

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**METABÓLITOS DE *Penicillium citrinum* E SUA AÇÃO NO
CONTROLE DE *Aspergillus niger*, AGENTE CAUSAL DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine ex
Engelm)**

CAROLINE LOPES DAMASCENO

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO – 2014**

**METABÓLITOS DE *Penicillium citrinum* E SUA AÇÃO NO
CONTROLE DE *Aspergillus niger*, AGENTE CAUSAL DA
PODRIDÃO VERMELHA DO SISAL (*Agave sisalana* Perrine ex
Engelm)**

CAROLINE LOPES DAMASCENO

Bacharela em Biologia

UFRB, 2012

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dra. Ana Cristina Fermino Soares

Co-orientador: Dra. Caline Gomes Ferraz

CRUZ DAS ALMAS – BA

AGOSTO - 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

D155m	<p>Damasceno, Caroline Lopes</p> <p>Metabólitos de <i>Penicillium citrinum</i> e sua ação no controle de <i>Aspergillus niger</i>, agente causal da podridão vermelha do sisal (<i>Agave sisalana</i> Perrine ex Engelm)/ Caroline L. Damasceno. - Cruz das Almas, BA, 2014. 154f.; il.</p> <p>Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Cristina Fermino Soares Coorientadora: Prof^a. Dr^a Caline Gomes Ferraz</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB.</p> <p>1. Fitopatologia. 2. <i>Agave sisalana</i> - Doenças e pragas. 3. Fungos fitopatogênicos – Controle biológico. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - CCAAB. II. Título.</p> <p>CDD: 632</p>
-------	---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

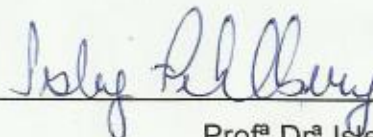
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
CAROLINE LOPES DAMASCENO



Profª Drª Ana Cristina Ferrino Soares

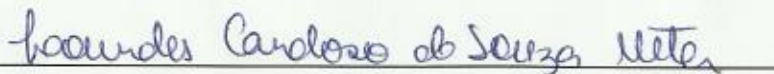
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

(Orientador)



Profª Drª Isley Fehlbey

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe - IFS



Profª Drª Lourdes Cardoso de Souza Neta

Universidade do Estado da Bahia - UNEB

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre
em Microbiologia Agrícola em _____."

À Deus, minha fortaleza.

À minha família e amigos. Especialmente à minha mãe, Maria (meu maior exemplo de vida), que sempre sofreu, torceu e comemorou cada pequena vitória, junto comigo durante minha jornada de aprendizados. Ao meu pai, que mesmo mais reservado, sempre se orgulhou de cada etapa vencida.

À André por tornar o caminhar tão mais leve ...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela realização do curso de Bacharelado em Biologia e Mestrado em Microbiologia Agrícola.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso de mestrado.

À Profª Drª Ana Cristina Fermino Soares pela amizade, orientação, paciência, por todo apoio, incentivo e principalmente por confiar e acreditar em minha capacidade. Ao Prof. Frederico Guaré pelo apoio, orientação e por disponibilizar seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profª Drª Caline Gomes Ferraz, pela orientação, amizade, por todo empenho e disposição na construção deste trabalho, por colaborar imensamente com o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão.

À Profª Drª Elisângela Boffo, pela amizade, companhia, conversas agradáveis e por sua imensa colaboração científica e experimental.

Ao pessoal do GESNAT, que me acolheu tão bem e por tornar meu dias mais legais, agradeço em especial ao Heiter, pela amizade, pelo café, conversas construtivas e por toda “consultoria” prestada, as quais foram imprescindíveis para meu aprendizado.

À Profª Drª Isley Fehlberg por sua disposição e colaboração e por ter ensinado tão pacientemente a metodologia para os ensaios biológicos.

À Renata da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela disposição, ajuda e agilidade com os espectros da segunda coluna.

Ao Nelson por disponibilidade e colaboração com as análises via CG-EM.

Aos meus colegas do laboratório de microbiologia, aos amigos Rafael, Cristiano, Jaque, Jefferson, Lica, Fábio, Emile, Valter, Zayda.

À Lydice pela amizade, por todas as valiosíssimas contribuições, pelo apoio no laboratório e por compartilhar de meus momentos de tensão.

À Ilana por toda ajuda e apoio, principalmente nos momentos que estive mais ausente.

Aos técnicos do laboratório de microbiologia, em especial Lene e Carolina.

Aos professores do curso de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela formação.

Às minhas amigas de residência, Érika, Mara, Paty e Thay.

À minha família, especialmente, meus pais, Domingos e Maria, meus irmãos, minha madrinha, pela base, por toda torcida, apoio incondicional e compreensão em todos os momentos.

À André, por sua presença em minha vida, apoio, preocupação, paciência, amor e por participar de todos os momentos. À família do André, por todo acolhimento, torcida e colaboração em meu desenvolvimento.

À Deus, por tudo e por estar sempre ao meu lado me fortalecendo.

Aos que não foram citados, mais que também fizeram parte desta história, muito obrigada!

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem,
ou que seus planos nunca vão dar certo,
ou que você nunca vai ser alguém...
...Quem acredita sempre alcança...
(Renato Russo)*

*“No início faça o imprescindível, depois, o possível
e, de repente estará fazendo o impossível”.
(São Francisco de Assis)*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BDA	Batata Dextrose Ágar
°C	Graus Celsius
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CL50	Concentração inibitória de 50% da germinação de esporos
CIM	Concentração inibitória mínima
cm	Centímetro
<i>d</i>	Dupleto
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
eV	Eletrón volt
CG-EM	Gas Chromatography Mass Spectrometry
GESNAT	Grupo de estudo de substâncias naturais e orgânicas
HCl	Ácido clorídrico
<i>g</i>HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Litro
K	Kelvin
mg	Miligrama
ml	Mililitro
m	Multiplete
Me	Metila

MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
Min	Minuto
MM	Massa molecular
mm	Milímetro
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaNO₃	Nitrato de sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards, atualizado para (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute.
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
s	Singleto
sp	Espécie
spp	Espécies
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1

Figura 1. Território do Sisal na Bahia.....31

CAPÍTULO 2

Figura 1. Inibição (%) da germinação de esporos de 10 isolados de *Aspergillus niger* (AN) por diferentes extratos de micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*.....64

CAPÍTULO 3

Figura 1. Obtenção dos extratos orgânicos a partir do micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*.....87

Figura 2. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato controle em clorofórmio (ECC).....88

Figura 3. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato controle em acetato de etila (ECA).....89

Figura 4. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato controle em n-butanol (ECB).....89

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato clorofórmico do micélio (ECM).....90

Figura 6. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato clorofórmico do filtrado (ECF)90

Figura 7. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) antes da metilação.....91

Figura 8. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.....91

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do filtrado (EAF).....92

Figura 10. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato metanólico do micélio (EMM).....92

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato n-butanólico do filtrado (EBF).....	93
Figura 12. Fracionamento em coluna do ECM.....	94
Figura 13. Substâncias isoladas a partir das frações 8-11ECM, 12-20ECM e 21-39ECM do extrato clorofórmico do micélio (ECM).....	95
Figura 14. Fracionamento em coluna do ECF.....	96
Figura 15. Substâncias presentes em frações do extrato clorofórmico do filtrado (ECF).....	98
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF.....	99
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M1.....	100
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M2.....	100
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M3.....	101
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M4.....	101
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF.....	102
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M1.....	103
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M2.....	103
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M3.....	104
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) antes da reação de metilação.....	105
Figura 26. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do Extrato de Acetato de Etila (EAM) de <i>Penicillium citrinum</i> antes da reação de metilação.....	106

Figura 27. Cromatograma de íons totais do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.....	106
Figura 28. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do Extrato de Acetato de Etila do Micélio (EAM) de <i>Penicillium citrinum</i> após reação de metilação.....	106
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.....	107
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.....	107
Figura 31. Estrutura proposta para a substância SI, identificada como Ergosterol.....	109
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 8-11ECM para a substância SI, ergosterol.....	110
Figura 33. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M2 para a substância SI, ergosterol.....	111
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M1 para a substância SI, ergosterol.....	112
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado para a substância SI, ergosterol....	113
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado, substância SI, ergosterol.....	116
Figura 37. Espectro de infravermelho [pastilha de KBr] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado para o composto ergosterol (SI).....	118
Figura 38. Estrutura proposta para a substância SII, identificada como 9,12-hexadecadienoato de n-propil.....	119
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 12-20ECM e substância SII.....	120
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 12-20ECM e substância SII.....	122
Figura 41. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do composto SII, fração 12-20ECM de <i>Penicillium citrinum</i>	124
Figura 42. Cromatograma de íons totais da fração 12-20ECM.....	125

Figura 43. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 18,88 minutos com os dados da biblioteca.....	125
Figura 44. Espectro de massas com o tempo de retenção 16,45 minutos.....	126
Figura 45. Biblioteca do equipamento.....	126
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da mistura M21-39ECM.....	129
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do Extrato de Acetato de Etila (EAM) metilado.....	129
Figura 48. Estrutura proposta para a substância SIII, identificada como octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila.....	130
Figura 49. Estrutura proposta para a substância SIV, identificada como 10,13-dimetiltetradecanoato de metila.....	130
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da mistura M-21-39ECM.....	133
Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato de acetato de etila do micélio (EAM) metilado.....	134
Figura 52. Estrutura proposta para a substância SIII, identificada como octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila.....	134
Figura 53. Estrutura proposta para a substância SIV, identificada como 10,13-dimetiltetradecanoato de metila.....	134
Figura 54. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] de M-21-39ECM de <i>Penicillium citrinum</i>	136
Figura 55. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do Extrato de Acetato de Etila (EAM) de <i>Penicillium citrinum</i> após metilação.....	137
Figura 56. Cromatograma de íons totais da mistura M-21-39ECM.....	138
Figura 57. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 18,68 minutos com os dados da biblioteca.....	138
Figura 58. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 16,24 minutos com os dados da biblioteca.....	139
Figura 59. Cromatograma de íons totais do extrato acetato de etila (EAM) metilado.....	139

Figura 60. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 16,42 minutos com os dados da biblioteca.....	140
Figura 61. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 18,83 minutos com os dados da biblioteca.....	140
Figura 62. Estrutura proposta para a substância SV, identificada um derivado de lactona insaturada, S-3-metilpent-2-enolactona.....	141
Figura 63. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV na fração 3ECF-M3.....	142
Figura 64. Ampliação da região entre 4,0 e 8,0 ppm do espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M3.....	143
Figura 65. Ampliação da região entre 0 e 3,0 ppm do espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M3.....	143
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV na fração 3ECF-M3.....	145
Figura 67. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.....	146
Figura 68. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.....	147
Figura 69. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.....	147
Figura 70. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.....	148
Figura 71. Mapa de contornos $g\text{HMBC}$ [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.....	148

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Substâncias isoladas de <i>Penicillium citrinum</i>	40
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Isolados de <i>Aspergillus niger</i>	59
---	----

Tabela 2. Inibição da germinação de esporos (%) de isolados de <i>Aspergillus niger</i> por diferentes extratos de <i>Penicillium citrinum</i>	62
---	----

Tabela 3. Concentração mínima inibitória de 50% (CL50) da germinação de esporos de diferentes isolados de <i>Aspergillus niger</i> causada por extratos e frações de <i>Penicillium citrinum</i>	65
---	----

Tabela 4. Classificação dos isolados de <i>Aspergillus niger</i> quanto à suscetibilidade aos extratos de micélio e filtrado de <i>Penicillium citrinum</i>	66
--	----

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de <i>Penicillium citrinum</i> , em isolados de <i>Aspergillus niger</i> de diferentes localidades.....	67
---	----

Tabela 6. CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de frações do extrato clorofórmico do micélio (ECM), em isolados de <i>Aspergillus niger</i>	68
---	----

Tabela 7. CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de frações do extrato clorofórmico do filtrado (ECF), em isolados de <i>Aspergillus niger</i>	69
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Frações obtidas a partir da cromatografia em coluna do extrato clorofórmico do micélio de <i>Penicillium citrinum</i> (ECM).....	94
---	----

Tabela 2. Frações obtidas a partir da cromatografia em coluna do extrato clorofórmico do micélio de <i>Penicillium citrinum</i> (ECF).....	97
---	----

Tabela 3. Constituintes químicos isolados do micélio e filtrado de <i>Penicillium citrinum</i>	108
---	-----

Tabela 4. Deslocamentos químicos característicos de ergosterol (SI) para os sinais de RMN de ^1H	114
--	-----

Tabela 5. Deslocamentos químicos característicos de ergosterol para os	117
---	-----

sinais de RMN de ^{13}C	
Tabela 6. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^1H	121
Tabela 7. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^{13}C	123
Tabela 8. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^1H	131
Tabela 9. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^{13}C	135
Tabela 10. Deslocamentos químicos característicos de lactonas para os sinais de RMN de ^1H	144
Tabela 11. Deslocamentos químicos característicos de lactonas para os sinais de RMN de ^{13}C	145
Tabela 12. Correlações dos sinais RMN de ^1H , ^{13}C e $g\text{HMBC}$ da substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona.....	149

ÍNDICE

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
INTRODUÇÃO.....	24
CAPÍTULO 1	
Controle biológico de <i>Aspergillus niger</i>, agente etiológico da podridão vermelha do sisal (<i>Agave sisalana</i> Perrine ex Engelm) e produção de metabólitos secundários por <i>Penicillium citrinum</i>.....	26
Resumo.....	27
Abstract	28
Sisal.....	29
Podridão vermelha do caule de sisal.....	32
<i>Aspergillus</i> spp.....	33
Controle Biológico.....	35
Gênero <i>Penicillium</i> no controle biológico.....	37
Produção de metabólitos secundários por fungos do Gênero <i>Penicillium</i>	38
Referências.....	43
CAPÍTULO 2	
Atividade antifúngica de extratos e frações de <i>Penicillium citrinum</i> em <i>Aspergillus niger</i>.....	53
Resumo.....	54
Abstract	55
Introdução.....	56
Material e métodos.....	57
1. Isolamento de <i>Penicillium citrinum</i>	57
2. Obtenção dos extratos e frações de <i>Penicillium citrinum</i>	58

3. Seleção dos isolados de <i>Aspergillus niger</i>	58
4. Obtenção da suspensão de esporos de <i>Aspergillus niger</i>	59
5. Inibição da germinação de esporos de <i>Aspergillus niger</i> por extratos brutos de metabólitos de <i>Penicillium citrinum</i>	60
6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de <i>Aspergillus niger</i> por extratos brutos e frações obtidas de <i>Penicillium citrinum</i>	61
Resultados.....	62
Discussão.....	69
Conclusão.....	72
Referências.....	73

CAPÍTULO 3

Constituintes químicos isolados de <i>Penicillium citrinum</i>, endofítico de plantas de sisal (<i>Agave sisalana</i> Perrine ex Engelm) do semiárido da Bahia, Brasil.....	79
Resumo.....	80
Abstract	81
Introdução.....	82
Material e métodos.....	83
1. Métodos cromatográficos.....	83
2. Métodos físicos.....	84
2.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....	84
2.2 Espectroscopia no infravermelho (IV).....	84
2.3 Cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG-EM).....	84
3. Reações.....	85
3.1 Metilação com diazometano.....	85
4. Isolamento de <i>Penicillium citrinum</i>	86
5. Obtenção dos extratos brutos de <i>Penicillium citrinum</i>	86
6 Isolamento dos constituintes químicos.....	93
6.1 Fracionamento do extrato clorofórmico do micélio (ECM).....	93
6.1.1 Estudo da fração 8-11ECM.....	95
6.1.2 Estudo da fração 12-20ECM.....	95
6.1.3 Estudo da fração 21-39ECM.....	96

6.2 Fracionamento do extrato clorofórmico do filtrado (ECF).....	96
6.2.1 Estudo das fração 2ECF.....	98
6.2.2 Estudo das fração 3ECF.....	102
6.3 Estudo do extrato acetato de etila do micélio (EAM).....	104
Resultados e discussão.....	108
1. Constituintes químicos isolados de <i>Penicillium citrinum</i>	108
1.1 Identificação da substância SI.....	109
1.2 Identificação da substância SII.....	118
1.3 Identificação das substâncias SIII e SIV.....	127
1.4 Identificação da substância SV.....	141
Conclusão.....	149
Referências.....	150
CONSIDERAÇÕES FINAIS	154

RESUMO

DAMASCENO, C. L. **Metabólitos de *Penicillium citrinum* e sua ação antifúngica a *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm).**

O sisal tem enorme importância econômica e social, sendo o principal produto agrícola da agricultura familiar, na região semiárida da Bahia. Fatores como a podridão vermelha do sisal, causada por *Aspergillus niger*, vem afetando a produtividade da agaveicultura nos últimos anos. *Penicillium citrinum* tem sido frequentemente isolado de plantas de sisal no semiárido da Bahia. Este fungo não é patogênico ao sisal, sendo um potencial agente de controle da podridão no sisal. Este trabalho teve como objetivo, o isolamento e teste da atividade antifúngica de metabólitos produzidos por *P. citrinum* contra *A. niger*. *P. citrinum* foi multiplicado em meio líquido Czapek, sendo o micélio e a fração líquida do cultivo separados por filtração e submetidos à extração com solventes para composição dos extratos brutos. Após análises de RMN de ^1H foram selecionados os extratos clorofórmicos do micélio (ECM) e do filtrado (ECF) para estudo cromatográfico por CC, CCDC e CCDP. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração letal para inibição de 50% da germinação de esporos (CL50) dos extratos de *P. citrinum*, para *A. niger*. As substâncias isoladas foram identificadas por análise RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, IV, CG-EM e comparação com os dados da literatura. Os seis extratos do micélio e filtrado de *P. citrinum* inibiram significativamente a germinação de esporos de *A. niger*. A maior porcentagem de inibição foi 61,27 % para o ECF e 58,96 % para o ECM. A CL50 para germinação de esporos foi de 15,62 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ECF e 15,62 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ECM, variando com o isolado de *A. niger*. Não houve inibição do crescimento micelial de *A. niger* pelos extratos. Foram identificadas cinco substâncias: ergosterol; 9,12 hexadecadienoato de n-propil; octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila; 10,13-dimetiltetradecanoato de metila e S-3-metilpent-2-enolactona. Conclui-se que *P. citrinum* produz metabólitos com ação antifúngica a *A. niger*. Estudos futuros devem determinar o princípio ativo de cada extrato.

Palavras-chave: Biocontrole, fitopatologia e compostos bioativos.

ABSTRACT

DAMASCENO, C. L. **Metabolites of *Penicillium citrinum* and their antifungal activity against *Aspergillus niger*, causal agent of sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) red rot disease.**

Sisal has an enormous economic and social importance, being the main agricultural product in family based agriculture of the semiarid region in the State of Bahia, Brazil. Sisal red rot stem disease caused by *Aspergillus niger* is affecting sisal productivity over the past few years. *Penicillium citrinum* has been frequently isolated from sisal plants in semiarid of Bahia. This fungus is not pathogenic to sisal, being a potential agent for controlling this sisal disease. This work had the objective of isolating and testing the antifungal activity of metabolites obtained from *P. citrinum* against *A. niger*. *P. citrinum* was grown in Czapek liquid medium and the mycelium and liquid fraction were separated by filtration and submitted to solvent extraction and partitioning for obtaining the crude extracts. After ^1H NMR extract analysis, chloroform extracts of mycelium (ECM) and filtrate (ECF) were selected for chromatographic studies by CC, TLCC and TLPC. It was also determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and lethal concentration (CL 50) of extracts for *A. niger*. The substances were identified by ^1H and ^{13}C NMR, gHMBC, IV, CG-EM and compared with data from the literature. The six extracts for mycelium and culture filtrate of *P. citrinum* significantly inhibited spore germination of *A. niger*. The highest percentage of inhibition was of 61.27 % for ECF and 58.96 % for ECM. The CL50 for spore germination varied from 5.62 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for ECF and from 15.62 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for ECM, depending on the isolate of *A. niger*. Inhibition of *A. niger* mycelium growth was not observed for the extracts at concentrations up to 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Five substances were identified and described: ergosterol (SI); n-propyl 9,12-hexadecadienoate (SII); methyl octadeca-9Z,12Z-dienoate (SIII); methyl 10,13-dimethyl-tetradecanoate (SIV) and S-3-methyl-pent-2-enolactona (SV). It is concluded that *P. citrinum* secretes metabolites with antifungal activity to *A. niger*. Studies are necessary to determine the active substances of each extract and their antimicrobial action.

Keywords: Biocontrol, phytopathology and bioactive compounds.

INTRODUÇÃO

O cultivo do sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) representa importante segmento econômico para o Nordeste brasileiro, devido a geração de renda e emprego em regiões do semiárido. O Brasil é o maior produtor mundial, sendo a região nordeste a única produtora nacional. Os estados produtores de sisal no Brasil são: Paraíba, Rio Grande do Norte e a Bahia, sendo o estado da Bahia responsável por aproximadamente 94% da produção nacional (SINDIFIBRAS, 2013; ADAB, 2013).

O sisal nos estados da Bahia e Paraíba vem sendo afetado pela podridão vermelha do caule de sisal que se constitui num dos fatores responsáveis pelo declínio desta cultura no Brasil (ABREU, 2010). Esta patologia inviabiliza o desfibramento das folhas e causa a morte das plantas, ocasionando a destruição de extensas áreas de plantio de sisal. A prevalência desta doença na região semiárida da Bahia é de 100% e a incidência média varia de 5 a 40%, nas regiões de cultivo (ABREU, 2010). Dentre os sintomas característicos da doença tem-se o escurecimento dos tecidos internos do caule, que evolui para uma descoloração avermelhada dos tecidos e apodrecimento do caule. As plantas murcham e as folhas tornam-se amareladas. Devido ao apodrecimento do caule, a planta morre e tomba (LIMA, 1998).

O agente causal da podridão vermelha do sisal é o *Aspergillus niger*, um fungo mitospórico e saprófita ou parasita fraco. Este micro-organismo está naturalmente presente no solo, fato que dificulta seu controle por métodos mais usuais como o uso de agrotóxicos.

O controle biológico, por meio da utilização de micro-organismos antagonistas para o controle de patógenos veiculados ao solo tem demonstrado ser uma alternativa viável e de baixo custo para a redução da população e do potencial de inóculo do patógeno, com conseqüente redução da incidência da doença (MICHEREFF, 2008).

Experimentos realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB têm demonstrado a inibição de *A. niger* por fungos como *Penicillium citrinum*, sugerindo assim, que este micro-organismo é um provável agente antagônico a

este patógeno do sisal e potencial agente de controle biológico (DAMASCENO, 2012).

O primeiro capítulo deste trabalho aborda aspectos gerais da cultura sisaleira, classificação botânica, importância socioeconômica, aspectos fitossanitários, principalmente a podridão vermelha causada por *Aspergillus niger*, além de estratégias para biocontrole desta doença, tais como metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de sisal.

O segundo capítulo apresenta a atividade antifúngica dos extratos e frações obtidos do micélio e filtrado de *P. citrinum* avaliada em dez isolados de *A. niger*. Esses isolados de *A. niger* oriundos de diferentes áreas produtoras de sisal foram testados quanto a inibição da germinação de esporos e do crescimento micelial por diferentes concentrações dos extratos e frações de *P. citrinum*.

Na temática do terceiro capítulo encontra-se o estudo relativo à constituição química de metabólitos produzidos por *Penicillium citrinum*, fungo antagônico ao *Aspergillus niger* e endofítico de sisal. Os extratos resultantes de extração com solventes orgânicos do micélio e filtrado obtidos do cultivo de *P. citrinum*, foram analisados por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas usuais da química de produtos naturais, tendo como resultado o isolamento de cinco metabólitos.

O objetivo deste trabalho foi o isolamento e identificação de metabólitos de *P. citrinum*, no intuito de testá-los na inibição do patógeno da podridão vermelha do sisal *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO 1

Controle biológico de *Aspergillus niger*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) e produção de metabólitos por *Penicillium citrinum*

RESUMO

DAMASCENO, C. L. **Controle de *Aspergillus niger*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) com extratos de *Penicillium citrinum***

A produção de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) representa importante segmento econômico para o Nordeste brasileiro, garantindo a geração de renda e emprego na região semiárida da Bahia e Paraíba. O Brasil é o maior produtor mundial, sendo a região nordeste a única produtora nacional. O desempenho da cultura do sisal nos estados como a Bahia e Paraíba, vem sofrendo queda de área plantada e produtividade. A podridão vermelha do caule de sisal constitui-se um dos fatores responsáveis pelo declínio desta cultura. Esta patologia inviabiliza o desfibramento das folhas e causa a morte das plantas, ocasionando a destruição de extensas áreas de plantio de sisal. Os sintomas característicos da doença são o amarelecimento e murcha das folhas, o escurecimento dos tecidos internos do caule, que evolui para uma descoloração avermelhada dos tecidos, o apodrecimento do caule e morte da planta, com o seu tombamento no campo. O agente causal da podridão vermelha do sisal é o *Aspergillus niger*, um fungo mitospórico, saprófita, cosmopolita, naturalmente presente no solo, tornando-o de difícil controle por métodos usuais. O controle biológico por meio da introdução de micro-organismos antagonistas para o controle de patógenos veiculados ao solo, tem demonstrado ser uma alternativa viável e de baixo custo para a redução da população e do potencial de inóculo do patógeno, com consequente redução da incidência da doença. Experimentos realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB têm demonstrado a inibição de *A. niger* por fungos do gênero *Penicillium*, conhecidos pela produção de metabólitos bioativos.

Palavras-chave: Cultura sisaleira, fitopatologia, substâncias bioativas.

ABSTRACT

DAMASCENO, C. L. **Control of *Aspergillus niger*, etiologic agent of red rot of sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) and production of metabolites by *Penicillium citrinum*.**

Sisal cultivation (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) represents an important economic sector in the Brazilian Northeastern region, generating income and employment in the semiarid regions. Brazil is the world's largest sisal producer, with the northeast being the only national producer. Sisal yields and planted areas in States of Bahia and Paraíba have been declining, and sisal red rot disease is pointed out as being one of the factors responsible for this decline. Plant leaves become inappropriate for decortication and fibre extraction and this disease causes plant death, with the destruction of large areas of sisal plantations. The characteristic symptoms are leaf yellowing and wilt, darkening of the internal tissues of sisal stem which evolves for tissue discoloration and redness, stem rot and plant death. The causing agent of sisal red rot disease is *Aspergillus niger*, a mitosporic, saprophytic and cosmopolitan fungus that is naturally present in the soil and difficult to control by conventional methods. Thus, biological control through the introduction of antagonist microorganisms can be a viable and cost effective method to reduce the population and the potential pathogen inoculum, with consequent reduction in the incidence of this disease. Experiments conducted in the laboratory of Agricultural Microbiology UFRB have demonstrated the antagonistic effect on *A. niger* by *Penicillium citrinum*, known for the production of bioactive metabolites.

Keywords: Culture sisal, antagonism, phytopathology, bioactive substances.

REVISÃO DE LITERATURA

Sisal

O sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) é uma planta monocotiledônea, da série Liliiflorea, família Agavaceae, subfamília Agavoidea, gênero Agave, subgênero Euagave (MEDINA, 1954). Nativo da América Central, suas fibras eram utilizadas desde os tempos pré-colombianos. Entretanto, em 1880 o desenvolvimento e comercialização da “máquina de amassar grãos” (*the machine grain binder*), patenteada nos Estados Unidos em 1892, possibilitou o atendimento à demanda por fios de baixo custo e, como consequência, aumentou o interesse pela utilização da fibra de sisal e também pela introdução e estabelecimento desta cultura em outros países (EB, 2014).

As folhas de sisal dão origem a principal fibra dura produzida no mundo, com importante relevância na indústria farmacêutica, automobilística e na construção civil. Contudo, existem outros produtos em que o sisal pode ser utilizado, tais como: tecidos, cordas, carpetes, revestimento para paredes e geotêxteis, polpa e mucilagem para papel, alimentação animal e fios de qualidade (SILVA et al., 1999).

No Brasil, o sisal foi introduzido por volta de 1903, no estado da Paraíba e no final da década de 30, na Bahia (SUINAGA et al., 2008). Entretanto, em 1930, já era cultivado em Angola, Haiti, Indonésia, Madagascar, Moçambique, Quênia, Taiwan, Venezuela e outras localidades na África e nas Filipinas (EB, 2014).

Atualmente, o Brasil é o maior exportador de sisal do mundo, apresentando uma produção anual de aproximadamente 263 mil toneladas, correspondendo a mais de 50 % da safra mundial (IBGE, 2014). A produção brasileira concentra-se na região Nordeste, nos estados da Bahia, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará e a Bahia é o principal estado produtor, contribuindo com 94 % da produção nacional.

A região sisaleira no Semiárido baiano é constituída por 20 municípios com uma população de aproximadamente 570.720 habitantes, dos quais, em torno de 59 % vivem na área rural (Figura 1) (SEBRAE, 2009; IDR, 2013; SEAGRI, 2011). Essa cultura tem enorme relevância socioeconômica para a sobrevivência da população rural e urbana dessa região, por exigir grande volume de mão de obra,

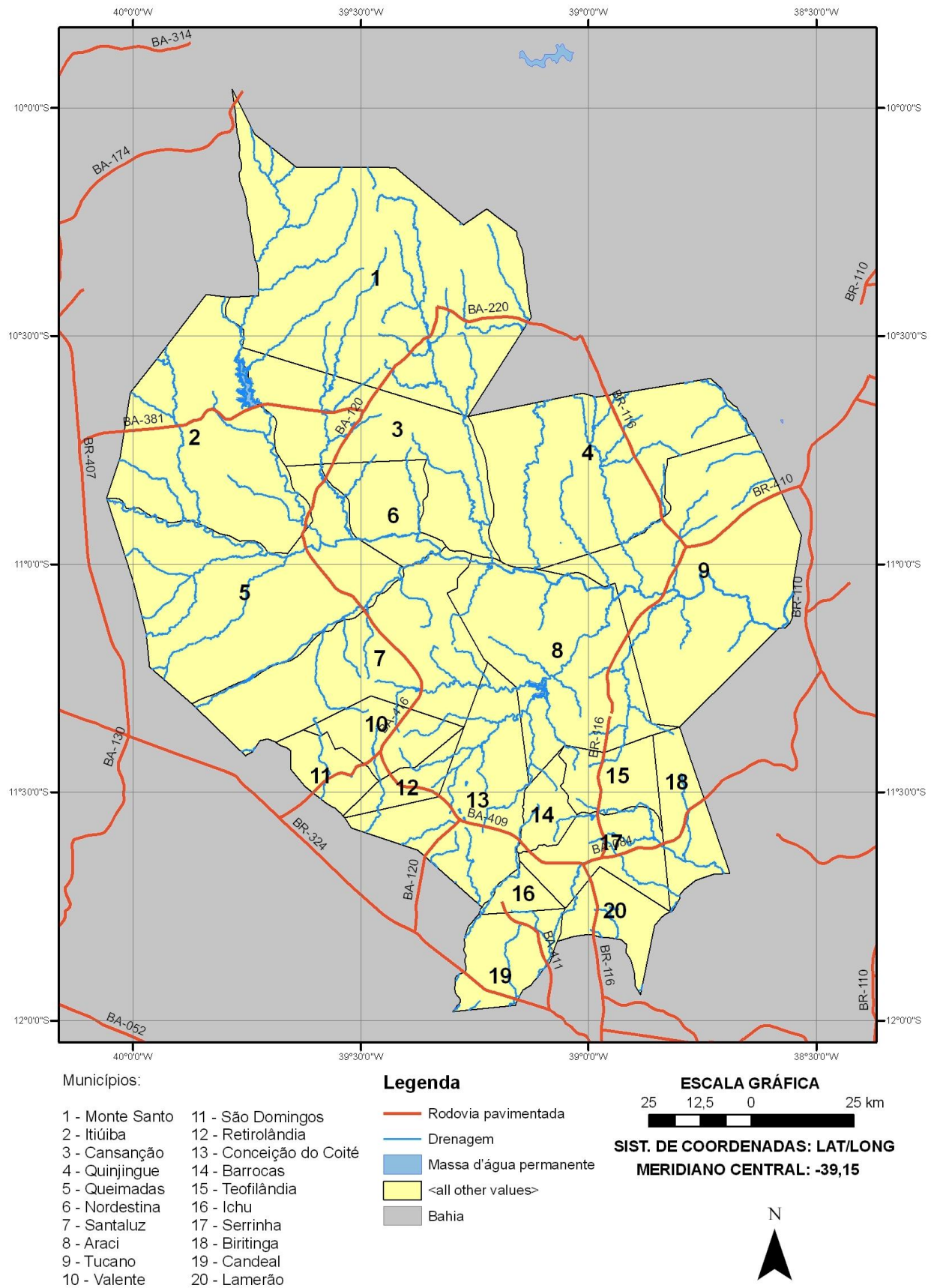
desde a manutenção das lavouras, extração e processamento da fibra para o beneficiamento, até as atividades de industrialização de diversos produtos e produção de artesanato, abrindo um mercado de trabalho que envolve aproximadamente 800 mil pessoas (CNA, 2010).

A cultura do sisal é imprescindível para a região semiárida da bahia e, conseqüentemente, para a economia brasileira, em função da geração de renda nesta região, na qual as condições edafo-climáticas limitam as alternativas de produção agrícola (ADAB, 2013). Por ser cultivado principalmente por agricultores familiares, o sisal tem uma enorme importância socioeconômica, sendo a produção de fibras de sisal fundamental para evitar o êxodo rural e garantir uma fonte de renda nessas regiões semiáridas (SUINAGA et al., 2006).

O sisal desenvolve-se em altitudes de 200 a 800 m acima do nível do mar, temperatura média entre 20 e 28°C, precipitação pluvial entre 600 e 1.500 mm.ano⁻¹ e solos silicosos, sílico-argilosos, permeáveis, de fertilidade média, com pH de 5,0 a 8,0, fazendo com que se estabeleça na região semiárida (SILVA, 1999).

A *Agave sisalana* apresenta características fisiológicas como epiderme cutinizada, redução do número de estômatos, folhas rígidas, carnosas, suculentas e lisas que permitem a adaptação nestas regiões (MEDINA, 1954). O sisal, monocárpico, floresce apenas uma vez, ao fim de seu ciclo vegetativo, emitindo o pendão, que os agricultores denominam de flecha (ALVES et al., 2004). Esta planta apresenta metabolismo fotossintético do tipo CAM (Crassuláceas Acid Metabolism – CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas)), seus estômatos abrem-se à noite, de forma a reduzir a perda de água por transpiração (BELTRÃO, 2006). Tais características tornam o sisal uma espécie semi-xerófila, adaptada à região Semiárida, além de conferir uma barreira natural contra a infecção por micro-organismos, o que a torna resistente ao ataque de pragas e doenças (SOUZA, 2010; COUTINHO et al., 2006).

Figura 1. Território do Sisal na Bahia (IBGE, 2007, citado por AGEITEC, 2014).



Apesar de ser resistente a diversas pragas e doenças, o sisal pode ser afetado por diversos patógenos que prejudicam a sua produção (BOCK, 1965). Dentre as doenças que afetam esta planta, somente duas foram descritas até o momento no Brasil: a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum agaves* (MEDINA, 1954), a qual não tem apresentado importância econômica, e a podridão vermelha do tronco, ou simplesmente podridão do tronco do sisal (LIMA et al., 1998), que vem afetando isoladamente a cultura do sisal desde 1970, nos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, sendo considerada a mais danosa para esta cultura, a partir de 1998 (SUINAGA et al., 2006).

Apesar de sua importância econômica, a cultura sisaleira tem declinado em termos de produção (OLIVEIRA, 2010). Diversos fatores, como: baixo índice de aproveitamento da planta de sisal, concorrência com as fibras sintéticas, problemas no beneficiamento e comercialização da fibra, tecnologia inadequada para produção, além de problemas fitossanitários como a podridão vermelha tem sido apontados como responsáveis por tais reduções significativas em área cultivada e produtividade do sisal (OASHI, 1999; SUINAGA et al., 2006; BATISTA, 2010; ALVES et al., 2004).

Podridão vermelha do caule de sisal

A doença conhecida como podridão vermelha do tronco ou caule de sisal, apresenta incidência variando de 5 a 40% nos sisalais brasileiros (ALVES et al., 2004; ABREU, 2010). Apesar das incertezas quanto ao ciclo e etiologia da doença, diferentes fungos já foram relatados causando podridões ao sisal: *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Aspergillus niger* (BOCK, 1965; LIMA et al., 1998; IKITOO e KHAYRALLAH, 2001). Esses micro-organismos são classificados como saprófitas ou parasitas fracos, pois em geral, dependem de condições ambientais e fisiológicas adversas ao hospedeiro, para dar início ao processo de infecção. No Brasil, somente foram relatados *L. theobromae* e *A. niger*, como patógenos de sisal (LIMA et al., 1998). Entretanto, o agente causal da podridão vermelha do sisal foi descrito como *A. niger* (LIMA et al., 1998, SOARES et al., 2006).

A podridão vermelha do caule de sisal se caracteriza por ocasionar escurecimento dos tecidos internos do tronco de sisal; as áreas acometidas apresentam coloração variando do cinza-escuro ao rosa pálido e as lesões se estendem da base das folhas à base do tronco da planta (LIMA et al., 1998). Em plantas com estádios avançados da doença, as folhas murcham, se tornam amareladas e o tronco inteiramente apodrecido. A podridão do tronco afeta plantas de sisal em todos os estádios fenológicos, desde rebentos a plantas no final do ciclo (SUINAGA et al., 2006; BOCK, 1965).

Após a infecção do hospedeiro e tempo de incubação, são percebidos os seguintes sintomas: amarelecimento e murcha das folhas, com a descoloração avermelhada do caule até a base das folhas e posterior apodrecimento deste, causando o desprendimento do solo e morte da planta (SÁ, 2009). As folhas murchas não servem para o desfibramento e comercialização da fibra. A doença afeta as plantas em todos os estádios fenológicos, desde rebentos a plantas adultas (ADAB, 2013).

***Aspergillus* spp.**

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez pelo botânico italiano Pier Antonio Micheli em 1729. Derivada do latim, a denominação “*asperger*”, é atribuída a aparência do conidióforo com o aspersório instrumento usado para aspergir água benta em cerimônias religiosas (AL-DOORY & WAGNER, 1985; BURKE & COLTMAN, 1971; BUCKINGHAM & HANSELL, 2003). Tom e Church (1926) divulgaram esse gênero por meio de uma monografia, tornando as espécies pertencentes a ele mais conhecidas e estudadas. Rapper e Fennel em 1965 realizaram uma descrição completa deste gênero, que possuía cerca de 132 espécies e 18 variedades (BENNETT, 2010; GEISER et al., 2007).

Atualmente, o gênero *Aspergillus* comporta de 260 a 837 espécies (GEISER et al., 2007, SAMSON & VARGA 2009; HAWKSWORTH 2011), são pertencentes a ordem Moniliales, difundidos em todo o mundo e comumente encontrado no solo (MORAES et al., 1997). Estes fungos não são considerados seletivos em termos de condições abióticas de desenvolvimento, entretanto, as condições ótimas de crescimento são, temperatura de 35 a 37°C, pH entre 1,4 e 9,8. Tais características

aliadas a alta taxa de produção de conidiósporos e facilidade de dispersão pelo ar, garantem que esses micro-organismos estejam presentes em ampla gama de ambientes (RIPPEL & BALDES 1955, citados por DEEPAKE, 2009).

Aspergillus spp. provocam doenças em diversas plantas e produtos vegetais, sendo que podem contaminar produtos agrícolas em diferentes fases, incluindo pré-colheita, colheita, processamento e manuseio. Entretanto, na maioria das vezes, não são considerados os agentes etiológicos principais (PERRONE et al., 2007). Em geral, são relatados como causadores de doenças pós-colheita, frequentemente podridões em: uva, figo, milho e cebola (NUNES et al., 1997; SANTIN et. al., 2004). Podem ocasionar a “Kernel rot” em caju, a qual afeta os frutos ainda verdes levando à podridão seca da amêndoa (MELLO et al., 1999). Em amendoim, provocam a podridão do colo, principalmente em solos com baixos teores de matéria orgânica (MORAES et al., 1997 citado por ABREU, 2010).

Esses fungos, de forma geral, são classificados como saprófitas ou parasitas fracos considerados oportunistas, sendo dependentes de condições ambientais e fisiológicas adversas ao hospedeiro para iniciar o processo de infecção (LIMA et al, 1998). *Aspergillus* spp. produz enzimas hidrolíticas que desintegram componentes celulares das plantas, podendo também secretar toxinas e assim resultar em morte e degradação das células do vegetal parasitado (AGRIOS, 2005).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* também são capazes de ocasionar enfermidades em animais, tais patologias são denominadas aspergiloses, sendo que a forma mais comum é a pulmonar (SÁNCHEZ e VIÑA, 2004). Essa infecção é resultado da inalação dos esporos presentes no ar (especialmente em ambientes úmidos), que se depositam no aparelho respiratório. Entretanto, propágulos de *Aspergillus* também podem ser encontrados em alimentos, solos e piscinas, além de restos orgânicos em putrefacção, poeiras, alimentos e sistemas de ventilação (RICHARDSON e JOHNSON, 2000). As espécies que mais frequentemente causam essas doenças são: *A. fumigatus* (75-85 %), *A. flavus* (5-10 %), *A. niger* (1,5-3 %) e *A. terreus* (2-3 %) (SÁNCHEZ e VIÑA, 2004).

De maneira geral, manifestações clínicas da aspergilose são dependentes de fatores como: virulência do fungo, intensidade de exposição, estado imunológico do doente e presença de patologia pulmonar anterior (SÁNCHEZ e VIÑA, 2004). Em indivíduos saudáveis, a inalação na maioria dos casos não é suficiente para

provocar doença (CARREIRA et al, 2011).

Dentre as espécies do gênero, *A. niger* é considerada a mais amplamente utilizada em processos biotecnológicos e vem sendo objeto de pesquisas e processos industriais, como produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico (SCHUSTER et al., 2002). Esse micro-organismo é também o único cujas enzimas tem o "status de GRAS" (geralmente considerado como seguro) pelo "Food and Drug Administration" (SILVA et al, 2011; SCHUSTER et al, 2002).

Controle Biológico

A podridão vermelha do caule de sisal é uma doença que tem ameaçado a sustentabilidade da cultura do sisal nos estados da Bahia e Paraíba, e apresenta capacidade destrutiva por causar a morte da planta, tornando as folhas inadequadas ao desfibramento. Até o momento, não existe tratamento curativo para esta fitopatologia, somente medidas preventivas para o manejo da doença (SUINAGA ET AL., 2006). De tal modo, definir meios de controle desta doença faz-se imprescindível para tornar possível a continuidade do cultivo de sisal.

Controle é a prevenção dos prejuízos de uma doença (WHETZEL et al., 1925, citado por BERGAMIN et al, 1997). Como estratégias de controle de doenças, podem ser usados agrotóxicos, prática bastante difundida atualmente, por proporcionar eficiência e produtividade. Entretanto, tais químicos afetam toda a comunidade microbiana no solo e provocam contaminações e problemas ambientais por acumularem-se na cadeia alimentar e ocasionar forte pressão de seleção que acarreta no surgimento de micro-organismos resistentes (FRANCESCHINI et al., 2001).

São escassos os produtos químicos registrados, no caso de patologias atribuídas a fungos habitantes de solo. Além disso, tais micro-organismos possuem mecanismos de sobrevivência e podem permanecer bastante tempo viáveis no solo (AZEVEDO, 2004).

O controle biológico constitui-se em potencial alternativa, dentre às estratégias de controle da podridão do caule do sisal, por ser considerado um método de baixo custo e menos prejudicial ao meio ambiente quando comparado ao controle químico.

De acordo à definição clássica proposta por Baker e Cook em 1974, o controle biológico é a diminuição da densidade de inóculo ou dos fatores determinantes da doença, provocada por um ou mais patógenos ou parasitas em estado de atividade ou dormência, sendo realizado naturalmente ou por manipulação ambiental, do hospedeiro ou do antagonista, ou ainda através da introdução em massa de um ou mais antagonistas (BERGAMIN et al., 1995).

De tal modo, antagonistas naturais são espécies ou raças apatogênicas que se adaptam às mesmas condições ambientais do patógeno e que podem ser utilizados para reduzir a população do patógeno (afetando seus processos vitais), de forma a diminuir a fonte de inóculo e infecção para os hospedeiros, ocasionando ainda, menos prejuízos ambientais, em comparação aos métodos químicos (MICHEREFF, 2008; GIROTTO et al., 2008).

Segundo Michereff (2008), antagonistas ou agentes de controle biológico podem agir por meio de: antibiose, na qual metabólitos secretados pelo antagonista afetam negativamente o patógeno, inibindo-o; competição, quando os micro-organismos competem entre si por recursos do ambiente; parasitismo, onde um dos organismos se nutre do outro, atacando assim suas estruturas; hipovirulência, que funciona por meio da transmissão de caracteres de uma linhagem do patógeno menos agressiva para uma causadora de doenças; predação, na qual o antagonista usa o patógeno e outros organismos como fonte de alimento e a indução de resistência, quando a introdução do antagonista ou de seus metabólitos provoca o desenvolvimento de defesa no hospedeiro.

