

NATÁLIA NOGUEIRA SARAIVA

ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO ANTAGONISTA
Trichoderma harzianum

**Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Química, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a
obtenção do Grau de Mestre em Química.**

Área de concentração: Química Orgânica.

**Orientadora: Profa. Dra. Maria da
Conceição Ferreira de Oliveira.**

Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.

Natália Nogueira Saraiva
Natália Nogueira Saraiva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/02/2009

EXAMINADORES:

Ma da Conceição F. Oliveira
Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Otilia Deusdênia Lóiola Pessoa
Profa. Dra. Otilia Deusdênia Lóiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará – UFC

Maria Rose Jane R. Albuquerque
Profa. Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

À Minha família pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a oportunidade de viver e ser quem eu sou.

À minha Família que sempre esteve ao meu lado e acreditou em mim.

À Maria (Profa. Maria da Conceição) pela sábia orientação, pelas oportunidades e pela amizade incondicional.

À Profa. Maria Nenmaura pela utilização da infra-estrutura do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes (LAMPS) – UFC e co-orientação.

Ao João (Prof. Edson Rodrigues Filho) pela co-orientação e amizade durante a realização desse trabalho no Departamento de Química da UFSCar.

Aos colegas de laboratório da UFSCar Bianca, Luciana, Thaícia, Taís, Gezimar, Marília, Maria Luíza, Zé, Lívia, Juliana, Matielo e James pela acolhida.

Ao Prof. Jair Mafezoli, pela ajuda no trabalho experimental, determinação estrutural e pela grande amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química e em especial à professora Otília Loiola Pessoa pelo carinho e atenção.

Ao CENAUREMN pela aquisição dos espectros de RMN e em especial à Gizelle e ao Gabriel pela realização dos experimentos.

Ao Bartholomeu e a Ayla pelos espectros de massas e IV.

Ao Daniel, Gizelle, Luciana Bertini e Ayla pela colaboração nos experimentos de biotransformação e nas análises por CG/DIC.

As amigas Érika, Mirella e Sara pelo companheirismo nos momentos mais difíceis.

Aos companheiros de laboratório Rosa, Reinaldo, Pontes, Alexandre, Érika Maiara, Aretha, Karla, Ernani, Bárbara, Francisco, Thiago e Pablo e em especial à Gizelle, Bartholomeu, Biel, Daniel e a Fátinha pela amizade e apoio.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

Aos funcionários Lana, Célia, Mazé e Mundinha pela amizade e colaboração.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPQ e FUNCAP.

*“...entre o céu e a terra os fungos são
mais benéficos do que imagina nossa
vã filosofia.”*

RESUMO

A investigação do potencial químico de *Trichoderma harzianum*, um fungo antagonista, foi realizada. A composição de ácidos graxos produzidos pelo fungo cultivado em Czapeck, peptona e caldo de batata, variando a fonte de carbono (glicose e manitol), nesse último meio, foi determinada por CG/EM. Foram identificados os seguintes ácidos graxos na forma dos seus ésters metílicos: hexadecanóico (C_{16:0}), octadecanóico (C_{18:0}), 9-octadecenóico (C_{18:1}) e 9,12-octadienóico (C_{18:2}). Dos extratos orgânicos do fungo cultivado em peptona por 16 dias e BD (Batata-dextrose) por 24 dias foi possível isolar o manitol e o composto antimicrobiano viridifungina A, respectivamente. Extratos e frações foram submetidos a testes antitumorais frente às linhagens tumorais humanas MDA-MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e SF-295 (glioblastoma) e cinco das frações testadas apresentaram CI50 \geq 75% em pelo menos duas linhagens tumorais. A atividade alcooldesidrogenases (ADHs) de *T. harzianum* foi identificada e o microrganismo foi empregado como biocatalisador na redução da (*R*)-carvona, acetofenona e seis alquilfenonas. Na maioria dos casos, os produtos de biorredução foram obtidos.

Palavras chaves: *Trichoderma harzianum*; ácidos graxos; viridifungina A; biorredução.

ABSTRACT

The chemical potential of *Trichoderma harzianum*, an antagonist fungus, was investigated. The fatty acid composition of this fungus grown in Czapeck, peptone and potato, with different carbon source (glycose and manitol) in the later medium, was determined after GC/MS analysis. The following fatty acids, as their methyl esters, were identified: hexadecanoic (C_{16:0}), octadecanoic (C_{18:0}), 9-octadecenoic (C_{18:1}) and 9,12-octadienoic (C_{18:2}). From the organic extracts of the microorganism cultivated in peptone (16 days) and potato-dextrose (21 days) broths, manitol and the antimicrobial viridifungin A were isolated, respectively. Extracts and fractions were submitted to antitumor assays against the human cell tumor lines MDA-MB435 (mama), HCT-8 (colon) e SF-295 (glioblastoma) and five of them showed IC₅₀ ≥ 75 % in two or three cell lines. Alcohol dehydrogenases (ADHs) activity of *T. harzianum* was identified and this microorganism was used as biocatalyst in the reduction of (*R*)-carvone, acetophenone and six akylphenones. In most cases, the products of the bioreductions were obtained.

Keywords: *Trichoderma harzianum*; fatty acids; viridifungin A; bioreductions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sintomas do ataque de <i>T. harzianum</i> em diversos hospedeiros: (A) Micoparasitismo por <i>Trichoderma</i> sp sobre o fitopatógeno <i>Pythium</i> sp na superfície de sementes de ervilha e (B) Micrografia eletrônica da superfície de hifas do fitopatógeno <i>Rhizoctonia solani</i> após micoparasitismo por <i>Trichoderma</i> sp (HARMAN, 2004).....	20
Figura 2 - Culturas da cepa <i>Trichoderma harzianum</i> em meio sólido Batata-dextrose-ágar (BDA) (HARMAN, 2004).....	21
Figura 3 - Progesterona (6) e seus produtos de biotransformação por <i>Trichoderma</i> spp.....	25
Figura 4 - Resolução cinética de álcoois secundários racêmicos 47 A-C.....	30
Figura 5 - Estrutura do 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).....	31
Figura 6 - Cromatograma dos ésteres metílicos de CZM.....	38
Figura 7 - Cromatograma dos ésteres metílicos de PEPM.....	38
Figura 8 - Cromatograma dos ésteres metílicos de BDM.....	39
Figura 9 - Cromatograma dos ésteres metílicos de BMM.....	39
Figura 10 - Espectro de massas do hexadecanoato de metila (C16:0).....	40
Figura 11 - Espectro de massas do octadecanoato de metila (C18:0).....	40
Figura 12 - Espectro de massas do 9,12-octadecadienoato de metila (9,12-(C18:2).....	40
Figura 13 - Espectro de massas do 9-octadecenoato de metila (9-C18:1).....	40
Figura 14 - Análise por CCD das frações do meio líquido do estudo cinético.....	41
Figura 15 - Estrutura do manitol 51.....	44
Figura 16 - Espectro de absorção na região do I.V. do manitol com pastilhas de KBr.....	45
Figura 17 - Espectro de RMN ¹³ C-BB (D ₂ O, 125 MHz) do manitol.....	45
Figura 18 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135 (D ₂ O, 125 MHz) do manitol.....	46
Figura 19 - Espectro de RMN ¹ H (D ₂ O, 500 MHz) do manitol.....	46
Figura 20 - Estrutura da viridiofungina A.....	51
Figura 21 - Espectro de massas de viridiofungina A (ES+, 6,7 eV).....	53
Figura 22 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	53
Figura 23 - Expansão (a) do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	54
Figura 24 - Expansão (b) do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	54
Figura 25 - Expansão (c) do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	55
Figura 26 - Espectro de RMN ¹³ C-BB (100 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	55
Figura 27 - Expansão (a) do espectro de RMN ¹³ C-BB (100 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	56
Figura 28 - Expansão (b) do espectro de RMN ¹³ C-BB (100 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	56
Figura 29 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (100 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	57
Figura 30 - Expansão do espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (100 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	57
Figura 31 - Espectro de RMN 2-D COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	58
Figura 32 - Espectro de RMN 2-D HSQC (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	59
Figura 33 - Expansão do espectro de RMN 2-D HSQC (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	59
Figura 34 - Espectro de RMN 2-D HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	60
Figura 35 - Expansão (a) do espectro de RMN 2-D HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	60
Figura 36 - Expansão (b) do espectro de RMN 2-D HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) de viridiofungina A.....	61
Figura 37 - Metabolismo da Glicose.....	62
Figura 38 - Reação catalisada por ADH.....	62

Figura 39 - Atividade da ADH em <i>Fusarium oxysporum</i> (Controle positivo)	63
Figura 40 - Atividade da ADH em <i>Trichoderma harzianum</i>	64
Figura 41 - Cromatograma do controle (somente a (R)-carvona)	66
Figura 42 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 1 dia estático	66
Figura 43 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 2 dias estático ..	67
Figura 44 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 3 dias estático ..	67
Figura 45 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 6 dias estático ..	68
Figura 46 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 3 dias em agitação	68
Figura 47 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 6 dias em agitação	69
Figura 48 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 9 dias em agitação	69
Figura 49 - Espectro de massas da (R)-carvona	70
Figura 50 - Espectro de massas do produto formado.....	70
Figura 51 - Produtos da redução da (R)-carvona com NaBH ₄	71
Figura 52 - Cromatograma dos produtos da redução química com NaBH ₄	72
Figura 53 - Cromatograma do produto de reação em células remanescentes com acetofenona em 3 dias.....	76
Figura 54 - Cromatograma do produto de reação no caldo de cultura com acetofenona em 3 dias	76
Figura 55 - Cromatograma do produto de reação em células remanescentes com acetofenona em 6 dias.....	77
Figura 56 - Cromatograma do produto de reação no caldo de cultura com acetofenona em 6 dias	77
Figura 57 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em células remanescentes com 3 dias em coluna quiral	78
Figura 58 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em caldo de cultura com 3 dias em coluna quiral.....	78
Figura 59 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em células remanescentes com 6 dias em coluna quiral	79
Figura 60 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em caldo de cultura com 6 dias em coluna quiral.....	79
Figura 61 - Cromatogramas de íons selecionados 136 (A) e 134 (B) dos produtos brutos da reação da propiofenona com 6 dias em agitação	82
Figura 62 - Espectro de massas da propiofenona	83
Figura 63 Espectro de massas do produto formado.....	83
Figura 64 - Cromatograma do íon selecionado 134 do experimento do padrão da propiofenona	84
Figura 65 - Espectro de massas do padrão da propiofenona.....	84
Figura 66 - Cromatogramas de íons selecionados 150 (A) e 148 (B) dos produtos brutos da reação da butirofenona com 6 dias em agitação	85
Figura 67 - Espectro de massas da butirofenona	85
Figura 68 - Espectro de massas do produto formado.....	86
Figura 69 - Cromatograma do íon selecionado 148 do experimento do padrão da butirofenona	86
Figura 70 - Espectro de massas do padrão da butirofenona.....	87
Figura 71 - Cromatogramas de íons selecionados 164 (A) e 162 (B) dos produtos brutos da reação da valerofenona com 6 dias em agitação.....	87
Figura 72 - Espectro de massas da valerofenona.....	88

Figura 73 - Espectro de massas do produto formado.....	88
Figura 74 - Cromatograma do íon selecionado 162 do experimento do padrão da valerofenona	89
Figura 75 - Espectro de massas do padrão da valerofenona	89
Figura 76 - Cromatogramas de íons selecionados 162 e 164 (A), 204 (B) e 206 (C) dos produtos brutos da reação da octanofenona com 6 dias em agitação.....	90
Figura 77 - Espectro de massas da octanofenona	90
Figura 78 - Espectro de massas (a) do produto da reação da octanofenona	91
Figura 79 - Espectro de massas (b) do produto da reação da octanofenona	91
Figura 80 - Espectro de massas (c) do produto da reação da octanofenona	92
Figura 81 - Cromatograma do íon selecionado 204 do experimento do padrão da octanofenona	92
Figura 82 - Espectro de massas do padrão da octanofenona.....	93
Figura 83 - Cromatograma do íon selecionado 232 do produto bruto da reação da decanofenona com 6 dias em agitação	93
Figura 84 - Espectro de massas da decanofenona	94
Figura 85 - Cromatograma do íon selecionado 232 do experimento do padrão da decanofenona	94
Figura 86 - Espectro de massas do decanofenona	95
Figura 87 - Cromatograma do íon selecionado 210 do produto bruto da reação da 2,4,6-trimetoxiacetofenona com 6 dias em agitação.....	95
Figura 88 - Espectro de massas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona	96
Figura 89 - Cromatograma do íon selecionado 210 do experimento do padrão da 2,4,6-trimetoxiacetofenona.....	96
Figura 90 - Espectro de massas do produto da 2,4,6-trimetoxiacetofenona	97
Figura 91 - Substratos utilizados na biotransformação por <i>T. harzianum</i>	113
Figura 92 - Estrutura das alquilfenonas testadas	114
Figura 93 - Curva de calibração do feniletan-1-ol.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biotransformação de esteróides por <i>T. hamatum</i>	26
Tabela 2 - Resolução cinética do álcool 1-feniletanol por <i>T. harzianum</i>	30
Tabela 3 - Resolução cinética do álcool 1-ciclohexaetanol por <i>T. harzianum</i>	31
Tabela 4 - Resolução cinética do álcool 1-(naft-2-il)etanol por <i>T. harzianum</i>	31
Tabela 5 - Produtos de biotransformação do TNT (50) por duas espécies de <i>Trichoderma</i> ...	32
Tabela 6 - Valores médios das massas fúngicas (g) de <i>T. harzianum</i>	35
Tabela 7 - Valores médios dos extratos fúngicos (mg) com 16 dias de crescimento.....	35
Tabela 8 - Ácidos graxos (%) identificados na forma de ésteres metúlicos	37
Tabela 9 - Valores médios dos extratos fúngicos do meio líquido (mg) com 16 dias de crescimento	42
Tabela 10 - Comparação dos dados de RMN ¹³ C do manitol (125 MHz, D ₂ O) com o do padrão (125 MHz, D ₂ O)	44
Tabela 11 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras que deram resultado positivo em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µL/mL	47
Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (δ) com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ¹³ C-BB e DEPT-135°	49
Tabela 13 - Dados espectrométricos de F14	51
Tabela 14 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de F14 e comparação com dados da viridiofungina A descritos na literatura	52
Tabela 15 - Composição do percentual relativo entre a (<i>R</i>)-carvona e seu produto em condição estática variando os dias de reação	65
Tabela 16 - Composição do percentual relativo entre a (<i>R</i>)-carvona e seu produto em agitação variando os dias de reação	65
Tabela 17 - Valores médios do percentual relativo da biotransformação da acetofenona utilizando o caldo de cultura e células remanescentes de <i>T. harzianum</i> como fonte enzimática.....	75
Tabela 18 - Valores dos tempos de retenção e relação m/z das biotransformações das alquilfenonas.....	80
Tabela 19 - Massas fúngicas (g) de <i>T. harzianum</i>	103
Tabela 20 - Massas dos extratos (mg) de <i>T. harzianum</i>	103
Tabela 21 - Extratos (mg) oriundos da saponificação	104
Tabela 22 - Frações após fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Acetonitrila	107
Tabela 23 - Frações após fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Aceton 4	108
Tabela 24 - Descrição das frações submetidas ao teste antitumoral.....	109
Tabela 25 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 µL/mL	109
Tabela 26 - Frações após fracionamento cromatográfico do extrato do meio líquido	110
Tabela 27 - Frações após fracionamento cromatográfico da amostra 3.....	111
Tabela 28 - Frações após fracionamento cromatográfico da amostra 4.....	111
Tabela 29 - Percentual relativo da concentração em mg/L de proteína variando os dias	113
Tabela 30 - Quantidades utilizadas de reagentes na preparação de padrões.....	115
Tabela 31 - Quantidade utilizada na biotransformação das correspondentes alquilfenonas...	119

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 - Fluxograma da obtenção dos extratos do meio líquido e do micélio em diferentes meios	42
Fluxograma 2: Obtenção dos ésteres metílicos para análise por CG/EM.....	105

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação de hidroxilação da puerarina (1) por <i>T. harzianum</i>	24
Esquema 2 - Reação de hidroxilação do esteróide 3 por <i>T. viride</i>	25
Esquema 3 - Reação de metilação realizada por duas espécies de <i>Trichoderma</i> sp. em 2,4,6-triclorofenol (39).....	28
Esquema 4 - Reação de glicosilação de 41 por <i>Trichoderma</i> sp.....	28
Esquema 5 - Bioxidação dos sulfetos 43 e 44 por <i>T. viride</i>	29
Esquema 6 - Proposta de fragmentação para o produto (NUNES, 2008).....	73
Esquema 7 - Proposta de fragmentação das alquilfenonas	81
Esquema 8 - Proposta de fragmentação dos álcoois correspondentes das bioeduções das alquilfenonas.....	82
Esquema 9 - Redução química da (<i>R</i>)-carvona	115
Esquema 10 - Redução química da acetofenona	115
Esquema 11 - Metilação química da 2,4,6-trihidroxiacetofenona.....	119

LISTA DE SIGLAS

ADH – Enzima Alcool desidrogenase
APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*
BD – Meio de Cultura Batata-Dextrose
BDA – Meio de Cultura Batata-Dextrose-Àgar
BM – Meio de Cultura Batata-Manitol
BSA – Albumina sérica bovina
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
CG/DIC – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama
CG/EM – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY – *Correlation Spectroscopy*
CZ – Meio de Cultura Czapeck
DEPT 135° – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°*
EM – Espectro de Massas
F14 – Substância isolada de *Trichoderma harzianum*
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*
IE – Impacto Eletrônico
IV - Infravermelho
J- Constante de Acoplamento
nOe – *Nuclear Overhauser Effect*
PEP – Meio de cultura peptona
RMN ¹³C – BB – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 – *Broad Band*
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
TR – Tempo de Retenção

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FLUXOGRAMAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE SIGLAS

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	20
3.	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	23
3.1.	Potencialidades de Aplicação de Enzimas de Microrganismos em Química Orgânica	23
3.2.	Biotransformação por <i>Trichoderma</i> spp	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1.	Avaliação dos ácidos graxos de <i>T. harzianum</i>	34
4.1.1.	Produção de massa micelial	34
4.1.2.	Obtenção de extratos fúngicos	35
4.1.3.	Identificação dos ácidos graxos	35
4.1.3.1.	Ésteres metílicos	36
4.2.	Otimização do cultivo de <i>T. harzianum</i> para produção de metabólitos secundários	41
4.2.1.	Estudo Cinético	41
4.2.2.	Estudo da variação do meio de cultura	41
4.3.	Cultivo de <i>T. harzianum</i> em grande escala em meio Peptona	43
4.4.	Teste antitumoral	47
4.5.	Cultivo de <i>T. harzianum</i> em grande escala em meio BD	47
4.5.1.	Determinação estrutural de F14	48
4.6.	Emprego de <i>T. harzianum</i> na biotransformação de substratos orgânicos	61
4.6.1.	Atividade Alcooldesidrogenases (ADHs)	61
4.6.2.	Dosagem de proteína dos meios de cultura filtrados	64
4.6.3.	Biotransformação da (<i>R</i>)-carvona	65
4.6.4.	Identificação do produto da biotransformação da (<i>R</i>)-carvona	71
4.6.4.1.	Identificação do produto	71
4.6.5.	Análise dos produtos de biotransformação da acetofenona	74
4.6.5.1.	Biotransformação por células em crescimento	74
4.6.5.2.	Biotransformação em caldo de cultura e células remanescentes	74
4.6.6.	Análise dos produtos de biotransformação das alquilfenonas	80
4.6.6.1.	Biotransformação em células remanescentes	80
5.	PARTE EXPERIMENTAL	99
5.1.	Métodos Cromatográficos	99
5.1.1.	Cromatografia em gel de sílica	99
5.1.2.	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	99
5.1.3.	Cromatógrafo Gasoso	99
5.2.	Solventes	100
5.3.	Métodos Espectrométricos	100
5.3.1.	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)	100
5.3.2.	Espectrometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)	100
5.3.3.	Espectrometria de Infravermelho (IV)	101
5.4.	Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	101

5.5.	Esterilização e preparação de meios de cultura.....	101
5.6.	Microrganismo	101
5.6.1.	Preservação do microrganismo.....	102
5.7.	Preparação dos meios de cultura	102
5.7.1.	Meio de Czapeck	102
5.7.2.	Meio de peptona	102
5.7.3.	Meio de caldo de batata.....	103
5.8.	Avaliação dos ácidos graxos de <i>T. harzianum</i>	103
5.8.1.	Saponificação	104
5.8.2.	Esterificação	104
5.8.3.	Análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos	105
5.9.	Otimização do cultivo de <i>T. harzianum</i> para a produção de metabólitos secundários	106
5.9.1.	Estudo Cinético.....	106
5.9.2.	Estudo da variação do meio de cultura	106
5.9.3.	Cultivo de <i>T. harzianum</i> em grande escala em meio peptona.....	106
5.9.3.1.	Fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Acetonitrila.....	107
5.9.3.2.	Fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Aceton 4.....	107
5.10.	Teste antitumoral.....	108
5.11.	Cultivo em grande escala em meio BD.....	109
5.11.1.	Fracionamento cromatográfico do extrato do meio líquido.....	110
5.12.	Emprego de <i>T. harzianum</i> na biotransformação de substratos orgânicos	111
5.12.1.	Atividade Alcooldesidrogenases (ADHs).....	111
5.12.2.	Dosagem de proteína dos meios de cultura filtrados	112
5.12.2.1.	Preparo do Reagente de Bradford.....	112
5.12.2.2.	Determinação de proteína dos meios de cultura filtrados.....	112
5.13.	Substratos.....	113
5.13.1.	Redução química dos substratos: preparação de padrões	114
5.13.2.	Construção da curva de calibração	115
5.14.	Biotransformação da (<i>R</i>)-carvona por células em crescimento de <i>T. harzianum</i>	116
5.14.1.	Análise por CG/EM	117
5.15.	Biotransformação da acetofenona.....	117
5.15.1.	Biotransformação por células em crescimento.....	117
5.15.2.	Biotransformação em caldo de cultura e em células remanescentes	117
5.15.3.	Análise do álcool CG/DIC	118
5.15.3.1.	Preparação das amostras.....	118
5.15.3.2.	Quantificação do feniletan-1-ol.....	118
5.15.3.3.	Determinação do excesso enantiomérico do fenietan-1-ol.....	118
5.16.	Biotransformação de alquilfenonas.....	118
5.16.1.	Biotransformação em células remanescentes	118
5.16.2.	Análise por CG/EM	120
6.	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS	123

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A busca de substâncias de uso prático para o homem na natureza é uma das mais antigas atividades da nossa civilização. No Brasil, as plantas têm sido os organismos vivos mais investigados como fonte de produtos naturais. No entanto, os microrganismos têm se mostrado uma fonte rica de substâncias para a humanidade. O Brasil apresenta como destaque uma grande biodiversidade de bactérias e fungos, conseqüentemente, torna-se uma fonte versátil de substâncias orgânicas potencialmente importantes.

Além de serem fornecedores de metabólitos secundários, fungos filamentosos e leveduriformes (leveduras) são amplamente empregados na transformação de moléculas orgânicas, revelando uma alta estereoespecificidade e estereosseletividade, demonstrando a grande importância destes microrganismos na síntese assimétrica de moléculas biologicamente ativas e de interesse comercial (GÁRCIA-PAJON, 2003).

Os fungos (Reino Fungi) representam o segundo maior grupo de organismos no mundo. Estima-se que existam em torno de 1,5 milhões de espécies diferentes de fungos, com aproximadamente 70.000 identificadas (RAVEN, 2001).

Na natureza, a maioria dos fungos é constituída de espécies saprófitas e muitas delas são benéficas às plantas, decompondo a matéria orgânica e tornando os elementos disponíveis como nutrientes. Algumas espécies são empregadas no controle biológico de insetos que prejudicam as plantas, como *Beauveria bassiana*, *Metarrhizium anisopliae* e *Entomophthora* spp., outras, no controle biológico de fitopatógenos, como *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp. e *Penicillium* spp. (MENEZES, 1993).

Devido à grande variedade encontrada na natureza, a taxonomia dos fungos ainda não está bem estabelecida, estando normalmente associada às suas propriedades fisiológicas (GRIFFIN, 1994). Estudos da composição de ácidos graxos têm sido realizados com o objetivo de auxiliar na taxonomia de várias espécies de fungos.

A comparação na composição de ácidos graxos de diferentes fungos demonstrou que pares de fungos com composições de ácidos graxos similares podem apresentar diferenças em alto nível de significância, através de análises discriminantes. (MONTENEGRO, 2007).

Espécies de *Trichoderma* são encontradas em quase todos os tipos de solos e *habitat* diversos, sendo bem conhecidas por produzirem uma variedade de substâncias antibióticas e agentes de controle biológicos na agricultura (HARMAN, *et al.*, 2004).

INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como objetivo a análise da composição de ácidos graxos e o isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos de *Trichoderma harzianum*, bem como o emprego dessa espécie como biocatalisador em reações orgânicas.

O trabalho apresenta ainda os seguintes capítulos: 2 – Considerações Taxonômicas; 3 – Levantamento Bibliográfico; 4 – Resultados e Discussão; 5 – Parte Experimental; 6- Conclusão.

Capítulo 2

Considerações

Gerais

CONSIDERAÇÕES GERAIS

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Trichoderma harzianum é um fungo antagonista de ocorrência natural em solos. Este fungo atua inibindo fitopatógenos habitantes de solo, utilizando-se de um ou mais mecanismos, que são basicamente a antibiose (antibióticos, toxinas e enzimas que afetam o desenvolvimento de fungos), parasitismo (Figura 1, p. 20) e competição. O microrganismo é indicado para aplicação no solo ou base das plantas, contra fungos de solo causadores de podridões radiculares, murchas, etc. Além do efeito direto sobre os fitopatógenos, espécies de *Trichoderma* também podem atuar na decomposição de matéria orgânica e na degradação de resíduos tóxicos em solos contaminados com agrotóxicos (EZIASHI, 2007).

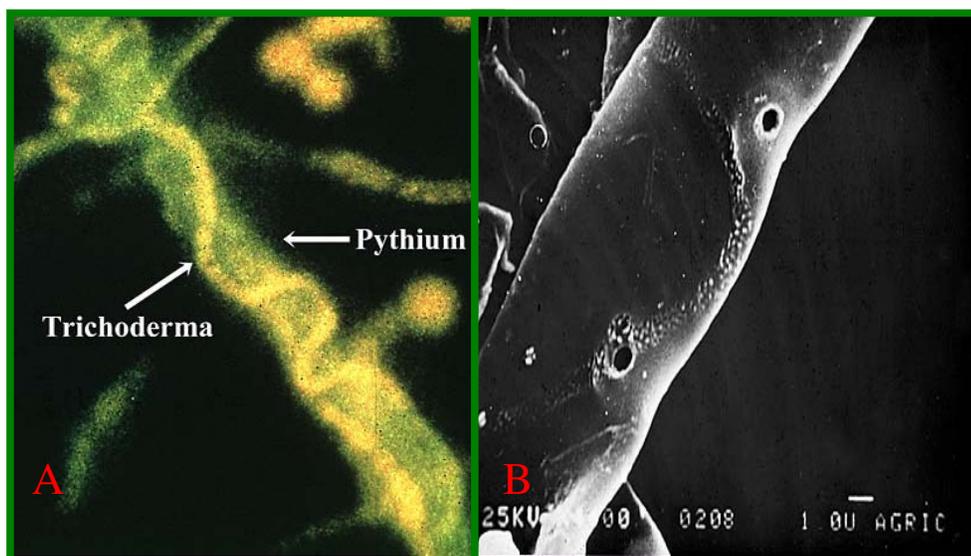


Figura 1 - Sintomas do ataque de *T. harzianum* em diversos hospedeiros: (A) Micoparasitismo por *Trichoderma* sp sobre o fitopatógeno *Pythium* sp na superfície de sementes de ervilha e (B) Micrografia eletrônica da superfície de hifas do fitopatógeno *Rhizoctonia solani* após micoparasitismo por *Trichoderma* sp (HARMAN, 2004)

T. harzianum é um fungo pertencente à classe dos Deuteromicetos, ordem dos Moniliales e a família Moniliaceae (MENEZES, 1993).

A taxonomia, genética e composição da população de *Trichoderma* spp. não são ainda bem compreendidas e, portanto, são necessários métodos mais precisos para diferenciar linhagens de diferentes espécies para propósito de patente ou determinação da variabilidade de linhagens em ecossistemas naturais. O crescimento rápido desse fungo em culturas, a produção de um micélio aéreo esparso, com o tipo de ramificação dos conidióforos e o modo

CONSIDERAÇÕES GERAIS

de disposição das filíades são características utilizadas para distinguir as espécies desse gênero (RESENDE, 2004).

Segundo Menezes (1993), em geral, o gênero *Trichoderma* apresenta conidióforos hialinos, não verticilados, filíades simples ou em grupos; conidiosporos (fialosporos) hialinos, unicelulares, ovóides, produzidos em pequenos clusters terminais; facilmente reconhecidos pelo rápido crescimento e produção de conídios verdes espalhados na superfície da colônia (Figura 2, p. 21).



Figura 2 - Culturas da cepa *Trichoderma harzianum* em meio sólido Batata-dextrose-ágar (BDA) (HARMAN, 2004)

Capítulo 3

Levantamento

Bibliográfico

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Desde a antiguidade os microrganismos são utilizados pelo homem em inúmeros processos. Mesmo sem o conhecimento científico, os povos antigos utilizavam a fermentação para a produção de pães, queijos e cerveja (LIMA, 1975). O aumento pelo interesse no estudo químico de microrganismos se deu durante a segunda guerra mundial com a descoberta da penicilina (TURNER, 1975). A partir desta descoberta, os microrganismos começaram a serem vistos como uma possível fonte de substâncias bioativas, com potencial aplicação na indústria farmacêutica (LIMA, 2003).

3.1 Potencialidades de Aplicação de Enzimas de Microrganismos em Química Orgânica

A utilização de enzimas provenientes de microrganismos vem sendo cada vez mais explorada devido à sua grande aplicação em síntese orgânica. Muitos dos problemas sintéticos da química orgânica clássica estão sendo resolvidos com a implantação das reações de biotransformação (FABER, 1995).

O uso de enzimas como biocatalisadores é uma estratégia ecologicamente correta, já que elas são degradadas pelo meio ambiente, diferentemente dos metais pesados normalmente empregados como catalisadores. Elas aceleram reações e possuem características muito interessantes do ponto de vista sintético, sendo quimio-, regio- e enantioseletivas (FABER, 1995).

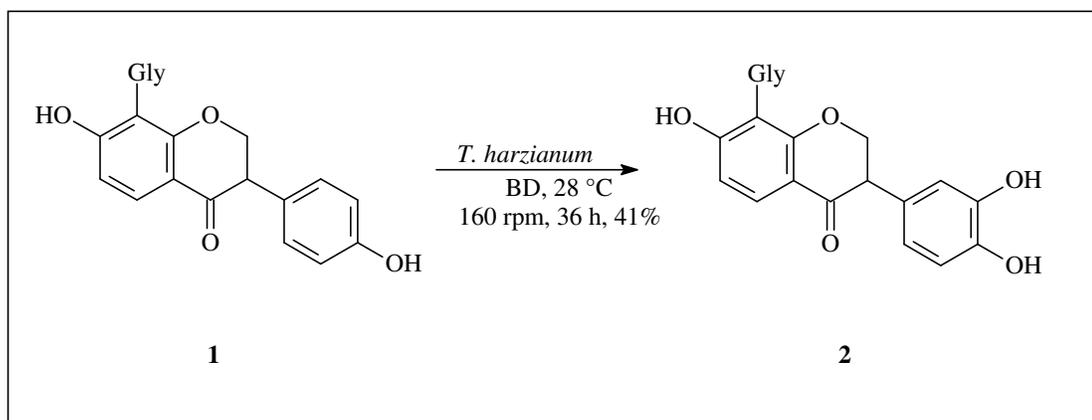
A escolha em utilizar enzimas isoladas ou microrganismos vivos depende de fatores como: tipo de reação, solubilidade do substrato, necessidade de cofator, escala de biotransformação e a necessidade de água residual. Em síntese orgânica, a utilização de enzimas isoladas é preferível, uma vez que o isolamento dos produtos é facilitado e também oferece quantidade mínima de subprodutos. No entanto, o uso de organismos vivos é mais viável do ponto de vista econômico (LANDOLFI, 1984).

Nos últimos anos, o número de trabalhos envolvendo a utilização de enzimas em síntese orgânica, tem aumentado consideravelmente. Muitas destas enzimas já foram isoladas (lipases, acilases, epoxidases, hidroxilases, etc) e são comercializadas por elevados valores (DAVIS, 2001). Entretanto, o uso de processos enzimáticos permite a formação de compostos de interesse de modo facilitado, diminuindo o número de passos sintéticos.

3.2 Biotransformação por *Trichoderma* spp

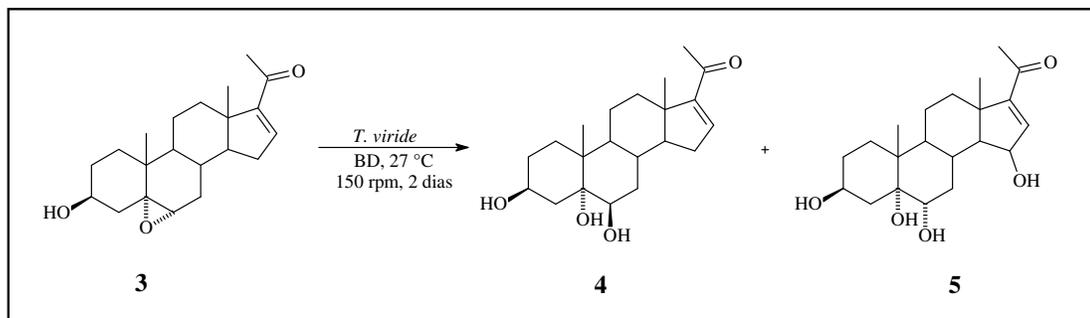
A utilização de *T. harzianum* em estudos de biotransformação é descrita em reações de hidroxilação, hidrólise, metilação, glicolisação, oxidação, acetilação e redução com resolução cinética de diversos substratos.

Puerarina **1** (daidzeina 8-C glicosídeo) é uma isoflavona isolada da raiz de *Pueraria lobata*. Estudos mostram que essa isoflavona pode prevenir o câncer e agir como antioxidante bem como pode ser usada no tratamento de doenças coronárias, infecções no globo ocular e surdez (Ye e colaboradores (2006)). Porém, a puerarina possui baixa solubilidade em água, dificultando sua absorção no organismo. Ye e colaboradores (2006) empregaram células íntegras de *T. harzianum* para biotransformar a puerarina (**1**) em 3'-hidroxipuerarina (**2**), melhorando em 1,3 vezes a solubilidade em água e em 20 vezes a atividade antioxidante (Esquema 1, p. 24).

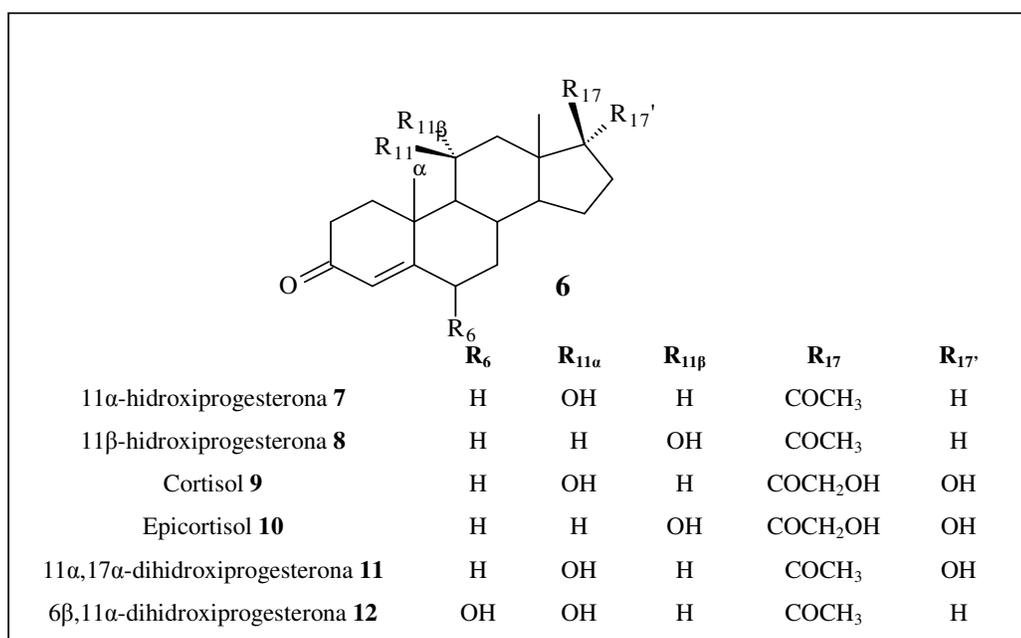


Esquema 1 - Reação de hidroxilação da puerarina (**1**) por *T. harzianum*

Esteróides são amplamente usados como anti-inflamatórios, diuréticos, anabólicos, contraceptivos, agentes antitumorais e outras aplicações (HONG-MIN, 2007). A hidroxilação de esteróides é geralmente realizada por transformações microbianas, resolvendo problemas de baixo rendimento e custo elevado, quando comparado aos métodos químicos clássicos. O fungo *T. viride* foi empregado na biotransformação de 5 α ,6 α -epoxi-3 β -16-pregnen-20-ona (**3**) (HONG-MIN, 2007) (Esquema 2, p. 25). Após 2 dias de reação foram obtidos dois esteróides poli-hidroxilados 3 β ,5 α ,6 β -trihidroxi-16-pregnen-20-ona (**4**) e 3 β ,5 α ,6 α ,15 β -tetrahidroxi-16-pregnen-20-ona (**5**).

Esquema 2 - Reação de hidroxilação do esteróide **3** por *T. viride*

Trinta e três isolados pertencendo a seis espécies do gênero *Trichoderma* foram testados na habilidade de hidroxilar a progesterona **6** para gerar os derivados **7-12** (Figura 3, p. 25) com 2 dias de reação em agitação à 28 °C (EL-KADI, 2003). *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. polysporum* e *T. pseudokoningii* produziram a 11 α -hidroxiprogesterona (**7**). *T. harzianum* e *T. hamatum* formaram apenas o isômero 11 β -hidroxiprogesterona (**8**). *T. koniingii* e *T. hamatum* produziram **7**, **8**, **11** e **12**. Os derivados **7**, **8**, **10**, **11** e **12** foram produzidos por *T. aureoviride* e *T. pseudokoningii*. O cortisol (**9**) foi produzido somente quando o meio de cultura foi fortificado com 10 g/L de peptona. Esse foi o primeiro trabalho relacionado à conversão da progesterona em mono-, di- e trihidroxiprogesterona por essas espécies de *Trichoderma*.

