



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

“Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas
no isolamento de bioherbicidas produzidos por
microrganismos”

Tânia Petta

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

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

RIBEIRÃO PRETO-SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Petta, Tânia

Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos.

Ribeirão Preto, 2008.

99 p.; 30 cm

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

Orientador: de Moraes, Luiz Alberto Beraldo

1. Bioherbicidas
2. LC-MS
3. Microrganismo
4. Bioensaio

“Gracias a la vida, que me ha dado tanto!”

(Violeta Parra)

Dedico essa dissertação aos queridos meus pais, Afonso e Maria, pelo exemplo de vida, pelo apoio, dedicação, por todo amor e carinho e por serem os melhores pais do mundo!

Aos meus irmãos Adriano e Isabella, pela amizade, companhia e pela alegria de tê-los como irmãos.

Em especial ao meu avô, Geraldo, que me acompanhou e me incentivou durante toda sua vida!!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, pela orientação, dedicação, competência profissional, confiança, por todas as oportunidades, pelas festas de fim de ano e principalmente pela amizade durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Leonardo Silva Santos, da Universidade de Talca-Chile, pela contribuição para minha formação, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e de conhecer terras chilenas.

A meus queridos companheiros de laboratório e “agregados”: Fernanda, Ana Flávia, Cris, Marcelo, Carol, Eduardo, Jussara, André, Tiago (Damãe), Letícia e Simone pelo agradável convívio e pela satisfação de trabalhar com vocês todos os dias!

Ao Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Laboratório de Microbiologia USP-RP), Prof. Dr. Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente) e a Prof^a Dr^a Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli pela grande dedicação com que me ajudou durante a realização desse trabalho, pelas sugestões e ensinamentos de microbiologia.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin (DQ-UNICAMP), Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (FCFRP), Dr. Eduardo Meurer (CORE) e Dr. Fábio Barros (Cebola) (CORE), por possibilitarem as análises por espectrometria de massas.

Aos alunos do laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente, em especial Flávia e Sarah pela ajuda em meus experimentos e pela amizade que construímos.

Aos docentes que participaram da minha banca de Qualificação Prof. Dr. Pietro Ciancaglini e Prof^a. Dr^a. Hosana Maria Deboni Navickiene pelas valiosas sugestões.

Aos funcionários do Departamento de Química da FFCLRP, Lâmia, Émerson, Sônia, Bel e André pelo auxílio e atenção que sempre recebi. À Virgínia, pelos experimentos de RMN e ao Djalma pelas análises de infravermelho e massas.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e à FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

Aos meus grandes amigos Lilian, Tati, Bruno, Pito, Paula, Lili, Vagninho, Mel, Flávia, Neto, Fabi, Bruna, Céli, Marlene, Cristine e Amna pelo privilégio de conhecer vocês!! Temos muita história pra contar...

Ao meu namorado To pelo companheirismo, carinho e paciência!!

A todos meus familiares em especial a minha querida prima Flávia.

A minha família chilena Tia Jackeline, Tio Jorge, Jano, Cláudio, Jorgito, Carlita e Seb por terem-me "adotado", por sempre me ajudar e por todos os momentos felizes que me proporcionaram na Ciudad de Talca. *Muchas gracias!!*

Aos meus pais aos meus queridos irmãos. Sem vocês eu não teria chegado até aqui!! Amo muito vocês!!

E a música, presente em todos os momentos da minha vida!!

RESUMO

Neste trabalho foi empregada uma metodologia rápida e eficiente para a identificação de metabólitos fitotóxicos produzidos por microrganismos. O isolamento do composto bioativo foi guiado através de bioensaio com *Lemna minor*. A espectrometria de massas, em especial o LC-MS, foi utilizada para acelerar o processo identificação do composto ativo.

As bactérias estudadas eram simbióticas do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfii*. Seus respectivos extratos orgânicos obtidos de culturas em meio BD (batata – dextrose) foram submetidos ao ensaio de fitotoxicidade com *Lemna minor*. Entre cinco bactérias foi selecionada a bactéria *Burkholderia sp*, a qual apresentou maior atividade no ensaio de fitotoxicidade. O fracionamento por cromatografia em coluna de sílica propiciou a identificação de uma fração ativa. A fitotoxina foi caracterizada como sendo um macropentólido de 20 membros. O composto pertence à classe dos polihidroxi-butiratos (PHBs). Sua estrutura foi determinada por RMN ¹H, RMN ¹³C, HMQC, HMBC, IV, ESI-MS/MS e também por comparação com dados da literatura. Esse composto nunca foi isolado de fontes naturais. Foi descrito na literatura uma rota sintética para sua obtenção, porém esta é a primeira vez que sua atividade fitotóxica é relatada. Este trabalho mostra uma nova perspectiva para o emprego de PHBs de baixo peso molecular e apresenta uma proposta de estrutura de composto fitotóxico que pode servir de modelo para a síntese de novos herbicidas.

ABSTRACT

In this work a quick and efficient methodology was employed for the identification of phytotoxic metabolites produced by microorganisms. The isolation of the bioactive compound was guided by *Lemna minor* bioassay. Mass spectrometry, especially LC-MS, was used to accelerate the process of identification of the phytotoxin.

All bacteria were symbiotic to the phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii*. The bacterium *Burkholderia sp* was selected among the five bacteria analyzed, due to its greater phytotoxic activity in the bioassay. The phytotoxin was characterized as a 20 member macropentolide. This compound belongs to the polyhydroxybutirates (PHBs) chemical class. Its structure was determined by NMR¹H, NMR ¹³C, HMQC, HMBC, IV, ESI-MS/MS and HRMS. It has never been isolated from natural sources before. Although a synthetic route has been proposed in the literature this is the first time that its phytotoxic activity is reported. This work leads to a new perspective for the application of low molecular weight PHBs and propose a phytotoxic structure that can be used as a model for the synthesis of new herbicide class.

Lista de Figuras

Figura 1. Principais herbicidas sintéticos empregados como pesticidas.	4
Figura 2. Herbicida bialafos produzido por <i>Streptomyces higroscopicus</i> e o derivado sintético glifosato..	7
Figura 3. Anisomicina, fitotoxina produzida por <i>Streptomyces</i> sp e o herbicida sintético NK-049.	8
Figura 4. Fitotoxina produzida pelo fungo <i>Ascochyta caulina</i>	8
Figura 5. Fitotoxinas produzidas pelos fitopatógenos <i>Streptomyces scabiei</i> e <i>S. acidiscabies</i>	9
Figura 6. Metodologia empregada na separação de metabólitos secundários.	11
Figura 7. Análise de LC-MS/MS empregada na desreplicação de compostos presentes em extratos de plantas.	13
Figura 8. Bioensaio de fitotoxicidade empregando <i>Lemna minor</i>	16
Figura 9. Compostos fitotóxicos isolados de folhas de <i>Laggera decurrens</i> guiado por bioensaio com <i>Lemna minor</i>	16
Figura 10. Metodologia empregada para o isolamento de fitotoxinas.	19
Figura 11. Síntese de oligômeros cíclicos a partir do ácido (R)-3-hidroxi-butírico.	28
Figura 12. Estrutura da fitotoxina rizoxina produzida pela bactéria endossimbionte <i>Burkholderia rhizoxina</i>	32
Figura 13. Substância rizobitoxina produzida pela bactéria simbiote <i>Bradyrhizobium elkanii</i>	34
Figura 14. Ensaio de fitotoxicidade das bactérias EMB1B, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B com <i>L. minor</i> , fermentadas por 11 dias em meio BD a 28 C.	35
Figura 15. Espectros de massas ESI ⁺ e potencial do cone 55V dos extratos orgânicos de EMB1B e, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B, fermentados por 5 dias em meio BD.	39
Figura 16. Espectros de massas ESI ⁺ e potencial do cone 55 V, dos extratos orgânicos de EMB1B e, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B, fermentados por 11 dias em meio BD.	41
Figura 17. Cromatogramas de LC-UV dos extratos das bactérias EMB obtidos com 11 dias de fermentação. Fase móvel H ₂ O/ACN 10%, coluna C18 (4.60 x 250 mm), modo isocrático e fluxo 1 ml/min e $\lambda = 215$ nm.	43
Figura 18. Sinais que caracterizam a presença de surfactinas no extrato EMB1B.	44
Figura 19. Estrutura geral das surfactinas.	45
Figura 20. a) Espectro de ESI-MS/MS do sinal de m/z (M+H) ⁺ 1037, obtido em modo positivo. b) Sequência de peptídeos da Surfactina C ₂	46
Figura 21. Ensaio de fitotoxicidade da bactéria EMB5B com <i>L. minor</i> , fermentadas por 5, 11, 17 e 21 dias em meio BD a 28 C.	48
Figura 22. Espectros de massas ESI ⁺ da bactéria EMB5B com 5, 11, 17 e 21 dias de fermentação, a 28°C em meio BD.	50
Figura 23. Cromatogramas de LC-UV dos extratos EMB5B obtidos em dias diferentes de fermentação. Fase móvel: H ₂ O/ACN10%, coluna C18 (4.60 x 250 mm), fluxo 1 ml/min em 215 nm.	52
Figura 24. Ensaio de fitotoxicidade das frações cromatográficas F1, F2, F3, F4 e F5 do extrato bactéria EMB5B-15dias com <i>L. minor</i>	55
Figura 25. LC-UV da fração ativa, fase móvel H ₂ O/ACN 10%, modo isocrático e fluxo 1 ml/min. Coluna C18 (250 x 4,60 mm), $\lambda = 215$ nm.	56
Figura 26. Espectro de massas referente à fração 1 no modo ESI ⁺	57
Figura 27. (a) extração do íon m/z 453 e (b) cromatograma de LC-MS do extrato EMB5B-11dias (ESI ⁺ , potencial do cone 50 V). Fase móvel: H ₂ O/ACN 10% e ácido fórmico 0,1%, coluna C18 (4.60x100 mm) e fluxo 0,3 ml/min.	58
Figura 28. Espectro de ESI-MS/MS do íon de m/z 431 [M+H] ⁺ no modo ESI ⁺ , potencial do cone 30 V e energia de colisão 15 eV.	59
Figura 29. Proposta mecanística para a fragmentação do composto de m/z 431.	60
Figura 30. Espectro de ESI-MS/MS do composto de m/z 453 [M+Na] ⁺ no modo ESI ⁺ , potencial do cone 45 V e energia de colisão 25 eV.	61

Figura 31. Estrutura do pentâmero fitotóxico	63
Figura 32. Espectro de Infravermelho da Fração 1.	65
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H do composto bioativo da bactéria , obtido em 500MHz (CDCl ₃ -TMS).	67
Figura 34. Espectro de RMN ¹³ C do composto bioativo da bactéria EMB5B, obtido em 400 MHz (CDCl ₃ -TMS).....	68
Figura 35. Espectro de HMQC do composto bioativo da bactéria EMB5B, obtido em 400MHz.(CDCl ₃ , TMS).....	70
Figura 36. Espectro de HMBC do composto bioativo da bactéria EMB5B, obtido em 500MHz. (CDCl ₃ , TMS).....	71
Figura 37. Antibiótico ftalocianina.....	72
Figura 38. Conformação otimizada (MM2) do pentólido fitotóxico.	74
Figura 39. Macrolactonas fitotóxicas produzidas pelo fungo <i>Cladosporium tenuissium</i>	75
Figura 40. Macrolactonas produzidas pelo fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	75
Figura 41. Esquema do experimento de MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).	76
Figura 42. Cromatograma de LC-MS/MS (modo MRM), canal m/z 431>155, para a fermentação da bactéria EMB5B para o branco 8, 15 dias (meio BD).	78
Figura 43. Monitoramento da produção do composto bioativo na fermentação da bactéria EMB5B em meio BD a 28°C.....	79
Figura 44. Cromatogramas de LC-UV da fração ativa e dos extratos EMB5B obtidos em meios BD, aveia, TSB e quínea. Fase móvel: H ₂ O/ACN10% e acetato de amônio 10 mM, coluna CN (4.60 x 250 mm), fluxo 1 ml/min e 254 nm.....	82
Figura 45. Espectros de massas ESI ⁺ dos extratos orgânicos de EMB5B-5dias. Potencial do cone 55eV.	86
Figura 46. Espectro de massas ESI ⁺ do bruto reacional da síntese do pentólido.	88
Figura 47. Espectro de RMN ¹³ C do bruto reacional obtido em 400MHz.	90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Substâncias produzidas por microrganismos	2
Tabela 2. Fitotoxinas promissoras para o uso como herbicidas	5
Tabela 3. Composição do meio de cultura SIS para <i>Lemna minor</i>	25
Tabela 4. Identificação preliminar das bactérias pelo método FAME.	30
Tabela 5. Diversidade de organismos submetidos ao bioensaio de fitotoxicidade com <i>Lemna minor</i>	33
Tabela 6. Resultado dos testes de fitotoxicidade dos extratos orgânicos das bactérias EMB.....	35
Tabela 7. Fracionamento do extrato EMB5B e bioensaio de fitotoxicidade.....	54

Lista de Abreviaturas e siglas

ACN - Acetonitrila

BD - Batata-Dextrose

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

(do inglês High Performance Liquid Chromatography)

Da - Unidade de massa atômica Dalton. (1Da=1 u.m.a)

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização Electrospray

(do inglês Electrospray Ionization Mass Spectrometry)

ESI-MS/MS - Espectrometria de Massas Sequencial com Fonte de Ionização por Electrospray (do

inglês Tandem Electrospray Ionization Mass Spectrometry)

EtOAc - Acetato de Etila

FAME - Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

(do inglês Fatty Acid Methyl Ester)

HMQC - Correlação Heteronuclear de Quantum Múltiplo

(do inglês Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)

HMBC - Correlação Heteronuclear de Ligações Múltiplas

(do inglês Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

J - Constante de Acoplamento

LC-MS - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

(do inglês Liquid Chromatography - Mass Spectrometry)

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas Sequencial

(do inglês Liquid Chromatography - Tandem Mass spectrometry)

LC/UV - Cromatografia Líquida com detector de Ultra-Violeta

((do inglês Liquid Chromatography - Ultra Violet Spectroscopy))

m/z - Razão Massa-Carga

MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas

(do inglês Multiple Reaction Monitoring)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polimerase Chain Reaction)

PHA - Polihidroxialcanoato

PHB - polihidroxibutirato

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

t_R - Tempo de Retenção

TSB – Caldo tripticaseína e soja (do inglês Tryptic Soy Broth)

TSBA – Caldo tripticaseína , soja e ágar (do inglês Tryptic Soy Broth Ágar)

Índice

1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS.....	1
1.1.1 – FERMENTAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	2
1.1.2 - FITOTOXINAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS	4
1.2- ESPECTROMETRIA DE MASSAS ACELERANDO A IDENTIFICAÇÃO DE FITOTOXINAS	10
1.3 – BIOENSAIOS COMO GUIA NO ISOLAMENTO DE FITOTOXINAS	14
2- OBJETIVO	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 - EQUIPAMENTOS.....	18
3.2 – REAGENTES.....	19
3.3 - METODOLOGIA.....	19
3.4 - ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS E MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	20
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS	20
3.6 MEIOS DE CULTURA E FERMENTAÇÃO	23
3.6.1- MEIO BD (BATATA – DEXTROSE)	23
3.6.2 - MEIOS TSB (TRYPITC-SOY-BROTH), QUÍNOA E AVEIA.....	24
3.7 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BACTERIANOS.....	24
3.8 - BIOENSAIO DE FITOTOXICIDADE COM <i>LEMNA MINOR</i>.....	24
3.8.1 MANUTENÇÃO DA <i>LEMNA</i>	25
3.9 CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	26
3.10 – ANÁLISES POR ESI-MS E ESI-MS/MS	27
3.11 – ANÁLISES POR LC-UV	27
3.12 - SÍNTESE DO COMPOSTO BIOATIVO E HOMÓLOGOS.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	29
4.2 – <i>SCREENING</i> BIOLÓGICO DOS EXTRATOS BRUTOS EMPREGANDO <i>LEMNA MINOR</i>.....	32
4.3- COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS.....	36
4.4 – EFEITO DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE FITOTOXINAS.....	47
4.5 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO EMB5B E IDENTIFICAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO	53
4.6 - MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DO COMPOSTO ATIVO POR MRM.....	75
4.7 – INFLUÊNCIA DO MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	80
4.8 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS PHBS	83

4.9 - DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA EMB5B.....	84
4.10 - SÍNTESE DO COMPOSTO FITOTÓXICO.....	87
5. CONCLUSÕES	87
6- REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	89

1 Introdução

1.1 - Metabólitos secundários bioativos produzidos por microrganismos

A natureza produz uma enorme variedade de metabólitos secundários das mais variadas classes. Cerca de 100.000 substâncias produzidas por plantas e microrganismos, que possuem alguma atividade biológica, já foram caracterizadas.¹ Estima-se que 77,8% dos fármacos anticancerígenos aprovados entre 1981 e 2006, são produtos naturais ou derivados de produtos naturais.²

Sabe-se que microrganismos como bactérias e fungos, além de serem responsáveis por importantes transformações metabólicas, pelo controle biológico de doenças e pragas, pela degradação de resíduos vegetais e outros produtos, são também poderosos mananciais na produção de metabólitos secundários das mais variadas classes. O exemplo mais conhecido da aplicação terapêutica desses metabólitos secundários são os antibióticos.³

Tabela 1. Substâncias produzidas por microrganismos

Composto/Classe	Propriedades	Microrganismo
Avermectina	Antelmíntico	<i>Streptomyces avermitilis</i>
Cefalosporina C	Antibiótico	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Bacteriocinas	Biopreservativos	<i>Lactobacillus lactis</i>
Carotenóides	Pigmentos	<i>Dunaliella bardarwil</i> (alga)
Elastatinal	Inibidor de Elastase	Vários <i>Streptomyces</i>
Giberelinas	Hormônios de Plantas	<i>Gibberella fujikuroi</i>
Herbecidina	Herbicida	<i>Streptomyces saganonensis</i>
Fosfatidil	Surfactante	<i>Rhodococcus</i> sp.
Piericidina	Inseticida	<i>Streptomyces mobaraensis</i>
Vitamina B ₁₂ (Cobalamina)	Vitamina	<i>Pseudomonas</i> sp.

Além de antibióticos, microrganismos sintetizam substâncias que possuem atividades biológicas diversas tais como hormônios, toxinas, agentes anti-cancerígenos e agentes inseticidas (Tabela 1).⁴

As estruturas químicas dos metabólitos secundários são bastante complexas e diversificadas, variando entre si de espécie para espécie ou até mesmo dentre as mesmas cepas isoladas de ambientes diferentes.⁵

1.1.1 – Fermentação microbiológica

A versatilidade da biossíntese microbiana é enorme. Metabólitos secundários produzidos por microrganismos podem ser obtidos em grandes quantidades por processos fermentativos, uma vez que há possibilidade do controle sobre as

condições dos meios de cultivo para produção desses metabólitos. Os microrganismos possuem algumas características importantes que justificam sua grande aplicação biotecnológica, dentre elas: facilidade de adaptação em diversos ambientes, o que permite transpor um microrganismo da natureza para o laboratório e posteriormente cultivá-lo em escala industrial; possuem um rápido mecanismo de nutrição e altas taxas de metabolismo e biossíntese; podem realizar uma grande variedade de reações; possibilidade de manipulação genética e capacidade de biossíntese de enantiômeros específicos, geralmente ativos, o que dificilmente ocorre na química sintética.^{6,7}

Os microrganismos usualmente degradam moléculas de alto peso molecular e as convertem em suas subunidades como aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos, as quais são precursores de proteínas, coenzimas, ácidos nucléicos, peptídeos, polissacarídeos e lipídeos, usados para o seu crescimento e sobrevivência.

Como outros organismos, eles atuam com extraordinária economia de material e energia, evitando a superprodução de metabólitos de forma a poderem sobreviver e competir no ambiente. Para isso eles possuem mecanismos de controle envolvendo a indução de substrato, regulação por realimentação e regulação nutricional, entre outras.

A modificação destes mecanismos é desejável quando se quer uma superprodução de um metabólito secundário específico, sendo esta a essência dos processos de fermentação. Variações das condições ambientais induzem os

microrganismos a responderem a estes estímulos produzindo metabólitos, proteínas, toxinas, que os tornem adaptáveis às novas condições.⁷

1.1.2 - Fitotoxinas produzidas por microrganismos

Aproximadamente 30.000 variedades de ervas daninhas estão distribuídas pelo planeta. A perda líquida da produção de grãos, causada por 1.800 tipos dessas plantas, somam 9.7% da produção agrícola total a cada ano.⁸ Ervas daninhas são plantas que crescem em locais indesejáveis e competem com a plantação por nutrientes e disseminam suas sementes, o que faz perpetuar o problema para as gerações seguintes.⁹

Atualmente os herbicidas sintéticos são os pesticidas mais usados para o extermínio dessas pragas agrícolas.³ Dentre os mais conhecidos estão o 2,4D; MCPA, diuron e a atrazina (Figura1).¹⁰

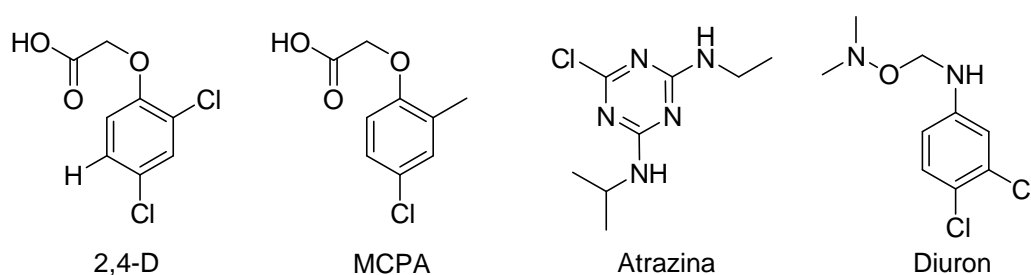


Figura 1. Principais herbicidas sintéticos empregados como pesticidas.

Certamente, esses agroquímicos têm sido eficientes no controle de pestes agrícolas. No entanto, são bastante conhecidos os problemas resultantes do seu uso

constante e, muitas vezes, indiscriminado. Dentre eles os principais são os efeitos danosos causados ao meio ambiente, afetando os seres vivos, causando desequilíbrios biológicos e aumentando resistência das espécies alvo, tornando o tratamento, em muitas vezes, ineficaz e de alto custo.¹¹

Muitas fitotoxinas produzidas tanto por plantas como por microrganismos possuem potencialidade para serem empregadas como herbicidas, ou melhor, como bioherbicidas. Como exemplos de fitotoxinas de origem vegetal, têm-se os aleloquímicos, compostos que regulam o crescimento de outros vegetais.^{12,13} Entretanto, a evolução das plantas para a produção de fitotoxinas potentes, pode acarretar em auto-toxicidade para as mesmas. Por isso, os microrganismos são fontes mais promissoras de bioherbicidas.¹⁴

A Tabela 2 apresenta algumas fitotoxinas promissoras para o uso como bioherbicidas, bem como os modos de ação e a fonte microbiana.⁴

Tabela 2. Fitotoxinas promissoras para o uso como herbicidas

Fonte microbiana	Fitotoxina	Ervas daninhas	Modo de ação
Fungos			
<i>Alternaria alternata</i>	Tentoxina	Gramas	CF 1-ATPase
<i>Ascochyta hyalospora</i>	Ascochitina	Sida espinhosa	Inibição do crescimento da raiz e perda de eletrólitos
<i>Fusarium sp.</i>	Ácido fusárico	Amplo espectro de ervas daninhas	Peroxidação de lipídeos e ação fotosensibilizante
<i>Paecilomyces variotti</i> SANK 21086	Cornexistina	Dicotiledôneas e algumas Monocotiledôneas	Inibição do Aspartato Amino Transferase (AST)
Actinomicetos			
<i>Streptomyces</i>	Polietrina A	Agrião de jardim	Inibe a Ceramida

Continuação Tabela 2

<i>hygroscopicus</i>			Sintase
<i>Streptomyces</i> sp.	Anisomicina	Gramma de curral	Inibição da fotossíntese
<i>Streptomyces</i> sp. A7847	Herboxidieno	Amplo espectro de ervas daninhas	Desconhecido
<i>Streptomyces</i> sp. 620061	Pirizadocidina	Rabo de raposa	Inibição do transporte de elétrons
<i>Streptomyces</i> sp. AM-3672	Herbimicina	<i>Digitaria</i> spp., Rabo de raposa	Desconhecido
Bactérias			
<i>Pseudomonas syringae</i> var. <i>tabaci</i>	Tabtoxina	Amplo espectro de ervas daninhas	Caminho GS-GOGAT
<i>Pseudomonas syringae</i> var. <i>phaseolicola</i>	Faseolotoxina	<i>Glycine wightii</i> e <i>Macrophyllum atropurpureum</i>	Inibição da Ornitina Carbamoil Transferase

O emprego de herbicidas produzidos por microrganismos apresenta a vantagem em relação aos herbicidas sintéticos, de serem biodegradáveis, uma vez que o tempo de meia vida é relativamente curto, e portanto não deixam resíduos tóxicos no meio ambiente. São ativos em pequenas quantidades, se comparados às enormes quantidades de pesticidas usados atualmente.

A maioria das fitotoxinas naturais possuem estruturas não-halogenadas, o que os torna menos tóxicas ao ambiente em relação a algumas classes de herbicidas sintéticos.⁴ Pode-se então afirmar que a contaminação de alimentos, do solo e da água é menos provável de ocorrer com os herbicidas naturais.¹⁰

De acordo com Duke e colaboradores,¹⁵ as fitotoxinas de origem microbiana podem ser produzidas por microrganismos fitopatogênicos, bem como por aqueles que não apresentam nenhum tipo de virulência.

Microrganismos patógenos de plantas produzem uma variedade de toxinas potentes e muitas vezes específicas e com diferentes modos de ação. Os fitopatógenos

são microrganismos que sintetizam substâncias capazes de provocar doenças, causar lesões, inibir o crescimento de plantas e levar a morte do hospedeiro.¹⁶

Neste contexto, muitos microrganismos não patogênicos produzem fitotoxinas extremamente potentes. Grande parte dos estudos com esses organismos tem sido feitos com microrganismos de solo, principalmente actinomicetos. Porém, outros microrganismos também apresentam potencial para a produção de fitotoxinas como os saprófitos e cianobactérias.¹⁵

As fitotoxinas de origem microbiana que tiveram maior sucesso como herbicidas, foram produzidas por microrganismos não fitopatogênicos. Os herbicidas comerciais glifosato e o bialafos foram isolados de actinomicetos do solo. O bialafos é um tripeptídeo, produto de fermentação de *Streptomyces higroscopicus*, que sofreu modificações estruturais e é atualmente comercializado como glifosato (Figura 2), o componente principal do herbicida Roundup[®], o herbicida mais vendido no mundo. É facilmente degradado por microrganismos do solo. Este foi o primeiro produto de fermentação que serviu de modelo para a produção de um herbicida comercial.⁶

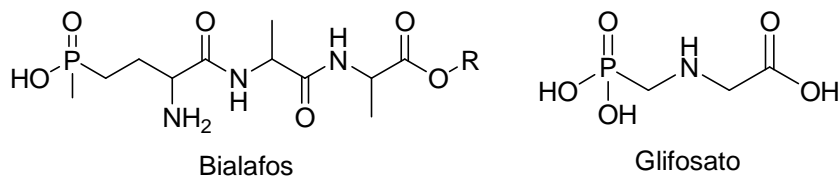


Figura 2. Herbicida bialafos produzido por *Streptomyces higroscopicus* e o derivado sintético glifosato.

