UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Raquel Peres de Moraes Urano

**Otimização das condições de produção microbiológica de
destruxinas por *Beauveria felina***

São Carlos – SP

2010

Raquel Peres de Moraes Urano

Otimização das condições de produção microbiológica de destruxinas por *Beauveria felina*

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos – SP

2010

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós **Pedro e Cândida** (in memoriam) pelo exemplo que me trouxeram até aqui.*

*Ao meu pai **Horestes**, pelo jeito leve de encarar a vida. E à minha mãe **Auxiliadora**, pelo amor incondicional, pela amizade, por me apoiar, incentivar e estar sempre ao meu lado me ensinando a ter força, a lutar e a transformar as dificuldades em amadurecimento.*

*Aos meus irmãos **Sara**, **Carlos Cézar**, **Mariana e Fernanda**, pelos momentos alegres, risadas e pelas conversas madrugada a dentro.*

*À minha tia **Antônia** pela presença constante em minha vida e pela eterna disponibilidade em me ajudar.*

*Ao meu esposo **Avelardo**, pela inspiração que tornou meu doutorado possível. Por seu amor, carinho, conselhos e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

●Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck, pela dedicação, confiança, paciência e amizade durante a realização deste trabalho.

●À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado direto e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

●À Profa. Mirna Helena R. Seleglim (DEBE-UFSCar) pelo apoio, conselhos, dedicação, amizade e paciência.

●À Darci C. D. Javarotti (DEBE-UFSCar) pelo carinho e ajuda de sempre.

●À Dra. Lara D. Sette (CPBQA-Unicamp) pela identificação do fungo *B. felina*.

●Ao Prof. Dr. Aristeu G. Tinis (IFET-Sertãozinho) pela ajuda no trabalho envolvendo o planejamento experimental.

●À Dra. Ana Carolina S. Chagas (Embrapa Pecuária Sudeste) pela realização dos bioensaios de atividade vermífuga e carrapaticida.

●À Dra. Karin Fabiana B. Camargo (IQSC-USP) pela ajuda e conselhos na realização do trabalho de validação de método analítico.

●Ao Instituto de Química de São Carlos pela infra-estrutura disponibilizada.

●À todos os amigos e colegas que são e que já foram do Grupo de Química Orgânica Produtos Naturais: Stela, Miriam, Simone, Eli, Fábio, Erica, Juliana, Carol,

Marcela, Angélica, Monique, Eliane, Karin, Fabiana, Renata, Michelli, Suzi, Marília, Richele, Camila, Milene, Luis Fernando, Bruna e Vinícius.

- Aos queridos amigos Stela, Miriam, Janete, Fábio, Julieta, Ana Paula, Cláudio, Bruno, Regis, Bruno (Yako) e Joel, pela amizade, apoio, companheirismo e inesquecíveis momentos de alegria e descontração que me foram essenciais para tornar minha vida melhor em São Carlos.

- À Josétima, amiga especial de Fortaleza, que mesmo longe está sempre presente.

- Aos amigos Sabrina, Luigi, Lisbeth, Jorge, Caio, Tatiana, Josy, Raquel, Luciana, Giancarlo, Katlyn, Katerine, Hércules, Lenilson, Yara, Isac, Paulinha e David pela amizade, convivência e momentos de descontração.

- Aos meus queridos Metrina (*in memoriam*), Tissi (*in memoriam*), Linus e Branca, por terem me dado imensas alegrias e carinhos sem limites.

- A toda a minha família, Peres, Moraes, Urano e Ferreira, e a todos os meus amigos de Fortaleza, que me incentivaram e torceram pelo meu sucesso.

- À Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.

RESUMO

URANO, R. P. M. **Otimização das condições de produção microbiológica de destruxinas por *Beauveria felina***. 2010. 161 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

O fungo entomopatogênico *Beauveria felina* produz as destruxinas, hexadepsipeptídeos cíclicos que apresentam diversas atividades biológicas, como por exemplo: atividade inseticida, fitotóxica, citotóxica contra células tumorais, atividade antiviral contra o vírus da hepatite B, dentre outras. Devido à atividade inseticida das destruxinas, os fungos que as produzem têm grande importância econômica. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a otimização das condições de crescimento e produção das destruxinas pelo fungo *Beauveria felina* utilizando diferentes meios de cultivo, a fim de se isolar destruxinas em maiores quantidades para a avaliação de seu potencial tóxico. Foram utilizados métodos de planejamento experimental e análise multivariada para a otimização das condições de crescimento, resultando em três condições ótimas de cultivo para cada um dos meios de cultura MF, PDB e SBD. Em todas as condições ótimas de cultivo foram observadas destruxinas conhecidas, desconhecidas e destruxinas que não foram isoladas anteriormente de *Beauveria felina*. O cultivo de *Beauveria felina* no meio PDB foi o que mais apresentou destruxinas desconhecidas (5). Em seguida foi realizada uma otimização das condições de análise cromatográfica de destruxinas por CLAD-DAD-DELE-EM e a validação deste método. Uma das frações obtidas do meio de cultura de *Beauveria felina* apresentou atividade vermífuga contra *Haemonchus contortus*. Duas de suas frações purificadas, P1 (destruxina Ed₁ – m/z 625 e pseudodestruxina B ou pseudodestruxina C – isobáricas, m/z 669) e P7 (destruxina D ou hidroxihomodestruxina B ou roseotoxina C – isobáricas, m/z 623), foram ativas contra o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

Palavras-chave: *Beauveria felina*, destruxinas, otimização, CLAD-DAD-DELE-EM.

ABSTRACT

URANO, R. P. M. **Optimal conditions for the microbial production of destruxins by *Beauveria felina***. 2010. 161 f. Thesis (Ph. D.) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

The entomopathogenic fungus *Beauveria felina* produces destruxins, cyclic hexadepsipeptides which have several biological activities, such as insecticidal, phytotoxic, cytotoxic against tumor cells, antiviral activity against hepatitis B virus, among others. Because of the insecticidal activity of destruxins, fungi that produce them have a considerable economic importance. Therefore the aim of this study was to optimize the conditions for the growth of *Beauveria felina* and its production of destruxins by using different culture media, in order to isolate larger quantities for the evaluation of their toxic potential. Experimental design and multivariate analysis were used for the optimization of growth conditions, resulting in three conditions for optimum growth for each of the culture media MF, PDB and SBD. Both known and unknown destruxins were observed in each of the optimal conditions, along with destruxins that were not previously isolated from *Beauveria felina*. The cultivation of *Beauveria felina* in PDB was the one that showed the largest amount of unknown destruxins (5). We then carried out an optimization of the chromatographic analysis of destruxins by HPLC-PDA-ELSD-MS and the validation of this method. One of the fractions obtained from the culture medium of *Beauveria felina* showed anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*, while two of its purified fractions, P1 (destruxin Ed₁ - m/z 625 and pseudodestruxin B or pseudodestruxin C - isobaric m/z 669) and P7 (destruxin D or hydroxyhomodestruxin B or roseotoxin C - isobaric m/z 623), were active against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*.

Keywords: *Beauveria felina*, destruxins, optimization, HPLC-PDA-ELSD-MS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Classificação científica do fungo <i>Beauveria felina</i>	29
Figura 1.2. Esqueleto básico das destruxinas	33
Figura 1.3. Diagrama de blocos interligando os fatores às respostas. (fonte: BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007)	37
Figura 3.1. Foto do fungo <i>Beauveria felina</i> (Raquel Peres)	44
Figura 4.1. Intervalo utilizado para o cálculo das áreas dos picos observados nos cromatogramas. O intervalo em negrito do cromatograma é corresponde a área de 0,56834. Cromatograma obtido da injeção da fração 4 do experimento 10 do meio MF do PFF. Condições de análise realizada em CLAD-DAD: coluna analítica de fase reversa C ₁₈ Phenomenex ® e gradiente de MeOH/H ₂ O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm	57
Figura 4.2. Fluxograma simplificado da metodologia para a obtenção das condições ótimas de crescimento de <i>B. felina</i> e análise dos extratos brutos	61
Figura 4.3. Cromatogramas dos padrões de destruxinas e dos experimentos multivariados realizados com o meio MF analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ Phenomenex ® , com gradiente de MeOH/H ₂ O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm. (A) roseotoxina B; (B) [Phe ³ ,N-Me-Val ⁵] destruxina B; (C) pseudodestruxina C; (D) experimento 7-fração 4-MF; (E) experimento 13-fração 3-MF e (F) experimento 7-fração 1-MF	63
Figura 4.4. Cromatogramas dos padrões de destruxinas analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ Phenomenex ® , com gradiente de MeOH/MeCN/H ₂ O por 30 minutos, monitorados em $\lambda = 205$ nm. (G) roseotoxina B; (H) [Phe ³ ,N-Me-Val ⁵] destruxina B; (I) pseudodestruxina C	64
Figura 4.5. Cromatogramas dos experimentos multivariados realizados com os meios PDB e SBD analisados em CLAD-DAD-DELE-EM em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ da marca Phenomenex ® , com gradiente de MeOH/MeCN/H ₂ O por 30 minutos, monitorados em $\lambda = 205$ nm. (J) experimento 16-fração 3-PDB; (K) experimento 16-fração 4-PDB; (L) experimento 12-ExMeOH-PDB; (M) experimento 9-fração 3-SBD; (N) experimento 9-fração 4-SBD e (O) experimento 7-fração 1-SBD	65
Figura 4.6. Cromatogramas dos experimentos multivariados analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C ₁₈ Phenomenex ® , com gradiente de MeOH/H ₂ O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm. (P) MF-Exp-Ot-2 fração 3; (Q) MF-Exp-Ot-1 fração3; (R)	72

MF-Exp-Ot-1 fração 4; (S) MF-Exp-Ot-2 fração 1; (T) MF-Exp-Ot-1 fração2

Figura 4.7. Cromatogramas das réplicas das condições otimizadas obtidas pela análise dos efeitos de interação de 1ª e 2ª ordem com o meio MF, analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex®, com gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm. (P) MF-Exp-Ot-1-fr4-r1; (Q) MF-Exp-Ot-1-fr4-r2 **73**

Figura 4.8. Gráficos de superfície de resposta relação área/massa – meio MF: (A) da interação entre pH inicial e temperatura; (B) da interação entre tempo de incubação e temperatura; (C) da interação entre nutrientes e tempo. Gráficos de superfície de resposta área dos picos dos cromatogramas: (D) da interação entre sais e tempo; (E) da interação entre nutrientes e tempo; (F) da interação entre sais e nutrientes **75**

Figura 4.9. Cromatograma da condição MF-CO-3-fração 4 com detecção por espectrômetro de massas (EM) **79**

Figura 4.10. Cromatograma da condição MF-CO-3-fração 4 com detecção por espalhamento de luz (DELE) **79**

Figura 4.11. Espectro de massas da condição MF-CO-3-fração 4, pico 2 [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V] **80**

Figura 4.12. Cromatograma da amostra CO-2-fr4-PDB com detecção por espectrometria de massas (EM) **94**

Figura 4.13. Espectro de massas da amostra CO-2-fr4-PDB, picos 1, 2 e 3, [MS (ESI +), voltagem do cone = 30 V] **94**

Figura 4.14. Cromatograma da amostra MF-CO-2-fr3 (MeOH/H₂O 75:25) realizado em uma coluna semi preparativa de fase reversa C₁₈ CSC-Inertsil eluída com MeOH/ACN/H₂O 35: 35: 30 com 0,1 % de TFA (ácido trifluoracetico) em cada um dos solventes, por 60 min com fluxo de 1 mL/min em $\lambda = 254$ nm **96**

Figura 5.1. Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD), $\lambda_{\text{máx}} = 254$ nm **106**

Figura 5.2. Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por espalhamento de luz (DELE) **106**

Figura 5.3. Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (EM) **107**

Figura 5.4. Espectro de massas da MF-CO-1-fração 4, pico 6 [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V] **107**

- Figura 5.5.** Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD), $\lambda_{\text{máx}} = 205 \text{ nm}$ **107**
- Figura 5.6.** Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por espalhamento de luz (DELE) **108**
- Figura 5.7.** Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (MS) **108**
- Figura 5.8.** Espectros de massas da MF-CO-1-fração 4, picos 6a e 6b, [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V] **108**
- Figura 5.9.** Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD), $\lambda_{\text{máx}} = 205 \text{ nm}$ **110**
- Figura 5.10.** Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por espalhamento de luz (DELE) **110**
- Figura 5.11.** Cromatograma da MF-CO-1-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (MS) **110**
- Figura 5.12.** Cromatogramas dos padrões de destruxinas com detecção por espectrometria de massas (EM), analisados sob condição cromatográfica final. Picos: (1) roseotoxina B; (2) $[\text{Phe}^3, \text{N-Me-Val}^5]$ destruxina B; (3) pseudodestruxina C **113**
- Figura 5.13.** Espectros de massas dos padrões de destruxinas: (A) roseotoxina B; (B) $[\text{Phe}^3, \text{N-Me-Val}^5]$ destruxina B; (C) pseudodestruxina C. [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V] **114**
- Figura 5.14.** Espectros de massas dos picos de (1) roseotoxina B, (2) $[\text{Phe}^3, \text{N-Me-Val}^3]$ destruxina B e (3) pseudodestruxina C em: **(a)** – cromatograma da amostra MF-CO-1-fr4; **(b)** cromatograma da roseotoxina B; **(c)** – cromatograma da $[\text{Phe}^3, \text{N-Me-Val}^5]$ destruxina B; **(d)** – cromatograma da pseudodestruxina C **120**
- Figura 5.15.** Estabilidade para as substâncias presentes na amostra MF-CO-3-fr4 em intervalos regulares de 24 h em três dias de análise utilizando $[\text{Phe}^3, \text{N-Me-Val}^5]$ destruxina B (11) como padrão interno **123**
- Figura 5.16.** Estabilidade para as substâncias presentes na amostra MF-CO-2-fr4 em intervalos regulares de 24 h em três dias de análise sem a utilização do padrão interno **123**
- Figura 6.1.** Cromatograma da amostra Exp1/19-MF-fr3 (MeOH/H₂O 75 : 25) realizado em uma coluna de fase reversa C₁₈ CSC-Inertsil 150A/ODS2 de dimensões 25 x 0,94 mm; 5 μ , eluída com MeOH/ACN/H₂O 38: 37: 25 com 0,1 % de ácido fórmico em cada um dos solventes, por 40 min com fluxo de 1 mL/min em $\lambda = 220 \text{ nm}$ **134**

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. - Planejamento fatorial fracionário com ponto central (valores de máximo e mínimo)	51
Tabela 4.2. - Planejamento fatorial fracionário com ponto central das condições de crescimento de <i>B. felina</i> em meio MF	52
Tabela 4.3. - Planejamento fatorial fracionário com ponto central das condições de crescimento de <i>B. felina</i> nos meios PDB e SBD	52
Tabela 4.4. - Cálculos para os efeitos de 1ª ordem (uma variável) para os valores das áreas dos cromatogramas da fração 3 dos experimentos multivariados realizados com o meio SBD	67
Tabela 4.5. - Cálculos para os efeitos de 2ª ordem (duas variáveis) para os valores das áreas dos cromatogramas da fração 3 dos experimentos multivariados realizados com o meio SBD	69
Tabela 4.6. - Efeitos calculados para a relação área/massa das frações 3 e 4 dos experimentos multivariados obtidos com o meio SBD	70
Tabela 4.7. - Condições otimizadas de crescimento obtidas a partir da análise das interações de 1ª e 2ª ordem dos experimentos multivariados realizados com o meio MF, PDB e SBD	71
Tabela 4.8. - Condições de crescimento obtidas a partir da análise dos gráficos de superfície de resposta dos experimentos multivariados realizados com o meio MF, PDB e SBD	77
Tabela 4.9. - Condições ótimas de crescimento para <i>B. felina</i> nos meios MF, PDB e SBD	78
Tabela 4.10. - Destruxinas presentes na condição ótima 2 e 3 do meio de cultura PDB	87
Tabela 4.11. - Destruxinas presentes no ExMeOH dos meios de cultura PDB e SBD	88
Tabela 4.12. - Destruxinas produzidas nas condições ótimas 1, 2 e 3, fração 4 do meio de cultura SBD	90
Tabela 4.13. - Destruxinas produzidas nas condições ótimas 1, 2 e 3, fração 4 do meio de cultura MF	91
Tabela 4.14. - Destruxinas conhecidas presentes nos três diferentes meios de crescimento de <i>B. felina</i>	92
Tabela 4.15. - Destruxinas desconhecidas presentes nos três diferentes meios de crescimento de <i>B. felina</i>	93
Tabela 4.16. - Massa das frações da amostra MF-CO-2-fr3	96

Tabela 5.1. - Gradiente de análise cromatográfica I utilizando uma coluna C ₁₈ Phenomenex ®	100
Tabela 5.2. - Gradiente de análise cromatográfica II utilizando uma coluna C ₁₈ Phenomenex ®	100
Tabela 5.3. - Gradiente de análise cromatográfica III utilizando uma coluna C ₁₈ X-terra ®	101
Tabela 5.4. - Substâncias observadas na amostra MF-CO-1-fr4 nas condições de análises cromatográficas I, II e III	111
Tabela 5.5. - Substâncias observadas nas amostras MF-CO-1-fr3; MF-CO-1-fr4; MF-CO-2-fr4; MF-CO-3-fr4 e MF-CO-3-fr4 nas condições de análises cromatográficas I, II e III	115
Tabela 5.6. - Substâncias observadas nos espectros de massas das amostras MF-CO-1-fr3; MF-CO-1-fr4; MF-CO-2-fr4; MF-CO-3-fr4 e MF-CO-3-fr4	124
Tabela 6.1. - Destruxinas desconhecidas	132
Tabela 6.2. - Massa das frações da amostra Exp1/19-MF-fr3	135
Tabela 6.3. - Verificação da eclodibilidade e da eficiência reprodutiva das fêmeas de carrapato (REI)	137
Tabela 6.4. - Eficácia carrapatida do tratamento	138

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
CLAD	Cromatografia líquida de alto desempenho
DAD	Detector de arranjo de diodos
DELE	Detector por espalhamento de luz evaporativo
Dtx	Destruína
EFS	Extração em fase sólida
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
ExMeOH	Extrato metanólico
FAB-MS	<i>Fast atom bombardment-mass spectrometry</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
MF	<i>Marine fungi</i>
PDB	<i>Potato dextrose broth</i>
PFF	Planejamento Fatorial Fracionário
SBD	<i>Sabouraud broth dextrose</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	20
1.1. Fungos - Generalidades	21
1.2. Fungos Marinhos	24
1.3. O gênero <i>Beauveria</i>	27
1.3.1. <i>Beauveria felina</i>	28
1.4. Destruínas – depsipeptídeos cíclicos de fungos patogênicos	30
1.5. Métodos de análise e detecção de destruínas	34
1.6. Otimização de experimentos e planejamento experimental	36
1.6.1. Planejamento fatorial fracionário	38
1.6.2. Planejamento composto central	39
Capítulo 2 – Objetivos	41
Capítulo 3 – Materiais e Equipamentos	43
3.1. Materiais	44
3.1.1. Microrganismo	44
3.1.2. Padrões	45
3.1.3. Solventes	45
3.1.4. Reagentes	45
3.1.5. Adsorventes	45
3.1.6. Softwares	46
3.2. Equipamentos	46
3.2.1. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD)	46

3.2.2. Colunas Cromatográficas	47
Capítulo 4 - Otimização das condições de produção microbiológica de destruxinas pelo fungo <i>Beauveria felina</i>	48
4.1. Metodologia	49
4.1.1. Planejamento Experimental	49
4.1.2. Preparação dos inóculos de <i>B. felina</i>	53
4.1.3. Obtenção dos extratos a partir dos experimentos de crescimento	54
4.1.4. Análises cromatográficas	55
4.1.5. Análises multivariadas	56
4.1.6. Crescimento de <i>B. felina</i> em maior volume	59
4.2. Resultados e Discussão	62
4.2.1. Determinação das condições ótimas de crescimento	62
4.2.2. Análise dos efeitos de interação de 1ª e 2ª ordem	66
4.2.3. Análise dos gráficos de superfície de resposta	74
4.2.4. Análise dos experimentos ótimos obtidos com os meios MF, PDB e SBD	81
Capítulo 5 - Otimização e validação de um método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por <i>B. felina</i> por CLAD-DAD-DELE-EM	98
5.1. Metodologia	99
5.1.1. Otimização de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por <i>B. felina</i> por CLAD-DAD-DELE-EM	99
5.1.2. Validação de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por <i>B. felina</i>	101

5.1.2.1. Condições cromatográficas	101
5.1.2.2. Preparação dos padrões e das amostras	102
5.1.2.3. Identificação dos picos	103
5.1.2.4. Parâmetros validados	103
• Seletividade	103
• Precisão	104
• Estabilidade	105
5.2. Resultados e Discussão	105
5.2.1. Otimização de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por <i>B. felina</i> por CLAD-DAD-DELE-EM	105
5.2.2. Validação de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por <i>B. felina</i>	119
• Seletividade	119
• Precisão	121
• Estabilidade	122
Capítulo 6 - Análise de frações contendo destruxinas em bioensaios de ação carrapaticida e vermífuga	125
6.1. Zoonoses em bovinos, caprinos e ovinos	126
6.1.1. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	126
6.1.2. <i>Haemonchus contortus</i>	127
6.2. Metodologia	128
6.3. Resultados e Discussão	129
6.3.1. Atividade vermífuga contra <i>H. contortus</i>	129

6.3.2. Bioensaio de atividade carrapaticida contra <i>R. microplus</i>	136
Capítulo 7 - Conclusões	139
Capítulo 8 - Referências Bibliográficas	143
Anexos	150

Capítulo I

Introdução

1.1. Fungos – Generalidades

Os fungos são microrganismos eucarióticos, multi ou pluricelulares, com parede celular, heterotróficos, podendo ser saprófitas (alimentando-se de matéria orgânica morta) ou parasitas. Eles encontram-se amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, na água, em detritos, em vegetais, em animais e inclusive no homem (TRABULSI, 2005).

Estes microrganismos alimentam-se por absorção, podendo utilizar quase toda fonte de carbono como energia para o seu desenvolvimento. Uma das habilidades dos fungos é a capacidade de adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sais ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos (GOMES et al., 2007). A temperatura de crescimento dos fungos abrange uma larga faixa, havendo, por exemplo, espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas.

Em geral, os fungos de importância médica são mesófilos, apresentando temperatura ótima de desenvolvimento, entre 20° e 30 °C. O pH mais favorável ao desenvolvimento dos fungos está entre 5 e 7, mas a maioria dos fungos tolera amplas variações de pH (TRABULSI, 2005).

O crescimento dos fungos é mais lento que o das bactérias. Culturas fúngicas necessitam, em média, de 5 a 14 dias ou mais de incubação. Existem algumas espécies fúngicas que exigem luz para seu desenvolvimento, outras são por ela inibidas. O fungo *Beauveria felina*, por exemplo, é fototrópico, ou seja, na presença de luz solar cresce em direção à ela, porém a luz não é um fator determinante para o seu crescimento.

Os fungos podem se desenvolver em meios de cultivo especiais formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias filamentosas são constituídas por estruturas multicelulares em forma de tubo - as hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. As hifas do interior do substrato, que funcionam como elementos de sustentação e de absorção de nutrientes, são chamadas hifas do micélio vegetativo. As hifas da superfície e que crescem acima do meio de cultivo são as hifas do micélio de reprodução e são aéreas. O crescimento dos fungos filamentosos é constituído das fases vegetativa e reprodutiva. A fase reprodutiva se dá com o início da esporulação, ocorrendo após a formação das hifas do micélio aéreo (PELCZAR et al., 1980).

