

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“TOXINAS PRODUZIDAS POR FUNGOS DOS
GÊNEROS *Fusarium* E *Alternaria*: ASPECTOS
ANALÍTICOS E QUÍMICO-ECOLÓGICOS”**

Gezimar Donizetti de Souza*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração:QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“TOXINAS PRODUZIDAS POR FUNGOS DOS
GÊNEROS *Fusarium* E *Alternaria*: ASPECTOS
ANALÍTICOS E QUÍMICO-ECOLÓGICOS”**

Gezimar Donizetti de Souza*

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de
concentração:QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

*** bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2009**

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

S729tp

Souza, Gezimar Donizetti de.

Toxinas produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria* : aspectos analíticos e químico-ecológicos /
Gezimar Donizetti de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
253 f.

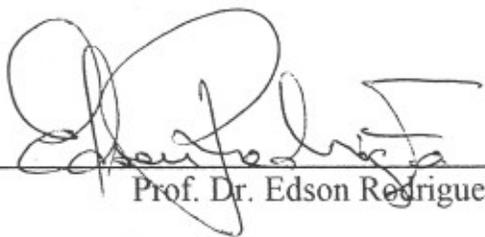
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2009.

1. Espectrometria de massas. 2. Fungos endofíticos. 3.
Toxinas. 4. CLAE-RMN. 5. Cromatografia líquida de alta
eficiência. 6. *Fusarium*. I. Título.

CDD: 547.8 (20^a)

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

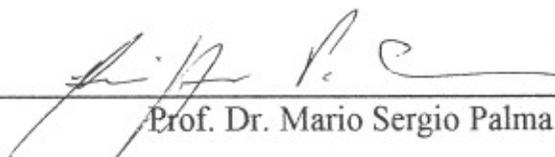
*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado do candidato **Gezimar Donizetti de Souza**, realizada em 02 de fevereiro de 2009:*



Prof. Dr. Edson Redrigues Filho



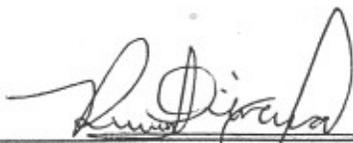
Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes



Prof. Dr. Mario Sergio Palma



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin



Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira

Aos meus pais, **Angélica Regina de Souza e Zigomar Benedito de Souza**, pelo apoio, amor e dedicação em todos os momentos.

DEDICO

*"In the field of observation,
chance favors only the prepared mind"*

Louis Pasteur
French biologist & bacteriologist
(1822 - 1895)

*"Oh let the sun beat down upon your
face, stars to fill my dream, I am
a traveler of both time and
space, to be where I have been"*

*(John Bonham / John Paul Jones / Jimmy Page / Robert Plant)
Led Zeppelin*

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho**, do DQ-UFSCar, pela oportunidade, orientação, ensinamentos, amizade e pelas partidas de futebol. Muito obrigado Mestre!

To **Dr. Axel Mithöfer**, from Max Planck Institut für chemische Ökologie, for being a wonderful host during 10 months in Jena, for all support, friendship, and for having introduced me *glühwien*.

To **Prof. Dr. Wilhelm Boland** and to **Dr. Dieter Spiteller**, from Max Planck Institut für chemische Ökologie, for all support and collaboration.

To **Dr. Bernd Schneider**, **Dr. Cristina Daolio** and **Dr. Renate Ellinger**, from NMR group of Max Planck Institut für chemische Ökologie, for the opportunity of using the HPLC-SPE-NMR system.

To **Dr. Tamara Krügel** and to **Johan Brandenburg**, from Greenhouse of Max Planck Institut für chemische Ökologie, for all guidelines on *Arabidopsis* work.

To **Andrea Lehr**, **Anja David** and **Dr. Sybille Lorenz**, from Max Planck Institut für chemische Ökologie, for all technical support.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Martinelli**, da UFRGS, ao **Dr. Paulo Dilkin**, da UFSM, ao **Dr. Ariano Morais Prestes** e a pesquisadora **Fernanda Rozanski**, da EMBRAPA-RS e ao **Dr. Nelson Arno Wulff**, da Fundecitrus-SP, pela gentileza ao conceder algumas cepas dos fungos de interesse neste projeto.

Ao **Prof. Dr. Emanuel Carrilho**, do IQSC-USP, e aos Professores **Profa. Dra. Quézia Bezerra Cass**, **Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira**, **Prof. Dr. Timothy**

Brocksom, Prof. Dr. Alcindo dos Santos e Profa. Dra. Regina Oliveira, do DQ-UFSCar, pela amizade e pelas frutíferas discussões científicas.

Aos professores **Prof. Dr. João Batista Fernandes, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva e Prof. Dr. Paulo César Vieira**, do Laboratório de Produtos Naturais – UFSCar, pela amizade e ensinamentos na graduação e pós-graduação.

Aos demais professores do DQ-UFSCar.

Ao corpo técnico do DQ-UFSCar: **Ademir, Doraí, Paula, Luciana, Paulo e Valdir**.

Aos demais técnicos do DQ-UFSCar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar e suas secretárias, **Ariane, Luciana e Cristina**.

Aos amigos de ontem, hoje e sempre, do Laboratório de Espectrometria de Massas – UFSCar: **Murgu, Grace, Francinete, Regina, Ana Paula, Ângela, Péricles, Lucília, Afonso, Antônia, Andrey, Sheila, Paschoalino, Fabiana, Renata, LF, LH, Elaine, Bianca, Luciana, Taícia, Thaís, Amanda, Cíntia, Malu, Zé, Ângelo, Enzo, Victor, Diego, Heloisa, Mariana**. Muito obrigado pela amizade ao longo de todo esse tempo!

Aos demais amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Laboratório de Síntese Inorgânica, Laboratório de Síntese Orgânica, Laboratório de Cromatografia Líquida, Laboratório de Eletroquímica e Cerâmica.

Aos demais amigos do DQ-UFSCar e à toda a turma 2000 do curso de Bacharelado em Química – UFSCar.

Em especial aos meus grandes amigos **Luis Henrique Gasparotto (Luli)**, **Francine Picon** e **Claudia Pelizzarro** pelo apoio, amizade e diversão.

To my “ecological” friends from Jena **Dorreen, Fabio, Paulina, Heiko, Andrea, Sandy, Margit, Tobias, Eduardo**. You are all aces on my book!

To further co-workers from Max Planck Institut für chemische Ökologie.

Ao **Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior** e aos amigos do laboratório de bioequivalência e equivalência farmacêutica da Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco – UNIFAG – USF. Em especial aos pesquisadores **Dr. Fábio Barros (Cebolinha)** e **Dr. Eduardo Meurer**, pela grande amizade e o imenso aprendizado em espectrometria de massas.

Aos “irmãos” **Rodrigo** e **Joel**, pela grande amizade ao longo de todos estes anos. Vocês moram no meu coração!

A **Marília**, mulher da minha vida, pelo amor, carinho, dedicação e compreensão, sempre. Te amo do tamanho do “maior universo do mundo”...

A minha família por todo o apoio.

A FAPESP, pela bolsa de doutorado direto concedida e também por todo o apoio concedido aos nossos laboratórios.

A CAPES, pela bolsa de doutorado *sandwich* concedida e por todo o apoio fornecido aos nossos laboratórios.

Ao CNPq e a FINEP, pelo apoio financeiro.

To Max Planck Gesellschaft, for support and the opportunity.

**Por fim, a todos que tornam a
química a ciência mais instigante deste universo!**

Artigos publicados, submetidos e em preparação

- 1) Simionato AVC, de Souza GD, Rodrigues-Filho Edson, Glick J, Vouros P, Carrilho E. "Tandem mass spectrometry of coprogen and deferoxamine hydroxamic siderophores". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**; 20: 193–199.
- 2) Magnani RF, de Souza GD, Rodrigues-Filho E. "Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether on flavedo and albedo tissues of tangerines (*Citrus reticulata*) with symptoms of Alternaria Brown Spot". *J. Agric. Food Chem.* **2007**; 55: 4980-4986.
- 3) von Poelhsitz G, Bogado AL, de Souza GD, Rodrigues-Filho E, Batista AA, Araujo MP. "New nitrosyl ruthenium complex [RuCl(NO)(dcype)(bipy)](PF₆)₂: Synthesis, electrochemistry, NMR and ESI-MS/MS studies". *Inorg. Chem. Comm.* **2007**; 10: 133–138.
- 4) Murgu M, Santos LFA, de Souza GD, Daolio C, Schneider B, Ferreira AG, Rodrigues-Filho E. "Hydroxylation of a hederagenin derived saponin by a xylareaceous fungus found in fruits of *Sapindus saponaria*". *J. Braz. Chem. Soc.* **2008**; 19(5): 831-835.
- 5) Reche KVG, de Souza GD, Trapp MA, Rodrigues-Filho E, Silva SC, Fernandes JB, Vieira PC, Muller MW, da Silva MFGF. "Methyl angolensate changes in *Khaya ivorensis*: phytoanticipin accumulation?". *Phytochemistry* **2008**; **submitted**.
- 6) Bogado AL, Barbosa MIF, de Souza GD, Trapp MA, Rodrigues-Filho E, Ueno L, Batista AA. "Ring-opening metathesis polymerization with a trans-chelating diphosphinobutane ligand". *J. Mol. Cat.* **2008**, **submitted**.
- 7) de Souza GD, Mithöfer A, Daolio C, Schneider B, Rodrigues-Filho E. "Detection and identification of *Alternaria alternata* mycotoxins by HPLC-SPE-NMR and their cytotoxic effects to soybean cell cultures". *J. Nat. Prod.*, **In preparation**.
- 8) de Souza GD, Mithöfer A, Rodrigues-Filho E. "Covering a range of toxic effect of *Alternaria* and *Fusarium* metabolites: a chemical ecology point-of-view". *Chem. Bio.*, **in preparation**.
- 9) de Souza GD, Rodrigues-Filho E. "The use of Hydrogen / Deuterium Exchange (HDX) to confirm zearalenone's fragmentation pathway by means of ESI-MS/MS". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **in preparation**.
- 10) de Souza GD, Campos FR, Trapp MA, Rodrigues-Filho E. Detection and Identification of 5-n-Alkylresorcinols from Wheat (*Triticum aestivum*) by HPLC-APCI-MS and APCI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **in preparation**.

Lista de abreviaturas e símbolos*

Técnicas Analíticas

2D NMR	<i>Two Dimension Nuclear Magnetic Resonance</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i>
cc	<i>Column Chromatography</i>
CE-MS	<i>Capillar Electrophoresis coupled to Mass Spectrometry</i>
CID-MS/MS	<i>Collision-Induced Desorption Tandem Mass Spectrometry</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DESI	<i>Desorption Electrospray</i>
EI	<i>Electron Ionization</i>
ES	<i>Electrospray</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ESI-MS/MS	<i>Direct Inserction Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>
gHMBC	<i>gradient Heteronuclear Multiple-Bond Correlaction</i>
gHSQC	<i>gradient Heteronuclear Single Quantum Correlaction</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-NMR	<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to Nuclear Magnetic Resonance</i>
HPLC-NMR-MS/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography coupled to Nuclear Magnetic Resonance coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
HPLC-UV-SPE-NMR	<i>High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection coupled to Solid-Phase Extraction coupled to Nuclear Magnetic Resonance</i>
HPLC-UV-SPE-NMR-MS/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection coupled to Solid-Phase Extraction coupled to Nuclear Magnetic Resonance coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography couplet to Mass Spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry</i>
MALDI	<i>Matrix Absorption Laser Desorption Ionization</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PTLC	<i>Preparative Thin-Layer Chromatography</i>
QqQ	<i>Triple-quadrupole</i>
QTOF	<i>Quadrupole – Time of Fly in line</i>
QTrap	<i>Quadrupole - Ion Trap in line</i>
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>

TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
UV	<i>Ultraviolet Detector</i>

Parâmetros Estatísticos e de Validação

4PL	<i>Four Parameter Logistic Model</i>
a	<i>Slope</i>
b	<i>Intercept</i>
CV	<i>Coefficient of Variation</i>
EC ₅₀	<i>Half Maximal Effective Concentration</i>
F	<i>F-Factor</i>
HQC	<i>High Quality Control</i>
IC ₅₀	<i>Half Maximal Inhibition Concentration</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LQC	<i>Low Quality Control</i>
MQC	<i>Medium Quality Control</i>
QC	<i>Quality Control</i>
r	<i>Angular Coefficient</i>
r ²	<i>Coefficient of Determination</i>
RMS	<i>Root Multiple Square</i>
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i>
s	<i>Standard Deviation</i>
S/N	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
s ²	<i>Variance</i>

Entidades

ACS	<i>American Chemical Society</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

Solventes, Fases Estacionárias, Reagentes e Meios de Cultura

ACN	<i>Acetonitrile</i>
C ₁₈	<i>Octadecylsilane</i>
C ₈	<i>Octasilano</i>
CD ₃ CN	<i>Deuterated Acetonitrile</i>
CD ₃ OD	<i>Deuterated Methanol</i>
CDCl ₃	<i>Deuterated Chloroform</i>
CH ₂ Cl ₂	<i>Dichloromethane</i>
CHCl ₃	<i>Chloroform</i>
DMSO-d ₆	<i>Deuterated Dimethylsulfoxide</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
HOAc	<i>Acetic Acid</i>
MeOH	<i>Methanol</i>
MS	<i>Murashige Skoog culture medium</i>

Na ₂ CO ₃	<i>Sodium Carbonate</i>
NH ₄ OAc	<i>Amonium Acetate</i>
ODS	<i>Octadecylsilane</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar medium</i>
SiO ₂	<i>Silicium Dioxide</i>
TFA	<i>Trifluoracetic Acid</i>

Parâmetros e Generalidades

δ	<i>Chemical Shift</i>
φ	<i>Diameter</i>
d1	<i>NMR Acquisition Time</i>
Da	<i>Dalton</i>
DC	<i>Direct Current</i>
d _n	<i>Deuterated Sample</i>
J	<i>NMR Constant Coupling</i>
k	<i>Constant of Reaction Velocity</i>
lb	<i>Logarithim Baseline</i>
log	<i>Logarithim on the Base 10</i>
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>
OD ₆₀₀	<i>Optical Density at 600 nm</i>
p1	<i>NMR Pulse Time</i>
PAL	<i>Phenylalanine-amoniliase</i>
ppm	<i>Parts per Million</i>
RF	<i>Radiofrequency</i>
SAM	<i>S-adenosyl-methyonine</i>
SWH	<i>Spectral Window</i>
™	<i>Trade Mark</i>

* As principais siglas foram mantidas em inglês pois algumas delas não possuem tradução estabelecida para o português. As outras foram mantidas em inglês visando a uniformidade do texto.

Lista de Tabelas

TABELA 1. Algumas substâncias já isoladas de <i>Fusarium</i> ^{7, 39}	9
TABELA 2. Exemplos de tricotecenos do tipo A.....	13
TABELA 3. Exemplos de tricotecenos do tipo B.....	13
TABELA 4. Exemplos de tricotecenos do tipo C.....	14
TABELA 5. Análogos de fumonisinas caracterizados desde 1988.....	17
TABELA 6. Algumas toxinas produzidas por <i>Alternaria</i> análogas a esfinganina e as fumonisinas.....	20
TABELA 7. Diferentes experimentos utilizando-se equipamento com triplo-quadrupolo.....	31
TABELA 8. Comparação entre as técnicas hífenadas HPLC-NMR e HPLC-MS/MS.....	35
TABELA 9. Cepas de <i>Fusarium graminearum</i> disponíveis em nossos laboratórios. Somente a cepa 01-186 foi selecionada para este trabalho.....	53
TABELA 10. Dados espectroscópicos para a substância zearalenona (14).....	81
TABELA 11. Dados espectroscópicos obtidos para o zearalenol (17).....	88
TABELA 12. Dados espectroscópicos obtidos para o deoxinivalenol (42).....	97
TABELA 13. Dados espectroscópicos obtidos para o nivalenol (41).....	102
TABELA 14. Cálculo da energia para a conformação mais estável dos fragmentos propostos. Dados obtidos via dinâmica molecular, utilizando-se o software Hyperchem TM	115
TABELA 15. Experimentos de íons precursores das moléculas não deuteradas.....	123
TABELA 16. Colunas testadas para o desenvolvimento do método de quantificação da zearalenona (14).....	130
TABELA 17. Teste de homocedasticidade para o método proposto.....	135
TABELA 18. Valores obtidos para precisão e exatidão.....	137
TABELA 19. Valores obtidos para a recuperação da zearalenona (14) analisados na curva de produção do fungo <i>Fusarium graminearum</i> . Os valores são a média ± RSD.....	139
TABELA 20. Ensaio para linearidade, LOQ e LOD para o método proposto (valores são as médias ± RSD, n = 3).....	152
TABELA 21. Ensaio para a precisão e exatidão dos compostos analisados nas matrizes flavedo e albedo.....	155
TABELA 22. Ensaio de recuperação para o método proposto de quantificação de alternarióis em tangerinas.....	156
TABELA 23. Resumo dos valores obtidos nos experimentos de ¹ H, ¹³ C NMR e gHMBC por HPLC-UV-SPE-NMR para os compostos 76 e 77 (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN). Valores de referência também estão apresentados para alternariol (76) ²¹⁴ e para o alternariol monometil éter (77) ²¹⁵	172
TABELA 24. Dados obtidos por EI-HRMS para os compostos previamente analisados por HPLC-UV-SPE-NMR.....	173
TABELA 25. Resumo dos valores obtidos nos experimentos de ¹ H, ¹³ C NMR e gHMBC por HPLC-UV-SPE-NMR para os compostos 90 e 91 (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN). Valores de referência também estão apresentados para o composto 90 ²¹⁵	174
TABELA 26. Resumo dos valores obtidos nos experimentos de ¹ H, ¹³ C NMR e gHMBC por HPLC-UV-SPE-NMR para os compostos 92 e 93 (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN). Valores de referência também estão apresentados para o composto 92 ²¹⁵	186
TABELA 27. Sementes utilizadas em experimentos iniciais realizados no Brasil.....	194
TABELA 28. Composição do meio de cultura MS ²²⁸	195
TABELA 29. Sumário dos principais efeitos causados toxinas produzidas por <i>Fusarium</i> e por <i>Alternaria</i> e de interesse neste projeto.....	199
TABELA 30. Dados estatísticos obtidos após os testes com as toxinas de interesse contra a lagarta <i>S. littoralis</i>	209
TABELA 31. Dados estatísticos obtidos após os testes com as toxinas de interesse contra as culturas de células de soja.....	216
TABELA 32. Os resultados obtidos em até 20 dias de cultivo das plântulas.....	219
TABELA 33. Resumo dos valores obtidos nos testes biológicos das substâncias testadas.....	224

Lista de Figuras

FIGURA 1. A) e B) conídeos de <i>Fusarium</i> ; C) conídeos de <i>Alternaria</i> ; D) hifas; E) esporos.....	4
FIGURA 2. Estruturas das substâncias apresentadas na TABELA 1.....	9
FIGURA 3. Estruturas da zearalenona (14) e de alguns de seus derivados.....	10
FIGURA 4. Esqueletos básicos dos diferentes grupos de tricotecenos.....	12
FIGURA 5. Subclasses de tricotecenos existentes.....	14
FIGURA 6. Rota biossintética do deoxinivalenol (42). Adaptado de Dewick (2004) ⁵⁰	15
FIGURA 7. A) Esqueleto básico das fumonisinas; B) ácido tricarbálico (TCA); C) 3-hidroxipiridinium (3HP).....	16
FIGURA 8. Algumas toxinas produzidas por fungos do gênero <i>Alternaria</i>	19
FIGURA 9. Esqueleto da sphinganina e das toxinas descritas na TABELA 6.....	20
FIGURA 10. Distribuição global do controle de toxinas fúngicas ⁸³	22
FIGURA 11. Esquema simplificado de uma fonte de ionização por ESI. O esquema representado é referente ao de uma fonte utilizada no equipamento Quattro LC (Waters).....	25
FIGURA 12. Esquematização do processo de Explosão Coulombica das gotículas carregadas gerando os íons moleculares $[M+H]^+$. Ionizações no modo negativo são idênticas, somente com inversão das cargas ($[M-H]^-$).....	25
FIGURA 13. Representação da fonte de ionização por APCI.....	27
FIGURA 14. Representação esquemática de um quadrupolo linear.....	28
FIGURA 15. Esquema de um analisador de triplo-quadrupolo (QqQ).....	31
FIGURA 16. Representações esquemáticas: A) da sonda convencional; B) da sonda para acoplamento <i>on-line</i> ; C) de todo o acoplamento HPLC-NMR.....	37
FIGURA 17. Representação esquemática do sistema de HPLC-UV-SPE-NMR.....	39
FIGURA 18. Foto do sistema de HPLC-SPE-NMR utilizado neste projeto.....	40
FIGURA 19. Objetos constantes de um método analítico.....	41
FIGURA 20. Processo para o isolamento das substâncias da classe das zearalenonas a partir dos extratos de <i>Fusarium graminearum</i>	56
FIGURA 21. Processo para o isolamento das substâncias da classe das zearalenonas a partir de <i>Fusarium moniliforme</i> patogênico.....	56
FIGURA 22. Procedimento para a obtenção de tricotecenos em extratos de <i>Fusarium graminearum</i>	58
FIGURA 23. Procedimento para a obtenção de tricotecenos em extratos de <i>Fusarium moniliforme</i> isolado como patógeno.....	58
FIGURA 24. Procedimento para o isolamento das toxinas produzidas por <i>Alternaria alternata</i>	60
FIGURA 25. Organogramas dos protocolos para deuteração da zearalenona (14). A) protocolo 1; B) protocolo 2; C) protocolo 3.....	62
FIGURA 26. Substâncias identificadas e isoladas em extratos de <i>Fusarium</i> . Os compostos 91-97 também forma isolados ou identificados em extratos de <i>Alternaria</i>	70
FIGURA 27. Espectro de ¹ H NMR da fração ZEAFG47D (Zearalenona (14)), (CDCl ₃ , 500 MHz). 72	
FIGURA 28. Espectro de COSY 45° da fração ZEAFG47D (zearalenona (14)), (CDCl ₃ , 500 MHz).	73
FIGURA 29. Ampliação da FIGURA 28.....	73
FIGURA 30. Espectro de gHSQC da fração ZEAFG47D (Zearalenona (14)), (CDCl ₃ , 500 MHz, 125 MHz).....	74
FIGURA 31. Ampliação da FIGURA 30.....	74
FIGURA 32. Nova ampliação da FIGURA 28.....	75
FIGURA 33. Nova ampliação da FIGURA 30.....	75
FIGURA 34. Espectro de gHMBC da fração ZEAFG47D (zearalenona (14)), (CDCl ₃ , 500 MHz, 125 MHz).....	77
FIGURA 35. Ampliação da FIGURA 34.....	78
FIGURA 36. Nova ampliação da FIGURA 34.....	78
FIGURA 37. Espectro de ¹³ C NMR da fração ZEAFG47D (zearalenona (14)), (CDCl ₃ , 125 MHz). 80	
FIGURA 38. Estrutura química da zearalenona (fração ZEAFG47D).....	82
FIGURA 39. Espectro de ¹ H NMR da fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD ₃ CN, 500 MHz). ..	83
FIGURA 40. Espectro de ¹³ C NMR da fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD ₃ CN, 125 MHz). .	84
FIGURA 41. Espectro de COSY 45° obtido para a fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD ₃ CN, 500 MHz).....	85

FIGURA 42. Ampliação da FIGURA 41.	85
FIGURA 43. Espectro de <i>g</i> HSQC obtido para a fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD ₃ CN, 500 MHz, 125 MHz).	86
FIGURA 44. Espectro de <i>g</i> HMBC obtido para a fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD ₃ CN, 500 MHz, 125 MHz).	86
FIGURA 45. Ampliação da FIGURA 44.	87
FIGURA 46. Estrutura química do zearalenol (17) (fração ZEAFG54A).	89
FIGURA 47. Espectro de ¹ H NMR da fração TRICFG5E (deoxinivalenol (42)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	90
FIGURA 48. Espectro de COSY 45° obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (42)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	91
FIGURA 49. Ampliação da FIGURA 48 com supressão da diagonal.	91
FIGURA 50. Espectro de <i>g</i> HSQC obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (42)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz, 125 MHz).	92
FIGURA 51. Espectro de <i>g</i> HMBC obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (42)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz, 125 MHz).	92
FIGURA 52. Ampliação da FIGURA 51.	94
FIGURA 53. Espectro de ¹³ C NMR obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (42)), (DMSO-d ₆ , 125 MHz).	95
FIGURA 54. Espectro de ESI-MS/MS para o deoxinivalenol (42) (15 eV).	96
FIGURA 55. Estrutura química do deoxinivalenol (42) (fração TRICFG5E).	96
FIGURA 56. Mecanismo proposto para a perda de 30 Da a partir do deoxinivalenol (42).	96
FIGURA 57. Espectro de ¹ H NMR da fração TRICFG6C (nivalenol (41)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz). ..	98
FIGURA 58. Espectro de ¹³ C NMR da fração TRICFG6C (nivalenol (41)), (DMSO-d ₆ , 125 MHz). ..	99
FIGURA 59. Espectro de COSY da fração TRICFG6C (nivalenol (41)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz).	99
FIGURA 60. Ampliação da FIGURA 59.	100
FIGURA 61. Espectro de <i>g</i> HSQC da fração TRICFG6C (nivalenol (41)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz, 125 MHz).	100
FIGURA 62. Espectro de <i>g</i> HMBC da fração TRICFG6C (nivalenol (41)), (DMSO-d ₆ , 500 MHz, 125 MHz).	101
FIGURA 63. Estrutura química do nivalenol (41).	102
FIGURA 64. Espectro de ESI-MS/MS do nivalenol (41) (15 eV).	102
FIGURA 65. Espectros de massas obtidos para a fumonisina B ₁ (57) por ESI no modo negativo de análises: A) Espectro <i>full scan</i> ; B) íons produto de <i>m/z</i> 721 (CID-MS/MS, 25 eV). ..	104
FIGURA 66. Proposta de fragmentação para a fumonisina B ₁ (57).	105
FIGURA 67. Cromatogramas por HPLC-MS/MS (perda neutra) obtidos para: A) solução de 10 µg/mL de fumonisina B ₁ , perda neutra de 158 Da; B) Branco, perda neutra de 158 Da; C) solução de 10 µg/mL de fumonisina B ₁ (57), perda neutra de 563 Da; B) Branco, perda neutra de 563 Da.	106
FIGURA 68. Núcleo básico das zearalenonas. Quando as posições R são hidrogênios, a molécula é a zearalenona (14), que origina o nome a classe química.	109
FIGURA 69. Representação esquemática da energia no ponto zero de uma ligação X—Y para dois isótopos de X: ⁿ X representa o isótopo mais leve e ^m X o mais pesado. Adaptado de Carey 1990 ¹³² e Günter 1999 ¹⁸⁷	110
FIGURA 70. Espectros de massas obtidos na análise dos produtos das diferentes metodologias de deuteração da zearalenona (14): A) protocolo 1; B) protocolo 2; C) protocolo 3. ...	111
FIGURA 71. Intensidade dos íons obtidos na fragmentação da zearalenona (14) por CID-MS/MS: A) ESI; B) APCI.	111
FIGURA 72. Espectros de íons produtos da zearalenona (14) obtidos por CID-MS/MS (25eV); de baixo para cima, d ₀ até d ₇	113
FIGURA 73. Possível formação do íon benzino na desidratação da zearalenona (14). As evidências experimentais não indicam que isso ocorra.	114
FIGURA 74. Modelo proposto para a perda de água a partir da molécula deprotonada [M-H] ⁻	114
FIGURA 75. Cálculos de dinâmica molecular indicam que a estrutura da zearalenona (14) pode assumir uma conformação tal que a distância entre o carbono 2' (nucleófilo, de acordo com o mecanismo de fragmentação proposto) e o carbono 12' (eletrófilo) seja de aproximadamente 3.21 Å, possibilitando, assim, a formação da ligação δ.	116
FIGURA 76. Espectros de íons produtos da 4-metoxizearalenone (20) por CID-MS/MS (20 eV); de baixo para cima, d ₀ até d ₆	118

FIGURA 77. Espectro de íons produtos do β -zearalenol (17) obtidos por CID-MS/MS (25 eV); de baixo para cima, d_0 até d_4 .	119
FIGURA 78. Proposta para a desidratação 1,2 do β -zearalenol (17) (perda de HRO – 18 ou 19Da). Aparentemente não há diferença considerável com respeito à estabilidade destes íons.	119
FIGURA 79. Proposta de fragmentação para a zearalenona (14).	120
FIGURA 80. Proposta para a formação do pico base nos espectros de CID-MS/MS da zearalenona (14).	120
FIGURA 81. Proposta para a formação dos picos base nos espectros de CID-MS/MS da 4-metoxizearalenone (20).	121
FIGURA 82. Formação de alguns íons isotopólogos m/z 163 – m/z 166 e m/z 175 – m/z 177 a partir de m/z 331 – m/z 337, moléculas deprotonadas da 4-metoxizearalenone (20).	122
FIGURA 83. Proposta para a formação de alguns íons produtos nos espectros de CID-MS/MS do β -zearalenol (17).	123
FIGURA 84. Mecanismo proposto para a formação dos íons isotopólogos m/z 188 até m/z 191 e m/z 162 até m/z 165 nos espectros obtidos para o β -zearalenol (17).	123
FIGURA 85. Proposta mecanística para a perda de 18Da a partir dos íons m/z 275 até m/z 279 (β -zearalenol (17)).	124
FIGURA 86. Correlação entre a fase móvel testada e a área do pico para as transições escolhidas (317→189 e 317→175).	129
FIGURA 87. Correlação entre a fase móvel testada e a relação sinal / ruído para as transições escolhidas (317→189 e 317→175). As fases-móvel são as mesmas representadas na FIGURA 86.	129
FIGURA 88. Resultados dos testes com as colunas representadas na TABELA 16.	130
FIGURA 89. Cromatogramas SEM para a zearalenona (14) (transição 317→175): A) e B) Maior concentração do intervalo dinâmico, 1000 ng/mL; C) e D) LOQ injetado 0,1 ng/mL; E) e F) LOD injetado, 0,035 ng/mL.	132
FIGURA 90. Cromatogramas SRM para o composto zearalenona (14). A transição monitorada é 317 → 175: A) Cromatograma para a amostra dopada em 1000 ng/mL; B) Cromatograma para a amostra de trigo sem dopagem – branco.	133
FIGURA 91. Curva de calibração obtida para a zearalenona (14), no intervalo dinâmico de 0,1 a 1000 ng/mL.	134
FIGURA 92. Gráficos de resíduos versus concentração do analito obtidos com o uso de fatores de peso nas curvas analíticas: $1/x$ em azul, $1/x^2$ em roxo, $1/y$ em vermelho e $1/y^2$ em magenta. Como pode ser observado, a menor variação dos resíduos foi obtida utilizando-se fator de peso $1/x$.	136
FIGURA 93. Curvas de produção de zearalenonas por diferentes cepas de fungos do gênero <i>Fusarium</i> .	141
FIGURA 94. Equação matemática que descreve o perfil da curva de produção de zearalenona (14) por parte dos fungos do gênero <i>Fusarium</i> estudados.	141
FIGURA 95. Expansão da curva de produção apresentada na FIGURA 93.	142
FIGURA 96. Biossíntese da zearalenona (14) – Adaptado de Dewick (2004) ⁵⁰ e Blackwell et al. (1985) ¹⁹⁸ .	142
FIGURA 97. Produção de zearalenona (14) por <i>Fusarium graminearum</i> em diferentes meios de cultura.	143
FIGURA 98. Frutos de tangerina (<i>Citrus reticulata</i>): A) e B) frutos com sintomas de Mancha Marrom de Alternária; C) Flavedo e Albedo, matrizes utilizadas para a quantificação dos alternariols.	146
FIGURA 99. Espectros de íons produto obtidos via CID-ESI-MS/MS; A) alternariol (76) (15 eV); B) alternariol monometil éter (77) (15 eV). Os íons demarcados formam as transições escolhidas para os experimentos de SRM.	148
FIGURA 100. Proposta mecanística para a perda de um radical metílico (15 Da): A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77).	149
FIGURA 101. Proposta para a perda de CO (28 Da) para o alternariol (76) e o alternariol monometil éter (77).	149
FIGURA 102. Simulação computacional da densidade de cargas feita com o software Hyperchem TM .	150
FIGURA 103. Proposta para a formação de m/z 215 e m/z 213 para o alternariol (76).	151

FIGURA 104. Cromatogramas obtidos para a matriz flavedo. O primeiro composto a eluir é o alternariol (76) (257→213) e o segundo é o alternariol monometil éter (77) (271→256). A) branco; B) concentrações no LOQ; C) concentração no ponto mais alto do intervalo dinâmico. Os valores são tempo de retenção (área do pico).....	153
FIGURA 105. Cromatogramas obtidos para a matriz albedo. O primeiro composto a eluir é o alternariol (76) (257→213) e o segundo é o alternariol monometil éter (77) (271→256). A) branco; B) concentrações no LOQ; C) concentração no ponto mais alto do intervalo dinâmico. Os valores são tempo de retenção (área do pico).....	154
FIGURA 106. Resultados da análises de amostras de tangerina pelo método proposto.	160
FIGURA 107. Curva de produção de alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) obtidos de <i>Alternaria alternata</i> , isolada como patógeno de trigo, e cultivada neste mesmo cereal.....	162
FIGURA 108. Biossíntese do alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) – adaptado de Dewick (2004) ⁵⁰	163
FIGURA 109. Produção de alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) em diferentes meios de cultura (40 dias de cultivo).	164
FIGURA 110. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV-SPE-NMR (254 nm). Os picos marcados foram trapeados automaticamente em discos de SPE: A) cromatograma inicial do extrato de <i>Alternaria alternata</i> (30 µL, 2mg/mL). Os picos marcados representam alternariol (76) (12,87 min) e alternariol monometil éter (77) (21,89 min). B) Cromatograma após otimização cromatográfica, pré-purificação por SPE manual e concentração da amostra (30 µL, 20mg/mL).	167
FIGURA 111. Espectros de ¹ H NMR das amostras de interesse analisadas por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz, CD ₃ CN): 1) alternariol (76); 2) alternariol monometil éter (77); 3) alternusin (76); 4) MAC50_108 (90); 5) MAC50_135 (91); 6) MAC50_153 (92); ...	168
FIGURA 112. Fragmentos dos compostos 76 e 77 que podem ser deduzidos a partir dos experimentos de ¹ H NMR.....	168
FIGURA 113. Estruturas químicas dos compostos alternariol (76) e alternariol monometil éter (77).	169
FIGURA 114. Espectro de gHMBC obtido para o composto 76 via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	170
FIGURA 115. Espectro de ¹³ C NMR obtido para o composto 77 via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (125 MHz para, CD ₃ CN). A imperfeição na linha de base é resultante da baixíssima sensibilidade da sonda capilar, imprescindível para hifenação com HPLC, nos experimentos de ¹³ C NMR.....	170
FIGURA 116. Espectro de gHMBC obtido para o composto 77 via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	171
FIGURA 117. Espectro de gHSQC obtido para o (90) via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	175
FIGURA 118. Espectro de gHMBC obtido para o (90) via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	176
FIGURA 119. Estrutura química do composto altenusin (90).	176
FIGURA 120. Proposta biossintética para a formação do altenusin. Adaptada de Dewick (2004) ⁵⁰	177
FIGURA 121. Espectro de gHMBC obtido para o composto 91 via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	179
FIGURA 122. Fragmentos estruturais extraídos dos experimentos de NMR mencionados.	179
FIGURA 123. Proposta estrutural para o composto 91 , nomeado aqui MAC50_108. Também podem ser observados nesta figura os análogos já isolados de microrganismos (91a – 91c).	181
FIGURA 124. Proposta biossintética para a formação do composto MAC50_108 (91). Baseada em Dewick (2004) ⁵⁰ e Ayer et al. (1990) ²²⁷	182
FIGURA 125. Espectro de gHSQC obtido para o composto 92 obtido via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	184
FIGURA 126. Espectro de gHMBC obtido para o composto 92 obtido via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	184
FIGURA 127. Espectro de gHMBC obtido para o composto 93 obtido via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ¹ H e 125 MHz para ¹³ C, CD ₃ CN).	185
FIGURA 128. Proposta estrutural para os MAC50_135 (92) e MAC50_153 (93).	187

FIGURA 129. Alvos desejados para o estudo do espectro de ação das toxinas de interesse neste projeto.	198
FIGURA 130. Curvas do crescimento de <i>E. coli</i> em meio contendo diferentes concentrações das toxinas: A) Alternariol (76); B) Alternariol monometil éter (77); C) Zearalenona (14); D) 4-metoxizearalenone (20); E) β -Zearalenol (17); F) Ácido fusárico (94); G) Nivalenol (41) e H) Deoxinivalenol (42).	201
FIGURA 131. Perfil do crescimento das lagartas <i>S. littoralis</i> submetidas à dieta especial contendo diferentes concentrações de zearalenona (14) (experimento sem homogeneização da amostra).	203
FIGURA 132. Perfil do crescimento das lagartas <i>S. littoralis</i> submetidas à dieta especial contendo diferentes concentrações das toxinas (experimento com homogeneização da amostra): A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77); C) nivalenol (41); D) deoxinivalenol (42).	204
FIGURA 133. Perfil do crescimento das lagartas <i>S. littoralis</i> submetidas à dieta especial contendo diferentes concentrações das toxinas (experimento com homogeneização da amostra): A) zearalenona (14); B) β -zearalenol (17); C) ácido fusárico (94); D) dimetoxizearalenone (20).	205
FIGURA 134. A) Lagarta controle (dieta + etanol); B) lagarta submetida à dieta com 10,0 μ W de zearalenona (14). É possível observar a ulceração provocada no inseto.	205
FIGURA 135. Equação do modelo logístico de quatro parâmetros.	206
FIGURA 136. Curvas para a determinação de EC ₅₀ obtidas para as toxinas produzidas por <i>Fusarium</i> : A) zearalenona (14); B) β -zearalenol (17); C) 4-metoxizearalenone (20); D) deoxinivalenol (42); E) nivalenol (41). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=5).	207
FIGURA 137. Curvas para a determinação de EC ₅₀ obtidas para as toxinas produzidas por <i>Alternaria</i> : A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77); C) altenusin (90); D) MAC50_108 (91); E) MAC50_135 (92). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=5).	208
FIGURA 138. Efeito das toxinas da classe das zearalenonas para as culturas de células de soja.	212
FIGURA 139. Curvas para a determinação de EC ₅₀ nos testes contra culturas de células de soja, obtidas para as toxinas produzidas por <i>Fusarium</i> : A) zearalenona (14); B) β -zearalenol (17); C) 4-metoxizearalenone (20); D) ácido fusárico (94); E) deoxinivalenol (42); F) nivalenol (41). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=4). ...	214
FIGURA 140. Curvas para a determinação de EC ₅₀ nos testes contra culturas de células de soja, obtidas para as toxinas produzidas por <i>Alternaria</i> : A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77); C) altenusin (90); D) MAC50_108 (91); E) MAC50_135 (92). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=4).	215
FIGURA 141. Sementes em estágio de pré-germinação em placas de Petri (zero dias).	220
FIGURA 142. Sementes em estágio de pré-germinação em placas de Petri (após 5 dias).	220
FIGURA 143. Plântulas de <i>Arabidopsis</i> cultivadas em meio MS contendo diferentes concentrações de toxinas produzidas por fungos do gênero <i>Fusarium</i> . Controle equivale ao meio + etanol – 1,8%.	223
FIGURA 144. Plântulas de <i>Arabidopsis</i> cultivadas em meio MS contendo diferentes concentrações de toxinas produzidas por fungos do gênero <i>Alternaria</i> . Controle equivale ao meio + etanol – 1,8%.	223
FIGURA 145. Esquematização da hipótese levantada neste projeto de pesquisas.	228
FIGURA 146. A) sementes de <i>Arabidopsis</i> crescidas em meio contendo <i>Fusarium</i> isolado como mutualista, como patógeno e branco (somente semente e meio de cultura); B) Placa de Petri após 5 dias de experimento; C) comparação do crescimento das plântulas depois de 5 dias; D) disposição das placas de Petri no início do experimento.	230
FIGURA 147. A) Câmara de Neubauer, utilizada para a contagem dos esporos. A área marcada corresponde ao local onde a leitura dos esporos é feita; B) Esporos de <i>Fusarium</i>	231
FIGURA 148. Experimentos em quintuplicata envolvendo a inoculação dos fungos de interesse em <i>Arabidopsis</i> ; A) <i>Fusarium moniliforme</i> (endofítico); B) <i>Fusarium graminearum</i> (patógeno); C) Controle.	232
FIGURA 149. A) e B) Plântulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> com 5 dias de germinação; C) e D) Com 3 dias.	233
FIGURA 150. Plântulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizada nos experimentos.	234

FIGURA 151. Acima, plantas com sintoma de patogenia inoculada com os fungos de interesse;
abaixo, comparação entre as folhas individuais dos experimentos..... 235

Resumo

“TOXINAS OBTIDAS POR FUNGOS DOS GÊNEROS *Fusarium* E *Alternaria*: ASPECTOS ANALÍTICOS E QUÍMICO-ECOLÓGICOS” – Este trabalho pretende contribuir para a compreensão do papel ecológico das toxinas micromoleculares produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*. A análise química dos extratos de *F. moniliforme*, isolado como endofítico de *Melia azedarach* (Meliaceae), não revelou a produção das toxinas características deste gênero. Realizando-se um estudo comparativo com os extratos de *F. moniliforme* e *F. graminearum*, ambos isolados como patógenos de trigo, foi observado que a ausência das toxinas era exclusividade do fungo isolado como endofítico. Com o desenvolvimento e a validação de um método por HPLC-MS/MS, foi possível a construção de curvas de produção de zearalenona por parte destes fungos. Ensaio biológicos envolvendo a bactéria *Escherichia coli*, a lagarta *Spodoptera littoralis*, culturas de célula de soja e a planta modelo *Arabidopsis thaliana* revelaram que a zearalenona, o β -zearalenol e o deoxinivalenol podem atuar como substâncias produzidas pelo fungo em defesa da planta ao ataque de herbívoros. A reinoculação do fungo endofítico em plantas *A. thaliana* mostrou que um microrganismo isolado como endofítico aparentemente pode se tornar um patógeno. O estudo via HPLC-UV-SPE-NMR dos extratos de *Alternaria alternata* revelou a presença de 6 substâncias da classe dos alternarióis, dos quais aparentemente 2 são inéditos na literatura. Estas substâncias foram ensaiadas contra os modelos descritos acima, o que evidenciou o alto poder citotóxico das mesmas, com valores de EC_{50} variando de 0,11 a 5,00 μ M. Ainda estas substâncias são altamente ativas contra as lagartas *S. littoralis*. O desenvolvimento e a validação de um método por HPLC-MS/MS permitiu também a quantificação de alternariol e alternariol monometil éter no flavedo (parte externa amarelada) e no albedo (tecido interno branco) de tangerinas sintomáticas à patologia Mancha Marrom de Alternária. Os resultados obtidos indicam que o flavedo funciona como uma barreira para a penetração destas substâncias no interior dos frutos. Além disso, estes resultados sugerem que a presença destas toxinas ocorre mesmo antes que os sintomas visuais possam ser identificados nos frutos.

Abstract

“ANALYTICAL AND CHEMICAL-ECOLOGICAL ASPECTS OF TOXIC COMPOUNDS PRODUCED BY *Alternaria* AND *Fusarium* SPECIES” – *This Ph.D. thesis is intent upon contributing to the comprehension of ecological role of Alternaria and Fusarium micromolecular compounds. Chemical analysis of F. moniliforme extracts revealed this fungus was not producing such toxic compounds. By comparison, both F. moniliforme and F. graminearum (pathogenic strains) increased zearalenone’s production by a factor of two hundred and fiftyfold. Such result was obtained after building zearalenone’s production curves, using a validated HPLC-MS/MS method. Biological tests involving bacteria Escherichia coli, caterpillars from Spodoptera littoralis species, soybean cell cultures suspension and in vivo tests on Arabidopsis thaliana plants were done. Such tests revealed that zearalenone, β -zearalenol, and deoxynivalenol toxins can play a role on insect-plant-fungi interaction. The re-inoculation of endophyte fungus into Arabidopsis plants has shown some evidences that it can act as pathogen. HPLC-UV-SPE-NMR analysis of Alternaria alternate extracts yielded at least 6 compounds of alternariol’s group. Among them, 2 compounds appear to be reported for the first time. The same tests mentioned above were employed to alternariols as well. A high cytotoxic activity was observed for these compounds, with EC_{50} values varying from 0.11 to 5.00 μ M. An analytical method using HPLC-MS/MS for quantifying alternariol and alternariol monomethyl ether on mandarin tissues, i.e. flavedo and albedo tissues, was developed and validated. Outcomes strongly suggested that mandarins symptomatic to Alternaria Brown Spot do accumulate alternariols on its fruits. However, it seems that flavedo tissue works as a barrier for alternariols diffusion into the whole fruit. Besides, our results indicated the presence of such toxins even before visual symptoms of disease.*

Sumário

1. APRESENTAÇÃO, CONTEXTUALIZAÇÃO E BASES TEÓRICAS	2
1.1. Alguns aspectos da ecologia microbiana.....	2
1.2. Microrganismos endofíticos: mutualistas ou patógenos em latência?.....	3
1.3. O interesse do grupo GEBioMMi no DQ-UFSCar.....	6
1.4. Toxinas produzidas por fungos do gênero <i>Fusarium</i> e suas conseqüências.....	7
1.4.1. As Zearalenonas.....	9
1.4.2. Os Tricotecenos.....	12
1.4.3. As Fumonisinias.....	16
1.5. O gênero <i>Alternaria</i> e suas toxinas.....	18
1.6. Vantagens e desvantagens no emprego de técnicas de extração, separação e identificação de toxinas fúngicas.....	23
1.6.1. Técnicas de ionização a pressão atmosférica (API): ESI e APCI.....	24
1.6.2. Experimentos específicos para garantir sensibilidade e seletividade.....	27
1.7. Estudo dos mecanismos de fragmentação envolvidos em CID-MS/MS.....	31
1.8. <i>Screening</i> visando a investigação da produção de toxinas fúngicas: uso de técnicas como HPLC-MS e HPLC-UV-SPE-NMR.....	33
1.9. Validação de métodos analíticos: figuras de mérito e sua importância.....	40
2. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO	46
3. PARTE 1: ASPECTOS ANALÍTICOS	48
3.1. Objetivos da parte analítica.....	48
3.2. Parte Experimental.....	49
3.2.1. Materiais e equipamentos utilizados.....	49
3.2.2. Procedimentos Experimentais	52
3.2.2.1. Isolamento dos metabólitos de interesse.....	52
3.2.2.1.1. Obtenção das cepas fúngicas.....	52
3.2.2.1.2. Cultivo fúngico da cepa de <i>Fusarium moniliforme</i> isolada como endofítico.....	53
3.2.2.1.3. Inoculação do fungo <i>F. moniliforme</i> endofítico nos meios de cultura de interesse.....	54
3.2.2.1.4. Cultivo e inoculação das cepas de <i>F. moniliforme</i> e <i>F. graminearum</i> isolados como patógenos de trigo.....	54
3.2.2.1.5. Extração e isolamento das substâncias da classe das zearalenonas.....	55
3.2.2.1.6. Extração e isolamento das substâncias da classe dos tricotecenos.....	57
3.2.2.1.7. Aplicação do método de extração e purificação de fumonisinias.....	59
3.2.2.1.8. Cultivo e inoculação das cepas de <i>Alternaria alternata</i>	59
3.2.2.1.9. Extração e isolamento dos alternariols obtidos a partir de cepas de <i>Alternaria alternata</i>	59
3.2.2.2. Análise dos extratos de <i>Fusarium</i> por HPLC-MS/MS envolvendo perda neutra visando a detecção de fumonisinias.....	60
3.2.2.3. Estudo dos mecanismos de fragmentação das zearalenonas.....	61
3.2.2.4. Quantificação da zearalenona e construção da curva de produção deste metabólito obtida por <i>Fusarium moniliforme</i> endofítico, <i>F. graminearum</i> e <i>F. moniliforme</i> patogênicos.....	63
3.2.2.4.1. Condições de ionização do MS.....	63
3.2.2.4.2. Curva de produção da zearalenona.....	63
3.2.2.5. Quantificação de alternariol e alternariol monometil éter em tangerinas (<i>Citrus reticulata</i>) sintomáticas à Mancha Marrom de Alternária.....	64
3.2.2.5.1. Obtenção do material vegetal.....	64
3.2.2.5.2. Extração e <i>clean-up</i> da amostra.....	65
3.2.2.5.3. Condições instrumentais para análise por HPLC-MS/MS.....	65

3.2.2.6. Análise dos extratos de <i>A. alternata</i> por HPLC-UV-SPE-NMR	66
3.2.2.6.1. Cultivo fúngico e obtenção dos extratos	66
3.2.2.6.2. Instrumentação empregada	67
3.2.2.6.3. Condições utilizadas no desenvolvimento da corrida cromatográfica e nas análises por NMR	68
3.3. Resultados e Discussões	69
3.3.1. Isolamento das substâncias de interesse	69
3.3.2. Detecção de fumonisinas em extratos de interesse	104
3.3.3. Estudos dos mecanismos de fragmentação	107
3.3.4. Curva de produção de zearalenona	125
3.3.5. Quantificação dos alternarióis produzidos por <i>Alternaria alternata</i>	144
3.3.6. Detecção e identificação dos metabólitos produzidos por <i>Alternaria alternata</i> por HPLC-SPE-NMR	165
4. PARTE 2: ASPECTOS QUÍMICO-ECOLÓGICOS	190
4.1. Objetivos	190
4.2. Parte experimental	190
4.2.1. Materiais utilizados	190
4.2.2. Procedimentos experimentais	191
4.2.2.1. Método empregado no teste de atividade das toxinas contra <i>E. coli</i>	191
4.2.2.2. Método empregado nos testes de atividade contra <i>S. littoralis</i>	192
4.2.2.3. Método empregado nos testes de toxicidade para culturas de células de soja.	192
4.2.2.4. Testes feitos no Brasil para a germinação de sementes	193
4.2.2.5. Método empregado nos testes de fitotoxicidade contra <i>Arabidopsis thaliana</i>	195
4.2.2.6. Reinoculação dos fungos em <i>Arabidopsis thaliana</i>	196
4.3. Resultados e Discussões	197
4.3.1. Testes com a bactéria <i>Escherichia coli</i>	200
4.3.2. Testes com lagartas <i>Spodoptera littoralis</i>	202
4.3.3. Testes com cultura de células de soja (<i>Glycine max</i>)	212
4.3.4. Testes iniciais envolvendo germinação de plantas no Brasil	218
4.3.5. Testes com plantas <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i>	221
4.3.6. Testes de reinoculação fúngica em plantas modelo (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	229
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	237
6. BIBLIOGRAFIA CITADA	240

***Apresentação, Contextualização e
Bases Teóricas***

1. APRESENTAÇÃO, CONTEXTUALIZAÇÃO E BASES TEÓRICAS

1.1. Alguns aspectos da ecologia microbiana

As mais diversas relações existentes entre os seres vivos, sejam elas inter ou intra-específicas, constituem um importante e emergente campo de pesquisa, com grande interesse científico e econômico. Esses tipos de associações são de vital importância para muitas espécies, principalmente para aquelas incapazes de se proteger contra predadores ou mesmo de conseguir seus próprios nutrientes, essenciais para a manutenção e evolução de suas vidas.

A compreensão dos mecanismos envolvidos nestas interações tem instigado diferentes setores da sociedade por séculos. Desde que Ernest Hæckel atribuiu um caráter científico ao termo **ecologia**, ao definir que esta é a ciência que explora as interrelações existentes entre os mais diversos tipos de organismos e seus ambientes bióticos e abióticos, o estudo destas relações deixou o campo esotérico para figurar como uma das áreas de pesquisa mais importantes da ciência moderna^{1, 2}. Uma das áreas da ecologia que tem despertado o interesse de cientistas por décadas é a chamada **ecologia microbiana**. Esta área da ciência se destina a examinar as relações ecológicas existentes entre os microrganismos e seus ambientes, de acordo com a própria definição de ecologia, bióticos e abióticos³. O desenvolvimento desta ciência tem possibilitado o conhecimento dos *habitats* destes organismos, fornecendo suporte para a compreensão das consequências ambientais deste tipo de interação.

Além disso, sabe-se que os microrganismos são essenciais em processos globais que contribuem para a qualidade ambiental e conseqüentemente para o bem estar humano. Isso sem contar a utilização destes microrganismos em benefício humano ao longo dos séculos. Na economia moderna, por exemplo, projeções financeiras apontam para um faturamento

médio anual de US\$ 800 bilhões das indústrias de biotecnologia para os próximos anos⁴. Outras projeções indicam ainda que aproximadamente 40% de toda a economia mundial terá base biotecnológica em 2025⁵.

1.2. Microrganismos endofíticos: mutualistas ou patógenos em latência?

As associações entre microrganismos e plantas, especialmente aquelas envolvendo microrganismos de *habitat* endofítico, tem surgido como uma área de pesquisa muito interessante para o estudo de aspectos envolvidos na ecologia microbiana. Estes ambientes proporcionam, muitas vezes, a produção de substâncias com grande potencial para uso farmacológico, na agricultura e em biotecnologia⁶. Estas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, que são os produtos finais de processos biossintéticos, não apresentando um papel óbvio para o microrganismo⁷. O termo **endofítico** (**endo** = dentro, **fítico** = planta)⁸ é rotineiramente confundido com mutualismo, numa suposição de que todos os endofíticos se desenvolvem harmonicamente com o hospedeiro.

No entanto, há muitas espécies de microrganismos patogênicos que conseguem penetrar nos tecidos da planta e viver em estado de latência até que, oportunamente, eles se desenvolvem de maneira prejudicial à planta, seja pelo consumo de nutrientes vitais para o crescimento e/ou desenvolvimento da planta, ou pelo acúmulo de fitotoxinas. Assim, uma possível abordagem na distinção entre fungos mutualistas-simbiontes e patógenos em latência pode ser realizada com base em análises químicas e bioquímicas destes fungos, especialmente através da detecção de algumas fitotoxinas que podem diferenciar estas interações.

Dentre os microrganismos – fungos, bactérias e vírus – que se associam às plantas, os mais frequentemente encontrados são os fungos⁹. Ao contrário das plantas, os fungos são seres heterotróficos, não sintetizam clorofila, não contém celulose em sua parede celular (exceto alguns fungos aquáticos) e

não armazenam amido como substância de reserva¹⁰. Alguns deles possuem parede celular constituída de quitina (N-acetilglicosamina), um polissacarídeo nitrogenado encontrado também em artrópodes; outros possuem polissacarídeos complexos e proteínas, com predominância de cisteína, bem como glicogênio como material de reserva, semelhante aos animais¹⁰. Sua estrutura é constituída por filamentos alongados em forma de tubos, denominados hifas, que juntas formam o micélio. Sua principal forma de reprodução ocorre via produção de esporos nos conídeos, através dos ciclos assexuais, sexuais e parassexuais, sendo este último mais raramente encontrado¹⁰ (ver FIGURA 1).

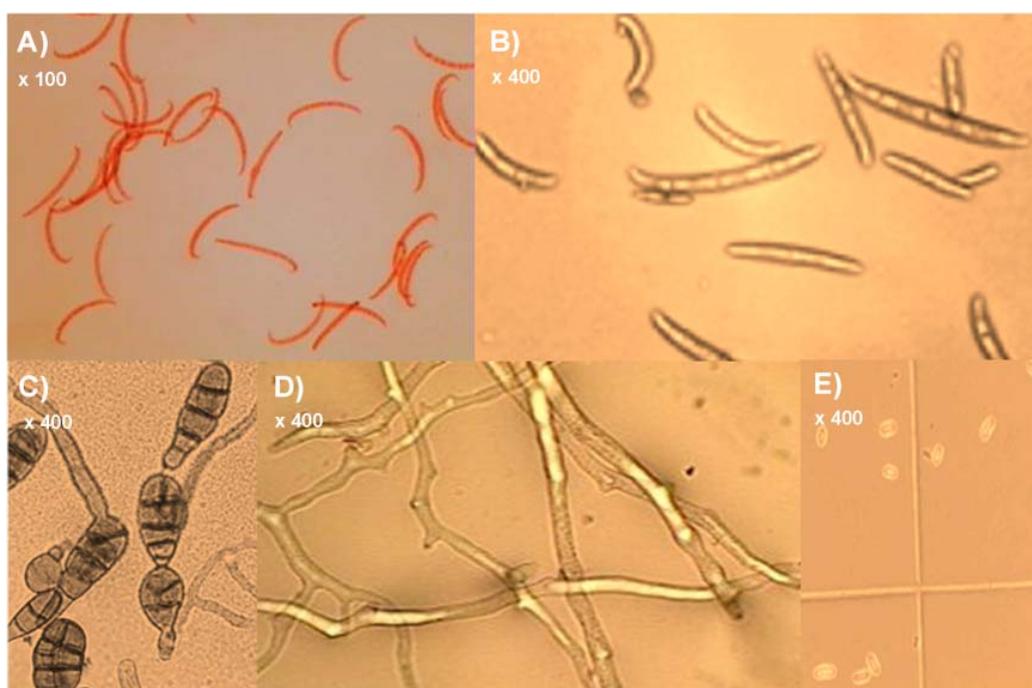


FIGURA 1. A) e B) conídeos de *Fusarium*; C) conídeos de *Alternaria*; D) hifas; E) esporos.

De acordo com alguns pesquisadores como Carroll¹¹, por exemplo, várias espécies de endófitos podem até proteger as plantas hospedeiras contra o ataque de patógenos. Estes processos envolvem principalmente a produção de metabólitos secundários que são tóxicos a outros organismos, mas não necessariamente ao hospedeiro. E exatamente neste ponto reside uma grande divergência com respeito aos termos utilizados. O termo micotoxina tem sido atribuído aos metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que causam alguma resposta tóxica em humanos e outros vertebrados¹². Por outro

lado, o termo fitotoxina é associado a qualquer composto químico que causa alguma resposta tóxica em plantas¹³ e não às substâncias produzidas por plantas que apresentam alguma toxicidade a outros organismos.

Desta maneira, o simples termo toxina é preferido em detrimento dos demais¹³, desde que obviamente seja mencionado à qual sistema uma referida substância possui efeito tóxico. Esta discussão não é exclusivamente de cunho semântico, pois algumas toxinas produzidas por fungos (micotoxinas) poderiam, além de apresentar toxicidade a humanos e a animais, também induzirem toxicidade em plantas (fitotoxinas). E, desta maneira, se comprovada a toxicidade para a planta, estas substâncias são fortes candidatas a atuarem de maneira direta no efeito de patogenia, distinguindo, por consequência, o caráter da relação fungo-planta¹¹.

Dentre as principais relações ecológicas existentes entre fungos e plantas, destacam-se as relações mutualistas, que se caracterizam como um exemplo de simbiose, na qual cada organismo recebe benefícios da associação. O modo pelo qual se manifesta esse benefício varia desde o compartilhamento ou troca de nutrientes até relações onde um dos organismos não é afetado nem positiva nem negativamente, enquanto o outro é beneficiado de alguma maneira (comensalismo)¹⁴.

Por outro lado, as associações antagonistas podem estar presentes na interação planta-fungo, e ocorrem quando um organismo atinge de modo adverso o ambiente do outro. Tais organismos, que interagem de forma antagônica, podem apresentar grande importância prática, já que eles produzem com frequência substâncias inibidoras dos processos normais de crescimento ou de sobrevivência de outros organismos. A segunda relação negativa entre duas populações se manifesta quando ambas as espécies são adversamente afetadas, onde o espaço físico e os nutrientes são limitados. Esta interação é denominada competição. O parasitismo é definido como uma relação entre organismos na qual um organismo vive sobre ou dentro do outro, de uma espécie diferente, e à custa desse organismo hospedeiro, sendo este último prejudicado no processo. A

quarta relação negativa é a predação, caracterizada quando ocorre a morte e a ingestão de um organismo de uma espécie por outros^{9, 14}.

Assim, o estudo do caráter destas relações constitui uma abrangente área de pesquisa, com aspectos químicos muito interessantes. O conhecimento da linguagem química envolvida nestes complexos processos ecológicos é um desafio que pode levar a compreensão do mecanismo seguido pela natureza nestes processos.

1.3. O interesse do grupo GEBioMMi no DQ-UFSCar

Todos estes aspectos mencionados anteriormente têm constituído o foco principal das pesquisas desenvolvidas no Grupo de Estudos em Bioquímica e Metabolismo de Microrganismos (GEBioMMi), coordenado pelo Prof. Dr. Edson Rodrigues-Filho e situado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Nos últimos 15 anos, o GEBioMMi tem atuado na investigação dos aspectos químico-ecológicos ligados a mais de 200 microrganismos.

Além de compreender o papel ecológico das substâncias micromoleculares produzidas por esses microrganismos, também é de interesse do grupo o desenvolvimento de ferramentas analíticas que possibilitem o monitoramento destes compostos. Muitos dos fungos isolados como endofíticos também infectam grãos de cereais e seus produtos associados. Estes produtos constituem importantes fontes de energia e de proteínas tanto para seres humanos quanto para animais. Quando estes grãos são colonizados por fungos, há um grande risco de contaminação com metabólitos secundários produzidos por estes¹⁵. Se considerarmos que a grande maioria destes metabólitos possui atividade biológica marcante, onde atuam como agentes mutagênicos, estrogênicos, carcinogênicos, entre outros efeitos, e ainda são acumulados ao longo da cadeia alimentar, pode-se desta forma imaginar a magnitude do risco aos quais todos os seres vivos estão sujeitos. Isso sem considerar que algumas

destas substâncias possuem potencial para atuarem como “poderosas armas químicas”¹⁶.

Assim, considerando-se principalmente estes fatores, os estudos sobre toxinas fúngicas têm se intensificado nas últimas décadas, com a intenção de se desenvolver desde os melhores métodos de identificação e caracterização destas substâncias até a determinação de genes responsáveis por suas respectivas sínteses¹⁷.

Nos últimos 35 anos muitos esforços em pesquisas foram realizados para o desenvolvimento de métodos de detecção e determinação destas toxinas em alimentos e em produtos de origem agrícola. Testes rápidos de detecção são utilizados para o controle de todos os estágios deste tipo de produção. Algumas análises destas toxinas, por exemplo, são propostas pelo *Official Methods Program of Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* e já possuem metodologias de análise bem definidas¹⁸. Porém, a contínua busca por métodos de análise cada vez mais sensíveis e viáveis economicamente também faz deste campo de pesquisas um setor fundamental para a sociedade como um todo.

Neste projeto em específico, tem-se interesse nas toxinas produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Alternaria*. O principal foco é checar a possibilidade da distinção entre fungos mutualistas e patógenos em latência com base em critérios químicos, ou seja, através da análise dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos e que possuem potencial para atuarem de maneira tóxica às plantas. Na sequência, segue uma breve discussão com respeito às toxinas utilizadas nesta etapa do projeto e também à respeito das técnicas empregadas para a averiguar o potencial tóxico destas substâncias.

1.4. Toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* e suas consequências

Como já mencionado, muitas espécies de fungos possuem a habilidade de produzir uma ampla quantidade de toxinas e muitas destas substâncias têm sido associadas a vários efeitos adversos em animais e em humanos¹⁹, agindo como neurotoxinas, agentes carcinogênicos, estrogênicos e uterotrópicos²⁰⁻²², entre outros.

Dentre as espécies de fungos produtores destas substâncias, existe um grande destaque para os do gênero *Fusarium*, pois são considerados alguns dos mais importantes na fitopatologia mundial²³. Além disso, algumas espécies são responsáveis por infecções oportunistas em pessoas, principalmente naquelas com deficiência imunológica, enquanto outras espécies, em sua maioria, são saprófitas²³. Este gênero possui uma ampla distribuição geográfica, com ocorrência em praticamente todos os ambientes terrestres. Eles são classificados como fungos mitospóricos, pertencendo a classe *Hyphomycetes* da subdivisão Deuteromicotina, uma vez que não possui o estágio sexuado identificado, o que é necessário para uma distinção taxonômica²³.

Como estes fungos usualmente são encontrados em alimentos e derivados, existe uma grande preocupação com respeito ao controle de qualidade destas toxinas nas mais diferentes matrizes, como leite²⁴, grãos²⁵⁻²⁸ e outros^{29, 30}, com significativa contaminação em milho, arroz, trigo, soja, cevada e aveia³¹⁻³⁸. A presença de altos níveis destas toxinas nestes grãos oferece um perigo significativo, pois animais e humanos que os consomem podem apresentar-se seriamente doentes e, em alguns casos, esta ingestão pode causar até mesmo morte³⁸.

Algumas das substâncias já isoladas de fungos pertencentes a este gênero podem ser encontradas na TABELA 1 e na FIGURA 2. Entretanto, dentre as toxinas produzidas por *Fusarium*, três classes merecem destaque: as **zearalenonas**, os **tricotecenos** e as **fumonisinias**. Estas classes são marcantes por seus efeitos biológicos, que em geral são adversos, mas que em alguns casos podem até mesmo ser benéficos. Na seqüência, segue uma discussão mais detalhada sobre as mesmas.

TABELA 1. Algumas substâncias já isoladas de *Fusarium*^{7, 39}.

Espécies de <i>Fusarium</i>	Substâncias	Efeito biológico
<i>F. bostrycoides</i>	Bostricoidina (1)	Antibiótico
<i>F. culmorum</i>	Culmorina (2)	Antibiótico
<i>F. graminearum</i>	Rubrofusarina (3), Ácido 4-acetoamido-2-butenóico (4)	Neurotóxicos
<i>F. javanicum</i>	Fusarubrina (5)	Tóxico
<i>F. lateritium</i>	2-(1-hidroxietil)-4-(3H)-quinazolinona (6)	—
<i>F. moniliforme</i>	Moniliformina (7), Giberilina A3 (8)	Tóxicos
<i>F. nivale</i>	Anidrato de politirosil (9)	Alucinógeno
<i>F. oxysporum</i>	Oxisporona (10)	Tóxico
<i>F. poae</i>	Poaefusarina (11)	Estrogênico
<i>F. roseum</i>	Fusarinina (12)	Tóxico
<i>F. solani</i>	Solaniol (13)	Tóxico

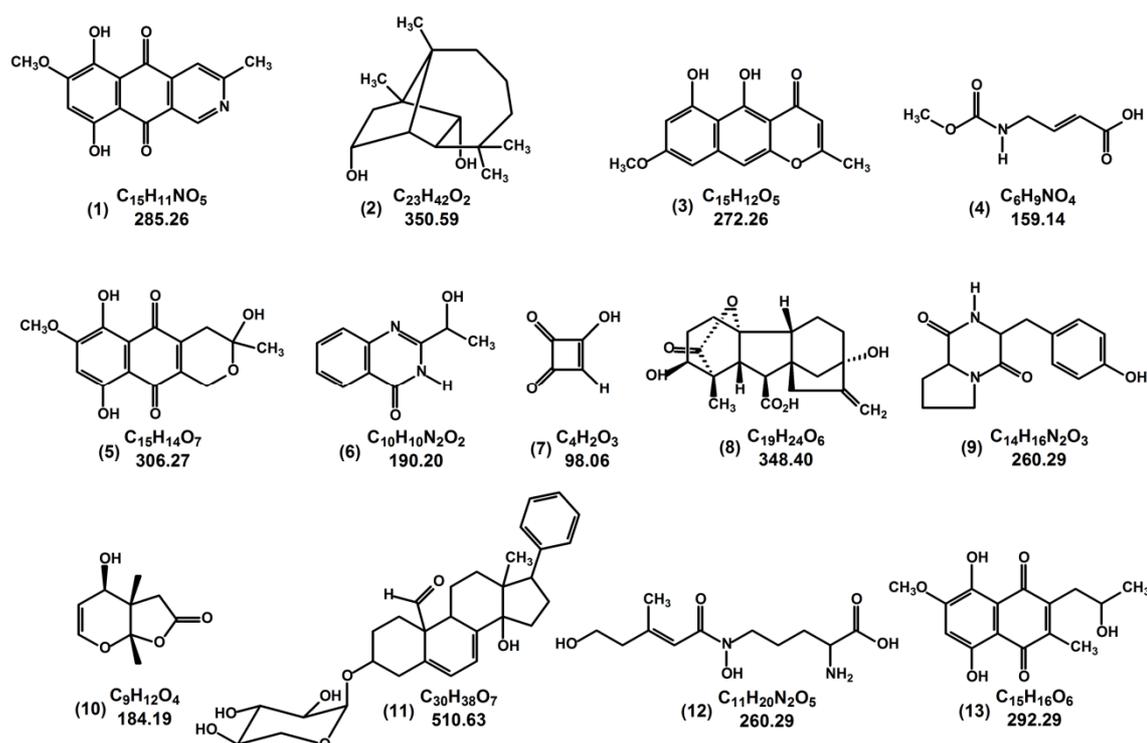


FIGURA 2. Estruturas das substâncias apresentadas na TABELA 1.

1.4.1. As Zearalenonas

As **zearalenonas** são notáveis pela intensa atividade estrogênica atribuída a elas⁴⁰. A zearalenona (14), μ -lactona do ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-

trans-1-undecinil)- β -resorcíclico, que dá nome à classe, é um metabólito secundário produzido por *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. moniliforme* e apresenta atividades estrogênicas e anabólicas em animais, regulando inclusive a produção dos estágios sexuais na espécie *Fusarium roseum*³⁹. Turner (1971)⁷ reporta que esta substância é responsável por anomalias genitais em alguns animais de interesse pecuário. Os efeitos foram observados 15 dias após estes animais ingerirem grãos contaminados com esta substância. O seu isômero *cis* não ocorre naturalmente, mas este possui maior atividade biológica do que o isômero *trans* na resposta de um estímulo uterotrópico em ratos⁴¹. A estrutura química da zearalenona (14) e de alguns de seus derivados pode ser observada na FIGURA 3.

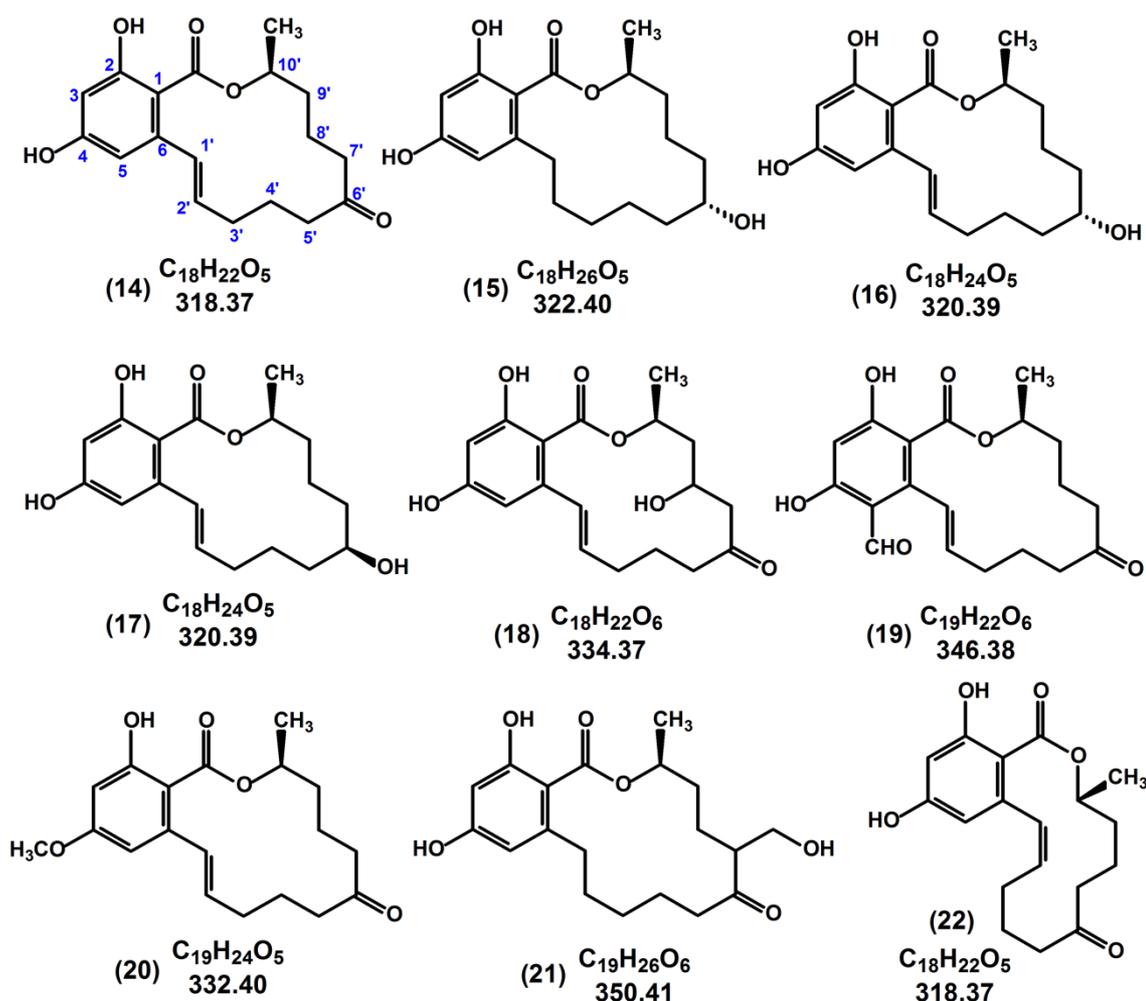


FIGURA 3. Estruturas da zearalenona (14) e de alguns de seus derivados.

Vários dos derivados da zearalenona (**14**) têm sido detectados como produtos do metabolismo secundário de *Fusarium* e outros, ainda, têm sido obtidos via síntese orgânica. Toda esta iniciativa visa potencializar possíveis ações biológicas benéficas destas substâncias, como a ação estimulante do crescimento⁴¹⁻⁴³, por exemplo. Dentre estes derivados, o zeranol – α -zearalanol (**15**) – tem sido utilizado como agente estimulador do crescimento, substituindo o estradiol⁴⁴. Porém este metabólito, comercializado sobre a marca RalgroTM, foi temporariamente proibido nos Estados Unidos, sob alegação de que o seu monitoramento farmacológico, que compreende métodos de análise sensíveis para a purificação e confirmação do analito e de seus metabólitos – entre eles, a zearalanona (**21**) – em amostras de urina, é dificultado pela presença de outras zearalenonas, como o α -zearalenol (**16**), o β -zearalenol (**17**) e a zearalenona (**14**)⁴⁵.

Em contrapartida, este mesmo país deu início recentemente ao projeto *Natural Zeranol*, não somente com a intenção de desenvolver e aprimorar os métodos de análise descritos anteriormente, como também visando monitorar os níveis destas toxinas encontrados naturalmente, para uma possível diferenciação entre contaminação natural ou por abuso de dosagem de Ralgro^{TM,45}.

As zearalenonas, em geral, também atuam como fracos agentes genotóxicos, mas mesmo assim possuem a habilidade de causar danos severos ao DNA de alguns microrganismos. Segundo Kuiper-Goodman et al. (1987)⁴⁵, a completa inibição da síntese do DNA em culturas de linfócitos periféricos do sangue humano obtida com 30 $\mu\text{g/mL}$ de zearalenona (**14**). Desta forma, é altamente recomendado que os níveis destas substâncias sejam cuidadosamente monitorados em alimentos e rações animais⁴⁶. Devido aos efeitos estrogênicos destas substâncias, Shier et al. (1998 e 2002)^{47, 48} recomendam que seja evitado ao máximo o consumo de derivados de milho por parte de adolescentes do sexo feminino e mulheres que já foram acometidas por câncer de mama.

1.4.2. Os Tricotecenos

Outra classe de toxinas fúngicas de muito interesse produzida por fungos do gênero *Fusarium* são os tricotecenos, um grupo de metabólitos com amplo espectro de ação tóxica. Diversos problemas relacionados com a ingestão destas substâncias por humanos e animais têm sido relatados por diferentes organizações internacionais como o WHO (*World Health Organization*) e FAO (*Food and Agricultural Organization of United Nations*)¹⁹. Estes problemas geralmente estão associados à intoxicação alimentar. Quimicamente, eles são sesquiterpenos tetracíclicos com um sistema policíclico básico 12,13-epoxi-tricotec-9-eno, podendo ser divididos em 4 subgrupos⁴⁹, como apresentados nas FIGURA 4 e FIGURA 5. As TABELA 2, TABELA 3 e TABELA 4 apresentam detalhes dos grupos substituintes de vários tricotecenos pertencentes a estas classes. Estas substâncias ocorrem em uma grande variedade de espécies de *Fusarium*¹⁹ e também em outros gêneros, como *Trichoderma* sp., por exemplo³⁶. Eles são biossintetizados via tricodieno, na rota nerolidil pirofosfato⁵⁰, sendo assim bem distintos quimicamente da maioria das outras toxinas fúngicas. A biossíntese do deoxinivalenol (**42**) pode ser encontrada na FIGURA 6.

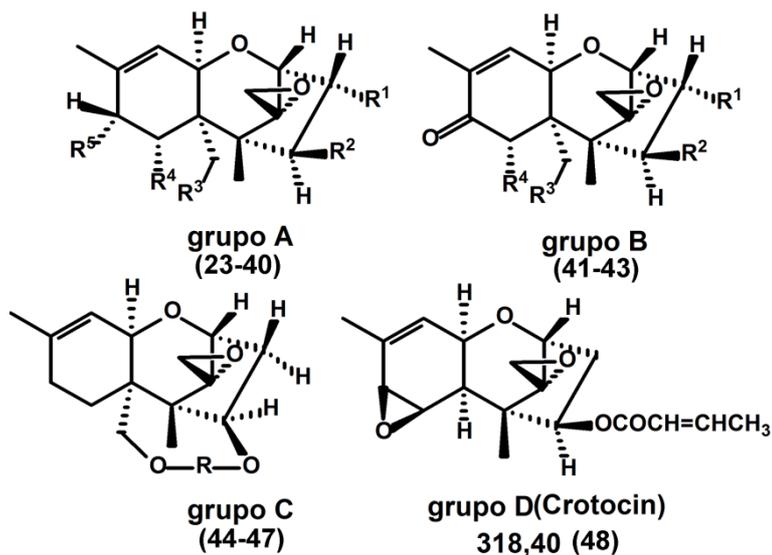


FIGURA 4. Esqueletos básicos dos diferentes grupos de tricotecenos.

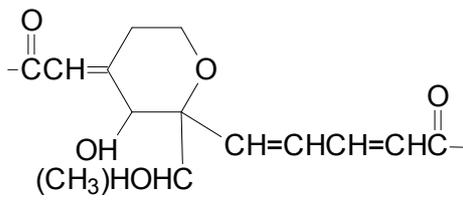
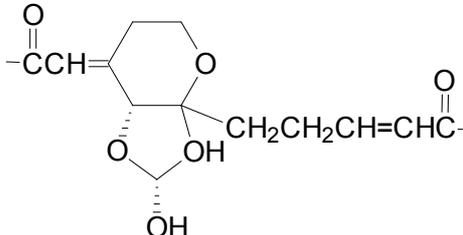
TABELA 2. Exemplos de tricotecenos do tipo A.

Tricotecenos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Massa Molecular (Da)
Tricoteceno (23)	H	H	H	H	H	234,3
Dihidrotricoteceno (24)	H	OH	H	H	OH	266,3
Tricodermol (25)	H	OH	H	H	H	250,3
Scirpentriol (26)	OH	OH	OH	H	H	282,3
Monoacetoxi-scirpenol (27)	OH	OH	OAc	H	H	324,4
Tricodermin (28)	H	OAc	H	H	H	293,3
Verrucarol (29)	H	OH	OH	H	H	266,3
T-2 tetraol (30)	OH	OH	OH	H	OH	298,3
Diacetoxiscirpenol (31)	OH	OAc	OAc	H	H	366,3
Neosolaniol (32)	OH	OAc	OAc	H	OH	382,2
Monoacetilneosolaniol (33)	OH	OAc	OAc	H	OAc	424,3
7-Hidroxidi- acetoxiscirpenol (34)	OH	OAc	OAc	OH	H	382,3
7,8-Dihidroxiacetoxiscirpenol (35)	OH	OAc	OAc	OH	OH	398,3
Toxina HT-2 (36)	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	424,5
Toxina T-2 (37)	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	466,2
Toxina acetil T-2 (38)	OAc	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂	508,2
Deacetilcalonecetrin (39)	OAc	H	OH	H	H	308,4
Calonecetrin (40)	OAc	H	OAc	H	H	350,4

TABELA 3. Exemplos de tricotecenos do tipo B.

Tricotecenos	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Massa Molecular (Da)
Nivalenol (41)	OH	OH	OH	OH	312,3
Deoxinivalenol (42)	OH	H	OH	OH	296,3
Tricotecin (43)	H	OCOCH ₃	H	H	319,3

TABELA 4. Exemplos de tricotecenos do tipo C.

Tricotecenos	R	Massa Molecular (Da)
Verrucacin A (44)	$-\text{OC}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{H}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{H}=\text{CHCH}=\text{CHC}\overset{\text{O}}{\parallel}-$	502,6
Rodirin A (45)	$-\text{OC}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\text{H}(\text{OH})\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}\overset{\text{CHOH}}{\text{H}}\text{H}=\text{CHCH}=\text{CHC}\overset{\text{O}}{\parallel}-$	516,6
Satratoxin H (46)		528,6
Vertisporin (47)		531,6

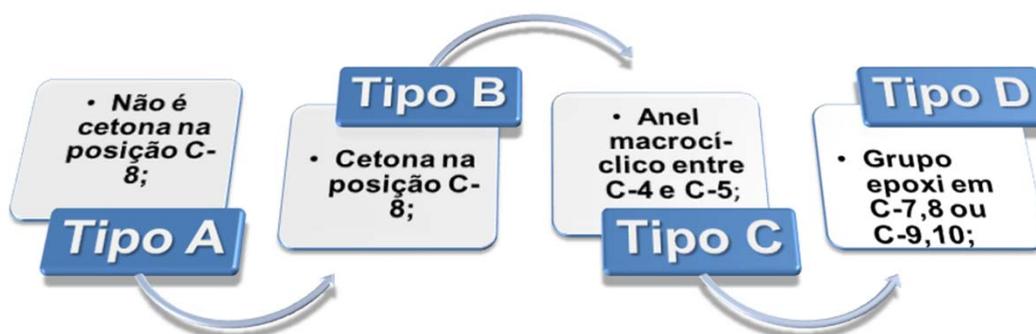


FIGURA 5. Subclasses de tricotecenos existentes.

Alguns tricotecenos como o nivalenol (41), por exemplo, possuem habilidades mutagênicas. Rodricks et al. (1977)⁴⁹ evidenciaram esta característica, descrevendo que o nivalenol (41) induz mutações, causando deficiência respiratória em células de leveduras. Dentre os vários tricotecenos conhecidos até o momento, talvez o que apresente a maior toxicidade seja a toxina

T-2 (37); ela causa abortos e deformação de fetos de porcos e, em concentrações elevadas, pode causar a morte destes suínos^{46, 49, 51}.

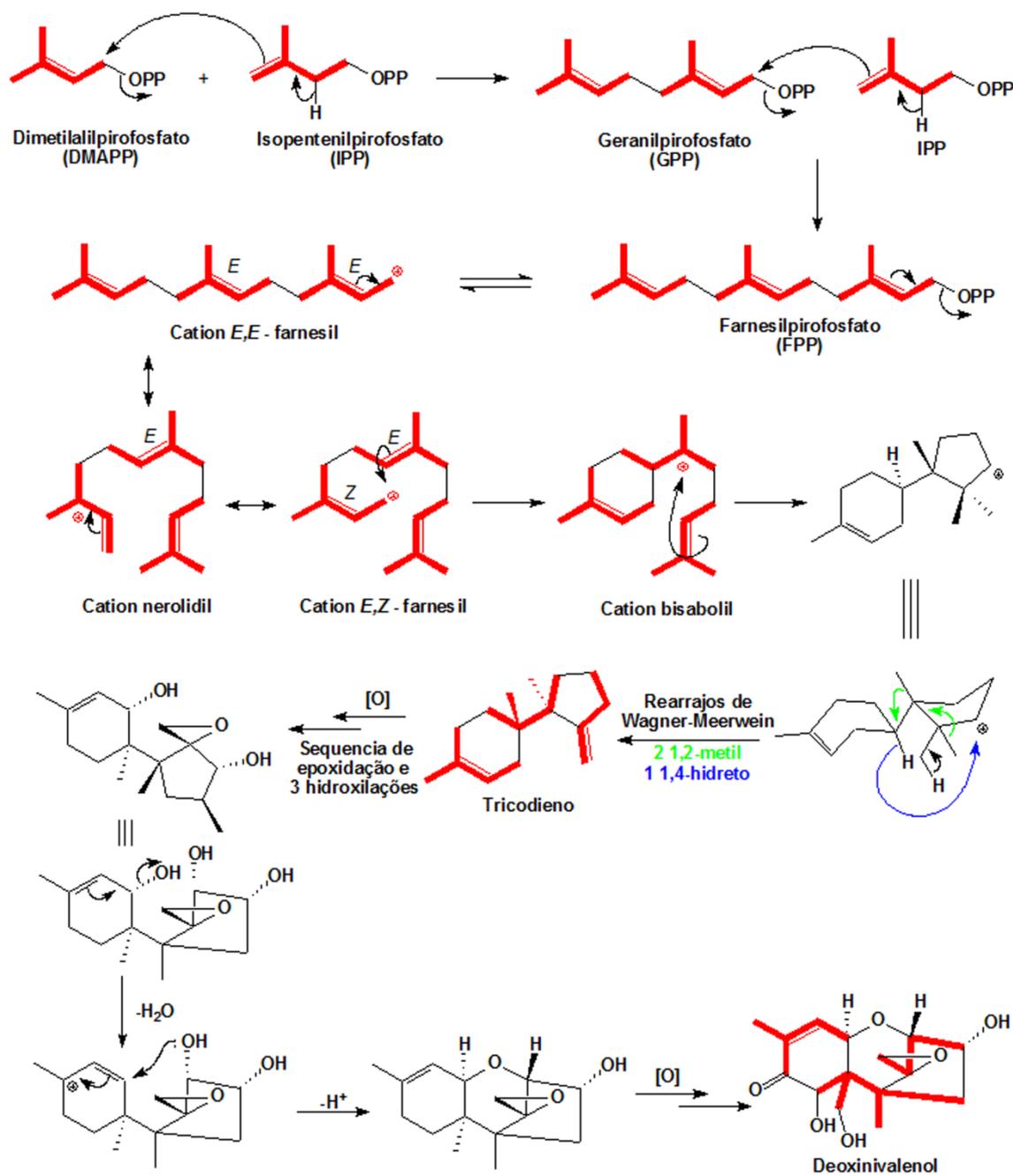


FIGURA 6. Rota biossintética do deoxinivalenol (42). Adaptado de Dewick (2004)⁵⁰.

1.4.3. As Fumonisinias

As fumonisinias pertencem a um grupo de toxinas fúngicas com ocorrência marcante no gênero *Fusarium*, embora já tenham sido detectadas e isoladas a partir de fungos do gênero *Alternaria*⁵². Elas foram primeiramente isoladas em 1988 de culturas de *Fusarium verticillioides* e segundo Sweeney et al. (1998)¹⁹, as principais espécies produtoras são *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. nygamai* e *F. oxysporum*.

A estrutura química básica destas toxinas é caracterizada por uma cadeia carbônica aminopolihidroalquílica diesterificada com ácido propano-1,2,3-tricarboxílico (também chamado ácido tricarbálico – TCA)^{21, 53}. A FIGURA 7 apresenta o esqueleto básico das fumonisinias, bem como a estrutura do TCA e do grupo 3-hidroxipiridinium (3HP), também encontrado em algumas classes de fumonisinias. A TABELA 5 apresenta os 27 análogos de fumonisinias já caracterizados, segundo Rhedeer et al. (2002)⁵³.

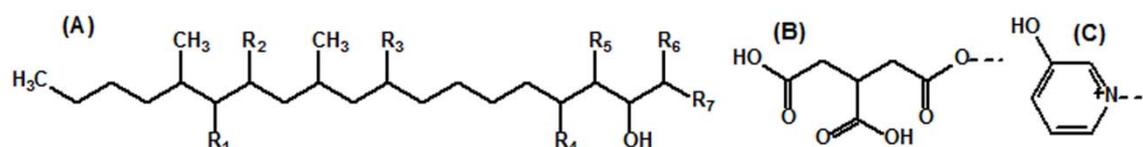


FIGURA 7. A) Esqueleto básico das fumonisinias; B) ácido tricarbálico (TCA); C) 3-hidroxipiridinium (3HP).

As fumonisinias podem ser divididas em quatro principais grupos, identificados como A, B, C e P^{21, 53}, com predominância da classe B. As fumonisinias FB₁ (**57**), FB₂ (**61**) e FB₃ (**62**) são as mais encontradas como contaminantes naturais de produtos alimentícios e estas são causadoras de edemas pulmonares em porcos e podem apresentar efeitos hepatocarcinogênicos em animais e humanos⁵⁴⁻⁵⁷. Dentro deste grupo de fumonisinias, a FB₁ (**57**) recebe importância especial, por geralmente ser produzida em maior abundância⁵⁸.

De acordo com estudos realizados com relação aos níveis de contaminação de alimentos por fumonisinas, pode-se observar que, em alguns países, estes níveis são bastante consideráveis. Por exemplo, a taxa de consumo humano de fumonisinas no Brasil, medida em ng/Kg de peso corpóreo/dia é da ordem de 1270; na China, é em torno de 3020; e, na África do Sul, estes valores podem chegar a cerca de 440000⁵².

TABELA 5. Análogos de fumonisinas caracterizados desde 1988.

Fumonisin		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Massa Molecular (Da)
FA ₁	(49)	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	763,9
FA ₂	(50)	TCA	TCA	H	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	747,9
FA ₃	(51)	TCA	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	747,9
PHFA _{3a}	(52)	TCA	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	589,8
PHFA _{3b}	(53)	OH	TCA	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	589,8
HFA ₃	(54)	OH	OH	OH	H	H	NHCOCH ₃	CH ₃	431,6
FAK ₁	(55)	=O	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	CH ₃	603,8
FBK ₁	(56)	=O	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	561,7
FB ₁	(57)	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	721,8
Iso- FB ₁	(58)	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	CH ₃	721,8
PHFB _{1a}	(59)	TCA	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	563,7
PHFB _{1b}	(60)	OH	TCA	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	563,7
HFB ₁	(61)	OH	OH	OH	OH	H	NH ₂	CH ₃	405,6
FB ₂	(62)	TCA	TCA	H	OH	H	NH ₂	CH ₃	705,8
FB ₃	(63)	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	CH ₃	705,8
FB ₄	(64)	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	CH ₃	689,8
FC ₁	(65)	TCA	TCA	OH	OH	H	NH ₂	H	707,8
N-acetil-FC ₁	(66)	TCA	TCA	OH	OH	H	NHCOCH ₃	H	749,8
Iso-FC ₁	(67)	TCA	TCA	OH	H	OH	NH ₂	H	707,8
N-acetil-iso-FC ₁	(68)	TCA	TCA	OH	H	OH	NHCOCH ₃	H	749,8
OH-FC ₁	(69)	TCA	TCA	OH	OH	OH	NH ₂	H	723,8
N-acetil-OH-FC ₁	(70)	TCA	TCA	OH	OH	OH	NHCOCH ₃	H	765,8
FC ₃	(71)	TCA	TCA	OH	H	H	NH ₂	H	691,8
FC ₄	(72)	TCA	TCA	H	H	H	NH ₂	H	675,8
FP ₁	(73)	TCA	TCA	OH	OH	H	3HP	CH ₃	800,9
FP ₂	(74)	TCA	TCA	H	OH	H	3HP	CH ₃	784,9
FP ₃	(75)	TCA	TCA	OH	H	H	3HP	CH ₃	784,9

Mudanças nas legislações visando estipular limites internacionais para este tipo de contaminação estão atualmente em estudo. Alguns autores, como Gelderblom et al. (1992)⁵⁸, propõem um índice tolerável de contaminação em torno de 800 ng/Kg de peso corpóreo/dia. Desta maneira, é necessária atenção especial com a contaminação de fumonisinas nestes países.

Embora estes limites internacionais ainda não existam, alguns países têm introduzido guias contendo alguns valores considerados toleráveis. Por exemplo, na Suíça, o *Swiss Federal Office of Public Health* sugeriu, em 1997, um limite para a soma de FB₁ e FB₂ em milho da ordem de 1000 µg/Kg do cereal para o consumo humano⁵⁴⁻⁵⁶. Na França, o *Conseil Superieur d'Hygiene Publique de France* recomenda um limite máximo tolerável de 3000 µg/Kg em qualquer espécie de cereal⁵⁴⁻⁵⁶. Devido à ampla ocorrência de fumonisinas nestes cereais, principalmente em milho, o qual constitui alimento presente diariamente na dieta de muitos países, o risco carcinogênico das fumonisinas em humanos foi avaliado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, em 1993, e estas toxinas foram descritas como “carcinogênicos do grupo 2B”, isto é, prováveis carcinogênicos humanos⁵⁹.

1.5. O gênero *Alternaria* e suas toxinas

Os fungos pertencentes ao gênero *Alternaria* são conhecidos por sua ampla distribuição e por suas características saprófitas e parasitárias^{60, 61}. Muitas espécies estão associadas a diversos tipos de doenças causadas em plantas e em animais. Dentro deste gênero, a espécie de maior interesse é a *Alternaria alternata*, sendo considerada um agente patogênico muito comum em safras de alimentos³⁴. A presença deste microrganismo também tem sido considerada um dos fatores etiológicos para o desenvolvimento de câncer de esôfago em humanos⁶²⁻⁶⁸. Este gênero também é produtor de várias toxinas que comprovadamente atuam como agentes mutagênicos, como os alternarióis alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**). Estas toxinas têm sido encontradas naturalmente em grãos³⁴ e suas estruturas, assim como algumas estruturas de outros análogos produzidos por fungos deste gênero, estão apresentadas na FIGURA 8. Existem também outras classes de toxinas produzidas por *Alternaria*. Uma delas envolve as toxinas análogas a esfinganina⁶⁹⁻⁷¹. Esta substância é conhecida por ser inibidora da enzima ceramida sintase e seu esqueleto químico pode ser encontrado na FIGURA 9. Os análogos produzidos por *Alternaria* podem ser encontrados nesta FIGURA e na TABELA 6.

É possível notar que estas substâncias são quimicamente parecidas com as fumonisinas, comentadas na sessão anterior.

