

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

**“IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DO FUNGO *Mucor circinelloides*
ISOLADO DO TRONCO DE *Pinus taeda*, COM ÊNFASE EM
BIOTRANSFORMAÇÃO DA CARVONA”**

Gabriel Franco dos Santos*

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

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
Março de 2012**

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

S237ie

Santos, Gabriel Franco dos.
Identificação e estudo do fungo *Mucor circinelloides*
isolado do tronco de *Pinus taeda*, com ênfase em
biotransformação da carvona / Gabriel Franco dos Santos. --
São Carlos : UFSCar, 2012.
80 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Química orgânica. 2. *Mucor circinelloides*. 3.
Biotransformação. 4. Carvona. I. Título.

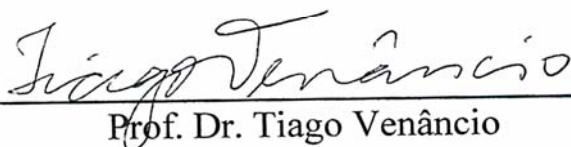
CDD: 547 (20^a)

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

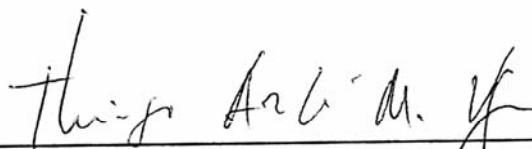
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do candidato Gabriel Franco dos Santos, realizada em 28 de março de 2012:



Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho



Prof. Dr. Tiago Venâncio



Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga

*“Os pensamentos são livres!
Quem pode adivinhá-los?
Eles passam voando
Como sombras da noite.
Ninguém pode sabê-los,
Ninguém pode atingi-los,
Não há como mudar:
Os pensamentos são livres!”*

*Eu penso o que eu quero,
E tudo o que me agrada,
Mas tudo em silêncio
Sem chamar a atenção.
Meu desejo e meu anseio
Ninguém pode impedir.
Não há como mudar:
Os pensamentos são livres!*

*E se eu for aprisionado
No mais sinistro calabouço,
Tudo isto será obra
Inútil e também vã;
Pois os meus pensamentos
Partem os grilhões
E os muros em dois:
Os pensamentos são livres!*

*Por isto para sempre
Deixarei de lado preocupações
Deixarei de lado para sempre
Os meus temores
Pois no coração sempre
Será possível rir e ser alegre
E ao mesmo tempo pensar:
Os pensamentos são livres.”*

(Karl Marx)

*“Até que um dia o mais frágil deles entra sozinho em nossa casa, rouba-nos a lua e,
conhecendo o nosso medo, arranca-nos a voz da garganta.
E porque não dissemos nada, já não podemos dizer nada.”*

(Vladimir Maiakóvski)

AGRADECIMENTOS

Ao Buda, Allah, Brahma, Oxalá, Rá e Tupã;

Aos meus pais;

Ao Profº Dr. Edson Rodrigues Filho, pela orientação;

Ao Profº Dr. Tiago Venâncio e Profº Dr. Thiago Andre de Moura Veiga pela disponibilidade para participar da banca;

A todos os profissionais que contribuíram com meu trabalho, principalmente o Profº Dr. André Rodrigues, Profº Dr. Flávio Henrique da Silva, Profº Dr. Emerson de Camargo, Profº Dra. Angélica Dias, Dr. Leonardo Toffano e Evandro Pietro, que contribuíram com a identificação do micro-organismo.

Por fim, agradeço a **TODOS** que contribuíram e contribuem para minha formação, tanto pessoal como profissional, desde conversas de corredor até experimentos em laboratório.

ABREVIATURAS

RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	-	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio - 1
RMN ¹³ C	-	Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
1D	-	Experimento de RMN de uma dimensão
2D	-	Experimento de RMN de duas dimensão
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
UV-VIS	-	Detector nos comprimentos de onda Ultravioleta/visível
MEV	-	Microscopia Eletrônica de Varredura
ESEM	-	Environmental Scanning Electron Microscope
ITS	-	Internal Transcribed Spacer
DNA	-	Deoxyribonucleic acid
PCR	-	Polimerase Chain Reaction
SDS	-	Sulfato Dodecil de Sódio
MS	-	<i>Mass Spectrometry</i>
LC-MS	-	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
GC-MS	-	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
ESI	-	Ionização por electrospray
EI	-	Ionização por impacto de elétrons em modo positivo
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
<i>t_R</i>	-	Tempo de retenção
EIC	-	Extracted Ion Chromatogram
CCD	-	Cromatografia de camada delgada
ODS	-	Octadecilsilano (C-18)
SPE	-	Extração em fase sólida
BDA	-	Batata, dextrose e ágar
ACN	-	Acetonitrila
MeOH	-	Metanol

min	-	Minutos
g	-	Gramas
cm	-	Centímetro
mm	-	milímetro
mg	-	miligrama
µm	-	micrômetro
L	-	Litro
mL	-	mililitro
µL	-	microlitro
°C	-	Graus centígrados
rpm	-	Rotações por minuto
h	-	Altura
Φ	-	Diametro
δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão
d	-	dubleto
dd	-	duplo dubleto
t	-	tripleto
dt	-	duplo tripleto
s	-	singleto
ODS	-	Octadecilsilano
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
[M+H] ⁺	-	Molécula protonada
[M+Na] ⁺	-	Aduto ou cluster de sódio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Representação de algumas variedades de fungos.-----	2
FIGURA 1.2 – Alguns produtos naturais isolados de micro-organismos e são comercializados como fármacos.-----	3
FIGURA 1.3 - Biotransformação da DHEA utilizando micro-organismos.-----	7
FIGURA 1.4 - Desmetilação seletiva da cafeína formando a teofilina-----	8
FIGURA 1.5 – Exemplos de tipos de terpenos encontrados na natureza. -----	10
FIGURA 1.6 – Caminho de biotransformação da curdiona por <i>Mucor spinosus</i> . (1) Curdiona; (2) 1 β ,10 α -Epoxycurdione; (3) 1 α ,10 β – Epoxycurdione; (4) 2 β – hydroxycurdione; (5) 11-Hydroxycurdione; (6) 2 β ,11-Dihydroxycurdione.-----	11
FIGURA 1.7 - Modelo ilustrativo de um <i>Mucor sp.</i> . (1) Hifas cenocíticas; (2) Esporângio; (3) Esporangióforo; (4) Columela; (5) Esporangiosporos.-----	14
FIGURA 3.1 - <i>Pinus taeda</i> .-----	23
FIGURA 3.2 - <i>M. circinelloides</i> em meio de cultura BDA.-----	23
FIGURA 3.3 - MEV da FEI Quanta 250 operando em ESEM.-----	24
FIGURA 3.4 - Esquema ilustrativo do preparo de amostra para a análise de MEV: (a) Colóide de nanopartículas de ouro; (b) Amostra de 1cm ² de fungo imerso em 50 mL de colóide de ouro; (c) Hifas dos fungos depositadas sobre substrato de silício.-----	26
FIGURA 4.1 - Isolado cultivado em meio sólido BDA.-----	38
FIGURA 4.2 - Hifas cenocíticas, esporangióforos curtos e columelas de <i>Mucor circinelloides</i> (400X).-----	39
FIGURA 4.3 - Esporangiósporos livres (400X).-----	39
FIGURA 4.4 - Esporângio visualizado em corante de lactofenol (400X).-----	39
FIGURA 4.5 - MEV ESEM de <i>Mucor circinelloides</i> . (a) Columela em meio as hifas; (b) Aplanósporos (esporos) em meio a hifas; (c) Columela ampliada com alguns esporos ainda presos.-----	40
FIGURA 4.6 - Imagens em MEV com recobrimento por nanopartículas de ouro. a) columelas em meio a hifas. b) esporo ainda preso a columela.-----	42
FIGURA 4.7 – Imagem em gel de agarose do DNA de <i>Mucor circinelloides</i> .-----	43

FIGURA 4.8 - Árvore filogenética baseada em um fragmento de 575 pares de base a região ITS de espécies de <i>Mucor</i> . A árvore foi inferida pelo algoritmo de neighbor-joining. Os nomes das espécies de <i>Mucor</i> estão seguidos pelo numero de acesso do voucher em coleção de cultura e o numero de acesso da sequência no GenBank (em parênteses).-----	44
FIGURA 4.9 – Espectros comparativos do fungo analisado com a biblioteca do equipamento. -----	46
FIGURA 4.10 – Ampliação de uma parte dos espectros da identificação do fungo. ----	46
FIGURA 4.11 – Ranking de probabilidade de identificação para o fungo analisado.----	47
FIGURA 4.12 – Espectro de RMN de ¹ H para a substância C_19 com ampliação da região de hidrogênios metílicos (400 MHz, CDCl ₃).-----	48
FIGURA 4.13 – Espectro de ¹ H do ergosterol (400 MHz, CDCl ₃). -----	48
FIGURA 4.14 – Estruturas do (a) ergosterol e (b) 3-epiergosterol. -----	49
FIGURA 4.15 – Espectro de RMN de ¹ H para C3-36 (400 MHz, CDCl ₃). -----	50
FIGURA 4.16 – Ampliações do RMN de ¹ H para: (a) Região entre δ 0,60 e 1,80 ppm; (b) Dubleto em δ 7,63 ppm (400 MHz, CDCl ₃). -----	50
FIGURA 4.17 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H para a região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos e olefínicos (400 MHz, CDCl ₃). -----	51
FIGURA 4.18 - Modelo estrutural de um cerebrosídeo -----	51
FIGURA 4.19 – Espectros de íons produtos de <i>m/z</i> 699, <i>m/z</i> 727, <i>m/z</i> 743 e <i>m/z</i> 815 .52	
FIGURA 4.20 – Proposta de fragmentação para cerebrosídeos.-----	53
FIGURA 4.21 – Espectro de RMN de ¹ H do C4-13 (400 MHz, Piridina-d ₅).-----	54
FIGURA 4.22 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H para a região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos(400 MHz, Piridina-d ₅). -----	55
FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ¹³ C para C4-13(400 MHz, Piridina-d ₅).-----	55
FIGURA 4.24 – Estrutura de 3-glucopiranosil sitosterol -----	57
FIGURA 4.25 – (4R)-carvona e (4S)-carvona. -----	58
FIGURA 4.26 – (a) Cominho (<i>Carum carvi</i>); (b) Hortelã (<i>Mentha spicata</i>). -----	58
FIGURA 4.27 - Espectro de RMN ¹ H para a substância carvR_61 (400 MHz, CD ₃ OD).59	
FIGURA 4.28 - Espectro de RMN ¹³ C para a substância carvR_61 (400 MHz, CD ₃ OD). -----	60
FIGURA 4.29 - Experimento de RMN dept-135 para carvR_61 (400 MHz, CD ₃ OD). ---	60

FIGURA 4.30 – CarvR_61 identificado com mentanotriol. -----	61
FIGURA 4.31 - Espectro de RMN ¹ H para a substância carvR_51_9 (400 MHz, CD ₃ OD). -----	61
FIGURA 4.32 - Espectro de RMN ¹³ C para a substância carvR_51_9 (400 MHz, CD ₃ OD).-----	62
FIGURA 4.33 - Estrutura molecular de (a) carvR_61 e (b) carvR_51_9-----	63
FIGURA 4.34 – CCD dos extratos de biotransformação da carvona. (1) Meio + carvona S; (2) Meio + fungo + carvona S; (3) Meio + fungo; (4) Meio + fungo + carvona R; (5) Meio + carvona R. -----	63
FIGURA 4.35 – Cromatograma de GC-MS para o extrato em acetato de etila da biotransformação da (4R)-carvona. -----	64
FIGURA 4.36 – Cromatograma de GC-MS para o extrato em acetato de etila da biotransformação da (4S)-carvona. -----	64
FIGURA 4.37 – Proposta de caminho de biotransformação para a (4R)- e (4S)-carvona. -----	65
FIGURA 4.38 – Estimativa de consumo para (4R)-carvona e produção do (4R)-dihydrocarveol. -----	67
FIGURA 4.39 – Estimativa de consumo para (4S)-carvona e produção para (4S)-dihydrocarvona, (4S)-dihydrocarveol e (4S)-neodihydrocarveol. -----	68
FIGURA 4.40 – Estimativa de produção para os dois isômeros de mentanotrióis isolados -----	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica para o gênero <i>Mucor</i> -----	13
TABELA 3.1 – Componentes da PCR e suas respectivas concentrações -----	27
TABELA 3.2 – Componentes do sequenciamento e suas respectivas concentrações -----	28
TABELA 3.3 – Sistema de eluição para coluna cromatográfica -----	32
TABELA 3.4 – Sistema de eluição para coluna cromatográfica -----	32
TABELA 3.5 – Sistema de eluição para coluna cromatográfica -----	33
TABELA 4.1 – Deslocamento de ¹³ C para o 3-glucopiranosil sitosterol (δ em ppm) ----	56

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 3.1 – Isolamento de micro-organismos endofíticos.	22
ESQUEMA 3.2 - Sínteses de nanopartículas de ouro.	25
ESQUEMA 3.3 - Metodologia de extração e partição líquido-líquido.	31

RESUMO

Identificação e estudo do fungo *Mucor circinelloides* isolado do tronco de *Pinus taeda*, com ênfase em biotransformação da carvona. Fungos associados a plantas têm sido intensamente estudados buscando a descoberta de novas substâncias e o entendimento das interações ecológicas entre plantas e microorganismos. Este trabalho visou à identificação de um fungo associado ao tronco do *Pinus taeda* utilizando para isso a identificação morfológica com imagens de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), identificação por sequenciamento genético da região 18S ribossomal, e identificação por perfil proteômico usando MALDI-TOF. O fungo foi identificado como *Mucor circinelloides* e seu metabolismo foi estudado, sendo identificadas uma mistura de ergosterol e 3-epiergosterol, mistura de glucosilceramidas, e o 3-glucopiranosil sitosterol. A ênfase do trabalho foi a biotransformação da carvona, que é um dos principais monoterpenos encontrados na natureza e um dos mais comercializados. Com o experimento de biotransformação foi possível isolar dois produtos trihidroxilados como também identificar alguns outros como dihidrocarvona, dihidrocarveol e neo-dihidrocarveol por GC-MS. A partir dos produtos identificados foi proposto um caminho de biotransformação como também uma estimativa de produção para alguns produtos e estimativa de consumo da (4R)- e (4S)-carvona, que é consumida em menos de 4 horas de experimento, mostrando um metabolismo muito acelerado conforme é relatado em diversos gêneros de *Mucor*.

ABSTRACT

Identification and study of the fungus *Mucor circinelloides* isolated from the trunk of *Pinus taeda*, with emphasis on the carvone biotransformation. Fungi associated with plants have been studied rippling seeking the discovery of new substances and the understanding of the ecological interactions between plants and microorganisms. This study aimed to identify a fungus associated with the trunk of *Pinus taeda* using morphological analysis with images obtained by optical microscopy and scanning electron microscopy (SEM), genetic sequencing of the 18S ribosomal region, and proteome analysis by MALDI-TOF. The fungus was identified as *Mucor circinelloides* and its metabolism was studied. A mixture of 3-epi ergosterol and ergosterol, glucosylceramidas mixture, and 3-glucopyranosyl-sitosterol were identified. The emphasis of this work was on the biotransformation of carvone, which is one of the main monoterpenes found in nature and one of the most commercialized. From the biotransformation experiment it was possible to isolate two trihydroxylated products and also dihydrocarvona, dihydrocarveol and neo-dihydrocarveol identified by GC-MS. The biotransformation products were identified by GC-MS and were proposed a pathway biotransformation. After that was performed also an estimative of production for some products and consumption estimated of (4R) - and (4S)-carvone, which is consumed in less than four hours of the experiment, showing a very rapid metabolism as reported in several genera of *Mucor*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Micro-organismos endofíticos e suas associações	2
1.2. Aspectos gerais de biotransformação	5
1.3. Terpenos	9
1.4. O gênero <i>Mucor</i>	12
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos gerais	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS	19
3.1. Reagentes e materiais cromatográficos	19
3.2. Equipamentos	20
3.3. Metodologia	22
3.3.1. Isolamento e cultivo do microorganismo	22
3.3.2. Identificação morfológica	23
3.3.3. Identificação por sequenciamento genético	26
3.3.3.1. Extração de DNA	26
3.3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase da Região ITS-1 do rDNA	27
3.3.3.3. Reação de sequenciamento	27
3.3.4. Identificação por MALDI-TOF	28
3.3.4.1. Preparo da amostra de fungo	28
3.3.4.2. Extração dos peptídeos	29
3.3.5. Análise de metabólitos produzidos por <i>Mucor circinelloides</i> cultivado em meio sólido de arroz	29
3.3.5.1. Cultivo do fungo em meio sólido de arroz	29
3.3.5.2. Partição líquido-líquido do extrato fúngico	30
3.3.5.3. Isolamento de metabólitos produzidos por <i>Mucor circinelloides</i>	31
3.3.5.3.1. Substância C_19	31

3.3.5.3.2. Substância C3_36	32
3.3.5.3.3. Substância C4_13	33
3.3.6. Biotransformação com <i>Mucor circinelloides</i>	34
3.3.6.1. Biotransformação da (4R)- e (4S)-carvona	34
3.3.6.1.1. Experimento em 12 dias	34
3.3.6.1.2. Estimativa de consumo da carvona e estimativa de produção para alguns produtos identificados	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1. Identificação de <i>Mucor circinelloides</i>	38
4.1.1. Identificação morfológica	38
4.1.2. Sequenciamento genético da região 18S ribossomal	42
4.1.3. Identificação por MALDI-TOF	44
4.2. Substâncias isoladas	47
4.2.1. Ergosterol e 3-Epiergosterol	47
4.2.2. Cerebrosidas	49
4.2.3. Sitosterol glicosilado	54
4.3. Biotransformações	57
4.3.1. Biotransformação da (4R)-carvona e (4S)-carvona	57
4.3.1.1. Determinação estrutural de mentanotrióis CarvR_61 e CarvR_51_9 isolados	59
4.3.1.2. Proposta de caminho de biotransformação para a (4R)- e (4S)-carvona	63
4.3.1.3. Estimativa de consumo da (4R)- e (4S)-carvona e de produção de outros produtos por GC-MS	66
4.3.1.4. Estimativa de produção de mentanotrióis	68
5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Micro-organismos endofíticos e suas associações

Tem se observado um grande interesse na área de microbiologia, principalmente na utilização dos fungos com potencial de uso na biotecnologia. Isso se deve principalmente ao rápido crescimento microbiano e a diversidade de seu metabolismo (TRABULSI, 1996; CHOMCHEON, 2009). O reino fungi é um dos mais numerosos, com cerca de 1 milhão e quinhentas mil espécies espalhadas pelo mundo apresentando uma grande variedade de formas, comportamentos e ciclos de vidas (FIGURA 1.1), sendo que apenas 5% dessas já foram catalogadas. Muitas dessas espécies são de grande importância natural e comercial, e dentre esses podemos destacar os utilizados na fabricação de alimentos, bebidas, fármacos e cosméticos. Com pesquisas na descoberta de novas espécies espera-se o surgimento de novas substâncias e novas propriedades com potencial e valor biotecnológico (HUTCHINSON, 1998; PELÁEZ, 2006).



FIGURA 1.1 - Representação de algumas variedades de fungos.

Durante milhares de anos a medicina popular utilizou carne, queijo e pão mofado para curar as feridas, contudo somente em 1928, 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 até mesmo bactericida para muitas bactérias patogênicas comuns. A substância, devido a sua origem, foi denominada penicilina e foi o primeiro antibiótico comercial (FONSECA, 1984).

Os micro-organismos constituem uma fonte extremamente rica para produção de diversos fármacos comerciais, incluindo: antibióticos (β -lactâmicos e tetraciclina), antitumorais (taxol), analgésicos (cefalosporina), redutores de colesterol (lovastatina), imunossupressores (ciclosporina A), anticancerígenos (bestatina), antifúngicos (validamicina) e vários outros (FIGURA 1.2) (PEARCE, 1997; HARVEY, 2008; GANESAN, 2008).

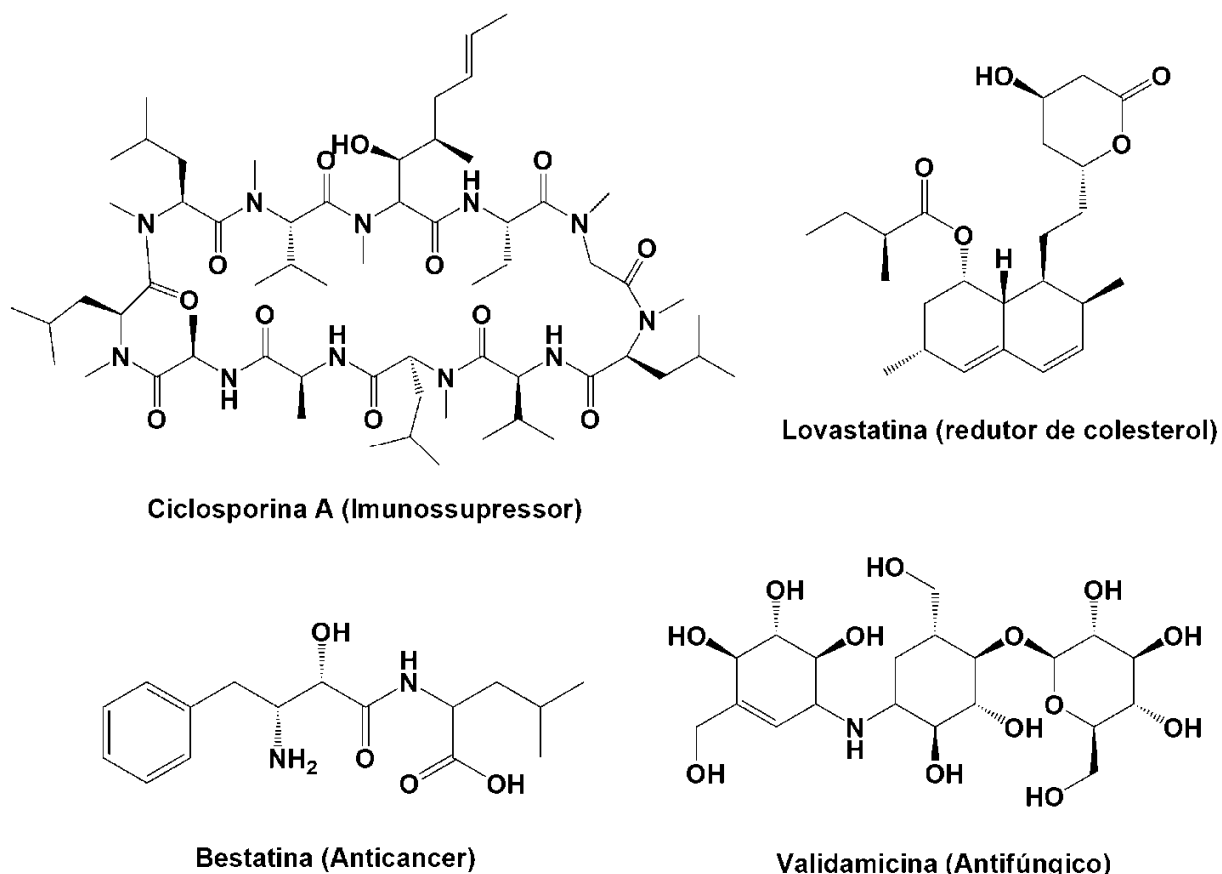


FIGURA 1.2 – Alguns produtos naturais isolados de micro-organismos e são comercializados como fármacos.

