



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Aplicação da Espectrometria de Massas na Derreplicação de Extratos Brutos
Produzidos Por Actinobactérias Isoladas da Rizosfera do Milho (*Zea mays L.*)”**

Ana Flávia Canovas Martinez

Dissertação apresentada à
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Aplicação da Espectrometria de Massas na Derreplicação de Extratos Brutos
Produzidos Por Actinobactérias Isoladas da Rizosfera do Milho (*Zea mays L.*)”**

Ana Flávia Canovas Martinez

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Martinez, Ana Flávia Canovas

“Aplicação da Espectrometria de Massas na Derreplicação de Extratos Brutos Produzidos Por Actinobactérias Isoladas da Rizosfera do Milho (*Zea mays L.*)” 132 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientador: de Moraes, Luiz Alberto Beraldo.

1. Derreplicação. 2. Bioherbicidas. 3. Produtos Naturais. 4. Espectrometria de massas.

Folha da Aprovação

Ana Flávia Canovas Martinez

“Aplicação da Espectrometria de Massas na Derreplicação de Extratos Brutos Produzidos Por
Actinobactérias Isoladas da Rizosfera do Milho (*Zea mays L.*)”

Aprovada em:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor.

Albert Einstein

Dedicatórias

A Deus pela oportunidade de viver;

Aos meus pais pelo amor e incentivo de estudar e crescer;

Ao meu Lindo amor Tiago DaMãe pela amizade, carinho e companheirismo;

Ao meu irmão que é um amigo leal;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes pelos ensinamentos, não só químicos, mas de humanidade e humildade;

Aos meus irmãos científicos que tornam o trabalho mais valoroso!

E a todos que torceram por mim!!!

Muito Obrigada!!

Agradecimentos

Ao meu orientador pela oportunidade de aprender;

Ao prof. Dr. Marcos Eberlin, a Elaine e ao Yuri do Laboratório Thomson da Unicamp;

Ao prof. Dr. Itamar de Mello, a Flavia e a Sarah do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa – Jaguariúna;

Ao prof. Dr. Luis Henrique de Souza Guimarães e a prof^a Dr^a. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli da microbiologia da FFCLRP – USP;

Às professoras Dr^a. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes e Dr^a. Mônica Puppo pelas sugestões valiosas no exame de qualificação;

Aos técnicos Mércia, Djalma e Vinicius pelas análises e, principalmente pela amizade dispensada nestes anos;

A Ana Masson pela ajuda e amizade;

Aos doutores Fabio Barros e Eduardo Meurer da Core Clinical Research;

A FAPESP;

A CAPES;

Ao CNPq.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Metabólitos Secundários..... | 2 |
| 1.2 Os Policetídeos (Aplicações e Biossíntese)..... | 5 |
| 1.3 Bioherbicidas | 10 |
| 1.4 Derrepliação de Extrato Bruto..... | 13 |
| 1.5 Versatilidade Analítica da Espectrometria de Massas | 21 |
| 2. Objetivos..... | 24 |
| 2.1 Objetivo Geral | 25 |
| 2.2 Objetivo Específico | 25 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 25 |
| 3.1 Materiais Utilizados | 26 |
| 3.1.1 Equipamentos | 26 |
| 3.1.2 Solventes e Reagentes..... | 27 |
| 3.2 Métodos..... | 27 |
| 3.2.1 Isolamento e Identificação das Actinobactérias..... | 27 |
| 3.2.2 Obtenção dos Extratos..... | 28 |
| 3.2.3 Bioensaio de Fitotoxicidade utilizando Lemna minor..... | 28 |
| 3.2.4 Variações dos meios de fermentação - Análises de perfil químico e atividade fitotóxica | 30 |
| 3.2.5 Fermentações Variando a Idade de Repique da Cepa..... | 31 |
| 3.2.6 Análises por Espectrometria de Massas (MS)..... | 32 |
| 3.2.7 Desenvolvimento do método cromatográfico..... | 32 |
| 3.2.8 UPLC - MS..... | 33 |
| 3.2.9 Análise de Infra - Vermelho..... | 33 |
| 3.2.10 Análises de Ressonância Magnética Nuclear..... | 34 |
| 3.2.11 Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (GC - MS)..... | 34 |
| 4. Resultados e Discussão..... | 35 |
| 4.1 Screening..... | 36 |
| 4.2 Derrepliação do Extrato da Actinobactéria 36 (50 PL)..... | 44 |
| 4.3 Estudo de Perfil Químico: Actinobactéria 17 (39 PL) | 51 |
| 4.4 Derrepliação do Extrato Ativo da Actinobactéria 17 (39 PL) em Meio BD..... | 62 |
| 4.5 Caracterização Estrutural do Composto com Atividade Fitotóxica produzido pela Actinobactéria 17 (39 PL) Fermentada em Meio BD..... | 78 |
| 4.6 Aplicação da Espectrometria de Massas na Química de Produtos Naturais | 95 |

| | |
|--|-----|
| 4.6.1 Experimentos de Perda Neutra | 95 |
| 4.6.2 Experimentos de MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas | 99 |
| 5. Conclusões..... | 105 |
| 6. Referências | 108 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Mevastatina (1), Lovastatina (2), Simvastatina (3) e Pravastatina (4): Metabólitos secundários e seus derivados utilizados pela indústria farmacêutica. | 4 |
| Figura 2: Ciclosporina (5) e Daptomicina (6), compostos ativos de origem microbiana. | 5 |
| Figura 3: Esquema geral da síntese de policetídeos e alguns exemplos. | 6 |
| Figura 4: Doxorrubicina (13), FK 506 (14), Avermectina (15), e Spinosina (16): Policetídeos com diversas atividades biológicas. | 9 |
| Figura 5: O Bialaphos (17) é metabolizado produzindo as Fosfinotricinas (18), que apresentam atividade de inibição da GS. A partir das Fosfinotricinas foi desenvolvido Roundup® (19), herbicida sintético largamente empregado. | 12 |
| Figura 6: Anisomicina (20) foi o primeiro metabólito usado para o desenvolvimento de um herbicida sintético. | 13 |
| Figura 7: Esquema geral aplicado ao processo de derreplicação de produtos naturais no isolamento de compostos com atividade biológica. | 17 |
| Figura 8: variações possíveis nos modos de análises para os espectrômetros triplos quadrupolos. | 23 |
| Figura 9: Gráficos das porcentagens de extratos classificados pela atividade fitotóxica. | 39 |
| Figura 10: Bioensaios de fitotoxicidade com extratos de actinobactérias da rizosfera do milho. | 40 |
| Figura 11: Espectros de massas dos extratos ativos dos microrganismos da rizosfera do milho: a) Extrato 12, b) Extrato 13, c) Extrato 17, d) Extrato 29, e) Extrato 36 e f) Extrato 49. | 43 |
| Figura 12: Espectros de fragmentação (MS/MS) das Leucinostatinas: a) Leucinostatina D, b) Leucinostatina H, c) Leucinostatina B e d) Leucinostatina U. | 46 |
| Figura 13: Estrutura da Leucinostatina F ($[M+H]^+ = 1105$) com as massas de seus fragmentos e seu espectro de massas. | 47 |
| Figura 14: HPLC (b) e UPLC (a) do extrato 36. HPLC: Coluna Luna C18 5 μm (100 x 4,60 mm Phenomenex), fluxo de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e a FM Água/Acetonitrila (1:1); UPLC: C ₁₈ 1,7 μm (2,1 x 50 mm), fluxo de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e a FM Água/Acetonitrila (1:1). | 50 |
| Figura 15: Bioensaio de fitotoxicidade com os extratos obtidos por fermentação em meios líquidos sintéticos. | 53 |
| Figura 16: Espectros de massas (ESI -) obtidos por fermentações em diversos meios líquidos sintéticos, a) meio 1; b) meio 2 e c) meio 3. | 53 |
| Figura 17: Resultado do bioensaio com <i>Lemna minnor</i> , extratos dos meios semi-sólidos. | 54 |
| Figura 18: Espectros de massas (ESI -) dos extratos obtidos por fermentação em meios semi-sólidos: a) Meio BD, b) arroz, c) canjica amarela e d) canjica branca. | 56 |
| Figura 19: Cromatogramas dos extratos brutos obtidos por fermentação da actinobactéria 17 (39 PL) em meios semi-sólidos. Coluna Fenil-Hexil, Fase móvel Acetonitrila/ ácido fórmico 0,1% (1:1), Fluxo 600 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. a) Meio BD, b) arroz, c) canjica amarela, e d) canjica branca. | 57 |
| Figura 20: Resultado do bioensaio com <i>Lemna minnor</i> , extratos com agitação (+ + -). | 59 |
| Figura 21: Espectros de massas variando a agitação do meio: a) fermentação realizada com agitação e b) fermentação estática. | 60 |
| Figura 22: Resultado do bioensaio com <i>Lemna minnor</i> , variando a idade da cepa. | 61 |
| Figura 23: Espectro de massas (ESI +) dos extratos com variação da idade da cepa, a) 4 dias, b) 10 dias, c) 19 dias e d) 31 dias. | 61 |

| | |
|---|----|
| Figura 24: Espectros de massas adquiridos por inserção direta: a) modo negativo (ESI-) e b) modo positivo (ESI+)..... | 63 |
| Figura 25: Deconvolução do sinal de m/z 1040.85 | 64 |
| Figura 26: Estrutura da Macroviracin A. | 65 |
| Figura 27: Espectros de massas (CID) em modo negativo de compostos de m/z 650 a 830. As figuras acima são a) m/z 669 e b) m/z 685. | 66 |
| Figura 28: Espectros de massas (MS/MS) em modo negativo de alguns compostos da região de m/z 430 a 560; (a) m/z 465 e b) m/z 479)..... | 66 |
| Figura 29: Estruturas das Julicromes encontradas no extrato bruto..... | 69 |
| Figura 30: LC-MS (ESI+ e ESI-). A coluna utilizada foi uma fenil-hexil, Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm. A fase móvel (1:1) Água/ Acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico, num fluxo de 0,6 mL.min ⁻¹ ,..... | 70 |
| Figura 31: Cromatogramas das extrações dos ions LC-MS (ESI-): a) Extrato bruto, b) m/z 749, c) m/z 717, d) m/z 633 e e) m/z 669. | 71 |
| Figura 32: Espectro de ¹ H RMN da Julicrome Q _{3,5} | 72 |
| Figura 33: Espectro HMQC da bisantraquinona Julicrome Q _{3,5} | 73 |
| Figura 34: Espectro HMBC da bisantraquinona Julicrome Q _{3,5} | 74 |
| Figura 35: Estrutura da Julicrome Q _{3,5} | 75 |
| Figura 36: Espectros de massas MS/MS de algumas Julicromes presentes no extrato da actinobactéria 17 (39 PL), a) m/z 669, b) m/z 733 e c) m/z 749..... | 77 |
| Figura 37: Proposta de fragmentação por perda de AcOH. | 77 |
| Figura 38: Resultado do bioensaio com <i>Lemna minnor</i> das frações da acinobactéria 17. Frações: 1 (- - -), 2 (- - -), 3 (+ + +), 4 (+ + -), 5 (+ + -), 6 (+ + -), 7 (+ + -), 8 (- - -), 9 (+ + -), 10 (- - -), 11 (- - -), 12 (+ + -), 13 (+ + -), 14 (- - -), 15 (- - -), 16 (- - -), 17 (- - -) e fração final (+ + -)..... | 79 |
| Figura 39: Espectro de massas (ESI-) da fração ativa da actinobactéria 17 (39PL). | 79 |
| Figura 40: Cromatograma da fração ativa. A coluna utilizada foi uma fenil-hexil, Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm. A fase móvel Acetonitrila/ ácido fórmico 0,1% (1:1), com fluxo de 0,6 mL.min ⁻¹ | 80 |
| Figura 41: Extração do íon de m/z 479 do cromatograma de LC-MS do extrato bruto. | 81 |
| Figura 42: Espectros de UV dos compostos Rt = 41,63 minutos e Rt = 44,54 minutos..... | 81 |
| Figura 43: Espectro de fragmentação CID: a) m/z 481 (ESI+) e b) m/z 479 (ESI-). | 82 |
| Figura 44: Espectro de fragmentação MS/MS de m/z 480 (EI). | 83 |
| Figura 45: Espectro de infravermelho da fração 03..... | 84 |
| Figura 46: Espectro de ¹ H RMN do composto de m/z 479..... | 85 |
| Figura 47: Espectro de ¹³ C RMN do composto de m/z 479..... | 86 |
| Figura 48: Espectro HMQC do composto de m/z 479. | 87 |
| Figura 49: Espectro HMBC do composto de m/z 479..... | 88 |
| Figura 50: Estrutura da série de Luminacinas. | 90 |
| Figura 51: Esquema de fragmentação observado para as Luminacinas C..... | 94 |
| Figura 52: Espectro de massas adquirido do experimento de perda neutra de 172 u.m.a..... | 96 |
| Figura 53: Proposta para a formação da Luminacina de m/z 465 encontrada no extrato bruto da actinobactéria 17 (39 PL)..... | 97 |
| Figura 55: Zoom do espectro de massas obtido no experimento de perda neutra de 60 u.m.a.. Os sinais assinalados com asterisco correspondem as Julicromes caracterizadas na literatura e que | |

| | |
|--|-----|
| estão presentes no extrato bruto..... | 98 |
| Figura 56: Espectro de massas MS/MS de alguns compostos que apresentaram perda de 60 u.m.a., mas que não foram caracterizados como Julicromes. a) m/z 659, b) m/z 719 e c) m/z 763. | 99 |
| Figura 57: Gráfico dos dias de fermentação <i>Versus</i> Área; Experimento do MRM (479 > 275)..... | 100 |
| Figura 58: Gráfico dos dias de fermentação <i>Versus</i> Área; Experimento do MRM (465 > 275)..... | 101 |
| Figura 59: Gráfico dos dias de fermentação <i>Versus</i> Área; Experimento do MRM (669 > 609)..... | 102 |
| Figura 60: Gráfico dos dias de fermentação <i>Versus</i> Área; Experimento do MRM (749 > 689)..... | 102 |
| Figura 61: Gráfico dos dias de fermentação <i>Versus</i> Área; Experimento do MRM (731 > 671)..... | 103 |
| Figura 62: Comparação das produções das Julicromes. Em amarelo: Julicrome Q _{1.3} ; em azul: Julicrome Q _{3.5} e em laranja: Julicrome Q _{3.3} | 104 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Composição química dos meios líquidos*..... | 30 |
| Tabela 2: Resultados do bioensaio com <i>Lemna minnor</i> dos extratos orgânicos de actinobactérias. | 38 |
| Tabela 3: Resultados do bioensaio com <i>Lemna minnor</i> dos extratos orgânicos de actinobactérias, teste de diluição..... | 41 |
| Tabela 4: Resultado da busca pelos compostos com massa molecular entre 1104 e 1105. | 44 |
| Tabela 5: Estrutura geral das Leucinostinas. | 48 |
| Tabela 6: Resultado da busca pelos compostos produzidos pelo <i>Streptomyces shiodaensis</i> | 68 |
| Tabela 7: Comparação dos dados espectroscópicos da Julicrome Q _{3,5} encontrados na literatura com os obtidos experimentalmente..... | 75 |
| Tabela 8: Resultado das buscas no Dicionário de Produtos Naturais..... | 82 |
| Tabela 9: Comparação dos resultados observados no espectro de ressonância magnética de próton da mistura da Luminacina C ₁ e C ₂ com dados da literatura..... | 91 |
| Tabela 10: Comparação dos resultados observados no espectro de ressonância magnética de carbono da mistura da Luminacina C ₁ e C ₂ com dados da literatura. | 92 |
| Tabela 11: Correlações da Luminacina C ₁ | 93 |

Resumo

Martinez, A.F.C., “Aplicação da Espectrometria de Massas na Derreplicação de Extratos Brutos Produzidos Por Actinobactérias Isoladas da Rizosfera do Milho (*Zea mays* L.)”. 2009. 132 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo.

O objetivo deste trabalho é identificar compostos que apresentem atividade fitotóxica nos extratos produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera do milho. Para isso foram realizados estudos de derreplicação dos extratos baseados nas informações estruturais obtidas por diversas técnicas analíticas. Em especial foi aplicada a espectrometria de massas acoplada a técnicas de purificação como HPLC e UPLC com a finalidade de acelerar estes estudos de caracterização estrutural.

Baseado nos resultados obtidos foi possível concluir que os extratos oriundos de processos fermentativos apresentam potencial aplicação herbicida, uma vez que mais de 60% das amostras ensaiadas apresentaram atividade fitotóxica.

Além disso, foi possível encontrar nestes extratos diversos compostos com atividades biológicas diversas e estruturas variadas.

No extrato da actinobactéria 36 (50 PL) foram encontradas as Leucinostatinas que apresentam diversas atividades biológicas, inclusive a atividade fitotóxica objetivada neste trabalho. Já o extrato da actinobactéria 17 (39 PL) revelou as Julicromes que são pigmentos intensos e em geral amarelos, apresentando algumas atividades biológicas como antibióticas, porém não apresentou atividade fitotóxica. O composto ativo deste extrato pertence à classe das Luminacinas e apresenta diversas atividades biológicas descritas como a inibição da formação de tubos capilares que implica na interrupção do ciclo celular, podendo ser utilizada no tratamento de angiogêneses. A Luminacina C₁ apresentou excelente atividade fitotóxica que foi verificada nos bioensaios de fitotoxicidade realizados com *Lemna minor*.

Abstract

“Mass spectrometry applied to the dereplication of crude extracts from rhizosphere actinomycetes”

Microorganisms, in particular the actinomycetes are known to produce a vast number of bioactive secondary metabolites of interesting pharmaceuticals and agrochemical industry. Bioherbicides, especially the microherbicides, which are highly effective on weed control and are environmentally friendly as well, are very attractive for research and application.

This means that direct metabolite profiling techniques such as direct injection mass spectrometry or LC-MS/MS can easily be used for chemotyping/metabolomics of strains from culture collections. In this report we discuss metabolomics as part of intelligent screening for the discovery of phytotoxic compounds when used in combination with modern methods for dereplication.

As result, two microorganisms were studied and 23 metabolite peaks were identified. The metabolite profiling was then conducted using the m/z value, and MS/MS fragmentation pattern analyses. Among the peaks, one unknown compound peak was identified and it was analogous to the Luminacins series.

In order to render this approach in a more rapid and efficient way, the dereplication of crude microbial extracts with LC-hyphenated techniques (LC/UV-DAD and LC/MS) represented a strategic element to avoid finding known constituents and to target the isolation of new bioactive compounds. The development of simple and rapid phototoxic bioassays which employed *Lemna minor* was also crucial to find the active principles efficiently.

1. Introdução

1.1 Metabólitos Secundários

Alguns autores definem o metabolismo primário como universal, uniforme, conservativo e indispensável, enquanto que o metabolismo secundário é singular, diverso, adaptativo, dispensável para o crescimento e desenvolvimento do organismo, porém indispensável para a sua sobrevivência¹. Williams e colaboradores sugerem que os metabólitos secundários servem para aumentar a capacidade de sobrevivência dos organismos produtores – “por ação de receptores específicos que competem com estes organismos”. Os metabólitos primários estão envolvidos na produção de biomassas e geração de energia e estão presentes em todas as células vivas, enquanto que os metabólitos secundários são produzidos por poucas espécies².

Os metabólitos secundários apresentam diversas estruturas químicas e são produtos característicos de grupos particulares de organismos – algumas vezes usados para identificar linhagens simples (estudos de quimiotaxonomia). Esta especificidade, juntamente com as condições fisiológicas necessárias para sua produção, reforça a conclusão de que os metabólitos secundários não são essenciais para o funcionamento do metabolismo. Eles são produzidos por um metabolismo exclusivo e sua produção não apresenta uma razão imediatamente previsível para ocorrer².

Os metabólitos secundários são sinalizadores químicos que, para a maioria dos organismos vivos, são as principais formas de interação com outros organismos da mesma espécie ou de espécies diferentes. Estes sinais químicos contêm misturas de vários compostos que apresentam estruturas complexas³.

Em 1977, mais de 10.000 metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por plantas, microrganismos, insetos e mamíferos eram conhecidos. Atualmente, cerca de 100.000 metabólitos secundários com massa molecular menor que 2.500 Da são caracterizados, principalmente produzidos por microrganismos e plantas⁴. Aproximadamente 50.000 destes metabólitos secundários são produzidos por microrganismos. Dos 12.000 antibióticos conhecidos em 1995, 55% eram produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, 11% por outras actinobactérias, 12% por bactérias e 22% por fungos⁵.

Os metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas. Cerca de 4.500 metabólitos secundários da classe dos alcalóides são conhecidos, sendo os mamíferos os principais produtores. Já os microrganismos produzem principalmente policetídeos, cumarinas, lipídios, polissacarídeos e outros polímeros. As plantas produzem, majoritariamente, compostos fenólicos e quinonas⁶.

Os microrganismos se destacam pela produção de um vasto número de metabólitos secundários bioativos através de processos fermentativos ou por derivação de seus compostos, que ainda são descobertos graças à grande variedade de linhagens de microrganismos existentes e que ainda não foram estudadas⁷.

Os metabólitos secundários são uma importante fonte para a descoberta de novos fármacos⁸ e agroquímicos⁹. Os compostos produzidos por microrganismos e seus derivados contribuíram para o aumento da expectativa de vida no século passado, como fonte de antibióticos e outros medicamentos⁵.

O fato é que entre 1981 e 2002, mais de 60% de todas as drogas prescritas no mercado mundial tiveram origem natural ou eram derivadas de produtos naturais¹⁰. Por exemplo, a Mevastatina (**1**) e a Lovastatina (**2**) são metabólitos de origem fúngica, pertencentes à família das “statinas”, que inibem a coenzima A glutaril hidroximetil hepática redutase, causando a redução dos níveis de colesterol. A Lovastatina foi comercializada primeiramente pela Merck em 1987, seguida pela Simvastatina (**3**), com pequenas modificações estruturais, e pela Pravastatina (**4**), produzida por biotransformação, pela Sankyo/Squibb em 1989¹¹.

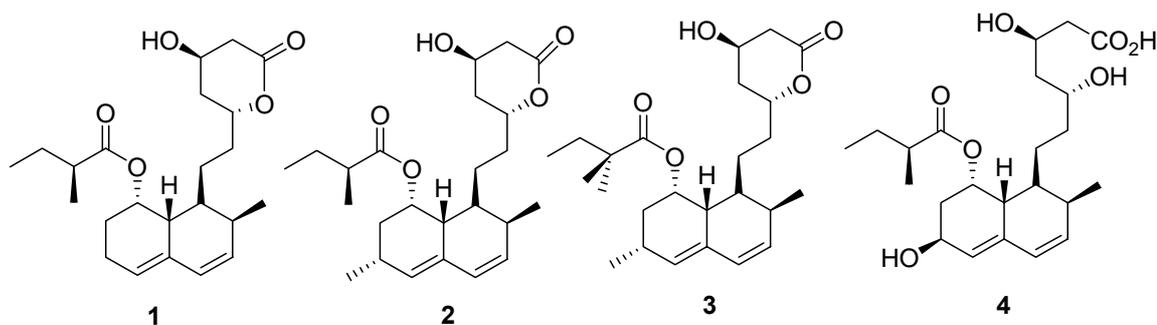


Figura 1: Mevastatina (**1**), Lovastatina (**2**), Simvastatina (**3**) e Pravastatina (**4**): Metabólitos secundários e seus derivados utilizados pela indústria farmacêutica.

A Ciclosporina (**5**), um polipeptídeo cíclico produzido pela fermentação do fungo *Tolyplocadium inflatum*, representa a maior descoberta na terapia imunossupressora^{12,13}. Já a Daptomicina (**6**), que pertence à classe dos lipopeptídeos antibióticos, teve recentemente sua utilização aprovada no tratamento de doenças de pele e infecções leves nos tecidos¹⁴.

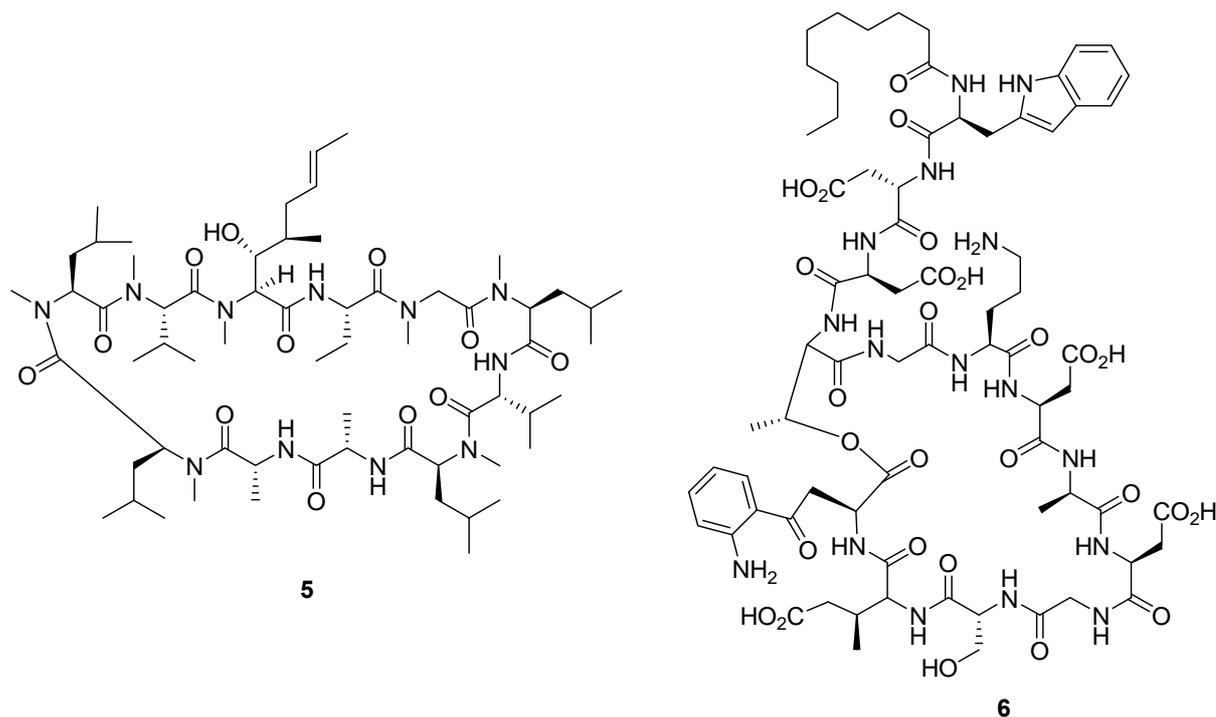


Figura 2: Ciclosporina (5) e Daptomicina (6), compostos ativos de origem microbiana.

1.2 Os Policetídeos (Aplicações e Biossíntese)

Uma importante classe de metabólitos secundários são os policetídeos. Eles são produzidos por bactérias, actinobactérias, fungos, plantas e animais. São biossintetizados pela polimerização de subunidades propinílicas e acetílicas, por um processo semelhante à síntese de ácidos graxos. Eles são os alicerces para uma gama de produtos naturais e seus derivados.

Os policetídeos são classificados em quatro grupos principais: aromáticos, macrolídeos (termo “macrolídeo” está relacionado com a estrutura - um anel de lactona de vários membros, ao qual se ligam um ou mais desoxi-glicóis), poliéteres e polienos. Apesar da sua diversidade estrutural, os policetídeos apresentam mecanismos de biossíntese comum às classes.

Os policetídeos são biossintetizados por sistemas multi-enzimáticos chamados de policetídeos sintetases (PKSs). O grande número de sintetases modula a arquitetura e as funções dos policetídeos, catalisando etapas de alongamento da cadeia policetídica, bem como as modificações estruturais pela adição de grupos funcionais^{15, 16, 17, 18, 19}.

Em cada etapa do alongamento da cadeia, um monômero do grupo acila é recrutado por precursores acil-CoA. Outros precursores típicos são os acetil-CoA, propionil-CoA e outros alquil-CoAs, podendo ser utilizados como iniciadores de cadeia, e outros como malonil-CoA e metilmalonil-CoA são utilizados somente no processo de alongamento. O tamanho do policetídeo produzido é controlado pelo número de etapas repetidas²⁰.

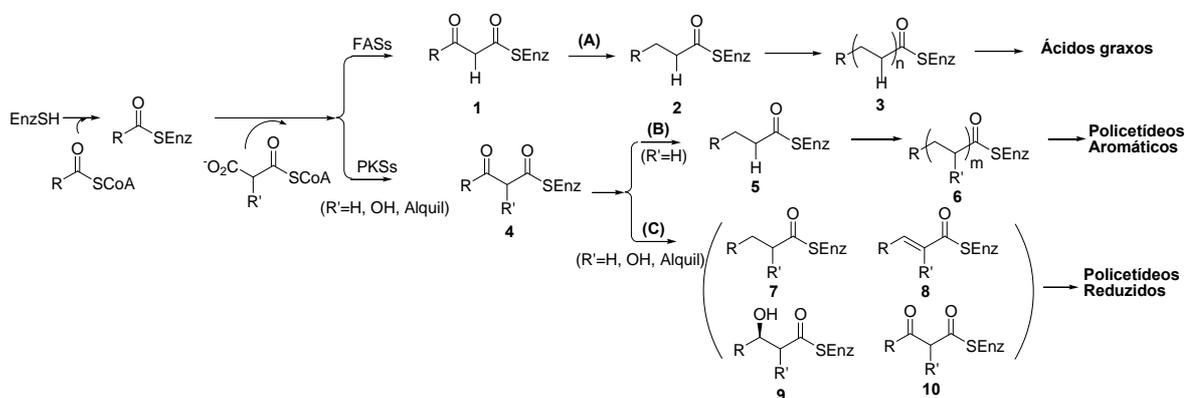
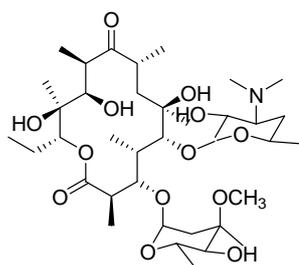
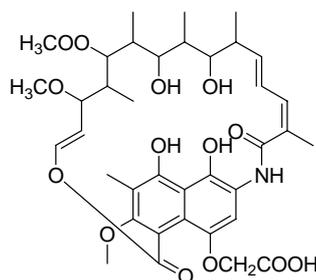


Figura 3: Esquema geral da síntese de policetídeos e alguns exemplos²¹.

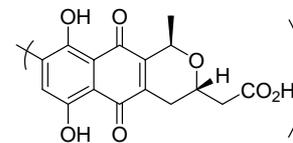
Continuação da Figura 3.



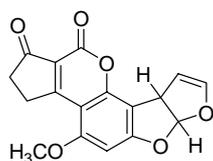
Eritromicina A (7)
Antibiótico Macrolídeo



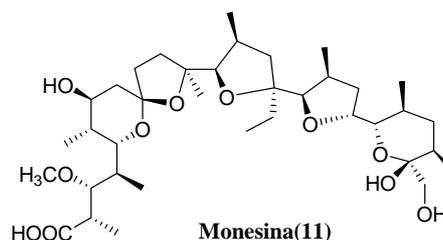
Rifamicina (8)
Antibiótico Ansamicina



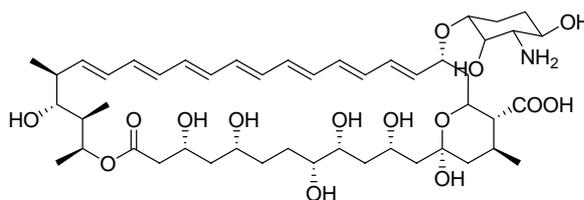
Actinorrodin (9)
Antibiótico Aromático



Aflatoxina B1 (10)
Micotoxina carcinogênica



Monesina(11)
Antibiótico Poliéter



Amphotericina B (12)
Polieno Antifúngico

As PKSs são classificados em dois tipos de acordo com sua arquitetura enzimática e sua organização genética. O tipo I são proteínas multifuncionais que são dominadas por atividades enzimáticas individuais e podem ser encontradas em bactérias, fungos e plantas. O tipo II são complexos multi-enzimáticos constituídos por proteínas monofuncionais e são encontrados apenas em bactérias.

É bem estabelecido que a biossíntese de policetídeos reduzidos seja catalisada por PKSs não interativas do Tipo I, que controlam a variação estrutural do produto desenvolvendo um conjunto de possibilidades de arranjos lineares que reproduzem a

seqüência biossintética do metabólito. E esta é a base do mecanismo para agrupar macrolídeos, poliéteres e polienos juntos como complexos ou policetídeos reduzidos.

As PKSs aromáticas catalisam a biossíntese de vários poli-ciclos, principalmente aromáticos, envolvendo um intermediário linear poli- β -cetona e usando malonil-CoA exclusivamente como unidade extensora. Os principais desafios encontrados pelos PKSs aromáticos são a escolha da unidade inicial, a determinação do número de extensões, o controle do dobramento dos intermediários lineares poli- β -cetonas e a realização regioespecíficas da redução, aromatização e ciclizações do intermediário policetídeo corretamente dobrado na produção de metabólitos policíclicos²².

Alguns policetídeos são largamente utilizados como anti-bactericidas (Eritromicina **(7)**, Tetraciclina e Rifamicina **(8)**), anti-fúngicos (Anfotericina), agentes anti-tumorais (Doxorrubicina **(13)**), imunossupressantes (FK 506 **(14)** e Rapamicina), produtos veterinários (Avermectina **(15)**, Tilosina e Monensina **(11)**) e agroquímicos (Spinosina **(16)**). Além disso, podem ser utilizados como anti-parasíticos, promotores de crescimento animal e inseticidas naturais de uso comercial.

