

Rafael Vieira

**EXPLORAÇÃO RACIONAL DA REDE METABÓLICA DE *XYLARIA SP.*
VISANDO À PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE
FARMACOLÓGICO ATRAVÉS DE FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS E
TÉCNICAS DE DESREPLICAÇÃO.**

Dissertação de Mestrado do aluno
Rafael Vieira como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em Química

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

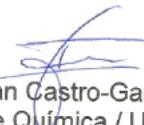
Araraquara
2015

RAFAEL VIEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 16 de dezembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa - (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Profª Drª Fabíola Manhas Verbi Pereira
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Profª Drª Flávia Talarico Saia
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / Santos – SP

Agradecimentos

À minha família, pai, mãe e irmãos, que sempre entenderam minha ausência e por terem – cada um ao seu modo – me incentivado a seguir em frente.

Ao professor Ian Castro-Gamboa, que me recebeu de braços abertos e permitiu que meu projeto de mestrado ganhasse vida. Pelos ensinamentos, pelas palavras positivas sempre nas horas certas. Pelo dinamismo e pela sensibilidade de perceber o outro. Um abraço muito carinhoso, professor. O Instituto de Química precisa de mais professores como você.

Aos amigos que tornaram-se irmãos, Tiago e Paulo, pelos momentos inesquecíveis e pelas horas incríveis que compartilhamos. Que a gente nunca se perca!

Aos bons amigos que esse mestrado proporcionou, Raq Sabará e Luciano. Sei que posso contar com vocês para sempre.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica pelos ensinamentos. E aos professores membros das bancas que me ajudaram a escrever melhor essa dissertação de mestrado.

Aos amigos do NuBBE. Obrigado pelos dois anos de convivência e por compartilhar grandes momentos. Em especial ao Afif e a Natália, que sempre estiveram presentes no desenvolvimento desse trabalho. Que a nossa amizade só cresça!

Aos técnicos do Instituto de Química pelo suporte e pelas análises.

Aos órgãos de fomento, pela ajuda financeira.

Ao Saulo, que sempre me viu melhor do que realmente sou, pela paciência, pelo companheirismo, e por acreditar em mim mais do que qualquer outra pessoa. Obrigado pelo carinho incondicional.

A todos, um beijo, muitos beijos - todos do tamanho do mundo.

Rafael Vieira, 29 anos, licenciado em química, almejando título de mestre. Nasceu na cidade de Matão - SP, lugar onde a família reside até hoje. Dono de uma infância simples, mas repleta de amor, amizade, sonhos e abraços.

Apaixonou-se pela escola ainda pequeno, quando o dinheiro era pouco e o pouquinho que se tinha era dividido entre jogos de videogame e gibis.

Dos gibis para os livros foi um pulo. E daí por diante, ele nunca mais pararia de estudar.

Trabalhou desde cedo. Estudou. Entrou na Universidade. Fez licenciatura em química, mesmo quando todo mundo falava que isso não dava dinheiro. Mas ele não se importava, porque aprendeu desde cedo a fazer um escudo de proteção contra palavras ruins e gente de má fé.

Aprendeu dar voz ao coração e achou que isso era o mais importante. Fez inúmeros malabarismos para se livrar de problemas maiores. Conteve saudades de casa. Se abasteceu de sonhos. Colecionou elogios. Errou. Aprendeu.

E claro, cruzou caminho com um monte de gente leve, e dali se fizeram inúmeras amizades.

Da vida ele não quer muito. Só espera viver com dignidade e ter espaço para ser professor e ensinar o que gosta. Porque como dizia sua mãe, Dona Marlene, a vida, apesar de bruta, ela também é meio mágica... e ele passou a acreditar nisso desde então.

RESUMO

Este trabalho de mestrado tem, como foco principal, analisar o comportamento do fungo *Xylaria sp.* perante variações físico-químicas, através da abordagem OSMAC (One Strain, Many Compounds). Para realizar tais induções e explorar a variabilidade da rede metabólica deste micro-organismo, um planejamento fatorial foi desenhado visando induzir a variabilidade (ou a potencialização) de metabólitos.

Diante de respaldos quimiométricos, induções planejadas foram impostas ao micro-organismo e observou-se variações no perfil químico nos extratos brutos.

Somado a isso, técnicas de desreplicação foram usadas a fim de estudar quimicamente as matrizes complexas produzidas por este fungo visando a produção de metabólitos de alto valor agregado e determinou-se condições específicas para produção de moléculas de citocalasina D e de griseofulvina.

ABSTRACT

This work has as its main focus, analyze the behavior of the fungus *Xylaria* sp. before physicochemical variations via the OSMAC approach (One Strain, Compounds Many). To achieve such induction and exploit the variability of the metabolic network of this micro-organism, a factorial design was designed to induce variability (or potentiating) metabolites.

Before chemometric backrests, planned inductions were imposed on the micro-organism and it was observed variations in the chemical profile in crude extracts.

Added to this, dereplication techniques were used to study the chemically complex matrices produced by this fungus aimed at producing high added value and metabolites was determined specific conditions for the production of molecules cytochalasin D and griseofulvin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 O FUNGO <i>XYLARIA SP.</i>	8
2.2 CITOCALASINAS.....	9
2.3 GRISEOFULVINA.....	12
2.4 A abordagem OSMAC – One Strain Many Compounds.....	12
2.5 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS.....	13
2.6 QUAIS SÃO OS OBJETIVOS DE REALIZAR INDUÇÕES PLANEJADAS E NÃO INDUÇÕES RANDÔMICAS?	14
2.7 TÉCNICAS DE DESREPLICAÇÃO	15
2.8 SOBRE OS EFEITOS.....	16
2.8 SOBRE AS INTERAÇÕES DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS.....	16
2 OBJETIVOS.....	17
3 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	18
3.1 CULTIVO DO FUNGO <i>XYLARIA SP.</i>	18
3.2 PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR CLAE – DAD.....	19
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CLAE/EM	19
3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG/EM.....	20
3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – RMN	23
4 DESENVOLVIMENTO – RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO.....	24
4.2 CÁLCULO DOS EFEITOS.....	28
4.3 O MODELO ESTATÍSTICO	36
4.4 DADOS ESPECTROMÉTRICOS E ESPECTROSCÓPICOS	55
4.5 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO METABÓLICA NO CLAE-EM NO MEIO CZAPEK.	56
4.6 Comparação da produção metabólica no CLAE-EM no meio Nutriente.....	60
4.6 A TÉCNICA DE DESREPLICAÇÃO PARA MOLÉCULAS DE CITOCALASINAS D	66
4.7 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA DETECÇÃO DE SINAIS DE CITOCALASINAS D.	71
4.8 TOCSY 1D NA IDENTIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE SPIN RELACIONADOS À CITOCALASINA D.	76
4.9 CROMATOGRAFIA GASOSA HIFENADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	83
5 CONCLUSÕES.....	100

1 INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos, em que estão inseridos os fungos endofíticos, consistem num grupo de micro-organismos que biossintetizam uma quantidade elevada de metabólitos secundários.

Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos de plantas e consistem em uma promissora fonte de recursos bioativos.

O fungo endofítico do gênero *Xylaria* tem demonstrado uma fonte rica de metabólitos secundários com grande variabilidade química e biológica (ZHANG et al., 2014).

1.1 O FUNGO *XYLARIA* SP.

O fungo *Xylaria* sp. pertence à ordem *Xylariales* e família *Xylariaceae*.

Esta família possui cerca de 40 gêneros e o número exato de espécies da família ainda não pôde ser determinado devido à grande dificuldade na classificação e a falta de coleções modernas de espécies tropicais.

Figura 1 – Fungo *Xylaria* sp. após 10 dias de cultivo em meio sólido



Fonte: Autor

Uma diversidade de metabólitos secundários produzidos por fungos do gênero *Xylaria* já foram catalogados, sendo eles: sesquiterpenos, diterpenoides,

triterpenos, esteroides, citocalasinas, ciclopeptídeos, dentre outras classe (SONG et al., 2014).

Todos estes metabólitos apresentam algum tipo de bioatividade tais como, ação antifúngica, anticolinesterásica, antimalárica e citotóxica, evidenciando a potencialidade destes fungos na produção de substâncias bioativas.

O fungo utilizado nesse trabalho de mestrado foi obtido da micoteca do NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia do Instituto de Química de Araraquara. Este micro-organismo foi isolado das folhas de *Casearia sylvestris* por Mariana Cafêu, em seu trabalho de doutorado. (CAFEU, 2007). Nas condições experimentais adotadas (CAFEU, 2007) conseguiu-se isolar até 52 mg de citocalasina D por litro de meio de cultura.

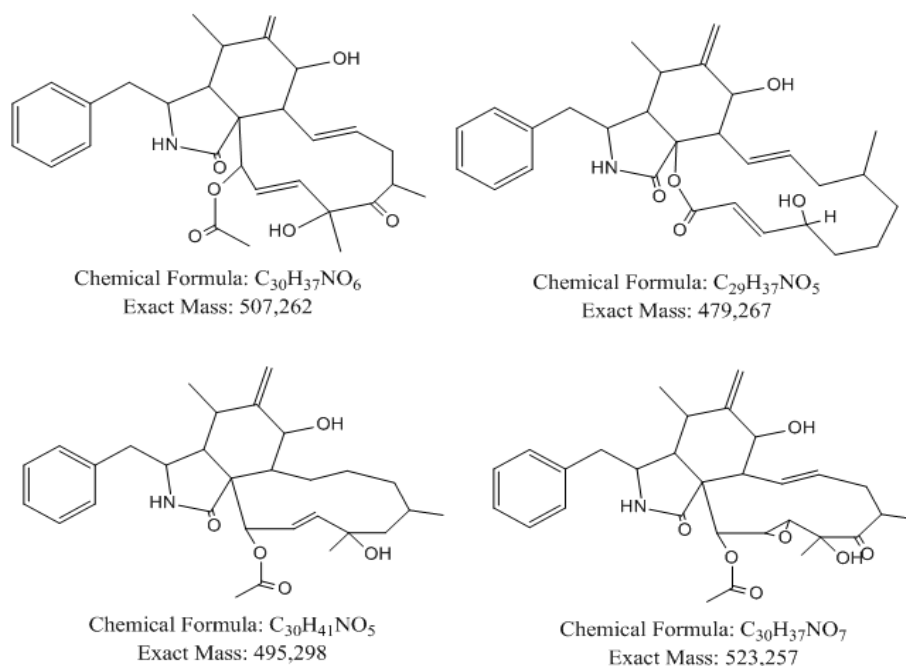
2.2 CITOCALASINAS

Citocalasinas constituem um grupo de metabólitos naturais produzidos por diversas espécies de fungos, incluindo *Helminthosporium sp.*, *Phoma sp.*, *Xylaria sp.*, *Hypoxylon sp.*, *Zygosporium mansonii*, *Chalara sp.*, *Pyrenophora semeniperda*, *Daldinia sp.*

Desde sua descoberta, em 1966 até a atualidade, vários tipos de citocalasinas foram relatadas. Estruturalmente são caracterizadas pela presença de um anel bicicloisoindolônico, fundido a um macro-ciclo de 11 a 14 membros e pela presença de uma unidade fenila na posição 10.

As citocalasinas foram descritas pela primeira vez em 1966. Desde então, há diversos estudos a respeito da sua biossíntese. A proposta biossintética mostra que a citocalasina B é formada a partir de uma unidade de fenilalanina, duas unidades de metionina e nove unidades de acetato e que as citocalasinas C e D apresentam uma unidade adicional de metionina (GRAF et al., 1974).

Abaixo exemplos de citocalasinas:

Figura 2 – Exemplos de citocalasinas

Fonte: autor

Assim sendo, trata-se de uma via biossintética do acetato mista, uma vez que a fenilalanina é proveniente do metabolismo primário e, sendo este aminoácido um derivado do ácido chiquímico, esta via pode ser chamada de acetato/chiquímico.

Na proposta de mecanismo, o derivado de policetídeo (nonacetídeo para a citocalasina B; octacetídeo para as citocalasinas C e D) se liga a fenilalanina através de uma conexão com a amida para formar o intermediário (I), que por processo de redução, dehidrogenação e condensação resulta no intermediário (II).

O intermediário (II) pode sofrer uma reação de cicloadição para formar (III). A epoxidação da ligação dupla no intermediário (III) resulta no sistema de anel presente nas citocalasinas E, F, G, K, L e M e em Chaetoglobosinas A, C, F e K.

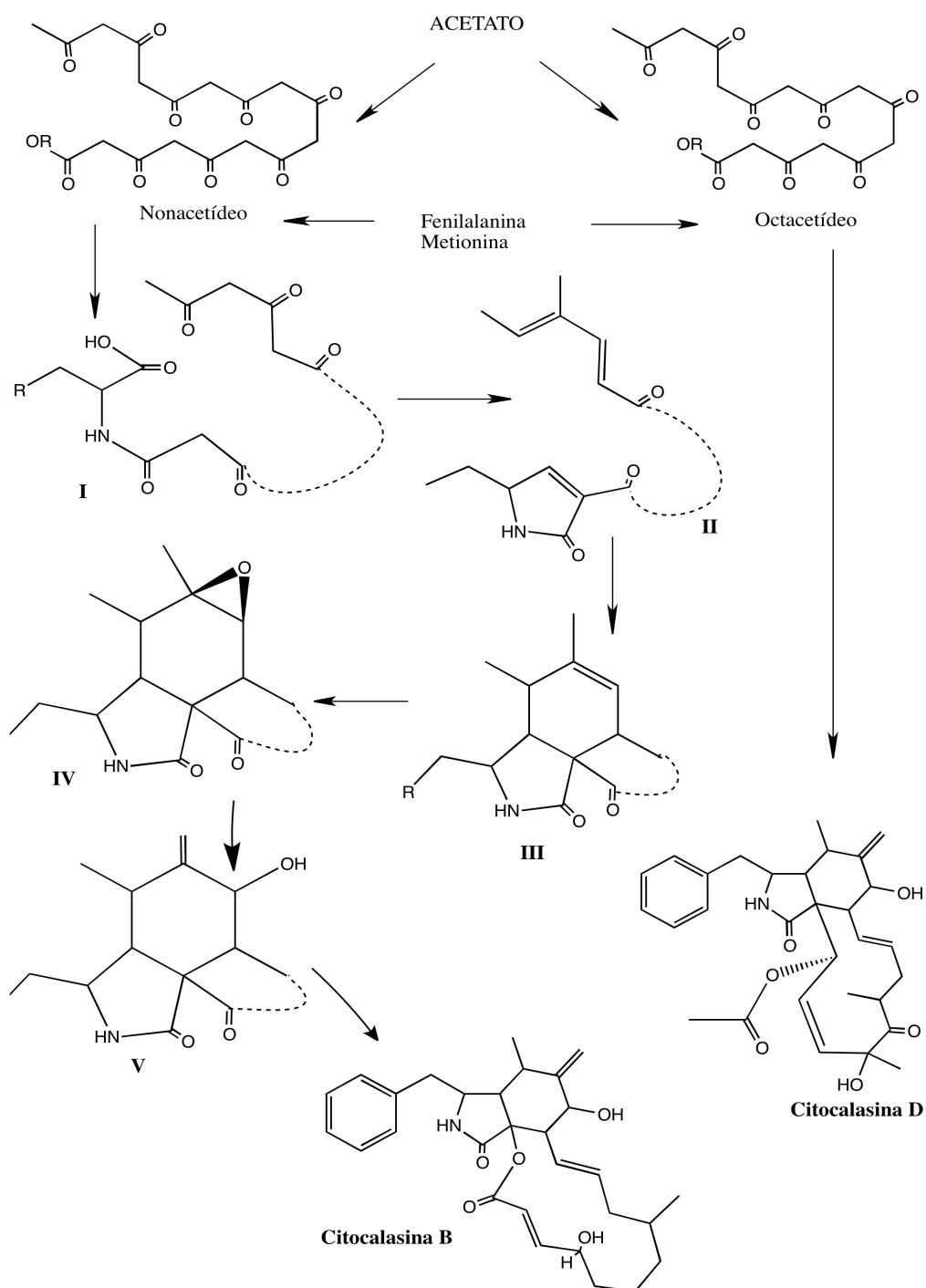
Em condições levemente acídicas, o epóxido é transformado em álcool alílico (V) e resulta no tipo de anel presente nos outros tipos de citocalasinas (TURNER; ALDRIDGE, 1983).

No caso da citocalasina B, sugere-se que a inserção do oxigênio entre os carbonos C-9 e C-23 ocorra por uma via enzimática do tipo Baeyer-Villiger e que o deoxafomina (V) seja um precursor direto uma vez que este possui o mesmo esqueleto carbônico e mesma configuração absoluta que a citocalasina B (ROBERT;

TAMM, 1975). A proposta de rota biossintética para as citocalasinas B, C e D está ilustrada no Esquema 8, onde R corresponde ao benzeno.

A figura 3 contempla a via biossintética das citocalasinas:

Figura 3 - Rota biossintética das citocalasinas

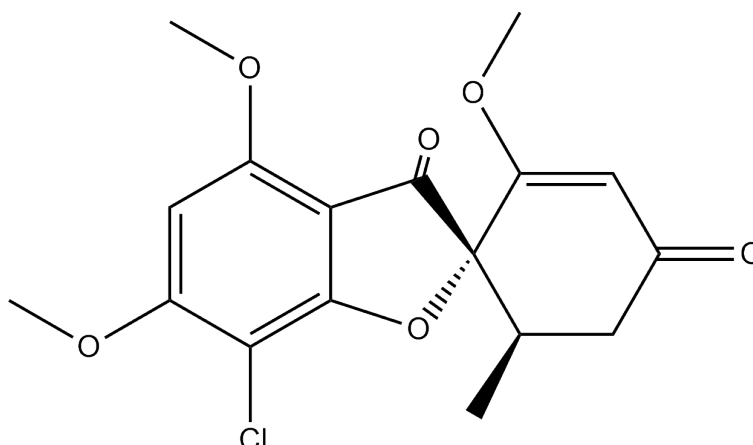


Fonte: (Roberth; Tamm, 1975)

2.3 GRISEOFULVINA

Outro metabólito que apresenta interesse comercial é a griseofulvina. Trata-se de um metabólito produzido por várias espécies de fungos e é utilizada, atualmente, como um poderoso antifúngico na medicina, em animais domésticos e como fungicida para agricultura (MANN, 1994). É empregada comercialmente nos medicamentos Fulcin® (Zeneca) e Sporostatin® (Shering Plough) e o seu mecanismo de ação é pela inibição da mitose celular fúngica, impedindo a divisão celular. Este agente fungicida apresenta atividade in vitro contra várias espécies de *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* (PEREA et al., 2001).

Figura 4 - Molécula de griseofulvina



2.4 A abordagem OSMAC – One Strain Many Compounds

O metabolismo secundário de micro-organismos está regulado por uma grande quantidade de genes que codificam enzimas e, portanto, uma variedade de metabólitos secundários é fruto dessa rede biossintética.

De fato, apenas uma minoria de genes são expressos sob condições padronizadas de laboratório e muitos compostos valiosos são negligenciados. Com o intuito de explorar o potencial metabólico de micro-organismos, muitas estratégias regulatórias são realizadas a fim de ativar vias adormecidas para facilitar a descoberta de novos produtos naturais por meio da modificação das condições de cultura; stress; co-culturas e abordagens genômicas. (ZHANG et al., 2015).

Esta abordagem, denominada OSMAC (One Strain Many Compounds) é um método útil que funciona sob o conceito de que um micro-organismo pode produzir diversos metabólitos secundários usando técnicas particulares, por exemplo, alteração dos parâmetros físico-químicos tais como pH, substratos (meios de cultivo), temperatura, agitação, luz, são alterados durante a cultura fúngica (HEWAGE et al., 2014). Há relatos que tais variações podem mudar completamente o perfil metabólico de muitos micro-organismos, induzindo vias metabólicas que antes não estavam ativadas. Com isso, uma variabilidade grande de metabólitos podem ser obtidos ou potencializados utilizando tal abordagem (WANG et al. 2015).

De tal forma, OSMAC apresenta-se como uma ferramenta com grande potencial para explorar a diversidade química dos metabólitos secundários de diversos gêneros de micro-organismos.

A manipulação de tais condições tem demonstrado ter impactos substanciais sobre a quantidade e diversidade de produção de metabolitos secundários (VANDERMOLEN et al., 2013).

A escolha do parâmetro a ser alterado geralmente é aleatória; por esse motivo, tais variações são conhecidas como induções randômicas. Em geral, realiza-se uma grande quantidade de experimentos fazendo inúmeras alterações, a fim de verificar o aumento da variabilidade metabólica do determinado micro-organismo.

Tentando suprimir e otimizar as condições experimentais, este trabalho de mestrado pretende realizar induções não randômicas, e sim, induções planejadas, respaldada por ferramentas quimiométricas a fim de criar um delineamento experimental baseado em planejamento fatorial visando maximizar a obtenção de resultados.

2.5 FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria é uma área das ciências que utiliza conhecimentos de matemática e estatística para a identificação de informações relevantes de um problema em estudo (KJELDAHL; BRO, 2010).

Buscando realizar induções planejadas, a quimiometria contribui nessa investigação permitindo criar um delineamento experimental das condições de cultivo. Esse tipo de desenho experimental, conhecido em inglês por *Design of*

Para se obter sucesso na utilização destas técnicas, é necessário definir características da qualidade e todos os possíveis fatores que podem afetar tais características.

Sem dúvida, o planejamento experimental permite estudar, de forma competente e econômica, o efeito de vários fatores sobre uma resposta de interesse. De um modo geral, no experimento fatorial aqui pretendido, cada fator assume dois níveis, por exemplo, dois valores de temperatura, dois níveis de um reagente (dois tipos de meio de cultivo), e principalmente, duas características qualitativas de um determinado fator, por exemplo uma peça "com" ou "sem" determinada característica, por exemplo, com/sem agitação ou com/sem luz.

Após a execução do planejamento fatorial para cultivo de fungo, obtêm-se respostas para cada tipo de experimento. No caso de um planejamento fatorial com três variáveis, haverá 2^3 experimentos, ou seja, 8 ensaios (8 extratos) para se analisar. Este trabalho de mestrado utilizará técnicas de desreplicação para estudar as matrizes complexas geradas nesses experimentos.

2.7 TÉCNICAS DE DESREPLICAÇÃO

Recentemente, o processo de desreplicação utilizando equipamentos analíticos como ressonância magnética nuclear, RMN; CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), CG (cromatográfica gasosa) ambos acoplados ao espectrômetro de massas, tem se mostrado como uma poderosa técnica para identificação de compostos conhecidos em produtos naturais.

Durante o processamento dos dados, pode-se realizar uma análise exploratória dos dados químicos fazendo uma varredura nos cromatogramas obtidos, buscando evidências de sinais de moléculas de alto valor agregado. Além disso, definir quais efeitos influenciam de forma mais efetiva no cultivo do micro-organismo, e também observar interações, sejam elas sinérgicas ou antagônicas, entre as variáveis consideradas no estudo.

2.8 SOBRE OS EFEITOS

O efeito de um fator pode ser definido como a mudança sofrida pela variável resposta quando passamos do nível baixo do fator para o nível mais alto.

Considere um experimento fatorial em que cada fator tenha dois níveis e r repetições para cada tratamento (combinações de níveis). Uma maneira especial de representar os tratamentos é usando a representação dos efeitos, como descrita abaixo:

Notação: atribui-se os sinais de - se nível baixo e + se nível alto para cada um dos fatores.

2.8 SOBRE AS INTERAÇÕES DAS VARIÁVEIS SELECIONADAS

Quando se observa que o comportamento de um fator é diferente nos dois níveis de outro fator, dizemos que existe interação entre os fatores. Calcula-se o efeito da interação entre dois fatores como sendo a média da diferença entre os efeitos de um fator nos níveis do outro fator.

A interação ocorre entre dois ou mais fatores se o efeito de um fator na resposta depende do nível dos outros fatores.

2 OBJETIVOS

Os objetivos centrais desse trabalho de mestrado consistem em:

- Analisar a variabilidade metabólica do fungo endofítico *Xylaria sp.* através de um enfoque metabolômico, fazendo-se uso de métodos de desreplicação e técnicas acopladas para o monitoramento e detecção da variedade metabólica do fungo.
- Utilizar a abordagem OSMAC (*One Strain Many Compounds*) para induzir a variabilidade metabólica do fungo;
- Propor modelagens matemáticas que expliquem a produção metabólica do micro-organismo;
- Maximizar a obtenção de resultados aplicando planejamento fatorial para a otimização e o estudo das condições experimentais ideais de cultivo para produção de citocalasinas e outros metabólitos de alto valor agregado;
- Minimizar o uso de meios de cultivos e, conseqüentemente, solventes orgânicos na extração e partições dos experimentos – o que contribui para os princípios da química verde e economia de tempo.

3 ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

3.1 CULTIVO DO FUNGO XYLARIA SP.

Inicialmente, definiu-se como objeto de estudo o fungo CSY-03 pertencente à micoteca do laboratório de micro-organismos do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara. Este fungo endofítico foi isolado da planta *Casearia sylvestris*.

Sequencialmente, partiu-se para o teste de viabilidade do fungo. Em placas de Petri foi adicionado meio de cultivo Nutriente Agar (Nutrient Agar (extrato de carne): 23g/L Acumedia, Neogen Corporation, Michigan 48912 lot: 104, 940B pH final: 6.8+0,2 a 25°C) e o fungo se desenvolveu durante 10 dias até atingir um tamanho considerável da placa. Para garantir que esta linhagem não se perdesse, foram feitas três preservações do micro-organismo. Para o preparo do meio líquido levou em consideração dois tipos de meio de cultivo, Czapek, classificado como um meio de cultura quimicamente definido, e Nutriente, um meio de cultura complexo, como pode ser observado na figura 5.

Figura 6 - Esquema de cultivo e extração para o fungo *Xylaria sp.*



Fonte: Autor

O caldos de cultivo foram preparados seguindo planejamento fatorial. Dessa forma, preparou-se 8 frascos de Nutriente, e 8 frasco de Czapek (porque foi realizado em duplicata), ambos contendo 300 mL de meio de cultivo. Todos os frascos foram autoclavados (autoclave Quimis Aparelhos Científicos Ltda) por 20 minutos.

Posteriormente, o fungo foi inoculado em cada um desses frascos e colocados em lugares específicos (descrito no item 4.1, página 24), onde havia controle de agitação e luz para que fossem monitorado.

Os fungos foram cultivados durante 28 dias.

Os extratos obtidos foram então analisados por CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM, CG-EM e RMN, buscando a identificação de substâncias conhecidas através de desreplicação e de substâncias desconhecidas por meio de índices de retenção e dados espectrométricos.

3.2 PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR CLAE – DAD

Os 8 extratos obtidos (quatro de meio nutriente e quatro de meio Czapek) foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. As amostras foram preparadas pesando-se 4 mg de cada extrato e solubilizando-os em 1 mL de acetronitrila. O cromatógrafo utilizado foi um Shimadzu acoplado às bombas modelo LC-6 AD Shimadzu, sistema de controle SCL-10VP-Shimadzu, detector de arranjo de diodos UV/VIS-Shimadzu PC 1520 – Diode Array).

A eluição foi feita com sistema binário de H₂O:ACN contendo 0,1mL de ácido fórmico em casa fase. Um gradiente exploratório com coluna C₁₈ (Kinetex, 150 x 4.6mm, 5 µm) foi realizado seguindo a seguinte proporção: H₂O:ACN 5:95 (v/v) até 1:0 (v/v) em 40 minutos, permanecendo por mais 10 minutos em vazão constante de 1,0 mL/min.

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CLAE/EM

Os perfis metabólicos dos extratos de *Xylaria sp.* foram obtidos pelo acoplamento do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, (Modelo Prominence Shimadzu. Bombas de alta pressão, modelo LC-20AD: Faixa de fluxo: 0.0001ml/min a 10.0000ml/min. Detector espectrofotométrico "Photodiode Array" modelo SPD-M20A, Marca Shimadzu. Desgaseificador, Modelo DGU-20A-5, Marca Shimadzu) ao espectrômetro de massas de alta resolução Bruker, microTOF II com ionização através de electrospray.

Parâmetros utilizados para a ionização:

A voltagem do capilar foi de 3500 Volts. A temperatura da fonte foi de 200 °C. O gás nebulizador foi nitrogênio, a uma pressão de 5,5 bar. A taxa de fluxo do gás foi fixada em 10L/min.

As mesmas amostras preparadas para traçar o perfil cromatográfico dos extratos foram utilizadas nessa etapa.

Os dados foram processados utilizando o software Bruker Data Analysis 4.1.

3.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS – CG/EM

As amostras para a realização dos perfis cromatográficos utilizando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram submetidas a reações de derivação. Para isso foram utilizados aproximadamente 6 mg de extratos, pesados separadamente em frascos preparativos.

Na reação de metoximação a massa pesada de cada amostra foi então reconstituída com 1 mL de solução de cloridrato de metoxiamina (Sigma Aldrich Chemistry) 20 mg/mL em piridina (Tedia Company), e mantida a 30° C por 90 minutos para formação das oximas.

A seguir as amostras foram sililadas durante 30 min a 37°C com 1 mL de MSTFA (*N*-metil-*N*-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) (Sigma Aldrich Chemistry). Após 24 horas em repouso na geladeira, as amostras puderam ser analisadas por cromatografia gasosa.

Para as análises por GC-MS utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu QP-2010 equipado com injetor automático AOC-5000 Shimadzu e interface com um espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi EN5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm). A

temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 120 °C (3 min) 3 °C / min 320 °C (10 min) até 79.67 min. A temperatura do injetor foi 260 °C. Modo de injeção: splitless/split (Grob). Início splitless, 0,75 min split (1/50), 2 min split 1/20, gás de arraste hélio (99,999%) a um fluxo constante de 1,3 mL/min, o volume de amostra injetado foi de 1 µL. Pressão: 114,9 kPa, velocidade linear: 43,1 cm/sec., fluxo total: 17.3. Condições MS: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de impacto de elétrons a 70 eV, faixa da massas de aquisição de m/z 40-600 Daltons. Os dados foram analisados pelo software da Shimadzu, CGMS Solution versão 2.61.

A derivatização é procedimento necessário para que as moléculas se tornem mais apolares, e, portanto, mais fáceis de serem volatilizadas e não fiquem retidas na coluna do cromatógrafo gasoso.

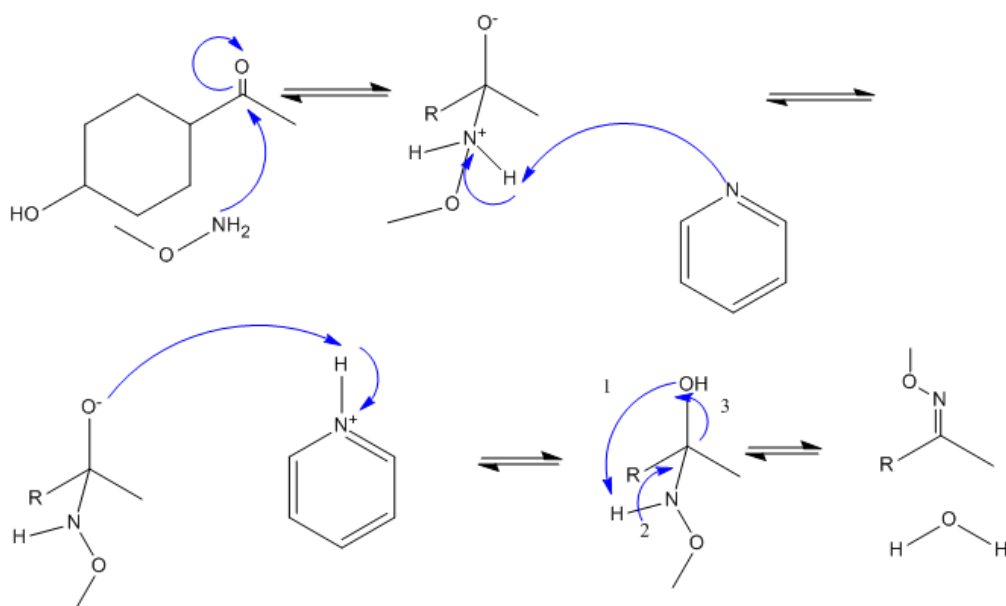
Cromatografia gasosa é uma técnica de separação com poder de resolução excelente, tornando possível a análise de centenas de substâncias de uma mesma amostra. Outro fator positivo é sua detectabilidade, que dependendo do tipo de substância analisada e do detector empregado pode chegar até cerca de 10^{-12} g. Essa característica possibilita a análise de pequenas quantidades de amostras, o que em certos casos limita a utilização de outras técnicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

A grande limitação da cromatografia gasosa é só poder ser empregada na análise de substâncias voláteis e estáveis termicamente, porém em alguns

casos essa dificuldade pode ser contornada pela preparação de derivados com estas características (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

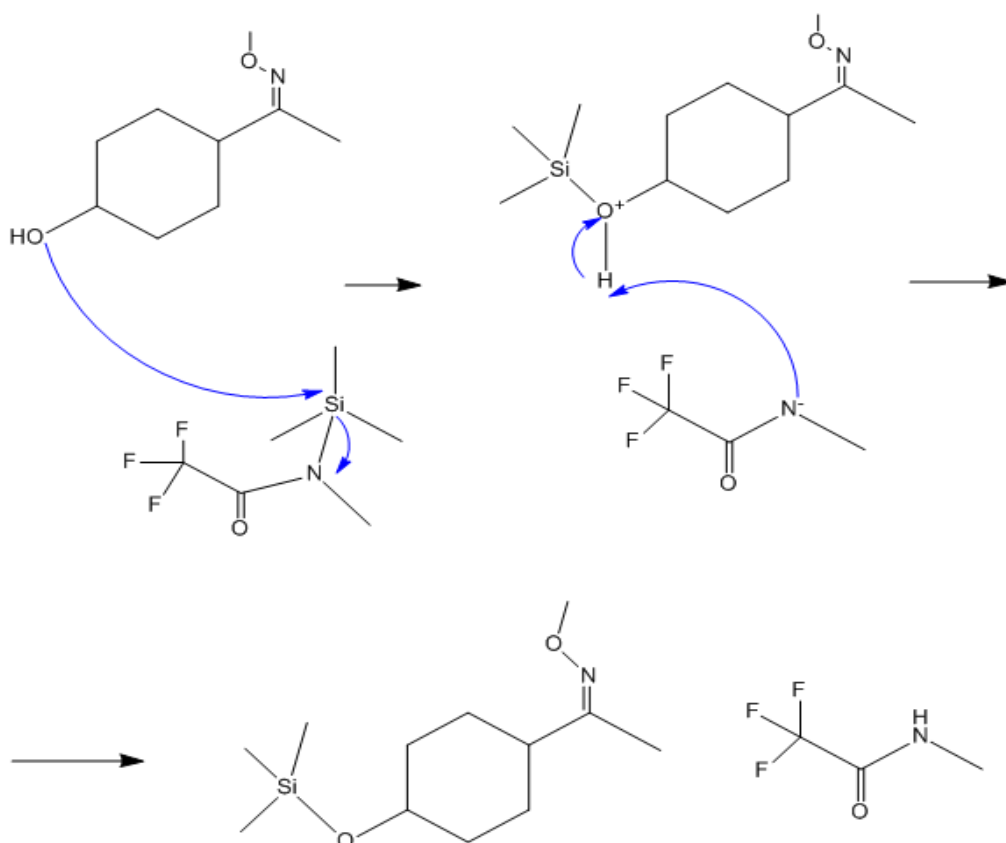
Para análise de metabólitos não voláteis por cromatografia gasosa, Roessner e colaboradores (ROESSNER et al, 2000) propõem um método baseado nas reações de metoximação e posterior sililação dos metabólitos da amostra, o que torna os seus derivados analisáveis por CG. O método consiste no tratamento do extrato ou fração com cloridrato de metoxiamina (em piridina) e então com reagente sililante MSTFA (*N*-metil-*N*-[trimetilsil]-trifluoracetamida).