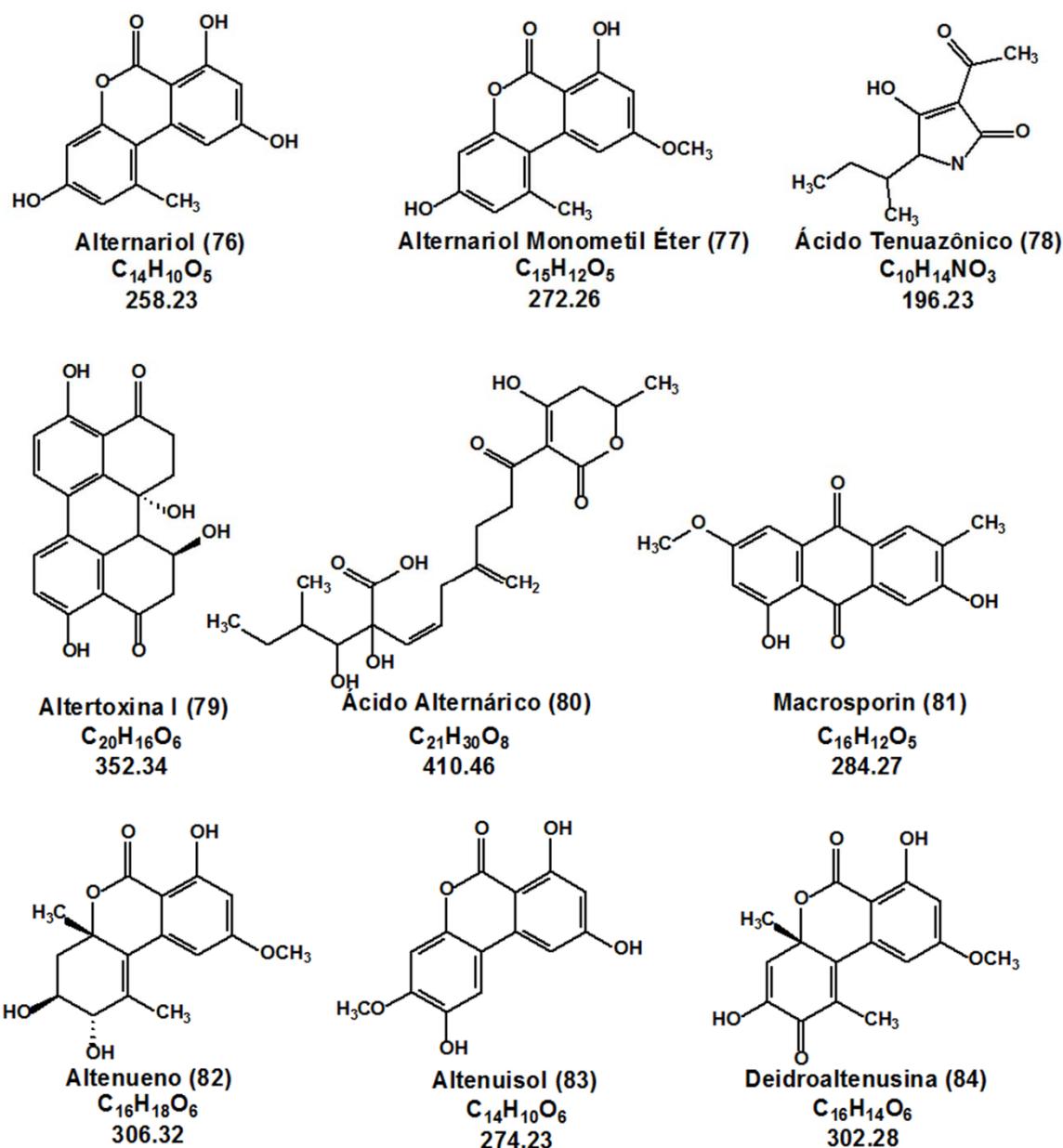


FIGURA 8. Algumas toxinas produzidas por fungos do gênero *Alternaria*.

De fato, Seefelder et al. (2003)⁷² demonstrou que além dos derivados da esfinganina mencionados acima, fungos do gênero *Alternaria* podem produzir a FB₁ glicosilada em alguns dos grupos R e nas funções ácido dos grupos TCA. Também foram apresentadas análises de derivados contendo

aminoácidos. Estes análogos foram obtidos sinteticamente, mas é plenamente possível que fumonisinas possam ocorrer nestas formas em sistemas biológicos.

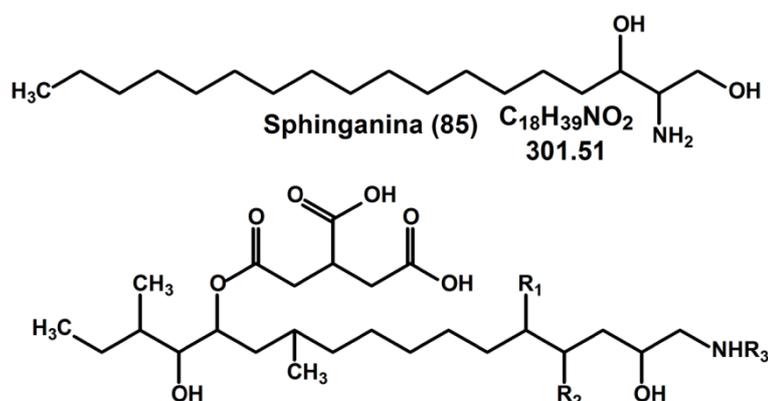


FIGURA 9. Esqueleto da sphinganina e das toxinas descritas na TABELA 6.

TABELA 6. Algumas toxinas produzidas por *Alternaria* análogas a esfinganina e as fumonisinas.

Toxina	R ₁	R ₂	R ₃	Massa Molecular (Da)
TA (86)	OH	OH	H	521,5
TB (87)	H	OH	H	505,5
TC (88)	H	H	H	489,5
TD (89)	H	OH	COCH ₃	547,5
TE (90)	H	H	COCH ₃	531,5

Com respeito ao papel fitotóxico das toxinas de *Fusarium* e *Alternaria*, ainda existe certa divergência na literatura científica com respeito aos tricotecenos e às zearalenonas. Alguns autores^{73, 74, 75} têm demonstrado que metabólitos secundários produzidos por fungos podem também atuar como toxinas para plantas – principalmente os pertencentes à classe dos tricotecenos –, ainda não é muito claro quais são os mecanismos de ação de tais substâncias. Além disso, alguns destes testes se baseiam na inibição da germinação de sementes em diferentes plantas e não na ação tóxica em plantas já crescidas, que são mais resistentes ao ataque de patógenos e, conseqüentemente, à ação dos compostos químicos. Com respeito às toxinas produzidas por *Fusarium*, existem relatos de que algumas zearalenonas, por exemplo, atuam como potentes fitoestrógenos⁷⁶, embora esta atividade não seja necessariamente

considerada tóxica. Outras toxinas, como o deoxinivalenol (**42**) são inibidores do crescimento das sementes de trigo⁷⁷.

Entretanto, as fumonisinas são compostos que comprovadamente atuam como agentes fitotóxicos. Abbas et al. (1998)⁷⁸ demonstrou que estas substâncias são letais na concentração de 1µM à algumas plantas modelo, como a *duckweed* (*Lemna pausicostata*), uma pequena planta aquática. Além disso, elas reduziram a atividade da clorofila em mais de 50% em média⁷⁸. Elas ainda exercem um importante papel como fator de virulência através da facilitação de algumas invasões fúngicas nos tecidos de algumas plantas⁷⁹. Ou seja, as fumonisinas, além de atuarem diretamente como fitotoxinas, debilitam a resposta sistêmica adquirida de uma planta, facilitando infecções secundárias.

Outros compostos produzidos por espécies de *Alternaria* também são tóxicos para plantas^{80, 81}. Com respeito ao alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**), duas outras importantes toxinas produzidas por *Alternaria*, existem alguns indícios com respeito aos seus potenciais fitotóxicos, embora estes ainda sejam pouco relatados e / ou confirmados. Quanto ao controle de qualidade destas substâncias nas mais diferentes matrizes, muitos esforços têm sido realizados nos últimos anos com o intuito de se estabelecer limites toleráveis⁸². Segundo o último levantamento realizado pela FAO em 2003⁸³, a grande maioria dos países possui algum tipo de regulamentação para estes níveis (FIGURA 10).

Porém estas regulamentações, na grande maioria dos casos (Brasil⁸⁴, por exemplo), são aplicadas somente para aflatoxinas, um grupo de toxinas extremamente ativas produzida por fungos do gênero *Aspergillus*. As outras grandes classes de toxinas mencionadas aqui possuem regulamentações em um número muito menor de países. No caso do controle de zearalenonas e tricotecenos em cereais o número de países que exercem regulamentação obrigatória é em torno de 35. Os limites aceitáveis de contaminação variam de 50 a 1000 µg/Kg para as zearalenonas e de 300 a 2000 µg/Kg para o deoxinivalenol⁸⁵.

qualidade o mercado interno, mas principalmente com o intuito de se adequar às legislações dos países importadores de seus produtos.

1.6. Vantagens e desvantagens no emprego de técnicas de extração, separação e identificação de toxinas fúngicas

Para a extração e o isolamento de toxinas fúngicas, as etapas iniciais envolvem o cultivo da cepa fúngica em meios de cultura adequados, visando posterior extração com solventes e obtenção de extratos brutos. No processo específico de isolamento, técnicas rotineiras de purificação em produtos naturais são usualmente empregadas, como cromatografia em coluna (CC) e em camada delgada (TLC), por exemplo. Mas como o emprego destas técnicas de isolamento demanda tempo e as toxinas são obtidas, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de análise rápidos e eficazes, que envolvam em geral a elaboração de protocolos incluindo extração em fase sólida (SPE) e posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas (MS), em conjunto ou em separado. Isso porque estas técnicas permitem a detecção e, em alguns casos, a identificação de quantidades mínimas destas substâncias sem a necessidade do isolamento das mesmas.

É neste sentido que o controle de qualidade destas toxinas tem sido dirigido. Assim, as análises por espectrometria de massas (MS) recebem grande destaque, sendo que a imensa maioria destas análises envolvem também o acoplamento com algum tipo de técnica de separação (GC-MS⁸⁸⁻⁹⁴, CE-MS^{95, 96}, HPLC-MS⁹⁷⁻¹⁰³). Estes métodos são utilizados principalmente para a quantificação destas toxinas.

Embora muitos dos métodos de análise de toxinas desenvolvidos até hoje tenham sido feitos por GC-MS, o grande número de trabalhos realizados com espectrometria de massas deve-se ao desenvolvimento de interfaces para cromatografia líquida, como APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e

ESI (*Electrospray Ionization*). Na seqüência, segue uma discussão um pouco mais detalhada sobre estas duas técnicas de ionização a pressão atmosférica.

1.6.1. Técnicas de ionização a pressão atmosférica (API): ESI e APCI

Os primeiros dados de análises realizadas combinando-se ESI-MS foram publicados por Fenn et al. (1984 e 1985)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Esta técnica opera por um processo de evaporação iônica, onde os íons são gerados a partir de um *spray* da fase móvel. A FIGURA 11 apresenta uma ilustração deste tipo de ionização. A amostra a ser analisada, em solução, é introduzida na fonte de ionização através de uma sonda (*probe*) do espectrômetro de massas a uma temperatura entre 200 e 550°C. Este *probe* possui em sua extremidade um capilar de aço inoxidável, com diâmetro interno de aproximadamente 100 µm. Todo este sistema pode operar com uma vazão de fase móvel entre 1 e 1000 µL/min¹⁰⁷, que deve ser cuidadosamente escolhida, priorizando-se um processo eficiente de ionização. Isso significa que a maioria das fases móveis utilizadas em sistemas HPLC no modo reverso de eluição sem fazer uso de aditivos podem ser aplicadas. Para ionizações no modo positivo de análises, o uso de ácidos “fracos” como o fórmico e o trifluoroacético podem ser empregados. De maneira similar, ótimos níveis de ionização no modo negativo de análise podem ser obtidos pela adição de bases fracas como trietilamina¹⁰⁸.

O processo de ionização é iniciado com aplicação de uma voltagem que varia de 2 a 5 KV no capilar. Este processo provoca a ionização das moléculas em solução, gerando ambos os íons positivos (molécula protonada, $[M+H]^+$) e negativos (molécula deprotonada, $[M-H]^-$). Adutos de sódio ($[M+Na]^+$) e outros também podem ser formados no modo positivo de análises.

Como conseqüência deste processo, os íons saem do capilar na forma de um aerosol de gotículas altamente carregadas (FIGURA 11). Aplicando-se um potencial inverso ao das gotículas carregadas no primeiro cone de entrada

da fonte de ionização, é possível atrair os íons com carga oposta e repelir os de mesma carga, possibilitando a entrada somente dos primeiros para dentro do sistema de vácuo. Este movimento é auxiliado por um fluxo de gás nebulizante (geralmente N_2), que também contribui para a evaporação da camada de solvatação das gotículas – e conseqüente diminuição do tamanho destas – gerando um aumento da repulsão entre as cargas das gotículas. Este processo é conhecido como **Explosão Coulombica** (FIGURA 12). Esta explicação é uma descrição simplória de processos bastante complexos que podem ser encontrados com maiores detalhes na literatura corrente^{104-106, 109-114}.

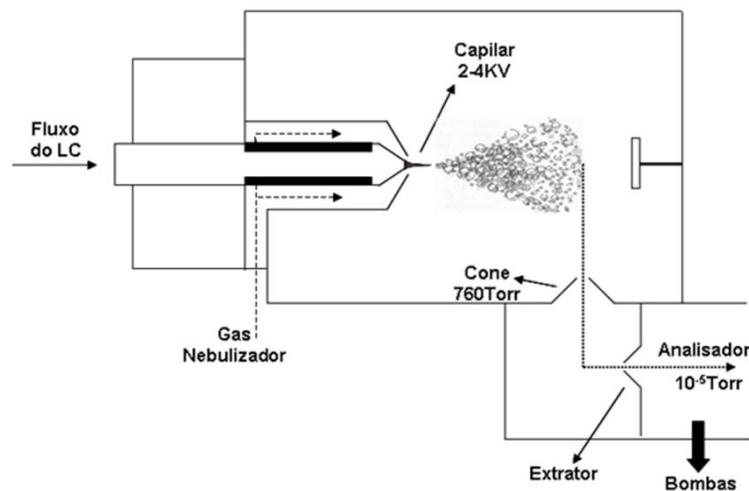


FIGURA 11. Esquema simplificado de uma fonte de ionização por ESI. O esquema representado é referente ao de uma fonte utilizada no equipamento Quattro LC (Waters).

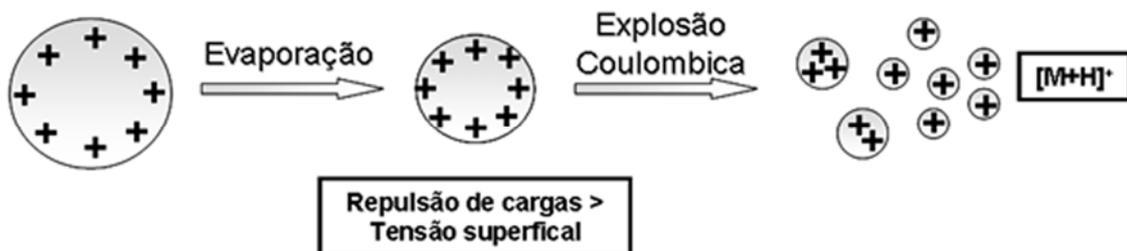


FIGURA 12. Esquemática do processo de Explosão Coulombica das gotículas carregadas gerando os íons moleculares $[M+H]^+$. Ionizações no modo negativo são idênticas, somente com inversão das cargas ($[M-H]^-$).

Os íons formados são atraídos para dentro de um cone e, na seqüência, para um cone extrator, ambos operando sob potenciais elétricos inversos à carga dos íons (fonte de ionização em *Z spray*). Finalmente, eles são então dirigidos para dentro do analisador de massas, que opera sob alto vácuo ($\sim 10^{-5}$ Torr). Devido à capacidade que esta técnica possui de ionizar moléculas em solução, ela é usualmente indicada na análise de compostos polares e/ou iônicos.

Já a técnica de APCI, embora também promova ionizações à pressão atmosférica, é mais indicada para compostos de média polaridade. Isso ocorre porque nesta técnica a alta voltagem não é aplicada no *probe* e os processos de nebulização e ionização ocorrem de modo independente^{115, 116}. A amostra em solução a ser analisada é inserida com vazão variando de 20 a 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ e elui do *probe* (temperatura entre 300 e 550°C) com o auxílio do fluxo do gás nebulizante, formando um aerosol de solvente que evapora rapidamente. Uma agulha carregada (corona) então aplica uma alta voltagem (2 - 4KV) que ioniza as moléculas do solvente. A colisão as estas moléculas do solvente ionizadas com as moléculas do analito promove a transferência de cargas e conseqüente ionização, também nas formas de molécula protonada ($[\text{M}+\text{H}]^+$) e molécula deprotonada ($[\text{M}-\text{H}]^-$). A FIGURA 13 mostra uma representação esquemática desta técnica.

Outras técnicas de ionização têm surgido no cenário da espectrometria de massas nos últimos anos e apresentam grande potencial na análise de toxinas fúngicas. A técnica de *Atmospheric Pressure Photo Ionization* (APPI) tem surgido como uma ferramenta que une o universo de moléculas que podem ser analisadas por APCI e ESI^{117, 118}. *Desorption Electrospray* (DESI), uma variação da técnica de ESI que *a priori* dispensa o preparo de amostras^{119, 120}, em princípio pode ser empregada para a análise de toxinas *in situ*.

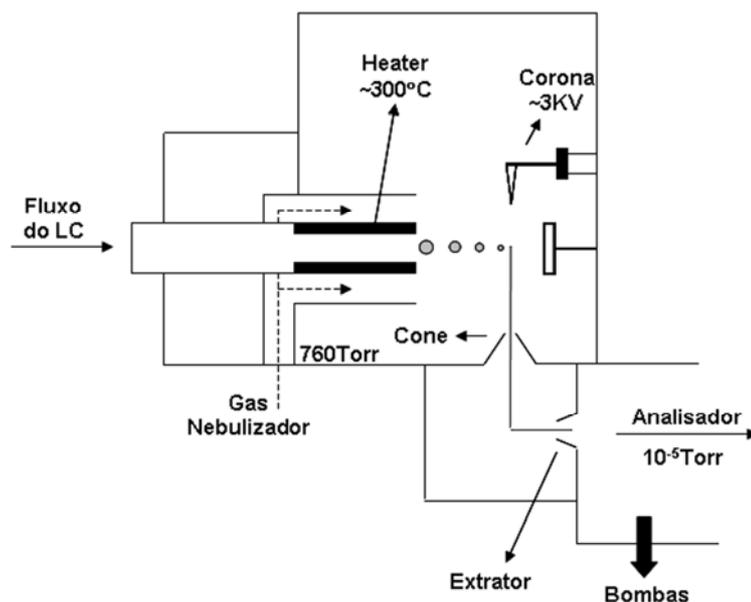


FIGURA 13. Representação da fonte de ionização por APCI.

A utilização destas técnicas de ionização em conjunto permite que uma ampla variedade de compostos orgânicos possam ser analisados. Além disso, elas são excelentes interfaces para o uso da MS em conjunto com HPLC. Porém, a escolha do modo de ionização adequado é apenas uma das etapas para o desenvolvimento do método de análise. No caso específico da espectrometria de massas, ainda podemos realizar diversos experimentos visando maior sensibilidade, seletividade, ou resolução espectral, especialmente se dispusermos de equipamentos com dois analisadores (quadrupolo – quadrupolo (QqQ), quadrupolo – *ion trap* (QTrap) ou quadrupolo – tempo de voo (Q-TOF), por exemplo).

1.6.2. Experimentos específicos para garantir sensibilidade e seletividade

O desenvolvimento de fontes de ionização a pressão atmosférica (API) para o acoplamento HPLC-MS, permitiu o surgimento de uma excelente ferramenta analítica. Todavia, podemos também nos valer da utilização dos

analisadores de massas para a obtenção de maiores informações estruturais e também de maior sensibilidade analítica.

Dentre os analisadores de baixa resolução mais utilizados na atualidade, destaca-se o analisador quadrupolar. Ele pode ser do tipo **linear**, que usa um campo elétrico para permitir que somente determinadas relações m/z geradas na fonte de ionização atinjam o detector, e também podem ser do tipo **ion-trap**, que usa um campo elétrico para estocar todos os íons gerados e então desestabiliza um destes íons em um determinado momento para gerar um espectro de massas¹²¹⁻¹²⁵.

Os quadrupolos lineares consistem de dois pares de barras cilíndricas ou hiperbólicas dispostas paralelamente como mostradas na FIGURA 14. Estas quatro superfícies condutoras são os pólos, onde duas destas são conectadas eletricamente com uma voltagem DC (*Direct Current*) positiva, constituindo uma hipérbole. As outras duas superfícies são conectadas com uma voltagem DC negativa.

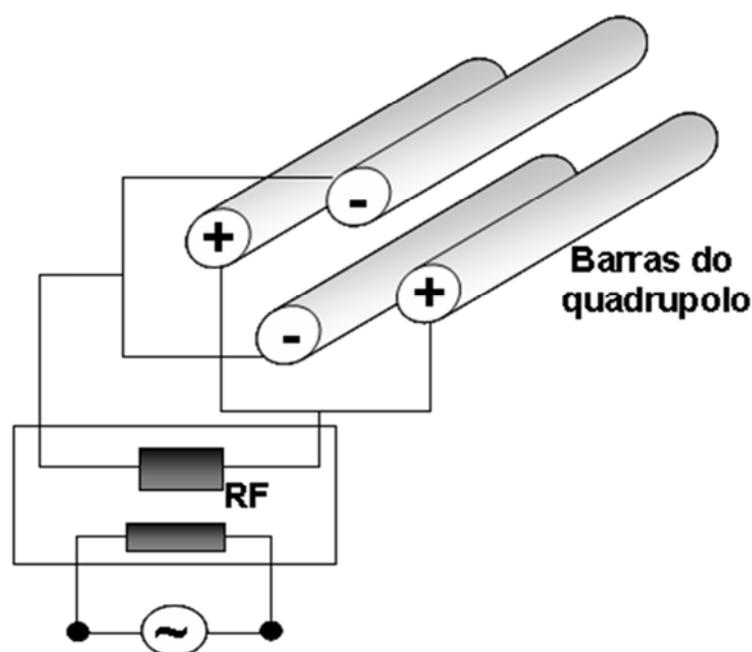


FIGURA 14. Representação esquemática de um quadrupolo linear.

Uma voltagem em RF (*Radiofrequency*) em uma frequência fixa com amplitude oscilando entre positivo e negativo, é aplicada nas quatro superfícies.

Então, íons com diferentes relações m/z são acelerados para dentro deste campo quadrupolar, que os separa em função de uma dada DC e uma amplitude RF. Somente os íons com um determinado valor de m/z atravessarão todo o campo quadrupolar, enquanto que os outros serão “filtrados” do feixe iônico através do choque com as barras do quadrupolo. Mantendo a relação da amplitude RF e DC constante, esta amplitude é então aumentada para trazer o próximo valor mais elevado de m/z em foco para a detecção subsequente. Estes passos são repetidos até que um espectro de massas seja totalmente obtido^{121, 126}

Valendo-se de dois destes analisadores em linha, interligados por uma cela de colisão (um hexapolo, por exemplo), temos um analisador do tipo triplo-quadrupolo (QqQ). A função da cela de colisão é proporcionar a fragmentação dos íons selecionados no primeiro quadrupolo, através da colisão com um gás inerte (geralmente argônio), que possui sua energia controlada. Esta colisão usualmente ocorre pelo processo de *Collision-Induced Dessorption* (CID-MS), ou seja, dessorção induzida por colisão^{127, 128}.

Com este arranjo, é possível realizar diversos tipos de experimentos para se obter informações estruturais, seletividade e sensibilidade, conforme o interesse demandado (FIGURA 15 e TABELA 7). Alguns destes experimentos, como os de íons produtos e íons precursores, permitem a obtenção de preciosas informações a respeito da estrutura molecular do composto analisado. Por exemplo, nos experimentos de íons produtos, o primeiro quadrupolo é programado de maneira que apenas uma determinada relação m/z atinja a cela de colisão, filtrando-se todos os demais íons. Assim, este íon pode ser fragmentado com uma energia conhecida e determinada na cela de colisão e todos seus fragmentos podem ser analisados no segundo quadrupolo. A origem de um determinado íon fragmento também pode ser determinada, agora invertendo as funções dos quadrupolos nos experimentos de íons precursores.

Altíssimas seletividade e sensibilidade podem ser alcançadas através de experimentos de SRM, pois neste experimento ambos os quadrupolos são programados para deixarem passar apenas uma determinada relação m/z . Todos os demais pares de íons produtos – íons precursores, chamados de

transições, não chegam ao detector e, portanto, não são registrados. Assim, a sensibilidade é aumentada em cerca de 100 vezes se comparada com experimentos de MS/MS convencional¹⁰⁷, permitindo a análise de um íon em baixas concentrações, mesmo em uma matriz complexa e sem qualquer resolução cromatográfica, desde que se conheça alguma fragmentação específica deste íon. Vale ressaltar que embora em teoria isso seja verdade, na prática um mínimo de separação cromatográfica é usualmente necessário para obter o efeito desejado. O equipamento, então, somente registrará o par determinado, ou seja, a transição selecionada, fornecendo uma Gaussiana no Cromatograma de Íon Totais (TIC). Portanto, neste modo de análise, nenhum espectro de massas é obtido.

Experimentos envolvendo Perda Neutra possibilitam a obtenção de excelente seletividade. Neste modo, o equipamento detecta apenas as perdas neutras previamente selecionadas, independentemente de quais são os íons precursores ou os íons produtos. A especificidade, em contrapartida, é prejudicada, pois várias moléculas podem apresentar perda de 18 Da (H_2O), por exemplo. Desta maneira, esta técnica pode ser empregada nos casos de *screening* de extratos, pois através de uma fragmentação específica de uma classe química, é possível detectar e identificar todos os análogos presentes na mistura, desde que eles apresentem uma mesma fragmentação comum.

Nestes casos, é muito importante conhecer a fragmentação desejada, pois do contrário torna-se praticamente impossível determinar se a fragmentação do analito de interesse é específica ou não. Caso ela não seja, poder-se-á identificar íons que não correspondem a moléculas de uma mesma classe química, gerando falsos resultados. Para tentar compreender um processo de fragmentação molecular por espectrometria de massas, usualmente é necessário o uso de algumas estratégias, teóricas e experimentais, além dos conhecimentos em mecanismos de fragmentação e química orgânica básica e avançada. Na seqüência, pode ser encontrada uma breve discussão sobre o tema.

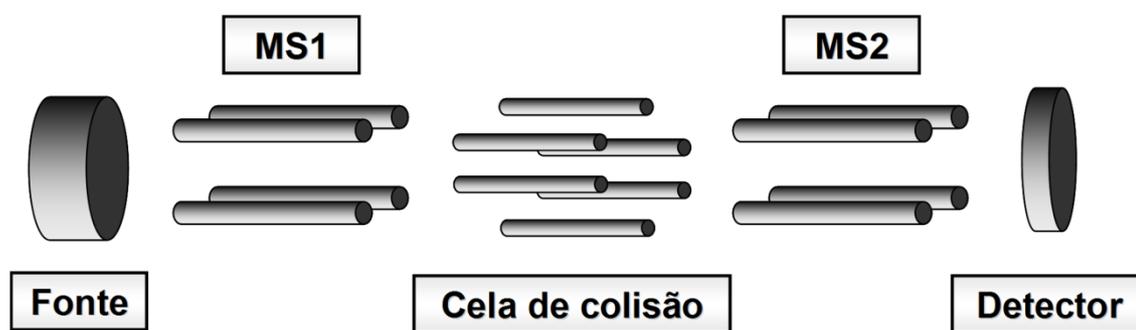


FIGURA 15. Esquema de um analisador de triplo-quadrupolo (QqQ).

TABELA 7. Diferentes experimentos utilizando-se equipamento com triplo-quadrupolo.

	MS1	Cella de colisão	MS2
	Escaneando		
Full scan		Inativa	—
Product ions (íons produto)	Estático 	Com gás	Escaneando
Precursor ions (íons precursores)	Escaneando 	Com gás	Estático
SRM	Estático 	Com gás	Estático
Neutral loss (perda neutra)	Escaneando 	Com gás	Escaneando

1.7. Estudo dos mecanismos de fragmentação envolvidos em CID-MS/MS

As técnicas de ionização anteriormente mencionadas são consideradas ionizações *soft*, ou seja, não produzem íons fragmentos. Análises realizadas utilizando-se estas técnicas com um único analisador de massas fornecem informações muito importantes com respeito à massa molecular do(s) composto(s) em questão, mas maiores informações com respeito à estrutura dos

compostos dificilmente são obtidas. Entretanto, se forem realizados experimentos com equipamentos que possuem dois analisadores ou mais (QqQ, QTrap, QTOF, entre outros) é plenamente possível a fragmentação de um íon em questão, gerando um espectro de íons produtos. Assim, informações preciosas podem ser obtidas através da determinação dos mecanismos de fragmentação das substâncias analisadas.

Porém, em alguns casos, faz-se necessário a confirmação dos mecanismos propostos, para que a interpretação de espectros de amostras desconhecidas possa ser mais confiável. Uma boa estratégia é realizar marcações isotópicas, principalmente deuteriações, nos compostos de interesse e comparar os espectros de íons produto da substância marcada e da mesma sem qualquer alteração isotópica. Alguns autores como Palmer et al. (2000)¹²⁹, Ustyuzhanin et al. (2003)¹³⁰ e Takats et al. (2003)¹³¹ apresentam análises de algumas substâncias através de HPLC-MS/MS utilizando-se trocas de hidrogênios lábeis por átomos de deutério, através de análises com solventes deuterados *on flow* (D₂O, por exemplo). Neste caso, o custo da análise é muito aumentado devido ao alto valor destes solventes.

Uma excelente alternativa é a dissolução dos compostos a serem analisados em pequenas quantidades de solvente deuterado e posterior análise com solventes apróticos (acetonitrila) ou pouco ácidos (acetonitrila com pequenas proporções de água, por exemplo), como fase móvel. Tal procedimento promove a troca de hidrogênios lábeis, como os de grupos hidroxil, devido à cinética desta reação ser altamente favorecida ($5 < k_H/k_D < 10$)¹³², garantindo que a reação de volta (troca de deutério por hidrogênio) seja bem mais lenta, possibilitando análises inequívocas.

Quando a substância a ser analisada não possui hidrogênios lábeis, ou quando se deseja obter informações mais específicas acerca dos mecanismos de fragmentação, deslocamentos do equilíbrio ceto-enólico ou mesmo o uso de algumas reações orgânicas, como substituições eletrofilicas aromáticas, por exemplo, podem ser realizados visando deuteriações efetivas dos compostos¹³³.

¹³⁴. Em paralelo, análises envolvendo simulação computacional que suportem os

resultados obtidos experimentalmente podem ser realizadas. Inúmeros softwares possibilitam tais análises¹³⁵, dependendo do grau de complexidade dos compostos simulados.

Desta maneira, a análise computacional é uma ferramenta muito interessante no auxílio da compreensão dos mecanismos de fragmentação por CID-MS/MS, mas é desejado que elas sejam acompanhadas de informações experimentais que suportem as proposições mecanísticas.

1.8. Screening visando a investigação da produção de toxinas fúngicas: uso de técnicas como HPLC-MS e HPLC-UV-SPE-NMR

A busca por metabólitos secundários de microrganismos, incluindo toxinas fúngicas e outros, pode muitas vezes se transformar em uma tarefa árdua, cara e vagarosa, pois muitas vezes estas substâncias encontram-se presentes em pequenas quantidades nas mais complexas matrizes. Assim, a obtenção de grandes quantidades destas substâncias, com grau de pureza elevado, seja para sua completa determinação estrutural ou para submetê-las frente a diferentes ensaios biológicos, deve necessariamente envolver etapas de cultivo, de extração e de purificação realizadas em larga escala.

Porém para que este trabalho não seja realizado sem nenhuma orientação, os extratos ou frações que serão submetidos ao processo de purificação devem ser selecionados de forma inequívoca. Uma excelente alternativa que vem sendo destacada na literatura é a realização dos procedimentos comumente chamados de *screening*, *metabolite profile* ou *dereplication*, que se baseiam em técnicas de alta sensibilidade e que podem prover informações estruturais confiáveis¹³⁶⁻¹³⁸. A combinação da seletividade, da alta eficiência em separação e da detecção adequada faz do acoplamento HPLC-MS/MS uma ferramenta crucial para este tipo de estudo. Isso porque a espectrometria de massas (MS) é talvez a técnica com a maior sensibilidade analítica na atualidade, chegando, em alguns casos, à limites de detecção da

ordem de fentogramas. Aliado ao alto poder de separação do HPLC, esta técnica permite a análise de diferentes metabólitos em matrizes complexas. Outra grande vantagem é que no modo *tandem* (MS/MS), é possível obter várias informações relacionadas à determinação estrutural do composto em questão.

Por outro lado, dentro deste mesmo contexto, é notório que a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) provê ao analista informações extremamente úteis quanto à estrutura química do composto em questão, embora seja usualmente necessário que a amostra esteja com elevado grau de pureza e em quantidades apreciáveis, geralmente na escala de miligramas.

Entretanto, com o recente avanço no desenvolvimento de *cryoprobos*, na construção de magnetos de alto campo e no desenvolvimento de sequencias de pulso e de interfaces apropriadas, o acoplamento entre a cromatografia líquida (LC) e a ressonância magnética nuclear (NMR) tem se tornado uma técnica viável e extremamente poderosa com relação à elucidação estrutural de compostos orgânicos em misturas complexas¹³⁹. Tais avanços também permitiram um aumento considerável nos níveis de detecção destes equipamentos^{140, 141}. Como consequência deste desenvolvimento tecnológico é o aumento do número de publicações na literatura atual, relatando o uso do acoplamento HPLC-NMR para este tipo de estudo¹⁴²⁻¹⁴⁷. Mas embora esta técnica forneça informações espectroscópicas extremamente importantes para a elucidação estrutural de novos compostos presentes em matrizes complexas, ela ainda é financeiramente inviável frente à técnica de HPLC-MS/MS. A TABELA 8, abaixo, apresenta alguns dos pontos mais relevantes quando comparadas ambas as técnicas. O ideal, evidentemente, seria a utilização destas técnicas em conjunto, fornecendo resultados muitas vezes complementares. De fato, o uso destas técnicas de maneira *on line* (HPLC-NMR-MS/MS) talvez seja a ferramenta química mais poderosa com respeito às análises de compostos orgânicos.

TABELA 8. Comparação entre as técnicas hífenadas HPLC-NMR e HPLC-MS/MS.

	HPLC-NMR	HPLC-MS/MS
Facilidade do acoplamento	Relativamente difícil, porém com os novos avanços no desenvolvimento de interfaces, este já não é mais o grande problema ¹⁴⁸	Extremamente simples nos dias atuais, principalmente com o uso de APCI ou ESI. Relativamente difícil para utilização de MALDI.
Sensibilidade	Com utilização de criosondas pode chegar a escala de ng/mL ^{140, 149}	Em equipamentos mais modernos e dependendo do analito, pode-se detectar fg/mL ¹⁵⁰
Informação estrutural	Excelente ferramenta. Permite a caracterização inequívoca da grande maioria dos analitos.	Menor do que a NMR, mas com recentes avanços, é possível a distinção até de enantiômeros ¹⁵¹
Custo	A utilização de poucas quantidades de solventes deuterados diminui o custo, mas ainda assim é considerada uma técnica cara.	Menor custo. Entretanto, alguns equipamentos de alta resolução podem se equiparar ao ao preço de um HPLC-NMR básico.
Analista especializado	Ambas as técnicas exigem a presença de analistas altamente especializados, inclusive em cromatografia.	
Seletividade	Pode ser seletiva ao se realizar experimentos envolvendo ressonância de diferentes núcleos (¹⁹ F, ³¹ P, ¹⁴ N,...)	Altamente seletiva no modo SRM. Perda neutra, íons produtos e precursores também podem garantir seletividade
Necessidade de pré-tratamento da amostra	Ambas as técnicas não necessitam de pré-tratamento de amostra <i>a priori</i> . Somente deve haver atenção especial quanto às concentrações utilizadas em espectrometria de massas e também com respeito a análises de compostos presentes em pequenas concentrações em matrizes complexas.	

Assim como toda a técnica hífenada, o acoplamento entre HPLC-NMR exige um fino ajuste de ambas os equipamentos e técnicas. Neste trabalho serão discutidos alguns dos inúmeros aspectos relevantes a este tipo de acoplamento.

Como mencionado anteriormente, a quantidade de amostra é um fator crucial para a detecção por NMR. Por outro lado, a sobrecarga de amostra na coluna cromatográfica é indesejada, pois a separação cromatográfica torna-se extremamente difícil. Além disso, a composição da fase móvel deve ser cuidadosamente elaborada, de modo que haja o menor número possível de sinais referentes aos solventes utilizados. Por exemplo, em fase reversa, é comum o uso de misturas envolvendo acetonitrila ou metanol em água, assim como em HPLC convencional. Nos sistemas de acoplamento direto entre HPLC e NMR, é usual o uso de água deuterada como um dos componentes da fase móvel, uma vez que o uso de solventes orgânicos deuterados eleva em muito o custo das análises^{139, 148}. Ainda assim, faz-se necessário o uso de sequências de pulso

especiais, que possibilitem uma efetiva supressão dos sinais relativos ao solvente.

Neste modo de acoplamento direto, duas diferentes técnicas de interfaceamento são utilizadas¹⁵². No modo de **fluxo contínuo**, a separação cromatográfica é continuamente monitorada pela aquisição de espectros de ¹H NMR^{152, 153}. Neste modo, a detecção fica limitada ao tempo de análise – usualmente pequeno – em que o analito em questão fica em contato com a bobina magnética, o que possibilita, em termos gerais, apenas a aquisição de espectros de ¹H NMR e, ainda assim, somente para amostras concentradas.

No modo de **fluxo interrompido**, a amostra é transferida de modo similar para o magneto; porém, quando o máximo do pico alcança a bobina de detecção, a corrida cromatográfica é interrompida. Desta maneira, é possível a aquisição de quantos transientes for necessário para a obtenção de um espectro com uma ótima relação sinal/ruído (S/N), inclusive no que diz respeito a experimentos bi-dimensionais (2D NMR)^{152, 153}. O grande inconveniente é que em cada corrida cromatográfica somente é possível a análise de um único pico, uma vez que efeitos de difusão de bandas e outros podem interferir diretamente na resolução cromatográfica enquanto o fluxo encontra-se interrompido¹⁵³. A sonda convencional de 5 mm para experimentos sem acoplamentos, a interface para HPLC-NMR e também uma representação esquemática deste acoplamento podem ser encontrados na FIGURA 16.

Entretanto, existe uma contínua busca por elaboradas sequencias de pulso que permitam a supressão do sinal do solvente sem distorções em outras partes do espectro. Além disso, ainda existe um aumento do custo de análise associado à utilização de água deuterada. Uma diferente abordagem que poderia, em princípio, minimizar estes problemas seria a utilização de técnicas de separação capilar¹⁴¹. O uso de volumes extremamente pequenos de solventes deuterados diminui os custos das análises, tornando-as economicamente mais atraentes. Entretanto, o uso de técnicas de separação capilar implica em uma redução drástica da sensibilidade da técnica^{141, 154, 155}.

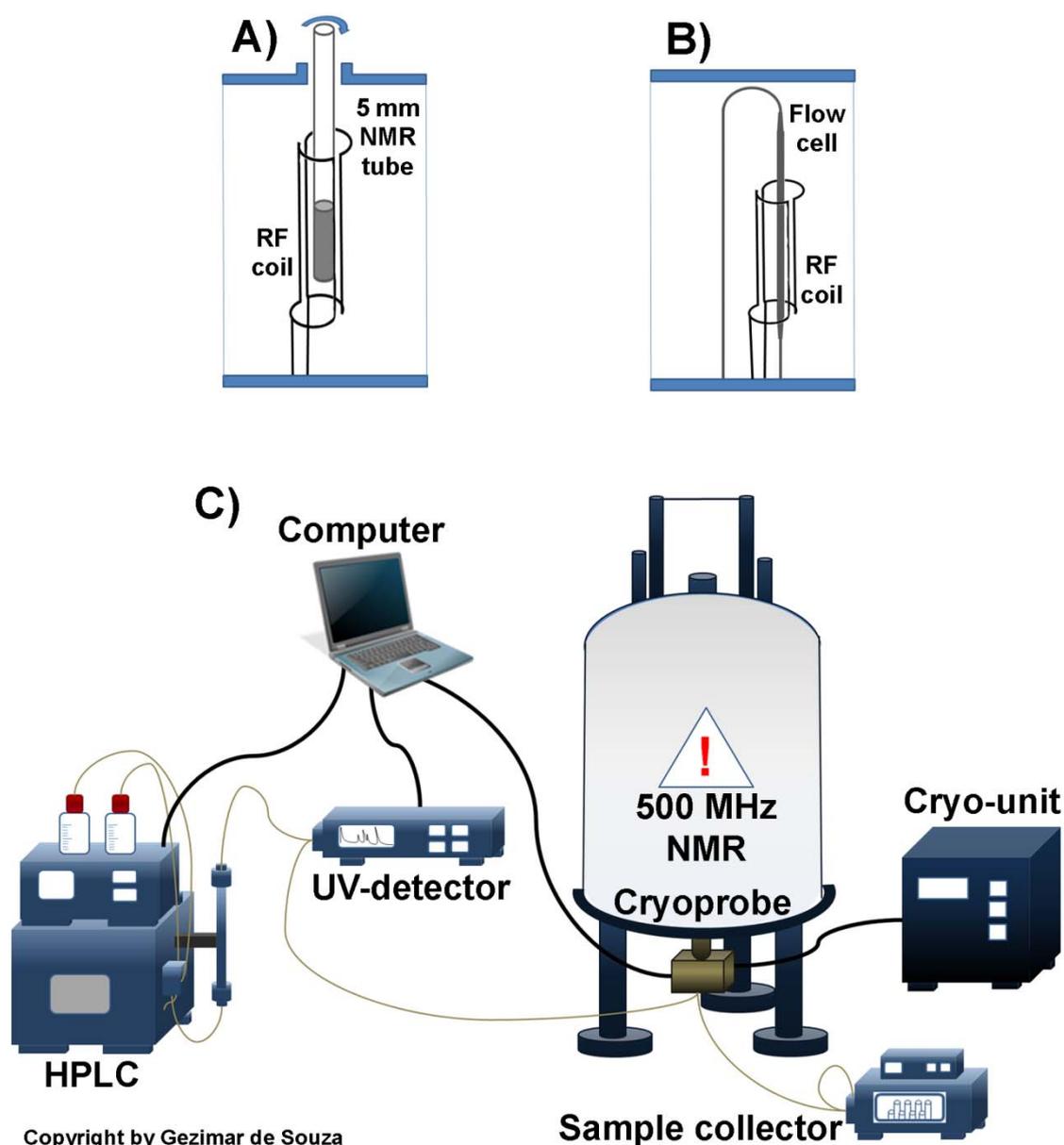


FIGURA 16. Representações esquemáticas: A) da sonda convencional; B) da sonda para acoplamento *on-line*; C) de todo o acoplamento HPLC-NMR.

Desta maneira, o desenvolvimento do acoplamento envolvendo a cromatografia líquida, a extração em fase sólida e a ressonância magnética nuclear (LC-SPE-NMR) tem surgido como uma das mais recentes configurações para a hifenação entre a NMR e a cromatografia líquida^{156, 157}. Neste arranjo, os diferentes bandas cromatográficas são trapeados em cartuchos de SPE, possibilitando o acúmulo destas substâncias até a saturação do cartucho. A consequência imediata deste processo é um aumento significativo na

sensibilidade da técnica, pois uma maior quantidade do analito é transferida para a cela de detecção se comparado com LC-NMR convencional¹⁵⁸. Além disso, outras vantagens são evidentes: a corrida cromatográfica pode ser realizada com qualquer composição de fase móvel, pois somente a transferência dos analitos trapeados para o magneto é feita com solventes deuterados. Isso reduz drasticamente o gasto com tais solventes e permite uma maior concentração da amostra, além de não ser absolutamente necessário o uso de sequências de pulso especiais que permitam a supressão dos sinais de solventes não-deuterados¹⁵⁸.

Em contraste com a LC-NMR convencional, todos os espectros de NMR dos analitos separados cromatograficamente são adquiridos e registrados em condições absolutamente idênticas, mesmo se eluições gradiente forem empregadas na separação cromatográfica. Isso permite uma comparação direta com espectros obtidos por NMR *off-line*, caso o mesmo solvente seja utilizado. Vale ressaltar que todo este processo é totalmente automatizado. Os cartuchos de SPE também podem ser trocados de acordo com as características do analito que se pretende trapear, ou seja, cartuchos contendo fases estacionárias comumente conhecidas como C-18 ou ciano podem ser utilizadas¹⁵⁹.

Durante a retenção seletiva dos analitos usando o modo reverso de eluição, uma bomba auxiliar é acionada. Esta bomba usualmente contém água como fase móvel e opera com uma vazão de 3 a 5 vezes maior do que o da corrida cromatográfica. Este fluxo se une ao da corrida cromatográfica na saída da coluna, pois desta maneira os analitos com características hidrofóbicas, que eluem da coluna com altas proporções de solventes orgânicos, possam ser “diluídos” em água antes de serem enviados para os cartuchos de SPE, aumentando a possibilidade de retenção dos analitos nos mesmos^{159, 160}. O fluxo desta bomba, bem como a fase estacionária dos cartuchos, é um dos vários parâmetros cruciais para o sucesso do acoplamento. Para analitos com fortes características hidrofóbicas, o poder de retenção dos cartuchos desenvolvidos com uma resina polimérica de polidivinil-benzeno, utilizada como um *default* para o trapeamento da grande maioria compostos orgânicos, é diminuído drasticamente, sendo então preferido à utilização de cartuchos para fase normal.

Uma representação esquemática deste sistema pode ser encontrada na FIGURA 17 e uma foto contendo o sistema utilizado neste projeto pode ser encontrada na FIGURA 18.

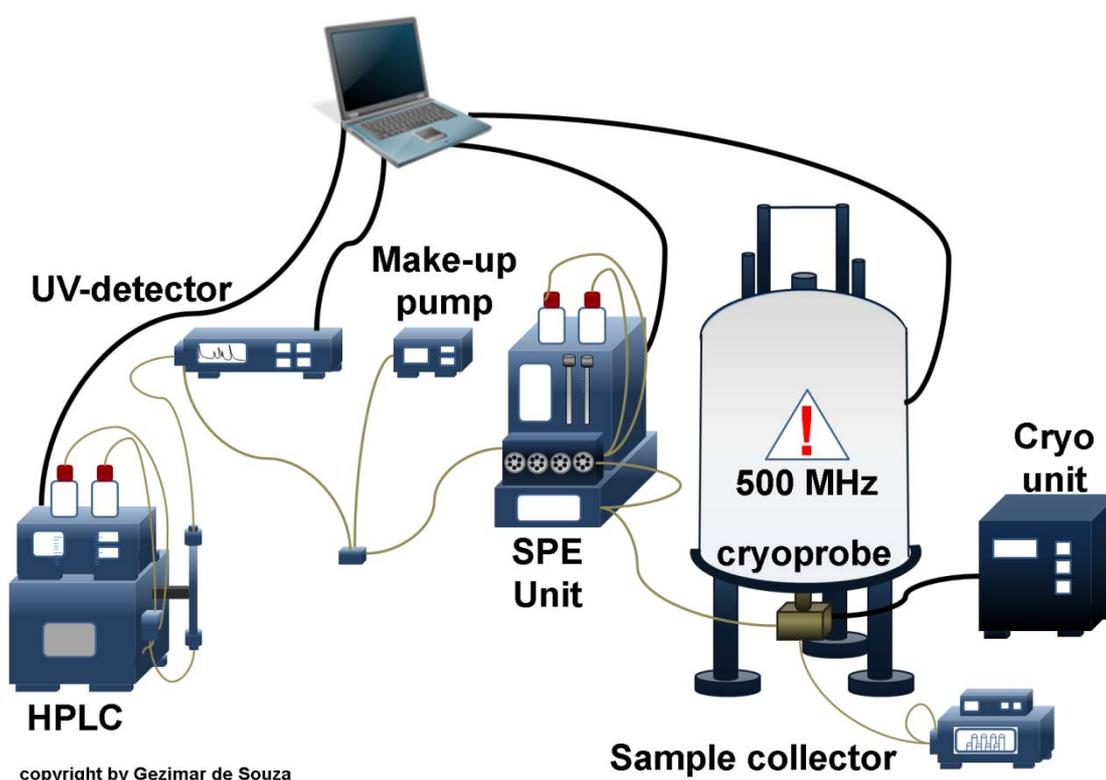


FIGURA 17. Representação esquemática do sistema de HPLC-UV-SPE-NMR.

A maior desvantagem com respeito ao uso desta técnica reside na necessidade de se otimizar as condições de trapeamento. Entretanto, isso pode ser feito até mesmo com uma única corrida cromatográfica *off-line* (com outro detector em linha), o que demanda pouco tempo e pequena quantidade de amostra¹⁵⁹. O investimento inicial também é um fator a ser considerado, já que a unidade de SPE automatizada representa algo em torno de um quarto do custo do sistema como um todo, estimado no presente momento em valores próximos a €1.000.000,00.

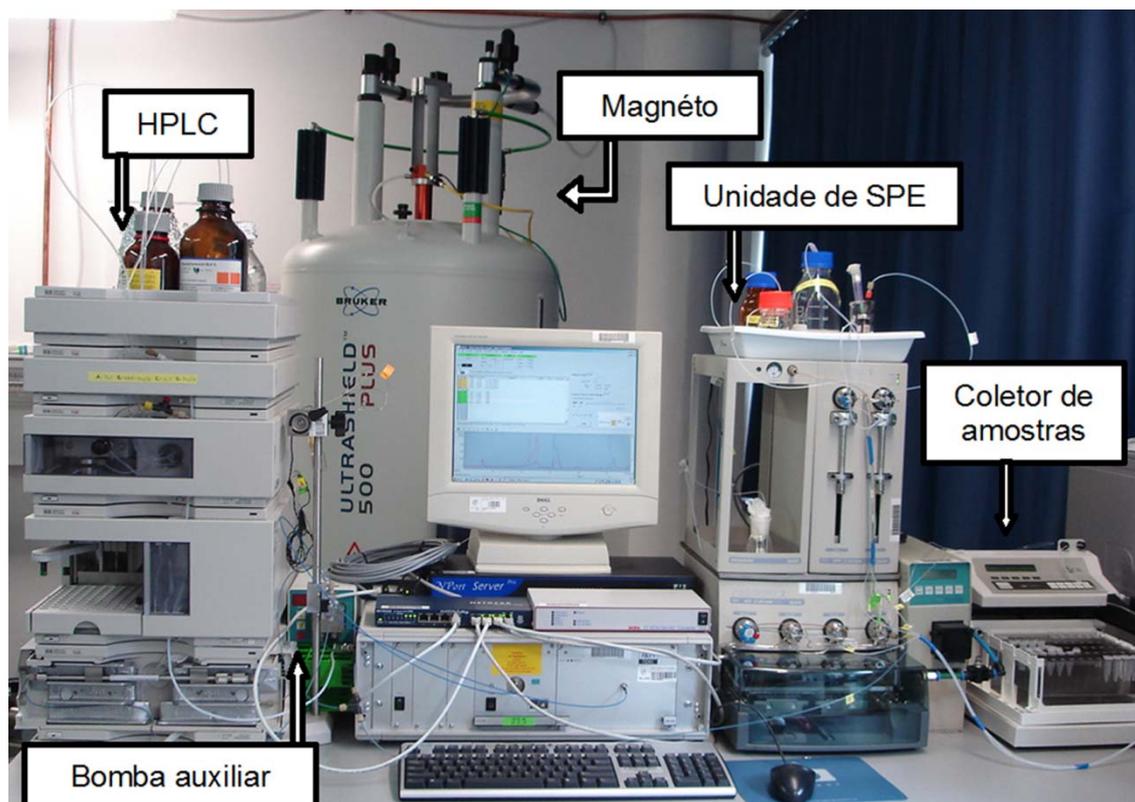


FIGURA 18. Foto do sistema de HPLC-SPE-NMR utilizado neste projeto.

Tal acoplamento tem surgido, por todos os motivos discutidos até aqui, como uma excelente alternativa à LC-NMR convencional sendo considerada por vários pesquisadores como uma das mais poderosas ferramentas de análise existente¹⁶⁰, principalmente quando um espectrômetro de massas é acoplado ao sistema, fornecendo a técnica de LC-UV-SPE-NMR-MS/MS¹⁶¹.

1.9. Validação de métodos analíticos: figuras de mérito e sua importância

A análise de toxinas fúngicas é de fundamental importância para diversos campos da sociedade. Mas evidentemente que para uma análise inequívoca destas substâncias, principalmente quando encontradas em matrizes complexas como é o caso da grande maioria dos cereais, o método utilizado deve

ser o mais sensível e seletivo possível. Isso necessariamente deve compreender etapas de otimização das condições analíticas durante o desenvolvimento e a aplicação do método de análise¹⁶².

Embora um método analítico com foco na investigação química de compostos não tenha que ser obrigatoriamente validado, para a aplicação de métodos de análise em controle de qualidade, ou seja, quando a confiabilidade no método e nos resultados obtidos seja de extrema importância, é fundamental que a validação do método proposto seja conduzida para assegurar a integridade do mesmo. Desta forma, a validação é o processo de determinação da susceptibilidade do método utilizado, visando gerar dados analíticos confiáveis¹⁶³.¹⁶⁴. A Sociedade Americana de Química (ACS), por exemplo, através do documento *ACS Guidelines for Data Acquisition and Quality Evaluation* recomenda o uso de métodos validados¹⁶⁵. Segundo esta mesma entidade, a hierarquia da metodologia analítica considera, basicamente, os objetos apresentados na FIGURA 19.

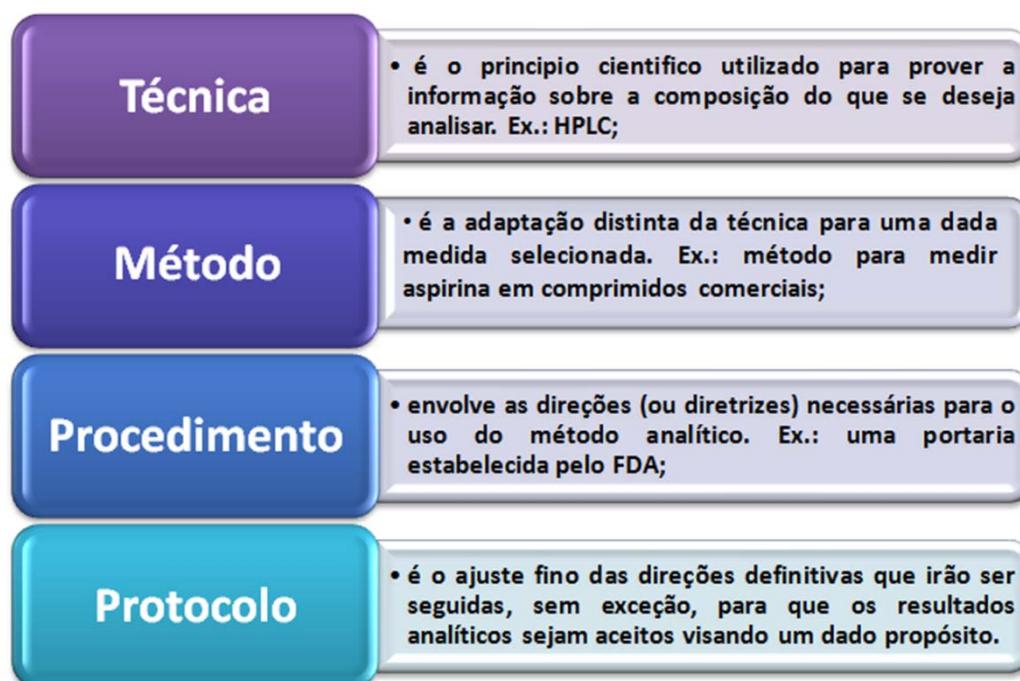


FIGURA 19. Objetos constantes de um método analítico.

Estabelecidas as características básicas de um método, é importante também que alguns critérios analíticos sejam respeitados. Para isso, alguns parâmetros são fundamentais para o desenvolvimento, para a validação e para a aplicação do método analítico^{18, 163-165}. Abaixo segue uma breve descrição destes parâmetros, que são necessárias para validação envolvendo qualquer técnica analítica e de alguns dos inúmeros pontos positivos que a técnica de HPLC-ESI-MS/MS via SRM oferece.

- **Seletividade (especificidade):** é a habilidade que o método possui em medir o analito de interesse de uma maneira precisa e seletiva sem a interferência de outros componentes que podem estar presentes na matriz. Neste aspecto, a utilização da técnica de SRM em espectrometria de massas é uma vantagem, próprio das suas características. Ela deve ser determinada pela análise de amostras da matriz sem a presença do analito ($n \geq 6$). No caso da análise de toxinas fúngicas em cereais, faz-se necessário o teste de outras marcas comerciais destes grãos;
- **Sensibilidade (LOD e LOQ):** é a habilidade que um método possui em detectar e quantificar baixas concentrações de uma analito. Ela é usualmente expressa em termos dos valores do Limite de Detecção (LOD) e do Limite de Quantificação (LOQ). O LOD é definido como a mais baixa concentração de um analito que pode ser detectado na amostra com confiabilidade. É usualmente expresso em termos da relação sinal-ruído (S/N) e o valor aceito pela grande maioria dos órgãos reguladores é de 3/1 ($S/N = 3$). Já o LOQ é definido como a concentração mais baixa de um analito que pode ser determinada (quantificada) com precisão e exatidão em uma amostra, dentro das condições empregadas no método de análise. Também é usualmente expresso pelo valor de S/N é o valor mínimo aceito é 10 ($S/N = 10$). É importante ressaltar que tanto o valor de LOQ quanto o de LOD depende, não somente do detector, mas também do processo de separação, pois a relação S/N depende, entre outros fatores, do formato da banda cromatográfica. Assim, mais uma vez a técnica de SRM se destaca, pois desde que a fase móvel esteja ajustada para o processo de separação na coluna cromatográfica e também para o processo de ionização da

amostra, o sinal obtido é muito próximo de uma Gaussiana perfeita, uma vez que os interferentes que possuem transições (fragmentações) diferentes, não são detectados e, portanto, não influenciam na simetria das bandas cromatográficas;

- **Linearidade:** é definida como a habilidade que o método possui em fornecer resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito. Para isso, são determinados pontos de concentração (mínimo de 5 pontos), que compreendem um intervalo dinâmico entre a concentração mais baixa e a mais alta do analito que podem ser determinadas com precisão e exatidão. Geralmente o primeiro ponto da curva é o LOQ e este ponto não deve apresentar desvio maior do que $\pm 20\%$. A linearidade é expressa pelo coeficiente de regressão linear (r) obtido pela reta de mínimos múltiplos quadrados. Valores de r acima de 0,98 são usualmente aceitos;

- **Exatidão:** é uma medida da concordância dos valores obtidos pelo método e os valores aceitáveis ou de referência. A exatidão é medida pela porcentagem do analito recuperado durante todo o processo e deve ser determinada utilizando-se no mínimo 3 diferentes concentrações em quintuplicata, formando assim os controles de qualidade baixos (LQC, 120% do LOQ), médios (MQC, 40-60% do ponto mais concentrado) e altos (HQC, 75-95% do ponto mais concentrado).

- **Precisão:** representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes. A precisão é medida como uma estimativa do desvio padrão relativo (RSD) juntamente com os coeficientes de variação das medidas obtidas; é avaliada em 3 etapas:
 - **Repetibilidade (ou precisão intra-dia):** mede o grau de variação de replicatas analisadas em um curto período de tempo;

- **Precisão intermediária (ou precisão inter-dia):** envolve a análise de replicatas de múltiplas análises em diferentes dias não consecutivos;
- **Reprodutibilidade:** mede a precisão entre laboratórios, onde um mesmo método e mesmas amostras levam aos mesmos resultados nestes diferentes laboratórios.
- **Recuperação:** avalia a eficiência do método de tratamento das amostras e é avaliado por meio da comparação de análises em quintuplicata de três concentrações (QC's) de amostras extraídas com amostras padrão não-extraídas (100%);
- **Robustez:** é a habilidade que o método possui em fornecer resultados inalterados quando submetido a pequenas alterações, como variações da concentração da fase móvel e temperatura.

A breve discussão apresentada acima engloba os aspectos gerais de um processo de validação. Evidentemente que, para cada caso específico, existe uma regulamentação a ser seguida e, portanto, faz-se necessário a inclusão de outras etapas analíticas. Maiores informações podem ser obtidas na literatura corrente ou consultando as referências citadas nesta presente sessão.

Proposição do Trabalho

2. PROPOSIÇÃO DO TRABALHO

Os trabalhos em desenvolvimento no Grupo de Estudos em Bioquímica e Metabolismo de Microrganismos, os quais visam, em primeiro plano, o entendimento da interação entre plantas e microrganismos, com ênfase nos microrganismos de habitat endofítico, tem se obtido coleções enormes de microrganismos. Esses estudos envolvem coletas de material vegetal para estudos da sazonalidade da hospedagem fúngica. Os estudos químicos desses microrganismos têm sido priorizados para aqueles que, aparentemente, são simbióticos. Isso vem sendo decidido por critérios que julgamos no mínimo subjetivos. O presente trabalho pretende também contribuir nesta distinção entre fitopatógenos latentes e endofíticos mutualistas.

Assim, para uma melhor compreensão do estudo realizado, os objetivos específicos, a parte metodológica, os resultados e as considerações finais serão divididos em duas partes: **parte 1**, onde serão abordados os aspectos analíticos envolvidos neste trabalho, e **parte 2**, onde serão discutidos os testes biológicos realizados com o intuito de se correlacionar a produção de metabólitos secundários com um possível papel ecológico desempenhado por tais compostos.

Parte 1: Aspectos Analíticos

3. PARTE 1: ASPECTOS ANALÍTICOS

Nesta parte do trabalho, serão apresentadas todas as análises instrumentais envolvidas neste projeto. Estas análises envolvem basicamente o uso de técnicas de HPLC-MS/MS e HPLC-UV-SPE-NMR. Uma descrição sobre o isolamento das toxinas de interesse também será abordada aqui.

3.1. Objetivos da parte analítica

Os principais objetivos envolvidos na parte analítica desta tese de doutorado foram:

- Obter as toxinas de interesse produzidas por espécies de *Fusarium* e *Alternaria*, cultivados em diferentes matrizes (milho, trigo, arroz...) através de metodologias já descritas na literatura e outras desenvolvidas no curso deste projeto;
- Analisar estas toxinas através de técnicas de separação (GC e HPLC) acopladas à Espectrometria de Massas (MS);
- Utilizar técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (^1H , ^{13}C e 2D NMR) para a elucidação estrutural das substâncias;
- Propor esquemas de fragmentação para as substâncias identificadas baseando-se em dados da literatura e, quando possível, através de comparação com padrões;
- Investigar a produção de possíveis análogos inéditos destas toxinas ainda não descritas na literatura;
- Quantificar os metabólitos de interesse usando HPLC-MS/MS via SRM visando a construção de curvas de produção destes metabólitos;

- Empregar a técnica hifenada HPLC-UV-SPE-NMR na análise de extratos de *Alternaria alternata*.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Materiais e equipamentos utilizados

Os principais equipamentos e acessórios utilizados foram:

- Espectrômetro de Massas QuattroLC (*triple-quadupole*, ESI/APCI, Micromass – Waters, Manchester, UK);
- Espectrômetro de Massas Quattro Micro (*triple-quadupole*, ESI/APCI, Micromass – Waters, Manchester, UK);
- Espectrômetro de Massas MasSpec (*double focusing MS*, Micromass – Waters, Manchester, UK);
- Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrometria de Massas (EI/CI, Fisons, Itália);
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear BRUKER (frequência de 200 MHz para o ^1H , Bruker, Rheinstetten, Germany);
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear BRUKER (frequência de 400 MHz para o ^1H , Bruker, Rheinstetten, Germany);
- Bomba LC10AD gradient pumps, SHIMADZU, Japão;
- Bomba Phoenix 40 Syringe Pump, CARLO ERBA, Itália;
- Detector de UV (PDA) para HPLC SPD-10A UV-Vis, SHIMADZU, Japão;
- Módulo de comunicação detector/computador em HPLC CBM-10A Communication BUS Module, SHIMADZU, Japão;
- Coluna para HPLC TECHNOLOGY Hypersil 15 ODS (250x4,6 mm), Thermo, USA;
- Coluna analítica C-18 Alltech, Inertisil (250 x 4,6 mm, 5 μm), Alltech, USA;
- Injetor para HPLC Auto Injector SIL-10ADVp, SHIMADZU, Japão;
- HPLC preparativo LC-8A SHIMADZU, Japão;
- Detector de UV (PDA) para HPLC SPD-16A UV-Vis, SHIMADZU, Japão;

- Coluna para HPLC preparativo Shim-Pak ODS(K) 250x30 mm, SHIMADZU, Japão;
- Sistema de HPLC-UV-SPE-NMR composto por HPLC Agilent Series 1100 (Agilent, Waldbroum, Germany), acoplado com unidade de SPE Prospekt II (Spark Holland, Emmen, The Netherlands), hifenado com Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear BRUKER AV 500 Ultrashield (11.7 T, Bruker, Rheinstetten, Germany) com *probe* para detecção inversa de 4mm HPLC-NMR (30 µL, Bruker, Rheinstetten, Germany);
- Coluna para HPLC LiChrosphere C-18 (250x4,6mm), Merck, Germany;
- Bomba auxiliar Knauer Smartline 1000 (Knauer, Berlin, Germany);
- Cartuchos para SPE automatizada HySphereResin GP 10-12 µm (Spark Holland, Emmen, The Netherlands);
- Sonicador BRANDSON 1510, BRANDSON, USA;
- Evaporador rotativo BÜCHI R-200 com banho de aquecimento BÜCHI B-490, Alemanha;
- Evaporador rotativo BÜCHI R-114 com banho de aquecimento BÜCHI B-480, Alemanha;
- Capela de fluxo laminar VECO (motor/germicida), VECO, Alaska, USA;
- BOD (Biochemical Oxygen Demand) TE-391, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- BOD (Biochemical Oxygen Demand) 347CD, Fanem, São Paulo, Brasil;
- Balança de precisão BTEC-210-A, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- Balança analítica BTEC 2200, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- PHmetro TEC-3MP, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- Agitador de tubos AP65, Phoenix, Brasil;
- Bomba de vácuo TE-0581, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- Microscópio NIKON Eclipse E200 equipado com câmera SAMSUNG Digital Câmera SCC-131, Japão;
- Microondas LG Smart Dial modelo MS 158DDA, LG, Brasil;
- Autoclave vertical PHOENIX AV75, Brasil;
- Moinho TE-631, Tecnal, Piracicaba, Brasil;
- Moinho TE-102, Tecnal, Piracicaba, Brasil.

Os principais materiais e solventes utilizados estão listados abaixo:

- Vidrarias em geral;
- Placas de Petri;
- Micropipetas WHEATON Variable Micropipette 50-200 μL e 200-1000 μL ;
- Seringa HAMILTON Microliter 25 μL ;
- Solventes destilados em geral;
- Solventes grau analítico em geral;
- Solventes grau HPLC MALLINCKRODT: Acetona, Acetonitrila, Clorofórmio, Diclorometano, Etanol, Hexano e Metanol;
- Solventes deuterados: piridina, clorofórmio, metanol e água (Cambridge);
- Solventes deuterados: acetonitrila, metanol, DMSO, acetona (deutero, germany);
- Agar bacteriológico SIGMA e Dextrose U.S.P. MALLINCKRODT GenAR (anidro e granular);
- Milho tipo “canjica” comercial da marca Yoki;
- Trigo comercial da marca Yoki;
- Arroz parbolizado *Uncle Beans*;
- Batatas francesas comerciais;
- Água purificada em aparelho MilliQ;
- Lâminas de bisturi;
- Seringas;
- Algodão;
- Fase estacionária Sílica (60-100 mash) ALDRICH, ODS, Alumina;
- Fase estacionária ODS (40-60 μm) ALDRICH;
- Fase estacionária Sephadex LH-20 (40-60 μm) ALDRICH;
- Cartuchos para SPE SUPELCO C₁₈ de 3 e 6 mL;
- Papel de filtro qualitativo (80g $\phi=12,5$ cm) SATELIT;
- Papel de filtro qualitativo (80g $\varnothing=12,5$ cm) SATELIT.

Os principais softwares utilizados foram:

- Programa de modelagem molecular HyperChem[®] 6.01 (Hypercube, USA);
- Masslynx 3.5 e 4.0, Waters, Manchester, UK;

- Chemwin 6.0, Biorad, California, USA;
- Photoshop 7.0.1, Adobe, USA;
- Origin 6.0 Professional, USA;
- SigmaPlot 7.0, SPSS Inc., USA;
- MestreNova 5.2.4, Mestrelab, Espanha.

3.2.2. Procedimentos Experimentais

3.2.2.1. Isolamento dos metabólitos de interesse

3.2.2.1.1. Obtenção das cepas fúngicas

A cepa de *Fusarium moniliforme*, isolado como endofítico de *Melia azedarach*, foi retirada da micoteca do laboratório GEBioMMi (Cepa 012). A cepa foi isolada de acordo com protocolo estabelecido no trabalho de Santos (2003)¹⁶⁶. As cepas de *Fusarium graminearum* foram obtidas junto ao Prof. Dr. José Antônio Martinelli do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e estão conservadas no laboratório GEBioMMi sob os códigos apresentados na TABELA 9. Como estas cepas se apresentaram muito semelhantes em termos do conteúdo de toxinas (estudo não mostrado aqui), optamos por trabalhar com a cepa 01-189, pois esta foi isolada de trigo.

A cepa de *Fusarium moniliforme*, isolado como patógeno de trigo, foi obtida junto ao Dr. Paulo Dilkin, do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria, no Rio Grande do Sul, e encontra-se no laboratório GEBioMMi sob o código 199.

TABELA 9. Cepas de *Fusarium graminearum* disponíveis em nossos laboratórios. Somente a cepa 01-186 foi selecionada para este trabalho.

Código do Isolado	Hospedeiro
01-105	Soja
01-156	Soja
01-186	Trigo
01-189	Soja
01-190	Soja
03-149	Aveia
03-256	Aveia

Uma das cepas de *Alternaria alternata*, foi isolada de tangerinas e cedida pelo Dr. Nelson Arno Wulff, do Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS. Infelizmente, por motivos diversos, esta cepa não foi conservada em nossos laboratórios. Outra cepa de *Alternaria alternata*, isolada como patógeno de trigo, foi gentilmente cedida pela pesquisadora Fernanda Rozanski e pelo Dr. Ariano Moraes Prestes, da EMBRAPA Trigo do Rio Grande do Sul, e esta cepa se encontra em no laboratório GEBioMMi com o código 198.

3.2.2.1.2. Cultivo fúngico da cepa de *Fusarium moniliforme* isolada como endofítico

Os fungos anteriormente citados foram cultivados em meio PDA (Batata-Dextrose-Ágar), preparado cozinhando-se 300g de batata cortada em cubos com casca em forno microondas com 500 mL de água destilada por 15 minutos (potência média). Em seguida, a solução formada foi filtrada. Neste filtrado, acrescentou-se 20g de dextrose e 15g de ágar. Esta mistura foi agitada por 1 min e o volume foi completado para 1000 mL, com água destilada. Este meio foi então autoclavado, juntamente com as placas de Petri por 15 min (1 atm, 121°C). Então, aguardou-se o resfriamento dos meios e das placas e nestas foi colocado 25 mL de meio em cada placa. Estas cepas mencionadas acima foram colocadas para crescer por 7 dias em BOD, a 25°C.

3.2.2.1.3. Inoculação do fungo *F. moniliforme* endofítico nos meios de cultura de interesse

A cepa de *Fusarium moniliforme* foi cultivada por 30 dias em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo aproximadamente 100g de trigo com 25% (v/m) de água destilada, previamente autoclavados duas vezes à 121°C por 40 minutos (intervalo de 24h). Foram cultivados 30 frascos de Erlenmeyer inoculados, além de 3 frascos controle, contendo somente meio de cultura.

Transcorridos 30 dias, foram aplicadas diferentes metodologias para a extração de zearalenonas^{40, 42, 44}, tricotecenos¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ e fumonisinas^{58, 170, 171} nos frascos contendo os isolados em trigo. Os extratos obtidos foram então monitorados por HPLC-UV e HPLC-MS, sem sucesso. Este mesmo protocolo foi repetido por mais 7 vezes, variando-se o meio de cultura. Ao invés de trigo, foram também utilizados milho, arroz, soja, aveia, cevada e sorgo, além do meio líquido Czapek. Nenhum destes meios, após aplicados diferentes métodos de extração, purificação e após analisados conforme mencionado acima, forneceram frações contendo as toxinas de interesse, tão pouco análogos não descritos na literatura. Assim, estes procedimentos não serão discutidos em detalhes aqui.

3.2.2.1.4. Cultivo e inoculação das cepas de *F. moniliforme* e *F. graminearum* isolados como patógenos de trigo

Estes fungos foram cultivados e inoculados da mesma maneira descrita nos itens 3.2.2.1.2. e 3.2.2.1.3., respectivamente, com exceção do inóculo em meio Czapek, que não foi realizado. Como o trabalho de bancada com os extratos obtidos através do cultivo destes fungos em trigo forneceram frações bastante promissoras no que diz respeito à presença das toxinas esperadas, os extratos obtidos em milho, arroz, soja, aveia, cevada e sorgo foram congelados as -20°C para análises futuras. Para cada extração, foi feito um novo cultivo fúngico, ou seja, as extrações não foram seqüenciais.

3.2.2.1.5. Extração e isolamento das substâncias da classe das zearalenonas

Transcorridos 30 dias, foi aplicada uma metodologia para extração de zearalenonas nos fungos cultivados em trigo. A extração foi realizada adicionando-se 2 x 200 mL de acetato de etila em cada frasco de análise, seguida por 1 x 200 mL de metanol, sempre filtrando-se os extratos por gravidade. Estes extratos foram reunidos, pesados e analisados por cromatografia em camada delgada (TLC). Após esta etapa, eles foram submetidos à separação cromatográfica em coluna de bancada (CC) e cromatografia em camada delgada preparativa (PTLC), conforme indicado nas FIGURA 20 e FIGURA 21.

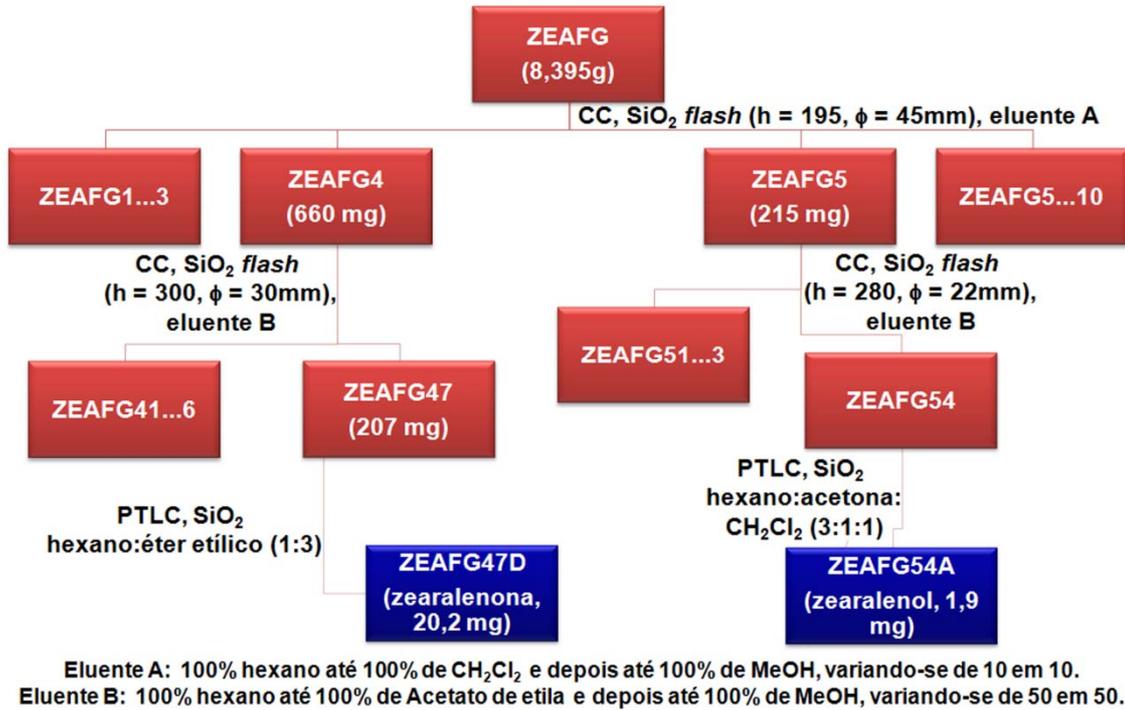


FIGURA 20. Processo para o isolamento das substâncias da classe das zearalenonas a partir dos extratos de *Fusarium graminearum*.

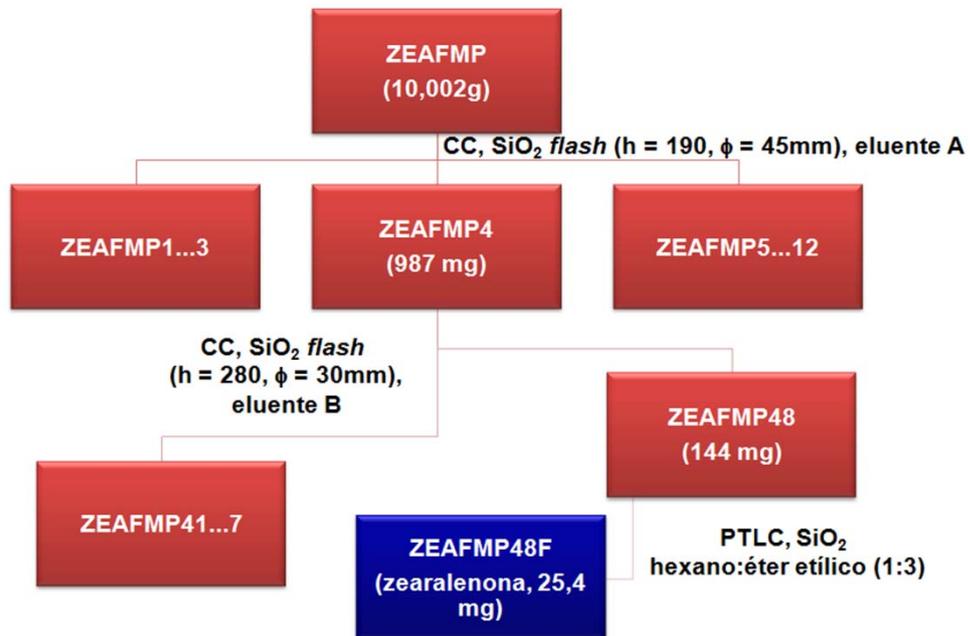


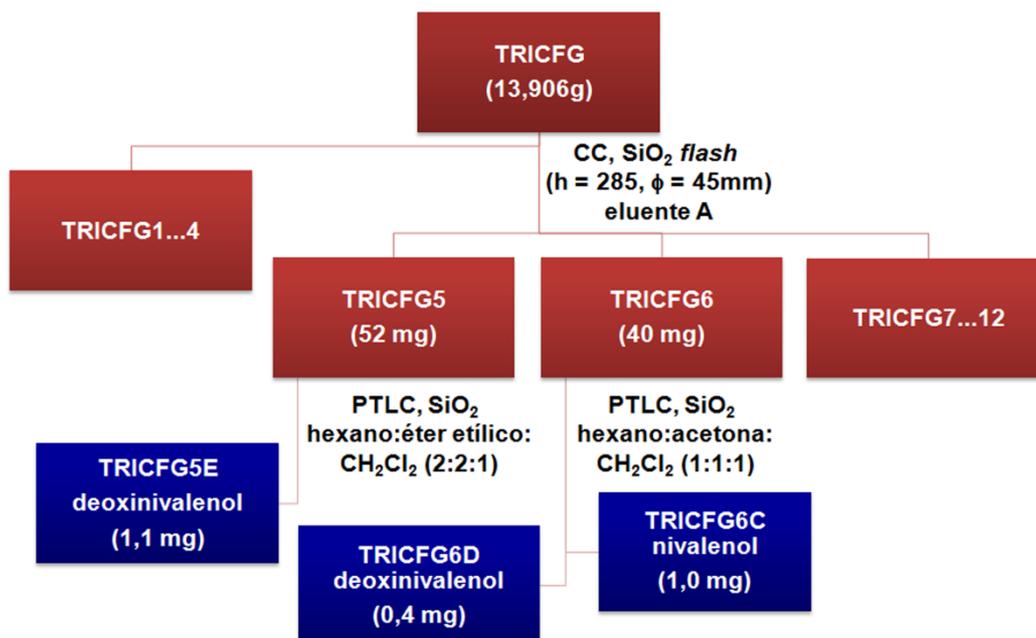
FIGURA 21. Processo para o isolamento das substâncias da classe das zearalenonas a partir de *Fusarium moniliforme* patogênico.

Todas as frações obtidas foram monitoradas por TLC e reunidas. Após isso, elas foram analisadas por ^1H NMR.

3.2.2.1.6. Extração e isolamento das substâncias da classe dos tricotecenos

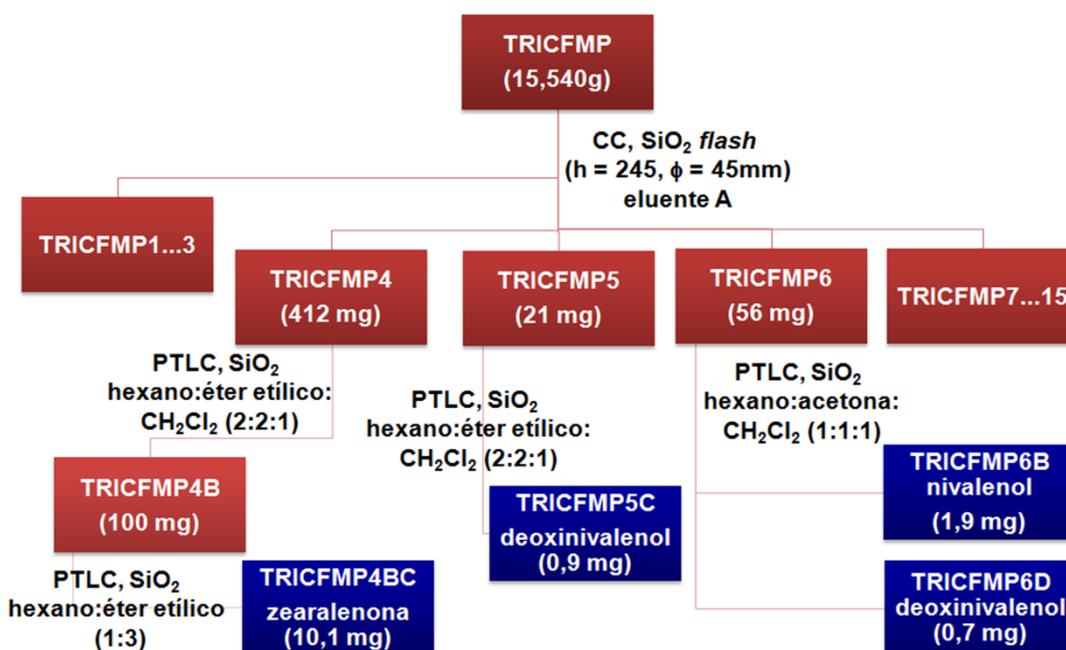
Em cada um dos frascos foram adicionados 200 mL de acetonitrila:H₂O (84:16)¹⁶⁸ e estes foram mantidos em repouso por 48h. Esta solução foi então filtrada a vácuo e foram adicionados novamente 200 mL de acetonitrila:H₂O (84:16) ao material residual. Uma nova filtração foi realizada e estes dois extratos foram reunidos e o solvente foi evaporado com auxílio de rotaevaporador.

Na seqüência, todos os extratos obtidos foram pesados e submetidos à cromatografia em camada delgada (TLC). Após esta etapa, eles foram submetidos a separação cromatográfica em coluna de bancada (CC) e cromatografia em camada delgada preparativa (PTLC), conforme indicado nas FIGURA 22 e FIGURA 23. Todas as frações obtidas foram monitoradas por TLC e reunidas. Após isso, elas foram analisadas por ^1H NMR.



Eluente A: 100% hexano até 100% de acetato de etila e depois até 100% de MeOH, variando-se de 10 em 10.

FIGURA 22. Procedimento para a obtenção de tricotecenos em extratos de *Fusarium graminearum*.



Eluente A: 100% hexano até 100% de Acetato de etila e depois até 100% de MeOH, variando-se de 10 em 10.

FIGURA 23. Procedimento para a obtenção de tricotecenos em extratos de *Fusarium moniliforme* isolado como patógeno.

3.2.2.1.7. Aplicação do método de extração e purificação de fumonisinas

Em cada um dos frascos foram adicionados 200 mL de MeOH:H₂O (3:1)⁵³ e os mesmos foram mantidos em repouso por 48h. Esta solução foi então filtrada a vácuo e foram adicionados novamente 200 mL de MeOH:H₂O (3:1) ao material residual. Uma nova filtração foi realizada e estes dois extratos foram reunidos e o solvente foi evaporado com auxílio de rotaevaporador. O resíduo aquoso foi congelado e após 24h este foi liofilizado. Este novo extrato (26,890g) foi trabalhado usando colunas de SiO₂, sephadexTM LH-20 e o ODS. Entretanto, nenhuma das substâncias de interesse foi obtida. Assim, um novo cultivo, sob as mesmas condições foi feito e repetiu-se o protocolo de extração, agora usando MeOH:H₂O (9:1), obtendo-se 20,126g de extrato. Procedimentos de purificação foram novamente executados, sem sucesso. Assim, estes procedimentos não serão detalhados aqui.

3.2.2.1.8. Cultivo e inoculação das cepas de *Alternaria alternata*

O cultivo fúngico foi realizado da mesma maneira descrita no item 3.2.2.1.2. A inoculação foi feita em 35 frascos de Erlenmeyers de 500 mL contendo 70g de trigo com 50% (v/m) de água destilada, previamente autoclavados por 2 x 45 min, com intervalo de 24 horas. 5 frascos controle, contendo somente trigo, foram utilizados como branco.

3.2.2.1.9. Extração e isolamento dos alternariols obtidos a partir de cepas de *Alternaria alternata*

Após 30 dias de cultivo, os fungos do gênero *Alternaria* cultivados em trigo foram extraídos utilizando-se 2 x 200 mL de EtOH:Acetato (9:1). Estes extratos foram filtrados e evaporados em evaporador rotativo. Os extratos obtidos

de ambas as cepas cultivadas, *A. alternata* isolada de tangerinas (28,833g) e isolada de trigo (34,558g) foram analisados por TLC e HPLC. Devido ao perfil idêntico dos dois extratos, eles foram reunidos para a continuidade dos experimentos. Assim, este novo extrato (63,181g) foi submetido a separação cromatográfica em coluna de bancada (CC), cromatografia em camada delgada preparativa (PTLC) e HPLC preparativo, conforme indicado nas FIGURA 24.

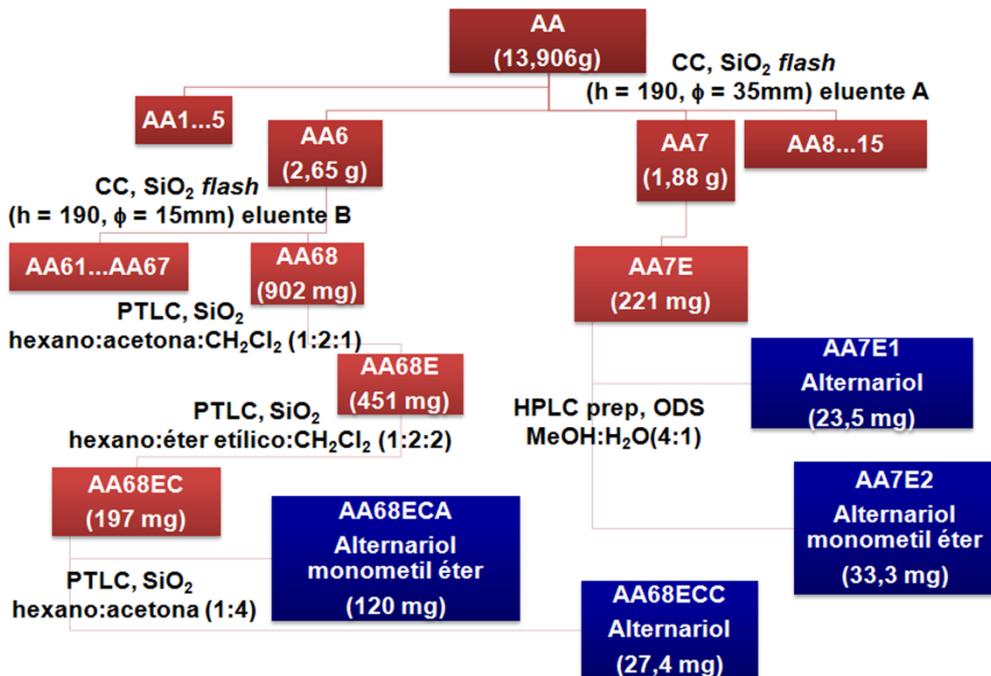


FIGURA 24. Procedimento para o isolamento das toxinas produzidas por *Alternaria alternata*.

Todas as frações obtidas foram monitoradas por TLC e reunidas. Após isso, elas foram analisadas por ^1H NMR para que os próximos passos fossem determinados.

3.2.2.2. Análise dos extratos de *Fusarium* por HPLC-MS/MS envolvendo perda neutra visando a detecção de fumonisinas

Com o emprego do padrão de fumonisina B₁ (57) (98%, SIGMA, USA), foram desenvolvidas condições de análise por HPLC-MS/MS para este

composto. Inicialmente, uma solução padrão (50 $\mu\text{g/mL}$) deste composto foi preparada em metanol e injetada diretamente no espectrômetro de massas para sintonia do equipamento. As temperaturas do bloco da fonte e do *probe* foram mantidas em 120°C e 350°C, respectivamente. O capilar foi mantido em 3,5 KV e as voltagens do cone e do extrator foram mantidas, respectivamente, em 43 e 5 V. As lentes para massa baixa e para massa alta de ambos os quadrupolos foram mantidas em 7 para facilitar a entrada de íons nestes analisadores e conseqüentemente aumentar a sensibilidade. A energia de colisão foi mantida em 17 eV. Foram monitoradas simultaneamente duas perdas neutras: 563 e 158 Da. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantida em 3.75e^{-3} mBar durante todos os experimentos.

O método analítico envolveu o uso de uma coluna phenomenex C-18 luna (250 x 4,6 mm, 5 μm), empregando-se um gradiente onde a porcentagem de acetonitrila (bomba B) foi mantida em 60% durante os 7 primeiros minutos, variada de 60 a 95% de 7 a 17 min e mantida constante em 95% até 40 min. Na bomba A foi utilizado apenas água. O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min com divisor de fluxo na proporção de 4:1 (descarte:massas) e em cada análise foram injetados 40 μL da solução padrão.

3.2.2.3. Estudo dos mecanismos de fragmentação das zearalenonas

Baseando-se em parâmetros de análise previamente desenvolvidos no grupo (energia do gás de colisão, temperatura dos *probes*,...), foram realizados experimentos para tentar verificar qual o mecanismo de fragmentação mais provável da toxina zearalenona (**14**) e de alguns de seus análogos. Para isso, a estratégia utilizada foi a tentativa de troca dos hidrogênios mais ácidos desta molécula por átomos de deutério. Assim 3 diferentes protocolos de reações foram elaborados. Estes protocolos estão apresentados na FIGURA 25. Ao final dos protocolos, todas as amostras foram analisadas com os mesmos parâmetros do

espectrômetro. As temperaturas da fonte e do *probe* de ESI foram mantidas respectivamente em 100°C e 250°C. A voltagem do capilar foi sintonizada em 2,80 KV e as voltagens do cone e do extrator foram mantidas em 25 e 4 V, respectivamente. O filtro de RF foi mantido em 0,3 V e as lentes foram sintonizadas em 16 em ambos os quadrupolos para uma resolução unitária de massa. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantida em $4.50e^{-3}$ mBar durante todos os experimentos.

Experimentos de MS/MS foram realizados por ESI no modo negativo utilizando 25 eV, utilizando-se Argônio como gás de colisão. O solvente empregado como fase móvel foi acetonitrila sem nenhum aditivo. As demais toxinas, isto é, β -zearalenol (**17**) e 4-metoxizearalenone (**20**), foram somente submetidos ao protocolo 1 de análise.

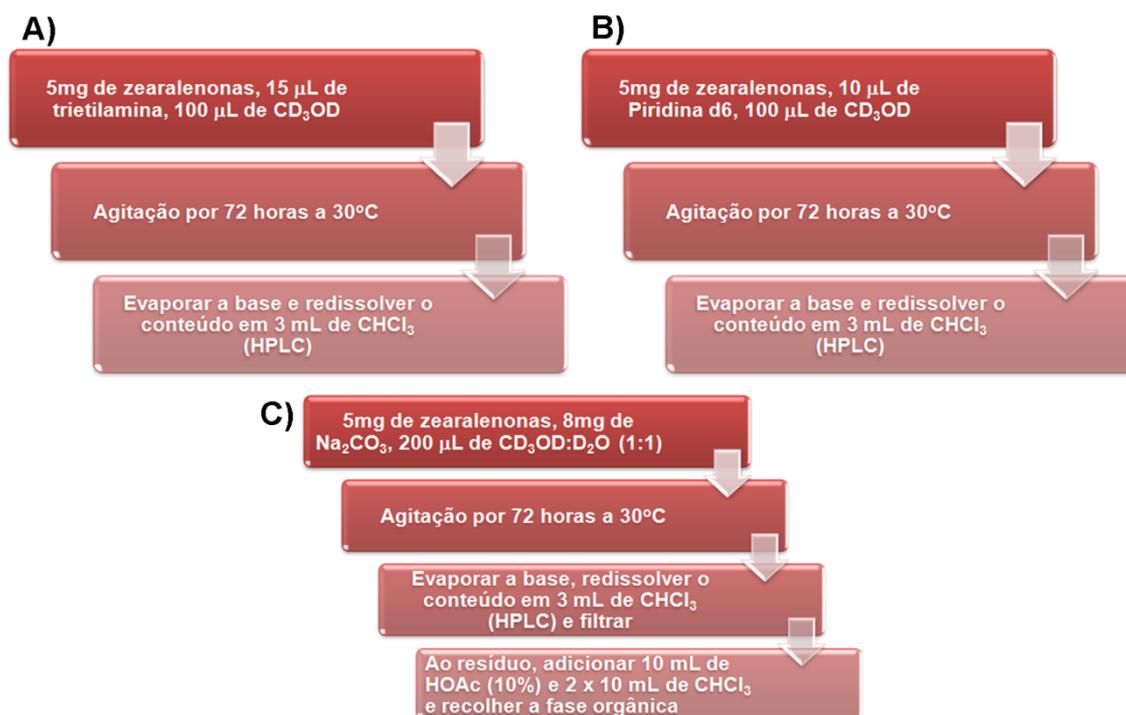


FIGURA 25. Organogramas dos protocolos para deuteração da zearalenona (**14**). A) protocolo 1; B) protocolo 2; C) protocolo 3.

Os cálculos computacionais envolveram simulação de dinâmica molecular e otimização de geometria, conforme recomendado por Vessecchi et al. (2008)¹³⁵.

3.2.2.4. Quantificação da zearalenona e construção da curva de produção deste metabólito obtida por *Fusarium moniliforme* endofítico, *F. graminearum* e *F. moniliforme* patogênicos

3.2.2.4.1. Condições de ionização do MS

As temperaturas da fonte e do *probe* de ESI foram mantidas respectivamente em 110°C e 320°C. A voltagem do capilar foi sintonizada em 3,20 KV e as voltagens do cone e do extrator foram mantidas em 35 e 5 V, respectivamente. O filtro de RF foi mantido em 0,8 V e as lentes foram sintonizadas em 6 em ambos os quadropolos. O multiplicador foi deixado em 870 (unidades arbitrárias). A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantida em $3.50e^{-3}$ mBar durante todos os experimentos. As transições monitoradas foram 317→175 (quantificação) e 317→189 (monitoramento), ambas obtidas com 23 eV. Todas as etapas de validação descritas no item 1.4.8., com exceção da reprodutibilidade e da robustez, foram realizadas. Ao longo da discussão dos resultados, estes parâmetros serão devidamente apresentados.