Outro exemplo é a anisomicina, um composto isolado de *Streptomyces* sp., que possui atividade fitotóxica, porém não chegou a ser empregado diretamente como bioherbicida. Entretanto, alterações sintéticas resultaram no herbicida NK-049, (3,3'-dimetil-4-metoxibenzofenona), o qual é comercializado e amplamente utilizado em plantações de arroz (Figura 3).⁴

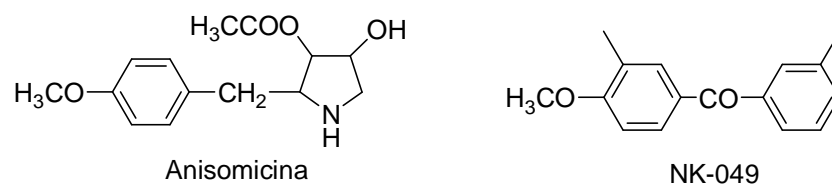


Figura 3. Anisomicina, fitotoxina produzida por *Streptomyces* sp e o herbicida sintético NK-049.

Ascochyta caulina é um fungo com especificidade para o controle da erva daninha *Chenopodium albu*. A substância responsável pela fitotoxicidade do fungo foi identificada como ascaulitoxina (Figura 4). Experimentos de campo mostraram que a aplicação direta desta toxina aumentou o controle das pragas em relação ao uso do microrganismo como agente biológico.¹⁶

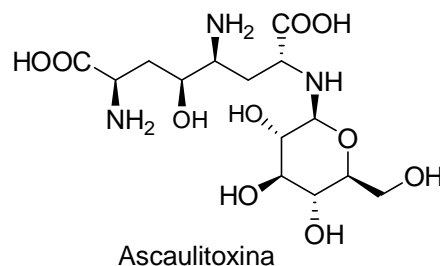


Figura 4. Fitotoxina produzida pelo fungo *Ascochyta caulina*.

Importantes fitotoxinas consideradas como promissores herbicidas são as taxtominas (Figura 5), produzidos por *Streptomyces scabei* e *Streptomyces acidiscabies*, os agentes causadores de lesões em batata.⁹

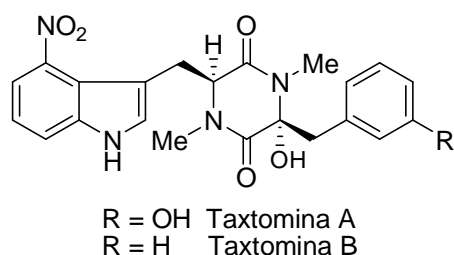


Figura 5. Fitotoxinas produzidas pelos fitopatógenos *Streptomyces scabei* e *S. acidiscabies*.

As bactérias são igualmente responsáveis por uma grande variedade de doenças tanto em plantações quanto em ervas daninhas. A procura por fitotoxinas bacterianas começou principalmente devido à descoberta da toxina tabotoxina, produto do metabolismo secundário da bactéria *Pseudomonas syringae var tabaci*, que causa doença no tabaco. O modo de ação desse composto é a inibição da atividade da enzima glutamina sintetase.¹⁷

É importante ressaltar que o emprego de fitotoxinas isoladas dos microrganismos possui muitas vantagens em relação ao uso de agentes de biocontrole vivos. Geralmente, a logística de estocagem, aplicação, formulação e tempo de meia-vida, favorecem as toxinas sobre os microrganismos. Também a possibilidade de disseminação de alguma doença para espécies não-alvo é menor no caso das toxinas. Além do mais, os fatores ambientais têm muito mais influência sobre a eficácia de um organismo vivo do que sobre suas toxinas. Em vista desses

fatores, as fitotoxinas de origem microbianas são usadas como modelos para o desenvolvimento de novos herbicidas.¹⁸

O desenvolvimento do uso de metabólitos secundários de microrganismos, para que possam ser explorados como herbicidas naturais, é um caminho a prevenir o planeta e a humanidade de conseqüências indesejáveis do uso irracional de pesticidas sintéticos. Portanto, espera-se que o uso de herbicidas naturais cresça em uma grandeza de 20% por ano.¹⁹

1.2 - Espectrometria de Massas acelerando a identificação de fitotoxinas

O auge dos produtos naturais ocorreu entre as décadas de 1950 e 1970. Durante este período, vários métodos foram desenvolvidos para o isolamento de uma grande variedade de metabólitos secundários.²⁰ Entretanto, era despendido muito tempo no isolamento e purificação de novos compostos a partir de produtos naturais, e além disso, o processo apresentava alto custo.²¹

Nos últimos 40 anos, métodos cromatográficos e espectrométricos têm sido empregados no estudo da composição química de uma grande variedade de compostos oriundos de fontes naturais.²²

Novas metodologias na área de produtos naturais às quais são aplicadas na aceleração do isolamento de substâncias bioativas têm despertado a atenção das indústrias farmacêuticas. Estas metodologias empregam novos métodos para determinação de sua atividade biológica, os quais correlacionam ocorrência,

atividade, estrutura e pureza, contribuindo significativamente para um grande avanço das técnicas de separação e detecção, com objetivo de possibilitar a rápida caracterização de componentes bioativos presentes em misturas complexas.²³

Avanços na tecnologia de instrumentação analítica possibilitaram o acoplamento de métodos de separação e de detecção. Técnicas hífenadas como a cromatografia líquida - espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia líquida - ressonância magnética nuclear (LC-NMR) possui grandes vantagens em relação aos procedimentos tradicionais de isolamento e identificação de compostos bioativos, os quais são geralmente laboriosos, demorados e requerem grande quantidades de amostras (Figura 6).

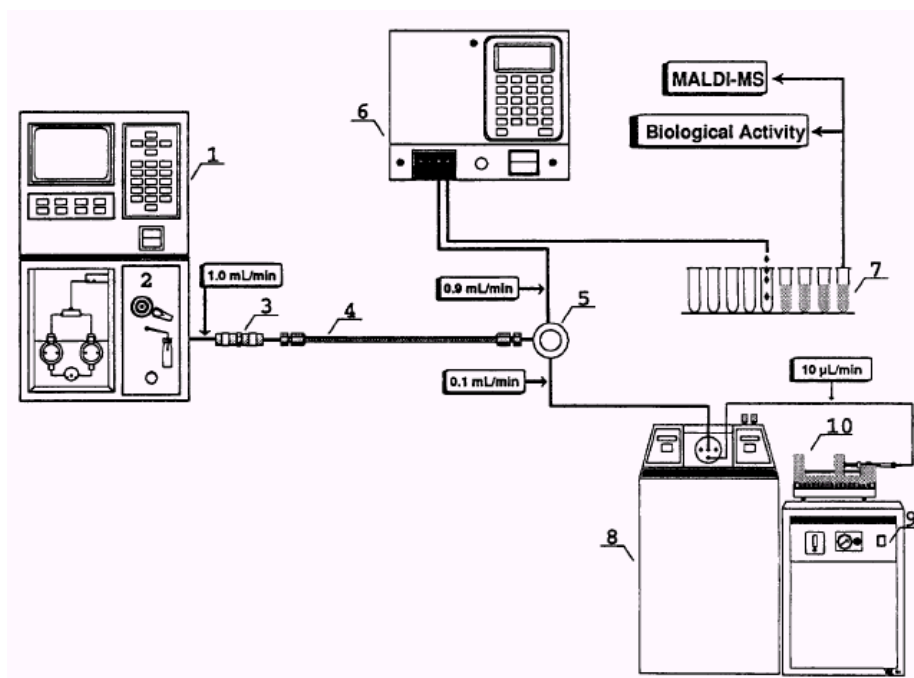


Figura 6. Metodologia empregada na separação de metabólitos secundários.²⁴

O desenvolvimento da interface entre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a espectrometria de massas com a ionização química por pressão atmosférica (API), em especial a fonte de ionização à electrospray (ESI), tornou possível a análise de compostos não voláteis e termolábeis, presentes em matrizes biológicas complexas e a identificação da massa molecular dos compostos presentes na amostra. O sistema LC-MS/MS é uma combinação poderosa em que é possível obter o padrão de fragmentação característico de um composto e obter informação sobre sua estrutura química.²⁵

Atualmente a desreplicação de produtos naturais é acelerada empregando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada com espectroscopia de UV e espectrometria de massas (MS).²⁶ Técnicas de análises como LC-UV, LC/MS *on-line* e LC/RMN *off-line* (Figura 7), têm revolucionado o processo de purificação de compostos proveniente de fontes naturais.²⁷

O sucesso da implementação do “high throughput screening” (HTS) na identificação de compostos bioativos depende de técnicas que permitem eficiência na desreplicação dos compostos.²⁸ A desreplicação é a metodologia empregada na identificação e diferenciação de compostos ou classe de compostos ativos, que já tenham sido descritos na literatura contendo atividade idêntica ou similar àquela observada no extrato de interesse. Envolve uma rápida caracterização através de bibliotecas e bancos de dados, em termos de suas massas moleculares em se tratando da espectrometria de massas.²⁹

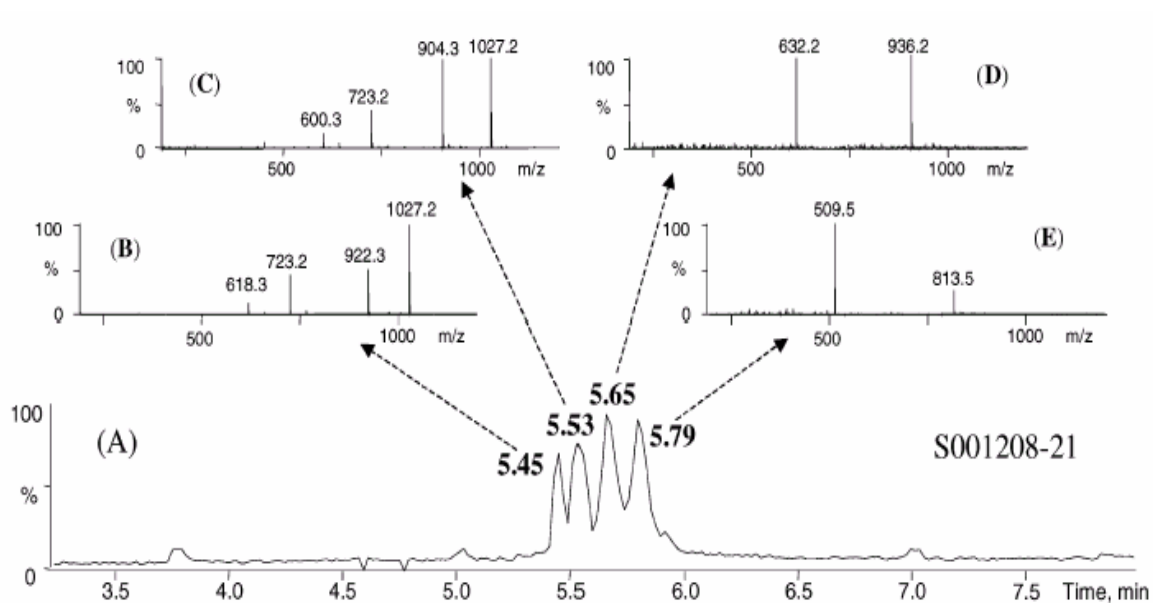


Figura 7. Análise de LC-MS/MS empregada na desreplicação de compostos presentes em extratos de plantas.³⁰

Adicionalmente, o processo de desreplicação permite obter uma gama de informações relacionadas ao composto identificado, como bioatividades, fontes alternativas e aplicações. Ayer e colaboradores reportaram que 72% dos compostos bioativos isolados eram compostos já conhecidos.³¹ Neste contexto, a espectrometria de massas e especialmente a espectrometria de massas de alta resolução é uma tecnologia apropriada para a desreplicação de extratos, usada em combinação com banco de dados de produtos naturais.³²

O processo de desreplicação também é importante para priorizar o isolamento de compostos ativos inéditos e para agrupar amostras que contêm perfis químicos semelhantes.³³

Wolfender e colaboradores,³⁴ relataram o uso de técnicas acopladas na investigação de metabólitos de plantas. Segundo os autores, a desreplicação dos

extratos empregando LC-MS, evita o isolamento de compostos de pouco interesse e permitem o isolamento de novos compostos bioativos.

1.3 – Bioensaios como guia no isolamento de fitotoxinas

No passado, o foco principal dos pesquisadores de produtos naturais era a elucidação estrutural de uma grande quantidade de novos compostos. A atividade biológica do composto puro era o estágio final do estudo, e pouca atenção era dada a significância do bioensaio no processo de fracionamento dos extratos.

Através de ensaios biológicos é possível avaliar a potencialidade da amostra testada, mesmo antes de se obter qualquer informação sobre a sua composição. Isso é muito importante, principalmente quando se procura atividade biológica em matrizes complexas, como extratos brutos de fermentação de microrganismos.

Para acelerar o processo de identificação de compostos bioativos, os bioensaios iniciais devem ser rápidos, eficientes e de baixo custo. Devem ser sensíveis, altamente reprodutíveis e de fácil interpretação.³⁵

A procura por novos herbicidas requer ensaios que permitam avaliar os efeitos fitotóxicos das amostras testadas. Uma grande variedade de plantas pode ser usada nesses bioensaios. Um bioensaio bastante empregado para a detecção de fitotoxinas é o ensaio com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e a gramínea *Agrostis stolonifera* L. Para avaliar potencial de fitotoxicidade dos extratos, nesses ensaios considera-se a morfologia das sementes como o crescimento das raízes e do caule e tamanho das

pétalas.³⁶

Outro bioensaio interessante é realizado com raízes de cebola (*Allium cepa*), onde é avaliada a inibição da divisão celular. Nesse ensaio, as etapas da mitose das células das raízes da cebola são observadas por um microscópio, com o objetivo de se detectar alguma anormalidade na divisão mitótica dessas células ou uma formação atípica da parede celular, provocado pela fitotoxina em estudo.³⁷

Atualmente o bioensaio mais utilizado emprega espécies de pequenas plantas aquáticas, em especial *Lemna minor*. Este tem sido empregado na detecção de bioherbicidas e na avaliação da toxicidade de herbicidas sintéticos.³⁸ *Lemna minor* é uma espécie de plantas flutuantes pertencentes à família *Lemnaceae*, presentes em vários ambientes aquáticos, como lagos, rios, efluentes e sedimentos. As plantas são coloniais e formam agregados de duas ou mais pétalas, sendo estas pequenas e de crescimento rápido. É empregada para teste de toxicidade em água devido à sensibilidade a uma grande variedade de substâncias orgânicas tóxicas.

Este bioensaio tem a vantagem de avaliar o poder de estimulação de crescimento das substâncias em análise, e de identificar de maneira rápida extratos fitotóxicos. É sensível empregando pequenas quantias de amostra.³⁹ Os testes com *L. minor* são freqüentemente usados por agências reguladoras federais, por indústrias e por laboratórios.⁴⁰

A metodologia do bioensaio consiste no crescimento de duas folhas agregadas de *L. minor* em um meio inorgânico adequado. Após um período de 7 dias é avaliado o potencial fitotóxico do extrato contra um branco constituído apenas pelo meio

inorgânico, através da multiplicação das pétalas de *L. minor* (Figura 8).

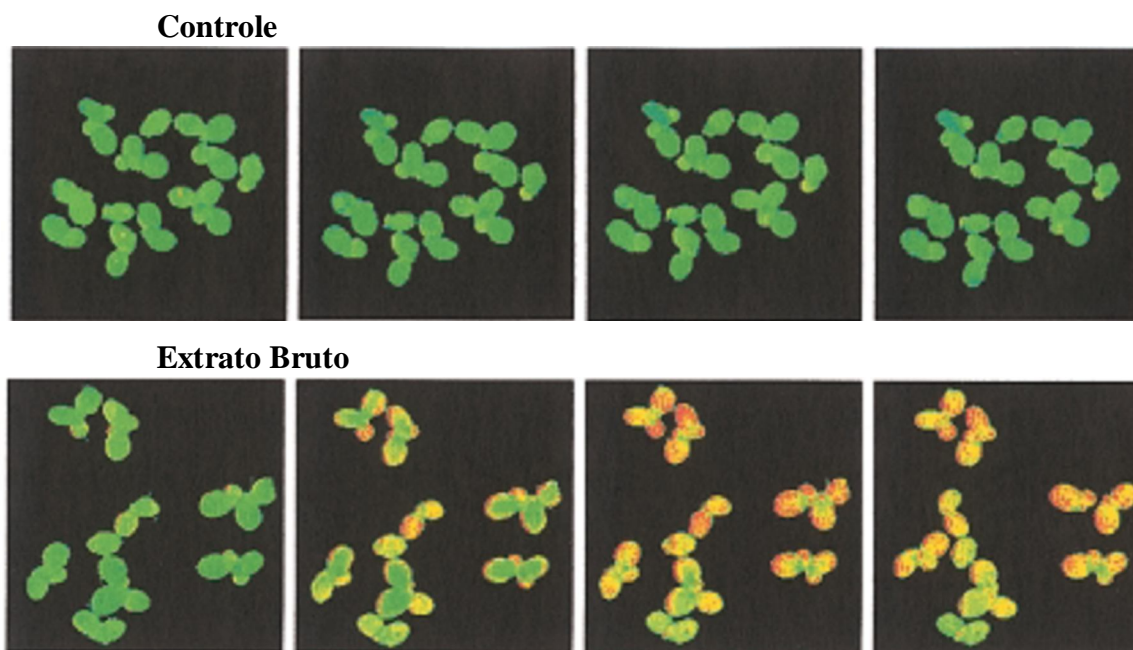


Figura 8. Bioensaio de fitotoxicidade empregando *Lemna minor*⁴¹

A partir do monitoramento de uma série de extratos de plantas medicinais africanas empregando o bioensaio com *L. minor*, foi identificada atividade fitotóxica em folhas de *Laggera decurrens*. O fracionamento das folhas guiado pelo bioensaio levou ao isolamento de dois compostos ativos: 3-hidroxitimoquinona e 5-acetoxi-2-hidroxitimol (Figura 9).⁴²

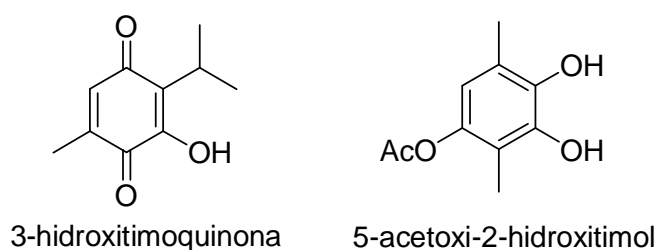


Figura 9. Compostos fitotóxicos isolados de folhas de *Laggera decurrens* guiado por bioensaio com *Lemna minor*.

2 **Objetivo**

O principal objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia adequada para a identificação, isolamento e caracterização estrutural de substâncias com atividade fitotóxica produzidas por processos fermentativos.

A metodologia desenvolvida utiliza a versatilidade da espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alta eficiência para acelerar a etapa de identificação dos compostos ativos, os quais são monitorados por bioensaios de fitotoxicidade empregando *Lemna minor*.

3 Materiais e Métodos

3.1 - Equipamentos

- Balança analítica FA2104N-Celtac®
- Estufa de fotoperíodo e alternância de temperatura Eletrolab®
- Rota evaporador R-144 BUCHI®
- Autoclaves verticais
- Incubadora TE-420 Tecnal®
- Espectrômetros de RMN Brucker® DRX-400MHz e BRUCKER DRX-500MHz
- Espectrômetros de massas Q-TOF II, Micromass-UK® e Quattro Micro, Waters®
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, com injetor automático SIL-10AF VP, bomba modelo LC-10AT VP Shimadzu®, e detectores de DAD e UV-Vis SPDM10 AVP Shimadzu®
- Espectrofotômetro de Infravermelho IFTIR-RX®

3.2 – Reagentes

- Todos os reagentes e os solventes orgânicos empregados para a realização dos experimentos foram de grau analítico.
- Para as análises de HPLC utilizou-se solventes de grau cromatográfico (J.T.BACKER, MALLINCKRODT®) e água purificada em um sistema Milli-Q.Millipore®.
- As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas utilizando clorofórmio deuterado MERCK® para solubilizar as amostras.

3.3 - Metodologia

O fluxograma apresentado na Figura 10 ilustra o procedimento empregado neste projeto, para o isolamento e identificação do composto fitotóxico produzido pela bactéria EMB5B.

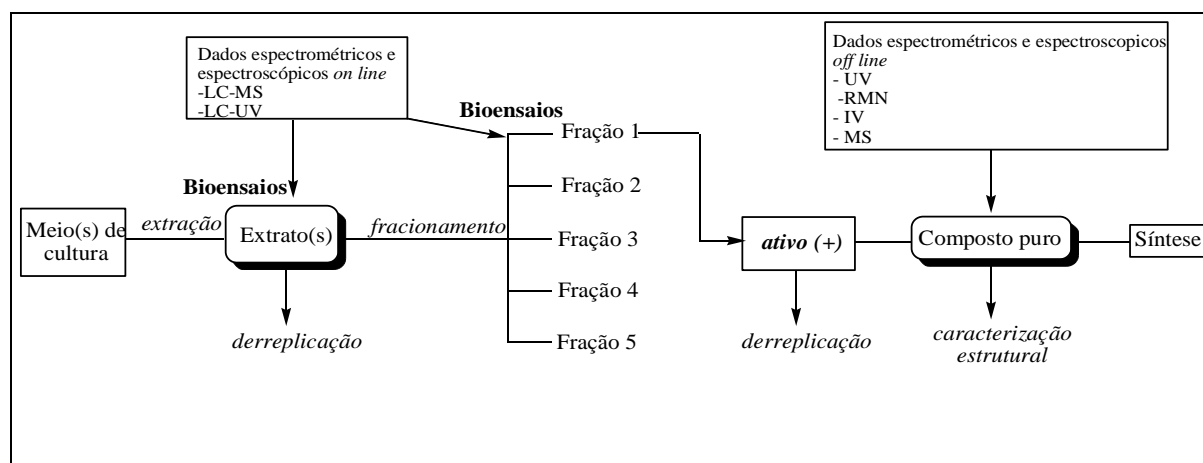


Figura 10. Metodologia empregada para o isolamento de fitotoxinas.

3.4 - Isolamento das bactérias e manutenção das cepas

As cinco bactérias empregadas nesse estudo foram isoladas do esclerócio do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii*, em meio sólido TSBA, pelo grupo do pesquisador Dr. Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente-Jaguariúna) e identificadas como EMB1B, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B.

Para conservá-las, estas foram repicadas periodicamente em nosso laboratório, em meio TSBA a 25°C. O manuseio dos microrganismos foi realizado em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com luz ultravioleta por 30 min. Os repiques foram feitos com uma alça de platina aquecida ao rubro pela chama de um bico de Bunsen.

3.5 - Identificação das Bactérias

Para identificação das bactérias foram empregados dois métodos. O primeiro analisa o perfil de ácidos graxos (FAME) e o segundo o gene 16SrDNA.

Os isolados das bactérias foram inicialmente submetidos à identificação pelo método FAME⁴³ através do perfil de ácidos graxos que compõem a membrana celular desses microrganismos. As bactérias a serem identificadas foram cultivadas em meio TSBA, pelo processo de estrias cruzadas, e incubadas a 28 °C por 24 horas. Decorrido este tempo, foram coletadas aproximadamente 40 mg (quatro a seis alças com capacidade para 10 µL) da cultura no 3º quadrante e transferidas para tubos

Kimax (100 X 13 mm). A seguir, os ácidos graxos presentes na membrana células das bactérias foram derivatizados para metil ésteres. Estes foram dissolvidos em acetato de etila e foram pipetadas e colocadas nos tubos *vial*. Em seguida, os tubos *vial* foram inseridos no cromatógrafo gasoso, para a leitura das amostras.

O segundo método utiliza o gene 16SrDNA. O microrganismo foi cultivado em 10 mL de meio de cultura TSA Líquido e incubado por 48 horas à 28°C, em shaker, à 120 rpm. Após esse período, a suspensão bacteriana foi recolhida em tubos de 15 mL e centrifugado por 5 minutos a 6.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspendido em 500 µL de TE (Tris-HCl 1 M pH 7,5, 10 mL; EDTA 0,5 M pH 8,0, 2 mL; água destilada, 1000 mL). Adicionou-se 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica e o material foi agitado em “bead beating” (Biospec products) por 30 segundos, para lise da parede celular. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio 1:1 e precipitado com isopropanol e NaCl (5M). A seguir, o DNA foi lavado com etanol 70% e seco a 37°C. Após a ressuspensão do material em 50 µL de água Milli-Q, este foi estocado a -20°C. A amostra foi tratada com RNase (10mgml⁻¹).

Para amplificar o DNA bacteriano, reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 5 µL (10 ng) de DNA molde; 0,2 µM do primer 968F (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC -3') e do primer R1387 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'); 200 µM de cada dNTP (Gibco BRL); 3,75 mM de MgCl₂; 0,5 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies®). No experimento foi adicionada uma reação sem DNA como controle negativo. Houve uso do

termociclador (Gene AMP PCR System 9700) programado para gerar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min a 60°C, 1min a 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1 min;72°C; 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min,58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais dois ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Foi utilizado 5 µL da reação para a observação em gel de agarose (1,2%) de um fragmento de aproximadamente 450 pb. O produto do PCR foi purificado com o kit (Ultra Clean PCR clen-up) de acordo com as instruções do fabricante e sequenciado com o primer R1387.

A identificação foi realizada pelo seqüenciamento de genes, pela amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico em termociclador (Gene AMP PCRSystem 9700) da bactéria. Após o seqüenciamento, estas foram analisadas por meio do BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), contra a base de dados (GenBank), onde foi observada a similaridade destas seqüências com o 16S rDNA de espécies já depositadas nesta base de dados.

3.6 - Meios de cultura e fermentação

Todos os meios de cultura líquidos para as fermentações foram preparados em Erlenmeyers, sendo que a razão entre o volume de meio e o espaço foi de no mínimo $\frac{1}{4}$, para proporcionar aeração para as culturas, uma vez que as bactérias submetidas à fermentação são aeróbicas.

Os meios foram esterilizados em autoclave vertical a 120°C por 30 minutos. Após atingirem temperatura ambiente, eles foram inoculados com as bactérias, utilizando uma alça de platina esterilizada em bico de Bunsen ao rubro, em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada por luz ultravioleta por 30 min. Todas as fermentações foram realizadas a 28°C e sob agitação em shaker a 130 rpm.

3.6.1- Meio BD (*batata – dextrose*)

O meio líquido BD foi preparado utilizando 800 ml de água destilada, 200 ml de caldo de batata e 20 g de D-glicose, para cada 1000 ml de meio. O caldo de batata foi preparado com 400 g de batata para cada 1000 ml de água destilada. As batatas foram previamente pesadas, descascadas e em seguida picadas em cubos pequenos. Estes foram lavados em água corrente e cozidos em uma vasilha contendo 250 ml de água por 30 minutos. A água resultante do cozimento foi utilizada no preparo do caldo de batata e os pedaços de batata restantes foram descartados. O líquido foi transferido para uma proveta e o volume completado para 500 ml com água destilada.

3.6.2 - Meios TSB (*tryptic-soy-broth*), Quínoa e Aveia

O meio TSB foi preparado com 30 g de TSB (*tryptic soy broth*) para cada 1000 ml de água destilada, conforme as proporções determinadas pelo fabricante. Para dissolver o TSB foi necessário colocar os frascos em banho-maria. As mesmas quantidades usadas para o preparo do meio TSB foram utilizadas para o meio quínoa e o meio de aveia.

3.7 - Obtenção dos extratos bacterianos

Após o período de incubação, o qual foi definido de acordo com a finalidade do experimento, os meios foram filtrados à vácuo, com papel de filtro, para a remoção das células bacterianas, e submetidos a sucessivas extrações líquido-líquido com acetato de etila (1:1, v/v) em funil de separação. As fases aquosas foram descartadas enquanto que as respectivas fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas a pressão reduzida em rota evaporador.

