UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae)

Nilton Syogo Arakawa

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Nilton Syogo Arakawa

Orientador : Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Ribeirão Preto
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Arakawa, Nilton Syogo
Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). Ribeirão Preto, 2007.
141 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.
Orientador: Da Costa, Fernando Batista.

1. Biotransformação. 2.Lactonas sesquiterpênicas. 3. Fungos de solo.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nilton Syogo Arakawa

Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas de *Viguier robusta* Gardn. (Asteraceae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.: _____

Instituição:_____Assinatura:_____

O presente trabalho foi

realizado sob orientação do

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

"Dedico este trabalho a todas as pessoas que me incentivaram para a realização deste sonho"

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir que toda manhã eu acorde e tenha várias descobertas maravilhosas sobre a vida.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa pela confiança, ensinamentos e liberdade para o desenvolvimento deste trabalho e a realização de um sonho.

À FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa

Ao Prof. Jairo Kenupp Bastos, Mônica Tallarico Pupo e João Luis Callegari pelos conselhos e demonstrações das experiência vividas.

A Profa. Dra. que foi a luz do fim do túnel.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela oportunidade e o direcionamento ao mundo da gno.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira pelo direcionamento a pesquisa e demonstrar todo o entusiasmo pelas plantas medicinais.

Ao pessoal da Pós Graduação: Ana, Rosana e Carlos pela paciência.

À Angélica e o Éd, pela imensa ajuda prestada durante a minha estadia no laboratório, conversando, explicando e esclarecendo todas as minhas dúvidas.

À Virgínia da FFCLRP-USP pela obtenção dos espectros de RMN.

À Cris da FCFRP-USP pelas análises no espectrofotômetro de IV.

Ao Thomaz e Giba pelos inúmeros quebra galhos na realização deste trabalho.

Ao Mário e Zé Luís pelas conversas e favores.

Aos funcionários da FCFRP-USP, Seu Antônio, D. Ivanira pelos cafezinhos, Ao seu Nivaldo por cuidar da *Viguiera* no canteirinho, Clovis, Marcão, João, e Ivano pelas conversas madrugadas a fora.

À galera da Orgânica Gobbo, Mitchel, Carlos.

Ao Kana, Cassandra, Lívia, Fúlvio e Ilana, Luizão e Lú (Ambrósio), Karas, valeu pela força.

Carinhosamente a estes mundos (todos farcões):

- À D. Helena, Waldir e **Wartin** pela amizade, compreensão, incentivo, ajudas e disposição para tudo neste trabalho.

- Sergião, Mazza, Nini, Pedra, Jaw, Bob, Karin, Jú, Meia, Paulinha, P Barboni, Fodão, JP, Bruno, Michelle, Rúbia, Waldiceu, Sandra, Fabiana, Souza, Camila, quantas

vezes vocês me auxiliaram nas mais difíceis horas, não tenho palavras para agradecê-los.

- Banda Fides Punica e agregados, Banda Tessa e agregadas pela convivência e incentivos.

- Ao Cândido Arakawa e família; Hiroko Moriya e família, obrigado pelo empurrãozinho que vocês me deram no início da minha carreira.

- Jan (Gigante): Dizem: “por trás de um grande homem sempre existe uma Gigante mulher”, isto é realmente verdade, companheira de todos os momentos e responsável pelo maior presente das nossas vidas, te amo muito.

- Breno (Nenezão): Não sei expressar de onde vem todo esse amor, sei que ainda não entende mas um dia você vai entender.

- Seu Zézão, D. Suzete, Zé Augusto, Edilaine, Isabela, Nessa, Laura e D. Letícia obrigado pelo imenso carinho, apoio, ombro amigo e conselhos valiosos.

- Shuydi e Yurie: que bom que tenho vocês ao meu lado.

- Batian (avó) e Ditian (avô): *Mineko Arakawa (Ba), *Tomoshiti Arakawa (Di), *Tadao Ocamoto (Di) (* *In memorian*), vocês que sempre me protegeram, onde quer que estejam sei que sempre estarão torcendo pelas minhas conquistas, Shizu Ocamoto símbolo de admiração, força e orgulho, obrigado pela sua existência.

- Aos meus tios que tanto me apoiaram.

- Papai e Mamãe: Todas as minhas conquistas conseguidas até este momento, devo a vocês que me apoiaram e me incentivaram incessantemente, não tenho palavras para agradecer por tanto carinho e dedicação de vocês. Valeu muito.....

- A todos que ficaram de fora desta lista, mas que contribuíram muito com a realização deste trabalho.

- Agradeço novamente à Deus por ter me dados todas essas pérolas que me fizeram muito feliz durante toda a minha vida, vocês são realmente especiais.