Devido à grande versatilidade da biossíntese microbiana, encontram-se várias moléculas isoladas de micro-organismos com as mais diversas atividades biológicas associadas, fazendo com que produtos naturais advindos de fungos e bactérias sejam diversos, podendo apresentar um amplo espectro de utilização. Para exemplificar essa relevância, apenas no ano de 1996, o mercado voltado aos compostos antimicrobianos movimentou cerca de 23 bilhões de dólares (DEMAIN, 1999; DEMAIN, 1998; HARVEY, 2008). De modo que cada dia aumenta-se o número de pesquisas relacionadas a fungos e bactérias, enfatizando à descoberta de novas substâncias produzidas pelos micro-organismos, ou o estudo das relações ecológicas e associações entre micro-organismos e hospedeiros.

Os micro-organismos podem apresentar diferentes tipos de interações com seus hospedeiros, podendo ser de forma neutra, benéfica ou prejudicial.

As associações neutras se caracterizam pela ausência de competição por nutrientes limitantes no meio entre o hospedeiro e o micro-organismo invasor, não havendo prejuízos para nenhuma das espécies.

Nas associações benéficas, conhecidas também como mutualísticas ou simbióticas, ambos os organismos obtêm vantagens. Exemplo disso são os micro-organismos endofíticos, que foram denominados por Petrini *et al.*, (1991) como “micro-organismos que durante determinado período de suas vidas colonizam seus hospedeiros (plantas) sem causar sintomas visíveis de doenças”, neste exemplo o micro-organismo pode produzir ou induzir a produção de metabólitos de grande importância à planta, os quais são responsáveis, por exemplo, pela diminuição de herbívoras, insetos e outros micro-organismos, trazendo grandes vantagens para o desenvolvimento de ambos (TINTJER, 2006; PETRINI, 1992; DAVITT, 2010). Outros exemplos são as micorrizas que constituem outro tipo de interação simbiótica importante, que são definidas como associação de micro-organismos com raízes das plantas. Esses micro-organismos, principalmente fungos da ordem dos zigomicetos podem penetrar nas células corticais do hospedeiro, formando arbustos ou rolos, ou formar uma camada feltrosa sobre as raízes e uma rede ao redor das células corticais. Desse modo as hifas fúngicas aumentam a superfície de absorção das raízes sendo vantajoso à planta pelo auxílio na obtenção de nutrientes (AGRIOS, 1988; PELCZAR, 1981).

As associações prejudiciais ou patogênicas são representadas por quatro interações: O antagonismo que se baseia na inibição de uma espécie por outra, como o fato de certos micro-organismos produzirem antibióticos. A competição que ocorre quando duas populações são adversamente afetadas em relação à sobrevivência e ao crescimento. O parasitismo, que é uma interação em que um organismo vive sobre ou dentro do outro organismo. A predação é uma associação na qual um organismo alimenta-se e digere outro organismo (PELCZAR, 1997; AGRIOS, 1988).

Essas associações entre micro-organismos e seus hospedeiros proporcionam que os micro-organismos tenham um sistema enzimático muito rico, ou para produção de metabólitos secundários na tentativa de se fortalecer em seu habitat, como exemplo a produção de antibióticos; ou na modificação estrutural de substâncias tóxicas produzidas pela planta, como as fitoalexinas.

Com a idéia de utilizar o metabolismo de um micro-organismo previamente selecionado para realizar modificações em diferentes substratos é que consiste a biotransformação, e para isso são utilizadas principalmente substâncias provenientes de fontes naturais como precursores. Os processos de biotransformação são também uma ferramenta importante para uma melhor compreensão da relação planta-microorganismo. A partir dos compostos produzidos pela planta e fungo, é possível prever os tipos de enzimas envolvidas na reação e assim compreender a relação bioquímica entre as duas espécies.

1.2. Aspectos gerais de biotransformação

São denominadas como biotransformações as reações químicas mediadas por micro-organismos ou por preparações enzimáticas, com o principal objetivo de substituir uma reação química convencional, por uma via biológica de baixo custo, alta especificidade e de fácil execução (ADELIN, 2011). Segundo Turner *et al.* (1998) biotransformação é uma ferramenta da tecnologia quiral, já que enzimas são geralmente estéreo e enantiosseletivas.

Existem duas classes principais de biotransformação: com células inteiras e enzimas:

- Células inteiras: são biotransformações geralmente baratas, mas é necessário experiência em técnicas microbiológicas. O isolamento do produto é complicado pela presença da biomassa e reações colaterais, incluindo o metabolismo do substrato. Além disso, são necessários grandes volumes na reação para biotransformar pequenas quantidades de material.
- Enzimas: devido às enzimas serem mais seletivas, esse tipo de biotransformação exige aparelhos mais simples, e pode ser executada em soluções mais concentradas e na presença de solventes orgânicos.

Alguns biocatalisadores podem realizar reações difíceis de serem obtidas por métodos tradicionais em química orgânica, tornando-os recomendáveis na síntese de compostos enantiomericamente puros. Isto se deve, principalmente, a aspectos de seletividade das reações enzimáticas tais como quimiosseletividade, regioseletividade e enantioseletividade (PATEL, 1997).

As enzimas, em sua maioria, são proteínas formadas a partir de 20 aminoácidos cuja seqüência e arranjo tridimensional determinam a função bioquímica dessas biomoléculas. A ação enzimática de uma proteína está sempre associada a um sítio ativo, área na superfície da enzima na qual o substrato se associa, conferindo a essa proteína uma especificidade catalítica (BASTOS, 2005).

Podemos enumerar algumas vantagens do uso das enzimas nas biotransformações e reações biocatalíticas (FABER, 1997):

- São catalisadores muito eficientes;
- São ambientalmente aceitáveis (degradáveis);
- Trabalham em condições reacionais suaves;
- Possuem uma alta tolerância aos substratos;
- Podem catalisar diferentes reações químicas.

Como desvantagem, temos que enzimas degradam com o tempo e a forma correta de armazenamento é essencial, além de que a reatividade das enzimas é profundamente influenciada pelas condições de reação, de modo que o controle do pH é fundamental para atividade máxima da enzima. Um dos problemas da biotransformação de substratos naturais é que o substrato freqüentemente é apenas

ligeiramente solúvel em água, e a maioria das enzimas tolera baixa concentração de etanol ou isopropanol como co-solvente, sem efeito sensível na reatividade (KELLY, 1998; HIROSE, 2002).

Reações biocatalíticas têm sido uma promessa para uma química mais "verde", sem o uso de solventes orgânicos e com formação de menos subprodutos, o que contribui para um crescente avanço neste ramo (HOLLMANN, 2011).

O uso de biotransformações vem sendo estudado por mais de um século, sendo que o primeiro uso descrito para biotransformação foi em 1858, quando Luis Pasteur conseguiu obter o L-tartarato de amônio a partir de uma mistura racêmica de DL-tartarato de amônio, utilizando para isso o fungo *Penicillium glaucum* (HANSON, 1992).

O progresso no uso de enzimas e células integrais na Química Orgânica Sintética foi relativamente lento até os anos 50, sendo que os estudos com esteróides podem ser referidos como marco histórico nessa área. Em 1937, Mamoli & Vercellone prepararam a testosterona a partir da deidroepiandrosterona DHEA, utilizando microrganismos (FIGURA 1.3). Este trabalho foi de grande importância, pois viabilizou o desenvolvimento da produção dos hormônios sintéticos (STOUDT, 1960).

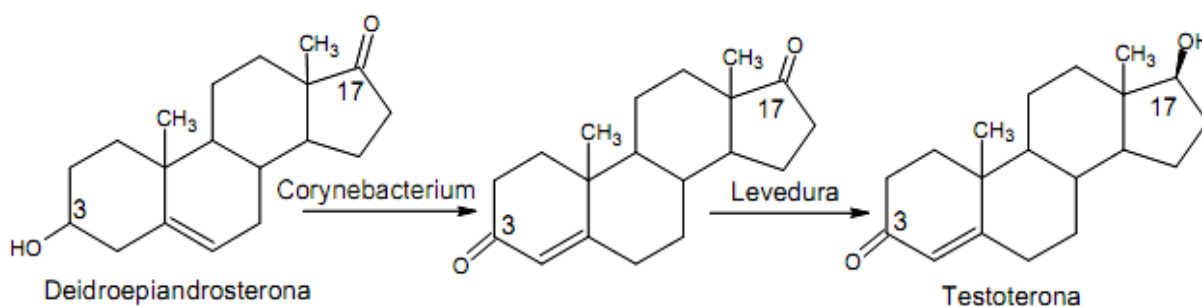


FIGURA 1.3 - Biotransformação da DHEA utilizando micro-organismos.

Atualmente, biotransformações tem se tornado uma ferramenta muito importante no desenvolvimento de novas tecnologias e para a síntese de compostos com alto valor agregado, devido à capacidade que fungos têm de reagir seletivamente em grupos funcionais, que estão quimicamente situados em regiões diferentes da molécula, e realizando reações em regiões que dificilmente ocorreriam por síntese

química convencional, principalmente quando se deseja obter fármacos enantiomericamente puros. (FABER, 1997; ADELIN, 2011).

Outro exemplo de biotransformação relatado recentemente pelo grupo LaBioMMi (Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos) foi a biotransformação da cafeína pelo fungo *Penicillium griseoroseum* isolado de *Coffea arábica*. O fungo foi capaz de biotransformar a cafeína, que é um dos principais metabólitos produzidos pela planta hospedeira, realizando uma desmetilação seletiva e formando assim a teofilina (FIGURA 1.4) (SILVA, 2009).

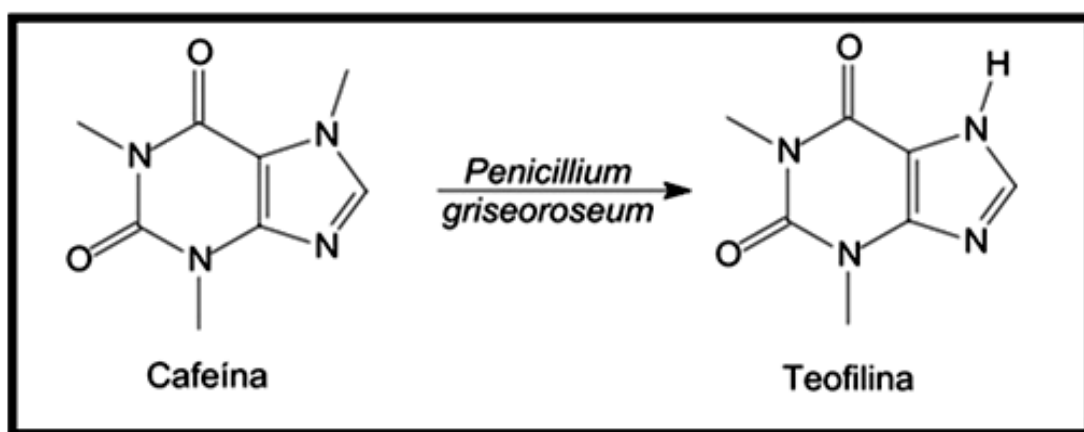


FIGURA 1.4 - Desmetilação seletiva da cafeína formando a teofilina

Partindo deste exemplo, podemos supor que micro-organismos terão maior sucesso em biotransformar constituintes químicos presentes na planta hospedeira, devido ao seu desenvolvimento evolutivo. Com isto em mente, partimos para o fato de que se realmente um fungo ou outro microorganismo presente em plantas sejam capazes de biotransformar os constituintes químicos mais encontrados nestas, talvez substâncias frequentemente encontrada em plantas como os terpenos, com diversas atividades associadas, sejam uma fonte de substratos extremamente diversificados para a produção de novas substâncias.

1.3. Terpenos

Os terpenos compreendem o maior grupo de produtos naturais, com mais de 35.000 substâncias conhecidas e apresentam uma grande diversidade estrutural (DEMYTTENAERE, 2001).

Estes compostos têm como base unidades isoprênicas C_5 . Os terpenos são classificados de acordo com o número dessas unidades presentes no seu esqueleto carbônico, como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), e tetraterpenos (C_{40}) (DEWICK, 2009).

A variação do número de repetições de unidades de isoprenos, as reações de ciclização e rearranjos entre os átomos das moléculas são os responsáveis pela incrível diversidade de estruturas observadas na natureza para estes compostos (

FIGURA 1.5) (ROHMER, 1999).

Para os produtos de origem terpênica observa-se vasta aplicação industrial, onde monoterpenóides e sesquiterpenóides, devido a sua alta qualidade sensorial, figuram como os principais compostos utilizados como flavorizantes na indústria de alimentos, medicamentos e cosméticos. Investigações revelam que compostos como alguns monoterpenos possuem ação na prevenção de doenças degenerativas, além de serem estudados como quimioterápicos contra tumores pancreáticos e de mama (BERGER, 1995).

Óleos essenciais, cujos componentes majoritários são monoterpenos e em menor quantidade sesquiterpenos, são encontrados em grande quantidade na natureza. Os óleos essenciais estão sendo qualificados como antioxidantes naturais e estão sendo reconhecidos como agentes naturais com potencial para a preservação de alimentos, sendo que sua efetividade contra uma grande variedade de microrganismos já foi relatada (BARATTA, 1998; YANISHLIEVA, 1998).

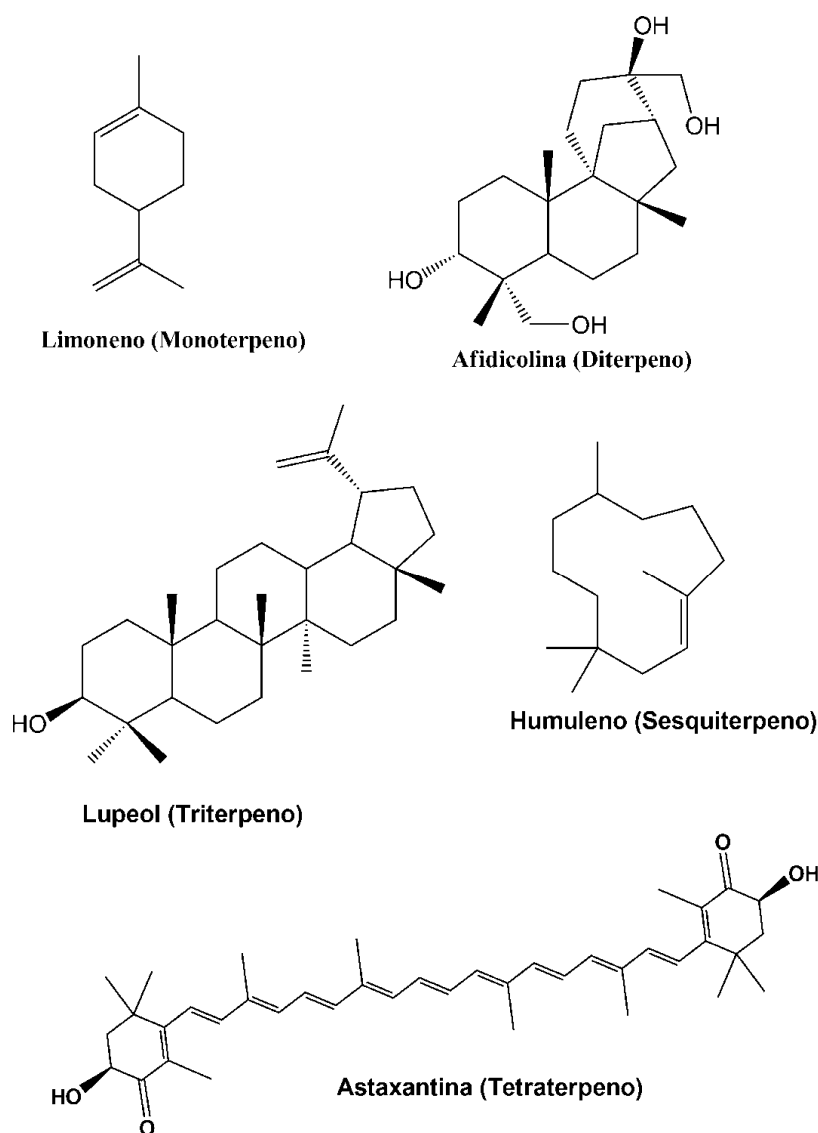


FIGURA 1.5 – Exemplos de tipos de terpenos encontrados na natureza.

A importância descrita para os óleos essenciais estão relacionadas principalmente as suas atividades, sendo que muitas vezes estas atividades estão relacionadas a um conjunto pequeno de substâncias, geralmente o constituinte principal da essência. Isoladamente alguns desses terpenos podem ser usados com maior eficiência e em menor concentração que esses óleos.

Dentre os terpenos encontrados na natureza, podemos destacar os oxigenados como aqueles de maior importância para a indústria, por apresentarem sabores e odores mais atrativos comercialmente (KING, 2003).

O interesse comercial por produtos naturais tem aumentado gradativamente ao passar dos anos, além de que a conotação “natural” tem se mostrado de grande impacto comercial. São consideradas também como substâncias naturais, as substâncias derivadas de reações puramente enzimáticas ou proveniente de processos envolvendo micro-organismos. Devido a isso, as reações envolvendo biocatalisadores naturais têm sido bastante exploradas, principalmente para a produção de novas fragrâncias comerciais a partir de terpenos (GHASEMI, 2009; CARVALHO, 2006).

Um bom exemplo de modificação de terpenos é um relato recente da biotransformação da curdiona, que é um sesquiterpeno com esqueleto do germacreno. Este sesquiterpeno foi isolado de diferentes plantas e mostrou algumas atividades importantes, como hepatoprotetora, sendo assim de interesse para a pesquisa (MA, 2006).

No processo de biotransformação da curdiona por *Mucor spinosus*, foram obtidos cinco substâncias diferentes com epoxidações e hidroxilações (FIGURA 1.6).

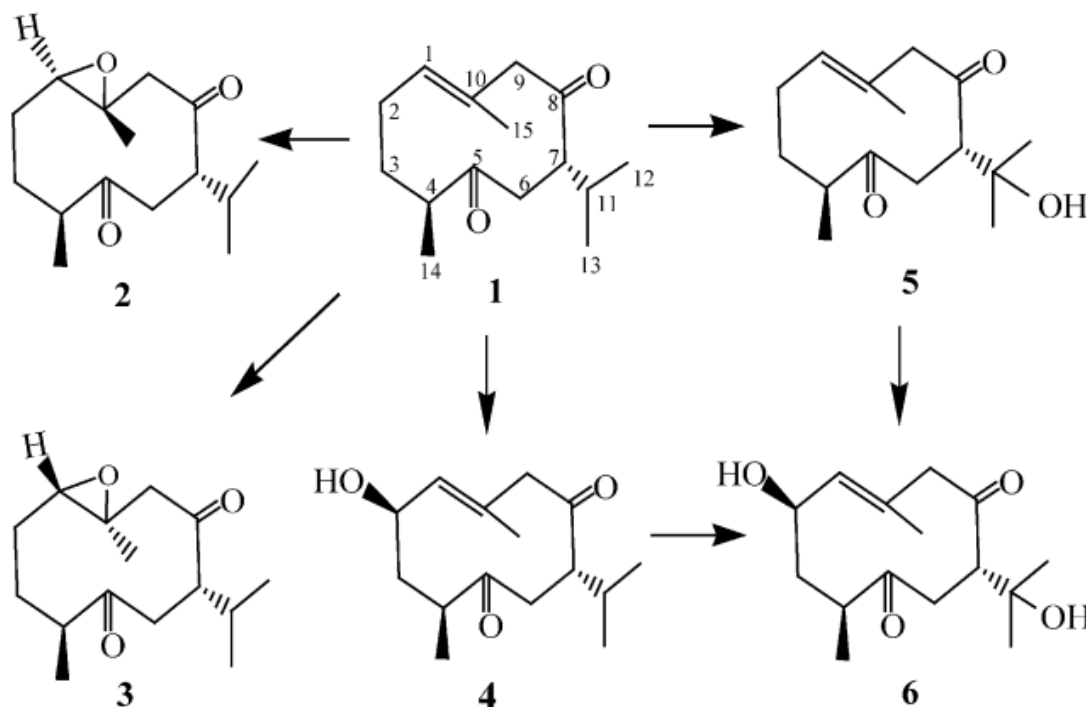


FIGURA 1.6 – Caminho de biotransformação da curdiona por *Mucor spinosus*. (1) Curdiona; (2) 1β,10α-Epoxycurdione; (3) 1α,10β-Epoxycurdione; (4) 2β-Hydroxycurdione; (5) 11-Hydroxycurdione; (6) 2β,11-Dihydroxycurdione.

A partir desse exemplo e de outros encontrados na literatura, destacamos a capacidade de diversos fungos para biotransformar diferentes classes de compostos, sendo os terpenos de extrema importância, por serem encontrados em boas quantidades e com diferentes grupos funcionais. Como mostrado no exemplo também, fungos do gênero *Mucor* são amplamente utilizados para biotransformação por apresentar um sistema enzimático rico e diversificado, além de não apresentar uma matriz “muito complexa”, ou seja, com diversas outras substâncias sendo produzidas.

1.4. O gênero *Mucor*

Os fungos são organismos eucariotos que em geral são filamentosos e ramificados. Os filamentos denominam-se hifas e as paredes celulares são constituídas por quitina. A classificação dos fungos baseia-se nos seguintes critérios:

- Características dos corpos de frutificação presentes durante os estágios sexuais e assexuais dos ciclos de vida.
- Natureza dos ciclos de vida.
- Características morfológicas do micélio ou células.

De acordo com conceitos taxonômicos atuais, baseados principalmente aos estudos morfológicos, a ordem Mucorales está inserida na classe Zygomycetes, do filo ou divisão Zygomycota e do reino Fungi (TABELA 1.1). A maioria dos zigomicetos que possui importância clínica ou industrial pertence à ordem Mucorales, sendo seus principais representantes os gêneros *Rhizopus*, *Absidia* e *Mucor* (RIBES, 2000 e ALEXOPOULOS, 1996).

Mucorales é a maior ordem em número de espécies e em diversidade morfológica da classe Zygomycetes. São fungos que ocorrem frequentemente no solo, ar e detritos vegetais e animais; podem constituir a flora transitória da pele e mucosas do homem e de algumas espécies animais, e alguns deles, também podem ser fitopatogênicos (ALEXOPOULOS, 1996).

TABELA 1.1 - Classificação taxonômica para o gênero *Mucor*

Reino	Fungi
Filo	Zygomycota
Classe	Zygomycetes
Ordem	Mucorales
Família	Mucoraceae
Gênero	<i>Mucor</i>

O gênero *Mucor* foi descoberto em 1821 por Micheli & Saint Amans (SIDRIM, 1999). Membro da família Mucoraceae seus principais representantes são: *M. amphibiorum*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. indicus*, *M. racemosus* e *M. ramosissimus* (RIBES, 2000).

Espécies do gênero *Mucor* têm crescimento muito acelerado, inclusive em temperaturas maiores que 37°C para algumas espécies, apresentando um período de maturação por volta do segundo ao quarto dia de semeadura, em diversos meios de cultura laboratorial. Quanto ao aspecto macromorfológico, possuem colônias com uma textura “algodonosa” alta e exuberante, com tonalidade branca ou amarelada, nos primeiros dias, tornando-se cinza ou castanha, durante o período de maturação dos esporângios. Quanto à micromorfologia, são fungos filamentosos constituídos de hifas cenocíticas de aspecto hialino, largas e irregulares, e com ramificações em ângulo próximo de 90°. No ápice dos esporangióforos é possível observar esporângios de formato esférico apresentando em seu interior grande quantidade de esporangiósporos (FIGURA 1.7) (DOMSCH, 1980).

A estratégia ecológica de sobrevivência dos Mucorales enquadra-se, principalmente, na categoria chamada de “seleção-R”, ou seja, são um dos primeiros fungos a colonizar os substratos e a capturar os carboidratos solúveis, sendo por isso muitas vezes chamado de “fungos do açúcar”. Apresentam micélio de crescimento rápido e reproduzem-se assexuadamente em abundância (TRUFEM, 1999).

