 Substâncias não β -lactâmicas detectadas por ESI⁺Figura 4.38 Espectro de íons produtos de m/z 229; m/z 197; m/z 261 e m/z 245.

Na figura 4.38 é apresentado o espectro de íons produtos obtido para cada íon, no entanto, as propostas de fragmentação não são discutidas nesta ocasião e a confirmação das estruturas é condicionada a futuros análises dos padrões.

Numa consideração final, é preciso esclarecer que para os espectros obtidos por MS/MS não foram propostas muitas das estruturas dos íons formados, devido a que para cada perda existem varias possibilidades, além disso, podem existir outros mecanismos diferentes dos propostos assim como das estruturas dos íons, conseqüentemente, estes não devem ser entendidos como uma proposta definitiva.

4.6. Busca de compostos β -lactâmicos nos extratos dos fungos: *penicillium sp*, *P. brasilianum*, *P. griseoroseum* e *Aspergillus aculeatus*.

Para a determinação de compostos β -lactâmicos da classe das penicilinas e cefalosporinas nos extratos dos fungos endofíticos cultivados, foram obtidos os espectros de *full scan*, íons produtos, íons precursores nas condições otimizadas pelos padrões. Além disso, foi aplicada a técnica de SRM nas análises de alguns íons.

4.6.1. Análises dos espectros de *full scan* e íons produtos.

Inicialmente foram obtidos os espectros de *full scan* via inserção direta, neles, não foi possível observar o pico do íon molecular que correspondesse à massa molar dos padrões analisados, porém, com a finalidade de aumentar a sensibilidade nas análises foram realizados experimentos de LC/MS nas condições descritas na seção 3.7; no entanto, os resultados obtidos não foram conclusivos.

Seguidamente foram obtidos os espectros de íons produtos de alguns dos íons observados no *full scan*, com o intuito de encontrar compostos com características de fragmentação semelhantes aos padrões. Mesmo assim, as análises destes íons

não gerarão resultados conclusivos sobre a presença de compostos β -lactâmicos nos extratos. Não obstante, foram identificadas algumas substâncias através do uso da ferramenta de íons selecionados (FIGURA 4.39).

Do extrato PG3 de *Penicillium griseoroseum* e do extrato SP1 obtido de *Penicillium sp.* foi identificado o ácido 6-aminopenicilânico (FIGURA 4.39 a e b). Além disso, foram identificados dois nucleotídeos; a adenosina detectada no extrato PB1 de *Penicillium brasilianum* (FIGURA 4.39 c) e a timina detectada no extrato AA1 de *Aspergillus aculeatus* (FIGURA 4.39 d). A determinação destas substâncias foi feita a partir da massa molar obtida através do íon molecular, além da comparação dos tempos de eluição com alguns reportes da literatura (Seifar *et al.*, 2008 e Pereira, 2000).