Nilton Syogo Arakawa

RESUMO

ARAKAWA, N.S. **Transformações microbianas e avaliação da citotoxicidade de lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae)**. 2007. 141f. Tese (Doutorado) Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O processo de transformação microbiana de metabólitos secundários é uma técnica emergente no Brasil e que apresenta enorme potencial para obtenção de substâncias biotransformadas com novas e diferentes moléculas, as quais podem apresentar melhor desempenho de suas atividades biológicas. O objetivo do presente projeto foi efetuar transformações microbianas de metabólitos secundários oriundos da espécie vegetal *Viguiera robusta* Gardn. (família Asteraceae), com ênfase nas lactonas sesquiterpênicas (LSTs), para posterior avaliação de sua citotoxicidade frente a linhagens celulares. As etapas de isolamento e purificação de LSTs foram realizadas através de métodos cromatográficos e a elucidação estrutural através de métodos espectroscópicos. A avaliação da atividade citotóxica dos metabólitos biotransformados foi proposta em virtude de estudos iniciais indicarem potencial citotóxico da LST budleína A frente às linhagens SK-BR-3 (adenocarcinoma de mama) e células leucêmicas JURKAT.

Palavras-chave: Transformações microbianas, Lactonas sesquiterpênicas, Fungos de solo

ABSTRACT

ARAKAWA, N.S. **Microbial Transformations and cytotoxic evaluation of sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae)**. 2007. 141f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The microbial transformation of secondary metabolites is an emerging technique in Brazil with high potential to obtain biotransformed compounds with new and different molecules which can show enhanced biological activities. Herein, microbial transformations of secondary metabolites from *Viguiera robusta* Gardn. (family Asteraceae), with emphasis in sesquiterpene lactones (STLs), were proposed with the aim to evaluate their cytotoxic activity against tumor cells lines. Isolation and purification of STLs were carried out through chromatographic methods and structural elucidation by spectroscopic methods. The evaluation of cytotoxic activity of the biotransformed metabolites was proposed due to the fact that previous studies indicated potential cytotoxic activity of the STLs budlein A against SK-BR-3 and JURKAT cells lines.

Keywords: Asteraceae, Sesquiterpene lactones, Soil fungi

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Viguiera robusta* em seu habitat natural..... 23

Figura 2. Cromatograma da substância LF 7 (7,33 min) em MeOH:H_2O 45:55, fluxo de 1,0 mL a 225 nm..... 49

Figura 3. Cromatograma da budleína A (7.44 min) em MeOH:H_2O 45:55, fluxo de 1,0 mL/min a 225 nm e DMP (15,07)..... 50

Figura 4. Cromatograma da budleína A (8,15 min) em CH_3CN:H_2O 35:65, fluxo de 1,3 mL/min a 225 nm e DMP (15,48 min)..... 50

Figura 5. Espectro no UV da budleína A em MeOH:H_2O 45:55..... 51

Figura 6. Estrutura da budleína A, LST do tipo furanoeliangolido..... 55

Figura 7. Atividade citotóxica dos microextratos frente as células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus niger*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO..... 57

Figura 8. Atividade citotóxica dos microextratos frente as células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus nidulans*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO..... 58

Figura 9. Atividade citotóxica dos microextratos frente as células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus terreus*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO..... 60

Figura 10. Atividade citotóxica dos microextratos frente as células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus phoenix*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO..... 61

Figura 11. Avaliação Atividade citotóxica dos microextratos frente as células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Penicillium corylophylum*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO..... 62

Figura 12. Atividade citotóxica dos micro-extratos frente as células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Penicillium waksmanii*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO..... 63

Figura 13. Estrutura do 4-hidróxi-benzaldeído (substância A3334)..... 65

Figura 14. Espectro no UV do composto A3525..... 70

Figura 15a. Estrutura parcial proposta para a substância A3525..... 67

Figura 15b. Estrutura proposta para a substância A3525..... 70

Figura 16. Espectro no UV do composto A3525..... 73

Figura 17. Estrutura proposta para a substância A3524..... 73
Figura 18. Espectro no UV da substância A11524..... 77
Figura 19. Estrutura parcial proposta para a substância A11524..... 77
Figura 20. Cromatograma da substância A4710 em MeOH:H_2O 45:55 a 268 nm..... 79
Figura 21. Espectro no UV da substância A4710..... 80
Figura 22. Cromatograma da substância A4102 em MeOH:H_2O 45:55 a 288 nm..... 80
Figura 23. Espectro no UV da substância A4102..... 81
Figura 24. Cromatograma da substância A12732 em MeOH:H_2O 45:55 a 265 nm..... 81
Figura 25. Espectro no UV da substância A12732..... 82
Figura 26. Cromatograma da substância A12733 em MeOH:H_2O 45:55 a 288 nm..... 82
Figura 27. Espectro no UV da substância A12733..... 83
Figura 28. Cromatograma da substância A13505 em MeOH:H_2O 45:55 a 258 nm..... 83
Figura 29. Espectro no UV da substância A13505..... 84
Figura 30. Cromatograma da substância A221029 em MeOH:H_2O 45:55 a 254 nm..... 84
Figura 31. Espectro no UV da substância A221029..... 85
Figura 32. Cromatograma da substância A2210210 em MeOH:H_2O 45:55 a 265 nm..... 85
Figura 33. Espectro no UV da substância A2210210..... 86
Figura 34. Cromatograma da substância A2210212 em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm..... 86
Figura 35. Espectro no UV da substância A2210212..... 87
Figura 36. Cromatograma da substância A2210213 em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm..... 87
Figura 37. Espectro no UV da substância A2210213..... 88
Figura 38. Cromatograma da substância A5177P em MeOH:H_2O 45:55 a 280nm..... 88
Figura 39. Espectro no UV da substância A5177P..... 89
Figura 40. Cromatograma da substância A51772 em MeOH:H_2O 45:55 a 264 nm..... 89
Figura 41. Espectro no UV da substância A51772..... 90
Figura 42. Cromatograma da substância A61714 em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm..... 90
Figura 43. Espectro no UV da substância A61714..... 91