3.2.2.4.2. Curva de produção da zearalenona

Para a construção da curva de produção de zearalenona (14), os fungos *Fusarium moniliforme* isolado como endofítico, *F. graminearum* e *F. moniliforme* isolados como patógenos foram crescidos em PDA como descrito no item 3.2.2.1.1. e inoculados em trigo conforme descrito no item 3.2.2.1.2. Entretanto, triplicatas de cada fungo foram extraídas em 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e

40 dias. Outros 3 frascos foram mantidos como controle (somente meio de cultura) ao longo de todo o experimento. Outros 3 frascos controle foram utilizados para o cálculo da recuperação em zero dias. Além disso, 3 frascos contendo trigo inoculado com o fungo *F. graminearum* com 20 dias e outros 3 com 40 dias foram utilizados para o cálculo da recuperação ao longo do tempo de cultivo total.

Os extratos foram obtidos de acordo com extração descrita no item 3.2.1.1.2. Após extraídos todos os pontos da curva e evaporado o solvente, uma nova extração foi realizada adicionando-se 1 mL de acetato de etila a 100 mg de extrato. Esta mistura foi agitada por 10 segundos e mantida em repouso por 10 min. Na sequência, o sobrenadante foi recolhido e uma nova extração com 1 mL de metanol foi realizada. A nova mistura foi novamente agitada por 10 segundos e mantida em repouso por 3 minutos. Então, uma filtração por gravidade foi realizada. Os extratos obtidos com acetato de etila e metanol foram reunidos, evaporados em capela convencional e na sequência reconstituídos em 1 mL da fase móvel.

Os extratos obtidos no item 3.2.1.1.4. que foram inicialmente congelados sofreram o processo de extração mencionado acima e foram analisados utilizando-se o método validado em trigo.

3.2.2.5. Quantificação de alternariol e alternariol monometil éter em tangerinas (*Citrus reticulata*) sintomáticas à Mancha Marrom de Alternária

3.2.2.5.1. Obtenção do material vegetal

As tangerinas sintomáticas e assintomáticas à doença Mancha Marrom de Alternária foram coletadas na cidade de Aguaí, localizada no centro do estado de São Paulo no mês de abril de 2004. Frutos saudáveis também foram coletados em um supermercado na cidade do Recife, capital do estado de

Pernambuco, região onde a doença aqui estudada ainda não foi encontrada. As tangerinas utilizadas durante este experimento foram manualmente descascadas com o auxílio de uma faca de forma a separar o albedo do flavedo. Esses dois materiais foram desidratados em estufa sob temperatura de 45°C durante três dias e em seguida esse material foi moído em moinho de facas até a forma de pó.

3.2.2.5.2. Extração e *clean-up* da amostra

O procedimento utilizado para a extração e preparo de amostra foi adaptado de LAU et al. (2003)¹⁷². Assim, 200 mg dos tecidos flavedo e albedo foram extraídos com 10 mL de acetonitrila contendo 1% de ácido acético. Esta suspensão foi mantida em banho de ultra-som durante 5 min e em seguida filtrada. Tanto o papel de filtro quanto o funil analítico utilizados no procedimento de filtração foram em seguida lavados três vezes com 2 mL do mesmo solvente de extração. Logo após, o solvente foi evaporado sob fluxo contínuo de nitrogênio com temperatura controlada de 58 °C e o resíduo foi reconstituído com 1,5 mL de acetato de etila.

O preparo da amostra constituiu de *clean-up* aplicando o extrato reconstituído em acetato de etila foi eluído em cartucho de SPE contendo fase estacionária aminopropil previamente condicionado com 6 mL de diclorometano. Em seguida, o cartucho foi lavado com 2 mL de acetona e com 2 mL de acetonitrila. Para a eluição dos alternarióis, foram utilizados 4 mL de acetonitrila com 1% de ácido acético. Em seguida esta fração foi concentrada sob fluxo de nitrogênio e reconstituída em 1 mL de acetonitrila:água (4:1). Todos os solventes utilizados tanto na extração quanto no preparo da amostra foram de grau HPLC.

3.2.2.5.3. Condições instrumentais para análise por HPLC-MS/MS

O método cromatográfico foi desenvolvido utilizando-se uma coluna analítica C-18 Alltech, Inertisil (250 x 4.6 mm, 5 μ m). A vazão da fase móvel (metanol:água 4:1) foi de 0.95 mL/min em método isocrático de análise, onde a entrada da amostra no espectrômetro de massas foi ajustada com o auxílio de um splitter para a proporção de 2:1 (descarte:massas). As amostras foram ionizadas utilizando uma fonte de ESI operando no modo negativo. As temperaturas do bloco da fonte e do probe foram ajustadas em 100 °C e 300 °C, respectivamente. Os fluxos de nitrogênio do nebulizador e do gás de desolvatação foram ajustados em 20 e 500 L/h, respectivamente. A voltagem do capilar foi mantida em 3.0 kV durante todo o experimento. Para os experimentos de SRM (foram selecionadas duas transições para cada analito: Para o alternariol foram selecionadas a transições 257 \rightarrow 213 (quantificação) e 257 \rightarrow 215 (monitoramento), mantendo o cone em 25 V e a energia de colisão em 25 eV. Para o alternariol monometil éter (77), foram selecionadas as transições 271 \rightarrow 256 (quantificação) e 271 \rightarrow 228 (monitoramento), mantendo o cone a 35 V e a energia de colisão em 30 eV. O parâmetro de *dwell-time* e *inte-scan delay* também foram otimizados visando obter maior sensibilidade para os analitos. Dessa forma, variou-se este parâmetro de 0,1 até 0,8 s (com acréscimo de 0,1 por análise) e o *inter-scan delay* de 0,005 até 0,05 s (com acréscimo de 0,005 por análise). Os valores que implicaram em melhor sensibilidade foram registrados através dos valores 0,3 e 0,01 respectivamente. A pressão do gás de colisão (argônio) foi mantido em $5.70 \cdot 10^{-3}$ mBar durante todos os experimentos.

Extratos de *Alternaria alternata* cultivada em trigo, milho e arroz também foram analisadas ao final da validação do método. Estes extratos foram preparados da mesma forma indicada na validação da zearalenona (item 3.1.2.4.)

3.2.2.6. Análise dos extratos de *A. alternata* por HPLC-UV-SPE-NMR

3.2.2.6.1. Cultivo fúngico e obtenção dos extratos

O fungo *Alternaria alternata* foi cultivado em 15 frascos contendo 70g de trigo, todos com 50 % (v/m) de água destilada, por 25 dias a 25°C. Cada frasco foi extraído com 200 mL de acetato de etila por duas vezes. Este extrato foi então evaporado até a secura. Primeiramente, 2mg deste extrato foram dissolvidas em 1 mL de metanol para a realização dos experimentos envolvendo HPLC-UV-SPE-NMR. Na sequência, 20 mg deste mesmo extrato foram dissolvidos em uma proporção de acetonitrila : água (7:3) e aplicados em cartucho de SPE de 6 mL contendo ODS como fase estacionária. Então, este cartucho foi lavado na sequência com 6 mL de acetonitrila : água (1:9) – fração MAC10 –, 10 mL de acetonitrila : água (1:1) – fração MAC50 – e 8 mL de acetonitrila pura – fração MAC100. Estas frações foram então analisadas por HPLC-UV e posteriormente por HPLC-UV-SPE-NMR como descrito a seguir. Entretanto, somente a fração MAC50 foi trabalhada, como será visto adiante.

3.2.2.6.2. Instrumentação empregada

Todas as medidas foram realizadas em um equipamento de 11.7 Tesla (500,13 MHz para frequência do hidrogênio), marca BRUKER, modelo AV 500 Ultrashield. O sistema de HPLC-SPE-NMR é composto de por um cromatógrafo Agilent Serie 1100 com uma bomba quaternária (Agilent G1311A), auto-injetor (Agilent G1313A) e forno. A sonda CLAE-RMN de 4mm, com volume de detecção reduzido (30 µL), foi utilizada em conjunto com uma unidade SPE Bruker/Spark Prospekt II da SparkHolland (Holanda) para a concentração dos compostos. A fase estacionária dos cartuchos empregados foi a HySphereResin GP 10-12 µm, também da SparkHolland (Holanda). Esta fase é composta de uma resina polimérica de polidivinil-benzeno, possuindo um caráter hidrofóbico. Após a corrida cromatográfica, cada banda cromatográfica de interesse foi recolhida individualmente e alocada em um cartucho onde, após secagem com nitrogênio, foi então redissolvido em 250 µL de acetonitrila deuterada (Deutero, Alemanha) e enviado ao espectrômetro para realização das medidas espectroscópicas.

3.2.2.6.3. Condições utilizadas no desenvolvimento da corrida cromatográfica e nas análises por NMR

Todas as corridas de HPLC foram realizadas com eluição gradiente utilizando-se água e acetonitrila como fase móvel, ambos solventes contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). O fluxo empregado foi de 1 mL/min e a detecção por UV foi realizada em 256 e 312 nm. Além disso, em cada análise foram injetados 20 μ L do extrato ou fração. Durante o trapeamento dos analitos de interesse, uma bomba Knauer com uma vazão adicional de 2,5 mL/min de H₂O com 0,1 % TFA foi utilizada para diminuir força do solvente e garantir que os compostos ficassem retidos à fase estacionária dos cartuchos de SPE.

Todos os compostos trapeados no sistema de SPE foram eluídos com acetonitrila deuterada (Deutero, Alemanha). Os espectros de hidrogênio foram adquiridos utilizando-se a seqüência de pulso zg30 (Topspin v.2.0. Bruker, Alemanha). O tempo de espera entre cada aquisição (d1) foi de 1 s e a duração do pulso para hidrogênio (p1) de 8,5 μ s, resultando em um tempo de aquisição de 2,64 s. A janela espectral SWH foi de 6613,75 Hz e foram adquiridos 32 scans para cada banda cromatográfica coletado. Após a obtenção dos espectros o processamento foi realizado com *zero filling* (SI \geq TD) e multiplicação exponencial (lb) de 0,3 Hz.

3.3. Resultados e Discussões

3.3.1. Isolamento das substâncias de interesse

No início deste trabalho, foi estudado o metabolismo de cepas de fungos da espécie *Fusarium moniliforme*, isolados como endofítico de *Melia azedarach*, e *Alternaria alternata*, isolada como patógeno de tangerinas e de trigo, com o intuito principal de isolar as toxinas clássicas produzidas por estes microrganismos, ou seja, aquelas já descritas na literatura. Para isso, estes fungos foram cultivados em diferentes meios de cultura e empregou-se inúmeros métodos de extração já descritos na literatura e alguns novos propostos primeiramente neste trabalho. Estes métodos foram eficientes para os fungos do gênero *Alternaria*, como será discutido mais adiante. Entretanto, durante um período de 17 meses, foram testados meios de cultura sólidos contendo trigo, milho, arroz, sorgo, cevada e aveia, na tentativa de se obter as toxinas clássicas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, isto é, zearalenonas, tricotecenos e fumonisinas. Meios de cultura líquidos como o meio Czapek também foram testados. Diferentes procedimentos para a extração destas toxinas foram empregados também, sem sucesso. Estes experimentos apenas renderam a identificação e o isolamento de substâncias comumente encontradas no trabalho com química de fungos. Estas substâncias estão apresentadas na FIGURA 26 e sua determinação estrutural não será discutida aqui.

Após este período dedicado a busca pelas toxinas produzidas por *Fusarium moliforme*, decidiu-se então solicitar uma cepa do fungo *Fusarium graminearum*, um patógeno bastante conhecido, e também uma cepa do próprio *Fusarium moliforme*.

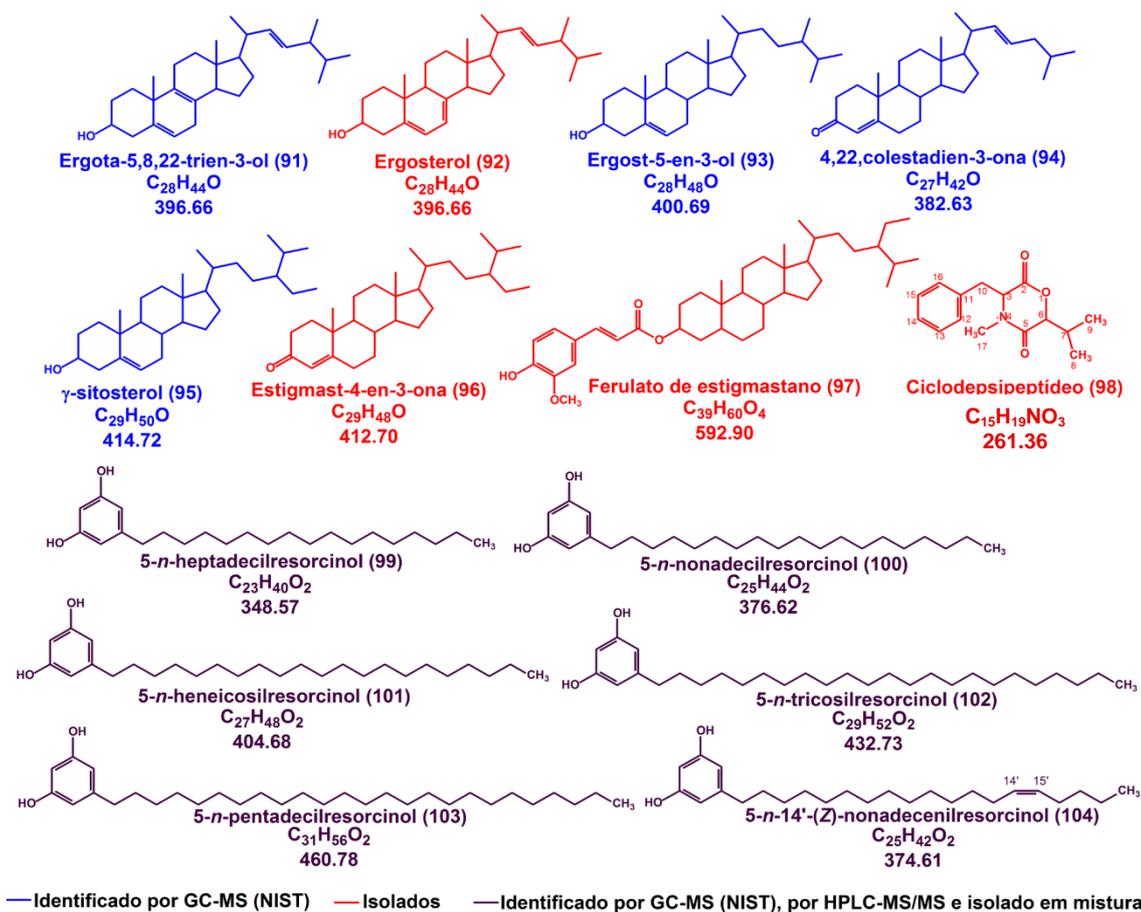


FIGURA 26. Substâncias identificadas e isoladas em extratos de *Fusarium*. Os compostos 91-97 também forma isolados ou identificados em extratos de *Alternaria*.

Após o cultivo destes microrganismos em grãos e posterior extração com protocolo desenvolvido no laboratório GEBioMMi, foram obtidos os primeiros indícios de que estes fungos eram hábeis produtores das toxinas de interesse neste trabalho. Após os fracionamentos descritos no item 3.1.2.1.5., foram obtidas as frações ZEAFG47D e ZEAFFMP48F, cujo os espectros de 1H NMR se mostraram idênticos e estão apresentados na FIGURA 27.

Através da análise deste espectro podemos observar a presença de 1 singleto intenso em δ 12,14 ppm integrando para 1 hidrogênio, indicando a presença de uma hidroxila quelada em um sistema aromático. Na sequencia, pode-se identificar um duplo dubleto (dd) em δ 7,00 ppm ($J^3 = 15,3$ Hz e $J^4 = 1,7$ Hz), também integrando para 1 hidrogênio, que possivelmente é referente a um hidrogênio olefínico em um sistema conjugado, devido ao seu alto valor de deslocamento químico. Observando-se o espectro de COSY 45° (FIGURA 28 e

FIGURA 29), este sinal exibe acoplamento *trans* com 1 hidrogênio em δ 5,67 ppm, um duplo duplo dubleto (ddd), e com o multiplete (m) em δ 2,34 – 2,44 ppm. Além disso, este sinal em δ 7,00 ppm exibe acoplamento no espectro de gHSQC com o carbono em δ 133,4 ppm (FIGURA 30 e FIGURA 31), reforçando atribuição realizada.

O duplo duplo dubleto (ddd) em δ 5,67 ppm, além do acoplamento *trans* com o dd em δ 7,00 ppm, apresenta outros dois acoplamentos, com $J = 10,2$ Hz e 4,1 Hz. Na aplicação do espectro de COSY, é possível verificar que estes acoplamentos ocorrem com o multiplete em δ 2,34 – 2,44 ppm (integral para 1 hidrogênio) e com o multiplete em δ 2,10 – 2,20 ppm (integral para 2 hidrogenios), respectivamente, sugerindo o prolongamento de uma cadeia carbônica. Na ampliação do espectro de gHSQC (FIGURA 31), é possível notar que este sinal apresenta acoplamento com o carbono em δ 132,3 ppm.

Na sequência de atribuições, o multiplete em δ 2,34 – 2,44 ppm apresenta acoplamento com o multiplete em δ 2,10 – 2,20 ppm e com o multiplete em δ 2,16 – 2,24 ppm (integral para 2 hidrogenios), de acordo com a ampliação do espectro de COSY 45° apresentado na FIGURA 32. O hidrogênio referente a este sinal está acoplado ao carbono em δ 31,0 ppm (FIGURA 33).

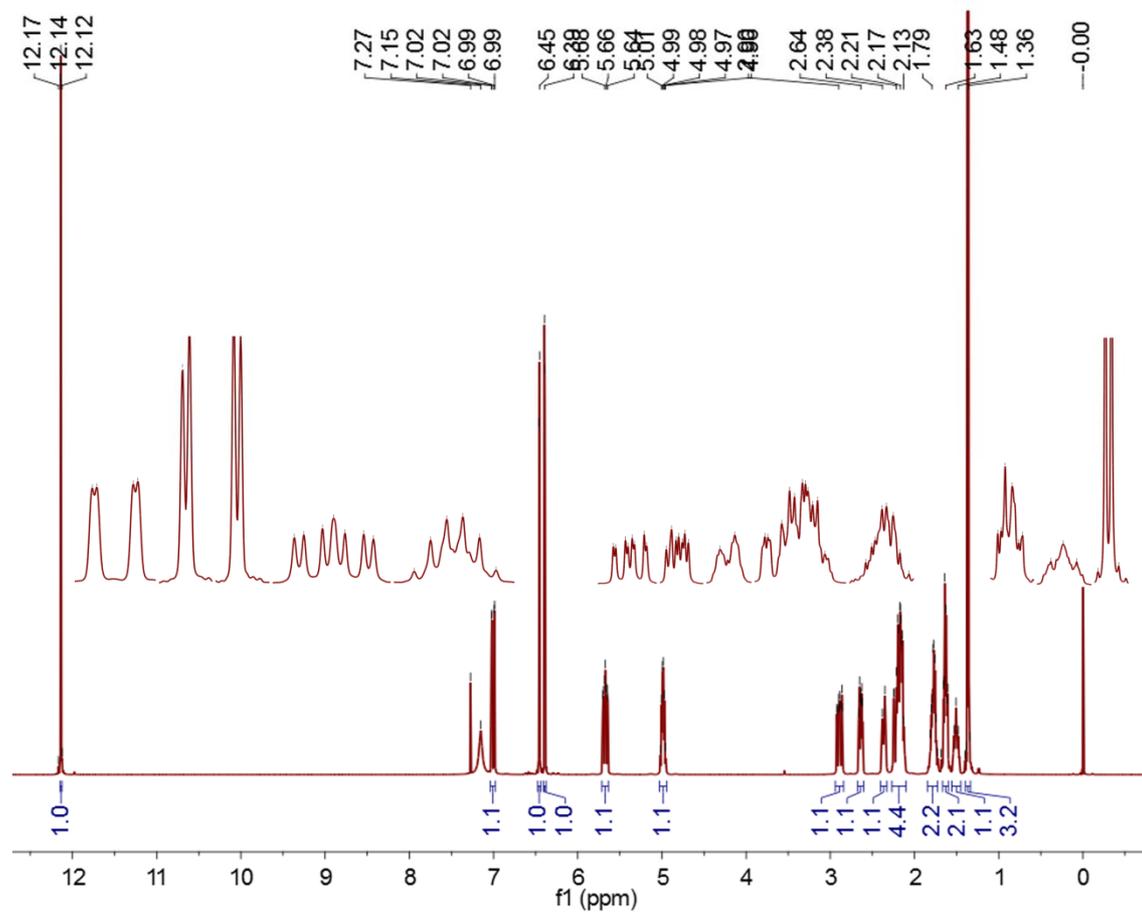


FIGURA 27. Espectro de ^1H NMR da fração ZEAFG47D (Zearalenona (**14**)), (CDCl_3 , 500 MHz).

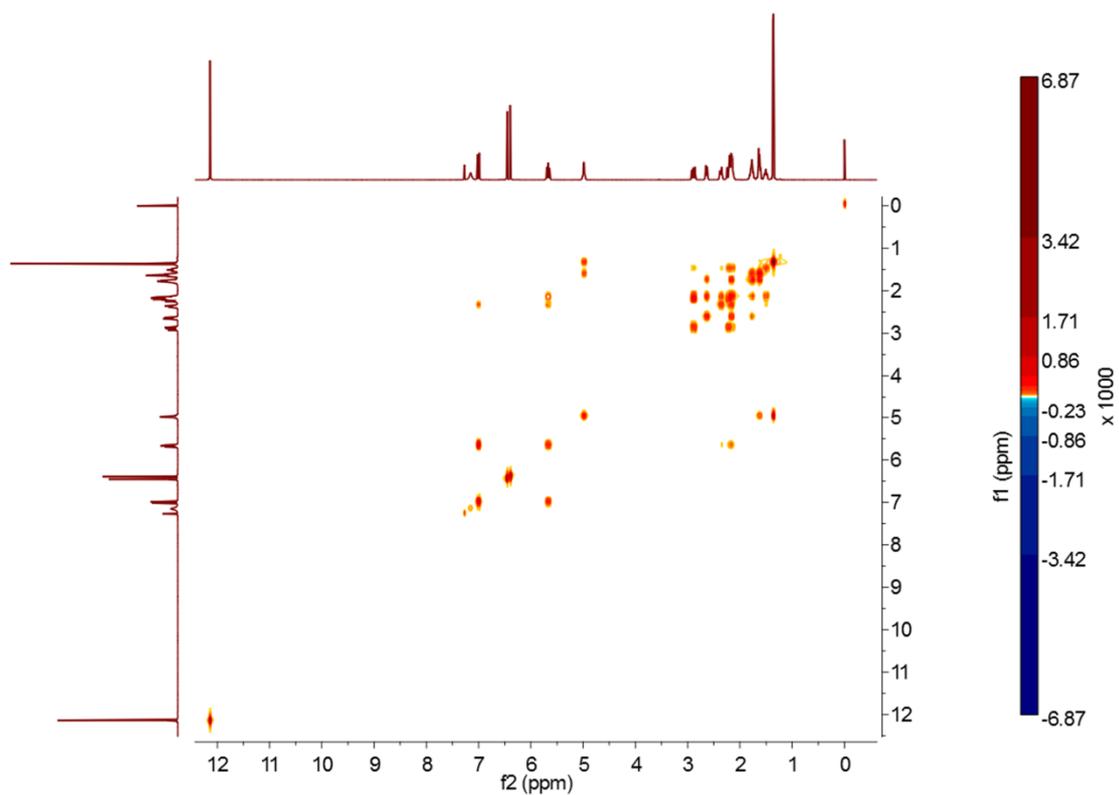


FIGURA 28. Espectro de COSY 45° da fração ZEAFG47D (zearalenona (**14**)), (CDCl₃, 500 MHz).

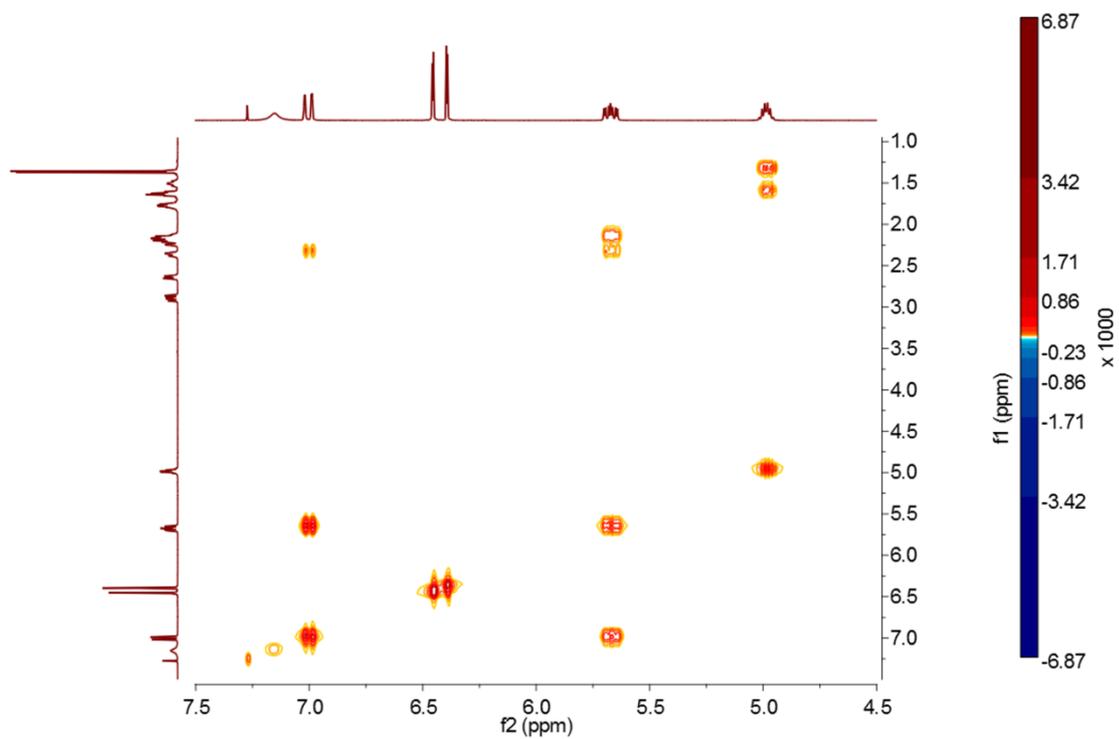


FIGURA 29. Ampliação da FIGURA 28.

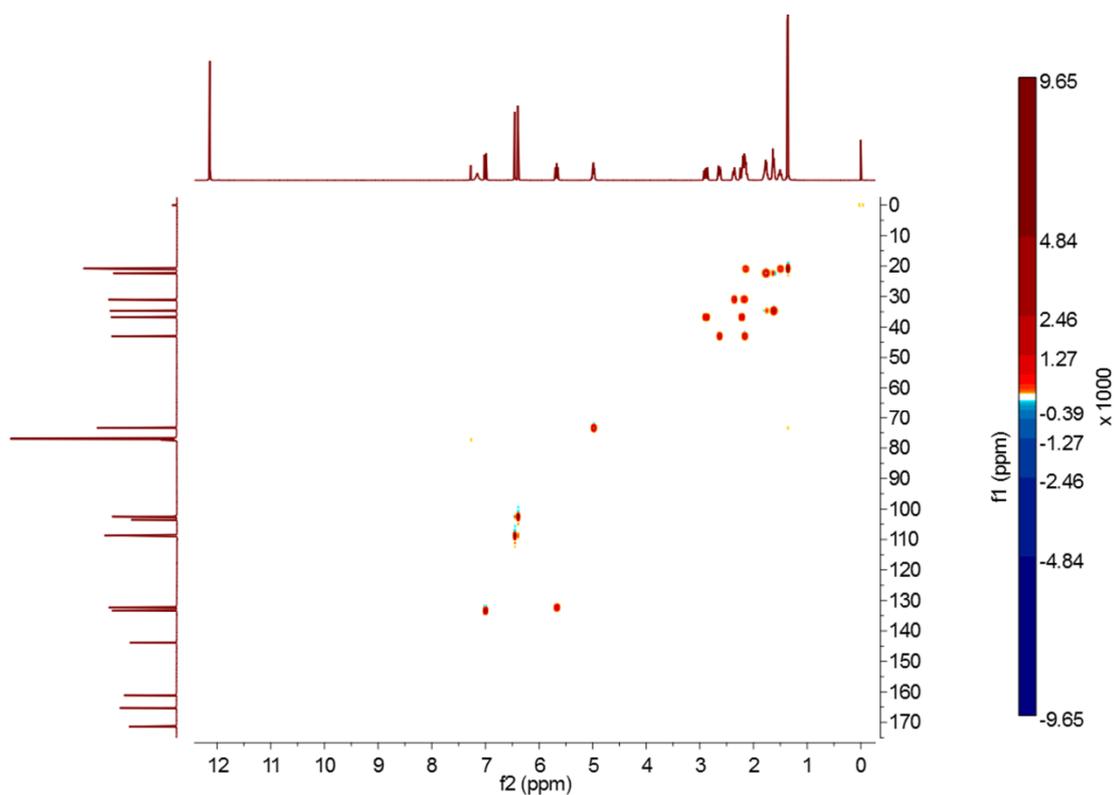


FIGURA 30. Espectro de gHSQC da fração ZEAFG47D (Zearalenona (**14**)), (CDCl_3 , 500 MHz, 125 MHz).

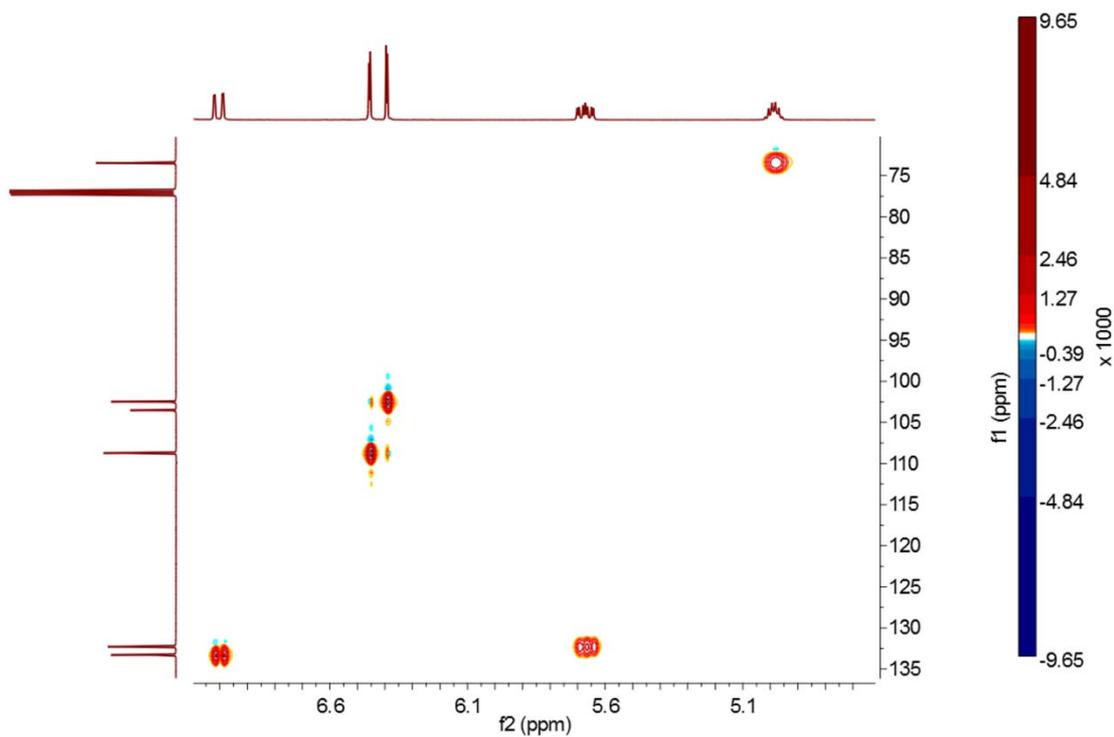


FIGURA 31. Ampliação da FIGURA 30.

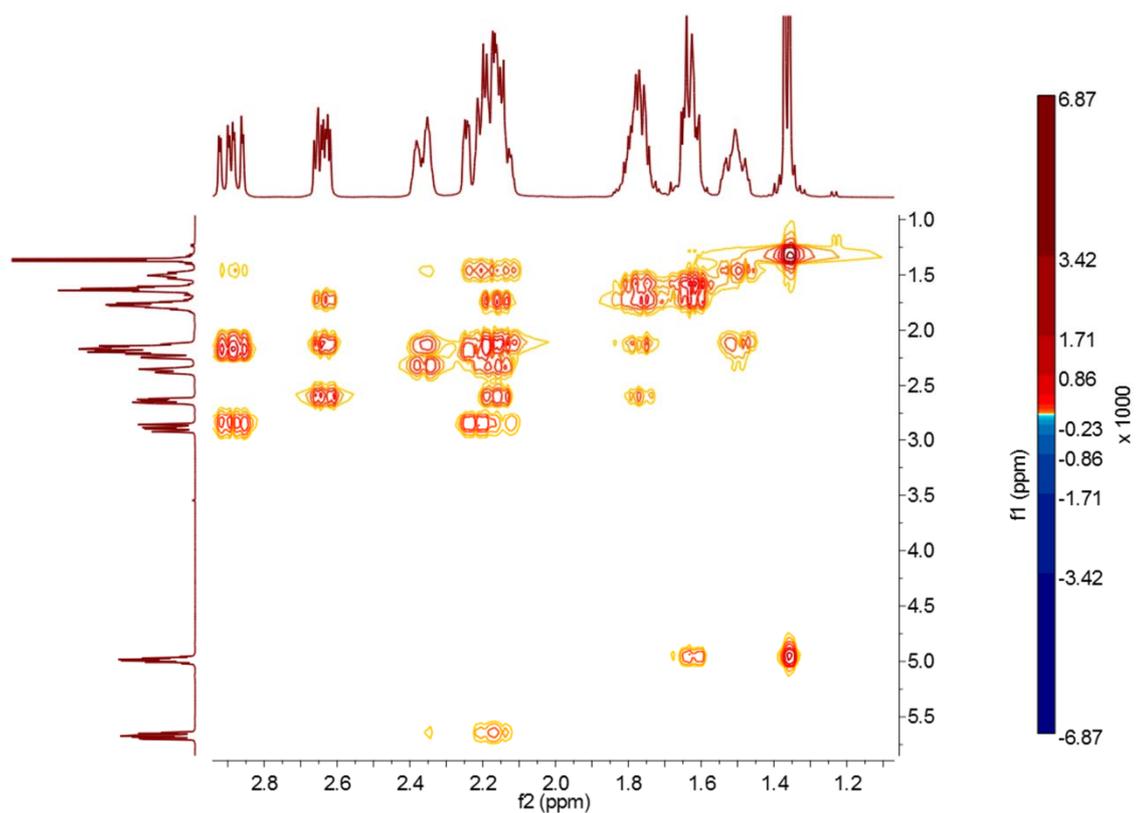


FIGURA 32. Nova ampliação da FIGURA 28.

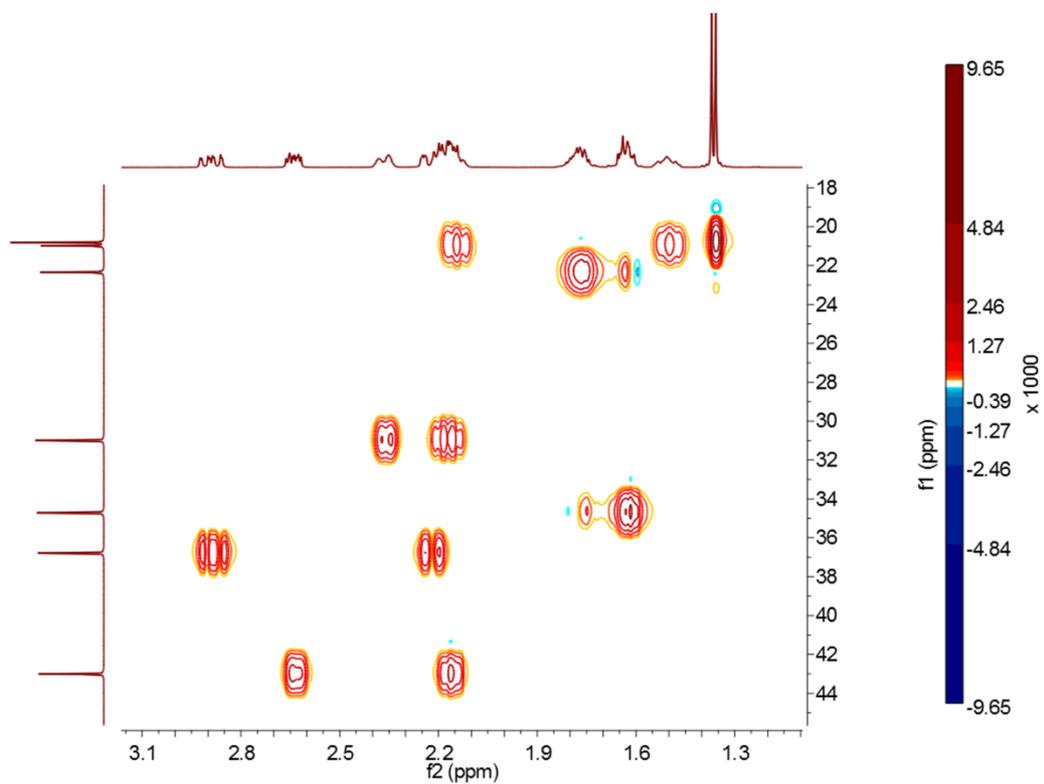


FIGURA 33. Nova ampliação da FIGURA 30.

Ainda na FIGURA 33 é possível observar que o carbono em δ 31,0 ppm, que está diretamente ligado ao multipletto em δ 2,34 – 2,44 ppm, também está diretamente ligado ao multipletto em δ 2,10 – 2,20 ppm. Isso somente pode ocorrer em um sistema onde haja diferenciação do ambiente químico entre dois hidrogênios ligados a um mesmo átomo de carbono, como em um sistema vizinho a um estereocentro ou pertencente a um macrociclo. Desta maneira, o acoplamento entre o multipletto em δ 2,34 – 2,44 ppm e o multipletto em δ 2,10 – 2,20 ppm seria geminal.

O multipletto em δ 2,10 – 2,20 ppm, apresenta acoplamento com o duplo duplo dubleto em δ 2,88 ppm, com os multiplettos em δ 2,61 – 2,67 ppm (1H), δ 2,34 – 2,44 ppm (1H), δ 1,72 – 1,82 ppm (2H) e em δ 1,45 – 1,55 ppm (1H), além do já mencionado acoplamento com o dd em δ 5,67 ppm, no espectro de COSY 45° (FIGURA 32) e com os carbonos em δ 20,8 e 20,9 ppm no gHSQC (FIGURA 33), evidenciando que existe um prolongamento do efeito discutido acima, ou seja, uma diferenciação entre 2 hidrogênios ligados ao mesmo carbono. Isso as vezes é mascarado pela interposição dos sinais dos hidrogênios nesta região. Tal comportamento reforça a idéia de que um macrociclo esteja presente nesta molécula.

O multipletto em δ 2,61 – 2,67 ppm (1H), exibe acoplamento com o multipletto em δ 1,72 – 1,82 ppm (2H) e com o multipletto em δ 2,10 – 2,20 ppm. O multipletto em δ 1,72 – 1,82 ppm (2H) acopla com o multipletto em δ 2,10 – 2,20 ppm, com o multipletto em δ 1,45 – 1,55 ppm (1H) e com o multipletto em δ 2,61 – 2,67 ppm (1H), mas não acopla com os hidrogênios em δ 2,34 – 2,44 ppm (1H). Todos estes dados, embora possam parecer bastante confusos em um primeiro momento, reforçam a hipótese de que há uma cadeia carbônica que forma o macrociclo. Observando com cuidado as integrais dos sinais entre δ 1,45 e 3,00 ppm no espectro de hidrogênio apresentado na FIGURA 27, pode-se notar que esta cadeia carbônica deve ter 12 átomos de hidrogênio com baixo deslocamento químico. Assim, ao se analisar o espectro de gHMBC do sinal mais desblindado dentro desta região do espectro, o duplo duplo dubleto em δ 2,88 ppm ($J = 14,6, 12,1, 2,5$) (FIGURA 34, FIGURA 35 e FIGURA 36), pode-se perceber que ele

acopla com os carbonos em δ 20,9, 31,0 e 212,7 ppm. Este último carbono é referente a um carbono carbonílico de cetona, devido ao seu alto deslocamento químico. Isso sugere que no meio da cadeia carbônica do macrociclo em questão existe uma carbonila. Outras evidências para isso podem ser extraídas do próprio espectro de gHMBC, apresentado na FIGURA 36. Este carbono em 212,7 ppm exhibe acoplamento com os multipletos em δ 2,61 – 2,67 ppm (1H), em δ 2,16 – 2,27 (1H), em δ 2,10 – 2,20 ppm (2H), em δ 1,72 – 1,82 ppm (2H) e δ 1,46 – 1,56 ppm (1H).

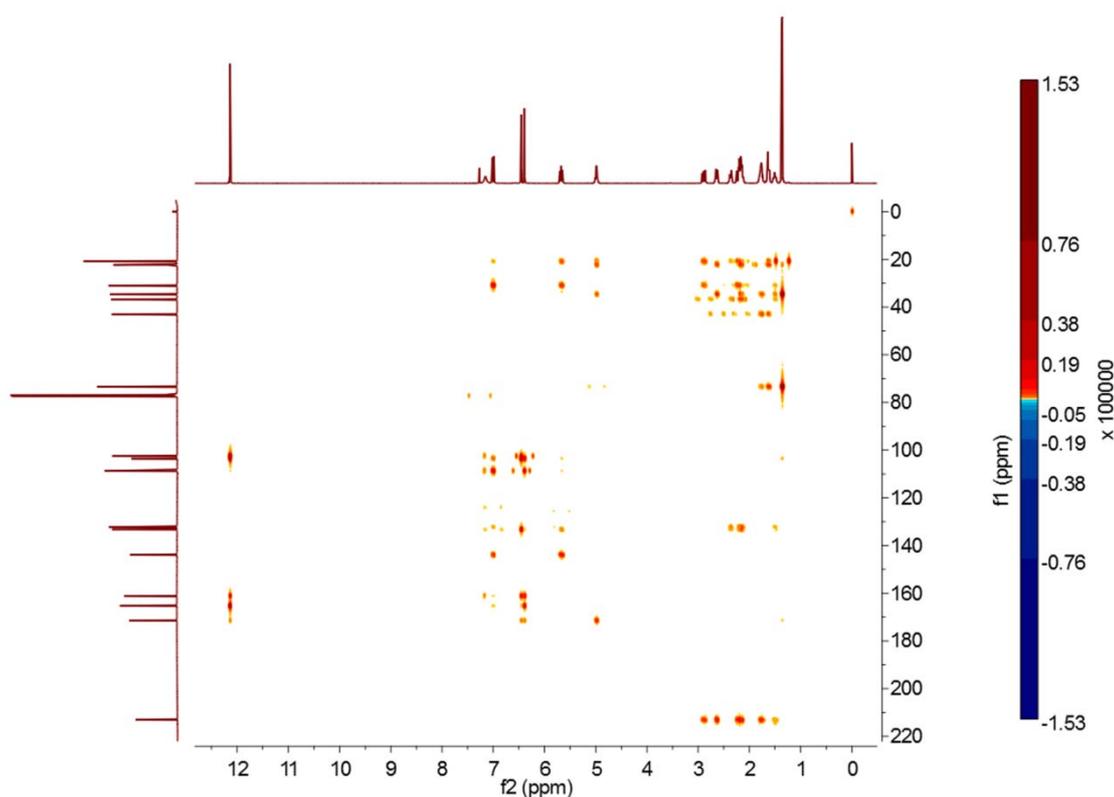


FIGURA 34. Espectro de gHMBC da fração ZEAFG47D (zearalenona (**14**)), (CDCl₃, 500 MHz, 125 MHz).

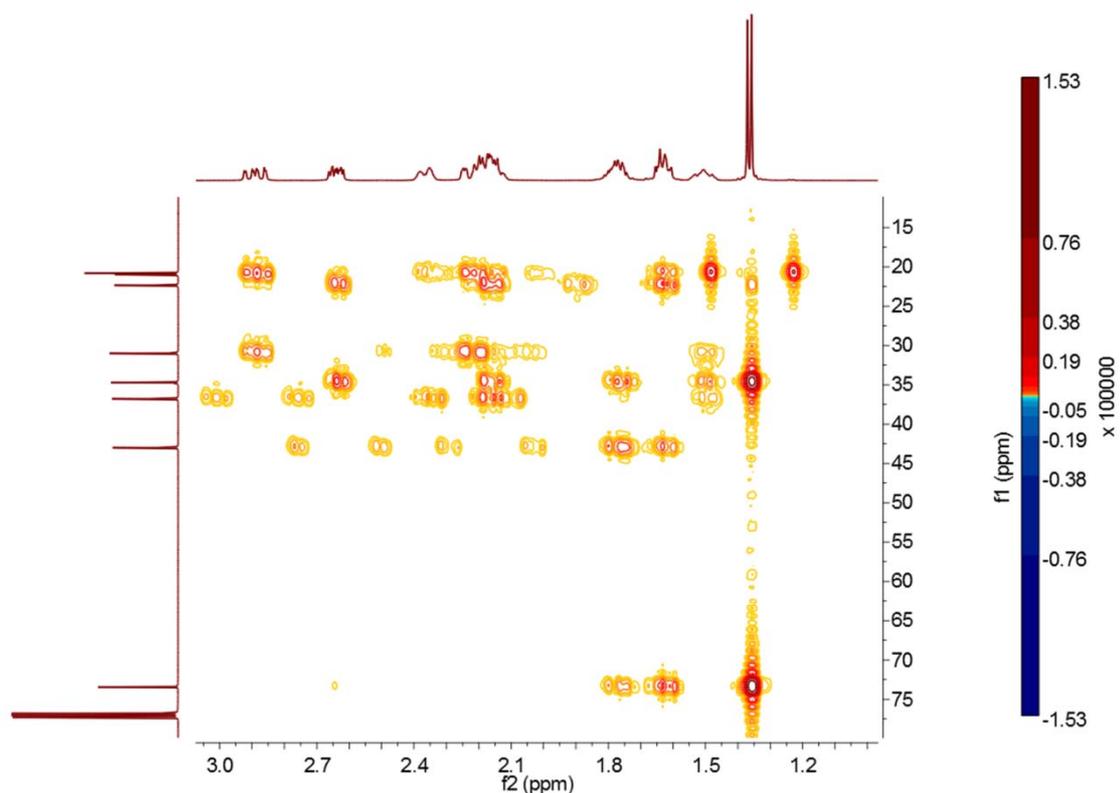


FIGURA 35. Ampliação da FIGURA 34.

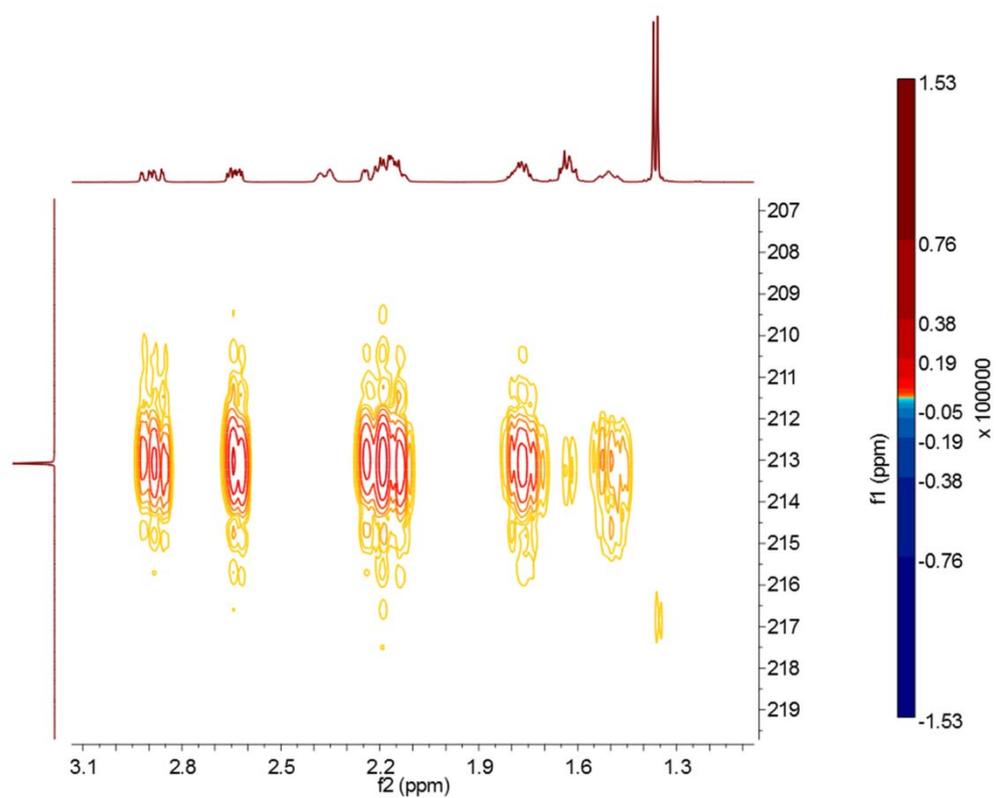


FIGURA 36. Nova ampliação da FIGURA 34.

O início da cadeia estrutural deste macrociclo, como já mencionado, ocorre com um sistema olefínico. O término dele deve ocorrer com o sextupletto em δ 4,99 ppm (1H), que acopla no COSY com o multipletto em δ 1,72 – 1,82 ppm (2H) (ver FIGURA 29). Este sinal também acopla com um dubletto em δ 1,36 ppm (3H), sugerindo a presença de uma metila nesta posição. No espectro de gHSQC (FIGURA 31), pode-se observar a correlação deste hidrogênio com um carbono carbinólico em δ 73,8 ppm.

Continuando a atribuição dos sinais do espectro de ^1H NMR da molécula em questão (FIGURA 27), pode-se ainda observar a presença de um anel aromático tetrasubstituído, com hidrogênios na posição *meta* entre eles, evidenciado pela presença de dois dubletos com $J = 2,4$ Hz, um em δ 6,44 ppm (1H) e outro em δ 6,39 ppm (1H). O primeiro exibe acoplamento no espectro de gHSQC com o carbono em δ 108,7 ppm e o segundo com o carbono em δ 102,5 ppm (FIGURA 31). Ambos apresentam acoplamento no espectro de gHMBC com o carbono em δ 171,4 ppm, que devido ao seu deslocamento químico pode ser atribuído à carboxila de grupos ácidos ou lactônicos. Além disso, o sinal em δ 6,44 ppm também acopla com um dos hidrogênios olefínicos mencionados no início desta discussão, em δ 133,4 ppm.

Desta maneira, pode-se concluir que o macrociclo possui uma carbonila em sua cadeia, sendo conectada ao anel aromático por um grupo lactônico de um lado e de outro por uma olefina. Observando-se o espectro de ^{13}C NMR, mostrado na FIGURA 37, é possível concluir que esta substância deve conter 18 carbonos, dos quais 14 se encontram na porção do macrolídeo, incluindo uma metila.

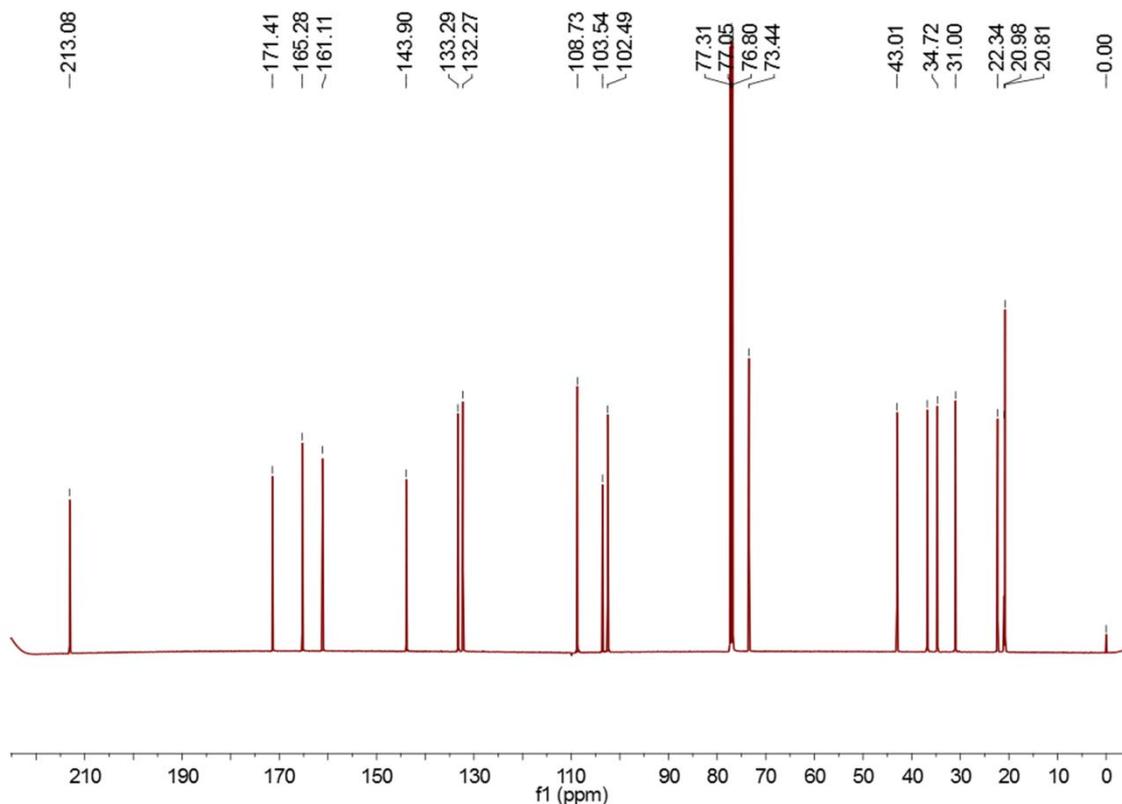


FIGURA 37. Espectro de ^{13}C NMR da fração ZEAFIG47D (zearalenona (**14**)), (CDCl_3 , 125 MHz).

Assim, com base em todas estas informações discutidas acima e que podem ser encontradas na TABELA 10, concluí-se que o composto em questão era a toxina zearalenona (**14**) (FIGURA 38). Nesta mesma tabela, pode-se notar que as informações são concordantes com os dados da literatura. Esta estrutura também foi confirmada por espectrometria de massas, dando um valor de m/z 317 ($[\text{M}-\text{H}]^+$) nas análises por ESI-MS no modo negativo (ver item 3.3.3 para os espectros de massas).

TABELA 10. Dados espectroscópicos para a substância zearalenona (14).

	Valores obtidos (CDCl ₃)				Referência (CDCl ₃) ^{173, 174}	
	δ_H (J, Hz)	δ_C	COSY (¹ H- ¹ H)	gHMBC (¹ H- ¹³ C)	δ_H (J, Hz)	δ_C
1		103.5				103.9
2		165.3				165.5
3	6.44, d (2.4), 1H	102.5	5	1, 2, 4, 5, 1', 12'	6.44, d (2.5), 1H	103.0
4		161.1				160.0
5	6.39, d (2.4), 1H	108.7	3	1, 2, 3, 4, 1', 12'	6.40, d (2.5), 1H	109.0
6		143.9				144.1
1'	7.00, dd (15.3, 1.7), 1H	133.4	2', 3'a	1, 2, 4, 5, 6, 2'	7.01, m, 1H	135.2
2'	5.67, ddd (15.3, 10.2, 4.1), 1H	132.3	1', 3'a, 3'b, 4'a, 5'a	1, 5, 1', 3' 4', 6	5.88, m, 1H	132.5
3'a	1.72-1.82, m, 2H		2', 3'b, 4'a, 4'b, 5'a	6, 1', 2', 4', 7'		
3'b	1.58-1.68, m, 2H	31.0	2', 3'a, 3'b, 4'a, 4'b, 5'a, 5'b	1', 2', 4', 5', 6', 7'	2.10, m, 2H	31.1
4'a	1.72-1.82, m, 2H		2', 3'a, 3'b, 4'b, 5'a, 5'b	3', 5', 6' 7'		
4'b	1.58-1.68, m, 2H	22.3	3'a, 3'b, 4'a, 5'a, 5'b	3', 5', 6' 7'	1.81, m, 2H	22.4
5'a	2.10-2.20, m, 3H		2', 3'a, 3'b, 4'b, 5'a, 5'b, 7'a, 7'b, 8'a	4', 5', 6', 7', 8'		
5'b	2.60-2.67, m, 1H	43.1	3'a, 3'b, 4'b, 5'a, 7'a, 7'b, 8'a, 8'b	4', 5', 6', 7', 8'	2.90, m, 2H	43.0
6'		213.1				211.8
7'a	2.20-2.26, m, 1H		3'b, 4'a, 4'b, 5'a, 7'b, 8'b	4', 5', 6', 8', 9'		
7'b	2.89, ddd (14.6, 12.1, 2.5), 1H	36.7	5'a, 5'b, 8'a, 8'b	4', 5', 6', 8', 9'	2.60, m, 2H	36.8
8'a	2.10-2.20, m, 3H		7'a, 7'b, 8'b, 9'a, 9'b	5', 6', 7', 9'		
8'b	1.45-1.55, m, 1H	21.0	7'a, 8'a, 9'a, 9'b	5', 6', 7', 9'	1.67, m, 2H	21.1
9'a	2.34-2.44, m, 1H		5'b, 7'a, 8'a, 9'b	6', 7', 8', 10'		
9'b	2.10-2.20, m, 3H	34.7	8'b, 9'a, 9'b, 10'	6', 7', 8', 10', 11'	2.31, m, 2H	34.8
10'	4.99, s (6,0), 1H	73.0	11', 9'b	6', 7', 8', 10', 11'	5.01, m, 2H	74.5
11'	1,37, d (6,0), 3H	20.8	10'	9', 10'	1.36, d (6.1) 2H	21.1
12'		171.4				171.4
2-OH	12.10, s, 1H					

É interessante observar que o sinal em δ 213,1 ppm, atribuído a carbonila na posição 6', acopla com os hidrogênios 5'b, 7'b, 5'a, 4'b, 7'a, 3'b, 4'a, como esperado a uma distância de duas e três ligações, confirmando a atribuição realizada no espectro de COSY. Pode-se também observar os acoplamentos

característicos da metila em 21 ppm com os hidrogênios 9'a, 9'b, 8'a, 9'b, com 7'b em W.

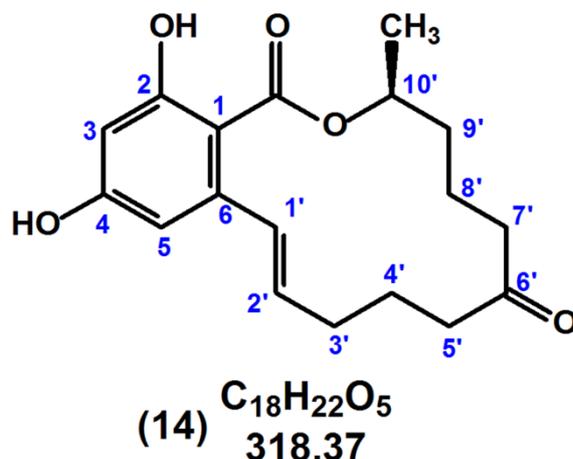


FIGURA 38. Estrutura química da zearalenona (fração ZEAFG47D).

O que mais surpreendeu ao final destes experimentos foi a grande quantidade de zearalenona (14) produzida por *Fusarium graminearum* e pelo *F. moniliforme* isolado como patógeno. Esta substância tornou-se então freqüente em todos os estudos de isolamento com estes fungos realizados no grupo. Isso atraiu muito a atenção do grupo de pesquisas e a partir disso foram elaboradas hipóteses tentando correlacionar a produção desta substância com a origem fúngica. Desta forma, foram estabelecidos critérios analíticos e ensaios biológicos na tentativa de checar se tal substância teria um papel na relação planta-fungo.

Em uma fração próxima da qual foi isolada a zearalenona (14) de *Fusarium graminearum*, foi obtida outra substância cujos dados espectroscópicos indicaram que poderia se tratar de outra substância da classe das zearalenonas. O espectro de 1H NMR desta substância, como pode ser visto na FIGURA 39, apresenta como uma das principais diferenças a presença de outro hidrogênio bastante desblindado, um singlete com integral para 1 hidrogênio em δ 9.07 ppm, atribuído possivelmente a outro grupo hidroxil da molécula que não havia sido detectado no experimento com a zearalenona (14), já que o solvente em que

estes dados foram registrados foi CD_3CN . Os experimentos foram feitos neste solvente devido a baixa solubilidade da molécula em CDCl_3 .

Outra grande diferença que pode ser observada é a presença de um multipletto de δ 3,70–3,81 ppm, integrando para um hidrogênio, e também a presença de um dubleto em δ 3,41 ppm ($J = 5,0$ Hz), integrando também para um hidrogênio. Isso é muito consistente com a presença de uma hidroxila na cadeia macrocíclica, onde o multipletto seria o sinal do hidrogênio ligado ao carbono carbonílico e o dubleto seria o próprio hidrogênio do grupo hidroxil acoplado com o anteriormente mencionado. O espectro de ^{13}C NMR desta substância reforça esta proposta (FIGURA 39).

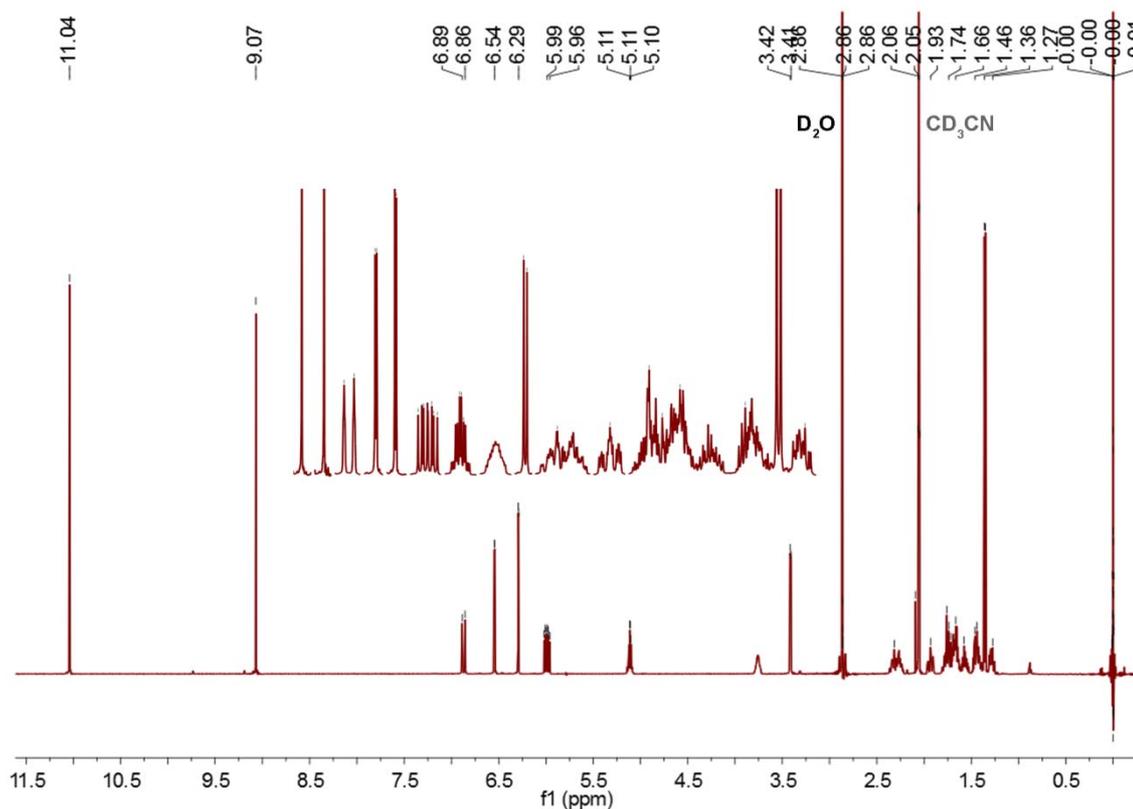


FIGURA 39. Espectro de ^1H NMR da fração ZEAFG54A (zearalenol (**17**)), (CD_3CN , 500 MHz).

O principal ponto é a ausência do carbono em δ 211,8 ppm, que na molécula de zearalenona (**14**) era o sinal do carbono da carbonila da cadeia lateral. Assim, até aqui temos fortes evidências de que houve uma redução desta cetona para um

álcool. Os dados bidimensionais também suportam esta proposta. Os espectros de COSY, apresentados na FIGURA 41 e FIGURA 42, evidenciam o acoplamento entre o multipletto em δ 3,70-3,81 ppm com sinais entre δ 1,2 e 1,5 ppm, característicos de cadeia carbônica saturada. No gHSQC, este sinal acopla com um carbono em δ 68,5 ppm (FIGURA 43) e no gHMBC, foram observadas apenas algumas poucas correlações, todas elas com carbonos também de cadeia carbônica saturada (FIGURA 44 e FIGURA 45).

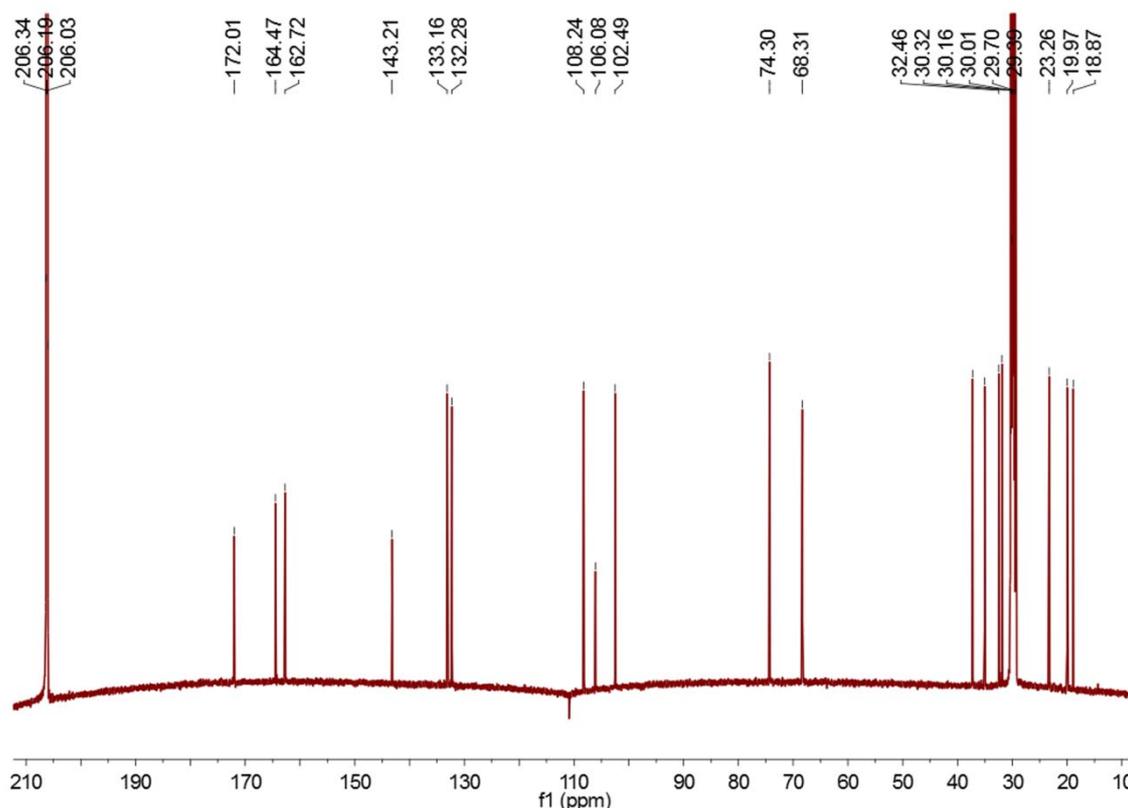


FIGURA 40. Espectro de ^{13}C NMR da fração ZEAFG54A (zearalenol (**17**)), (CD_3CN , 125 MHz).

Desta maneira, foi proposto que o composto em questão se tratava do zearalenol (**17**) (FIGURA 46). Os dados obtidos são concordantes com os da literatura, como pode ser observado na TABELA 11. Entretanto, não foi possível a distinção entre os isômeros α e β desta substância, pois a diferença entre as constantes de acoplamento do multipletto em δ 3,70-3,81 ppm com os sinais dos hidrogênios vizinhos deve ser muito baixa para ambos os isômeros.

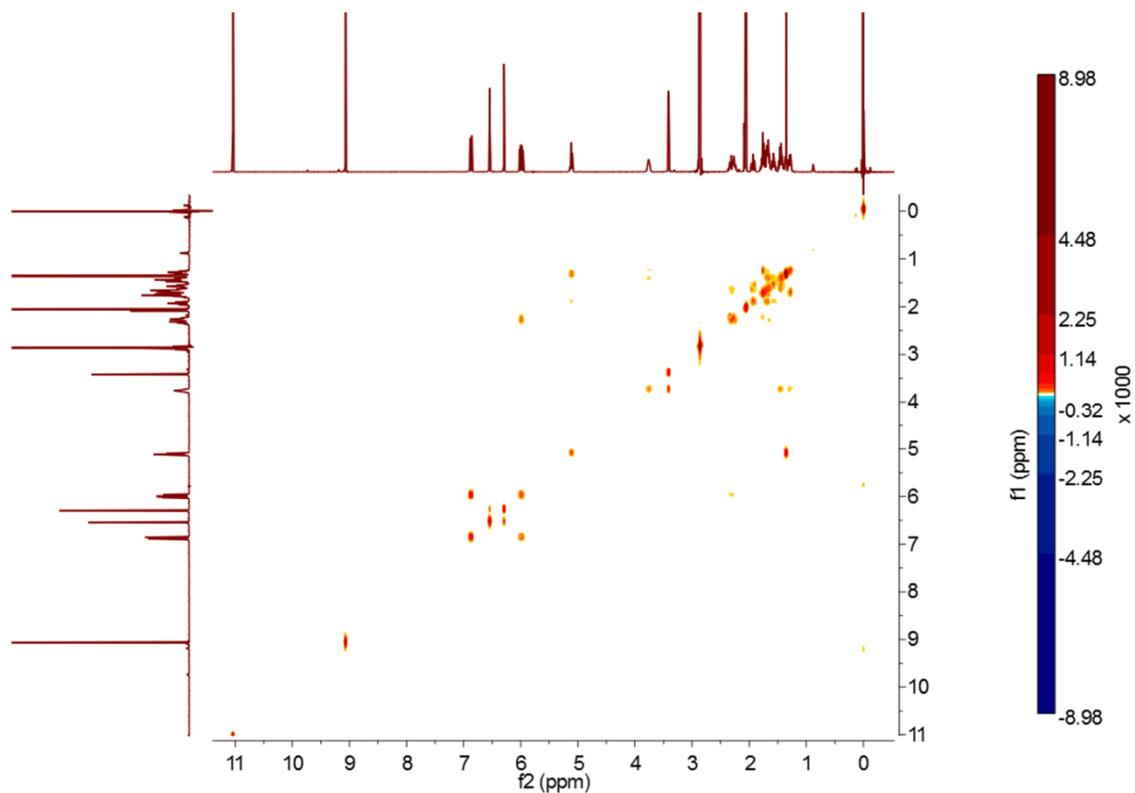


FIGURA 41. Espectro de COSY 45° obtido para a fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD₃CN, 500 MHz).

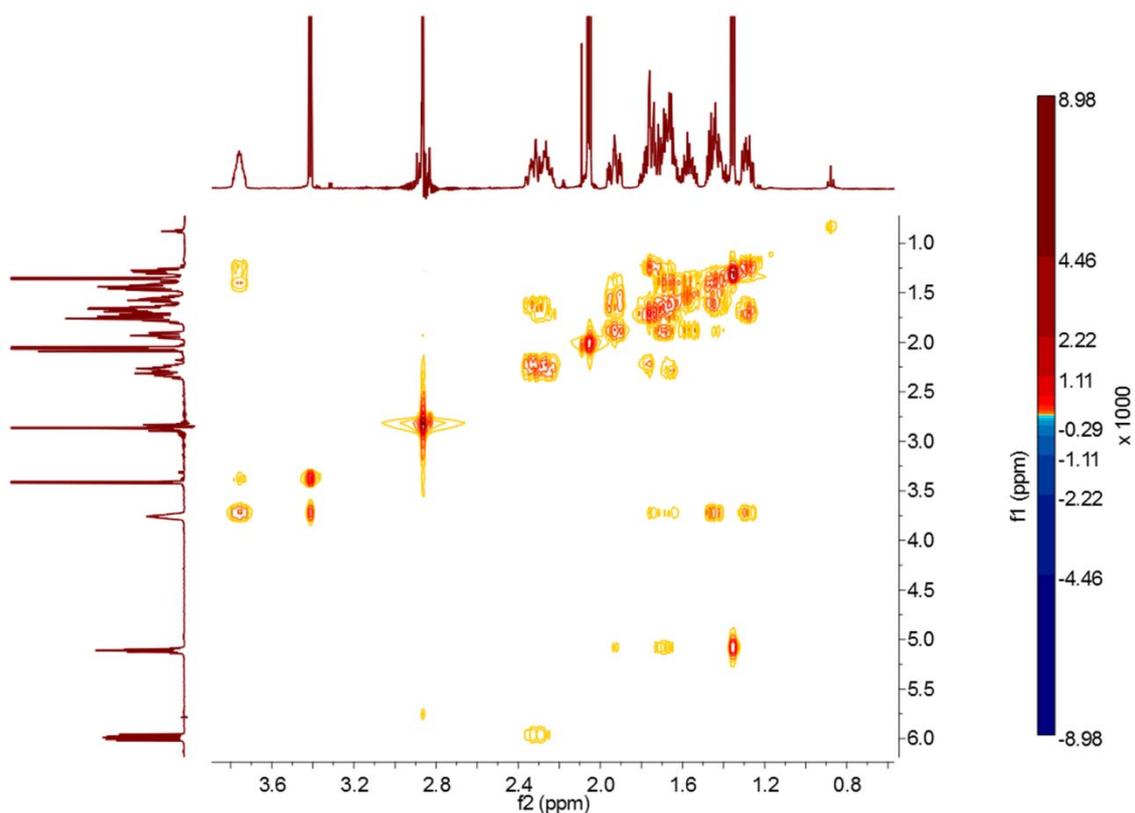


FIGURA 42. Ampliação da FIGURA 41.

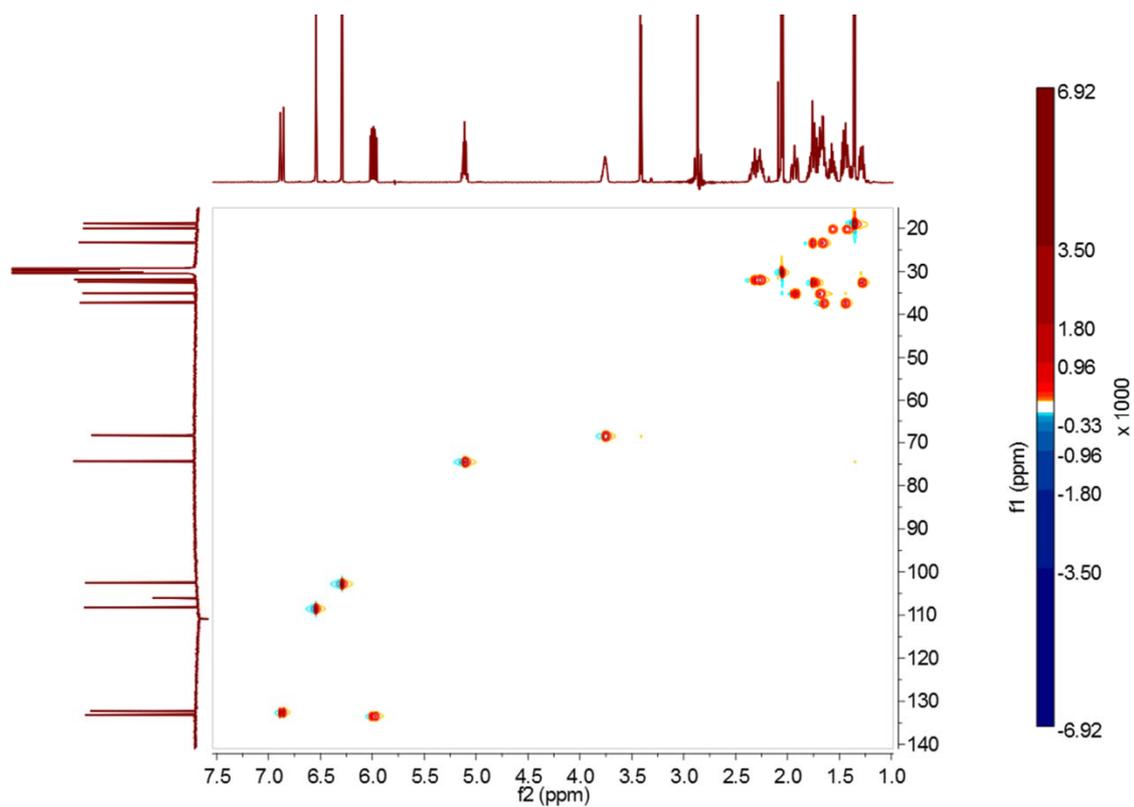


FIGURA 43. Espectro de gHSQC obtido para a fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD₃CN, 500 MHz, 125 MHz).

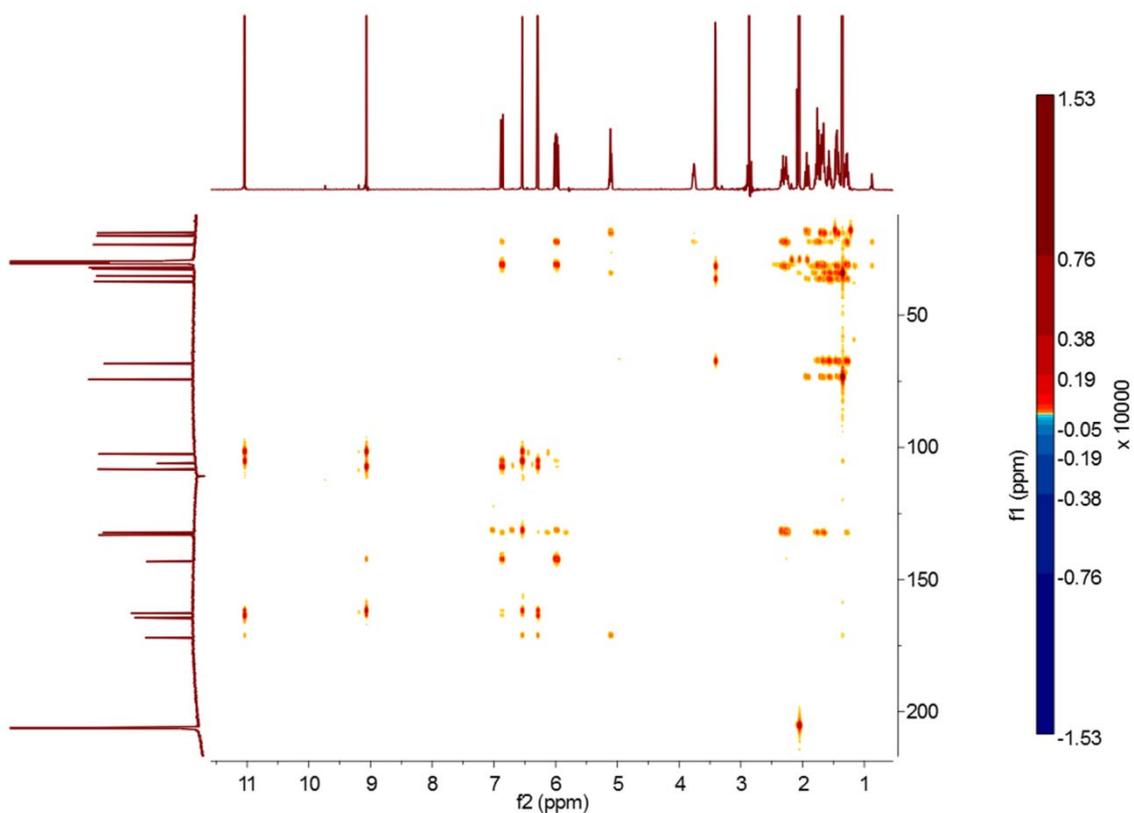


FIGURA 44. Espectro de gHMBC obtido para a fração ZEAFG54A (zearalenol (17)), (CD₃CN, 500 MHz, 125 MHz).

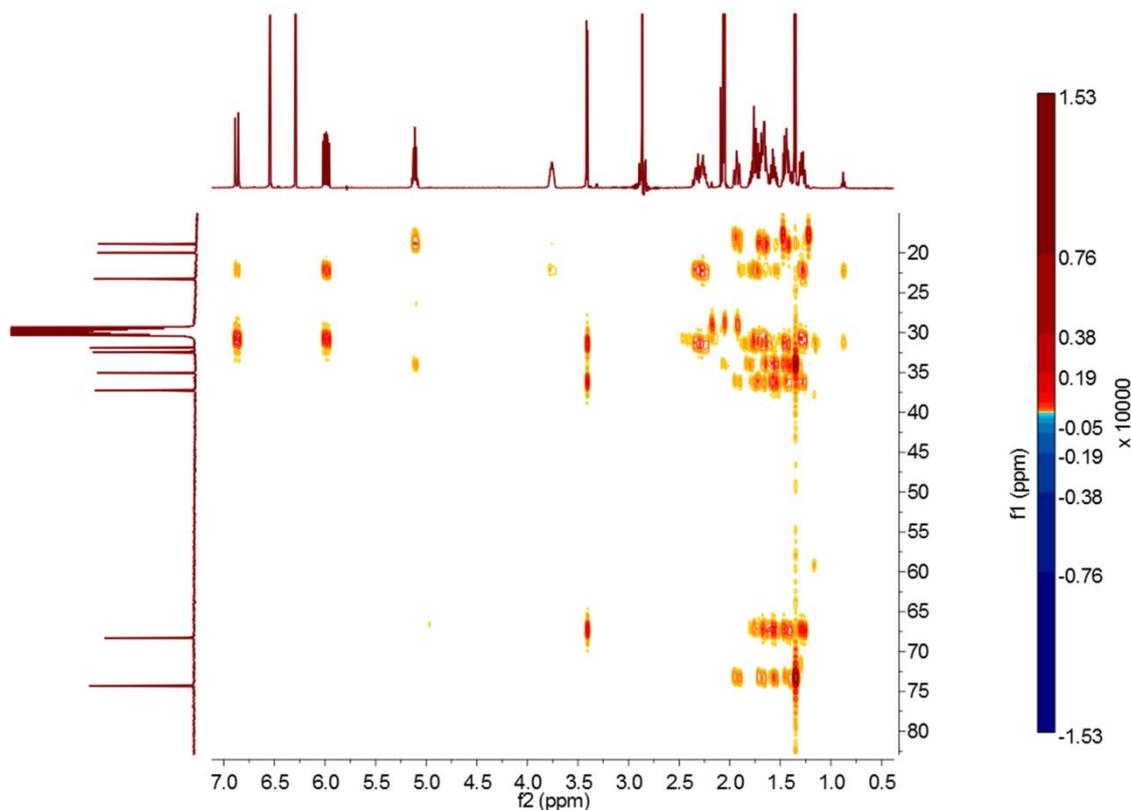


FIGURA 45. Ampliação da FIGURA 44.

Entretanto, ao contrário da zearalenona (**14**), esta substância foi isolada em traços, não apresentando um alto rendimento como a de seu análogo. Outro detalhe importante é que ela somente foi isolada das cepas de *Fusarium graminearum*, não tendo sido observado sua produção em cepas de *Fusarium moniliforme*, mesmo aquele isolado como patógeno. Para a realização dos ensaios biológicos (ver parte 2), foi necessário a aquisição de 1mg da substância β -zearalenol (**17**), pois o pouco que foi isolado desta substância foi utilizado em experimentos envolvendo estudos de fragmentação.

TABELA 11. Dados espectroscópicos obtidos para o zearalenol (17).

	Valores obtidos (CDCl ₃)				Referência (CDCl ₃) ^{173, 174}	
	δ_H (J, Hz)	δ_C	COSY (¹ H- ¹ H)	gHMBC (¹ H- ¹³ C)	δ_H (J, Hz)	δ_C
1		106.1				103.8
2		164.5				165.0
3	6.54, d (2.4), 1H	102.5	5	1, 2, 4, 5, 1', 12'	6.54, d (2.5), 1H	102.6
4		162.7				160.8
5	6.29, d (2.4), 1H	108.2	3	1, 2, 3, 4, 1', 12'	6.34, d (2.5), 1H	108.6
6		143.2				144.6
1'	6.87, dl (15.2), 1H	133.2	2', 3'a	1, 2, 4, 5, 6, 2'	6.90, m, 1H	133.6
2'	5.99, ddd (15.3, 8.58, 5.1), 1H	132.3	1', 3'a, 3'b, 4'a, 5'a	1, 5, 1', 3' 4', 6	5.98, m, 1H	131.7
3'	1.88-1.81, m, 2H	30.2	2', 3'b, 4'a, 4'b, 5'a	6, 1', 2', 4', 7'	2.25, m, 2H	30.3
4'	1.60-1.70, m, 2H	20.0	3'a, 3'b, 4'a, 5'a, 5'b	3', 5', 6' 7'	1.90, m, 2H	21.5
5'a	2.20-2.36, m, 1H		2', 3'a, 3'b, 4'b, 5'a, 5'b, 7'a, 7'b, 8'a	4', 5', 6', 7', 8'		
5'b	2.80-3.00, m, 1H	37.3	3'a, 3'b, 4'b, 5'a, 7'a, 7'b, 8'a, 8'b	4', 5', 6', 7', 8'	2.48, m, 2H	35.3
6'	3.70-3.80, m, 1H	68.3	3'b, 4'a, 4'b, 5'a, 7'b, 8'b		3.76, m, 1H	66.9
7'a	2.20-2.36, m, 1H		3'b, 4'a, 4'b, 5'a, 7'b, 8'b	4', 5', 6', 8', 9'		
7'b	2.80-3.00, m, 1H	32.5	5'a, 5'b, 8'a, 8'b	4', 5', 6', 8', 9'	2.85, m, 2H	33.8
8	1.39-1.50, m, 2H	23.3	7'a, 7'b, 8'b, 9'a, 9'b	5', 6', 7', 9'	1.62, m, 2H	18.7
9'a	1.88-1.98, m, 1H		5'b, 7'a, 8'a, 9'b	6', 7', 8', 10'		
9'b	1.71-1.82, m, 1H	31.8	8'b, 9'a, 9'b, 10'	6', 7', 8', 10', 11'	2.30, m, 2H	30.8
10'	5.11, dq (6.2, 2.8), 1H	74.3	11', 9'b	6', 7', 8', 10', 11'	5.10, m, 1H	72.6
11'	1.35, d (6.2), 3H	18.9	10'	9', 10'	1.46, d (6.1) 3H	19.0
12'		172.0				170.3
2-OH	11.00, s, 1H					
4-OH	9.07, s, 1H					
6'-OH	3.41, d, 1H					

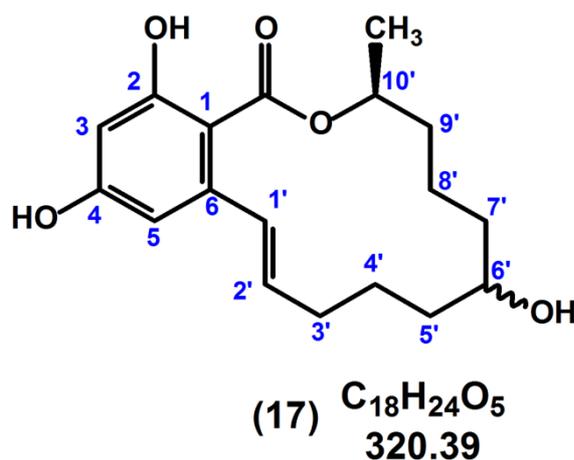


FIGURA 46. Estrutura química do zearalenol (17) (fração ZEAFG54A).

Ao se trabalhar com os extratos de maior polaridade, também foi isolada outra fração cujo espectro de 1H NMR também se mostrou muito interessante, como o apresentado na FIGURA 47. Neste espectro é possível evidenciar a presença de um duplo quadrupletto em δ 6,55 ppm ($J = 5,9, 1,5, 1H$), provavelmente referente a um hidrogênio oleifínico. Este hidrogênio apresenta, no espectro de COSY (FIGURA 48 e FIGURA 49) acoplamentos com o dubleto em δ 4,91 ppm ($J = 5,9, 1H$), referente a um hidrogênio carbinólico, e com o dubleto em δ 1,71 ppm ($J = 1,5, 3H$), referente a uma metila ligada a carbono sp^2 .

No espectro de gHSQC (FIGURA 50) é possível observar que este hidrogênio exibe um acoplamento com o carbono em δ 138,0 ppm. Este valor é maior do que o esperado para um simples carbono oleifínico e, portanto, ele deve fazer parte de algum sistema conjugado retirador de elétrons, como uma carbonila α,β -insaturada, por exemplo. Já no espectro de gHMBC (FIGURA 51) pode-se ver que o sinal em δ 6,55 ppm exibe acoplamento com um carbono metílico em δ 15,0 ppm, com um carbono em δ 51,7 ppm, com outro em δ 69,4 ppm e com um carbono em δ 200,0 ppm. Este último é bastante característico exatamente de uma carbonila α,β -insaturada, reforçando a sugestão apresentada acima. O dubleto em δ 4,91 ppm ($J = 5,9, 1H$) acopla com J^1 com o carbono em δ 69,4 ppm, indicando que este deva ser um hidrogênio carbinólico (ver FIGURA 50). Outros vários hidrogênios carbinólicos também estão presentes nesta molécula, como

pode ser evidenciado pelo alto número de sinais na região entre δ 3,3 e 5,5 ppm do espectro de hidrogênio apresentado na FIGURA 47.

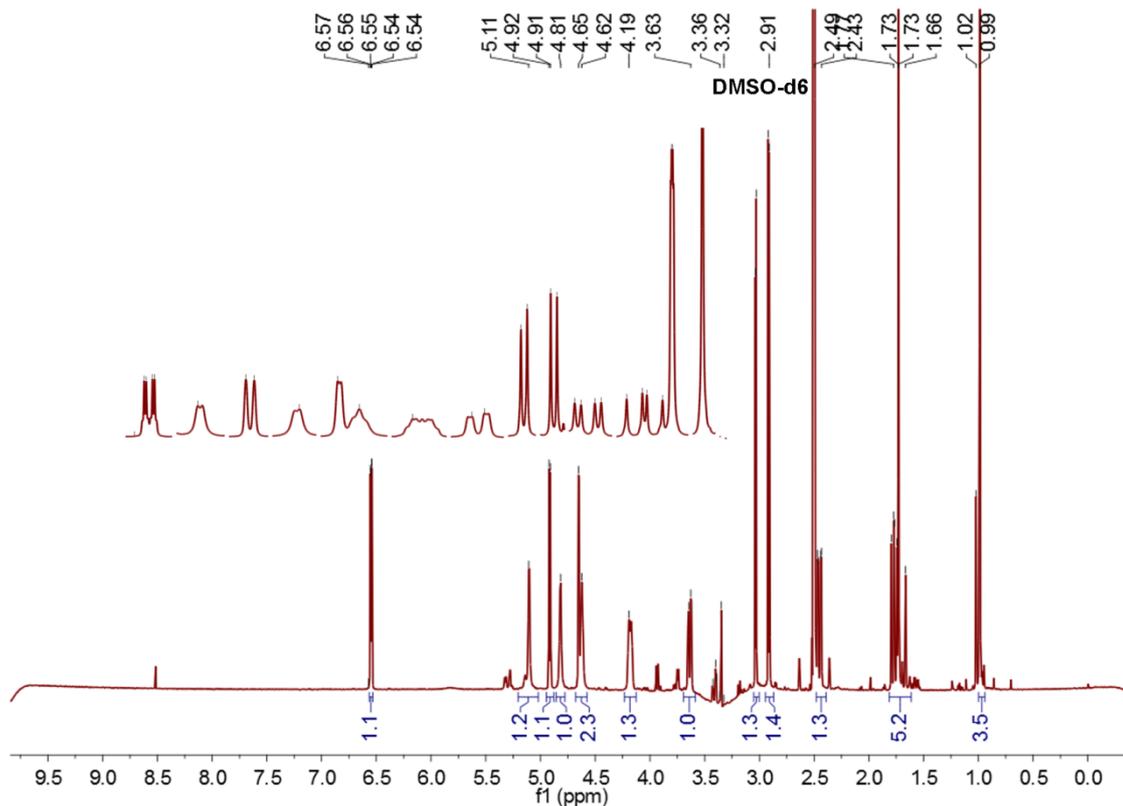


FIGURA 47. Espectro de ¹H NMR da fração TRICFG5E (deoxinivalenol (**42**)), (DMSO-d6, 500 MHz).

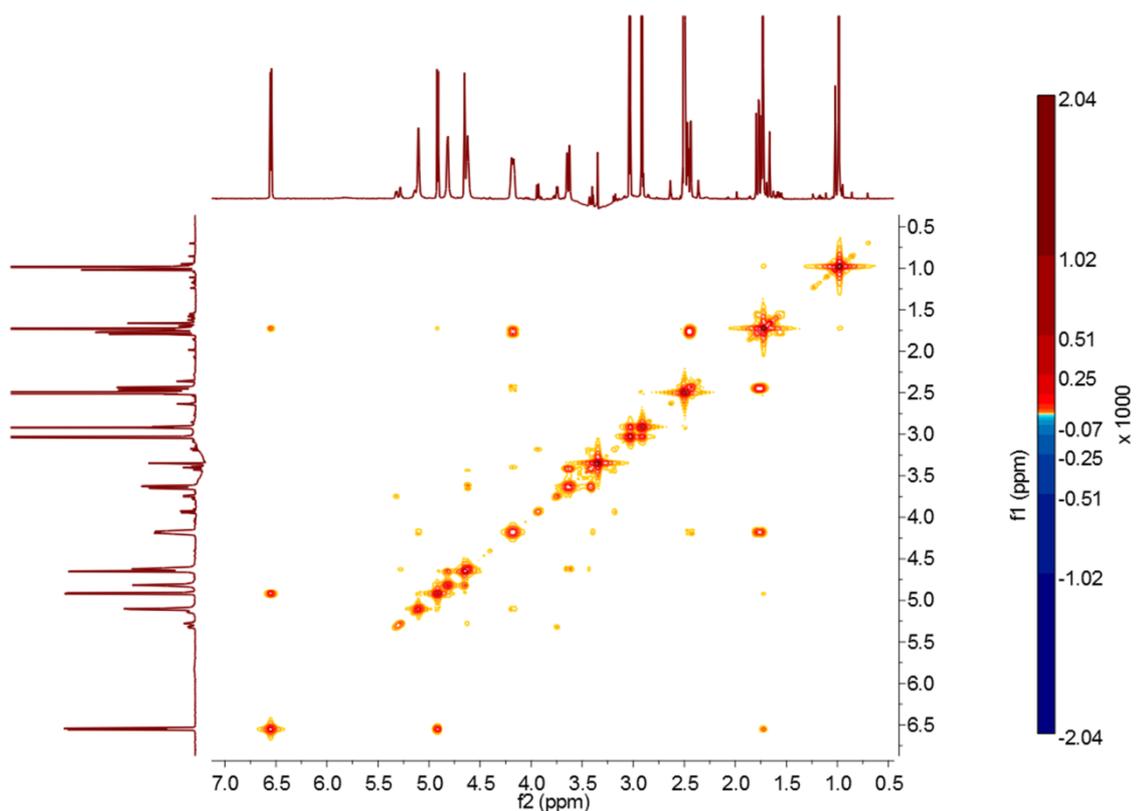


FIGURA 48. Espectro de COSY 45° obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (**42**)), (DMSO-d₆, 500 MHz).

