UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO
PRETO

Otimização das condições de cultivo de *Rhizopus microsporus* var.
rhizopodiformis para a produção, isolamento e identificação de metabólitos com
atividade antimicrobiana.

ANA SILVIA CISCATO CAMILLO

Ribeirão Preto
2007

ANA SILVIA CISCATO CAMILLO

Otimização das condições de cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiiformis* para a produção, isolamento e identificação de metabólitos com atividade antimicrobiana.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Camillo, Ana Silvia Ciscato

Otimização das condições de cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* para a produção, isolamento e identificação de metabólitos com atividade antimicrobiana. Ribeirão Preto, 2007.

125p.; il, 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1 - *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*; 2 - Cultivo; 3 - Metabolismo secundário; 4 - MIC; 5 - Perfil cromatográfico; 6 - Atividade antimicrobiana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Silvia Ciscato Camillo
Otimização das condições de cultivo de
Rhizopus microsporus var. *rhizopodiformis* para
a produção, isolamento e identificação de
metabólitos com atividade antimicrobiana.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre. Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

*"Se não houver frutos
Valeu a beleza das flores
Se não houver flores
Valeu a sombra das folhas
Se não houver folhas
Valeu a intenção da semente"*

HENFIL, do livro *Diretas Já*

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Beatriz e Evandro, por estarem sempre presentes em todos os momentos, pela compreensão e carinho e às minhas irmãs Ana Lucia e Ana Paula pelo apoio e incentivo para a realização deste presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter permitido a realização de todo este trabalho, por ter me dado força, saúde e sabedoria!

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pelos ensinamentos, pela atenção, pela confiança em mim e pela paciência ao longo da realização deste trabalho.

À Profa Dra Mônica Tallarico Pupo pela cooperação e por ceder o Laboratório de Química Farmacêutica para a finalização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa pelos ensinamentos passados, pelo apoio e pelo incentivo.

Ao Prof Dr. João Atílio Jorge por fornecer o material bibliográfico para o início deste presente trabalho.

À Profa. Dra. Suraia Said pela colaboração neste presente trabalho.

A toda a minha família pela compreensão dos momentos difíceis e palavras de incentivos nas horas de alegria em especial aos meus pais Maria Beatriz e Evandro pela criação, educação e exemplo a ser seguido.

À Virginia da FFCLRP-USP pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao professor Antonio Gilberto Ferreria, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos pela obtenção de espectros de RMN.

Aos técnicos Walter, José Luis, Mário, Angélica e a Claudia pela amizade e colaboração a este presente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia: Marley (BOB), Juliana, Gustavo (Pedrega), João Paulo, Paulinha, Paulo Barboni, Fabio, Karin, Elisete, Sergio Faloni, Sergio Ambrosio, Nilton, Ricardo (jaw-jaw), Iara, Ramon, Wanessa, Willian, Leonardo pela amizade, auxílio e as longas conversas. Agradeço especialmente a Nieve pela paciência, pela amizade sincera e pela troca de experiências.

Aos amigos do Laboratório de Química Farmacêutica: Luciano, Margareth, Warley, Denise, Henrique, Daniela, Jaqueline pelo suporte e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pela oportunidade de crescimento científico, de desenvolvimento do meu trabalho e pela paciência.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP pela ajuda técnico-científica na realização deste presente trabalho.

À FAPESP que concedeu auxílio financeiro ao Laboratório de Farmacognosia, através do projeto Temático: **Bioprosecta (04/07935-6)**, que foi de grande importância para a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma maneira, mesmo que somente em pensamento positivo, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O fungo *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* foi submetido a determinadas condições de cultivo, objetivando produzir substâncias com atividade antimicrobiana. O microorganismo foi transferido da sílica, na qual foi armazenado, e incubado por sete dias em meio aveia-ágar para o crescimento prévio. Em seguida, 4×10^6 esporos/mL de meio foram transferidos para o meio pré-fermentativo e incubado por 24 horas, seguido de transferência para meio fermentativo (meio Czapek, meio Jackson e meio Vogel) e incubado por períodos de tempo determinados. Além disso, foi incubado em meio fermentativo de arroz por 20 dias. Após a fermentação nos diferentes meios, o caldo da cultura foi obtido por filtração e submetido a partições utilizando-se solventes orgânicos: acetato de etila e *n*-butanol, os quais foram recuperados por evaporação a vácuo. Os extratos obtidos dessas partições foram submetidos aos testes de bioautografia para determinação das frações ostentando atividade antimicrobiana. Os extratos em acetato de etila dos quatro meios fermentativos apresentam tal atividade. As frações ativas foram submetidas a diferentes modalidades cromatográficas para isolamento das substâncias, como a cromatografia líquida em coluna de sílica e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Foram isolados quatro metabólitos secundários a partir das frações obtidas em acetato de etila dos meio líquido Jackson e do meio sólido de arroz. Foram identificadas duas dicetopiperazinas (ciclos Leu-Pro e Leu-4-OH-Pro) e um derivado aromático contendo nitrogênio na porção alifática da molécula. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) das substâncias isoladas contra os seguintes microorganismos: *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todos os extratos obtidos dos meios de cultura apresentaram atividade contra *S. aureus* e *K. rhizophila*, bem como o extrato metanólico dos micélios. Apenas os extratos em *n*-butanol não foram ativos. Nos ensaios de microdiluição, as três

substâncias identificadas apresentaram CIMs entre 400 e 350 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos indicam que o fungo em questão é uma fonte interessante para obtenção de metabólitos secundários.

ABSTRACT

The fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* was cultivated in different fermentative media aiming to produce secondary metabolites bearing antimicrobial activity. The conidia storage in silica gel was incubated in oat medium for conidia production. After seven days the conidia (4×10^6 conidia/mL) was transferred to a pre-fermentative medium and incubated for 24 h for mycelium production. After that, it was transferred to three fermentative media: Czapek, Jackson and Vogel, and incubated for different periods of time. After fermentation, cultures were filtered and the broth was submitted to partition using ethyl acetate and *n*-butanol in sequence, which were, afterwards, recovered under vacuum. The obtained crude extracts were evaluated under bioautography assay aiming to select the most adequate medium for secondary antimicrobial metabolite production. The ethyl acetate extracts obtained from both Jackson and rice media displayed the higher activities. Therefore, they were submitted to different chromatographic means, including silica gel column and HPLC, furnishing four isolated compounds, from which three were identified: two diketopiperazines (cyclos Leu-Pro and Leu-4-OH-Pro) and one aromatic compound containing a nitrogen in the aliphatic moiety. The pure isolated compounds were submitted to microdilution tests against the following bacteria: *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), aiming to determine their Minimum Inhibitory Concentrations (MIC). All the ethyl acetate extracts displayed antimicrobial activity in the bioautography assays against *S. aureus* and *K. rhizophila*, as well as the mycelia methanol extracts. Only the *n*-butanol extracts did not display activity. Regarding the microdilution assay, three of evaluated pure compounds displayed MIC values between 400 and 350 $\mu\text{g/mL}$. The obtained results indicated that the studied fungus is an interesting source for biologically active secondary metabolites production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> incubado em meio de aveia	33
Figura 2: <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i> incubado em meio de arroz	37
Figura 3: Bioautografia dos extratos obtidos dos meios Czapek (C120) e Jackson com 120 horas de crescimento (1A) e bioautografia dos extratos obtidos dos meios Czapek (C144) e Jackson com 144 horas de crescimento (1B) Bioautografia dos extratos brutos com partição acetato obtidos dos meios Czapek (esquerda) e Jackson com 192 horas de crescimento (1C).....	51
Figuras 4: Bioautografias dos meios Czapek (C168) e Jackson (J168) com 168 horas de crescimento (2A), e bioautografia do meio Vogel com 192 (V192) e 120 horas de crescimento (V120) (2B), bioautografias dos extratos acetato do meio Jackson (J144) com o crescimento de 144 horas e o meio Vogel (V168) com o crescimento de 168 horas(2C).....	52
Figura 5: Bioautografias dos extratos micelial em metanol dos meios de cultura Czapek, Vogel e Jackson, respectivamente, em tempo de 192 horas de crescimento (3A), e com 144 horas de crescimento (3B).....	53
Figura 6: Bioautografias dos extratos do micélio em metanol dos três meios Czapek, Vogel e Jackson, respectivamente, com o crescimento de 120 horas (4A), e com 168 horas de crescimento (4B)	53
Figura 7: Bioautografia do extrato butanólico bruto obtido do meio Czapek com 168 horas de crescimento e do meio Jackson com 192 horas de crescimento.....	54
Figura 8: Bioautografia do extrato acetato (direita) e do extrato metanólico (esquerda) obtido do meio Jackson com 192 horas de crescimento contra o <i>Kokuria rhizophila</i>	55
Figura 9: Bioautografia do extrato acetato do meio de arroz, usando como microrganismo indicador o <i>Stapyilococcus aureus</i>	55
Figura 10: Bioautografia do extrato acetato do meio de arroz, usando como microrganismo indicador o <i>Kokuria rhizophila</i>	55
Figura 11: Cromatogramas em CLAE e espectro U.V. do cultivo em meio Czapek em 120 horas de crescimento partição acetato	57
Figura 12: Cromatogramas em CLAE e espectro U.V. do cultivo em meio Czapek em 120 horas de crescimento da maceração em metanol.....	57
Figura 13: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel com 120 horas de crescimento partição acetato	58
Figura 14: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel com 120 horas de crescimento da maceração em metanol	58
Figura 15: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson com 120 horas de crescimento partição acetato	59
Figura 16: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson, com 120 horas de crescimento da maceração em metanol	60

Figura 17: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Czapek, com 144 horas de crescimento partição acetato	61
Figura 18: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Czapek, com 144 horas de crescimento maceração da em metanol	61
Figura 19: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel com 144 horas de crescimento partição acetato	62
Figura 20: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel, com 144 horas de crescimento da maceração em metanol.	63
Figura 21: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson, com 144 horas de crescimento partição acetato	64
Figura 22: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson, com 144 horas de crescimento da maceração em metanol	64
Figura 23: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Czapek, com 168 horas de crescimento partição acetato	65
Figura 24: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Czapek, com 168 horas de crescimento da maceração em metanol	65
Figura 25: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel, com 168 horas de crescimento partição acetato	66
Figura 26: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel, com 168 horas de crescimento maceração em metanol	66
Figura 27: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson com 168 horas de crescimento partição acetato	67
Figura 28: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson, com 168 horas de crescimento da maceração em metanol	68
Figura 29: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Czapek, com 192 horas de crescimento partição acetato	69
Figura 30: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Czapek, com 192 horas de crescimento da maceração em metanol	69
Figura 31: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel, com 192 horas de crescimento, partição acetato	70
Figura 32: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Vogel, com 192 horas de crescimento da maceração em metanol	70
Figura 33: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson com 192 horas de crescimento, partição com acetato	71
Figura 34: Cromatograma e o espectro U.V. do cultivo em meio Jackson com 192 horas de crescimento da maceração em metanol	72

Figura 35: Cromatograma e o espectro U. V. do meio Czapek partição com acetato.....	73
Figura 36: Cromatograma e o espectro U. V. do meio Vogel partição com acetato.....	74
Figura 37: Cromatograma e o espectro U. V. do meio Jackson partição com acetato.....	74
Figura 38: Cromatogramas em CLAE e espectro U.V. do cultivo em meio Jackson em 192 horas de crescimento em partição acetato em escala de erlenmeyer de 6 litros.....	75
Figura 39: Cromatogramas em CLAE e espectros de U.V. da partição em acetato de etila do extrato etanólico do cultivo em meio de arroz	76
Figura 40: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V.da fração correspondente à substância isolada ASCC 1.1	77
Figura 41: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V.da fração correspondente à substância isolada ASCC 1.4	77
Figura 42: Perfil químico e espectro de U. V. da substância codificada ASCC 2.1	79
Figura 43: determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas das substâncias isoladas, contra <i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	80
Figura 44: Estrutura química da substância ASCC 1.4.....	82
Figura 45: Estrutura química da substância ASCC 1.1	82
Figura 46: Estratégias de síntese das 2,5 dicetopiperazinas com as possíveis quebras indicadas ...	82
Figura 47: Estrutura química da substância isolada ASCC 2.1.....	86
Figura 48: Espectro de RMN ^1H da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 500Mz).....	109
Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 100Mz).....	110
Figura 50: Mapa de contornos HMBC da substância ASCC 1.1(CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz/ ^{13}C) .	111
Figura 51: Mapa de contornos HMQC da substância ASCC 1.1(CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz/ ^{13}C) .	112
Figura 52: Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 500Mz).....	113
Figura 53: Espectro de RMN ^1H da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 500Mz).....	114
Figura 54: Espectro de RMN ^{13}C da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 100Mz).....	115
Figura 55: Mapa de contornos HMBC da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz/ ^{13}C).....	116
Figura 56: Mapa de contornos HMQC da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz/ ^{13}C).....	117
Figura 57: Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 500Mz).....	118
Figura 58: Espectro de RMN ^1H da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz).....	119

Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 100Mz).....	120
Figura 60: Mapa de contornos HMBC da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz ^{13}C).....	121
Figura 61: Espectro de DEPT da substância ASCC 2.1(CDCl_3 , 100Mz).....	122
Figura 62: Mapa de contornos HMQC da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz ^{13}C).....	123
Figura 63: Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz).....	124
Figura 64 : Espectroscopia de massas da substancia ASCC 2.1	125

LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1:** Esquema do rendimento da produção de extratos nos três meios líquidos 36
- Esquema 2:** Diagrama geral do procedimento de fracionamento dos extrato bruto do meio Jackson em escala piloto 43
- Esquema 3:** Diagrama geral do procedimento de fracionamento do extrato bruto do meio sólido de arroz 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Massas obtidas através da fermentação em meio líquido.....	36
Tabela 2: Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz) para as substâncias isoladas 1.1 e 1.4 (δ , CDCl_3)	84
Tabela 3: Dados dos espectros de RMN ^{13}C (100 MHz) para as substâncias isoladas 1.1 e 1.4 (δ , CDCl_3)	85
Tabela 4: Dados dos mapas de contornos HMBC (500 MHz/ ^1H ; 100MHz/ ^{13}C) da substância ASCC 1.4	85
Tabela 5: Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz) para as substâncias isoladas ASCC 2.1(δ , CDCl_3)	87
Tabela 6: Dados dos espectros de RMN ^{13}C (100 MHz) para as substâncias isoladas ASCC 2.1 (δ , CDCl_3)	88
Tabela 7: Dados dos mapas de contornos HMBC (500 MHz/ ^1H ; 100MHz/ ^{13}C) da substância ASCC 2.1	88

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY ^1H ^1H	<i>Correlation spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
F.E	Fase Estacionária
F.M	Fase Móvel
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento (em Hertz)
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono – 13
<i>sl</i>	Singleto largo
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	x
Lista de figuras	xi
Lista de esquemas	xv
Lista de tabelas	xvi
Lista de abreviaturas.....	xvii
1. Introdução	21
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	33
3.1 Manutenção do estoque	33
3.2 Obtenção das biomassas em meio pré-fermentativo	34
3.3 Produção de metabólitos em meio líquido	34
3.3.1 Obtenção dos extratos	35
3.3.2.Dissolução dos extratos	35
3.4 Produção de metabólito em meio sólido.....	37
3.4.1 Obtenção dos extratos	37
3.4.2 Dissolução dos extratos	38
3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	38
3.5.1 Bioautografia	38
3.5.1.1 Dissolução dos extratos.....	39
3.5.1.2 Microrganismos indicadores.....	39
3.5.1.3 Detecção da atividade antimicrobiana	39
3.6 Perfil cromatográfico dos extratos do meio líquido.....	40
3.7 Aumento da escala fermentativa.....	41
3.8 Isolamento dos metabólitos secundários.....	41
3.8.1 Metabólitos produzidos em meio líquido	41
3.8.1.1 Coluna cromatográfica.....	41
3.8.1.2 Coluna de separação parte II.....	42

3.8.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência	42
3.8.2 Metabólitos produzidos em meio sólido.....	44
3.8.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	44
3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas utilizando-se o método de microdiluição em microplaca	46
3.9.1 Preparo das amostras	46
3.9.2 Microrganismos utilizados	46
3.9.3 Preparo do inóculo	46
3.9.3.1 Bactérias.....	46
3.9.3.2 Leveduras.....	47
3.9.4 Determinação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas.....	47
4. Resultados	50
4.1 Bioautografias dos extratos do meio líquido	50
4.2 Bioautografias dos extratos do meio sólido.....	55
4.3 Perfil químico dos extratos do meio líquido.....	56
4.4 Perfil químico dos extratos do meio sólido	76
4.5 Perfil químico das substâncias isoladas do meio líquido.....	76
4.6 Perfil químico das substâncias isoladas no meio sólido	78
4.7 Atividade antimicrobiana das substâncias isoladas	80
4.8 Elucidação estrutural da substância isolada a partir do meio líquido.....	82
4.9 Elucidação estrutural da substância isolada a partir do meio sólido.....	86
5. Conclusões	90
6. Referências Bibliográficas	92
Apêndice	99
Anexos.....	109

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção das indústrias farmacêuticas, de alimentos e química tem como maior fonte de produtos as descobertas em microbiologia (Demain 2000a). Desse uso da microbiologia, tem-se o desenvolvimento da biotecnologia que consiste no uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social, explorando os conhecimentos em bioquímica, microbiologia e engenharias, envolvendo microrganismos, plantas e cultura de tecidos (Bennett, 1998).

Bioprocessos despertam o interesse até de companhias químicas tradicionais com a DuPont, Dow, Basf e Monsanto pelo fato de terem um custo menor e de necessitarem de menores capitais de investimento para a manufatura de produtos, aliado ao uso de materiais brutos renováveis (Miller Jr.; Nagarajan, 2000).

A diversidade de microrganismos é enorme e somente um pequeno número destes tem sido investigado para produção de metabólitos importantes (Demain, 1999). Estima-se que apenas 5% do total de espécies fúngicas foram descritas e destas (69.000), 16% (11.500) têm sido cultivadas (Hawksaworth, 1991 apud DEMAIN, 1999). A diversidade microbiana é muito maior do que se imagina e, portanto, não tem sido descrita adequadamente. Além disso, em muitos casos há ocorrências de metabólitos não espécie específica e sim cepa específica (Rondon *et al.*, 1999).

A busca por novos produtos naturais ainda é intensa devido à insatisfação de muitas necessidades, à notável diversidade de estruturas e atividades, existência de métodos de análise mais sensíveis, de melhores técnicas para isolamento e caracterização, bem como a existência de novos métodos de produção (Clark, 1997).

A versatilidade de biossíntese microbiana é enorme. Entre os produtos naturais, aqueles provenientes de microrganismos podem ser obtidos em grandes quantidades por

processos fermentativos, haja vista a disponibilidade do uso de manipulação genética e outros processos de otimização. A importância dos microrganismos na indústria de fermentação é destacada por alguns aspectos: 1- A existência de uma alta razão entre a área de superfície e o volume, assim os microrganismos são relativamente fáceis de serem cultivados, possuindo rápidos mecanismos de nutrição e altas taxas de metabolismo e biossíntese; 2 – A variedade de reações que os microrganismos são capazes de realizar; 3 – A facilidade de adaptação em diversos ambientes, o que permite transpor a cultura da natureza para o laboratório e posteriormente para a indústria, onde é capaz de se desenvolver em fontes baratas de carbono e nitrogênio e produzir compostos de interesse; 4 – A possibilidade de manipulação genética, com resultado em tempo hábil e 5 – Capacidade de um metabolismo distinto, como a biossíntese de um enantiômero específico, geralmente o ativo, o contrário do que ocorre normalmente por síntese química, quando a mistura ou o enantiômero inativo é produzido (DEMAIN, 2000).

Entre os 520 novos fármacos aprovados entre 1983 e 1994, 39% são produtos naturais ou derivados de produtos naturais (Harvey, 2002). Estes predominam na área de antibacterianos (78%) e na área de antitumorais (61%) (Cragg *et al.*, 1997). Dos antibacterianos introduzidos no mercado no período de 1981 a 2002, 10% são produtos naturais, 68% são derivados de um produto natural, 1% foi obtido totalmente por síntese, porém baseados em um grupo farmacofórico de um produto natural e 21% são de origem sintética. Dos fármacos antitumorais introduzidos no mercado no mesmo período, 11% são produtos naturais, 27% são derivados de um produto natural, 21% são de origem sintética obtidos por modificações de uma substância conhecida, 10% são de origem sintética, porém desenvolvidos com conhecimentos adquiridos de produtos naturais, 9% são obtidos por síntese total, mas o grupo farmacofórico é oriundo de um produto natural e 4% são totalmente obtidos por síntese (Newman *et al.*, 2003).

A possibilidade de se aumentar a produção de uma substância de interesse por otimização das condições de cultivo de um microrganismo é outra justificativa para os investimentos em pesquisas desenvolvidas para a obtenção de compostos de origem microbiana, pois há grande dificuldade para se obter compostos isolados de plantas em quantidade suficiente para suprir o mercado (Demain, 2000).

Dos produtos oriundos de fungos tem-se desde a produção de metabólitos primários (aminoácidos, vitaminas, açúcares, ácidos orgânicos e nucleotídeos), os quais tem funções mais estruturais, energéticas e servem de intermediários na produção de metabólitos secundários, até os metabólicos secundários propriamente ditos, sendo que destes os antibióticos são os mais conhecidos (Griffin, 1994).

Vários metabólitos primários que são sintetizados por diversas espécies de *Corynebacterium* e *Brevibacterium* são utilizados nas indústrias de alimentos e movimentam anualmente cerca de 1,6 bilhão de libras (Demain, 2000 b). O uso comercial de *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico propicia uma receita de 1,4 bilhão de dólares por ano (Demain, 2000 b).

Riboflavina (vitamina B₂) é produzida industrialmente por *Eremothecium ashbyii* de acordo com regulamentações do FDA. E a estimativa da produção anual pelos líderes de mercado, incluindo a Hoffman – la Roch e a Basf, está acima de 3000 toneladas por ano (Kalingan; Liao, 2002). Três toneladas de cianocobalamina (vitamina B₁₂) produzidas por *Propionibacterium shermanii* ou por *Pseudomonas denitrificans* movimentam 71 milhões de dólares anualmente (McCoy, 1999).

A produção de antibióticos a partir de fungos iniciou-se com a descoberta de Alexander Fleming publicada em 1929. Ele observou a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* em placas contaminadas com *Penicillium notatum* (Fleming, 1929; Hamilton-Miller, 2002). Após três anos Fleming demonstrou que a inibição do crescimento

era devido à penicilina (Clutterbuck *et al.*, 1932), sendo sua estrutura elucidada apenas em 1945 por Hodgking e Low por meio de análise cristalográfica com raios X, identificando-se o anel β -lactâmico, segundo Abraham (1983).

Além dos metabólitos primários, os metabólitos secundários produzidos por microrganismos são extremamente importantes, principalmente nas áreas de saúde e nutrição (Demain, 2000 b). Muitas companhias têm participado com sucesso da descoberta e aplicação de metabólitos secundários microbianos entre estas: Abbott Laboratories, Bayer AG, Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly & Co, Hoechst Marion Roussel, Pfizer Inc, Roche e Schering Plough (Demain, 1999).

As estruturas químicas dos metabólitos secundários são bastante complexas e diversificadas, variando-se entre si de espécie para espécie ou até mesmo diferindo-se através das cepas, às quais a produção desse metabólito esta vinculada (Griffin, 1994, Sanders & Di Blasé, 2000). O número de estruturas químicas conhecidas destes bioprodutos vem crescendo rapidamente, com o aprimoramento de técnicas analíticas e de investigação biológica.

A produção dos metabólitos secundários freqüentemente está relacionada a algum tipo de carência nutricional e ocorre na idiofase de crescimento microbiano. Essas substâncias têm sua origem como derivados de diferentes intermediários do metabolismo primário, tendo como precursores principais: aminoácidos, ácido chiquímicos, acetilCoA, ácidos mevalônico, polissacarídeos e peptideopolissacarídeos (Griffin, 1994)

Os metabólitos secundários mais conhecidos são os antibióticos. Até 1994 eram conhecidos cerca de 11900 antibióticos, sendo que destes aproximadamente 6600 (55%) eram produzidos por *Streptomyces* spp., 2600 (22%) por fungos filamentosos, 1400 (12%) por bactérias excluindo os actinomicetos e 1300 (11%) estavam até 1997 no mercado (Strohl, 1997). Em 1994 o mercado de antibióticos foi de 18 bilhões de dólares saltando para 23 bilhões em 1996 e dois anos depois houve aumento de 28%. O mercado de antibacterianos

apenas nos EUA em 1995 foi maior que 8 bilhões de dólares, com as cefalosporinas (45%), penicilinas (15%), quinolonas (11%), tetraciclinas (6%) e com os macrolídeos (5%) representando o maior volume das vendas. Já em 1997 as vendas de ciprofloxacina excederam as vendas de todos os outros fármacos antimicrobianos movimentando cerca de 1,06 bilhão de dólares (Strohl, 1997). A venda das quinolonas atingiu 2,7 bilhões de dólares em 1998 e estima-se que ultrapassou as vendas de cefalosporinas até o ano de 2005 (Centro de Informação de Medicamentos, 2002).

A maioria dos fármacos antitumorais utilizados foi isolada, primeiramente, como antibióticos produzidos por microrganismos incluindo actinomicina D, mitomincina, bleomicinas e as antraciclinas daunorubicina e doxorubicina (Tomasz, 1995, apud DEMAIN, 1999). O próprio taxol, originalmente descoberto em plantas, também é produzido por fungos e no ano de 2000 propiciou uma receita de 1 bilhão de dólares à Bristol-Myers Squibb (McCarthy, 2002). Além de outras substâncias, a mevastatina foi uma das primeiras estatinas a ser descoberta como um metabólito secundário de fungo, seguido depois pela lovastatina (Manzoni, 2002; Bizukojc, 2006), catestatinas (Woo, 1995) e imunossuppressores (Watanabe 2003) dentre outros.