Figura 44. Cromatograma da substância A61715 em MeOH:H_2O 45:55 a 268 nm..... 91

Figura 45. Espectro no UV da substância A61715..... 92

Figura 46. Proposta de biotransformação das substâncias A3524 e A3525. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lactonas sesquiterpênicas e espécies de *Aspergillus* utilizados no processo de biotransformação..... 12

Tabela 2 - Eluição do solvente utilizado no fracionamento da fase em DCM..... 26

Tabela 3 - Fungos, códigos de seus extratos brutos utilizados no processo de transformação microbiana da budleína A e as massas obtidas em mg..... 30

Tabela 4 - Sistema de eluição de solventes utilizado no fracionamento do extrato A3 e os códigos das frações coletadas..... 31

Tabela 5 - Sistema de eluição de solventes utilizado no fracionamento do extrato A4 e o código das frações coletadas..... 36

Tabela 6 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato A1..... 38

Tabela 7 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato A2..... 40

Tabela 8 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato A5..... 42

Tabela 9 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato A6..... 43

Tabela 10 - Dados de RMN -^{1}H e ^{13}C da substância LF 7 (300 MHz e 75 MHz, $CDCl_3$; δ em ppm; multiplicidade; J em Hz) e da literatura para a budleína A (100 MHz, $CDCl_3$; δ em ppm; multiplicidade; J em Hz)..... 54

Tabela 11 - Dados de RMN ^{1}H e de ^{13}C da substância A3334 [RMN ^{1}H, 500 MHz; RMN ^{13}C, 125 MHz; pyr-D; δ em ppm; (*multiplicidade; J* em Hz)] e dados da literatura..... 65

Tabela 12 - Dados de RMN da substância A3B 3525 ($CDCl_3$, 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C, δ em ppm)..... 71

Tabela 13 - Dados de RMN da substância A3B 3524 ($CDCl_3$, 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C, δ em ppm)..... 74

Tabela 14 - Dados de RMN da substância A1524 ($CDCl_3$, 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C, δ em ppm)..... 78

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Obtenção do EBLF..... 24
Esquema 2 - Partição e fracionamento do EBLF..... 25
Esquema 3 - Fracionamento do extrato em DCM através de CLV..... 26
Esquema 4 - Fracionamento do extrato A3 das transformações microbianas através de CLV..... 31
Esquema 5 - Fracionamento do extrato A4 das transformações microbianas através de CLV..... 36
Esquema 6 - Ensaio da atividade citotóxica..... 48

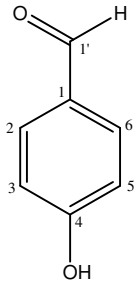
LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
Ar	Aromático
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
δ	Deslocamento químico
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
dq	Duplo quadrupleto
dt	Duplo tripleto
DCM	Diclorometano
DMP	2,5-dimetilfenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade óptica
EB	Extrato bruto
EBLF	Extrato bruto de lavagem foliar
Hex	*n*-Hexano
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LF	Lavagem foliar
LST(s)	Lactona(s) sesquiterpênica(s)
m	Multipleto
CH_3CN	Acetonitrila
MTT	3-(4,5-2il-dimetiltiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazolium
mult	Multiplicidade
PDA	*Potato Dextrose Agar*
q	Quadrupleto
qq	Quádruplo quadrupleto
RMN ^{1}H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
t	Tripleto
THF	Tetraidrofurano
trr	Tempo de retenção relativo
UV	Ultravioleta

CONSTITUINTES ISOLADOS NO PRESENTE TRABALHO

Metabólitos fúngicos

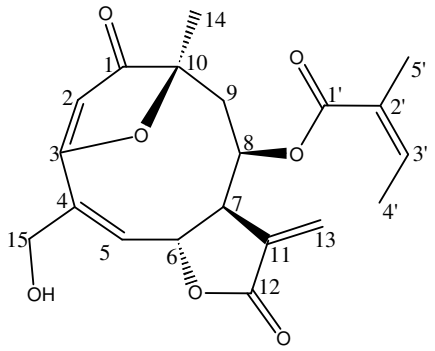
4-Hidróxi-benzaldeído



Substrato

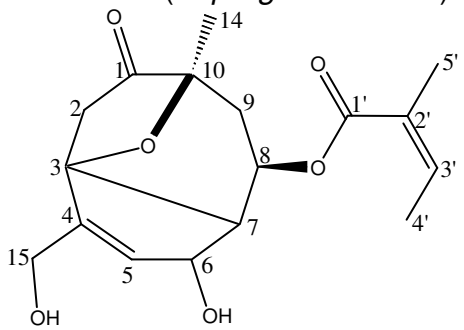
1-ona-3β,10β-epoxi-8β-angeloilóxi-15-hidróxi-germacra-2-4*Z*,11(13)-trien-6α,12-olido