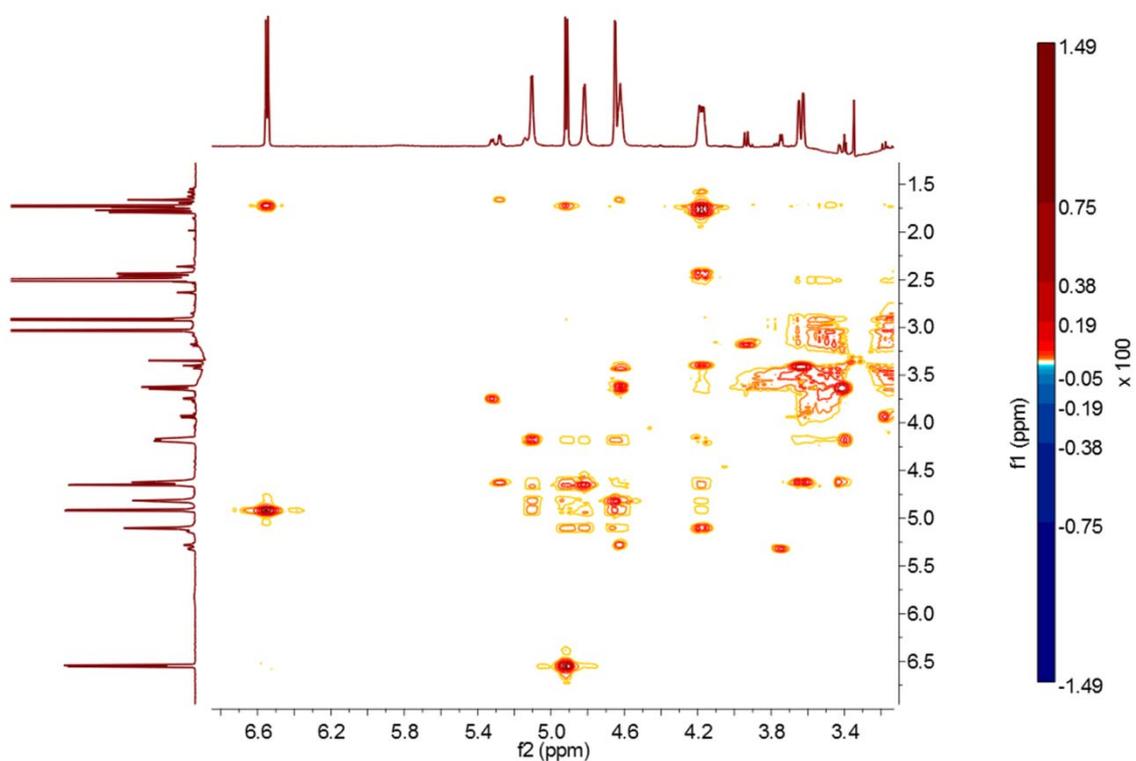


FIGURA 49. Ampliação da FIGURA 48 com supressão da diagonal.

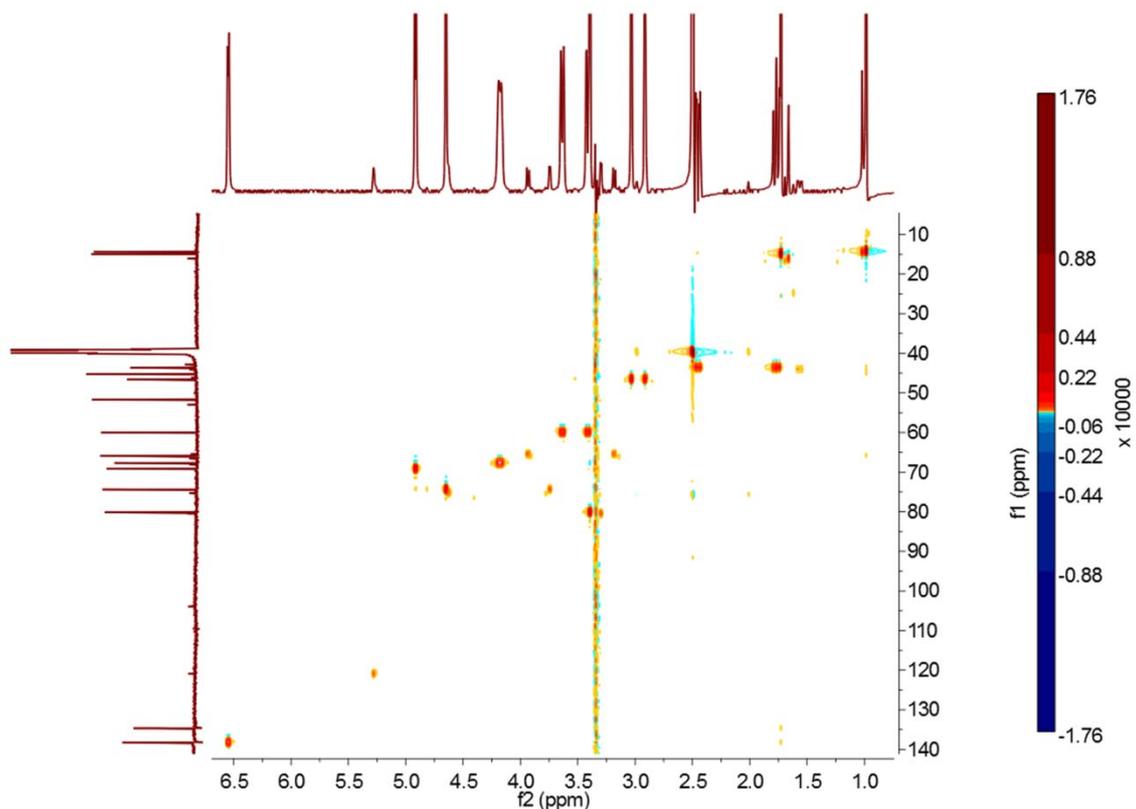


FIGURA 50. Espectro de gHSQC obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (**42**)), (DMSO-d₆, 500 MHz, 125 MHz).

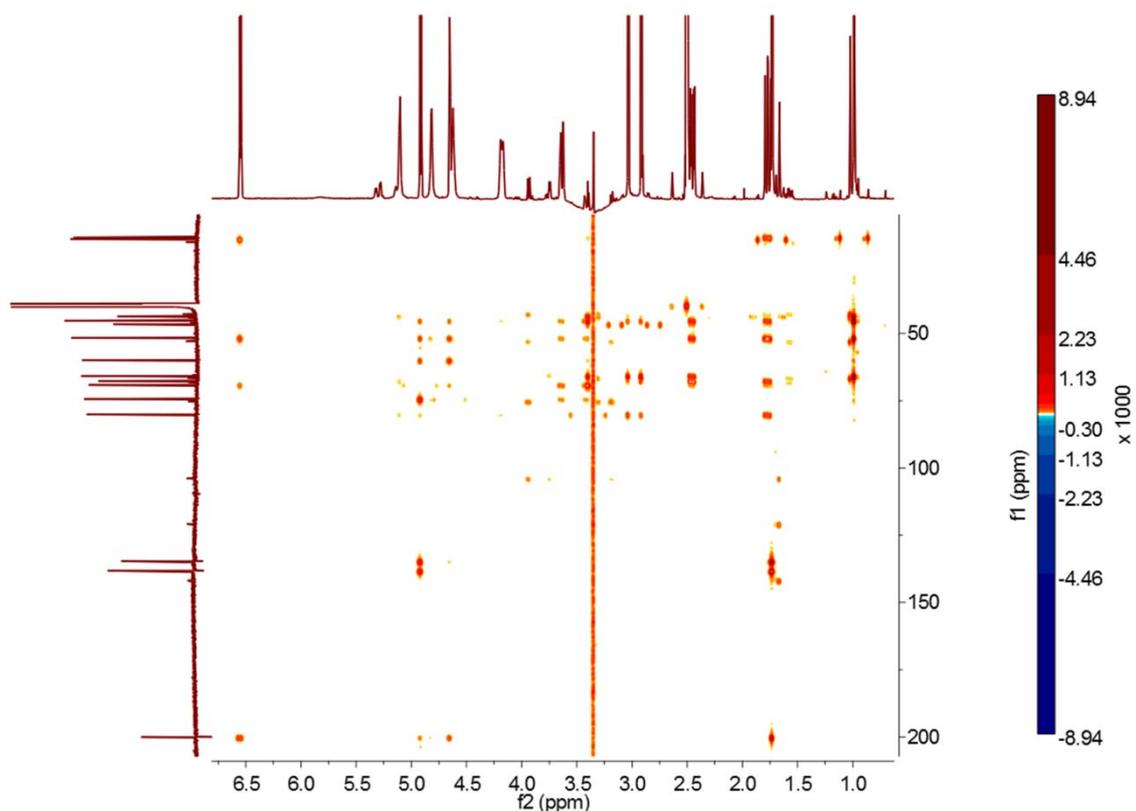


FIGURA 51. Espectro de gHMBC obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (**42**)), (DMSO-d₆, 500 MHz, 125 MHz).

Entretanto, ao se analisar o espectro de *g*HSQC (FIGURA 50) podemos observar que os dubletos em δ 5,10 ppm ($J = 1,5$, 1H), δ 4,82 ppm ($J = 1,5$, 1H) e δ 4,62 ppm ($J = 1,0$, 1H) não acoplam com nenhum carbono a uma ligação. Este é um forte indício de que estes hidrogênios estão diretamente ligados a um heteroátomo, provavelmente a um oxigênio, constituindo, portanto, 3 grupos hidroxila na molécula em questão. Este efeito usualmente não é observado quando os experimentos são realizados em solventes próticos deuterados como CD₃OD, pois os hidrogênios de hidroxilas são trocados por átomos de deutério assim que a amostra é solubilizada e não são detectados por ¹H NMR.

Os sinais referentes a estes hidrogênios de hidroxilas acoplam com outros hidrogênios carbinólicos, como pode ser observado no espectro de COSY (FIGURA 41, FIGURA 48 e FIGURA 49): o dubletos em δ 5,10 ppm ($J = 1,5$, 1H) acopla com o multiplete em δ 4,13-4,25 ppm (1H). O dubleto em δ 4,82 ppm ($J = 1,5$, 1H) acopla com outro dubleto em δ 4,65 ppm ($J = 1,5$, 1H); e finalmente o dubleto em δ 4,62 ppm ($J = 1,0$, 1H), acopla com os duplos dubletos em δ 3,63 ppm ($J = 11,0$, 1,0, 1H) e em δ 3,42 ppm ($J = 11,0$, 1,0, 1H). Embora a interpretação destes dados pareça difícil, os resultados indicam que a molécula em questão possui 3 grupos hidroxila, dois deles ligados a CH *sp*³ e um deles a um CH₂ também *sp*³.

Outros dois hidrogênios carbinólicos que possuem deslocamentos químicos distintos dos valores usualmente encontrados são os dubletos em δ 3,04 ppm ($J = 4,4$, 1H) e em δ 2,92 ppm ($J = 4,4$, 1H), que acoplam entre si. O valor da constante de acoplamento está de acordo com o acoplamento geminal existente em um CH₂ de um grupo epóxi. Esta proposta é reforçada pelo acoplamento destes hidrogênios com um mesmo carbono em δ 46,6 ppm, de acordo com o espectro de *g*HSQC (FIGURA 50). Uma ampliação do espectro de *g*HMBC, apresentado na FIGURA 52, evidencia o acoplamento destes dois hidrogênios com os carbonos em δ 45,3 ppm, δ 80,2 ppm e o carbono quaternário carbinólico em δ 65,9 ppm.

A conectividade entre todos os sinais discutidos até o momento pode ser checada também no espectro de *g*HMBC (FIGURA 51 e FIGURA 52). O duplete em δ 4,91 ppm ($J = 5,9$, 1H), referente a um hidrogênio carbinólico com alto deslocamento químico (por exemplo ligado a um grupo OR), acopla com os carbonos em δ 60,0 e δ 80,2 ppm, carbinólicos, com os carbonos em δ 134,7 e 138,0 ppm, oleifínicos, e com a carbonila em δ 200,0 ppm. Já o duplete em δ 3,35 ppm ($J = 4,6$, 1H) acopla com o carbono em δ 43,6 ppm, CH₂ alifático, com os carbonos em δ 51,7 e 65,9 ppm, quaternários alifáticos, com o carbono em δ 67,7 ppm, carbinólico, e com o carbono em δ 46,6 ppm, característico de CH₂ de grupo epóxi. A grande diferença nos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários alifáticos em δ 51,7 e 65,9 ppm sugere que este último esteja ligado em um ciclo bastante contraído, como o grupo epóxi, citado acima.

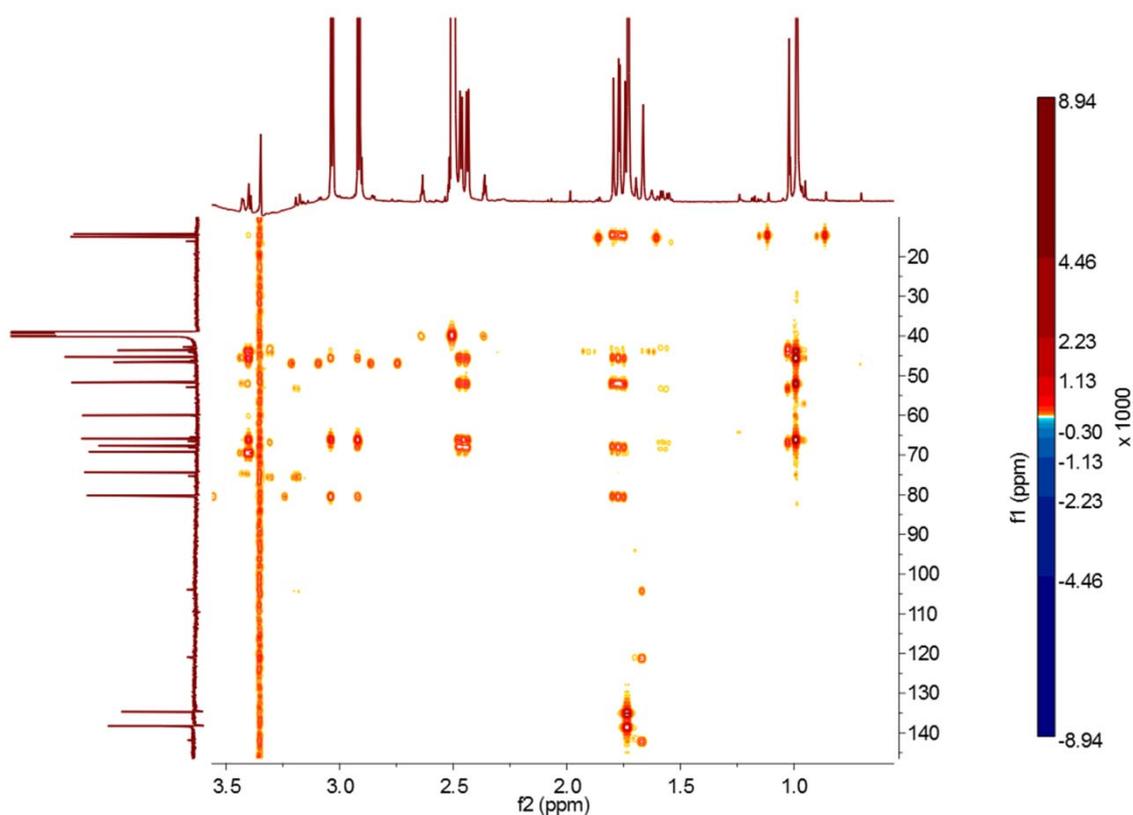


FIGURA 52. Ampliação da FIGURA 51.

Quando o espectro de ¹³C NMR (FIGURA 53) é analisado, pode-se observar a presença de 15 átomos de carbono, conforme já havia sido verificado

nos espectros de correlação ^1H - ^{13}C 2D. Reunindo-se todas as informações discutidas acima, juntamente com a informação obtida por ESI-MS/MS, que forneceu no modo negativo a molécula deprotonada em m/z 295, concluí-se que a molécula em questão era o deoxinivalenol (**42**) (FIGURA 55). A fragmentação característica, uma perda de 30 Da referente a fragmentação do grupo epoxi, como pode ser visto na FIGURA 56, reforça essa proposta. Todos os dados espectroscópicos obtidos para esta molécula estão sintetizados na TABELA 12. Semelhantemente ao zearalenol (**17**), este composto foi isolado em pouquíssimas quantidades (pouco mais de 1,5 mg). Entretanto, ele foi isolado de ambas as cepas de fungos patógenos, ou seja, de *F. graminearum* e de *F. moniliforme*.

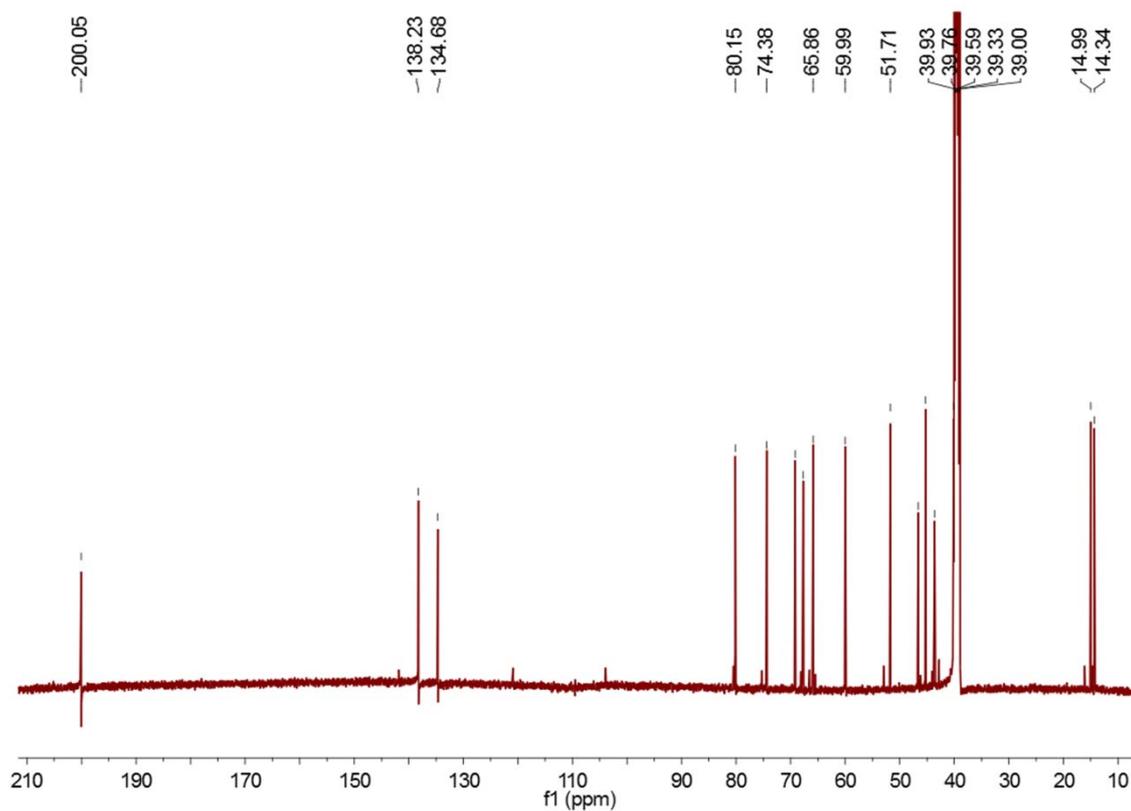


FIGURA 53. Espectro de ^{13}C NMR obtido para a fração TRICFG5E (deoxinivalenol (**42**)), (DMSO- d_6 , 125 MHz).

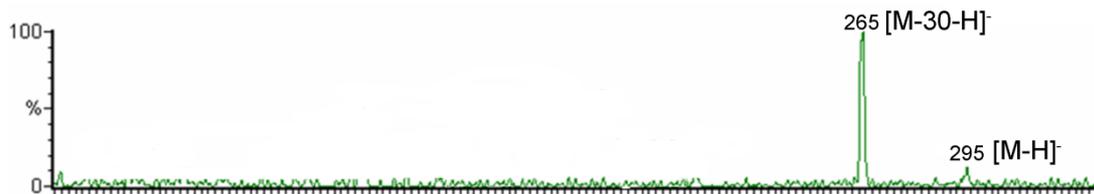


FIGURA 54. Espectro de ESI-MS/MS para o deoxinivalenol (42) (15 eV).

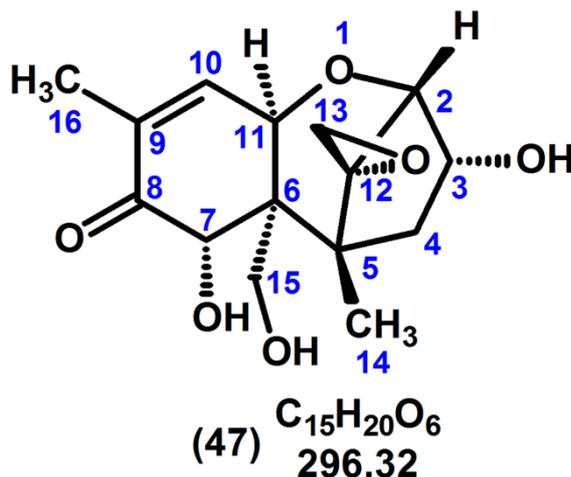


FIGURA 55. Estrutura química do deoxinivalenol (42) (fração TRICFG5E).

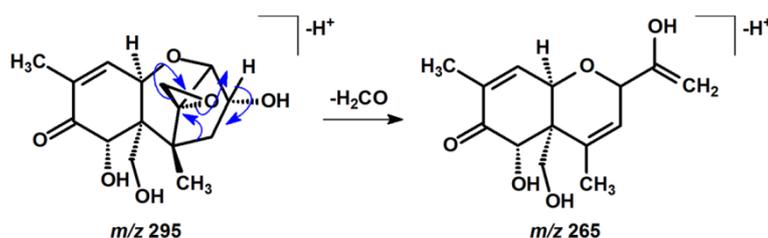


FIGURA 56. Mecanismo proposto para a perda de 30 Da a partir do deoxinivalenol (42).

Embora tenham sido isoladas quantidades muito pequenas desta substância em comparação com a zearalenona (14), esta substância também foi utilizada em ensaios biológicos frente a diversos modelos, como será discutido mais adiante. Entretanto, devido a pequena quantidade isolada, optou-se por não realizar uma curva de produção desta substância. Para os ensaios biológicos, foram adquiridos comercialmente mais 1mg desta substância vendida.

TABELA 12. Dados espectroscópicos obtidos para o deoxinivalenol (**42**).

	Valores obtidos (DMSO-d6)				Referência (CDCl ₃) ¹⁷⁴	
	δ_H (J, Hz)	δ_C	COSY (¹ H- ¹ H)	gHMBC (¹ H- ¹³ C)	δ_H (J, Hz)	δ_C
2	3.35, d (4.6), 1H	80.2	3	3, 4, 6, 12, 13	3.62, d (4.5)	80.6
3	4.13-4.23, m, 1H	67.7	2, 4a, 4b, 3-OH	5	4.53, dt (10.7, 4.5), 1H	68.6
4a	2.45, dd (14.4, 4.5), 1H	43.6	3, 4b	3, 6, 12, 13	2.21, d, (14.8), 1H	43.0
4b	1.77, dd (14.4, 11.2), 1H	43.6	3, 4a, 14	2, 3, 5, 6, 14	2.07, dd, (10.7, 4.5), 1H	43.0
5		45.3				46.0
6		51.7				52.1
7	4.65, d (1.5), 1H	74.4	7-OH	5, 6, 8, 11, 15	4.83, d, (2.0), 1H	70.2
8		200.0				202.3
9		134.7				135.7
10	6.55, dq (5.9, 1.5), 1H	138.0	11, 16	6, 7, 8, 16	6.61, dq (5.9, 1.5), 1H	138.4
11	4.91, d (5.9), 1H	69.4	3, 10, 16	2, 8, 9, 10, 15	4.80, d (5.9), 1H	74.4
12		65.9				65.7
13a	3.04, d (4.4), 1H	46.6	2, 4a, 4b, 13b	2, 5, 12	3.15, d, (4.3), 1H	47.2
13b	2.92, d (4.4), 1H	46.6	2, 4a, 4b, 131	2, 5, 12	3.07, d, (4.3), 1H	47.2
14	1.01, s, 3H	14.3	4a, 4b, 13b	2, 4, 5, 6	1.13, s, 3H	13.9
15a	3.63, dd (11.0, 1.0), 1H	60.0	15b, 15-OH	5, 6, 7, 11	3.89, d, (11.7), 1H	61.4
15b	3.42, dd (11.0, 1.0), 1H	60.0	15a, 15-OH	5, 6, 7, 11, 12	3.73, d, (11.7), 1H	61.4
16	1.71, d (11.0), 1H	15.0	10, 11	8, 9, 10	1.85, d, (1.5), 1H	14.9
3-OH	5.10, d (1.5), 1H		3			
7-OH	4.82, d (1.5), 1H		7		3.82, s	
15-OH	4.62, d (1.0), 1H		15			

Outra fração interessante deste extrato apresentou espectro de ¹H NMR muito parecido com o do deoxinivalenol (**42**), como pode ser observado na FIGURA 57. A principal diferença deste espectro para o do deoxinivalenol (**42**), além da pequena diferença no deslocamento químico de alguns sinais, é a presença de mais dois sinais na região de hidrogênios carbinólicos, ambos os dois singletos largos, um em δ 3,80 ppm (1H) e outro sinal em δ 3,14 ppm (1H). O espectro de ¹³C NMR apresenta o mesmo número de carbonos, ou seja, 15

sinais, como podemos ver na FIGURA 58. Ambos os sinais mencionados acima acoplam entre si no espectro de COSY (FIGURA 59 e FIGURA 60), sugerindo portanto que pode haver outro grupo hidroxil na molécula em questão. A correlação apresentada no espectro de gHSQC entre o sinal em δ 3,80 ppm e o carbono em 83,2 ppm corrobora com esta proposta (FIGURA 61). Assim, com indícios de que existe outro grupo hidroxil nesta molécula em comparação com o deoxinivalenol (**42**), o próximo passo foi tentar localizar este grupo na molécula em questão. Isso foi confirmado pelo acoplamento, exibido no espectro de gHMBC (FIGURA 62) entre o hidrogênio em δ 3,80 ppm e o carbono em δ 69.2 ppm, referente a outro carbono carbonílico.

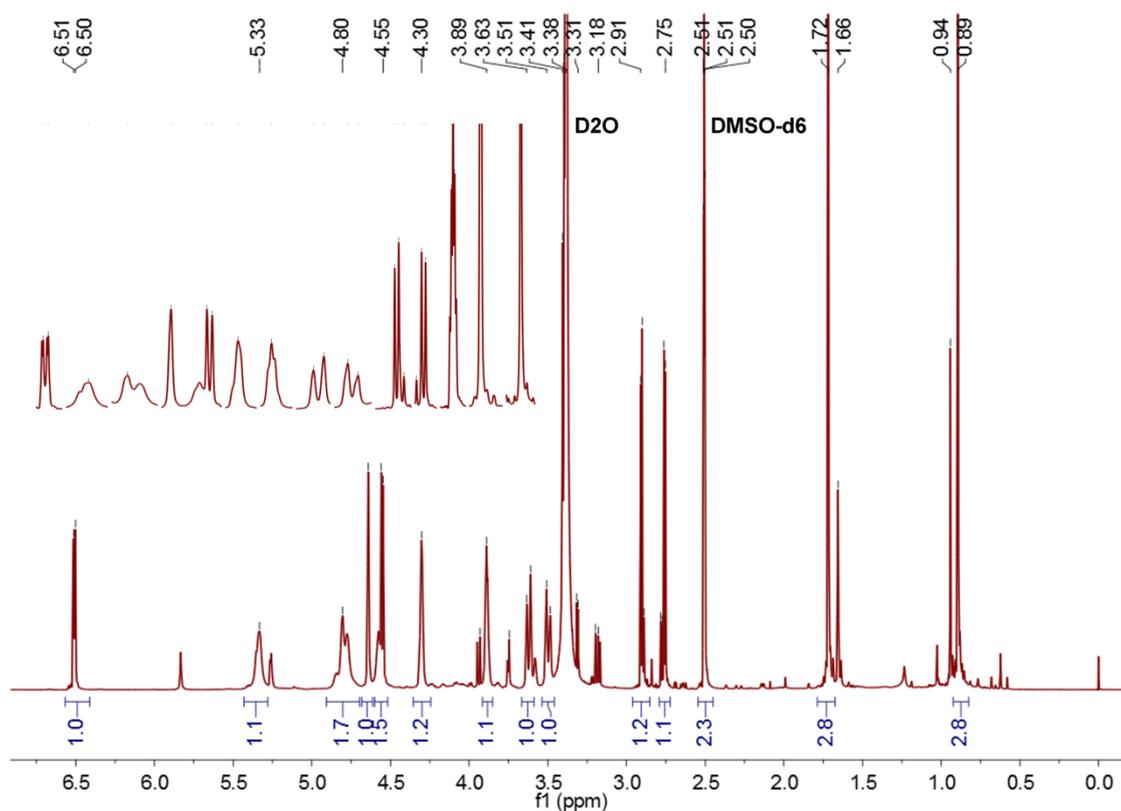


FIGURA 57. Espectro de ^1H NMR da fração TRICFG6C (nivalenol (**41**)), (DMSO- d_6 , 500 MHz).

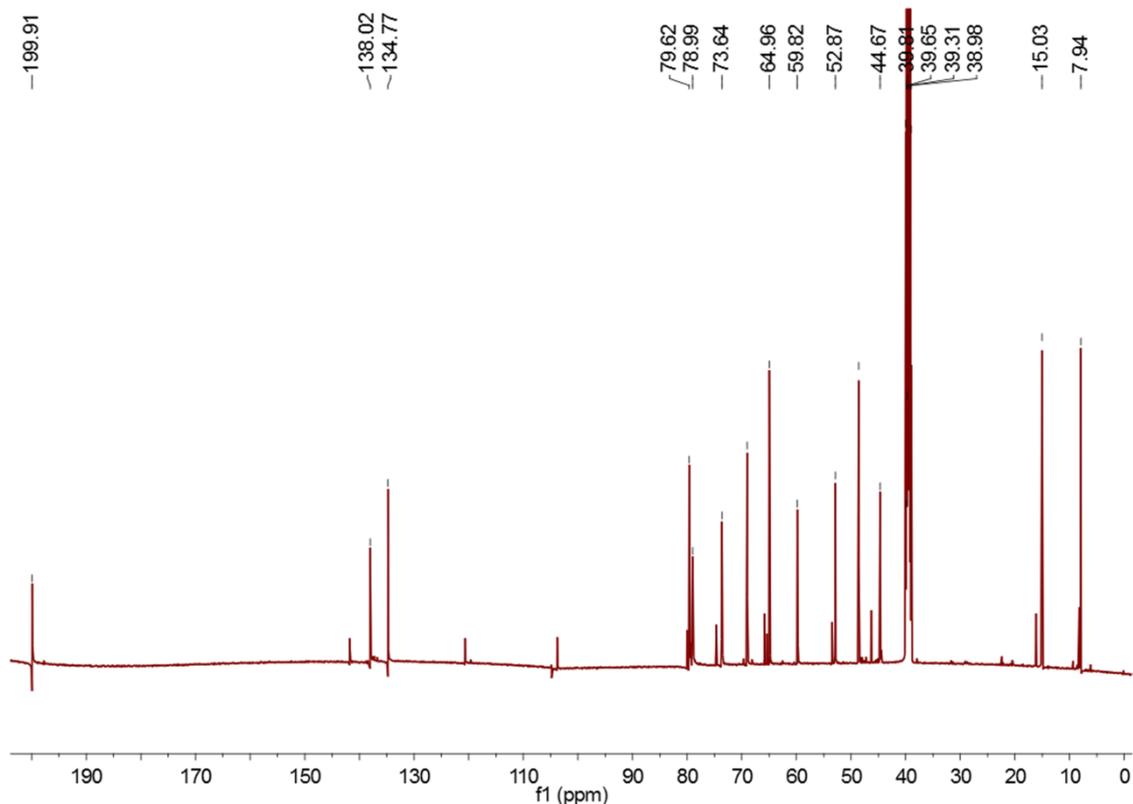


FIGURA 58. Espectro de ^{13}C NMR da fração TRICFG6C (nivalenol (**41**)), (DMSO-d₆, 125 MHz).

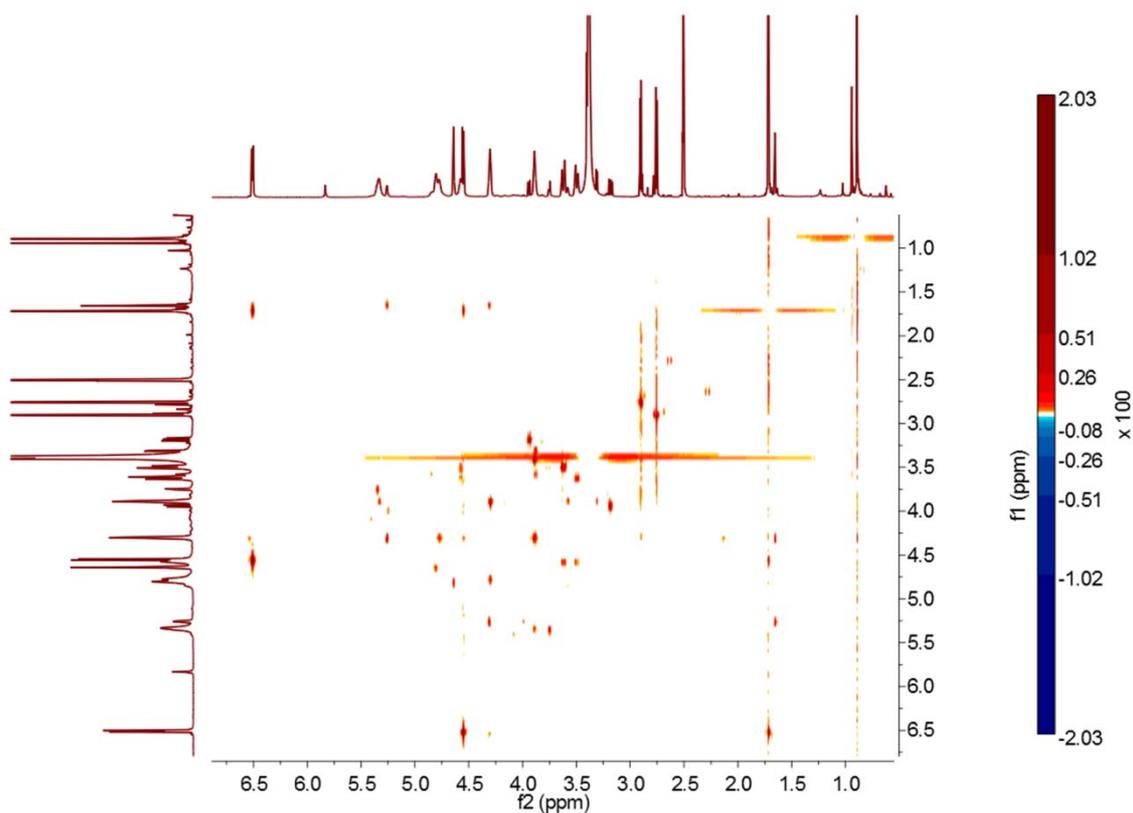


FIGURA 59. Espectro de COSY da fração TRICFG6C (nivalenol (**41**)), (DMSO-d₆, 500 MHz).

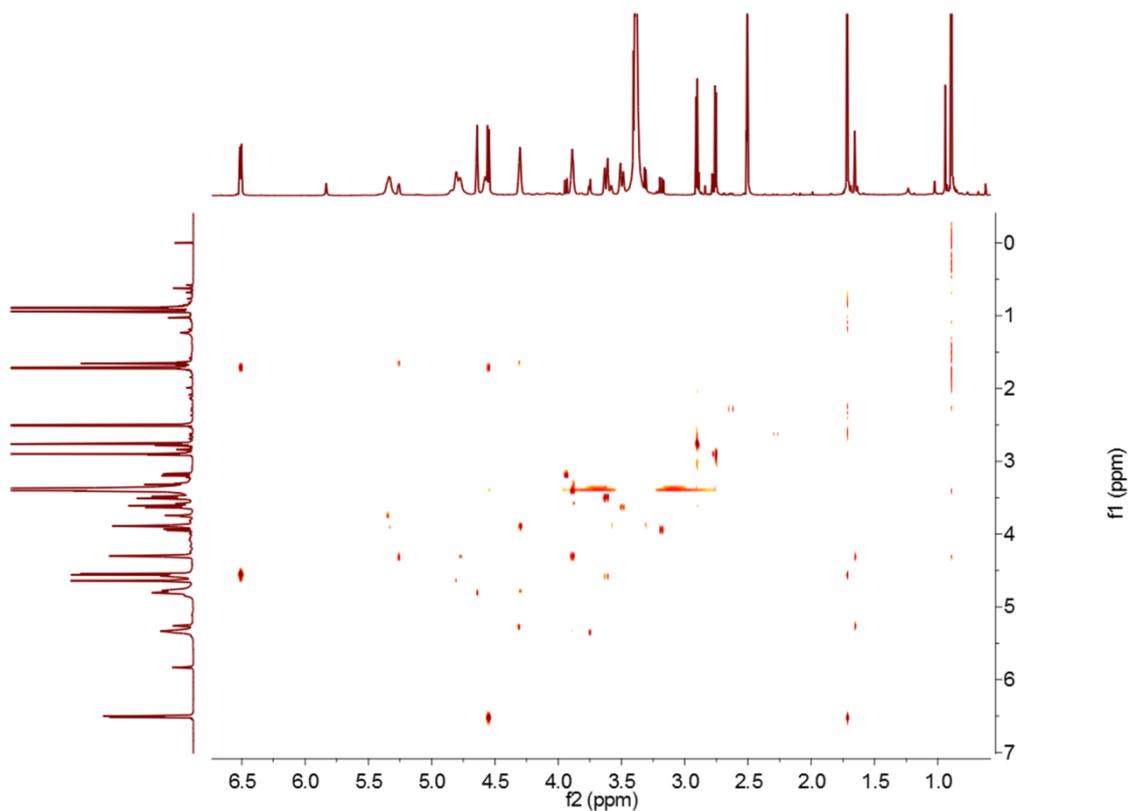


FIGURA 60. Ampliação da FIGURA 59.

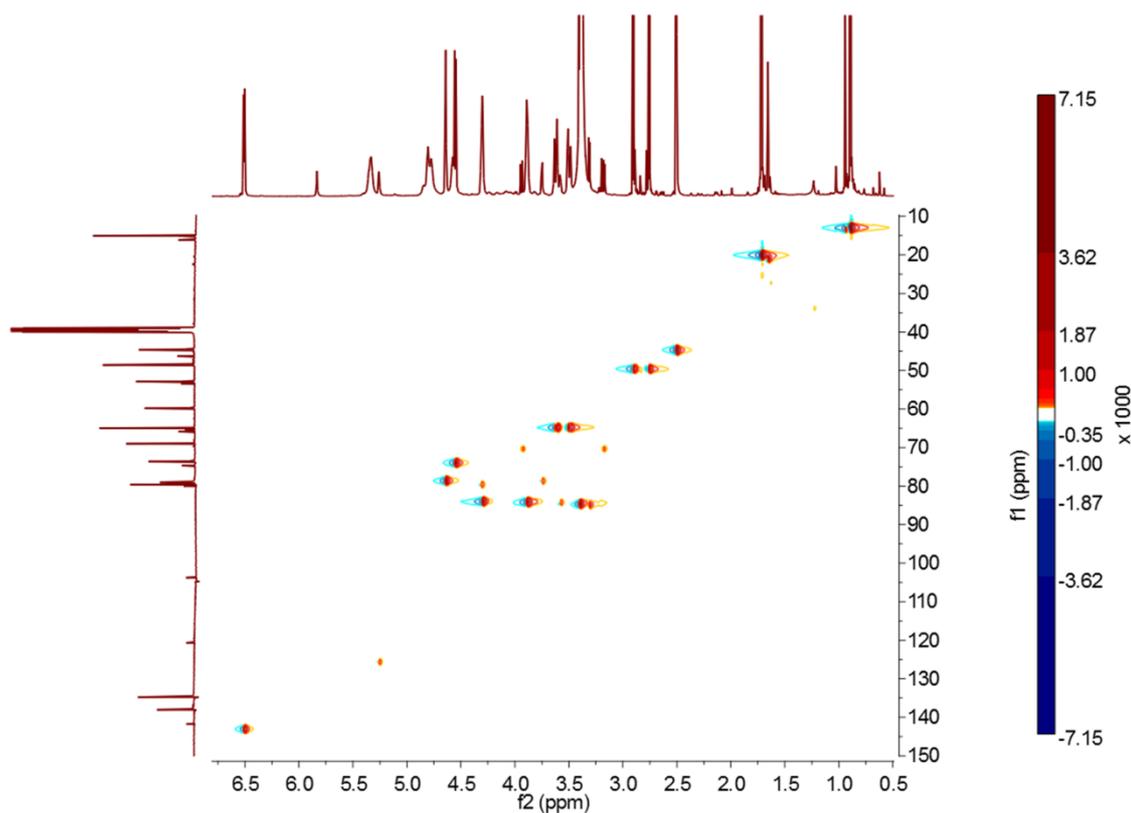


FIGURA 61. Espectro de gHSQC da fração TRICFG6C (nivalenol (**41**)), (DMSO-d₆, 500 MHz, 125 MHz).

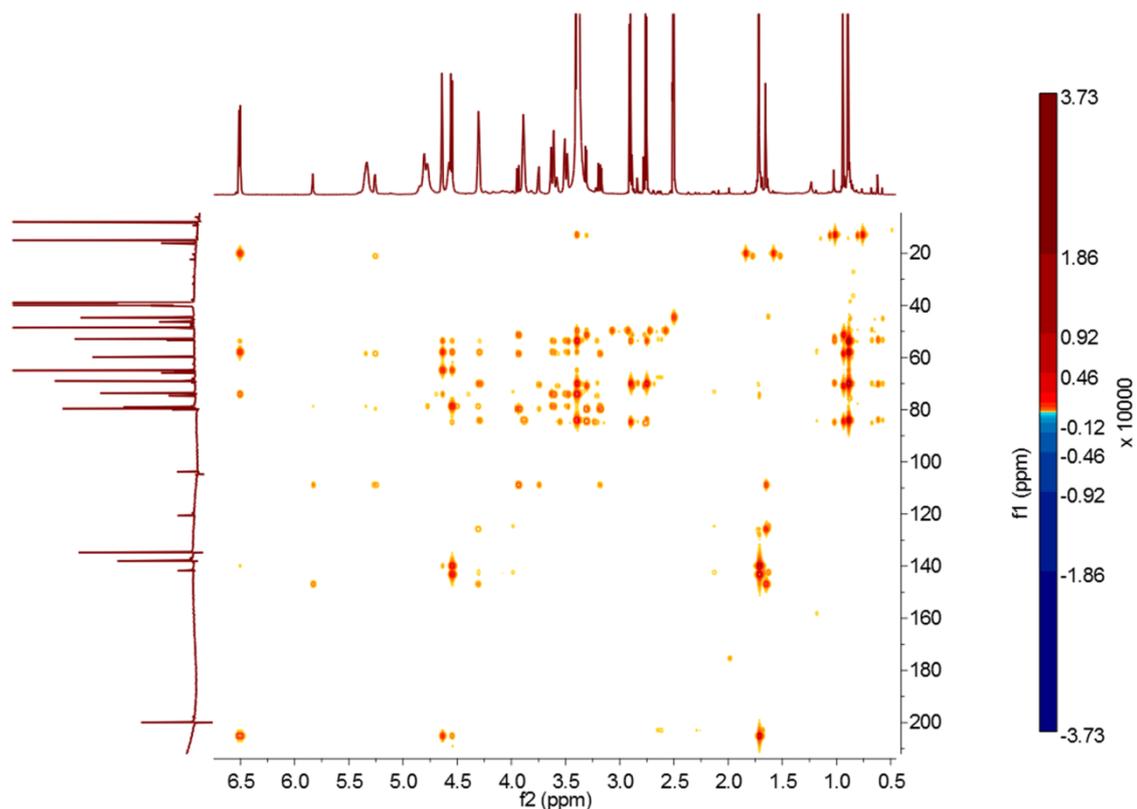


FIGURA 62. Espectro de gHMBC da fração TRICFG6C (nivalenol (**41**)), (DMSO-d₆, 500 MHz, 125 MHz).

Assim, com base nestes dados, foi proposta a estrutura do composto nivalenol (**41**) (FIGURA 63) como sendo a substância referente a esta fração. Os dados obtidos por ESI-MS/MS no modo negativo de análise também confirmou esta proposta, uma vez que foi obtido m/z 311 para a molécula deprotonada ($[M-H]^-$) e a fragmentação é idêntica a apresentada para o deoxinivalenol (**42**), ou seja, uma perda de 30Da (ver espectro para o nivalenol (**41**) na FIGURA 64). Os principais dados espectroscópicos obtidos estão apresentados na TABELA 13.

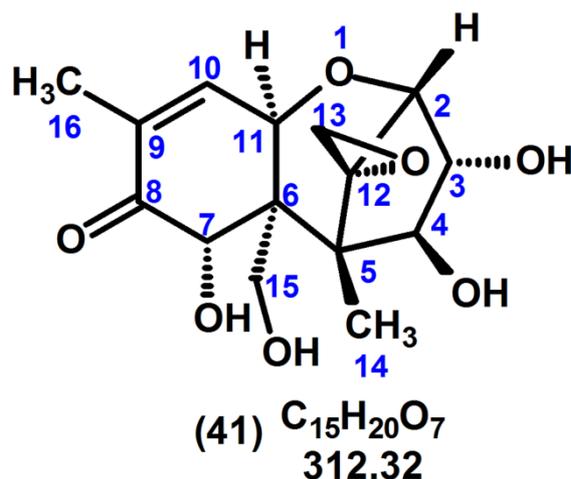


FIGURA 63. Estrutura química do nivalenol (41).

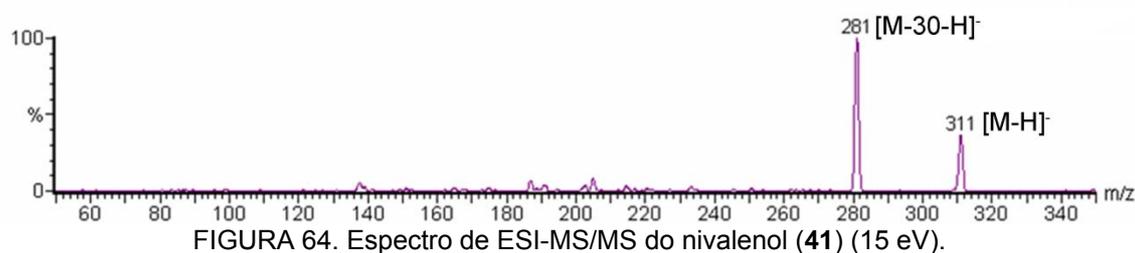


TABELA 13. Dados espectroscópicos obtidos para o nivalenol (41).

Valores obtidos (DMSO-d6)				
	δ_H (J, Hz)	δ_C	COSY (1H - 1H)	$gHMBC$ (1H - ^{13}C)
2	3.35, d (4.6), 1H	79.6	3	3, 4, 6, 12, 13
3	3.94, dd (4.6, 3.5), 1H	65.0	2, 4, 3-OH	5
4	3.89, t (3.5), 1H	79.1	3, 4	3, 6, 12, 13
5		48.6		
6		52.9		
7	4.66, sl, 1H	73.6	7-OH	5, 6, 8, 11, 15
8		199.9		
9		134.8		
10	6.55, dq (5.9, 1.5), 1H	138.0	11, 16	6, 7, 8, 16
11	4.55, d (5.9), 1H	69.0	3, 10, 16	2, 8, 9, 10, 15
12		79.00		
13a	2.90, d (4.3), 1H	44.6	2, 4, 13b	2, 5, 12
13b	2.76, d (4.3), 1H	44.6	2, 4, 131	2, 5, 12
14	0.87, s, 3H	7.94	4a, 13b	2, 4, 5, 6
15a	3.61, d (11.0), 1H	59.9	15b, 15-OH, 11	5, 6, 7, 11, 12
15b	3.49, d (11.0), 1H	59.9	15a, 15-OH, 11	5, 6, 7, 11, 12
16	1.73, s, 3H	15.0	10, 11	8, 9, 10
3-OH	5.36, sl, 1H		3	
4-OH	3.14, sl, 1H			
7-OH	4.77, sl, 1H		7	
15-OH	4.85, sl, 1H		15	

Esta substância também foi isolada de ambos os fungos patogênicos, *F. moniliforme* e *F. graminearum*. Entretanto, foi isolado aproximadamente 0,9 mg do primeiro e 1,7 mg do segundo.

Em linhas gerais, não foram obtidas nenhuma das toxinas clássicas esperadas com o estudo do fungo *F. moniliforme* isolado como endofítico de *Melia azedarach*. Entretanto, ambos os fungos *F. moniliforme* e *F. graminearum*, isolados como patógenos, se mostraram produtores de toxinas das classes das zearalenonas e dos tricotecenos. A única exceção foi a ausência da produção de zearalenol (**17**) por parte de *F. moniliforme*. Quando comparamos qualitativamente a produção destas substâncias, é absolutamente nítido que ambos os fungos produziram muito mais zearalenona (**14**) do qualquer outra substância.

Por este motivo, foram estabelecidas algumas bases para o desenvolvimento de um método analítico visando sua aplicação no monitoramento de uma curva de produção de zearalenona (**14**). Esta etapa foi iniciada com um estudo aprofundado do perfil de fragmentação da zearalenona (**14**), do zearalenol (**17**) e da 4-metoxizearalenone (**20**), um derivado sintético disponível em no laboratório GEBioMMi. É interessante notar que, de acordo com os métodos empregados, não foi isolada de nenhum dos fungos estudados, nenhuma substância pertencente a classe das fumonisinas. Para checar se realmente não havia a produção destas substâncias por parte dos fungos de interesse, foram desenvolvidas alternativas analíticas para checar a presença desta substância nos extratos de interesse de maneira rápida e direta. Estas alternativas estão melhor discutidas na próxima sessão.

Com respeito aos fungos do gênero *Alternaria*, grandes quantidades de alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**) foram isolados de ambas as cepas estudadas, ou seja, a cepa de *A. alternata* isolada como patógeno de tangerinas e outra cepa, também de *A. alternata*, isolada como patógeno de trigo (item 3.2.2.1.1.). Como estas substâncias foram novamente estudadas nos experimentos envolvendo HPLC-UV-SPE-NMR (item 3.3.6.), a determinação

estrutural destas duas substâncias e de seus análogos será descrita em detalhes nesta sessão.

3.3.2. Detecção de fumonisinas em extratos de interesse

Como nenhuma das fumonisinas clássicas foi isolada no trabalho descrito anteriormente, foi utilizado um padrão comercial da fumonisina B₁ (**57**) (98%, 1mg Sigma, USA) a fim de se realizar estudos de fragmentação e de se determinar algumas condições de análise via HPLC-MS/MS. Os espectros de massas *full scan* e de íons produtos desta substância estão apresentados na FIGURA 65, abaixo:

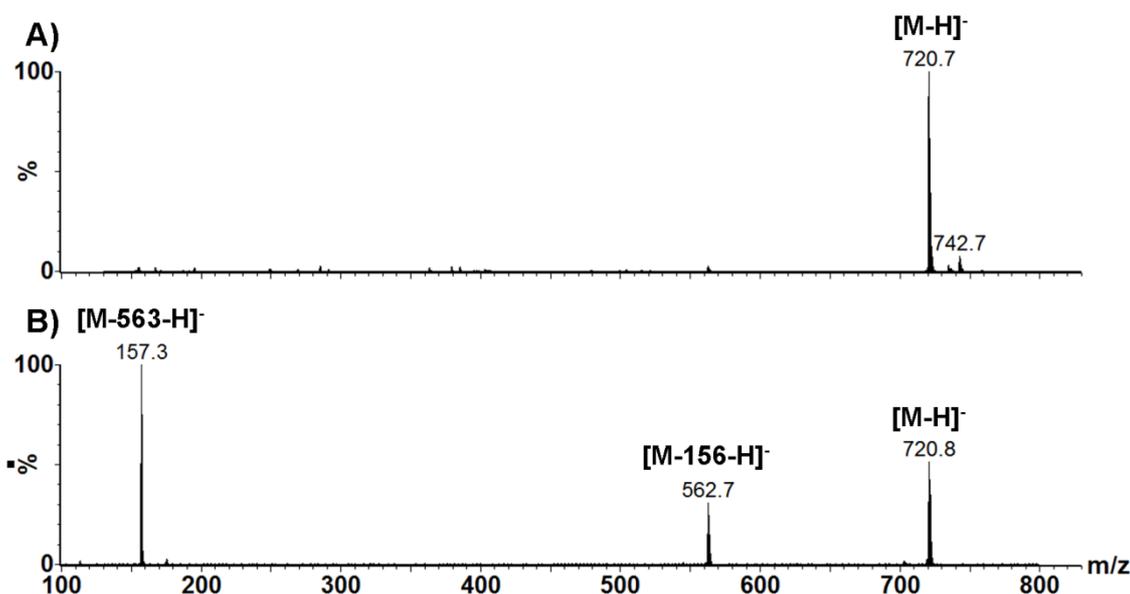


FIGURA 65. Espectros de massas obtidos para a fumonisina B₁ (**57**) por ESI no modo negativo de análises: A) Espectro *full scan*; B) íons produto de *m/z* 721 (CID-MS/MS, 25 eV).

Podemos perceber claramente que *m/z* 721 se fragmenta gerando apenas dois íons produtos: *m/z* 563 e *m/z* 157. Através da interpretação destes resultados evidencia-se que as fragmentações principais envolvem a clivagem na ligação σ entre o carbono carbonílico e o oxigênio heteroatomo do éster TCA, ora

com a molécula ionizada neste grupo (m/z 157), ora com a carga negativa no esqueleto da cadeia carbônica (m/z 562, FIGURA 66).

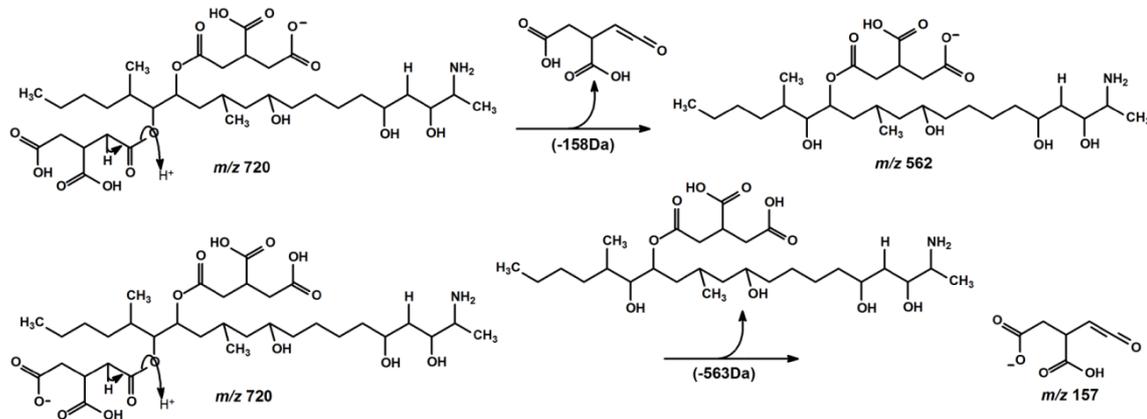


FIGURA 66. Proposta de fragmentação para a fumonisina B₁ (**57**).

Como podemos observar nos espectros mostrados aqui, a principal fragmentação da fumonisina B₁ (**57**) envolve a perda do grupo TCA na forma de ceteno (158 Da). Assim, pode-se assumir que todas as fumonisinas que possuem este grupo não modificado devem apresentar esta fragmentação. Portanto, um bom caminho para analisarmos uma determinada fração com respeito a presença destas substâncias é a realização de experimentos de perda neutra de 158 Da. Desta maneira, todas as fumonisinas que possuem este grupo podem ser detectadas. Experimentos de íons precursores de m/z 157 podem ser utilizados em conjunto com esta perda neutra para confirmar a presença destas substâncias. Além disso, para detectar as fumonisinas que não possuem o grupo TCA (as esfinganinas), podemos nos valer da realização de experimentos envolvendo a perda neutra de 563 Da.

Assim, visando detectar diferentes fumonisinas nos extratos de interesse, foi empregada a técnica de perda neutra monitorando as perdas de 158 e 563 Da. Os extratos de *F. moliforme* isolado como endofítico, *F. moniliforme* e *F. graminearum* isolados como patógeno e cepas de *A. alternata* isolados como patógenos. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 67. Como pode ser observado, a solução padrão de FB₁ apresentou dois picos com uma

diferença de 14,5 minutos entre pos picos detectados. Entretanto, os espectros de massas de ambos os picos são idênticos entre si (iguais também aos apresentados na FIGURA 65), o que sugere que o padrão comercial possui um isômero praticamente na proporção de 1:1.

Embora este resultado tenha sido inesperado, ele não inviabilizou o restante do estudo, ou seja, embora o padrão de fumonisina B₁ (**57**) não estivesse completamente puro, seria possível a análise dos extratos obtidos nestas condições. Entretanto, assim como o branco, todos os extratos obtidos não apresentaram a presença de qualquer derivado da fumonisina B₁ (**57**), de acordo com a metodologia de análise empregada.

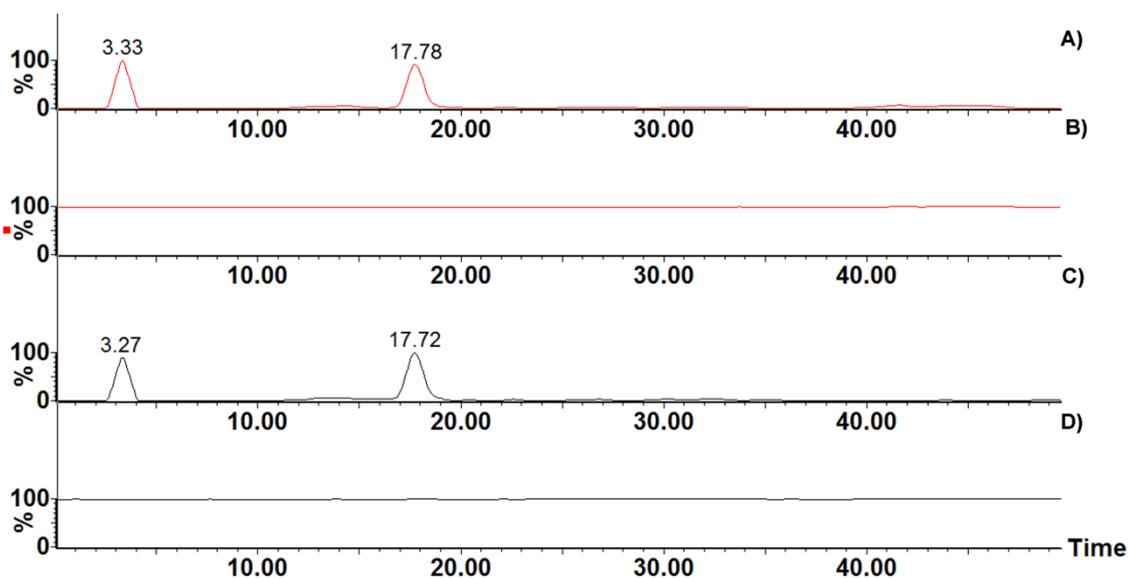


FIGURA 67. Cromatogramas por HPLC-MS/MS (perda neutra) obtidos para: A) solução de 10 $\mu\text{g/mL}$ de fumonisina B₁, perda neutra de 158 Da; B) Branco, perda neutra de 158 Da; C) solução de 10 $\mu\text{g/mL}$ de fumonisina B₁ (**57**), perda neutra de 563 Da; B) Branco, perda neutra de 563 Da.

Também não foi observado nenhum nos cromatogramas obtidos para os demais fungos, evidenciando que nenhum deste produziu fumonisinas sob as condições empregadas neste estudo. De maneira idêntica, experimentos de íons precursores de m/z 157 também indicaram a ausência desta substância nos extratos estudados. Embora este resultado tenha sido de certa maneira frustrante em um primeiro momento, ele foi fundamental para o estabelecimento da continuidade do estudo químico das fumonisinas. Ou seja, as cepas de

Fusarium e *Alternaria* utilizadas não se mostraram produtores deste tipo de composto.

Assim, optamos por iniciar os estudos dos mecanismos de fragmentação das zearalenonas ao invés de investir esforços e recursos na tentativa de se conseguir condições ótimas para a produção de fumonisinas. Os resultados obtidos no estudo destes mecanismos de fragmentação por CID-MS/MS estão apresentados na sequência.

3.3.3. Estudos dos mecanismos de fragmentação

Após o isolamento das substâncias mencionadas no item 3.3.1., iniciamos um estudo envolvendo a compreensão dos mecanismos de fragmentação das zearalenonas. O perfil de fragmentação destas substâncias já foi estudado sob condições de ionização a alto vácuo, utilizando-se técnicas como a *Fast Atom Bombardment* (FAB)¹⁷⁵ e a Ionização por Elétrons (EI)¹⁷⁶. Entretanto, pouco é conhecido sobre o perfil de fragmentação desta classe de substâncias por técnicas de ionização a pressão atmosférica, como *Eletrospray* (ES) ou *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI). O conhecimento deste perfil de fragmentação é de fundamental importância, não somente para a confirmação dos mecanismos envolvidos nos processos de CID-MS/MS (*Collision-Induced Dissociation*), mas também para aplicações mais diretas, como elucidações estruturais e controle de qualidade de amostras de interesse¹⁷⁷.

As estratégias para a elucidação destes mecanismos devem envolver, necessariamente, evidências experimentais sólidas, que em geral são obtidas realizando-se marcações isotópicas nas moléculas de interesse. Isso possibilita a comparação dos perfis de fragmentação entre o analito e seu análogo marcado isotopicamente. Esta estratégia foi utilizada previamente pelo nosso grupo em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Emanuel Carrilho, do Instituto de Química de São Carlos, USP, na análise de sideróforos hidroxâmicos¹⁷⁸.

Outra estratégia geralmente adotada na elucidação de mecanismos de fragmentação por CID-MS/MS é o uso de cálculos computacionais que suportam as propostas previamente elaboradas. Através destes cálculos, é possível obter, por exemplo, valores que indicam a estabilidade do fragmento proposto e a energia associada ao estado de transição que leva a um fragmento específico. Softwares como o GaussianTM, MOPACTM, e HyperchemTM são geralmente utilizados para a realização de tais cálculos¹⁷⁷.

Neste presente trabalho, iniciamos a estratégia para a determinação dos mecanismos de fragmentação de zearalenonas por CID-MS/MS baseando-se em reações químicas simples que fornecessem análogos deuterados destas substâncias. A incorporação de deutério nos analitos de interesse, visando a realização de estudos de fragmentação em espectrometria de massas, tem sido amplamente utilizada¹⁷⁷⁻¹⁸². Entretanto, os protocolos desenvolvidos, ao contrário dos reportados na literatura, não envolvem apenas a dissolução do analito em solvente deuterado apropriado, o qual permite somente a troca dos hidrogênios mais ácidos – como os de grupos hidroxila – por átomos de deutério em sua forma catiônica (D⁺). Além disso, estes protocolos incluem a adição de algum tipo de base que possa realizar a abstração de outros hidrogênios com menor acidez, como os α -carbonílicos, por exemplo.

Desta maneira, foram desenvolvidos 3 diferentes protocolos visando a deuteração de posições estratégicas nas moléculas zearalenona (**14**), 4-metoxizearalenone (**20**) e β -zearalenol (**17**), como descrito no item 3.2.2.3. (FIGURA 25). Os protocolos A e B envolvem o uso de bases relativamente volumosas, com baixo poder nucleofílico. O terceiro, protocolo C, foi adaptado de Miles et. al. (1996)¹⁸³, com condições de hidrólise mais “facilitadas”. Além disso, houve a preocupação com a tentativa de se deuterar também as posições 3 e 5, através de substituições eletrofílicas aromáticas.

Os dados já mencionados na literatura^{181, 184} e experimentos prévios (dados não mostrados aqui) nos indicaram que o uso de agentes deuterantes como CD₃OD e D₂O, utilizados em excesso estequiométrico no meio reacional, proporcionaram a troca dos hidrogênios mais ácidos logo após a dissolução do

analito. Assim, os protocolos foram desenvolvidos levando-se em consideração 2 outros fatores importantes: a base a ser empregada e a cinética de troca de átomos de hidrogênio por deutério.

Ao se observar o esqueleto químico de um composto da classe das zearalenonas (FIGURA 68), é possível identificar a presença de um anel macrolactônico. Portanto, as bases utilizadas deveriam necessariamente apresentar pouco caráter nucleofílico, caso contrário este anel seria aberto e conseqüentemente o perfil de fragmentação por CID-MS/MS seria completamente modificado. Assim, bases volumosas como trietilamina foram preferidas em relação a bases mais nucleofílicas, como hidróxidos em geral. Além desta, piridina e carbonato de sódio também foram utilizados.

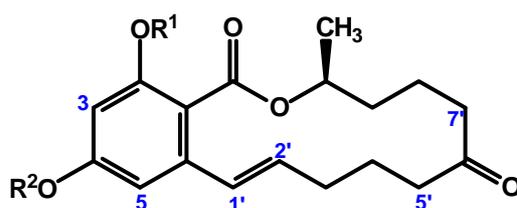


FIGURA 68. Núcleo básico das zearalenonas. Quando as posições R são hidrogênios, a molécula é a zearalenona (**14**), que origina o nome a classe química.

Quanto a cinética de troca de átomos de hidrogênio por deutério, dados da literatura indicam que a relação k_{H-D} / k_{D-H} compreende um valor entre 5 e 10 para sistemas ligados a átomos de carbono^{185, 186}. Ou seja, a troca de hidrogênio por deutério é de 5 a 10 vezes mais rápida do que o contrário. Isso ocorre porque a ligação C—H possui uma determinada energia vibracional no seu estado fundamental. Esta energia é chamada “energia no ponto zero” e está relacionada com a massa dos átomos que compõem esta ligação. Como a massa do deutério é o dobro do valor da massa do hidrogênio, a energia vibracional associada à ligação C—D contribui menos para a energia do ponto zero do que a energia de C—H. O raio da ligação química entre C—D também é menor do que a de C—H. Assim sendo, a substituição de prótons por deutérios, em geral, diminui a energia no ponto zero para uma dada molécula (FIGURA 69). A

compreensão deste mecanismo é de fundamental importância para o desenvolvimento do *set up* experimental para análises por CID-MS/MS. Como a infusão do analito foi feita via HPLC, o uso de fase móvel contendo solventes práticos poderia induzir a reação de volta, ou seja, a substituição de átomos de deutério já incorporados na molécula por prótons. Embora a cinética seja desfavorável para tal efeito, preferiu-se utilizar acetonitrila como fase móvel. A ionização certamente foi prejudicada, mas desta forma garantimos que realmente não houve a troca de deutério por hidrogênio.

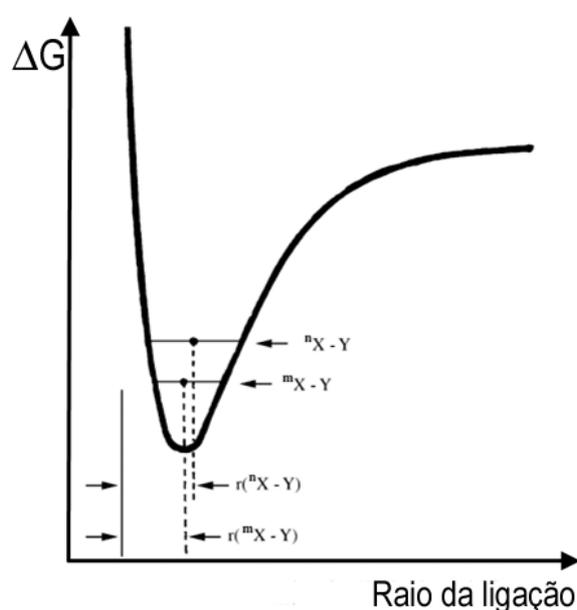


FIGURA 69. Representação esquemática da energia no ponto zero de uma ligação X—Y para dois isótopos de X: ${}^n\text{X}$ representa o isótopo mais leve e ${}^m\text{X}$ o mais pesado. Adaptado de Carey 1990¹³² e Günter 1999¹⁸⁷.

Os espectros de massas *full scan* obtidos no modo negativo estão apresentados na FIGURA 70. Os hidrogênios mais ácidos desta molécula provavelmente são os encontrados nas posições R¹ e R² (FIGURA 68), sendo este último o mais ácido devido ao fato do hidrogênio em R¹ encontrar-se quelado com a carbonila lactônica. Como o perfil de ionização e fragmentação da substância zearalenona (**14**) é idêntico quando analisadas por ESI ou APCI (FIGURA 71), decidiu-se realizar todas as análises por ESI.

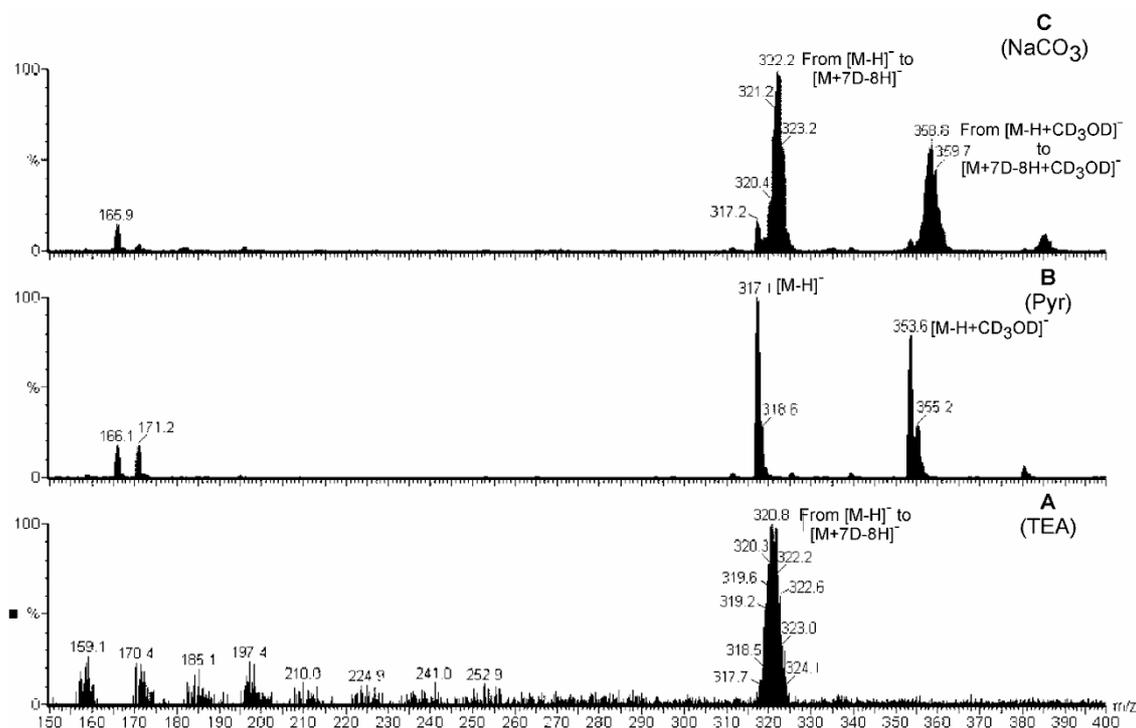


FIGURA 70. Espectros de massas obtidos na análise dos produtos das diferentes metodologias de deuteração da zearalenona (**14**): A) protocolo 1; B) protocolo 2; C) protocolo 3.

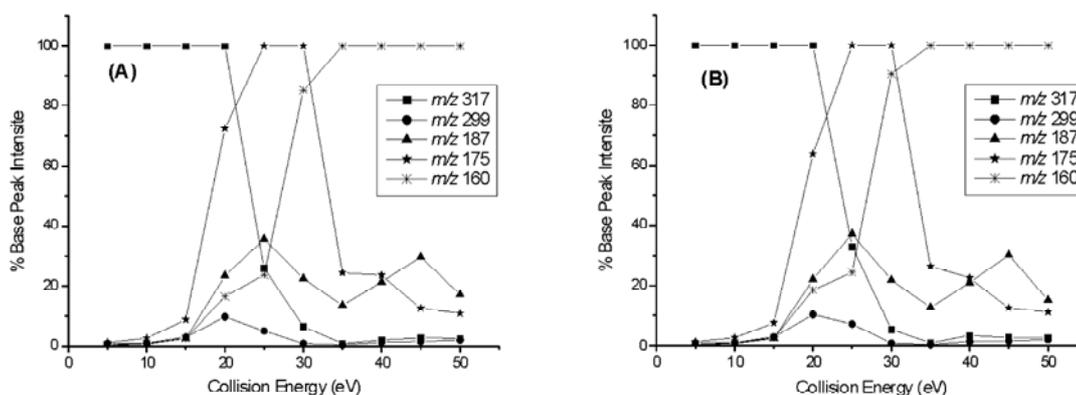


FIGURA 71. Intensidade dos íon obtidos na fragmentação da zearalenona (**14**) por CID-MS/MS: A) ESI; B) APCI.

Através da análise destes espectros podemos observar que o protocolo 1 foi bastante eficaz, incorporando de 1 a 8 átomos de deutério na molécula de zearalenona (**14**) (massa molecular 318 Da, molécula deprotonada variando de m/z 318 a m/z 324). Os protocolos 2 e 3 apresentaram produtos de adição à carboxila lactônica $[M-H+CD_3OD]^-$, sendo que este último também

apresentou deuterações nas posições esperadas. Desta maneira, somente os produtos obtidos através do protocolo 1 foram analisados com respeito a suas fragmentações, já que este demonstrou ser o mais eficiente nas reações de deuterações, sem produtos de hidrólise. Os espectros de CID-MS/MS obtidos para estes produtos estão apresentados na FIGURA 72. Os ruídos destes espectros foram mantidos os mesmos, com o intuito de se analisar absolutamente todos os possíveis picos.

Analisando-se estes espectros, podemos observar que a primeira fragmentação envolve sempre a perda de uma molécula de água ($[M-18]^-$). Isso indica que nenhum átomo de hidrogênio que pudesse ter sido trocado por deutério está envolvido nesta desidratação. Isso sugere que esta desidratação ocorra por um mecanismo pouco convencional. Diante deste dado experimental, foi excluída a possibilidade de haver uma desidratação envolvendo os hidrogênios α -carbonílicos ou mesmo uma desidratação das hidroxilas fenólicas para dar o íon benzino. Apesar deste íon já ser descrito na literatura como um fragmento formado em alguns processos envolvendo análises por espectrometria de massas^{188, 189}, aparentemente ele não é formado no processo de desidratação da zearalenona (**14**) (mecanismo na FIGURA 73).

Além da comprovação experimental, via marcação isotópica, cálculos computacionais possibilitariam uma contraprova do mecanismo proposto. Entretanto, a molécula de zearalenona (**14**) possui muitos graus de liberdade e assim seria muito complexo e inviável tentar propor um mecanismo de fragmentação baseando-se somente em cálculos quânticos de estabilidade dos fragmentos e dos estados de transição envolvidos nesta fragmentação.

Assim, com base somente nos dados obtidos, foi proposto um mecanismo de fragmentação que sugere a abertura do anel macrolactônico através de um Rearranjo de MacLafferty, seguido de uma nova ciclização formando um anel de cinco membros. Após esta etapa, seria possível uma simples desidratação 1,2, que ocorreria sem envolver nenhum hidrogênio label (FIGURA 74).

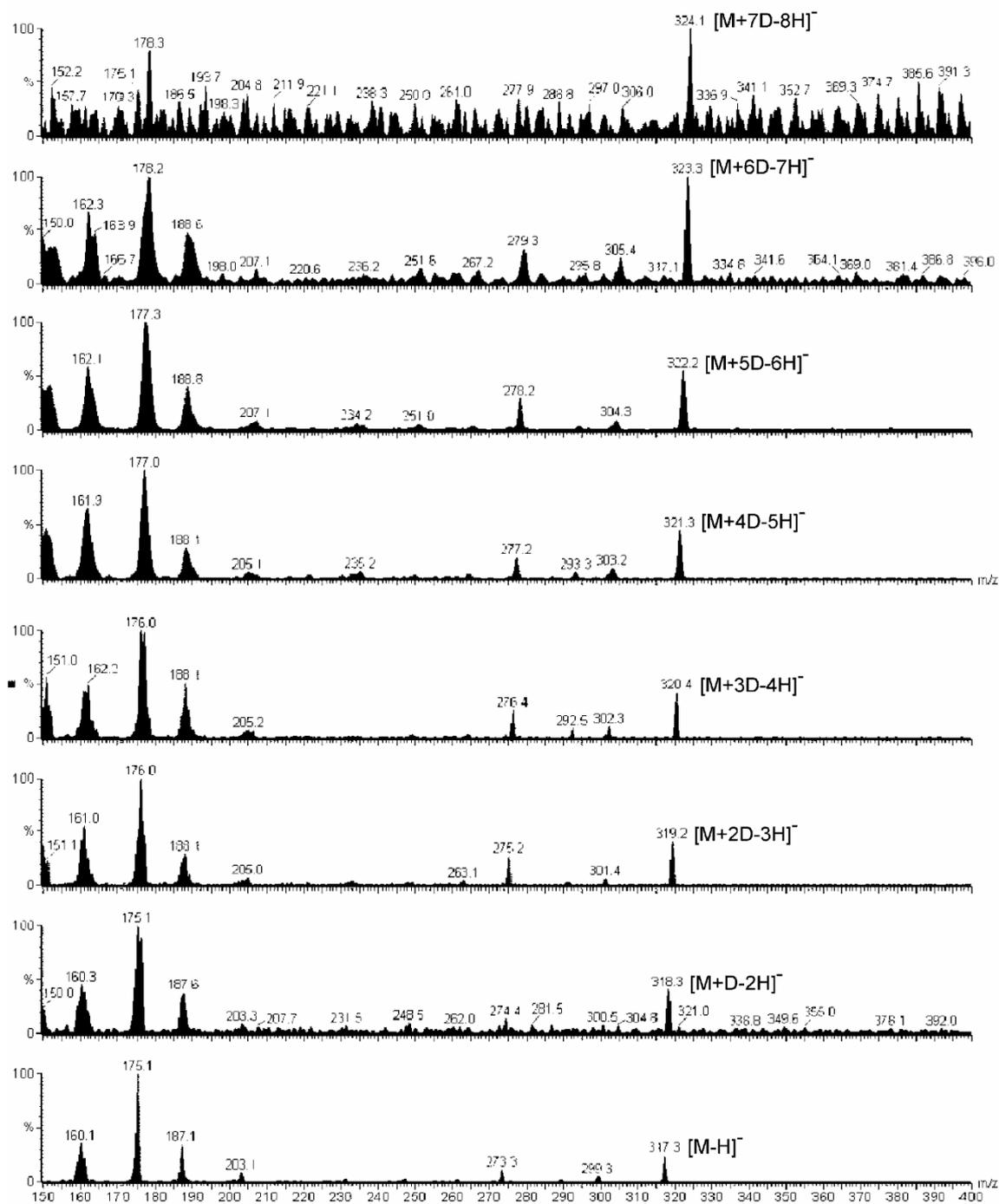


FIGURA 72. Espectros de íons produzidos da zearalenona (14) obtidos por CID-MS/MS (25eV); de baixo para cima, d_0 até d_7 .

Embora seja inviável a realização de cálculos quânticos complexos para esta molécula, a otimização geométrica dos fragmentos gerados, realizada utilizando-se o software HyperchemTM, corrobora com a proposta de fragmentação apresentada. Ainda que o modelo seja bastante simplório, a estabilidade dos íons gerados após a desidratação da zearalenona (**14**) via o mecanismo proposto na FIGURA 74 é muito maior do que a estabilidade do íon benzino (TABELA 14). Além disso, tanto a clivagem do anel lactônico através do rearranjo de MacLafferty proposto quanto a desidratação no passo seguinte leva à íons com energias menores do que a própria molécula de zearalenona (**14**) deprotonada.

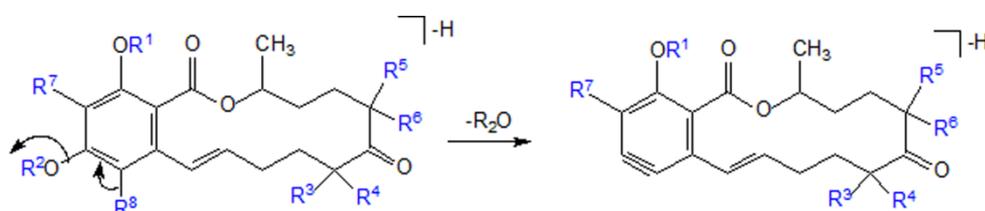


FIGURA 73. Possível formação do íon benzino na desidratação da zearalenona (**14**). As evidências experimentais não indicam que isso ocorra.

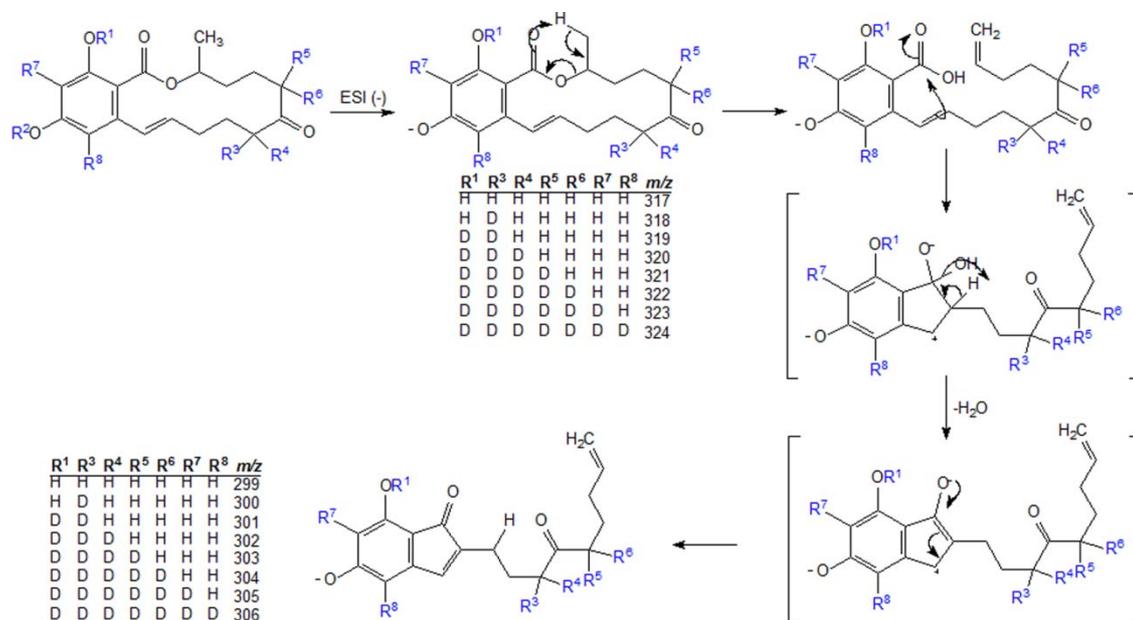


FIGURA 74. Modelo proposto para a perda de água a partir da molécula deprotonada [M-H]⁻.

A única questão remanescente é se existiria a possibilidade para o ataque nucleofílico envolvendo os elétrons π da dupla entre os carbonos 1' e 2' na

carboxila do carbono 12'. Cálculos de dinâmica molecular indicam que pode haver a racemização desta dupla para uma geometria *cis* e assim a distância entre o carbono 2' e o carbono 12' seria de aproximadamente 3.21 Å e, portanto, o ataque poderia ocorrer (FIGURA 75). Isso também confirma o fato de que a fragmentação da zearalenona (**14**) (*trans*-zearalenona (**14**)) por ESI-CID-MS/MS, no modo negativo, ser idêntica à de seu análogo, a *cis*-zearalenona (**22**), não estudada aqui exatamente por esta similaridade. Além disso, os valores de densidade eletrônica também indicam que o ataque nucleofílico é possível. Embora o carbono em C2' apresente-se relativamente neutro (0.004), ou seja, com baixa densidade de carga, o carbono carboxílico em C12' é altamente eletrofílico, com um valor de densidade de carga superior ao da carbonila em C6' (ver FIGURA 75).

TABELA 14. Cálculo da energia para a conformação mais estável dos fragmentos propostos. Dados obtidos via dinâmica molecular, utilizando-se o software Hyperchem™.

Íons	Energia total (kcal/mol)
Zearalenona (14)	
Zearalenona (14) ([M-H] ⁻ , FIGURA 74)	39.263214
<i>m/z</i> 317, após rearranjo de McLafferty ([M-H] ⁻ , FIGURA 74)	35.983517
[M-H-H ₂ O] ⁻ gerado pelo mecanismo proposto na FIGURA 74	29.710922
Íon benzino para a zearalenona (14) ([M-H-H ₂ O] ⁻ , FIGURA 73)	138.863489
4-metoxizearalenone (20)	
4-metoxizearalenone (20) ([M-H] ⁻ , análogo a FIGURA 74)	42.671844
<i>m/z</i> 313, após rearranjo de McLafferty ([M-H] ⁻ , análogo a FIGURA 74)	36.858215
[M-H-H ₂ O] ⁻ gerado pelo mecanismo proposto de maneira análoga ao da FIGURA 74	30.657011
Íon benzino para a 4-metoxizearalenone (20) ([M-H-H ₂ O] ⁻ , análogo a FIGURA 73)	193.200291
β-zearalenol (17)	
β-zearalenol (17) ([M-H] ⁻ , FIGURA 78)	47.785293
[M-H-H ₂ O] ⁻ gerados pelos mecanismos propostos na FIGURA 78	40.617321
	39.013984
Íon benzino para o β-zearalenol (17) ([M-H-H ₂ O] ⁻ , análogo a FIGURA 73)	143.441360

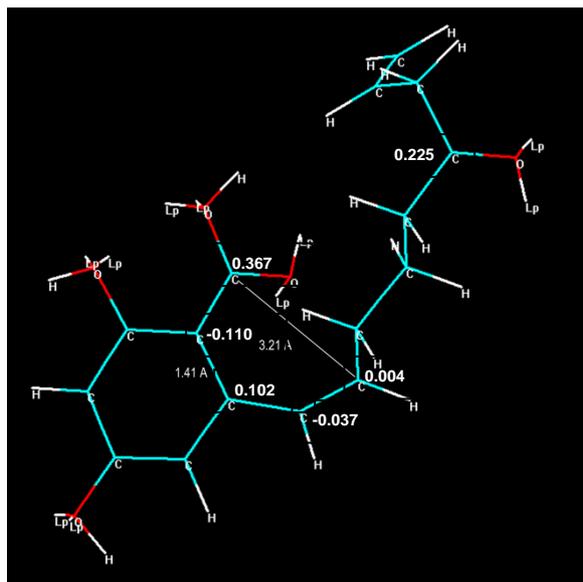


FIGURA 75. Cálculos de dinâmica molecular indicam que a estrutura da zearalenona (**14**) pode assumir uma conformação tal que a distância entre o carbono 2' (nucleófilo, de acordo com o mecanismo de fragmentação proposto) e o carbono 12' (eletrófilo) seja de aproximadamente 3.21 Å, possibilitando, assim, a formação da ligação δ .

Evidentemente que toda esta comparação é baseada em modelos quânticos simples. Energias dos estados de transição, por exemplo, não podem ser calculadas usando estes modelos. Desta maneira, utilizamos as informações dos cálculos computacionais apenas como um indicativo de que o mecanismo proposto e checado através de marcação isotópica pode realmente ser o que melhor explica os íons formados.

Este mesmo comportamento, ou seja, perda de 18 Da, é observado no espectro de massas da 4-metoxizearalenone (**20**) (FIGURA 76) (alguns valores de m/z apresentados nos espectros podem não corresponder exatamente a perda de 18 Da devido ao processo de *smooth* dos picos, que calcula somente a média dos valores dos picos). Os valores de $[M-H]^-$ variam de m/z 331 – sem nenhum deutério incorporado – até m/z 337 – com seis átomos de deutério. Porém, esta mesma fragmentação não ocorre no caso do β -zearalenol (**17**) (FIGURA 77), muito possivelmente porque este composto possui uma hidroxila na posição 6' e os grupos (R^3), (R^4), (R^5) e (R^6) agora não são mais hidrogênios lábeis e conseqüentemente eles não podem ser substituídos por deutério. Assim sendo, uma simples desidratação 1,2 envolvendo a hidroxila da posição 6' é preferível frente à desidratação proposta na FIGURA 74. Como agora apenas 4 hidrogênios

foram trocados por deutério – (R^1), (R^7), (R^8) e a hidroxila da posição 6' – os valores de $[M-H]^-$ variam de m/z 319 até m/z 323.

Através de uma interpretação detalhada destes espectros, foi proposta uma possível e provável ordem de substituição de hidrogênios lábeis por átomos de deutério na molécula de β -zearalenol (**17**): R^1 – grupos hidroxila – (R^7) ou (R^8). Assim, a simples desidratação 1,2 fornece a perda de 18 Da (H_2O) para m/z 319 e m/z 320 ($(R^1) = \text{deutério}$), mas para os demais íons é observada a perda de 19Da (HDO), como apresentado na FIGURA 78.

Mecanismos de fragmentação para outros íons também foram propostos. Para a zearalenona (**14**), por exemplo, se considerarmos que a ionização tenha ocorrido na hidroxila mais livre (na posição 4), podemos inferir que a primeira deuteração deve ter ocorrido em uma posição α à carbonila – (R^3), (R^4), (R^5) ou (R^6). Já a segunda deuteração deve ter ocorrido na outra hidroxila, que é quelada pela carboxila lactônica; isso porque os íons m/z 160, m/z 175 e m/z 187 (íons produtos de m/z 318, FIGURA 72) não apresentam nenhuma incorporação de deutério. Na seqüência, as outras deutações devem ocorrer nas outras 3 posições α carbonílicas. Por fim, as duas últimas deutações devem ocorrer nas duas posições aromáticas, através de um mecanismo de substituição eletrofílica aromática.

É interessante salientar que o mecanismo pelo qual o íon m/z 175 é gerado envolve o rearranjo com um dos grupos ligados ao carbono α carbonílico ((R^3) ou (R^4)). Quando estas posições encontram-se deuteradas é observado m/z 177 (D-2); além disso, são observados m/z 188 e m/z 162 (D-1) como íons produtos de m/z 321, evidenciando que provavelmente este deva ser o mecanismo envolvido nesta fragmentação. Os clusters de íons m/z 160 – m/z 163 e m/z 187 – m/z 190 são todos gerados através de um Rearranjo de MacLafferty envolvendo a carbonila na posição 6' (FIGURA 79 e FIGURA 80). A estabilidade dos picos base (m/z 175 – m/z 179) é justificada pelas conjugações envolvendo a carga negativa e a carbonila (FIGURA 80).

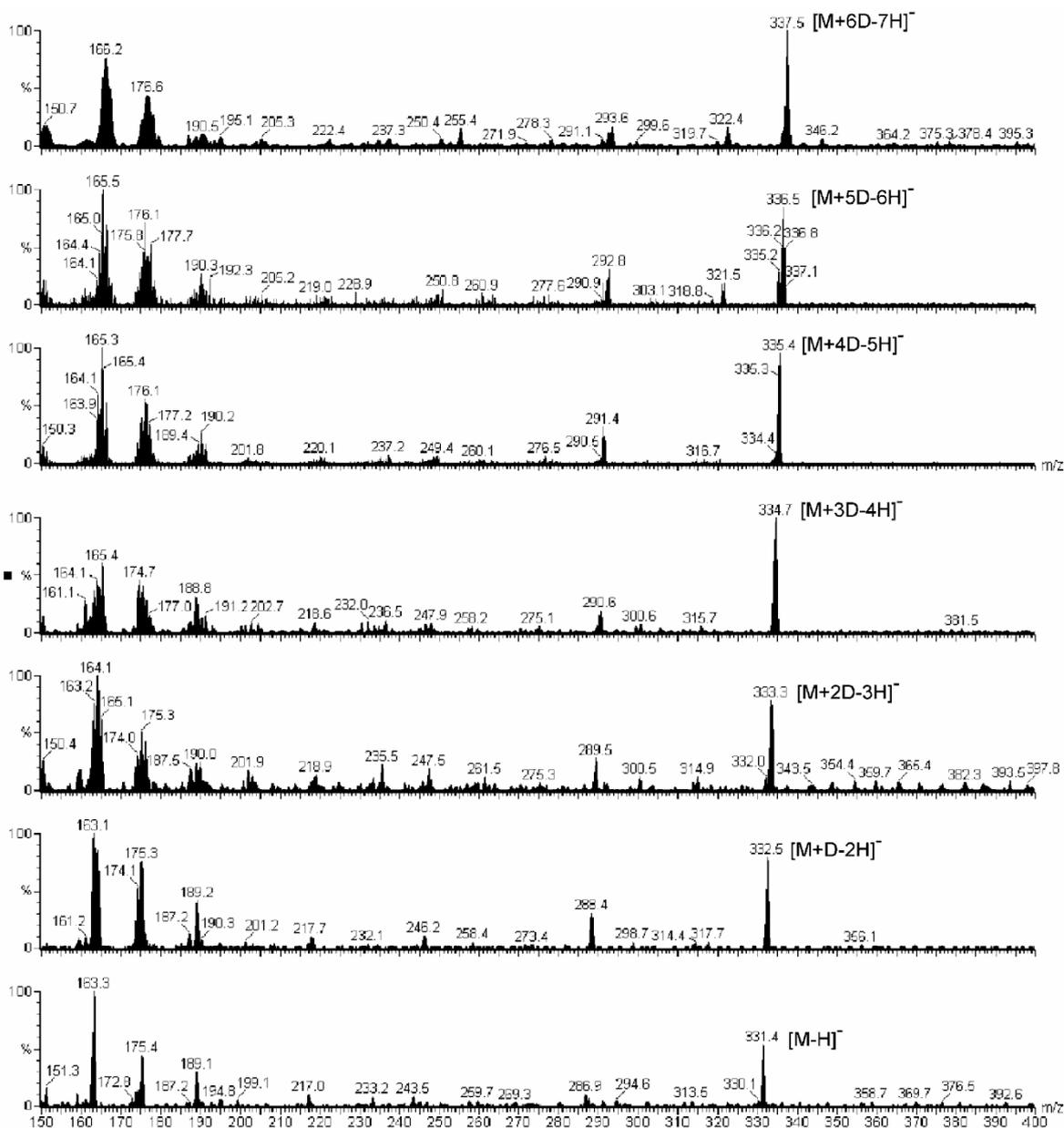


FIGURA 76. Espectros de íons produtos da 4-metoxizearalene (**20**) por CID-MS/MS (20 eV); de baixo para cima, d₀ até d₆

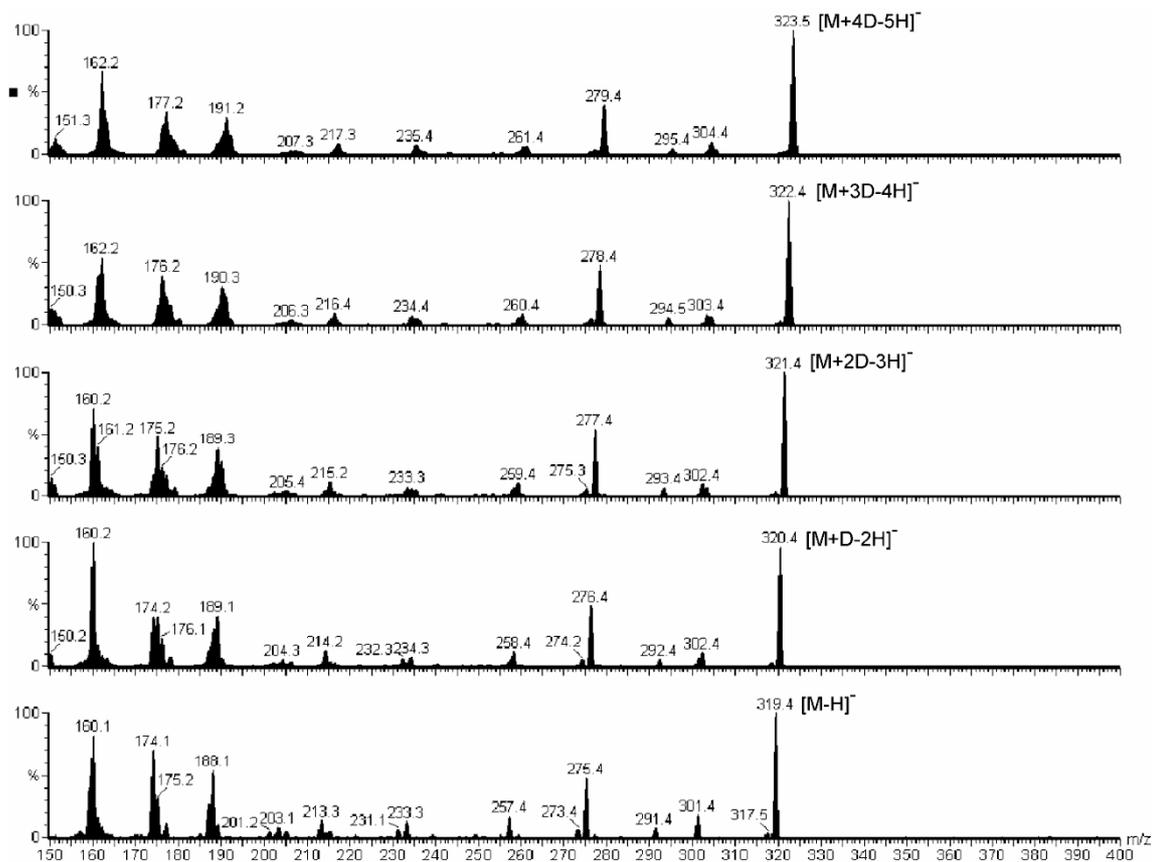


FIGURA 77. Espectro de íons produtos do β -zearalenol (17) obtidos por CID-MS/MS (25 eV); de baixo para cima, d_0 até d_4 .

