UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var.
thermoidea, visando produção e isolamento de metabólitos
secundários biologicamente ativos**

Willian Jonis Andrioli

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var.
thermoidea, visando produção e isolamento de metabólitos
secundários biologicamente ativos**

Willian Jonis Andrioli

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Andrioli, Willian Jonis

Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos. Ribeirão Preto, 2008.

113 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Humicola grisea*. 2. Antibióticos. 3. Metabólitos secundários.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Willian Jonis Andrioli

Título do Trabalho: Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho,

Aos meus amados pais Lea e Jaime pelo amor, carinho e orientação desde os meus primeiros passos. Aos meus irmãos Gabriela e Ronald, pela cumplicidade e amizade.

À minha querida Cláudia, pelo amor, carinho e compreensão
dedicados em todos os momentos desde que nos conhecemos.
Vale muito a pena viver ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, pela orientação, confiança,
amizade e por contribuir para minha formação pessoal e
humana. Tenha minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Grande é minha lista de agradecimentos, o que me torna uma pessoa de sorte.

A Deus pela força, coragem e luz destinadas a mim e por ter colocado em meu caminho as pessoas certas.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa pela colaboração e amizade.

Aos Técnicos de Laboratório Walter Lopes e Mário, pela colaboração, disponibilidade e pela alegria de sempre.

À Profa. Dra. Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado, a “Ni”, uma pessoa fantástica, de mil virtudes e que está sempre disposta a ajudar.

À Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo, pela colaboração e disponibilidade em ajudar.

À Profa. Dra. Suraia Said, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pela gentileza de haver fornecido o fungo com o qual o trabalho foi desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ambrósio, pelas dicas.

Ao Prof. Dr. Vladimir Constantino Gomes Heleno, pela obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

À Virgínia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela atenção e obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear.

Aos meus amigos e irmãos de República, Tony Márcio (Beraba), André, Maller e Guzão, vocês foram incríveis.

Novamente aos meus grandes amigos André e Maller pelos bons momentos que já passamos e com certeza, ainda construiremos muitas histórias para contar. Vocês estarão em todos os meus agradecimentos.

Aos amigos Fausto, Nilmar, Lobão e André, pela amizade sincera e para todas as horas.

Aos amigos do Laboratório: João Paulo, Niltinho, Bruno Minero, Ana Paula, Rejane, Ana Sílvia, Bob, Ramon, Renata, Luciano, Verônica, Iara e Wanessa, pela convivência agradável, muitos momentos de descontração e colaborações.

Agradecimentos especiais a João Paulo e Niltinho pela grande ajuda, suprimindo minhas dúvidas a todo momento.

As amigas Vivian Benassi, Vivian Cipriano e Ernna, quantas histórias.

Ao meus queridos amigos, Jão e Juliano, pelos vários momentos de descontração e disponibilidade.

A todos os agregados da República.

À Coordenação da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e as funcionárias Ana, Eleni e Rosana, pela atenção e paciência.

Às secretarias Sônia, Lílian e Ruth do Departamento de Ciências Farmacêuticas pelo auxílio em vários momentos e pela amizade.

À CAPES, CNPq e pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

Aos demais professores que com sua dedicação me ajudaram em minha formação e a abrir novos horizontes. Sempre que precisei me estenderam uma mão amiga.

A todos vocês que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho os meus mais sinceros AGRADECIMENTOS.

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo, fazer da queda um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte, da procura, um encontro."

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de abreviaturas	viii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.1 BIOTECNOLOGIA E MICOTECNOLOGIA	1
1.2 ANTIBIÓTICOS	5
1.3 AGENTES ANTITUMORAIS	8
1.4 AGENTES HIPOCOLESTEROLÊMICOS	8
1.5 <i>Humicola grisea</i> variedade <i>thermoidea</i>	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 MANUTENÇÃO DO ESTOQUE	12
3.2 OBTENÇÃO DAS BIOMASSAS EM MEIO LÍQUIDO PRÉ –FERMENTATIVO ...	12
3.3 PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS EM MEIO FERMENTATIVO LÍQUIDO.....	13
3.4 PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS EM MEIO FERMENTATIVO SÓLIDO.....	13
3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	14
3.5.1 Obtenção dos extratos do meio líquido.....	14
3.5.2 Obtenção dos extratos em meio sólido.....	15
3.6 ANÁLISE QUALITATIVA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	15
3.7 AUMENTO DA ESCALA FERMENTATIVA	16

3.8 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS OBTIDOS EM ESCALA AMPLIADA	16
3.8.1 Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (1700 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo	18
3.8.2 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (4600 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo	20
3.8.3 Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (4000 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo	22
3.8.4 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (3750 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo	24
3.9 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE	26
3.9.1 Cromatografia líquida a vácuo	26
3.9.2 Cromatografia em placa preparativa.....	26
3.9.3 Cromatografia “Flash”	27
3.9.4 Técnica de Cristalização	27
3.9.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	27
3.9.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Reciclante (CLAE-R).....	28
3.10 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	28
3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA	29
3.11.1 Dissolução dos extratos	29
3.11.2 Microrganismos indicadores	29
3.11.3 Detecção da atividade antimicrobiana	30
3.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA – Concentração Inibitória Mínima (CIM)	31
3.12.1 Preparo das amostras	31
3.12.2 Microrganismos utilizados	31
3.12.3 Preparo do inóculo	31
3.12.4 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de meio líquido e meio sólido de arroz.....	32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Obtenção de biomassa em meio pré-fermentativo	33
4.2. Produção de metabólitos em meio fermentativo líquido	33
4.3. Produção de metabólitos em meio fermentativo sólido	35
4.4. Produção de metabólitos antimicrobianos	41
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	42
4.5.1. Técnica de Bioautografia	42
4.5.2. Técnica de Microdiluição em Microplaca – Concentração Inibitória Mínima	48
4.6. Comparação dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência	49
4.7. Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (1700 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.....	54
4.8. Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (4600mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.....	55
4.9. Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (4000 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.	58
4.10. Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (3750 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.	66
4.11. Elucidação estrutural das substâncias isoladas	68
4.12. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	78
5. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICES	93
ANEXO	99

RESUMO

ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos.** 2008. 113f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* foi submetido a diferentes condições de cultivo com o intuito de determinarem-se as melhores condições para produção de conídios, crescimento e produção de metabólitos secundários com atividade biológica. Para tal foram desenvolvidos experimentos avaliando dois parâmetros: meio fermentativo e tempo de incubação. Os meios fermentativos líquidos utilizados foram Czapek, Jackson e Vogel em condições de agitação (120 rpm), e os tempos avaliados foram 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas. Também foi desenvolvida cultura por fermentação em substrato sólido, meio de arroz enriquecido, em diferentes tempos de incubação, sendo escolhido o período de 60 e 90 dias como os mais promissores. Todos os cultivos foram realizados em temperatura de 40°C. Dos cultivos em meio líquido foram obtidos extratos acetoetílicos e butanólicos dos filtrados das culturas e metanólicos dos micélios. Dos cultivos a partir do meio sólido foram obtidos extratos acetoetílicos. Os extratos foram avaliados pela técnica de bioautografia na concentração de 30 mg/mL (10 µL), utilizando-se como indicadores biológicos as cepas *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885). Os extratos acetoetílicos e metanólicos obtidos a partir dos cultivos em Czapek e Vogel, nos tempos 144, 168 e 192 horas se mostraram ativos contra as cepas *K. rhizophila* e *S. aureus*. Os extratos obtidos do meio sólido e o extrato acetoetílico (192 horas) obtido do meio de cultivo de Czapek foram avaliados pelo método de microdiluição em microplaca com o objetivo de determinarem-se os valores de CIM, utilizando como microrganismos indicadores *K. rhizophila* e *S. aureus*. O extrato mais promissor foi o extrato acetoetílico do cultivo em meio de arroz enriquecido, durante 90 dias, sendo os valores de concentração inibitória mínima de 350 µg/mL e de 250 µg/mL, contra *S. aureus* e *K. rhizophila*, respectivamente. Os extratos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo a princípio considerados promissores os extratos em acetato de etila de Czapek e arroz enriquecido. O fungo foi cultivado em arroz (60 e 90 dias), devido ao maior rendimento, manejo mais simples, menores valores de concentração inibitória mínima quando comparados aos cultivos desenvolvidos nos meios fermentativos líquidos avaliados. Deste modo, foi promovida ampliação da escala de cultivo em meio sólido e os extratos obtidos foram submetidos a processos cromatográficos visando o isolamento de substâncias ativas. Foram isoladas seis substâncias, e elucidadas três: dimetil tereftalato, ácido *p*-hidroxifenilacético e uma lactama, a qual foi isolada pela primeira vez de fungos e havia sido isolada apenas da esponja marinha (*Halichondria melanodocia*) infestada por alga. Os resultados dos ensaios de microdiluição em microplaca de tais substâncias se mostraram bastante discretos. Entretanto, outros ensaios biológicos, dentre eles, antitumorais e antiparasitários serão realizados para as substâncias isoladas.

Palavras chave: *Humicola grisea* var *thermoidea*. Antibióticos. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

ANDRIOLI, W. J. **Otmization of the growth conditions for *Humicola grisea* var. *thermoidea*, aiming the production and isolation of biologically active secondary metabolites.** 2008. 113f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* was submitted to different growth conditions, aiming to determine the best condition for the conidia production, mycelia growth and production of secondary metabolites bearing biological activities, as well. For that, it was evaluated both deferent fermentative media (Czapek, Jackson and Vogel) and incubation time (72, 96, 120, 144, 168 e 192 hours), under 120 RPM. The fungus was also cultivated in solid medium using enriched rice in different times of incubation in two batches of 60 and 90 days of fermentation. All fermentations were undertaken at 40°C. From the fermetation in liquid media it was obtained the extracts in ethyl acetate and n- butanol, from the broth, respectively, and in methanol from the mycelium. From the solid media (rice) it was obtained the ethyl acetate extract. The obtained extracts were submitted to bioautography assay by applying 10 µL of a solution containing 30 mg/mL of each extract against the following bacteria strains: *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885). The extracts em ethyl acetate and methanol obtained from from Czapek and Vogel media at 144, 168 e 192 hours displayed activity against *K. rhizophila* and *S. aureus*. The extracts obtained from the solid medium and the ethyl acetate extract from the Czapek nedium at 192 hours were evaluated using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in microplates, aiming to determine the MIC values for these extracts against both *K. rhizophila* and *S. aureus*. The most active extract (ethyl acetate) was the one obtained from solid media cultivated for 90 days, furnishing the MIC values of 350 µg/mL and 250 µg/mL against *S. aureus* and *K. rhizophila*, respectively. All the obtained extracts were submitted to HPLC chromatography and the best chromatographic profiles were displayed by both ethyl acetate extracts from Czapek and enriched rice media. The cultivation in rice media was simple and produced the highest yield of extract, as well as displayed the lowest CIM in comparison with the extracts obtained from the broth of liquid media. Therefore, the fungus was cultivated in a larger scale in rice aiming to obtain enough amount of ethyl acetate extract to allow the isolation of the major active compounds by chromatographic means. Thus, six compounds were isolated, from which three were identified so far: dimethyl tereftalate, *p*-hidroxyphenylacetic acid and the one lactam. The lactam was isolated for the firs time from a soil fungus, and it was previous isolated only from a marine sponge (*Halichondria melanodocia*) infested by algae. However, the obtained MIC values for these compounds were very high. Even though, other biological assays, such as: anticancer and antiparasitic, among other will be undertaken to evaluate the potential of the isolated compounds.

Keywords: *Humicola grisea* var *thermoidea*. Antibiotics. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Humiculona, tetralona citotóxica de <i>Humicola grisea</i>	10
Figura 2. Esquema de partição dos cultivos em arroz - 60 e 90 dias	18
Figura 3. Bioautografia dos extratos acetoetílicos obtidos do cultivo em meio fermentativo de Czapek do fungo <i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i> contra <i>Kocuria rhizophila</i>	48
Figura 4. Bioautografia dos extratos em acetato de etila obtidos do cultivo em meio fermentativo de Vogel do fungo <i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figura 5. Cromatogramas dos extratos acetoetílicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Arroz	50
Figura 6. Cromatogramas dos extratos acetoetílicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Czapek	51
Figura 7. Cromatogramas dos extratos acetoetílicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Jackson	52
Figura 8. Cromatogramas dos extratos acetoetílicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Vogel	53
Figura 9. Esquema geral de fracionamento do extrato diclorometânico - cultura de 60 dias	55
Figura 10. Esquema geral de fracionamento do extrato acetoetílico - cultura de 90 dias	58
Figura 11. Análise de grau de pureza em CLAE – Substâncias H3 e H4	61
Figura 12. Cromatograma de fração acetoetílica obtida de cromatografia “flash”	61
Figura 13. Cromatograma de fração obtida de cromatografia preparativa	62
Figura 14. Cromatograma de CLAE-R – substância H1	63
Figura 15. Cromatograma de CLAE-R – substância H2	63
Figura 16. Cromatograma de CLAE-R – substância H3	64
Figura 17. Cromatograma de CLAE-R – substância H3	64
Figura 18. Verificação do grau de pureza em CLAE – Substâncias H1, H2 e H3	65

Figura 19. Esquema geral de fracionamento do extrato diclorometânico - cultura de 90 dias.....	66
Figura 20. Verificação do grau de pureza em CLAE – Substância H4	67
Figura 21. Fragmento 1 com as respectivas correlações observadas no mapa de contornos HMBC	69
Figura 22. Fragmento 2 com as respectivas correlações observadas no mapa de contornos HMBC, em cor azul as correlações dos hidrogênios em δ 3,94	70
Figura 23. Lactama isolada de <i>Halichondria melanodocia</i> e produzida por <i>Humicola grisea</i> var <i>thermoidea</i>	70
Figura 24. Proposta estrutural para substância H5 – Dimetil tereftalato.....	72
Figura 25. Proposta estrutural para a substância H6 – Ácido <i>p</i> – hidroxifenilacético.....	73
Figura 26. Esquema geral de produção de politrimetiltereftalato (PTT)	75
Figura 27. Substâncias produzidas por <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	77
Figura 28. Espectro de RMN ^1H da substância H6 - Ácido <i>phidróxifenilacético</i> (CD_3OD , 300 MHz).....	99
Figura 29. Espectro de RMN ^1H da substância H5 – Dimetil tereftalato (CDCl_3 , 400 MHz).....	100
Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C da substância H6 – Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético (CD_3OD , 300 MHz).....	101
Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C da substância H5 - Dimetil tereftalato (CDCl_3 , 400 MHz).....	102
Figura 32. Espectro de RMN ^1H da substância H4 - Lactama (CD_3OD , 400 MHz)	103
Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C da substância H4 - Lactama (CD_3OD , 400 MHz).....	104
Figura 34. Mapa de contornos HMQC da substância H4 - Lactama (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H e ^{13}C 400 MHz).....	105
Figura 35. Mapa de contornos HMQC da substância H4 – Lactama. Fragmento 1 (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H e ^{13}C 400 MHz).....	106
Figura 36. Mapa de contornos HMQC da substância H4 – Lactama. Fragmento 2 (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H e ^{13}C 400 MHz).....	107

Figura 37. Mapa de contornos HMBC da substância H4 - Lactama (CD ₃ OD, 400 MHz/ ¹ H e ¹³ C 400 MHz).....	108
Figura 38. Mapa de contornos HMBC da substância H4 – Lactama. Fragmento 1 (CD ₃ OD, 400 MHz/ ¹ H e ¹³ C 400 MHz).....	109
Figura 39. Mapa de contornos HMBC da substância H4 – Lactama. Fragmento 2 (CD ₃ OD, 400 MHz/ ¹ H e ¹³ C 400 MHz).....	110
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H da substância H1 - (CD ₃ OD, 400 MHz)	111
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H da substância H2 - (CD ₃ OD, 400 MHz)	112
Figura 42. Espectro de RMN ¹ H da substância H3 - (CD ₃ OD, 400 MHz)	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Antibióticos de ampla utilização em medicina	6
Tabela 2. Compostos identificados no início dos anos 70 usando screening	7
Tabela 3. Cromatografia líquida a vácuo de 1700 mg do extrato acetoetílico do cultivo em meio fermentativo de arroz de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> por 60 dias a 40°C	19
Tabela 4. Agrupamento das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo de 1700 mg do extrato acetoetílico da cultura de <i>Humicola grisea</i> desenvolvida em meio sólido	19
Tabela 5. Cromatografia líquida a vácuo de 4600 mg do extrato diclorometânico do cultivo em meio fermentativo de arroz de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> por 60 dias a 40°C	21
Tabela 6. Agrupamento das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo de 4600 mg do extrato diclorometânico da cultura de <i>Humicola grisea</i> desenvolvida em meio sólido	22
Tabela 7. Cromatografia líquida a vácuo de 4000 mg do extrato acetoetílico do cultivo em meio fermentativo de arroz de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> por 90 dias a 40°C	23
Tabela 8. Cromatografia líquida a vácuo de 4000 mg do extrato acetoetílico do cultivo em meio fermentativo de arroz de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> por 90 dias a 40°C	23
Tabela 9. Cromatografia líquida a vácuo de 3750 mg do extrato diclorometânico do cultivo em meio fermentativo de arroz de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> por 90 dias a 40°C	25
Tabela 10. Agrupamento das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo de 3750 mg do extrato diclorometânico da cultura de <i>Humicola grisea</i> desenvolvida em meio sólido	25
Tabela 11. Vantagens biotecnológicas da fermentação em substrato sólido (FSS) comparada à fermentação por tecnologia submersa (FS)	38
Tabela 12. Bioautografia dos extratos* em Acetato de Etila de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> obtido do cultivo em meio fermentativo de Vogel	43
Tabela 13. Bioautografia dos extratos* em Acetato de Etila de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> obtido do cultivo em meio fermentativo de Jackson	44

Tabela 14. Bioautografia dos extratos* em Acetato de Etila de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> obtido do cultivo em meio fermentativo de Czapek	45
Tabela 15. Bioautografia dos extratos* em Metanol de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> obtido do cultivo em meio fermentativo de Czapek	46
Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos extratos de culturas de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos de culturas de <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> frente a <i>Kocuria rhizophila</i>	49
Tabela 18. Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 13 a 18 (880mg).....	56
Tabela 19. Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 13 a 18 (3, 4, 5, 6) (490mg).....	56
Tabela 20. Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 28 a 33 (250mg).....	57
Tabela 21. Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 28 a 33 (11,12).....	57
Tabela 22. Fração Acetoetílica 16 – 21 (880 mg)	59
Tabela 23. Fração Acetoetílica 16 – 21 (5-7) (300 mg).....	59
Tabela 24. Fração Acetoetílica 18 - 29 (439 mg)	67
Tabela 25. Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) para a substância isolada – Lactama H4 (δ , CD_3OD).....	70
Tabela 26. Dados do espectro de RMN ^{13}C (400 MHz) para a substância isolada - Lactama H4 (δ , CD_3OD) correlacionado aos mapas de contorno de HMQC e HMBC.....	71
Tabela 27. Dados dos espectros de RMN ^{13}C (300 MHz e 400 MHz, respectivamente) para as substâncias isoladas - Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético (δ , CD_3OD) e 1, 4 – dimetil benzenodicarboxilato (δ , CDCl_3)	73
Tabela 28. Dados dos espectros de RMN ^1H (300 MHz e 400 MHz, respectivamente) para as substâncias isoladas - Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético (δ , CD_3OD) 1, 4 – dimetil benzenodicarboxilato (δ , CDCl_3).	73
Tabela 29. Avaliação de atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em microplaca	78

LISTA DE ABREVIATURAS

CCT	Cloreto de Trifeniltetrazólio
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLV	Cromatografia Líquida a Vácuo
<i>d</i>	Dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hz)
<i>m</i>	multiplete
MHz	Mega Hertz
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
δ	Deslocamento químico
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	triplete

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOTECNOLOGIA E MICROTECNOLOGIA

Entre as maiores e novas tecnologias que tem surgido desde os anos 70, biotecnologia tem atraído atenção, tem provado ser capaz de gerar enormes riquezas e de influenciar setores significantes da economia. A biotecnologia tem afetado substancialmente a área da saúde; produção e processamento de alimentos; agricultura e florestas, proteção do meio ambiente; e produção de materiais e substâncias químicas (GAVRILESCU, CHISTI; 2005).

Consiste na aplicação de princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais por agentes biológicos. Algumas das definições de tecnologia dentro da moderna biotecnologia incluem engenharia genética, cultura de microrganismos recombinantes, células de animais e plantas, engenharia metabólica, tecnologia de hibridoma, nanobiotecnologia, engenharia de proteínas, animais e plantas transgênicos, engenharia de tecidos e órgãos, ensaios imunológicos, genomas e proteomas, tecnologias de bioseparação e biorreatores. Os benefícios econômicos e de meio ambiente que a biotecnologia pode oferecer em manufatura, monitoramento e gestão de desperdícios são consideravelmente elevados. Estes benefícios incluem: grande redução da dependência de combustíveis não renováveis e de outras fontes; redução do potencial de poluição de processos industriais e produtos; habilidade em degradar com segurança os poluentes acumulados através da remediação do meio ambiente; maior rendimento econômico em processos produtivos; e produção sustentável de produtos atuais e também de novos produtos (GAVRILESCU, CHISTI; 2005).

Biotecnologia se refere ao uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social. Dentro destes sistemas, os fungos são microrganismos de grande interesse em processos fermentativos que culminam na produção de metabólitos secundários importantes na pesquisa de novos antibióticos, agentes antitumorais, imunossuppressores, antiparasitários, entre outros. A descoberta e o desenvolvimento de antibióticos foi um dos mais significantes avanços da medicina no século XX. Contudo, muitos agentes antimicrobianos que foram usados para o tratamento de uma grande variedade de doenças humanas infecciosas agora são ineficientes. Portanto, para assegurar a efetividade dos fármacos que serão utilizados futuramente, é necessário melhorar os

antimicrobianos existentes criando estratégias para identificar novos antibióticos (SMITH e JARVIS, 1999).

Fungos são muito usados em processos industriais, como a produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, álcoois, pigmentos, lipídios e glicolipídios. Alguns destes produtos são produzidos comercialmente enquanto outros são potencialmente úteis em biotecnologia. Metabólitos secundários de fungos são extremamente importantes para saúde e nutrição e têm grande impacto econômico. Em adição às múltiplas seqüências de reações em fermentações, fungos são extremamente úteis em processos de biotransformação. Estão se tornando essenciais para a indústria de química fina na produção de enantiômeros específicos. Tecnologia de DNA recombinante, que inclui leveduras e outros fungos como objetos de estudo, estão notadamente aumentando o mercado de enzimas microbianas. Manipulação molecular tem sido adicionada à técnicas mutacionais como uma forma de aumentar o rendimento de processos microbianos e a descoberta de novos fármacos. Atualmente, a biologia de fungos é a maior participante na indústria global. Além disso, o melhor ainda está por chegar com o sequenciamento de genomas, estudo de genes e arranjo de proteínas (ADRIO e DEMAINE, 2003).

Programas de pesquisa de produtos oriundos de microrganismos têm sido desenvolvidos continuamente desde o início da década de 40 pela Merck e Glaxo. Com a produção de novas substâncias sintetizadas a partir do metabolismo de fungos, um novo ramo da microbiologia foi originado: a micotecnologia (DEMAINE, 2000a).