Dentre os micro-organismos eficientes utilizados para controle biológico no Brasil, tem-se como o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (controle de insetos da cana de açúcar e soja), *Trichoderma* spp. (controle da vassoura de bruxa na cultura do cacau), *Acremonium* spp. (com aplicação na lixa do coqueiro), além de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (NETO, 2002; BETTIOL, 2009).

Em trabalhos realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, com o objetivo de isolar *A. niger* à partir de plantas de sisal com sintomas da podridão vermelha, várias plantas de sisal apresentaram o crescimento exclusivo de *Penicillium citrinum*, quando fragmentos dos tecidos das plantas foram desinfestados e colocados em placas de Petri com meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA) (dados não publicados). Estas observações levaram a formulação das

seguintes hipóteses: 1) *Penicillium citrinum* é também o agente causal da doença; 2) *Penicillium citrinum* pode estar agindo em sinergia com *A. niger*, causando sintomas de podridão vermelha do sisal; 3) *Penicillium citrinum* inibe o crescimento de *A. niger*, sendo nesta última situação um micro-organismo antagônico ao patógeno e potencial agente de controle biológico.

Neste sentido, o uso de micro-organismos antagonistas, como *P. citrinum*, endofítico de sisal e adaptado às condições da região semiárida, ou ainda a utilização de metabólitos produzidos por este fungo, podem constituir-se em alternativas para o controle biológico desta doença no sisal.

Gênero *Penicillium* no controle biológico

Penicillium spp. apresenta-se como um grupo de fungos, em maioria filamentosos, encontrados comumente na vegetação em decomposição, no solo e no ar (SAMSON e FRISVAD, 2011; MEMBRILLERA, 1950). Estes micro-organismos pertencem ao filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes* e a ordem *Eurotiales* (NCBI, 2010; PALLU, 2010).

Este gênero de fungos divide-se em quatro subgêneros: *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* e *Furcatum*, os quais diferem entre si por meio de características como: o número de verticilos (pontos de ramificação) entre a fiálide e o estipe; forma e tamanho das fiálides; tamanho, cor e ornamentação dos conídios; textura da estipe, ramos e métulas (PITT, 1998, citado por CARDOSO et al., 2007; SERRA, 2005).

Espécies do gênero *Penicillium* têm sido relatadas em alguns estudos como importantes agentes de biocontrole, tais como: *Penicillium* spp. que apresentou antagonismo contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco em pepineiros (ETHUR et al., 2005), *Penicillium pinophilum*, antagonista à *Rhizoctonia solani* (STEFANO et al., 1999), *P. striatisporum* que afetou significativamente o crescimento micelial de *Phytophthora* spp., *Cladosporium cucumerium* e *Sclerotinia sclerotiorum* (MA, 2008), *P. oxalicum* com efeito antagônico à *Alternaria alternata*, fungo patogênico à cultura do arroz, micoparasitando-o e desintegrando os conídios e conidióforos (SEMPERE e SANTAMARINA, 2010). *Penicillium citrinum* apresentou notável atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* frente à *Phytophthora*

palmivora, agente causal da podridão parda do cacauzeiro (BASTOS, 1987). Sequeira et al. (2009) se depararam com a atividade antimicrobiana de *Penicillium* spp. contra bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus aureus*.

Produção de metabólitos secundários por fungos do Gênero *Penicillium*

Os metabólitos secundários, grupo de compostos bastante estudados na área de química de produtos naturais, são definidos como substâncias de baixo-peso-molecular, frequentemente bioativas (KELLER et al., 2005).

Segundo Madigan et al, (2010), metabólitos secundários somente são sintetizados por micro-organismos próximo ao final da fase de crescimento ou na fase estacionária de crescimento. Tem-se como principais características dos metabólitos secundários a não essencialidade ao crescimento e reprodução; síntese dependente das condições de cultivo (fontes de carbono, açúcares, nitrogênio, etc); produção em grupos de compostos relacionados entre si; possibilidade de superprodução; sintetização frequentemente associada a micro-organismos produtores de esporos, além de restrita distribuição taxonômica, sendo cada metabólito produzido por um grupo pequeno de organismos (MADIGAN et al., 2010; KELLER et al., 2005).

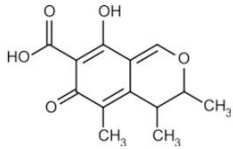
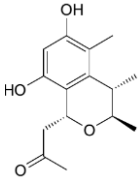
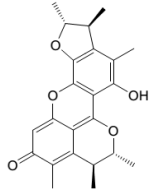
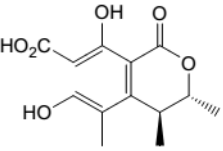
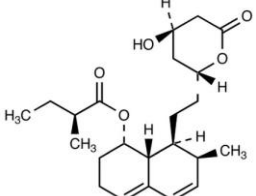
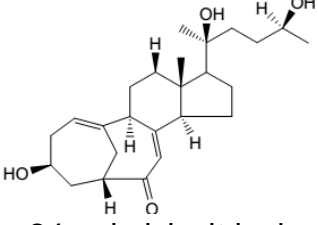
Fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela capacidade de produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, como por exemplo: alcalóides, terpenóides, peptídeos, dentre outros e, também, enzimas extracelulares, como as pectinases, utilizadas na indústria de suco de laranja (SARGO, 2009; GRASSIN, 1996, citado por CARDOSO et al., 2007). Estas substâncias podem ser aplicadas em diversos setores da ciência, como o controle biológico, fonte de fármacos, antiparasíticos, antibióticos e imunossupressores (ALECRIM, 2007).

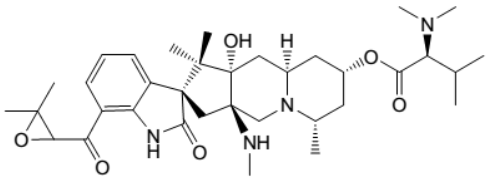
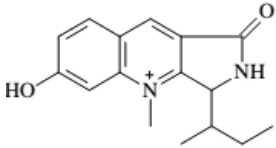
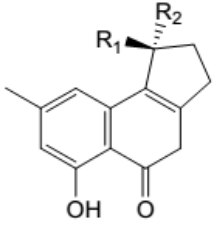
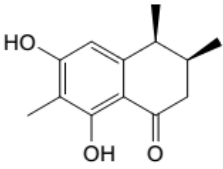
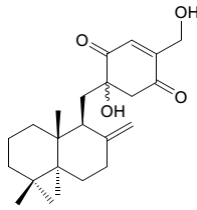
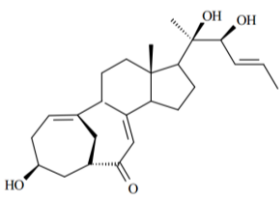
Como exemplo mais difundido desses antibióticos, tem-se a penicilina, substância descoberta acidentalmente em 1928 por Alexander Fleming, a qual foi isolada do *Penicillium notatum* e, atualmente, possui notável importância para a indústria médica e farmacêutica, na ação a diversos agentes infecciosos (FERRARONI e GRUMACH, 2006).

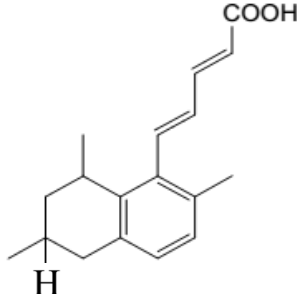
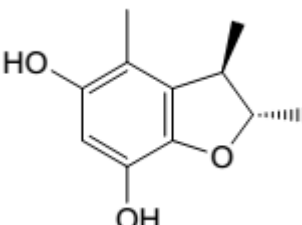
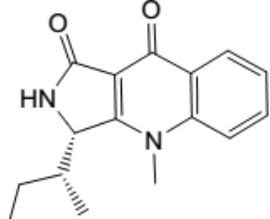
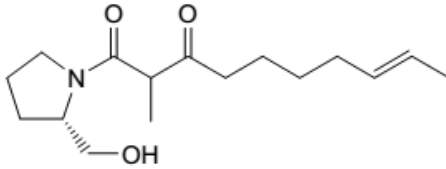
Em meio as espécies de *Penicillium* spp., *P. citrinum* tem sido comumente relatado por ser encontrado em diferentes condições ambientais, variando de sedimentos congelados à solos agrícolas e de florestas tropicais, além do ar, rizosfera e água com ocorrências dessa espécie em diferentes países (DUTTA et al., 2007; MUILENBERG et al., 1990; WEI et al., 1993; SHOKRI et al., 2010; XU et al., 2006). Esse grupo de fungos é também considerado um dos mais estudados, tendo ganho maior importância após a descoberta da citrinina, que é um metabolito secundário tóxico, e outros metabólitos secundários (Tabela 1) (KHOSRAVI et al., 2012).

Este trabalho tem por objetivo isolar e identificar de metabólitos produzidos por *Penicillium citrinum*, os quais deverão ser testados quanto à inibição de *Aspergillus niger*, fungo patogênico, agente causal da podridão vermelha do sisal.

Tabela 1. Substâncias isoladas de *Penicillium citrinum*.

Estrutura	Classe	Atividade	Referência
 <p>Citrinina</p>	Policetídio	Antibiótica	MALMSTRØM, 2000
 <p>Penicitrinol C</p>	Policetídio	Citotóxica	CHEN et al., 2011
 <p>Penicitrinona A</p>	Policetídio	Não demonstrou atividade antimicrobiana	WAKANA et al., 2006
 <p>Descarboxidiidrocitrinina</p>	Policetídio	Não relatado	CLARCK et al., 2006; WAKANA et al., 2006
 <p>Compactin</p>	Policetídio	Antifúngica e inibidora competitiva da enzima Co A reductase	SYED et al., 2013
 <p>24-epi-ciclocitrinol</p>	Esteróide	Não relatado	DU et al., 2008

 <p>Citrinadina A</p>	Alcalóide	Não relatado	TSUDA et al., 2004
 <p>Quinocitrinina</p>	Alcalóide	Antibiótica	KOZLOVSKY, 2003
 <p>Citrinolactonas</p>	Não relatado	Reguladores no crescimento de plantas	KURAMATA et al., 2007
 <p>Esclerotinina C</p>	Não relatado	Reguladores no crescimento de plantas	KURAMATA et al., 2007
 <p>Penicilliumina A</p>	Quinona	Citotóxica	LIN et al., (2012)
 <p>Isoclocitrinol A</p>	Esteróide	Antibacteriana	AMAGATA et al., 2003

 <p>Ácido tanzawáico A</p>	<p>Não relatado</p>	<p>Inibidor da produção do ânion superóxido</p>	<p>MALMSTRØM, 2000; KURAMOTO et al., 1997.</p>
 <p>2,3,4-trimetil-5,7-diidroxi-2,3-diidrobenzofurano</p>	<p>Não relatado</p>	<p>Antioxidante</p>	<p>CHEN et al., 2002</p>
 <p>Quinolactacinas A</p>	<p>Não relatado</p>	<p>Inibição da enzima acetilcolinesterase</p>	<p>KIM et al., 2001</p>
 <p>Scalusamidas A</p>	<p>Amida pirrolidínica</p>	<p>Não relatado</p>	<p>TSUDA et al., 2005</p>

REFERÊNCIAS

ABREU, K.C.L. de M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2010.

ADAB. **Podridão Vermelha do Sisal**. Disponível em:<http://www.adab.ba.gov.br/modules/mastop_publish/?tac=168> (Acesso em: novembro de 2013).

AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Árvore do conhecimento, Território Sisal**. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_sisal/Abertura.html> (Acesso: maio de 2014).

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 922p , 2005.

ALDOORY Y. **The mycology of the Aspergilli**. In: Aldoory Y, Wagner G.E. (Eds.). *Aspergillosis*. Charles C Thomas, Springfield.:7-24,1985.

ALECRIM, M. M.; SOUZA, T. C. de; TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. de A. **METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO GÊNERO *Penicillium* PROMOVEDO ANTAGONISMO FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS, Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC**, FAPEAM, Universidade Federal do Amazonas, 2007.

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro no nordeste Brasileiro**. Documentos do Etene (Escritório técnico de recursos socioeconômicos do Nordeste), vol. 4, Fortaleza: Banco do Nordeste, 2004

AMAGATA, T.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.;VALERIOTE, F.A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; CREWS, P. Unusual C25 steroids produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*. **Organic letters**, 2003, Vol.5(23), pp.4393-6.

AZEVEDO, L. A. S. de. **Danos ocasionados por fungos e as estratégias de controle**. [2004]. Disponível em:<<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/pdfs/danfungos.pdf>> (Acesso em: novembro de 2013)

BASTOS, C.N. Ação antibiótica de metabólitos de *Penicillium citrinum* Thom. Sobre *Phytophthora palmivora* (Buti.) Buti. **Revista Theobroma** 17(1): 31-37, Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil, 1987.

BATISTA, D. DA C.; SILVA, F. M.; SOUZA, W. C. O. DE; BARBOSA, M. A. G.; COSTA, V. S. DE O.; BRANDÃO, W. N.; TERAQ, D. **Manejo da Podridão Vermelha do Tronco do Sisal**, Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, Dezembro, 2010 (Circular técnica on-line ISSN 1808-9976)

BELTRÃO, N.E.M. **A planta**. In: ANDRADE, W. (Ed.). O Sisal do Brasil. 1. ed. Salvador: SINDIFIBRAS; Brasília: APEX-Brasil, p.25-28,. 2006.

BENNET, J. W. **An Overview of the Genus *Aspergillus***, 2010. Disponível em: <<http://www.open-access-biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2012.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Bioncontrole de doenças de plantas: usos e perspectivas**. Embrapa meio ambiente, Jaguariúna, SP, 2009. 341p.

BOCK, K. R. Diseases of sisal. **World Crops**, v.17, n.1, p.64-67, 1965.

BURKE, P.S.; COLTMAN, C. A. Jr. Multiple pulmonary aspergillomas in acute leukemia. **Cancer**,28:1289-92, 1971.

BUCKINGHAM, S. J., HANSELL, D. M. *Aspergillus* in the lung: diverse and coincident forms. **European radiology**, 2003;13:1786-800.

CARDOSO, P.G.; QUEIROZ, M.V. de; PEREIRA, O.L.; ARAÚJO, E.F. de. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology** (2007) 38:71-77, Viçosa - MG. ISSN 1517-8283.

CARREIRA, S.; LOPES, A.; PINTO BASTO, R.; FARIA, I.; PONTES DA MATA, J. Aspergilose pulmonar necrotizante: a propósito de dois casos clínicos. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, 2011;17:80-4

CHEN, L.; LIU, W.; HU, X.; HUANG, K.; WU, J.; ZHANG, Q. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 515-517, 2011.

CHEN, C.; SHAW, C.; CHEN, C.; TSAI, Y. 2,3,4-trimethyl-5,7-dihydroxy-2,3-dihydrobenzofuran, a novel antioxidant, from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, p. 740-741, 2002.

CLARK, B. R.; CAPON, R. J. LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Citrinin revisited: from monomers to dimmers and beyond. **Organic Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 4, p. 1520-1528, 2006.

CNA. **Sisal: problemas e soluções.** Disponível em: <<http://www.cna.org.br/Indice%20Assuntos/sisal1.htm>>. Acesso em: 20/08/2010.

COUTINHO, W.M.; LUZ, C.M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O.F.E.; SUINAGA, F.A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, EMBRAPA, novembro/2006

DAMASCENO, C. L. **Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal.** Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, 2012.

DEEPAKE, U. Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators**, v. 19, 2009.

DU, L.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. Unusual C25 steroid isomers with bicyclo[4.4.1]A/B rings from a volcano ash-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, p. 1343-1351, 2008.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2007;35:275-82.

EB - Encyclopaedia Britannica Online: Academic Edition. "**Sisal.**" Inc., 2014. Web. 02 Apr. 2014. <<http://www.britannica-com.ez1.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/546658/sisal>>.

ETHUR, Luciana Zago ; BLUME, E. ; MUNIZ, Marlove Fátima Brião ; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da ; STEFANELO, Daniela R ; ROCHA, Edileusa K . Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FRANCESHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M. V. da; DUTRA, V.; NAKAZOTO, L.; CASTRO, L.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, nº23, novembro/dezembro, 2001.

FERRARONI, N. R.; GRUMACH, A. S. O PAPEL DA PENICILINA NA MEDICINA MODERNA. **DST – Jornal brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis**, 18(1): 7-13, SP, 2006

GEISER, D. M et al. The current status of species recognition and identification. In *Aspergillus*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, p. 1-10, 2007.

GIROTTI, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M.F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódico Semestral.

HAWKSWORTH, D. L. **A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names**, 2011.

IBGE, 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**, Rio de Janeiro v.27 n.01 p.1-85 janeiro, 2014. ISSN 0103-443X.

IDR (Instituto de desenvolvimento da região do sisal). **Cadeia Produtiva de Sisal**. Disponível em:<<http://www.idrsisal.org.br/sisal/17.php>> (Acesso em: 20/08/2013)

IKITOO, E.C.; KHAYRALLAH, W.A. Sisal: Past research results and present production practices in East Africa – present status, problems, opportunities and future prospects. Vienna: United Nations Industrial Development Organization, Common Fund for Commodities. **Technical Paper** no. 8, 2001.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology** 3, 937-947, December, 2005. doi:10.1038/nrmicro1286

KIM, W. G.; SONG, N. K.; YOO, I. D.; Quinolactacins A1 and A2, new acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium citrinum*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 54, p. 831-835, 2001.

KHOSRAVI, A.R.; SHEIKHKARAMI, M.; SHOKRI, H.; SABOKBAR, A. Genetic Variability of Citrinin-Producing *Penicillium Citrinum* Strains as Occupational Health Hazards in Northern Iran. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, [S.I.], v. 63, n. 4, dec. 2012.

KOZLOVSKY, A.G.; ZHELIFONOVA, V.A; ANTIPOVA, T.V; ADANIN, V.M.; OZERSKAYA, S.M., KOCHKINA, G.A.; SCHLEGEL, B.; DAHSE, H.M.; GOLLMICK, F.A.; GRÄFE, U.; Quinocitrinines A and B, new quinoline alkaloids from *Penicillium citrinum* Thom 1910, a permafrost fungus. **The Journal of Antibiotics**, 56(5), p.488-491, 2003.

KURAMATA, M.; FUJIOKA, S.; SHIMADA, A.; KAWANO, T.;KIMURA, Y. Citrinolactones A, B and C, and scleritin C, plant growth regulator from *Penicillium citrinum*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 71, p. 499-503, 2007.

KURAMOTO, M.; YAMADA, K.; SHIKANO, M.; YAZAWA, K.; ARIMOTO, H.; OKAMURA, T.; UEMURA, D. Tanzawaic acids A, B, C and D: Inhibitors of superoxide anion production from *Penicillium citrinum*. **Chemistry Letters**, Tokyo, v. 26, p. 885-886, 1997.

LIMA, E.F. et al. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, maio-ago. 1998.

LIN, X.; ZHOU, X.; WANG, F.; LIU, K.; YANG, B.; YANG, X.; PENG, Y.; LIU, J.; REN, Z.; LIU, Y. A new cytotoxic sesquiterpene quinone produced by *Penicillium* sp. F00120 isolated from a deep sea sediment sample. **Marine Drugs**, v. 10, p. 106-115, 2012.

MA, Y.; CHANG, Z.; ZHAO, J.; ZHOU, M. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on Phytophthora root rot of chilli pepper. **Biological control**, 44, pag. 24-31, China, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed. 12 ed., 2010. 1160 p.

MALMSTRØM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, 54, p.301-309, 2000.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 1954, 286p.

MELLO, Q. M. S.; TEIXEIRA, L. M. S.; BLEICHER, E.; RODRIGUES, S. M. M. **Artrópodes e microrganismos associados ao cajueiro**. Documentos, n.33, Novembro, Fortaleza: Embrapa,- CNPAT, 27 p., 1999.

MEMBRILLERA, J. L. G. de. Clave determinativa de las especies del género penicillium. **Anales de la Universidad de Murcia**, ed. Murcia: Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones, 1950. 132ISSN: 0365-7973 Disponível em: <http://hdl.handle.net/10201/6407> (Acesso em: dezembro de 2011).

MICHEREFF, S.J. **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, 2008 - Área de fitossanidade (FITOPATOLOGIA I).

MORAES, S.A.; GODOY, I.J. Amendoim (*Arachishypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE F.X.R.; ZAMBOLIN, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, cap.1 p.1-43, 1997.

MUILENBERG, M.; BURGE, H.; SWEET, T.; SOLOMON, W. *Penicillium* species in and out of doors in Topeka KS. **The Journal of allergy and clinical immunology** 1990;85:247.

NCBI. **Penicillium spp**. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> > (Acesso em: novembro de 2013).

NETO, P.A. de S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Micro-organismos endofíticos: Interações com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, ano V, nº 29, 2002.

NUNES, M. E. T.; KIMATI, H. **Doenças do alho e da cebola**. In: KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M., Manual de Fitopatologia, v.2: Doenças de plantas cultivadas, ed. 3ª, Editora Agronômica Ceres, 776 p. São Paulo, 1997.

PALLU, A. P. de S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**, 2010, 130f, Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas)- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

OASHI, M. C. G. **Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agronegócio do sisal na Paraíba**. 1999. 253 f. Tese (Doutorado em Engenharia da Produção) – Universidade Federal da Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, L. **Eficiência do resíduo de sisal para compostagem com esterco animal e farinha de rocha natural**. Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycological**, Netherlands, v. 59, p. 53-66, 2007.

RAPPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The Genus *Aspergillus***. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1965.

RICHARDSON, M.D.; JOHNSON, E.M. **Fungal infection**. In: Opportunistic fungal infections. [S.l.]: Blackwell Science; p.30-6, 2000.

SÁ, J. O de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

SAMSON, R.A. & FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology** (Baarn) 49. 2004.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. “What is a species in *Aspergillus*?”. **Medical mycology**, v. 47, p. 13-20, 2009.

SÁNCHEZ, C. D.; VIÑA, A.L. *Aspergillus* y pulmón. **Archivos de Bronconeumología**, 40:114-22, 2004.

SANTIN, J. A.; REIS, E. M.; MATSUMURA, A. T. S.; MORAES, M. G. Efeito do retardamento da colheita de milho na incidência de grãos ardidos e de fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.2, p.182-192, 2004.

SARGO, C. R.; SILVA, J. V. da; SILVA, B. F. da; FILHO, E. R. Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários do fungo *Penicillium griseoroseum*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), **Anais da 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química** [2009]. Disponível em:< <http://sec.s bq.org.br/cdrom/1ra/resumos/T0881-1.pdf>> (Acesso em: novembro de 2010).

SCHUSTER, E.; COLEMAN, N.D.; FRISVAD, J.C.; DIJCK, P.W.M.V. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59:426-435, 2002

SEAGRI. Disponível em <http://www.seagri.ba.gov.br/mapaagricola>. Acesso: janeiro de 2011.

SEBRAE-BA – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Projeto de Desenvolvimento do Território do Sisal**, em andamento desde 2009.

SEQUEIRA, D.C.M. de; COSTA, G.L. da; BARBOSA, J.P. Isolamento e identificação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de *Penicillium* spp. **Anais da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza – CE, 2009.

SERRA, R. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. Tese de doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho, 2005. Disponível em< <http://hdl.handle.net/1822/2579>> (Acesso em: novembro de 2011)

SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R.; NASERI, A.; GHIASI, M.; ZIAPOUR, S.P. Common environmental allergenic fungi causing respiratory allergy in northern Iran. **International Journal of Veterinary Research**, 2010;4:169-72.

SILVA, D. M.; BATISTA, L. R.; REZENDE, E. F.; FUNGARO, M. H. P.; SARTORI, D.; ALVES, E. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, June 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000200044>.

SILVA, O. R. R. da. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

SINDIFIBRAS - **Ações p/ Prevenção e Controle da Podridão Vermelha do Sisal na Região Sisaleira do Estado da Bahia**. Disponível em: <<http://www.brazilianfibres.com.br/?p=736>> Acesso em: novembro de 2013.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: **Anais do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2006, Salvador, BA.

SOUZA, L. S. S.. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal**, 2010, 91f. Dissertação Mestrado em Ciências Agrárias – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro**. Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 5, novembro de 2006.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. A história do sisal no Brasil. In: ANDRADE, Wilson. (Org.). **O sisal do Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS/APEX, 2008, v., p. 16-21.

STEFANO, S. de; NICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry**, Volume 52, Number 8, December 1999.

SYED, M. B.; SERAMAN, S.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Optimization of compactin production by plackett-burman method using *Penicillium Citrinum*. **International Journal of ChemTech Research**, vol.5, No.3, pp 1393-1400, April-June, 2013.

XU, B.J.; JIA, X.Q.; GU, L.J.; SUNG, C.K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**;17:271-85, 2006.

THOM C; CHURCH M. **The Aspergilli**. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins. p. 147. 1926.

TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, Washington, v. 6, p. 3087-3089, 2004.

TSUDA, M.; SASAKI, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Scalusamides A-C, New pyrrolidine alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 273-276, 2005.

WAKANA, D.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; OKADA, K.; TABAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, K. New citrinina derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p. 279-289, 2006.

WEI, D.L.; CHEN, J.H.; JONG, S.C.; SHEN, H.D. Indoor airborne *Penicillium* species in Taiwan. **Current microbiology**, 1993;26:137-40.

CAPÍTULO 2

Atividade antimicrobiana de extratos e frações de *Penicillium citrinum* em *Aspergillus niger*

RESUMO

DAMASCENO, C. L. **Atividade antifúngica de extratos e frações de *Penicillium citrinum* em *Aspergillus niger***

O cultivo do sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) representa importante segmento econômico para o Nordeste brasileiro, com geração de renda e emprego na região semiárida da Bahia. Contudo, nas últimas quatro décadas, o desempenho da cultura do sisal na Bahia vem sofrendo queda de área plantada e produtividade, tendo a podridão vermelha do caule, causada por *Aspergillus niger*, como um dos fatores responsáveis por este declínio. *Penicillium citrinum* tem sido frequentemente isolado de plantas de sisal no semiárido da Bahia. Este fungo não é patogênico ao sisal e produz metabólitos bioativos, com atividade antimicrobiana, sendo um potencial agente de controle da podridão. Este trabalho teve como objetivo, estudar a atividade antifúngica de metabólitos produzidos por *P. citrinum* contra *A. niger*. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração letal para inibição de 50% da germinação de esporos (CL50) dos extratos de filtrados da cultura e do micélio de *P. citrinum*, para o controle de *A. niger*, com a metodologia de microdiluição em caldo. Os seis extratos do micélio e filtrado de *P. citrinum* inibiram significativamente a germinação de esporos de *A. niger*. A maior porcentagem de inibição foi 61,27 % para o extrato clorofórmico do filtrado (ECF) e 58,96 % para o extrato clorofórmico do micélio (ECM). A CL50 para germinação de esporos foi de 15,62 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ECF e 15,62 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ECM, variando com o isolado de *A. niger*. Não houve inibição do crescimento micelial de *A. niger* pelos extratos nas concentrações até 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Germinação de esporos, concentração inibitória mínima, fitopatógenos e suscetibilidade microbiana.

ABSTRACT

DAMASCENO, C. L. **Antifungal activity of extracts and fractions from *Penicillium citrinum* against *Aspergillus niger***

Sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) crop represents an important economic sector of the Brazilian Northeastern region, with generation of income and jobs in the semiarid region. However, for the last four decades, yields of sisal fibre have declined in the State of Bahia, and sisal stem red rot disease caused by *Aspergillus niger*, has been pointed out as one of the factors responsible for this decline. *Penicillium citrinum* has been frequently isolated from sisal plants in the semiarid region of Bahia State. This fungus is not pathogenic to sisal plants, and produces bioactive metabolites, with antimicrobial activities, being considered a potential agent for controlling sisal red rot disease. This work had the objective of studying the antifungal activity to *A. niger* of metabolites extracted from *P. citrinum*. The minimum inhibitory concentration (MIC) and lethal concentration 50% (LC 50), for spore germination, of culture filtrate and mycelium extracts of *P. citrinum* against *A. niger* were determined with the methodology of liquid medium dilution. The six extracts for mycelium and culture filtrate of *P. citrinum* significantly inhibited spore germination of *A. niger*. The highest percentage of inhibition was of 61.27 % for the chloroform filtrate extract (ECF) and 58.96 % for chloroform mycelium extract (ECM). The CL50 for spore germination varied from 5.62 to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for ECF and from 15.62 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for ECM, depending on the isolate of *A. niger*. Inhibition of *A. niger* mycelium growth was not observed for the extracts at concentrations until 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords: Germination of spores, minimum inhibitory concentration, plant pathogens and microbial susceptibility.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador de fibra de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) do mundo, com uma produção anual de aproximadamente 263 mil toneladas, que representa mais de 50% da safra mundial (IBGE, 2014). A agaveicultura destaca-se na economia brasileira por sua capacidade de geração de emprego e renda na região semiárida do Nordeste. No estado da Bahia são produzidos cerca de 255 mil toneladas de sisal por ano, contribuindo com 94% da produção nacional (IDR, 2013; IBGE, 2014; ADAB, 2013).

O sisal é uma espécie semi-xerófila, apresentando epiderme cutinizada, metabolismo fotossintético do tipo CAM, folhas rígidas, suculentas e lisas, verde-lustrosas e pontiagudas (MEDINA, 1954), características estas, que o tornam adaptado à região semiárida, além de conferir uma barreira natural contra a micro-organismos patogênicos e insetos (SOUZA, 2010; COUTINHO et al., 2006).

Apesar desta barreira ao ataque de patógenos, o sisal pode ser acometido por doenças, como a podridão vermelha do tronco de sisal, ou simplesmente podridão do caule do sisal, a qual vem afetando esta cultura desde 1970 e ocasionando prejuízos à produção do sisal, desde 1998 (LIMA et al. 1998; SUINAGA et al, 2006).

A podridão vermelha do sisal afeta a planta em todos os estádios fenológicos, de rebento ou bulbilho até o fim do ciclo. A incidência desta doença varia de 5 a 40% nos plantios de sisal na Bahia. Em plantas com estádios avançados da doença, as folhas murcham, se tornam amareladas e o tronco apodrece (ALVES et al., 2004). O agente causal da podridão vermelha do sisal foi descrito como *Aspegillus niger* (LIMA et al., 1998, SOARES et al., 2006) fungo da ordem Moniliales, difundido em todas as regiões e comumente encontrado no solo (MORAES et al., 1997).

Essa doença tem ameaçado a sustentabilidade da cultura sisaleira na Bahia por apresentar ampla capacidade destrutiva, uma vez que a planta morre e o desfibramento das folhas fica inviabilizado, o que ocasiona perdas econômicas. A seleção de micro-organismos antagonistas ao *A. niger*, e adaptados às condições da região semiárida se constitui numa estratégia para o controle biológico da

podridão vermelha do caule de sisal, e em uma opção para assegurar continuidade da agaveicultura na Bahia e outros estados do Brasil.

Espécies de *Penicillium* spp. têm sido relatadas como agentes de biocontrole, com ação antagônica a fungos patogênicos tais como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp., *Cladosporium cucumerium*, *Alternaria alternata* e *Phytophthora palmivora* (ETHUR et al., 2005; STEFANO et al., 1999; MA, 2008; SEMPERE e SANTAMARINA, 2010; BASTOS, 1987) e atividade antimicrobiana contra as bactérias: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus aureus* (SEQUEIRA et al., 2009).

Fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, como: alcalóides, terpenóides, peptídeos, quinonas e esteroides, os quais podem ser aplicados no controle biológico, sendo também fonte de fármacos, antiparasíticos, antibióticos e imunossupressores (SARGO, 2009; GRASSIN, 1996, citado por CARDOSO et al, 2007; ALECRIM, 2007).

Experimentos realizados no laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB têm demonstrado efeito antagônico de *Penicillium citrinum*, isolado de plantas de sisal, à *A. niger*, sugerindo que este micro-organismo é um provável agente antagônico a este patógeno do sisal e agente de controle biológico (DAMASCENO, 2012).

Assim, este trabalho teve o objetivo de avaliar a ação de extratos e frações de metabólitos secundários de *P. citrinum* na inibição de isolados de *A. niger*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB (CCAAB-UFRB) e no laboratório de química orgânica do Instituto de Química da UFBA.

1. Isolamento de *Penicillium citrinum*

Penicillium citrinum foi isolado de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha do caule, no município de São Domingos-BA e mediante testes *in vitro* e casa de vegetação, foi considerado potencial agente antagônico à *Aspergillus niger*,

agente patogênico ao sisal (SÁ, 2009; DAMASCENO, 2012). Este isolado de *P. citrinum* faz parte da coleção de culturas de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, campus de Cruz das Almas.

2. Obtenção dos extratos e frações de *Penicillium citrinum*

Fragmentos do isolado de *Penicillium citrinum* crescido em meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA) por sete dias de cultivo, foram repicados em Erlenmeyers (500 mL), com meio líquido Czapek® enriquecido com 0,5% de extrato de levedura. Após quatorze dias de incubação, micélio e a fração líquida do cultivo foram separados por filtração à vácuo e a partir destes obtiveram-se extratos brutos por meio de extração com solventes orgânicos. Após três extrações do micélio em clorofórmio, acetato de etila e metanol, por período de 72 horas cada extração respectivamente foram obtidos 3 extratos: extrato clorofórmico do micélio (ECM), extrato acetato de etila do micélio (EAM) e extrato metanólico do micélio (EMM); os quais foram posteriormente concentrados em evaporador rotativo. A fração líquida do cultivo, renomeada como filtrado, de *P. citrinum* foi particionada com clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, resultando nos extrato clorofórmico do filtrado (ECF), acetato de etila do filtrado (EAF) e n-butanólico do filtrado (EBF), os extratos foram em seguida concentrados.

Os extratos de clorofórmio do micélio (ECM) e do filtrado (ECF) foram fracionados por meio de cromatografia em coluna por adsorção (CC), possuindo sílica gel 70-230 Mesh (0,063-0,210mm) da marca Merck, como fase estacionária. Para eluição, foram utilizadas misturas de clorofórmio e metanol para o ECM e de diclorometano e metanol para o ECF em ordem crescente de polaridade. Do ECM foram resultantes 22 frações, nomeadas 1-2ECM a 55ECM. Já do ECF foram coletadas 25 frações do ECF, nomeadas de 1ECF a 25ECF.

As frações que apresentaram perfil indicativo de ácidos graxos foram metiladas utilizando-se diazometano recém preparado por reação com nitrosometiluréia (VOGUEL, 1971).

3. Seleção dos isolados de *Aspergillus niger*

Os isolados utilizados neste trabalho (Tabela 1) foram obtidos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola do CCAAB-UFRB e foram selecionados com base em estudos sobre a diversidade genética e agressividade de isolados de *A. niger* obtidos de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha e de solo em regiões produtoras de sisal com incidência da doença. (SILVA, 2012).

Tabela 1. Isolados de *Aspergillus niger*.

Código	Isolado	Município	Origem	Incidência da doença(%)	
				Casa-de-vegetação	Campo
AN1	37*	São Domingos	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	100	100
AN2	33	Conceição do Coité	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	90	20
AN3	58	Retirolândia	Folha (<i>Agave sisalana</i>)	100	90
AN4	77*	Capela do Alto Alegre	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	100	100
AN5	85	Ourolândia	Folha (<i>Agave sisalana</i>)	95	80
AN6	146	Conceição do Coité	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	95	90
AN7	149*	Várzea nova	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	95	100
AN8	159	Mirangaba	Solo	100	90
AN9	217	Araci	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	95	60
AN10	223	Araci	Caule (<i>Agave sisalana</i>)	100	70

* 100% de incidência da doença nas plantas, tanto em casa-de-vegetação quanto em campo (SILVA, 2012).

4. Obtenção da suspensão de esporos de *Aspergillus niger*

Cada isolado de *Aspergillus niger* foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, à temperatura de $\pm 28^{\circ}\text{C}$. Após incubação por período de 7 dias, acrescentou-se 20 mL de água destilada esterilizada e duas gotas de Tween 20 ® em cada placa e com o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram raspadas e a suspensão contendo esporos e micélio do fungo foi filtrada em gaze

esterilizada. Para o ajuste da concentração de esporos da suspensão, realizou-se contagem de esporos em câmara de Newbauer, com auxílio de microscópio óptico e quando necessário diluição com água destilada esterilizada, padronizando assim a concentração final da suspensão de esporos de *A. niger* para 10^6 conídios. mL⁻¹.

5. Inibição da germinação de esporos de *A. niger* por extratos brutos de metabólitos de *Penicillium citrinum*

Os extratos obtidos a partir do micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*: ECM (extrato clorofórmico do micélio), EAM (extrato acetato de etila do micélio), EMM (extrato metanólico do micélio), ECF (extrato clorofórmico do filtrado), EAF (extrato acetato de etila do filtrado) e EBF (extrato n-butanólico do filtrado) foram testados para atividade antifúngica, com dez isolados de *Aspergillus niger*. A técnica utilizada foi a microdiluição em caldo conforme descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (ELLOF 1998; KUSUCU et al, 2004).

Inicialmente foram preparadas soluções estoques dos extratos em DMSO numa concentração de 8000 µg/mL e do controle positivo ciclopirox de olamina 400 µg/mL em água. Cada solução do extrato foi distribuída, em triplicata, na primeira fileira de uma placa de 96 poços, do tipo ELISA, que continha o meio de cultivo batata e dextrose (BD), além do controle positivo e o controle negativo, formado por DMSO na mesma concentração da solução dos extratos. Fez-se uma microdiluição seriada de razão dois. Em seguida, foram adicionados a cada poço, 100 µL de suspensão de esporos de *A. niger* na concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹. A concentração final dos extratos e controle diluente foi de: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 µg/mL e o controle positivo de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 µg/mL.

Após a adição de 100 µL de suspensão de esporos de *A. niger* na concentração 10^6 conídios.mL⁻¹, as placas foram vedadas com filme PVC e incubadas em B.O.D. por 72 horas a 28°C. A avaliação foi realizada por meio de observação em microscópio óptico de luz, em objetiva de 40X e contagem aleatória de 100 esporos, após a adição de uma gota de lactofenol azul, em todos os tratamentos, para paralisar a germinação de esporos. O lactofenol azul foi adicionado no momento em que o tratamento controle possuía 70% de esporos germinados, após o período de aproximadamente 16 horas da incubação. Foram

considerados germinados, os esporos cujos tubos germinativos apresentavam comprimento superior ao dobro do diâmetro do esporo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. A porcentagem de inibição foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Inibição (%) = [Controle (número de esporos germinados(neg) – Tratamento (neg)/controle (neg)]*100 (Uldahl e Knutsen, 2009). Os dados foram analisados pelo teste de médias Tukey, a 5% de probabilidade. Para comparar a sensibilidade dos esporos de cada isolado aos tratamentos com extratos, calculou-se também a concentração de cada extrato que causou 50% de inibição da germinação de esporos (CL50) (Gabler et al., 2004).

6. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para *A. niger* por extratos brutos e frações obtidas de *Penicillium citrinum*

As amostras constituídas por seis extratos e frações obtidos a partir do micélio e filtrado de *Penicillium citrinum* e frações do ECM (extrato clorofórmico do micélio) e do ECF (extrato clorofórmico do filtrado) foram testados quanto à inibição do crescimento micelial de dez isolados de *Aspergillus niger*. Utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, padronizada pelo NCCLS (ELLOF 1998; KUSUCU et al, 2004).

As soluções estoques dos extratos e controles positivo com ciclopirox® e controle com DMSO foram preparadas conforme descrito acima para o teste de germinação de esporos. Para as soluções estoques das frações do ECM e ECF utilizou-se a concentração de 2000 µg/mL e para o seu respectivo controle com DMSO. As soluções das frações foram distribuídas, em triplicata, na primeira fileira de uma placa de 96 poços, contendo meio BDA, além dos controles positivo com ciclopirox® e controle com DMSO. Seguiu-se a técnica de microdiluição seriada de razão dois e em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL de suspensão de esporos de *A. niger* na concentração 10^6 conídios.mL⁻¹. As concentrações finais das frações do ECM e ECF e controle com DMSO foram de: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 µg/mL e o controle positivo com ciclopirox de: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 µg/mL.

As placas foram vedadas com filme PVC e incubadas por 72 horas a 28°C. Após o período de incubação foi observado se houve o crescimento do micro-organismo nos poços e este foi visualmente comparado ao controle positivo.

RESULTADOS

Os seis extratos obtidos a partir do micélio e filtrado de *P. citrinum* inibiram significativamente a germinação de esporos dos diferentes isolados de *A. niger* (Tabela 2). Dentre estes, a maior porcentagem de inibição da germinação foi 61,27%, obtida com o extrato clorofórmico do filtrado (ECF) seguido do extrato clorofórmico do micélio (ECM), com 58,96%. O extrato acetato de etila do filtrado (EAF) e n-butanólico do filtrado (EBF) causaram inibições de 56,77 e 56,23%, respectivamente, não diferindo entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Inibição da germinação de esporos (%) de isolados de *Aspergillus niger* por diferentes extratos de *Penicillium citrinum*.

Tratamento	Inibição da germinação de esporos de <i>Aspergillus niger</i> (%)
Extrato clorofórmico do micélio	58,96 B
Extrato acetato de etila do micélio	50,96 D
Extrato metanólico do micélio	45,12 E
Extrato clorofórmico do filtrado	61,27 A
Extrato acetato de etila do filtrado	56,77 C
Extrato de n-butanol do filtrado	56,23 C

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade

Os esporos dos 10 isolados de *A. niger* apresentaram diferentes respostas à germinação em função dos extratos utilizados (Figura 1). O isolado AN 1 apresentou maior inibição da germinação de esporos no extrato n-butanólico do filtrado (EBF). Concentrações de 125 µg mL⁻¹ de EBF e do Extrato Metanólico do Micélio (EMM) foram capazes de reduzir em 50% a germinação de esporos do isolado AN1 (Figura 1; Tabela 3).

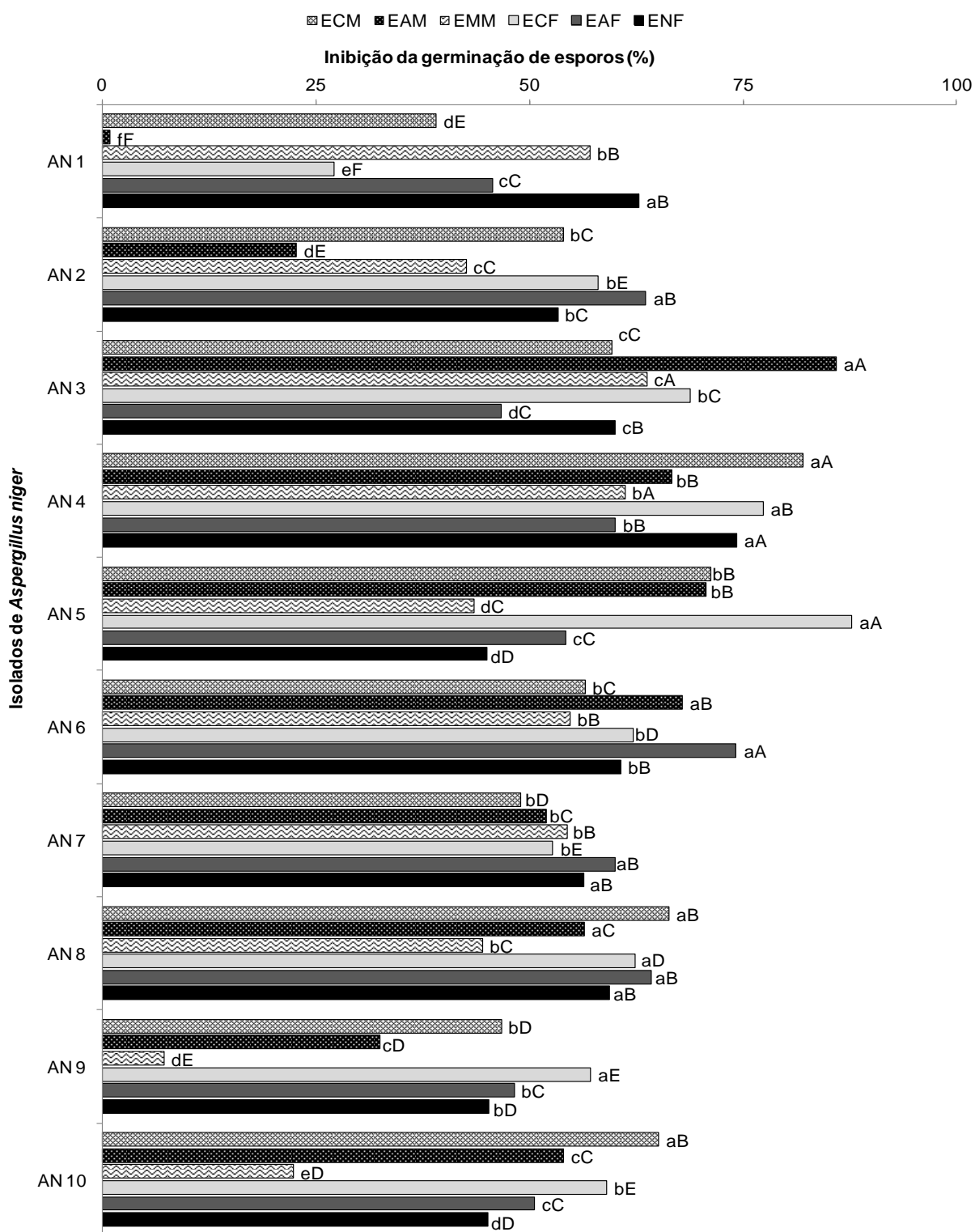
Os esporos do isolado AN 2 apresentaram mais de 50% de inibição da germinação, quando submetidos ao extrato acetato de etila do filtrado (EAF) e os

extratos de Clorofórmio do Micélio (ECM), de Clorofórmio do Filtrado (ECF) e n-butanólico do Filtrado (EBF). Os extratos EAF e ECF se destacaram com concentrações mínimas inibitórias da germinação de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1; Tabela 3).