ou budleína A

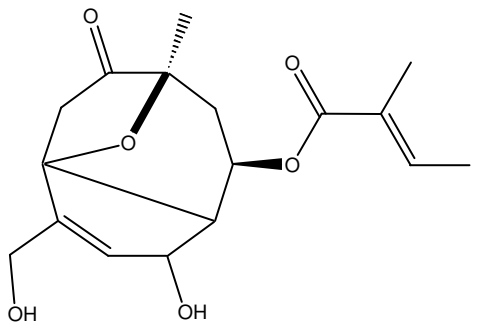


Produtos de Biotransformação

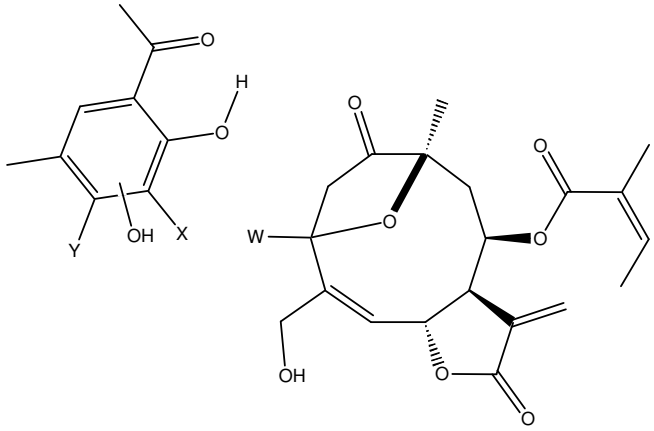
Produto 1 (*Aspergillus terreus*)



Produto 2 (*Aspergillus terreus*)



Produto 3 (*Aspergillus niger*)



SUMÁRIO

	RESUMO	i
	SUMÁRIO	ii
	LISTA DE FIGURAS	iii
	LISTA DE TABELAS	v
	LISTA DE ESQUEMAS	vi
	LISTA DE ABREVIATURAS	vii
	ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	viii
1	**Introdução**	1
1.1	**Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.....**	1
1.2	**O gênero *Viguiera* e a espécie *Viguiera robusta*.....**	3
1.3	**As lactonas sesquiterpênicas (LSTs).....**	4
1.4	**Transformações microbianas de produtos naturais.....**	5
1.5	**Transformações microbianas de lactonas sesquiterpênicas.....**	11
1.6	***High-Throughput Screening* (HTS) ou Triagem de Alta Demanda**	19
1.7	**Citotoxicidade…….....**	21
2	**Objetivos**	22
3	**Materiais e métodos**	23
3.1	**Procedimentos fitoquímicos.....**	23
3.1.1	**Coleta do vegetal e preparo das exsicatas.....**	23
3.1.2	**Obtenção do extrato bruto de lavagem foliar (EBLF).....**	24
3.1.3	**Partição e fracionamento do EBLF.....**	25
3.1.4	**Isolamento e purificação dos metabólitos secundários do extrato em DCM.....**	26
3.1.4.1	**Fração LF 7.....**	27
3.2	**Transformações microbianas de lactonas sesquiterpênicas.....**	28
3.2.1	**Manutenção dos fungos utilizados.....**	28
3.2.2	**Obtenção do inoculo.....**	28
3.2.3	**Transformações microbianas.....**	28
3.2.4	**Obtenção dos micro-extratos das transformações microbianas.....**	29
3.2.5	**Obtenção dos extratos brutos da transformação microbiana em escala ampliada.....**	29
3.3	**Isolamento e purificação dos produtos de transformações microbianas dos extratos obtidos.....**	30
3.3.a	**Extrato A3 (*Aspergillus terreus*).....**	31
3.3.a.1	**Fração A33.....**	32
3.3.a.1.1	**Subfração A334.....**	33
3.3.a.2	**Fração A35.....**	33
3.3.a.2.1	**Subfração A351.....**	34
3.3.a.2.2	**Subfração A352.....**	34
3.3.a.3	**Fração A36.....**	34
3.3.a.4	**Fração A38.....**	35
3.3.a.4.1	**Subfração A382.....**	36
3.3.b	**Extrato A4 (*Aspergillus Phoenix*).....**	36
3.3.b.1	**Fração A47.....**	37
3.3.b.2	**Fração A410.....**	37