Figura 3 - Progesterona (**6**) e seus produtos de biotransformação por *Trichoderma* spp

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

T. hamatum foi utilizado por Bartmanska e Dmochowska-Gladysz (2006) como biocatalisador para uma série de reações com vários 3-oxoesteróides. O fungo promoveu 1-desidrogenação, que é raramente observada em culturas fúngicas, hidroxilação nas posições 11 α , 6 α , e 12 β , hidrólise da ligação éster, oxidação da hidroxila 17 α , quebra da ligação C-17/C-20 e a lactonização do anel D. Os rendimentos obtidos variaram de 5-89% (Tabela 1, p. 26).

Tabela 1 - Biotransformação de esteróides por *T. hamatum*

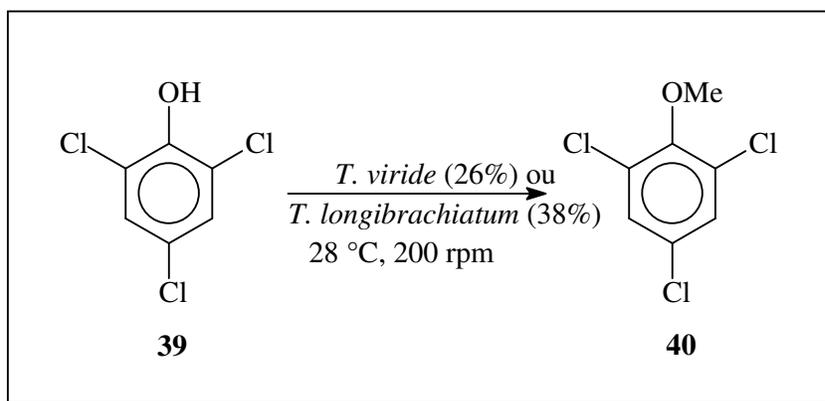
Substrato	Tempo (dias)	Produtos	Rend. (% por CG)
Testosterona (13)	8	11 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (24)	77
		1-dehidrotestolactona (25)	12
		6 α -hiandrost-1,4-dien-3,17-diona (26)	5
		Androsta-1,4-dien-3,17-diona (27)	51
Propionato de testosterona (14)	4	11 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (24)	26
		6 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (26)	8
		1-dehidrotestolactona (25)	5
Androstenediona (15)	6	11 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (24)	63
		11 α -hidroxiandrostenediona (28)	16
		1-dehidrotestolactona (25)	13
		6 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (26)	5
19-nortestosterona (16)	14	11 α -hidroxiestr-4-en-3,17-diona (29)	32
		Estra-1,4-dien-3,17-diona (30)	26
		11 α -hidroxi-19-nortestosterona (31)	16
17 α -metiltestosterona (17)	14	11 α -hidroxi-17 α -metiltestosterona (32)	37
		12 β -hidroxidianabol (33)	26
		11 α -hidroxidianabol (34)	22
1-dehidrotestosterona (18)	6	Dianabol (19)	11
		11 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (24)	83
		6 α -hiandrost-1,4-dien-3,17-diona (26)	14
Dianabol (19)	14	11 α -hidroxidianabol (34)	37
		12 β -hidroxidianabol (33)	22
		11 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (24)	20
17 α -etinitestosterona (20)	14	Dianabol (19)	10
Noretandrolona (21)	14	-	-
		1-dehidronoretandrolona (35)	35
Progesterona (22)	3	Noretandrolona (21)	56
		11 α -hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona (24)	70
Cortexolona (23)	14	11 α -hidroxi-1-dehidrotestolactona (36)	15
		11 α -hidroxitestolactona (37)	5
		1-dehidrocortexolona (38)	89

Tabela 1- Biotransformação de esteróides por *T. hamatum*

<p>13 X-OH Y-CH₃ Z-H 14 X-OCOC₂H₅ Y-CH₃ Z-H 16 X-OH Y-H Z-H 17 X-OH Y-CH₃ Z-CH₃ 20 X-OH Y-CH₃ Z-CCH 21 X-OH Y-H Z-C₂H₅ 22 X-COCH₃ Y-CH₃ Z-H 23 X-COCH₂OH Y-CH₃ Z-CH₃</p>	<p>24 Y-CH₃ R-OH R¹-H 26 Y-CH₃ R-H R¹-OH 27 Y-CH₃ R-H R¹-H 30 Y-H R-H R¹-H</p>	<p>18 Z-H R-H R¹-H 19 Z-CH₃ R-H R¹-H 33 Z-CH₃ R-H R¹-OH 34 Z-CH₃ R-OH R¹-H</p>
<p>31 Y-H Z-H 32 Y-CH₃ Z-CH₃</p>	<p>25 R-H 36 R-OH</p>	<p>15 Y-CH₃ R-OH 28 Y-CH₃ R-OH 29 Y-H R-OH</p>
35	37	38

A cortiça é utilizada na indústria de bebidas para engarrafamento de vinhos desde o século XVII, por possuir características como a impermeabilidade ao ar e líquidos, compressibilidade, habilidade em aderir ao vidro e por ser quimicamente inerte. Observa-se, no entanto, que há a incidência de 2-7% da perda de qualidade da cortiça, decorrente da alteração da qualidade do vinho, traduzida no que se designa por "gosto de rolha". Dentre os compostos responsáveis por essa alteração destaca-se o 2,4,6-tricloroanisol (**40**, TCA), cujo precursor direto, o 2,4,6-triclorofenol (**39**, TCF) é utilizado por fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium* e *Trichoderma* para produzir o TCA.

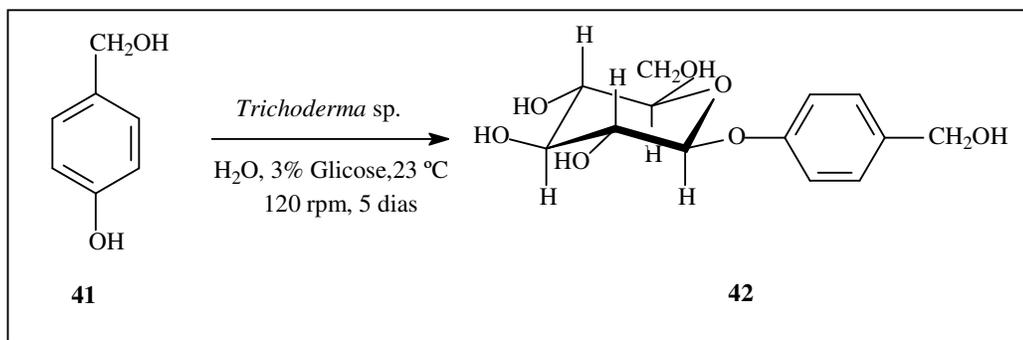
Estudos foram realizados visando a identificação da flora microbiana presente na cortiça do vinho (Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2002 e S. Prak *et al.* 2006). Dentre os fungos isolados e testados na biotransformação do TCF em TCA, destacaram-se *T. viride* e *T. longibrachiatum* com 26 e 38% de conversão, respectivamente (Esquema 3, p. 28).



Esquema 3 - Reação de metilação realizada por duas espécies de *Trichoderma* sp. em 2,4,6-triclorofenol (**39**)

Freqüentemente, a glicosilação é a etapa final na biossíntese de metabólitos secundários de plantas. Esta biotransformação confere à molécula alvo um aumento da solubilidade e diminuição da volatilidade quando comparada à moléculas não glicosiladas. Além disso, representa um método viável economicamente para a produção de drogas esteroidais glicosiladas e outros compostos relacionados para diversas aplicações.

Baseados nestes fundamentos, Hai-Feng e colaboradores (2008) realizaram a glicosilação do (4-hidroxifenil)metanol (**41**) para (4-hidroximetil)fenil 4-*O*-β-D-glicosídeo (**42**) (Esquema 4, p. 28), utilizando células de fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*. Nesse estudo, foi obtido somente 45,8% de conversão, pelo fato do substrato inibir o crescimento da biomassa do fungo.

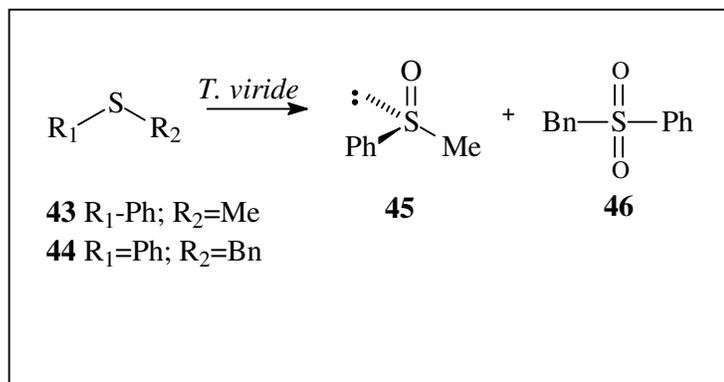


Esquema 4 - Reação de glicosilação de **41** por *Trichoderma* sp

Sulfóxidos enantiomericamente puros são substratos para síntese de produtos farmacêuticos e compostos biologicamente ativos. Como produtos naturais, eles ocorrem em uma variedade de aminoácidos funcionalizados, possuindo diversas atividades biológicas (Pinedo-Rivilha e colaboradores (2007)). Nos últimos anos, métodos catalíticos fazem uso de microrganismos e enzimas isoladas como uma alternativa vantajosa para este efeito. No

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

trabalho realizado por Pinedo-Rivilha e colaboradores (2007) foram testadas biooxidações (Esquema 5, p. 29) de quatro sulfetos por células de *T. viride*. O fungo apresentou bons resultados na oxidação do tioanisol (**43**), onde foi observado a produção do sulfóxido de (*R*)-metilfenila (**45**) com 70% *ee*, com 5 dias de fermentação em condição estática. O sulfóxido de (*R*)-benzilfenila (**46**) foi obtido por *T. viride* com 10 dias de fermentação, em agitação, com 95% de excesso enantiomérico e 60% de rendimento.



Esquema 5 - Biooxidação dos sulfetos **43** e **44** por *T. viride*

Com um aumento na procura de compostos quirais enantiopuros, novos microrganismos e/ou suas enzimas são objetos de triagem para produzir esses substratos. Um exemplo foi o trabalho realizado por Nagy e colaboradores (2006) a partir de uma triagem de fungos filamentosos cultivados sob fermentação em estado sólido para testar a atividade de lipases e resolução cinética de álcoois secundários racêmicos por acetilação com acetato de vinila em solventes orgânicos. Foram testados três álcoois racêmicos: 1-feniletanol (**47**), 1-ciclohexiletanol (**48**) e 1-(naft-2-il)etanol (**49**) e verificado se a biotransformação pelos fungos seguiu a regra Kazlauskas (Figura 4, p. 30). Esta regra postula que nas reações de hidrólise e esterificação de ésteres e álcoois racêmicos, respectivamente, por via enzimática apresentam mesma preferência estereoquímica. Os substratos das reações possuem diferença de tamanho dos substituintes unidos ao centro estereogênico. Logo, o enantiômero do álcool que reage mais rápido, ou seja, (enantiômero favorecido) se une a cavidade da enzima. De forma que o substituinte, mais volumoso é encaixado na cavidade de maior tamanho, enquanto que a cavidade de menor tamanho acomoda o grupo médio. A situação para o enantiômero menos favorecido procede ao contrário. Para que este possa reagir com a enzima, o grupo volumoso deverá ser alojado na cavidade menor. Este modelo estima que os valores obtidos da enantiosseletividade por uma lipase em resolução de álcool é determinado pela diferença de tamanho entre os substituintes. É sabido que os tamanhos dos grupos estão limitados por um

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

espaço disponível na respectiva cavidade do centro ativo da cada lipase, ou seja, se os substituintes do centro estereogênico forem maiores promove o decréscimo de forma considerada da enantiosseletividade (KAZLAUSKAS *et al*, 1990).

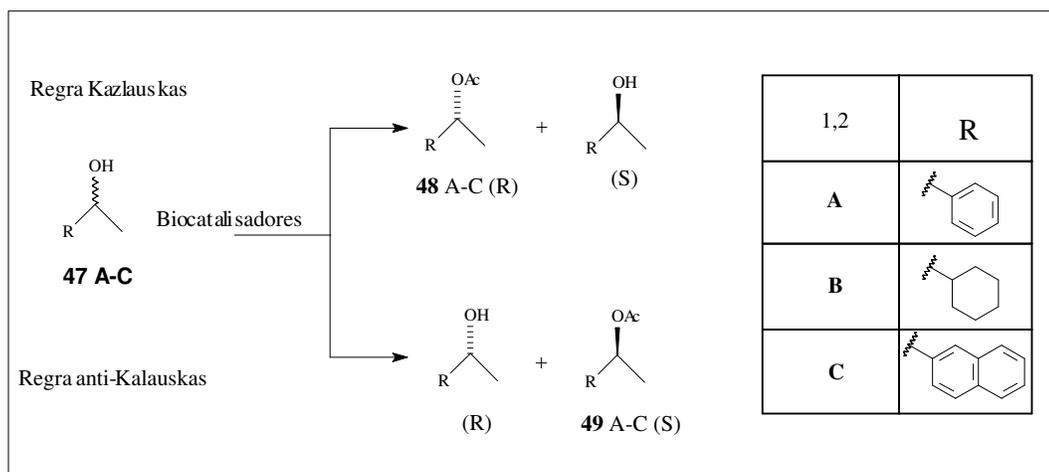


Figura 4 - Resolução cinética de álcoois secundários racêmicos **47 A-C**

O potencial enzimático de vários isolados de *T. harzianum* foram testados na acetilação desses três álcoois secundários racêmicos, onde os melhores resultados encontram-se nas Tabelas 2-4, p. 30-31. A maioria provou ser eficaz como biocatalisadores enantiosseletivos. Na acetilação do 1-feniletanol (**47 A**) e 1-ciclohexiletanol (**47 B**), os isolados exibiram alta enantiosseletividade, seguindo a regra de Kazlauskas (Figura 4, p. 30). Porém, para o 1-(naft-2-il)etanol (**47 C**) não observou-se a acetilação do substrato, sendo possível apenas detectar a presença do álcool (*R*) correspondente, resultado justificado pelo fato do substrato apresentar um grupamento rígido e volumoso.

Tabela 2 - Resolução cinética do álcool 1-feniletanol por *T. harzianum*

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Tempo de reação	(<i>S</i>) 47 A ee (%)	(<i>R</i>) 48 A ee (%)
TUB F-886	24	54,3	92,1
TUB F-946	24	43,4	91,4
TUB F-947	24	48,2	90,5
TUB F-354	120	7,9	64,3
TUB F-791	120	5,7	39,0

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Tabela 3 - Resolução cinética do álcool 1-ciclohexaetanol por *T. harzianum*

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Tempo de reação	(S) 47 B ee (%)	(R) 48 B ee (%)
TUB F-963	48	68,6	99,5
TUB F-947	48	31,2	98,9
TUB F-886	48	38,3	98,9
ATCC 56.678	72	96,6	95,6
TUB F-946	48	34,2	92,0

Tabela 4 - Resolução cinética do álcool 1-(naft-2-il)etanol por *T. harzianum*

Isolados de <i>T. harzianum</i>	Tempo de reação	(S) 47 C ee (%)
TUB F-791	120	61,5

Dois isolados de *T. harzianum* e *T. longibrachiatum* se mostraram capazes de biotransformar o 2,4,6-trinitrotolueno (**50**, TNT) (Figura 5, p. 31) (WEBER, 2002), um dos mais importantes explosivos do mundo. A Tabela 5 (p. 32) apresenta os produtos de biotransformação identificados para cada fungo.

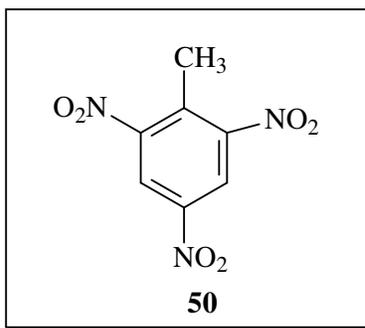


Figura 5 - Estrutura do 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Tabela 5 - Produtos de biotransformação do TNT (50) por duas espécies de *Trichoderma*

	TNT (ppm)	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<i>T. harzianum</i>	50	○	●								
	1000	●	●	○	●	●	●	●	●		
<i>T. longibrachiatum</i>	100	○	●	○						○	○
	1000	●	●								○

A-2,4,6-trinitrotolueno

B-2-amino-4,6-trinitrotolueno

C-4-amino-2,6-trinitrotolueno

D-2-*N*-acetilamida-4,6-dinitrotoluenoE-4-*N*-acetilamida-2,6-dinitrotolueno

F-4,4',6,6'-tetranitro-2,2'-azoxitolueno

G-2,4,6,6'-tetranitro-2,4'-azoxitolueno

H-4,4',6,6'-tetranitro-2,2'-azoxitolueno

I-4,4',6,6'-tetranitro-2,2'-azotolueno

J-4,4',6,6'-tetranitro-2,2'-azotolueno

● Grande quantidade

○ Pequena quantidade

Capítulo 4

Resultados e

Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação dos ácidos graxos de *T. harzianum*

A avaliação dos ácidos graxos produzidos por *T. harzianum* foi feita utilizando-se os meios de cultura líquidos batata, peptona e Czapeck (Item 5.8, p. 103). Além de variar o meio de cultura, também foi variada a fonte de carbono no meio líquido de batata, sendo utilizado glicose e manitol. Assim, este estudo envolveu o cultivo de *T. harzianum* em 4 meios diferentes: batata-glicose - BD, batata-manitol - BM, peptona - PEP, Czapeck - CZ.

4.1.1. Produção de massa micelial

Ao longo do crescimento fúngico foi possível observar diferenças na massa micelial produzida. Visualmente, as culturas à base de caldo de batata (BD e BM) e peptona (PEP) apresentaram crescimento superior àquelas cultivadas em meio de cultura Czapeck (CZ). Diferenças na produção de massa micelial desse tipo são esperadas, uma vez que a composição dos meios de caldo de batata e peptona é bem mais abundante em nutrientes do que o meio Czapeck, que é formado a base de sais inorgânicos. Não foi possível observar diferenças significativas entre os dois meios de batata, no que se refere a fonte de carbono utilizada, glicose ou manitol.

A avaliação final das culturas fúngicas foi realizada com 16 dias (SOMASHEKAR *et al.*, 2001) e, após separação do meio de cultura do micélio por filtração à vácuo, algumas observações acerca das massas miceliais obtidas foram feitas.

Os valores médios das massas miceliais secas obtidas nos quatro meios de cultura utilizados (Tabela 6, p. 35), revela que o crescimento fúngico foi mais acentuado quando se utilizou o meio líquido a base de peptona. Uma maior produção de massa micelial nesse meio deve-se à presença de glicose e do sal de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na sua composição. A influência desses dois compostos no crescimento fúngico de espécies de *Trichoderma* foi anteriormente descrito por Serrano-Carreón e colaboradores (1992) no estudo da composição lipídica desse gênero. O caldo de batata apresentou valores intermediários de massa micelial, quando comparado com os outros dois meios de cultura, enquanto que o meio Czapeck forneceu os menores valores de massa fúngica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6 - Valores médios das massas fúngicas (g) de *T. harzianum*

Czapeck	Peptona	Caldo de batata Glicose	Caldo de batata Manitol
CZM	PEPM	BDM	BMM
1,0	16,0	8,0	5,0

4.1.2. Obtenção de extratos fúngicos

Para a análise dos ácidos graxos, todos os micélios oriundos de 16 dias de crescimento foram extraídos com a mistura AcOEt/MeOH 1:1 e após destilação do solvente foram obtidas as massas (valores médios) apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores médios dos extratos fúngicos (mg) com 16 dias de crescimento

Czapeck	Peptona	Caldo de batata Glicose	Caldo de batata Manitol
137,0	530,5	1613,4	362,9

É sabido que a produção de lipídeos é diretamente proporcional ao crescimento da massa fúngica (SERRANO-CARREON *et al.*, 1992). No entanto, as maiores massas de extratos foram obtidas do meio de caldo de batata com glicose, embora o cultivo em peptona tenha produzido a maior massa micelial. Isso pode ser justificado pelo fato dos lipídeos fazerem parte do metabolismo basal do fungo, isto é, quando há um esgotamento da fonte principal de carbono, neste caso a glicose, o microrganismo passa a consumir outra fonte de alimento para suprir suas necessidades. Desse modo, como a média de crescimento em meio peptona foi praticamente o dobro do verificado em caldo de batata, é possível que nesse meio de cultura o fungo tenha consumido os lipídios produzidos após o esgotamento da glicose (SERRANO-CARREON *et al.*, 1992).

4.1.3. Identificação dos ácidos graxos

Os extratos foram submetidos à saponificação seguida de metilação (Item 5.8.3, p. 105). Esse procedimento teve como objetivo identificar os ácidos graxos totais (glicerídeos e livres) (FAKAS *et al.*, 2007).

4.1.3.1. Ésteres metílicos

Os ésteres metílicos foram injetados em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas e a identificação dos constituintes foi feita através da análise dos cromatogramas (Figuras 6-9, p. 38-39) e dos espectros de massas (Figuras 10-13, p. 40).

Foi possível identificar os ésteres metílicos dos seguintes ácidos: ácido hexadecanóico (C16:0, ácido palmítico), ácido octadecanóico (C18:0, ácido esteárico), ácido 9-octadecenóico (C18:1, ácido oléico) e ácido 9-12-octadecadienóico (9,12-C18:2, ácido linoléico) (Tabela 8, p. 37). Todos esses ácidos graxos são geralmente relatados em altas concentrações na composição lipídica de fungos (COX; SCHERM; RILEY, 2006), incluindo o gênero *Trichoderma* (SERRANO-CARREON *et al.*, 1992) (Tabela 8, p. 37).

É importante destacar que na análise dos cromatogramas dessas amostras (Figuras 6-9, p. 38-39) foi possível verificar a presença de diversos sinais não atribuídos a ésteres metílicos de ácidos graxos, provavelmente compostos pertencentes a outras classes de substâncias.

Os extratos oriundos dos cultivos fúngicos em Czapeck (CZM), caldo de batata com glicose (BDM) e manitol (BMM) apresentaram a mesma composição de ácidos graxos: C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico) e 9-C18:1 (ácido oléico). Além desses ácidos graxos, o extrato obtido do crescimento fúngico em peptona (PEPM) apresentou o ácido 9,12-C18:2 (ácido linoléico) em sua composição.

Embora Serrano-Carreon e colaboradores (1992) tenham identificado os mesmos quatro ácidos graxos na composição lipídica intracelular de *T. harzianum* (cepa IMI 206040), esses autores relataram o ácido 9,12-C18:2 (ácido linoléico) como majoritário, sendo o ácido C16:0 (ácido palmítico) o segundo mais abundante. No nosso caso, o inverso foi observado no meio de peptona, o que pode ser justificado por dois fatores: (i) o meio empregado pelos autores, apesar de conter glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, não apresenta a mesma composição do meio empregado por nós nesse estudo; (ii) apesar de termos estudado a mesma espécie relatada pelos autores, isolados fúngicos distintos foram investigados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8 - Ácidos graxos (%) identificados na forma de ésteres metílicos

Ácido graxo	TR (min)	CZM	PEPM	BDM	BMM	SERRANO- CARREON <i>et</i> <i>al.</i> , 1992
ácido hexadecanóico (C16:0)	23,9	43,5	52,3	71,9	50,1	20,09
ácido 9-12-octadecadienóico (9,12-C18:2)	26,0	ND	18,8	ND	ND	48,26
ácido 9-octadecenóico (9-C18:1)	26,1	2,6	16,1	14,9	2,8	28,07
ácido octadecanóico (C18:0)	26,4	53,9	12,8	13,1	47,0	3,57

CZM: Meio Líquido Czapeck; PEPM: Meio Líquido Peptona; BDM: Meio Líquido Batata-dextrose; BMM: Meio Líquido Batata-manitol; TR: tempo de retenção e ND: sinal não detectado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

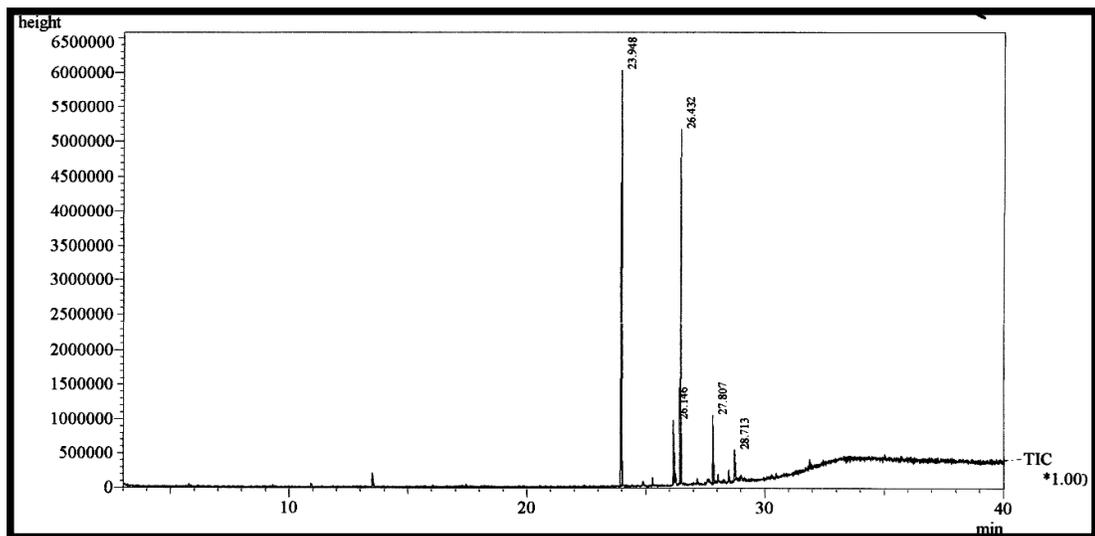


Figura 6 - Cromatograma dos ésteres metílicos de CZM

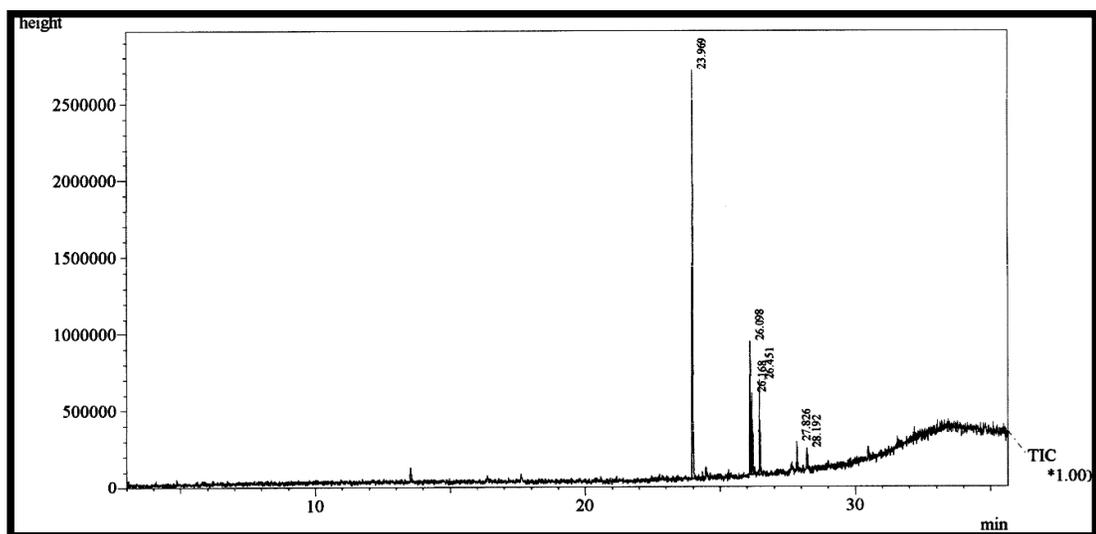


Figura 7 - Cromatograma dos ésteres metílicos de PEPM

RESULTADOS E DISCUSSÃO

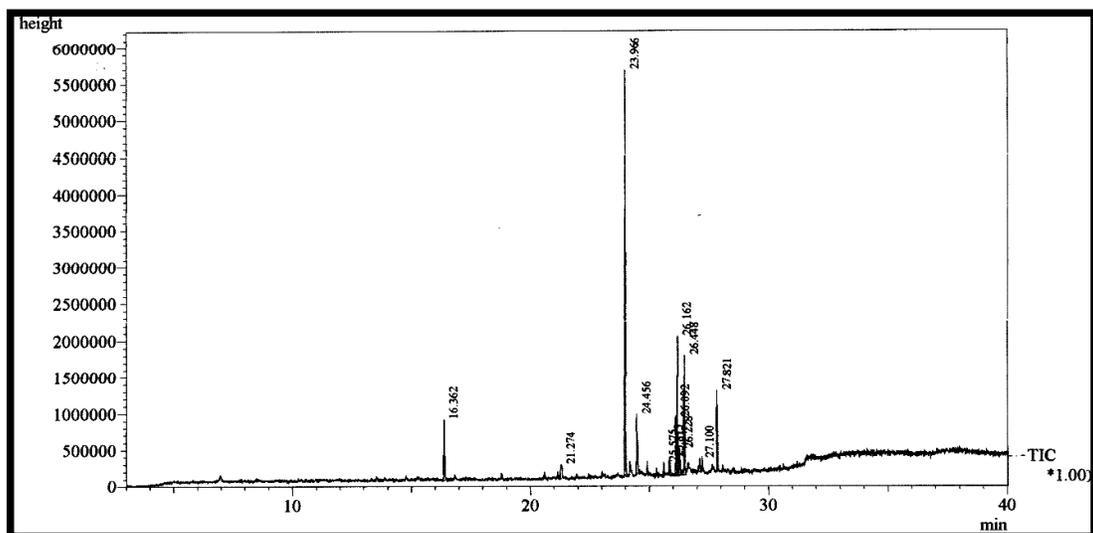


Figura 8 - Cromatograma dos ésteres metílicos de BDM

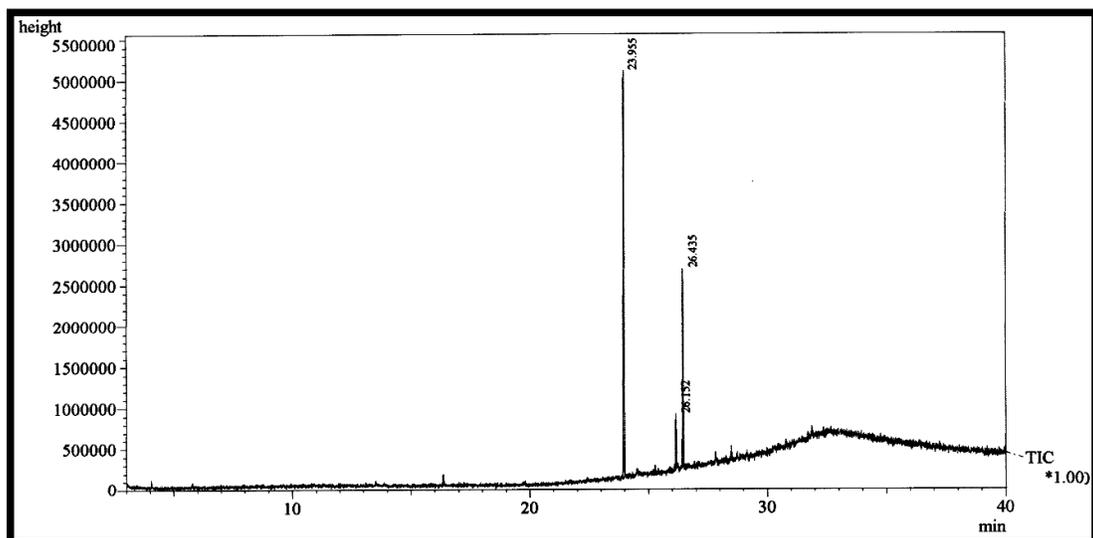


Figura 9 - Cromatograma dos ésteres metílicos de BMM

RESULTADOS E DISCUSSÃO

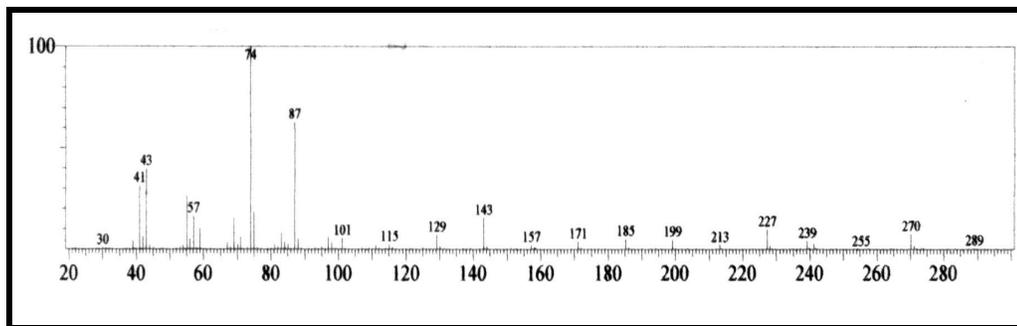


Figura 10 - Espectro de massas do hexadecanoato de metila (C16:0)

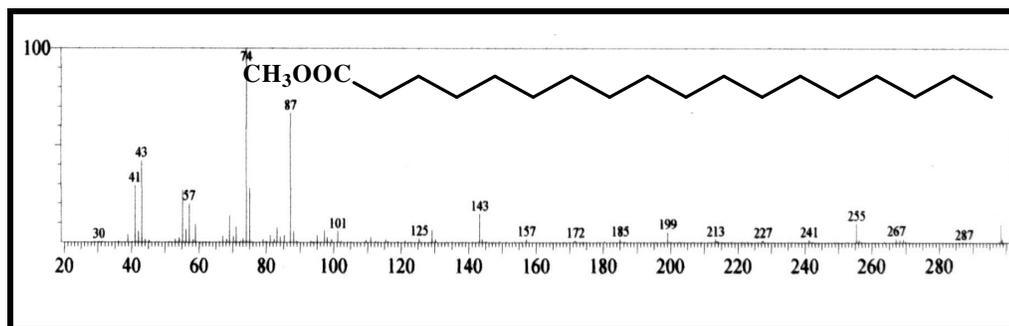


Figura 11 - Espectro de massas do octadecanoato de metila (C18:0)

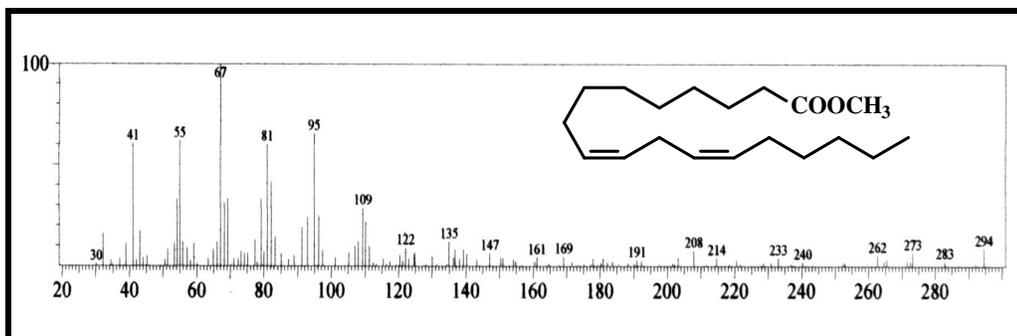


Figura 12 - Espectro de massas do 9,12-octadecadienoato de metila (9,12-(C18:2))

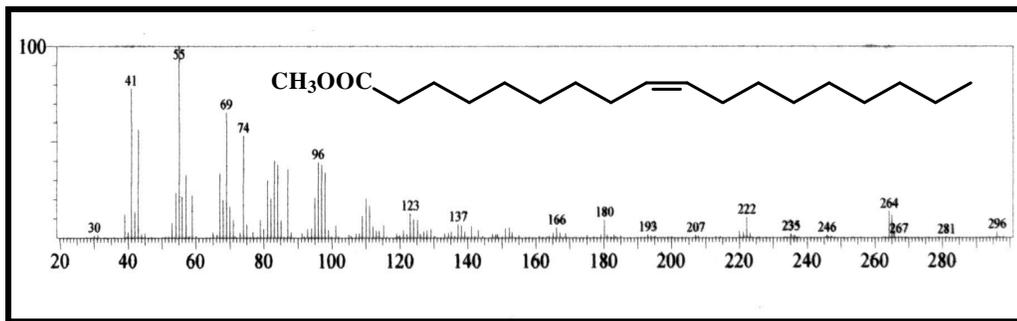


Figura 13 - Espectro de massas do 9-octadecenoato de metila (9-C18:1)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2. Otimização do cultivo de *T. harzianum* para produção de metabólitos secundários

4.2.1. Estudo Cinético

Com o objetivo de avaliar a cinética de produção de metabólitos secundários por *T. harzianum*, este foi cultivado em meio BD e os extratos oriundos do micélio e do meio líquido analisados por CCD a cada 4 dias de crescimento fúngico, durante 32 dias (Item 5.9.1, p. 106).

Através da análise dos extratos do meio líquido (Figura 14, p. 41) foi possível verificar uma maior produção de metabólitos a partir do 16º dia de crescimento fúngico, mantendo-se constante até o 32º dia. Não foi possível observar diferenças significativas na produção de metabólitos secundários nos extratos provenientes do micélio.



