



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0607784-6 B1

(22) Data do Depósito: 31/03/2006

(45) Data de Concessão: 05/09/2017



* B R F I O 6 0 7 7 8 4 B 1 *

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR PRODUTOS METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS OU BACTÉRIAS E PRODUTO METABÓLICO SECUNDÁRIO DE FUNGOS OU BACTÉRIAS, MARCADO DE FORMA ISOTÓPICA

(51) Int.Cl.: C12P 1/02; C12P 1/04; C12P 11/00; C12P 13/00; C12Q 1/02; C12R 1/01; C12R 1/645

(30) Prioridade Unionista: 05/04/2005 AT A 574/2005

(73) Titular(es): ERBER AKTIENGESELLSCHAFT

(72) Inventor(es): MARTIN FREUDENSCHUSS; GEORG HÄUBL; RUDOLF KRŠKA; GÜNTHER JAUNECKER; EVA BINDER

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA PRODUZIR PRODUTOS METABÓLICOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS OU BACTÉRIAS E PRODUTO METABÓLICO SECUNDÁRIO DE FUNGOS OU BACTÉRIAS, MARCADO DE FORMA ISOTÓPICA"**.

5 A presente invenção refere-se a um método para produzir produtos metabólicos secundários marcados de forma isotópica, de fungos ou bactérias, em um meio de cultura sintético líquido, bem como os produtos metabólicos secundários marcados de forma isotópica, de fungos ou bactérias.

10 Atualmente, as substâncias marcadas de forma isotópica são de interesse crescente, particularmente na tecnologia de cromatografia líquida com detecção espectrométrica de massas (LCMS), que possibilita análises espectrométricas eficientes em altos volumes de produtos. Esta tecnologia pode ser usada para uma ampla série de analisados potenciais, sem impor
15 quaisquer limitações quanto à massa molecular, mas ainda assim com possíveis problemas ocorrendo na detecção das substâncias individuais, significando que os espectros de desintegração e os picos de moléculas individuais devem ser especificados correspondentemente. Para assegurar aplicação e método confiáveis da LCMS, o uso de assim denominadas substâncias de padrão interno tornou-se cada vez mais importante. Os padrões internos são substâncias que mais se assemelham à característica dos analisados-alvos, isto é, particularmente, tendo possivelmente estruturas moleculares idênticas, contudo em pesos moleculares diferentes. As moléculas do analisado-alvo, marcadas de forma isotópica, isto é, moléculas nas quais
20 um ou vários átomos na molécula são substituídos por seus isótopos e, portanto, passaram a ser padrões internos ideais. Atualmente, tais substâncias são produzidas por sínteses orgânicas, por exemplo, substituindo átomos de
25 hidrogênio ou carbono pelos isótopos mais pesados correspondentes.

Neste contexto, demonstrou-se, entretanto, em análises por
30 LCMS, que é desejável que as substâncias marcadas de forma isotópica, usadas como padrões internos, tenham diferenças de massas moleculares da ordem de pelo menos 3, para permitir a separação distinta entre elas e os

analisados-alvo, e que, se possível, sejam usadas substâncias que compreendem tão poucos isotopômeros quanto possível.

Uma maneira para produzir metabólitos vegetais ou microbianos, marcados de forma isotópica, é por intermédio da rota biossintética das respectivas plantas e/ou micróbios. Ao fazer isto, os meios de cultura são suplementados com nutrientes marcados de forma radioativa e os componentes dos meios de cultura são incorporados até uma certa porcentagem nos ciclos anabólicos e metabólicos das culturas microbianas ou vegetais, de tal modo que os isótopos sejam incorporados nos produtos metabólicos. Esse método envolve a desvantagem de que uma marcação apenas incompleta é factível por esse método e que uma mistura de diferentes isotopômeros é normalmente formada, o que torna essas substâncias marcadas de forma isotópica, ou os metabólitos vegetais ou microbianos marcados de forma isotópica, dificilmente adequadas para uso como padrões internos, pois, com o uso dessas substâncias, não apenas um padrão, mas um amplo espectro de padrões seria aplicado, o que, por sua vez, tornaria a detecção seletiva de substâncias-alvo em espectrometrias de LCMS impossível ou possível apenas com grande dificuldade.

A presente invenção visa a fornecer um método para produzir produtos metabólicos secundários de fungos ou bactérias, marcados de forma isotópica, nos quais todos ou quase todos átomos de carbono, átomos de nitrogênio ou átomos de enxofre contidos no produto de partida são substituídos por isótopos estáveis, produzindo assim um único produto final marcado de forma isotópica, para ser detectável de forma fácil e confiável em processos espectrométricos, particularmente LCMS. A invenção visa ainda a produzir um produto metabólico que pode ser usado de forma segura e confiável como um padrão interno em processos analíticos espectrométricos, particularmente LCMS.