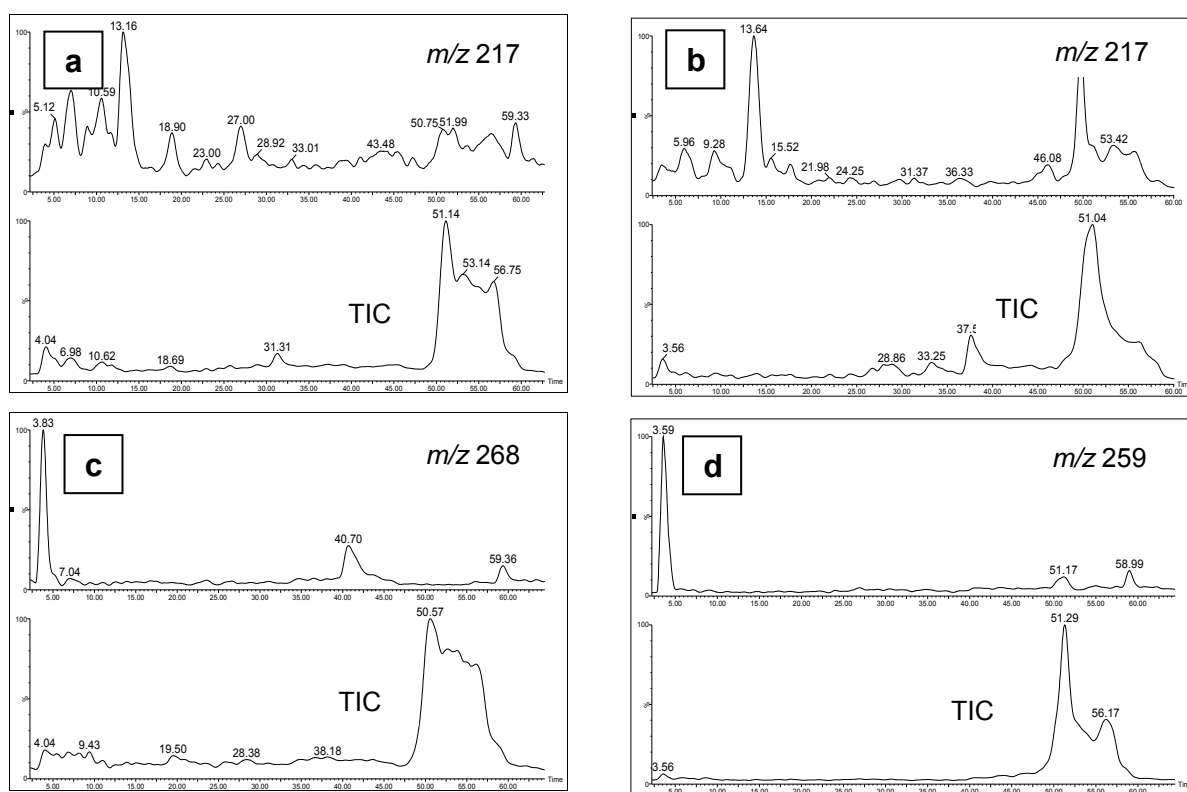


FIGURA 4.39 Cromatogramas de íons totais (TIC) e de íons selecionados de: (a) Extrato PG3 (b) Extrato SP1 (c) Extrato PB1 e (d) Extrato AA1.

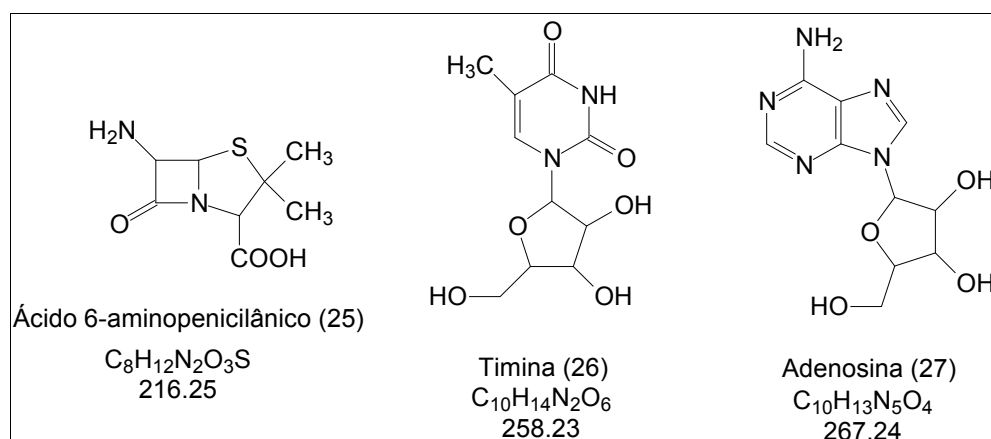


FIGURA 4.40 Substâncias identificadas por LC/MS nos extratos dos fungos endofíticos.

Embora os mecanismos de fragmentação não sejam discutidos nesta ocasião, os espectros de íons produtos são apresentados na figura 4.41. A confirmação da presença destas substâncias nos extratos poderia ser feita com a disponibilidade do padrão ou com o isolamento dos mesmos a partir dos extratos.