3.8 - Bioensaio de fitotoxicidade com *Lemna minor*

Os bioensaios foram realizados empregando uma solução dos extratos brutos das bactérias, em uma concentração final de 10 mg/ml, em DMSO. A cada poço da Placa de ELISA, foram adicionadas alíquotas de 30 µl dessas soluções. O volume foi completado para 3 ml com meio de cultura Swedish SIS para *Lemna minor*,⁴⁴

produzindo uma concentração final de 100 µg/ml de extrato por poço. Em cada poço foram introduzidas duas folhas agregadas de *Lemna minor*, visualmente saudáveis. As placas foram incubadas, a 26 °C em uma estufa de fotoperíodo, 16/8h (luz/escuro) com lâmpada fria fluorescente. Uma solução de DMSO 1% em meio de cultura foi usada como branco. A Atrazina, (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-S-triazina) (Figura 1, pg. 4), herbicida sintético,⁴⁵ foi utilizado como controle, em uma concentração final de 100 µg/ml por poço. O potencial de fitotoxicidade dos extratos foi avaliado visualmente mediante a necrose das folhas ou inibição do crescimento e reprodução, em comparação com o branco, após um período de 7 dias de incubação. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.8.1 Manutenção da *Lemna*

As folhas de *Lemna minor* foram cultivadas no laboratório em meio de cultura SIS e conservadas em temperatura e iluminação ambientes. A Tabela 3 mostra os elementos presentes nesse meio.

Tabela 3. Composição do meio de cultura SIS para *Lemna minor*.

	Soluções estoque	Massa de reagente (mg)
1)	NaNO ₃	4250 mg
	KH ₂ PO ₄	670 mg
2)	MgSO ₄ .7 H ₂ O	3750 mg
3)	CaCl ₂ .2 H ₂ O	1800 mg
4)	Na ₂ CO ₃	1000 mg
5)	H ₃ BO ₃	500 mg
	MnCl ₂ .2 H ₂ O	100 mg
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	5 mg
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	25 mg
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,5 mg
	CoCl ₂	5 mg
6)	FeCl ₃ .6 H ₂ O	42,5 mg
	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	70 mg

O meio SIS foi preparado com 20 ml das soluções estoque nº 1, 2, 3, 4 e 6 e 2 ml da solução estoque nº 5 em um balão volumétrico de 1L. O volume foi completado com água destilada e o meio mantido sob agitação. Em seguida, o meio foi esterilizado em filtro com membrana de 0,2 µm de porosidade e mantido sob refrigeração a 10 °C. Para garantir a saúde das pétalas, estas eram lavadas a cada 15 dias. Com o auxílio de espátulas, as pétalas visualmente sadias eram cuidadosamente transferidas para placas de Petri (20 cm) contendo água destilada e esterilizada, onde permaneceram em repouso por 30 minutos. Em seguida elas foram transferidas para um novo meio de cultura, rico em nutrientes, presente em outra placa, para garantir as condições nutricionais para as plantas.

3.9 Cromatografia em coluna

Para a cromatografia líquida em coluna de vidro de dimensões 1.5 x 60 cm. Empregou-se sílica gel (Acros, 60-200) como fase estacionária. A coluna foi empacotada com 20 g de sílica. A amostra a ser fracionada foi adsorvida na sílica e aplicada no topo da coluna. O fracionamento foi feito com eluição em gradiente crescente de polaridade, utilizando como fase móvel hexano- acetato de etila- metanol. As frações coletadas foram analisadas em placas de CCD utilizando como reveladores luz UV com os comprimentos de onda 254 e 366 nm e uma solução aquosa de ácido fosfomolibídico 5% (p/v), sulfato cérico 1% (p/v) e H₂SO₄ 4% (v/v).

3.10 – Análises por ESI-MS e ESI-MS/MS

Para a obtenção dos espectros de massas, os extratos foram dissolvidos em metanol/acetato de amônio 0,1% (1:1), para uma concentração final de 200 µg/ml e introduzidos no aparelho por injeção direta via bomba de seringa com fluxo de 20 µl/min. Os espectros foram adquiridos no modo full scan (ESI-MS) em alta resolução tanto no modo positivo como no modo negativo. Para a dissociação dos íons utilizou-se argônio como gás de colisão (ESI-MS/MS). Os espectros de massas adquiridos foram analisados no software Mass Lynx versão 4.0.

3.11 – Análises por LC-UV

As colunas empregadas nos experimentos foram C₁₈ (4,60 x 250 mm) 5µ, Phenomenex e CN (4,60 x 250 mm) 5u, Phenomenex. As fases móveis usadas foram H₂O/ACN (90:10 v/v) e H₂O/ACN (90:10 v/v) com acetato de amônio 10mM e um fluxo de 1 ml/min, no modo isocrático.

3.12 - Síntese do composto bioativo e homólogos

A reação, a qual está apresentada na Figura 11, foi realizada em balão de 250 ml, onde 500 mg (4,80 mmol) de ácido 3-(R)- hidroxibutírico e 75,8 mg (0,41 mmol) de

TsOH.H₂O foram refluxados em 150 ml de tolueno por 48h, sob agitação vigorosa. O produto amarelo resultante da reação foi lavado exaustivamente com uma solução aquosa de NaHCO₃ (5% p/v) em funil de separação de 500 ml. A fase orgânica resultante foi concentrada em rota evaporador sob pressão reduzida.

O mesmo procedimento foi realizado para a reação empregando o ácido (S)-3-hidroxi-butírico.

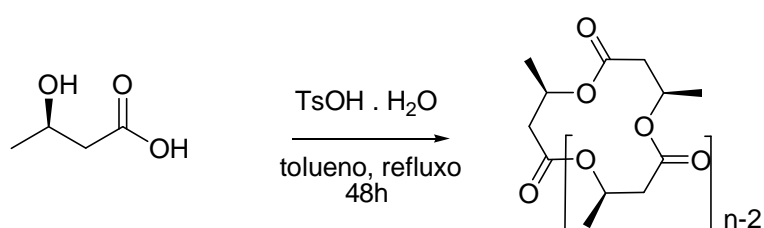


Figura 11. Síntese de oligômeros cíclicos a partir do ácido (R)-3-hidroxi-butírico.

4 Resultados e Discussão

4.1 – Isolamento e identificação dos microrganismos

Esta etapa do projeto foi realizada no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa-Jaguariúna, pelo grupo de pesquisa do Dr. Itamar Soares de Melo. Os experimentos que serão apresentados foram realizados com cinco bactérias simbióticas ao fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii*.

Sabe-se que o *Sclerotium rolfsii* é um fungo que causa doenças em uma grande variedade de espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas, sendo, deste modo, responsável por grandes prejuízos na agricultura.⁴⁶

Foi observado que o crescimento do *Sclerotium rolfsii* era inibido na presença das bactérias (EMB) em ensaios de antagonismo (microrganismo vs microrganismo). Baseado neste fato iniciou-se um estudo com essas bactérias com o objetivo de utilizá-las para o controle biológico do *Sclerotium rolfsii*. As bactérias foram isoladas, e as respectivas cepas enviadas para o nosso grupo, para identificarmos os princípios

ativos responsáveis pela inibição do crescimento do fitopatógeno. Porém, os ensaios de antagonismo e antibiose, realizados *in vitro*, que avaliaram a inibição do fungo pelas bactérias, apresentaram resultados negativos.

Os mesmos extratos usados no ensaio de antibiose foram submetidos a testes de fitotoxicidade com *Lemna minor*, onde um apresentou atividade. Consideramos esse resultado de grande relevância, uma vez que foi evidenciada atividade fitotóxica em uma bactéria associada a um fungo fitopatogênico, e em vista disso, estas foram selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho.

O método FAME foi empregado para a identificação dos microrganismos e forneceu informação inicial sobre as bactérias isoladas do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii* (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação preliminar das bactérias pelo método FAME.

Código	Bactéria	IS
EMB1B	<i>Bacillus subtilis</i>	0,746
EMB2B	NI	0,474
EMB3B	<i>Pseudomonas cepacia</i>	0,927
EMB5B	NI	0,322
EMB6B	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	0,583

IS = índice de similaridade; NI = bactéria não identificada

O índice de similaridade (IS) de 0,5 é considerado o valor mínimo para a identificação do microrganismo. Uma vez que os IS para as bactérias EMB2B e EMB5B foram 0,474 e 0,322, respectivamente, estas não foram identificadas por esta metodologia.

A bactéria EMB5B, a qual apresentou a maior atividade fitotóxica foi submetida à identificação utilizando o gene 16SrDNA.

A seqüência parcial de nucleotídeos obtida através da extração do DNA da bactéria apresentou 93% de identidade com seqüências de *Burkholderia gladioli* (EU090890.1, EU024170.1, AY586515.1, AY268165.1, AY268164.1, AY268163.1, DQ355169.1) pela análise BLAST. Identidade de seqüência de 16SrDNA acima de 97,5% indica que a linhagem pertence à mesma espécie segundo Stackebrandt & Goebel, 1994.⁴⁷ Assim, pôde-se obter apenas informações sob o gênero da bactéria de interesse, *Burkholderia* sp.

Para simplificar a apresentação do trabalho, as bactérias serão mencionadas ao longo do texto como bactérias EMB1B (*Bacillus subtilis*), EMB2B (*não identificada*), EMB3B (*Pseudomonas cepacia*), EMB5B (*Burkholderia* sp.) e EMB6B (*Paenibacillus lentimorbus*).

Bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* sp. são organismos altamente versáteis, explorados como agentes de biocontrole, biorremediação e promotores do crescimento de plantas. São também causadora de doenças infecciosas, especialmente a fibrose cística. Extratos de *Burkholderia cepacia* podem ser usados para o controle de doenças em sementes e raízes de plantas. Essas bactérias podem colonizar a rizosfera de inúmeras plantações incluindo milho, arroz, pêssego, e conseqüentemente aumentar o rendimento das colheitas.^{48,49,50}

Um exemplo relevante de bactéria pertencente a esse gênero é a *Burkholderia ambifaria*, atualmente um dos agentes de biocontrole mais estudados. O extrato AMMDt possui atividade contra o *Pythium aphanidermatum*, fungo fitopatogênico responsável pelo tombamento pré e pós emergente em pêssego e também contra

Aphanomyces euteiches, que causa apodrecimento de maçãs.^{51,52}

Um outro aspecto interessante em relação às bactérias do gênero *Burkholderia*, foi revisado recentemente na literatura. Fungos fitopatogênicos pertencentes ao gênero *Rhizopus* são responsáveis pela inibição do crescimento das sementes de arroz, efeito causado pela fitotoxina rizoxina (Figura 12). Porém, estudos de microscopia mostraram que a fitotoxina é produzida pelas bactérias do gênero *Burkholderia* que vivem no organismo do fungo, isto é, bactérias endossimbiontes, e não pelo fungo. Acredita-se que os sinalizadores químicos oriundos da associação fungo-bactéria sustentam a produção da fitotoxina.^{53,54}

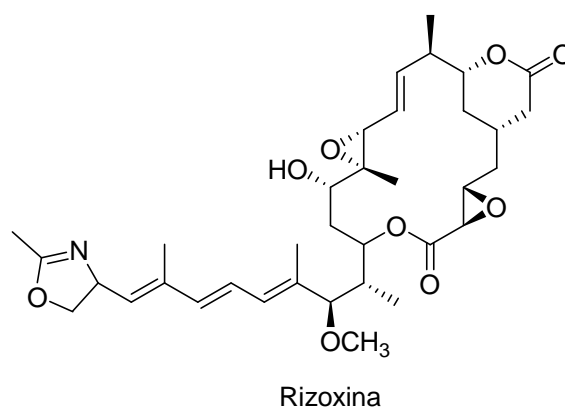


Figura 12. Estrutura da fitotoxina rizoxina produzida pela bactéria endossimbionte *Burkholderia rhizoxina*.

4.2 – Screening biológico dos extratos brutos empregando *Lemna minor*

O isolamento do composto ativo foi guiado através do bioensaio com *Lemna minor*. Para a primeira triagem, as fermentações foram feitas em Erlenmeyers de 250

ml, sendo que cada um continha 50 ml de meio de cultura líquido BD. Cada bactéria foi cultivada em duplicata por um período de 5 e 11 dias.

Segundo dados da literatura, podem-se empregar solventes orgânicos para dissolver esses compostos a serem testados. Alguns solventes como acetona, clorofórmio, etanol e DMSO, foram testados para verificar sua toxicidade frente às pétalas de *L.minor*. O melhor resultado foi obtido com DMSO, o qual promoveu uma melhor solubilização dos extratos. O DMSO foi empregado na concentração máxima permitida (1% v/v). Esse solvente foi selecionado porque é capaz de dissolver moléculas polares e apolares e principalmente por apresentar baixa toxicidade, em relação aos demais.⁵⁵

Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados com os extratos brutos orgânicos obtidos das fermentações das bactérias EMB1B, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B bem como extratos obtidos de outras fontes naturais. A Tabela 5 apresenta a diversidade dos extratos submetidos ao bioensaio com *L.minor*.

Tabela 5. Diversidade de organismos submetidos ao bioensaio de fitotoxicidade com *Lemna minor*

Fontes dos extratos	Quantidade	Ativos	Ativos(%)
Cianobactérias	95	3	2.8
Actinomicetos	17	9	17
Bactérias Embrapa	5	1	20

Dentre os extratos avaliados, optamos por trabalhar com as bactérias EMBRAPA por que são bactérias simbióticas isoladas de um fungo fitopatogênico, o

Sclerotium rolfsii. Uma grande variedade de metabólitos secundários são produzidos por microrganismos simbióticos, isolados de eucariontes. Muitos desses compostos possuem atividade biológica⁵⁶, como por exemplo, a substância rizobitoxina (Figura 13) produzida pela bactéria *Bradyrhizobium elkanii* a qual promove clorose em soja. Inicialmente foi considerada uma toxina produzida por um legume. Porém, mais tarde foi demonstrado que a inativação genética da produção desta toxina pela bactéria simbiote diminuiu os efeitos danosos causado na soja.⁵⁷

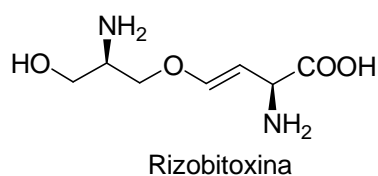


Figura 13. Substância rizobitoxina produzida pela bactéria simbiote *Bradyrhizobium elkanii*.

Com base nesses exemplos sugerimos que as bactérias Embrapa poderiam ser fontes promissoras para produção de novos compostos bioativos, em especial de fitotoxinas. A Tabela 6 apresenta os resultados da primeira triagem realizada com os extratos dessas bactérias, as quais foram fermentadas por períodos de 5 e 11 dias.

Tabela 6. Resultado dos testes de fitotoxicidade dos extratos orgânicos das bactérias EMB

Bactéria	Período de fermentação	Atividade fitotóxica
EMB1B	5 dias	---
	11 dias	---
EMB2B	5 dias	---
	11 dias	---
EMB3B	5 dias	---
	11 dias	---
EMB5B	5 dias	---
	11 dias	+++
EMB6B	5 dias	---
	11 dias	---

(+++) extrato ativo; (---) extrato inativo; (++) extrato moderadamente ativo

A Figura 14 apresenta a foto relativa ao bioensaio dos extratos fermentados por 11 dias, o qual possibilitou selecionar uma bactéria EMB5B entre as demais.

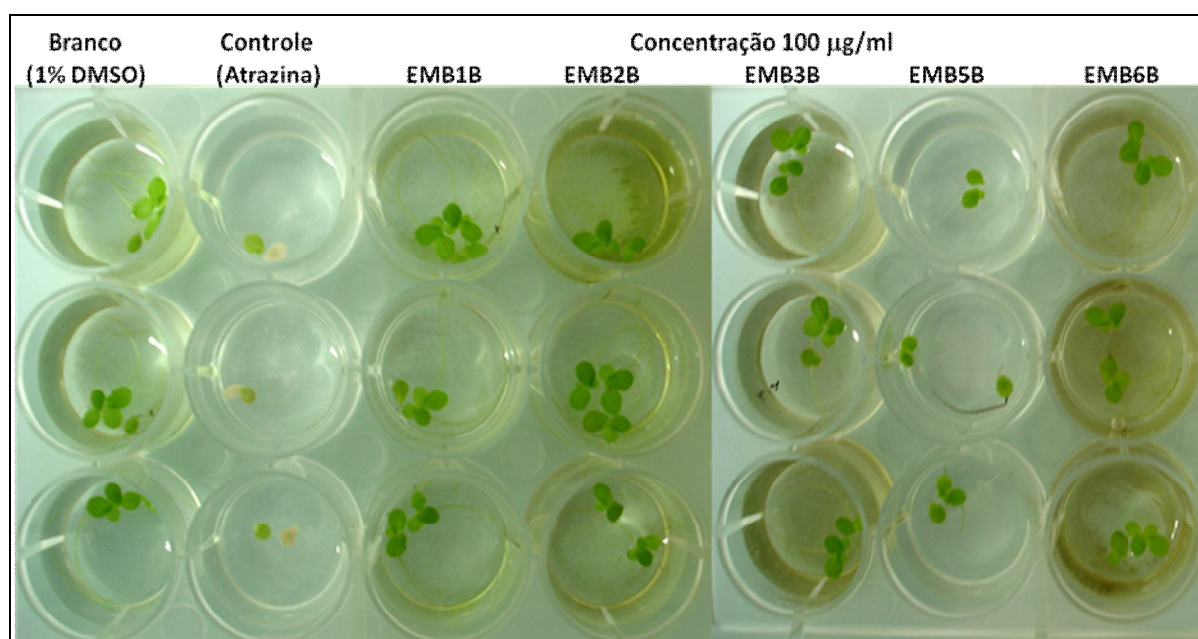


Figura 14. Ensaio de fitotoxicidade das bactérias EMB1B, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B com *L. minor*, fermentadas por 11 dias em meio BD a 28 C.

Como pode ser observado na figura acima, na primeira coluna referente ao branco (meio SIS + 1% de DMSO), houve a multiplicação das pétalas de *Lemna* e elas

permaneceram visualmente sadias. Na segunda coluna, referente à atrazina (controle), podemos observar que ocorreu necrose e inibição da multiplicação e do crescimento das pétalas.

A multiplicação e o aspecto das pétalas das plantas presentes nos poços referentes às bactérias EMB1B, EMB2B, EMB3B e EMB6B (3ª, 4ª, 5ª e 7ª colunas respectivamente), foram semelhantes ao branco. Através destes resultados concluímos, que esses extratos não apresentaram nenhuma atividade fitotóxica.

Na 6ª coluna, onde está presente o extrato EMB5B, podemos observar que ocorreu inibição da multiplicação e do crescimento das pétalas em relação ao branco. Além disso, ocorreu um leve amarelamento, indicando o início de necrose das pétalas.

Baseado no resultado deste ensaio, constatamos que a bactéria EMB5B, quando fermentada por 11 dias produziu um extrato com atividade fitotóxica contra a planta *Lemna minor*. Desta forma, este microrganismo foi selecionado entre os demais, para a identificação e isolamento do seu princípio ativo.

4.3 - Comparação entre os perfis químicos dos extratos

O estudo do perfil químico dos extratos por espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray foi realizado com o objetivo de determinar as massas moleculares dos metabólitos secundários produzidos pelas bactérias, o que possibilitou submetê-los a um estudo de desreplicação bem como fazer a comparação

entre os perfis e a diversidade metabólica desses extratos.

A inserção direta dos extratos brutos das bactérias em um espectrômetro de massas operando com fonte de electrospray fornece importantes informações sobre a composição das amostras, bem como o perfil dos metabólitos secundários produzidos e suas respectivas massas moleculares devido a falta de fragmentação, a qual é característica da ionização por electrospray. Esta metodologia tem possibilitado a criação de bancos de dados de massas moleculares dos metabólitos e tem sido usado na classificação quimiotaxonômica de microrganismos.⁵⁸

Julian e colaboradores⁵⁹ e Higgs e colaboradores⁶⁰ utilizaram esta metodologia para estimar e diferenciar metabólitos secundários em extratos de microrganismos.

No perfil químico dos extratos bacterianos obtido por ESI-MS, os espectros foram adquiridos tanto no modo positivo como no modo negativo. Porém, no modo negativo a ionização dos compostos não foi eficiente. Em vista disso serão apresentados os espectros de massas adquiridos no modo positivo. O fator que determina a eficiência da ionização é, principalmente, a estrutura química dos analitos. Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas em modo positivo, dadas à relativa facilidade de protonação desses grupos funcionais. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas em modo negativo. A natureza do solvente utilizado e o pH são igualmente importantes na geração de íons positivos e negativos. Íons positivos são geralmente analisados empregando-se soluções da

amostra em metanol e com baixos valores de pH.⁶¹

A Figura 16 apresenta os espectros de massas no modo *full scan* dos extratos brutos das bactérias EMB1B, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B, cultivadas em meio BD por um período de 11 dias.

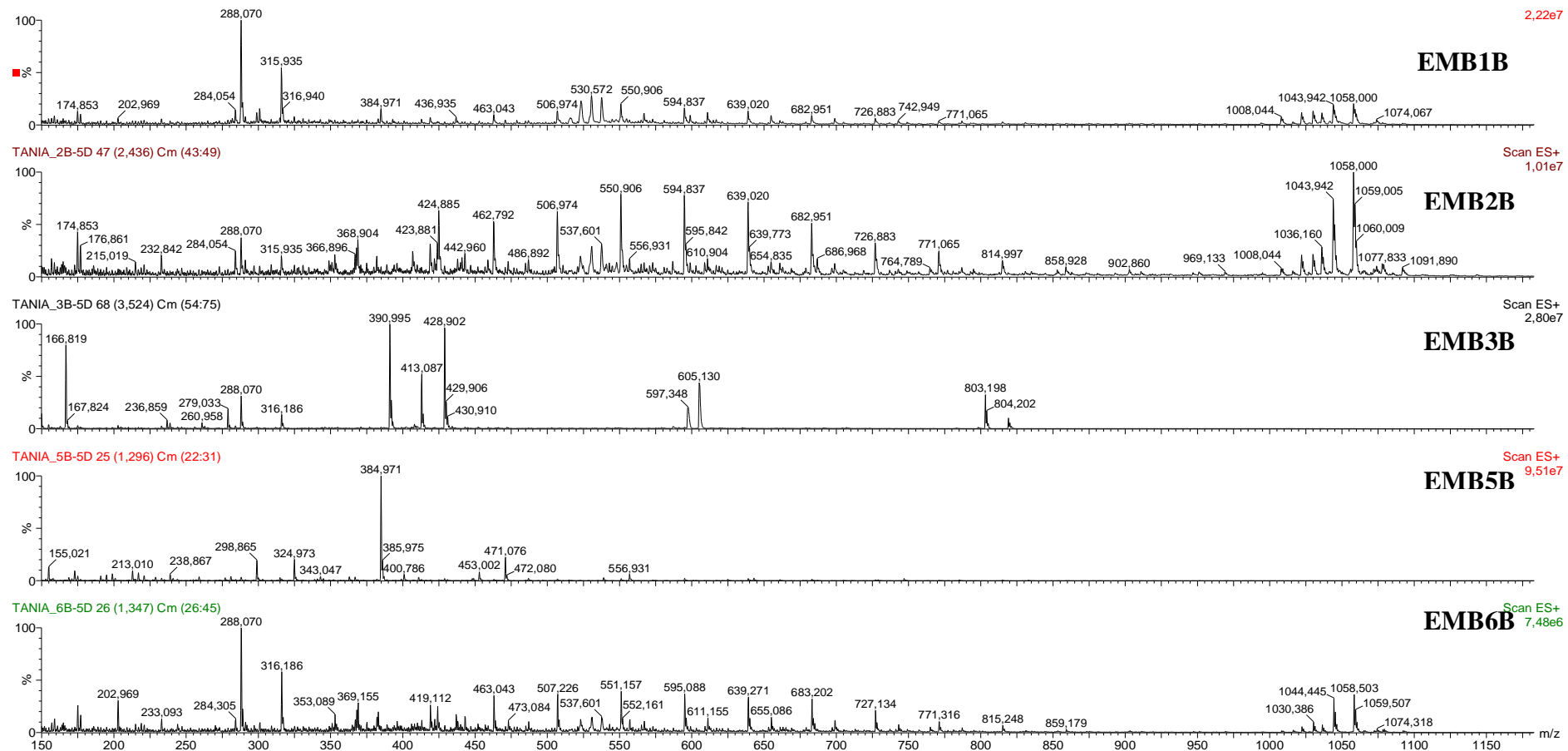


Figura 15. Espectros de massas ESI⁺ e potencial do cone 55V dos extratos orgânicos de EMB1B e, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B, fermentados por 5 dias em meio BD.

Os espectros apresentados mostram uma grande diversidade de metabólitos secundários nesses extratos. Em termos de composição dos extratos, os perfis das bactérias EMB1B e EMB2B são bastante semelhantes. Outro fato relevante é que os extratos EMB1B, EMB2B e EMB6B apresentam uma semelhança de metabólitos secundários na faixa de massas de m/z 1008 a 1060. O perfil do espectro de massas do extrato EMB5B, o qual apresentou atividade fitotóxica, mostrou-se bastante diferente, quando comparado com os demais espectros.

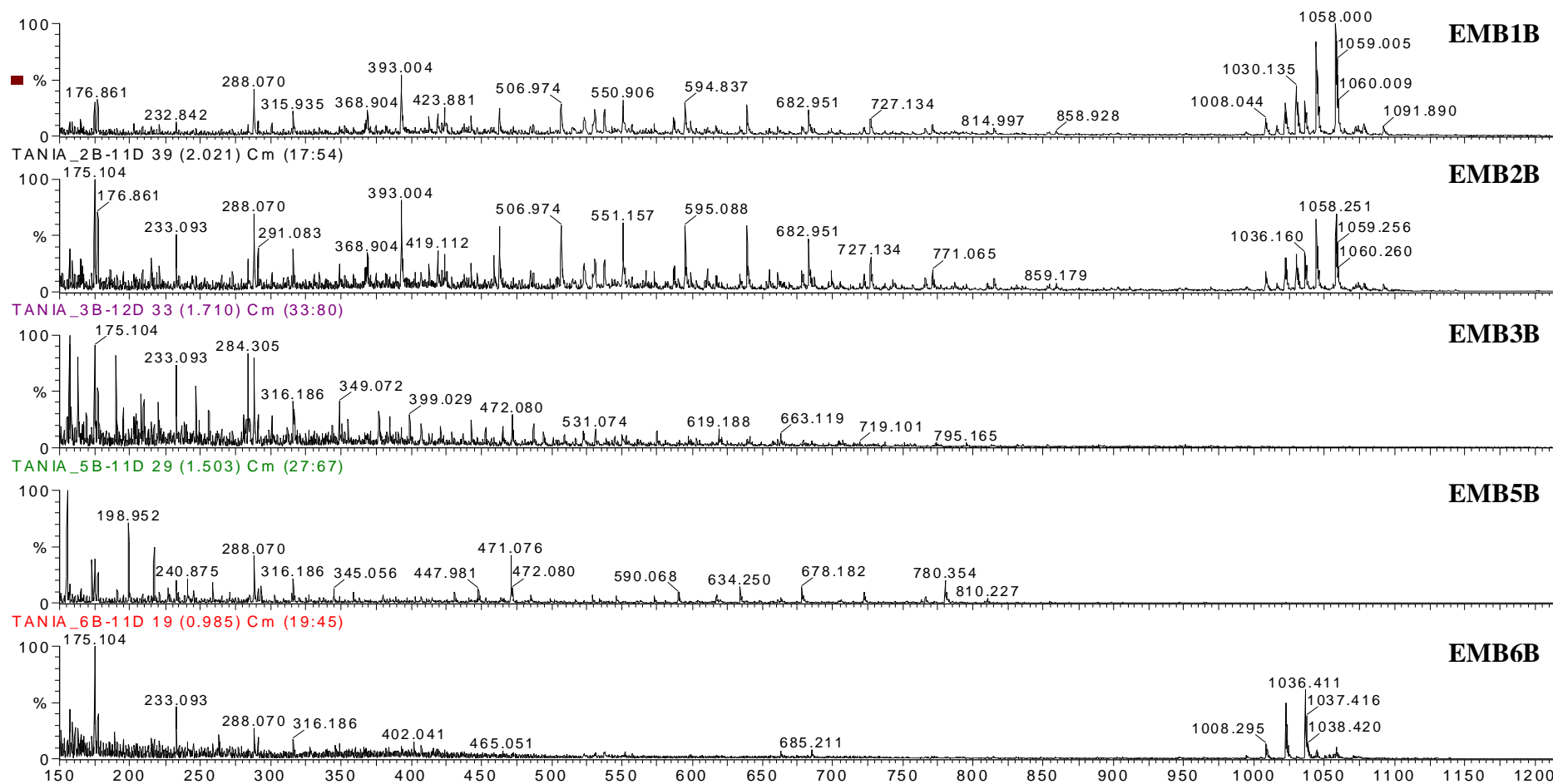


Figura 16. Espectros de massas ESI⁺ e potencial do cone 55 V, dos extratos orgânicos de EMB1B e, EMB2B, EMB3B, EMB5B e EMB6B, fermentados por 11 dias em meio BD

Quando comparamos os espectros de massas relativos à fermentação das bactérias por 5 e 11 dias (Figura 15 e Figura 16), observamos que o perfil de metabólitos para as bactérias EMB1B, EMB2B e EMB6B não variou significativamente, com o aumento dos dias de fermentação na região da faixa de massas de m/z 1008 a 1060.