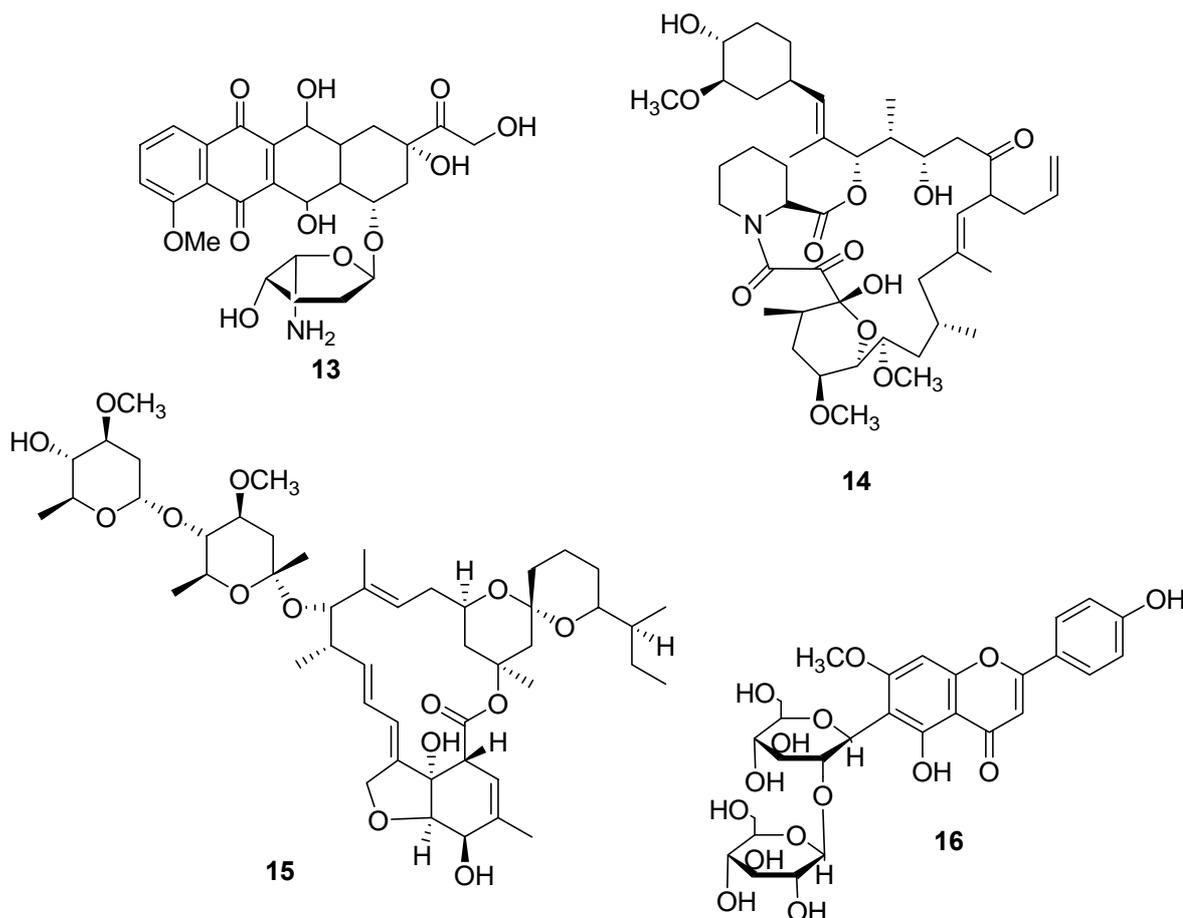


Figura 4: Doxorubicina (13), FK 506 (14), Avermectina (15), e Spinosina (16): Policetídeos com diversas atividades biológicas.

O grande número de antraquinonas naturais é um excelente exemplo de policetídeos com estruturas acetato-derivadas. A Endocrocina foi isolada de espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo formada a partir da dobra de um policetídeo contendo oito unidades de C₂ nas periferias da cadeia carbônica²³.

1.3 Bioherbicidas

Outra importante aplicação dos metabólitos secundários é a sua utilização na indústria agroquímica como pesticidas e, em especial como bioherbicidas (herbicidas naturais - compostos que apresentam atividade fitotóxica). Estimativas apontam que ainda neste século a população mundial atingirá o dobro da população atual. Com isso a produção de alimentos deverá ser suficiente para suprir esse aumento. Apesar de todo desenvolvimento tecnológico iniciado na década de 40, as pestes (ervas daninhas e insetos) continuam sendo problemas para os ecossistemas²⁴.

Os microrganismos produzem uma grande variedade de compostos com atividade fitotóxica e potencial para serem usados diretamente como herbicidas, ou como protótipos para a descoberta de novos herbicidas sintéticos²⁵. Ao contrário, as plantas não são boas referências para a obtenção de fitotoxinas, devido ao efeito autotóxico que estes compostos podem apresentar, destacando-se como fonte de outros pesticidas, particularmente os inseticidas²⁶.

As fitotoxinas são produtos do metabolismo de fitopatógenos (fungos, bactérias ou actinobactérias) capazes de causar danos nos tecidos vegetais e são responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento de doenças em plantas²⁷, e não são toxinas produzidas por plantas. Alguns microrganismos não patogênicos também podem produzir fitotoxinas, porém são mais raramente encontradas.

A maioria das fitotoxinas com potencial aplicação herbicida produzida por microrganismos possui vantagens significativas frente aos herbicidas sintéticos, tais como: tempo de meia vida relativamente curto, são mais facilmente biodegradáveis,

deixam menos resíduos tóxicos no meio ambiente podendo, muitas vezes, ser utilizadas como modelo para o desenvolvimento de novos herbicidas menos agressivos. Pode-se afirmar que a probabilidade de contaminação de alimentos, do solo e da água é menos provável de ocorrer com os herbicidas naturais do que com os sintéticos²⁴.

Outra vantagem determinante para a escolha por bioherbicidas refere-se as suas atividades específicas, invadindo a planta hospedeira, destruindo sua estrutura e provocando cloroses e necroses. Químicos e biólogos tem se atentado a estes compostos principalmente por apresentarem alvos específicos e novas estruturas químicas que dificilmente seriam sintetizadas por métodos convencionais de química combinatorial ^{28, 29}.

Embora seja considerado eficaz no controle de um número considerável de ervas daninhas, o uso de herbicidas sintéticos tem sido questionado quanto as seu impacto ambiental. Por este motivo, a busca por herbicidas naturais que não apresentem os efeitos nocivos dos herbicidas sintéticos é de fundamental importância, visando principalmente, minimizar o impacto ambiental causado por essas atividades. Além dos problemas ambientais, alguns problemas relacionados à saúde também são descritos como alergias, problemas relacionados com a reprodução e redução de crescimento²⁴.

Devido à complexidade estrutural dos metabólitos secundários que geralmente apresentam múltiplos centros quirais, sua produção via síntese laboratorial

economicamente inviável. Porém uma alternativa para a utilização destes compostos está relacionada com a obtenção de estruturas análogas a atividade biológica³⁰.

Um exemplo deste tipo de estratégia ocorreu com o isolamento do Bialafos (**17**), que é produzido por *Streptomyces viridochromogenes* e *Streptomyces hygroscopicus*. O tripeptídeo natural não inibe a Glutamina Sintetase (GS), que é uma enzima importante na assimilação de nitrogênio, na fotorrespiração e no balanço de carbono nas plantas, porém ele é metabolizado por ela produzindo a Fosfinotricina (**18**) (estrutura similar ao ácido glutâmico), que se apresenta como um potente inibidor desta biossíntese³¹.

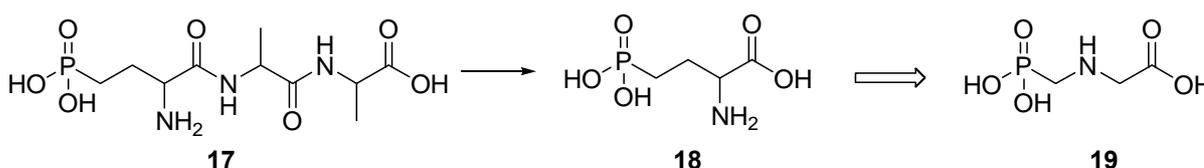


Figura 5: O Bialafos (**17**) é metabolizado produzindo as Fosfinotricinas (**18**), que apresentam atividade de inibição da GS. A partir das Fosfinotricinas foi desenvolvido Roundup® (**19**), herbicida sintético largamente empregado.

Os mecanismos de ação dos herbicidas são diversos. Alguns deles são capazes de inibir a fotossíntese e processos fisiológicos (como as anilidas, quinonas, pirazinonas, triazinedionas, hidroxibenzonitrilas, triazinas etc), bloqueando o transporte de elétrons, outros inibem a divisão celular (como as dinitroanilidas e as amidas fosfóricas), retendo a tubulina, que é a proteína que compõe os microtúbulos. Os microtúbulos são indispensáveis na divisão celular e na formação da parede celular^{32, 33}.

A Anisomicina (**20**) é produzida pelo *Streptomyces* spp e foi o primeiro metabólito produzido por microrganismos usado para o desenvolvimento do

herbicida sintético metoxifenona (3,3-dimetil-4-metoxibenzofenona)³⁴. O herbicida sintético metoxifenona (3,3-dimetil-4-metoxibenzofenona), também conhecido como metoxifenona NK - 049 foi testado em arroz e capim para determinação do seu modo de ação nas duas plantas. Diferenças marcantes foram observadas em relação à velocidade de ação e as quantidades de absorção e transporte entre as duas plantas. Quando aplicado somente na superfície das folhas, ocorreu uma rápida penetração no capim enquanto que no arroz o mesmo foi pouco absorvido. Quando aplicado nas raízes, mergulhando-as em uma solução do herbicida, a absorção foi maior pelo capim onde o mesmo foi rapidamente levado para as partes aéreas. E finalmente quando aplicado nas sementes, a quantidade absorvida pelo capim foi maior, porém um número maior de sementes de arroz absorveu o composto³⁵.

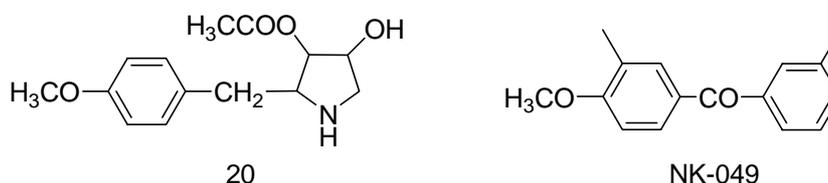


Figura 6: Anisomicina (20) foi o primeiro metabólito usado para o desenvolvimento de um herbicida sintético.

1.4 Derreplicação de Extrato Bruto

O desenvolvimento de novos fármacos envolve quatro estágios distintos: a descoberta da droga, o desenvolvimento pré-clínico, o desenvolvimento clínico e a comercialização. Esforços para acelerar cada um destes estágios contribuem para a

diminuição de tempo entre a descoberta de um novo composto com atividade biológica e sua comercialização³⁶.

As estratégias utilizadas na descoberta de novas fitotoxinas, independente da classe a que pertencem, não são diferentes das usadas na descoberta de outras moléculas bioativas como fármacos e pesticidas. A estratégia dominante é, sem dúvidas, um *screening* sistemático de um grande número de moléculas para a otimização estrutural destes compostos²⁸.

Por muitos anos, os químicos de produtos naturais se atentaram em isolar e elucidar as estruturas dos metabólitos secundários sem se preocuparem com suas atividades biológicas. Mas, com os modernos avanços em técnicas espectroscópicas e de separação, produzindo ferramentas para purificação e análises estruturais com níveis extraordinários de sensibilidade e sofisticação, os mesmos químicos se aventuraram nos isolamentos guiados por bioensaios, podendo agora entender a origem das atividades³⁷.

A aplicação de bioensaios no monitoramento da presença de compostos com atividades biológicas durante o processo de isolamento é chamado de fracionamento (ou isolamento) guiado por bioensaios. Assim, todas as frações são testadas para avaliação da suas atividades biológicas, e se o resultado for positivo serão purificadas para terem suas estruturas elucidadas³⁷.

Os bioensaios são métodos de detecção de compostos ativos e são o centro de todo o *screening* e estratégia de isolamento e derreplicação. Eles detectam compostos com atividades biológicas específicas e por isso devem ser específicos, sensíveis,

simples de operar, robustos, rápidos, baixo custo, com boa reprodução e preferencialmente passivos de automação³⁸.

Os bioensaios de fitotoxicidade consistem em ensaios que determinam a atividade fitotóxica dos metabólitos testados. Estes bioensaios avaliam se um determinado extrato pode inibir o crescimento, causar murchamento, necroses totais ou parciais, cloroses ou matar a planta utilizada como alvo, apresentando potencialidade para ser usado como herbicidas³⁹.

Alguns fatores podem complicar a realização dos bioensaios. O mais comum está relacionado com a solubilidade limitada de alguns extratos brutos ou frações, fazendo com que a alíquota da amostra não represente o extrato original. A maioria dos extratos pode ser solubilizada pela formação de complexos com polivinilpirrolidona. Em alguns casos também é possível utilizar dimetilssulfóxido (DMSO). Outros fatores que podem ocorrer e que não são fáceis de serem identificados são mudanças químicas durante a extração e a manipulação dos extratos, além de efeitos de sinergia ou antagonismo³⁷.

Um problema custoso do processo de isolamento advém da “redescoberta” de compostos já descritos na literatura. Depois de caros e demorados processos de isolamento e elucidação estrutural, encontrar uma estrutura com atividade biológica já descrita pode ser comum e indesejada. Isso acontece porque diferentes organismos podem produzir os mesmos metabólitos secundários. Cientistas da Monsanto relataram que 72% das fitotoxinas que tiveram suas estruturas determinadas na companhia já eram conhecidas⁴⁰. Entretanto, nem todos estes compostos redescobertos

já tinham sua atividade fitotóxica examinada. Um exemplo será discutido neste trabalho que identificou a classe das Leucinostatinas e das Luminacinas que já haviam sido caracterizadas, porém não tiveram sua atividade fitotóxica testada anteriormente.

A derreplicação é um processo que pode minimizar problemas como a “redescoberta” de compostos, bem como economizar tempo de pesquisa e dinheiro, acelerando o estágio de descoberta de novas substâncias com atividade biológica. A derreplicação consiste em um processo de reconhecimento e eliminação prévia de substâncias isoladas presentes em um extrato e tem sido um consenso na química de produtos naturais desde o início da pesquisa de antibióticos⁴¹.

O procedimento geral frequentemente usado envolve a separação dos componentes de extratos usando HPLC (fase reversa) e após a coluna um *splitting* distribuindo o eluente para vários detectores e um coletor de frações^{42, 43, 44, 45}. As informações obtidas dos detectores após a coluna são então analisadas e os compostos conhecidos já descritos na literatura podem ser rapidamente detectados, usando bancos de dados comerciais ou produzidos pelo próprio grupo de pesquisa⁴³.



Figura 7: Esquema geral aplicado ao processo de derreplicação de produtos naturais no isolamento de compostos com atividade biológica.

O processo de derreplicação é também importante porque ajuda a priorizar extratos para isolamento químico e agrupar amostras que contêm componentes ativos desconhecidos com perfis de derreplicação similares. Assim que o componente ativo do extrato é identificado, o perfil obtido por MS/MS pode ser utilizado para estabelecer a presença do composto em outros extratos⁴⁶.

Portanto as estratégias de derreplicação envolvem a combinação de bioensaios, técnicas de purificação, métodos espectroscópicos e bancos de dados que podem ser consultados por informações químicas ou biológicas.

Os avanços tecnológicos em técnicas analíticas tornaram possíveis os acoplamentos de técnicas de separação com métodos espectroscópicos. Alguns acoplamentos de técnicas como LC-MS (cromatografia líquida com espectrometria de

massas) e LC-RMN (cromatografia líquida com ressonância magnética nuclear) apresentam muitas vantagens ao isolamento clássico como a utilização de menores quantidades de amostra e o tempo menor de análise, acelerando o processo de derreplicação.

A aplicação da espectrometria de massas (MS) e o seu acoplamento com técnicas de separação em fase líquida, especialmente a cromatografia líquida (LC-MS), tem sido reconhecida como a técnica de separação direta mais eficiente em análises e caracterização de produtos naturais. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é capaz de realizar separações delicadas de compostos em uma grande variedade de extratos. A espectrometria de massas (MS), especialmente quando é possível a realização da fragmentação dos compostos (MS/MS), pode ser usada para detectar analitos com maior sensibilidade e seletividade, através da análise da razão massa-carga (m/z)⁴⁷.

A contribuição do LC-MS na pesquisa de produtos naturais é ilustrada pelo incomparável desempenho em varias áreas, incluindo *screenings* preliminares, isolamento e caracterização de compostos, além de controles de qualidade, estudos fármaco - cinéticos para a obtenção de parâmetros referentes à absorção, distribuição, metabolismo e excreção de produtos naturais bioativos⁴⁷.

O LC-MS ganhou mais atenção na elucidação estrutural devido ao desenvolvimento de interfaces com a ionização por eletrospray (ESI). Esse tipo de técnica torna possível analisar biocompostos não voláteis, com alto peso molecular, trazendo informações estruturais, que podem ser obtidas por experimentos MS/MS⁴⁸.

As técnicas de ionização brandas como o Eletrospray (ESI) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI - do inglês "*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*") são técnicas que resultam em pouca fragmentação e como consequência informações estruturais insuficientes para a caracterização das substâncias. Este inconveniente pode ser facilmente solucionado utilizando espectrometria de massas sequencial⁴⁹.

Tanto a ESI como a APCI são processos de Ionização a Pressão Atmosférica (API - do inglês "*Atmospheric Pressure Ionization*"). Diferentemente da Ionização por Impacto Eletrônico (EI - do inglês "*Electron Ionization*"), API causam a protonação ou desprotonação das moléculas analisadas para gerar espécies com cargas, do qual são bastante estáveis frente a fragmentações. Ambas as técnicas podem ser empregadas em análises quantitativas e qualitativas⁴⁹.

A Ionização por eletrospray é uma técnica utilizada para produzir moléculas ionizadas de uma solução líquida. Ela consiste na transferência de íons da solução para o espectrômetro de massas através da formação de um fino "spray eletrolítico" sob pressão atmosférica. A solução é pulverizada por um capilar de metal (cone de Taylor) com um forte campo elétrico mantido em aproximadamente 4000 V. Nesta etapa, o contra-íon é oxidado ou reduzido e formam-se as gotas com excesso de carga (positiva ou negativa). Com a diminuição de tamanho das gotículas carregadas, a densidade do campo elétrico é aumentada na superfície. A repulsão entre cargas iguais na superfície torna-se tão grande que ultrapassa as forças de tensão superficial, e íons começam a deixar a gotícula através do que é conhecido como "cone de Taylor".

Os íons são direcionados para o orifício através de lentes eletrostáticas conduzindo para o analisador de massa⁵⁰.

Com a técnica de ESI torna-se possível também a formação de cargas múltiplas nas moléculas. Esta é uma importante característica uma vez que o espectrômetro de massa mede a massa/carga (m/z), tornando possível observar grande número de moléculas com relativamente pouca variação de massa.

A polaridade dos íons formados com ESI depende do modo de operação. Por exemplo, na análise de íons positivos (modo empregado em análises de compostos básicos) é necessária a aplicação de um potencial positivo de aproximadamente 4 kV, relativos ao potencial do contra-eletrodo e vice-versa nas análises de íons negativos (modo empregado em análises de compostos ácidos) ^{51, 52}.

Depois de separados, vaporizados e ionizados, os íons em fase gasosa entram na região de alto vácuo dos analisadores de massas. Já no interior, campos elétricos e magnéticos são manipulados para influenciar de forma diferente os íons e então dirigi-los para os detectores. Com exceção das moléculas grandes (> 1000Da), que quando ionizadas podem apresentar várias cargas, a maioria dos íons formados apresenta uma única carga. A relação de valores de m/z é apresentada nos espectros de massas. Os principais analisadores empregados na pesquisa de produtos naturais são: Quadrupolos, *Íon Trap* e os TOF⁴².

1.5 Versatilidade Analítica da Espectrometria de Massas

Como apresentado anteriormente, estas técnicas de ionização são consideradas ionizações *brandas*, ou seja, não produzem íons fragmentos. Desta forma, apenas informações a respeito das massas moleculares dos compostos são obtidas. Para a obtenção de informações estruturais empregando a ionização por *electrospray* é necessária a aplicação da espectrometria de massas sequencial, operando com mais de um analisador de massas.

Os principais equipamentos utilizados para a caracterização estrutural são os *ions-traps*, os triplo quadrupolos (QqQ e QTrap) e os equipamentos híbridos quadrupolos-tempo de voo (Q-TOF).

Valendo-se de dois analisadores quadrupolos em linha (Q1 e Q3), interligados por uma cela de colisão (q2), os equipamentos triplo quadrupolos (QqQ) apresentam uma maior versatilidade analítica, pois possibilitam diferentes modos de varreduras, variando-se os valores de RF e DC dos quadrupolos Q1 e Q3. Nestes equipamentos a cela de colisão (q2) propicia a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo (Q1), através da colisão com um gás inerte (geralmente argônio), com energia controlada. Esta colisão usualmente produz fragmentos que são analisados no quadrupolo (Q3), processo identificado como dissociação induzida por colisão CID (do inglês "*Collision - induced dissociation*").

A Figura 08 apresenta algumas variações possíveis nos modos de análises para os espectrômetros triplos quadrupolos. Nos experimentos de íons produtos, o primeiro quadrupolo é programado para que apenas um íon de relação m/z

específica atinja a cela de colisão, filtrando-se os demais íons presentes. Assim, os íons fragmentos podem ser analisados possibilitando a caracterização estrutural do íon selecionado. A origem de um íon fragmento específico, também pode ser determinada através de experimentos de íons precursores.

Nos experimentos em que os quadrupolos funcionam como filtros de íons de m/z específicos, é observado um ganho extraordinário em seletividade e sensibilidade do método analítico, especialmente nos experimentos de MRM e perda neutra.

No modo de análise empregando o monitoramento de reações múltiplas (MRM - do inglês "*Multiple-reaction monitoring*"), um ou mais íons precursores, muitas vezes o mais abundante, são selecionados no primeiro analisador de massas (Q1) para ser fragmentado por CID. Para cada íon precursor apenas um único íon produto é selecionado em Q3 e irá para o próximo estágio de detecção. A combinação da seleção dos dois eventos confere a alta seletividade, bem como a excelente sensibilidade do método.

Experimentos envolvendo perda neutra apresentam uma excelente seletividade e são empregados na identificação de perdas de moléculas conhecidas. Neste modo, o equipamento detecta apenas as perdas de moléculas neutras previamente selecionadas, independentemente de quais são os íons precursores ou os íons produtos. Desta maneira, esta técnica pode ser empregada no *screening* de extratos brutos, através da fragmentação específica de uma classe química.

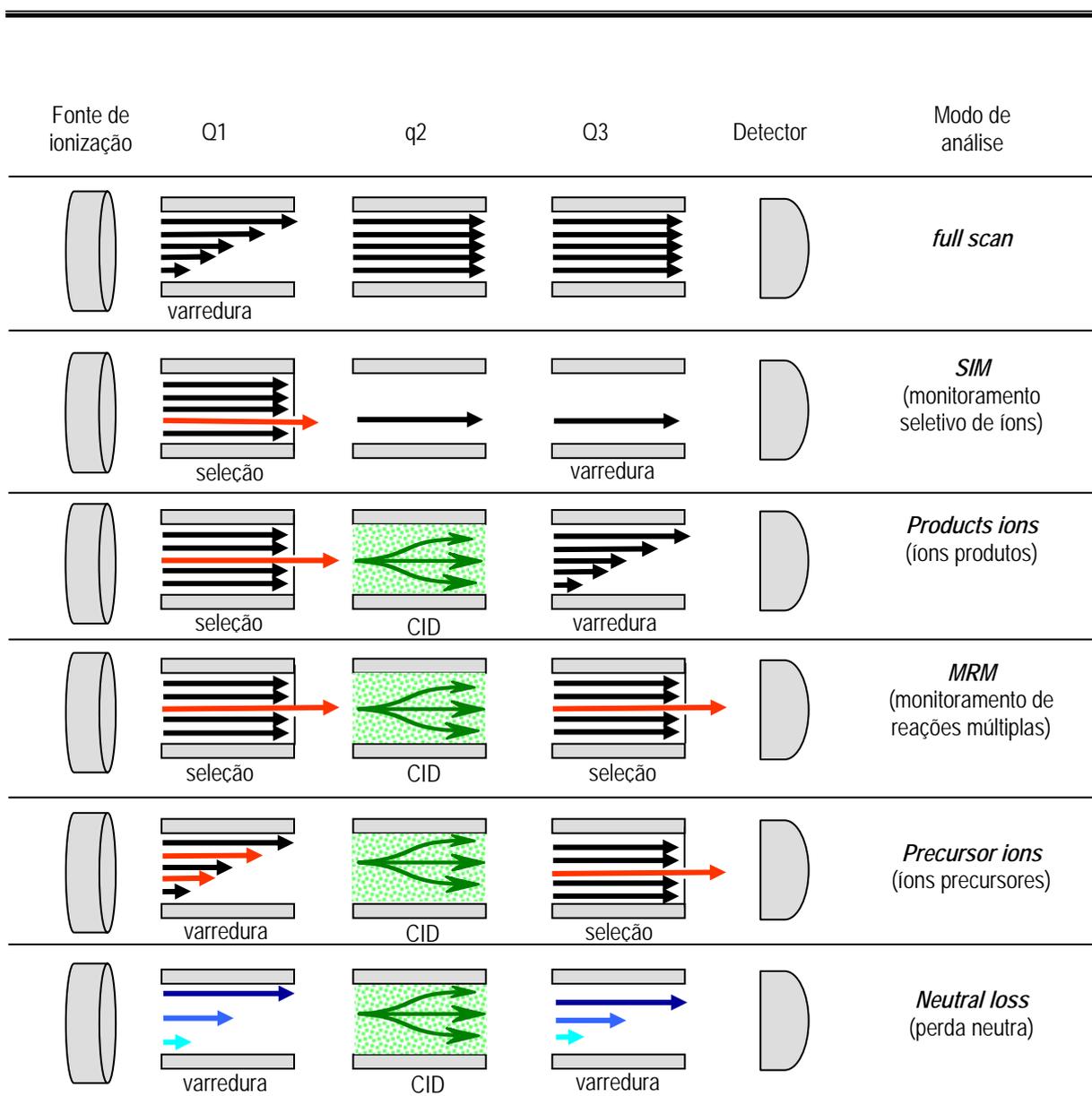


Figura 8: variações possíveis nos modos de análises para os espectrômetros triplos quadrupolos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho consiste em aplicar a versatilidade da espectrometria de massas (MS) acoplada a cromatografia líquida ou por inserção direta, na derreplicação dos extratos brutos produzidos por actinobactérias isoladas da rizosfera do milho, para uma análise rápida de fitotoxinas presentes em extratos oriundos de processos fermentativos.

2.2 Objetivo Específico

✓ Realizar o *screening* da atividade fitotóxica dos extratos das actinobactérias isoladas da rizosfera do milho por meio de bioensaios de fitotoxicidade utilizando *Lemna minnor*.

✓ Aplicar a técnica de derreplicação nos extratos brutos, empregando a espectrometria de massas (MS) e a fragmentação (MS/MS), para identificação dos compostos presentes.

✓ Isolar as substâncias com atividade fitotóxica presentes nos extratos e caracterizá-las utilizando métodos *offline* como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e infravermelho.

✓ Desenvolvimento de um método analítico que empregue a espectrometria de massas por inserção direta para identificação e diferenciação química de metabólitos secundários.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais Utilizados

3.1.1 Equipamentos

- ✓ Balança analítica FA2104N - Celtaç;
- ✓ Câmara laminar (fluxo);
- ✓ Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas CG 2010 Plus - Shimadzu, com auto injetor AOC - 20i;
- ✓ Cromatógrafo líquido - HP series II 1090;
- ✓ Cromatógrafo líquido - Shimadzu com detector DAD, modelo SPD-10ADVP, injetor Reodyne com Loop de 20 µL;
- ✓ Acquity UPLC/MS - Waters;
- ✓ Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas Electrospray Quattro-LC;
- ✓ Estufa de germinação com foto - período e alternância de temperatura Eletrolab;
- ✓ Espectrofotômetro de Infravermelho IFTIR - RX (Perkin Helmer), as análises foram realizadas em pastilhas de KBr e as amostras solubilizadas em clorofórmio;
- ✓ Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker DRX -500 e Bruker DRX - 400;

- ✓ Shaker Tecnal TE - 420;
- ✓ Rota evaporador R - 144 BUCHI.

3.1.2 Solventes e Reagentes

- ✓ Acetato de etila P.A. para extrações e para análises por CCD;
- ✓ Acetonitrila grau HPLC para as análises cromatográficas;
- ✓ Água Miliq para as análises cromatográficas;
- ✓ Álcool Etilico P.A. para as extrações;
- ✓ Álcool Metílico P.A. para as extrações;
- ✓ Hexano P.A. para as análises por CCD;
- ✓ Sílica 0,060 - 0, 200 mm, marca Across Organics;
- ✓ Sílica - gel para cromatografia 0,035 - 0,070 mm, marca Across Organics.

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento e Identificação das Actinobactérias

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida pela doutoranda Flávia Mandolesi Pereira de Melo, sob orientação do professor Dr. Itamar Soares de Melo do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa - Jaguariúna.

Os microrganismos foram isolados de regiões edafoclimáticas do Estado de São Paulo, especificamente de Socorro, Serra Negra e Ribeirão Preto (Sistema Agro florestal).

3.2.2 Obtenção dos Extratos

Os extratos foram obtidos por processos fermentativos dos microrganismos em meio BD (Batata - Dextrose).

Para a preparação de 1000 mL de meio foram adicionados 800 mL de água, 200 mL de caldo de batata e 20 g de dextrose. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers obedecendo à proporção máxima de 1/3 (um terço) de meio de cultura em relação ao volume total do erlenmeyer utilizado.

Para o preparo do caldo de batata foram usados 400 g de batata sem casca e picada em cubos pequenos para 1 litro de água. As batatas foram cozidas por aproximadamente 15 minutos e o volume de água evaporado durante o cozimento foi completado. Somente o caldo foi utilizado.

Todos os meios de cultura foram autoclavados à temperatura de 120° e alta pressão por 20 minutos antes de serem colocados os microrganismos.

As fermentações foram mantidas por um período de 8 dias no shaker com agitação de 130 rpm à temperatura ambiente. Os extratos orgânicos foram obtidos por sucessivas extrações líquido-líquido utilizando sempre acetato de etila.

3.2.3 Bioensaio de Fitotoxicidade utilizando *Lemna minnor*

Os bioensaios com *Lemna minnor* foram realizados em Placas de ELISA com 12 poços (3X4).

Como controles negativos foram utilizados meio Sis e DMSO. Na primeira coluna da placa de ELISA foram empregados 3000 μL de meio SIS e na segunda coluna foram adicionados 2970 μL de meio SIS mais 30 μL de DMSO (concentração máxima final de 1% por poço). Como controle positivo foi empregado atrazina (herbicida sintético). Assim, na terceira coluna foram adicionados 2970 μL de meio SIS mais 30 μL de atrazina também solubilizada em DMSO na concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, finalizando a concentração 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por poço.

Os bioensaios com os extratos seguiram as mesmas concentrações utilizadas no controle positivo, substituindo-o por 30 μL da amostra do extrato solubilizado em DMSO com concentração de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, de modo que a concentração final de extrato em cada poço do bioensaio também fosse de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Em cada poço foi colocado um par de folhas de *Lemna minor* procurando manter a uniformidade no tamanho e na coloração. Após um período de sete dias foi feita uma análise visual comparando os resultados dos extratos testados com os controles positivo e negativo. O que se observou no final do período de sete dias do bioensaio foi:

- A capacidade da fitotoxina em inibir a multiplicação das folhas ou matá-las;
- A ocorrência de necrose (tecidos mortos), clorose (ausência de clorofila), quebra de colônia e destruição da raiz.

3.2.4 Variações dos meios de fermentação - Análises de perfil químico e atividade fitotóxica

3.2.4.1 Meios Líquidos Sintéticos

Foram adicionados 150 mL de cada meio em dois erlenmeyers de 500 mL. A Tabela abaixo apresenta a composição química dos meios líquidos preparados.

Tabela 1: Composição química dos meios líquidos*.

| <i>Reagentes</i> | <i>Meio 1⁵³</i> | <i>Meio 2</i> | <i>Meio 3</i> |
|--|----------------------------|---------------|---------------|
| <i>NaNO₃</i> | 2,25 g | - | 0,3 g |
| <i>K₂HPO₄.3 H₂O</i> | 2 g | 5 g | 0,12 g |
| <i>Sacarose</i> | 150 g | - | 8 g |
| <i>KCl</i> | 0,5 g | 2 g | 0,05 |
| <i>MgSO₄. 7 H₂O</i> | 0,5 g | 5 g | 0,25 g |
| <i>FeSO₄. 7 H₂O</i> | 0,05 g | - | 0,05 g |
| <i>Yeast</i> | 1 g | - | 0,01 g |
| <i>Ácido cítrico</i> | 0,7 g | - | - |
| <i>Celulose</i> | - | 50 g | - |
| <i>Peptona</i> | - | 13 g | - |
| <i>NH₄NO₃</i> | - | 8 g | - |

* As quantidades descritas na Tabela referem-se à preparação de 1000 mL de meio.

As actinobactérias utilizadas nas fermentações tinham quatro dias de repique. As fermentações foram mantidas por oito dias com agitação de 130 rpm e temperatura ambiente. Os metabólitos foram obtidos por sucessivas extrações líquido-líquido, utilizando acetato de etila.

3.2.4.2 Meios Semi-Sólidos

Os grãos utilizados como fontes de nutrientes foram: arroz, canjica branca, canjica amarela, soja, trigo em grãos, trigo grosso, feijão branco, amendoim branco e amendoim vermelho. Para o preparo de cada meio foram adicionados 25 g do grão e 18 mL de água deionizada em erlenmeyers de 250 mL de capacidade.