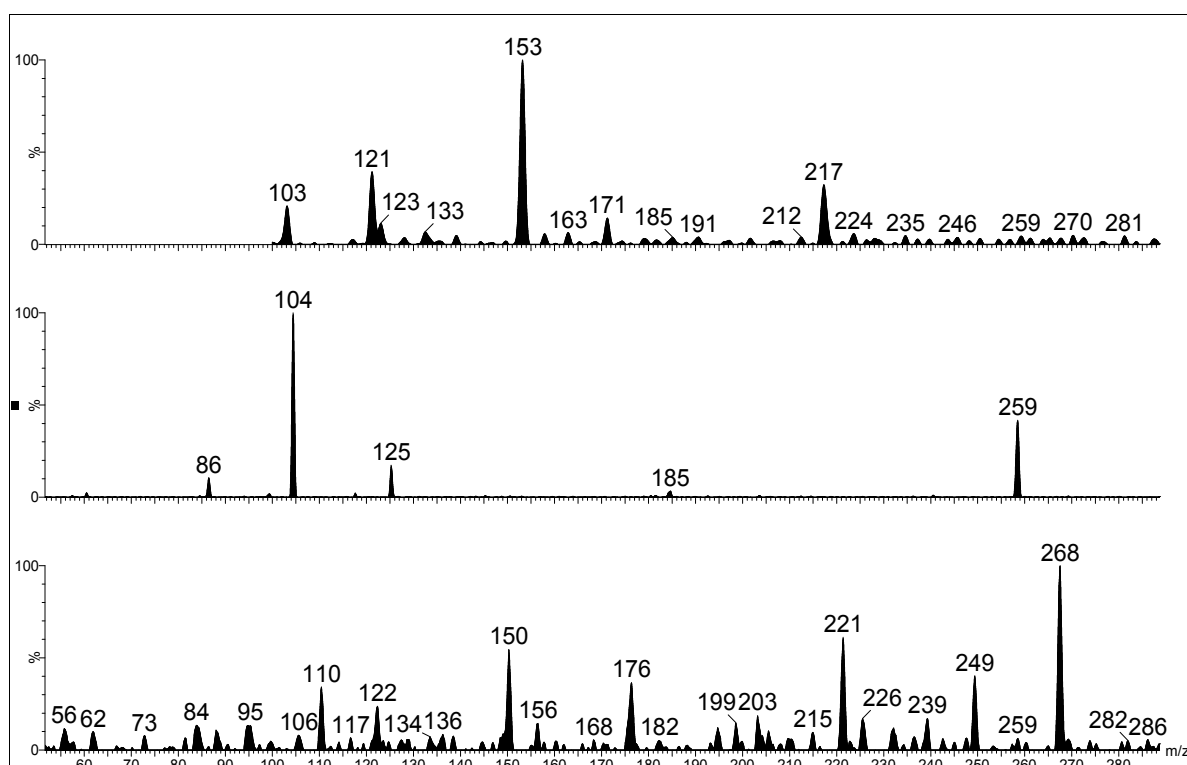


Figura 4.41 Espectros de íons produtos de m/z 217, m/z 259 e m/z 268.

4.6.2. Análises dos espectros de íons precursores e experimento SRM.

Para a determinação de compostos da classe das penicilinas foram realizados os experimentos de íons precursores de m/z 160 e SRM (Selected Reaction Monitoring) por serem técnicas mais seletivas e sensíveis na detecção de substâncias em baixa concentração.

Os espectros de íons precursores de m/z 160 obtidos das análises são apresentados na figura 4.42, neles é possível observar íons que após sofrerem fragmentação na câmara de colisão originam o íon m/z 160. A seguir cada um dos íons observados foi fragmentado; porém, somente a partir do íon m/z 252 do extrato AA1 foi obtido um espectro de íons precursores que mostrou evidências claras de pertencer a uma substância da classe das penicilinas ou pelos menos que possui em sua estrutura química um anel tiazolidino. Este anel seria o responsável pela formação do íon m/z 160 e m/z 114 como foi determinado nas análises dos padrões. Além disso, quando comparado o espectro de íons produtos de m/z 252 com o espectro de íons produtos da penicilina G são observados vários outros íons semelhantes como os íons m/z 116, m/z 98 e m/z 70, contudo, não foi possível determinar a estrutura do composto. A comparação dos espectros de íons produtos é mostrada na figura 4.43.

