

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS-
HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA A SAÚDE (PPG-CAPS)

ESTUDOS DE COMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Aspergillus terreus*
ISOLADO DO SOLO DO CERRADO GOIANO

LETÍCIA MIKAELLY DE OLIVEIRA MOREIRA

Anápolis-GO

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS- HENRIQUE
SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA A SAÚDE

LETICIA MIKAELLY DE OLIVEIRA MOREIRA

**ESTUDOS DE COMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Aspergillus terreus*
ISOLADO DO SOLO DO CERRADO GOIANO**

Anápolis – GO

2017

LETICIA MIKAELLY DE OLIVEIRA MOREIRA

**ESTUDOS DE COMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Aspergillus terreus*
ISOLADO DO SOLO DO CERRADO GOIANO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos Para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos da Saúde.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Valdirene Neves Monteiro

Co- orientador (a): Prof^a. Dr^a. Marilene Silva Oliveira

Anápolis – GO

2017

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MM838 Mikaelly de Oliveira Moreira, Leticia
ESTUDOS DE COMPOSTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO
Aspergillus terreus ISOLADO DO SOLO DO CERRADO GOIANO /
Leticia Mikaelly de Oliveira Moreira; orientador Valdirene Neves
Monteira; co-orientador Marilene Silva Oliveira. -- , 2017.
76 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado
Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) --
Câmpus-Anápolis CET, Universidade Estadual de Goiás, 2017.

1. Microrganismos do solo . 2. Metabólitos secundários. 3. Análise
estrutural. I. Neves Monteiro, Valdirene, orient. II. Silva Oliveira,
Marilene , co-orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento é a Deus por ter me iluminado e pelas bênçãos no decorrer do meu caminho, pela oportunidade de poder realizar mais um sonho, por ter me dado força e saúde para concluir este trabalho.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Valdirene Neves Monteiro, pela confiança, dedicação e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Marilene Silva Oliveira, pela paciência, auxílio no manuseio dos equipamentos e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

À Professora Dr^a. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet pela atenção e colaboração ao disponibilizar o laboratório de Bioquímica de Microrganismos.

À Professora Dr^a Solange Xavier dos Santos, pela amizade e colaboração ao disponibilizar o laboratório de Microbiologia.

À Professora Dr^a Samantha Salomão Caramori, pelas contribuições no trabalho e por disponibilizar o laboratório de Biotecnologia.

Ao Professor Dr^o Plinio Lázaro Faleiro Naves, pelas contribuições no trabalho.

Aos meus amados pais, irmãos Andreza, Ricardo e Henrique pelo amor que sempre tiveram comigo.

Ao meu marido Elder, pelo seu amor, confiança e compreensão. Obrigada por sempre acreditar em mim, por me dar forças e por ser a minha alegria de viver.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Os microrganismos representam uma importante fonte de compostos bioativos com alto valor econômico agregado. Dentre os microrganismos, os fungos apresentam muitas vantagens de uso devido suas potencialidades como produtores de metabólitos secundários. Este trabalho teve como objetivo produzir e analisar os metabólitos secundários do fungo *Aspergillus terreus* isolado do solo do Cerrado Goiano. Os metabólitos secundários foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), observou-se pelos cromatogramas gerados a presença de vários picos, sendo necessária a separação dos picos para sua identificação e caracterização. Para a separação dos picos detectados foi empregada a técnica de extração em fase sólida (EFS). Esta técnica resultou em frações que foram analisadas na CLAE e foi observado pelos cromatogramas que esta técnica concentrou os metabólitos necessitando assim a utilização de outro meio para sua separação. Foi utilizada uma coluna preparativa empacotada com sílica C18, onde metabólitos foram separados pela diferença de polaridade utilizada na coluna preparativa. O extrato de metabólitos secundários sem fracionamento, foi denominado de extrato total de metabólitos secundários, onde este apresentou toxicidade moderada pelo teste de toxicidade em *Artemia salina*.

Palavras-chave: metabólitos secundários, microrganismos, solo do Cerrado Goiano, *Aspergillus terreus*.

ABSTRACT

Microorganisms represent an important source of bioactive compounds with high added economic value. Among the microorganisms, fungi have many advantages of use due to their potential as producers of secondary metabolites. This work aimed to produce and analyze the secondary metabolites of the *Aspergillus terreus* fungus isolated from the Cerrado Goiano soil. The secondary metabolites were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), the chromatograms were observed the presence of several peaks, being necessary the separation of the peaks for the identification and their characterization. For the separation of detected peaks the solid phase extraction technique (SPE) was used. This technique resulted in fractions that were analyzed in the HPLC and it was observed by the chromatograms that this technique concentrated the metabolites necessitating the use of another means of separation of these. A preparative column packed with C18 silica was used, where metabolites were separated by the polarity difference used in the preparative column. The extract of secondary metabolites without fractionation was denominated crude extract, where this showed moderate toxicity by the toxicity test in *Artemia salina*.

Keywords: secondary metabolites, microorganisms, Cerrado Goiano soil, *Aspergillus terreus*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição da vegetação do Cerrado no Brasil. Fonte Ratter, Ribeiro e Bridgewater, 1997..... 16
- Figura 2.** Aspecto do fungo *Aspergillus terreus* em meio ágar, glicose e extrato de levedura (MYG) (A); Características microscópicas do fungo *A. terreus* pela Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (B)..... 35
- Figura 3:** Cromatograma dos composto existentes no extrato total de metabólitos secundário. Coluna de fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos com monitoração em comprimento de onda de 280nm. 36
- Figura 4:** Cromatogramas obtidos por CLAE para as 5 frações da EFS dos compostos provenientes do fungo *Aspergillus Terreus*. Condições experimentais: coluna fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos, monitorados em comprimento de onda de 280nm. **A) FRAÇÃO 1, B) FRAÇÃO 2, C) FRAÇÃO 3, D) FRAÇÃO 4, E) FRAÇÃO 5**..... 38
- Figura 5:** Cromatogramas obtidos por CLAE para as 8 frações da coluna preparativa dos compostos provenientes do fungo *Aspergillus Terreus*. Condições experimentais: coluna fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos, monitorados em comprimento de onda de 280nm. **A) FRAÇÃO 1, B) FRAÇÃO 2, C) FRAÇÃO 3, D) FRAÇÃO 4, E) FRAÇÃO 5, F) FRAÇÃO 6, G) FRAÇÃO 7, H) FRAÇÃO 8**..... 40
- Figura 6:** Cromatogramas obtidos por CLAE para as 7 frações da coluna preparativa dos compostos provenientes do fungo *Aspergillus Terreus*. Condições experimentais: coluna fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos, monitorados em comprimento de onda de 280nm. **A) FRAÇÃO 1, B) FRAÇÃO 2, C) FRAÇÃO 3, D) FRAÇÃO 4, E) FRAÇÃO 5, F) FRAÇÃO 6, G) FRAÇÃO 7**.....44
- Figura 21:** Estruturas químicas advindas das frações extraídas do extrato total de metabólitos secundários, propostas pelos dados do CG/MS com os resepctivos nomes em ordem crescente: Ácido hexadecanóico; Dibutilftalato.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação da toxicidade do extrato bruto em <i>Artemia salina</i>	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL - Concentração Letal

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EFS- Extração em Fase Sólida

EM- Espectro de Massas

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MSC- Microrganismo do Solo de Cerrado

nm- Nanômetro

PCR- Reação em cadeia da polimerase

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

LC- Cromatografia líquida

UV – Ultravioleta

VIS- Visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
1.1 O Bioma Cerrado.....	15
1.2 Microbiota do solo.....	16
1.3 Fungos.....	17
1.4 Metabólitos	18
1.5 O gênero <i>Aspergillus</i>	21
1.6 Teste de toxicidade: <i>Artemia salina</i>	22
1.7 Extração em Fase Sólida (EFS)	23
1.8 Cromatografia	24
1.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	24
1.10 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).....	25
OBJETIVOS	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
2 METODOLOGIA	28
2.1 Coleta e isolamento do fungo <i>Aspergillus terreus</i>	28
2.2 Manutenção do fungo isolado do solo de Cerrado.....	28
2.3 Condições de cultivo e obtenção do extrato bruto	28
2.4 Produção e extração de metabólitos secundários de <i>Aspergillus terreus</i>	29
2.5 Identificação do Fungo <i>Aspergillus terreus</i> por Sequenciamento do DNA.....	29
2.5.1 Extração de DNA	29
2.5.2. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	29

2.5.3. Purificação do Amplificado do Gene 18s RDNA.....	30
2.6 Análise das Características Microestruturais do Fungo <i>Aspergillus terreus</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	31
2.7 Análise dos compostos produzidos por <i>Aspergillus terreus</i> utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	31
2.8 Técnica de Extração em Fase Sólida (EFS)	32
2.9 Coluna preparativa	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
3.1 Extração dos compostos produzidos por <i>Aspergillus terreus</i>	34
3.3 Análises das características microestruturais do fungo <i>Aspergillus terreus</i> por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Separação dos metabólitos por extração em fase sólida (EFS).....	36
3.5 Coluna preparativa	39
3.6 Segunda Coluna Preparativa.....	41
3.7 Segunda Coluna Preparativa.....	42
3.8 Análise dos compostos voláteis produzidos pelo fungo <i>Aspergillus terreus</i> utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas (CG-EM)	44
3.9 Teste de toxicidade <i>Artemia salina</i>	47
Conclusão	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

INTRODUÇÃO

O solo do Cerrado é uma imensa fonte de biodiversidade, dentre eles estão os microrganismos, dos quais destacam-se os fungos, que contribuem para o melhor funcionamento do ecossistema, decomposição da matéria orgânica, ciclagem dos nutrientes, crescimento das plantas, fertilidade e estrutura do solo (WANG et al., 2014; PEREIRA et al., 2016).

Por ser um ambiente complexo, o solo abriga considerável parte da diversidade de fungos existentes (PFENNING et al., 2006). A diversidade de fungos tem sido estudada especialmente em virtude destes produzirem uma série de compostos, principalmente metabólitos secundários de interesse industrial.

O estudo com metabólitos secundários advindos de fungos é crescente, por serem uma fonte simples e segura de compostos de interesse industrial como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, pigmentos, aromas, agentes de controle biológico de pragas, antibióticos, biocatalisadores, dentre outros (LANGE et al., 2012).

Com o avanço do desenvolvimento tecnológico os procedimentos biotecnológicos têm se destacado cada vez mais, apresentando características econômicas e operacionais que atribuem vantagens em relação aos processos químicos empregados atualmente.

Este trabalho tem como propósito contribuir para o conhecimento da potencialidade biotecnológica de fungos em regiões de Cerrado, onde o fungo MSC 48 isolado do solo do Cerrado goiano foi estudado como fonte de produção de metabólitos secundários bioativos, visto a necessidade da utilização de novos microrganismos com potencial para utilização nas indústrias e no tratamento de algumas doenças.

Diante disto, tem-se uma breve descrição do bioma Cerrado e o que se tem estudado sobre os microrganismos em solos de Cerrado. Para a identificação do gênero e espécie do fungo em estudo foram utilizadas as técnicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e sequenciamento do DNA. Foi feita a extração dos metabólitos secundários, e a análise destes por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE).

Portanto, a busca por metodologias que ampliem e facilitem o estabelecimento de métodos e análise de identificação de metabólitos secundários devem ser investigadas de modo a se obter um perfil preliminar sobre o fungo em estudo. Este trabalho possibilita obter um perfil dos metabólitos produzidos por *Aspergillus terreus*.

1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

1.1 O Bioma Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. É considerado a maior região de savana na América do Sul (MITTERMEIER et al., 2004). O termo Cerrado é utilizado para nomear um conjunto de ecossistemas compostos de savanas, matas, campos e matas de galeria (RATTER et al., 2003).

Os solos de Cerrado são ácidos, apresentam baixa disponibilidade de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, possuem alta saturação por alumínio. A maioria destes solos é classificada como Latossolos (48,66%), entretanto nesta fitofisionomia também se encontram Cambissolos, Neossolos Quartzarênicos, entre outros. Este fato pode estar relacionado a fatores, como: profundidade do solo, drenagem natural, posição na paisagem (topo, meia-encosta, baixada) e altura do lençol freático (SPERA et al., 1999; RIBEIRO; WALTER 2008; REATTO et al. 2008)

As árvores do Cerrado que compõem a vegetação são muito peculiares, com troncos tortuosos, cujas folhas são geralmente grandes e rígidas, possuindo uma composição diversificada de espécies de plantas. Essas características indicam que as plantas sofreram adaptações as condições de seca (RATTER et al., 1977; RIBEIRO; WALTER, 2008).

Apesar de sua importância, o Cerrado tem sofrido degradação por décadas devido às atividades agrícolas e às alterações humanas no uso do solo. Mais da metade dos 2 milhões de Km² de área do Cerrado tem sido transformada em pasto, agricultura comercial e monoculturas (KLINK; MACHADO, 2005).

A área do Cerrado compreende os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia e Distrito Federal, além de enclaves do Amapá, Roraima e Amazonas (Figura 1) (KLINK; MACHADO, 2005).

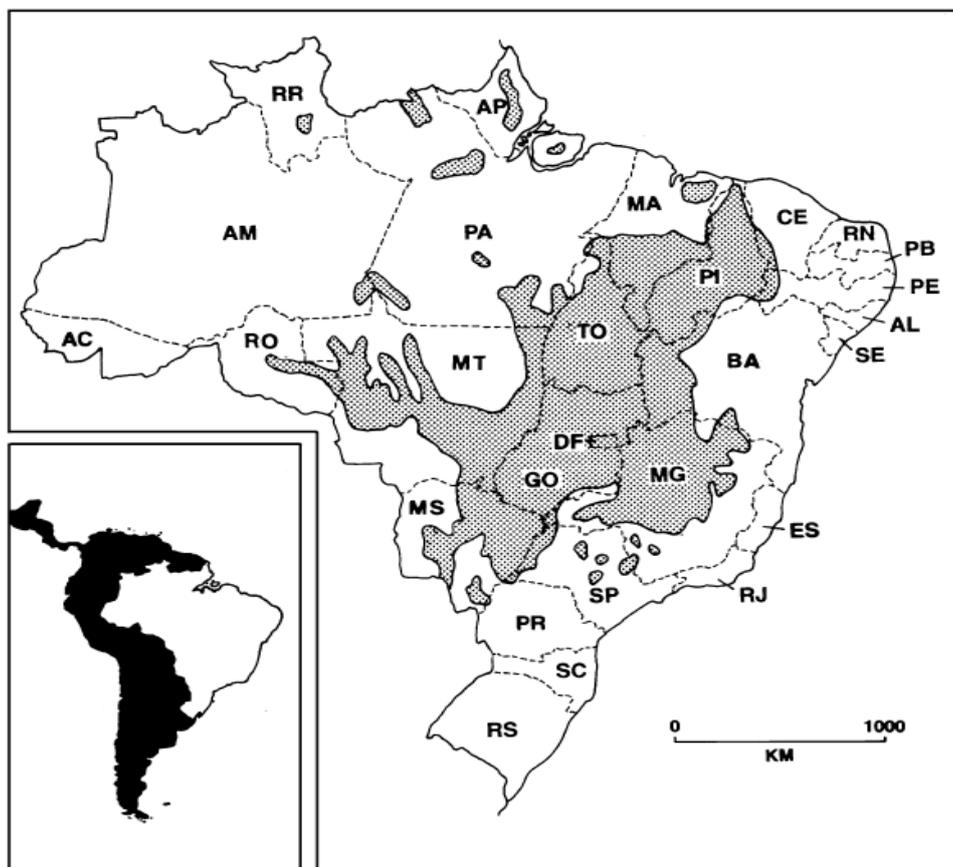


Figura 1. Distribuição da vegetação do Cerrado no Brasil. Fonte Ratter, Ribeiro e Bridgewater, (1997).

Espirito-Santo e colaboradores (2016) avaliaram mudanças na cobertura do solo de Cerrado no estado de Minas Gerais, entre os anos de 2000 a 2015 e puderam constatar que 23.446Km² de áreas do Cerrado foram convertidas em áreas cultiváveis, tendo uma perda líquida anual de -1,2% ao ano da cobertura de Cerrado.

A conversão de solos de Cerrado para a agricultura resulta na redução da fertilidade e na perda de matéria orgânica do solo (PERIN et al., 2003; SINSABAUGH, 2010). O cultivo intenso pode influenciar no que se refere à disponibilidade de nutrientes, quantidade e qualidade dos resíduos vegetais, deixando o solo quimicamente degradado, alterando a atividade e diversidade microbiana (PANKHURST et al., 2003; BALOTA et al., 2004)

1.2 Microbiota do solo

Os microrganismos estão presentes nos mais variados ambientes, interagindo com diversas formas de vida. Suas características conferem adaptações de sobrevivência em

ambientes considerados hostis, desempenhando papel fundamental na manutenção de ecossistemas. O solo é considerado um dos principais habitats de microrganismos e de 80-90% dos processos que ocorrem no solo são reações mediadas por microrganismos (NANNIPIERI et al., 2003).

Os microrganismos do solo se destacam pela versatilidade adaptativa à mudança de fatores como pH, umidade, concentração de determinado elemento, temperatura, dentre outras características, sendo muitas vezes protegidos e estimulados pela comunidade vegetal presente (AQUINO; ASSIS, 2005). Os microrganismos do solo podem apresentar mais de 10.000 espécies por grama de solo (TORSVIK et al., 1990). E representam cerca de 85% da biomassa e 90% do fluxo de CO₂ entre os componentes bióticos responsáveis pela decomposição de serrapilheira (PAOLETTI; BRESSAN, 1996).

A possibilidade de sobrevivência dos microrganismos do solo de Cerrado é menor por causa do solo ácido e pobre de nutrientes. Para garantir a sua sobrevivência neste meio estes produzem componentes característicos para impedir e defender os ataques de inimigos. Sendo assim são capazes de fazer uma biossíntese eficiente, contribuindo cada vez mais com diversos componentes para a fabricação de uma série de medicamentos (TAKAHASHI et al., 2008).

1.3 Fungos

Os fungos são classificados como organismos eucariontes e heterotróficos, possuem uma grande variedade de formas, comportamentos e ciclos de vida. Estes organismos estão distribuídos na natureza em diferentes ambientes como, por exemplo, no solo, na água, no Ártico e como parasitas de plantas, insetos e animais (FEOFILA, 2001).

O número de espécies de fungos ultrapassa a 1,5 milhão em todo mundo, sendo que aproximadamente 100 mil destas espécies encontra-se descritas (HAWKSWORTH 2004; KIRK et al., 2008). No Brasil estão registradas no Catálogo de Plantas e Fungos 78 ordens, 924 gêneros e mais de 3600 espécies nativas de fungos (FORZZA et al., 2010).

Os fungos possuem características heterotróficas, não possuem clorofila, necessitando de material orgânico para sobreviverem, sendo sua nutrição feita por absorção de nutrientes, através da presença de enzimas. As enzimas produzidas auxiliam na degradação de todas as principais macromoléculas biológicas como as proteínas,

carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos, da mesma forma que de moléculas menores como aminoácidos e vitaminas (SOLEWICZ, 1987, PELCZAR et al., 1996).

Ao tomar conhecimento que os fungos possuem algumas vias biosintética iguais às plantas, estes se tornaram extremamente valiosos para os pesquisadores, pois podem ser utilizados como princípio ativo e ajudam a prevenir e curar inúmeras doenças. Os fungos têm vantagens em relação às plantas, pois crescem em menor tempo e espaço e as condições de cultivo (pH, nutrientes, temperatura, e aeração) podem ser modificadas a fim de aumentar ou direcionar a produção de metabólitos de interesse (GOFFEAU et al., 1996; MEWES et al., 1997).

Fungos apresentam grande potencial biotecnológico, sintetizam inúmeros compostos de importância agrícola, industrial e farmacêutica, como vitaminas, medicamentos, enzimas e atuam no controle biológico (GOI; SOUZA,2006; COUTO; SANROMÁN, 2006).

Os fungos filamentosos são formados a partir de estruturas de frutificação que germinam dando origem a tubos germinativos que crescem, formando as hifas. O conjunto de hifas é denominado micélio. O micélio é responsável pelo aspecto característico das colônias, contribui para a fixação do fungo no substrato e para a reprodução através da produção de esporos (RODRIGUES; LIRIO; LACAZ, 1992).