As reações de formação de oximas são necessárias antes da sililação porque a derivação direta de monossacarídeos com TMS leva a uma série de picos cromatográficos diferentes relacionados às estruturas cíclicas epiméricas e à cadeia aberta dessas substâncias.



A conversão das carbonilas de aldeídos e cetonas em oximas (metoxiamina) antes de formar os éteres de TMS, impede a ciclização dos monossacarídeos limitadas pela ligação C=N, resultando apenas na formação de formas syn e anti abertas e ainda protege a molécula contra a descarboxilação (GULLBERG et al., 2004).

Figure 8 - Proposta de mecanismo de sililação



A identificação por CG-EM foi baseada na comparação dos espectros de massas com bibliotecas de dados disponíveis (NIST e WILEY), comparação dos índices de retenção calculados com os encontrados na literatura (bases de dados – WebNIST, GMD).

3.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR – RMN

A ressonância magnética nuclear dos extratos foi realizada em magneto Bruker Avance 600 operando em 600 MHz para o núcleo de hidrogênio com criossonda de 3 mm.

As amostras foram preparadas em tubo de 3 mm, solubilizando 1 mg do extrato bruto em 240 microlitros de metanol deuterado (CD_3OD) marca Cambridge Isotopes Laboratories, com 99,8% de pureza.

Para cada amostra foram realizadas análises de ^1H e TOCSY 1D. Os dados foram tratados no software Mestrenova versão 6.0.2

As análises de espectrometria de massas foram realizadas na Faculdade de Farmácia, da Faculdade de Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto. Os demais cromatogramas e espectros foram obtidos no próprio Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

4 DESENVOLVIMENTO – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO

Para realizar o planejamento fatorial aplicado aos experimentos desse trabalho de mestrado, três variáveis foram selecionadas com base em referências bibliográficas (CAFEU, 2007) de cultivo de micro-organismos sendo elas: luz, agitação e meio de cultura. Estas três variáveis foram testadas em dois níveis diferentes, gerando, portanto, 8 ensaios.

O desenho experimental foi planejado da seguinte forma (Tabela 1):

Tabela 1 - Variáveis selecionadas para o planejamento fatorial

Variáveis	Níveis	
	Baixo	Alto
A) Meio de Cultivo	Czapek	Nutriente
B) Agitação	Sem agitação	Com agitação
C) Luz	Sem luz	Com luz

Definidas as variáveis, foi possível combinar, como descritos na tabela 2, oito tipos de ensaios.

Tabela 2- Apresentação esquemática das combinações das variáveis

Ensaio	Meio de Cultivo	Agitação	Luz
1	Czapek	Sem	Sem
2	Nutriente	Sem	Sem
3	Czapek	Com	Sem
4	Nutriente	Com	Sem
5	Czapek	Sem	Com
6	Nutriente	Sem	Com
7	Czapek	Com	Com
8	Nutriente	Com	Com

Realizando uma normalização, atribui-se, convencionalmente, as unidades -1 (para o nível baixo) e +1 (para o nível alto).

Importante ressaltar que essa atribuição referente a nível baixo e alto não significa que o nível baixo seja inferior, ou vice-versa. Trata-se apenas de uma codificação sem qualquer grau de inferioridade. Como descrito na tabela 1, o ensaio que apresentar agitação será representado com a unidade + 1, e o que estiver estático, -1. O mesmo serve para a variável luz, os ensaios que estiverem sob luz, serão representados como +1, e aos que estiverem na ausência de iluminação será categorizado como -1. Por fim, os meios de cultura foram designados da seguinte forma: para o Czapek, um meio “pobre” e quimicamente definido, atribuiu-se -1, e ao Nutriente, por se tratar de um meio complexo e mais “rico” em nutrientes, atribuiu-se a categoria +1.

O resultado desse planejamento, agora codificado, está esquematizado na tabela abaixo

Tabela 3 - Tabela de planejamento fatorial com codificação das variáveis

Ensaio	Meio de Cultivo	Agitação	Luz
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Com esta codificação não discriminamos quaisquer variáveis. Todas, nessa etapa serão analisadas independentes de suas características experimentais.

Por serem ensaios demorados, pois trata-se do cultivo de fungos, tomou-se cuidado de verificar a disponibilidade de equipamentos de agitação e monitorá-los com relação a temperatura (para que esta fosse igual nos cultivos sem agitação),

pois a temperatura é um fator que poderia alterar a produção metabólica, mas que não foi uma variável selecionada para estudo.

Por esse motivo, a temperatura foi controlada nos dois ambientes de cultivo, tanto na incubadora com agitação quanto na incubadora horizontal (em que ficaram estocados os ensaios sem agitação, bem como os que necessitavam de abrigo de luz).

Os ensaios **1** e **2** foram acomodados na bancada do laboratório de micro-organismos, embrulhados com papel alumínio, pois nenhum deles foi agitado e necessitavam estar ao abrigo de luz. Lembrando que ambos foram classificados como -1 nas duas variáveis.

Para os experimentos **3** e **4** ambos os frascos foram envolvidos com papel alumínio e colocados em uma incubadora de bancada com agitação (marca Quimis). A agitação do equipamento foi ajustada a 100 rpm. Esses experimentos foram classificados como -1 (sem luz) e +1 (com agitação).

Os ensaios **5** e **6** foram deixados também na bancada, porém, estes estavam abertos (sem estar envolvidos com papel alumínio) e expostos à luz, pois suas codificações eram +1 para luz, e -1 para agitação, ou seja, deveriam ser deixados em modo estático.

Por fim, os frascos **7** e **8** foram inseridos também na incubadora de bancada, porém, sem papel alumínio, à exposição de luz. Pois suas codificações eram de +1 para ambas variáveis. A luz foi deixada constantemente acesa. Não houve nenhum momento em que houve problema na iluminação. O planejamento foi feito em duplicata.

A temperatura do laboratório de micro-organismos foi mantida em 26 graus. Após 28 dias de inoculação, preparou-se o extrato de cada um dos ensaios, como descrito na seção 3.1.

Ao fim das extrações, obteve-se 450 mL de fase orgânica (a extração foi feita com acetato de etila) para cada ensaio. As partições orgânicas foram concentradas com auxílio de um evaporador rotatório a vácuo (marca Buchi) ajustando a temperatura para 40 graus e pressão de 240 mmHg.

Após a secagem dos extratos, estes foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo AG 204) o que possibilitou finalizar o planejamento fatorial. A resposta (massa de extrato) pôde ser inserida na tabela 4.

Tabela 4 - Tabela de planejamento fatorial completo

Ensaio	Meio de Cultivo	Agitação	Luz	Extrato 1	Extrato 2	Média
1	-	-	-	59	63,2	61,1
2	+	-	-	29,5	32,7	31,1
3	-	+	-	103	99,7	101,4
4	+	+	-	55,9	53,2	54,6
5	-	-	+	24,9	22,1	23,5
6	+	-	+	22,6	19,2	20,9
7	-	+	+	99	92,7	95,9
8	+	+	+	19,6	23,1	21,4

A tabela 4 apresenta o planejamento fatorial completo, já incluindo a resposta, que nesse caso, é a massa de extrato bruto de cada ensaio.

O ensaio 3 apresentou a maior massa de extrato. Trata-se do ensaio que apresenta como meio de cultivo o Czapek, que se manteve com agitação e ao abrigo de luz. A massa do extrato bruto foi de 101,4 mg, em média. Assim como todos os ensaios, é importante ressaltar que todos os experimentos foram obtidos de 300 mL de meio de cultivo.

O destaque para o meio de cultivo Nutriente foi o ensaio 4, com 54,6 mg de extrato bruto.

Uma informação muito rica pode ser extraída desse planejamento fatorial completo. Por exemplo, rotineiramente, o cultivo de fungos no laboratório de micro-organismos do NuBBE segue o padrão de realizar a inoculação e deixar os frascos na bancada, este é o tipo de cultivo chamado de “modo estático”. Ali, também no prazo de 28 dias, a cultura de micro-organismo permanece estática e, em muitos casos, a luz é mantida acesa.

De uma forma bem intuitiva, se observasse na tabela 4 os experimentos que descrevem o cultivo protocolado do laboratório de micro-organismos em que esse

trabalho de mestrado foi realizado; os ensaios 5 e 6 seriam selecionados, com massa de 23,5 e 20,9 mg, respectivamente. Nota-se que são massas de extratos muito próximas, apenas para esses dois ensaios, a variável meio de cultura não é tão expressiva. Porém, analisando de forma cuidadosa a mudança de nível da variável agitação (que nos ensaios 5 e 6 seu nível era -1) para o nível +1 seriam obtidos os experimentos 7 e 8. Nesse ensaio, cada meio de cultivo está sob luz e sob agitação, mas o que se observa é uma mudança expressiva na produção com Czapek (aumentando de 23,5 mg para 95,85 mg), um incremento de quase 4 vezes a resposta. O que, por outro lado, no caso do meio Nutriente, uma sensível mudança ocorreu, aumentando de 20,9 mg para 21,35, as menores produções entre os 8 experimentos.

Há o que se discutir sobre os outros ensaios. Como dito, informações valiosas podem ser tiradas de tal planejamento, mostrando que as técnicas quimiométricas apresentam um valor inquestionável também na química de produtos naturais.

Percebe-se que as variáveis tem forte influência na massa do extrato do fungo. É importante, inclusive, calcular quais são os efeitos mais relevantes e como eles alteram a resposta dos experimentos.

A seguir, o cálculo dos efeitos desse planejamento fatorial será apresentado. É importante destacar que todos os efeitos e interações aqui descritas foram realizadas em programas computacionais específicos, como Excel, um software bastante difundido e de fácil acesso; e também o programa Matlab, que é uma plataforma de alta performance, e que permite realizar inúmeros tipos de cálculos.

Nessa seção de resultados e discussão, os efeitos e interações serão apresentados de forma algébrica, contribuindo de forma didática e mais palpável para melhor entendimento das induções provocadas pelas variáveis selecionadas: meio de cultivo, luz e agitação.

4.2 CÁLCULO DOS EFEITOS

A próxima etapa de um planejamento fatorial é quantificar a importância de cada efeito nos experimentos. Com o cálculo dos efeitos é possível identificar as variáveis que mais contribuem para a indução da produção metabólica do fungo *Xylaria sp.*

Algebricamente, os efeitos são obtidos como sendo a média das respostas no nível alto, menos a média das respostas no nível baixo.

$$\text{Efeito} = \bar{y}_+ - \bar{y}_-$$

onde: $\bar{y}$ = média

Para a variável (A) meio de cultivo o efeito é calculado da seguinte forma: as respostas do nível alto, que são os ensaio pares (2, 4, 6 e 8), são: 31,1; 54,55; 20,9; 21,35 entram em contraste com o nível baixo, que são os ímpares (1, 3, 5 e 7), as respostas são: 61,1; 101,35; 23,5 e 95,85.

$$\text{Efeito (A)} = \frac{31,1+54,44+20,9+21,35}{4} - \frac{61,1+101,35+23,5+95,85}{4}$$

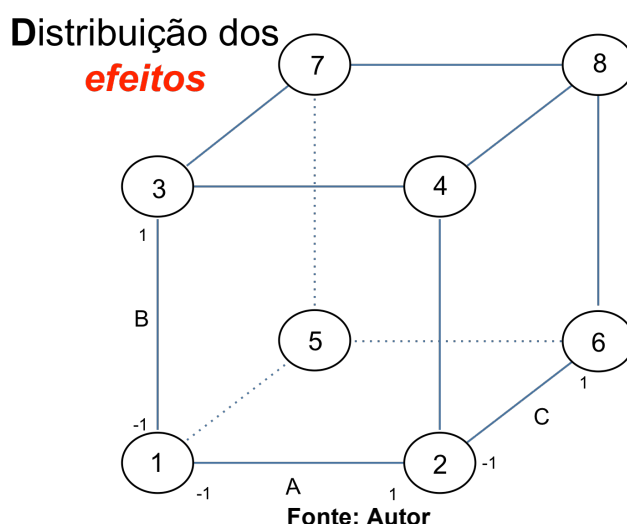
Dessa forma, o efeito da variável A é calculado como sendo:

$$\text{Efeito (A)} = 31,95 - 70,45 = -38,5 \text{ mg}$$

Também é possível representar o comportamento desses efeitos de forma geométrica. Trata-se de uma forma mais didática e intuitiva de observar o perfil do planejamento fatorial realizado.

Para o planejamento fatorial descrito nesse projeto de mestrado, por se tratar de um planejamento 2^3 , os dados da tabela 4 podem ser representados graficamente em um cubo.

Figura 9 - Distribuição dos efeitos em um cubo



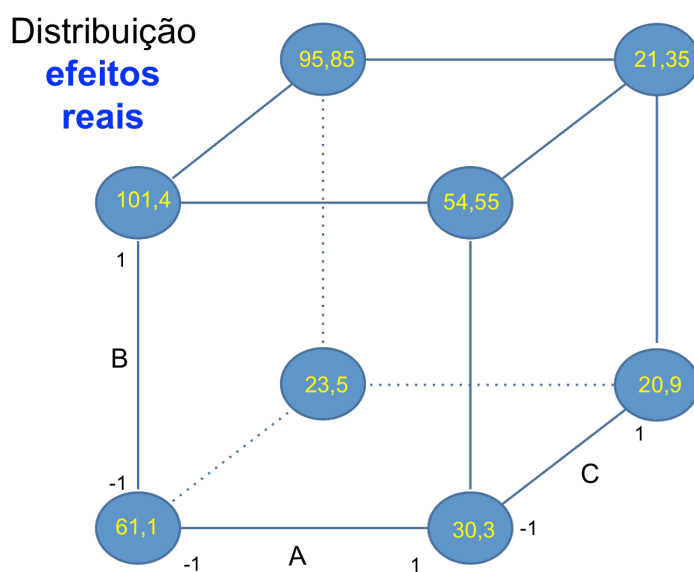
Cada um dos ensaios ocupam o vértice de um cubo de acordo com suas características experimentais.

Atribuindo o valor das respostas obtidas em cada um dos ensaios, o cubo pode contemplar os valores das massas dos extratos obtidos, possibilitando o cálculo do efeitos e podendo visualizar quais ensaios estão em contrastes.

Tabela 5 - Relação das massas obtidas para cada ensaio

Ensaio	Extrato (mg)
1	61,1
2	31,1
3	101,4
4	54,6
5	23,5
6	20,9
7	95,85
8	21,35

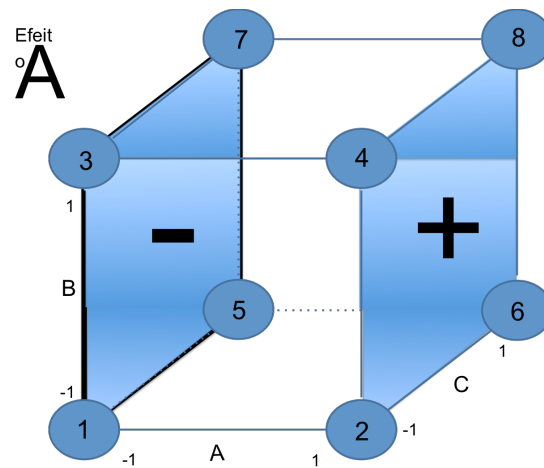
Figura 10 - Disposição das massas dos extratos em um cubo



Fonte: Autor

Para o cálculo do efeito A, subtrai-se as respostas que situam-se no nível alto (2, 4, 6 e 8) das que estão alocadas no nível baixo (1, 3, 5 e 7).

Figura 11 - Faces destacadas para o nível alto e nível baixo - Cálculo efeito A



Fonte: Autor

$$\text{Efeito (A)} = \frac{31,1 + 54,55 + 20,9 + 21,35}{4} - \frac{61,1 + 101,4 + 23,5 + 95,85}{4}$$

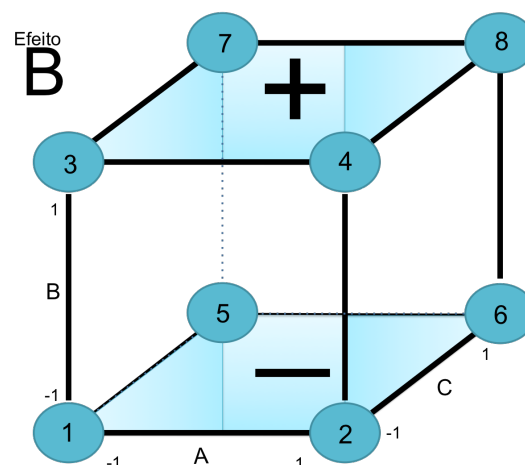
Portanto, o efeito da variável A (meio de cultivo) é de:

$$\text{Efeito A} = 31,99 - 70,46$$

$$\text{Efeito A} = -38,5 \text{ mg}$$

O efeito B também é calculado da mesma forma. Buscam-se as respostas no nível alto, sendo o ensaio 3, 4, 7 e 8 e subtrai do nível baixo (1, 2, 5, 6).

Figura 12 - Faces do cubo destacada para o nível alto e baixo - Cálculo de B



Fonte: Autor

$$\text{Efeito (B)} = \frac{101,35+54,55+95,85+21,35}{4} - \frac{61,1+31,1+23,5+20,9}{4}$$

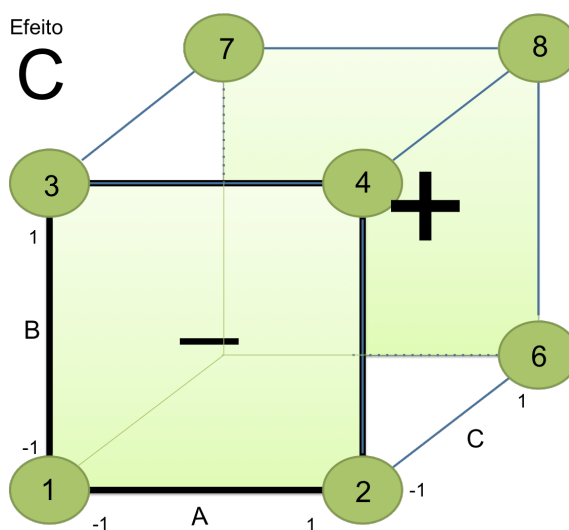
Portanto, o efeito da agitação é o seguinte:

$$\text{Efeito (B)} = 68,28 - 34,15 = \mathbf{34,13 \text{ mg}}$$

E por fim, o mesmo critério é aplicado para calcular o efeito da luz. Os níveis alto da variável luz encontram-se nos ensaios 5, 6, 7 e 8, e os níveis baixos são: 1, 2, 3 e 4.

Aplicando à mesma fórmula, obtêm-se o efeito da luz na resposta dos experimentos.

Figura 13 - Faces destacadas para o nível alto e baixo - Cálculo de C



Fonte: Autor

$$\text{Efeito (C)} = \frac{23,5+20,9+95,85+21,35}{4} - \frac{61,1+31,1+101,35+54,55}{4}$$

$$\text{Efeito (C)} = 40,4 - 62,03 = \mathbf{-21,63 \text{ mg}}$$

Esses três efeitos calculados são chamados de **efeitos principais**. Mas em um planejamento fatorial com 3 variáveis, outros efeitos também podem ser

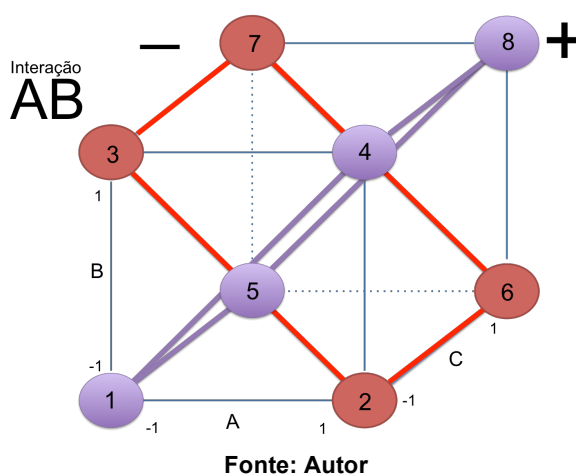
calculados, porque, de muitas formas, eles podem interagir entre si e contribuir de forma positiva ou negativa para a produção do extrato.

Para o tipo de planejamento construído aqui, 8 ensaios foram realizados, e é possível encontrar 7 efeitos:

- 3 efeitos principais (já calculados logo acima)
- 3 efeitos secundários
- 1 efeito terciário

Para os efeitos secundários e terciário, o mesmo raciocínio aplica-se. Por exemplo, para o efeito entre meio de cultivo e agitação (efeito AB) os níveis altos são aqueles que apresentarem para as duas variáveis os sinais -1, -1 ou +1, +1, seguindo a regra algébrica de combinação de sinais, ou seja, os níveis altos seriam os ensaios 1, 4, 5 e 8. Para os níveis baixos, os ensaios com sinais -1, +1, que são representados pelos ensaios 2, 3, 6 e 7.

**Figura 14 - Destaque do nível alto e nível baixo -
Cálculo de interação AB**



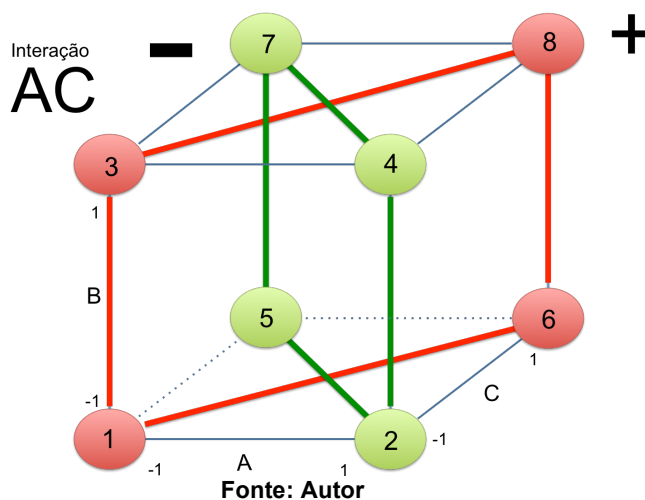
$$\text{Efeito AB} = \frac{61,1 + 54,55 + 23,5 + 21,35}{4} - \frac{31,1 + 101,35 + 20,9 + 95,85}{4}$$

Portanto, o efeito AB = 40,13 – 62,3 = **-22,17 mg**

Todos os demais efeitos foram calculado seguinte os mesmos critérios algébricos explicitados acima.

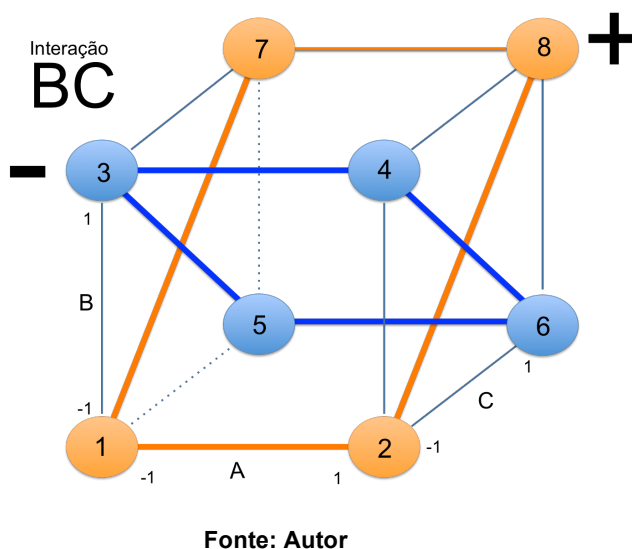
Para o efeitos AC, os experimentos considerados para o nível alto foram 1, 3, 6 e 8 e para o nível baixo, 2, 4, 5 e 7. Obtendo o efeito AC **-0,08mg**.

Figura 15 - Destaque do nível alto e nível baixo - Cálculo de interação AC



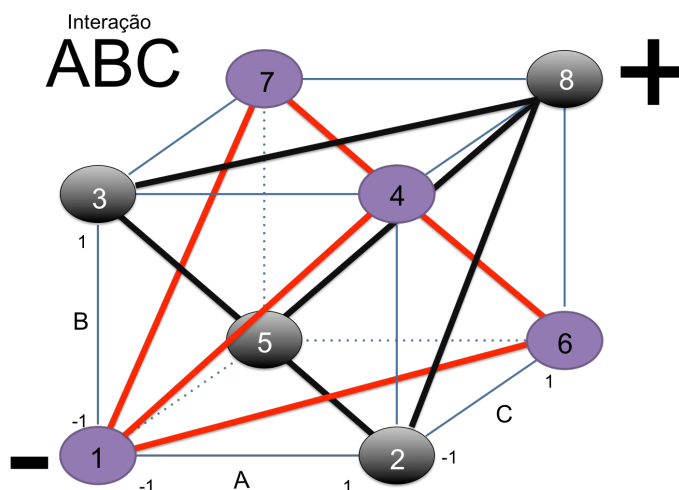
O efeito BC foi calculado pelo contraste entre os níveis alto (1, 2, 7 e 8) e baixo (3, 4, 5, 6), obtendo efeito BC = $52,35 - 50,075 = 2,28 \text{ mg}$

Figura 16 - Destaque do nível alto e baixo - Cálculo de interação BC



E, por fim, o efeito terciário, ABC, também a diferença entre o nível alto (2, 3, 5 e 8) e o nível baixo (1, 4, 6 e 7), concluindo com efeito ABC = **-13,78 mg**.

Figura 17 - Destaque dos níveis alto e baixo - Cálculo interação ABC



Fonte: Autor

Neste tipo de interação, em que todas as variáveis apresentam relevância, o contraste se dá pela diferença de dois tetraedros inscritos em um cubo regular, como representado pelas linhas que unem os ensaios positivos e os negativos.

Tabela 6 - Agrupamento dos efeitos do planejamento fatorial

Efeitos principais	Efeitos Secundários	Efeitos Terciários
A) -38,5 mg	AB) -22,17 mg	ABC) -13,78 mg
B) 34,13 mg	AC) -0,08 mg	
C) -21,63 mg	BC) 2,28 mg	

Somente agora, com os todos os efeitos calculados, podemos entender o comportamento do fungo *Xylaria sp.* perante as três variáveis propostas para esse planejamento fatorial.

Discutindo sobre os efeitos principais, todas variáveis apresentam efeitos significativos nas condições de cultivo. Evidentemente o meio de cultivo e a agitação apresentam maior influência na modificação da resposta. A luz, entre as três variáveis, foi a que menos influenciou no processo, mas não deixa de ter relevância.

Quando os efeitos secundários são analisados, nota-se que apenas o efeito AB apresenta destaque frente aos outros dois.

E por fim, a combinação dos três efeitos também apresenta uma alteração na resposta do fungo.

Mas como saber se realmente tais efeitos são significativos?

Existem diversas formas de deduzir se um efeito é importante. Por exemplo, os efeitos secundários AC e BC são muito pequenos se comparados com os demais. A análise cuidadosa da tabela de efeitos mostra que a variável C (luz) tem uma influência menor entre os efeitos principais, e sempre quando combinada, por exemplo, AC, BC e ABC, ela faz com que os efeitos sejam diminuídos. Portanto, para a luz, mudando de um experimento sem luz para um experimento com luz, há abaixamento da produtividade.

A variável A, meio de cultivo, apresenta efeito de -38,5 mg. O sinal negativo não diz que o efeito é prejudicial, pelo contrário, ele explica que mudando do meio Czapek para o Nutriente, a quantidade de extrato produzido é, em média, diminuída em 38,5 mg.

Já a variável B, quando passamos do modo estático para um experimento com agitação, o efeito de tal variável aumenta, em média, em 34,13 mg.

E por fim, a variável luz, codificada com a letra C, apresenta um abaixamento de -21,63 mg quando realizamos ensaios na presença de luz.

4.3 O MODELO ESTATÍSTICO

Um modelo estatístico é um conjunto de um ou mais modelos matemáticos cuja finalidade é a modelagem de sistemas de interesse em termos de suas características.

Um problema recorrente na ciência consiste em tentar expressar uma ou mais variáveis, denominadas variáveis respostas y , como função de um conjunto de outras variáveis, denominadas variáveis explicativas x . Dessa forma, o efeito de x sobre y pode ser expresso através de um modelo matemático do tipo: $y=f(x)$.

Frequentemente, por diversos motivos, esta relação não é perfeita. Como consequência, $f(x)$ apenas se aproxima de y e, portanto, a igualdade não se verifica considerando apenas as variáveis x . Uma situação comum é que, além de x ,

inúmeras outras características também afetam y . Assim, o efeito conjunto dessas características é agrupado em outra variável, ε , que representa os erros que podem estar associados aos ensaios.

Ao expressar o modelo desta forma, pressupõe-se portanto, que o efeito conjunto é aditivo. É importante observar também que com essa configuração, não é possível estudar o efeito de x isoladamente.

Um modelo estatístico de um planejamento fatorial pode ser construído seguindo a seguinte estrutura:

$$y(x_1, x_2, x_3) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$$

Com a codificação, cada efeito passa a corresponder sempre à variação de duas unidades do fator correspondente, já que o nível do fator varia de -1 para +1. Por unidade de X_1 e X_2 , conseqüentemente, os efeitos são a metade dos valores que foi calculado.

Dizer que o efeito do meio de cultivo é de -38,5 mg quando A passa de Meio Czapek para Nutriente é o mesmo que dizer que esse efeito é de -19,25 mg por unidade de X . Dividindo por dois os efeitos calculados obtém-se os novos valores - 19,25 mg (meio de cultivo), 17,07 mg (agitação) e -10,82 mg (luz). Para as interação entre meio de cultivo e agitação, encontra-se um abaixamento de 11,09 mg; para interação entre meio de cultivo e luz, apenas 0,035 mg; a interação entre agitação e luz também é pequeno, de apenas 1,14 mg e por fim, a interação entre todos os efeitos principais, meio de cultivo, agitação e luz, com -6,89 mg.

Portanto, o modelo estatístico representado nesse planejamento fatorial pode ser descrito da seguinte forma:

$$y(x_1, x_2, x_3) = 51,22 - 19,25x_1 + 17,07x_2 - 10,82x_3 - 11,09x_1x_2 - 0,035x_1x_3 + 1,14x_2x_3 - 6,89x_1x_2x_3$$

Por exemplo, para o ensaio 1, onde tem-se os níveis -1 para todas as variáveis, pode-se estimar a resposta (y) substituindo os valores de x_1 , x_2 e x_3 por -1.