B0-Branco de 0 dias e B32-Branco de 32 dias

Figura 14 - Análise por CCD das frações do meio líquido do estudo cinético

4.2.2. Estudo da variação do meio de cultura

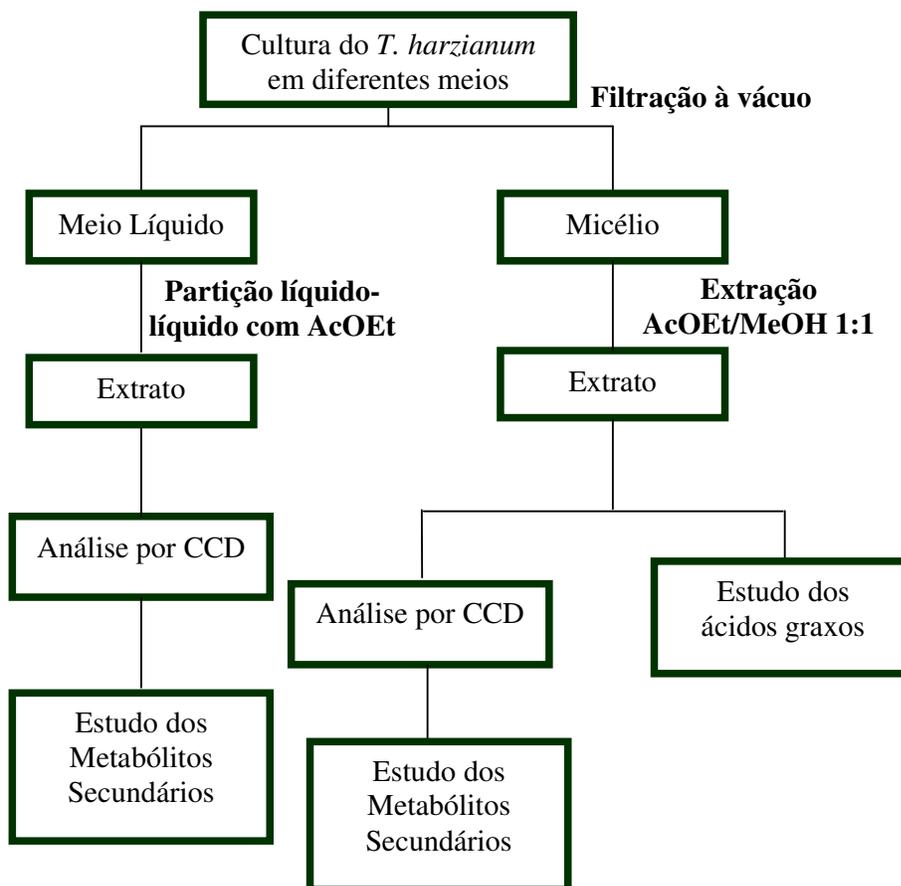
A partir da identificação do tempo de 16 dias como o de máxima produção de metabólitos secundários por *T. harzianum* (Item 5.9.2, p. 106), resolveu-se verificar a influência do meio de cultura no perfil de metabólitos secundários desse fungo. Os meios Czapeck, peptona e caldo de batata foram empregados, sendo que nesse último variou-se a fonte de carbono com glicose e manitol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos do meio líquido e do micélio foram analisados por CCD, constatando-se que o meio peptona era o melhor meio de cultivo, pois apresentava uma maior quantidade de substâncias que absorviam no UV, além de uma maior massa de extrato (Tabela 9, p. 42). Os extratos dos meios de caldo de batata (BDL e BML) apresentaram o mesmo perfil de metabólitos secundários, e o extrato proveniente do meio Czapeck foi o que apresentou a menor produção desses compostos. Não foi observada variação significativa no perfil de metabólitos secundários nos extratos do micélio, os quais foram empregados no estudo do perfil de ácidos graxos de *T. harzianum* (Fluxograma 1, p. 42), descrito anteriormente no Item 4.1 (p. 34).

Tabela 9 - Valores médios dos extratos fúngicos do meio líquido (mg) com 16 dias de crescimento

Meio	CZL	PEPL	BDL	BML
Massas	14,2	97,4	85,2	68,3



Fluxograma 1 - Fluxograma da obtenção dos extratos do meio líquido e do micélio em diferentes meios

4.3. Cultivo de *T. harzianum* em grande escala em meio Peptona

A partir dos resultados obtidos do estudo de otimização do cultivo de *T. harzianum* para produção de metabólitos secundários (Itens 4.2.1-4.2.2, p. 41), foi realizado o cultivo desse fungo em grande escala, empregando-se o meio peptona e 16 dias de crescimento fúngico (Item 5.9.3, p. 106).

Desse cultivo, foram obtidos dois extratos: TM16 PEP (oriundo do micélio) e T16 PEP (oriundo do meio líquido), os quais foram concentrados obtendo-se 5,02 e 1,60 g de material, respectivamente. O extrato TM16 PEP foi submetido a uma partição líquido-líquido com acetonitrila e hexano, obtendo-se duas frações: TM16 PEP Acetonitrila (1,97g) e TM16 PEP Hexano (3,03 g). A fração TM16 PEP Acetonitrila, bem como o extrato T16 PEP foram submetidos a fracionamentos cromatográficos.

O extrato T16 PEP foi cromatografado em gel de sílica, observando-se que a maior parte do material permanecia retido no adsorvente, mesmo após eluição com metanol. Esse resultado não era esperado, já que através de revisão bibliográfica sobre os metabólitos isolados de *T. harzianum*, verificou-se que esta espécie é produtora de diferentes classes de moléculas pouco polares: antraquinonas, azafilonas, lactonas e lactamas (VINALE, *et al.*, 2006). Diante desse resultado, resolveu-se fracionar TM16 PEP Acetonitrila em Sephadex (Item 5.9.3, p.106), utilizando metanol como eluente. Nesse caso, foi possível obter 8 frações, sendo que três delas apresentaram uma maior quantidade de material (F2-F4, Tabela 22, p. 107). A fração F4, que apresentou a maior massa, foi recromatografada em gel de sílica tipo *flash*. Novamente, não foi possível recuperar uma quantidade de massa suficiente para posterior recromatografia. O material recuperado desse fracionamento foi posteriormente submetido à coluna Sephadex, sendo possível a obtenção de um precipitado branco, solúvel apenas em água e com ponto de fusão 165,6 °C como constituinte majoritário da fração. Esse precipitado foi identificado por comparação com padrão por CCD, dados de RMN ¹H e ¹³C (Tabela 10, p. 44) e o ponto de fusão como sendo o poliálcool manitol (Figura 15, p. 44). O manitol já foi isolado pelo fungo *Trichoderma hamatum* por Hussain e colaboradores (1975). Vale ressaltar que trata-se do primeiro relato de isolamento desta molécula de *T. harzianum*.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 16, p. 45) mostrou uma banda larga em 3328,4 cm⁻¹, referente à deformação axial O-H, caracterizando a presença de hidroxilas alcoólicas; absorção em 2938,2 cm⁻¹ referente à deformação axial C_{sp3}-H, e ainda absorções em 1085,9 e 1021,0 cm⁻¹ atribuídas à deformação axial C-O, típicas de compostos polioxigenados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de RMN ^{13}C -BB (125 MHz) do manitol (Figura 17, p. 45), obtido em D_2O , exibiu três linhas espectrais na região compatível com carbonos oxigenados (δ 59,58-67,19).

A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -BB e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 18, p. 46) revelou a existência de dois carbonos metínicos (δ 65,63-67,20) e um metilênico (δ 59,58).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz) (Figura 19, p. 46) corroborou as informações sugeridas por apresentar apenas sinais na região característica de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, na faixa de δ 3,67-3,90.

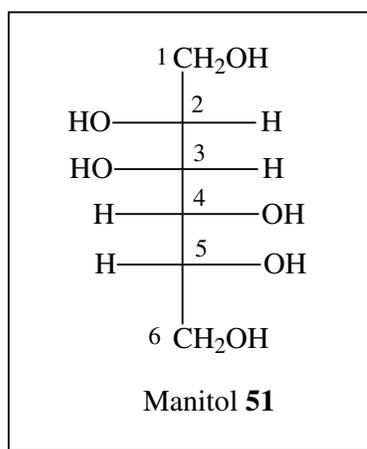


Figura 15 - Estrutura do manitol **51**

Tabela 10 - Comparação dos dados de RMN ^{13}C do manitol (125 MHz, D_2O) com o do padrão (125 MHz, D_2O)

	<i>manitol</i>	<i>Padrão</i>
C	δ_{C}	δ_{C}
1 e 6	59,58	63,41
2 e 5	65,62	69,57
3 e 4	67,19	71,13

RESULTADOS E DISCUSSÃO

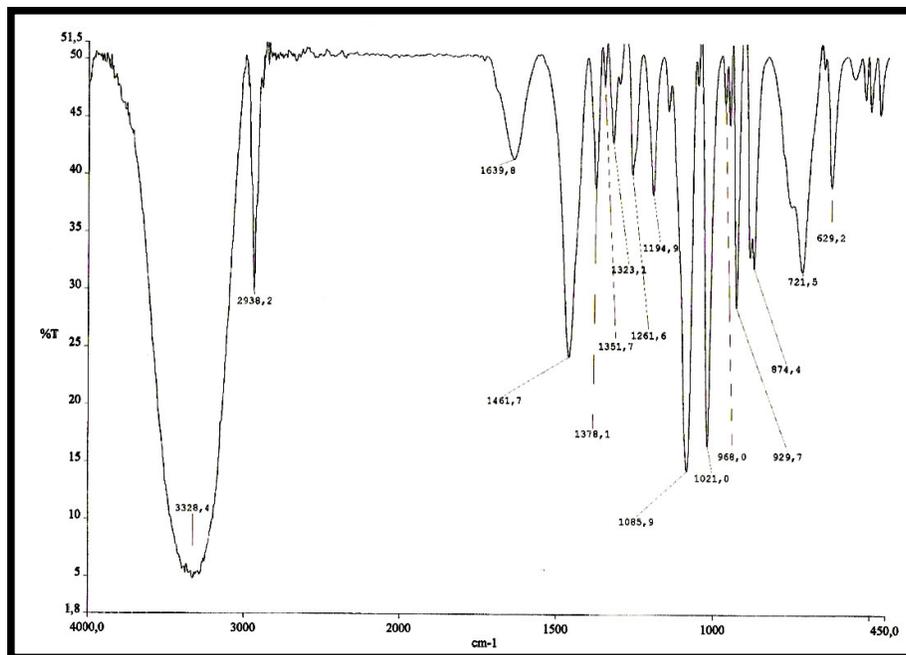


Figura 16 - Espectro de absorção na região do I.V. do manitol com pastilhas de KBr

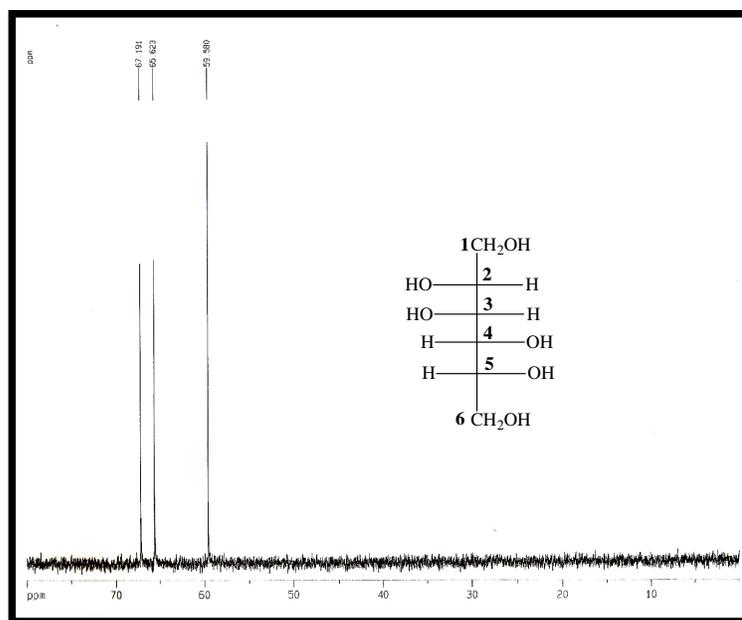


Figura 17 - Espectro de RMN ¹³C-BB (D₂O, 125 MHz) do manitol

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os casos não foi possível isolar os metabólitos secundários desse fungo. Desse modo, resolvemos submeter todas as frações até então obtidas ao ensaio de atividade antitumoral (Item 5.10, p. 108).

4.4. Teste antitumoral

A citotoxicidade *in vitro* de extratos e frações de *T. harzianum* (Tabela 25, p. 109) foi ensaiada frente a 3 linhagens de células tumorais e os resultados das frações que apresentaram valores de inibição $\geq 75\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais (Tabela 11).

Tabela 11 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras que deram resultado positivo em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 $\mu\text{L/mL}$

Substâncias estoque de 10 mg/mL > [C] poço= 50 $\mu\text{g/mL}$	MTT 72 horas percentagem de inibição		
	Linhagens celulares		
	HCT-8	SF-295	MDA-MB435
	Média da inibição	Média da inibição	Média da inibição
TM16 PEP Acetonitrila	100,00	84,37	97,55
TM16 PEP Aceton 3	90,09	61,97	73,30
TM16 PEP Aceton 2	100,00	98,02	99,46
BD1L	100,00	100,00	100,00
BM1L	100,00	98,08	100,00
CZ1L	100,00	97,29	100,00

[C]: Concentração; MTT: sal de tetrazolium; HCT-8: cólon - humano; SF-295: glioblastoma - humano; MDA-MB435: mama - humano; TM16 PEP Acetonitrila: Extrato do micélio, do meio peptona e extraído com acetonitrila; TM16 PEP Aceton 3: 3^a Fração da cromatografia da fração TM16 PEP Acetonitrila; TM16 PEP Aceton 2: 2^a Fração da cromatografia da fração TM16 PEP Acetonitrila; BD1L: Extrato do micélio, crescido no meio Batata-dextrose; BM1L: Extrato meio líquido, crescido em meio Batata-manitol e CZ1L: Extrato meio líquido, crescido em meio Czapeck

4.5. Cultivo de *T. harzianum* em grande escala em meio BD

A dificuldade encontrada no isolamento de metabólitos secundários dos extratos de *T. harzianum* cultivado em peptona levou a tentar isolar esses compostos a partir de extratos em meios de cultura diferentes, os quais já haviam sido analisados (Item 4.2.2, p. 41) e que possuíam atividade citotóxica (Item 4.4, p. 47). Desse modo, foi realizado o cultivo do fungo em grande escala, empregando-se o meio BD (Batata-dextrose) e 24 dias de crescimento fúngico (Item 5.11, p. 109), com o objetivo de se obter uma maior quantidade de massa de extrato.

Desse cultivo, foram obtidos dois extratos: TM24BD (oriundo do micélio) e T24BD (oriundo do meio líquido), os quais foram concentrados obtendo-se 11,42 g e 1,30 g de extratos, respectivamente. A fração T24BD foi submetida a fracionamento cromatográfico

RESULTADOS E DISCUSSÃO

em coluna Sephadex LH 20 com eluição em metanol, onde foram obtidas 9 frações. Após análises por CCD, resolveu-se trabalhar com duas das frações (F3 e F4, Tabela 26, p. 110). Estas foram fracionadas por HPLC preparativo, as quais levaram ao isolamento de uma substância de aspecto oleoso, denominado inicialmente de F14.

4.5.1. Determinação estrutural de F14

O espectro de massas (Figura 21, p. 53) de F14, obtido pela técnica de elétron spray no modo positivo, apresentou o pico íon molecular com razão massa/carga igual a 592 $[M-H]^+$ Daltons e um outro pico com razão massa/carga igual a 614 $[M-Na]^+$, que corresponde ao aduto de sódio. Essas massas sugerem que a substância se trata de um composto com um número ímpar de átomos de nitrogênio.

O espectro de RMN 1H (Figuras 22-25, p. 53-55) de F14 apresentou sinais na região de hidrogênios alifáticos (δ 0,89 – 1,98): δ 0,89 (3H, t, $J = 6,4$ Hz); δ 1,28 (14H, m); δ 1,52 (4H, m) e δ 1,98 (2H, m). Foram observados sinais com deslocamentos de hidrogênios alfa a carbonilas e a carbonos nitrogenados (δ 2,44 - 4,60): δ 2,44 (4H, t, $J = 7,6$ Hz); δ 2,61 (1H, d, $J = 16,4$ Hz), δ 2,89 (2H, m), δ 3,10 (1H, dd, $J = 5,2$ e 14,6 Hz), δ 3,21 (1H, d, $J = 7,6$ Hz) e δ 4,60 (1H, dd, $J = 5,2$ e 8,4 Hz). Além desses sinais foram observados dois sinais referentes a hidrogênios de anéis aromáticos em δ 6,70 (2H, d, $J = 8,8$ Hz) e δ 7,02 (2H, d, $J = 8,8$ Hz) e um sinal de hidrogênios de olefina em δ 5,54 (2H, m).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figuras 26-28, p. 55-56) para essa substância apresentou 28 sinais, com 3 sinais equivalentes, que pode ser verificado pela intensidade dos sinais e pela massa da substância, contabilizando, assim, 31 carbonos. Destes, 11 encontram-se na região de carbonos sp^2 (δ 116,2-214,7), sendo 6 deles funcionalizados (δ 157,4 e 214,7), 17 característicos de carbonos sp^3 , um deles em δ 78,0, atribuído a carbono oxigenado e outro em δ 55,1, referente a carbono nitrogenado (Tabela 12, p.49).

Comparação do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figuras 29-30, p. 57) com o espectro de RMN ^{13}C -BB mostrou a presença de oito carbonos não hidrogenados (C), oito carbonos metínicos (CH), quatorze carbonos metilênicos (CH₂) e um sinal para carbono metílico (CH₃) (Tabela 12, p. 49).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (δ) com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros ^{13}C -BB e DEPT-135°

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
78,0	55,1	23,7	14,4	
128,7	57,8	24,8		
157,4	116,2 (2C)	24,9		
173,6	124,5	29,8		
173,8	131,4 (2C)	29,9		
174,5	137,6	30,1		
175,8		30,2		
214,7		30,3		
		32,9		
		33,5		
		37,5		
		43,1		
		43,5 (2C)		
C ₈	C ₈ H ₈	C ₁₄ H ₂₈	CH ₃	C ₃₁ H ₃₉ C ₃₁ H ₄₅ NO ₁₀
C-NH				
C-OH (5)				
C=O (5)				

A partir dos dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e RMN ^{13}C -DEPT 135° pode-se sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$ para o composto, a qual está de acordo com o pico íon molecular de razão massa/carga igual à 592 Daltons $[\text{M}-\text{H}]^+$, obtido no espectro de massas (Figura 21, p. 53).

No espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H – COSY (400 MHz, CD_3OD) (Figura 31, p. 58), foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ 1,52 (H-11-15) com o sinal em δ 2,44 (H-12-14); acoplamento δ 3,21 (H-4) com o sinal δ 5,54 (H-5) e esse último com o sinal δ 5,54 (H-6). Além dos acoplamentos em δ 6,70 e 7,02 (H-6'-8') com δ 6,6 e 7,02 (H-5'-9') (Tabela 13, p. 51).

O espectro de correlação heteronuclear ^1H x ^{13}C – HSQC (Figura 32-33, p. 59) de F14 apresentou as correlações dos hidrogênios metílicos em δ 0,89 com o carbono δ 14,4. Correlação dos hidrogênios metilênicos em δ 1,28 com os carbonos δ 23,7, 29,8, 29,9, 30,1, 30,2, 30,3, 32,9 e 33,5; δ 1,52 com os carbonos em δ 24,8 e 24,9; δ 2,44 com o carbono δ 43,5; dos hidrogênios diastereotópicos em δ 2,61 e 2,89 com o carbono em δ 43,1 e δ 2,89 e 3,10 com o carbono δ 37,5. Hidrogênios metínicos em δ 4,60 com o carbono δ 55,1 e δ 3,21 com o carbono δ 57,8. Apresentou também acoplamento dos hidrogênios aromáticos em δ 6,70 e 7,02 com os respectivos carbonos em δ 116,2 e 131,4 e dos hidrogênios olefínicos em δ 5,54 com os carbonos δ 124,5 e 137,6 (Tabela 13, p. 51).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de correlação heteronuclear à longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC (Figuras 34-36, p. 60-61) de F14, mostrou a correlação à longa distância dos hidrogênios em δ 0,89 com os carbonos 23,7 (2J), 32,9 (3J), dos hidrogênios em δ 1,52 com os carbonos 30,1 (2J) e 43,5 (2J), confirmando as posições dos carbonos alfa e beta a carbonila da cetona. Hidrogênios localizados em δ 1,98 com os carbonos 124,5 (2J) e 137,6 (3J) e δ 3,21 com os carbonos 124,5 (3J) e 137,6 (2J), os quais determinaram a localização da dupla ligação. A correlação com hidrogênios em δ 2,44 com os carbonos 24,9 (2J), 29,9 (3J) e 214,7 (2J), o que indicou a posição da carbonila da cetona. As posições das outras carbonilas foram indicadas pelas seguintes correlações: δ 2,61 com o carbono 173,6 (2J) e 175,8 (3J); δ 2,89 com o carbono 174,5 (2J); δ 3,10 com o carbono 174,5 (3J). Mostrou ainda a correlação dos hidrogênios aromáticos em δ 6,70 com os carbonos 116,2 (3J), 128,7 (3J) e δ 157,4 (2J) e em δ 7,02 com os carbonos 116,2 (2J), 131,4 (3J) e δ 157,4 (3J) (Tabela 13, p. 51).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 13 - Dados espectrométricos de F14

C	HSQC		COSY	HMBC	
	$\delta_H^{(a)}$	$\delta_C^{(b)}$		2J	3J
2	2,61 (1H, d, $J = 16,4$ Hz) 2,89 (1H, d, $J = 16,4$ Hz)	43,1	2,61; 2,89	78,0; 173,6 78,0; 173,6	57,8; 175,8
4	3,21 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)	57,8	5,54	78,0; 137,6	124,5
5	5,54 (2H, m)	137,6	3,21	57,8; 124,5	33,5
6	5,54 (2H, m)	124,5	1,98	33,5	57,8
11-15	1,52 (4H; m)	24,8-24,9	1,29	30,1; 43,5	
12-14	2,44 (4H, t, $J = 7,6$, Hz)	43,5	1,52	24,9; 214,7	29,9
19	1,28 (14H, m)	23,7	0,89	30,1	33,5
20	0,89 (3H, t, $J = 6,4$, Hz)	14,4	1,29	23,7	32,9
2'	4,60 (1H, dd, $J = 5,2; 8,4$, Hz)	55,1	2,89; 3,10	37,5; 174,5	128,7
3'	2,89 (1H, dd, $J = 8,4; 14,6$ Hz) 3,10 (1H, dd, $J = 5,2; 14,6$ Hz)	37,5	2,89; 3,10	55,1; 128,7 55,1; 128,7	131,4; 174,5 131,4; 174,5
5'	7,02 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	131,4	6,70	116,2; 128,7	157,4
9'				116,2; 128,7	157,4
6'	6,70 (2H, d, $J = 8,8$, Hz)	116,2	7,02	157,4	128,7; 116,2
8'				157,4	128,7; 116,2

(a) MeOD, 400 MHz

(b) MeOD, 100 MHz

Através da análise dos dados de massas, ressonância magnética nuclear uni- e bidimensional de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura (HARRIS *et al.*, 1993) foi possível sugerir que F14 tratava-se de um antimicrobiano conhecido como viridifungina A (Figura 20, p. 51) isolado anteriormente de *Trichoderma viride*. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C observados estão em concordância com os descritos na literatura (Tabela 14, p. 52). Vale ressaltar que trata-se do primeiro relato de isolamento desta molécula de *T. harzianum*.

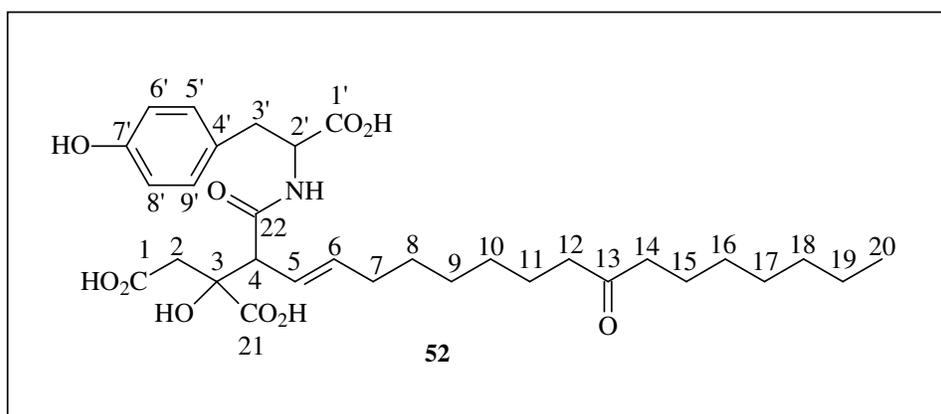


Figura 20 - Estrutura da viridifungina A

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 14 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de F14 e comparação com dados da viridifungina A descritos na literatura

C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	F14 ^a	HARRIS <i>et. al.</i> , 1993 ^b	F14 ^c	HARRIS <i>et. al.</i> , 1993 ^d
1			173,6	173,6
2	2,61 (1H, d, $J = 16,4$ Hz) 2,89 (1H, d, $J = 16,4$ Hz)	2,62 (1H, d, $J = 16,3$ Hz) 2,91 (1H, d, $J = 16,3$ Hz)	43,1	43,1
3			77,9	77,9
4	3,21 (1H, d, $J = 7,6$ Hz)	3,22 (1H, d, $J = 8,5$ Hz)	57,8	57,8
5	5,54 (2H, m)	5,53 (2H, m)	137,6	137,6
6	5,54 (2H, m)	5,53 (2H, m)	124,5	124,5
7	1,98 (2H, m)	1,98 (2H, m)	33,47	33,47
8-10				
	1,28 (14H; m)	1,29 (14H; m)	29,8-32,9	29,8-32,8
16-18				
11-15	1,52 (4H; m)	1,53 (4H; m)	24,8; 24,9	24,8; 24,9
13			214,6	214,7
12-14	2,44 (4H, t, $J = 7,6$, Hz)	2,44 (4H, t, $J = 7,2$, Hz)	43,5	43,5
19	1,28 (14H, m)	1,28 (14H, m)	23,7	23,6
20	0,89 (3H, t, $J = 6,4$, Hz)	0,90 (3H, t, $J = 7,0$, Hz)	14,4	14,1
21			175,8	175,8
22			173,8	173,8
1'			174,5	174,5
2'	4,60 (1H, dd, $J = 5,2; 8,4$, Hz)	4,61 (1H, dd, $J = 5,0; 8,7$, Hz)	55,1	55,1
3'	2,89 (1H, dd, $J = 8,4; 14,6$ Hz) 3,10 (1H, dd, $J = 5,2; 14,6$ Hz)	2,89 (1H, dd, $J = 8,7; 14,3$ Hz) 3,11 (1H, dd, $J = 5,3; 14,3$ Hz)	37,5	37,5
4'			128,7	128,7
5'-9'	7,02 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	7,03 (2H, d, $J = 8,8$, Hz)	131,4	131,4
6'-8'	6,70 (2H, d, $J = 8,8$, Hz)	6,68 (2H, d, $J = 8,8$, Hz)	116,2	116,2
7'			157,4	157,3

(a) 400 MHz, CD₃OD

(b) 300 MHz, CD₃OD

(c) 100 MHz, CD₃OD

(d) 75 MHz, CD₃OD

RESULTADOS E DISCUSSÃO

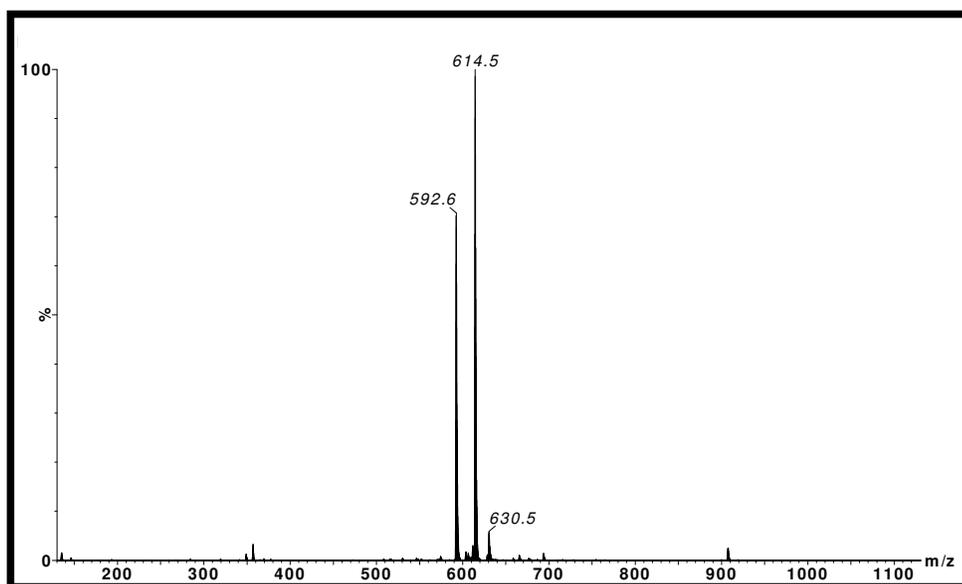


Figura 21 - Espectro de massas de viridifungina A (ES+, 6,7 eV)

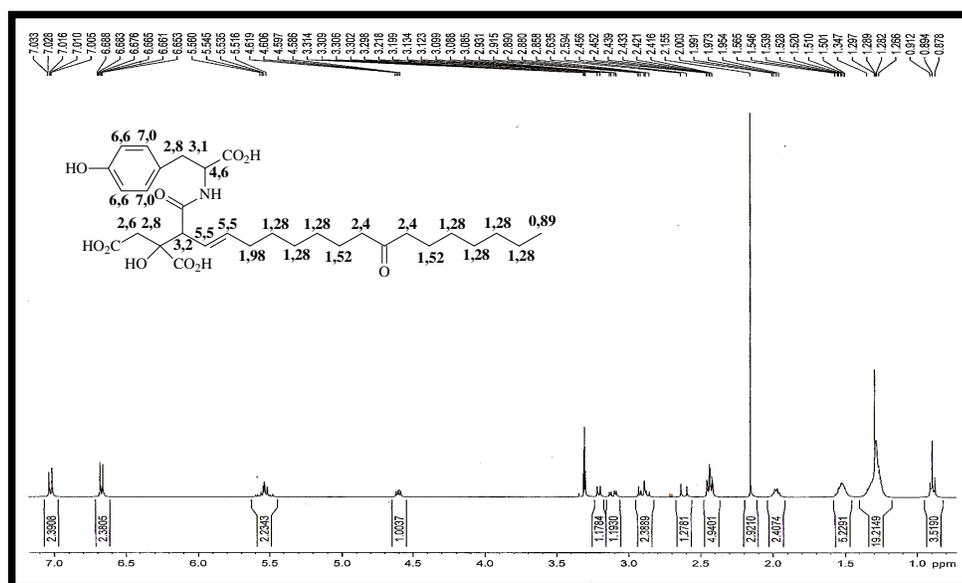


Figura 22 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) de viridifungina A

RESULTADOS E DISCUSSÃO

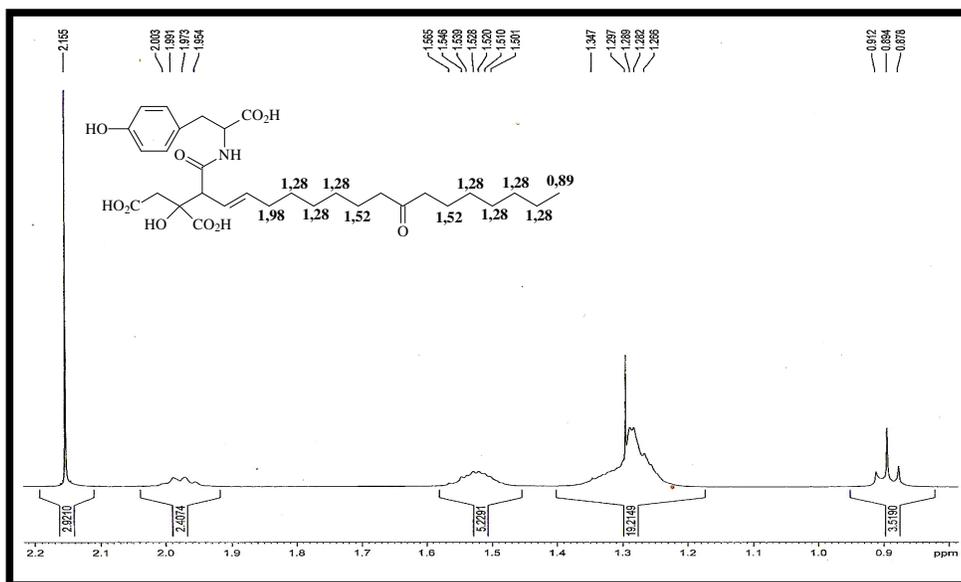


Figura 23 - Expansão (a) do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de viridifungina A

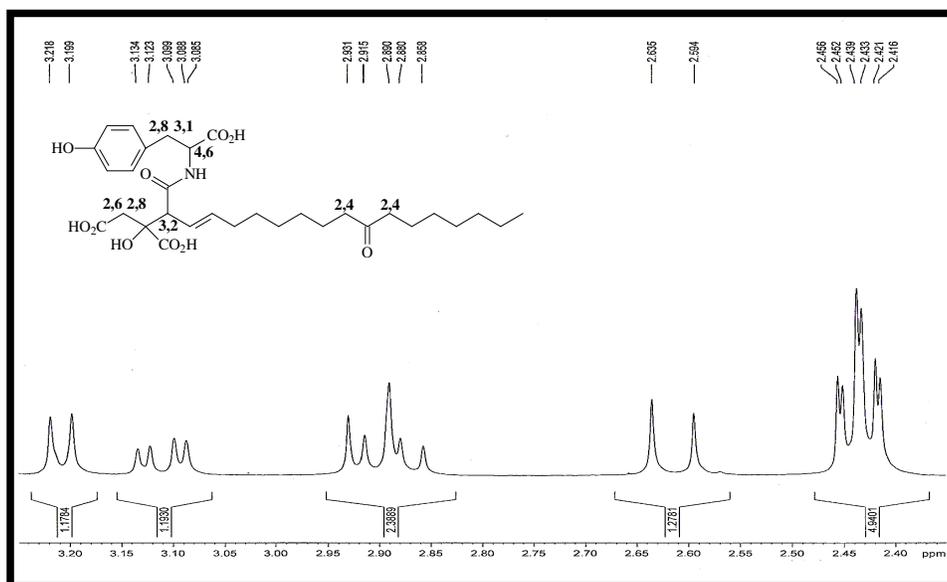


Figura 24 - Expansão (b) do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de viridifungina A

RESULTADOS E DISCUSSÃO

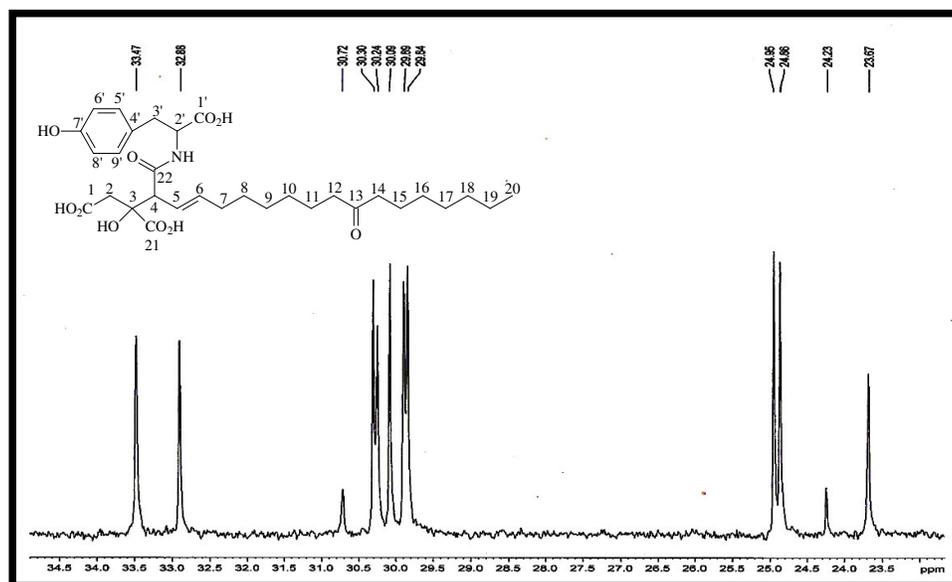


Figura 27 - Expansão (a) do espectro de RMN ^{13}C -BB (100 MHz, CD_3OD) de viridifungina A

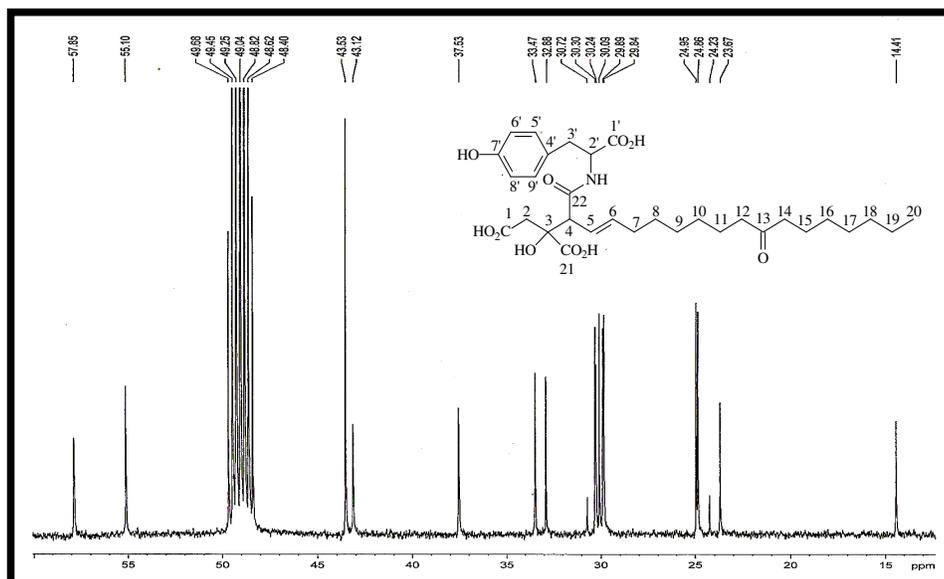


Figura 28 - Expansão (b) do espectro de RMN ^{13}C -BB (100 MHz, CD_3OD) de viridifungina A

RESULTADOS E DISCUSSÃO

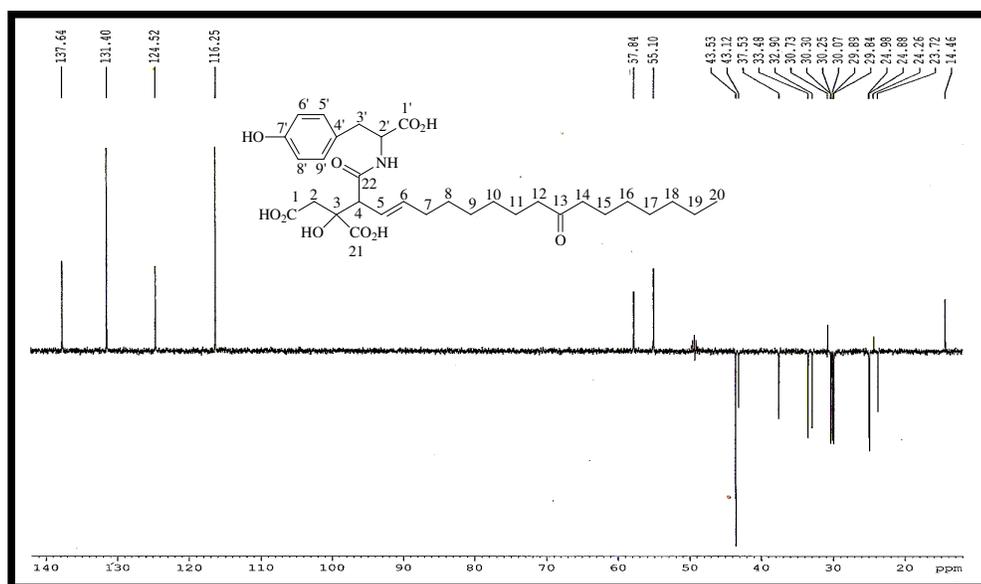


Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (100 MHz, CD_3OD) de viridifungina A