As hifas podem apresentar partições delimitadas pelas transversais chamadas septos, podem ser chamadas de septadas ou asseptadas as que não apresentam(cenocítica). O septo tem a função de causar a individualização das células que compõem as hifas, entre dois septos têm-se uma célula e, portanto, um núcleo. Portanto, ainda que o septo esteja presente, a individualização não acontece totalmente, pois os septos exibem poros conectados ao citoplasma de uma célula com outra (TORTORA et al., 2002).

1.4 Metabólitos

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que acontece em cada célula de um organismo. O objetivo dessas reações é aproveitar os nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula, bem como a biossíntese de substâncias essenciais a sua sobrevivência. Os compostos químicos formados, transformados ou degradados são chamados de metabólitos (FERREIRA C., 2000).

Os metabólitos podem ser divididos em primários e secundários, sendo os metabólitos primários um conjunto de pequenas moléculas formadas durante o crescimento vegetativo, são imprescindíveis, pois tem papéis fundamentais associados à fotossíntese, crescimento, respiração e desenvolvimento (ALVES, 2011; SANTOS, 2002; CROZIER 2006)

Metabólitos secundários são definidos como compostos de baixo peso molecular que não são essenciais para o crescimento do organismo, sendo caracterizados pela grande diversidade de estrutura química e variação de forma em diferentes condições ambientais, conferindo uma vantagem seletiva ao organismo produtor (BUTLER; BUSS, 2006).

Os fungos possuem enorme capacidade metabólica para produzir grande diversidade de metabólitos bioativos (LI; VEDERAS, 2009). Metabólitos secundários são sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária, são de massa molecular relativamente baixa, produzidos principalmente por microrganismos e plantas. Exibem uma vasta gama de atividades biológicas contra várias doenças crônicas, tornando importante e valioso para toda a humanidade (HANSON 2003; DIAS et al., 2012. ZERIKLY M; CHALLIS 2009).

Muitos metabólitos secundários com atividades biológicas vêm sendo isolados de diferentes lugares e tem sido estudados com o objetivo de compreender e caracterizar a via biosintética levando a descoberta de novos compostos (COLLEMARE et al., 2008).

A produção de metabólitos secundários isolados de fungos do solo depende das distintas condições de cultivo, como a disponibilidade de nutrientes (fonte de carbono, nitrogênio, fosfato e oxigênio) e fatores ambientais que incentivam a sua biossíntese. Pequenas mudanças no ambiente tem a capacidade de afetar a quantidade, qualidade, características e a diversidade dos metabólitos secundários (BILLS et al., 2008).

Em geral, os metabólitos secundário são sintetizados a partir de um metabólito primário, ou seja, são formados quando grandes quantidades de metabólitos primários, tais como aminoácidos, piruvato, acetato e outros são acumulados (JAY, 2005; KELLER et al., 2005; MARTÍN et al., 2005; YU; KELLER, 2005; NIGAM, 2009).

Dentre as classes de metabólitos secundários tem-se os metabólitos voláteis, que são definidos como substâncias de alta pressão de vapor, são responsáveis pela combinação química através de moléculas com massa de 300 Da e com facilidade são carregadas pela água e pelo ar. Os compostos voláteis são a base das respostas sexuais e comportamentais e são utilizados nas interações entre organismos vivos para a obtenção

de alimentos ou atração do parceiro sexual, podendo também repelir um inimigo e demarcar o território (TURIM 1996).

O primeiro metabólito fúngico descoberto de grande eficácia foi, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta por Fleming, em 1928 (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2012). O emprego da penicilina em larga escala no início da década de 40 levou à redução do índice de mortalidade de soldados da Segunda Guerra Mundial. Este foi um marco importante na era dos antibióticos, pois com o seu uso foi possível diminuir expressivamente o número de mortes causadas por doenças infecciosas, contribuindo para o avanço científico e a prospecção em culturas de microrganismos, principalmente de fungos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os fungos constituem uma fonte inesgotável rica de importantes fármacos incluindo os antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos), antibióticos antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina, mitomicina e ácidos aureólicos), agentes redutores de colesterol, agentes imunossupressores, entre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

O hábito da automedicação e o uso excessivo de antibióticos acarretam a seleção de cepas de bactérias resistentes, sendo importante a crescente busca de novos antibióticos, agentes quimioterapêuticos e produtos agroquímicos que sejam altamente eficientes, de baixa toxicidade, baixo custo e biodegradáveis (STROBET; DAYSE, 2003). Apesar da inserção de fármacos na terapia contra o câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado. Assim, é necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças avançadas (COSTA LOTUFO et al., 2010).

Os agentes antitumorais comercializados possuem diversos efeitos colaterais, como: náuseas, toxicidade no trato intestinal que podem ocasionar alterações morfológicas, bioquímica e funcionais dos rins (CHAUDHARY et al., 2006). Uma das principais áreas estudadas atualmente no mundo é a pesquisa de novos medicamentos com propriedades antitumorais. Grandes centros de pesquisa têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de novos fármacos eficazes e seguros empregados no tratamento do câncer (MACHADO et al., 2010).

Os metabólitos advindos de fungos podem ser cultivados em larga escala, por meio de fermentadores. Adquirindo assim grande vantagem, não gerando prejuízo ao ecossistema, como por exemplo a remoção de plantas e algas, e nem problemas éticos

como pode vir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outros animais (TAKAHASHI; LUCAS 2008; SURYANARAYANAN et al., 2009).

E reportado na literatura que fungo *Aspergillus terreus* possui como metabólitos secundários a Lovastina ((HILL, 2006; COX, 2007; CAMPBELL; VEDERAS, 2010; CHIANG et al., 2010; CHOOI; TANG, 2012), Asperfuranona (CHIANG et al., 2013) Terrein (ZAEHLE et al., 2014), Ácido terrico (YAMAMOTO et al., 1980), Acetilaranotina, butirolactona, Asterriquinones e Isoflavipucine (GUO; WANG, 2014).

A descoberta de novos metabólitos ativos de origem microbiana é um desafio que traz muitos benefícios, e com o desenvolvimento de tecnologias será possível explorar está biodiversidade para a produção de novas moléculas (SINGH; MACDONALD 2010).

1.5 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 e já foram estudados mais de 260 espécies que fazem parte dele. Os fungos deste gênero são reconhecíveis pelos seus perfis de metabólitos secundários, coloração dos conídios e por sua taxa de crescimento em diferentes temperaturas e meios (SAMSON; VARGA, 2009 *apud* MONTEIRO, 2012, p. 27).

Espécies de *Aspergillus* desempenham papéis ecológicos importantes, degradando amidos, hemiceluloses, celuloses e outros polissacarídeos (HUBKA et al., 2013). O fungo *Aspergillus tubigensis* foi isolado do solo de um aterro de lixo na cidade de Islamabad no Paquistão e mostrou ser altamente eficiente na degradação de poliéster poliuretano (KHAN et al., 2017).

O gênero *Aspergillus* apresenta um amplo espectro de produção de enzimas de interesse biotecnológico. Assim, a produção de amiloglicosidases, exopoligalacturonase, α -galactosidase e β -galactosidase por *Aspergillus Niger*, α -amilase por *Aspergillus awamori*, α -galactosidase, proteases e amilases por *Aspergillus oryzae* e β -glucosidase, celulase, lipase e pectinases por *Aspergillus terreus* são bons exemplos na produção de enzimas com grande importância biotecnológica por espécies de *Aspergillus* (CUI et al., 1998; SUMITRA et al., 2004; EL-GHONEMY; DINA, 2015; SOHAIL; AHMAD; KHAN, 2016; SETHI et al., 2016; COLLA et al., 2016).

Shah e colaboradores identificaram a produção de enzimas fitase proveniente do fungo *Aspergillus niger* e obtiveram sucesso na aplicação dessa enzima para a

biodegradação de pesticidas organofosforados. Nwagu et al., (2017) estudaram opções viáveis para a estabilização da amilase digestora de amido a partir do fungo *Aspergillus carbonarius*.

Contudo, apesar da grande utilização econômica o gênero *Aspergillus* pode causar doenças respiratórias em seres humanos, pois produzem várias micotoxinas como aflatoxinas e ocratoxina A (VARGA et al., 2003). A doença aspergilose crânio cerebral ocorre em hospedeiros imunocompetentes têm sido relatada principalmente da Índia, Sudão, Paquistão, Arábia Saudita e alguns outros países africanos. A razão para esta diferença demográfica não é clara, e uma explicação plausível pode ser o clima quente e seco e o baixo nível socioeconômico nas regiões acima mencionadas favorecem o crescimento do fungo *Aspergillus* (SHAMIM et al., 2007; ANTINORI et al., 2013).

1.6 Teste de toxicidade: *Artemia salina*

Bioensaio é uma estimativa da concentração ou da eficácia de determinada substância através de uma resposta biológica produzida pela mesma, podendo medir a atividade de substâncias novas ou quimicamente não definidas (RANG et al., 2001).

Para o desenvolvimento de novos compostos é importante executar vários testes para comparar a atividade toxicológica, os testes selecionados devem ser simples e rápidos. A letalidade *in vivo* de um organismo pode ser usado como um instrumento de avaliação de compostos naturais bioativos. Neste contexto é comumente empregado o teste com *Artemia salina*.

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca que vive em água salgada e serve como alimento vivo para peixes (NASCIMENTO et al., 2008). Esta espécie tem a habilidade de produzir cistos e náuplios. Os cistos apresentam diâmetro médio de 250 µm, podem ser armazenados a seco, suportando o vácuo. Os náuplios recém-eclodidos possuem 450 µm de comprimento e uma artêmia adulta possui corpo alongado, medindo cerca de 10 mm de comprimento. Os ovos de *Artemia salina* Leach são comercializados em lojas de animais a um baixo custo e quando colocados em água marinha eclodem dentro de 48h gerando quantidade de larvas para o uso experimental (MCLAUGHLIN; ROGERS 1998).

Este bioensaio consiste na avaliação da resposta biológica de um composto em relação a sua concentração. Em geral, os compostos bioativos são tóxicos às larvas de

Artemia salina. Assim, a letalidade a este microcrustáceo pode ser utilizada como um teste preliminar rápido e simples (RAHMAN et al., 2001).

Estudos partindo de resultados positivos em testes com *Artemia salina* são encontrados como forma de triagem de substâncias candidatas a testes específicos mais caros. Portanto, o ensaio de letalidade em *Artemia salina* mostra-se como uma ferramenta útil e versátil, poupando a necessidade de ensaios antitumorais ou em animais. É importante salientar que o bioensaio com *Artemia salina* não é um ensaio específico para esta ou aquela atividade biológica (MEYER et al., 1982).

1.7 Extração em Fase Sólida (EFS)

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, onde é empregada uma pequena coluna aberta, comumente chamada cartucho de extração. A EFS tem como propósito isolar, extrair e concentrar um ou mais analitos presentes em uma matriz complexa, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC) (LANÇAS, 2004; JARDIM 2010).

A EFS é um método muito utilizado no preparo de amostras em análises de rotina. Possui uma ampla área de aplicação como análises de fármacos, alimentos, água entre outros (HAMID; ESKICIOGLU 2012).

Este método apresenta vantagens, como a menor utilização de solvente, facilidade de manuseio, recuperação do analito, menor quantidade de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar a concentração do analito e os equipamentos necessários são acessíveis (HERNÁNDEZ et al., 2007). Como desvantagens tem-se a demora para efetuar a análise, o alto valor do cartucho e em algumas ocasiões de baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho (DE-BRABANDER et al., 2009).

O cartucho utilizado em EFS é em formato de barril ou seringa, com capacidade de 50 a 500 mg de fase sólida (FS) sendo o tamanho da partícula de 40 a 60 μm . A FS é fixada no cartucho por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 μm (XU et al., 2010).

Os procedimentos de EFS requerem quatro etapas, a primeira etapa é o condicionamento da fase sólida com solvente previamente selecionado, a segunda etapa

é a aplicação da amostra que será analisada no cartucho, a terceira etapa é o clean-up que consiste em retirar os interferentes menos retidos que a amostra, a quarta etapa é a eluição da amostra (LANÇAS, 2004).

Quando coloca-se a amostra no cartucho, esta é eluída com uma leve pressão ocasionada com o auxílio de um embolo de seringa. Entretanto, deve-se tomar cuidado para evitar que o material contido no cartucho seque antes da aplicação da amostra, pois pode formar caminhos preferenciais (ZHAO et al., 2013).

1.8 Cromatografia

A Cromatografia é um método físico-químico de separação que está baseada na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária. As diversas possibilidades de combinações entre fases móveis e estacionárias deixa essa técnica muito versátil e de ampla aplicação. A cromatografia se mostra eficiente para a purificação de compostos, separação dos interferentes, separação dos componentes de uma matriz complexa, entre outras atribuições (DEGANI; CASS; VIEIRA. 1998).

Na cromatografia líquida em coluna, a fase estacionária é acondicionada geralmente em tubos cilíndricos de vidro e é constituída por partículas sólidas empacotadas na coluna, a qual passa a fase móvel (líquida). A fase móvel elui pela força gravitacional ou pela aplicação de pressão; as frações separadas são recolhidas na parte inferior da coluna (LANÇAS, 2009).

Quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel denomina-se cromatografia líquida com fase normal, o contrário é denominado de cromatografia líquida com fase reversa. O diâmetro das colunas analíticas de 2-6 mm e da coluna da preparativa de 6-50mm (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1993)

1.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica físico-química de separação de substâncias em mistura, baseada nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias em razão das afinidades pela fase móvel e pela fase estacionária. Neste processo utiliza-se colunas,

cheias de fase estacionária e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. É um método rápido, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS; GUIMARÃES, 1988)

O material da fase estacionária da coluna cromatográfica é inerte, sendo o comprimento, diâmetro e a fase móvel primordiais para definir a capacidade da coluna a ser utilizada. A fase móvel deve ter alto grau de pureza, não podem interagir quimicamente com a fase estacionária, deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma boa separação, pois impurezas na fase móvel pode interferir na detecção do analito. As fases móveis mais utilizadas neste processo geralmente são água, metanol e acetonitrila (SKOOG; LEARY, 1992).

Como fase estacionária são comumente utilizadas partículas sólidas, porosas esféricas ou irregulares, podem variar os diâmetros e a polaridade, suportam a pressão de até 350 bar, uma das fases estacionárias mais utilizadas é a sílica (CIOLA, 2000).

Os detectores para a CLAE apresentam alta taxa de obtenção de dados, resposta rápida, sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade, deve apresentar resposta linear e rápida aos analitos. Sendo assim os detectores mais empregados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta e no visível. Utiliza-se detectores por índice de refração, detecção eletroquímica, fluorescência e espectrômetro de massa (SNYDER et al., 1997; DEEPAK et al., 2007).

1.10 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)

A cromatografia gasosa é uma técnica aplicável a compostos voláteis, possui temperaturas elevadas empregadas durante o processo de separação cromatográfica. A sensibilidade do CG é bastante elevada sendo possível analisar várias substâncias em uma amostra. É considerada uma técnica de identificação quando acoplada a um espectrofotômetro de massas ou outro detector (CHIARADIA et al., 2008)

A amostra líquida volátil ou gasosa é injetada através de um septo para dentro do injetor aquecido e a amostra é vaporizada rapidamente. O vapor é arrastado por uma coluna por meio de um gás de arraste inerte (Hélio, Nitrogênio ou Hidrogênio) e cada componente da amostra é separado por meio da interação da fase estacionária no interior da coluna cromatográfica, em função do tempo de separação de uma mistura através das características físico-químicas de cada componente presente (PINHO et al., 2009).

O espectrômetro de massas consiste de uma fonte de ionização onde a amostra é ionizada por meio do bombardeamento de elétrons, gerando a fragmentação e formação de íons moleculares. Os íons positivos produzidos por impacto de elétrons são atraídos em direção a um analisador de massas onde são separados com base da razão massa/carga. Após a separação, cada componente químico é analisado e a resposta pode ser visualizada em computador que produz um gráfico denominado espectro de massa. Espectrometria de massas é uma técnica utilizada para medir os íons molecular de uma molécula, sendo possível obter informações estruturais obtendo as massas dos fragmentos produzidos quando as moléculas são quebradas (MCMURRY JOHN, 2011).

Os espectrômetros de massa são muito úteis na análise de compostos de estrutura cujo espectro de massas é conhecido e na análise de compostos de estrutura desconhecida. Existe uma busca em uma biblioteca de espectros no próprio equipamento, que compara o espectro da amostra analisada com a biblioteca (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Extrair e analisar os metabólitos secundários provenientes do fungo *Aspergillus terreus* da coleção do Laboratório de Proteômica e Genômica Funcional de Fungos Filamentosos (CCET/UEG).

Objetivos específicos

- Identificar o fungo *Aspergillus terreus* por MEV e sequenciamento de DNA;
- Extrair os metabólitos secundários do fungo *Aspergillus terreus*;
- Separar os compostos do fungo utilizando a Extração em Fase Sólida (EFS) e coluna preparativa;
- Analisar os compostos extraídos pelo fungo *Aspergillus terreus* utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Analisar a estrutura química dos metabólitos secundários utilizando CG/EM
- Avaliar a toxicidade do extrato total de metabólitos secundários, frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta e isolamento do fungo *Aspergillus terreus*

Todo o procedimento de coleta, isolamento e preservação da linhagem fúngica foi feito em um trabalho anterior realizado no LPGFF. Nesse trabalho, o solo foi coletado na reserva ecológica do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás - CCET/UEG no município de Anápolis - Goiás (Latitude: -16° 23' 0.4194'' Longitude: -48° 56' 37.7874'').

As amostras de solo foram coletadas de cinco pontos distintos em uma região de 5 m², cerca de 200g/ponto. Posteriormente foram isoladas 11 linhagens fúngicas, codificadas por MSC (Microrganismos do Solo do Cerrado). Estas linhagens se encontram armazenadas na coleção do Laboratório de Proteômica e Genômica de Fungos Filamentosos (LPGFF/CCET/UEG). Todas as linhagens isoladas foram avaliadas enquanto a produção de metabólitos secundários e esses submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.2 Manutenção do fungo isolado do solo de Cerrado

O fungo foi mantido com repiques periódicos em meio MYG (0,5% de extrato de malte, 0,25% de extrato de levedura, 1% de glicose e 2% de ágar) e estocado a 4°C.

2.3 Condições de cultivo e obtenção do extrato bruto

Esporos (1×10^7 mL⁻¹) do fungo foram inoculados em frasco de 500 mL contendo 200 mL de meio TLE (CaCl₂ 0,1 g L⁻¹, KH₂PO₄ 7,0 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2,0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,1 g L⁻¹, MgSO₄.7H₂O 0,1 g L⁻¹, Bactopectonag L⁻¹ e 0,1mL de solução elementos traços). O frasco foi colocado no agitador rotatório à 28 °C a 120 rpm no escuro por 7 dias. Após esse período, o meio foi filtrado a vácuo e foi coletado o filtrado.

2.4 Produção e extração de metabólitos secundários de *Aspergillus terreus*

O filtrado de *A.terreus* foi submetido à extração por partição líquido-líquido com acetato de etila. Para isso os compostos de interesse foram extraídos com adição de acetato de etila (1:2), sendo que para otimizar a extração, também foi adicionado NaCl $1,5 \text{ molL}^{-1}$. Após a separação das fases em um funil de separação, a fase apolar foi coletada e levada a um rotaevaporador. O resíduo formado foi ressuspendido com solução de acetonitrila 50% em água e foi seco por speedvac.

2.5 Identificação do Fungo *Aspergillus terreus* por Sequenciamento do DNA

2.5.1 Extração de DNA

O DNA fúngico foi extraído a partir de micélio congelado e liofilizado através da metodologia proposta por Raeder e Broda (1985) acrescida de tampão CETAB (CetilTrimetil Amônio Brometo). Para a obtenção do micélio, o fungo foi cultivado anteriormente em meio ágar MYG a 180 rpm, 28 °C por 48 horas.

A certificação da eficácia da extração de DNA foi realizada por meio da análise por gel de eletroforese. O DNA extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão de corrida TBE 1x (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e tampão de amostra. A eletroforese foi desenvolvida em tampão TBE 1x (Tampão para Eletroforese 1x Concentrado) a 90 V por 40 minutos.

O gel de agarose foi corado com brometo de etídio $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e lavado com água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação *MultiDoc-it*[®](UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1kb DNA Ladder[®](BIOLABS).