Em especial para a bactéria EMB3B, foi observada grande variação no perfil de metabólitos para os dois períodos. Os perfis de metabólitos para a bactéria EMB5B indicaram um aumento da diversidade de metabólitos produzidos pela mesma, devido à presença de maior número de sinais no espectro referente à fermentação por 11 dias.

No perfil cromatográfico, obtido por LC-UV (Figura 17) pode ser observado grande variação de metabólitos entre os extratos EMB6B, EMB5B e EMB3B. Os picos variam entre si em relação ao t_R e intensidade. Já os cromatogramas dos extratos EMB1B e EMB2B são similares. Ambos apresentam 3 picos em t_R 2,4; 2,7 e 3,8 minutos, com intensidades semelhantes entre si.

Podemos observar que o perfil metabólitos dos extratos produzidos pela bactéria EMB5B, por LC-UV e ESI-MS, fornece informações semelhantes sobre a variação de suas composições em função do tempo. Entretanto, o perfil obtido pela ESI-MS nos dá mais informações a respeito da composição de cada extrato.⁶²

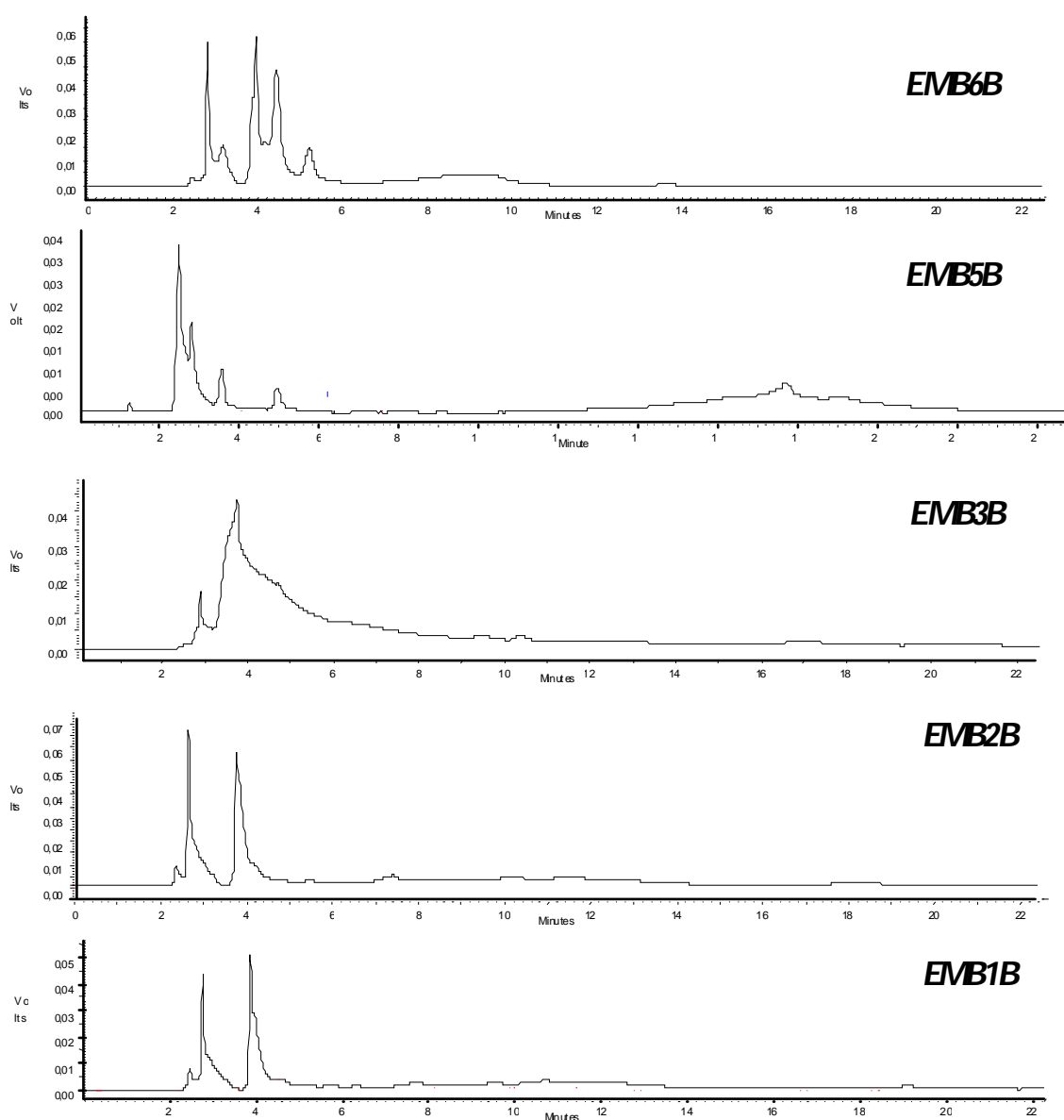


Figura 17. Cromatogramas de LC-UV dos extratos das bactérias EMB obtidos com 11 dias de fermentação. Fase móvel H₂O/ACN 10%, coluna C18 (4.60 x 250 mm), modo isocrático e fluxo 1 mL/min e $\lambda = 215$ nm.

Mediante a pesquisa na Biblioteca de Produtos Naturais (Chapman & Hall), os metabólitos secundários na faixa de massas de m/z 1008 a 1060 foram atribuídos à presença de surfactinas, lipopeptídeos com grande atividade surfactante produzidas principalmente por *Bacillus* sp (Figura 18). Foram identificados, neste extrato, os compostos Surfactina A₁ a qual apresentou sinal de m/z [M + H]⁺ 1008, os sinais de m/z [M + H]⁺ 1022 e m/z [M + Na]⁺ 1044 foram atribuídos à Surfactina B₁ e a Surfactina C₂ apresentou sinais de m/z [M + H]⁺ 1037 e m/z [M + Na]⁺ 1059.

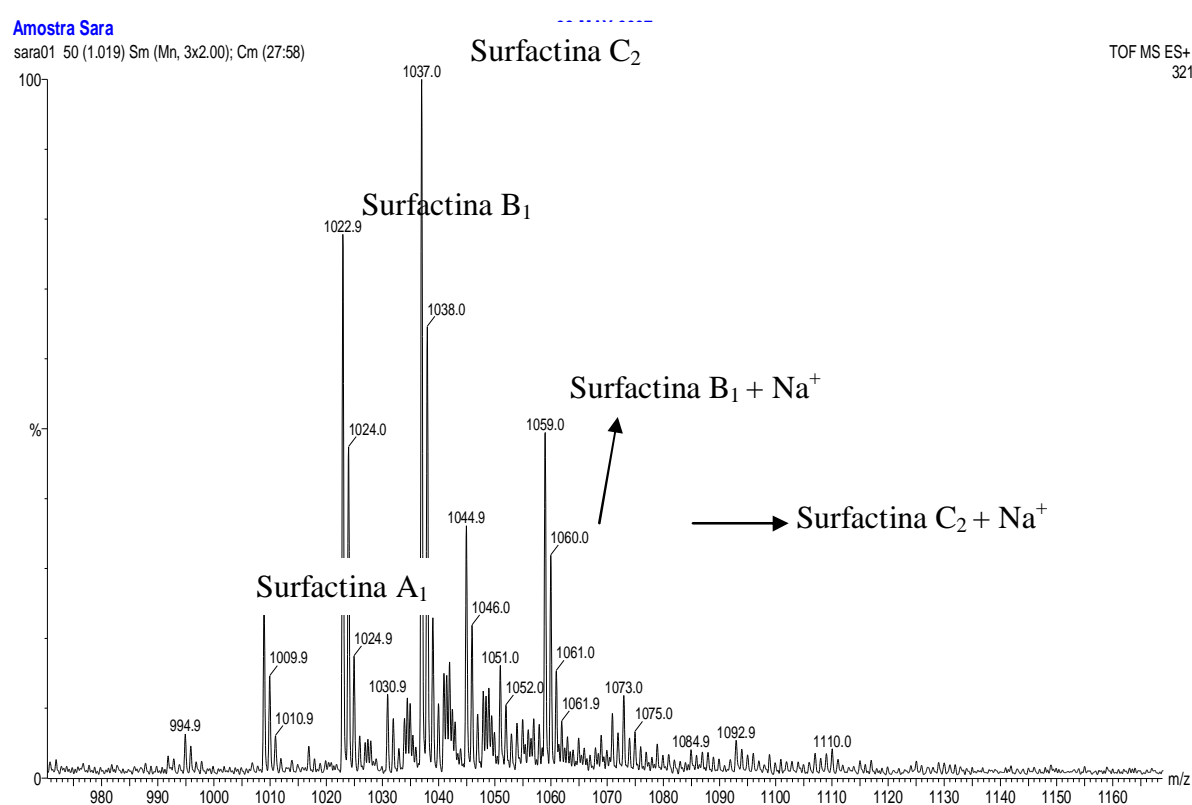


Figura 18. Sinais que caracterizam a presença de surfactinas no extrato EMB1B.

Esta classe de compostos se caracteriza pela existência de peptídeos ligados a

ácidos graxos, sendo que a porção protéica da molécula pode ser neutra ou aniônica, e os aminoácidos estão frequentemente dispostos em uma estrutura cíclica (Figura 19).^{63,64}

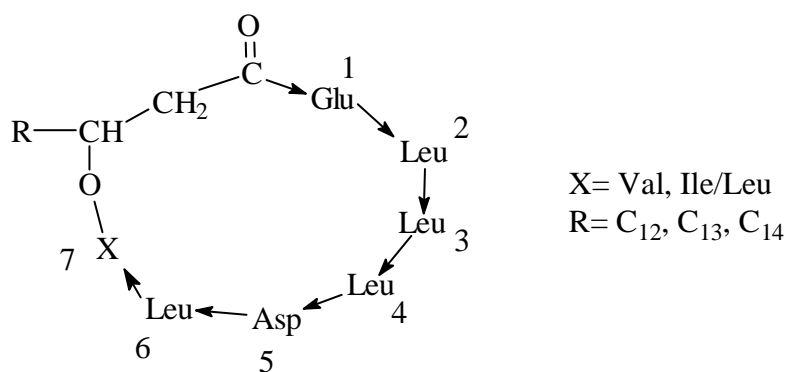


Figura 19. Estrutura geral das surfactinas.

O espectro de ESI-MS/MS obtido para o sinal de m/z $[M + H]^+$ 1037 possibilitou caracterizar a seqüência de peptídeos da surfactina C₂ (Figura 20).

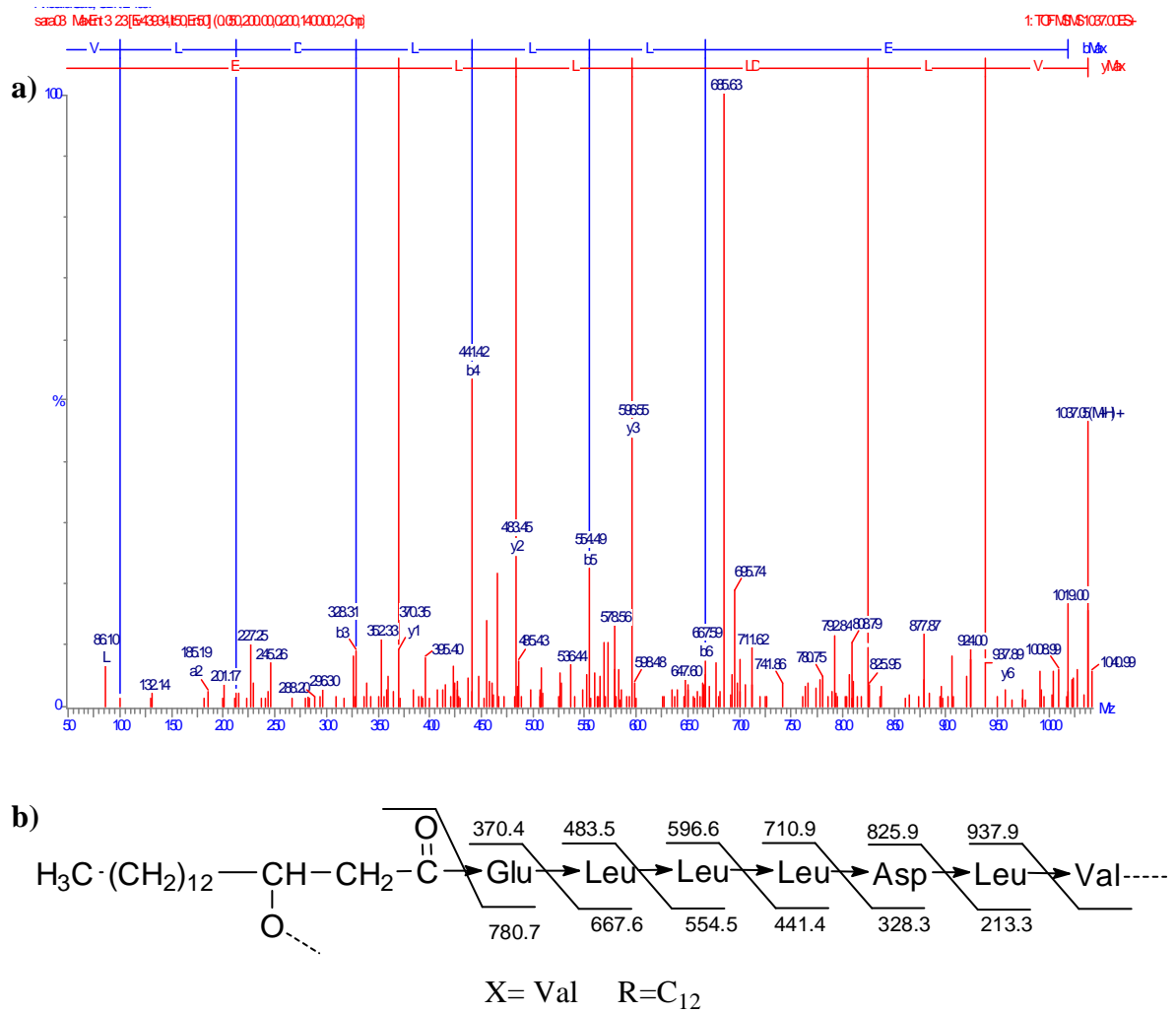


Figura 20. a) Espectro de ESI-MS/MS do sinal de m/z $(\text{M}+\text{H})^+$ 1037, obtido em modo positivo. b) Sequência de peptídeos da Surfactina C_2 .

A presença de surfactinas nos extratos EMB1B, EMB2B e EMB6B é uma indicação quimiotaxonômica de que a identificação das bactérias por FAME está correta, pois segundo esta metodologia a bactéria EMB1B é um *Bacillus subtilis* e a bactéria EMB6B é um *Paenibacillus lentimorbus*, ambas produtoras de surfactinas.

4.4 – Efeito do tempo de cultivo na produção de fitotoxinas

Existe um gama enorme de variáveis que podem ser testadas para a otimização do processo de produção de metabolitos secundários, como temperatura, fontes de carbono e nitrogênio, aeração, tempo, pH entre outros. Nesta etapa foi testada a influencia do tempo de fermentação para a produção das fitotoxinas.

Empregando o bioensaio de fitotoxicidade foi possível verificar a influência do tempo de fermentação sobre a fitotoxicidade dos extratos. O extrato EMB5B-5dias não apresentou atividade contra *L. minor*, e no extrato EMB5B-11dias observou-se uma atividade fitotóxica bastante pronunciada. Em função disso, dois fatores foram estudados: o tempo de fermentação e a composição do meio de cultivo.

Em relação à influência do tempo de fermentação na atividade do extrato, podemos observar na Figura 21, o bioensaio realizado com os extratos fermentados por períodos de 5, 11, 17 e 21 dias.

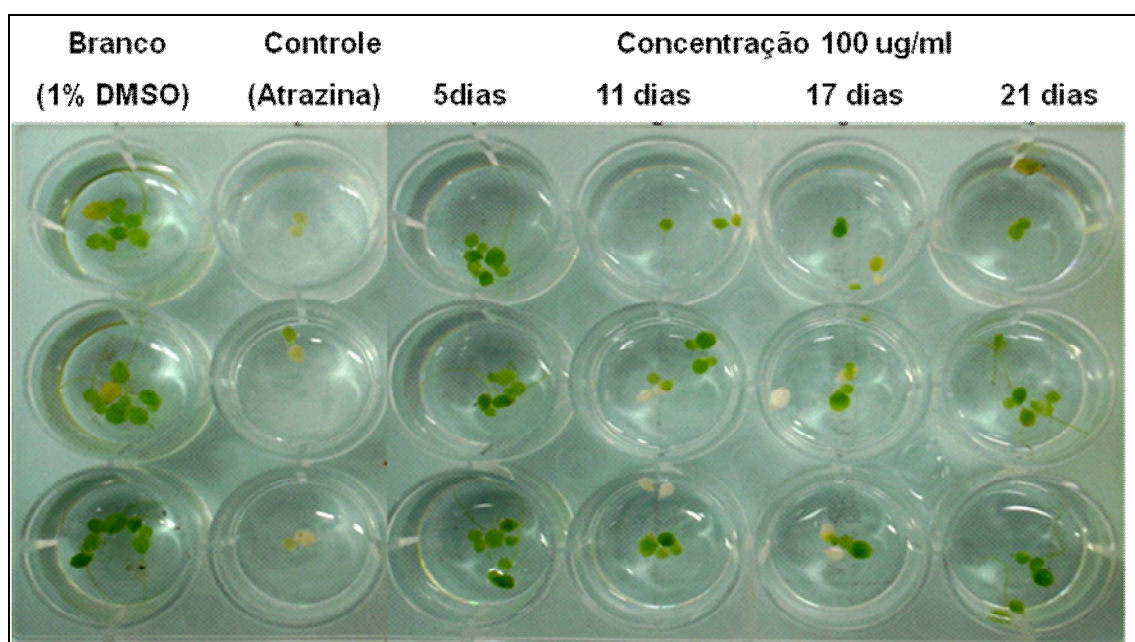


Figura 21. Ensaio de fitotoxicidade da bactéria EMB5B com *L. minor*, fermentadas por 5, 11, 17 e 21 dias em meio BD a 28 C.

Podemos observar que o extrato EMB5B-5dias não apresentou atividade (3ª coluna), uma vez que a multiplicação e o aspecto das folhas de *L. minor* foram similares ao branco (1% DMSO). Já na fermentação por 11 dias, presente na quarta coluna, foi observado início de necrose e inibição da multiplicação das pétalas. Com o aumento do tempo de fermentação para 17 dias, a atividade observada para o extrato foi semelhante ao observado para o cultivo de 11 dias. E para o extrato EMB5B-24dias, presente na 6ª coluna, a fitotoxicidade do extrato diminuiu, uma vez que a necrose e inibição da multiplicação das pétalas foram menores em relação aos extratos obtidos com 11 e 17 dias.

O perfil dos metabólitos obtido por ESI-MS esta apresentado na Figura 22. Para a fermentação com 5 dias é observado poucos sinais no espectro de massas, indicando a baixa produção de metabólitos neste período. Com o aumento do tempo

de fermentação para 11 dias, foi observado um aumento na diversidade de metabólitos e este permanece inalterado até o período de 17 dias. Podemos observar também uma grande semelhança entre o perfil dos metabólitos secundários nesses dois períodos.

Ao 21º dia verifica-se a supressão e diminuição da intensidade de alguns sinais assim como o aparecimento de novos picos, o que indica que a bactéria está metabolizando/consumindo alguns metabólitos que produziu anteriormente.

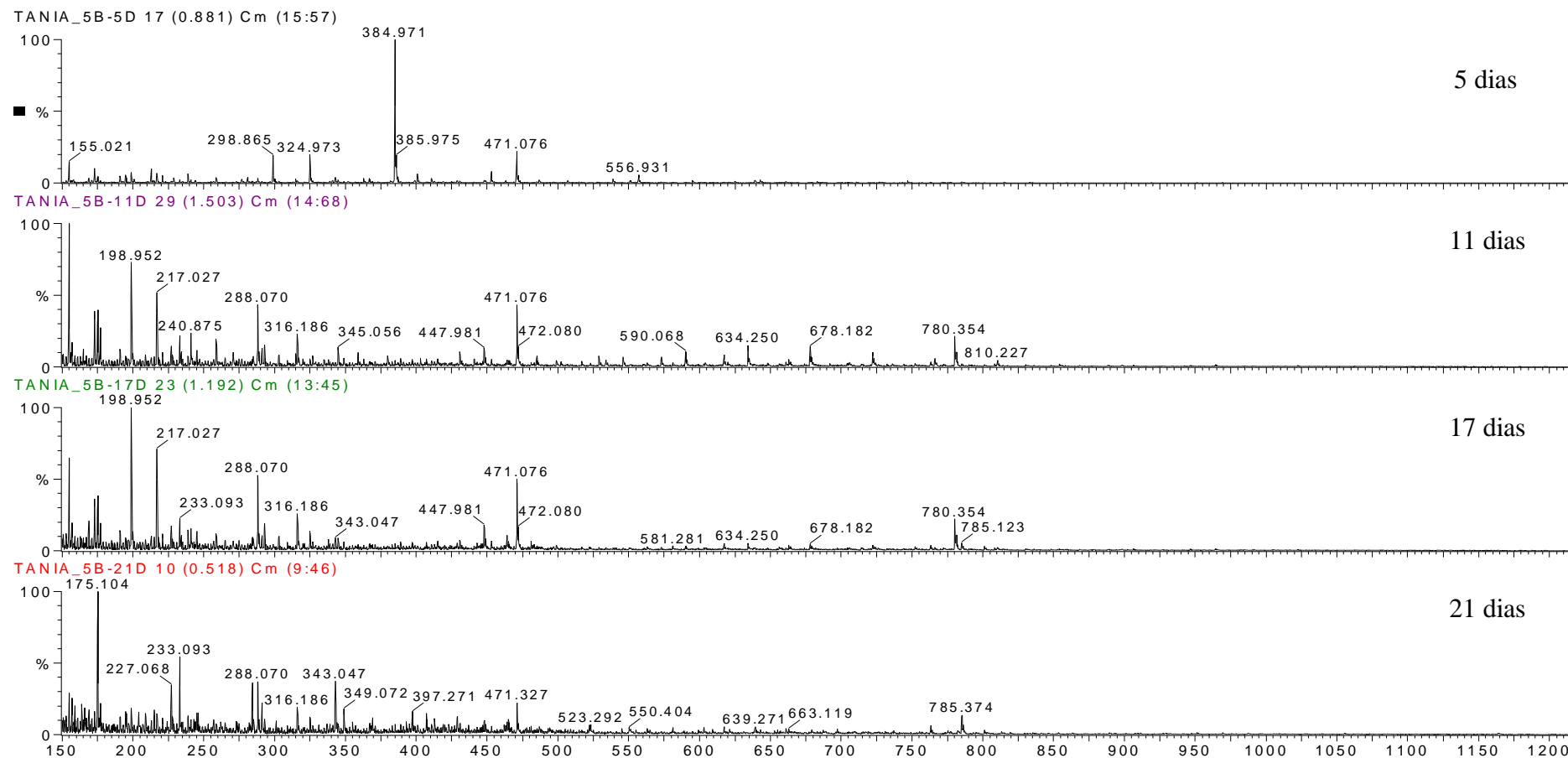


Figura 22. Espectros de massas ESI⁺ da bactéria EMB5B com 5, 11, 17 e 21 dias de fermentação, a 28°C em meio BD.

Na Figura 23, apresentamos os cromatogramas dos extratos EMB5B com 5, 11, 17 e 21 dias de fermentação, obtidos por LC-UV. Através da análise desses cromatogramas verificamos uma grande variação entre os t_R e as áreas de alguns picos e em função do período de fermentação. A variação mais significativa foi o pico em $t_R=17,8$ min, que aparece nos cromatogramas referentes aos extratos EMB5B-11 dias e 17 dias. Da mesma forma que o perfil obtido por ESI-MS, o espectro de UV evidencia que o microrganismo produz diferentes compostos detectáveis devido à variação do período de fermentação.

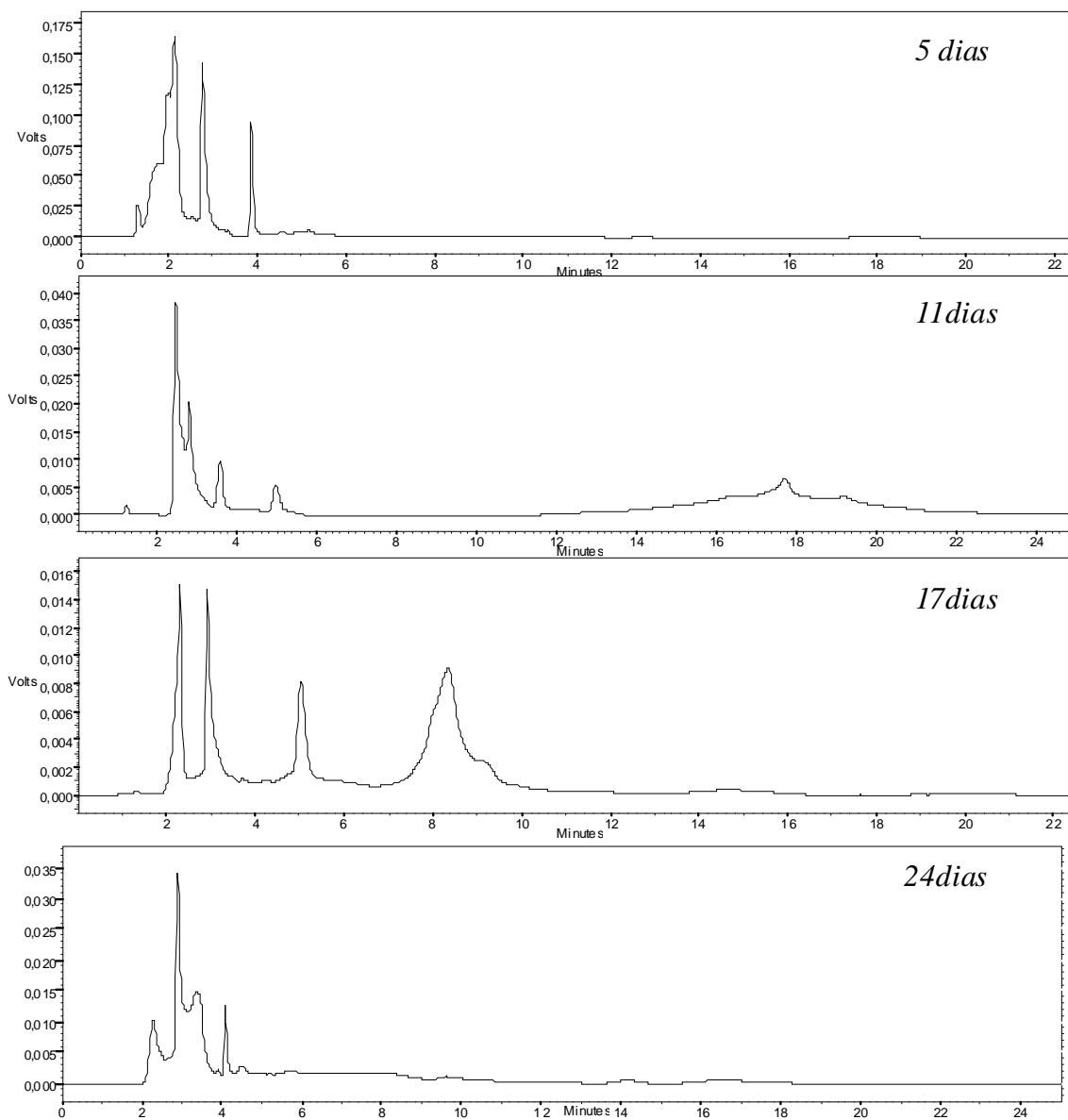


Figura 23. Cromatogramas de LC-UV dos extratos EMB5B obtidos em dias diferentes de fermentação. Fase móvel: H₂O/ACN10%, coluna C18 (4.60 x 250 mm), fluxo 1 ml/min em 215 nm.