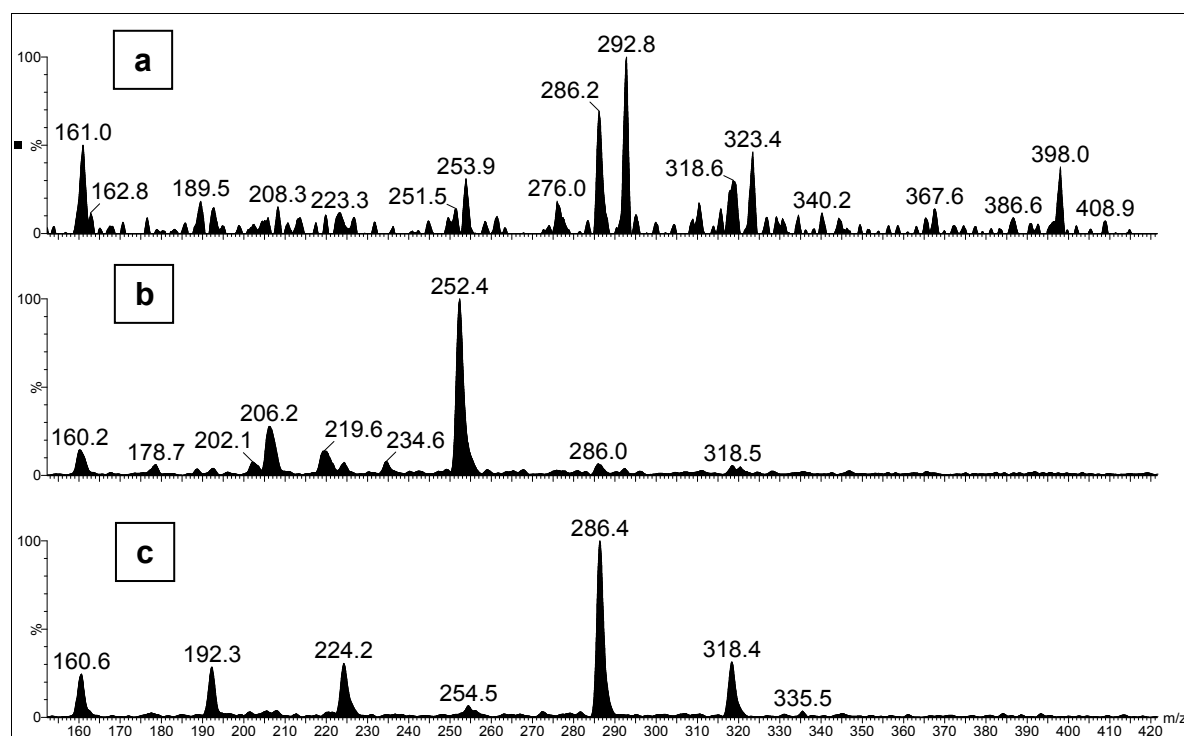


FIGURA 4.42 Espectros de íons precursores de m/z 160 de: (a) Extrato PG3 (b) Extrato AA1 (c) Extrato SP1.

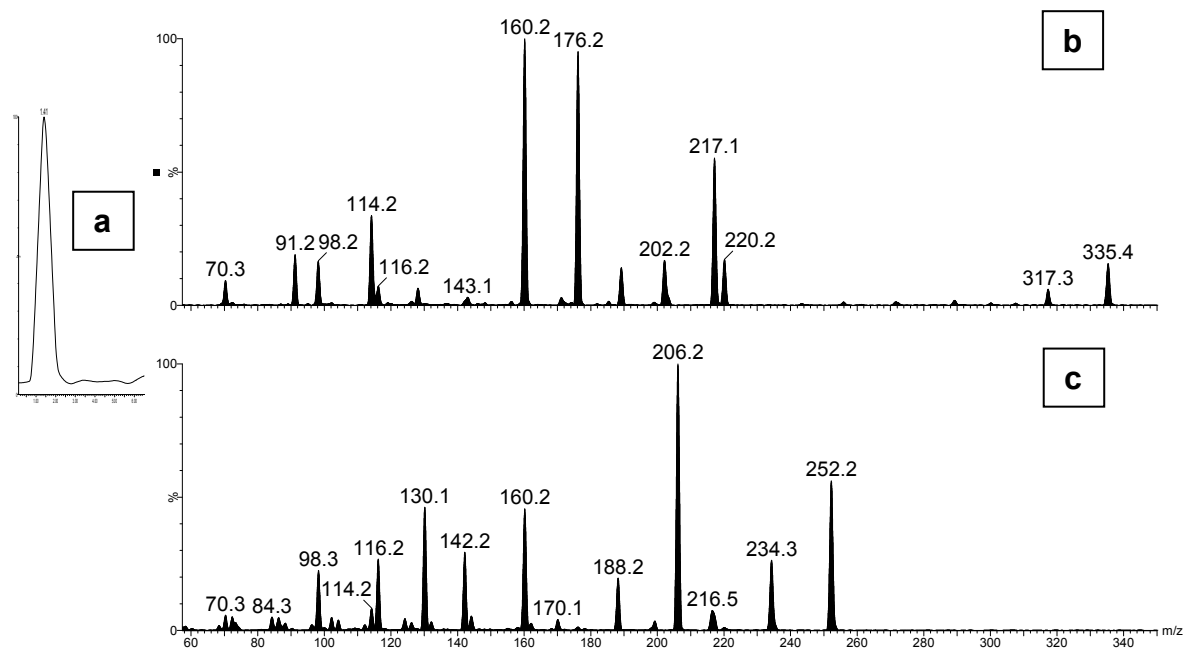


FIGURA 4.43 (a) Cromatograma de íons selecionados m/z 252. (b) Espectro de íons produtos de penicilina G (c) Espectro de íons produtos de m/z 252.