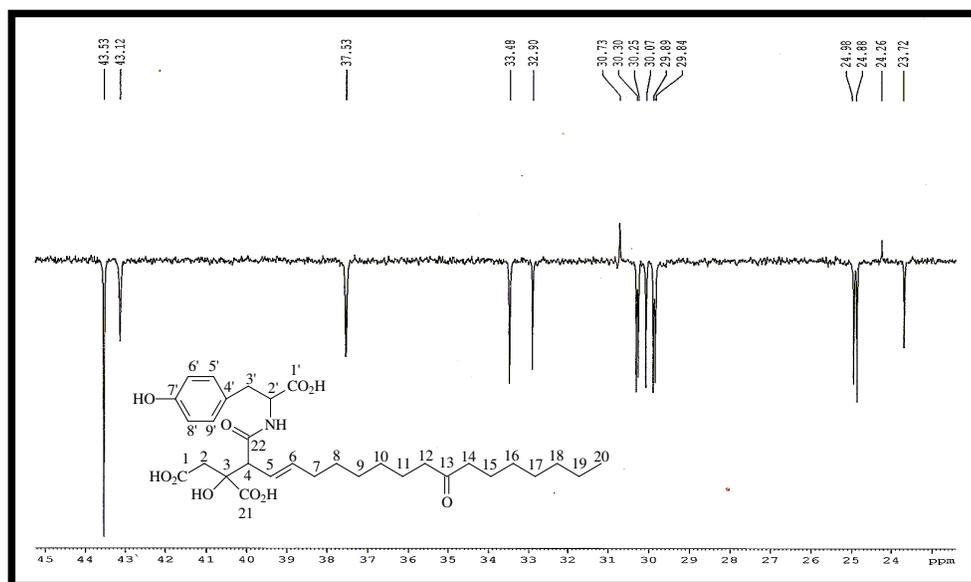


Figura 30 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (100 MHz, CD_3OD) de viridifungina A

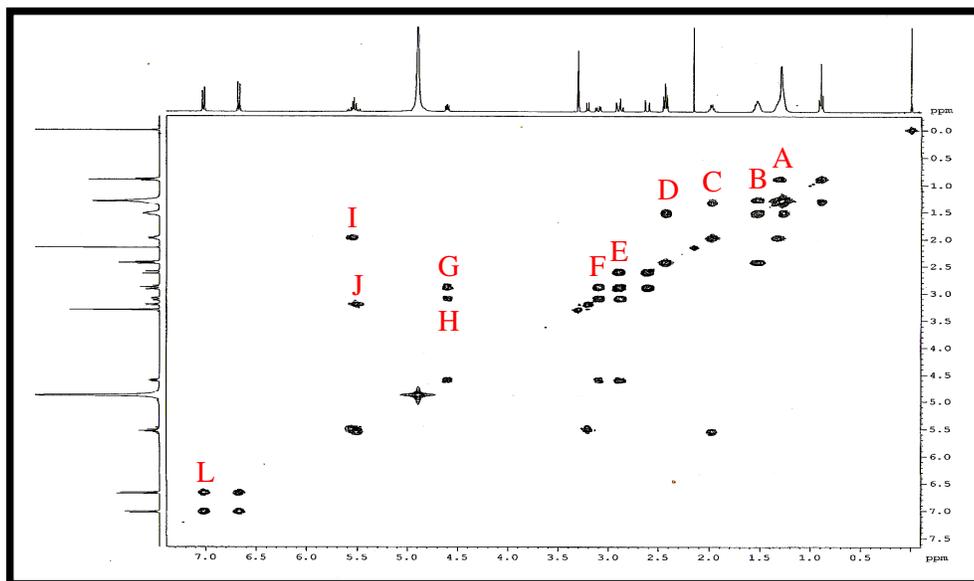
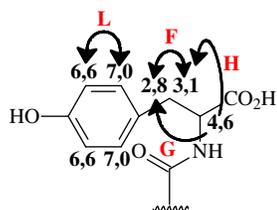
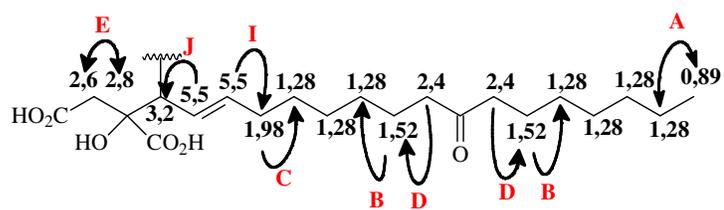


Figura 31 - Espectro de RMN 2-D COSY (400 MHz, CD₃OD) de viridiofungina A

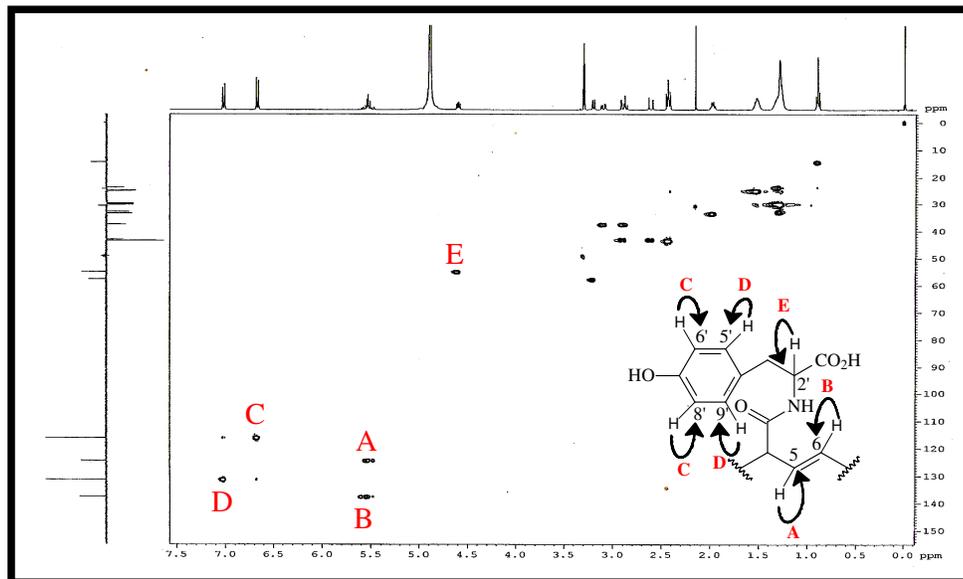


Figura 32 - Espectro de RMN 2-D HSQC (400 MHz, CD₃OD) de viridifungina A

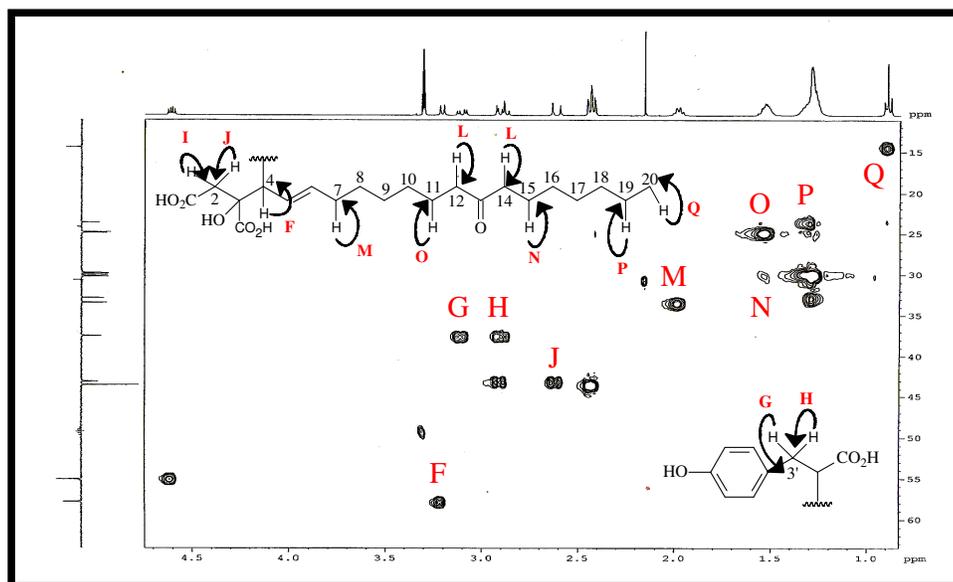


Figura 33 - Expansão do espectro de RMN 2-D HSQC (400 MHz, CD₃OD) de viridifungina A

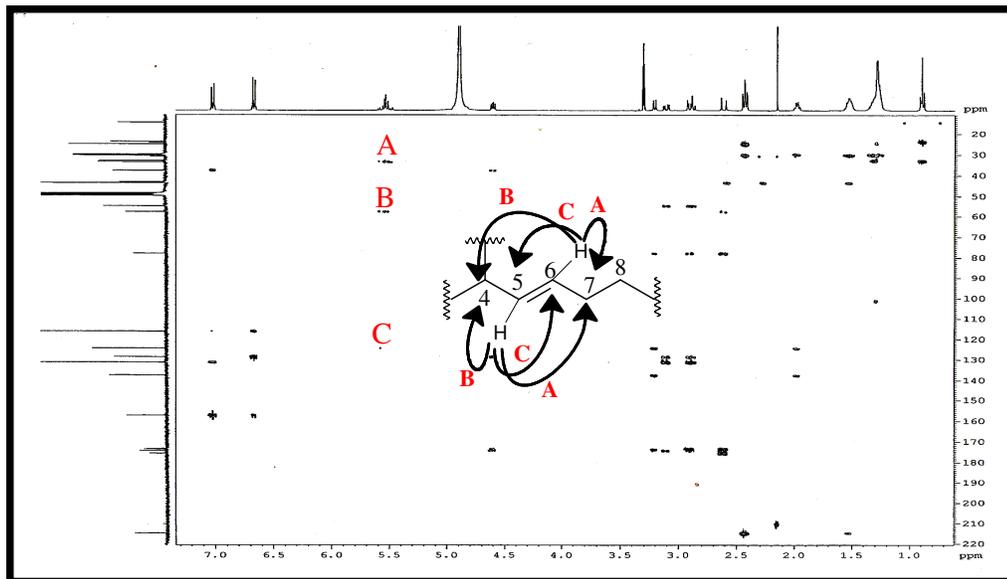


Figura 34 - Espectro de RMN 2-D HMBC (400 MHz, CD₃OD) de viridifungina A

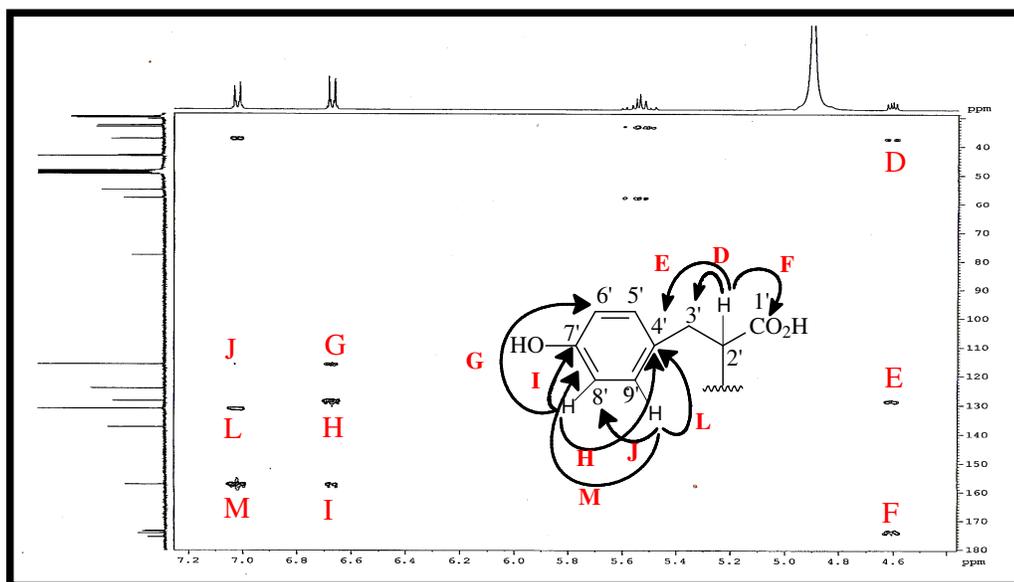


Figura 35 - Expansão (a) do espectro de RMN 2-D HMBC (400 MHz, CD₃OD) de viridifungina A

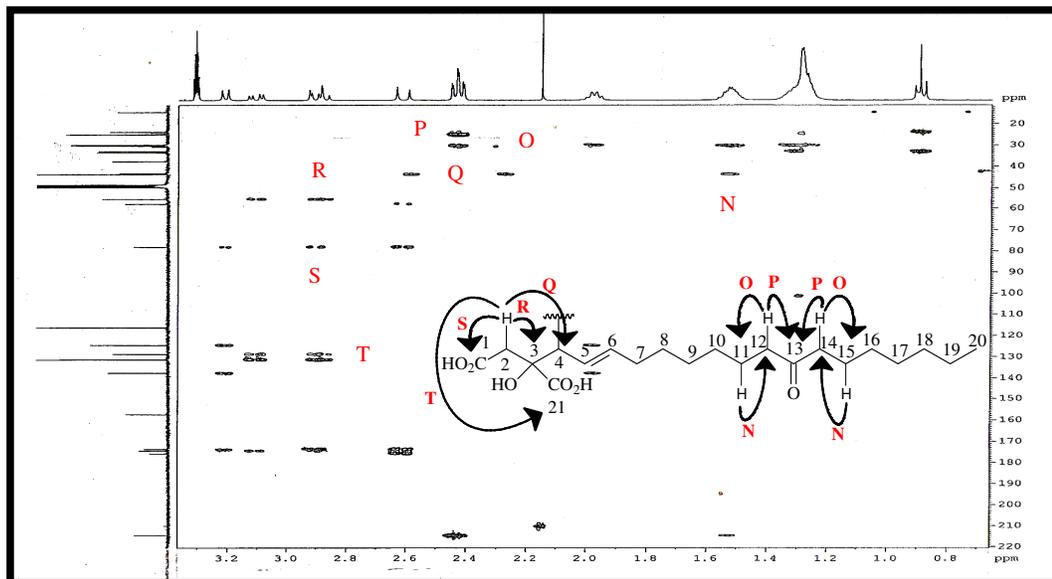


Figura 36 - Expansão (b) do espectro de RMN 2-D HMBC (400 MHz, CD₃OD) de viridiofungina A

4.6. Emprego de *T. harzianum* na biotransformação de substratos orgânicos

Antes de se empregar o *T. harzianum* na biotransformação de substratos orgânicos, foram realizados estudos preliminares de identificação de atividade ADH (Item 5.12.1, p. 111) e dosagem de proteínas (Item 5.12.2, p. 112).

4.6.1. Atividade Alcooldesidrogenases (ADHs)

Do ponto de vista biotecnológico, as enzimas álcool desidrogenases (ADHs) são bastante empregadas em química orgânica sintética devido ao seu grande potencial de resolução de centros quirais (MATSUDA, 2007). A enzima álcool desidrogenase (ADH, EC 1.1.1.1) é uma enzima intracelular envolvida no catabolismo da glicose, Figura 37 (p. 62) (ESPOSITO, 2004; NELSON e COX, 2006; PRESECKI e VASIC-RACKI, 2005), que catalisa a oxidação reversível de álcoois aos correspondentes compostos carbonilados, Figura 38 (p. 62) (SILVERMAN, 2002).

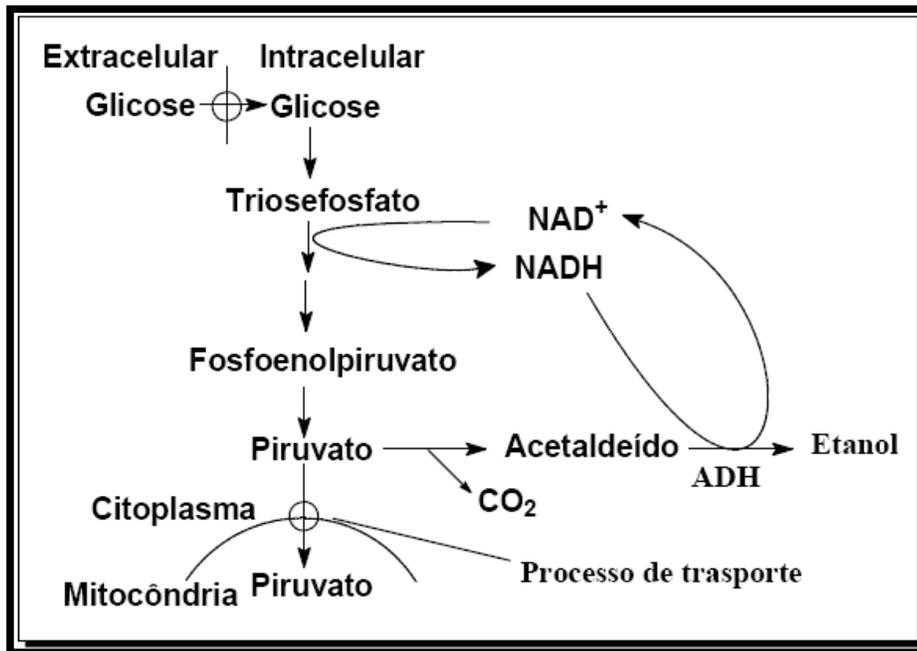


Figura 37 - Metabolismo da Glicose

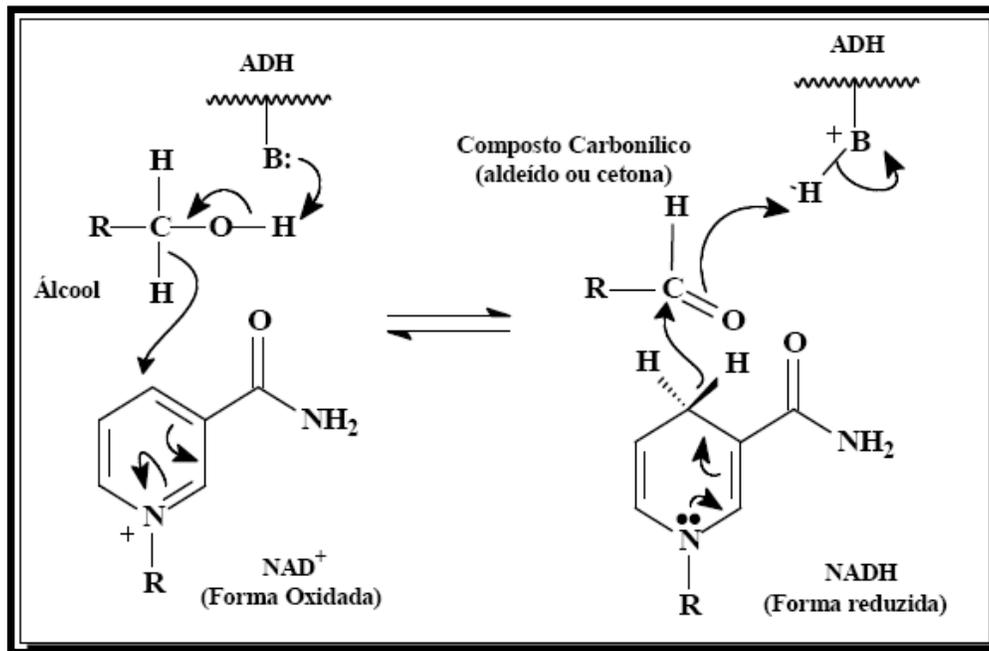


Figura 38 - Reação catalisada por ADH

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na busca pelo biocatalisador ideal, inúmeros estudos de triagem de microrganismos vêm sendo realizados através do *screening* de atividade metabólica de enzimas desidrogenases (FREIMOSER *et al.*, 1999; MELETIADIS *et al.*, 2000; ZANON *et al.*, 2007). Uma das metodologias descritas na literatura para *screening* de atividade álcool desidrogenase envolve o emprego de fucsina básica como corante do substrato enzimático (DELAMATER, 1948; KLIGMAN e MESCON, 1950; PUCHTLER *et al.*, 1975; HILLOCKS, 1985; MADSEN *et al.*, 1998). Nesse ensaio, o piruvato formado a partir do metabolismo da glicose segue a rota da fermentação alcoólica produzindo acetaldeído, que logo em seguida é reduzido a etanol pela ação da ADH (ESPOSITO, 2004; NELSON e COX, 2006; PRESECKI e VASIC-RACKI, 2005). A fucsina básica reage com o acetaldeído mudando a coloração das colônias para rosa (PUCHTLER *et al.*, 1975). No presente trabalho foi realizada a bioprospecção da atividade ADH em *Trichoderma harzianum* pelo método de difusão em gel, com adaptações das metodologias propostas por PUCHTLER (1975), KLIGMAN e MESCON (1950) e HILLOCKS (1985). Nesse ensaio foi empregado como meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA) suplementado com 0,1% de fucsina básica e crescimento vegetativo de 7 a 40 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e o fungo *Fusarium oxysporum* (Figura 39) foi utilizado como controle positivo (HILLOCKS, 1985).

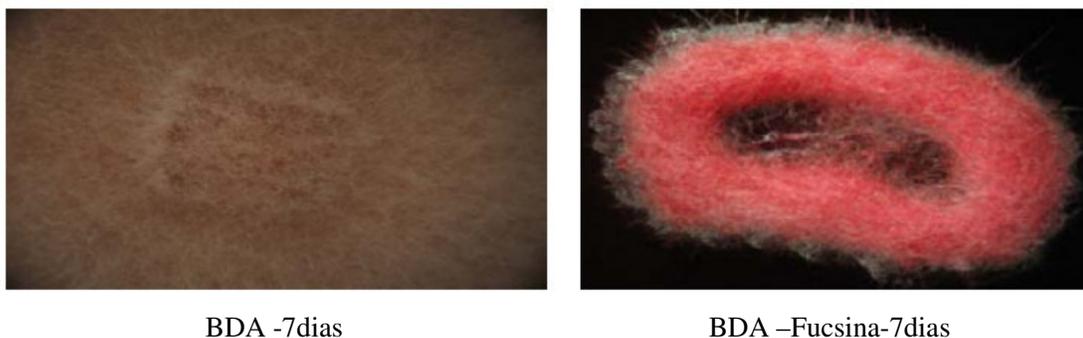


Figura 39 - Atividade da ADH em *Fusarium oxysporum* (Controle positivo)

O desenvolvimento de colônias rosadas no crescimento de *T. harzianum* no período de 7 a 40 dias (Figura 40, Pág. 64) indicou um resultado positivo para ADHs e motivou o emprego desse fungo na redução de cetonas.

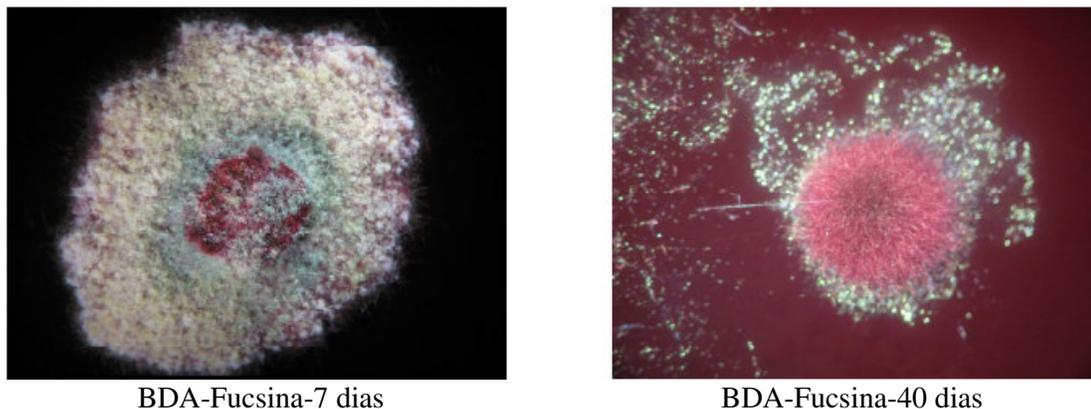


Figura 40 - Atividade da ADH em *Trichoderma harzianum*

4.6.2. Dosagem de proteína dos meios de cultura filtrados

Para o emprego de uma boa técnica de dosagem de proteínas deve-se levar em consideração os seguintes critérios: facilidade na detecção, especificidade, manuseio, rapidez e custo. Muitos métodos são propostos para a determinação de proteínas, sendo eles divididos da seguinte forma: os que ocorrem por reações químicas e os de fixação da proteína aos corantes (BRADFORD, 1976).

Um dos métodos que apresenta grande sensibilidade, freqüentemente empregados em dosagem de proteínas, é o de Bradford. Esse método baseia-se na interação do corante “Coomassie Blue Brilliant G-250” com macromoléculas de proteínas que contenham grupos ácidos ou básicos em suas cadeias laterais. Este corante se liga principalmente à resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos, especialmente arginina. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (ZAIA *et al*, 1998; LUCARINI e KILIKIAN, 1998).

Nesse trabalho, o método de Bradford foi empregado na dosagem de proteínas presentes no meio líquido caldo de batata com glicose (BD) proveniente do cultivo de *T. harzianum* no período de três dias em agitação. Foi possível identificar um teor 140,5 mg/L de proteína no terceiro dia. A dosagem foi realizada também no primeiro e no segundo dia, revelando um teor de 3,0 e 28,0 mg/L de proteínas, respectivamente. Com isso, observou-se que o teor de proteína aumentava com o decorrer dos dias, nos permitindo analisar as biotransformações a partir do terceiro dia em agitação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.3. Biotransformação da (*R*)-carvona

Às culturas de *T. harzianum* em meio líquido BD, com 7 dias de crescimento, foi adicionada 20 µL (0,13 mmol) de (*R*)-carvona e mantidas sob condição estática por 1, 2, 3 e 6 dias. Também foi testada a biotransformação sob agitação, mantidas por 3, 6 e 9 dias. Os testes foram feitos em triplica e o meio líquido contendo somente o substrato foi empregado como branco.

A análise dos cromatogramas (Figuras 41-48, p. 66-69) e dos espectros de massas (Figuras 49-50, p. 70) para ambos os estudos mostraram a presença da (*R*)-carvona e um produto de biotransformação. O padrão de fragmentação observado no espectro de massas desse produto foi semelhante ao descrito na literatura para derivados da (*R*)-carvona (THOMAS; WILLHAM, 1966; DYK *et al.*, 1998).

No estudo sob condição estática (Tabela 15, p. 65), observou-se que com o decorrer dos dias havia um aumento no percentual relativo de conversão da (*R*)-carvona no produto formado. O mesmo foi observado no estudo sob agitação (Tabela 16, p. 65).

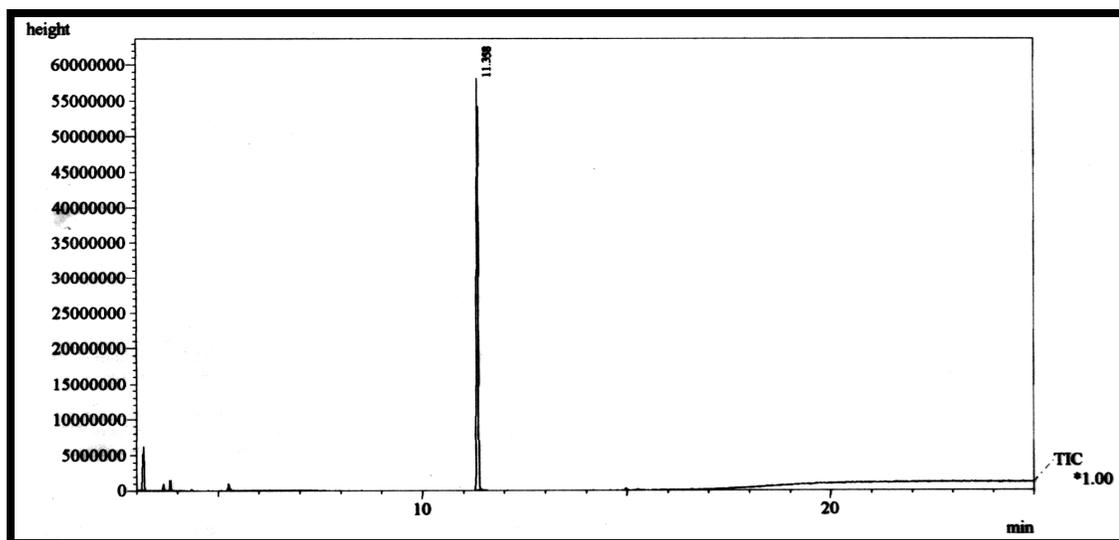
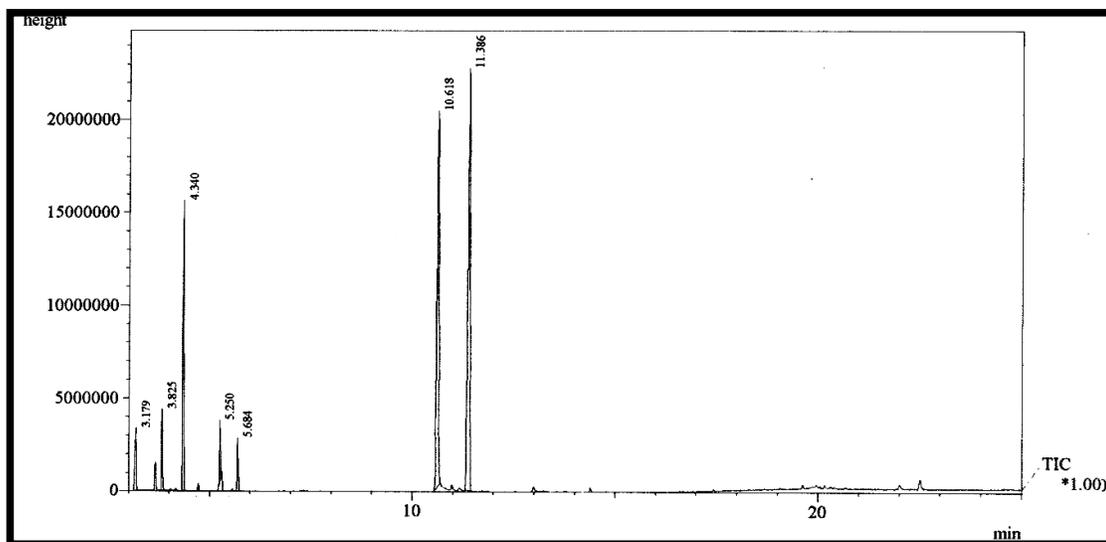
Tabela 15 - Composição do percentual relativo entre a (*R*)-carvona e seu produto em condição estática variando os dias de reação

	Percentual relativo (%)			
	1 dia	2 dias	3 dias	6 dias
Produto (10,6 min)	33,2	34,3	40,0	68,7
(<i>R</i>)-carvona (11,3 min)	66,8	65,7	60,0	31,3

Tabela 16 - Composição do percentual relativo entre a (*R*)-carvona e seu produto em agitação variando os dias de reação

	Percentual relativo (%)		
	3 dias	6 dias	9 dias
Produto (10,6 min)	84,2	93,7	98,6
(<i>R</i>)-carvona (11,3 min)	15,8	6,3	1,4

Foi possível observar as maiores bioconversões da (*R*)-carvona nas reações realizadas sob agitação, o que pode ser justificado pelo fato das enzimas ADHs estarem presentes no interior das células fúngicas (NELSON & COX, 2006) e serem lançadas para o meio extracelular durante o processo de agitação. É importante salientar que a extração dos produtos da reação é realizada no meio líquido (Item 5.14, p. 116).

Figura 41 - Cromatograma do controle (somente a *(R)*-carvona)Figura 42 - Cromatograma do produto bruto da reação da *(R)*-carvona com 1 dia estático

RESULTADOS E DISCUSSÃO

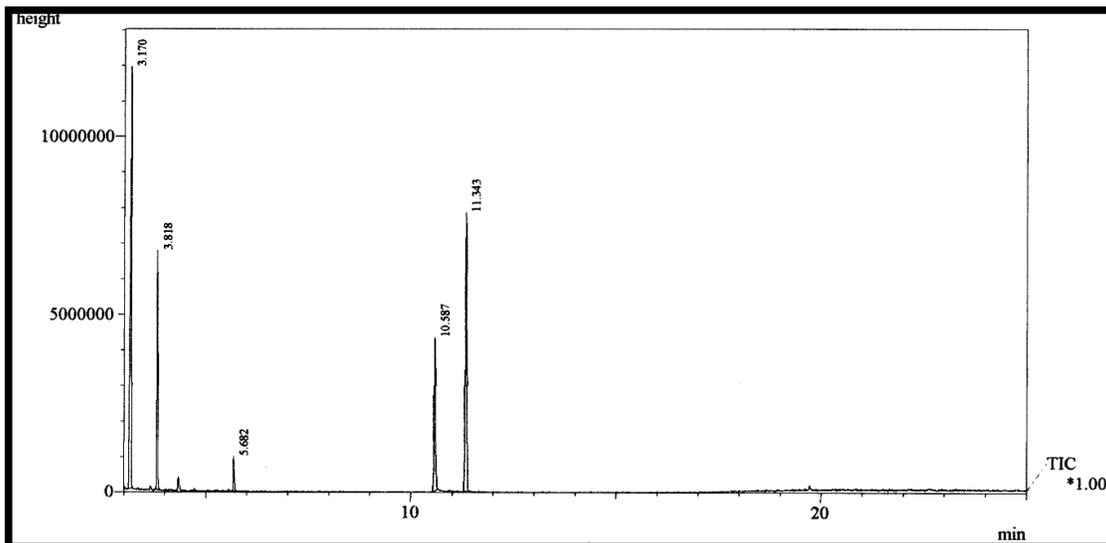


Figura 43 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 2 dias estático

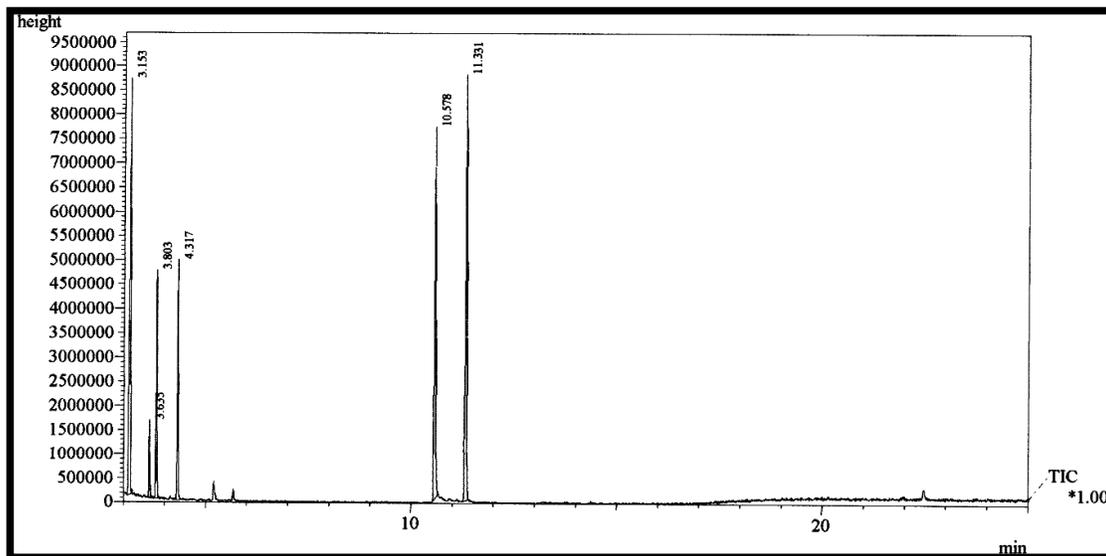


Figura 44 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 3 dias estático

RESULTADOS E DISCUSSÃO

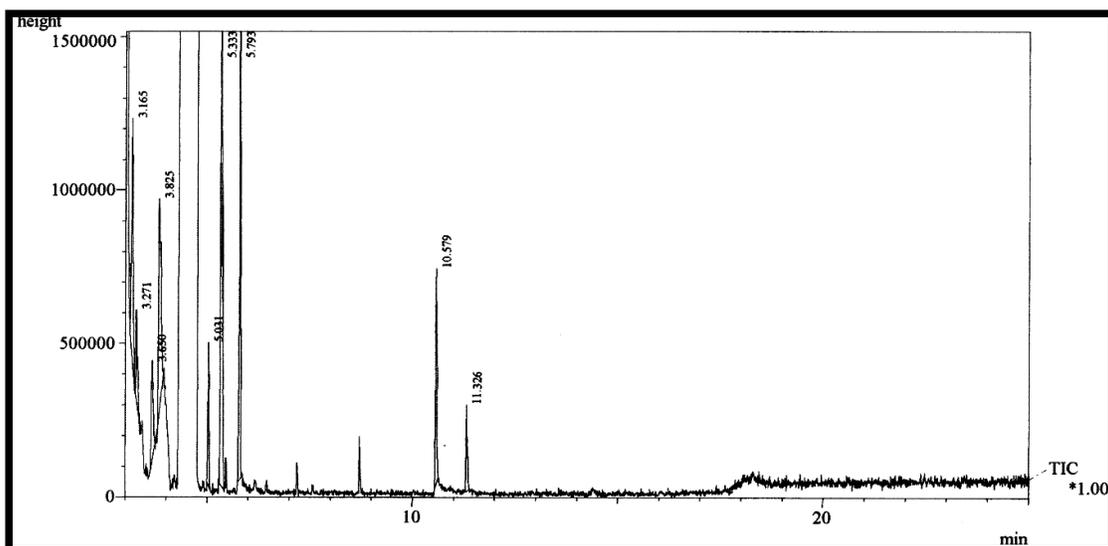


Figura 45 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 6 dias estático

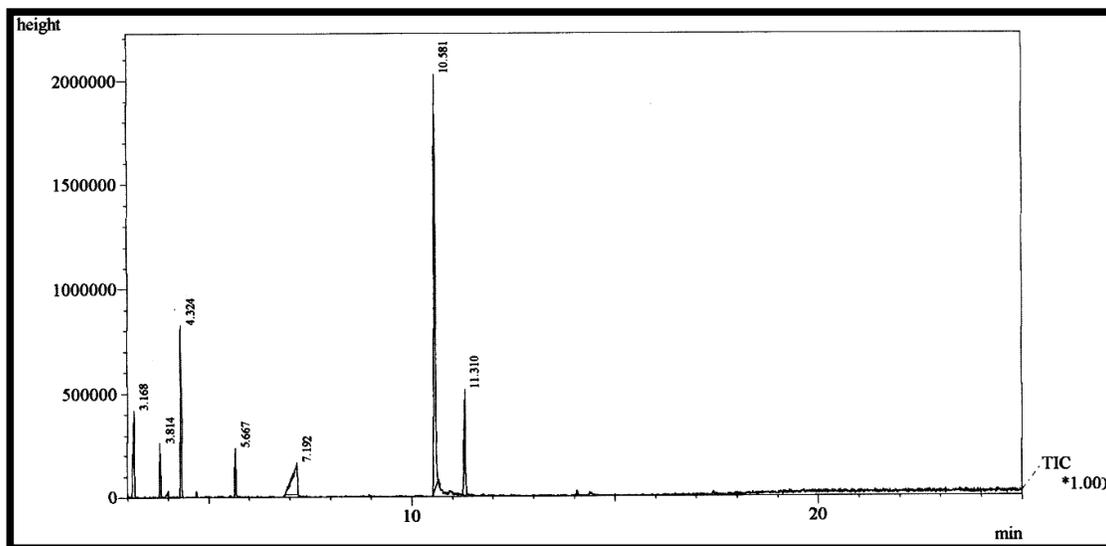
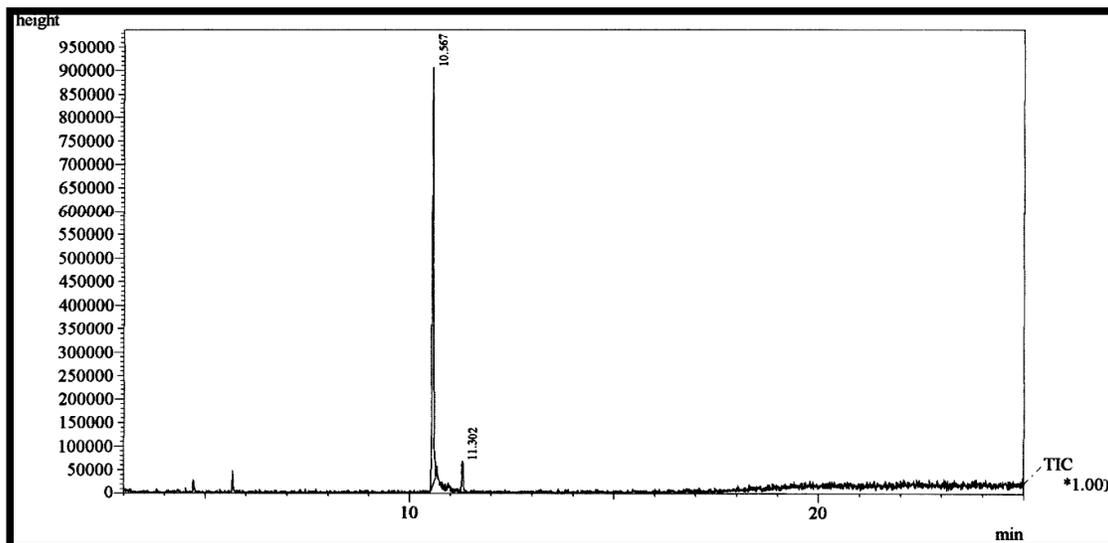
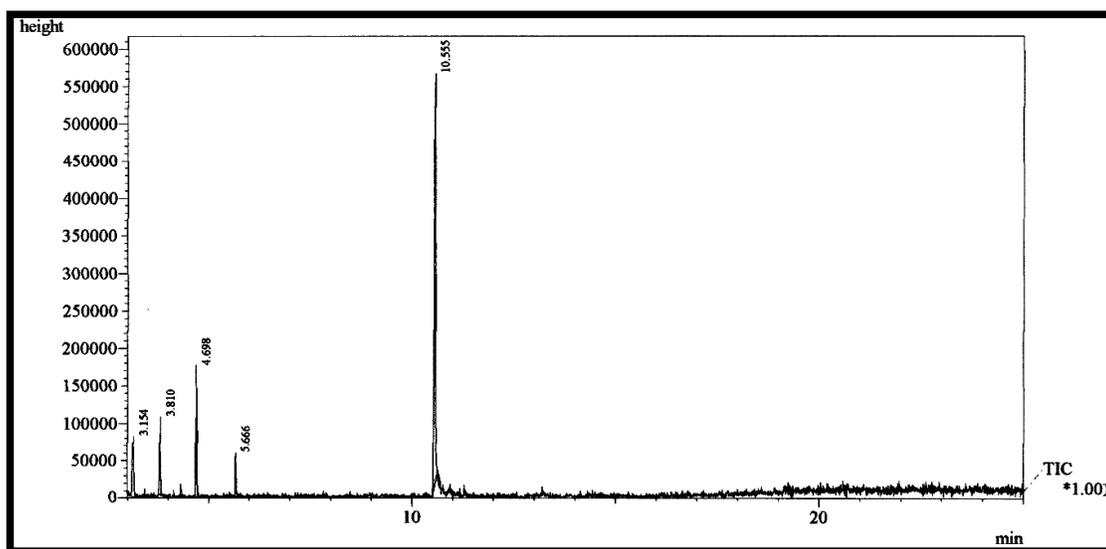