A maioria dos zigomicetos é saprófita e está distribuído na natureza nos alimentos, solo e ar. Estes exibem mínima patogenicidade a saúde dos indivíduos, mas estão constantemente envolvidos em infecções em humanos. Zygomycose é a infecção causada por membros da classe dos zigomicetos. Essa classe é dividida em dois grupos: *Entomophthorales*, que causa a entomofitoramicose e a *Mucorales*, que causa a mucormicose. A Mucormicose é predominantemente causada pela espécie do gênero *Rhizopus* sp., e também causada por fungos do gênero *Abisidia*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Rhizomucor* e outros. Esses fungos podem infectar invasivamente os pacientes com sistema imunológico severamente comprometido, causando infecções fatais. Por causa do seu rápido

curso e por ser uma infecção inesperada, há muitos dos casos de mucomicose que só são diagnosticados no posmorte, sendo um grande desafio para a terapêutica e a diagnóstica (Nagao, 2005). A aspiração dos esporos acontece facilmente e acarreta a invasão dos tecidos pelas vias respiratórias. Esses tipos de fungos são encontrados em solo e em uma variedade de alimentos (Kauffman, 2001).

Os fungos desta classe mais freqüentemente isolados de casos de mucormicose em humanos são *Rhizopus oryzae* (*arrhizus*) e o *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, e são responsáveis por 90 % de todos os casos clínicos causados por zigomicetos. Aproximadamente 15 % destes casos são atribuídos ao *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. *Rhizopus* sp freqüentemente causam sinusites, infecções em estruturas cerebrais, tecidos cutâneos ou pulmões. As mucormicose têm como marcas patológicas: A invasão vascular da hifa, trombose, necrose do tecido e infarto. Na maioria dos casos, a infecção é progressiva e freqüentemente fatal, a menos que se inicie prontamente um tratamento combinado de terapia cirúrgica e antifúngica, apesar da terapia antifúngica se resumir ao uso exclusivamente de anfotericina B, o que pode causar muitas reações adversas (Spreer, 2006), mesmo que este fungo seja testado para diferentes agentes antifúngicos conhecidos (Dannaoui, 2003).

Espécies do gênero *Rhizopus* sp. freqüentemente causam a putrefação de vegetais e frutas, podendo ocorrer em grande número como contaminantes de produtos como o malte. Algumas espécies foram largamente usadas em países de faroeste para a produção de uma grande quantidade de produtos fermentados, incluindo o “tépé” e tape na Indonésia, lao-chao na China e Taiwan e meju na Coreia (Jennessen, 2005).

Neste trabalho está sendo estudado o fungo filamentosso *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, da classe zigomycetes, com uma velocidade de crescimento rápida (Meletiadi et al. 2000) e utilizado para vários estudos. Este fungo foi isolado de solo

brasileiro (cerrado) e produz altos índices de atividade amilolítica termoestável a 45°C. Amilases produzidas por fungos termotolerantes e termofílicos são especialmente interessantes porque são enzimas geralmente termoestáveis, e podem ser usados no processo de sacarificação que ocorre em altas temperaturas. O potencial das amilases termoestáveis para aplicações biotecnológicas tem estimulado a procura por amostras microbianas expressando atividades de acordo com o necessário (Peixoto 2003). É usado na manufatura de vários alimentos fermentados asiáticos (sufu) (Hanz 2000; Aoki *et al.* 2003), sendo pesquisado também para a produção da trealase, que é uma enzima a qual quebra a trealose (dissacarídeo presente em insetos, fungos, bactérias e plantas) em glicose, sendo que a trealose pode ser usada como fonte de carbono extracelular em fungos (Aquino *et. al.*, 2005)

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais utilizados atualmente. O monitoramento das frações por cromatografia líquida de alta eficiência, associada aos detectores UV-visível, espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear, possibilita direcionar as operações de fracionamento para o isolamento dos compostos de interesse em função dos dados espectrais obtidos (Strege, 1990). Nos últimos 20 anos a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Ressonância Magnética Nuclear, têm sido os primeiros instrumentos usados por químicos de produtos naturais para o isolamento e a identificação de compostos, respectivamente. O mais comum está sendo usar várias técnicas de cromatografia, incluindo a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para isolar-se alguns miligramas de produtos naturais puros, seguido por espectroscopia de massa e experimentos de Ressonância Magnética Nuclear em tubos de 5 mm ou 3 mm para determinar a estrutura da molécula de interesse. Recentemente, avanços em RMN permitiram ao HPLC ser diretamente conectado ao RMN. Esses avanços incluem o uso de campos magnéticos nucleares maiores (500 MHz ou maior) e processamento por sinal digital que ajudaram

diminuir a sensibilidade desta técnica. O espectro de RMN propicia um grande número de informações sobre a estrutura da substância de interesse (Bobzin, 2000).

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido utilizada para separar e quantificar quimicamente antibióticos e tem como vantagem não ser um procedimento destrutivo e, conseqüentemente, por permitir a coleta de frações para serem submetidas aos ensaios biológicos, sendo uma técnica rápida, de alta precisão, especificidade e seletividade (Hugo; Russel, 1987).

O biomonitoramento pode ser realizado utilizando-se diferentes métodos. Um deles, a bioautografia, baseia-se na inibição do crescimento de certos microorganismos devido à presença de compostos biologicamente ativos, sendo utilizada no monitoramento da atividade antibiótica das diferentes frações dos extratos. A sua utilização permite a fácil localização da atividade de misturas complexas (Hamburger, Cordell, 1987) e grande aplicação nas descobertas de novos antibióticos (Golab; Kline 1965). A observação das zonas de inibição é facilitada com a utilização de sais de tetrazólio (Lund & Lyon 1975). Utiliza-se também o método de difusão em ágar o qual permite avaliar os vários extratos provenientes do fungo, sem possibilitar a localização de atividade, ou seja, podendo ser conclusivo apenas para ensaios com as substâncias puras. O halo de inibição é mensurado, obtendo-se resultados que se comparam com padrões de antibióticos, visando também avaliar a potência da substância. Além destes, utilizam-se também vários métodos afim de se determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC), na qual se estabelece a menor concentração em que as substâncias isoladas têm ação antimicrobiana sobre um inóculo conhecido de microorganismos, sendo usada a menor quantidade possível de substância isolada para se obter resultado detectável (Andrews, 2001; Vitale *et al.* 2002). Define-se, também, como a menor concentração com crescimento não visível depois de um período de incubação, usada para estimar a prevalência de resistência (Hannan, 1999; Annis, 2005).

Em 1996 o “the Journal American Medical Association” e outros 35 periódicos documentaram as ocorrências, causas e consequências do ressurgimento da ameaça microbiana (Winker; Flanagan, 1996; Lederberg, 1997). A resistência de muitos patógenos as drogas disponíveis foi apontada como sendo uma situação de urgência (Cragg et al., 1997; Nwosu, 2001) e o problema da resistência a múltiplos fármacos é considerado atualmente o maior desafio da quimioterapia moderna, pois além da existência de células bacterianas resistentes, a quimioterapia antifúngica enfrenta os mesmos problemas (Milewski et al., 2001).

Diante do que foi abordado ressalta-se a importância da pesquisa por novos agentes antimicrobianos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Fazer a bioprospecção de fungos presentes em amostras de solo, água e plantas do estado de São Paulo, conforme projeto temático da FAPESP, Proc. No. 04/07935-6, intitulado: “Bioprospecção em fungos: a busca de novos princípios ativos para o design de novos fármacos e de enzimas com aplicações farmacêuticas e industriais”.

Objetivos específicos:

-Otimização das condições de cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* van Tieghem (Saito) Schipper & Stalpers, utilizando diferentes meios fermentativos líquidos e sólido, visando a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana;

- Avaliação por técnica bioautográfica e determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos extratos e substâncias isoladas;

-Obtenção de extratos em solventes orgânicos (acetato de etila e *n*-butanol) dos meios de cultura fermentativos;

- Fracionamento cromatográfico do extrato ativo por meio de monitoramento com ensaios antimicrobianos;

- Isolamento e identificação das substâncias isoladas por meio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção do estoque

O fungo *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* objeto deste estudo foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli 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 de meio de aveia (aveia, água e ágar bacteriológico), as quais foram repicadas e incubadas em estufa durante 7 dias a 30°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 suspensão de leite com o microrganismo, 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.

Figura 1: *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* incubado em meio de aveia.

3.2 Obtenção das biomassas em meio Pré-Fermentativo

As culturas mantidas em sílica gel foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de aveia e incubadas em estufa durante sete dias à temperatura de 30°C. Foram adicionados 5 mL de solução aquosa esterilizada de Tween 80 a 2 % em cada cultura 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 quatro frascos Erlenmeyer contendo 120 mL de meio pré fermentativo cada. Estes foram incubados à temperatura de 30 ° sob agitação constante de 120 rpm durante 24 horas.

3.3 Produção de metabólitos em meio líquido

Após 24 horas, o conteúdo de cada Erlenmeyer da cultura em meio pré fermentativo foi filtrado utilizando-se bomba à vácuo e a massa micelial obtida foi transferida para 240 mL dos meios fermentativos I -Czapek (Atlas, 1995), II -de Vogel (Vogel, 1956) e III - Jackson (Jackson et al., 1993). Estas culturas foram incubadas sob as mesmas condições que as culturas do meio pré-fermentativo. O estudo do efeito do tempo de incubação foi realizado através da retirada seletiva de um Erlenmeyer de cada vez em tempos pré-estabelecidos. As culturas foram processadas após 72, 96, 120 e 144 horas de incubação, respectivamente.

3.3.1 Obtenção dos extratos

As culturas processadas nos períodos pré-estabelecidos foram filtradas com o auxílio de bomba à vácuo. Os filtrados obtidos foram submetidos à partição com 20 mL de acetato de etila para cada 120 mL de meio (três repetições), e com *n*-butanol, em sequência, utilizando-se o mesmo procedimento. A fração aquosa remanescente foi liofilizada. Foram também obtidos extratos metanólicos da massa micelial. A extração foi realizada em metanol por processo de maceração em equipamento de ultra-som por 30 minutos, a qual foi repetida por três vezes consecutivas, seguidas de filtração. Todos os solventes foram evaporados em rotaevaporador até obtenção dos extratos brutos, os quais foram armazenados em frascos âmbar. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 Dissolução dos extratos

Os extratos foram solubilizados com solução aquosa de DMSO (Dimetil sulfóxido) 50 % (V/V), na concentração de 5 mg de extrato por mL de solução (0,5 % p/v). Nos testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas estas soluções, bem como, um controle negativo com o diluente para cada microrganismo indicador e controles positivos: penicilina G (Gram +), estreptomicina (Gram -) e miconazol (leveduras), todos da SIGMA.

Esquema 1: Esquema do rendimento da produção de extratos nos três meios líquidos. **Tabela 1:** Massas obtidas por meio da fermentação em meio líquido.

Tempos	Meio Czapeck	Meio Vogel	Meio Jackson
120 horas	0,556g	0,569g	0,603g
144 horas	0,605g	0,587g	0,627g
168 horas	0,632g	0,620g	0,680g
192 horas	0,687g	0,660g	0,705g

3.4 Produção de metabólito em meio sólido

As culturas mantidas em sílica gel foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de aveia e incubadas em estufa durante sete dias à temperatura de 30°C. Foram transferidos 1cm² de meio de aveia contendo o fungo em questão para o meio de arroz, o qual foi previamente pesado e esterilizado, seguindo-se de incubação por 20 dias a temperatura de 40°C.

Figura 2: *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* incubado em meio de arroz.

3.4.1 Obtenção dos extratos

Após este período de 20 dias, adicionou-se etanol ao meio de arroz (Santos 2002), deixando-se em maceração por 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato etanólico foi filtrado e evaporado até à metade de seu volume inicial, completando-se o volume inicial com água destilada, para que a concentração final do extrato fosse etanol:água 1:1.

Este extrato bruto etanólico foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila (três repetições). Este extrato em acetato de etila foi particionado com outros três

solventes: *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila, respectivamente (três repetições para todos os solventes), sendo estes evaporados até a secura do extrato.

A fração em diclorometano do extrato do meio sólido foi submetida a uma nova partição sequencialmente com *n*-hexano, acetato de etila e metanol, tendo sido estes evaporados em seguida.

3.4.2 Dissolução dos extratos

Os extratos foram solubilizados com solução aquosa de DMSO (dimetil sulfóxido) 50 % (V/V), na concentração de 5 mg de extrato por mL de solução (0,5 % p/v). Nos testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas estas soluções, bem como, um controle negativo com o diluente para cada microrganismo indicador e controles positivos: penicilina G (Gram +), estreptomicina (Gram -) e miconazol (leveduras), todos da SIGMA.

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.5.1 Bioautografia

Com os extratos que apresentaram atividade antimicrobiana foi adotado o procedimento descrito por Lund et al., (1975). Foi feita uma análise através de cromatografia comparativa em camada delgada (CCD) utilizando-se placas de vidro com sílica gel G₆₀F₂₅₄ 5 x 20 cm (Art. 7730-Merck) com espessura de camada de 0,25 mm. Os extratos obtidos foram solubilizados em acetato de etila na concentração de 1 mg/mL, tendo sido aplicados na placa 8 µl de cada extrato, utilizando-se microseringa graduada. Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando-se o sistema solvente clorofórmio: metanol (9:1, v/v).

3.5.1.1 Dissolução dos extratos

Os extratos foram solubilizados de acordo com os itens 3.3.2 e 3.4.3.