Para atingir esses objetivos, o método de acordo com a presente invenção é conduzido de uma maneira tal que a síntese seja conduzida imobilizando os fungos ou bactérias sobre um veículo inerte, e ao mesmo tempo, adicionando um meio de cultura líquido sintético no qual substan-

cialmente todos os átomos de carbono, átomos de nitrogênio e/ou átomos de enxofre foram substituídos por isótopos estáveis. Ao realizar a síntese imobilizando os fungos ou bactérias sobre um veículo inerte, e ao mesmo tempo, adicionando um meio de cultura líquido sintético no qual substancialmente todos os átomos de carbono, átomos de nitrogênio e/ou átomos de enxofre foram substituídos por isótopos estáveis, tornou-se factível produzir um produto metabólico dos fungos e bactérias, marcado de forma isotópica, no qual todos os átomos, ou pelo menos 95% dos átomos, a serem obtidos a partir do meio de cultura por crescimento, isto é, átomos de carbono, nitrogênio ou enxofre, foram substituídos pelos isótopos mais estáveis dos nutrientes marcados de forma isotópica, contidos no meio de cultura, de modo a permitir a recuperação de um produto seletivo marcado de forma isotópica, em vez de uma mistura de diferentes homólogos que têm números variados de átomos de isótopos, como foi descrito freqüentemente nas técnicas anteriores. Assim sendo, é factível por este método de produção obter um produto metabólico secundário marcado de forma isotópica que pode ser usado seletivamente e que pode ser clara e indubitavelmente detectado em qualquer análise, mesmo em estudos metabólicos.

De acordo com outra modalidade, o método é conduzido de uma maneira tal que os açúcares ou álcoois de açúcares, particularmente D-[U- $^{13}\text{C}_6$]-glicose, ^{13}C -sacarose, ^{13}C -glicerina e/ou ^{13}C -acetato, sejam usados como fontes de carbono no meio de cultura líquido sintético; ^{15}N -aminoácidos, -nitratos, -compostos amoníacos ou -uréia sejam usados como fontes de nitrogênio; ^{33}S - ou ^{34}S -sulfatos, -sulfetos ou -aminoácidos, sejam usados como fontes de enxofre. Quando são desenvolvidos produtos metabólicos de fungos ou bactérias, os fungos ou as bactérias, conseqüentemente, devido ao fato de as fontes de carbono, nitrogênio e/ou enxofre completamente marcadas estarem contidas no meio de cultura líquido sintético, serão forçados a incorporar dentro do produto metabólico o isótopo respectivamente marcado, de modo a assegurar que os produtos metabólicos secundários dos fungos ou bactérias fiquem marcados com os respectivos isótopos, ou substituídos pelos respectivos isótopos, em um alto grau, se não completamente.

Para melhorar o rendimento de produtos metabólicos secundários de fungos ou bactérias, marcados de forma isotópica, o método de acordo com uma outra modalidade é conduzido de uma maneira tal que o meio de cultura líquido sintético contenha adicionalmente uma mistura selecionada entre sais inorgânicos ou ácidos e bases que têm íons Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} , B^{+++} bem como CO_3^{--} , SO_4^{--} , PO_4^{--} , NO_3^- . Devido ao fato de que os sais ou ácidos e bases que têm os íons Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} , B^{+++} , bem como CO_3^{--} , SO_4^{--} , PO_4^{--} , NO_3^- , estão contidos no meio de cultura líquido sintético, assegura-se que quaisquer íons estranhos possivelmente presentes nos fungos ou bactérias, além de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, sejam fornecidos de forma segura em quantidades suficientes de modo a assegurar altos rendimentos além de rápido crescimento.

Para melhorar ainda mais o rendimento, usa-se um veículo natural ou sintético que tem uma grande área superficial interna, particularmente silicato, silicato estratificado, zeólita, bentonita, argila queimada, terra diatomácea, materiais sintéticos ou similares, na qualidade do dito veículo inerte. Usando um veículo inerte que tem uma grande área superficial interna, é factível melhorar o rendimento no método de acordo com a invenção em pelo menos 50%, diferentemente dos métodos convencionais que são conduzidos sem veículos inertes que têm grandes áreas superficiais internas. Tais aumentos no rendimento não apenas tornam o método mais econômico, mas também asseguram que quantidades suficientes dos produtos finais desejados dos produtos metabólicos secundários marcados de forma isotópica sejam produzidas de modo a permitir que os mesmos sejam usados de uma maneira apropriada como padrões internos em análises, ou mesmo em estudos metabólicos.

De acordo com a invenção, as maiores melhoras no rendimento serão obtidas, particularmente, pelo fato de que se usa um silicato de alumínio, como por exemplo, terra diatomácea, particularmente diatomita, HM-N isoluto ou uma zeólita, ou silicato estratificado, particularmente uma vermiculita, entre o grupo de minerais de mica, na forma natural ou tratada, na quali-

dade do dito veículo inerte. Com essas substâncias, as propriedades superficiais tais como tensão superficial, porosidade, e similares, são, particularmente, apropriadas para atingir taxas especialmente boas de reposição sobre as superfícies do veículo. De uma maneira análoga, o uso de veículos sintéticos inertes, que podem ser selecionados entre materiais espumados, poliamida, silicone, polietileno, polipropileno, poli(tetraflúor etileno), poliéster, ou similares, possibilitarão conseqüentemente a obtenção de grandes melhoras no rendimento, com o que o uso de veículos naturais que têm grandes áreas superficiais, ou o uso de veículos sintéticos, produzirá rendimentos siilarmente aumentados, em função dos produtos metabólicos a serem produzidos.