Os fungos podem elaborar vários metabólitos, como antibióticos, dos quais a penicilina é o mais conhecido, e micotoxinas, como a aflatoxina, que lhes conferem vantagens adaptativas. Tais metabólitos, quando bioativos, podem ser utilizados como matéria prima pela indústria alimentícia, farmacêutica, bioquímica e agroquímica. As atividades biológicas de metabólitos de fungos filamentosos são principalmente antibióticas e anticarcinogênicas, além de outras atividades adaptativas, que incluem a inibição do ciclo celular, a inibição do agrupamento de plaquetas, a atividade antiviral e a inibição de proteínas fosfatases e quinases (BUGNI; IRELAND, 2004).

Atualmente conhece-se mais de 20.000 metabólitos secundários isolados de microrganismos, mas apenas um pequeno percentual desse número chegou à comercialização na forma de medicamento. Um microrganismo é capaz de produzir metabólitos secundários para se adaptar e competir com outros microrganismos presentes no seu meio ambiente. A condição ambiental é um elemento chave para a descoberta e produção de diferentes metabólitos secundários (KNIGHT et al., 2003).

A quantidade de carbono, nitrogênio e elementos traço (zinco, manganês e ferro), bem como a temperatura, o tempo de crescimento e reprodução, e o pH do meio de crescimento, são fundamentais para a produção de metabólitos secundários por microrganismos. Por exemplo, o uso de diferentes meios de cultura pode aumentar ou iniciar o processo de biossíntese de metabólitos secundários (KNIGHT et al., 2003). A concentração das fontes de C e N no meio de crescimento são fatores que podem influenciar no aumento da produção de destruxinas. Por exemplo, peptona/glicose 2:1, bem como a utilização de diferentes meios de cultura como PDA (ágar dextrose batata) e SBD (caldo dextrose sabouraud), também podem aumentar seu rendimento (WANG et al., 2004). Para explorar o potencial dos microrganismos, as condições fisiológicas de crescimento utilizadas para gerar extratos precisam ser diversificadas (KNIGHT et al., 2003).

A realização de experimentos variando-se fatores que influenciam na produção de metabólitos secundários como os componentes do meio de crescimento, a temperatura, o pH e o tempo de incubação, são importantes para encontrar uma condição ideal para o crescimento microbiano e produção de seus metabólitos secundários. Porém, esse é um processo demorado e oneroso, além de ser de difícil interpretação dos resultados.

O uso de métodos de planejamento experimental e análise multivariada para se obter uma condição ótima para a produção de metabólitos secundários pode ser uma boa alternativa, pois com poucos experimentos e em um tempo mais curto de análise podemos encontrar condições adequadas do meio de cultura para a otimização da produção de metabólitos secundários. (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

1.2. Fungos Marinhos

Considerando-se que a ocorrência de fungos no ambiente marinho foi primeiramente reportada no final do século XIX, e que os oceanos cobrem mais de 70% da superfície da Terra, o número de espécies de fungos marinhos que já foram descritas é surpreendentemente menor do que o de espécies terrestres. Isto ocorre porque não somente a micologia marinha é uma ciência recente, mas também porque é sabido ser mais difícil o estabelecimento de condições de crescimento para isolamento e crescimento de novos fungos marinhos facultativos e obrigatórios (VITA-MARQUES et al., 2008).

Fungos marinhos obrigatórios são definidos como sendo capazes de produzir gerações sucessivas por meio sexual e assexual em águas oceânicas naturais e meios artificiais. Por outro lado, os fungos marinhos facultativos são microrganismos aquáticos e terrestres capazes de crescer também em ambiente marinho. Até 1991, somente 321 espécies de fungos marinhos obrigatórios haviam sido descritas, a maioria da classe Ascomycetae, freqüentemente associados com algas marinhas, caranguejos, peixes e esponjas. Fungos marinhos facultativos foram explorados em muito menor extensão do que os terrestres e somente 56 espécies tinham sido descritas até 1999 (VITA-MARQUES et al., 2008).

Segundo Bugni e Ireland (2004), fungos associados a esponjas, madeira e algas são responsáveis pela maioria dos produtos naturais já descritos de fungos marinhos (70%). Os fungos derivados de esponjas forneceram a maior parte (33%) do total de compostos descritos na literatura. Os fungos derivados de algas vêm em segundo lugar, tendo sido a fonte de 24% do número total de produtos naturais de fungos marinhos, dos quais 27% apresentaram estruturas inéditas.

De um modo geral, as atividades biológicas dos compostos isolados de fungos de origem marinha são principalmente antibióticas e anticancerígenas, mas outras atividades como antimalárica, antiviral, inibição enzimática, fitotóxica, dentre outras, também foram observadas (PAN et al., 2008; BLUNT et al., 2010).

Os estudos de produtos naturais marinhos revistos por Blunt et al. (2010) mostraram que os microrganismos continuam a ser uma fonte muito importante para a investigação de novos produtos naturais marinhos (1065 relatados até 2008). Dentre estes podem ser citadas as scopuralidinas A (1) e B (2), que são depsipeptídeos cíclicos isolados do fungo *Scopulariopsis brevicaulis* (isolado de uma esponja marinha) e que apresentaram atividade inibitória contra células tumorais humanas. A chaetoxanthona B (3) que apresentou atividade contra o protozoário *Plasmodium falciparum* (causador da malária) e a chaetoxanthona C (4) que apresentou atividade contra *Trypanosoma cruzi* (causador da doença de Chagas), ambos os metabólitos secundários do fungo *Chaetomium* sp. (isolado de uma alga marinha não identificada). E os trichodermatídeos A (5), B (6), C (7) e D (8) produzidos pelo fungo *Trichoderma reesei* (isolado de sedimento marinho) e que apresentaram atividade citotóxica contra uma linhagem de célula de melanoma (BLUNT et al., 2010).

(1)

(2)

(3)

(4)

(5)

(6)

(7)

(8)

1.3. O gênero *Beauveria*

Os fungos do gênero *Beauveria* foram primeiramente estudados pelo advogado e cientista italiano Agostino Bassi que investigava a causa de uma doença que estava atacando o bicho-da-seda nos séculos 18 e 19 na Europa. Por esse motivo, *Beauveria* foi um dos primeiros fungos entomopatogênicos a ser estudado (VEGA; BLACKWELL, 2005). Os fungos entomopatogênicos são aqueles que podem parasitar insetos, matando-os ou incapacitando-os.

Os estudos científicos realizados por Agostino Bassi foram antecedentes importantes para a “pathogenic theory of medicine” (teoria patogênica da medicina), uma das teorias mais importantes na história da ciência. Em 1835, ele responsabilizou o fungo *Beauveria* sp. como o agente causador da morte dos insetos, onde a massa micelial era visível a olho nu. Estudos posteriores realizados por Vuillemin classificaram este fungo como sendo *Beauveria bassiana* em homenagem a Agostino Bassi (VEGA; BLACKWELL, 2005).

Embora a investigação do gênero *Beauveria* tenha nascido da necessidade de se proteger um inseto caseiro benéfico, este fungo também é um importante patógeno natural de diversas pragas de insetos que são economicamente importantes. Por isso existe muito interesse científico em torno de fungos do gênero *Beauveria*, sendo focalizada na utilização destes fungos para o controle biológico de insetos (VEGA; BLACKWELL, 2005).

Beauveria é um gênero de ampla distribuição demográfica. *B. bassiana* é encontrado em muitos insetos-praga no mundo inteiro, e também pode ser isolado do solo. É utilizado em escala comercial na produção de inseticidas biológicos em países como Estados Unidos e México. No Brasil os estudos com fungos

entomopatogênicos começaram em 1923, quando foram identificadas duas espécies de cigarrinha infectadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae* (DALZOTO; UHRY, 2009).

O ciclo biológico de *B. bassiana* permite sua caracterização como um parasita facultativo, ou seja, que não depende do hospedeiro para sobreviver. Seus conídios podem penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto e a penetração é mediada por enzimas líticas (que rompem as células), podendo também ocorrer pelos aparelhos respiratório e digestivo. Depois de atravessar a cutícula, formam-se tubos germinativos e hifas que atravessam a parte externa do hospedeiro. Em seguida o fungo se multiplica formando uma massa micelial considerável. O inseto morre e, assim, com o esgotamento dos nutrientes, se houverem condições favoráveis, o fungo emerge, exteriorizando suas hifas e formando uma massa micelial branca na superfície do cadáver (DALZOTO; UHRY, 2009).

1.3.1. *Beauveria felina*

Beauveria felina é um fungo marinho facultativo filamentoso, fototrópico, endofítico (endo = dentro; fito = planta), produtor das destruxinas, hexadepsipeptídeos cíclicos (LIRA et al., 2006), de quitinase (PATIDAR et al., 2005) e de um inibidor de geranylgeranyl difosfato sintase, denominado de gerfelina (ZENITANI et al, 2003a; ZENITANI et al, 2003b). A classificação de *B. felina* é apresentada na Figura 1.1.

Filo: Ascomycota
Classe: Sordariomycetes
Ordem: Hypocreales
Família: Clavicipitaceae
Gênero: <i>Beauveria</i>
Espécie: <i>Beauveria felina</i>

Figura 1.1. Classificação científica do fungo *Beauveria felina*.

Segundo Baute et al. (1981) o fungo *Isaria felina* foi classificado por De Hoog em 1972 e, em seguida, re-classificado como *Beauveria felina*, sendo esta última a denominação mais recente e correntemente utilizada para esta espécie. Os estudos com *I. felina* iniciaram-se com o isolamento da isariina por Taber e Vining de 1957 a 1963. A isariina mostrou ser, na verdade, uma mistura de depsipeptídeos cíclicos denominadas isariinas B (9), C (10) e D (11) em estudos realizados por Baute et al. (1981). Os estudos com *B. felina* para produção de destruxinas tiveram início a partir do isolamento da [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (KIM et al., 2002) e da pseudodestruxina C e a [β-Me-Pro] cloridrina da destruxina E (LIRA et al., 2006).

1.4. Destruixinas – depsipeptídeos cíclicos de fungos patogênicos

As destruxinas são hexadepsipeptídeos cíclicos originalmente isolados do fungo entomopatogênico *Oospora destructor*. Este fungo foi posteriormente reclassificado como *Metarhizium anisopliae* (PEDRAS et al., 2002). As destruxinas pertencem à classe geral dos peptídeos cíclicos, biossintetizados a partir de peptídeos sintetases não-ribossomais. Devido à presença de um grupo α -hidroxiácido ligado a um grupo éster, esta classe de compostos pode ser denominada como ciclodepsipeptídeo (NICOLETTI et al., 2000).

Os peptídeos cíclicos são tipicamente sintetizados pelo acoplamento de um aminoácido intacto e um resíduo de α -hidroxiácido, seguido pela ciclização intramolecular resultante de uma cadeia peptídica linear. A ordem dos acoplamentos dos resíduos e da escolha da ciclização são aspectos-chave a serem considerados

para o desenvolvimento e elaboração de uma rota sintética (NICOLETTI et al., 2000).

Pedras et al. (2002) realizou um estudo de biossíntese de destruxinas utilizando precursores marcados isotopicamente (^{13}C) no meio de cultivo de *M. anisopliae*. Experimentos utilizando L -[$^{13}\text{CH}_3$]metionina mostraram a incorporação de ^{13}C nos grupos N-metila (resíduos de MeVal e MeAla). Os resultados mostraram a incorporação de 5 unidades acetato, e foi observada uma pequena taxa de incorporação de resíduos de valina, alanina ou β -alanina nas destruxinas A, B e E.

Os estudos de síntese e de biossíntese de diferentes tipos de destruxinas revistos por Pedras et al. (2002), mostraram que os aminoácidos isoleucina, valina, prolina, alanina e β -alanina são recorrentes no esqueleto básico das destruxinas.

A destruxina A (**12**) foi a primeira destruxina a ser isolada e identificada (SUZUKI et al., 1966). Desde o primeiro relato do descobrimento das destruxinas A e B por Kodaira (1961) um grande número de estudos sobre a família destes compostos foi publicado. Esta classe de compostos é produzida por diferentes espécies de fungos como: *Aspergillus ochraceus* (destruxina A [**12**]), *Aschersonia* sp. (destruxina A₄ [**13**]), *Alternaria brassicae* (destruxina B [**14**]) (NICOLETTI et al., 2000), *Sinapis alba* (hidroxidestruxina B [**15**]) e *Nigrosabulum globosum* (pseudodestruxinas A [**16**] e B [**17**]), dentre outros (PEDRAS et al., 2002). Porém não há relatos na literatura desses tipos de destruxinas isoladas do fungo *Beauveria felina*.

(12)
destruxina A

(13)
destruxina A₄

(14)
destruxina B

(15)
hidroxidestruxina B

(16)
pseudodestruxina A

(17)
pseudodestruxina B

A estrutura básica das destruxinas é composta por 5 aminoácidos e um α -hidroxiácido. As destruxinas individuais diferem na estrutura do α -hidroxiácido, no grau de N-metilação e nos grupos R dos resíduos de aminoácidos. O esqueleto básico das destruxinas é sempre o mesmo, sendo que o resíduo de α -hidroxiácido é o que mais apresenta variação estrutural, como indicado na Figura 1.2 (PEDRAS et al., 2002).

Figura 1.2. Esqueleto básico das destruxinas.

Estes compostos apresentam potentes atividades biológicas. Várias destruxinas apresentam atividade inseticida, fitotóxica, citotóxica contra células tumorais, atividade antiviral contra o vírus da hepatite B, atividade inotrópica em músculo cardíaco de ratos, bem como atividade inibitória de ATPases (PEDRAS et al., 2002; VÁSQUEZ et al., 2005).

Devido a atividade inseticida das destruxinas, os fungos que as produzem têm grande importância econômica. Os esporos secos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* são utilizados na região Nordeste do Brasil para o controle da cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar. Volumes consideráveis do fungo *Beauveria bassiana* foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café (FARIA et al., 2001).

Sendo assim, as destruxinas são compostos extremamente interessantes, tanto do ponto de vista estrutural como do ponto de vista de suas atividades biológicas, sendo consideradas uma das classes mais importantes de metabólitos secundários produzidos por fungos terrestres.

1.5. Métodos de análise e detecção de destruxinas

A grande maioria das destruxinas pode ser analisada por HPLC (high performance liquid chromatography) com detector UV, observadas em 206 - 214 nm, por terem cromóforos não conjugados na sua estrutura (HU, et al., 2006; FENG et al., 2004; PEDRAS et al., 2002). A detecção por espectrometria de massas com método de ionização por bombardeamento de átomos em alta velocidade (FAB-MS fast atom bombardment - mass spectrometry) foi um método usado para análises de destruxinas em extratos brutos de fungos (PEDRAS et al., 2002). Mais recentemente os métodos para análise das destruxinas incluem o uso de cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas LC-MS (liquid chromatography - mass spectrometry) usando o método de ionização química por pressão atmosférica (APCI – atmospheric pressure chemical ionization), e um LC-MS com ionização por “electrospray” (ESI – electrospray ionization) tanto no modo positivo, quanto no

modo negativo (PEDRAS et al., 2002). Além disso, o uso de detectores como UV-MS (WANG et al., 2004), PDA-MS (SEGER et al., 2004; HSIAO et al., 2001), MS (JEGOROV et al., 1998; LOUTELIER et al., 1996) e MS/MS (POTTERAT et al., 2000) também foi reportado.

A ionização das substâncias orgânicas no capilar do “electrospray” depende, entre outros parâmetros, da estrutura da substância e do solvente. Substâncias que apresentam heteroátomos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Íons positivos são geralmente analisados empregando-se soluções da amostra em metanol e com baixos valores de pH. Íons negativos, por sua vez, são produzidos em maior proporção a partir de soluções em clorofórmio e com altos valores de pH (CROTTI et al., 2006).

O uso de um detector por espalhamento de luz evaporativo (ELSD – evaporative light scattering detection) é uma boa alternativa para a detecção de destruxinas frente aos outros tipos de detectores, já que não são exigidos grupos funcionais específicos ou um cromóforo para a detecção. Ele pode ser acoplado diretamente a um cromatógrafo líquido e, também, pode ser utilizado com uma ampla variedade de solventes tanto para a cromatografia de fase normal quanto de fase reversa (GANZERA et al., 2005).

Essa é uma técnica versátil e inédita para a análise de extratos brutos isolados de *B. felina*, permitindo distinguir diferentes tipos de destruxinas. Sua principal vantagem encontra-se na habilidade em detectar quase todas as classes de compostos, não obstante suas propriedades espectroscópicas ou químicas (GANZERA et al., 2005).

1.6. Otimização de experimentos e planejamento experimental

Os microrganismos têm uma grande capacidade de se adaptarem a diferentes ambientes. Pequenas mudanças na temperatura de incubação, quantidade de água disponível e nos componentes de um meio de crescimento podem levar a uma alteração na produção dos seus metabólitos secundários, fazendo com que produzam diferentes substâncias que irão auxiliar na sua sobrevivência.

Recentes trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando métodos estatísticos para se obter uma maior produção de metabólitos secundários bioativos por parte de fungos, como por exemplo: a menisporopsina A, um antimalárico produzido pelo fungo *Menisporopsis theobromae* (MADLA et al., 2006); a compactina produzida pelo fungo *Penicillium citrinum*, que tem atividade antifúngica e é um potente inibidor da biosíntese do colesterol (CHAKRAVARTI; SAHAI, 2002) e carotenóides produzidos por *Rhodotorula glutinis*, que são utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia, médica e cosmética (TINOI et al., 2005). A otimização da produção de enzimas é utilizada na indústria de alimentos, como a β -fructofuranosidase produzida por *Aspergillus niger* (BALASUBRAMANIAM et al., 2001). A otimização de DHA (ácido docosahexaenóico), produzido pelo fungo marinho *Schizochytrium limacinum*, é importante, pois esta é uma substância da família dos ácidos graxos ômega-3 que desempenham um papel importante na melhoria e no desenvolvimento neural da retina em bebês e diminui a incidência de determinadas doenças cardiovasculares (SONG et al., 2007).

Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007), otimizar um sistema significa descobrir quais os valores dos fatores ou variáveis envolvidas produzem a

melhor resposta. O procedimento correto para se obter o melhor rendimento dos valores das variáveis consiste em fazer variar todas as variáveis ao mesmo tempo. A razão para isso é que as variáveis podem influenciar-se mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. Este comportamento é chamado de interação entre variáveis, fenômeno que ocorre frequentemente, pois raras são as situações em que duas ou mais variáveis atuam de forma independente.

O objetivo esperado é que, utilizando-se planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores possam extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação procurada (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2007). No planejamento de qualquer experimento, a primeira etapa a ser realizada é se decidir quais são os fatores (variáveis) e as respostas de interesse, conforme a Figura 1.3, para o sistema que se deseja estudar.

Figura 1.3. Diagrama de blocos interligando os fatores às respostas. (fonte: BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2007).

As respostas são as variáveis de saída do sistema, que serão ou não afetadas por modificações provocadas nas variáveis que o experimentador tem condições de controlar. As respostas podem ser qualitativas ou quantitativas. Dependendo do problema, é possível se ter respostas de interesse que talvez precisem ser consideradas simultaneamente.

No estudo de otimização das condições de produção de destruxinas por *B. felina* em diferentes meios de cultura, as variáveis empregadas foram: 1) concentração da salinidade do meio de cultura; 2) concentração dos nutrientes do meio de cultura; 3) período de crescimento em dias; 4) pH inicial e 5) temperatura de incubação. Estas variáveis foram escolhidas por serem fatores ambientais que estão diretamente ligados ao crescimento microbiano.

1.6.1. Planejamento fatorial fracionário

Para a realização de planejamentos experimentais com um número grande de variáveis (k) é aconselhável se fazer um planejamento fatorial fracionário 2^{k-1} , pois o número de experimentos necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com o número de variáveis. Por exemplo, com sete variáveis um planejamento completo exigiria $2^7 = 128$ experimentos, já um planejamento fatorial fracionário exige $2^{7-1} = 64$ experimentos.

O número de interações de ordem mais alta aumenta com o número de variáveis. Como em uma expansão em série, as interações de ordem mais baixa exercem maior efeito no comportamento da função do que as interações de ordem mais alta. Na maioria dos casos essas interações têm valores pequenos e, portanto, seus efeitos não são significativos o suficiente para nos fazer realizar todos os

experimentos de um planejamento completo. Assim, a informação desejada muitas vezes pode ser obtida a partir de um número de experimentos bem menor, correspondente a uma fração do número de experimentos do planejamento completo.

Usar o planejamento fatorial fracionário 2^{k-1} é vantajoso, pois envolve um número menor de experimentos, implicando em um menor consumo de amostra, reagentes e materiais. Há uma redução no tempo de execução dos experimentos e, conseqüentemente, um aumento da eficiência da investigação experimental, sem significativa perda de informação.

1.6.2. Planejamento composto central

A realização do planejamento composto central acrescenta aos 2^k experimentos do planejamento fatorial um determinado número de experimentos realizados no ponto central, com o objetivo de fornecer uma medida do erro puro do planejamento e estabilizar a variância da resposta prevista.

Para realizar um planejamento composto central é necessário se definir o número de experimentos do planejamento experimental 2^k completo ou fracionário, com os níveis das variáveis ($x_1, x_2, \dots, x_k$) em valores de máximo (codificados com +1) e mínimo (-1), determinar o valor da constante α e decidir o número de repetições que serão feitas no ponto central. O ponto central corresponde à média aritmética do valor máximo e mínimo de cada variável ($x_1 = x_2 = \dots = x_k = 0$).

O valor de α é dependente do número de variáveis (k) utilizadas no planejamento. Para um planejamento fatorial fracionário com cinco variáveis, o valor calculado de α é igual a 2,00. Para determinar o número de repetições no ponto

central, uma regra prática é fazer de 3 a 5 repetições se α estiver próximo de $\sqrt{k}$, e uma ou duas repetições a mais se α estiver perto de 1. Para k igual a 5, a $\sqrt{k}$ é 2,236, o que é próximo de α . Portanto, neste planejamento deverão ser realizadas de 3 a 5 repetições no ponto central (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

As respostas obtidas com a repetição dos experimentos no ponto central são utilizadas na construção dos gráficos de superfície de resposta e nos cálculos para se obter as interações de primeira e segunda ordem.

Capítulo II

Objetivos

Dando continuidade aos estudos realizados no Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck no âmbito do projeto “Estabelecimento de Condições para o Isolamento e Crescimento de Linhagens de Fungos Marinhos para a Produção de Metabólitos Secundários” esse projeto de doutorado teve por objetivos:

1. Realizar experimentos de otimização das condições de produção microbiológica das destruxinas por parte da linhagem *Beauveria felina* utilizando-se métodos de planejamento experimental e análise multivariada, variando-se a composição dos meios de cultura MF, PDB e SBD em termos de salinidade, concentração de nutrientes e pH inicial, bem como tempo de crescimento (em dias) e temperatura de incubação;
2. Otimizar as condições de análises cromatográficas por CLAD-DAD-DELE-EM das condições ótimas de crescimento para a produção de destruxinas por *B. felina*;
3. Realizar a identificação de destruxinas que ainda não tenham sido isoladas que venham a ser obtidas a partir do estudo químico de extratos produzidos pelo fungo *B. felina* sob condições otimizadas;
4. Avaliar a atividade vermífuga contra *Haemonchus contortus* e carrapaticida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de destruxinas isoladas.