2.5.2. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

O DNA extraído foi amplificado utilizando a técnica de PCR para a amplificação da região 18S rDNA do fungo segundo a técnica modificada por Arturo et al. (1995). Para a amplificação do gene 18S rDNA do material genético extraído do fungo selecionadas,

foram utilizados os seguintes “primers” ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') seguindo o protocolo descrito por WHITE et al. (1990) (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991).

A região ITS1-5.8S e ITS2 foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando a combinação dos primers em volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada dNTP, 3 µM de MgCl₂, 5 µM de cada oligonucleotídeo, 1,5 U/µL de Taq-polimerase, tampão da enzima 1x e 11,75 µL de água ultra pura estéril. A reação em cadeia de polimerase foi conduzida em termociclador programado para realizar desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94 °C por 45 seg, 50 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg, respectivamente) e um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min. Após a amplificação, 5µL da reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1x corado com Brometo para visualizar um fragmento de aproximadamente 565 e 613 pares de base (HENRY, IWEN, HINRICHS, 2000).

Os fragmentos obtidos na amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%, em tampão de corrida TBE 1X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e tampão de amostra FSUDS (azul de bromofenol 0,25% SDS 0,1%, Ficoll® 20% em T₁₀E₁) como descrito acima. Para a visualização das bandas amplificadas, estas foram coradas e fotografadas conforme a metodologia descrita no item anterior.

2.5.3. Purificação do Amplificado do Gene 18s rDNA

Para a purificação da reação de PCR da região 18S rDNA com volume final de 50µL foram acrescentados 50µL de polietilenoglicol (PEG), sendo que a mistura foi incubada por 15 min a 37 °C, em seguida centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foram adicionados 125µL de etanol 80%. Após 10 minutos os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e a amostra final foi seca a temperatura ambiente por 4 h para total evaporação do etanol seguida da ressuspensão do precipitado em 250µL de TLE (IKEDA, 2010).

O produto de purificação foi utilizado na reação de sequenciamento utilizando um DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e sequenciados no aparelho ABI prisma 3100 (Applied Biosystem). A reação de sequenciamento foi realizada em triplicata.

2.6 Análise das Características Microestruturais do Fungo *Aspergillus terreus* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A análise por Microscopia Eletrônica de Varredura foi conduzida na Universidade Federal de Goiás no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) com o microscópio eletrônico de varredura (MEV) Jeol, modelo JSM-6610 (JeolLtda, Tóquio, Japão).

Discos de cultura de 5 mm foram retirados das placas de Petri após 72 h de crescimento e fixados em solução à base de glutaraldeído 2% e para formaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05mol L⁻¹ pH 7,2 por 12 h a 4 °C. Após a fixação o material sofreu quatro lavagens em tampão cacodilato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,2 e foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio e tampão cacodilato em uma proporção 1:1 por 1 hora. Toda a amostra foi envolvida em papel alumínio. Posteriormente, o material sofreu uma série de quatro lavagens com tampão cacodilato 0,05mol L⁻¹ pH 7,2 e, em seguida, foi desidratado em série aquosa de acetona a concentração de 30, 50, 70, 85, 95 e 100% (V/L), mudando gradualmente de uma solução para outra. O material permaneceu por 15 min em cada uma das concentrações, sendo que para a concentração final de 100% o material recebeu duas lavagens de 10 minutos cada. Logo após a desidratação, foi feita a secagem ao ponto crítico, utilizando-se o equipamento de secagem ao ponto crítico Balzers CPD 030 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein). Em seguida o material foi vaporizado com ouro, durante 150 seg, usando-se o “SputterCoater” Balzers SCD 50 (Bal-Tec, Fuerstentum, Liechtenstein), completando-se assim o preparo do material para observação ao MEV. Posteriormente, foram realizadas as eletromicrografias com o microscópio eletrônico de varredura.

2.7 Análise dos compostos produzidos por *Aspergillus terreus* utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Após a liofilização do material, 200 µg da amostra foi ressuspensa em acetonitrila, e submetido à CLAE. O equipamento utilizado foi um CLAE modelo Varian Pro Star, bomba Pro Star modelo 240, Detector de comprimento de onda fixo de UV-Vis modelo

ProStar 310 e injetor automático ProStar modelo 410, em uma coluna analítica Wide-Pore C18 (Agilent, 5 μ m 250 mm X 4,6 mm).

Os parâmetros empregados para avaliar a separação cromatográfica foram: solução A (TFA 0,1% em água ultra pura) e solução B (TFA 0,1% em acetonitrila) com fluxo de 1,2 mL/min. O gradiente de concentração de B foi de 5-90% por 30 minutos; 90-5% em 32 e permaneceu em 5% em 35 min. A detecção foi realizada em 280 nm.

2.8 Técnica de Extração em Fase Sólida (EFS)

Para a técnica de EFS foi utilizado um cartucho com fase estacionária C18 (Emporec10mm/6mL e Sulpeco 6mL). O cartucho foi pré-condicionado com 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de acetonitrila e cerca de 15mL de água destilada.

Em seguida colocou-se 90 mg da amostra (extrato total de metabólitos secundários) no cartucho e 15 mL de água, e para a eluição do analito foram utilizadas 5mL de acetonitrila nas concentrações de 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% (v/v) e assim até a concentração de 100%, recolhendo frações a cada 1mL em microtubos.

Posteriormente, foram feitas as leituras das frações em um espectrofotômetro de microplacas UV/visível (Epoch) no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual de Goiás com comprimento de onda de 280nm e em seguida as frações de maior absorbância foram analisadas por CLAE, para reunir as frações semelhantes de acordo com os cromatogramas.

2.9 Coluna preparativa

Com a intenção de aprimorar a separação dos metabólitos secundários, foi elaborada uma coluna preparativa, utilizando como fase estacionária a sílica C18. Colocou-se 5 g de sílica C18 em uma bureta de 10 mL, pré-condicionado com 10mL de metanol, seguidos de 10mL de acetonitrila e 20 mL de água destilada. Posteriormente colocou-se 90 mg da amostra (extrato total de metabólitos secundários) na bureta e 20 mL de água, e para a eluição do analito foram utilizadas 10mL de acetonitrila nas concentrações de 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% (v/v) e assim até a concentração de 100%, recolhendo frações a cada 1,5 mL em microtubos.

Preparou-se uma segunda coluna preparativa utilizando uma bureta com a mesma quantidade de fase estacionária e o mesmo pré-condicionamento da primeira coluna, a diferença é que utilizou-se a metade da quantidade de amostra (45 mg) e para a eluição do analito colocou-se 20mL de acetonitrila nas concentrações de 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% (v/v) e assim até a concentração de 100%, recolhendo frações a cada 1,5mL em microtubos (eppendorf).

2.10 Análise dos compostos produzidos pelo fungo *Aspergillus terreus* utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas (CG-EM)

As frações obtidas através da coluna de EFS e coluna preparativa foram secas em "speed-vac" e em seguida diluídas com 100 µL de metanol e posteriormente foram analisadas, por CG-EM utilizando um cromatógrafo a gás (Shimadzu 2010) (Tokio, Japan) acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu QP 2010 Plus) e equipado com uma coluna capilar de sílica fundida. A programação de temperatura do CG iniciou em 60 °C e permaneceu por 1 minutos, seguido de uma taxa de aquecimento de 8 °C /min até alcançar 280 °C que permaneceu por mais 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 240 °C e o modo de injeção foi "splitless", tendo o gás hélio como gás carreador com uma velocidade de 1mL min⁻¹, sendo o tempo total de corrida de 33 min e 50seg e o volume de injeção da amostra foi de 1 µL. Este equipamento encontra-se instalado no Laboratório de Análise Instrumental- UEG-CCET.

2.11 Avaliação do potencial tóxico dos compostos produzidos pelo fungo *Aspergillus terreus*, utilizando o teste de letalidade em *Artemia salina*

O bioensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* foi conduzido segundo a metodologia adaptada de Rhaman e colaboradores (2005). O bioensaio foi realizado em microplaca de poliestireno de 96 poços com as seguintes concentrações: 4.000, 2.000, 1000, 500 e 250 µg/mL do extrato total de metabólitos secundários, diluídos em acetato de etila 2,5% (v/v).

Para a eclosão dos cistos, foi empregado o meio de água marinha sintética preparado com a dissolução de sal marinho em água destilada 4,0% (p/v) suplementado com extrato de leveduras (6 g/L) e esterilizado em autoclave. O pH foi ajustado a 8,5 com solução de Na₂CO₃ 0,1 mol/L. Os cistos foram incubados por 36 horas no meio com

iluminação natural, com temperatura ambiente e oxigenação constante. Após a eclosão, os náuplios foram transferidos para uma placa de Petri e com auxílio de uma micropipeta, foram distribuídas dez larvas para cada poço da microplaca na presença das concentrações dos compostos a serem testados.

Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem de *Artemias* vivas e mortas ou imobilizadas. Foram incluídos nos ensaios controles positivo e de letalidade utilizando diluições seriadas de $K_2Cr_2O_7$ e controle negativos, somente com água salina e água salina com acetato de etila 2,5% (v/v). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A toxicidade foi expressa como concentração letal a 50% (CL50), estimada a partir do método da regressão linear obtida da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e concentração da substância teste, usando o programa Statplus 2009 professional (AnalystSoft/ Probitos).

Esse teste é feito analisando-se a taxa de vida e morte do microcrustáceo *Artemia salina*. Esse resultado mostra, num primeiro momento, a concentração capaz de matar 50% dos indivíduos de *Artemia salina* testados. Assim, torna-se um dado toxicológico preliminar importante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Extração dos compostos produzidos por *Aspergillus terreus*.

Após as extrações, obteve-se 17 L do filtrado, que foi transferido para um balão de fundo redondo (500mL) previamente tarado (328g), o solvente foi evaporado com o auxílio de um rotaevaporador, e após esse processo o balão foi novamente pesado (334g), e foram obtidos 589 mg do extrato bruto, impregnados no balão.

Posteriormente para a retirada do material contido no balão colocou-se 20mL de acetonitrila p.a, este material foi seco em speedvac, obtendo-se 540mg do extrato total de metabólitos secundários, sendo estes armazenados em seis microtubos de 90mg cada, estocados em freezer (-20 °C).

3.2 Identificação dos Fungos por Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região 18s RDNA

Após o sequenciamento do DNA da amostra, a análise foi realizada pelo “blast” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os resultados obtidos entre as sequências amplificadas e as sequências descritas no banco de dados mostraram similaridade de 100% com o fungo *Aspergillus terreus*.

3.3 Análises das características microestruturais do fungo *Aspergillus terreus* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia do gênero *Aspergillus*, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo a principal característica macroscópica utilizada para classificação, sendo encontradas colônias com colorações em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (Figura 2A) (KLICH, 2002; VARGAS et al., 2004).

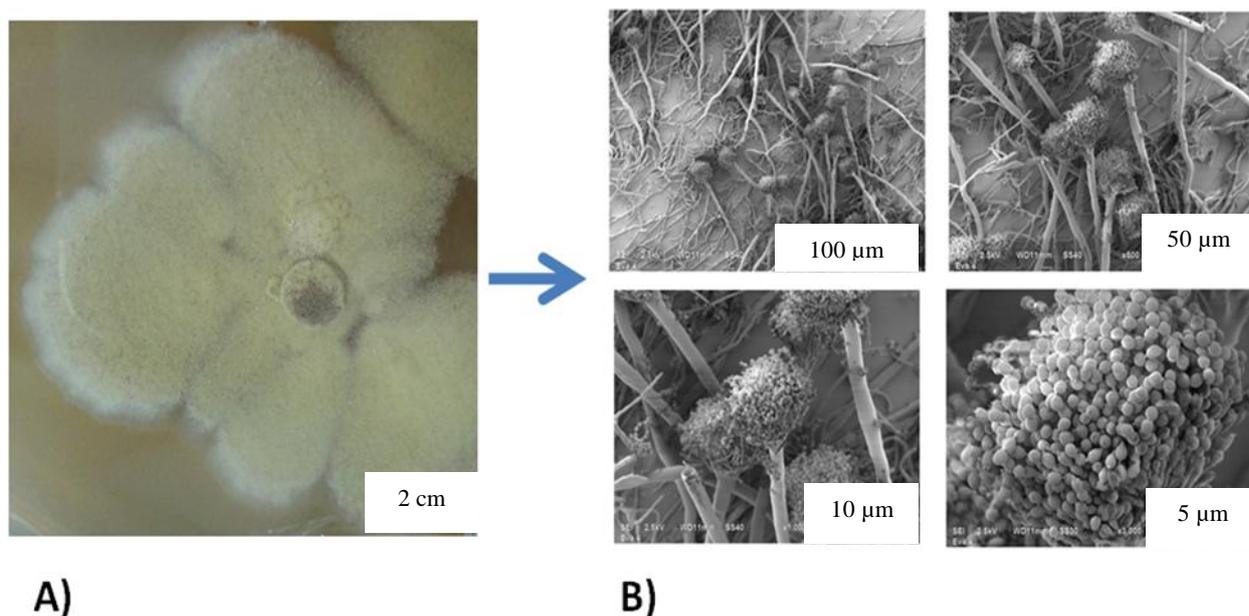


Figura 2. Aspecto do fungo *Aspergillus terreus* em meio ágar, glicose e extrato de levedura (MYG) (A); Características microscópicas do fungo *A. terreus* pela Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (B).

O fungo previamente denominado MSC 48, foi sequenciado e demonstrando alta similaridade com o fungo *Aspergillus terreus*. Para análise microscópica do fungo foi realizada uma microscopia eletrônica de varedura (MEV). Essa análise mostrou microestruturas que corroboram o descrito por Bennett e colaboradores (2010), que caracterizam o gênero *Aspergillus* com conidióforos simples, sem ramificação possuindo ápice em forma de uma clava arredondada terminando com numa vesícula globosa, coberta com uma camada de fiálides seguida de conídios em cadeia que formam cabeças conidiais radiadas, com 300 µm a 400 µm de diâmetro e as fiálides são unisseriadas ou bisseriadas (Figura 2B).

A característica definidora do gênero *Aspergillus* são os esporos parecidos com o aspergilus, que é um instrumento utilizado na liturgia da igreja católica para aspergir água benta, nome dado por Michaeli em 1729 (AINSWORTH, 1976). Sendo está a característica microscópica mais importante utilizada em taxonomia de *Aspergillus*.

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Separação dos metabólitos por extração em fase sólida (EFS)

O extrato total de metabólitos secundários de *Aspergillus terreus* foi analisado por CLAE. A análise resultou em um perfil cromatográfico complexo, mostrando vários picos relacionados a diferentes metabólitos (Figura 3).

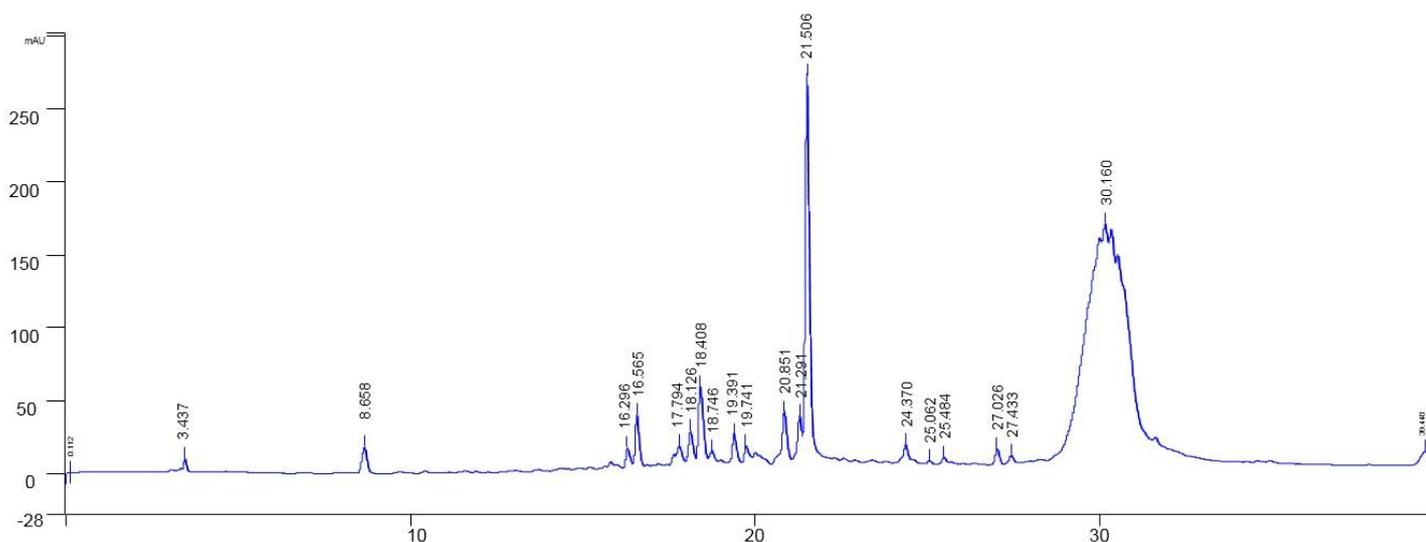


Figura 3: Cromatograma dos composto existentes no extrato total de metabólitos secundários de *Aspergillus terreus*. Coluna de fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos com monitoração em comprimento de onda de 280nm.

A figura 3 apresenta um cromatograma com diversidade em metabólitos secundários com diferentes tempos de retenção. Com o objetivo de obter um perfil cromatográfico mais puro o extrato bruto foi submetido a uma separação utilizando cartucho de extração em fase sólida (EFS).

Para a EFS o extrato bruto de metabólitos secundários foi submetido a uma separação utilizado um cartucho com sílica C18, com um gradiente de eluição das frações de 1mL em 1m min. As frações foram recolhidas em microtubos plásticos e armazenados a -20°C.

As frações obtidas na separação por EFS foram analisadas em espectrofotômetro e aquelas que apresentaram maior absorção a 280nm foram analisadas pela CLAE resultando em cinco frações (anexo). Posteriormente as cinco frações foram analisadas na CLAE e estão apresentadas nos cromatogramas da Figura 4.

Observa-se na Figura 4, que as frações obtidas por EFS apresentam diferentes perfis de metabólitos e que não houve uma boa separação dos mesmos, que distintos metabólitos estão agrupados em uma mesma fração. A medida que se aplicou a técnica de EFS alguns metabólitos foram concentrados, podendo ser visualizados pela intensidade dos picos nos cromatogramas.

Prelli e colaboradores (2013) em sua pesquisa com micotoxinas produzidas por espécies de *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus melleus* e *Aspergillus nigri* e espécies de *Penicillium verrucosum* e *Penicillium nordicum*, utilizou a EFS para concentrar as amostras de alimentos (cacau, café, vinhos, cervejas e especiarias) antes das análises cromatográficas.

Entretanto, Giovannoli e colaboradores (2017) utilizaram a EFS para separar o metabólito secundário (patulina) proveniente do fungo *Aspergillus sp.* e posteriormente analisaram a fração em CLAE e obtiveram um cromatograma puro com o pico correspondente da patulina facilmente detectado.