O extrato acetato de etila do micélio (EAM) reduziu em 85 % a germinação dos esporos do isolado AN 3, enquanto que outros extratos como ECF, EMM, ECM e EBF reduziram a germinação acima de 50 % (Figura 1; Tabela 3). O EAM na concentração $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ inibiu em 50% a germinação de esporos (Figura 1; Tabela 3).

Os 6 extratos testados causaram a inibição da germinação de esporos do isolado AN 4 em mais de 50 %, e as maiores percentagens de inibição, estatisticamente significativas, foram para os extratos ECM, ECF e EBF. Esses extratos na concentração de $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ do ECM inibiram em 50% a germinação de esporos do isolado AN 4 (Figura 1; Tabela 3).

Figura 1. Inibição (%) da germinação de esporos de 10 isolados de *Aspergillus niger* (AN) por diferentes extratos de micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*.



ECM – extrato clorofórmico do micélio; EAM – extrato acetato de etila do micélio; EMM – extrato metanólico do micélio; ECF - extrato clorofórmico do filtrado; EAF – extrato acetato de etila do filtrado e EBF – extrato n-butanólico do filtrado. AN 1 - 10 – diferentes isolados de *Aspergillus niger*. Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre os tratamentos e maiúscula entre isolados não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 3. Concentração mínima inibitória de 50% (CL50) da germinação de esporos de diferentes isolados de *Aspergillus niger* causada por extratos e frações de *Penicillium citrinum*.

Extratos*	Isolados de <i>Aspergillus niger</i>									
	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7	AN8	AN9	AN10
	CL50 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
ECM	500	500	250	15,62	62,5	250	250	125	250	125
EAM	>2000	>2000	15,62	31,25	31,25	125	500	250	2000	250
EMM	125	500	62,5	500	1000	62,5	250	250	>2000	>2000
ECF	1000	125	62,5	62,5	15,62	125	250	62,5	250	125
EAF	500	125	250	500	250	31,25	250	125	250	500
EBF	125	250	62,5	31,25	250	250	125	125	500	125

* Extratos: ECM – extrato clorofórmico do micélio; EAM – extrato acetato de etila do micélio; EMM – extrato metanólico do micélio; ECF - extrato clorofórmico do filtrado; EAF – extrato acetato de etila do filtrado e EBF – extrato n-butanólico do filtrado.

Dos 6 extratos testados, 4 inibiram a germinação de esporos do isolado AN 5 em mais de 50 %. O extrato ECF se destacou, estatisticamente, causando 87 % de inibição da germinação de esporos de *A. niger*. Observou-se que concentrações a partir de $15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ do ECF reduziram em 50% a germinação de esporos do isolado AN 5 (Figura 1; Tabela 3).

Em relação ao isolado AN 6, a inibição da germinação de esporos foi mais de 50 % para todos os extratos testados, porém, estatisticamente, EAM e EAF se destacaram por causarem inibição de 67 % da germinação de esporos. O extrato EAF em concentrações de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ reduziu em 50 % a germinação (Figura 1; Tabela 3).

Em se tratando do isolado AN 7, foram considerados mais eficazes os tratamentos com os extratos EAF e EBF, sendo que este último apresentou concentração mínima inibitória de 50 % da germinação com a concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1; Tabela 3).

Excetuando-se o EMM, todos os extratos de *P. citrinum* inibiram em mais de 56% a germinação de esporos do isolado de *A. niger* AN 8. O ECF foi considerado mais eficaz, uma vez que, na concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ conseguiu reduzir em 50% a germinação de esporos (Figura 1; Tabela 3).

O isolado AN 9 apresentou menor porcentagem de inibição quando tratado com o extrato ECF e a concentração mínima inibitória foi de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dois dos extratos testados, ECM e ECF inibiram em mais de 50 % a germinação de esporos, e o mais eficaz, estatisticamente, foi ECM com CIM de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1; Tabela 3).

Os isolados de *A. niger* avaliados neste estudo exibiram suscetibilidade diferenciada aos extratos de *P. citrinum* (Tabela 4). Foram observados valores de inibição da germinação de esporos abaixo de 50%, para os isolados AN 1, AN 2, AN 9 e AN 10, sendo estes considerados isolados resistentes aos extratos de *P. citrinum*. Os isolados AN 7 e AN 8 foram considerados de suscetibilidade intermediária, com inibição da germinação entre 50 e 60 %. Já os isolados AN 3, AN 4, AN 5 e AN 6 tiveram inibição da germinação de esporos acima de 60% sendo classificados como suscetíveis.

Tabela 4. Classificação dos isolados de *Aspergillus niger* quanto à suscetibilidade aos extratos de micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*.

Isolados de <i>Aspergillus niger</i>	Inibição total da germinação de esporos (%)	Suscetibilidade aos extratos de <i>Penicillium citrinum</i>
AN 1	38,79 F	Resistente
AN 2	49,05 E	Resistente
AN 9	39,53 F	Resistente
AN 10	49,37 E	Resistente
AN 7	54,09 D	Intermediário
AN 8	58,90 C	Intermediário
AN 3	64,14 B	Suscetível
AN 4	70,23 A	Suscetível
AN 5	62,06 B	Suscetível
AN 6	62,69 B	Suscetível

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre tratamentos isolados não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Não foi observada inibição do crescimento micelial dos isolados de *A. niger* nas concentrações de extratos de *P. citrinum* testadas (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de extratos de *Penicillium citrinum*, em isolados de *Aspergillus niger* de diferentes localidades.

Extratos*	Isolados de <i>Aspergillus niger</i>									
	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7	AN8	AN9	AN10
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
ECM	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
EAM	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
EMM	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
ECF	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
EAF	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
EBF	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
DMSO**	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Ciclopirox®	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12

*ECM – extrato clorofórmico do micélio; EAM – extrato acetato de etila do micélio; EMM – extrato metanólico do micélio; ECF - extrato clorofórmico do filtrado; EAF – extrato acetato de etila do filtrado e EBF – extrato n-butanólico do filtrado.

Do mesmo modo, não foi constatada inibição do crescimento micelial dos isolados de *A. niger* nas concentrações de frações metiladas e não-metiladas do extrato clorofórmico do micélio de *P. citrinum* testadas (Tabela 6).

Tabela 6. CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de frações do extrato clorofórmico do micélio (ECM), em isolados de *Aspergillus niger*.

Frações	Isolados de <i>Aspergillus niger</i>									
	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7	AN8	AN9	AN10
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
1ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
5ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
4ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
7ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
10ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
25-29ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
25-29ECM*	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
30-36ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
40-41ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
42ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
43ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
44ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
45ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
46-49ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
50ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
51ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
52ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
53ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
54ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
55ECM	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Ciclopirox®	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12

* amostras metiladas.

Não foi constatado efeito inibitório para crescimento micelial dos isolados de *A. niger* nas concentrações de frações do extrato clorofórmico do filtrado de *P. citrinum* testadas (Tabela 7).

Tabela 7. CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de frações do extrato clorofórmico do filtrado (ECF), em isolados de *Aspergillus niger*.

Frações	Isolados de <i>Aspergillus niger</i>									
	AN1	AN2	AN3	AN4	AN5	AN6	AN7	AN8	AN9	AN10
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
3ECF	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
5ECF	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9ECF	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
11ECF	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
20ECF	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Ciclopirox®	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12

DISCUSSÃO

No presente estudo, os diferentes tipos de extratos de *P. citrinum* exibiram potencial atividade antifúngica para os isolados de *A. niger*, patogênicos ao sisal. Segundo Bokari (2009), cada extrato é definido pela forma que é preparado e a natureza do solvente. Foram utilizados solventes de diferentes polaridades para extração de metabólitos de *P. citrinum*. Assim, cada componente é extraído por determinados solventes, resultando em atividade antimicrobiana diferenciada (JAVAID et al., 2008).

De acordo com Yanagita (1956), a fisiologia do crescimento de fungos pode ser estudada em três passos principais: germinação de esporos, crescimento micelial e esporulação. Assim, a germinação de esporos, primeiro passo no desenvolvimento fisiológico dos fungos em micélio, irá culminar na formação da hifa, a qual depende, primariamente, da habilidade do esporo em utilizar as reservas estocadas e produzir certas proteínas (GOTTLIEB, 1950). Este evento crucial na propagação de espécies é fator determinante no início da colonização de hospedeiros no caso de fungos fitopatogênicos (ABDEL-RAHIM e ARBAB, 1985).

Segundo Dantigny et al. (2005), a germinação de esporos é um passo ao qual deve ser dada atenção especial, pois assim que ocorre degradação em produtos, logo as hifas se tornam visíveis. Para ser considerado germinado, o tubo

germinativo mais longo deve apresentar dimensão maior que o esporo inchado (DANTIGNY et al., 2006).

Em virtude da dependência do processo da germinação de esporos para crescimento e esporulação de fitopatógenos pode-se considerar que a inibição da germinação causada por extratos de micro-organismos pode ser um mecanismo de ação contra fungos no controle de doenças de plantas (WHETZEL et al., 1925 citado por BERGAMIN et al., 1995; PALLU et al., 2010). Para Uldahl e Knutsen (2009), a avaliação da germinação e do dilatação de esporos de fungos, apresenta-se como uma nova proposta de bioensaio para testar, rapidamente, a suscetibilidade de fungos a extratos brutos.

O extrato clorofórmico do filtrado (ECF) inibiu em 61,27 % a germinação de esporos, sendo o extrato mais eficaz, demonstrando assim que componentes com polaridade intermediária apresentaram maior atividade antimicrobiana contra o micro-organismo testado (MAHLO et al., 2010). A polaridade do clorofórmio permite extrair classes de compostos diferentes, como flavonoides e cumarinas, os quais apresentam propriedades biológicas distintas, podendo assim, apresentar um espectro mais amplo dessa atividade. Os compostos com polaridade intermediária apresentam alta atividade e podem estar relacionados com a absorção do composto pela célula fúngica (MAHLO et al., 2010), justificando assim, a maior inibição ao utilizarmos esse extrato.

Os 10 isolados de *A. niger* patogênicos do sisal apresentaram respostas diferenciadas ao extrato testado, tal fato pode estar relacionado à absorção dos componentes pelas células fúngicas (MAHLO et al., 2010). Essa característica mostra que apesar de pertencerem à mesma espécie, os isolados de *A. niger* testados possuem sensibilidade específica a certos componentes antimicrobianos, provavelmente determinada por diferenças genéticas e ecológicas de cada um dos isolados. Os isolados fúngicos, devem ser avaliados individualmente, em função da variação detectada para as atividades antimicrobianas de cada extrato (VIZCAINO et al., 2005). Assim, fazem-se necessários estudos complementares a fim de determinar o princípio ativo de cada um dos extratos e o comportamento dos isolados frente a eles.

Os diferentes níveis de inibição observados para os isolados de *A. niger*, permitiram classifica-los em resistentes, intermediários e suscetíveis, quanto à

sensibilidade aos extratos de *P. citrinum*. A suscetibilidade de patógenos a extratos dependerá diretamente da espécie vegetal ou microbiológica estudada, dos solventes utilizados para extração e da concentração avaliada, e também dos organismos testados e a fase de crescimento em que se encontram (BAGWAN, 2001; ABOU-JAWDAH et al., 2002; KUMARAN et al., 2012).

As concentrações de extratos e frações de *P. citrinum* não inibiram o crescimento micelial dos isolados de *A. niger*, provavelmente por estarem em baixa concentração. É necessário, em testes futuros aumentar a concentração desses extratos para verificar se em maiores concentrações ocorre a inibição do crescimento micelial. Em trabalho realizado por Mahlo et al. (2010), *A. niger* também foi considerado resistente aos extratos de acetona, hexano, diclorometano e metanol das espécies vegetais: *Bucida buceras*; *Breonida salicina*; *Harpephyllum cafrum*; *Olinia ventosa*; *Vangueria infausta* e *Xylothea kraussiana* testados com uma CIM média de 1,06 mg mL⁻¹. Portillho et al., (2001) relataram que *A. niger* foi considerado resistente aos extratos diclorometano, aquoso e metanólico de 14 tradicionais plantas do Paraguai.

Já em experimentos realizados por Hussain et al., (2010), *A. niger* e outros patógenos foram suscetíveis aos extratos de *Polygonum persicaria*, *Rumex nepalensis*, *Polygonum plebejum* e *Rheum australe*, com CIM de 1,75µg mL⁻¹.

Observamos em nossos estudos que *P. citrinum* é um micro-organismo promissor, produzindo substâncias com atividade inibitória da germinação de esporos do patógeno *A. niger*. Micro-organismos tem sido importantes no desenvolvimento de novos fármacos, com diversos “antibióticos chave”, como: penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, rapamicina, entre outros (FLEMING, 1929; KUMAR et al., 2010). Fungos dos gêneros: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* são considerados “espécies criativas”, por sua diversidade na produção de metabólitos secundários (DREYFUSS e CHAPELA, 1994).

CONCLUSÃO

Os extratos de *Penicillium citrinum*, apresentaram-se como fontes promissoras de componentes antimicrobianos. Conclui-se que esses extratos podem ser utilizados para prevenção da germinação de esporos de *A. niger*. Entretanto, não foi possível determinar a concentração mínima inibitória para o crescimento micelial de *A. niger* por extratos e frações de *P. citrinum*. Neste contexto, faz-se necessário aprofundar os estudos com estes extratos, assim como a purificação e identificação do composto ativo responsável pelo efeito antifúngico.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHIM, A. M.; ARBAB, HA. Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*. **Mycopathologia** 89, 75-79, 1985.

ABOU-JAWDAH, Y.; SOBH, H.; SALAWAH, A. Extract of petroleum ether was more effective than methanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50: 3208-3213, 2002.

ADAB. **Podridão Vermelha do Sisal**. Disponível em: <http://www.adab.ba.gov.br/modules/mastop_publish/?tac=168> (Acesso em: novembro de 2013).

ALECRIM, M. M.; SOUZA, T. C. de; TEIXEIRA, M. F. S.; SILVA, T. de A. METABÓLITOS PRODUZIDOS POR FUNGOS DO GÊNERO *Penicillium* PROMOVEDO ANTAGONISMO FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS, **Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC**, FAPEAM, Universidade Federal do Amazonas, 2007

ALVES, M. O.; SANTIAGO, E. G.; LIMA, A. R. M. **Diagnóstico socioeconômico do setor sisaleiro no nordeste Brasileiro**. Documentos do Etene (Escritório técnico de recursos socioeconômicos do Nordeste), vol. 4, Fortaleza: Banco do Nordeste, 2004

BASTOS, C.N. Ação antibiótica de metabólitos de *Penicillium citrinum* Thom. Sobre *Phytophthora palmivora* (Buti.) Buti. **Revista Theobroma**, 17(1): 31-37, Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil, 1987.

BAGWAN, N. B. Anthracnose of banana fruits and its management with plant extracts. **Current Research University of Agricultural Sciences Bangalore**, 30: 197-198, 2001.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995.

BOKHARI, F. M. Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah Saudi Arabia. **Mycopath**; 7(1) :51-57, 2009.

CARDOSO, P.G.; QUEIROZ, M.V. de; PEREIRA, O.L.; ARAÚJO, E.F. de. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of**

Microbiology (2007) 38:71-77, Viçosa - MG. ISSN 1517-8283.

COUTINHO, W.M.; LUZ, C.M.; SUASSUNA, N. D.; SILVA O.F.E.; SUINAGA, F.A. **A podridão vermelha do tronco do Sisal**, EMBRAPA, novembro/ 2006.

DAMASCENO, C. L. **Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, 2012.

DANTIGNY, P., GUILMART, A., BENSOUSSAN, M. Basis of predictive mycology. **International Journal of Food Microbiology**, 100, 187–196, 2005.

DANTIGNY, P.; BENSOUSSAN, M.; VASSEUR, V.; LEBRIHI, A.; BUCHET, C.; ISMAILI-ALAOUI, M.; DEVLIEGHERE, F.; ROUSSOS, S. Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. **International Journal of Food Microbiology**, 108, 286–291, 2006.

DREYFUUS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low molecular weight pharmaceuticals. In: **The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential** (ed. V.P. Gullo). Butterworth-Heinemann, London, UK: 49-80, 1994.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, 64: 711-713, 1998.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E. ; MUNIZ, M. F. B. ; SILVA, A. C. F. da ; STEFANELO, D. R. ; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FLEMING, A. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. influenza. **British Journal of Experimental Pathology**, 10:226–236, 1929.

GABLER, F. M.; MANSOUR, M. F.; SMILANICK, J. L.; MACKEY, B. E. Survival of spores of *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, Issue 6, 2004.

GOTTLIEB, D. A. The physiology of spore germination in fungi. **Journal The Botanical Review**, V 16, N 5, 1950

HUSSAIN, F.; AHMAD, B.; HAMEED, I.; DASTAGIR, G.; PARVEEN SANAULLAH, P.; SADIQ AZAM, S. Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of polygonaceae. **African Journal of Biotechnology**, vol. 9(31), pp. 5032-5036, 2 August, 2010.

IBGE, 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da produção agrícola**, Rio de Janeiro v.27 n.01 p.1-85 janeiro, 2014. ISSN 0103-443X.

IDR (Instituto de desenvolvimento da região do sisal). **Cadeia Produtiva de Sisal**. Disponível em:<<http://www.idrsisal.org.br/sisal/17.php>> (Acesso em: 20/08/2013)

JAVAID, A.; SHAFIQUE, S. Herbicidal activity of *Datura metel* L. against *Phalaris minor* Retz. **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, 14:209- 220, 2008.

KUMAR, C. G.; MONGOLLA, P.; JOSEPH, J.; NAGESWAR, Y.V.D. ; KAMAL, A. Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. **Journal de Mycologie Médicale/ Journal of Medical Mycology**, ISSN 1156-5233, Volume 20, Issue 4, December 2010.

KUMARAN, N. S.; BRAGADEESWARAN, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; MENNAKSHI, V. K. Bioactivity of extracts from ascidian *Lissoclinum fragile*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol 6 (25), 2012.

KUSUCU, C.; RAPINO, B.; MCDERMOTT, L.; HADLEY, S.; Comparison of the Semisolid Agar Antifungal Susceptibility Test with the NCCLS M38-P Broth Microdilution Test for Screening of Filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, 42, 1224, 2004.

LIMA, E.F. et al. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, maio-ago. 1998.

MA, Y.; CHANG, Z.; ZHAO, J.; ZHOU, M. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on Phytophthora root rot of chilli pepper. **Biological control**, 44, pag. 24-31, China, 2008.

MAHLO, S. M. **Characterization and biological activity of antifungal compounds present in *Bretondia salicina* (Rubiaceae) leaves**. PhD thesis, Phytomedicine Programme, University of Pretoria, 2009.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 1954, 286p.

MORAES, S.A.; GODOY, I.J. Amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Controle de doenças. In: VALE F.X.R.; ZAMBOLIN, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Ed. UFV, Viçosa, Minas Gerais, cap.1 p.1-43, 1997.

PALLU, A. P. de S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**, 2010, 130f, Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas)- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal Ethnopharmacology**, 76, 93e98, 2001.

SÁ, J. O de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

SARGO, C. R.; SILVA, J. V. da; SILVA, B. F. da; FILHO, E. R. Isolamento e Identificação de Metabólitos Secundários do fungo *Penicillium griseoroseum*. Sociedade Brasileira de Química (SBQ), **Anais 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009. Disponível em: < <http://sec.sbq.org.br/cdrom/1ra/resumos/T0881-1.pdf> > (Acesso em: novembro de 2010).

SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* Currie & Thom and *Alternaria alternata* (fr.) Keissler. **Brazilian Journal of Microbiology**, ISSN 1517-8382, Valencia – Espanha, 2010.

SEQUEIRA, D.C.M. de; COSTA, G.L. da; BARBOSA, J.P. Isolamento e identificação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários de

Penicillium spp. **Anais da 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza – CE, 2009. Disponível em: <http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/lista_area_QB.htm> (Acesso em: fevereiro de 2011).

SILVA, J. R. DE Q. **Agente etiológico da podridão vermelha do sisal: densidade populacional, sobrevivência, caracterização genética e de agressividade**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2012.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaulo do sisal. In: **Anais do XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 2006, Salvador, BA.

SOUZA, L. S. S.. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum* L.) e sisal (*Agave sisalana* Perrine) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal**, 2010, 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro**. Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 5, novembro de 2006.

STEFANO, S. de; NICOLETTI, R.; MILONE, A.; ZAMBARDINO, S. 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry**, Volume 52, Number 8, December 1999, pp. 1399-1401(3).

ULDAHL, S. A.; KNUTSEN, G. Spore swelling and germination as a bioassay for the rapid screening of crude biological extracts for antifungal activity, **Journal of Microbiological Methods**, Volume 79, Issue 1, 2009.

VIZCAINO, J. A.; SANZ, L.; BASILIO, A.; VICENTE, F.; GUTIERREZ, S.; HERMOSA, M. R. E MONTE, E. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolate representing three *Trichoderma* sections. **Mycological Research**, 109, (12), 1397-1406, 2005.

VOGUEL, A. I. **Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa**. vol. 3, 3 ed., Rio de Janeiro: Ao livro Técnico S. A., 1971, p1018.

YANAGITA, T. A. Biochemical aspects on the germination of conidiospores of *Aspergillus niger*. **Journal Archiv für Mikrobiologie**, v. 26, n. 4, 1957.

CAPÍTULO 3

**Constituintes químicos isolados de *Penicillium citrinum*,
endofítico de plantas de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm)
do semiárido da Bahia, Brasil***

*Artigo a ser submetido ao periódico Chemistry of Natural Compounds [ISSN: 0009-3130]

RESUMO

DAMASCENO, C. L. **Constituintes químicos isolados de *Penicillium citrinum*, endofítico de plantas de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) do semiárido da Bahia, Brasil.**

Fungos do gênero *Penicillium* são conhecidos pela produção diversificada de metabólitos, como a citrinina, policetídeo que conferiu certo destaque à espécie *Penicillium citrinum*. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e a identificação de metabólitos de um isolado *P. citrinum* obtido de plantas de sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) da região semiárida da Bahia. Este isolado de *P. citrinum* foi descrito como potencial agente de biocontrole da podridão vermelha do sisal, causada por *Aspergillus niger*. O micélio e a fração líquida do cultivo de *P. citrinum* foram separados por filtração à vácuo. Dessas amostras separadas, foram obtidos os extratos brutos por meio de extração e partição com solventes orgânicos de diferentes polaridades. O micélio foi macerado utilizando primeiramente clorofórmio, seguido de acetato de etila e metanol e a fração líquida do cultivo foi particionada com clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. Os extratos foram em seguida concentrados. Após análises de RMN de ^1H foram selecionados os extratos clorofórmicos do micélio (ECM) e filtrado (ECF) para estudo cromatográfico. Os ECM e ECF foram fracionados por CC e suas frações foram submetidas CCDC, sendo algumas amostras separadas por CCDP. As substâncias isoladas foram identificadas por análise RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, IV, CG-EM e comparação com os dados da literatura. Foram identificadas cinco substâncias: ergosterol (SI); 9,12 hexadecadienoato de n-propil (SII); octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila (SIII); 10,13-dimetiltetradecanoato de metila (SVI) e S-3-metilpent-2-enolactona (SV).

Palavras-chave: Produtos naturais, ácidos carboxílicos, esteróides, lactonas, metabólitos microbianos.

ABSTRACT

DAMASCENO, C. L. **Chemical constituents isolated from *Penicillium citrinum*, an endophyte of sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) plants in the semiarid region of Bahia, Brasil.**

Fungus of the genus *Penicillium* are known for their production of diversified metabolites, such as citrinin, a policetide that brought special interest to the species *Penicillium citrinum*. This work aimed to isolate and identify metabolites from one isolate of *P. citrinum* isolated from sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm) plants from the semiarid region of Bahia. This *P. citrinum* isolate has been described as a potential agent for biocontrol of sisal red rot disease caused by *Aspergillus niger*. The mycelium and liquid fraction of *P. citrinum* culture growth were separated by filtration with vacuum. From these separated samples, crude extracts were obtained through extraction and partitioning with solvents of different polarities. Mycelium was macerated with chloroform first, followed by ethyl acetate and methanol and the liquid fraction of the culture was partitioned with chloroform, ethyl acetate and n-butanol. Extracts were then concentrated. After ^1H NMR analysis, chloroform extracts of the mycelium (ECM) and filtered (ECF) were selected for chromatographic studies. The ECM and ECF were fractionated by CC and its fractions were subjected TLDC, some samples being separated by TLPC. The compounds were identified by NMR analysis of ^1H , ^{13}C , gHMBC, IR, CG-EM and compared with the literature data. Five substances were identified and described: ergosterol (SI); n-propyl 9,12-hexadecadienoate (SII); methyl octadeca-9Z,12Z-dienoate (SIII); methyl 10,13-dimethyl-tetradecanoate (SIV) and S-3-methyl-pent-2-enolactona (SV).

Keywords: Natural products, carboxylic acids, steroids, lactones and microbial metabolites.

INTRODUÇÃO

A penicilina, produzida inicialmente pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibição bacteriana foi descoberta, acidentalmente, por Alexander Fleming em 1928, é o primeiro metabólito fúngico de destaque, por ter sido utilizada com eficácia em larga escala em 1940 (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1998).

A partir da penicilina, micro-organismos passaram a serem visualizados como fontes de potenciais substâncias biologicamente ativas, além de uma variedade de outros produtos importantes para indústria farmacêutica e de alimentos (TAKAHASHI e LUCAS, 2008; SILVA et al., 2004). Dentre esses compostos encontram-se os metabólitos primários: peptídeos, enzimas e ácidos orgânicos e, também, os metabólitos secundários: antibióticos (BENNET, 1998; DEMAIN, 2000).

O gênero *Penicillium*, pertencente ao filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes* e a ordem *Eurotiales*, possui cerca de 200 espécies descritas, a maioria habitantes comuns de solo (NCBI, 2010; PALLU, 2010). Fungos deste gênero são conhecidos por produzirem diversas espécies de metabólitos secundários, como alcalóides, benzodiazepinas, quinolinas, quinazolininas, e policetídeos (KOZLOVSKII et al. 2013). Assim, diversas espécies deste gênero tem sido exploradas em termos de bioprospecção e isolamento de numerosos novos metabólitos bioativos, incluindo substâncias antibacterianas, antifúngicas, imunossupressores e agentes redutores de colesterol, indicando assim a importância como fonte de moléculas bioativas (NICOLETTI et al., 2007; KNOW et al., 2002; LARSEN et al., 2007).

Penicillium citrinum é uma espécie facilmente encontrada no ambiente em diferentes condições (DUTTA et al., 2007; XU et al., 2006). A citrinina, metabólito secundário da classe dos policetídeos e de ação nefrotóxica, foi um composto cujo isolamento concedeu notória importância a esta espécie (KHOSRAVI et al., 2012). Além da citrinina, há relatos da ocorrência dos ácidos tanzânicos E e F e de benzopirranonas, xantonas e benzofenonas (BENNETT e FRISVAD, 2000; TRISUWAN et al., 2014).

O isolado de *P. citrinum* estudado neste trabalho foi obtido como endofítico de sisal, *Agave sisalana* Perrine (Ex Engelm) da região semiárida da Bahia. Este

isolado foi testado para o controle da podridão vermelha do sisal, sendo classificado como potencial agente de biocontrole desta doença por inibir o crescimento e esporulação de *Aspergillus niger* em experimentos *in vitro* e reduzir a incidência da doença em plantas de sisal (DAMASCENO, 2012).

Este trabalho teve como objetivo estudar a composição química do fungo *P. citrinum*, visando futuros estudos desses compostos para o controle de *Aspergillus niger*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da UFRB e no laboratório de química orgânica, em parceria com o grupo GESNAT, do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

1. Métodos cromatográficos

As análises cromatográficas em camada delgada comparativa (CCDC) foram realizadas utilizando respectivamente gel de sílica HF₂₅₄₊₃₆₆ e PF₂₅₄₊₃₆₆, sendo a primeira das marcas Merck e Acros Organics Bélgica e a segunda da marca Merck.

As cromatoplasmas foram preparadas por meio do espalhamento da suspensão de sílica em água destilada em placas de vidro com o auxílio do espalhador mecânico, para obtenção de placas com 0,50 mm e 1,00 mm de espessura para CCDC e CCDP, respectivamente. As placas de vidro utilizadas apresentavam dimensões de: 2,5 x 7,0 cm, 5,0 x 20,0 cm e 20,0 x 20,0 cm. Após secagem à temperatura ambiente, as placas eram ativadas em estufa a 100°C por um período mínimo de uma hora. Para compor os sistemas de eluição foram utilizadas solventes orgânicos: Clorofórmio, Acetato de etila, Metanol, Hexano e Diclorometano de qualidade P.A das marcas Quemis e Tedia. As substâncias presentes nas cromatoplasmas foram reveladas utilizando-se irradiações com lâmpadas ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm e vapores de iodo.

2. Métodos físicos

2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C e $g\text{HMBC}$, foram adquiridos em equipamento Varian Inova 500 de 11,7 Tesla, operando na frequência de 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono-13. O equipamento é equipado com sondas direta de 5 mm e indireta de 3 mm, sendo a temperatura de 298K. Para obtenção dos espectros utilizou-se os solventes deuterados: clorofórmio, metanol, e dimetilsulfóxido da marca Merck. Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados a partir do padrão interno tetrametilsilano (TMS) ($\delta = 0$). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: singleto (s), duplete (d), tripleto (t) e multiplete (m).

2.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros adquiridos na região do infravermelho foram registrados com espectrofotômetro Shimadzu, na faixa de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram preparadas na forma de filme com clorofórmio e acetato de etila P.A. da marca Quemis em filme com janela de NaCl seco para amostras oleosas e na forma de pastilhas de KBr, para amostras sólidas.

2.3 Cromatografia em fase gasosa com detector de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer, modelo Clarus 680 acoplado a um detector de massas modelo Clarus SQ 8T com ionização por impacto de elétrons a 70 eV. As amostras, previamente metiladas, foram solubilizadas em 1,0 mL de metanol e injetadas manualmente no cromatógrafo num volume de 10 μL . Empregou-se o modo full scan de escaneamento, pois não se conhecia o perfil de intensidade das massas e utilizou-se um analisador de massas do tipo quadrupolo armadilha de íons.

A caracterização dos perfis das amostras ocorreu por comparação do espectro de massa obtido com os padrões existentes na biblioteca do software (Mass Spectral Database NIST/EPA/NIH). Baseando-se nos valores de área total dos picos, correspondentes a 100%, quantificou-se a porcentagem do composto em função da área relativa de cada pico.

3. Reações

3.1 Metilação com diazometano

As amostras de frações e extratos contendo ácidos graxos foram metiladas utilizando-se diazometano preparado por reação com nitrosometiluréia. Para isso, a nitrosometiluréia foi preparada por meio da adição, com agitação constante, de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (a 35%) a uma solução de bromo líquido (Br_2) (22,00 g) e acetamida (14,75 g). Em seguida, a mistura foi aquecida até o ponto de fervura, sendo posteriormente resfriada em banho de gelo durante duas horas, obtendo-se após filtração a vácuo e secagem ao ar, cristais de acetil-metiluréia (com um rendimento aproximado de 12,25 g).

Os cristais obtidos, foram então dissolvidos em 12,50 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e aquecidos durante 12 minutos. Após este procedimento, a solução foi diluída em água destilada (12,50 mL) e resfriada em banho de gelo, numa temperatura abaixo de 10°C . A seguir, adicionou-se uma solução gelada de nitrato de sódio (NaNO_3) (43%) a esta solução. Após a filtração a vácuo e secagem ao ar, obteve-se um sólido amarelo pálido (nitrosometiluréia). Assim, a metilação das amostras ocorreu em solução etérea de diazometano recentemente preparado por reação com nitrosometiluréia a uma solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) (50%) em éter sulfúrico colocados em banho de gelo (VOGUEL, 1971).

A amostra a ser metilada foi dissolvida em CHCl_3 e adicionou-se lentamente, solução de diazometano gelado, até não observar-se mais desprendimento de gás (excesso de CH_2N_2). O solvente da mistura foi evaporado a temperatura ambiente, o produto da reação foi analisado por CCDC e RMN ^1H para verificar a ocorrência da metilação.

4. Isolamento de *Penicillium citrinum*

O isolado de *Penicillium citrinum* foi obtido a partir de trabalhos anteriores, conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, que tinham como objetivo isolar *Aspergillus niger* de plantas de sisal com sintomas de podridão vermelha do caule, no município de São Domingos-BA (SÁ, 2009). Nestes isolamentos de *A. niger*, diversas vezes observou-se o crescimento exclusivo de *Penicillium* sp.. Também se observou que este isolado inibia o crescimento e a esporulação de *A. niger* em testes realizados *in vitro* e reduzia a incidência da podridão vermelha em plantas de sisal, em estudos de casa de vegetação (DAMASCENO, 2012). O isolado de *P. citrinum* encontra-se na coleção de culturas de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, campus de Cruz das Almas.

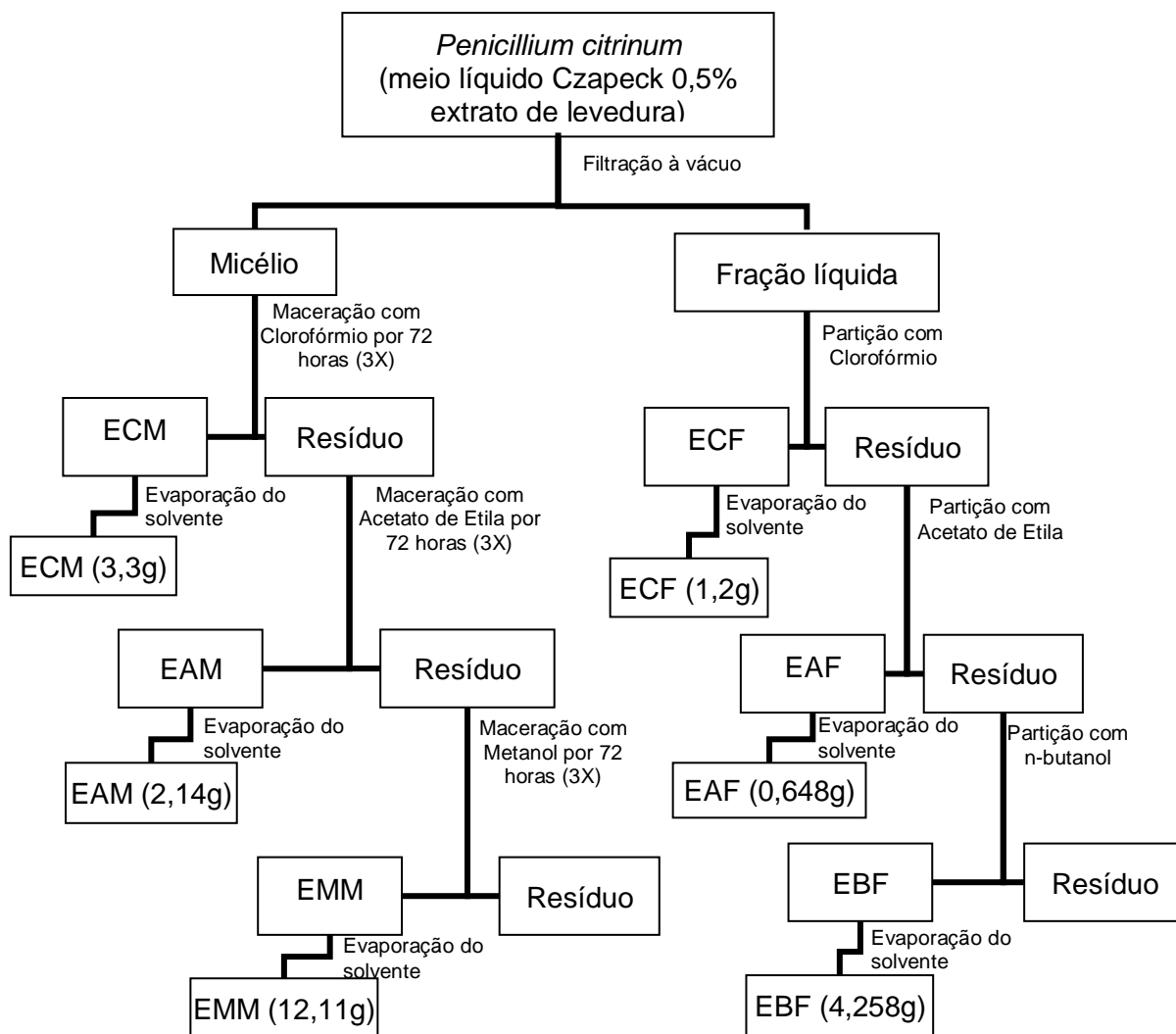
5. Obtenção dos extratos brutos de *Penicillium citrinum*

O fungo *P. citrinum* foi multiplicado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata, Dextrose e Ágar (BDA). Após sete dias de cultivo, fragmentos miceliais foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, contendo 150 mL de meio líquido Czapek® enriquecido com 0,5% de extrato de levedura. Foram realizadas três etapas sucessivas de cultivo em 35 Erlenmeyers em dois agitadores rotativos à temperatura de 28°C. Após quatorze dias de cultivo, o micélio e a fração líquida do cultivo de *P. citrinum* foram separados por filtração à vácuo. Dessas amostras, separadas, foram obtidos os extratos brutos por meio de extração com solventes orgânicos de diferentes polaridades (Figura 1). Os extratos brutos do micélio foram obtidos após três extrações em clorofórmio, acetato de etila e metanol, respectivamente. A primeira com clorofórmio por 72 horas, foi repetida por três vezes, obtendo-se o extrato de clorofórmio (ECM) e o resíduo. Este resíduo foi utilizado para a segunda extração utilizando-se acetato de etila e o resíduo formado utilizou-se para a terceira extração com metanol (Figura 1). Os três extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo.

A fração líquida, obtida do cultivo de *P. citrinum*, denominada filtrado, obtida do cultivo de *P. citrinum* foi particionada pelos solventes, clorofórmio, acetato de

etila e n-butanol sendo em seguida concentrados. Assim, foram obtidos 6 extratos a partir do cultivo de *P. citrinum* (Figura 1).

Figura 1. Obtenção dos extratos orgânicos a partir do micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*.



Legenda

- ECM** – Extrato clorofórmico do micélio.
- EAM** – Extrato acetato de etila do micélio.
- EMM** – Extrato metanólico do micélio.
- ECF** - Extrato clorofórmico do filtrado.
- EAF** – Extrato acetato de etila do filtrado.
- EBF** – Extrato n-butanólico do filtrado.

Realizou-se também uma extração controle, utilizando-se somente o meio de cultura, meio líquido Czapek® enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, após exposição deste às mesmas condições de cultivo do *Penicillium citrinum*. O meio de cultura foi então particionado com clorofórmio, seguido de acetato de etila e o n-butanol, após evaporação do solvente os extratos controles foram posteriormente concentrados. Resultaram 3 extratos controles: extrato controle em clorofórmio (ECC), extrato controle em acetato de etila (ECA) e extrato controle em n-butanol (ECB), cujos espectros de RMN de ^1H foram obtidos (Figura 2 a 4).

Figura 2. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato controle em clorofórmio (ECC).

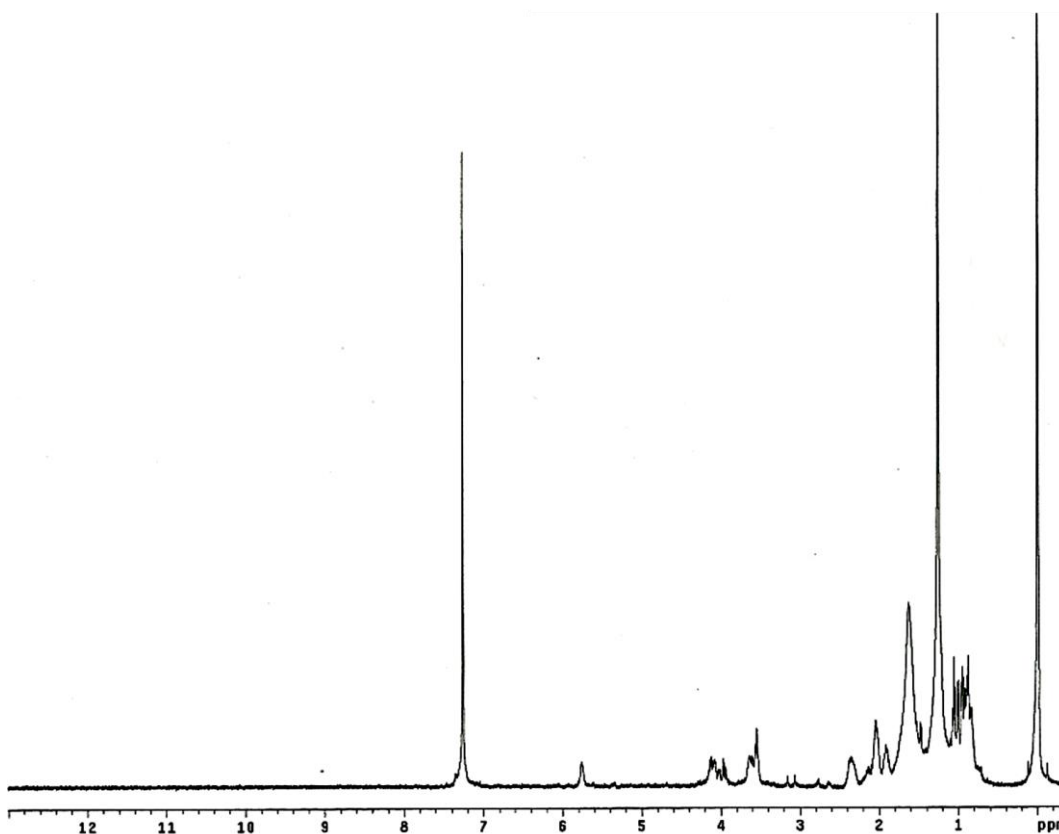


Figura 3. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] do extrato controle em acetato de etila (ECA).