Finalmente foi realizado o experimento SRM nos extratos para a detecção de penicilina G, cefalosporina C e cefamicina C conforme condições de análise descritas na seção experimental. No entanto, somente no extrato SP1 de *Penicillium sp* e no extrato PB3 de *Penicillium brasilianum*, foi observada uma sinal que corresponderia à presença de uma substância com o íon molecular em m/z 335 e os íons fragmentos m/z 160 e m/z 176, mas, com um tempo de eluição de 4.66 e 4.29 min respectivamente. Tempos muito diferentes do observado para a penicilina G (13.5 min). Por esta razão foi concluído que o íon m/z 335 monitorado nos extratos não corresponde à penicilina G. Na figura 4.44 são observados os cromatogramas relativos a este experimento.

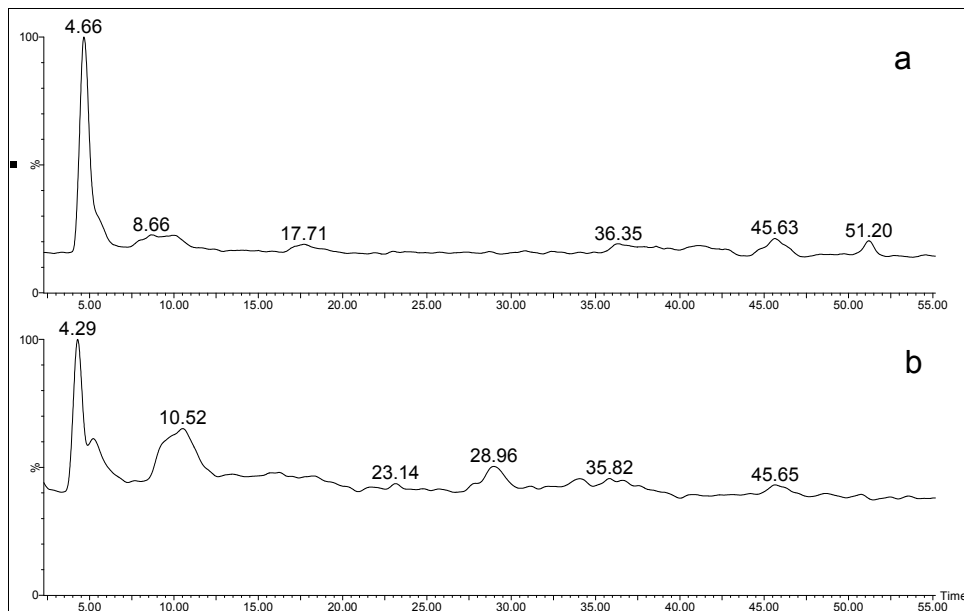


Figura 4.44. Experimento SRM para penicilina G (a) Extrato SP1 (b) Extrato PB3.

4.7. Resultados dos ensaios antimicrobianos

O estudo dos metabólitos produzidos por microrganismos pode ser de grande interesse, não só para fins acadêmicos como também para as indústrias farmacêuticas pela possibilidade de se obter novos compostos que possam ser empregados na cura de doenças. Por esta razão os extratos obtidos dos cultivos dos fungos endofíticos em estudo e do *Streptomyces clavuligerus* foram testados para verificar a atividade antibacteriana frente às bactérias *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

TABELA 4.3 Resultados do ensaio antibacteriano. Valores da medida do halo de inibição.

Extrato	Bactéria/halo de inibição (mm)		
	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
PB1	14.0	16.0	14.0
PB2	15.0	15.0	15.0
PB4	11.0	13.0	9.0
SP1	N	N	13.0
BCCII	N	N	16.0
MIV	N	N	14.0

N: Nenhum efeito observado.

As amostras não discriminadas na tabela 4.3 apresentaram uma baixa atividade ou foram inativas. Todos os resultados descritos acima foram acompanhados de experimentos de controles do solvente, da amostra e do antibiótico padrão, evitando por tanto a possibilidade de resultados falso-positivo ou falso-negativos.

Nos resultados é possível observar que exceto o extrato PB3 todos os outros extratos obtidos do *Penicillium brasilianum* inibem o crescimento das bactérias testadas, No entanto dos demais extratos analisados somente os extratos SP1, BCCII e MIV foram ativos contra *E. coli*. A atividade antibacteriana observada nas espécies de *Penicillium* foi anteriormente reportada e se deve provavelmente à presença de compostos da classe dos policetídeos, meroterpenos e alcalóides. Já, a inibição causada pelos extratos de *S. clavuligerus* sugere a presença de compostos da classe das cefalosporinas e penicilinas como é amplamente descrito na literatura. Estes resultados foram tomados como indícios da possível presença de antibióticos β -lactâmicos para a execução dos experimentos desenvolvidos neste projeto. Contudo a ausência de atividade antibacteriana não pressupõe a inexistência de compostos antibacterianos nos extratos, sendo possível a presença destes em misturas complexas ou pelo sinergismo dos mesmos.