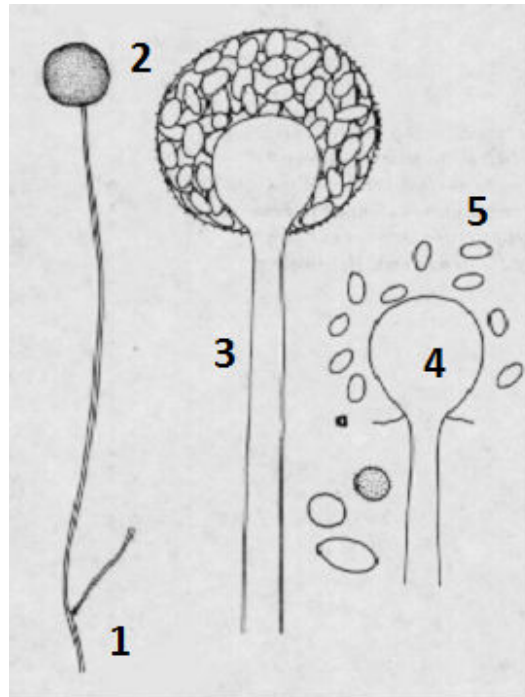


FIGURA 1.7 - Modelo ilustrativo de um *Mucor sp.* (1) Hifas cenocíticas; (2) Esporângio; (3) Esporangióforo; (4) Columela; (5) Esporangiosporos.

O família Mucorales é amplamente distribuídas na natureza, e as espécies de *Mucor* são conhecidas por terem sistemas de enzimas com alta atividades proteolíticas e lipolíticas e algumas dessas espécies são usados na fermentação da indústria tradicional de sufu e molho de lagosta, como também, em diversos outros processos industriais (MA, 2011; HAN, 2001).

Apesar de serem usados comercialmente na indústria de alimentos, estes microrganismos são considerados patógenos oportunistas. Porém a infecção causada pelos mesmos é extremamente rara em hospedeiros saudáveis, sugerindo que a patogenicidade destes fungos é observada principalmente quando um aspecto específico da defesa do hospedeiro sofre alguma alteração, tal como se observa em casos de leucemia, anemia, transplantes de órgãos ou medula óssea, diabetes, asma, câncer gástrico e outros casos diversos (CHAYAKULKEEREE, 2006; PANDIT, 2003; VIRALLY, 2002).

Fungos pertencentes à classe Zygomycetes, causam um grupo distinto de infecções designadas Zygomycose ou Mucormycose, que é a quarta causa mais comum

de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos (PANDIT, 2003). Muitos autores, arbitrariamente, atribuem ao gênero *Mucor* a causa desta doença, baseando apenas em confirmação de cultura, porém *Mucor* é apenas o terceiro gênero associado a esta patologia (CHAYAKULKEEREE, 2006).

Fungos do gênero *Mucor* têm sido exaustivamente estudados, nas mais diversas áreas e aplicações. Muitos dos seus estudos estão relacionados a doença Zygomycose, na produção de lípidos e em áreas como biorremediação e biotransformação devido a ser encontrados em solos e materiais em degradação (XIA, 2011).

Dentre os fungos do gênero *Mucor* estudados, o fungo *M. circinelloides*, isolado anteriormente de diversas fontes, como plantas, solo, e animais é um dos mais encontrados na literatura. Ele já se mostrou capaz de ser utilizado para hidrolisar derivados da celulose, e também para a transformação de esteróides e terpenos, mostrando assim um rico sistema enzimático a ser explorado (SAHA, 2004; MITSUKURA, 2005; SHAN, 2009).

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Utilizar diferentes metodologias de identificação para o fungo isolado de *Pinus taeda*, estudar seu metabolismo isolando e identificando substâncias produzidas por este, como conhecer um pouco de seu sistema enzimático com um estudo direcionado em biotransformação da carvona.

2.2. Objetivos específicos

- Cultivar o fungo em meio sólido e visualizá-lo em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV), bem como fazer toda sua identificação por morfologia;
- Realizar o sequenciamento da região 18S ribossomal do fungo para confirmar sua identificação em nível de espécies;
- Isolar através de técnicas cromatográficas, identificar e caracterizar os metabólitos produzidos, através das técnicas de RMN e espectrometria de massas.
- Identificar e isolar possíveis produtos de biotransformação, a partir dos substratos administrados ao meio de cultivo do micro-organismo.

3. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

3. Métodos experimentais

3.1. Reagentes e materiais cromatográficos

a) Suportes para Cromatografia:

- Sílica gel 70-230 Mesh
- Sílica gel 230-400 Mesh
- ODS
- Sephadex™ LH 20

b) Colunas cromatográficas:

- PHENOMENEX Synergi 4 μ Fusion 250 x 4.6mm (5 μ de diâmetro de poro);
- Agilent Extend C-18 5 μ 2.1x150 mm

c) Cartucho de SPE Supelco C-18 – 500 mg/ 6 mL;

d) Solventes:

- Solventes destilados no departamento de química, utilizados em cromatografia de coluna de bancada;
- Solventes grau HPLC Merck®, Aldrich®, Tedia e JT Baker
- Solventes PA Merck, Synth, Vetex, Reagen e outros
- Solventes deuterados MERCK® e ALDRICH® (98,0 – 99,9 %), para a obtenção dos espectros de RMN.
- Água purificada em aparelho Milli-Q;

e) Meios de cultura:

- BDA (Batata inglesa, Dextrose e Agar);
- BEA (Batata inglesa, Stevita® e Agar)
- Czapek:
 - ✓ D-Glicose

- ✓ NaNO₃
- ✓ MgSO₄·7H₂O
- ✓ KCl
- ✓ FeSO₄·7H₂O
- ✓ K₂HPO₄
- ✓ Agar
- ✓ Extrato de Levedura

3.2. Equipamentos

a) Espectrômetros de RMN:

- BRUKER DRX 400.

b) Espectrômetros de Massas:

- MICROMASS Quattro LC, (triplo-quadrupolo);
- BRUKER Autoflex speed MALDI-TOF

c) HPLC

- Waters Alliance 2695: Detector de UV (PDA) para HPLC Waters 2996 e Waters 2695 Separations Module.

d) Cromatógrafo a gás

- Shimadzu QP 2010 plus, equipado com uma coluna capilar Restek Rtx[®]-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)

e) – Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 250 da FEI.

- Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss Supra 35VP.

f) Evaporadores Rotativos:

- Rotaevaporador Tecnal (TE 120)

- Rotaevaporador Buchi 461-water bath (EL 131)

- g) Câmara de Fluxo Laminar:
 - Veco VL FS-12M;
 - Pachane.

- h) Autoclave Vertical:
 - Phoenix AV 70;
 - Phoenix AV 75;

- i) Triturador Turratec Tecnal;

- j) Mesa Incubadora Rotativa Tecnal TE 140;

- k) SpeedVac Tecnal;

- l) Banho de ultrasom BRANDSON 1510;

- m) Balança analítica Tecnal;

- n) Estufa de secagem Quimis;

- o) BOD (Biochemical – Oxygen – Demand) Technal TE 391;

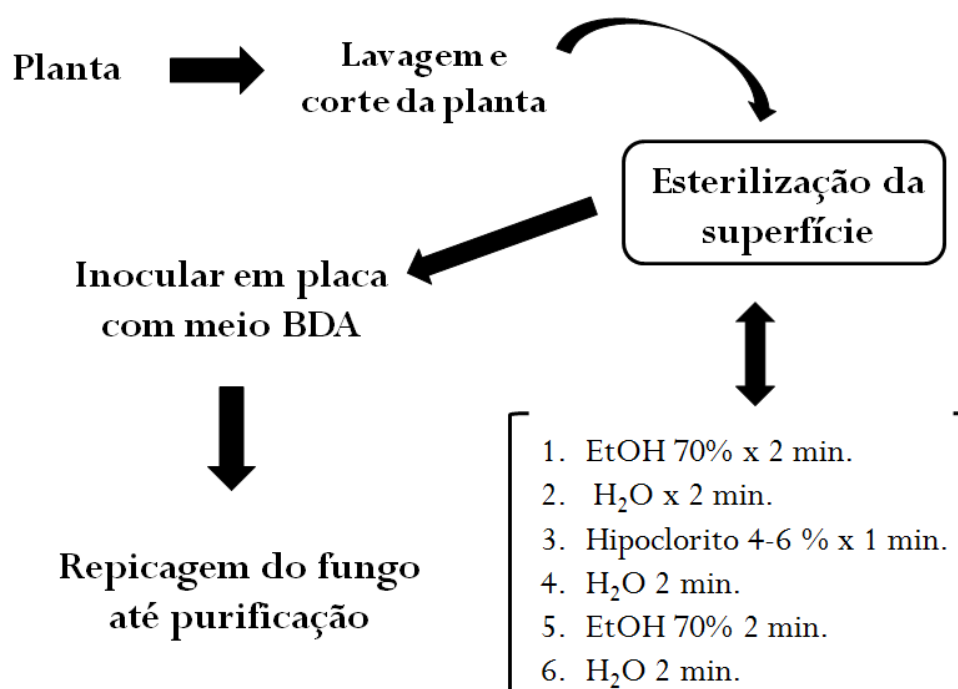
- p) Centrífuga Eppendorf 5810 R

- q) Seqüenciador de DNA Abi Prism 377

3.3. Metodologia

3.3.1. Isolamento e cultivo do microorganismo

Primeiramente foram coletados fragmentos do tronco de *Pinus taeda* (FIGURA 3.1) encontrada no campus da UFSCar. O isolamento do endófito foi realizado de acordo com a metodologia descrita por PETRINI *et al.* (1992). Após a lavagem do material vegetal em água corrente, toda a micro população epifítica foi eliminada por meio de imersão de fragmentos da planta em etanol 70% por 2 minutos, seguido da imersão em água destilada por 2 minutos, solução aquosa de hipoclorito de sódio 11% durante 1 minuto, água destilada por 2 minutos, etanol 70% por 2 minutos, e por último, a lavagem em água destilada para a remoção de resíduos dos agentes esterilizantes (ESQUEMA 3.1). Os fragmentos do material vegetal foram depositados sob placa de Petri contendo meio sólido BDA acrescido de antibiótico terramicina e incubados a temperatura ambiente sendo observados diariamente.



ESQUEMA 3.1 – Isolamento de micro-organismos endofíticos.

A fim de purificar o fungo de estudo, promoveram-se repiques sucessivos do fungo em placa de petri com meio sólido BDA para garantir a pureza (FIGURA 3.2).



FIGURA 3.1 - *Pinus taeda*.



FIGURA 3.2 - *M. circinelloides* em meio de cultura BDA.

3.3.2. Identificação morfológica

Depois de purificado, o isolado G001 foi cultivado em meio sólido ágar malte 2% e incubado a 25°C e a 37°C durante sete dias sob a ausência de luz (DOMSCH, 1980). Também foi cultivado em placas de meio BDA por 2 e 7 dias para serem visualizadas em microscopia óptica com água estéril como líquido de montagem e microscopia eletrônica de varredura (MEV) tanto ESEM como também em alto vácuo.

3.3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura operando em pressão ambiental (ESEM)

O fungo foi cultivado em meio sólido sob a ausência da luz por 3 dias. Em seguida, a morfologia do fungo foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura utilizando-se um microscópio Quanta 250 da FEI operando em pressão ambiental (ESEM - Environmental Scanning Electron Microscope). A análise foi realizada no

Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, na UFSCar, com auxílio da Prof. Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias.



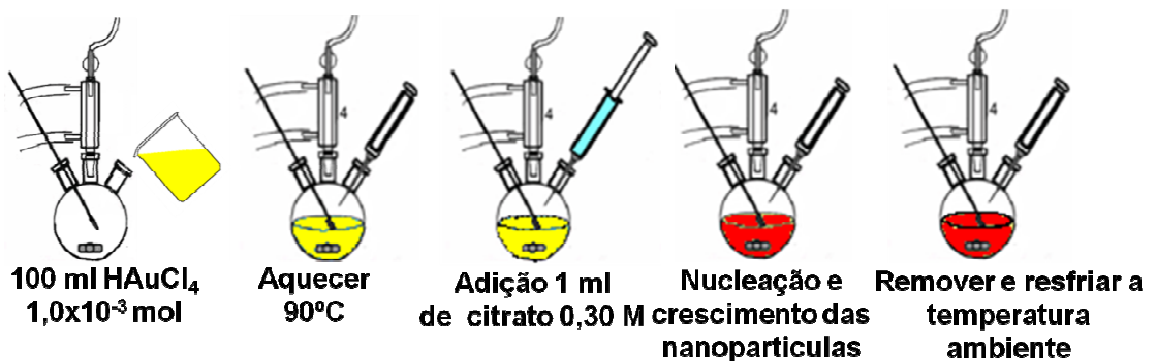
FIGURA 3.3 - MEV da FEI Quanta 250 operando em ESEM.

A análise foi realizada cultivando o fungo por 3 dias em meio sólido BDA sob a ausência de luz e utilizando parte do micélio com unidades reprodutivas formadas para ser visualizadas no equipamento. O MEV ESEM permite que as imagens sejam captadas sem o recobrimento da amostra com nenhum metal, como tradicionalmente é feito em alto vácuo. A análise sendo realizada sem o recobrimento da amostra com ouro tem a vantagem do custo mais baixo e preparo de amostra mais rápido. Porém em modo ESEM a imagem perde um pouco de resolução devido a pouca condutibilidade dos elétrons na amostra.

3.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura operando em alto vácuo:

O fungo foi cultivado em meio sólido BDA por aproximadamente 3 dias de crescimento sob a ausência da luz como mencionado anteriormente. Após os 3 dias preparou-se uma solução de nanopartículas de ouro, usada para recobrimento da amostra.

Nanopartículas de ouro foram sintetizadas em um balão de fundo redondo contendo 300 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 ($1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) à 90°C . Em seguida foram adicionados 3 mL de uma solução de citrato de sódio ($3,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) com pH ajustado em 3,0 (ESQUEMA 3.2). Essa mistura foi mantida sob constante agitação e aquecimento durante cinco minutos. Durante o período de aquecimento foram recolhidas alíquotas de 10 mL, as quais foram resfriadas até a temperatura ambiente e submetidas à caracterização por UV-Vis e MEV.



ESQUEMA 3.2 - Sínteses de nanopartículas de ouro.

A morfologia do fungo foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. Para esse efeito, foi utilizado um microscópio Zeiss Supra 35VP com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM) trabalhando a 10 kV. As amostras inicialmente foram cultivadas sobre uma placa de petri em meio sólido BDA, pedaços de 1 cm^2 do fungo foram cortados e adicionados em 50 mL de dispersão coloidal de ouro e armazenados protegidos da luz por 3 dias (FIGURA 3.4). Durante esse período as nanopartículas aderiram à superfície da hifa recobrando parcialmente a parede da hifa. Após, a amostra foi depositada em substrato de silício e secadas em estufa a 40°C por 12 horas. Esse procedimento permite uma melhor visualização dos detalhes morfológicos do fungo que não poderiam ser observados se utilizássemos o procedimento mais comum, a deposição de ouro por magnetron *sputtering*. A análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural, no Departamento de Engenharia de Materiais, UFSCar, com auxílio do doutorando Luiz Fernando Gorup e do Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo.

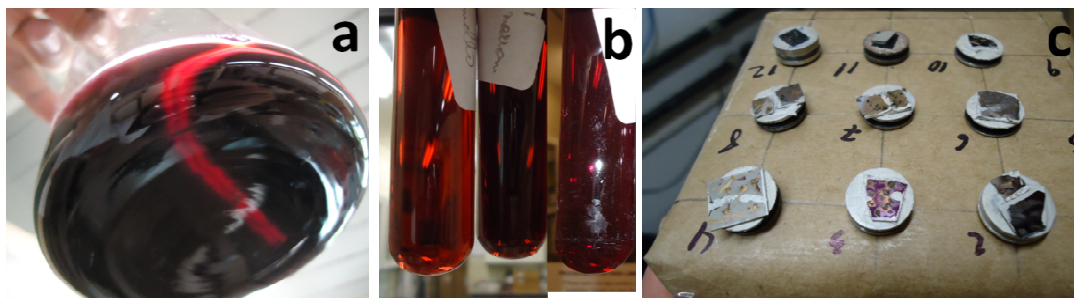


FIGURA 3.4 - Esquema ilustrativo do preparo de amostra para a análise de MEV: **(a)** Colóide de nanopartículas de ouro; **(b)** Amostra de 1cm² de fungo imerso em 50 mL de colóide de ouro; **(c)** Hifas dos fungos depositadas sobre substrato de silício.

3.3.3. Identificação por sequenciamento genético

3.3.3.1. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído segundo a metodologia descrita por Dellaporta, Wood e Hicks (1983) adaptada. Este procedimento foi realizado no Departamento de Química da UFSCar com auxílio do Dr. Leonardo Toffano e Evandro Pietro.

Os isolados foram cultivados em meio Czapeck a temperatura ambiente, colocados no shaker a uma rotação de 120 rpm, durante sete dias. Cerca de 50 mg de micélio do fungo foram transferidos assepticamente para microtubos de 1,5 mL, contendo 600 µL de tampão de extração (NaCl 0,5 M; EDTA 0,05 M; Tris-HCl 0,1 M; pH 8,0; β-mercapoetanol 0,2%). Mediante auxílio de um pistilo, o micélio foi macerado no tampão de extração. Após maceração foi adicionado em cada microtubo 50 µL de SDS 20%, seguindo-se agitação durante um minuto e incubação a 60 °C por 15 minutos. Posteriormente adicionado-se 300 µL de acetato de potássio 5 M, agita-se por um minuto e a mistura obtida será levada para centrifugação a 14000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, 400 µL do sobrenadante, obtidos da centrifugação, foram transferidos para novos microtubos contendo 400 µL de isopropanol. Uma breve agitação foi realizada nos microtubos e, em seguida, foram levados para centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente do microtubo e junto ao precipitado foi introduzido 500 µL de etanol 70% em cada tubo. Os microtubos foram submetidos à nova centrifugação a 14000 rpm durante 5 minutos.

Por fim todo o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 μL de água ultra-pura autoclavada. Após a extração, foi realizado eletroforese em gel de agarose 1% para obter-se a quantificação do DNA extraído, com aplicação de 2 μL de amostra de DNA.

3.3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase da Região ITS-1 do rDNA

A partir dos primers por White *et al.* (1990) para a região ITS-1 (internal transcribed spacer) do rDNA as reações foram realizadas (TABELA 3.1).

TABELA 3.1 – Componentes da PCR e suas respectivas concentrações

Reagentes	Concentração	Quantidades
Água		10,2 μL
Tp	10 X	2,5 μL
MgCl ₂	25 mM	3,0 μL
dNTP	1.25 mM	3,0 μL
Primer ITS 1	10 pMol	2,0 μL
Primer ITS 4	10 pMol	2,0 μL
Taq-polimerase	5,0 U	0,3 μL
DNA		2,0 μL

As reações de amplificação foram nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguidos de 40 ciclos de 2 min de desnaturação a 94°C, 2 min de anelamento a 55 °C e 2 min de alongação a 72 °C e concluindo com 10 min a 72 °C. O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etidium, comparado com o DNA ladder de 100 pb e estimado em 50 ng/ μL .

3.3.3.3. Reação de sequenciamento

A amostra de DNA do fungo foi seqüenciada com os primers ITS-1 e seu complementar ITS-4 separadamente. O produto da PCR das regiões ITS's foram

diluídos em água destilada autoclavada na proporção de 1/10 e utilizou-se 2,0 µL para o sequenciamento (TABELA 3.2).

TABELA 3.2 – Componentes do sequenciamento e suas respectivas concentrações

Componentes	Quantidades
ETdye	2,0 µL
Save Money	2,0 µL
Primer	1,0 µL (10 pMol/ µL)
Água	3,0 µL
Produto da PCR	2,0 µL

O programa da termociclagem consistiu em desnaturação inicial a 96 °C por 2 min, seguidos de 35 ciclos de 20 seg de desnaturação a 95 °C, 15 seg de anelamento a 50 °C e 1 min de alongação a 60 °C, concluindo a 4 °C por 24 horas. O produto desta PCR foi precipitado e ressuspendido em 3,0 µL de tampão (loading) e aplicado em gel de acrilamida para leitura das bases no aparelho seqüenciador de DNA Abi Prism 377.

3.3.4. Identificação por MALDI-TOF

Para realizar a análise em MALDI-TOF é necessário primeiramente fazer uma limpeza da amostra e realizar um procedimento de extração dos peptídeos do fungo, os quais vão ser ionizados produzindo um perfil de comparação com a biblioteca do equipamento. Este método nos permite em poucas horas saber o gênero do fungo e ter idéia de sua espécie, mas para isso é preciso que a biblioteca tenha várias espécies cadastradas para uma maior confiabilidade de identificação.

3.3.4.1. Preparo da amostra de fungo

Com o auxílio de um loop de 10 µL, foi transferido uma amostra de micélio do fungo da placa de Petri em meio sólido BDA para um frasco eppendorff contendo

500 µL de água. O eppendorff foi aquecido a 95°C por 30 minutos para matar o microorganismo e agitado em vortex para dispersão das células. A amostra foi centrifugada por 2 minutos a 5000 rpm e teve seu sobrenadante removido.

Foram adicionados mais 500 µL de água ultra-pura e levados para a centrifuga por mais 2 minutos com eliminação do sobrenadante. A amostra foi ressuspendida em 1,2 mL de etanol 70%, centrifugada por 2 minutos, e o sobrenadante foi retirado novamente, restando apenas o micélio sem contaminantes.

3.3.4.2. Extração dos peptídeos

Após ser retirado o excesso de etanol, a amostra foi lavada com água estéril, seguindo da adição de 50 µL de TFA 80% e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de repouso a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 3 minutos. Transferiu-se para outro eppendorff uma alíquota de 45 µL do sobrenadante, onde acrescentou-se também 135 µL de água deionizada e 180 µL de ACN. A amostra foi novamente centrifugada por 3 minutos e seu sobrenadante foi transferido para outro eppendorff, o qual foi seco em Speedvac. Depois de seca, a amostra foi dissolvida em 20 µL de uma solução 50% ACN/TFA, sendo esta solução usada para aplicar na placa de análise do MALDI-TOF. Este procedimento foi adaptado pelo grupo LaBioMMi com base na literatura (HETTICK, 2008)

3.3.5. Análise de metabólitos produzidos por *Mucor circinelloides* cultivado em meio sólido de arroz

3.3.5.1. Cultivo do fungo em meio sólido de arroz

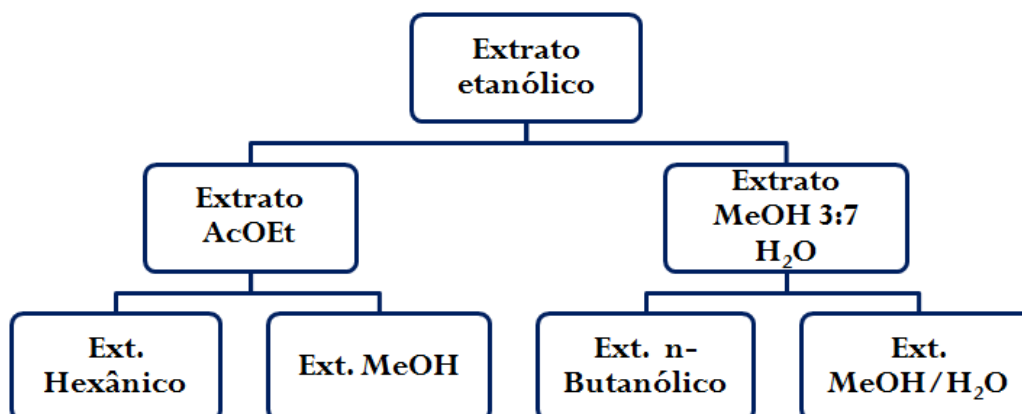
Para o estudo dos metabólitos produzidos por *Mucor circinelloides*, o fungo foi cultivado em arroz. Para isso adicionou-se 90 g de arroz parbolizado Uncle Ben's® e 80 mL de água destilada em 30 erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados por 20 minutos, à 120°C e 1 atm de pressão para a esterilização do meio

de cultura. Em seguida, os frascos foram agitados vigorosamente a fim de desprender os grãos de arroz e transferidos à capela de fluxo laminar, previamente esterilizada. Após o meio atingir a temperatura ambiente, transferiu-se para os erlenmeyers fragmentos com cerca de 0,5 cm cada, do fungo, contido em placas de Petri em meio BDA. Além dos frascos com os inóculos, manteve-se também durante o experimento três erlenmeyers contendo apenas o meio de cultura arroz, para controle microbiológico. Os frascos foram incubados durante 30 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C), de modo estático. Durante três dias, os frascos foram agitados diariamente para homogeneizar o meio junto à massa micelial em crescimento.