Para conseguir um controle do método tão rápido quanto possível simultaneamente com um alto rendimento, outra modalidade da invenção aprimora até o grau em que a produção é realizada em temperaturas na faixa entre 3 e 45°C, particularmente entre 10 e 35°C. Neste contexto, parcialmente veio a ser favorável que o método de produção nem sempre seja conduzido em uma temperatura constante, mas que variações de temperatura dentro dos limites indicados também possam levar a melhores rendimentos ou velocidades de reação aceleradas ou números elevados de reposição.

Para obter um produto final tão puro quanto possível, o método de acordo com a invenção é conduzido de uma maneira tal que os produtos metabólicos secundários marcados de forma isotópica sejam recuperados a partir do meio de cultura líquido sintético por extração e concentração, por exemplo, por uma combinação de etapas tais como extração sólido/líquido-líquido/líquido, centrifugação, filtração e evaporação. Depois da recuperação dos produtos metabólitos secundários marcados de forma isotópica, veio a ser vantajoso submeter esses produtos a um procedimento adicional de purificação, onde, de acordo com a invenção, são usados de preferência métodos cromatográficos e, particularmente, cromatografia de coluna, cromatografia preparatória em camada delgada, cromatografia iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão e/ou cromatografia líquida prepara-

tória sob alta pressão, como procedimentos de purificação. Tal método de reprocessamento e procedimento de purificação tornará possível a recuperação de produtos metabólicos secundários marcados de forma isotópica, de fungos e bactérias, nos quais pelo menos 95% dos átomos de carbono, átomos de nitrogênio e/ou átomos de enxofre foram substituídos pelos respectivos isótopos estáveis, permitindo assim a recuperação de produtos com diferenças de massa apropriadas em relação aos seus analisados naturais, de modo a serem suficientemente distinguíveis dos isótopos pesados de ocorrência natural, por exemplo, em uma cromatografia líquida com detecção espectrométrica de massas (LCMS), e, assim sendo, por exemplo, permitir o fornecimento de padrões internos estáveis claramente identificáveis nessas análises.

A invenção visa ainda a fornecer um produto metabólico secundário de fungos bactérias, marcado de forma isotópica, que compreende substancialmente todos, particularmente pelo menos 95% dos átomos de carbono, átomos de nitrogênio e/ou átomos de enxofre substituídos por isótopos estáveis.

De acordo com outra modalidade da invenção, tais produtos metabólicos secundários de fungos ou bactérias, marcados de forma isotópica, podem ser usados como padrões internos em química analítica, para estudos metabólicos em testes de alimentação de animais, em estudos metabólicos para elucidar ciclos metabólicos, rotas de degradação e/ou períodos de degradação, bem como intercalações. No caso de todos propósitos de uso mencionados, é de essencial importância ter obtido um padrão estável e claramente detectável, ou uma substância claramente detectável e rastreável, no esquema de teste ou esquema de degradação, para ser capaz de reproduzir precisamente as etapas individuais do método ou do processamento.

De acordo com outra modalidade, as micotoxinas, particularmente tricotecenos tais como nivalenol, desoxinivalenol, 3-acetil-desoxinivalenol, 15-acetil-desoxinivalenol, fusarenona-X, toxina T-2, toxina HT-2, DAS, fumonisinas tais como fumonisina B1, B2 ou B3, ocratoxinas tais como ocratoxina A, B, C ou D, zearalenonas, moniliformina ou aflatoxinas

tais como aflatoxina B1, B2, G1 ou G2, são usadas como produtos metabólicos em métodos analíticos ou em estudos metabólicos, rotas de degradação, e similares. As micotoxinas são de interesse crescente na etiologia de doenças animais, e é necessário produzir tecnicamente quantidades suficientes dessas substâncias, para possibilitar subsequente a condução dos respectivos exames toxicológicos veterinários, usando substâncias químicas tão distintas e puras quanto possível. Como as micotoxinas constituem sérios riscos de saúde para homens e animais, seu procedimento analítico é um tema de interesse mundial, pois, particularmente, muitos países já desenvolveram orientação e valores-limite para a tolerância de tais substâncias. A detecção e quantificação dessas micotoxinas por intermédio do uso de padrões internos, que são precisamente detectáveis, e assim sendo, possibilitam a análise quantitativa da respectiva toxina, constituem um avanço importante na detecção dessas substâncias nocivas.