O campo da indústria da microbiologia tem utilizado apenas uma pequena porção do arsenal microbiano da natureza para a descoberta de moléculas com potencial biológico. A razão é a inabilidade dos microbiologistas para cultivar a vasta maioria dos microrganismos da natureza. É estimado que apenas 1% das bactérias e 5% dos fungos existentes têm sido cultivados em laboratório. Este problema tem sido estudado e alguns sucessos têm sido alcançados pelo uso de uma ou mais das seguintes estratégias: (1) menor concentração de nutrientes, (2) sinalização de moléculas, (3) inibidores de microrganismos indesejados, (4) longos períodos de incubação, (5) condições de crescimento que se assemelham às do meio natural, (6) proteção das células de peróxidos exógenos, (7) adição de ácido húmico, (8) hipóxia (1-2%O₂) ou atmosferas anóxicas, (9) elevada concentração de CO₂ ao longo do

cultivo e uso de tecnologia de cadeias de polimerase de alta performance (DEMAIN, 2006).

Os produtos naturais podem exibir vários efeitos ou não possuir nenhuma interação com outro organismo qualquer. Em outras palavras, eles podem apresentar algum tipo de atividade biológica. Esta pode ser altamente específica, exibida geralmente em baixas concentrações (representando as substâncias bioativas usuais), ou podem apresentar ação muito inespecífica (tóxica). O exato número de produtos naturais bioativos (compostos com bioatividade ou toxicidade descobertas) é até certo ponto indeterminado, mas este número figura em torno de 200000 a 250000 compostos, incluindo mais de 20000 metabólitos microbianos (BERDY, 2005).

As espécies de actinomicetos filamentosos produzem mais de 10000 compostos bioativos, 7600 derivados de *Streptomyces* e 2500 provenientes das chamadas raras espécies de actinomicetos, representando o maior grupo (45%) de metabólitos microbianos bioativos. Dentre os fungos microscópicos eucarióticos, os ascomicetos e diversas outras espécies de fungos filamentosos e endofíticos são os mais significantes. Os basidiomicetos são também freqüentemente reportados como produtores, enquanto leveduras, ficomicetos e limos raramente produzem metabólitos bioativos. O número total de produtos bioativos de fungos é de aproximadamente 8600 compostos, representando 38% de todos os produtos microbianos. Do conjunto conhecido (em torno de 22500) de antibióticos e compostos microbianos bioativos similares, menos do que 1%, somente cerca de 150 compostos estão em uso direto na medicina humana e veterinária, bem como na agricultura. Em terapia humana, mais de 100 compostos são derivados de actinomicetos (BERDY, 2005).

Os metabólitos secundários mais valiosos economicamente são os antibióticos, agentes antitumorais, imunossupressores, agentes redutores de colesterol e fármacos antiparasitários. (DEMAIN, 2006).

O reino Fungi tem sido um importante instrumento para processos biotecnológicos e, por muitos anos, estes e outros microrganismos têm sido utilizados para produzir diversos produtos. Porém, foi na década de 70 que ocorreu um grande avanço na microbiologia industrial, com o aparecimento de técnicas de biologia molecular (BENNETT, 1998; DEMAIN, 2000a).

Desde os tempos pré-bíblicos, leveduras e fungos filamentosos têm sido usados para produção de bebidas, vinhos, pão e queijo. No século XX, o período de ouro para a microbiologia industrial, rendeu uma incontável quantidade de produtos gerados por processos de fermentação: solventes, antibióticos, enzimas, vitaminas, aminoácidos, polímeros e muitos outros compostos de utilidade (DEMAIN, 1999a). O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular gerou novos caminhos para o uso de leveduras e de modelos celulares microbianos para a produção de proteínas homólogas e heterólogas bem como outros metabólitos, como antibióticos, pigmentos e ácidos graxos. A escolha do microrganismo é feita com base no rendimento de produção e parâmetros regulatórios, especialmente para fungos usados em indústria alimentícia. Fungos objetos de estudo são geralmente escolhidos dentre aqueles que têm a classificação GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro), status dado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos. Diversas espécies de fungos têm este status e são amplamente usados em larga escala de produção de proteínas recombinantes e metabólitos (PUNT *et al.*, 2002).

Fermentação microbiana é um método para produção comercial de certos produtos que são gerados em quantidades substanciais (WEISS e EDWARDS, 1980; STRHOL, 1997; LEEPER, 2000; LIESE *et al.*, 2000; SCHREIBER, 2000). Somente o mercado dos antibióticos excede 30 bilhões de dólares e inclui cerca de 160 antibióticos e derivados. Outros importantes produtos farmacêuticos produzidos por microrganismos se referem aos agentes redutores de colesterol ou estatinas, enzimas inibidoras, imunossupressores e compostos antitumorais. (DEMAIN, 2000b). O mercado mundial de estatinas gira em torno de 15 bilhões de dólares. O total do mercado farmacêutico excede os 400 bilhões de dólares e continua a crescer mais rápido do que a média da economia mundial. Neste âmbito a biotecnologia está diretamente envolvida nos processos de produção de muitos destes fármacos (GAVRILESCU, CHISTI, 2005).

Novos métodos de produção por fermentação vêm sendo desenvolvidos continuamente para fármacos e seus precursores. (MOODY, 1987; CHISTI, 1989, 1998; GAVRILESCU e ROMAN, 1993, 1995, 1996, 1998; ROMAN e GAVRILESCU, 1994; SANCHEZ e DEMAIN, 2002). Um exemplo é a produção da lovastatina, substância redutora de colesterol, também usada para a produção de estatinas semi-sintéticas (CHANG *et al.*, 2002; CASAS LÓPEZ *et al.*, 2003; VILCHES FERRÓN *et al.*, 2005).

1.2 ANTIMICROBIANOS

Os antibióticos têm sido muito úteis em batalhas contra bactérias e fungos infecciosos por mais de 50 anos. Entretanto, muitos antibióticos são usados comercialmente, ou são potencialmente úteis em medicina para outras atividades não relacionadas às suas ações antibióticas. Eles são usados como agentes antitumorais, agentes imunossupressores, agentes hipocolesterolêmicos, inibidores enzimáticos, agentes antiagregantes e agentes antiparasitários. Muitos destes produtos foram descobertos como antibióticos que falharam em seu desenvolvimento como tal, ou como micotoxinas. Em adição às alternativas citadas acima, novos antibióticos potentes têm sido descobertos e comercializados recentemente e outros estão sendo testados clinicamente (DEMAIN, 1999b).

A seletiva ação exercida em bactérias e fungos patogênicos por estes metabólitos secundários microbianos inseridos durante a era dos antibióticos e por muitos anos, tem beneficiado a humanidade pela notável propriedade de fármacos como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrolídeos e muitas outras (DEMAIN, 1999b). O sucesso destes fármacos foi tão expressivo que estes antibióticos foram virtualmente os únicos utilizados para quimioterapia contra microrganismos patogênicos. Desde 2002, mais de 22 mil compostos bioativos têm sido descobertos a partir de microrganismos. Isto incluiu 20 mil antibióticos, principalmente produzidos por actinomicetos (45%), fungos (38%) e bactérias unicelulares (17%, *Pseudomonas* e *Bacillus*) (BERDY, 2005). Dos antibióticos a partir de actinomicetos, cerca de 80% são produzidos pelo gênero *Streptomyces*, sendo que um microrganismo produz geralmente mais do que um composto. Por exemplo, a linhagem de *Micromonospora* produtora de gentamicina gera 50 metabólitos secundários isoláveis (BERDY, 1977).

A descoberta do antimicrobiano “penicilina” por Fleming em 1928, reisolamento e estudos clínicos por Chain, Florey e colaboradores no início dos anos 40, e a comercialização de penicilinas sintéticas revolucionaram a pesquisa para descoberta de fármacos. Seguindo o sucesso da penicilina, companhias farmacêuticas e grupos de pesquisa rapidamente organizaram grandes coleções de culturas de microrganismos para descobrir novos antibióticos. A produção em poucos anos da pesquisa destes antibióticos foi fértil e incluiu exemplos como estreptomicina **(1)**, cloranfenicol **(2)**, clortetraciclina **(3)**, cefalosporina C **(4)**, eritromicina **(5)** e vancomicina **(6)**, apresentados na tabela 1. Muitos destes compostos, ou derivados destes ainda estão em uso (BUTLER, 2004).

Tabela 1 – Antibióticos de ampla utilização em medicina.

(1) - estreptomicina	(2) - cloranfenicol	(3) - clortetraciclina

(4) – cefalosporina C	(5) - eritromicina	(6) - vancomicina

Há cerca de 35 anos, a dificuldade e alto custo de isolamento de novas substâncias e de agentes antimicrobianos com novos modos de ação levaram o campo da pesquisa de antibióticos a uma fase de declínio. De fato, o número de pesquisas de novos fármacos anti-infecciosos declinou algo em torno de 50% da década de 60 para o início da década de 80 (DiMASI *et al*, 1994). Entretanto, foi percebido que compostos com atividade antibiótica também possuíam outras ações, que tinham sido discretamente exploradas no passado, e que desta maneira alargando o escopo poderiam ser explorados e expandidos no futuro. Assim, uma vasta seleção de moléculas antibioticamente ativas para ação antagonista contra outros organismos, bem como para ensaios usados para farmacologia aplicada, foram propostas para render novas utilidades aos “antibióticos sem sucesso”. Diversos testes de laboratório *in vitro* foram desenvolvidos para ajudar a detectar, isolar e purificar compostos de utilidade. Muito desta ênfase foi trazida por Hamao Umezawa (1972, 1982), que pontuou o potencial de fármacos inibidores de enzimas (DEMAIN, 1999b).

Os antibióticos formam um tipo especial de agentes quimioterápicos e, desde a época de Alexander Fleming, o número destas substâncias vem aumentando, devido a intensivos programas de pesquisa em várias partes do mundo. A cada ano, aproximadamente 500 novos antibióticos têm sido descobertos e cerca de 30 a 35% destes são resultantes de processos fermentativos. Sanglier *et al.*, 1996 *apud*

Demain, 2000, descreveram mais de 1000 novos metabólitos secundários apenas em actinomicetos (KRUEGER & KRUEGER, 1989; DEMAINE, 2000b).

Produzidas por fungos filamentosos a penicilina G e a penicilina V biossintética, geraram um mercado combinado de 4,4 bilhões de dólares em 1995, muitas penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas semi-sintéticas possuíam um mercado de 11 bilhões de dólares em 1999 (DEMAINE, 1999b).

Um dos recentes avanços na descoberta de fármacos é o uso de mecanismos baseados em high throughput screening (screening de alta performance). O contínuo desenvolvimento de formatos de screening, produção de reagentes, robotização e gerenciamento de dados têm se tornado o suporte principal dos sistemas de screening de alta performance (HTS), caracterizados pela rapidez, automação e número de amostras avaliadas. Alguns dos primeiros compostos identificados no início dos anos 70 usando mecanismos baseados em métodos de screening (tabela 2) incluíram beta – lactamase inibidora de ácido clavulânico **(7)** de *Streptomyces vuligerus* e o inibidor de HMG – CoA redutase, mevastatina **(8)**, produzido por *Penicillium citrinum*. Mevastatina foi também reportada como um agente antifúngico de *P. brevicompactum*. A mistura de ácido clavulânico e amoxicilina **(9)** tem sido ainda usada como primeira opção em tratamentos com antibióticos, enquanto mevastatina e lovastatina **(10)** foram compostos protótipos para uma série de fármacos antilipêmicos conhecidos como “estatinas” (BUTLER, 2004).

Tabela 2 - Compostos identificados no início dos anos 70 usando mecanismos de screening.

(7) - ácido clavulânico	(8) - mevastatina

(9) - amoxicilina	(10) - lovastatina

Deste modo, a potencialidade destes microrganismos na produção de diversas classes de substâncias é fato marcante na microbiologia aplicada. Sendo assim, a biotecnologia tem contribuído de forma considerável na busca de soluções para os problemas que afetam a população mundial, sobretudo no que concerne às questões de saúde e alimentação.

1.3 AGENTES ANTITUMORAIS

Muitas das importantes substâncias antitumorais usadas para quimioterapia de tumores são antibióticos produzidos por microrganismos (OKI e YOSHIMOTO, 1979; TOMASZ, 1995). Estes incluem actinomicina D, mitomicina, bleomicinas, e as antraciclinas, daunorrubicina, e doxorrubicina. O taxol uma molécula de recente sucesso (paclitaxel) foi originalmente descoberta em plantas (WALL e WANI, 1995), mas também tem sido encontrada como metabólito microbiano (STIERLE *et al*, 1993). Aprovado para tratamento de câncer de mama e útero é o único fármaco conhecido até o momento que bloqueia a despolimerização de microtúbulos. Em 2000, a venda de taxol gerou algo em torno de 1 bilhão de dólares para a Bristol Myers-Squibb, representando 10% das vendas da companhia farmacêutica e a terceira maior venda de produto (THAYER, 2000).

1.4 AGENTES HIPOCOLESTEROLÊMICOS

Os agentes hipocolesterolêmicos de grande sucesso da família das estatinas têm forte atividade antifúngica especialmente contra leveduras. Brown *et al* (1976) descobriram o primeiro membro deste grupo, a compactina, como um antibiótico produto de *Penicillium brevicompactum*. Todos os membros deste grupo são lactonas hexahidronaftaleno substituídas. Independentemente, Endo *et al* (1979) descobriram a compactina em cultivos de *Penicillium citrinum* como um inibidor de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase, a enzima reguladora e a etapa limitante da biossíntese do colesterol. Mais tarde Endo (1979) e Alberts *et al* (1980) descobriram independentemente uma forma metilada mais ativa do que a compactina, conhecida como lovastatina (monacolina K; mevinolina) em cultivos de *Monascus ruber* e *Aspergillus terreus*. As compactinas inibiam a síntese de colesterol no fígado, a maior fonte de colesterol sanguíneo. O alto nível de colesterol no sangue leva a quadros de aterosclerose, que é o fator causador de muitos tipos

de doenças cardíacas coronárias, a principal causa de morte humana atualmente. A lovastatina foi aprovada pelo FDA em 1987 quando testes clínicos em humanos apresentaram uma redução de colesterol sanguíneo de 18 a 34%, e uma diminuição de 19 a 39% nos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL – “colesterol ruim”), e um leve aumento nos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL – “colesterol bom”). Estes compostos e seus derivados têm tido um enorme sucesso comandando um mercado anual de 6 bilhões de dólares em 1998 (McALPINE, 1998). Um dos derivados é a pravastatina, a qual é produzida pela bioconversão da compactina (SERIZAWA e MATSUOKA, 1991; PENG e DEMAINE, 1998).

1.5 *Humicola grisea* var. *thermoidea*.

O fungo objeto do estudo pertence ao gênero *Humicola*. Trata-se de um fungo termofílico que produz diversas enzimas extracelulares, incluindo amilase (BARNETT e FERGUS 1971), celulasas (YOSHIOKA et al. 1982), β -glicosidades (PERALTA et al., 1990), trealase (ZIMMERMANN et al. 1990) e xilanases (MONTI et al. 1991). A espécie *Humicola grisea* var. *thermoidea* é um fungo filamentoso, isolado de solo brasileiro (cerrado) e produz altos índices de atividade de β -glicosidase termoestável, sendo considerado um fungo termotolerante (PERALTA et al., 1996).

Muitos estudos têm sido feitos com fungos do gênero *Humicola*, e muitos deles descrevem atividade hidrolítica de distintas espécies (HAYASHIDA & YOSHIDA, 1980), caracterização enzimática ou manipulação genética relativa a amilases (ADAMS, 1994; GAUR et al., 1993), xilanases (MONTI et al., 1991), glicoamilases (TOSI et al., 1993; CAMPOS e FELIX, 1995), trealase (CARDELLO et al., 1994) e celulasas (CHAVES e BRUNE, 1989; TAKASHIMA et al., 1996). *H. grisea* var. *thermoidea* é conhecido como um bom produtor de celulase (ARAUJO et al., 1983; TAKASHIMA et al., 1996). De Paula, Ramos e Azevedo demonstraram o potencial industrial do microrganismo para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em uma fonte de carbono solúvel, gerando produtos que são valiosos componentes de comida animal e de fertilizantes. (De PAULA et al, 1999).

O gênero *Humicola* inclui diversas espécies de fungos termofílicos, encontrados no solo, e que são capazes de degradar substratos naturais complexos. Somado a isso, *Humicola grisea* var. *thermoidea* é um importante fungo produtor de enzimas termoestáveis, como L – glucosidase, celobiohidrolase, endoglucanase, e xilanase, com ótima atividade em temperaturas variando entre 50 e 60°C. Além disso,

celulases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* apresentam ampla capacidade de estudo biotecnológico (DANTAS-BARBOSA *et al*, 1998).

Humicola grisea var. *thermoidea* é um eficiente produtor de enzimas degradadoras de carboidratos, incluindo β – xilanase, β – glicosidase e glicoamilase (TOSI *et al*. 1993; ALMEIDA *et al*. 1995; FILHO 1996). Isto mostra a alta expressão de atividade de β – xilanase quando cultivado em meio contendo substratos naturais complexos, especialmente sobras agrícolas (XIMENES *et al*. 1997; LUCENA-NETO & FILHO 2004) (LEMBO *et al*, 2006).

Como se percebe, o potencial do gênero *Humicola* para a produção de enzimas de interesse biotecnológico e em processos industriais é bastante amplo, e a espécie *Humicola grisea* var. *thermoidea* tem sido bastante estudada. Entretanto, estudos referentes ao potencial de ação de metabólitos secundários são bastante escassos, como por exemplo, ação antimicrobiana. Faz-se ressalva de estudo publicado por Laurent e colaboradores em 2002, mostrando a atividade citotóxica de uma nova tetralona derivada de *Humicola grisea* Traaen, fungo isolado em ambiente aquático, mais especificamente na Nova Caledônia (Oceânia). A tetralona em questão trata-se da humiculona, cuja estrutura é apresentada na figura 1.

Figura 1. Humiculona, tetralona citotóxica de *Humicola grisea*

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Desenvolver a bioprospecção de fungos presentes em amostras de solo, água e plantas, conforme Projeto Temático da FAPESP Proc. No. 04/07935-6, intitulado: Bioprospection in Fungi: the Search of Lead Compounds for Drug Design and Enzymes for Pharmaceutical and Industrial Applications (Bioprospecção em fungos: a busca de novos princípios ativos para o design de novos fármacos e de enzimas com aplicações farmacêuticas e industriais).

2.2. Objetivos específicos:

1 - Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var *termoidea* visando produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, em meios fermentativos líquidos e sólido.

2 - Obtenção de extratos do micélio e dos filtrados das culturas em solventes orgânicos;

3 - Fracionamento dos extratos do micélio e/ou dos filtrados das culturas de *Humicola grisea* var *termoidea*, visando determinação das frações responsáveis pela atividade antimicrobiana, por meio de monitoramento com ensaios biológicos e isolamento da(s) substância(s) ativa(s)

4 - Elucidação da(s) estrutura(s) químicas(s) da(s) substância(s) ativa(s).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MANUTENÇÃO DO ESTOQUE

O microrganismo avaliado, *Humicola grisea* var *thermoidea*, foi gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As culturas do fungo foram mantidas em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de aveia, repicadas e incubadas em estufa durante 14 dias a 40°C. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de solução aquosa de leite em pó desnatado a 7,5 %, previamente esterilizado, sobre cada cultura, sendo então agitadas em mixer. Em seguida, 1 mL de cada suspensão foi transferido para tubos de ensaio com tampa de rosca, contendo sílica gel (14–20 mesh), previamente esterilizada em estufa a 160°C por 90 minutos, preenchendo 75% do tubo. A transferência foi feita gotejando-se lentamente a solução de leite com o microorganismo, na tentativa de melhor difusão desta solução por toda a sílica. Os tubos foram mantidos no banho de gelo com a tampa não rosqueada por 1 hora e depois a temperatura ambiente por 7 dias. Após este período, as tampas foram rosqueadas e os tubos armazenados a 4°C.

As culturas do fungo também estão sendo mantidas em tubos de ensaio e garrafas de vidro contendo 5 mL e 50 mL de meio ágar-aveia, respectivamente, ambos armazenados sob temperatura de 4°C em geladeira.

3.2. OBTENÇÃO DAS BIOMASSAS (massa micelial) EM MEIO LÍQUIDO PRÉ - FERMENTATIVO

As culturas mantidas em sílica gel e em ágar-aveia foram repicadas para tubos de ensaio e garrafas de vidro contendo meio de ágar-aveia e incubadas em estufa durante 14 dias à temperatura específica de 40°C para obtenção de esporos. Os 14 dias de incubação devem-se ao maior tempo de crescimento que este fungo requer e a temperatura de 40°C é utilizada por tratar-se de fungo termofílico. Decorrido o tempo de cultivo foram adicionados 5 mL de solução aquosa de Tween 80 (esterilizada) a 2 % em cada cultura (tubos e garrafas) e, em seguida, foi realizada a contagem do número de esporos utilizando-se Câmara de Neubauer, para inoculação de uma concentração conhecida de esporos (4×10^6 esporos/mL de meio) no meio pré-fermentativo (Jackson et al., 1993).

Os esporos foram inoculados em seis frascos tipo Erlenmeyer contendo 200 mL de meio pré-fermentativo, e incubados à temperatura específica de crescimento de 40°C sob agitação constante de 120 rpm durante 72 horas em mesa agitadora Innova™ 4300 – New Brunswick Scientific. O uso de seis frascos tipo Erlenmeyer se refere aos tempos de análise dos cultivos. O tempo de cultivo em meio pré-fermentativo foi ampliado de 24 horas para 72 horas, para que o fungo pudesse consumir os nutrientes e adquirir massa micelial para o processo posterior, a fermentação.

3.3. PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS EM MEIO FERMENTATIVO LÍQUIDO

Após 72 horas, o conteúdo de cada frasco tipo Erlenmeyer do meio pré fermentativo foi filtrado utilizando-se conjunto de Kitassato, funil de Buchner, papel filtro e bomba a vácuo em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar). Por fim, as massas miceliais obtidas foram transferidas para 400 mL dos meios fermentativos: I – Czapeck (Atlas 1995), II - de Vogel (Vogel 1956) e III - Jackson (Jackson et al., 1993). Estas culturas foram incubadas sob as mesmas condições às quais as culturas do meio pré-fermentativo foram submetidas. O estudo do efeito do tempo de incubação foi desenvolvido através da retirada seletiva de um frasco tipo Erlenmeyer de cada vez em tempos pré-estabelecidos. As culturas foram processadas durante 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas de incubação, respectivamente. Optou-se por ampliar o estudo do efeito do tempo de incubação em 48 horas, que correspondem aos tempos de 168 e 192 horas de cultivo (no projeto inicial a proposta era o estudo do período de 72 a 144 horas de cultivo). Uma vez que o acréscimo de tempo pode possibilitar ao microrganismo, a produção e elaboração de metabólitos de maior interesse e/ou atividade biológica.

3.4. PRODUÇÃO DOS METABÓLITOS EM MEIO FERMENTATIVO SÓLIDO

Inicialmente o fungo foi cultivado em garrafas de vidro contendo meio ágar aveia por um período de incubação de 14 dias, sob temperatura de 40°C para obtenção de esporos. A produção de metabólitos secundários em meio sólido se desenvolveu através da inoculação destes esporos removidos com solução de Tween 80 (estéril) a 2% para meio de arroz enriquecido e esterilizado. O meio de arroz foi enriquecido com solução de aminoácidos e solução de elementos traços, para proporcionar melhor suporte de nutrientes ao fungo, com finalidade de possibilitar a elaboração de

metabólitos de interesse. Os esporos foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo proporção de 90 mL de água para 90 g de arroz, além de 1 mL de solução de aminoácidos elaborada e 1 mL de solução estéril de elementos traços. A solução de aminoácidos foi esterilizada por processo de filtração por membrana (20 µm) e adicionada, então, ao meio de arroz previamente esterilizado. O processo fermentativo em meio sólido foi desenvolvido à temperatura de 40°C por período de 60 dias e 90 dias, tendo em vista o fato de o microrganismo em estudo requerer maior tempo para se desenvolver e consumir o substrato ofertado quando comparado aos outros fungos.