Capítulo III

Materiais e Equipamentos

3.1. Materiais

3.1.1. Microrganismo

O fungo endofítico *Beauveria felina*, foi isolado da alga *Caulerpa* sp., coletada na Praia do Cabelo Gordo (Cebimar – USP, São Sebastião - SP), em abril de 2002 por Aline Maria de Vita-Marques (VITA-MARQUES, 2003).

Figura 3.1. Foto do fungo *Beauveria felina* (Raquel Peres).

Este fungo foi identificado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – Unicamp) sob a coordenação da Dra Lara Durães Sette, após extração do DNA genômico, análise filogenética, técnica de PCR ITS, análises macroscópicas e microscópicas e sequenciamento de DNA.

3.1.2. Padrões

Foram utilizados padrões de destruxinas pseudodestruuxina C, [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B e roseotoxina B isolados do fungo *B. Felina* por uma ex-aluna do prof. Berlinck, Simone Possedente de Lira, no decorrer do seu projeto de doutorado (LIRA, 2007).

3.1.3. Solventes

Os solventes utilizados para a contagem de esporos foram solução de Twin 80 e H₂O (destilada). Para a extração em fase sólida (EFS) foram utilizados H₂O ultrapura purificada em sistema Mili-Q e MeOH grau analítico da (JT Baker ou Mallinkrodt). Para as análises cromatográficas foram utilizados MeOH e MeCN grau cromatográfico (JT Baker ou Mallinkrodt) e H₂O ultrapura preparada em sistema Mili-Q.

3.1.4. Reagentes

Ácido Fórmico (J. T. Baker)

Ácido Trifluoracético (TFA - J. T. Baker)

3.1.5. Adsorventes

Para a contagem de esporos foi utilizada uma membrana de fibra de vidro. Para a extração em fase sólida (EFS) utilizaram-se uma colunas pré-empacotas

SepPak C₁₈ da marca Phenomenex®, contendo 2 g de fase estacionária para o cultivo em pequeno volume (50 mL), e de 5 e 10 g de fase estacionária para o cultivo em maior volume (2 L).

3.1.6. Softwares

Microsoft Office Excel, Microcal Origin 7.5, Statistica 6.0, Empower 2.0 e Millenium.

3.2. Equipamentos

3.2.1. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD)

Os equipamentos utilizados para análise e separações por cromatografia líquida de alto desempenho consistiam em um sistema Waters®, com duas bombas modelo Pump 600, três degaseificadores de nitrogênio. O primeiro sistema estava acoplado em linha com um detector espectrofotométrico UV-Visível, marca Waters® 2487, com leitura em dois comprimentos de onda, e um sistema de controle Controller 600. O segundo e o terceiro sistema de controle Alliance Waters® 2695 estavam acoplados, cada um deles, com um detector de arranjo de fotodiodos ("Photodiode Array Detector"), Waters® modelo 2996, que nos permitiu observar entre os comprimentos de onda de 200 a 800 nm (CLAD-DAD). O terceiro sistema também estava acoplado a um detector por espalhamento de luz evaporativo (DELE), marca Waters®, modelo 2424 e um espectrômetro de massas (EM) quadrupolar da marca Waters® Micromass ZQ 2000, com uma interface de "electrospray" (CLAD-DAD-DELE-EM).

3.2.2. Colunas Cromatográficas

Coluna Phenomenex®, Synergi 4 μ Fusion - C₁₈ 80, 25 x 4,60 mm

Coluna CSC Inertsil®, 5 μ - C₁₈ 150A/ODS2, 25 x 0,94 mm

Coluna X-terra, Waters® 3,5 μ m - C₁₈, 2,1 x 50 mm

Capítulo IV

*Otimização das condições de produção
microbiológica de destruxinas pelo fungo
Beauveria felina*

4.1. Metodologia

4.1.1. Planejamento experimental

No presente trabalho foi realizado o planejamento fatorial fracionário $2^{(k-1)}$, onde k é igual a 5. Temos, então: $2^{(5-1)} = 2^{(4)} = 16$ experimentos diferentes a serem realizados para o planejamento fatorial fracionário (PFF) com ponto central. O experimento do ponto central foi realizado em triplicata. Um planejamento fatorial é composto de valores de máximo (+), mínimo (-) e pontos centrais (0). Os valores de máximo e mínimo para cada variável foram os seguintes:

1- Concentração da salinidade (solução de água do mar artificial contendo os sais: CaCl_2 1,36g/L; MgCl_2 9,68g/L; KCl 0,61g/L; NaCl 30,00g/L; Na_2HPO_4 0,14mg/L; Na_2SO_4 3,47g/L; NaHCO_3 0,17g/L; KBr 100mg/L; SrCl_2 40mg/L; H_3BO_3 30mg/L) do meio de cultura. Valor máximo (+) para esta variável: 80% da concentração original de todos os sais; valor mínimo (-) desta variável: 20% da concentração de todos os sais. Ponto central: 50% da concentração de todos os sais.

2- Concentração dos nutrientes do meio de cultura. Valor máximo (+) para esta variável: 60% da concentração total de nutrientes; valor mínimo (-) para esta variável: 10% da concentração total de nutrientes. Ponto central: 35% da concentração total de nutrientes.

3- Período de incubação em dias. Valor máximo (+) de 35; mínimo (-) de 21 dias; ponto central com 28 dias para o meio MF. Valor máximo (+) de 21 dias; mínimo (-) de 7 dias; ponto central com 14 dias para os meios PDB e SBD.

4- pH inicial do meio de cultura. Valor máximo (+): pH 8; valor mínimo (-): pH 6. Ponto central: pH 7.

5- Temperatura de incubação. Valor máximo (+) de 30 °C e mínimo (-) de 15 °C. Ponto central com temperatura de 23 °C.

A partir destes 5 parâmetros experimentais montou-se um planejamento fatorial com valores de máximo e mínimo para cada variável, além de 3 pontos centrais (realizados em triplicata).

Foram utilizados os meios de cultura MF composto de: glicose 2 %, amido 1 %, peptona de soja ou soytone 2 %, peptona 0,5 %, extrato de carne 0,03 %, extrato de levedura 0,5 % (KAKEYA et al., 1995), PDB (potato dextrose broth: batata 0,4 % e dextrose 2 %) e SBD (sabouraud broth dextrose: peptona micológica 1 % e glicose 4 %).

O planejamento experimental foi construído intercalando-se os valores de máximo e mínimo, para cada variável, da seguinte maneira:

- Coluna da % de sal – os valores foram dispostos intercalando um máximo e um mínimo (até o experimento 16);
- Coluna da % de nutrientes – os valores foram dispostos intercalando-se dois máximos e dois mínimos (até o experimento 16);
- Coluna do tempo em dias – os valores foram dispostos intercalando-se quatro máximos e quatro mínimos (até o experimento 16);
- Coluna do pH inicial – os valores foram dispostos intercalando-se oito máximos e oito mínimos;
- Coluna da temperatura – os valores de máximo e mínimo foram encontrados pela multiplicação, em termos de sinais de máximo (+) e mínimo (-), das colunas anteriores.

Assim, para a variável temperatura, podemos ilustrar como exemplo o experimento 5 do planejamento fatorial fracionário que foi realizado para o meio MF

(Tabela 4.2), em que temos: concentração salina [80% que é valor máximo, sinal positivo (+)], concentração de nutrientes [60% que é valor máximo, sinal positivo (+)], tempo em dias [21 que é valor mínimo, sinal negativo (-)] e pH [8 que é valor máximo, sinal positivo (+)]. Com isso, multiplicando-se todas estas quatro colunas temos $(+) \cdot (+) \cdot (-) \cdot (+) = (-)$. Portanto, a temperatura para este experimento deve ter valor mínimo (devido ao sinal negativo) que é de 15 °C. Os pontos centrais (experimentos 17, 18 e 19) são os valores médios de cada uma das variáveis.

Desta maneira, definiram-se os parâmetros experimentais de cada experimento do planejamento experimental para a otimização das condições de crescimento e produção de destruxinas por *B. felina* nos três diferentes meios de cultura.

Tabela 4.1. - Planejamento fatorial fracionário com ponto central (valores de máximo e mínimo)

Experimento	% de Sais	% de Nutrientes	Tempo (dias)	pH inicial	Temperatura (°C)
1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1	+1	-1
4	-1	-1	+1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1
7	+1	-1	-1	+1	+1
8	-1	-1	-1	+1	-1
9	+1	+1	+1	-1	-1
10	-1	+1	+1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	+1	-1	-1
13	+1	+1	-1	-1	+1
14	-1	+1	-1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	+1
Pontos centrais					
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

Tabela 4.2. - Planejamento fatorial fracionário com ponto central das condições de crescimento de *B. felina* em meio MF

Experimento	% de Sais	% de Nutrientes	Tempo (dias)	pH inicial	Temperatura (°C)
1	80	60	35	8	30
2	20	60	35	8	15
3	80	10	35	8	15
4	20	10	35	8	30
5	80	60	21	8	15
6	20	60	21	8	30
7	80	10	21	8	30
8	20	10	21	8	15
9	80	60	35	6	15
10	20	60	35	6	30
11	80	10	35	6	30
12	20	10	35	6	15
13	80	60	21	6	30
14	20	60	21	6	15
15	80	10	21	6	15
16	20	10	21	6	30
Pontos centrais					
17	50	35	28	7	23
18	50	35	28	7	23
19	50	35	28	7	23

Tabela 4.3. - Planejamento fatorial fracionário com ponto central das condições de crescimento de *B. felina* nos meios PDB e SBD

Experimento	% de Sais	% de Nutrientes	Tempo (dias)	pH inicial	Temperatura (°C)
1	80	60	21	8	30
2	20	60	21	8	15
3	80	10	21	8	15
4	20	10	21	8	30
5	80	60	7	8	15
6	20	60	7	8	30
7	80	10	7	8	30
8	20	10	7	8	15
9	80	60	21	6	15
10	20	60	21	6	30
11	80	10	21	6	30
12	20	10	21	6	15
13	80	60	7	6	30
14	20	60	7	6	15
15	80	10	7	6	15
16	20	10	7	6	30
Pontos centrais					
17	50	35	14	7	23
18	50	35	14	7	23
19	50	35	14	7	23

4.1.2. Preparação dos inóculos de *B. felina*

Para a realização dos experimentos foi feita a contagem de esporos do fungo *B. felina*, seguido de sua inoculação em cada um dos meios de cultura MF, PDB e SBD.

O fungo *B. felina* foi repicado em 8 tubos de ensaio pyrex contendo o meio de cultura sólido e incubado por 14 dias a temperatura ambiente (25 – 27 °C). Após o tempo de incubação, foi adicionado em cada tubo 1 mL da solução de Tween 80 0,5% estéril. O meio foi raspado com alça estéril para liberação dos esporos, agitado e colocado em um erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de água destilada e 15 pérolas de vidro. Esse procedimento foi repetido duas vezes para retirar os esporos que restaram. Logo após foi realizada uma filtração com fibra de vidro e centrifugação com a própria solução de Tween 80 e uma com água. A contagem dos esporos foi realizada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer e logo após foram inoculados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio em caldo (sem ágar). Para cada experimento do planejamento fatorial fracionário (Tabelas 4.2 e 4.3) foram inoculados uma média de 10^5 esporos por mL. Os 57 experimentos foram feitos sem agitação orbital durante o período (em dias) determinado pela análise fatorial. De acordo com os estudos realizados por Vita-Marques (2003) os experimentos de crescimento de *B. felina* realizados sem agitação orbital foram mais promissores, demonstrando melhores resultados do que os experimentos realizados com agitação orbital.

4.1.3. Obtenção dos extratos a partir dos experimentos de crescimento

Após o período de incubação em cada um dos diferentes meios de cultivo, as culturas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo com auxílio de uma membrana de fibra de vidro e coletadas em frascos (1º filtrado). Ao micélio foi adicionado 10 mL de MeOH, submetido a sonicação em ultrassom por 1 min. Este foi filtrado novamente, sendo o extrato metanólico do micélio coletado em tubos de ensaio (2º filtrado).

O primeiro filtrado (obtido a partir do meio de cultura) foi submetido a uma extração em fase sólida (EFS) com o objetivo de se realizar uma limpeza das amostras retirando-se contaminantes do meio de cultura como sais, nucleosídeos, aminoácidos etc. Para isso foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ de 2 g eluída com 8 mL de cada solução:

- Fração 1: MeOH 25% e H₂O 75%
- Fração 2: MeOH/H₂O 1:1
- Fração 3: MeOH 75% e H₂O 25%
- Fração 4: MeOH 100%

As frações obtidas do primeiro filtrado submetido à EFS e o segundo filtrado (extrato metanólico do micélio – ExMeOH) foram evaporadas em uma centrífuga de alto vácuo (“Speedvac” Savant), diluídas com MeOH/H₂O 1:1 (1 mg em 1 mL) e submetidas à análise cromatográfica juntamente com os padrões de destruxinas: pseudodestruína C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**).

4.1.4. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas dos experimentos obtidos com o meio MF e dos padrões de destruxinas foram realizadas em CLAD-DAD, utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex®. As amostras foram injetadas na concentração de 1 mg/mL, com tempo de análise de 40 min, o volume injetado foi de 50 µL e foi utilizado um gradiente de MeOH em H₂O com fluxo de 1 mL/min.

Os experimentos obtidos com os meios PDB e SBD, e os padrões de destruxinas foram analisados em um CLAD-DAD-DELE-EM, utilizando-se uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex®. As amostras foram injetadas na concentração de 1 mg/mL, com tempo de corrida de 30 min, com volume de injeção de 20 µL, utilizando-se um gradiente de MeOH/MeCN/H₂O com 0,1 % de ácido fórmico e fluxo de 1 mL/min.

Cada cromatograma foi analisado calculando-se as integrais das áreas dos picos correspondentes ao comprimento de onda de 230 nm no intervalo de 10 a 26 minutos de tempo de retenção. Esses cromatogramas foram comparados com padrões de destruxinas: pseudodestruxina C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**). Também foi utilizado um método de análise que relaciona a área do cromatograma com a massa obtida das frações de EFS ou ExMeOH do micélio do fungo (relação área/massa). As áreas dos cromatogramas, bem como a relação área/massa, foram utilizadas na análise dos efeitos de interação de primeira e segunda ordem e da superfície de resposta (usando o programa “Statistica 6.0”).

4.1.5. Análises multivariadas

Todos os 57 experimentos realizados foram analisados por CLAD-DAD e as integrais das áreas dos picos no intervalo de 10 a 26 minutos. Os cromatogramas obtidos foram comparados com os padrões de destruxinas pseudodestruxina C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**).

Figura 4.1. Intervalo utilizado para o cálculo das áreas dos picos observados nos cromatogramas. O intervalo em negro do cromatograma é corresponde a área de 0,56834. Cromatograma obtido da injeção da fração 4 do experimento 10 do meio MF do PFF. Condições de análise realizada em CLAD-DAD: coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex® e gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm.

Os valores das áreas dos picos dos cromatogramas e das massas das frações (fração 1 - MeOH 25% e H₂O 75%; fração 2 - MeOH/H₂O 1:1; fração 3 - MeOH 75% e H₂O 25% e fração 4 - MeOH 100%) gerados pelos experimentos de crescimento fúngico foram utilizados para o cálculo da razão entre a área de cada pico e a massa de cada uma das frações, obtendo-se um fator de enriquecimento (u.a/mg) que relaciona a intensidade de absorção com a massa da fração em estudo.

Após realizar os cálculos das integrais de todos os cromatogramas de todas as frações de todos os 57 experimentos (19 para cada meio de cultura) foi possível analisar os efeitos de interação de 1ª ordem (para apenas uma variável) e 2ª ordem (para duas variáveis). Nestes, os resultados significativos, ou seja, que influenciam positivamente a produção de destruxinas, foram considerados através de cálculos percentuais. Também foi possível analisar os gráficos de superfície de resposta, tanto para a área do cromatograma quanto para a relação área/massa.

As análises das superfícies de resposta foram obtidas utilizando o software “Statística 6.0”. Os gráficos de superfície de resposta foram construídos com base nos valores das áreas dos picos dos cromatogramas das 5 frações (4 frações obtidas por EFS e o ExMeOH do micélio do fungo) e também com os valores da relação área/massa destas mesmas frações. As 5 variáveis (sais, nutrientes, tempo, pH e temperatura) do planejamento fatorial fracionário (Tabelas 4.2 e 4.3) foram cruzadas entre si, gerando 10 interações diferentes para cada meio de cultura:

- [Sais] e [nutrientes]; [sais] e tempo; [sais] e pH do meio; [sais] e temperatura; [nutrientes] e tempo; [nutrientes] e pH do meio; [nutrientes] e temperatura; tempo e pH do meio; tempo e temperatura; pH do meio e temperatura.

Com cada uma dessas interações foi construído um gráfico com os valores das áreas dos picos dos cromatogramas e com os valores da relação área/massa de cada fração. Estes gráficos são tridimensionais apresentando 3 eixos (X, Y e Z), onde os eixos X e Y correspondem a uma variável diferente (sais, nutrientes, tempo, pH ou temperatura) e o eixo Z equivale ao valor da área do cromatograma ou da relação área/massa de uma das 5 frações.

Depois de realizadas todas estas análises (efeito de interação de 1ª e 2ª ordem e superfície de resposta) foi possível encontrar uma composição ótima de cada meio de cultura para o crescimento e produção das destruxinas por parte de *B. felina*. Esse processo de análises realizado para as áreas dos cromatogramas também foi feito para a relação área/massa.

4.1.6. Crescimento de *B. felina* em maior volume

As condições ótimas de cada uma das condições de crescimento, utilizando-se os três diferentes meios de cultura, foram utilizadas para o crescimento de *B. felina* em 2 L de meio (8 frascos de 500 mL de capacidade com 250 mL de meio de cultura em cada um). Foi realizada contagem de esporos conforme Tópico 4.1.2.

O processo de filtração para os inóculos de 2 L foi diferente do que o utilizado no planejamento fatorial fracionário. Não foi utilizada a membrana de fibra de vidro pelo fato desse tipo de membrana reter partículas sólidas muito pequenas e com isso aumentar muito o tempo de filtração. Para se minimizar este problema, foi realizada uma filtração em um funil de vidro sinterizado contendo celite (terra de diatomáceas). Desta forma, a parte sólida (micélio) foi separada da parte líquida (meio de cultura). A parte líquida foi submetida a uma extração em fase sólida (EFS). O processo de EFS foi realizado em colunas de fase reversa C₁₈ de 5g. Foram aplicados 250 mL do meio de cultura de uma vez e, em seguida, foi aplicado 25 mL de água para eliminar sais e aminoácidos. Na seqüência, foi feito um gradiente de MeOH/H₂O e quatro frações foram obtidas: fração 1 (fr1) – 25:75 MeOH/H₂O (25 mL); fração 2 (fr2) – 1:1 MeOH/H₂O (25 mL); fração 3 (fr3) – 75:25 MeOH/H₂O (25 mL) e fração 4 (fr4) – 100% de MeOH (25 mL).

Ao micélio foram adicionados 20 mL de MeOH, a mistura foi levada ao ultrassom por 1 minuto e novamente filtrada gerando o extrato metanólico do micélio (ExMeOH). O solvente das frações de EFS e ExMeOH foi evaporado em “Speedvac” e as amostras foram submetidas a análise por CLAD-DAD-DELE-EM. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex®. As amostras foram analisadas na concentração de 1 mg/mL, sob um fluxo de eluente de 1 mL/min. Para

as amostras obtidas com o meio MF foi utilizado um gradiente de MeOH em H₂O, com tempo de corrida de 40 min e volume de injeção de 50 µL. Já para as amostras obtidas com os meios PDB e SBD foi utilizado um gradiente de MeOH/MeCN/H₂O com 0,1 % de ácido fórmico, tempo de corrida de 30 min e volume de injeção de 20 µL.

A Figura 4.2. mostra todo o procedimento simplificado para obtenção e análise das frações derivadas das condições otimizadas de crescimento de *B. felina*.

Figura 4.2. Fluxograma simplificado da metodologia para a obtenção das condições ótimas de crescimento de *B. felina* e análise dos extratos brutos.

4.2. Resultados e Discussão

4.2.1. Determinação das condições ótimas de crescimento

Os cromatogramas das frações 1, 2, 3 e 4 (obtidas por EFS) e do extrato metanólico (ExMeOH) do micélio do fungo de todos os experimentos multivariados realizados com os três meios de cultura foram comparados com os cromatogramas dos padrões de destruxinas: pseudodestruxina C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**). Na Figura 4.3 temos um exemplo da comparação entre os cromatogramas dos padrões com os cromatogramas de dois dos 19 experimentos multivariados realizados com o meio MF.

Figura 4.3. Cromatogramas dos padrões de destruxinas e dos experimentos multivariados realizados com o meio MF analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex®, com gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm. (A) roseotoxina B; (B) [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B; (C) pseudodestruxina C; (D) experimento 7-fração 4-MF; (E) experimento 13-fração 3-MF e (F) experimento 7-fração 1-MF.

A comparação dos cromatogramas das frações de EFS dos experimentos 7 e 13 – meio MF (Figura 4.3 - D, E e F) com o cromatograma dos padrões de destruxinas (Figura 4.3 - A, B e C) indica que a fração 1 (MeOH 25 % e H₂O 75 %) do experimento 7 (Figura 4.3 - F) não contém destruxinas. Já os cromatogramas das

frações 3 (MeOH 75% e H₂O 25 %) e 4 (MeOH 100 %) dos experimentos 13 e 7 (Figura 4.3 - D e E), respectivamente, apresentam vários sinais em tempo de retenção entre 16 e 24 min, indicando a presença de destruxinas nestas frações.

A Figura 4.4 mostra os cromatogramas dos padrões de destruxinas analisados em uma coluna de fase reversa C₁₈ com um gradiente de MeOH/MeCN/H₂O com 0,1 % de ácido fórmico em cada um dos solventes, descritas no Tópico 4.1.4.

Figura 4.4. Cromatogramas dos padrões de destruxinas analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex®, com gradiente de MeOH/MeCN/H₂O por 30 minutos, monitorados em $\lambda = 205$ nm. (G) roseotoxina B; (H) [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B; (I) pseudodestruxina C.

Na Figura 4.5 podemos observar os cromatogramas de dois dos 19 experimentos multivariados realizados com o meio PDB e com o meio SBD.

Figura 4.5. Cromatogramas dos experimentos multivariados realizados com os meios PDB e SBD analisados em CLAD-DAD-DELE-EM em coluna analítica de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex®, com gradiente de MeOH/MeCN/H₂O por 30 minutos, monitorados em $\lambda = 205$ nm. (J) experimento 16-fração 3-PDB; (K) experimento 16-fração 4-PDB; (L) experimento 12-ExMeOH-PDB; (M) experimento 9-fração 3-SBD; (N) experimento 9-fração 4-SBD e (O) experimento 7-fração 1-SBD.

Podemos observar a presença de destruxinas nas frações 3 e 4 do experimento 16 realizado com o meio PDB (Figura 4.5 - J e K) e nas frações 3 e 4 do experimento 9 realizado com o meio SBD (Figura 4.5 - M e N). Já no ExMeOH do experimento 12 – PDB (Figura 4.5 – L) e na fração 1 do experimento 7 – SBD (Figura 4.5 – O) não foram observadas destruxinas, bem como para estas mesmas frações e para a fração 2 de todos os outros experimentos multivariados realizados com os meios PDB e SBD.