15 Similarmente, também a detecção quantitativa ou rastreamento de toxinas e, sobretudo, e de acordo com outra modalidade da invenção, de endotoxinas e exotoxinas, particularmente as toxinas bacterianas de *Escherichia coli* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. ou *Staphylococcus* sp., é de vital interesse para a saúde pública e para a detecção de substâncias nocivas em alimentos e alimentos finos. Além disso, o uso de produtos metabólicos tais como antibióticos e, particularmente, antibióticos produzidos a partir de actinomicetos, tais como tetraciclinas, estreptomicinas ou aminoglicosídeos, antibióticos produzidos a partir de *Bacillus* sp., tais como bacitracina ou polimixina, antibióticos produzidos a partir de *Penicillium*, tais como penicilina ou griseofulvina, ou cefalosporinas produzidas a partir de *Cephalosporium*, é de importância crescente, particularmente no caso de doenças ou para a detecção dessas substâncias em alimentos e alimentos finos, onde isto também vale para as substâncias que tornam factível a detecção quantitativa de produtos metabólicos tais como antibióticos são de vital interesse para o público em geral.

30 De acordo com outra modalidade, substâncias puras que têm graus de marcação de ^{13}C , ^{15}N , or ^{33}S ou ^{34}S são usadas como produtos me-

tabólicos, e assim sendo, por um lado, permitindo a clara diferenciação entre substâncias não-marcadas ou produtos metabólicos, e, por outro lado, assegurando também de forma segura a diferenciação entre isótopos de ocorrência natural, e, finalmente, produzindo uma substância para ser rastreável precisamente em análises e processos de detecção.

No texto que se segue, a invenção será explanada mais detalhadamente por meio de exemplos que ilustram a produção de produtos metabólicos marcados de forma altamente isotópica.

Exemplo 1

10 Produção de [U-¹³C₁₅]-desoxinivalenol (DON) marcado de forma altamente isotópica

Para produzir ¹³C-DON completamente marcado, um fungo fusarium, a saber, *Fusarium graminearum*, é inoculado sobre um material veículo inerte, a saber, vermiculita, e incubado em um meio de cultura sintético que consiste em 0,5 g de K₂HPO₄, 2,0 g de NaNO₃, 0,7 g de MgSO₄.7H₂O, 15 2,0 g de KCl, 15 g de D-[U-¹³C₆]glicose, 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O ou 20 mg de ZnSO₄*7H₂O and contendo D-[U-¹³C₆]glicose como única fonte de carbono. Depois de 5 semanas a cerca de 28°C, o material que contém toxina é extraído com acetato de etila e subsequente-
20 purificado até a qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração, cromatografia e cristalização.

Cerca de 40 mL de meio de incubação são preparados por formulação de produção. Depois disso, o material coletado contendo toxina é processado adicionalmente. A partir de 1.000 mL de formulação ou lote, são
25 obtidos 5 e 50 mg [7,5 a 17,5 mg] de [U-¹³C₁₅]-DON completamente marcado.

O produto purificado foi caracterizado pelos seguintes processos analíticos:

¹H RMN e ¹³C-RMN

30 LC-EM/EM Q Trap para determinar a parte do isótopo ¹³C

Determinação da pureza e concentração contra materiais referenciais, usando UV/VIS e HPLC-DAD

Ajuste da concentração

Controle de qualidade usando UV/VIS, HPLC-DAD, LC-EM/EM

A Trap

Esse $^{13}\text{C}_{15}$ -desoxinivalenol ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON) marcado de forma altamente isotópica pode ser usado, por exemplo, como um padrão interno. Tal padrão interno tem um peso molecular mais pesado em exatamente 15 g/mol, seu sinal no espectro de massas (figura 1), aparecendo, assim, exatamente 15 unidades de massa atômica (u.m.a.) mais altas do que o sinal do analisado. Como todas as outras propriedades químicas e físicas do DON marcado com ^{13}C são idênticas àquelas do analisado, tal padrão interno apresenta exatamente a mesma fragmentação que o analisado, e também a ionização da substância é idêntica, e assim sendo, também o rendimento da ionização. Isto significa que as alturas dos sinais dos fragmentos ou dos íons da substância tornam-se absolutamente comparáveis entre o padrão interno e o analisado, e, devido ao fato de que a concentração do padrão interno é conhecida em uma análise, podem ser tiradas conclusões quanto à concentração de um analisado, e é por isso que esse desoxinivalenol altamente marcado constitui um padrão interno perto do ideal.

A figura 1 ilustra C_{12} -DON e C_{13} -DON em um espectro de massas coletivo. Além dos picos moleculares de $^{13}\text{C}_{15}$ -DON e ^{12}C -DON em 295,2 e 310,2, respectivamente, a figura 1 indica também a distribuição dos compostos nos quais nem todos os átomos de carbono foram marcados, e assim sendo, não consistem em uma espécie de isótopo (isotopômeros). No caso de desoxinivalenol de ocorrência natural, esse é $^{13}\text{C}_1$ -DON, que corresponde à distribuição natural entre C_{12} e C_{13} .