Durante o processo fermentativo em substrato sólido foram retiradas amostras em tempos diferentes para realizar avaliação dos perfis cromatográficos obtidos em diferentes tempos de cultivo. As culturas foram analisadas após 23º, 40º, 46º, 52º, 60º e 90 dias de cultivo.

3.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

3.5.1 Obtenção dos extratos do meio líquido

As culturas retiradas nos períodos pré-estabelecidos de 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas foram filtradas utilizando-se conjunto de Kitassato, funil de Buchner, papel filtro e bomba a vácuo (pressão de 700 mm Hg) em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar). A seguir, os filtrados obtidos foram submetidos à partição líquido-líquido em funil de separação na proporção de 20 mL de solvente orgânico acetato de etila para cada 120 mL de meio. Este procedimento foi desenvolvido por três vezes consecutivas. O mesmo processo foi realizado com 20 mL do solvente orgânico *n*-butanol, também em triplicata. Entretanto, antes do processo de partição com o solvente *n*-butanol, as frações aquosas remanescentes foram rotaevaporadas para remoção de resíduos de acetato de etila do processo de partição com tal solvente. As frações aquosas remanescentes foram armazenadas sob a temperatura de 4°C em geladeira, sendo que como mencionado acima, foram também rotaevaporadas para eliminação de quantidades residuais de *n*-butanol. Foram obtidos extratos metanólicos da massa micelial. A massa micelial foi macerada em metanol por período de 24 horas, seguido de filtração, este processo foi desenvolvido em triplicata. Todos os solventes foram evaporados até *secura* através do processo de rotaevaporação sob vácuo de 700 mmHg e temperatura máxima de

55°C em banho-maria, de maneira a prevenir degradação das substâncias presentes nos extratos. Em seguida, os extratos foram armazenados em frascos âmbar, devidamente codificados e mantidos sob refrigeração à temperatura de 4°C, para posteriores testes biológicos.

3.5.2. Obtenção dos extratos em meio sólido

Desenvolveu-se extração com etanol, por ser um solvente de menor custo e toxicidade em relação ao metanol. A cada frasco tipo Erlenmeyer de cultivo de arroz foi adicionada quantidade suficiente de etanol para deixar a massa de cultivo submersa, o processo macerativo foi realizado durante período de 5 horas. Em seguida, o conteúdo de cada frasco tipo Erlenmeyer, correspondente a massa micelial e solução de etanol foram filtrados sob vácuo com auxílio de conjunto: Kitassato, funil de Buchner e papel filtro. A solução hidroalcoólica obtida foi submetida à processo de evaporação em evaporador rotativo, sob temperatura de 55°C, até que todo o etanol fosse eliminado. Em seguida os extratos foram solubilizados em solução água:metanol (H₂O:MeOH) na proporção de 9:1, e esta solução foi então particionada com *n*-hexano e acetato de etila, respectivamente, na proporção de 20 mL de solvente para cada 120 mL da suspensão de extrato, em triplicata, semelhantemente ao processo relatado anteriormente para os extratos obtidos do cultivo em meio líquido. Optou-se pela utilização de *n*-hexano para partição dos extratos obtidos do cultivo em meio de arroz, previamente à partição com o solvente acetato de etila, para proceder remoção de compostos apolares, como por exemplo, ácidos graxos, os quais não apresentam interesse no processo de isolamento. Todos os solventes foram evaporados até *secura* através do processo de rotaevaporação sob vácuo de 700 mmHg e temperatura máxima de 55°C, de maneira a prevenir qualquer tipo de degradação das substâncias presentes nos extratos. Em seguida, os extratos foram armazenados em frascos âmbar, devidamente codificados e depositados sob refrigeração à temperatura de 4°C para realização posterior dos testes biológicos.

3.6. ANÁLISE QUALITATIVA DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a realização das análises qualitativas, por cromatografia líquida de alta eficiência, dos extratos obtidos, utilizou-se o cromatógrafo da marca Shimadzu. O equipamento é composto por três bombas Shimadzu LC-10AD, detector

espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M10A_{VP} (Diode Array), sistema controlador SCL-10 A_{VP}, conectado a um computador com *software* Shimadzu Class-VP versão 5.02, injetor automático (SIL-10AD_{vp}) e coletor de frações FRC-10A. Foi empregada a coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C – 18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 µm. Para proteção da coluna analítica foi empregada uma pré-coluna Pelliguard™ LC-18 (4,6 mm x 20 mm cartridge, SUPELCO PARK).

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: sistema de eluição por gradiente, iniciando com 50 % de metanol:água e finalizando com 100 % de metanol, tempo de 26 minutos e vazão de 1,0 mL/min. Os extratos foram solubilizados na fase móvel inicial de modo a obter-se uma concentração de 1 mg/mL. Foram injetados 20 µL de cada extrato, pela utilização de sistema de injeção automática.

3.7. AUMENTO DA ESCALA FERMENTATIVA

A ampliação de escala foi desenvolvida através do cultivo em batelada, utilizando a mesma escala em que foi desenvolvido o cultivo inicial em meio fermentativo sólido. O cultivo foi desenvolvido em 80 frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL, contendo cada 90 g meio de arroz nas mesmas condições de cultivo anteriormente citadas. Os frascos tipo Erlenmeyer foram incubados em temperatura de 40°C durante período de 60 dias e 90 dias. Sendo, portanto dois cultivos em escala ampliada: 60 e 90 dias.

3.8. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS OBTIDOS EM ESCALA AMPLIADA - 60 e 90 dias de cultivo.

A cada frasco tipo Erlenmeyer de cultivo de arroz foi adicionada quantidade suficiente de etanol para submergir a massa de cultivo, o processo realizado durante período de 5 horas. Em seguida, o conteúdo de cada frasco, correspondente a massa micelial e solução de etanol, foram filtrados sob vácuo com auxílio de conjunto: Kitassato, funil de Buchner e papel filtro. A solução extrativa de etanol obtida foi submetida a processo de evaporação em evaporador rotativo, sob temperatura de 55°C, até que todo o etanol fosse eliminado. Em seguida os extratos foram solubilizados em solução água:metanol (H₂O:MeOH) na proporção de 9:1, e

esta solução foi então particionada com *n*-hexano e acetato de etila, respectivamente, na proporção de 20 mL de solvente para cada 120 mL da suspensão de extrato, em triplicata, semelhantemente ao processo relatado anteriormente para os extratos obtidos do cultivo em meio líquido. O extrato bruto em acetato de etila proveniente resultou em massa de 13 g para cultivo em 60 dias, após evaporação até secura por processo de rotaevaporação.

Previamente ao processo de fracionamento cromatográfico em coluna, o extrato bruto em acetato de etila foi submetido ao tratamento por partição com solventes de diferentes polaridades, com o propósito de otimizar o processo cromatográfico adiante. Para tal, os 13 gramas de extrato bruto em acetato de etila foram solubilizados em 300 ml de solução metanol:água, proporção 1:9. Em seguida a solução foi submetida à partição com *n*-hexano na proporção de 40 ml de solução aquosa para 120 ml de solvente, com finalidade de remover substâncias de baixa polaridade, sobretudo lipídios, que não são de interesse. Posteriormente, a fração aquosa remanescente foi submetida à partição com diclorometano, na proporção de 40 ml de solução aquosa para 120 ml do solvente orgânico e por fim, a fração aquosa deste processo foi submetida à partição com acetato de etila, nas mesmas proporções indicadas acima. Os solventes foram evaporados até a secura e os extratos resultantes da partição indicaram as massas de 4600 mg para partição diclorometânica e 1700 mg para partição em acetato de etila.

Para o cultivo em 90 dias, o procedimento sofre pequenas alterações. A solução extrativa de etanol foi rotaevaporada até secura e na sequência solubilizada em 300 ml de solução metanol:água, proporção 1:9. Em seguida a solução foi submetida à partição com *n*-hexano na proporção de 40 ml de solução aquosa para 120 ml de solvente, com finalidade de remover substâncias de baixa polaridade, sobretudo lipídios, que não são de interesse. Posteriormente, a fração aquosa remanescente foi submetida à partição com diclorometano, na proporção de 40 ml de solução aquosa para 120 ml do solvente orgânico e por fim, a fração aquosa deste processo foi submetida à partição com acetato de etila, nas mesmas proporções indicadas acima. Os solventes foram evaporados até a secura e os extratos resultantes da partição indicaram as massas de 3750 mg para partição diclorometânica e 4000 mg para partição em acetato de etila.

Figura 2 – Esquema de partição dos cultivos em arroz - 60 e 90 dias.

3.8.1 Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (1700 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Utilizou-se coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada, de dimensões 15 cm x 5 cm (cromatografia líquida a vácuo). O sistema cromatográfico consiste de coluna cromatográfica, kitassato e bomba de vácuo. A coluna de vidro foi preenchida com 150 g de sílica 60 H (Merck) até altura de 13,5 cm. A amostra de 1700 mg foi homogeneizada e incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 Mesh ASTM), e aplicada ao topo da coluna empacotada, sendo que a amostra foi acrescida de areia limpa, para proteção desta quando da adição da fase eluente. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na tabela 3, fornecendo 29 frações de 300 mL cada, estas foram então rotaevaporadas. As frações coletadas foram submetidas à cromatografia comparativa em placas de sílica gel GF₂₅₄ (Art. 7730 – Merck) 20 x 20 cm. As substâncias foram observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e posteriormente, as placas cromatográficas foram expostas a vapores de iodo e finalmente reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico (CANNEL, 1998).

A análise cromatográfica em camada delgada de todas as frações permitiu reuni-las em 10 frações apresentadas na tabela 4.

Tabela 3 – Cromatografia líquida a vácuo de 1700 mg do extrato acetoetílico do cultivo em meio fermentativo de arroz de *Humicola grisea* var. *thermoidea* por 60 dias a 40°C.

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	300	1,6
2	90:10	300	9,4
3	80:20	300	9,6
4	80:20	300	22,3
5	80:20	300	25,1
6	70:30	300	22,9
7	70:30	300	85,4
8	70:30	300	110,3
9	50:50	300	159,3
10	50:50	300	92,4
11	50:50	300	86,3
12	40:60	300	23,7
13	40:60	300	37,1
14	40:60	300	53,7
15	40:60	300	48,0
16	30:70	300	19,5
17	30:70	300	27,5
18	30:70	300	30,8
19	20:80	300	34,5
20	20:80	300	16,9
21	20:80	300	8,7
22	10:90	300	13,0
23	10:90	300	10,2
24	10:90	300	15,6
25	0:100	300	10,5
26	0:100	300	8,6
27	0:100	300	7,1
28	0:100	300	11,8
29	100 (MeOH)	300	210,5

Tabela 4 – Agrupamento das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo de 1700 mg do extrato acetoetílico da cultura de *Humicola grisea* desenvolvida em meio sólido.

Frações reunidas	Massa (mg)
1 – 3	20,6
4 - 5	47,4
6	22,9
7 - 8	195,7
9	159,3
10 - 11	178,7
12 - 15	162,5
16 - 18	77,8
19 - 28	135,9
29	280,5

As frações reunidas foram submetidas à cromatografia comparativa em camada delgada, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica.

3.8.2 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (4600mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Utilizou-se coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada, de dimensões 20 cm x 10 cm (cromatografia líquida a vácuo). O sistema cromatográfico consiste de coluna cromatográfica, kitassato e bomba de vácuo. A coluna de vidro foi preenchida com 250 g de sílica 60 H (Merck) até altura de 14 cm. A amostra de 4600 mg foi homogeneizada e incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 Mesh ASTM), e aplicada ao topo da coluna empacotada, sendo que a amostra foi acrescida de areia limpa, para proteção desta quando da adição da fase eluente. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na tabela 5, fornecendo 34 frações de 300 mL cada, estas foram então rotaevaporadas. As frações coletadas foram então submetidas à cromatografia comparativa em placas de sílica gel GF₂₅₄ (Art. 7730 – Merck) 20 x 20 cm. As substâncias foram observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e posteriormente, as placas cromatográficas foram expostas a vapores de iodo e finalmente reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico (CANNEL, 1998).

A análise cromatográfica em camada delgada de todas as frações permitiu reuni-las em 12 frações apresentadas na tabela 6.

Tabela 5 – Cromatografia líquida a vácuo de 4600 mg do extrato diclorometânico do cultivo em meio fermentativo de arroz de *Humicola grisea* var. *thermoidea* por 60 dias a 40°C.

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	500	1,9
2	100:0	500	9,2
3	100:0	500	33
4	90:10	500	1
5	90:10	500	77,7
6	90:10	500	105,7
7	80:20	500	225,5
8	80:20	500	573,5
9	80:20	500	403,7
10	70:30	500	338,3
11	70:30	500	444,6
12	70:30	500	194,1
13	60:40	500	143,4
14	60:40	500	247,5
15	60:40	500	169,4
16	50:50	500	132,7
17	50:50	500	149,9
18	50:50	500	136,0
19	40:60	500	100,9
20	40:60	500	87,8
21	40:60	500	86,2
22	30:70	500	51,3
23	30:70	500	71,6
24	30:70	500	64,3
25	20:80	500	54,7
26	20:80	500	58,4
27	20:80	500	58,7
28	10:90	500	45,6
29	10:90	500	54,8
30	10:90	500	46,5
31	0:100	500	44,0
32	0:100	500	34,8
33	0:100	500	30,1
34	100 (MeOH)	1500	2,9467

Tabela 6 – Agrupamento das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo de 4600 mg do extrato diclorometânico da cultura de *Humicola grisea* desenvolvida em meio sólido.

Frações reunidas	Massa (mg)
1	1,9
2	9,2
3	33
4 - 5	78,7
6	105,7
7 - 8	799
9 - 12	1380,7
13 - 18	978,9
19 - 22	326,2
23 - 27	307,7
28 - 33	255,8
34	2,9467

As frações reunidas foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica.

3.8.3 Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (4000 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Utilizou-se coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada, de dimensões 20 cm x 10 cm (cromatografia líquida a vácuo). O sistema cromatográfico consiste de coluna cromatográfica, kitassato e bomba de vácuo. A coluna de vidro foi preenchida com 250 g de sílica 60 H (Merck) até altura de 14 cm. A amostra de 4000 mg foi homogeneizada e incorporada à quantidade suficiente de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 Mesh ASTM), e aplicada ao topo da coluna empacotada, sendo que a amostra foi acrescida de areia limpa, para proteção desta quando da adição da fase eluente. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na tabela 7, fornecendo 31 frações de 500 mL cada, estas foram então rotaevaporadas. As frações coletadas foram então submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa em placas de sílica gel GF₂₅₄ (Art. 7730 – Merck) 20 x 20 cm. As substâncias foram observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e, posteriormente, as placas cromatográficas foram expostas a vapores de iodo e finalmente reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico (CANNEL, 1998).

A análise cromatográfica em camada delgada de todas as frações permitiu reuni-las em 8 frações apresentadas nas tabela 8.

Tabela 7 – Cromatografia líquida a vácuo de 4000 mg do extrato acetoetílico do cultivo em meio fermentativo de arroz de *Humicola grisea* var. *thermoidea* por 90 dias a 40°C.

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
1	100:0	500	2
2	100:0	500	2
3	90:10	500	8
4	90:10	500	17
5	80:20	500	24
6	80:20	500	84
7	70:30	500	162
8	70:30	500	128
9	60:40	500	309
10	60:40	500	433
11	50:50	500	316
12	50:50	500	82
13	40:60	500	124
14	40:60	500	113
15	40:60	500	60
16	30:70	500	101
17	30:70	500	195
18	30:70	500	159
19	20:80	500	116
20	20:80	500	175
21	20:80	500	137
22	10:90	500	125
23	10:90	500	115
24	10:90	500	90
25	10:90	500	87
26	10:90	500	40
27	0:100	500	73
28	0:100	500	58
29	0:100	500	31
30	50:50 (AcOEt/EtOH)	500	224
31	100 (MeOH)	500	410

Tabela 8 – Cromatografia líquida a vácuo de 4000 mg do extrato acetoetílico do cultivo em meio fermentativo de arroz de *Humicola grisea* var. *thermoidea* por 90 dias a 40°C.

Frações reunidas	Massa (mg)
1 - 5	53
6 - 7	246
8 -11	1186
12 - 15	379
16 -21	883
22 - 25	417
26 -29	202
30 - 31	634

As frações reunidas foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica.

3.8.4 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (3750mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Utilizou-se coluna cromatográfica de vidro com placa sinterizada, de dimensões 20 cm x 10 cm (cromatografia líquida a vácuo). O sistema cromatográfico consiste de coluna cromatográfica, kitassato e bomba de vácuo. A coluna de vidro foi preenchida com 250 g de sílica 60 H (Merck) até altura de 14 cm. A amostra de 3750 mg foi homogeneizada e incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 Mesh ASTM), e aplicada ao topo da coluna empacotada, sendo que a amostra foi acrescida de areia limpa, para proteção desta quando da adição da fase eluente. A coluna foi eluída segundo o esquema apresentado na tabela 9, fornecendo 31 frações de 500 mL cada, estas foram então rotaevaporadas. As frações coletadas foram então submetidas à cromatografia comparativa em placas de sílica gel GF₂₅₄ (Art. 7730 – Merck) 20 x 20 cm. As substâncias foram observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e posteriormente, as placas cromatográficas foram expostas a vapores de iodo e finalmente reveladas com **solução** vanilina/ácido sulfúrico (CANNEL, 1998).

A análise cromatográfica em camada delgada de todas as frações permitiu reuni-las em 6 frações apresentadas na tabela 10.

Tabela 9 – Cromatografia líquida a vácuo de 3750 mg do extrato diclorometânico do cultivo em meio fermentativo de arroz de *Humicola grisea* var. *thermoidea* por 90 dias a 40°C.

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
1	95:5	500	1
2	95:5	500	12
3	85:15	500	24
4	85:15	500	123
5	85:15	500	150
6	75:25	500	590
7	75:25	500	30
8	75:25	500	41
9	65:35	500	20
10	65:35	500	125
11	65:35	500	22
12	50:50	500	75
13	50:50	500	80
14	50:50	500	54
15	40:60	500	46
16	40:60	500	30
17	40:60	500	26
18	30:70	500	38
19	30:70	500	64
20	30:70	500	40
21	20:80	500	46
22	20:80	500	59
23	20:80	500	40
24	10:90	500	44
25	10:90	500	56
26	10:90	500	16
27	0:100	500	23
28	0:100	500	24
29	0:100	500	15
30	100 (EtOH)	500	646
31	100 (MeOH)	500	1220

Tabela 10 – Agrupamento das frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo de 3750 mg do extrato diclorometânico da cultura de *Humicola grisea* desenvolvida em meio sólido.

Frações reunidas	Massa (mg)
1 - 6	900
7 - 9	91
10 - 12	222
13 - 17	236
18 - 29	435
30 - 31	1866

As frações reunidas foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e a 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, com vistas a direcionar o processo de isolamento de maneira mais dinâmica.

3.9. ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE

O detalhado processo cromatográfico das frações acima obtidas está discutido na seção Resultados e Discussão, onde as modalidades cromatográficas abaixo foram desenvolvidas.

3.9.1 Cromatografia líquida a vácuo

As frações reunidas que apresentaram melhor perfil para isolamento quando analisadas através de cromatografia em camada delgada foram submetidas a sucessivas cromatografias líquidas a vácuo, utilizando fase móvel composta por gradiente hexano/acetato de etila e metanol. De modo a promover melhor separação e resolução dos componentes majoritários, visando obtenção de maior quantidade de massa para realização de ensaios biológicos bem como para obtenção de espectros de RMN das estruturas. No processo cromatográfico foram utilizadas colunas cromatográficas de vidro com placa sinterizada, de dimensões: 20 cm x 10 cm, 20 cm x 4 cm e 15 cm x 5 cm, preenchidas com sílica 60 H (Merck), em quantidade inerente a cada processo desenvolvido. As amostras foram homogeneizadas e incorporadas em quantidade suficiente de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 Mesh ASTM)

3.9.2 Cromatografia em placa preparativa

As frações submetidas às colunas de CLV (cromatografia líquida a vácuo) que apresentaram bom perfil de separação nas análises por cromatografia em placa comparativa foram submetidas à técnica de cromatografia preparativa em placa. Para tal foram desenvolvidas cromatografias de forma a escolher fase móvel adequada, quantidades não superiores a 25 mg foram aplicadas em cada placa, estas foram eluídas em cuba de vidro, retiradas, secas à temperatura ambiente e observadas sob luz UV, 254 nm e 366 nm. As frações visíveis e bem definidas quando observadas em comprimento de onda curto (254 nm) foram então recolhidas, suspensas em metanol e em seguida filtradas em placa sinterizada para remoção da sílica.

3.9.3 Cromatografia “Flash”

As frações submetidas às colunas de CLV (cromatografia líquida a vácuo) que apresentaram bom perfil de separação nas análises por cromatografia em camada delgada foram submetidas à técnica de cromatografia “flash”. Esta modalidade cromatográfica se caracteriza pela rapidez e eficiência de isolamento, utilizando ar comprimido para auxiliar a eluição da amostra. O sistema cromatográfico utilizado para fracionar os extratos obtidos é composto por coluna cromatográfica de vidro de dimensões 25 cm x 2 cm, preenchida com 20 g de sílica 60 A (Merck) até altura de 20 cm. As amostras foram homogeneizadas e incorporadas em quantidade suficiente de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 Mesh ASTM). Também compõe o sistema: reservatório de fase móvel no topo da coluna, sistema de injeção de ar comprimido e válvulas de controle de alimentação de fase móvel e de vazão de ar comprimido. As frações submetidas a esta modalidade cromatográfica, foram eluídas em sistemas isocráticos elaborados de acordo com as características inerentes ao perfil cromatográfico em camada delgada de cada fração de interesse.

3.9.4 Técnica de Cristalização

As amostras provenientes da separação por cromatografia em placa preparativa e/ou cromatografia “flash” foram submetidas à técnica de cristalização utilizando o princípio de solubilidade em combinação de dois solventes. Neste caso, as amostras foram solubilizadas em 400 µL de éter etílico, sob temperatura de 55 °C e em seguida foram adicionados 4,5 mL de *n*-hexano, onde as amostras foram insolúveis. Os frascos foram mantidos sob a bancada para a evaporação do solvente, à medida que os solventes evaporavam ocorria formação de cristais nas paredes do frasco, os cristais foram recolhidos para frascos previamente pesados, analisados por CLAE e enviados para análises espectroscópicas.

3.9.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras que não foram satisfatoriamente purificadas pelos processos cromatográficos acima mencionados foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tal foi utilizado o cromatógrafo da marca Shimadzu e coluna de fase reversa (C18) (item 3.6 – Material e Métodos).