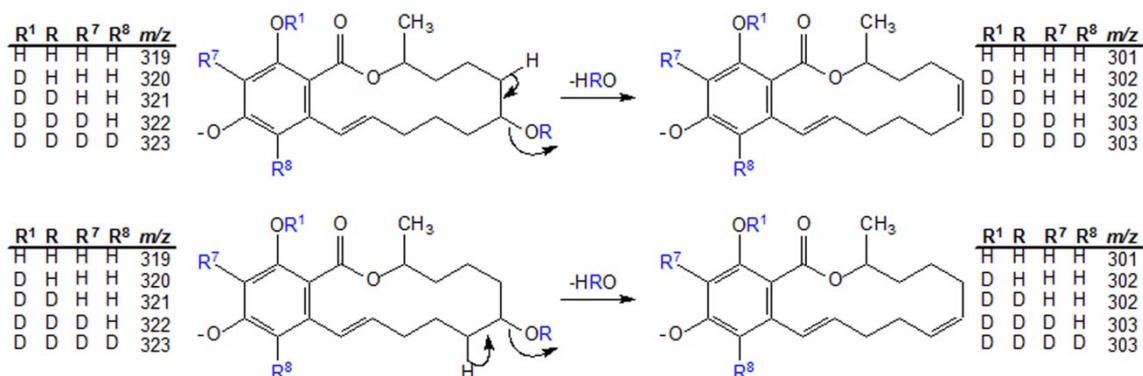


FIGURA 78. Proposta para a desidratação 1,2 do β -zearalenol (17) (perda de HRO – 18 ou 19Da). Aparentemente não há diferença considerável com respeito à estabilidade desses íons.

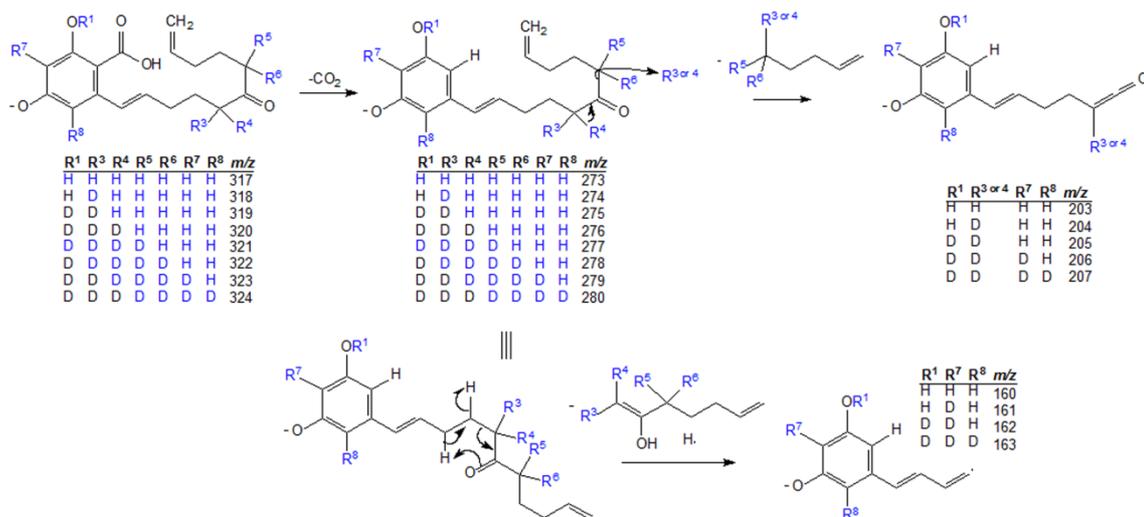


FIGURA 79. Proposta de fragmentação para a zearalenona (14).

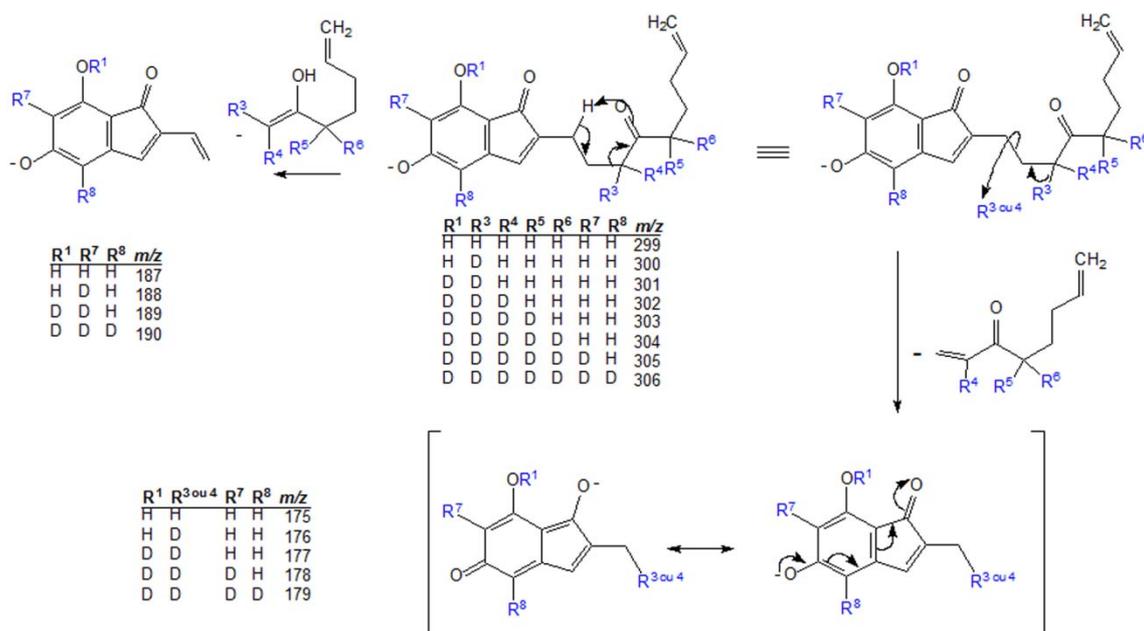


FIGURA 80. Proposta para a formação do pico base nos espectros de CID-MS/MS da zearalenona (14).

Fragmentações similares ocorrem com a 4-metoxizearaleno (20), mas agora provavelmente a ionização deva ocorrer na hidroxila ligada ao carbono 2 (FIGURA 68). A perda de 44 Da, provavelmente na forma de uma molécula de CO₂, fornece íons variando de m/z 287 até m/z 293 (fragmentação não mostrada).

Após o rearranjo que permite a desidratação das moléculas deprotonadas (idêntico ao que ocorre para a zearalenona (14), (FIGURA 74), são

gerados íons que variam de m/z 313 até m/z 319. Assim, um simples rearranjo envolvendo (R^3) ou (R^4) com a clivagem heterolítica da ligação σ C3'—C4' (perda de 124 Da) forneceria íons variando de m/z 189 até m/z 192 (FIGURA 81). Fragmentações idênticas, somadas às perdas de CO_2 não mostradas aqui, ocorrem com as moléculas deprotonadas m/z 331 até m/z 337 depois da abertura do anel macrocíclico por um Rearranjo de MacLafferty para gerar os íons de m/z 163 até m/z 166. Um novo Rearranjo de MacLafferty envolvendo a carbonila em C6' e o hidrogênio em C3' (também com perda concomitante de CO_2) dos íons moleculares fornecem m/z 175 até m/z 177. Todas estas propostas de fragmentação estão apresentadas na FIGURA 82.

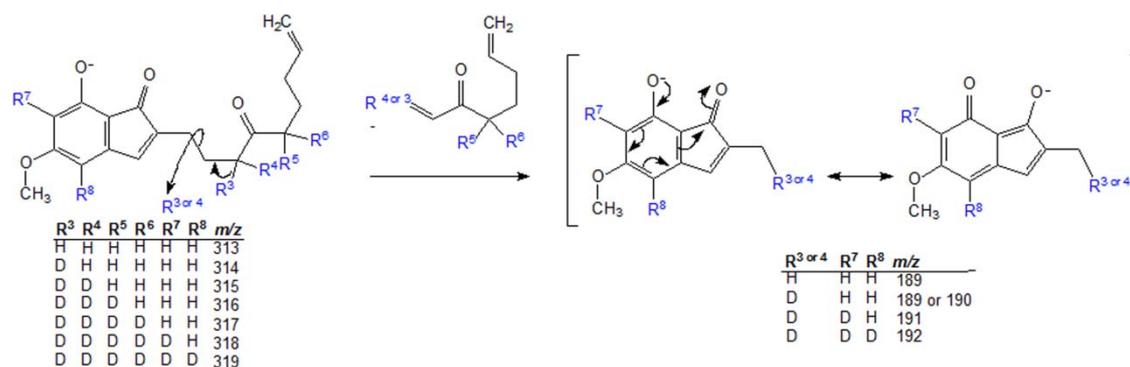


FIGURA 81. Proposta para a formação dos picos base nos espectros de CID-MS/MS da 4-metoxizearalenone (**20**).

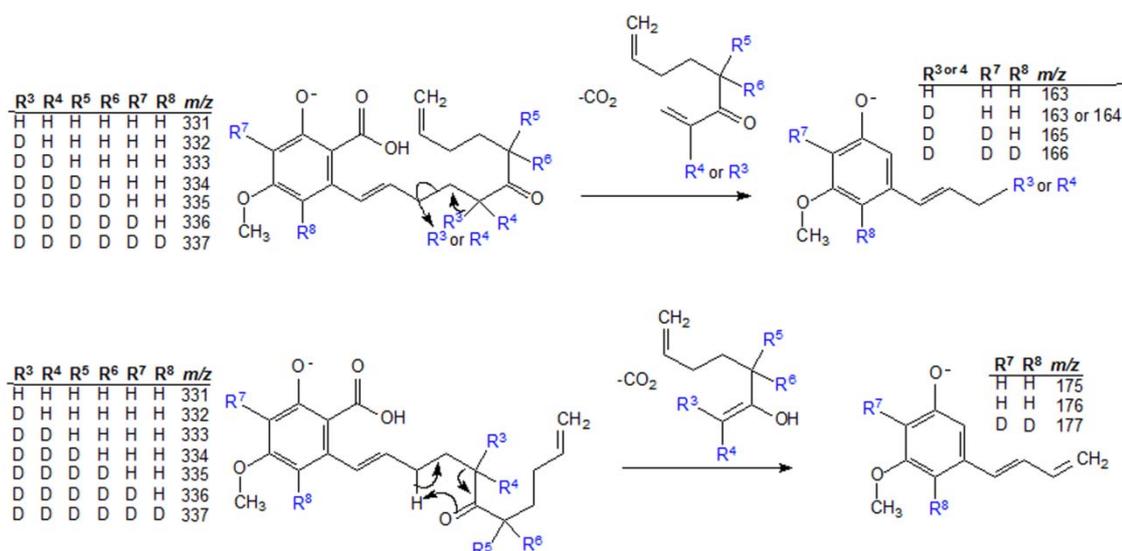


FIGURA 82. Formação de alguns íons isotopólogos m/z 163 – m/z 166 e m/z 175 – m/z 177 a partir de m/z 331 – m/z 337, moléculas deprotonadas da 4-metoxizearalenone (**20**).

Para o β -zearalenol (**17**), a única fragmentação que é similar às apresentadas até aqui é a perda de CO_2 (44Da) a partir das moléculas deprotonadas, gerando m/z 275 até m/z 279. Considerando agora que a ionização ocorre na hidroxila ligada a C4, podemos observar, além da perda de CO_2 já comentada, a perda de 28 Da (CO), gerando os íons isotopólogos m/z 291 até m/z 295. Algumas propostas mecanísticas para esta e outras fragmentações são mostradas na FIGURA 83. Através de clivagem da ligação σ entre C5' e C6' dos íons m/z 275 até m/z 279, foi proposta a formação dos íons m/z 175 até m/z 178 e, na seqüência, a formação dos íons m/z 174 até m/z 177 pela perda de um hidrogênio radicalar (FIGURA 83). Este íon é bastante estável, pois o radical encontra-se em uma posição alílica e pode conjugar com todo o sistema aromático.

Experimentos de íons precursores também foram realizados no intuito de se comprovar os mecanismos propostos até aqui. Os dados obtidos, sumarizados na TABELA 15, mostram que os íons isotopólogos m/z 162 até m/z 165 são produtos dos íons m/z 301 até m/z 303. Assim, foi proposta uma simples clivagem homolítica para a geração destes íons, como mostrado na FIGURA 84. Nesta proposta, os íons m/z 188 até m/z 191 são gerados por clivagem homolítica de diferentes ligações σ C—C a partir dos íons isotopólogos m/z 301 até m/z 304.

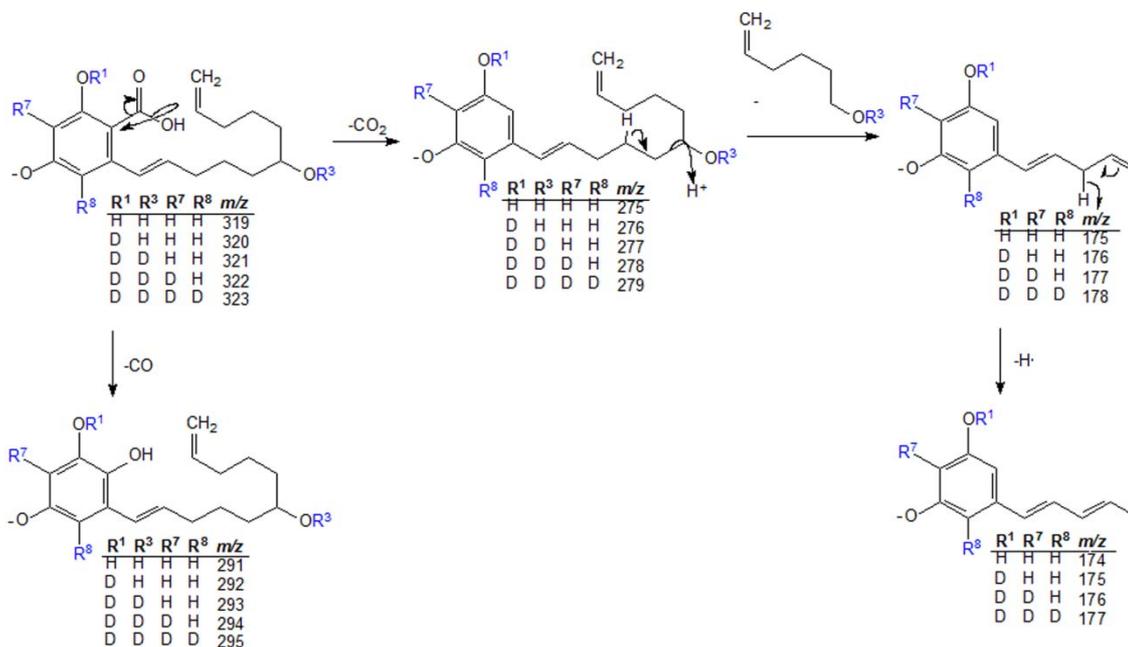


FIGURA 83. Proposta para a formação de alguns íons produtos nos espectros de CID-MS/MS do β-zearelenol (17).

TABELA 15. Experimentos de íons precursores das moléculas não deuteradas.

Zearalenona (14)		4-metoxizearalenone (20)		β-zearelenol (17)	
Íons Produtos (m/z)	Íons Precursores (m/z)	Íons Produtos (m/z)	Íons Precursores (m/z)	Íons Produtos (m/z)	Íons Precursores (m/z)
299	317	313	331	301	319
273	317	287	331	291	319
203	273	189	331	275	319
187	299, 273	175	331	188	301
175	299, 273	163	331	175	275
160	299, 273			174	175, 275
				160	301

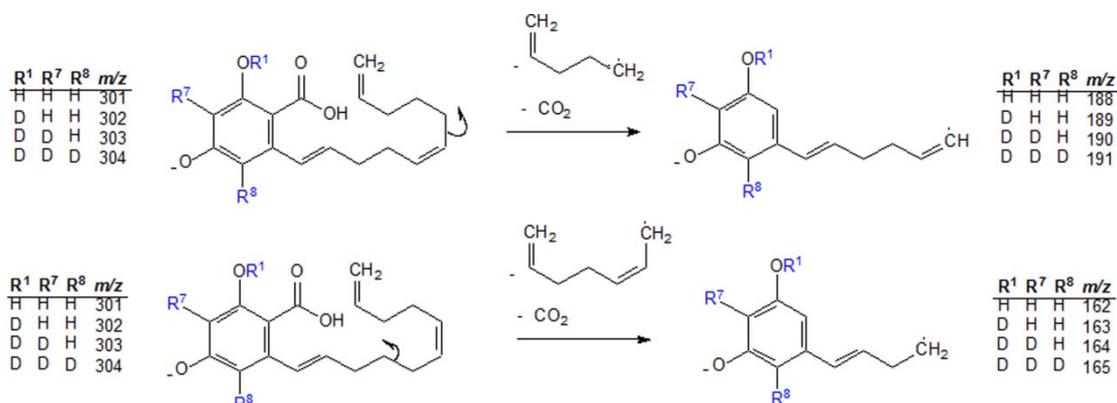


FIGURA 84. Mecanismo proposto para a formação dos íons isotopólogos m/z 188 até m/z 191 e m/z 162 até m/z 165 nos espectros obtidos para o β-zearelenol (17).

Analisando-se a FIGURA 85, pode-se observar uma perda de H₂O (18Da) a partir dos íons *m/z* 275 - *m/z* 279, gerando íons de *m/z* 257 até *m/z* 261. Isso significa que nenhum hidrogênio lábel está envolvido nesta fragmentação. Se considerarmos, ao contrário do que foi proposto anteriormente, que a ionização ocorra em R², o processo de desidratação 1,2 fornece uma perda de 19Da (HDO). Assim, a ionização deve ocorrer na hidroxila da posição C6', pois desta maneira seria possível a abstração do hidrogênio γ, geometricamente favorável, gerando um íon com total delocalização desta carga e conseqüente perda de H₂O (FIGURA 85).

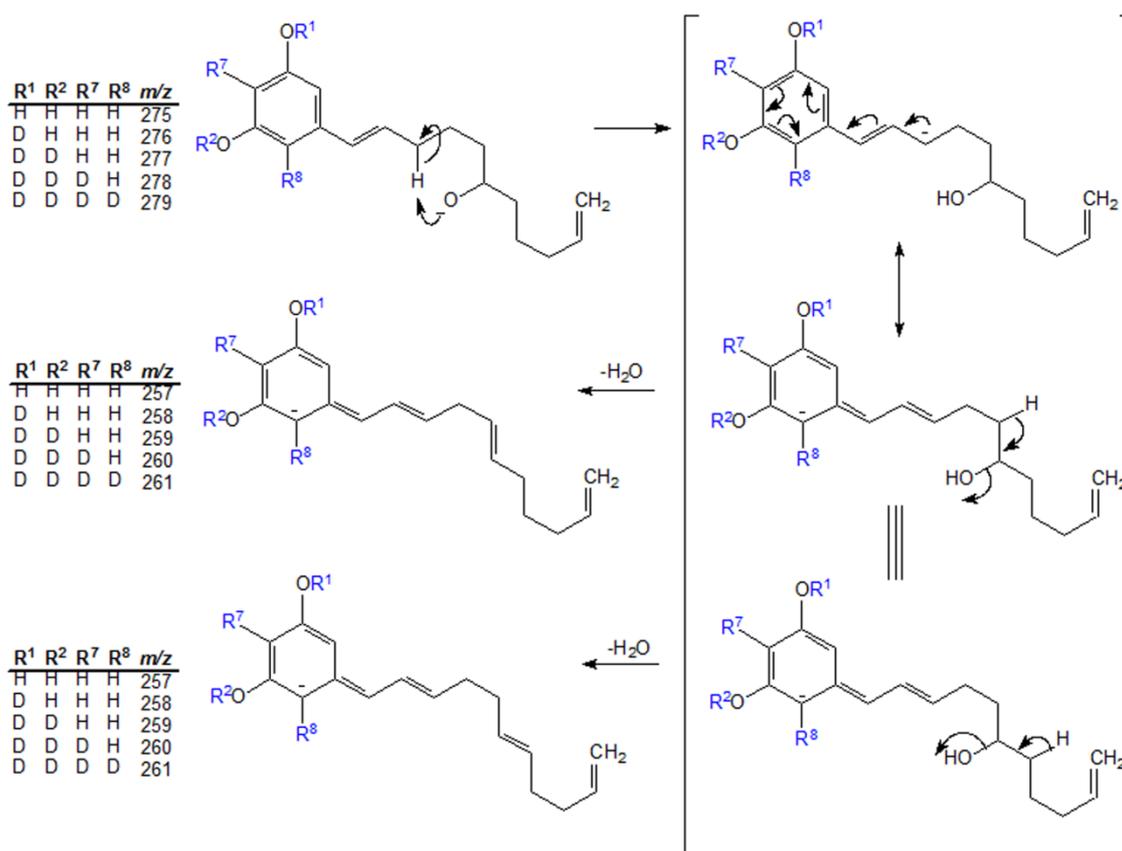


FIGURA 85. Proposta mecânica para a perda de 18Da a partir dos íons *m/z* 275 até *m/z* 279 (β-zearalenol (17)).

Todas estas fragmentações foram também confirmadas por experimentos de íons precursores (TABELA 15) além de toda a marcação isotópica. A confirmação destes mecanismos de fragmentação é de fundamental

importância para a análise destes compostos, pois uma vez confirmados, os espectros podem ser utilizados como *fingerprinting* para estes compostos. Além disso, estes trabalhos representam grandes desafios, tanto em termos experimentais (reações de deuteração e análise inequívoca via CID-MS/MS), quanto na elucidação estrutural através de espectrometria de massas.

3.3.4. Curva de produção de zearalenona

Como anteriormente apresentado (sessão 3.2.2.1.), os fungos *Fusarium moniliforme* e *F. nivale*, isolados como endofíticos de *Melia azedarach*, não se mostraram produtores de toxinas das classes das zearalenonas, tricotecenos ou fumonisinas, clássicas dentre este gênero. Entretanto, outros fungos deste mesmo gênero (*F. moniliforme* e *F. graminearum*), isolados como patógenos de trigo e aveia, produziram algumas destas toxinas, com grande destaque para a substância zearalenona (**14**), em específico. No caso dos fungos *Fusarium moniliforme*, os resultados obtidos indicavam a existência de um controle da produção destas toxinas intimamente relacionado com a relação ecológica na qual estes microrganismos participavam quando foram isolados. Embora as cepas destes fungos sejam diferentes, eles possuem a mesma carga genética e o mesmo perfil enzimático para a produção destas substâncias.

O que então poderia definir a biossíntese destas substâncias pelo fungo? Será que o tipo de relação ecológica envolvida poderia influenciar nesta produção? Evidentemente que as respostas para estas perguntas não são triviais. Entretanto, diante de tal desafio científico, foram formuladas 2 hipóteses que poderiam ser checadas a fim de contribuir para a solução destas questões.

- **Hipótese 1- O fungo interrompe o metabolismo de seus compostos:** admitindo-se que os compostos produzidos pelo fungo sejam tóxicos à planta, ele poderia, enquanto mutualista-simbionte, interromper a produção dos mesmos, numa tentativa de coexistir de forma harmônica com a planta.

O estado patogênico poderia então ser desencadeado pela ativação do mecanismo de produção de tais compostos;

- **Hipótese 2- Inibição do metabolismo do fungo pela planta:** a planta, de alguma maneira, poderia produzir outras substâncias (macro ou micromoleculares) na tentativa de bloquear alguma etapa chave na biossíntese dos compostos pelo fungo. Estas substâncias não eliminariam o fungo, mas possibilitaria que o mesmo vivesse dentro da planta sem causar nenhum dano aparente a mesma.

O primeiro caminho para checar se estas hipóteses eram viáveis seria a confirmação de que os fungos isolados como endofíticos realmente não poderiam produzir tais substâncias, mesmo em quantidades passíveis de não serem isoladas através dos métodos convencionais empregados em química de produtos naturais. Para isso, decidimos então desenvolver um método analítico que fosse rápido, sensível, seletivo e específico para as toxinas desejadas. Na realidade, priorizou-se o desenvolvimento de um método para a zearalenona (**14**), uma vez que as outras toxinas obtidas dos fungos isolados como patógenos (*F. graminearum* e *F. moniliforme*) apresentaram um rendimento muito baixo.

Desta maneira, iniciamos as etapas de ajuste de um método analítico, utilizando padronização externa e análise por HPLC-MS/MS via SRM, em colaboração com a Unidade de Farmacologia e Gastroenterologia (UNIFAG) da Universidade São Francisco (USF), *campus* Bragança Paulista. Tal colaboração foi fundamental para o desenvolvimento deste método, uma vez que nosso equipamento não se encontrava em plenas condições de uso na época destas análises

Antes de se desenvolver um método de análise envolvendo HPLC-MS/MS, algumas considerações devem ser feitas. A principal delas talvez seja a compreensão de que uma técnica hifenada é uma nova técnica de análise, e portanto os fundamentos e parâmetros que antes eram otimizados para cada técnica individualmente agora devem ser otimizados de forma paralela. Ou seja, é importante para um bom método que o analista tenha conhecimento em cada

técnica analítica de maneira distinta, mas é imprescindível que ele tenha a percepção de que agora está lidando com uma terceira técnica, com parâmetros e peculiaridades próprias. Por exemplo, a otimização da fase móvel em análises via HPLC-MS/MS deve possibilitar no mínimo uma razoável separação cromatográfica e também não prejudicar a coluna utilizada (parâmetros exclusivos do HPLC). Além disso, a fase móvel deve possibilitar excelentes graus de ionização do analito de interesse de acordo com a técnica utilizada (parâmetro exclusivo do MS). Assim, a otimização da fase móvel para o acoplamento HPLC-MS/MS deve ser realizada em conjunto, sempre baseada nos fundamentos de cada técnica individualmente.

Durante o trabalho de determinação dos mecanismos de fragmentação da zearalenona (**14**) (item 3.3.3.), foram estabelecidas condições ideais de ionização para este composto por ESI no modo negativo. Após este estudo, também se tinha conhecimento da fragmentação desta molécula e assim foi possível escolher criteriosamente quais seriam as transições (fragmentações) selecionadas para quantificação e monitoramento do analito de interesse. Os outros inúmeros parâmetros foram otimizados por infusão com bomba seringa em fluxo contínuo de amostra e fase móvel.

Após otimizados os parâmetros do espectrômetro de massas, foram testadas dez diferentes fases móveis. Em cada análise, 30 µL de uma solução 1000 ng/mL do analito foram analisados no modo reverso de eluição, onde as fases móveis foram constituídas basicamente de acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) e água com alguns aditivos. Estes aditivos foram limitados ao ácido fórmico e ao acetato de amônio, basicamente porque outros ácidos mais fracos (ácido acético) propiciam a formação de bandas cromatográficas alargadas, e ácidos mais fortes (ácido trifluoroacético) suprimem muito a ionização no modo negativo de análise. A utilização de bases também foi considerada como aditivo, mas o pH destas fases móveis era inadequado para as colunas cromatográficas testadas (pH > 9).

As FIGURA 86 e FIGURA 87 apresentam os testes realizados sem coluna cromatográfica, visando apenas a obtenção das melhores fases móveis

nas respectivas transições monitoradas, correlacionando as transições com a área do pico e com a relação sinal ruído (S/N), respectivamente. A área do pico é um parâmetro importante que devemos levar em consideração, pois toda a quantificação será feita baseando-se nela. Porém, para a escolha da melhor fase móvel e da melhor transição a ser utilizada, é necessário avaliarmos a relação sinal ruído, pois é ela quem nos aponta a sensibilidade do método utilizado.

Se observarmos a FIGURA 86 podemos notar que embora a ionização ocorra no modo negativo, a adição de 0.1% de ácido fórmico (fases móvel 3 e 8) como aditivo da fase orgânica pode ter efeitos bastante desejados. De fato, vários métodos na literatura utilizam este artifício¹⁹⁰⁻¹⁹², que pode facilitar a reação de redução do analito no probe, melhorando a eficiência da ionização no modo negativo e conseqüentemente melhorando a sensibilidade¹⁹³. Embora isso promova um aumento na área do pico do analito, a adição de ácido à fase móvel, neste caso, causa uma resposta mais ruidosa, diminuindo a relação S/N. Isso pode ser facilmente notado se essa resposta for comparada com a mesma fase móvel sem aditivo (FIGURA 87).

Podemos também observar que a adição de NH_4OAc na composição da fase móvel (fase móvel 5), leva a um aumento da relação S/N com relação a adição de ácido fórmico. A base acetato provavelmente torna a ionização no modo negativo mais estável do que a adição de ácido. Entretanto somando-se as informações obtidas via área do pico (FIGURA 86) e relação S/N (FIGURA 87), a melhor fase móvel dentre as testadas se mostrou ser a composição 2, ou seja, a composta por metanol:água na proporção de 8:2. Como esta relação S/N está em torno de 110000, tem-se um LOQ na faixa de 0,9 ng/mL, pois no LOQ a relação S/N deve ser de 10. Esta fase móvel foi então testada com diferentes colunas cromatográficas para a otimização dos tempos de retenção, da vazão da fase móvel, do formato da banda cromatográfica e também para novas medidas da relação S/N. Estes dados encontram-se resumidos na FIGURA 88 e TABELA 16.

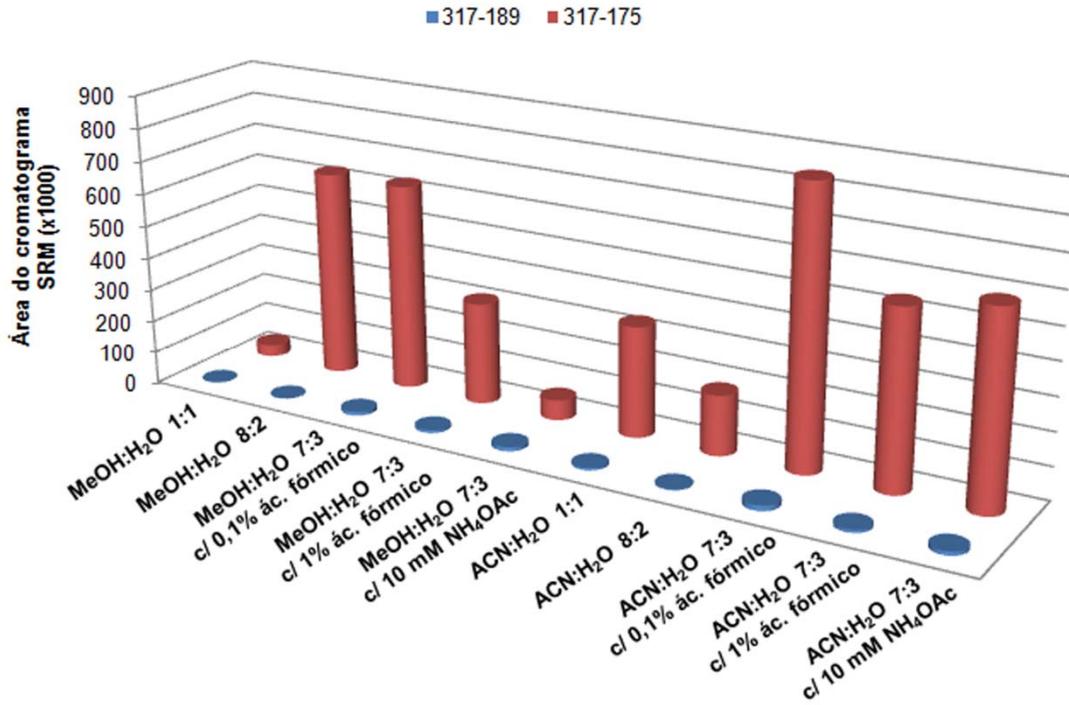


FIGURA 86. Correlação entre a fase móvel testada e a área do pico para as transições escolhidas (317→189 e 317→175).

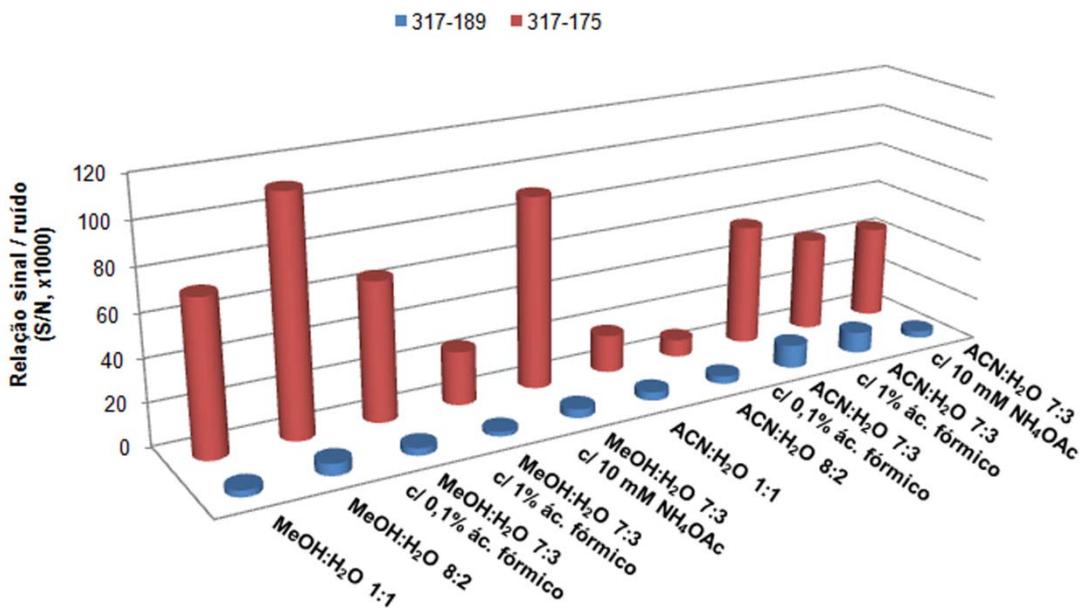


FIGURA 87. Correlação entre a fase móvel testada e a relação sinal / ruído para as transições escolhidas (317→189 e 317→175). As fases-móvel são as mesmas representadas na FIGURA 86.

O gráfico apresentado na FIGURA 88 nos apresenta uma correlação direta entre a coluna utilizada (eixo x), a relação S/N obtida (eixo y) e a área do pico SRM (diâmetro da bolha). Assim, podemos observar que a melhor relação

sinal ruído - apresentando, também, uma boa área do pico - foi conseguida com a coluna Luna C18, 5 μ , 100 x 4,6 mm Phenomenex (coluna 3); de fato, se observarmos a FIGURA 89, é possível notar que esta relação está em torno de 109000, fornecendo um LOQ de um pouco menos de 0,1 ng/mL, evidenciando a alta sensibilidade do método.

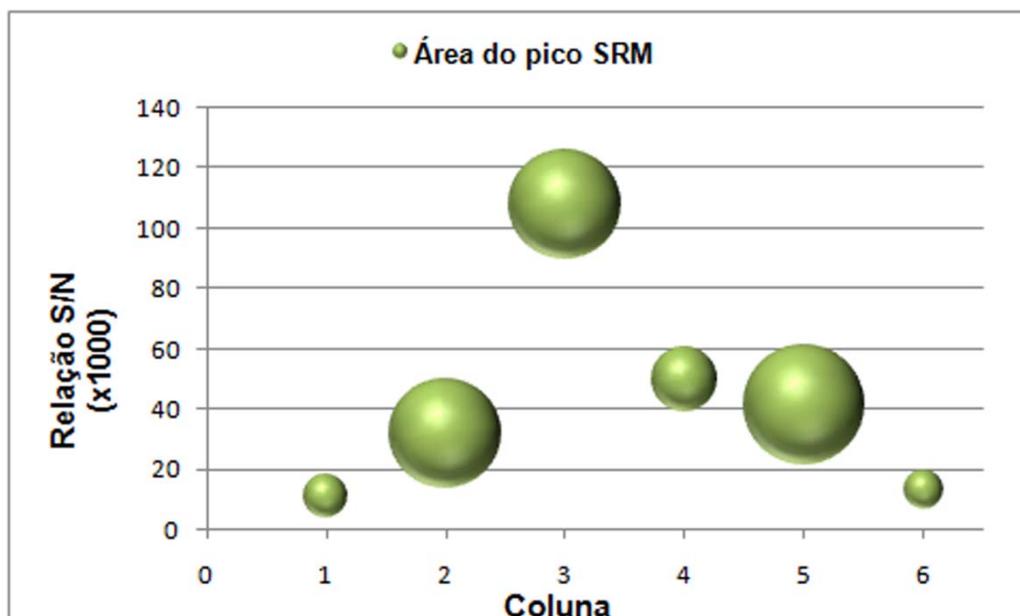


FIGURA 88. Resultados dos testes com as colunas representadas na TABELA 16.

TABELA 16. Colunas testadas para o desenvolvimento do método de quantificação da zearalenona (14).

Coluna	Vazão da fase móvel (μ L/min)	Tempo de retenção (min)
(1) Coluna monolítica Ônix C ₁₈ , 100x4,6 mm, Phenomenex, USA	500	4,85
(2) Coluna C ₈ , 50x2,0 mm, Phenomenex, USA	200	0,98
(3) Coluna Luna 5u C ₁₈ , 100x4,6 mm, Phenomenex, USA	1000 (250 p/ o massas)	3,86
(4) Coluna Luna 5u C ₁₈ , 150x4,6 mm, Phenomenex, USA	1000 (250 p/ o massas)	2,84
(5) Coluna Polaris 5u C ₁₈ , 50x2,0 mm, Phenomenex, USA	350	1,00
(6) Coluna Luna 5u C ₁₈ , 250x4,6 mm, Phenomenex, USA	1000 (250 p/ o massas)	6,23

Com as condições do método determinadas, testamos a transposição destas para o espectrômetro de massas localizado no Departamento

de Química da UFSCar. As condições obtidas foram muito similares às aquelas conseguidas no Laboratório da Unifag.

Assim, iniciou-se o processo de validação do método analítico, através do estabelecimento das características e limitações deste método, visando o domínio das possíveis fontes de erro¹⁹⁴. Este processo assegura que o método tenha qualificação para seu uso pretendido¹⁹⁵. Para tal, foram consideradas as normas estabelecidas na Resolução 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que consiste em um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos¹⁹⁵. A validação do método, neste caso específico, foi feita com o objetivo principal de assegurar a qualidade analítica do resultado obtido e fornecer resultados para comprovar se os fungos isolados como endofíticos realmente não produziam zearalenona (**14**), dando assim suporte para as hipóteses formuladas previamente.

A escolha dos canais de monitoramento e quantificação utilizados foi feita baseando-se no estudo completo de fragmentação da zearalenona (**14**), descrito no item 3.3.3. A especificidade do método foi verificada pela comparação entre os cromatogramas obtidos para as amostras dopadas e as amostras-branco (no caso da validação, em trigo). A FIGURA 90 apresenta os cromatogramas obtidos.

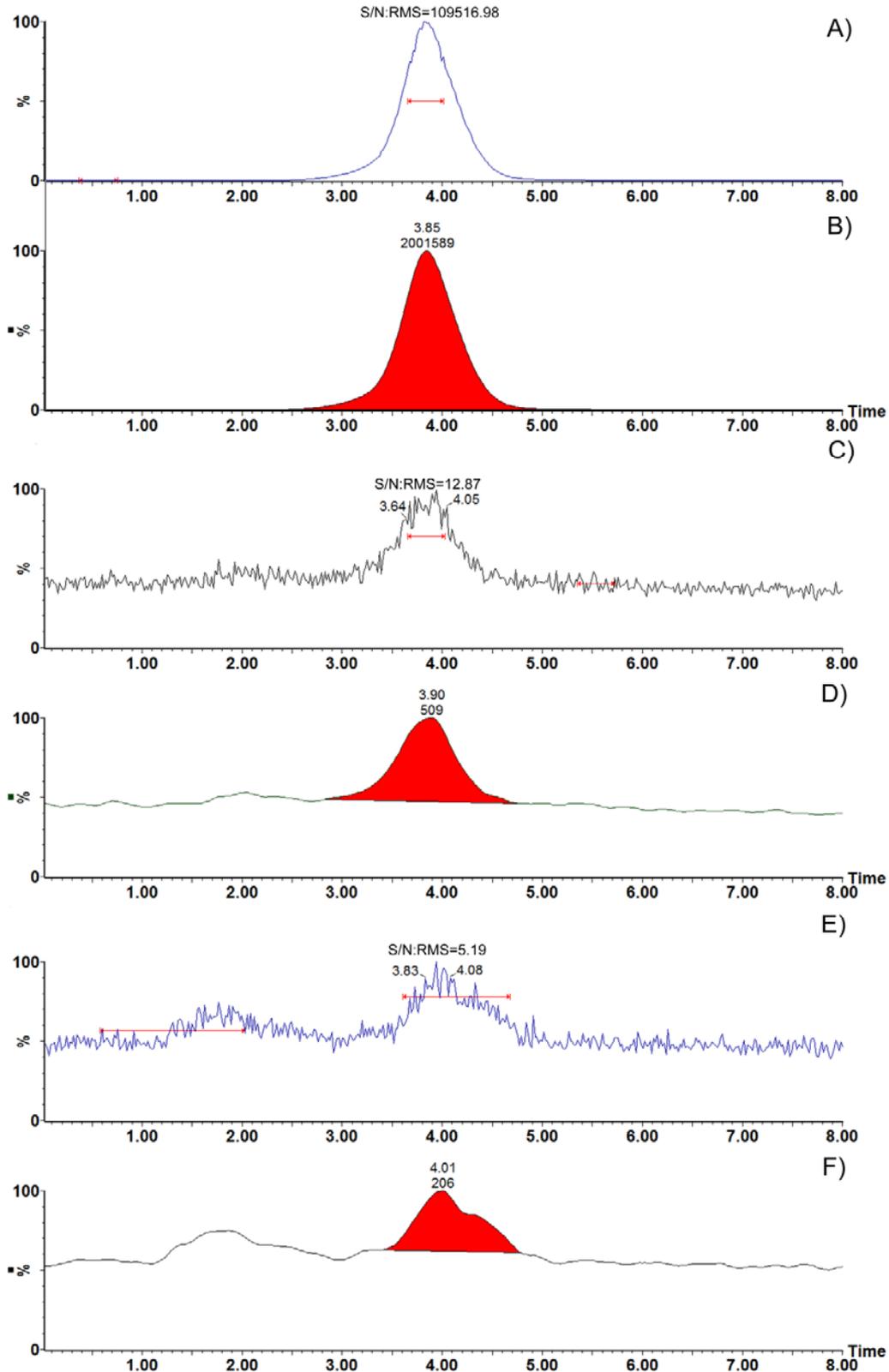


FIGURA 89. Cromatogramas SRM para a zearalenona (14) (transição 317→175): A) e B) Maior concentração do intervalo dinâmico, 1000 ng/mL; C) e D) LOQ injetado 0,1 ng/mL; E) e F) LOD injetado, 0,035 ng/mL.

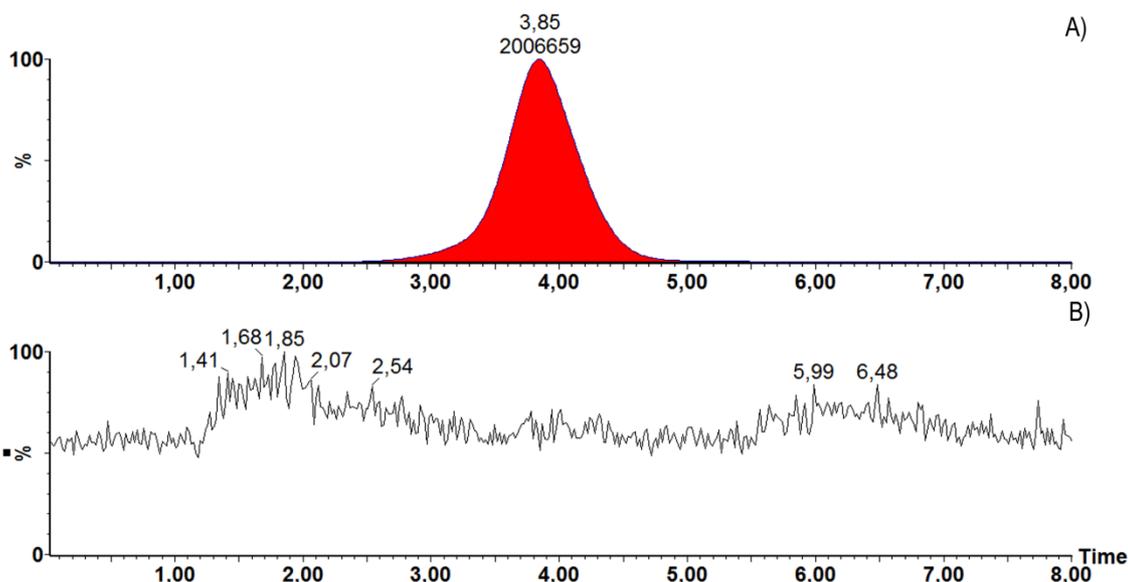


FIGURA 90. Cromatogramas SRM para o composto zearalenona (**14**). A transição monitorada é 317 → 175: A) Cromatograma para a amostra dopada em 1000 ng/mL; B) Cromatograma para a amostra de trigo sem dopagem – branco.

A sensibilidade do método foi garantida pela determinação dos limites de quantificação (LOQ) e de detecção (LOD). Estes valores foram obtidos preparando-se as soluções, injetando-se e medindo-se a relação S/N. O valor de LOQ obtido foi de $0,095 \pm 0,019$ ng/mL e o de LOD foi de $0,028 \pm 0,009$ pg/mL, todos medidos com $n = 6$. Tais valores demonstram a boa sensibilidade do método analítico e somente foram possíveis após a otimização de inúmeros parâmetros. Além dos já mencionados aqui, dois outros parâmetros cruciais para a obtenção de tal sensibilidade foram os valores de *dwell time* e *inter scan delay*. O primeiro é o tempo gasto em cada *scan* de uma determinada transição no experimento de SRM e o segundo é o intervalo entre um *scan* e outro¹⁹⁶. Se o valor de *dwell time* for muito baixo, o tempo ajustado pode não ser suficiente para escanear a transição desejada. Se ele for muito alto, pode-se perder resolução no cromatograma de SRM, pois um menor número de *scans* será acumulado.

No desenvolvimento deste método em específico, observou-se que quando o *dwell time* é aumentado de 0,05 para 0,5 segundos, a sensibilidade é aumentada em aproximadamente 5 vezes. Desta maneira, o valor de *dwell time* foi ajustado para 0,5 segundos, com um *inter scan delay* de 0,01 segundos.

Para se determinar a linearidade do método dois parâmetros foram avaliados: o primeiro deles foi o valor do coeficiente de determinação, r^2 , que pode ser observado na FIGURA 91 abaixo. O valor obtido durante a etapa de linearidade foi de $0,996 \pm 0,003$, superior ao normalmente exigido de $0,98$ ¹⁹⁵.

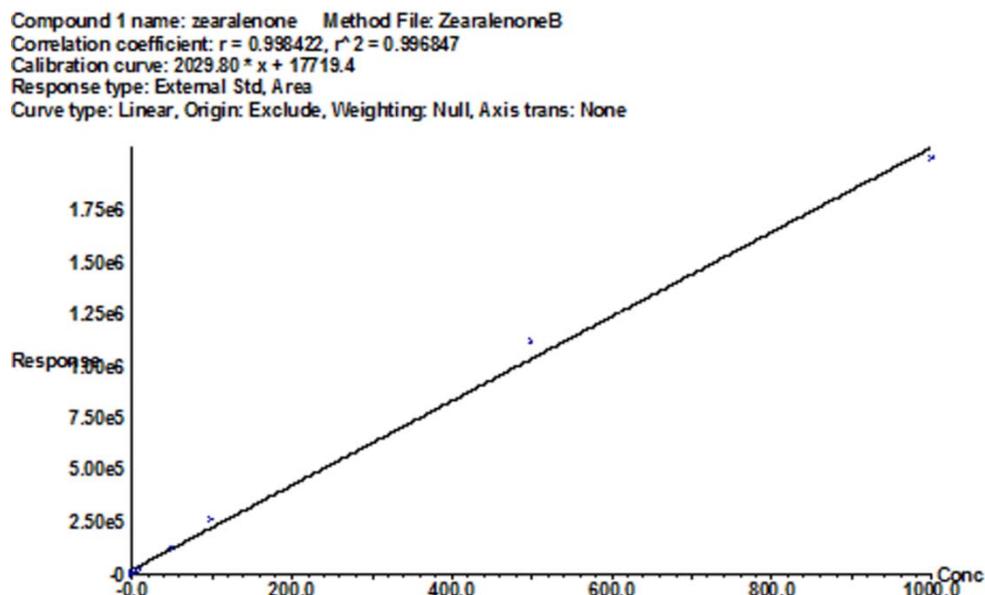


FIGURA 91. Curva de calibração obtida para a zearalenona (**14**), no intervalo dinâmico de 0,1 a 1000 ng/mL.

Entretanto, para uma avaliação adequada da linearidade, faz-se necessário a realização do teste de homocedasticidade, que pode ser feito plotando-se os resíduos versus a concentração e aplicando-se o teste F ¹⁹⁷. O intuito deste teste é verificar se a curva analítica precisa ser ajustada por algum fator de peso. Na prática, determinam-se a razão entre as variâncias nos pontos de concentração mais alta (s_2^2) e mais baixa (s_1^2) do intervalo dinâmico para se obter o valor de F_{exp} . Este valor é então comparado com o valor de F_{tab} , tabelado, para um dado intervalo de confiança desejado. Se $F_{exp} \leq F_{tab}$, o método é dito homocedástico, ou seja, a curva analítica não precisa de nenhum ajuste de peso. Mas se $F_{exp} > F_{tab}$, então o método é heterocedástico e pesos como $1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$ devem ser testados na curva analítica. Como pode ser observado na TABELA 17, o método aqui proposto mostrou-se ser heterocedástico e, portanto, fez-se necessário a utilização de um fator de peso na curva analítica.

A escolha deste fator pode ser feita empiricamente. Ou seja, aplica-se o fator de peso desejado e plota-se um gráfico de resíduos versus concentração. O gráfico que apresentar a menor variação randômica dos resíduos ao longo do eixo x representa o melhor fator de peso a ser utilizado. Como pode ser observado na FIGURA 92, o gráfico que mais se adequou aos pontos do intervalo dinâmico foi o de 1/x. Assim, este fator de peso foi utilizado em todas as curvas analíticas durante a validação.

TABELA 17. Teste de homocedasticidade para o método proposto.

Concentração (ng/mL)	Resposta obtida (Área abaixo do pico no cromatograma SRM para 317→175)	Variância (s ²)
0,1	625	244,33
	644	
	613	
1000,0	1774031	1,48 x 10 ¹⁰
	1788443	
	1991603	
$F_{exp} = \frac{s_{1000,0}^2}{s_{0,1}^2} = \frac{1,48 \cdot 10^{10}}{244,33} = 6,06 \cdot 10^7$ $F_{tab}(2,2, 99\%) = 99,0$ $F_{exp} \gg F_{tab} = \text{método heterocedástico}$		

A precisão e a exatidão do método também foram avaliadas. Para a precisão, que é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária¹⁹⁵. A primeira representa a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, e a segunda, determinada em 4 dias não consecutivos com intervalo de 2 dias entre cada medida. Como podemos observar nos dados apresentados na TABELA 18, o método mostrou-se preciso, com uma variação nos valores de desvio padrão relativo (RSD) menores do que 5,2% na análise de repetibilidade e menores do que 14,9% na precisão intermediária, de acordo com o recomendado pela ANVISA¹⁹⁵.

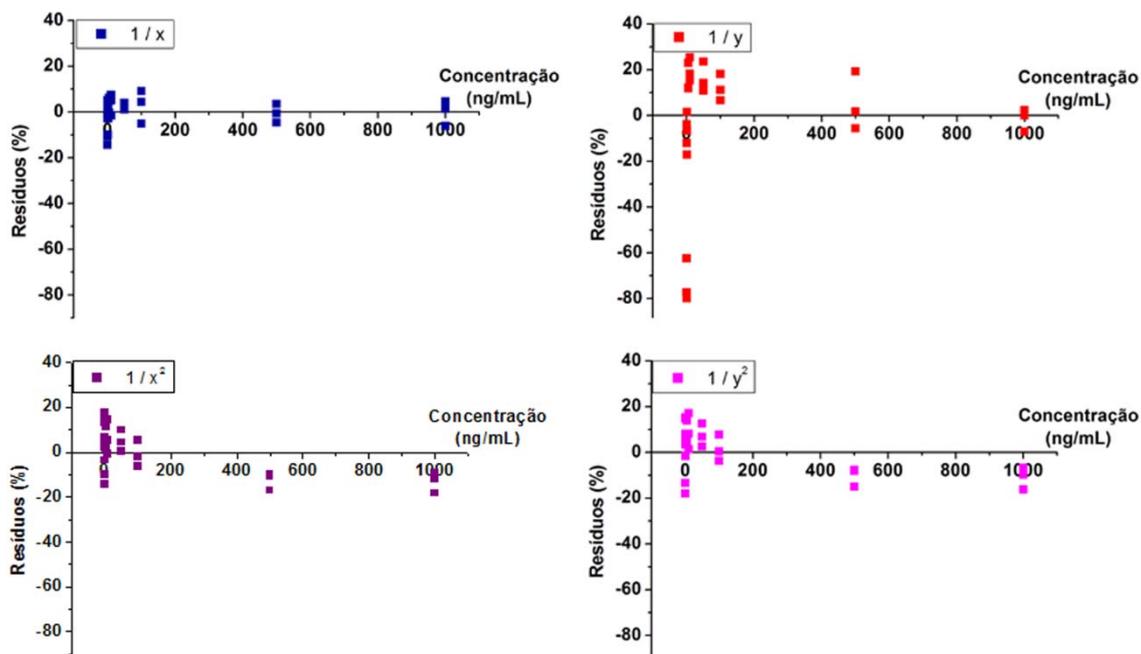


FIGURA 92. Gráficos de resíduos versus concentração do analito obtidos com o uso de fatores de peso nas curvas analíticas: $1/x$ em azul, $1/x^2$ em roxo, $1/y$ em vermelho e $1/y^2$ em magenta. Como pode ser observado, a menor variação dos resíduos foi obtida utilizando-se fator de peso $1/x$.

Para a análise da exatidão foram utilizados os valores de erro relativo, que correlacionam os valores obtidos pelo método em estudo com os valores ditos verdadeiro. Como pode ser observado novamente na TABELA 18, estes valores permaneceram entre -11,0 e 1,7 %, dentro do preconizado pela ANVISA. Assim, o método proposto mostrou ser preciso e exato para ser utilizado no acompanhamento da produção de zearalenona (**14**) por fungos endofíticos e patogênicos cultivados *in vitro*.

TABELA 18. Valores obtidos para precisão e exatidão.

Intra-dia (n = 5)			
Concentração teórica (ng/mL)	Concentração medida (ng/mL) ($\bar{x} \pm SD$)	RSD (%)	Erro relativo* (%)
0,12 (LQC)	0,122 \pm 0,004	3,7	1,7
600 (MQC)	564,6 \pm 29,5	5,2	-5,9
900 (HQC)	801,0 \pm 30,8	3,9	-11,0
Inter-dias (n = 20)			
0,12 (LQC)	0,112 \pm 0,017	14,9	-6,7
600 (MQC)	579,2 \pm 43,8	7,6	-3,5
900 (HQC)	828,4 \pm 60,3	7,3	-8,0

Legenda: SD, desvio padrão; RSD, desvio padrão relativo.*Fornecido pelo Quantify do software Masslynx 4.0.

A última figura de mérito analisada nesta validação foi a recuperação, etapa necessária para medir a eficiência de extração de um método analítico. Ela pode ser expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida pela comparação dos resultados de amostras fortificadas (brancas acrescidas de padrão) e submetidas ao processo de extração, com os resultados de soluções padrão não extraídas¹⁹⁵. Portanto, em geral, basta que a matriz seja fortificada com o analito nas concentrações dos QC's, extraída e os resultados obtidos podem então ser comparados com os valores obtidos de amostras extraídas e somente depois dopadas.

Entretanto, no caso da quantificação de metabólitos fúngicos ao longo do tempo, têm-se um problema adicional: a matriz varia com o crescimento fúngico. Desta forma, analisando em detalhes o problema aqui proposto, especificamente. A validação deste método foi realizada com o intuito de excluir qualquer dúvida à respeito da questão analítica. Isso foi extremamente necessário pois o objetivo era o de desejávamos pesquisar a produção de zearalenona (**14**) por fungos do gênero *Fusarium*, isolados como patógenos e como endofíticos mutualistas. Como já discutido anteriormente, a produção destas substâncias poderia ter uma correlação direta com o caráter da interação planta-fungo. Assim, os fungos de interesse foram cultivados por 40 dias em, um meio de cultura bastante rico em nutrientes e no qual foi verificada pela primeira vez a produção de zearalenona (**14**) por *Fusarium graminearum* (isolado como patógeno do próprio trigo) neste projeto.

Mas não seria correto afirmar que a matriz do nosso experimento todo é o trigo. Isso é verdade unicamente no instante após a inoculação do fungo neste substrato. A partir daí, pode-se somente afirmar que a matriz é composta de trigo, menos os nutrientes que já foram consumidos pelo fungo, somados a massa fúngica naquele momento e acrescidos ainda dos metabólitos biossintetizados pelo fungo. Ou seja, a matriz muda constantemente com o tempo de cultivo. E, portanto, faz-se necessário avaliar se estas mudanças influenciam significativamente no processo de extração e conseqüentemente na recuperação do nosso método de análise.

Para a construção da curva de produção de zearalenona (**14**), foram utilizados 10 pontos para cada fungo: controle (branco), 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias, todos obtidos em triplicata. Evidentemente que calcular a recuperação em cada ponto seria uma tarefa inviável. Assim, decidiu-se por calcular a recuperação no ponto médio da curva de produção (20 dias) e no final da mesma (40 dias), além obviamente de calcular a recuperação no trigo sem o fungo (zero dias). Entretanto, como em 20 e 40 dias já seria esperada a produção de zearalenonas por parte dos fungos, a recuperação nestes pontos foi calculada por adição de padrão. Ou seja, os extratos respectivos a estes dias foram dopados na concentração dos controles de qualidade (QC's), extraídos e injetados. Os valores de área obtidos foram subtraídos dos pontos nos mesmos dias, sem dopagem, e o valor de área residual foi utilizado como valor de dopagem. A recuperação em zero dias foi calculada por padronização externa, normalmente.

Os resultados obtidos sugerem fortemente que a recuperação varia quando extraímos zearalenona (**14**) da matriz trigo em comparação com a matriz trigo mais fungo. O valor médio global da recuperação em zero dias, ou seja, quando a matriz é composta de trigo sem inoculação fúngica é de $83,4 \pm 7,2$ %. Quando o valor médio da recuperação global obtido após 20 dias de cultivo é analisado, observamos uma queda de 15,5 % na eficiência da extração (TABELA 19). Mesmo considerando-se a margem de erro percentual, é nítida a queda na eficiência da extração da zearalenona (**14**). Este efeito provavelmente se deve ao fato de que o fungo, em 20 dias de cultivo, já metabolizou uma série de

metabólitos primários (proteínas, carboidratos, ...) e de metabólitos secundários (como a zearalenona (14), por exemplo). Estes metabólitos muito provavelmente influenciam na extração da zearalenona (14), alterando o valor da recuperação.

Entretanto, segundo o método de análise proposto, não existe diferença significativa entre a eficiência de extração em 20 ou em 40 dias de cultivo (TABELA 19). Uma possível explicação para este fato é que de 20 dias de cultivo em diante, o fungo provavelmente já não metaboliza mais metabólitos primários, ou seja, ele já não se encontra mais em sua fase *log* (de crescimento micelial). Como em geral os metabólitos primários se encontram em maior quantidade do que os secundários, a influência na extração da zearalenona (14) é agora somente influenciada por estes tipos de metabólitos.

TABELA 19. Valores obtidos para a recuperação da zearalenona (14) analisados na curva de produção do fungo *Fusarium graminearum*. Os valores são a média \pm RSD.

Concentração esperada (ng/mL)	zero dias de cultivo	20 dias de cultivo	40 dias de cultivo
0.12	76,5 \pm 18,4	61,2 \pm 16,1	64,0 \pm 10,0
600.0	87,5 \pm 8,9	69,9 \pm 11,8	73,8 \pm 13,5
900.0	86,1 \pm 7,2	72,6 \pm 12,3	72,1 \pm 9,5
Valor global	83,4 \pm 7,2	67,9 \pm 8,8	69,7 \pm 7,1

Determinadas as etapas principais que são necessárias para a validação de um método analítico, iniciamos a sua aplicação. Assim, foram analisados os extratos dos fungos *Fusarium graminearum* – isolado como patógeno de trigo – *F. moniliforme* – isolado como patógeno de trigo – e outra cepa de *F. moniliforme*, esta isolada como endofítico de *Melia azedarach*.

O fungo *F. graminearum* nos serviria como uma espécie de controle para a produção de zearalenona (14), uma vez que dele foi isolado pela primeira vez esta substância durante este projeto. O fungo *F. moniliforme* patogênico poderia ser usado como controle de patogenia, enquanto que o fungo *F. moniliforme* seria o nosso alvo endofítico.

Os dados obtidos quantitativamente constataram os mesmos resultados obtidos experimentalmente. Verificou-se que o fungo *F. moniliforme*, isolado como endofítico, não produz zearalenonas nas mesmas quantidades dos dois outros fungos deste mesmo gênero, ambos isolados como patógenos. Estes resultados podem ser encontrados na FIGURA 93 que, além disso, mostra que o perfil da produção de zearalenona (14) é muito parecido entre os dois fungos isolados como patógenos, mesmo eles sendo de diferentes espécies. É possível notar que a produção de zearalenona (14) por estes fungos segue um crescimento sigmoidal, cuja a equação é apresentada na FIGURA 94. Esta equação se adequa aos dados com r^2 igual a 0,989 para a curva do *Fusarium graminearum* patógeno e igual a 0,996 para a curva do *F. moniliforme* patógeno.

Analisando-se a FIGURA 93, inicialmente poderia-se concluir que o fungo *F. moniliforme* isolado como endofítico não produz zearalenonas. Isso iria de encontro com a hipóteses formuladas anteriormente, ou seja, que ou o fungo ou o hospedeiro poderia de alguma forma inibir a biossíntese de zearalenonas. Entretanto, ao se expandir a curva de produção obtida para este fungo, é possível observar que no período de 25 a 35 dias de cultivo existe um aumento considerável na produção desta substância (FIGURA 95). O perfil apresentado é muito semelhante ao observado para os fungos isolados como patógenos (FIGURA 93), embora as quantidades sejam drasticamente diferentes.

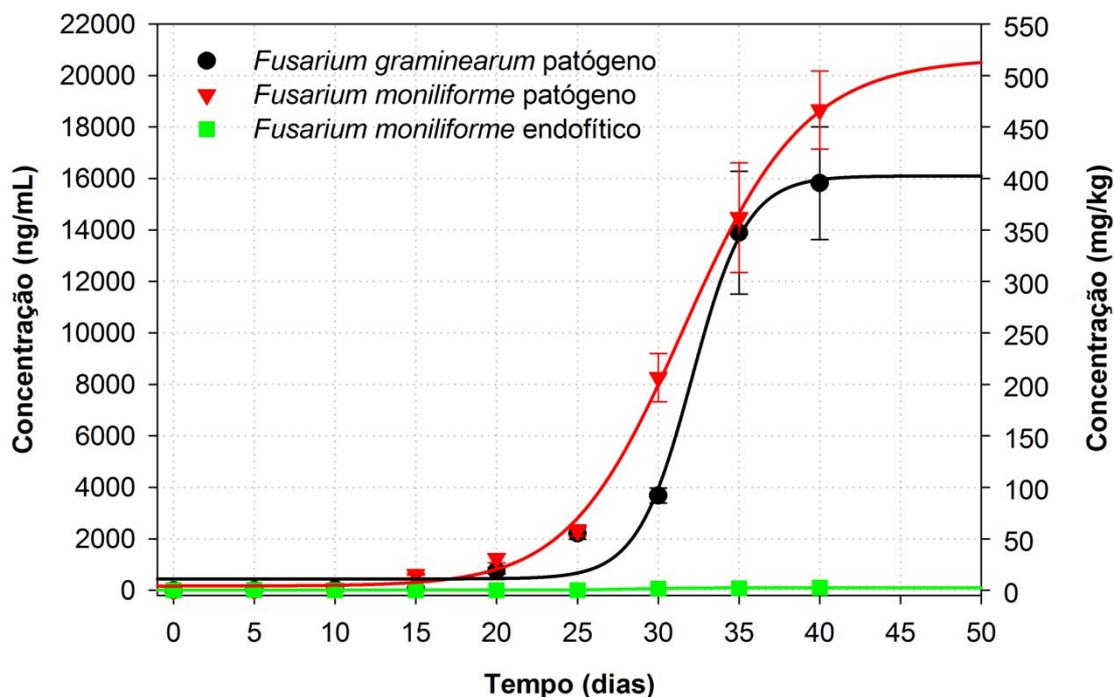


FIGURA 93. Curvas de produção de zearalenonas por diferentes cepas de fungos do gênero *Fusarium*.

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{b}}}$$

FIGURA 94. Equação matemática que descreve o perfil da curva de produção de zearalenona (14) por parte dos fungos do gênero *Fusarium* estudados.

Esta observação não indica se a planta ou o próprio fungo é que está regulando o metabolismo da zearalenona (14). Todavia, deve haver alguma mudança na biossíntese desta substância para que o que efeito observado ocorra. Talvez alguma enzima chave no processos de redução das carbonilas ou mesmo na ciclização dos intermediários biossintéticos para a formação da zearalenona (14) esteja sendo inibida (biossíntese na FIGURA 96). Embora não se saiba qual é o mecanismo envolvido em tal processo, os resultados aqui obtidos confirmam que não houve inibição total da produção de zearalenona (14).

Por algum motivo, o fungo *Fusarium moniliforme*, isolado como um endófito de *Melia azedarach*, ainda produz esta substância.

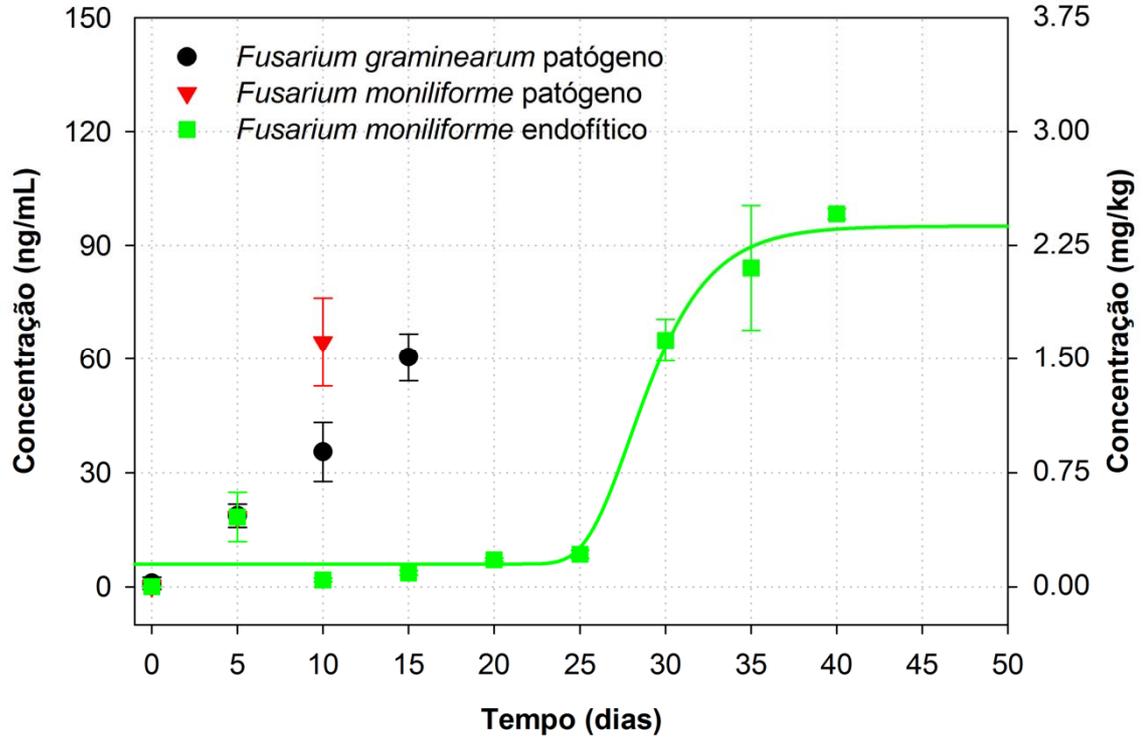


FIGURA 95. Expansão da curva de produção apresentada na FIGURA 93.

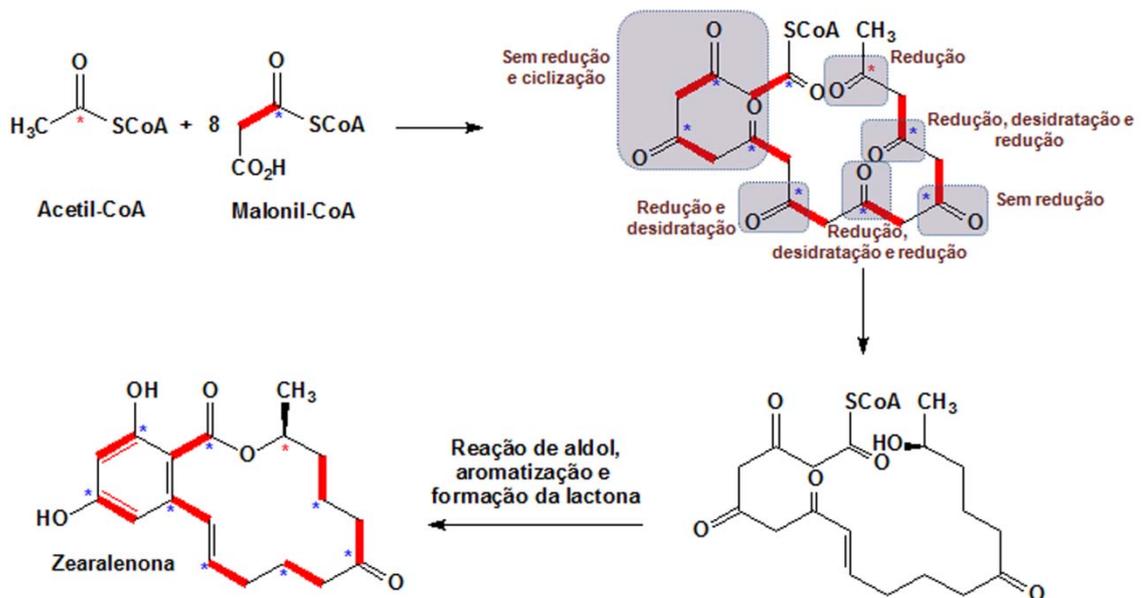


FIGURA 96. Biossíntese da zearalenona (14) – Adaptado de Dewick (2004)⁵⁰ e Blackwell et al. (1985)¹⁹⁸.

Desta maneira, procurou-se desenvolver modelos de testes *in vitro* que pudessem fornecer algum tipo de informação sobre a diminuição na produção de zearalenona (**14**) e se esta aparente regulação poderia ter alguma correlação com o caráter da interação planta-fungo. A resposta a esta questão seria mais interessante do ponto de vista químico-ecológico e priorizou-se tal estudo em detrimento da compreensão dos mecanismos enzimáticos envolvidos nesta regulação, uma vez que não era o objetivo de nosso trabalho. Para tanto, buscamos a colaboração do *Institut Max Planck für chemische Ökologie*, na cidade de Jena, Alemanha, para a realização de um estágio de doutorado sanduiche sob a supervisão do Dr. Axel Mithöfer e do Prof. Dr. Wilhelm Boland. Mais adiante, na parte 2, os dados obtidos durante tal estágio serão melhor discutidos.

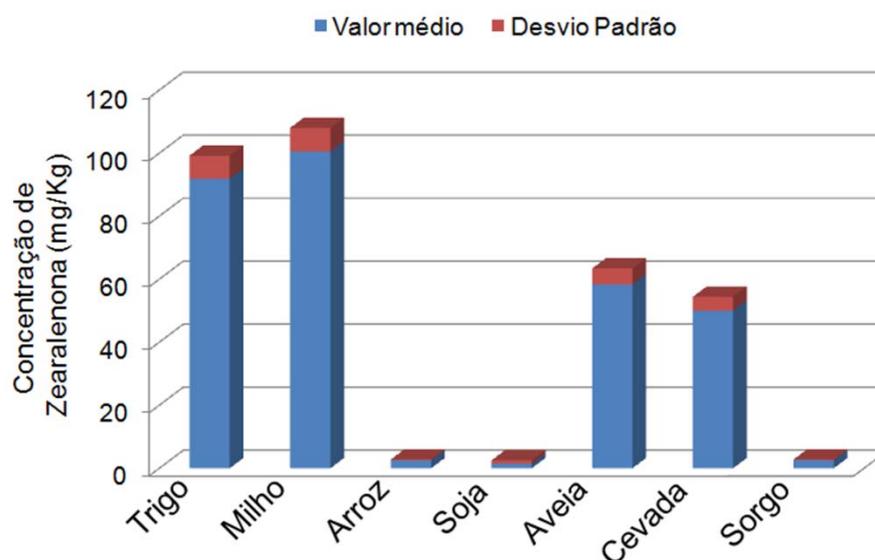


FIGURA 97. Produção de zearalenona (**14**) por *Fusarium graminearum* em diferentes meios de cultura.

Como um método analítico bastante sensível para a quantificação de zearalenona (**14**) em trigo estava desenvolvido e validado, decidiu-se utilizá-lo para a análise de extratos de *Fusarium graminearum* cultivados por 30 dias em diferentes meios sólidos de cultura (FIGURA 97). Analisando-se os dados obtidos,

claramente há uma maior produção desta substância nos meios de cultura milho e trigo. Ainda que estes dados não nos forneçam informações que possam ser associadas ao caráter da interação planta-fungo, é possível utilizá-los como guia para avaliar a produção de zearalenonas por parte do fungo *Fusarium graminearum*. Assim, caso o objetivo seja obter estas substâncias com altos rendimentos, os dados aqui apresentados indicam que a melhor forma de obtê-los envolve o cultivo em trigo ou milho por 35 ou 40 dias.

3.3.5. Quantificação dos alternariols produzidos por *Alternaria alternata*

Outra classe de toxinas fúngicas isoladas neste trabalho foram os alternariols, representados pelo alternariol (76) e pelo alternariol monometil éter (77) e obtidos a partir de cepas de *Alternaria alternata*. Porém, neste caso não se dispunha de uma cepa deste fungo que tivesse sido isolada como endofítica para que fosse possível um estudo comparativo, como foi feito no caso da substância zearalenona (14). Ao contrário, o grupo de pesquisas possuía duas cepas de *Alternaria alternata* isoladas como patógenos, uma delas isolada de tangerinas e gentilmente cedida pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), e a outra isolada como patógeno de trigo, cedida pela EMBRAPA trigo do Rio Grande do Sul.

Após a obtenção dos alternariols a partir de ambas as cepas de *Alternaria*, decidiu-se então desenvolver um método de análise que fosse rápido e sensível, visando a quantificação destas substâncias com objetivos mais aplicados do que no caso das zearalenonas.

Um dos objetivos seria contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta analítica que pudesse ser utilizada no diagnóstico da doença Mancha Marron de Alternária. Esta doença, causada pelo fungo *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, ataca principalmente os tecidos das plantas jovens do gênero *Citrus*. Ela se caracteriza por causar manchas necróticas de cor marrom-escuro, rodeadas por

um halo amarelado nas folhas, ramos e frutos das plantas (FIGURA 98 A e B). A queda das folhas e dos frutos, além da seca dos ramos, está entre as principais consequências desta doença, que obviamente causa sérios prejuízos aos produtores de *Citrus* em todo o mundo¹⁹⁹.

Embora seja atribuído que o fungo somente sobreviva nos tecidos mortos das folhas e dos ramos, sem ocorrência do mesmo nos frutos¹⁹⁹, há uma grande falta de informação com respeito à presença destas toxinas nos frutos de tangerina. Ou seja, apesar dos vários estudos realizados nas últimas décadas envolvendo as principais características desta doença²⁰⁰⁻²⁰⁴, uma importante questão ainda não havia sido investigada: existe o acúmulo de alternariols nos frutos com sintomas de Mancha Marrom de Alternária?

Na tentativa de contribuir para o conhecimento mais aprofundado desta doença, foi proposto o desenvolvimento de um método analítico, a ser realizado empregando-se HPLC-ESI-MS/MS, para quantificar os alternariols nos frutos de tangerinas assintomáticas e sintomáticas à Mancha Marrom de Alternária. Até o momento do desenvolvimento deste método, o Dr. Rodrigo Facchini Magnani, então aluno de doutorado em nosso grupo de pesquisa, havia brilhantemente estudado esta e inúmeras outras doenças de *Citrus* do ponto de vista micromolecular²⁰⁵. Assim, decidiu-se por desenvolver e aplicar esse método em conjunto, de maneira não só a identificar e quantificar os alternariols nos frutos de tangerinas, mas também com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico para tal doença.

Para a quantificação destas substâncias nos frutos de tangerinas, foi importante a definição de qual parte do fruto seria analisada. De acordo com informações providas pela FUNDECITRUS, os sintomas fúngicos somente se expressam na parte externa do fruto, ou seja, no flavedo (epicarpo ou exocarpo, a casca amarela externa ao fruto), não sendo relatada a presença de sintomas de infecção no interior do mesmo, como no albedo (mesocarpo, pele branca interna do fruto) (FIGURA 98 C). Mas como não se tinha nenhuma informação com respeito ao acúmulo de alternariols nos frutos, decidimos por validar o método nas duas matrizes mencionadas aqui, ou seja, no flavedo e no albedo. Assim, caso

fosse detectado os alternariols nos frutos, poderia ser conduzido um estudo comparativo entre estas duas matrizes.



FIGURA 98. Frutos de tangerina (*Citrus reticulata*): A) e B) frutos com sintomas de Mancha Marrom de Alternária; C) Flavedo e Albedo, matrizes utilizadas para a quantificação dos alternariols.

Assim, foi iniciado o desenvolvimento do método de análises. Testes similares aos realizados no desenvolvimento do método de quantificação da zearalenona (**14**) foram também empregados, mas não serão discutidos em detalhes aqui. Entretanto, a escolha da fase móvel teve um papel crucial, não somente para fornecer uma excelente separação cromatográfica entre o alternariol (**76**) e o alternariol monometil éter (**77**), mas também para fornecer níveis de ionização suficientes por ESI no modo negativo. A fase móvel que forneceu os melhores resultados foi metanol : água 4:1 sem nenhum aditivo.

A escolha das transições a serem monitoradas foi realizada com base no perfil de fragmentação obtido por CID-ESI-MS/MS. Os espectros de íons produtos para o alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**) mostraram os picos relativos às moléculas deprotonadas ($[M-H]^-$) em m/z 257 e em m/z 271, respectivamente (FIGURA 99). Uma discussão sobre o perfil de fragmentação dos alternariols também podem ser encontrado em detalhes em Magnani (2007)²⁰⁵.

Ambos alternariol e alternariol monometil éter (**77**) perdem 15 Da na forma de um radical metílico. Entretanto, é notável a diferença na intensidade destes fragmentos: enquanto m/z 242 é um pico com baixa intensidade no espectro do alternariol (**76**) (FIGURA 99 A), m/z 256 é o pico mais intenso do espectro do alternariol monometil éter (**77**).

Uma possível explicação para este efeito é que esta perda ocorra pela clivagem homolítica de uma ligação σ carbono-carbono no alternariol (**76**), formando um radical não estabilizado em um carbono sp^2 (FIGURA 100 A). Isso explicaria a baixa intensidade de m/z 242. Quando comparado com o alternariol monometil éter (**77**), esta fragmentação também pode ocorrer. Entretanto, a clivagem homolítica da ligação σ carbono-oxigênio da metoxila desta molécula agora leva a um radical bastante estabilizado por conjugação com o anel aromático (FIGURA 100 B), contribuindo assim para a grande estabilidade de m/z 256. A perda de CO (28 Da) também foi observada para ambos os compostos. A proposta aqui apresentada inclui a abertura do anel lactônico e um novo fechamento para um anel de cinco membros com concomitante expulsão de uma molécula de CO, como apresentado na FIGURA 101. Aparentemente esta fragmentação gera um íon mais estável para o alternariol monometil éter (**77**) (m/z 228) do que para o alternariol (**76**) (m/z 229).

Esta proposta mecanística também é reforçada por cálculos computacionais. Realizando-se o cálculo da densidade de carga no intermediário proposto na FIGURA 101, pode-se observar que o maior valor de densidade de carga negativa encontra-se exatamente no oxigênio carbonílico que faz o ataque nucleofílico, possibilitando a ciclização para um anel de cinco membros (-0,577, em unidades arbitrárias, ver molécula com valores na FIGURA 102). O eletrófilo, carbono com densidade de carga -0.019, não possui carga positiva como esperado. Entretanto, ele apresenta-se quase neutro (valor muito próximo de zero) e com densidade de carga muito menos negativa do que as dos outros carbonos aromáticos em posição *orto* a carbonos ligados a grupos hidroxila. É conhecido que estes carbonos recebem uma densidade de carga negativa por efeito de conjugação mesomérica quando nestas posições. Assim, pode-se perceber que a ciclização proposta é realmente viável.

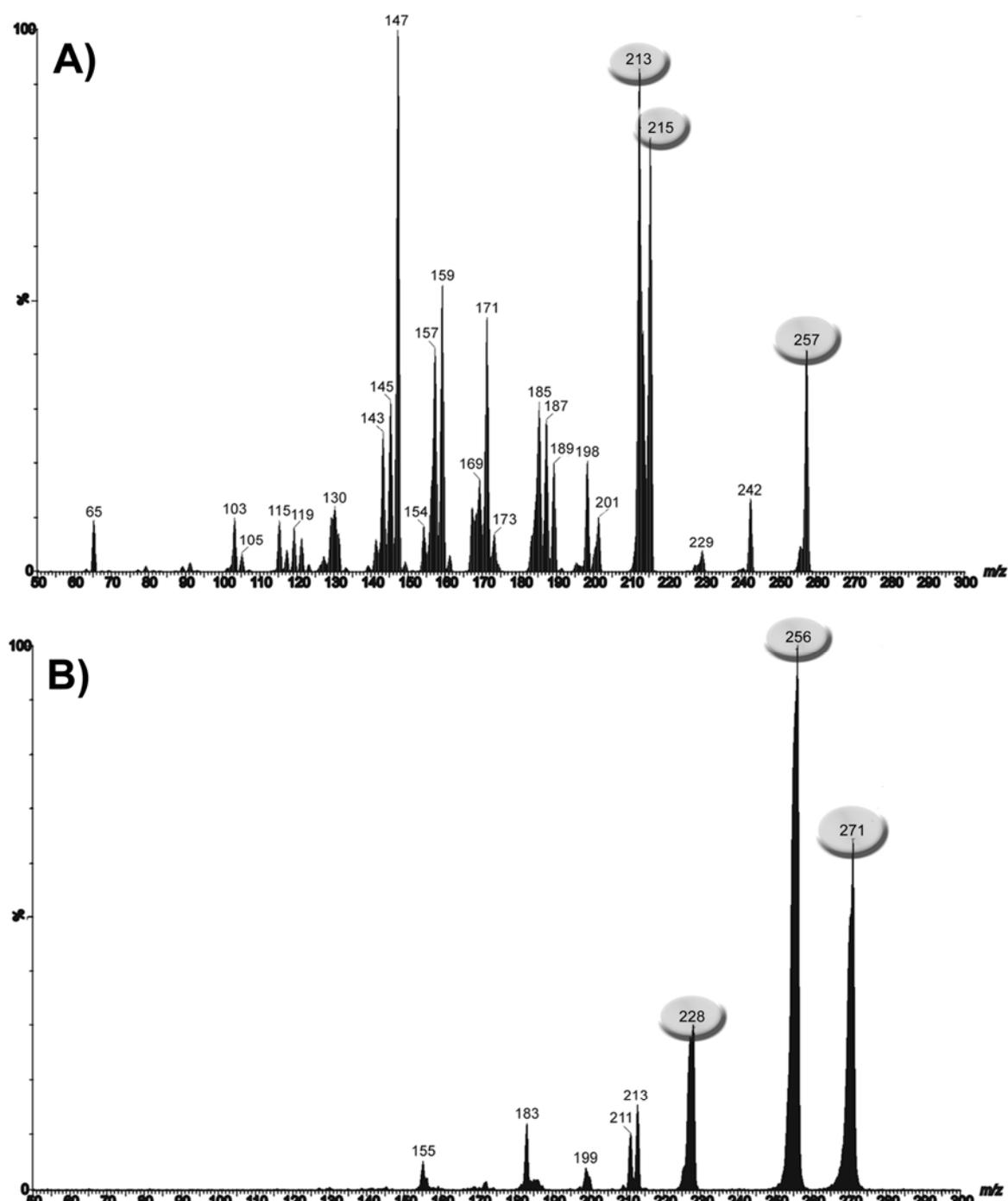


FIGURA 99. Espectros de íons produto obtidos via CID-ESI-MS/MS; A) alternariol (**76**) (15 eV); B) alternariol monometil éter (**77**) (15 eV). Os íons demarcados formam as transições escolhidas para os experimentos de SRM.

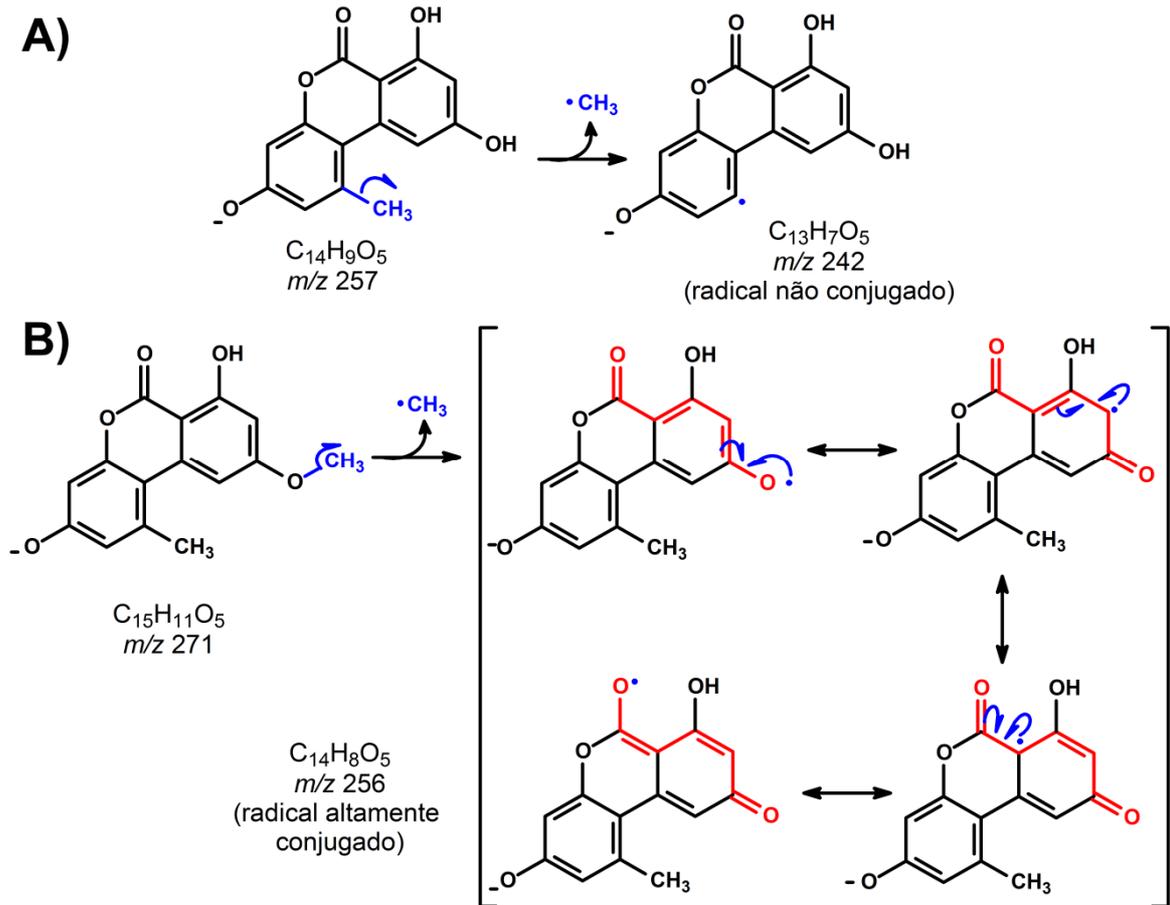


FIGURA 100. Proposta mecânica para a perda de um radical metílico (15 Da): A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77).

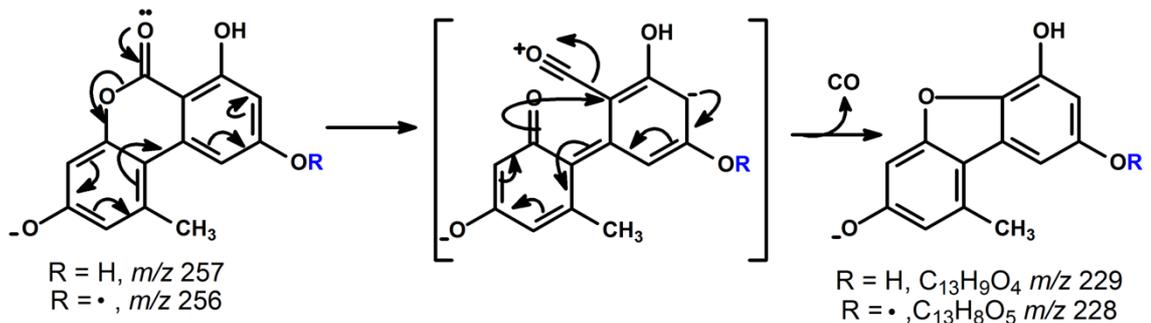


FIGURA 101. Proposta para a perda de CO (28 Da) para o alternariol (76) e o alternariol monometil éter (77).

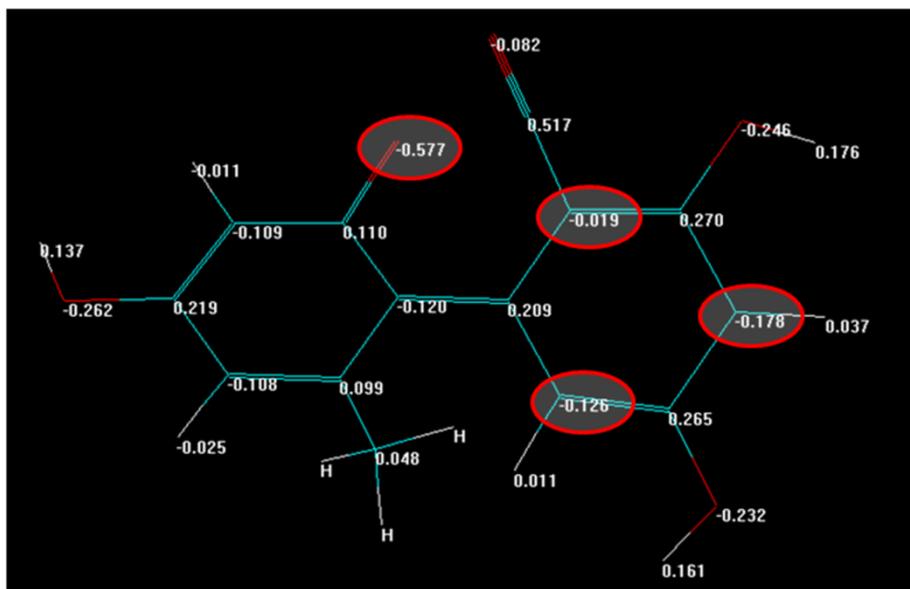
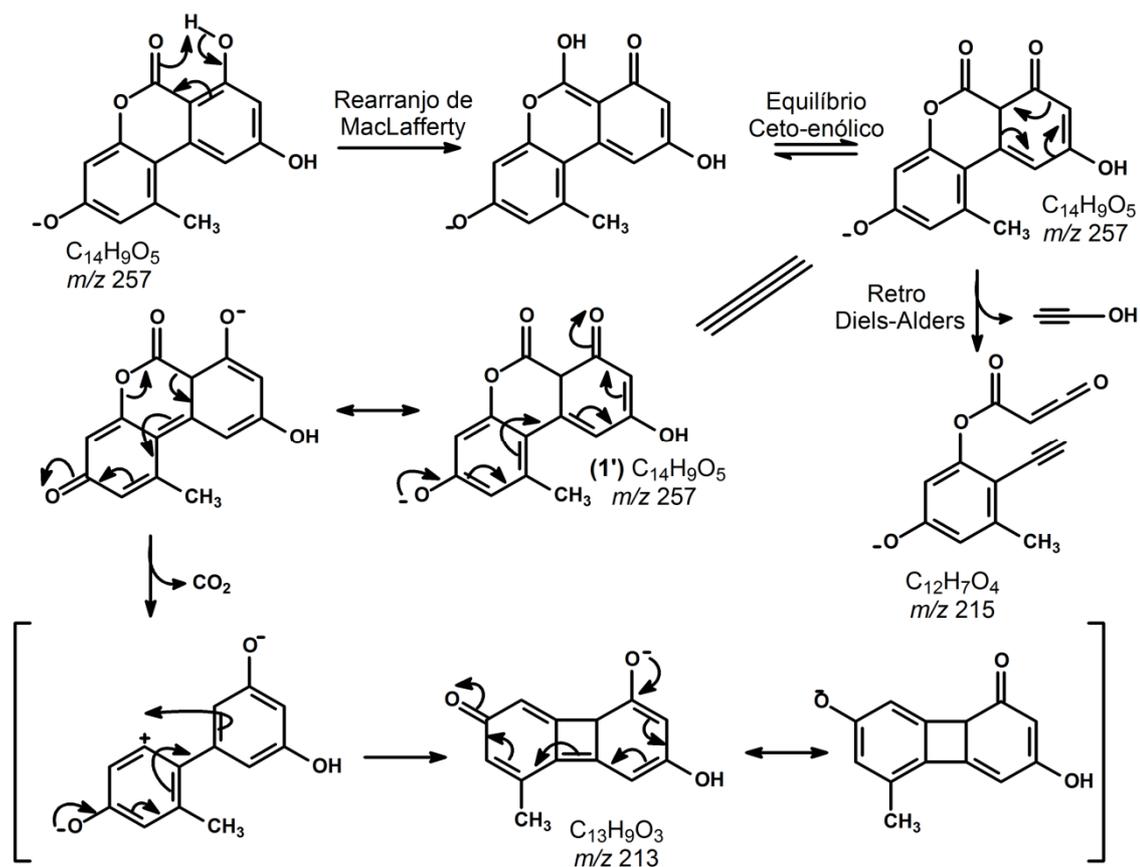


FIGURA 102. Simulação computacional da densidade de cargas feita com o software Hyperchem™.