Exemplo 2

Produção de ^{13}C -fumonisina marcada de forma altamente isotópica

Para produzir uma fumonisina completamente marcada com ^{13}C , 1.000 mL de um meio líquido que consiste em 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de KNO_3 , 0,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g de KCl , 17,5 g de $\text{D-[U-}^{13}\text{C}_6\text{]glicose}$, 1,5 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 15 mg de $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sendo $\text{D-[U-}^{13}\text{C}_6\text{]glicose}$ a única fonte de carbono, aplicados sobre cubos de

espuma de 1 x 1 x 1 cm, são inoculados com *Fusarium moniliforme* e incubados em uma incubadora a 28°C e 70% de umidade relativa. Depois de 3 semanas, o material que contém a toxina é extraído com uma mistura de solventes, contendo acetonitrila:H₂O 1:1, e subseqüentemente purificado até a
5 qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração e etapas cromatográficas, tal como cromatografia de troca iônica, cromatografia instantânea em coluna com sílica-gel, cromatografia de camada delgada e HPLC preparatória.

Desta maneira, são obtidos 80-240 mg de ¹³C-fumonisininas por 1.000 mL de formulação (HPLC-FLD).

10 Exemplo 3

Produção de [U-¹³C₁₇]-3-acetil-desoxinivalenol marcado de forma altamente isotópica

Para produzir [U-¹³C₁₇]-3-acetil-desoxinivalenol marcado de forma altamente isotópica, 1.000 mL de um meio líquido sintético, consistindo
15 em 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5 g de D-[U-¹³C₆]glicose, 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O e 20 mg de ZnSO₄*7H₂O , e contendo [U-¹³C₆]glicose completamente marcada de forma isotópica como a única fonte de carbono, aplicados sobre terra diatomácea, a saber, HM-N isoluto, são inoculados com *Fusarium graminea-*
20 *rum* e incubados em uma incubadora a 28°C por 9 dias. Depois de 9 dias, o material que contém a toxina é colhido, extraído com azeótropo de acetonitrila/H₂O, e subseqüentemente, purificado até qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração, cromatografia, cristalização, Büchi-MPLC e recristalização. A partir de uma batelada, podem ser obtidos cerca de 15-50
25 mg de um produto final altamente puro. A verificação da pureza é realizada através de análise por LC-UV, usando uma coluna capilar de C18.

Um 3-acetil-desoxinivalenol marcado de forma isotópica, produzido desta maneira, tem uma massa molecular mais pesada em 17 g/mol do que aquela do 3-acetil-desoxinivalenol não-marcado ou não intensamente ou
30 não completamente marcado. O 3-acetil-desoxinivalenol marcado de forma incompleta tem uma massa molecular de M/z = 338, enquanto que o produto marcado completamente de forma isotópica tem uma massa molecular de

355. A figura 2 ilustra o espectro de massas do ^{13}C -3-acetil-desoxinivalenol puro, a partir da qual pode-se observar que o produto foi marcado em 75% e a distribuição dos isótopos do produto é evidente. A distribuição do produto e dos isotopômeros marcados de forma incompleta neste caso depende da pureza isotópica do produto de partida, $^{13}\text{C}_6$ -glicose, e pode ser ainda claramente deslocada na direção de um produto completamente marcado quando se usa $^{13}\text{C}_6$ -glicose completamente pura. A partir da figura 2, fica, entretanto, claramente evidente que os isotopômeros que têm menos do que 13 átomos de ^{13}C estão virtualmente ausentes, de tal modo que o ^{13}C -3-acetil-desoxinivalenol também pode ser usado perfeitamente como um padrão interno.

Exemplo 4

Produção de [U- $^{13}\text{C}_{17}$]-15-acetil-desoxinivalenol altamente marcado de forma isotópica

Para produzir [U- $^{13}\text{C}_{17}$]-15-acetil-desoxinivalenol altamente marcado de forma isotópica, um meio de cultura que consiste em 0,5 g de K_2HPO_4 , 2,0 g de NaNO_3 , 0,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g de KCl , 15 g de D-[U- $^{13}\text{C}_6$]glicose, 1,5 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 15 mg de $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ é inoculado com *Fusarium graminearum* sobre um veículo de filossilicato com grãos grossos e incubado a 28°C em uma incubadora. Depois de 9 dias, o material que contém a toxina é colhido, extraído com acetato de etila, e subsequentemente, purificado até uma qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração, cromatografia e cristalização. Alternativamente à cristalização, pode ser também aplicada uma etapa adicional de purificação, usando HPLC preparatória.

Cerca de 30-60 mg do produto-alvo altamente puro podem ser obtidos partir de uma batelada de fermentação.

Exemplo 5

Produção de [U- $^{13}\text{C}_{15}$]-nivalenol ou [U- $^{13}\text{C}_{17}$]-fusarenona-X altamente marcado de forma isotópica

Para produzir [U- $^{13}\text{C}_{15}$]-nivalenol ou [U- $^{13}\text{C}_{17}$]-fusarenona-X altamente marcado de forma isotópica, um meio líquido que consiste em 0,5 g de K_2HPO_4 , 2,0 g de NaNO_3 , 0,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g de KCl , 15 g de

D-[U-¹³C₆]glicose, 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O ou 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, sendo [U-¹³C₆]-glicose a única fonte de carbono, e filossilicato inerte, é inoculado com *Fusarium nivale* e incubado a 28°C por 5 semanas. Depois disso, o material que contém a toxina é extraído com metanol e cloreto de metileno, e subseqüentemente, purificado até uma qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração, cromatografia e cristalização. Alternativamente à cristalização, pode ser aplicada uma purificação adicional, usando HPLC preparatória.