3.3.c **Extrato A1 (*Aspergillus niger*)**..... 38
3.3.c.1 **Fração A1152**..... 39
3.3.c.2 **Fração A1273**..... 39
3.3.c.3 **Fração A1350**..... 40
3.3.d **Extrato A2 (*aspergillus nidulans*)**..... 40
3.3.d.1 **Fração A2210**..... 41
3.3.d.1.1 **Subfração A22102**..... 41
3.3.e **Extrato A5 (*Penicillium corylophylum*)**..... 41
3.3.e.1 **Fração A5177**..... 42
3.3.f **Extrato A6 (*Penicillium waksmanii*)**..... 43
3.3.f.1 **Fração A6171**..... 44
3.4 **Atividade citotóxica**..... 44
3.4.1 **Ensaio de atividade citotóxica "in vitro"**..... 44
3.4.1.a **Meios de cultura**..... 44
3.4.1.b **Linhagens utilizadas**..... 45
3.4.1.c **Preparação dos microextratos e da budleína A para o teste de atividade citotóxica**..... 45
3.4.1.d **Ensaio da atividade citotóxica dos microextratos e da budleína A.** 46

4 **Resultados e Discussões** 49
4.1 **Dados cromatográficos e identificação estrutural das substâncias isolada**..... 49
4.1.1 **LF7**..... 49
4.2 **Elucidação estrutural das substâncias isolada de *Viguiera robusta***..... 51
4.2.1.a **Substância LF 7**..... 51
4.3 **Condições para a obtenção das transformações microbianas e selecionamento citotóxico das micro-extrações**..... 55
4.3.1 **Fungos testados**..... 55
4.3.1.1 ***Aspergillus niger* (A1)**..... 55
4.3.1.2 ***Aspergillus nidulans* (A2)**..... 57
4.3.1.3 ***Aspergillus terreus* (A3)**..... 58
4.3.1.4 ***Aspergillus phoenix* (A4)**..... 60
4.3.1.5 ***Penicillium corylophilum* (A5)**..... 61
4.3.1.6 ***Penicillium waksmanii* (A6)**..... 62
4.3.2 **Interferência dos solventes na viabilidade celular**..... 63
4.3.2.1 **Interferência do tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona na viabilidade celular sobre o fungo *Aspergillus phoenix***..... 64
4.4 **Elucidação estrutural das substâncias biotransformadas**..... 64
4.4.1.a **A3334**..... 64
4.4.1.b **A3517**..... 66
4.4.1.c **A3525**..... 66
4.4.1.d **A3524**..... 72
4.4.2 **Substâncias oriundas do extrato A1 (*Aspergillus niger*)**..... 75
4.4.2.a **A11524**..... 75
4.5 **Compostos isolados ainda sem os dados de RMN**..... 79
4.5.1 **Substâncias oriundas do extrato A4 (*Aspergillus phoenix*)**..... 79
4.5.1.a **A4710**..... 80

4.5.1.b **A4102**..... 80
4.5.2 **Sustâncias oriundas do extrato A1 (*Aspergillus niger*)**..... 81
4.5.2.a **A12732**..... 81
4.5.2.b **A12723**..... 82
4.5.2.c **A13505**..... 83
4.5.3 **Substâncias oriundas do extrato A2 (*Aspergillus nidulans*)**..... 84
4.5.3.a **A221029**..... 84
4.5.3.b **A2210210**..... 85
4.5.3.c **A2210212**..... 86
4.5.3.d **A2210213**..... 87
4.5.4 **Substâncias oriundas do extrato A5 (*Penicillium corylophilum*)**..... 88
4.5.4.a **A5177P**..... 88
4.5.4.b **A51772**..... 89
4.5.5 **Substâncias oriundas do extrato A6 (*Penicillium waksmanii*)**..... 90
4.5.5.a **A61714**..... 90
4.5.5.b **A61715**..... 91
4.6 **Proposta de biotransformação enzimática dos compostos isolados**..... 92

5 **Conclusão** 94

6 **Referências bibliográficas** 97

Apêndices 106

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*

Os fungos são importantes agentes primários do declínio de carbono e nitrogênio e de outros nutrientes no ciclo do carbono, de nitrogênio na biosfera e na degradação útil de materiais e produtos. Eles causam sérias doenças em plantas e animais, incluindo os seres humanos, não apenas pelo seu ataque direto e invasões, mas também indiretamente através de secreção de toxinas. Sua capacidade de sintetizar muitas substâncias, "estranhas" e significantes para nós, não está limitada apenas à atividade deletéria, mas inclui a produção de muitas substâncias importantes para a alimentação, drogas e indústrias químicas (GRIFFIN, 1994).

Os Ascomycetos são um dos maiores grupos de fungos, contendo 2.700 gêneros e 28.600 espécies. Se forem incluídos todos os líquens e as espécies de Deuteromycetos que são membros primários derivados dos Ascomycetos, este grupo contém mais de 75% de todas as espécies de fungos (GRIFFIN, 1994). A classificação taxonômica dos fungos, de maneira geral, é discutível e a identificação ainda é difícil, pois até hoje tem sido baseada em características morfológicas ou através de seus ciclos sexuais, sendo necessária uma convenção internacional para a sua taxonomia (COMERIO, 2000, YOKOYAMA *et al.*, 2001, ABARCA *et al.*, 2004).