3.9.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Reciclante (CLAE-R)

As frações que não foram possíveis purificar em CLAE foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência reciclante (CLAE-R). Para tal foi utilizado cromatógrafo da marca Shimadzu. O equipamento é composto por uma bomba LC-6AD Shimadzu, detector espectrofotométrico por UV/VIS Detector Shimadzu SPD-20A, sistema controlador CBM-20A, conectado a um computador com *software LC Solution*. Foi empregada a coluna cromatográfica polimérica Shodex Asahipak GS-310206. O funcionamento da cromatografia líquida de alta eficiência reciclante é justamente explicado pelo princípio do reciclo da amostra. A amostra passa pela coluna e pelo aparelho repetidas vezes (ciclos) em função da presença de válvula de reciclo, e a cada ciclo completado a tendência é de que as substâncias se distanciem uma da outra possibilitando assim a separação das mesmas que em seguida são coletadas, através da abertura da válvula de reciclo. O princípio de separação dependerá da coluna cromatográfica utilizada, neste caso a coluna polimérica separa as substâncias pelo princípio da exclusão, ou seja, do tamanho da substância.

Condições cromatográficas: Fase estacionária - coluna cromatográfica polimérica Shodex Asahipak GS-310206. Fase móvel - MeOH 100%; vazão 3,0 ml/min. As amostras foram eluídas sob as mesmas condições variando apenas o comprimento de onda de detecção e o tempo de eluição.

3.10 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

A elucidação das estruturas químicas foi feita por meio das seguintes técnicas espectroscópicas: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H , 300 MHz, 400 MHz e 500 MHz) e de carbono (RMN ^{13}C , 300 MHz e 400 MHz), HMQC (*Heteronuclear multiple quantum coherence*, ^1H - ^{13}C , 300 MHz/ ^1H , 400 MHz/ ^{13}C) e HMBC (*Heteronuclear multiple bond coherence*, ^1H - ^{13}C , 300 MHz/ ^1H , 400 MHz/ ^{13}C). Os espectros de RMN foram obtidos em metanol, clorofórmio e acetona deuterados.

3.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA TÉCNICA DE BIOAUTOGRAFIA

Foi adotado o procedimento descrito por Lund et al., (1975). Para isso foi desenvolvida cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de vidro com sílica gel G₆₀F₂₅₄ 5 cm x 20 cm (Art. 7730-Merck) com espessura de camada de 0,25 mm.

3.11.1 Dissolução dos extratos

Os extratos foram solubilizados em solventes adequados de acordo com o solvente usado no processo extrativo dos mesmos. Como é o caso dos extratos acetoetílicos, butanólicos e metanólicos. A quantidade de solvente adicionada a cada extrato obtido foi calculada de forma a se obter uma concentração conhecida de 3 mg de extrato em 100 µL de solvente (30 mg/mL). Nas placas de sílica gel G₆₀F₂₅₄ 5 x 20 cm (Art. 7730-Merck) com espessura de camada de 0,25 mm foram aplicados 10 µL dos extratos avaliados com o auxílio de microseringa graduada de 50 µL (Hamilton^R), resultando na aplicação de 300 µg de cada extrato. Para cada tipo de extrato, foram testadas diferentes fases móveis, até que se encontrassem fases móveis ideais para eluição das placas. Para os extratos em acetato de etila estabeleceu-se a fase móvel hexano:acetato na proporção 70:30, com 1% de ácido acético glacial. Já para os extratos butanólicos ficou definida a fase eluente água:butanol:ácido acético glacial na proporção 50:40:10. Por fim, para os extratos metanólicos a fase móvel utilizada foi hexano:acetato de etila na proporção 60:40, contendo 1% de ácido acético glacial. As amostras foram aplicadas nas placas de CCD em distância de 2 cm da base, e o intervalo de eluição padronizado foi de 15 cm. Foram aplicados 3 extratos por placa, utilizando-se placas de vidro de 5 x 20 cm. Em seguida, as placas foram eluídas em cuba de vidro contendo 200 mL da fase móvel correspondente. Por fim, as mesmas foram retiradas e secas ao ar livre.

3.11.2 Microorganismos indicadores

Utilizaram-se como microrganismos indicadores na revelação das placas os microrganismos *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885).

Os microrganismos foram mantidos em culturas imersas em glicerol e congeladas. Para o uso, as culturas foram retiradas do freezer e imediatamente imersas em banho-maria a 50°C. Após a liquefação do glicerol estas foram retiradas dos tubos e imediatamente transferidas para 10 mL de caldo triptona soja (TSB). As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e, em seguida, repicadas com o auxílio de alça de platina em tubos de ensaio contendo meio MHA (Mueller Hinton Agar) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Com o auxílio de alça de platina esterilizada os microrganismos foram transferidos para tubos contendo 5 mL de solução salina, e estas foram padronizadas pela comparação com tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %). Foram realizadas diluições sucessivas de forma a fornecer inóculo de 10^7 células/mL. Estas suspensões foram adicionadas ao meio Mueller Hinton na proporção de 2 %, dando origem aos inóculos. As suspensões foram mantidas em banho-maria à temperatura de aproximadamente 50°C até o momento do uso.

3.11.3 Detecção da atividade antimicrobiana

As placas cromatográficas desenvolvidas foram cuidadosamente secas e as substâncias eluídas observadas sob luz ultravioleta a 254 nm (UV curto) e a 366 nm (UV longo).

Sobre as placas, com o auxílio de pipeta esterilizada, foram adicionados lentamente 20 mL dos inóculos (Meio Mueller Hinton). Após a solidificação, discos de 10 µg de gentamicina (Laborclin) foram aplicados nas placas como controle positivo de inibição de crescimento. As placas foram então incubadas à temperatura de 37°C por período de 24 horas, em câmaras úmidas.

Após o período de incubação as placas foram reveladas com solução de ágar 1% contendo 0,02% de cloreto de trifêniltetrazólio (CTT) e incubadas novamente a 37°C por cerca de 30 minutos.

3.12 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM MICROPLACA para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.12.1. Preparo das amostras

Foram preparadas soluções de três extratos em acetato de etila, um proveniente do caldo da cultura em meio líquido (Czapek, 192 horas) e dois obtidos do cultivo do fungo em meio sólido (60 e 90 dias de cultivo), contendo 1 mg em 150 µL de DMSO. Transferiram-se estes 150 µL para tubos de ensaio estéreis contendo 1850 µL de caldo Mueller Hinton (OXOID^R). Utilizaram-se estas soluções para a realização dos ensaios. Também foram avaliadas as substâncias purificadas do cultivo em meio sólido

3.12.2. Microrganismos utilizados

Utilizaram-se as cepas padrão de *K. rhizophila* ATCC 9341 e de *S. aureus* ATCC 25923, para ensaios com extratos (extrato em acetato de etila dos cultivos em arroz; e extrato em acetato de etila obtido em meio Czapek). Para as substâncias purificadas além dos microrganismos indicadores acima, foram utilizados também as cepas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885).

3.12.3. Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores, desenvolvidas em Ágar Mueller Hinton (OXOID^R), foram transferidas para tubo de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada. Padronizaram-se estas suspensões comparando-as com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %). Efetuou-se a transferência de 1 mL de cada suspensão para 9 mL de solução salina 0,9%. Em seguida, foram transferidos 2 mL de cada suspensão para 10 mL de caldo Mueller Hinton. Desta última suspensão foram retiradas alíquotas de 20 µL de inóculo.

3.12.4. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de meio líquido e meio sólido de arroz e das substâncias purificadas.

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram depositados um total de 100 µL da mistura do caldo Mueller Hinton, das soluções dos extratos escolhidos para o teste e das suspensões dos microrganismos indicadores. As substâncias purificadas também foram avaliadas. Os extratos e as substâncias purificadas foram avaliadas nas seguintes concentrações: 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350 e 400 µg/mL de caldo Mueller Hinton. Foi determinada a concentração inibitória mínima do extrato que inibiu o crescimento em uma menor concentração, utilizando-se o método de microdiluição em microplaca (ANDREWS, 2001).

Em um dos orifícios de cada placa foi feito o controle da cultura, o qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano. Em outro orifício foi feito o controle de esterilidade do caldo Mueller Hinton e, em outro, o controle do sistema solvente utilizado na solubilização dos extratos testados, no caso, dimetilsulfóxido (DMSO).

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 40 µL de cloreto de trifêniltetrazólio (SIGMA^R) preparado em solução aquosa (0,7%). As microplacas foram incubadas novamente por 30 minutos, sendo então observado o aparecimento de coloração avermelhada. A ausência de cor nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento microbiano (microrganismo sensível ao extrato ou a substância avaliada).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção de biomassa em meio pré-fermentativo

Inicialmente a proposta era desenvolver 24 horas de cultivo em meio pré fermentativo com vistas à obtenção de biomassa para o cultivo em meio fermentativo. Entretanto, observou-se que este tempo era insuficiente para o fungo em estudo adquirir massa micelial necessária para um bom processo fermentativo na etapa posterior. Tendo em vista tal, observou-se que o tempo de 72 horas para pré-fermentação fornecia massa micelial necessária para o processo seguinte.

O crescimento de fungos filamentosos em cultura submersa pode ser dividido em 4 fases: lag, exponencial, de crescimento reduzido e estacionário (FINKELSTEIN; BALL, 1992). A fase lag representa o período durante o qual os esporos se adaptam ao novo ambiente. A adaptação inclui a síntese de enzimas e intermediários para dar suporte à retomada do crescimento. O tempo desta fase não depende somente do estado fisiológico do microrganismo, mas também da concentração do inóculo. A fase exponencial do crescimento é caracterizada por um aumento significativo da massa celular. A taxa de crescimento da hifa depende da cepa do fungo e das condições ambientais. Como a etapa em meio pré-fermentativo é utilizada com a finalidade de se obter massa celular, a transferência da biomassa na fase exponencial de crescimento é fundamental para que haja uma diminuição da disponibilidade de carbono no meio fermentativo mais rapidamente, desencadeando assim a produção de metabólitos secundários em um tempo menor (BRATNAGAR et al., 1988; ROBBERS et al., 1997), sendo o meio pré- fermentativo rico em nutrientes e que favorece o aumento da massa vegetativa.

4.2. Produção de metabólitos em meio fermentativo líquido

A otimização dos parâmetros foi desenvolvida segundo um planejamento de experiências, o qual é fundamental (LINDLEY, 1995). A falta de planejamento, muitas vezes, é a causa do insucesso de uma investigação, pois sem um planejamento adequado nunca se sabe se os resultados experimentais poderão ser úteis para a elaboração de novos protocolos. A atividade estatística mais importante não é a análise de dados e sim o planejamento dos experimentos em que esses dados devem ser obtidos. A essência de um bom planejamento consiste em projetar

um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação desejada.

É de se esperar que as condições do meio fermentativo influenciem nos tipos de metabólitos secundários a serem produzidos. Tais condições incluem: composição do meio, disponibilidade de nutrientes, pH do meio, tempo de incubação (GADEN – JUNIOR, 2000).

Inicialmente, com o objetivo de selecionar os melhores meios de cultura para a produção dos metabólitos de interesse, foram avaliados três meios de cultura para o processo fermentativo: Czapek, Jackson e Vogel. Fazendo-se a ressalva de que o segundo meio em questão foi modificado, pela troca do componente melaço de cana por sacarose. O meio fermentativo de Czapek foi mais promissor por fornecer extratos com potencial de inibição em ensaios de bioautografia, como será relatado a seguir e por apresentar um perfil cromatográfico de CLAE mais promissor que os demais meios avaliados. A temperatura de 40°C foi selecionada uma vez que a alteração desta poderia resultar em perda de atividade das substâncias de interesse, e também por tratar-se de um fungo termofílico, a utilização de temperaturas inferiores a 40°C retardariam o crescimento. É conhecido que alguns fatores podem interferir na atividade de substâncias antimicrobianas durante obtenção das mesmas, incluindo-se a fase de obtenção de extratos, como elevação da temperatura, a presença de cátions bivalentes e alterações bruscas de pH. Por meio dos fatores citados, a perda da atividade pode ocorrer devido a mudanças na conformação da molécula ativa ou devido à perda da ação estabilizadora de proteínas, que sofrem desnaturação sobre as moléculas ativas (IROBI, 1997).

Alguns aspectos relevantes devem ser considerados sobre o processo de fermentação. GADEN – JUNIOR (2000) descreve a cinética do processo fermentativo associada a três fatores fundamentais: 1 – relaciona com o metabolismo de carboidratos, com a obtenção de energia; 2 – relaciona os subprodutos deste metabolismo e, 3 – relaciona os subprodutos não diretamente ligados à oxidação de carboidratos.

GADEN – JUNIOR (2000) definem uma fase inicial de crescimento, em que a massa micelial é formada (forma vegetativa), acompanhada de uma redução dos constituintes do meio, tais como, fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, além do aumento da demanda de oxigênio. Um antibiótico, grupo de metabólitos secundários, é produzido após este momento de crescimento, o qual pode ser

definido como idiofase. Novamente, os aspectos que mostram o metabolismo secundário como uma *válvula de escape* para as condições não favoráveis ao fungo.

A avaliação das atividades antimicrobianas, bem como dos perfis cromatográficos de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), de culturas incubadas por diferentes períodos, em três diferentes meios, possibilitou a seleção de três diferentes tempos de incubação, 144, 168 e 192 horas, como será relatado posteriormente.

4.3. Produção de metabólitos em meio fermentativo sólido

Visando a produção de metabólitos secundários de interesse biológico, foram desenvolvidos cultivos em meio fermentativo sólido, com o propósito de realizar estudo comparativo ao cultivo em meio líquido de forma a analisar a viabilidade do mesmo.

Água livre não parece ser o meio natural para a maioria dos microrganismos. Nem todos os microrganismos marinhos optam por viver livres em água do mar, onde 98% dos isolados do meio marinho têm sido obtidos de superfícies de substratos sólidos submersos, e menos de 1% de todos os fungos conhecidos têm sido encontrados em ambientes marinhos (CARLILE & WALKINSON, 1994; KELECOM, 2002). A evolução da maioria dos fungos acontece pelo crescimento em substratos sólidos. Ascomicetos e basidiomicetos gastaram suas histórias de evolução em ambientes terrestres, com apenas algumas espécies adaptando-se em ambiente aquático mais tarde em seus processos evolutivos. Produtos de fungos de interesse biotecnológico, isto é, enzimas, metabólitos secundários e esporos, foram desenvolvidos pelo uso de substratos sólidos úmidos e não em substratos líquidos. Conseqüentemente, o cultivo de microrganismos em suspensão aquosa pode apresentar eficiência metabólica ímpar. Neste aspecto, a tecnologia de fermentação submersa (FS) pode ser considerada um tipo de violação do habitat natural de microrganismos selvagens. Entretanto, a fermentação em estado (substrato) sólido (FSS) é frequentemente usada apenas para a produção de pequena extensão de enzimas e metabólitos secundários. Por outro lado, diversos microrganismos, bem adaptados à fermentação submersa (líquida) por engenharia genética são utilizados para a produção de enzimas em escala industrial.

Fermentação em substrato sólido (FSS) é definida como o cultivo de microrganismos em suporte sólido úmido, que porta substratos inertes ou insolúveis

que podem, em adição, ser usados como fonte de carbono e energia. A fermentação leva a ausência ou quase ausência de água livre, deste modo sendo caracterizado o meio natural ao qual os microrganismos estão adaptados (PANDEY *et al*, 2000). De forma mais geral, a fermentação em substrato sólido pode ser entendida como algum processo em que substratos em estado de partícula sólida são utilizados (MITCHELL, 2000b).

O objetivo da fermentação em substrato sólido é levar ao fungo ou bactéria cultivada o contato com substratos insolúveis e deste modo complementar a maior concentração de substrato para o processo fermentativo. Esta tecnologia resulta, embora por enquanto em pequena escala, em várias vantagens de processo de significativo potencial econômico e importância ecológica quando comparado à fermentação submersa (líquida) (Tabela 11). Entretanto, existem também diversas desvantagens da fermentação em substrato sólido, que desencorajam o uso desta técnica para processo de produção industrial. As principais obstruções se devem principalmente a transposição de gradientes – de temperatura, pH, umidade, concentração de substrato ou pO_2 – durante o cultivo, que são difíceis de controlar devido à limitada disponibilidade de água.

Um trabalho de considerável importância tem sido feito para entender os aspectos da engenharia bioquímica do processo de fermentação em substrato sólido (MITCHELL *et al*, 2000a, 2000b; PANDEY, 2003). E é surpreendente que estes problemas técnicos ainda não tenham sido resolvidos, ainda mais por ser um dos mais antigos processos biotecnológicos conhecidos. Há cerca de 5000 anos os fungos são cultivados em processo de fermentação em substrato sólido para a produção de comida, provavelmente o processo mais antigo e conhecido de fermentação de arroz por *Aspergillus oryzae* foi usado para iniciar o processo de koji; o fungo *Penicillium roquefortii* tem sido usado para a produção de queijo por 4000 anos; bebida de soja tem sido produzida na Ásia e pão no Egito desde 3000 anos atrás (PANDEY *et al*, 2001).

Tabela 11 – Vantagens biotecnológicas da fermentação em substrato sólido (FSS) comparada à fermentação por tecnologia submersa (FS).

Vantagens	Conseqüências	Problemas a serem resolvidos
Avanços biotecnológicos		
Menor demanda de água	Menor perda de água	Organização de gradientes úmidos
Maior concentração de endo produtos		
Repressão catabólica significativamente menor ou perda	Fermentação em presença de glicose	
Utilização de substrato sólido	Maior concentração de substratos para crescimento	Organização de gradientes de substratos
Menor demanda de esterilidade	Mistura de culturas para fermentação pelos microrganismos	Organização de gradientes de pH
Suporte sólido para o microrganismo		
Simulação do meio natural	Melhor performance para o cultivo dos microrganismos	
Fermentação de substratos insolúveis em água		
Cultura de mistura de microrganismos	Sinergismo para a performance metabólica.	
Vantagens de processo		
Maior volume de produtividade	Menor volume de fermentação	
Menor demanda de energia para aquecimento		Organização de gradiente de temperatura
Fácil aeração		Organização de gradientes de oxigênio para cultivo em larga escala
Utilização de diferentes e não usuais fontes de carbono	Baratas e abundantes fontes de carbono	
Não é necessário o uso de químicos antiespumantes	Não há perda de microrganismos durante a fermentação	

Aplicações biotecnológicas de fermentação em substrato sólido estão bastante difundidas (RAIMBAULT, 1998; PANDEY *et al*, 2000, 2001). Revisões relativas à produção de metabólitos secundários (BALAKRISHNAN e PANDEY, 1996; ROBINSON *et al*, 2001), aflatoxinas (BARRIOS – GONZALES e TOMASINI, 1996), técnicas enzimáticas (PANDEY *et al*, 1999), enzimas bacterianas (BABU e SATYANARAYANA, 1996), enzimas sacarificantes de amido (SELVAKUMAR *et al*, 1998), celulase (CEN e XIA, 1999), enzimas celulolíticas (NIGAM e SINGH, 1996b), comida chinesa (HAN *et al*, 2001), a bioconversão de lignocelulose (TENGERDY e SZAKACS, 2003), cultivo de cogumelo e flavors naturais (WANG, 1999), e comidas enriquecidas com proteínas (NIGAM e SINGH, 1996a) também têm sido publicadas.

De forma conclusiva as vantagens do cultivo em meio sólido incluem maior produtividade de fermentação, menor repressão catabólica, menor demanda de água e consequentemente, menor demanda de esterilidade devido a menor atividade de água, cultivo de microrganismos requerendo suporte sólido, e cultivos com mistura de vários fungos.

A produção de metabólitos secundários representa outro aspecto da aplicação da fermentação em substrato sólido que tem ganhado importância nos últimos anos. Diversos metabólitos secundários biologicamente ativos têm sido produzidos por FSS (BALAKRISHNAN e PANDEY, 1996; BARRIOS – GONZALEZ e MEJÍA, 1996; ROBINSON *et al*, 2001). A produção de metabólitos secundários é frequentemente casada ao crescimento em fase estacionária do microrganismo usado, e depende da limitação de fósforo (P) e nitrogênio (N) junto com excesso de carbono e fonte de energia. Em FSS, a produção de metabólitos secundários também mostra ser promovida pela reduzida quantidade de água e pelo suprimento de nutriente. Além disso, isto muitas vezes depende da associação de micélio do fungo com o substrato sólido ou com um suporte inerte. Diversos fungos necessitam um substrato sólido como âncora para otimizar o crescimento e produtividade. Portanto, microrganismos geneticamente modificados que foram otimizados em condições de cultivos líquidos, têm geralmente sido usados em fermentações submersas ao passo que aqueles isolados naturalmente têm desenvolvido um melhor papel na fermentação sólida (HOLKER *et al*, 2004).

O arroz vermelho, uma tradicional comida asiática, tem sido por mais de mil anos preparada pela fermentação de arroz vaporizado por *Monascus purpureus* em processo de fermentação em estado sólido. Este fungo produz seis diferentes

pigmentos policetídeos coloridos de brilho amarelo à vermelho, que tem encontrado aplicações tanto para aditivos alimentares como para produtos farmacêuticos (JOHNS e STUART, 1991; JUZLOVA *et al*, 1996). O esforço para o cultivo de *M. purpureus* por fermentação submersa resultou em baixa produção de pigmento (HSU *et al*, 2002). A fermentação em substrato sólido tem desenvolvido um papel chave, particularmente na produção de comidas asiáticas, sendo operado sob condições semi-estéreis de fermentação (HAN *et al*, 2001; SU *et al*, 2003). Cultura mista de fungos e leveduras, que não pode ser estabelecida em meio fermentativo líquido, pode produzir em uma via sinérgica, vários componentes aroma – ativos quando cultivados em FSS (NOUT e AIDOO, 2002). Fu e colaboradores (2002) identificaram 70 compostos voláteis, 29 com aroma atividade, quando brotos de bambu foram fermentados em meio sólido. Todos estes elementos juntos foram necessários para gerar o flavor, e quando colocados em meio fermentativo líquido não puderam gerar o mesmo resultado (HOLKER *et al*, 2004)

Outro problema que não poderia ser satisfatoriamente resolvido na fermentação submersa foram mudanças no suprimento de oxigênio devido a alterações no meio de crescimento durante o curso da fermentação. Em muitos casos os fungos necessitam de meio altamente viscoso para secreção dos metabólitos requeridos. A viscosidade é conseguida pela constante secreção de substâncias poliméricas durante o crescimento do fungo. Desta maneira nestes casos, a fermentação em substrato sólido parece ser a melhor alternativa desde que a velocidade de agitação e o suprimento de oxigênio não desenvolvam papel importante (ELIBOL e MUVITUNA, 1997).

Diversos metabólitos secundários bioativos como antibióticos, micotoxinas, endotoxinas bacterianas, alcalóides, ou fatores de crescimento de plantas, podem ser obtidos por fermentação em substrato sólido com rendimento significativamente maior do que em processo de fermentação submersa. Especialmente em cultivos de *Streptomyces*, a fermentação em substrato sólido é uma excelente alternativa, porque a produção de metabólitos secundários está associada à formação de esporos formados pelo micélio aéreo. Desde modo, antibióticos como penicilina (BARRIOS-GONZALES *et al*, 1993), cefalosporina (JERMINI e DEMAINE, 1989), ciclosporina A (BALAKRISHNAN e PANDEY, 1996; RAMANA MURTHY *et al*, 1999), tetraciclina (YANG e LING, 1989), oxitetraciclinas (YANG e WANG, 1996), rifamicina (KRISHNA *et al*, 2003) e iturina (OHNO *et al*, 1993) têm sido fabricados com elevada

produtividade, definidos como produto de concentração por volume (HOLKER *et al*, 2004).