A solução empregada como pré-inóculo foi preparada adicionando-se uma alçada de microrganismo em um erlenmeyer com aproximadamente 50 mL de água autoclavada. Imediatamente após colocar o microrganismo na água, um mililitro desta solução foi acrescido aos respectivos meios de cultura, que também já estavam autoclavados.

As cepas empregadas tinham quatro dias de repique. As fermentações foram mantidas por um período de 20 dias sem agitação. Em seguida, adicionou-se o volume aproximado de 100 mL de etanol (volume suficiente para cobrir os grãos) em cada erlenmeyer, os quais ficaram sob agitação em shaker por 24 horas. Posteriormente a solução alcoólica foi filtrada e concentrada à pressão reduzida.

3.2.5 Fermentações Variando a Idade de Repique da Cepa

Neste experimento foram variadas as idades das linhagens (cepas) utilizadas nas fermentações. As fermentações foram realizadas em meio BD (batata-dextrose) como descrito no item 3.2.2.

Todas as cepas utilizadas foram repicadas no mesmo dia e todos os meios utilizados também foram preparados de uma só vez e congelados. Os meios foram inoculados utilizando cepas com 4 dias, 9 dias, 16 dias e 31 dias.

Os meios foram inoculados com uma solução preparada pela adição de uma alçada de microrganismo à água autoclavada, que imediatamente foi acrescida ao meio de cultura.

Todas as fermentações duraram oito dias e foram realizadas com agitação de 130 rpm e temperatura ambiente. A extração dos metabólitos foi líquido-líquido com acetato de etila.

3.2.6 Análises por Espectrometria de Massas (MS)

3.2.6.1 Inserção direta

As amostras foram diluídas com MeOH/acetato de amônio 0,1% (1:1) para uma concentração final de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e analisadas por inserção direta em um espectrômetro de massas Electrospray Quattro - LC ou Q - TOF. No espectrômetro de massas Quattro - LC as amostras foram injetadas via cromatografia líquida sem coluna cromatográfica (em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) simultaneamente). Para o espectrômetro de massas Q - TOF as amostras foram introduzidas na fonte de ionização através de uma bomba de seringa com fluxo de 5 μL por minuto, em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) individualmente.

3.2.7 Desenvolvimento do método cromatográfico

O desenvolvimento do método cromatográfico foi realizado em um cromatógrafo líquido - Shimadzu com detector DAD, modelo SPD-10ADVP, injetor Reodyne com Loop de 20 μL .

Foram testadas diversas colunas cromatográficas como C18, C8 e Fenil - Hexil, além de diversas fases móveis de diferentes polaridades.

Para cada análise foram injetados 10 μL de amostra na concentração de 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ MeOH.

Para a actinobactéria 17 (39 PL) a melhor condição cromatográfica se deu com a coluna fenil-hexil (Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm), fase móvel foi Acetonitrila/Ácido fórmico 0,1% (1:1) e fluxo de 600 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Para a actinobactéria 36 (50 PL) a melhor condição cromatográfica foi obtida com uma coluna Luna 5 μ C18 (100 x 4,60 mm, Phenomenex), fase móvel foi Água/Acetonitrila (1:1) e fluxo de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.8 UPLC - MS

As análises foram realizadas em um equipamento da marca Acquity UPLC/MS - Waters. Foi utilizado uma coluna C18 (1,7 μm , 2,1 x 50 mm, Waters), fase móvel usada foi Água / Acetonitrila (1:1) e fluxo de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.9 Análise de Infra - Vermelho

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio e analisadas no equipamento IFTIR-RX em pastilhas de KBr.

3.2.10 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado e analisadas no espectrofotômetro da Brucker DRX - 500 e Brucker DRX - 400.

3.2.11 Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (GC - MS)

As amostras foram solubilizadas em diclorometano e analisadas em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu e coluna BP1 SGE, 30m x 0,25cm. A temperatura usada no forno foi de 60°C e a temperatura de injeção foi 250°C. A temperatura inicial foi 60°C por 2 minutos, aumentando até 300°C e permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. O tempo total de corrida foi 36 minutos.

4. Resultados e Discussão

4.1 Screening

A primeira etapa do trabalho consistiu em um *screening* dos extratos orgânicos com atividade fitotóxica empregando bioensaios com *Lemna minor* produzidas pelas actinobactérias isoladas da rizosfera do milho. O principal objetivo desta primeira etapa foi encontrar extratos com potencial atividade fitotóxica para posterior processo de fermentação, isolamento e caracterização das fitotoxinas.

Os microrganismos estudados neste projeto foram isolados de grandes plantações de milho orgânico que tiveram seus produtos certificados para o consumo. As plantações orgânicas foram escolhidas para a verificação da biodiversidade de actinobactérias em solos rizosféricos, onde era conhecido o manejo completo do solo utilizado no plantio (regiões edafoclimáticas), para que não houvesse interferências de outras fontes, que não fossem as naturais, ou seja, apenas a presença de microrganismos endógenos. Estas plantações localizam-se em Socorro, Serra Negra e Ribeirão Preto (Sistema Agro florestal), no Estado de São Paulo.

A rizosfera é a região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato. O número de microrganismos na raiz e à sua volta é muito maior do que no solo livre e os tipos de microrganismos na rizosfera também diferem do solo livre de raiz. Esta região do solo é influenciada pelas raízes e tem máxima atividade microbiana. O crescimento das plantas é controlado substancialmente pelo solo na região radicular, um ambiente que a própria planta ajuda a criar e onde a atividade microbiana associada exerce diversas atividades benéficas. Esta região é importante para

processos relacionados com a nutrição da planta, trocas de O₂ e CO₂, gradientes de unidades do solo, mineralização, amonificação, nitrificação e simbiose.

A rizosfera é uma fonte de microrganismos produtores de metabólitos secundários, como auxinas, antibióticos, ácidos, enzimas extracelulares, dentre outras. Algumas destes microrganismos são potentes agentes de controle de fungos patogênicos que atacam o sistema radicular. Além disso, ainda apresenta poucos estudos frente à quantidade de microrganismos existentes (<http://www.cnpma.embrapa.br>).

Para este primeiro *screening* foram ensaiados 54 extratos de actinobactérias empregando *Lemna minnor* como alvo. Estes bioensaios consistem em ensaios rápidos, sensíveis e de baixo custo para a descoberta de fitotoxinas. *Lemna minnor* é uma planta aquática com algumas características intrínsecas:

- É uma planta do grupo das angiospermas aquáticas e vasculares da família *Lemnaceae*;
- Apresenta alta capacidade adaptativa;
- Seu cultivo é relativamente simples e pode ser realizado em Placas de Petri utilizando meio Sis (meio de cultura rico em sais) para a sua manutenção;
- São sensíveis a contaminantes orgânicos tóxicos;
- São utilizadas para testes de herbicidas e monitoramento de fluentes⁵⁴.

Os resultados obtidos no *screening* inicial foram resumidos na Tabela abaixo.

Tabela 2: Resultados do bioensaio com *Lemna minor* dos extratos orgânicos de actinobactérias.

| <i>Extrato</i> | <i>Resultados</i> | <i>Extrato</i> | <i>Resultados</i> | <i>Extrato</i> | <i>Resultados</i> | <i>Extrato</i> | <i>Resultados</i> |
|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| 01 | --- | 16 | + - - | 31 | --- | 46 | + - - |
| 02 | + - - | 17 | + + - | 32 | + - - | 47 | + - - |
| 03 | + - - | 18 | --- | 33 | --- | 48 | + - - |
| 04 | --- | 19 | --- | 34 | + - - | 49 | + + - |
| 05 | + - - | 20 | + - - | 35 | --- | 50 | --- |
| 06 | + - - | 21 | + - - | 36 | + + + | 51 | --- |
| 07 | + - - | 22 | --- | 37 | + - - | 52 | + - - |
| 08 | --- | 23 | --- | 38 | --- | 53 | + - - |
| 09 | + - - | 24 | --- | 39 | + - - | 54 | + - - |
| 10 | + - - | 25 | --- | 40 | --- | | |
| 11 | + - - | 26 | + - - | 41 | --- | | |
| 12 | + + - | 27 | + - - | 42 | --- | | |
| 13 | + + - | 28 | + - - | 43 | + - - | | |
| 14 | + - - | 29 | + + - | 44 | + - - | | |
| 15 | + - - | 30 | + - - | 45 | --- | | |

(+ + +): Muito bom; (+ + -): Bom; (+ - -): Com atividade moderada; (- - -): Sem atividade fitotóxica. Concentração final: 100 µg/mL.

Os resultados apresentados na Tabela 2 foram obtidos por comparações visuais entre os padrões negativo e positivo do bioensaio, apresentando algumas variações de acordo com os critérios utilizados pelo observador.

Como pode ser observado na Tabela acima, dos 54 extratos testados 6 deles apresentaram boa atividade fitotóxica, sendo o extrato 36 (50 PL) o mais ativo. É

possível observar também que 29 deles apresentaram alguma atividade fitotóxica, porém menos acentuada.

Estatisticamente foi observado que 64,8 % dos extratos testados apresentaram atividade fitotóxica e que apenas 35,2 % não apresentaram nenhuma atividade fitotóxica. Este resultado indica o grande potencial dos microrganismos isolados da rizosfera do milho na produção de metabólitos secundários com atividade fitotóxica.

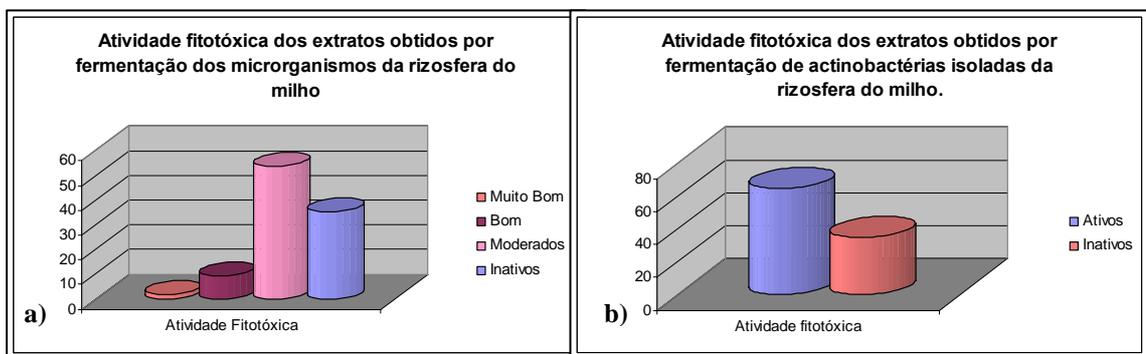


Figura 9: Gráficos das porcentagens de extratos classificados pela atividade fitotóxica.

Na Figura 09 foram representadas duas vertentes do mesmo resultado: na Figura a os dados foram analisados de acordo com a potencialidade dos extratos, enquanto que a Figura da direita resume os resultados obtidos em ativos e inativos.

A Figura abaixo apresenta os resultados do bioensaio de fitotoxicidade de alguns dos extratos testados. Para que o leitor possa avaliar a potencialidade da atividade fitotóxica dos extratos como feito na Tabela 2, a Figura traz também o resultado de alguns extratos com atividade fitotóxica moderada e sem atividade.

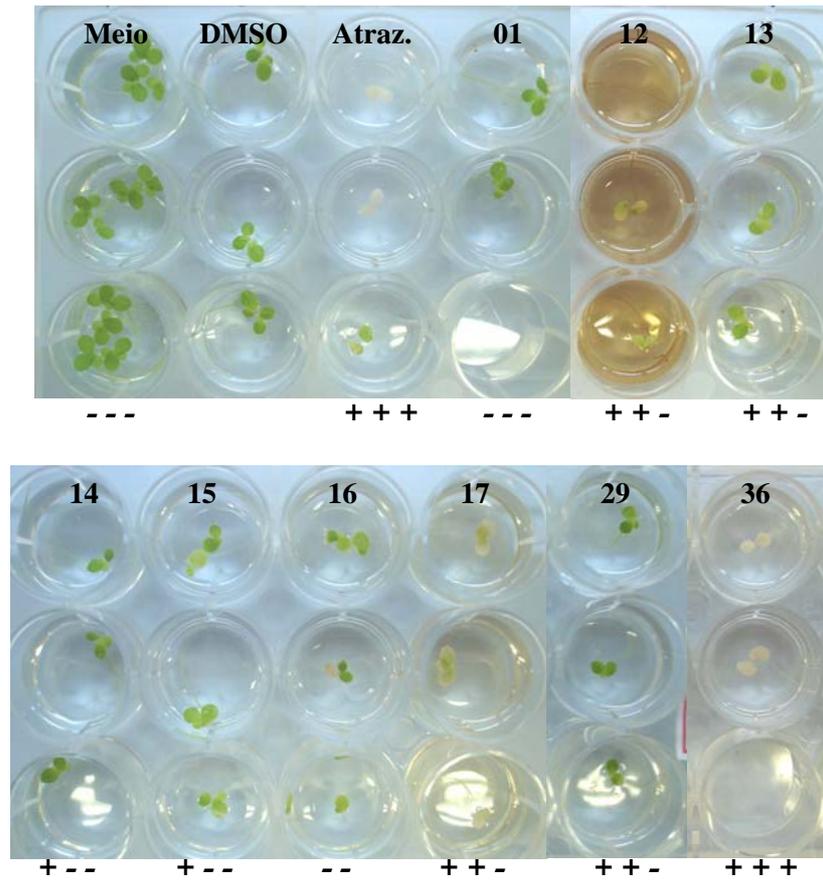


Figura 10: Bioensaios de fitotoxicidade com extratos de actinobactérias da rizosfera do milho.

O extrato 01 não apresentou atividade fitotóxica como pode ser observado na Figura acima, uma vez que o crescimento das folhas de *Lemna minor* pôde ser comparado ao padrão negativo com DMSO (coluna 2). Já os extratos 14, 15 e 16 exibiram atividade fitotóxica moderada por apresentarem amarelamento, redução de crescimento e menor número de folhas que o padrão. Os demais extratos apresentaram boa atividade fitotóxica por causarem diminuição de crescimento da planta, amarelamento e diminuição no número de folhas e necrose.

Diante dos resultados obtidos, os seis extratos mais ativos (12, 13, 17, 29, 36 e 49) foram submetidos a novos ensaios de fitotoxicidade variando suas concentrações nos mesmos. O objetivo deste experimento é relacionar o efeito da concentração do

extrato bruto com a atividade fitotóxica. A Tabela 3 resume os resultados obtidos no bioensaio com *Lemna minor*.

Tabela 3: Resultados do bioensaio com *Lemna minor* dos extratos orgânicos de actinobactérias, teste de diluição.

| Extratos | 100 µg/mL | 50 µg/mL | 25 µg/mL | 12,5 µg/mL |
|----------|-----------|----------|----------|------------|
| 12 | ++- | +- | +- | +- |
| 13 | ++- | ++- | ++- | ++- |
| 17 | ++- | ++- | ++- | ++- |
| 29 | ++- | --- | --- | --- |
| 36 | +++ | ++- | ++- | ++- |
| 49 | ++- | ++- | ++- | ++- |

(+++): Muito bom; (++-): Bom; (+-): Com atividade moderada; (---): Sem atividade fitotóxica.

Os resultados obtidos demonstraram que os extratos 13, 17 e 49 não tiveram redução da atividade fitotóxica em função da diminuição de suas concentrações e que os extratos 12 e 36 apresentaram atividade fitotóxica menos acentuada em menores concentrações. Estes resultados demonstraram que os extratos testados apresentam atividade fitotóxica mesmo em baixas concentrações. O extrato 29 se mostrou inativo nas concentrações testadas.

Mesmo apresentando atividade fitotóxica em concentrações reduzidas, os bioensaios foram realizados com a concentração final de 100 µg/mL para o ensaio de atividade fitotóxica, devido à grande diversidade de metabólitos presentes nos extratos.

Após o *screening* inicial, todos os extratos (ativos e inativos) foram analisados por espectrometria de massas utilizando a fonte de ionização por eletrospray (ESI) para a determinação do perfil químico dos metabólitos. ESI é considerada uma técnica

branda de ionização quando comparada à ionização por impacto eletrônico (EI), tendo como principal característica a produção do íon da molécula protonada $[M+H]^+$ ou desprotonada $[M-H]^-$, sem que ocorra a fragmentação da mesma, o que possibilita a identificação dos compostos baseada em suas respectivas massas moleculares, uma vez que a detecção é dada a partir da razão massa/carga (m/z). As aquisições foram feitas em modo positivo e negativo simultaneamente. De acordo com os sinais de massas observados nos espectros, a derreplicação dos extratos pôde ser iniciada.

Com a espectrometria de massas, em especial com a técnica de ESI, é possível realizar estudos sobre o perfil químico dos extratos baseados nas massas moleculares encontradas nos espectros. A Figura 11 traz os espectros de massas adquiridos em modo positivo dos seis extratos que apresentaram atividade fitotóxica mais pronunciada. É possível observar que os perfis químicos são semelhantes exceto para o extrato 36 (50 PL), o qual apresentou um grupo de sinais distintos na região de m/z entre 1050 e 1250. A melhor atividade fitotóxica em comparação aos demais, pode estar relacionada à presença deste grupo de sinais. Desta forma, este extrato foi submetido a um estudo de derreplicação empregando a espectrometria de massas sequencial.

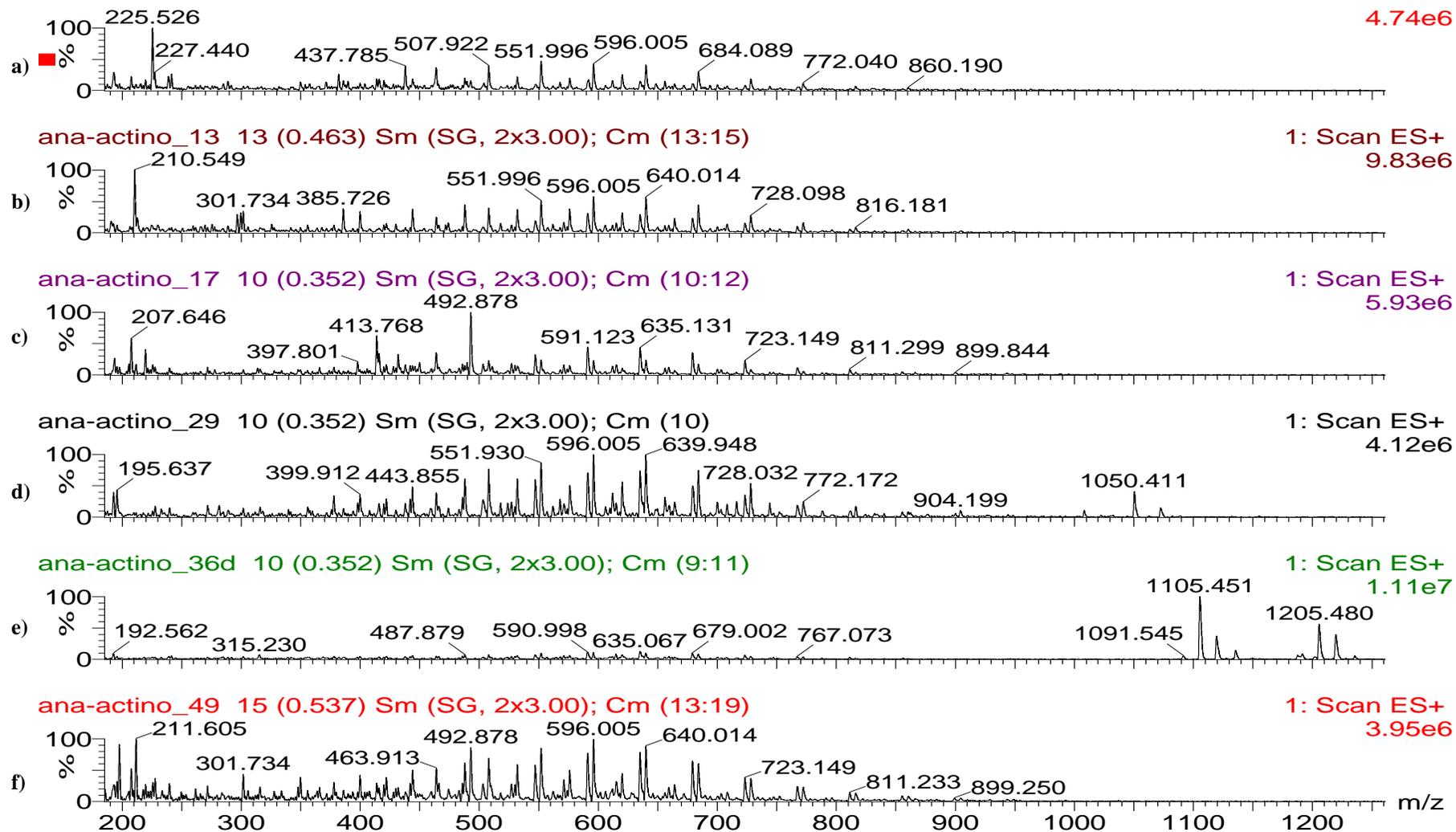


Figura 11: Espectros de massas dos extratos ativos dos microrganismos da rizosfera do milho: a) Extrato 12, b) Extrato 13, c) Extrato 17, d) Extrato 29, e) Extrato 36 e f) Extrato 49.

4.2 Derreplicação do Extrato da Actinobactéria 36 (50 PL)

O extrato da actinobactéria 36 (50 PL) foi submetido ao estudo de derreplicação com base nos sinais de m/z obtidos no espectro de ESI. As buscas pelos possíveis compostos foram realizadas utilizando o banco de dados *Dictionary of Natural Products* (<http://dnp.chemnetbase.com>) e no *Chemical Abstract* (CAS).

O presente no espectro de massas apresenta sinal de m/z 1105 quando analisado em modo positivo. O início da busca deu-se pelo intervalo de massas 1104 a 1105. O resultado encontrado apresentou 17 compostos possíveis, dos quais 9 deles foram isolados de plantas, 4 foram produzidos por microrganismos e em 3 deles a busca não informou a origem biológica e 1 deles foi isolado de órgãos de caranguejos (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da busca pelos compostos com massa molecular entre 1104 e 1105.

| Resultado | Nome | Origem biológica |
|-----------|--|--|
| 01 | Ácido agrimônico A | Isolado de raízes de <i>Agrimonia japonica</i> e do pericarpo de <i>Rosa laevidata</i> |
| 02 | Ácido agrimônico B | Isolado de raízes de <i>Agrimonia japonica</i> e do pericarpo de <i>Rosa laevidata</i> |
| 03 | Antibiótico MH 850, MH 850 A | _____ |
| 04 | <i>Penaeus monodon</i> FRMF | _____ |
| 05 | Amida GAHKNYLRF | Isolado de órgãos pericárdios e do sistema nervoso estomogástrico de caranguejos <i>Cancer borealis</i> , <i>Cancer productus</i> e <i>Cancer magister</i> |
| 06 | Glansrin A | Constituintes de sementes de <i>Juglans regia</i> |
| 07 | Hippophaenin B | Isolados das folhas <i>Hippophae rhamnoides</i> |
| 08 | Leucinostatin D | Isolados de <i>Paecilomyces lilacinus</i> e <i>Paecilomyces marquandii</i> |
| 09 | Macarinin C | Isolado das folhas de <i>Macaranga sinensis</i> |
| 10 | <i>Locusta migratória</i> Periviscerokinins; Lom- PVK - 1 | _____ |
| 11 | Platycaryanin D | Constituintes da <i>Platycarya strobilacea</i> |
| 12 | Polaramycin | Produzido por <i>Streptomyces hygrosopicus</i> |
| 13 | Pyoverdin A | Produzido por <i>Pseudomonas fluorescens</i> PL8 |
| 14 | Rugisin C | Isolado da <i>Rosa rugosa</i> e <i>Stachyurus praecox</i> |
| 15 | Rugisin C, 1 – Epímero | Isolado das folhas <i>Terminalia calamansanai</i> |
| 16 | Sanglifehrin C | Produzido por <i>Streptomyces</i> sp. A 92-308110 |
| 17 | Sanguiin H2 | Constituinte da <i>Snaguisorba officinalis</i> |

Dos compostos pesquisados, o grupo das Leucinostatinas apresentou um número grande de massas coincidentes às observadas no espectro de massas do extrato 36 (50 PL).

A próxima etapa consistiu no estudo da fragmentação (MS/MS) dos compostos encontrados neste extrato para obtenção de informações estruturais. Os espectros de fragmentação (MS/MS) indicaram a presença de duas séries homólogas, evidenciadas pelos padrões de fragmentação, como podem ser observados na Figura 12.

Isogai e colaboradores⁵⁵ descrevem o isolamento e a caracterização de uma série de Leucinostatinas empregando a espectrometria de massas por ionização por FAB (do inglês *Fast Atom Bombardement*). Este resultado confirmou uma série de Leucinostatinas no extrato da actinobactéria 36 (50 PL).

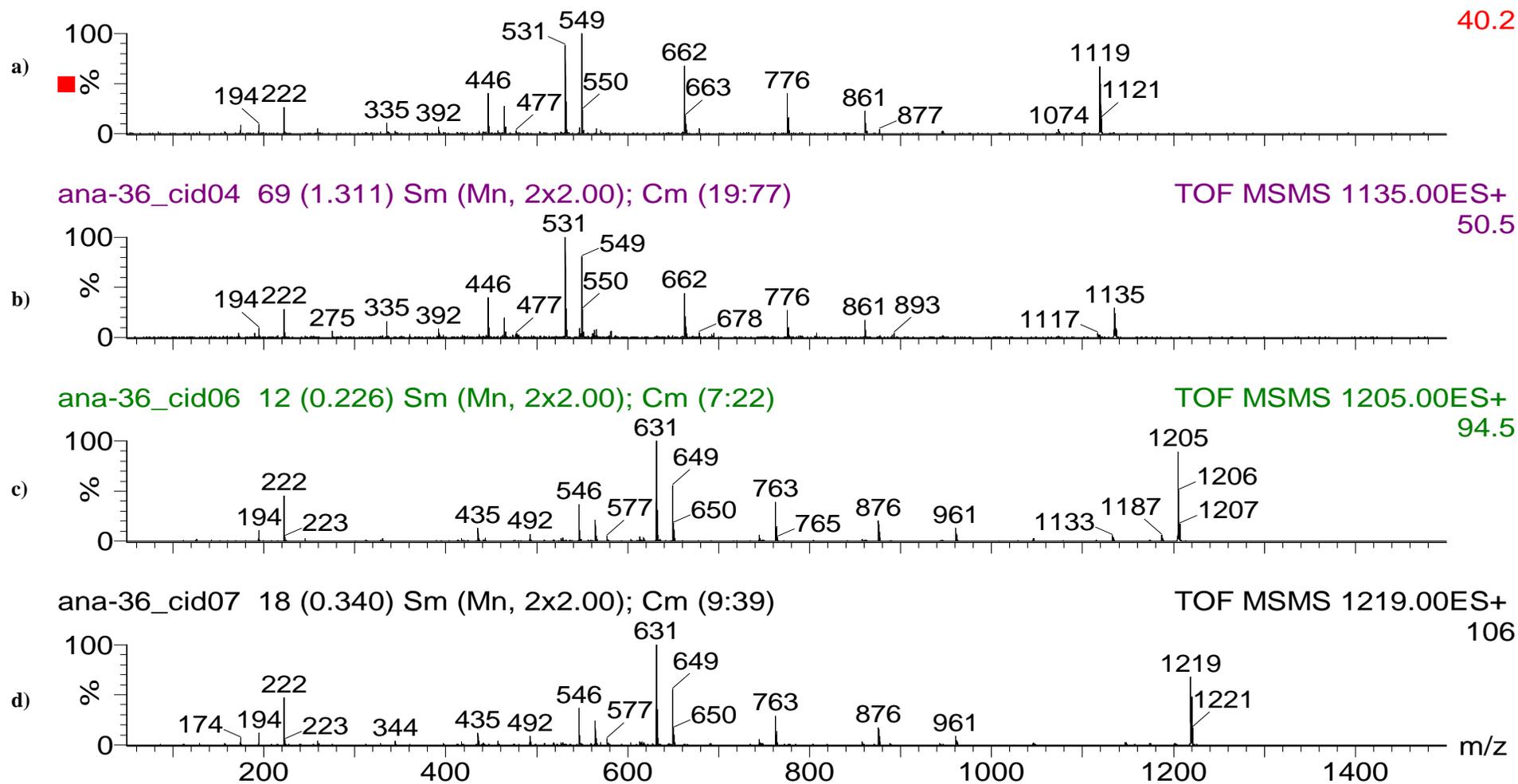


Figura 12: Espectros de fragmentação (MS/MS) das Leucinostatinas: a) Leucinostatina D, b) Leucinostatina H, c) Leucinostatina B e d) Leucinostatina U.

Para exemplificar os resultados dos estudos de fragmentação, a Figura 13 traz a estrutura da Leucinostatina F com as massas de seus respectivos fragmentos (Y e B) e o espectro de MS/MS obtido neste estudo.

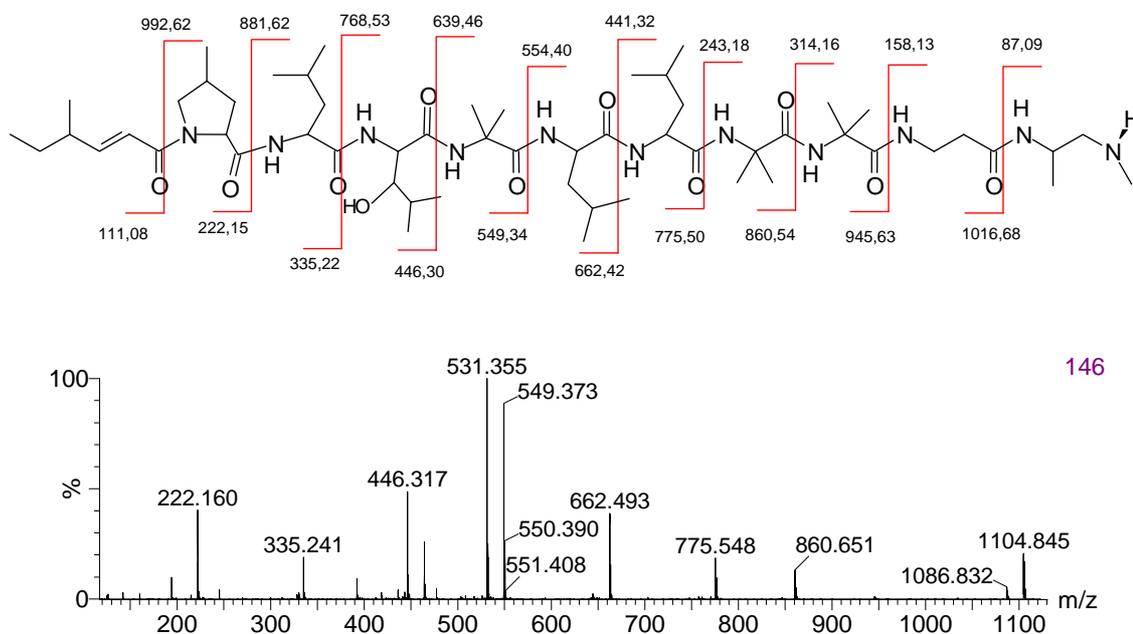


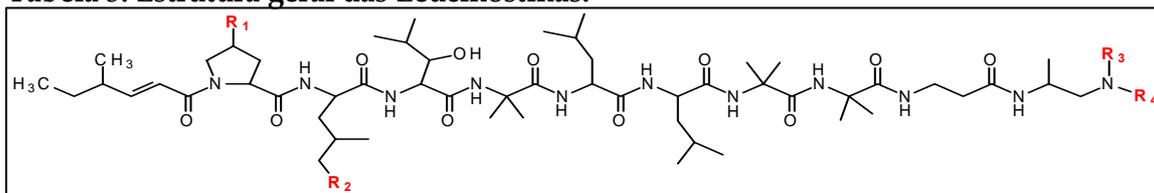
Figura 13: Estrutura da Leucinostatina F ($[M+H]^+ = 1105$) com as massas de seus fragmentos e seu espectro de massas.

As Leucinostatinas são conhecidas como peptabólitos e peptabióticos. Pertencem a classe dos lipopeptídeos e os lipoaminopeptídeos que apresentam mais de 300 compostos com interessantes propriedades físico-químicas e variadas atividades biológicas.

Os lipopeptídeos são constituídos por uma cadeia lipídica que pode variar na sua forma e tamanho e estão ligadas a um peptídeo que pode ser cíclico ou não, variando os aminoácidos que o constituem. Nas duas últimas décadas foram descritas 23 classes de lipopeptídeos, sendo que 21 eram cíclicas. As Leucinostatinas são lineares e formadas por 11 aminoácidos, cuja estrutura varia de acordo com diferentes

substituições na sua cadeia principal. As diferenças de massas observadas entre os componentes desta classe são devidas às substituições de grupos em locais específicos da cadeia. A Tabela abaixo apresenta a estrutura básica comum às Leucinostatinas, com os possíveis pontos de permutação dos substituintes.