A maioria das espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* constitui grupos diversos e familiares dos Ascomycetos (alguns autores classificam estes gêneros como sendo Deuteromycetos) e são capazes de crescer numa grande gama de substratos orgânicos. Eles são essencialmente saprofíticos, ou seja, nutrem-se a partir de matéria morta em decomposição e estão

associados com os mofos de vários produtos. São metabolicamente versáteis e várias espécies têm sido descritas como produtoras de metabólitos tóxicos (GEISER, *et al*., 1996, PELCZAR, *et al*., 1997, MAGNOLI, *et al*. 1998). Muitas das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são úteis nos processos industriais, tais como na produção de antibióticos e de outros metabólitos secundários, em fermentações industriais, na biotecnologia e na produção de enzimas comerciais (YOKOYAMA *et al*. 2001, ABARCA *et al*., 2004).

De acordo com diversos autores (GEISER *et al*., 1996; ABARCA *et al*., 2000; FISHER & COOK, 2001 e PETIT *et al*., 2004), a árvore genealógica das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* pode ser assim descrita:

Família: Moniliaceae

Gênero: *Aspergillus e Penicillium*

Espécies: *Aspergillus niger* van Tierghem, grupo *A. niger*, subgênero *Circumdati*, seção *Nigri*

Aspergillus phoenicis van Tierghem, grupo *A. niger*, subgênero *Circumdati*, seção *Nigri*

Aspergillus nidulans Samson and Grams, grupo *A. nidulans*, subgênero *Nidulantes*, seção *Nidulantes*

Aspergillus terreus Thom, grupo *A. terreus*, subgênero *Nidulantes*, seção *Terrei*;

Penicillium corylophilum, subgênero *Furcatum*;

Penicillium waksmanii Zaleski.

Dentre as espécies mais pesquisadas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, pode se destacar *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *Penicillium notatum e P. chrysogenum*, os dois últimos produzindo um dos antibióticos mais conhecidos, a penicilina.

1.2 – O Gênero *Viguiera* e a espécie *Viguiera robusta*

Viguiera é um importante gênero da subtribo do girassol, denominada Heliantheae, família Asteraceae, com aproximadamente 200 espécies, sendo filogeneticamente relacionado ao gênero *Helianthus*, o próprio girassol. Ao longo dos últimos dez anos, vários estudos envolvendo o gênero V*iguiera* têm sido publicados nas diversas áreas da ciência. A maioria destas espécies são originárias do México, da América Central e do Sul, sendo estas regiões as áreas de maior concentração (MERAGELMAN *et al*., 1996; SCHILLING *et al*., 2000).

Das 72 espécies de *Viguiera* da América do Sul reconhecidas por Blake (1918) cerca de 35 ocorrem no Brasil, sendo a maioria restrita a regiões de cerrado na parte central do país (GUILLET *et al*., 1997; SCHILLING *et al*., 2000; SCHORR, *et al*., 2002).

Na maioria das espécies brasileiras há uma predominância de tricomas glandulares foliares, considerados reservatórios de lactonas sesquiterpênicas (LSTs) (SPRING, 1989). Nas espécies analisadas até o momento foram isoladas e caracterizadas LSTs do tipo furanoeliangolido, guaianolido, germacrolido, heliangolido e eudesmanolido. Também estão presentes em outras partes da planta diterpenos do tipo caurano, pimarano e clerodano, além de derivados do mioinositol, poliacetilenos, flavonóides e cumarinas. Diversos estudos fitoquímicos de espécies brasileiras de *Viguiera* vem sendo realizados desde 1996 no Laboratório de Farmacognosia da FCFRP – USP.

A espécie *Viguiera robusta* Gardn. um arbusto perene, é parecida com o girassol. Sua ocorrência está mais concentrada no Planalto Central (área de cerrado), porém é bastante dispersa, podendo ser encontrada ao longo de

auto-estradas, fazendas ou áreas urbanas, sendo portanto uma das espécies de *Viguiera* mais comuns no país (DA COSTA *et al.*, 2002). Após vários estudos realizados em nosso laboratório, foi possível isolar diversas LSTs, diterpenos e cumarinas. Através destes estudos, constatou-se que budleína A é a LST de maior concentração nos tricomas glandulares de *V. robusta*.

1.3 – As lactonas sesquiterpênicas (LSTs)

As LSTs são unidades terpenoídicas C15 com anel lactônico de cinco membros (γ-lactona ou butirolactona). O anel lactônico, na maioria das vezes, é α,β-insaturado, com uma ligação dupla exocíclica. Esta classe de substância é característica de plantas da família Asteraceae. Estes metabólitos são biossintetizados e armazenados nos tricomas glandulares, nos quais, após várias transformações moleculares, formam as mais variadas estruturas químicas. Sua produção pode estar associada com a proteção das plantas contra os predadores devido às suas características alergênicas e sabor amargo (LUCKNER, 1990; BUCHANAN *et al.*, 2000).