3.5.1.2 Microrganismos indicadores

Utilizaram-se como microrganismos indicadores *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os microrganismos indicadores foram repicados em tubos de ensaio contendo Ágar Triptona Soja e incubados em estufa a 37 °C por 24 horas.

Com o auxílio de alça de platina esterilizada cada microrganismo foi transferido para tubo contendo 5 mL de solução salina e esta foi padronizada pela comparação com o 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%). Esta suspensão foi adicionada ao ágar Mueller Hinton na proporção de 2 %, dando origem ao inóculo. Estas suspensões foram mantidas em banho-maria a temperatura de aproximadamente 50°C até o momento do uso.

3.5.1.3 Detecção da atividade antimicrobiana

As placas cromatográficas desenvolvidas foram cuidadosamente secas e as substâncias eluídas foram observadas sob luz ultravioleta a 254 nm e 366 nm, respectivamente.

Sobre as placas, com o auxílio de uma pipeta esterilizada, foram adicionados lentamente 20 µL do inóculo (Meio Mueller Hinton). Após a solidificação, discos de 10 µg de gentamicina (Laborclin) foram aplicados nas placas como controle positivo de inibição de

crecimento para bactérias Gram negativas e Gram positivas, sendo que para *Candida Albicans* utilizaram-se discos de miconazol. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

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

3.6 Perfil cromatográfico dos extratos do meio líquido

Os extratos brutos obtidos por partição com acetato de etila foram pesados em aproximadamente 1,0 mg e transferidos para frasco tipo Eppendorf. Os extratos brutos obtidos por maceração com metanol foram pesados em aproximadamente 2,0 mg e também transferidos para frascos tipo Eppendorf. Nestes frascos, os extratos brutos foram solubilizados em uma solução de 1,0 mL de metanol e água 1:1. Foram colocados em centrifuga a 13000 rpm durante dois minutos e, quando necessário, as amostras foram filtradas em filtro de 45 µm. Todas as soluções de cada amostra foram injetadas no volume de 10 µL, respeitando-se o limite de detecção do equipamento.

Foram obtidos os perfis cromatográficos dos extratos confeccionados a partir dos meios de cultura não inoculados, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para a definição das melhores condições para a produção de metabólitos do fungo em questão. A instrumentação consiste equipamento Shimadzu (SCL-10Avp, Japan) com sistema de bombeamento de solvente de três bombas, Shimadzu SPD-M10Avp Detector de Fotodiodo de Varredura, e um computador Intel Celeron para controle analítico do sistema e coleta e processamento dos dados. A cromatografia analítica foi feita usando análise isocrática (metanol/água 55:45) em eluição de 30 minutos. A coluna cromatográfica C18 CLC-ODS (M) – 4.6 x 250 mm Shimadzu foi utilizada com vazão de 1.0 ml / min.

3.7 Aumento da escala fermentativa

Após a otimização dos parâmetros experimentais para produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, a escala de fermentação em meio líquido foi ampliada para frascos tipo Erlenmeyer de 6 L de capacidade contendo 1,2 L de meio de cultura fermentativo. Esta etapa teve como objetivo aumentar a produção dos metabólitos de interesse nas quantidades necessárias ao processo de isolamento, identificação e realização dos ensaios biológicos com as substâncias puras. Os caldos das culturas foram submetidos à partição com acetato de etila e com *n*-butanol, em seqüência, utilizando-se o mesmo procedimento dos extratos em escala laboratorial. A fração aquosa remanescente foi liofilizada.

3.8 Isolamento dos metabólitos secundários

3.8.1 Metabólitos produzidos em meio líquido

3.8.1.1 Coluna cromatográfica

O extrato em acetato de etila da escala piloto foi submetido a uma nova seqüência de partições: *n*-butanol (amostra 2.1), diclorometano (amostra 2.2) e acetato de etila (amostra 2.3), respectivamente. Os solventes foram eliminados em rotaevaporador à vácuo. A fração 2.2 foi submetida a uma seqüência de duas colunas de cromatografia clássica. A primeira foi coluna cromatográfica com as fases estacionárias Sephadex LH20 ®(Anderson, 1971), usando como fase móvel a mistura metanol e diclorometano na proporção 1:1 (Kenmogne, 2006). Foram obtidas aproximadamente 150 frações de cada coluna, contendo 4,0 mL cada.

3.8.1.2 Coluna de separação parte II

Das frações coletadas da coluna de Sephadex LH20 e agrupadas conforme sua composição, foi selecionada uma sub fração (amostra 2.2.1), contendo a maior massa (0,650 g), a qual foi submetida a uma segunda coluna cromatográfica, contendo fase estacionária de sílica gel e, como fase móvel, utilizou-se uma mistura de hexano e acetato de etila, começando com 100 % de hexano, indo até a concentração de 30 % do mesmo. Foram obtidas aproximadamente 200 frações desta segunda coluna.

3.8.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Das frações obtidas da coluna de sílica de fase normal, foram obtidas três sub frações (2.2.1.1, 2.2.1.2 e 2.2.1.3), as quais foram submetidas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A cromatografia foi feita usando sistema gradiente iniciando-se com metanol:água 2:8, chegando-se no tempo de 30 minutos até a concentração de 100% de metanol. Utilizou-se a coluna cromatográfica VP250/10 Nucleosyl 120-5C18 – 10 x 250 mm Marcherey – Nagel USA com vazão de 3.0 mL / min. A partir das três frações foram isoladas quatro substâncias ostentando pureza acima de 90%, as quais tiveram suas estruturas químicas elucidadas com base nos dados de Ressonância Magnética Nuclear e posterior determinação da Concentração Inibitória Mínima contra os microrganismos avaliados.

Esquema 2: Diagrama geral do procedimento de fracionamento do extrato bruto do meio Jackson em escala piloto:

3.8.2 Metabólitos produzidos em meio sólido

3.8.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a definição das melhores condições para a separação dos metabólitos produzidos pelo fungo em questão. A separação cromatográfica dos metabólitos foi realizada utilizando-se sistema gradiente de fase móvel, iniciando-se com a fase metanol:água 2:8 e terminando com 100% de metanol em uma eluição de 30 minutos. A coluna cromatográfica C18 CLC-ODS (M) – 4.6 x 250 mm Shimadzu foi utilizada com vazão de 1.0 mL / mim.

Esquema 3: Diagrama geral do procedimento de fracionamento do extrato bruto do meio sólido de arroz:

3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas utilizando-se o método de microdiluição em microplaca.

3.9.1 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções das cinco substâncias isoladas a partir dos extratos em acetato de etila, contendo 0,25 mg em 40 µL de DMSO e 10 µL de metanol para a total solubilização das amostras. Após completa solubilização das amostras, adicionaram-se 450 µl de caldo Mueller Hinton. Esta solução foi usada em todo o experimento de microdiluição em microplaca.

3.9.2 Microrganismos utilizados

Utilizaram-se as cepas padrão de *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

3.9.3 Preparo do inóculo

3.9.3.1 Bacterias

Com o auxílio da alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos organismos indicadores, desenvolvidas em ágar triptona soja (OXOID), foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina esterilizada (0,9%). Padronizaram-se as suspensões comparando-as com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Efetuou-se a primeira diluição transferindo-se 1000 µL de cada suspensão para 9000 µL de solução salina. Em seguida,

transferiram-se 2000 µL da suspensão anterior para 10000 µL de caldo Mueller Hinton. Desta ultima suspensão retiraram-se alíquotas de 20 µL de inóculo.

3.9.3.2 Leveduras

Com o auxilio da alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos organismos indicadores, desenvolvidas em ágar triptona soja (OXOID), foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina esterilizada (0,85%). Padronizaram-se as suspensões comparando-as com o tubo 0,5 da escala de McFarland. Efetuou-se a primeira diluição transferindo-se 100 µL de cada suspensão para 900 µL de solução salina. Em seguida, transferiram-se 200 µL da suspensão anterior para 7800 µL de caldo Mueller Hinton. Desta ultima suspensão retiraram-se alíquotas de 20 µL de inóculo.

3.9.4 Determinação da atividade antimicrobiana das substâncias isoladas

Foram adicionados 100 µL nos orifícios da microplaca contendo: caldo triptona soja, as soluções das substâncias isoladas e as suspensões bacterianas. As substâncias foram avaliadas no intervalo de concentração entre 400 µg/mL (primeiro poço), 350, 300, 250, 200, 150, 100, 80, 60, 40, e 20 µg/ mL respectivamente até o poço 11.

Em um dos orifícios de cada placa foi feito o controle da cultura, contendo somente meio de cultura mais microrganismo indicador, o qual deve apresentar crescimento microbiano devido a ausência de agente antimicrobiano. Em outro orifício foi feito o controle de esterilidade do caldo triptona soja e em outro o controle do sistema solvente utilizado na solubilização das substâncias isoladas.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS

A forma de manutenção do estoque utilizada foi satisfatória, pois os extratos apresentaram atividade antimicrobiana em todos os passos deste trabalho, tendo sido observada pequena diferença de atividade antimicrobiana entre os extratos utilizados em todos os experimentos.

Os resultados obtidos foram bastante expressivos, com vários extratos apresentando atividade antimicrobiana. O fungo em questão foi submetido a diferentes condições de crescimento utilizando-se os meios de cultura Czapek, Vogel e Jackson e em tempos de crescimento de 120, 144, 168 e 192 horas.

4.1 Bioautografias dos extratos do meio líquido

Com o intuito de otimizar as condições de produção de substâncias com atividade antimicrobiana, realizaram-se experimentos variando-se o tempo de incubação da cultura, e os meios fermentativo utilizados. Inicialmente, utilizou-se o teste de bioautografia, para verificar a ocorrência de possíveis substâncias ostentando atividade antimicrobiana.

Constatou-se a presença de atividade antimicrobiana em todos os extratos em acetato de etila e da maceração do micélio do fungo em metanol. Somente os extratos butanólicos não apresentam atividade.

A extração após a separação da massa micelial do filtrado da cultura foi reprodutível e mostra-se vantajosa. Manzoni et al. (1999) optaram também por este procedimento com o intuito de aumentar a recuperação de lovastatina e provastatina das culturas de *Monascus paxii* e *Aspergillus terreus*, pois quando comparada a extração direta da cultura como um todo propicia melhores rendimentos.

Na figura 3 são apresentadas três placas de bioautografia contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), sendo a figura 3A a placa da bioautografia dos extratos brutos obtidos nos meios Czapek (esquerda) e Jackson com 192 horas de crescimento. Na figura 3B aparece a placa e observam-se os resultados dos testes dos extratos obtidos no meio Czapek (esquerda) e Jackson com 120 horas de crescimento. Na figura 3C a placa dos resultados dos testes dos extratos dos meios Czapek (esquerda) e Vogel com 144 horas de crescimento.

Figura 3: Bioautografia dos extratos obtidos dos meios Czapek (C120) e Jackson com 120 horas de crescimento (3A); bioautografia dos extratos obtidos dos meios Czapek (C144) e Jackson com 144 horas de crescimento (3B) e Bioautografia dos extratos brutos com partição acetato obtidos dos meios Czapek (esquerda) e Jackson com 192 horas de crescimento (3C).

Na figura 4 são apresentados os resultados de três bioautografias contra *S. aureus*: na primeira, figura 4A, a bioautografia dos extratos brutos obtidos em acetato de etila dos meios Czapek (esquerda) e Jackson com 168 horas de crescimento; na figura 4B são apresentados os resultados obtidos para os extratos em acetato de etila do meio Vogel com 192 (esquerda) e 120 horas de crescimento e, na figura 4C, são apresentadas as bioautografias dos extratos

obtidos em acetato de etila do meio Jackson (esquerda), com o crescimento de 144 horas, e do meio Vogel com o crescimento de 168 horas, respectivamente.

Figura 4: Bioautografias dos extratos obtidos dos meios Czapek (C168) e Jackson (J168) com 168 horas de crescimento (4A); do meio Vogel com 192 (V192) e 120 horas de crescimento (V120) (4B); dos extratos em acetato de etila do meio Jackson (J144) com o crescimento de 144 horas e do meio Vogel (V168) com o crescimento de 168 horas (4C).

Na figura 5 são apresentados os resultados das bioautografias contra *S. aureus* dos extratos metanólicos brutos obtidos a partir do micélio. Na figura 5A observam-se os extratos dos micélios em metanol correspondes aos três meios de cultura (Czapek, Vogel e Jackson, respectivamente na mesma foto) com 192 horas de crescimento. Na figura 5B são apresentados os resultados dos extratos em metanol do micélio dos três meios de cultura com 144 horas de crescimento.

Figura 5: Bioautografias dos extratos em metanol dos micélios obtidos nos meios de cultura Czapek, Vogel e Jackson, respectivamente, em tempo de 192 horas de crescimento (5A), e com 144 horas de crescimento (5B).

Na figura 6 são apresentadas as bioautografias contra *S. aureus*. dos extratos metanólicos, sendo que na figura 6A são apresentados os extratos obtidos dos três meios de cultura em 120 horas de crescimento. Na figura 6B são apresentados os resultados correspondentes aos três meios de cultura com 168 horas de crescimento fermentativo.

Figura 6: Bioautografias dos extratos em metanol do micélio obtidos nos três meios de cultura: Czapek, Vogel e Jackson, respectivamente, com o crescimentos de 120 horas (6A) e 168 horas (6B).