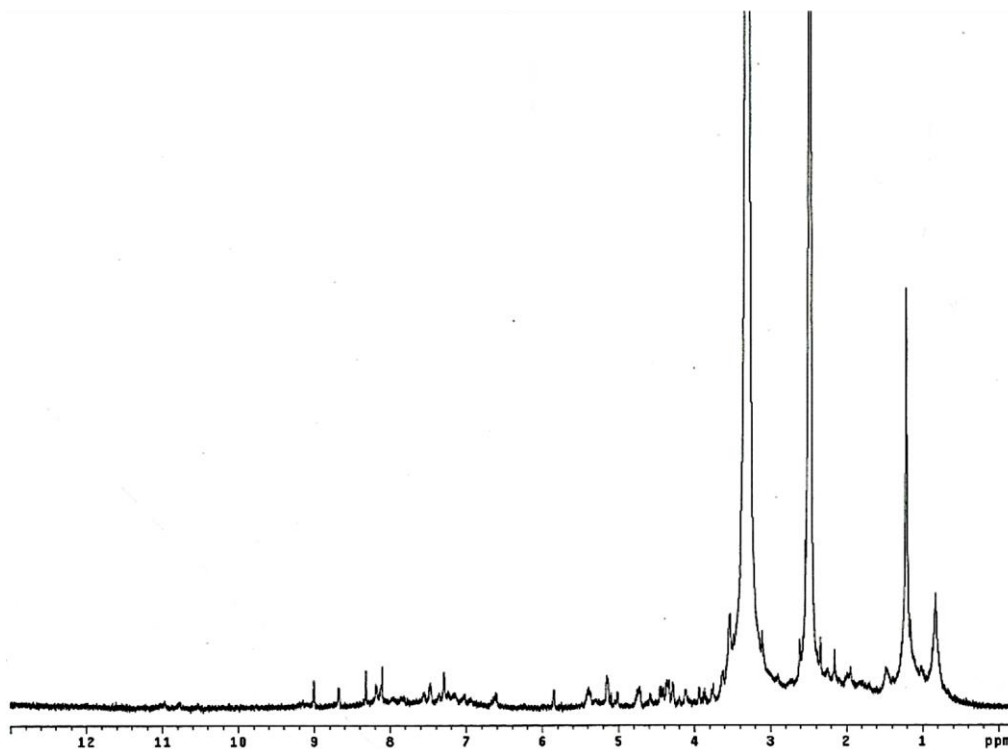
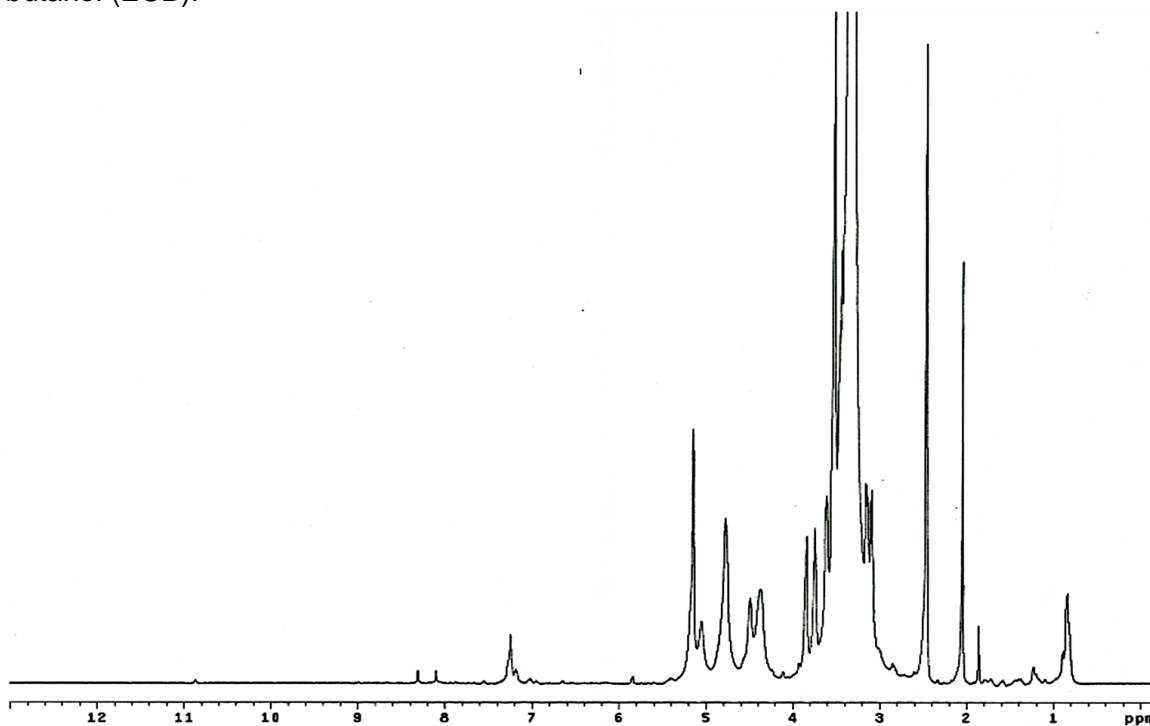


Figura 4. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] do extrato controle em n-butanol (ECB).



Após análises de RMN de ^1H dos seis extratos obtidos a partir da extração do micélio e do filtrado de *Penicillium citrinum*, foram selecionados para estudos cromatográficos os extratos em clorofórmio do micélio (ECM) e do filtrado (ECF) e o extrato em acetato de etila do micélio (EAM) foi submetido à metilação para caracterização por CG-EM (Figuras 5 a 8).

Figura 5. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato clorofórmico do micélio (ECM).

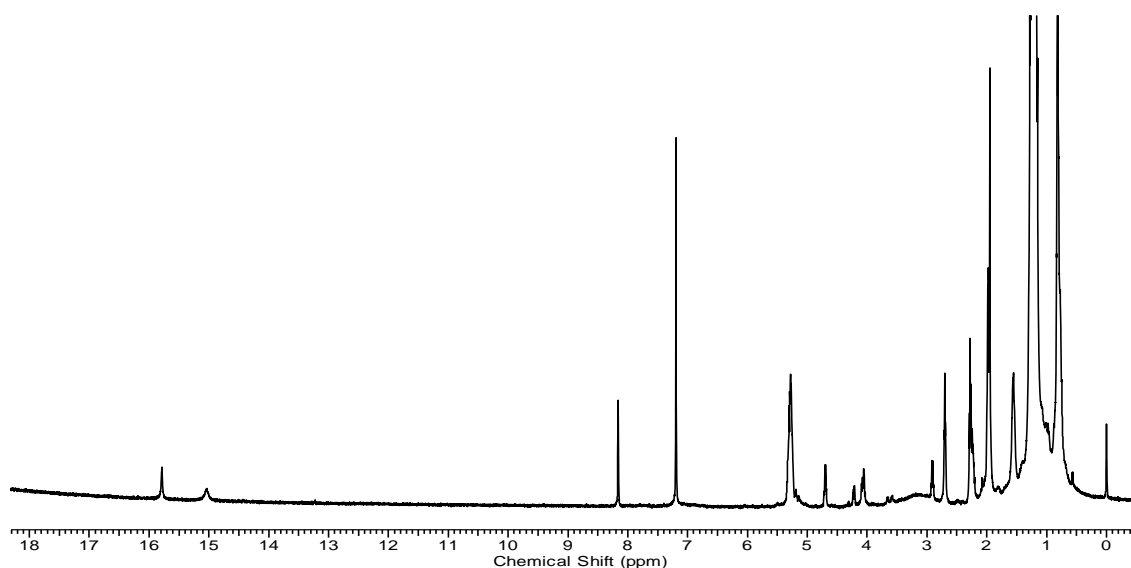


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato clorofórmico do filtrado (ECF).

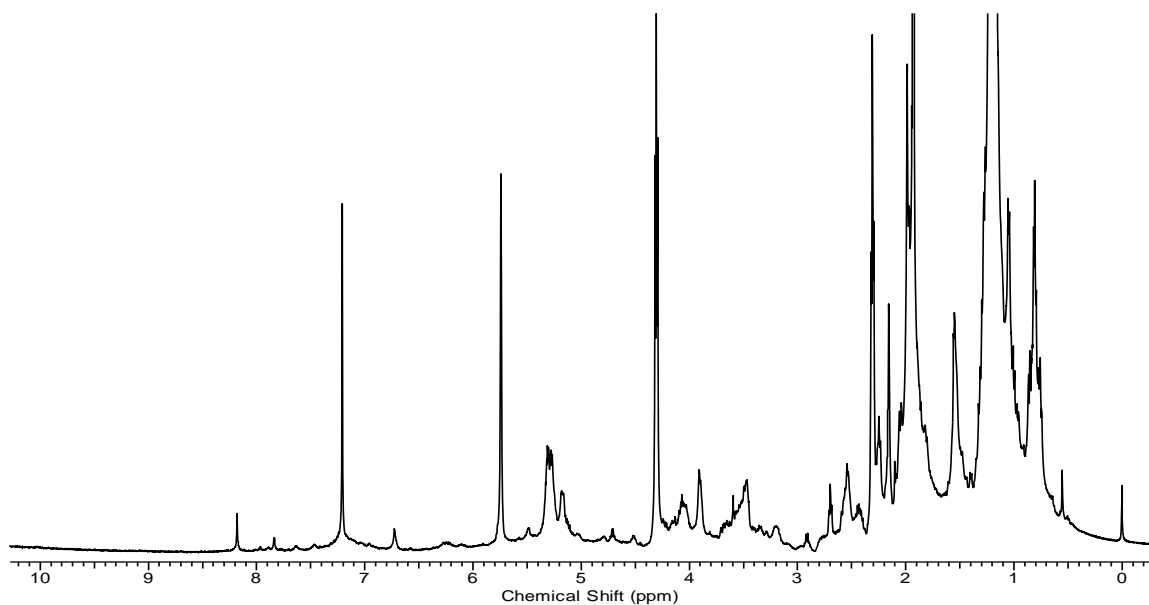


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) antes da metilação.

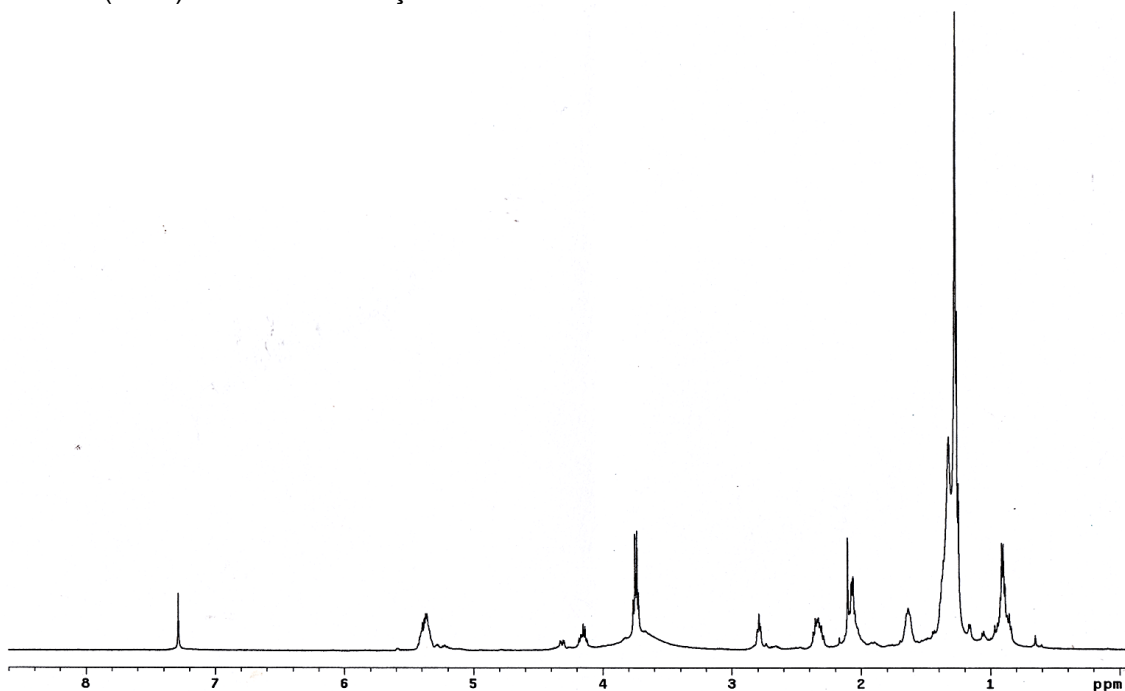
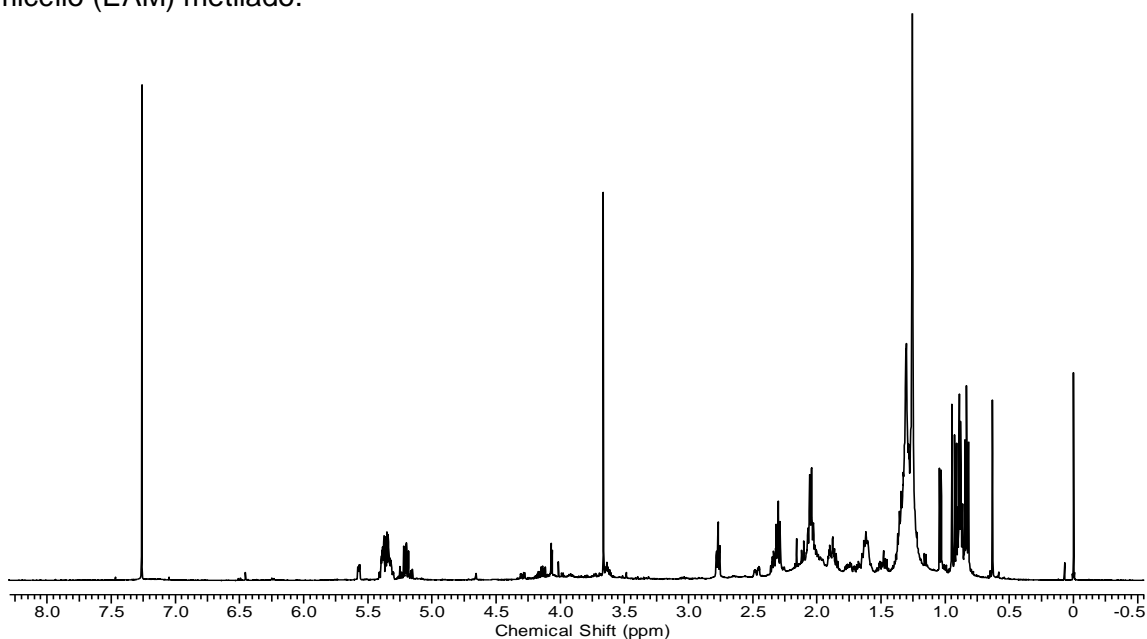


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.



Os extratos em acetato de etila do filtrado (EAF), metanólico do micélio (EMM) e n-butanólico do filtrado (EBF) foram reservados para serem analisados posteriormente (Figuras 9 a 11).

Figura 9. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do filtrado (EAF).

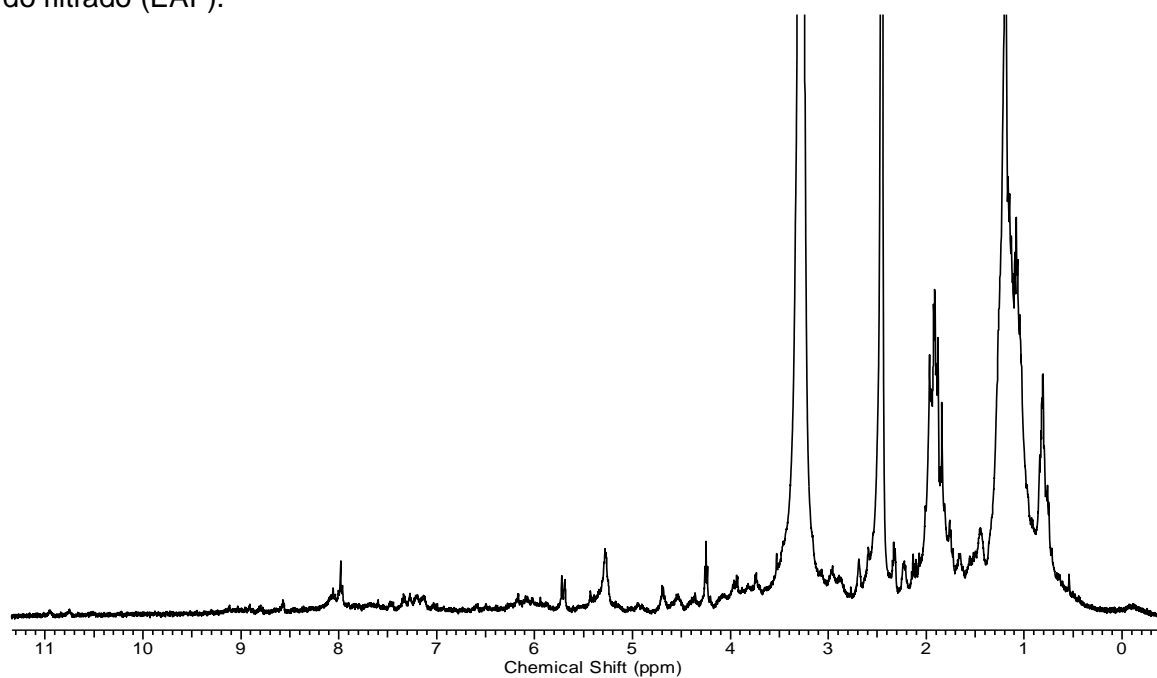


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO-d_6 , δ (ppm)] do extrato metanólico do micélio (EMM).

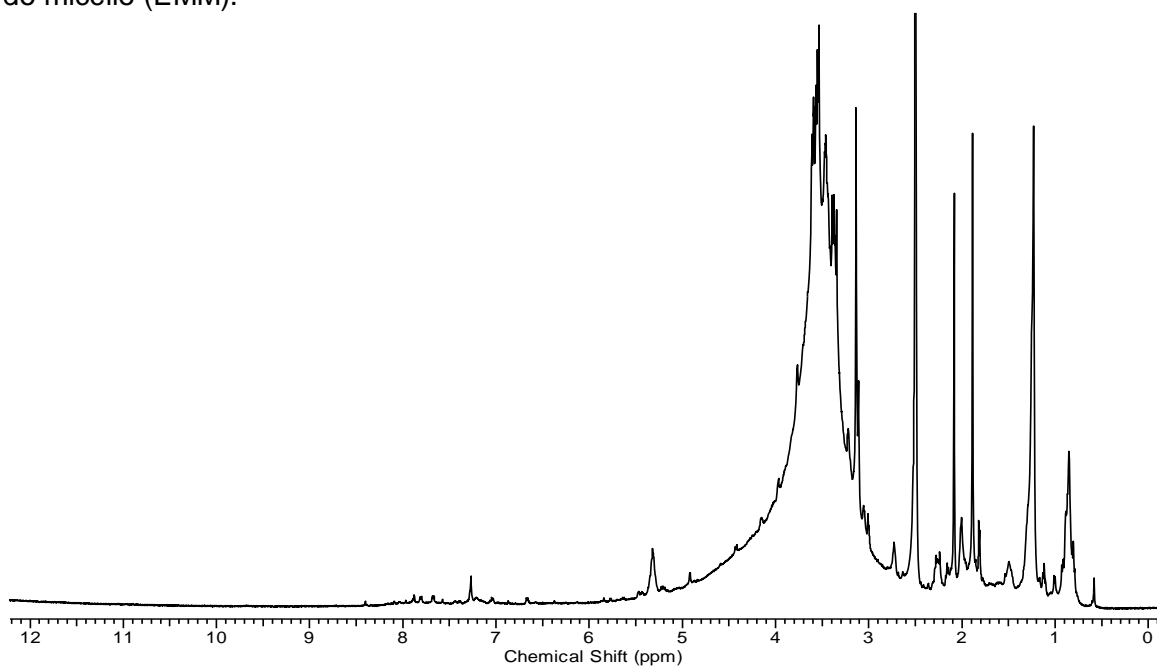
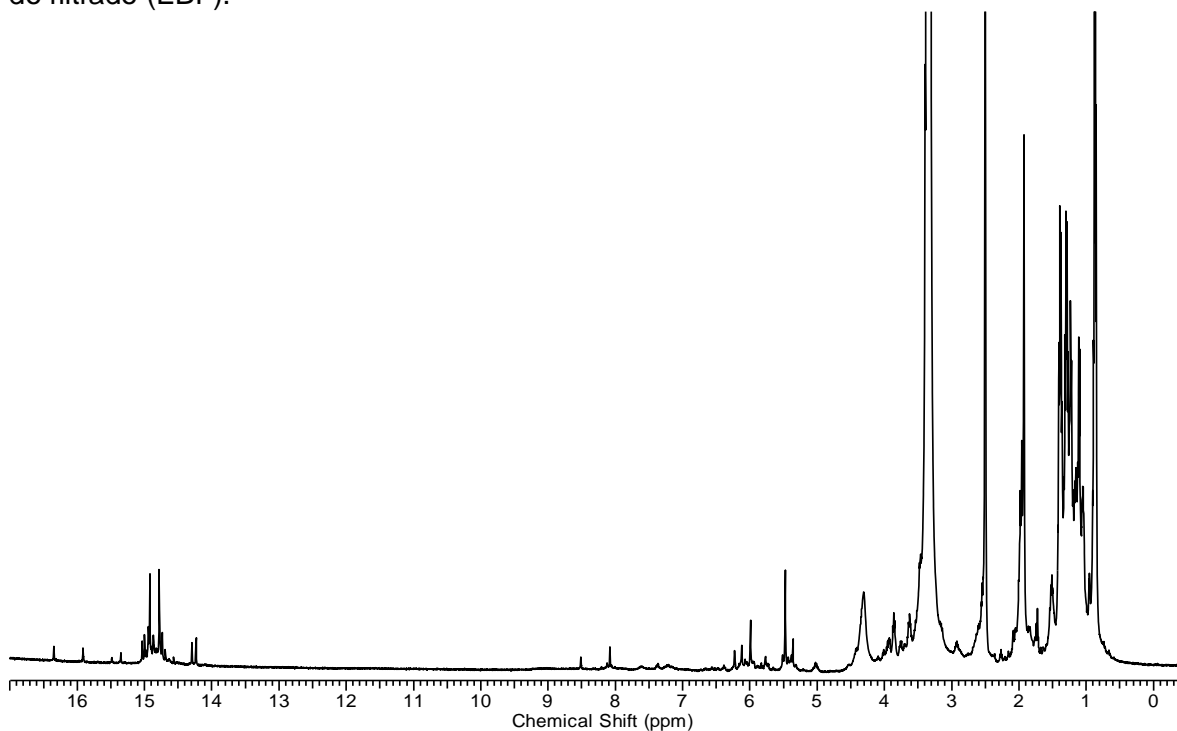


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)] do extrato n-butanólico do filtrado (EBF).



6. Isolamento dos constituintes químicos

6.1 Fracionamento do extrato clorofórmico do micélio (ECM)

O extrato clorofórmico do micélio (ECM), com massa de 3,3 g, foi fracionado por cromatografia em coluna por adsorção (CC) (Figura 12). Inicialmente, utilizou-se clorofórmio para eluição da coluna e em seguida a polaridade deste sistema foi gradualmente aumentada por meio da adição de metanol. As 55 frações obtidas do ECM foram coletadas em balões de 250mL e concentradas à pressão reduzida em rota-evaporador (Tabela 1).

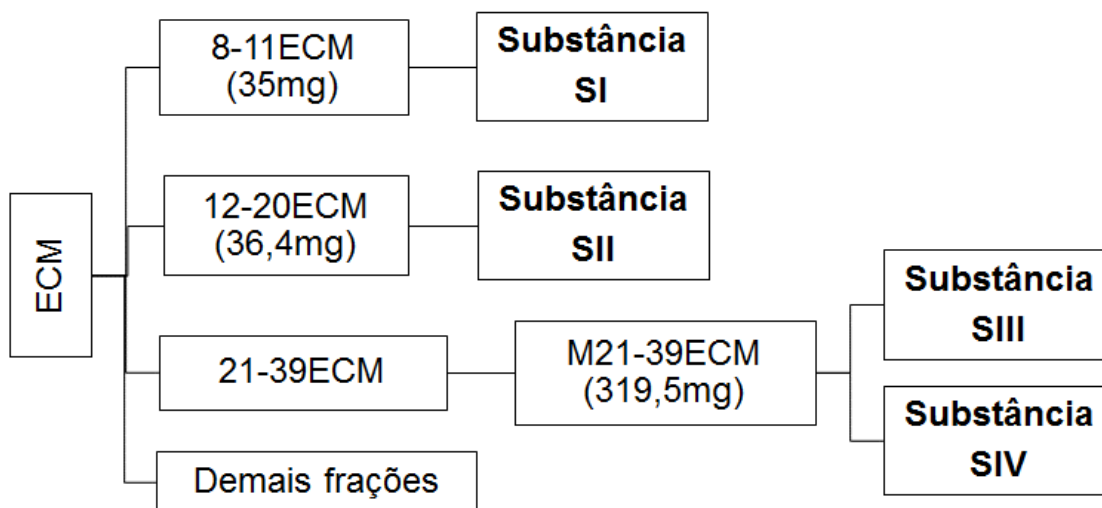
Figura 12. Fracionamento em coluna do ECM.**Tabela 1.** Frações obtidas a partir da cromatografia em coluna do extrato clorofórmico do micélio de *Penicillium citrinum* (ECM).

Frações	Sistema de solventes	Massa (mg)	Massa Total (g)
1ECM a 22ECM	Clorofórmio	273,0	
23ECM a 33ECM	Clorofórmio/ Metanol 99:1	177,5	
34ECM a 38ECM	Clorofórmio/ Metanol 98:2	223,4	
39ECM a 43ECM	Clorofórmio/ Metanol 95:5	-	
44ECM a 48ECM	Clorofórmio/ Metanol 90:10	152,2	3,3g
49ECM a 53ECM	Clorofórmio/ Metanol 80:20	48,7	
54ECM a 55ECM	Metanol	25,2	

As frações adquiridas foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). As frações que apresentavam perfil químico semelhantes foram reunidas resultando em 22 frações, as quais foram nomeadas 1-2ECM a 55ECM.

Após análise por CCDC e RMN de ^1H as frações 8-11ECM, 12-20ECM e 21-39ECM foram escolhidas para estudo, após análise por CCDC e RMN de ^1H (Figura 13).

Figura 13. Substâncias isoladas a partir das frações 8-11ECM, 12-20ECM e 21-39ECM do extrato clorofórmico do micélio (ECM).



6.1.1 Estudo da fração 8-11ECM

A fração 8-11ECM, sólido amorfo de coloração vinho foi submetida à sucessivas lavagens com acetona, resultando na obtenção de um sólido branco cristalino. Após análise de RMN de ^1H e infravermelho, esse composto foi identificado como a substância SI (Figura 13).

6.1.2 Estudo da fração 12-20ECM

A fração 12-20ECM de aspecto oleoso e coloração amarelada e foi caracterizada através de análises por RMN de ^1H e de ^{13}C , infravermelho e CG-EM, após tratamento com reação de metilação, como substância SII (Figura 13).

6.1.3 Estudo da fração 21-39ECM

A fração 21-39ECM, de aspecto oleoso e cor amarelo claro, foi classificada como uma mistura de ácidos graxos, por meio de análises CCDC, RMN de ^1H , ^{13}C , infravermelho e após reação de metilação, a amostra foi analisada por CG-EM, sendo renomeada como M21-39ECM e identificada como uma mistura dos ésteres metílicos de ácidos carboxílicos, as substâncias SIII e SIV (Figura 13).

6.2 Fracionamento do extrato clorofórmico do filtrado (ECF)

O extrato clorofórmico do filtrado (ECF), de massa 1,2g, foi fracionado por CC, seguindo a mesma metodologia anterior, sendo que os sistemas de eluição foram constituídos de misturas dos solventes: diclorometano e metanol em gradiente crescente de polaridade (Figura 14, Tabela 2).

Figura 14. Fracionamento em coluna do ECF.



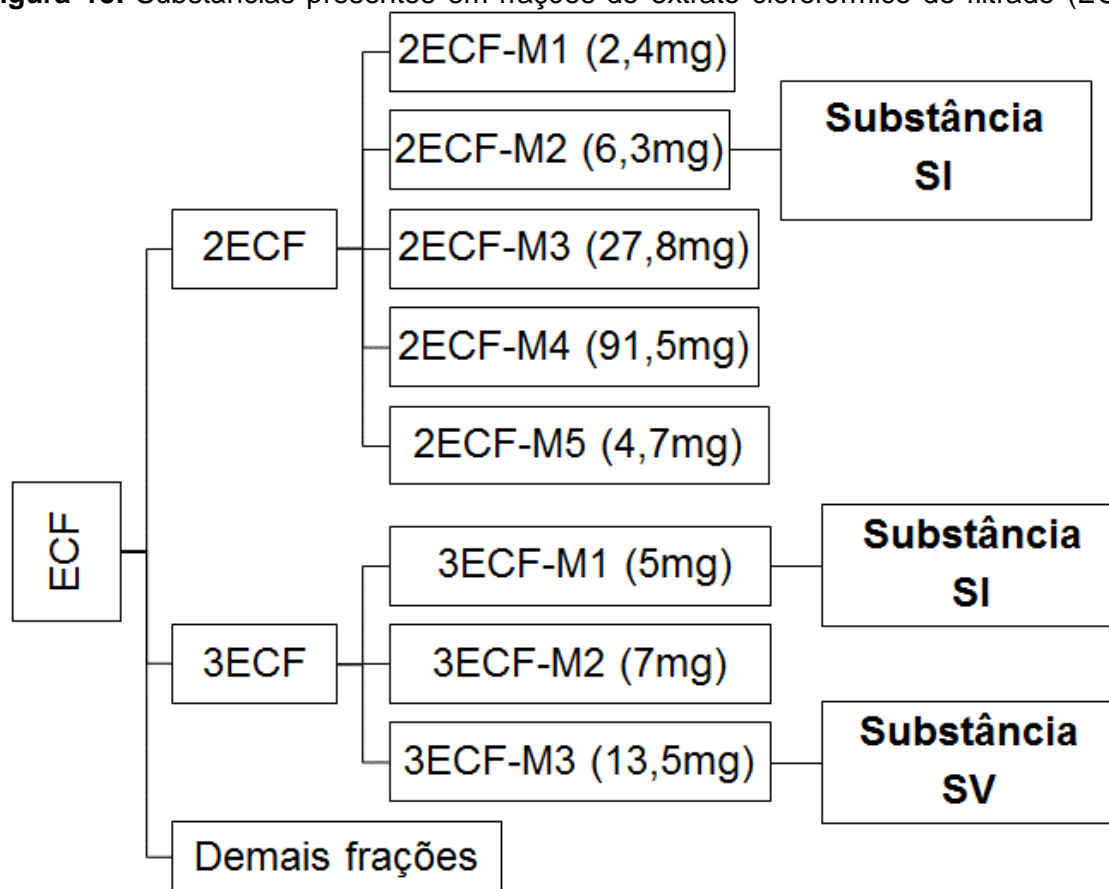
Foram obtidas 25 frações do ECF, nomeadas de 1ECF a 25ECF, as quais foram concentradas em rota-evaporador e analisadas por CCDC (Tabela 2).

Tabela 2. Frações obtidas a partir da cromatografia em coluna do extrato clorofórmico do micélio de *Penicillium citrinum* (ECF).

Frações	Sistema de solventes	Massa (mg)	Massa Total (g)
1ECF e 2ECF	Diclorometano	100,0	
3ECF	Diclorometano/ Metanol 99:1	37,1	
4ECF a 12ECF	Diclorometano/ Metanol 98:2	146,1	
13ECF	Diclorometano/ Metanol 97:3	-	
14ECF a 19ECF	Diclorometano/ Metanol 95:5	-	
20ECF	Diclorometano/ Metanol 90:10	14,2	1,2g
21ECF	Diclorometano/ Metanol 80:20	-	
22ECF	Diclorometano/ Metanol 70:30	58,0	
23ECF	Diclorometano/ Metanol 50:50	-	
24ECF a 25ECF	Metanol	-	

Após análise por RMN de ^1H as frações: 1ECF, 2ECF e 3ECF foram escolhidas para estudo (Figura 15).

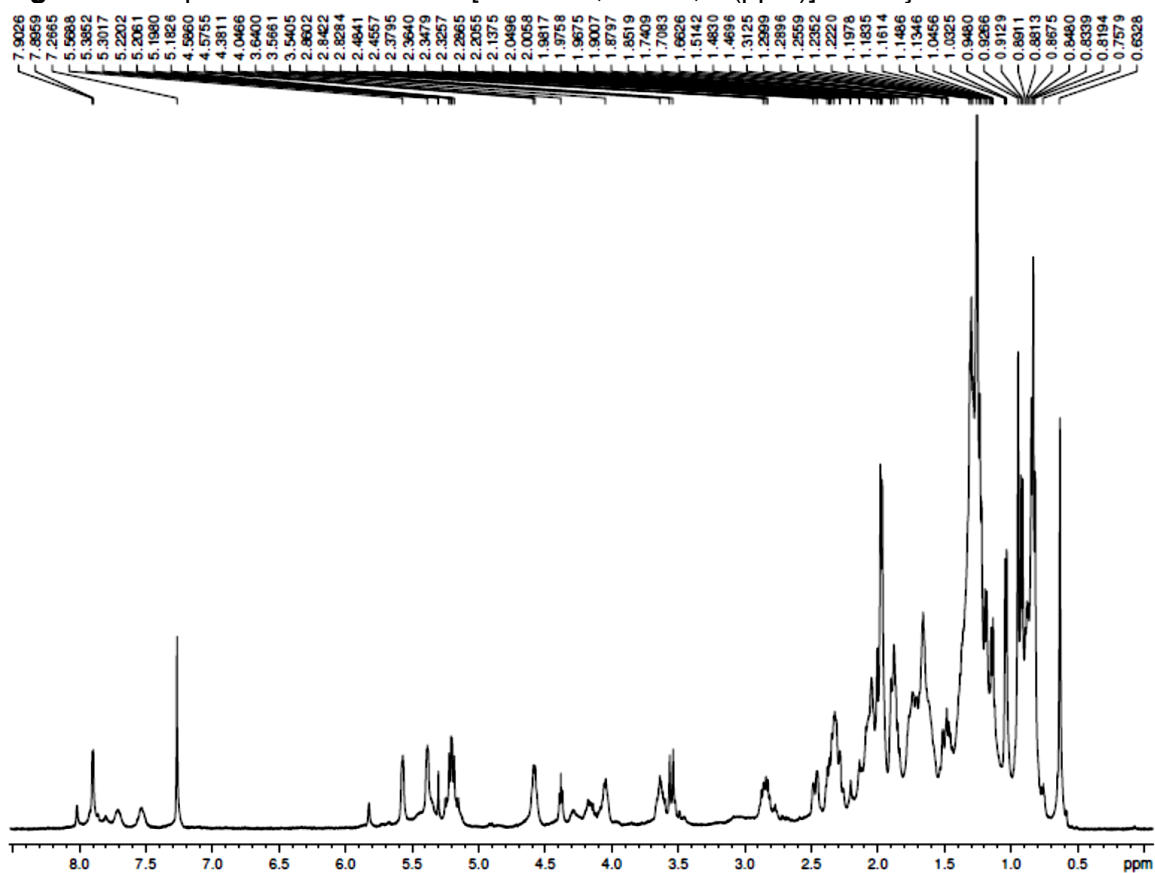
Figura 15. Substâncias presentes em frações do extrato clorofórmico do filtrado (ECF).



6.2.1 Estudo da fração 2ECF

A fração 2ECF apresentou aspecto oleoso com consistência pastosa e coloração castanho-amarelada. Posteriormente a análises de RMN de ^1H (Figura 16) e em CCDC, a fração foi submetida à separação por CCDP, utilizando clorofórmio como sistema de eluição, a partir da qual foram originadas 5 novas frações: 2ECF-M1; 2ECF-M2; 2ECF-M3; 2ECF-M4 e 2ECF-M5 (Figura 15).

Figura 16. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF.



Das frações adquiridas da CCDP de 2ECF, as frações 2ECF-M1; 2ECF-M2; 2ECF-M3 e 2ECF-M4 foram analisadas por RMN de ^1H (Figuras 17 a 20). Por meio deste procedimento foi possível identificar a substância SI, na fração 2ECF-M2 (Figura 18). As frações restantes foram reservadas para estudos posteriores.

Figura 17. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M1.

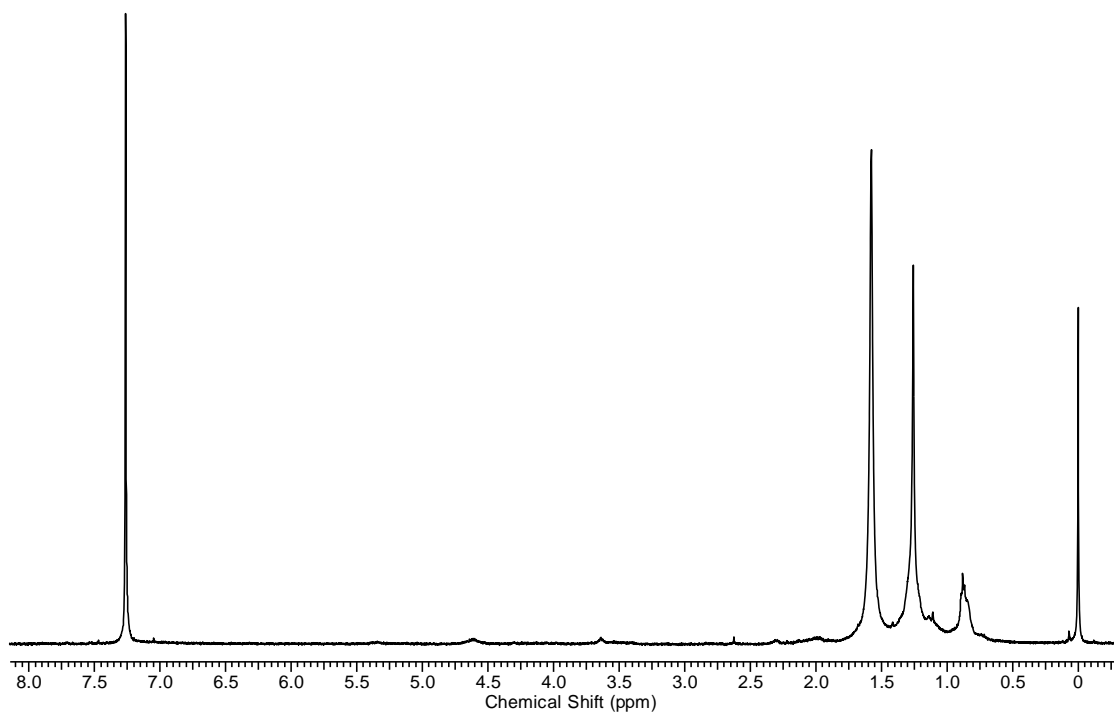


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M2.

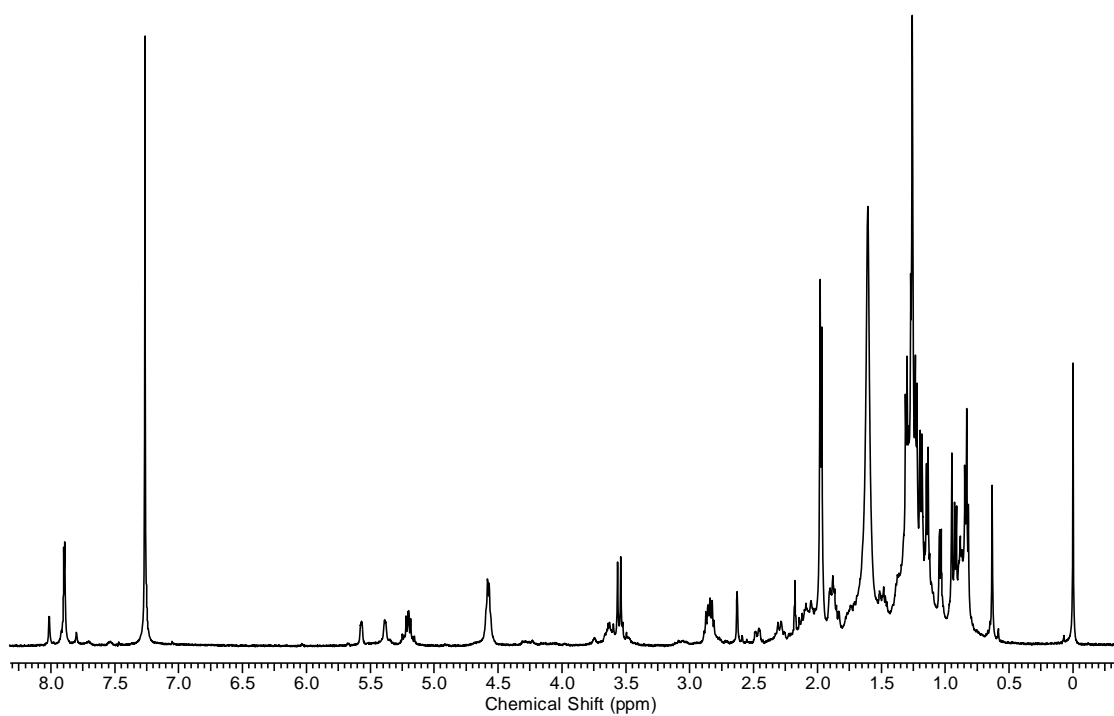


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M3.

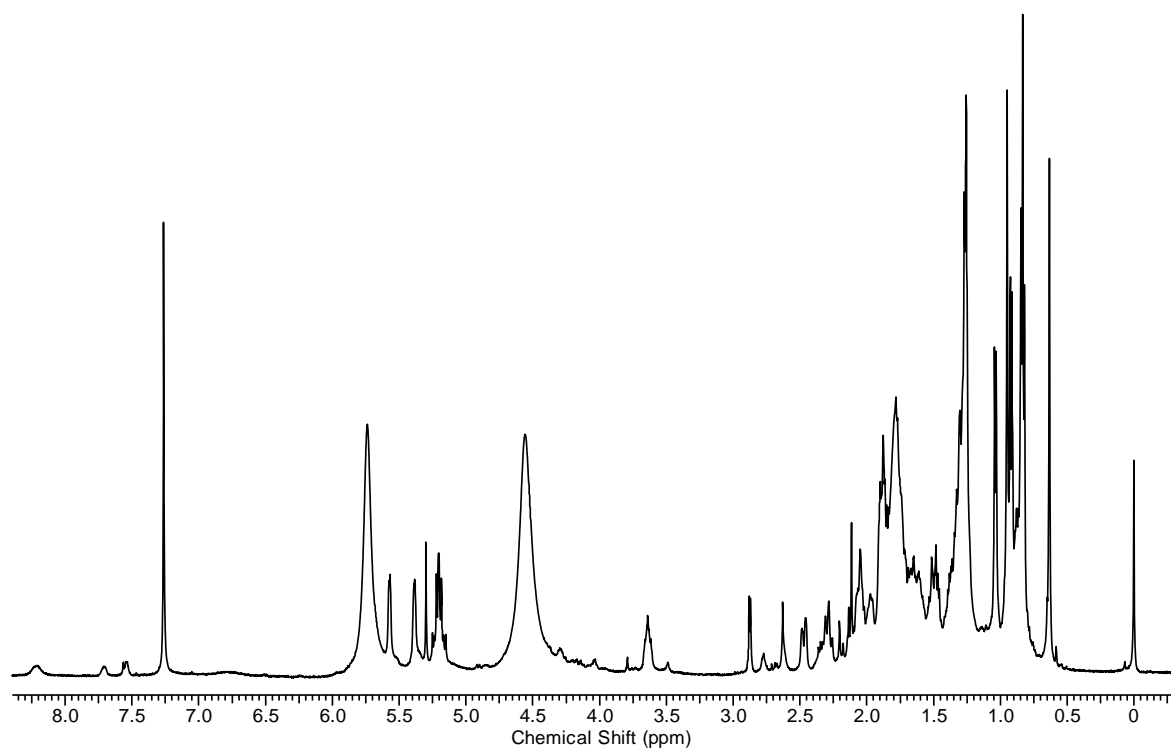
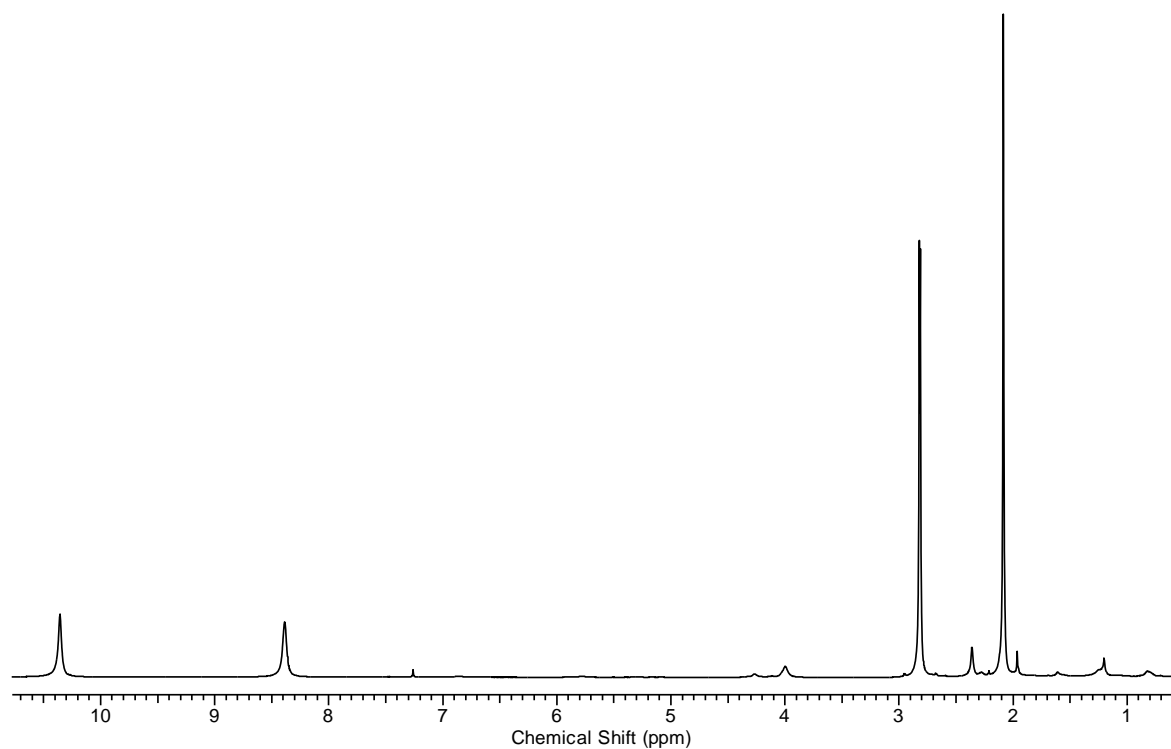


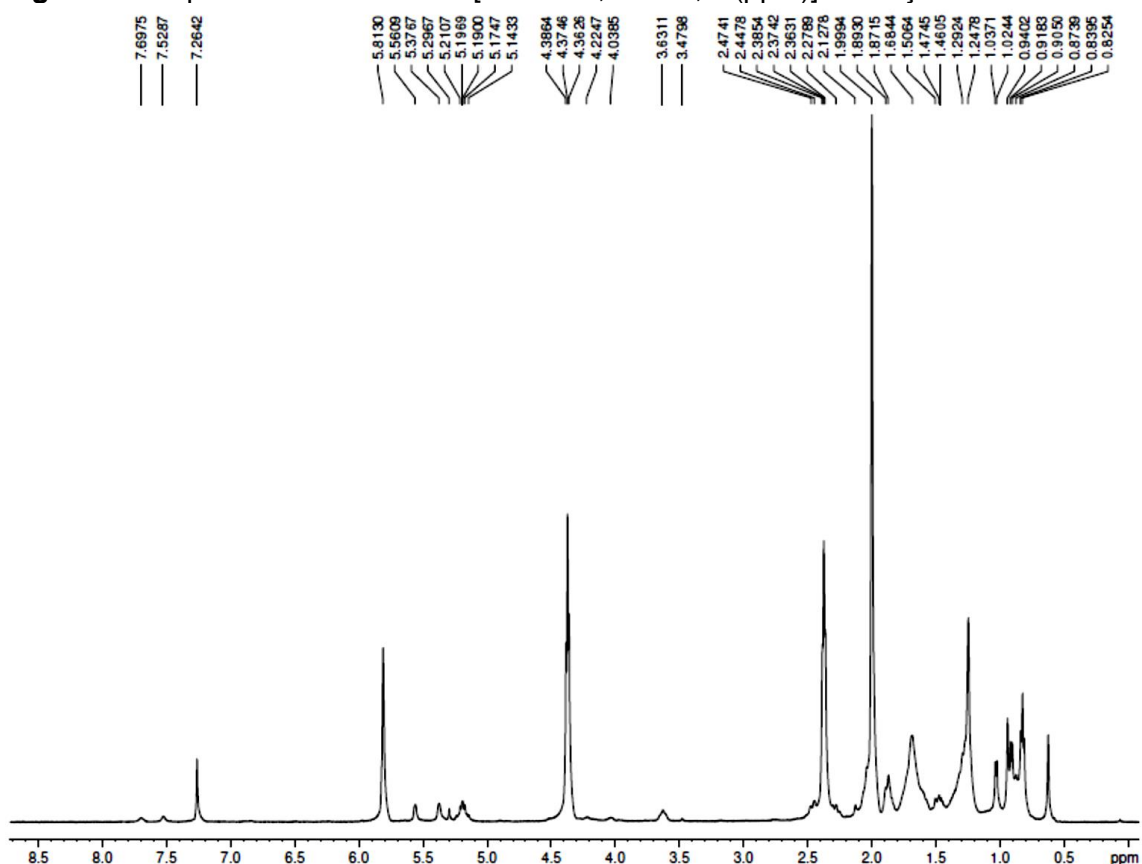
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M4.