A produção de iturina por *Bacillus subtilis* através da fermentação em substrato sólido foi investigada por Ohno *et al* (1993, 1996); a produção de iturina encontrada foi cerca de 20 vezes maior em fermentação em biorreator com 3 kg substrato sólido [$0,55 - 0,8 \text{ mg (g de cultura)}^{-1} \text{ dia}^{-1}$] comparado à fermentação submersa em biorreator contendo 5 litros de meio [$0,0032 - 0,044 \text{ mg (g de cultura)}^{-1} \text{ dia}^{-1}$]. Em adição, a iturina obtida por fermentação em substrato sólido exibiu maior atividade antifúngica, presumivelmente devido a maior superfície de ligação (HOLKER *et al*, 2004).

Alcalóides do ergot, como a dietilamida do ácido lisérgico, são usados como princípios ativos farmacêuticos. Hernández e colaboradores (1993) demonstraram que o rendimento de alcalóides foi 3,9 vezes maior quando *Claviceps fusiformis* foi cultivado por processo de fermentação em substrato sólido quando comparado à fermentação submersa. Diferentes cultivos de *Claviceps purpurea* por fermentação em substrato sólido e fermentação submersa revelaram não haver diferença no rendimento da produção de alcalóides do ergot; entretanto, o espectro de metabólitos secundários foi diferente. Isto muito provavelmente se deveu a sensibilidade do fungo a substâncias antiespumantes, a alta demanda de oxigênio e/ou a produção de enzimas inibidoras da produção de alcalóides do ergot (BALAKRISHNAN e PANDEY, 1996).

A produção de elevadas quantidades de micotoxinas, como a ochratoxina A (OTA) e ochratoxina B (OTB), em fermentação em substrato sólido agitado foi reportada por Harris e Mantle (2001). A concentração final obtida por fermentação em substrato sólido (cerca de $10 \text{ mg de OTA/g}^{-1}$ substrato) foi significativamente maior do que o cultivo em meio submerso. Ácido micofenólico foi produzido por *Penicillium brevicompactum* através de fermentação em substrato sólido em concentrações superiores a 425 mg.kg^{-1} em farelo de trigo (SADHUKHAN *et al*, 1999). Em ambos os processos a ampliação de escala mostrou ser problemática (HOLKER *et al*, 2004).

Apesar do bom crescimento no processo de fermentação submersa, alguns fungos produzem metabólitos secundários apenas em fase estacionária quando cultivados em superfícies sólidas. O fungo coprofílico *Coniochaeta ellipsoida* produz o antibiótico ácido tetrâmico coniosetina, apenas quando submetido à fermentação

em substrato sólido (SEGETH *et al*, 2003). Em um novo tipo de biorreatores de fermentação em substrato sólido construído apenas para permitir o desenvolvimento de diversos experimentos sob as mesmas condições (HOLKER, 2002), a otimização da composição de culturas foi desenvolvida em escala de 1 kg de substrato sólido. Os resultados indicaram que centeio e farelo de aveia foram os melhores substratos para o cultivo de *C. ellipsoia* em fermentação sólida. O processo de ampliação de escala fermentativa foi desenvolvido com 5 kg de massa de substrato usando um sistema estéril de leite fluidizado em biorreator (HOLKER, 2003), resultando em rendimento máximo de conioseina na concentração de 1,4 mg/g de substrato seco (resultados publicados por Bioreact, Bonn, Germany/Aventis Pharma Deutschland, Frankfurt, Germany).

Pela observação desta conjuntura, optou-se inicialmente pelo cultivo em meio fermentativo em substrato sólido, no caso em arroz enriquecido, pelas seguintes razões: i - maior rendimento, ii - manejo mais simples, iii - perfil cromatográfico em CLAE e, iv - potencial de ação antimicrobiana (ensaio de microdiluição em microplaca) mais promissores quando comparados aos cultivos desenvolvidos nos meios fermentativos líquidos avaliados. Conceitos que serão reforçados posteriormente.

4.4. Produção de metabólitos antimicrobianos

Com relação à atividade antimicrobiana foram testados por processo de bioautografia um total de 60 extratos, sendo que destes, 54 oriundos dos cultivos em diferentes tempos e meios líquidos de fermentação, obtidos de partições utilizando os solventes acetato de etila, *n*-butanol e metanol. Estes extratos apresentaram atividades antimicrobianas em diferentes níveis. Os seis extratos restantes foram obtidos a partir dos diferentes tempos de cultivo em meio fermentativo de substrato sólido, arroz enriquecido, os quais apresentaram atividade bastante discreta e modesta quando avaliados pela técnica de bioautografia. Entretanto, mostraram-se mais promissores em relação aos extratos obtidos em meio líquido quando avaliados pela técnica de microdiluição em microplaca utilizando CTT (cloreto de trifeniltetrazólio), determinando a concentração inibitória mínima (CIM).

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1. Técnica de Bioautografia

A seguir estão apresentadas as tabelas com resultados dos ensaios bioautográficos dos extratos resultantes dos cultivos em três diferentes meios líquidos fermentativos (Czapek, Jackson e Vogel), resultantes de seis tempos de cultivos diferentes (72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas), sendo 18 extratos acetoetílicos, 18 butanólicos e 18 metanólicos.

Tabela 12 - Bioautografia dos extratos* em Acetato de Etila de *Humicola grisea* var. *thermoidea* obtido do cultivo em meio fermentativo de Vogel

Bactérias	1	72h	96h	120h	144h	168h	192h
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	+(7,6 – 8,4)	-	+ (0–1,8; 2,7–3,3; 5–5,4; 7,5– 8,3)	+ (0–2,7; 2,7–3,7;4,5–5,2;7,8–8,4)	+ (0–2; 2,5–3,6; 5–5,5; 8,3–9)
<i>Escherichia coli</i>		-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>		-	+(7,5–8,0)	-	+ (2,6–3,6; 4,8–5,5; 8,0–8,7)	+ (2,6–3,6; 4,8–5,5)	+ (2,6–3,6; 4,8–5,5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-	-	-	-	-	-

1 – Tempo de cultivo de cada extrato em meio fermentativo de Vogel.

* Concentração do extrato aplicado 30 mg/mL / Volume de extrato aplicado – 10 µL.

- ausência de atividade.

+ atividade com respectivo intervalo de halo de inibição, correspondente ao intervalo entre os fatores de retenção que compreendem o halo.

Tabela 13 - Bioautografia dos extratos* em Acetato de Etila de *Humicola grisea* var. *thermoidea* obtido do cultivo em meio fermentativo de Jackson

Bactérias	1	72h	96h	120h	144h	168h	192h
<i>Staphylococcus aureus</i>		+ (2,4–2,9)	+ (2,1–2,5)	-	+ (2,5–3,2; 4,3–5,0; 5,1– 5,6; 7,3–8,0; 8,5–9,5)	-	-
<i>Escherichia coli</i>		-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>		-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-	-	-	-	-	-

1 – Tempo de cultivo de cada extrato em meio fermentativo de Jackson.

* Concentração do extrato aplicado 30 mg/mL / Volume de extrato aplicado – 10 µL.

- ausência de atividade.

+ atividade com respectivo intervalo de halo de inibição, correspondente ao intervalo entre os fatores de retenção que compreendem o halo.

Tabela 14 - Bioautografia dos extratos* em Acetato de Etila de *Humicola grisea* var. *thermoidea* obtido do cultivo em meio fermentativo de Czapek

Bactérias	1	72h	96h	120h	144h	168h	192h
<i>Staphylococcus aureus</i>		+ (01,6;2,5-4,0)	-	+(0-3,0)	+ (5,3-8,0;9,5-10,8)	+(1,0-3,7)	+(2,0-3,3)
<i>Escherichia coli</i>		+(1,5-2,2)	-	+(0-2,7)	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>		+(0-8,0)	-	+(0-7,0)	+(0-5,0)	+(0-1,1;1,2-2,0;2,2-4,0)	+(0-1,0;2,3-3,2)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-	-	-	-	-	-

1 - Tempo de cultivo de cada extrato em meio fermentativo de Czapek.

* Concentração do extrato aplicado 30 mg/mL / Volume de extrato aplicado – 10 µL.

- ausência de atividade.

+ atividade com respectivo intervalo de halo de inibição, correspondente ao intervalo entre os fatores de retenção que compreendem o halo.

Tabela 15 - Bioautografia dos extratos* em Metanol de *Humicola grisea* var. *thermoidea* obtido do cultivo em meio fermentativo de Czapek

Bactérias	1	72h	96h	120h	144h	168h	192h
<i>Staphylococcus aureus</i>		+ (2,3 – 3,7)	-	-	+ (2,0 – 5,0)	+ (origem – 1 cm; 3,7 – 7,0)	+ (3,7 – 6,0)
<i>Escherichia coli</i>		-	-	-	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>		+ (1,0 – 1,6; 2,0 – 4,7)	-	+ (0 – 4,7; 7,2 – 7,8)	+ (1,0 – 1,6; 2,5 -5,7)	+ (origem – 1,3 cm; 2,0 – 6,0)	+ (3,3 -5,5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		-	-	-	-	-	-

1 – Tempo de cultivo de cada extrato em meio fermentativo de Czapek.

* Concentração do extrato aplicado 30 mg/mL / Volume de extrato aplicado – 10 µL.

- ausência de atividade.

+ atividade com respectivo intervalo de halo de inibição, correspondente ao intervalo entre os fatores de retenção que compreendem o halo.

Os extratos butanólicos obtidos dos três meios fermentativos e os extratos metanólicos obtidos dos cultivos em meio Jackson e Vogel, não apresentaram ação inibitória, não sendo portanto, mencionados nas tabelas anteriormente citadas.

Observando os resultados dos processos bioautográficos pode-se elencar alguns importantes pontos: os extratos acetoetílicos se mostraram mais promissores quando comparados aos extratos butanólicos e metanólicos, apresentando considerável atividade inibitória em relação às cepas bacterianas utilizadas como indicadores biológicos, sendo que os extratos em acetato de etila obtidos dos cultivos em meios Czapek e Vogel propiciaram maior ação inibitória quando comparados aos extratos acetoetílicos provenientes do cultivo em meio fermentativo de Jackson.

Referente ao tempo de cultivo, observou-se que os extratos compreendidos entre o sexto e o oitavo dias (144 a 192 horas), mostraram-se mais ativos, caracterizando esse período de tempo de cultivo, como tempo razoável para que o fungo pudesse promover a formação de substâncias de interesse. Tal afirmação será melhor embasada a partir dos resultados dos perfis de cromatografia líquida de alta eficiência.

Com relação aos indicadores microbiológicos utilizados, observou-se que as bactérias gram – positivas, *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram mais suscetíveis à ação dos extratos em teste e, por outro lado, as bactérias gram – negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885), mostraram-se relativamente resistentes. Provavelmente este fato se deva à composição da parede celular, característica que diferencia as duas classes de bactérias utilizadas. Já para a levedura *Candida albicans*, dificuldades de crescimento do microrganismo inviabilizaram os ensaios pelo processo de bioautografia com esta cepa.

Para ilustrar o processo bioautográfico desenvolvido com extratos dos cultivos do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, seguem as figuras 3 e 4.

Figura 3. Bioautografia dos extratos acetotílicos obtidos do cultivo em meio fermentativo de Czapek do fungo *Humicola grisea* var *thermoidea* contra *Kocuria rhizophila*, extrato de 168 horas (halo superior) e extrato de 192 horas (halo inferior). À direita controle com gentamicina.

Figura 4. Bioautografia dos extratos em acetato de etila obtidos do cultivo em meio fermentativo de Vogel do fungo *Humicola grisea* var *thermoidea* contra *Staphylococcus aureus*, extratos de 192, 168 e 144 horas (halos de cima para baixo). À esquerda controle com gentamicina.

4.5.2. Método de Microdiluição em Microplaca

Os extratos obtidos por cultivo em meio fermentativo sólido não se mostraram promissores quando avaliados pela técnica de bioautografia, optou-se então por realizar avaliação pelo método de microdiluição em microplaca utilizando CTT (Cloreto de Trifeniltetrazólio), a qual tem maior sensibilidade quando comparada à técnica de bioautografia. Foram avaliados 3 extratos; 2 provenientes do cultivo em arroz, extrato acetotílico de 60 dias de cultivo e extrato acetotílico de 90 dias de cultivo; o terceiro extrato avaliado foi obtido a partir da extração por acetato de etila do cultivo de 192 horas em meio fermentativo de Czapek, o qual se mostrou mais promissor dentre os extratos obtidos a partir dos cultivos em meio líquido quando avaliado pela técnica de bioautografia.

Os microrganismos indicadores utilizados nesta técnica foram *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), uma vez que estes se mostraram mais sensíveis quando submetidos à avaliação por técnica bioautográfica.

Os resultados obtidos utilizando os microrganismos indicadores citados acima estão apresentados nas tabelas 16 e 17. As condições de preparo e metodologia de avaliação estão relatadas no item 3.12 da seção Material e Métodos.

Tabela 16. Atividade antimicrobiana dos extratos de culturas de *Humicola grisea* var. *thermoidea* frente a *Staphylococcus aureus*.

Condições de Cultivo			Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
Meio fermentativo	Temperatura (°C)	Tempo	
Czapek	40	192 horas	-
Arroz enriquecido	40	60 dias	400
Arroz enriquecido	40	90 dias	350

Tabela 17. Atividade antimicrobiana dos extratos de culturas de *Humicola grisea* var. *thermoidea* frente a *Kocuria rhizophila*.

Condições de Cultivo			Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
Meio fermentativo	Temperatura (°C)	Tempo	
Czapek	40	192 horas	400
Arroz enriquecido	40	60 dias	300
Arroz enriquecido	40	90 dias	250

4.6. Comparação dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os extratos em acetato de etila provenientes dos cultivos em meio líquido e os extratos obtidos a partir do cultivo em meio fermentativo sólido foram submetidos à análise cromatográfica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), o critério para seleção destes foram os resultados obtidos a partir dos ensaios microbiológicos de bioautografia e microdiluição em placa. Estas análises foram desenvolvidas com vistas a definir meio fermentativo e tempo de cultivo que ofereçam as melhores condições de quantidade de metabólitos de interesse e perfil dos mesmos, de forma a caracterizar o processo de otimização.

As figuras a seguir apresentam os cromatogramas obtidos com as análises dos extratos em acetato de etila em 260 nm (comprimento de onda mais apropriado para análise dos cromatogramas em estudo), provenientes das culturas desenvolvidas em diferentes condições de cultivo. É pertinente sinalizar que além dos cromatogramas dos extratos obtidos dos cultivos também foram desenvolvidos cromatogramas dos meios de cultura utilizados nas fermentações, no caso: meio de Czapek, Jackson, Vogel e Arroz enriquecido. O que possibilita realizar um paralelo entre os cromatogramas obtidos dos metabólitos gerados pelo fungo e dos componentes dos meios de cultura, que corresponderiam ao tempo zero de cultivo.

Figura 5. Cromatogramas dos extratos acetotílicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Arroz. Controle do meio (Ac), cultivo de 23 dias (A 23), cultivo de 40 dias (A 40), cultivo de 46 dias (A 46), cultivo de 52 dias (A 52), cultivo de 60 dias (A 60) e cultivo de 90 dias (A 90). 260 nm (F.E.: coluna de fase reversa CLC – ODS (M). F.M.: eluição por gradiente iniciando com MeOH:H₂O 1:1 e terminando com 100% de MeOH em 26 minutos, vazão de 1,0 ml/min.)

Figura 6. Cromatogramas dos extratos acetoeólicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Czapek. Controle do meio (CZA Controle), cultivo de 72 horas (C 72) e cultivo de 120 horas (C 120), cultivo de 144 horas (C 144), cultivo de 168 horas (C 168) e cultivo de 192 horas (C 192). 260 nm (F.E.: coluna de fase reversa CLC – ODS (M). F.M.: eluição por gradiente iniciando com MeOH:H₂O 1:1 e terminando com 100% de MeOH em 26 minutos, vazão de 1,0 ml/min.)

Figura 7. Cromatogramas dos extratos acetônicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Jackson. Controle do meio (JACK Controle), cultivo de 72 horas (J 72), cultivo de 96 horas (J 96) e cultivo de 120 horas (J 120), cultivo de 144 horas (J 144), cultivo de 167 horas (J 168) e cultivo de 192 horas (J 192). 260 nm (F.E.: coluna de fase reversa CLC – ODS (M). F.M.: eluição por gradiente iniciando com MeOH:H₂O 1:1 e terminando com 100% de MeOH em 26 minutos, vazão de 1,0 ml/min.)

Figura 8. Cromatogramas dos extratos acetoeólicos das culturas desenvolvidas em meio fermentativo de Vogel. Controle do meio (VOG Controle), cultivo de 72 horas (V 72), cultivo de 96 horas (V 96) e cultivo de 120 horas (V 120), cultivo de 144 horas (V 144), cultivo de 168 horas (V 168) e cultivo de 192 horas (V 192). 260 nm (F.E.: coluna de fase reversa CLC – ODS (M). F.M.: eluição por gradiente iniciando com MeOH:H₂O 1:1 e terminando com 100% de MeOH em 26 minutos, vazão de 1,0 ml/min).

Desenvolvendo um paralelo entre os perfis cromatográficos dos extratos obtidos do cultivo em meio fermentativo sólido podem-se fazer as seguintes observações: entre o tempo zero ou controle do meio e o extrato obtido do 23º dia de cultivo, não existem diferenças substanciais entre os perfis tanto no aspecto quantitativo quanto qualitativo. Já o extrato do 40º dia de cultivo apresenta um perfil quantitativamente diferente em relação aos extratos anteriores, leia-se controle e 23º dia de cultivo. Os extratos que compreendem o 46º, 52º e 60º dias de cultivo, apresentaram perfis cromatográficos bastante semelhantes, quantitativa e qualitativamente, com discretas diferenças entre os mesmos. Por sua vez o extrato obtido do período de 90 dias de cultivo apresentou perfil semelhante aos 46º, 52º e 60º dias de cultivo, entretanto com diferenças no aspecto quantitativo.

Dos perfis obtidos dos cultivos nos três meios fermentativos avaliados, vale a pena destacar que os extratos obtidos dos cultivos em meio Czapek apresentaram perfis mais complexos, quando comparados àqueles obtidos dos extratos dos cultivos em meio Jackson e Vogel. Isso pode em tese ser reforçado pelos resultados dos ensaios por processo de bioautografia, nos quais os extratos do cultivo em Czapek apresentaram os melhores resultados de inibição de crescimento das cepas analisadas. E justamente os extratos de 120, 144, 168 e 192 horas que se mostraram ativos biologicamente nos testes de bioautografia, apresentam perfis cromatográficos em CLAE bastante semelhantes.

4.7 Fracionamento cromatográfico do extrato acetotílico (1700 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Do fracionamento deste extrato através de cromatografia líquida a vácuo foram obtidas 29 frações, como relatado na seção Material e Métodos, item 3.9.1. As frações 7 e 8 foram agrupadas e submetidas à técnica de cristalização pelo sistema: éter – *n*-hexano. Quando a substância se encontra cristalizada, geralmente o grau de pureza é considerado satisfatório se não houver cristalização de duas ou mais substâncias. Os cristais foram cuidadosamente recolhidos, armazenados e solubilizados em metanol deuterado e posteriormente enviados para análise por ressonância magnética nuclear (RMN). Os dados espectrométricos e a estrutura proposta estão relatados nesta seção. Foi obtido um total de 90 mg da substância

H6, que para o trabalho com metabólitos de fungos é bastante raro ocorrer, por se tratar de uma massa considerável.

4.8 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (4600mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (60 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Do fracionamento da fração diclorometânica foram obtidas 34 frações, como relatado na seção Material e Métodos, item 3.9.1.

Figura 9. Esquema geral de fracionamento do extrato diclorometânico - cultura de 60 dias

As frações 13, 14, 15, 16, 17 e 18 foram agrupadas por apresentar perfil bastante semelhante em cromatografia analítica em placa, seguindo o trabalho de purificação estas frações (880 mg) foram submetidas à CLV (cromatografia líquida a vácuo). Deste processo cromatográfico foram obtidas 11 sub-frações, sendo que as semelhantes, que corresponderam as sub-frações F3 a F6 (490 mg), foram

agrupadas e submetidas novamente ao processo de cromatografia em coluna com utilização de vácuo. Desta coluna, foram obtidas nove sub-frações, as semelhantes, que corresponderam as sub-frações de F3 a F6 (168 mg) foram agrupadas e submetidas à cromatografia preparativa em placa, utilizando a fase móvel $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ – 97:3 (1% de ácido acético), resultando na purificação da substância H5. Desta substância, foi obtida considerável massa, foram cerca de 100 mg. Assim como relatado anteriormente, também foi utilizada a técnica de cristalização. A substância recolhida em placa preparativa foi submetida à técnica de cristalização pelo sistema: éter – *n*-hexano, como descrito no item 3.9.4 da seção Material e Métodos. Os cristais foram solubilizados em clorofórmio deuterado e enviados para análise por ressonância magnética nuclear (RMN), os dados espectrométricos, bem como a estrutura proposta estão relatados nesta seção.

Abaixo segue o esquema de fracionamento da fração agrupada Fr 13 a 18.

Tabela 18 – Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 13 a 18 (880 mg)

Sub-frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
F1	90:10	200	50,8
F2	80:20	200	241,8
F3	70:30	200	198,2
F4	65:35	200	145,5
F5	60:40	200	105,8
F6	55:45	200	57,8
F7	50:50	200	27,2
F8	40:60	200	26,3
F9	30:70	200	18,1
F10	100:	200	21,6
F11	100 (MeOH)	200	116,9

Sub-frações agrupadas para desenvolvimento de CLV: F3 a F6 (490 mg)

Tabela 19 – Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 13 a 18 (3 - 6) (490mg)

Sub-frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
F1	100:0	200	3,8
F2	90:10	200	3,5
F3	85:15	200	25,3
F4	80:20	200	65,2
F5	75:25	200	55,4
F6	70:30	200	21,1
F7	50:50	200	6,7
F8	0:100	200	2
F9	100 (MeOH)	200	31,1

Sub-frações agrupadas para desenvolvimento de cromatografia preparativa: F3 a F6 (168 mg).

Por sua vez as frações de 28 a 33 (250 mg), obtidas da CLV do extrato diclorometânico inicial (4600 mg) (item 3.8.2 – seção Material e Métodos), foram agrupadas e submetidas a outro processo cromatográfico em coluna a vácuo, resultando em 13 sub-frações. As sub-frações F11 e F12 (127 mg), foram agrupadas e igualmente submetidas ao processo de cromatografia líquida a vácuo, resultando em sete novas sub-frações. A sub-fração F5 (42,4 mg), foi submetida à cromatografia em placa preparativa, utilizando o sistema eluente CH_2Cl_2 /Acetona/Ácido Acético, na proporção 70:26:4. A substância isolada (H4) foi extraída da placa preparativa com metanol, filtrada para remoção da sílica e analisada em CLAE, para verificação do grau de pureza. Esta apresentou o mesmo perfil cromatográfico em CLAE e em cromatografia analítica em placa quando comparada à substância isolada da fração agrupada contendo Fr 16, 17 e 18 do extrato acetofílico do cultivo em arroz por 60 dias.

Abaixo segue o esquema de fracionamento da fração agrupada 28 a 33 (250mg).