Logo:

$$y(-1,-1,-1) = 51,22 - 19,25(-1) + 17,07(-1) - 10,82(-1) - 11,09(-1)(-1) - 0,035(-1)(-1) + 1,14 (-1)(-1) - 6,89 (-1)(-1)(-1)$$

$$y(-1,-1,-1) = 51,22 + 19,25 - 17,07 + 10,82 - 11,09 - 0,035 + 1,14 + 6,89 = \mathbf{61,12 \text{ mg}}$$

$$y(+1,-1,-1) = 51,22 - 19,25(1) + 17,07(-1) - 10,82(-1) - 11,09(1)(-1) - 0,035(1)(-1) + 1,14 (-1)(-1) - 6,89 (1)(-1)(-1)$$

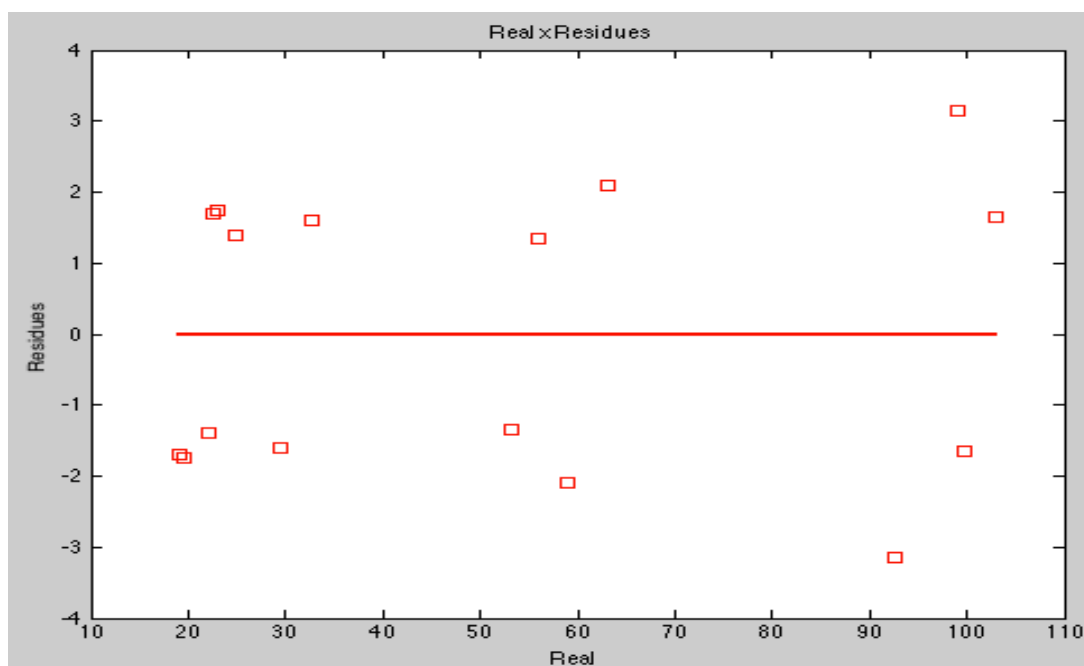
$$y(+1,-1,-1) = 51,22 - 19,25 - 17,07 + 10,82 + 11,09 - 0,035 + 1,14 - 6,89 = \mathbf{31,10 \text{ mg}}$$

Aplicando essa equação matemática para todos os ensaios, obtêm-se os valores preditos pelo modelo proposto:

Tabela 7 - Cálculo do resíduo gerado pelo modelo proposto

Ensaio	R1	R2	Média	Previsto	Resíduo 1	Resíduo 2
1	59	63,2	61,10	61,12	-2,13	2,08
2	29,5	32,7	31,10	31,10	-1,60	1,60
3	103	99,7	101,35	101,38	1,62	-1,68
4	55,9	53,2	54,55	54,56	1,34	-1,36
5	24,9	22,1	23,50	23,50	1,40	-1,40
6	22,6	19,2	20,9	20,885	1,72	-1,685
7	99	92,7	95,85	95,875	3,12	-3,18
8	19,6	23,1	21,35	21,345	-1,74	1,76

Abaixo, gráfico que relaciona os valores preditos com os resíduos deixados pelo modelo matemático.

Figura 18 - Relação dos valores reais versus resíduos

Fonte: Autor

A estimativa do rendimento do ensaio 1, por exemplo, é 61,12 mg, enquanto os valores realmente observados nos experimentos individuais foram de 59 e 63,2 mg. A previsão feita pelo modelo matemático deixa dois resíduos, -2,13 e 2,08.

Com todos os dados já calculados, como apresentados nas tabelas abaixo, é possível calcular a porcentagem que cada efeito ou interação contribui para o modelo estatístico do planejamento fatorial.

Tabela 8 - Apresentação dos efeitos e porcentagens

	Efeitos	efeitos^2	Porcentagem
A	-38,48	1480,33	38,96
AB	-22,18	491,73	12,94
C	-21,63	467,64	12,31
ABC	-13,78	189,75	4,99
AC	-0,08	0,01	0,00
BC	2,28	5,18	0,14
B	34,13	1164,52	30,65
SOMA		3799,14	

Dessa forma, a porcentagem de cada efeito é encontrada fazendo uso da seguinte relação matemática:

$$\text{Porcentagem(\%)} = ((\text{efeito}^2)/\sum(\text{efeitos}^2))*100$$

A tabela 6 traz o cálculo da porcentagem de acordo com os efeitos e interações em ordem crescente de importância. Nota-se que o efeito A é o mais relevante, contribuindo com 38,96% da resposta. Seguido pelo efeito da agitação, depois da interação entre meio de cultivo e agitação; em quarto lugar a luz, e por fim, a interação entre todas as variáveis. É importante destacar que as interações BC (agitação e luz) e AC (meio de cultivo e luz) quase não apresentam significância para a resposta dos ensaios.

Para realmente ter subsídios para descartar estas duas interações, é possível calcular as variâncias e os erros (tanto experimentais como de cada efeito específico).

Tanto a variância como o desvio padrão, na realidade, é a medida da dispersão de um conjunto de dados. A variância mede o quanto cada elemento de uma distribuição se desviou do valor central, ou seja, da média dos experimentos.

Tabela 9 - Variâncias e coeficientes

VARIÂNCIA	N	G.L	VAR X G.L	COEF	COEF^2
8,82	2	1	8,82	0,25	0,0625
5,12	2	1	5,12	0,25	0,0625
5,445	2	1	5,445	0,25	0,0625
3,645	2	1	3,645	0,25	0,0625
3,92	2	1	3,92	0,25	0,0625
5,78	2	1	5,78	0,25	0,0625
19,845	2	1	19,845	0,25	0,0625
6,125	2	1	6,125	0,25	0,0625
soma		8	58,7		0,5

A variância é calculada como sendo a diferença entre a resposta e a média dos experimentos.

No caso deste planejamento fatorial, por exemplo, para o ensaio 1, a duplicata apresenta as respostas: 59 e 63,2, cuja média é 61,1. A variância para esse caso é encontrada da seguinte forma:

$$S^2 = (59 - 61,1)^2 + (63,2 - 61,1)^2 / 2 - 1 = 8,82.$$

A tabela 7, apresenta a variância de cada ensaio na primeira coluna. O n é o número de réplicas, no caso, 2, para todos os ensaios. G.l é o grau de liberdade, ou seja, n-1.

No caso do planejamento proposto aqui, fica evidente o valor do coeficiente fica mais claro quando se analisa, por exemplo, o cálculo algébrico do cálculo de cada efeito. Exemplo, para encontrar a interação AB, temos:

$$\text{Efeito AB} = \frac{61,1+54,55+23,5+21,35}{4} - \frac{31,1+101,35+20,9+95,85}{4}$$

Note que cada parte da subtração é dividida por 4 (o número de ensaios que estão no nível alto ou baixo). É o mesmo que cada ensaio fosse multiplicado por $\frac{1}{4}$. Por esse motivo, o coeficiente explicitado na tabela 7 é 0,25.

Com isso, a variância experimental é encontrada pela relação existente entre a variância de cada efeito com o grau de liberdade.

Logo,

$$S^2 = \frac{8,82+5,12+5,45+3,65+3,92+5,78+19,85+6,13}{1+1+1+1+1+1+1+1}$$

Variância experimental: $S^2 = 7,34$

E o erro experimental é a raiz quadrada da variância experimental:

$$S=7,34^{0,5} = \mathbf{2,71}$$

Agora é possível encontrar o erro de um efeito.

Variância de um efeito é encontrado quando todos os coeficientes são elevados ao quadrado, multiplicado pela variância experimental dividido por 2 (que é o número de réplicas para cada ensaio). Ou seja, algebricamente, o cálculo do erro de um efeito é descrito da seguinte forma:

$$\text{Variância de um efeito} = (\sum \text{coef}^2) * S^2 / 2 = 0,5 * (7,34 / 2) = \mathbf{1,84}$$

E, conseqüentemente, o **erro de um efeito** é a raiz da variância de um efeito.

Logo: erro de um efeito = $1,84^{0,5} = 1,35$

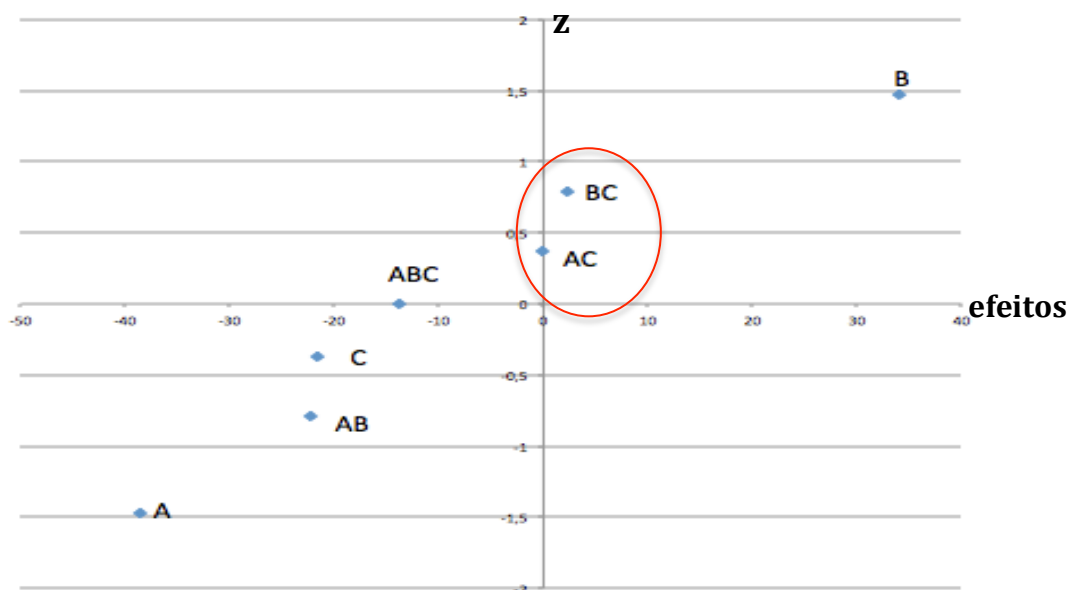
Além disso, é importante enfatizar que os 7 efeitos calculados seguem uma distribuição gaussiana, ou distribuição normal.

Tabela 10 - Valor para o cálculo da distribuição normal

	Efeitos	início	fim	centro	z
A	-38,48	0,00	0,14	0,07	-1,47
AB	-22,18	0,14	0,29	0,21	-0,79
C	-21,63	0,29	0,43	0,36	-0,37
ABC	-13,78	0,43	0,57	0,50	0,00
AC	-0,08	0,57	0,71	0,64	0,37
BC	2,28	0,71	0,86	0,79	0,79
B	34,13	0,86	1,00	0,93	1,47

Como sete efeitos foram calculados, a curva gaussiana deve ser dividida igualmente, logo, o primeiro experimento, A, ele se inicia em 0 e vai até 0,143 (que é 1/7 da área da gaussiana). Isso foi feito para todos ensaios. Cada uma dessas áreas se relaciona com um valor de z, que é o valor da distribuição normal, que é facilmente encontrado em tabelas específicas. Por fim, encontra-se valores de z simétricos que estão distribuídos em uma curva gaussiana.

Figura 19 - Gráfico de probabilidade - Efeitos versus valor de z



Fonte: Autor

Realizando a análise no gráfico dos efeitos versus o valor de z , é possível identificar que duas interações estão muito próximas de 0 (sendo estas correspondentes às interações AC e BC). Os demais efeitos apresentam influências mais significativas na resposta.

Para ter certeza se essas interações destacadas em vermelho podem ser desconsideradas (ou receberem menos importância) é necessário realizar um teste de t de Student.

O número de grau de liberdade para este planejamento é igual a 8. Em um teste t com 95% de confiança, e com 8 graus de liberdade, o valor de t é de **2,306** (valor encontrado em tabelas próprias. Ou calculados facilmente em softwares, como o Excel, por exemplo).

Um t crítico é encontrado quando multiplica-se o erro de um efeito com o valor de t com 8 graus de liberdade e 95% de confiança.

Ou seja,

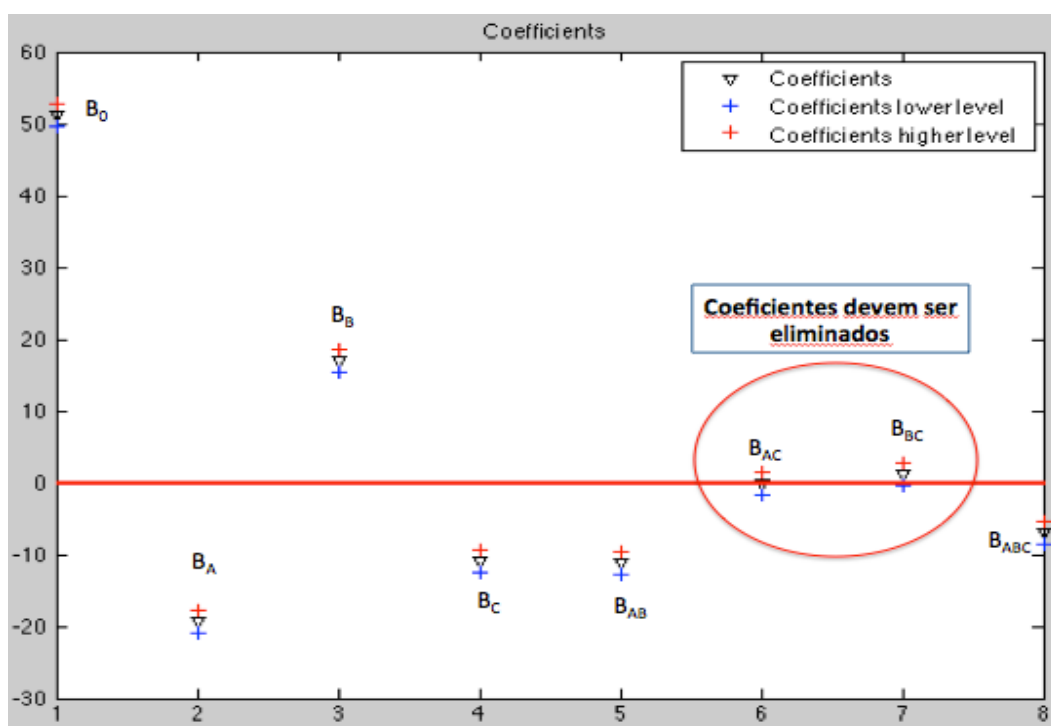
$$T_{\text{crítico}} = 2,306 * 1,35 = \mathbf{3,11}.$$

Com isso, todos os efeitos e interações menores que 3,11 podem ser descartados. Analisando a tabela de efeitos e interações (tabela 6, na página 30) apenas duas interações apresentam valor menor que 3,11, sendo exatamente os pontos destacados pela região vermelha no gráfico de probabilidade. Dessa forma, as interações entre meio de cultura e luz (AC) e agitação e luz (BC) são menos relevantes e podem, portanto, receber menos atenção no tratamento dos dados.

Os efeitos A, B, C e as interações AB e ABC, juntas, correspondem a 99,95% da modelagem estatística.

Do mesmo modo, os coeficientes calculados e seus respectivos valores quando subtraídos e somados pelo intervalo de confiança podem ser representados graficamente.

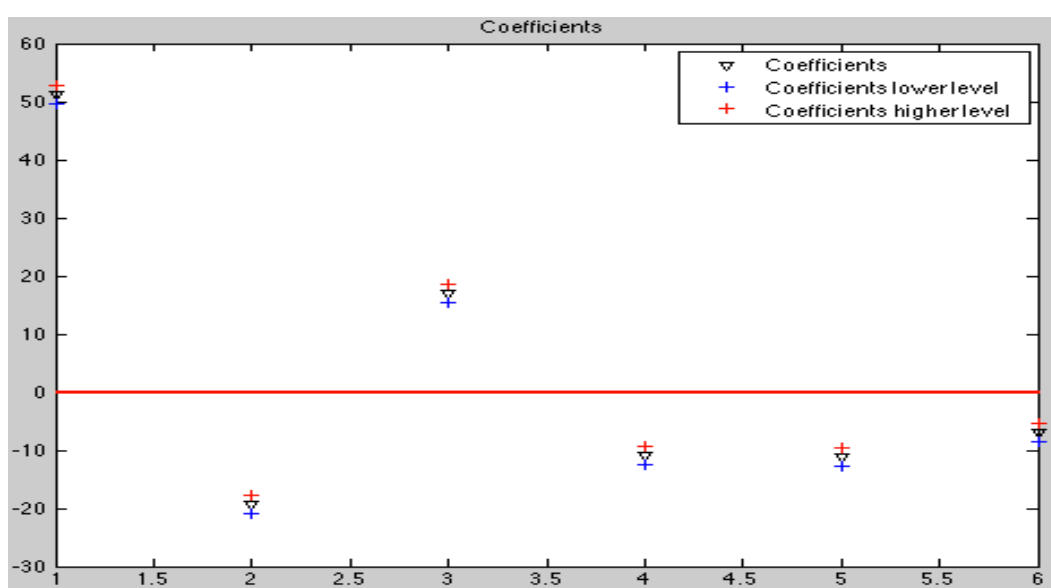
Nota-se que no gráfico, dois coeficientes passam pelo zero. Isso significa que tais coeficientes podem assumir o valor de 0 no modelo matemático. Os cálculos apresentados evidenciam que esses dois coeficientes podem ser negligenciados, significa que o modelo deve ser reajustado eliminando os coeficientes AC e BC e refazendo novamente os cálculos para obtenção de um modelo mais consistente.



Fonte: Autor

O modelo é reajustado, eliminando as interações AC e BC. Com isso, a predição dada pelo modelo ajustado gera novos resíduos que podem também ser apresentados em um gráfico.

Figura 21 - Apresentação dos coeficientes e seus respectivos intervalos de confiança



Fonte: Autor

Dessa forma, observa-se na figura 21 que nenhum coeficiente pode assumir o valor 0. Todos os coeficientes ali demonstrados são relevantes para o modelo proposto.

Uma tabela de ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) é apresentada a seguir. Esta tabela faz contemplar a análise da variância do modelo representado até aqui.

A Soma Quadrática da Regressão é uma das informações que a tabela de ANOVA apresenta. Trata-se da soma total do quadrado da diferença entre os valores previstos pelo modelo e as médias das respostas encontradas. O grau de liberdade permitido para Soma Quadrática de Regressão (SQ_R) é $p-1$ (onde p corresponde ao número de coeficientes encontrado) Para o modelo proposto aqui, foram 6 coeficientes, logo, 5 graus de liberdade são atribuídos à SQ_R .

O mesmo é feito para os resíduos deixados pelo modelo. Ou seja, subtrai-se dos dados experimentais os valores previstos pelo modelo, o valor obtido é elevado ao quadrado, obtendo, assim, a Soma Quadrática dos Resíduos (SQ_{res}). Este valor representa a quantidade de resposta que não está sendo contemplada pelos coeficientes de regressão que foram determinados para o modelo proposto.

Somando os dois valores obtidos na SQ_r e SQ_{res} , obtêm-se a Soma Quadrática Total, com 15 graus de liberdade.

Verifica-se que as Somas Quadráticas sempre estão associadas a determinado número de grau de liberdade. Dividindo-as por este valor de grau de liberdade, obtêm-se uma média, denominada Média Quadrática.

Com isso, a Média Quadrática dará uma informação sobre o modelo estatístico proposto até aqui.

A seguir, são apresentadas as tabelas de descrições de ANOVA, bem como os valores encontrados para o planejamento fatorial aqui descrito.

Tabela 11 - Tabela de Anova (Analysis of Variance)

Parâmetro	Soma quadrática	G.L	Média Quadrática
Regressão, SQR	$\sum_{i=1}^n (\hat{y} - \bar{y})^2$	$p-1$	$MQ_R = \frac{SQR}{p-1}$
Resíduo, SR_{res}	$\sum_{i=1}^n (y - \hat{y})^2$	$n-p$	$MQ_{res} = \frac{SQ_{res}}{n-p}$

Total, SQT	$\sum_{i=1}^n (y - \bar{y})^2$	n-1	$MQT = \frac{SQT}{n-1}$
Erro Puro, SQep	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (\hat{y}_{ij} - \bar{y})^2$	n-m	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n-m}$
Falta de ajuste, SQ_{faj}	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m-p}$

Onde: G.L= Grau de liberdade, p= número de coeficiente, n=número de experimentos, m = número de experimentos independentes, $\bar{y}_i$ = resposta prevista e $\bar{y}$ = média das respostas experimentais.

Portanto, os valores de cada elemento da tabela ANOVA foram calculados e estão contemplados na tabela abaixo.

Tabela 12 - Tabela de Anova calculada

Anova (Analysis of Variance)				
	SQ	g.l.	MQ	Teste F
R	15175,85	5	3035,17	1,412
r	79,42	10	7,9425	
T	15255,28	15	1017,02	
EP	58,70	8	7,3375	
FaJ	20,72	2	10,3625	
R²	0,9948	0,9973		
R² max	0,9961	0,9980		

As médias quadráticas obtidas podem ser comparadas por um teste F. Obtêm-se um valor de F na divisão da Média Quadrática da Regressão pela Média Quadrática dos Resíduos. E compara-se com um valor de F tabelado que contemple os graus de liberdade do numerador (G.L=5) e do denominador (G.L=10) e com os critério de 95% de confiança.

$$F = \frac{MQR}{MQ_{res}}$$

$$F = \frac{3035,1705}{7,94} = \mathbf{382,14}$$

O valor de F tabelado (95% de confiança e com graus de liberdade 5 e 10) é **3,33**. Logo, o modelo é confiável.

Analisando a razão entre SQ_R e SQT , obtêm-se:

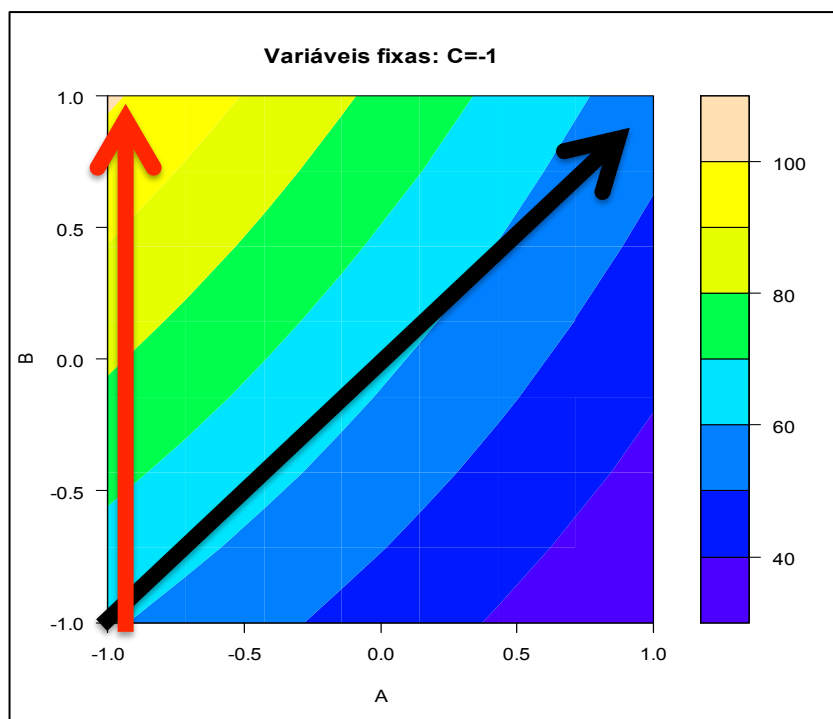
$$\frac{SQR}{SQT} = \frac{15175,85}{15255,28} = 0,9948$$

99,58% da Soma Quadrática de todo o planejamento está sendo relacionada com SQR . Esta é mais uma informação de que o modelo proposto é válido em suas determinadas condições.

Abaixo, os gráficos de contorno que esse modelo estatístico descreve. Lembrando que o modelo proposto está restrito aos níveis -1 e +1, fora dessa definição (em outro meio de cultivo, com outro tipo de agitação ou com uma intensidade de luz alternada) não é possível afirmar, matematicamente, que o fungo *Xylaria sp.* se comporta da mesma forma.

O gráfico abaixo é conhecido como curva de contorno. Fixando a variável C (luz) no nível baixo, ou seja, com ausência de luz, é possível analisar o comportamento do meio de cultivo frente a agitação, seguindo a seta indicativa (em cor preta) que representa a passagem do Czapek para o Nutriente e partindo para experimentos com agitação, a tendência é obter massa de extrato mais baixa, próxima de 50 mg (cor azul).

Figura 22 - Gráfico de curva de contorno

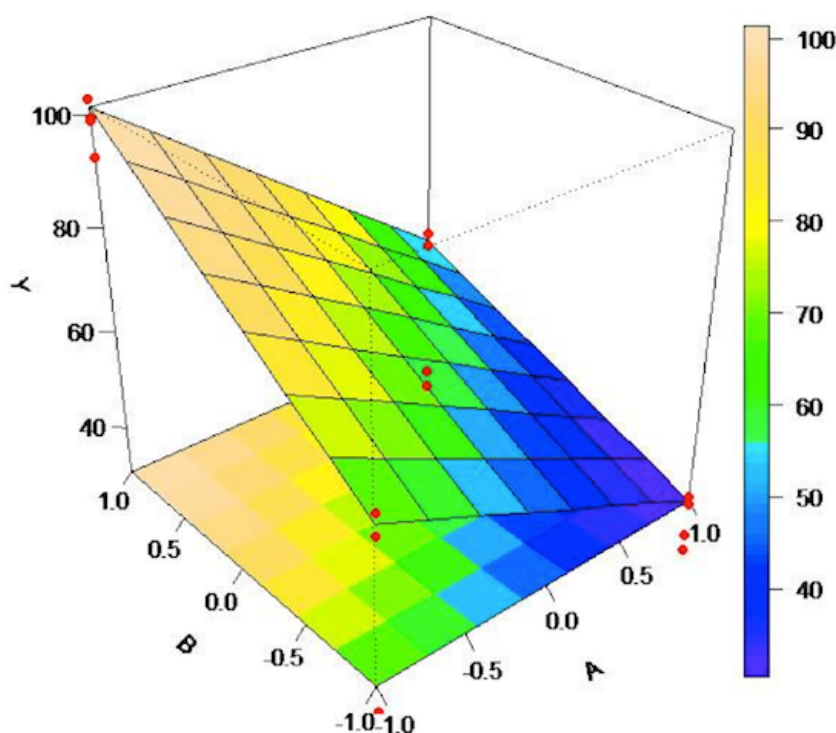


Fonte: Autor

Por outro lado, a seta vermelha indica que há um aumento na produção de extrato. Significa que se o meio de cultivo for Czapek e a agitação for aplicada ao ensaio, a tendência é aumentar a resposta, chegando próximo a 100 mg de extratos, coloração rosa, (o que se configuraria no experimento 3, com massa obtida de 101,35 mg).

A figura abaixo apresenta uma superfície de resposta do modelo proposto para este planejamento fatorial. Fixando a variável C em -1, onde há os ensaios com maiores respostas, pode-se observar que nos níveis correspondentes a -1, sem agitação, sem luz (já que está fixada), e Czapek, a massa fica próxima de 60 mg (ensaio 1). Passando do nível -1 para +1 na variável B, há um aumento de quase 40 mg, obtendo 100 mg de extrato, o que equivale ao ensaio 3. E um decaimento de massa quando passa-se do nível -1 para +1 da variável A. Ou seja, cai de 100 mg para 54 mg (ensaio 4).

Figura 23 - Superfície de resposta para o modelo proposto



Fonte: Autor

Como o objetivo desse trabalho é explorar a variabilidade metabólica do fungo *Xylaria sp.* em diferentes condições de cultivo, é bastante claro na literatura que o meio de cultivo é um fator determinante na produção metabólica dos micro-organismos.

Com o intuito de verificar como os demais fatores, agitação e luz, influenciam no comportamento do fungo, excluiu-se a variável A (meio de cultivo) e um novo planejamento fatorial foi feito, visando compreender como a agitação e luz influenciam o comportamento do fungo.

O planejamento fatorial apresentado até aqui, foi desmembrado em dois planejamentos fatoriais 2^2 , um apenas com os ensaios de Czapek (destacado na tabela acima na cor azul) e outro, com meio Nutriente.

O novo planejamento fatorial, 2^2 , é apresentado abaixo:

Tabela 13 - Apresentação dos dados de planejamento fatorial 2²

Czapek				Nutriente			
Ensaio	B	C	Médias	Ensaio	B	C	Médias
1	-1	-1	61,1	2	-1	-1	31,1
3	1	-1	101,1	4	1	-1	54,6
5	-1	1	23,5	6	-1	1	20,9
7	1	1	95,9	8	1	1	21,4

Legenda: B – Agitação, C – Luz

Para este novo planejamento, os efeitos também foram calculados e são expressos nas tabelas abaixo:

Tabela 14 - Cálculo dos efeitos e valores de z para o planejamento fatorial 2² (Czapek)

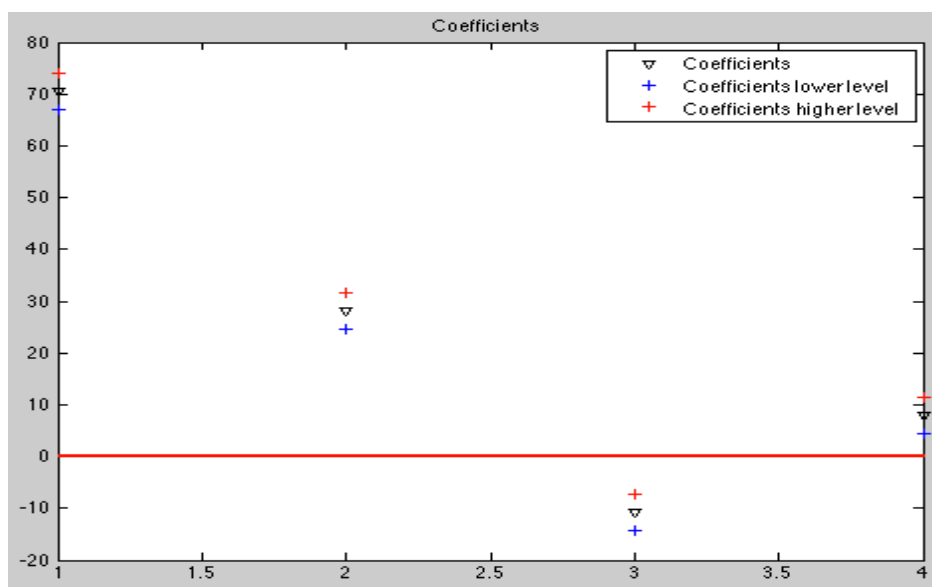
Czapek	Efeito	%	início	fim	centro	z
C	-21,4	11,80	0	0,33	0,17	-0,97
BC	16,2	6,76	0,33	0,66	0,5	0
B	56,2	81,42	0,66	1	0,83	0,97

Tabela 15 - Cálculo dos efeitos e valores de z para o planejamento fatorial 2² (Nutriente)

Nutriente	Efeito	%	início	fim	centro	z
C	-21,7	63,03	0	0,33	0,17	-0,97
BC	-11,5	17,70	0,33	0,66	0,5	0
B	12	19,27	0,66	1	0,83	0,97

O modelo proposto para os experimentos apenas com meio Czapek não precisa de ajuste, como mostrado no gráfico abaixo. Nenhum dos coeficientes passa pelo valor zero, portanto, todos são relevantes.