Estes resultados demonstram que o procedimento de limpeza por EFS realizado com os meios de cultura dos experimentos de crescimento é eficaz para remover contaminantes do meio de cultura. Assim, foram consideradas para análise dos efeitos de interação de 1ª e 2ª ordem e dos gráficos de superfície de resposta, as áreas dos cromatogramas e a relação área/massa das frações menos polares (3 e 4) de todos os meios de cultura, que apresentaram destruxinas em sua composição.

4.2.2. Análise dos efeitos de interação de 1ª e 2ª ordem

Após a obtenção de todos os cromatogramas das frações obtidas por EFS e o extrato metanólico (ExMeOH) do micélio do fungo dos 57 experimentos multivariados, foram calculadas as áreas dos picos dos cromatogramas e a relação área/massa para cada um dos meios de cultura MF, PDB e SBD. Com estes valores foram realizados cálculos com o auxílio do programa Excel.

Para exemplificar os cálculos de interação de 1ª ordem, as variáveis do planejamento fatorial foram nomeadas como: (a) % de salinidade; (b) % de nutrientes; (c) tempo em dias; (d) pH inicial; (e) temperatura. Os cálculos dos efeitos

de interação de 1ª ordem (para apenas uma variável) foram efetuados através da multiplicação dos sinais de máximo e mínimo (Tabela 4.1) pelos valores encontrados para as áreas dos cromatogramas, ou para a relação área/massa.

Por exemplo, a Tabela 4.4 mostra os cálculos para os efeitos de interação de 1ª ordem realizados com os valores das áreas dos cromatogramas da fração 3 da EFS dos experimentos multivariados com o meio SBD, onde os sinais da coluna a (% de salinidade) foram multiplicados pelos valores das áreas dos cromatogramas (coluna f), resultando na coluna a.f. Em seguida, foi realizada a soma dos 16 valores encontrados nesta multiplicação (Tabela 4.4, coluna a.f) e a divisão desse valor por 8, já que foram atribuídos 8 valores de máximo e 8 valores de mínimo. O resultado dessa divisão foi 0,05. Este valor foi, então, dividida pela variância. A variância foi encontrada através de cálculos efetuados com os valores das áreas obtidas nos pontos centrais (a variância para esta fração foi de 0,10). A sigla utilizada para este efeito foi Ea (efeito da variável a) e o efeito foi de 0,50.

Tabela 4.4. - Cálculos para os efeitos de 1ª ordem (uma variável) para os valores das áreas dos cromatogramas da fração 3 dos experimentos multivariados realizados com o meio SBD

Experimento	a	Áreas (f)	a.f
1	+	0,04	0,04
2	-	0,02	-0,02
3	+	0,04	0,04
4	-	0,03	-0,03
5	+	0,11	0,11
6	-	0,06	-0,06
7	+	0,14	0,14
8	-	0,10	-0,10
9	+	0,27	0,27
10	-	0,16	-0,16
11	+	0,14	0,14
12	-	0,02	-0,02
13	+	0,15	0,15
14	-	0,08	-0,08
15	+	0,07	0,07
16	-	0,11	-0,11

Desta forma os cálculos foram realizados para todas as variáveis (a, b, c, d, e) em função das áreas dos cromatogramas das frações de EFS (fr1, fr2, fr3, fr4) e das áreas dos cromatogramas dos ExMeOH da seguinte maneira: a x área fr3 (Ea para a fr3); b x área F3 (Eb para a fr3); c x área F3 (Ec para a fr3); d x área F3 (Ed para a fr3); e x área F3 (Ee para a fr3); a x área fr4 (Ea para a fr4), e assim por diante. Foram obtidos 5 efeitos de interação de 1ª ordem (Ea, Eb, Ec, Ed, Ee) para cada fração de EFS e para cada ExMeOH.

Os cálculos dos efeitos de interação de 2ª ordem (para duas variáveis) foram efetuados através da multiplicação dos sinais de máximo e mínimo (Tabela 4.1) de duas variáveis, simultaneamente, pelos valores encontrados para as áreas dos cromatogramas ou para a relação área/massa. Por exemplo, na Tabela 4.5 os sinais da coluna a foram multiplicados pelos da coluna b, que foram multiplicados pelos valores das áreas dos cromatogramas da coluna f, resultando na coluna axbxf. Em seguida, foi realizada a soma dos 16 valores obtidos destas multiplicações (coluna axbxf) e a divisão desse valor por 8, já que foram atribuídos 8 valores de máximo (+) e 8 valores de mínimo (-). O resultado dessa divisão foi 0,02. Esta média também foi dividida pela variância (0,10). A sigla utilizada para este efeito foi Eab (efeito de interação das variáveis a com b) e o efeito foi de 0,2.

Tabela 4.5. - Cálculos para os efeitos de 2ª ordem (duas variáveis) para os valores das áreas dos cromatogramas da fração 3 dos experimentos multivariados realizados com o meio SBD

Experimento	a	b	Áreas (f)	axbxf
1	+	+	0,04	0,04
2	-	+	0,02	-0,02
3	+	-	0,04	-0,04
4	-	-	0,03	0,03
5	+	+	0,11	0,11
6	-	+	0,06	-0,06
7	+	-	0,14	-0,14
8	-	-	0,10	0,10
9	+	+	0,27	0,27
10	-	+	0,16	-0,16
11	+	-	0,14	-0,14
12	-	-	0,02	0,02
13	+	+	0,15	0,15
14	-	+	0,08	-0,08
15	+	-	0,07	-0,07
16	-	-	0,11	0,11

Desta forma os cálculos do efeito de 2ª ordem foram realizados para todas as variáveis (a, b, c, d, e) em função das áreas dos cromatogramas e da relação área/massa das frações de EFS (fr1, fr2, fr3 e fr4) e das áreas dos cromatogramas e da relação área/massa dos ExMeOH. Assim, foram obtidos 10 efeitos de interação de 2ª ordem (Eab, Eac, Ead, Eae, Ebc, Ebd, Ebe, Ecd, Ece, Ede) para cada fração de EFS e para cada ExMeOH.

Os resultados significativos, ou seja, que influenciam para melhorar a produção de destruxinas, foram considerados através de cálculos percentuais. Para cada fração de EFS ou ExMeOH foram gerados 5 efeitos de interação de 1ª ordem e 10 efeitos de interação de 2ª ordem (total de 15 efeitos para cada fração de EFS ou ExMeOH). É considerado estatisticamente significativo um efeito cujo valor absoluto for superior a 20 % do maior valor de interação observado para a fração de EFS ou ExMeOH em estudo. Por exemplo, na Tabela 4.6 para a relação área/massa, efeito fr3, o maior valor de interação é de 1,23 (valor absoluto destacado em vermelho) e

20 % deste valor é 0,25. Portanto, todos os valores inferiores a 0,25 (positivos ou negativos) não são significativos para a produção de destruxinas. Os sinais de cada interação significativa indicam os valores de máximo (sinal positivo) ou de mínimo (sinal negativo) que deverão ser utilizados para cada variável em estudo.

Tabela 4.6. - Efeitos calculados para a relação área/massa das frações 3 e 4 dos experimentos multivariados obtidos com o meio SBD

Interações	Área do cromatograma (230 nm)		Relação área/massa	
	Efeito-fr3	Efeito-fr4	Efeito-fr3	Efeito-fr4
Ea	0,45	-0,08	0,99	0,24
Eb	0,32	-0,03	-1,15	-0,62
Ec	-0,12	0,58	0,83	0,90
Ed	-0,55	0,27	-1,05	-0,70
Ee	0,14	0,26	0,71	0,13
Eab	0,16	0,22	-0,58	0,19
Eac	0,17	-0,08	1,23	0,29
Ead	-0,17	-0,10	-1,08	-0,32
Eae	-0,20	-0,39	0,62	0,41
Ebc	0,35	0,06	-0,23	-0,32
Ebd	-0,47	-0,52	0,52	0,17
Ebe	-0,32	-0,23	-1,21	-0,37
Ecd	-0,56	-0,23	-0,97	-1,08
Ece	-0,12	0,48	0,62	0,39
Ede	-0,13	0,03	-0,71	-0,06
Valores significativos	> 0,11	> 0,12	> 0,25	> 0,22

O resultado do efeito da interação de 2ª ordem para Ebe [com as variáveis nutrientes (a) e temperatura (e)] para a relação área/massa da fração 3 é negativo, o valor absoluto é de 1,21, (em módulo) que é maior que o valor significativo (0,25) sendo, portanto, considerado para análise. O sinal algébrico negativo (-) indica que deverá ser utilizado o valor de mínimo para concentração de nutrientes (10 %) e o valor de mínimo para a temperatura (15° C). Esta análise é feita para cada uma das frações 3 e 4, obtidas para cada um dos experimentos de crescimento considerando

tanto os valores da área do cromatograma quanto os valores da relação área/massa das frações de EFS obtidas a partir dos experimentos de crescimento realizados nos meios MF, PDB e SBD.

Os resultados obtidos das análises dos efeitos de interação de 1ª e 2ª ordem para o crescimento de *B. felina* realizados nos três meios de cultura foram os seguintes:

Tabela 4.7. - Condições otimizadas de crescimento obtidas a partir da análise das interações de 1ª e 2ª ordem dos experimentos multivariados realizados com o meio MF, PDB e SBD

Experimentos otimizados	Sais (%)	Nutrientes (%)	Tempo (dias)	pH	Temperatura (°C)
MF-Exp-Ot-1	20	10	35	6	15
MF-Exp-Ot-2	50	35	28	7	23
MF-Exp-Ot-3	20	10	35	8	30
MF-Exp-Ot-4	20	10	35	6	30
PDB-Exp-Ot-1	80	60	7	8	30
SBD-Exp-Ot-1	80	10	21	6	15

Foram obtidas 4 condições otimizadas para o cultivo de *B. felina* em meio MF e 1 condição otimizada em cada um dos meios PDB e SBD. Comparando as condições de crescimento em meio MF, PDB e SBD com os experimentos multivariados (Tabelas 4.2 e 4.3, respectivamente), observou-se que os experimentos MF-Exp-Ot-4, PDB-Exp-Ot-1 e SBD-Exp-Ot-1 apresentaram condições distintas de todos os experimentos de crescimento realizados até então. Os experimentos MF-Exp-Ot-1, MF-Exp-Ot-2 e MF-Exp-Ot-3 equivalem aos experimentos 12, ponto médio (média entre os valores máximos e mínimos) e 4, respectivamente, do planejamento fatorial fracionário, tal como indicado na Tabela 4.2.

As 4 condições obtidas com o meio MF foram testadas novamente (em triplicata) para o crescimento de *B. felina* e a produção de destruxinas, conforme o

procedimento descrito nos Tópicos 4.1.2 e 4.1.3. Os experimentos foram analisados cromatograficamente. Todos os cromatogramas gerados (4 frações de EFS e ExMeOH do micélio) foram comparados com os cromatogramas dos padrões de destruxinas (Figura 4.3), como mostra a Figura 4.6, a seguir:

Figura 4.6. Cromatogramas dos experimentos multivariados analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex®, com gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm. (P) MF-Exp-Ot-2 fração 3; (Q) MF-Exp-Ot-1 fração 3; (R) MF-Exp-Ot-1 fração 4; (S) MF-Exp-Ot-2 fração 1; (T) MF-Exp-Ot-1 fração 2.

A análise dos cromatogramas indica que a fração 1 do experimento MF-Exp-Ot-2 (Figura 4.6 - S) e a fração 2 do experimento MF-Exp-Ot-1 (Figura 4.6 - T) não contém destruxinas. Os cromatogramas dos experimentos MF-Exp-Ot-1 (Figura 4.6 - Q e R) e MF-Exp-Ot-2 (Figura 4.6 - P) apresentaram sinais com tempo de retenção (t_r) diferentes, mas compatível com as destruxinas. Portanto, estas duas condições de crescimento foram selecionadas dentre as quatro condições obtidas pela análise das interações de 1ª e 2ª ordem, e foram consideradas condições ótimas de crescimento, pois podemos ter diferentes tipos de destruxinas em cada experimento. Por exemplo, na fração 3 do experimento MF-Exp-Ot-2 (Figura 4.6 - P) aparece um sinal em $t_r = 22$ min que não aparece no cromatograma da fração 3 do experimento MF-Exp-Ot-1 (Figura 4.6 - Q).

Como estas condições de crescimento foram realizadas em triplicata, as suas réplicas foram comparadas entre si, como mostra a Figura 4.7:

Figura 4.7. Cromatogramas das réplicas das condições otimizadas obtidas pela análise dos efeitos de interação de 1ª e 2ª ordem com o meio MF, analisados em CLAD-DAD em coluna analítica de fase reversa C₁₈ Phenomenex®, com gradiente de MeOH/H₂O por 40 minutos, monitorados em $\lambda = 230$ nm. (U) MF-Exp-Ot-1-fr4-r1; (V) MF-Exp-Ot-1-fr4-r2.

Como pode ser observado, os dois cromatogramas das réplicas da condição otimizada 1, fração 4 do meio MF (MF-Exp-Ot-1-fr4-r1 e MF-Exp-Ot-1-fr4-r2) são praticamente idênticos, apresentando os mesmos picos, nos mesmos tempos de retenção. Com isso, os resultados da análise dos perfis cromatográficos mostraram que os experimentos de crescimento do fungo *B. felina* apresentam boa reprodutibilidade na produção de destruxinas em repetições de uma mesma condição de crescimento. Isto também indicou que a extração em fase sólida (EFS) é reprodutível para a análise de extratos de microrganismos.

A partir dessas análises foram selecionadas 2 condições ótimas de crescimento para o fungo *B. felina* em meio MF:

- Condição ótima 1 (MF-CO-1): 20 % da concentração de sais; 10 % da concentração de nutrientes; tempo de incubação de 35 dias; pH 6 e temperatura de 15 °C.
- Condição ótima 2 (MF-CO-2): 50 % da concentração de sais; 35 % da concentração de nutrientes; tempo de incubação de 28 dias; pH 7 e temperatura de 23 °C.

4.2.3. Análise dos gráficos de superfície de resposta

Os gráficos de superfície de resposta foram construídos utilizando-se os valores das áreas dos picos dos cromatogramas das 5 frações (4 frações obtidas por EFS e o extrato metanólico do micélio do fungo) e também com os valores da relação área/massa destas mesmas frações, para cada um dos experimentos multivariados realizados com os meios MF, PDB e SBD. Foram obtidos 50 gráficos construídos com os valores das áreas dos picos dos cromatogramas de cada uma

das 5 frações de EFS e 50 gráficos construídos com os valores da relação área/massa de cada uma das 5 frações para cada um dos meios de cultura. Com isso, foram analisados um total de 300 gráficos semelhantes ao da Figura 4.8.

Figura 4.8. Gráficos de superfície de resposta relação área/massa – meio MF: (A) da interação entre pH inicial e temperatura; (B) da interação entre tempo de incubação e temperatura; (C) da interação entre nutrientes e tempo. Gráficos de superfície de resposta área dos picos dos cromatogramas: (D) da interação entre sais e tempo; (E) da interação entre nutrientes e tempo; (F) da interação entre sais e nutrientes.

Os gráficos foram analisados considerando-se os maiores valores das áreas dos cromatogramas das frações, que são observados nas regiões de cores mais fortes (marrom) e que representam o máximo e as menores áreas dos cromatogramas das frações que estão nas cores mais fracas (esverdeadas) e que representam o mínimo. Os gráficos mais significativos (valor superior a 20 % do máximo obtido para as áreas dos cromatogramas das frações de SPE ou ExMeOH), ou seja, aqueles em que as variáveis exercem maior influência, são aqueles que apresentam maiores diferenças entre o máximo e o mínimo. Se o valor máximo for muito próximo do mínimo não houve diferença entre as áreas. Isso pode ser observado nos gráficos de superfície de resposta C e F da Figura 4.8 para o meio de cultura MF. O ideal é que o valor máximo seja igual ou superior ao dobro do mínimo. Por exemplo, na Figura 4.8 - B o valor máximo (0,166) é maior que o triplo do valor mínimo (0,051). Neste caso as variáveis tendem para tempo de incubação de 21 dias e temperatura de 19 °C.

Com o meio MF foram obtidas duas condições ótimas de crescimento para *B. felina*:

- Para a superfície de resposta construída com os valores da relação área/massa das frações (4 frações obtidas por EFS e ExMeOH do micélio do fungo): 55 % da concentração de sais, 10 % da concentração de nutrientes, tempo de incubação de 21 dias, pH 8 e temperatura 15 °C.
- Para a superfície de resposta construída com os valores das áreas dos picos dos cromatogramas das frações (4 frações obtidas por EFS e ExMeOH do micélio do fungo): 50 % da concentração de sais, 35 % da

concentração de nutrientes, tempo de incubação de 28 dias, pH 7 e temperatura 23°C.

Como esta segunda condição (50 % da concentração de sais, 35 % da concentração de nutrientes, tempo de incubação de 28 dias, pH 7 e temperatura 23 °C) é igual ao experimento ótimo 2 da Tabela 4.7 (MF-Exp-Ot-2) obtida pela análise das interações de 1ª e 2ª ordem, podemos utilizá-la. A primeira condição de crescimento (relação área/massa) foi nomeada como condição ótima 3 (MF-CO-3).

Após a análise de todos os gráficos de superfície de resposta chegamos às seguintes condições ótimas de crescimento para o fungo *B. felina* nos meios MF, PDB e SBD:

Tabela 4.8. - Condições de crescimento obtidas a partir da análise dos gráficos de superfície de resposta dos experimentos multivariados realizados com o meio MF, PDB e SBD

Condição otimizada	Sais (%)	Nutrientes (%)	Tempo (dias)	pH	Temperatura (°C)
MF-CO-3	55	10	21	8	15
PDB-CO-2	50	10	21	8	30
PDB-CO-3	20	10	21	8	30
SBD-CO-2	50	35	21	6	30
SBD-CO-3	80	10	21	6	30

A análise dos gráficos de superfície de resposta, tanto em relação à área quanto em relação à área/massa para os meios PDB e SBD, mostrou uma leve diferença entre a composição dos meios ótimos de um mesmo meio de cultura. Isso pode ser observado para as condições ótimas do meio de cultura PDB (Tabela 4.8) onde só houve diferença na concentração de sais. Além disso, pôde ser observado que o pH ótimo resultou no valor máximo (8,0) para o meio PDB e o no valor mínimo (6,0) para o meio SBD.

Assim temos na Tabela 4.9 todas as condições ótimas encontradas para o cultivo de *B. felina* (Bf) nos 3 meios de cultura:

Tabela 4.9. - Condições ótimas de crescimento para *B. felina* nos meios MF, PDB e SBD

Meio de cultura	Condição ótima	Código	Sais (%)	Nutrientes (%)	pH	Tempo (dias)	Temperatura (°C)
MF	1	Bf-MF-CO-1	20	10	6	35	15
	2	Bf-MF-CO-2	50	35	7	28	23
	3	Bf-MF-CO-3	55	10	8	21	15
PDB	1	Bf-PDB-CO-1	50	10	8	21	30
	2	Bf-PDB-CO-2	20	10	8	21	30
	3	Bf-PDB-CO-3	80	60	8	7	30
SBD	1	Bf-SBD-CO-1	50	35	6	21	30
	2	Bf-SBD-CO-2	80	10	6	21	30
	3	Bf-SBD-CO-3	80	10	6	21	15

As condições ótimas 1 e 2 (Bf-MF-CO-1 e Bf-MF-CO-2) do meio MF e a condição ótima 3 (Bf-PDB-CO-3 e Bf-SBD-CO-3) dos meios PDB e SBD foram obtidas através da avaliação pelo método de análise multivariada de análises das interações de 1ª e 2ª ordem. Já a condição ótima 3 (Bf-MF-CO-3) do meio MF e a condição ótima 2 (Bf-PDB-CO-2 e Bf-SBD-CO-2) dos meios PDB e SBD foram obtidas através da avaliação pela análise multivariada de superfície de resposta construída com os valores da relação área/massa das frações (4 frações obtidas por SPE e ExMeOH do micélio do fungo). As condições ótimas 1 (Bf-PDB-CO-1 e Bf-SBD-CO-1) dos meios PDB e SBD foram obtidas pela análise de superfície de resposta construída com os valores das áreas dos picos dos cromatogramas das frações (4 frações obtidas por EFS e ExMeOH do micélio do fungo) geradas pelos experimentos multivariados.

Estas condições ideais estabelecidas para a produção de destruxinas por parte de *B. felina* foram testadas experimentalmente em maior volume (2 L), com o objetivo de se isolar destruxinas minoritárias, destruxinas desconhecidas e destruxinas que não foram anteriormente isoladas de *B. felina*. Além de se obter maiores quantidades para posterior envio para bioensaio de atividade vermífuga e

de atividade carrapaticida. Para isso foi utilizada a metodologia descrita no Tópico 4.1.6, incubando-se o fungo nas condições ideais estabelecidas.

A produção de destruxinas em meio MF foi quantificada por CLAD-DAD-DELE-EM utilizando a condição cromatográfica descrita no Tópico 4.1.6. A análise dos cromatogramas mostrou alguns picos com misturas de destruxinas dificultando sua interpretação, como observado nas Figuras 4.9 a 4.11.

Figura 4.9. Cromatograma da condição Bf-MF-CO-3-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (EM – ESI⁺).

Figura 4.10. Cromatograma da condição Bf-MF-CO-3-fração 4 com detecção por espalhamento de luz evaporativo (DELE).

Figura 4.11. Espectro de massas da condição Bf-MF-CO-3-fração 4, pico 2 [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V].

A Figura 4.11 mostra o espectro de massas da condição ótima 3, fração 4 do meio MF (Bf-MF-CO-3-fr4), que contém uma mistura de sinais de destruxinas (Dtxs), como por exemplo em: m/z 594,7 [isobáricas: Dtx B (**14**) ou Dtx E (**21**)] e m/z 630,7 [Dtx E cloridrina (**22**)].

Assim, tornou-se necessária a otimização das condições de análises cromatográficas para uma melhor interpretação dos experimentos de otimização das condições de crescimento e produção de destruxinas por *B. felina*, bem como para o posterior isolamento e purificação das destruxinas produzidas.

4.2.4. Análise dos experimentos ótimos obtidos com os meios MF, PDB e SBD

Os cromatogramas dos experimentos ótimos obtidos com os meios de cultura PDB e SBD foram analisados comparando-se com os padrões de destruxinas pseudodestruxina C (18); roseotoxina B (19) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (20) e com as destruxinas detectadas nos cromatogramas dos experimentos ótimos obtidos com o meio de cultura MF.

A análise de todos os cromatogramas obtidos indicou uma repetição de destruxinas conhecidas produzidas por *B. felina* nos três diferentes meios de cultura. Nos meios de cultura PDB e SBD também foram detectadas várias destruxinas previamente não isoladas de *B. felina* (VITA-MARQUES et al., 2008; LIRA et al.,

2006) como, por exemplo: Dtx B₁ (**23**) ou Dtx E₁ (**24**) ou homoDtx B (**25**) ou roseotoxina A (**26**) - todas isobáricas; desmetilDtx C (**27**) ou Dtx F (**28**) ou Dtx C₂ (**29**) - isobáricas entre si; Dtx Ed₁ (**30**); cloroidrina da Dtx A₄ (**31**); Dtx D₁ (**32**); Dtx E₁diol (**33**); Dtx A (**12**) e Dtx C (**34**) ou Dtx D₂ (**35**) ou hidroxidtx B (**15**) – todas isobáricas.