Tabela 20 – Frações da cromatografia líquida a vácuo de Fr 28 a 33 (250mg)

Sub-frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
F1	100:0	200	2,7
F2	90:10	200	4.7
F3	80:20	200	4.2
F4	70:30	200	6.6
F5	60:40	200	8.2
F6	50:50	200	11.2
F7	40:60	200	11.8
F8	30:70	200	7.6
F9	20:80	200	9.4
F10	10:90	200	20.4
F11	5:95	200	44
F12	0:100	200	83
F13	100 MeOH	200	55

Sub-frações agrupadas para o desenvolvimento de CLV: F11 e F12 (127,5 mg)

Tabela 21 – Frações da cromatografia líquida a vácuo - Fr 28 a 33 (11 - 12) (127mg)

Sub-frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Peso (mg)
F1		200	5.6
F2		200	7.2
F3		200	8.7
F4		200	23.5
F5		200	42.4
F6		200	36.1
F7		200	5.9

Sub-fração para desenvolvimento de cromatografia em placa preparativa: F5 (42,4 mg)

4.9. Fracionamento cromatográfico do extrato acetoetílico (4000 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Do fracionamento da fração acetoetílica foram obtidas 31 frações, como relatado na seção Material e Métodos (item 3.8.3)

Figura 10. Esquema geral de fracionamento do extrato acetoetílico - cultura de 90 dias.

CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo

C. “Flash” – Cromatografia “Flash”

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-R – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Reciclante

4.9.1. Fração Acetoetílica 16-21 (880 mg) – Cromatografia Líquida à Vácuo

As 31 frações obtidas da CLV inicial foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e as semelhantes foram agrupadas em 8 frações, como relatado na seção Material e Métodos (item 3.8.3). A fração agrupada 16-21 (880 mg) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo, gerando 8 frações (coluna 20 cm x 4 cm; 50 g de sílica 60 H). O fracionamento foi desenvolvido de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 22 – Fração Acetoetílica 16 – 21 (880 mg)

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
F1	60:40	400	80
F2	50:50	400	135
F3	40:60	400	150
F4	30:70	400	185
F5	20:80	400	100
F6	10:90	400	150
F7	0:100	400	50
F8	100 (MeOH)	400	30

4.9.2. Fração Acetoetílica 16-21 (5-7) (300 mg) - Cromatografia Líquida à Vácuo

As frações resultantes da etapa acima mencionada foram submetidas à cromatografia em camada delgada, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, as frações 5, 6 e 7 (300 mg) foram reunidas e submetidas novamente a cromatografia líquida a vácuo, gerando novamente 8 frações (coluna 20 cm x 4 cm; 50 g de sílica 60 H). O fracionamento foi desenvolvido de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 23 – Fração Acetoetílica 16 – 21 (5-7) (300 mg)

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
F1	50:50	300	9
F2	40:60	300	11
F3	30:70	300	91
F4	20:80	300	108
F5	10:90	300	20
F6	0:100	300	18
F7	15:85 (EtOH:AcOEt)	300	4
F8	100 (MeOH)	300	39

4.9.3. Fração Acetoetílica 16-21 (5-7) 4-6 (146 mg) – Cromatografia “Flash”

As frações resultantes da etapa acima mencionada foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, as frações 4, 5 e 6 (146 mg) foram reunidas e submetidas a outra modalidade cromatográfica, Cromatografia “Flash” (item 3.9.3 da seção Material e Métodos). O fracionamento foi desenvolvido em sistema isocrático, com a fase móvel clorofórmio:metanol - 93:7 (CHCl_3 :MeOH), acrescido de 1% de ácido acético glacial. Foram obtidas 75 frações, estas foram analisadas sob cromatografia em camada delgada e as semelhantes foram agrupadas em 8 frações.

As frações de maior interesse foram analisadas por CLAE para delinear a melhor estratégia de isolamento.

4.9.3.1. Frações Acetoetílicas 16-21 (5-7) 4-6 (9-13) (23 mg) e 16-21 (5-7) 4-6 (14-16) (12 mg) - CLAE

As frações acetoetílicas Fr 16-21 (5-7) 4-6 (9-13) (23 mg) e Fr 16-21 (5-7) 4-6 (14-16) (12 mg) resultantes da cromatografia “flash”, foram submetidas a isolamento em CLAE, gerando as substâncias H4 (8,4 mg) para fração 9-13; H3 (4 mg) e H4 (4 mg) para fração 14-16.

Condições cromatográficas de isolamento de H3 e H4. Fase estacionária - coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 μm . Fase móvel - eluição por gradiente multilinear iniciando com $\text{CH}_3\text{AcCN}:\text{H}_2\text{O}$ - 10:90, aumentando até 100% de CH_3AcCN em 16 minutos de eluição e retornando para $\text{CH}_3\text{AcCN}:\text{H}_2\text{O}$ - 10:90 em 23 minutos, vazão de 1,0 ml/min, tempo de eluição – 23 minutos.

Para isolamento de H4 da fração Fr 16-21 (5-7) 4-6 (9-13) e também para o perfil da fração Fr 16-21 (5-7) 4-6 (14-16) foi utilizado o mesmo gradiente multilinear acima citado, apenas diferindo a fase móvel utilizada, onde foi promovida a troca de acetonitrila (CH_3AcCN) por metanol (MeOH).

Os cromatogramas a seguir indicam o grau de pureza das substâncias isoladas.

Figura 11. Análise de grau de pureza em CLAE – Substâncias H3 e H4.

1. Fr 16-21 (5-7) 4-6 (9-13) – substância H4 (tempo de retenção – 16 minutos)
2. Fr 16-21 (5-7) 4-6 (14-16) – perfil contendo as substâncias H3 e H4
3. Fr 16-21 (5-7) 4-6 (14-16) 1 – substância H3 (tempo de retenção – 3,58 minutos)
4. Fr 16-21 (5-7) 4-6 (14-16) 2 – substância H4 (tempo de retenção – 14 minutos)

4.9.3.2. Frações Acetoetílicas 16-21 (5-7) 4-6 (19-28) (45 mg) – Cromatografia Preparativa

Esta fração foi analisada em CLAE sob as mesmas condições acima citadas, gerando o cromatograma a seguir.

Figura 12. Cromatograma de fração acetoetílica obtida de cromatografia “flash”.

A fração foi submetida à cromatografia preparativa em placa, para tal, foram utilizadas 4 placas preparativas, onde em cada uma foram depositados em torno de 11 mg de amostra. As placas foram eluídas três vezes, com as seguintes fases

móveis: i - H₂O:Ácido Acético:MeOH:CHCl₃ (1:1:3:95) e ii - H₂O:Ácido Acético:MeOH:Acetona:CHCl₃ (2:1:5:25:67). Sendo uma eluição com a primeira fase móvel e duas com a segunda. As placas foram observadas em UV (254 e 366nm) e recolheram-se quatro frações: 1; 1.1; 2 e 2.1. Estas foram analisadas em CLAE, sob as mesmas condições citadas acima.

Figura 13. Cromatograma de fração obtida de cromatografia preparativa.

Como observado nos cromatogramas, as substâncias não estão totalmente purificadas e algumas se encontram bastante próximas, portanto optou-se pelo uso de cromatografia líquida de alta eficiência – reciclante (CLAE-R) para promover o isolamento das mesmas.

Fr AcOEt 16-21 (5-7) 4-6 (19-28) 1 – CLAE-R. Substância H1.

A fração 1 (6,9 mg) foi submetida a CLAE-R. O tempo de ciclo da substância majoritária foi de cerca de 47 minutos. A amostra foi eluída por 190 minutos, totalizando 4 ciclos. A substância majoritária foi coletada no terceiro ciclo (144 min) quando sua distância para as substâncias vizinhas estava segura, referente ao quesito pureza. Deste procedimento foram isolados 3,0 mg de substância denominada H1.

Figura 14. Cromatograma de CLAE-R – substância H1.

Fr AcOEt 16-21 (5-7) 4-6 (19-28) 1.1 – CLAE-R. Substância H2

A fração 1.1 (11 mg) foi submetida a CLAE-R. O ciclo da substância majoritária foi de 44 minutos e de 47 minutos para a substância minoritária. A amostra foi eluída por 290 minutos, totalizando 7 ciclos. A substância majoritária foi coletada no sexto ciclo (276 min) e a minoritária igualmente (290 min), quando à distância entre as mesmas assegurou um bom nível de pureza. Deste procedimento foram isolados 3,8 mg de H1 e 5,1 mg de H2.

Figura 15. Cromatograma de CLAE-R – substância H2.

Fr AcOEt 16-21 (5-7) 4-6 (19-28) 2 - CLAE-R. Substância H3

A fração 2 (16 mg) foi submetida a CLAE-R. O ciclo da substância majoritária foi de 45 minutos. A amostra foi eluída por cerca de 100 minutos, totalizando 2 ciclos. A substância foi coletada no segundo ciclo (90 min), assegurando bom nível de pureza. Deste procedimento foram isolados 6,0 mg de H3.

Figura 16. Cromatograma de CLAE-R – substância H3.

Fr AcOEt 16-21 (5-7) 4-6 (19-28) 2.1 - CLAE-R. Substância H3

A fração 2.1 (12 mg) foi submetida a CLAE-R. O ciclo da substância de interesse foi de 45 minutos. A amostra foi eluída por cerca de 150 minutos, totalizando 3 ciclos. A substância foi coletada no terceiro ciclo (137 min), assegurando bom nível de pureza. Deste procedimento foram isolados 6,5 mg de H3.

Figura 17. Cromatograma de CLAE-R – substância H3.

As substâncias isoladas e identificadas como H1, H2 e H3, foram submetidas a CLAE, para verificar o grau de pureza das mesmas, para posterior desenvolvimento de técnicas espectroscópicas com as mesmas.

Condições cromatográficas: Fase estacionária - coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 µm. Fase móvel: - eluição por gradiente multilinear iniciando com CH₃AcCN:H₂O - 10:90, aumentando até 100% de CH₃AcCN em 16 minutos e retornando para CH₃AcCN:H₂O - 10:90 até 23 minutos, vazão de 1,0 ml/min, 260 mm).

Figura 18. Verificação do grau de pureza em CLAE – Substâncias H1, H2 e H3.

Referente aos três cromatogramas acima apresentados, as três substâncias mostram tempos de retenção bastante próximos (H1 – 3,03 min, H2 – 3,19 min e H3 – 3,58 min), além de apresentarem perfis de UV semelhantes, o que pode caracterizar substâncias de mesma classe química.

4.10. Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico (3750 mg) obtido da cultura em escala ampliada em meio sólido (90 dias), utilizando cromatografia líquida a vácuo.

Do fracionamento da fração diclorometânica foram obtidas 31 frações, como relatado na seção Material e Métodos (item 3.8.4).

Figura 19. Esquema geral de fracionamento do extrato diclorometânico - cultura de 90 dias.

CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

4.10.1. Fração Diclorometânica 18-29 (439 mg) – Cromatografia Líquida à Vácuo

As 31 frações obtidas da CLV inicial foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada e as semelhantes foram agrupadas em seis frações, como relatado na seção Material e Métodos. A fração agrupada 18-29 (439 mg) foi submetida à cromatografia líquida a vácuo, gerando 8 frações. O fraacionamento foi desenvolvido de acordo com a tabela a seguir.

Tabela 24 – Fração Acetoetífica 18 - 29 (439 mg)

Frações	Hexano/Acetato	Volume (mL)	Massa (mg)
F1	60:40	400	32
F2	50:50	400	53
F3	40:60	400	28
F4	30:70	400	60
F5	20:80	400	50
F6	10:90	400	44
F7	0:100	400	60
F8	100 (MeOH)	400	112

4.10.2. Fração Diclorometânica 18-29 (5-7) (154 mg) – Cromatografia “Flash”

As frações resultantes da etapa acima mencionada foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa, observadas previamente sob luz ultravioleta a 254 nm e 366 nm e reveladas com solução vanilina/ácido sulfúrico, as frações 5, 6 e 7 (154 mg) foram reunidas e submetidas a outra modalidade cromatográfica, Cromatografia “Flash” (relatado no item 3.9.3 da seção Material e Métodos). O fracionamento foi desenvolvido em sistema isocrático, com a fase móvel hexano:acetato de etila:metanol – 25:69:6 (*n*-Hex:AcOEt:MeOH). Foram obtidas 46 frações, estas foram analisadas sob cromatografia em camada delgada e as semelhantes foram agrupadas em 3 frações.

As frações foram analisadas por CLAE para delinear a melhor estratégia de isolamento.

Fr DCM 18-29 (5-7) 4-6 (10-21) (77 mg) – CLAE. Substância H4.

Das três frações obtidas a partir da cromatografia flash, a fração agrupada 10-21 (77 mg) quando submetida à análise em CLAE resultou no cromatograma apresentado a seguir, indicando elevado grau de pureza da amostra proveniente de coluna cromatográfica “flash”.

Figura 20. Verificação do grau de pureza em CLAE – Substância H4.

Condições cromatográficas de análise de pureza de Fr DCM 18-29 (5-7) 4-6 (10-21): Fase estacionária - coluna cromatográfica analítica de fase reversa (C-18) CLC-ODS (M) – Shimadzu, 4,0 mm x 250 mm, diâmetro das partículas 5 µm. Fase móvel: - eluição por gradiente multilinear iniciando com MeOH:H₂O - 10:90, aumentando até 100% de MeOH em 16 minutos e retornando para MeOH:H₂O - 10:90 até 23 minutos, vazão de 1,0 ml/min, 275 mm). A substância proveniente da coluna cromatográfica “flash”, da fração diclorometânica refere-se a substância denominada H4, também isolada a partir da fração acetoetílica.

4.11. Elucidação estrutural das substâncias isoladas

A substância isolada, denominada H4, foi elucidada através de métodos espectroscópicos (RMN uni e bidimensionais) aliados a dados previamente descritos na literatura científica.

Foram inicialmente obtidos os espectros de RMN unidimensionais para H4. Os espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C da substância H4, estão no anexo A. Pode-se observar no espectro de RMN ¹H dois dubletos: δ 7,96 e em δ 6,88 (*d*, *J* - 8,9 Hz; 2H), caracterizando quatro hidrogênios em relação *orto* em sistema aromático *p* - substituído. Também apresenta um tripleto em δ 6,61 (*t*, *J* - 4,2 Hz; 1H), evidenciando a presença de hidrogênio vinílico. Além destes sinais, apresenta um singleto largo, um tripleto e um multipeto com as seguintes características: δ 3,94 (*sl*, 2H); δ 3,46 (*t*, *J* - 7,3 Hz; 2 H) e δ 2,44 (*m*, 2H).

Referente aos dados de RMN ¹³C, este permite afirmar que a substância em questão apresenta: grupo carbonílico, devido aos sinais em δ 198,6 e δ 168,4 além dos sinais de carbonos sp² em δ: 164,0; 141,0; 132,0; 131,0; 129,8 e 116,3; evidenciando um anel benzênico *p*-substituído e uma insaturação adicional, conjugada à carbonila devido ao valor de deslocamento químico em 141,0 ppm. O sinal em δ 164,0 indica que uma das posições do anel aromático é substituída por oxigênio. Também foram observados três sinais de carbonos metilênicos sp² em δ: 40,6; 40,4 e 25,3.

Os espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C, incluindo os dados de HMBC e HMQC, foram obtidos em metanol deuterado. Os dados obtidos por meio de análises dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C (400 MHz) da substância isolada H4 (lactama) e os dados reportados da literatura estão nas tabelas 25 e 26, a seguir. Com a ressalva

de que em literatura existem somente dados de RMN ^1H , obtidos quando do isolamento da substância pela primeira vez.

Também foram obtidos os mapas de contorno de HMQC e HMBC (anexo A). As análises dos mapas de contorno do HMQC possibilitaram fazer as atribuições dos carbonos ligados a hidrogênio e as do HMBC permitiram estabelecer as correlações entre hidrogênios e carbonos, possibilitando a atribuição dos carbonos quaternários e a confirmação da estrutura da molécula.

Foi possível observar no mapa de contornos HMBC correlações dos hidrogênios referentes ao anel aromático (δ 7,96 e δ 6,88) com os carbonos em δ 116,3; 132,0; 164,0 e 198,6 para os hidrogênios em δ 7,96. Os hidrogênios δ 6,83 apresentam correlação com os carbonos em δ 116,3; 129,8 e 164,0. Sugerindo a existência do fragmento 1 para a molécula. A presença da carbonila ligada ao anel aromático é também confirmada pela desblindagem dos hidrogênios em δ 7,96, fato que se deve ao efeito anisotrópico da carbonila.

Figura 21. Fragmento 1 com as respectivas correlações observadas no mapa de contornos HMBC

Os hidrogênios metilênicos (δ 3,94; 3,46 e 2,44) apresentam correlações no HMBC com os mesmos carbonos, evidenciando a proximidade destes hidrogênios. Os hidrogênios em δ : 3,94 correlacionam-se com os carbonos sp^2 em δ 198,6 (carbonila ligada ao anel aromático), em δ 168,4; 141,0 e 131,0 (sistema de carbonila α,β – insaturada). O deslocamento em δ 168,4 sugere que esta carbonila seja uma amida. Estas correlações estão representadas na figura 22 e permitiram a proposição do fragmento 2 para a molécula.

Tabela 26. Dados do espectro de RMN ^{13}C (400 MHz) para a substância isolada - Lactama H4 (δ , CD_3OD) correlacionado aos mapas de contorno de HMQC e HMBC.

Posição	H4 (lactama)	HMQC	HMBC
C ₁	168,4	-	H ₅ (δ 6,61); H ₇ (δ 3,94); H ₃ (δ 3,46)
C ₂	-	-	
C ₃	40,6	H ₃ (δ 3,46)	H ₅ (δ 6,61); H ₄ (δ 2,44)
C ₄	25,2	H ₄ (δ 2,44)	H ₅ (δ 6,61); H ₃ (δ 3,46)
C ₅	141,0	H ₅ (δ 6,61)	H ₇ (δ 3,94); H ₃ (δ 3,46); H ₄ (δ 2,44)
C ₆	131,0	-	H ₇ (δ 3,94); H ₄ (δ 2,44)
C ₇	40,4	H ₇ (δ 3,94)	H ₅ (δ 6,61)
C ₈	198,6	-	H _{2'6'} (δ 7,96); H ₇ (δ 3,94)
C _{1'}	164,0	-	H _{5'3'} (δ 6,88)
C _{2' e 6'}	116,3	H _{5'3'} (δ 6,88)	H _{5'3'} (δ 6,88); H _{2'6'} (δ 7,96)
C _{3' e 5'}	132,0	H _{2'6'} (δ 7,96)	H _{2'6'} (δ 7,96); H _{5'3'} (δ 6,88)
C _{4'}	129,8	-	H _{2'6'} (δ 7,96); H _{5'3'} (δ 6,88); H ₇ (δ 3,94)

Assim sendo, foram realizadas buscas no SciFinder Scholar com a estrutura proposta. A busca evidenciou a presença de uma lactama de origem marinha, que possui a mesma estrutura molecular da substância H4.

Esta lactama foi isolada em 1979 a partir de uma esponja caribenha (*Halichondria melanodocia*) infestada por alga. Espécimes da esponja foram coletadas em Summerland Key, Flórida (GOPICHAND, SCHIMITZ, 1979). A substância foi obtida a partir do extrato isopropanólico da esponja úmida (fresca). Quando os dados de RMN ^1H da substância H4 e da lactama de origem marinha são comparados é possível afirmar que a substância H4 em questão se trata realmente da lactama isolada a partir da esponja, *Halichondria melanodocia*.

As substâncias H5 e H6, foram elucidadas através de métodos espectroscópicos (RMN unidimensionais) aliados a dados previamente descritos na literatura científica.

Os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C das substâncias H5 e H6, estão no anexo A. Pode-se observar no espectro de RMN ^1H de H5 apenas dois singletos: δ 8,10 e em δ 3,95, caracterizando uma molécula de sistema aromático *p* – substituído e com simetria. De forma que o singlete em δ 8,10 corresponde aos hidrogênios do sistema aromático e o singlete em δ 3,95 corresponde aos hidrogênios das substituições em *para*. Por sua vez o espectro de RMN ^{13}C , traz dados que sustentam a proposta acima mencionada. Os sinais em δ 166,6 correspondem às carbonilas da função éster; δ 134,2 correspondem aos carbonos do anel aromático ligados diretamente às carbonilas; δ 129,5 correspondem aos carbonos do anel

aromático onde se ligam os hidrogênios do mesmo e por fim os sinais em δ 52,5 correspondem aos carbonos das metilas esterificadas.

Comparando com dados da literatura, foi proposta a estrutura do dimetil tereftalato (DMT). Os dados espectrais de H5, bem como da literatura estão relatados nas tabelas 27 e 28.

Figura 24. Proposta estrutural para substância H5 – Dimetil tereftalato.

O espectro de RMN ^1H de H6 apresenta baixa complexidade. Existem 2 dubletos: δ 7,08 e δ 6,72, ambos com constante de acoplamento (J) de 8,6 Hz, caracterizando acoplamento *orto* e molécula de sistema aromático *p* – substituído e por fim um singlete em δ 3,45. Todos os sinais integram para dois hidrogênios. Por sua vez o espectro de RMN ^{13}C , traz dados que convergem para a proposta abaixo mencionada. Os sinais em: δ 177,3 corresponde à carbonila do ácido carboxílico; δ 157,5 corresponde aos carbonos aromáticos vizinhos ao grupo hidroxílico; δ 131,4 corresponde ao carbono do anel aromático onde se liga a ramificação do ácido carboxílico (resultou em menor desblindagem do que a hidroxila, pois não está diretamente ligado a carbonila); δ 126,9 corresponde aos carbonos em posição *orto* em relação a ramificação do ácido carboxílico (efeito de desblindagem do grupamento carbonila); δ 116,3 corresponde aos carbonos em posição *orto* em relação a hidroxila e por fim o sinal em δ 41,2 corresponde ao carbono metilênico sp^2 (ligado diretamente à carbonila do grupo carboxílico).

Comparando com dados da literatura, foi proposta a estrutura do ácido *para* – hidróxifenilacético, substância semelhante ao tirosol. Os dados espectrais de H6, bem como da literatura estão relatados nas tabelas 27 e 28.

Figura 25. Proposta estrutural para a substância H6 – Ácido *p* - hidroxifenilacético

Tabela 27. Dados dos espectros de RMN ^{13}C (300 MHz e 400 MHz, respectivamente) para as substâncias isoladas - Ácido *p*-hidroxifenilacético (δ , CD_3OD) e 1, 4 – dimetil benzenodicarboxilato (δ , CDCl_3).

Posição	ApHF (δ)	Literatura (ApHF)* (δ)	Posição	DMT (δ)	Literatura (DMT)* (δ)
C 1	157,5	157,8	C 1	166,6	166,2
C 2 6	116,3	117,2	C 2	134,2	133,9
C 3 5	126,9	126,7	C 3	129,5	129,5
C 4	131,4	132,1	C 4	52,5	52,3
C 7	41,2	41,3	-	-	-
C 8	177,3	178,2	-	-	-

* National Institute of Advanced Science and Technology (AIST) – JAPAN.

Tabela 28. Dados dos espectros de RMN ^1H (300 MHz e 400 MHz, respectivamente) para as substâncias isoladas - Ácido *p*-hidroxifenilacético (δ , CD_3OD) 1, 4 – dimetil benzenodicarboxilato (δ , CDCl_3).