Figura 46 - Cromatograma do produto bruto da reação da (R)-carvona com 3 dias em agitação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 47 - Cromatograma do produto bruto da reação da (*R*)-carvona com 6 dias em agitaçãoFigura 48 - Cromatograma do produto bruto da reação da (*R*)-carvona com 9 dias em agitação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

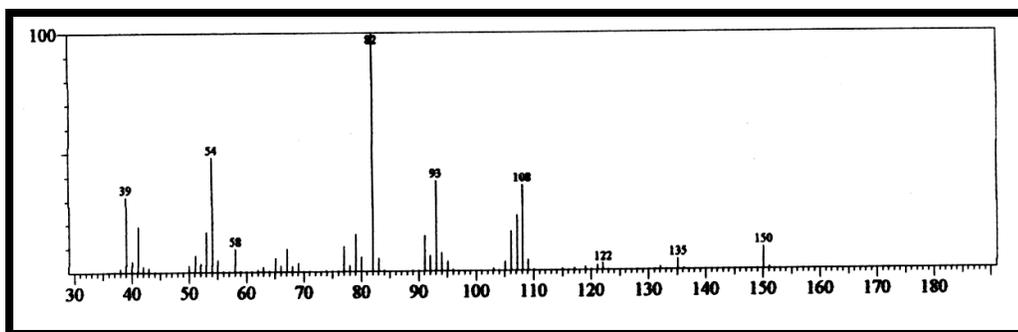
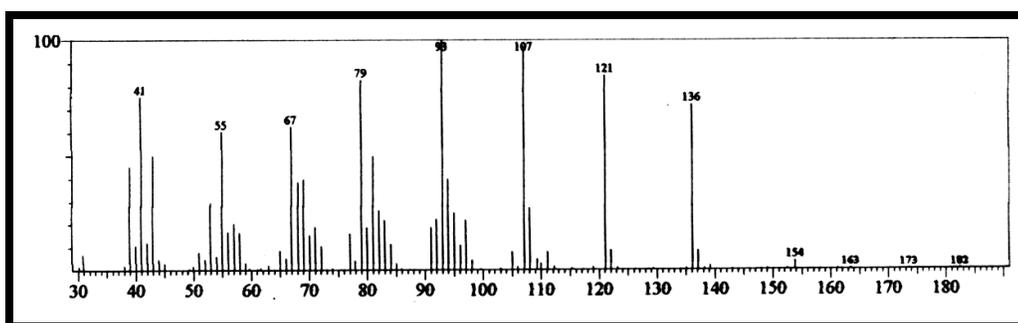
Figura 49 - Espectro de massas da (*R*)-carvona

Figura 50 - Espectro de massas do produto formado

4.6.4. Identificação do produto da biotransformação da (*R*)-carvona

4.6.4.1. Identificação do produto

Inicialmente, a identificação do produto da biotransformação da (*R*)-carvona foi feita através de comparação com os produtos da redução desse monoterpreno com NaBH₄ (Item 5.13.1, p. 114). A análise do cromatograma do produto da redução com NaBH₄ (Figura 52, p. 72) mostrou a presença de três compostos (Figura 51, p. 71) e seus respectivos espectros de massas revelaram tratar-se dos diastereoisômeros *cis*- e *trans*-carveol e do neodihidrocarveol.

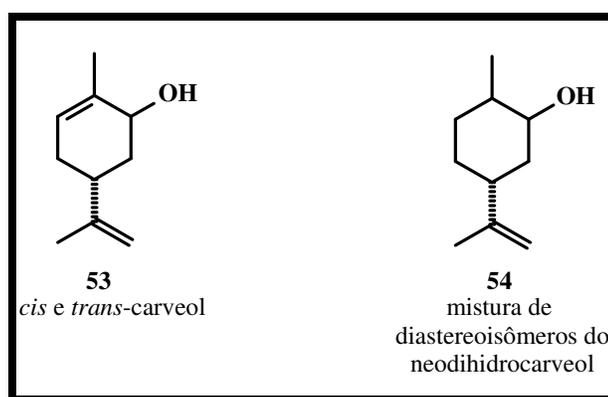


Figura 51 - Produtos da redução da (*R*)-carvona com NaBH₄

Assim, a comparação do cromatograma e dos espectros de massas dos produtos da redução química (Figura 52, p. 72) com o obtido no emprego de *T. harzianum* como bioreagente, permitiu identificar o neodihidrocarveol como único produto de biotransformação. Nos cromatogramas foi possível observar apenas um sinal referente a um dos diastereoisômeros do neodihidrocarveol não nos permitindo identificar de qual se tratava.

A análise do espectro de massas do produto (Figura 50, p. 70) confirma a estrutura sugerida, e a sua proposta de fragmentação está descrita no Esquema 6 (p. 73).

O neodihidrocarveol é um dos principais produtos da redução enzimática da (*R*)-carvona. Sua obtenção é descrita na literatura a partir de reduções com cultura de células vegetais (KIM *et al.*, 2002) e células em crescimento de fungos, leveduras (DYK *et al.*, 1998) e microalgas (HOOK; RYAN; SHERIDAN, 2003).

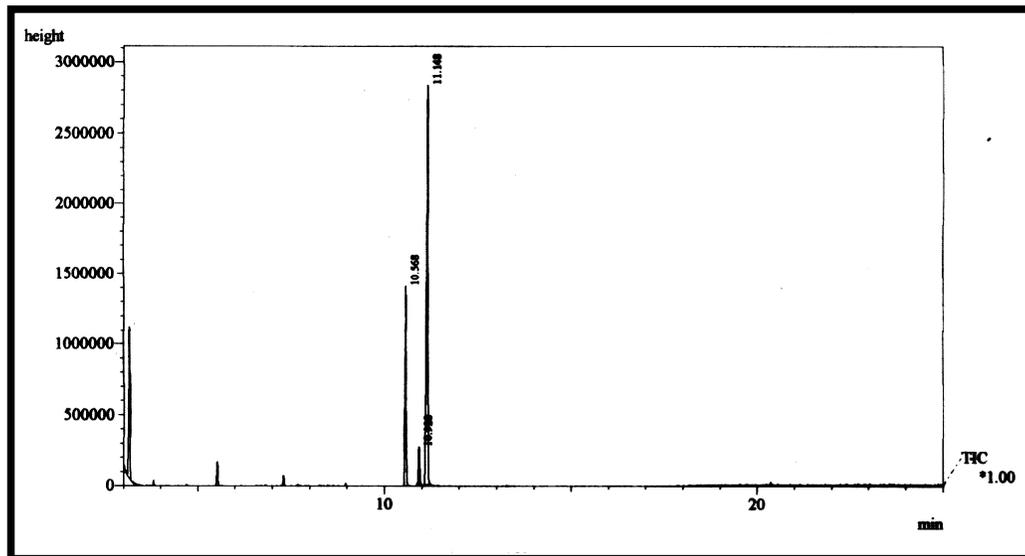
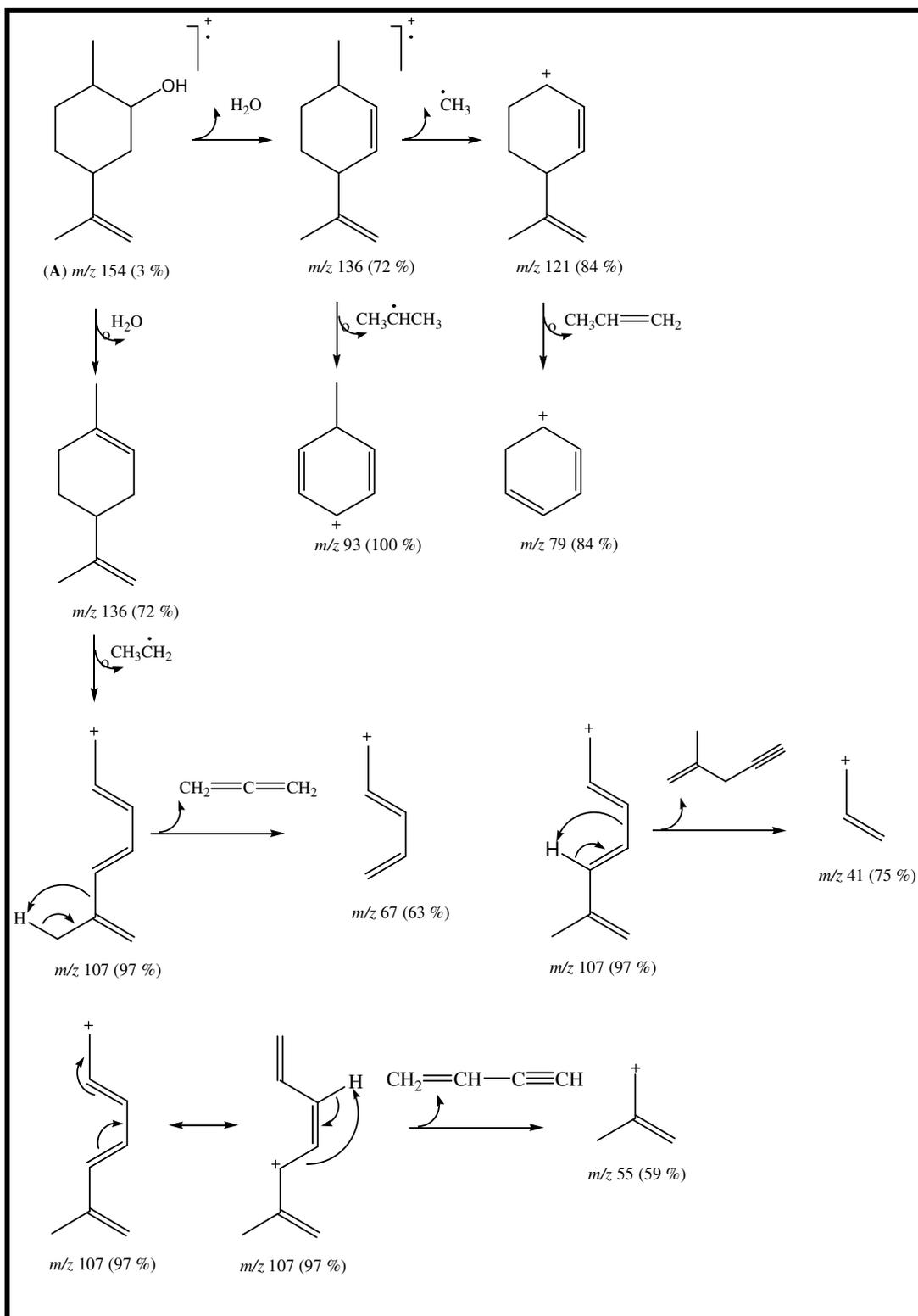


Figura 52 - Cromatograma dos produtos da redução química com NaBH₄

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Esquema 6 - Proposta de fragmentação para o produto (NUNES, 2008)

4.6.5. Análise dos produtos de biotransformação da acetofenona

4.6.5.1. Biotransformação por células em crescimento

Às culturas de *T. harzianum* em meio líquido BD, com 7 dias de crescimento, foi adicionada 15,6 µL (0,13 mmol) de acetofenona sob agitação, mantidas por 3 e 6 dias. Os testes foram feitos em triplica e o meio líquido contendo somente o substrato foi empregado como branco. O produto da reação foi extraído com AcOEt (Item 5.15.1, p. 117) e analisado por CCD. Foi verificado nos extratos dos produtos das biotransformações o surgimento de um produto com fator de retenção (Rf) inferior ao da acetofenona, semelhante ao do obtido por redução química (Item 5.13.1, p. 114) e empregado como padrão. No entanto, o produto bruto reacional não pode ser analisado por CG/EM e nem o feniletan-1-ol quantificado por CG/DIC, pois ambos os equipamentos encontravam-se com problemas no período de execução do experimento.

4.6.5.2. Biotransformação em caldo de cultura e células remanescentes

A acetofenona foi também submetida à biotransformação empregando-se como biocatalisadores os sistemas enzimáticos excretados por *T. harzianum* para o caldo de cultura e aqueles presente na massa fúngica. Após crescimento em BD por 7 dias, o micélio foi separado do caldo de cultura por filtração sob condições assépticas. O micélio foi ressuspenso em solução tampão de fosfato pH 7 (Item 5.15.2, p. 117). Alíquotas de 15,6 µL de acetofenona foram adicionadas ao meio líquido e ao micélio ressuspenso no tampão, permanecendo sob agitação por 3 e 6 dias (Item 5.15.2, p. 117).

Para a determinação do rendimento cromatográfico do álcool (feniletan-1-ol) foi construída uma curva de calibração utilizando-se isopropilbenzeno como padrão interno (Item 5.13.2, p. 115).

Os tempos de retenção da acetofenona e seu respectivo álcool foram determinados pela injeção com padrão em CG/DIC para posterior comparação com o produto da reação (Figuras 53-60, p. 76-79). Os tempos de retenção dos enantiômeros do álcool foram determinados pela injeção do racemato em CG/DIC com coluna quiral e posterior comparação com dados da literatura (ANDRADE *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2006) (Figuras 53-60, p. 76-79).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da Tabela 17 (p. 75) foi verificado que com o decorrer dos dias há um aumento na conversão da acetofenona ao álcool no experimento realizado com as células remanescentes. No experimento onde o caldo de cultura foi empregado, verificou-se uma diminuição na conversão. Desse modo, os resultados obtidos mostraram que os sistemas enzimáticos do caldo de cultura e as células remanescentes não são iguais, levando aos rendimentos diferentes.

O enantiômero de configuração *S* foi formado preferencialmente em todos os parâmetros estudados e a comparação dos excessos enantioméricos (*ee*) com os rendimentos cromatográficos mostrou uma relação inversa nas células remanescentes e pouca diferença no caldo de cultura.

Tabela 17 - Valores médios do percentual relativo da biotransformação da acetofenona utilizando o caldo de cultura e células remanescentes de *T. harzianum* como fonte enzimática

Fonte enzimática	3 dias		6 dias	
	Rend. ^(a) (%)	<i>ee</i> (%)	Rend. ^(a) (%)	<i>ee</i> (%)
Células remanescentes	15,9	72,1	28,5	67,4
Caldo de cultura	25,2	24,3	20,6	24,9

(a) Rendimento cromatográfico obtido por CG/DIC através de curva de calibração

RESULTADOS E DISCUSSÃO

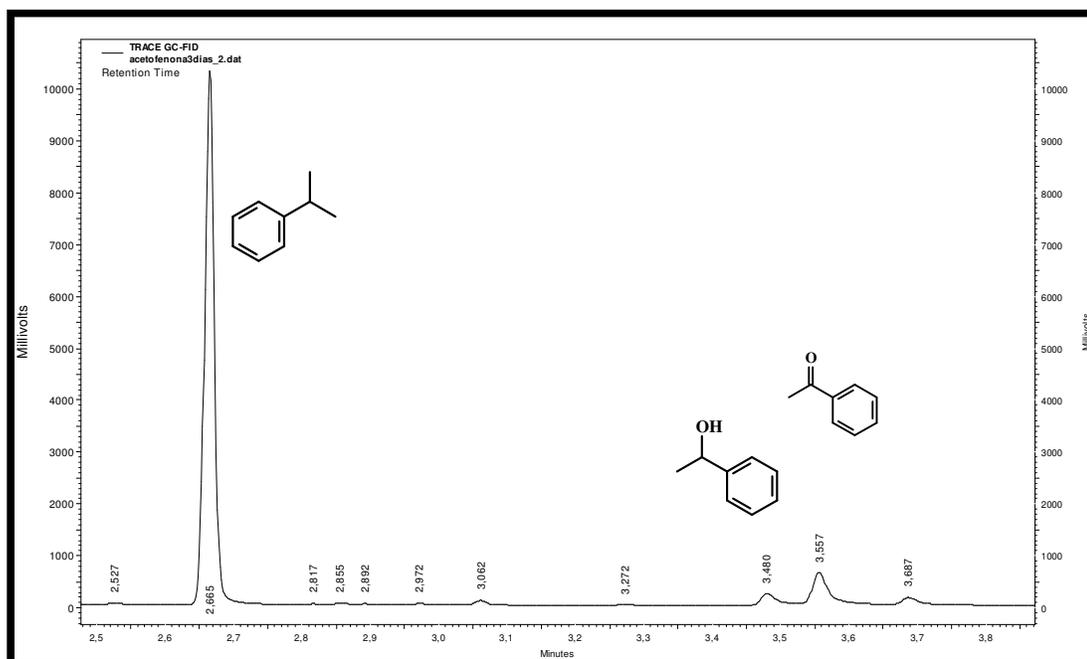


Figura 53 - Cromatograma do produto de reação em células remanescentes com acetofenona em 3 dias

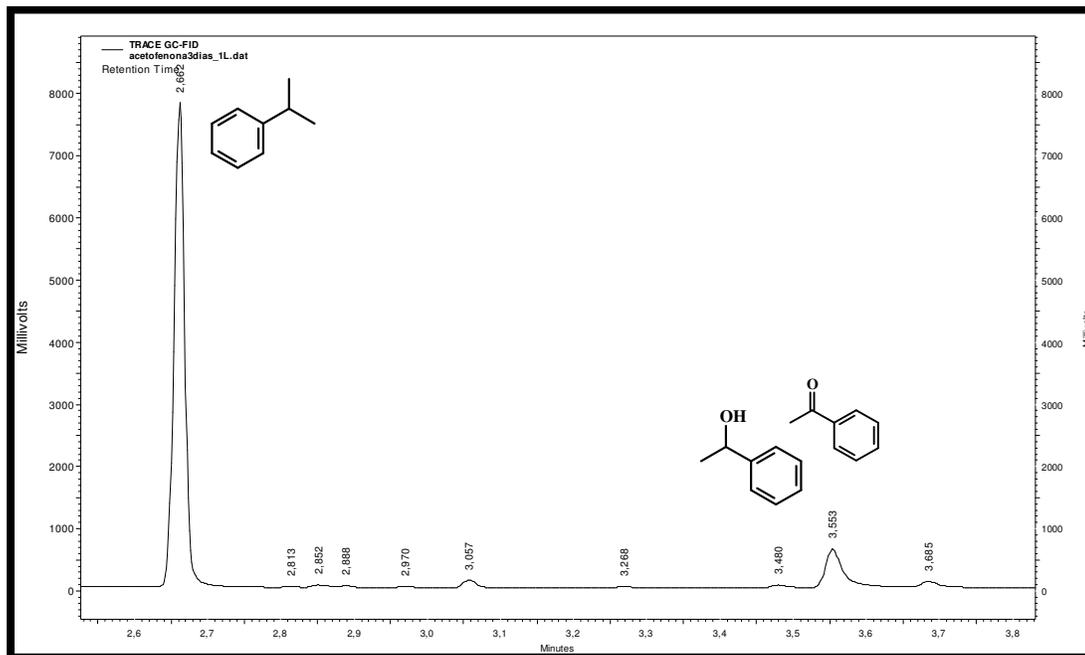


Figura 54 - Cromatograma do produto de reação no caldo de cultura com acetofenona em 3 dias

RESULTADOS E DISCUSSÃO

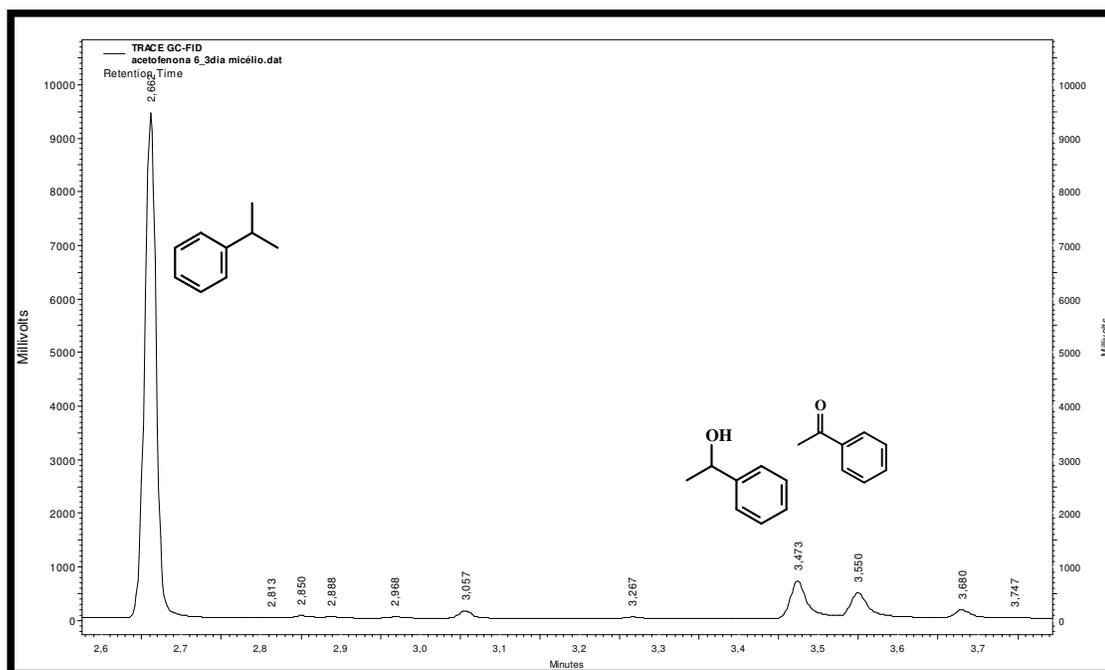


Figura 55 - Cromatograma do produto de reação em células remanescentes com acetofenona em 6 dias

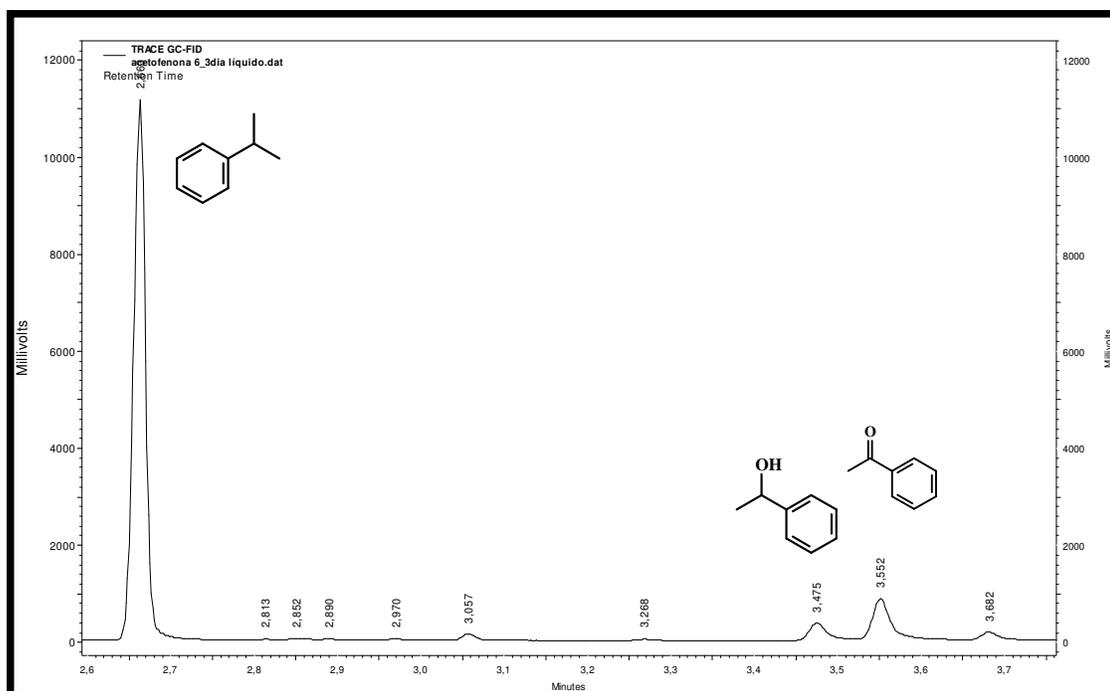


Figura 56 - Cromatograma do produto de reação no caldo de cultura com acetofenona em 6 dias

RESULTADOS E DISCUSSÃO

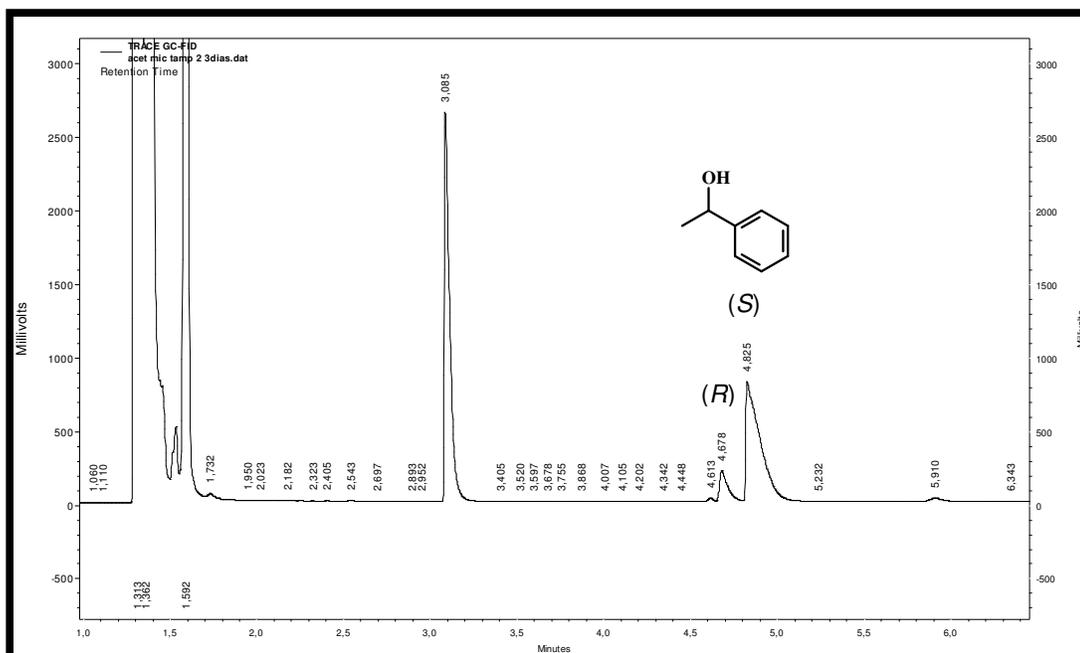


Figura 57 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em células remanescentes com 3 dias em coluna quiral

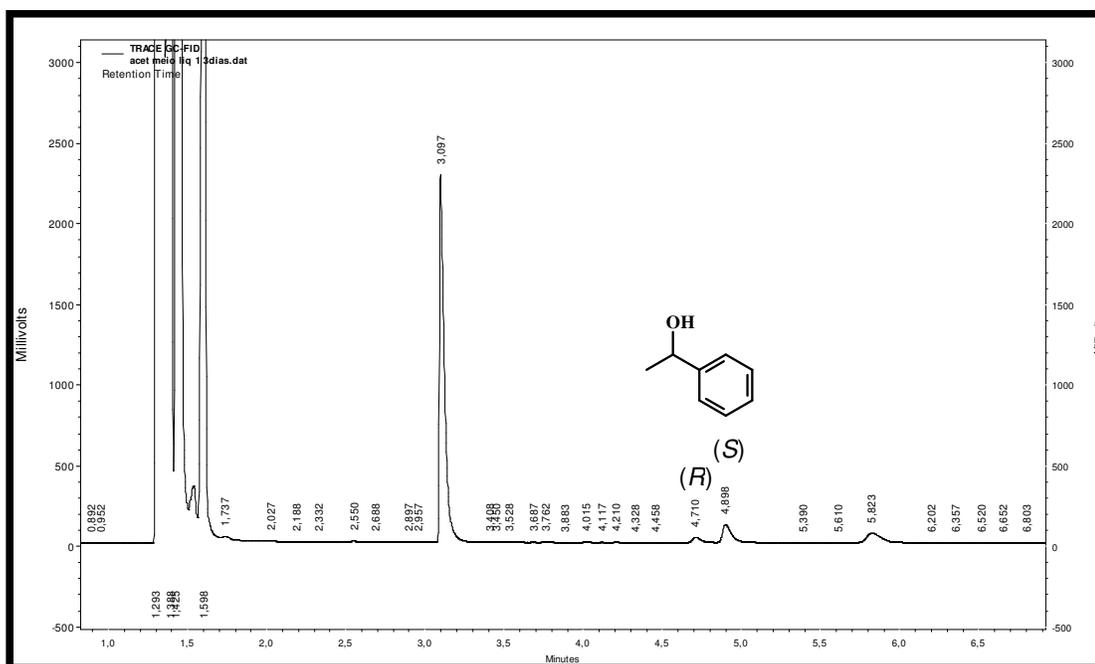


Figura 58 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em caldo de cultura com 3 dias em coluna quiral

RESULTADOS E DISCUSSÃO

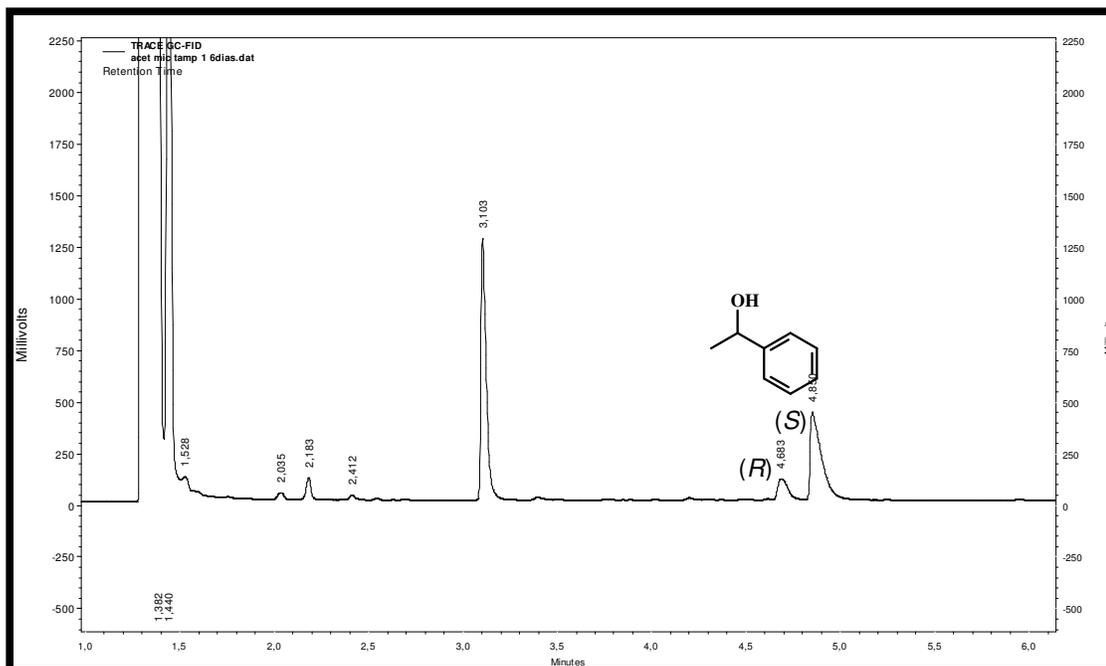


Figura 59 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em células remanescentes com 6 dias em coluna quiral

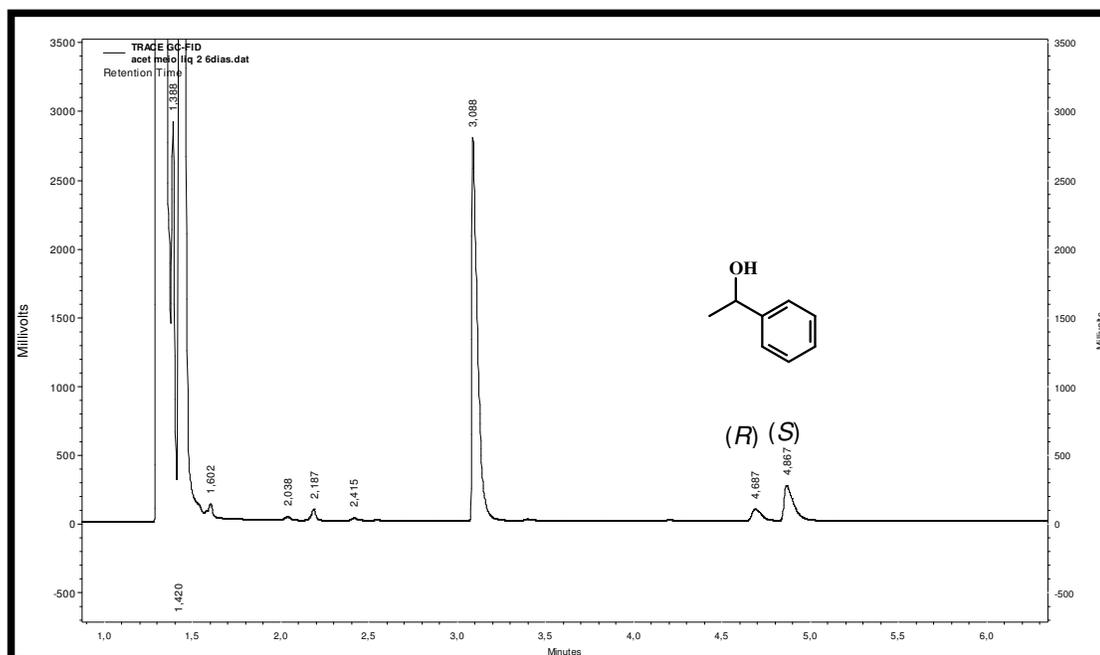


Figura 60 - Cromatograma do produto de reação da acetofenona em caldo de cultura com 6 dias em coluna quiral

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.6. Análise dos produtos de biotransformação das alquilfenonas

4.6.6.1. Biotransformação em células remanescentes

Após análise dos resultados obtidos das biotransformações com a acetofenona, onde se observou um melhor rendimento nas bio reduções nos sistemas enzimáticos excretados por *T. harzianum* presente na massa fúngica (células remanescentes), com 6 dias em agitação, resolveu-se empregar essas mesmas condições para seis alquilfenonas: propiofenona ($C_9H_{10}O$), butirofenona ($C_{10}H_{12}O$), valerofenona ($C_{11}H_{14}O$), octanofenona ($C_{14}H_{20}O$), decanofenona ($C_{16}H_{24}O$) e 2,4,6-trimetoxiacetofenona ($C_{11}H_{14}O_4$) (Figura 92, p. 114). O emprego destas cetonas permitiu investigar o quanto o aumento da cadeia alifática de uma cetona aromática iria interferir em possíveis reduções. Com isso, após o crescimento em BD por 7 dias, o micélio foi separado do caldo de cultura por filtração sob condições assépticas. O micélio foi ressuspendido em solução tampão de fosfato pH 7. Alíquotas das alquilfenonas (Tabela 31, p. 119) foram adicionadas ao micélio ressuspendido no tampão, permanecendo sob agitação por 6 dias (Item 5.16.1, p. 118).