Uma maior variedade de destruxinas desconhecidas pôde ser observada na condição ótima 2, fração 4 (Bf-PDB-CO-2-fr4) e na condição ótima 3, fração 4 (Bf-PDB-CO-3-fr4), descrita na Tabela 4.9 do meio PDB. Para ambas as condições de crescimento, durante o período de incubação foi observada uma baixa produção da massa micelial e uma rápida esporulação. Isso pode ter ocorrido, provavelmente, devido à alta temperatura de incubação (30 °C), que acelera o crescimento microbiano, e à escassez de nutrientes, diminuindo seu tempo de crescimento (fase micelial vegetativa) e acelerando a esporulação (fase micelial reprodutiva).

O crescimento dos fungos filamentosos é constituído das fases vegetativa e reprodutiva. As hifas do micélio vegetativo podem penetrar no meio de crescimento em busca de nutrientes, enquanto que as hifas do micélio de reprodução são, em

geral, aéreas. A fase reprodutiva se dá com o início da esporulação, que para alguns fungos, pode ocorrer após a formação das hifas do micélio aéreo (PELCZAR et al., 1980).

Durante a realização dos experimentos ótimos de crescimento com o fungo *B. felina*, foram feitas as seguintes observações: os pHs inicial e final dos meios de cultura foram medidos e observou-se que o pH final do meio de cultivo foi igual a 6,0, independente do pH inicial da condição de crescimento. Isso ocorre porque à medida que o fungo cresce, ele altera o pH do meio. Nesse caso o pH inicial não influenciou de maneira significativa a produção das destruxinas. Vale ressaltar que não foi utilizado um tampão para manter o pH inicial.

Outra observação feita foi em relação ao crescimento microbiano nos diferentes meios de cultura. Para um meio de cultura rico em nutrientes, *B. felina* passa muito tempo na fase vegetativa, depois se formam as hifas aéreas e em seguida inicia-se a fase reprodutiva, com a esporulação. Esse processo se deu de maneira prolongada quando foi utilizado o meio de cultura MF (com tempo de incubação de 21, 28 e 35 dias). Já com os meios PDB e SBD, o fungo passava pouco tempo na fase vegetativa, entrando rapidamente na fase reprodutiva (o tempo de incubação foi de 7 e 21 dias).

O meio MF é rico em nutrientes sendo composto de glicose, amido solúvel (fontes de C), farinha de soja ou soytone, peptona, extrato de carne e extrato de levedura (fontes de N). Como pode ser observado na Tabela 4.9, as 3 condições ótimas de crescimento para o meio MF apresentaram uma baixa porcentagem da concentração total de nutrientes (10 % e 35 %). O meio PDB é composto de dextrose (fonte de C) e batata (fonte de N), e o meio SBD é composto de glicose

(fonte de C) e peptona (fonte de N). Estes meios são mais pobres em nutrientes, do que o meio MF. Portanto, mesmo que haja um aumento na concentração de nutrientes para os meios PDB e SBD e uma diminuição na concentração de nutrientes para o meio MF, ele pode manter as diferentes fontes de C e N disponíveis em quantidades maiores do que para os outros dois meios de cultura.

Quando do crescimento em meio PDB com a condição 3 [que tem uma maior concentração total de nutrientes (60 %)] ou condição 2 [cuja concentração total de nutrientes é muito inferior (10 %)] pode ter ocorrido uma situação de estresse para o fungo, acelerando a sua esporulação e produção dos metabólitos secundários. Em geral, os metabólitos secundários são produzidos sob estresse para adaptação do fungo ao meio de crescimento. Isso indica que, sob condições de depleção nutricional, *B. felina* produz as destruxinas mais rapidamente.

Quando da realização dos estudos sobre o “Metabolismo secundário e o desenvolvimento de fungos,” Calvo et al. (2002), mostrou que o metabolismo secundário é associado, geralmente, com os processos de esporulação nos microrganismos. Por exemplo, os compostos derivados do ácido linoléico que são produzidos com o início da esporulação pelo fungo *Aspergillus nidulans*, e a zearalenona produzida por *Fusarium graminearum*. Sendo assim, por analogia, pode-se dizer que quando em situação de estresse, com poucas fontes de C e N e uma elevada temperatura de incubação, *B. felina* começa a esporular rapidamente e, conseqüentemente, a produzir as destruxinas.

Foi observada a presença de destruxinas conhecidas e desconhecidas nas frações 3 (MeOH/H₂O 75 : 25) e 4 (MeOH 100 %) de EFS (extração em fase sólida) para os 3 diferentes meios de cultura. A condição ótima 3 do meio PDB (Bf-PDB-CO-

3) apresentou, em apenas 7 dias de incubação, um total de 6 destruxinas na fração 3 e 8 destruxinas na fração 4. Já a condição ótima 2 (Bf-PDB-CO-2) apresentou um total de 11 destruxinas na fração 4. Praticamente metade das destruxinas detectadas em cada fração é de destruxinas desconhecidas, como pode ser observado na Tabela 4.10, a seguir:

Tabela 4.10. - Destruxinas produzidas nas condições ótimas 2 e 3 do meio de cultura PDB

Fração	Pico	Nome	P.M.	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
Bf-PDB-CO-2-fr4	1	Dtx Ed ₁ (30)	625	625.8	647.8
	2	desconhecida	588	588.7	610.6
	3	desconhecida	539	539.8	561.8
	4	Dtx A (12)	577	577.7	599.7
	5	desconhecida	553	553.7	575.6
	6	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	591.7	613.8
	7	desconhecida	567	567.8	589.7
	8	desconhecida	641	641.8	663.7
	9	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	607.7	629.6
	10	[Phe ⁻³ -N-Me-Val ³] dtx B (20)	655	655.7	677.7
	11	pseudoDtx B (17) ou pseudoDtx C (18)	669	669.8	691.7
Bf-PDB-CO-3-fr3	1	Dtx E cloridrina (22)	629	629.7	651.8
	2	Desconhecida	539	539.8	561.8
	3	Dtx A (12)	577	577.8	599.8
	4	desconhecida	553	553.9	575.8
	5	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	591.7	613.8
	6	desconhecida	567	567.8	589.7
Bf-PDB-CO-3-fr4	1	desconhecida	539	539.8	561.8
	2	desconhecida	553	553.7	575.8
	3	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	591.7	613.8
	4	desconhecida	567	567.8	589.8
	5	desconhecida	641	641.8	663.8
	6	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	607.9	629.9
	7	[Phe ⁻³ -N-Me-Val ³] dtx B (20)	655	655.9	677.9
	8	pseudoDtxB (17) ou pseudoDtxC (18)	669	669.8	691.8

P.M. = peso molecular

Todas as destruxinas desconhecidas que foram observadas nos meios de cultivo MF e SBD puderam ser detectadas nas condições 2 e 3 do meio PDB. Também foram detectadas destruxinas conhecidas e desconhecidas nos extratos metanólicos do micélio do fungo (ExMeOH), mas somente nos meios PDB e SBD. As destruxinas detectadas no ExMeOH de um meio de cultivo são, em sua maioria, as mesmas observadas para o outro meio de cultura. O número de destruxinas conhecidas e desconhecidas nos ExMeOH é menor comparando-se com as destruxinas observadas nas frações 3 e 4 de EFS. As destruxinas conhecidas e a destruxina desconhecida recorrentes no extrato metanólico do micélio do fungo, para os meios PDB e SBD, podem ser observadas na Tabela 4.11, a seguir:

Tabela 4.11. - Destruxinas presentes no ExMeOH dos meios de cultura PDB e SBD

Nome	P.M.	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
[Phe ³ -N-Me-Val ⁵] Dtx B (20)	655	655.7	677.7
desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29)	595	595.7	617.7
pseudoDtxB (17) ou pseudoDtxC (18)	669	669.8	691.8
Dtx C (34) ou Dtx D ₂ (35) ou hidroxilDtx B (15)	609	609.8	631.9
cloridrina da Dtx A ₄ (31)	643	644.7	666.7
Dtx D ₁ (32)	637	637.8	659.7
desconhecida	567	567.7	589.7

P.M. = peso molecular

A quantidade de massa micelial e a quantidade de amostra obtida dos métodos de extração (EFS e ExMeOH) foram praticamente as mesmas para as três condições ótimas de crescimento para cada um dos meios de cultura MF, PDB e SBD. Na fração 4 de EFS foi possível se observar mais destruxinas que na fração 3 de todas as condições ótimas de todos os meios de crescimento. A fração Bf-PDB-CO-2-fr4 (Tabela 4.10) rendeu uma quantidade de amostra duas vezes maior do que a fração Bf-PDB-CO-3-fr4. A condição que gerou a Bf-PDB-CO-2-fr4 foi obtida pela análise dos gráficos de superfície de resposta para a relação área/massa.

Para o meio SBD a fração Bf-SBD-CO-3-fr4 foi a que mais apresentou destruxinas, como mostra a Tabela 4.12. Foi observado nesta fração um total de 12 substâncias, sendo 4 delas desconhecidas (P.M. 539, 553, 567 e 641). Na fração Bf-SBD-CO-1-fr4 foram observadas 8 substâncias, onde 4 delas são desconhecidas. Já para a Bf-SBD-CO-2-fr4 foram observadas 5 substâncias, sendo que 3 delas são desconhecidas. Todas as destruxinas conhecidas e desconhecidas presentes nas condições Bf-SBD-CO-1-fr4 e Bf-SBD-CO-2-fr4, foram observadas na Bf-SBD-CO-3-fr4.

A condição Bf-SBD-CO-3 (Tabela 4.9, página 78) foi obtida pela análise das interações de 1ª e 2ª ordem e a condição Bf-SBD-CO-2 foi obtida pela análise dos gráficos de superfície de resposta para a relação área/massa. A única diferença entre estas duas condições é na temperatura de incubação, conforme pode ser observado na Tabela 4.9. Porém o resultado final na produção de destruxinas é bem diferente para cada uma destas condições. Na condição Bf-SBD-CO-3 foi observado mais que o dobro de destruxinas observadas na condição Bf-SBD-CO-2 e somente uma substância desconhecida a mais que as observadas nesta última condição. Isto

indica que a diminuição na temperatura pode ter influenciado para o aumento na produção de destruxinas por *B. felina*.

Tabela 4.12. - Destruxinas produzidas nas condições ótimas 1, 2 e 3, fração 4 do meio de cultura SBD

Fração	Pico	Nome	P.M.	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
Bf-SBD-CO-1-fr4	1	desconhecida	539	539.8	561.7
	2	desconhecida	553	553.7	575.8
	3	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	591.9	613.9
	4	desconhecida	567	567.8	589.8
	5	desconhecida	641	641.8	663.8
	6	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	607.7	629.7
	7	[Phe ³ -N-Me-Val ⁷] dtx B (20)	655	655.9	677.7
	8	pseudoDtx C (17) ou pseudoDtx B (18)	669	669.8	691.8
Bf-SBD-CO-2-fr4	1	desconhecida	553	553.7	576.6
	2	desconhecida	567	567.8	589.8
	3	desconhecida	641	641.8	663.8
	4	[Phe ³ -N-Me-Val ⁷] dtx B (20)	655	655.9	677.7
	5	pseudoDtxB (17) ou pseudoDtxC (18)	669	669.8	691.7
Bf-SBD-CO-3-fr4	1	desconhecida e Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	539 e 607	539.8 e 607.7	561.7 e 629.7
	2	desconhecida	553	553.7	576.6
	3	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	591.7	613.8
	4	desconhecida	567	567.8	589.8
	5	desconhecida	641	641.8	663.7
	6	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	607.7	629.7
	7	[Phe ³ -N-Me-Val ⁷] dtx B (20)	655	655.9	677.9
	8	desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29)	595	595.8	617.8
	9	pseudoDtxB (17) ou pseudoDtxC (18)	669	669.8	691.8
	10	Dtx C (34) ou Dtx D ₂ (35) ou hidroxíDtx B (15)	609	609.9	631.8
	11	Dtx D ₁ (32)	637	637.9	659.8

P.M. = peso molecular

Na Tabela 4.13, para o meio MF, pôde-se observar para a fração Bf-MF-CO-1-fr4 um total de 9 substâncias, sendo uma delas desconhecida (P.M. 567). Na

fração Bf-MF-CO-2-fr4 foram observadas 4 substâncias, sendo uma delas desconhecida. E para a fração Bf-MF-CO-3-fr4 foram observadas 7 destruxinas conhecidas. A fração Bf-MF-CO-1-fr4 foi a que apresentou o maior número de destruxinas, além da desconhecida que também estava presente na fração Bf-MF-CO-2-fr4. Portanto para o meio MF a condição Bf-MF-CO-1 foi a melhor, e esta condição foi obtida pela análise das interações de 1ª e 2ª ordem.

Tabela 4.13. - Destruxinas produzidas nas condições ótimas 1, 2 e 3, fração 4 do meio de cultura MF

Fração	Pico	Nome	P.M.	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺
Bf-MF-CO-1-fr4	1	Dtx Ed ₁ (30)	625	626.3	648.4
	2	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26) e cloroidrina da Dtx A ₄ (31)	607 e 643	608.5 e 644.4	630.5 e 666.4
	3	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	592.4	614.4
	4	desconhecida	567	568.3	590.5
	5	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	608.4	630.5
	6	[Phe ³ -N-Me-Val ³] dtx B (20)	655	656.6	678.4
	7	desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29)	595	596.4	618.4
	8	pseudoDtx C (17) ou pseudoDtx B (18)	669	670.5	692.4
Bf-MF-CO-2-fr4	1	desconhecida	567	568.4	590.5
	2	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	608.4	630.5
	3	[Phe ³ -N-Me-Val ³] dtx B (20)	655	656.6	678.5
	4	pseudoDtx C (17) ou pseudoDtx B (18)	669	670.6	692.6
Bf-MF-CO-3-fr4	1	Dtx Ed ₁ (30)	625	626.7	648.8
	2	cloroidrina da Dtx A ₄ (31)	643	644.8	666.8
	3	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	592.7	614.7
	4	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	608.8	630.8
	5	[Phe ³ -N-Me-Val ³] dtx B (20)	655	656.9	678.8
	6	desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29) e pseudoDtx C (17) ou pseudoDtx B (18)	595 e 669	596.8 e 670.8	618.8 e 692.8

P.M. = peso molecular

Nos experimentos de crescimento realizados com o meio de cultura MF foram detectadas 2 destruxinas desconhecidas, enquanto que nos experimentos de crescimento com os meios SBD e PDB foram detectadas 4 e 5 destruxinas desconhecidas, respectivamente. Praticamente todas as destruxinas desconhecidas presentes nos meios MF e SBD puderam ser observadas no meio PDB, especialmente nas condições ótimas 2 e 3. A condição de crescimento Bf-PDB-CO-2 forneceu um maior número de destruxinas por massa de extrato bruto produzido por *B. felina* em relação aos outros dois meios de cultura, podendo-se afirmar que esta condição é a melhor escolha para produção de destruxinas conhecidas e desconhecidas. Nas Tabelas 4.14 e 4.15 podem ser observadas as destruxinas conhecidas e desconhecidas, respectivamente, presentes nos meios de cultura MF, SBD e PDB.

Tabela 4.14. - Destruxinas conhecidas presentes nos três diferentes meios de crescimento de *B. felina*

Destruxinas conhecidas	P.M.	Meios de cultura		
		MF	SBD	PDB
Dtx A (12)	577			x
Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	x	x	x
desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29)	595	x	x	x
Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	x	x	x
Dtx C (34) ou Dtx D ₂ (35) ou hidroxidtx B (15)	609		x	x
Dtx E diol (37)	611	x		
hidroxihomoDtx B (38) ou Dtx D (39) ou roseotoxina C (40)	623	x		
Dtx Ed ₁ (30)	625	x		x
Dtx E cloroidrina (22)	629	x		x
Dtx D ₁ (32)	637		x	x
cloroidrina da dtx A ₄ (31)	643	x	x	
[Phe ³ -N-Me-Val ³] dtx B (20)	655	x	x	x
pseudoDtxB (17) ou pseudoDtxC (18)	669	x	x	x

P.M. = peso molecular

Tabela 4.15. - Destruxinas desconhecidas presentes nos três diferentes meios de crescimento de *B. felina*

Destruxinas desconhecidas (P.M.)	Meios de cultura		
	MF	SBD	PDB
539		x	x
553		x	x
567	x	x	x
588			x
610	x		
641		x	x

P.M. = peso molecular

Os espectros de massas das destruxinas conhecidas detectadas nos experimentos ótimos dos três diferentes meios de crescimento e dos padrões de destruxinas indicam a presença de uma molécula cationizada com sódio $[M+Na]^+$ juntamente com o íon pseudomolecular $[M+H]^+$. Tais dados nos permitem confirmar

a massa molecular das destruxinas detectadas. Isto também pôde ser observado nos espectros de massas das destruxinas desconhecidas, como mostram as Figuras 4.12 e 4.13:

Figura 4.12. Cromatograma da amostra Bf-PDB-CO-2-fr4 com detecção por espectrometria de massas (EM-ESI+).

Figura 4.13. Espectro de massas da amostra Bf-PDB-CO-2-fr4, picos 1, 2 e 3, [MS (ESI +), voltagem do cone = 30 V].

O pico 1 do cromatograma da amostra Bf-PDB-CO-2-fr4 ($t_R = 6,080$ min) refere-se à Dtx Ed₁ (P.M. = 624,8) e os picos 2 ($t_R = 7,239$ min) e 3 ($t_R = 7,944$) são destruxinas desconhecidas de P.M. 587,7 e 538,8, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela 4.10, a fração 4 da condição Bf-PDB-CO-2 e a fração 4 da condição Bf-PDB-CO-3 apresentaram o maior número de destruxinas desconhecidas.

As condições ótimas 2 e 3 de crescimento do meio PDB mostram ser excelentes para produção de destruxinas conhecidas e desconhecidas. Isso porque enquanto a Bf-PDB-CO-2 apresentou um grande número de destruxinas conhecidas e desconhecidas em uma mesma fração (Bf-PDB-CO-2-fr4), a Bf-PDB-CO-3 apresentou destruxinas conhecidas e desconhecidas nas frações 3 e 4 de EFS e no extrato metanólico do micélio do fungo.

Após a análise das destruxinas presentes nos três diferentes meios de cultivo, foi realizado o isolamento e purificação das destruxinas por CLAD-DAD da fração 3 do experimento Bf-MF-CO-2. Esta amostra apresentou o seguinte perfil cromatográfico:

Figura 4.14. Cromatograma da amostra Bf-MF-CO-2-fr3 (MeOH/H₂O 75:25) realizado em uma coluna semi preparativa de fase reversa C₁₈ CSC-Inertsil, eluída com MeOH/ACN/H₂O 35: 35: 30 com 0,1 % de TFA (ácido trifluoracético) em cada um dos solventes, por 60 min com fluxo de 1 mL/min em $\lambda = 254$ nm.

As massas das frações da amostra Bf-MF-CO-2-fr3 obtidas por CLAD, foram as seguintes:

Tabela 4.16. - Massa das frações da amostra Bf-MF-CO-2-fr3

Picos	Código	Massa (mg)	Substância	P.M.
1	Bf-MF-CO-2-fr3-P1	5,2	desconhecida/Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou rosetoxina A (26)/[Phe ³ ,N-Me-Val ⁵] Dtx B (20) /pseudoDtx B (17) ou pseudoDtx C (18)	567/607/655/669
2	Bf-MF-CO-2-fr3-P2	7,5	Dtx Ed ₁ (30)/[Phe ³ ,N-Me-Val ⁵] Dtx B (20)/pseudoDtx B (17) ou pseudoDtx C (18)	625/655/669
3	Bf-MF-CO-2-fr3-P3	3,1	Dtx Ed ₁ (30)/Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou rosetoxina A (26)/[Phe ³ ,N-Me-Val ⁵] Dtx B (20)	625/607/655
4	Bf-MF-CO-2-fr3-P4	16,9	cloridrina Dtx A ₄ (31)	643
5	Bf-MF-CO-2-fr3-P5	3,6	Dtx A (12)	577
6	Bf-MF-CO-2-fr3-P6	8,1	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591
7	Bf-MF-CO-2-fr3-P7	2,3	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)/Dtx B (14) ou Dtx E (21)	591/593
8	Bf-MF-CO-2-fr3-P8	1,6	desconhecida/Dtx B (14) ou Dtx E (21)	567/593
9	Bf-MF-CO-2-fr3-P9	3,4	desconhecida/Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou rosetoxina A (26)	567/607
10	Bf-MF-CO-2-fr3-P10	3,7	[Phe ³ ,N-Me-Val ⁵] Dtx B (20)	655

P.M. = peso molecular

As frações geradas durante o fracionamento da amostra por CLAD foram analisadas por CLAD-DAD-DELE-EM a fim de verificarmos seu grau de pureza. Após as análises cromatográficas, foi observado que quase todas as frações não estavam puras sendo necessária a sua re-purificação, com exceção das frações Bf-MF-CO-2-fr3-P4; Bf-MF-CO-2-fr3-P5, Bf-MF-CO-2-fr3-P6 e Bf-MF-CO-2-fr3-P10.

As amostras de interesse são as frações que apresentaram destruxinas desconhecidas. Estas substâncias também estavam presentes na amostra que foi ativa contra *H. contortus* (Capítulo 6).

Capítulo V

*Otimização e validação de um
método cromatográfico para análise de
destruxinas produzidas por B. felina por
CLAD-DAD-DELE-EM*

5.1. Metodologia

5.1.1. Otimização de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por *B. felina* por CLAD-DAD-DELE-EM

Para a otimização das condições das análises cromatográficas foram utilizadas as amostras obtidas dos seguintes experimentos de crescimento em meio MF: condições ótimas de crescimento 1 e 3 nas frações 3 e 4 (Bf-MF-CO-1-fr3; Bf-MF-CO-1-fr4; Bf-MF-CO-3-fr3; Bf-MF-CO-3-fr4) e condição ótima 2 na fração 4 (Bf-MF-CO-2-fr4) de *B. felina*. Estas amostras foram analisadas por CLAD-DAD-DELE-EM e a aquisição de dados e o processamento foram realizados utilizando-se o software Empower 2.0.

Foram testadas diversas proporções de solventes MeOH/H₂O, MeCN/H₂O e MeOH/MeCN/H₂O no modo gradiente, diferentes volumes de injeção e tempos de corrida. Em todas as misturas de solventes foi adicionado 0,1 % de ácido fórmico para facilitar a reação de protonação das moléculas de destruxinas que ocorre no capilar do “electrospray” do espectrômetro de massas. As amostras foram injetadas na concentração de 1 mg/mL. Foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ da marca Phenomenex® (Synergi 4 μ Fusion - RP 80, 25 x 4,60 mm) e uma coluna analítica C₁₈ X-terra Waters® (3,5 μ m de tamanho de partícula, 2,1 x 50 mm). A seguir estão especificadas somente as condições de análise mais significativas: Condição de Análise Cromatográfica I, II e III para cada um dos detectores.

- 1) Para o espectrômetro de massas foram utilizadas as seguintes condições: Capillary (Kv) = 3.0; Cone (V) = 30; Extractor (V) = 3; Source temp. (°C) = 100; Desolvation temp. (°C) = 350. Gas flow: desolvation (L/hr): 350 e cone (L/hr) = 50.
- 2) No detector por espalhamento de luz evaporativo (DELE) foi usado: Gain: 150; Gas: 50 psi; Nebulizer: 60% e Drift tube: 50° C (Cond. Anal. Cromat. I) e 75° C (Cond. Anal. Cromat. II e III).
- 3) As destruxinas foram observadas em UV-Visível $\lambda = 254$ nm (Cond. Anal. Cromat. I) e $\lambda = 205$ nm (Cond. Anal. Cromat. II e III). A amostra foi injetada em um volume de 50 μ L (Cond. Anal. Cromat. I) e 20 μ L (Cond. Anal. Cromat. II e III).