6.2.2 Estudo da fração 3ECF

A fração 3ECF foi isolada na forma de óleo castanho-amarelado. Em seguida a análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 21) e observação em CCDC, a amostra foi separada por CCDP, cujo sistema de eluição utilizado foi hexano/acetato de etila na proporção de 95:5. Deste procedimento, resultaram 3 frações: 3ECF-M1; 3ECF-M2 e 3ECF-M3 (Figura 15).

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF.



As frações 3ECF-M1; 3ECF-M2 e 3ECF-M3 foram submetidas a RMN de ^1H (Figuras 22 a 24). Em 3ECF-M1, a análise do espectro indicou a presença da substância SI (Figura 22). No espectro de RMN de ^1H da fração 3ECF-M3 (Figura 24) é possível observar a presença de sinais que indicativos da substância SV; e após caracterização via RMN de ^{13}C confirmou-se a presença do composto por comparação com dados da literatura. A fração 3ECF-M2 encontra-se em processo de purificação e ainda não possui estruturas elucidadas.

Figura 22. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M1.

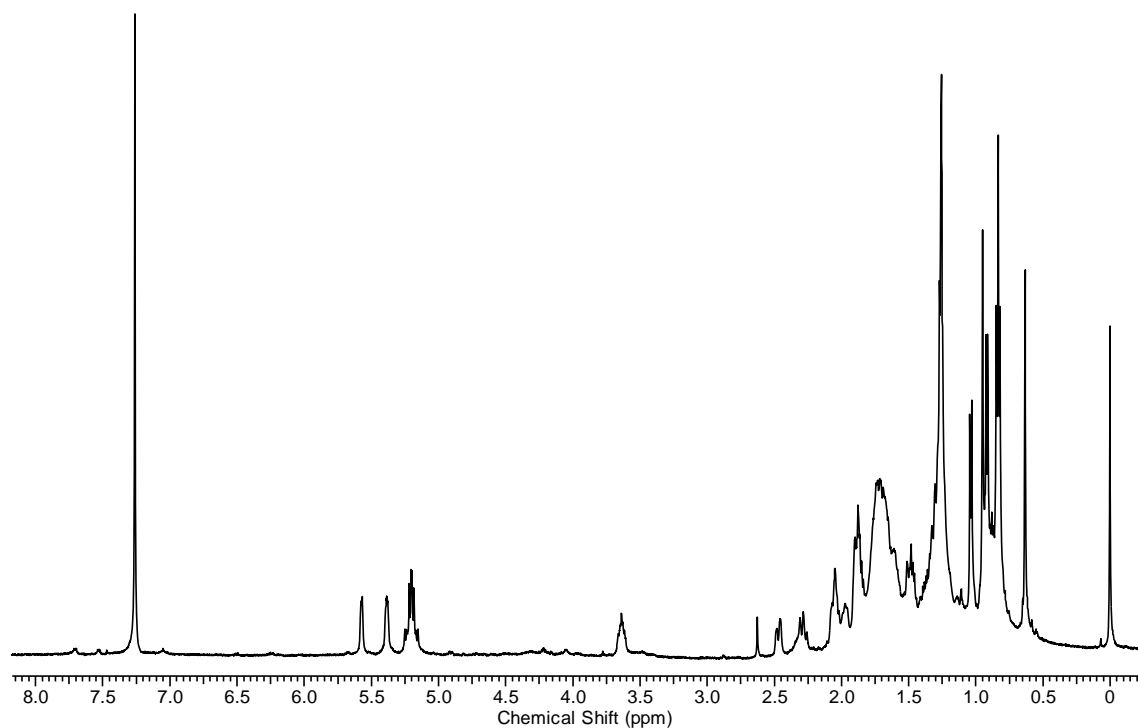


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M2.

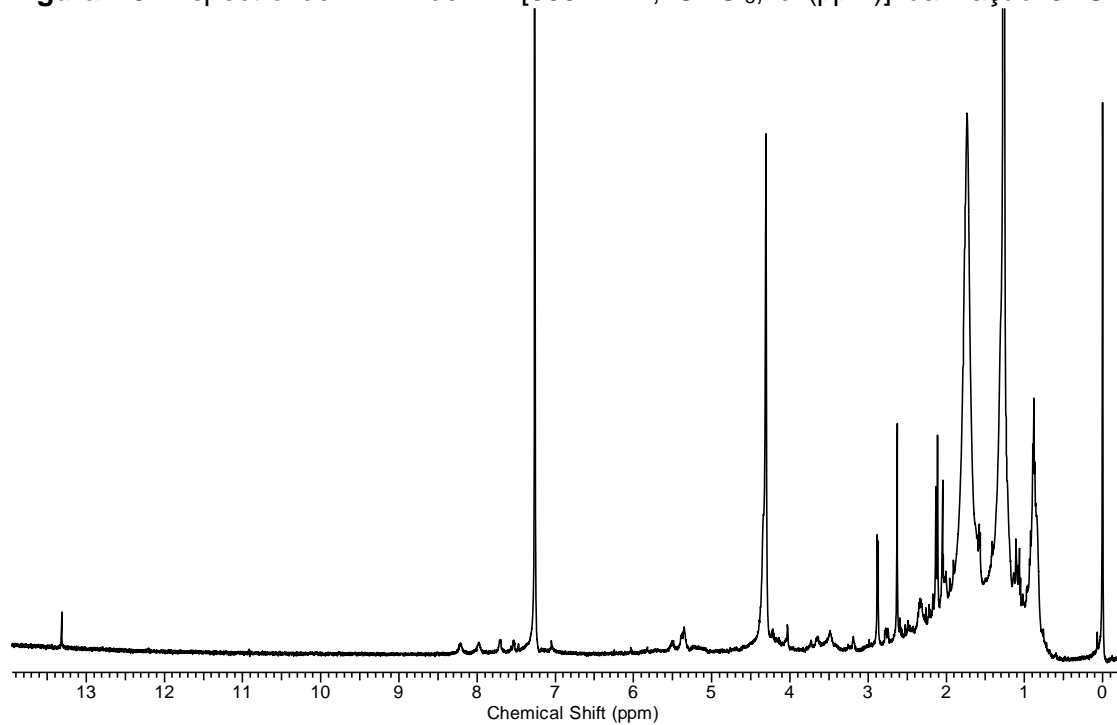
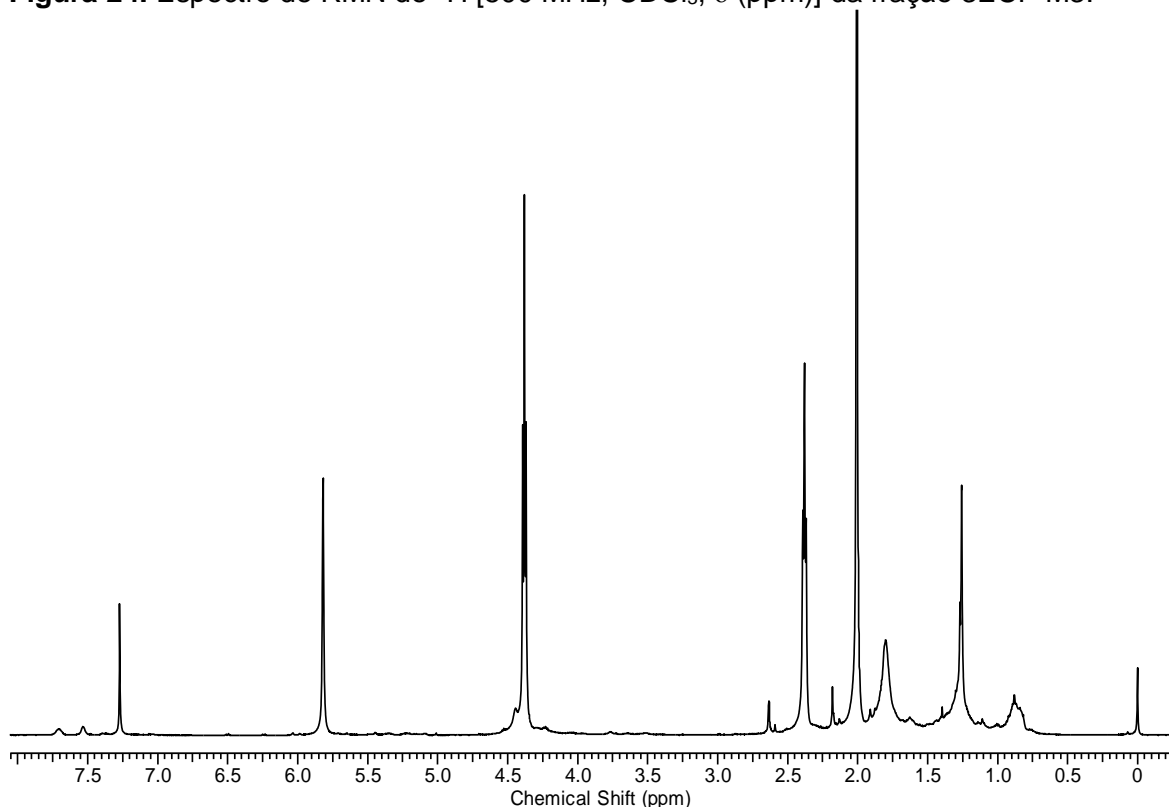


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M3.



6.3 Estudo do extrato acetato de etila do micélio (EAM)

A análise do espectro de IV e RMN de ^1H do extrato de acetato de etila (EAM) antes da reação de metilação (Figura 25 e 26) revelaram a presença de ácidos graxos. O EAM de aspecto pastoso, coloração castanha, solúvel em clorofórmio foi metilado e submetido a caracterização por CG-EM (Figura 27) e infravermelho (Figura 28). Após este procedimento, o EAM metilado, foi novamente estudado por RMN de ^1H e ^{13}C e a análise desses espectros permitiu a confirmação da presença das substâncias SI, SIII e SVI (Figuras 29 e 30). Entretanto, o EAM ainda encontra-se em processo de análise visando elucidação de novos compostos.

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) antes da reação de metilação.

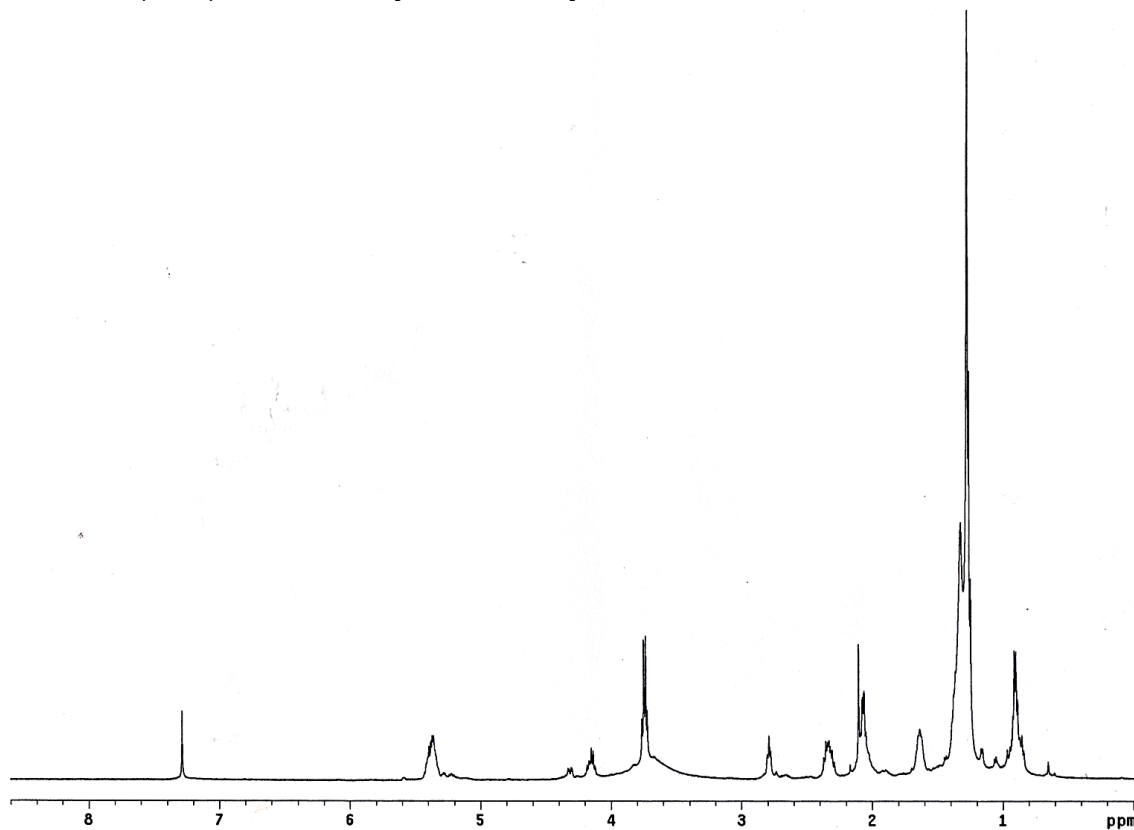


Figura 26. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do Extrato de Acetato de Etila (EAM) de *Penicillium citrinum* antes da reação de metilação.

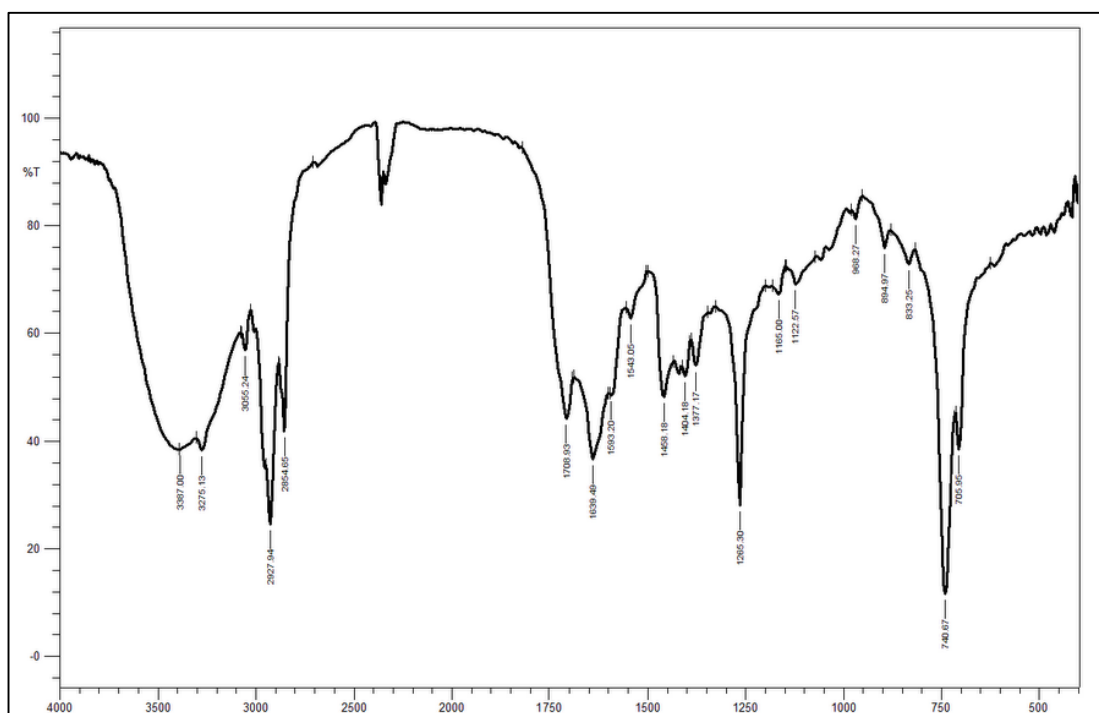


Figura 27. Cromatograma de íons totais do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.

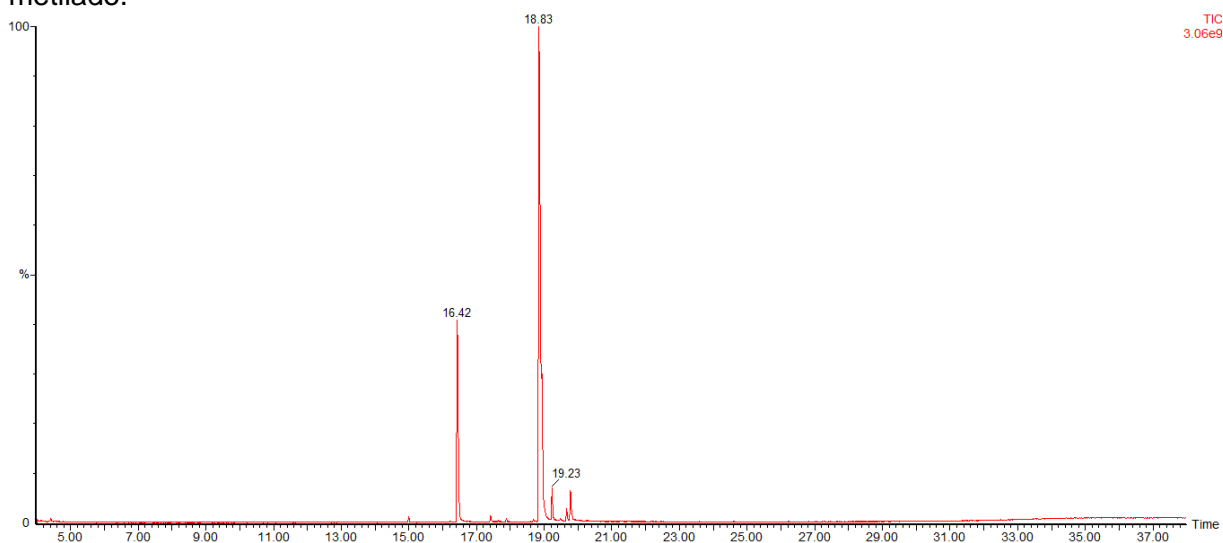


Figura 28. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do Extrato de Acetato de Etila do Micélio (EAM) de *Penicillium citrinum* após reação de metilação.

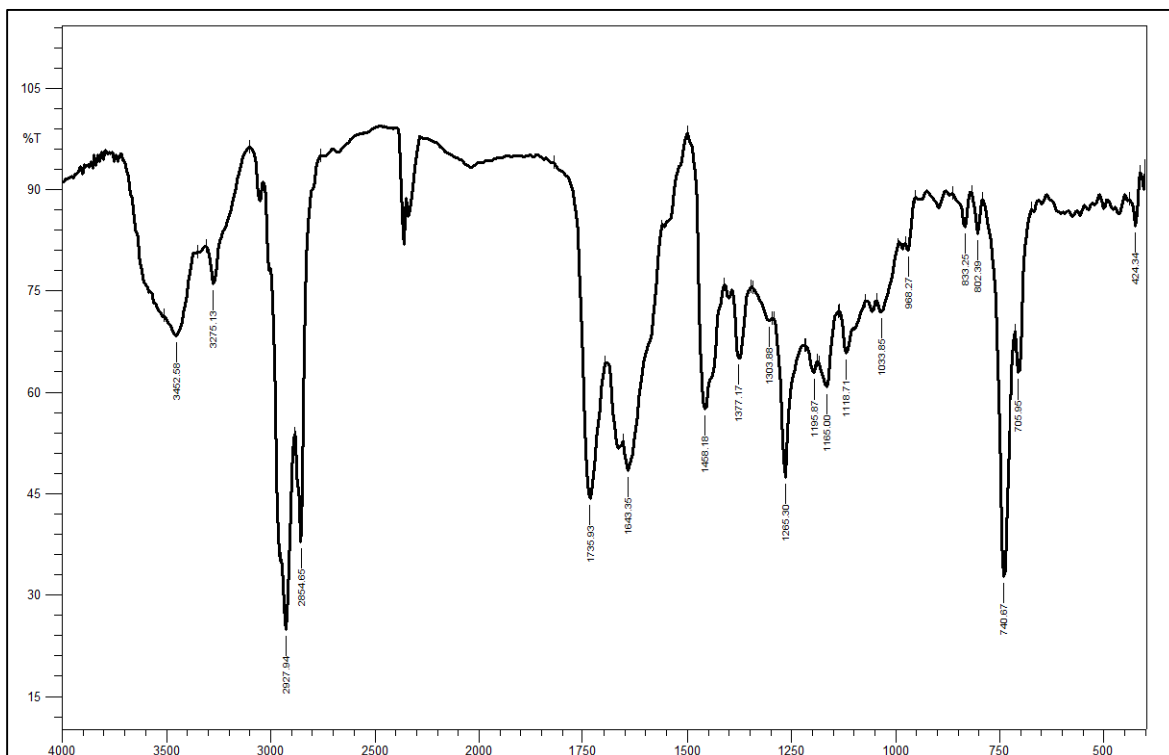


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.

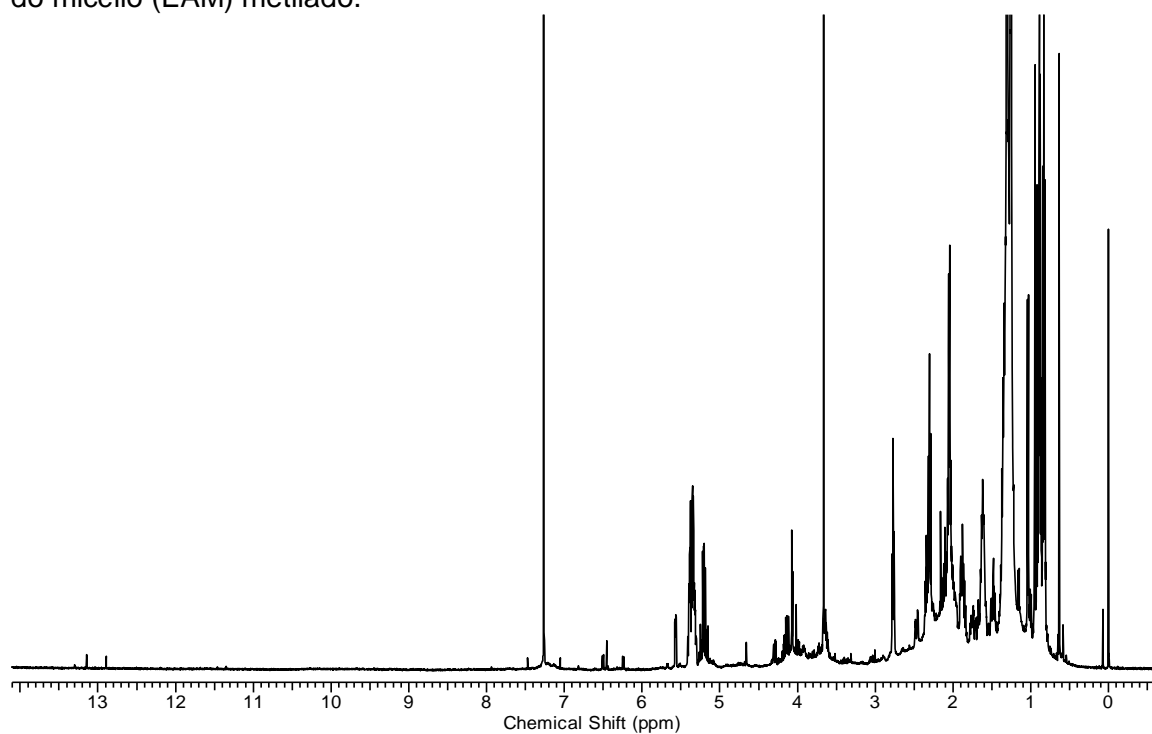
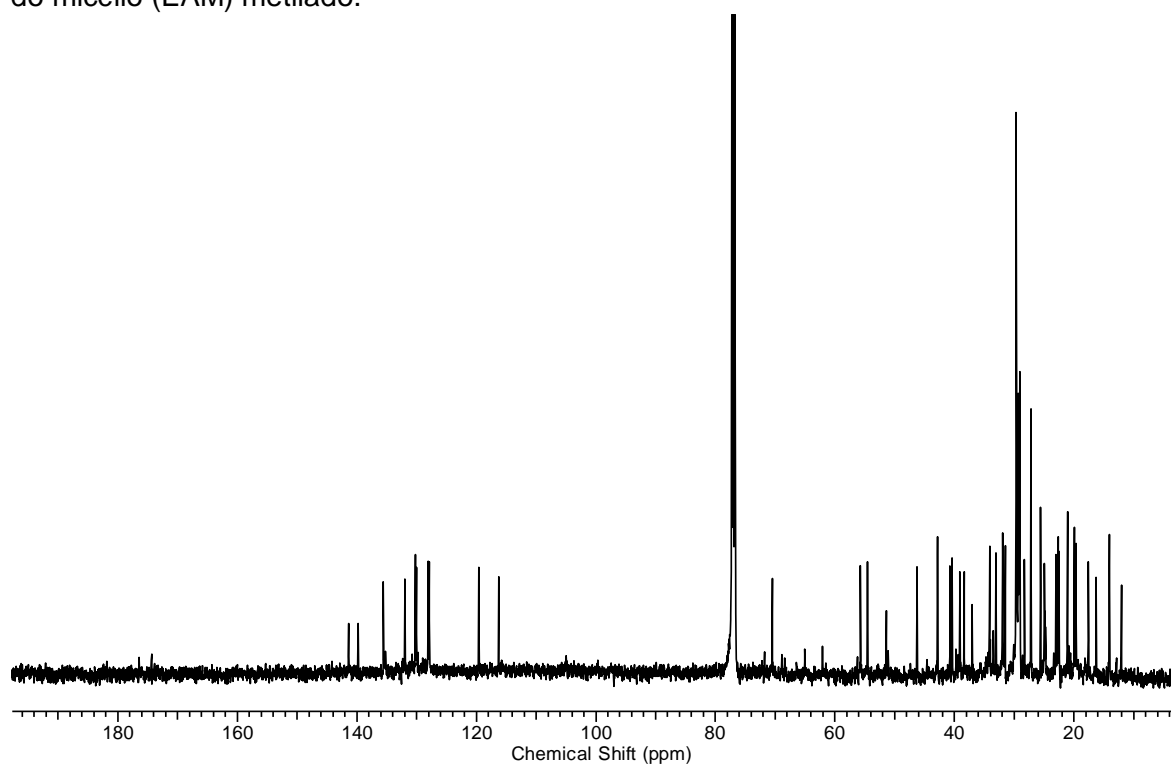


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado.

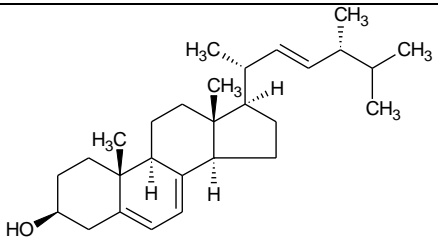
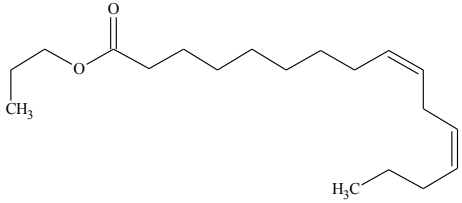
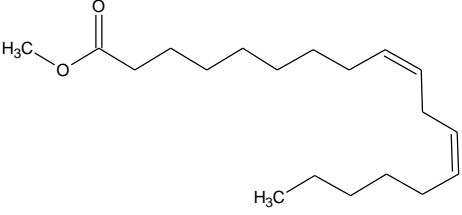
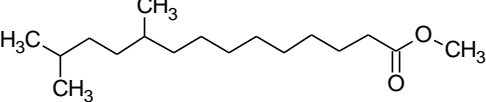
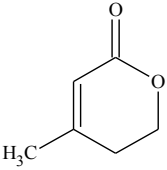


RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Constituintes químicos isolados e identificados de *Penicillium citrinum*

Os métodos cromatográficos aplicados aos extratos de clorofórmio do micélio (ECM), clorofórmio do filtrado (ECF) e acetato de etila do micélio (EAM), resultaram no isolamento e identificação de 5 substâncias: ergosterol (SI); 9,12 hexadecadienoato de n-propil (SII); 9,12 octadecadienoato de metila (SIII); 10,13-dimetiltetradecanoato de metila (SIV) e S-3-metilpent-2-enolactona (SV) (Tabela 3).

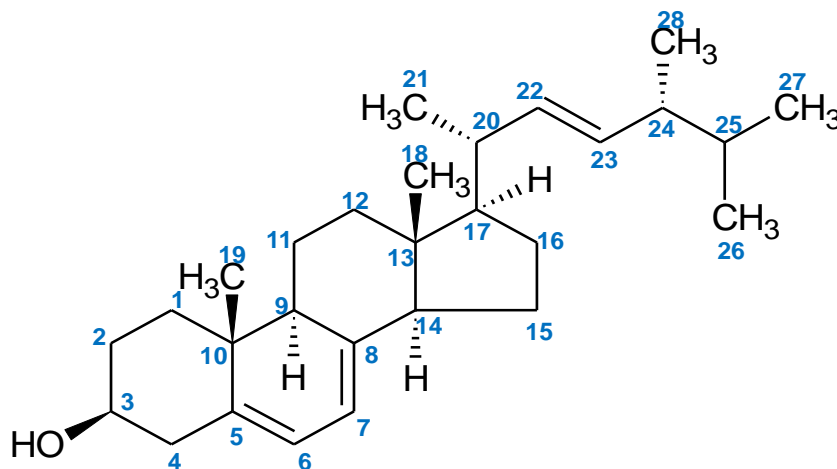
Tabela 3. Constituintes químicos isolados e identificados do micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*.

Código da substância	Estrutura	Amostras
Substância (SI)		Fração 8-11ECM Fração 2ECF-M2 Fração 3ECF-M1 EAM (metilado)
Substância (SII)		Fração 12-20ECM
Substância (SIII)		Fração 21-39ECM EAM (metilado)
Substância (SIV)		Fração 21-39ECM EAM (metilado)
Substância (SV)		Fração 3ECF-M3

1.1 Identificação da substância SI

O composto SI (75 mg) (Figura 31) foi isolado como um sólido cristalino de coloração branca em frações de polaridade intermediária do: extrato clorofórmico do micélio (ECM) na fração 8-11ECM; extrato clorofórmico do filtrado (ECF) nas frações 2ECF-M1 e 3ECF-M2 e extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado (Tabela 4). Nas frações 8-11ECM, 2ECF-M1 e 3ECF-M2, a descrição de SI foi realizada somente por meio de espectro de RMN de ^1H (Tabela 4). Para o EAM metilado, a caracterização do ergosterol foi feita por RMN de ^1H e ^{13}C , além de espectroscopia na região do infravermelho, sendo então os dados comparados com a literatura (Figuras 35 a 36). Assim, identificou-se SI, com a estrutura do composto esteroidal, ergosterol, de fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$ (Figura 31) (MARINHO, 2005; ROSSET, 2011; CHEN et al., 2013).

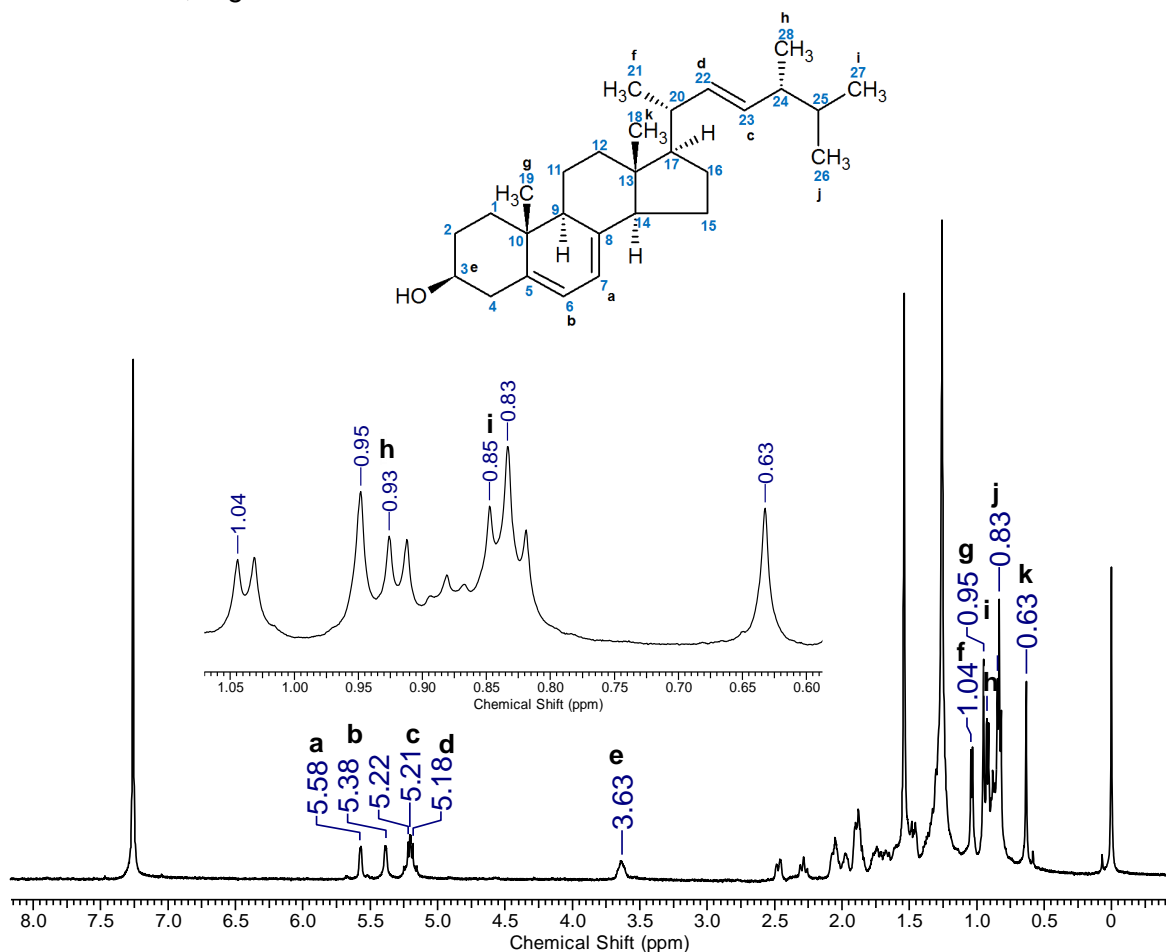
Figura 31. Estrutura proposta para a substância SI, identificada como Ergosterol.



A análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 8-11ECM, demonstrou deslocamentos característicos de substâncias da classe dos esteróides (Figura 32), singletos proeminentes em δ 0,63 e em δ 0,95 (Figura 32k, 32g; Tabela 4), tripletos em δ 0,83 e em δ 0,85 (Figura 32j, 32i; Tabela 4), além de dubletos em δ 0,93 e δ 1,04 (Figura 32h, 32f; Tabela 4), sinais estes, que sugerem a presença de hidrogênios metílicos terminais ao longo da cadeia. Observou-se um multipletto em δ 3,63 indicando existência de hidrogênio metínico (Figura 32e; Tabela 4). Foram visualizados ainda no espectro sinais de hidrogênios olefínicos

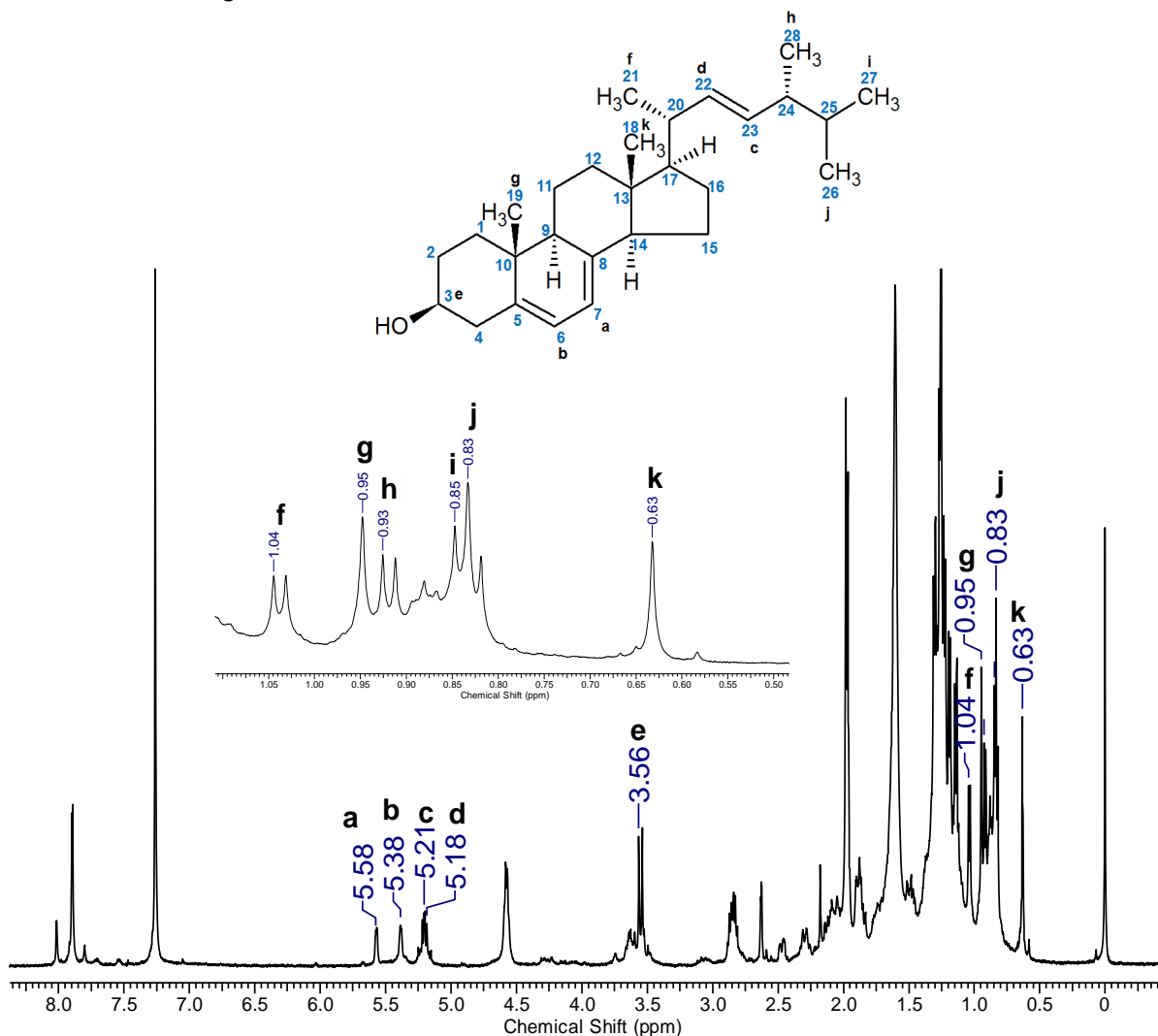
na molécula, como nos multipletos em δ 5,18, δ 5,21, δ 5,38 e δ 5,58 (Figura 32d, 32c, 32b, 32a; Tabela 4) (MARINHO, 2005; CHEN, 2013). Assim, observa-se que os dados espectrais observados no espectro de RMN ^1H são equivalentes aqueles relatados em literatura para o ergosterol.

Figura 32. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 8-11ECM para a substância SI, ergosterol.



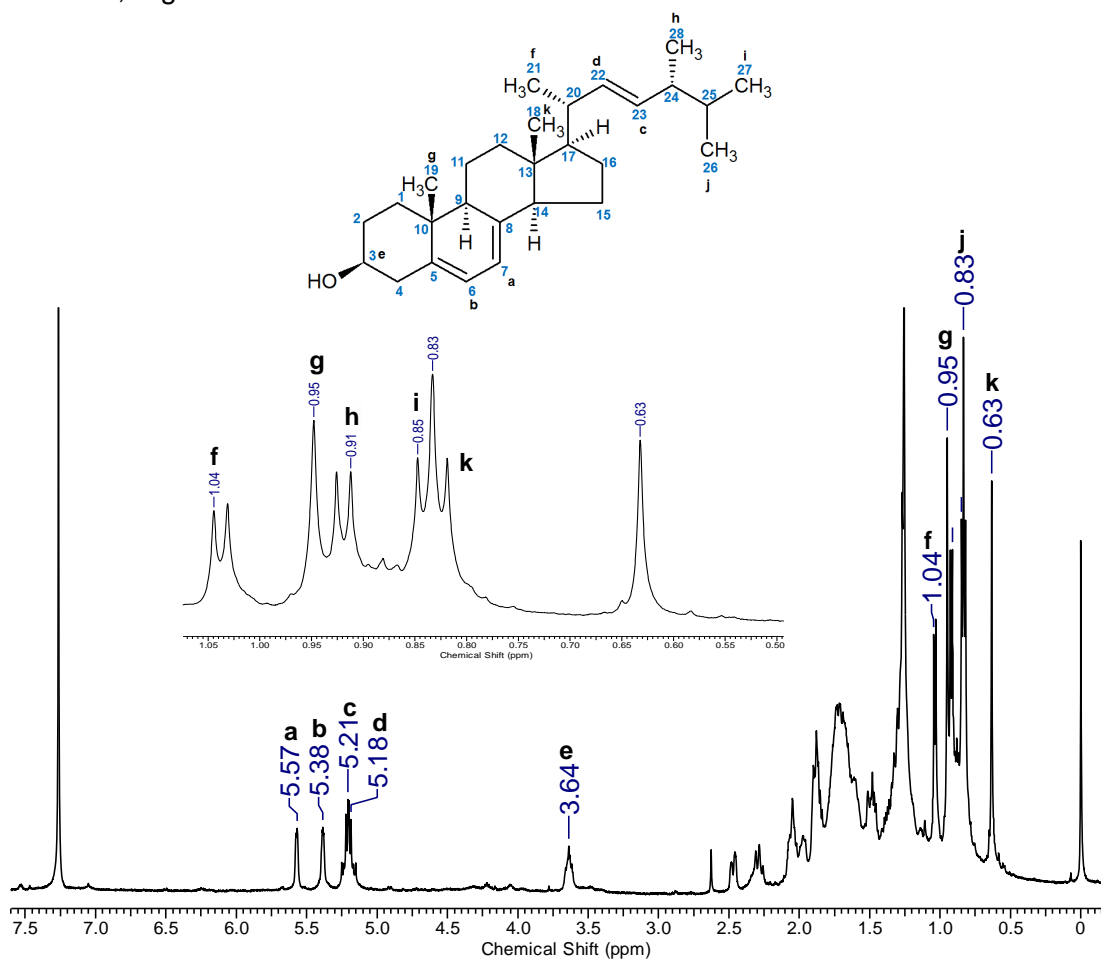
O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 2ECF-M2 (Figura 33), apresentou sinais sugestivos de ergosterol, como em δ 0,63, δ 0,95, δ 0,83 δ 0,85, δ 0,93 e δ 1,04, os quais indicam hidrogênios metílicos na estrutura (Figura 33k, 33g, 33h, 33j, 33i, 33f; Tabela 4). Em δ 3,56, um multipeto, relativo à presença de hidrogênio metínico (Figura 33e; Tabela 4). Além de multipletos em δ 5,18, δ 5,21, δ 5,38 e δ 5,58 alusivos a hidrogênios olefínicos da molécula (Figura 33d, 33c, 33b, 33a; Tabela 4).