Exemplo 6

10 Produção de [U-¹³C₂₀]-ocratoxina A altamente marcada de forma isotópica

Para obter a substância-alvo, o fungo *Petromyces albertensis* sobre um veículo de filossilicato inerte é fermentado com um meio líquido sintético que consiste em 0,5 g de K₂HPO₄, 2,0 g de NaNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 15 g de D-[U-¹³C₆]glicose, 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O ou 20 mg de ZnSO₄*7H₂O, que contém glicose completamente marcada com ¹³C, como a única fonte de carbono. Os frascos são então incubados em uma incubadora por 6 semanas a 28°C e 70% de umidade do ar, e subseqüentemente, o material é extraído com tolueno. A substância-alvo é purificada por cromatografia de coluna e recristalizada como nos exemplos precedentes.

Exemplo 7

Produção de [U-¹³C₁₈]-zearalenona altamente marcada de forma isotópica

Para produzir [U-¹³C₁₈]-zearalenona altamente marcada de forma isotópica, 1.000 mL de um meio líquido que consiste em 0,5 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KNO₃, 0,7 g de MgSO₄*7H₂O, 2,0 g de KCl, 17,5 g de D-[U-¹³C₆]glicose, 1,5 g de NH₄H₂PO₄, 15 mg de Fe(II)SO₄*7H₂O e 20 mg ZnSO₄*7H₂O, sendo a D-[U-¹³C₆]glicose a única fonte de carbono, aplicado sobre argila porosa queimada na forma granular, a saber, Seramis ou Lecca, é inoculado com *Fusarium semitectrum* e incubado em uma incubadora a 28°C e 70% de umidade relativa. Depois de 3 semanas, o material que contém a toxina é extraído com éter de petróleo puro e uma mistura de éter de petróleo/acetato de etila 4:1 e 2:1, e subseqüentemente, purificado até a qualida-

de-padrão (pureza >98%) por meio de extração e etapas cromatográficas, tais como cromatografia de troca iônica, cromatografia instantânea em coluna com sílica-gel, cromatografia de camada delgada e HPLC preparatória.

Exemplo 8

5 Produção de $^{15}\text{N}_5$ -rocquefortina C altamente marcada de forma isotópica

Para produzir uma rocquefortina C completamente marcada com o isótopo de nitrogênio ^{15}N , 1.000 mL de um meio líquido que consiste em 0,8 g de KH_2PO_4 , 0,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de KCl, 17,5 g de D-Glicose, 1,0 g de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 1,5 g de NaH_2PO_4 , 15 mg de $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sendo o $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ a única fonte de nitrogênio, aplicado sobre terra de diatomácea grossa, são inoculados com *Penicillium commune* e incubados em uma incubadora a 12°C e 70% de umidade do ar. Depois de 48 dias, o material que contém a toxina é extraído com um solvente orgânico que consiste em clorofórmio:metanol 9:1, e subseqüentemente, purificado até uma qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração líquido-líquido, cromatografia instantânea em coluna com sílica-gel, e HPLC preparatória. São obtidos 300 mg de $^{15}\text{N}_5$ -rocquefortina C por 1.000 mL de formulação é (HPLC-FLD).