As Tabelas 5.1, 5.2 e 5.3 mostram os gradientes das três condições de análise: I, II e III.

Tabela 5.1. - Gradiente de análise cromatográfica I utilizando uma coluna C₁₈ Phenomenex®

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	MeOH (%)	H ₂ O (%)	Curva
-	1	5	95	-
1	1	5	95	3
25	1	95	5	4
35	1	5	95	1
40	1	5	95	1

Tabela 5.2. - Gradiente de análise cromatográfica II utilizando uma coluna C₁₈ Phenomenex®

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	MeOH (%)	MeCN (%)	H ₂ O (%)	Curva
-	1	25	25	50	-
1	1	25	25	50	6
20	1	50	50	0	6
25	1	25	25	50	6
30	1	25	25	50	6

Tabela 5.3. - Gradiente de análise cromatográfica III utilizando uma coluna C₁₈ X-terra®

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	MeOH (%)	MeCN (%)	H ₂ O (%)	Curva
-	0,5	5	5	90	-
1	0,5	5	5	90	6
20	0,5	50	50	0	6
25	0,5	5	5	90	6
30	0,5	5	5	90	6

5.1.2. Validação de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por *B. felina*

O protocolo de validação foi realizado seguindo os procedimentos da literatura (BANDEIRA; CAVALHEIRO, 2009) e as normas propostas pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Foram definidos critérios de aceitação para os seguintes parâmetros: seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e estabilidade.

5.1.2.1. Condições cromatográficas

No sistema CLAD-DAD-DELE-EM foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ X-terra Waters® (3,5 µm de tamanho de partícula, 2,1 x 50 mm). A fase móvel foi composta de MeOH/MeCN/H₂O com 0,1 % de ácido fórmico em cada um dos solventes. A análise foi realizada em um sistema gradiente em um fluxo de 0,5 mL/min (Tabela 5.3). Foram obtidos espectros no UV registrados entre 200 e 400 nm e o comprimento de onda específico foi de 205 nm. As condições utilizadas no espectrômetro de massas e no detector por espalhamento de luz evaporativo estão descritas no Tópico 5.1.1. Foi injetada no sistema uma alíquota de 20 µL e as análises foram realizadas a 20 °C.

5.1.2.2. Preparação dos padrões e das amostras

Os padrões de destruxinas pseudodestruxina C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**) foram pesadas e dissolvidas em MeOH grau CLAD na concentração de 1,0 mg/mL.

As cinco amostras Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4 obtidas dos experimentos de crescimento em meio MF (conforme metodologia descrita no Capítulo 4, Tópico 4.1.2 a 4.1.6) foram secas, pesadas com precisão e as soluções foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL utilizando-se como solvente MeOH grau cromatográfico. As soluções foram mantidas em frascos fechados e refrigerados a 20 °C.

A [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**), presente em cada uma das amostras foi utilizada como padrão interno.

5.1.2.3. Identificação dos picos

Destruxinas isobáricas foram identificadas através da análise dos espectros de massas (EM) e comparação com os tempos de retenção dos padrões e dados da literatura (PEDRAS et al., 2002).

5.1.2.4. Parâmetros validados

A validação do método cromatográfico desenvolvido em CLAD-DAD-DELE-EM para análise de destruxinas produzidas por *B. felina* estabelecida neste trabalho envolveu os seguintes parâmetros: seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e estabilidade para as áreas dos picos dos cromatogramas e os tempos de retenção de cada destruxina presente nas diferentes amostras.

- **Seletividade**

Em métodos cromatográficos são realizados testes de pureza de picos para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA, 2003). Isso pode ser feito com o auxílio de detector de arranjo de diodos e por espectrometria de massas.

A pureza do pico do padrão interno [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**) e de cada pico cromatográfico das amostras Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4, foi avaliada através da comparação dos

espectros de massas e de UV das amostras com os padrões de destruxinas pseudodestruína C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**) utilizando o software Empower (Waters Co.).

- **Precisão**

A precisão de um procedimento analítico expressa a aproximação de resultados de uma série de medidas obtidas de uma amostra (ANVISA, 2003). A precisão foi calculada através da avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária em um nível de concentração (1 mg / mL) para cada análise.

Na avaliação da repetibilidade (precisão intra-dia) as amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia. Na avaliação da precisão intermediária (precisão inter-dia) as amostras foram analisadas em triplicata em três dias consecutivos.

A precisão foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) da área do pico relativa (área do pico dos analitos/área do pico do padrão interno) e do tempo de retenção relativo (tempo de retenção dos analitos/tempo de retenção do padrão interno) utilizando o padrão interno. A precisão também foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) da área do pico e do tempo de retenção dos analitos sem a utilização do padrão interno.

- **Estabilidade**

A estabilidade da amostra foi avaliada em um nível de concentração (1,0 mg/mL), em triplicata, em intervalos regulares de 24 e 48 h. Durante esse período as amostras foram armazenadas a 20 °C. Os resultados estão apresentados em anexo.

5.2. Resultados e Discussão

5.2.1. Otimização de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por *B. felina* por CLAD-DAD-DELE-EM

O uso de um detector com absorção no ultravioleta (UV), a técnica preferida para a cromatografia líquida de alto desempenho (CLAD), torna-se problemático quando deve analisar compostos que possuem grupos cromóforos com absorção muito baixa no UV. Se a mudança do comprimento de onda não resolver o problema, ou os compostos de interesse devem ser derivatizados com o objetivo de aumentar sua absorção no UV, ou deverá ser utilizada uma técnica alternativa de detecção (GANZERA et al., 2005).

Diversos tipos de destruxinas não possuem grupos cromóforos e, portanto, não tem absorção no UV. Por este motivo foi usado o detector por espalhamento de luz evaporativo (DELE) que foi eficaz na detecção de diferentes destruxinas. O uso desse detector é inédito para a análise de extratos brutos isolados de *B. felina*, permitindo distinguir diferentes tipos de destruxinas, sendo de extrema importância para a análise destas amostras.

Após as análises, os cromatogramas obtidos de todas as diferentes condições de análise foram comparados entre si. Como por exemplo, podem ser observados, primeiramente, os cromatogramas da condição ótima 1 - fração 4 do meio MF (Bf-MF-CO-1-fr4) analisados em 3 diferentes condições de análises cromatográficas dos procedimentos de otimização: Cond. Anal. Cromat. I, II e III.

- Cromatogramas das condições de análise cromatográfica I da condição Bf-MF-CO-1-fração 4:

Figura 5.1. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD), $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$.

Figura 5.2. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por espalhamento de luz evaporativo (DELE).

Figura 5.3. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (EM).

Figura 5.4. Espectro de massas da Bf-MF-CO-1-fração 4, pico 6 [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V].

- Cromatogramas das condições de análise cromatográfica II da condição Bf-MF-CO-1-fração 4:

Figura 5.5. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD), $\lambda_{\text{máx}} = 205 \text{ nm}$.

Figura 5.6. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por espalhamento de luz evaporativo (DELE).

Figura 5.7. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (MS).

Figura 5.8. Espectros de massas da Bf-MF-CO-1-fração 4, picos 6a e 6b, [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V].

De maneira geral, os cromatogramas obtidos com a condição inicial (I) mostram picos muito juntos e com pouca definição na linha de base do cromatograma com detecção por UV (Figura 5.1). Para a condição de análise intermediária (II) pode-se observar picos com uma melhor separação e definição

utilizando os 3 tipos de detectores. Também pode ser observado uma maior variedade de picos na condição de análise intermediária (II) em relação a condição de análise inicial (I).

Diferentes tipos de destruxinas que apresentaram o mesmo tempo de retenção na condição inicial (I), apresentaram-se separadas na condição intermediária (II). A Figura 5.4 mostra o espectro de massas do pico 6 com dois tipos de destruxinas, a destruxina C₂ ou destruxina F ou desmetildestruxina C (isobáricas, P.M. 595) e a pseudodestruxina B ou pseudodestruxina C (isobáricas, P.M. 669), analisados na condição inicial (I). Já a Figura 5.8 mostra os espectros destas mesmas destruxinas (pico 6a e pico 6b), agora separadas, com diferentes tempos de retenção.

Comparando-se com a condição de análise final (III) foi possível observar outras destruxinas, além daquelas já detectadas nas condições anteriores, como mostram as Figuras 5.9 a 5.11, a seguir:

- Cromatogramas das condições de análise cromatográfica III da condição Bf-MF-CO-1-fração 4

Figura 5.9. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD), $\lambda_{\text{máx}} = 205 \text{ nm}$.

Figura 5.10. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por espalhamento de luz evaporativo (DELE).

Figura 5.11. Cromatograma da Bf-MF-CO-1-fração 4 com detecção por espectrometria de massas (MS).

Podemos observar que as substâncias presentes nos picos P6a e P6b das Figuras 5.5 a 5.7 aparecem juntas no pico P6ab das Figuras 5.9 a 5.11. Porém, foi possível observar o aparecimento de mais 3 picos nos cromatogramas de DAD-UV e EM nas Figuras 5.9 e 5.10. Estes 3 picos a mais são referentes a: P2a – desconhecida (P.M. 645); P6c – hidroxidestruxina B ou Dtx C ou Dtx D₂ (isobáricas, P.M. 609) e P7a – Dtx D₁ (P.M. 637).

A Tabela 5.4 mostra as substâncias que puderam ser observadas na amostra Bf-MF-CO-1-fr4 em cada uma das diferentes condições cromatográficas de análise.

Tabela 5.4. – Substâncias observadas na amostra Bf-MF-CO-1-fr4 nas condições de análises cromatográficas I, II e III

Substâncias	P.M.	Picos		
		Cond. Anal. Cromat. I	Cond. Anal. Cromat. II	Cond. Anal. Cromat. III
Dtx Ed ₁ (30)	625	P1	P1	P1
desconhecida	645	-	-	P2a
Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	-	P2a	P2b
cloroidrina da Dtx A ₄ (31)	643	P2	P2b	P2c
Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	P3	P3	P3
desconhecida	567	P4	P4a	P4a
Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607		P4b	P4b
[Phe ³ -N-Me-Val ⁹] Dtx B (20)	655	P5	P5	P5
desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29)	595	P6	P6a	P6ab
pseudoDtx B (17) ou pseudoDtx C (18)	669		P6b	
Dtx C (34) ou Dtx D ₂ (35) ou hidroxiDtx B (15)	609	-	-	P6c
Dtx D ₁ (32)	637	-	-	P7a
desconhecida	601	P7	P7	P7b

P.M. = peso molecular

A análise de todos os cromatogramas permitiu observar 9 substâncias e 7 picos para a Cond. Anal. Cromat. I; 10 substâncias e 10 picos para a Cond. Anal. Cromat. II e 13 substâncias e 12 picos para a Cond. Anal. Cromat. III. A condição de análise cromatográfica III se mostrou melhor do que as demais, pois foi possível observar 3 novas substâncias além daquelas já detectadas na primeira análise: desconhecida (P.M. 645); hidroxiDtx B ou dtx C ou dtx D₂ (isobáricas, P.M. 609) e a destruxina D₁ (P.M. 637).

A escolha da curva de alteração da proporção dos solventes no gradiente foi eficaz para a separação dos compostos. A curva 6 utilizada altera de maneira linear a proporção dos solventes da fase móvel ao decorrer do tempo de corrida de análises das amostras.

O uso de acetonitrila na fase móvel foi essencial para uma melhor otimização da separação das destruxinas, pois manteve a força dos solventes constante. Em cromatografia em fase reversa a força do solvente aumenta com o decréscimo da polaridade do solvente. Assim, água (solvente mais fraco) < metanol < acetonitrila. Além disso, a acetonitrila pode ser usada em uma baixa faixa de absorção no UV (CASS et al., 2001), como pode ser observado no caso das destruxinas.

A condição cromatográfica otimizada foi utilizada para a análise de diferentes amostras com o intuito de observar diferentes destruxinas, bem como no auxílio para o seu posterior isolamento e purificação, tornando-se mais fácil a separação de diversos picos em uma mesma amostra. Os padrões de destruxinas também foram submetidos a análises cromatográficas na condição otimizada, como se mostra a seguir:

Figura 5.12. Cromatogramas dos padrões de destruxinas com detecção por espectrometria de massas (EM), analisados sob condição cromatográfica final. Picos: (1) roseotoxina B; (2) [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B; (3) pseudodestruxina C.

Figura 5.13. Espectros de massas dos padrões de destruxinas: (A) roseotoxina B; (B) [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B; (C) pseudodestruxina C. [EM (ESI +), voltagem do cone = 30 V].

Nos espectros de massas dos padrões de roseotoxina B (P.M. 591), [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B (P.M. 655) e pseudodestruxina C (P.M. 669), Figura 5.13, podemos observar a geração de uma molécula cationizada com sódio [M+Na]⁺ em m/z 614,5 juntamente com o íon pseudomolecular [M+H]⁺ em m/z 592,5 para a roseotoxina B, em m/z 678,5 e 656,5 para a [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B e em m/z 692,6 e 670,5 para a pseudodestruxina C. Isto também foi observado nos espectros de massas das destruxinas detectadas em todos os experimentos. Por exemplo, nos espectros de massas da Figura 5.8, em P6a é possível observar um íon pseudomolecular ([M+H]⁺) igual a m/z 596,4, e a molécula cationizada com sódio com íon molecular de m/z 618,4.

A Tabela 5.5 mostra todas as substâncias detectadas em todas as amostras analisadas nas 3 diferentes condições cromatográficas de análise.

Tabela 5.5. – Substâncias observadas nas amostras Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4 nas condições de análises cromatográficas I, II e III

Substâncias	P.M.	Cond. Anal. Cromat. I	Cond. Anal. Cromat. II	Cond. Anal. Cromat. III
desconhecida	679		x	x
Dtx E diol (37)	611	x	x	x
desconhecida	610	x		
Dtx Ed ₁ (30)	625	x	x	x
desconhecida	645			x
Dtx E cloroidrina (22)	629			x
cloroidrina da Dtx A ₄ (31)	643	x	x	x
Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591	x	x	x
desconhecida	687			x
desconhecida	567	x	x	x
Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607	x	x	x
[Phe ³ -N-Me-Val ²] Dtx B (20)	655	x	x	x
desmetilDtx C (27) ou Dtx F (28) ou Dtx C ₂ (29)	595	x	x	x
pseudoDtx B (17) ou pseudoDtx C (18)	669	x	x	x
desconhecida	556			x
desconhecida	627			x
desconhecida	578			x
Dtx C (34) ou Dtx D ₂ (35) ou hidroxíDtx B (15)	609			x
Dtx D ₁ (32)	637			x
desconhecida	601	x	x	x

P.M. = peso molecular

Pôde-se notar que na Cond. Anal. Cromat. I e II foram detectadas 11 substâncias, sendo 8 destruxinas conhecidas e 3 desconhecidas. Já na Cond. Anal. Cromat. III foram observadas 19 substâncias, onde 11 delas são destruxinas conhecidas e 8 são desconhecidas. Isso mostra que esta foi a melhor condição cromatográfica de análise para a detecção de destruxinas conhecidas e desconhecidas.

A análise dos cromatogramas e uma busca no banco de dados Scinfinder permitiu observar diferentes tipos de destruxinas que não foram anteriormente isoladas de *B. felina* (VITA-MARQUES et al., 2008; LIRA et al., 2006) como, por exemplo, as destruxinas (Dtx): Dtx B₁ (**23**) ou Dtx E₁ (**24**) ou homoDtx B (**25**) ou roseotoxina A (**26**) - todas isobáricas, P.M. 607; desmetilDtx C (**27**) ou Dtx F (**28**) ou Dtx C₂ (**29**) - isobáricas entre si, P.M. 595; Dtx E diol (**37**) - P.M. 611; Dtx Ed₁ (**30**) - P.M. 625; cloroidrina da Dtx A₄ (**31**) - P.M. 643; Dtx C (**34**) ou Dtx D₂ (**35**) ou hidroxidtx B (**15**) - isobáricas, P.M. 609 e Dtx D₁ (**32**) - P.M. 637. Também pôde-se observar destruxinas desconhecidas, como por exemplo, as de massa molecular 679, 610, 645, 687, 567, 556, 627, 578 e 601.

A otimização das condições de crescimento e produção de destruxinas por *B. felina* e a otimização das condições cromatográficas de análises das destruxinas, proporcionaram a detecção de compostos majoritários e minoritários em quantidades suficientes para se realizar isolamento e purificação, bem como a observação de picos mais intensos e mais bem definidos nos cromatogramas de UV.

A Cond. Anal. Cromat. III possibilitou uma detecção de maiores quantidades de destruxinas conhecidas e desconhecidas em relação às demais condições cromatográficas de análise. A utilização de uma coluna analítica pequena acoplada a uma menor taxa de fluxo não comprometeu a resolução e mostrou que pode reduzir significativamente o consumo de solventes para análises em CLAD.

5.2.2. Validação de método cromatográfico para análise de destruxinas produzidas por *B. felina*

- **Seletividade**

A seletividade foi avaliada pela medida da pureza do pico dos padrões de destruxinas pseudodestruína C (**18**); roseotoxina B (**19**) e [Phe³-N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**) nas frações Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4 com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos e do espectrômetro de massas. A pureza do pico foi confirmada por uma análise cuidadosa dos espectros UV e de EM de todos os picos cromatográficos e nenhuma interferência foi observada.

Como por exemplo, na Figura 5.14, pôde-se observar a presença dos padrões de destruxinas no cromatograma da amostra Bf-MF-CO-1-fr4. Isto pôde ser confirmado pela comparação dos espectros de massas dos padrões com os espectros de massas da amostra.

Figura 5.14. Espectros de massas dos picos de (1) roseotoxina B, (2) $[Phe^3, N-Me-Val^5]$ destruxina B e (3) pseudodestruxina C em: (a) cromatograma da amostra Bf-MF-CO-1-fr4; (b) cromatograma da roseotoxina B; (c) cromatograma da $[Phe^3, N-Me-Val^5]$ destruxina B; (d) cromatograma da pseudodestruxina C.

- **Precisão**

Para a repetibilidade, onde as amostras foram analisadas em triplicata no mesmo dia ($N = 3$), o desvio padrão relativo (DPR) para a área do pico não ultrapassou 5,68 % (detector de UV) e para o tempo de retenção o DPR não ultrapassou 1,52 % (detector de EM), ao nível de concentração de 1 mg/mL utilizando o padrão interno [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**). Sem o uso do padrão interno, o desvio padrão relativo (DPR) para a área do pico não ultrapassou 4,34 % (detector de UV) e para o tempo de retenção o DPR não ultrapassou 1,17 % (detector de EM).

Na avaliação da precisão intermediária, para as medições realizadas durante três dias consecutivos ($N = 9$), o DPR para a área do pico não ultrapassou 5,66 % (detector de UV) e para o tempo de retenção o DPR não ultrapassou 1,01 % (detector de EM), quando foi calculado ao nível de concentração de 1 mg/mL para o padrão interno [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**). Sem o uso do padrão interno, o DPR para a área não ultrapassou 5,57 % (detector EM) e para o tempo de retenção o DPR não ultrapassou 1,07 % (detector de EM) ao nível de concentração de 1 mg/mL.

Os valores de DPR para a repetibilidade e para a precisão intermediária utilizando os valores de tempo de retenção estão dentro do critério de aceitação (ANVISA, $\text{DPR} \leq 5\%$). Já os valores de valores de DPR para a repetibilidade e para a precisão intermediária utilizando as áreas dos picos dos cromatogramas das frações são ligeiramente superiores aos valores aceitos pelo critério de alto padrão de qualidade (ANVISA, $\text{DPR} \leq 5\%$).

- **Estabilidade**

As amostras Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4 permaneceram estáveis em 48 h com DPR para a área do pico de 5,36 % (detector de UV) e DPR de 0,90 % (detector EM) para o tempo de retenção utilizando o padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**). Sem a utilização do padrão interno, as amostras permaneceram estáveis em 48 h (ANVISA, DPR ≤ 5 %) com DPR para a área do pico de 4,95 % (detector de EM) e DPR de 0,84 % (detector EM) para o tempo de retenção (XI et al., 2005).

A estabilidade também pôde ser observada comparando o comportamento das substâncias dentro da amostra dia-a-dia, para isso foi aplicado um teste t de Student (CAMARGO, 2008), como mostram as Figuras 5.15 e 5.16. O gráfico da Figura 5.15 relaciona a média e o desvio padrão da área do pico do cromatograma de UV de cada uma das substâncias presentes na amostra Bf-MF-CO-3-fr4 em três dias de análise em intervalos regulares de 0, 24 e 48 h utilizando a [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (**20**) como pico de referência. A Figura 5.16 relaciona a média e o desvio padrão da área do pico do cromatograma de EM de cada uma das substâncias presentes na amostra Bf-MF-CO-2-fr4 em três dias de análise em intervalos regulares de 0, 24 e 48 h sem a utilização do pico de referência.

Figura 5.15. Estabilidade para as substâncias presentes na amostra Bf-MF-CO-3-fr4 em intervalos regulares de 24 h em três dias de análise utilizando [Phe³,N-Me-Val⁵] destruxina B (11) como padrão interno.

Figura 5.16. Estabilidade para as substâncias presentes na amostra Bf-MF-CO-2-fr4 em intervalos regulares de 24 h em três dias de análise sem a utilização do padrão interno.

Os resultados globais obtidos mostraram boa concordância da seletividade, precisão e estabilidade, para as amostras analisadas com detectores de arranjo de diodos, espalhamento de luz evaporativo e de espectrometria de massas. Portanto, nosso método pôde ser convenientemente validado.

A Tabela 5.6 relaciona o nome, o peso molecular e aduto de Na de todas as substâncias observadas nas amostras Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4 utilizadas para a validação do método cromatográfico.

Tabela 5.6. – Substâncias observadas nos espectros de massas das amostras Bf-MF-CO-1-fr3, Bf-MF-CO-1-fr4, Bf-MF-CO-2-fr4, Bf-MF-CO-3-fr3 e Bf-MF-CO-3-fr4

Substância	Nome	P.M.	[M+Na] ⁺
1	destruxina E diol (37)	611	634
2	destruxina Ed ₁ (30)	625	648
3	cloroidrina da destruxina A ₄ (31)	643	666
4	destruxina A ₁ (36)	591	614
5	destruxina A ₄ (13)	591	614
6	roseotoxina B (19)	591	614
7	destruxina B ₁ (23)	607	630
8	destruxina E ₁ (24)	607	630
9	homodestruxina B (25)	607	630
10	roseotoxina A (26)	607	630
11	[Phe ³ , N-Me-Val ^b] destruxina B (20)	655	678
12	pseudodestruxina B (17)	669	691
13	pseudodestruxina C (18)	669	691
14	destruxina C ₂ (29)	595	618
15	desmetildestruxina C (27)	595	618
16	destruxina F (28)	595	618
17	hidroxidestruxina B (15)	609	632
18	destruxina C (34)	609	632
19	destruxina D ₂ (35)	609	632
20	destruxina D ₁ (32)	637	660
21	destruxina E cloroidrina (22)	629	652
22	desconhecida	645	-
23	desconhecida	601	624
24	desconhecida	627	650
25	desconhecida	556	579
26	desconhecida	567	590
27	desconhecida	687	710
28	desconhecida	679	-
29	desconhecida	578	-

P.M. = peso molecular

Capítulo VI

*Análise de frações contendo destruxinas
em bioensaios de ação carrapaticida e
vermífuga*

6.1. Zoonoses em bovinos, caprinos e ovinos

6.1.1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um carrapato que tem os bovinos como seus principais hospedeiros. Possui grande importância econômica nas áreas tropicais do mundo, onde é encontrado em alta prevalência e causa redução no ganho de peso e na produção de leite. No Brasil, as perdas econômicas devido a este parasito estão estimadas em 2 bilhões de dólares por ano e existe grande preocupação quanto à possibilidade da permanência de resíduos de carrapaticidas no ambiente e em alimentos, especialmente no leite. A resistência crescente de *R. microplus* aos carrapaticidas comerciais disponíveis para seu controle, a demanda dos consumidores por carne e leite sem resíduos químicos e a procura por produtos seguros para o meio ambiente têm acelerado a busca por pesticidas biodegradáveis (BORGES et al., 2005).