Depois do período de incubação, em capela de fluxo laminar foram adicionados 300 mL de etanol absoluto a cada frasco contendo o meio de cultura em arroz. Triturou-se completamente todo o conteúdo dos erlenmeyers e após 24 horas de extração, filtrou-se a pressão reduzida. O filtrado foi rotaevaporado, obtendo assim o extrato etanólico do fungo.

3.3.5.2. Partição líquido-líquido do extrato fúngico

As partições do extrato do fungo foram realizadas utilizando-se 17 g de extrato, suspensos em 500 mL de uma solução de álcool metílico P.A. e água destilada (3:7). Então foram adicionados 300 mL de acetato de etila e após a agitação em funil de decantação, a fase acetato foi separada e coletada. A extração com acetato de etila se repetiu mais duas vezes, juntando toda a fase em acetato de etila e concentrada em rotaevaporador. A solução de MeOH/H₂O foi particionada novamente com 200 mL de n-butanol, repetindo a extração por três vezes. Depois disso toda a fase n-butanólica e a fase MeOH/ H₂O foram concentradas no rotaevaporador. O extrato em acetato de etila foi ressuspensionado em MeOH e particionado por três vezes com 150 mL de hexano, este também sendo concentrado, e nos deixando com quatro novos extratos (ESQUEMA 3.3).



ESQUEMA 3.3 - Metodologia de extração e partição líquido-líquido.

3.3.5.3. Isolamento de metabólitos produzidos por *Mucor circinelloides*

Os extratos foram todos analisados previamente por CCD com diferentes fases móveis e submetidos à Cromatografia Líquida Clássica, buscando o isolamento de metabólitos primários e secundários. Foram primeiro fracionados os extratos de menores polaridades e depois os de maiores polaridades.

3.3.5.3.1. Substância C_19

Em uma coluna cromatográfica de dimensões $h = 30$ cm e $\Phi = 6.5$ cm, utilizando sílica 70-230 mesh, foram aplicados 11,40 g do extrato hexânico e fracionados com um sistema de eluição demonstrado na TABELA 3.3 a seguir. As frações foram coletadas em frascos de 25 mL, e foram secas em capela com auxílio de jato de ar.

Todas as frações foram monitoradas por CCD e algumas foram reunidas devido a suas similaridades. A fração número 19 foi ressuspensa com hexano e depois com metanol, resultando um precipitado branco, solúvel em clorofórmio. Este precipitado foi submetido a análise de RMN para caracterização.

TABELA 3.3 – Sistema de eluição para coluna cromatográfica

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (mL)	Frações
Hex : CH ₂ Cl ₂	1 : 1	160	1-8
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 2%	80	9-12
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 5%	60	13-15
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 10%	120	16-22
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 15%	120	23-28
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 20%	60	29-31
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 30%	60	32-34
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 50%	80	35-38
MeOH	100 %	140	39-45

3.3.5.3.2. Substância C3_36

As frações de 7 a 13 obtidas do fracionamento do extrato hexânico foram reunidas de acordo com a similaridade entre elas. Elas foram secas e submetidas a outro fracionamento cromatográfico com sílica 70-230 *mesh*, sendo aplicado agora 0,5 g de amostra, com um sistema de eluição mostrado abaixo na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 – Sistema de eluição para coluna cromatográfica

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (mL)	Frações
Hex : Acetona	9 : 1	130	1-13
Hex : Acetona	7 : 3	120	14-26
Hex : Acetona	1 : 1	70	27-33
Hex : Acetona	3 : 7	60	34-39
Acetona : MeOH	1 : 1	70	40-47

As frações foram todas monitoradas por CCD e a fração 36 se mostrou com um grau de pureza significativo, sendo assim submetida a análise por RMN, buscando a identificação da molécula. A análise dos dados de RMN permitiu sugerir a classe da molécula, e esta foi analisada por HPLC-MS/MS (Waters do módulo de

separação 2695 e Micromass Espectrômetro de Massas, Quattro LC) e o método de separação adotado foi utilizando uma coluna Synergi C18, 4.6 X 250 mm, 5 micrômetros de tamanho de partícula com sistema de eluição gradiente de H₂O/ACN.

3.3.5.3.3. Substância C4_13

Após a análise do extrato hexânico, foi realizada a separação do extrato metanólico, da partição em AcOEt. A separação foi realizada em coluna cromatográfica de dimensões h= 30 cm e $\Phi = 6.5$ cm, utilizando sílica 70-230 *mesh*, aplicando 28 g de amostra. O sistema de eluição é o mostrado na tabela abaixo.

TABELA 3.5 – Sistema de eluição para coluna cromatográfica

Sistema de eluentes	Proporção	Volume (mL)	Frações
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 2%	120	1-6
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 5%	120	7-12
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 10%	75	13-17
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 15%	120	18-25
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 20%	75	26-30
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 30%	90	31-36
Hex : CH ₂ Cl ₂ : MeOH	1 : 1 : 50%	105	37-43
MeOH	100%	90	44-49

As frações foram todas monitoradas por CCD e secas em capela. A fração 13 apresentou-se como um sólido branco de baixa solubilidade em clorofórmio, diclorometano e metanol, devido a isto o experimento de RMN de 1D e 2D foi realizado com a amostra solubilizada em piridina-d₅ para verificar sua pureza e identificar sua estrutura.

3.3.6. Biotransformação com *Mucor circinelloides*

3.3.6.1. Biotransformação da (4R)- e (4S)-carvona

3.3.6.1.1. Experimento em 12 dias

Para realizar o experimento de biotransformação primeiramente foram preparados 3,430 L de meio líquido Czapeck enriquecido com 2% de extrato de levedura. O meio de cultura foi dividido em 49 frascos erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 70 mL de meio, e autoclavados por 15 min a 120°C.

Depois de esfriar os frascos erlenmeyers, estes foram armazenados na capela de fluxo laminar previamente esterilizada e foram inoculados um pedaço de micélio de *Mucor circinelloides* por frasco em 43 frascos. Os seis frascos sem microorganismos foram separados para o controle do meio com o substrato (3 para (4R)-carvona e 3 para (4S)-carvona). Os erlenmeyers foram agitados em mesa agitadora a 120 rpm na temperatura ambiente por 24 horas, onde foram adicionados com auxílio de uma seringa acoplada a um filtro de 0,2 µm a (4R)-carvona em 20 frascos com fungo, a (4R)-carvona em 3 frascos só com meio, a (4S)-carvona em 20 frascos com fungo, a (4S)-carvona em 3 frascos com meio e por último reservando 3 erlenmeyer somente com meio e fungo, como mostrado abaixo.

- 20 erlenmeyers com meio + fungo + (4R)-carvona
- 20 erlenmeyers com meio + fungo + (4S)-carvona
- 3 erlenmeyers com meio + (4R)-carvona
- 3 erlenmeyers com meio + (4S)-carvona
- 3 erlenmeyers com meio + fungo

Os erlenmeyers ficaram em agitação a 120 rpm por 12 dias, onde o experimento foi interrompido, tendo a fase aquosa separada do micélio por filtração a vácuo. As fases aquosas foram extraídas com acetato de etila, e em seguida foram extraídas com n-butanol, buscando extrair produtos de alta polaridade e que possam ter ficado na fase aquosa. As fases em acetato e n-butanol foram reunidas de acordo com

o material do recipiente e concentradas em rotaevaporador, produzindo um extrato acetato e um butanólico para cada experimento e para cada controle.

Os extratos n-butanólicos foram separados em cromatografia de média pressão Combiflash®Rf Teledyne Isco com uma coluna ODS (RediSep® Rf- HPC18, 275g), aplicando 5,3 g de amostra para (4R)-carvona. O gradiente de eluição usado foi de 20-100% MeOH/H₂O com um fluxo de 20 mL/min. Foram coletados 146 frações em tubos de ensaios que foram secos em Speedvac, e submetidos a análise em CCD, verificando a similaridade entre as amostra 61 a 70, que foi identificada como pura por RMN e chamada de **CarvR_61**, e similaridade entre 45 a 51 que foram reunidas e submetidos ainda a coluna cromatográfica clássica.

A eluição foi realizada no modo isocrático com 15% acetona / hexano e a partir desta separação foram obtidos 23 frações, sendo a fração 9 considerada pura por meio da análise por RMN, e nomeada de **CarvR_51_9**.

O extrato butanólico de (4S)-carvona também foi separado por cromatografia de media pressão usando o mesmo equipamento, coluna e gradiente de eluição, somente com a diferença de ser aplicado 5,5 g de amostra. Porém todas as frações foram analisadas por CCD e reunidas as que apresentaram similaridade e submetidas a cromatografia clássica sem sucesso na purificação de nenhum produto de biotransformação.

3.3.6.1.2. Estimativa de consumo da carvona e estimativa de produção para alguns produtos identificados

Para a estimativa de consumo do substrato pelo fungo, ele foi cultivado em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Czapeck, sob agitação de 120 rpm. Depois de 18 horas de crescimento, 20 mg de substrato foi adicionado a cada frasco. A cada quatro horas três frascos contendo (4R)-carvona e três outros contendo (4S)-carvona foram retirados. O micélio foi filtrado e a parte aquosa foi extraída com 20 mL de diclorometano e depois com 20 mL de álcool n-butílico. No final 66 amostras foram obtidas, isto é, onze pontos em triplicata, ambos com extrato diclorometano e n-butílico. Dos 20 mL de diclorometano usado para a

extração, 1,5 mL foi recolhido, seco e analisado por GC-MS. Assim, os extratos em diclorometano foram analisados por GC-MS proporcionando uma estimativa de consumo da carvona e uma estimativa de produção para os compostos de biotransformação.

Para investigação da composição dos produtos de biotransformação foi investigada por um cromatógrafo a gás Shimadzu CG-MS 2010 plus equipado com uma coluna capilar Restek Rtx[®]-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). O gás de arraste foi o Hélio e a rampa de temperatura foi programada para 60 °C por 5 min, 60-240 °C à 6 °C/min e subsequentemente mantidos a 240°C durante 5 min. Injetor: 220 ° C, interface: 240 ° C. Os dados foram obtidos utilizando 70 eV como tensão de ionização e a identificação foi realizada em comparação os espectros de massas das substâncias com os espectros da biblioteca NIST.

Os extratos n-butanólicos foram analisados por HPLC-MS/MS (Waters do módulo de separação 2695 e Micromass Espectrômetro de Massas, QuattroLC) utilizando experimentos de SRM para fazer uma estimativa de alguns produtos de biotransformação, que foram anteriormente isolados e caracterizados por RMN. O método de separação adotado foi utilizando uma coluna Synergi C18, 4.6 X 250 mm, 5 micrômetro de tamanho de partícula com sistema de eluição gradiente de H₂O/MeOH 0.1% de TFA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. Resultados e discussões

4.1. Identificação de *Mucor circinelloides*

4.1.1. Identificação morfológica

O isolado M1 (FIGURA 4.1) foi cultivado em ágar malte 2% e incubado a 25° C durante sete dias, no escuro. As colônias apresentaram diâmetro de 90 mm após 4 dias de incubação (crescimento rápido). Não houve crescimento a 37° C. O isolado apresentou micélio aéreo abundante de coloração marrom claro a cinza, apresentando esporângioforos curtos e de coloração marrom clara (DOMSCH, 1980).



FIGURA 4.1 - Isolado cultivado em meio sólido BDA.

Observações microscópicas utilizando água estéril como líquido de montagem (FIGURA 4.2 e FIGURA 4.3) e com corante de lactofenol (FIGURA 4.4) revelaram as seguintes características:

- (i) Esporangióforos (7,5 - 15 μ m de diâmetro) de parede rugosa, com ramificações monopodiais, simpodiais e circinadas;
- (ii) Esporangióforos contendo grânulos amarelos por até 14 dias com parede equinulada;
- (iii) Esporângio com membrana equinulada;

- (iv) Columela esférica a sub-esférica (40 – 80 μm de comprimento por 27,5 - 70 μm de largura) apresentando colarete evidente;
- (v) Esporangiósporos elipsóides a subesféricos, parede lisa (4,5 - 5,5 μm de comprimento por 3,5 - 5,0 μm de largura);
- (vi) Clamidósporos presentes;
- (vii) Zigósporos não observados em cultura.

As características morfológicas estão de acordo com aquelas apresentadas em Dosmch *et al.*, 1980, sendo o fungo identificado como *Mucor circinelloides*.



FIGURA 4.2 - Hifas cenocíticas, esporangióforos curtos e columelas de *Mucor circinelloides* (400X).

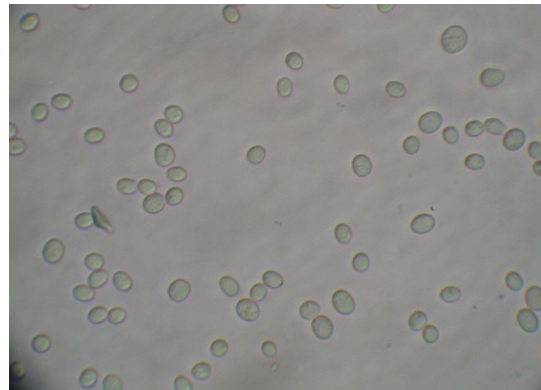


FIGURA 4.3 - Esporangiósporos livres (400X).



FIGURA 4.4 - Esporângio visualizado em corante de lactofenol (400X).

Microscopia Eletrônica de Varredura tipo ESEM:

Certas amostras, principalmente biológicas, contêm água, e são danificadas pelo vácuo, enquanto outras exalam voláteis que podem prejudicar o equipamento. O MEV ESEM trabalha com um baixo vácuo e uma baixa temperatura, em torno de 0 °C. O baixo vácuo permite que a amostra não precise ser recoberta com ouro ou filmes metálicos, facilitando o preparo de amostras e minimizando os custos de análise.

Para a visualização do fungo em ESEM, o fungo foi cultivado em BDA por 3 dias e fragmentos do micélio foram posicionados no amostrador para captação das imagens (FIGURA 4.5).

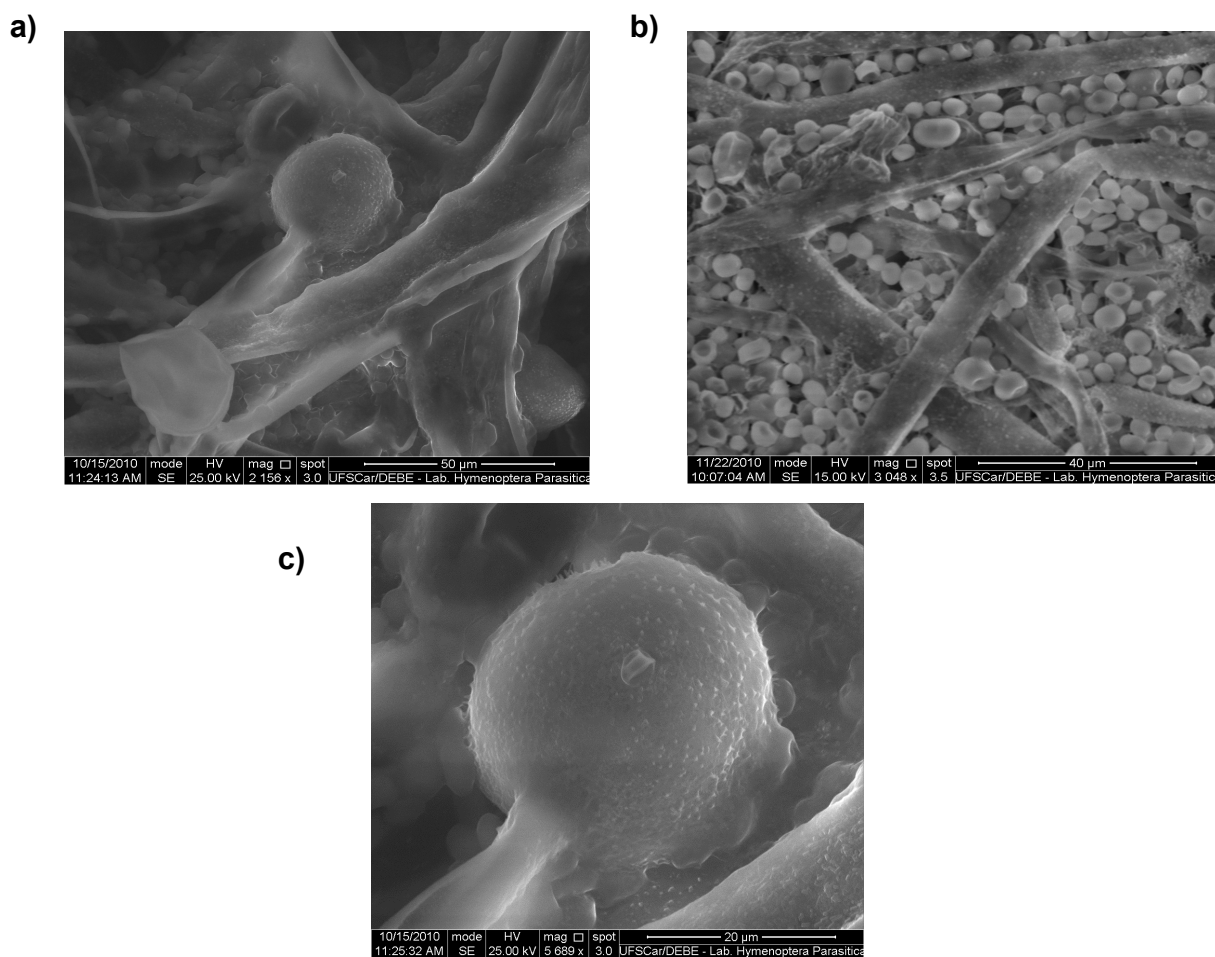


FIGURA 4.5 - MEV ESEM de *Mucor circinelloides*. (a) Columela em meio as hifas; (b) Aplanósporos (esporos) em meio a hifas; (c) Columela ampliada com alguns esporos ainda presos.

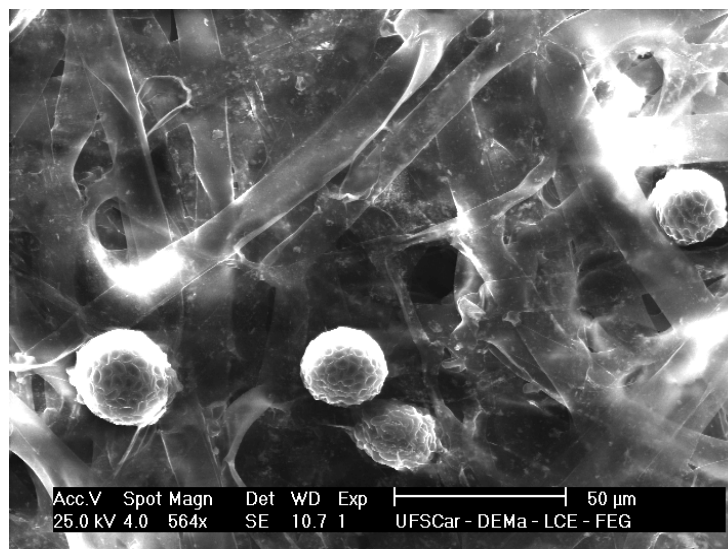
Além das vantagens adquiridas com estes tipos de análise, encontramos algumas pequenas desvantagens, como a ampliação da imagem. Com o MEV ESEM não é possível obter imagens em nanômetros, pois a falta de um condutor de elétrons faz com que a imagem não apresente uma boa resolução em uma grande ampliação.

Microscopia Eletrônica de Varredura em alta pressão:

O fungo recoberto com nanopartículas de ouro foi visualizado em MEV de alto vácuo, obtendo diferentes imagens microscópicas de *Mucor circinelloides* (FIGURA 4.6). Essas imagens em alto vácuo, possuem maior resolução devido à presença do condutor de elétrons na amostra.

Além disso, o recobrimento de nanopartículas ainda permite uma melhor visualização dos detalhes morfológicos do fungo que não poderiam ser observados se utilizássemos o procedimento mais comum, a deposição de ouro por magnetron *sputtering*.

a)



b)

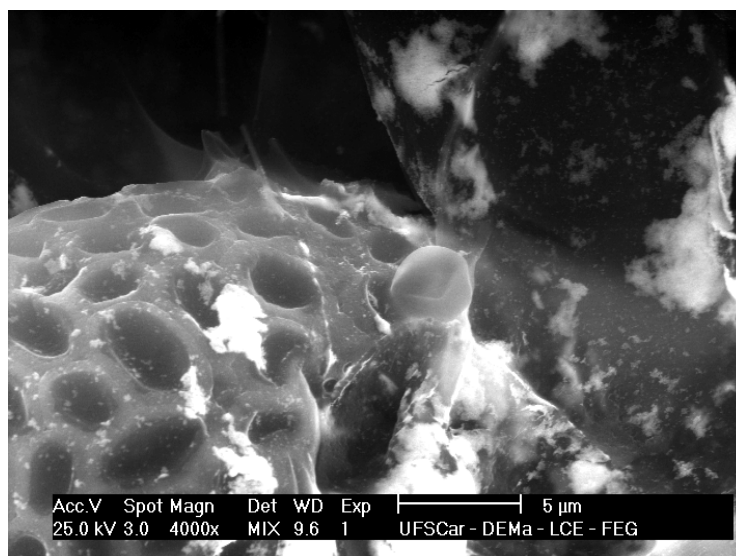


FIGURA 4.6 - Imagens em MEV com recobrimento por nanopartículas de ouro. **a)** columelas em meio a hifas. **b)** esporo ainda preso a columela.

Com os dados morfológicos, principalmente pelas imagens em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, é possível identificar o micro-organismo de estudo como sendo um zigomiceto, por apresentar hifas cenocíticas, e sendo um *Mucor* por não apresentar rizóides, e por fim, pelas dimensões, cores e tempo de crescimento como sendo *Mucor circinelloides*.

4.1.2. Sequenciamento genético da região 18S ribossomal

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído segundo a metodologia descrita por Dellaporta *et al.*, 1983 adaptada. Após a extração, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a extração do DNA (FIGURA 4.7).

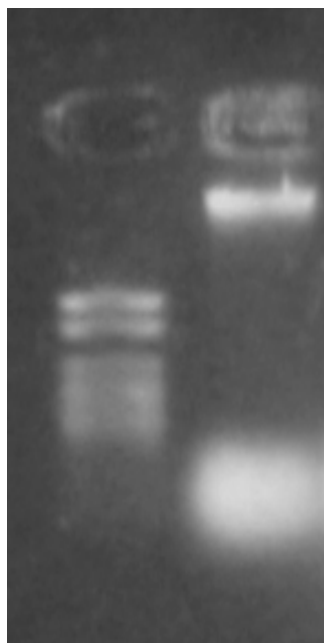


FIGURA 4.7 – Imagem em gel de agarose do DNA de *Mucor circinelloides*.

Após a verificação da eficiência de extração, o DNA foi sequenciado na região 18S ribossomal com os primers ITS1 e ITS4 como complementar. A sequência genética obtida foi conferida e alinhada, sendo confrontada com as depositadas no banco genômico do NCBI (National Center for Biotechnology Information), confirmando a espécie com a identificada pelas observações morfológicas, aumentando assim o grau de confiabilidade para a identificação do fungo como *Mucor circinelloides*.