As LST são consideradas marcadores quimiotaxonômicos de várias espécies das Asteraceae. Dentre elas, pode-se citar algumas como os eudesmanolidos de *Dimerostemma vestitum* e de *Artemisia canariensis* (STEFANI *et al.*, 2002; MANSILA & PALENZUELA, 1999), furanoeliangolidos de *Helianthus niveus* (OHNO & MABRY, 1980), guaianolidos de *Cichorium intybus* (KIESIEL & ZIELINSKA, 2001), guaianolidos e pseudo-guaianolidos de *Zaluzania grayana* (SPRING *et al.,* 1995), heliangolidos de *Helianthus maximiliani* (HERZ & KUMAR, 1981), heliangolidos, furanoeliangolidos e eudesmanolidos de *Tithonia diversifolia e T. rotundifolia* (SCHUSTER *et al.,* 1992), dentre vários outros exemplos. Estes estudos revelaram que tanto a

funcionalização como os diferentes tipos de esqueletos carbônicos são importantes para determinados grupos de vegetais.

Inúmeras atividades biológicas são atribuídas às LSTs, tais como antibacteriana, antiprotozoária, antiinflamatória, citotóxica, antitumoral, quimioprofiláticas contra a esquistossomose, além de apresentarem propriedades alelopáticas e serem responsáveis por alguns mecanismos de interação inseto-planta (PICMAN, 1986; RODRIGUEZ *et al.*,1976). SCHIMIDT (1999) atribui toxicidade às plantas que contém LSTs, porque estas interagem através de reações de alquilação com diversos alvos moleculares, tais como grupos tióis de peptídeos de baixo peso molecular e proteínas funcionais. São descritos ainda efeitos tóxicos sobre células tumorais de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. *In vivo* o efeito tóxico estende-se sobre os sistemas nervoso, cardiovascular, gastrintestinal e órgãos internos, sendo também irritante para pele, desenvolvendo processo alérgico através de contato. Somando-se a isso existem ainda ações no sistema imune, no sistema reprodutivo, genotoxicidade e mutagenicidade, bem como efeitos tóxicos sobre microrganismos, invertebrados e plantas (SCHIMIDT, 1999).

1.4 – Transformações microbianas de produtos naturais

Um método para maximizar a diversidade estrutural que um produto natural pode ter é o uso de um outro sistema biológico, na forma de células inteiras ou enzimas. Na sua forma simples, este processo envolve a incubação de um produto natural isolado com uma ou muitas culturas microbianas, permitindo as enzimas de cada microrganismo agir nas substâncias para produzir suas formas modificadas (CANELL, 1998). Neste contexto, as transformações de substâncias orgânicas com enzimas

purificadas não serão abordadas, embora existam, diversos estudos a respeito.

O conceito de *catálise* pode ser definido como um processo no qual uma reação química é acelerada pela presença de um outro composto químico, que classicamente por sí só não realiza essa transformação química.

Existem diferentes processos biológicos que podem ser utilizados como catalisadores para obter diversos derivados partindo-se de um produto natural. Dentre eles, pode-se destacar três processos: biocatálise, biotransformação e bioconversão.

As *biocatálises* são os milhares de processos catalíticos realizados entre tecidos e fluidos de plantas e animais vivos. A técnica é amplamente empregada nas indústrias químicas e farmacêuticas. Essencialmente, elas utilizam microrganismos para executar transformações, através de passos simples ou múltiplos, que não são usualmente obtidos pelos métodos químicos convencionais (ROSE, 1980).

Uma razoável definição de *biotransformação* é que trata-se de um processo biológico no qual um composto orgânico é modificado a um produto recuperável através de uma reação simples, quimicamente definida e catalisada pelas enzimas contidas nas células. Abrange um processo onde um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato, envolvendo um número limitado de etapas enzimáticas (BU´LOCK & KRISTIANSEN, 1987).

A biotransformação difere da fermentação e da biossíntese no qual os produtos tais como antibióticos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos e solventes resultam de complexos maquinários biossintéticos de metabolismo primário e secundário, que são acumulados por todas as células, órgãos ou

organismos. A biotransformação também é diferente da biodegradação, na qual substâncias complexas são degradadas em substâncias mais simples, como por exemplo a degradação de pesticidas (GIRI *et al.*, 2001, LIMA & MOTA, 2003).

A *bioconversão* é um processo utilizado para realizar, em substratos complexos (por ex. produtos naturais), conversões específicas (régio e estereoespecificidade), utilizando para isso, plantas, animais ou células microbianas (GIRI, *et al.*, 2001).

O mundo microbiano é rico em espécies, as quais possuem imensa variedade de enzimas agrupadas, possibilitando uma ampla gama de reações em diversas classes de compostos. Denominamos de *transformações microbianas*, aquelas produzidas, principalmente, por fungos e bactérias.

Os processos de transformações microbianas possuem um histórico relativamente curto tendo em vista a utilização de processos fermentativos ao longo dos séculos. O primeiro uso importante de um microrganismo como um reagente químico “vivo” foi descoberto no início de 1930 e foi utilizado para a produção da substância efedrina. Posteriormente, vários processos envolvendo passos mediados através de microrganismos foram sendo desenvolvidos, tais como a bioconversão de ácido ascórbico, produção de diidróxiacetona, vários processos de oxidações, reduções, hidrólises e resoluções racêmicas (ROSE, 1980).