Tabela 5: Estrutura geral das Leucinostatinas.



| <i>m/z</i> [<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺ | Leucostatina | <i>R</i> ₁ | <i>R</i> ₂ | <i>R</i> ₃ , <i>R</i> ₄ |
|---|-----------------|-----------------------|--|---|
| 1091 | Leucostatina T | H | H | H, Me |
| 1105 | Leucostatina F | Me | H | H, Me |
| 1118 | Leucostatina D | Me | H | Me, Me |
| 1121 | Leucostatina N | Me | OH | H, Me |
| 1135 | Leucostatina H | Me | H | Me, Me, (O) |
| 1187 | Leucostatina B2 | Me | CH ₃ CH ₂ COCH=CH | H, Me |
| 1191 | Leucostatina L | H | CH ₃ CH ₂ COCH ₂ CH(OH) | H, Me |
| 1203 | Leucostatina R | Me | C ₅ H ₉ O | Me, Me |
| 1204 | Leucostatina B | Me | CH ₃ CH ₂ COCH ₂ CH(OH) | H, Me |
| 1205 | Leucostatina S | Me | C ₅ H ₁₁ O | Me, Me |
| 1219 | Leucostatina U | Me | C ₆ H ₁₁ O ₂ | H, Me |

Sua principal origem biológica são fungos de solo e patogênicos às plantas. Apresentam diversas atividades biológicas como antitumoral, antifúngica e antiviral, além de ser ativa contra bactérias gram-positivas^{56, 57, 58}. Também causam a inibição da

ATPase mitocondrial interrompendo a oxidação fosforilativa, são imunossupressoras e induzem morfogêneses em fungos^{59, 60, 61, 62, 63}.

Outro aspecto trivial desta classe heterogênea de substâncias é sua biossíntese via não-ribossômica. Esse mecanismo é responsável pela presença de aminoácidos não-proteinogênicos, aminoalcoóis, ácidos lipoamínicos, aminas e ácidos graxos na estrutura⁶⁴. Estudos estruturais revelam que as Leucinostatinas são compostas por aminoácidos não-usuais, como o (L) cis-4-metilprolina (MePro), (L) treo-P-hidroxileucina (Hy-Leu) e o ácido α -aminoisobutírico (Aib)⁶⁵. A cadeia carbônica (parte graxa do composto) e a seqüência de aminoácidos conferem a sua atividade biológica⁶⁶.

As Leucinostatinas já foram isoladas dos fungos *Paecilomyces lilacinus* A - 267⁶⁷, *Paecilomyces marquandii*⁶⁴ e *Penicillium lilacinus* A - 267⁶⁸. *Paecilomyces lilacinus* são fungos patogênicos considerados um dos mais promissores controles biológicos contra nematóides parasitas em plantas^{69, 70}, que causam doenças e comprometem as colheitas⁷¹. *Paecilomyces lilacinus* da linhagem 251 (PL 251) é comercializado e registrado com nome de BioAct WG em diversos países como agente de biocontrole de nematóides⁷².

O extrato 36 (50 PL) também foi submetido a análises cromatográficas. Neste estudo, foram comparadas as técnicas de separação cromatográfica HPLC e UPLC acopladas à espectrometria de massas. Na Figura 14 estão apresentados os cromatogramas obtidos utilizando cada técnica.

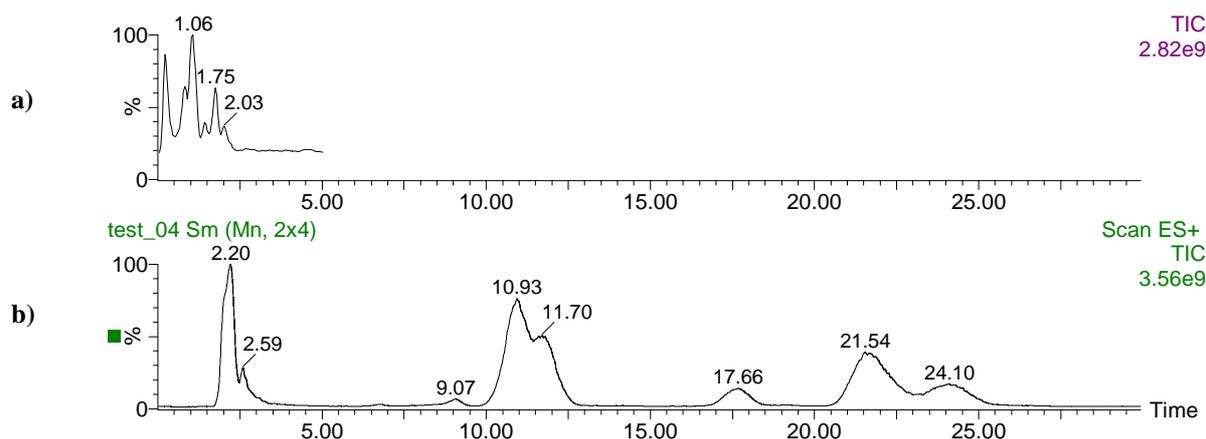


Figura 14: HPLC (b) e UPLC (a) do extrato 36. HPLC: Coluna Luna C18 5 μm (100 x 4,60 mm Phenomenex), fluxo de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e a FM Água/Acetonitrila (1:1); UPLC: C₁₈ 1,7 μm (2,1 x 50 mm), fluxo de 100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ e a FM Água/Acetonitrila (1:1).

Como podem ser observadas na Figura acima, as duas técnicas foram eficientes, porém a separação obtida com UPLC foi aproximadamente seis vezes mais rápida. Como exemplo, pode ser citada a Leucinostatina S apresenta sinal de m/z 1205 e apresentou um tempo de retenção igual a 1,03 minutos quando analisada pelo UPLC e 18 minutos quando analisada pelo HPLC. Com isso, pode-se assegurar que esta técnica acelera a análise de compostos no processo de derreplicação dos extratos brutos.

O uso da técnica UPLC torna possível utilizar os princípios cromatográficos conhecidos de forma mais rápida, usando colunas menores e/ou baixos fluxos que aumentam a velocidade das análises, com maior sensibilidade e resolução⁷³.

Uma comparação das duas técnicas de separação foi feita por Xu e colaboradores que analisaram a presença de micro-cistinas em amostras de água. Os resultados observados apontaram duas vantagens significativas da utilização do UPLC frente ao HPLC, que foram a melhor separação com maior velocidade e a

sensibilidade da análise. As análises das micro-cistinas com HPLC duraram cerca de 30 minutos, enquanto que com UPLC apenas 10 minutos. A outra vantagem que está relacionada com a sensibilidade da técnica que apresentou o limite de detecção em torno de 0,1 ng.L⁻¹⁷⁴.

Em outro trabalho, Nováková e colaboradores transferiram os controles de qualidade de quatro formulações farmacêuticas do HPLC para UPLC e perceberam que o UPLC apresentou diversas vantagens como maior rapidez, sensibilidade e resolução, mantendo os princípios cromatográficos. Além disso, a significativa diminuição do tempo de análise (de 5 a 7 vezes) gerou um menor consumo de solvente (de 6 a 9 vezes)⁷⁵.

4.3 Estudo de Perfil Químico: Actinobactéria 17 (39 PL)

As células não produzem metabólitos além do necessário, independente do meio em que estão, o que permite que espécies disputem com outras formas de vida a sobrevivência na natureza. Alguns mecanismos externos importantes como o substrato, a regulação nutricional e a regulação por *feedback* (mecanismo que controla os caminhos catabólicos e biossintéticos, controlando o metabolismo primário e secundário) controlam as funções moduladoras. Modificações em alguns destes mecanismos conduzem certos microrganismos isolados à produção de metabólitos secundários⁷⁶.

Para a maior produção de metabólitos secundários é necessário causar uma desregulação das funções fisiológicas nos microrganismos. Isso porque o citoplasma

das células é delimitado por uma membrana de permeação seletiva e não está diretamente exposto às mudanças do meio.

A composição química das células vegetativas pode variar somente dentro de um limite. As respostas celulares às mudanças físico-químicas do meio são mediadas por auto-regulação do metabolismo secundário, funcionando com um *feedback* (um canal entre o “interior e o exterior”). Sendo assim, alguns produtos são mediados por mensageiros endógenos ou “hormônios intracelulares”, que modulam a síntese de proteínas e o conjunto de estruturas sub-celulares em resposta as mudanças do meio⁷⁷.

Alguns fatores químicos como a constituição nutricional do meio, o pH e a concentração dos gases dissolvidos (O₂ e CO₂), e alguns fatores físicos como a agitação, a temperatura e a viscosidade influenciam na produção dos metabólitos secundários.

Neste sentido, a segunda parte do trabalho foi estudar a influência de alguns fatores químicos e físicos na regulação da produção de metabólitos secundários com atividade fitotóxica, através da variação nutricional dos meios de cultura e da agitação durante a fermentação da actinobactéria 17 (39 PL).

Os primeiros ensaios foram realizados variando o meio de cultura. Três diferentes meios líquidos foram. Após o período de fermentação, os meios foram extraídos com acetato de etila e submetidos à bioensaio com *Lemna minor*. Os resultados do bioensaio sugerem que apenas o meio sintético 3 apresentou pouca atividade fitotóxica, como pode ser observado na Figura abaixo.

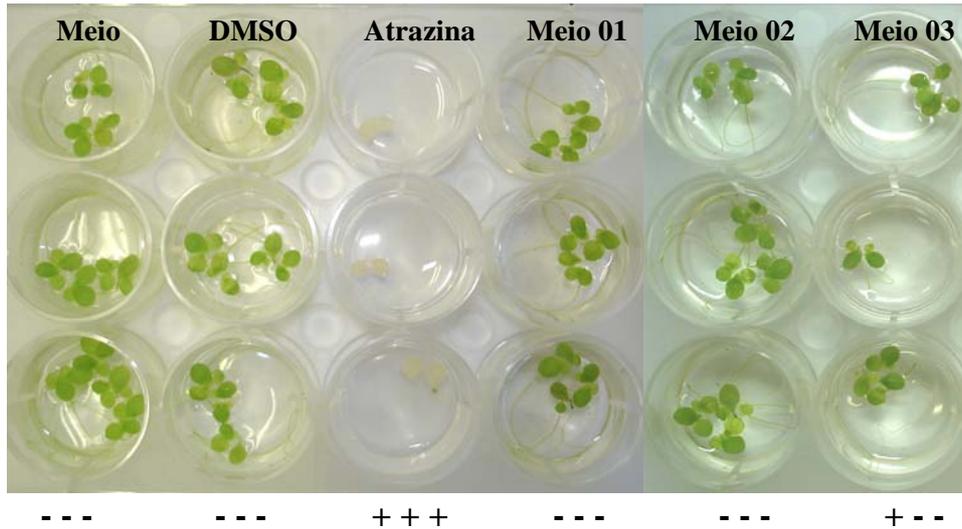


Figura 15: Bioensaio de fitotoxicidade com os extratos obtidos por fermentação em meios líquidos sintéticos.

Como podem ser observados na Figura 15, os extratos obtidos nos diferentes meios sintéticos não apresentaram atividade fitotóxica relevante, fazendo com que não houvesse interesse em isolar e caracterizar os metabólitos. Os perfis químicos dos extratos foram obtidos por espectrometria de massas pode ser observado na Figura 16.

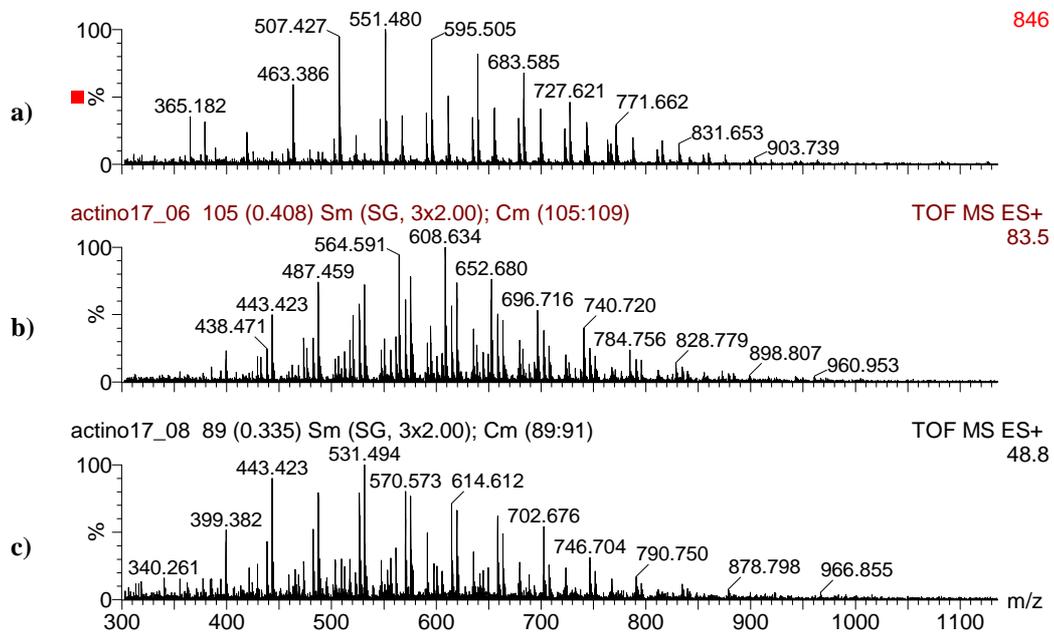


Figura 16: Espectros de massas (ESI-) obtidos por fermentações em diversos meios líquidos sintéticos, a) meio 1; b) meio 2 e c) meio 3.

Também foram testados meios semi-sólidos, compostos por grãos de diferentes culturas. Após 20 dias de fermentação, foi realizada a extração com etanol e os ensaios com *Lemna minor* para verificar a atividade fitotóxica dos mesmos. Três meios, canjica amarela (D), canjica branca (E) e arroz (B), apresentaram uma boa atividade fitotóxica, como pode ser observado na Figura 17. Já os extratos obtidos nos meios de soja, feijão branco e trigo grosso apresentaram atividade fitotóxica moderada, enquanto que os obtidos nos meios de amendoim vermelho, amendoim branco e trigo em grãos não apresentaram atividade fitotóxica e ainda induziram o crescimento das plantas.

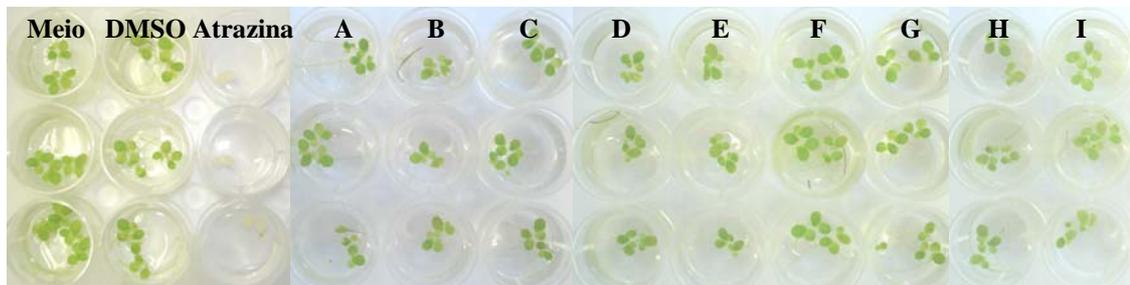


Figura 17: Resultado do bioensaio com *Lemna minor*, extratos dos meios semi-sólidos.
A = Soja (+ - -), B = Arroz (+ + -), C = Feijão branco (+ - -), D = Canjica amarela (+ + -), E = Canjica branca (+ + -), F = Amendoim vermelho (- - -), G = Amendoim branco (- - -), H = Trigo grosso (+ - -) e I = Trigo em grãos (- - -).

Segundo dados da Embrapa Arroz e Feijão (www.cnpaf.embrapa.br), o arroz e as canjicas têm como principal componente o amido. No arroz, os carboidratos representam 85 % de sua composição e está na forma de amilose e amilopectina. No milho para a canjica 79,6%. Também estão presentes proteínas, vitaminas e fibras alimentares em quantidades inferiores (www.cnpms.embrapa.br). Já a soja é rica em proteínas, representando 30 a 45% de sua composição. Os carboidratos representam 10 a 17% de sua composição, porém não apresenta amido o que a diferencia das demais leguminosas (www.cnpso.embrapa.br). O amendoim é rico em lipídeos e proteínas e

suas sementes possuem vitaminas (E e complexo B) e vários minerais, em que o potássio, magnésio, fósforo, cálcio, ferro, zinco e manganês são os principais. O feijão é composto por carboidratos e lipídeos. O trigo é rico em carboidratos e fibras (www.cnpaf.embrapa.br).

Baseado nestas informações é possível sugerir que a produção dos metabólitos com atividade fitotóxica está relacionada com a presença de amido na composição do meio de cultura, uma vez que meios sem este componente, como o meio de soja, não produziram compostos que aferem atividade fitotóxica aos extratos. Além disso, os minerais e as vitaminas que compõem os grãos também são responsáveis pela ativação de vias metabólicas que favorecem o metabolismo secundário.

Os perfis químicos dos extratos com atividade fitotóxica obtidos por fermentações nos meios semi-sólidos foram semelhantes entre si nas análises por espectrometria de massas, com pequenas variações nas intensidades dos sinais. No entanto, estes se diferiram do perfil do extrato obtido por fermentação em meio BD, uma vez que as massas observadas neste espectro não coincidiram com as encontradas nos meios semi-sólidos. Isso sugere que o mesmo microrganismo foi capaz de produzir compostos estruturalmente diferentes com atividade fitotóxica semelhante. A Figura 18 apresenta os espectros de massas com os perfis químicos dos extratos fermentados variando a composição dos meios semi-sólidos.

É possível concluir que a composição nutricional do meio de cultura interferiu nos perfis químicos dos metabólitos secundários produzidos pela actinobactéria 17 (39 PL). Isso ocorre porque os microrganismos utilizam-se dos nutrientes do meio para sobreviver e produzir os metabólitos secundários. As fontes de carbono,

nitrogênio e fósforo favorecem o crescimento do microrganismo. A carência de um ou mais nutrientes favorecem o metabolismo secundário, desde que haja condições nutricionais para o microrganismo sobreviver. O metabolismo secundário torna possível a sobrevivência do microrganismo em meios limitados de nutrientes. A presença de glicose no meio, muitas vezes, pode inibir o metabolismo secundário, pois diminui a atividade de várias enzimas⁷⁸.

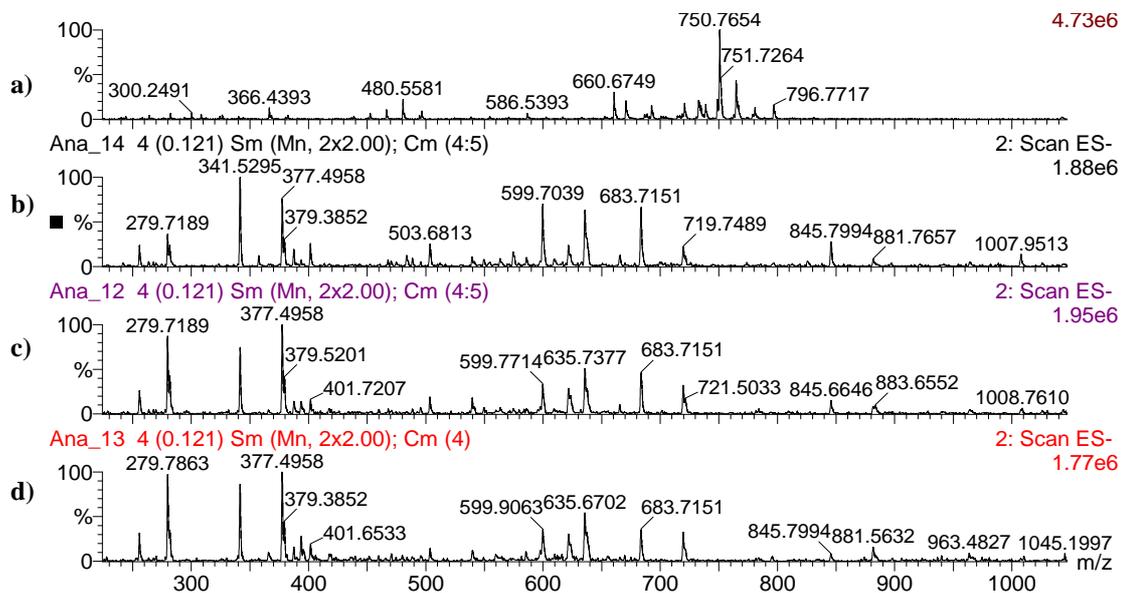


Figura 18: Espectros de massas (ESI-) dos extratos obtidos por fermentação em meios semi-sólidos: a) Meio BD, b) arroz, c) canjica amarela e d) canjica branca.

Outro estudo comparativo dos perfis químicos destes extratos foi realizado utilizando a cromatografia líquida. A comparação cromatográfica está representada na Figura 19. As condições cromatográficas das análises foram as que apresentaram melhor separação para o extrato bruto obtido em meio BD.

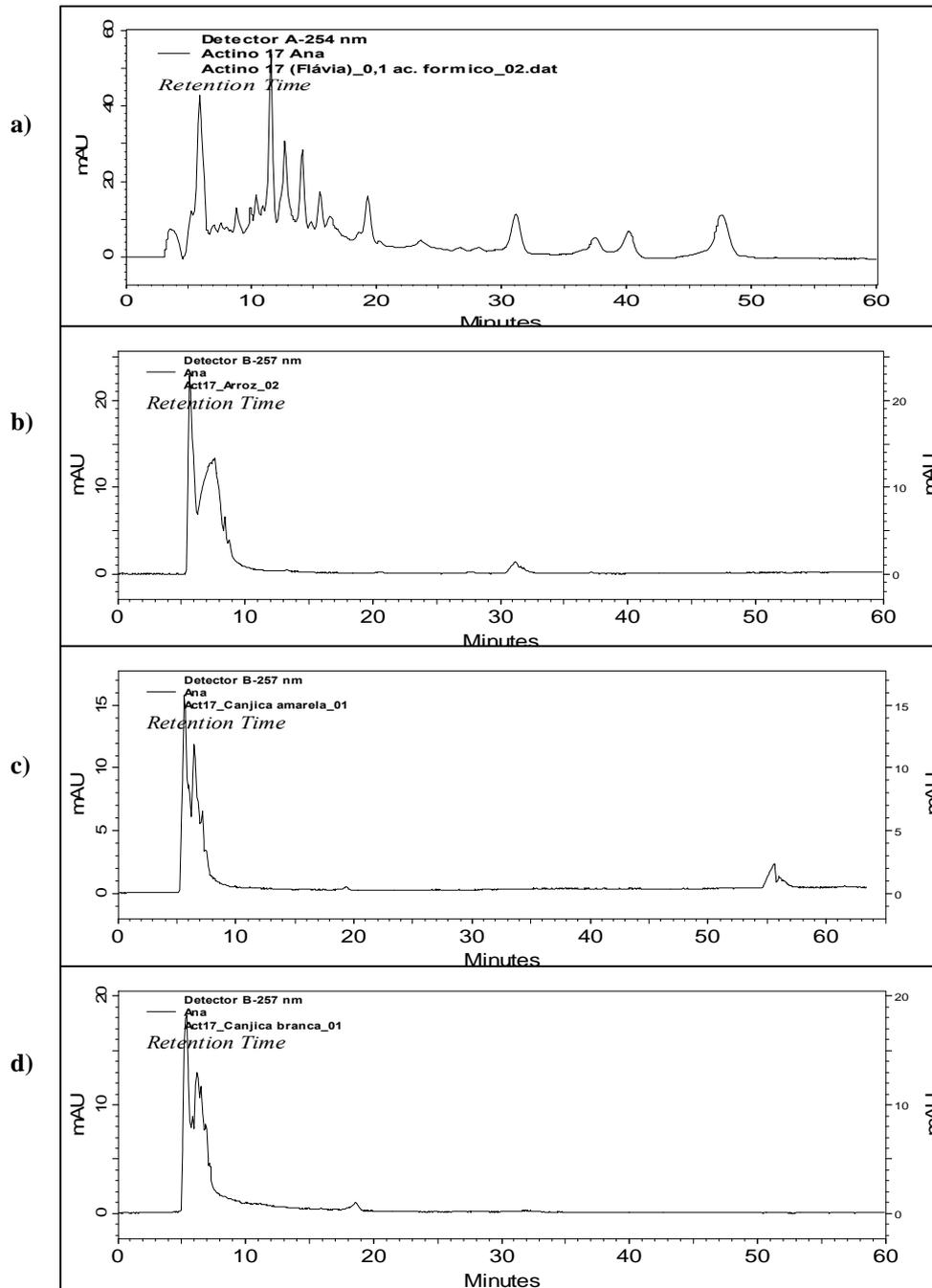


Figura 19: Cromatogramas dos extratos brutos obtidos por fermentação da actinobactéria 17 (39 PL) em meios semi-sólidos. Coluna Fenil-Hexil, Fase móvel Acetonitrila/ ácido fórmico 0,1% (1:1), Fluxo $600 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. a) Meio BD, b) arroz, c) canjica amarela, e d) canjica branca.

As análises por cromatografia líquida (HPLC) confirmaram que os perfis químicos dos extratos ativos fermentados em meios semi-sólidos apresentaram semelhanças entre si, mas diferiram do perfil do extrato obtido em meio BD, em

concordância com os resultados obtidos com a espectrometria de massas por inserção direta. Com isso, foi possível concluir que os estudos realizados com a espectrometria de massas apresentaram diversas vantagens frente às análises com a cromatografia líquida, como a rapidez das análises, a quantidade de amostra necessária, o baixo consumo de solvente, as informações obtidas nos espectros de massas e os bancos de dados disponíveis que facilitam a descoberta dos compostos.

Outro fator que afeta a produção de metabólitos secundários é a agitação do meio. A agitação causa um stress mecânico nos microrganismos quando estão sendo fermentados. Este stress tende a favorecer e acelerar a produção de metabólitos secundários como um mecanismo de defesa contra a perturbação sofrida. Fermentações com agitação tendem a apresentar menor tempo de inoculação, devido ao fim da fase de crescimento. A agitação pode aumentar satisfatoriamente a produção de metabólitos secundários em resposta à deformação estrutural da membrana citoplasmática na produção celular: a membrana permeável pode ser alterada em resposta as influências mecânicas externas, associando a desregulação das funções fisiológicas com o metabolismo secundário.

Além disso, a agitação aumenta a aeração do meio, variando as concentrações dos gases dissolvidos (outro fator que afeta a produção de metabólitos secundários). Quando os microrganismos são mantidos sem agitação, a troca de gás ocorre diretamente entre a superfície celular e a atmosfera, dificultando a troca de oxigênio e a transferência de massa. Já com agitação, a transferência de oxigênio está relacionada com a flotação em pequenas bolhas de ar adsorvidas. Quanto ao gás carbônico, sabe-se

que o mesmo é mais solúvel que o oxigênio em água e que algumas biossínteses de metabólitos secundários são inibidas por CO₂. Uma função importante da ventilação (relacionada com a agitação) é a expulsão do CO₂ e outros metabólitos voláteis da cultura⁷⁹.

Para este estudo, que visou verificar a influência da agitação na produção de metabólitos secundários pela actinobactéria 17 (39 PL), as fermentações foram realizadas em meio BD igualmente dividido em 4 erlenmeyers, nos quais dois deles foram fermentados com agitação de 130 rpm e temperatura ambiente, e os outros dois foram fermentados sem agitação (fermentação estática) a temperatura ambiente. Todos os erlenmeyers foram inoculados com a mesma linhagem do microrganismo, garantindo a reprodutibilidade dos meios. Os extratos foram obtidos por extração líquido - líquido com acetato de etila e submetidos ao bioensaio com *Lemna minor*. A Figura 20 apresenta o resultado do bioensaio de fitotoxicidade.

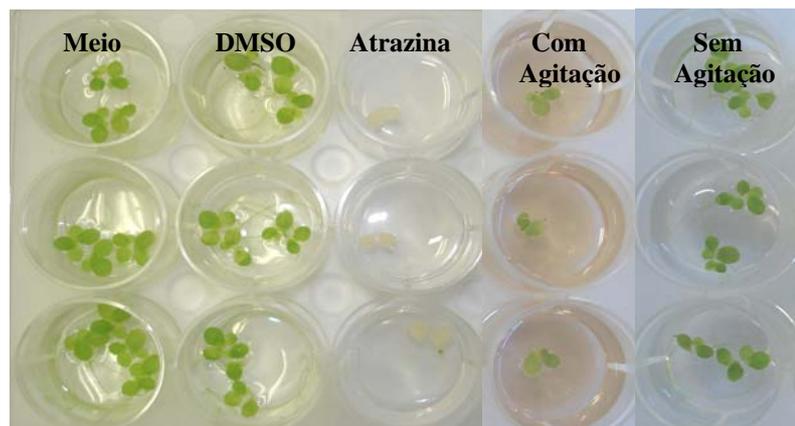


Figura 20: Resultado do bioensaio com *Lemna minor*, extratos com agitação (+ + -) e estático (- - -).

Como é possível observar na Figura acima, somente o extrato obtido com agitação apresentou atividade fitotóxica. Os espectros de massas evidenciam a diferença nos perfis químicos.

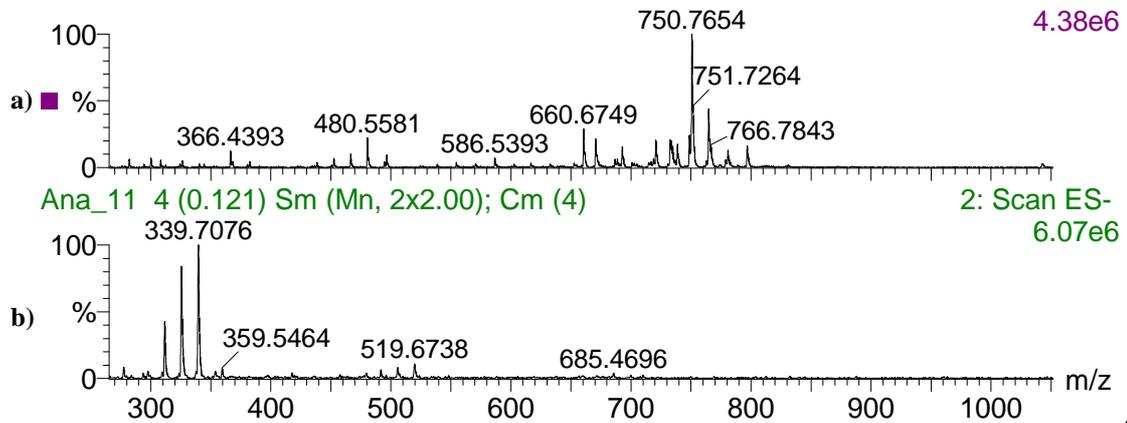


Figura 21: Espectros de massas variando a agitação do meio: a) fermentação realizada com agitação e b) fermentação estática.

Como pode ser observado na Figura 21, o extrato obtido sem agitação apresenta poucos compostos e estes não estão presentes no extrato obtido com agitação.

As amostras também foram analisadas por cromatografia líquida (HPLC). E mais uma vez, a cromatografia líquida confirma os resultados já obtidos com a espectrometria de massas, demonstrando que os perfis são completamente distintos.

Outro parâmetro estudado foi o tempo de repique da cepa submetida à fermentação, para a otimização da produção de fitotoxinas pela actinobactéria 17 (39 PL). Os microrganismos foram fermentados variando a idade da linhagem utilizada, ou seja, a quantidade de dias de repique da cepa. Como é possível observar na Figura 22, independente da idade da cepa todos os extratos foram ativos, porém os extratos obtidos com 19 e 31 dias de repique apresentaram maior atividade fitotóxica.

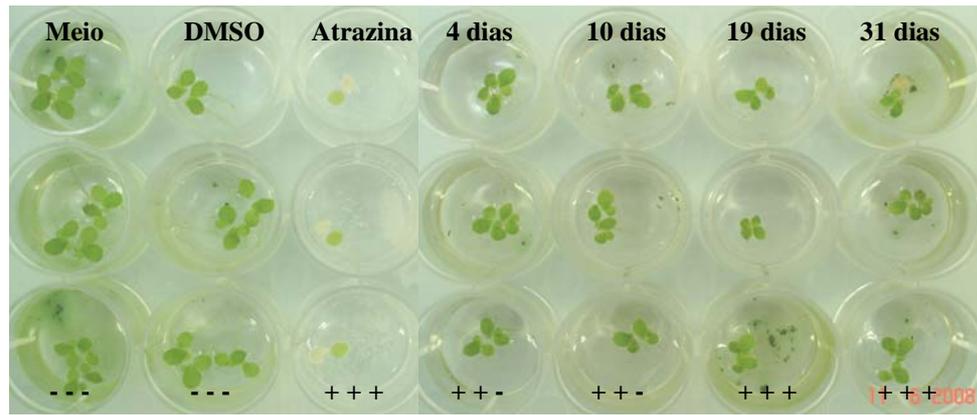


Figura 22: Resultado do bioensaio com *Lemna minor*, variando a idade da cepa.

Este resultado evidencia que o tempo de repique também influencia na composição dos metabólitos produzidos. Porém, neste caso a influência foi menos pronunciada. O perfil químico obtido por espectrometria de massas está apresentado na Figura a seguir. Pode ser observada uma pequena diferença nas intensidades dos sinais presentes nos espectros.