Posição	ApHF	Literatura (ApHF)*	Posição	DMT	Literatura (DMT)*
H 3 5	δ 7,08 (<i>d</i> , <i>J</i> - 8,6 Hz; 2H)	δ 7,28 (<i>d</i> , <i>J</i> - 8,6 Hz; 2H)	H 3	δ 8,10 (<i>s</i> , 4H)	δ 8,09 (<i>s</i> , 4H)
H 2 6	δ 6,72 (<i>d</i> , <i>J</i> - 8,6 Hz; 2H)	δ 6,72 (<i>d</i> , <i>J</i> - 8,6 Hz; 2H)	H 4	δ 3,95 (<i>s</i> , 6H)	δ 3,94 (<i>s</i> , 6H)
H 7	δ 3,45 (<i>s</i> , 2H)	δ 3,66 (<i>s</i> , 2H)	-	-	-

* National Institute of Advanced Science and Technology (AIST) – JAPAN.

As substâncias H5 e H6 são metabólitos secundários de baixa complexidade estrutural, mas que por outro lado foram gerados em grande quantidade, 90 e 100 mg, respectivamente. Isto possibilita a realização das técnicas espectroscópicas (RMN ^1H , RMN ^{13}C e massas) e ensaios biológicos com relativa tranquilidade. O trabalho com produtos naturais é bastante exaustivo, pois estes são constituídos geralmente por mistura de inúmeros compostos de estrutura complexa, requerendo desta forma etapas de fracionamento, purificação e concentração normalmente mais

elaborados, sendo freqüentemente de custo elevado. Contribui para isso, a reduzida concentração desses compostos em sua matriz de origem. Sobretudo, em estudos envolvendo metabólitos de fungos, justamente pelo fato de apresentarem sistema enzimático versátil, sendo capazes de gerar extratos de alta complexidade e de elevado número de substâncias.

O ácido *p*-hidroxifenilacético, proveniente da fração acetato de etila do cultivo em meio sólido de arroz, possui estrutura semelhante ao tirosol. Este é um composto fenólico com ampla distribuição na natureza, sendo encontrado em plantas e fungos. Presente em azeite de oliva e vinhos confere a estes alimentos capacidade de sequestrar radicais livres. O fungo *Penicillium corylophilum* sintetiza tirosol, o qual é encontrado em *Rhodiola rosea* (Crassulaceae), sendo isolada da fração metanólica obtida de extratos de tronco. Chen *et al* (2004) identificaram o tirosol como sendo uma molécula sinalizadora na regulação do crescimento de *Candida albicans*. Esta substância atua estimulando a formação do tubo germinativo (SILVA. *et al*, 2006). Igualmente, o tirosol foi isolado em *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo endofítico associado à *Viguiera robusta* (Asteraceae) e tem sido identificado em várias linhagens de fungos endofíticos, sugerindo que esta substância possa ter alguma função comum para estes microrganismos (BORGES *et al*, 2005).

Por sua vez o éster 1,4 – dimetil do ácido benzenodicarboxílico ou 1,4 – dimetil benzenocarboxilato (ácido tereftálico), também conhecido como dimetil tereftalato (DMT), foi isolado a partir da fração diclorometânica do cultivo do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em meio fermentativo de arroz, sendo classificado como um ácido dicarboxílico. O ácido tereftálico é um dos monômeros utilizados para produção do polímero polítrimetiltereftalato (PTT), gerado pela polimerização de 1-3 propanodiol (PDO) com ácido tereftálico (AT) ou dimetil tereftalato (DMT), que é considerado um monômero petroquímico. O diálcool PDO é produzido por via fermentativa a partir de glicose proveniente do amido de milho. AT ou DMT, entretanto, são produzidos via síntese química a partir de intermediários petroquímicos. A glicose é convertida a glicerol e a seguir a 1, 3 - propanodiol por *E. coli* geneticamente modificada. O produto é separado, purificado e levado à planta de polimerização. A polimerização se dá em processo contínuo e é similar à produção de polietileno tereftalato (PET), podendo ser usada as próprias unidades industriais de PET já instaladas para produção de PTT. A polimerização é realizada com excesso de PDO e remoção de água proveniente da esterificação com AT (ou

metanol da reação de transesterificação no caso de se usar DMT). O crescimento da cadeia PTT é produzido pela polimerização de 1, 3 - propanodiol (PDO) com ácido tereftálico (AT) ou dimetil tereftalato (DMT). Este polímero tem potencial de substituição de aplicações que utilizam Nylon (fibras para confecções e carpetes) e PET (principalmente frascos e garrafas) (PRADELLA, 2006).

Figura 26. Esquema geral de produção de politrimetiltereftalato (PTT).

Devido às suas excelentes propriedades físicas e à grande variedade de materiais que pode ser obtida pela variação de composição dos monômeros dióis e ácidos dicarboxílicos, os poliésteres alifáticos-aromáticos (PAA) têm sido objeto de intensa pesquisa e desenvolvimento por grandes *players* mundiais da área química (DuPont, Shell, Basf, entre outras) (PRADELLA, 2006).

Nestes casos os monômeros provenientes da petroquímica também são produzidos e copolimerizados separadamente. Além da melhoria da produtividade destes processos, objetiva-se substituição da rota química de produção de dióis e de ácidos dicarboxílicos por rotas que utilizem matérias primas renováveis (PRADELLA, 2006).

Os poliésteres alifáticos – aromáticos (PAA), se referem a um grupo de produtos caracterizado pelo fato dos monômeros estarem sendo produzidos atualmente via síntese química a partir de matérias primas petrolíferas, embora exista um grande esforço da utilização de técnicas de DNA recombinante e de engenharia bioquímica para produzi-los a partir de matérias primas renováveis. Em todos os casos o material é produzido a partir de um diol copolimerizado com um ou mais ácidos dicarboxílicos. Neste ponto é fundamental frisar que os polímeros desta família apresentam uma excelente oportunidade para a biotecnologia industrial, pois muitos

dos dióis e diácidos utilizados para síntese química destes polímeros podem ser produzidos a partir de matéria primas renováveis, a exemplo de outras famílias de bioplásticos (PRADELLA, 2006).

Os polióis como os poliésteres utilizados na síntese de poliuretanas (PURs) podem potencialmente ser sintetizados a partir de diálcoois e diácidos que, por sua vez podem ser biossintetizados a partir de carboidratos e outras fontes de carbono de matérias-primas renováveis. Entre eles podemos citar os ácidos dicarboxílicos, adípico e succínico e os álcoois di ou tri funcionais 1, 2 e 2, 3 - propanodiol, 1, 4 - butanodiol, 1, 6 - hexanodiol e glicerol.

Por sua vez o polibutilenotereftalato (PBT) é um copoliéster linear sintetizado pela reação de transesterificação e policondensação do diálcool 1-4 butanodiol (BDO) e de dimetiltereftalato (DMT), embora também possa ser utilizado AT ao invés de DMT. O esquema de reação é semelhante ao apresentado para PTT, somente com a substituição de PDO por BDO. Diferente de PTT, entretanto, não há rota biotecnológica estabelecida para produção do diálcool, embora seja importante salientar que a possibilidade de se utilizar ferramentas de DNA recombinante e engenharia bioquímica para suprir microrganismos com vias metabólicas adequadas para produção de BDO. Seu potencial de substituição por polímeros convencionais é parecido com os do PTT (Nylon e PET) e suas aplicações correspondentes. Por seu alto custo, quase o dobro de PET, o PBT pode se utilizado em ligas com outros polímeros convencionais, por exemplo, policarbonato para aplicações como plástico de engenharia nas áreas automobilística e eletrônica (PRADELLA, 2006).

Para tanto, ganhos de escala de produção, rotas tecnológicas otimizadas e a intensificação do uso de fontes renováveis de matérias primas e energia de baixo custo têm atraído a atenção dos atuais desenvolvimentos dos bioplásticos. Do ponto de vista da biotecnologia industrial, estas iniciativas abrem um leque de possibilidades que deve ser explorada pelas instituições públicas e empresas privadas. Em uma análise preliminar pode-se citar algum dos temas onde a biotecnologia industrial pode intervir, seja otimizando processos de produção, seja intensificando o uso de matérias primas renováveis.

Logo o fungo de solo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, apresenta potencial biotecnológico para produção de ácido dicarboxílico para síntese de biopolímeros.

Figura 27. Substâncias produzidas por *Humicola grisea* var. *thermoidea*

Referente às substâncias H1, H2 e H3, foram obtidos somente os espectros de RMN ¹H (400 MHz), em metanol deuterado para H1 e H3 e em mistura de metanol/acetona deuterados para a substância H2. Tais substâncias estão no Instituto de Química da Universidade de São Paulo – São Carlos para realização de demais experimentos em RNM (carbono e bidimensionais).

Apesar de não existir dados suficientes para fazer a proposta estrutural destas substâncias, de posse dos dados de ultra violeta e de RMN ¹H, é possível fazer algumas afirmações. As três substâncias absorvem na região de 260 nm no espectro de ultra violeta (observar Figura 18), denotando a presença de insaturações conjugadas, comportamento típico de substâncias que apresentam sistema aromático, para reforçar esta hipótese, o espectro de RMN ¹H das três substâncias apresentam sinais de hidrogênios aromáticos (região de δ 6,0 a 8,0) – δ – 7,25 para as substâncias H1 e H3 e δ – 7,72 para a substância H2.

Além disso, as substâncias H1 e H3 apresentam mais dois sinais no espectro de RMN ¹H: um singlete em δ – 1,92 e um dubleto em δ – 1,87. Por sua vez a substância H2 apresenta um dubleto em δ - 5,89 e um singlete em δ - 1,89.

Embora este conjunto de informações seja importante para a proposição estrutural eles não são suficientes e conclusivos para tal. De qualquer forma os dados espectrais de RMN ¹H estão no anexo A.

4.12. Avaliação da atividade antimicrobiana

Utilizando a técnica de microdiluição em microplaca – concentração inibitória mínima (CIM), foi avaliado o potencial de ação antimicrobiana das substâncias isoladas contra as cepas *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885). O intervalo de concentração para o ensaio antimicrobiano de microdiluição em microplaca variou de 50 a 400 µg/mL das substâncias isoladas em caldo Mueller Hinton. Os resultados estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29. Avaliação de atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em microplaca.

	Ác. <i>p</i> -hidróxifenilacético (H6)	Dimetil tereftalato (H5)	Lactama (H4)
<i>E. coli</i>	300 µg/mL	350 µg/mL	300 µg/mL
<i>K. rhizophila</i>	250 µg/mL	350 µg/mL	350 µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-

De forma bastante pontual, é possível concluir que as três substâncias avaliadas apresentam atividade antimicrobiana discreta quando adotada a técnica de microdiluição em microplaca para o ensaio antimicrobiano. Relativo à substância H4 (lactama), a literatura não traz informações referentes a ensaios biológicos, e apesar de não ter apresentado atividade antimicrobiana promissora em um primeiro momento, a massa obtida permite explorar outras atividades em potencial, entre elas, ensaios antitumorais, antiparasitários, entre outros.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e o trabalho desenvolvido com o fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*, apresentam-se as seguintes conclusões:

- Os extratos em acetato de etila aparentam ser os mais promissores quanto à atividade biológica, no caso daqueles obtidos dos meios fermentativos líquidos;
- Os meios de cultivo fermentativos Czapek e Vogel apresentam-se como melhores meios de cultivo para geração de metabólitos secundários com atividade antibiótica, em comparação ao meio fermentativo de Jackson;
- Os tempos de cultivo em meio fermentativo líquido compreendidos entre 144 e 192 horas se mostraram favoráveis para que o microrganismo produzisse metabólitos de interesse;
- Os extratos obtidos do cultivo em substrato sólido (arroz enriquecido) não se mostraram ativos nos ensaios pela técnica de bioautografia, sendo que se apresentaram promissores nos ensaios por microdiluição em placa, ensaio este mais sensível. O extrato obtido no 90º dia de cultivo foi mais promissor;
- As bactérias gram – positivas (*Kocuria rhizophila* e *Staphylococcus aureus*) são mais sensíveis aos extratos testados, enquanto gram – negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) apresentaram resistência, quando do ensaio pela técnica de bioautografia.
- Utilizando técnica de microdiluição em microplaca, as substâncias purificadas apresentaram ação, ainda que discreta, contra *Kocuria rhizophila* e *Escherichia coli*.
- O cultivo por fermentação em substrato sólido apresenta maior rendimento em relação ao cultivo em meio fermentativo submerso (líquido);
- Os perfis cromatográficos em CLAE desenvolvidos revelam que os extratos obtidos dos cultivos em meio fermentativo sólido oferecem as melhores condições para isolamento e obtenção de metabólitos secundários de interesse biológico, tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo. Onde o extrato obtido do 90º dia de cultivo mostrou-se promissor em ensaio de microdiluição em placa, apesar dos extratos em acetato de etila, oriundos do cultivo em fermentação submersa terem se mostrado mais promissores nos ensaios de bioautografia. Como mencionado anteriormente, o cultivo em meio sólido apresenta rendimento bastante superior ao cultivo em meio líquido.
- A ampliação de escala de cultivo utilizando a fermentação em substrato sólido (arroz), através da estratégia de cultivo em batelada, é uma boa alternativa para a

obtenção de metabólitos secundários de interesse biológico. E permite obter extratos com perfil cromatográfico semelhante ao obtido quando do cultivo em pequena escala.

- O processo de fracionamento/isolamento do extrato obtido a partir do cultivo em meio sólido forneceu as mesmas substâncias tanto na partição diclorometânica quanto na partição acetoetílica;
- A técnica de cromatografia líquida a vácuo se mostrou uma excelente opção para fracionamento de extratos brutos, sendo o extrato previamente submetido à partição com solventes de diferente polaridade, de forma a dinamizar o processo cromatográfico;
- Foram isoladas 6 substâncias: H1, H2, H3, lactama (H4), ácido *p*-hidroxifenilacético (H6) e dimetil tereftalato (H5);
- As substâncias isoladas apresentaram atividade bastante discreta nos ensaios de microdiluição em placa.
- A substância H5 - dimetil tereftalato, mostrou que o fungo apresenta potencial biotecnológico para a produção deste monômero, utilizado na síntese do biopolímero trimetiltereftalato.
- A substância H4 (lactama), isolada em ambiente marinho a partir da esponja *Halichondria melanodocia*, infestada por alga, foi isolada pela primeira vez em cultivo de fungo de solo e não há na literatura resultados de atividades biológicas para esta substância.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, E.P. History of β -lactic antibiotics, p. 1-14. In DEMAIN, A.L. and Solomon, N.A. (ed.), Antibiotics containing β -lactic structure, vol. I. Springer-Vela KG, Berlin, Germany. 1983.
2. ADAMS, P.R. Extracellular amylase activities of *Rhizomucor pusillus* and *Humicola lanuginosa* at initial stages of growth. **Mycopathologia** 128, 139-141. 1994.
3. ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal Biotechnology. **International Microbiology**. 6: 191 – 199, 2003.
4. AHARONOWITZ, Y.; COHEN, G.; MATIN, J. F. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation and evolution. **Annu Rev Microbiology**. 46:461–495. 1992.
5. ALBERTS, A. W.; CHEN, J.; KURON G.; HUNT, V.; HU, J.; HOMAN, C.; ROTHROCK, J.; LOPEZ, M.; JOSHUA, H.; HARRIS, E.; PATCHETT, A.; MONAGHAN, R.; CURRIE, S.; STAPLEY, E.; ALBERS-SCHONBERG, G.; HENSENS, O.Ç HIRSHELD, J.; HOOGSTEEN, K.; SPRINGER, J. A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Academic Science USA** 77: 3957±3961, 1980.
6. ALMEIDA, E. M., POLIZELI, M. L. T. M., TEREZI, H. F. & JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of a β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiology Letters**. 130, 171–176. 1995.
7. ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations, **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.48, supply. S1, p 5-16. 2001.
8. ARAUJO, E. F.; BARROS, E. G.; CALDAS, R. A., SILVA, D. O. Betaglycosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp. **Biotechnology Letters** 5, 781-784. 1983.
9. BABU, K. R., SATYANARAYANA, T. Production of bacterial enzymes by solid state fermentation. **J Sci Ind Res** 55:464–467. 1996.
10. BALAKRISHNAN, K., PANDEY, A. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. **J Sci Ind Res** 55:365–372. 1996.
11. BARNETT, E. A. & FERGUS, C. L. The Relation of extracellular amylase, mycelium, and time, in some thermophilic and mesophilic *Humicola* species. **Mycopathology Applied**. 44. 131-141, 1971.
12. BARRIOS – GONZALES, J., MEJÍA, A. Production of secondary metabolites by solid state fermentation. **Biotechnology Annu. Rev** 2:85–88. 1996.

13. BARRIOS – GONZALES, J.; CASTILLO, T. E.; MEJÍA, A. Development of high penicillin producing strains for solid state fermentation. **Biotechnology Advances** 11:525–537. 1993.
14. BARRIOS-GONZALES, J., TOMASINI, A. Production of aflatoxines in solid state fermentation. **J Sci Ind Res** 55:424–430. 1996.
15. BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**. v. 66, n. 2 – 3, p. 101 – 107. 1998.
16. BERDY, J. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? **Proceedings of the 9th International Symposium on The Biology of Actinomycetes Part 1. Allerton Press**, New York, pp 3±23. 1995.
17. BORGES, W. S; OLIVEIRA, L. F.; LOPES, N. P; PUPO, M. T. Metabólitos isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* (Asteraceae). 28ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 2005.
18. BRATNAGAR, R. K.; DOULL, J. L.; VINING, L. C. Role of the carbon source in regulating chloranphenicol production by *Streptomyces venezuelae*: studies in bath and continous cultures. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 34, n. 9, p. 1277 – 1233. 1998.
19. BROWN, A. G. Clavulanic acid, a novel b-lactamase inhibitor ± a case study in drug discovery and development. **Drug Design Delivery** 1: 1±21, 1976.
20. BROWN, D. W.; YU, J. H.; KELKAR, H. S.; FERNANDES, M.; NESBITT, T. C.; KELLER, N. P.; ADAMS, T.H. *et al.* Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. **Proc Natl Acad Sci USA** 93:1418–1422. 1996.
21. BUTTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**. 67, 2141-2153. 2004.
22. CAMPOS, L.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. **Applied and Environmental Microbiology** 61 (6), 2436-2438. 1995.
23. CANNELL, R. J. P. (ed.). Scale-up of natural products isolation. In: **Natural products isolation**. New Jersey, Humana Press, 1998. cap. 14, p. 409 – 424.
24. CARDELLO, L., TERENCEI, H.F., JORGE, J.A. A cytosolic trehalase rom thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Microbiology** 40, 1671-1677. 1995.
25. CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C. The Fungi. **Academic Press**, San Diego, Calif. 1994.
26. CEN, P.; XIA, L. Production of cellulase by solid-state fermentation. **Advances Biochemical Engeneering** 65:69–92.1999.

27. CHAVES, V. M. G., BRUNE, W. Characterization of a thermophilic and cellulolytic *Humicola* sp. isolated from compost. **Rev Microbiology** 20 (4), 470-476. 1989.
28. CLARK, F.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.60, p.52-60, 1997.
29. CLUTTERBUCK, P.W.; LOVELL, R.; RAISTRICK, R. (1932). The formation from glucose by members of the *Penicillium chrysogenum* series of a pigment, an alkali-soluble protein and penicillin – the antibacterial substance of Fleming. **Biochemical Journal** 26:1907-1918.
30. CRAGG, G.M. *et al.* Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**. 60, 52–60. 1997.
31. CUTLER, H. G.; LAUREN, D. R.; WILKINS, A. L.; HOLLAND, P. T.; HILL, R. A.; DUGAN, F. M. Ruakuric acid: a natural product from *Aspergillus fumigatus*. **Phytochemistry**, New York, v.43, n.1, p.209-214, 1996.
32. DANTAS-BARBOSA, C., ARAÚJO, E. F., MORAES, L. M. P., VAINSTEIN, M. H., AZEVEDO, M. O. Genetic transformation of germinated conidia of the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* to hygromycin B resistance. **FEMS Microbiology Letters** 169, 185-190. 1998.
33. DEACON, J. W. Introduction to Modern Mycology. **Blackwell Scientific Publications**. p. 76 – 87: Metabolism. 1980.
34. DEMAINE, A. L.; MASUREKAR, P. S. Lysine inhibition of in vivo homocitrate synthesis in *Penicillium chrysogenum*. **Journal Gen Microbiology** 82:143–151. 1974.
35. DEMAINE, A. L. New applications of microbial products. **Science**. Washington, v.19, p.709-714, 1983.
36. DEMAINE, A. L. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: Sutton B (ed) A century of mycology. **Cambridge University Press**, Cambridge, USA, pp 233–254. 1996.
37. DEMAINE, A.L . Metabolites, primary and secondary. In: Flickinger MC, Drew SC (eds) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. Wiley, New York, pp 1713–1732, 1999a
38. DEMAINE, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.52, n.4, p.455-463, 1999b
39. DEMAINE, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.18, p.499-514, 2000a.
40. DEMAINE, A. L., Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.18, n.1, p.26-31, 2000b.

41. De-PAULA, E. H., RAMOS, L. P., AZEVEDO, M. O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology** 68, 35-41. 1999.
42. DE STEFANO, S.; MICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. 3-*o*-Methylfunicone, a fungitoxi metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry**, n. 52, p. 1399 – 1401, 1999.
43. DiMASI, J. A.; SEIBRING, M.A.; LASAGNA, L. New drug development in the United States from 1963 to 1992. **Clinical Pharmacology Ther** 55: 609±622. 1994.
44. ELIBOL, M.; MUVITUNA, F. Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. **Process Biochemical** 35:85–90. 1997.
45. ENDO, A., KURODA, M., TSUITA, Y. ML-236B and ML-236 C new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. **Journal of Antibiotics** 29: 1346±1348, 1976.
46. FENICAL, W.; JENSEN, P. R. In: Attaway DH, Zaborsky OR (eds) Marine biotechnology I: pharmaceutical and bioactive natural products. **Plenum**, New York. 1993.
47. FERNANDEZ-CANON, J. M.; REGLERO, A.; MARTINEZ-BLANCO, H.; LUENGO, J. M. Uptake of phenylacetic acid by *Penicillium chrysogenum* Wis 54–1255: a critical regulatory point in benzylpenicillin biosynthesis. **J Antibiot** 42:1398–1409. 1989.
48. FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a β -glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology** 42, 1–5. 1996.
49. FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. Biotechnology of Filamentous Fungi. Technology and Products. Washington, Butterworth-Heinemann. p. 520. 1992.
50. FLEMING, A. . On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium* with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. **Br. J. Exp. Pathol.** 10:226-236. 1929.
51. FU, S. G.; YOON, Y.; BAZEMORE, R. Aroma-active compounds in fermented bamboo shoots. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 50:549–554. 2002.
52. GADEN – JUNIOR, E. L. Fermentation process kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**. n.6, v.67, p.629-635. 2000.
53. GEHRIG, I.; BART, H. J.; ANKE, T.; GERMERDONK, R. Influence of morphology and reology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyanathus striatus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 5, p. 525 – 533. 1998.