Os cromatogramas e os espectros de massas das biotransformações das alquilfenonas e seus respectivos produtos foram analisados inicialmente por CCD e depois por injeção em CG/EM para posterior comparação com os dos padrões das cetonas (Figuras 61-90, p. 82-97) (Tabela 18).

Tabela 18 - Valores dos tempos de retenção e relação m/z das biotransformações das alquilfenonas

Biotransformação	Tempo de retenção			m/z		
	Alquilfenona	Produto(s)	Cetona padrão	Alquilfenona	Produto(s)	Cetona padrão
propiofenona	14,98	14,61	15,06	134	136	134
butirofenona	17,30	17,19	17,48	148	150	148
Valerofenona	20,02	19,81	20,08	162	164	162
Octanofenona	26,69	23,86; 26,97	27,01	204	164; 206	204

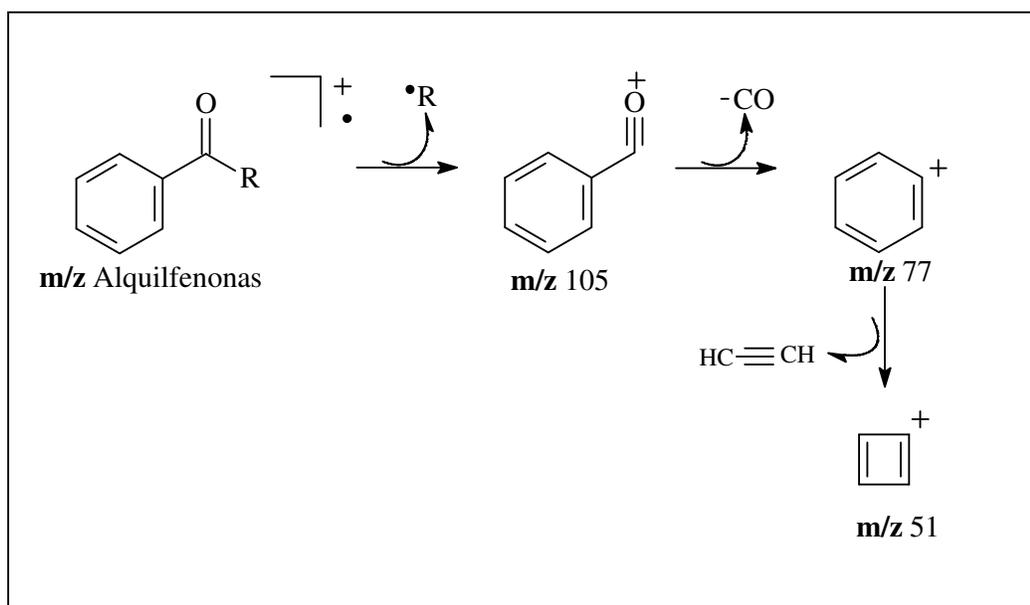
Assim, os tempos de retenção e os espectros de massas das alquilfenonas obtidos das biotransformações foram comparados com os dos seus respectivos padrões (Figuras 61-90, p. 82-97), confirmando ainda a presença das mesmas após 6 dias de reação. Em quatro alquilfenonas: propiofenona, butirofenona, valerofenona e octanofenona foi possível identificar os seus álcoois correspondentes a partir das fragmentações características de reduções dos mesmos (Esquema 8, p. 82).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

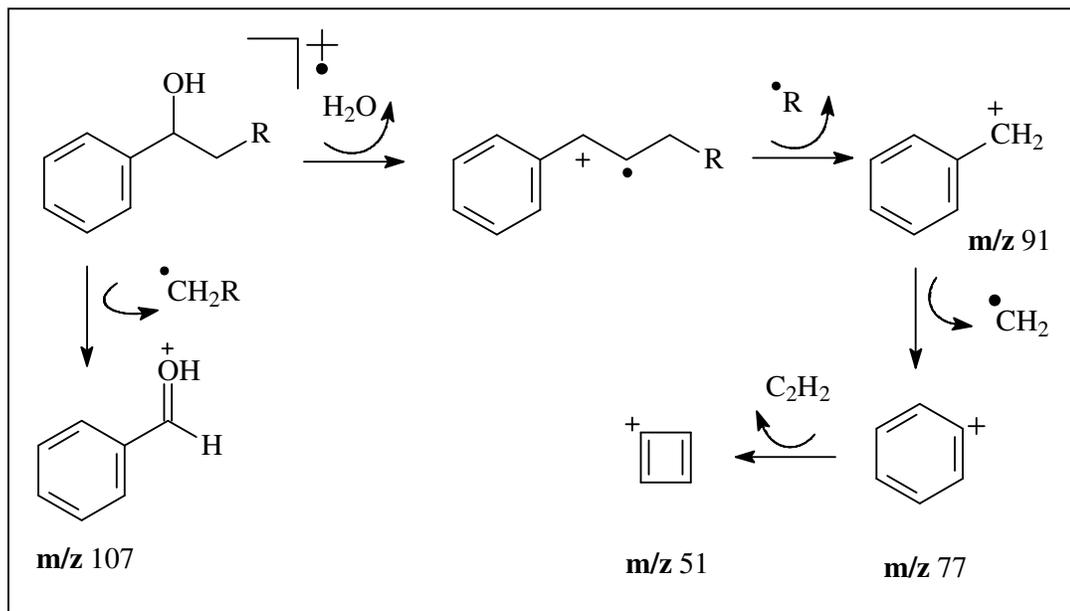
No cromatograma do produto da bioredução da octanofenona foi possível verificar, além dos picos da cetona e do seu respectivo álcool ($t_r = 26,97$ min), um pico com tempo de retenção de 23,86 min. Este foi selecionado, obtendo-se para o mesmo dois espectros de massas com picos base de m/z de 162 e 164, os quais foram, respectivamente, associados a. valerofenona e do seu álcool correspondente (Figuras 76-82, p. 90-93).

Na análise dos cromatogramas e espectros das biotransformações da decanofenona ($C_{16}H_{24}O$) e 2,4,6-trimetoxiacetofenona ($C_{11}H_{14}O_4$) (Figuras 83-90, p. 93-97) não foi possível observar a presença dos álcoois correspondentes.

Diante desses resultados pode se verificar que o fungo *T. harzianum* possui uma certa dificuldade em bioreduzir alquilfenonas de cadeia alifática longa e alquilfenonas mais complexas, como foi o caso da 2,4,6-trimetoxiacetofenona. Deve-se levar em consideração os dias de reação empregados, pois em 6 dias o fungo foi capaz de clivar a cadeia alifática da octanofenona ($C_{14}H_{20}O$), obtendo-se assim a valerofenona ($C_{11}H_{14}O$) e seu álcool. Embora experimentos com tempos mais longos não tenham sido empregados no caso da decanofenona, é possível supor que o mesmo processo de clivagem poderia ocorrer com a mesma. Vale ressaltar que não foi encontrado na literatura estudos com o *T. harzianum* em reações de redução de alquilfenonas.



Esquema 7 - Proposta de fragmentação das alquilfenonas



Esquema 8 - Proposta de fragmentação dos álcoois correspondentes das bio-reduções das alquilfenonas

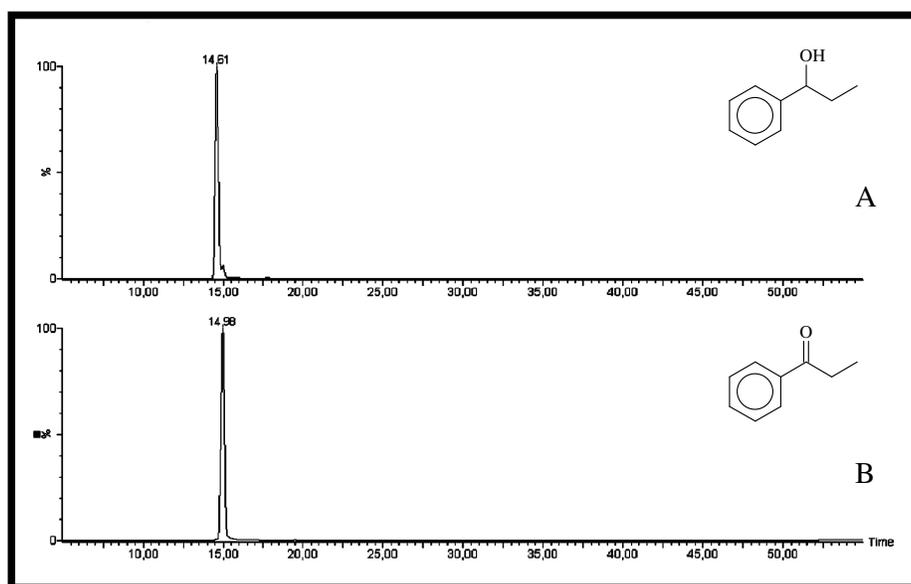


Figura 61 - Cromatogramas de íons selecionados 136 (A) e 134 (B) dos produtos brutos da reação da propiofenona com 6 dias em agitação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

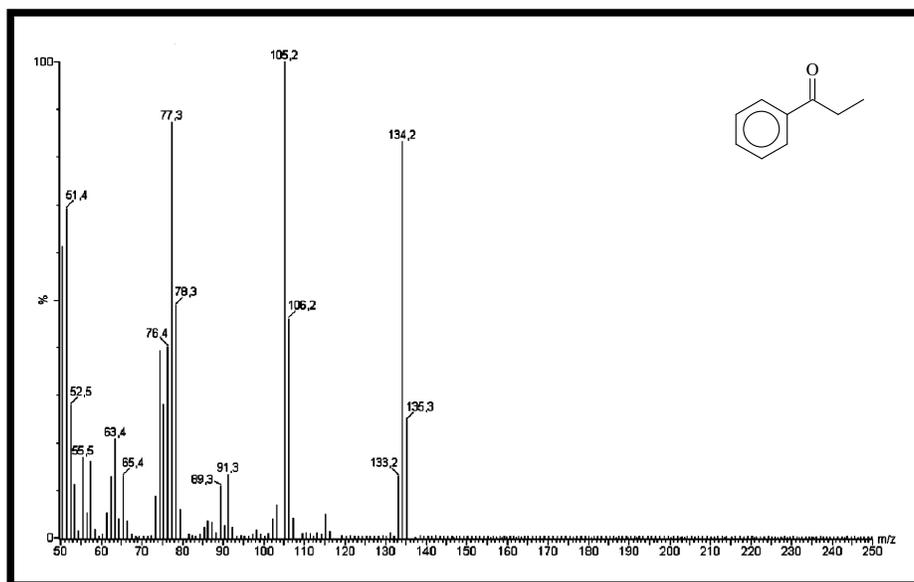


Figura 62 - Espectro de massas da propiofenona

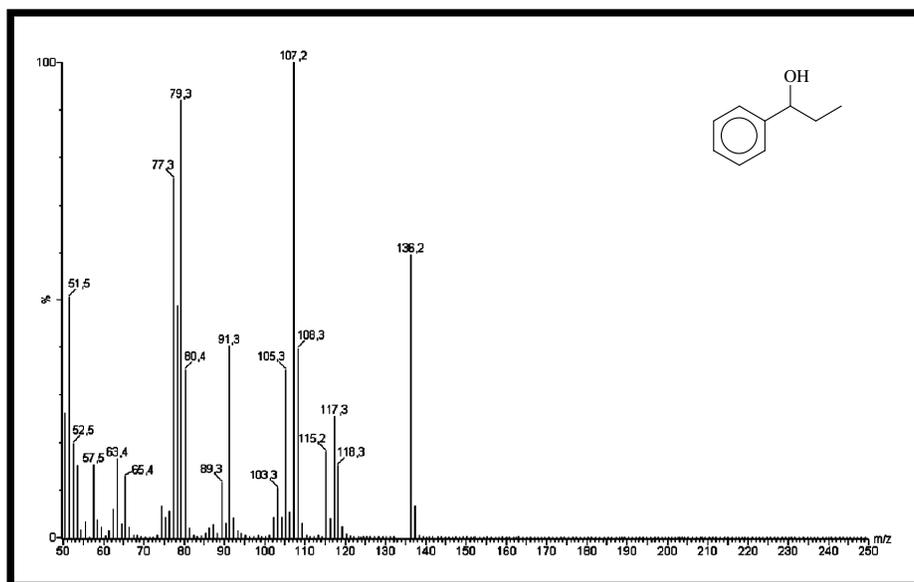


Figura 63 Espectro de massas do produto formado

RESULTADOS E DISCUSSÃO

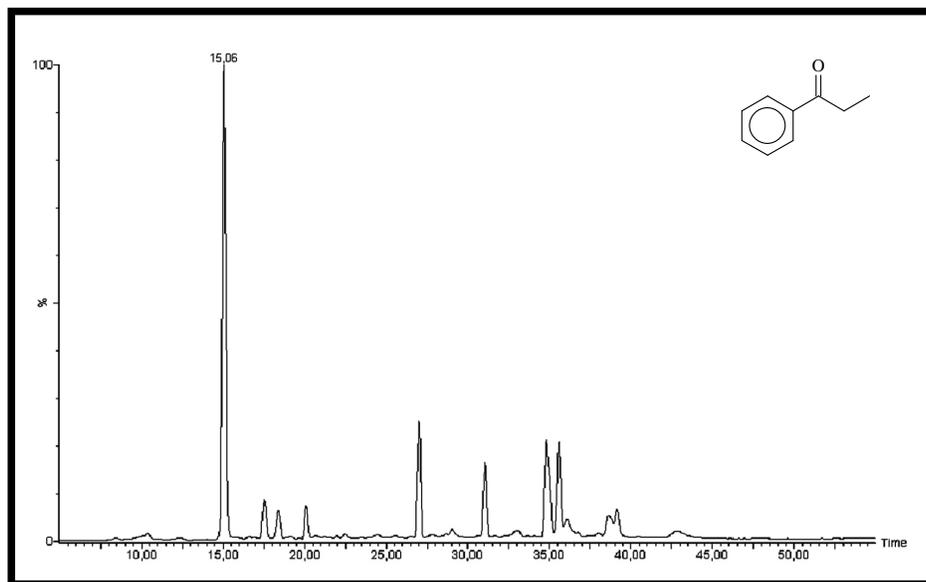


Figura 64 - Cromatograma do íon selecionado 134 do experimento do padrão da propiofenona

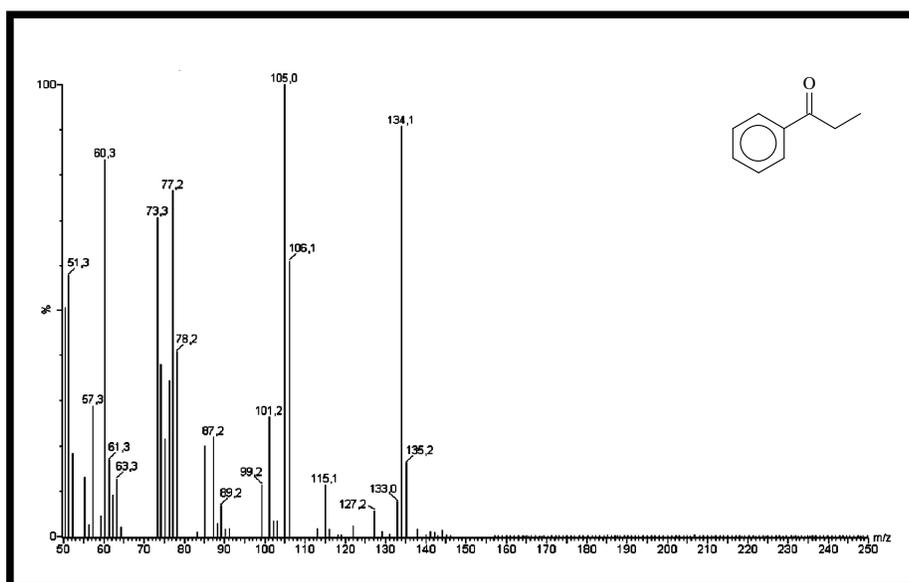


Figura 65 - Espectro de massas do padrão da propiofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

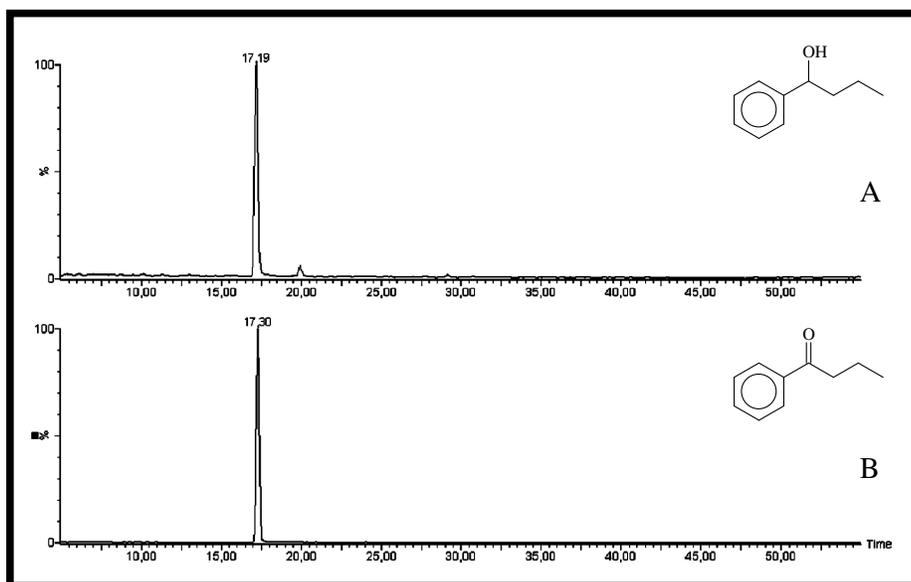


Figura 66 - Cromatogramas de íons selecionados 150 (A) e 148 (B) dos produtos brutos da reação da butirofenona com 6 dias em agitação

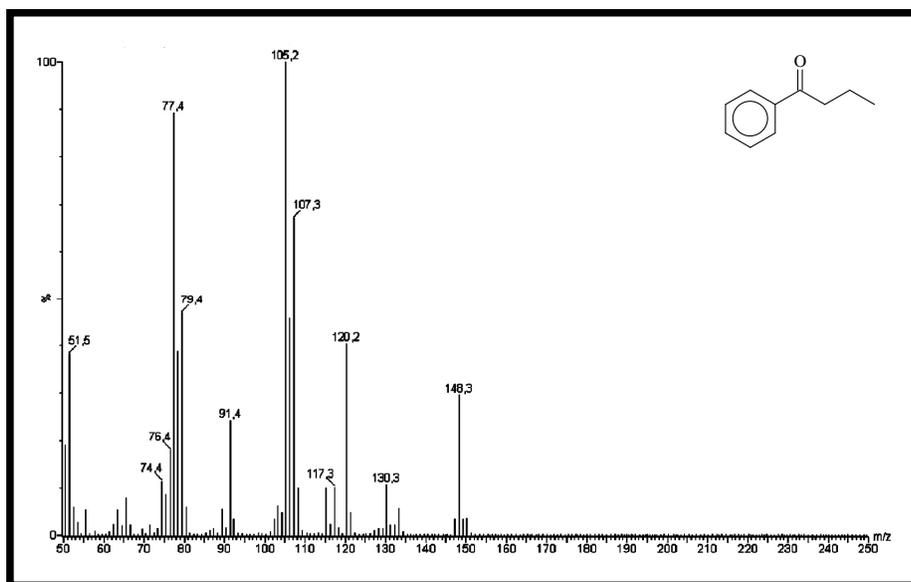


Figura 67 - Espectro de massas da butirofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

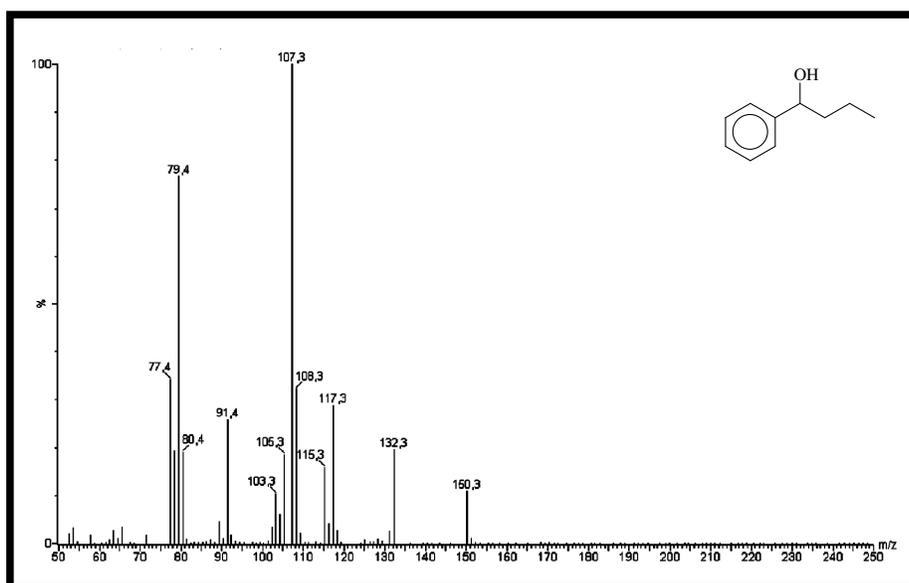


Figura 68 - Espectro de massas do produto formado

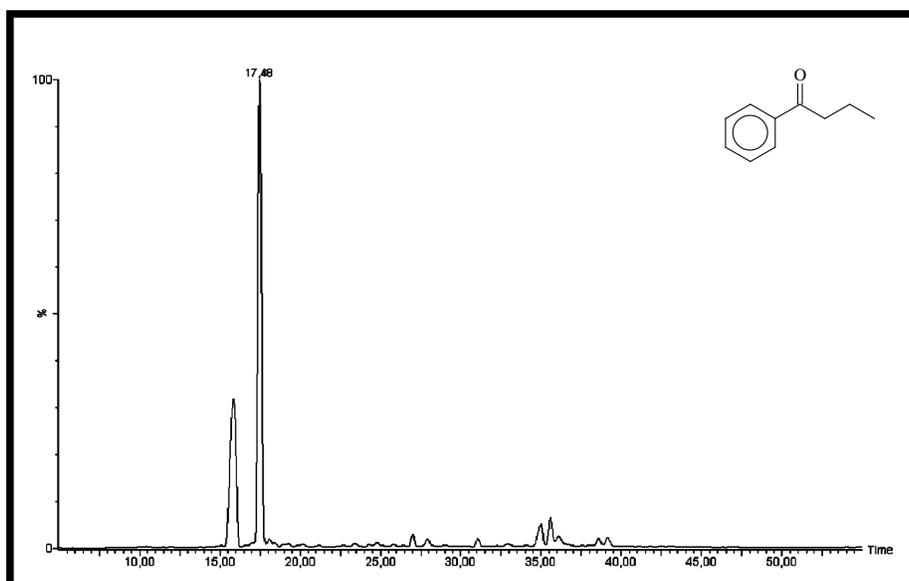


Figura 69 - Cromatograma do íon selecionado 148 do experimento do padrão da butirofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

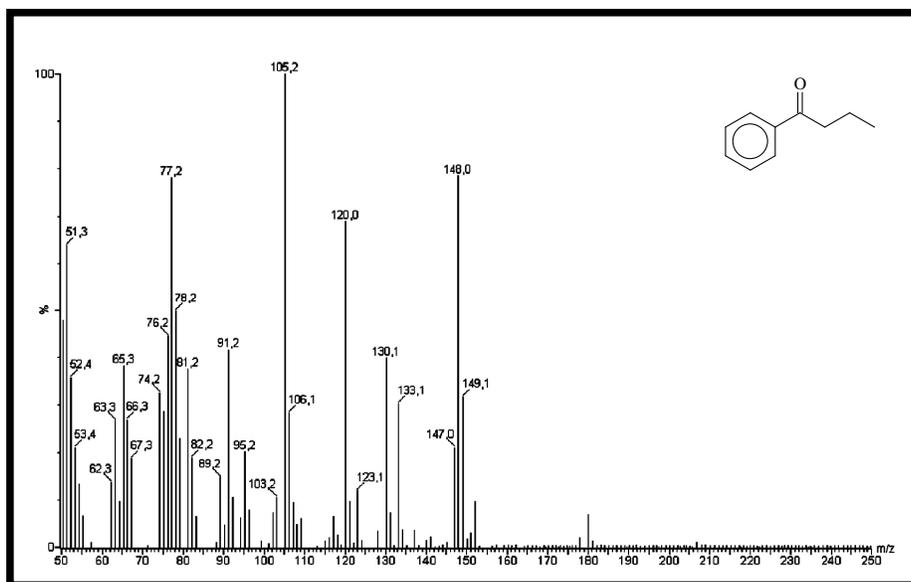


Figura 70 - Espectro de massas do padrão da butirofenona

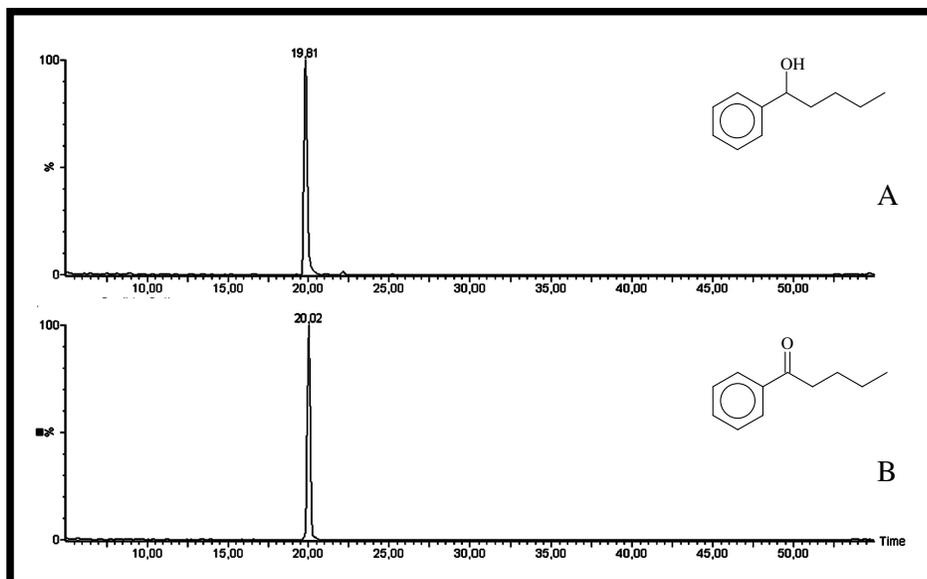


Figura 71 - Cromatogramas de íons selecionados 164 (A) e 162 (B) dos produtos brutos da reação da valerofenona com 6 dias em agitação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

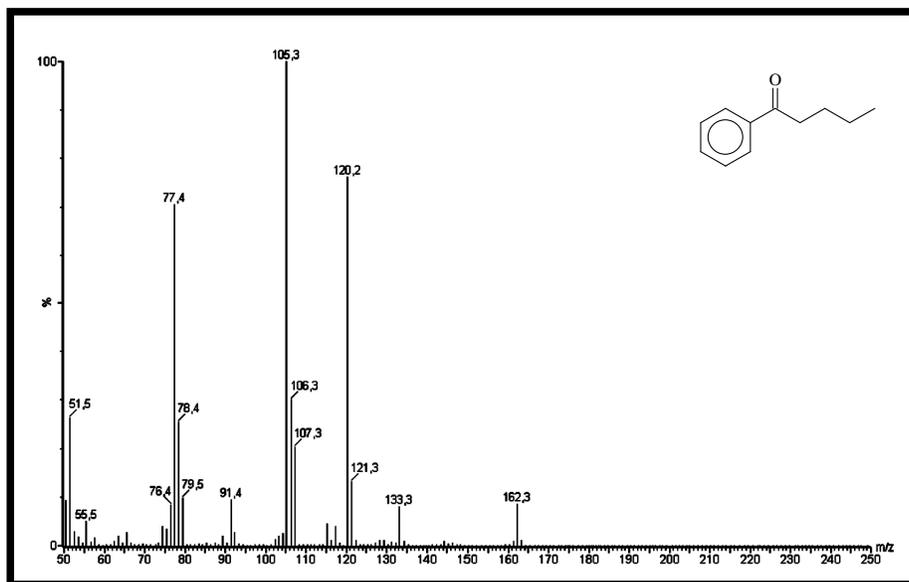


Figura 72 - Espectro de massas da valerofenona

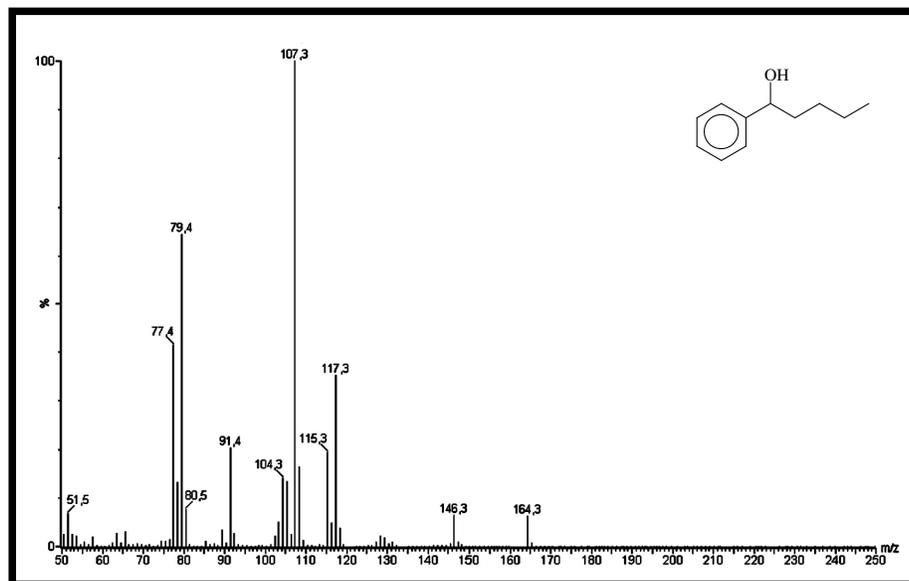


Figura 73 - Espectro de massas do produto formado

RESULTADOS E DISCUSSÃO

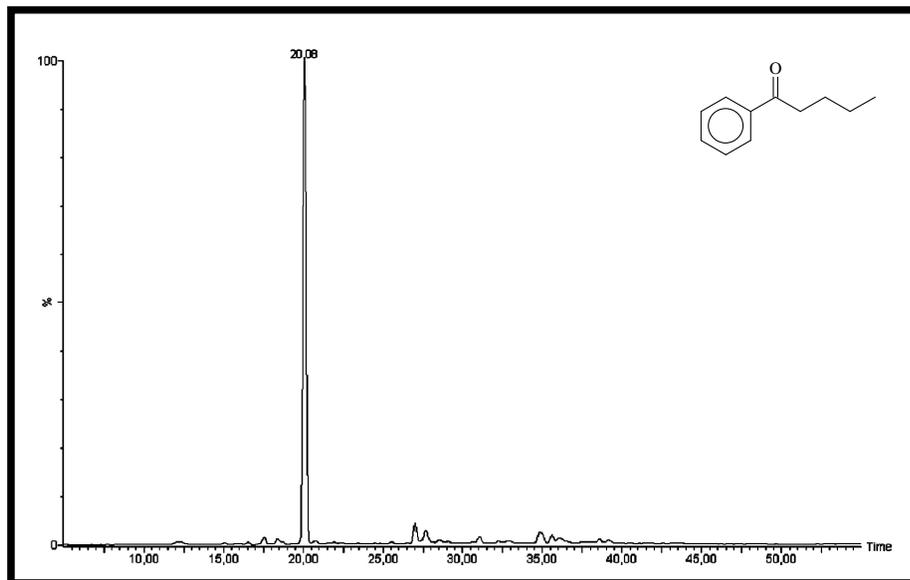


Figura 74 - Cromatograma do íon selecionado 162 do experimento do padrão da valerofenona

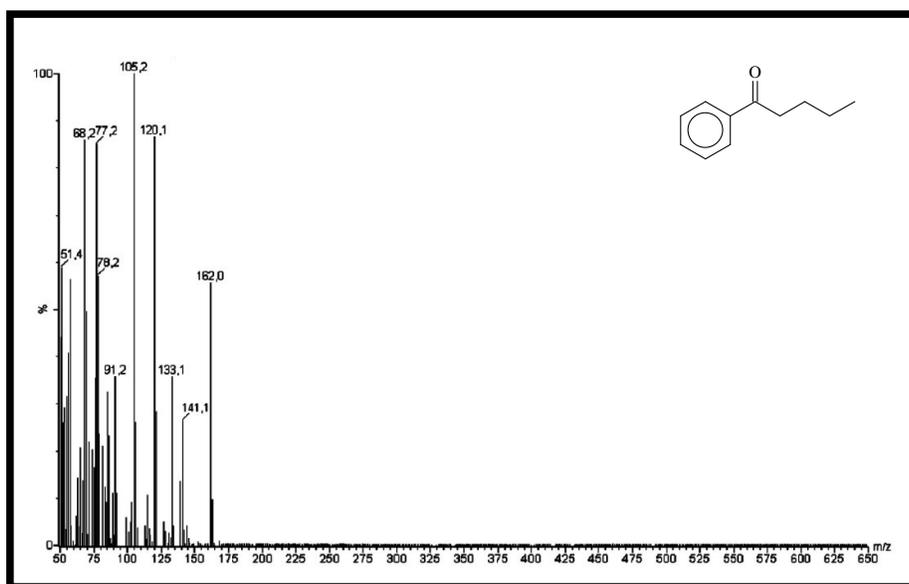


Figura 75 - Espectro de massas do padrão da valerofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

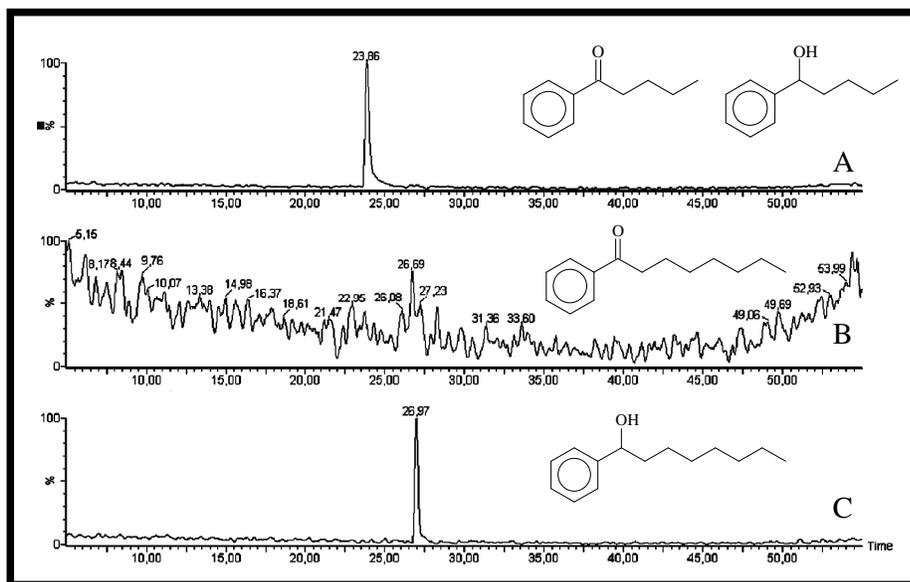


Figura 76 - Cromatogramas de íons selecionados 162 e 164 (A), 204 (B) e 206 (C) dos produtos brutos da reação da octanofenona com 6 dias em agitação

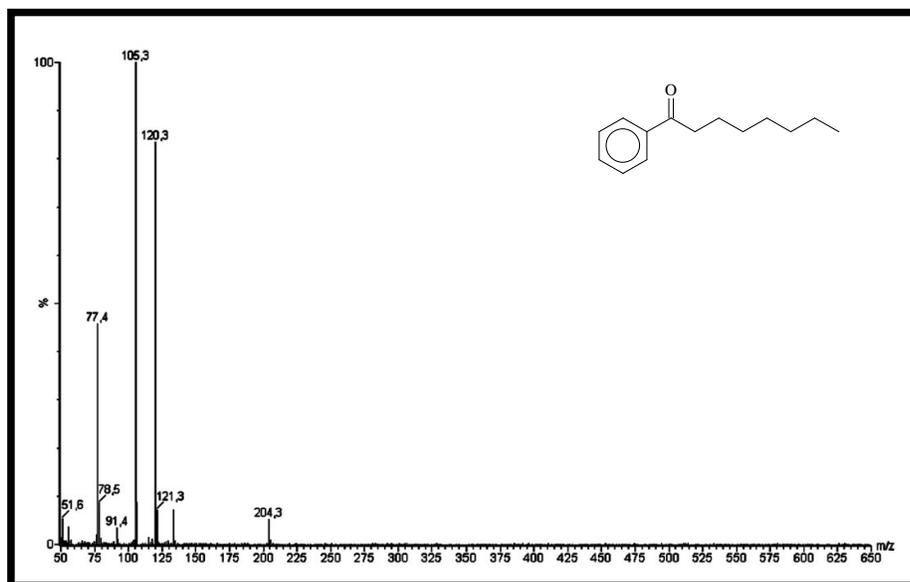


Figura 77 - Espectro de massas da octanofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