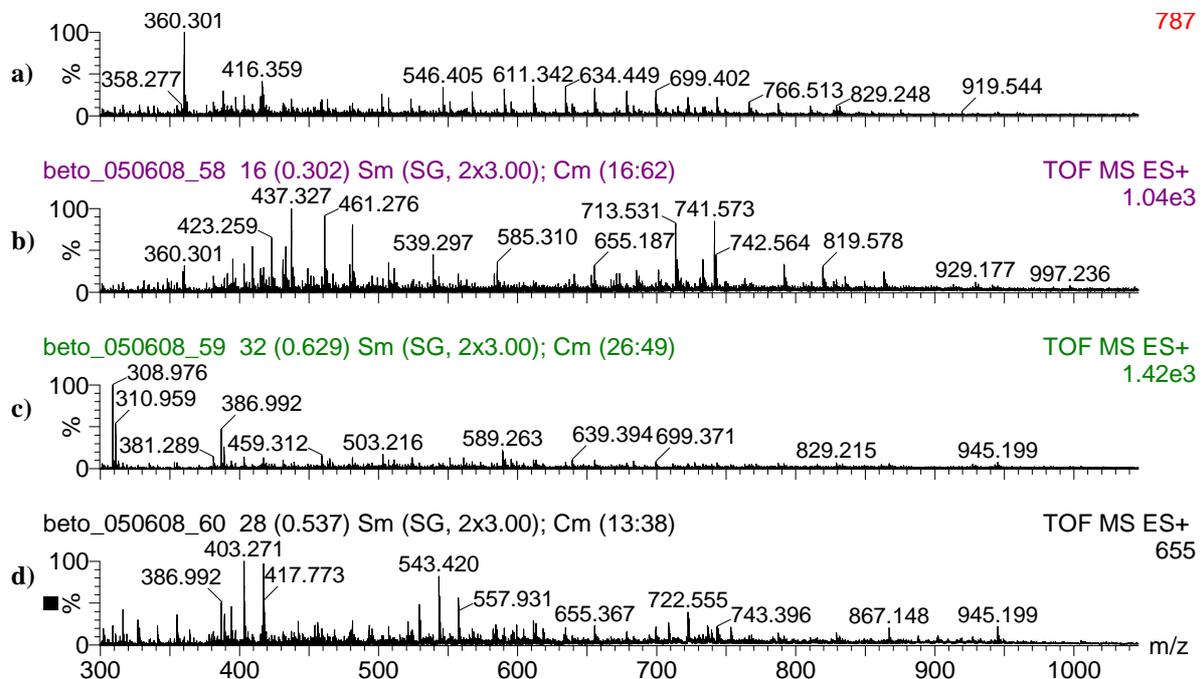


Figura 23: Espectro de massas (ESI+) dos extratos com variação da idade da cepa, a) 4 dias, b) 10 dias, c) 19 dias e d) 31 dias.

Depois de realizado o trabalho de investigação dos perfis químicos dos extratos produzidos pela actinobactéria 17 (39 PL), o extrato ativo produzido por fermentação em meio BD foi submetido ao estudo de derreplicação e posterior fracionamento para isolamento da fração ativa.

4.4 Derreplicação do Extrato Ativo da Actinobactéria 17 (39 PL) em Meio BD

Como apresentado na introdução desta dissertação, a derreplicação consiste na utilização de técnicas analíticas para a identificação prévia de compostos conhecidos presentes nos extratos.

Nesta etapa do projeto, a derreplicação foi aplicada no extrato bruto da actinobactéria 17 (39 PL) fermentada em meio BD, empregando a espectrometria de massas com ionização por eletrospray acoplada com a cromatografia líquida e por inserção direta.

O processo de derreplicação foi iniciado pela análise do extrato bruto por inserção direta. Esta técnica consiste na inserção da amostra na fonte de ionização através de uma bomba de seringa ou através de um injetor automático do sistema de cromatografia, operando sem coluna. Desta forma, todos os componentes presentes na amostra serão observados com suas respectivas razões massa/carga ($[M+H]^+$ e $[M-H]^-$). Neste modo de análise, a separação é realizada através da distinção entre os sinais de massas observados, sem a necessidade de separação cromatográfica, como observado na Figura abaixo.

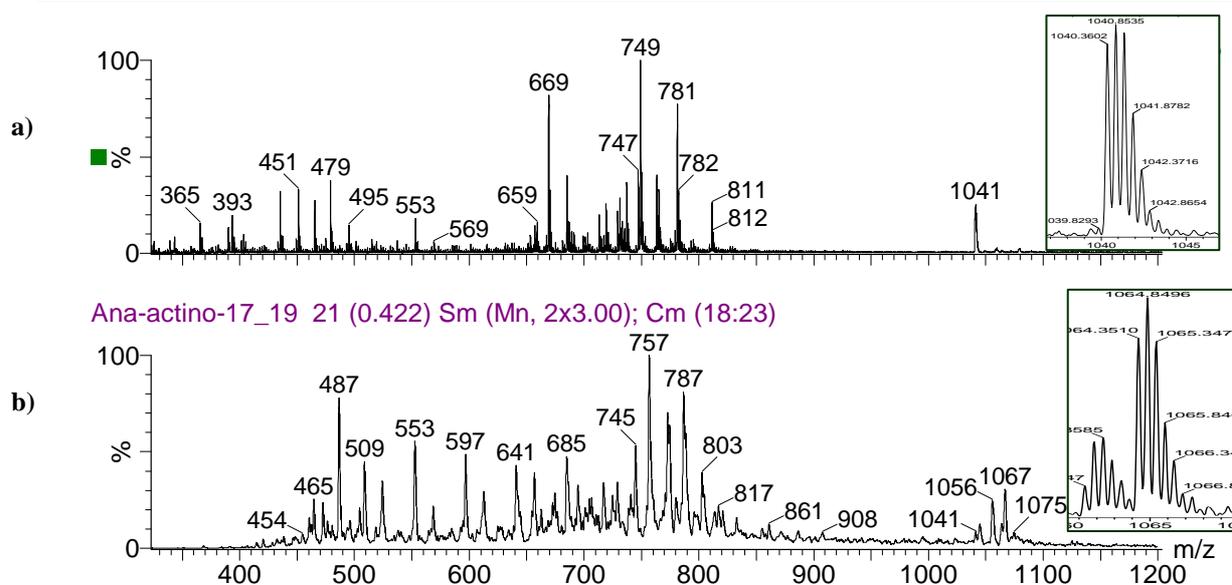


Figura 24: Espectros de massas adquiridos por inserção direta: a) modo negativo (ESI-) e b) modo positivo (ESI+).

O espectro de massas ESI por inserção direta apresentou grande quantidade de sinais, o que indica a grande diversidade de metabólitos presentes no extrato ativo.

O espectro de massas no modo negativo (ESI-), Figura 24.a apresentou três grupos de sinais com maior intensidade nas regiões de m/z 430 a 560, 650 a 830 e na região em torno de 1040.

O próximo passo no processo de derreplicação foi submeter os principais sinais do espectro a um estudo de fragmentação (MS/MS), através de experimentos de dissociação induzida por colisão (CID).

Análise realizada no espectrômetro de massas Q-TOF (alta resolução) em ESI-, possibilitou a verificação de que o sinal de m/z 1042 corresponde a um metabólito duplamente carregado $[M-2H]^{-2}$. Este resultado também foi observado para a análise em modo positivo ESI+. Entretanto, neste caso, outros sinais também foram observados. O sinal de m/z 1053,37 foi atribuído a $[M+H+NH_4]^{2+}$, o sinal de m/z

1062,39 foi atribuído a $[M+2NH_4]^{2+}$ e o sinal de m/z 1064,84 foi atribuído a $[M+2Na]^{2+}$. A deconvolução dos espectros em negativo foi realizada e os resultados indicaram que a molécula analisada possui massa molecular de 2084 Da, como apresentado na a abaixo.

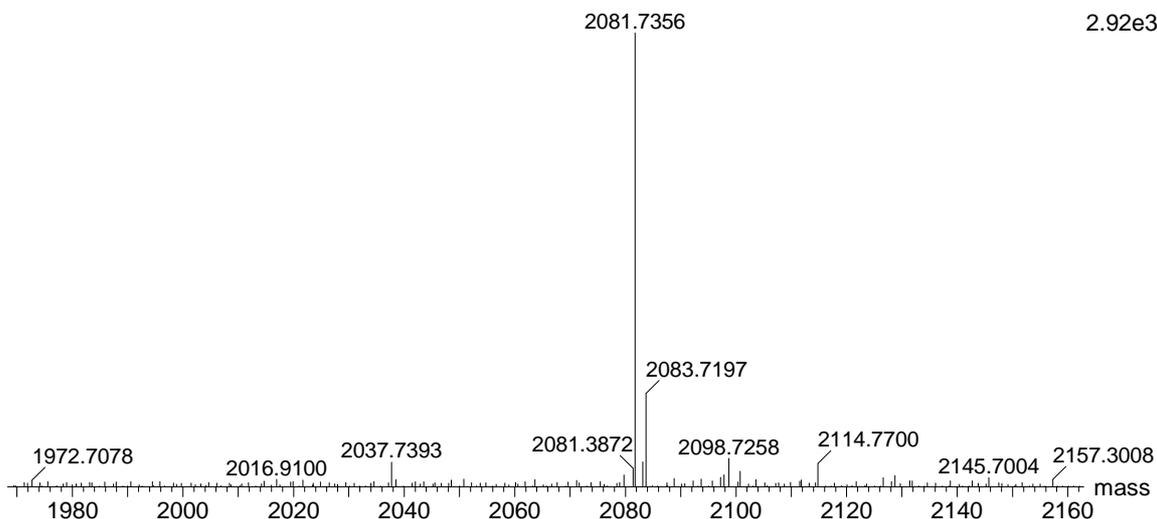


Figura 25: Deconvolução do sinal de m/z 1040.85

Com base nesta informação foi realizada uma busca no Dicionário de Produtos Naturais com o intervalo de massas 2084 a 2085. O resultado obtido sugere que o composto analisado pode ser a Macroviracin A, a qual é produzida por *Streptomyces* sp. BA-2836. A série da Macroviracin exibe uma excelente atividade antiviral, em especial contra o vírus herpes simplex do tipo I (HSV-1) e contra o vírus da varicela-zoster (VZV), com potencialidade 10 vezes maior que a Aciclovir. Macroviracin A é um dos 42 membros da família dos macrodiolídeos que são constituídos por dímeros de cadeias graxas compostas por 22 carbonos e resíduos de D-glicoses ligadas ao centro da cadeia. Sua estrutura está apresentada na Figura a seguir.

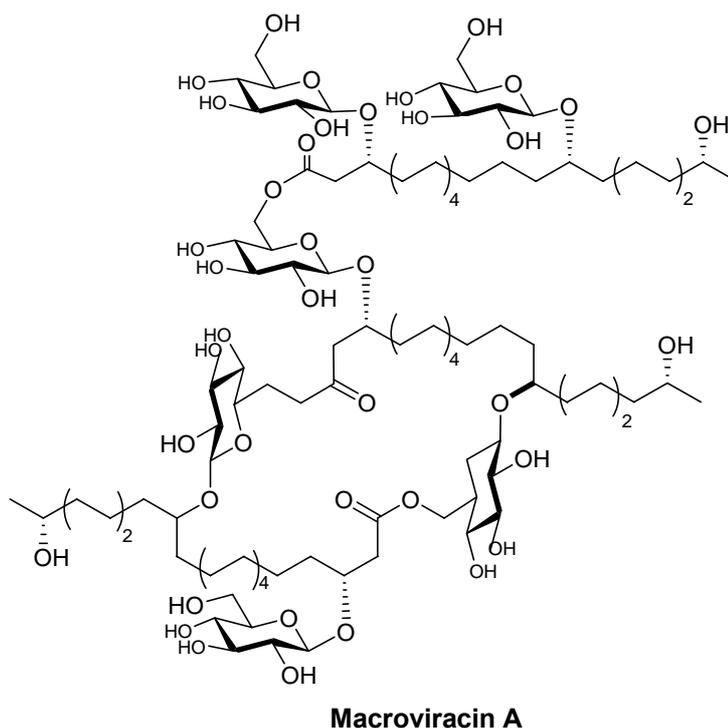


Figura 26: Estrutura da Macroviracin A.

Os sinais da região de m/z 650 a 830 foram selecionados individualmente e submetidos à dissociação. Os espectros de fragmentação dos sinais selecionados apresentaram o mesmo perfil de fragmentação, sugerindo que estes compostos pertencem a uma mesma classe. Os principais fragmentos observados foram as perdas de H_2O [M-H-18]⁻, MeOH [M-H-32]⁻ e AcOH [M-60]⁻ como pode ser observado na Figura 27.

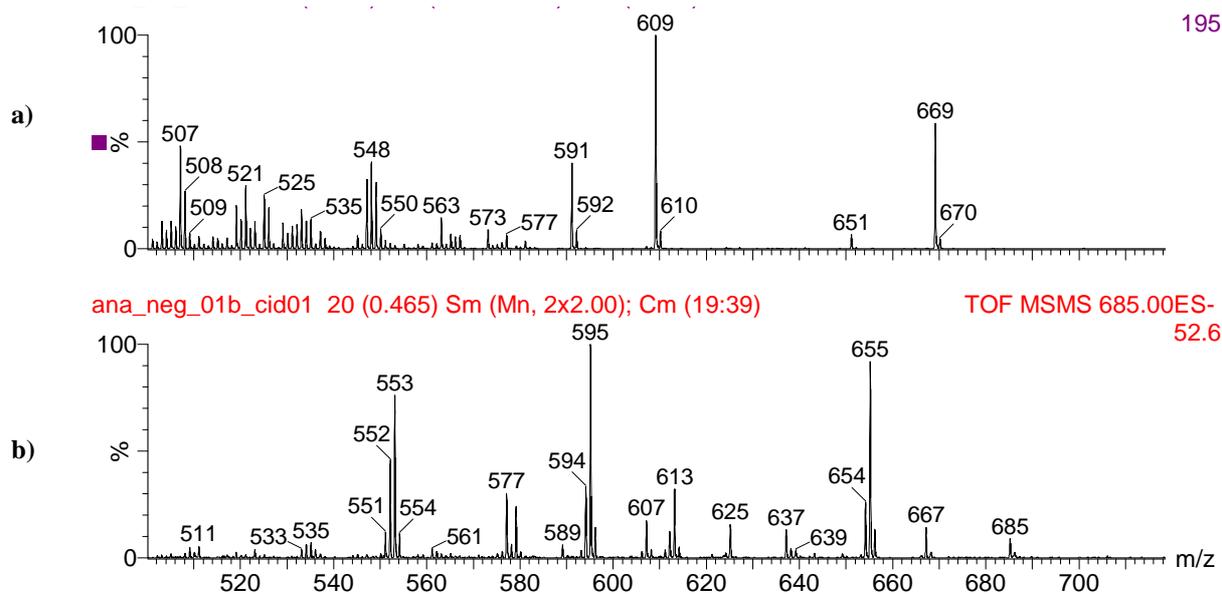


Figura 27: Espectros de massas (CID) em modo negativo de compostos de m/z 650 a 830. As figuras acima são a) m/z 669 e b) m/z 685.

Os sinais da região de m/z 430 a 560 também foram submetidos a estudos de fragmentação. As análises dos espectros de CID indicaram que estes compostos pertencem à mesma classe estrutural, uma vez que apresentaram mesmo perfil de fragmentação e o com sinal característico de $[M-H-172]^-$, como pode ser observado na Figura 28.

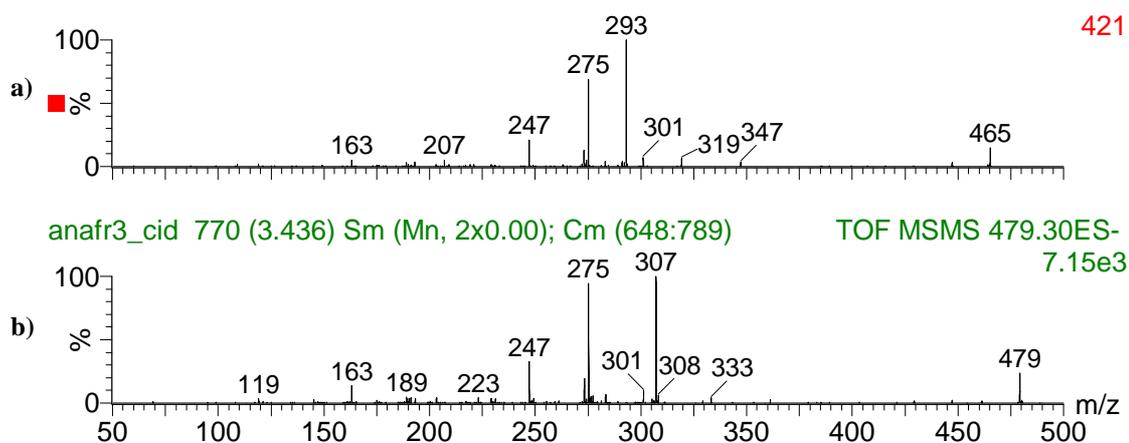


Figura 28: Espectros de massas (MS/MS) em modo negativo de alguns compostos da região de m/z 430 a 560; (a) m/z 465 e b) m/z 479).

Tendo em mãos os dados das massas dos compostos obtidos no espectro de massas e as informações estruturais dos mesmos através dos experimentos de fragmentação, a sequência do processo de derreplicação foi realizada com uma busca nos bancos de dados *Dictionary of Natural Products* e CAS, cruzando estes dados com outras informações como *Streptomyces* e actinomycetes.

A primeira busca foi realizada com o intervalo de massas de 670 – 671. Foram encontrados 108 compostos, onde 12 deles foram produzidos por actinobactérias do gênero *Streptomyces* e os demais resultados apresentaram diversas fontes biológicas como bactérias, fungos, sementes, raízes, caranguejos, esponjas, anêmonas e plantas em geral. Independente da fonte biológica todos os compostos foram analisados sendo alguns descartados na primeira análise com base no espectro de fragmentação ou devido a presença de cloro ou enxofre em razão da abundância isotópica relativa. Por exemplo, os compostos glicosilados foram descartados com base nos espectros de fragmentação não apresentarem como sinal característico [M-H-162]⁻, indicando a perda de hexoses. Os compostos produzidos por actinobactérias despertaram mais a atenção por se tratarem do mesmo gênero do microrganismo fermentado, por isso sua busca foi mais criteriosa.

Uma das possíveis estruturas encontradas na busca foi a Julicrome Q_{3.5} produzidas por *Streptomyces shiodaensis*. Novas buscas foram realizadas e os resultados mostraram a existência de uma série homóloga composta por 20 bisantraquinonas, como pode ser observado na Tabela a seguir.

Tabela 6: Resultado da busca pelos compostos produzidos pelo *Streptomyces shiodaensis*.

| Nome | Massa Molecular |
|---|------------------------|
| Julicrome Q _{1,1} | 714,19 |
| Julicrome Q _{1,2} | 696,18 |
| Julicrome Q _{1,3} | 732,20 |
| Julicrome Q _{1,3} , 4a, 9a – Diepímero | 732,20 |
| Julicrome Q _{1,3} ; 9 – cetona | 730,20 |
| Julicrome Q _{1,5} | 652,16 |
| Julicrome Q _{1,6} | 700,21 |
| Julicrome Q _{1,9} | 746,28 |
| Julicrome Q _{2,2} | 678,17 |
| Julicrome Q _{2,3} | 714,19 |
| Julicrome Q _{2,5} | 634,15 |
| Julicrome Q _{3,3} | 750,21 |
| Julicrome Q _{3,3} ; 9 – cetona | 748,20 |
| Julicrome Q _{3,5} | 670,17 |
| Julicrome Q _{3,5} ; 10 – cetona | 668,15 |
| Julicrome Q _{3,8} | 734,22 |
| Julicrome Q _{5,5} | 590,12 |
| Julicrome Q _{5,6} | 638,18 |
| Julicrome Q _{6,6} | 686,24 |
| Julicrome Q _{6,6} ; 10,10' - dihidroxi | 718,23 |

Baseado na possível identificação da Julicrome Q_{3,5} no extrato bruto da actinobactéria 17 (39 PL), foi realizada uma busca no espectro de massas na tentativa de encontrar outras Julicromes. A Figura 29 apresenta todas as Julicromes presentes no extrato, que foram identificadas e caracterizadas por experimentos de fragmentação (MS/MS).

As Julicromes apresentam-se como uma classe de pigmentos que apresentam coloração intensa do amarelo ao laranja. A Julicrome Q_{3,5} apresentou atividade citotóxica moderada contra células humanas tumorais, como descrito por Shaaban⁸⁰ e colaboradores.

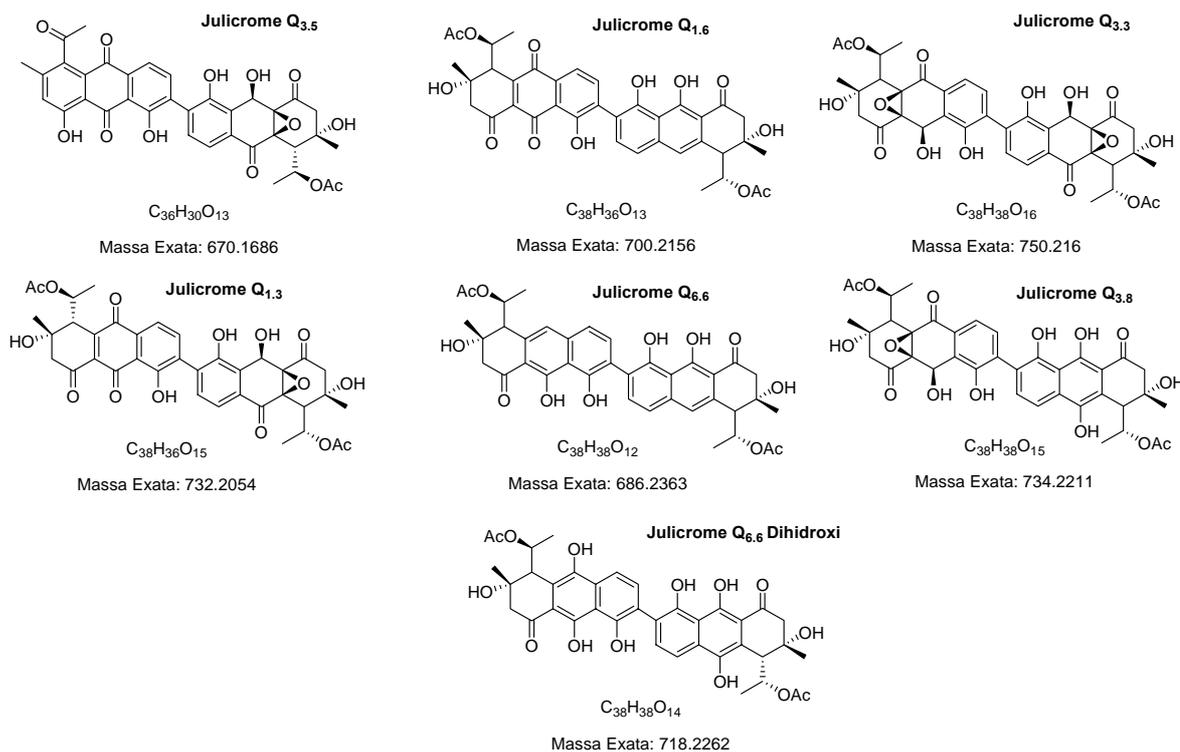


Figura 29: Estruturas das Julicromes encontradas no extrato bruto.

A derreplicação do extrato bruto também foi realizada empregando a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida. Desta forma, as condições cromatográficas (LC-DAD) foram transpostas para a análise de LC-MS.

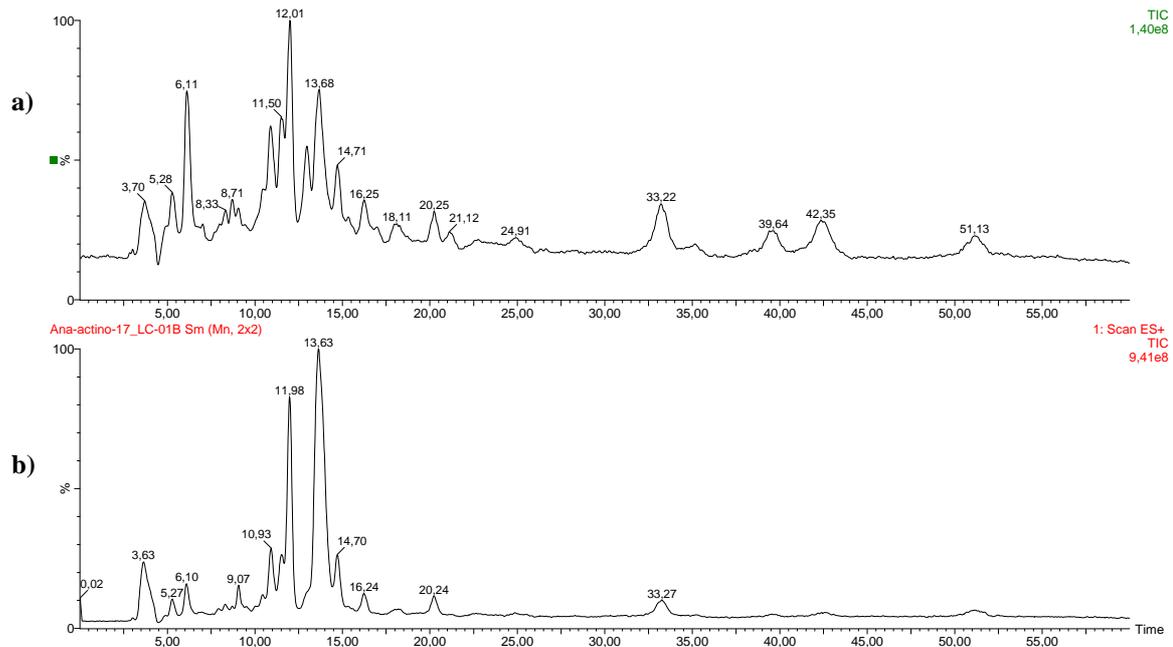


Figura 30: LC-MS (ESI+ e ESI-). A coluna utilizada foi uma fenil-hexil, Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm. A fase móvel (1:1) Água/Acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico, num fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, a) ESI - e b) ESI+.

A Figura 30 apresenta os cromatogramas obtidos por LC-MS em modo positivo e negativo. As variações nas intensidades dos picos observadas nos dois modos de análise são explicadas pelas diferenças nos potenciais de ionizações dos compostos presentes no extrato, que devido às suas propriedades ácido-base tendem a ser mais estáveis como cátions ou ânions.

Conhecendo as massas dos metabólitos produzidos pelo microrganismo, as mesmas foram extraídas do cromatograma obtido por LC-MS em modo negativo. A Figura 31 apresenta alguns dos cromatogramas obtidos pelas extrações dos íons correspondentes as Julicromes presentes no extrato.

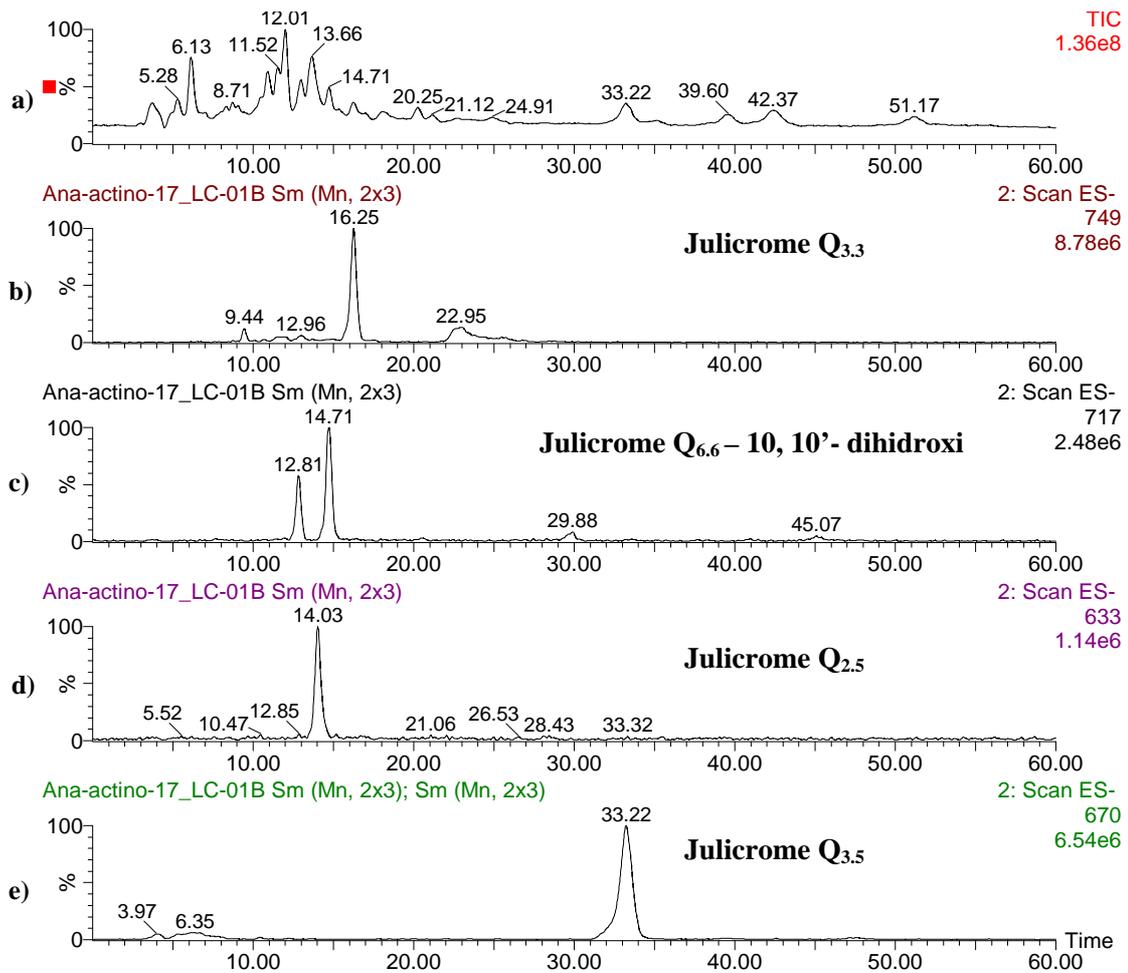


Figura 31: Cromatogramas das extrações dos ions LC-MS (ESI-): a) Extrato bruto, b) m/z 749, c) m/z 717, d) m/z 633 e) m/z 669.

O próximo passo foi submeter o extrato bruto a um fracionamento por cromatografia líquida preparativa para o isolamento, identificação e caracterização do composto com atividade fitotóxica. O fracionamento foi realizado empregando uma coluna preparativa ODS (C18 com 20 x 250 mm, 5 μ m - Shimatzu), com fluxo de 10 mL.min⁻¹ e fase móvel Acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (1:1). As frações foram coletadas com um volume de 10 mL a cada 1 minuto de corrida aproximadamente, por um coletor automático.

A fração que continha o composto de m/z 669 foi re-purificada em uma coluna empacotada com Silicagel 0,035 - 0,070 μm para posterior caracterização por ressonância magnética nuclear de próton, carbono e técnicas de ressonância bidimensionais de HMQC (do inglês *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*), HMBC (do inglês *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) e espectrometria de massas (fracionamento).

Os espectros obtidos por ressonância magnética nuclear de próton, HMQC e HMBC estão representados nas Figuras a seguir e estão de acordo com a estrutura proposta para a Julicrome Q_{3,5}.

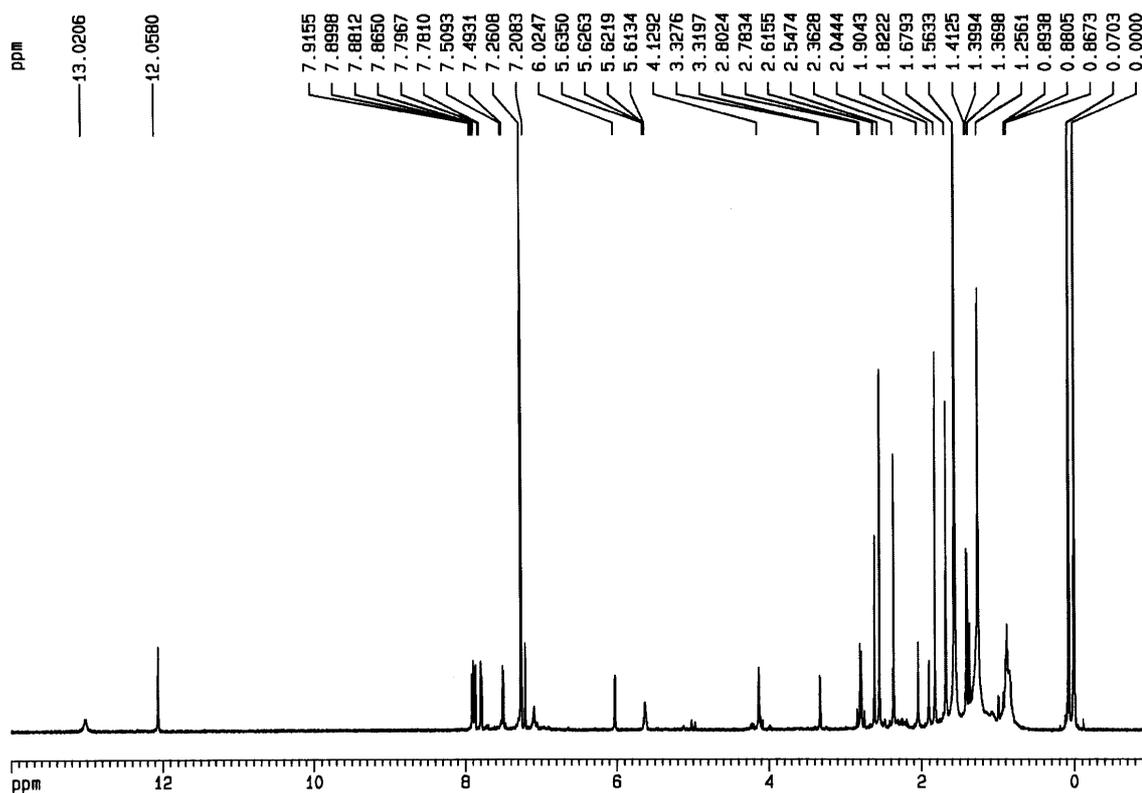


Figura 32: Espectro de ^1H RMN da Julicrome Q_{3,5}.