Exemplo 9

20 Produção de $^{15}\text{N}_2$ - ^{33}S -penicilina altamente marcada de forma isotópica

Para produzir uma penicilina completamente marcada com o isótopo de nitrogênio ^{15}N e com o isótopo de enxofre ^{33}S , 1.000 mL de um meio líquido que consiste em 1,0 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de MgCl_2 , 20,0 g de D-glicose, 1,0 g de $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 0,5 g de $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$, 1,5 g de Na_2HPO_4 , 5 mg de Fe(II)Cl_2 , 5 mg de ZnCl_2 , sendo o $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ a única fonte de nitrogênio, e o $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$, a única fonte de enxofre, aplicados sobre pequenos cubos de espuma, são inoculados com *Penicillium notatum* e incubados em uma incubadora a 28°C e 70% de umidade do ar. Depois de 30 dias, o material que contém a toxina é extraído com acetato de etila, e subseqüentemente purificado até a qualidade-padrão (pureza >98%) por meio de extração líquido-líquido, cromatografia instantânea em coluna com sílica-gel, e HPLC preparatória. São obtidos 500 mg de $^{15}\text{N}_2$ - ^{33}S -penicilina por 1.000 mL de formulação (HPLC-FLD).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir produtos metabólicos secundários de fungos ou bactérias, marcados de forma isotópica, em um meio de cultura líquido sintético, caracterizado pelo fato de que a síntese é conduzida
5 immobilizando os fungos ou bactérias sobre um veículo inerte, e ao mesmo tempo, adicionando um meio de cultura líquido sintético no qual pelo menos 95% dos átomos de carbono, átomos de nitrogênio e/ou átomos de enxofre foram substituídos por isótopos estáveis.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
10 fato de que são usados açúcares ou álcoois de açúcares, particularmente D-[U-¹³C₆]-glicose, ¹³C-sacarose, ¹³C-glicerina e/ou ¹³C-acetato, como fontes de carbono no meio de cultura líquido sintético, são usados ¹⁵N-amino-ácidos, -nitratos, -compostos amoniacais ou -uréia como fontes de nitrogênio, e são usados ³³S- or ³⁴S-sulfatos, -sulfetos ou -aminoácidos
15 como fontes de enxofre.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o meio de cultura líquido sintético contém adicionalmente uma mistura selecionada entre sais inorgânicos ou ácidos e bases que têm íons Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, B⁺⁺⁺, bem como CO₃⁻, SO₄⁻,
20 PO₄⁻, NO₃⁻.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que usa-se um veículo natural ou sintético que tem uma grande área superficial interna, particularmente silicato, silicato estratificado, zeólita, bentonita, argila queimada, terra diatomácea, materiais
25 sintéticos ou similares, na qualidade do dito veículo inerte.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que como veículo inerte se usa um silicato de alumínio, como por exemplo, uma zeólita ou um silicato estratificado, particularmente uma vermiculita, do grupo de minerais de mica, na forma natural ou tratada.

30 6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que como veículo sintético inerte são usados os materiais espumados, poliamida, silicone, polietileno, polipropileno, poli(tetraflúor-

etileno), poliéster, ou similares.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a produção é realizada em temperaturas na faixa entre 3 e 45°C, particularmente entre 10 e 35 °C.

5 8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que os produtos metabólicos secundários marcados de forma isotópica são recuperados a a partir do meio de cultura líquido sintético por extração e concentração, por exemplo, por uma combinação de etapas tais como extração sólido/líquido-líquido/líquido,
10 centrifugação, filtração e evaporação.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que são usados métodos cromatográficos, e particularmente, cromatografia de coluna, cromatografia preparatória em camada delgada, cromatografia iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão
15 e/ou cromatografia líquida preparatória sob alta pressão, como processos de purificação.

10. Produto metabólico secundário de fungos ou bactérias, marcado de forma isotópica, caracterizado pelo fato de que pelo menos 95% dos átomos de carbono, átomos de nitrogênio e/ou átomos de enxofre foram
20 substituídos por isótopos estáveis, selecionado do grupo consistindo de micotoxinas, tricotecenos como nivalenol, deoxinivalenol, 3-acetil-deoxinivalenol, 15-acetil deoxinivalenol, fusarenon X, toxina T-2, toxina HT-2, DAS, fumonisinas como fumonisina, B1, B2 ou B3, ocratoxinas como ocratoxina A, B, C ou D, zearalenonas, moniliformina ou aflatoxinas como
25 aflatoxina B1, B2, G1 ou G2 ou antibióticos como antibióticos formados por actinomicetos como tetraciclina, streptomycinas ou aminoglicosídeos, antibióticos formados por *Bazillus sp.* como bacitracina ou polimixina, antibióticos formados por *penicillium* como penicilina ou griseofulvina, ou cefalosporinas formadas por *cefalosporium*, que é produzido por um método
30 como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, para a produção de um padrão interno em química analítica, para estudos metabólicos em experiências de alimentação em animais, para estudos metabólicos para

explicar ciclos metabólicos, rotas de degradação e/ou períodos de degradação, bem como intercalações.

5 11. Produto metabólico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que é uma substância pura que tem um grau de marcação com ^{13}C , ^{15}N , ^{33}S ou ^{34}S de pelo menos 95%.

10 12. Produto metabólico, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que são usadas toxinas tais como endotoxinas e exotoxinas, particularmente toxinas bacterianas de *Escherichia coli* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. ou *Staphylococcus* sp., na qualidade do dito produto metabólico.