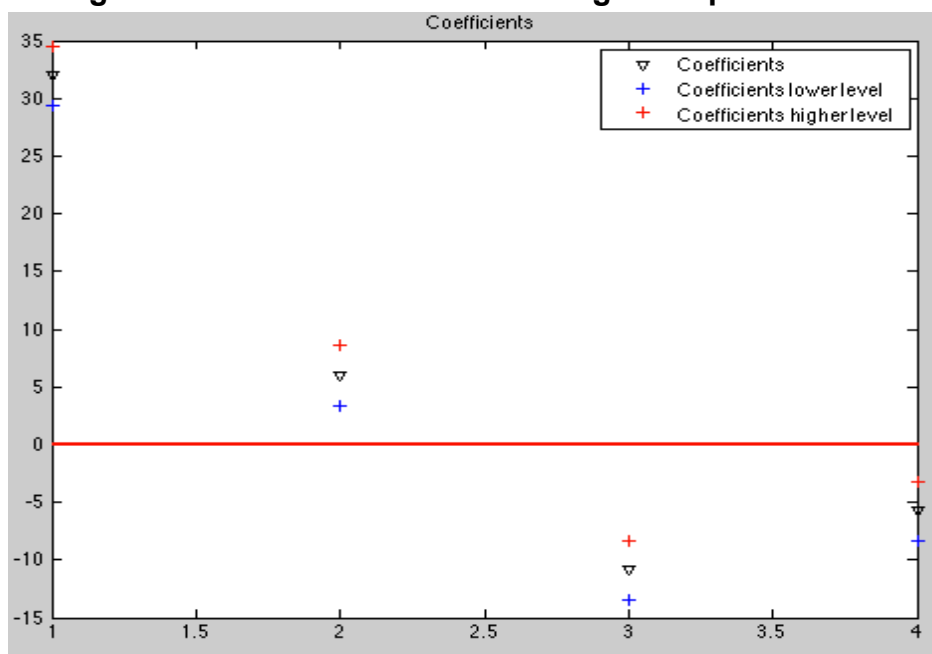
Figura 24 - Gráfico de coeficientes para o modelo do meio Czapek



Fonte: Autor

Do mesmo modo, para o modelo gerado para os ensaios cultivados com meio Nutriente, todos os coeficientes são relevantes para a modelagem matemática, como mostra o gráfico abaixo:

Figura 25 - Coeficiente do modelo gerado para o meio Nutriente

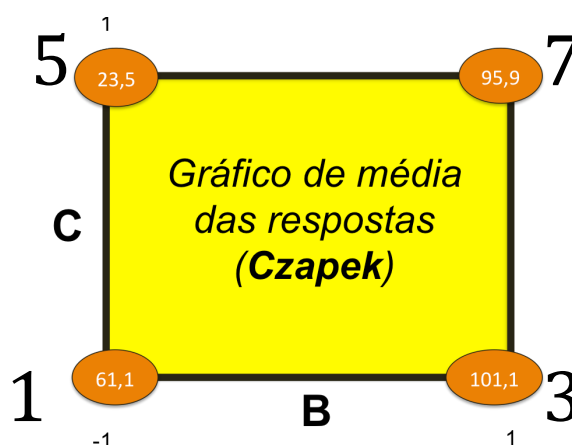


Informações importantes são observadas quando se divide o planejamento 2^3 em dois grupos. Analisando o grupo Czapek, pode-se notar que a agitação contribui em 81,42% no modelo matemático, e a luz, 11,80%. Isso é o oposto do que se observa para ensaio com meio Nutriente. A agitação 19,27%, e a luz, 63,03%.

Somado a isso, é possível dispor os valores das respostas em gráficos, como mostrados abaixo. Observa-se que quando se realiza experimentos com agitação, há um aumento médio, na massa de extrato obtidos de meio Czapek, de 40mg. E que sem agitação e com luz, os ensaios tem o menor rendimento, 23,5 mg.

Uma informação muito interessante é que o fungo *Xylaria sp.* é aeróbio, e por esse motivo, quando se tem agitação, há maior oxigenação, e com isso, o metabolismo do fungo faz com que produza maior quantidade de extrato.

Figura 26 - Gráfico das médias das respostas para os extratos em meio Czapek

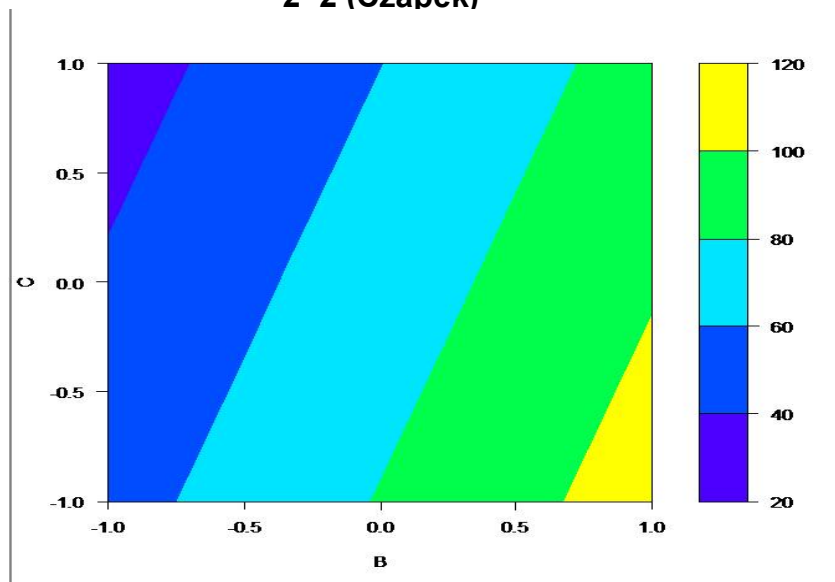


Fonte: Autor

O gráfico de contorno e a superfície de resposta criadas para os ensaios com Czapek descrevem o mesmo comportamento discutido anteriormente; aqui, porém, é possível encontrar o melhor caminho para se aumentar a produção de extrato do fungo.

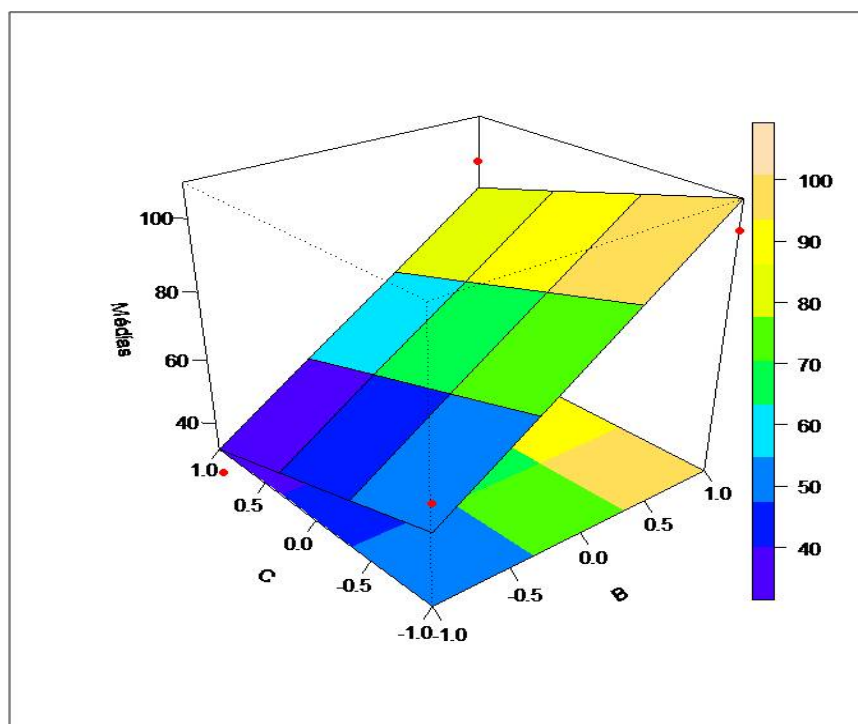
No gráfico de contorno, a área em amarelo é aquela que apresenta maior produção metabólica. Desse modo, caso a intenção seja produzir maior quantidade de extrato, a agitação é um fator determinante. Nessas condições de cultivo, a agitação se deu em 100 rpm. O gráfico de contorno e a superfície de contato sugere que se aumentar a agitação (e ao abrigo da luz) a produção de extrato é aumentada.

Figura 27 - Gráfico da curva de contorno para o modelo do planejamento 2^2 (Czapek)



Fonte: Autor

Figura 28 - Superfície de resposta para o planejamento 2^2 (Czapek)

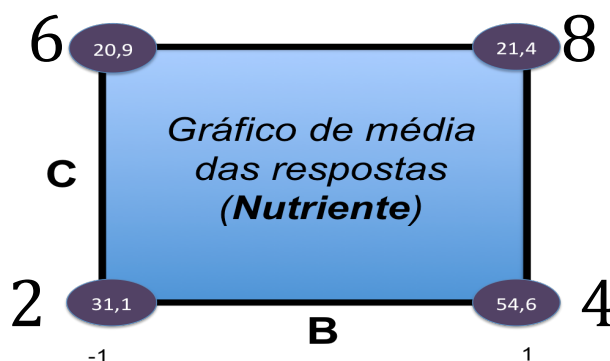


Fonte: Autor

O mesmo raciocínio foi feito perante os ensaios que correspondem ao cultivo com meio Nutriente.

Dessa forma, os gráficos de média de respostas e os de contorno e superfície de resposta também foram plotados.

Figura 29 - Gráfico da média das respostas para o meio Nutriente

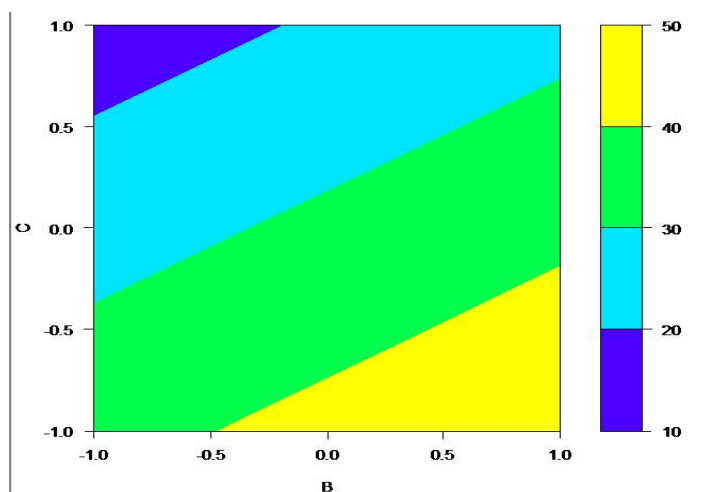


Fonte: Autor

Buscando a otimização das condições de cultivo, a análise do gráfico de contorno e da superfície de resposta apontam que as melhores condições de cultivo em meio nutriente também são com agitação e ao abrigo de luz (Ensaio 4).

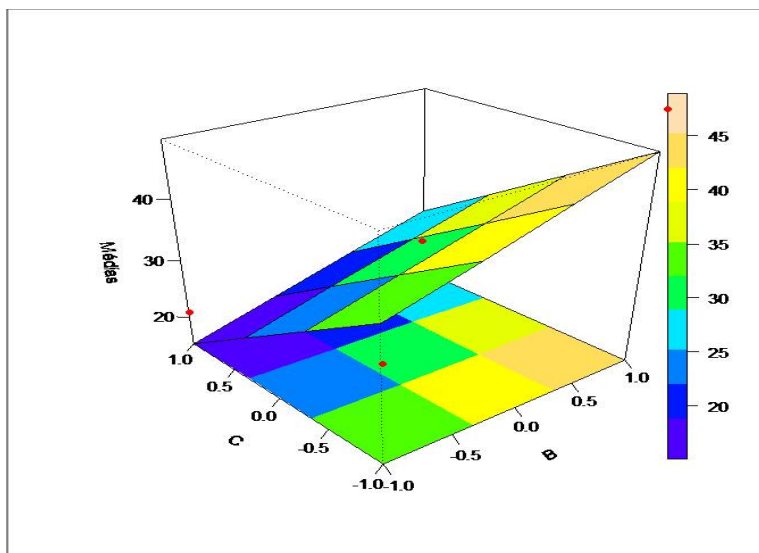
Os meios de cultivo Nutriente mostram que a agitação também favorece a produção de extrato. Para este caso, o efeito da agitação é apenas 12 mg, em média. Já o da luz, é de -21,7 mg. Ou seja, a luz tem uma relevância muito maior para a modelagem matemática do que a agitação.

Figura 30 - Gráfico de contorno do planejamento 2^2 (nutriente)



Fonte: Autor

Figura 31 - Superfície de resposta para o planejamento 2^2 (Nutriente)



Fonte: Autor

4.4 DADOS ESPECTROMÉTRICOS E ESPECTROSCÓPICOS

O planejamento fatorial descrito anteriormente garantiu que induções planejadas pudessem influenciar na produção metabólica do fungo *Xylaria sp.* pelo menos no sentido quantitativo, pois alguns ensaios proporcionaram uma quantidade maior de massa, outros, uma faixa intermediária ou até mesmo mais baixa.

Os extratos obtidos pelo planejamento foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM) e também cromatográfica gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

Inicialmente, será apresentado dos dados de CLAE-EM. Cada amostra foi analisada seguindo a descrição já apresentada na sessão experimental.

Como o intuito inicial é observar a variabilidade metabólica do fungo, foi realizada uma análise prévia dos cromatogramas obtidos pelo planejamento fatorial. Obviamente, o meio de cultivo é algo determinante na produção metabólica do micro-organismo. Por esse motivo, serão analisados os extratos separadamente, de acordo com o planejamento 2^2 porque assim, pode-se analisar quais são os fatores que realmente proporcionam OSMAC.

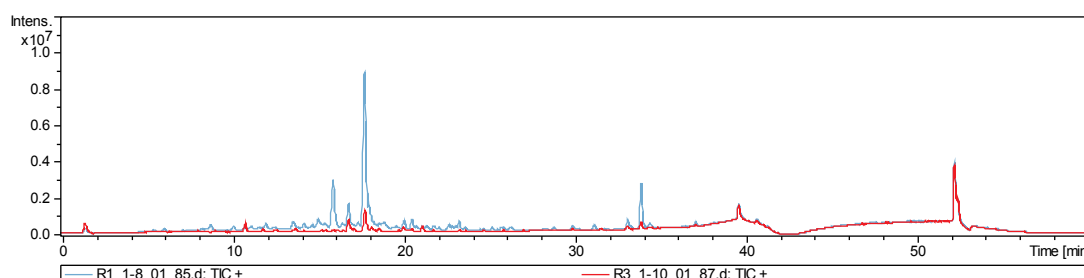
O objetivo principal de ter realizado tais induções, variações físico-química que poderia modificar a produção metabólica do fungo era verificar a possível ativação ou desativação de algumas vias metabólicas específicas para produção de determinados metabólitos. Através dos perfis cromatográficos obviamente há uma alteração bem significativa no número de sinais dos extratos obtidos do meio de cultivo Czapek, (sendo eles 1, 3, 5 e 7) daqueles de Nutriente (2, 4, 6 e 8). São meios de cultivo totalmente distintos em sua composição, o Czapek tem a Sacarose, como única fonte de carbono. Já o Nutriente é um meio complexo, com extrato de carne e extrato de levedura como constituintes principais.

4.5 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO METABÓLICA NO CLAE-EM NO MEIO CZAPEK.

Obviamente, a produção de metabólitos com diferentes meios de cultivo é distinta (ainda mais comparando-se um meio quimicamente definido onde a única fonte de carbono é a sacarose e um meio complexo). Por este motivo foram agrupados de tais formas, em dois grandes blocos. Nesta etapa, serão apresentadas as comparações dos ensaios obtidos do cultivo em Czapek, e posteriormente, obtidos do cultivo em Nutriente.

A primeira comparação é entre o ensaio 1 e o 3. Relembrando que o ensaio 1 foi contemplado com os níveis -1 (para toda as variáveis), então, trata-se de um experimento estático ao abrigo de luz. E o 3, mesmo meio de cultivo, mas com agitação, e também ao abrigo de luz. A amostra 1 é representada em azul. E a 3, em vermelho.

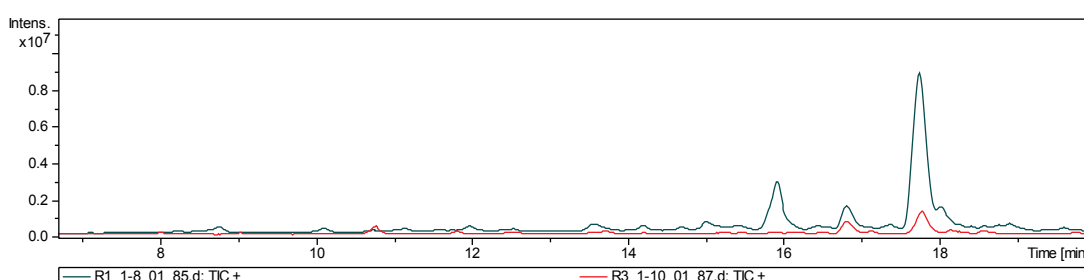
Figura 32 - Comparação entre os cromatogramas extrato 1 e 3



É importante destacar novamente que na comparação desses dois ensaios, quando se inseriu a agitação nas condições de cultivo, houve um aumento médio de 40 mg na produção de extrato.

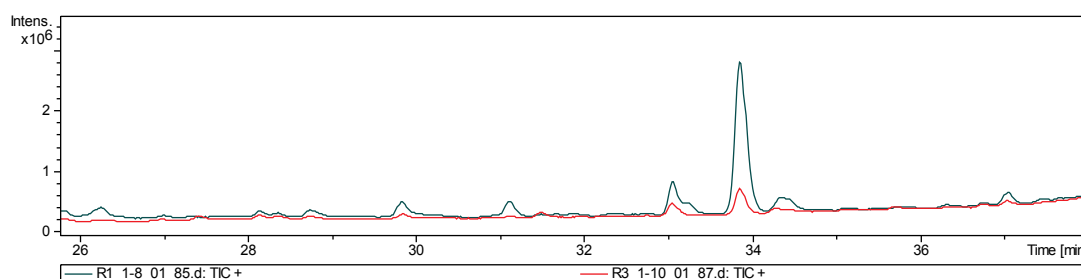
Na análise dos perfis dos cromatogramas do CLAE-EM é possível verificar que as induções planejadas induzem o fungo a mudar seu metabolismo. Ampliando as regiões dos cromatogramas, fica evidente que há sinais bastante destacados em um tipo de cultivo, e que são ausentes em outro.

Figura 33 - Ampliação da comparação entre 1 e 3 (7 a 19 min)



O sinal em 16 minutos, por exemplo, está presente apenas no ensaio 1, sem agitação.

Figura 34 - Ampliação e comparação entre 1 e 3 (26 a 38 min)



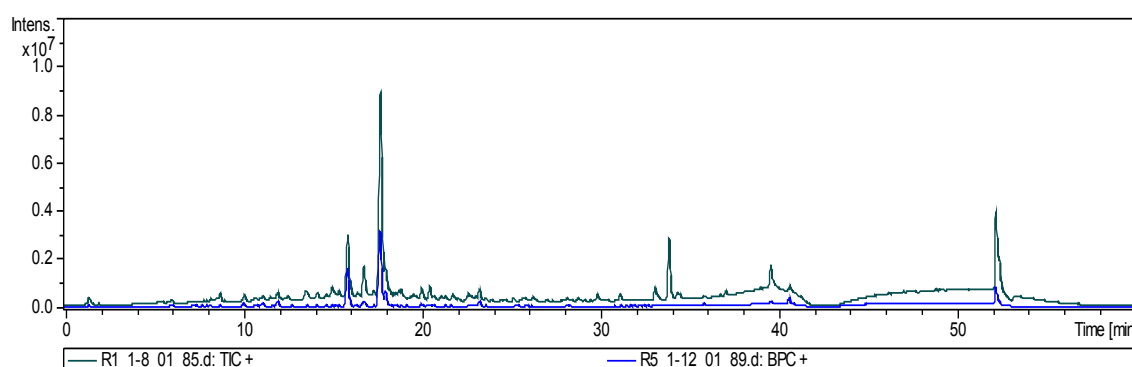
Do mesmo modo, é evidente que grande parte dos metabólitos produzidos são os mesmos, mas sinais diferenciados são evidenciados na comparação desses dois ensaios em condições de cultivo distintas.

A mesma comparação será feita entre todos os ensaios. Essa comparação entre os perfis cromatográficos das matrizes complexas pode dar resposta ao objetivo pretendido nesse trabalho de mestrado, que era explorar a rede metabólica

do fungo *Xylaria sp.* através de induções planejadas. As demais comparações são apresentadas a seguir.

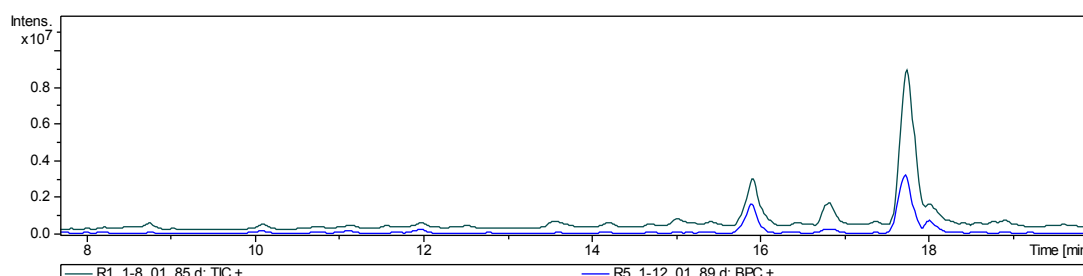
Os dois cromatogramas apresentados a seguir trata-se novamente do ensaio 1, cultivo estático ao abrigo de luz, agora com o 5, cultivo estático, porém, exposto à luz.

Figura 35 - Comparação entre ensaios 1 e 5



Fica evidente que algumas regiões são semelhantes, mas que há sinais que não aparecem em determinada condição de cultivo. Obviamente, agitação e luz, não são fatores que podem mudar completamente o perfil metabólico de um micro-organismo, mas pode-se observar que determinadas regiões dos cromatogramas apresentam sinais diferenciados. Metabólitos secundários diferentes podem estar sendo produzidos quando se muda as condições de cultivo, tornando claro que induções desse tipo podem despertar ou inibir determinadas vias metabólicas do fungo.

Figura 36 - Ampliação e comparação entre 1 e 5 (8 a 20 min)



Nessa região ampliada mostrada na figura 34, o perfil metabólico é praticamente o mesmo.

Porém, na figura 35 e 36 observa-se sinais diferenciados. Sugerindo uma variação na produção metabólica do micro-organismo estudado.

Figura 37 - Ampliação e comparação entre 1 e 5 (20 a 34 min)

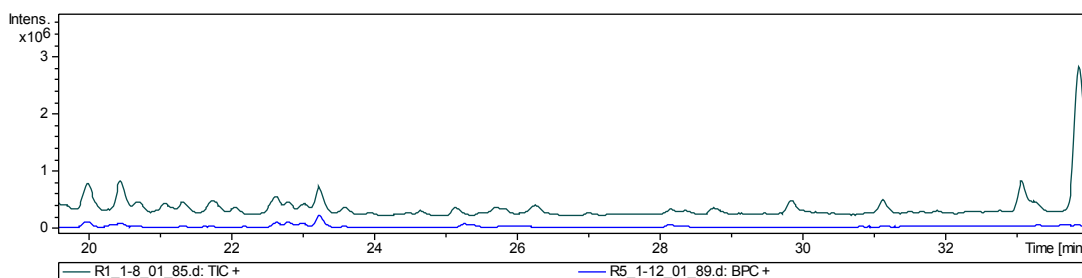
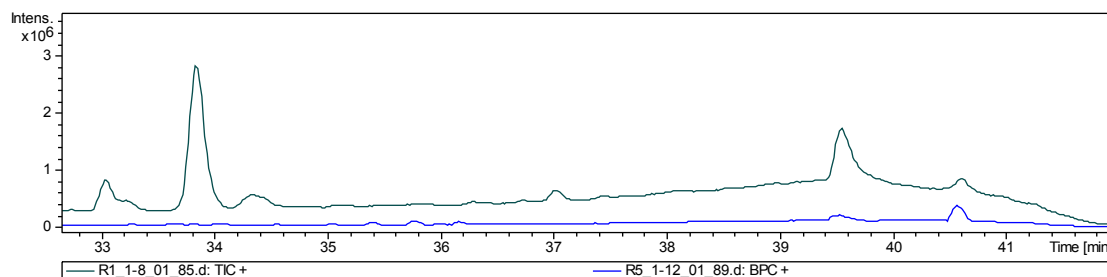


Figura 38 - Ampliação e comparação entre 1 e 5 (34 a 41 min)



Dessa vez, a comparação se dá entre o ensaio 1, em modo estático ao abrigo de luz, com 7, cultivo sob agitação e na incidência de luz.

Figura 39 - Comparação entre ensaios 1 e 7

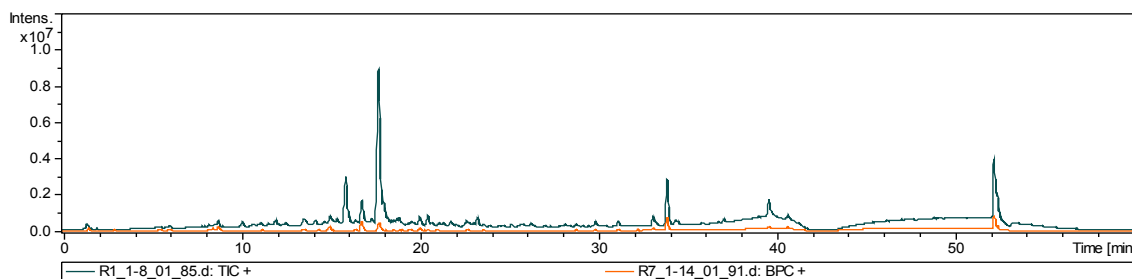


Figura 40 - Ampliação da comparação entre ensaios 1 e 7 (10 a 20 min)

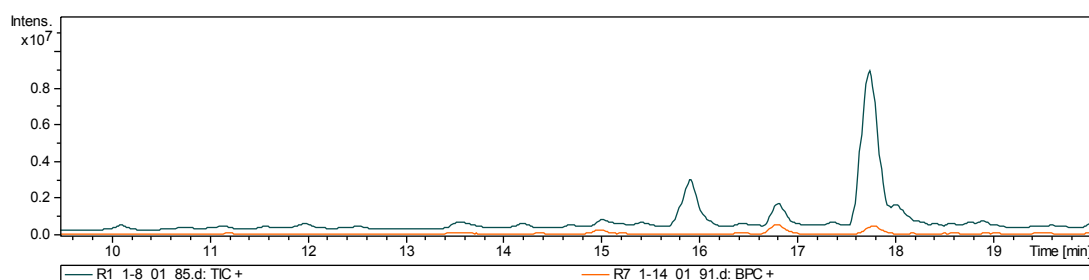
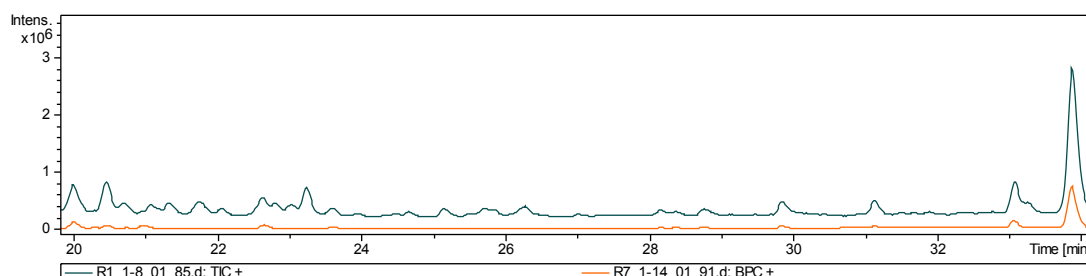


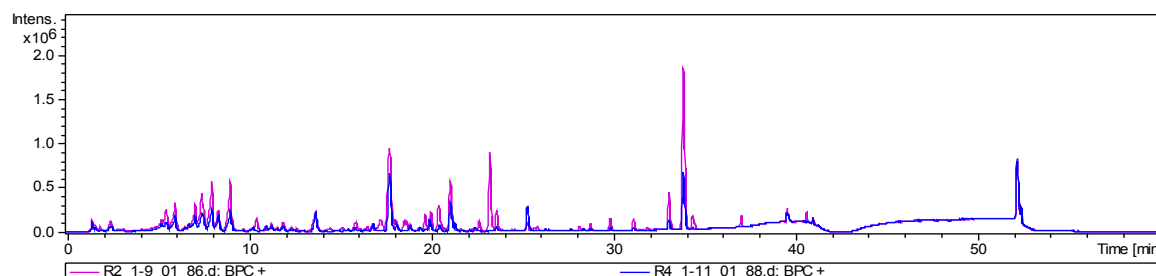
Figura 41 - Ampliação da comparação entre ensaios 1 e 7 (20 a 34 min)



A diferença na produção metabólica nos perfis cromatográficos também são bastante significativas.

4.6 Comparação da produção metabólica no CLAE-EM no meio Nutriente.

Figura 42 - Comparação entre cromatogramas dos extrato 2 e 4



Quando comparados, observa-se que o perfil cromatográfico destas matrizes complexas não são idênticos. Há sinais similares em determinadas regiões, mas também é possível visualizar picos distintos para cada extrato.

Figura 43 - Ampliação e comparação entre ensaios 2 e 4 (10 a 20 min)

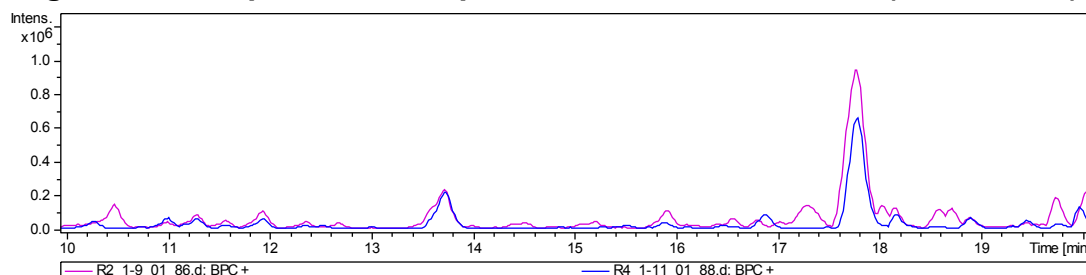
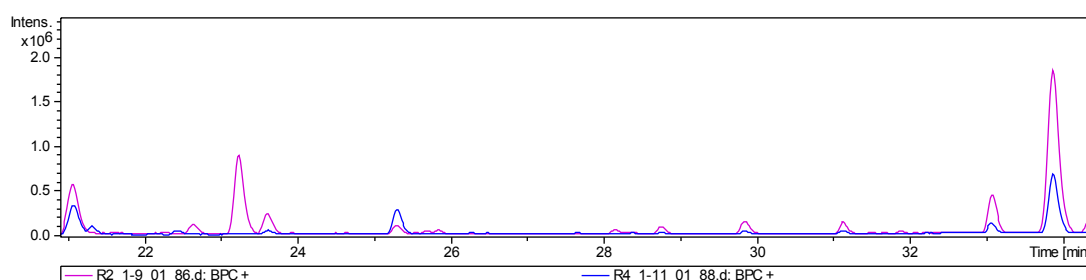


Figura 44 - Ampliação e comparação entre ensaios 2 e 4 (21 a 34 min)



A segunda comparação entre os extratos obtidos do cultivo em meio Nutriente, é entre o ensaio 2 e o 6. Enfatizando que o 2 trata-se de um cultivo estático e ao abrigo de luz, e o ensaio 6, por outro lado, foi cultivado com agitação e na incidência de luz.

Figura 45 - Comparação entre ensaios 2 e 4

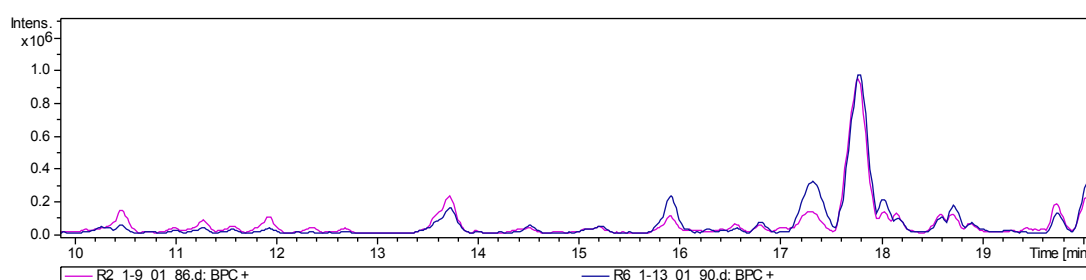


Figura 46 - Ampliação e comparação dos ensaios 2 e 4 (20 a 30 min)

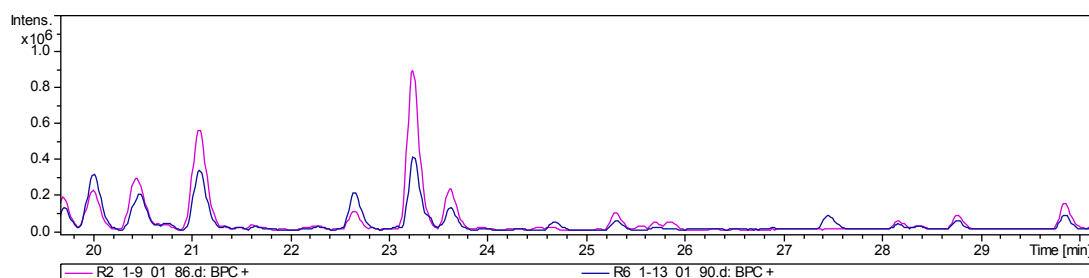
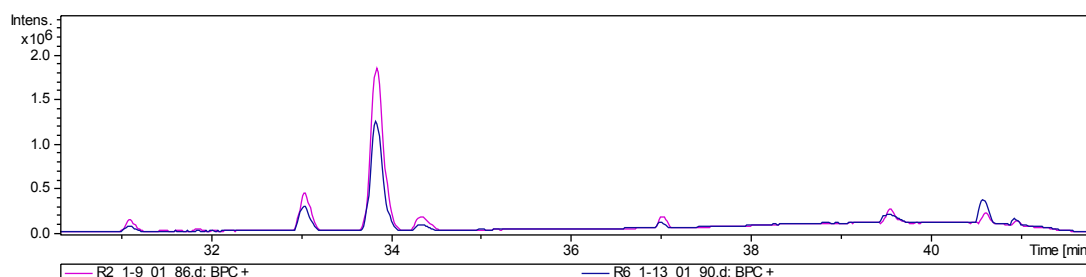


Figura 47 - Ampliação e comparação entre ensaios 2 e 6 (31 a 41 min)



A terceira comparação que se faz entre os ensaios com meio Nutriente é entre 2 e 8. O 2 é estático e na ausência de luz. O ensaio 8 foi cultivado de forma oposta, sob agitação e com luz.