Os estudos realizados com esses extratos confirmam a variação da atividade fitotóxica em função do tempo de cultivo da bactéria EMB5B. Haja visto, que a presença do composto responsável pela atividade fitotóxica no extrato bruto, deve ter uma concentração mínima necessária para que possa responder ao bioensaio com *L. minor*.

A determinação da maior fitotoxicidade dos extratos através do bioensaio foi uma etapa importante para que pudéssemos aumentar a escala de fermentação do microrganismo. Como o período em que a bactéria apresentou maior fitotoxicidade foi entre 11 e 17 dias, a fermentação em maior escala foi realizada em um tempo intermediário de 15 dias, para garantir uma concentração máxima da fitotoxinas para a etapa posterior de isolamento e caracterização estrutural do composto ativo.

4.5 - Fracionamento do extrato bruto EMB5B e identificação do princípio ativo

Após a otimização do período de fermentação para a produção máxima de metabólitos com atividade fitotóxica através do bioensaio com *L. minor* a escala de fermentação em meio líquido foi aumentada para 1L. Para esta fermentação, empregou-se Erlenmeyers de 1 L contendo 250 ml (1/4) de meio de cultura BD.

A bactéria EMB5B foi fermentada em meio BD, por 15 dias, a 28°C e 130 rpm. Após o período de incubação, o meio foi extraído com acetato de etila, produzindo

uma massa total de 210 mg do extrato bruto.

A partir do fracionamento desse extrato foram obtidas 86 frações, as quais foram agrupadas em cinco frações principais baseado nas semelhanças dos perfis obtidos por CCD. Em seguida, estas foram secas em rota-evaporador sob pressão reduzida.

Essas cinco frações foram submetidas a uma nova bateria de bioensaios. De acordo com o potencial de fitotoxicidade apresentado no bioensaio com *Lemna minor*, foi identificada uma fração ativa, F1 (Tabela 7).

Tabela 7. Fracionamento do extrato EMB5B e bioensaio de fitotoxicidade

Fração	Massa (mg)	Atividade biológica
Fração 1	8	+ + +
Fração 2	3	- - -
Fração 3	3	- - -
Fração 4	40	- - -
Fração 5	59	- - -

A Figura 24 apresenta o resultado do teste de fitotoxicidade para as cinco frações.

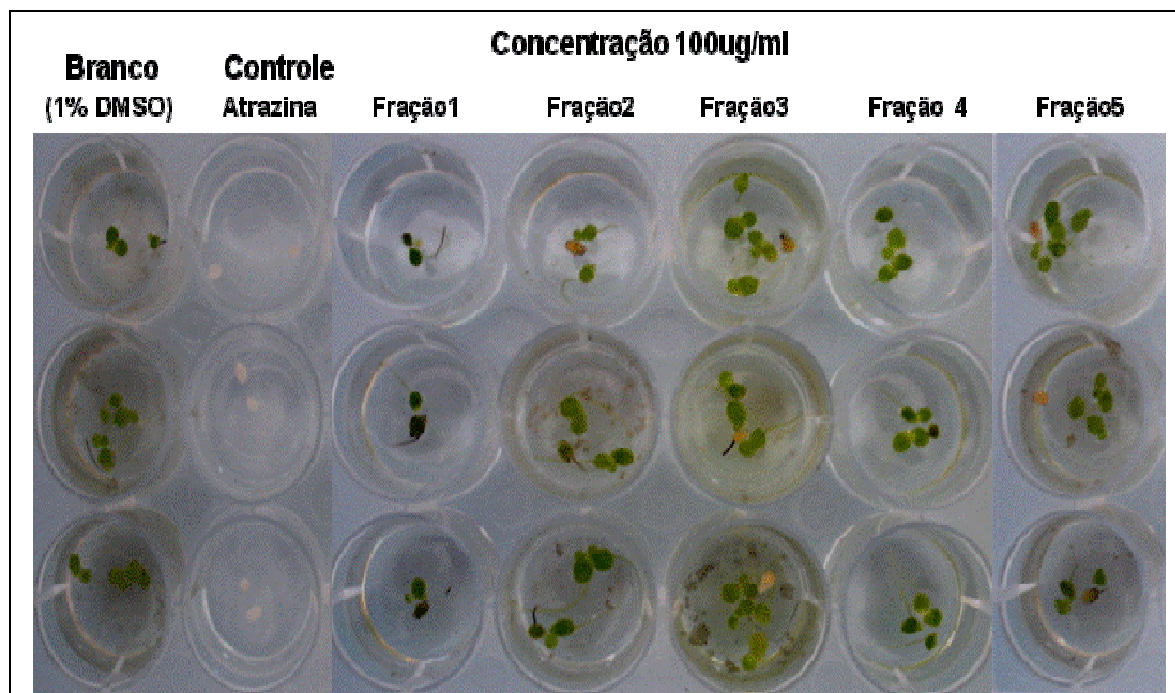


Figura 24. Ensaio de fitotoxicidade das frações cromatográficas F1, F2, F3, F4 e F5 do extrato bacteriana EMB5B-15dias com *L. minor*.

Como observado na Figura 24, em relação ao branco (meio + DMSO 1%), as folhas de *L. minor* se multiplicaram e permaneceram visualmente saudáveis enquanto que o controle (atrazina, coluna 2) provocou inibição do crescimento e necrose das pétalas. Em relação ao branco, as frações F2, F3, F4 e F5 provocaram necrose de algumas pétalas, mas esse efeito não foi observado em todos os poços, portanto concluímos que essas frações não apresentaram atividade fitotóxica pronunciada. Na terceira coluna, onde foi adicionada a fração F1, pode ser constatada a inibição completa da multiplicação das folhas da planta, uma vez que o ensaio foi inicialmente realizado com duas pétalas de *L. minor* agregadas, e após sete dias esse número permaneceu constante, havendo assim uma inibição completa da multiplicação das folhas. Apesar da fração não ter provocado necrose na planta, em

relação à inibição de crescimento, o efeito causado por essa fração foi o mesmo observado para o controle, a atrazina.

A Figura 25 apresenta o cromatograma LC-UV da Fração 1. Podemos observar a presença de um pico com tempo de retenção 17,5 minutos. Esta análise possibilitou identificar desse composto no cromatograma do extrato bruto EMB5B (Figura 23, pág 52).

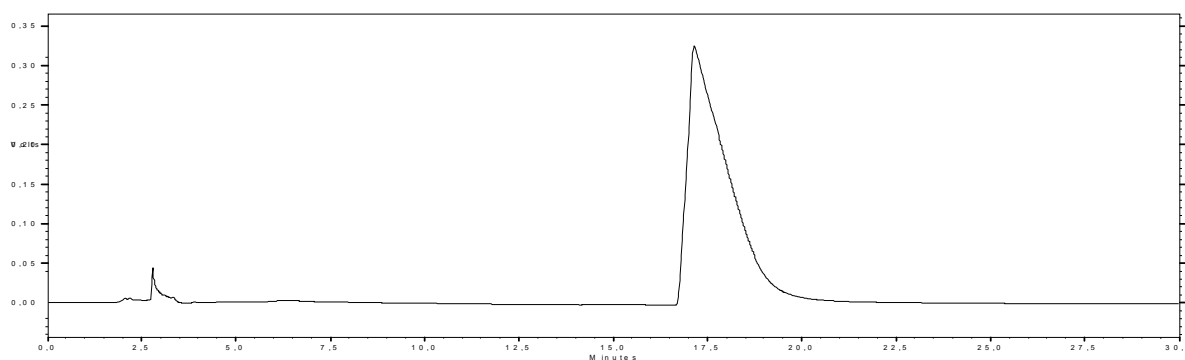


Figura 25. LC-UV da fração ativa, fase móvel H₂O/ACN 10%, modo isocrático e fluxo 1 ml/min. Coluna C18 (250 x 4,60 mm), $\lambda = 215$ nm.

O espectro de massas da fração 1 esta apresentado na Figura 26, possibilitou determinar a massa molecular do composto ativo.

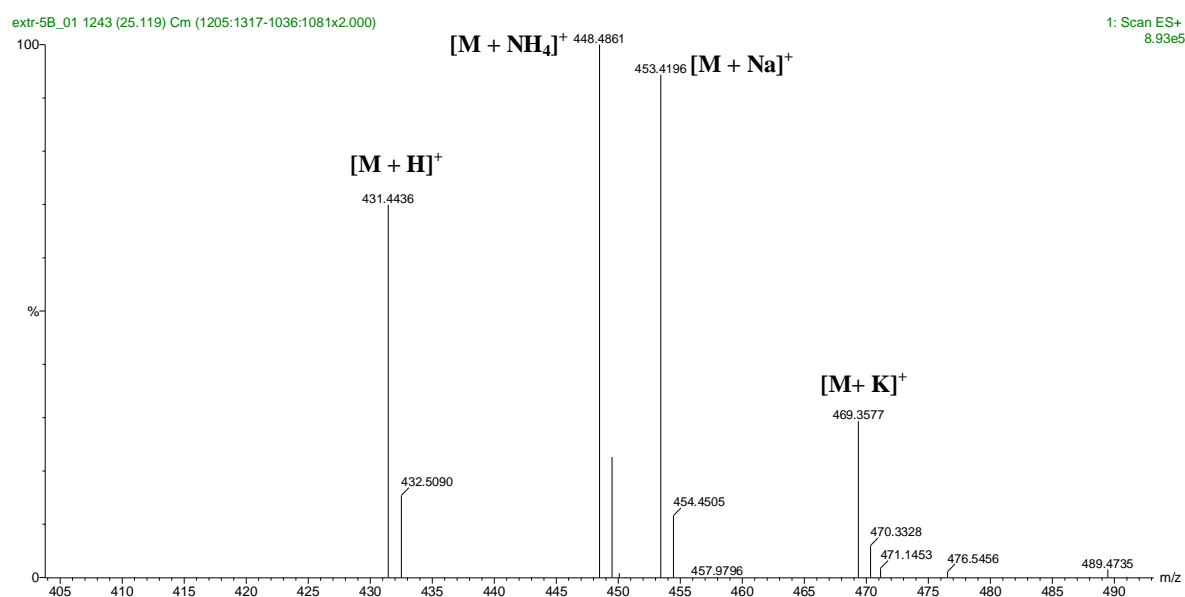


Figura 26. Espectro de massas referente à fração 1 no modo ESI⁺.

Nesse espectro, é observado um “cluster” de sinais de m/z 431, m/z 448, m/z 453 e m/z 469. Esses sinais confirmam que o princípio ativo possui uma massa molecular de 430 Da. Os sinais observados no espectro de ESI⁺ foram caracterizados como m/z 431 [M + H]⁺, m/z 448 [M + NH₄]⁺, m/z 453 [M + Na]⁺ e m/z 469 [M + K]⁺. A grande abundância relativa desses adutos no espectro sugere que esse composto possui uma grande afinidade por cátions.

Também foi realizada análise por LC-MS do extrato EMB5B. A Figura 27b, apresenta o cromatograma de LC-MS obtido do extrato bruto. A Figura 27a apresenta o cromatograma proveniente da extração do íon de m/z 453 [M + Na]⁺, referente à molécula do princípio ativo sodiada.

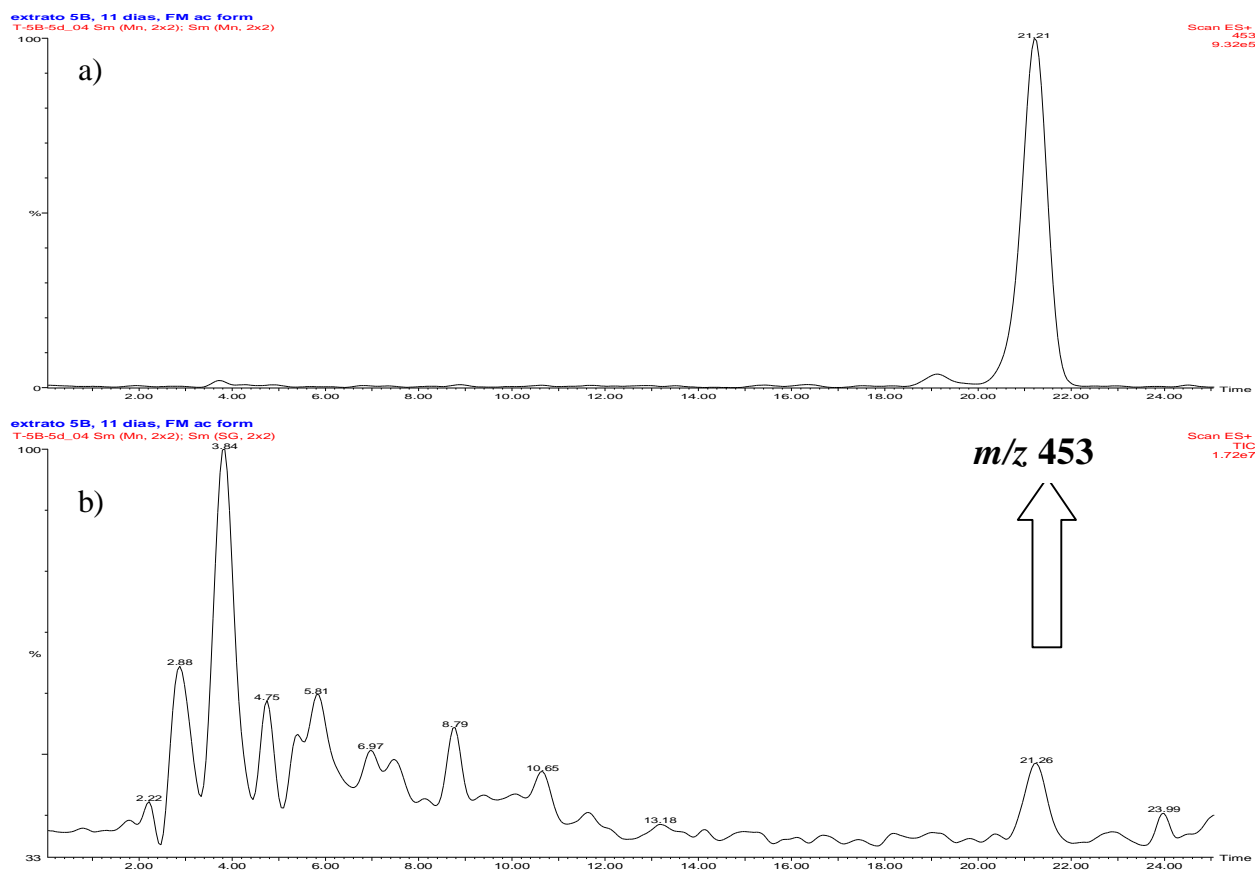


Figura 27. (a) extração do íon m/z 453 e (b) cromatograma de LC-MS do extrato EMB5B-11 dias (ESI+, potencial do cone 50 V). Fase móvel: H_2O/ACN 10% e ácido fórmico 0,1%, coluna C18 (4.60x100 mm) e fluxo 0,3 ml/min.

Os sinais de m/z 431 e m/z 453 foram submetidos a um estudo de fragmentação induzida por colisão (CID), Figura 28 e Figura 30, com a finalidade de obter informações estruturais do princípio ativo.

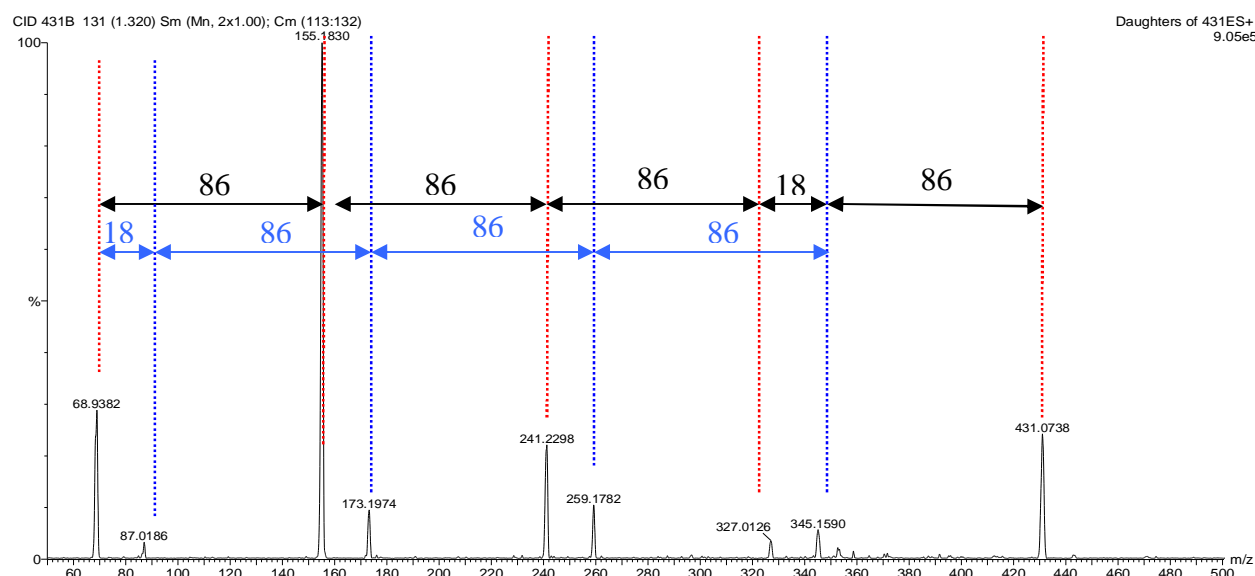


Figura 28. Espectro de ESI-MS/MS do íon de m/z 431 $[M+H]^+$ no modo ESI⁺, potencial do cone 30 V e energia de colisão 15 eV.

O espectro de massas da Figura 28 mostra que a fragmentação do composto bioativo protonado (m/z 431), pode ocorrer por duas vias diferentes. A primeira ocorre por uma perda de 86 Da, seguida de H₂O (18 Da) e três perdas sequenciais de 86 Da, que originam os íons filhos de m/z 345, m/z 327, m/z 241, m/z 155, m/z 69 (setas pretas). Na segunda, (setas azuis) ocorrem quatro perdas em série de 86 Da, seguida de uma perda de H₂O, formando os íons filhos m/z 345, m/z 259, m/z 173, m/z 87, m/z 69.

Com base no espectro de MS/MS foi proposto um caminho de fragmentação para o princípio ativo de m/z 431 (Figura 29).

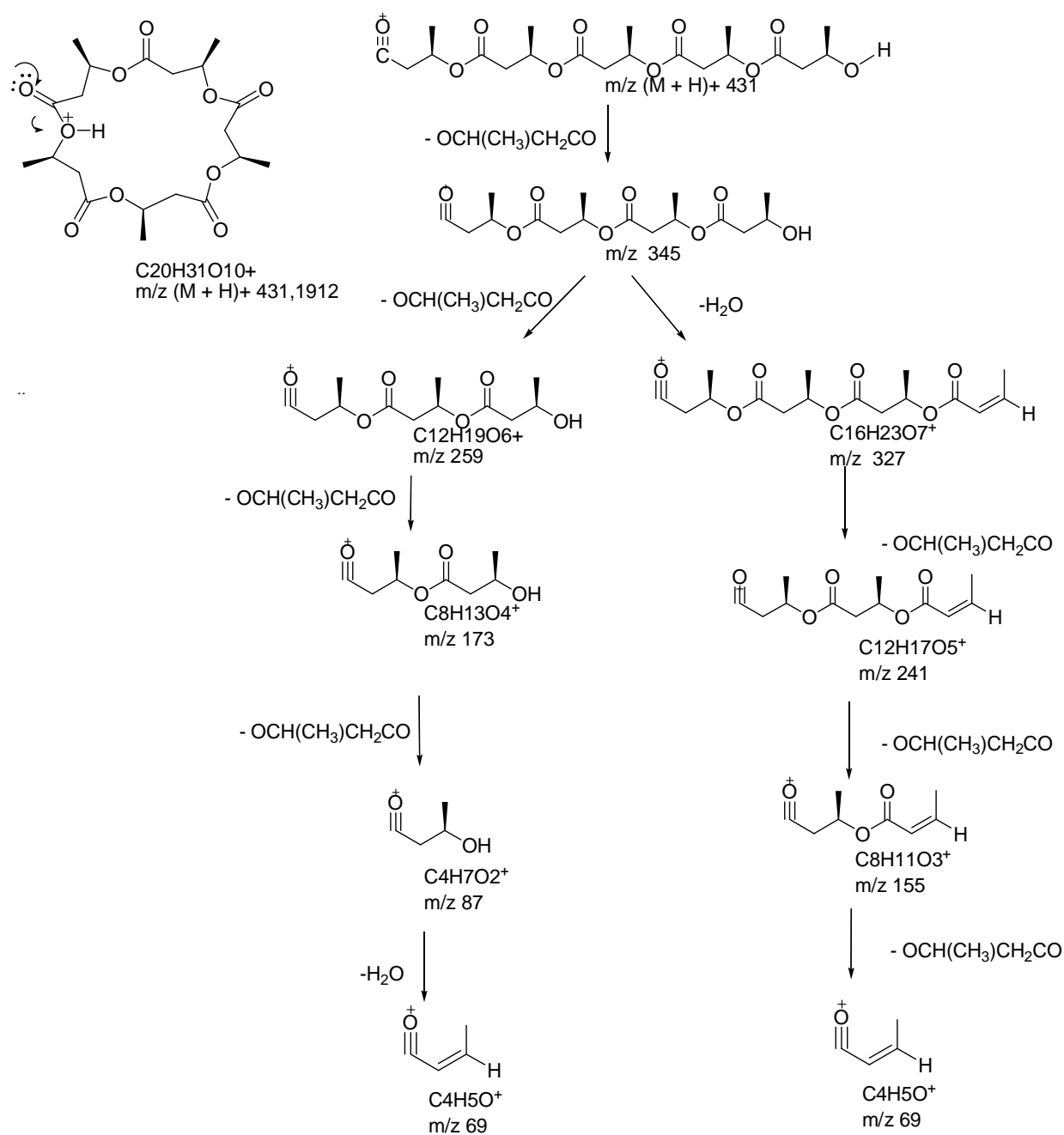


Figura 29. Caminho de fragmentação do composto de m/z 431.

O espectro de ESI-MS/MS do composto ativo sodiado de m/z 453 $[M + Na]^+$ apresentou um padrão de fragmentação semelhante a do composto protonado (Figura 30). Porém, o caminho de fragmentação ocorre apenas através das quatro perdas seqüenciais de fragmentos neutros com 86 Da, que geraram os íons filhos m/z 367, m/z 281, m/z 195 e m/z 109.

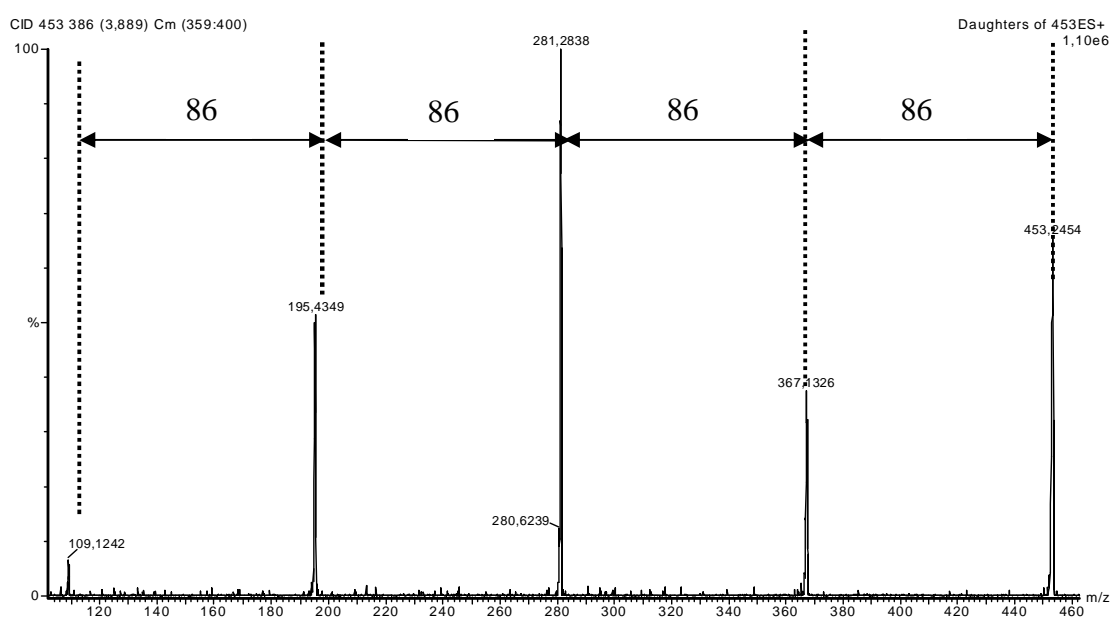


Figura 30. Espectro de ESI-MS/MS do composto de m/z 453 $[M+Na]^+$ no modo ESI⁺, potencial do cone 45 V e energia de colisão 25 eV.

Os espectros de massas obtidos até aqui apontaram alguns aspectos importantes que nos levaram a conclusões preliminares a respeito da estrutura do composto.

Primeiramente, a molécula referente ao composto ativo foi ionizada no modo positivo e não mostrou nenhuma ionização no modo negativo. Como foi dito

anteriormente, substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas nesse modo.

Um outro aspecto importante é a presença dos adutos metálicos no espectro de ESI-MS o que indica que o composto ativo possui grande afinidade por cátions. Este fato sugere que esta molécula pode ser uma substância orgânica contendo átomos como oxigênio, nitrogênio, enxofre, entre outros, que possuem elétrons livres que funcionam como sítios de complexação com metais. Os íons que possuem carga positiva são atraídos pelos pares eletrônicos livres, se coordenando ao composto devido à ação de forças eletrostáticas.

Baseados nas análises dos espectros sugerimos que esses heteroátomos podem ser átomos de oxigênio ou números pares de átomos de nitrogênio. Como o composto de m/z 431[M+H]⁺ fragmenta-se perdendo água, concluímos que a molécula possui oxigênio em sua estrutura.

Outro aspecto interessante refere-se ao perfil de fragmentação observado para os íons de m/z [M+H]⁺ e m/z [M + Na]⁺. As perdas sequenciais de fragmentos que possuem a mesma unidade de massa indicaram que a molécula possui uma estrutura “polimérica” e que a fragmentação ocorre mediante perdas de monômeros cujas massas são de 86 Da.

Nossas observações foram confirmadas através da comparação das análises espectroscópicas e espectrométricas para o composto ativo com dados descritos na literatura.