Após a identificação do fungo a nível molecular, foi possível a construção de uma árvore filogenética para a identificação da cepa “M1” com a proximidade com as outras espécies do gênero *Mucor* (FIGURA 4.8).

Na árvore filogenética, a escala representa a variação de genes dentre as espécies, variando conforme os processos evolutivos.

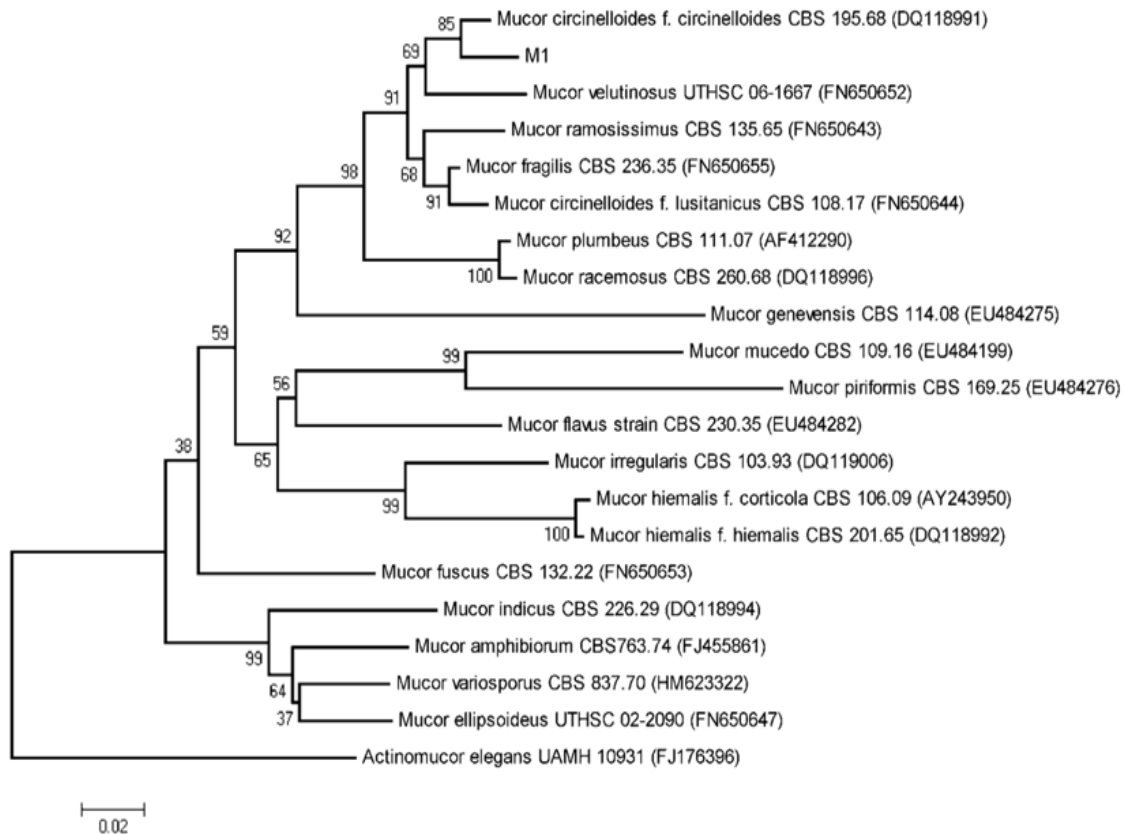


FIGURA 4.8 - Árvore filogenética baseada em um fragmento de 575 pares de base a região ITS de espécies de *Mucor*. A árvore foi inferida pelo algoritmo de neighbor-joining. Os nomes das espécies de *Mucor* estão seguidos pelo número de acesso do voucher em coleção de cultura e o número de acesso da sequência no GenBank (em parênteses).

4.1.3. Identificação por MALDI-TOF

O sistema mais antigo para a classificação de espécies de fungos é baseado em dados morfológicos, principalmente aqueles ligados as suas estruturas reprodutivas. No entanto, este método de classificação apresenta limitações críticas, tais como as culturas de fungos que não desenvolvem estruturas reprodutivas, ou a semelhança morfológica entre membros de espécies distintas. A incorporação de testes moleculares em taxonomia de fungos tem ajudado a resolver esses problemas, porém a aplicação de métodos moleculares é relativamente cara e exige equipamento e mão-de-obra altamente especializados,

além de um tempo de análise significativamente longo para a identificação (CORREIA, 2006; HETTICK, 2008).

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) é uma técnica robusta para a análise de moléculas orgânicas que tem sido usada para a identificação rápida de fungos. Neste caso, o interesse da técnica em questão é a análise das células intactas, onde o espectro gerado é interpretado como um “fingerprint” para o micro-organismo. Esta técnica tem dado uma grande contribuição para o conhecimento científico a cerca da identificação de micro-organismos e já tem sido utilizada como uma ferramenta eficaz para testes rápidos, estando fundamentada principalmente na análise dos peptídeos ribossomais dos fungos.

Para realizar a análise, foi feita uma extração dos peptídeos ribossomais e estes foram ionizados e visualizados por MALDI-TOF. Os espectros obtidos nesta abordagem são comparados com espectros de referências existentes em bases de dados. Os agrupamentos entre esses espectros são baseados em dados estatísticos mostrando um grau similaridade.

Na FIGURA 4.9 vemos em azul o espectro usado como comparação pela biblioteca do equipamento, e em cima desde vemos um espectro de coloração vermelha, amarela e verde, referente ao fungo que está sendo analisado. Neste espectro a coloração vermelha indica os sinais que não correlacionaram com sinais do espectro da biblioteca; os sinais em verde são os sinais que correlacionaram com precisão com os do espectro da biblioteca; e por ultimo, os sinais em amarelo são os que correlacionaram com algum desvio ao da biblioteca. Essas cores e os vários sinais podem ser melhor visualizado na FIGURA 4.10, que mostra uma ampliação de uma parte dos espectros.

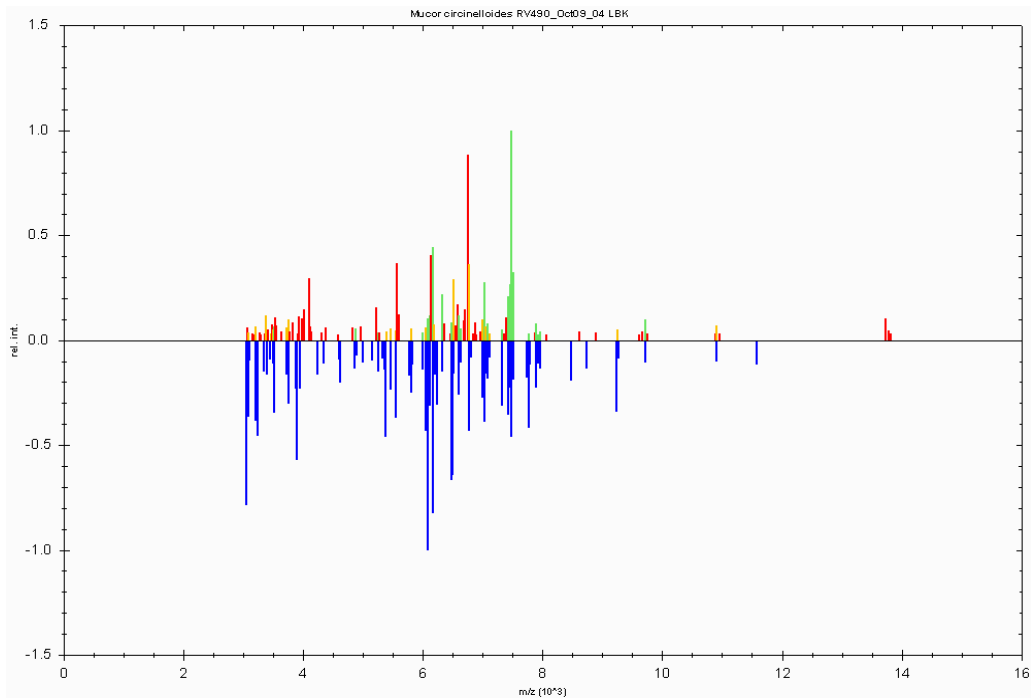


FIGURA 4.9 – Espectros comparativos do fungo analisado com a biblioteca do equipamento.

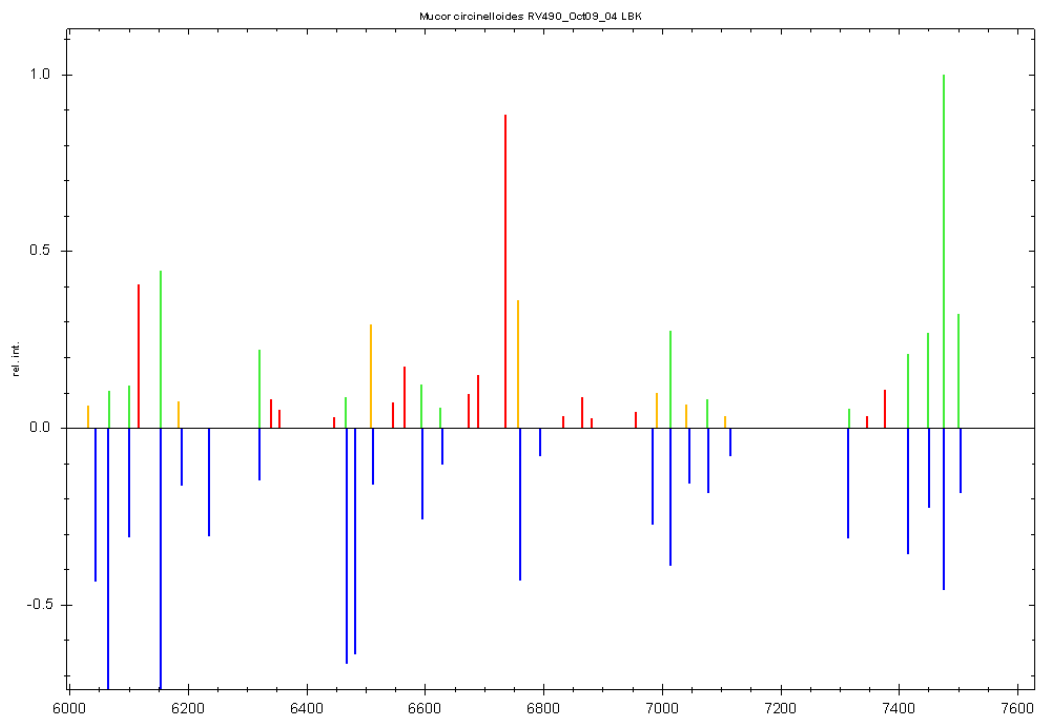


FIGURA 4.10 – Ampliação de uma parte dos espectros da identificação do fungo.

Devido às correlações entre os espectros, foi possível chegar a uma identificação razoável para o fungo, sendo que a maior similaridade de identificação foi com o espectro da espécie do fungo analisado e já identificado por outras técnicas. Na FIGURA 4.11 vemos o ranking de identificação, com *M. circinelloides* como primeira opção, seguido por duas leveduras. Os (++) significam uma qualidade eficaz ao nível de gênero, ou seja, com essa qualidade de identificação podemos afirmar que esse fungo pertence ao gênero descrito, porém sem garantia de identificação da espécie.

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Mucor circinelloides RV490_Oct09_04 LBK	2.048	36080
2 (+)	Candida_krusei[ana]# (Issatchenkia_orientalis[teleo]) ATCC 6258 THL	1.801	4909
3 (+)	Candida_krusei[ana]# (Issatchenkia_orientalis[teleo]) ATCC 14243 THL	1.788	4909

FIGURA 4.11 – Ranking de probabilidade de identificação para o fungo analisado.

Para uma boa identificação é necessário termos em nosso banco de dados maiores quantidades de cepas e espécies cadastradas, para que assim possamos ter uma maior confiabilidade de identificação, atingindo um “score” mais elevado.

4.2. Substâncias isoladas

4.2.1. Ergosterol e 3-Epiergosterol

A substância C_19, um precipitado branco isolado do extrato hexânico do cultivo do fungo em arroz, foi solubilizado em CDCl_3 e analisado por RMN de ^1H (FIGURA 4.12). No espectro vemos dois sinais multipletos em δ 3,54 e 3,65 ppm, característicos de hidrogênio ligado a carbono carbinólico, indicando uma possível duplicação de sinais. Olhando na região de metila de δ 0,65 a 1,07 ppm vemos também duplicação em vários sinais da metila, , como principalmente

nos sinais de δ 0,65 e 0,70 ppm, que indicam ser sinais metílicos bem blindados de esteróides, levando a acreditar uma possível existência de uma mistura de diastereoisômeros.

Devido aos sinais de metilas indicarem a substância ser um esteróide, adquirimos um espectro de ^1H de um ergosterol padrão, que é o principal esteróide encontrado na parede celular de fungos. O espectro do ergosterol é mostrado na FIGURA 4.13.

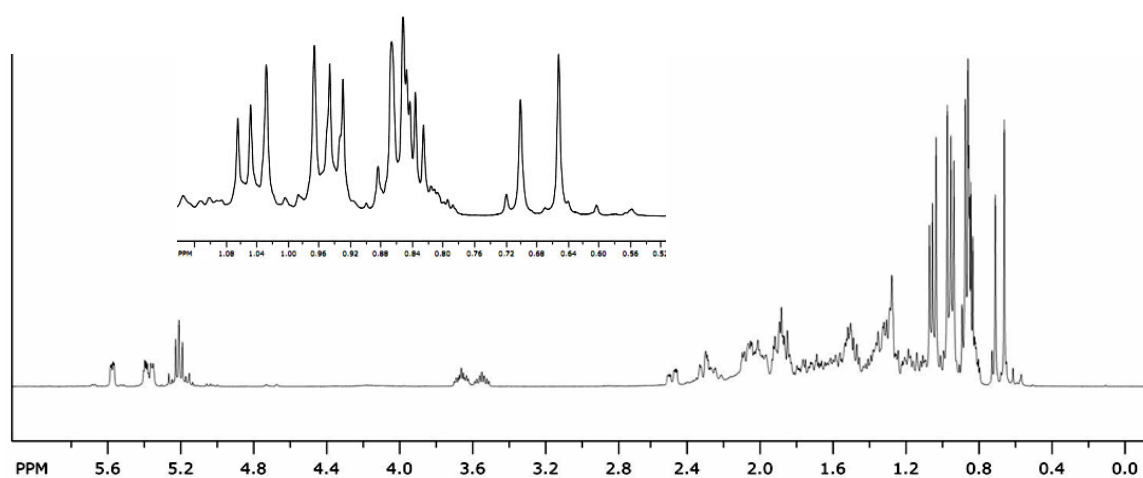


FIGURA 4.12 – Espectro de RMN de ^1H para a substância C_19 com ampliação da região de hidrogênios metílicos (400 MHz, CDCl_3).

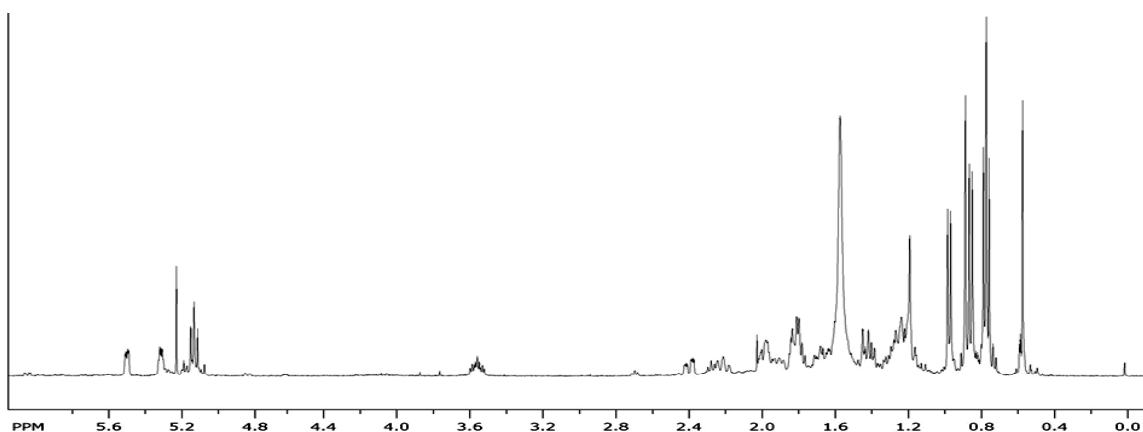


FIGURA 4.13 – Espectro de ^1H do ergosterol (400 MHz, CDCl_3).

Comparando os sinais do ergosterol com o da substância C_19 é visto uma imensa similaridade entre os espectros com a diferença de sinais duplicados na amostra isolada. Interpretando os sinais e comparando-os com a literatura, vemos que a substância isolada é uma mistura do ergosterol com o 3-epi ergosterol, que é o ergosterol com a hidroxila do carbono 3 em α , não em β como é o ergosterol (FIGURA 4.14)(GRIFFITHS, 2003).

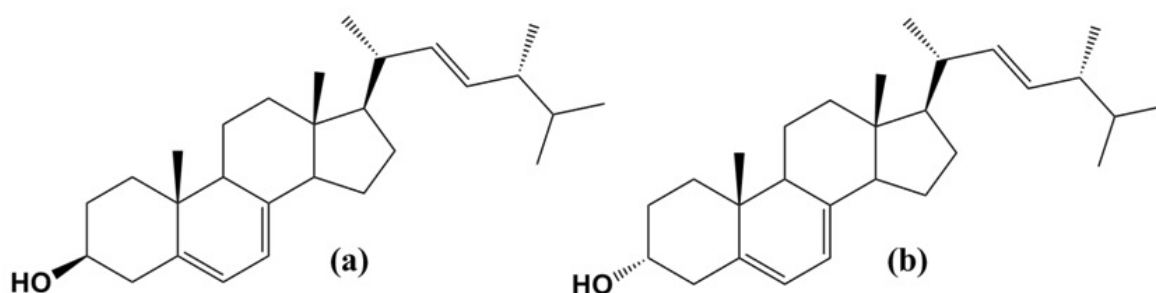


FIGURA 4.14 – Estruturas do (a) ergosterol e (b) 3-epi ergosterol.

O ergosterol é uma substância encontrada em grandes quantidades por diversos fungos, e dia após dia são encontradas diversas atividades biológicas associadas ao ergosterol e seus derivados, como atividade antitumoral, citotóxica, pró-apoptótica e outras (TARAKU, 2001; CHEN, 2009 e RUSSO, 2010). O 3-epi ergosterol não é um derivado muito encontrado na natureza, fazendo com que um fungo que produz essa substância possa ser importante para a descoberta de outras atividades biológicas ou de algumas atividades já relatadas em maiores intensidades.

4.2.2. Cerebrosidas

A substância C3-36 foi isolado por cromatografia líquida clássica e submetido a experimentos de RMN 1D e 2D em CDCl_3 .

Os sinais característicos presentes nos espectros de RMN de ^1H na região de maior blindagem dos núcleos, referem-se a um singlete típico de cadeia de ácidos graxos em δ 1,19 ppm, um singlete relativo aos núcleos de hidrogênio

de metila ligada a carbono com hibridização sp^2 em δ 1,50 ppm, assim como um tripleto condizente à metila terminal de cadeia alquílica em δ 0,80 ppm (FIGURA 4.15).

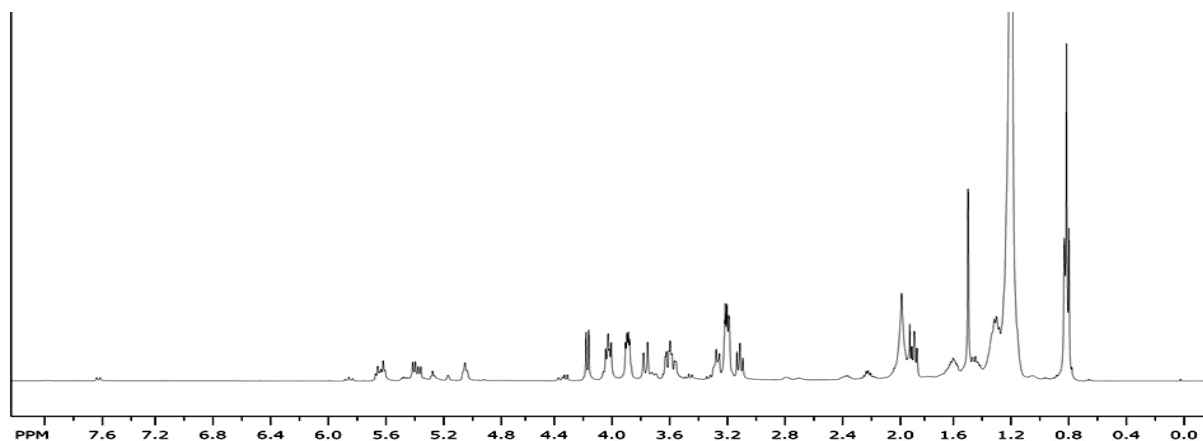


FIGURA 4.15 – Espectro de RMN de ^1H para C3-36 (400 MHz, CDCl_3).

Outros sinais importantes característicos estão localizados em região típica de deslocamento químico de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos e olefínicos, entre δ 3,1 e 4,2 ppm, e entre δ 5,0 e 5,7 ppm respectivamente. Outro sinal característico trata-se de um dubleto em δ 7,63 ppm (FIGURA 4.16 e FIGURA 4.17), relativo a um provável núcleo de hidrogênio ligado a um nitrogênio.

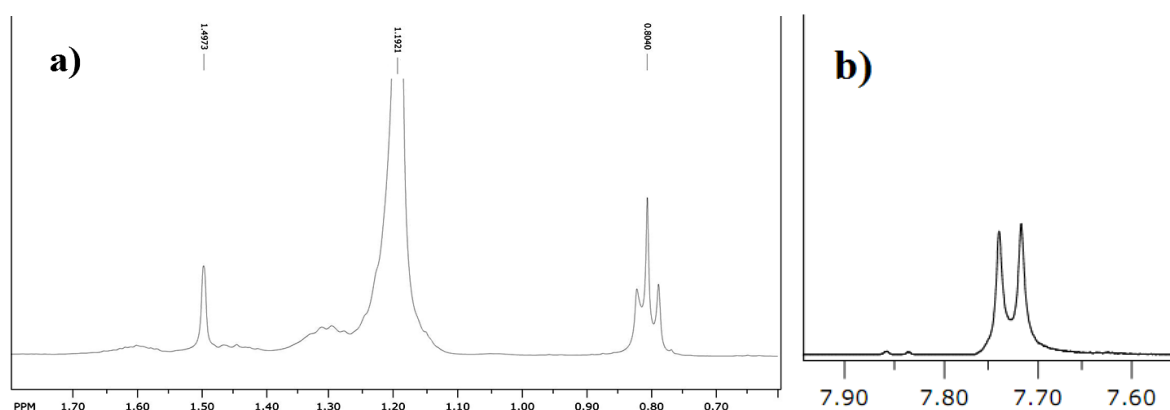


FIGURA 4.16 – Ampliações do RMN de ^1H para: (a) Região entre δ 0,60 e 1,80 ppm; (b) Dubleto em δ 7,63 ppm (400 MHz, CDCl_3).