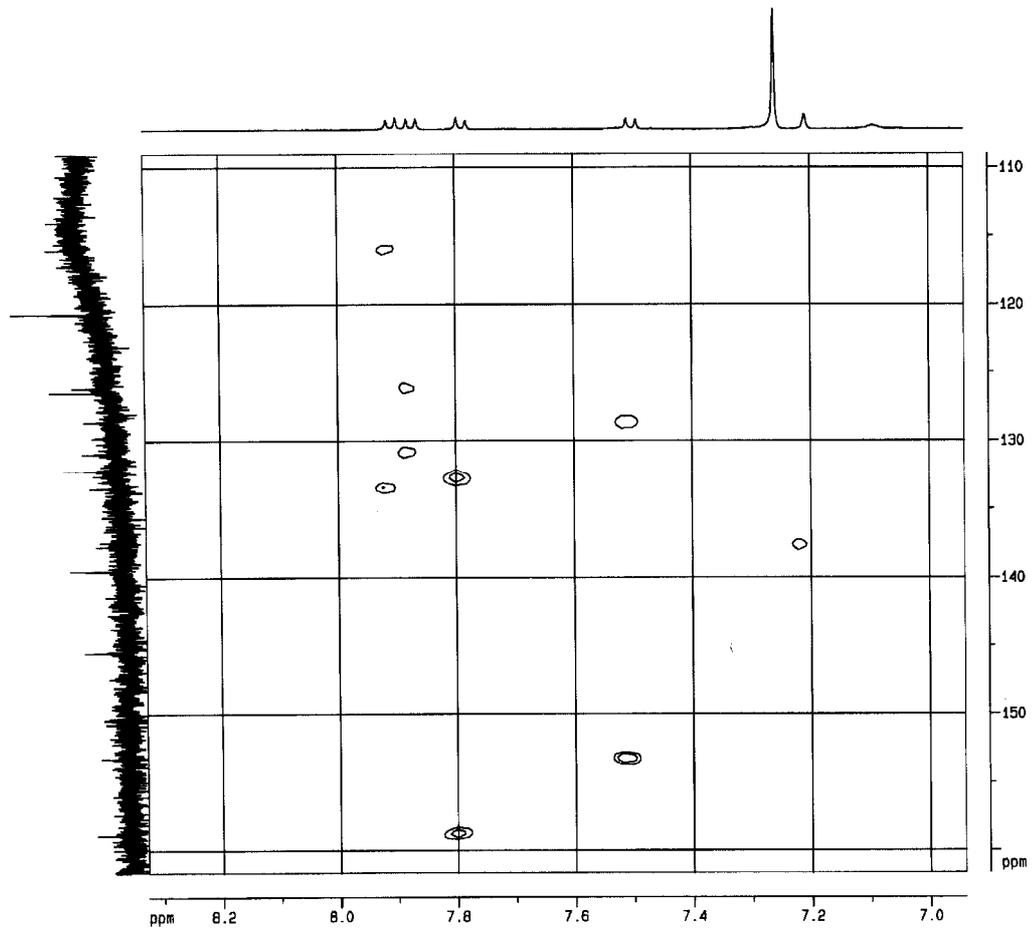


Figura 33: Espectro HMQC da bisantraquinona Julicrome Q_{3.5}.

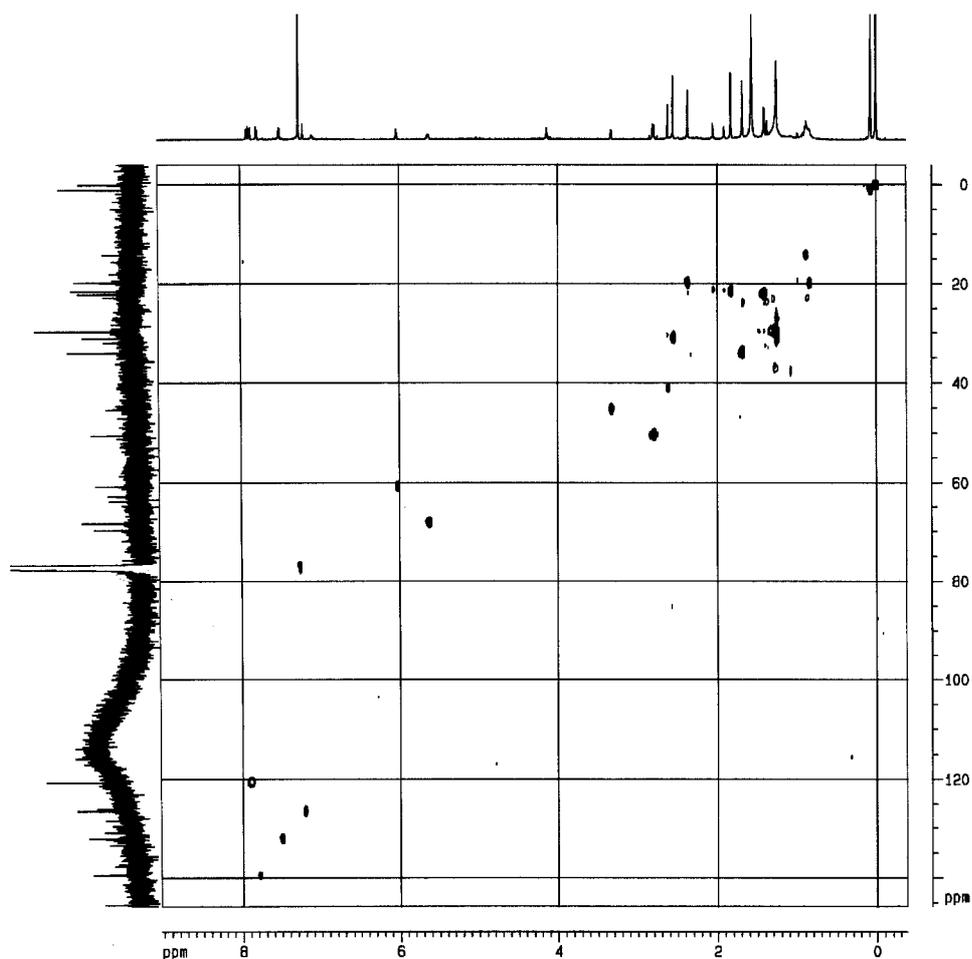
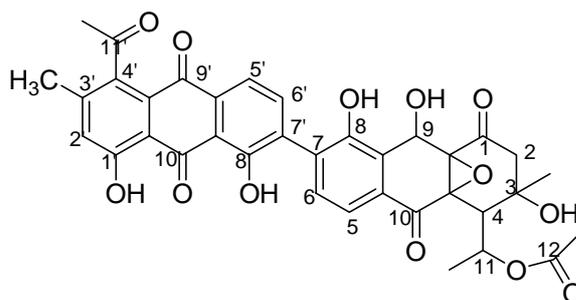


Figura 34: Espectro HMBC da bisantraquinona Julicrome Q_{3,5}.

Comparando os resultados obtidos nos espectros acima com dados da literatura^{80,81} foi confirmada a presença da Julicrome Q_{3,5} no extrato.

A comparação dos resultados obtidos na literatura com os valores experimentais pode ser observada na Tabela a seguir. A Figura 35 traz a estrutura da Julicrome Q_{3,5} com as respectivas posições de seus átomos.

Figura 35: Estrutura da Julicrome Q_{3,5}.Tabela 7: Comparação dos dados espectroscópicos da Julicrome Q_{3,5} encontrados na literatura com os obtidos experimentalmente.

| Posição | δ H (Experimental) | δ H (Literatura) | δ C (Experimental) | δ C (Literatura) |
|----------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 1 | - | - | 204,5 | 204,1 |
| 2 | 2,7 (Ha), 2,8 (Hb) | 2,78(Ha), 2,74 (HB) | 51 | 50,4 |
| 3 | - | - | 68,5 | 69,5 |
| 3 – CH ₃ | 1,7 | 1,65 | 34 | 33,8 |
| 4 | 3,4 | 3,30 | 45,5 | 45,2 |
| 4a | - | - | 63,5 | 62,7 |
| 5 | 7,9 | 7,83 | 121 | 120,5 |
| 6 | 7,5 | 7,46 | 134 | 132,0 |
| 7 | - | - | 129 | 130,7 |
| 8 | - | - | 153,5 | 153,0 |
| 8a | - | - | 127 | 126,0 |
| 9 | 6 | 6,01 | 61 | 60,3 |
| 9a | - | - | 64 | 63,7 |
| 10 | - | - | 188,5 | 187,4 |
| 10a | - | - | 129 | 128,5 |
| 11 | 5,7 | 5,60 | 69 | 68,3 |
| 11 – CH ₃ | 1,4 | 1,38 | 23,5 | 21,9 |
| 12 | - | - | 171 | 170,6 |
| 13 | 1,8 | 1,80 | 22 | 21,4 |
| 1' | - | - | 127 | 126,6 |
| 2' | 7,2 | 7,17 | 126 | 126,3 |
| 3' | - | - | 146 | 145,2 |
| 3' – CH ₃ | 2,3 | 2,33 | 20 | 19,6 |
| 4' | - | - | 138 | 137,4 |
| 4'a | - | - | 131 | 129,5 |
| 5' | 7,9 | 7,86 | 121 | 120,5 |

Continuação da tabela 7

| | | | | |
|----------------------|------|-------|-------|-------|
| 6' | 7,8 | 7,75 | 140 | 139,3 |
| 7' | - | - | 134 | 133,3 |
| 8' | - | - | 159 | 158,7 |
| 8'a | - | - | 117 | 115,7 |
| 9' | - | - | 187,5 | 192,7 |
| 9'a | - | - | 114 | 113,3 |
| 10' | - | - | 182 | 181,7 |
| 10'a | - | - | 131 | 132,7 |
| 11' | - | - | 204 | 204,8 |
| 11'- CH ₃ | 2,55 | 2,52 | 30,5 | 31,1 |
| 8 - OH | - | - | - | - |
| 1' - OH | 12,1 | 12,08 | - | - |
| 8' - OH | 13 | 12,88 | - | - |

Os demais compostos pertencentes à classe das Julicromes presentes no extrato foram caracterizados por espectrometria de massas (MS/MS). Uma característica em comum dos compostos pertencentes a esta classe é a presença do sinal de [M-H-60], como podem ser observados na Figura 36 e 37, que apresenta alguns exemplos.

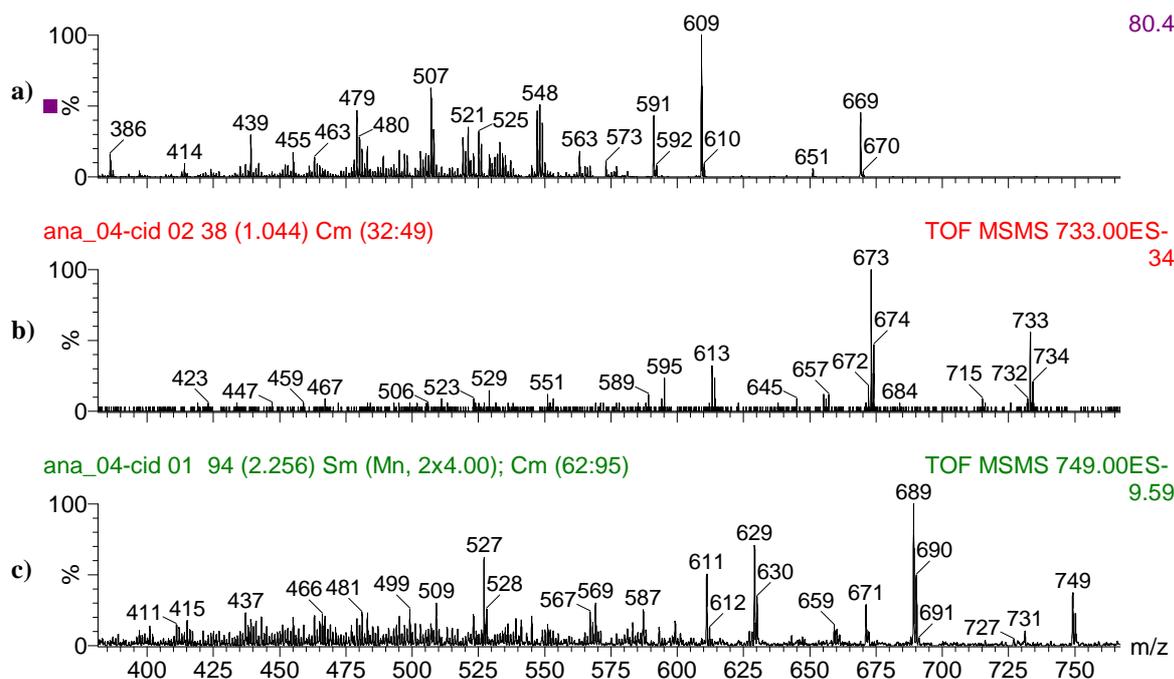


Figura 36: Espectros de massas MS/MS de algumas Julicromes presentes no extrato da actinobactéria 17 (39 PL), a) m/z 669, b) m/z 733 e c) m/z 749.

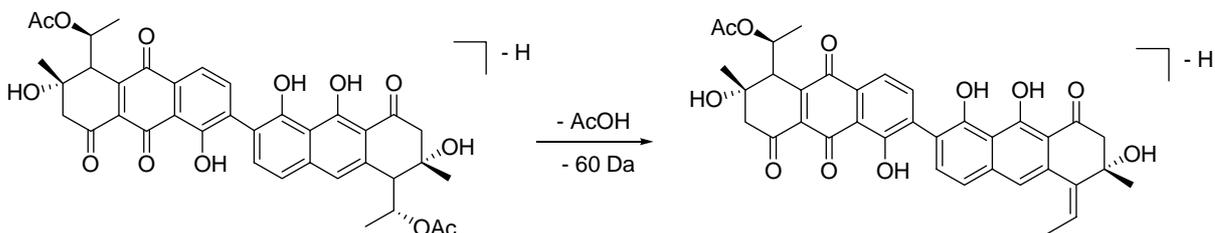


Figura 37: Proposta de fragmentação por perda de AcOH.

Alguns estudos mostraram que a Julicrome $Q_{1.3}$, produzida pela linhagem de *Streptomyces* sp. TM-71, é capaz de inibir a formação de galhas sem afetar a germinação de sementes alfafa. Este composto foi submetido ao bioensaio de discos de batata (*Potato tuber disk assay*) apresentando inibição mínima na concentração de $1,6 \mu\text{g}/\text{disco}$. Além disso, não causa necrose em concentrações inferiores a $100 \mu\text{g}/\text{disco}$ e tão pouco causa a inibição da germinação de sementes de alfafa em concentrações inferiores a $50 \mu\text{g}/\text{disco}$, além de não exibir atividade contra

Agrobacterium tumefaciens. Estes dados demonstraram que o composto é especificamente ativo em qualquer uma das etapas da formação da planta sem afetar suas células ou o crescimento de *A. tumefaciens*, sendo promissor na investigação da elucidação dos mecanismos de transformações de plantas⁸².

Algumas bisantraquinonas, como as Citosporinas A e B, inibem o crescimento de bactérias Gram - Positivas incluindo as linhagens que são resistentes a antibióticos⁸³.

4.5 Caracterização Estrutural do Composto com Atividade Fitotóxica produzido pela Actinobactéria 17 (39 PL) Fermentada em Meio BD

Para isolar e caracterizar a fração com atividade fitotóxica, a actinobactéria 17 (39 PL) foi fermentada em 2 litros de meio BD, de onde foram extraídos aproximadamente 130 mg de extrato bruto. Este foi fracionado em coluna de sílica gel utilizando fases móveis com ordem crescente de polaridade, partindo da proporção 7:3 de Hexano/Acetato de etila em gradiente até 100 % de metanol. Foram coletadas 170 frações, as quais foram agrupadas em 18 novas frações por semelhanças em cromatografia de Camada Delgada (CCD). As frações foram submetidas ao bioensaio de *Lemna minor* para identificação das frações ativas.

As frações com atividade fitotóxica identificadas pelo bioensaio foram: 03, 04, 05, 06, 07, 09, 12, 13, 18 e a fração final, porém a fração 03 apresentou maior atividade fitotóxica. A Figura 38 apresenta o resultado do bioensaio das frações ativas.

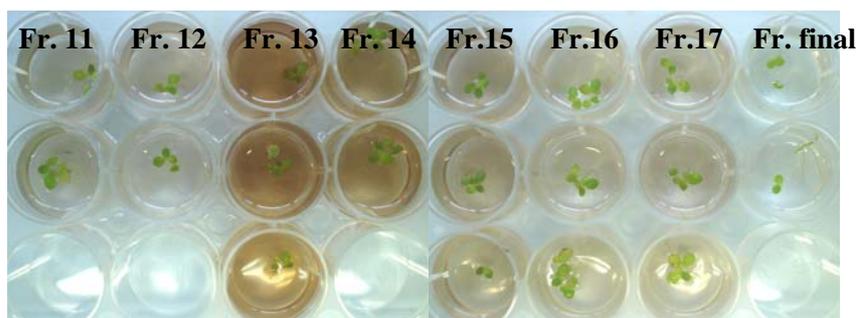
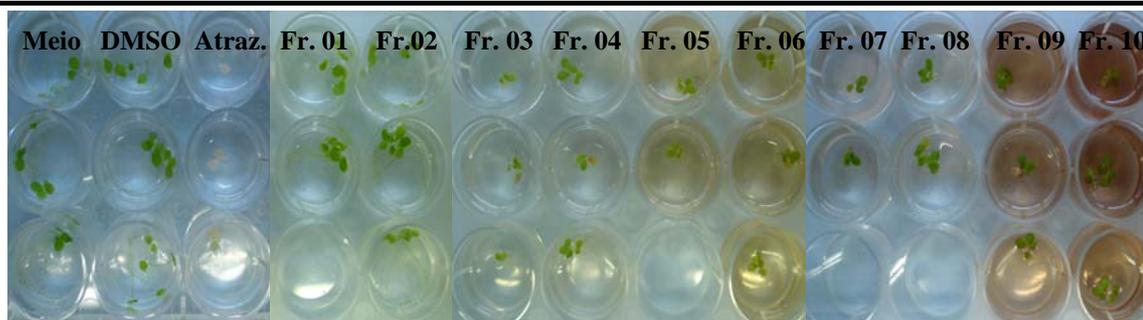


Figura 38: Resultado do bioensaio com *Lenna minor* das frações da actinobactéria 17. Frações: 1 (---), 2 (---), 3 (+++), 4 (+ + -), 5 (+ + -), 6 (+ + -), 7 (+ + -), 8 (---), 9 (+ + -), 10 (---), 11 (---), 12 (+ + -), 13 (+ + -), 14 (---), 15 (---), 16 (---), 17 (---) e fração final (+ + -).

A próxima etapa da caracterização foi a análise por espectrometria de massas da fração ativa. A amostra foi injetada por cromatografia líquida sem coluna, em modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-), porém o espectro em modo positivo ficou bastante ruidoso. O fato de a amostra ionizar melhor no modo negativo indica seu caráter ácido. O espectro obtido no modo negativo apresenta uma ionização mais eficiente, sugerindo um caráter ácido do composto ativo. O espectro de massas adquirido em modo negativo está apresentado na Figura abaixo.

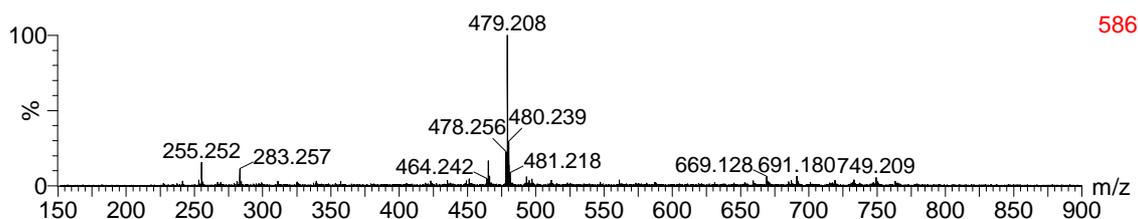


Figura 39: Espectro de massas (ESI-) da fração ativa da actinobactéria 17 (39PL).

Posteriormente a fração ativa foi analisada por HPLC aplicando as mesmas condições cromatográficas desenvolvidas para o extrato bruto. O perfil pode ser observado na Figura 40. Foi possível observar que a fração ativa era composta por, pelo menos, dois compostos, uma vez que apresentou dois picos cromatográficos.

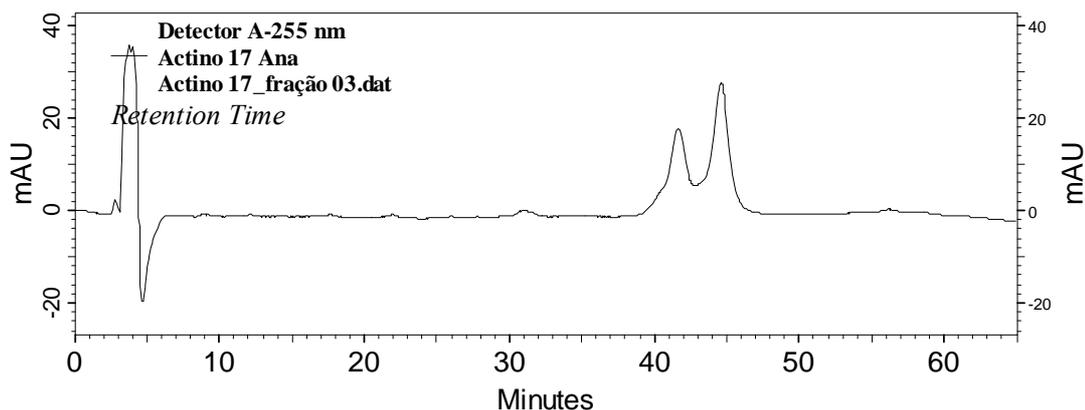


Figura 40: Cromatograma da fração ativa. A coluna utilizada foi uma fenil-hexil, Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm. A fase móvel Acetonitrila/ ácido fórmico 0,1% (1:1), com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

Baseados no tempo de retenção dos compostos presentes na fração ativa e na análise do extrato bruto por LC-MS foi possível confirmar as massas moleculares dos compostos. As análises por LC-MS demonstraram que os dois picos apresentavam a mesma razão de m/z 479 (ESI -), evidenciando que estes compostos são isômeros. Na análise por injeção direta previamente realizada foi possível determinar apenas a massa dos compostos, mas não foi possível identificar que se tratavam de dois compostos. Pela espectrometria de massas essa informação seria possível de ser obtida quando feita a extração do íon de interesse no cromatograma de LC-MS do extrato bruto. A Figura abaixo apresenta a extração do íon de m/z 479 do cromatograma de LC-MS do extrato bruto.

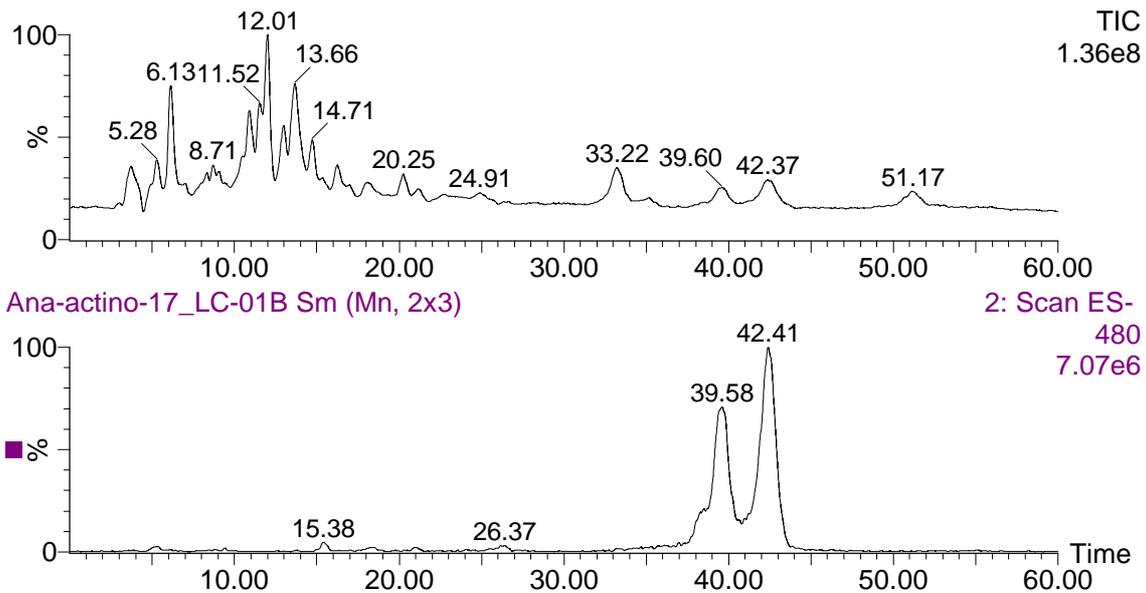


Figura 41: Extração do íon de m/z 479 do cromatograma de LC-MS do extrato bruto.

Somado às informações obtidas pela espectrometria de massas, estes compostos também apresentaram o mesmo perfil de UV como pode ser observado na Figura a seguir.

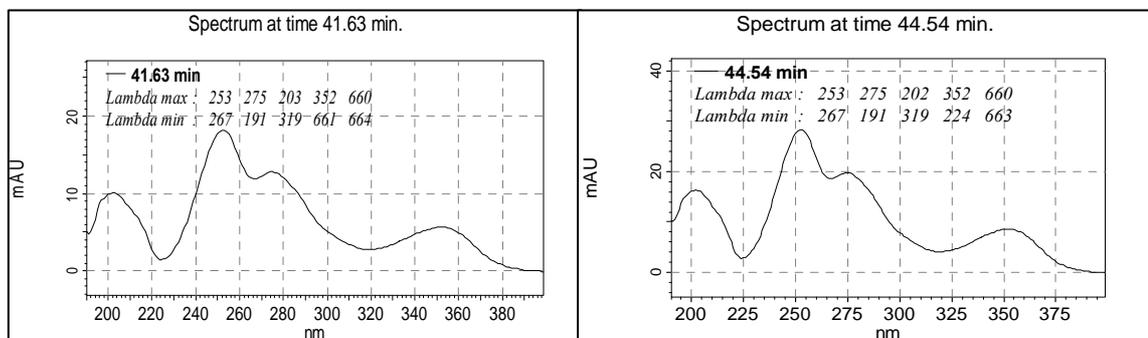


Figura 42: Espectros de UV dos compostos $R_t = 41,63$ minutos e $R_t = 44,54$ minutos.

Conhecendo a massa molecular dos compostos presentes na fração ativa e algumas informações biológicas do extrato, a derreplicação pôde ser realizada. As novas buscas foram direcionadas pela massa molecular cruzada com as outras informações como a fonte biológica (actinomicetos), os microrganismos utilizados, que

neste caso foram *Streptomyces*, e a atividade biológica (neste caso, a atividade fitotóxica). A busca no *Dictionary of Natural Products* esta resumida na Tabela 8.

Tabela 8: Resultado das buscas no Dicionário de Produtos Naturais.

| Busca | Resultado |
|--|---------------------------|
| Intervalo de massa molecular 480 a 481 | 424 compostos encontrados |
| Intervalo de massa molecular 480 a 481 + <i>Streptomyces</i> | 6 compostos encontrados |
| Intervalo de massa molecular 480 a 481 + Actinomicetos | 0 |
| Intervalo de massa molecular 480 a 481 + Bioherbicidas | 0 |
| Intervalo de massa molecular 480 a 481 + Fitotoxinas | 0 |

O próximo passo foi o estudo de fragmentação dos compostos para a obtenção de informações estruturais. As fragmentações por CID do íon de m/z 481 (modo positivo) e do íon de m/z 479 (modo negativo) estão representadas na Figura a seguir.

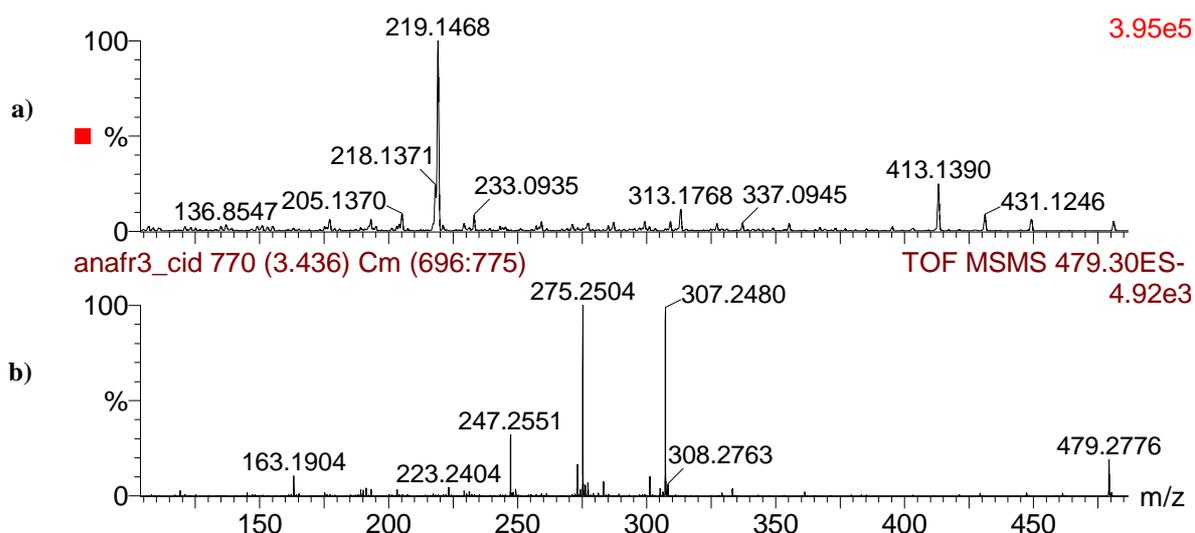


Figura 43: Espectro de fragmentação CID: a) m/z 481 (ESI+) e b) m/z 479 (ESI-).

Na análise no modo positivo foi possível observar, principalmente, o sinal de m/z 219 que corresponde ao $[M-H-262]^+$. Já no modo negativo, o experimento de CID produziu dois fragmentos mais que foram os sinais de m/z 307 que corresponde a $[M-H-172]^-$ e o de m/z 275 que corresponde a $[M-H-204]^-$. Este perfil de fragmentação não é comum, sendo difícil determinar a estrutura do composto desejado apenas com este experimento.

Estudos por EI também foram realizados e apresentou um perfil intermediário entre os dois experimentos de CID apresentados acima. A Figura 44 apresenta o espectro de MS/MS obtido pela fragmentação por impacto eletrônico (EI). Este tipo de ionização é caracterizado por acusar uma maior fragmentação dos compostos, como pode ser observada comparando os espectros obtidos por ESI com os de EI. Com base nos dados de ESI foi possível observar que o sinal de m/z 276 e o sinal da molécula ionizada perdendo 204 Da $[M^+-204]$.

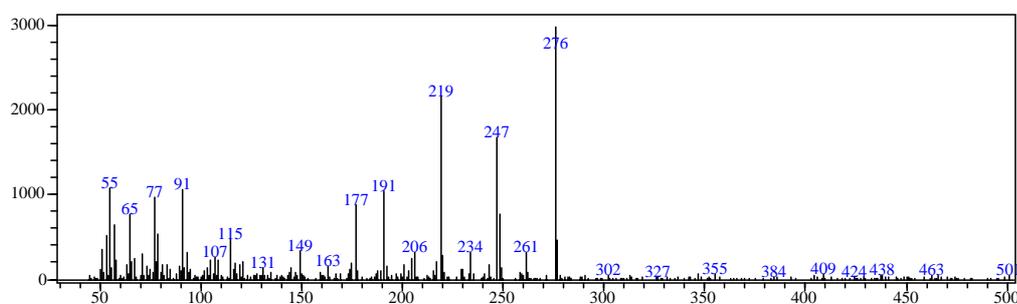


Figura 44: Espectro de fragmentação MS/MS de m/z 480 (EI).

Com o resultado desta análise foi possível realizar uma nova busca em outra biblioteca: NIST - MS Search 2.0 (do inglês *National Institute of Standards and Technology*). Nesta biblioteca estão disponíveis mais de 4000 compostos e sua identificação pode ser feita pela comparação do espectro gerado pela amostra com os

disponíveis na biblioteca. Esta busca indicou algumas classes químicas possíveis, porém com baixo grau de similaridade < 60%.

Outra análise realizada foi a absorção no infravermelho. Algumas bandas características puderam ser observadas como as correspondentes às ligações duplas conjugadas na região de 1600 cm^{-1} , 2 sinais de carbonilas na região de 1700 cm^{-1} e 1634 cm^{-1} , além da banda referente a hidroxilas, na região de 3500 cm^{-1} e ligação C - O na região de 1092 e 1042 cm^{-1} . A Figura apresenta o espectro de infravermelho.

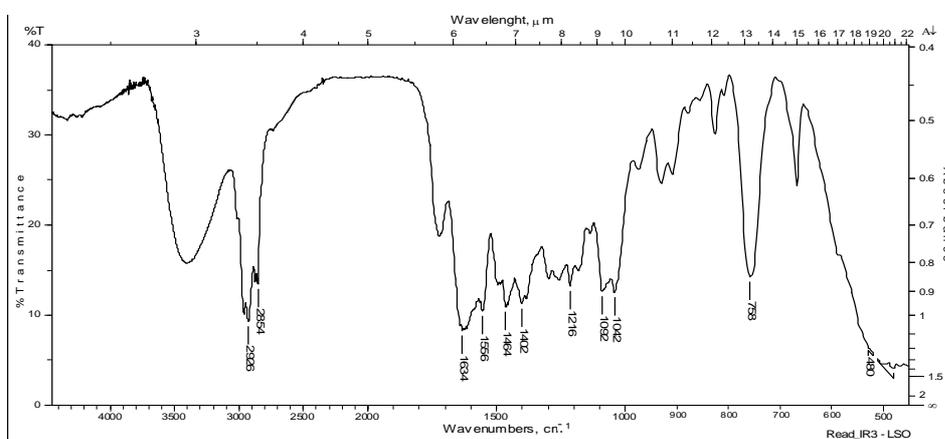


Figura 45: Espectro de infravermelho da fração 03.

O próximo passo consistiu em análises de ressonância magnética nuclear. Para isso, a quantidade de amostra obtida no primeiro fracionamento não foi suficiente e novas fermentações e purificações foram requeridas.