A seguir, também é apresentado um comparativo entre esses diferentes ensaios.

Figura 48 - Comparação entre ensaios 2 e 8

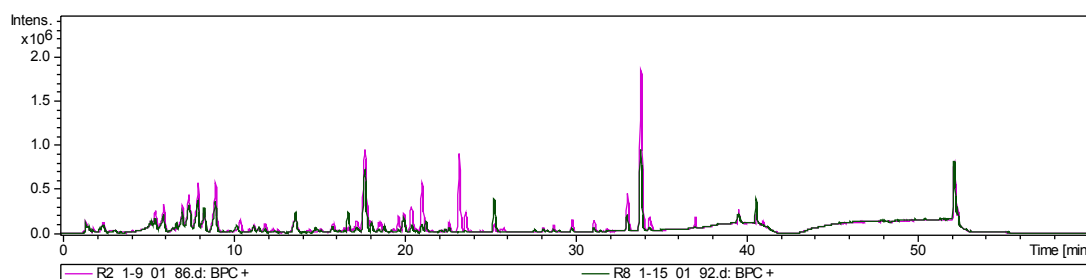
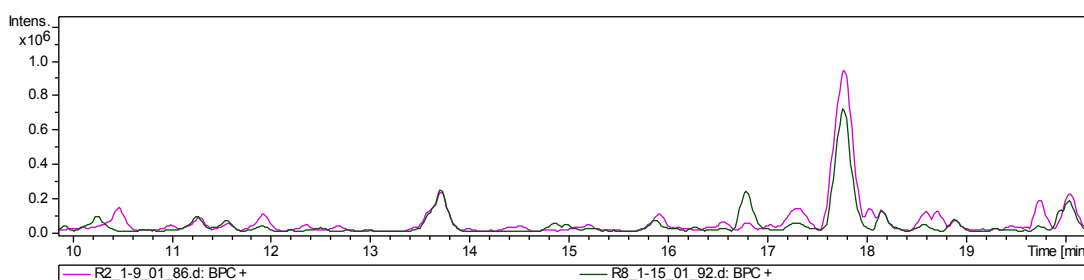
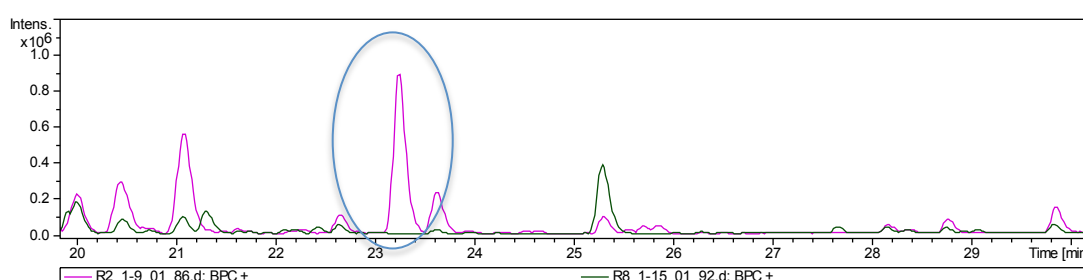


Figura 49 - Ampliação e comparação dos ensaios 2 e 8 (10 a 20 min)**Figura 50 - Ampliação e comparação dos ensaios 2 e 8 (20 a 30 min)**

Sinais evidentes no ensaio 2 não aparecem no ensaio 8, e vice-versa. O metabolismo do micro-organismo é alterado quando diferentes condições de cultivo são realizadas.

A variabilidade metabólica pode ser melhor representada quando há a contagem de sinais dos cromatogramas. Agrupando os cromatogramas pelo tipo de extrato obtido, Czapek ou Nutriente, pode-se realizar uma avaliação da diferença de sinais detectados de acordo com as diferentes condições impostas ao cultivo do fungo, e uma forma de evidenciar a abordagem OSMAC pretendia para este trabalho.

A seguir, são apresentados os cromatogramas dos ensaios 1, 3, 5 e 7, que correspondem ao extratos obtidos do meio de cultivo Czapek.

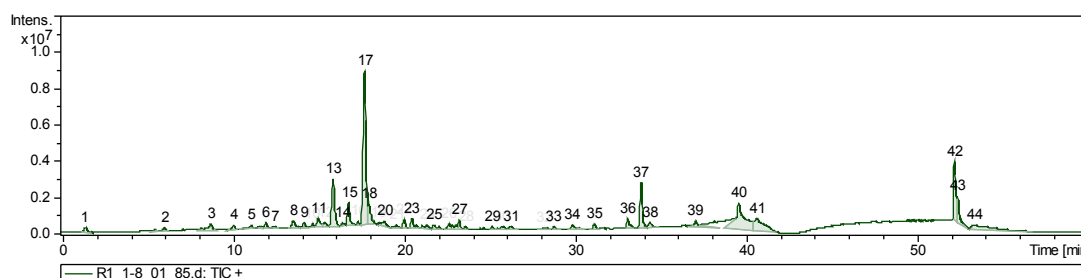
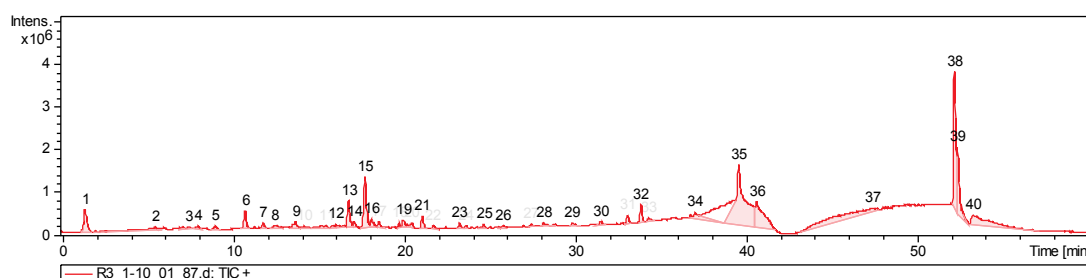
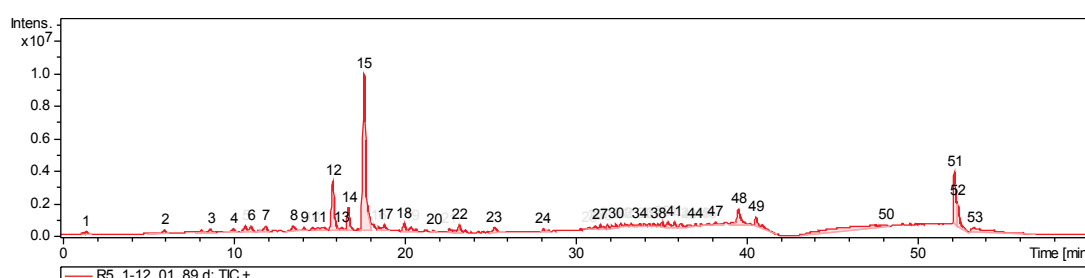
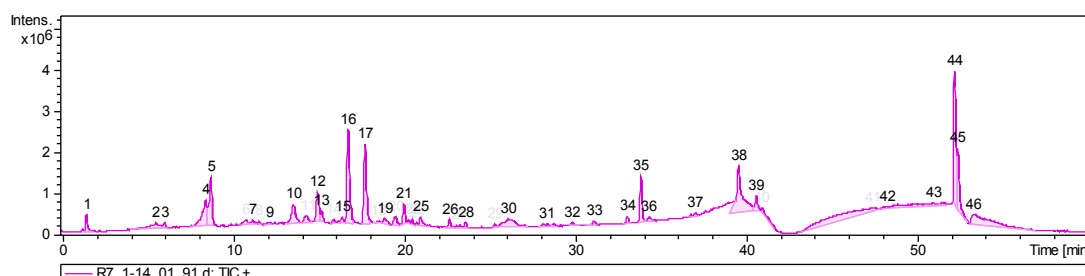
Figura 51 - Contagem de picos no extrato 1

Figura 52 - Contagem de picos no extrato 3**Figura 53 - Contagem de picos no extrato 5****Figura 54 - Contagem de picos no extrato 7**

Os cromatogramas obtidos dos extratos de meio Nutriente são apresentados abaixo, com o intuito de explicitar a variabilidade metabólica induzida pela variação das condições de cultivo.

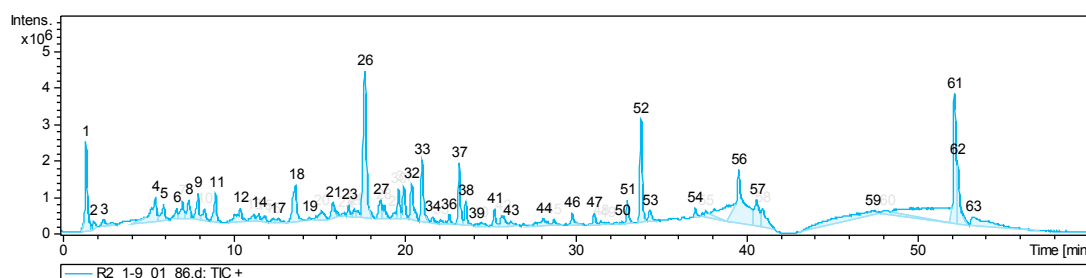
Figura 55 - Contagem de picos no extrato 2

Figura 56 - Contagem de picos no extrato 4

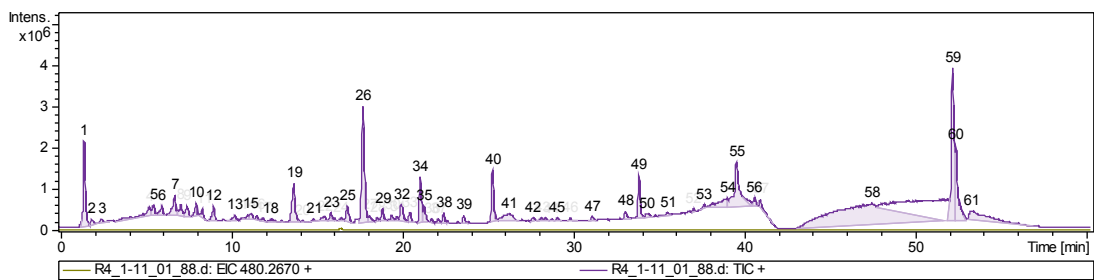


Figura 57 - Contagem de picos no extrato 6

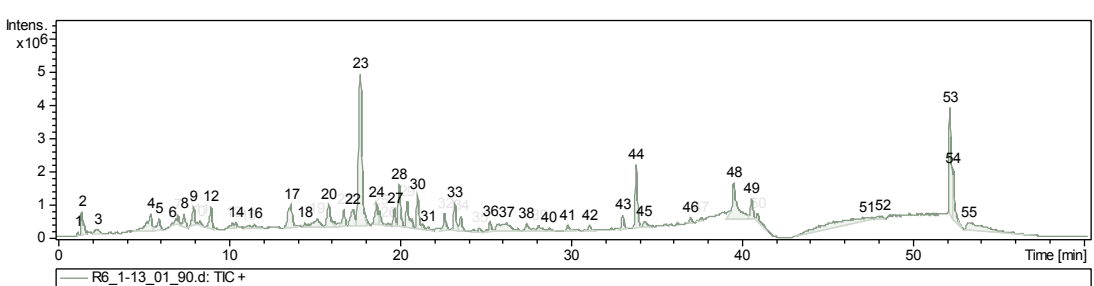


Figura 58 - Contagem de picos no extrato 8

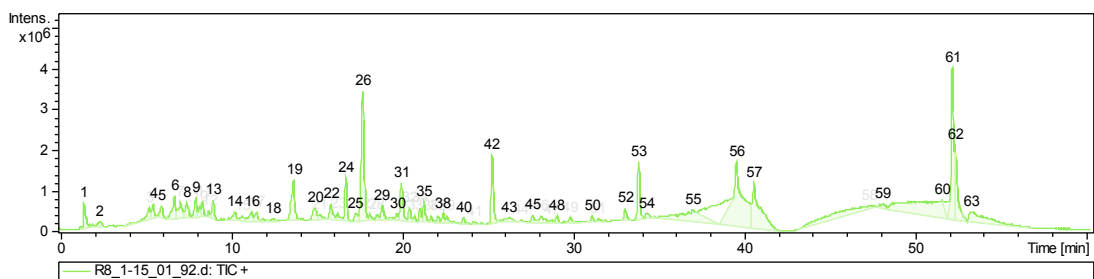


Tabela 13 - Apresentação do número de picos para cada ensaio

Ensaio	nº de sinais	Ensaio	nº de sinais
1	44	2	63
3	40	4	61
5	53	6	55
7	46	8	63

A contagem da quantidade de sinais de cada cromatogramas é mais uma evidência de que houve OSMAC através de uma indução planejada realizada através de um delineamento experimental.

4.6 A TÉCNICA DE DESREPLICAÇÃO PARA MOLÉCULAS DE CITOCALASINAS D

Em um trabalho utilizando a técnica de desreplicação, alguns sinais são selecionados, gerando espectros de massa evidenciando dados de relação massa carga (m/z) os quais são procurados em bases de dados a fim de encontrar compatibilidade com compostos já relatados na literatura.

O processo de desreplicação envolve a separação de metabólitos por métodos cromatográficos, identificação dos compostos por métodos espectroscópicos, bioensaios para avaliação da atividade biológica, e pesquisa em base de dados para verificação se o metabólito já está catalogado.

Além disso, pode-se promover a varredura química ou analisar o perfil metabólico nos extratos já direcionando para uma molécula de interesse, ou, por outro lado, a fim de verificar a possibilidade de moléculas inéditas, os sinais que não apresentam relação em base de dados podem ter potencial para um tratamento mais refinado, visando identificar determinado composto.

As técnicas hifenadas aqui utilizadas, como os cromatogramas apresentados acima obtidos por CLAE-EM, combinam o método de separação, cromatografia líquida, com a técnica de identificação estrutural, espectrometria de massas, combinando a versatilidade da cromatografia líquida com a sensibilidade da espectrometria de massas.

Por outro lado, o CLAE é utilizado para separar macromoléculas, espécies iônicas, moléculas de variadas polaridades e alto peso molecular, de acordo com a solubilidade na fase móvel e, a fase estacionária selecionada para a análise. Esses fatores favorecem o CLAE como uma excelente técnica para desreplicação e para traçar o perfil metabólico dos estudos de compostos naturais em misturas complexas.

No sistema CLAE, a amostra é injetada na fase móvel e transportada através da coluna contendo a fase estacionária onde a separação acontece. Esta separação

ocorre pela interação seletiva entre a amostra, a fase móvel e a fase estacionária e é monitorado por um detector que usualmente pode ser UV, RMN ou EM. Para o CLAE-EM, os compostos são detectados na coluna do sistema CLAE e direcionados para o espectrômetro de massas onde são ionizados e separados pela razão massa-carga.

Os cromatogramas dos extratos aqui apresentados foram obtidos por CLAE-EM, ionização por electrospray (ESI). Como resultado da ionização por electrospray as moléculas podem ser protonadas ($[M+H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$); cationizadas, usualmente como $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$; anionizadas, $[M-Cl]^-$ dependendo da estrutura molecular do analito.

O fungo *Xylaria sp.* é um micro-organismo que produz metabólitos de alto valor agregado e de interesse farmacêutico. Foi por esse motivo que ele foi selecionado como foco desse trabalho de mestrado, para induzir (através de variações planejadas) a produção de citocalasinas, que é um produto natural utilizado atualmente para tratamento de câncer e nos últimos anos está sendo inserido também no tratamento de HIV. É um composto comercializado no Brasil por aproximadamente mil reais o miligrama de citocalasina D (comercializado pela Sigma Aldrich).

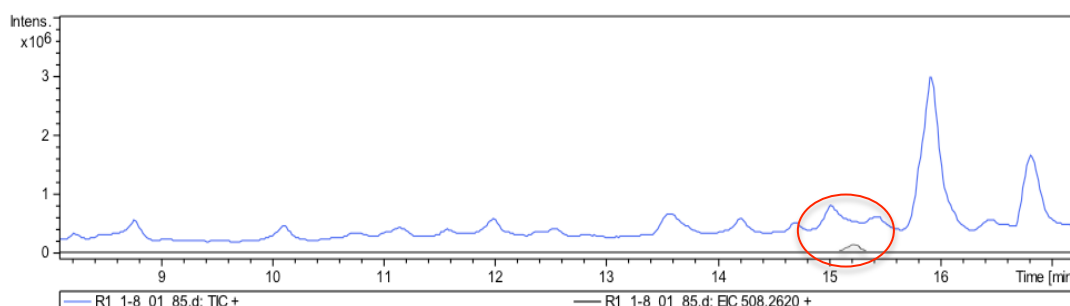
Após observar a viabilidade de se fazer OSMAC, induzindo de forma planejada o micro-organismo, a segunda etapa desse trabalho é realizar a varredura dos extratos brutos nos cromatogramas de CLAE-EM buscando sinais da massa de alta resolução de citocalasina D. Trata-se de uma molécula de fórmula molecular $C_{30}H_{37}NO_6$ e sua respectiva massa de alta resolução é 507,2620.

Os cromatogramas dos extratos de todos os ensaios foram varridos buscando as seguintes massas-carga: $[M+H]^+ = 508,2620$; $[M+Na]^+ = 530,2620$ e $[M+K]^+ = 546,352$. Com o erro pré determinado de $\pm 0,5$.

O sinal indicando a presença da massa-carga de 508,2620 apareceu para os seguintes ensaios: 1, 5, para Czapek e 2, 6 e 8, para meio Nutriente.

A seguir, serão apresentados os cromatogramas com a indicação do tempo de retenção que sugere a massa-carga procurada.

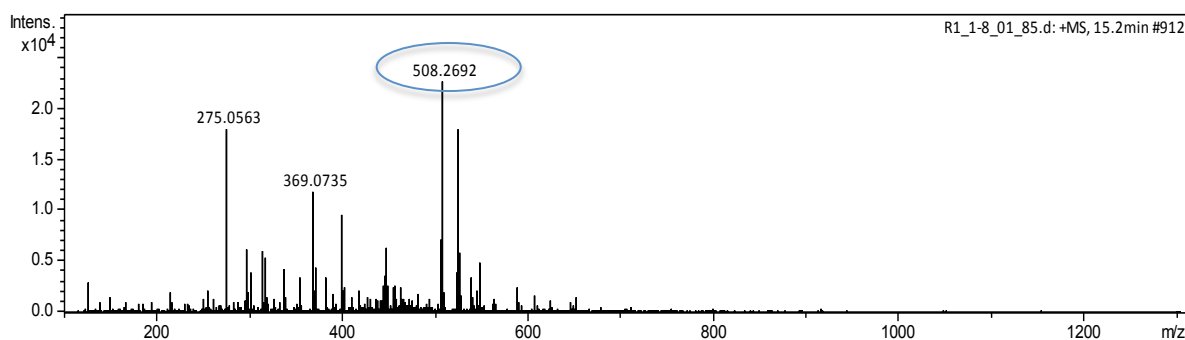
Figura 59 - Identificação do sinal da molécula de citocalasina D no extrato 1



O pequeno sinal destacado em vermelho sinaliza que no tempo de retenção próximo a 15,2 minutos, a massa de **508,2620**, que corresponde a $[M+H]^+$, está presente.

Com isso, é possível analisar o espectro de massas correspondente a esse sinal:

Figura 60 - Espectro de massas do pico destacado na figura 57



No ensaio 5 também foi detectado o sinal com a massa de alta resolução de citocalasina D. Também foi registrado no tempo de aproximadamente 15,2 minutos.

Figura 61 - Detecção do sinal de citocalasina D no extrato 5

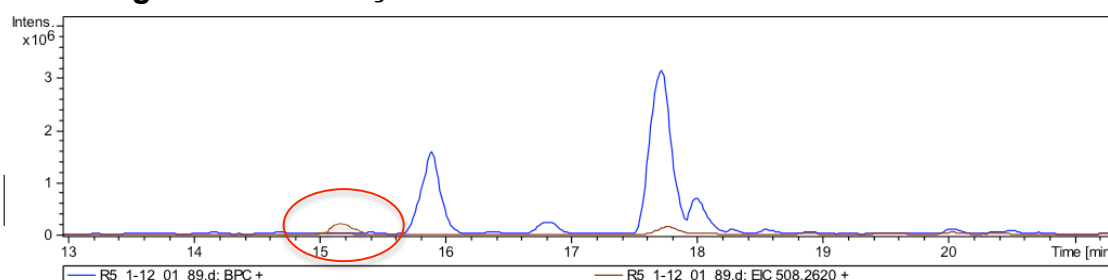
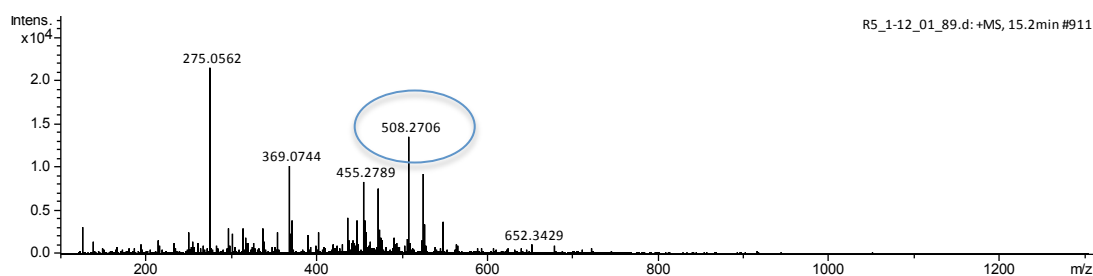


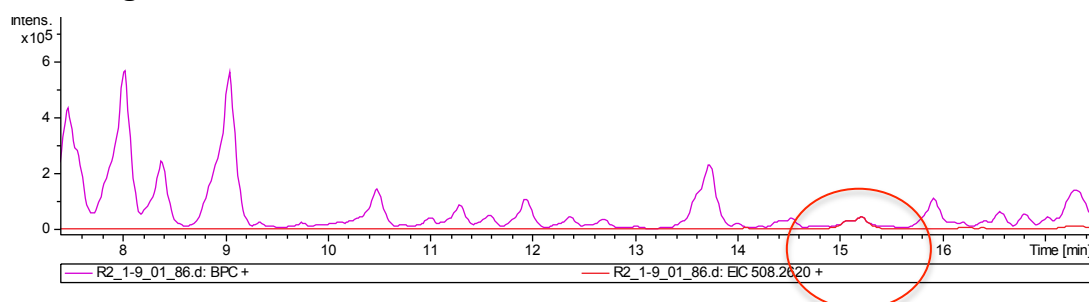
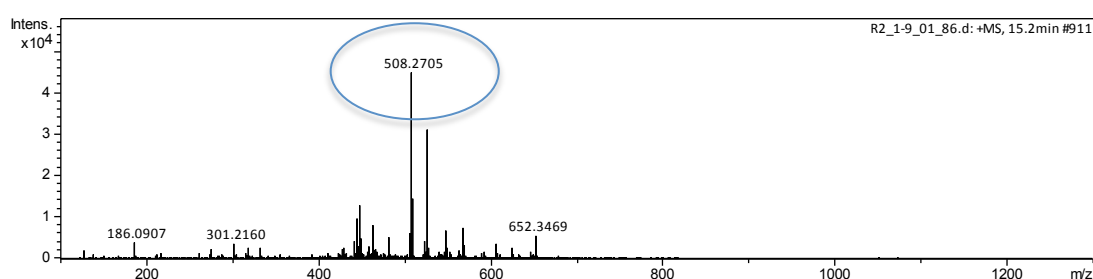
Figura 62 - Espectro de massas do sinal destacado na figura 59

É importante enfatizar que o ensaio 1 trata-se do experimento cujo níveis determinados no planejamento fatorial são -1. Ou seja, sem agitação e ao abrigo de luz.

Por outro lado, o ensaio 5 foi cultivado sob luz, mas sem agitação.

Para os cultivos com agitação, em meio Czapek, não foi detectado sinal de citocalasina D. Nas condições aqui descritas, a luz é um fator que não influencia na produção desse determinado metabólito.

Para os cultivos com meio Nutriente, também foi feito a mesma varredura, buscando encontrar sinais que correspondessem ao metabólito de interesse. Para esse grupo de quatro ensaios, três apresentaram sinais de citocalasina D, que correspondem aos ensaios 2, 6 e 8. Os cromatogramas e os espectros de massas são mostrados a seguir:

Figura 63 - Detecção do sinal de citocalasina D no extrato 2**Figure 64 - Sinal de citocalasina D no extrato 2**

Nos ensaios em meio Nutriente, os sinais correspondentes à massa-carga de Citocalasina D é apresentado em 15,2 minutos.

O ensaio 2 foi previamente determinado realizando um cultivo estático e ao abrigo de luz.

Já o ensaio 6, que também apresentou sinais da molécula desejada, e tratava-se de um cultivo também estático, porém, na incidência de luz.

O cromatogramas do ensaio 6 referente ao sinal de citocalasina D é apresentado a seguir, juntamente com o espectro de massas que corresponde à molécula pretendida.

Figura 65 - Detecção do sinal de citocalasinas D no extrato 6

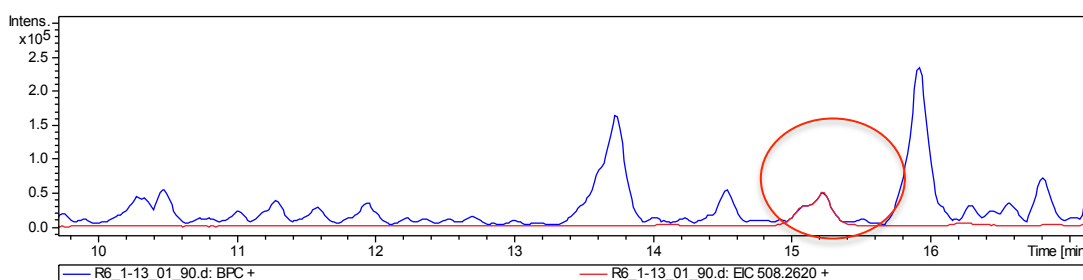
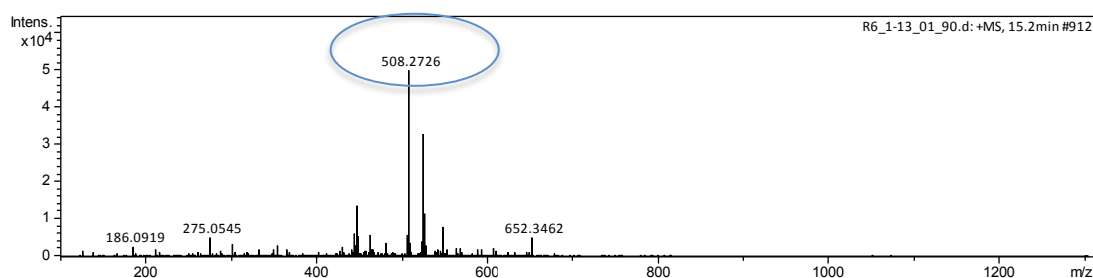


Figura 66 - Espectro de massas do sinal destacado na figura 63



Por fim, o terceiro extrato que apresentou sinais de Citocalasina D foi o ensaio 8, submetido às condições de cultivo com agitação e na incidência de luz.

Figura 67 - Detecção do sinal de citocalasina D no extrato 8

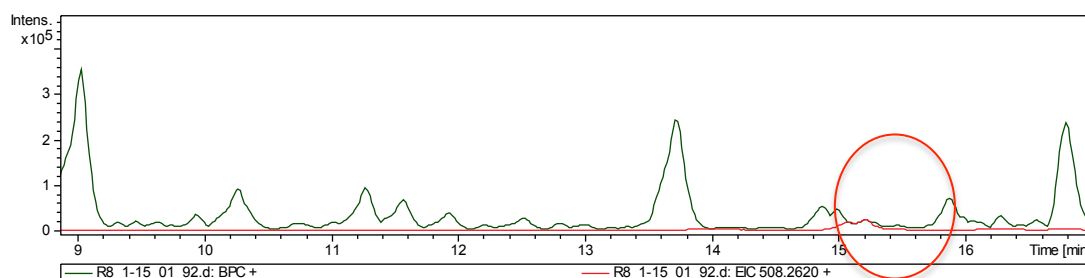
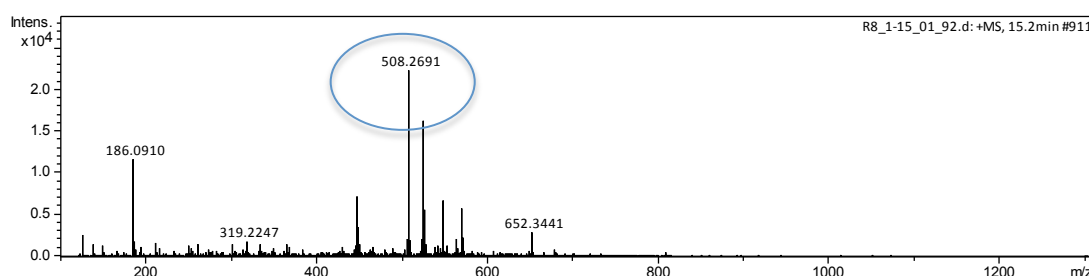


Figura 68 - Espectro de massas referente ao sinal destacado na figura 65



Nos cultivos em meio Nutriente, Citocalasinas D só não foram detectados nos ensaios em que havia agitação e sem incidência de luz, muito parecido com o ensaio 3, de Czapek, submetido às mesmas condições.

4.7 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR NA DETECÇÃO DE SINAIS DE CITOCALASINAS D.

A última análise espectrométrica realizada para completar o quadro de técnicas para realizar a abordagem de desreplicação foi a Ressonância Magnética Nuclear, RMN.

Com a evidência de que há extrato contendo sinais de Citocalasina D, obteve-se os espectros de RMN de todos os extratos do planejamento fatorial, assim, seria possível ter mais uma ferramenta na tentativa de entender o comportamento do fungo *Xylaria sp.* frente as variáveis selecionadas, tendo mais um subsídio para

afirmar que a OSMAC foi obtida, ou se simplesmente os metabólitos foram potencializados em produção.

Agregado a isso, com o intuito também de verificar possíveis sinais de Citocalasina D nos ensaios, e ter mais uma ferramenta que aumentasse a possibilidade de encontrar tal metabólito nas matrizes complexas, uma série de experimentos de Ressonância Magnética Nuclear foram executados e serão apresentados e discutidos a seguir.

Os espectros de RMN foram obtidos para todos os ensaios, mas para efeito de comparação entre a variação do perfil metabólico produzido pelo fungo, serão apresentados os espectros dos ensaios 1, 3, 5 e 7, que correspondem aos cultivos em meio Czapek.