Os extratos butanólicos do fungo *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* não apresentaram atividade antimicrobiana como pode ser observado na figura 7. Na parte superior de todas as figuras aparece o halo de inibição do disco de gentamicina (G), o qual foi utilizado como controle positivo. Estes experimentos foram feitos utilizando-se *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), como microrganismo indicador deste *screening* prévio, pela facilidade de seu crescimento e porque sua cultura apresentava melhor rendimento.

Figura 7: Bioautografia do extrato butanólico bruto obtido do meio Czapek com 168 horas de crescimento e do meio Jackson com 192 horas de crescimento.

Após a otimização dos parâmetros experimentais para produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, a escala de fermentação foi ampliada para frascos Erlenmeyer de 6 L de capacidade contendo 1,2 L de meio de cultura fermentativo. Esta etapa teve como objetivo aumentar a produção dos metabólitos de interesse nas quantidades necessárias ao processo de isolamento, identificação e realização dos ensaios biológicos com as substâncias puras. Para os experimentos de ampliação da escala foram obtidos somente os extratos da partição acetato de etila do meio Jackson e somente aqueles obtidos em 192 horas foram submetidos aos testes de bioautografia usando os microrganismos *Kokuria rhizophila* (ATCC 9341), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14885). São apresentadas atividades antimicrobianas contra *Kokuria rhizophila*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*. Na figura 8 são apresentados os resultados da bioautografia contra o *Kokuria rhizophila* do extrato em acetato de etila do meio e do extrato metanólico do micélio, ambos obtidos do meio Jackson com 192 horas de crescimento.

Figura 8: Bioautografia contra o *Kokuria rhizophila* do extrato em acetato de etila (direita) e do extrato metanólico (esquerda) obtidos do meio Jackson com 192 horas de crescimento.

4.2 Bioautografias dos extratos obtidos do meio sólido

O meio fermentativo de arroz foi utilizado para se otimizar ainda mais a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana pelo fungo *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, pois trata-se de um meio que contém diferentes fontes de energia e por ser uma produção estática, sem agitação, com conseqüente baixa aeração do meio.

Figura 9: Bioautografia do extrato acetato do meio de arroz, usando como microorganismo indicador o *Staphylococcus aureus*.

Figura 10: Bioautografia do extrato em acetato de etila do meio de arroz, usando como microorganismo indicador o *Kokuria rhizophila*.

4.3 Perfil químico dos extratos do meio líquido

No perfil químico obtido em CLAE, os espectros de ultravioleta (U.V.) foram analisados para diferenciar os extratos obtidos através do cultivo do fungo *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, nos diferentes meios de cultura em diferentes tempos de cultivo, analisando-se também a interferência dos meios de cultura na produção dos metabólitos.

Nas figuras 11 e 12 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Czapek por 120 horas. São apresentados os perfis dos extratos com detecção em dois diferentes comprimentos de onda, para melhor comparação dos resultados. Na figura 12 são apresentados os cromatogramas dos extratos metanólicos da maceração dos micélios do cultivo em meio Czapek em 120 h de crescimento e o espectro de ultravioleta do mesmo. Pode-se observar que no período de 120 h de fermentação no meio Czapek foram obtidos apenas dois picos majoritários nos cromatogramas, sendo que no extrato em acetato de etila, o pico majoritário aparece em 5,60 min (Fig. 11). Já no extrato metanólico, o pico majoritário aparece em 2,75 min, sendo que os espectros de UV de ambas atestam as diferenças significativas entre elas. Evidenciam também que o microorganismo pesquisado produz diferentes substâncias detectáveis, mesmo em tempos de cultivo muito curtos.

Figura 11: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V. da partição acetato de etila do cultivo em meio Czapek em 120 horas de crescimento.

Figura 12: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Czapek em 120 horas de crescimento.

Nas figuras 13 e 14 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Vogel por 120 horas. Todavia, observa-se maior número de

substâncias na amostra (picos menores) quando se utiliza o meio de Vogel para o cultivo, considerando-se maior complexidade da amostra.

Figura 13: Cromatograma em CLAE e o espectro de U.V. da partição acetato de etila do cultivo em meio Vogel com 120 horas de crescimento.

Figura 14: Cromatograma em CLAE e o espectro de U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Vogel com 120 horas de crescimento.

Nas figuras 15 e 16 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Jackson por 120 horas. Diferentemente do que foi observado para os meios de Czapek e Vogel, no meio Jackson aparece somente um pico majoritário e a amostra praticamente não contém outras substâncias detectáveis no ultravioleta, sendo demonstrada a menor complexidade da amostra, neste tempo de cultivo do fungo, neste meio de cultura.

Figura 15: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Jackson com 120 horas de crescimento.

Figura 16: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Jackson, com 120 horas de crescimento.

Nas figuras 17 e 18 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Czapek por 144 horas. A partir deste tempo de crescimento surge na partição em acetato de etila, em comparação com o mesmo meio de cultura, um grande número de picos, indicando maior complexidade da amostra, sendo o pico majoritário com tempo de retenção de 5,60 minutos. No extrato metanólico, os picos minoritários são diferentes em comparação com o tempo de 120 horas, mas o pico em 5,60 minutos se mantém, inclusive com o mesmo espectro de ultravioleta. Já o extrato metanólico do micélio obtido nas mesmas condições apresenta perfil simples de substâncias, não tendo sido considerado como parâmetro para seleção do melhor meio de cultivo do fungo em questão.

Figura 17: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Czapek com 144 horas de crescimento.

Figura 18: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Czapek, com 144 horas de crescimento.

Nas figuras 19 e 20 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Vogel por 144 horas. Na partição com acetato de etila aparece maior número de picos em relação ao tempo do mesmo meio de 120 horas. Os picos que

também aparecem no tempo de 120 horas, desta vez apresentam maior intensidade de absorvância, todavia, com o mesmo espectro de ultravioleta, caracterizando o mesmo perfil químico. Já no extrato metanólico da maceração do micélio, ocorre maior complexidade de substâncias no extrato, em relação ao extrato de 120 horas.

Figura 19: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Vogel com 144 horas de crescimento.

Figura 20: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Vogel, com 144 horas de crescimento.

Nas figuras 21 e 22 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Czapek por 144 horas. Observa-se no cromatograma da partição em acetato de etila, maior número de picos, com intensidades de absorvância diferentes e tempo de retenção do pico majoritário diferente (6,59 minutos). No extrato metanólico, os picos são relativamente semelhantes, aumentando apenas a intensidade em 144 horas.

Figura 21: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição com acetato de etila do cultivo em meio Jackson com 144 horas de crescimento.

Figura 22: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Jackson, com 144 horas de crescimento.

Nas figuras 23 e 24 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Czapek por 168 horas. Os cromatogramas da partição com acetato de etila (figura 23) são semelhantes aos cromatogramas de 144 horas, com

intensidades de absorvância maiores e com tempo de retenção de 5,65 minutos do pico majoritário. Na maceração em metanol aparece o pico majoritário em 2,08 minutos, igual ao observado para o tempo de 144 horas, mas com intensidade maior.

Figura 23: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição com acetato de etila do cultivo em meio Czapek com 168 horas de crescimento.

Figura 24: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Czapek, com 168 horas de crescimento.

Nas figuras 25 e 26 são apresentados os perfis cromatográficos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Vogel por 168 horas. Estes são semelhantes aos

cromatogramas da partição em acetato de etila, em relação ao meio de Vogel, nos diferentes tempos e com intensidade da absorvância variando conforme o tempo, com o pico majoritário (5,50 min) aparecendo nos três tempos de cultivo. No extrato metanólico do micélio aparece um cromatograma com picos semelhantes, mas com intensidades de absorvância menores e espectro de U. V. também diferente.

Figura 25: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. em acetato de etila do cultivo em meio Vogel com 168 horas de crescimento partição.

Figura 26: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Vogel, com 168 horas de crescimento.

Nas figuras 27 e 28 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Jackson por 168 horas. Na partição em acetato de etila aparece maior complexidade de substâncias do que nos tempos de cultivo menores, aumentando a quantidade de substâncias detectadas pelo ultravioleta nestes dois comprimentos de onda. Na maceração em metanol do micélio, o perfil químico é semelhante aos outros tempos de cultivo do mesmo meio, com intensidade de absorvância maior.

Figura 27: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Jackson com 168 horas de crescimento.

Figura 28: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Jackson, com 168 horas de crescimento.

Nas figuras 29 e 30 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Czapek por 192 horas. Na partição em acetato de etila aparecem picos com intensidades de absorvância menores do que nos tempos anteriores, com complexidade da amostra semelhante. Na maceração em metanol do micélio, o perfil é semelhante aos outros tempos de cultivo.

Figura 29: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Czapek com 192 horas de crescimento.

Figura 30: Cromatograma em CLAE e o espectro de U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Czapek, com 192 horas de crescimento.

Nas figuras 31 e 32 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Vogel por 192 horas. Na partição em acetato de etila, o pico majoritário continua sendo o pico com o tempo de retenção em torno de 5,50 minutos, com os

picos minoritários semelhantes em tempos de retenção, mas com detecções de absorvância diferentes. O extrato metanólico do micélio aparece com maior complexidade de substâncias da amostra, as quais foram detectadas apenas com esse tempo maior de maceração.

Figura 31: Cromatograma em CLAE e o espectro U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Vogel com 192 horas de crescimento.

Figura 32: Cromatograma em CLAE e o espectro de U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Vogel, com 192 horas de crescimento.

Nas figuras 33 e 34 são apresentados os perfis químicos dos extratos obtidos a partir do fungo cultivado em meio Jackson por 192 horas. Na partição em acetato de etila há maior complexidade da amostra do que para todos os tempos anteriores, com intensidades de absorvância maiores do que nos outros tempos de cultivo, sendo este o tempo de cultivo e o meio de cultura escolhidos para o aumento da produção de extrato bruto visando a obtenção de quantidades maiores de metabólitos secundários.

Não houve influência significativa dos diferentes meios e tempos de cultivo nos perfis dos extratos dos micélios, pois os perfis dos cromatogramas variaram pouco de acordo com o tempo de cultivo e com o meio de cultura do fungo em questão.

Figura 33: Cromatograma em CLAE e o espectro de U.V. da partição em acetato de etila do cultivo em meio Jackson com 192 horas de crescimento.

Figura 34: Cromatogramas em CLAE e o espectro de U.V. da maceração em metanol do micélio do cultivo em meio Jackson, com 192 horas de crescimento.

Os extratos provenientes das culturas desenvolvidas no mesmo meio, porém em tempos de cultivo diferentes, mantendo-se constantes as outras variáveis, apresentaram também perfis diferentes em termos qualitativos e quantitativos, dependendo também das demais condições selecionadas, pois conforme o maior tempo de cultivo, maior a complexidade do extrato obtido. Sendo o cultivo em meio Jackson o que apresenta maior complexidade do extrato em acetato de etila, entre os três meios de cultura estudados.

O meio Jackson e o tempo de 192 horas de fermentação foram os escolhidos para que fosse feito o aumento de escala fermentativa, visando a obtenção de maior massa do extrato para o isolamento de maior quantidade de substâncias puras.

Nas partições butanólicas não foram feitos os testes de perfil químico por não apresentarem substâncias com atividade antimicrobiana.

Foram obtidos perfis químicos dos meios de cultura líquidos usados neste experimento, sem inoculação e crescimento do fungo, para ser usado como controle negativo

desta produção. Estes foram particionados com acetato de etila (após serem autoclavados) e seus perfis cromatográficos foram obtidos para comparação dos demais perfis.

Na figura 35 são apresentados o cromatograma e o espectro de U. V. do meio Czapek particionado com acetato de etila. Nas figuras 36 e 37, respectivamente, são apresentados os cromatogramas e os espectros de U.V. dos meios Vogel e Jackson. Foram observados nos cromatogramas somente os picos majoritários para serem comparados com os cromatogramas dos extratos dos meios fermentados, visando identificar as substâncias do meio de cultura que não foram produzidas pelo fungo daquelas que o foram após a fermentação, bem como para determinar se os componentes do meio de cultura influenciaram nos produtos do metabolismo secundário do fungo.

Figura 35: Cromatograma em CLAE e o espectro de U. V. da partição em acetato de etila do meio Czapek sem inóculo.

Figura 36: Cromatograma em CLAE e o espectro de U. V. da partição em acetato de etila do meio Vogel sem inoculo.

Figura 37: Cromatograma em CLAE e o espectro de U. V. da partição em acetato de etila do meio Jackson sem inoculo.

Observa-se que os três meios de cultura apresentaram substâncias que foram interferentes nas análises por CLAE na detecção dos metabólitos do fungo, sendo o meio Jackson, dentre os três meios utilizados, o que apresentou maior quantidade de substâncias

interferentes. Todavia, estes interferentes não inviabilizaram a escolha do melhor meio de cultura para a produção de metabólito secundário pelo fungo em questão.