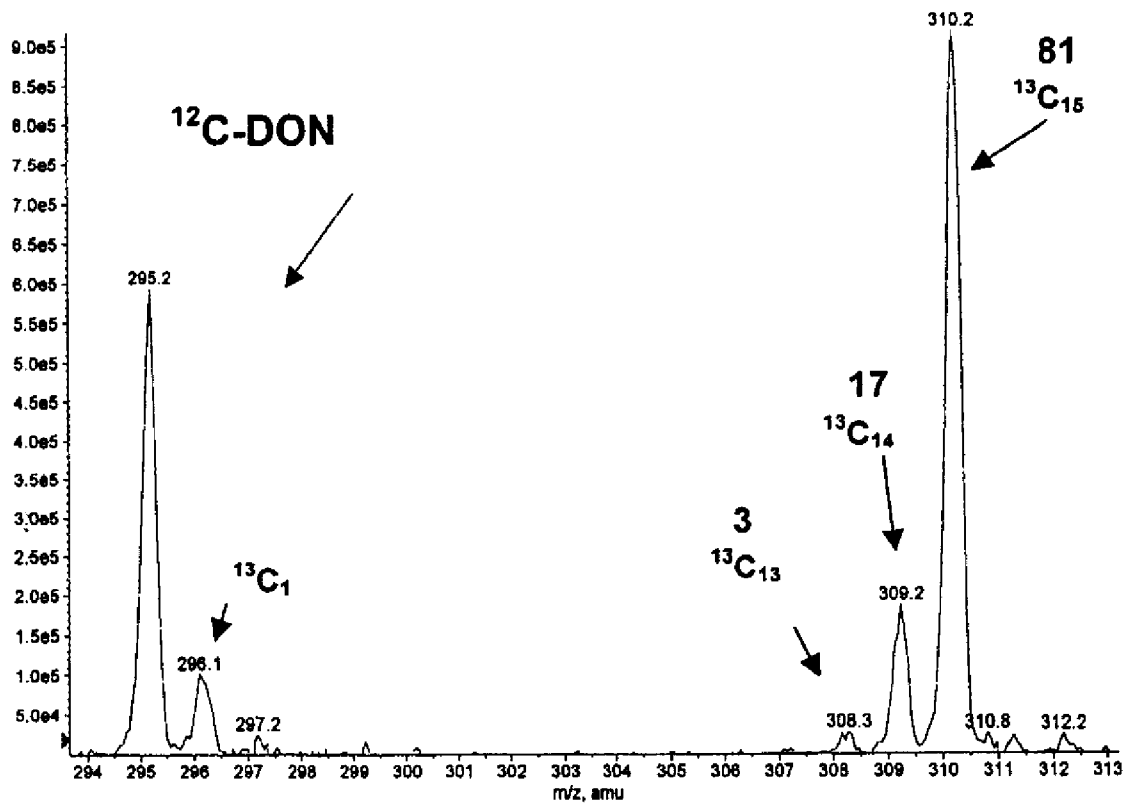


Fig. 1

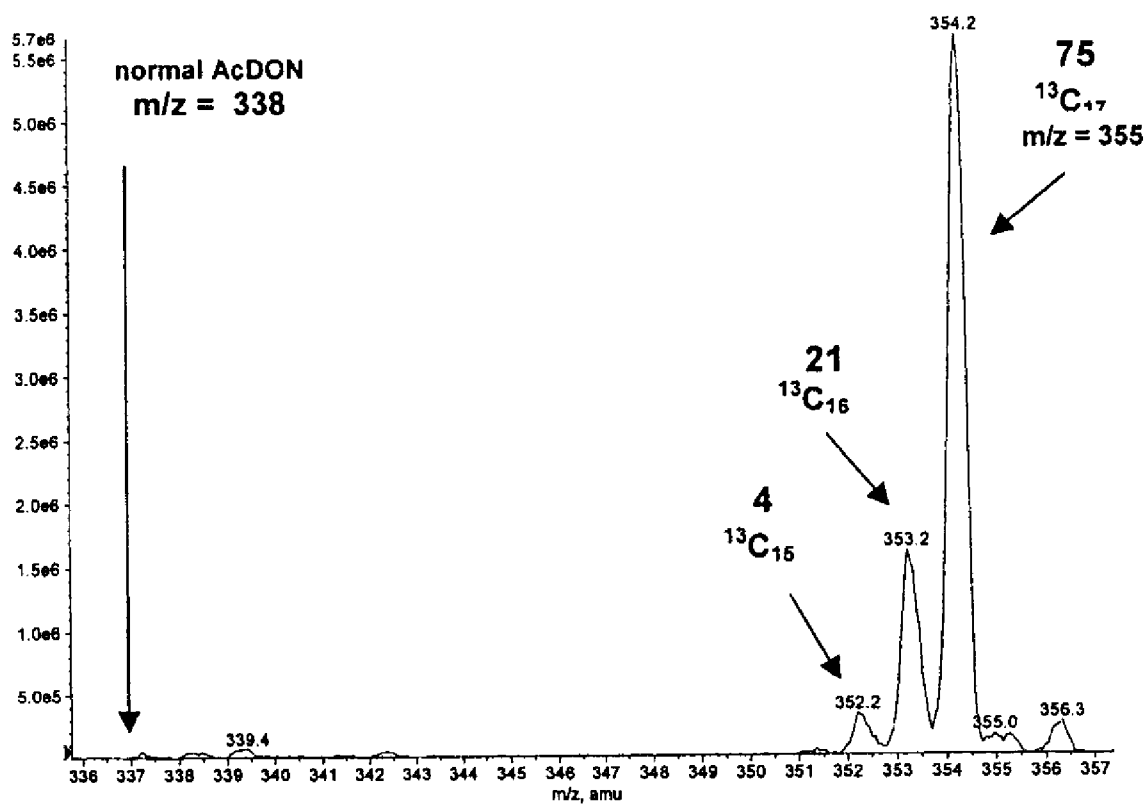


Fig. 2