Embora as perdas de CO e de um radical metil ocorram nos dois compostos estudados, a fragmentação que leva aos íons m/z 215 (-42 Da) e m/z 213 (-44 Da) aparentemente ocorrem apenas na molécula de alternariol (**76**). A sugestão aqui apresentada para estas fragmentações envolvem um Rearranjo de MacLafferty seguido por um equilíbrio ceto-enólico. Na sequência, uma fragmentação do tipo Retro Diels-Alders leva à formação do íon m/z 215. A partir da estrutura gerada após o equilíbrio ceto-enólico, é possível ocorrer a perda de CO₂ (-44 Da) para gerar o íon m/z 213, que de acordo com a nossa proposta pode ser bastante estabilizado por conjugação com todo o sistema aromático.

Identificados os principais fragmentos obtidos para o alternariol (**76**) e o alternariol monometil éter (**77**), canais de SRM envolvendo estas fragmentações foram selecionados e analisados com respeito a sua seletividade e sensibilidade. Os canais escolhidos foram m/z 257 → m/z 215 (monitoramento) e m/z 257 → m/z 213 (quantificação) para o alternariol (**76**) e m/z 271 → m/z 256 (quantificação) e m/z 271 → m/z 228 (monitoramento) para o alternariol monometil éter (**77**).


 FIGURA 103. Proposta para a formação de m/z 215 e m/z 213 para o alternariol (76).

Selecionadas as transições a serem utilizadas, foram iniciadas as etapas de validação do método. A seletividade foi garantida pelo uso de duas transições nos experimentos de SRM e a comparação com as amostras branco evidenciou este ponto (FIGURA 104 e FIGURA 105). Além de seletivo, o método mostrou-se bastante sensível, com limites de detecção (LOD) da ordem de 0,13 ng/mL e limites de quantificação (LOQ) em torno de 0,5 ng/mL, como pode ser observado através dos cromatogramas SRM apresentados nas FIGURA 104 e FIGURA 105 e na TABELA 20.

Boa linearidade também foi conseguida neste método de análises em um intervalo dinâmico de 0,50 até 20,0 ng/mL. Os valores de r^2 , que podem ser verificados na TABELA 20, forma todos maiores do que 0,997 para ambos os compostos tanto no flavedo quanto no albedo.

TABELA 20. Ensaio para linearidade, LOQ e LOD para o método proposto (valores são as médias \pm RSD, n = 3)

Toxina	Limite de quantificação (ng/mL)	Limite de detecção (ng/mL)	slope (a)	intercept (b)	coeficiente de determinação (r^2)
Flavado					
Alternariol (76)	0.40 \pm 4.0	0.12 \pm 12.6	243.97 \pm 4.9	7.27 \pm 20.9	0.998 \pm 0.1
Alternariol monometil éter (77)	0.32 \pm 7.4	0.10 \pm 11.0	2938.63 \pm 1.6	681.50 \pm 13.7	0.997 \pm 0.2
Albedo					
Alternariol (76)	0.42 \pm 5.7	0.13 \pm 14.1	266.71 \pm 1.4	-6.54 \pm 14.6	0.998 \pm 0.1
Alternariol monometil éter (77)	0.41 \pm 6.6	0.12 \pm 11.0	3032.83 \pm 0.8	678.53 \pm 9.6	0.998 \pm 0.1

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados da mesma maneira descritos para o método de quantificação da zearalenona (14). Estes resultados podem ser encontrados na TABELA 21, abaixo. Claramente pode-se observar que os valores do desvio padrão relativo (RSD) para ambos os compostos analisados ficaram abaixo de 6,6% na matriz flavado. Isso demonstra que o método é bastante preciso com respeito a sua repetibilidade (análises intra-dia) e a sua precisão intermediária (análises inter-dias). Para a matriz albedo, os desvios foram um pouco maiores. Entretanto, os valores obtidos ainda se encontram abaixo de 14,5%, conferindo precisão ao método desenvolvido também para esta matriz.

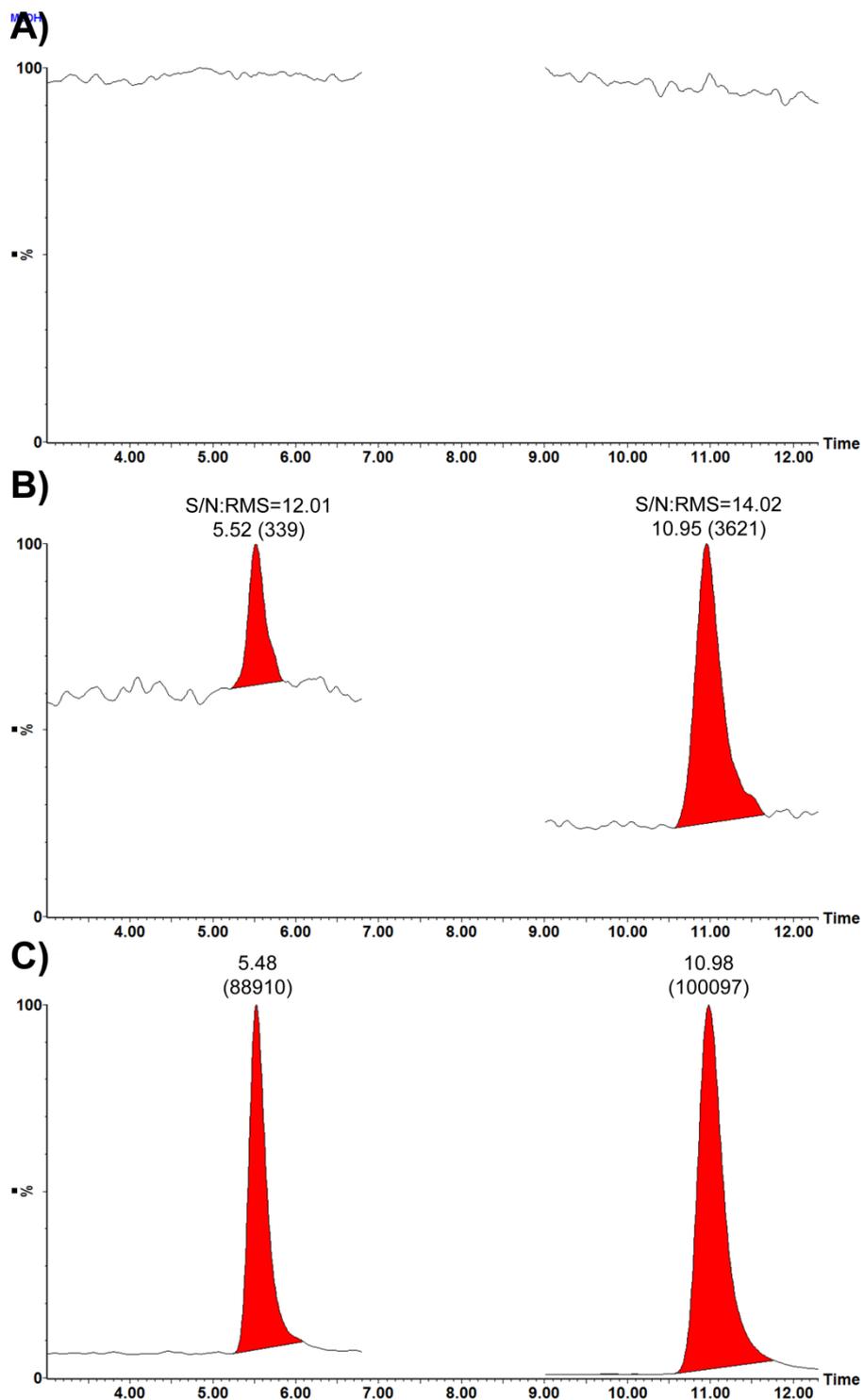


FIGURA 104. Cromatogramas obtidos para a matriz flavedo. O primeiro composto a eluir é o alternariol (**76**) (257→213) e o segundo é o alternariol monometil éter (**77**) (271→256). A) branco; B) concentrações no LOQ; C) concentração no ponto mais alto do intervalo dinâmico. Os valores são tempo de retenção (área do pico).

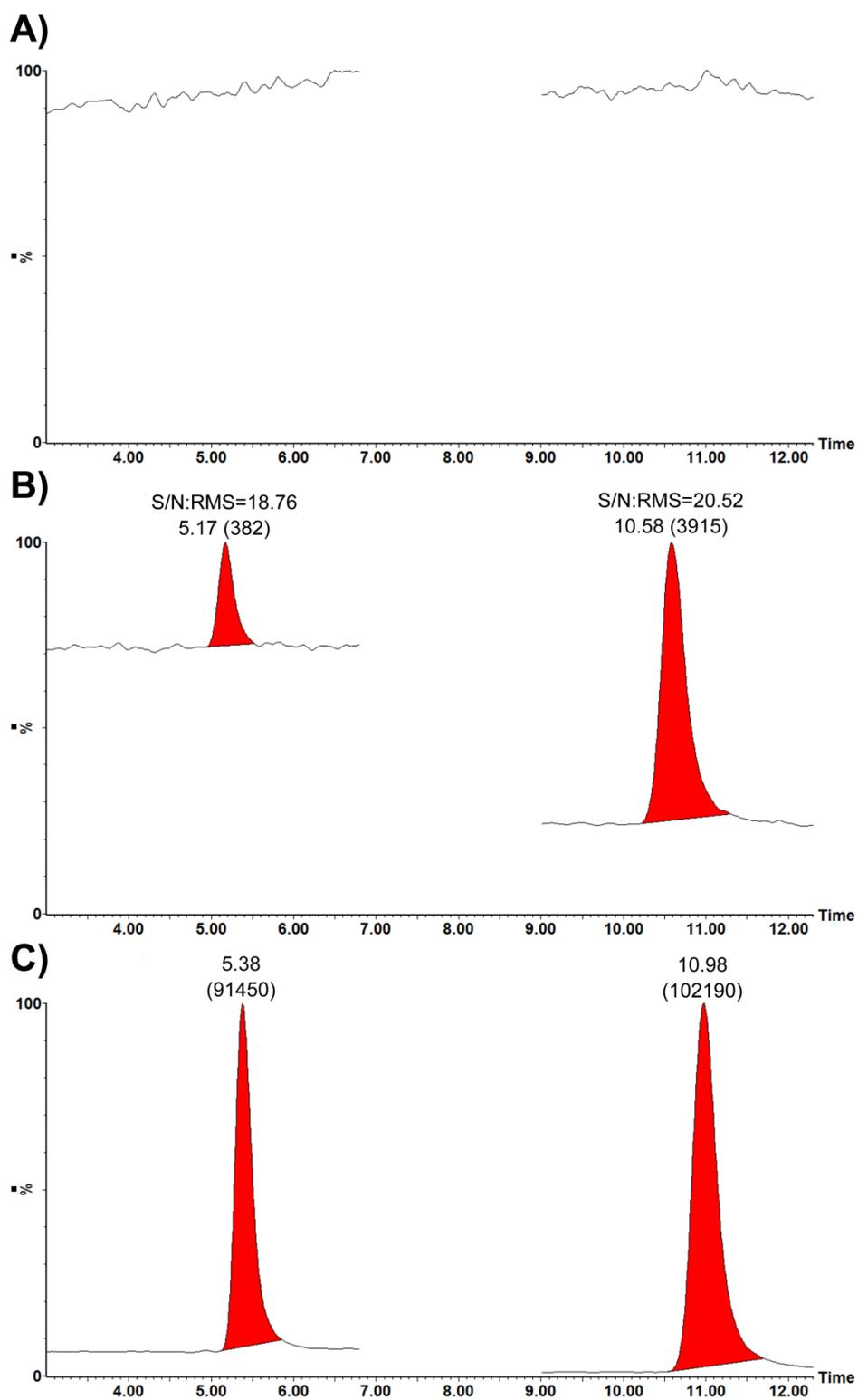


FIGURA 105. Cromatogramas obtidos para a matriz albedo. O primeiro composto a eluir é o alternariol (**76**) (257→213) e o segundo é o alternariol monometil éter (**77**) (271→256). A) branco; B) concentrações no LOQ; C) concentração no ponto mais alto do intervalo dinâmico. Os valores são tempo de retenção (área do pico).

Os erros relativos, que expressam a exatidão do método, também podem ser encontrados na TABELA 21. Mais uma vez eles foram menores na matriz flavedo do que no albedo, indicando que este último tecido constitui uma matriz ligeiramente mais complexa do que o primeiro. Ainda assim todos os valores ficaram abaixo de 11% no flavedo e 14,5% no albedo, indicando que além de preciso o método proposto também é exato. Na análise de micotoxinas em alimentos, ambos os valores de RSD e erro relativo são geralmente aceitos quando menores do que 20%^{206, 207}.

TABELA 21. Ensaio para a precisão e exatidão dos compostos analisados nas matrizes flavedo e albedo.

Composto	Intra-dias (n = 5)				Inter-dias (n = 12)		
	Concentração esperada (ng/mL)	Concentração medida (ng/mL)	RSD (%)	Erro relativo (%)	Concentração medida (ng/mL)	RSD (%)	Erro relativo (%)
Flavedo							
Alternariol (76)	0.5	0.52 ± 0.02	3.8	4.4	0.51 ± 0.02	3.9	2.3
	1.0	1.06 ± 0.07	6.6	6.0	1.06 ± 0.06	5.7	5.9
	2.5	2.23 ± 0.12	5.4	-10.8	2.23 ± 0.11	4.9	-10.9
	5.0	5.13 ± 0.23	4.5	2.7	5.17 ± 0.22	4.3	3.4
	10.0	9.99 ± 0.29	2.9	-0.1	10.34 ± 0.57	2.5	3.5
	20.0	20.07 ± 0.45	2.2	0.4	19.93 ± 0.43	2.2	-0.3
Alternariol monometil éter (77)	0.5	0.55 ± 0.01	1.8	9.8	0.55 ± 0.02	3.6	10.2
	1.0	1.00 ± 0.02	2.0	-0.4	0.99 ± 0.02	2.0	-0.8
	2.5	2.29 ± 0.02	0.9	-8.4	2.23 ± 0.04	1.8	-10.7
	5.0	5.05 ± 0.04	0.8	1.0	4.99 ± 0.11	1.2	-0.2
	10.0	0.96 ± 0.15	1.5	-0.4	9.93 ± 0.14	1.4	-0.7
	20.0	20.20 ± 0.09	0.5	1.0	20.33 ± 0.29	1.4	1.3
Albedo							
Alternariol (76)	0.5	0.50 ± 0.03	6.0	0.1	0.47 ± 0.06	12.8	-0.9
	1.0	0.98 ± 0.13	13.3	-2.2	0.99 ± 0.06	6.1	-0.4
	2.5	2.46 ± 0.08	3.3	-1.6	2.41 ± 0.21	8.7	-4.2
	5.0	5.52 ± 0.05	0.9	10.3	5.72 ± 0.07	1.2	14.4
	10.0	9.25 ± 0.66	7.1	-7.5	9.61 ± 0.88	9.2	-0.6
	20.0	20.31 ± 1.17	5.8	1.5	19.69 ± 2.17	11.0	-3.4
Alternariol monometil éter (77)	0.5	0.47 ± 0.02	4.3	-5.7	0.50 ± 0.07	14.0	-0.5
	1.0	0.99 ± 0.07	7.1	-0.1	0.97 ± 0.13	13.4	-2.4
	2.5	2.41 ± 0.24	10.0	-3.4	2.30 ± 0.21	9.1	-7.8
	5.0	5.72 ± 0.08	1.4	14.5	5.44 ± 0.22	4.0	8.9
	10.0	9.61 ± 0.71	7.4	-3.9	9.78 ± 1.27	13.0	-2.2
	20.0	19.69 ± 2.32	11.8	-1.5	19.65 ± 1.92	9.8	-1.7

A recuperação do método também foi analisada, ou seja, verificou-se a eficiência do processo de extração e *clean-up* dos analitos de interesse pelo

método proposto. Os valores obtidos indicam que a recuperação é praticamente a mesma para ambos os compostos analisados (TABELA 22). Entretanto, os valores nominais obtidos sugerem que o procedimento de extração e *clean-up* podem ser melhorados, pois a recuperação global está em torno de 40% em ambas as matrizes.

Embora os valores de recuperação estejam baixos, eles corroboram com os reportados por Lau et al. (2003)¹⁷² que obteve valores na ordem de 36% para o alternariol (**76**) e 20% para o alternariol monometil éter (**77**) em sucos de laranjas usando um procedimento de extração similar ao que foi proposto aqui. Isso indica que matrizes provindas de plantas do gênero *Citrus*, sejam elas na forma de sucos ou de frutas *in natura*, ocasionam consideráveis efeitos de matriz durante os processo de extração, *clean-up* ou mesmo de ionização na fonte de ES. Outras frutas como maçãs por exemplo, não apresentam tamanho efeito de matriz e valores para recuperação da ordem de 90% são reportados na literatura^{172, 207}

TABELA 22. Ensaio de recuperação para o método proposto de quantificação de alternariols em tangerinas.

Concentração esperada (ng/mL)	Recuperação (% da média ± RSD)			
	Flavado		Albedo	
	Alternariol (76)	Alternariol monometil éter (77)	Alternariol (76)	Alternariol monometil éter (77)
0.50	43.75 ± 7.5	38.26 ± 13.1	44.71 ± 12.2	35.11 ± 6.9
1.00	42.22 ± 7.3	38.05 ± 6.8	45.17 ± 8.9	40.80 ± 12.7
2.50	40.00 ± 5.0	39.00 ± 6.2	41.70 ± 14.2	38.21 ± 11.4
5.00	39.38 ± 7.6	43.86 ± 5.1	41.30 ± 6.9	40.95 ± 6.4
10.00	39.23 ± 9.5	42.84 ± 13.2	41.86 ± 6.6	35.94 ± 10.7
20.00	41.34 ± 5.6	39.97 ± 7.2	42.01 ± 5.8	36.55 ± 9.0
Recuperação média global (média ± SD)	40.99 ± 1.6	40.33 ± 3.6	42.79 ± 3.4	37.93 ± 2.5

Após checados todos os parâmetros necessários para a validação do método, amostras de tangerina sintomáticas e assintomáticas à patogenia Mancha Marrom de Alternária foram então analisadas. Para isso, contamos com a colaboração do Dr. Nelson Wulff, da FUNDECITRUS, que cedeu amostras de

tangerinas selecionadas por este próprio órgão. Além disso, analisamos 2 amostras de tangerinas, assintomáticas a esta doença, compradas em Recife, PE. Isso foi feito pois não existem relatos da ocorrência desta patogenia na região nordeste brasileira e assim seria possível verificar se as análises realizadas pelo método aqui proposto poderiam confirmar este fato.

Assim, de acordo com o método proposto, as quantidades de alternariol (**76**) detectadas foram em média 5 vezes maior do que as de alternariol monometil éter (**77**) na matriz flavedo das amostras sintomáticas (FIGURA 106). Um dos resultados mais significativos obtidos aqui e reportados na FIGURA 106 é que mesmo as amostras assintomáticas a esta patogenia, coletadas no estado de São Paulo, apresentavam níveis de alternariol e alternariol monometil éter (**77**) no flavedo. Estes níveis estão entre 15 e 25% dos níveis encontrados nas amostras sintomáticas. Este resultado foi de fundamental importância tanto para o grupo quanto para a FUNDECITRUS, pois ele sinalizou que o método de análise por HPLC-ESI-MS/MS aqui proposto tinha potencial para ser utilizado como uma ferramenta de diagnósticos para a detecção de Mancha Marrom de Alternária em *Citrus*. A identificação dos sintomas desta patogenia é feito através de análises visuais dos frutos e, em muitos casos, quando estes sintomas se manifestam, uma grande quantidade de plantas já está acometida pela doença na plantação.

Com uma ferramenta de análises que poderia detectar a presença da patogenia mesmo antes dos sintomas visuais, seria possível um diagnóstico rápido e eficaz no combate desta praga. Entretanto, os altos custos das análises por espectrometria de massas, entre outros detalhes, dificultam a implementação desta técnica no controle de qualidade de tangerinas. Nossa contribuição neste presente trabalho foi comprovar a potencialidade da técnica, desenvolvendo um método de análise que cientificamente atingiu o escopo demandado pela indústria da citricultura. Avanços no sentido de minimizar os custos podem, no médio prazo, viabilizar esta proposta analítica em termos comerciais.

Com respeito à confiabilidade das análises, os resultados das amostras compradas em Recife, PE, onde não existem relatos desta patogenia, forneceram informações muito importantes. Como pode ser observado na

FIGURA 106, as toxinas não foram detectadas em nenhuma parte destes frutos. Ou seja, provavelmente os frutos assintomáticos coletados no estado de São Paulo estavam com a patogenia no início do seu desenvolvimento, sem aparentes sintomas. Já os coletados em Recife, PE, realmente estavam isentos da patogenia, comprovada pela ausência das toxinas nos frutos.

Outro resultado muito interessante foi a constatação de que não existe acúmulo de alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**) no tecido albedo, a pele interna branca do fruto. Isso ocorre inclusive para as amostras sintomáticas a Mancha Marrom de Alternária (FIGURA 106) e sugere que a camada externa da casca, o flavedo, funciona como uma barreira química para a transposição destas toxinas. Este resultado é uma aparente oposição à constatação de Agrios (1989)⁹, que observou que pequenas lesões na superfície de frutos com sintomas de Mancha Marrom de Alternária podem indicar uma extensiva infecção dentro do fruto.

Os nossos resultados, entretanto, sugerem que a infecção nem sempre está associada ao acúmulo de toxinas, principalmente no interior do fruto. Alguns pesquisadores têm atribuído propriedades antimicrobianas ao albedo, principalmente devido às altas concentrações de flavonóides e outros compostos fenólicos neste tecido^{208, 209}. Embora alguns destes compostos possam ser encontrados também no flavedo, até o presente momento nenhuma atividade antimicrobiana foi atribuída a este tecido^{208, 209}. Tais observações corroboram com os resultados aqui apresentados e talvez a presença de flavonóides e outras substâncias fenólicas possam inibir a infecção fúngica, atuando também como uma barreira para transposição dos alternariols para dentro dos frutos de tangerina.

Os níveis de contaminação aqui apresentados são menores do que os reportados por Logrieco et al. (2003)²¹⁰. Embora este trabalho não tenha sido validado, é um dos poucos dados encontrados na literatura corrente e reporta a detecção de 0,92 mg.kg⁻¹ de alternariol e 0,17 mg.kg⁻¹ de alternariol monometil éter (**77**) em laranjas acometidas pela Mancha Preta de Alternária, outra doença causada por fungos do gênero *Alternaria* e que embora tenha o nome muito

similar à primeira, possui característica e mecanismos de ação completamente distintos. Isso sugere a alta produção *in situ* destas toxinas se comparadas com a infecção pela Mancha Marrom de *Alternaria*, alvo do nosso presente trabalho.

O desenvolvimento e a aplicação deste trabalho foram publicados no *Journal of Agricultural and Food Chemistry*²¹¹ e constituem uma importante contribuição tanto para o desenvolvimento de ferrements visando o diagnóstico de doenças características de *Citrus*, quanto para a compreensão de como as toxinas produzidas por *Alternaria* são acumuladas nos frutos de tangerina. Além disso, os nossos resultados aqui apresentados podem indicar uma alternativa de consumo para as tangerinas. Mesmo aquelas com sintomas de Mancha Marrom de *Alternaria* podem ser consumidas desde que o flavedo seja completamente removido do fruto. Este é um procedimento de praxe no consumo das frutas *in natura*, mas em muitos casos a produção de suco de tangerina emprega o fruto como um todo. Para estes casos, existe um risco na ingestão de quantidades consideráveis de alternarióis, caso frutos sintomáticos a esta doença sejam empregados na fabricação do suco. Como não existem limites internacionais para o consumo destas substâncias e como elas são consideradas substâncias moderadamente carcinogênicas^{212, 213}, sugere-se cautela na ingestão de sucos provindos de tangerinas.

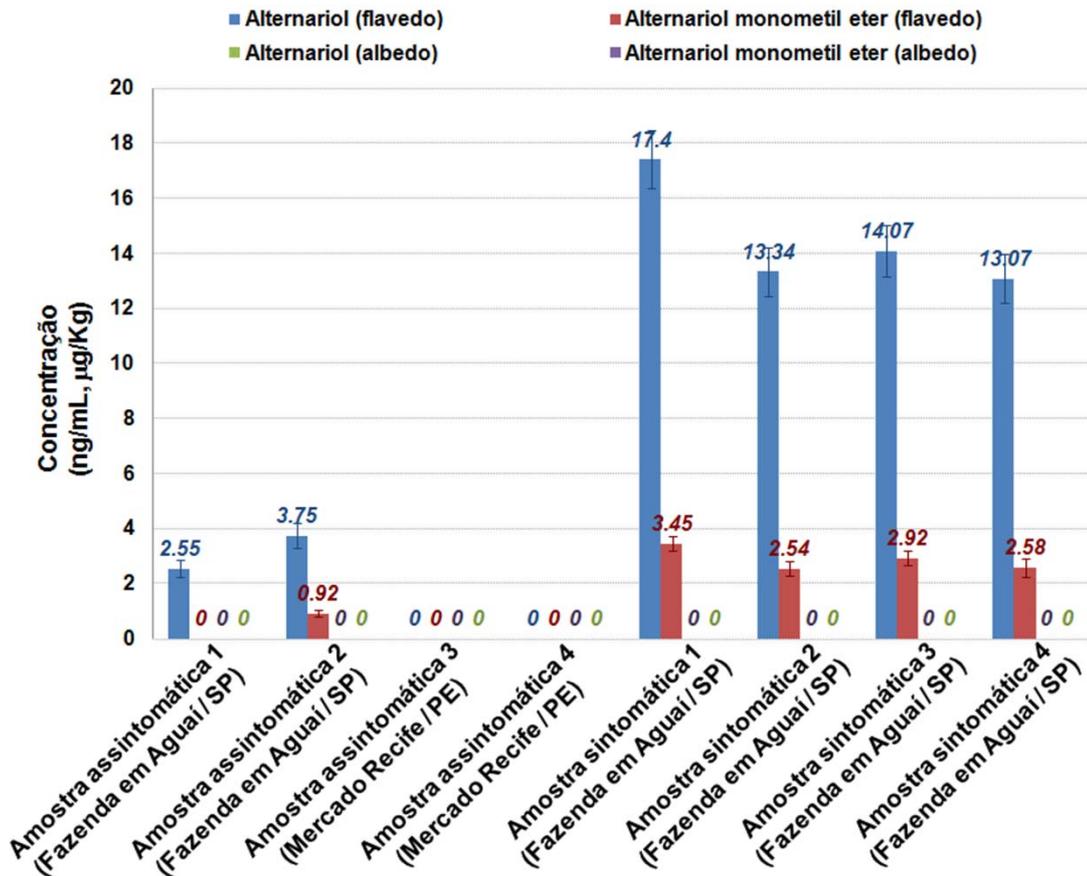


FIGURA 106. Resultados da análises de amostras de tangerina pelo método proposto.

Embora a validação do método apresentado acima tivesse sido realizado nas matrizes albedo e flavado de tangerinas, decidimos empregá-lo para a construção de curvas de produção de alternariols, isolados como patógenos de trigo, usando o próprio trigo como meio de cultura. O principal intuito de se realizar tais curvas de produção é checar o perfil do metabolismo de *Alternaria alternata*.

Como pode-se observar na FIGURA 107, não existe uma modificação considerável até 10 dias de cultivo fúngico. Entretanto, de 15 a 20 dias podemos observar perfis distintos para o alternariol (76) e para o alternariol monometil éter (77): enquanto a concentração do primeiro aumenta exponencialmente, as quantidades do segundo permanecem quase que estáticas. Este perfil aparentemente se inverte no período de 20 a 30 dias, ou seja,

enquanto a concentração de alternariol monometil éter (77) cresce exponencialmente, a de alternariol (76) permanece em patamares quase idênticos. Uma nova inversão no perfil de produção é observada do período de 30 a 40 dias. A equação que descreve este perfil é a mesma descrita no método de quantificação de zearalenonas (FIGURA 94). Para o alternariol monometil éter (77), a equação se encaixa com r^2 igual a 0,998. A única diferença é quanto a produção de alternariol (76), onde existem dois estágios em que esta equação se aplica: um até 30 dias de cultivo, com r^2 igual a 0,986, e outro de 30 a 40 dias, com r^2 igual a 0,997.

O perfil encontrado para a produção destas toxinas vai de encontro com o reportado por Magnani²⁰⁵, embora suas análises tenham sido realizadas por HPLC-UV, usando um método de análises não validado e utilizando-se outra cepa de *Alternaria alternata* (isolada como patógeno de *Citrus*). Ou seja, aparentemente o perfil de produção de alternariols não diverge entre as duas cepas de *Alternaria* disponíveis no grupo de pesquisa. Entretanto, as quantidades absolutas em cada dia estudado divergem consideravelmente. Aparentemente, a cepa isolada de *Citrus* e estudada por Magnani²⁰⁵ produz cerca de 5 vezes mais alternariols do que a cepa aqui estudada. Como o método empregado neste estudo anterior não foi validado, as quantidades detectadas representam apenas uma estimativa e uma quantificação em valores absolutos, pois inúmeros fatores analíticos podem influenciar os resultados obtidos. Independentemente destes valores, o perfil das curvas obtidas foi muito semelhante.

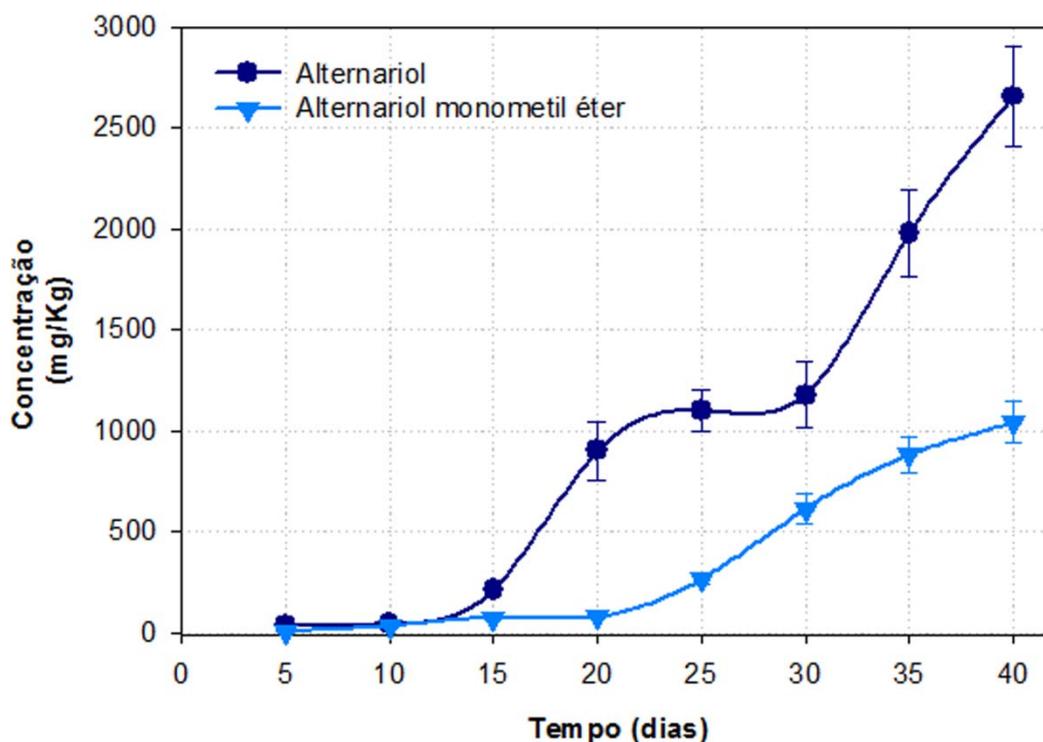


FIGURA 107. Curva de produção de alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) obtidos de *Alternaria alternata*, isolada como patógeno de trigo, e cultivada neste mesmo cereal.

Uma explicação bastante plausível para o perfil observado na produção de alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) (FIGURA 107) pode ser encontrada na biossíntese destas substâncias. Segundo Dewick (2004)⁵⁰, os aspectos essenciais da biossíntese deste composto podem ser redigidos, embora a sequência precisa das reações envolvidas ainda não seja plenamente conhecida. O alternariol (76) é formado a partir de 7 unidades acetato intactas. Após 2 reações de aldol intramoleculares, é possível a enolização e conseqüente formação do anel lactônico, gerando o alternariol (76), como apresentado na FIGURA 108. Uma simples metilação via enzima carregadora do grupo S-adenosilmetionina (SAM) permite a formação do alternariol monometil éter (77).

De acordo com a biossíntese, portanto, o alternariol (76) pode ser considerado um intermediário para a formação de seu derivado metoxilado. Assim, enquanto há a biossíntese de alternariol (76), aparentemente não existe “material de partida” suficiente para a considerável produção de alternariol monometil éter (77) (períodos de 10 a 20 dias e de 30 a 40 dias, FIGURA 107).

Quando este começa a ser produzido, aparentemente o excesso de alternariol (**76**) gerado no meio é usado nesta conversão química e, portanto, não há um incremento na concentração do alternariol (**76**) (período de 20 a 30 dias, FIGURA 107). O refinado processo enzimático que controla estes processos tende a ser bastante sofisticado e será objeto de estudos futuros em nosso grupo de pesquisas.

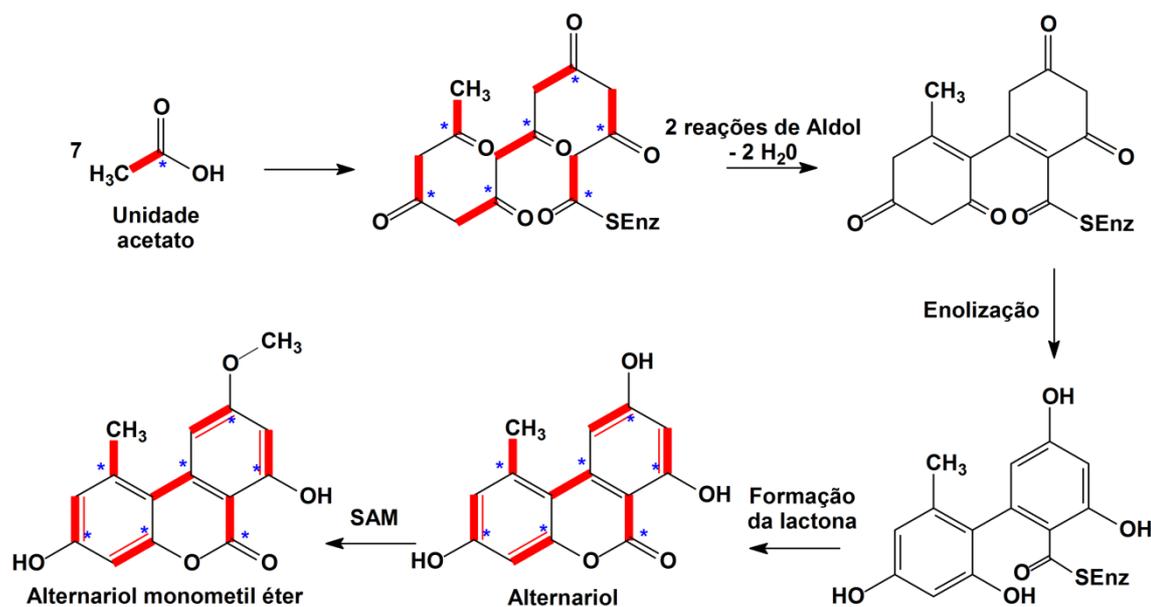


FIGURA 108. Biossíntese do alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**) – adaptado de Dewick (2004)⁵⁰.

Aproveitando-se o desenvolvimento do método, também checamos 3 diferentes meios de cultura sólidos para a obtenção destas substâncias: trigo milho e arroz. Como podemos observar na FIGURA 109, existe uma tendência à produção destas substâncias. O melhor meio de cultura para a produção de ambas as substâncias foi o milho, seguido pelo trigo – utilizado na obtenção da curva de produção – e por último o arroz.

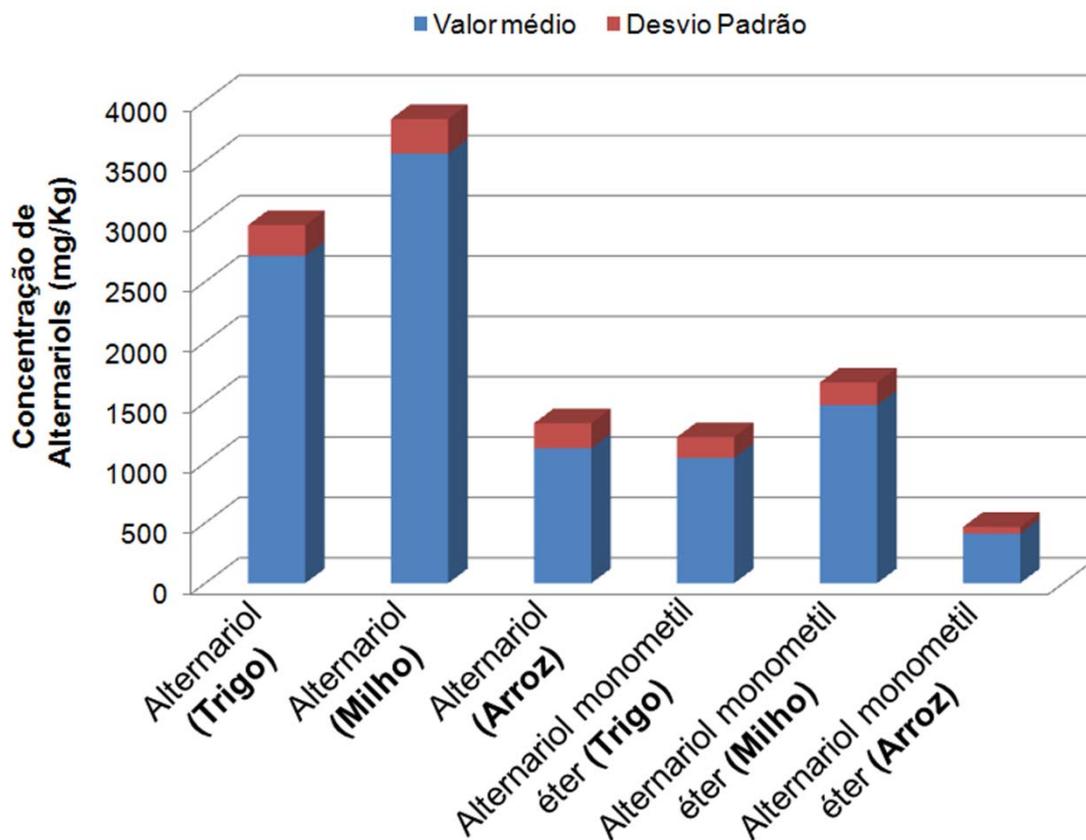


FIGURA 109. Produção de alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) em diferentes meios de cultura (40 dias de cultivo).

Estes resultados, quando comparados com os obtidos na curva de produção da zearalenona (14) (FIGURA 93), revelam certa preferência pelos cereais milho e trigo, quanto a produção de toxinas por fungos dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium*. Estas informações são muito revelantes, pois permitem uma prévia seleção das melhores condições de cultivo para estas substâncias. Neste presente documento, foram apenas testados as variáveis tempo de cultivo e meio de cultura, pois o objetivo final de cada quantificação e da construção das curvas de produção eram distintos para cada um dos fungos analisados. Porém, otimizações envolvendo mudanças no teor de umidade, no pH, na temperatura, entre outros fatores, são extremamente interessantes e podem complementar os dados aqui reportados.

3.3.6. Detecção e identificação dos metabólitos produzidos por *Alternaria alternata* por HPLC-SPE-NMR

Após a detecção e a quantificação das toxinas alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**) em frutos de tangerinas e em extratos de *Alternaria alternata*, obtidos através do cultivo em milho, trigo e arroz, estes extratos foram investigados mais detalhadamente com respeito a possibilidade de haver outros análogos destas substâncias. Tal investigação iniciou-se com alguns indícios obtidos via HPLC-MS em nosso laboratório no DQ-UFSCar. Porém, como pode ser observado na FIGURA 110A, o extrato é constituído basicamente dos compostos alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**), tornando a caracterização completa dos outros compostos por técnicas de espectrometria de massas até certo ponto limitada.

Desta maneira, estabelecemos uma parceria com o *Max Planck Institut für chemische Ökologie*, localizado na cidade de Jena, Alemanha. Tal parceria permitiu a utilização de um sistema de hifenação entre a cromatografia líquida com a extração em fase sólida e a ressonância magnética nuclear (HPLC-SPE-NMR). Este equipamento, como mencionado na introdução, é atualmente considerado um dos sistemas mais eficientes para a identificação e caracterização de compostos orgânicos em matrizes complexas.

Assim, visando a detecção e identificação dos metabólitos produzidos por *Alternaria alternata*, decidimos submeter um extrato que havia sido produzido no DQ-UFSCar (ítem 3.2.2.6.1.) à análises por HPLC-SPE-NMR. O primeiro cromatograma obtido está apresentado na FIGURA 110A. Após a obtenção deste cromatograma, os picos de interesse foram seletivamente trapeados em cartuchos de SPE e depois eluídos para dentro do magneto para o registro dos experimentos de ^1H NMR. Entretanto, ao se observar os espectros relativos às bandas cromatográficas então retidas, foi possível identificar os compostos alternariol (**76**) (12,87 min) e alternariol monometil éter (**77**) (21,89 min), os quais já haviam sido previamente detectados como as substâncias majoritárias do extrato. As substâncias referentes ao trapeamento dos demais

picos se mostraram muito impuras, inviabilizando uma completa determinação estrutural (espectros de ^1H NMR não mostrados aqui).

Portanto, foi realizada uma pré-purificação por SPE manual usando cartuchos contendo ODS como fase estacionária. Desta maneira, o extrato inicial foi separado em 3 frações: 10 (MAC10), 50 (MAC50) e 100% (MAC100) de acetonitrila em água. Os cromatogramas relativos às frações MAC10 e MAC100 se mostraram pouco interessantes com respeito à presença de alternariols e assim não foram trabalhados. A fração MAC50, ao contrário, mostrou-se rica em compostos com UV muito similar ao dos alternariols. Esta fração foi então concentrada e o método cromatográfico foi otimizado visando uma separação de linha de base dos compostos de interesse (FIGURA 110B). Todos os picos foram trapeados e analisados por NMR. Destes, 4 outros picos (assinalados no cromatograma da FIGURA 110B) além do alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**) se apresentaram muito interessantes e portanto foram analisados mais cuidadosamente.

Os espectros de ^1H NMR dos picos trapeados no sistema de SPE estão apresentados na FIGURA 111. Através de uma investigação criteriosa destes espectros, é possível observar que os componentes majoritários deste extrato, (compostos **76** e **77**) exibem um perfil espectral muito similar. A presença de quatro dubletos na região aromática (δ variando de 6.40 a 7.30 ppm), exibindo constantes de acoplamento *meta* ($J \approx 2.0$ Hz), sugerem a presença de dois anéis aromáticos tetra-substituídos. Singletos muito intensos por volta de δ 12.00 e 2.80 ppm (este último com integral igual a 3) indicam a presença de uma hidroxila quelada e de um grupo metílico ligados aos anéis aromáticos, respectivamente. A única diferença existente entre os compostos **76** e **77** é a presença de outro singlete muito intenso em δ 3.95 ppm integrando para 3 hidrogênios no composto **77**, muito provavelmente relacionado à um grupo metoxil ligado ao anel aromático (FIGURA 112).

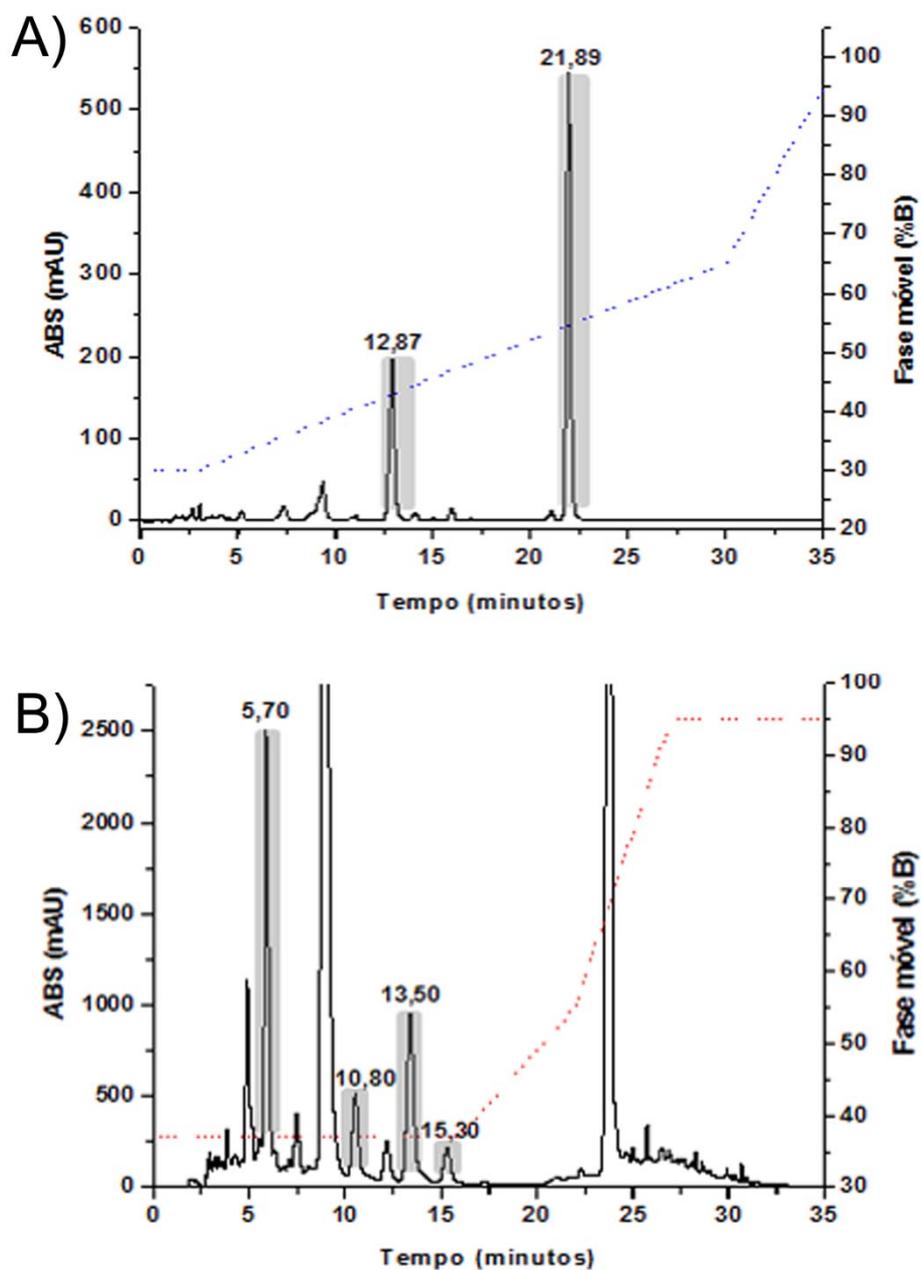


FIGURA 110. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV-SPE-NMR (254 nm). Os picos marcados foram trapeados automaticamente em discos de SPE: A) cromatograma inicial do extrato de *Alternaria alternata* (30 μ L, 2mg/mL). Os picos marcados representam alternariol (**76**) (12,87 min) e alternariol monometil éter (**77**) (21,89 min). B) Cromatograma após otimização cromatográfica, pré-purificação por SPE manual e concentração da amostra (30 μ L, 20mg/mL).

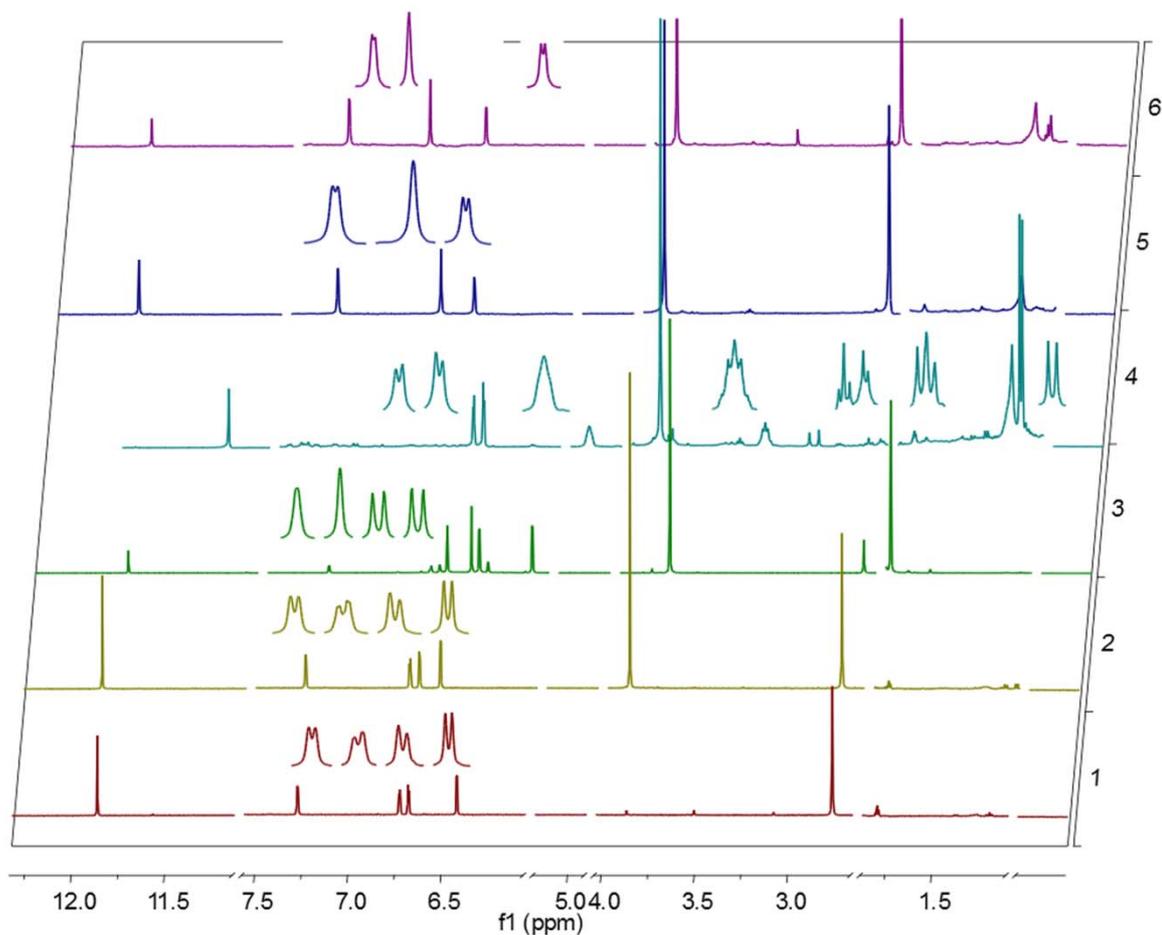


FIGURA 111. Espectros de ^1H NMR das amostras de interesse analisadas por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz, CD_3CN): **1**) alternariol (**76**); **2**) alternariol monometil éter (**77**); **3**) alternusin (**76**); **4**) MAC50_108 (**90**); **5**) MAC50_135 (**91**); **6**) MAC50_153 (**92**);

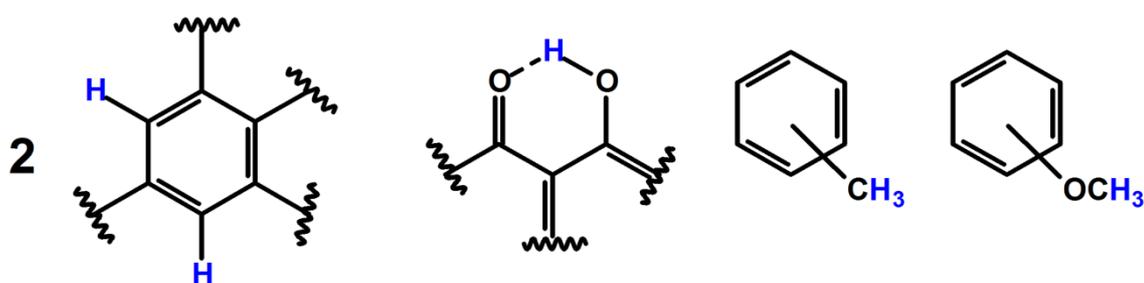


FIGURA 112. Fragmentos dos compostos **76** e **77** que podem ser deduzidos a partir dos experimentos de ^1H NMR.

Com base nestas informações e de acordo com o conhecimento prévio de obtenção deste extrato, é possível inferir que as substâncias **76** e **77** possuem o esqueleto químico dos alternariols, e como a diferença entre as mesmas é de apenas um grupo metoxil, podemos associar o composto **76** ao

alternariol e o composto **77** ao alternariol monometil éter (FIGURA 113). O perfil dos espectros de ^{13}C NMR, sejam eles obtidos de maneira direta ou extraídos dos experimentos de gHMBC via detecção inversa, também são bastante similares, com exceção da presença de uma carbono em 56.4 ppm para o composto **77**. Este dado reforça que a diferença entre um composto e outro é a presença de um grupo metoxil ligado a um dos anéis aromáticos no composto **77**, ou seja, no alternariol monometil éter (**77**). Os espectros de gHMBC para composto **76** e de ^{13}C NMR e gHMBC para o composto **77**, podem ser observados nas FIGURA 114, FIGURA 115 e FIGURA 116. Todas as correlações observadas, bem como o deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos detectados encontram-se resumidos na TABELA 23.

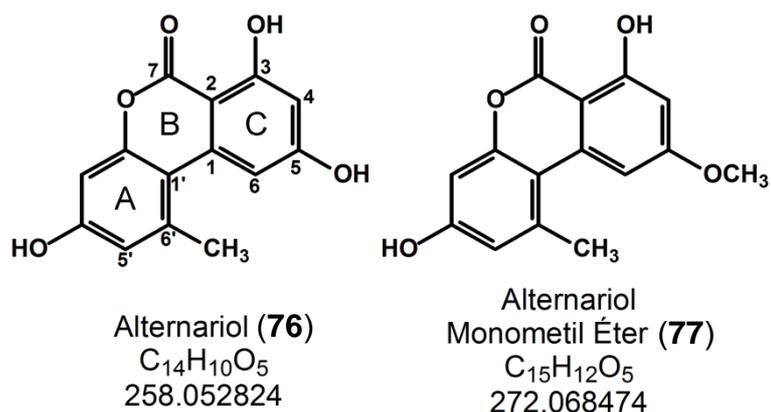


FIGURA 113. Estruturas químicas dos compostos alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**).

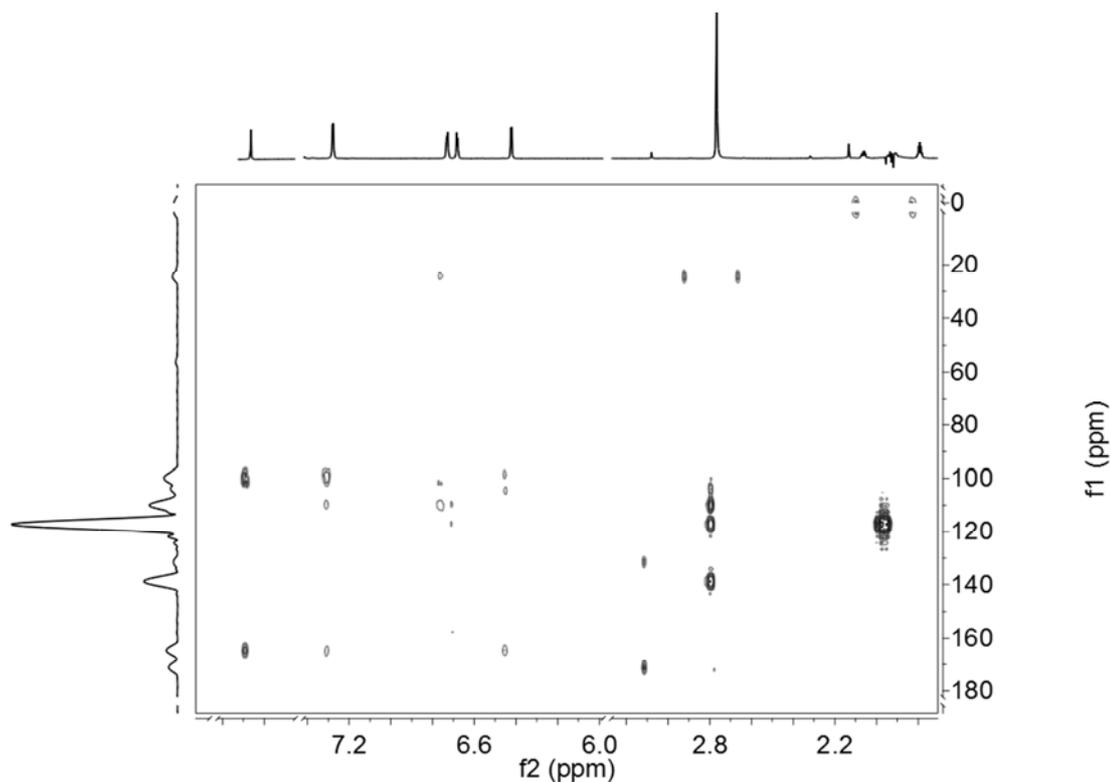


FIGURA 114. Espectro de *g*HMBC obtido para o composto **76** via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

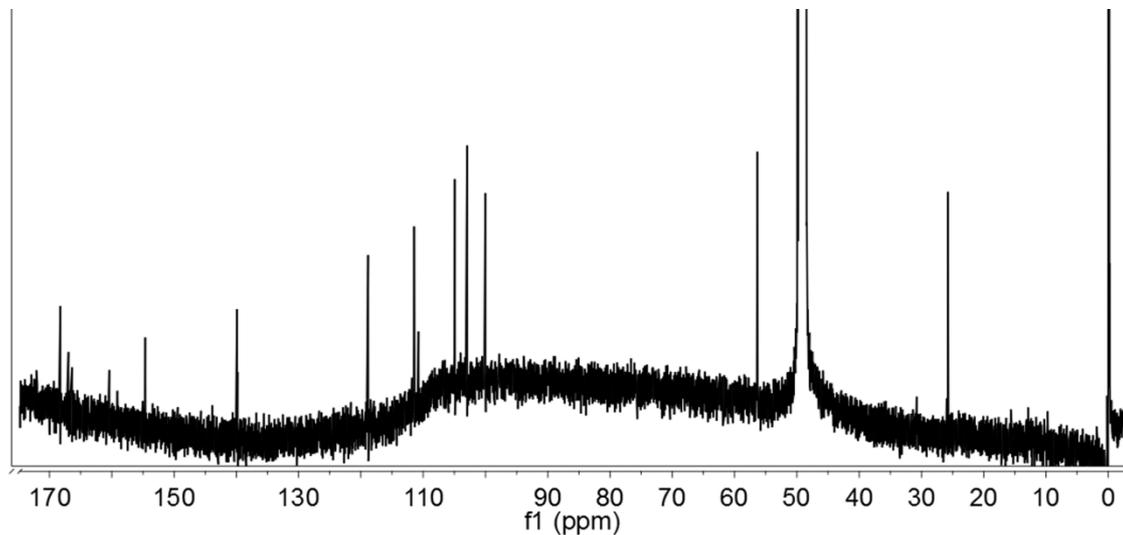


FIGURA 115. Espectro de ^{13}C NMR obtido para o composto **77** via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (125 MHz para, CD_3CN). A imperfeição na linha de base é resultante da baixíssima sensibilidade da sonda capilar, imprescindível para hifenação com HPLC, nos experimentos de ^{13}C NMR.

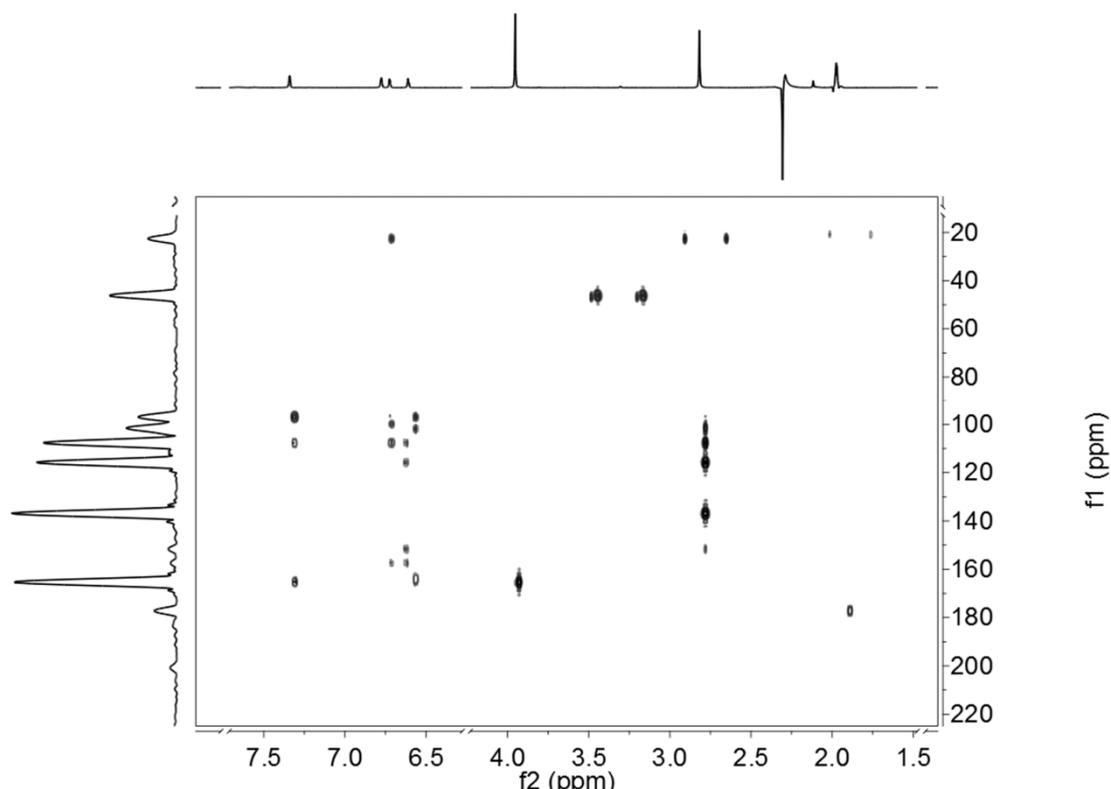


FIGURA 116. Espectro de gHMBC obtido para o composto **77** via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

Ambos os espectros de gHMBC apresentam o hidrogênio da posição H-3' correlacionando com os carbonos C-1' and C-2' (para os deslocamentos químicos, conforme TABELA 23), evidenciando a conectividade dos entre os anéis A e B. O mesmo pode ser observado para as conectividades entre os anéis B e C, uma vez que H-6 correlaciona com J^3 com os carbonos C-1' and C-2. As demais correlações observadas confirmam as estruturas propostas. Assim, baseando-se nestes dados, foi possível associar indubitavelmente os picos **76** e **77** aos compostos alternariol e alternariol monometil éter. Dados encontrados na literatura suportam a nossa atribuição estrutural, como pode ser observado na comparação feita na TABELA 23, embora tenham sido obtidos a partir de experimentos envolvendo solventes diferentes dos aqui utilizados.

TABELA 23. Resumo dos valores obtidos nos experimentos de ^1H , ^{13}C NMR e gHMBC por HPLC-UV-SPE-NMR para os compostos **76** e **77** (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN). Valores de referência também estão apresentados para alternariol (**76**)²¹⁴ e para o alternariol monometil éter (**77**)²¹⁵.

	Alternariol (76)					Alternariol monometil éter (77)				
	Valores obtidos			Referência (CDCl_3)		Valores obtidos			Referência (DMSO)	
	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}^*	gHMBC	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	gHMBC	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}
1		139.0			138.1		138.3			
2		99.6			97.4		98.1			101.6
3		164.9			164.1		165.5			160.1
4	6.42, d (2.0)	101.1	2,3,6	6.38, d (1.9)	100.9	6.61, d (2.0)	101.5	2,3,5,6	6.55, d (2.3)	106.0
5		165.3			165.5		166.5			160.1
6	7.28, d (2.0)	104.9	2,4,5,1'	7.27, d (2.0)	104.4	7.34, d (2.0)	103.3	2,4,5, 1'	7.28, d (2.3)	108.0
7		165.1			164.7		168.3			n.d.
1'		110.2			109.0		109.3			109.5
2'		153.9			152.6		153.4			153.2
3'	6.68, d (2.4)	102.3	1',2',4', 5'	6.32, d (2.6)	101.6	6.72, d (2.4)	101.5	1',2',4', 5'	6.69, d (2.3)	101.3
4'		158.0			158.4		158.9			159.0
5'	6.73, d (2.4)	117.4	1',3',6'-CH ₃	6.71, d (2.6)	117.6	6.78, d (2.4)	117.5	1',3',4', 6'-CH ₃	6.77, d (2.3)	122.9
6'		139.2			138.3		138.8			139.5
3-OH	11.86, s		2,3,7			11.93, s				
5-OCH₃						3.95, s	56.4	5	3.97, s	56.3
6'-CH₃	2.78, s	25.4	1,1',5',6'	2.77, s	25.3	2.82, s	25.7	1,1',2', 5', 6'	2.79, s	24.6

*Obtidos a partir dos experimentos de gHSQC e gHMBC.

Após análises por NMR, os compostos de interesse foram coletados e submetidos a análises por espectrometria de massas de alta resolução via ionização por elétrons (EI-HRMS). Foram detectados íons moleculares ($[\text{M}^{+\bullet}]$) com m/z 258.05197 ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$) para o alternariol (**76**) e m/z 272.06711 ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$) para o alternariol monometil éter (**77**) (TABELA 24), corroborando com a identificação estrutural realizada por NMR.

TABELA 24. Dados obtidos por EI-HRMS para os compostos previamente analisados por HPLC-UV-SPE-NMR.

Composto	Íon detectado (m/z)	Massa Calculada (Da)	Exatidão (ppm)	Desvio (mDa)
Alternariol (C ₁₄ H ₁₀ O ₅) (76)	258.051979	258.052824	3.3	0.8
Alternariol monometil éter (C ₁₅ H ₁₂ O ₅) (77)	272.067114	272.068474	5.0	1.4
Altenusin (C ₁₅ H ₁₄ O ₆) (90)	290.079702	290.079038	-2.3	-0.7
MAC50_108 (C ₁₄ H ₁₄ O ₅) (91)	262.085163	262.084124	-4.0	-1.0
MAC50_135 (C ₁₅ H ₁₂ O ₆) (92)	288.063813	288.063388	-1.5	-0.4
MAC50_153 (C ₁₅ H ₁₂ O ₆) (93)	288.062755	288.063388	2.2	0.7

Desta maneira, conseguimos separar, identificar e caracterizar indubitavelmente as substâncias alternariol (**76**) e o alternariol monometil éter (**77**) nos extratos de *Alternaria alternata*. Estes compostos têm sido isolados de diferentes espécies de fungos deste gênero, como *A. alternata*²¹⁶, *A. arborescens*, *A. infectoria*, *A. tenuissima*²¹⁷, dentre outras. Estas substâncias possuem efeitos mutagênicos e citotóxicos para bactérias e células de mamíferos²¹⁸, e estes são suspeitos de agirem como agentes carcinogênicos humanos^{219, 220}.

Prosseguindo com as análises dos espectros de NMR obtidos, podemos notar que o composto com tempo de retenção 5,7 minutos, aqui assinalado composto **90**, apresenta um perfil no espectro ¹H NMR (FIGURA 111) bastante similar quando comparado com o alternariol (**76**) e com o alternariol monometil éter (**77**), embora os sinais relativos à hidrogênios aromáticos estejam deslocados para uma região mais blindada do espectro. Além disso, para este composto não são mais observados quatro dubletos nesta região e sim dois singletos e dois dubletos (TABELA 25). Isso sugere fortemente uma mudança no perfil de substituição de um dos anéis aromáticos para um sistema tetra *orto*-substituído. Além disso, não são mais observados os sinais em ambos os espectros de ¹H e ¹³C NMR relativos ao deslocamento químico da metila ligada ao anel A. Se comparados com o alternariol monometil éter (**77**), por exemplo, estes sinais foram deslocados de δ 2.82 e 25.7 ppm, respectivamente, para uma região mais blindada, em δ 1.90 e 19.3 ppm em **90**. Tal deslocamento é consistente com uma abertura no anel lactônico.

TABELA 25. Resumo dos valores obtidos nos experimentos de ^1H , ^{13}C NMR e gHMBC por HPLC-UV-SPE-NMR para os compostos **90** e **91** (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN). Valores de referência também estão apresentados para o composto **90**²¹⁵.

Altenusin (90)					MAC50_118 (91)			
Valores obtidos			Referência (CD_3OD)		Valores obtidos			
	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	gHMBC	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	gHMBC
1		147.2			148.3		137.4	
2		104.5			106.5		100.2	
3		163.8			163.0		164.8	
4	6.47, d (2.6), 1H	99.7	2, 3, 5, 6	6.25, d (2.2), 1H	102.3	6.48, d (2.3), 1H	102.3	2, 3, 6
5		165.0			165.3		166.2	
6	6.19, d (2.6), 1H	110.6	1, 2, 4, 5	6.03, d (2.2), 1H	112.1	6.53, d (2.3), 1H	103.1	1, 2, 4
7								
1'		133.8			135.8		122.7	
2'	6.52, s, 1H	115.5	1, 1', 3', 4', 6'	6.46, s, 1H	116.6		158.1	
3'		141.5			143.3	3.33, m, 1H	27.1	1', 2', 3'- CH ₃ , 4', 5'
4'		144.2			144.7	2.93, ddd (15.5, 7.6, 6.7), 1H 2.25, ddd, (15.5, 3.1, 2.2), 1H	37.8	1', 2', 3', 3'-CH ₃ , 5' 1', 2', 3', 3'-CH ₃ , 5'
5'	6.65, s, 1H	116.3	1', 3', 4' 6'-CH ₃	6.55, s, 1H	117.2	5.09, bdd (6.7, 2.2), 1H	61.0	1', 3', 4', 6'-CH ₃
6'		126.9			127.3			
3-OH	11.87, s, 1H					11.36, s, 1H		
5-OCH₃	3.81, s, 3H	55.6	5	3.87, s, 1H	56.4	3.88, s, 1H	56.7	5
6'-CH₃	1.90, s, 3H	18.4	1', 2', 4' 5', 6'	1.90, s, 1H	19.3			
3'-CH₃						1.22, d (6.9), 1H	21.1	1', 2', 3', 4'

Experimentos de gHSQC e gHMBC, apresentados na FIGURA 117 e na FIGURA 118, respectivamente, suportam tal sugestão. Entretanto, as correlações-chave para tal proposta de abertura do anel lactônico incluem a existente entre o hidrogênio H-2' (δ 6.52 ppm) e o carbono 6' (δ 126.9 ppm),

observada no espectro de gHMBC, e a própria presença de um hidrogênio na posição H-6' acoplando com os carbonos C-1, C-2, C-4 e C-5, neste mesmo espectro. Desta maneira, baseando-se nestes dados e por comparação com a literatura²¹⁵, pode-se associar o (90) com a toxina altenusin (ver FIGURA 119), um metabólito conhecido produzido por *Alternaria* e alguns outros microrganismos.

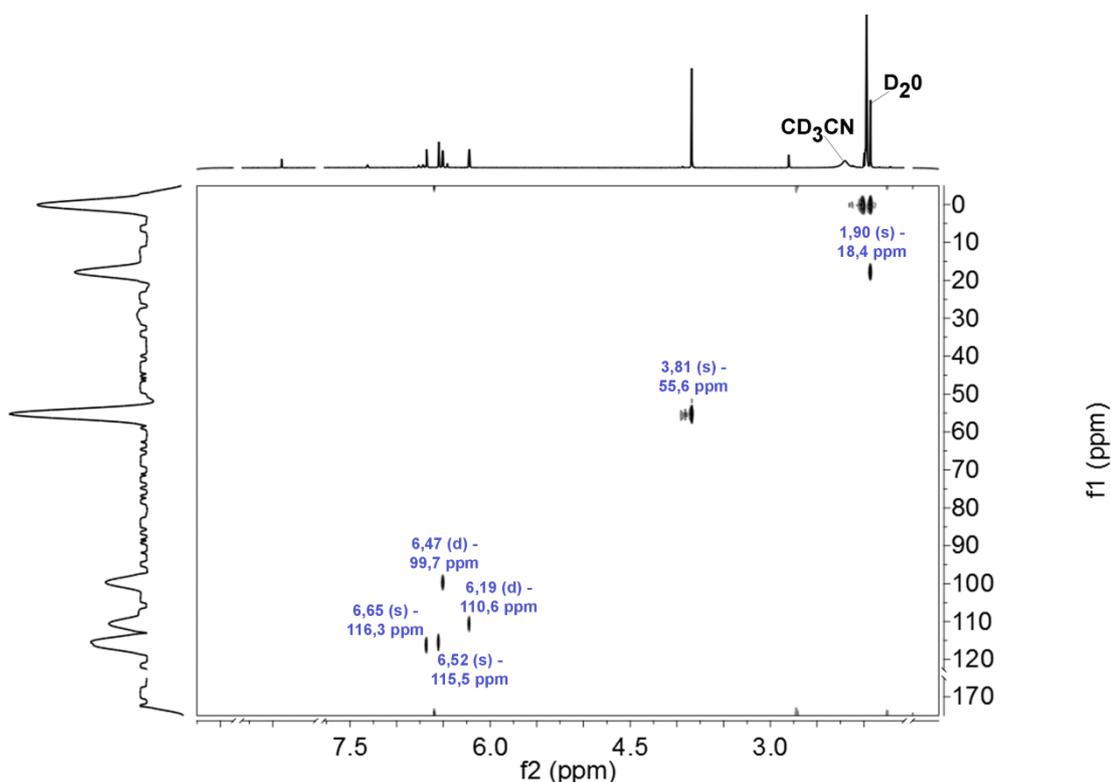


FIGURA 117. Espectro de gHSQC obtido para o (90) via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

Mais uma vez experimentos de EI-HRMS confirmaram a proposta estrutural aqui elaborada, uma vez que um íon molecular com m/z 290.079702 Da ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$) foi observado (ver TABELA 24).

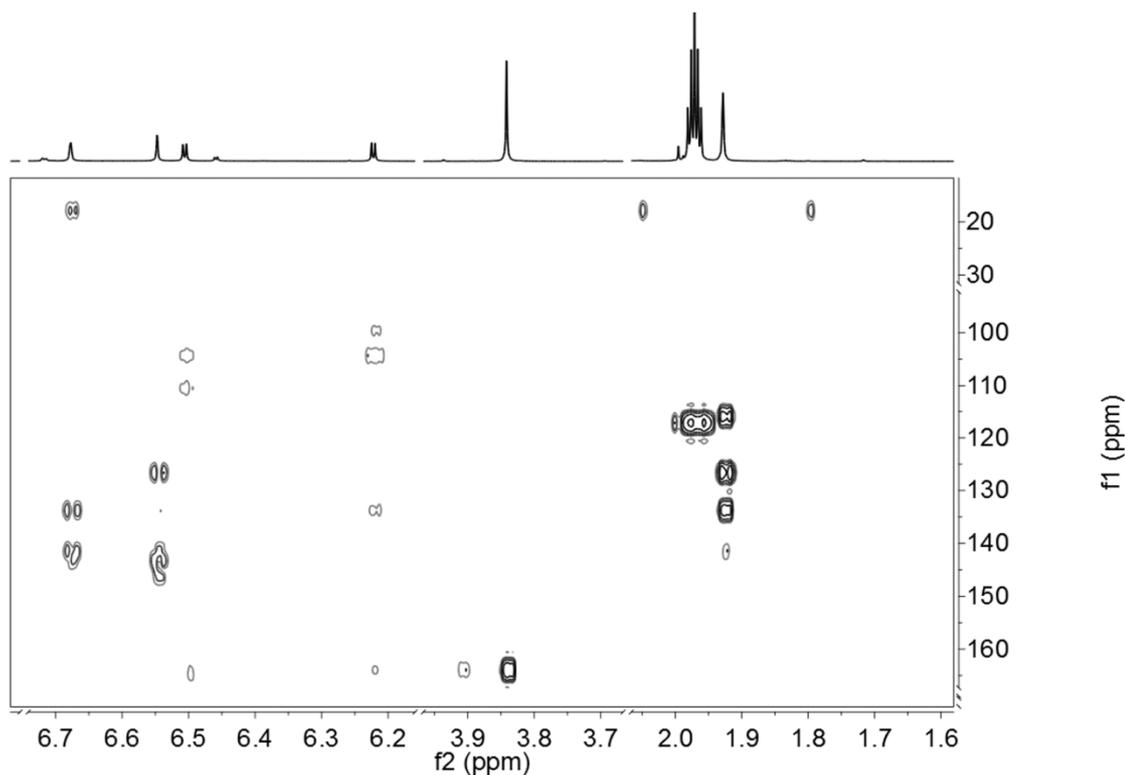
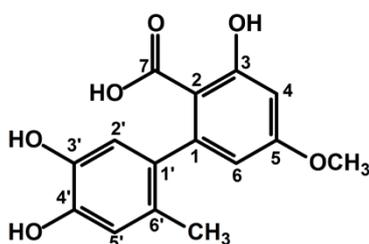


FIGURA 118. Espectro de gHMBC obtido para o (90) via experimentos de por HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).



MAC50_57 (3)
 $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$
 290.079038

FIGURA 119. Estrutura química do composto altenusin (90).

Embora a biossíntese desta substância não seja inteiramente conhecida, é possível propor a sua formação seguindo a rota dos alternarióis (FIGURA 108). A proposta apresentada na FIGURA 120 sugere a ocorrência de etapas de oxi-redução no intermediário para a formação do alternariol (76).

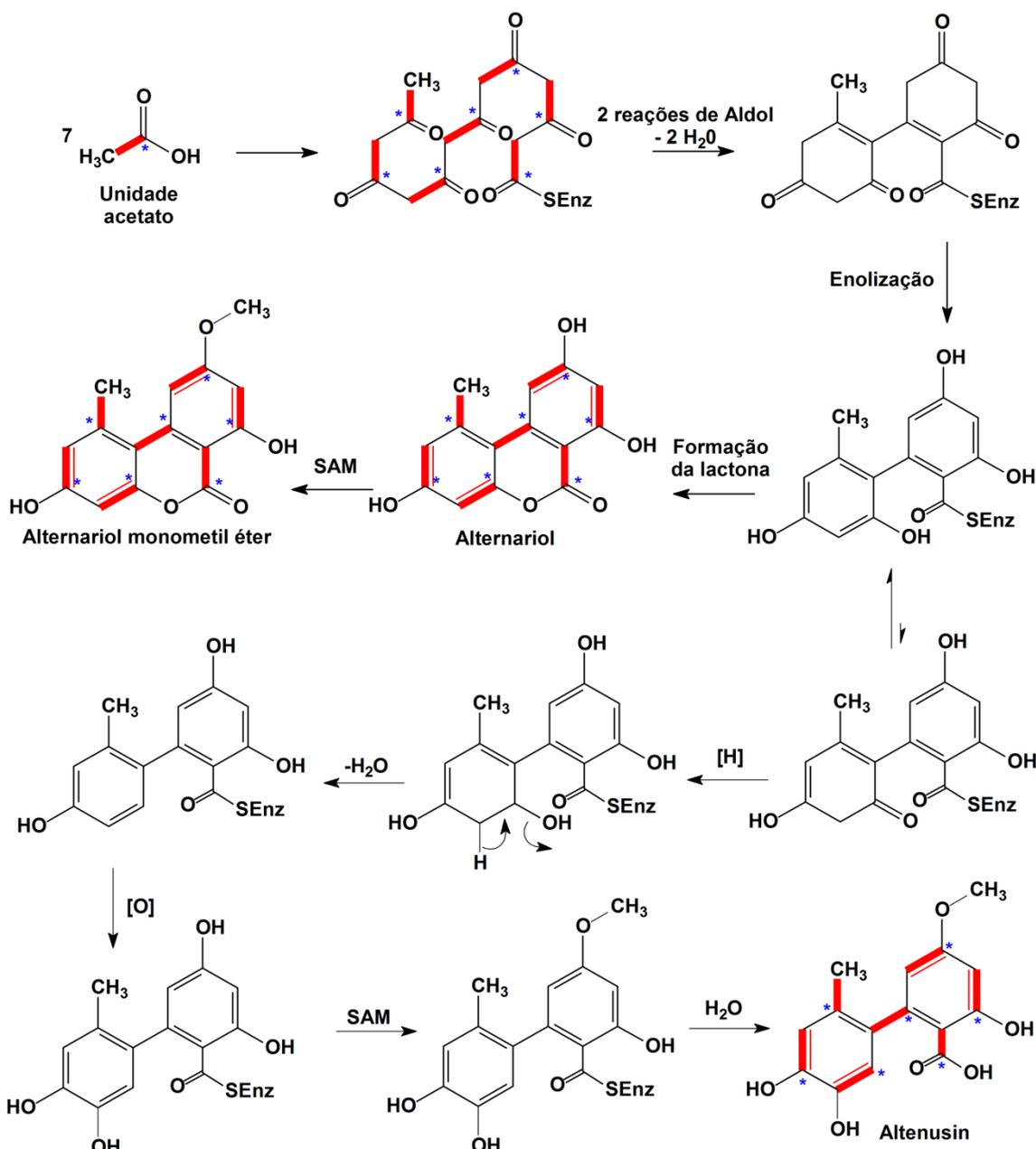


FIGURA 120. Proposta biossintética para a formação do altenusina. Adaptada de Dewick (2004)⁵⁰.

Esta proposta não foi checada experimentalmente, mas explica em partes o porquê das quantidades de alternariol (76) e alternariol monometil éter (77) serem muito maiores do que as de altenusina (90), por exemplo. Muito provavelmente a enzima responsável pela formação do anel lactônico e conseqüente formação do alternariol (76) deve ser peça-chave na regulação deste processo. Ou seja, por ela “facilitar” esta etapa, o processo biossintético deve estar direcionado para a produção de alternariol (76) e alternariol monometil

éter (**77**) e muito pouco do substrato para esta enzima estaria disponível para sofrer outro tipo de reação, levando a outros análogos.

Este composto, o altenusin, é reportado como sendo um metabólito menos tóxico do que os seus análogos alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**). Entretanto, Nakanishi et al. (1995)²²¹ verificaram que ele pode agir como um inibidor da enzima *miosyl light chain kinase*, responsável por ativar a contração dos músculos lisos. Em outro trabalho, Aly et al. (2008)²¹⁵ verificaram que esta substância possui um efeito citotóxico considerável contra células de linfoma de ratos, apresentando uma concentração de efeito a 50% (EC₅₀) de 23,4 nM. Estes dados indicam e reforçam que os alternariols podem atuar como agentes citotóxicos potentes.

Observando novamente os espectros de ¹H NMR apresentados na FIGURA 111, não é difícil notar que o composto **91**, aqui denotado MAC50_108, é aquele que exibiu o perfil mais diferente dentre as substâncias reportadas. Na região de hidrogênios aromáticos existem apenas dois dubletos em δ 6.48 e 6.53 ppm ambos acoplado entre si com $J^2 = 2.3$ Hz. Isso sugere novamente a presença de um anel aromático tetra-substituído, que remete ao esqueleto químico dos compostos **76**, **77** e **90**. A presença dos singletos intensos em δ 11.36 and 3.88 ppm, provavelmente referentes à presença de uma hidroxila quelada e de um grupo metoxil, respectivamente, reforçam a presença, ao menos em parte, de um esqueleto similar ao dos alternariols. Entretanto, o composto **91** também exibe quatro diferentes picos variando de δ 2.25 a 5.09 ppm. Estes sinais não foram observados em nenhum dos outros compostos, sugerindo mudanças significativas em parte do esqueleto químico. Um duplo dubleto largo (dbb) em δ 5.09 ppm é provavelmente relativo à um hidrogênio carbinólico. Este hidrogênio exibe correlações no gHMBC correlations com os carbonos em δ 158.1, 122.7, 37.8, e 27.1 ppm (FIGURA 121 e TABELA 25). Estas correlações sugerem que tal hidrogênio se encontra em uma porção não aromática da molécula. A presença de dois duplo duplo dubletos (ddd) em δ 2.92 e 2.25 ppm, exibindo um acoplamento geminal ($J^2 = 15.5$ Hz) e correlações no gHMBC com os carbonos em δ 158.1, 122.7, 61.1, 37.8, 27.1, and 21.1 ppm, reforçam esta observação. O

multiplete em δ 3.33 ppm, acopla com um dubleto integrando para 3 hidrogênios em δ 1.22 ppm, sugerindo a presença de um grupo metil ligado a um carbono alifático. Os fragmentos estruturais discutidos até aqui podem ser encontrados na FIGURA 122.

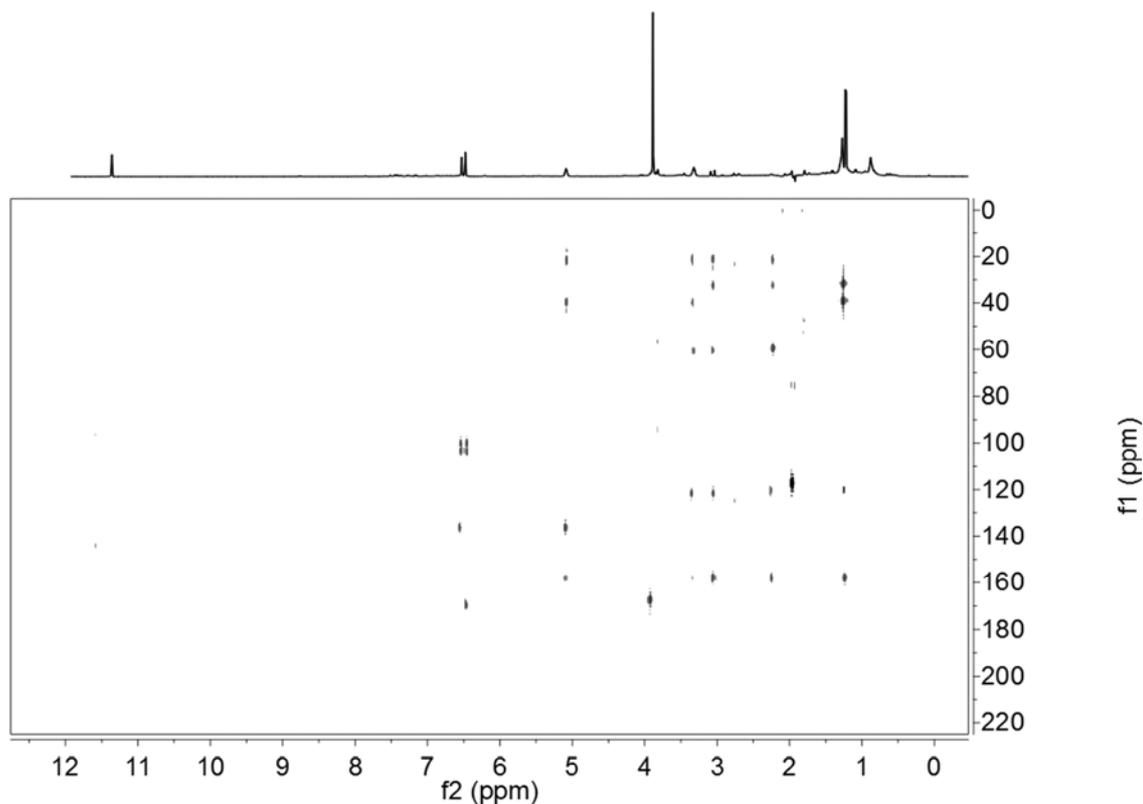


FIGURA 121. Espectro de *g*HMBC obtido para o composto **91** via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

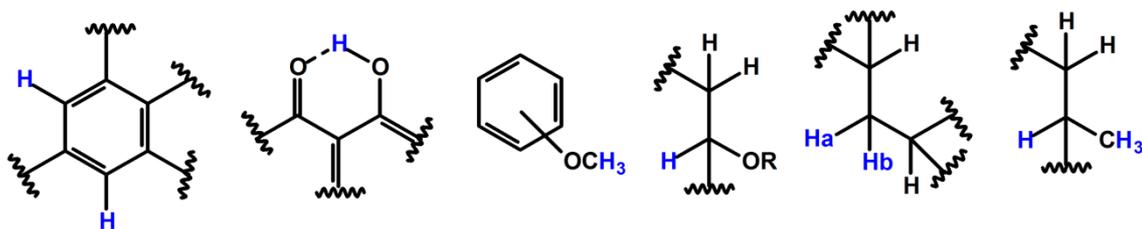


FIGURA 122. Fragmentos estruturais extraídos dos experimentos de NMR mencionados.

As correlações destes dois sinais respectivamente com os carbonos C -1', C-2', 3'-CH₃, C-4', C-5' e C-1', C-2', C-3', C-4', observados através dos experimentos de *g*HMBC, sugerem fortemente que o anel A dos alternariols agora constitui um anel não aromático de cinco membros tetra-substituído. A proposta

estrutural aqui apresentada, suportada pelos experimentos acima discutidos e pelos experimentos de EI-HRMS que forneceram um íon molecular em m/z 262.085163 ($C_{14}H_{14}O_5$) (TABELA 24), sugere um análogo do alternariol monometil éter (**77**), no qual o anel A foi contraído para um anel de 5 membros. Esta proposta pode ser encontrada na FIGURA 123.

De acordo com recente levantamento bibliográfico, este composto é aparentemente novo na literatura, embora o seu esqueleto químico já tenha sido isolado. A deoxitalaroflavona (**91a**), um composto similar com uma oxidação na posição 5', foi previamente isolado por Ayer et al. (1990)²²² a partir de culturas de *Talaromyces flavus*. O seu isômero, a 1-deoxirubralactona (**91b**), foi isolado a partir de outro fungo, *Penicillium rubrum*, por Kimura et al. (2007)²²³. Nenhum destes autores faz qualquer menção à possível ação biológica destes compostos. Naganuma et al. (2008)²²⁴, entretanto, reportam que a 1-deoxirubralactona (**91b**), isolada de um microrganismo marinho não identificado, pode atuar como um inibidor específico das famílias X e Y de DNA polimerases. Kurumata et al. (2007)²²⁵ também isolaram um composto análogo ao MAC50_108 (**91**), chamado de citrolactona (**91c**). Os autores reportam que esta substância inibe o crescimento de sementes de alface. As estruturas discutidas acima podem ser encontradas na FIGURA 123. A biossíntese da deoxitalaroflavona (**91a**) já é conhecida na literatura²²⁶. Assim, baseando-se nos processos biossintéticos já descritos para o alternariol (**76**) e para esta molécula, foi proposta uma possível rota para a substância MAC50_108 (**91**).

Isso foi de fundamental importância tanto para a confirmação da estrutura química deste composto, auxiliando durante todo o procedimento para a elucidação estrutural da mesma, quanto para uma compreensão, em nível superficial, do metabolismo do fungo. A proposta aqui apresentada envolve uma sequência de reações de oxidação, ciclização e redução (FIGURA 124) e sugere uma possível explicação para o fato de esta substância ser produzida em quantidades muito menores do que o alternariol (**76**) ou alternariol monometil éter (**77**), assim como o alternusin (**90**), já discutido acima. Provavelmente o processo biossintético está voltado para a formação do alternariol (**76**), através da formação do anel lactônico, desviando a rota para a produção de outros compostos.

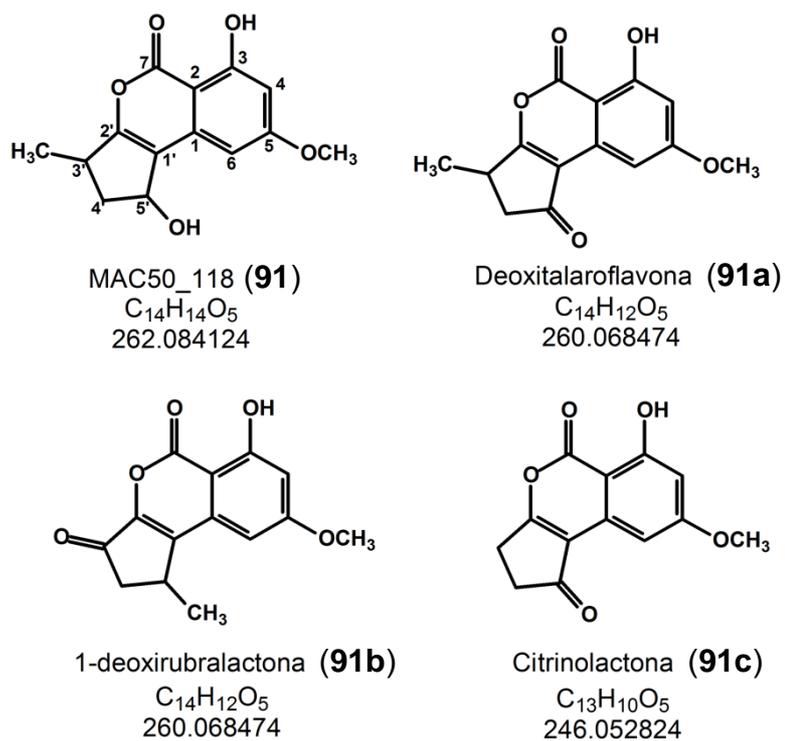


FIGURA 123. Proposta estrutural para o composto **91**, nomeado aqui MAC50_108. Também podem ser observados nesta figura os análogos já isolados de microrganismos (**91a** – **91c**).