Na figura 38 são apresentados os cromatogramas e o espectro de U. V. do extrato bruto em partição com acetato de etila do meio Jackson com 192 horas de crescimento em uma escala piloto. Com frascos Erlenmeyer de 6 litros, contendo maior quantidade de meio de cultura, foi possível o acúmulo de extrato. Todavia, houve diferenças significativas em relação ao mesmo extrato em escala de produção menor, apresentando também variações da quantidade de substâncias produzidas pelo fungo. Portanto, o aumento da escala fermentativa interfere no perfil da produção de substâncias ativas pelo microrganismo. Com o aumento do Erlenmeyer, aumenta-se a proporção de nutrientes, aumenta-se a aeração do meio, pois estes meios estão em constante agitação, sendo diferentes as condições dadas ao fungo para a produção de metabólitos secundários.

Figura 38: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V. da partição com acetato de etila do cultivo em meio Jackson em 192 horas de crescimento em escala de Erlenmeyer de 6 litros.

4.4 Perfil químico dos extratos do meio sólido

No cultivo em meio sólido de arroz foi obtido o perfil químico do extrato em acetato de etila, o qual apresentou complexidade de metabólitos secundários muito maior do que todos os cromatogramas dos meios líquidos.

Figura 39: Cromatogramas em CLAE e espectros de U.V. da partição em acetato de etila do extrato etanólico do cultivo em meio de arroz.

4.5 Perfil químico das substâncias isoladas do meio líquido

Foram obtidos em CLAE os perfis químicos das frações das quais foram isoladas substâncias. A primeira substância isolada foi codificada ASCC 1.4. Na figura 40 são apresentados os perfis químicos e os espectros de UV desta substância isolada. A pureza desta substância foi acima de 90%.

Figura 40: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V. da fração correspondente à substância isolada ASCC 1.1.

Figura 41: Cromatogramas em CLAE e espectro de U.V. da fração correspondente à substância isolada ASCC 1.4.

Um único pico em CLAE sugere a presença de somente um componente. Contudo, recomenda-se analisar a substância isolada utilizando-se ao menos duas fases móveis, visando confirmar a pureza da substância.

Esta mesma substância foi isolada de duas diferentes frações resultantes da coluna cromatográfica de sílica de fase normal, sendo que foi utilizado para o isolamento destas

substâncias o mesmo sistema solvente (hexano : acetato de etila), com a mesma polaridade, diferenciando somente o tempo de retenção da substância na coluna.

A utilização de CLAE com detecção de fotodiodos propicia o isolamento das substâncias, podendo-se utilizar, inicialmente, um sistema gradiente para eluir os componentes de alta polaridade e, assim, detectá-los mesmo que as absorvâncias de alguns constituintes sejam pequenas. Foi utilizado o sistema gradiente, começando com 20 % de metanol em água, até 100% do metanol, durante 30 minutos, com vazão de 1 mL/min. Desta forma, pode-se reduzir as possibilidades da presença de impurezas não detectáveis eluírem juntamente com os constituintes desejados. Outra possibilidade para se evitar a presença, principalmente de compostos que não possuem grupos cromóforos, seria utilizar análise por cromatografia de camada delgada comparativa, pois a maioria dos compostos é revelada quando se utiliza vanilina como agente químico revelador (Gibbons; Gray, 1998). No entanto, não se optou por esse procedimento em virtude da pequena quantidade de substâncias isoladas.

A própria Ressonância Magnética Nuclear, bem como a espectroscopia de massas são ferramentas úteis para a detecção e quantificação de impurezas. Todavia, é prudente verificar a pureza das substâncias para se evitar que as impurezas interfiram na elucidação estrutural das mesmas, gastos desnecessários com a elucidação estrutural e sobretudo dúvidas nos resultados dos ensaios biológicos.

4.6 Perfil químico das substâncias isoladas no meio sólido

No perfil cromatográfico do meio de arroz, foram isoladas duas substâncias majoritárias codificadas em ASCC 2.1 e ASCC 2.2, sendo feito o isolamento a partir de injeções sucessivas da amostra no aparelho de CLAE, o que confirmou também a boa repetibilidade do experimento.

As substâncias isoladas apresentam espectros de U. V. diferentes, sendo portanto, atribuídos a duas substâncias diferentes, tendo tempos de retenção em 17,85 e 20,35 minutos, como é apresentado na figura 40. As substâncias isoladas foram submetidas a eliminação do solvente e mantidas em dessecador previamente as análises por Ressonância Magnética Nuclear e determinação da Concentração Inibitória Mínima.

As amostras recolhidas foram novamente analisadas em CLAE para se verificar o grau de pureza das substâncias isoladas. A seguir são apresentados os perfis cromatográficos das substâncias ASCC 2.1 e ASCC 2.2

Figura 42: Perfil químico e espectro de U. V. da substância codificada ASCC 2.1.

4.7 Atividade antimicrobiana das substâncias isoladas

Figura 43: determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas das substâncias isoladas, contra *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341).

Quanto aos ensaios realizados com as substâncias isoladas, devido ao fato de dispormos de pequena quantidade das mesmas, optou-se pela realização do método de microdiluição em microplaca, pois pode-se utilizar diminuta quantidade de substâncias e, por meio da realização de diluições seriadas, é possível determinar a concentração inibitória mínima (Bonaventura et al., 2002; Lass-Flörl et al., 2003). No entanto, houve dificuldade na solubilização das substâncias isoladas, o que não ocorreu com o extrato quando avaliado por este método.

As substâncias ASCC 1.4 e ASCC 1.1 são da família das 2,5 dicetopiperazinas, sendo muito comuns em uma grande quantidade de produtos naturais exibindo grande variedade de atividades biológicas, tais como: antibiótica, antifúngica e anticancer, bem como há também patentes para tratamento de obesidade e antagonista da oxitocina (Tullberg, 2006).

Segundo dados disponíveis na literatura, estes dipeptídeos cíclicos não são solúveis em DMSO mesmo na concentração de 1mg/mL (Graz et al., 1999). Todavia, são solúveis em metanol, porém este solvente não é o mais adequado para a realização deste ensaio. Por esta razão, realizou-se um experimento utilizando a concentração de metanol no caldo da cultura para avaliar a susceptibilidade dos microrganismos indicadores *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341). Nas padronizações aprovadas pelo NCCLS verificou-se que DMSO pode ser utilizado em até 10 % (v/v). Para a melhor solubilização da amostra no meio de cultura, utilizaram-se 2% de metanol e 8% de DMSO, de tal forma que as concentrações finais de metanol e de DMSO não ultrapassassem os limites estabelecidos.

Três das substâncias isoladas a partir do cultivo do fungo *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* apresentam atividade antimicrobiana significativa contra *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), pois estas (ASCC 1.4, ASCC 2.1 e ASCC 1.1) apresentaram concentrações inibitórias mínimas entre 400 µg/mL e 350 µg/mL.

O inóculo tem a concentração de 5×10^4 UFC/ mL de meio, sendo uma concentração padronizada para os testes antimicrobianos pela NCCLS/CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) na publicação “Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana; 15º Suplemento Informativo”, sendo considerada uma concentração alta de microrganismo para esse tipo de teste com sensibilidade alta.

A substancia ASCC 1.4, estudada por Furtado e seus colegas, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Kocuria rhizophila*, numa concentração de $2,9 \times 10^{-3}$ M, com um inóculo de 10^3 UFC/mL (Furtado et. al. , 2005).

4.8 Elucidação estrutural da substância isolada a partir do meio líquido

Ciclo (Leu-Pro)

Figura 44: Estrutura química da substância ASCC 1.4

Ciclo (Leu-4-OH-Pro)

Figura 45: Estrutura química da substância ASCC 1.1

As substâncias isoladas pertencem a classe das dicetopiperazinas, alcalóide que apresenta atividades biológicas, sendo uma classe de metabólito secundário amplamente distribuída na natureza (Kanzaki et al., 1999). As 2,5 dicetopiperazinas são dímeros que naturalmente ocorrem como modelo estrutural. Eles também são freqüentemente gerados como subprodutos ou sinal de degradação de oligopeptídeos. O esquema a seguir apresenta uma estratégia sintética, geralmente visando obter vantagem de uma larga quantidade de aminoácidos naturais e sintéticos disponíveis como material de partida enantiomericamente puro. A formação das 2,5 dicetopiperazinas envolve o acoplamento de um α -aminoácido-*N*-protegido com um α -aminoácido-éster, seguido de uma *N*-desproteção e ciclização, com aumento de temperatura. (Dinsmore, 2002).

Figura 46: Estratégias de síntese das 2,5 dicetopiperazinas com os possíveis fragmentos indicados.

Todas têm em comum o anel dicetopiperazínico, o qual apresenta deslocamentos químicos característicos dos carbonos carbonílicos de amida (δ 167 e 171). Esta substância isolada é biossintetizada a partir da condensação do aminoácido prolina ou hidroxiprolina com outro aminoácido. Os dados dos deslocamentos químicos dos carbonos do anel dicetopiperazínico foram comparados com a literatura e observou-se que estes ocorrem em torno de δ 59, δ 45, δ 22 e δ 27 (Fdhila et al., 2003).

Os dados de RMN ^1H e de RMN ^{13}C das substâncias 1.1 e 1.4 diferem praticamente devido à presença do resíduo de hidroxiprolina somente na substância 1.1, pois as duas são originadas, respectivamente, da condensação do aminoácido leucina com hidroxiprolina e leucina com prolina. Os espectros de RMN ^1H destas substâncias são apresentados nas figuras 48 e 51, páginas 109 e 112 e os dados encontram-se organizados na tabela 2, página 83. Pode-se observar nos espectros de RMN ^1H de 1.1 e de 1.4, respectivamente, dois dubletos em δ 0,96 e em δ 1,01 (d ; $J = 6,5$ Hz; 3H) e outros dois dubletos em δ 0,96 e em δ 0,99 (d ; $J = 6,5$ Hz; 3H) que demonstram a presença de duas metilas na molécula. Além destes sinais, os multipletos em δ 4,03 a δ 4,09 e em δ 3,99 a δ 4,03, em δ 2,01 a δ 2,21 e em δ 1,98 a δ 2,18, em δ 1,46 a δ 1,57 e em δ 1,48 a 1,56, respectivamente, para 1.1 e 1.4, sugerem a presença de uma unidade de leucina nestas moléculas.

Para cada uma das substâncias isoladas foram obtidos os mapas de contornos de COSY, HMQC e HMBC (anexo). As análises dos mapas de contorno de COSY permitiram estabelecer os acoplamentos entre os hidrogênios, as do HMQC possibilitaram fazer as atribuições dos carbonos e as do HMBC permitiram estabelecer as correlações entre hidrogênios e carbonos, possibilitando sugerir a presença da unidade de prolina nas moléculas. Os dados dos mapas de contornos HMBC das substâncias estão apresentados nas tabelas 2 e 3 (páginas 83 e 84) e as correlações que sugeriram a presença de uma unidade de prolina nas moléculas são as dos hidrogênios ligados ao carbono 3 com o carbono 6.

O ciclo L-leucina-L-prolina foi isolado do caldo da cultura de *Halobacillus litoralis* (Yang et al., 2002) e o ciclo D-leucina-D-prolina foi isolado da co-cultura de uma cepa bacteriana não identificada com a *Vibrio anguillarum* (Fdhila et al., 2003).

Os espectros de RMN ^1H (500 MHz) e de RMN ^{13}C (100 MHz) da substância isolada, encontram-se no anexo A e os dados obtidos das análises dos mesmos se encontram nas tabelas 1, 2 e 3

Tabela 2 -Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz) para as substâncias isoladas 1.1 e 1.4 (δ , CDCl_3)

Posição	1.1	1.4
1	-	-
2	-	-
3	3a- 3,73 <i>dd</i> (4,2; 12,5 Hz; 1H) 3b- 3,56 <i>dd</i> (0,5; 12,5 Hz; 1H)	3,51-3,63 <i>m</i> (2H)
4	4,60 <i>tl</i> (4,2 Hz; 1H)	4a- 1,98 – 2,18 <i>m</i> (1H) 4b- 1,86 - 1,95 <i>m</i> (1H)
5	5a- 2,39 <i>ddd</i> (1,0; 6,5; 13,1 Hz; 1H) 5b- 2,01-2,21 <i>m</i> (1H)	5a- 2,31 – 2,38 <i>m</i> (1H) 5b- 1,98 - 2,18 <i>m</i> (1H)
6	4,50 <i>ddd</i> (1,2; 6,5; 11,1 Hz; 1H)	4,09 - 4,13 <i>m</i> (1H)
7	-	-
8	5,79 <i>sl</i> (1H)	5,83 <i>sl</i> (1H)
9	4,03 – 4,09 <i>m</i> (1H)	3,99 – 4,03 <i>m</i> (1H)
10	10a – 2,01-2,21 <i>m</i> (1H) 10b – 1,46 – 1,57 <i>m</i> (1H)	10a – 1,98 – 2,18 <i>m</i> (1H) 10b – 1,48 – 1,56 <i>m</i> (1H)
11	2,01-2,21 <i>m</i> (1H)	1,69 - 1,77 <i>m</i> (1H)
12	0,96 <i>d</i> (6,5 Hz; 3H)	0,96 <i>d</i> (6,5 Hz; 3H)
13	1,01 <i>d</i> (6,5 Hz; 3H)	0,99 <i>d</i> (6,5 Hz; 3H)

Tabela 3 – Dados dos espectros de RMN ^{13}C (100 MHz) para as substâncias isoladas 1.1 e 1.4 (δ , CDCl_3)

Posição	1.1	1.4
1	170,0	166,0
2	-	-
3	56,0	45,5
4	69,5	23,2
5	37,0	28,1
6	58,0	59,0
7	173,3	170,2
8	-	-
9	54,4	53,5
10	39,8	38,8
11	24,7	24,8
12	21,1	21,3
13	23,1	22,7

Tabela 4 - Dados dos mapas de contornos HMBC (500 MHz/ ^1H ; 100MHz/ ^{13}C) da substância ASCC 1.4

Carbono	ASCC1.4
1	H9, H10a e H10b
2	-
3	H4b e H5a
4	H3, H5a, e H5b
5	H6, H3, H4a e H4b
6	H3, H4a, H5a, e H5b
7	H6 e H5b
8	-
9	H10 a e H10 b
10	H9, H11, H12 e H13
11	H9, H10a e H10 b, H12 e H13
12	H10a, H10b e H11 e H13
13	H10a, H10b, e H11 e H12

4.9 Elucidação estrutural da substância isolada a partir do meio sólido

Figura 47: Estrutura química da substância isolada ASCC 2.1.