Os carrapaticidas constituem o principal mecanismo de controle do carrapato, particularmente do *R. microplus*. Os inseticidas e acaricidas provocam certo grau de poluição ambiental, sendo prejudiciais à vida aquática. Resíduos de acaricidas no leite e/ou carne constituem um problema universal e de grande importância na saúde pública e sua presença interfere na comercialização de produtos de origem animal (CHAGAS et al., 2002).

Os produtos naturais podem ser de potencial interesse no combate às pestes. Primeiro porque, graças à diversidade de tipos estruturais, constituem fonte rica de compostos a serem pesquisados em testes biológicos de triagem (“screening”). Segundo porque o conhecimento sobre sua atividade biológica pode

levar à aplicação direta do próprio produto natural ou de produtos resultantes de modificações estruturais. Terceiro porque conhecer e compreender a função de um produto químico na natureza pode levar a novas estratégias no manejo de pragas (CHAGAS et al., 2002).

São frequentemente utilizados extratos brutos de plantas, como por exemplo: óleos essenciais da leguminosa *Stylosanthes*, a cânfora presente em algumas plantas como o *Cinnamomum camphora* (CHAGAS et al., 2002). Porém não há relatos na literatura da eficácia carrapaticida de destruxinas contra *R. microplus*.

6.1.2. *Haemonchus contortus*

As nematodeoses gastrintestinais são consideradas um dos maiores entraves à caprinocultura e ovinocultura no Brasil. Os principais sintomas são debilidade, anemia severa e hipoproteïnemia, levando à perda da condição corporal do animal, queda na produtividade e eventualmente morte. A doença tende a ser mais intensa em animais jovens, mas os adultos também podem ser afetados severamente. *Haemonchus contortus* é considerado o principal problema nas criações por ser hematófago (CHAGAS; VIEIRA, 2007).

Os parasitas possuem grande capacidade de multiplicação e adaptação ao meio ambiente, permanecendo por meses nas pastagens ainda com capacidade infectante. Além disso, em condições ambientais adversas a hipobiose é utilizada como estratégia de sobrevivência. A larva do parasita diminui a sua atividade no organismo do hospedeiro, devido às condições imunológicas apresentadas pelo animal parasitado, esperando assim uma diminuição da imunidade para voltar a sua

atividade normal (CHAGAS; VIEIRA, 2007). O controle tem sido realizado utilizando-se o uso contínuo e intensivo de anti-helmínticos sintéticos. No entanto, o alto custo desses medicamentos e o desenvolvimento de populações resistentes ao nematóide, juntamente com o risco de contaminação dos produtos de origem animal e do meio ambiente têm estimulado a busca de alternativas de controle (OLIVEIRA et al., 2009). Há duas décadas não surge um princípio ativo novo nas formulações comerciais. Desse modo tornou-se grande o interesse em buscar por novos vermífugos que sejam eficientes contra esse parasita (CHAGAS; VIEIRA, 2007).

6.2. Metodologia

As frações 3 (MeOH 75% e H₂O 25%) e 4 (MeOH 100%) obtidas dos experimentos de otimização realizados com o meio de cultura MF (Capítulo 4 – Tópico 4.1.3) foram reunidas para obtenção da quantidade mínima (10 mg) das destruxinas presentes nestas frações para serem enviadas para bioensaio de atividade vermífuga contra o verme *Haemonchus contortus* (nematóide gastrointestinal que ataca ovinos e caprinos) na Embrapa Pecuária Sudeste.

A amostra Exp1/19-fr3-MF enviada para o bioensaio de atividade carrapaticida foi obtida através da reunião da fração 3 (MeOH 75% e H₂O 25%) dos experimentos de otimização realizados com o meio de cultura MF. Esta amostra foi purificada por CLAD-DAD utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ eluída com MeOH/MeCN/H₂O 38 : 37 : 25 com 0,1 % de ácido fórmico em cada um dos solventes, por 40 min com fluxo de 1 mL/min, observada em 220 nm. Foram obtidas 13 frações (P1 a P13) que foram analisadas por RMN-¹H em 400 MHz para sua caracterização estrutural, e 11 delas foram enviadas para testes contra o carrapato

bovino *R. microplus* na Embrapa Pecuária Sudeste, de onde 7 frações foram analisadas: Exp1/19-fr3-MF-**P1**; Exp1/19-fr3-MF-**P2**; Exp1/19-fr3-MF-**P4**; Exp1/19-fr3-MF-**P5**; Exp1/19-fr3-MF-**P6**; Exp1/19-fr3-MF-**P7** e Exp1/19-fr3-MF-**P8**.

Para o bioensaio foram usadas fêmeas ingurgitadas de carrapato. Estas foram pesadas em grupos de 10 e cada grupo foi submetido à imersão por 5 minutos em duplicata em cada uma das 7 frações analisadas (0,2 mg/mL, exceto P4: 0,1 mg/mL). As amostras contendo destruxinas foram solubilizadas em Tween 80 a 2% e água destilada, e o controle também foi constituído dessa forma. Os grupos foram colocados em estufa climatizada ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e umidade de 80%), os ovos foram pesados e a eclodibilidade verificada visualmente.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Atividade vermífuga contra *H. contortus*

As frações 3 (MeOH/H₂O 75 : 25) e 4 (MeOH 100 %) dos 19 experimentos de otimização realizados com o meio de cultura MF (Exp1/19-MF) foram reunidas e enviadas para bioensaio de atividade vermífuga contra o verme *H. contortus*. Foram obtidos os seguintes resultados: a fração 3 apresentou 98 % de eficácia no bioensaio, mostrando ser ativa contra o verme e a fração 4 não apresentou atividade.

Estas frações foram analisadas por CLAD-DAD-DELE-EM para verificar quais destruxinas estão presentes nas duas amostras (fração 3: ativa; fração 4: inativa) e em que proporções relativas. A partir da análise dos cromatogramas, foram detectadas destruxinas conhecidas e desconhecidas (P.M. 657 e P.M.567) na fração

ativa, bem como outros tipos de substâncias. As destruxinas presentes nas frações 3 e 4 são:

1. Destruxinas presentes na fração 3 (ativa):

2. Destruxinas presentes na fração 4 (inativa):

Tabela 6.1. - Destruxinas desconhecidas

Massa Molecular
647
639
673
687
601

3. Destruxinas presentes nas frações 3 (ativa) e 4 (inativa):

Foram observadas duas destruxinas desconhecidas de massa molecular 657 e 645.

A fração ativa foi purificada por CLAD-DAD e apresentou o seguinte perfil cromatográfico:

Figura 6.1. Cromatograma da amostra Exp1/19-MF-fr3 (MeOH/H₂O 75:25) realizado em uma coluna de fase reversa C₁₈ CSC-Inertsil 150A/ODS2 de dimensões 25 x 0,94 mm; 5 μ , eluída com MeOH/ACN/H₂O 38: 37: 25 com 0,1 % de ácido fórmico em cada um dos solventes, por 40 min com fluxo de 1 mL/min em λ = 220 nm.

As massas das frações da amostra Exp1/19-MF-fr3 obtidas por CLAD, foram as seguintes:

Tabela 6.2. - Massa das frações da amostra Exp1/19-MF-fr3

Picos	Código	Massa (mg)	Substância	P.M.
1	Exp1/19-MF-fr3-P1	12,0	Dtx Ed ₁ (30)/pseudoDtx B (17) ou pseudoDtx C (18)	625/669
2	Exp1/19-MF-fr3-P2	4,7	cloridrina da Dtx A ₄ (31)	643
3	Exp1/19-MF-fr3-P3	10,9	desconhecida	657
4	Exp1/19-MF-fr3-P4	2,2	Dtx E diol (37)	611
5	Exp1/19-MF-fr3-P5	9,4	Dtx Ed ₁ (30)	625
6	Exp1/19-MF-fr3-P6	2,7	desconhecida	645
7	Exp1/19-MF-fr3-P7	9,3	hidroxihomoDtx B (38) ou Dtx D (39) ou roseotoxina C (40)	623
8	Exp1/19-MF-fr3-P8	3,3	Dtx A (12)	577
9	Exp1/19-MF-fr3-P9	7,1	Dtx A ₁ (36) ou Dtx A ₄ (13) ou roseotoxina B (19)	591
10	Exp1/19-MF-fr3-P10	2,1	Dtx B (14) ou Dtx E (21)	593
11	Exp1/19-MF-fr3-P11	2,2	desconhecida	567
12	Exp1/19-MF-fr3-P12	1,7	Dtx B ₁ (23) ou Dtx E ₁ (24) ou homoDtx B (25) ou roseotoxina A (26)	607
13	Exp1/19-MF-fr3-P13	3,4	[Phe ³ -N-Me-Val ⁵] dtx B (20)	655

P.M. = peso molecular

As frações obtidas foram enviadas para análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H) em 400 MHz para posterior caracterização estrutural. Em seguida, cada uma das frações foi analisada por CLAD-DAD-DELE-EM a fim de verificarmos seu grau de pureza. Após as análises cromatográficas, foi observado que algumas frações não estavam puras sendo necessária a sua re-purificação.

As frações que apresentaram destruxinas desconhecidas foram re-purificadas e reenviadas para o bioensaio de atividade vermífuga a fim de se obter informações a respeito de qual das destruxinas isoladas é responsável pela atividade vermífuga.

As análises cromatográficas indicaram a presença de destruxinas presentes em ambas as frações (ativa e inativa). Desta forma pudemos verificar que as destruxinas [Phe³,N-Me-Val⁵] Dtx B, pseudoDtx B ou pseudoDtx C, Dtx B₁ ou Dtx E₁

ou homoDtx B ou rosetoxina A, a de massa molecular 657 e a homodescardina não são responsáveis pela atividade vermífuga. Dentre as 12 destruxinas observadas na fração ativa, restaram 8 destruxinas (Dtx Ed₁, cloridrato da Dtx A₄, Dtx E diol, Dtx D ou Hidroxi-homoDtx B ou roseotoxina C, Dtx A, Dtx A₁ ou Dtx A₄ ou rosetoxina B, Dtx B ou Dtx E e a de massa molecular 567) que poderiam ser responsáveis pela atividade vermífuga.

Por falta de amostras para se repetir o bioensaio de atividade vermífuga, as amostras enviadas foram submetidas ao bioensaio de atividade carrapaticida (método mais sensível).

6.3.2. Bioensaio de atividade carrapaticida contra *R. microplus*

A eficiência reprodutiva das fêmeas (REI) e a porcentagem eficácia carrapaticida das frações (EC) foram calculadas pelas fórmulas já padronizadas:

$$REI = \frac{\text{peso da massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20.0000}{\text{peso das fêmeas ingurgitadas}} \quad (1)$$

$$EC = \frac{REI \text{ do controle} - REI \text{ do tratamento}}{REI \text{ do controle}} \times 100 \quad (2)$$

A Tabela 6.3 mostra os valores dos pesos das fêmeas, os pesos dos ovos, a eclodibilidade e a eficiência reprodutiva das fêmeas de carrapato (REI) tanto das amostras analisadas, quanto do controle.

Tabela 6.3. - Verificação da eclodibilidade e da eficiência reprodutiva das fêmeas de carrapato (REI)

	Tratamento	Massa das amostras (mg)	17/12/2009 peso fêmeas (g)	04/01/2010 peso ovos (g)	14/01/2010 eclo	REI
1	controle	0	2,25	1,19	100	100
2	controle	0	2,21	1,008	95	86,7
média					97,5	93,35
3	P1	1	2,21	0,85	85	65,385
4	P1	1	2,23	0,857	85	65,332
média					85	65,358
5	P2	1	2,22	0,936	95	80,108
6	P2	1	2,21	0,868	95	74,624
média						77,366
7	P4	0,5	2,21	1,023	85	78,692
8	P4	0,5	2,21	0,961	90	78,271
média					87,5	78,482
9	P5	1	2,24	1	100	89,286
10	P5	1	2,22	1,008	95	86,270
média					97,5	87,778
11	P6	1	2,25	0,944	90	75,520
12	P6	1	2,24	0,912	95	77,357
média					92,5	76,439
13	P7	1	2,22	0,84	90	68,108
14	P7	1	2,23	0,726	100	65,112
média					95	66,610
15	P8	1	2,23	0,88	100	78,924
16	P8	1	2,27	0,875	100	77,093
média					100	78,008

Os valores destacados em amarelo correspondem ao controle obtidos pela fórmula (1). Com a média dos valores da REI do controle e do tratamento foram obtidos os valores da eficácia carrapaticida para cada uma das amostras através da fórmula (2) como pode ser observado na Tabela 6.4.

Tabela 6.4. - Eficácia carrapaticida do tratamento

Tratamento	Média REI (%)	EC (%)
controle	93,4	
P1	65,4	30
P2	77,4	17,1
P4	78,5	15,9
P5	87,8	6
P6	76,4	18,2
P7	66,6	28,7
P8	78,0	16,5

As frações P1 e P7 (destacadas em amarelo) foram as mais eficazes dentre as testadas. Estas frações correspondem as destruxinas: P1: destruxina Ed₁ (**30**) - P.M. 625 e pseudodestruxina B (**17**) ou pseudodestruxina C (**18**) – isobáricas, P.M. 669; P7: hidroxihomodestruxina B (**38**) ou destruxina D (**39**) ou roseotoxina C (**40**) – isobáricas, P.M. 623).

Estas amostras foram re-enviadas para o bioensaio de atividade carrapaticida para serem testadas em conjunto a fim de se potencializar a porcentagem de eficácia carrapaticida. Os resultados mostraram que a eficácia foi ainda menor.

O extrato bruto (Exp1/19-fr3-MF) que gerou as frações ativas não apresentou eficácia carrapaticida. Isso mostra que o isolamento e a purificação do extrato bruto levou a obtenção de destruxinas purificadas em uma concentração suficiente para serem eficazes contra o carrapato bovino, uma vez que a diminuição na população de carrapatos por um fator de 30 % já é considerada uma diminuição de interesse comercial. Porém, o fato de frações enriquecidas em determinadas destruxinas não terem apresentado atividade carrapaticida indica que existe uma ação sinérgica destes compostos. A obtenção de quantidades adicionais destes compostos será necessária para realização de estudos posteriores sobre a ação vermífuga e carrapaticida das destruxinas.

Capítulo VII

Conclusões

Neste trabalho realizou-se a otimização das condições de crescimento e produção de destruxinas por *B. felina* com o uso de métodos de planejamento experimental e análise multivariada. Os resultados indicaram ser possível a observação de destruxinas minoritárias e destruxinas que não foram isoladas anteriormente para *B. felina*. Este foi o primeiro estudo deste tipo realizado para a produção de destruxinas.

As condições de crescimento estabelecidas pelos resultados das análises de interação de 1ª e 2ª ordem que foram realizadas em triplicata apresentaram pequenas variações entre si para uma mesma condição. Observou-se que o fungo se comportou de maneira semelhante dentro de repetições de uma mesma condição de crescimento, mostrando uma boa reprodutibilidade no crescimento e produção das destruxinas. Além disso as metodologias de extração e “clean-up” também apresentaram excelente reprodutibilidade.

Os meios de cultura PDB e SBD foram mais eficientes do que o meio MF para a produção de destruxinas conhecidas e desconhecidas, pois foi possível observar nestes dois meios de cultura a maioria das destruxinas observadas no meio MF, além de outras destruxinas desconhecidas não observadas nesse meio de cultura. A condição que apresentou um maior número de destruxinas desconhecidas (5) foi a condição ótima 2 do meio PDB.

A otimização e validação de um método cromatográfico para determinação simultânea de diferentes tipos de destruxinas por CLAD-DAD-DELE-EM, realizada com os experimentos ótimos 1, 2 e 3 (frações 3 e 4) dos experimentos de otimização do meio de cultura MF, indicou segurança analítica para avaliar esta classe de substâncias. A utilização de uma “mini” coluna analítica, associada a uma menor taxa de fluxo, não comprometeu a resolução da separação das destruxinas. Além

disso, o método utilizado permitiu reduzir significativamente o consumo de solventes para análises em CLAD, melhorou a separação destes compostos e auxiliou na identificação de diferentes tipos de destruxinas em misturas complexas de diversas amostras, facilitando o seu posterior isolamento.

O uso de acetonitrila como fase móvel, o aumento da temperatura do “drift tube” no detector por espalhamento de luz e a mudança na composição do gradiente e na curva de análise, foram fatores importantes para a detecção de destruxinas conhecidas e desconhecidas produzidas pelo fungo *B. felina*, permitindo distinguir os diferentes compostos presentes na amostra.

Desta forma, foram detectadas várias destruxinas previamente não isoladas de *B. felina* como, por exemplo, as destruxinas: Dtx B₁ ou Dtx E₁ ou homoDtx B ou roseotoxina A (isobáricas, P.M. 609); desmetilDtx C ou Dtx F ou Dtx C₂ (isobáricas, P.M. 595); Dtx E diol (P.M. 611); Dtx Ed₁ (P.M. 625); cloroidrina da Dtx A₄ (P.M. 643); hidroxidtx B ou Dtx C ou Dtx D₂ (isobáricas, P.M. 607) e Dtx D₁ (P.M. 637).

O uso do detector por espalhamento de luz evaporativo (DELE) é inédito para a análise de extratos brutos isolados de *B. felina*. Este detector foi eficaz na detecção de destruxinas conhecidas e desconhecidas mostrando que é uma boa técnica a ser utilizada para a análise desta classe de compostos, além de ser uma alternativa econômica, já que o laser de diodo do DELE é muito mais barato e tem uma vida útil muito maior do que as lâmpadas de UV utilizadas no detector de arranjo de diodo.

O método cromatográfico de análise foi validado com base nas normas da ANVISA e os parâmetros de seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e estabilidade estiveram dentro dos critérios de aceitação.

As destruxinas apresentam diversas atividades biológicas, porém não há relatos na literatura de atividade vermífuga contra *Haemonchus contortus* para extratos brutos do fungo *B. felina*, nem de atividade carrapaticida contra o carrapato bovino *Ripicephalus (Boophilus) microplus* para destruxinas purificadas. As destruxinas isoladas do fungo *B. felina* que apresentam atividade carrapaticida contra *Ripicephalus microplus* foram a destruxina Ed₁ (P.M.625) e pseudodestruxina B ou pseudodestruxina C (isobáricas, P.M. 669) e a destruxina D ou hidroxihomodestruxina B ou roseotoxina C (isobáricas, P.M. 623). Frações enriquecidas em determinadas destruxinas não apresentaram atividade carrapaticida, mostrando que existe ação sinérgica destes compostos. Seria necessária a obtenção de maiores quantidades destes compostos para a realização de estudos posteriores sobre a ação carrapaticida das destruxinas.

O presente trabalho, portanto, apresenta uma contribuição muito importante nos estudos realizados com destruxinas produzidas pelo fungo *Beauveria felina*, uma vez que este é o primeiro trabalho de otimização das condições de produção microbiológica de destruxinas por *B. felina* e da otimização e validação de um método cromatográfico de utilizando a técnica hifenada CLAD-DAD-DELE-EM para análise desta classe de substâncias. Também, é a primeira vez que destruxinas isoladas do fungo *B. felina* apresentaram atividade carrapaticida contra *Ripicephalus microplus*.

Tais resultados podem suscitar um incremento na utilização de *B. felina* no controle biológico de pragas agrícolas, uma vez que é possível se otimizar a produção de seus metabólitos secundários (destruxinas) e se utilizar um novo e eficiente método para o controle de qualidade da produção destas substâncias por *B. felina*.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 04 maio 2010.

BALASUBRAMANIAM, A. K.; NAGARAJAN, K. V.; PARAMASAMY, G. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1241–1247, 2001.

BANDEIRA, K. F.; CAVALHEIRO, A. J. An LC-DAD fingerprinting method for alkaloids, flavonoids and styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. **Chromatographia**, v. 70, p. 1455-1460, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. 480 p.

BAUTE, R.; DEFFIEUX, G.; MERLET, D.; BAUTE, M. A.; NEVEU, A. New insecticidal cyclodepsipeptides from the fungus *Isaria felina*. I. Production, isolation and insecticidal properties of Isariins B, C and D. **Journal of Antibiotics**, v. 34, p. 1261-1265, 1981.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINCEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 165-237, 2010.

BORGES, L. M. F.; FERRI, P. H.; SILVA, W. C.; SILVA, W. J.; MELO, L. S.; SOUZA, L. A. D.; SOARES, S. F.; FARIA, K. A.; GOMES, N. A.; MORI, A.; SILVA, N. F. Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (MELIACEAE) sobre *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) em bezerros infestados artificialmente. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, p. 53-59, 2005.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 143-163, 2004.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 447-459, 2002.

CAMARGO, K. F. B. **Variabilidade intraespecífica de estirilpironas em quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana*: avaliação da produção em diferentes órgãos e em extratos enzimáticos.** 2008. 245 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimentos de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação.** São Carlos: EdUFSCAR, 2001. p. 30.

CHAGAS, A. C. S.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J. Ação larvicide de derivados arilsulfonílicos da (+)- cânfora e da (+)- isopinocanfona sobre o carrapato *Boophilus microplus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 462-467, 2002.

CHAKRAVARTI, R.; SAHAI, V. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 481-486, 2002.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 49-55, 2007.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287-292, 2006.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 37-41, 2009.

FARIA, M. R.; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 18-21, 2001.

GATES, P. J.; SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; CAROLLO, C. A.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, N. P. Mass spectrometry ionisation techniques and applications for the analysis of organic compounds. **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**, p. 1-19, 2006.

GANZERA, M.; STUPPNER, H. Evaporative light scattering detector (ELSD) for the analysis of natural products. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 1, p. 135-144, 2005.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoeestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

HSIAO, Y. M.; KO, J. L. Determination of destruxins, cyclic peptide toxins, produced by different strains of *Metarhizium anisopliae* and their mutants induced by ethyl methane sulfonate and ultraviolet using HPLC method. **Toxicon**, v. 39, p. 837-841, 2001.

HU, Q. B.; REN, S. X.; WU, J. H.; CHANG, J. M.; MUSA, P. D. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. **Toxicon**, v. 48, p. 491-498, 2006.

JEGOROV, A.; HAVLICEK, V.; SEDMERA, P. Rapid screening of destruxins by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 274-280, 1998.

KAKEYA, H.; TAKAHASHI, J.; OKADA, G.; OSADA, H. Epolactaene, a novel neurotoxic compound in human neuroblastoma cells, produced by a marine fungus. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, p. 733-735, 1995.

KIM, H. S.; JUNG, M. H.; AHN, S.; LEE, C. W.; KIM, S. N.; OK, J. H. Structure elucidation of a new cyclic hexadepsipeptide from *Beauveria felina*. **Journal of Antibiotics**, v. 55, p. 598-601, 2002.