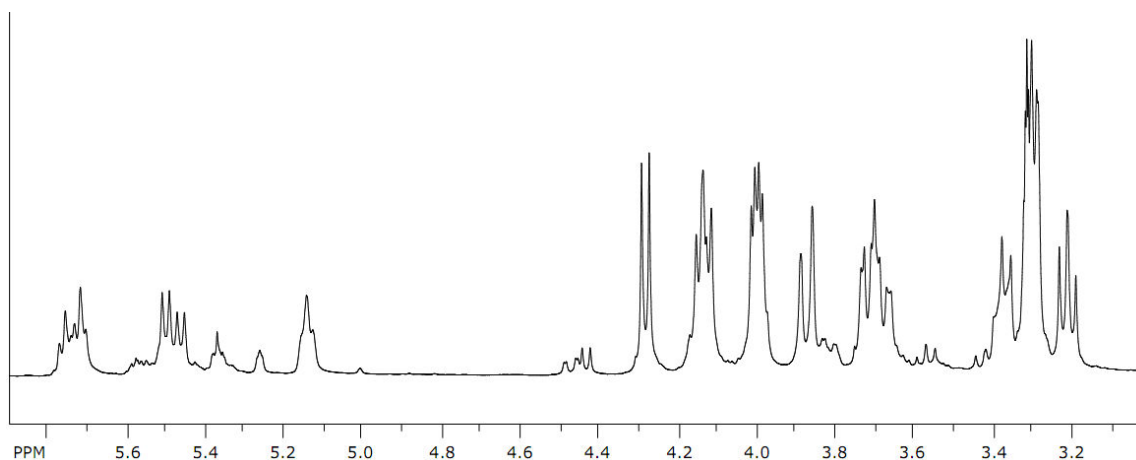


FIGURA 4.17 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H para a região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos e olefínicos (400 MHz, CDCl_3).

As informações obtidas através dos espectros de RMN de ^1H , juntamente com comparações com a literatura, nos indicaram a existência de uma mistura de compostos da classe das glucoceramidas, conhecidas como cerebrosídeos.

Esfingolípídeos são os principais constituintes das membranas celulares e tem um papel central em uma variedade de processos biológicos. A identificação e caracterização desses compostos em sistemas biológicos é fundamental para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos processos de determinadas doenças, como Alzheimer e Niemann-Pick (MANICKE, 2008).

Os cerebrosídeos são compostos pertencentes ao grupo dos glicosfingolípídios, sendo estruturalmente caracterizados por uma hexose ligada a uma ceramida (FIGURA 4.18). Esta última, geralmente constituída por uma base esfingóide (cadeia longa com função álcool, ligada a uma unidade amino) ligada a uma cadeia longa de ácido graxo, formando uma ligação amídica.

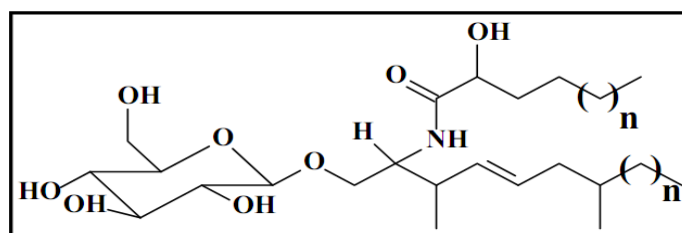


FIGURA 4.18 - Modelo estrutural de um cerebrosídeo

Após a confirmação por RMN de se tratar de uma mistura de cerebrosídeos, a amostra foi analisada por LC-ESI-MS/MS no modo de ionização negativo, gerando os íons produtos visualizados no espectro abaixo (FIGURA 4.19), os quais são possíveis a verificação de fragmentações características mostradas por setas.

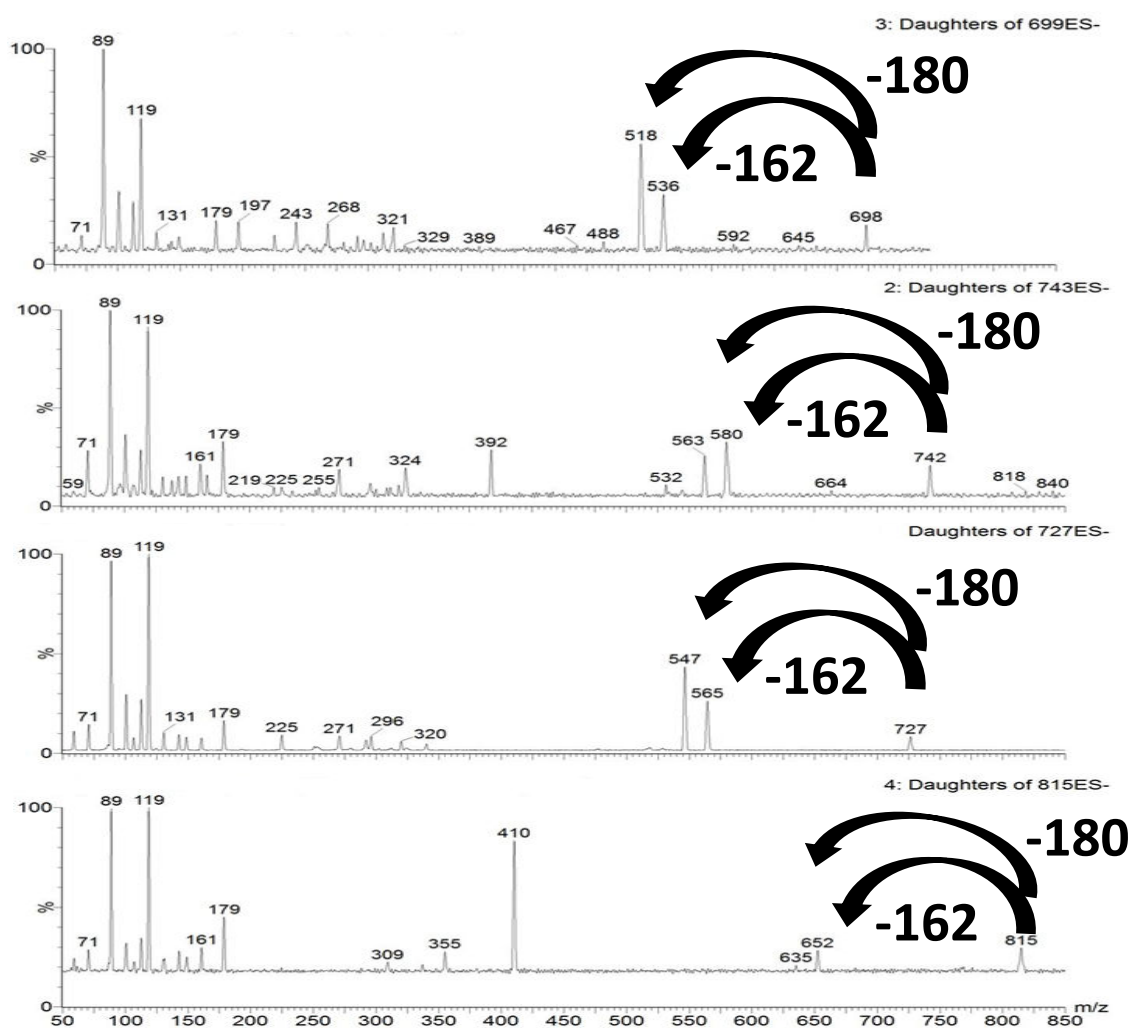


FIGURA 4.19 – Espectros de íons produtos de m/z 699, m/z 727, m/z 743 e m/z 815 .

É possível visualizarmos alguns íons característicos, já que a classe das cerebrosídas tem um perfil de fragmentação semelhante a essas substâncias.

Primeiramente vemos uma perda de 162 e 180 Da (FIGURA 4.20), indicando a perda do glicosídeo ligado a ceramida. Vemos também íons na região entre m/z 179 a m/z 71 que são encontrados em todos os espectros mostrados, isto se deve ao fato de que esta classe de moléculas fragmenta-se até o íon de m/z 179, o qual segue um perfil de fragmentação semelhante com íons de m/z 179, m/z 119, m/z 89 e m/z 71 (MEDEIROS, 2010) (FIGURA 4.20).

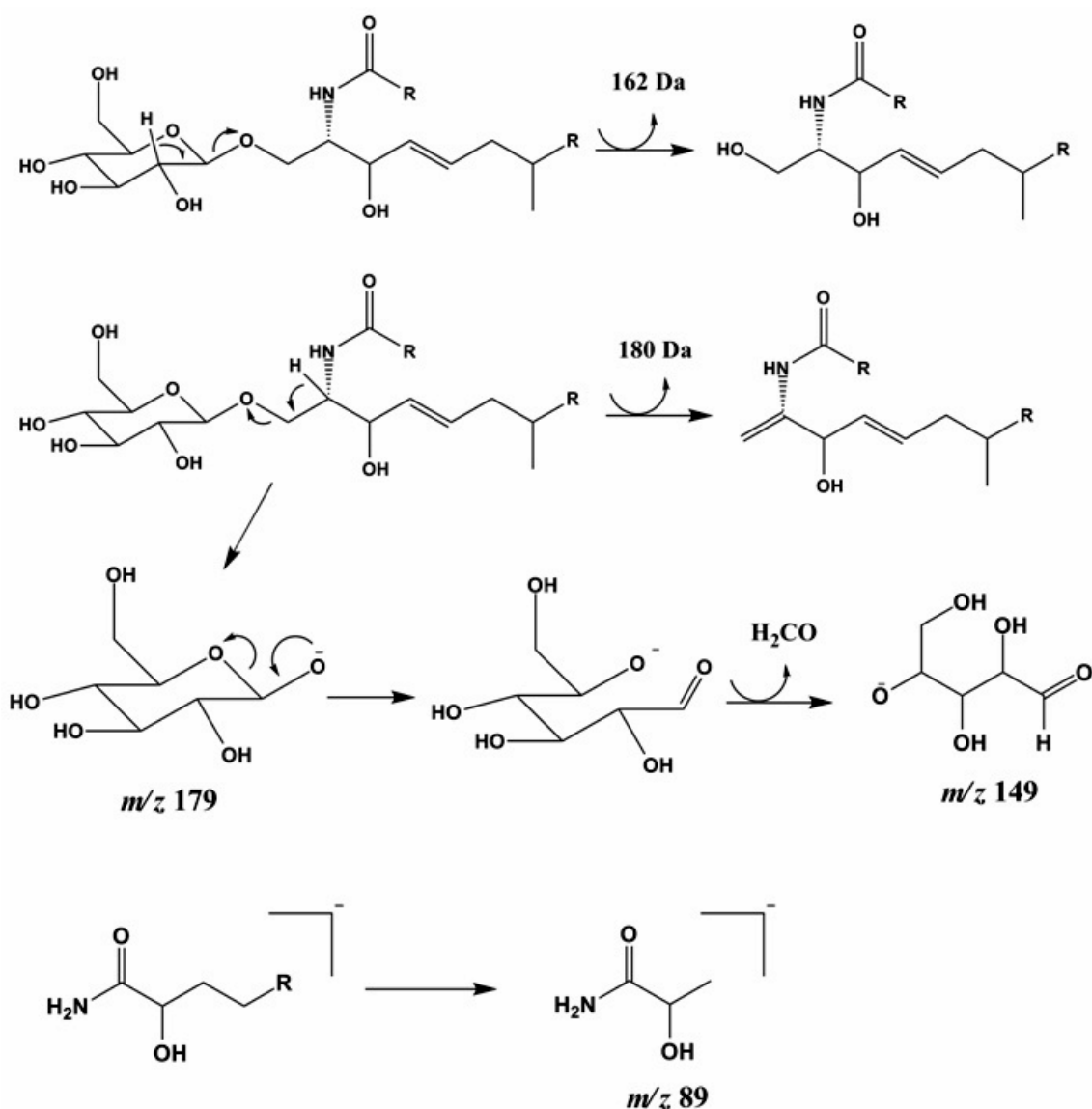


FIGURA 4.20 – Proposta de fragmentação para cerebrosídeos.

4.2.3. Sitosterol glicosilado

A substância C4-13 foi isolada por cromatografia líquida clássica a partir do extrato metanólico da partição com acetato de etila do extrato etanólico obtido do fungo cultivado em arroz. Para a obtenção da amostra foi utilizado coluna com sílica comum, e um gradiente de 100% hexano até 100% metanol.

A substância é amorfa e possui uma coloração branca, sendo muito difícil sua solubilização na maioria dos solventes orgânicos. A substância foi submetida a um RMN de ^1H para uma prévia caracterização (FIGURA 4.21).

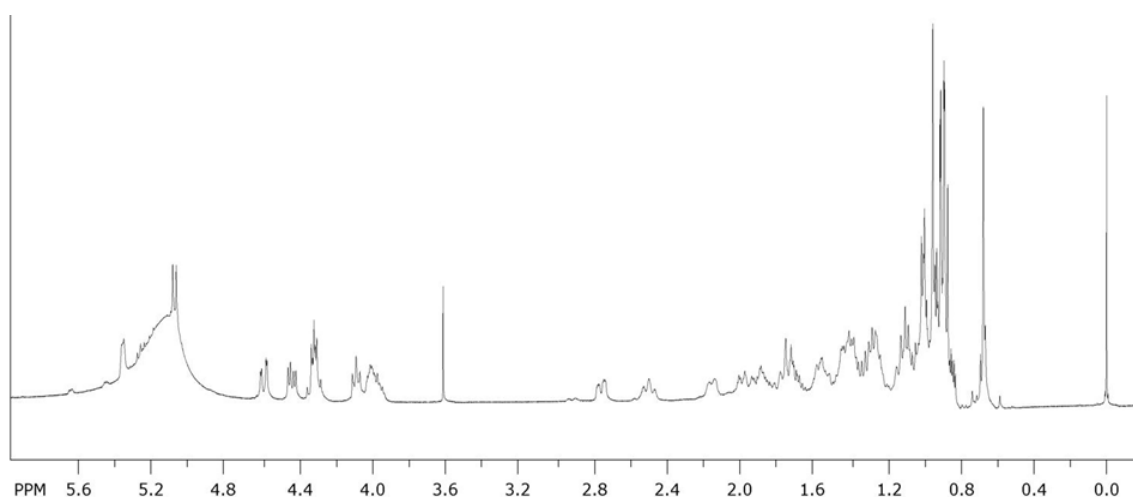


FIGURA 4.21 – Espectro de RMN de ^1H do C4-13 (400 MHz, Piridina-d₅).

No espectro de RMN de ^1H é possível observar vários sinais nas regiões de δ 0,67 a 2,76 ppm indicando a presença de hidrogênios metílicos e metilênicos característicos do esqueleto esteroidal. Também é possível observar sinais nas regiões δ 3,90 a 5,10 ppm referentes a hidrogênios carbinólicos, como um duplo dubleto em δ 4,60 correspondente ao hidrogênio ligado no carbono anomérico, também foram observados (FIGURA 4.22).

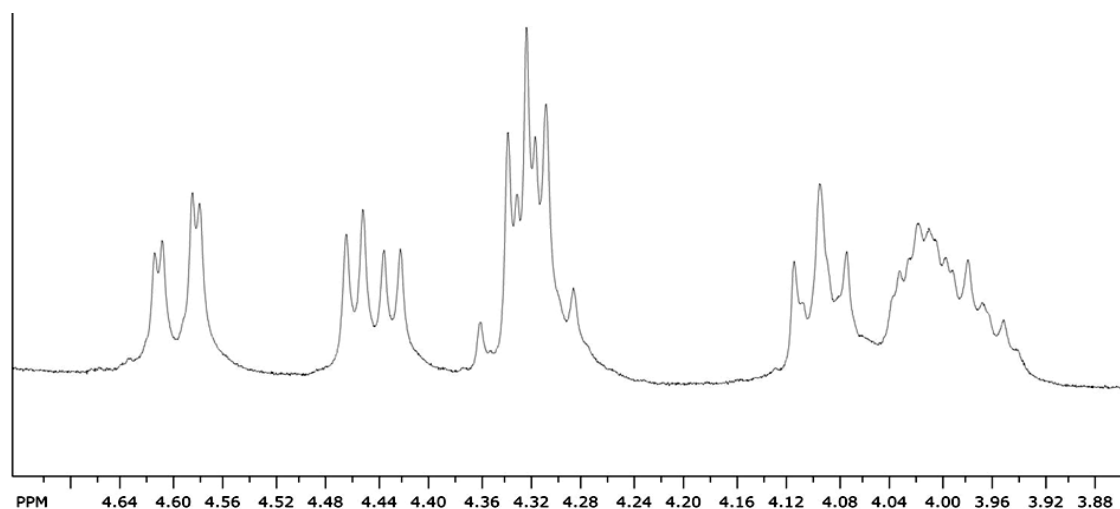


FIGURA 4.22 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H para a região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos(400 MHz, Piridina-d₅).

Devido as dados obtidos de RMN de ^1H podemos sugerir a molécula como sendo um esteróide ligado a um glicosídeo. Para melhor identificação foi realizado experimento de RMN de ^{13}C (FIGURA 4.23).

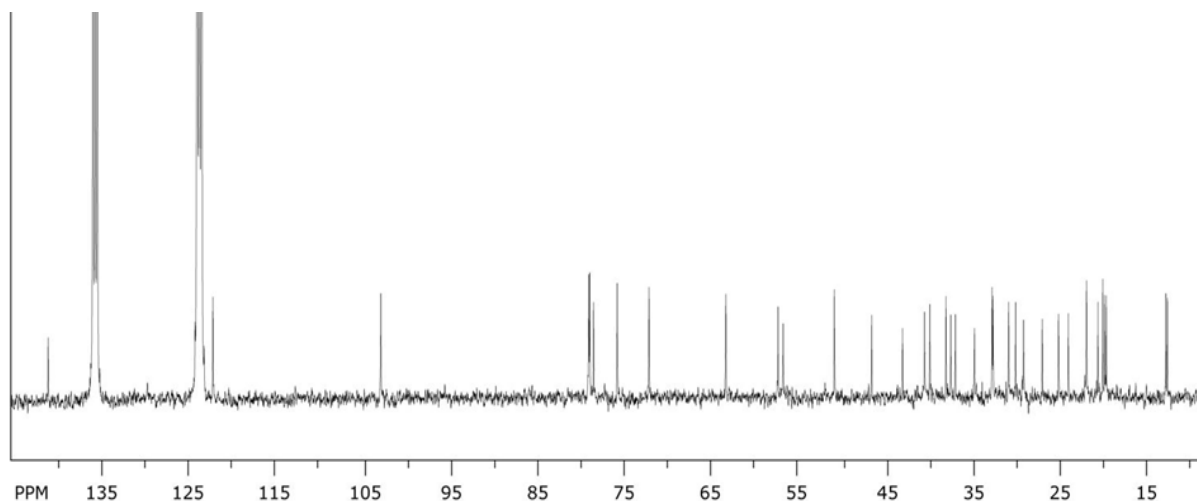


FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ^{13}C para C4-13(400 MHz, Piridina-d₅).

Com a verificação do número de carbonos com seus respectivos deslocamentos (TABELA 4.1), e comparando com a literatura (SAKAKIBARA, 1983), foi possível identificar a substância isolada como sendo o 3-glucopiranosil sitosterol (FIGURA 4.24).

TABELA 4.1 – Deslocamento de ^{13}C para o 3-glucopiranosil sitosterol (δ em ppm)

C	Grupo sitosterol (400 MHz, Piridina-d5)	C	Grupo glicosil (400 MHz, Piridina-d5)
1	37,5	1'	102,6
2	30,3	2'	75,4
3	78,5	3'	78,7
4	40,0	4'	71,7
5	141,0	5'	78,2
6	122,0	6'	62,9
7	32,2		
8	32,1		
9	50,4		
10	37,0		
11	21,3		
12	39,4		
13	42,5		
14	56,9		
15	24,6		
16	28,6		
17	56,3		
18	12,0		
19	19,5		
20	36,4		
21	19,1		
22	34,2		
23	26,4		
24	46,1		
25	29,5		
26	19,3		
27	20,0		
28	23,4		
29	12,2		

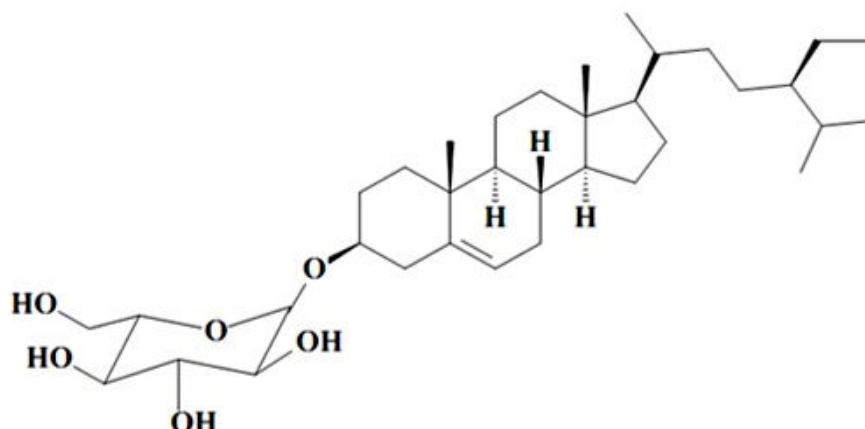


FIGURA 4.24 – Estrutura de 3-glucopiranosil sitosterol

Muito curioso é o fato desta substância ter sido isolado de um fungo, já que sitosterol é um esteróide muito comum encontrado na parede celular de plantas. Como o fungo foi cultivado em arroz, existe a hipótese de que a substância possa ter sido isolada do arroz e não do fungo, porém não há relato na literatura dessa substância ser encontrada no arroz.

Devido ao fato de na literatura não ser enfatizado esta substância produzida pelo arroz, e também por não ser comum isolar esta substância de fungos cultivados em arroz, como é feito frequentemente em nosso grupo de trabalho (LaBioMMi), acreditamos que a substância deva ser realmente produzida pela cepa de *M. circinelloides* isolada por nosso grupo.

4.3. Biotransformações

4.3.1. Biotransformação da (4R)-carvona e (4S)-carvona

Carvona é um monoterpene comum encontrado em muitos óleos essenciais e é também amplamente utilizado para adicionar sabor e aroma em muitos tipos de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, apresentando algumas propriedades antimicrobianas e antifúngicas (MORRISH, 2008).

A carvona pode ser encontrada na natureza em duas formas: (4R)-carvona e (4S)-carvona (FIGURA 4.25). Ambos os enantiômeros são muito utilizados na síntese enantiosseletiva de produtos naturais, sendo que a (4R)-carvona está presente principalmente no hortelã (*Mentha spicata*), enquanto que a (4S)-carvona é abundante em alcarávia/cominho (*Carum carvi*) (CRAMAROSSA, 2005) (FIGURA 4.26).

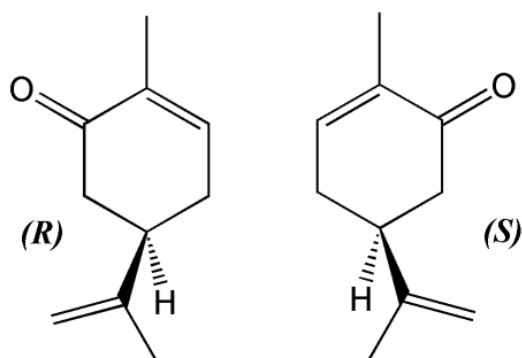


FIGURA 4.25 – (4R)-carvona e (4S)-carvona.



FIGURA 4.26 – (a) Cominho (*Carum carvi*); (b) Hortelã (*Mentha spicata*).

Devido a toda importância comercial, seu baixo custo, facilidade de ser encontrada na natureza e possuir dois enantiômeros muito usados em síntese químicas, a carvona vem a ser uma substância muito interessante para ser biotransformada.

4.3.1.1. Determinação estrutural de mentanotrióis CarvR_61 e CarvR_51_9 isolados

As substâncias CarvR_61 e CarvR-51_9 foram isoladas por métodos cromatográficos diversos do extrato n-butílico do experimento de biotransformação com a carvona por *M. circinelloides*.

A CarvR_61 foi submetida a análise por RMN de ^1H e de ^{13}C (FIGURA 4.27 e FIGURA 4.28). O espectro de hidrogênio mostrou dois sinais de metilas integrando para três, um em δ 0,95 ppm (*dd*) e 1,06 ppm (*s*), mostrando que em uma metila houve alguma modificação. Vemos também dois sinais de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos, um em δ 3,43 ppm e 3,84 ppm, sendo que anteriormente tínhamos apenas uma carbonila e nenhuma hidroxila.