5. CONCLUSÕES

O estudo das condições de cultivo para *Streptomyces clavuligerus* forneceu várias informações importantes, a primeira delas é que a velocidade de aeração não só limita a produção de metabólitos como é amplamente descrito na literatura, como também limita o crescimento do microrganismo. Em segundo lugar, foi determinado que a utilização do tampão MOPS é de fundamental importância nos cultivos em incubador rotativo, permitindo o controle do pH em torno da neutralidade e evitando a degradação dos metabólitos. E finalmente, a baixa concentração celular do inóculo influencia na formação de aglomerados celulares denominados “Pellets”.

O ácido antranílico e a 7-hidroxi -2-metilcromona foram isoladas dos extratos obtidos dos cultivos de *S. clavuligerus*; estas substâncias nunca antes foram reportadas como metabólitos deste microrganismo. Dos extratos dos fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Aspergillus aculeatus* foi identificado o sorbitol, substância previamente isolada em vários estudos realizados com fungos.

O trabalho com cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas através da ionização por *electrospray*, mostrou-se como uma técnica rápida e seletiva para análises de compostos β -lactâmicos. A análise inicial dos padrões permitiu propor rotas de fragmentação que serviram como base na procura de compostos β -lactâmicos nos extratos. A utilização de experimentos de íons produtos, íons precursores e SRM (Selected Reaction Monitoring) foram fundamentais na determinação destas substâncias.

O estudo de substâncias β -lactâmicas da classe das penicilinas e cefalosporinas produzidas por *Streptomyces clavuligerus* levou à identificação de cefamicina C e dois compostos precursores da cefamicina C: a penicilina N e a deacetoxicefalosporina C. Através das análises por SRM foi possível determinar que a presença de amido e lisina nos meios de cultivo influenciam a produção de compostos cefâmicos.

Para a detecção do ácido clavulânico nos extratos a técnica SRM mostrou-se como a mais apropriada. Através destes experimentos foi possível determinar a presença

deste composto nos cultivos que continham glicerol como fonte de carbono e triptona ou soytone como fonte de nitrogênio. Além disso, foi possível fazer uma comparação qualitativa da efetividade dos métodos de extração com solventes orgânicos.

Assim mesmo, relatou-se a presença de quatro substâncias não β -lactâmicas, N-propionil holotina, 3-etil – 2,5-bis(2-hidroxietil)pirazina, Ácido 8-hidroxicapecilânico e uridina nos extratos de *S. clavuligerus*. Embora, não se dispõem das substâncias padrões, a confirmação das estruturas poderá ser feita por meio das análises dos padrões em trabalhos futuros.

No extrato AA1 do fungo *Aspergillus aculeatus* foi possível determinar a presença de um composto da classe das penicilinas de massa 251 Da através da utilização de técnica de íons precursoros de m/z 160, o espectro de íons produtos para este íon mostra íons semelhantes com os observados no espectro da penicilina G. Além disso neste extrato foi determinada a timina.

Do extrato PG3 do *Penicillium griseoroseum* e do extrato SP1 do *Penicillium sp* foi identificado o ácido 6-aminopenicilânico através do uso da ferramenta de íons selecionados; e do extrato PB1 do *Penicillium brasilianum* foi identificado a adenosina. Estas substâncias não tiveram suas estruturas confirmadas, uma vez que não foi possível obter o padrão para comparação.

Os resultados obtidos a partir dos testes antimicrobianos sugerem a presença de compostos β -lactâmicos nos extratos de *Streptomyces clavuligerus* o qual pode ser confirmado através das análises por espectrometria de massas. Já, a atividade observada nos extratos de *Penicillium sp.* e *P. brasilianum* provavelmente esteja relacionada com a presença de substâncias como meroterpenos, policetídeos e alcalóides produzidas por estes microrganismos, uma vez que não foi possível determinar a presença de compostos β -lactâmicos nestes extratos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Nova York: Academic Press, 1988.
- AHARONOWITZ, Y.; COHEN, G.; MARTIN, J. F. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution. **Annual Review Microbiology**, v. 46, p. 461–495, 1992.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley e Sons, 1977.
- ASHRAF-KHORASSANI, M.; et al. Quantitative analysis of amoxicillin, clavulanic acid, and ticarcillin in multi-wells by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry as a strategy for quality control. **Chromatographia**, v. 62, p. 459-463, 2005.
- BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Product Reports**, v.14, n. 4, p. 309-333, 1997.
- BERSANETTI, P. A.; et al. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p.31-36, 2005.
- BRAKHAGE, A. Molecular regulation of β -Lactam biosynthesis in filamentous fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 1-10, 1998.
- BRIZUELA, M. A.; et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. **Revista Iberoamericana de Microbiología**, v. 15, p. 69-74, 1998.
- BROWN, A. G.; et al. Naturally occurring β -lactamase inhibitor with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 6, p. 668-669, 1976.
- BROWN, D.; EVANS, J. R.; FLETTON, R. A. Structures of three novel β lactams isolated from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 282–283, 1979.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties biosynthesis, and fermentation. In: VANDAME, E. **Biotechnology of industrial antibiotics**. New York: Dekker, 1984.
- BUYNAK, J. D. Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 930-940, 2006.
- CAMPOS, F. R. **Metabolismo secundário de *Aspergillus aculeatus* e *Microbispora* sp. isolados como microrganismos endofíticos de *Melia azedarach* L. (*Meliaceae*)**. 2005. 284 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- CHAMPNESS, W. C. **Prokaryotic development**. Washington: Asm Press, 2000.