Após a fermentação e extração, aproximadamente 150 mg de extrato foram simplificados por cromatografia em coluna se sílica gel. As frações que continham o princípio ativo foram agrupadas por CCD e submetidas a uma purificação por HPLC preparativa. Esta metodologia foi escolhida em virtude dos resultados prévios (página 80) que indicavam que a fração ativa continha uma mistura de isômeros.

Infelizmente após o processo de separação por LC-preparativa e concentração das amostras, houve a degradação dos compostos da amostra.

Como não foi possível isolar os dois isômeros separadamente, uma nova fração foi preparada para as análises de ressonância magnética nuclear contendo uma mistura dos dois compostos. A fração ativa foi solubilizada em CDCl_3 e os espectros adquiridos podem ser observados nas Figuras que seguem. As análises realizadas foram RMN de próton e carbono, além de técnicas de ressonância bidimensionais como HMQC e HMBC. As Figuras a seguir apresentam os respectivos espectros de ressonância magnética nuclear.

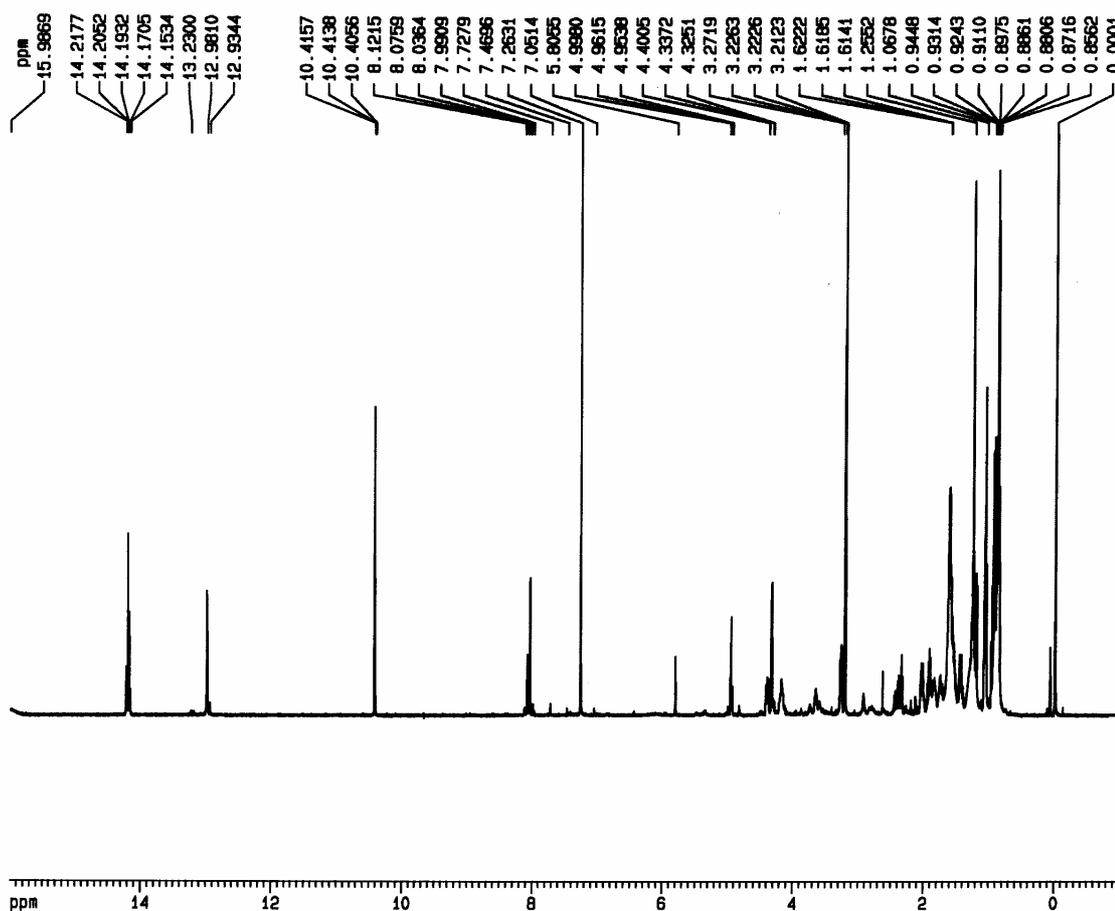


Figura 46: Espectro de ^1H RMN do composto de m/z 479.

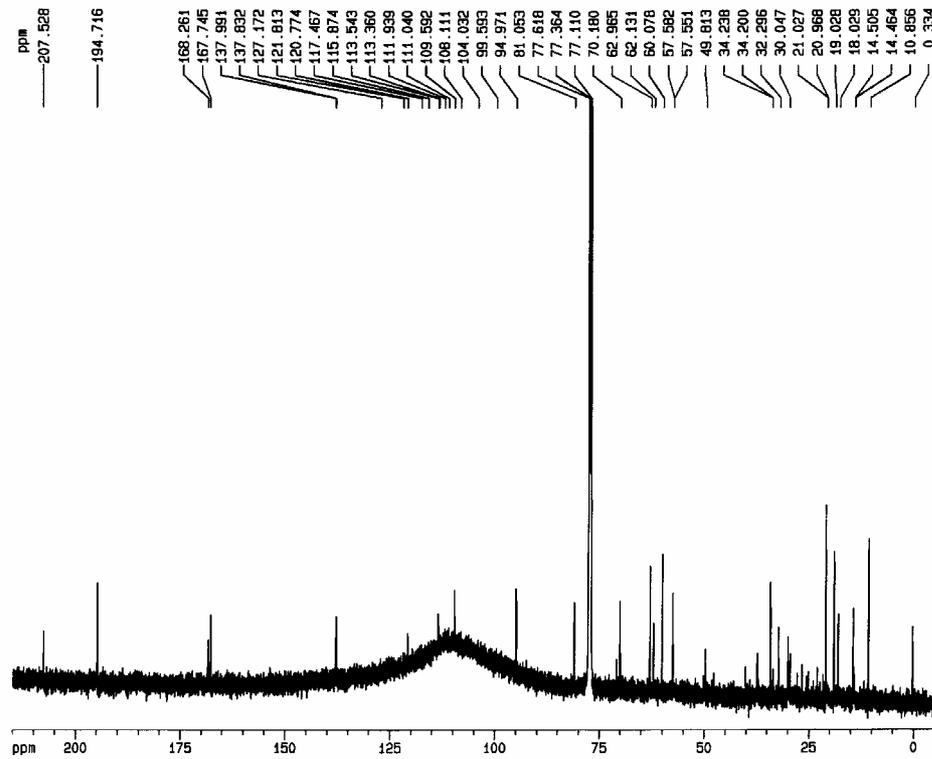


Figura 47: Espectro de ^{13}C RMN do composto de m/z 479.

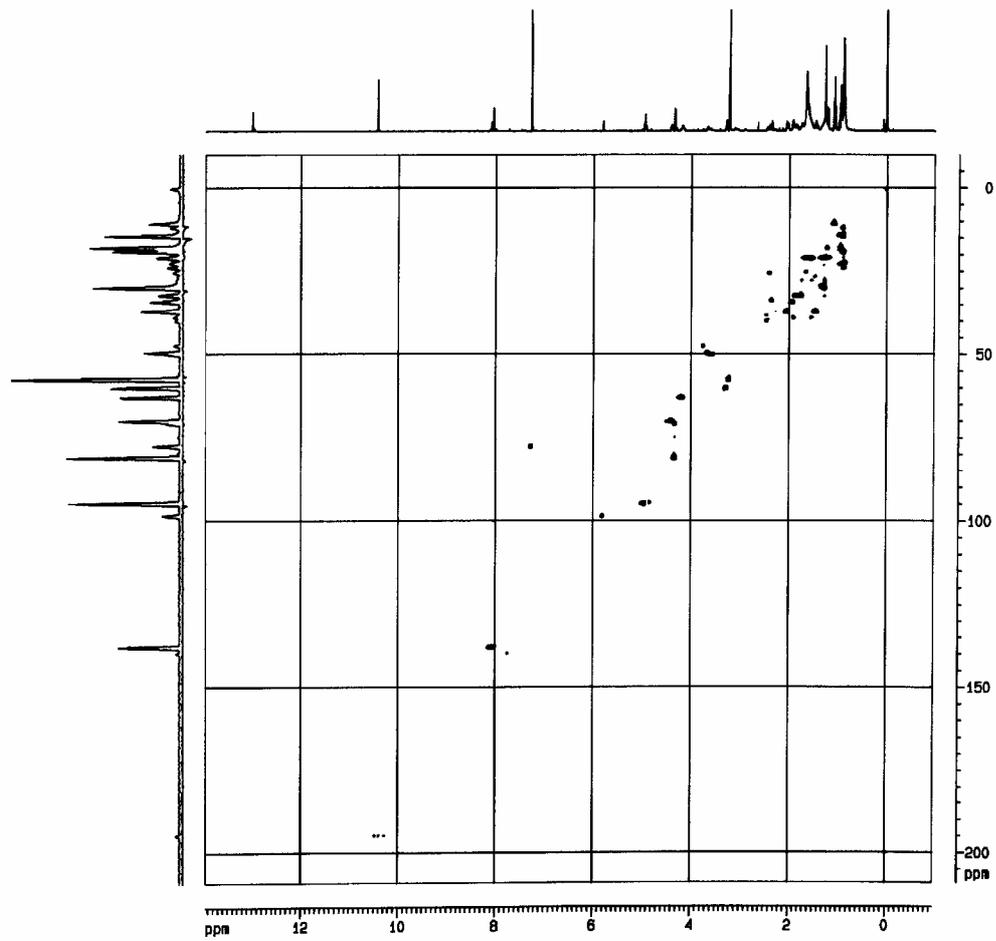


Figura 48: Espectro HMBC do composto de m/z 479.

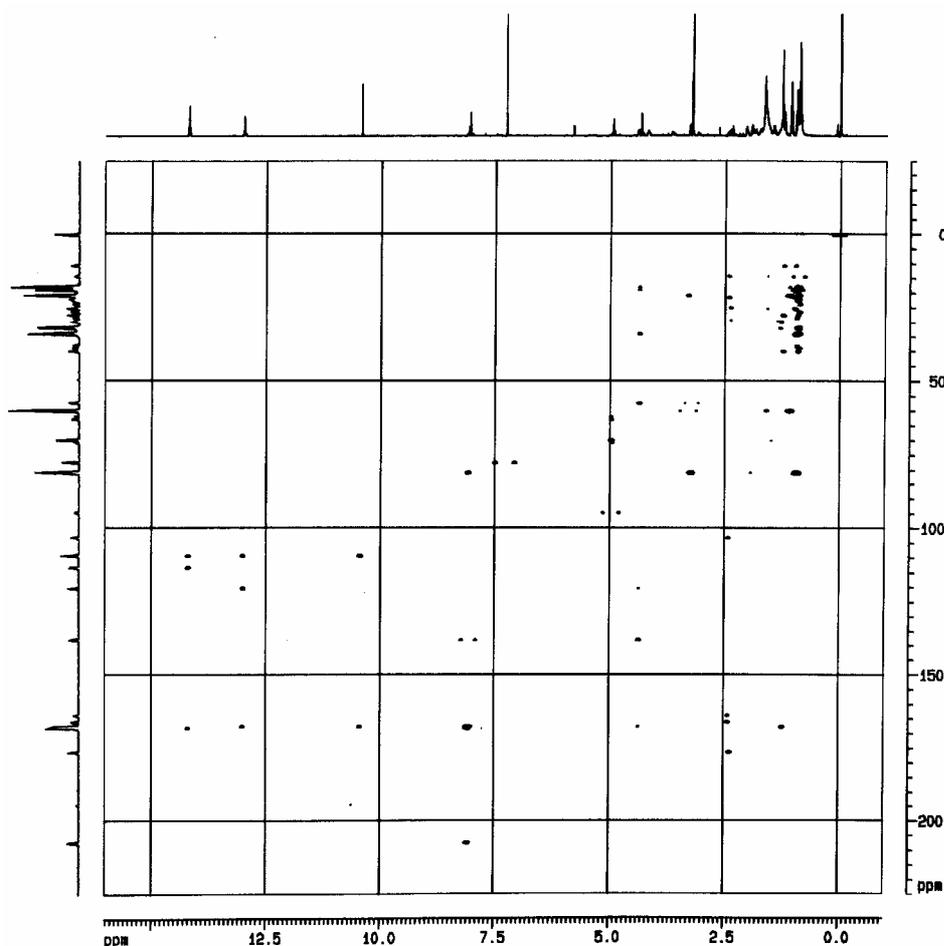


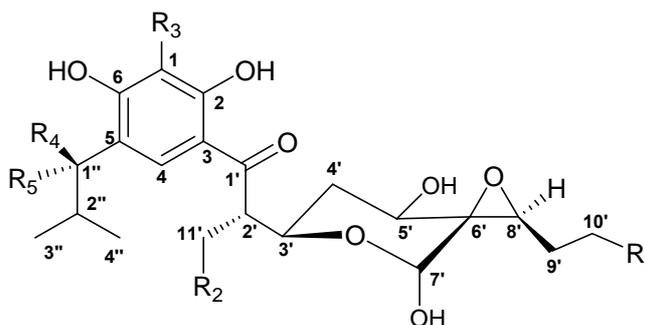
Figura 49: Espectro HMBC do composto de m/z 479.

As informações estruturais obtidas no espectro de ressonância magnética nuclear indicaram a presença de carbonos de carbonilas referentes a aldeídos com $\delta= 195$ ppm, cetonas com $\delta= 207$ ppm e de carbonos aromáticos ligados a oxigênio com $\delta= 170$ ppm. Também indicaram a presença de hidrogênios fenólicos com $\delta= 13$ ppm e $\delta= 14$ ppm. Foi possível constatar a presença de hidrogênios ligados a átomos de oxigênio com δ entre 3,5 e 5,0 ppm. Também foram observados carbonos referentes a isoprenilas com δ entre 60 e 70 ppm, além dos carbonos aromáticos com δ entre 110 e 140 ppm. Os sinais de ^1H e ^{13}C para este composto é bastante diferente dos sinais observados nos respectivos espectros para a Julicrome, exceção feita para os prótons com δ 14 e δ 13 ppm, referentes as fenilas queladas com a carbonila.

A fração submetida à análise de ressonância magnética nuclear foi injetada num espectrômetro de massas de altíssima resolução (FT - MS da Thermo). O experimento revelou que a massa exata dos compostos era de m/z 479, 2286 com desvio de apenas 10 ppm. O software possibilita a análise elementar do sinal selecionado. Desta forma o sinal de m/z 479, 2286 corresponde a fórmula molecular $C_{25}H_{35}O_9$. Neste ponto vale a pena ressaltar que a mesma estratégia foi feita nos espectros obtidos no Q-TOF em alta resolução. Porém o software Mass Lynx 4.0 apresentou outras possibilidades, as quais foram analisadas sem sucesso.

Com base nos resultados obtidos no FT-MS foi realizada uma nova busca nos bancos de dados *DNP* e *CAS*. O *DNP* apresentou 17 estruturas possíveis e o *CAS* apresentou 109 estruturas possíveis para a fórmula molecular encontrada.

Foram feitas buscas na literatura pela Luminacina C e descobriu-se que esta pertence a uma série homóloga com 14 componentes nomeados de A_1 , A_2 , B_1 , B_2 , C_1 , C_2 , D , E_1 , E_2 , E_3 , F , G_1 e G_2 , que variam em 5 posições distintas. A estrutura básica das Luminacinas, seus possíveis grupos substituintes com suas respectivas massas moleculares estão representados na Figura a seguir.



| Luminacin | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ , R ⁵ | Massa Molecular |
|----------------|-------------------|---|---------------------|---------------------------------|-----------------|
| A ₁ | - H | - CH ₂ CH ₃ | - H | =O | 436,2097 |
| A ₂ | - H | - CH ₂ CH ₃ | - H | =O | 436,2097 |
| B ₁ | - H | - CH(CH ₃) ₂ | - H | =O | 450,2253 |
| B ₂ | - H | - CH(CH ₃) ₂ | - H | =O | 450,2253 |
| C ₁ | - H | - CH ₂ CH ₃ | - CHO | - OCH ₃ , H | 480,2359 |
| C ₂ | - H | - CH ₂ CH ₃ | - CHO | - OCH ₃ , H | 480,2359 |
| D | - H | - CH ₂ CH ₃ | - CHO | - H,H | 450,2253 |
| E ₁ | - H | - CH(CH ₃) ₂ | - CHO | - OCH ₃ , H | 494,2516 |
| E ₂ | - H | - CH(CH ₃) ₂ | - CHO | - OCH ₃ , H | 494,2516 |
| E ₃ | - H | - CH ₂ CH ₂ CH ₃ | - CHO | - OCH ₃ , H | 494,2516 |
| F | - CH ₃ | - CH ₂ CH ₃ | - CHO | - H,H | 464,2410 |
| G ₁ | - H | - CH(CH ₃) ₂ | - CHO | - H,H | 464,2410 |
| G ₂ | - H | - CH ₂ CH ₂ CH ₃ | - CHO | - H,H | 464,2410 |
| H | - H | - CH ₂ CH ₃ | - COCH ₃ | - H,H | 464,2410 |

Figura 50: Estrutura da série de Luminacinas.

A Luminacina C apresentou atividade fitotóxica. As Luminacinas C₁ e C₂ são epímeras e devido a isto não foi possível separá-las como foi descrito anteriormente. Por este motivo, não foi possível indicar qual delas aferiu atividade fitotóxica ao extrato ou se ambas o fizeram.

Naruse *et.al* estudaram esta classe e em seus trabalhos foram descritos o isolamento e a caracterização estrutural destes compostos, além de algumas atividades biológicas^{84, 85}.

A amostra submetida a análise de ressonância magnética nuclear continha a mistura dos dois componentes da Luminacina C₁/C₂. As atribuições dos deslocamentos químicos de próton e carbono observados nos espectros da Luminacina foram realizadas comparando dados da literatura⁸⁴. A Tabela a seguir apresenta a comparação dos valores dos deslocamentos químicos e das multiplicidades dos prótons obtidos experimentalmente com os observados por Naruse.

Tabela 9: Comparação dos resultados observados no espectro de ressonância magnética de próton da mistura da Luminacina C₁ e C₂ com dados da literatura.

| Posição | C ₁ : δH (ppm) (Experimental) | C ₁ : δH (ppm) (Literatura) | C ₂ : δH (ppm) (Experimental) | C ₂ : δH (ppm) (Literatura) |
|--|---|---|---|---|
| 1 – CHO | 10,43 | 10,42 (s) | 10,43 | 10,43 (s) |
| 2 – OH | 14, 19 | 14,17 (s) | 14,20 | 14,21 (s) |
| 4 | 8,09 | 8,08 (s) | 8,05 | 8,05 (s) |
| 6 – OH | 12,99 | 12,97 (s) | 13,00 | 12,99 (s) |
| 2' | 3,62 | 3,61 (m) | 3,68 | 3,68 (ddd) |
| 3' | 4,41 | 4,40 (ddd) | 4,42 | 4,41 (ddd) |
| 4' | 2,06 | 2,05 (ddd) | 2,04 | 2,03 (ddd) |
| 5' | 4,20 | 4,19 (dt) | 4,20 | 4,19 (dt) |
| 5' - OH | 1,56 | 1,56 (d) | 1,63 | 1,62 (d) |
| 7' | 4,97 | 4,97 (d) | 4,97 | 4,96 (d) |
| 7' – OH | 2,65 | 2,89 (s) | 2,84 | 2,99 (d) |
| 8' | 3,29 | 3,28 (t) | 3,29 | 3,27 (t) |
| 9' | 1,64 | 1,64 (dq) | 1,59 | 1,60 (m) |
| 10' | 1,08 | 1,08 (t) | 1,08 | 1,07 (t) |
| 11' | 1,76 | 1,80 (m) | 1,86 | 1,82 (m) |
| 11' – <u>CH</u> ₂ CH ₃ | 1,25 | 1,28 (m) | 1,20 | 1,24 (m) |
| 11' – CH ₂ <u>CH</u> ₃ | 0,87 | 0,89 (t) | 0,87 | 0,88 (t) |
| 1'' | 4,34 | 4,33 (d) | 4,35 | 4,34 (d) |
| 1'' – OCH ₃ | 3,24 | 3,23 (s) | 3,22 | 3,22 (s) |
| 2'' | 1,94 | 1,92 (m) | 1,94 | 1,96 (m) |
| 3'' | 0,93 | 0,93 (d) | 0,93 | 0,92 (d) |
| 4'' | 0,91 | 0,90 (d) | 0,89 | 0,88 (d) |

O sinal de próton na posição 2' evidencia a presença da mistura de epímeros.

Por se tratar de um experimento feito com a mistura dos compostos, algumas multiplicidades se sobrepuseram. Também foram comparados os deslocamentos químicos dos carbonos obtidos experimentalmente com os da literatura. A Tabela 10 apresenta os valores observados.

Tabela 10: Comparação dos resultados observados no espectro de ressonância magnética de carbono da mistura da Luminacina C₁ e C₂ com dados da literatura.

| Posição | C ₁ : δC (ppm) (Experimental) | C ₁ : δC (ppm) (Literatura) | C ₂ : δC (ppm) (Experimental) | C ₂ : δC (ppm) (Literatura) |
|---------------------------------------|---|---|---|---|
| 1 | 109,6 | 109,2 | 109,6 | 109,1 |
| 1 – CHO | 194,7 | 194,4 | 194,8 | 194,4 |
| 2 | 168,2 | 167,9 | 168,2 | 167,9 |
| 3 | 113,5 | 113,0 | 113,5 | 113,2 |
| 4 | 137,8 | 137,6 | 137,8 | 137,5 |
| 5 | 120,5 | 120,3 | 120,5 | 120,3 |
| 6 | 167,8 | 167,3 | 167,8 | 167,4 |
| 1' | 207,5 | 207,2 | 207,5 | 207,3 |
| 2' | 49,8 | 49,8 | 49,8 | 49,3 |
| 3' | 70,2 | 69,6 | 70,2 | 69,8 |
| 4' | 37,4 | 37,1 | 37,3 | 36,9 |
| 5' | 62,9 | 62,6 | 62,9 | 62,6 |
| 6' | 62,1 | 61,8 | 62,1 | 61,8 |
| 7' | 94,9 | 94,5 | 94,9 | 94,5 |
| 8' | 60,1 | 59,7 | 60,1 | 59,7 |
| 9' | 20,9 | 20,6 | 20,9 | 20,7 |
| 10' | 10,8 | 10,5 | 10,8 | 10,5 |
| 11' | 32,3 | 32,1 | 32,3 | 32,1 |
| 11' – CH ₂ CH ₃ | 21,0 | 20,6 | 21,0 | 20,6 |
| 11' – CH ₂ CH ₃ | 14,4 | 14,1 | 14,5 | 14,2 |
| 1'' | 81,1 | 80,6 | 81,1 | 80,5 |
| 1'' – OCH ₃ | 57,6 | 57,2 | 57,6 | 57,2 |
| 2'' | 34,2 | 33,8 | 34,2 | 33,7 |
| 3'' | 19,1 | 18,7 | 19,1 | 18,7 |
| 4'' | 18,0 | 17,6 | 18,0 | 17,9 |

De acordo com a comparação dos valores apresentados nas Tabelas 09 e 10 pôde-se confirmar a presença das Luminacinas C no extrato bruto da actinobactéria 17 (39 PL).

A Tabela com as respectivas correlações para a Luminacina C₁ está apresentada a seguir.

Tabela 11: Correlações próton x carbono para a Luminacina C₁.

| Posição | C ₁ : δH (ppm) | Multiplicidade | HMQC | HMBC |
|---|------------------------------|-----------------|-------|---|
| 1 | 109,6 | C ₀ | - | 2-OH, 6-OH, 1-CHO |
| 1 – CHO | 194,7 | CH | 10,43 | 1-CHO |
| 2 | 168,2 | C ₀ | - | 2-OH, 6-OH, 1-CHO, H ₄ , H ₁ '' |
| 3 | 113,5 | C ₀ | - | - |
| 4 | 137,8 | CH | 80,9 | H ₄ , H ₁ '' |
| 5 | 120,5 | C ₀ | - | 6-OH, H ₁ '' |
| 6 | 167,8 | C ₀ | - | 2-OH, 6-OH, 1-CHO, H ₄ , H ₁ '' |
| 1' | 207,5 | C ₀ | - | H ₃ ' |
| 2' | 49,8 | CH | 3,62 | - |
| 3' | 70,2 | CH | 4,41 | H ₇ ', 5'- OH |
| 4' | 37,4 | CH ₂ | 2,06 | - |
| 5' | 62,9 | CH | 4,20 | H ₇ ', 5'- OH |
| 6' | 62,1 | C ₀ | - | H ₇ ' |
| 7' | 94,9 | CH | 4,97 | H ₇ ' H ₃ ' |
| 8' | 60,1 | CH | 3,29 | H ₉ ', H ₈ ' |
| 9' | 20,9 | CH ₂ | 1,64 | H ₈ ', H ₁₀ ' |
| 10' | 10,8 | CH ₃ | 1,08 | |
| 11' | 32,3 | CH ₂ | 1,76 | 11' – <u>CH₂CH₃</u> , 11' – <u>CH₂CH₃</u> |
| 11' – <u>CH₂CH₃</u> | 21,0 | CH ₂ | 1,09 | 11' – <u>CH₂CH₃</u> |
| 11' – <u>CH₂CH₃</u> | 14,4 | CH ₃ | 0,87 | - |
| 1'' | 81,1 | CH | 4,34 | H ₄ , 1'' – OCH ₃ , H ₃ '', H ₄ '' |
| 1'' – OCH ₃ | 57,6 | CH ₃ | 3,24 | H ₁ '' |
| 2'' | 34,2 | CH | 1,94 | H ₁ '', H ₃ '', H ₄ '' |
| 3'' | 19,1 | CH ₃ | 0,93 | H ₁ '', H ₃ '', H ₄ '' |
| 4'' | 18,0 | CH ₃ | 0,91 | H ₁ '', H ₃ '', H ₄ '' |

Os experimentos de fragmentação CID indicaram que as Luminacinas podem ser caracterizadas pela perda de 172 u.m.a. e pela formação do fragmento de m/z 275. A Figura 51 apresenta um possível caminho de fragmentação para as Luminacinas.

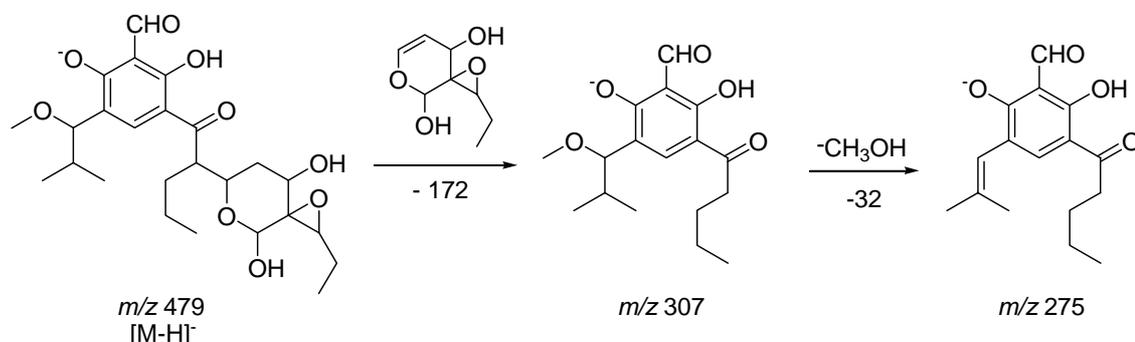


Figura 51: Esquema de fragmentação observado para as Luminacinas C.

É importante ressaltar que toda a caracterização química apresentada neste trabalho, desde a etapa de *screening* de atividade fitotóxica, isolamento e análises para a caracterização, foi realizada com extratos brutos produzidos por fermentações pequenas em erlenmeyers, resultando em um menor consumo de reagente e menor geração de resíduos, quando comparado com a caracterização feita por Naruse⁸⁴ e colaboradores, em que 200 litros de meio de cultura foram utilizados para a fermentação do *Streptomyces* sp. Mer - D1207.

Assim, é possível afirmar que a técnica de derreplicação foi bem empregada, possibilitando a identificação de várias classes de substâncias, como as Leucinostatinas, as Julicromes e as Luminacinas, através da utilização de várias técnicas analíticas eficientes que resultaram em um menor consumo de amostras e rapidez nas análises.

4.6 Aplicação da Espectrometria de Massas na Química de Produtos Naturais

A espectrometria de massas se apresenta como uma técnica bastante versátil para a química de produtos naturais. Além de sua aplicação em estudos de caracterização estrutural como foi observada no decorrer deste trabalho, a espectrometria de massas também pode ser empregada em estudos de identificação de classes químicas através de experimentos de perda neutra e íons pais, e no monitoramento da produção de metabólitos com o experimento de MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas, dentre outras inúmeras aplicações.

Nesta etapa de trabalho exploramos a potencialidade da espectrometria de massa em sua plenitude.

4.6.1 Experimentos de Perda Neutra

Nos experimentos de perda neutra, seleciona-se a massa do fragmento que caracteriza a uma molécula neutra perdida de CID, desta forma serão detectados somente os compostos que apresentem esta perda. Este estudo é importante e auxilia na identificação dos compostos pertencentes à uma mesma classe química ou compostos que contenham o mesmo substituinte, uma vez que como já foram bem estabelecidos, os perfis de fragmentação são semelhantes, como pôde ser observado nos estudos de derreplicação das Leucinostatinas e das Julicromes deste trabalho.

Com base no padrão de fragmentação (Figura 28, pagina 66) e na proposta de fragmentação para estas classe de compostos (Figura 51, pagina 54) , acredita-se que

toda a série de Luminacinas que apresentem o “açúcar” deva fragmentar por perda de 172 u.m.a..

Desta forma, um experimento de perda neutra de 172 u.m.a. foi realizado através de inserção direta do extrato bruto. O espectro obtido para este experimento está apresentado na Figura abaixo.

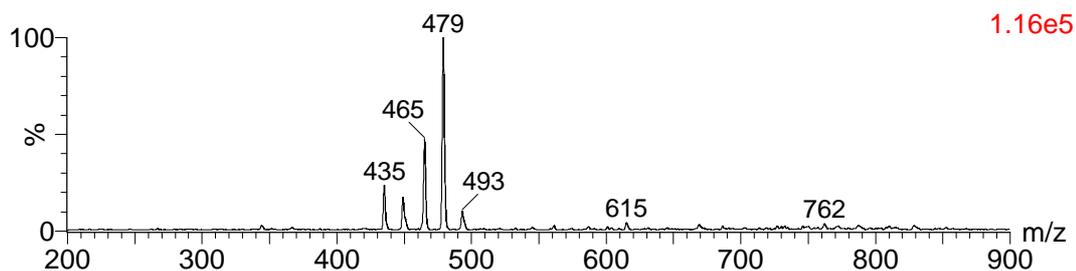


Figura 52: Espectro de massas adquirido do experimento de perda neutra de 172 u.m.a..

Além da já esperada a presença do íon de m/z 479, outros sinais também foram ser observados. Baseado na Figura 50 foi possível constatar com este experimento a presença de outras Luminacinas como a Luminacina A₁/A₂ de m/z 435, a Luminacina B₁/B₂ ou D (ou ambas) de m/z 449, a Luminacina E₁/E₂ de m/z 493 e um sinal de m/z 465. Não há na literatura descrição de Luminacinas que correspondam ao sinal de m/z 465.

Com base nas diferenças de massas entre os possíveis compostos inéditos e as Luminacinas (Figura 50) e as modificações que podem ocorrer nestas estruturas para a formação do composto com massa molecular 466 u.m.a., foram propostas. A primeira possibilidade seria a oxidação da Luminacina D na posição R₄ e a segunda possibilidade seria a redução da Luminacina H na posição R₃, como apresentados na Figura a seguir.

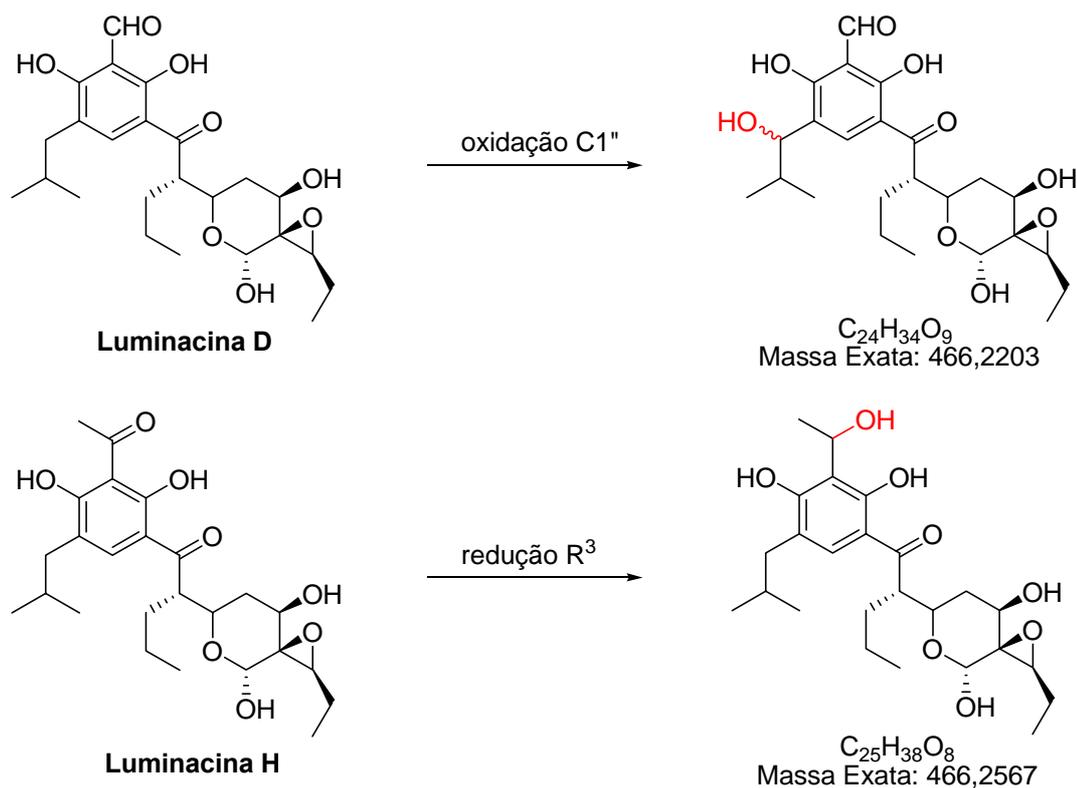


Figura 53: Proposta para a formação da Luminacina de m/z 465 encontrada no extrato bruto da actinobactéria 17 (39 PL).