Em 1988 quando o químico Seebach e colaboradores tentavam sintetizar um

composto derivado dos antibióticos naturais pirenoforina, vermiculina e elaiofilina, a partir da reação de macrolactonização do ácido *R*-3- hidroxibutanóico sob condições de *Yamagushi*,⁶⁵ obteve como produto uma mistura equimolar (1:1:1) de três oligômeros cíclicos, que foram identificados como um trímero, um pentólido e um hexólido.⁶⁶

Os dados de RMN¹H e ESI-MS/MS, obtidos para o composto fitotóxico isolado da bactéria EMB5B foram idênticos aos dados obtidos para o pentólido cíclico. A análise dos dados obtidos bem como a comparação com esses dados da literatura apresentados permitiu determinar a estrutura do composto ativo como sendo um pentâmero cíclico do ácido 3-hidroxibutáico (Figura 31).

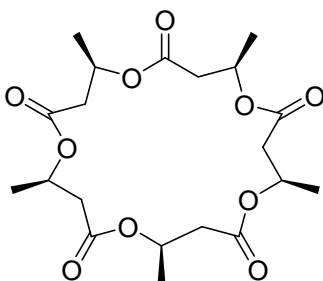


Figura 31. Estrutura do pentâmero fitotóxico

Além da espectrometria de massas, a estrutura do composto ativo também foi confirmada por Infravermelho, RMN¹H, RMN¹³C, HMQC e HMBC. Os espectros de RMN¹H, e RMN¹³C apresentados nas Figuras 33 e 34, respectivamente, revelaram grupos de sinais característicos de polihidroxibutiratos.^{67,68}

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi usada por Karanth e colaboradores para monitorar a produção de PHBs por uma grande variedade de

microrganismos, através identificação da banda do éster carboxílico em 1724 cm^{-1} nas amostras, como banda característica de PHB.⁶⁹

O espectro de infravermelho do pentólido puro está apresentado na Figura 32. Pode ser observada uma banda forte em 1728 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento dos grupo C=O e duas bandas intensas em 1303 cm^{-1} e 1118 cm^{-1} que correspondem aos estiramentos do grupo e C-O. O espectro também apresentou as bandas com intensidade média em 2993 cm^{-1} , 2963 cm^{-1} , 2921 cm^{-1} correspondente a deformação axial das ligações C-H sp^3 .

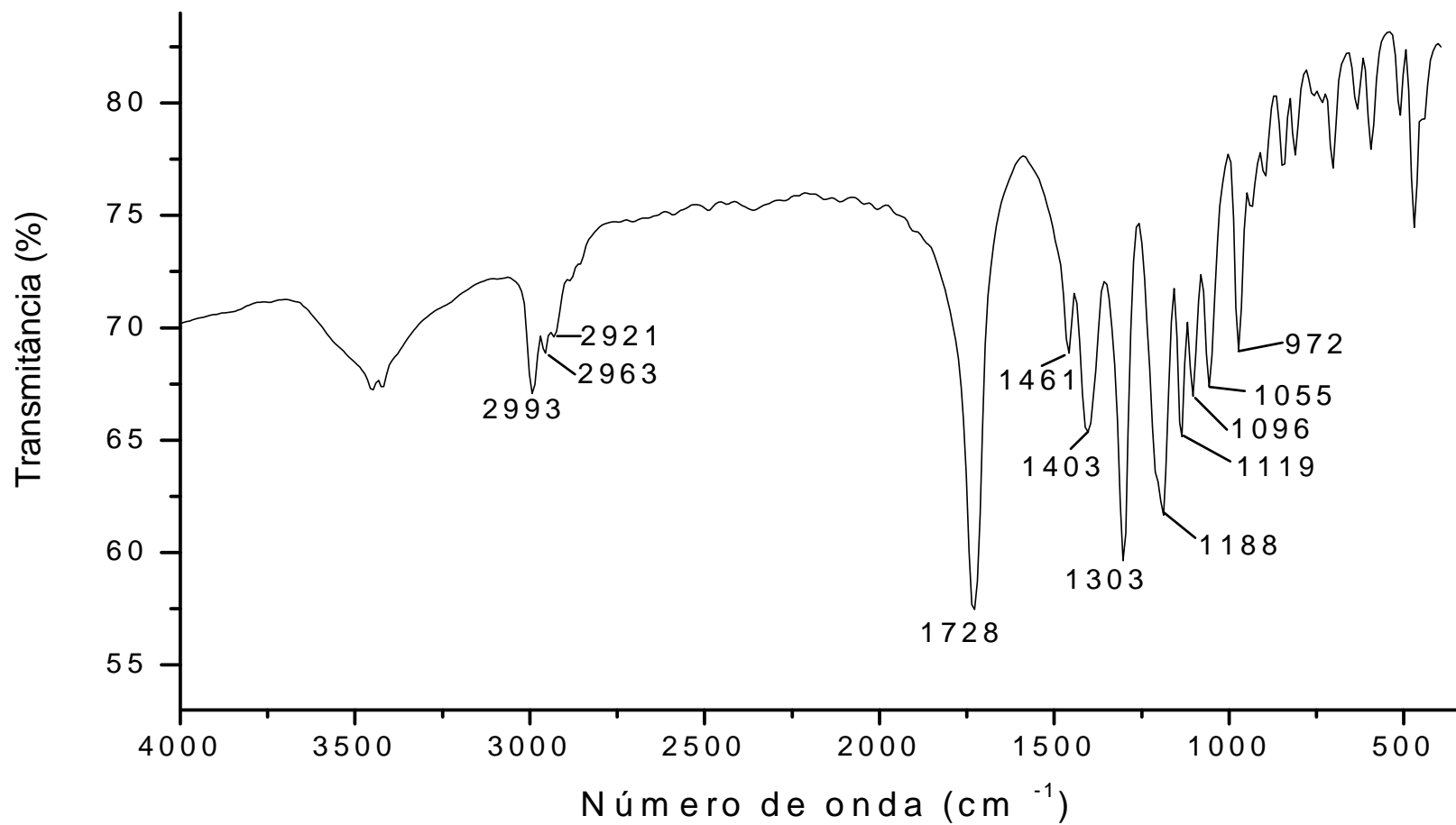


Figura 32. Espectro de Infravermelho da Fração 1.

Para o espectro de RMN¹H (Figura 33), o dubleto ($J^3 = 6,5$ Hz) em 1,30 ppm foi atribuído ao grupo metílico; os sinais em 2,54 ppm correspondem ao par de prótons diastereotópicos adjacentes a um átomo de carbono assimétrico ligado a um único próton e o multiplete em 5,25 ppm, corresponde ao próton do carbono assimétrico, adjacente ao grupo metílico e ao par de prótons diastereotópicos. Os dados de RMN ¹³C da substância (Figura 34) apresentaram sinais em 20,1 ppm correspondentes ao carbono metílico, 41,3 ppm referente ao carbono metilênico, 67,89 ppm foi atribuído ao carbono ligado ao oxigênio e o sinal correspondente a carbonila do éster foi identificado em 169,76 ppm.

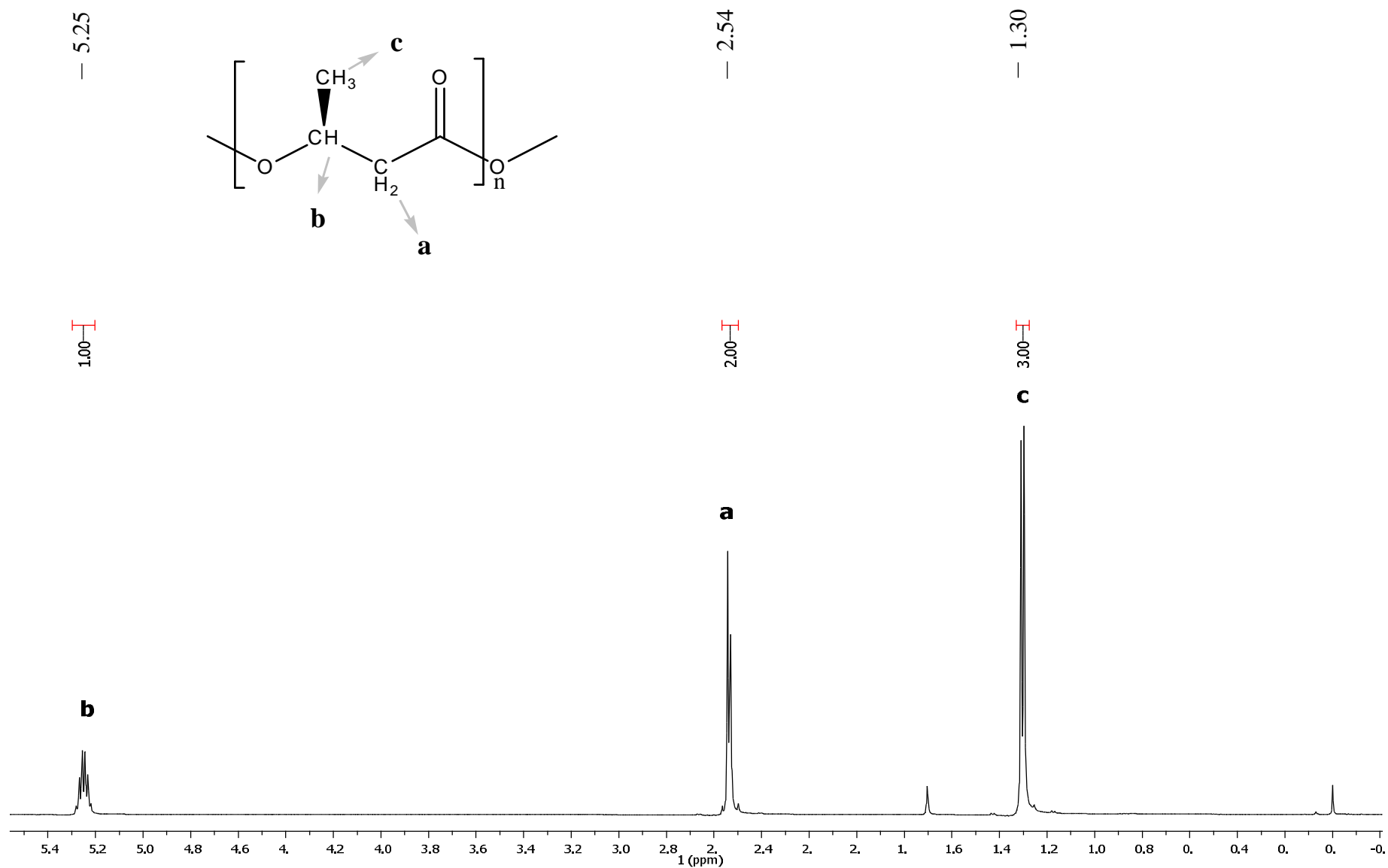


Figura 33. Espectro de RMN1H do composto bioativo da bactéria , obtido em 500MHZ (CDCl₃-TMS).

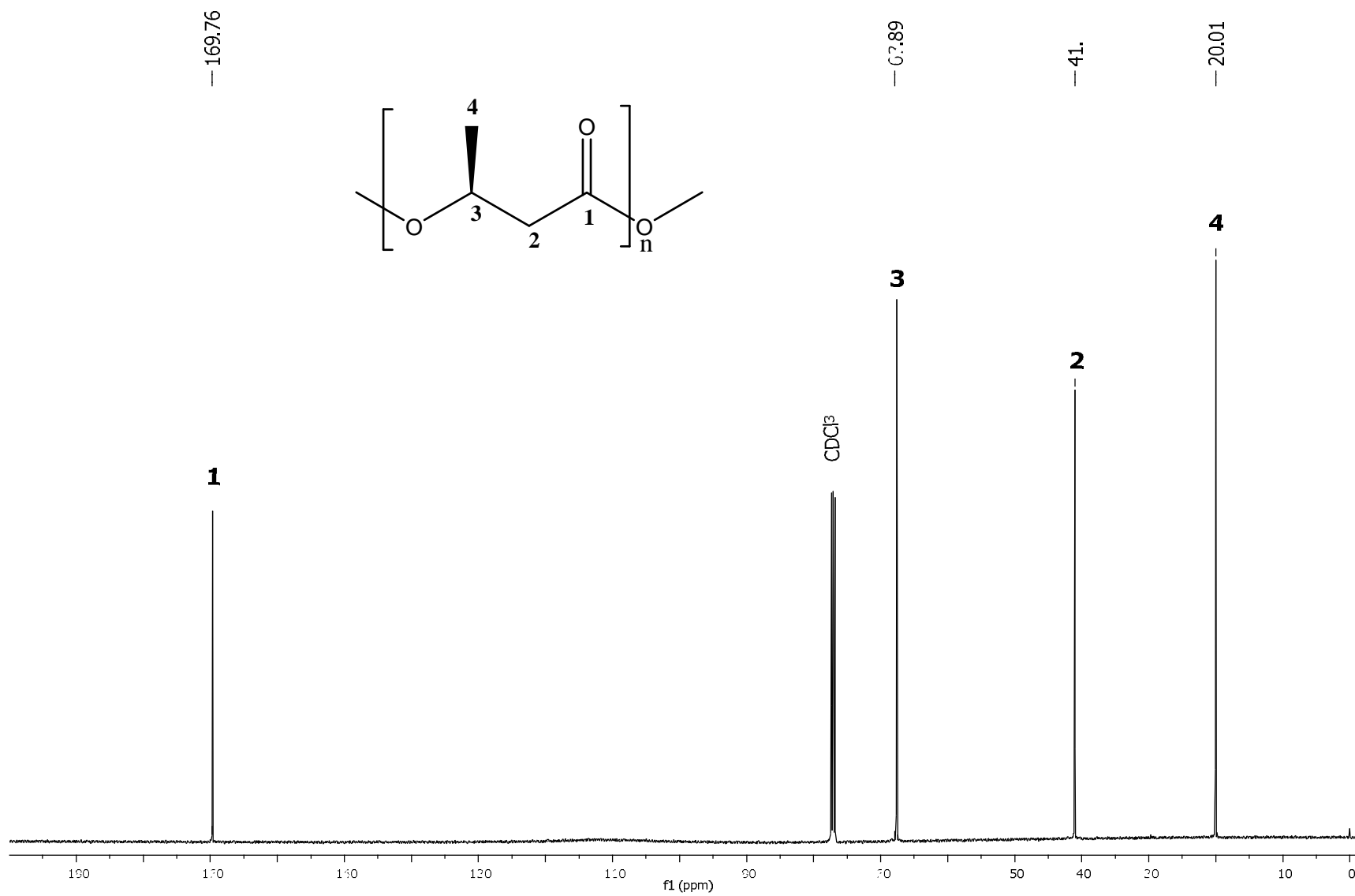


Figura 34. Espectro de RMN¹³C do composto bioativo da bactéria EMB5B, obtido em 400 MHz (CDCl₃-TMS).

Para o pentólido, também foram obtidos os mapas de contorno de HMQC (Figura 35) e HMBC (Figura 36). As análises desses espectros permitiram confirmar a estrutura proposta pela determinação das correlações entre carbonos e hidrogênios. Os espectros de HMQC, o qual apresenta correlações de hidrogênios ligados a carbonos ($^1J_{C-H}$) apresentou os seguintes dados:

- carbono em δ 20,01 apresenta correlação com o hidrogênio em δ 1,30.
- carbono em δ 41,03 apresenta correlação com o hidrogênio em δ 2,54.
- carbono em δ 67,89 apresenta correlação com o hidrogênio em δ 5,25.

O espectro de HMBC $^1H-^{13}C$, que correlaciona hidrogênios ligados a carbonos através de 2 ou 3 ligações ($^2J_{C-H}$, $^3J_{C-H}$) apresentou os seguintes resultados:

- hidrogênio em δ 1.30 (H-c) se correlaciona com carbonos em δ 67,89 (2J); δ 41,03 (3J) e δ 169,76 (4J).
- hidrogênio em δ 2.54 (H-a) se correlaciona com carbonos em δ 67,89 (2J); δ 169,76 (2J) e δ 20,01(3J).
- hidrogênio em δ 5.25 (H-b) se correlaciona com carbonos em δ 41,03 (2J); δ 20,01 (2J) e δ 169,76 (3J).

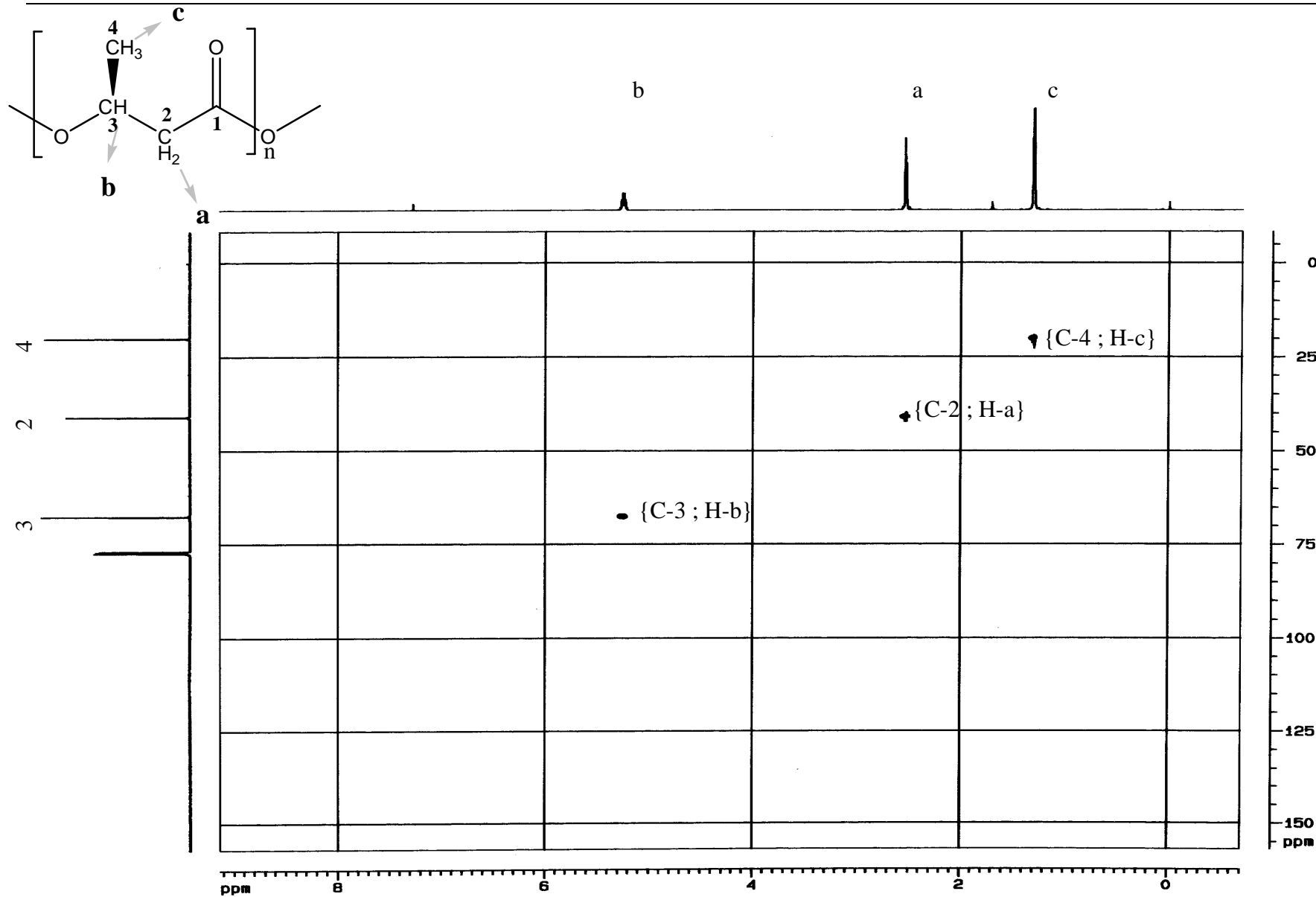


Figura 35. Espectro de HMQC do composto bioativo da bactéria EMB5B, obtido em 400MHz.(CDCl₃, TMS).

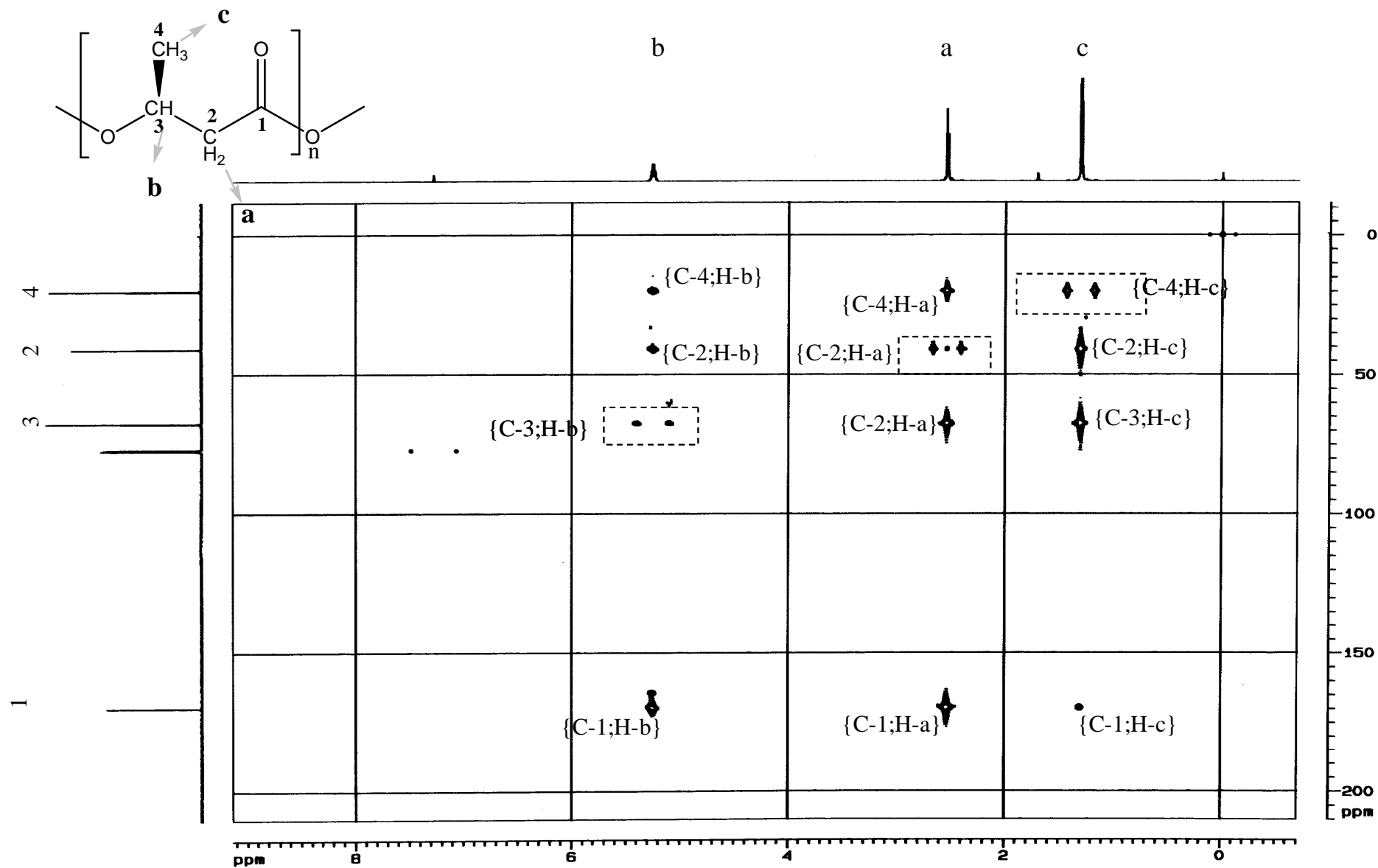


Figura 36. Espectro de HMBC do composto bioativo da bactéria EMB5B, obtido em 500MHz. (CDCl₃, TMS)

Fitotoxinas podem apresentar diferentes modos de ação.⁷⁰ O modo de ação do composto ativo não foi estudado neste projeto, todavia, segundo Duke e colaboradores,⁷¹ uma análise detalhada da estrutura química da molécula pode oferecer alguma indicação relacionada a seu modo de ação.

Uma característica estrutural que pode estar relacionada com a toxicidade do composto é a capacidade de quelar com metais. Os agentes complexantes são também chamados de ionóforos, que significa transportadores (foros) de íons. Substâncias como a ftalocianina foi isolada, sintetizadas e estudadas como potentes antibióticos, devido sua propriedade de formar complexos com íons metálicos (Figura 37).⁷²

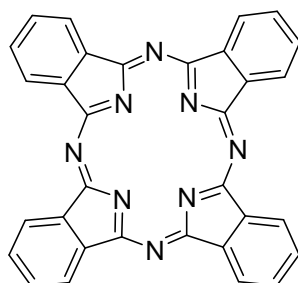


Figura 37. Antibiótico ftalocianina.

Foi demonstrado que vários oligômeros cíclicos, derivados do ácido (R)-3-hidroxi-butírico, dentre eles o pentólido o qual foi isolado neste estudo, além de um trímero e outros derivados alifáticos, também funcionam como ionóforos. O trabalho publicado mostrou que essas moléculas são capazes de transportar metais alcalinos como Li^+ e Cs^+ e metais alcalinos terrosos do Mg^{2+} e Ba^{2+} através de uma membrana

composta por uma fase orgânica de CH_2Cl_2 .⁷³ As propriedades ionofóricas dos oligômeros investigados derivados do ácido (R)-3-hidroxi-butírico são compatíveis com as propriedades biológicas observadas para os PHB como componentes de canais iônicos de membranas celulares.⁷⁴

Os ionóforos em geral são conhecidos como moléculas cujos esqueletos são formados de diversas estruturas que contêm heteroátomos localizados estrategicamente no espaço.

Essas moléculas são capazes de assumir conformações críticas nas quais os heteroátomos estão localizados em uma cavidade de um anel, por exemplo. Nessa conformação um cátion pode se alojar mais facilmente. Os oxigênios ligantes constituem-se de vários grupos funcionais como éteres, alcoóis, carboxilas e amidas. Os oxigênios ligantes neutros ligam-se aos cátions via interação íon-dipolo, analogamente a solvatação de íons em solventes com constantes dielétricas altas.⁷⁵

Foi realizada uma otimização conformacional do pentólido empregando mecânica molecular método MM2 utilizando o Software ChemDraw 8.0. Para a conformação de mais baixa energia adotada pelo pentólido, os quatro oxigênios carbonílicos estão localizados no mesmo lado do plano da molécula e o outro átomo, do lado oposto. Estudo cristalográfico do pentólido já foi descrito na literatura, confirmando a estrutura proposta.⁷⁶ Como pode ser observado na Figura 38, nesta conformação, os oxigênios das carbonilas dos ésteres podem servir como sítios de complexação para os cátions. A grande afinidade do pentólido por cátions pode ser constatada no espectro de massas da fração ativa F1 (Figura 26, pg. 57). Pode-se

observar a alta abundância dos sinais referentes ao composto ativo cationizado com sódio, potássio e amônio.

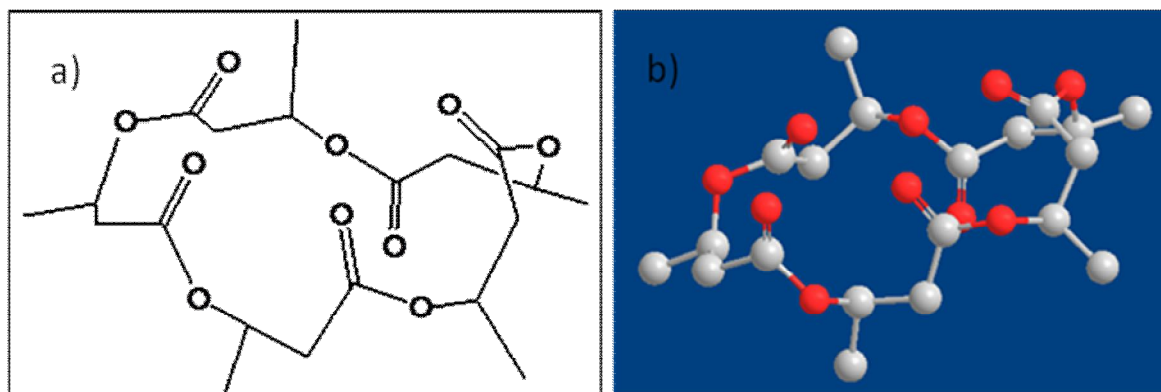


Figura 38. Conformação otimizada (MM2) do pentólido fitotóxico.