54. GAUR, R.; GARG, S.K.; SINGH, S.P.; VERMA, J. A comparative study of the production of amylase from *Humicola* and *Paecylomyces species*. **Biores Technology** 46, 213-216. 1993.
55. GRABLEY, S.; GRANZER, E.; HUTTER, K.; LUDWIG, D.; MAYER, M.; THIERICKE, R.; TILL, G.; WINK, J.; PHILIPPS, S.; ZEEK, A. Secondary metabolites by chemical screening . 8` Decarestrictines, a new family of inhibitors of cholesterol biosynthesis from *Penicillium* – Strain description, fermentation, isolation and properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 1, p. 56 – 65, 1992.
56. GOLAB, T.; KLINE, R. M. A simple technique in developing thin-layer bioautographs. **Journal of Chromatography**, Amsteram, v.18, p.409-411. 1965.
57. GOPICHAND, Y.; SCHMITZ, F. Two Novel Lactams from the Marine Sponge *Halichondria melanodocia*. **Journal Organical Chemistry**. Vol. 44, No. 26. p. 4995-4997. 1979.
58. GRIFFIN, D. H. Fungal physiology. 2.ed. New York, John Willy Sons, 458p. 1994.
59. HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. A direct bioautography TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.50, n.1, p.19-22. 1987.
60. HAN, B. Z., ROMBOUTS, F. M., NOUT, M. J. R. A Chinese fermented soybean food. **International Journal of Food Microbiology** 65:1–10. 2001.
61. HARRIS, J. P.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. **Phytochemistry** 58:709–716. 2001.
62. HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **DDT** Vol. 5, No. 7. 2000.
63. HARVEY, A. New developments in the use of natural products in drug discovery. **Business Briefing: Future drug discovery**. Disponível em: <http://www.wmrc.com/businessbriefinig/pdf/drugdisc2002/book/harvey.pdf>. Acesso em : 12 Dez. 2006.
64. HAYASHIDA, S.; YOSHIDA, H. Production and purification of thermostable cellulases from *Humicola insolens* YH-8. **Agricultural Biology Chemistry** 44, 1721-1728. 1980.
65. HERNANDEZ, M. R. T.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M. ROUSSOS, S. Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029c in solid-state fermentation system: influence of the composition of liquid medium used for impregnation sugarcane pith bagasse. **Process Biochemical** 28:23–27. 1993.
66. HOLKER, U. Bioreactor having at least two reaction chambers. Patent WO 02/100999 A3. 2002.

67. HOLKER, U. Kultivierungsverfahren für Mikroorganismen und Bioreaktor. Patent PCT/EPO3/01663. 2003.
68. HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**. 64: 175–186. 2004.
69. HOHN, T. M.; McCORMICK, S. P.; DESJARDINS, A. F. Evidence for a gene cluster involving trichothecene-pathway biosynthetic genes in *Fusarium sporotrichioides*. **Current Genetics** 24:291–295. 1995.
70. HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. (ed.). Pharmaceutical microbiology. 4 ed. London, **Blackwell Scientific Publications**, p.511. 1987
71. HSU, F. L.; WANG, P. M.; LU, S. Y.; WU, W. T. A combined solid-state and submerged cultivation integrated with adsorptive product extraction for production of *Monascus* red pigments. **Bioprocess Biosystems Engineering** 25:165–168. 2002.
72. IROBI, O. N. Antibiotic properties of ethanol extract of *Chromolaena odorata* (Asteracea). **International Journal of Chromatography**. Lissie, v. 35, n. 2, p. 111 – 115. 1997.
73. ISHIKAWA, N. K.; YAMAJI, K.; TAHARA, S.; FUKUSHI, Y.; TAKAHASHI, K.; Highly oxidized cuparene – type sesquiterpenes form a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 777 – 782, 2000.
74. JACKSON, M.; KARWOSWSKI, J. P.; HUMPHREY, P. E.; KOHL, W. L.; BARLOW, G. J.; TANAKA, S. K. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v.46, p.34-38. 1993.
75. JERMINI, M. F. G.; DEMAÏN, A. Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. **Experientia** 45:1061–1065. 1989.
76. JOHNS, M. R.; STUART, D. M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **Journal Industrial Microbiology**. 8:23–28. 1991.
77. JUZLOVA, P.; MARTINKOVA, L. KREN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. **Journal Industrial Microbiology** 16:163–170. 1996.
78. KELCOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Ann Acad Bras Cienc** 74:151–170. 2002.
79. KOSEMURA, S.; UOTSU, S.; YAMAMURA, S. Citreospirosteroid, a new metabolite of a hybrid strain KO 001 derived from *Penicillium citro* – vide B. IFO 6200 and 4692. **Tetrahedron Letters**, n. 42, v. 38, p. 7373 – 7374, 1997.
80. KRISHNA, P. S.; VENKATESWARLU, G.; PANDEY, A.; PS, Venkateswarlu G, Pandey A, RAO, L. V. Biosynthesis of rifamycin SV by *Amiclatopsis*

- mediterranei MTCC17 in solid cultures. **Biotechnol Applied Biochemistry** 37:311–315. 2003.
81. KRUEGER, W.; KRUEGER, A. *Biotechnologia: manual de microbiologia industrial*, 4 ed., Zaragoza, Acribia. cap. 19, p. 263 – 275. **Antibióticos**. 1989.
 82. KRUPINSKI, V. M.; ROBERTS, J. E.; FLOSS, H. G. Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level. **Journal of Bacteriology** 125:158–165. 1976.
 83. LAI, S.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAXAI, K.; FURUKAWA, H. Three new phenolic metabolites from *Penicillium* species. **Heterocycles**, v. 32, n2, p. 297 - 305, 1991.
 84. LARSEN, T. O.; SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J. C.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C. Consistent production of penigequinolone A and B by *Pencillium scabrosum*. **Biochemical Systematcis and Ecology**, n. 27, p. 329 – 332, 1999.
 85. LEMBO, T., AZEVEDO, M. O., BLOCH, C. Jr., FILHO, E.X.F. Purification and partial characterization of a new *b*-xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 22: 475–479. 2006.
 86. LIM, D.; HAINS, P.; WALSH, B.; NEVALAINEN, H. Proteins associated with the cell envelope of *Trichoderma reesei*: a proteomic approach. **Proteomics** 1:899–909. 2001.
 87. LINDLEY, N. D. Analysis and engineering of metabolic networks. **Biofutur**. Paris, p. 35 – 40. 1995.
 88. LOGAN, N.A. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. **Journal of Medicine and Microbiology** 25:157-165. 1988.
 89. LUCENA – NETO, A. S., FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Brazilian Journal of Microbiology** 35, 86–90. 2004.
 90. LUCKNER, M.; NOVER, L.; BOHM, H. Secondary metabolism and cell differentiation. **Mol Biol Biochem Biophys** 23:57. 1977.
 91. LUND, B.M. and LYON, G.D. Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *Erwinia herbicola* on thin-layer chromatograms. **Journal of Chromatography**. 110:193-196. 1975.
 92. MALMSTRON, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J.C. Secondary metabolites characteristics of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, v.54, p. 301 – 309, 2000.

93. MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., STUART, D. M., PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation: II. Rational approaches to design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry** 35:1211–1225. 2000a.
94. MITCHELL, D. A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. Biochemical engineering of solid state bioprocessing. **Adv Biochem Eng Biotechnol** 68:61–138. 2000b.
95. MONTI, R., TERENCE, H. F. & JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology** 37, 675-681, 1991.
96. McALPINE, J. Unnatural natural products by genetic manipulation. In: Sapienza DM, Savage LM (eds) Natural products II: New technologies to increase efficiency and speed. **International Business Communications**, Southborough, Mass, pp 251±278, 1998.
97. NAGARAJAN, V.; MILLER, J. A. Jr. The Impact of biotechnology on the chemical industry in the 21st century. **Trends in Biotechnology**. v.18, p. 190-191, 2000.
98. NEWMAN, D.J.; CRAGG, C.M; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Cincinnati. v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.
99. NIGAM, P., SINGH, D. Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for microbial protein production. **J Sci Ind Res** 55:373–380. 1996a.
100. NIGAM, P., SINGH, D. Processing of agricultural wastes in solid state fermentation for cellulolytic enzymes production. **J Sci Ind Res** 55:457–463. 1996b.
101. NOUT, M. J. R.; AIDOO, K. E. Asian fungal fermented food. In: Osiewacz X (ed) **The Mycota**. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 23–47. 2002.
102. OKI, T., YOSHIMOTO, A. Antitumor antibiotics. In: Perlman D (ed) Annual reports on fermentation processes, vol 3. **Academic Press**, New York, pp 215±251, 1979.
103. OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of the antifungal peptide, iturin, by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as substrate. **J Ferment Bioengineering** 75:23–27. 1993.
104. OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB 22. **Process Biochem** 31:801–806. 1996.
105. PADMANABHA, R; SHU, Y.; COOK, L. S.; VEITHC, J. A.; DONOVAM, M.; LOWE, S.; HUANG, S.; PIRINK, D.; MANLY, S. P. 1-Methoxy-agroclavine from *Penicillium* sp. Wc75209, a novel inhibitor of the LCK tyrosine kinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 8, p. 569 – 574, 1998.

106. PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem Eng J** 13:81–84. 2003.
107. PANDEY, A, SOCCOL, C. R., RODRIGUEZ-LEON, J. A., NIGAM, P. Solidstate fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **Asiatech**, New Delhi. 2001.
108. PANDEY, A, SOCCOL, C. R, MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation. I Processes and products. **Process Biochem** 35:1153–1169. 2000.
109. PANDEY, A, SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C. R. NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science** 77:149–162. 1999.
110. PELCZAR, M.J; Chan, E.C.S.; Krieg N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações. Trad. De Sueli Fumie Yamada, 2. ed., São Paulo, Makron Books, 1996, 517p.
111. PENG, Y.; DEMAINE, A. L. A new hydroxylase system in *Actin- omadura* sp cells converting compactin to pravastatin. **Journal of Industry Microbiology Biotechnology** 20: 373±375, 1998.
112. PERALTA, R. M. A highly thermoestable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **Microbiology Letters**. v.145, p.191-195, 1996.
113. PERALTA, R. M., TERENCE, H. F. JORGE, J. A. β -D- Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1033, 243 – 249, 1990.
114. PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. São Paulo, 2006.
115. PUNT, P.J.; Van VIESEN, N.; CONESA, A; ALBERS, A.; MANGNUS, J., Van den HONDEL, C. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends Biotechnol** 20:200– 206. 2002.
116. RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal Biotechnology** 1:1–15. 1998.
117. RAMANA MURTHY, M. V.; MOHAN, E. V. S.; SADHUKHAN, A. K. Cyclosporin A production by *Tolypocladium inflatum* using solid state fermentation. **Process Biochem** 34:269–280. 1999.
118. ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Antibióticos. In: **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. (Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology). Trad. de Ivone de Castilho Benedetti. São Paulo, Editorial Premier, cap. 11, p. 247 – 316. 1997.

119. ROBINSON T., SINGH, D., NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology Biotechnology** 55:284–289. 2001.
120. ROESSNER, C.A.; SCOTT, A.L. Genetically engineered synthesis of natural products: from alkaloids to corrins. **Annu. Rev. Microbiology** 50, 467–490. 1996.
121. SADHUKHAN, A. K.; RAMANA MURTHY, M. V.; AJAYA KUMAR, R.; MOHAN, E. V. S; VANDANA, G. BHAR, C.; VENKATESWARA RAO, K. Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Industry Microbiology Biotechnology** 22:33–38. 1999.
122. SEGETH, M. P.; BONNEFOY, A.; BRONSTRUP, M.; KNAUF, M. SCHUMMER, D. TOTI, L.; VERTESY, L.; WETZEL, L.; WETZEL – RAYNAL, M. C.; WINK, J.; SEIBERT, G. Coniosetin a novel tetramic antibiotic from *Coniochaeta ellipsoidea* DSM 13856. **J Antibiot** 56:114–122. 2003.
123. SELVAKUMAR, P., ASHAKUMARY, L., PANDEY, A. Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using tea waste as the basis of solid substrate. **Bioresour Technology** 65:83–85. 1998.
124. SERIZAWA, N.; MATSUOKA, T. A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. **Biochim Biophys Acta** 1084: 35±40, 1991.
125. SILVA, M. G.; FURTADO, N. A. J. C.; BASTOS, J. K. Isolamento e identificação de compostos fenólicos produzidos por *Penicillium corylophilum*. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2006.
126. SMITH, T.L.; JARVIS, W.R. Antibacterial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microbes Infect.**, 1, 795-805, 1999.
127. SORENSEN, D.; LARSEN, T. O.; CHRISTOPHERSEN, C.; NIELSEN, P. H.; ANTHONI, U. Dipodazine, a diketopiperazine from *Penicillium dipodomys*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1181 – 1183, 1999.
128. STIERLE, A.; STROBEL, G, STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science** 260: 214±216, 1993.
129. STRHOL, W.R. Industrial antibiotics: today and the future. In: Strohl WR (ed) **Biotechnology of antibiotics**, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp 1±47. 1997.
130. SU, Y. C.; WANG, J. J.; LIN, T. T. Production of secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology** 30:41–46. 2003.

131. TAKASHIMA, S., NAKAMURA, A., HIDAKA, M., MASAKI, H., UOZOMI, T. Cloning, sequencing, and expression of the *ceU* genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Journal of Biotechnology** 50, 137-147. 1996.
132. TENGGERDY, R. P., SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochem Eng J** 13:169–179. 2003.
133. THAYER, M. Busting down a blockbuster drug. **Chem Eng News** 78:20–21. 2000.
134. TOMASZ, M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). **Current Biol** 2: 575±579, 1995.
135. TOSI, L. R.; TERENSI, H. F., JORGE, J. A. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Canadian Journal of Microbiology** 39, 846-852. 1993.
136. UMEZAWA, H. Enzyme inhibitors of microbial origin. University Park Press, Baltimore. 1972.
137. UMEZAWA, H. Low-molecular-weight inhibitors of microbial origin. **Annu Rev Microbiology** 36: 75±99. 1982.
138. VELASCO, J.; GUTIERREZ, S.; FERNANDEZ, F. J.; MARCOS, A. T.; ARENOS, C.; MARTIN, J. F. Exogenous methionine increases levels of mRNAs transcribed from *pcbAB*, *pcbC*, and *cefEF* genes, encoding enzymes of the cephalosporin biosynthetic pathway, in *Acremonium chrysogenum*. **J Bacteriol** 176:985–991. 1995.
139. VOGEL, H.J. A conveniente medium for *Neurospora* (medium N). **Microbiology General Bulletin**, v.13, p.42. 1956.
140. XIMENES, F.A., FONSECA, A. S., XIMENES, E. A., SILVEIRA, F. Q. P., SILVA, C. H. C., LUCENA - NETO, S. A., RIBEIRO, W. R. C. & FILHO, E. X. F. Xylan-degrading enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** 28, 22–28. 1997.
141. YANG, S. S.; LING, M. Y. Tetracycline production with sweet potato residues by solid state fermentation. **Biotechnology Bioengineering** 33:1021–1028. 1989.
142. YANG, S. S.; LING, M. Y. Morphogenesis, ATP content and oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* in solid substrate cultivation. **Journal of Applied Bacteriology** 80:545–550. 1996.
143. YOSHIOKA, H., ANRAKU, S. I. & HAYASHIDA, S. Production and purification of a novel type of CM-case from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. **Agric. Biol. Chem.** 46, 75-82, 1982.

144. ZHANG, J. Y.; WOLFE, S.; DEMAIN, A. L. Effect of ammonium s nitrogen source on production of d-(L-a-aminoadipyl)-Lcysteinyl-D-valine synthetase by *Cephalosporium acremonium* C-10. **Journal of Antibiotics** 40:1746–1750. 1987.
145. ZIMMERMAN, A. L. S., TERENZI, H. F. & JORGE, J. A. Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var *thermoidea*. **Biochim Biophys Acta** 1036, 41-46, 1990.
146. WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic. **Cancer Res** 55: 753±760, 1995.
147. WANG, H. H. Development and/or reclamation of bioresources with solid state fermentation. **Proc Natl Sci Counc ROC B** 23:45–61. 1999.

APÊNDICES

APÊNDICE A

ESPECIFICAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

1. Meio de aveia

Farinha de aveia – Carrefour	4,00 g
Ágar – Oxoid	1,80 g
Água destilada qsp	100,00 mL

2. Meio pré fermentativo (Jackson et al., 1993)

Pó de milho – Veranita	0,25 g
Glicose – Synth	1,00 g
Farinha de aveia – Carrefour	1,00 g
Polpa de tomate – Arisco	4,00 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O – Mallinckrodt GenAR	1,00 g
Solução com traços de elementos	1,000 mL
Água destilada qsp	100,000 mL

3. Meio fermentativo de Czapek (Atlas 1995)

Sacarose – Synth	3,000 g
NaNO ₃ – Merck	0,200 g
KCl – Merck	0,050 g
KH ₂ PO ₄ – Synth	0,050 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O – Merck	0,050 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O – Merck	0,001 g
Água destilada qsp	100,000 mL

4. Meio fermentativo de Vogel (Vogel 1956)

Dextrose – Oxoid	2,000 g
Solução de Vogel 50x	2,000 ml
Água destilada qsp	100,000 ml

4.1 Solução de Vogel 50x :

Citrato de sódio diidratado	12,500 g
NH_4NO_3	10,000 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5000 g
KH_2PO_4	25,000 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,000 g
Solução de Biotina (0,5mg/ml)	0,100 g
Solução com traços de elementos	0,500 ml
Água destilada qsp	100,000 mL

5. Meio fermentativo de Jackson (Jackson et al., 1993)

Glicerol – Nuclear	1,500 mL
Sacarose – Synth	1,500 mL
Peptona – Oxoid	0,600 g
Extrato de levedura – Merck	0,150 g
NaCl – Synth	3,000 g
KH_2PO_4 – Synth	0,060 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Merck	0,500 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Merck	0,0003 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Mallinckrodt GenAR	0,0001 g
Água destilada qsp	100,000 mL

6. Meio Fermentativo de Arroz enriquecido

Arroz Parboilizado (Tio João)	90 g
Solução de Aminoácidos	5 ml
Solução de Elementos Traços	1 ml
Água destilada qsp	90 ml

6.1 Solução de Aminoácidos

Constituintes	g/L de água
L – arginina (base livre)	0,200
L – asparagina (anidra)	0,050
L – aspártico, ácido	0,020
L – cistina. 2HCl	0,0652
L – glutâmico, ácido	0,020
L – glutamina	0,300
Glicina	0,010
L – histidina (base livre)	0,015
L – Lisina. HCl	0,040
L – serina	0,030
L – treonina	0,020
L – tirosina.2 Na	0,02883

6.2 Solução de Elementos Traços

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,100 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,100 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,010 g
H_3BO_3	0,056 g
$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0019 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,020 g
Água destilada qsp	100,000 mL

APÊNDICE B

1. Especificações dos materiais e equipamentos utilizados.

Solventes

Foram utilizados solventes P. A. das marcas Em Science, Merck, Nuclear, Synth e Vetec e solventes de grau cromatográfico da marca Mallinckrodt.

Materiais: componentes dos meios de cultura e reagentes.

- Ácido cítrico – Mallinckrodt GenAR;
- Ácido sulfúrico concentrado – Nuclear;
- Ágar – Oxoid;
- Ágar triptona soja – Oxoid;
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Mallinckrodt GenAR;
- Citrato de sódio diidratado - Mallinckrodt GenAR;
- Cloreto de Trifeniltetrazólio – Sigma;
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Mallinckrodt GenAR;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Mallinckrodt GenAR;
- Dextrose – Synth;
- Dimetilsulfóxido – Synth;
- Extrato de levedura – Merck;
- Farinha de aveia – Carrefour;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Merck;
- Gentamicina – Laborclin- 10 µg (discos);
- Glicerol – Nuclear;
- Glicose – Synth;
- H_3BO_3 – Nuclear;
- KCl – Synth;
- K_2HPO_4 – Synth;
- $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ – Synth;
- Leite em pó desnatado Molico – Nestlé;
- $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Merck;
- $\text{Mn Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Merck;
- $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Mallinckrodt GenAR;

- Monooleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80) – Synth;
- *Mueller Hinton medium* – Oxoid;
- NaCl – Synth;
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Mallinckrodt GenAR;
- NaNO_3 – Synth;
- NH_4NO_3 – Mallinckrodt GenAR;
- Papel de filtro – Melitta;
- Peptona – Oxoid;
- Pó de milho – Veranita;
- Polpa de Tomate – Arisco;
- Sacarose – Synth;
- Sílica gel G60 (Art. 7730) – Merck;
- Sílica gel 60 (400 – 230 mesh) – Merck;
- Vanilina – Merck;
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Merck;

1.3. Equipamentos e acessórios.

- Agitador mecânico tipo *mixer* - FANEN;
- Autoclave vertical Phoenix AV75.
- Balança eletrônica “Marte”;
- Capela de Fluxo Laminar VECO VC FS-09M;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu. O equipamento é composto por três bombas Shimadzu LC-10AD, detector espectrofotométrico por conjunto de arranjo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M10A_{VP} (Diode Array), sistema controlador SCL- 10 A_{VP}, conectado a um computador com *software* Shimadzu Class – VP versão 5.02, injetor automático (SIL-10AD_{VP}) e coletor de frações FRC-10A;
- Espectrofotômetro de RMN: Bruker[®] DRX – 300 MHZ, Bruker[®] DRX – 400 MHZ
- Estufa de incubação FANEN Ltda – 347 C;
- Mesa agitadora INNOVA[™] 4300 – New Brunswick Scientific;
- Micropipetas automáticas ajustáveis de 10,0 a 1000,0 µL – Sigma;
- Microscópio Olympus CH- 2;
- Microseringa graduada de 10 e 50 µL – The Hamilton Company;

1.4. Microrganismos utilizados

Microrganismos indicadores:

Cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC):

- <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
- <i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC 9341
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC2592

Figura 28. Espectro de RMN ^1H da substância H6 - Ácido *p*-hidróxifenilacético (CD_3OD , 300 MHz).

C

Figura 29. Espectro de RMN ^1H da substância H5 – Dimetil tereftalato (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C da substância H6 – Ácido *p*-hidroxifenilacético (CD_3OD , 300 MHz).

Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C da substância H5 - Dimetil tereftalato (CDCl_3 , 400 MHz).

Figura 32. Espectro de RMN ^1H da substância H4 - Lactama (CD_3OD , 400 MHz).

Figura 33. Espectro de RMN ¹³C da substância H4 - Lactama (CD₃OD, 400 MHz).

Figura 34. Mapa de contornos HMBC da substância H4 - Lactama (CD₃OD, 400 MHz/ ¹H e ¹³C 400 MHz).

Figura 35. Mapa de contornos HMQC da substância H4 – Lactama. Fragmento 1 (CD₃OD, 400 MHz/ ¹H e ¹³C 400 MHz).

Figura 36. Mapa de contornos HMQC da substância H4 – Lactama. Fragmento 2 (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H e ^{13}C 400 MHz).

Figura 37. Mapa de contornos HMBC da substância H4 - Lactama (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H e ^{13}C 400 MHz).

Figura 38. Mapa de contornos HMBC da substância H4 – Lactama. Fragmento 1 (CD_3OD , 400 MHz/ ^1H e ^{13}C 400 MHz).

Figura 39. Mapa de contornos HMBC da substância H4 – Lactama. Fragmento 2 (CD₃OD, 400 MHz/ ¹H e ¹³C 400 MHz).

Figura 40. Espectro de RMN ¹H da substância H1 - (CD₃OD, 400 MHz).

Figura 41. Espectro de RMN ^1H da substância H2 - (CD_3OD , 400 MHz).

Figura 42. Espectro de RMN ¹H da substância H3 - (CD₃OD, 400 MHz).