Figura 33. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 2ECF-M2 para a substância SI, ergosterol.



No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração 3ECF-M1 (Figura 34), também foram observados sinais indicativos de hidrogênios metílicos na cadeia: singletos em δ 0,63 e em δ 0,95 (Figura 34k, 34g; Tabela 4); tripletos em δ 0,83 e em δ 0,85 (Figura 34j, 34i; Tabela 4) e dubletos em δ 0,93 e δ 1,04 (Figura 34h, 34f; Tabela 4). Um singlete em δ 3,64 característico de hidrogênio metínico (Figura 34e; Tabela 4) e sinais de hidrogênios olefínicos na estrutura, em: δ 5,18, δ 5,21, δ 5,38 e δ 5,57 (Figura 34d, 34c, 34b, 34a; Tabela 4).

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M1 para a substância SI, ergosterol.



No extrato acetato de etila do micélio de *Penicillium citrinum* (EAM) metilado, a substância SI estava em mistura, entretanto, foi possível observar sinais sugestivos da presença do ergosterol (SI) no espectro de RMN de ^1H obtido (Figura 35). Sinais típicos de metilas terminais, em: δ 0,63, δ 0,95, δ 0,83, δ 0,85, δ 0,93 e δ 1,04 (Figura 35k, 35g, 35h, 35j, 35i, 35h, 35f; Tabela 4). Visualizou-se também deslocamento característico de hidrogênio metínico na estrutura, num multiplete em δ 3,64 (Figura 35e; Tabela 4). Observou-se ainda no espectro, multipletos em δ 5,18, δ 5,22, δ 5,37 e δ 5,58 (Figura 35d, 35c, 35b, 35a; Tabela 4), sinais estes que sugerem a presença de hidrogênios olefínicos ao longo da cadeia.

Figura 35. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado para a substância SI, ergosterol.

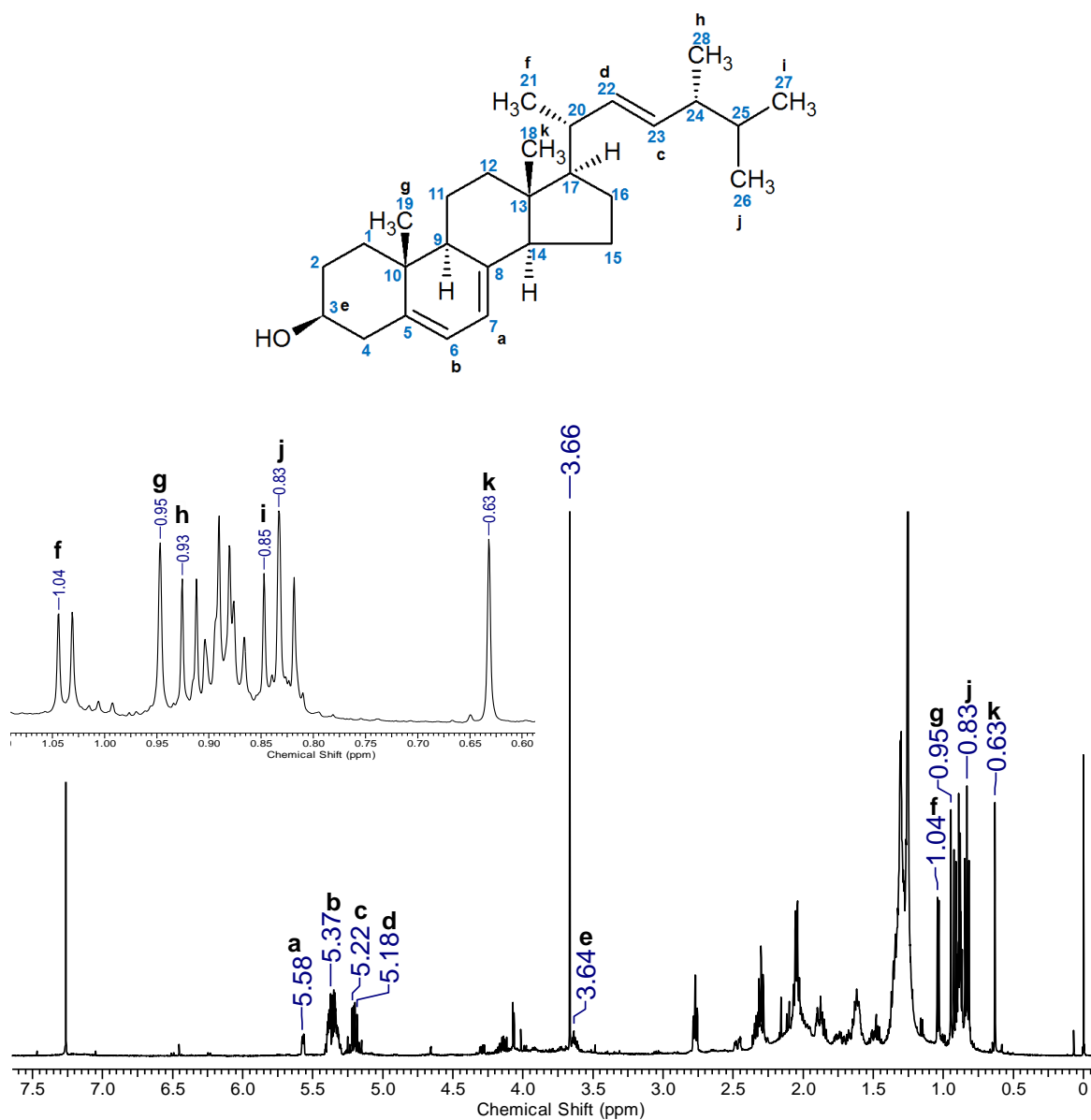


Tabela 4. Deslocamentos químicos característicos de ergosterol (SI) para os sinais de RMN de ^1H .

Símbolo	$\delta^1\text{H}$ (Experimental) Fração 8-11ECM	$\delta^1\text{H}$ (Experimental) Fração 2ECF-M1	$\delta^1\text{H}$ (Experimental) Fração 3ECF-M1	$\delta^1\text{H}$ (Experimental) EAM (metilado)	$\delta^1\text{H}$ (Literatura)*
a	5,58	5,58	5,57	5,58	5,58
b	5,38	5,38	5,38	5,37	5,39
c	5,21	5,21	5,21	5,22	5,22
d	5,18	5,18	5,18	5,18	5,18
e	3,63	3,56	3,64	3,64	3,63
f	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04
g	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
h	0,93	0,93	0,93	0,91	0,92
i	0,85	0,85	0,85	0,85	0,84
j	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
k	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63

*Valores retirados da literatura obtidos em CDCl_3 a 30°C , Chen et al., 2013.

Segundo Arora et al. (2004), o ergosterol é classificado como um esteroide não-polar, derivado do lanosterol, componente da membrana plasmática de fungos e essa substância desempenha importante papel na organização e dinâmica da membrana celular, contribuindo para a sua estrutura, barreira biofísica e fluidez (SOOD e KINNUNEN, 2008). Alguns estudos indicam ainda que, o ergosterol possivelmente participa em outros eventos biológicos, como por exemplo na regulação da síntese de quitina, polissacarídeo de origem microbiana (CAMELINI, 2010).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C do EAM metilado também apresentou sinais indicativos de SI (Figura 36) demonstrou um sinal em δ 141,34 (C-24) (Figura 36l; Tabela 5) indicativo de carbono metínico ligado a carbono metílico. Em δ 139,77 (C-5), observa-se um singlete referente a carbono não-hidrogenado na estrutura (Figura 36m; Tabela 5). Sinais observados em δ 135,56 (C-22) e em δ 131,98 (C-23) sugerem carbonos olefínicos ligados a carbonos metínicos (Figura 36n, 36o; Tabela 5). Já os sinais em δ 119,58 (C-6), δ 116,28 (C-7) e δ 54,56 (C-14) são indicativos de carbonos olefínicos hidrogenados (Figura 36p, 36q, 36s; Tabela 5) (MARINHO, 2005; SACCHI e col., 1997; VIGLI et al., 2003; ROSSET, 2011).

Em δ 70,47 (C-3) é possível visualizar um sinal associado a um carbono metínico ligado a um grupo hidroxila na molécula (Figura 36r; Tabela 5). Observou-se também sinais indicativos de carbonos metilênicos em δ 38,38 (C-1) e em δ 23,00 (C-15) (Figura 36t, 36u; Tabela 5). Os carbonos metílicos ao longo da cadeia, característicos da molécula de ergosterol, puderam ser visualizados através de sinais em δ 19,94 (C-26), δ 19,64 (C-27), δ 17,60 (C-28), δ 16,28 (C-19) e δ 12,05 (C-18) (Figuras 36v, 36x, 36w, 36y, 36z; Tabela 5) (MARINHO, 2005).

Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado, substância SI, ergosterol.

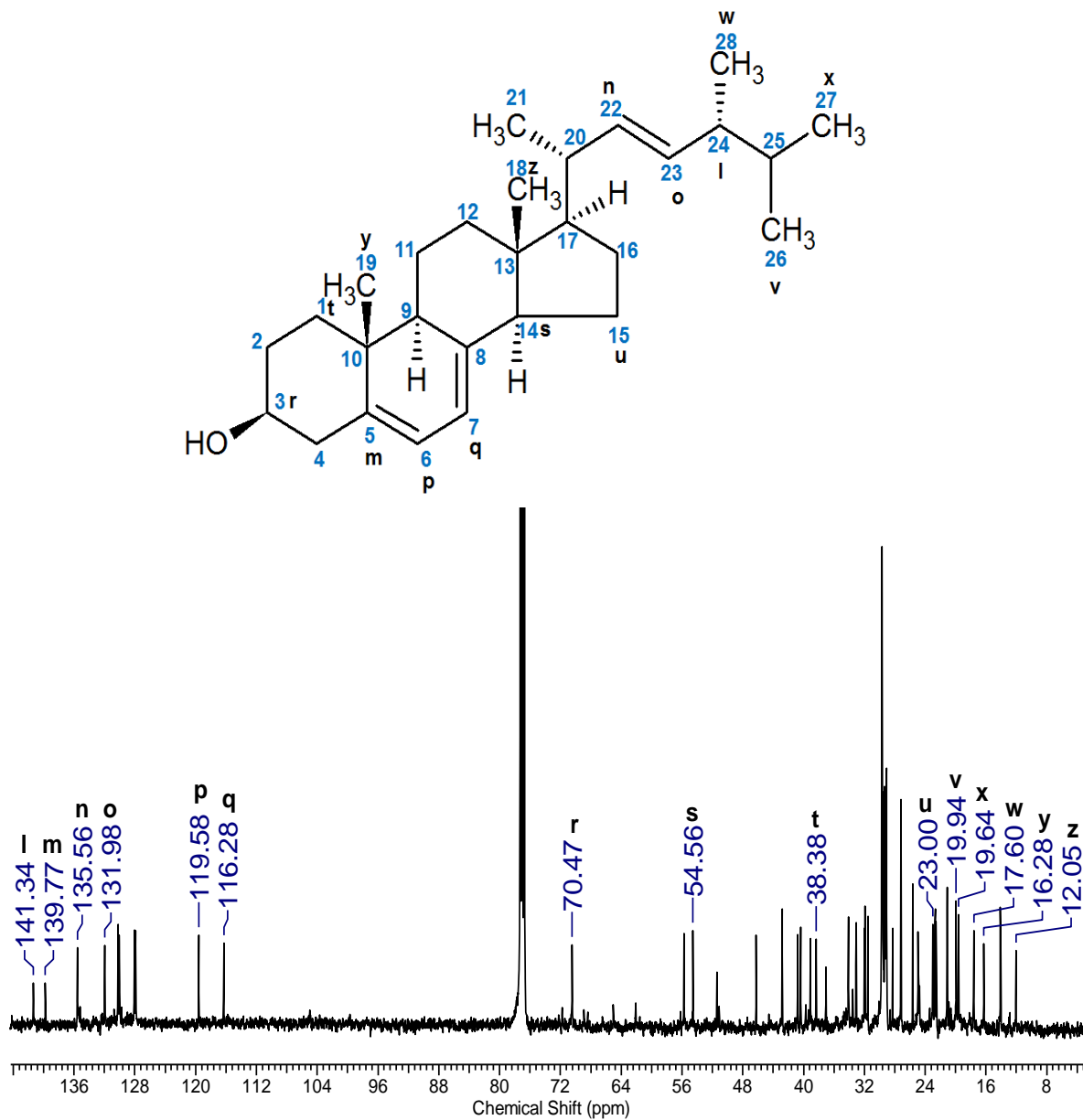


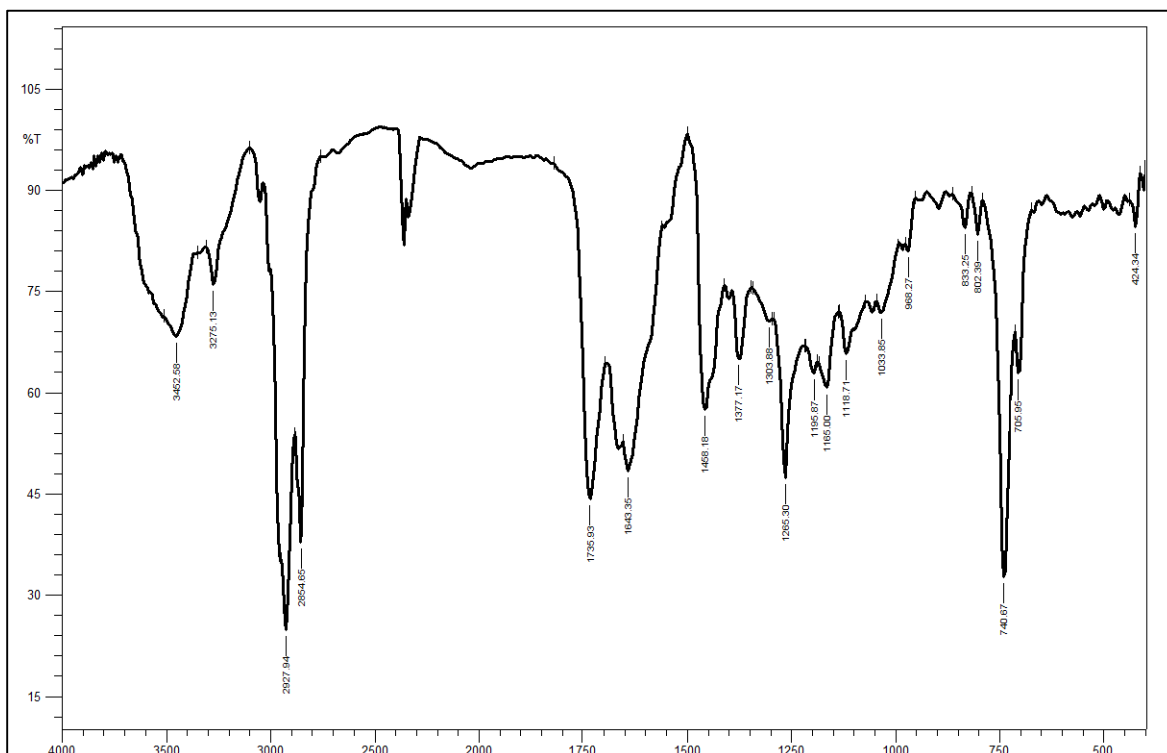
Tabela 5. Deslocamentos químicos característicos de ergosterol para os sinais de RMN de ^{13}C .

Símbolo	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental) EAM metilado	$\delta^{13}\text{C}$ (Literatura)*
l	141,34	141,4
m	139,77	139,8
n	135,56	135,6
o	131,98	132,0
p	119,58	119,3
q	116,28	116,3
r	70,47	70,5
s	54,56	54,6
t	38,38	38,4
u	23,00	23,0
v	19,94	19,6
x	19,64	19,4
w	17,6	17,6
y	16,28	16,3
z	12,05	12,2

*Valores retirados da literatura obtidos em CDCl_3 a 30 °C, Chen et al., 2013.

A análise por espectroscopia na região do infravermelho do extrato acetato de etila do micélio (EAM) (Figura 37) demonstrou informações corroborativas com aquelas encontradas por RMN ^1H . Em relação ao espectro obtido, foram observadas bandas em 2927, 2854, 1458, 968 e 740 cm^{-1} , as quais são comumente relacionadas à vibrações de estiramentos de grupos metilenos (Figura 37). Sinais em 1735 cm^{-1} , sugerem a presença de carbonila (Figura 37) (LOPES e FASCIO, 2004; HUANG et al., 2011). Em 1377 cm^{-1} , visualiza-se uma banda de média intensidade sugerindo a presença de deformações de grupos metila (Figura 37) (Silva, 2005). Segundo Huang et al. (2011), as bandas observadas em 3452 cm^{-1} estão associadas a vibrações de alongamento de OH e em 1033 cm^{-1} a vibração de alongamento C-O (Figura 37).

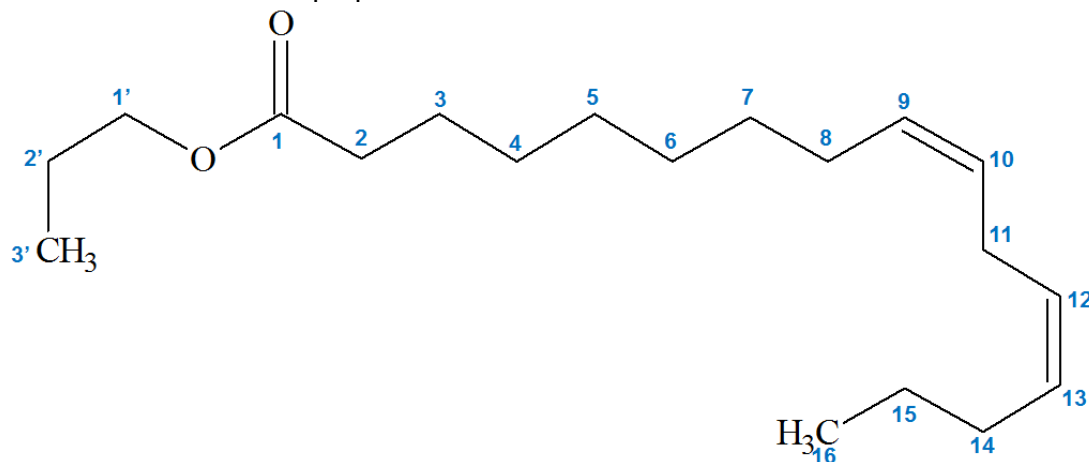
Figura 37. Espectro de infravermelho [pastilha de KBr] do extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado para o composto ergosterol (SI).



1.2 Identificação da substância SII

A substância SII (36,4mg), obtida após fracionamento em coluna do extrato clorofórmico do micélio (ECM), na fração 12-20ECM, apresentou aspecto oleoso e cor amarelada (Figura 38). Foi realizada a caracterização da substância por meio de espectroscopia de infravermelho, RMN de ^1H , ^{13}C e espectrometria CG-EM, sendo proposta a estrutura de um éster metílico, do ácido graxo poli-insaturado, 9,12-hexadecadienoato de n-propil.

Figura 38. Estrutura proposta para a substância SII, identificada como 9,12-hexadecadienoato de n-propil.



A análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , Figura 39) da fração 12-20ECM demonstrou sinais referentes à estrutura da substância SII (Figura 43) apresentou um multiplete largo em δ 5,36 (Figura 39a; Tabela 6), o qual foi atribuído a hidrogênios olefínicos presentes na molécula. Um sinal em δ 4,17 indicativo da presença de hidrogênios metilênicos da propila (Figura 39b; Tabela 6). Pode-se observar um multiplete em δ 2,77 alusivo à presença de um grupo metilênico entre os hidrogênios olefínicos (Figura 39c; Tabela 6). Um triplete em δ 2,30 caracterizando hidrogênio metilênico α a carbonila (Figura 39d; Tabela 6). Visualizou-se um multiplete em δ 2,04 aos hidrogênios metilênicos α olefínicos exceto aqueles entre olefinas (Figura 39e; Tabela 6). Sinais em δ 1,3 (Figura 39f; Tabela 6), sugerem hidrogênios metilênicos e em δ 1,25 e δ 1,60 podem ser indicativos de hidrogênios metilênicos adjacentes a grupos metílicos (Figura 39g; Tabela 6). Foram observados ainda sinais em δ 0,88 e δ 0,90 indicando a presença de metilas terminais (Figura 39h; Tabela 6) (MARINHO, 2005; MARIA, 2009; FAGUNDES, 2011).

Figura 39. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 12-20ECM e substância SII.

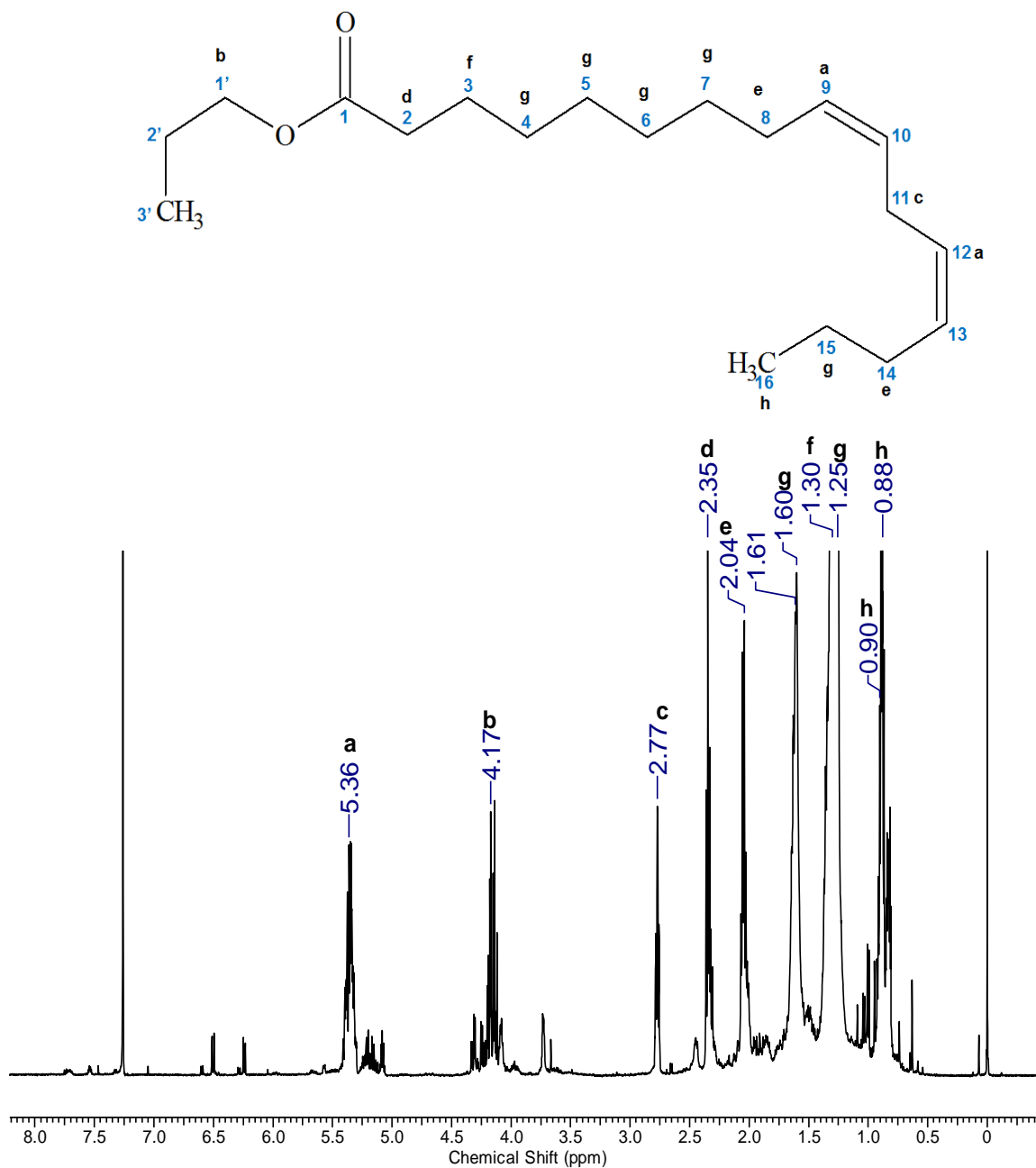


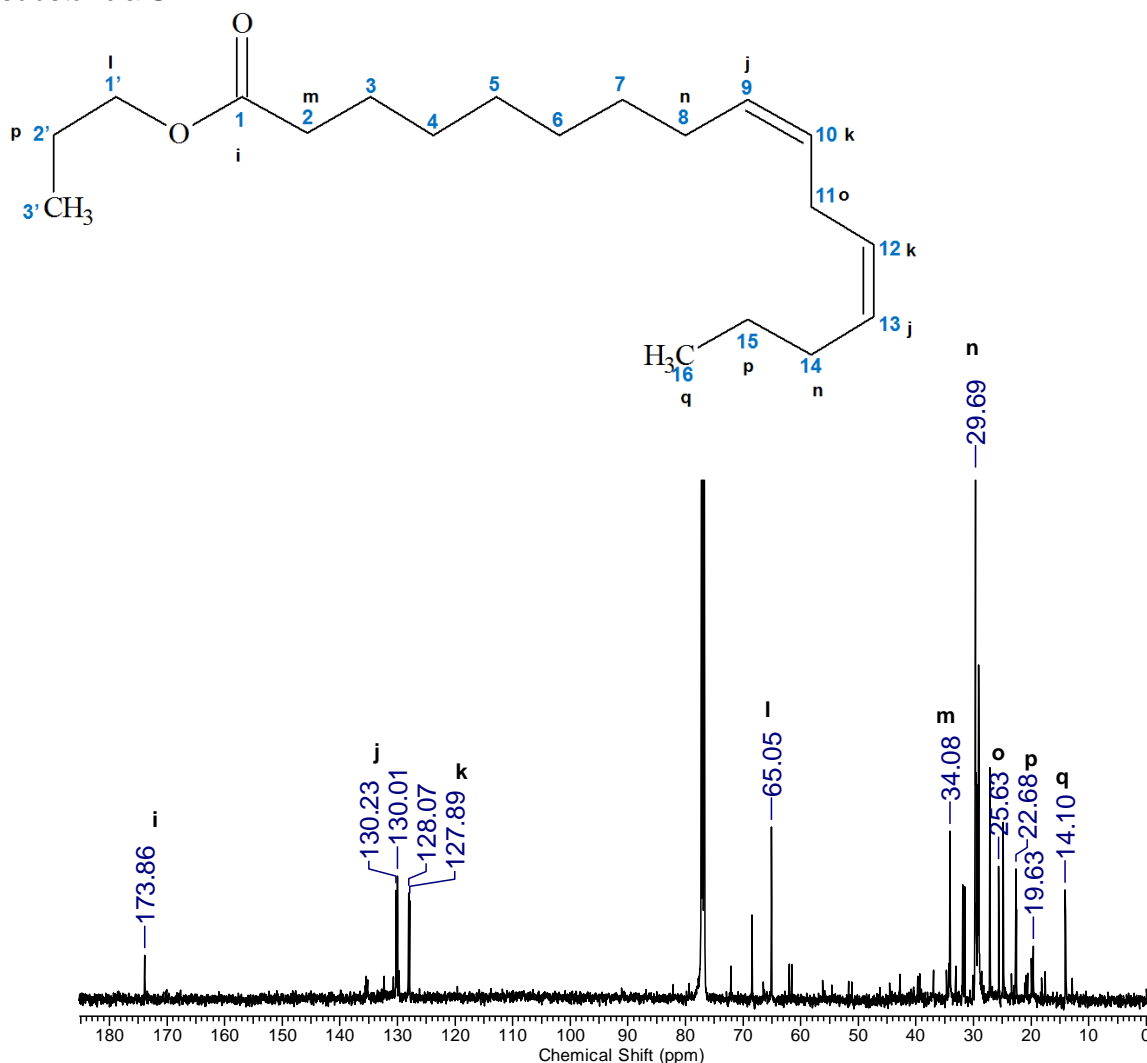
Tabela 6. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^1H .

Símbolo	δ ^1H (Experimental)	δ ^1H (Literatura)*	Atribuição
a	5,36	5,29	- CH=CH
b	4,17	4,12; 4,31	-O- CH₂ CH ₂ CH ₃
c	2,77	2,76	-CH=CH- CH₂ - CH=CH
d	2,30	2,20	- CH₂ -COOR
e	2,04	2,02	- CH₂ -CH=CH
f	1,3	1,20	(CH₂) _n
g	1,25 e 1,60	1,60	- CH₂ -CH ₂ -COOR
h	0,88 e 0,90	0,85	CH₃ -(CH ₂) _n

*Valores retirados da literatura obtidos em CDCl_3 a 30 °C (SACCHI e col., 1997; VIGLI et al., 2003; ROSSET, 2011).

O espectro RMN ^{13}C de SII, fração 12-20ECM (Figura 40) exibiu um sinal em δ 173,9 (C-1) (Figura 40i; Tabela 7) referente a uma carbonila de éster, quatro sinais de carbonos olefínicos δ 130,01 (C-9), δ 128,07 (C-10), δ 127,89 (C-12) e δ 130,23 (C-13) (Figura 40j, 40k; Tabela 7) (MARINHO, 2005; SACCHI e col., 1997; VIGLI et al., 2003; ROSSET, 2011).

Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 12-20ECM e substância SII.



Foi observado um sinal em 65,05 (C-1') referente ao carbono metilênico do propil éster (Figuras 45l; Tabela 7). Um sinal em δ 34,08 (C-2), indicativo de carbono metilênico (Figuras 45m; Tabela 7). Visualizou-se ainda no espectro, sinais típicos de carbonos metilênicos em δ 29,69 (C-8) (Figura 45n; Tabela 7) e de carbonos metilênicos vizinhos a carbonos metílicos em δ 22,56 (C-15) e δ 19,93 (C-2') (Figuras 45p; Tabela 7). Um singlete em δ 25,63 (C-11) sugestivo de carbono metilênico entre os carbonos olefínicos (Figuras 45o; Tabela 7). E em δ 14,10 (C-16) um singlete típico de carbono metílico terminal (Figuras 45q; Tabela 7) (MARINHO, 2005).

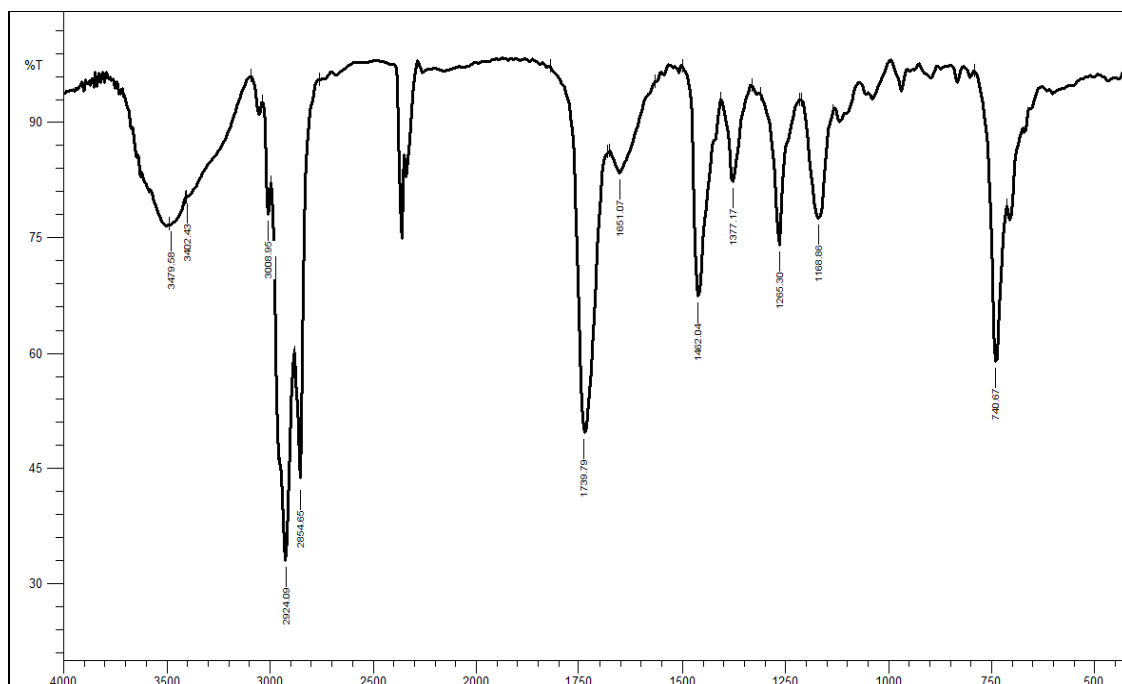
Tabela 7. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^{13}C .

Símbolo	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental)	$\delta^{13}\text{C}$ (Literatura)*	Atribuição
i	173,9	172,5	R- C OOR
j	130,01 e 130,23	130,0	- CH =CH-CH ₂ -CH= CH -
k	127,89 e 128,07	128,0	-CH= CH -CH ₂ - CH =CH-
l	65,05	65,83	- O(CH ₂) ₂ -CH ₃
m	34,08	34,0	- CH ₂ -COOR
n	29,69	29,5	-(CH ₂) _n -
o	25,63	25,8	-CH=CH- CH ₂ -CH=CH-
p	22,56 e 19,93	22,60	-(CH ₂)-CH ₃
q	14,10	14,0	-(CH ₂) _n - CH ₃

*Valores retirados da literatura obtidos em CDCl_3 a 30 °C (SACCHI e col., 1997; VIGLI et al., 2003; ROSSET, 2011).

O espectro obtido na análise por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 41), apresentou bandas em 2924, 2854, 1462 e 740 cm^{-1} , associadas às vibrações de estiramentos de grupos metílicos. Foram observados também, estiramentos em 1739 cm^{-1} referentes à carbonila do éster, em 1168,86 cm^{-1} referente a ligação C-O-C de éster e 1462 cm^{-1} indicativo de ligações duplas na cadeia (Figura 41) (LOPES e FASCIO, 2004; HUANG et al., 2011). Uma banda de média intensidade em 1377 cm^{-1} indicou a presença de deformação do grupo metila. Foi possível observar ainda, bandas características de ligações C-O de ésteres nas regiões de 1265 e 1168 cm^{-1} (Figura 41) (SILVA, 2005).

Figura 41. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do composto SII, fração 12-20ECM de *Penicillium citrinum*.



O cromatograma de íons totais da fração 12-20ECM (Figura 42) obtido a partir do fracionamento do extrato clorofórmio do micélio do *Penicillium citrinum* mostrou uma série de bandas (Figura 42). O espectro de massas (Figura 48) relacionado à banda com o tempo de retenção 18,88 minutos foi identificado como o composto SII, 9,12- hexadecadienoato de n-propil por comparação com a biblioteca de massas do equipamento (NIST). Não foi possível a identificação de um composto relacionado à banda com o tempo de retenção 16,45 minutos quando o espectro de massas deste foi comparado com a biblioteca do equipamento (Figura 49 e 50).

Figura 42. Cromatograma de íons totais da fração 12-20ECM.

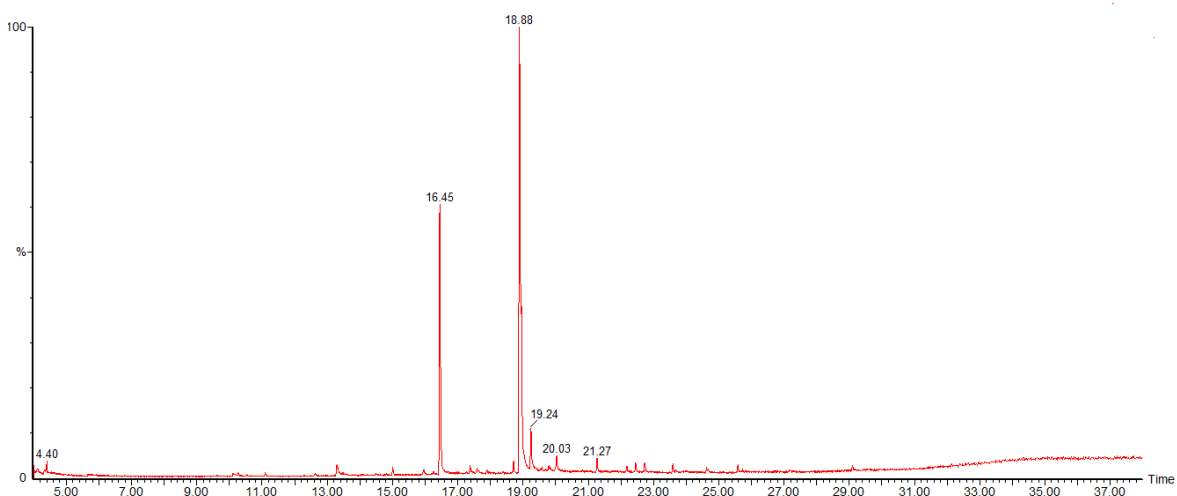


Figura 43. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 18,88 minutos com os dados da biblioteca.

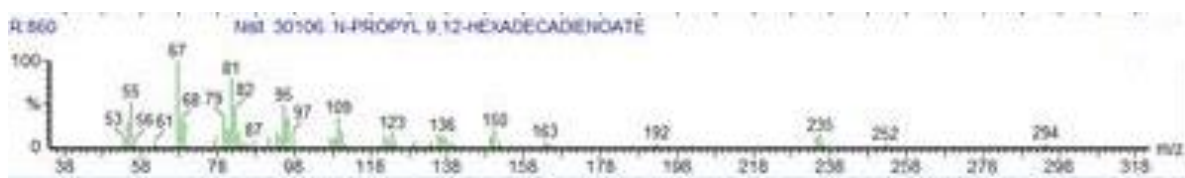
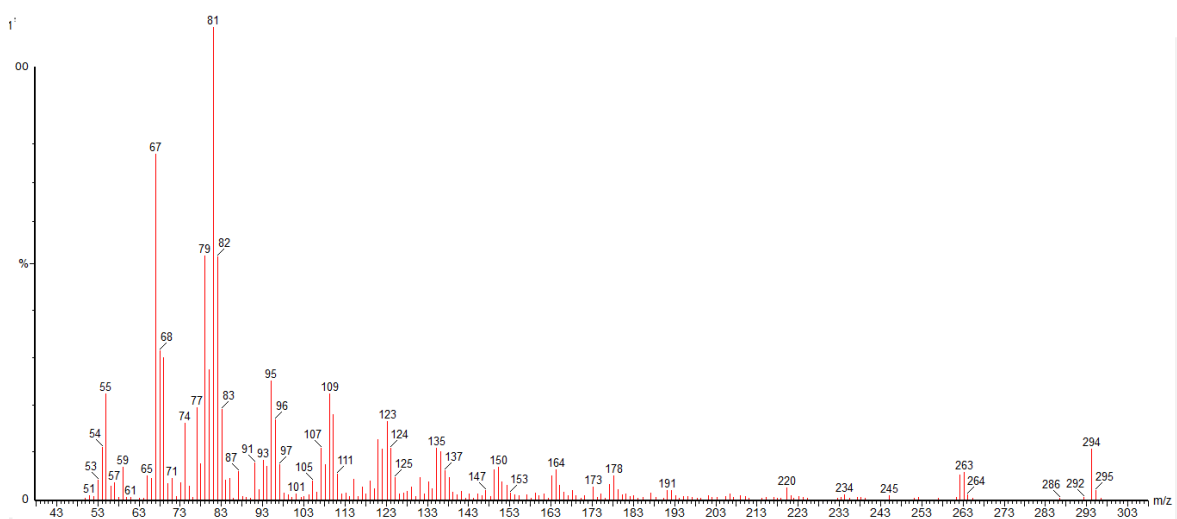


Figura 44. Espectro de massas com o tempo de retenção 16,45 minutos.

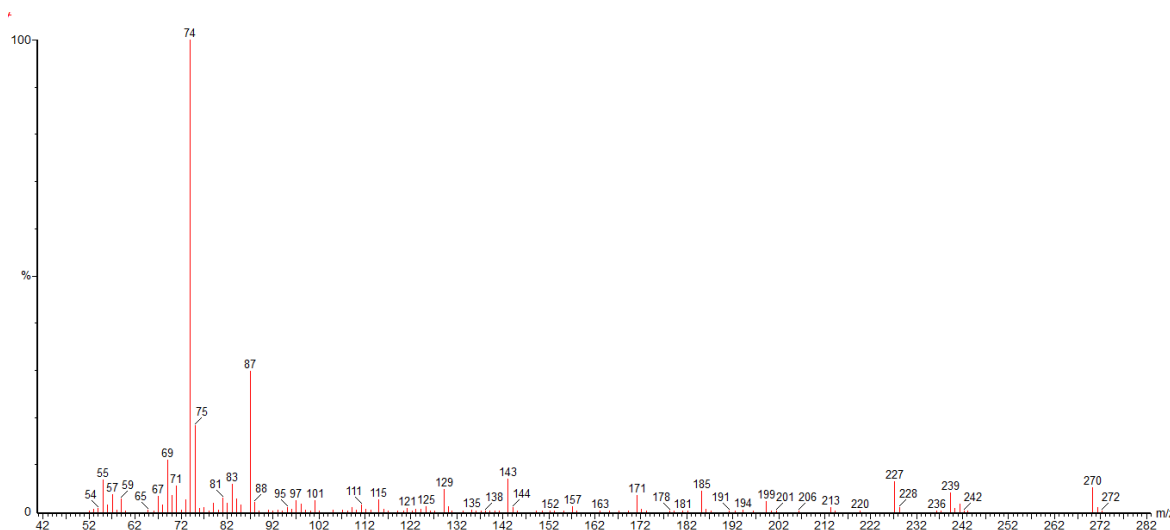
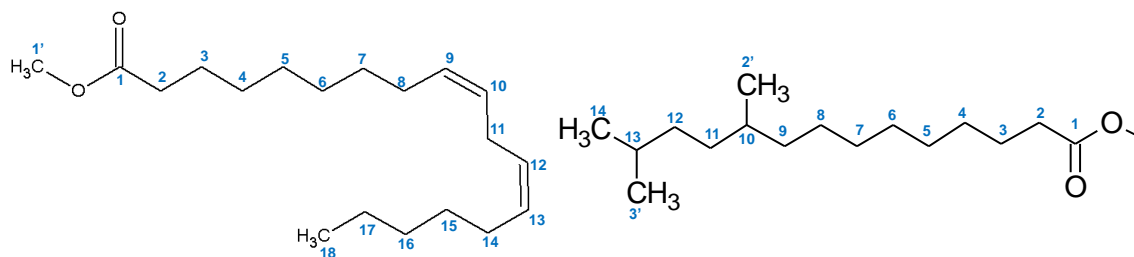


Figura 45. Biblioteca do equipamento.

Hit	REV	for	Compound Name	M.W.	Formula	CAS	Library
1	868	772	METHYL 11-METHYL-DODECANOATE	228	C14H28O2	900336-45-1	Nist
2	849	748	TRIDECANOIC ACID, 12-METHYL-, METHYL ESTER	242	C15H30O2	5129-58-8	Nist
3	843	589	TETRADECANOIC ACID, 10,13-DIMETHYL-, METHYL ESTER	270	C17H34O2	267850-23-7	Nist
4	828	729	UNDECANOIC ACID, 10-METHYL-, METHYL ESTER	214	C13H26O2	5129-56-6	Nist
5	821	703	METHYL 8-METHYL-NONANOATE	186	C11H22O2	900336-43-6	Nist
6	813	733	TRIDECANOIC ACID, METHYL ESTER	228	C14H28O2	1731-88-0	Nist
7	811	735	METHYL 13-METHYL-TETRADECANOATE	256	C16H32O2	900336-31-4	Nist
8	809	684	METHYL 18-FLUORO-OCTADECANOATE	316	C19H37O2F	900336-47-5	Nist
9	804	761	HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER	270	C17H34O2	112-39-0	Nist
10	797	717	HEXADECANOIC ACID, 15-METHYL-, METHYL ESTER	284	C18H36O2	6929-04-0	Nist
11	789	703	TRIDECANOIC ACID, METHYL ESTER	228	C14H28O2	1731-88-0	Nist
12	782	675	NONANOIC ACID, METHYL ESTER	172	C10H20O2	1731-84-6	Nist
13	779	672	NONANOIC ACID, METHYL ESTER	172	C10H20O2	1731-84-6	Nist
14	776	712	PENTADECANOIC ACID, METHYL ESTER	256	C16H32O2	7132-64-1	Nist
15	771	735	HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER	270	C17H34O2	112-39-0	Nist
16	769	727	HEXADECANOIC ACID, METHYL ESTER	270	C17H34O2	112-39-0	Nist
17	769	668	HEPTADECANOIC ACID, 16-METHYL-, METHYL ESTER	298	C19H38O2	5129-61-3	Nist
18	765	732	PENTADECANOIC ACID, 14-METHYL-, METHYL ESTER	270	C17H34O2	5129-60-2	Nist
19	765	665	DODECANOIC ACID, 10-METHYL-, METHYL ESTER	228	C14H28O2	5129-65-7	Nist
20	765	689	HEPTADECANOIC ACID, METHYL ESTER	284	C18H36O2	1731-92-6	Nist

1.3 Identificação das substâncias SIII e SIV



octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila (SIII) 10,13-dimetiltetradecanoato de metila (SIV)

As substâncias SIII e SIV foram identificadas como constituintes da fração M21-39ECM (319,5mg), uma mistura obtida a partir do fracionamento em coluna do extrato clorofórmico do micélio de *Penicillium citrinum*, de aspecto oleoso e coloração amarelada. Os compostos SIII e SIV também foram observados em mistura no extrato acetato de etila do micélio (EAM) metilado. A identificação das substâncias octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila (SIII) e 10,13-dimetiltetradecanoato de metila (SIV), presentes nas misturas, foi realizada com base nos dados de RMN de ^1H , ^{13}C , espectroscopia de infravermelho e CG-MS e comparação com os valores da literatura (AMBROSIO, 2014).