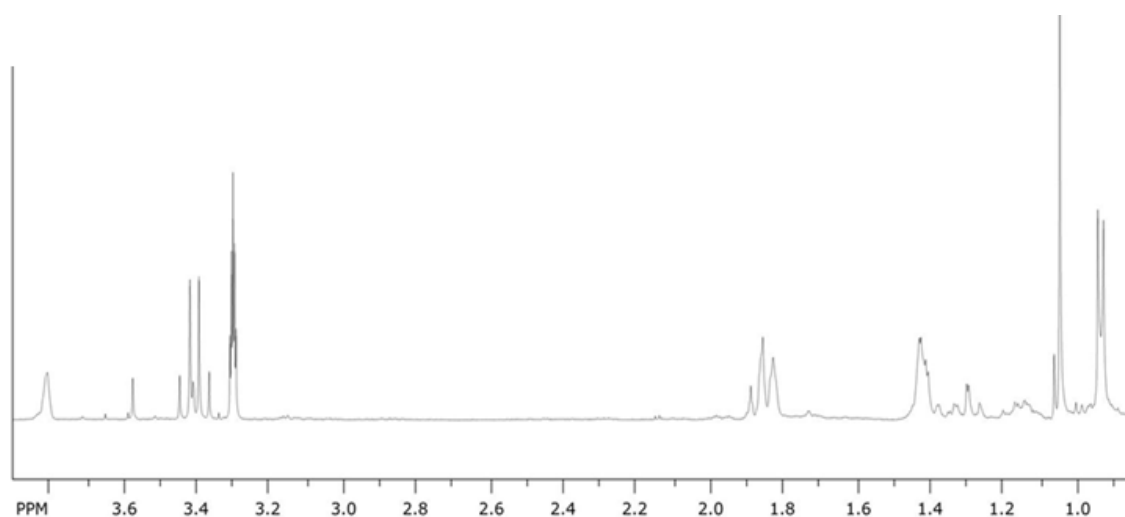


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN ^1H para a substância carvR_61 (400 MHz, CD_3OD).

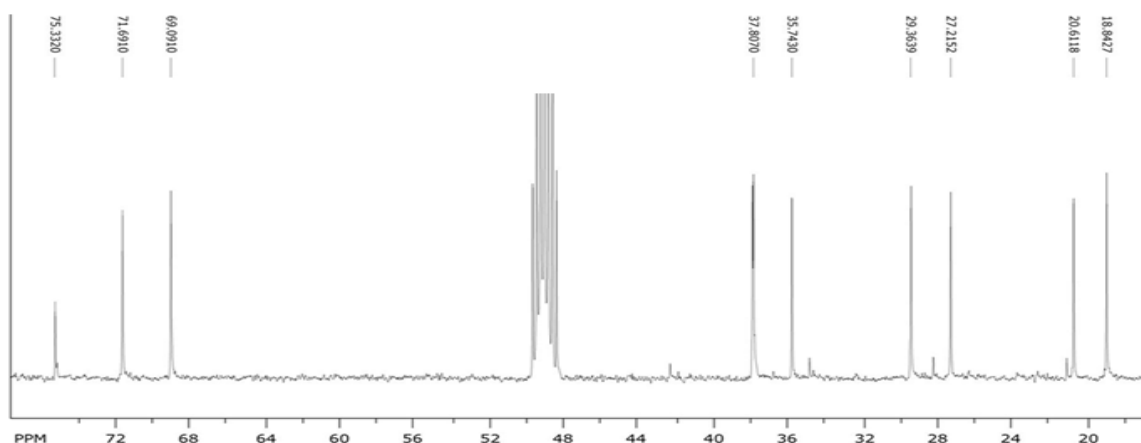


FIGURA 4.28 - Espectro de RMN ^{13}C para a substância carvR_61 (400 MHz, CD_3OD).

No espectro de carbono, vemos 10 sinais, indicando dois de metila (δ 18,85 e 20,61 ppm), cinco de metilenos e metínicos (δ 27,22, 29,34, 35,74, 37,81 e 37,86 ppm) e três de carbonos carbinólicos (δ 69,09, 71,69 e 75,31 ppm). Porém foi também realizado o experimento de dept-135 (FIGURA 4.29), a fim de se obter o número de hidrogênios ligados a cada carbono, verificando que tínhamos um carbono quaternário em δ 75,31 ppm e que tínhamos três carbonos metilênicos e dois metínicos. Partindo do esqueleto da carvona, foi possível chegar à estrutura da molécula somente com esses dados e comparações na literatura (MATSUMURA, 2001). A molécula foi identificada como sendo um mentanotriol (FIGURA 4.30).

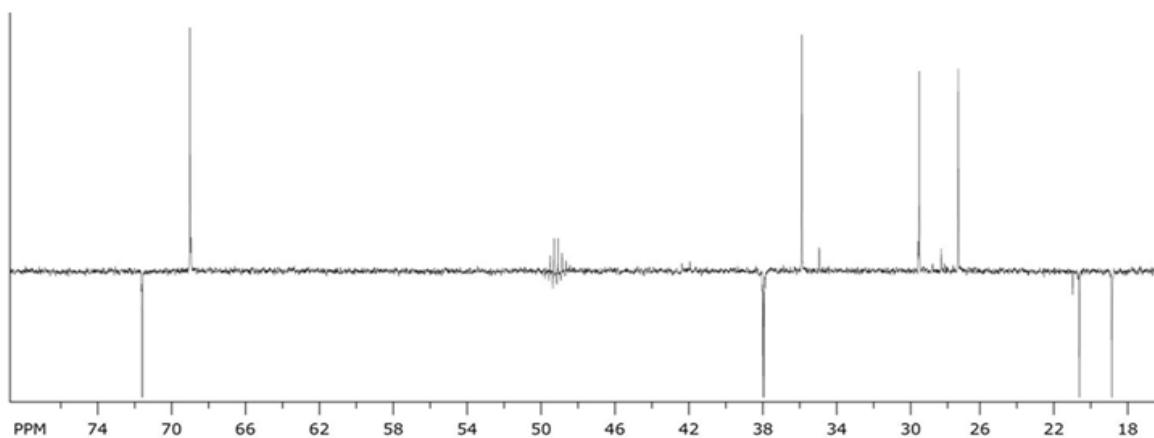


FIGURA 4.29 - Experimento de RMN dept-135 para carvR_61 (400 MHz, CD_3OD).

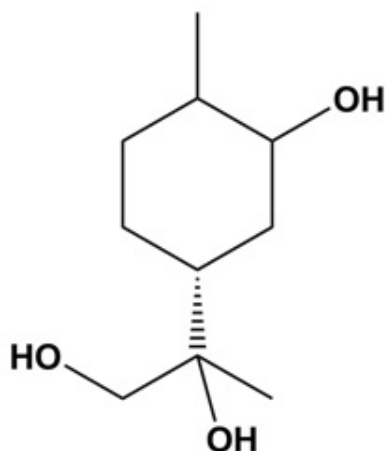


FIGURA 4.30 – CarvR_61 identificado com mentanotriol.

A substância CarvR_51_9 foi submetida aos experimentos de RMN de ^1H e de ^{13}C mostrando muita semelhança com a substância identificada acima. O espectro de RMN de ^1H apresenta alguns sinais de difícil interpretação devido a presença de um isômero em menor quantidade (FIGURA 4.31).

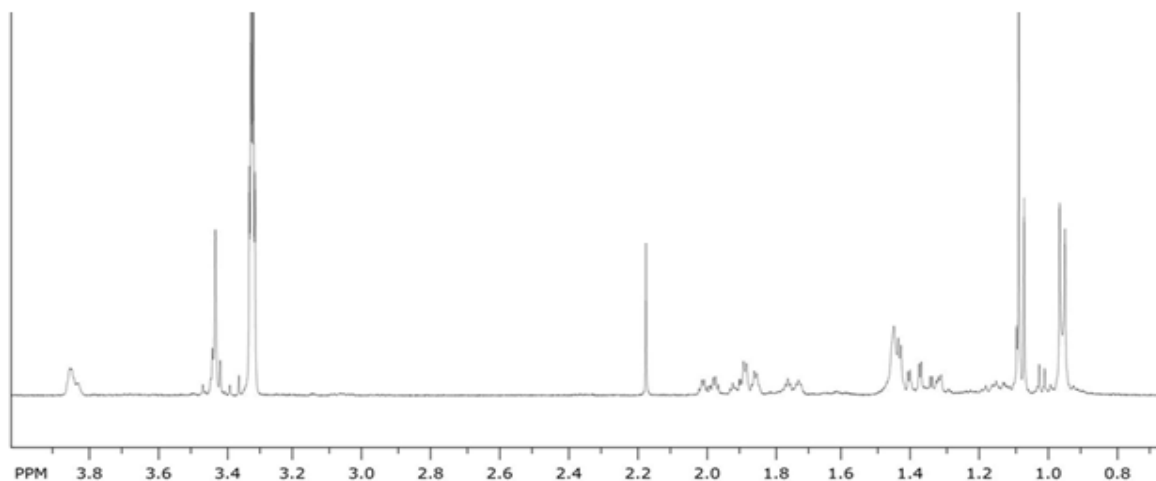


FIGURA 4.31 - Espectro de RMN ^1H para a substância carvR_51_9 (400 MHz, CD_3OD).

No espectro de RMN de ^{13}C verificamos os dez sinais muito semelhantes com o espectro de carbono da substância acima, porém com apenas

dois sinais com deslocamentos diferentes. Somente os sinais de δ 27,22 e 35,74 ppm da substância CarvR_61 foram deslocados para δ 28,14 e 34.,80 ppm nesta molécula (FIGURA 4.32).

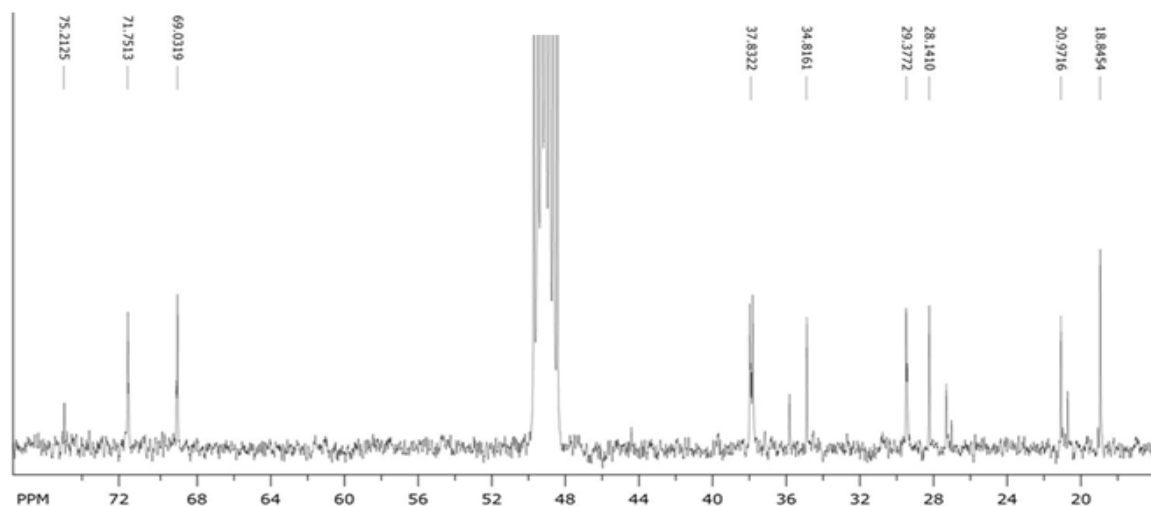


FIGURA 4.32 - Espectro de RMN ^{13}C para a substância carvR_51_9 (400 MHz, CD_3OD).

De acordo com os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , com os dados de RMN 2D e com a literatura (MATSUMURA, 2001), foi possível identificar a substância como sendo também um mentanotriol. Esse mentanotriol isolado é um isômero do identificado acima, mudando a posição da hidroxila no carbono 8. Os hidrogênios do carbono 9 se correlacionam a distância com os hidrogênios do carbono 3 e 5, de acordo com a posição da hidroxila, fazendo com que o deslocamento químico desses dois carbonos mudem entre as moléculas. As substâncias foram submetidas a LC-MS para confirmação da massa, gerando íon de m/z 211 ($\text{M}+\text{Na}^+$), e comprovando que os dois são isômeros, fortalecendo a identificação estrutural (FIGURA 4.33).

Algo curioso de se notar é que esses dois isômeros encontrados somente no experimento da (4R)-carvona foram, até o ano de 2011, isolados somente do fruto do *Carum carvi*, que é uma das principais fontes de carvona existentes na natureza, sendo que o nome carvona provém do nome desta planta. Esse fato nos leva a pensar na possibilidade de que micro-organismos endofíticos

podem estar produzindo este produto, e não a planta em questão (MATSUMURA, 2011).

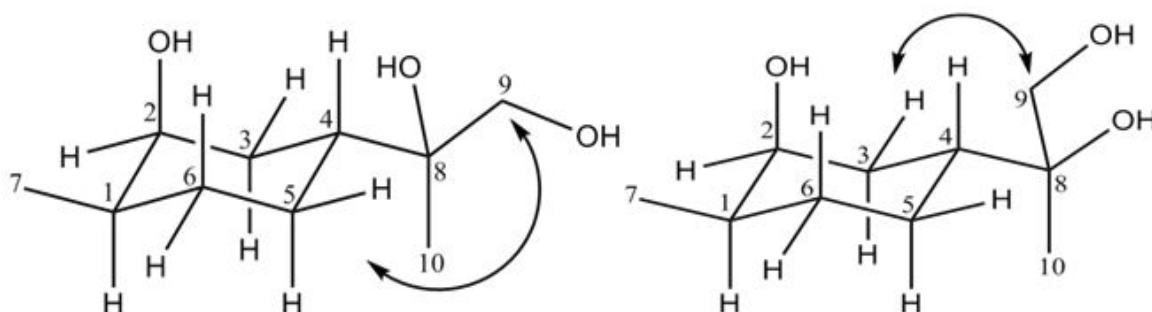


FIGURA 4.33 - Estrutura molecular de (a) carvR_61 e (b) carvR_51_9

4.3.1.2. Proposta de caminho de biotransformação para a (4R)- e (4S)-carvona

Os extratos de acetato de etila para (4R)- e (4S)-carvona, mostraram uma banda larga em CCD (FIGURA 4.34), sendo que esta banda não está presente em extratos de controle, o que sugere que está relacionada com os produtos de biotransformação. Assim, estes extratos foram analisados por GC-MS, a fim de identificar as estruturas químicas dos produtos de biotransformação por comparação com a biblioteca NIST.

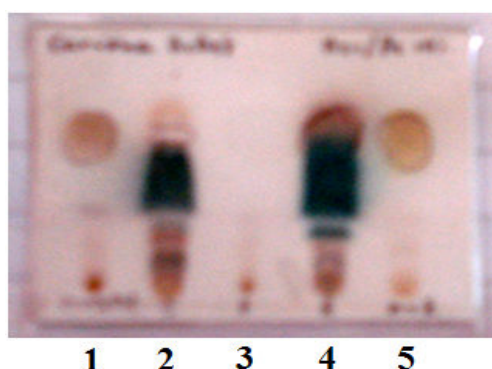
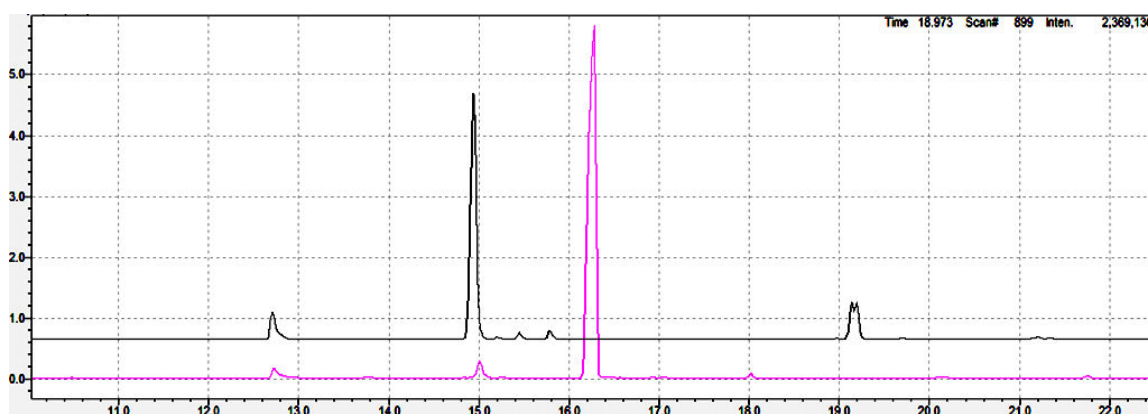


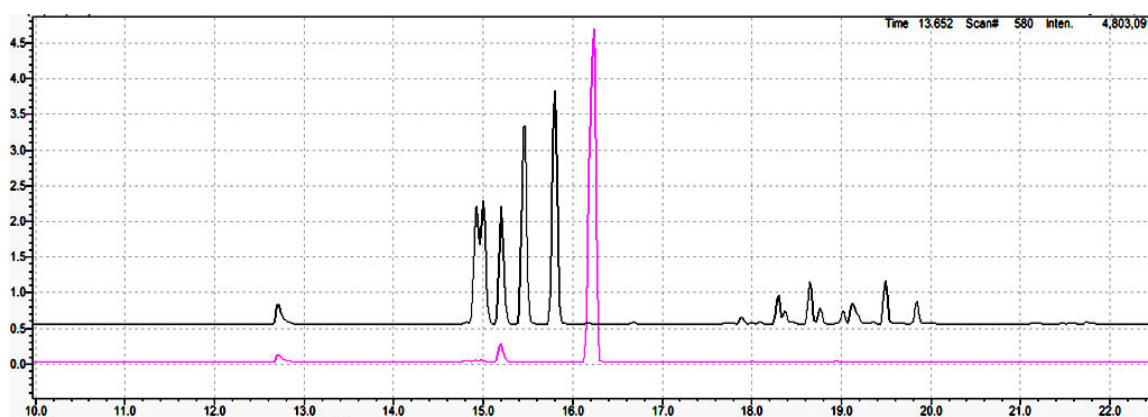
FIGURA 4.34 – CCD dos extratos de biotransformação da carvona. (1) Meio + carvona S; (2) Meio + fungo + carvona S; (3) Meio + fungo; (4) Meio + fungo + carvona R; (5) Meio + carvona R.

Em GC-MS a (4R)-carvona produziu apenas um produto de biotransformação identificado como dihidrocarveol, enquanto que o extrato de (4S)-carvona mostrou basicamente cinco bandas intensas, identificadas como sendo dois isômeros de dihicarvona, dois isômeros de dihidrocarveol, e uma banda de neo-dihidrocarveol, além de diversas bandas de baixa intensidade que não foram possíveis suas identificações (FIGURA 4.35 e FIGURA 4.36).



— Meio + (4R)-carvona — Meio + fungo + (4R)-carvona

FIGURA 4.35 – Cromatograma de GC-MS para o extrato em acetato de etila da biotransformação da (4R)-carvona.



— Meio + (4S)-carvona — Meio + fungo + (4S)-carvona

FIGURA 4.36 – Cromatograma de GC-MS para o extrato em acetato de etila da biotransformação da (4S)-carvona.

O caminho de biotransformação para ambas a (4R)- e (4S)-carvona seguem caminhos diferentes. Para a (4R)-carvona o primeiro passo de biotransformação é a redução enantioseletiva da ligação dupla do anel e da carbonila, sendo realizado provavelmente pelas enzimas enona redutase e carbonil redutase respectivamente, formando assim o dihidrocarveol (**1a**) (HOOK, 2003; SINGH, 2011). Em seguida, este composto é dihidroxilado na ligação dupla remanescente, resultando nos isômeros trihidroxilados: menthanotriol (**1b**).

Para (4S)-carvona a via de biotransformação é um pouco diferente e o primeiro composto produzido é a dihidrocarvona (**2a, 2b**). Esse é o resultado da redução regio-seletiva da ligação dupla endocíclica pela enona redutase e a produção máxima é em aproximadamente quatro horas (74,7%). Depois disso, o próximo passo é conversão de dihidrocarvona para dihidrocarveol (**2c, 2d**) e neodihidrocarveol (**2e**) por ação da carbonila redutase. Não foi possível identificar a configuração absoluta destes compostos, porém é possível diferencia-los por GC-MS. O caminho de biotransformação proposto é mostrado na FIGURA 4.37.

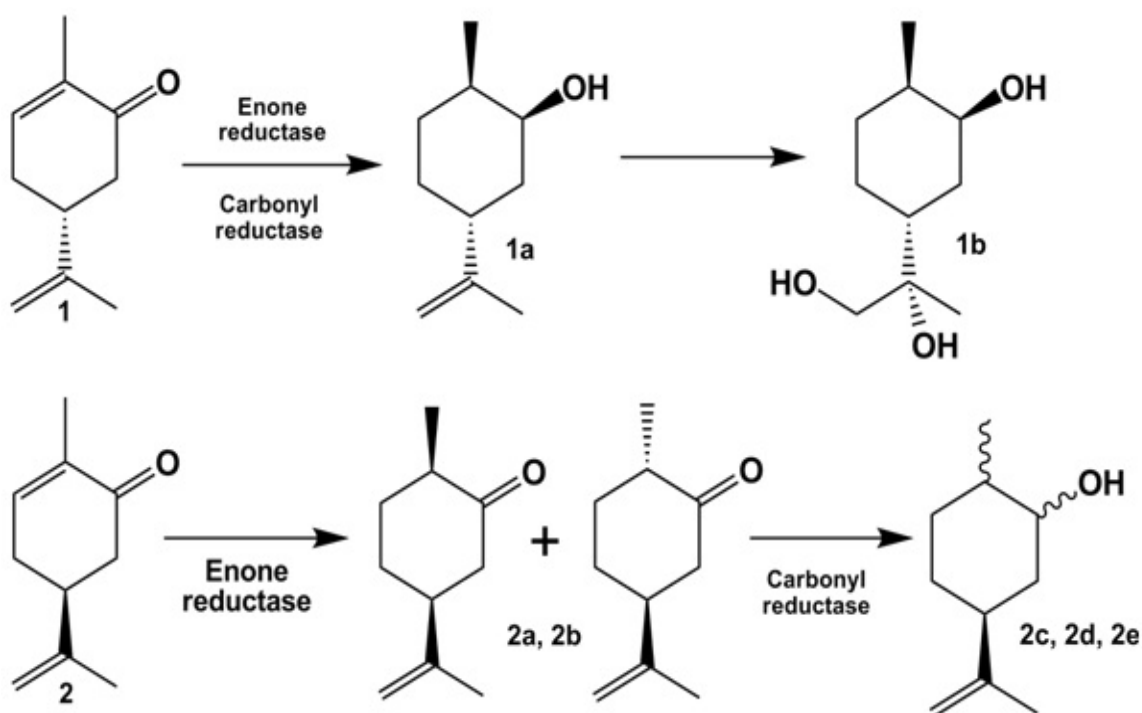


FIGURA 4.37 – Proposta de caminho de biotransformação para a (4R)- e (4S)-carvona.

4.3.1.3. Estimativa de consumo da (4R)- e (4S)-carvona e de produção de outros produtos por GC-MS

Para se realizar a estimativa de consumo da carvona e estimativa de produção para algumas substâncias, foi realizado um cultivo do fungo, sendo extraídas alíquotas do experimento em triplicata a cada 4 horas. O extrato em diclorometano foi seco e injetado no GC-MS, sendo possível a identificação de alguns produtos que já foram relatados no tópico acima, porém no gráfico mostrado abaixo é visto que em quatro horas após a adição da (4R)- e (4S)-carvona ao meio, toda a carvona é consumida, mostrando um metabolismo extremamente acelerado (FIGURA 4.38 e FIGURA 4.39). No experimento da (4R)-carvona é possível verificar que toda a carvona é consumida, sendo que 93,8% do produto formado é o (4R)-dihidrocarveol, que com o passar das horas também vai sendo consumido, provavelmente para se transformar nos mentanotrióis identificados anteriormente (FIGURA 4.38).