- CHARNAS, R. L.; KNOWLES, J. R. Inactivation of RTEM β -lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid and 9-deoxyclavulanic acid. **Biochemistry**, v. 20, n. 11, p. 3214- 3219, 1981.
- CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 14555-14561, 2003.
- CHENG, K-C.; et al. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 6, p. 455-458, 2002.
- COLEMAN, K.; et al. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, n. 6, p. 1091-1116, 1994.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: a textbook of industrial microbiology**. Sunderland: Sinaver Associates, 1990.
- DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259-264, 1998.
- DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The β -lactam antibiotics: past, present and future. **Antonie Van Leeuwenhock**, v. 75, p. 5-19, 1999.
- DREYFUUS, M. M.; CHAPELA, I. H. **The discovery of natural products with therapeutic potential**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994.
- ELSON, S. W.; et al. N-Acyl derivatives of clavaminic acid produced by a mutant of *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 14, p. 979-980, 1988.
- ESSACK, S. Y. The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases, **Pharmaceutical Research**. v. 18, n. 10, p. 109-127, 2001.
- FANG, A.; DEMAIN, A. L. Dependence of nitrogen and phosphorus regulation of β -lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* on aeration level. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 407-410, 1998.
- FONSECA, A. L. **Antibióticos na clínica diária**. Rio de Janeiro: Epume, 1984.
- GHOSH, A. C.; BORAH, M. M.; DUTTA, N. N. Development in liquid membrane separation of β -lactam antibiotics. **Bioseparation**, v. 6, p. 91-105, 1996.
- HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity, its magnitude, and significance. **Mycological Research**, v. 95, n. 5, p. 641-685, 1991.
- HIGGINS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. Nov., a β -lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 21, p. 326-331, 1971.

- KENIG, M.; READING, C. Holomycin and an antibiotic (MM 19290) related to tunicamycin, metabolites of *Streptomyces clavuligerus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 32, n. 6, p. 549-554, 1979.
- KIESER, T.; et al. Practical *Streptomyces* genetics. Reino Unido: John Innes Centre, 2000.
- KIM, I-C.; et al. Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized *Streptomyces clavuligerus* mutant., **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 869-872, 2001.
- LEBRIHI, A.; LEFEBVRE, G.; GERMAIN, P. Carbon catabolite regulation of cephamycin C expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p 44-51, 1988.
- LEE, P. C.; HO, C. C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12 p. 73-75, 1996.
- LEREAU, J. Y.; BOUIX, M. **Microbiologia industrial**: los microorganismos de interes industrial. Zaragoza: Acribia S. A., 2000.
- LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 109-124, 1999.
- LIRAS, P.; MARTIN, J. F. **Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus***: methods in biotechnology. Totowa: Human Press. 2005.
- LIRAS, P.; MARTÍN, J. Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression. **International Microbiology**, v. 9, p. 9-19, 2006.
- LOCCI, R. ***Streptomyces* and related genera**: manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Bergey's. 1989.
- LLOYD, A. B. Dispersal of *Streptomyces* in air. **Journal of General Microbiology**, v. 57, p. 35-40, 1969.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 1997.
- MARTIN, J. F.; DEMAINE A. L. Control of antibiotics biosynthesis. **Microbiology**, v. 44, p. 230-251, 1980.
- MARTIN, J. F. New aspects of gene and enzymes for β -lactam antibiotic biosynthesis. **Applied Microbiology Biotechnol**, v. 50, p. 1-15, 1998.
- MAYER, A. F.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. D. Purification of clavulanic acid by ion-pairing systems. **Bioseparations**, v. 6, p. 25-39, 1996.