Os espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de M-21-39ECM (Figura 46) e EAM metilado (Figura 47), misturas em análise das substâncias SIII e SIV, apresentaram características espectrais semelhantes. A substância SIII demonstrou um tripleto largo em δ 5,35 atribuído a hidrogênios olefínicos foi observado no espectro de RMN ^1H da mistura M-21-39ECM, sendo este sinal também visualizado no espectro do EAM metilado (Figuras 46a, 47a, 48a; Tabela 8). As substâncias SIII e SIV exibiram um singleto em δ 3,67 indicando a presença de grupo metoxílico para o espectro da mistura M-21-39ECM, um sinal com a mesma atribuição foi visto em δ 3,66 para o espectro do EAM metilado (Figuras 46b, 47b, 48b, 49b; Tabela 9). Para a substância SIII, foi possível observar um tripleto em δ 2,77, em ambos espectros de M-21-39ECM e do EAM metilado, sugerindo a presença de um grupo metilênico entre os grupos olefínicos (Figura 46c, 47c, 48c; Tabela 8). Para as substâncias SIII e SIV os espectros de M-21-39ECM e também o do EAM metilado exibiram um tripleto

em δ 2,30 caracterizando hidrogênio metilênico α a carbonila (Figura 46d, 47d, 48d, 49d; Tabela 8). Para a substância SIII, foi observado um tripleto em δ 2,04, em ambos espectros da mistura M-21-39ECM e do EAM metilado, referente aos hidrogênios metilênicos α olefínicos exceto aqueles entre olefinas (Figuras 46e, 47e, 48e; Tabela 8) e o sinal em δ 1,67 referente aos grupos metilênicos β carbonílicos visualizado no espectro de M-21-39ECM, um sinal referente a esta atribuição foi demonstrado em δ 1,62 para o espectro do EAM metilado (Figuras 46f, 47f, 48f; Tabela 8). Para as substâncias SIII e SIV, o sinal em δ 1,30, dos espectros de M-21-39ECM e EAM metilado, foi atribuído a todos os grupos metilênicos, com exceção para os α e β carbonílicos e α olefínicos apresentados para os ésteres graxos (Figuras 46g, 47g, 48g; Tabela 8) Um singleto em δ 0,88 no espectro de M-21-39ECM e em δ 0,85 no espectro de EAM metilado, sugeriram a presença de metila terminal para a substância SIII (Figuras 46h, 47h, 48h; Tabela 8). Para as substâncias SIII e SIV, foram observados sinais em δ 0,88 e δ 0,89 sugerindo a ocorrência de metilas, tanto para o espectro de M-21-39ECM, quanto para o espectro do EAM metilado (MARINHO, 2005; MARIA, 2009; FAGUNDES, 2011).

Figura 46. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da mistura M21-39ECM.

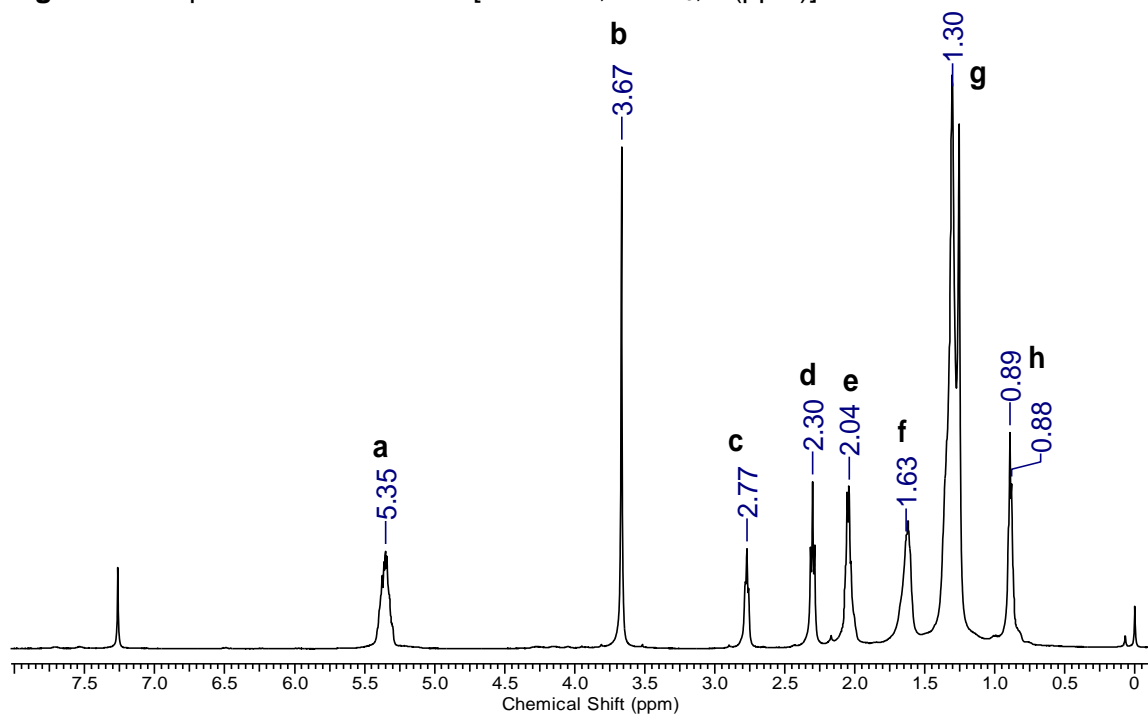


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do Extrato de Acetato de Etila (EAM) metilado.

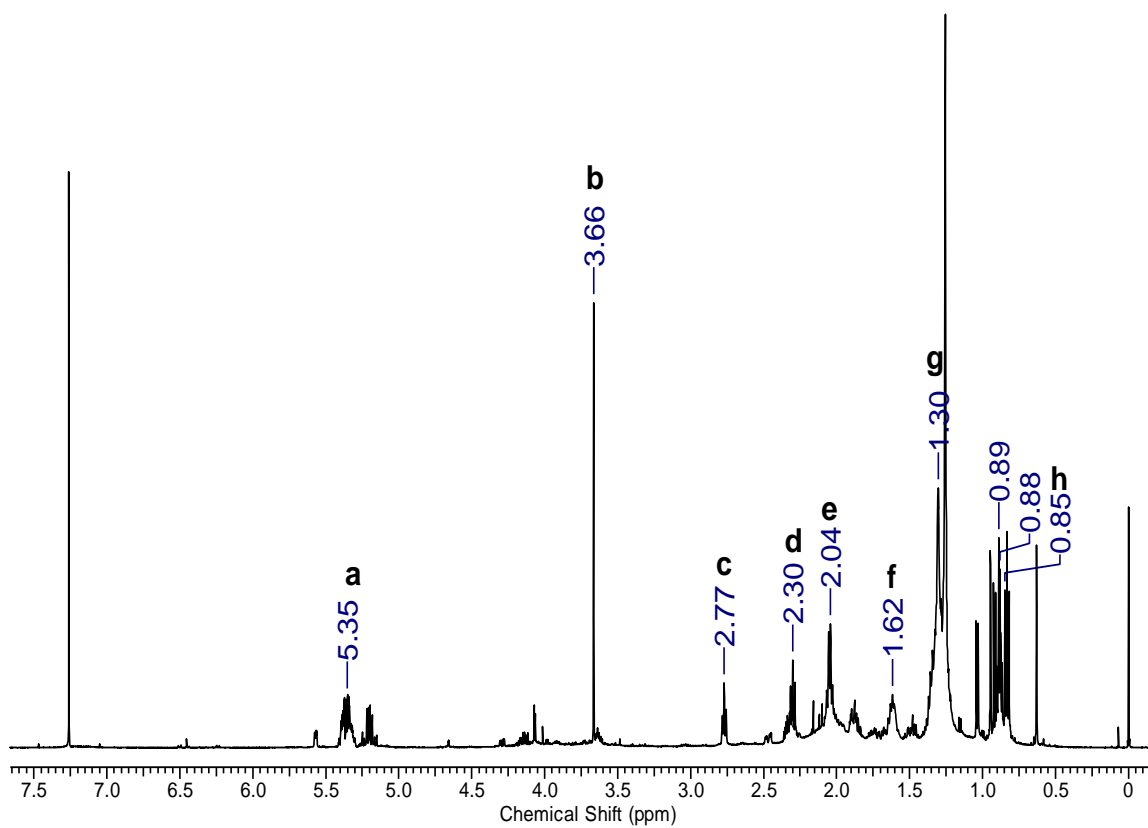


Figura 48. Estrutura proposta para a substância SIII, identificada como octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila.

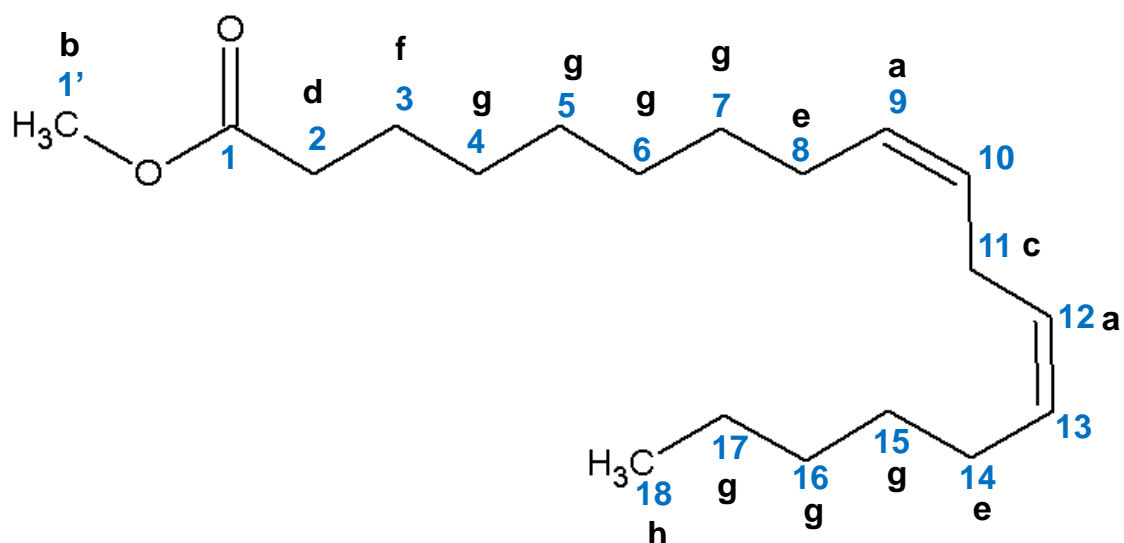


Figura 49. Estrutura proposta para a substância SIV, identificada como 10,13-dimetiltetradecanoato de metila.

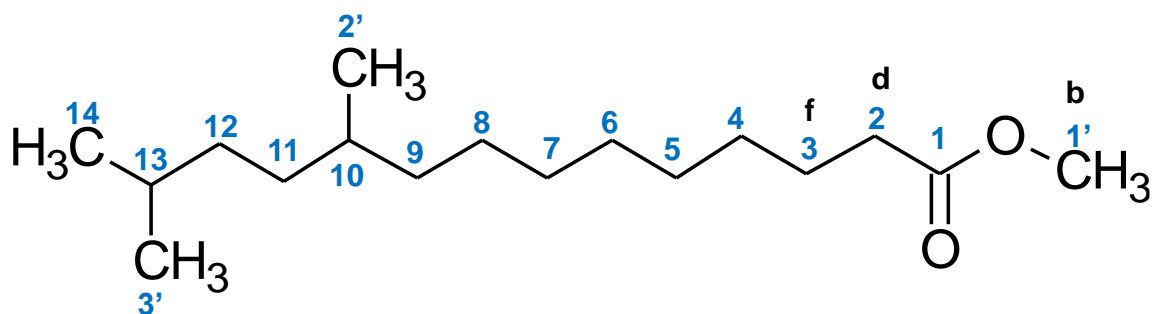


Tabela 8. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^1H .

Símbolo	SIII	SIV	SIII	SIV	$\delta ^1\text{H}$ (Literatura)*	Atribuição
	$\delta ^1\text{H}$ (Experimental) Fração M21- 39ECM	$\delta ^1\text{H}$ (Experimental) Fração M21- 39ECM	$\delta ^1\text{H}$ (Experimental) EAM metilado	$\delta ^1\text{H}$ (Experimental) EAM metilado		
a	5,35		5,35		5,29	-CH=CH-
b	3,67	3,67	3,66	3,66	3,70	- OCH₃
c	2,77		2,77		2,76	-CH=CH-CH₂-CH=CH-
d	2,30	2,30	2,30	2,30	2,20	-CH₂-COOR
e	2,04		2,04		2,02	-CH₂-CH=CH-
f	1,67	1,67	1,62	1,62	1,60	-CH₂-CH₂-COOR
g	1,30	1,30	1,30	1,30	1,20	(CH₂)_n
h	0,88	0,88	0,85	0,85	0,85	CH₃-(CH₂)_n

*Valores retirados da literatura, obtidos em CDCl_3 a $30\text{ }^\circ\text{C}$, (SACCHI e col., 1997; VIGLI et al., 2003; ROSSET, 2011).

O espectro de RMN ^{13}C da mistura M-21-39ECM (Figura 50) apresentou um sinal em δ 174,27 (C-1) referente a uma carbonila de éster (Figuras 50i, 50i, 51i, Tabela 9), este mesmo sinal pode ser visualizado em baixa intensidade em δ 174,33 para o espectro de RMN de ^{13}C do EAM metilado (Figuras 51i, 52i, 53i, Tabela 9) para os dois compostos SIII e SIV. Foram observados para o composto SIII tanto no espectro de M-21-39ECM quanto no espectro de EAM metilado, quatro sinais de carbonos olefínicos em δ 127,9 (C-12), δ 128,0 (C-10), δ 130,0 (C-9) e δ 130,2 (C-13) dos grupos metílenos externos e internos, respectivamente (Figuras 50j, 50k, 51j, 51k, 52j, 52k; Tabela 9), (MARINHO, 2005). Para os compostos SIII e SIV, um sinal de carbono metoxílico em δ 51,4 (C-1') foi visualizado no espectro da mistura M-21-39ECM (Figuras 50l, 52l, 53l; Tabela 9) e também no espectro do EAM metilado (Figuras 51l, 52l, 53l; Tabela 9) (MARINHO, 2005). Para ambas substâncias SIII e SIV, visualizou-se um singlete em δ 34,0 (C-2), no espectro de M-21-39ECM, sugestivo de carbono metilênico α carbonila (Figuras 50m, 52m, 53m; Tabela 9), um sinal correspondente a essa atribuição também foi observado no espectro do EAM metilado em δ 34,11 (C-2) (Figuras 51m, 52m; Tabela 9). Para composto SIII, no espectro de M-21-39ECM, foi observado o sinal em δ 27,18 (C-11) indicando a presença de carbonos metilênico α olefínicos exceto aqueles entre olefinas (Figuras 50n, 52n; Tabela 9), como também um sinal em δ 25,55 (C-11) sugere a presença de um carbono metilênico entre os grupos olefínicos (Figuras 50o, 52o; Tabela 9). Sinais similares a estes e referentes ao composto SIII foram encontrados em δ 27,2 (C-11) e em δ 25,63 (C-11) no espectro do EAM metilado (Figuras 51n, 51o, 52n, 52o; Tabela 9). Nas substância SIII e SIV, sinais visualizados em δ 29,43, no espectro de M-21-39ECM (Figuras 50, 52, 53; Tabela 9) e em δ 29,69 no espectro do EAM metilado (Figuras 51, 52, 53; Tabela 9) sugerem a presença de carbonos metílicos. Observou-se ainda um dublete em δ 22,5 (C-2') e δ 22,6 (C-3'), nos espectros das duas amostras, de M-21-39ECM e do EAM metilado, sugestivos de carbonos metílicos na estrutura de SIII (Figura 50, 51, 52; Tabela 9). O sinal em δ 14,0 (C-18) do espectro de M-21-39ECM, sugerindo carbonos metílicos para as substâncias SIII e em SIV (Figura 50p, 52p; Tabela 9). Um sinal de carbonos metílicos em SIII e em SIV também

pode ser visualizado no espectro do EAM metilado em δ 14,1 (C-18) (Figura 51p, 52p; Tabela 9).

Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da mistura M-21-39ECM.

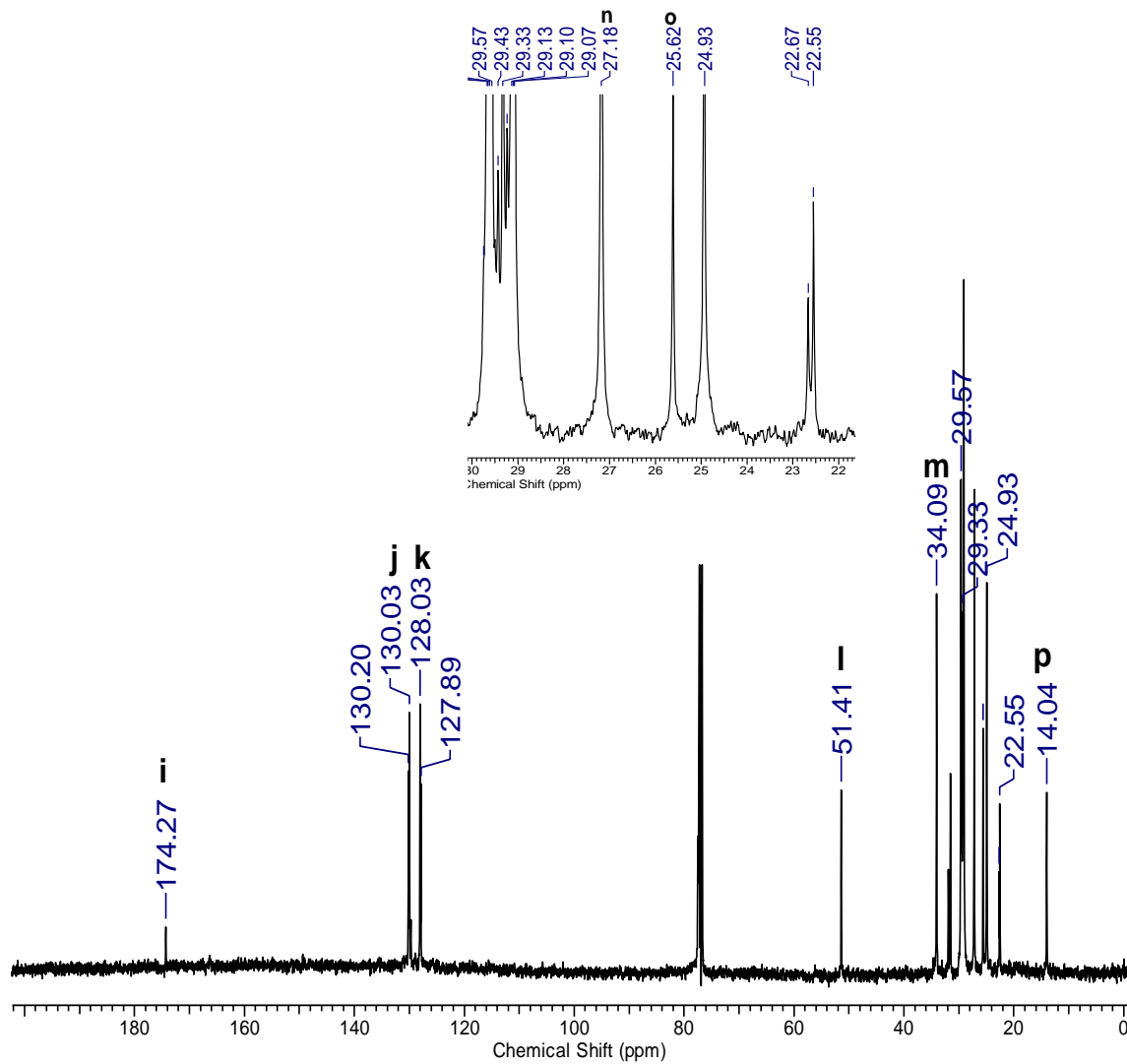


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] do extrato de acetato de etila do micélio (EAM) metilado.

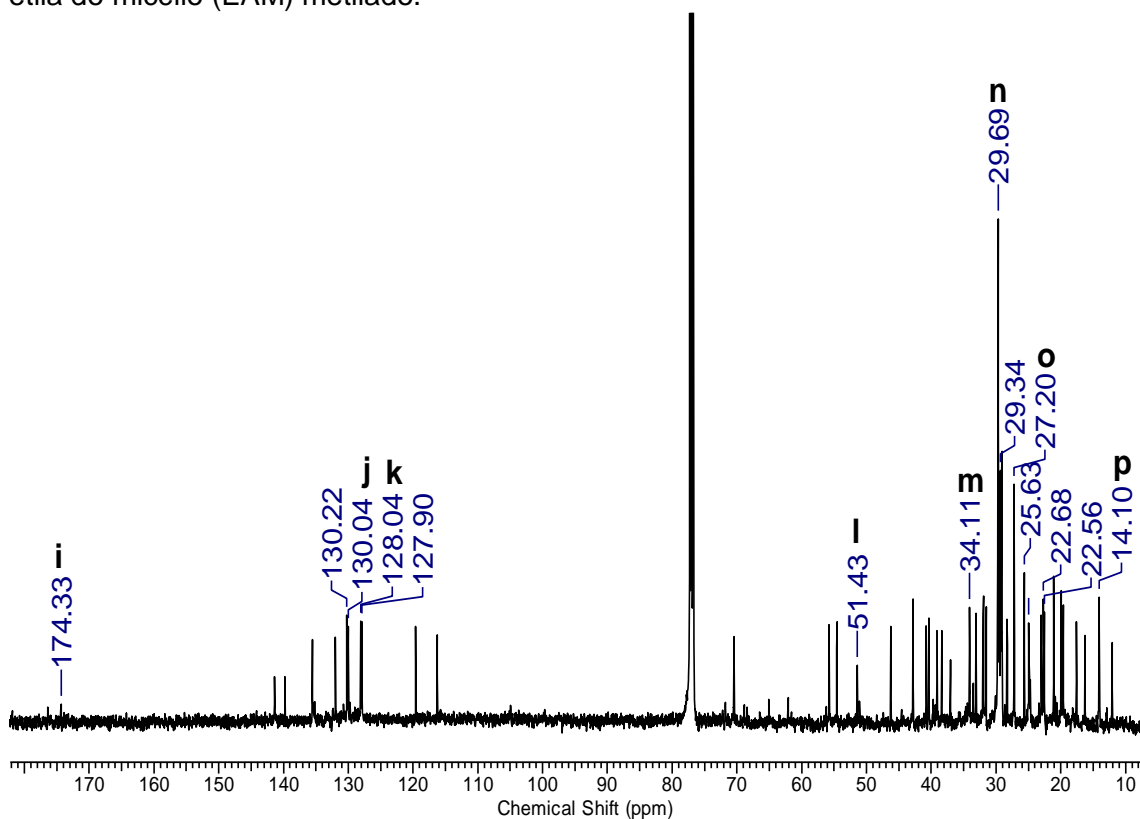


Figura 52. Estrutura proposta para a substância SIII, identificada como octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila.

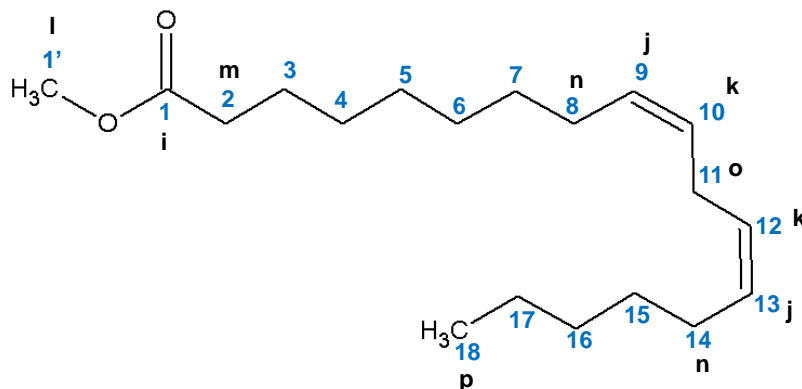


Figura 53. Estrutura proposta para a substância SIV, identificada como 10,13-dimetiltetradecanoato de metila.

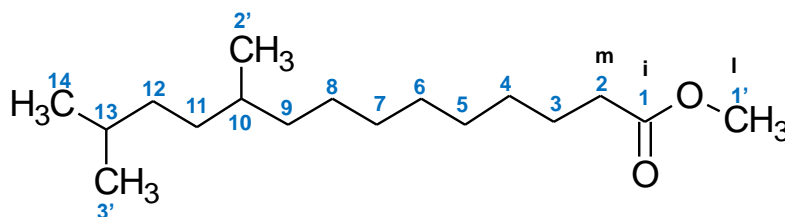


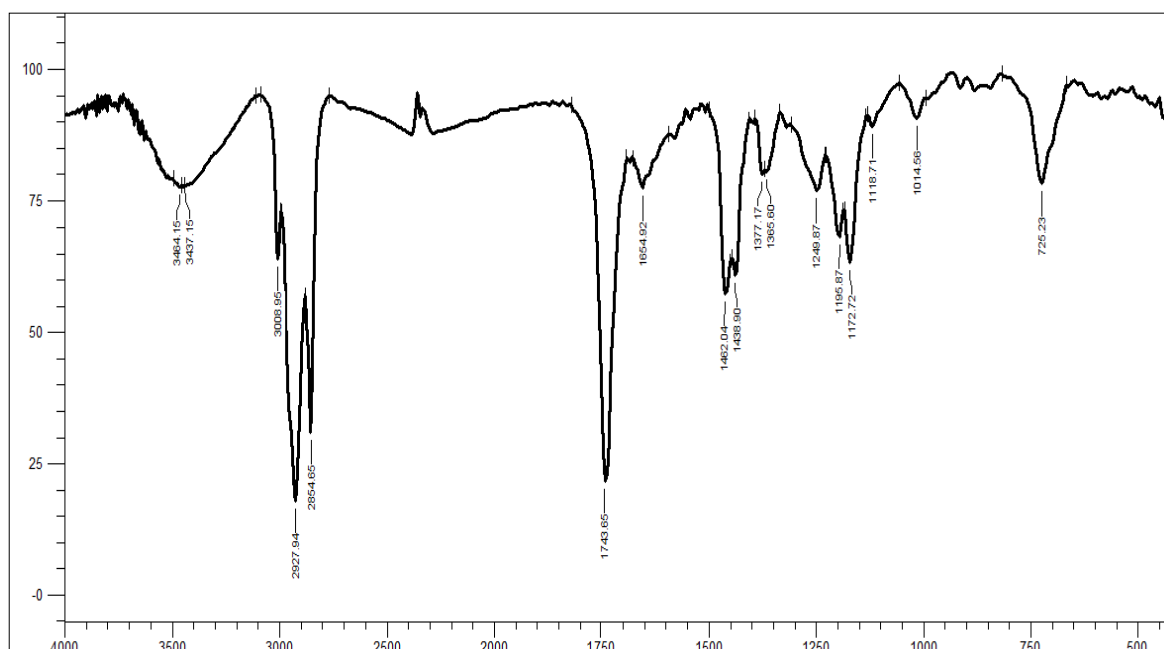
Tabela 9. Deslocamentos químicos característicos de ésteres para os sinais de RMN de ^{13}C .

Símbolo	SIII	SIV	SIII	SIV	$\delta^{13}\text{C}$ (Literatura)*	Atribuição
	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental) Fração M-21- 39ECM	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental) Fração M-21- 39ECM	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental) EAM metilado	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental) EAM metilado		
i	174,0	174,0	174,33	174,33	172,5	R-COOR
j	130,0 e 130,2		130,04 e 130,22		130,0	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-
k	127,9 e 128,0		127,9 e 128,0		128,0	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-
l	51,4	51,4	51,4	51,4	51,4	-OCH ₃
m	34,0	34,0	34,11	34,11	34,0	-CH ₂ -COOR
-	29,43	29,43	29,69	29,69	29,5	-(CH ₂) _n -
n	27,18		27,2		27,2	-CH ₂ -CH=CH-CH ₂ -
o	25,55		25,63		25,8	-CH=CH-CH ₂ -CH=CH-
p	14,0	14,0	14,1	14,1	14,0	CH ₃ -(CH ₂) _n

*Valores retirados da literatura, obtidos em CDCl₃ a 30 °C, (SACCHI e col., 1997; VIGLI et al., 2003; ROSSET, 2011).

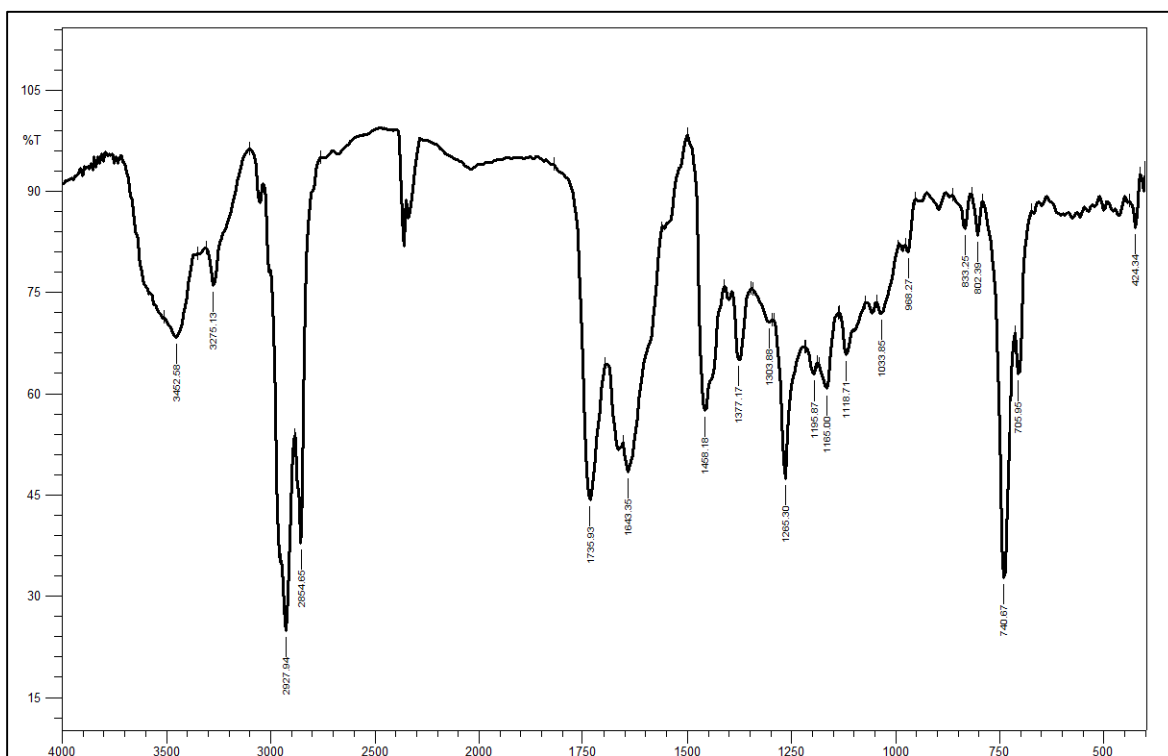
Na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho de M21-39ECM (Figura 54), o espectro apresentou estiramentos em $1741,72\text{ cm}^{-1}$ referentes à carbonila do éster, em $1170,79\text{ cm}^{-1}$ indicativo de ligação C-O-C do éster e próximos a $1438,90\text{ cm}^{-1}$ sugerindo ligações duplas da cadeia alifática. Além disso, foram observadas bandas em $2927, 2851, 1461$ e 721 cm^{-1} , associadas às vibrações de estiramentos de grupos metílenos. Em 1376 cm^{-1} observa-se uma banda com intensidade média atribuída à deformação do grupo metila. Nas regiões de 1249 e 1172 cm^{-1} , são observadas banda de C-O dos ésteres (SILVA, 2005).

Figura 54. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] de M-21-39ECM de *Penicillium citrinum*.



No espectro de infravermelho do EAM metilado (Figura 55), as bandas indicativas de carbonila do éster foram observadas em $1735,93\text{ cm}^{-1}$ e referentes à ligação C-O-C em $1165.\text{ cm}^{-1}$ (Figura 55). As vibrações de estiramentos correspondentes a grupos metílenos foram visualizadas em $2927,94$; $2854,65$, e $740,67\text{ cm}^{-1}$. Observou-se também uma banda em $1377,17\text{ cm}^{-1}$ sugestiva de grupamentos metila (SILVA, 2005).

Figura 55. Espectro de infravermelho [filme com janela de NaCl] do Extrato de Acetato de Etila (EAM) de *Penicillium citrinum* após metilação.



O cromatograma de íons totais da fração M-21-39ECM (Figura 56) obtido a partir do fracionamento do extrato clorofórmio do micélio de *P. citrinum* mostrou uma série de bandas conforme a figura (Figura 56). O espectro de massas (Figura 57) relacionado à banda com o tempo de retenção 18,68 minutos foi identificado como o composto SIII (9,12-octadecadienoato de metila) por comparação com a biblioteca de massas do equipamento (NIST), o mesmo comportamento para o componente SIV, 10,13-dimetiltetradecanoato de metila com o tempo de retenção em 16,24 minutos (Figura 58). Este mesmo comportamento foi observado para os tempos de retenção 18,83 e 16,42 minutos para o espectro de CG/MS do acetato de metila metilado (Figuras 59 a 61).

Figura 56. Cromatograma de íons totais da mistura M-21-39ECM.

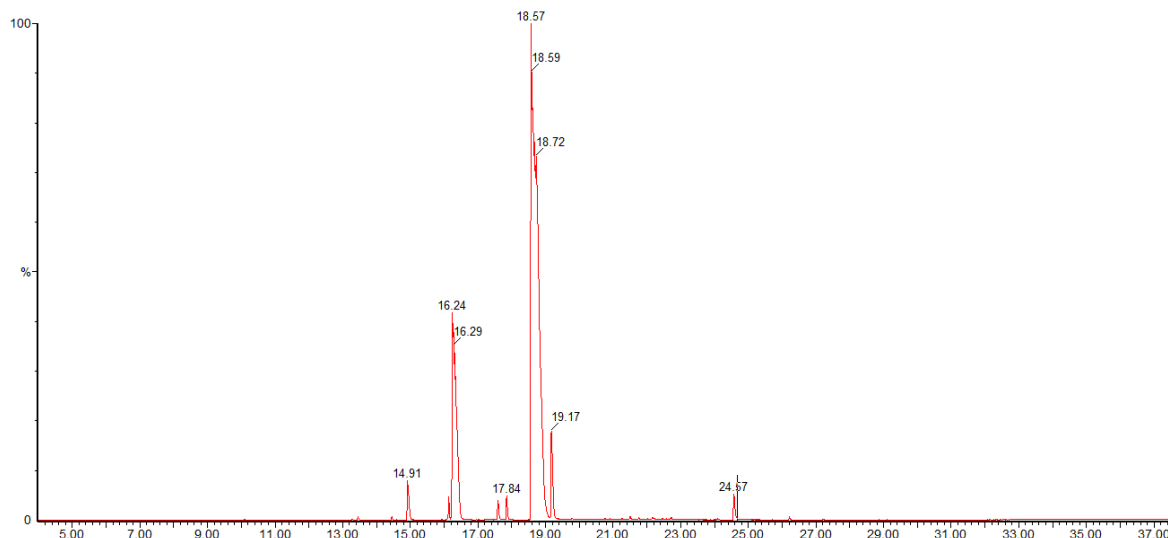


Figura 57. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 18,68 minutos com os dados da biblioteca.

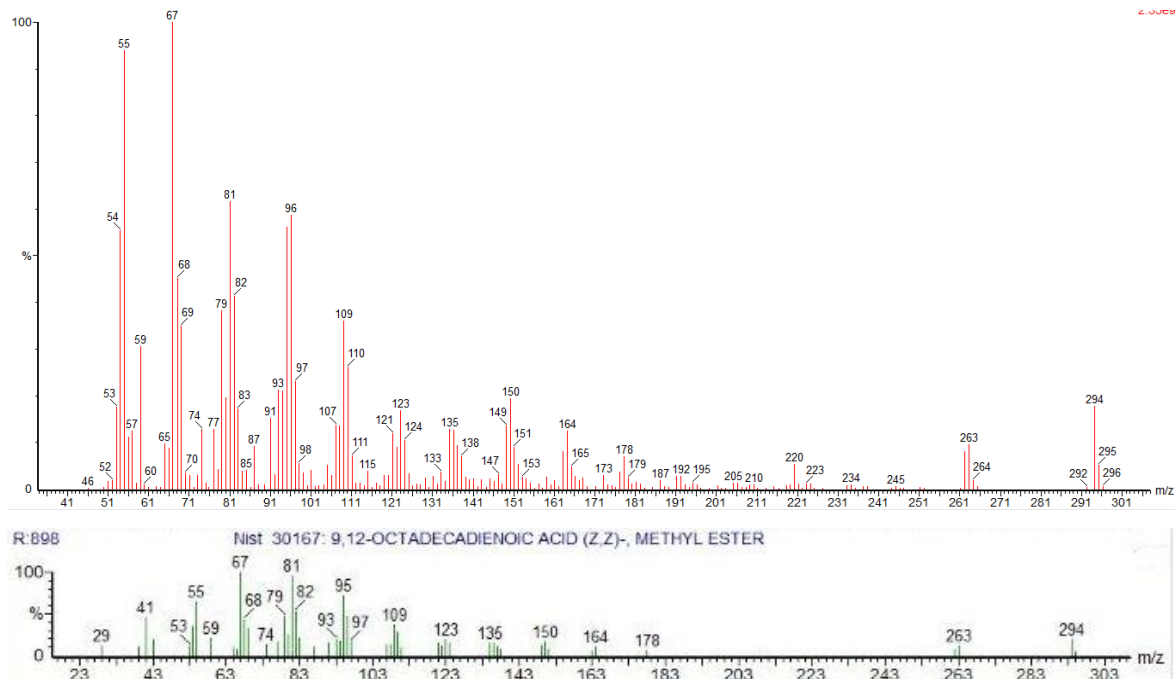


Figura 58. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 16,24 minutos com os dados da biblioteca.

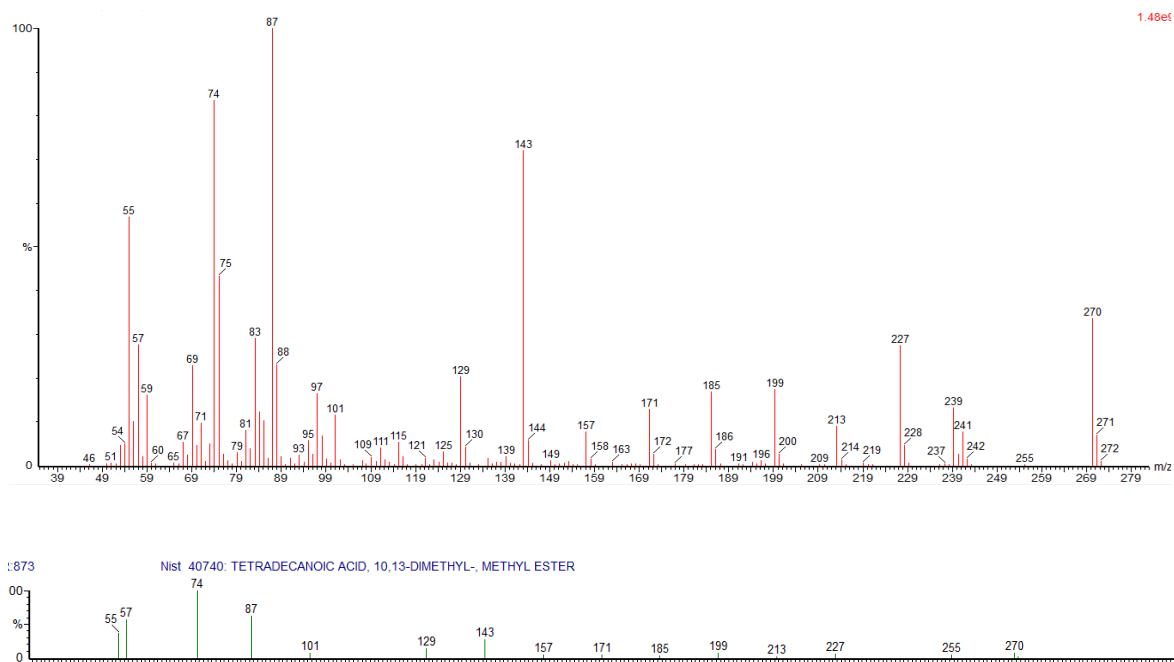


Figura 59. Cromatograma de íons totais do extrato acetato de etila (EAM) metilado.

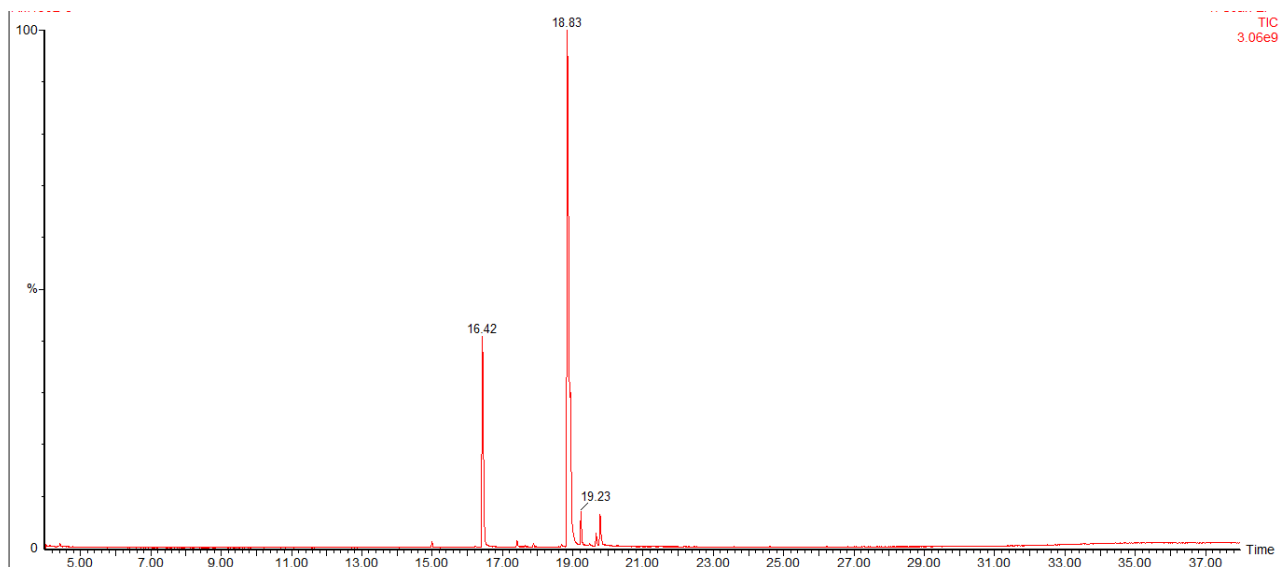


Figura 60. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 16,42 minutos com os dados da biblioteca.