O espectro de RMN da substância ASCC 2.1 está apresentado na figura 56. A ocorrência de sinais na região de hidrogênios ligados a anéis aromáticos integrados para cinco hidrogênios indica a presença de um anel aromático monossustituído e sinais em δ 5,63 e δ 5,31 indicam hidrogênios ligados a carbonos sp^2 . Observam-se também sinais de grupos metílicos em δ 0,99 e δ 1,68. Os dados de RMN 1H e de RMN ^{13}C obtidos estão apresentados na tabela 117 e 118.

Foram observados no espectro de RMN ^{13}C os sinais em δ 195,0 indicando a presença de uma carbonila de cetona e em δ 113,0 e δ 185,0 indicando a presença de carbono sp^2 . Os sinais em δ 70,5, δ 70,6 e em δ 73,1 indicam a presença de carbonos carbonílicos.

Para cada uma das substâncias isoladas foram obtidos os mapas de contornos de COSY 1H - 1H , HMQC e HMBC (anexo). As análises dos mapas de contorno de COSY permitiram estabelecer os acoplamentos entre os hidrogênios, as do HMQC possibilitaram fazer as atribuições dos carbonos e as do HMBC permitiram estabelecer as correlações entre hidrogênios e carbonos, possibilitando sugerir as estruturas das substâncias.

Até o presente momento não foi encontrado relato na literatura da descrição desta substância, os resultados obtidos indicam que o fungo em questão é uma fonte interessante para obtenção de metabólitos secundários.

Tabela 5 -Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz) para as substâncias isoladas ASCC 2,1(δ , CDCl_3)

Posição	ASCC 2.1
1	-
2	8,31 <i>d</i> (7,6 Hz)
3	7,49 <i>t</i> (7,6 Hz)
4	7,65 <i>t</i> (7,6 Hz)
5	7,49 <i>t</i> (7,6 Hz)
6	8,31 <i>d</i> (7,6Hz)
7	-
8	-
9	-
10	1,68 <i>s</i>
11	-
12	4,74 <i>dd</i> (7,5 Hz; 6,5 Hz)
13	4,59 <i>d</i> (4,8Hz)
14	-
15	3,42 <i>s</i>
16	4,69 <i>s</i>
17	5,31 <i>ddd</i> (11,2Hz; 9,1Hz; 1,5Hz)
18	5,63 <i>dt</i> (11,2Hz; 7,6Hz; 7,6Hz)
19	2,12 <i>m</i>
20	0,99 <i>t</i> (7,6Hz)

Tabela 6– Dados dos espectros de RMN ^{13}C (100 MHz) para as substâncias isoladas ASCC 2.1 (δ , CDCl_3)

Posição	ASCC 2.1
1	132,0
2	130,6
3	128,7
4	134,8
5	128,7
6	130,6
7	195,0
8	113,0
9	185,0
10	6,0
11	-
12	70,6
13	70,5
14	90,1
15	51,7
16	73,1
17	126,4
18	137,0
19	21,9
20	14,1

Tabela 7 - Dados dos mapas de contornos HMBC (500 MHz/ ^1H ; 100MHz/ ^{13}C) da substância ASCC 2,1

Carbono	ASCC2,1
1	H3 e H5
2	H4
3	-
4	H2 e H6
5	-
6	H4
7	H2 e H6
8	H10
9	H10
10	-
11	-
12	H13
13	H12
14	H15
15	-
16	-
17	H19
18	H20 e H19
19	H20
20	H18 e H19

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- Os meios de cultura utilizados, Czapeck, Jackson e Vogel propiciaram ótimo crescimento do fungo na temperatura escolhida;
- O fungo foi capaz de biossintetizar substâncias ostentando atividade antimicrobiana em todos os tempos de fermentação avaliados: 120, 144, 168 e 192h;
- Todos os extratos obtidos em solventes orgânicos dos caldos de cultura apresentaram atividade antimicrobiana, com exceção do *n*-butanólico;
- Os extratos metanólicos dos micélios também apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas;
- Cultura do fungo em meio de arroz pelo período de 20 dias propiciou a biossíntese em maior quantidade de substâncias antimicrobianas;
- O fungo produziu metabólitos secundários com atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram positivas *S. aureus* e *K. rhizophila* nos ensaios de bioautografia em ambos meios utilizados;
- O fracionamento cromatográfico dos extratos em acetato de etila dos meios Jackson e do meio de arroz propiciou ao isolamento de quatro metabólitos secundários dos quais três apresentaram atividade antimicrobiana;
- Com base nos resultados obtidos pode-se afirmar que o *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* apresenta grande potencial para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, E.P. IN DOMAIN, A.L. and SOLOMON, N.A. (ed.), Antibiotics containing b-lactic structure. **History of b-lactic antibiotics**, p. 1-14. vol. I. Springer-Vela KG, Berlin, Germany.1983.
- ANDERSON, D. M. W.; DEA, I. C. M.; HENDRIE, A. Analytical and Experimental Aspects of Molecular-sieve Chromatography, *Talanta Review*, v. 18, p. 365-394, Edinburgh, 1971.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **The journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.48, supply. S1, p 5-16, 2001.
- ANNIS, D. H.; AND CRAIG, B. A. Statistical properties and inference of the antimicrobial MIC test, **Statistics in Medicine**, v. 24, p. 3631-3644, Monterey, 2005
- AOKI, H; UDA, I.; TAGAMI, K; FURUYA, Y.; ENDO, Y.; FUGIMOTO, K. (2003). The production of a new tempeh-like fermented soybean containing a high level of gamma-aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*, **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 67 (5): 1018-1023, 2003.
- AQUINO, A. C. M. DE; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M., Characterisation of an acid trehalase produced by the thermotolerant fungus *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: Biochemical properties and immunochemical localisation **FEMS Microbiology Letters**, v 251(1), P 169-175, 2005.
- ATLAS, R. M. Handbook of microbiological media. Boca Raton: CRC Press, p.280, 1995.
- BENNETT, J. W, Micotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, V, 66, N. 2-3, P. 101-107, 1998.
- BIZUKOJC, M.; PAWLOWSKA, B.; LEDAKOWICZ S. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*, **Journal of Biotechnology** , v.127, p. 258–268, 2006.
- BONAVENTURA, G. D.; D'ANTONIO, D.; CATAMO, G.; BALLONE, E.; PICCOLOMINI, R. Comparison of Etest, agar dilution, broth microdilution and disk diffusion methods for testing in vitro activity of levofloxacin against *Staphylococcus* spp. Isolated from neutropenic cancer patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.19, p.147-154, 2002.
- BOBZIN, S. C.; YANG, S.; KASTEN, T. P.; Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products, **Journal of Chromatography B**, v. 748, p. 259-267, Saint Louis, 2000
- CENTRO DE INFORMAÇÃO DE MEDICAMENTOS. Disponível em: <http://www.einstein.br/cimapr.htm>. Acesso em: 16 Ago. 2002.

- CHAKRABARTI, A.; DASS, A.; MANDAL, J.; SHIVAPRAKASH, M. R.; GEORGE, V. K.; TARAI, B. The rising trend of invasive zygomycosis in patients with uncontrolled diabetes mellitus, **Medical Mycology**, v. 44, p. 335-342, 2006.
- 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.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.60, n.1-3, p.52-60, 1997.
- CHOPRA, I. AND ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 65(2), p.232-260, 2001.
- 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. **Biochemistry Journal**. V. 26, p. 1907-1918, 1932.
- DANNAOUI, E.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. F. G. M.; VERWEIJ, P.E.; *In vitro* susceptibilities of zygomycetes to conventional and new antifungals, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Nijmegen, v. 51, p. 45–52, 2003.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.52, n.4, p.455-463, 1999.
- DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe, **Biological Advances**, Oxford, v.18, p.499-514, 2000.
- DINSMORE, J. C.; BESORE, D. C. Recent advances in the synthesis of diketopiperazines, **Tetrahedron**, v. 58, p. 3297-3312, 2002, West Point.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. (1988). Métodos microbiológicos. 4ª ed. São Paulo.
- FDHILA, F.; VÁZQUES, V.; SANCHES, L. J.; RIGUERA, R. DD-Diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, p. 1299-1301, 2003.
- 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**, v. 10, p. 226-236, 1929.
- FURTADO, N. A. J. C.; Pupo, M. T.; Carvalho, I.; Campo, V. C.; Duarte, M. C. T.; Bastos, J. K. Diketopiperazines Produced by an *Aspergillus fumigatus* Brazilian Strain, **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 16, n. 6B, p. 1448-1453, 2005, Campinas.
- GIBBONS, S.; GRAY, A. I. Isolation by planar chromatography. In: **Natural products isolation**. Totowa, Humana Press, 1998. cap. 7, p.209-246.

- GOLAB, T.; KLINE, R. M. A simple technique in developing thin-layer bioautographs, **Journal of Chromatography**, Amsteram, v.18, p.409-411, 1965.
- GRAZ, M.; HUNT, A.; JAMIE, H.; GRANT, G.; MILNE, P. Antimicrobial activity of selected cyclic dipeptides. **Die Pharmazie**, Govi, v.54, p.772-775, 1999.
- GRIFFIN G. E.; HAYWARD C. M. M; Antibiotic-resistance- The current position and the molecular mechanism involved, **British Journal of Hospital Medicine**, v. 52 (9), p. 473-478, 1994.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology** 2 ed. New York, John Wiley & Sons, 458p.,1994,
- HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. A direct bioautography TLC assay for compounds prossessing antibacterial activity. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.50, n.1, p.19-22, 1987.
- HAMILTON-MILLER, J. M. T.; Antibiotic resistance from two perspectives: man and microbe, **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23(3) p.209-212, 2002.
- HANNAN, P. C. T.; Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species, **Veterinary Resistance**. V. 31, p. 373–395, Reino Unido, 1999.
- HANZ, B. Z.; NOUT, R. M. J. Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempe fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R-microsporus* var. *oligosporus*. **World Journal of Microbiology & Biotchnology**. v.16 (8-9), p. 853-858, 2000.
- HARVEY, L. M.; MC NEIL, B.; BERRY, D. R.; WHITE, S. Autolysis in batch cultures of *Penicillium chrysogenum* at varying agitation rates. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.22, n.6, p.446-458, 1998.
- HUGO, W.B.; RUSSEL, A.D. (ed.) *Pharmaceuatical microbiology*. 4 ed. London, **Blackwell Scientific Publications**, p.511, 1987.
- ITOH, J.; OMOTO, S.; SHOMURA, T.; NISHIZAWA, N.; MIYADO, S.; YUDA, Y.; SHIBATA, U.; INOUYE, S. (1981). Amicoumacin-A, a new antibiotic with strong anti-inflammatory and antiulcer activity. **Journal of Antibiotics**. 34:611-613, 1981.
- ITOH, J.; SHOMURA, T.; OMOTO, S.; MIYADO, S.; YUDA, Y.; SHIBATA, U.; INOUYE, S. Isolation, physicochemical properties and biological activities of amicoumarins produced by *Bacillus pumilus*. **Agric. Biol. Chem.** 46:1255-1259, 1982.
- 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.

- JENNESSEN, J.; NIELSEN, K.F.; Houbraeken, J.; Lyhne, E.K.; Schnurer, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. **Journal of agricultural and food chemistry**, Suécia, v 53(5), p.1833-40, 2005.
- KAJIMURA, Y. AND KANEDA, M. Fusaricidin A, new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. **Journal of Antibiotics**. 49:129-135, 1996.
- KALIGAN, A. E.; LIAO, C.M. Influence of type and concentration of flavinogenic factors on production of riboflavin by *Ermothecium ashbyii* NRRL 1363. **Bioresource Technology, Barking**, v.82, p.2190224, 2002.
- KANKAZI, H.; IMURA, D.; Nitoda, T.; Kawazu, K. Enzymatic dehydrogenation of cyclo (L-Phe-L-Leu) to a bioactive derivate, albonoursin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.6, p. 265-270, 1999.
- LASS-FLÖRL, C.; SPETH, C.; KOFLER, G.; DIERCH, M. P.; GUNSILIUS, E.; WÜRZNER, R. Effect of increasing inoculum sizes of *Aspergillus* hyphae on MICs and MFCs of antifungal agents by broth microdilution method. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.21, p.229-233, 2003.
- LEDERBERG, J. Infectious disease as an evolutionary paradigm. **Emerging Infectious Disease**, v. 3, p. 417-423, 1997.
- LOGAN, N.A. *Bacillus* species of medical and veterinary importance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 25, p. 157-165, 1988.
- 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.
- MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58(5), p. 555-64, 2002.
- MCCARTHY, M. US states file lawsuit against Bristol-Myers Squibb. **The Lancet, New York**, v.359, p.2092, 2002.
- MCCOY, M. Setting course for prosperity. **Chemical Engineering. News**, Washington, v.77, p. 29-34, 1999.
- MELETIADIS, J.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W. ; VERWEIJ, P. E. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media, **Journal of Clinical Microbiology**, p. 478–484 Vol. 39, No. 2, 2000.
- MILEWSKI, S.; MIGNINI, F.; PRASAD, R.; BOROWSKI, E. Unusual susceptibility of a multidrug-resistant yeast strain to peptidic antifungals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 45, n. 1, p. 223-228, 2001.