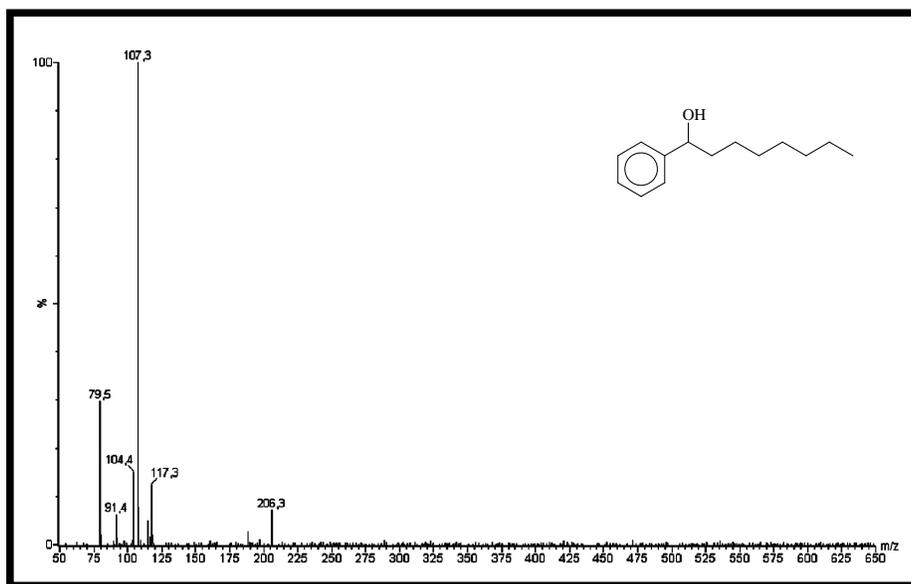


Figura 78 - Espectro de massas (a) do produto da reação da octanofenona

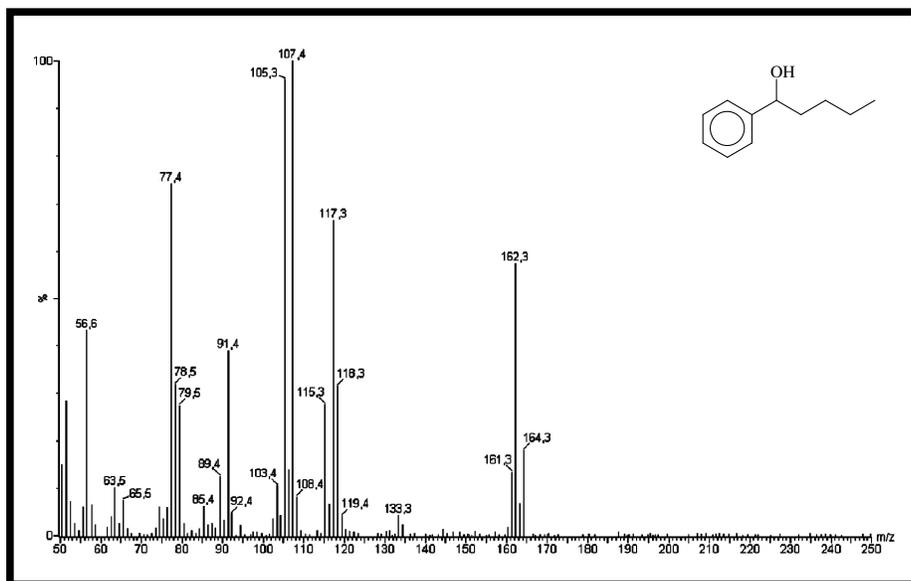


Figura 79 - Espectro de massas (b) do produto da reação da octanofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

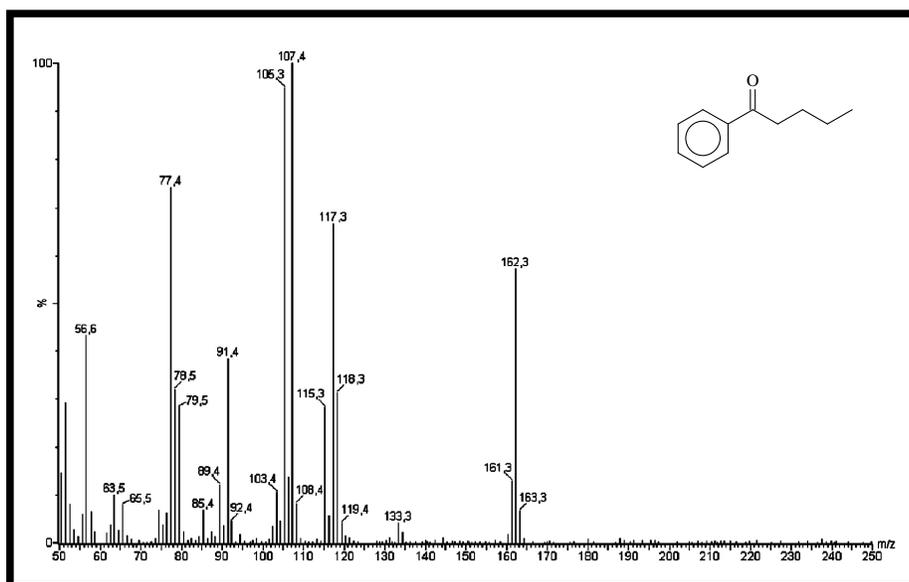


Figura 80 - Espectro de massas (c) do produto da reação da octanofenona

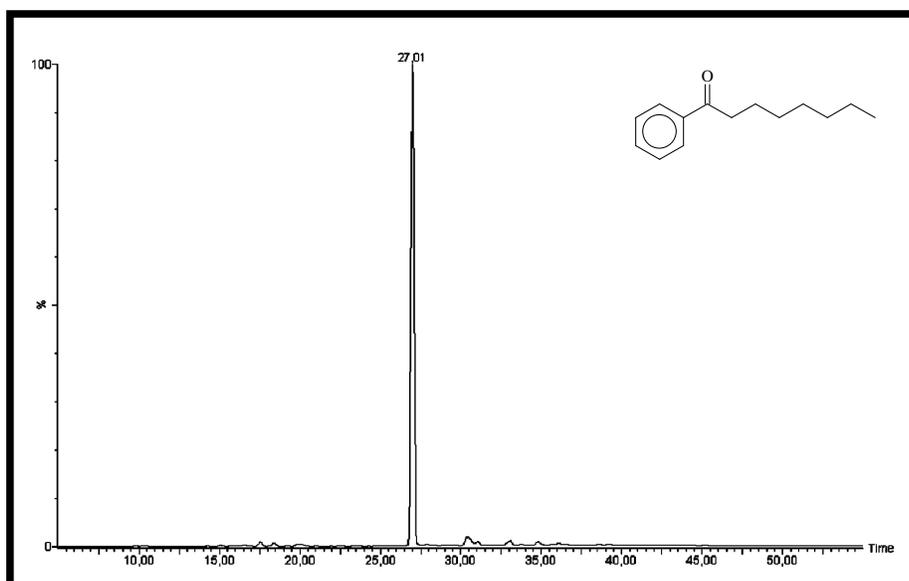


Figura 81 - Cromatograma do íon selecionado 204 do experimento do padrão da octanofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

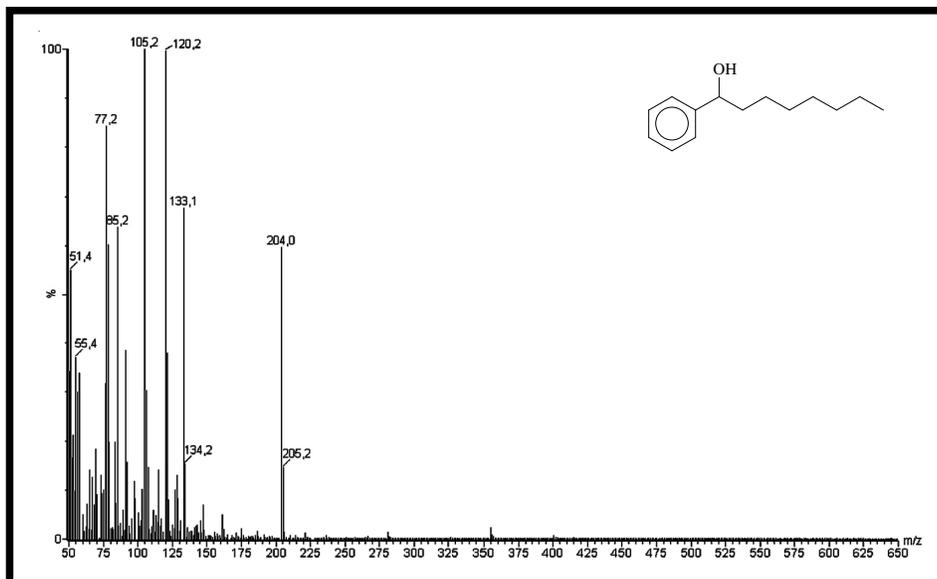


Figura 82 - Espectro de massas do padrão da octanofenona

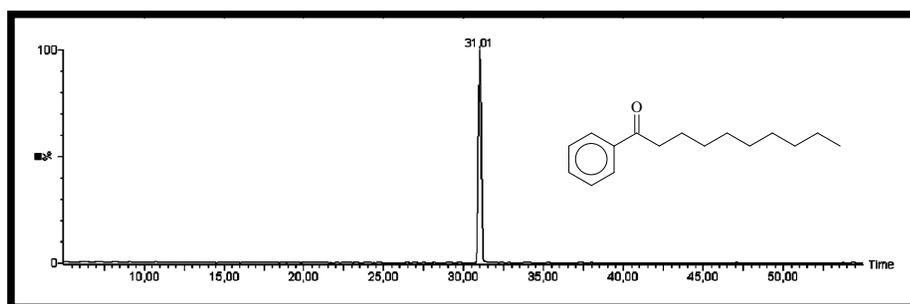


Figura 83 - Cromatograma do íon selecionado 232 do produto bruto da reação da decanofenona com 6 dias em agitação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

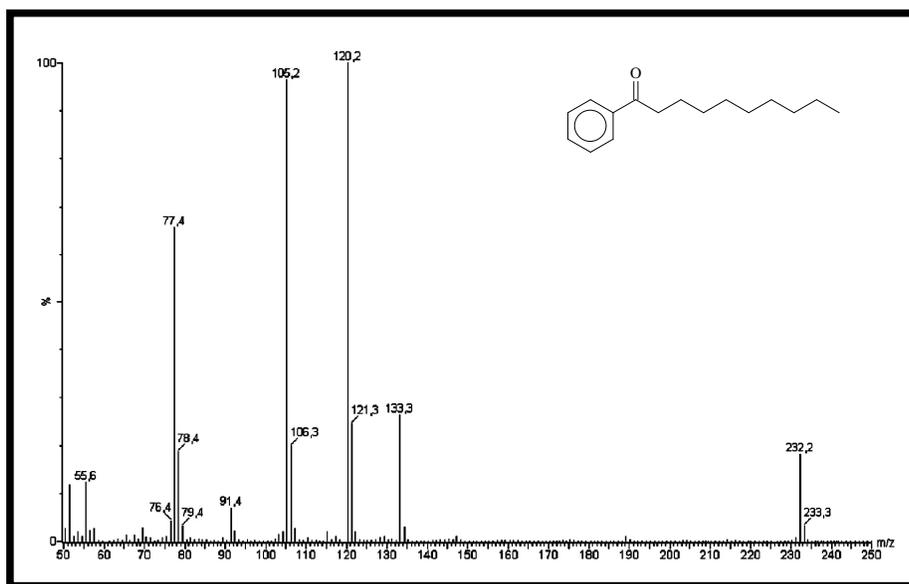


Figura 84 - Espectro de massas da decanofenona

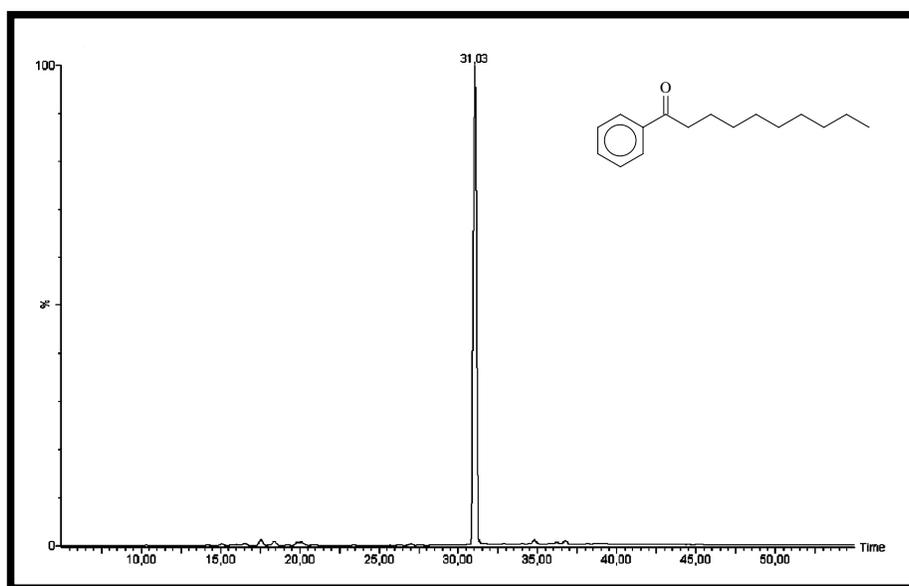


Figura 85 - Cromatograma do íon selecionado 232 do experimento do padrão da decanofenona

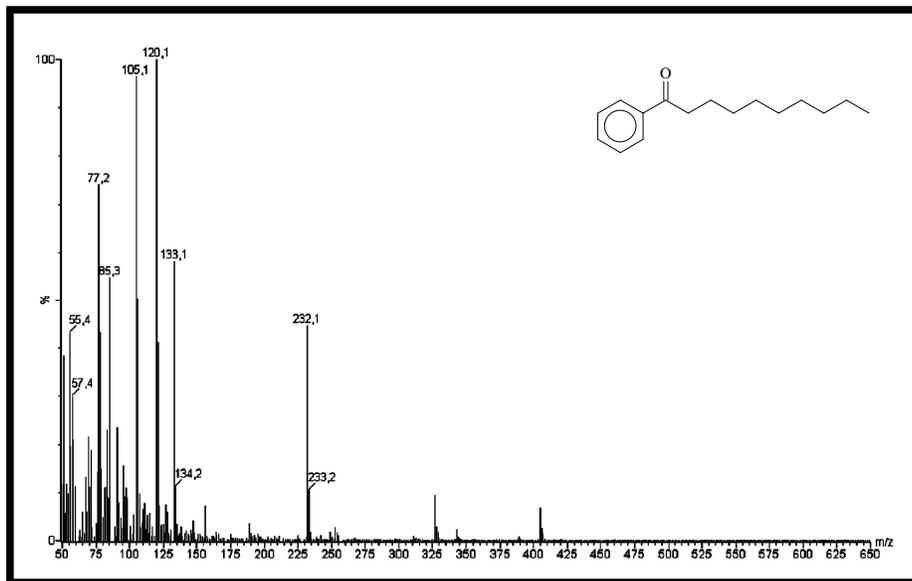


Figura 86 - Espectro de massas do decanofenona

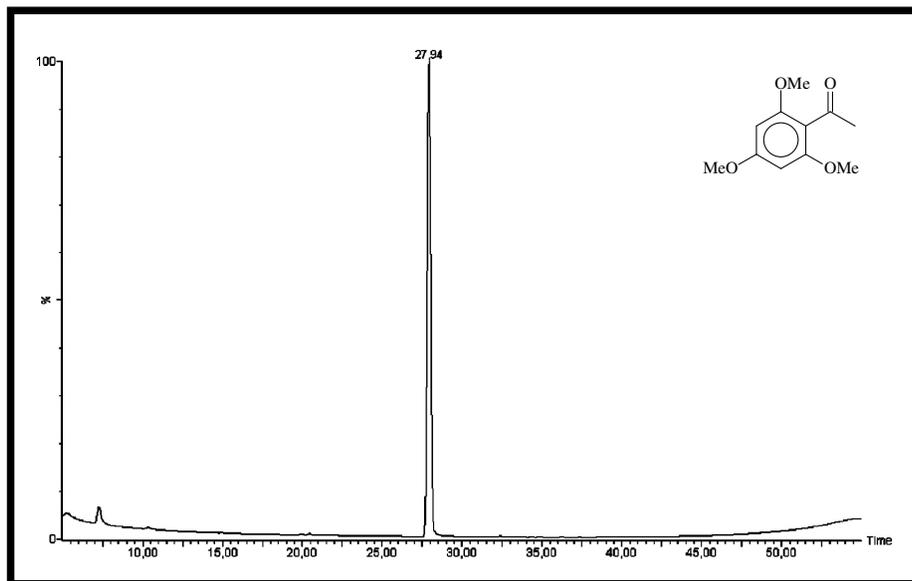


Figura 87 - Cromatograma do íon selecionado 210 do produto bruto da reação da 2,4,6-trimetoxiacetofenona com 6 dias em agitação

RESULTADOS E DISCUSSÃO

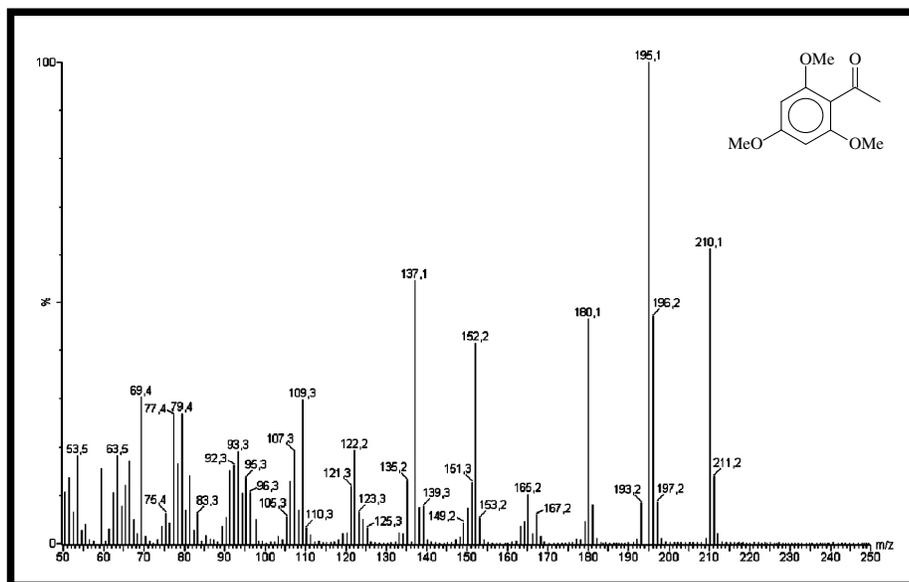


Figura 88 - Espectro de massas da 2,4,6-trimetoxiacetofenona

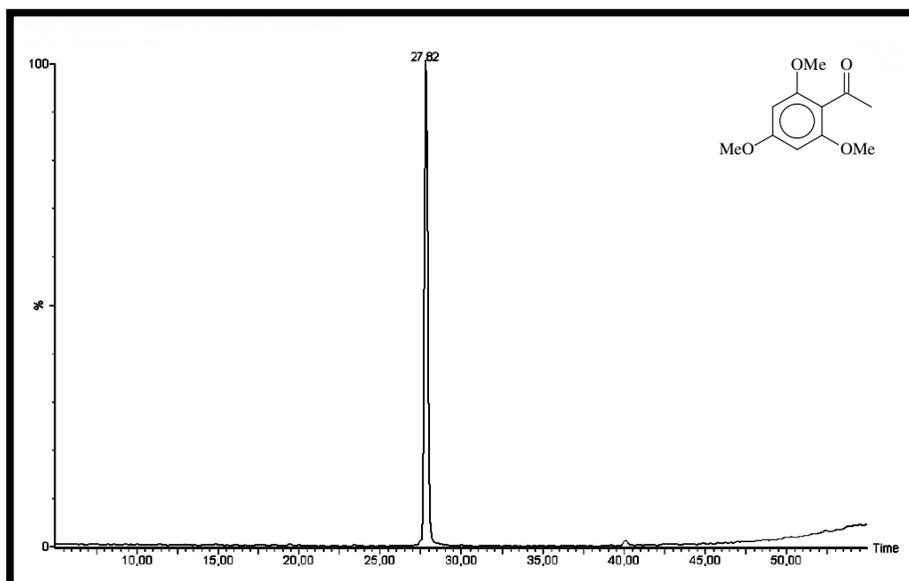


Figura 89 - Cromatograma do íon selecionado 210 do experimento do padrão da 2,4,6-trimetoxiacetofenona

RESULTADOS E DISCUSSÃO

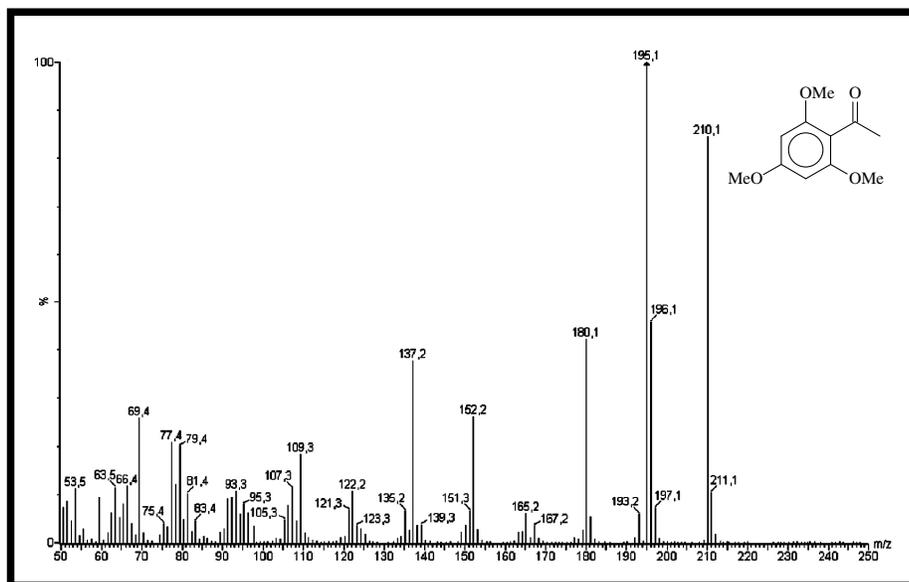


Figura 90 - Espectro de massas do produto da 2,4,6-trimetoxiacetofenona

Capítulo 5

Parte

Experimental

5. PARTE EXPERIMENTAL**5.1. Métodos Cromatográficos****5.1.1. Cromatografia em gel de sílica**

Para os procedimentos cromatográficos em coluna aberta foi utilizada como fase estacionária gel de sílica 60 (63 - 200 μm) – VETEC[®] e Sephadex LH-20 de 47,0 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro e outra de 36,0 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, enquanto que para cromatografia do tipo *flash* sob média pressão sílica gel 60 (35 - 70 μm) – VETEC[®].

A análise cromatográfica em camada delgada (CCD) foi feita sobre cromatofolhas de alumínio ou plástico cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ – MERCK[®] (espessura de 0,2 mm) ou em placas de vidro cobertas com gel de sílica 60 G – VETEC[®], preparadas no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica da UFC.

A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da MINERAL LIGHT[®], em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e pulverização ou imersão com solução de vanilina em ácido perclórico/etanol.

5.1.2. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas em um sistema SHIMADZU[®] LC. A coluna empregada e as condições de injeção encontram-se descritos no Item 5.11.1 (p. 110).

5.1.3. Cromatógrafo Gasoso

Para a análise da bioredução da acetofenona foi utilizado um sistema de cromatografia gasosa Thermo[®], com detector por ionização de chama. A coluna empregada e as condições de injeção dos experimentos encontram-se descritos no Item 5.15.3(p. 118).

5.2. Solventes

Os solventes utilizados nas separações, assim como nas análises cromatográficas foram de procedência PA - SINTH[®] e VETEC[®]. As análises por CLAE foram feitas com solventes grau CLAE - MALLINCKODT[®] e TEDIA[®].

5.3. Métodos Espectrométricos

5.3.1. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

Os ésteres metílicos do estudo da composição de ácidos graxos (Item 5.8.3, p. 105), assim como os produtos da biotransformação da (*R*)-carvona (Item 5.14.1, p. 117) foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas utilizando sistema SHIMADZU[®] QP5050A. O espectrômetro de massas possuía fonte de ionização por elétrons a 70 eV. A coluna empregada e as condições de injeção dos experimentos encontram-se descritos nos Itens 5.8.3 e 5.14.1. Os produtos de biotransformação das alquilfenonas (Item 5.16.2, p. 120) foram analisados também por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, o cromatógrafo era CarloErba, série 8000 e o espectrômetro de massas era VG-PlatformII no Departamento de Química da UFSCar. A coluna empregada e as condições de injeção dos experimentos encontram-se descritos no Item 5.16.2.

A aquisição do espectro de massas da substância F14 foi realizada em um equipamento MICROMASS[®] Quattro LC (triplo quadrupolo), equipado com fontes de ionização ESI e APCI no Departamento de Química da UFSCar.

5.3.2. Espectrometria na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

As leituras das absorções das frações nos experimentos de dosagem de proteína foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) modelo Cary 50 Conc da Varian no comprimento de onda de 595 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

5.3.3. Espectrometria de Infravermelho (IV)

O espectro de absorção na região do infravermelho (IV) foi obtido no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), em espectrômetro PERKIM - ELMER[®] modelo FT – IR SPECTRUM 1000 utilizando pastilhas de KBr para a amostra sólida.

5.4. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) da substância F14 foram obtidos em espectrômetros BRUCKER[®] ARX 200 e AVANCE DRX 400 do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

A aquisição dos espectros de RMN ¹H e ¹³C do manitol foi realizado em espectrômetros BRUCKER[®] DPX 300 e DRX 500, do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) na UFC.

5.5. Esterilização e preparação de meios de cultura

A esterilização de vidrarias e meios de culturas foi realizada nos seguintes laboratórios: Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes (LAMPS) – UFC e Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) – UFC.

Os procedimentos de esterilização foram realizados em autoclaves verticais, PHOENIX[®] AV 75 e Soc. FABBE[®] 103 e a repicagem nos meios de cultura em capelas de fluxo laminar VECO[®] VL FS – 12 M e LABCONCO[®] MOD # 8089000.

5.6. Microrganismo

T. harzianum (isolado de esterco de boi) foi fornecido pela Profa. Dra Maria Nenmaura G. Pessoa do Laboratório de Micologia e Patologia de Sementes (LAMPS) da UFC.

PARTE EXPERIMENTAL

5.6.1. Preservação do microrganismo

T. harzianum foi inicialmente incubado em meio de cultura semi-sólido BDA por 7 dias e em seguida preservado em óleo mineral para evitar a desidratação do microrganismo, isolando-o do contato com o ar, e reduzir ao mínimo seu metabolismo (MENEZES, 1993). O procedimento de conservação em óleo mineral encontra-se descrito a seguir:

- O fungo foi repicado em tubo de ensaio contendo cerca de 5 mL (metade do volume do tubo de ensaio) do meio cultura BDA solidificados com inclinação.
- A cultura fúngica foi incubada a temperatura ambiente por 7 dias.
- O ágar inclinado, contendo as estruturas do fungo, foi coberto com óleo mineral Nujol[®] (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) e estocado a temperatura ambiente.

A cultura fúngica preservada através dessa metodologia descrita serviu de matriz para todos os estudos realizados nesse trabalho.

5.7. Preparação dos meios de cultura

No estudo químico de *T. harzianum* foram utilizados os meios líquidos Czapeck, peptona e caldo de batata, preparados conforme procedimentos descritos a seguir.

5.7.1. Meio de Czapeck

Na preparação do meio de cultura Czapeck (ALVIANO *et al.*, 1993) foram utilizados glicose (30 g/L), NaNO₃ (2,0 g/L), K₂HPO₄ (2,0 g/L), MgSO₄ · 7H₂O (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L) e FeSO₄ (0,5 g/L). Depois de distribuído nos erlenmeyers, o meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos. O meio apresentou o pH = 8,5.

5.7.2. Meio de peptona

O meio de cultura de peptona (MAZIERO *et al.*, 1999) foi preparado utilizando glicose (39 g/L), peptona G (1,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), KH₂PO₄ (1,0 g/L), MgSnO₄ · 7H₂O (0,2 g/L), (NH₄)₂SO₄ (5 g/L). O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, após ser distribuídos em erlenmeyers. O meio apresentou o pH = 6,3.

PARTE EXPERIMENTAL

5.7.3. Meio de caldo de batata

O caldo de batata utilizado na preparação do meio líquido foi obtido pelo cozimento de 200 g de batata inglesa descascada em 1 L de água destilada. Depois de cozida, a água do cozimento foi separada por filtração, seguido da adição de 20 g de glicose. Para o estudo dos ácidos graxos (Item 5.8) a glicose foi substituída pela mesma quantidade de manitol. O volume foi completado para 1 litro com água destilada. O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos (YANG, *et. al.*, 2000) e apresentou pH = 6,5.

5.8. Avaliação dos ácidos graxos de *T. harzianum*

Para avaliar a produção de ácidos graxos por *T. harzianum*, quatro meios de culturas foram utilizados: Czapeck, peptona e caldo de batata. Nesse último meio, variou-se a fonte de carbono (glicose e manitol). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Em três erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de cada meio de cultura, foi adicionado um disco do inóculo ($\phi = 3$ cm). Os erlenmeyers foram incubados por 16 dias a temperatura ambiente. O micélio foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo. Após secagem em estufa até peso constante, o micélio foi pesado e as massas (g) encontram-se descritas na Tabela 19.

Tabela 19 - Massas fúngicas (g) de *T. harzianum*

Meio	Czapeck	Peptona	Caldo de batata Glicose	Caldo de batata Manitol
Sigla	CZM	PEPM	BDM	BMM
Amostras	1,0	13,0	6,0	6,0
	1,0	15,0	7,0	5,0
	1,0	20,0	10,0	5,0

O micélio foi extraído com 100 mL da mistura AcOEt/MeOH 1:1, sob condição estática, durante 24 horas. Os extratos obtidos (Tabela 20) foram concentrados por destilação do solvente a pressão reduzida. Todos os extratos foram submetidos a reações de saponificação/esterificação (Itens 5.8.1-5.8.2, p. 104).

Tabela 20 - Massas dos extratos (mg) de *T. harzianum*

Meio	Czapeck	Peptona	Caldo de batata Glicose	Caldo de batata Manitol
Sigla	CZM	PEPM	BDM	BMM
Amostras	160,3	287,7	1271,8	367,2
	149,8	609,8	1109,5	343,0
	101,0	694,0	2459,0	378,7

PARTE EXPERIMENTAL**5.8.1. Saponificação**

Em um balão de fundo redondo de 10 mL foram adicionados 100 mg de cada extrato do micélio, solubilizados em MeOH, e 1 mL de solução etanólica de KOH 0,5 mol/L. O sistema foi mantido em refluxo por 30 minutos. A reação foi encerrada pela adição de 5 mL de H₂O destilada. Os insaponificáveis foram extraídos através de partição líquido-líquido com CH₂Cl₂ e a fase aquosa foi acidificada com HCl até pH = 2. Posterior extração com CH₂Cl₂ levou a separação dos ácidos graxos livres. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada sob pressão reduzida e as massas obtidas encontram-se descritas na Tabela 21 (p. 104).

Tabela 21 - Extratos (mg) oriundos da saponificação

Amostras	Saponificáveis	Insaponificáveis
CZ1M	13,8	46,6
CZ2M	13,1	27,1
CZ3M	13,3	24,0
PEP1M	26,9	46,8
PEP2M	9,5	92,8
PEP3M	7,1	52,0
BD1M	49,5	28,2
BD2M	17,3	108,6
BD3M	14,1	108,7
BM1M	24,2	61,7
BM2M	15,5	153,7
BM3M	14,5	53,2

5.8.2. Esterificação

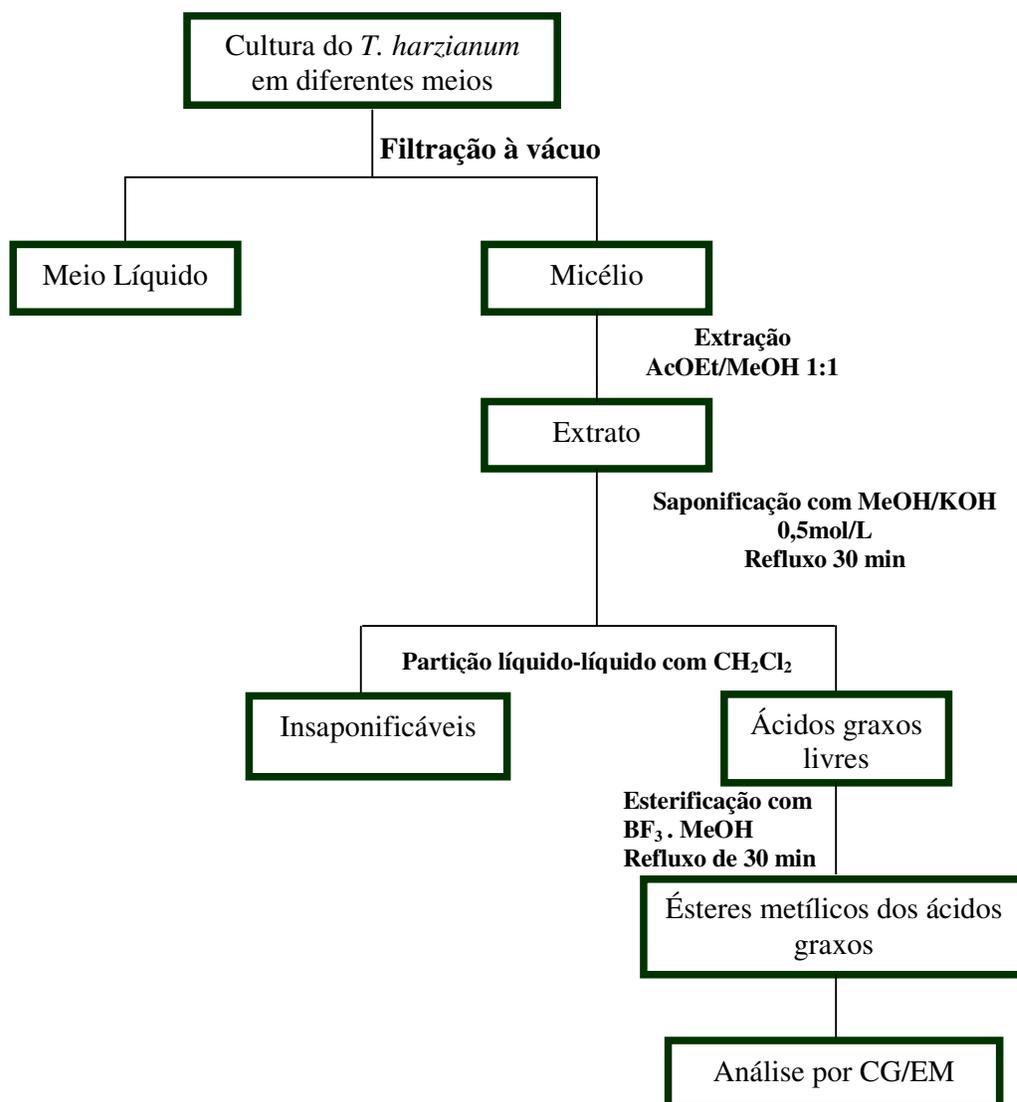
Foram adicionados a um balão de fundo redondo de 10 mL os ácidos graxos livres (10 mg de cada amostra), dissolvidos em 5 mL de MeOH, e 0,5 mL do BF₃/MeOH. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 30 minutos, sendo então adicionado 5 mL de hexano, permanecendo em refluxo por mais 5 minutos. Os ésteres metílicos foram extraídos com

PARTE EXPERIMENTAL

hexano, seguido de secagem com sulfato de sódio anidro e concentração do solvente sob pressão reduzida.

5.8.3. Análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos

As análises dos ésteres metílicos foram feitas por CG/EM (Fluxograma 2), utilizando uma coluna OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. Inicialmente, a temperatura da coluna foi de 80 °C aumentando para 180 °C a 5 °C/min. Nesse ponto, a velocidade aumentou para 10 °C min até atingir 300 °C, permanecendo nessa temperatura por 8 minutos. A temperatura do injetor foi de 280 °C e o tempo total de análise cromatográfica foi de 45 minutos.



Fluxograma 2: Obtenção dos ésteres metílicos para análise por CG/EM

5.9. Otimização do cultivo de *T. harzianum* para a produção de metabólitos secundários

5.9.1. Estudo Cinético

O fungo foi cultivado por 5 dias em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar). Discos do micélio foram retirados e transferidos para 33 erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio BD (Batata-dextrose), e mantido sob condição estática durante 32 dias para estudo cinético da produção dos metabólitos secundários. A cada 4 dias, 3 erlenmeyers eram sacrificados para extração com solvente orgânico. O micélio foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo e foi extraído com 100 mL da mistura AcOEt/MeOH 1:1, sob condição estática, durante 24 horas. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Os extratos obtidos foram concentrados por destilação do solvente a pressão reduzida e analisados por CCD.

5.9.2. Estudo da variação do meio de cultura

Para o estudo da produção de metabólitos secundários na variação do meio de cultivo por *T. harzianum*, quatro meios líquidos foram utilizados: Czapeck, peptona e caldo de batata. Nesse último meio, variou-se a fonte de carbono (glicose e manitol). Todos os experimentos foram feitos em triplicata. Em três erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de cada meio de cultura, foi adicionado um disco do inóculo ($\phi = 3$ cm). Os erlenmeyers foram incubados por 16 dias a temperatura ambiente e extraídos com solvente orgânico e analisados por CCD como no Item 5.9.1.

5.9.3. Cultivo de *T. harzianum* em grande escala em meio peptona

Foram empregados 53 erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio peptona em cada, dos quais 3 foram utilizados como controle. Após 16 dias de crescimento, fez-se filtração à vácuo para separação do micélio do meio líquido. Com o micélio, fez-se uma extração com AcOEt/MeOH 1:1 e o meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Dois extratos foram obtidos, TM16 PEP (oriundo do micélio) e T16 PEP (oriundo do meio líquido), os quais foram concentrados obtendo-se 5,02 e 1,60 g de material, respectivamente. O extrato TM16 PEP foi submetido a uma partição líquido-líquido com

PARTE EXPERIMENTAL

acetonitrila e hexano. O extrato foi dissolvido com 20 mL de acetonitrila e extraído 3 vezes com 50 mL de hexano, obtendo-se duas frações: TM16 PEP Acetonitrila (1,97g) e TM16 PEP Hexano (3,03 g).

5.9.3.1. Fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Acetonitrila

Uma alíquota da fração TM16 PEP Acetonitrila (1,43 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em uma coluna Sephadex, utilizando metanol como eluente. Foram coletadas 8 frações de 100 mL em erlenmeyers de 250 mL. Essas estão descritas e nomeadas na Tabela 22.

Tabela 22 - Frações após fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Acetonitrila

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rend.(%)
TM16 PEP Aceton 1	1	4,7	0,33
TM16 PEP Aceton 2	2	204,7	14,3
TM16 PEP Aceton 3	3	495,1	34,6
TM16 PEP Aceton 4	4	702,4	49,0
TM16 PEP Aceton 5	5	7,5	0,5
TM16 PEP Aceton 6	6	13,5	0,9
TM16 PEP Aceton 7	7	2,3	0,2
TM16 PEP Aceton 8	8	1,4	0,1

5.9.3.2. Fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Aceton 4

A fração TM16 PEP Aceton 4 (354,4 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico em uma coluna Sephadex, utilizando metanol como eluente, sendo coletadas 48 frações de 10 mL. As frações foram analisadas por CCDA e as que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram agrupadas como descrito na Tabela 23 (p. 108). As frações 18-26 e 27-33 apresentaram um precipitado no sobrenadante, o qual foi analisado e revelou que se tratava do manitol.