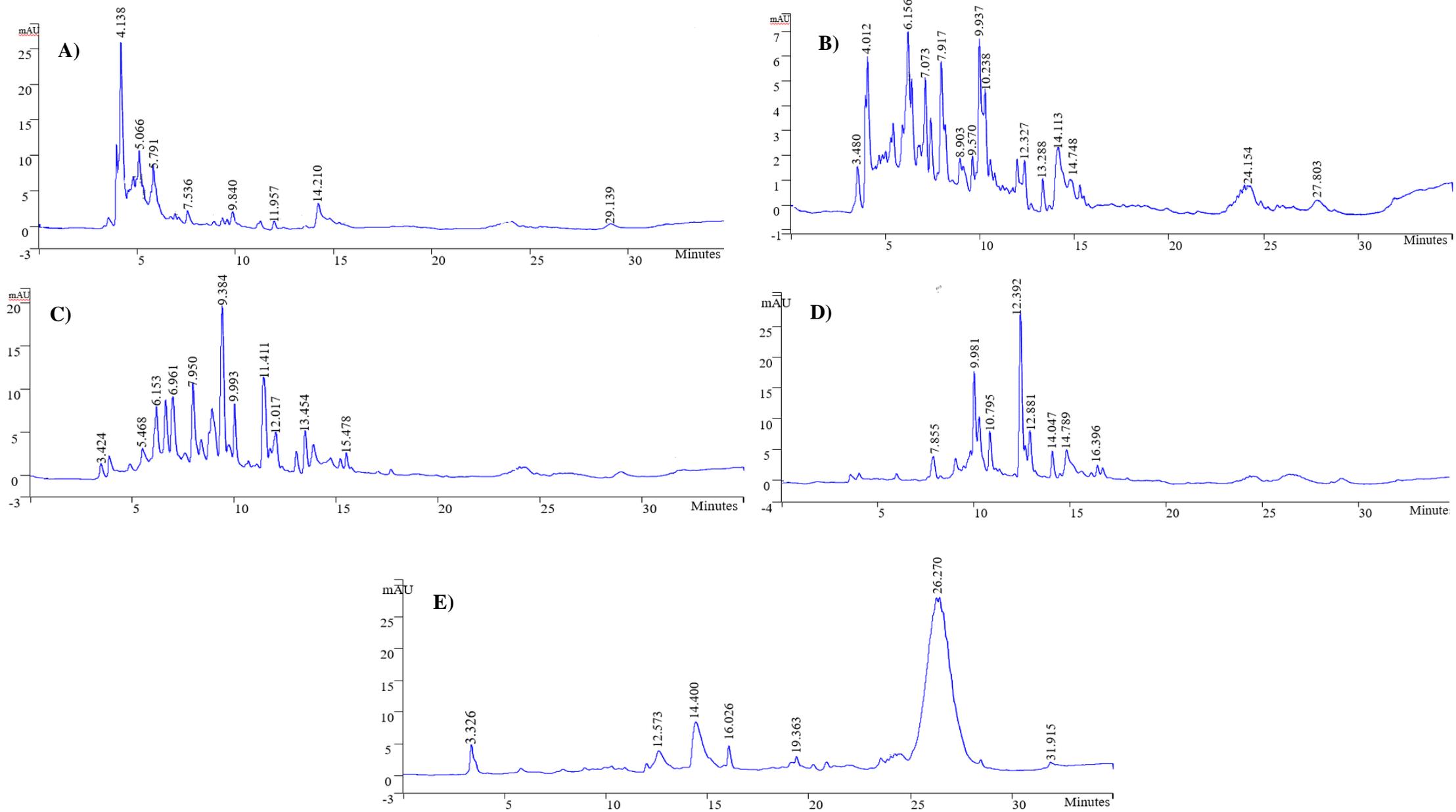


Figura 4: Cromatogramas obtidos por CLAE para as 5 frações da EFS dos compostos provenientes do fungo *Aspergillus Terreus*. Condições experimentais: coluna fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos, monitorados em comprimento de onda de 280nm. **A)** FRAÇÃO 1, **B)** FRAÇÃO 2, **C)** FRAÇÃO 3, **D)** FRAÇÃO 4, **E)** FRAÇÃO 5.

Pimenta (2010), Investigou as condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum*, e utilizou a EFS para extrair os metabólitos secundários e analisou por CLAE, conseguiu-se quatro frações.

Recentemente, Zhou e colaboradores (2017), desenvolveram o método de EFS para a separação de metabólitos secundários de *Aspergillus Flavus* e *Aspergillus Parasiticus* em amostras de óleo de soja, óleo de arroz, óleo de gergelim, óleo de amendoim e óleo de girassol, e conseguiram limpar a matriz de óleo e extrair satisfatoriamente os metabólitos.

No intuito de obter cromatogramas mais puros utilizou-se a estratégia de utilização de uma coluna preparativa com sílica C18.

3.5 Coluna preparativa

Noventa miligramas de extrato total de metabólitos secundários foram adicionados em uma coluna empacotada com sílica C18, em eluição gradiente das frações de 1, 5mL.min recolhidas em microtubos plásticos de 2 mL e armazenadas a -20 °C. As frações foram analisadas em espectrofotômetro e aquelas que apresentaram maior absorção a 280nm foram analisadas pela CLAE resultando em sete frações (anexo).

Observa-se pelos cromatogramas apresentados (Figura 5) que o uso da coluna preparativa foi mais eficiente para separar os metabólitos secundários do fungo *Aspergillus terreus* do que a técnica de EFS. Visto que, a coluna preparativa apresenta picos cromatográficos mais intensos e separados.

PINTO (2005), em sua pesquisa com metabólitos secundários, aplicou a técnica de separação utilizando coluna preparativa com o sistema de solvente hexano/acetato de etila. Obteve-se 70 frações que foram reunidas por similaridade e obtiveram sucesso na separação através da coluna preparativa.

JUSTOS (2010), estudou a separação de metabólitos do extrato das folhas *Bauhinia variegata* L., por cromatografia de coluna preparativa e CLAE e conseguiu separar metabólitos com picos de retenção diferentes, pela porcentagem utilizada de solvente (água, metanol e acetonitrila) na coluna preparativa.

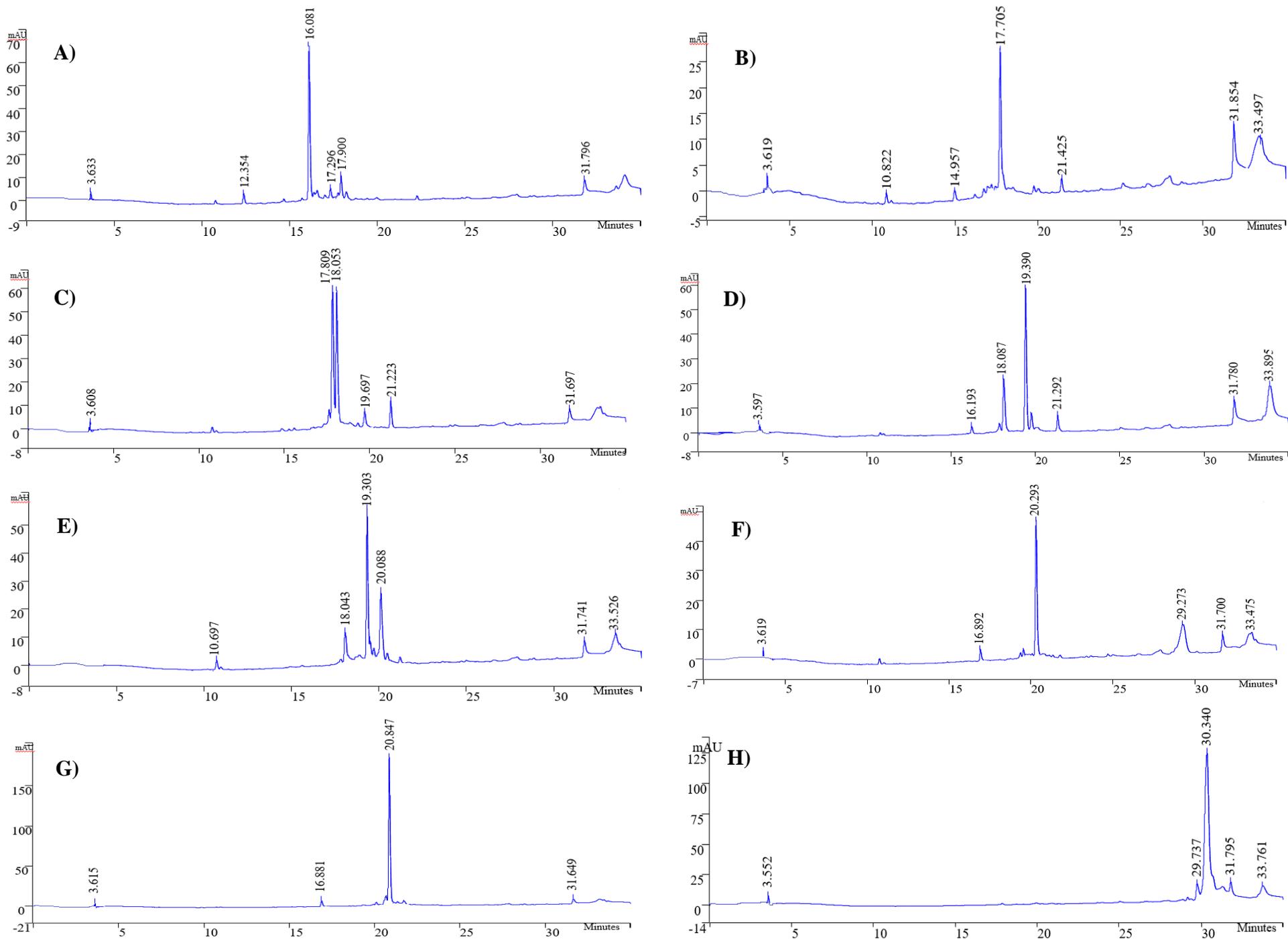


Figura 5: Cromatogramas obtidos por CLAE para as 8 frações da coluna preparativa dos compostos provenientes do fungo *Aspergillus Terreus*. Condições experimentais: coluna fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos, monitorados em comprimento de onda de 280nm. **A)** FRAÇÃO 1, **B)** FRAÇÃO 2, **C)** FRAÇÃO 3, **D)** FRAÇÃO 4, **E)** FRAÇÃO 5, **F)** FRAÇÃO 6, **G)** FRAÇÃO 7, **H)** FRAÇÃO 8.

3.6 Segunda Coluna Preparativa

Em busca de uma melhor separação dos componentes da amostra proveniente do extrato bruto, fez-se novamente uma coluna preparativa. Nesta etapa foi utilizada uma bureta empacotada com sílica C18, e foram recolhidas frações de 1,5mL em 1,5mL. Sendo que nesta etapa foi acrescentado um volume maior das diferentes concentrações de acetonitrila totalizando 430 microtubos, armazenados em freezer a temperatura de -20°C. Posteriormente foi feita uma análise no espectrofotômetro das frações obtidas e as que tiveram a intensidade mais elevada de acordo com a densidade óptica, foram analisadas 56 frações na CLAE e destas foram selecionadas 7 frações. As 7 frações selecionadas foram submetida à CLAE e apresentou o seguinte perfil cromatográfico (Figura 6).

3.7 Segunda Coluna Preparativa

Em busca de uma melhor separação dos componentes da amostra proveniente do extrato bruto, fez-se novamente uma coluna preparativa. Nesta etapa foi utilizada uma bureta empacotada com sílica C18, e foram recolhidas frações de 1,5mL em 1,5mL. Sendo que nesta etapa foi acrescentado um volume maior das diferentes concentrações de acetonitrila totalizando 430 microtubos, armazenados em freezer a temperatura de -20°C. Posteriormente foi feita uma análise no espectrofotômetro das frações obtidas e as que tiveram a intensidade mais elevada de acordo com a densidade óptica, foram analisadas 56 frações na CLAE e destas foram selecionadas 7 frações que estão em anexo. As 7 frações selecionadas foram submetida à CLAE e apresentaram o seguinte perfil cromatográfico (Figura 6).

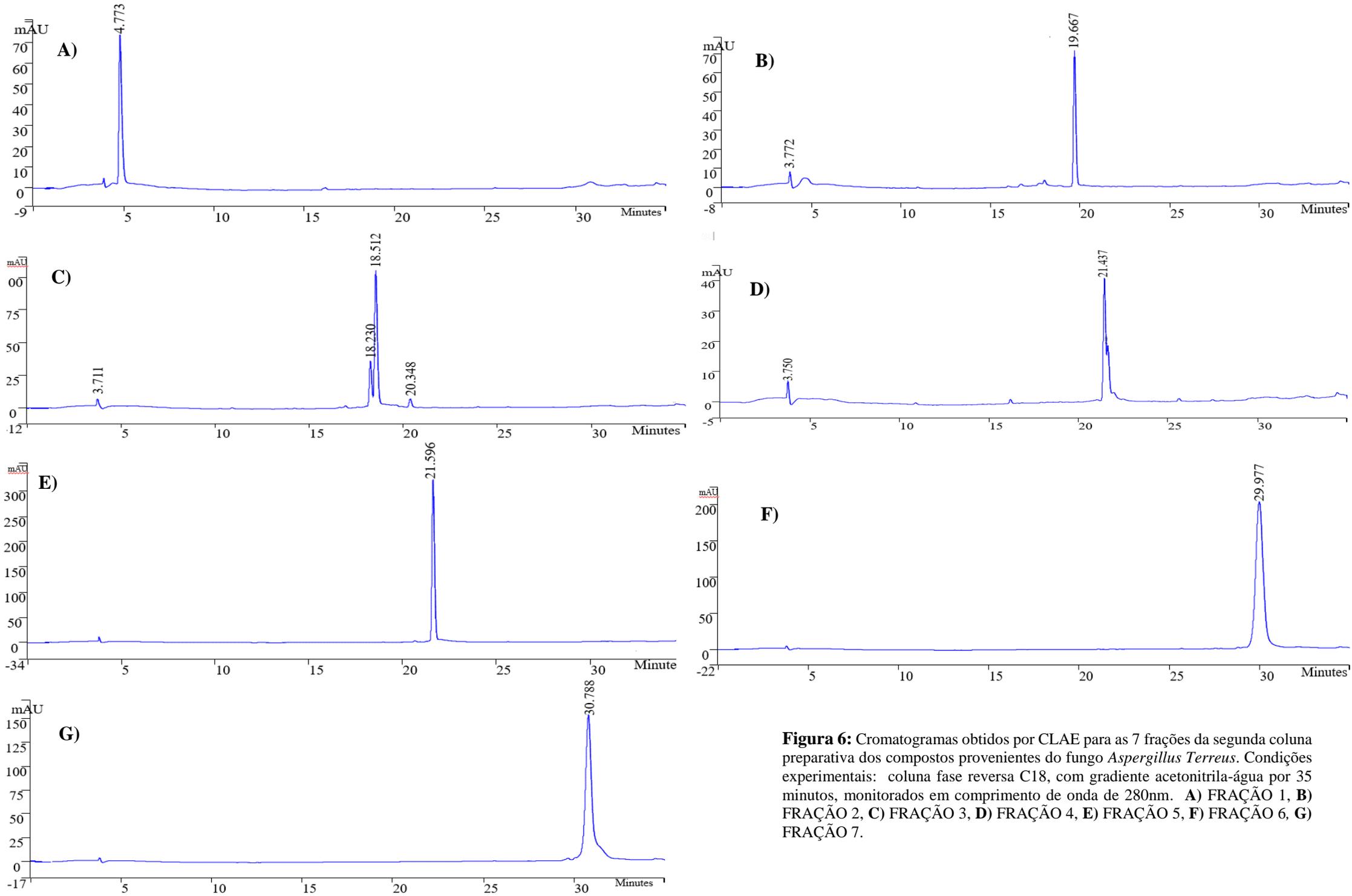


Figura 6: Cromatogramas obtidos por CLAE para as 7 frações da segunda coluna preparativa dos compostos provenientes do fungo *Aspergillus Terreus*. Condições experimentais: coluna fase reversa C18, com gradiente acetonitrila-água por 35 minutos, monitorados em comprimento de onda de 280nm. **A)** FRAÇÃO 1, **B)** FRAÇÃO 2, **C)** FRAÇÃO 3, **D)** FRAÇÃO 4, **E)** FRAÇÃO 5, **F)** FRAÇÃO 6, **G)** FRAÇÃO 7.

Os metabólitos secundários do fungo em estudo submetido à segunda coluna preparativa resultou em perfis cromatográficos limpos e bem separados (Figura 6), apresentando assim melhores resultados em relação a EFS e a primeira coluna.

Deng et al., (2013) isolaram o fungo *Aspergillus terreus* de um ambiente marinho na China e utilizaram a coluna preparativa com sílica para separar os metabólitos, obtiveram dez frações e estas foram analisadas em CLAE e em LC/EM, obtiveram seis metabólitos descritos pela primeira vez a partir de microrganismos marinhos e um composto inédito que exibiu atividade contra linhas de células tumorais. Barakar; Gohar (2012) também utilizaram a coluna preparativa para separar os metabólitos do fungo *Aspergillus terreus* e obtiveram um composto biologicamente ativos contra alguns patógenos de peixes.

Podemos inferir que de acordo com o acréscimo da concentração de acetonitrila os metabólitos foram eluidos da coluna preparativa em tempos de retenção consecutivos.

Sendo importante salientar que tanto na EFS como na coluna preparativa os metabólitos secundários foram extraídos em concentrações de até 100% de água/acetonitrila, porém somente até a concentração de 55% de água/acetonitrila que houve a incidência dos metabólitos.

3.8 Análise dos compostos voláteis produzidos pelo fungo *Aspergillus terreus* utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massas (CG-EM)

Essa técnica nos permite propor as estruturas químicas dos compostos presentes nas frações extraídas do extrato total de metabólitos secundários. Os cromatogramas advindos do CG e do EM estão em anexo e as estruturas químicas propostas estão na Figura 7.

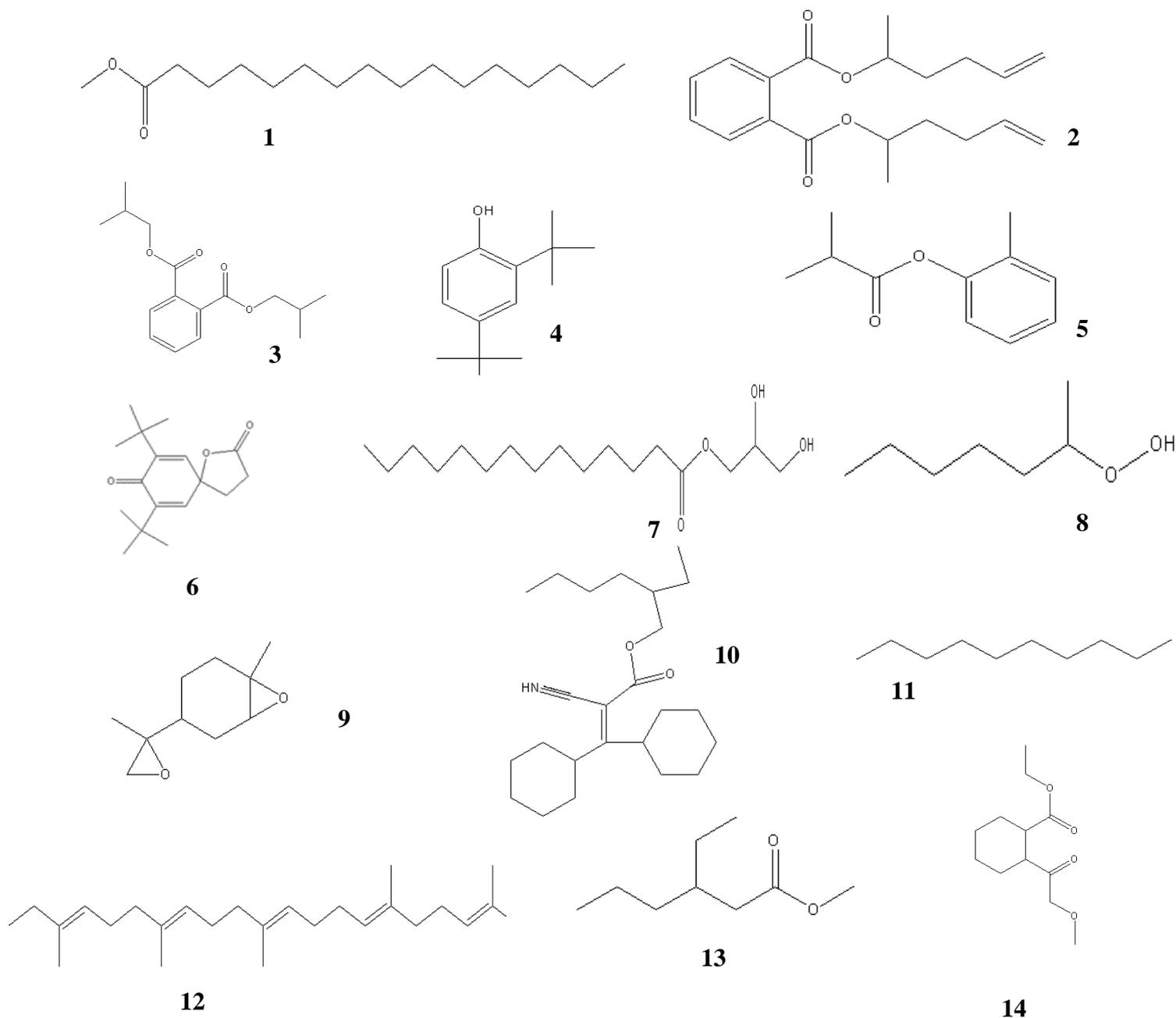


Figura 7: Estruturas químicas advindas das frações extraídas do extrato total de metabólitos secundários, propostas pelos dados do CG/MS com os respectivos nomes em ordem crescente: Methyl palmitate; Dihex-5-em-yl-phthalate; Disobutyl phthalate; 2,4- di- tert- butylphneol; tolyl isobutyrate; 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione; 2,3-dihydroxypropyl-tetradecanoate; 2 hydroperoxyheptane ; 1-methyl-4- (2- methyl oxiran- 2 yl)- 7- oxa- bicyclo (4,1) heptane; 2- ethylhexyl 3,3- dicyclohexyl-2 (iminomethyl) propanoate; decane; 2,6,11,15,19- pentamethylhenicosa- 2,6,10,14,14, 18 pentaene; methyl-3- ethylhexanoate; ethyl- 2- (2- methoxyacetyl) cyclohexanecarboxylate.