Figura 69 - Espectro de RMN do extrato 1 (região destacada entre 5,5 e 7,5 ppm)

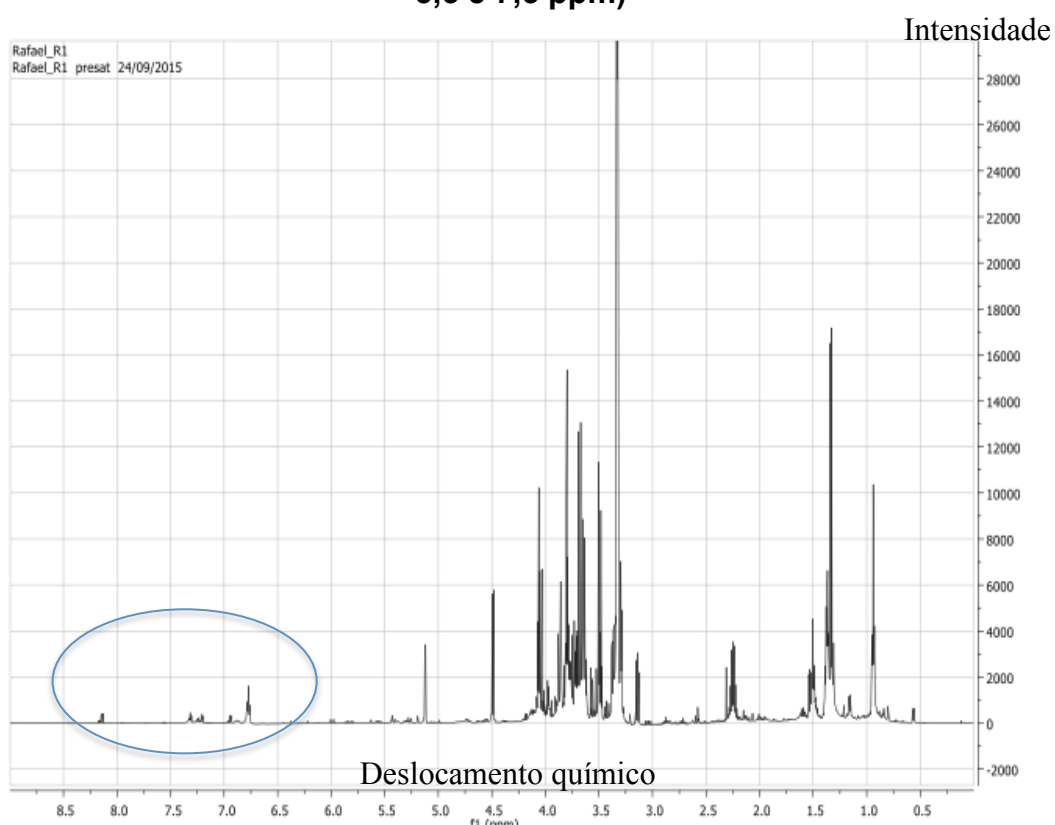
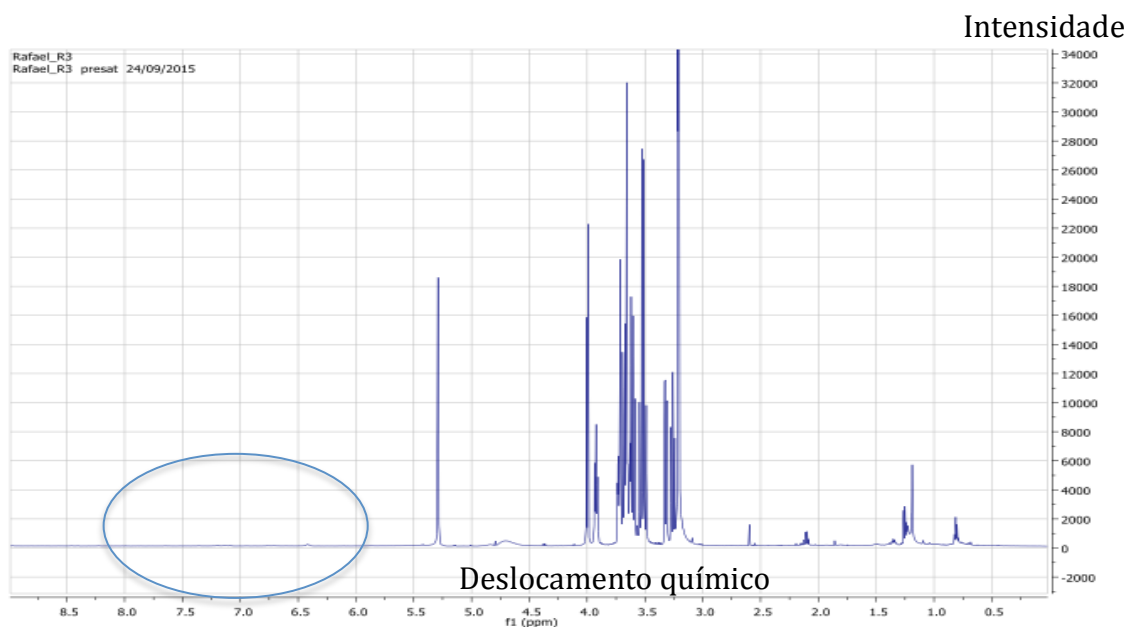


Figura 70 - Espectro de RMN do extrato 3 (região destacada entre 8 e 6 ppm)



As diferenças no espectro de Ressonância Magnética Nuclear entre os ensaios 1 e 3 são bastante evidentes. Observa-se que no ensaio 1, há sinais bastante mais desblindados (que estão destacados na figura acima) que não aparecem no ensaio 3. Lembrando que ambos os ensaios foram cultivados no escuro, ao abrigo de luz, porém, o terceiro ensaio foi agitado durante seu cultivo.

Figura 71 - Espectro de RMN do extrato 5 (destaque da região 5,5 e 7,5 ppm)

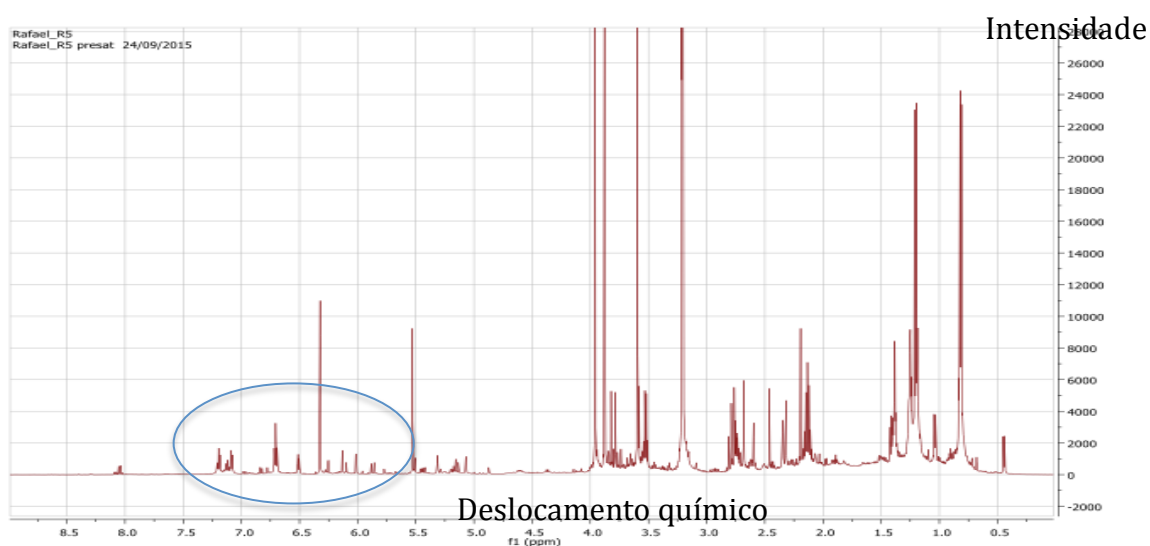
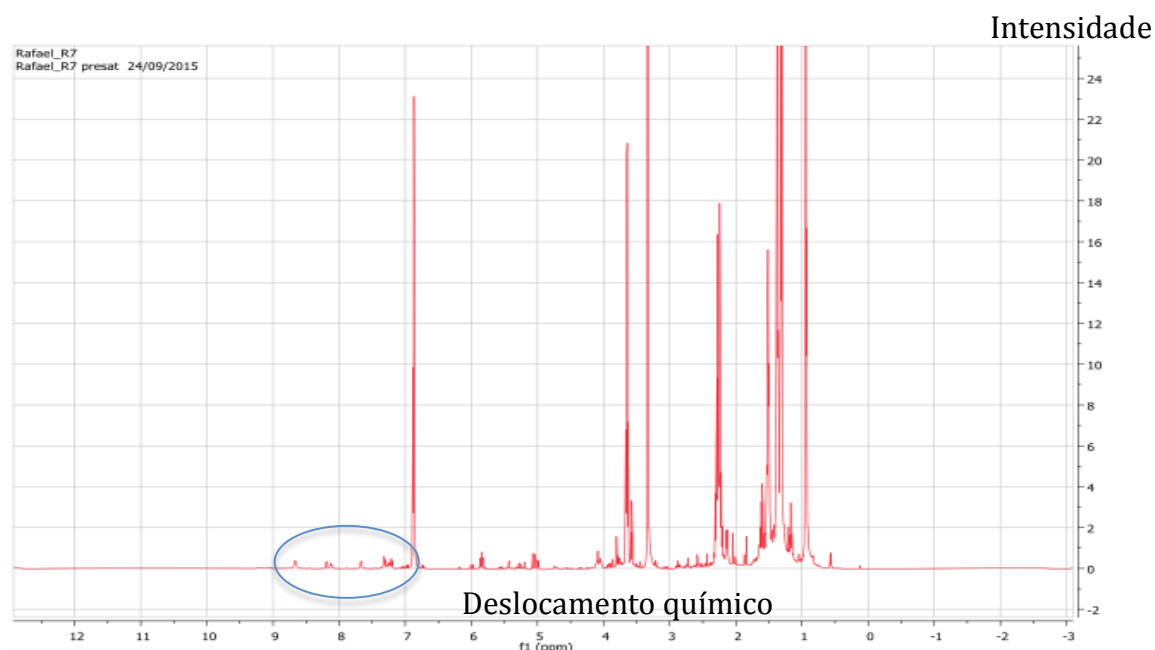


Figura 72 - Espectro de RMN do extrato 7 (destaque da região 9 a 7 ppm)



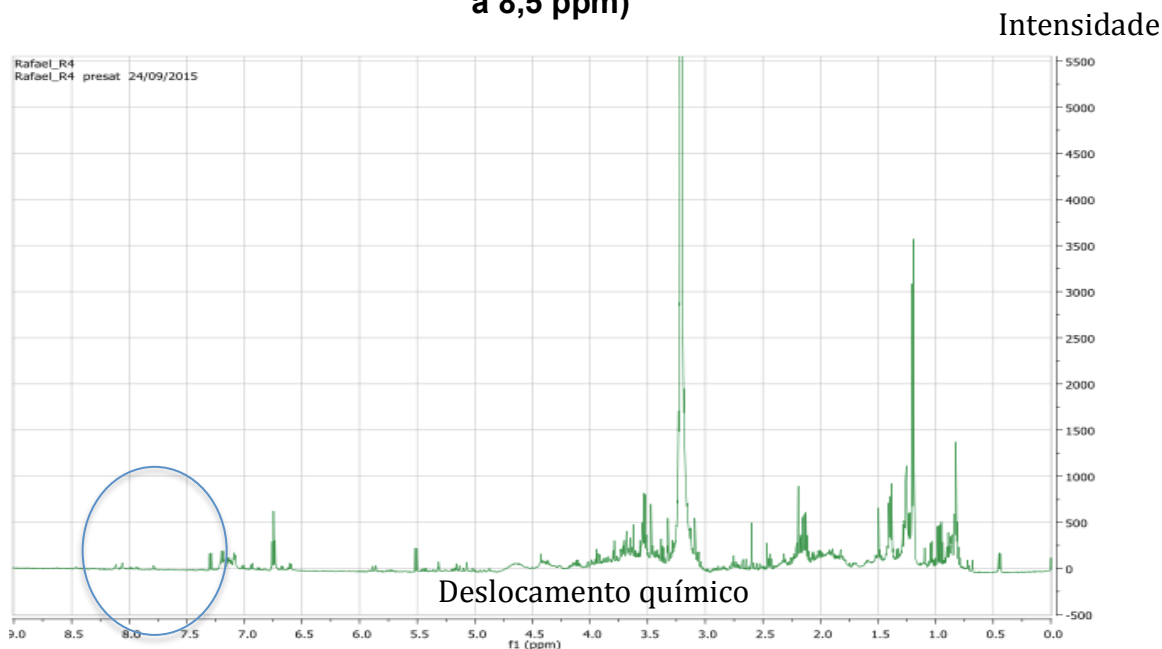
As regiões destacadas nas figuras 71 e 72 mostram que existe, sim, uma variação no perfil das matrizes complexas obtidas do mesmo tipo de meio de cultivo. Para os ensaios 5 e 7, ambos foram cultivados na presença de luz, porém, o 7 foi agitado durante todo o processo.

Do mesmo modo, decidido pelo critério de apresentar os espectros em grupos, serão apresentados os espectros de RMN dos meios de cultivo Nutriente, que correspondem aos ensaios pares, 2, 4, 6 e 8.

Figura 73 - Espectro de RMN do extrato 2 (destaque da região de 7,5 a 8,5 ppm)



Figura 74 - Espectro de RMN do extrato 4 (destaque da região de 7,5 a 8,5 ppm)



Ambos espectros de RMN são muito parecidos. Porém, a região destacada mostra que há sinais que não aparecem no ensaio 4, mas que são evidentes no ensaio 2. A única diferença na produção dos extratos entre esses dois ensaios é que o ensaio 4 foi cultivado sob agitação durante todo o período.

Figura 75 - Espectro de RMN do extrato 6 (destaque da região de 5 a 8,5 ppm)

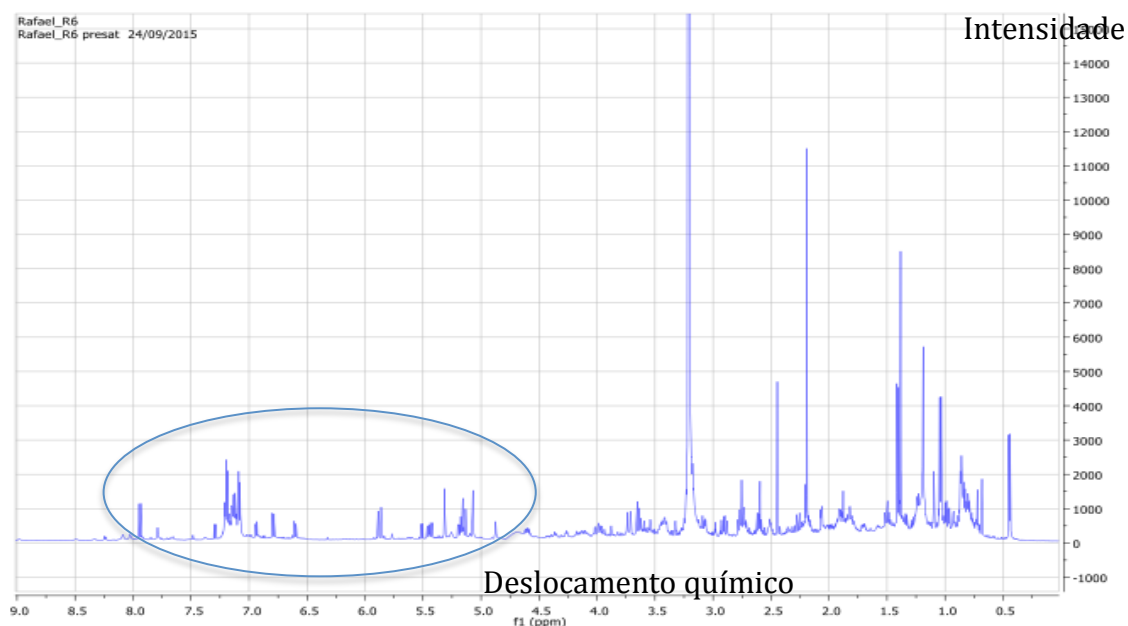
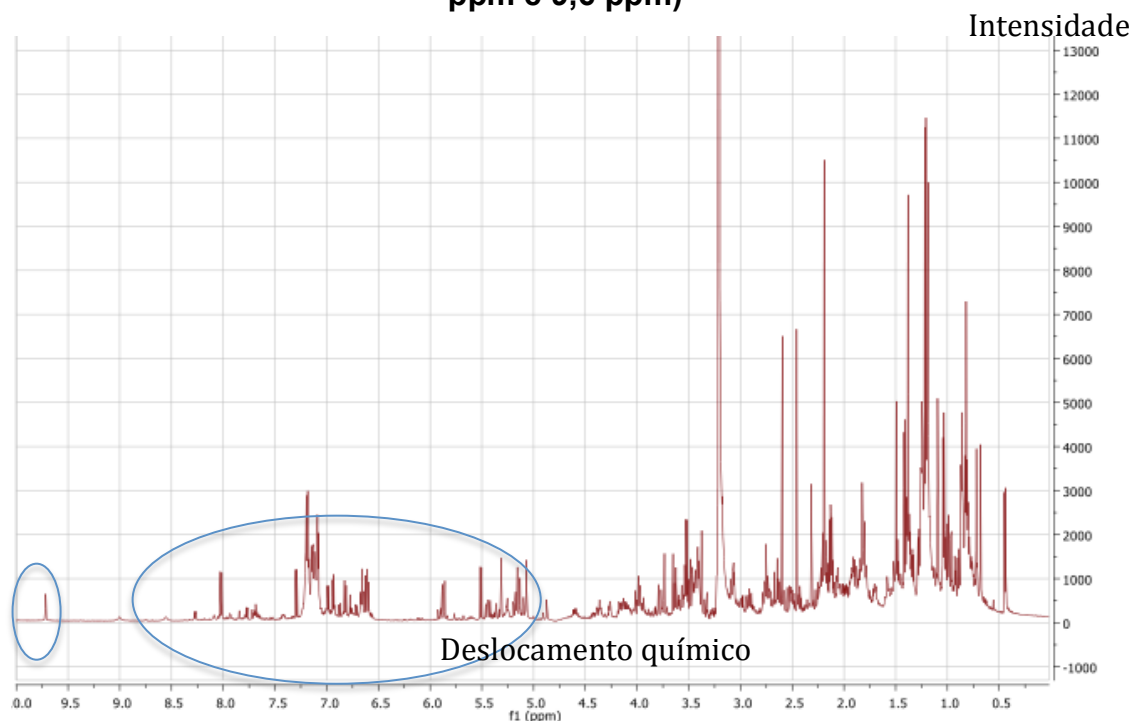


Figura 76 - Espectro de RMN do extrato 8 (destaque da região de 5 a 8,5 ppm e 9,6 ppm)



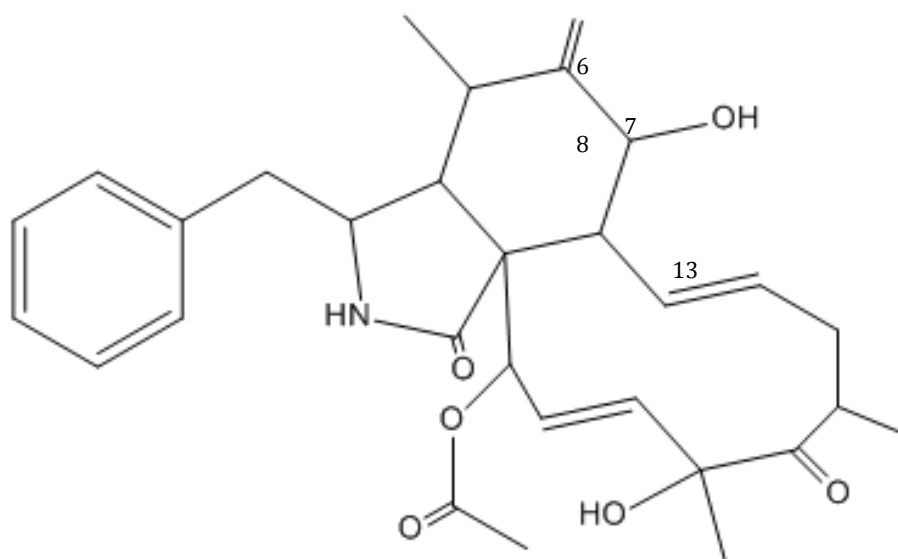
Enfatizando as diferenças entre os espectros de RMN dos ensaios 6 e 8, a região destacada em azul, entre δ 5 e 8,5 são muito parecidas entre os dois ensaios. Porém, no último ensaio destaca-se um singlete em δ 9,5 e 10,0, o que não aparece em nenhum outro ensaio de meio Nutriente. Ambos experimentos foram realizados sob luz, porém, o último ensaio foi mantido com agitação durante todo o período de cultivo do fungo.

Ao comparar com cuidado os espectros de RMN de todos os ensaios constata-se que houve mudança no metabolismo do micro-organismo, é mais uma forte evidência que houve variação no perfil metabólico do fungo *Xylaria sp.*, e é possível afirmar que obteve-se OSMAC através de um delineamento experimental.

4.8 TOCSY 1D NA IDENTIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE SPIN RELACIONADOS À CITOCALASINA D.

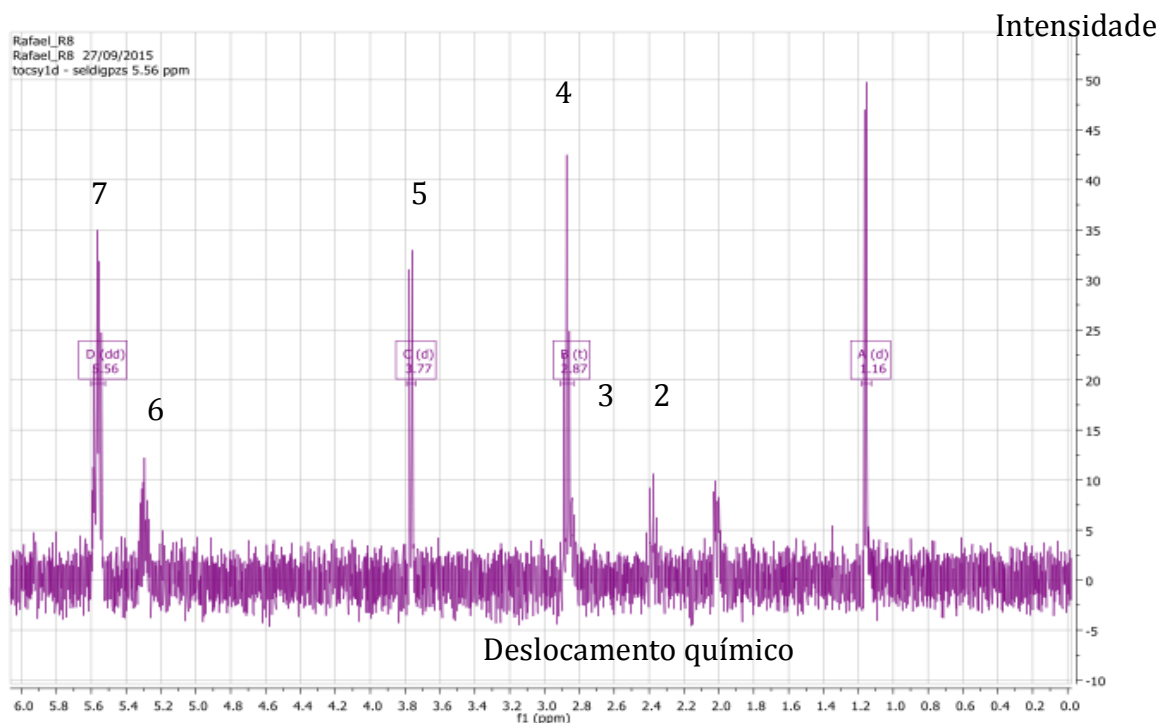
Com o objetivo de identificar no extrato bruto sinais da molécula Citocalasina D, inicialmente, buscou-se na literatura informações a respeito de tal molécula já isolada. Com os deslocamentos químicos já catalogados, foi possível irradiar determinados sinais que poderiam ser potenciais hidrogênios da molécula desejada, tendo encontrar sistemas de spin que tivessem relação e concordância com a estrutura molecular da Citocalasina D. Essa técnica de irradiar determinado sinal e encontrar o sistema de spin relacionado chama-se TOCSY 1D. Este foi o tipo de análise realizada com o intuito de encontrar sinais que corroborassem com as informações pré-determinadas pelo CLAE-EM, podendo, portanto, afirmar que Citocalasina D estaria presente em alguns ensaios.

Figura 77 - Molécula de citocalasina D com numeração dos carbonos



Fonte: Autor

Para a molécula de citocalasina D apresentada na figura 76, os hidrogênios referentes aos carbonos 13 e 14, região olefínica, é característica para toda a classe de moléculas de citocalasina. Na literatura, tais hidrogênios apresentam deslocamento químico entre 5,08 (14) e 5,40 (13). Para realizar o experimento de Tocsy 1D, essa região foi analisada com maior cuidado, com o intuito de encontrar dubletos nessa faixa de deslocamento químico. Irradiou-se um dubleto na posição 5,56 e um sistema de spin foi encontrado, como mostrado a seguir:

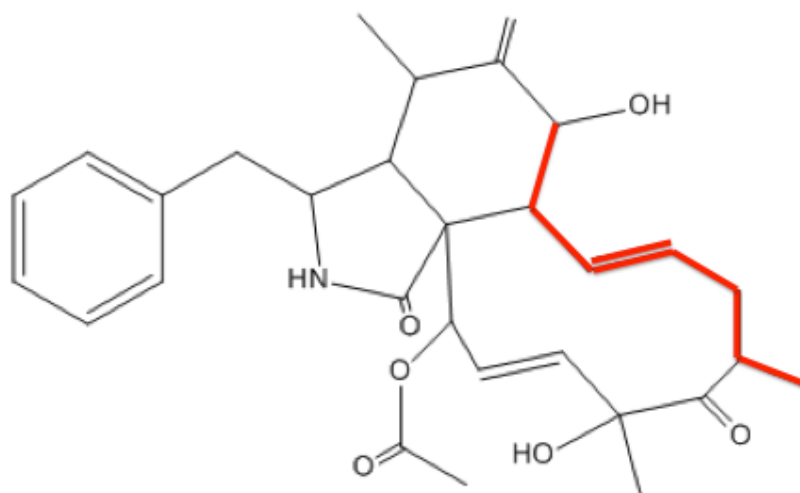
Figura 78 - Destaque do sistema de spin encontrado no extrato 8

O primeiro TOCSY 1D realizado foi no extrato 8. Irradiando-se o dubleto no deslocamento química δ 5,56, um sistema de spin com sete sinais foi encontrado, como demonstrado na espectro acima.

Com o intuito de confirmar se todos os sinais faziam parte do mesmo sistema de spin, escolheu-se o sinal de 1,16, o que possivelmente seria uma metila, para fazer novamente o mesmo experimento, com o objetivo de encontrar real concordância no sistema de spin. Ao irradiar o próton na região de δ 1,16, o mesmo sistema de spin foi detectado, contendo sete sinais, sendo eles observados em δ 1,16; 2,02; 2,39; 2,86; 3,77; 5,29 e 5,56.

Com o sistema de spin obtido, sugeriu-se que esses sinais fossem atribuídos ao 7 hidrogênios que são demonstrados na parte em vermelho da molécula de citocalasina D.

Figura 79 - Molécula de citocalasina com destaque para o sistema de spin encontrado para identificação da molécula



Fonte: Autor

No sistema de spin detectado, os sete sinais foram atribuídos aos hidrogênios da molécula de acordo com referências na literatura, como deslocamentos químicos e também suas constantes de acoplamento. Na posição 7, sugeriu-se o valor de 3,77, próton do carbono carbinólico. Na posição 8, atribuiu-se o valor de 2,86. Para a região olefínica, 5,56 para o próton ligado no carbono 13, e 5,29, ao próton do carbono 14. Ao próton do carbono 15, o sinal em 2,02; ao carbono 16, 2,39. E por fim, metila irradiada na posição 1,16.

Essas informações dão fortes subsídios de que é um sistema de spin que pode ser atribuído à molécula de Citocalasina D, especificamente.

Desse modo, com o objetivo de encontrar sinais do mesmo sistema de spin nos demais extratos, buscou-se irradiar os sinais tanto na região olefínica, como da metila em 1,16.

Os extratos 1 e 5, correspondentes ao Czapek, foram detectados o mesmo sistema de spin, contendo os mesmos sete sinais já discutidos acima.

Para os cultivos em meio Nutriente, os ensaios 2, 6 e 8 apresentam o sistema de spin que potencialmente indica a presença de citocalasinas D.

Os espectros de TOCSY 1D para tais ensaios são demonstrados a seguir.

Figura 80 - Sistema de spin encontrado no espectro de RMN extrato 1

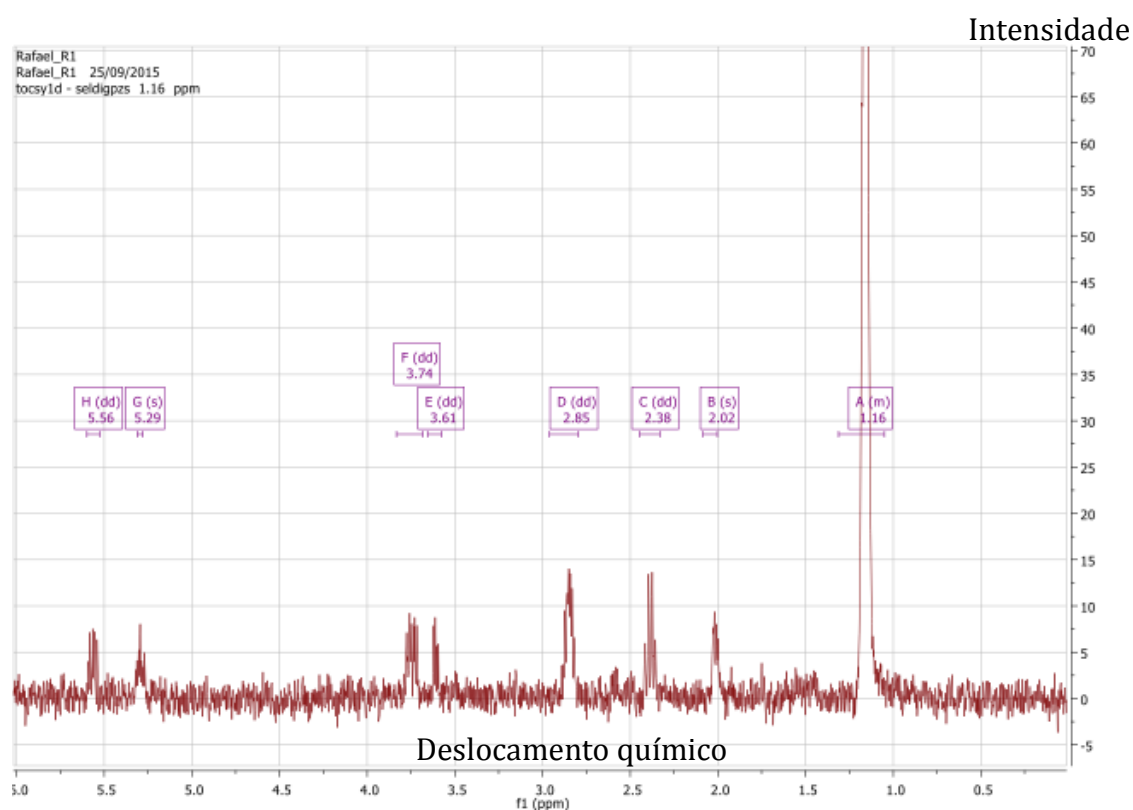


Figura 81 - Sistema de spin encontrado no espectro de RMN do extrato 2

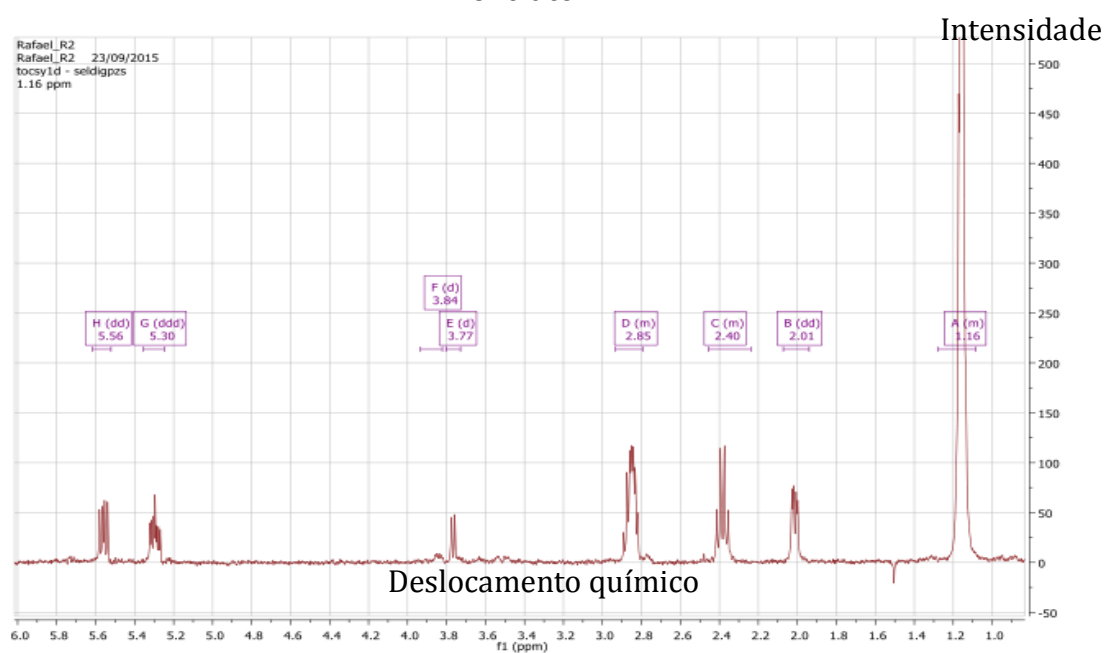


Figura 82 - Sistema de spin encontrado no espectro de RMN extrato 5

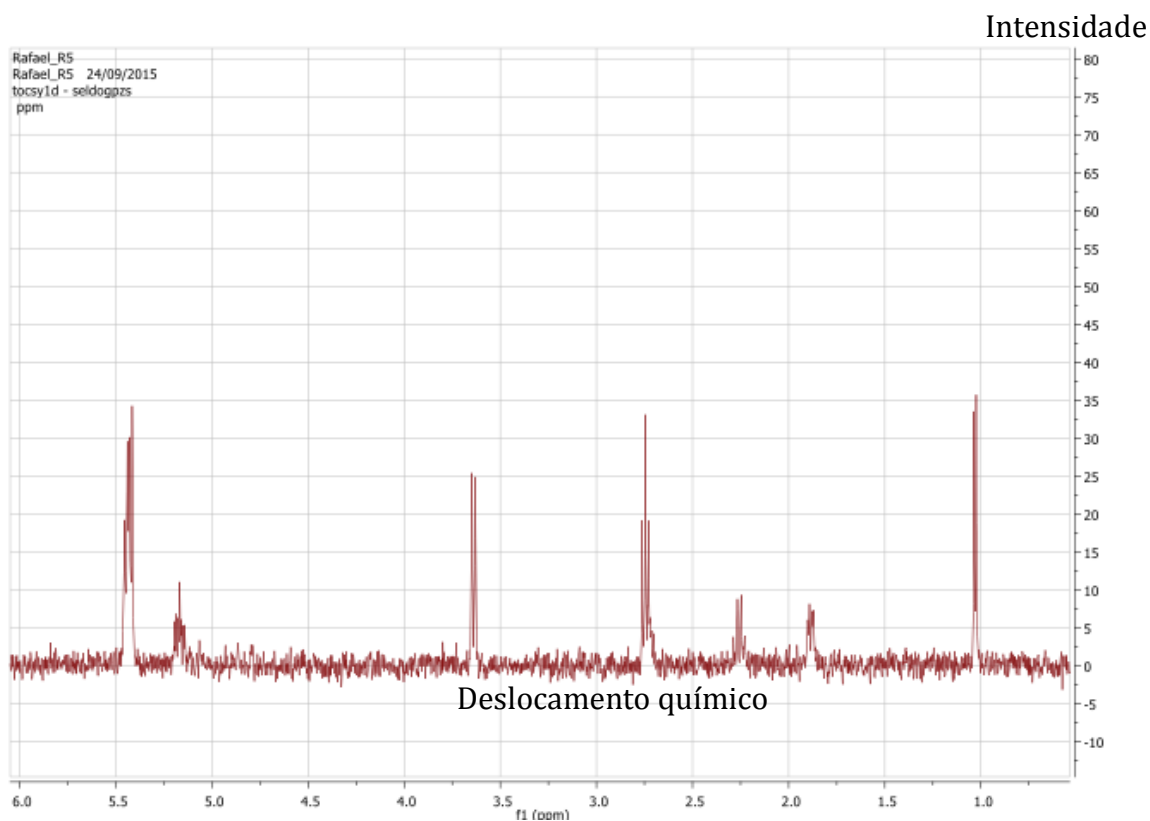
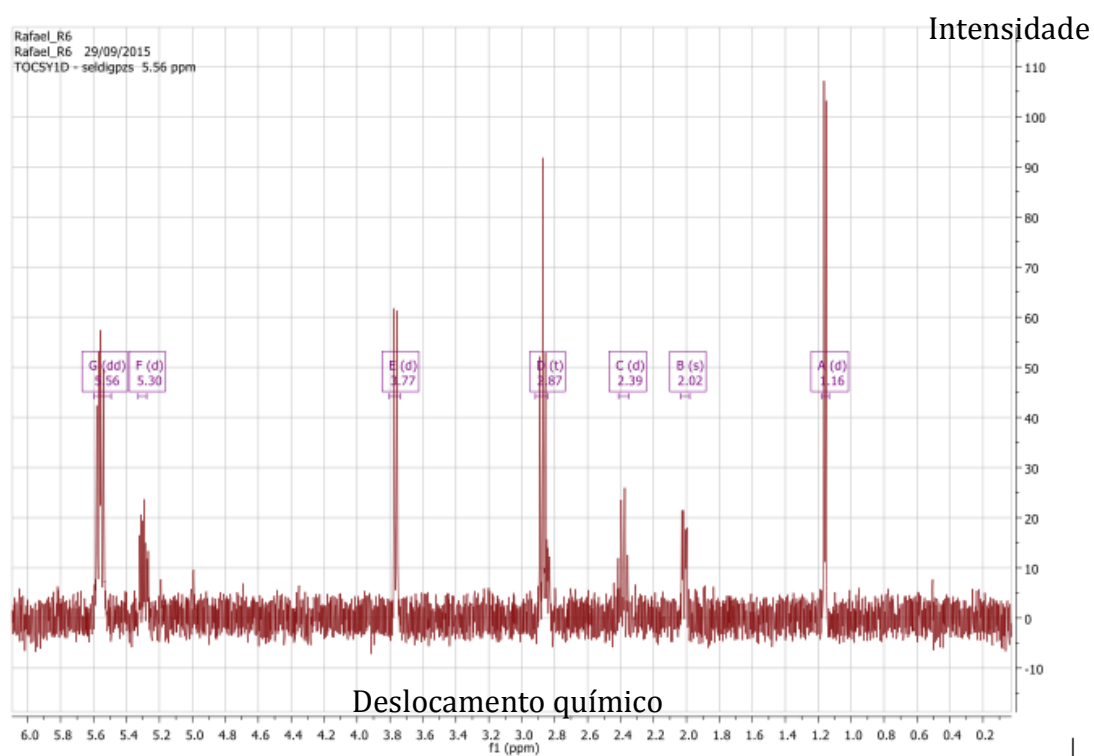


Figura 83 - Sistema de spin encontrado no espectro de RMN extrato 6



Os extratos que foram detectados o sistema de spin que sugerem ser de Citocalasinas D são: 1 e 5 (Czapek) e 2, 6 e 8 (Nutriente), os mesmos que apresentaram sinais no CLAE-EM. Isso significa que nas condições impostas ao cultivo do fungo, apenas alguns ensaios apresentam sinal de determinado metabólito.