Como podem ser observados na Figura 53, os compostos apresentados são isóbaros. A diferenciação entre as duas estruturas possíveis foi realizada através de experimentos ESI- empregando a altíssima resolução do espectrômetro FT-MS. A análise do espectro de massas obtido e posterior análise elementar do sinal de m/z 465,2138 confirmaram a estrutura de fórmula molecular $C_{24}H_{24}O_9$ como sendo a estrutura inédita das Luminacinas presente no extrato bruto da actinobactéria 17 (39 PL). Assim, a combinação de experimentos da espectrometria de massas identificou os compostos pertencentes à classe das Luminacinas presentes no extrato bruto e possibilitou a caracterização de uma nova estrutura (Luminacina I).

Outro experimento de perda neutra realizado neste trabalho visou a confirmação da presença de Julicromes no extrato bruto. Para tal, a perda sugerida foi de 60 u.m.a., que correspondente à perda de um ácido acético (AcOH). O espectro de massas obtido está representado na Figura a seguir.

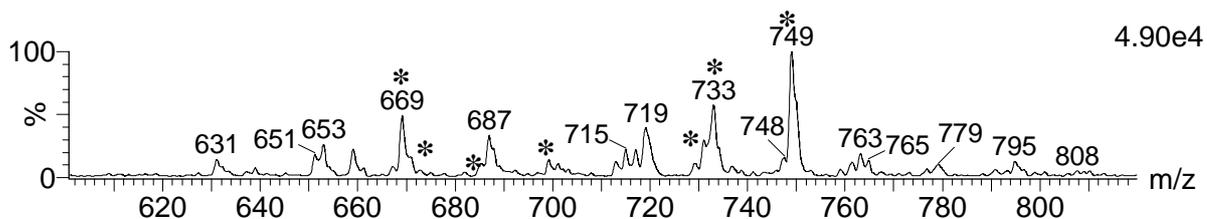


Figura 54: Zoom do espectro de massas obtido no experimento de perda neutra de 60 u.m.a.. Os sinais assinalados com asterisco correspondem as Julicromes caracterizadas na literatura e que estão presentes no extrato bruto.

Como podem ser constatados na Figura acima, foram observados mais sinais além daqueles já esperados para as Julicromes descritas neste trabalho. Os sinais observados que correspondem as Julicromes já caracterizadas foram apresentados na Figura 29 (página 69) estão assinalados com asterisco. Outros sinais com perda de 60 u.m.a. também foram encontrados no espectro de massas, porém estes sinais ainda não foram classificados na literatura como outras formas de Julicromes. Foi realizado o experimento de fragmentação por CID destes sinais e foi observado um perfil de fragmentação semelhante ao encontrado para as Julicromes, reforçando a hipótese de que estes sinais pertencem à esta classe.

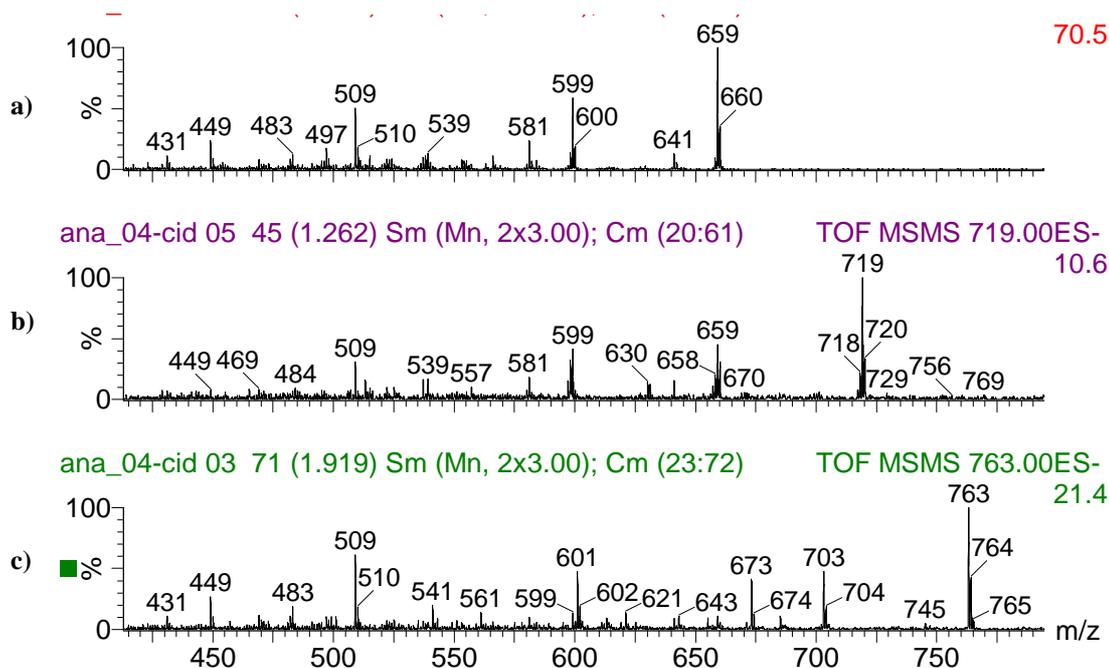


Figura 55: Espectro de massas MS/MS de alguns compostos que apresentaram perda de 60 u.m.a., mas que não foram caracterizados como Julicromes. a) m/z 659, b) m/z 719 e c) m/z 763.

O experimento confirma a perda de 60 u.m.a. que são características da classe das Julicromes contendo o grupo acetato. Assim, com a combinação dos experimentos de perda neutra com os estudos de fragmentação foi possível constatar a presença de novos homólogos para esta classe, porém suas estruturas ainda não foram caracterizadas.

4.6.2 Experimentos de MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas

Nesta etapa foi realizado um estudo (MRM) com alguns compostos caracterizados anteriormente, visando determinar o seu período de maior produção, além de verificar se a produção está relacionada com o consumo de outros metabólitos do meio.

Para isso, a actinobactéria 17 (39 PL) foi fermentada em meio BD e os extratos orgânicos foram obtidos a partir de extrações líquido-líquido em dias alternados totalizando 25 dias, para posteriores análises por LC-MS.

Para este estudo, foram escolhidos dois sinais que correspondem ao íon molecular e ao íon com maior intensidade ou pico base. Estes sinais são escolhidos para aumentar a sensibilidade da análise.

Com os resultados obtidos foi possível produzir gráficos de área do metabólito em função do tempo de fermentação (em dias). Todas as análises foram realizadas em uma única corrida cromatográfica, a partir da seleção dos canais específicos. Os resultados são apresentados a seguir.

O primeiro estudo foi realizado com o composto que apresentou atividade fitotóxica do extrato da actinobactéria 17 (39 PL). O canal de MRM foi 479 > 275. A Figura 56 apresenta o gráfico obtido neste experimento.

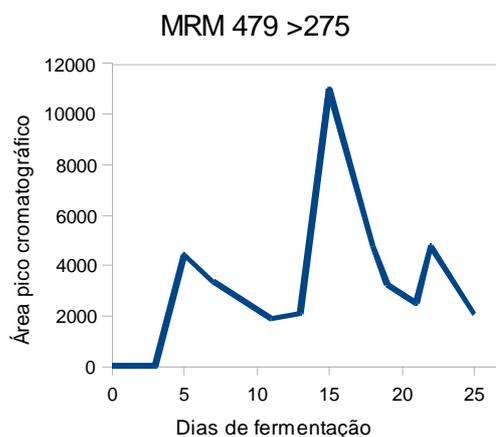


Figura 56: Gráfico dos dias de fermentação *Versus* Área; Experimento do MRM (479 > 275).

Como pode ser observado na Figura acima, o início de sua produção se deu com 3 dias e a sua produção máxima ocorreu com 15 dias de fermentação.

Já o outro estudo realizado verificou a produção do composto inédito também pertencente à classe das Luminacinas. Para isso, o canal de MRM foi 465 > 275. A Figura a seguir apresenta o gráfico obtido.

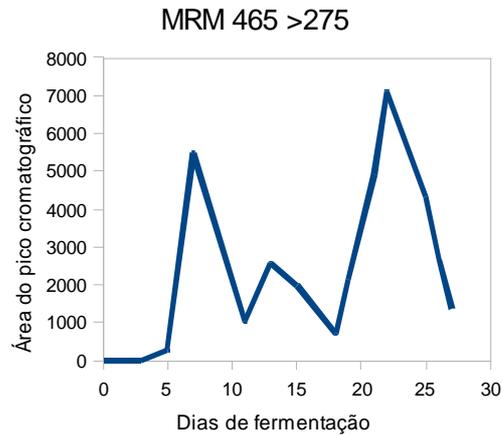


Figura 57: Gráfico dos dias de fermentação Versus Área; Experimento do MRM (465 > 275).

Como pode ser observado na Figura acima a maior produção do composto se deu entre 20 e 25 dias de fermentação. É possível observar também que em torno dos 15 dias de fermentação ocorreu o consumo deste composto, uma vez que sua presença no extrato bruto foi menos acentuada.

A mesma estratégia foi empregada para as Julicromes. A primeira a ser mostrada é a Julicrome Q_{3.5}. Para seus estudos foi selecionado o canal de MRM de 669 > 609. Os resultados estão apresentados na Figura 58.

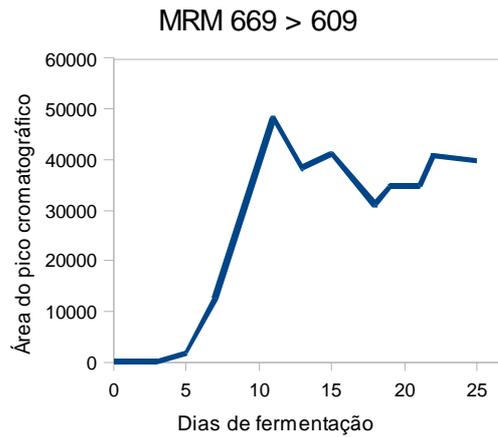


Figura 58: Gráfico dos dias de fermentação *Versus* Área; Experimento do MRM (669 > 609).

Para a Julicrome Q_{3.5} o perfil observado foi diferente. O início de sua produção aconteceu com 5 dias e a maior produção ocorreu em torno dos 10 dias de fermentação, porém a mesma manteve – se praticamente constante durante os 15 dias posteriores.

O outro composto que teve sua produção analisada foi a Julicrome Q_{3.3} e o canal de MRM selecionados foi 749 > 689. A Figura abaixo representa os resultados.

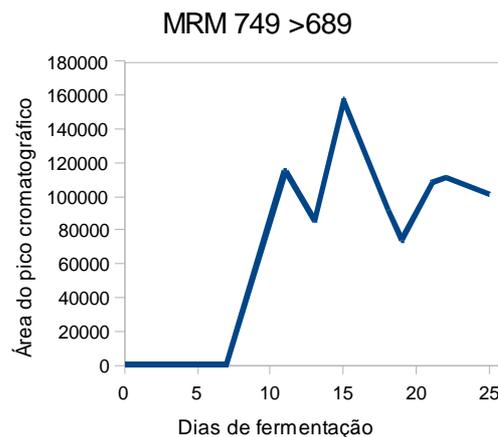


Figura 59: Gráfico dos dias de fermentação *Versus* Área; Experimento do MRM (749 > 689).

Como pode ser observada na Figura acima a maior produção ocorreu com 15 dias de fermentação. Uma característica interessante a ser ressaltada foi que sua produção somente foi iniciada a partir do sétimo dia de fermentação.

E por último, a produção da Julicrome Q_{1.3} foi analisada selecionando o canal de MRM 731 > 671. A Figura a seguir apresenta os resultados.

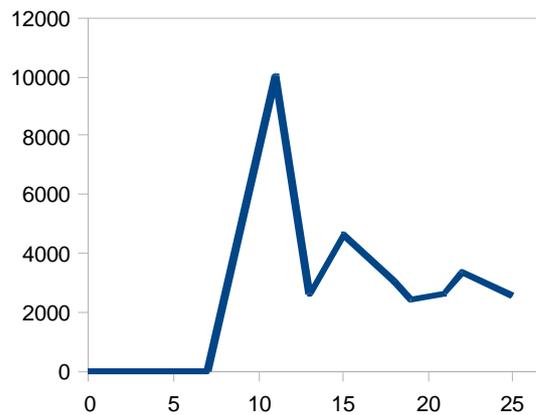


Figura 60: Gráfico dos dias de fermentação *Versus* Área; Experimento do MRM (731 > 671).

Neste caso a maior produção se deu com 10 dias de fermentação. Neste caso, novamente houve uma demora para o início da produção do composto, que só ocorreu a partir do 7º dia de fermentação.

O próximo estudo comparou a produção das três Julicromes. Os resultados estão apresentados na Figura 61.

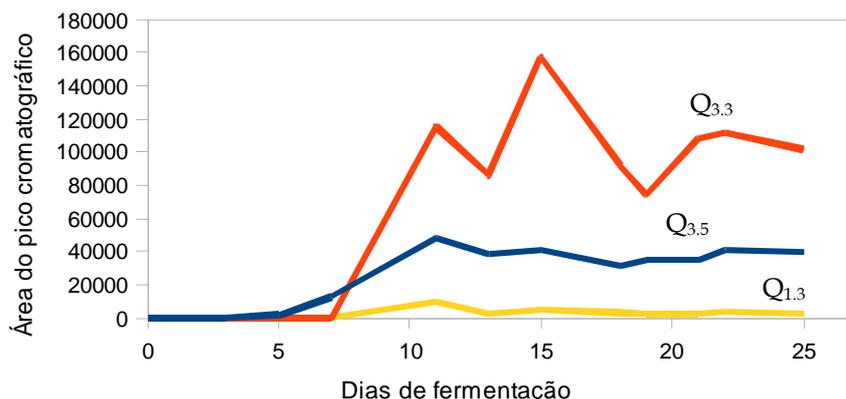


Figura 61: Comparação das produções das Julicromes. Em amarelo: Julicrome Q_{1.3}; em azul: Julicrome Q_{3.5} e em laranja: Julicrome Q_{3.3}.

Como pode ser observado, a Julicrome Q_{3.3} apresentou a maior produção dentre as estudadas e a Julicrome Q_{1.3} foi produzida em menor quantidade. Também é observado que com 7 dias as três Julicromes já tinham começado a ser produzidas, e que com 10 dias de fermentação duas delas estavam no máximo da produção. Desta forma, para a produção das Julicromes não são necessários mais que 20 dias de fermentação.

Os experimentos de MRM são importantes para otimização do processo de produção dos compostos, indicando o período propício para as extrações dos mesmos metabólitos secundários de interesse.

5. Conclusões

Após análises e discussão dos resultados foi possível concluir que a utilização de microrganismos isolados da rizosfera do milho na busca por fitotoxinas se mostrou bastante eficiente, tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho com aproximadamente 65% dos extratos brutos testados apresentando algum tipo de atividade fitotóxica em bioensaio com *Lemna minor*.

A metodologia utilizada para a derreplicação dos extratos mostrou-se bastante eficiente e rápida, pois possibilitou a identificação de uma grande variedade de compostos presentes no extrato bruto, como as Leucinostatinas, Julicrome, Luminacinas e uma possível Macroviracin, sem a necessidade de fracionamento ou purificação por técnicas clássicas de separação como a cromatografia líquida por coluna ou de alta eficiência.

A técnica de separação cromatográfica por UPLC se mostrou apropriada para o aceleração da derreplicação dos extratos, já que a duração de suas análises foi seis vezes menor do que as realizadas com HPLC.

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos empregando a espectrometria de massas comprovam a grande aplicabilidade desta técnica na química de produtos naturais, mesmo quando é utilizada a inserção direta de amostra.

Experimentos de alta resolução e precisão de massas, realizados no Q-TOF e FT-MS foram empregados na identificação e caracterização dos compostos presentes no extrato bruto. Esta metodologia minimiza as fórmulas moleculares possíveis para cada sinal, e os experimentos de CID completam a caracterização.

Os experimentos de perda neutra e íons pai foram fundamentais para a identificação dos compostos inéditos das classes das Julicromes e Luminacinas.

Esta versatilidade também permitiu estudar a produção dos compostos presentes no extrato bruto em função do tempo de fermentação, sem que fosse necessária a purificação dos mesmos, através de experimentos de MRM.

Assim, é possível concluir que a metodologia empregada neste trabalho cumpriu todos os requisitos previstos de forma eficiente, rápida e consciente e que as actinobactérias são excelentes fontes de uma grande diversidade de metabólitos secundários.

6. Referências

-
- ¹ Hartmann T., *Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view*, *Entomologia Experimentalis et Applicata* 80, 177 – 188, 1996;
- ² Williams D. H., Stone M. J., Hauck P. R., Rahman S.K., *Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?* *Journal of Natural Products* 52 (6), 1189 – 1208, 1989;
- ³ Swain T., *Secondary compounds as protective agents*, *Annual Review of Plant Physiology* 28, 479-501, 1977;
- ⁴ Roessner C.A., Scott A.I., *Genetically engineered synthesis of natural products: from alkaloids to corrins*, *Annual Review of Microbiology*. 50, 467 – 490, 1996;
- ⁵ Demain A.L., *Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 455 – 463, 1999;
- ⁶ Luckner M., *Secondary metabolites in the life of plants and animals* in *Secondary Metabolism in Plants and Animals*, Chapman & Hall, 3 – 12, 1972;
- ⁷ Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M., Puglia A.M.; *Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites*, *Journal of Biotechnology* 99, 187 – 198, 2002;
- ⁸ Butler M. S., *The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery*, *Journal of Natural Products* 67, 2141 – 2153, 2004;
- ⁹ Pachlatko J. P., *Natural Products in Crop Protection*, *Chimia* 52, 29 – 47, 1998;
- ¹⁰ Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M., *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*, *Journal of Natural Products* 66 (7), 1022 – 1037, 2003;
- ¹¹ Tobert J.A., *Lovastatin and beyond: the history of the HMG - CoA reductase inhibitors*, *Nature Review Drug Discovery* 2, 517 – 526, 2003;
- ¹² Borel J.F., Kis Z.L., *The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune)*, *Transplantation Proceedings* 23 (2), 1867 – 1874, 1991;
- ¹³ Heusler K., Pletscher A., *The controversial early history of cyclosporine*, *Swiss Med Wkly* 131, 299 – 302, 2001;

-
- ¹⁴ Raja A., LaBonte J., Lebbos J., Kirkpatrick P., *Daptomycin*, Nature Review Drug Discovery 2, 943 – 944, 2003;
- ¹⁵ Hutchinson C.R., *Microbial polyketide synthases: More and more prolific*, Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 3336 – 3338, 1999;
- ¹⁶ Simpson T.J., *The Biosynthesis of Polyketides*, Natural Products Reports, 339 – 376, 1987;
- ¹⁷ O'Hagan D., *Biosynthesis of Polyketide Metabolites*, Natural Products Reports, 447 – 479, 1992;
- ¹⁸ O'Hagan D., *Biosynthesis of Fatty Acid and Polyketide Metabolites*, Natural Products Reports, 1 – 32, 1995;
- ¹⁹ Rawlings B.J., *Biosynthesis of fatty acids and related metabolites*, Natural Products Reports, 275 – 308, 1998;
- ²⁰ Khosla C., Gokhale R.S., Jacobsen J.R., Cane D.E., *Tolerance and specificity of polyketide synthases*, Annual Review Biochemistry 68, 219 – 253, 1999;
- ²¹ Staunton J., Weissman J., *Polyketide biosynthesis: a millennium review*, Natural Products Reports 18, 380 – 416, 2001;
- ²² Shen B., *Biosynthesis of Aromatic Polyketides*, in Leeper J.L., Vederas J.C., Topics in Current Chemistry 209, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1 – 51, 2000;
- ²³ Dewick P.M., *The acetate pathway: fatty acids and polyketides*, in Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach, Second Edition, 32 – 108, 1998;
- ²⁴ Saxena S., Pandey A. K.; *Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium*, Applied Microbiology and Biotechnology 55, 395 – 403, 2001;
- ²⁵ Greaves M.P., *Microbial herbicides - Factors in development*, in Copping L.G., Crop protection agents from nature, 444 – 467, 1996;
- ²⁶ Stonard R.J., Miller-Wideman M.A., *Herbicides and plants growth regulators*, in Godfrey C.R.A., Agrochemicals From Natural Products, 285 – 310, Marcel Dekker, New York, 1995;
- ²⁷ Beckie H.J., Morrison I.N., *Effect of ethalfluralin and other herbicides on trifluralin – resistant Green foxtail (Setaria viridis)*, Weed Technology 7, 6 – 14, 1993;

-
- ²⁸ Duke S.O., Dayan F.E., Romagni J.G., Rimando A.M.; *Natural products as sources of herbicides: current status and future trends*, Weed Research 40, 99 - 111; 2000;
- ²⁹ Li Y., Sun Z., Zhuang X., Xu L., Chen S., Li M., *Research progress in microbial herbicides*, Crop Protection 22, 247 – 252, 2003;
- ³⁰ Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E., Frisvad J.C., *Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug Discovery*, Natural Products Reports 22, 672 – 695, 2005;
- ³¹ Lydon J., Duke S.O., *Inhibitors of glutamine biosynthesis*, In: Singh B.K., Plant amino acids: Biochemistry and Biotechnology, Ed. BK Singh, 445 – 464, 1999;
- ³² Duke S.O., *Overview of Herbicide Mechanisms of Action*, Environmental Health Perspectives 87, 263 - 271, 1990;
- ³³ Hess F.D., *Herbicide interference with cell division in plants*, in Boger P., Sandman G., Target sites of herbicide action, 85 – 103, 1989;
- ³⁴ Yamada O., Kaise Y., Futatsunga F., Ishida S., Ito K., Yamamoto H., Munakata K., *Studies on the plant growth-regulating activities of ansiomycin and toycamycin*, Agricultural and Biological Chemistry 36 (11), 2013 – 2015, 1972;
- ³⁵ Fujii Y., Kurokawa K., Yamaguchi I., Misato T., *Selective herbicidal activity of 3,3'-dimethyl-4-methoxybenzophenone (methoxyphenone, NK – 049); absorption, translocation and metabolism*, Journal pesticide Science 3, 291 – 298, 1978;
- ³⁶ Niessen W.M.A., *Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*, Journal of Chromatography A 1000, 413 – 436, 2003;
- ³⁷ Ghisalberti E.L., *Detection and Isolation of Bioactive Natural Products* In Colegate S.M., Molyneux R.J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination, Second Edition, CRC Press, 11 – 76, 2008;
- ³⁸ Dinan L., *Dereplication and Partial Identification of Compound*, In Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. , Natural Products Isolation, Humana Press, 297 – 322, 2000;
- ³⁹ Strobel G. A., *Bacterial phytotoxins*, Annual Review of Microbiology 31, 205 – 224, 1977;
- ⁴⁰ McGowan C. M., Willms L., Ayer S.W., Isaac B. G., Krupa D. M., Crosby K. E., Letendre L. J., Stonard R.J., Phillipson J. D., Powell R.G., Nair M. G., Putam A. R., *Extended summaries pesticides*
-

group symposium natural products as a source for new agricultural chemicals^{Pesticide Science} 27 (2), 217 – 231, 1989;

⁴¹ Cordell G.A., Beecher C.W.W., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M., Constant H.L., Chai H.B., Fang L., Seo E.K., Long L., Cui B., Barillas K.S., *The dereplication of plant-derived natural products*, In Atta – ur – Rahman, *Studies in Natural products Chemistry* 19, 749 – 791, 1997;

⁴² Cordell G.A., Shyn Y.G., *Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts*, *Pure and Applied Chemistry* 71, 1089 – 1094, 1999;

⁴³ Bobzin S.C., Yang S., Kasten T.P., *LC – NMR: a new toll to expedite the dereplication and identification of natural products*, *Journal of Industrial Microbiology & \biotechnology* 25, 342 – 345, 2000;

⁴⁴ Lee M.S., Kerns E.H., *LC/MS applications in drug development*, *Mass Spectrometry Reviews* 18, 187 – 279, 1999;

⁴⁵ Wolfender G.C., Ndjoko K., Hostettmann K.; *Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites*, *Journal of Chromatography A* 1000, 437–455, 2003;

⁴⁶ Buss A.D., Butler M.S., *A New Model for Utilising Chemical Diversity from Natural Sources*, *Drug Development Reserch* 62, 362 – 370, 2004;

⁴⁷ Cheng Ka-Wing, Chen F., Wang M., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Natural Product Research in Colegate S.M., Molyneux R.J. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*, Second Edition, CRC Press, 245 - 266, 2008;

⁴⁸ Rodrigues M.V.N., Rehder V.L.G., Sartoratto A., Boaventura S. Júnior, Santos A.S.S.; *O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais*, *Construindo a história dos Produtos Naturais* 7, 2006;

⁴⁹ Herderich M., Richling E., Roscher R., Schneider C., Schwab W., Humpf H.-U., Schreier P., *Application of atmospheric pressure ionization HPLC-MS-MS for the analysis of natural products*, *Chromatographia* 45, 127 - 132, 1997;

⁵⁰ Siuzdak G., *Íon sources and sample introduction in Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press, 4 – 16, 1996;

-
- ⁵¹ Fountain S.T., *A mass spectrometry primer*, in Rossi D.T., Sinz M.W., *Mass Spectrometry in Drug Discovery*, Ed. Marcel Dekker, 25 – 84, 2002;
- ⁵² Galceran M.T., Moyano E., Puignou L., Pais P., *Determination of heterocyclic amines by pneumatically assisted electrospray liquid chromatography-mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A* 730, 185 - 194, 1996;
- ⁵³ Farina J.I., Sineriz F., Molina O.E., Perotti N.I., *Isolation and physicochemical characterization of soluble scleroglucan from Sclerotium rolfssii. Rheological properties, molecular weight and conformational characteristics*, *Carbohydrate Polymers* 44, 41 – 50, 2001;
- ⁵⁴ Wang W., *Literature Review on Duckweed Toxicity Testing*, *Environmental Research* 52, 7 – 22, 1990;
- ⁵⁵ Isogai A., Nakayama J., Takayama S., Kusai A., Suzuki A., *Structural elucidation of minor components of peptidyl antibiotic P168s (Leucinostatins) by tandem mass spectrometry*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemical* 56 (7), 1079 – 1085, 1992;
- ⁶² Radics L., Kajatar-Peredy M., Casinovi C.G., Rossi C., Ricci M., Tuttobello L., *Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine – oxide terminal group from Paecilomyces marquandiiisolation, structure and biological activity*, *Journal of Antibiotics* 40, 714 – 716, 1987;
- ⁵⁷ Ishiguro K., Arai T., *Action of the Peptide Antibiotic Leucinostatin*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 9 (6), 893 – 898, 1976;
- ⁵⁸ Dosioa F., Riccib M., Brusaa P., Rossib C., Cattel L., *Antibody-targeted leucinostatin A*, *Journal of Controlled Release* 32, 37 – 44, 1994;
- ⁵⁹ Schiell M., Hofmann J., Kurz M., Schmidt F.R., Vertesy L., Vogel M., Wink J., Seibert G., *Cephaibols, new peptaibol antibiotics with antihelminthic properties from Acremonium tubakii DSM 12774*, *Journal of Antibiotics* 54 (3), 220 – 233, 2001;
- ⁶⁰ Csermely P., Radics L., Rossi C., Szamel M., Ricci M., Mihály K., Somogyi J., *The nonapeptide leucinostatin A acts as a weak ionophore and as an immunosuppressant on T. lymphocytes*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1221, 125 – 132, 1994;
- ⁶¹ Matsuzaki K., Shioyama T., Okamura E., Umemura J., Takenaka T., Takaishi T., Fujita T., Miyajima K., *A comparative study on interactions of α -aminoisobutyric acid containing antibiotic peptides, trichopolyn I and hypelcin, with phosphatidylcholine bilayers*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1070, 419 – 428, 1991;
-

-
- ⁶² Mori Y., Suzuki M., Fukushima K., Arai T., *Structure of leucinostatin B, an uncoupler on mitochondria*, Journal of Antibiotics 36, 1084 – 1086, 1983;
- ⁶³ Shima A., Fukushima K., Arai T., Terada H., *Dual inhibitory effects of the peptide antibiotics leucinostatins on oxidative phosphorylation in mitochondria*, Cell Structure and Function 15, 53 – 58, 1990;
- ⁶⁴ Degenkolb T., Berg A., Gams W., Schlegel B., Grafe U., *The Occurrence of Peptaibols and Structurally Related Peptaibiotics in Fungi and their Mass Spectrometric Identification via Diagnostic Fragment Ions*, Journal of Peptide Science 9, 666 – 678, 2003;
- ⁶⁵ Abraham R. J., McLauchlan K. A., Dalby S., Kenner G. W., Sheppard R. C., *Structures and conformations of some naturally occurring of proline*, Nature 192, 1150 – 1153, 1961;
- ⁶⁶ Yang S.Z., Wei D.Z., Mu B.Z., *Determination of the structure of the fatty acid chain in a cyclic lipopeptide using GC–MS*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70, 519 – 523, 2007;
- ⁶⁷ Mori Y., Tsuboi M., Suzuki M., Fukushima K., Arai T., *Structure of Leucinostatin A, New Peptide Antibiotic from Paecilomyces lilacinus A-267*, Journal of Chemical Society 94 – 96, 1982;
- ⁶⁸ Arai T., Mikami Y., Fukushima K., Utsumi T., Yazawa K., *New Antibiotic, Leucinostatin, derived from Penicillium lilacinum*, Journal of Antibiotics 26 (3), 157 – 161, 1972;
- ⁶⁹ Jatala P., *Biological control of plant-parasitic nematodes*, Annual Review of Phytopathology 24, 453–489, 1986;
- ⁷⁰ Zhu M.L., Mo M.H., Xia Z.Y., Li Y.H., Yang S.J., Li T.F., Zhang K.Q., *Detection of two fungal biocontrol agents against root-knot nematodes by RAPD markers*, Mycopathologia 161, 307 – 316, 2006;
- ⁷¹ Khan A., Williams K.L., Nevalaine H.K.M., *Control of plant-parasitic nematodes by Paecilomyces lilacinus and Monacrosporium lysipagum in pot trials*, BioControl 51, 643 – 658, 2006;
- ⁷² Atkins S. D., Clark I. M., Pande S., Hirsch P. R., Kerry B.R., *The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of Paecilomyces Lilacinus*, FEMS Microbiology Ecology 51, 257 – 264. 2005;
- ⁷³ Swartz M.E., *UPLC: An Introduction and Review*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 28: 1253 – 1263, 2005;
-

-
- ⁷⁴ Xu W., Chen Q., Zhang T., Cai Z., Jia X., Xie Q., Ren Y., Development and application of ultra performance liquid chromatography – electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples, *Analytica Chimica Acta* 626, 28 – 36, 2008;
- ⁷⁵ Nováková L., Matyssová L., Solich P., *Advantages of application of UPLC on pharmaceutical analysis*, *Talanta* 68, 908 – 918, 2006;
- ⁷⁶ Sanchez S., Demain A.L., *Metabolic regulation of fermentation processes*, *Enzyme and Microbial Technology* 31, 895 – 906, 2002;
- ⁷⁷ Grafe U., *Autoregulatory Secondary Metabolites from Actinomycetes* In Shapiro S., *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, CRC Press, 75 – 127, 1988;
- ⁷⁸ Demain A. L., *Carbon Source Regulation of Idiolite Biosynthesis in Actinomycetes* In Shapiro S., *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, CRC Press, 127 – 134, 1988;
- ⁷⁹ Votruba J., Vanek Z., *Physicochemical Factors Affecting Actinomycete Growth and Secondary Metabolism* In Shapiro S., *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, CRC Press, 263 – 281, 1988;
- ⁸⁰ Shaaban K. A. , Shaaban M., Wollny I. G., Maier A., Fiebig H. H., Laatsch H., *Julicrome Q6 Glucuronide, a Monomeric Subunit of the Julimycin B-I Complex from a Terrestrial Streptomyces sp.*, *Journal of Natural Products* 70 (10), 1545 – 1550, 2007;
- ⁸¹ Don M.J., Huang Y.J, Huang R.L., Lin Y.L., *New Phenolic Principles from Hypericum sampsonii*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52 (7), 866 – 869, 2004;
- ⁸² Kanzaki H., Kawabata G., Kobayashi A., Kawazu K., *Bisanthraquinones, Inhibitors of Plant Transformation*, *Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry* 57 (12), 2104-2106, 1993;
- ⁸³ Singh M.P., Janso J.E., Brady S.F., *Cytoskyrins and Cytosporones Produced by Cytospora sp. CR200: Taxonomy, Fermentation and Biological Activities*, *Marine Drugs* 5, 71 – 84, 2007;
- ⁸⁴ Naruse N., Kageyama – Kawase R., Funahashi Y., Wakabayashi T., *Luminacins: A family of capillary tube formation inhibitors from Streptomyces sp. – I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico – chemical properties and structure elucidation*, *The Journal of Antibiotics* 53 (6), 579 – 590, 2000;
- ⁸⁵ Wakabayashi T., Kageyama – Kawase R., Naruse N., Funahashi Y., Yoshimatsu K., *Luminacins: A family of capillary tube formation inhibitors from Streptomyces sp. – II. Biological activities*, *The Journal of Antibiotics* 53 (6), 591 – 596, 2000.
-

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)