Uma vez que esses compostos são capazes de quelar com metais e atravessar membranas, devido às propriedades discutidas anteriormente, o seu modo de ação pode estar relacionado com a capacidade de ocasionar alterações no gradiente iônico celular.

Outro aspecto importante em relação à estrutura do composto ativo é que pode servir como modelo para a síntese de novos compostos com atividade fitotóxica.

Substâncias com estruturas análogas também apresentam bioatividade. Os compostos apresentados na Figura 39 são fitotoxinas que possuem estruturas análogas ao pentólido, ou seja, são macrolactonas. Lactonas produzidas pelo fungo *Cladosporium tenuissimum*, são responsáveis por inibir o crescimento de plantas.⁷⁷

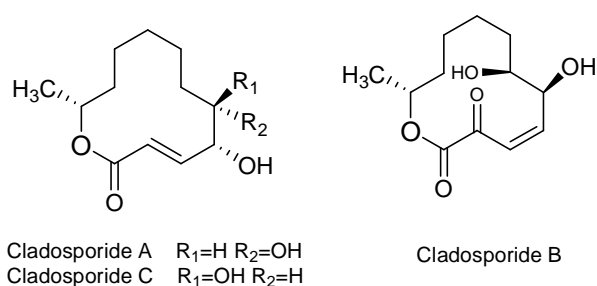


Figura 39. Macrolactonas fitotóxicas produzidas pelo fungo *Cladosporium tenuissium*.

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* é conhecido por causar danos em plantações de morango e uva. Ele produz uma fitotoxina, a gloeosporona cuja estrutura também é semelhante a do pentólido fitotóxico (Figura 40).⁷⁸

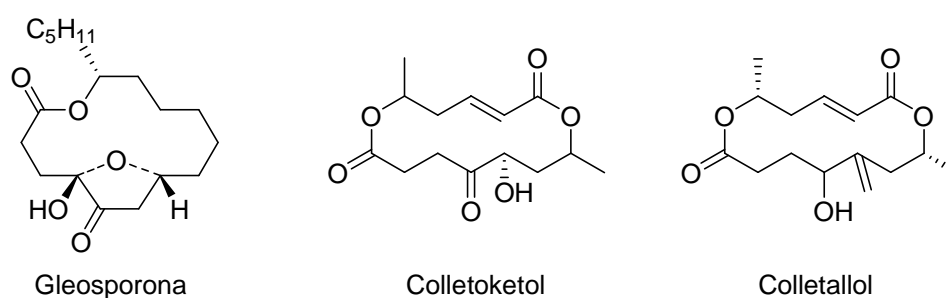


Figura 40. Macrolactonas produzidas pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*

4.6 - Monitoramento da produção do composto ativo por MRM

Resultados anteriores mostraram que a produção do metabólito bioativo pela bactéria 5B é dependente do tempo de fermentação. Em função desse fato achamos apropriado fazer um estudo mais detalhado para determinar o período em que a produção do metabólito bioativo é máxima. Esse estudo foi realizado por LC-

MS/MS, empregando os dados adquiridos no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas). O objetivo de aplicar essa metodologia foi monitorar a produção do composto fitotóxico de uma forma rápida, robusta, sensível e seletiva sem a necessidade de isolar o analito ou mesmo saber sua estrutura.

Neste modo de varredura, o íon precursor de interesse é selecionado no quadrupolo Q1, fragmentado em Q2 com gás de colisão, e um único íon fragmento é selecionado em Q3, como mostra a Figura 41.

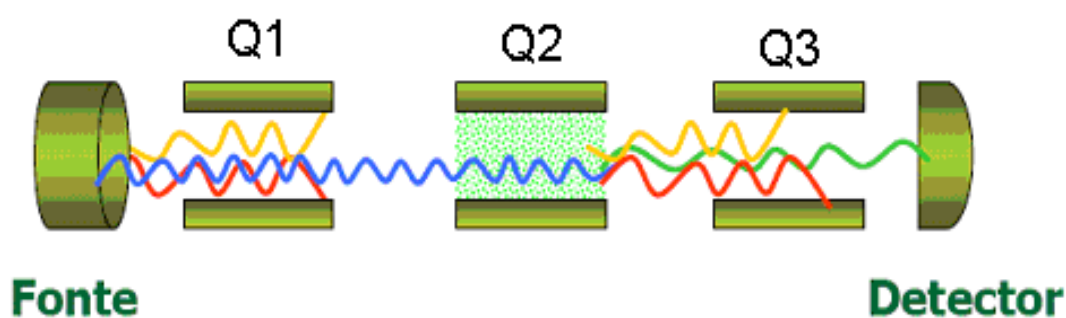


Figura 41. Esquema do experimento de MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

O cromatograma obtido neste modo de análise é muito mais simples, contendo apenas um pico cromatográfico referente ao canal selecionado pelo íon precursor e seu respectivo fragmento. Portanto, esse procedimento é ideal para a análise de compostos alvo em matrizes complexas.

A LC-MS/MS possui a vantagem de ser método extremamente sensível e seletivo para a determinação simultânea de metabólitos em pequenas quantidades de amostras que contêm concentrações baixas de analitos. Estudos anteriores de

produtos naturais empregaram o método SIR (Single Íon Recording) para o estudo de metabólitos secundários, mas esta metodologia apresenta algumas desvantagens como o aparecimento de “falsos positivos” e a supressão iônica, o que é comum na análise de amostras biológicas.⁷⁹

Para realizar o experimento, a bactéria foi cultivada em 25 ml de meio BD. Esta cultura foi empregada como pré-inóculo. As culturas para análise foram fermentadas em 11 alíquotas de 25 ml de meio BD, presentes em Erlenmeyers de 100 ml. Uma dessas alíquotas foi usada como branco e as outras foram inoculadas, com 1 ml do pré-inóculo, para garantir que todos os meios recebessem a mesma quantidade de células. O ensaio foi monitorado a cada dois dias, durante um período de 21 dias. Os extratos obtidos para cada ponto de análise foram diluídos em metanol para uma concentração final de 1000 µg/ml.

A análise cromatográfica desses extratos foi realizada em uma coluna de fase reversa Polaris C18 (5.0 x 20 mm) 5µ Varian. A fase móvel foi uma mistura de H₂O/ACN (90:10) e de acetato de amônio 10 mM e o fluxo foi de 0,2 ml/min no modo isocrático.

Os canais MRM foram selecionados com base nos espectros de fragmentação dos seus íons precursores. Assim, para o composto ativo, o íon precursor de m/z 431 foi selecionado no Q1, com uma voltagem do cone de 30 V. Este íon foi dissociado com uma energia de colisão de 15 eV em Q2 com argônio. Os fragmentos foram analisados em Q3, onde o sinal de m/z 155 foi selecionado por apresentar maior intensidade relativa, nessas condições. Com o objetivo de confirmar a presença do

composto ativo nos extratos, seu respectivo aduto sodiado também foi monitorado aplicando-se a mesma metodologia. A energia do cone foi de 45 V para a otimização do sinal de m/z 453. A energia de colisão foi de 25 eV, a qual apresentou o fragmento de m/z 281 como sendo o mais intenso.

A determinação da produção máxima do composto ativo foi realizada a partir do monitoramento dos canais referentes ao composto ativo protonado, e o mesmo composto cationizado com sódio para confirmar a presença do composto ativo no extrato bruto. Foram analisados simultaneamente os canais m/z 431 >155 e 453 > 281.

Podemos observar pelo LC-MS/MS referente ao canal m/z 431 >155 obtido pelo modo MRM (Figura 42), a alta seletividade para o canal selecionado, devido a presença de apenas um pico em t_R 3,35 min.

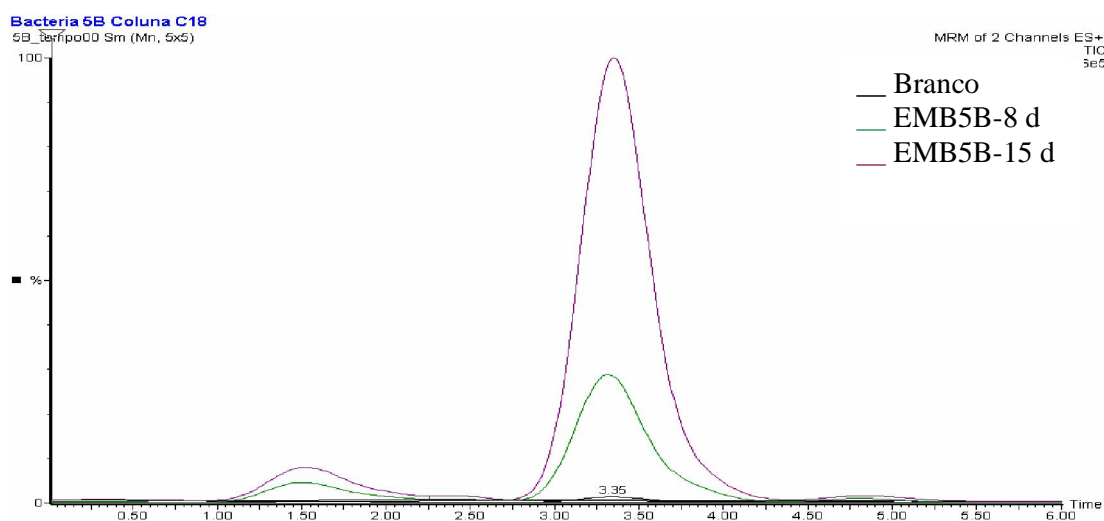


Figura 42. Cromatograma de LC-MS/MS (modo MRM), canal m/z 431>155, para a fermentação da bactéria EMB5B para o branco 8, 15 dias (meio BD).

Os dados do experimento foram analisados através de uma curva construída a partir das áreas dos cromatogramas obtidos para os canais selecionados em função do período de fermentação (Figura 43).

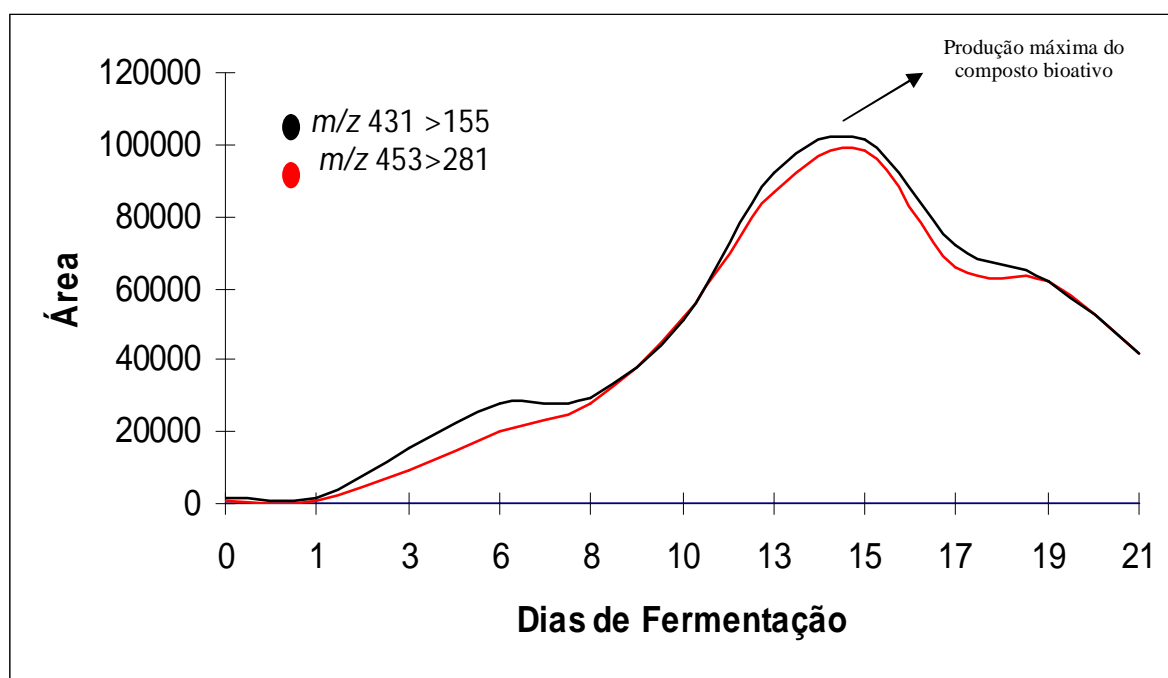


Figura 43. Monitoramento da produção do composto bioativo na fermentação da bactéria EMB5B em meio BD a 28°C.

Podemos observar no gráfico, a curva em preto é referente ao monitoramento do composto ativo protonado (canal m/z 431 >155) e a uma curva em vermelho é referente ao monitoramento do composto ativo sodiado (m/z 453 >281). O gráfico mostra que, em relação ao composto ativo a produção pela bactéria foi crescente do a partir do 1º dia até atingir seu máximo, aproximadamente no 14º dia. A partir do 15º dia, observa-se que o composto está sendo “consumido” uma vez que a curva sofre um declínio até o 21º dia de análise, ultimo dia de analise.

Através da análise desses dados foi possível definir com precisão o período ótimo de produção do metabólito bioativo pela bactéria EMB5B em aproximadamente 15 dias de fermentação. Este dado está em concordância com os resultados prévios obtidos para os bioensaios de fitotoxicidade, onde a atividade máxima do extrato foi observada entre o intervalo de 11 e 17 dias.

4.7 – Influência do meio de fermentação

Além do tempo de fermentação, a composição do meio de cultura também pode afetar a produção de metabólitos secundários pelos microrganismos. Desta forma, a influência do meio na produção do composto ativo também foi avaliada.

A biossíntese de metabólitos secundários freqüentemente está relacionada a algum tipo de carência nutricional e ocorre na ediofase do crescimento microbiano. Estas substâncias são derivadas de diferentes intermediários do metabolismo primário tem como precursores principais aminoácidos, ácidos chiquímicos, acetilCoA, ácido mevalônicos, polissacarídeos e peptídeossacarídeos. Muitos substratos de carbono ou nitrogênio que são rapidamente metabolizados e, conseqüentemente, promovem um crescimento celular máximo, podem inibir a produção de metabólitos secundários.⁸⁰ Em estudo realizado com *Streptomyces scabies*, Beaulieu e colaboradores⁸¹ mostraram que os aminoácidos triptofano e a fenilalanina quando presentes nos meios de cultura desse microrganismo são inibidores da produção da fitotoxina taxtomina A, enquanto que diversos

aminoácidos alifáticos não causam declínio significativo na produção da substância e modificações estruturais no triptofano promovem a síntese da toxina.

Neste estudo, a bactéria EMB5B foi fermentada em quatro diferentes meios de cultura: os meios líquidos BD, TSB, quinoa e aveia. Cada meio foi preparado em duplicata em Erlenmeyers de 250 ml, contendo em cada um 50 ml de meio.

Os extratos orgânicos dessas fermentações foram analisados por HPLC. Os quatro meios (BD, quinoa, TSB e aveia) foram submetidos a essas condições cromatográficas. Os experimentos foram realizados usando coluna CN (4.60 x 250 mm), Phenomenex; a fase móvel foi composta por uma mistura de H₂O/ACN10% e acetato de amônio 10 mM. A eluição foi isocrática e o fluxo foi de 1 ml/min. Os compostos foram visualizados no comprimento de onda 254 nm.

O estudo inicial do perfil químico dos extratos em diferentes meios foi feito por LC-UV. Os cromatogramas desses extratos e cromatograma referente a fração 1 são verificados na Figura 44.

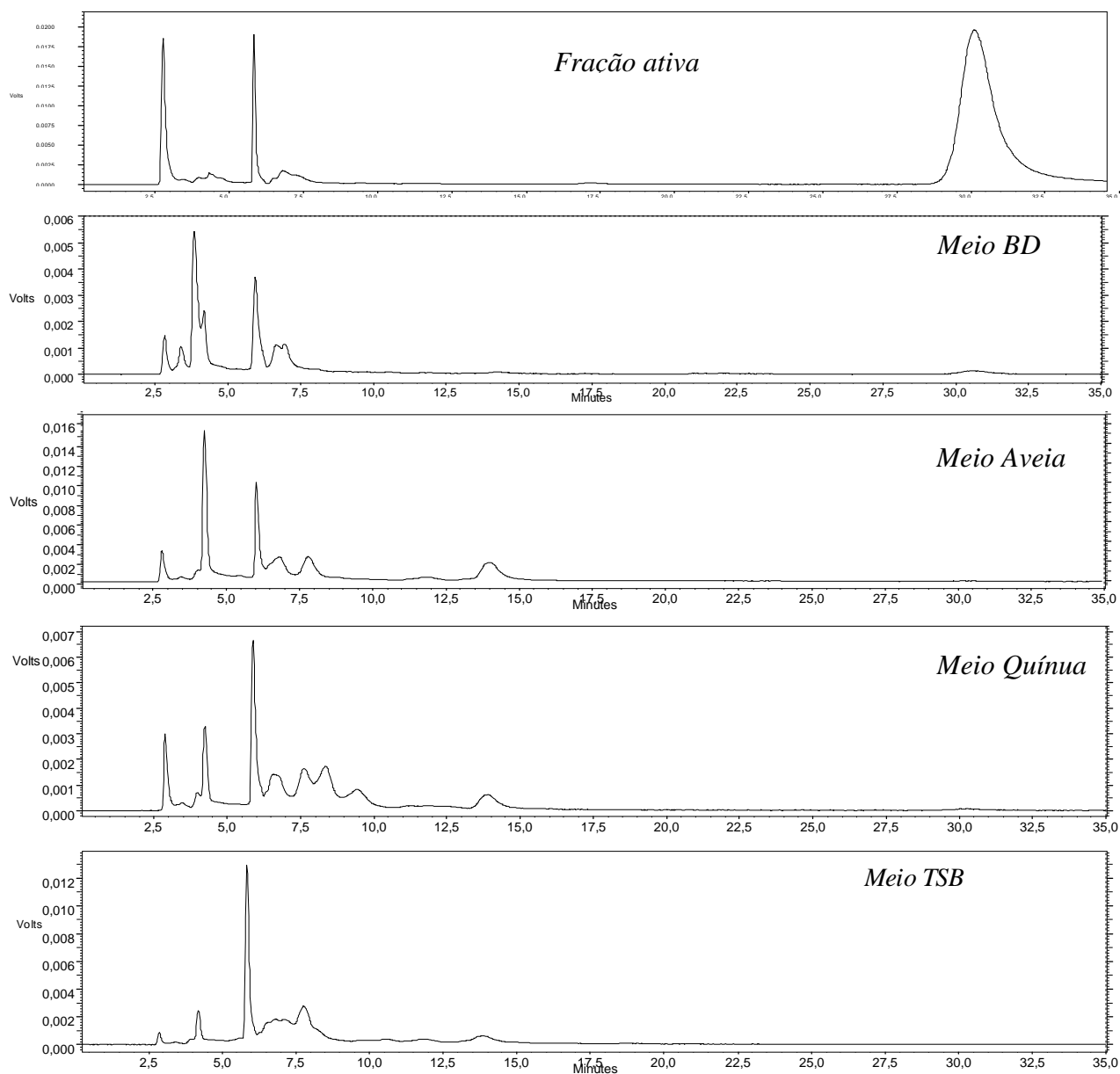


Figura 44. Cromatogramas de LC-UV da fração ativa e dos extratos EMB5B obtidos em meios BD, aveia, TSB e quínua. Fase móvel: H₂O/ACN10% e acetato de amônio 10 mM, coluna CN (4.60 x 250 mm), fluxo 1 ml/min e 254 nm.

Podemos observar pelo cromatograma do composto bioativo (Figura 44) um pico em t_R de 30 minutos. A partir desse cromatograma é possível identificar o pico referente ao composto ativo, em todos os extratos. Podemos verificar que somente no meio BD, ocorreu a produção do composto ativo. Para os outros meios não foi constatada a formação da fitotoxina com t_R 30 min.

4.8 – Considerações gerais sobre os PHBs

Polihidroxicanoatos (PHAs) são materiais de reserva intracelulares que são acumulados por vários microrganismos geralmente sobre condições nutricionais desfavoráveis como baixa demanda de nitrogênio, fósforo, oxigênio, magnésio ou potássio e na presença de excesso de fonte de carbono.⁸²

PHB é acumulado nas células como grânulos distintos protegidos por membranas. Esses compostos desempenham importantes funções. Além de serem matérias de reserva de energia das células, os PHBs também atuam como fonte de energia no processo de fixação simbiótica de nitrogênio por bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.⁸³ Também são encontrados nas células participando da regulação da concentração de cálcio e na sinalização desse íon.⁷³ Porém, a aplicação mais importante dos PHBs é como biopolímeros, utilizados atualmente, para substituir compostos derivados de petróleo.

Os PHBs são poliésteres bacterianos, que possuem as propriedades mecânicas semelhantes a do polipropileno e, por isso, têm sido empregados como

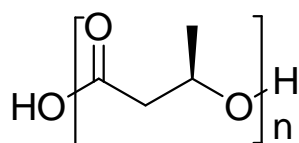
termoplásticos biodegradáveis para uma grande variedade de aplicações, uma vez que são degradados por enzimas ou por hidrólise.⁷⁴ Uma vez que esses materiais são produzidos por fontes renováveis e decompostos no ambiente, eles são menos danosos ao ambiente em relação aos materiais plásticos produzidos a partir do petróleo.

Recentemente, várias espécies de bactérias, como *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas oleovorans*, *Rhodospirillum rubrum* mostraram potencial na produção de PHBs.

De acordo com o número de átomos de carbono constituindo as unidades monoméricas os PHAs bacterianos podem ser classificados em 2 grupos: os PHA de cadeia curta com cinco ou menos átomos de carbono (SHL) e os PHAs de cadeia média com seis ou mais átomos de carbono (MCL).⁸⁴

4.9 - Desreplicação do extrato bruto da EMB5B

Também foram identificados nos extrato brutos EMB5B, outros polihidroxitiratos de baixo peso molecular, porém contendo cadeias abertas. Os espectros de massas apresentaram picos moleculares relativas às moléculas protonadas bem como os respectivos adutos sodiados. Foram identificados os compostos contendo de 3 até 6 unidades monoméricas, como mostra a Figura 45.



Os seguintes PHBs de cadeia aberta foram identificados:

- Trímero ($n=3$), o qual apresentou os íons moleculares de $C_{12}H_{22}O_8$ m/z 277,129 $[M+H]^+$ e m/z 299,111 $[M+Na]^+$ referente ao

- Tetrâmero ($n=4$), $C_{16}H_{28}O_{10}$ o qual apresentou os íons moleculares de m/z 363,165 $[M+H]^+$ e m/z 385,148 $[M+Na]^+$.

-Pentâmero ($n=5$), $C_{20}H_{32}O_{11}$ o qual apresentou os íons moleculares de m/z $[M+H]^+$ 449,202 e m/z + 471,184 $[M+Na]$.

-Hexâmero ($n=6$), $C_{24}H_{40}O_{14}$ o qual apresentou os íons moleculares de m/z 535,239 $[M+H]^+$ e m/z 557,221 $[M+Na]^+$.

Este resultado comprova a imensa contribuição da espectrometria de massas com fonte electrospray para a química de produtos naturais em especial na desrepliação de extratos brutos.

Amostra Tania- Bact'eria 5B- 5 dias
TANIA_5B-5D 17 (0,881) Cm (13:32)

Scan ES+
9,31e7

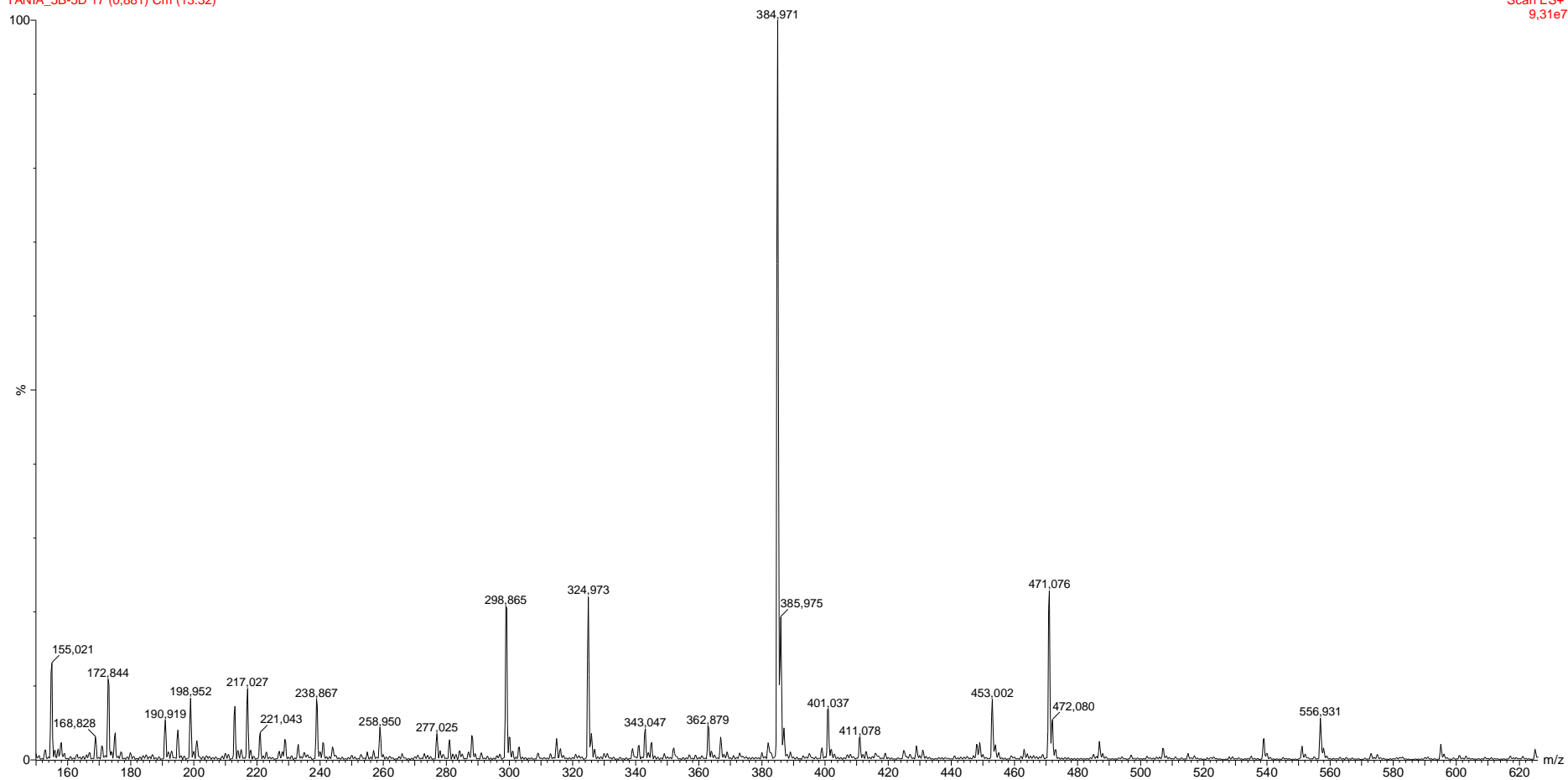


Figura 45. Espectros de massas ESI⁺ dos extratos orgânicos de EMB5B-5dias. Potencial do cone 55eV.