Os dois meios de cultivo apesar de serem diferentes em composição, permitem que o fungo produza citocalasina D em condições específicas. Para o meio de cultivo Czapek, ela é detectada apenas nos ensaios 1 e 5, que correspondem dois ensaios que estão no nível baixo para agitação, ou seja, são experimentos realizados de modo estático.

Porém, o ensaio 1 foi cultivado ao abrigo de luz, e o 5, não. Ou seja, para as condições impostas ao cultivo do fungo *Xylaria sp.* em meio Czapek visando a produção de citocalasina do tipo D, a luz não é um fator determinante para que não seja produzida tal molécula, já a agitação, sim. A partir do momento que insere-se agitação no cultivo do fungo, a citocalasina D não é detectada pelas técnicas espectrométricas ou espectroscópicas.

Já o meio de cultivo Nutriente, por se tratar de um meio complexo, o fungo não tem restrição de substrato e acaba não se limitando à fonte de carbono ou de elementos-traço como no meio Czapek. Dos 4 ensaios em meio Nutriente, 3 deles apresentaram sinais de Citocalasina D tanto no CLAE-EM como nos dados de RMN, nos experimentos de TOCSY 1D. O único cultivo que não foi possível detectar sinal do metabólito desejado foi o 4, em que tratava-se de um ensaio com agitação e ao abrigo de luz. Quando combinadas essas duas variáveis, não se detecta, nos ensaios realizados, sinais do metabólito desejado.

Assim sendo, há evidências de que a via metabólica que corresponde à produção de Citocalasina do tipo D é ativada nas condições descritas para os ensaios 1, 2, 5, 6 e 8, segundo os dados aqui obtidos, e são silenciadas ou não expressas nas condições do cultivo 3 (com agitação e sem luz), 4 (com agitação e sem luz) e 7 (com agitação e com luz).

Como o fungo *Xylaria sp.* é um micro-organismo importante devido à produção de metabólitos com elevados interesses farmacológicos, além da produção de citocalasinas D que foram discutidas anteriormente e identificadas em determinados extratos, este fungo também é responsável pela produção de outros

metabólitos secundários com atividades biológicas, desse forma, dando continuidade à exploração racional da produção metabólica do fungo *Xylaria sp.* e fazendo uso de outra técnica, a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, a análise foi direcionada às sugestões dadas pela base de dados do próprio equipamento, com isso, outro metabólito bastante relatado para o micro-organismo estudado foi sugerido nos dados por CG-EM.

4.9 CROMATOGRAFIA GASOSA HIFENADA AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Dando continuidade à exploração racional da rede metabólica do fungo *Xylaria sp.* os extratos foram, então, analisados de acordo com as condições já relatadas no item 3.4.

Todos os cromatogramas e espectros gerados foram analisados a fim de encontrar moléculas com alto grau de similaridade. Para o ensaio 1, foram encontradas 5 moléculas com similaridade acima de 90%. Para as possíveis moléculas encontradas pelo software, foram calculados os índices de retenção. Porém, na base de dados, há grande dificuldade de encontrar as mesmas condições de análise, como coluna, temperatura e gás de arraste. Por esse motivo, a similaridade será baseada, principalmente, pela semelhança de apresentada pelo espectro de massas.

Abaixo será apresentado o cromatogramas gasoso do ensaio 1 e uma tabela que contempla as sugestões de moléculas dadas pelo software CG Solutions.

O destaque das moléculas sugeridas para o ensaio 1 é a molécula de Griseofulvina, com similaridade de 90%.

Figura 84 - Cromatograma obtido por CG-EM do extrato 1

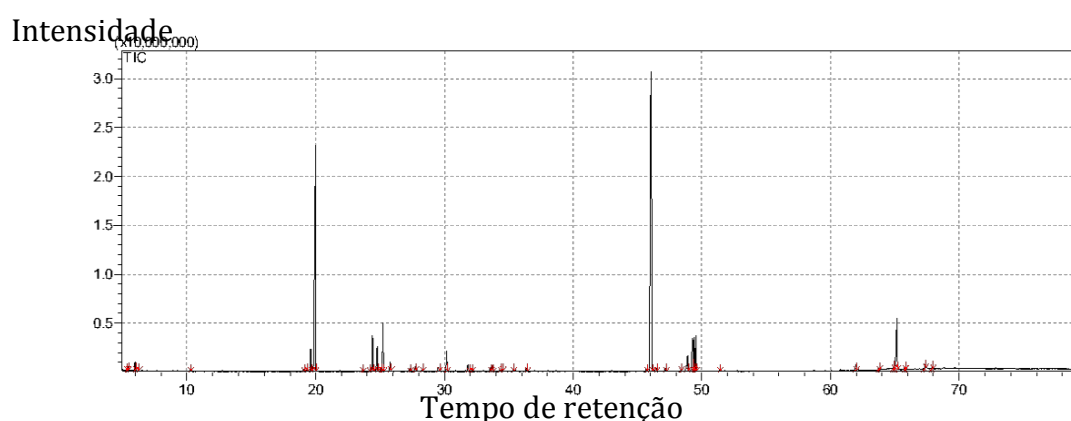
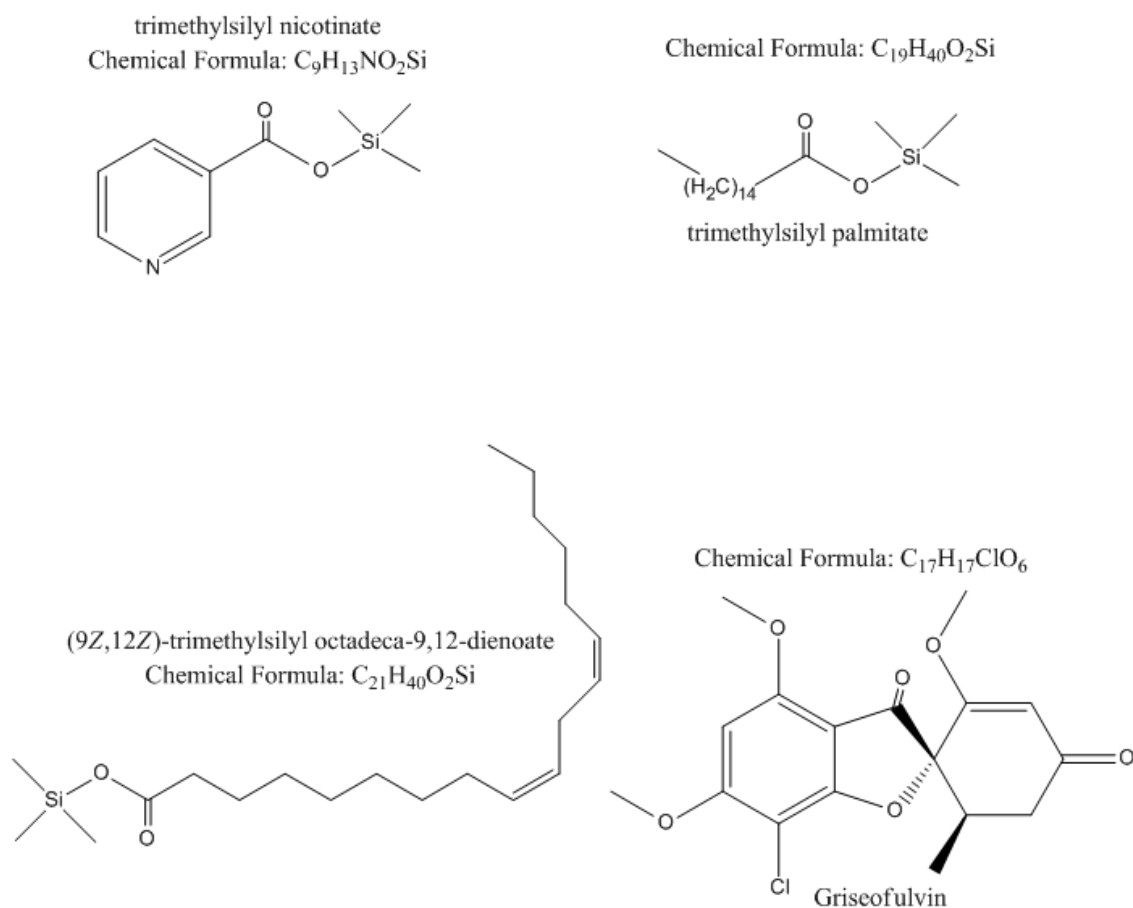


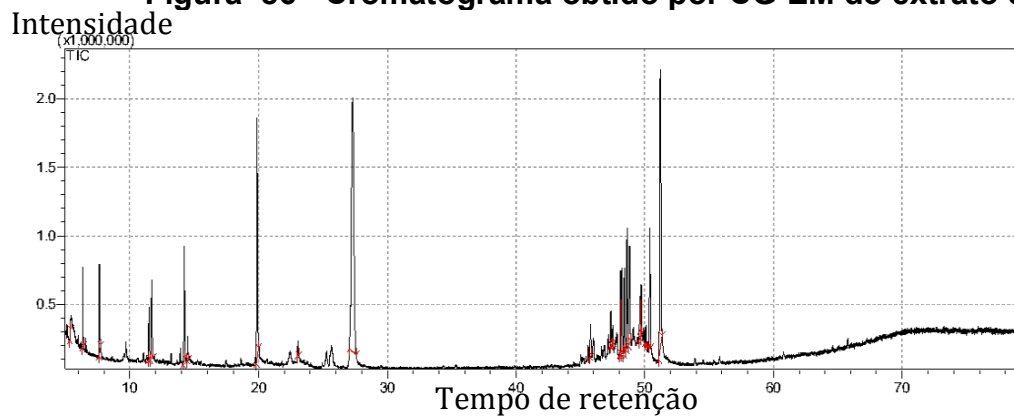
Tabela 14 - Sugestão de similaridade de molécula no extrato 1 por CG-EM

Ensaio 1		
Moléculas	Tempo de retenção	Similaridade
$C_9H_{13}NO_2Si$	5,94	94%
$C_{19}H_{40}O_2Si$	29,53	93%
$C_{21}H_{40}O_2Si$	34,32	90%
$C_{17}H_{17}ClO_6$	48,89	90%

Figura 85 - Moléculas sugeridas para o extrato 1



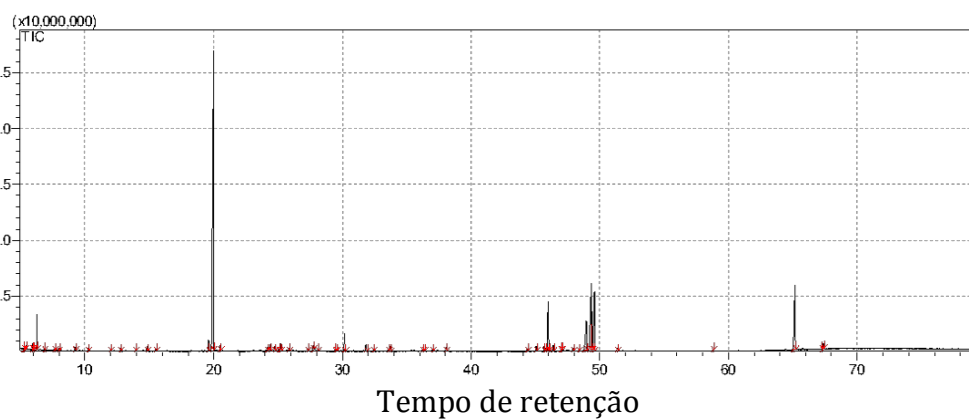
Ensaio 3 – Não apareceram sugestões de moléculas acima de 90% de similaridade.

Figura 86 - Cromatograma obtido por CG-EM do extrato 3

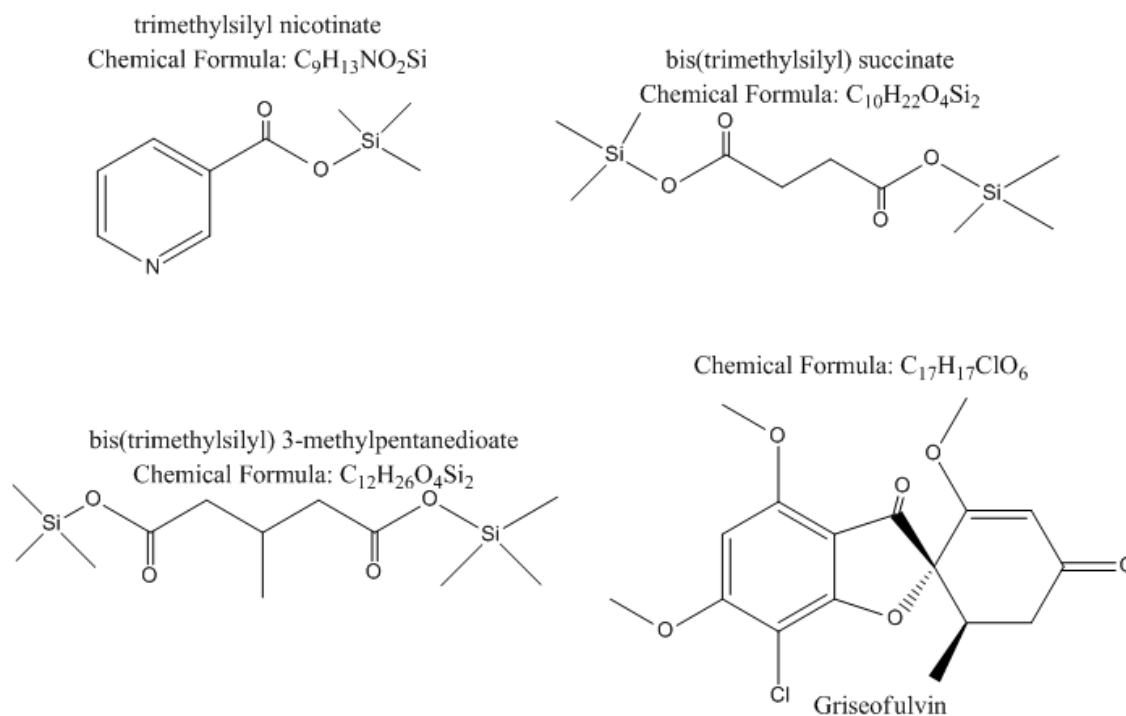
Para o ensaio 5, o destaque também foi a molécula de Griseofulvina, com similaridade de 90%.

Figura 87 - Cromatograma obtido por CG-EM do extrato 5

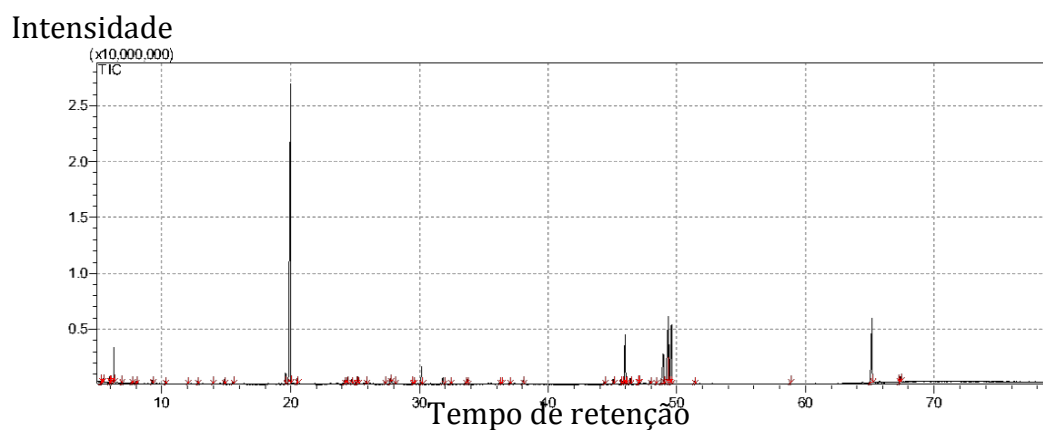
Intensidade

**Tabela 15 - Sugestão de similaridade de moléculas no extrato 5 por CG-EM**

Ensaio 5		
Moléculas	Tempo de retenção(min)	Similaridade
$C_9H_{13}NO_2Si$	5,94	93%
$C_{10}H_{22}O_4Si_2$	6,25	96%
$C_{12}H_{26}O_4Si_2$	9,22	90%
$C_{17}H_{17}ClO_6$	48,89	90%

Figura 88 - Sugestão de moléculas do extrato 5

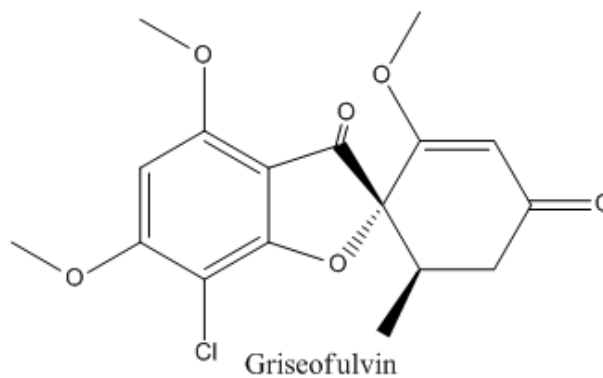
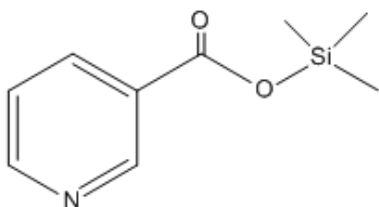
O último ensaio para o meio Czapek também apresentou a Griseofulvina com 90% de similaridade. O cromatogramas para o extrato 7 é apresentado a seguir:

Figura 89 - Cromatograma obtido por CG-EM no extrato 7**Tabela 16 - Sugestão de similaridade de molécula no ensaio 7 por CG-EM**

Ensaio 7		
Moléculas	Tempo de retenção(min)	Similaridade
$C_9H_{13}NO_2Si$	5,94	94%
$C_{17}H_{17}ClO_6$	48,89	90%

Figura 90 - Sugestão das moléculas do extrato 7

trimethylsilyl nicotinate
Chemical Formula: $C_9H_{13}NO_2Si$



Chemical Formula: $C_{17}H_{17}ClO_6$

Foram apresentados os ensaios em que o meio de cultivo era Czapek. A fim de realizar uma comparação entre os diferentes tipos de meio de cultivo.

A seguir, são apresentados os dados de CG/EM obtidos dos extratos de meio de cultivo Nutriente.

O primeiro cromatograma gasoso é o do ensaio 2. Nesse extrato, o software sugere 8 moléculas.

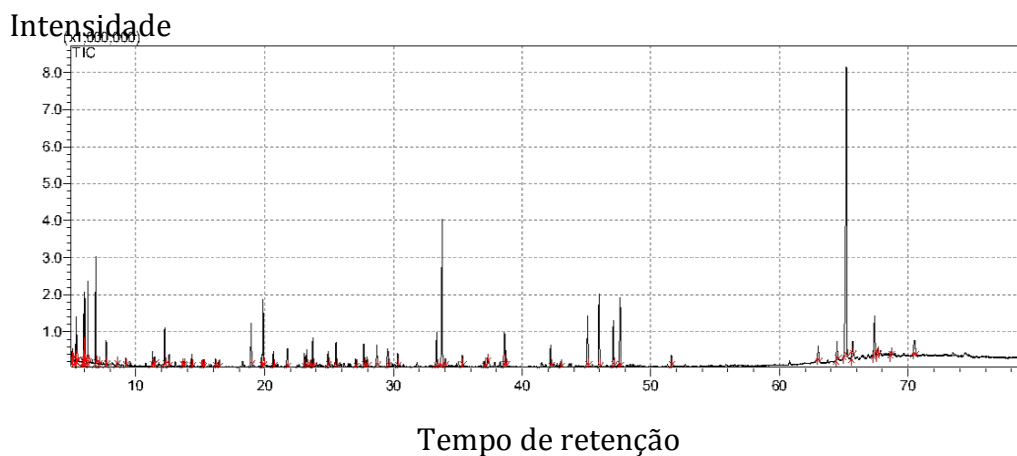
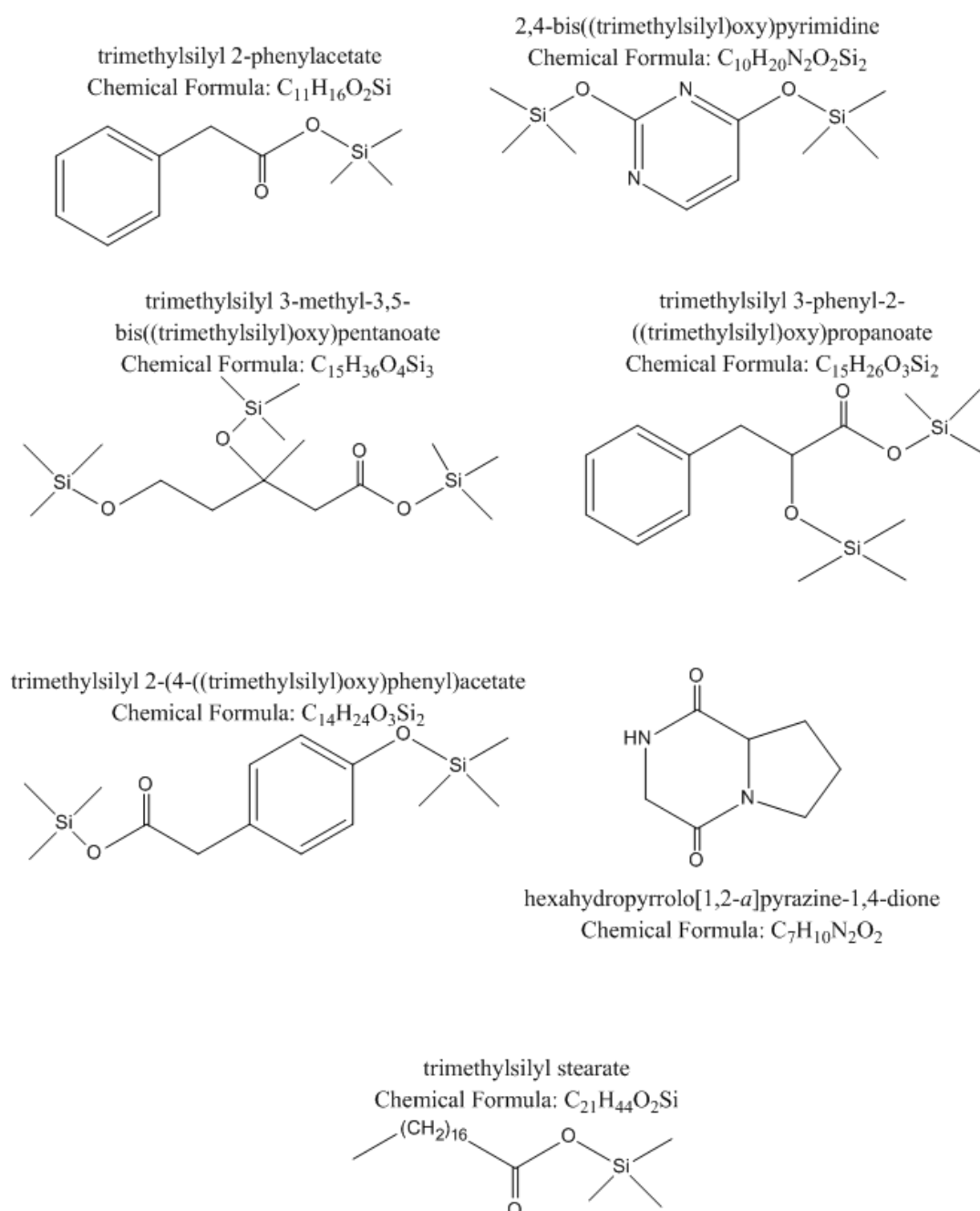
Figura 91 - Cromatograma obtido por CG-EM do extrato 2

Tabela 17 - Sugestão de similaridade de moléculas do ensaio 2 por CG-EM

Ensaio 2		
Moléculas	Tempo de retenção(min)	Similaridade
$C_{11}H_{16}O_2Si$	6,00	97%
$C_{10}H_{20}N_2O_2Si_2$	6,86	92%
$C_{15}H_{26}O_3Si_2$	14,33	94%
$C_{14}H_{24}O_3Si_2$	16,15	91%
$C_7H_{10}N_2O_2$	19,79	91%
$C_{21}H_{44}O_2Si$	35,34	91%

Figura 92 - Moléculas sugeridas para o extrato 2



Para o ensaio 4, três moléculas com similaridade acima de 90% são sugeridas. O cromatograma gasoso é apresentado abaixo, bem como a tabela contemplando as sugestões das referidas moléculas:

Figura 93 - Cromatograma obtido por CG-EM no extrato 4

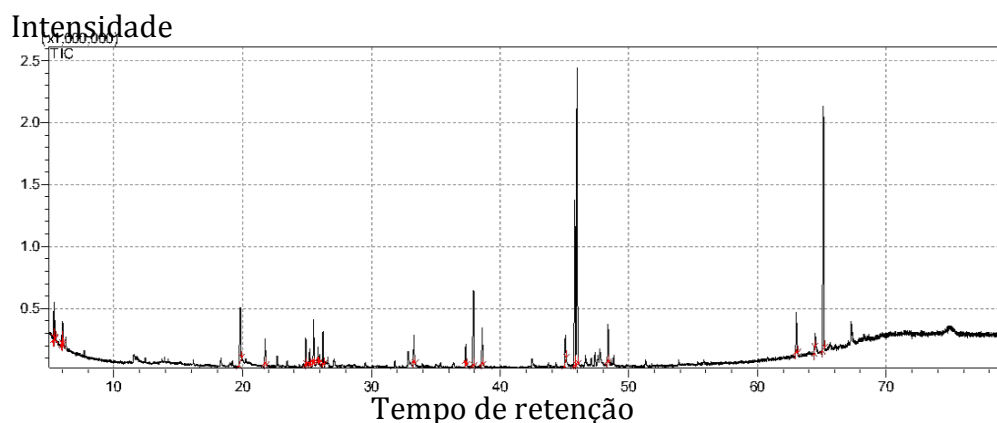
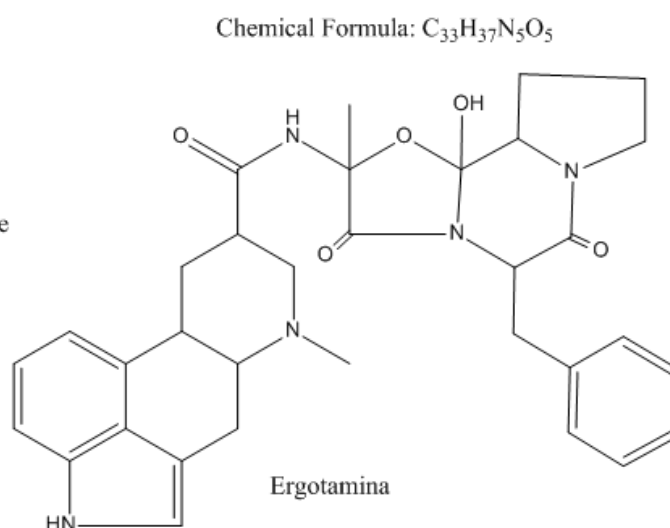
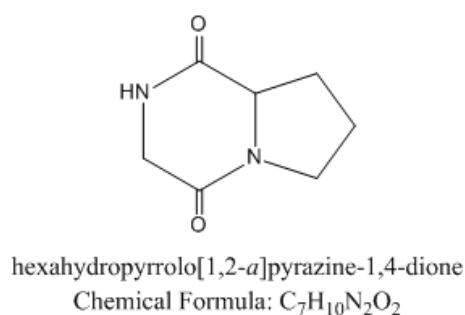


Tabela 18 - Sugestão de similaridade de molécula do ensaio 4 por CG-EM

Ensaio 4		
Moléculas	Tempo de retenção(min)	Similaridade
$C_7H_{10}N_2O_2$	19,790	91%
$C_{33}H_{37}N_5O_5$	37,315	90%

Figura 94 - Moléculas sugeridas para o extrato 4



Para o ensaio 6, cinco moléculas são sugeridas com grau de similaridade acima de 90%.