Pela biblioteca do equipamento CG/EM, podemos analisar 14 diferentes estruturas de metabólitos secundários voláteis. Em geral, esses compostos voláteis tem como características baixa massa molecular, alta pressão de vapor, baixo ponto de ebulição e uma fração lipofílica (MORAT et al., 2012; SCHMID et al., 2015). No solo e na rizosfera podem se difundir sob pressão atmosférica e serem carregados pelo ar e pelo solo. Atua na resistência de plantas a pragas e doenças, no controle de patógenos e alguns dos compostos voláteis já são comercializados como antibióticos e antifúngicos (SAUTER et al., 1999; AMIMURA et al., 2001; KOST; HEIL, 2006).

Comercialmente conhecido como ácido palmítico (Figura 21, estrutura 1) pertence a ésteres metílicos e pode ser encontrado em óleo de palma, óleos vegetais extraídos do amendoim, soja, milho (HUA et al., 2005). Encontrado também em própolis de abelhas (SOARES et al., 2008). E também são relatados em altas concentrações na composição lipídica de fungos (COX; SCHERM; RILEY, 2006). Ácido palmítico é um éster metílicos e estes quando encontrados em fungos participam no processo de produção dos biocombustíveis e também atuam como marcadores quimiotaxonômicos, diferenciando espécies distintas de fungos (CHEN et al., 2001; VICENTE et al., 2010).

Serrano-Carreón e colaboradores (1992) identificaram quatro ácidos graxos na composição do fungo *Trichoderma harzianum* e obtiveram o ácido palmítico como composto majoritário.

Santos (2005), estudou o fungo *Penicillium* e este apresentou teores de ésteres metílicos semelhantes ao encontrado na soja, indicando que pode apresentar características semelhantes de um biocombustível produzido a partir de uma fonte vegetal.

Os ftalatos (Figura 21, estruturas 2,3) podem ser encontrados em cosméticos, pesticidas, adesivos, envoltórios de celofane e como plastificantes para aumentar a flexibilidade. Em alguns plásticos, os ftalatos constituem até 50% do peso total (SAILLENFAIT E LAUDET, 2005). É possível sugerir que o fungo *Aspergillus terreus* seja um agente de biodegradação plástica, podendo ser explorado para fins ambientais, uma vez que as alternativas para a degradação de ftalatos são buscadas no mundo todo.

Bettio; Pessan (2012) utilizaram Disobutyl phthalate (Figura 21, estrutura 3) como agente plastificante na preparação de nanocompósitos de poli cloreto de vinila, plastisol com nano-argila.

Lucas et al., 2008 investigaram o potencial do fungo *Curvularia senegalensis* isolados de uma amostra de solo de Cerrado e como metabólitos secundários os ftalatos: 1-hexyl-2-propylphthalate, 1-hexyl-2-propylphylphthalate, 1-ethyl-2-heptylphthalate, 1-hexil-2-butylphthalate, 1-heptyl-2-proylphthalate, 1-propenyl-2-nonyphthalate e 1-decyl-2-butane phthalate, e estes foram identificados por CG/ EM e RMN.

Roy et al., 2006 isolaram ftalatos da bactéria *Streptomyces albidoflavus*. Rigobello et al., 2015 encontraram o composto 7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5) deca-6,9-diene-2,8-dione (Figura 21, estrutura 6) em amostras de solo de aterro sanitário.

O composto 2,4- di- tert- butylphneol (Figura 7) estrutura 4, é um antioxidante fenólico para produtos à base de hidrocarbonetos que vão desde petroquímicos até plásticos, são utilizados industrialmente como estabilizador ultravioleta e na fabricação de produtos farmacêuticos e fragrâncias (YOON et al. 2006).

Sang; Kim (2012), enquanto estudavam uma estirpe bacteriana *Flavobacterium johnsoniae* e caracterizaram as propriedades desta estirpe e localizaram como metabólito volátel : 2,4- di- tert- butylphneol e este foi responsável pela inibição do desenvolvimento de *P. capsici* e *Colletotrichum acutatum* (patógenos fúngicos de antracnose do pepino), por inibir a infecção em radículas de pimenta e estimular o amadurecimento do fruto da pimenta.

A técnica utilizada foi eficiente para detectar metabólitos secundários voláteis, porém para complementar a técnica e elucidar as demais estruturas é necessário utilizar outros equipamentos como LC/EM e RMN.

3.9 Teste de toxicidade *Artemia salina*

Este teste pode ser usado como um primeiro passo na análise toxicológica de um extrato. As frações ou substâncias ativas são, posteriormente, testadas em ensaios de citotoxicidade, obtendo-se uma boa correlação.

Os compostos isolados do fungos *Aspergillus terreus* (Tabela 1) foram testados nas concentrações de 40.000, 2.000, 1000, 500 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A análise dos ensaios testados confere para o dicromato de potássio toxicidade alta (CL50 = 11,49 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), dentro dos padrões apresentados pela literatura que atesta a adequação das condições experimentais (MOLINAS-SALINAS, SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

Para a classificação do nível de toxicidade, foi utilizado o critério proposto por Nguta et al, (2012). Os autores consideram que os valores de CL_{50} menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam alta atividade toxicológica, CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam moderada atividade toxicológica, CL_{50} entre de 500 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentam fraca atividade toxicológica e CL_{50} acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados não tóxicos.

Amostra	$CL_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$	Classificação da toxicidade (Nguta et al., 2012)
EXTRATO BRUTO	279	Moderada

Tabela 1 : Avaliação da toxicidade do extrato bruto em *Artemia salina*.

O extrato bruto apresentou uma Concentração Letal 50 (CL_{50}) moderada, de acordo com a classificação de Nguta et al., 2012. Resultados que apontam alta ou moderada toxicidade em *Artemia salina* têm demonstrado correlação com outras atividades biológicas (antimicrobiana, antiparasitária, antitumoral, entre outras), sugerindo o grande potencial do extrato bruto, o que reforça a importância de se realizar novos testes.

Entretanto Barakar; Gohar (2012) demonstraram que o extrato bruto do fungo *Aspergillus terreus* apresenta uma CL_{50} equivalente a $32 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerado de alta toxicidade, em seguida foi feito testes de atividade antibacteriana e obtiveram um resultado superior comparados a alguns antibióticos padrão conhecidos.

Conclusão

Este é um trabalho inicial sobre a separação de metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus terreus* que permitiram as seguintes conclusões:

Foi possível identificar o fungo em estudo e extrair seus metabólitos secundários.

O método de extração em fase sólida concentrou os metabólitos secundários proveniente do fungo em estudo.

A escolha em realizar a coluna preparativa como método de separação foi adequada, pois além de ser uma técnica de fácil aplicação e manuseio, está se mostrou bastante eficiente na separação dos metabólitos. Porém para ter certeza da elucidação estrutural das frações obtidas na coluna são necessárias avaliações por outras técnicas espectroscópicas como Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A técnica CG/EM identificou estruturas dos metabólitos secundários voláteis.

A avaliação da atividade tóxica do extrato bruto do fungo *Aspergillus terreus* frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, demonstrou moderada toxicidade o que salienta a importância da realização de testes biológicos mais específicos.

Portanto, o estudo realizado foi de grande importância para o desenvolvimento da pesquisa visando a extração e separação dos metabólitos secundários provenientes do fungo *Aspergillus terreus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MALLEK, A. Y; EL-MARAGHY, S.S.M; HASAN, H. A. H. Mycotoxin-producing potential of some *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates found on corn grains and sunflower seeds in Egypt. *Journal of Islamic Academy of Sciences*.v.6, p.189-192, 1993.

AINSWORTH, G. C. *Introduction to the History of Mycology*. Cambridge, Cambridge University Press. 1976.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos temáticos de química Nova na Escola**, n. 3, p. 10-15, 2001.

AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L., (Eds.). *Processos biológicos do sistema solo-planta*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 181-200, 2005.

ARIMURA, G.; OZAWA, R.; HORIUCHI, J.; NISHIOKA, T.; TAKABAYASHI, J. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. **Biochemical Systematic and Ecology**, Oxford, v. 29, n.10, p. 1049-1061, 2001.

BALOTA, E.L.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D.S.; DICK, R.P. long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and c and n mineralization in a Brazilian oxisol. **Soil & Tillage Research**, v. 77, p.137-145, 2004.

BARAKAT, K. M; GOHAR, Y. M; Antimicrobial agents produced by marine *Aspergillus terreus* var. *africanus* against some virulent fish pathogens. *Indian Journal Microbiology*, v. 52, 366-372, 2012.

BARATA, R. A. ANDRADE, M. H., RODRIGUES, R. D., CASTRO, I. M. Purification and Characterization of an Extracellular Trypsin-Like protease of *Fusarium oxysporum* var. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 304-308, 2002.

BENNET, J.W. An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus molecular biology and genomics*, p.1-17, 2010. In: *Aspergillus molecular Biology and Genomics*. M. Machida and K. Gomi (eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK.

BETTIO, PAOLA P. S. DE B.; PESSAN, LUIZ A. Preparação e caracterização reológica de nanocompósitos de poli (cloreto de vinila): plastisol com nano-argila. **Polímeros**, São Carlos, v. 22, n. 4, p. 332-338, 2012.

BIJAY, S.; PRATIVA, N.; SANTILATA, S. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. **3 Biotechnology**, v. 6, p. 1-15, 2016.

BILLS, G. F. PLATAS, G. FILLOLA, A, JIMENEZ, M. R. COLLADO, J., VICENTE F. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.1644-1658, 2008.

BUZZINI, P., MARTINJ, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 5-1020, 2002.

CALIXTO, F. M. C., CAVALHEIRO, G. T. E. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico. **Química Nova na Escola**. v. 34, p. 118-123, 2012.

CAMPBELL, C. D.; VEDERAS, J. C. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. **Biopolymers**, v.93, p.755–763, 2010.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R., ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.1, p.20-22, 2001.

CHAUDHARY, A.; SINGH, A.K.; SINGH, R.V. Investigations of the Possible Pharmacological Effects of Organotin (II) Complexes. **Journal Inorganic Biochemistry**, 100, p. 1632-1645, 2006.

CHIANG, Y. M., OAKLEY, B. R., KELLER, N. P.; WANG, C. C. Unraveling polyketide synthesis in members of the genus *Aspergillus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p.1719–1736, 2010.

CHIANG, Y. M., OAKLEY, C. E., AHUJA, M., ENTWISTLE, R., SCHULTZ, A., CHANG, S. L. An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, p. 7720–7731, 2013.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, C. S. F.; O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, 31: 3, 623-636, 2008.

CIOLA, R., Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC. São Paulo: Edgard Blücher, p. 28-153, 2000.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 3 ed. São Paulo: Ed. Unicamp, p. 179 – 243, 1988.

COSTA-LOTUFO LV, MONTENEGRO RC, ALVES APNN, MADEIRA SVF, PESSOA C, MORAES MEA. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, p. 47-58, 2010.

COUTO, S. R., SANROMÁN, M. A. Application on solid-state fermentation to food industry. **A review Journal of food Engineering**. v. 76, p. 291-302, 2006.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Ames, Iowa –EUA. **Blackwell Publishing**, p. 1-384, 2006.

CUI, Y.Q., VAN DER LANS, R.G.J.M., GIUSEPPIN, M.L.F, LUYBEN, K.C.A.M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, n. 23, p. 157-167, 1998.

DEBRABANDER, H.F., NOPPE, H. K., VERHEYDEN, J.V., BUSSCHE, K., WILLE, L., OKERMAN, L., VANHAECKE, W., REYBROECK, S., OOGHE, S. CROUBELS. **Journal of Chromatography**, v. 1216,p. 7964, 2009.

DEEPAK, S.J., SUBBAIAH, G., SANYAL, M., JAIN, V. K. SHRIVASTAV, P. A rapid and specific approach for direct measurement of pravastatin concentration in plasma by LC-MS/MS employing solid-phase extraction. *Biomedical Chromatography*, v.21, p.67-78, 2007.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA. P.C.; Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na escola**. nº 7, p. 21-25, 1998.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**. P.499-514, 2000.

Deng, Chun-Mei; Liu, Shi-Xin; Huang, Cai-Huan; Pang, Ji-Yan;, Yong-Cheng Lin. Secondary Metabolites of a Mangrove Entophytic Fungus *Aspergillus Terreus*(No. GX7-3B) From The South China Sea. *Mar Drugs*, v. 11, p. 2616-2624, 2013.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**. v.2, p. 303-336, 2012.

ESPIRITO-SANTO, M.M., LEITE, M. E., SILVA, J. O., BARBOSA, R. S. , ANAYA, F. C. , DUPIM, M. G. Understanding patterns of land-cover change in the Brazilian Cerrado from 2000 to 2015. **Philosophical Transactions of the Royal society B**,V. 371, P.1703-1710, 2016.

FEOFILA, E. P. The kingdom fungi: heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationship with plants, animals, and prokaryotes (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 124-137, 2001.

FERREIRA, C. P.; JARROUGE, M. G.; TUNDISI, M.; MARTIN, N. F. **Bioquímica Básica**. 4. ed. São Paulo, p. 413, 2000.

FORZZA, R.C; LEITMAN, P. M; COSTA, A.A. DE CARVALHO JR; PEIXOTO, A.L; WALTER, B.M.T; BICUDO, C. D; ZAPPI, D.P. Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, v.2, p. 127, 2010.

GERMANOA, S. PANDEY, A. OSAKU, C. A. , ROCHA, S. N. , SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. Produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, n.2, p. 246-251, 2003.

GIOVANNOLI C, SPANO G, DI NARDO F, ANFOSSI L, BAGGIANI C. Screening of a Combinatorial Library of Organic Polymers for the Solid-Phase Extraction of Patulin from Apple Juice. *Toxins*. v. 9 p. 2-10, 2017.

GOFFEAU, A., BARRELL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUHON, B., FELDMANM, H. LIFE WITH 6000 GENES. **Science**, v. 274, p. 563-567, 1996.

GOI, S. R., SOUZA, F. A. Diversidade de microrganismos do solo. *Floresta e Ambiente, Seropédica*, v. 13, n 2, p. 46-65, 2006.

GUCKER, B.; BOECHAT, I. G.; GIANI, A. Impacts of agricultural land use on ecosystem structure and whole-stream metabolism of tropical Cerrado streams. **Fresh water Biology**, Chicago, v. 54, n. 10, p. 2069-2085, 2009.

GUIMARÃES, O.D., MOMESSO, S. L., PUPO, T.M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v.33, nº3, p.667-679, 2010.

GUO, C.J; WANG, C.C.C; Recent advances in genome mining of secondary metabolites in *Aspergillus terreus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p.1-13, 2014.

HAMID, H. , ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**. v.46, p. 5813–5833, 2012.

HANSON, J.R. Natural Products: The Secondary Metabolites. **The Royal Society of Chemistry**, v. 1, p. 3-154, 2003.

HAWKSWOETH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1431, 2004.

Hill, A. M.. The biosynthesis, molecular genetics and enzymology of the polyketide-derived metabolites. **Natural Product Reports**, v.23, p.256–320, 2006.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: Fundamentos teóricos e novas estratégias para a preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13-25, 2010.

JUSTOS, R. Separação de metabólitos do extrato das folhas *Bauhinia vrieg ta L.* por cromatografia de coluna preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência. Universidade Estadual de Londrina. Dissertação de Mestrado, p. 5-64, 2010.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism, from biochemistry to genomics. **Nature reviews, Microbiology**. v. 3, p.937-947, 2005.

KIRK P, CANNON P, MINTER D, STALPERS J. Dictionary of the fungi. Wallingford, UK: CABI. 2008.

KITANO, H. K., KATAOKA, K., FURUKAWA, K., HARA, S. Specific expression. and temperature a dependent expression of the acid protease-encoding gene (pepa) in *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (rice-koji). **Journal Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 93, p. 7-563, 2002.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 210-027, 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v.94, n 1, p. 619-629, 2006.

LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida(SPE). São Carlos. Ed Ri Ma, 2004.

LANGE, L; BECH, L; BUSK, P.K; GRELL, M.N; HUANG, Y. M; LANGE, T. LINDE, B. PILGAARD, D. ROTH, X. TONG, The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy *Fungus* v.3, p. 92,2012.

LI, J. W; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? , **Science**, v.325, p. 161-165, 2009.

LUCAS, E. M.F; ABREU, L.M; MARRIEL, I.E.; PFENNING, L.H.; TAKAHASHI, J.A. Phythalates production from *Curvalaria senegalensis*(Speg.) Subram, fungal species associated to crops of commercial value. *Microbiological Research*, v. 162, p.495-502, 2008.

MACHADO, F. L. S., KAISER, C. R., COSTA, S. S., GESTINARI, L. M., SOARES, A. R. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p. 52-441, 2010.

MARTÍN, J.F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages o finer cellular communication. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p.282-293, 2005.

MCLAUGHLIN, J.L, ROGERS, L.L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Information Journal**, v. 32, p.513-24, 1998.

MCMURRY JOHN. Determinação de estruturas: Espectrometria de massaas e Espectroscopia no Infra vermelho. **Química orgânicav.** 1. São Paulo p.385-393, 2011.

MEWES H.W ALBERMANN K, BAHR, M. FRISHMAN, D., GLEISSNER A., HANI, J. OVERIEW OF THE YEAST GENOME. **Nature**, v. 387, p. 7-65, 1997.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, DE, Mclaughlin, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p.31-34, 1982.

MITTERMEIER, R.A., ROBLES GIL, P., HOFFMANN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G., LAMOREUX, J. & FONSECA, G.A.B. Hotspots Revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Agrupación Sierra Madre, México City, p. 392-420, 2004.

MORATH, S.U; HUNG R, BENNETT JW. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews.** v. 26, p. 73–83, 2012.

NANNIPIERI, P., ASCHER, J., CECCHERINI, M. T., LANDI, L., PIETRAMELLARA, G., RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 54, n.4, p. 665-670, 2003.

NASCIMENTO, J.E.; MELO A.F.M.; LIMA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 145- 150, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 34-215, 2000.

NGUTA, L. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia salina* l. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, n. 14 (2), p. 358-361, 2012.

NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. **Springer Science and Business Media**, p. 130-144, 2009.

PANKHURST, C.E.; MAGAREY, R.C.; STIRLING, G.R.; BLAIR, B.L.; BELL, M.J.; GARSIDE, A.L. Management practices to improve soil health and reduce the effects of detrimental soil biota associated with yield decline of sugarcane in Queensland Aust. **Soil & Tillage Research**, v. 72, p. 125-137, 2003.

PAOLETTI, M. G. & BRESSAN, M. Soil invertebrates as bio indicators of human disturbance. **Critical Review in Plant Sciences**, v.15, p.21-62, 1996.

PELCZAR Jr., M. J., CHAN, E. E. C. S., KRIEG, N. R. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*, **Makson Books**, 1996.

PEREIRA. C. A, SARTORI. S. M.R. S, QUIRINO B. F, DA CUNHA B. M. M, KRÜGER R. H. Microbial Diversity in Cerrado Biome (Neotropical Savanna) Soils. **PLOS ONE**. v. 11, p. 1-16, 2016.

PERIN, E.; CERETTA, C. A.; KLAMT, E. Tempo de uso agrícola e propriedades químicas de dois latossolos do planalto médio do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, p.665-674, 2003.

PFENNING, L.H., ABREU, L. M. Diversity of microfungi in tropical soils. In: MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O., BRUSSARD, L. **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI, P. 184-205, 2006.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O.; Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, 32:4, 987-995, 2009.

PINTO, M. A.S., *Técnicas de separação e identificação aplicadas a produtos naturais*. Universidade Federal de Santa Catarina Centro de Ciências Físicas e Matemáticas Departamento De Química. Florianópolis, Novembro de 2005.