KNIGHT, V.; SANGIER, J. J.; DiTULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 446-458, 2003.

LIRA, S. P.; VITA-MARQUES, A. M.; SELEGHIM, M. H. R.; BUGNI, T. S.; LABARBERA, D. V.; SETTE, L. D.; SPONCHIADO, S. R. P.; IRELAND, C. M.; BERLINCK, R. G. S. New destruxins from the marine-derived fungus *Beauveria felina*. **Journal of Antibiotics**, v. 59, p. 553-563, 2006.

LOUTELIER, C.; CHERTON, J.-C.; LANGE, C.; TRARIS, M.; VEY, A. Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae* Direct high-performance liquid Chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests. **Journal of Chromatography A**, v. 738, p. 181-189, 1996.

MADLA, S.; KITTA KOOP, P.; WONGSA, P. Optimization of culture conditions for production of antimalarial menisporopsin A by the seed fungus *Menisporopsis theobromae* BCC 4162. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 548-553, 2006.

NICOLETTI, R.; DE STEFANO, S. Peptidi ciclici di origine fungica. **Il Tabacco**, p. 33-59, 2000.

OLIVEIRA, L. M. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; BARROS, R. S.; RODRIGUES, A. C. M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; LIMA, Y. C.; VIEIRA, L. S.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 55-59, 2009.

PAN, J. H.; JONES, E. B. G.; SHE, Z. G.; PANG, J. Y.; LIN, Y. C. Review of bioactive compounds from fungi in the South China Sea. **Botanica Marina**, v. 51, p. 179-190, 2008.

PATIDAR, P.; AGRAWAL, D.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Chitinase production by *Beauveria felina* RD 101: optimization of parameters under solid substrate fermentation conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 93-95, 2005.

PEDRAS, M. C. S. C.; ZAHARIA, L. I.; WARD, D. E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. **Phytochemistry**, v. 59, p. 579-596, 2002.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia I**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v. 1, p. 320.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suppl. 1, p. 45-61, 2002.

POTTERAT, O.; WAGNER, K.; HAAG, H. Liquid chromatography–electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus *Metarrhizium anisopliae*. **Journal of Chromatography A**, v. 872, p. 85-90, 2000.

- SEGER, C.; STURM, S.; STUPPNER, H.; BUTT, T. M.; STRASSER, H. J. Combination of a new sample preparation strategy with an accelerated high-performance liquid chromatography assay with photodiode array and mass spectrometric detection for the determination of destruxins from *Metarhizium anisopliae* culture broth. **Journal of Chromatography A**, v. 1061, p. 35-43, 2004.
- SONG, X.; ZHANG, X.; KUANG, C.; ZHU, L.; GUO, N. Optimization of fermentation parameters for the biomass and DHA production of *Schizochytrium limacinum* OUC88 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1391–1397, 2007.
- SUZUKI, A.; KUYAMA, S.; KODAIRA, Y.; TAMURA, S. Structural elucidation of destruxin A. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 30, p. 517–518, 1996.
- TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.
- TINOI, J.; RAKARIYATHAMA, N.; DEMING, R. L. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2551–2557, 2005.
- TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 718 p.
- VÁZQUEZ, M. J.; ALBARRÁN, M. I.; ESPADA, A.; RIVERA-SAGREDO, A.; DÍEZ, E.; HUESO-RODRÍGUEZ, J. A. A new destruxin as inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 123-130, 2005.
- VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. v. 1.

VITA-MARQUES, A. M. ; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA C.; MORAES, M. O.; COELHO, B.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; MINARINI, P. R. R.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D.. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 2008.

VITA-MARQUES, A. M. **Isolamento, atividade biológica e análise do perfil químico de fungos coletados no litoral do estado de São Paulo**. 2003. 179f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

WANG, C.; SKROBEK, A.; BUTT, T. M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 168-174, 2004.

XI, Y. B.; XU, Q. S.; HU, Y. Z.; HEYDEN, Y. V. Development, optimization and validation of a fingerprint of Ginkgo biloba extracts by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 97-104, 2005.

ZENITANI, S.; SHINDO K.; TASHIRO S.; SEKIGUCHI, M.; NISHIMORI, M.; SUZUKI, K.; IMOTO, M. Gerfelin, a novel inhibitor of geranylgeranyldiphosphate synthase from *Beauveria felina* QN22047. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. **Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 617-621, 2003.

ZENITANI, S.; SHINDO K.; TASHIRO S.; SEKIGUCHI, M.; NISHIMORI, M.; SUZUKI, K.; IMOTO, M. Gerfelin, a novel inhibitor of geranylgeranyldiphosphate synthase from *Beauveria felina* qn22047. II. Structural elucidation. **Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 658-660, 2003.

Anexos

Lista de Anexos

Anexo 1: Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-1-fr3 medidos com e sem padrão interno	02
Anexo 2: Tempo de retenção dos picos da amostra Bf-MF-CO-1-fr3 medidos com e sem padrão interno	03
Anexo 3: Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-1-fr4 medidos com e sem padrão interno	04
Anexo 4: Tempo de retenção dos picos da amostra Bf-MF-CO-1-fr4 medidos com e sem padrão interno	05
Anexo 5: Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-2-fr4 medidos com e sem padrão interno	06
Anexo 6: Tempo de retenção dos picos da amostra Bf-MF-CO-2-fr4 medidos com e sem padrão interno	07
Anexo 7: Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-3-fr3 medidos com e sem padrão interno	08
Anexo 8: Tempo de retenção dos picos da amostra Bf-MF-CO-3-fr3 medidos com e sem padrão interno	09
Anexo 9: Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-3-fr4 medidos com e sem padrão interno	10
Anexo 10: Tempo de retenção dos picos da amostra Bf-MF-CO-3-fr4 medidos com e sem padrão interno	11

Anexo 1

Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-1-fr3 medidos com e sem padrão interno

Tabela 1. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-1-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. As áreas dos picos foram medidas em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	S	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
1	-	-	-	-	-	-	3,09	1,57	2,72
2	3,92	5,09	1,51	-	-	-	3,79	1,43	5,25
21	2,73	4,50	1,85	-	-	-	1,17	3,74	3,90
3	3,62	3,13	0,43	-	-	-	3,20	2,27	1,19
4,5,6	2,48	1,17	2,40	-	-	-	3,44	1,06	4,18
26	-	-	-	-	-	-	0,97	2,42	5,31
7,8,9,10	2,99	3,18	2,65	-	-	-	0,84	2,09	3,13
11	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0,00	0,00	0,00
14,15,16	2,43	2,01	2,05	-	-	-	2,34	2,93	3,26
29	-	-	-	-	-	-	0,20	3,66	2,77

Tabela 2. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-1-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
1	-	-	-	-	-	-	2,99	1,65	1,67
2	2,05	1,52	1,25	1,88	1,32	1,81	4,01	2,89	3,82
21	0,34	2,28	2,59	-	-	-	1,09	4,78	2,33
3	1,63	2,36	0,56	0,74	1,17	2,00	3,46	1,57	2,05
4,5,6	0,81	0,04	1,56	0,64	2,35	1,10	3,24	1,43	3,55
26	-	-	-	-	-	-	1,23	0,78	3,14
7,8,9,10	1,76	0,55	1,81	2,52	1,27	2,89	0,76	1,40	1,23
11	3,01	1,79	0,84	-	-	-	0,27	2,95	2,24
14,15,16	1,20	2,25	1,63	2,34	2,91	0,64	2,36	1,98	1,36
29	-	-	-	-	-	-	0,17	3,98	2,60

Anexo 2

Tempos de retenção da amostra Bf-MF-CO-1-fr3 medidos com e sem padrão interno

Tabela 3. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-1-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. Os tempos de retenção foram medidos em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	IP (N = 9)	E
1	-	-	-	-	-	-	1,24	0,51	0,12
2	0,24	0,22	0,06	-	-	-	1,52	0,49	0,04
21	0,22	0,17	0,23	-	-	-	1,46	0,42	0,18
3	0,16	0,19	0,03	-	-	-	1,34	0,30	0,05
4,5,6	0,09	0,74	0,06	-	-	-	1,28	0,14	0,03
26	-	-	-	-	-	-	1,23	0,20	0,05
7,8,9,10	0,01	0,05	0,01	-	-	-	1,19	0,11	0,07
11	0,00	0,00	0,00	-	-	-	0	0	0
14,15,16	0,09	0,04	0,06	-	-	-	1,11	0,12	0,12
29	-	-	-	-	-	-	1,06	0,12	0,04

Tabela 4. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-1-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
1	-	-	-	-	-	-	0,18	1,07	0,14
2	0,43	0,36	0,06	0,48	0,39	0,14	0,46	0,42	0,04
21	0,24	0,38	0,16	-	-	-	0,41	0,35	0,14
3	0,35	0,26	0,08	0,27	0,27	0,09	0,28	0,36	0,04
4,5,6	0,26	0,54	0,03	0,27	0,30	0,18	0,22	0,21	0,09
26	-	-	-	-	-	-	0,17	0,17	0,02
7,8,9,10	0,19	0,14	0,08	0,11	0,10	0,16	0,13	0,15	0,09
11	0,20	0,13	0,07	-	-	-	1,06	0,16	0,07
14,15,16	0,12	0,10	0,12	0,11	0,11	0,08	0,16	0,08	0,16
29	-	-	-	-	-	-	0,04	0,18	0,05

Anexo 3

Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-1-fr4 medidos com e sem padrão interno

Tabela 5. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-1-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. As áreas dos picos foram medidas em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
2	2,72	3,55	2,78	3,30	1,22	4,29	3,81	1,86	1,34
22	0,70	4,71	0,74	-	-	-	0,71	0,87	2,16
3	2,34	1,58	3,85	1,17	2,03	4,09	3,57	1,38	2,41
4,5,6	2,29	2,33	1,49	2,88	2,44	4,95	2,31	1,01	0,50
26	2,91	5,66	2,63	2,69	3,80	1,95	1,08	1,51	3,58
7,8,9,10	0,06	1,68	1,86	2,59	0,90	4,29	0,60	4,30	1,65
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12,13 e 14,15,16	0,20	3,58	3,40	1,20	1,82	3,11	1,02	1,57	2,00
17,18,19	-	-	-	-	-	-	1,12	3,37	1,66
20	-	-	-	-	-	-	1,13	2,70	1,75
23	1,11	3,31	2,36	2,44	0,80	2,57	0,46	0,10	1,42

Tabela 6. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-1-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
2	2,27	0,37	1,24	2,14	0,60	1,65	4,04	1,42	0,62
22	3,20	1,37	2,33	-	-	-	1,65	2,51	2,27
3	2,49	1,94	1,60	0,30	0,53	0,57	3,17	1,35	3,74
4,5,6	0,26	1,66	1,34	2,73	0,40	3,64	3,09	2,24	1,10
26	1,14	1,01	0,88	2,01	1,72	1,66	1,11	1,37	3,67
7,8,9,10	2,50	3,64	4,66	1,26	2,08	0,82	1,58	0,99	0,12
11	2,52	1,56	2,81	1,35	1,53	3,48	0,98	1,42	1,58
12,13 e 14,15,16	2,47	1,03	0,97	2,42	1,24	2,66	1,37	1,50	0,87
17,18,19	-	-	-	-	-	-	0,35	0,63	1,48
20	-	-	-	-	-	-	0,17	2,42	2,27
23	1,54	0,75	0,70	3,75	1,83	0,98	0,52	0,41	0,81

Anexo 4

Tempos de retenção da amostra Bf-MF-CO-1-fr4 medidos com e sem padrão interno

Tabela 7. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-1-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. Os tempos de retenção foram medidos em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
2	0,02	0,03	0,09	0,37	0,12	0,15	0,19	0,15	0,11
22	0,08	0,02	0,14	-	-	-	0,30	0,19	0,18
3	0,09	0,02	0,09	0,13	0,21	0,35	0,13	0,08	0,10
4,5,6	0,05	0,01	0,08	0,05	0,18	0,21	0,06	0,23	0,10
26	0,02	0,01	0,02	0,10	0,09	0,25	0,19	0,06	0,15
7,8,9,10	0,05	0,03	0,07	0,09	0,12	0,15	1,21	0,12	0,07
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,13 e 14,15,16	0,05	0,03	0,04	0,07	0,06	0,13	0,13	0,05	0,10
17,18,19	-	-	-	-	-	-	0,05	0,12	0,11
20	-	-	-	-	-	-	0,04	0,06	0,07
23	0,02	0,08	0,18	0,15	0,20	0,16	0,38	0,75	0,90

Tabela 8. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-1-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
2	0,03	0,09	0,14	0,34	0,07	0,07	0,13	0,04	0,06
22	0,04	0,11	0,13	-	-	-	0,29	0,30	0,17
3	0,08	0,10	0,10	0,15	0,05	0,20	0,05	0,04	0,07
4,5,6	0,03	0,11	0,12	0,04	0,07	0,03	0,06	0,21	0,19
26	0,03	0,11	0,11	0,08	0,08	0,09	0,13	0,07	0,02
7,8,9,10	0,05	0,10	0,11	0,11	0,06	0,05	1,17	0,06	0,11
11	0,04	0,12	0,13	0,03	0,17	0,19	0,09	0,12	0,16
12,13 e 14,15,16	0,06	0,09	0,13	0,06	0,12	0,05	0,07	0,08	0,09
17,18,19	-	-	-	-	-	-	0,05	0,01	0,06
20	-	-	-	-	-	-	0,05	0,06	0,10
23	0,05	0,05	0,19	0,13	0,08	0,08	0,47	0,74	0,84

Anexo 5

Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-2-fr4 medidos com e sem padrão interno

Tabela 9. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-2-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. As áreas dos picos foram medidas em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
4,5,6	1,89	1,22	3,52	-	-	-	0,56	4,58	1,11
27	2,22	2,04	3,85	-	-	-	2,59	3,89	2,41
26	1,36	3,92	2,03	0,66	3,47	1,38	2,53	4,65	4,32
7,8,9,10	2,78	1,68	5,31	1,44	1,09	2,9	1,54	4,72	2,45
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,13 e 14,15,16	5,68	2,45	5,18	0,38	0,55	0,85	2,29	4,61	3,98
20	1,89	1,22	3,52	0,66	3,47	1,38	2,31	2,44	4,25
23	2,22	2,04	3,85	1,44	1,09	2,9	1,57	3,24	0,77

Tabela 10. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-2-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
4,5,6	0,22	1,35	1,13	-	-	-	1,71	5,57	0,61
27	0,68	2,8	2,11	-	-	-	3,58	4,75	2,55
26	0,77	1,91	1,31	0,56	1,65	2,05	0,63	2,34	4,7
7,8,9,10	2,03	3,75	5,04	1,02	3,43	0,59	1,13	2,04	1,75
11	1,66	1,14	2,71	0,48	1,69	3,44	2,16	2,52	0,79
12,13 e 14,15,16	4,34	1,08	2,75	0,67	1,67	3,52	0,57	0,43	4,71
20	0,22	1,35	1,13	0,56	1,65	2,05	3,44	0,79	4,95
23	0,68	2,8	2,11	1,02	3,43	0,59	0,74	0,14	0,17

Anexo 6

Tempos de retenção da amostra Bf-MF-CO-2-fr4 medidos com e sem padrão interno

Tabela 11. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-2-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. Os tempos de retenção foram medidos em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
4,5,6	0,28	0,04	0,06	-	-	-	0,16	0,27	0,15
27	0,05	0,09	0,17	-	-	-	0,45	0,05	0,74
26	0,05	0,12	0,19	0,22	0,05	0,14	0,23	0,25	0,09
7,8,9,10	0,07	0,09	0,13	0,03	0,06	0,09	0,14	0,32	0,07
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,13 e 14,15,16	0,07	0,12	0,1	0,01	0,08	0,13	0,39	0,14	0,09
20	-	-	-	-	-	-	0,23	0,22	0,12
23	-	-	-	-	-	-	0,25	1,01	0,08

Tabela 12. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-2-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
4,5,6	0,41	0,09	0,05	-	-	-	0,07	0,15	0,19
27	0,1	0,09	0,13	-	-	-	0,61	0,11	0,76
26	0,11	0,03	0,08	0,15	0,05	0,23	0,05	0,09	0,11
7,8,9,10	0,08	0,04	0,09	0,04	0,05	0,11	0,05	0,16	0,1
11	0,15	0,13	0,11	0,07	0,01	0,13	0,19	0,16	0,04
12,13 e 14,15,16	0,13	0,06	0,05	0,06	0,07	0	0,2	0,18	0,1
20	-	-	-	-	-	-	0,06	0,06	0,16
23	-	-	-	-	-	-	0,15	0,85	0,11

Anexo 7

Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-3-fr3 medidos com e sem padrão interno

Tabela 13. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-3-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. As áreas dos picos foram medidas em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
28	1,78	1,58	3,50	-	-	-	0,44	0,51	1,19
1	1,77	2,79	4,29	-	-	-	1,76	0,58	0,89
2	0,66	3,42	4,67	3,34	3,30	1,88	1,12	0,66	3,12
21	2,55	5,65	2,98	-	-	-	3,21	0,60	4,45
3	1,03	2,73	2,61	3,97	1,48	3,18	2,91	0,92	2,19
4,5,6	0,23	1,08	1,77	4,97	1,88	2,41	1,43	0,29	2,77
26	3,93	3,65	5,32	-	-	-	4,26	2,18	2,01
7,8,9,10	2,05	2,81	3,34	3,94	0,43	0,99	0,43	1,58	2,07
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24 e 25	1,78	1,58	3,50	3,38	2,54	4,64	1,31	1,82	1,01

Tabela 14. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-3-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
28	2,78	1,42	4,38	-	-	-	0,74	1,7	2,45
1	0,17	1,02	2,61	-	-	-	2,15	1,93	1,2
2	2,32	0,76	2,28	1,36	1,45	0,79	0,82	0,33	1,2
21	1,05	2,68	0,34	-	-	-	3,89	1,42	4,78
3	2,42	1,5	5,29	0,57	0,15	0,9	2,21	0,7	0,25
4,5,6	2,06	1,13	3,03	1,24	1,18	0,57	0,79	0,67	1,35
26	2,71	3,58	2,08	-	-	-	3,8	4,35	0,13
7,8,9,10	1,12	4,87	1,46	1,14	3,34	1,86	0,88	1,38	1,71
11	1,84	0,47	3,34	3,66	1,67	2,69	0,69	0,39	1,93
24 e 25	2,78	1,42	4,38	3,52	2,22	2,96	1,23	0,71	2,81

Anexo 8

Tempos de retenção da amostra Bf-MF-CO-3-fr3 medidos com e sem padrão interno

Tabela 15. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-3-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. Os tempos de retenção foram medidos em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
28	0,02	0,18	0,02	-	-	-	0,05	0,12	0,08
1	0,06	0,04	0,14	-	-	-	0,04	0,08	0,17
2	0,12	0,05	0,06	0,33	0,25	0,3	0,05	0,3	0,24
21	0,03	0,1	0,08	-	-	-	0,07	0,13	0,1
3	0,05	0,04	0,02	0,28	0,03	0	0,04	0,05	0,03
4,5,6	0,05	0,02	0,02	0,49	0,15	0,3	0,03	0,11	0,02
26	0,16	0,08	0,42	-	-	-	0,08	0,21	0,31
7,8,9,10	0,07	0,03	0,03	0,33	0,28	0,15	0,12	0,15	0,15
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 e 25	-	-	-	0,3	0,25	0,16	0,02	0,12	0,1

Tabela 16. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-3-fr3 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
28	0,01	0,14	0,07	-	-	-	0,03	0,12	0,11
1	0,04	0,03	0,06	-	-	-	0,07	0,01	0,15
2	0,12	0,11	0,1	0,11	0,21	0,24	0,06	0,23	0,13
21	0,03	0,04	0,04	-	-	-	0,09	0,05	0,16
3	0,04	0,05	0,09	0,08	0,05	0,08	0,06	0,05	0,11
4,5,6	0,04	0,06	0,09	0,24	0,17	0,09	0,06	0,06	0,11
26	0,15	0,12	0,39	-	-	-	0,07	0,15	0,18
7,8,9,10	0,06	0,07	0,11	0,2	0,32	0,18	0,13	0,08	0,07
11	0,02	0,06	0,08	0,29	0,04	0,08	0,03	0,08	0,13
24 e 25	-	-	-	0,07	0,28	0,12	0,03	0,04	0,11

Anexo 9

Área dos picos da amostra Bf-MF-CO-3-fr4 medidos com e sem padrão interno

Tabela 17. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-3-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. As áreas dos picos foram medidas em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
26	-	-	-	-	-	-	0,88	1,76	1,03
7,8,9,10	2,01	2,05	5,32	3,54	2,46	3,48	0,99	1,35	4,47
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,13	2,83	1,11	0,83	1,82	1,21	1,38	1,35	2,91	3,1
17,18,19	-	-	-	-	-	-	1,23	1,98	1,05
20	-	-	-	-	-	-	1,78	1,77	1,52
23	3,34	3,84	5,36	2,48	1,73	1,81	1,86	3,77	2,46

Tabela 18. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para as áreas dos picos observados na fração Bf-MF-CO-3-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
26	-	-	-	-	-	-	1,2	3,41	3,33
7,8,9,10	0,72	2,84	2,76	1,19	2,48	2,93	1,5	0,76	1,72
11	1,29	0,35	3,76	2,34	1,71	1,97	0,56	0,64	2,93
12,13	1,91	0,51	3,23	3,58	1,75	0,65	1,83	2,11	2,78
17,18,19	-	-	-	-	-	-	1,69	3,27	2,37
20	-	-	-	-	-	-	1,36	2,64	1,53
23	2,36	1,51	2,45	0,3	0,69	0,28	1,84	2,08	0,56

Anexo 10

Tempos de retenção da amostra Bf-MF-CO-3-fr4 medidos com e sem padrão interno

Tabela 19. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-3-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. Os tempos de retenção foram medidos em relação ao padrão interno [Phe³, N-Me-Val⁵] Dtx B (11).

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
26	-	-	-	-	-	-	0,29	0,08	0,28
7,8,9,10	0,03	0,16	0,26	0,06	0,08	0,11	0,2	0,05	0,19
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,13	0,14	0,29	0,27	0,07	0,09	0,05	0,27	0,06	0,25
17,18,19	-	-	-	-	-	-	0,2	0,11	0,34
20	-	-	-	-	-	-	0,39	0,06	0,24
23	0,23	0,05	0,22	0,14	0,19	0,13	0,32	0,24	0,51

Tabela 20. Desvio padrão relativo (%) da repetibilidade (RP), precisão intermediária (PI) e estabilidade (E) calculado para o tempo de retenção observado na fração Bf-MF-CO-3-fr4 usando detectores de CLAD com UV, DELE e EM. O padrão interno não foi utilizado.

Substância	UV			DELE			EM		
	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E	RP (N = 3)	PI (N = 9)	E
26	-	-	-	-	-	-	0,08	0,09	0,1
7,8,9,10	0,05	0,2	0,12	0,01	0,22	0,2	0,02	0,11	0,13
11	0,07	0,3	0,13	0,07	0,14	0,1	0,22	0,11	0,32
12,13	0,2	0,22	0,15	0,13	0,05	0,05	0,13	0,08	0,09
17,18,19	-	-	-	-	-	-	0,08	0,07	0,03
20	-	-	-	-	-	-	0,19	0,12	0,1
23	0,18	0,27	0,14	0,2	0,16	0,19	0,12	0,13	0,54