4.10 - Síntese do composto fitotóxico

A síntese do pentólido foi realizada a partir do ácido (R)-3-hidroxi-butírico e do ácido (S)-3-hidroxi-butírico seguindo procedimento descrito por Seebach.⁸⁵ Nesta etapa o principal objetivo foi o de avaliar a atividade fitotóxica do composto em relação aos diferentes oligômeros formados e sua configuração.

Os microrganismos são altamente estereoseletivos. Especificamente na via metabólica das bactérias para a produção de PHB, enzima PHA sintetase, envolvida na conversão de ácido graxo a polihidroxi-butirato é ativa somente para os isômeros R.⁸⁶

A Figura 46 apresenta o espectro de massas ESI-MS no modo positivo do bruto da reação por inserção direta via bomba de seringa. São observados os de sinais de m/z (M+H)⁺ 259, 345, 431, 517, 603, 689, 775 e 861. A diferença de massa observada para esses sinais é de 86 Da. Esses sinais foram atribuídos aos macrociclos com n=3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 unidades monoméricas.

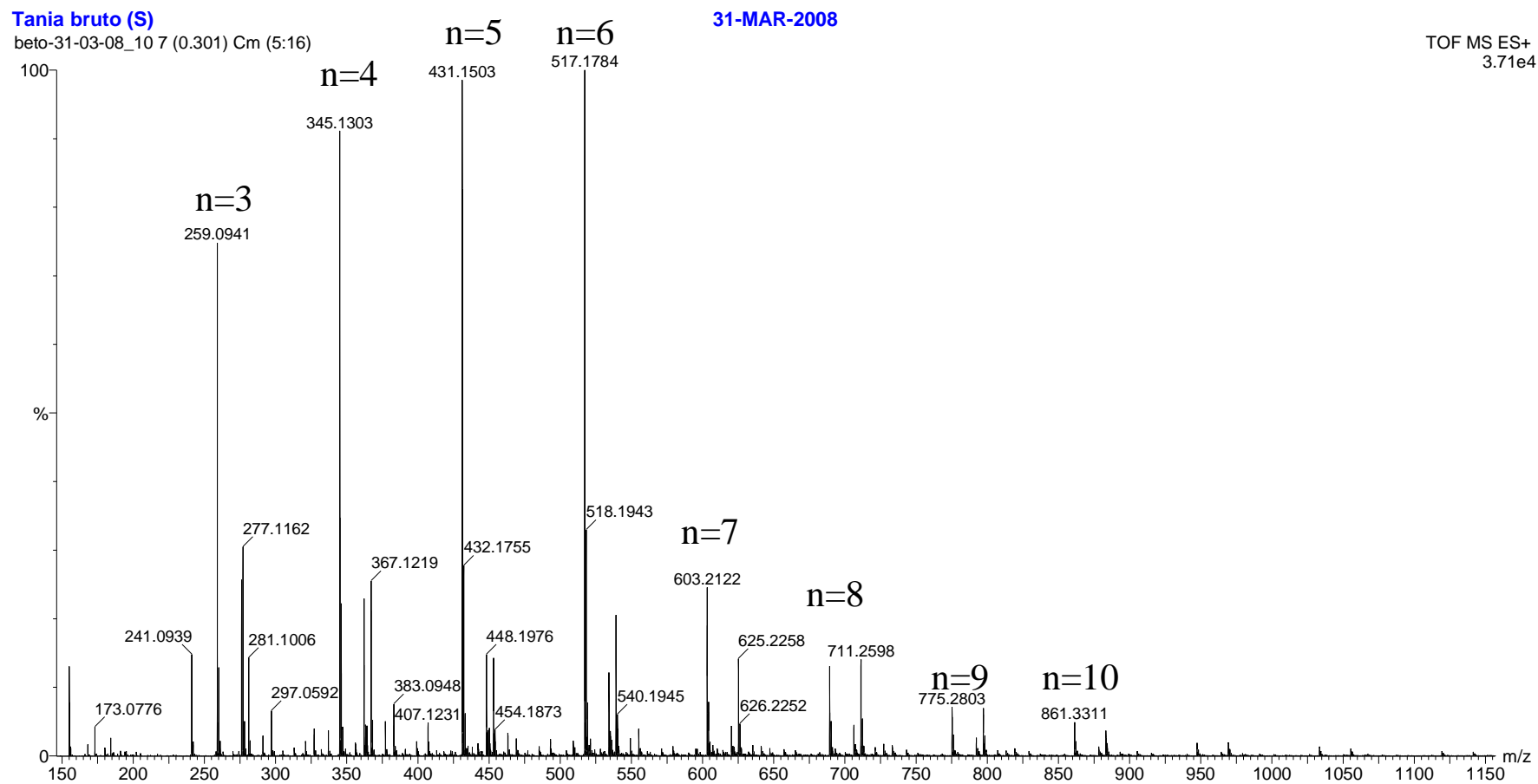


Figura 46. Espectro de massas ESI+ do bruto reacional da síntese do pentólido.

O bruto reacional também foi analisado por RMN¹³C. Seebach e colaboradores,⁸⁵ caracterizaram aos compostos cíclicos formados com base nos deslocamentos químicos característicos das carbonilas de cada um deles. Cada macrólido possui um deslocamento químico único e característico para cada átomo de carbono carbonílico, com o triólido em campo mais baixos e o decólido em campos mais altos. Seguindo esta metodologia os macrociclos formados foram identificados contendo 3, 4, 5, 6 e 7 unidades monoméricas, apresentando deslocamentos químicos de δ 170,3; δ 169,9; δ 169,6; δ 169,5; δ 169,4, respectivamente (Figura 47).

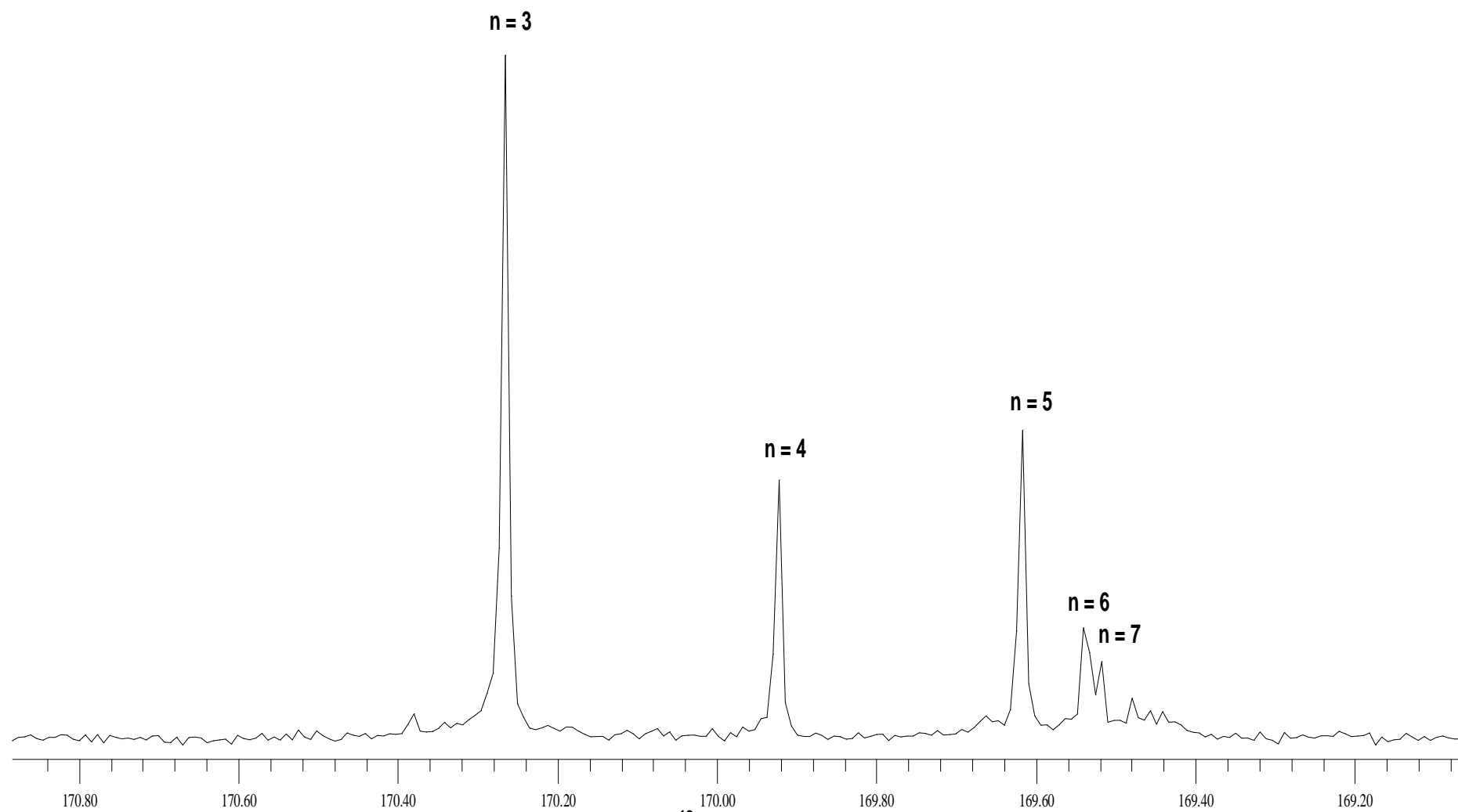


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C do bruto reacional obtido em 400MHz.

Comparando o resultado das análises do bruto reacional obtidos por ESI-MS e por RMN é observada uma diferença entre a quantidade de compostos que foram detectados, em cada uma dessas técnicas. Em relação ao espectro de massas foi possível identificar os ciclos contendo de 3 a 10 unidades de 3-(R)-hidroxibutirato. Já no espectro de RMN identificaram-se cinco oligômeros principais, os quais, são formados por 3, 4, 5, 6 e 7 unidades monoméricas.

Isso ocorre porque os anéis maiores podem não ser produtos da síntese da reação. Eles podem ser formados a partir dos oligômeros menores, especialmente na presença de traços de ácido ou base.⁶⁶ Como esse composto é facilmente ionizado, este pode ser detectado por ESI-MS mesmo quando presentes traços desses na amostra. No caso da espectroscopia de RMN, é uma técnica que depende da quantidade de amostra e é menos sensível do que a espectrometria de massas. Conseqüentemente, os compostos presentes em concentrações muito baixas não foram detectados, nessas condições de análise. Pela integração dos sinais é possível determinar os compostos que prevaleceram na síntese.

Os brutos reacionais, tanto para o ácido (R)-3-hidroxibutírico quanto para o ácido (S)-3-hidroxibutírico, foram submetidos à bioensaios de fitotoxicidade com *Lemna minor* e nenhum deles apresentou atividade. Este resultado pode estar relacionado ao fato da concentração do pentólido ser relativamente baixa na mistura reacional.

5 Conclusões

Podemos concluir que a metodologia empregada nesse trabalho para a identificação e isolamento de fitotoxinas foi desenvolvida com sucesso. O emprego da espectrometria de massas, em especial o ESI, em conjunto com bioensaio de fitotoxicidade com *Lemna minor* possibilitou a identificação de uma fitotoxina de uma maneira rápida e eficiente.

Além disso, a espectrometria de massas mostrou ser uma ferramenta eficiente para ser aplicada no monitoramento e otimização de processos fermentativos, devido a sua alta sensibilidade e seletividade, para o composto de interesse pelo emprego do modo de varredura MRM. Mesmo sem a caracterização estrutural do princípio ativo, foi possível monitorar a produção do analito, uma vez que era conhecida sua massa molecular e a massa do respectivo fragmento mais abundante.

O composto ativo identificado, um ciclopentólido da família dos PHBs, já foi previamente sintetizado, porém nunca foi isolado de fontes naturais, e é a primeira vez que sua atividade fitotóxica é relatada. Uma característica relevante desse composto é a capacidade de formar complexos com metais.

Em vista da atividade fitotóxica do pentólido e de suas características estruturais, acreditamos que o trabalho desenvolvido possa servir como modelo para a síntese de novas classes de herbicidas.

6 Referências Bibliográficas

1. ROESSNER, C. A.; AI, S.; "Genetically engineered synthesis of natural products: from alkaloids to corrins" - *Annual Review of Microbiology*; 50: 467-490, **1996**.
2. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; "Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years" - *Journal of Natural Products*; 66:1022-1037, **2003**.
3. DEMAIN, A. L.; "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms" - *Applied Microbiology and Biotechnology*; 52: 455-463, **1999**.
4. SAXENA, S.; PANDEY, K. A.; "Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium" - *Applied Microbiology and Biotechnology*; 55:395 – 403. **2001**.
5. VINNING, L.C.; "Functions of secondary metabolites" - *Annual Review of Microbiology*; 44:395-427, **1990**.
6. DREW, S. W.; "Effect of primary metabolites on secondary metabolism" - *Annual Review of Microbiology*; 31: 343-56, **1977**.
7. SANCHES, S.; DEMAIN, A. L.; "Metabolic regulation of fermentation processes" - *Enzyme and Microbial Technology*; 31:895-906, **2002**.
8. LI, Y.; SUN, Z.; ZHUANG, X.; XU, L.; CHEN, S; Li, M; "Research progress on microbial herbicides" - *Crop Protection*; 22: 247–252, **2003**.
9. MCFADYEN, R.E.C.; "Biological control of weeds"; *Annual review of entomology*; 43:369–93; **1998**.
10. VYVYAN, J. R.; "Allelochemicals as leads of new herbicides and agrochemicals" - *Tetrahedron*; 58:1631-1646, **2002**.
11. MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; In: Controle Biológico, Embrapa: p. 1- 121, **2000**.
12. BASILEA, A.; SORBOA, U. S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANOC, D.; CASTALDO, R.; COBIANCHA; VUOTTO; C. M. L.; FERRARAC, L.; "Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves" - *Fitoterapia*; 71:110-116, **2000**.
13. MACIAS, F. A.; VARELA, R. M.; TORRES, A. M.; OLIVA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G.; "Bioactive norsesquiterpenes from *Helianthus annuus* with potential allelopathic activity" - *Phytochemistry*; 48: 631-636, **1998**.
14. LANGE, L., LOPEZ, C. S. Microorganisms as a source of biologically active secondary metabolites. In: COPPING, L. G. Crop protection agents from nature. Cambridge: p. 1-20, **1996**.

15. DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; RIMANDO, A. M.; "Natural products as sources of herbicides: current status and future trends" - *Weed Research*; 40:99-111; **2000**.
16. STRANGE, R. N.; "Phytotoxins produced by microbial plant pathogens" - *Natural Products Reports*; 24:127-144, **2007**.
17. STEWARD, W. W.; "Isolation and proof of structure of wildfire toxin."- *Nature*; 229:174-178, **1971**.
18. GREAVES, M. P.; Microbial herbicides: Factors in development,. In COPPING, L.G. Crop protection agents from nature. Cambridge: p. 444-467, **1996**.
19. DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; RIMANDO, A. M.; "Natural products as sources of herbicides: current status and future trends" - *Weed Research*; 40:99-111; **2000**.
20. VANMIDDELSTORTH, F.; CANNELL, R. J. P.; Dereplication and partial identification of natural products. In: CANNELL, R. J. P., *Natural Products Isolation*. Humana Press: p. 279-327, 1998.
21. GRABLEY, S.; THIERICKE, R.; "The impact of natural products in drug discovery"; *Drugs discovery from nature*; Ed. Springer, NY, p. 3-37, **1999**.
22. W.M.A. NIESSEN, J. VAN DER GREEF, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Marcel Dekker, N Y, **1992**.
23. HOSTETTMANN, K., DOMON, B., SCHAUFELBERGER, D., HOSTETTMANN, M., J. "Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents" - *Journal of Chromatography A*, 794: 299-316, **1998**.
24. LEE, M. S.; KERNS, E. H.; "LC/MS applications in drug development" - *Mass Spectrometry Reviews*, 18:187-279, **1999**.
25. NIESSEN, W. M. A; Greef, J.; "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Principles and Applications", Marcel Dekker, NY, **1992**.
26. BITZER, J.; KÖPCKE, B.; STADLER, M.; HELLWIG, V.; JU, Y.; SEIP, S.; HENKEL, T.; "Accelerated Dereplication of Natural Products, Supported by reference libraries"- *Natural Products In drug discovery* 61: 332-338, **2007**.
27. HOSTETTMANN, K., WOLFENDER, J.-L., "Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents" - *Journal of Chromatography A*, 794: 299-316, **1998**.
28. ZHOU, S., HAMBURGER, M.; "Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces" - *Journal of Chromatography A*; 755:189-204, **1996**.
29. NIESSEN, W.M.A; "Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening" - *Journal of Chromatography A*; 1000:413-436, **2003**.
30. NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD J.; "Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology"-*Journal of Chromatography A*; 1002:111-136, **2003**.
31. AYER, S. W.; ISAAC, B. G; LETENDRE, L. J.; STONARD, R. J.; Herbicidal nucleosides from microbial sources- *The Journal of the antibiotics*; 44: 729-732, **1991**.
32. LARSEN, T.O.; SMESDGAARD, J.; NIELSEN, K.F.; HANSEN, M.E.; FRISVAD, J. C.; "Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery" - *Natural Products Reports*; 22:672

- 695; **2005**.
33. BUSS, A. D.; BUTLER, M. S.; “A new model for utilising chemical diversity from natural sources” *Drug Development Research*, 62:362-370, **2004**.
 34. WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K.; “Liquid chromatography with ultraviolet absorbance–mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites” - *Journal of Chromatography A*; 1000:437–455, **2003**.
 35. STONARD, R. J.; WIDEMAN, M. A.; Herbicides and Plant Growth Regulators, In: GODFREY, C. R. *Agrochemicals from natural products*, Dekker: p. 285-311, **1994**.
 36. DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; “Investigating the mode of action of natural phytotoxins” - *Journal of Chemical Ecology*, 26:2079-2094, **2000**.
 37. ROST, T. L.; HESS, F. D.; Analysis of the mitotic index in root tip meristems as a tool to determine herbicide cell cycle specificity; In: BOGER, P.; Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds. Lewis Publishers: p.185-287, **1992**.
 38. FAIRCHILD, J. F.; RUESSLER, D. S.; HARVERLAND, P. S.; CERLSON, A. R.; “Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*”; 32:353-357, **1997**.
 39. RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M., I.; THOMSEN, W. J.; in “*Bioassay Techniques for Drug Development*”; Hardwood academic publishers, p. 109-113, **2001**.
 40. WANG, W.; “Literature Review on Duckweed Toxicity Testing”- *Environmental Research*; 52:7-22, **1990**.
 41. HULSEN, K; MINNE, V.; LOOTENS, P.; VANDECASTEELE, P; HOFTE, M.; “A chlorophyll *a* fluorescence-based *Lemna minor* bioassay to monitor microbial degradation of nanomolar to micromolar concentrations of linuron” - *Environmental Microbiology*, 4:327–337, **2002**.
 42. PUYVELDE, L. V.; BOSSELAERS, J. C.; STEVENS, C.; KIMPE, N. D.; GESTEL, J. V.; DAMME, P. V.; “Phytotoxins from the Leaves of *Laggera decurrens*” - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 1116 – 1119, **1999**.
 43. BUSSE, H. J., DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W; “Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematic” - *Journal of Biotechnology*; 47: 3- 38, **1996**.
 44. American Society for Testing and Materials (1993) “Standard Guide for conducting toxicity tests with *Lemna Gibba*” .In: Annual book of ASTM standards: American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, p. 1232.
 45. SHIMABUKURO, R. H.; SWANSON, H. R.; “Atrazine Metabolism, Selectivity, and Mode of Action” - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 17: 199-205, **1969**.
 46. SARMA, B. K.; SINGH, U. P.; “Ferulic acid may prevent infection of *Cicer arietinum* by *Sclerotium rolfsii*” - *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; 19:123-127, **2003**.
 47. STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. “Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.”- *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 44:846-849, **1994**.
 48. MCLOUGHLIN, T. J., QUINN, J. P., BETTERMANN, A., BOOKLAND, R.; “*Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease.”

- *Applied and Environmental Microbiology*; 58:1760–1763, **1992**.
49. HEBBAR, P.K.; MERTEL, M.H.; HEULIN, T.; “Suppression of pre- and postemergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*.” - *European journal of plant pathology*; 104: 29–36, **1998**.
 50. VAN, V. T.; BERGE, O.; NGO KE, S., BALANDREAU, J., HEULIN, T. “Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam” - *Plant and Soil*; 218: 273–284, **2000**.
 51. PARKE, J.L.; RAND, R.E.; JOY, A.E.; KING, E.B.; Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Disease* 75:987–992, **1991**.
 52. BOWERS, J.; PARKE, J.; “Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control.” – *Phytopathology*; 83:1466–1473, **1993**.
 53. PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWERCK, C.; “Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production” – *Nature*; 437:884–888, **2005**.
 54. KIRSCHERLACH, K.; PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; DAHSE, H. M.; HERTWECK, C.; “Antimitotic Rhizoxin Derivatives from a Cultured Bacterial Endosymbiont of the Rice Pathogenic Fungus *Rhizopus Microspores*” - *Journal of the American Chemical Society*; 128:11529-11536, **2006**.
 55. DUKE, S. O.; DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; “Investigating the mode of action of natural phytotoxins” - *Journal of Chemical Ecology*, 26:2079-2094, **2000**.
 56. PIEL, N. J.; “Metabolites from symbiotic bacteria”- *Natural Products reports*; 21:519-538, **2004**.
 57. YUHASHI, K.; ICHIKAWA, N.; EZURA, H.; AKAO, S.; MINAKAWA, Y.; NUKUI, N.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K.; “Rhizobitoxine Production by *Bradyrhizobium elkanii* Enhances Nodulation and Competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*” – *Applied and environmental microbiology*, 66: 2658–2663, **2000**.
 58. SMEDSGARD, J.; FRISVAD, J.C.; “Using direct mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts” - *Journal of Microbiological Methods*; 25, 5-17, **1996**.
 59. JULIAN, R. K.; Jr., R. E. HIGGS, R. E.; GYGI, J. D.; HILTON, M. D.; “A Method for quantitatively differentiating crude natural extracts using high-performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry” - *Analytical Chemistry*; 70: 3249-3254, **1998**.
 60. HIGGS, R.; ZAHN, J. A.; GYGI, J. D.; HILTON, M. D.; “Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts” - *Applied and environmental microbiology*, 67: 371-376, **2001**.
 61. CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; “Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular” - *Química Nova*, 29: 287-292, **2006**.
 62. PAVIA, L.D.; LAPMAN, G. M.; In: Introduction to Spectroscopy, Harcourt Brace & Company, NY, **1996**.
 63. BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M.; “Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos” - *Química Nova*, 30:409-414, **2007**.
 64. KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D.; “Separation and characterization of surfactin of isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105” - *Journal of*

Colloid and Interface Science, 204, 1-8, **1998**.

65. INANAGA, J.; HIRATA, K.; SAEKI, H.; TSUTOMU, K.; YAMAGUSHI, M.; "A rapid esterification by means of mixed anhydride and its application to large ring lactonization"- *Bulletin of the chemical society of Japan*; 52: 1989-1993, **1979**.
66. SEEBACH, D.; BRANDLI, U.; SCHNURRENBERGER, P.; "High-Yield synthesis of 20-, 24- and 28-membered macropentolide, -hexolide and -heptolide, respectively, from (R) - or (S) - 3-hydroxybutanoic acid under Yamaguchi's macrolization conditions." *Helvetica Chimica Acta*, 71: 155-167, **1988**.
67. DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; NAKAMURA, Y.; KUNIOKA, M. "Nuclear Magnetic Resonance Studies of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polyphosphate Metabolism in *Alcaligenes eutrophus*" – *Applied and environmental microbiology*; 55: 2932-2938, **1989**.
68. HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y.; "Recovery and Characterization of Poly (3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*" - *Applied and environmental microbiology*; 61: 34–39; **1995**.
69. MISRA, A. K.; THARKUR, M. S.; SRINIVAS, P.; KARANTH, N. G.; "Screening of poly- γ -hydroxybutyrate-producing microorganisms using Fourier transform infrared spectroscopy"- *Biotechnology Letters*; **22**:1217–1219, **2000**.
70. DUKE, S.O.; "Overview of Herbicide Mechanisms of Action" – *Environmental Health Perspectives*. 87:263-271, **1990**.
71. DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O.; "Investigating the mode of action of natural phytotoxins"- *Journal of Chemical Ecology*, 26: 2079-2094, **2000**.
72. LIN, W. O.; NETO, J. T. X. B.; "Agentes complexantes: podante, coronante e criptante, classificação e nomenclatura" - *Química Nova*; 21: 630-634, **1998**.
73. SEEBACH, D.; BÜRGER, H. M.; "Cation transport across bulk liquid organic membranes with oligomers of (R)-3-hydroxybutanoic acid", *Helvetica Chimica Acta*; 76: 94-97, **1993**.
74. ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A.; "Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalcanoates"- *Microbiological Reviews*; 54:450-472, **1990**.
75. PRESSMAN, B. C.; "Biological applications of ionophores"- *Annual Review of Biochemistry*; 1976.45:501-530.
76. SEEBACH, D.; BRANDLI, U.; MULLER, H. S.; DOBLER, M.; EGLI, M.; "On the Macrolactonization of β -Hydroxy Acids. Crystal structures of the pentolide and the hexolide from (R)-3-hydroxybutanoic acid. Molecular modeling studies of the tetrolide."- *Helvetica Chimica Acta*; 72:1704 - 1717, **1989**.
77. HAMASAKI, T.; FUJII, Y.; FUKUDA, A.; ICHIMOTO, I.; NAKAJIMA, H.; "Twelve-membered lactones produced by *Cladosporium tenuissimum* and the plant growth retardant activity of Cladosporide B"- *Phytochemistry*; 40: 1443-1446, **1995**.
78. PAJON, C. M. G. P.M.; COLLADO, I. G.; "Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species" - *Natural Product Reports*; 20:426–431, **2003**.
79. PEUNTE, P. F.; SÁEZ, M. J. F.; HAMILTON, B.; LEHANE, M.; RAMSTAD, H.; FERREY, A.; JAMES, K. J.; "Rapid determination of polyether marine toxins using liquid chromatography–multiple tandem mass spectrometry" - *Journal of Chromatography A*; 1056: 77–82, **2004**.

-
80. GALLO, M.; KATZ, E.; "Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose" - *Journal of Bacteriology*; 109:659-667, **1972**.
 81. LAUZIER, A.; GOYER, C; RUEST, L.; BRZEZINSKI, R; CRAWFORD, D. L.;BEAULIEU, C; "Effect of amino acids on thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces scabies*" - *Canadian Journal Microbiology*; 48:359-364; **2002**.
 82. DAWES, E. A., SENIOR, J.P; "The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms." - *Advanced Microbial Physiology*;10:135-266, **1973**.
 83. EMERICH, D.W.; KARR, D. B.; WATERS, J. K.; SUZUKI,F.; "Enzymes of the Poly-,b-Hydroxybutyrate and Citric Acid Cycles of *Rhizobium japonicum* Bacteroids"- *Plant Physiology*; 75:1158-1162, **1984**.
 84. ANNUAR, M. S. M.; TAN, I. K. P.; IBRAIN, S.; RAMACHANDRAN, K. B.; "Production of medium-chain-length poly (3- hydroxyalkanoates) from crude fatty acids mixture by *Pseudomonas putida*" - *Food and Bioproducts Processing*; 85:104-109, **2007**.
 85. SEEBACH, D; PLATTNER, D. A.; BRUNNER, A.; DOBLER, M.; MÜLLER H. M.; PETTER, W; ZBINDEN, P.; "Cyclic oligomers of (R)-3-hydroxybutanoic acid: preparation and structural aspects" - *Helvetica Chimica Acta*;76:2004-2033, **1993**.
 86. TAGUCHI, K.; TAGUCHI, .S.; SUDESH, K; MAEHARA, A.; TSUGE, T; DOY, Y.; Metabolic pathways and engineering of PHA biosynthesis. In: DOI, STEINBÜCHEL; *Biotechnology of Biopolymers* , Wiley-V, p. 161-191, **2005**.