PRELLE, A., SPADARO, D., DENCA, A., GARIBALDI, A., AND GULLINO, M. L. Comparison of clean-up methods for ochratoxin A on wine, beer, roasted coffee and chili commercialized in Italy. *Toxins*. v. 5, p.1827-1844, 2013.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M.I.; THOMSON, W. J. Bioassay techniques for drug development, ed. Harwood academic publishers, p. 8-100, 2001.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAN, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. **Advanced Biotech**, p.19-25, 2008.

RANG. H. P.; DALE; M;M. RITTER. J.M. FARMACOLOGIA. 4 ED. RIO DE JANEIRO. EDITORA GUANABATA KOOGAN 2001.

RATTER JA, BRIDGEWATER S, RIBEIRO JF. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 áreas . **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, p. 57-109, 2003.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. R. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223- 230, 1997.

REATTO, A; CORREIA, J. R. C; SPERA, S. T; MARTINS, E.S. Solos do bioma Cerrado: aspectos pedológicos. In Sano, S. M. Almeida, S. P; Ribeiro, J.F. Cerrado: ecologia e flora. v. 2. **Embrapa-CPAC**, Planaltina. p. 1-212, 2008.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO. S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: ecologia e flora. Embrapa: Brasília – DF, p. 1.279, 2008.

RIBEIRO, J. F; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In Sano, S. M. Almeida, S. P; Ribeiro, J.F. Cerrado: ecologia e flora. v. 2. **Embrapa-CPAC**, Planaltina. p. 151-212, 2008.

RIGOBELLO, E. S.; SCANDELA, A. P. J.; CORSO, B. L.; TAVARES, C. R. G. Identificação de compostos orgânicos em lixiviado de aterro sanitário municipal por

cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. **Química Nova na Escola**, v.38, n 6, p. 794-900 , 2015.

RODOARTE, M. P. , DIAS, R. D. , VILELA, D. M. , SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea Arabica* L.) **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 3, p.457-464, 2011.

RODRIGUES, E.G.; LIRIO, V.S.; LACAZ, C. S., preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de medicina Tropical de São Paulo**, v.34 p. 159-165, 1992.

ROY RN, LASKAR S, SEN SK. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus*, **Microbiological Research**, p. 121-161, 2006.

SAILLENFAIT, A. M; LAUDET, H. PHTHALATES. Ecotoxicologic Pathology tive properties. **Ecotoxicology Environmental Safety**, p. 2-13, 2005.

SANG, M. K.; KIM, K.D. The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. **Journal Applied Microbiology**, nº 113, p. 383-398, 2012.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK,P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365. 2002.

SCHMIDT, R., CORDOVEZ, V., DE BOER, W., RAAIJMAKERS, J. & GARBEVA, P. Volatile affairs in microbial interactions. **The ISME journal**, v. 42, 2015.
SHATA, H. M. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid-state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v.54, n.3, p.7-241, 2005.

SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van leeuwenhoek**, Amsterdam, v.23, n.1, p.15-22, 1957.

SILVERSTEIN. R.M.; WEBSTER. F.X.; KIEMLE. D.J. Espectrometria de massas. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**- Rio de Janeiro- SÉTIMA EDIÇÃO. LTC. 2013.

SINSABAUGH, R. L. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 3, 2010.

SKOOG, D. A. & LEARY, J. J. High-Performance Liquid Chromatography. In: **Principles of Instrumental Analysis**. Florida: Harcourt Brace College Publishers, p. 628 – 669, 1992.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. **WileyInterscience**, p. 765, 1997.

SOLEWICZ, E. **Biotecnologia: Enzimas na Síntese Orgânica**, INT, 19, n.40, p.20-29, 1987.

SPERA, S. T.; REATTO, A.; CORREIA, J. R.; SIMM, K. M. B.; MILHOMEM. A. S. Características físicas dos solos e a ocorrência de fitofisionomias de Cerrado na bacia do rio Jardim-Distrito Federal. **Embrapa**, n. 39, p. 5, 1999.

STROBEL, G.DAISE,B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.67, p. 491-502, 2003.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal ensophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v.23, p. 9-19, 2009.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHASHI, J.A.; MONTEIRO DE CASTRO, M.C.; SOUZA, G.G.; LUCAS, E.M.F.; BRACARENSE, A.A.P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, M.S.;

FLOREANO, M.B.; OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, p. 198-204, 2008.

TORSVIK, V. et al., Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 776-781, 1990.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**.6. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2002.

TUNGA, R., SHRIVASTAVA, B., BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1553-1558, 2003.

VARGA, J., JUHÁSZ, A., KEVEI, F., KOZAKIEWICZ, Z. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 627-640, 2004.

VARGA, J. ET AL. Molecular diversity of agricultural important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*. Dordrecht v. 110. P. 637-640. 2004. MONTEIRO. M. C.P. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DOS GENEROS ASPERGILLUS E PENICILLIUM EM SOLOS PRESERVADOS DO CERRADO dissertação mestrado Universidade federal de lavras 2012.

WANG, W., LI, Y., WANG, H.,ZU,Y., Differences in the Activities of Eight Enzymes from tem soil fungi and their possible influences on the surface struture, functional groups, and element composition of soil colloids. **PLOS ONE**. v. 9, p.1-12, 2014.

WANG, W., LI, Y., WANG, H.,ZU,Y., Differences in the Activities of Eight Enzymes from tem soil fungi and their possible influences on the surfasse struture,functional groups, and element composition of soil colloids. **PLOS ONE**. v. 9, p.1-12, 2014.

XU, Q.; WU, S.Y.; W, M.; Y, X.Y.; WEN, Z.Y.; GEN, W.N.; GU, Z.Z. Electrospun Nylon6 Nanofibrous Membrane as SPE Adsorbent for the Enrichment and Determination of Three Estrogens in Environmental Water Samples. **Journal of Chromatography**, v. 71, p. 487–492, 2010.

YAMAMOTO, H., MORIYAMA, K., JINNOUCHI, H.; YAGISHITA, K. Studies on terreic acid. **The Journal of Antibiotics**, v.33, p. 320–328, 1980.

YOON, M. A., JEONG, T. S.; PARK,D. S.; XU,M. Z.; OH, H.W.; SONG, K.B.; LEE, W.S.; PARK, H.Y. Antioxidant Effects of Quinoline Alkaloids and 2,4-Di-tert-butylphenol Isolated from *Scolopendra subspinipes*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 735-739, 2006.

YU, J.H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**. v.43, p.437-458, 2005.

ZAEHLE, C., GRESSLER, M., SHELEST, E., GEIB, E., HERTWECK, C.; BROCK, M. Terrein biosynthesis in *Aspergillus terreus* and its impact on phytotoxicity, **Chemistry Biology**, v. 21, p.719–731, 2014.

ZERIKLY M., CHALLIS, G.L. Strategies for the Discovery of new natural products by genome mining. **Chem Bio Chem**, v. 10, p. 625-633, 2009.

ZHAO, Y.G.; CHEN, X.H.; PAN, S.D.; ZHU, H.; SHEN, H.Y.; JIN, M.C. Simultaneous analysis of eight phenolic environmental estrogens in blood using dispersive micro-solid-phase extraction combined with ultrafast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Talanta**, v.115, p. 787–797, 2013.

ZHOU, N. Z; LIU, P, S; LIAO, Y. H; LEI, N.S; LIANG, Y. H; ZHOU, S. H; LIN, W. S; CHEN, J; FENG, Y.Q; TANG, Y. Low-cost humic acid-bonded silica as an effective solid-phase extraction sorbent for convenient determination of aflatoxins in edible oils. **Analytica Chimica Acta**. p. 38-46, 2017.

ANEXOS

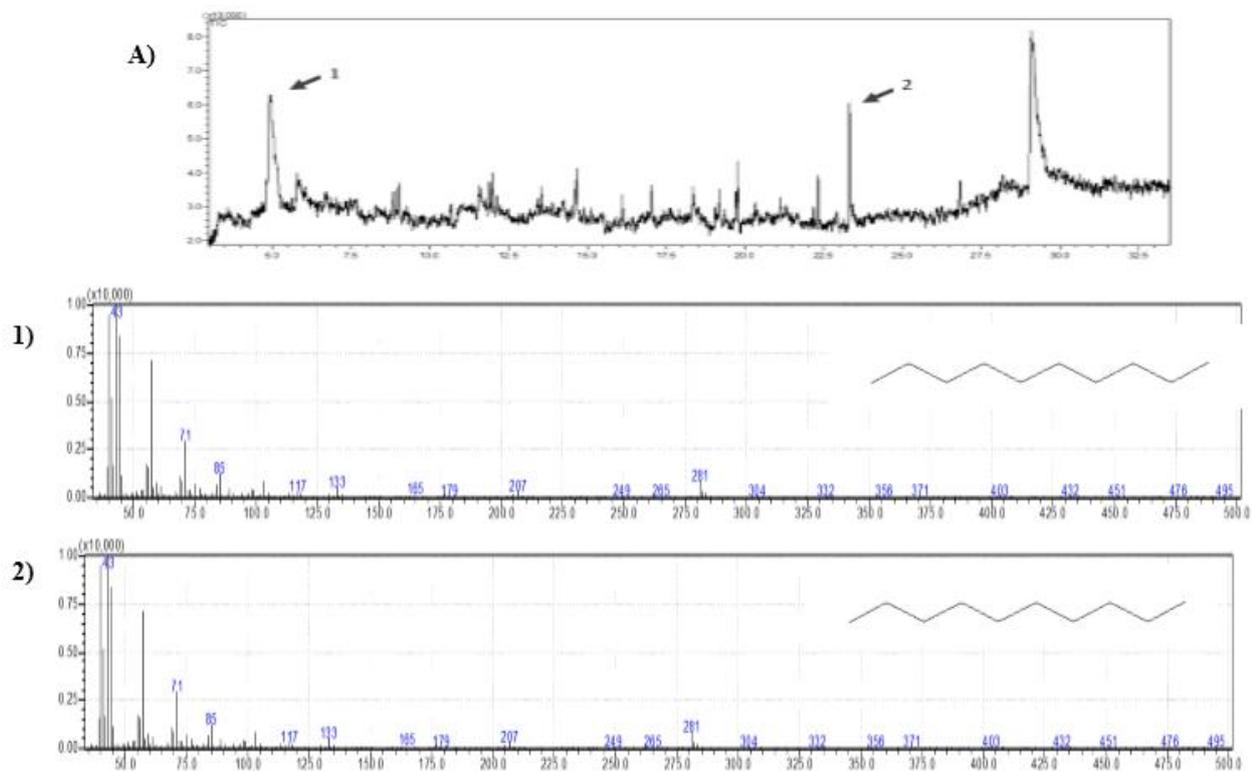


Figura 8: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2) referente a FRAÇÃO 1 da primeira coluna preparativa.

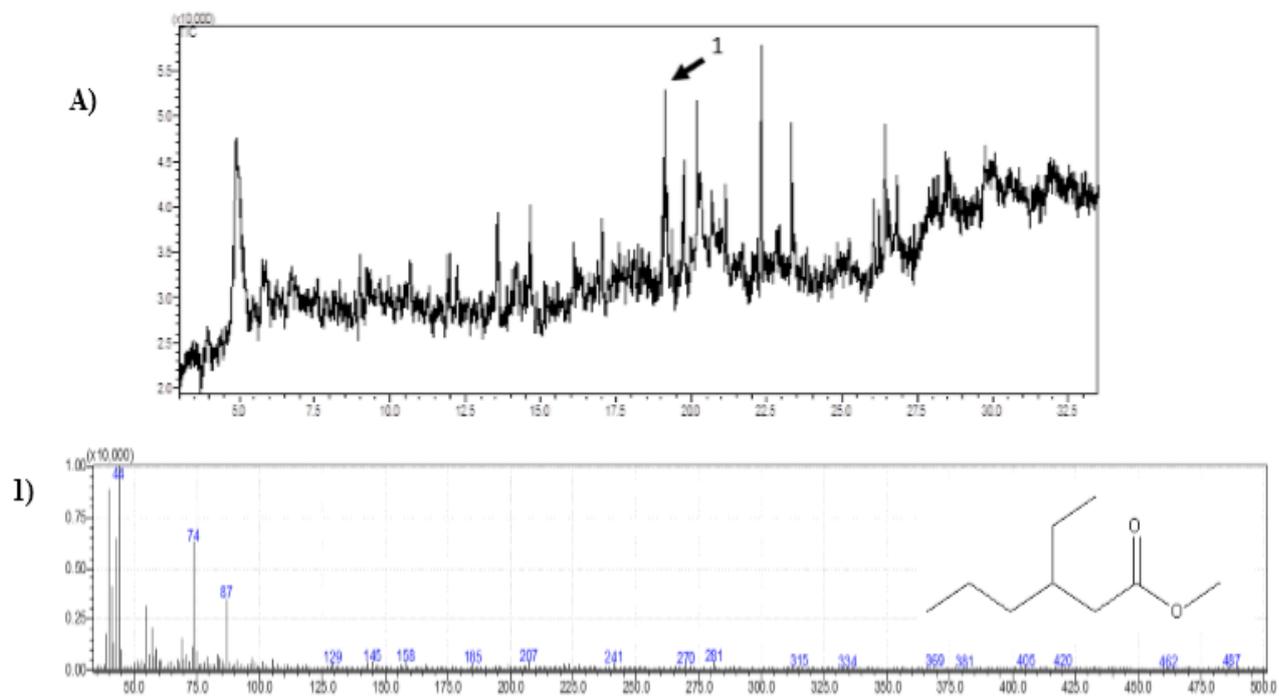


Figura 9: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1) referente a FRAÇÃO 2 da primeira coluna preparativa

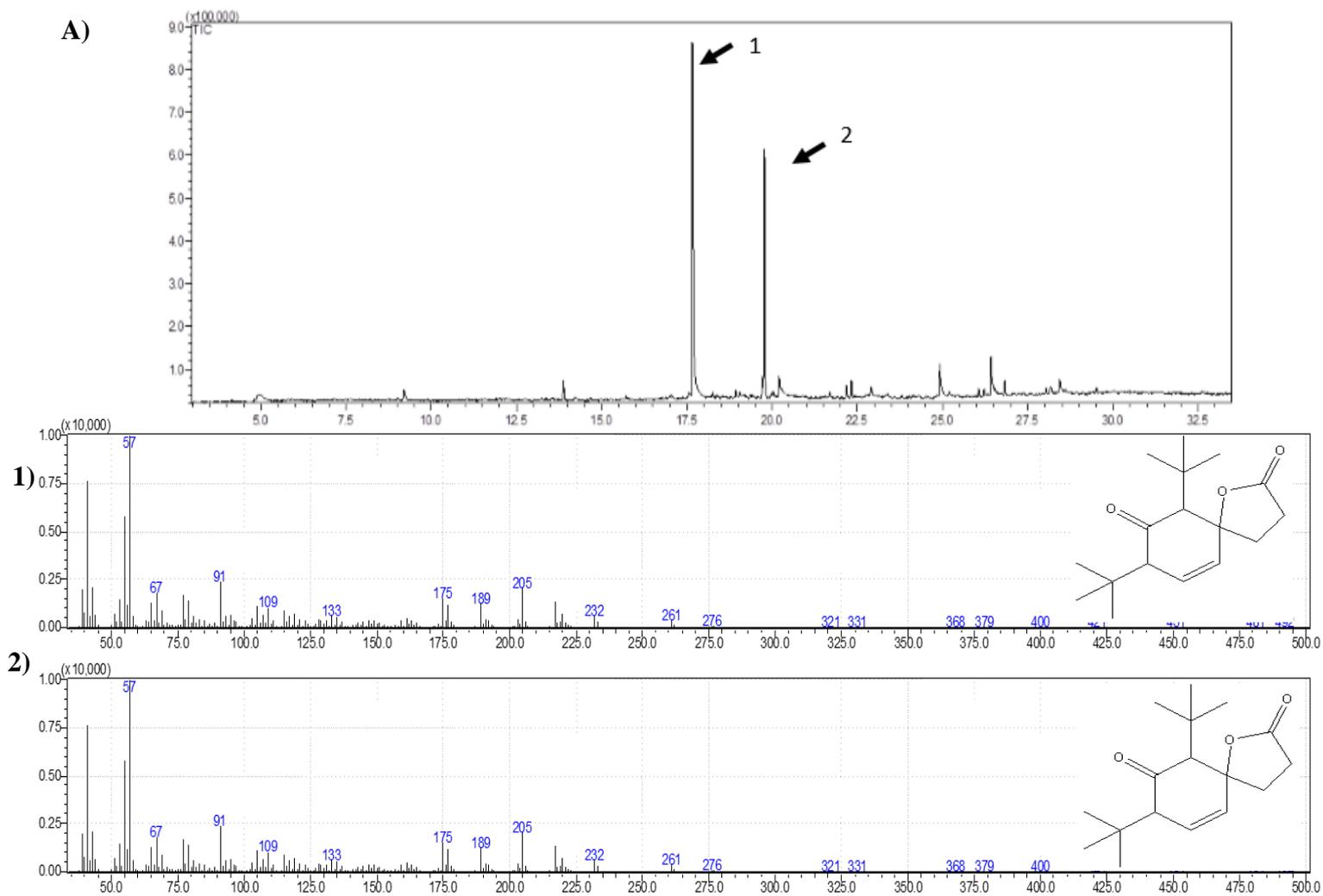


Figura 10: a) Cromatogramas do CG (**A**) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (**1,2**) referente a FRAÇÃO 3 da primeira coluna preparativa

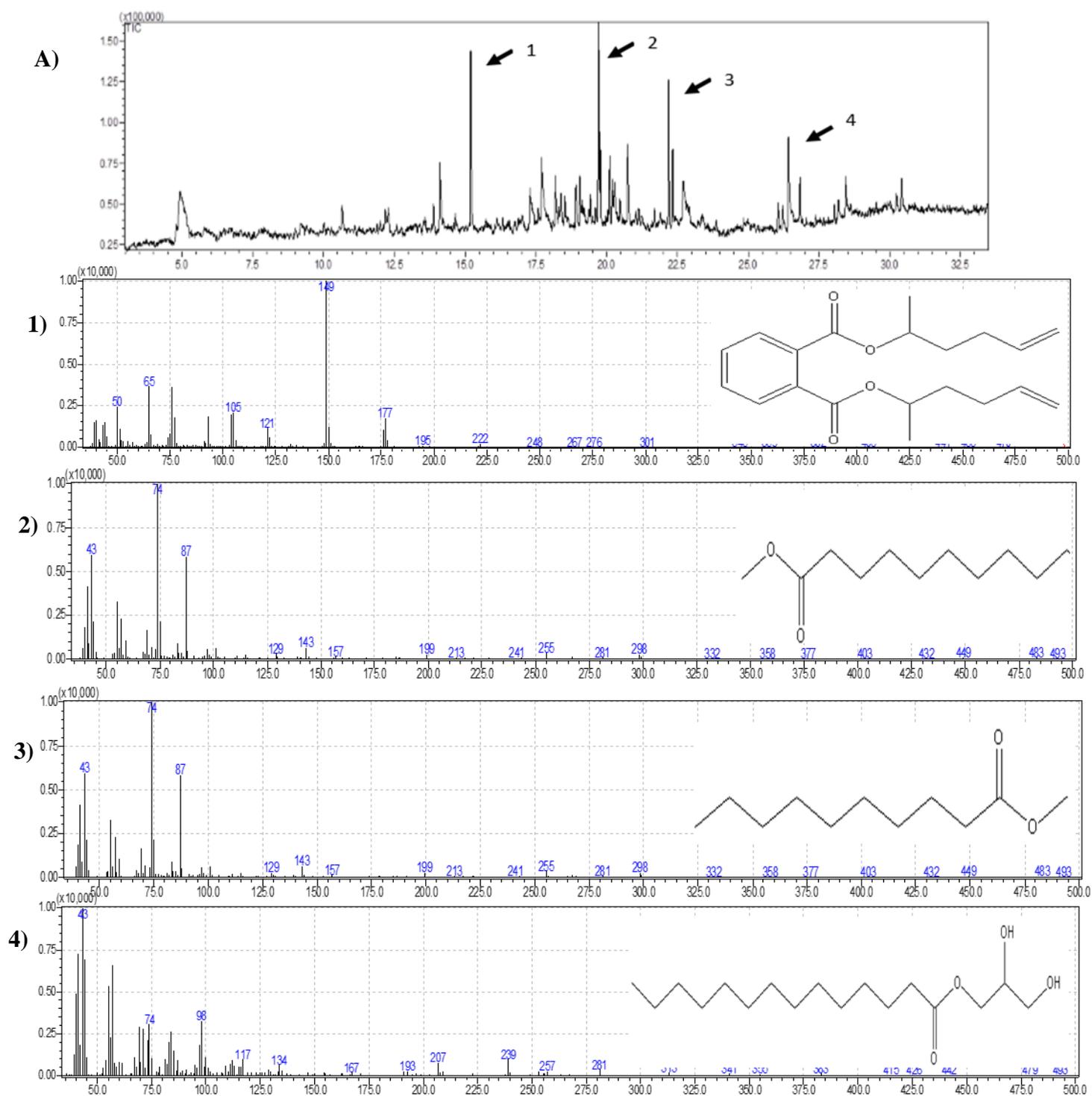


Figura 11: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3,4) referente a FRAÇÃO 4 da primeira coluna preparativa