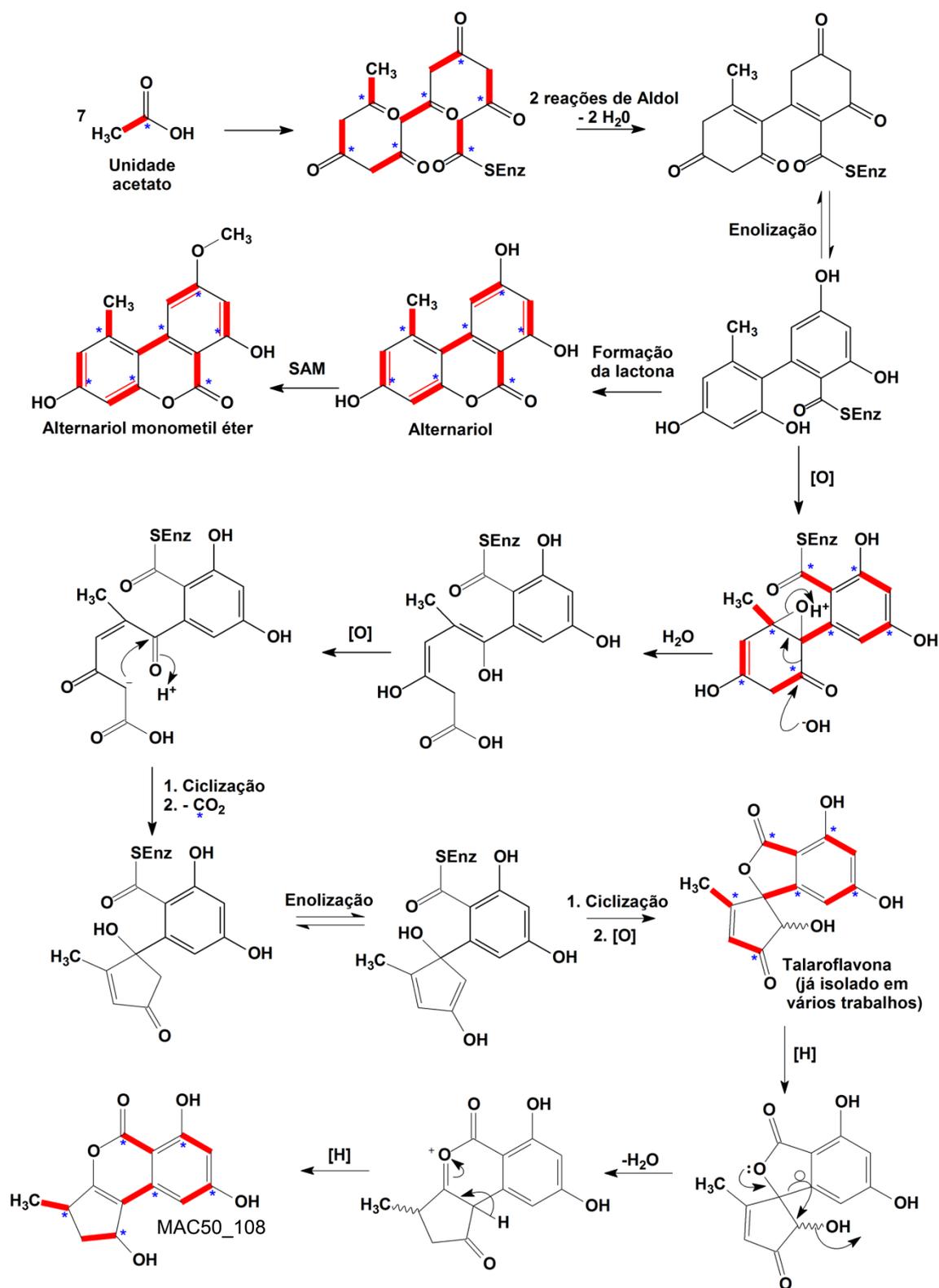


FIGURA 124. Proposta biossintética para a formação do composto MAC50_108 (91). Baseada em Dewick (2004)⁵⁰ e Ayer et al. (1990)²²⁷.

Ao contrário do composto MAC50_108 (91), que mostrou um perfil no espectro de ^1H NMR bastante distinto do alternariol (76) e do alternariol

monometil éter (**77**), os outros dois compostos trapeados – aqui nomeados MAC50_135 (**92**) e MAC50_153 (**93**) – exibiram semelhanças muito interessantes com os espectros do alternariol monometil éter (**77**) (FIGURA 111). A única diferença é com respeito a ausência dos dois dubletos em δ 6.78 e 6.72 ppm. Ao invés destes sinais, foi observado um singleto em δ 6.76 ppm para o composto (**92**) e em δ 6.82 ppm para o composto (**93**). Esta mudança sugere fortemente a presença de outro radical ligado ao anel A.

Os demais sinais são muito próximos e, comparando-se somente o composto **92** com o composto **93**, podemos notar que todos os demais sinais não apresentam mudanças significativas. Como os espectros de ^1H NMR de ambos os compostos foram registrados sob as mesmas condições, calibrados minuciosamente e estes dois compostos foram separados e trapeados na unidade de SPE com uma diferença de 2,20 minutos, a possibilidade que se trate de um único composto é muito remota.

As informações obtidas por EI-HRMS confirmam a modificação no perfil de substituição do anel A. Foram obtidos íons moleculares condizentes com a fórmula química ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$), ou seja, m/z 288.063813 para o composto **92** e m/z 288.062755 para o composto **93** (TABELA 24), confirmando a presença de um grupo hidroxil ligado ao anel A. Este grupo pode estar ligado somente na posição 3' ou na posição 5' neste anel. Assim, os compostos **92** e **93** provavelmente são isômeros de posição destas hidroxilas, restando apenas a confirmação de qual composto possui a hidroxilação na posição 3' e qual possui na 5'. As correlações observadas nos espectros bidimensionais de NMR também corroboram para as estruturas propostas. Os espectros de $g\text{HSQC}$ do composto **92** e $g\text{HMBC}$ dos compostos **92** e **93** podem ser encontrados nas FIGURA 125, FIGURA 126 e FIGURA 127, respectivamente. As correlações observadas estão resumidas na TABELA 26.

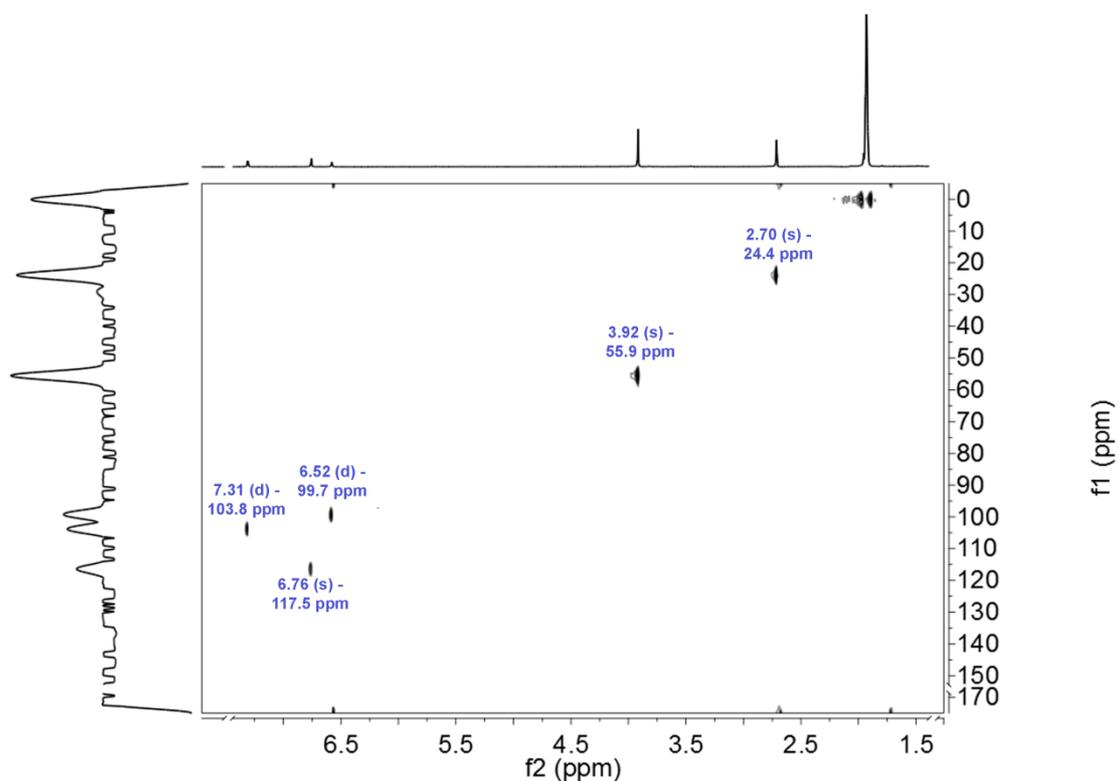


FIGURA 125. Espectro de gHSQC obtido para o composto **92** obtido via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

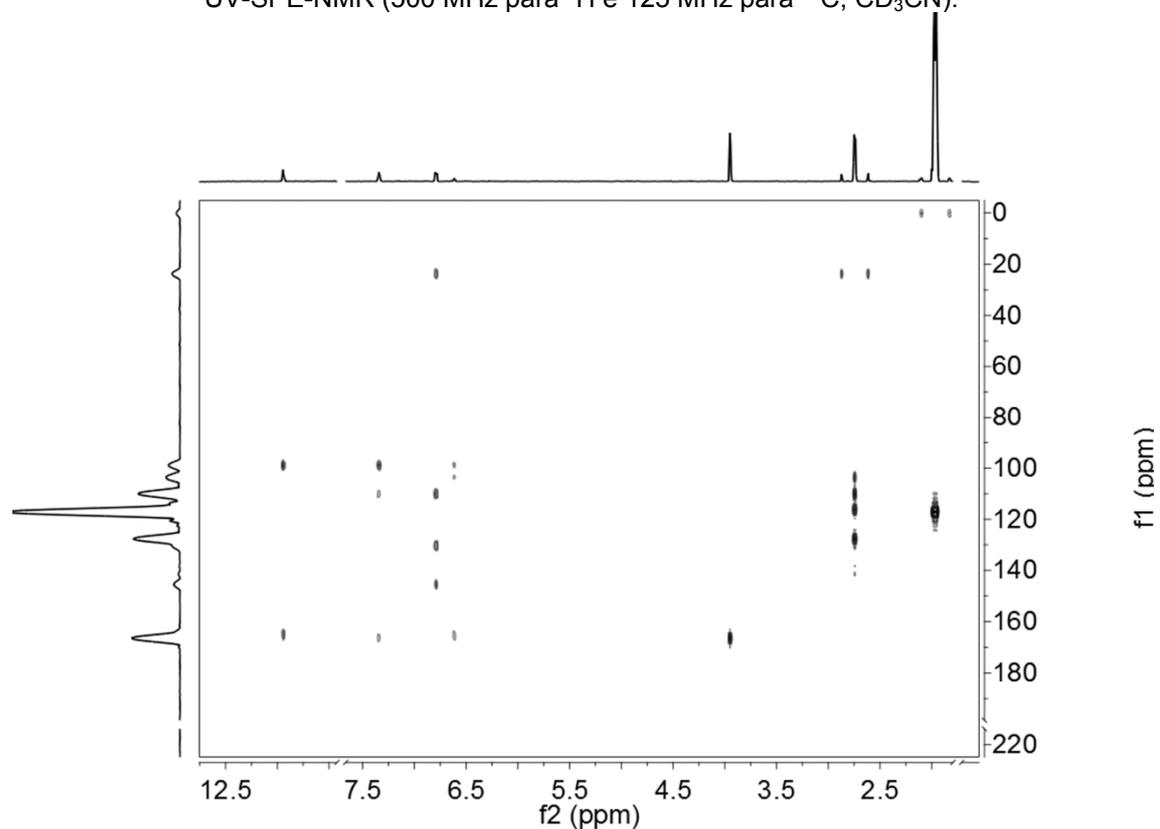


FIGURA 126. Espectro de gHMBC obtido para o composto **92** obtido via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

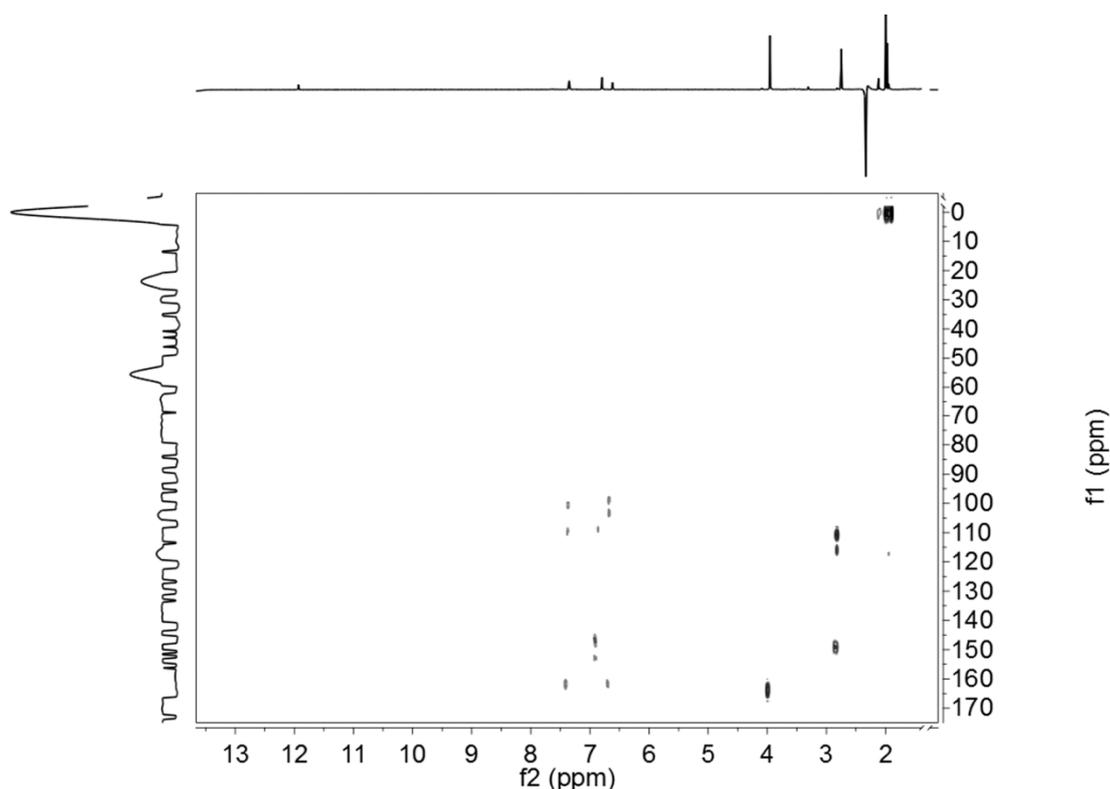


FIGURA 127. Espectro de gHMBC obtido para o composto **93** obtido via experimentos de HPLC-UV-SPE-NMR (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN).

A principal característica que define os compostos **92** e **93** é correlação entre o hidrogênio em δ 6.76 ppm no composto **92** (H-5') e o carbono em δ 24.4 ppm (6'- CH_3), referente ao grupo metil. Tal correlação não é observada para o hidrogênio correspondente no composto **93** (δ 6.88 ppm, H-3'). A ausência desta correlação é devido à grande distância existente H-3' e o carbono deste grupo metílico, impossibilitando o acoplamento. Esta é uma grande evidência de que o composto **92** possui o grupo hidroxil ligado ao anel A na posição 3' e, portanto, o grupo hidroxil deve estar na posição 5' no composto **93**. Esta pequena diferença se reflete no perfil dos espectros de ^1H NMR obtidos, idênticos, com exceção de uma diferença de apenas 0.1 ppm entre um composto e outro.

TABELA 26. Resumo dos valores obtidos nos experimentos de ^1H , ^{13}C NMR e gHMBC por HPLC-UV-SPE-NMR para os compostos **92** e **93** (500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C , CD_3CN). Valores de referência também estão apresentados para o composto **92**²¹⁵.

	MAC50_135 (92)				MAC50_153 (93)			
	Valores obtidos			Referência (DMF-d7)		Valores obtidos		
	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C} *	gHMBC	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C} *	gHMBC
1		138.4			139.5			
2		99.2			99.2		99.8	
3		165.5			165.4		163.9	
4	6.52, d (1.9)	99.7	2, 3, 6	6.63, d (1.8)	99.7	6.48, d (1.9)	100.4	2, 5, 6
5		166.6			167.3		163.9	
6	7.31, d (1.9)	103.8	2, 4, 5, 1'	7.30, d (1.8)	104.2	7.26, d (1.9)	103.2	2, 3, 4, 1'
7					165.8			
1'		110.4			110.1		110.2	
2'		141.7			142.3		145.3	
3'		130.7			132.4	6.88, s		1', 2', 4', 5'
4'		145.8			148.2		152.8	
5'	6.76, s	117.5	1', 2', 3', 4', 6', 6'-CH ₃	6.82, s	117.7		146.5	
6'		127.6			123.3		117.0	
3-OH	11.91, s					11.85, s		
5-OCH₃	3.92, s	55.9	5	3.99, s	56.3	3.87, s	164.8	5
6'-CH₃	2.70, s	24.4	1, 6, 1', 2', 5', 6'	2.74, s	24.9	2.71, s		1', 5', 6

A proposta estrutural para os compostos **92** e **93** foi, portanto, elaborada com base em todos os experimentos realizados e discutidos acima. As demais correlações existentes nos espectros bidimensionais são muito parecidas com as do alternariol monometil éter (**77**) e também confirmam a proposta apresentada na FIGURA 128.

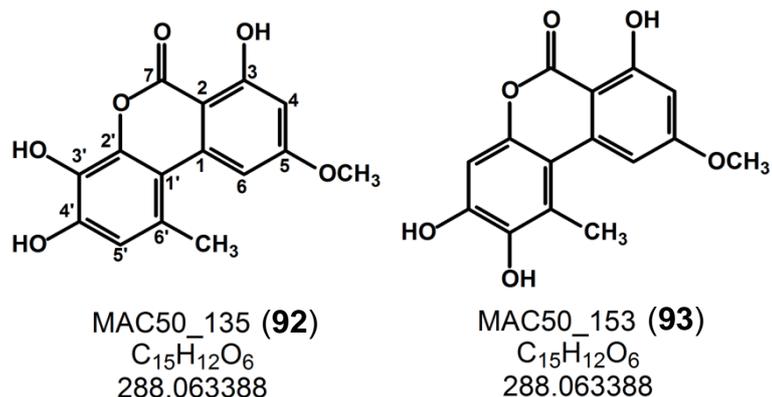


FIGURA 128. Proposta estrutural para os MAC50_135 (**92**) e MAC50_153 (**93**).

O composto **92** não é inédito, embora existam apenas duas referências a este composto segundo busca bibliográfica realizada na base de dados *Chemical Abstracts*. Ele já foi isolado de culturas de *Alternaria* sp.²¹⁵. Entretanto, a detecção e identificação do composto **93** em extratos de *Alternaria* está aparentemente sendo descrita aqui pela primeira vez. Ambos os compostos **92** e **93** foram previamente reportados como metabólitos do alternariol monometil éter (**77**) obtidos *in vitro* a partir de incubação com microsomas²²⁶. Entretanto, o composto **93** somente foi detectado por técnicas cromatográficas neste estudo e portanto este é o primeiro trabalho que reporta dados de NMR para o mesmo.

No presente momento, um *paper* intitulado “*Detection and Identification of Alternaria alternata Mycotoxins by HPLC-SPE-NMR and their Cytotoxic Effects to Soybean Cell Cultures*” está em fase final de correção e será submetido a apreciação do comitê científico do *Journal of Natural Products*.

A utilização da técnica hifenada de HPLC-UV-SPE-NMR proporcionou uma altíssima eficiência na separação, detecção e identificação de metabólitos fúngicos em extratos complexos. A economia de tempo também foi relativamente grande, uma vez que não são necessárias etapas complexas de tratamento de amostra antes da utilização do sistema. O único inconveniente desta técnica para aplicação em produtos naturais é a limitação para a obtenção de espectros de ^{13}C NMR por detecção direta. O espectro apresentado na FIGURA 115 somente foi conseguido pois a concentração de alternariol monometil éter (**77**) trapeada no sistema de SPE foi muito alta (em torno de 800 μ g). Isso ocorre pois

a sonda capilar, fundamental para o acoplamento com o HPLC, fica localizada a uma distância muito grande da sonda de detecção para este tipo de experimento. Entretanto, na grande maioria dos casos todos os sinais de carbono podem ser obtidos através de experimentos 2D por detecção inversa, como *g*HSQC e *g*HMBC, tornando este problema plenamente contornável. Todos os demais experimentos foram realizados com aproximadamente 100 µg de amostra evidenciando a alta sensibilidade desta técnica se compara com NMR tradicional (a massa de cada amostra foi estimada por curva de calibração por HPLC-UV, usando-se o alternariol (**76**) como referência – dados não mostrados aqui).

Como muitos acoplamentos físicos e eletrônicos estão envolvidos e como esta ferramenta constitui uma tecnologia até certo ponto nova, inúmeras são as variáveis que o analista deve controlar para a obtenção de um dado satisfatório. Neste sentido, o treinamento na operação de tal sistema permitiu um aprendizado único para o analista, embora ele tenha apenas os princípios básicos de operação.

Parte 2: Aspectos Químico- Ecológicos

4. PARTE 2: ASPECTOS QUÍMICO-ECOLÓGICOS

4.1. Objetivos

Os principais objetivos desta parte do estudo realizado foram:

- Realizar testes biológicos com as toxinas isoladas. Os testes foram desenvolvidos principalmente usando como modelo basicamente plantas e insetos;
- Utilizar tais testes na tentativa de se estabelecer um possível papel ecológico para algumas destas toxinas, especialmente no que diz respeito às relações fungo-planta e fungo-planta-inseto;
- Realizar a reinoculação dos fungos estudados em plantas modelo.

4.2. Parte experimental

4.2.1. Materiais utilizados

Os principais materiais, equipamentos e softwares utilizados foram:

- Meio de cultura *MS* para cultivo de plântulas, Sigma;
- Incubadora Certomat BS-1, Braum Biotech Internacional, Alemanha;
- Fotômetro Biophotometer Eppendorf, Alemanha;
- Sementes de interesse;
- Meio de cultura *BDL*, Sigma;
- Placas de Elisa de 24 poços, Eppendorf, Alemanha;
- Balança analítica de alta precisão, Eppendorp, Alemanha;
- Água purificada em aparelho MilliQ;

- Solventes diversos;
- Pipetas automáticas, Eppendorf, Alemanha;
- Liofilizador
- Câmara de cultivo Linde chamber, Erfurt, Alemanha;
- Autoclave automática, Systec, Alemanha;
- Solução esterelizante *damklorix*, Colgate-Palmolive, Alemanha;
- Fracos de plástico, Eppendorf, Alemanha)
- Microscópio com câmera digital Carl Zeiss, Alemanha;
- Placas de Petri descartáveis, Sigma, Alemanha;
- Câmara de Neubauer, Optek Labor, Friedrichshofen, Alemanha;
- SigmaPlot 2001 v.7, SPSS Inc., EUA.

4.2.2. Procedimentos experimentais

4.2.2.1. Método empregado no teste de atividade das toxinas contra *E. coli*

Culturas da bactéria *E. coli* conservadas a -70°C foram reativadas em 5 mL de meio LB (Sigma, Alemanha) durante 12 horas a 37°C . Após isso, 2 mL destas culturas foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB juntamente com as toxinas desejadas em concentração apropriada. Estes frascos foram então deixados sob agitação (100 rpm) em incubador a 37°C . A cada 30 min, uma alíquota era cuidadosamente retirada do meio para medidas de densidade óptica em 600 nm (OD_{600}). Esse processo foi repetido por 12 horas contínuas de experimento. Quando o valor de OD_{600} aproximava-se de 1, a amostra era diluída em uma proporção de 1:10 com meio de cultura. Todas as medidas foram obtidas em triplicata e para cada toxina testada, controles (meio + *E. coli*) também foram utilizados em triplicata.

4.2.2.2. Método empregado nos testes de atividade contra *S. littoralis*

Larvas da lagarta *S. littoralis* foram crescidas de acordo com Maffei et al²¹ sob temperatura entre 21-26°C, umidade relativa entre 55-65% e fotoperíodo regulado para uma proporção de 16:8 luz:escuro. A dieta especial a qual estas lagartas foram submetidas era composta de 300 g/L de agar, 400 g/L de farinha de feijão, 3 g de ascorbato de sódio, 3 g *p*-hidroxibenzoato de etila e 1 g de formaldeído. Quando tais lagartas atingiram idade entre 10 e 12 dias, elas foram colocadas em contato com 6g desta mesma dieta contendo diferentes concentrações das toxinas de interesse. Controles (dieta com adição de solvente – etanol) e brancos (somente dieta) foram utilizados para cada experimento. Na seqüência, a massa destas lagartas foi monitorada dia-a-dia por um período de 10 dias. Após este primeiro experimento, foi realizado um segundo teste, nas mesmas condições, mas agora monitorando-se somente as massas iniciais das lagartas e as massas obtidas após 3 dias de tratamento com a dieta especial contendo as toxinas. Todos estes testes foram realizados usando-se amostras em triplicata. Para o cálculo do valor de EC₅₀, foi usado o programa estatístico Sigma Plot e a curva analítica *Four Parameter Logistic Model (4PL)* – Modelo Logístico contendo Quatro Parâmetros.

4.2.2.3. Método empregado nos testes de toxicidade para culturas de células de soja.

Culturas de células de soja foram crescidas em meio B5 (Sigma, Alemanha) por 5 dias sob agitação (100 rpm) e no escuro. Após este período, 1 mL destas culturas foram transferidas para placas de ELISA contendo 24 poços. Em cada poço, foi adicionado uma quantidade específica das toxinas de interesse, de modo que o volume total de cada poço fosse sempre o mesmo. Na seqüência, estas placas foram deixadas no escuro, em constante agitação (100 rpm) por 48 horas. As soluções foram então quantitativamente transferidas para

frascos de plástico previamente pesados. Estes frascos foram liofilizados por 24 horas e então a massa destes foi novamente registrada. Este experimento foi repetido por 3 vezes, sempre utilizando-se quintuplicatas de cada ponto analisado. Controles (células mais solvente – etanol) também foram utilizados para cada toxina. Os cálculos estatísticos foram realizados conforme descrito no item anterior.

4.2.2.4. Testes feitos no Brasil para a germinação de sementes

As sementes utilizadas nos testes iniciais de crescimento de plântulas foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Fernanda Rozanski, da EMBRAPA Trigo do Rio Grande do Sul, e também pelo Eng^o Nicola Vincenzo Di Salvo, responsável pela empresa DI SOLO Sementes Agrícolas, com plantações entre as cidades de Catalão e Cristalina (GO) e com sede em São Carlos (SP). Outras sementes foram obtidas no comércio local, também em São Carlos (SP). A TABELA 27, apresenta de maneira detalhada as sementes utilizadas nos testes iniciais.

Para a obtenção das plântulas *in vivo*, inicialmente realizou-se a assepsia das sementes imergindo-as em solução de álcool etílico 70% por 5 min; em seguida, estas mesmas sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 20 min e, na seqüência, duas lavagens em água destilada previamente esterilizada (2 x 15 min, 121°C, 1 atm e 40 min sob luz UV). As sementes então foram pré-germinadas por 4 dias em placas de Petri contendo 13 discos de papel de filtro e 20 mL de água destilada esterilizada, a 20°C e próximas à janela do laboratório (fotoperíodo natural). Em seguida, as sementes foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo meio MS²²⁸ modificado (sem edamina, ácido indolacético, cinetina e sucrose), previamente esterilizado (2 x 15 min, 1atm, 121°C). Este experimento foi realizado em triplicata e 3 outros frascos contendo somente o meio de cultura foram reservados para controle (branco). O tempo de cultivo foi variado de acordo com as características de cada semente. A composição deste meio encontra-se detalhada na TABELA 28;

TABELA 27. Sementes utilizadas em experimentos iniciais realizados no Brasil.

Nome popular	Nome científico	Origem
Alface	<i>Lactuca sativa</i>	Agristar do Brasil – RJ
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	Fazenda Di Solo – GO
Capim Barba-de-Bode	<i>Aristida pallens</i>	Campo de Futebol / UFSCar – SP
Cevada (BRS Bor.)	<i>Hordeum vulgare</i>	Embrapa Trigo – RG
Cevada (BRS Mar.)	<i>Hordeum vulgare</i>	Embrapa Trigo – RG
Feijão	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fazenda Di Solo – GO
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	São Carlos – SP
Milho (BR)	<i>Zea mays</i>	Fazenda Di Solo – GO
Milho (RG)	<i>Zea mays</i>	Fazenda Di Solo – GO
Soja	<i>Glycine max</i>	Fazenda Di Solo – GO
Sorgo	<i>Sorghum bicolor</i>	Fazenda Di Solo – GO
Trigo (BRS 194)	<i>Triticum vulgare</i>	Embrapa Trigo – RG
Trigo (BRS Angico)	<i>Triticum vulgare</i>	Embrapa Trigo – RG
Trigo (BRS Louro)	<i>Triticum vulgare</i>	Embrapa Trigo – RG

TABELA 28. Composição do meio de cultura MS²²⁸.

Composto	Quantidade	Marca
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6,20 mg	Sigma, USA, PCCT
Ácido Nicotínico (C ₆ H ₅ NO ₂)	0,50 mg	Sigma, USA, PCCT
Agar ((C ₁₂ H ₁₈ O ₉) _n)	10,00 g	Sigma, USA,
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	440,00 mg	Sigma, USA, PA
Cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ .6H ₂ O)	25,00 µg	Mallinckodt, Japão, PA
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	170,00 mg	Sigma, USA, PCCT
Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	2,00 mg	Sigma, USA, CCT
Iodeto de potássio (KI)	830,00 µg	Merck, Brasil, PA
Molibdato de sódio dihidratado (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	250,00 µg	Sigma, USA, PCCT
Myo-Inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	100,00 mg	Sigma, USA, PCCT
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	1,65 g	Ultra, Brasil, PA
Nitrato de potássio (KNO ₃)	1,90 g	Ultra, Brasil, PA
Piridoxina (C ₈ H ₁₁ NO ₃)	500,00 µg	Sigma, USA, PCCT
Sal de sódio de EDTA dihidratado (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	37,30 mg	Sigma, USA, CCT
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O)	25,00 µg	Cinética Química, Brasil, PA
Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	27,80 mg	Reagan, Brasil, PA
Sulfato de magnésio pentahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	370,00 mg	Mallinckodt, Japão, PA
Sulfato de manganês monohidratado (MnSO ₄ .1H ₂ O)	22,30 mg	Mallinckrodt, Japão, PA
Sulfato de zinco pentahidratado (ZnSO ₄ .5H ₂ O)	8,60 mg	Mallinckodt, Japão, PA
Tiamina (C ₅ H ₆ N ₂ O ₂)	100,00 µg	Sigma, USA, PCCT
Água destilada	1,00 L	

PA: Grau analítico; PCCT: *Plant Cell Culture Tested*; CCT: *Culture Cell Tested*.

4.2.2.5. Método empregado nos testes de fitotoxicidade contra *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (variedade colombiana) (50mg) foram esterilizadas com 10 mL de uma solução água : *damklorix* em proporção de 3:1 por 6 min. Na seqüência, elas foram lavadas com 10 mL de solução de

etanol 90% e depois com mais 4 vezes 10 mL de água esterelizada. Por fim, as sementes foram suspensas em 10 mL também de água esterelizada.

Estas sementes foram então transferidas para placas de Petri ($\phi = 10$ cm) contendo meio *MS* (Sigma, Alemanha) com ajuda de pipeta automática de 1 μ L (Gilson, Alemanha). Foram transferidas aproximadamente 50 sementes por placa, num total de 25 placas. Após 1 semana, as plântulas foram transferidas novamente, agora para placas de Petri ($\phi = 5$ cm) contendo meio *MS* com adição das toxinas em diferentes concentrações. Após 1 semana, as plantas foram devidamente fotografadas. Este experimento foi realizado em quadruplicata e repetido 2 vezes. Nenhum tratamento estatístico foi feito com os dados obtidos.

4.2.2.6. Reinoculação dos fungos em *Arabidopsis thaliana*

O método inicialmente testado envolveu a germinação de sementes de *Arabidopsis*, previamente esterilizadas conforme mencionado no item anterior, e posterior inoculação em meio *MS* juntamente com os fungos de interesse. Este teste foi realizado em quintuplicata. Na seqüência, o novo teste envolveu a inoculação de uma solução de esporos (6×10^7 esporos por mL) nas folhas de *Arabidopsis* cultivada em meio *MS*. A solução de esporos foi preparada colocando-se 10 mL de água destilada esterilizadas em placas de Petri contendo a cultura fúngica com 7 dias. Esta solução foi então transferida para uma câmara de Neubauer para a contagem dos esporos. Na seqüência, as soluções de esporos foram normalizadas com respeito às suas concentrações. Cerca de 100 μ L das soluções de esporos foram inoculadas nas folhas de *Arabidopsis* com 5 dias de vida com o auxílio de uma microseringa descartável. Este experimento foi feito em quintuplicata.

O último experimento envolveu a inoculação desta mesma solução de esporos em *Arabidopsis* cultivada em solo (em vasos plásticos). Para isso, estas plântulas, previamente cultivadas em meio *MS*, foram transferidas com 5 dias para os vasos com terra esterilizada. Estas plântulas foram então

transferidas para uma câmara *Linde* com as seguintes condições: temperatura de 20,4°C; 60% de umidade; foto período de **14** horas de luz / 10 horas de ausência de luz; intensidade luminosa em potência 3; exaustão de 50 litros de ar por hora.

Após 5 semanas, as folhas de *Arabidopsis* foram inoculadas com 3 x 100µL com as soluções de esporos. Na seqüência, as plantas foram observadas diariamente. Este experimento foi realizado utilizando-se 10 plantas para cada fungo inoculado, com mais 10 plantas controle (branco).

4.3. Resultados e Discussões

Como já mencionado anteriormente, as amostras trapeadas no sistema de HPLC-UV-SPE-NMR foram coletadas após o registro dos experimentos e submetidas a análises por EI-HRMS *off line*. Em cada processo de trapeamento, após 5 injeções de 30 µL dos extratos de *Alternaria* em concentração de 10 mg/mL, algo em torno de 200 µg dos compostos minoritários eram coletados. Como os espectros obtidos foram registrados por 3 vezes, incluindo as otimizações, foi obtida uma quantidade suficiente dos compostos altenusin (**90**), MAC50_108 (**91**) e MAC50_135 (**92**) necessária para a elaboração de testes biológicos voltados para a obtenção de informações com respeito ao papel destas substâncias na relação planta-fungo. Entretanto, não foi possível a aquisição de uma quantidade mínima do composto MAC50_153 (**93**) e portanto ele não foi ensaiado.

Uma quantidade menor do que 5 mg é usualmente insuficiente para a realização da maioria dos testes biológicos empregados em produtos naturais. Entretanto, nossos testes foram desenvolvidos em colaboração com o Dr. Axel Mithöfer do *Max Planck Institut für chemische Ökologie* baseando-se na alta toxicidade dos metabólitos geralmente isolados de microrganismos, necessitando, assim, de baixas quantidades de amostras. Desta maneira, as toxinas isoladas de *Fusarium* e *Alternaria* neste projeto, inclusive os análogos obtidos após as

análises por HPLC-UV-SPE-NMR, puderam ser utilizados para verificar suas respectivas atividades biológicas de interesse neste trabalho.

É sabido que a exposição às toxinas fúngicas tem sido associada com diversos problemas de saúde em animais e humanos. A natureza dos diferentes efeitos tóxicos depende da estrutura química do composto em questão e obviamente da concentração e do tempo de exposição, da espécie animal e também do estado de saúde inicial do indivíduo^{229, 230}. Embora existam inúmeros estudos relatando tais efeitos em humanos e animais^{32, 70, 231, 232}, pouco ainda é sabido com respeito aos efeitos de tais substâncias para plantas e outros organismos (ver FIGURA 129 e TABELA 29).

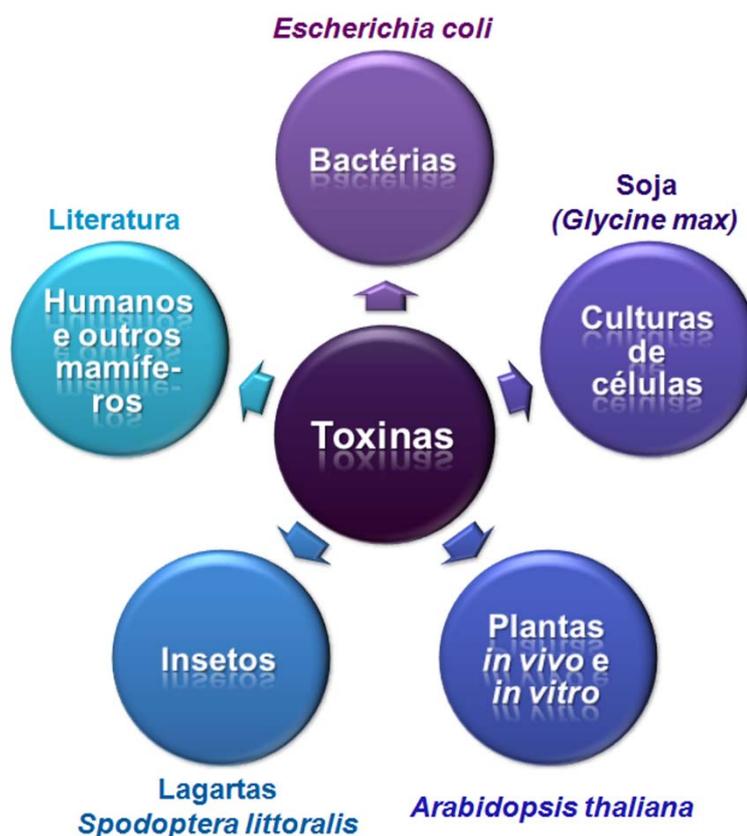


FIGURA 129. Alvos desejados para o estudo do espectro de ação das toxinas de interesse neste projeto.

Os efeitos biológicos das substâncias obtidas após análises por HPLC-UV-SPE-NMR foram mencionados ao longo da discussão da sessão 3.3.6. e, portanto, não estão discriminados nesta TABELA.

Desta maneira, dentro dos interesses específicos deste projeto, procuramos contribuir para uma melhor compreensão do espectro de ação de tais substâncias. Para isso, foram desenvolvidas metodologias de análise envolvendo testes com as substâncias de interesse em bactérias (*Escherichia coli*), em insetos (*Spodoptera littoralis*), em culturas de células vegetais (soja) e plantas *in vitro* (*Arabidopsis thaliana*). Os resultados de tais testes serão discutidos na seqüência. Em todos estes testes, o composto químico ácido fusárico (**94**) (sigma, Alemanha), um metabólito produzido por várias espécies de *Fusarium*, também foi incluído.

TABELA 29. Sumário dos principais efeitos causados toxinas produzidas por *Fusarium* e por *Alternaria* e de interesse neste projeto.

	Animais e humanos	Plantas	Outros
Zearalenona (14) e β-Zearalenol (17)	Atividade estrogênica ^{23, 47, 48} , efeito hepato, hemato, imuno e genotóxico ²³³ , entre outros. Afetam o sistema surogenital ⁴⁷ .	Inibem a germinação de algumas plantas ²³⁴ e promovem crescimento em milho ²³⁵ . Inibem a enzima PAL ²³⁶ .	Inibem o crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²³⁷ .
4-Metoxizearalenona (20)*	Atividade estrogênica ^{48, 173} .	—	—
Nivalenol (41) e Deoxinivalenol (42)	Imunossupressores ²³⁸ , inibidores de síntese proteica ²³⁹ , causam hemorragias, irritação de pele, vômitos, diarreias e rejeição a comida ^{51, 239} .	Inibem germinação de alfafa e outros ²⁴⁰ . Causam necrose em tomates ²⁰⁷ e afetam o crescimento de <i>Arabidopsis</i> ²⁴¹⁻²⁴³ .	Inibem o crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ²³⁷ .
Ácido Fusárico (94)*	Ataca os sistemas imunológico, cardiovascular e nervoso ²⁴⁴ .	Tóxico em altíssimas concentrações (>5M). Induz resposta fisiológica em células de <i>Arabidopsis</i> ²²⁰ . Inibe a PAL ²³⁶ .	Atua como antimicrobiano para <i>Ruminococcus albus</i> e <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> ²⁴⁵ .
Alternariol (76) e Alternariol monometil éter (77)	Efeitos mutagênicos em elevadas concentrações ^{246, 247} .	Produz clorose quando injetados em folhas de tabaco e são produzidos no flavedo de tangerinas durante sintomas da Mancha Marron de Alternária ^{218, 248-250} .	Inibem o crescimento de <i>Bacillus</i> ²¹⁸ e <i>Artemia salina</i> ²⁵¹ .

* Substâncias não isoladas neste projeto.

4.3.1. Testes com a bactéria *Escherichia coli*

Um dos primeiros testes realizados teve o intuito de avaliar a ação bactericida das toxinas utilizadas neste projeto. Porém, o teste foi desenvolvido de tal maneira que pudesse ser obtido um perfil de ação destas toxinas no metabolismo de *E. coli* e não somente se as substâncias eram ativas ou não. Para isso, o protocolo descrito no item 4.2.2.1. foi empregado. Neste, alíquotas do meio de cultura contendo ou não as toxinas foram retiradas a cada 30 minutos por um período de 10 horas (600 minutos) ou então até que não houvesse um incremento significativo no valor da densidade óptica medida com comprimento de onda em 600 nm (OD_{600}). Estes valores de densidade óptica são diretamente proporcionais ao número de células presentes no meio, fornecendo, assim, um excelente parâmetro para o crescimento bacteriano.

Tal experimento foi conduzido com duas diferentes concentrações para cada toxina, acrescidas de um controle (somente bactéria, meio de cultura e solvente), pois foi estabelecido que qualquer atividade eventualmente apresentada com uma concentração acima da máxima utilizada neste experimento não seria interessante do ponto de vista ecológico, pois isso implicaria que o referido fungo deveria produzir tais substâncias em quantidades apreciáveis nos seus ambientes naturais. Analisando os gráficos apresentados na FIGURA 130 pode-se claramente observar que, nas concentrações testadas, a maioria das toxinas não apresenta atividade significativa contra *E. coli*. Isso é evidenciado pelo idêntico perfil das curvas controle (em preto) e das curvas obtidas para as duas diferentes concentrações utilizadas (em verde e em vermelho) nos testes efetuados com as toxinas de interesse neste projeto.

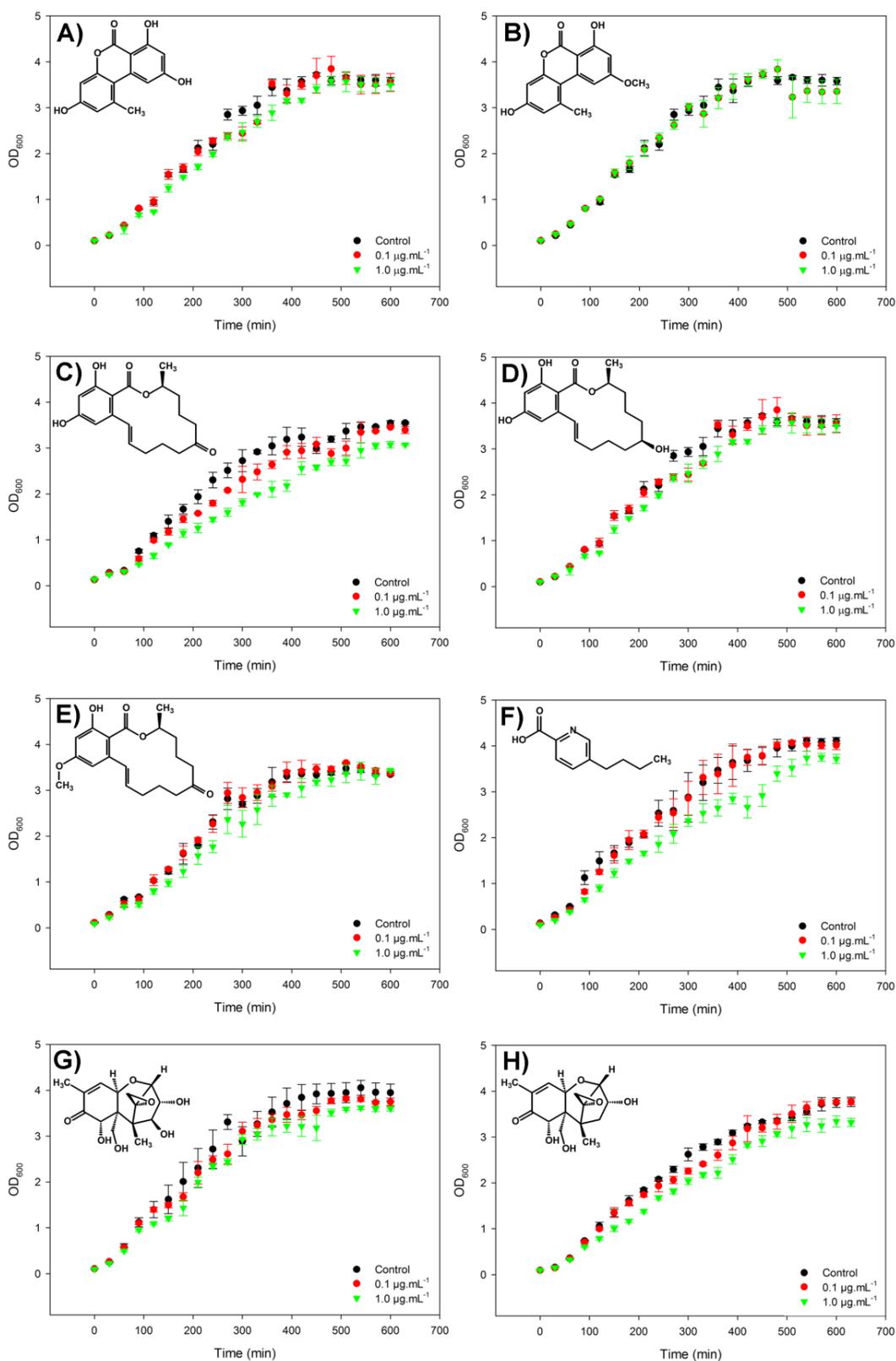


FIGURA 130. Curvas do crescimento de *E. coli* em meio contendo diferentes concentrações das toxinas: A) Alternariol (76) ; B) Alternariol monometil éter (77); C) Zearalenona (14); D) 4-metoxizearalenone (20); E) β-Zearalenol (17); F) Ácido fusárico (94); G) Nivalenol (41) e H) Deoxinivalenol (42).

Surpreendentemente, nenhum dos tricotecenos testados apresentou ao menos um indício de toxicidade (FIGURA 130 G e H) nestas concentrações, já que estas substâncias apresentam um amplo espectro de ação tóxica (TABELA 29), inclusive em níveis parecidos com os utilizados neste teste. Como os resultados obtidos também indicaram que os alternarios não apresentam toxicidade à *E. coli* nas concentrações testadas. Os compostos altenusin (**90**), MAC50_108 (**91**) e MAC50_135 (**92**) não foram testados devido à alta massa de substância exigida para tal experimento.

Um pequeno efeito pode ser observado para a concentração mais alta utilizada (1,0 µg/mL) no caso da zearalenona (**14**) e do ácido fusárico (FIGURA 130 C e E, respectivamente). Porém, testes com concentrações mais elevadas não eram o objetivo deste experimento, pois caso estas toxinas fossem ativas a uma concentração maior do que as testadas, pouco significativo seria o resultado com respeito a uma possível correlação com o papel ecológico destas substâncias.

4.3.2. Testes com lagartas *Spodoptera littoralis*

Visando verificar e compreender a toxicidade das substâncias de interesse neste projeto, também foram desenvolvidos métodos que pudessem ser utilizadas para testes contra insetos. Desta maneira, a lagarta *Spodoptera littoralis* foi escolhida como alvo, pois além da grande disponibilidade deste inseto no *Max Planck Institut*, ele é considerado uma importante praga para diversas culturas, como milho por exemplo²³. Assim, seria possível o estabelecimento de alguma relação entre a produção de micotoxinas *in situ* em plantações de cereais e o efeito destas substâncias na mortalidade desta praga.

Porém, para o sucesso na obtenção dos resultados, é de extrema importância que a metodologia analítica utilizada seja a mais confiável possível. Para tanto, neste trabalho, decidiu-se submeter insetos entre 10 e 12 dias de vida à uma dieta especial contendo as toxinas em diferentes concentrações, como

descrito no ítem 4.2.2.2. Os resultados do primeiro experimento submetendo estes insetos a uma dieta com diferentes concentrações de zearalenona (14) estão apresentados na FIGURA 131. Gráficos similares foram obtidos para as demais micotoxinas. Como pode ser observado, nenhuma conclusão com respeito aos efeitos tóxicos desta substância pode ser obtida, principalmente porque não há nenhuma correlação entre a massa das lagartas, medida ao longo do experimento, com as concentrações administradas. Assim que estes resultados foram obtidos, ficou evidente que a homogenização das soluções das micotoxinas na dieta especial exercia influência significativa no experimento, ou seja, como as soluções foram somente borrifadas na superfície de um pedaço da dieta (~ 6g), as lagartas podiam acessar outras partes da comida de modo a evitarem o contato com as micotoxinas.

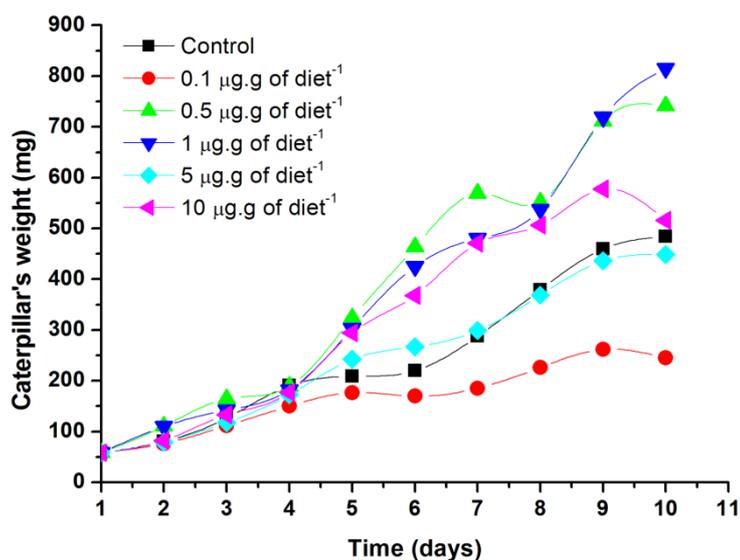


FIGURA 131. Perfil do crescimento das lagartas *S. littoralis* submetidas à dieta especial contendo diferentes concentrações de zearalenona (14) (experimento sem homogenização da amostra).

Desta maneira, um segundo experimento foi realizado, mas agora misturando-se as soluções contendo as toxinas de interesse com a dieta especial. Os resultados obtidos podem ser encontrados nas FIGURA 132 e FIGURA 133. Através de uma simples análise destes dados, é possível verificar que as lagartas controle (submetidas à uma dieta especial contendo apenas 1.8% de etanol – solvente) se desenvolveram muito bem a partir do segundo dia de experimento,

culminando, então, com o estágio de pupa no sétimo dia. Em contrapartida, mesmo as lagartas submetidas à menor concentração das toxinas ($0,1 \mu\text{g} / \text{g}$ de dieta) morreram no máximo até o quinto dia de experimento, evidenciando a toxicidade desta substância. Além disso, um fato que também indicou a toxicidade destas substâncias foi que as lagartas submetidas à dieta com zearalenona (**14**) e deoxinivalenol (**42**) apresentavam ulcerações em seu corpo (FIGURA 134).

A exceção a estes resultados foram as lagartas submetidas à dieta contendo diferentes concentrações de ácido fusárico (**94**) (FIGURA 133 C). Neste caso, houve apenas um atraso de um dia no estágio de pupa destas lagartas. Isso possivelmente evidencia que lagartas *S. littoralis* possuem um sistema de detoxificação desta substância. Desta maneira, ela não foi selecionada para a continuidade dos experimentos.

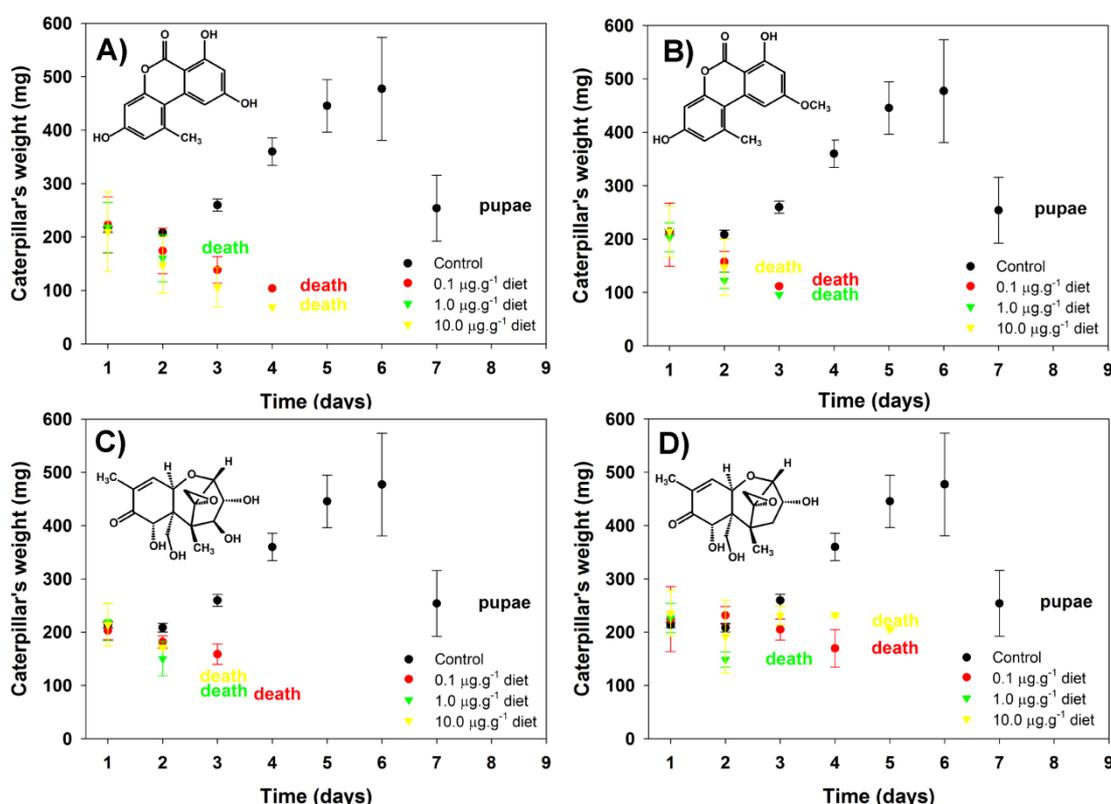


FIGURA 132. Perfil do crescimento das lagartas *S. littoralis* submetidas à dieta especial contendo diferentes concentrações das toxinas (experimento com homogeneização da amostra): A) alternariol (**76**); B) alternariol monometil éter (**77**); C) nivalenol (**41**); D) deoxinivalenol (**42**).

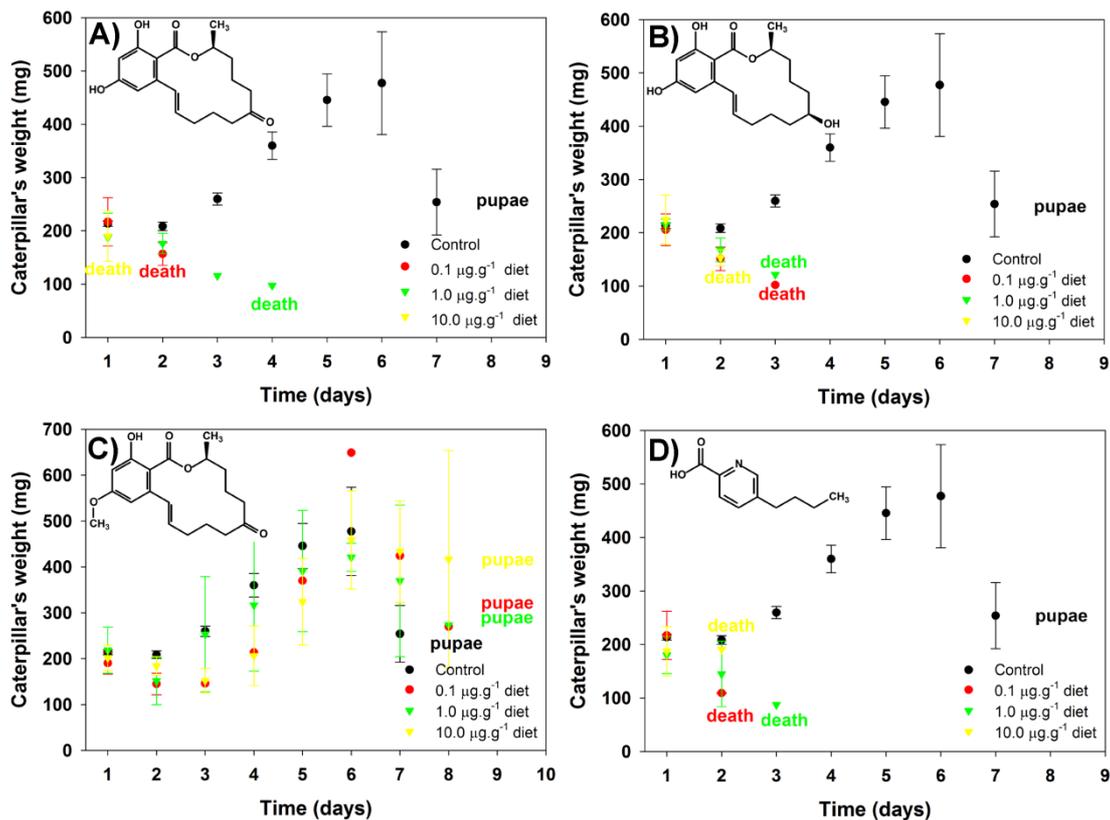


FIGURA 133. Perfil do crescimento das lagartas *S. littoralis* submetidas à dieta especial contendo diferentes concentrações das toxinas (experimento com homogeneização da amostra): A) zearealenona (14); B) β -zearealenol (17); C) ácido fusárico (94); D) dimetoxizearealenone (20).

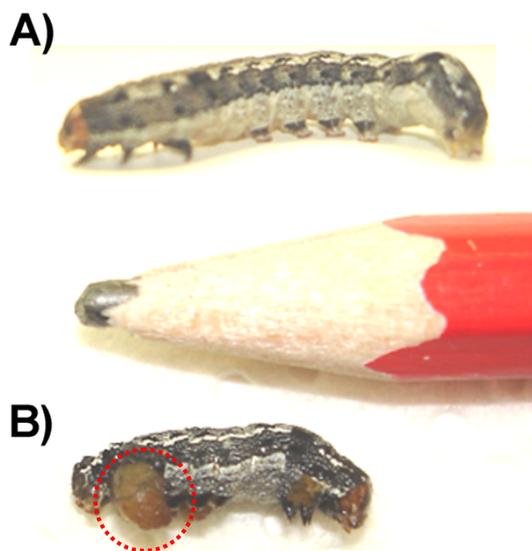


FIGURA 134. A) Lagarta controle (dieta + etanol); B) lagarta submetida à dieta com 10,0 μ W de zearealenona (14). É possível observar a ulceração provocada no inseto.

Observado o efeito tóxico através deste procedimento, decidiu-se então elaborar experimentos onde fosse possível a quantificação de tais resultados. Para isso, decidimos calcular o valor de EC₅₀ (*half maximal effective concentration*), ou seja, o valor de concentração de toxina no qual a atividade tóxica corresponde à metade do valor máximo. As informações obtidas durante o segundo experimento foram cruciais para a acurácia dos valores de EC₅₀, pois através destes experimentos pode-se observar qual seria o melhor dia para o registro das medidas, qual seria a quantidade da dieta especial necessária para a evolução dos experimentos, entre outros.

Para o cálculo do valor de EC₅₀, é importante que cada ponto da curva a ser gerada para um determinado teste biológico seja convertido em porcentagem da atividade biológica ou em porcentagem da inibição com respeito aos controles utilizados. Além disso, a escolha de uma curva analítica que represente de forma correta os resultados obtidos também é fundamental. No caso do cálculo de valores de EC₅₀, a curva mais representativa é a chamada *Four Parameter Logistic Model (4PL)* – Modelo Logístico contendo Quatro Parâmetros – também chamada de Modelo de Hills-Slope. A equação que representa esta curva está apresentada na FIGURA 135, onde *bot* representa o valor mais baixo obtido, *top* o valor máximo, *slope* é o valor da inclinação da curva e IC₅₀, neste caso, representando o valor de EC₅₀.

$$y = bot + \frac{(top-bot)}{1+(x/IC_{50})^{slope}}$$

FIGURA 135. Equação do modelo logístico de quatro parâmetros.

As toxinas altenusin (90), MAC50_108 (91) e MAC50_135 (92) não haviam sido submetidas aos testes anteriores devido a baixa quantidade de massa disponível. Entretanto, após otimizadas as variáveis experimentais, elas foram utilizadas para o cálculo dos valores de EC₅₀. Para isso, foram gerados gráficos em que a taxa de crescimento diária (% do controle, eixo y) foi plotada

contra logaritmo da concentração das substâncias (em mol/Kg, eixo x). Este modelo foi então aplicado aos resultados obtidos e as curvas geradas para cada toxina podem ser vistas nas FIGURA 136 e FIGURA 137.

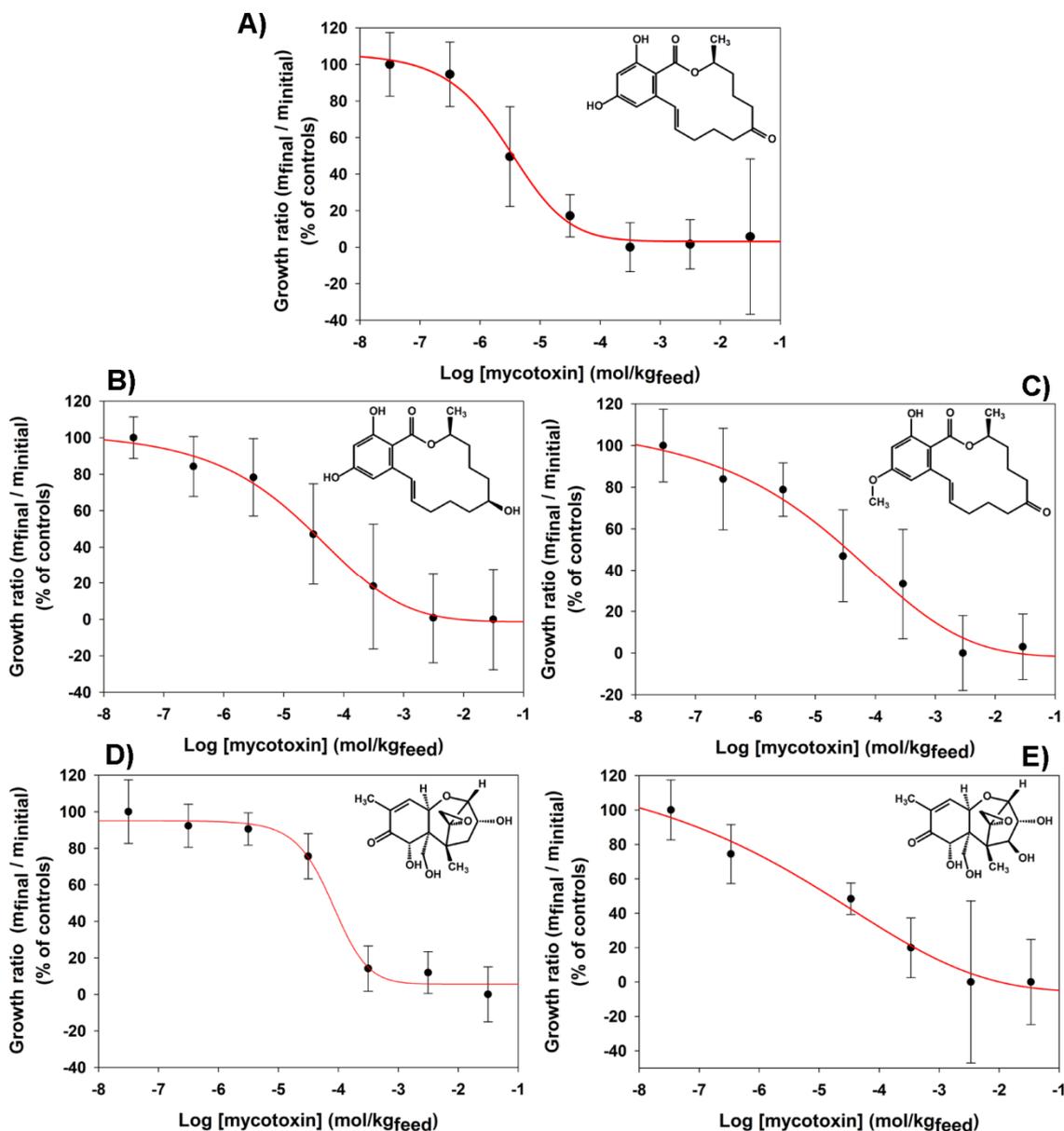


FIGURA 136. Curvas para a determinação de EC₅₀ obtidas para as toxinas produzidas por *Fusarium*: A) zearalenona (14); B) β-zearalenol (17); C) 4-metoxizearaleno (20); D) deoxinivalenol (42); E) nivalenol (41). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=5).

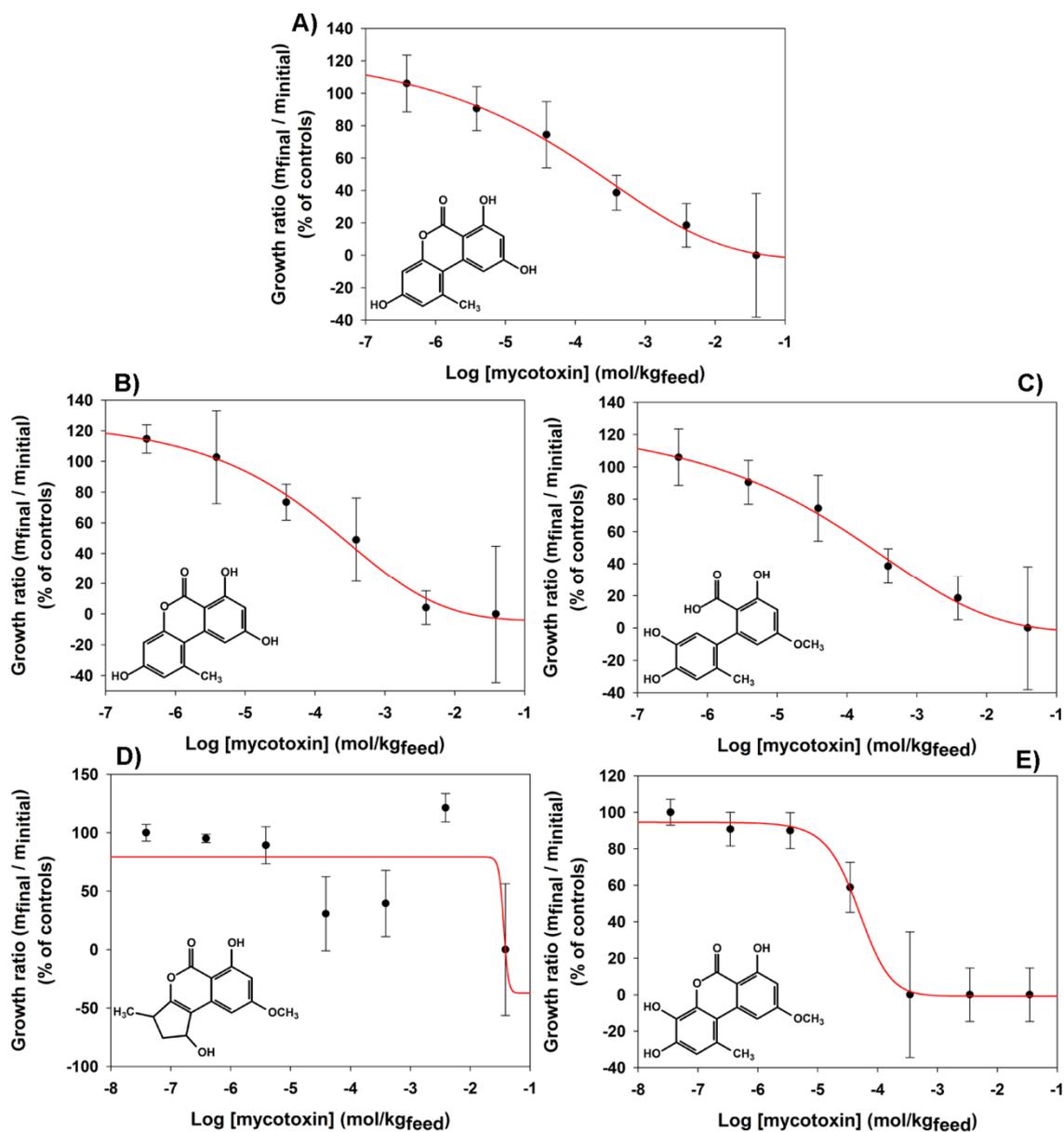


FIGURA 137. Curvas para a determinação de EC₅₀ obtidas para as toxinas produzidas por *Alternaria*: A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77); C) altenusin (90); D) MAC50_108 (91); E) MAC50_135 (92). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=5).

Através destes gráficos, foi possível não somente obter os valores de EC₅₀ reportados na TABELA 30, dados em micromolal (μ W, μ mol de toxina / kilograma de dieta), bem como todos os demais parâmetros obtidos através dos cálculos estatísticos usando o software SigmaPlot™. Além disso, é possível verificar as diferentes faixas de concentração nas quais estas toxinas são ativas. Por exemplo, as toxinas zearalenona (14) e nivalenol (41) apresentaram uma curva que mostra uma queda quase que abrupta da taxa de crescimento diária

em uma pequena variação de concentração, resultando em valores de EC_{50} muito baixos, da ordem de $3 \mu W$.

TABELA 30. Dados estatísticos obtidos após os testes com as toxinas de interesse contra a lagarta *S. littoralis*.

Toxinas	EC_{50} (μW)	CV (\pm %)	r^2
Zearalenona (14)	2.87	2.4	0.994
β -Zearalenol (17)	21.38	1.6	0.994
4-Metoxizearalenona (20)	21.78	12.7	0.980
Ácido Fusárico (94)	—	—	—
Deoxinivalenol (42)	3.17	11.4	0.983
Nivalenol (41)	30.83	3.3	0.991
Alternariol (76)	30.09	10.5	0.995
Alternariol monometil éter (77)	101.09	9.1	0.991
Altenusin (90)	10.81	1.9	0.995
MAC50_108 (91)	> 100000	—	0.454
MAC50_135 (92)	47.53	1.8	0.996

Em contrapartida, algumas toxinas, como o caso dos alternarióis e do deoxinivalenol (42) apresentaram um perfil mais próximo de um decaimento linear da taxa de crescimento do que as toxinas citadas anteriormente. Isso evidencia que estas substâncias possuem um efeito tóxico gradativo, enquanto que as citadas anteriormente possuem uma estreita faixa de concentração na qual elas passam de pouco tóxicas a letais. Isso provavelmente se deve aos diferentes mecanismos de ação destes compostos. Uma possível explicação para o mecanismo de ação do deoxinivalenol (42), por exemplo, poderia estar associada ao fato desta substância induzir efeitos eméticos em suínos (indução de vômito)²⁵² e, em consequência disso, o animal rejeita o alimento, perdendo peso até atingir um estado crítico de saúde ou mesmo morrer. Entretanto, essa aproximação deve ser feita com muita cautela, pois o sistema de absorção e o metabolismo desta substância deve ser distinto em suínos (mamíferos) e em lagartas (insetos). Além disso, é possível verificar as diferentes faixas de concentração nas quais estas toxinas são ativas. Por exemplo, as toxinas zearalenona (14) e nivalenol (41) apresentaram uma curva que mostra uma

queda quase que abrupta da taxa de crescimento diária em uma pequena variação de concentração, resultando em valores de EC₅₀ muito baixos.

De fato, algumas destas toxinas já foram testadas contra insetos²⁵³.²⁵⁴. Porém estes resultados foram obtidos usando-se culturas de células dos mesmos, o que torna mais difícil uma comparação direta entre estes resultados. No trabalho de Forneli et al. (2004)²⁵⁴, os autores reportam que as toxinas zearalenona (**14**) e o deoxinivalenol (**42**) apresentaram valores de IC₅₀ em torno de 18 µM e de 46 µM, respectivamente. Isso reforça os dados que obtivemos e talvez estas diferenças sejam intrínsecas dos diferentes alvos utilizados, uma vez que no referido trabalho foram usadas, como já mencionado, culturas de células da lagarta *Spodoptera frugiperda*. Assim, como são diferentes espécies, as respostas podem ser ligeiramente diferentes. Outra diferença é quanto às unidades dos valores: como testes *in vivo* foram realizados com o inseto “inteiro”, os valores foram reportados em molalidade (W), que compreende mol por uma unidade de massa (quilograma) da dieta especial fornecida a estes insetos. Já os testes realizados por Forneli et al. (2004)²⁵⁴, os dados são reportados em molaridade (M), ou seja, mol por unidade de volume (litro). Mas independentemente destas diferenças, os dados obtidos são aproximadamente similares, ou seja, da ordem de µM ou µW. Além disso, ambos os trabalhos evidenciam o caráter pouco tóxico do ácido fusárico (**94**).

A única oposição aparente com respeito ao referido trabalho é que aqui foi observada uma toxicidade maior da toxina deoxinivalenol (**42**) com respeito ao seu análogo nivalenol (**41**) (TABELA 30), enquanto que Forneli et al (2004)²⁵⁴ observaram o oposto. Isso provavelmente se deve ao fato das lagartas não serem exatamente da mesma espécie e, assim, uma delas poderia ser mais susceptível a um composto do que ao seu análogo. Não existem outros relatos com respeito às outras toxinas aqui testadas, o que dificulta uma comparação direta entre os dados obtidos e os reportados na literatura.

É extremamente interessante notar que todas as curvas se ajustaram aos dados gerando sempre valores de r^2 maiores ou iguais a 0,98,

evidenciando a confiabilidade nos dados gerados. Além disso, todos os valores de EC₅₀ relativos foram obtidos com um desvio menor do que 13 %.

A exceção a estes valores é a substância MAC50_108 (**91**), que não apresentou efeito contra as lagartas *S. littoralis*. Quando é esta substância é comparada com os seus análogos apresentados na TABELA 30, é possível notar que esta é a única na qual o anel A dos alternariols sofreu uma drástica modificação, mudando de um anel aromático de 6 para um não aromático de 5 membros.

Os resultados aqui obtidos indicam que este anel é crucial para a atividade tóxica contra *S. littoralis* desta classe de toxinas. Como pôde ser observado, os compostos altenusin (**90**) e MAC50_135 (**92**) apresentaram valores de EC₅₀ abaixo dos obtidos para o alternariol (**76**) e alternariol monometil éter (**77**), sugerindo que estes compostos são mais tóxicos do que os análogos presentes em alta concentração nos extratos de *Alternaria*. Além disso, o perfil de decaimento da curva é mais parecido com o da zearalenona (**14**) e o do nivalenol (**41**), que foram as substâncias mais ativas dentre as apresentadas na TABELA 30. Isso sugere também que o anel B dos alternariols, o anel lactônico, não é fundamental para o efeito tóxico observado, já que o altenusin foi o composto mais ativo dentre todos os alternariols testados.

Estes testes foram realizados não somente com o intuito de se avaliar o potencial tóxico das substâncias de interesse neste projeto, mas também com o objetivo de se traçar um possível papel ecológico para estas substâncias. Partindo-se de uma suposição que estes compostos estão envolvidos em processos essenciais nas relações ecológicas entre inseto-planta-fungo, o próximo passo neste sentido seria a realização de testes envolvendo plantas modelo, que pudessem nos fornecer informações sobre a fitotoxicidade destes compostos.

Para isso, de acordo com a disponibilidade e interesse, foram desenvolvidos outros dois testes na tentativa de se obter confirmações para a hipótese acima levantada: um teste envolvendo culturas de células de soja e outro

envolvendo plantas-modelo *in vivo* (*Arabidopsis thaliana*, no caso). Na seqüência, é encontrada uma discussão com respeito aos resultados obtidos.

4.3.3. Testes com cultura de células de soja (*Glycina max*)

A mesma sistemática dos testes anteriores foi empregada aqui. Primeiramente, testes iniciais foram realizados com o intuito de se verificar a existência da atividade tóxica por parte destas substâncias, além de se estipular em quais concentrações tal toxicidade poderia ser observada. Estes testes foram realizados de acordo com o item 4.2.2.3.

Como podemos observar na FIGURA 138, mesmo nas menores concentrações testadas, já foi possível observar um efeito tóxico dos compostos pertencentes à classe das zearalenonas. Gráficos similares foram obtidos para as demais toxinas e portanto não serão exibidos aqui. Assim, o cálculo dos valores de EC₅₀ foi realizado com concentrações bem mais baixas.

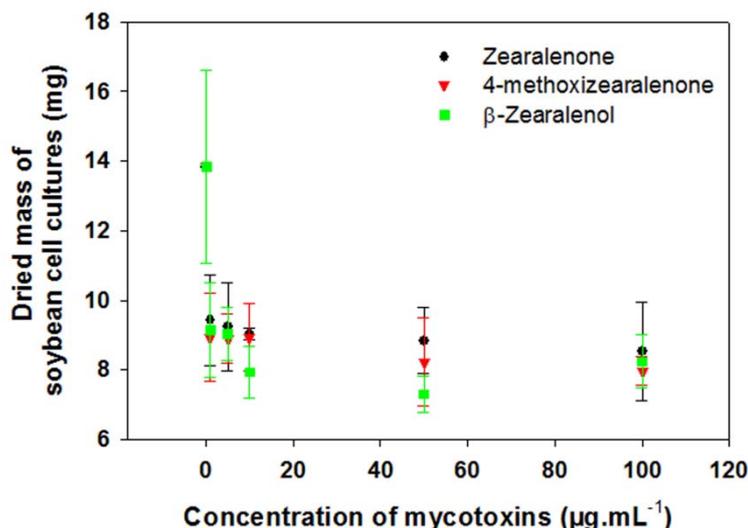


FIGURA 138. Efeito das toxinas da classe das zearalenonas para as culturas de células de soja.

Através dos dados apresentados nas FIGURA 139 e FIGURA 140, é possível verificar que a toxicidade dos compostos para este sistema é muito maior

se comparado com a toxicidade para as lagartas *S. littoralis*. Algumas destas substâncias, como no caso do β -zearalenol (**17**) e do alternariol (**76**), os valores de EC_{50} estão na faixa de nanomolares, o que evidencia o altíssimo caráter citotóxico destas substâncias (TABELA 31). É possível observar que mais uma vez o modelo estatístico se encaixa perfeitamente com os dados obtidos, apresentando um r^2 maior do que 0,98 e um coeficiente de variação menor do que 9%.

Como pode-se observar, o perfil de ação tóxica da zearalenona (**14**) e da maioria das outras toxinas se repete se compararmos com os experimentos discutidos anteriormente para as lagartas *S. littoralis*. Entretanto, no caso dos tricotecenos nivalenol (**41**) e deoxinivalenol (**42**), observamos uma inversão no perfil da curva: enquanto a ação tóxica para as lagartas revelou uma estreita faixa de concentração na qual o nivalenol (**41**) passa de não-tóxico à letal, para as culturas de células de soja a faixa se mostra um pouco maior. No caso do deoxinivalenol (**42**), é observado exatamente o oposto. Isso sugere que, embora estas toxinas sejam muito parecidas estruturalmente, o mecanismo de ação tóxica difere entre elas quando avaliadas em modelos diferentes, ou seja, quando avaliadas suas potencialidades como inseticida e citotóxicas.

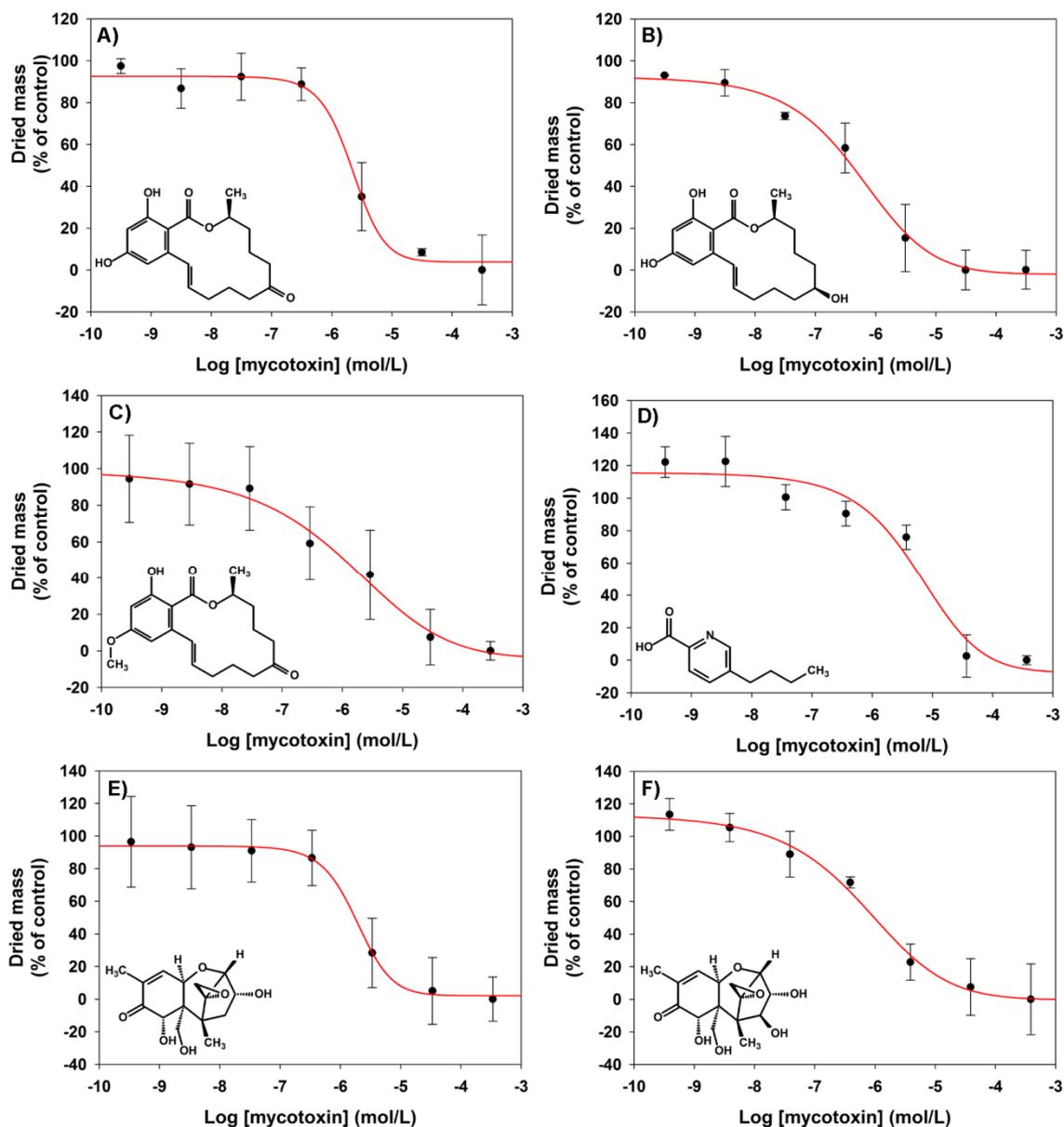


FIGURA 139. Curvas para a determinação de EC_{50} nos testes contra culturas de células de soja, obtidas para as toxinas produzidas por *Fusarium*: A) zearalenona (**14**); B) β -zearalenol (**17**); C) 4-metoxizearalenone (**20**); D) ácido fusárico (**94**); E) deoxinivalenol (**42**); F) nivalenol (**41**). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=4).

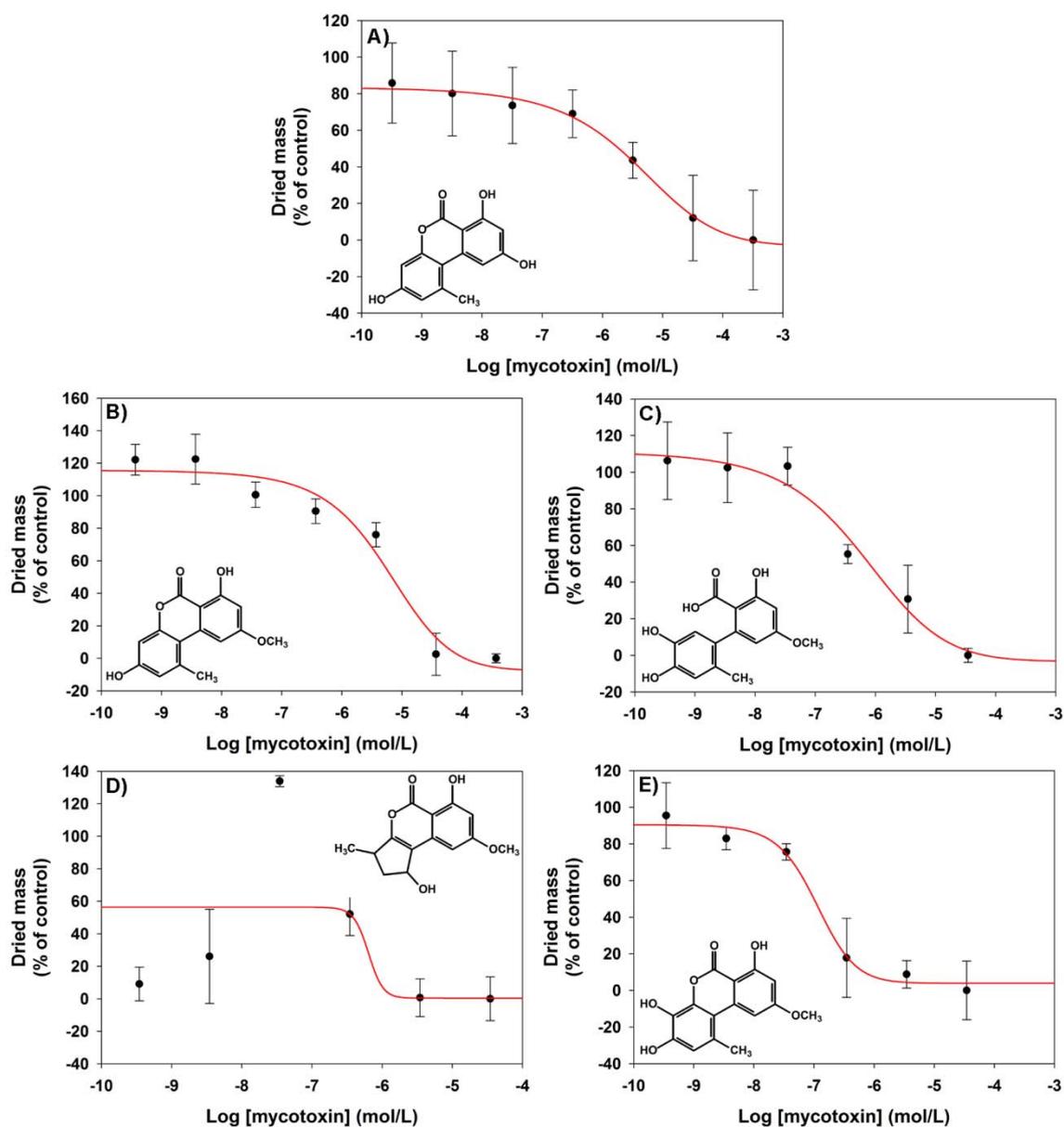


FIGURA 140. Curvas para a determinação de EC_{50} nos testes contra culturas de sélulas de soja, obtidas para as toxinas produzidas por *Alternaria*: A) alternariol (76); B) alternariol monometil éter (77); C) altenusin (90); D) MAC50_108 (91); E) MAC50_135 (92). Os testes foram repetidos 3 vezes (n=4).

Como este teste é realizado com culturas de células de soja, é possível evidenciar o efeito citotóxico de tais toxinas. Os dados obtidos estão aparentemente em concordância com os reportados por Robbana-Barnat et al. (1989)²⁵⁵, que descreve efeitos citotóxicos na faixa de 0,20 a 0,72 μ M para a substância deoxinivalenol (42), contra linfomas de ratos. Estes dados também estão de acordo com os obtidos por Aly et al. (2008)²¹⁵, que reportam efeitos citotóxicos não quantitativos para as substâncias alternariol (76), alternariol

monometil éter (**77**) e altenusin (**90**), também contra células de linfoma de ratos. Além disso, alguns autores comentam que os alternariols podem apresentar-se como tóxicos a células humanas^{226, 246}. A substância MAC50_108 (**91**), aparentemente aqui reportada pela primeira vez, novamente não apresentou efeito biológico considerável, reforçando a constatação de que o anel A dos alternariols é fundamental para conferir toxicidade a estas moléculas.

TABELA 31. Dados estatísticos obtidos após os testes com as toxinas de interesse contra as culturas de células de soja.

Micotoxinas	EC ₅₀ (μM)	CV (± %)	r ²
Zearalenona (14)	2.19	1.7	0.992
β-Zearalenol (17)	0.54	2.3	0.993
4-metoxizearalenone (20)	1.31	4.1	0.988
Ácido Fusárico (94)	6.70	5.7	0.978
Deoxinivalenol (42)	1.86	0.9	0.998
Nivalenol (41)	3.98	2.5	0.990
Alternariol (76)	0.67	6.6	0.993
Alternariol monometil éter (77)	4.69	8.9	0.993
Altenusin (90)	0.63	4.5	0.985
MAC50_108 (91)	> 100000	—	0.675
MAC50_135 (92)	0.11	2.4	0.989

Porém, do ponto de vista ecológico, este é um resultado até certo ponto contraditório. Partindo-se do pré-suposto que os testes envolvendo lagartas, cujos valores de EC₅₀ são reportados em molalidade (W), podem ser comparados diretamente com os resultados acima apresentados, em molaridade (M), então esperar-se-ia que valores de EC₅₀ obtidos para os testes envolvendo as lagartas fossem menores do que os envolvendo as culturas de células. Isso porque em um contexto ecológico no qual o fungo se desenvolve em harmonia com o seu hospedeiro, as substâncias por ele produzidas poderiam ser então utilizadas por este mesmo hospedeiro de maneira a repelir ou afastar herbívoros, por exemplo. Uma abordagem parecida foi confirmada por Carroll (1988)¹¹, que estudou estes tipos de interação e produção de toxinas em sistemas envolvendo microrganismos endofíticos e arbustos.

Tal cenário químico-ecológico estaria de acordo com os resultados obtidos para a produção de zearalenonas, por exemplo. Ou seja, assumindo-se então que o fungo, no caso *Fusarium*, produz substâncias tóxicas ao hospedeiro, mas em concentrações pequenas ao ponto em que a toxicidade não seja observada, estas substâncias poderiam indiretamente agir como toxinas para os herbívoros, protegendo, de certa maneira, o hospedeiro e o fungo. Mas obviamente que para que isso pudesse ter algum fundamento, os resultados aqui apresentados deveriam ser aparentemente o inverso do que realmente foram, ou seja, os valores de EC_{50} para as culturas de células de soja deveriam ser maiores do que os valores de EC_{50} para as largatas.

Entretanto, tal afirmação não pode ser feita de maneira tão direta, pois as culturas de células representam um ótimo modelo para o estudo de toxicidade de algumas substâncias, mas obviamente que tais células são muito mais frágeis do que uma planta inteira formada, ou mesmo do que uma plântula nos estágios iniciais de vida. Assim, seria de se esperar que os valores de EC_{50} para culturas de células seriam menores do que os mesmos valores para a planta como um todo. Desta maneira, este teste fornece resultados muito importantes com respeito a citotoxicidade dos compostos testados, mas não reflete diretamente as diferenças de atuação destas substâncias para herbívoros e plantas de maneira próxima à encontrada na natureza.

Assim foram realizados, embora de uma maneira semi-quantitativa (sem a obtenção dos valores de EC_{50}), testes de toxicidade com plantas *in vivo*, usando a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Na seqüência, estão apresentados os dados obtidos nos testes de fitotoxicidade das substâncias de interesse para estas plantas. Vale ressaltar que os dados aqui apresentados, segundo o levantamento bibliográfico realizado, são inéditos, uma vez que estas substâncias nunca foram ensaiadas frente a culturas de células de soja.]

Desta maneira, estamos finalizando no momento a elaboração de um *paper* intitulado “*Covering a range of toxic effect of Alternaria and Fusarium metabolites: a chemical ecology point-of-view*” que será em breve submetido à revista *Chemistry and Biodiversity*.

4.3.4. Testes iniciais envolvendo germinação de plantas no Brasil

Visando o estabelecimento de algumas bases para o estudo da interação planta-fungo bem como um treinamento inicial na condução de experimentos envolvendo cultivo de plântulas, estabelecemos algumas condições de microcultivo em nossos laboratórios no Brasil, a fim de se obter plântulas em condições assépticas, ideais para os testes com as substâncias de interesse. O crescimento das plântulas foi monitorado diariamente por um período de 20 dias e os resultados obtidos estão sumarizados na TABELA 32. Além disso, a FIGURA 141 e a FIGURA 142 apresentam fotos do experimento realizado.

Como pode ser observado, a maioria das sementes germinou e o índice de contaminação foi satisfatório (<10%). Apenas as sementes da planta “barba-de-bode” não germinaram. O interesse nestas sementes se baseia no fato de que esta planta é considerada uma praga, principalmente para campos gramados com fins esportivos, e assim a descoberta de substâncias que possivelmente inibam a sua germinação pode ser de grande valia.

Outro fator bastante interessante é que as sementes de laranja apresentaram uma germinação bem mais lenta do que as demais. Isso provavelmente porque se faz necessária a retirada de uma película protetora desta semente para que a germinação possa ocorrer de maneira eficaz. Esta película não foi retirada nestes primeiros experimentos pois havia uma grande preocupação com respeito à contaminação destas sementes, uma vez que a maneira mais adequada de se realizar o microcultivo com sementes de laranja é abrir a própria fruta em um instante antes da esterilização, evitando assim contaminações e a desidratação desta semente.

TABELA 32. Os resultados obtidos em até 20 dias de cultivo das plântulas.

Nome popular	Crescimento (dias)	Características
Alface	20 dias.	Crescimento satisfatório em 10 dias, porém sem evolução a partir deste período. Sem contaminação
Arroz	10 dias	2 frascos com contaminação e 2 frascos com crescimento normal.
Branco	-----	Todos 3 frascos sem contaminação.
Capim Barba-de-Bode	Nenhum.	Provavelmente estas sementes não estão aptas a germinação
Cevada (BRS Bor.)	15 dias	1 frasco não germinou, crescimento satisfatório em 20 dias.
Cevada (BRS Mar.)	Nenhum.	1 frasco contaminado.
Feijão	Nenhum.	Provavelmente processo de esterilização muito agressivo.
Milho (BR)	5 dias.	Com 20 dias início de mortalidade.
Milho (RG)	5 dias.	A partir do 16 ^o dia, crescimento de um fungo branco e mortalidade da planta.
Soja	Extremamente tímido.	Mortalidade com 10 dias. Provavelmente idem ao feijão.
Laranja	Dos 6 frascos, apenas 2 germinaram com 25 dias.	Provavelmente existe a necessidade de se retirar a casca da semente para uma boa germinação.
Sorgo	5 dias.	Todos os frascos com crescimento de um fungo.
Trigo (BRS 194)	7 dias.	Considerável crescimento sem nenhuma contaminação.
Trigo (BRS Angico)	7 dias.	Apenas 1 frasco com contaminação.
Trigo (BRS Louro)	7 dias.	Apenas 1 frasco não germinou.