PARTE EXPERIMENTAL

Tabela 23 - Frações após fracionamento cromatográfico de TM16 PEP Aceton 4

Frações	Amostras	Masssas (mg)	Rend.(%)
1-5	1	0,3	0,1
6-10	2	0,1	0,5
11-17	3	17,7	5,3
18-26	4	165,5	49,6
27-33	5	129,5	38,8
34-38	6	17,3	5,2
39-48	8	3,1	0,9

5.10. Teste antitumoral

A atividade antitumoral de extratos e frações (Tabela 24, p. 109) foi avaliada no Laboratório de Oncologia Experimental da UFC, sob a coordenação da Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

O ensaio foi realizado frente as linhagens tumorais humanas MDA-MB435 (mama), HCT-8 (côlon) e SF-295 (glioblastoma), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), cultivadas em meio RPMI 1640 suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras a serem testadas foram diluídas em DMSO puro estéril para uma concentração final de 50 µg/ml. As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-8. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

PARTE EXPERIMENTAL

Tabela 24 - Descrição das frações submetidas ao teste antitumoral

Siglas	Descrição
TM16 PEP Hexano	Extrato do micélio, do meio peptona e extraído com hexano
TM16 PEP Acetonitrila	Extrato do micélio, do meio peptona e extraído com acetonitrila
TM16 PEP Aceton 2	2ª Fração da cromatografia da fração TM16 PEP Acetonitrila
TM16 PEP Aceton 3	3ª Fração da cromatografia da fração TM16 PEP Acetonitrila
TM16 PEP Aceton 6	6ª Fração da cromatografia da fração TM16 PEP Acetonitrila
BD1M	Extrato do micélio, crescido no meio Batata-dextrose
BM1M	Extrato do micélio, crescido no meio Batata-manitol
CZ1M	Extrato do micélio, crescido no meio Czapeck
BD1L	Extrato meio líquido, crescido em meio Batata-dextrose
BM1L	Extrato meio líquido, crescido em meio Batata-manitol
PEP1L	Extrato meio líquido, crescido em meio Peptona
CZ1L	Extrato meio líquido, crescido em meio Czapeck
BD branco	Extrato do branco do meio Batata-dextrose
BM branco	Extrato do branco do meio Batata-manitol
PEP branco	Extrato do branco do meio Peptona
CZ branco	Extrato do branco do meio Czapeck

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. A atividade citotóxica de todas as amostras está apresentada na Tabela 25.

Tabela 25 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais testadas na dose única de 50 μ L/mL

Substâncias estoque de 10 mg/mL > [C] poço = 50 μ g/mL	MTT 72 horas percentagem de inibição		
	Linhagens celulares		
	HCT-8	SF-295	MDA-MB435
	Média da inibição	Média da inibição	Média da inibição
TM16 PEP Hexano	0	13,06	12,41
TM16 PEP Acetonitrila	100,00	84,37	97,55
TM16 PEP Aceton 2	100,00	98,02	99,46
TM16 PEP Aceton 3	90,09	61,97	73,30
TM16 PEP Aceton 6	0	0	17,00
BD1M	0	0	6,98
BM1M	0	0	48,44
CZ1M	0	0	23,73
BD1L	100,00	100,00	100,00
BM1L	100,00	98,08	100,00
PEP1L	12,97	0	63,66
CZ1L	100,00	97,29	100,00
BD branco	11,44	0	20,14
BM branco	6,46	0,39	27,29
PEP branco	0,529	0	0
CZ branco	10,80	22,75	35,90

5.11. Cultivo em grande escala em meio BD

Foram empregados 32 erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio em cada, dos quais 2 foram utilizados como controle. Após 24 dias, fez-se filtração à vácuo para

PARTE EXPERIMENTAL

separação do micélio do meio líquido. Com o micélio, fez-se uma extração com etanol e o meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. Obtiveram-se dois extratos um oriundo do micélio e o outro oriundo do meio líquido, concentrados obtendo-se 11,42 g e 1,30 g de extratos, respectivamente.

5.11.1. Fracionamento cromatográfico do extrato do meio líquido

Uma quantidade de 941,4 mg do extrato do meio líquido foi submetida a fracionamento cromatográfico em uma coluna Sephadex LH 20 com eluição em MeOH, tendo altura de 36,0 cm e 2,5 cm de diâmetro. Foram coletadas 35 frações que foram analisadas por CCD e reunidas. Essas estão descritas e nomeadas abaixo na Tabela 26.

Tabela 26 - Frações após fracionamento cromatográfico do extrato do meio líquido

Frações	Amostras	Massas (mg)
1	1	52,1
2	2	57,5
3	3	469,7
4	4	284,1
5	5	61,4
6-8	6	9,3
9-12	7	5,0
13-16	8	1,3
17-35	9	1,0

Após análises por CCD, resolveu-se trabalhar com as amostras 3 e 4. Foram fracionadas em HPLC preparativo nas seguintes condições:

- Coluna: ODS – preparativa Shimadzu;
- Eluente: Água MiliQ e Metanol;
- Modo de eluição: Água MiliQ/Metanol 2:8;
- Vazão: 4 mL/min;
- Loop: 500 µL;
- Detecção: Dois canais: 225 nm e 294 nm.

A amostra 3 foi injetada e foram coletadas 20 frações, foram analisadas por CCD e reunidas. Essas estão descritas e nomeadas abaixo na Tabela 27.

PARTE EXPERIMENTAL

Tabela 27 - Frações após fracionamento cromatográfico da amostra 3

Frações	Amostras	Massas (mg)
1-6	1	17,3
7-9	2	9,9
11-13	3	9,0
14-15	4	7,2
16-18	5	88,9
19	6	25,2

A amostra 4 foi injetada e resultou em 19 frações, as quais foram analisadas por CCD e reunidas, conforme descrito abaixo na Tabela 28.

Tabela 28 - Frações após fracionamento cromatográfico da amostra 4

Frações	Amostras	Massas (mg)
1-8	1	42,3
9	2	10,1
10-13	3	10,3
14-16	4	48,0
18-19	5	14,0

5.12. Emprego de *T. harzianum* na biotransformação de substratos orgânicos

5.12.1. Atividade Alcooldesidrogenases (ADHs)

Foi preparado meio líquido BDA (Batata-dextrose-ágar), após autoclavagem, foi colocado 1% de fucsina básica para cada 1 L de meio. O meio foi vertido em placas de Petri, seguido da inoculação de um disco de 3 cm do *T. harzianum* ao centro da placa. O teste foi realizado em triplicata e empregou-se *Fusarium oxysporum* como controle positivo. Após 7 dias as placas foram analisadas para visualização do desenvolvimento de uma coloração rosa no micélio.

PARTE EXPERIMENTAL

5.12.2. Dosagem de proteína dos meios de cultura filtrados

Foi usada a metodologia descrita por Bradford utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão interno (BRADFORD, 1976).

5.12.2.1. Preparo do Reagente de Bradford

Em um balão volumétrico de 1 L, adicionou-se 100 mg de Coomassie Brilhante Blue (G250) dissolvidos em 50 mL de álcool etílico (95%) e 100 mL de ácido fosfórico (85%). O volume final foi completado com água destilada. Em seguida a solução final foi transferida para um erlenmeyer de 1L revestido com papel alumínio e mantido sob agitação por 60 minutos. Realizou-se uma filtração simples da solução de Bradford duas vezes, em ambiente escuro, e acondicionou-a em ambiente escuro e sob refrigeração.

5.12.2.2. Determinação de proteína dos meios de cultura filtrados

Para a determinação da quantidade de proteína do meio líquido de *T. harzianum*, foi adotado o seguinte procedimento: o fungo foi cultivado por 5 dias em placas de Petri, contendo o meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar). Discos do micélio foram retirados e transferidos para 9 erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio BD (batata-dextrose). O estudo foi realizado em agitação durante 3 dias (Tabela 29, p. 113) para estudo cinético da produção de proteína pelo fungo. A cada dia de análise 3 erlenmeyers eram sacrificados para separação do micélio do caldo de cultura em condições assépticas por filtração à vácuo. O micélio foi descartado. Assim, foram obtidas frações de 1, 2 e 3 dias. O procedimento foi realizado em triplicata, gerando um total de 9 frações mais uma contendo o branco (apenas o meio de cultura), retirando uma alíquota todos os dias de análise. Essas frações foram acondicionadas em baixa temperatura.

Em tubos de ensaio adicionou-se 0,1 mL de cada fração e 2,5 mL do reagente de Bradford. Após 2 minutos foi realizada a leitura desta amostra em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 595 nm. Albumina bovina foi empregada como padrão da curva de calibração. Foi feito também outro branco, constando de 0,1 mL de água destilada e 2,5 mL do reagente de Bradford. Esse procedimento foi feito em triplicata.

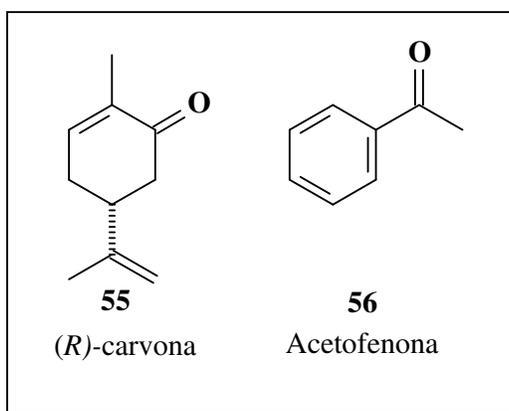
PARTE EXPERIMENTAL

Tabela 29 - Percentual relativo da concentração em mg/L de proteína variando os dias

	1 dia	2 dias	3 dias
Concentração mg/L	3,0	28,0	140,5

5.13. Substratos

Para as reações de biotransformação com *T. harzianum* foi utilizado o monoterpeno (*R*)-carvona, acetofenona (Figura 91) e 6 alquilfenonas (Figura 92, p. 114), ambos de procedência Aldrich®.

Figura 91 - Substratos utilizados na biotransformação por *T. harzianum*

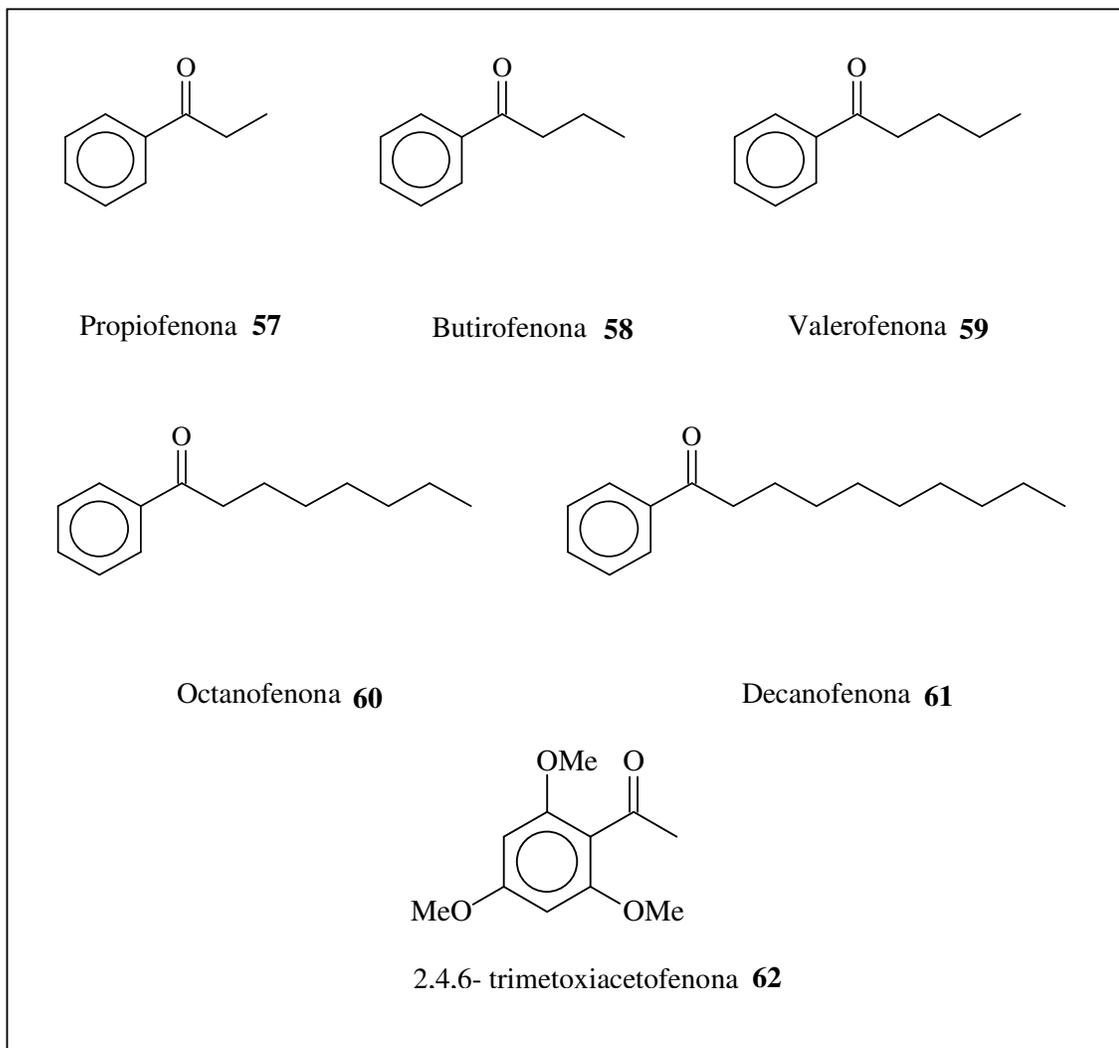


Figura 92 - Estrutura das alquilfenonas testadas

5.13.1. Redução química dos substratos: preparação de padrões

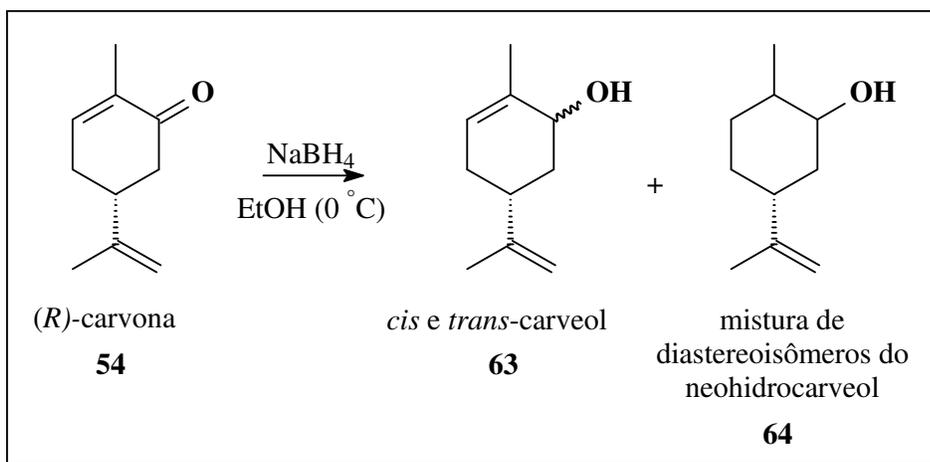
Em um balão de fundo redondo de 125 mL foram adicionados os substratos (Esquemas 9-10, p. 115) solubilizados em etanol e NaBH_4 segundo as quantidades descritas na Tabela 30 (p. 115). As misturas reacionais permaneceram sob agitação por 3 horas em banho de gelo. As reações foram interrompidas pela adição de água e os produtos extraídos através de partição líquido-líquido com AcOEt. As fases orgânicas foram secas com Na_2SO_4 anidro e o solvente destilado a pressão reduzida. O produto bruto de cada reação foi purificado por fracionamento cromatográfico em gel de sílica.

PARTE EXPERIMENTAL

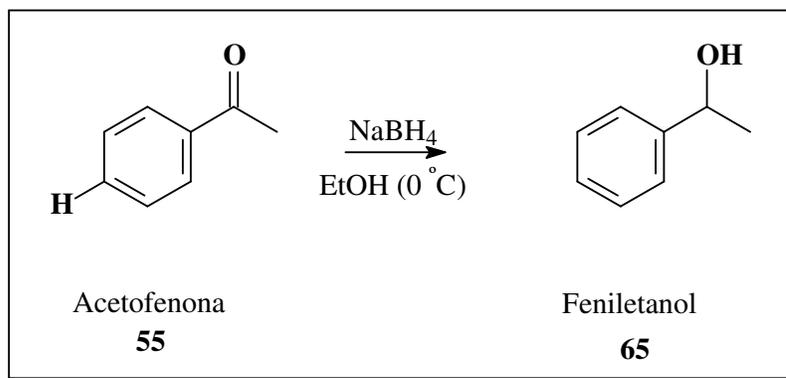
Tabela 30 - Quantidades utilizadas de reagentes na preparação de padrões

Substrato	Quantidade do substrato	Volume de Etanol	Quantidade de NaBH ₄	Produto Bruto da reação	Produto purificado
(<i>R</i>)-carvona	1,0 g	10 mL	2,0 g	0,92 g	0,80 g
ACTF*	100 mg	2 mL	200 mg	90,0 mg	85,2

* ACTF: acetofenona



Esquema 9 - Redução química da (*R*)-carvona



Esquema 10 - Redução química da acetofenona

5.13.2. Construção da curva de calibração

A quantificação do álcool, obtido da redução da acetofenona, foi realizada por cromatografia gasosa, empregando-se o isopropilbenzeno como padrão interno. Foram preparadas soluções estoques do álcool e a partir de diluições em série foram obtidas soluções em cinco concentrações. Estas soluções continham 5, 10, 15, 20 e 25 μL do álcool padrão e 25 μL do padrão interno, sendo o volume completado para 25 mL com AcOEt. As soluções foram injetadas em um cromatógrafo gasoso, utilizando uma coluna

PARTE EXPERIMENTAL

OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), com detector de ionização de chama. Os valores numéricos referentes à concentração do álcool padrão e padrão interno do cromatograma foram utilizados para a construção da curva de calibração, através da razão entre a área do pico do álcool padrão e a área do pico do padrão interno (Figura 93, p. 116).

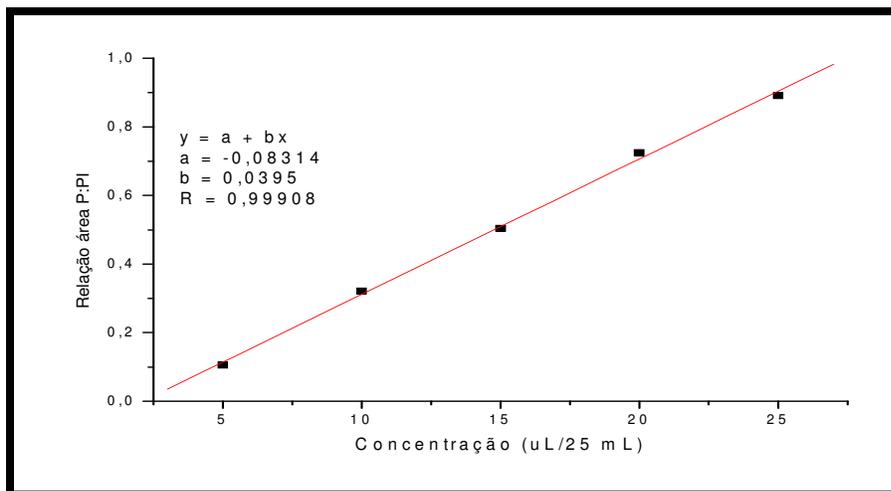


Figura 93 - Curva de calibração do feniletan-1-ol

5.14. Biotransformação da (R)-carvona por células em crescimento de *T. harzianum*

Um disco ($\phi = 3$ cm) de *T. harzianum* em BDA foi adicionado a erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio líquido BD, permanecendo estático por 7 dias. Após esse período, foi adicionado 20 μ L (0,13 mmol) de (R)-carvona à cultura fúngica e mantido sob condição estática por 1, 2, 3 e 6 dias. Também foi testada a biotransformação sob agitação, mantidas por 3, 6 e 9 dias. Os testes foram feitos em triplicata e o meio líquido contendo somente o substrato foi empregado como branco.

A cultura fúngica em BD foi submetida à extração com AcOEt. O micélio foi separado do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido particionado com AcOEt. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e concentrada a 40 °C por destilação do solvente até 5 mL, sob pressão reduzida. As alíquotas obtidas foram posteriormente analisadas por CG/EM (Item 5.14.1, p. 117).

PARTE EXPERIMENTAL

5.14.1. Análise por CG/EM

Os produtos de biotransformação descritos no item anterior foram analisados por CG/EM. Como fase estacionária foi utilizada coluna OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e hélio como gás de arraste com fluxo de 0,7 mL/min. A temperatura inicial foi de 40 °C e elevada a 180 °C a uma velocidade de 10 °C/min. A partir deste ponto, a velocidade aumentou para 40 °C/min até atingir a temperatura de 300 °C, permanecendo nessa temperatura por 8 minutos. O injetor operou a uma temperatura de 250 °C e o tempo total de análise cromatográfica foi de 25 minutos.

5.15. Biotransformação da acetofenona

5.15.1. Biotransformação por células em crescimento

Um disco ($\phi = 3$ cm) de *T. harzianum* em BDA foi adicionado a erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio líquido BD, permanecendo estático por 7 dias. Após esse período, foi adicionado 15,6 μ L (0,13 mmol) de acetofenona à cultura fúngica e mantido sob agitação por 3 e 6 dias. Os produtos foram extraídos através de partição líquido-líquido com AcOEt. Os testes foram feitos em triplicata e o meio líquido contendo somente o substrato foi empregado como branco.

5.15.2. Biotransformação em caldo de cultura e em células remanescentes

Depois de incubado por 7 dias em BD, o micélio de *T. harzianum* foi separado do caldo de cultura em condições assépticas por filtração à vácuo. Ao caldo de cultura e ao micélio resuspendido em solução tampão de fosfato (pH = 7) foram adicionados 15,6 μ L da acetofenona e incubados por 3 e 6 dias a 125 rpm em temperatura ambiente. O caldo de cultura e a solução tampão foram extraídos através de partição líquido-líquido com AcOEt. Os testes foram feitos em triplicata. O caldo de cultura e a solução tampão de fosfato, ambos contendo somente o substrato, foram empregados como branco.

A solução tampão pH = 7 foi preparada com 305,0 mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mol/L e 195 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mol/L, adicionados a um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado com água destilada.

5.15.3. Análise do álcool CG/DIC

5.15.3.1. Preparação das amostras

Para a preparação das amostras, os extratos orgânicos (Item 5.15.2, p. 117) foram transferidos para balões volumétricos de 25 mL, acrescidos de 25 µL de isopropilbenzeno (padrão interno) e o volume completado com AcOEt. A quantificação e determinação dos excessos enantioméricos foram feitas pela injeção de 1 µL de amostra no CG/DIC. Os valores das áreas obtidas foram empregados na equação da reta, obtida na curva de calibração (Item 5.13.2, p.115).

5.15.3.2. Quantificação do feniletan-1-ol

A quantificação do feniletan-1-ol foi feita utilizando uma coluna OV-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), e nas seguintes condições cromatográficas de análise: temperatura inicial de 90 °C até 112 °C a 10 °C/min e de 112 °C até 120 °C a 1 °C/min com temperatura do injetor em 250 °C; temperatura do detector em 250 °C; split = 1/50 e fluxo = 1 mL/min.

5.15.3.3. Determinação do excesso enantiomérico do feniletan-1-ol

A determinação do excesso enantiomérico foi realizada utilizando uma coluna CHIRASIL-DEX (25 m x 0,25 mm x 0,25 µm), empregando-se as seguintes condições de análise: temperatura inicial de 130 °C, com aquecimento de 2 °C/min até 180 °C, permanecendo 2 minutos. Temperatura do injetor em 200 °C e do detector em 200 °C; split = 1/50 e fluxo = 1 mL/min.

5.16. Biotransformação de alquilfenonas

5.16.1. Biotransformação em células remanescentes

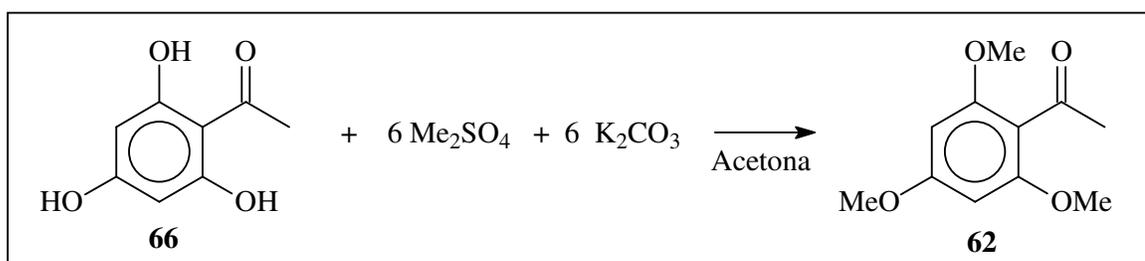
Foram testadas 6 alquilfenonas (Figura 92, p. 114) e para todas realizou-se, individualmente, o seguinte experimento: Um disco de aproximadamente 3,0 cm de *T. harzianum* em BDA foi adicionado a erlenmeyers de 250 mL com 100 ml de meio líquido BD, permanecendo estático por 7 dias. Após esse período, o micélio do fungo foi separado do

PARTE EXPERIMENTAL

caldo de cultura em condições assépticas por filtração à vácuo e o micélio ressuspensionado em solução tampão de fosfato (pH = 7). Foram adicionadas quantidades equivalentes a utilizada na biotransformação da acetofenona (Tabela 31, p. 119) e incubadas por 6 dias a 125 rpm em temperatura ambiente. A extração foi através de partição líquido-líquido com AcOEt. Os testes foram feitos em triplicata. O tampão contendo somente o substrato foi empregado como branco.

A solução tampão pH = 7 foi preparada com 305,0 mL de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mol/L e 195 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mol/L, adicionados a um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado com água destilada.

A 2,4,6-trimetoxiacetofenona foi obtida por uma reação de metilação (Esquema 11) da 2,4,6-trihidroxiacetofenona.



Esquema 11 - Metilação química da 2,4,6-trihidroxiacetofenona

Os reagentes foram adicionados e dissolvidos em acetona a 45 °C de aquecimento, em um banho de óleo sob refluxo, durante aproximadamente 14 horas. Interrompeu-se a reação com a adição de uma solução de HCl 10%. Realizou-se uma partição líquido-líquido com diclorometano, em seguida adicionou-se à fase orgânica uma solução de hidróxido de potássio para a retirada do excesso de ácido. O produto da reação foi seco com sulfato de sódio anidro e o solvente destilado sob pressão reduzida. O material resultante foi purificado por fracionamento cromatográfico em gel de sílica.

Tabela 31 - Quantidade utilizada na biotransformação das correspondentes alquifenonas

Alquifenonas	Massa molar mol/L	Quantidade utilizada
Propiofenona	134,18	17,0 µL
Butirofenona	148,21	19,0 µL
Valerofenona	162,23	21,0 µL
Octanofenona	204,31	28,0 µL
Decanofenona	232,37	30,0 mg
2,4,6-trimetoxiacetofenona	210,0	27,0 mg

5.16.2. Análise por CG/EM

Os produtos de biotransformação descritos no item anterior foram analisados por CG/EM. Como fase estacionária foi utilizada coluna DB (J&W) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e hélio como gás de arraste com fluxo de 0,7 mL/min. A temperatura inicial foi de 100 °C e elevada a 120 °C a uma velocidade de 1 °C/min. A partir deste ponto, a velocidade diminuiu para 0,5 °C/min até atingir a temperatura de 200 °C. O injetor operou a uma temperatura de 250 °C e o tempo total de análise cromatográfica foi de 60 minutos.

Capítulo 6

Conclusão

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

No estudo do perfil de ácidos graxos de *T. harzianum* em quatro meios diferentes, foi identificada uma mistura de ácidos graxos através da análise por CG/EM. Foram identificados os ácidos graxos hexadecanóico (C_{16:0}), octadecanóico (C_{18:0}), 9-octadecenoico (C_{18:1}) e 9,12-octadienoico (C_{18:2}) em diferentes concentrações nos meios estudados. A composição dos ácidos graxos encontrada está de acordo com os dados relatados na literatura para esse fungo. No entanto, foi possível observar uma inversão no teor dos ácidos C_{18:2} e C_{16:0}, o que pode ser justificado pela variação do meio de cultivo empregado.

Na otimização do cultivo de *T. harzianum* para produção de metabólitos secundários foi possível determinar 16 dias de crescimento e o meio peptona como melhores condições de cultivo. Após vários fracionamentos cromatográficos, foi possível isolar somente o manitol. Com a dificuldade encontrada no isolamento de metabólitos secundários dos extratos de *T. harzianum* resolveu-se submeter todas as frações obtidas ao ensaio de atividade antitumoral. Das 16 amostras analisadas, cinco (1,95 %) apresentaram valores de inibição ≥ 75 % em pelo menos duas linhagens tumorais testadas. Devido ao bom resultado obtido do teste antitumoral para o extrato resultante do crescimento do fungo em meio BD, o mesmo foi cultivado novamente nesse meio e o extrato foi submetido a fracionamento em CLAE preparativo em coluna de fase reversa, onde foi possível isolar a Viridiofungina A, que já foi isolada do gênero do fungo, mas não na espécie, com isso sendo inédita na literatura para *T. harzianum*. Desta forma pode-se sugerir a viridiofungina A como marcador quimiotaxonômico para o gênero.

A atividade ADH de *T. harzianum* foi determinada através de ensaio qualitativo e posterior reação de bio-redução de cetonas pró-quirais. Do estudo da bio-redução (*R*)-carvona e da acetofenona por *T. harzianum*, foi possível identificar o neodihidrocarveol e o feniletan-1-ol, respectivamente, como produtos de redução. O emprego de alquifenonas de cadeias mais longas e mais complexas levou a formação dos respectivos álcoois, exceto quando a decanofenona e 2,4,6-trimetoxiacetofenona foram empregadas como substratos. Esse resultado revelou a seletividade do microrganismo por cadeias carbônicas menos complexas e de tamanhos intermediários.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M. L.; LÓPEZ-OCANÁ, L.; LÓPEZ-CORONADO, J. M.; RODRÍGUEZ, E.; MARTÍNEZ, M. J.; LARRIBA, G.; COQUE, J. R. Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by o methylation of 2,4,6-trichlorophenol. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5860-5869, 2002.
- ALVIANO, C. S.; FARBIARZ, S. R.; TRAVASSOS, L. R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W. Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathologia*. **Micopathologia**, v. 119, p. 17-23, 1993.
- ANDRADE, L. H.; KEPPLER, A. F.; SCHOENLEIN-CRUSIUS, I. H.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Evaluation of acetophenone monooxygenase and alcohol dehydrogenase activities of different fungal strains by biotransformation of acetophenone derivaties. **Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic**, v. 31, n. 4-6, p. 129-135, 2004.
- ANDRADE, L. H.; UTSUNIMIYA, R. S.; OMORI, A. T.; PORTO, A. L. M.; COMASSETO, J. V. Edible catalysts for clean chemical reactions: bioreduction of aromatic ketones and biooxidation of secondary alcohols using plants. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 38, n. 2, p. 84-90, 2006.
- BARTMANSKA, A.; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J. Transformation of steroids by *Trichoderma hamatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1615-1621, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- COX, K. D.; SCHERM, H.; RILEY, M. B. Characterization of *Armillaria spp.* from peach orchards in the southeastern united states using fatty acid methyl ester profiling. **Mycological Research**, v. 110, n. 4, p. 414-422, 2006.
- DAVIS, B. G.; BOYER, V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 618-640, 2001.
- DELAMATER, E. D. Basic fuchsin as a nuclear stain for Fungi. **Mycologia**, v. 40, n. 4, p. 423-429, 1948.
- DYK, M. S.; RENSBURG, E.; RENSBURG, I. P. B.; MOLELEKI, N. Biotransformation of monoterpenoid ketones by yeasts and yeast-like fungi. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 5, n. 1-4, p. 149-154, 1998.

EL-KADI, I. A.; MOSTAFA, M. E. Hydroxylation of progesterone by some *Trichoderma* species. **Folia microbiologica**, v. 49, n. 3, p. 285-290, 2003.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

EZIASHI, E. I.; OMAMOR, I. B.; ODIGIE, E. E. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 388-392, 2007.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. A Textbook. 2. ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995.

FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1321-1327, 2007.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3727-3729, 1999.

GARCÍA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum*. **Natural Products Reports**, v. 20, n. 4, p. 426-431, 2003.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2. ed. New York: Wiley Less, 1994.

HARMAN, G. E.; LORITO, M.; LYNCH, J. M. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution. **Advances in Applied Microbiology**, v. 56, p. 313-330, 2004.

HARRIS, G. H.; JONE, E. T. T.; MEINZ, M. S.; NALLIN-OMSTEAD, M.; HELMS, G. L.; BILLS, G. F.; ZINK, D.; WILSON, K. E. Isolation and structure elucidation of viridifungins A, B and C. **Tetrahedron letters**, v. 34, n. 33, p. 5235-5238, 1993.

HAI-FENG, Z.; GUO-QING H.; JING L.; HUI R.; QI-HE C.; QIANG Z.; JIN-LING W.; HONG-BO Z. Production of gastrodin through biotransformation of p-2-hydroxybenzyl alcohol (sic) by cultured cells of *Armillaria luteo-virens* Sacc. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2008.

HILLOCKS, R. J. The effect of root-knot nematode on vascular resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the stems of cotton plants. **Annals of applied Biology**, v. 107, n. 2, p. 213-218, 1985.

HOOK, I. L.; RYAN, S.; SHERIDAN, H. Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. **Phytochemistry**, v. 63, n. 1, p. 31-36, 2003.

HUSSAIN, S. A.; NOORANI, R.; QURESHI, I. H. Isolation and characterization of gliotoxin, ergosterol, palmitic acid and mannitol – metabolic products of *Trichoderma hamatum* Bainier. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 18, n. 5, p. 221-223, 1975.

KAZLAUSKAS, R. J.; WEISSFLOCH, A. N. E.; RAPPAPORT, A. T.; CUCCIA, L. A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal Organic Chemistry**, v 56, p. 2656-2665, 1990.

KIM, G. -S.; PARK, S. -H.; CHANG, Y. - J.; LIM, Y. -H.; KIM, S. -U. Transformation of menthane monoterpenes by menthe piperita cell culture. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 19, p. 1553-1556, 2002.

KLIGMAN, A. M.; MESCON, H. The Periodic-Acid-Schiff stain for the demonstration of fungi in animal tissue. **Jornal of Bacteriology**, v. 60, n. 4, p. 415-421, 1950.

LANDOLFI, R.; MOWER, R. L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids: structure-activity relations. **Biochemical Pharmacology**, v. 3, n. 9, p. 1525-1530, 1984.

LIMA, M. C. L. **Produtos Naturais obtidos de Fungos: Atividade Biológica, Isolamento e Determinação Estrutural**. 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Exame de Qualificação de Doutorado.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975, p. 1-18.

LIU, H.; GE, W.; LI, H.; WU, J. Microbial transformation of 5alpha, 6alpha-epoxy-3beta-hydroxy-16-pregnen-20-one by *Trichoderma viride*. **Steroids**, v. 72, n. 6-7, p. 509-513, 2007.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances; **Biotechnology Techniques**, v 13, p. 149, 1998.

MADSEN, R. D.; BAUTISTA, L. S.; PAWLAK, J. W.; PRONOVOST, A. D. **Direct Stain Specific Binding Assays For Microorganisms**. 5741662, 18 dez.1995, 21 abr. 1998.

MATSUDA, T. **Future Directions in Biocatalysis**. Oxford: Elsevier, 2007.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 77-84, 1999.

MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F. G. M.; DONNELLY, J. P.; VERWEIJ, P. E. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 2949-2954, 2000.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária, 1993.

MONTENEGRO, T. G. C. **Estudo do Perfil de Ácidos Graxos de Fungos Fitopatogênicos**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

NAGY, V.; TOKE, E. O. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZAKÁCS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 141-148, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Savier, 2006.

NUNES, F. M. **Estudo Químico do Fungo Fitopatogênico *Lasiodiplodia theobromae* (Sphaeropsidaceae)**. 2008. 207 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PRESECKI, A. V.; VASIC-RACKI, D. Modelling of the alcohol dehydrogenase production in baker's yeast. **Process Biochemistry**, n. 40, n. 8, p. 2781-2791, 2005.

PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; COLLADO, I. G. Enantiomeric oxidation of organic sulfides by the filamentous fungi *Botrytis cinerea*, *Eutypa lata* and *Trichoderma viride*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1-4, p. 18-23, 2007.

PRAK, S.; G. Z.; GUIRAUD, J. P.; SCHORR-GALINDO, S. Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2, 4, 6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 271-280, 2006.

PUCHTLER, H.; MELOAN, S. N.; BREWTON, B. R. On structural formulas of basic fuchsin and aldehyde-schiff reaction products. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 3, p. 255-265, 1975.

RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**. São Paulo: Guanabara, 2001, 297 p.

RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrônômica**, v. 28 p. 793-798, 2004.

SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT, Y.; BENSOUSSAN, M. Lipid accumulation in *Trichoderma* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, n. 2, p. 181-187, 1992.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions**. California: Academic Press, San Diego, California, USA, 2002.

SOMASHEKAR, D.; VENKATESHWARAN, G.; SRIVIDYA, C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 317-320, 2001.

THOMAS, A. F.; WILLHAM, B. Mass spectra and organic analysis. VII. The mass spectra of the menthols, carvomenthols, their acetates, and related alcohols. **Journal of the Chemical Society B**, v. 3, p. 219-227, 1966.

TURNER, W. B. Commercially Important Secondary Metabolites. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. K. **The Filamentous Fungi**: Industrial Mycology. EUA: Hardcover, 1975. p. 122-142.

VINALE F.; MARRA R.; SCALA F.; GHISALBERTI E. L.; LORITO M.; SIVASITHAMPARAM K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 143-148, 2006.

WEBER, R. W. S.; RIDDERBUSCH, D. C.; ANKE, H. 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) tolerance and biotransformation potential of microfungi isolated from TNT-contaminated soil. **Mycological Research**, v. 106, n. 3, p. 336-344, 2002.

YANG, Q.; ASAI, M.; MATSUURA, H.; YOSHIHARA, T. Potato micro-tuber inducing hydroxylasioidiplodins from *Lasioidiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 5, p. 489-494, 2000.

YE H.; YUAN S.; CONG X. Biotransformation of puerarin into 3'-hydroxypuerarin by *Trichoderma harzianum* NJ01. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 594-597, 2007.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed method. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

ZANON, J. P.; PERES, M. F. S.; GATTAS, E. A. L. Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 466-470, 2007.