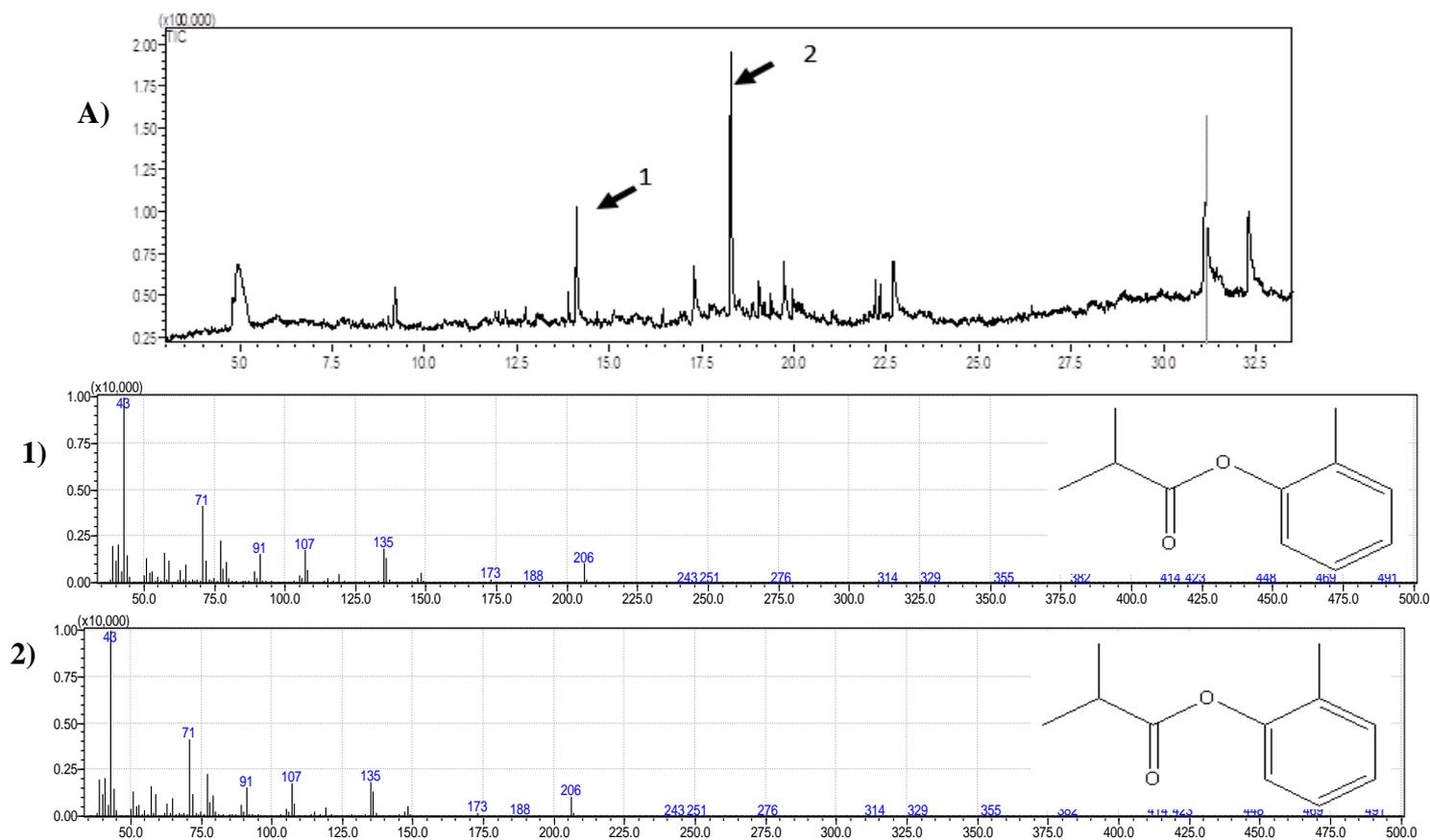


Figura 12: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2) referente a FRAÇÃO 5 da primeira coluna preparativa

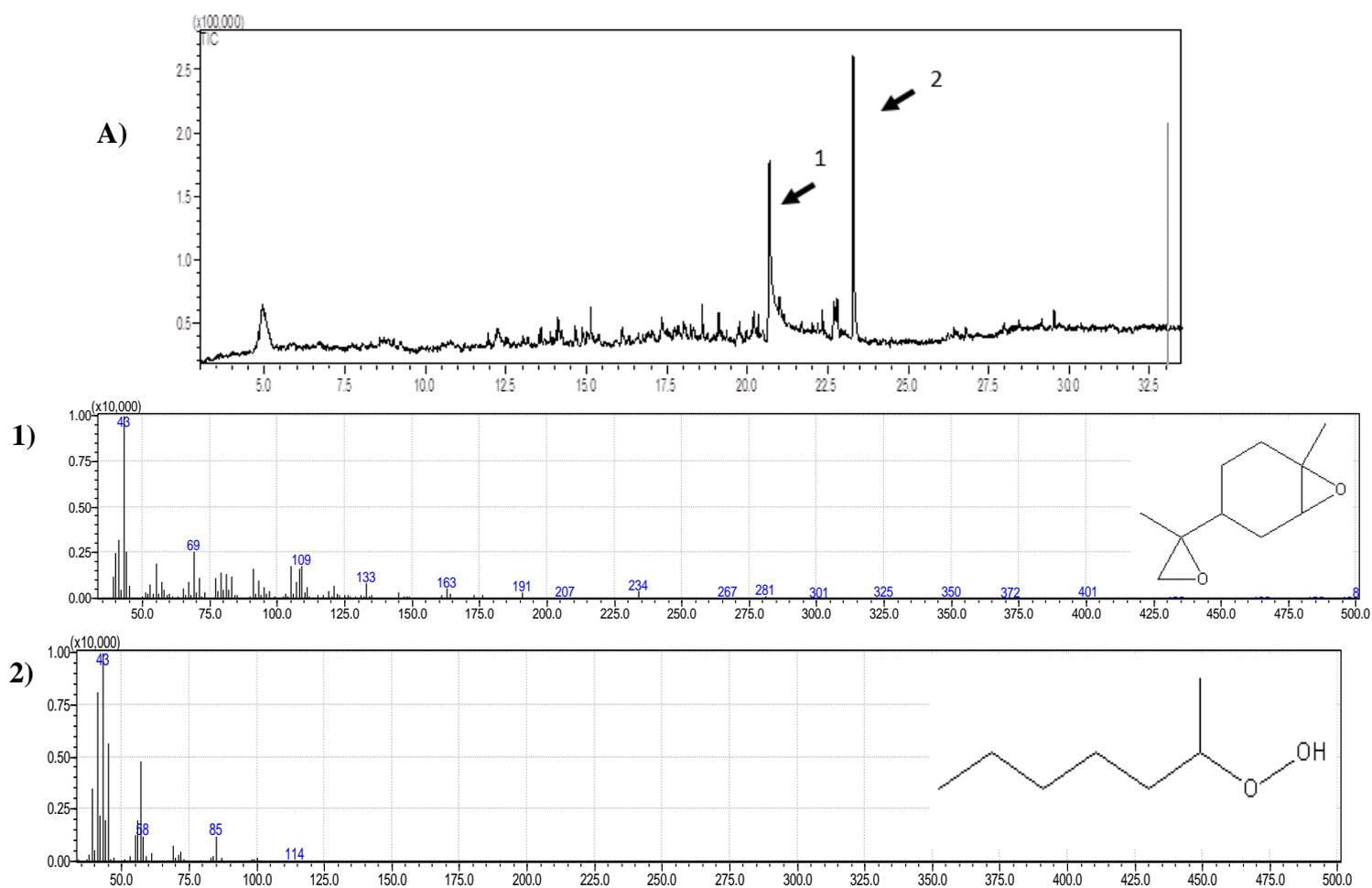


Figura 13: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2) referente a FRAÇÃO 6 e7 da primeira coluna preparativa

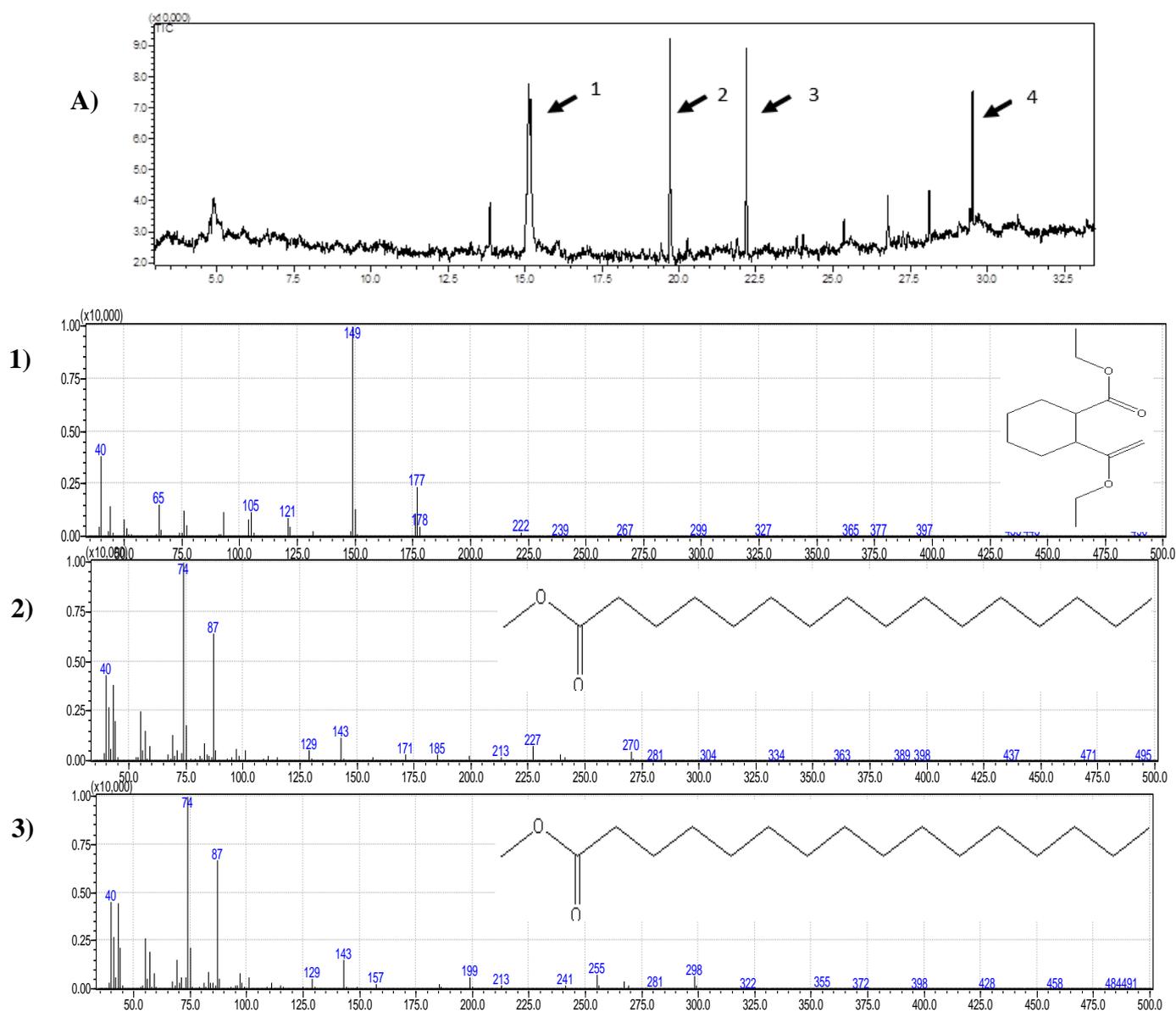


Figura 14: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2 3) referente a FRAÇÃO 8 da primeira coluna preparativa

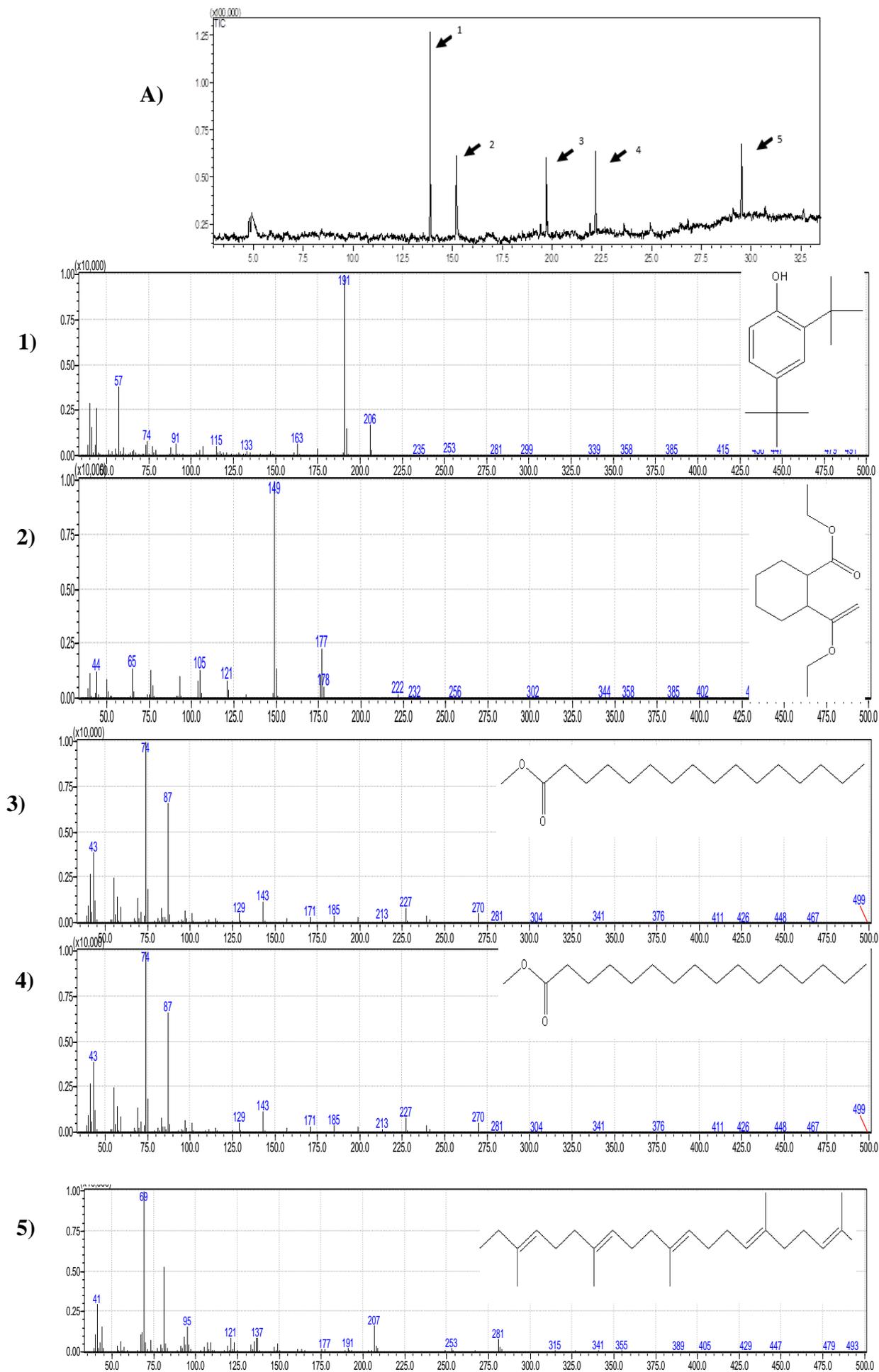


Figura 15: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3,4,5) referente a FRAÇÃO 1 da segunda coluna preparativa

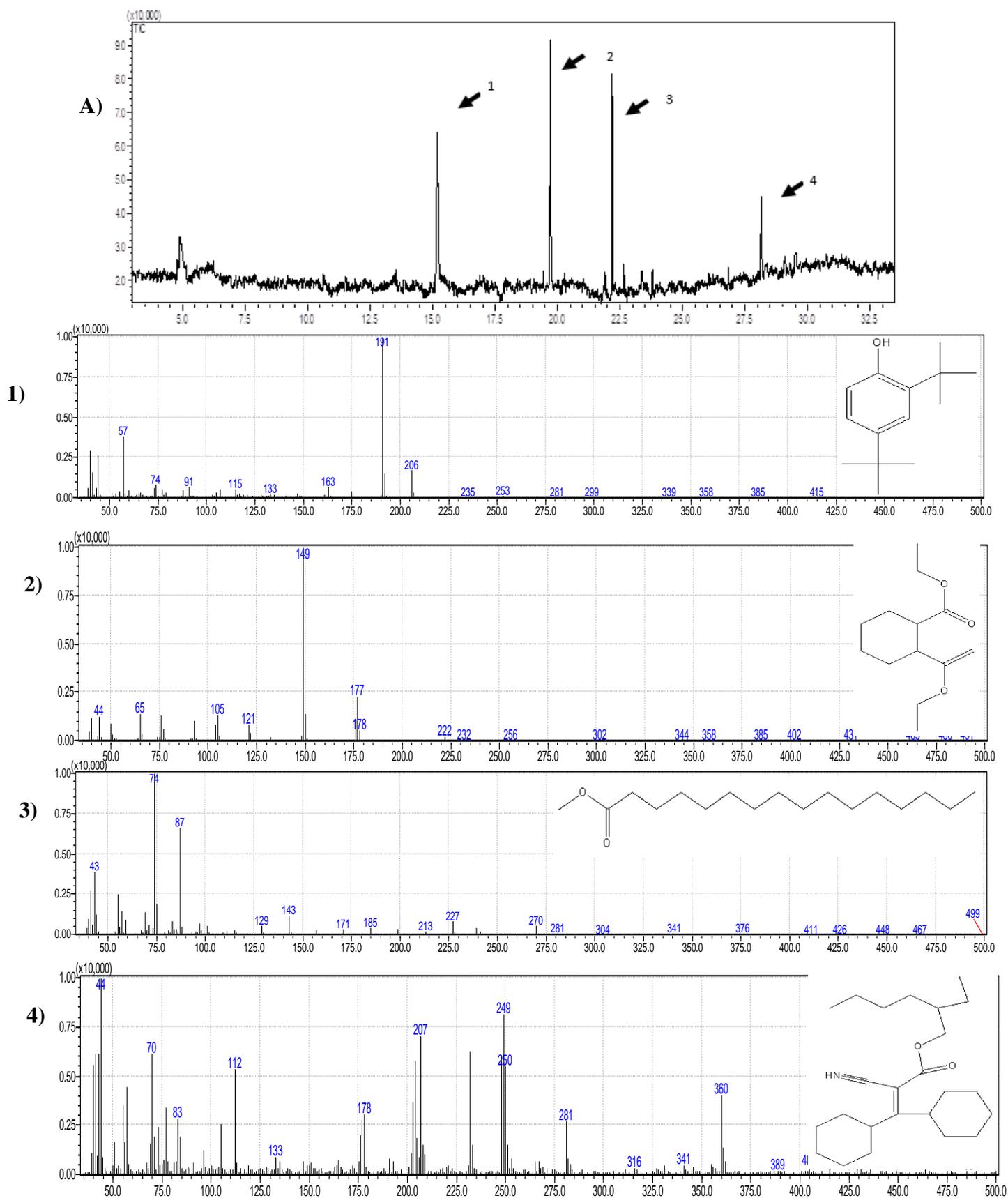


Figura 16: a) Cromatograma do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3,4) referente a FRAÇÃO 2 da segunda coluna preparativa