As sementes de cotiledoneas como o feijão e a soja provavelmente necessitam de um processo de esterilização mais brando, uma vez que os cotilédones se abrem com certa facilidade, levando à morte do embrião e, conseqüentemente, não há germinação destas sementes.

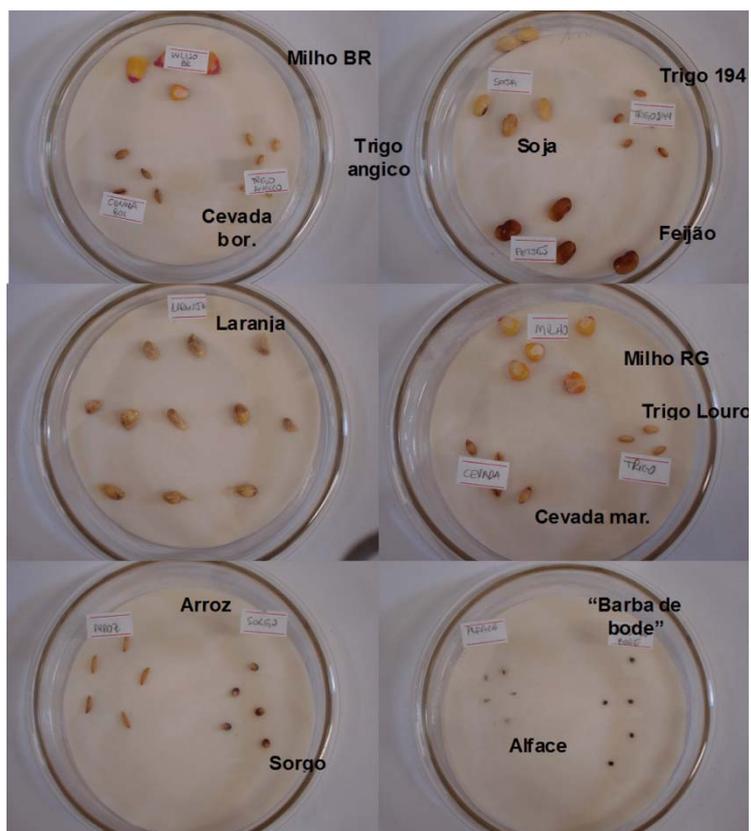


FIGURA 141. Sementes em estágio de pré-germinação em placas de Petri (zero dias).

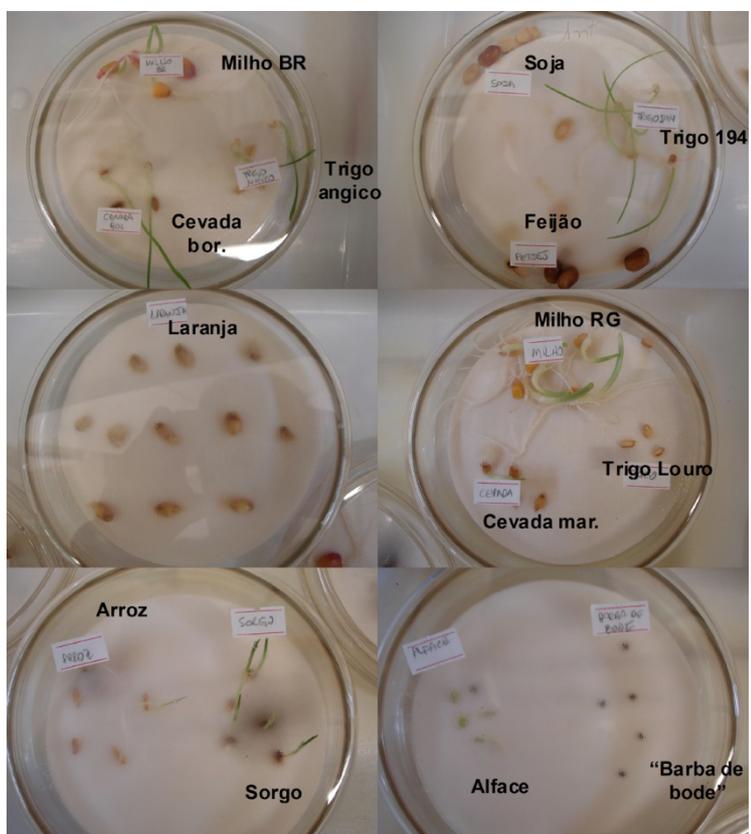


FIGURA 142. Sementes em estágio de pré-germinação em placas de Petri (após 5 dias).

Estes testes foram realizados com o principal objetivo de se adquirir habilidades no trabalho com plântulas. Desta maneira, foram utilizados o maior número de sementes disponíveis em nossos laboratórios. Entretanto, para uma melhor compreensão dos estudos de fitotoxicidade e também das interações existentes entre plantas e fungos, a melhor abordagem é a utilização de plantas consideradas modelo, ou seja, plantas cuja resposta a fatores de estresse já é bem conhecida e também cujo o genoma já foi mapeado e pode portanto ser manipulado^{236, 238}. Desta maneira, para a elaboração destes estudos no *Max Planck Institut*, optou-se pelo uso da planta modelo *Arabidopsis thaliana*, como pode ser visto a seguir.

4.3.5. Testes com plantas *Arabidopsis thaliana in vitro*

Uma das maneiras mais diretas de se verificar a toxicidade de um determinado composto frente a uma dada planta é encontrar maneiras de crescer esta planta em ambientes estéreis, com condições controladas e então administrar as substâncias às mesmas. No caso de *Arabidopsis*, muita atenção deve ser tomada com respeito à temperatura, umidade, incidência de luz e outros fatores que podem levá-las a um estresse não desejado e, portanto, fornecerem falsos resultados positivos.

Uma vez controlados todos estes fatores, as plântulas previamente crescidas em meio *MS* sem adição das toxinas foram então transferidas para o meio *MS* contendo diferentes concentrações destas (item 4.2.2.5.). Os resultados foram então analisados de maneira visual, pois um dos principais sintomas de patogenia em *Arabidopsis* envolve o efeito chamado de clorose, ou seja, quando as folhas progressivamente perdem clorofila e ficam amareladas, ou até mesmo esbranquiçadas em alguns casos mais drásticos^{236, 238}. Outro efeito, provocado pelo acúmulo de antocianidinas, leva ao escurecimento das folhas e caules e é também comumente associado ao estresse em *Arabidopsis*²⁴². Em alguns casos, a necrose dos tecidos vegetais também pode ocorrer²⁴².

Como pode ser visto nas FIGURA 143 e FIGURA 144, todas as substâncias pertencentes a classe das zearalenonas, isto é, a zearalenona (**14**), o β -zearalenol (**17**) e a 4-metoxizearalenone (**20**), apresentaram algum tipo de resposta tóxica às plântulas de *Arabidopsis thaliana*. No caso das plântulas em que β -zearalenol (**17**) foi adicionado ao meio, pode-se claramente observar um forte efeito de clorose na concentração mais alta administrada (50 $\mu\text{g/mL}$). O efeito tóxico desta micotoxina para *Arabidopsis* é bastante evidente nesta concentração, embora algum indício tóxico, caracterizado por um leve amarelamento das folhas, já possa ser plenamente observado acima de 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Neste sentido, o mesmo pode ser dito dos outros dois análogos, a zearalenona (**14**) e a 4-dimetoxizearalenona (**20**). Entretanto, acima desta concentração foi observado somente o acúmulo de antocianidinas, evidenciado pelo rocheamento das folhas.

De acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, não existem estudos envolvendo a fitotoxicidade de substâncias da classe das zearalenonas para *Arabidopsis thaliana*. Entretanto, um grande estudo com respeito a resposta tóxica de tricotecenos em *Arabidopsis* foi feito por Desjardins et al. (2007)²⁴¹. Embora os experimentos realizados por estes autores tenham sido feitos envolvendo a imersão das folhas em soluções contendo as toxinas, diferentemente do nosso modelo que envolve a absorção das toxinas pelas raízes de plantas cultivadas em meio de cultura apropriado, os resultados publicados por eles suportam os obtidos aqui. Estes autores verificaram que 25 diferentes tricotecenos induzem alguma resposta tóxica em 100 μM e que reações de esterificação nos grupos hidroxil diminuem a atividade fitotóxica.

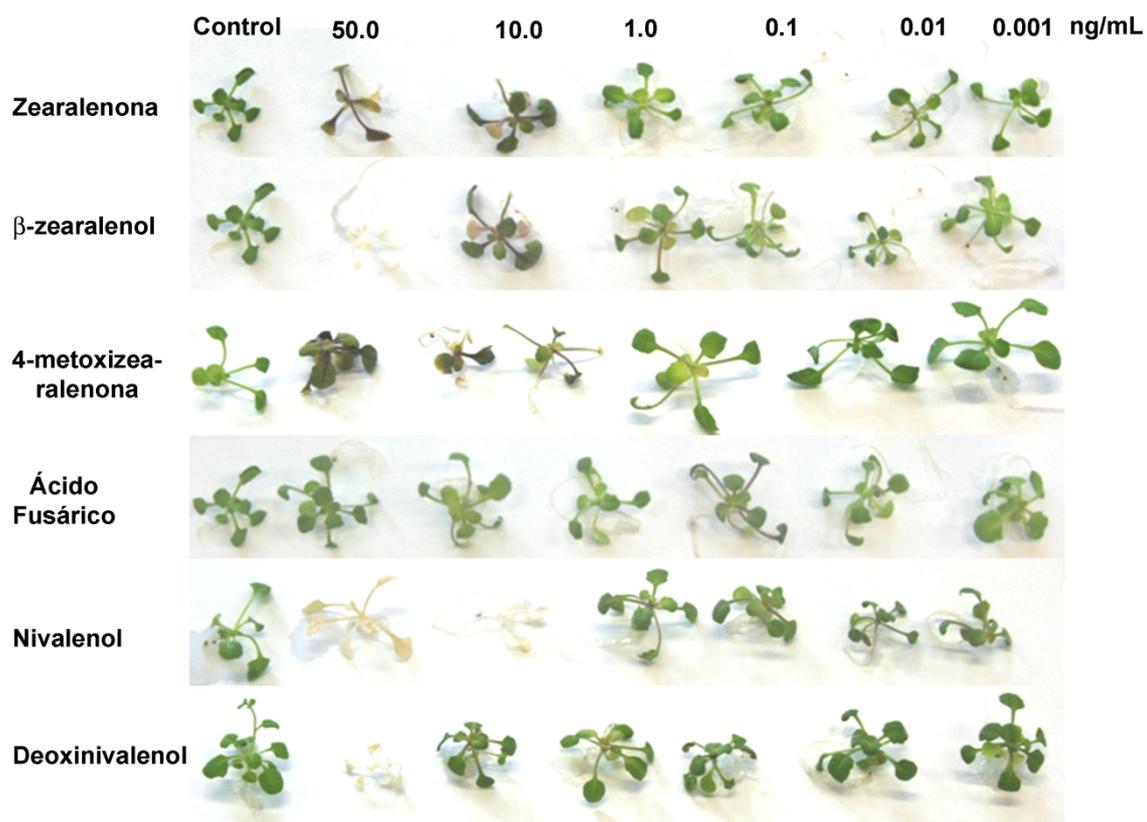


FIGURA 143. Plântulas de *Arabidopsis* cultivadas em meio MS contendo diferentes concentrações de toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*. Controle equivale ao meio + etanol – 1,8%.

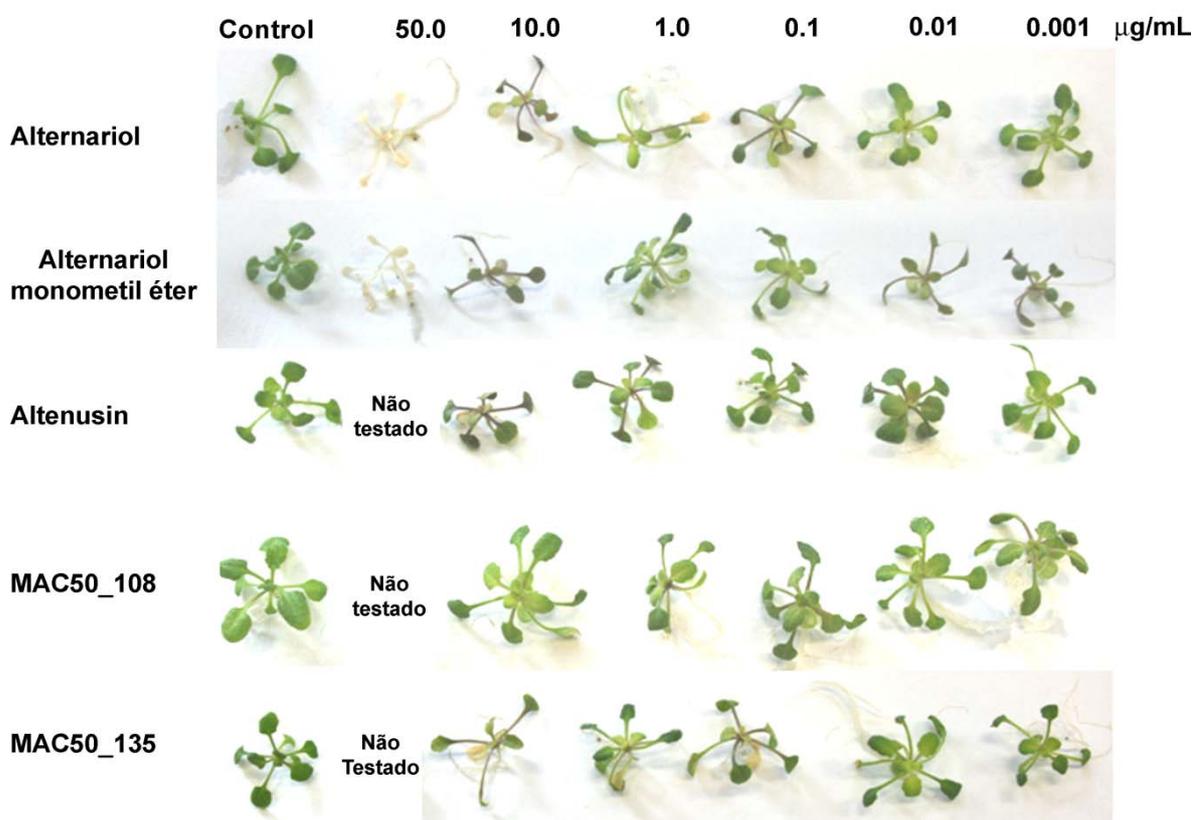


FIGURA 144. Plântulas de *Arabidopsis* cultivadas em meio MS contendo diferentes concentrações de toxinas produzidas por fungos do gênero *Alternaria*. Controle equivale ao meio + etanol – 1,8%.

Os dois tricotecenos testados, o nivalenol (**41**) e o deoxinivalenol (**42**), apresentaram efeito abaixo de 32 μM (TABELA 33). A única aparente contradição é que os autores reportam que o deoxinivalenol (**42**) ($\text{EC}_{50} = 23 \mu\text{M}$) é mais tóxico do que o nivalenol (**41**) ($\text{EC}_{50} = 100 \mu\text{M}$), enquanto foi observado que ambos os tricotecenos são ativos a baixo de 32 μM . Embora o valor de EC_{50} não tenha sido calculado, foi determinada uma concentração na qual o efeito visual pode ser indubitavelmente caracterizado. Estes valores podem ser encontrados na TABELA 33, abaixo.

TABELA 33. Resumo dos valores obtidos nos testes biológicos das substâncias testadas.

Substância	<i>S. littoralis</i> EC_{50} (μW)	Culturas células de soja EC_{50} (μM)	<i>A. thaliana</i> C_{min}^* (μM)
Zearalenona (14)	2.87	2.19	31.45
β -zearalenol (17)	21.38	0.54	31.25
4-metoxizearalenone (20)	21.78	1.31	254.20
Ácido fusárico (94)	—	6.70	> 279
Deoxinivalenol (42)	3.17	1.86	29.05
Nivalenol (41)	30.83	3.98	3.21
Alternariol (76)	30.09	0.67	25.70
Alternariol monometil éter (77)	101.09	4.69	27.1
Altenusin (90)	10.81	0.63	28.9
MAC50_108 (91)	> 10000	> 10000	> 10000
MAC50_135 (92)	47.53	0.11	31.4

* C_{min} se refere a mínima concentração testada na qual algum efeito tóxico é perceptível visualmente

O ácido fusárico (**94**) curiosamente apresentou um pequeno efeito tóxico visível se comparado com as plantas controle. Assim como no caso dos testes envolvendo as lagartas *S. littoralis*, esta substância não se mostrou ativa. Os alternariols, em contrapartida, apresentaram um efeito tóxico bastante característico, exceto novamente para a substância MAC50_108 (**91**). Esta é mais uma evidência da importância do anel A dos alternariols para a toxicidade dos mesmos.

As substâncias altenusin e MAC50_135 (92) apresentaram efeitos fitotóxicos similares aos apresentados pelo alternariol e pelo alternariol monometil éter (77) (FIGURA 144). Para estas substâncias, não foram realizados testes acima desta concentração de 10 µg/mL, pois não havia quantidade suficiente de tais compostos. Entretanto, devido à altíssima toxicidade apresentada nos testes realizados, a quantidade de substância não foi um fator limitante para a obtenção dos dados.

O resultado mais interessante obtido neste teste foi a constatação que, ao menos para as plantas testadas, os alternariois mostraram-se quase tão tóxicos quanto os tricotecenos (FIGURA 143 e FIGURA 144 e TABELA 33). Este resultado confirma que tais substâncias podem atuar como fitotoxinas tanto quanto os tricotecenos ou zearalenonas.

Os resultados aqui obtidos contribuem para a verificação do real potencial fitotóxico destas substâncias, uma vez que muitas delas não tem sido sistematicamente testadas contra alvos modelos^{241, 243}. Embora os resultados aqui demonstrados tenham sido analisados de maneira visual, isso não compromete a interpretação dos mesmos, pois um dos principais sintomas de patogenia em *Arabidopsis* envolve o efeito chamado de clorose, ou seja, quando as folhas vão progressivamente perdendo clorofila e ficam amareladas, até mesmo esbranquiçadas em alguns casos mais drásticos. Outro efeito, provocado pelo acúmulo de antocianidinas, leva ao escurecimento das folhas e do caule e é também comumente associado ao estresse em *Arabidopsis*. Em alguns casos, a necrose dos tecidos vegetais também pode ocorrer.

De acordo com os dados apresentados na TABELA 33, é possível observar que em geral todas as toxinas analisadas foram mais tóxicas para as culturas de células de soja do que para as lagartas. Isso evidencia o forte efeito citotóxico destas substâncias, mas nada pode ser dito com relação às suas atividades fitotóxicas, pois estas células são muito mais sensíveis do que uma plântula formada. Quando comparamos os dados de EC₅₀ obtidos nos testes contra as lagartas com os dados obtidos nos testes de fitotoxicidade contra *Arabidopsis thaliana* (a concentração reportada é a concentração onde qualquer

pequeno efeito de clorose, necrose ou acúmulo de antocianidinas foi observado e não o valor no qual o efeito é reduzido à metade – EC_{50}), é possível notar que algumas das substâncias possuem uma toxicidade muito maior para as lagartas do que as plantas (caso da zearalenona (**14**), da 4-metoxizearalenona (**20**) e do deoxinivalenol (**42**)).

Estes resultados confirmariam a hipótese de que um fungo pode viver nos tecidos internos de seu hospedeiro, no caso uma planta, e pode produzir substâncias que são fitotóxicas. Porém, estas substâncias são produzidas em concentrações nas quais nenhum efeito tóxico se pronuncia no hospedeiro, mas sim em possíveis herbívoros (no caso, as lagartas). Desta forma, a planta forneceria um ambiente propício para o crescimento fúngico, e o fungo, em contrapartida, auxiliaria no sistema de defesa da planta contra seus patógenos. Neste caso, ambos os organismos se desenvolveriam de forma harmônica e mutualista.

Entretanto, isso não significa que o fungo endofítico permanecerá durante todo o seu ciclo de vida atuando de maneira mutualista. Em algum período de sua vida, este fungo poderia atuar como patógeno para o seu hospedeiro. Isso poderia ocorrer, por exemplo, quando o sistema de defesa da planta for muito enfraquecido por ação de um predador mais agressivo. Dessa forma, o fungo simplesmente aumentaria a concentração das substâncias que já estariam sendo produzidas e atuaria como um patógeno, habitando inclusive a superfície dos tecidos da planta, visando assim a liberação de seus esporos para que novos hospedeiros fossem atacados.

Esta hipótese vem de encontro com muitos dos resultados obtidos em nossos laboratórios e explicaria uma questão dúbia na literatura. Por exemplo, o fungo *Fusarium moniforme*, isolado como endofítico neste projeto, foi trabalhado durante um ano e meio sem que nenhuma das toxinas clássicas reportadas por eles. De acordo com os dados obtidos na sessão 3.3.4., quando ele foi comparado com outro fungo da mesma espécie com respeito a produção de zearalenonas, concluiu-se que ele não havia deixado de produzir tal substância,

mas sim ele havia diminuído drasticamente as quantidades produzidas da mesma.

Após todos os testes biológicos realizados neste trabalho, os resultados indicam que este fungo possivelmente ajustou seu metabolismo para conviver harmonicamente com seu hospedeiro. Mais do que isso, ele possibilitou, através deste fino ajuste, a possibilidade de estabelecer uma relação mutualista com a planta, pois produzindo zearalenona (**14**) em pouquíssimas quantidades, ele ainda assim fornece um inseticida natural a planta, protegendo-a de possíveis herbívoros.

Da mesma maneira, estes resultados explicariam o porquê o fungo *Alternaria*, um patógeno agressivo, dificilmente é isolado como endofítico. Todas as substâncias produzidas por ele se mostraram mais tóxicas para *Arabidopsis* do que para as lagartas *S. littoralis*, ou ao menos se mostraram na mesma faixa de toxicidade (TABELA 33).

Uma ilustração desta hipótese pode ser encontrada na Figura 4.13. Obviamente que esta hipótese deve ser checada com relação à outros aspectos também. Por exemplo, é necessário obter informações com respeito à capacidade de detoxificação destas substâncias por parte do hospedeiro, ou mesmo de saber se de alguma forma o hospedeiro é quem influencia diretamente a produção das substâncias por parte do fungo. Estudos em nível macromolecular, genético e evolutivo são necessários para uma indubitável comprovação desta hipótese.



FIGURA 145. Esquemática da hipótese levantada neste projeto de pesquisas.

Contudo, o intuito deste projeto foi contribuir para a compreensão do papel ecológico destas substâncias na interação fungo-planta-inseto. Além disso, os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste trabalho indicam que um fungo endofítico que atua como mutualista pode vir a atuar como patógeno, dependendo das condições em que ele se encontra.

Na tentativa de verificar a hipótese de que um fungo endofítico mutualista poderia vir a ser um patógeno simplesmente pelo aumento na concentração das micotoxinas produzidas por ele, alguns experimentos de reinoculação do fungo em plantas-modelo foram desenvolvidos. Estes experimentos serão discutidos na seqüência.

4.3.6. Testes de reinoculação fúngica em plantas modelo (*Arabidopsis thaliana*)

Com o intuito de confirmar a hipótese levantada neste trabalho, foram realizados experimentos na tentativa de verificar a potencialidade de um microrganismo endofítico em induzir sinais de patogenicidade se reinoculado novamente em seu hospedeiro. Esta seria uma adaptação do **postulado de Koch**, que estabelece que um microrganismo patogênico deve ser reinoculado em seu hospedeiro para a comprovação da patogenicidade^{256, 257}, entre outras características já preenchidas pelo fungo em questão. Neste trabalho em específico, foi investigado se um fungo isolado como endofítico pode, quando reinoculado no seu hospedeiro ou em plantas modelo, induzir patogenicidade.

Como o crescimento da planta hospedeira (*Melia azedarach*) *in vitro* e sob condições que garantissem a ausência de outros microrganismos nos tecidos internos desta planta seria inviável, principalmente pelo tempo levado para que esta planta atinja um estado adulto em comparação com plantas modelo, optou-se pela reinoculação do fungo em *Arabidopsis thaliana*. Inicialmente o método adotado foi o de simplesmente colocar as sementes para crescer em meio MS juntamente com o fungo. Desta maneira, o fungo poderia infectar a plântula quando esta começasse a germinar e então os efeitos de inoculação poderiam ser avaliados.

Ao final de 5 dias de experimento, as plantas foram comparadas com respeito ao tamanho de suas folhas e raízes. Como pode ser observado na FIGURA 146, as raízes e as folhas das plantas que não foram submetidas à inoculação fúngica (branco-controle) apresentaram-se de 2 a 3 vezes maiores do que as inoculadas com *Fusarium graminearum* isolado como epifítico patogênico e também do que as inoculadas com *Fusarium moniliforme* isolado como endofítico mutualista. Ambos os fungos apresentaram o mesmo comportamento e induziram os mesmos efeitos danosos ao crescimento das plântulas, o que em um primeiro momento poderia ser interpretado como um indício da atividade patogênica de um fungo isolado como endofítico mutualista.

Entretanto, o grande problema observado neste experimento foi que o fungo, embora inoculado em um meio de cultura desenvolvido para o cultivo de plantas (*MS*), apresentou um crescimento muito rápido, dominando todo o meio de cultura e impossibilitando as sementes de terem acesso aos nutrientes do meio. Isso prejudicou de maneira nítida o crescimento das plântulas. Esta metodologia foi inicialmente adotada por sugestão da Dr^a. Tamara Krügel, Diretora da *Green House* do *Max Planck Institut für chemische Ökologie* e uma das maiores especialistas do mundo em crescimento de *Arabidopsis*. A Dr^a. Krügel já possuía experiência na inoculação de bactérias em plantas deste gênero e, portanto, foi uma colaboradora essencial destes experimentos. Porém, o método desenvolvido não forneceu resultados confiáveis, como já mencionado acima.

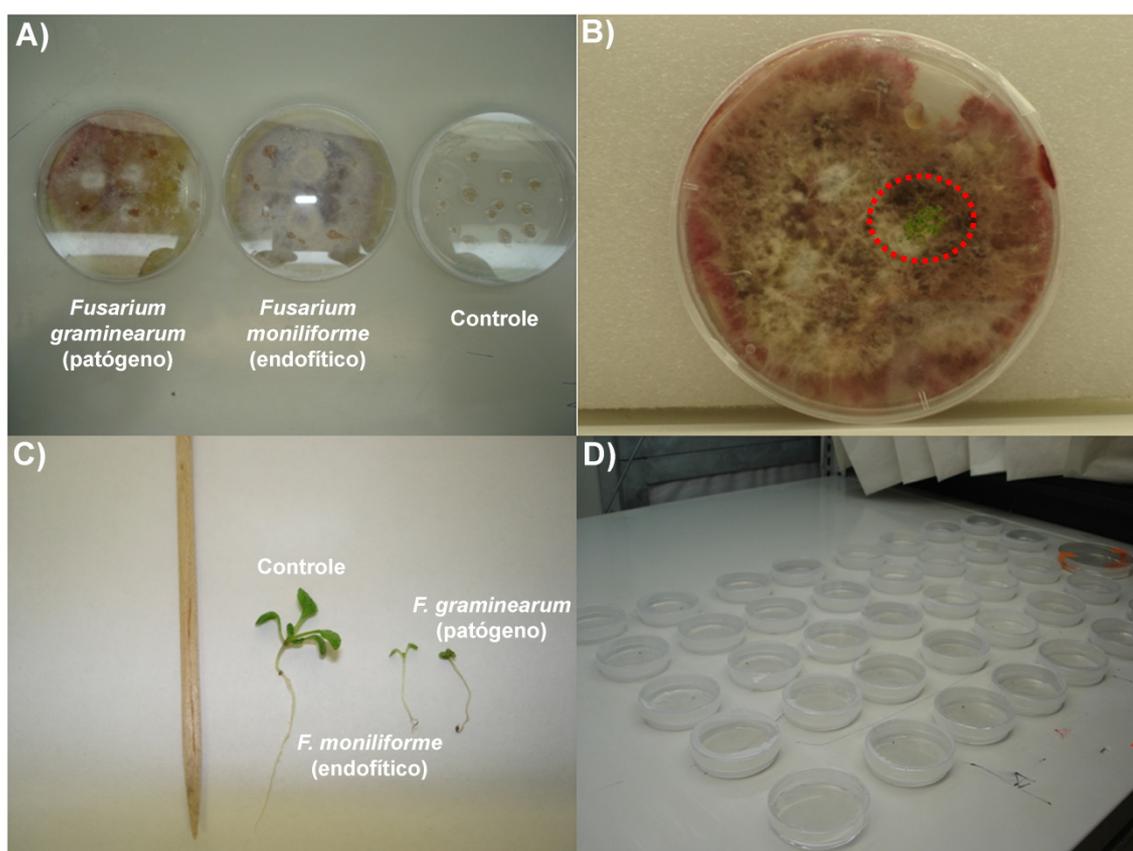


FIGURA 146. A) sementes de *Arabidopsis* crescidas em meio contendo *Fusarium* isolado como mutualista, como patógeno e branco (somente semente e meio de cultura); B) Placa de Petri após 5 dias de experimento; C) comparação do crescimento das plântulas depois de 5 dias; D) disposição das placas de Petri no início do experimento.

Diante destes resultados, decidiu-se por realizar a inoculação fúngica através da injeção de uma solução de esporos dos fungos diretamente nas folhas das plântulas de *Arabidopsis*. Para isso, as sementes foram germinadas em condições assépticas por 5 dias e então inoculadas com auxílio de uma microseringa. As plantas controle (branco) também foram inoculadas com uma solução estéril de água para garantir que qualquer possível efeito observado no crescimento da plântula não fosse causado em decorrência do corte com a microseringa. A FIGURA 147 ilustra a Câmara de Neubauer, utilizada para a contagem dos esporos, e os próprios esporos de *Fusarium*.

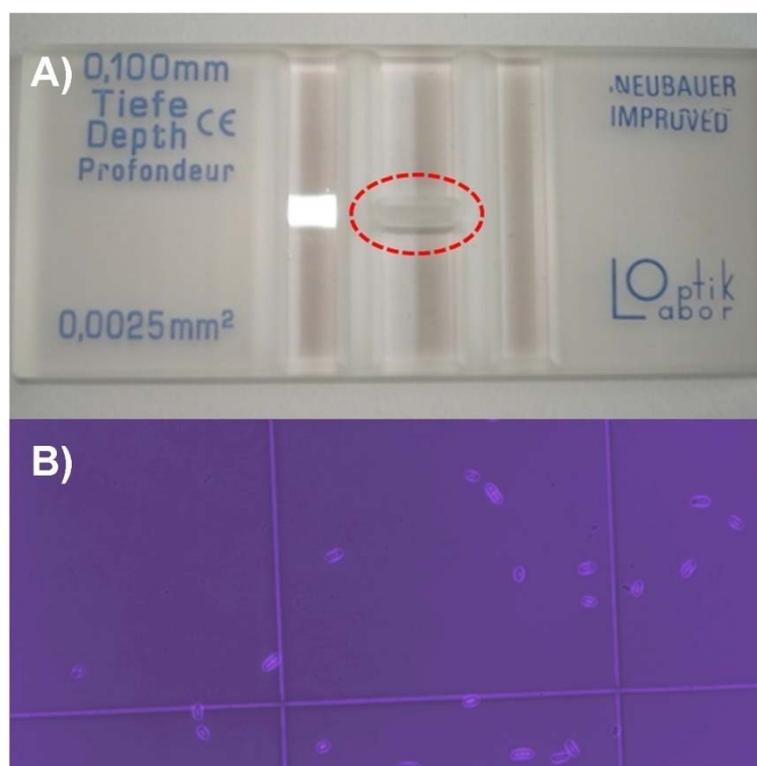


FIGURA 147. A) Câmara de Neubauer, utilizada para a contagem dos esporos. A área marcada corresponde ao local onde a leitura dos esporos é feita; B) Esporos de *Fusarium*.

Entretanto, quando a solução de esporos foi inoculada nas plântulas de *Arabidopsis*, inevitavelmente os esporos entraram em contato com o meio de cultura. Desta forma, o fungo novamente cresceu de maneira rápida, impossibilitando, em poucos dias, que as plântulas tivessem acesso aos nutrientes do meio e, assim, fornecendo resultados pouco confiáveis no que diz respeito à patogenia dos fungos. A FIGURA 148 ilustra o que foi discutido acima.

Assim sendo, pouco pode ser dito sobre os experimentos realizados em termos de ação patogênica dos fungos. Visando solucionar este problema, o meio de cultivo das plantas foi modificado para o próprio solo ao invés dos meios de cultura artificiais. Em princípio, isso dificultaria o completo domínio do meio pelo fungo e possibilitaria um crescimento uniforme das plantas. Além disso, este modelo seria muito mais próximo do encontrado no meio ambiente e poderia nos fornecer informações muito interessantes.

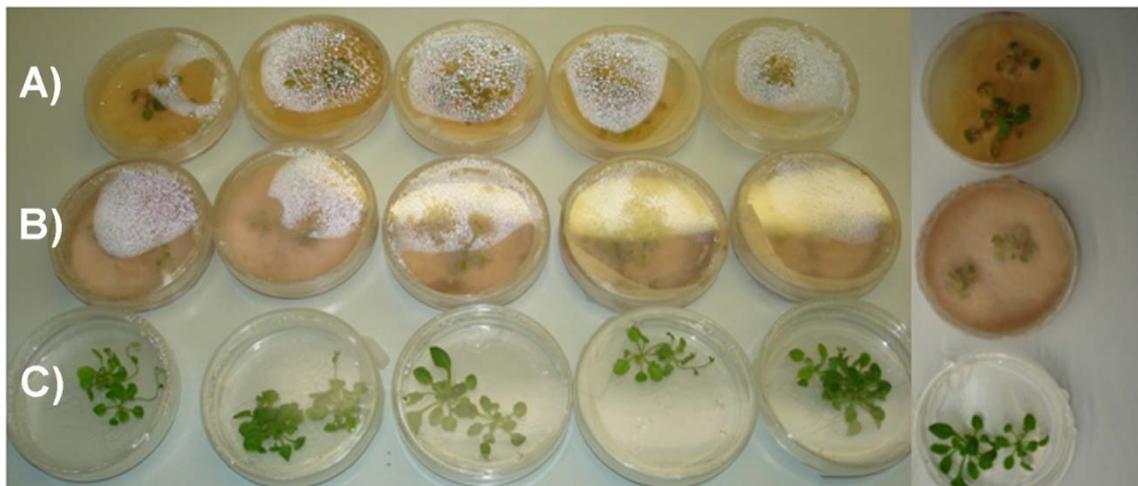


FIGURA 148. Experimentos em quintuplicata envolvendo a inoculação dos fungos de interesse em *Arabidopsis*; A) *Fusarium moniliforme* (endofítico); B) *Fusarium graminearum* (patógeno); C) Controle.

Para isso, as sementes de *Arabidopsis thaliana* foram germinadas em condições assépticas em meio *MS* até que as plântulas possuem 5 dias de vida, como ilustrado na FIGURA 149. Então, estas plântulas foram transferidas para vasos contendo terra estéril acrescida de nutrientes. Visando o total controle deste experimento, foi utilizada uma câmara onde variáveis como intensidade luminosa, temperatura, foto-periodismo e umidade pudessem ser controladas.

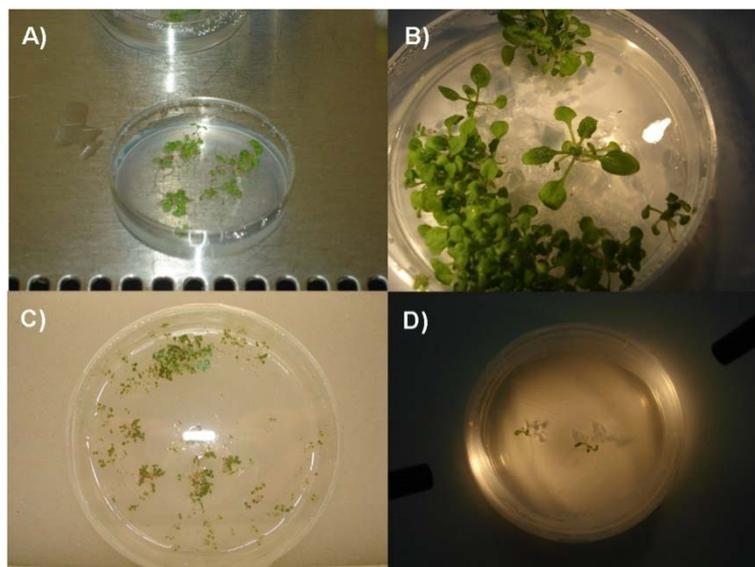


FIGURA 149. A) e B) Plântulas de *Arabidopsis thaliana* com 5 dias de germinação; C) e D) Com 3 dias.

Assim, após 5 dias crescendo em meio de cultura artificial *MS*, as plântulas foram cuidadosamente transferidas para os vasos e, após 4 semanas, estas plantas foram inoculadas com a solução de esporos dos fungos de interesse. Nas plantas controle (branco), foram injetadas a mesma quantidade (3 x 100 μ L) de uma solução de água estéril. A FIGURA 150, abaixo, mostra as plantas no dia de sua transferência e após 3 semanas, no meio do seu crescimento. Pode-se notar que as condições utilizadas proporcionaram um crescimento bastante satisfatório das plântulas, indicando, assim, que estas condições poderiam ser utilizadas para a realização do experimento.

O ajuste destas condições é fundamental para evitar falsos resultados positivo, pois as plantas do gênero *Arabidopsis* respondem facilmente a qualquer tipo de estresse, seja de ordem ambiental, fisiológica ou infecciosa. O principal efeito é a florescência, que indica que algum dos parâmetros de cultivo, como temperatura ou intensidade luminosa, não está regulado.



FIGURA 150. Plântulas de *Arabidopsis thaliana* utilizada nos experimentos.

Após realizada a inoculação dos fungos, as plântulas foram monitoradas por 1 semana, diariamente. Por volta do terceiro dia, os primeiros efeitos começaram a ser registrados e, no sétimo dia, as folhas que sofreram a inoculação fúngica apresentaram evidentes sinais de clorose (FIGURA 151).

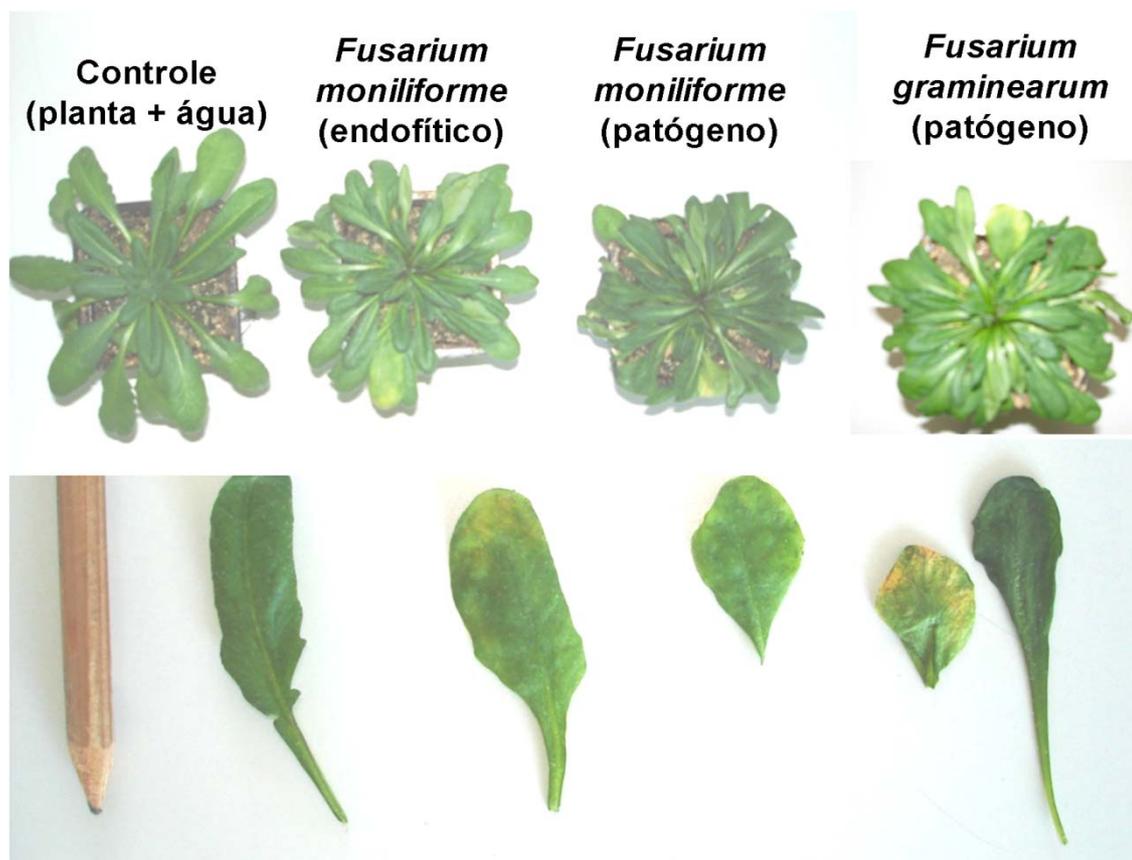


FIGURA 151. Acima, plantas com sintoma de patogenia inoculada com os fungos de interesse; abaixo, comparação entre as folhas individuais dos experimentos.

É interessante notar que as folhas de *Arabidopsis* inoculadas apenas com água estéril não mostraram nenhum sinal de patogenia, confirmando a eficácia do método proposto. Além disso, todos os fungos inoculados, inclusive o *Fusarium moniliforme* isolado como endofítico mutualista, induziram claramente efeitos de patogenia nas folhas de *Arabidopsis*. Uma comparação direta com o *F. graminearum* isolado como epifítico patogênico e com uma cepa de *F. moniliforme* isolada também como epifítico patogênico, mostra que o fungo isolado como endofítico mutualista provoca exatamente o mesmo efeito de patogenia do que os demais. O fungo *F. moniliforme* isolado como patógeno não foi utilizado nos experimentos anteriores pois houve uma grande dificuldade em fazê-lo produzir esporos. Felizmente, tal dificuldade foi contornada dias antes da inoculação neste experimento.

Este experimento reforçou a hipótese levantada anteriormente: os resultados aqui descritos apontam na direção de que um fungo, isolado como endofítico de um determinado hospedeiro aparentemente saudável e, portanto, não atuando como patógeno naquele momento, pode vir a induzir efeitos de patogenia quando reinoculado em plantas consideradas modelo para este tipo de estudo (no caso *Arabidopsis thaliana*).

Mais uma vez, para que seja confirmada tal hipótese, é necessário um estudo mais aprofundado envolvendo os mecanismos de defesa da planta, química em nível macromolecular e genética. Entretanto, aqui o enfoque tenta relacionar o caráter da interação fungo-planta e, em alguns casos, fungo-planta-inseto em nível micromolecular, baseando-se principalmente na produção de toxinas. Tentou-se, ao longo deste projeto e em trabalhos correlatos, contribuir para a compreensão do tipo de relação ecológica do ponto de vista micromolecular.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos com os extratos do fungo *Fusarium moniliforme*, isolado como endofítico de *Melia azedarach* (Meliaceae), não revelaram nem a presença das toxinas fúngicas clássicas nem de possíveis novos análogos. Realizando-se um estudo comparativo com outra cepa desta mesma espécie de fungo, isolada como patógeno de trigo, foi possível o isolamento de algumas toxinas da classe das zearalenonas e dos tricotecenos. A comparação com um terceiro fungo, *Fusarium graminearum*, isolado também como patógeno de trigo, revelou uma grande similaridade com respeito às toxinas fúngicas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* isolados como patógenos.

Tal resultado levou à formulação de duas hipóteses nas quais a produção de zearalenona, uma das toxinas isoladas de *Fusarium moniliforme* patogênico, seria inibida. O desenvolvimento de um método de análises por HPLC-MS/MS permitiu confiabilidade na obtenção dos resultados da construção de curvas de produção deste composto. Tais curvas foram de encontro com as hipóteses levantadas. Entretanto, foi observado que não houve uma completa inibição da produção de zearalenona por parte do fungo *Fusarium moniliforme* isolado como endofítico. Havia ainda uma pequena produção deste composto.

Estes resultados foram obtidos após um sólido estudo dos mecanismos de fragmentação da zearalenona e de outros dois análogos, o β -zearalenol e a 4-metoxizearalenona. Neste estudo, estratégias envolvendo deuteração dos compostos em posições chave destas moléculas foram realizadas. Análises envolvendo dinâmica molecular (software HyperchemTM) suportaram os dados experimentais obtidos possibilitando, assim, uma ferramenta robusta para a identificação dos mecanismos de fragmentação destas moléculas por CID-MS/MS.

Os resultados obtidos com os testes biológicos desenvolvidos sugerem que as toxinas da classe das zearalenonas e dos tricotecenos (especialmente o deoxinivalenol) podem exercer um papel importante na relação inseto-planta-fungo, uma vez que em linhas gerais elas são bem mais tóxicas à

lagartas *Spodoptera littoralis* do que às plantas modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta talvez seria uma explicação para a baixa produção de zearalenona por parte do fungo *Fusarium moniliforme* isolado como endofítico se comparado com o *Fusarium moniliforme* isolado como patógeno. O fungo endofítico, numa tentativa de viver harmonicamente com seu hospedeiro (a planta), tem o metabolismo de suas toxinas diminuído, pois elas podem atuar como fitotoxinas, causando uma resposta negativa na planta.

Entretanto, a produção destas toxinas, no caso a zearalenona, não é interrompida totalmente. Apenas é diminuída drasticamente, chegando a níveis que não são tóxicos à planta, mas que causam efeitos letais à alguns herbívoros, como a lagarta *S. Littoralis*. Assim, o fungo estaria, através da biossíntese de algumas toxinas, fornecendo um mecanismo de proteção ao seu hospedeiro contra o ataque de algumas pragas.

Embora a hipótese levantada acima forneça uma explicação plausível para o perfil da produção de toxinas observado neste presente trabalho, isso não significa que o fungo endofítico manterá estes níveis de produção ao longo de todo o seu ciclo de vida. Os resultados envolvendo a reinoculação do fungo endofítico em plantas do gênero *Arabidopsis* sugerem que é possível que este fungo venha a atuar, durante um determinado período, como um patógeno.

Assim, o refinado mecanismo que regula estas interações é bastante complexo e deve ser estudado também em nível macromolecular, genético e evolutivo. A contribuição do projeto em questão foi a de fornecer ferramentas para o estudo das micromoléculas produzidas nesta interação, numa tentativa de se atribuir algum papel ecológico para as mesmas.

O estudo com cepas isoladas como patógenos de *Alternaria alternata* possibilitou o desenvolvimento de um método de análises para a quantificação de alternariol e alternariol monometil éter no flavedo e no albedo de tangerinas com sintomas da patologia Mancha Marrom de Alternária. Tal método revelou que o flavedo, parte amarela externa, funciona como uma barreira para a penetração destas substâncias nos frutos de tangerina. Além disso, este método

também nos proporcionou a construção de curvas de produção destas substâncias, sugerindo que ambas competem pelo mesmo precursor na biossíntese destes compostos.

Ainda, a investigação dos extratos de *Alternaria* possibilitou a detecção e identificação de ao menos 2 análogos de alternariols que, ao que tudo indica, ainda não foram reportados na literatura. O uso da técnica de HPLC-UV-SPE-NMR possibilitou uma ferramenta altamente poderosa para a separação e caracterização de compostos de origem fúngica em matrizes complexas. Com ela, foi possível a total separação e caracterização de 6 metabólitos de *Alternaria*.

Os testes biológicos realizados com estes metabólitos reforçaram a suspeita de que os alternariols atuam como fortes agentes citotóxicos, além de serem muito tóxicos também às lagartas *S. littoralis*. Esta toxicidade aparentemente está intimamente relacionada com a presença do anel A nestes compostos. Entretanto, estas substâncias aparentemente não exercem um papel ecológico na relação inseto-plantas-fungo, podendo ser consideradas como toxinas não específicas.

6. BIBLIOGRAFIA CITADA

1. Häeckel, E., *Generelle Morphologie der Organismen*. Gruyter: Berlin, **1866**.
2. Häeckel, E., Plankton studien. *Jena Zeitschrift fur Naturwissenschaft* **1891**, 25, 232-236.
3. Atlas, R. M.; Bartha, R., *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4th ed.; Addison Wesley Longman: Menlo Park, CA, **1998**; p 694.
4. Hodgson, J., Private biotech 2004: the numbers. *Nat Biotech* **2006**, 24, (6), 635-641.
5. Salleh, A. Journalism at Risk: Factor Influencing Journalism Coverage of the GM Food and Crops. University of Wollongong, Wollongong, **2004**.
6. Smith, J. E., *Biotechnology*. 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, **1997**.
7. Turner, W., *Fungal Metabolites*. Academic Press: New York, **1971**.
8. Mayer, A. M., Plant-fungal interactions: A plant physiologist's viewpoint. *Phytochemistry* **1989**, 28, (2), 311-317.
9. Agrios, G. N., *Plant Pathology*. 3rd ed.; Academic Press: New York, **1989**.
10. Trabulsi, L. R., *Microbiologia*. 2a ed.; Atheneu: São Paulo, **1998**.
11. Carroll, G., Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology* **1988**, 69, (1), 2-9.
12. Bennett, J. W.; Klich, M., Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, 16, (3), 497-516.
13. Holliday, P. A., *Dictionary of Plant Pathology*. Cambridge University Press: Cambridge, **1989**.
14. Pelczar, M. J.; Shan, E. C. S.; Crieg, N. R., *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. Makron Books: New York, **1981**; Vol. 2.
15. USDA, Grain Fungal Diseases & Micotoxins Reference. In Agriculture, USDA, Ed. **2006**.
16. Paterson, R. R. M., Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research* **2006**, 110, (9), 1003-1010.
17. Hicks, J. K.; Yu, J.-H.; Keller, N. P.; Adams, T. H., Aspergillus sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA Galpha protein-dependent signaling pathway. *Embo J.* **1997**, 16, (16), 4916-4923.
18. AOAC http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/criteria.pdf (12 de Janeiro de 2008),
19. Sweeney, M. J.; Dobson, A. D. W., Review: Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, 43, (3), 141-158.
20. Rodrigues-Fo, E.; Mirocha, C. J.; Xie, W.; Krick, T. P.; Martinelli, J. A., Electron ionization mass spectral fragmentation of deoxynivalenol and related tricothecenes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, (19), 1827-1835.
21. Seo, J. A.; Kim, J. C.; Lee, Y. W., Isolation and characterization of two new type C fumonisins produced by Fusarium oxysporum. *J Nat Prod* **1996**, 59, (11), 1003-5.
22. Sorensen, L. K.; Elbaek, T. H., Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, 820, (2), 183-196.
23. Marin, S.; Velluti, A.; Ramos, A. J.; Sanchis, V., Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by Fusarium graminearum in non-sterilized maize grain. *Food Microbiol.* **2004**, 21, (3), 313-318.

24. Park, J. W.; Choi, S.-Y.; Hwang, H.-J.; Kim, Y.-B., Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, 103, (3), 305-314.
25. Abramson, D.; Hulasare, R.; York, R. K.; White, N. D. G.; Jayas, D. S., Mycotoxins, ergosterol, and odor volatiles in durum wheat during granary storage at 16% and 20% moisture content. *J. Stored Prod. Res.* **2005**, 41, (1), 67-76.
26. Bittencourt, A. B. F.; Oliveira, C. A. F.; Dilkin, P.; Correa, B., Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil. *Food Control* **2004**, 16, (2), 117-120.
27. Caldas, E. D.; Silva, A. C. S., Mycotoxins in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assessment for Fumonisin. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, (19), 7974-7980.
28. Rosa, C. A. R.; Cavaglieri, L. R.; Ribeiro, J. M. M.; Keller, K. M.; Alonso, V. A.; Chiacchiera, S. M.; Dalcero, A. M.; Lopes, C. W. G., Mycobiota and naturally-occurring ochratoxin A in dairy cattle feed from Rio de Janeiro State, Brazil. *World Mycotoxin J.* **2008**, 1, (2), 195-201.
29. Fente, C. A.; Jaimez, J.; Vazquez, B. I.; Franco, C. M.; Cepeda, A., Determination of alternariol in tomato paste using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst (Cambridge, U. K.)* **1998**, 123, (11), 2277-2280.
30. Rademacher, W.; Companys, V.; Speakman, J.-B.; Herrmann, H.; Strobel, D.; Semar, M. Use of growth regulators for controlling contamination of plants and plant products by toxins from trichothecene-producing molds. 2006-EP643672007009988, 20060718., **2007**.
31. Abbas, H. K.; Bosch, U., Evaluation of trichothecene and nontrichothecene mycotoxins produced by *Fusarium* in soybeans. *Mycotoxin Res.* **1990**, 6, (1), 13-20.
32. Baumgardt, M.; Grudzinska-Sterno, M.; Djurle, A.; Yuen, J.; Stenlid, J., Mycotoxin producing *Fusarium* species in oats during the growing season. *Cereal Res. Commun.* **2008**, 36, (Suppl. B), 473-475.
33. Goebel, R.; Lusky, K., Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **2004**, 87, (2), 411-416.
34. Kosiak, B.; Torp, M.; Skjerve, E.; Andersen, B., *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality--a matched pair sample study. *Int J Food Microbiol* **2004**, 93, (1), 51-62.
35. Lee, U. S.; Lee, M. Y.; Park, W. Y.; Ueno, Y., Decontamination of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone, in barley by the polishing process. *Mycotoxin Res.* **1992**, 8, (1), 31-6.
36. Mateo, J. J.; Mateo, R.; Jimenez, M., Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *Int J Food Microbiol* **2002**, 72, (1-2), 115-23.
37. Sydenham, E. W.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O., Occurrence and chemical determination of zearalenone and alternariol monomethyl ether in sorghum-based mixed feeds associated with an outbreak of suspected hyperestrogenism in swine. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36, (3), 621-5.
38. Chelkowski, J., *Topics in Secondary Metabolism 2: Fusarium Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier: Amsterdam, **1989**.
39. Turner, W., *Fungal Metabolites*. Academic Press: New York, **1983**; Vol. 2.
40. Mirocha, C. J.; Pathre, S. V., Zearalenone and Related Compounds. In *Advances in Chemistry Series Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*, Rodricks, J. V., Ed. Elsevier: Amsterdam, **1976**.
41. Lindsay, D. G., Zearanol--a 'nature-identical' oestrogen? *Food Chem Toxicol* **1985**, 23, (8), 767-74.
42. De Saeger, S.; Sibanda, L.; Van Peteghem, C., Analysis of zearalenone and alpha -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 487, (2), 137-143.

43. Krska, R.; Josephs, R., The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2001**, 369, (6), 469-476.
44. van Bennekom, E. O.; Brouwer, L.; Laurant, E. H. M.; Hooijerink, H.; Nielen, M. W. F., Confirmatory analysis method for zearanol, its metabolites and related mycotoxins in urine by liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 473, (1-2), 151-160.
45. Kuiper-Goodman, T.; Scott, P. M.; Watanabe, H., Risk Assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **1987**, 7, 253-306.
46. D'Mello, J. P. F.; MacDonald, A. M. C., Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology* **1997**, 69, 155-166.
47. Shier, W. T., Estrogenic mycotoxins. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)* **1998**, 149, (6), 599-604.
48. Shier, W. T.; Shier, A. C.; Xie, W.; Mirocha, C. J., Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol* **2001**, 39, (9), 1435-1438.
49. Rodricks, J. V.; Hesseltine, C. W.; Mehlman, M. A., *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox: Illinois, **1977**.
50. Dewick, P. M., *Medicinal Natural Products*. 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, **2004**.
51. Eriksen, G. S.; Pettersson, H., Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2004**, 114, (1-4), 205-239.
52. Soriano, J. M.; Dragacci, S., Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. *Food Res. Int.* **2004**, 37, (4), 367-374.
53. Rheeder, J. P.; Marasas, W. F. O.; Vismer, H. F., Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68, (5), 2101-2105.
54. Gelderblom, W. C.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W. F.; Thiel, P. G.; Horak, R. M.; Vlegaar, R.; Kriek, N. P., Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* **1988**, 54, (7), 1806-11.
55. Gelderblom, W. C. A.; Galendo, D.; Abel, S.; Swanevelder, S.; Marasas, W. F. O.; Wild, C. P., Cancer initiation by fumonisin B1 in rat liver - role of cell proliferation. *Cancer Lett. (Shannon, Irel.)* **2001**, 169, (2), 127-137.
56. Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O.; Lebepe-Mazur, S.; Swanevelder, S.; Abel, S., Cancer initiating properties of fumonisin B1 in a short-term rat liver carcinogenesis assay. *Toxicology* **2008**, 250, (2-3), 89-95.
57. Rumora, L.; Kovacic, S.; Rozgaj, R.; Cepelak, I.; Pepeljnjak, S.; Zanic Grubisic, T., Cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B1 on rabbit kidney RK13 cell line. *Arch Toxicol* **2002**, 76, (1), 55-61.
58. Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O.; Vlegaar, R.; Thiel, P. G.; Cawood, M. E., Fumonisin: isolation, chemical characterization and biological effects. *Mycopathologia* **1992**, 117, (1-2), 11-16.
59. IARC, Toxins derived from *Fusarium moniliforme*: fumonisin B1 and B2 and fusarin C. In International Agency for Research on Cancer: **1993**.
60. Robiglio, A. L.; Lopez, S. E., Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Red Delicious apples in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* **1995**, 24, (3), 413-17.
61. Wang, H.; Jones, C.; Ciacci-Zanella, J.; Holt, T.; Gilchrist, D. G.; Dickman, M. B., Fumonisin and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: Sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, 93, (8), 3461-5.
62. Morisseau, C.; Ward, B. L.; Gilchrist, D. G.; Hammock, B. D., Multiple epoxide hydrolases in *Alternaria alternata* f. sp. lycopersici and their relationship to medium composition and host-specific toxin production. *Appl Environ Microbiol* **1999**, 65, (6), 2388-95.

63. Nakashima, T.; Ueno, T.; Fukami, H.; Taga, T.; Masuda, H.; Osaki, K.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S., Isolation and structures of AK-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, (3), 807-15.
64. Nakatsuka, S.; Feng, B. N.; Goto, T.; Tsuge, T.; Nishimura, S., Biosynthesis of host-selective toxins produced by *Alternaria alternata* pathogens. Part 2. Biosynthetic origin of (8R,9S)-9,10-epoxy-8-hydroxy-9-methyldeca-(2E,4Z,6E)-trienoic acid, a precursor of AK-toxins produced by *Alternaria alternata*. *Phytochemistry* **1990**, 29, (5), 1529-31.
65. Okada, M.; Miyagawa, H.; Ueno, T., Synthesis of the methyl ester of tritium-labeled AK-toxin I, a host-specific toxin produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1999**, 63, (7), 1253-1260.
66. Otani, H.; Kohmoto, K.; Kodama, M., *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Can. J. Bot.* **1995**, 73, (Suppl. 1, Sect. A-D, Fifth International Mycological Congress, Sect. A-D, 1994), S453-S458.
67. Pinot, F.; Caldas, E. D.; Schmidt, C.; Gilchrist, D. G.; Jones, A. D.; Winter, C. K.; Hammock, B. D., Characterization of epoxide hydrolase activity in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Possible involvement in toxin production. Epoxide hydrolase in *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Mycopathologia* **1997**, 140, (1), 51-58.
68. Ruswandi, S.; Kitani, K.; Akimitsu, K.; Tsuge, T.; Shiraishi, T.; Yamamoto, M., Structural analysis of cosmid clone pcAFT-2 carrying AFT10-1 encoding an acyl-CoA dehydrogenase involved in AF-toxin production in the strawberry pathotype of *Alternaria alternata*. *J. Gen. Plant Pathol.* **2005**, 71, (2), 107-116.
69. Berg, T., How to establish international limits for mycotoxins in food and feed? *Food Control* **2003**, 14, (4), 219-224.
70. Kuiper-Goodman, T., Mycotoxins: risk assessment and legislation. *Toxicol. Lett.* **1995**, 82/83, (1-6), 853-9.
71. Shephard, G. S., Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Addit. Contam., Part A* **2008**, 25, (2), 146-151.
72. Seefelder, W.; Knecht, A.; Humpf, H.-F., Bound Fumonisin B1: analysis of fumonisin B1 glyco and amino acid conjugates by liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry. *Journal Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 5567-5573.
73. Stierle, A. C.; Cardellina, J. H., II; Strobel, G. A., Phytotoxins from *Alternaria alternata*, a pathogen of spotted knapweed. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, (1), 42-7.
74. Solfrizzo, M.; De Girolamo, A.; Vitti, C.; Tylkowska, K.; Grabarkiewicz-Szczesna, J.; Szopinska, D.; Dorna, H., Toxigenic profile of *Alternaria alternata* and *Alternaria radicina* occurring on umbelliferous plants. *Food Addit. Contam.* **2005**, 22, (4), 302-308.
75. Nedelnik, J.; Repkova, J., Phytotoxicity of some *Fusarium* toxins to red clover and alfalfa. *Cereal Res. Commun.* **1997**, 25, (3, Pt. 1), 507-509.
76. Mirocha, C. J.; Swanson, S. P., Regulation of perithecia production in *Fusarium roseum* by zearalenone. *J. Food Saf.* **1983**, 5, (1), 41-53.
77. Wakulinski, W., Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight). *Acta Physiol. Plant.* **1989**, 11, (4), 301-6.
78. Abbas, H. K.; Shier, W. T.; Seo, J. A.; Lee, Y. W.; Musser, S. M., Phytotoxicity and Cytotoxicity of the Fumonisin C and P Series of Mycotoxins from *Fusarium* spp. Fungi. *Toxicon* **1998**, 36, (12), 2033-2037.
79. Vesonder, R. F.; Wu, W.; Weisleder, D.; Gordon, S. H.; Krick, T.; Xie, W.; Abbas, H. K.; McAlpin, C. E., Toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolated from dairy cattle feed produce fumonisins, moniliformin and a new C21H38N2O6 metabolite phytotoxic to *Lemna minor* L. *J. Nat. Toxins* **2000**, 9, (2), 103-112.

80. Evans, N.; McRoberts, N.; Hill, R. A.; Marshall, G., Phytotoxin production by *Alternaria linicola* and phytoalexin production by the linseed host. *Ann. Appl. Biol.* **1996**, 129, (3), 415-431.
81. Abbas, H. K.; Vesonder, R. F.; Boyette, C. D.; Peterson, S. W., Phytotoxicity of AAL-toxin and other compounds produced by *Alternaria alternata* to jimson weed (*Datura stramonium*). *Can. J. Bot.* **1993**, 71, (1), 155-60.
82. Anklam, E.; Stroka, J.; Boenke, A., Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control* **2002**, 13, (3), 173-183.
83. FAO, Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. In Food and Agriculture Organization of the United Nations: New York, **2003**.
84. MAPA, Diretrizes Gerais do Plano Nacional de Segurança e Qualidade dos Produtos de Origem Vegetal. In Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Brasília, **2008**.
85. EU, Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. In *1881/2006*, Official Journal of the European Union: **2006**.
86. MCS Mycotoxins Certification Standard. <http://www.mycotoxin-certification.eu/index.php?ActiveTab=0> (10/11/2008),
87. FDA, An attempt to harmonize mycotoxin training programs worldwide. In Food and Drug Administration: Maryland, **2002**.
88. Cooney, J. M.; Hotter, G. S.; Lauren, D. R., Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one by cell suspension cultures of *Pinus radiata*. *Phytochemistry* **2000**, 53, (4), 447-450.
89. Jelen, H. H.; Wasowicz, E., Determination of trichothecenes in wheat grain without sample cleanup using comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2008**, 1215, (1-2), 203-207.
90. Krishnamurthy, T.; Sarver, E. W., Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. III. Synthesis, characterization and applications of pentafluoropropionyl and trifluoroacetyl esters of simple trichothecenes. *J Chromatogr* **1986**, 355, (1), 253-64.
91. Krishnamurthy, T.; Sarver, E. W.; Greene, S. L.; Jarvis, B. B., Mass spectral investigations on trichothecene mycotoxins. II. Detection and quantitation of macrocyclic trichothecenes by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Assoc Off Anal Chem* **1987**, 70, (1), 132-40.
92. Plattner, R. D.; Ross, P. F.; Reagor, J.; Stedelin, J.; Rice, L. G., Analysis of corn and cultured corn for fumonisin B1 by HPLC and GC/MS by four laboratories. *J Vet Diagn Invest* **1991**, 3, (4), 357-8.
93. Ryu, J. C.; Yang, J. S.; Song, Y. S.; Kwon, O. S.; Park, J.; Chang, I. M., Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvested in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Addit Contam* **1996**, 13, (3), 333-41.
94. Shephard, G. S., Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, (11), 2468-2477.
95. Mashogo Mlawule, R.; Rumbold, K.; De Mey, M.; Vandamme, E.; Soetaert, W.; Heijnen Joseph, J., Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol Lett* **2007**, 29, (1), 1-16.
96. Rittgen, J.; Puetz, M.; Pyell, U., Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. *Electrophoresis* **2008**, 29, (10), 2094-2100.
97. Faberi, A.; Foglia, P.; Pastorini, E.; Samperi, R.; Lagana, A., Determination of type B fumonisin mycotoxins in maize and maize-based products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using a QqQ-linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, (2), 275-282.

98. Mol, H. G. J.; Plaza-Bolanos, P.; Zomer, P.; de Rijk, T. C.; Stolker, A. A. M.; Mulder, P. P. J., Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2008**, 80, (24), 9450-9459.
99. Plattner, R. D., Detection of fumonisins produced in *Fusarium moniliforme* cultures by HPLC with electrospray MS and evaporative light scattering detectors. *Nat Toxins* **1995**, 3, (4), 294-8; discussion 317.
100. Plattner, R. D., HPLC/MS analysis of fusarium mycotoxins, fumonisins and deoxynivalenol. *Nat Toxins* **1999**, 7, (6), 365-70.
101. Rosenberg, E.; Krska, R.; Wissiack, R.; Kmetov, V.; Josephs, R.; Razzazi, E.; Grasserbauer, M., High-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *J Chromatogr A* **1998**, 819, (1-2), 277-88.
102. Senyuva, H.; Gilbert, J.; Ozcan, S.; Gurel, N., Rapid LC and LC/MS for routine analysis of mycotoxins in foods. *World Mycotoxin J.* **2008**, 1, (3), 229-235.
103. Songsermsakul, P.; Razzazi-Fazeli, E., A Review of Recent Trends in Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of Mycotoxins. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, 31, (11 & 12), 1641-1686.
104. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **1985**, 57, (3), 675-9.
105. Yamashita, M.; Fenn, J. B., Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, (20), 4671-5.
106. Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, (20), 4451-9.
107. Micromass, Quattro LC User's Guide. In Micromass / Waters: Manchester - UK.
108. Leitner, A.; Emmert, J.; Boerner, K.; Lindner, W., Influence of solvent additive composition on chromatographic separation and sodium adduct formation of peptides in HPLC-ESI MS. *Chromatographia* **2007**, 65, (11/12), 649-653.
109. Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P., Electrospray ionization mass spectrometry: chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. *Quim. Nova* **2006**, 29, (2), 287-292.
110. De la Mora, J. F.; Van Berkel, G. J.; Enke, C. G.; Cole, R. B.; Martinez-Sanchez, M.; Fenn, J. B., Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, (8), 939-952.
111. Gamero-Castano, M.; Fernandez de la Mora, J., Kinetics of small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrosprays. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, (7), 790-803.
112. Gaskell, S. J., Electrospray: principles and practice. *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, (7), 677-688.
113. Kebarle, P., A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, (7), 804-817.
114. Tang, L.; Kebarle, P., Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Anal. Chem.* **1993**, 65, (24), 3654-3668.
115. Nixdorf, A., Innovative interfaces for liquid chromatography/mass spectrometer coupling. *LaborPraxis* **1999**, 23, (2), 16-18.
116. Tsuchiya, M., Development, principle and application of liquid ionization mass spectrometry. *Anal. Sci.* **1998**, 14, (4), 661-676.

117. Raffaelli, A.; Saba, A., Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2003**, 22, (5), 318-31.
118. Robb Damon, B.; Blades Michael, W., State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal Chim Acta* **2008**, 627, (1), 34-49.
119. Cooks, R. G.; Ouyang, Z.; Takats, Z.; Wiseman, J. M., Ambient Mass Spectrometry. *Science (Washington, DC, U. S.)* **2006**, 311, (5767), 1566-1570.
120. Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Cooks, R. G., Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom.* **2005**, 40, (10), 1261-1275.
121. Yost, R. A.; Boyd, R. K., Tandem mass spectrometry: quadrupole and hybrid instruments. *Methods Enzymol* **1990**, 193, 154-200.
122. Creaser, C. S.; Stygall, J. W., Recent developments in analytical ion trap mass spectrometry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1998**, 17, (10), 583-593.
123. March, R. E., An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, (4), 351-369.
124. Schwartz, J. C.; Jardine, I., Quadrupole ion trap mass spectrometry. *Methods Enzymol* **1996**, 270, 552-86.
125. Wong, P. S. H.; Cooks, R. G., Ion trap mass spectrometry. *Curr. Sep.* **1997**, 16, (3), 85-92.
126. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S., *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*. Harcourt Brace College Publishers: New York, **1996**.
127. Shukla, A. K.; Futrell, J. H., Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, (9), 1069-1090.
128. Yost, R. A.; Enke, C. G., Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, (7), 2274-2275.
129. Palmer, M. E.; Tetter, L. W.; Wilson, I. D., Hydrogen/deuterium exchange using a coaxial sheath-flow interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, (9), 808-817.
130. Ustyuzhanin, P.; Ustyuzhanin, J.; Lifshitz, C., An electrospray ionization-flow tube study of H/D exchange in protonated serine. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 223-224, (1-3), 491-498.
131. Takats, Z.; Schlosser, G.; Vekey, K., Hydrogen/deuterium exchange of electrosprayed ions in the atmospheric interface of a commercial triple-quadrupole mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, 228, (2-3), 729-741.
132. Carey, F. A.; Sundberg, R. J., *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms*. 3rd edition ed.; Plenum Press: New York, **1990**; p 802.
133. Chen, G.; Khusid, A.; Daaro, I.; Irish, P.; Pramanik, B. N., Structural identification of trace level enol tautomer impurity by on-line hydrogen/deuterium exchange HR-LC/MS in a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42, (7), 967-970.
134. Werstiuk, N. H.; Banerjee, S., On the mechanisms of acid-catalyzed enolization and hydrogen isotope exchange of cyclic ketones. *Can. J. Chem.* **1977**, 55, (1), 173-6.
135. Vessecchi, R.; Galembeck, S. E.; Lopes, N. P.; Nascimento, P. G. B. D.; Crotti, A. E. M., Application of computational quantum chemistry to chemical processes involved in mass spectrometry. *Quim. Nova* **2008**, 31, (4), 840-853.
136. Cavaliere, C.; Foglia, P.; Guarino, C.; Motto, M.; Nazzari, M.; Samperi, R.; Lagana, A.; Berardo, N., Mycotoxins produced by *Fusarium* genus in maize: determination by screening and confirmatory methods based on liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2007**, 105, (2), 700-710.

137. Nielsen Kristian, F.; Smedsgaard, J., Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A* **2003**, 1002, (1-2), 111-36.
138. Smedsgaard, J.; Nielsen, J., Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J. Exp. Bot.* **2005**, 56, (410), 273-286.
139. Jayawickrama, D. A.; Wolters, A. M.; Sweedler, J. V., Mobile phase compensation to improve NMR spectral properties during solvent gradients. *Analyst (Cambridge, U. K.)* **2003**, 128, (5), 421-426.
140. Spraul, M.; Freund, A. S.; Nast, R. E.; Withers, R. S.; Maas, W. E.; Corcoran, O., Advancing NMR sensitivity for LC-NMR-MS using a cryoflow probe: application to the analysis of acetaminophen metabolites in urine. *Anal Chem* **2003**, 75, (6), 1536-41.
141. Schefer, A. B. Separação e identificação de substâncias em misturas através de técnicas de acoplamento CLAE-RMN. UFSCar, São Carlos, SP, **2007**.
142. Albert, K.; Braumann, U.; Tseng, L.-H.; Schlotterbeck, G., Online coupling of capillary HPLC with ¹H NMR spectroscopy. *Biomed. Chromatogr.* **1998**, 12, (3), 158-159.
143. Bringmann, G.; Guenther, C.; Schlauer, J.; Rueckert, M., HPLC-NMR Online Coupling Including the ROESY Technique: Direct Characterization of Naphthylisoquinoline Alkaloids in Crude Plant Extracts. *Anal. Chem.* **1998**, 70, (14), 2805-2811.
144. Griffiths, L., Optimization of NMR and HPLC Conditions for LC-NMR. *Anal. Chem.* **1995**, 67, (22), 4091-5.
145. Seddon, M. J.; Spraul, M.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Improvement in the characterization of minor drug metabolites from HPLC-NMR studies through the use of quantified maximum entropy processing of NMR spectra. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, 12, (3), 419-24.
146. Sidelmann, U. G.; Gavaghan, C.; Carless, H. A. J.; Farrant, R. D.; Lindon, J. C.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K., Identification of the Positional Isomers of 2-Fluorobenzoic acid 1-O-Acyl Glucuronide by Directly Coupled HPLC-NMR. *Anal. Chem.* **1995**, 67, (19), 3401-4.
147. Spraul, M.; Hofmann, M.; Wilson, I. D.; Lenz, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C., Coupling of HPLC with fluorine-19 and proton NMR spectroscopy to investigate the human urinary excretion of flurbiprofen metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, 11, (10), 1009-15.
148. Jaroszewski, J. W., Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: Direct hyphenation. *Planta Med.* **2005**, 71, (8), 691-700.
149. Wann, M.-H., Application of LC-NMR in pharmaceutical analysis. *Sep. Sci. Technol. (San Diego, CA, U. S.)* **2005**, 6, (Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC), 569-579.
150. Landin, P.; Llompert, M.; Lourido, M.; Garcia-Jares, C.; Carro, N.; Cela, R., Rapid determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in water samples by using solid-phase microextraction followed by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, (1), 44-49.
151. Wu, L.; Tao, W. A.; Cooks, R. G., Kinetic method for the simultaneous chiral analysis of different amino acids in mixtures. *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, (4), 386-393.
152. Albert, K., LC-NMR: theory and experiment. *On-Line LC-NMR Relat. Tech.* **2002**, 1-22.
153. Albert, K., Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr., A* **1999**, 856, (1 + 2), 199-211.
154. Jayawickrama, D. A.; Sweedler, J. V., Hyphenation of capillary separations with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr., A* **2003**, 1000, (1-2), 819-840.
155. Pusecker, K.; Schewitz, J.; Gfroerer, P.; Tseng, L.-H.; Albert, K.; Bayer, E., Online Coupling of Capillary Electrochromatography, Capillary Electrophoresis, and Capillary HPLC with Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Anal. Chem.* **1998**, 70, (15), 3280-3285.

156. Jaroszewski, J. W., Hyphenated NMR methods in natural products research, part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. *Planta Med.* **2005**, 71, (9), 795-802.
157. Schneider, B., Nuclear magnetic resonance spectroscopy in biosynthetic studies. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, 51, (3), 155-198.
158. Exarchou, V.; Krucker, M.; van Beek, T. A.; Vervoort, J.; Gerothanassis, I. P.; Albert, K., LC-NMR coupling technology: Recent advancements and applications in natural products analysis. *Magn. Reson. Chem.* **2005**, 43, (9), 681-687.
159. Wilson, S. R.; Maleroed, H.; Petersen, D.; Simic, N.; Bobu, M.-M.; Rise, F.; Lundanes, E.; Greibrokk, T., Controlling LC-SPE-NMR systems. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, (4), 582-589.
160. Wilson, S. R.; Maleroed, H.; Petersen, D.; Rise, F.; Lundanes, E.; Greibrokk, T., An alternative multiple-trapping LC-SPE-NMR system. *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, (3), 322-328.
161. Ceccarelli, S. M.; Schlotterbeck, G.; Boissin, P.; Binder, M.; Buettelmann, B.; Hanlon, S.; Jaeschke, G.; Kolczewski, S.; Kupfer, E.; Peters, J.-U.; Porter, R. H. P.; Prinssen, E. P.; Rueher, M.; Ruf, I.; Spooren, W.; Stampfli, A.; Vieira, E., Metabolite identification via LC-SPE-NMR-MS of the in vitro biooxidation products of a lead mGlu5 allosteric antagonist and impact on the improvement of metabolic stability in the series. *ChemMedChem* **2008**, 3, (1), 136-144.
162. Swartz, M. E.; Krull, I. S., *Analytical Method Development and Validation*. Marcel Dekker Inc.: New York, **1997**.
163. Keith, L. H.; Crummett, W.; Deegan, J., Jr.; Libby, R. A.; Taylor, J. K.; Wentler, G., Principles of environmental analysis. *Anal. Chem.* **1983**, 55, (14), 2210-18.
164. Cass, Q. B.; Degani, A. L. G., *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. EDUFSCar: São Carlos, **2001**.
165. MacDougall, D.; Crummett, W. B.; et al., Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* **1980**, 52, (14), 2242-9.
166. Santos, R. M. G. d. Metabolismo Secundário de fungos endofíticos associados a *Melia azedarach* (Meliaceae). UFSCar, São Carlos, **2003**.
167. Desjardins, A. E.; Manandhar, G.; Plattner, R. D.; Maragos, C. M.; Shrestha, K.; McCormick, S. P., Occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, (4), 1377-83.
168. Berger, U.; Oehme, M.; Kuhn, F., Quantitative determination and structure elucidation of type A- and B-trichothecenes by HPLC/ion trap multiple mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **1999**, 47, (10), 4240-5.
169. Murakami, Y.; Okuda, T.; Shindo, K., Roridin L, M and verrucarín M, new macrocyclic trichothecene group antitumor antibiotics, from *Myrothecium verrucaria*. *J Antibiot (Tokyo)* **2001**, 54, (11), 980-3.
170. Cawood, M. E.; Gelderblom, W. C. A.; Vleggaar, R.; Behrend, Y.; Thiel, P. G.; Marasas, W. F. O., Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, (11), 1958-62.
171. Sanchis, V.; Abadias, M.; Oncins, L.; Sala, N.; Vinas, I.; Canela, R., Fumonisin B1 and B2 and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. *Int. J. Food Microbiol.* **1995**, 27, (1), 37-44.
172. Lau Benjamin, P. Y.; Scott Peter, M.; Lewis David, A.; Kanhere Shrinivas, R.; Cleroux, C.; Roscoe Veronica, A., Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages. *J Chromatogr A* **2003**, 998, (1-2), 119-31.
173. El-Sharkawy, S. H.; Abul-Hajj, Y. J., Microbial transformation of zearalenone. 2. Reduction, hydroxylation, and methylation products. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, (3), 515-19.

174. Blackwell, B. A.; Greenhalgh, R.; Bain, A. D., Carbon-13 and proton nuclear magnetic resonance spectral assignments of deoxynivalenol and other mycotoxins from *Fusarium graminearum*. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, 32, (5), 1078-83.
175. Rodrigues Filho, E.; Xie, W.; Mirocha, C. J.; Hogge, L. R., Fragmentation of some zearalenones by fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, (14), 1515-1520.
176. Greenhalgh, R.; Blackwell, B. A.; Pare, J. R. J.; Miller, J. D.; Levandier, D.; Meier, R. M.; Taylor, A.; Apsimon, J. W., Isolation and characterization by mass spectrometry and NMR spectroscopy of secondary metabolites of some *Fusarium* species. *Bioact. Mol.* **1986**, 1, (Mycotoxins Phycotoxins), 137-52.
177. Vessecchi, R.; Nascimento, P. G. B. D.; Lopes, J. N. C.; Lopes, N. P., Fragmentation studies of synthetic 2-acylamino-1,4-naphthoquinones by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2006**, 41, (9), 1219-1225.
178. Simionato Ana, V. C.; de Souza Gezimar, D.; Rodrigues-Filho, E.; Glick, J.; Vouros, P.; Carrilho, E., Tandem mass spectrometry of coprogen and deferroxamine hydroxamic siderophores. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, 20, (2), 193-9.
179. Cardozo Karina, H. M.; Carvalho Valdemir, M.; Pinto, E.; Colepicolo, P., Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, 20, (2), 253-8.
180. Hagman, C.; Tsybin, Y. O.; Haakansson, P., Solution-phase deuterium/hydrogen exchange at a specific residue using nozzle-skimmer and electron capture dissociation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 20, (4), 661-665.
181. Herrmann Kristin, A.; Wysocki Vicki, H.; Vorpapel Erich, R., Computational investigation and hydrogen/deuterium exchange of the fixed charge derivative tris(2,4,6-trimethoxyphenyl) phosphonium: implications for the aspartic acid cleavage mechanism. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, 16, (7), 1067-80.
182. Tobler, S. A.; Sherman, N. E.; Fernandez, E. J., Tracking lysozyme unfolding during salt-induced precipitation with hydrogen exchange and mass spectrometry. *Biotechnol Bioeng* **2000**, 71, (3), 194-207.
183. Miles, C. O.; Erasmuson, A. F.; Wilkins, A. L.; Towers, N. R.; Smith, B. L.; Garthwaite, I.; Scahill, B. G.; Hansen, R. P., Ovine Metabolism of Zearalenone to β -Zearalanol (Zeranol). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, (10), 3244-3250.
184. Rozman, M.; Kazazic, S.; Klasinc, L.; Srzic, D., Kinetics of gas-phase hydrogen/deuterium exchange and gas-phase structure of protonated phenylalanine, proline, tyrosine and tryptophan. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, (24), 2769-2772.
185. Wiberg, K. B., The Deuterium Isotope Effect. *Chemical Reviews* **1955**, 55, (4), 713-743.
186. Westheimer, F. H., The Magnitude of the Primary Kinetic Isotope Effect for Compounds of Hydrogen and Deuterium. *Chemical Reviews* **1961**, 61, (3), 265-273.
187. Günther, H., Selected topics from recent NMR studies of organolithium compounds. *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, 10, 241-262.
188. Amegayibor, F. S.; Nash, J. J.; Lee, A. S.; Thoen, J.; Petzold, C. J.; Kenttaemaa, H. I., Chemical Properties of a para-Benzyne. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, (41), 12066-12067.
189. Hoke, S. H., II; Molstad, J.; Dilettato, D.; Jay, M. J.; Carlson, D.; Kahr, B.; Cooks, R. G., Reaction of fullerenes and benzyne. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, (19), 5069-71.
190. Durden, D. A., Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, 850, (1-2), 134-146.

191. Hou, S.; Zhu, J.; Ding, M.; Lv, G., Simultaneous determination of extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* **2008**, 76, (4), 798-802.
192. Song, M.; Hang, T.; Zhao, H.; Wang, L.; Ge, P.; Ma, P., Simultaneous determination of amiloride and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive/negative ion-switching electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, 21, (21), 3427-3434.
193. Wu, Z.; Gao, W.; Phelps, M. A.; Wu, D.; Miller, D. D.; Dalton, J. T., Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, 76, (3), 839-847.
194. Vanatta, L. E.; Coleman, D. E., Calibration, uncertainty, and recovery in the chromatographic sciences. *J. Chromatogr., A* **2007**, 1158, (1-2), 47-60.
195. ANVISA Resolução - RE 899: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. www.anvisa.gov.br (22 de Setembro de 2008),
196. Korytár, P.; Parera, J.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. T., Quadrupole mass spectrometer operating in the electron-capture negative ion mode as detector for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1067, (1-2), 255-264.
197. Almeida, A. M.; Castel-Branco, M. M.; Falcão, A. C., Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, 774, (2), 215-222.
198. Blackwell, B. A.; Miller, J. D.; Greenhalgh, R., ¹³C NMR study of the biosynthesis of toxins by *Fusarium graminearum*. *J Biol Chem* **1985**, 260, (7), 4243-7.
199. FUNDECITRUS www.fundecitrus.com.br (28 de dezembro de 2006),
200. Main, C. E.; Ero, R. W., Phytotoxins in the brown spot disease of tobacco caused by *Alternaria tenuis*. *Phytotoxins Plant Dis., Proc. NATO Advan. Study Inst.* **1972**, 427-9.
201. Peever, T. L.; Olsen, L.; Ibanez, A.; Timmer, L. W., Genetic Differentiation and Host Specificity Among Populations of *Alternaria* spp. Causing Brown Spot of Grapefruit and Tangerine x Grapefruit Hybrids in Florida. *Phytopathology* **2000**, 90, (4), 407-14.
202. Reis, R. F.; de Goes, A.; Mondal, S. N.; Shilts, T.; Brentu, F. C.; Timmer, L. W., Effect of lesion age, humidity, and fungicide application on sporulation of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of tangerine. *Plant Dis.* **2006**, 90, (8), 1051-1054.
203. Solel, Z.; Oren, Y.; Kimchi, M., Control of *Alternaria* brown spot of *Minneola tangelo* with fungicides. *Crop Prot.* **1997**, 16, (7), 659-664.
204. Timmer, L. W.; Solel, Z.; Gottwald, T. R.; Ibanez, A. M.; Zitko, S. E., Environmental Factors Affecting Production, Release, and Field Populations of Conidia of *Alternaria alternata*, the Cause of Brown Spot of Citrus. *Phytopathology* **1998**, 88, (11), 1218-23.
205. Magnani, R. F. Aspectos químicos envolvidos nas interações de *Citrus* com fungos fitopatogênicos. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, **2007**.
206. Gilbert, J.; Anklam, E., Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2002**, 21, (6+7), 468-486.
207. Scott, P. M., Analysis of agricultural commodities and foods for *Alternaria* mycotoxins. *J. AOAC Int.* **2001**, 84, (6), 1809-1817.
208. Mokbel, M. S.; Sukanuma, T., Antioxidant and antimicrobial activities of the methanol extracts from pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) fruit albedo tissues. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 224, (1), 39-47.
209. Nogata, Y.; Sakamoto, K.; Shiratsuchi, H.; Ishii, T.; Yano, M.; Ohta, H., Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2006**, 70, (1), 178-192.

210. Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mule, G.; Moretti, A.; Perrone, G., Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Eur. J. Plant Pathol.* **2003**, 109, (7), 645-667.
211. Magnani, R. F.; De Souza, G. D.; Rodrigues-Filho, E., Analysis of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether on Flavedo and Albedo Tissues of Tangerines (*Citrus reticulata*) with Symptoms of Alternaria Brown Spot. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, (13), 4980-4986.
212. Ostry, V., Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* **2008**, 1, (2), 175-188.
213. Lehmann, L.; Wagner, J.; Metzler, M., Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44, (3), 398-408.
214. Koch, K.; Podlech, J.; Pfeiffer, E.; Metzler, M., Total Synthesis of Alternariol. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, (8), 3275-3276.
215. Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Mueller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schaechtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R., Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, (6), 972-980.
216. Bradburn, N.; Coker, R. D.; Blunden, G.; Turner, C. H.; Crabb, T. A., 5'-epialtenuene and neoaltenuene, dibenzo-[alpha]-pyrones from *Alternaria alternata* cultured on rice. *Phytochemistry* **1994**, 35, (3), 665-669.
217. Andersen, B.; Kroger, E.; Roberts, R. G., Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycol. Res.* **2002**, 106, (2), 170-182.
218. Pero, R. W.; Posner, H.; Blois, M.; Harvan, D.; Spalding, J. W., Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria". *Environ Health Perspect* **1973**, 4, 87-94.
219. Dong, Z.; Liu, G.; Dong, Z.; Qian, Y.; An, Y.; Miao, J.; Zhen, Y., Induction of mutagenesis and transformation by the extract of *Alternaria alternata* isolated from grains in Linxian, China. *Carcinogenesis* **1987**, 8, (7), 989-991.
220. An, Y.; Zhao, T.; Miao, J.; Liu, G.; Zheng, Y.; Xu, Y.; Van Etten, R. L., Isolation, identification, and mutagenicity of alternariol monomethyl ether. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37, (5), 1341-1343.
221. Nakanishi, S.; Toki, S.; Saitoh, Y.; Tsukuda, E.; Kawahara, K.; Ando, K.; Matsuda, Y., Isolation of myosin light chain kinase inhibitors from microorganisms: dehydroaltenuenol, altenuenol, atroveteninone, and cyclooctasulfur. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1995**, 59, (7), 1333-5.
222. Ayer, W. A.; Racok, J. S., The metabolites of *Talaromyces flavus*. Part 1. Metabolites of the organic extracts. *Can. J. Chem.* **1990**, 68, (11), 2085-94.
223. Kimura, Y.; Yoshinari, T.; Koshino, H.; Fujioka, S.; Okada, K.; Shimada, A., Rubralactone, rubralides A, B and C, and rubramin produced by *Penicillium rubrum*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2007**, 71, (8), 1896-1901.
224. Naganuma, M.; Nishida, M.; Kuramochi, K.; Sugawara, F.; Yoshida, H.; Mizushima, Y., 1-Deoxyrubralactone, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, (6), 2939-2944.
225. Kuramata, M.; Fujioka, S.; Shimada, A.; Kawano, T.; Kimura, Y., Citrinolactones A, B and C, and sclerotinin C, plant growth regulators from *Penicillium citrinum*. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2007**, 71, (2), 499-503.
226. Pfeiffer, E.; Schebb, N. H.; Podlech, J.; Metzler, M., Novel oxidative in vitro metabolites of the mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, 51, (3), 307-316.
227. Ayer, W. A.; Racok, J. S., The metabolites of *Talaromyces flavus*. Part 2. Biological activity and biosynthetic studies. *Can. J. Chem.* **1990**, 68, (11), 2095-101.

228. Murashige, T.; Skoog, F., Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, 15, 473-97.
229. Charmley, L. L.; Trenholm, H. L.; Prelusky, D. B.; Rosenberg, A., Economic losses and decontamination. *Nat Toxins* **1995**, 3, (4), 199-203; discussion 221.
230. Smith, J. E.; Solomons, G.; Lewis, C.; Anderson, J. G., Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Nat Toxins* **1995**, 3, (4), 187-92; discussion 221.
231. Hohn, T. M.; McCormick, S. P.; Alexander, N. J.; Desjardins, A. E.; Proctor, R. H., Function and biosynthesis of trichothecenes produced by *Fusarium* species. *Dev. Plant Pathol.* **1998**, 13, (Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease), 17-24.
232. Scott, P. M., Trichothecenes in grains. *Cereal Foods World* **1990**, 35, (7), 661-6.
233. Zinedine, A.; Soriano, J. M.; Molto, J. C.; Manes, J., Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An estrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, 45, (1), 1-18.
234. Vurro, M.; Ellis, B. E., Effect of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Sci. (Shannon, Irel.)* **1997**, 126, (1), 29-38.
235. Vianello, A.; Macri, F., Zearalenone enhances alpha -amylase and alpha -glucosidase activity of germinating maize seeds. *Phytopathol. Mediterr.* **1982**, 21, (2), 86-8.
236. Plaza, S.; Tearall, K. L.; Zhao, F.-J.; Buchner, P.; McGrath, S. P.; Hawkesford, M. J., Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* **2007**, 58, (7), 1717-1728.
237. Hasenbrink, G.; Sievernich, A.; Wildt, L.; Ludwig, J.; Lichtenberg-Frate, H., Estrogenic effects of natural and synthetic compounds including tibolone assessed in *Saccharomyces cerevisiae* expressing the human estrogen alpha and beta receptors. *Faseb J.* **2006**, 20, (9), 1552-1554, 10.1096/fj.05-5413fje.
238. Bouizgarne, B.; El-Maarouf-Bouteau, H.; Frankart, C.; Rebutier, D.; Madiona, K.; Pennarun, A. M.; Monestiez, M.; Trouverie, J.; Amiar, Z.; Briand, J.; Brault, M.; Rona, J. P.; Ouhdouch, Y.; El Hadrami, I.; Bouteau, F., Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytol.* **2006**, 169, (1), 209-218.
239. Wang, H.; Ng, T. B., Pharmacological activities of fusaric acid (5-butylpicolinic acid). *Life Sci* **1999**, 65, (9), 849-56.
240. Nishiuchi, T.; Masuda, D.; Nakashita, H.; Ichimura, K.; Shinozaki, K.; Yoshida, S.; Kimura, M.; Yamaguchi, I.; Yamaguchi, K., *Fusarium* phytotoxin trichothecenes have an elicitor-like activity in *Arabidopsis thaliana*, but the activity differed significantly among their molecular species. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2006**, 19, (5), 512-520.
241. Desjardins Anne, E.; McCormick Susan, P.; Appell, M., Structure-activity relationships of trichothecene toxins in an *Arabidopsis thaliana* leaf assay. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, (16), 6487-92.
242. Masuda, D.; Ishida, M.; Yamaguchi, K.; Yamaguchi, I.; Kimura, M.; Nishiuchi, T., Phytotoxic effects of trichothecenes on the growth and morphology of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **2007**, 58, (7), 1617-1626.
243. Poppenberger, B.; Berthiller, F.; Lucyshyn, D.; Sieberer, T.; Schuhmacher, R.; Krska, R.; Kuchler, K.; Glossl, J.; Luschnig, C.; Adam, G., Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **2003**, 278, (48), 47905-14.
244. Zonno, M. C.; Vurro, M., Inhibition of germination of *Orobanche ramosa* seeds by *Fusarium* toxins. *Phytoparasitica* **2002**, 30, (5), 519-524.
245. May, H. D.; Wu, Q.; Blake, C. K., Effects of the *Fusarium* spp. mycotoxins fusaric acid and deoxynivalenol on the growth of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter ruminantium*. *Can J Microbiol* **2000**, 46, (8), 692-9.

246. Brugger, E.-M.; Wagner, J.; Schumacher David, M.; Koch, K.; Podlech, J.; Metzler, M.; Lehmann, L., Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* **2006**, 164, (3), 221-30.
247. Schrader, T. J.; Cherry, W.; Soper, K.; Langlois, I., Further examination of the effects of nitrosylation on *Alternaria alternata* mycotoxin mutagenicity in vitro. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2006**, 606, (1-2), 61-71.
248. Mehdi, F. S.; Dawar, S.; Sarwar, S., Mycotoxin production by *Alternaria alternata*. *Int. J. Biol. Biotechnol.* **2004**, 1, (1), 75-77.
249. Panigrahi, S.; Dallin, S., Toxicity of the *Alternaria* spp metabolites, tenuazonic acid, alternariol, altertoxin-I, and alternariol monomethyl ether to brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae. *J. Sci. Food Agric.* **1994**, 66, (4), 493-6.
250. Pero, R. W.; Main, C. E., Chlorosis of tobacco induced by alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria tenuis*. *Phytopathology* **1970**, 60, (11), 1570-3.
251. Visconti, A.; Sibilia, A.; Sabia, C., *Alternaria alternata* from oilseed rape: mycotoxin production, and toxicity to *Artemia salina* larvae and rape seedlings. *Mycotoxin Res.* **1992**, 8, (1), 9-16.
252. Rotter, B. A.; Prelusky, D. B.; Pestka, J. J., Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health* **1996**, 48, (1), 1-34.
253. Cespedes Carlos, L.; Salazar, J. R.; Martinez, M.; Aranda, E., Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry* **2005**, 66, (20), 2481-93.
254. Fornelli, F.; Minervini, F.; Logrieco, A., Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invertebr Pathol* **2004**, 85, (2), 74-9.
255. Robbana-Barnat, S.; Lafarge-Frayssinet, C.; Frayssinet, C., Use of cell cultures for predicting the biological effects of mycotoxins. *Cell Biology and Toxicology* **1989**, 5, (2), 217-226.
256. Koch, R., *Mitt Kaiser Gesundh* **2. 1884**; pp 1-88.
257. Evans, A. S., Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. *Yale J Biol Med* **1976**, 49, 175-195.

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](#)