MCLAFFERTY, F. W.; TURECEK, F. **Interpretation of mass spectra**. California: University Science Books, 1993.

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications e regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Reino Unido: Pergamon Press, 1985.

MURGO, M. **Estudo de metodologias analíticas para quassinóides: espectrometria de massas e cromatografia**. 1998. 131 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

NAGARAJAN, R.; et al. β -lactam antibiotics from *Streptomyces*. **Journal of American Chemical Society**. v. 93, p. 2308-2310, 1971.

NAGELE, E.; MORITZ, R. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSⁿ and accurate mass determination by ESI-TOF. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 1670-1676, 2005

OKAMURA, K.; et al. Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. **The Journal Antibiotics**, v. 30, p. 334-336, 1977.

OMURA, S.; et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 12215-12220, 2001.

OSBORNE, A. G.; GOOLAMALI, Z. ¹H and ¹³C NMR spectral studies of some 4H-3,1-benzoxazin-4-ones and their 2-acylaminobenzoic acid precursors. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 56, p. 1079-1100, 2000.

PELAÉZ, F. The historical derivery of antibiotics from microbial natural products, can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 981-990, 2006.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1996.

PEREIRA, G. K. **Identificação de substâncias micromoleculares de fungos endofíticos isolados de *Cedrela fissilis* e *Melia azederach***. 2000. 201 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

PHAFF, H. J. Industrial microorganisms. **Scientific American**, v. 245, n. 3, p. 77-89, 1981.

PITARCH, J.; et al. Neutral and alkaline hydrolysis of model β -lactam antibiotics: an initio study of water catalysis. **Journal of American Chemical Society**, v. 120, n. 9, p. 2146-2155, 1998.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Taloromyces***. New York: Academic Press, 1979.

REYNS, T.; et al. Quantitative analysis of clavulanic acid in porcine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 282-289, 2007.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces Clavuligerus*. **Journal Applied Microbiology Biotechnology**, v. 20, p. 318-325, 1984.

ROSA, J. C. **Influência das condições de transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2002. 97 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

SÁNCHEZ, L.; BRANA, A. F. Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. **Microbiology**, v. 142, n. 5, p. 1209-1220, 1996.

SANTOS, R. M. G. **Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium sp* e *Fusarium moniliforme* isolados como endofíticos de *Melia azedarach***. 2003. 432 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

SEIFAR, R. M.; et al. Quantitative analysis of metabolites in complex biological samples using ion-pair reversed-phase liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 103-110, 2008.

SCHAUBER, C.; et al. Modulation of lipid metabolism and spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* unstable mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2730-2737, 1999.

SIUZDAK, G. **Mass spectrometry for biotechnology**. San Diego: Academic Press, 1996.

SPERANDEI, S. C. **Avaliação de condições para a imobilização de células de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 para a produção de ácido clavulânico em biorreator tipo torre**. 2003. 158 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

STANIER, R.; DOUDOROFF, M.; ADELBELG, E. **Mundo dos micróbios**. São Paulo: Edgard Blucher, 1969.

STRAUB, R. F.; VOYKSNER R. D. Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephalixin by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 647, p. 167-181, 1993.

STREGE, M. A. High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **Journal of Chromatography B**, v. 725, p. 67-78, 1999.

TANAKA, Y.; OMURA, S. Agroactive compounds of microbial origin. **Annual Reviews Microbiology**, v. 47, p. 57–87, 1993.

TEIXEIRA, M. F. S.; FERNANDES, M. J. S.; LUNA, E. A. Taxonomia de *Aspergillus*. **Revista da universidade do Amazonas. Série: Ciências da Saúde**, v. 13, n. 46, p. 252, 1994.

THOMSON, B. A. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography/mass spectrometry together at last. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v. 9, p. 187-193, 1998.

TROVATTI, E. **Desenvolvimento de meio de cultivo semi – sintético para processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064**. 2001. 108 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

WALSH, C. **Antibiotics: Actions, origins, resistance**. Washington: ASM PRESS, 2003.

YEGNESWARAN, P. K.; GRAY, M. R.; WESTLAKE, D. W. S. Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 7, p. 479-484, 1988.

YU, D.; et al. Anti-AIDS agents 60. Substituted 3'R,4'R - Di-O- (-) – camphanoyl - 2',2'- dimethyldihydropyrano [2,3-f] chromone (DCP) analogues as potent anti-HIV agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 4072-4082, 2004.

ZHANG, J.; DEMAIN, A. L. Regulation of ACN synthetase activity in the beta-lactam biosynthetic pathway by carbon source and their metabolites. **Archives of Microbiology**, v.158, p. 364, 1992.