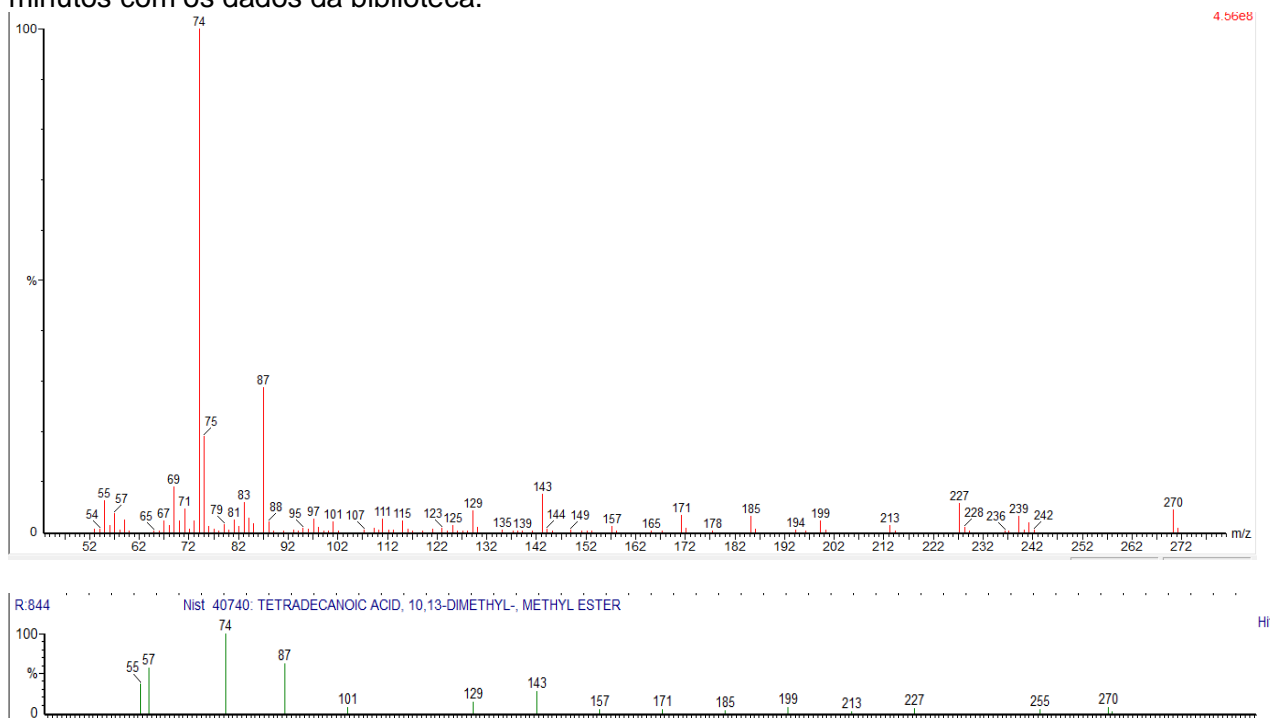
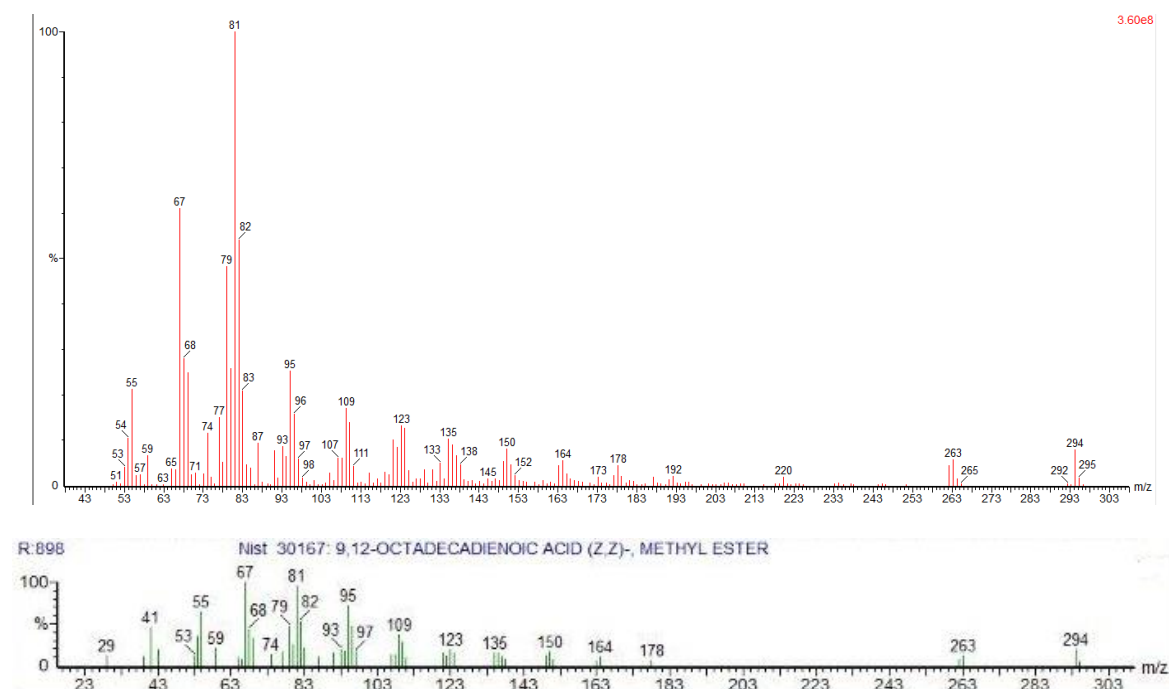


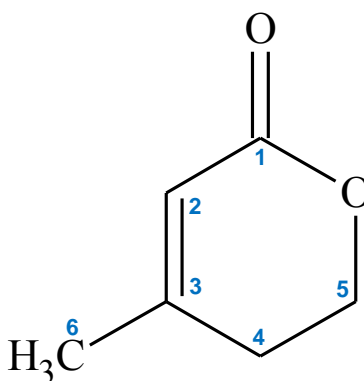
Figura 61. Comparação com o espectro de massas com o tempo de retenção 18,83 minutos com os dados da biblioteca.



1.4 Identificação da substância SV

A substância SV (13,5 mg), aparência oleosa e coloração amarelada, foi obtida após cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) da fração 3ECF, resultante do fracionamento em coluna do extrato clorofórmico do filtrado (ECF) (Figura 62). Sua estrutura foi proposta com base na interpretação dos dados obtidos por RMN de ^1H (Figuras 63, 64 e 65), RMN de ^{13}C (Figura 66) e gHMBC (Figura 67 a 71) e comparação com a literatura. Assim, a substância SV foi identificada como um derivado de lactona insaturada, denominada S-3-metilpent-2-enolactona (BRICHACEK e CARLSON, 2007).

Figura 62. Estrutura proposta para a substância SV, identificada um derivado de lactona insaturada, S-3-metilpent-2-enolactona.



O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , Figura 63) da fração 3ECF exibiu um singlete em δ 5,82 (H-2) (Figuras 63a, 64; Tabela 10), integrando para um hidrogênio, referente a hidrogênio olefínico presente na estrutura. Em δ 4,38 (H-5, $J = 6,22$ e $6,48$ Hz) observou-se um tripleto, integrando para dois hidrogênios, indicativo de hidrogênios metilênicos (Figura 63b, 64; Tabela 3). Um outro tripleto em δ 2,38 (H- 4, $J = 5,96$ e $6,22\text{Hz}$), integrando para dois hidrogênios, sugere a presença de hidrogênios metilênicos (Figura 63c, 65; Tabela 10). Observou-se ainda no espectro um singlete proeminente em δ 2,0 (H-6) integrando para três hidrogênios, sugerindo a presença de hidrogênio metílico (Figura 63d, 65; Tabela 10) (MARINHO, 2005; KATO e YOSHIKOSHI, 1991; BRICHACEK e CARLSON, 2007).

Figura 63. Espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV na fração 3ECF-M3.

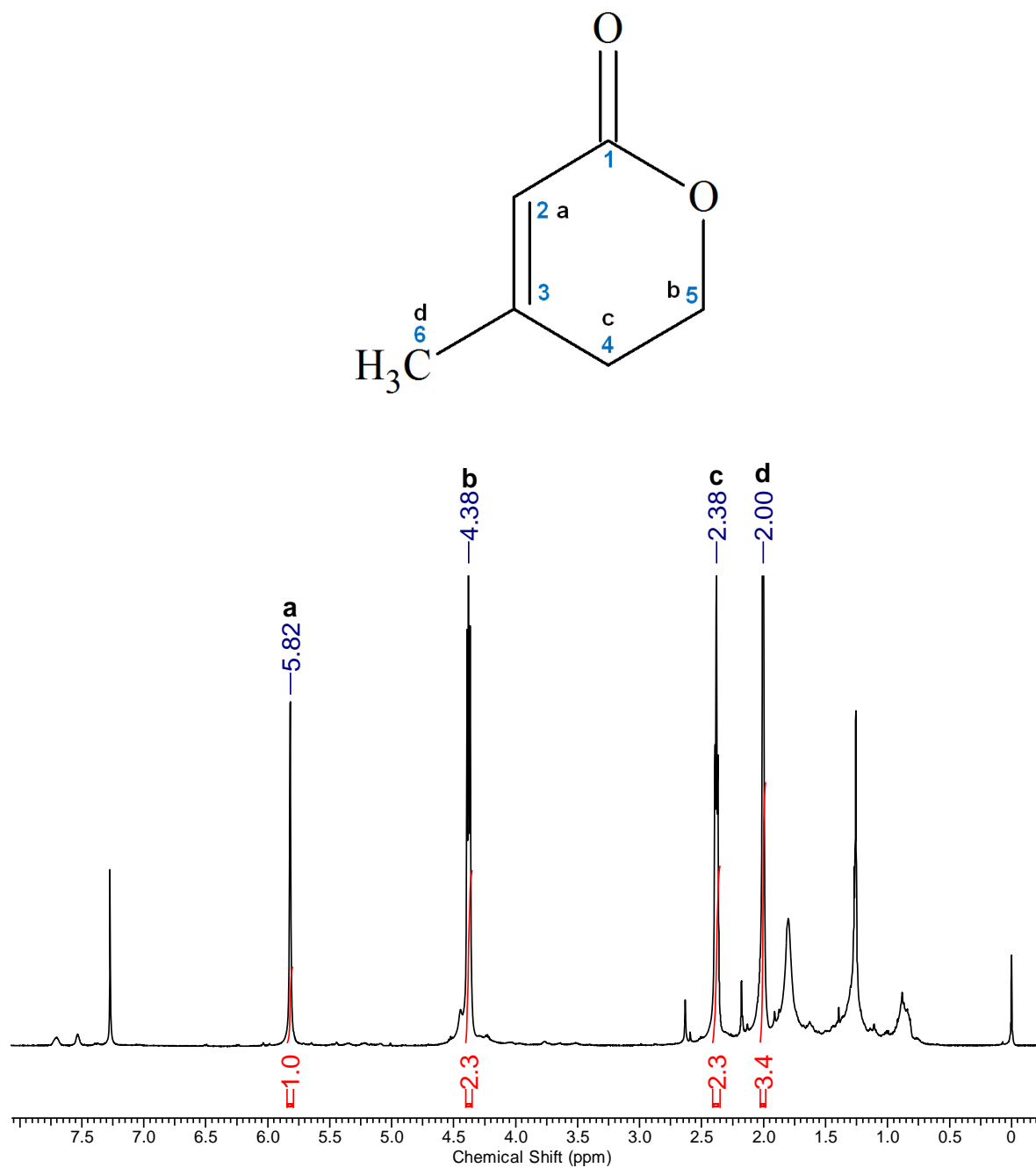


Figura 64. Ampliação da região entre 4,0 e 8,0 ppm do espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M3.

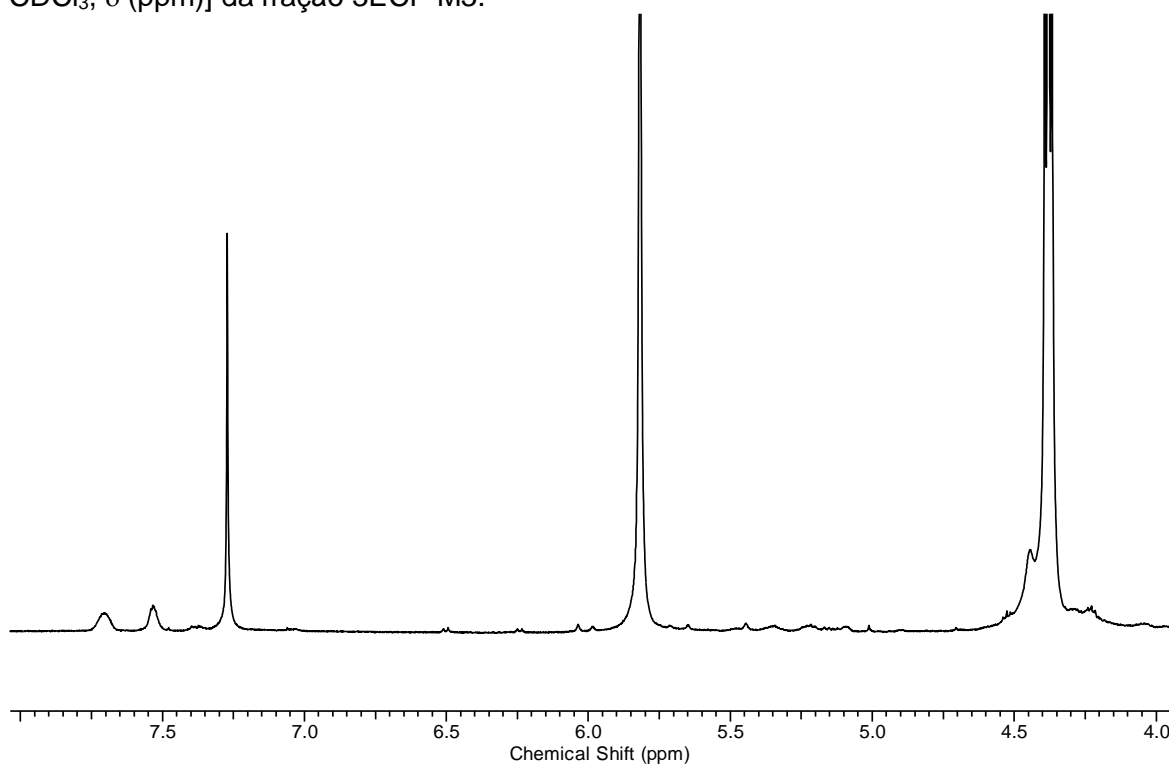


Figura 65. Ampliação da região entre 0 e 3,0 ppm do espectro de RMN de ^1H [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] da fração 3ECF-M3.

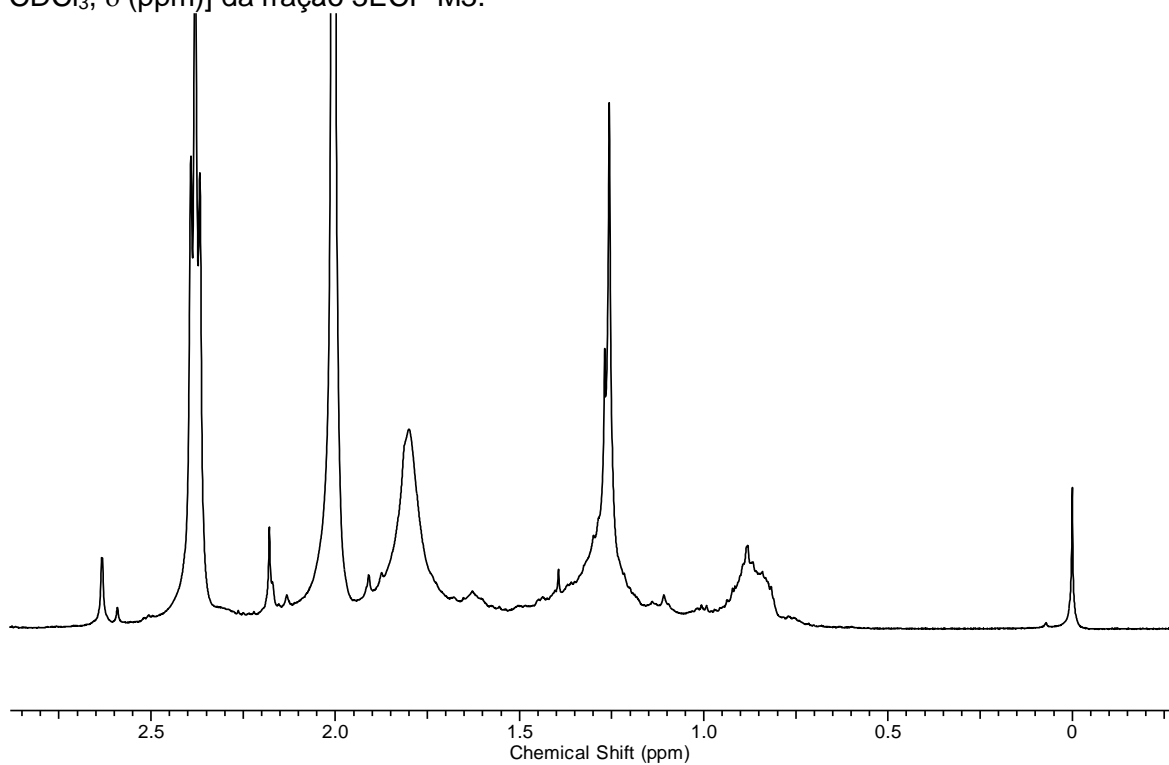


Tabela 10. Deslocamentos químicos característicos de lactonas para os sinais de RMN de ^1H .

Símbolo	δ ^1H (Experimental)	δ ^1H (Literatura)*	Atribuição
a	5,82	5,8	-C=CH
b	4,38	4,4	-CH₂-O
c	2,38	2,4	-C-CH₂-CH₂-
d	2,00	2,0	-CH₃

*Valores retirados da literatura (KATO e YOSHIKOSHI, 1991; BRICHACEK e CARLSON, 2007).

No espectro de RMN ^{13}C da fração 3ECF-M3 (Figura 66) observou-se um sinal em δ 164,58 (C-1) (Figura 66e; Tabela 11) indicativo de carbonila na molécula. Em δ 157,74 (C-3) e δ 116,75 (C-2) podem ser visualizados sinais atribuídos a carbonos olefínicos da estrutura (Figura 66f, 66g; Tabela 11). Foram observados sinais típicos de carbonos metilênicos em δ 29,18 (C-4) e em δ 65,85 (C-5) e um sinal sugestivo de carbono metílico em δ 22,95 (C-6) (Figuras 66i, 66h, 66j; Tabela 11) (MARINHO, 2005; KATO e YOSHIKOSHI, 1991; BRICHACEK e CARLSON, 2007).

Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C [125 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV na fração 3ECF-M3.

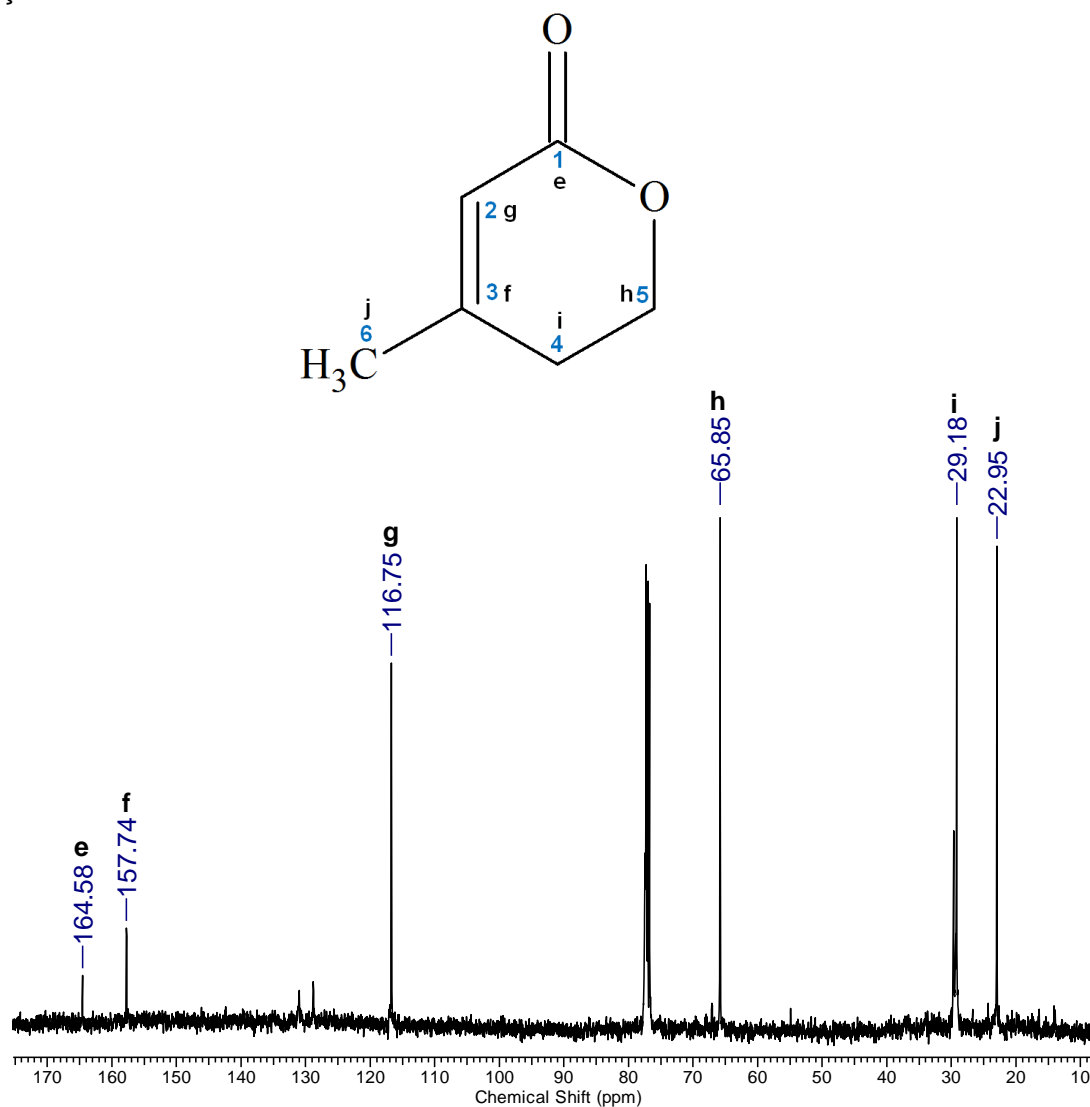


Tabela 11. Deslocamentos químicos característicos de lactonas para os sinais de RMN de ^{13}C .

Símbolo	$\delta^{13}\text{C}$ (Experimental)	$\delta^{13}\text{C}$ (Literatura)*	Atribuição
e	164,58	164,0	-C=O
f	157,74	157,0	-C=CH
g	116,75	117,0	-C=CH
h	65,85	67,0	-CH ₂ -O
i	29,18	29,0	-CH ₂ -CH ₂
j	22,95	24,0	CH ₃

*Valores retirados da literatura (KATO e YOSHIKOSHI, 1991; BRICHACEK e CARLSON, 2007).

Para confirmar a estrutura foi realizado experimento de $g\text{HMBC}$. Foi observada correlação dos sinais em δ 5,82 (H-2) e δ 4,38 (H-5) com o carbono C-

4 (δ 29,18) (Figura 67; Tabela 12), o sinal em δ 5,82 (H-2) com o carbono C-1 (δ 164,58) em conjunto com o sinal em δ 4,38 (H-5) com os carbonos C-1 (δ 164,58) e o carbono C-3 (δ 157,74) (Figura 68; Tabela 12). A correlação dos sinais em δ 2,38 (H-4) e δ 2,00 (H-6) com os carbonos C-2 (δ 116,75), C-3 (δ 157,74) (Figura 69; Tabela 12), como também a correlação dos sinais em δ 2,38 (H-4) com os carbonos C-6 (δ 22,95) e C-5 (δ 65,85) e o hidrogênio H-6 (δ 2,0) com os carbonos C-4 (δ 29,18) (Figura 70; Tabela 12) possibilitaram a identificação da lactona (Figura 71; Tabela 12).

Figura 67. Mapa de contornos gHMBC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.

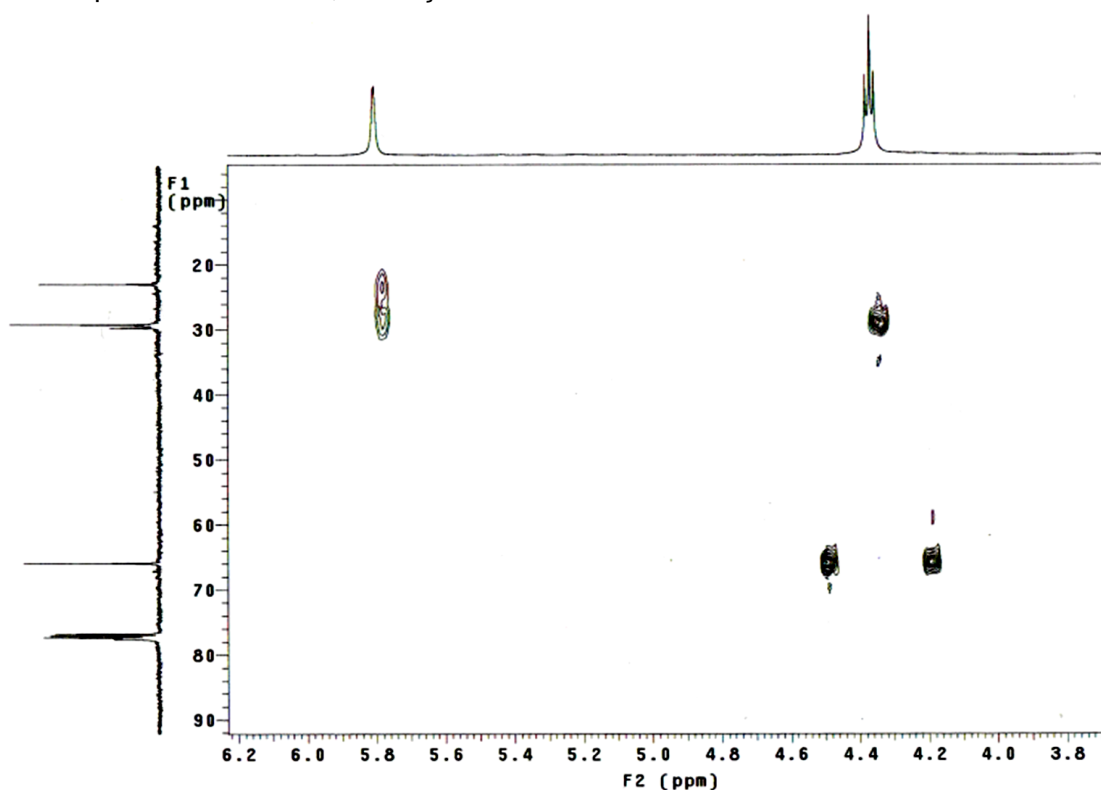


Figura 68. Mapa de contornos gHMBC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.

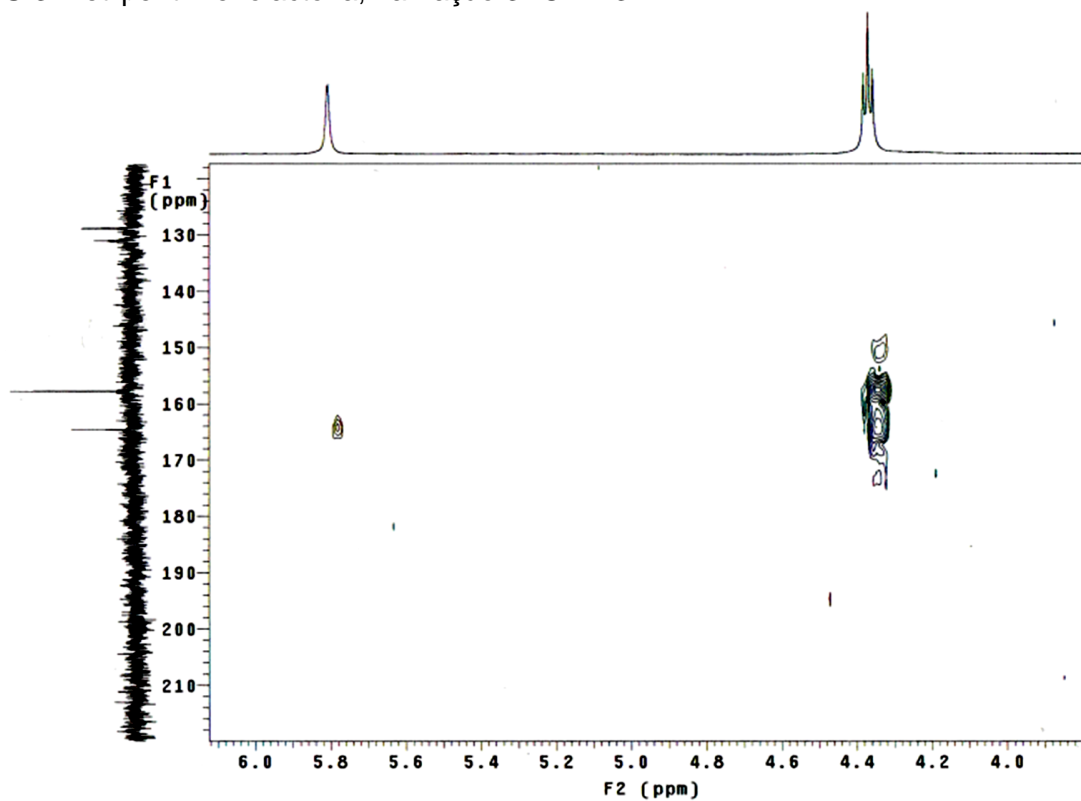


Figura 69. Mapa de contornos gHMBC [500 MHz, CDCl₃, δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.

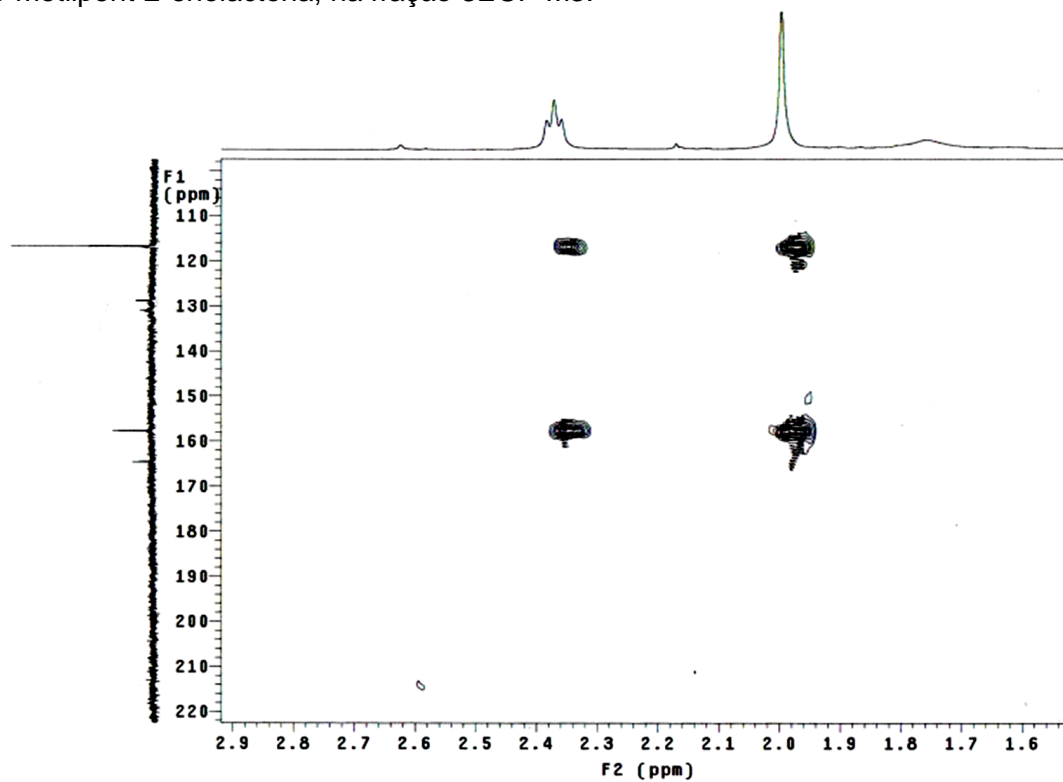


Figura 70. Mapa de contornos gHMBC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.

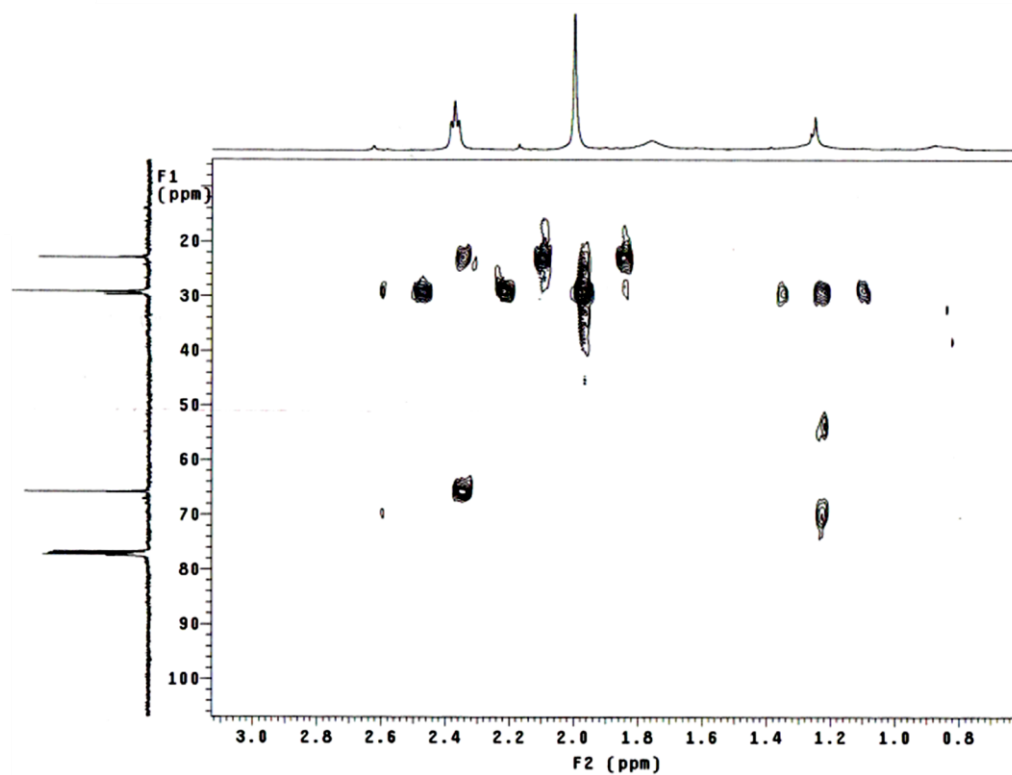


Figura 71. Mapa de contornos gHMBC [500 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)] para a substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona, na fração 3ECF-M3.

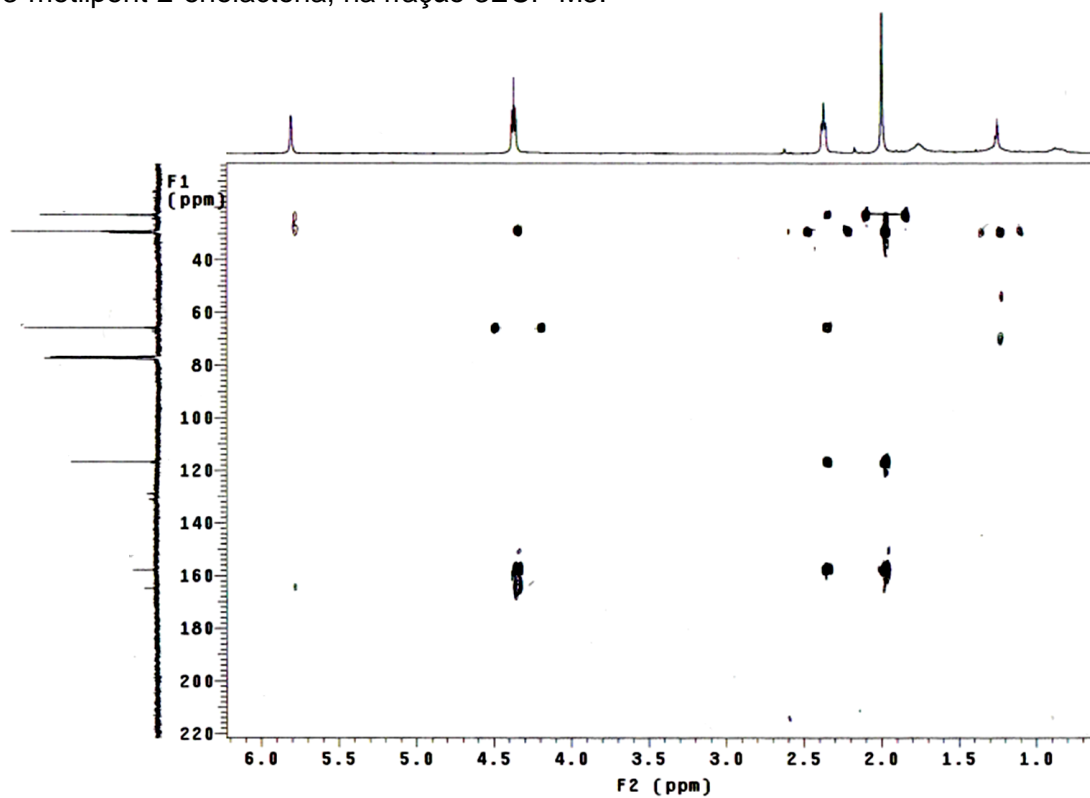
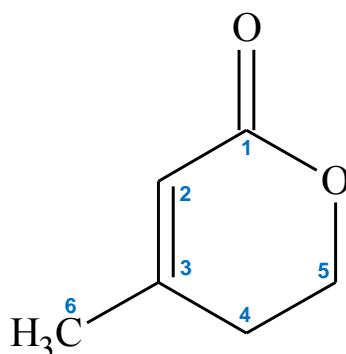


Tabela 12. Correlações dos sinais RMN de ^1H , ^{13}C e $g\text{HMBC}$ da substância SV, S-3-metilpent-2-enolactona.



Número	$\delta ^1\text{H}$ (Experimental)	$\delta ^{13}\text{C}$ (Experimental)	$g\text{HMBC}$
1		164,58	H-2; H-5
2	5,82	116,75	H-4; H-6
3		157,74	H-4; H-5; H-6
4	4,38	29,18	H-2; H-5; H-6
5	2,38	65,85	H-4
6	2,00	22,95	H-4

CONCLUSÃO

O estudo químico dos extratos clorofórmicos do micélio (ECM) e do filtrado (ECF) e acetato de etila do micélio (EAM) obtidos a partir do cultivo de *Penicillium citrinum*, fungo endofítico de plantas de sisal do semiárido baiano, resultou no isolamento de cinco substâncias: ergosterol (SI); 9,12 hexadecadienoato de n-propil (SII); octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila (SIII); 10,13-dimetiltetradecanoato de metila (SVI) e S-3-metilpent-2-enolactona (SV). Os compostos identificados foram caracterizados e descritos por meio de análises por espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C e $g\text{HMBC}$, espectrometria na região do infravermelho, cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) e comparação com a literatura.

REFERÊNCIAS

AMBROSIO, E.; MILANO, L. M.; SOUZA, M. T. F. de; CHIAVELLI, L. U. R.; MONTANHER, P. F.; VISENTAINER, J. V.; ALMEIDA, V. de C.; SOUZA, N. E.; GARCIA, J. C. Study of biodiesel photodegradation through reactions catalyzed by Fenton's reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 25, n. 4, Apr. 2014.

ARORA, A.; RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 318, p. 920-926, 2004.

CAMELINI, C. M. **Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos**. Florianópolis, 2010. 215 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, 66, 101–107, 1998.

BENNETT, J. W.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry** 54:301–309, 2000.

BRICHACEK, M.; CARLSON, R. M. Dihydropyran as a Template for Lactone Synthesis, **Synthetic Communications**, 37, 3541-49 (2007).

CHEN, D. Q.; AN J. M.; FENG, Y. L.; TIAN, T.; QIN, X. Y.; ZHAO, Y.Y. Cloud-point extraction combined with liquid chromatography for the determination of ergosterol, a natural product with diuretic activity, in rat plasma, urine, and faeces. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, 2013. doi: 10.1155/2013/479056.

DAMASCENO, C. L.. **Potencial de *Penicillium citrinum* para o controle de *Aspergillus niger*, agente causal da podridão vermelha do sisal**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, BA, 2012.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, 18, 499–514, 2000.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 2007;35:275-82.

FAGUNDES, C. A. M. **Síntese e caracterização de biodiesel metílico e etílico a partir de blendas dos óleos de tungue e de soja**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RG, 2011

HUANG, L.; CAO, Y.; XU, H.; CHEN, G. Separation and purification of ergosterol and stigmasterol in *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl by high-speed counter-current chromatography. **Journal of separation science**, 34(4): 385-392, 2011.

KATO, M.; OUCHI, A.; YOSHIKOSHI, A. A useful synthetic method for 3-substituted d-lactones: Synthesis of secocrispiolide. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 64(5),1479– 1486, 1991.

KHOSRAVI, A.R.; SHEIKHKARAMI, M.; SHOKRI, H.; SABOKBAR, A. Genetic Variability of Citrinin-Producing *Penicillium citrinum* Strains as Occupational Health Hazards in Northern Iran. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, [S.l.], v. 63, n. 4, dec. 2012.

KOROLKOVAS, A. e BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Editora Guanabara Roogan. Rio de Janeiro, 1998.

KOZLOVSKII, A.G.; ZHELIFONOVA, V.P.; ANTIPOVA, T.V. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (Review). **Journal of Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n.1, 2013.

KWON, O. E.; RHO, M. C.; SONG, H. Y.; LEE, S. W.; CHUNG, M. Y.; LEE, J. H.; KIM, Y. H.; LEE, H. S.; KIM, K. Phenylpyropene A and B, new inhibitors of acyl- CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. **Journal of Antibiotics**, 55, 2002.

LARSEN, T. O.; LANGE, L.; SCHNORR, K.; STENDER, S.; FRISVAD, J. C. Solistatinol, a novel phenolic compactin analogue from *Penicillium solitum*. **Tetrahedron Letters**, 48: 1261-1264, 2007.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, Aug. 2004.

MARIA, R. M. **Análise do ácido linoléico conjugado em carne bovina por RMN**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP, 2009

MARINHO, A. M. do R. **Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados às plantas *Murraya paniculata* (Rutaceae) e *Melia azedarach* (Meliaceae)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2005.

NCBI. ***Penicillium* spp.** Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> > (Acesso em: novembro de 2010).

NICOLETTI, R.; LOPEZ-GRESA, M. P.; MANZO, E.; CARELLA, A.; CIAVATTA, M. L. Production and fungitoxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. **Mycopathologia**, 163: 295-301, 2007.

PALLU, A. P. de S. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**, 2010, 130f, Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de plantas)- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2010.

ROSSET, I. G. **Produção de biodiesel empregando biocatálise via reações de esterificação e transesterificação**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP, 2011.

SÁ, J. O de. **Patogênese de *Aspergillus niger* e biocontrole da podridão vermelha do sisal por *Trichoderma* spp.**, 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009.

SACCHI, R.; ADDEO, F.; PAOLILLO, L. ^1H and ^{13}C NMR of virgin olive oil: A overview. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 35: S133, 1997.

SILVA, C. L. M. da. **Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol**. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2005.

SILVA, M. G.; FURTADO, N. A. J. C.; PUPO, M. T.; FONSECA, M. J. V.; SAID, S.; FILHO, A. A. DA S.; BASTOS, J. K.; Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Microbiological Research**, Volume 159, Issue 4, 2004.

SOOD, R.; KINNUNEN, P. K. J. Cholesterol, lanosterol, and ergosterol attenuate the membrane association of LL-37(W27F) and temporin L. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1460-1466, 2008.

VIGLI, G.; PHILIPDIS, A.; SPYROS, A. DAIS, P. Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oils adulteration in virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 5715, 2003.

VOGUEL, A. I. **Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa**. vol. 3, 3 ed., Rio de Janeiro: Ao livro Técnico S. A., 1971, p1018.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, 31(7), 2008.

TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; BORWORNWIRIYAPAN, K.; PHONGPAICHIT, S.; SAKAYAROJ, J.; Benzopyranone, benzophenone, and xanthone derivatives from the soil fungus *Penicillium citrinum* PSU-RSPG95. **Tetrahedron Letters**, Volume 55, Issue 7, 12, 2014

XU, B.J.; JIA, X.Q.; GU, L.J.; SUNG, C.K. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**; 17:271-85, 2006

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou os estudos químicos dos extratos de clorofórmio do micélio (ECM) e clorofórmio do filtrado (ECF) e do extrato acetato de etila do micélio (EAM) obtidos a partir do micélio e filtrado de *Penicillium citrinum*, fungo endofítico de plantas de sisal do semiárido baiano. Foram identificadas cinco substâncias: ergosterol (SI); 9,12 hexadecadienoato de n-propil (SII); octadeca-9Z,12Z-dienoato de metila (SIII); 10,13-dimetiltetradecanoato de metila (SVI) e S-3-metilpent-2-enolactona (SV), as quais foram descritas mediante auxílio de análises por espectrofotometria de RMN de ^1H , ^{13}C , gHMBC, IR, CG-EM e comparação com a literatura.

Contudo, faz-se necessária a continuação deste estudo, objetivando, avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias identificadas e a caracterização dos extratos e frações ainda não analisados, visando a elucidação de novas estruturas.

O isolado de *Penicillium citrinum* foi considerado neste trabalho um micro-organismo bastante promissor no que tange à produção de substâncias antimicrobianas, visto que se observou atividade inibitória da germinação de esporos de *A. niger*, agente etiológico da podridão vermelha do sisal, por extratos de *P. citrinum*. Assim, os extratos obtidos do micélio e fração líquida do cultivo de *P. citrinum*, apresentaram-se como fontes promissoras de compostos bioativos e podem ser utilizados para inibir a germinação de esporos de *A. niger*.

Não foi possível determinar a concentração mínima inibitória para o crescimento micelial de *A. niger* por extratos e frações obtidos de *P. citrinum*, sendo necessário aprofundar os estudos com estes extratos, assim como a purificação e identificação de prováveis substâncias antifúngicas.