A transformação rápida de (4R)-carvona em (4R)-dihidrocarveol por *Mucor circinelloides* poderia ser uma ferramenta interessante na produção industrial de dihidrocarveol, uma vez que, esta biotransformação ocorre em apenas quatro horas com aproximadamente 93% de rendimento. O dihidrocarveol tem um valor agregado de aproximadamente cinco vezes mais que a carvona e, este composto é largamente utilizado como ingrediente de fragrâncias em produtos cosméticos e não-cosmético, sendo usado de 0,1-1 toneladas métricas por ano (BHATIA, 2008).

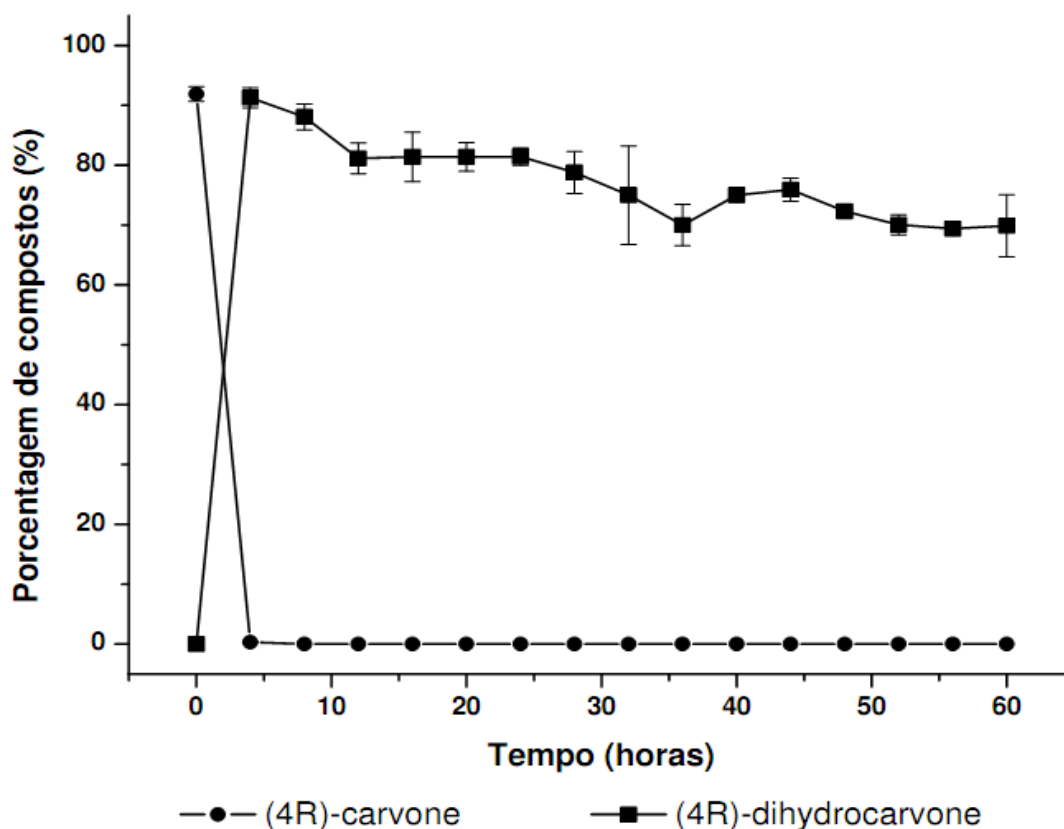


FIGURA 4.38 – Estimativa de consumo para (4R)-carvona e produção do (4R)-dihidrocarveol.

No experimento com a (4S)-carvona vemos também a rápida conversão da carvona (4 hs), porém o produto principal formado é a (4S)-dihidrocarvona com 74,7 % de conversão em 4 horas. Conforme as horas vão passando vemos um decréscimo do nível de (4S)-dihidrocarvona, sendo que em 60 horas encontramos somente em torno de 11% deste entre as bandas identificadas no GC-MS. Provavelmente a (4S)-dihidrocarvona vai sendo convertida em outros produtos, como podemos acompanhar no gráfico o crescimento na produção de dois isômeros de (4S)-dihidrocarveol e do (4S)-neo-dihidrocarveol (FIGURA 4.39).

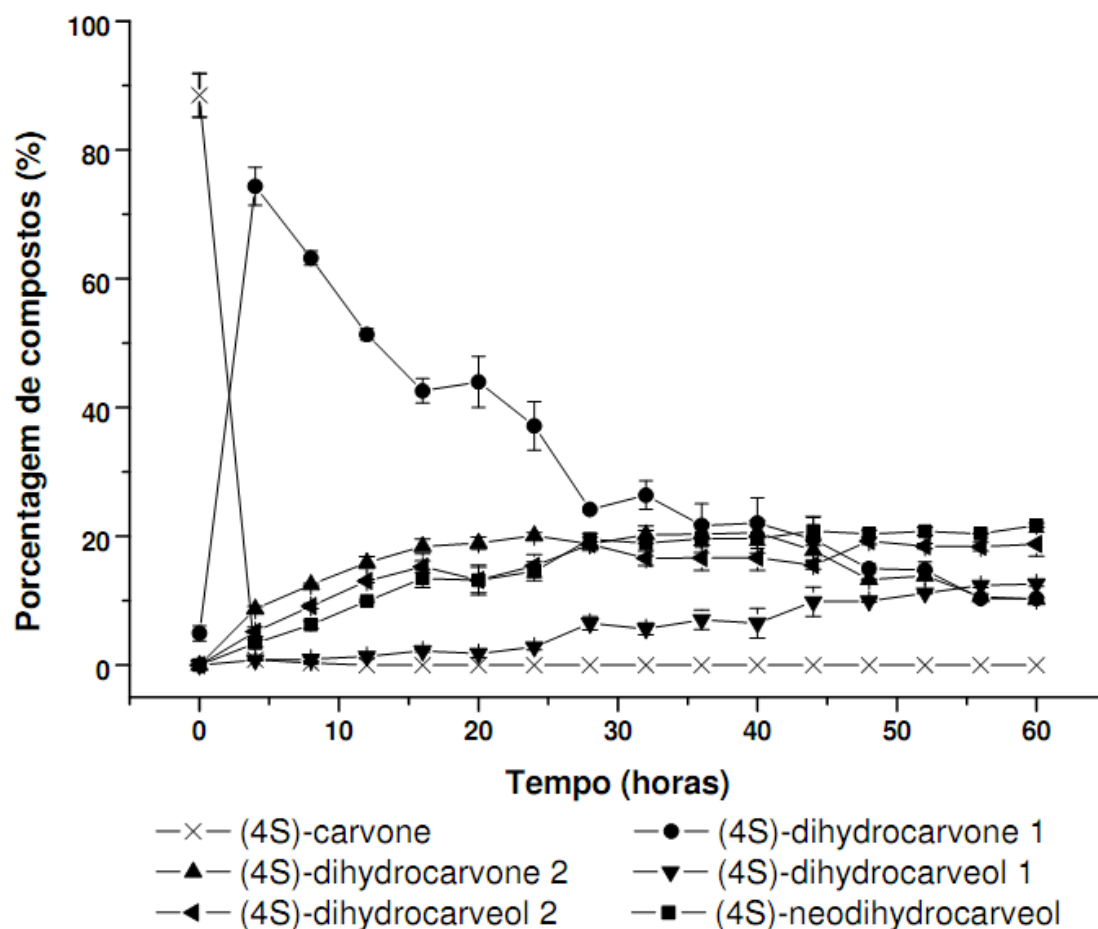


FIGURA 4.39 – Estimativa de consumo para (4S)-carvona e produção para (4S)-dihydrocarvona, (4S)-dihydrocarveol e (4S)-neodihydrocarveol.

4.3.1.4. Estimativa de produção de mentanotrióis

Os extratos n-butílicos foram analisados por HPLC-MS/MS para verificar a produção de outros produtos de biotransformação e para a estimativa de produção dos menthanotrióis já isolados. Em HPLC-MS/MS foi verificado como produto de biotransformação apenas os sinais de m/z 211, referentes ao $[M+Na]^+$ dos dois isômeros de menthanotriol. As análises foram realizadas com experimentos de SRM (Selected Reaction Monitoring), buscando a massa selecionada dos produtos como monitoramento da produção dessas substâncias durante 60 horas. Pelas análises é possível verificar que a produção dos

mentanotrióis começa em 8 horas com um máximo de produção em torno de 48 horas (FIGURA 4.40).

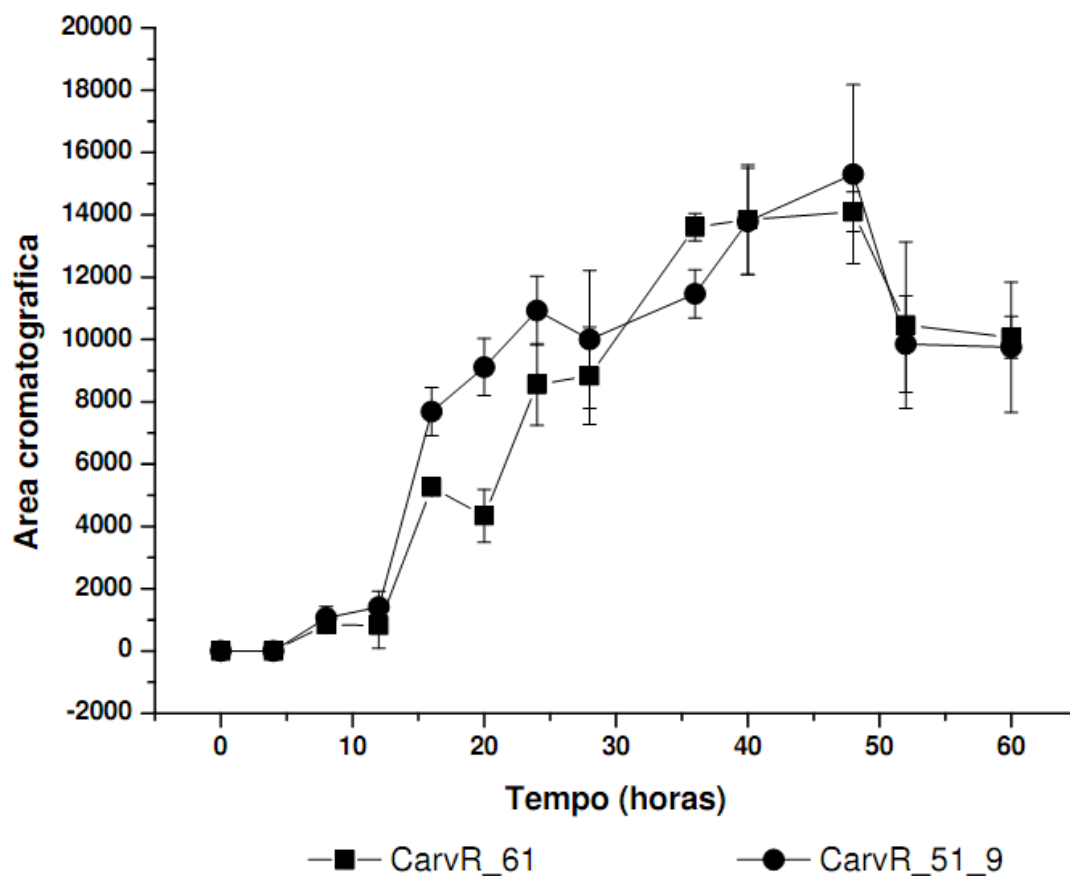


FIGURA 4.40 – Estimativa de produção para os dois isômeros de mentanotrióis isolados

As análises do extrato n-butílico por LC-MS/MS não mostraram produtos de biotransformação para (4S)-carvona, sendo identificado os dois isômeros de menthanotriol somente para a (4R)-carvona, mostrando uma conversão enantioselectiva pelo fungo *M. circinelloides*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. Conclusões e considerações finais

Com o estudo de diferentes meios de identificação do fungo, foi possível verificar a eficiência da identificação morfológica, que pode ser usado como primeiro meio de identificação. Para a identificação morfológica é necessário que o fungo produza unidades reprodutivas, pois somente com a visualização do micélio não é possível a identificação do gênero e espécie de estudo, necessitando outras técnicas para isso. Sequenciamento genético é o meio mais usado e confiável de identificação, porém requer uma demanda maior de tempo como também equipamentos de alto custo, sendo importante o estudo de novos métodos de identificação como o encontrado na análise por MALDI-TOF, que tem se mostrado um meio bem rápido e eficiente de análise apresentando uma boa confiabilidade, mas para isso é preciso maiores estudos para o preparo de amostras e para a formação de banco de dados com variabilidade de microorganismos.

A cepa de *Mucor circinelloides* isolada de *Pinus taeda* apresentou a produção de substâncias pouco comuns de serem encontrados em fungos, como o 3-epi ergosterol e o 3-glucopiranosil sitosterol. O ergosterol epimerizado pode ser importante para a identificação de atividades biológicas associadas aos derivados dessa molécula. O sitosterol glicosilado pode nos mostrar uma associação ambiental importante no qual o fungo, por algum motivo, aprende a sintetizar essa molécula, que é geralmente produzida por plantas, através do contato com seu hospedeiro.

Outra associação ambiental relevante é a capacidade e facilidade de biotransformação da carvona por *M. circinelloides*, sendo esta molécula muito presente em diferentes plantas, como em espécies de *Pinus*. A biotransformação da carvona nos mostra a capacidade do fungo para realizar redução e oxidação na mesma molécula, como na produção dos mentanotrióis isolados.

Com a biotransformação da carvona é possível verificar a produção de diferentes substâncias em tempos muito curtos, podendo ser uma boa ferramenta para o desenvolvimento na área de biotecnologia. Em apenas 4 horas

de fermentação temos todo o consumo da (4R)- e (4S)-carvona e a produção em grande quantidade de (4R)-dihidrocarveol, que é um produto com valor de aproximadamente cinco vezes maior que a carvona, sendo muito usado na indústria.

Devido a sua grande capacidade biotecnológica este fungo pode ser muito explorado como ferramenta em biotransformações e biossínteses, principalmente em compostos com insaturações, no qual se mostrou muito eficiente para modificações.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências bibliográficas

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; GALLARD, J. F.; MARTIN, M. -T.; RETAILLEAU, P.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; OUZZANI, J. "Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 2456-2459.

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. Nova York: Academic Press, 1988.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Zygomycota: Class Zygomycetes. In: *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 127-171.

AMARAL, L. "Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica*". *Dissertação de mestrado*, 2009.

BARATTA, M. T. "Chemical composition, antimicrobial and anti-oxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils". *Journal of Essential Oil Research*, 1998, 10, 618-627.

BASTOS, D. Z. L. "Biotransformação por fungos do ácido betulínico e derivados". *Tese de doutorado*, 2005.

BERGER, R.G. "Aroma biotechnology", Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1995.

BHATIA, S. P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S. and API, A. M. "Fragrance material review on dihydrocarveol". *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46, S123-S125.

CHAYAKULKEEREE, M.; GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. "Zygomycosis: the re-emerging fungal infection". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2006, 25, 215-229.

CHEN, Y. -K.; KUO, Y. -H.; CHIANG, B. -H.; LO, J. -M.; SHEEN, L. -Y. "Cytotoxic Activities of 9,11-Dehydroergosterol Peroxide and Ergosterol Peroxide from the Fermentation Mycelia of *Ganoderma lucidum* Cultivated in the Medium Containing Leguminous Plants on Hep 3B Cells". *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 5713-5719.

CHOMCHEON, P. "Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36". *Phytochemistry* 70: 407-413, 2009.

CORREIA, A., SAMPAIO, P., JAMES, S., PAIS, C. "Candida bracarensis sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*". *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2006, 56, 313-317.

CRAMAROSSA, M. R. *et al.* "Biocatalytic reduction of (+)- and (-)-carvone by bacteria". *C. R. Chimie*, 2005, 8, 849-852.

DAVITT, A. J.; STANSBERRY, M.; RUDGERS, J. A. "Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability?" *New Phytologist*, 2010, 188, 824-834.

DEMAIN, A. L. "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 52, 455-463.

DEMAIN, A. L. "Induction of microbial secondary metabolism". *International Microbiology*, 1998, v. 1, 259-264.

DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Report.*, 1983, v.1, 19-20.

DEMYTTENAERE, J.C.R. "Biotransformation by microorganisms". In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). *Studies in natural products chemistry*, 2001, Vol.25, p.125.

DEWICK, P.M. "Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach". 3^o Edition. Englan: John Wiley & Sons. 2009.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. "Compendium of soil fungi". London: Academic Press, 2v.,1980.

FABER, K. "Biotransformations in organic chemistry". 3^a. ed. Germany:Springer-Verlag Heidelberg. 1997, p402.

FONSECA, A. L. *Antibióticos na clínica diária*. Rio de Janeiro: Epume, 1984.

GANESAN, A. "The impact of natural products upon modern drug discovery". *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, v.12, 306-317.

GHASEMI, Y.; MOHAGHEGHZADEH, A.; MOSHAVASH, M.; OSTOVAN, Z.; RAEI, M. J.; MOSAVI-AZAM, S. B. "Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla*". *World J. Microbiol Biotechnol*, 2009, 25, 1301–1304.

GRIFFITHS, K. M.; BACIC, A.; HOWLETT, B. J. "Sterol composition of mycelia of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*". *Phytochemistry*, 2003, 62, 147-153.

HAN, B. -Z.; ROMBOUTS, F. M.; NOUT M. J. R. "A Chinese fermented soybean food" *Int. J. Food Microbiol.* 2001, 65, 1–10.

HANSON, J. R. "The microbiological transformations of diterpenoids". *Nat. Prod. Rep.* 9:139, 1992.

HARVEY, A. L. "Natural products in drug discovery". *Drug Discovery*, 2008, v.13, 894-901.

HETTICK, J. M.; GREEN, B. J.; BUSKIRK, A. D.; KASHON, M. L.; SLAVEN, J. E.; JANOTKA, E.; BLACHERE, F. M.; SCHMECHEL, D.; BEEZHOLD, D. H. "Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting". *Analytical Biochemistry*, 2008, 380, 276–281.

HIROSE, Y. *Production and isolation of enzymes*. In: DRAUZ, K., WALDMANM, H. (Ed.). *Enzymes catalyses in organic synthesis: a comprehensive hand book*. 2th Edition. Wiley-VCH., 2002, 41-67.

HOLLMANN, F.; ARENDS, I. W. C. E.; HOLTSMANN, D. "Enzymatic reductions for the chemist". *Green Chem.*, 2011, 13, 2285–2313.

HOOK, I. L.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. "Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae". *Phytochemistry*, 2003, 63, 31-36.

HUTCHINSON, C.R. ; *Manipulation microbial metabolites for drug discovery and production*. In: ZANG, L., DEMAINE, A.L.. *Natural products: drug discovery and therapeutic medicine*. Huma press. Totowa. P.77-93. 2005.

KELLY, D. R.. *Biotransformations – Pratical aspects*. In: REHM, J.H., REED, G., KELLY, D.R. (Ed.). *Biotechnology: second completely revised edition*. *Biotransformation I*. v. 8a. Wiley-VCH.p. 26-33.1998.

KING, A. J.; DICKINSON, J. R. "Biotransformation of aroma terpenoids by ale and lager yeast". *FEMS Yeast Research*, 2003, v. 3, 53-62.

MA, L.; LIU, X.; LIANG, J.; ZHANG, Z. "Biotransformations of cinnamaldehyde, cinnamic acid and acetophenone with *Mucor*". *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 27, 9, 2133-2137.

MA, X. -C. *et al.* "Microbial transformation of curdione by *Mucor spinosus*". *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38, 367–371.

MATSUMURA, T.; ISHIKAWA, T.; KITAJIMA, J. "New p-menthanetriols and their glucosides from the fruit of caraway". *Tetraedron*, 2001, 57, 8067-8074.

MEDEIROS, L. S. de, "Estudo químico e biológico de micro-organismos endofíticos associados às frutas banana, pêra e goiaba", *Dissertação de Mestrado*, 2010, p. 164.

MITSUKURA, K.; IMOTO, T.; NAGAOKA, H.; YOSHIDA, T.; NAGASAWA, T. "Regio- and stereo-selective hydroxylation of abietic acid derivatives by *Mucor circinelloides* and *Mortierella isabellina*". *Biotechnology Letters*, 2005, 27, 1305–1310.

MORRISH, J. L. E.; DAUGULIS, A. J. "Inhibitory effects of substrate and product on the carvone biotransformation activity of *Rhodococcus erythropolis*". *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 1245.

PANDIT, S.P.; RAHEEMA, M.A. "Mucormycosis in acute myeloid leukaemia". *Br. J. Haematol.*, 2003, 121(3), 382.

PATEL, R. N. "Stereo selective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates". *Advanced Applied Microbiology*. v.43, p. 91-140, 1997.

PEARCE, C. "Biologically Active Fungal Metabolites". *Advances in Applied Microbiology*, 1997, 44, 1-80.

PELÁEZ, F. "The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat ?". *Biochemical Pharmacology*, 71: 981-990, 2006.

PELCZAR, M. J.; SHAN, E. C. S.; CRIEG, N. R., "Microbiologia: Conceitos e Aplicações". Makron Books: New York, 1981; Vol. 2.

PETRINI, O., SIEBER, T. N., TOTI, L., VIRET, O. "Ecology, metabolite, production and substrate utilization in endophytic fungi". *Natural Toxins*, 1992, 1, 185-196.

RIBES, J.A.; VANOVER-SAMS, C.L.; BAKER, D.J. "Zygomycetes in human disease". *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000, 13: 236-301.

RUSSO, A.; CARDILE, V.; PIOVANO, M.; CAGGIA, S.; ESPINOZA, C. L.; GARBARINO, J. A. "Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7,22-dien-5 α -hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells". *Chemico-Biological Interactions* , 2010, 184, 352–358.

SAHA, B. C. "Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*". *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1871-1876.

SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H.; OHKI, T. "6 β -hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cemuus*". *Phytochemistry*, 22: 2553, 1983.

SHAN, L.-H.; LIU, H. –M.; HUANG, K. –X.; DAI, G. –F.; CAO, C. and DONG, R. –J. “Synthesis of 3 β ,7 α ,11 α -trihydroxy-pregn-21-benzylidene-5-en-20-one derivatives and their cytotoxic activities”. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, 19, 6637–6639.

SILVA, B. F. Da “Estudo do potencial enzimático de micro-organismos endofíticos para a biotransformação de produtos naturais e análogos sintéticos”. Tese de doutorado, UFSCar, 2009.

SINGH, A.; CRISTI, Y.; BANERJEE, U. C. “Production of carbonyl reductase by *Metschnikowia koreensis*”. *Bioresource Technology*, 2011, 102, 10679-10685.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. “Isolation of an Antitumor Compound from *Agaricus blazei* Murill and Its Mechanism of Action”. *J. Nutr.* 2001, v. 131, 5, 1409-1413.

TINTJER, T.; RUDGERS, J. A. “Grass-herbivore interactions altered by strains of a native endophyte”. *New Phytologist*, 2006, 170, 513-521.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O.F., CANDEIAS, J.A. *Microbiologia*, 3ª Ed. São Paulo: Ateneu, 1996.

VIRALLY, M. L. *et al.* “Pulmonary mucormycosis in a diabetic patient with HIV”. *Diab. Care.*, 2002, 25(11), 2105.

XIA, C.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; HU, B. “A new cultivation method for microbial oil production: cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*”. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4:15.

YANISHLIEVA, N. V., MARINOVA, E. M., GORDON, M. H., RANEVA, V. G. “Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems”. *Food Chemistry*, 1999, 64, 59-66.