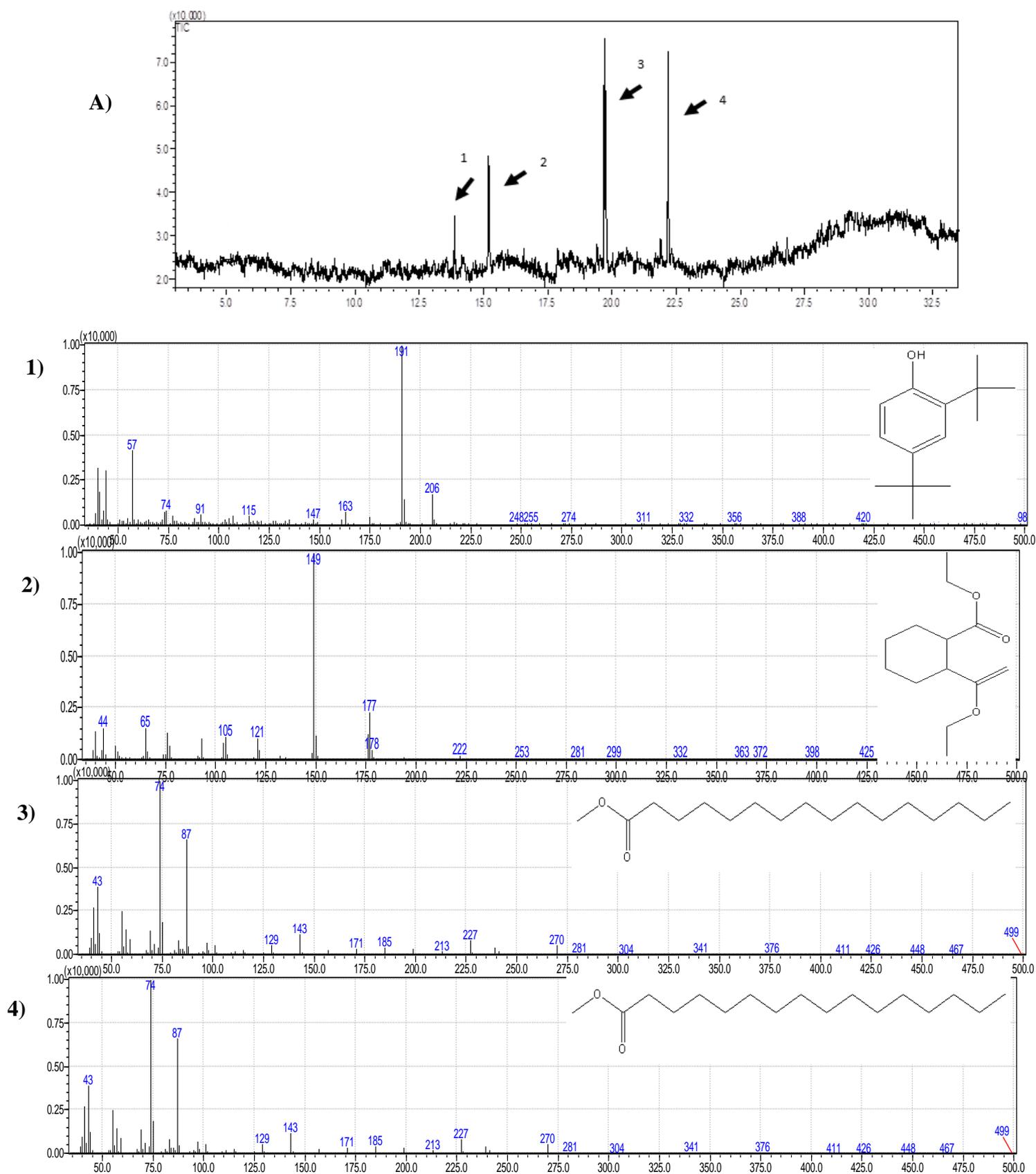


Figura 17: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3,4) referente a FRAÇÃO 3 da segunda coluna preparativa

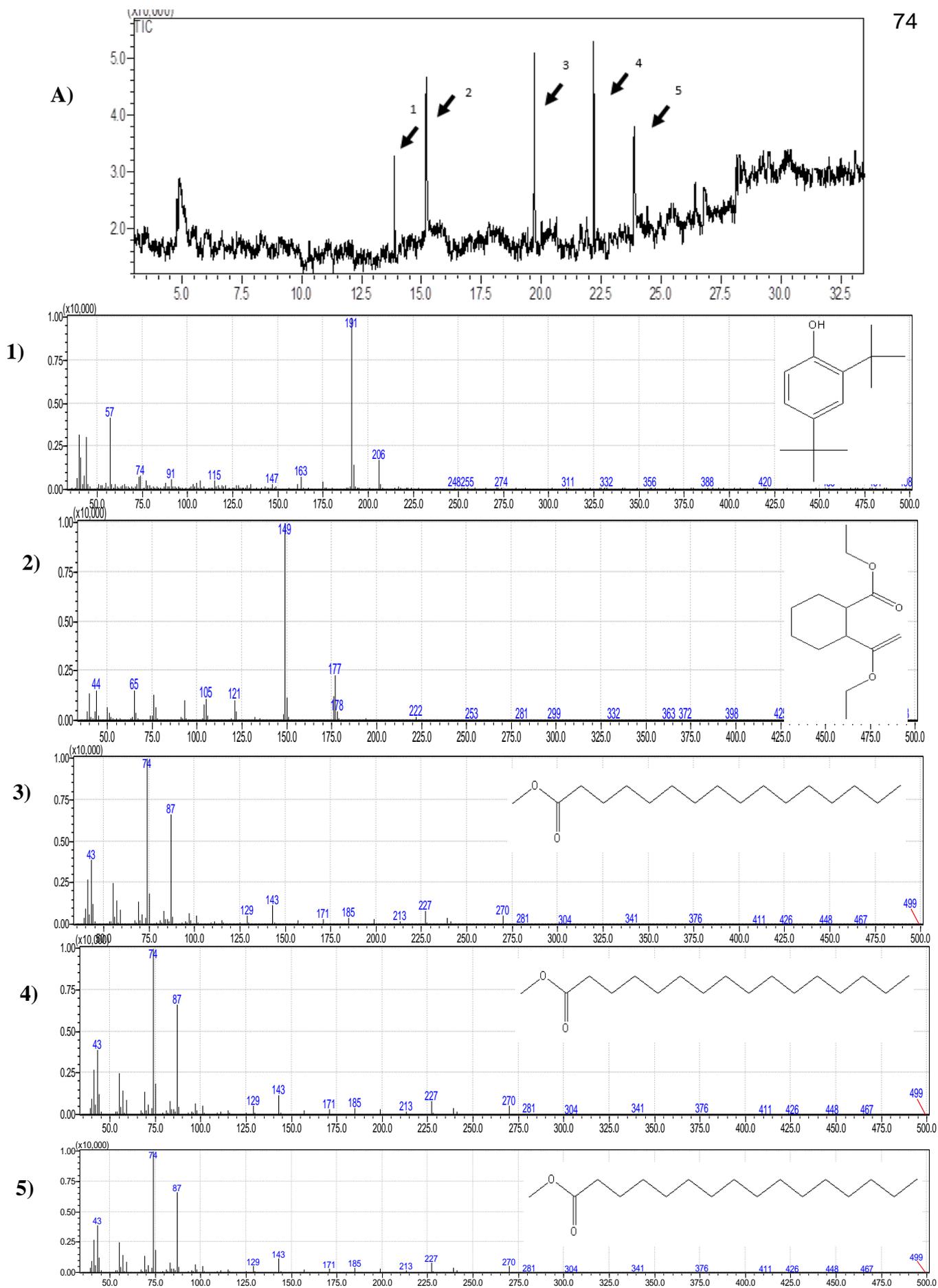


Figura 18: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3,4,5) referente a FRAÇÃO 4 da segunda coluna preparativa

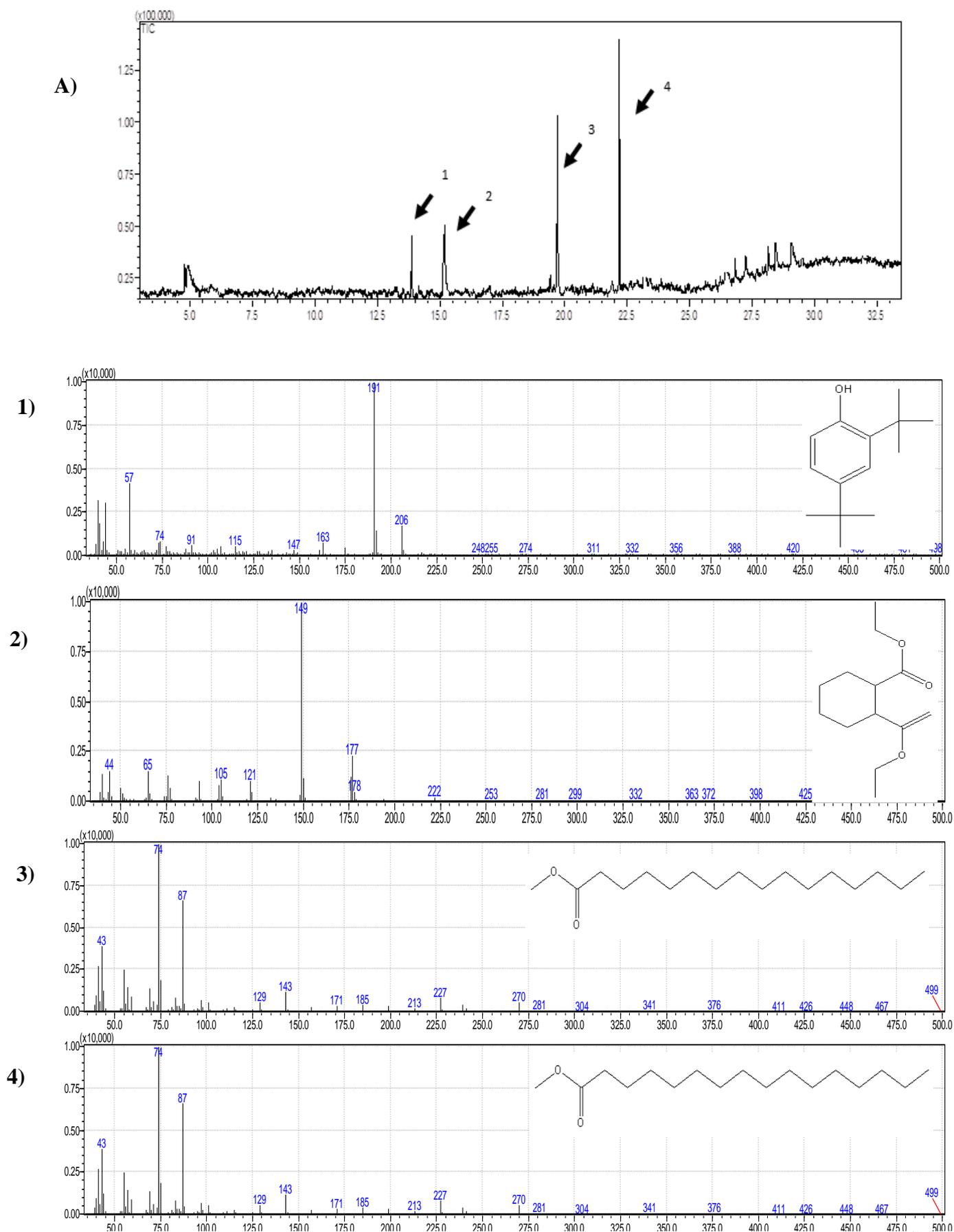


Figura 19: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3,4) referente a FRAÇÃO 5 da segunda coluna preparativa

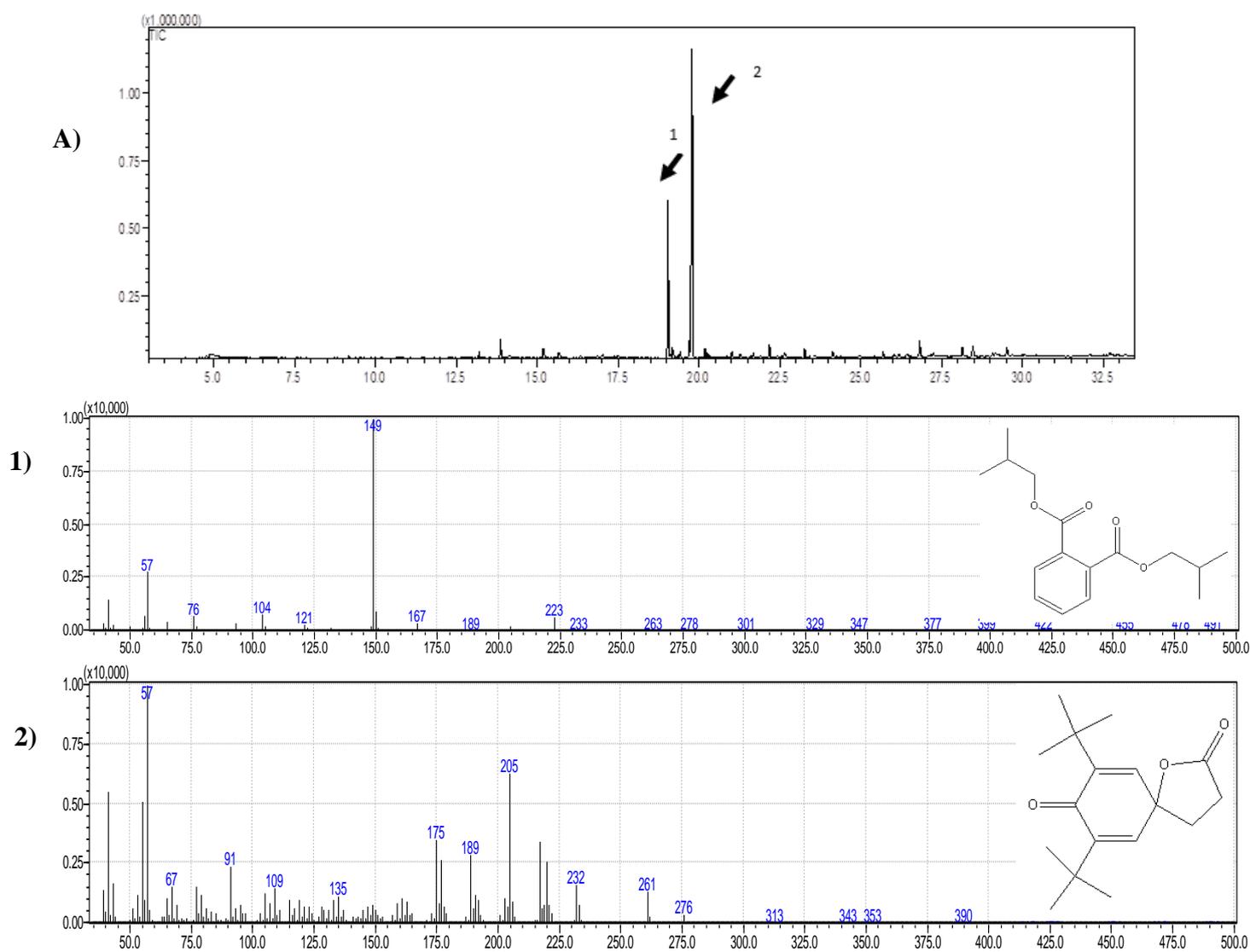


Figura 20: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2) referente a FRAÇÃO 6 da segunda coluna preparativa

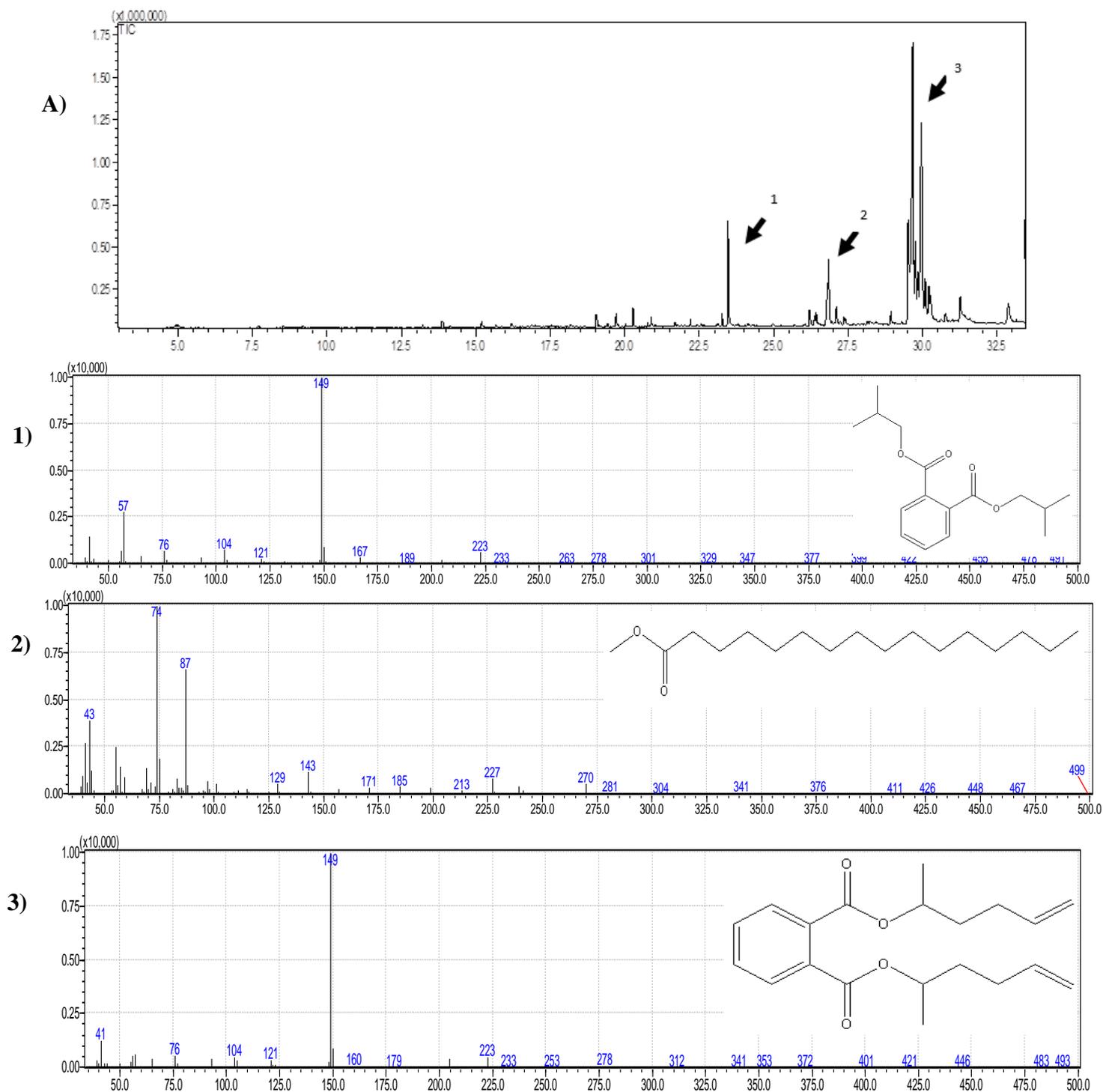


Figura 21: a) Cromatogramas do CG (A) e as possíveis estruturas propostas pelo EM (1,2,3) referente a FRAÇÃO 7 da segunda coluna preparativa

Frações	Numeração das frações concentradas
10, 13,16,18	1
22,24,25,28,29,30	2
31,32,33,34,35	3
38, 39,40	4
77, 78	5

Tabela 2: Frações obtidas por EFS, reunidas de acordo com a similaridade dos cromatogramas gerados por CLAE.

Frações	Numeração das frações Concentradas
98	1
107	2
109	3
111	4
114	5
122	6
129	7
173	8

Tabela 3: Frações proveniente da coluna preparativa, oito frações de 1,5 mL cada, colocadas em ordem crescente, posteriormente essas frações serão analisadas na CLAE.

Frações	Numeração das frações Concentradas
89	1
129	2
133	3
145	4
149	5
171	6
180	7

Tabela 4: Frações proveniente da segunda coluna preparativa, sete frações de 1,5 mL cada, colocadas em ordem crescente, posteriormente essas frações serão analisadas na CLAE.