O cromatograma gasoso desse extrato é mostrado a seguir:

Figura 95 - Cromatograma obtido por CG-EM do extrato 6

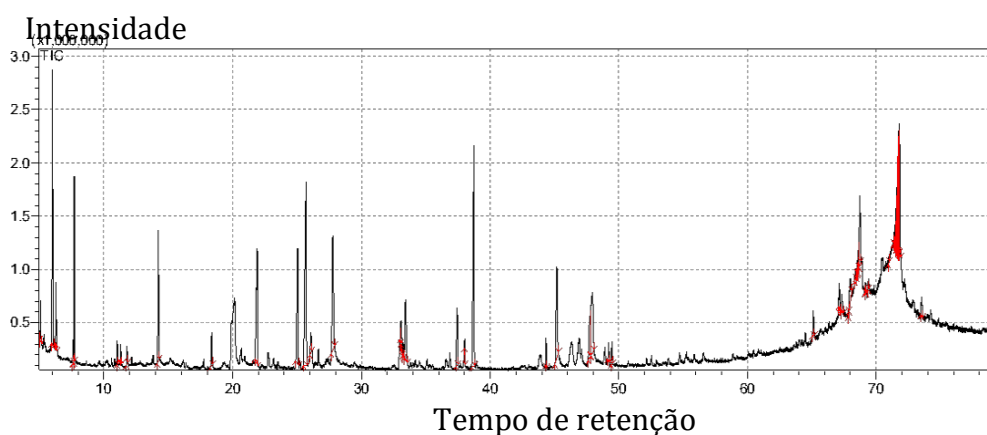
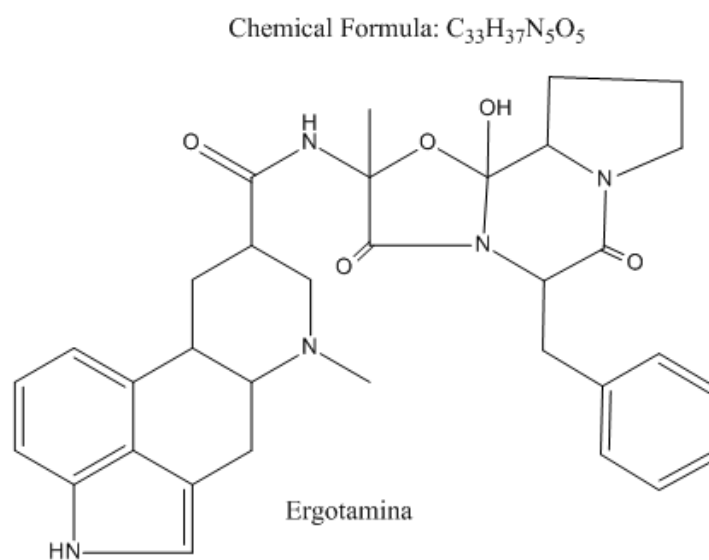
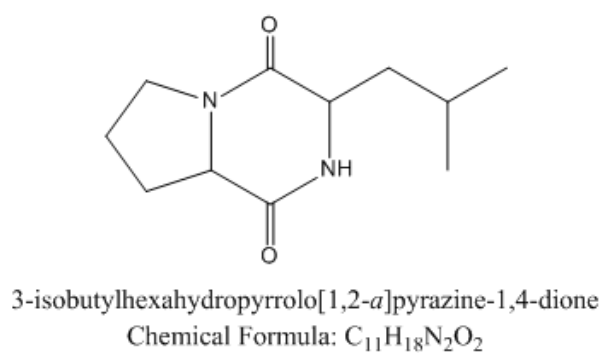
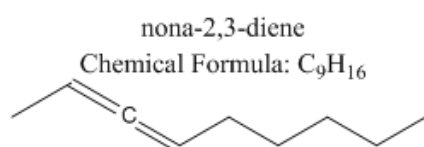
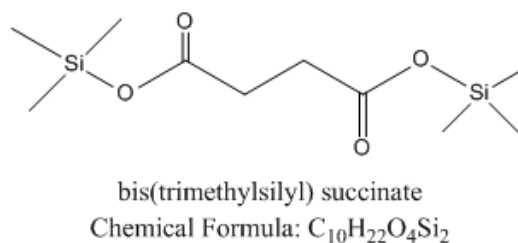
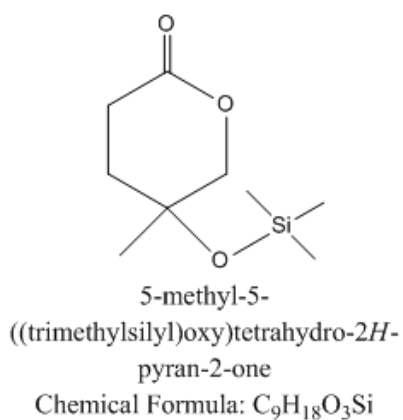


Tabela 19 - Sugestão de similaridade de moléculas do ensaio 6 por CG-EM

Ensaio 6		
Moléculas	Tempo de retenção(min)	Similaridade
$C_9H_{18}O_3Si$	7,700	97%
$C_{10}H_{22}O_4Si_2$	6,260	92%
C_9H_{16}	14,225	90%
$C_{11}H_{18}N_2O_2$	25,035	91%
$C_{33}H_{37}N_5O_5$	37,425	89%

Figura 96 - Moléculas sugeridas para o extrato 6



Por fim, para o ensaio 8 são sugeridas 8 moléculas com similaridade de 90% com a base de dados do software. O cromatograma gasoso e a tabela contendo as moléculas sugeridas são apresentados a seguir:

Figura 97 - Cromatograma obtido por CG-EM do extrato 8

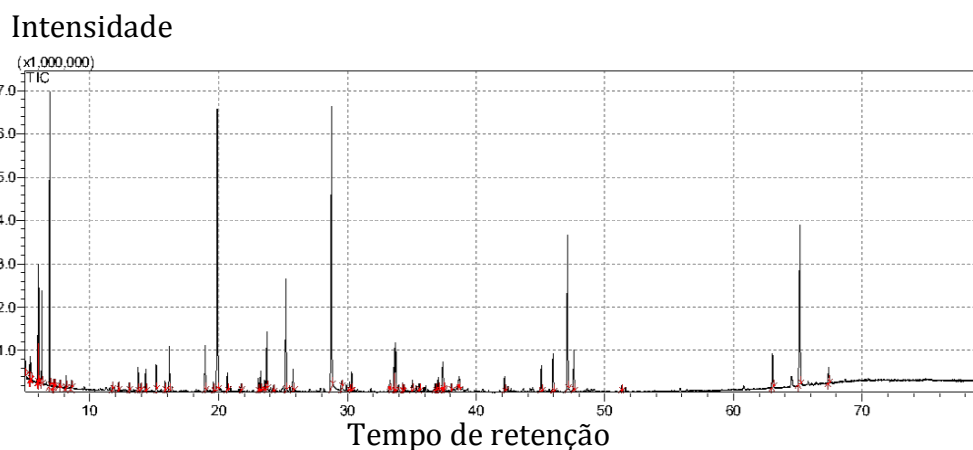
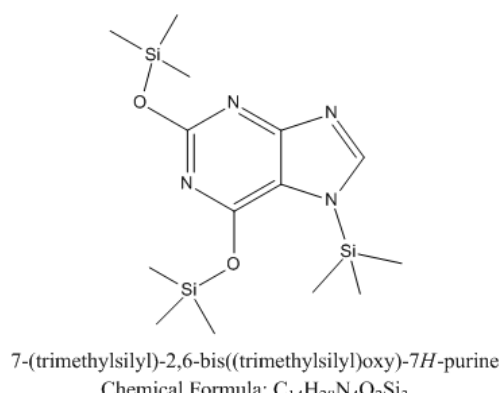
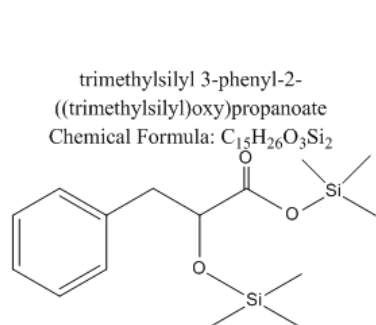
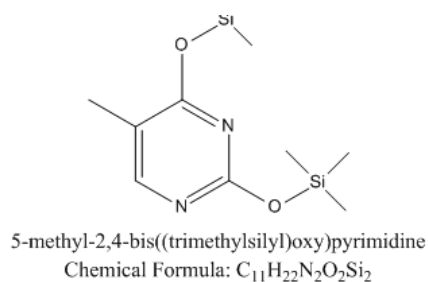
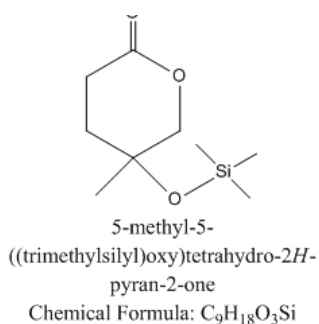


Tabela 20 - Sugestão de similaridade de moléculas do ensaio 8 por CG-EM

Ensaio 8		
Moléculas	Tempo retenção(min)	Similaridade
$C_9H_{18}O_3Si$	7,700	92%
$C_{11}H_{22}N_2O_2Si_2$	8,540	90%
$C_{14}H_{24}O_3Si_2$	16,160	96%
$C_{14}H_{28}N_4O_2Si_3$	28,770	90%

Figura 98 - Sugestão de moléculas para extrato 8



Em geral, as moléculas sugeridas pelo software para os extratos obtidos do meio Nutriente, não apresentam grande valor comercial. Basicamente são ácidos orgânicos de cadeia longa e moléculas de metabolismo primários.

Em nenhum dos ensaios com meio Nutriente foi detectada a molécula de Griseofulvina.

Na cromatografia gasosa dos ensaios 1, 5 e 7 foi detectado sinal da molécula de griseofulvina. Os espectros de massas que sugerem essa similaridade de 90% de confiança são apresentados a seguir.

Abaixo em destaque o cromatograma gasoso do extrato bruto 1. A região destacada é referente ao sinal da molécula de Griseofulvina que é sugerida pelo software.

Figura 99 - Detecção do sinal de griseofulvina no cromatograma de CG-EM do extrato 1

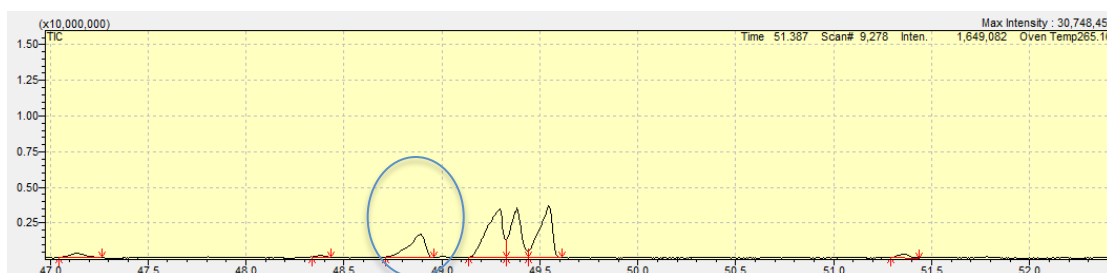
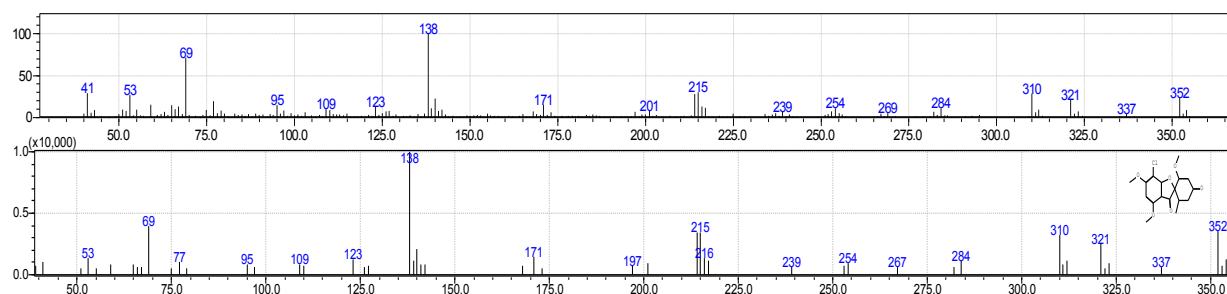


Figura 100 - Padrão de fragmentação e comparação entre os espectros de massas de griseofulvina sugerido para o extrato 1



O sinal correspondente à molécula de Griseofulvina encontra-se próximo de 48,5 minutos.

Para o ensaio 5, também é apresentada o cromatograma gasoso com seus respectivos padrões de fragmentação e que dão similaridade de 90% para a molécula em estudo.

Figura 101 - Detecção do sinal de griseofulvina no cromatograma de CG-EM do extrato 5

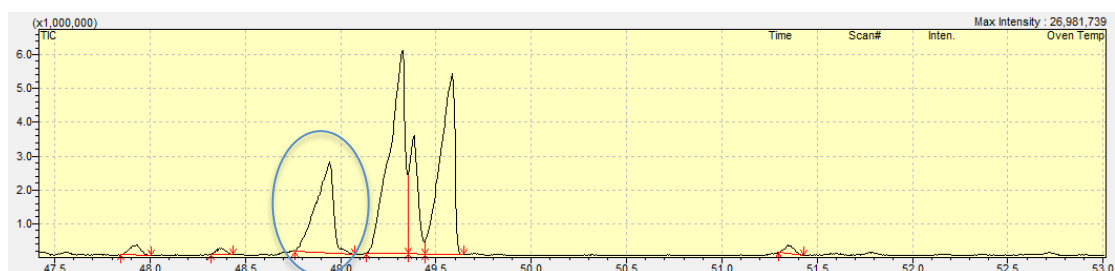
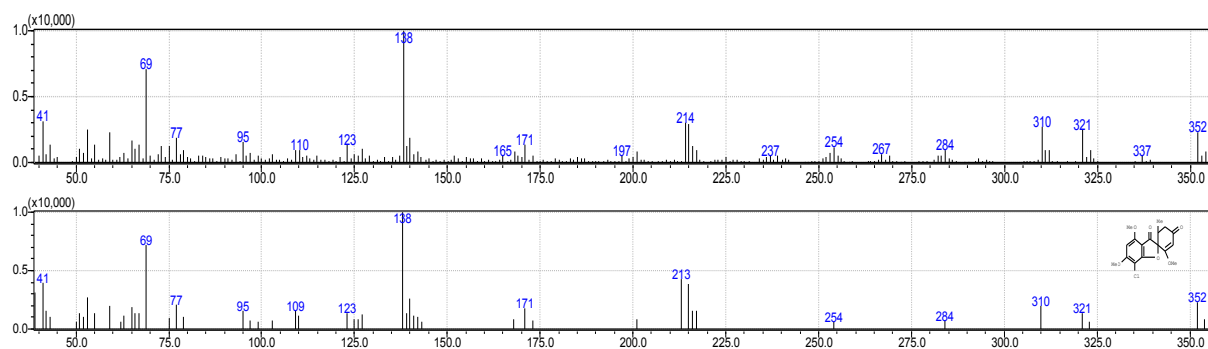


Figura 102 - Padrão de fragmentação e comparação entre os espectros de massas de griseofulvina sugerida para o extrato 5



O ensaio 7 apresentou um sinal muito baixo referente à molécula de Griseofulvina. Mesmo assim, ele foi considerado devido à similaridade dos padrão de fragmentação na porcentagem de 90%.

Figura 103 - Detecção do sinal de griseofulvina no cromatograma de CG-EM do extrato 5

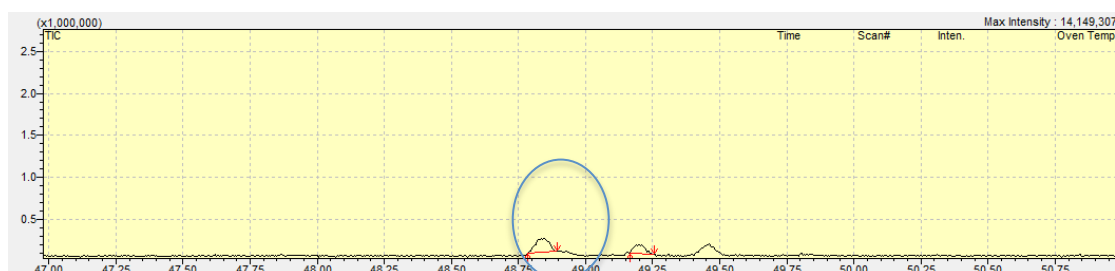
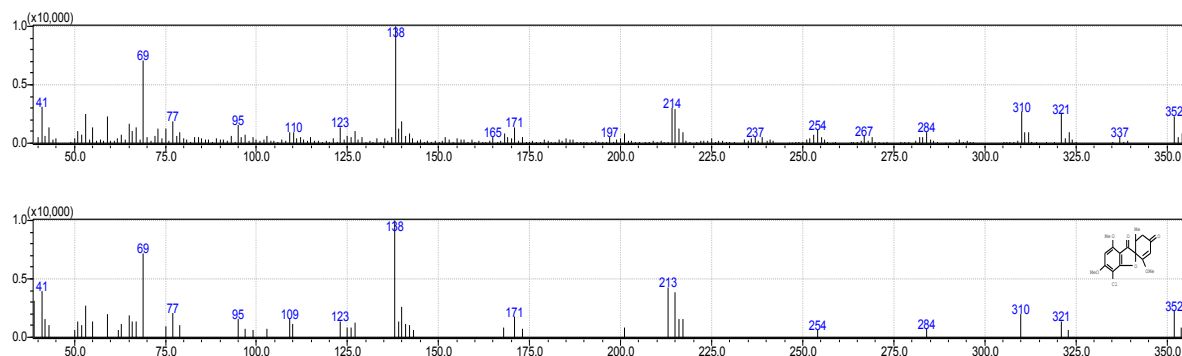


Figura 104 - Padrão de fragmentação e comparação entre os espectros de massas de griseofulvina sugerida para o extrato 7



Para os ensaios 1 e 5 o sinal no tempo de retenção em 48,5 minutos são intensos, porém, para o ensaio 7, apesar de ser detectado, é muito baixo.

Enfatizando que houve um delineamento experimental para as condições de cultivos do fungo, portanto, o ensaio 1 trata-se de um ensaio de nível baixo para todas as variáveis, ou seja, sem agitação e sem luz. O ensaio 5, também foi cultivado em modo estático, porém, com presença de luz.

Já o ensaio de número 7 trata-se de cultivo que esteve no nível alto do planejamento fatorial, ou seja, com agitação e com luz.

Nas bases de dados disponíveis atualmente, não existem informações referentes à molécula de Griseofulvina para que possa ser realizada uma comparação, por exemplo, com o índice de Kovats. Dessa forma, buscando um subsídio que pudesse contribuir para alegar a possível existência de Griseofulvina nos extratos, analisou-se os cromatogramas de CLAE-EM fazendo o mesmo procedimento utilizado para buscar a massa de alta resolução da molécula de citocalasina D.

Com isso, a massa-carga referente à molécula de Griseofulvina, $[M+H]^+ = 353,0710$ foi varrida em todos os cromatogramas dos ensaios.

A molécula cuja massa-carga corresponde exatamente a 353,0710 foi detectada em apenas dois ensaios, sendo eles o ensaio 1 e o ensaio 5. Isso condiz com as informações obtidas da CG-EM, onde sugere-se a presença de Griseofulvina

nos ensaios 1, 5 e 7, porém, este último apresentou um sinal muito baixo e provavelmente não foi detectado no CLAE-EM.

Os cromatogramas que apresentam os sinais das moléculas de Griseofulvina são apresentados e discutidos a seguir:

Figura 105 - Detecção da massa de alta resolução de griseofulvina no extrato 1 por CLAE-EM

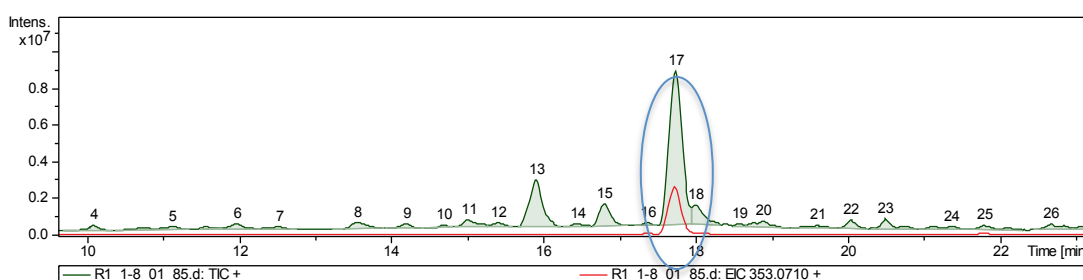
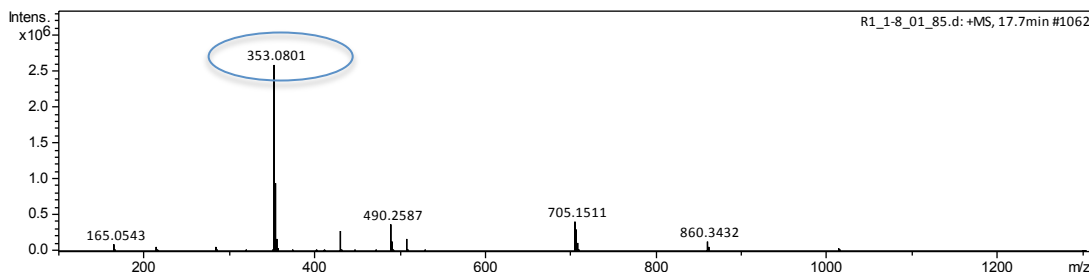


Figura 106 - Espectro de massas correspondente ao sinal destacado na figura 99



No ensaio 1, o pico 17 contém o sinal de Griseofulvina. O espectro de massas mostra como sinal majoritário a massa-carga que condiz com o valor procurado da molécula em questão.

O ensaio 5 também apresenta um pico que corresponde à molécula de Griseofulvina. Trata-se do pico 15 em que o sinal referente à massa da molécula analisada é encontrado. A seguir são apresentados os cromatogramas do extrato 5 e o espectro de massas que corresponde à razão m/z da molécula pesquisada.

Figura 107 - Detecção do sinal de griseofulvina no cromatograma do extrato 5 obtido por CLAE-EM 97

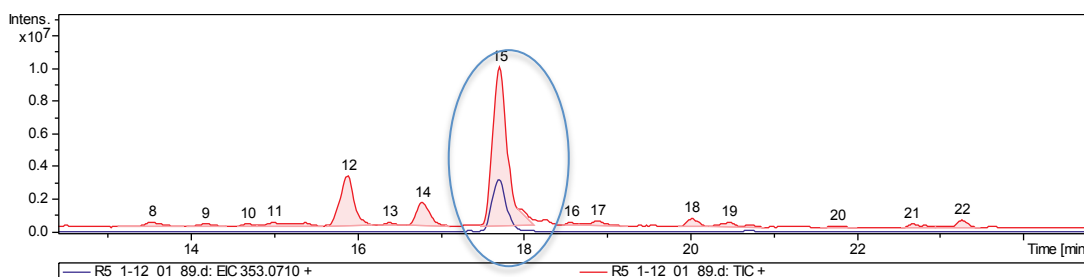
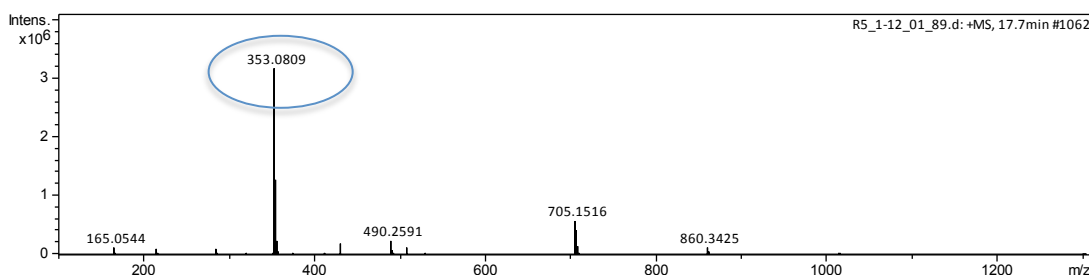


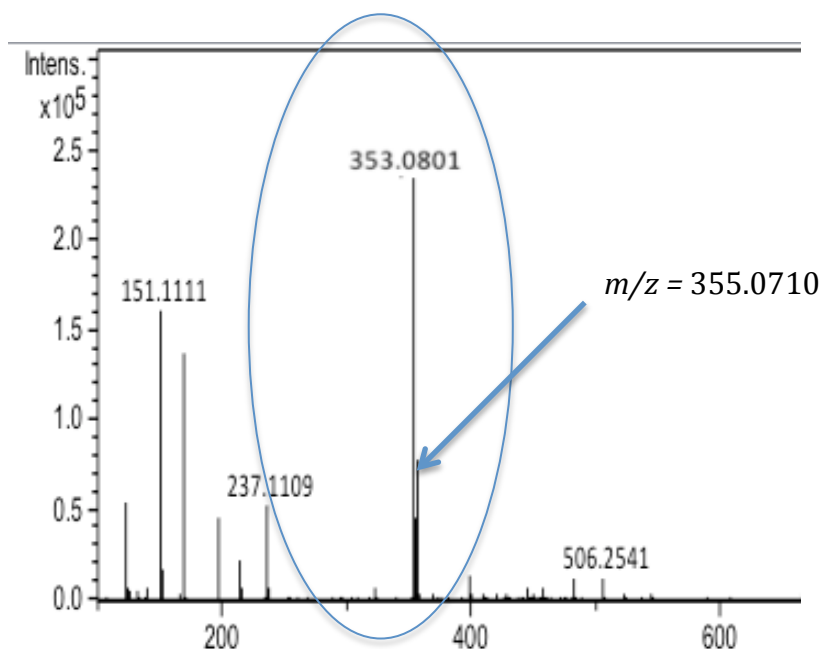
Figura 108 - Espectro de massas correspondente ao sinal destacado na figura 101



O ensaio 7 não apresentou sinal referente à molécula de Griseofulvina no CLAE-EM, isso se deve, provavelmente, à baixa quantidade desta molécula no extrato, uma vez que isso já havia sido evidenciado no cromatograma gasoso.

Como o espectrômetro de massas é um equipamento extremamente sensível, é possível, inclusive, detectar a massa dos isótopos nas moléculas. A molécula de Griseofulvina, em especial, apresenta um átomo de cloro em sua estrutura. Existem dois isótopos para o átomo de Cloro, o Cl-35 e o Cl-37, porém, a abundância do Cl-37 é menor, em torno de 32,5%. No espectro de massa há o sinal referente a massa de 353,0710, como mostrado abaixo, porém, quando se amplia esse espectro, nota-se que existe dois picos muito próximos, um com $m/z = 353,0710$ e $m/z = 355,0710$

Figura 109 - Destaque das massas de griseofulvina para os dois isótopos de cloro (35 e 37)



Além disso, fazendo-se uma varredura das duas razões massa-cargas, aparecem dois sinais referente aos sinais procurados tanto para o ensaio 1 quanto para o ensaio 5. A presença dessa evidência isotópica nos espectros de massas pode ser um argumento bastante forte para dizer que existe a molécula de griseofulvina nos respectivos extratos.

Os sinais contendo a massa de 353,0710 e 355,0710 são apresentados a seguir:

Figura 110 - Detecção das diferentes massas atribuídas aos isótopos do cloro na molécula de griseofulvina do extrato 5

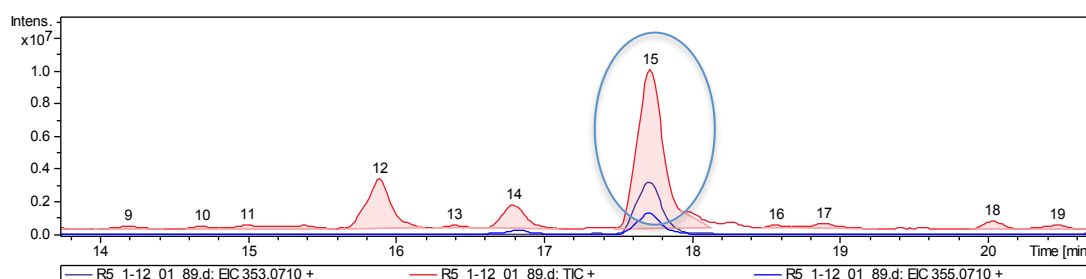
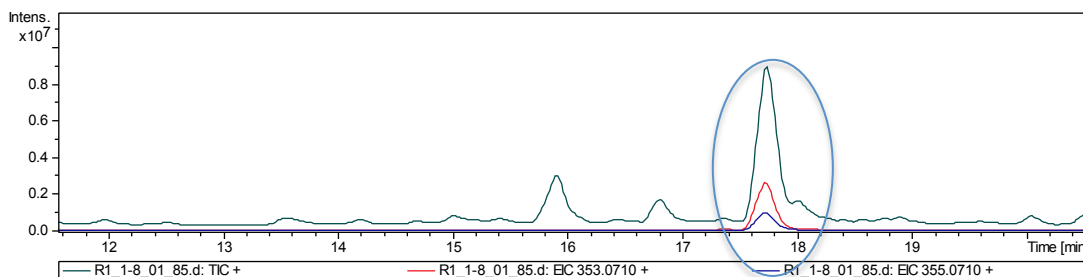


Figura 111 - Detecção das diferentes massas atribuídas aos isótopos do cloro na molécula de griseofulvina do extrato 1



Dessa forma, é possível alegar que há grandes evidências da presença de Griseofulvina nas condições de cultivo 1 e 5. Ambos cultivos foram obtidos no modo estático, porém, o 1 estava ao abrigo de luz.

São exatamente as mesmas condições impostas para a molécula de Citocalasina D que foi discutida anteriormente. Porém, vale ressaltar que Citocalasina D foi detectada em ambos os extratos, tanto os de Czapek, quanto de Nutriente. Neste caso, a griseofulvina só foi detectada nos ensaios de Czapek de acordo com os dados de CG-EM e CLAE-EM.

Na análise de todos os cromatogramas e espectros aqui apresentados, observa-se que há variação na produção metabólica do fungo *Xylaria sp.* pois os perfis cromatográficos não são iguais. Utilizar tais mudança das variáveis que controlam as condições de cultivos, como agitação e luz, fortalece a hipótese de que algumas vias metabólicas são induzidas, ou evidenciadas, e outras, inativadas ou silenciadas.

5 CONCLUSÕES

A respeito das conclusões desse trabalho de mestrado, destaca-se que a abordagem OSMAC foi obtida através de um planejamento fatorial completo, e que o uso da quimiometria permitiu analisar quais variáveis contribuí de forma mais significativa para a obtenção de extrato. É importante ressaltar que para o meio Czapek, a agitação é a variável mais importante no aumento da massa de extrato, diferente do meio nutriente, o qual a luz é o fator determinante para massa de extrato bruto.

Para a técnica de desreplicação, dois metabólitos de interesse farmacológico foram detectados. O primeiro deles é a molécula de citocalasina D, evidenciada pela técnica de CLAE/EM e TOCSY 1D. O outro metabólito de valor agregado é a griseofulvina, detectada pela técnica de CG/EM e CLAE/EM.

Diante de um delineamento experimental, foi possível encontrar quais as condições específicas para a produção tanto de citocalasina D como de griseofulvina. A Citocalasina D foi detectada nos ensaios 1 e 5, de Czapek; e 2, 6 e 8, de Nutriente. Não necessariamente os ensaios com maior massa de extrato são aqueles que contêm as moléculas de alto valor agregado.

Para o meio quimicamente definido, fica evidente que a agitação silencia a via metabólica responsável pela produção de citocalasinas. A luz não é um fator determinante na produção de citocalasinas. Por outro lado, no meio nutriente, por ser complexo e mais rico em substratos, moléculas de citocalasinas D só não foi detectada nas condições do ensaio 4 (com agitação e ao abrigo de luz), ou seja, diante dessas condições, a via metabólica para produção desse metabólito não é evidenciada.

Por outro lado, a molécula de griseofulvina só foi encontrada nos ensaios 1 e 5 de Czapek. Não foi detectada nos ensaios de Nutriente.

REFERÊNCIAS

- CAFEU, C. M. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris***. 2007. 248 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1997. 104 p.
- GRAF, W.; ROBERT, J. L.; VEDERAS, J. C.; TAMM, C. Biosynthesis of cytochalasans. Part III. C-13-NMR of cytochalasin B (phomin) and cytochalasin D – incorporation of [1-C-13] and [2-C-13] sodium acetate. **Helvetica Chimica Acta**, v. 57, n. 6, p. 1801-1815, Oct. 2004.
- GULLBERG, J.; MORITZ, T.; SJÖSTRÖM, M.; NORDSTRÖM, A.; JONSSON, P. Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of *Arabidopsis thaliana* samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 2, p. 283-295, Aug. 2004.
- HEWAGE, R. T.; AREE, T.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTA KOOP, P. One Strain Many Compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87-94, Dec. 2014.
- KJELDAHL, K. I.; BRO, R. Some common misunderstandings in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 7, p. 558-564, July 2010.
- MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. New York: Oxford University Press, 1994. 94 p.
- PEREA, S.; FOTHERGILL, A. W.; SUTTO, N. D. A.; RINALDI, M. G. Comparison of in vitro activities of voriconazoles and established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 385-388, Jan. 2001.
- ROBERT, J. L.; TAMM, C. Biosynthesis of cytochalasans. Part 5. The incorporation of deoxaphomin into cytochalasin B (Phomin). **Helvetica Chimica Acta**, v. 58, n. 8, p. 2501-2504, Nov. 1975.
- ROESSNER, U.; WAGNER, C.; KOPTA, J.; TRETHEWEY, R. N.; WILLMITZER, L. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. **The Plant Journal**, v. 23, n. 1, p. 131-142, July 2000.

SONG, F.; WU, S.; ZHAI, Y.; WANG, T. Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 5, p. 673-684, May 2014.

TURNER, W. B; ALDRIDGE, D. C. **Fungal metabolites II**. New York: Academic Press, 1983. 631 p.

VANDERMOLEN, K. M.; RAJA, H. A.; EI-ELIMAT, T.; OBERLIES, N. H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 71-77, Dec. 2013.

WANG, Q.; BAO, L.; YANG, X.; GUO, H. Tricycloalternarenes F–H: three new mixed terpenoids produced by an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. using OSMAC method. **Fitoterapia**, v. 85, p. 8-13, Mar. 2013.

ZHANG, H.; DENG, Z.; GUO, Z.; PENG, Y.; HUANG, N.; HE, H.; TU, X.; ZOU, K. Effect of culture conditions on metabolite production of *Xylaria* sp. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7940-7950, May 2015.