- MILLER Jr., J. A.; NAGARAJAN, V. The impact of biotechnology on the chemical industry in the 21st century. **Tibtech**, London, v.18, p.190-191, 2000.
- NAGAO, K.; OTA, T.; TANIKAWA, A.; TAKAE, Y.; MORI, T.; UDAGAWA, S.; NISHIKAWA, T. Genetic identification and detection of human pathogenic *Rhizopus* species, a major mucormycosis agent, by multiplex PCR based on internal transcribed spacer region of rRNA gene. **Journal of Dermatological Science**, v. 39, p. 23-31, 2005.
- 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.
- 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.
- NWOSU, V. C. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. **Research Microbiology**, Paris, v. 152, p. 421-430, 2001.
- OBANYE, A.I.C.; HOBBS, G.; GARDNER, D.C.J.; OLIOVER, S.G. Correlation between carbon flux through the pentose phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Microbiology**. 142:133-137, 1996.
- ONDEYKA, J.G.; GIACOBBE, R. A.; BILLS, G. F.; CUADRILLERO, C.; SCHMATZ, D.; GOETZ, M. A.; ZINK D. L.; SINGH S. B. Coprophilin: An anticoccidial agent produced by a dung inhabiting fungus Merck Research Laboratories, P.O. Box 2000, Rahway, NJ 07065, U.S.A. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, V. 8, p. 3439-3442, 1999.
- PEIXOTO, S. C.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases. **International Microbiology** 6 (4): 269-273 DEC 2003
- RONDON, M. R.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Tibtech**, London, v.17, p.403-409, 1999.
- SANTOS, R. M. G. dos; RODRIGUES-FO, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*, **Phytochemistry**. v. 61, p. 907-912, 2002.
- SINGH, S. B.; ZINK, D. L.; DOMBROWSKI, A. W.; POLISHOOK, J. D.; ONDEYKA, J.G.; HIRSHFIELD, J.; FELOCK, P.; AND HAZUDA, J.D. Integracides: tetracyclic triterpenoid inhibitors of HIV-1 integrase produced by *Fusarium* sp. Merck Research Laboratories, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11(7):p. 1577-1582., 2002.
- SPREER, A.; RUCHEL, R.; REICHARD, U.; Characterization of an extracellular subtilisin protease of *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during invasive rhinoorbital mycosis. **Medical mycology**, v. 44(8), p.723-31, 2006

- STREGE, M. A.; High-performance liquid chromatographic–electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening, **Journal of Chromatography B**, v. 725, p. 67–78, Indianapolis, 1999.
- STRÖM, K.; SJÖGREN, J.; BROBERG, A.; SCHÜNER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 383 Produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pho) and 3-phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. V. 68, n. 9, p. 4322-4327, 2002.
- STROHL, W. R. Industrial antibiotics: today and the futures. In: STROHL, W. R. (Ed.). **Biotechnology of antibiotics**. 2 ed. V.82, 1997; p.1-47.
- TULLBERG, M.; GRÖTLI, M.; LUTHMAN, K. Synthesis of Functionalized, Unsymmetrical 1,3,4,6-Tetrasubstituted 2,5-Diketopiperazines, **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 195-199, 2006, Göteborg.
- VITALE, R. G.; MOUTON, J. W.; AFELTRA, J.; MEIS, J. F. G. M.; VERWEIJ P. E.; Method for Measuring Postantifungal Effect in *Aspergillus* Species. Department of Medical Microbiology, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** (2003) v. 52, p. 65–70, 2002.
- VOGEL, H.J. A conveniente medium for *Neurospora* (medium N). **Microbiology General Bulletin**, v.13, p.42, 1956.
- YAGINUMA S.; ASAHII A.; MORISHITA A.; HAYASHI M.; TSUJINO M.; TAKADA M.; Isolation and characterization of new thiol protease inhibitors estatins A and B. **J Antibiotics** (Tokyo). 1989 Sep;42(9):1362-9, 1989.
- YANG, L.; TAN, R.; WANG, Q.; HUANG, W.; YIN, Y. Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. **Tetrahedron letters**, Oxford, v.43, p. 6545-6548, 2002.
- WATANABE, I. , *et al.* Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin, **Vaccine**, v. 21, p. 4532-4538, 2003.
- WEST, B. C.; OBERLE, A. D.; KWON-CHUNG, K. J. Mucormycosis Caused by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*: Cellulitis in the Leg of a Diabetic Patient Cured by Amputation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33(12), p. 3341–3344, 1995.
- WINKER, M. A.; FLANAGIN, A. Infection emergent. **The Journal of the American Association**, Chicago, v.275, n.3, p. 243-246, 1996.
- WOO J. T.; ONO H.; TSUJI T.; Cathestatin, new cysteine protease inhibitors produced by *Penicillium citrinum*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**;v. 59(2):p. 350-2, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice A

1 Especificações de materiais e equipamentos utilizados.

1.1 Solventes

Foram utilizados solventes P.A. das marcas Synth, F.Maia, Quimex, Cromoline e Vetec e solvente de grau cinematográfico da marca J. T. Baker.

Utilizou-se clorofórmio deuterado das marca ACROS e ALDRICH

1.2 Materiais componente de meio de cultura e reagentes

- Ágar bacteriológico – Oxoid;
- Ágar triptona de soja – Oxoid;
- Antibiotic medium n 1 – Oxoid;
- Aveia em flocos – Neston (Nestlé)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Synth;
- Citrato de sódio diidratado – Mallinckrodt GenAR;
- Cloreto de trifeniltetrazolio – Sigma;
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Vetec;
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Vetec;
- Dextrose – Synth;
- Dimetil sulfoxido – Synth;
- Estreptomicina 777U/mg – Sigma;
- Extrato de levedura – Merck;

- Farinha de aveia – Quaker;
- $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Synth;
- Gentamicina – Laborclin - 10 μg (discos);
- Glicerol – Vetec;
- H_3BO_3 – Nuclear;
- KCl – Synth;
- K_2HPO_4 – Synth;
- KH_2PO_4 – Synth;
- Leite em po desnatado Molico – Nestlé;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Merck;
- Miconazol – Sigma;
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Merck;
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – Synth;
- Monooleato de polioxietilenosorbitano (Twenn 80) – Synth;
- Mueller Hinton médium – Oxoid;
- NaCl – Vetec;
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Synth;
- NaNO_3 – Synth;
- NH_4NO_3 – Synth;
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Merck;
- Papel de filtro – Mellita;
- Penicilina G 1215U/mg – Sigma;
- Peptona – Oxoid;
- Pó de milho – OKTA;
- Polpa de tomate – Arisco;

- Sacarose – Vetec;
- Sílica gel
- Sílica gel -- Sephadex® LH20;
- Vanilina – Merck;

1.3 Equipamentos e acessórios

- Agitados mecânico tipo mixer – Fane;n
- Autoclave vertical – Phoenix;
- Balança eletrônica “Marte”;
- Balança analítica “Marte” modelo AL500;
- Capela de Fluxo Laminar – Pachane;
- Cromatografo Liquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu. O equipamento é composto com um sistema de bombeamento de solvente de três bombas Shimadzu LCc-10AD, Detector de Fotodiodo de Varredura Shimadzu SPD-M10Avp, sistema controlador SCL-10Avp, e um computador Intel Celeron com software Shimadzu Class-VP versão 5.02;
- Cromatografo Liquido de Alta Eficiência da marca Shimadzu. O equipamento é composto com um sistema de bombeamento de solvente de duas bombas (LC-6AD), Detector de Fotodiodo de Varredura Shimadzu SPD-M10Avp, sistema controlador SCL-10Avp e um computador Epson (SCL-10A-VP) Com um forno CTO-10ASVP, injetor automatico Shimatzu SIL-10AF
- Espectrômetros de RMN: Bruker®DRX-500MHz
- Estufa de incubação FANEN Ltda – 347C
- Estufa com ar circulante SOC. Fabbe Ltda;
- Mesa Agitadora Innova™ 4300 – New Brunswick Scientific;

- Micropipatas ajustáveis de 1 a 100µl – Sigma;
- Microscópio Olympus CH-2
- Microseringa Graduanda de 10µl – The Hamilton Company;

1.4 Microrganismos utilizados

Microrganismos indicadores

Cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC):

- <i>Kocuria rhizophila</i>	ATCC 9341
- <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
- <i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
- <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Apêndice B

1. Meios de Cultura

1.1 Meio de Aveia

Farinha de aveia.....	4,00 g
Ágar.....	1,80 g
Água.....	100,00 mL

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

Pó de milho	0,25 g
Glicose	1,00 g
Farinha de aveia	1,00 g
Pasta de tomate	4,00 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00 g
Solução com traços de elementos	1,00 mL
Água.....	100,00 mL

1.2.1 Solução com traços de elementos

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1000 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1000 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0100 g
H_3BO_3	0,0560 g
$(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0019 g

ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0200 g
Água.....	100,0000 mL

1.3 Meio fermentativo I (Jackson et. al., 1993).

Glicerol	1,5000 mL
Sacarose	1,5000 mL
Peptona	0,6000 g
Extrato de levedura	0,1500 g
NaCl	3,0000 g
KH ₂ PO ₄	0,0600 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5000 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0001 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,0003 g
Água.....	100,0000 mL

1.4 Meio de Czapek (Atlas, 1995):

Sacarose.....	3,0 g
NaNO ₃	0,2 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,05 g
KCl.....	0,05 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,001 g
Água destilada.....	100 mL

1.5 Meio de Vogel (Vogel, 1956):

Dextrose.....	2,0 g
Solução de Vogel 50 x.....	2,0 mL
Água destilada.....	100 mL

1.5.1 Solução de Vogel 50 x:

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

1.5.2 Solução com traços de elementos:

Ácido cítrico.....	5,0 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2$	1,0 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
H_3BO_3	0,05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Água destilada.....	100 mL

1.6 Ágar Triptona Soja

Triptona	1,50 g
Peptona de soja	0,50 g
NaCl	3,00 g
Agar	1,50 g
Água	100,00 mL

1.7 Caldo Triptona Soja

Digerido pancreático de caseína	1,70g
Digerido papaínico de semente de soja	0,30g
Cloreto de sódio	0,50g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
Água	100,00 mL

1.8 Meio Antibiótico n° 1

Peptona	6,00 g
Triptona	4,00 g
Extrato de levedura	0,15 g
Extrato de carne	1,50 g
Glicose	1,00 g
Agar	11,50 g
Água.....	100,00 mL

1.9 Mueller Hinton medium

Infusão desidratada de carne.....	30,0 g
Hidrolisado de caseína.....	1,75 g
Amido.....	1,5 g
Ágar.....	1,7 g
Água destilada.....	100 mL

ANEXOS

Figura 48: Espectro de RMN ^1H da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 500Mz)

Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 100Mz)

Figura 50: Mapa de contornos HMBC da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz/ ^{13}C)

Figura 51: Mapa de contornos HQBC da substância ASCC 1.1(CDCl_3 , 500 MHz^1H ; 100 MHz^{13}C)

Figura 52. Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância ASCC 1.1 (CDCl_3 , 500Mz)

Figura 53: Espectro de RMN ^1H da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 500Mz).

Figura 54: Espectro de RMN ^{13}C da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 100Mz)

Figura 55: Mapa de contornos HMBC da substância ASCC 1.4 (CDCl_3 , 500MHz/ ^1H ; 100MHz/ ^{13}C)

Figura 56: Mapa de contornos HMQC da substância ASCC 1.4 (CDCl₃, 500Mz/¹H; 100Mz/¹³C)

Figura 57: Mapa de contornos COSY ¹H-¹H da substância ASCC 1.4 (CDCl₃, 500Mz)

Figura 58: Espectro de RMN ^1H da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz)

Figura 59: Espectro de RMN ^{13}C da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 100Mz).

Figura 60: Mapa de contornos HMBC da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz/ ^1H ; 100Mz/ ^{13}C)

Figura 61: Espectro de DEPT da substância ASCC 2.1 (CDCl₃, 100Mz).

Figura 62: Mapa de contornos HMQC da substância ASCC 2.1 (CDCl₃, 500Mz/¹H; 100Mz/¹³C)

Figura 63: Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância ASCC 2.1 (CDCl_3 , 500Mz)

Figura 64 : Espectroscopia de massas da substancia ASCC 2.1.