Mas as primeiras tentativas, com sucesso, na utilização da metodologia de transformações microbianas foram realizadas com sobre os esteróides, quando Manoli e Vercellone, em 1937, constataram que uma hidroxila nuclear podia ser oxidada e uma ligação nuclear reduzida por intervenção do fungo *Rhizopus arrhizus* (ROSE, 1980). A observação de bioconversão da

progesterona em 11-hidroxiprogesterona promoveu rendimentos em quantidades apreciáveis, pois a 11-hidroxiprogesterona pôde ser convertida em cortisona em aproximadamente seis passos, tendo em vista que através de métodos sintéticos tal conversão era realizada por aproximadamente 36 passos. Este experimento demonstrou notável melhoramento na síntese de compostos químicos puros (LIMA, et al., 2001).

A grande façanha obtida através da pesquisa sobre a bioconversão de esteróides encorajou as companhias químicas, farmacêuticas e outros grupos de pesquisa a avaliarem a possibilidade de se utilizar microrganismos para produzir alterações em antibióticos e quimioterápicos, na esperança que estas bioconversões pudessem produzir compostos modificados estruturalmente com propriedades superiores (alta atividade antimicrobiana, amplo espectro, baixa toxicidade e melhor absorção) comparado ao antibiótico padrão.

Existem várias pesquisas sobre a obtenção de antibióticos ativos através de transformações microbianas, entretanto, nenhuma dessas bioconversões foram aprovadas como comercialmente viáveis, por razões puramente econômicas. Um exemplo deste caso é a capacidade do fungo *Curvularia lunata*, um microrganismo conhecido, capaz de hidroxilar muitos esteróides na posição 11-α e também a hidroxilar a 12-α-deoxytetraciclina, biotransformando-a em tetraciclina.

O único sucesso comercial de bioconversão mediada por enzimas na síntese de antibióticos é a hidrólise da penicilina para o ácido 6-amino-peniciliânico (6-APA), uma reação catalisada pela penicilina acilase e o primeiro passo na semi-síntese dos derivados penicilânicos comercializados atualmente (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Os sistemas biológicos obedecem às leis da química. Todavia, as transformações microbianas são preferidas aos processos químicos, pois são consideradas uma tecnologia verde. As reações enzimáticas podem ser realizadas em soluções aquosas, a temperatura ambiente e em pH neutro, sem a necessidade de altas pressões e condições severas. Por exemplo, o processo biocatalítico para produção do 6-APA ocorre em solução aquosa, sob condições brandas, utilizando-se a penicilina acilase, usualmente na forma de enzima imobilizada. Em contraste, a rota química para obtenção de 6-APA emprega um inimigo ambiental, o fósforo pentacloridro, solventes e ainda requer condições anidras restritas e baixa temperatura. A maioria do 6-APA disponível atualmente é produzido enzimaticamente, a partir da penicilina G, o restante sendo derivado da penicilina V. A reação produz, adicionalmente ao 6-APA, ácido fenilacético e ácido fenoxiacético, respectivamente, havendo a necessidade de manter o pH básico pela adição de uma base como amônia ou hidróxido de sódio. O 6-APA produzido é recuperado por filtração e secagem (GODFREY & WEST, 1996).

Uma vez que as transformações microbianas acontecem em temperatura ambiente (20 – 40ºC) e pressões normais, esses processos são vantajosos sobre os processos químicos, nos quais freqüentemente são necessárias quantidades significativas de energia. Além disso, poluem menos que os solventes orgânicos utilizados nas conversões químicas. Podem também ser utilizados na determinação dos padrões de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), observando-se deste modo estudos do metabolismo de drogas através de mono-oxigenases, das quais a enzima chave é o citocromo P450 (CANELL, 1998).

A principal desvantagem dos sistemas de transformações microbianas é que este processo não é muito previsível (exceto algumas vezes, no caso de enzimas purificadas). A fim de maximizar as chances de se obter um produto particular ou de obtenção de grande variação de produtos, é freqüentemente necessário utilizar uma ampla variedade de espécies de microrganismos na triagem inicial.

Para a realização de transformação microbiana são necessárias algumas etapas, tais como: 1) triagem inicial para identificar os microrganismos que realizam as biotransformações do composto em estudo; 2) selecionados os microrganismos que atendem ao esperado, é necessário usá-los como controle, ou seja, inoculá-los no meio de cultivo sem a presença do composto a ser transformado; 3) analisar ambos extratos, tanto o do grupo controle como o do grupo que continha o composto a ser transformado, para descartar a possibilidade de compostos do próprio meio de cultura serem confundidos com o biotransformado; 4) obter micro-extratos para a realização de testes de atividades biológicas; 5) promover ampliação de escalas de culturas; 6) realizar o isolamento de metabólitos.

Após a obtenção dos micro-extratos, uma alternativa interessante para o direcionamento dos estudos de transformações microbianas é a realização de triagem dos extratos através de bioensaios monitorados em micro-escala, os chamados “High-Throughtput Screening” ou (HTS) para obter-se informações sobre quais extratos são promissores ou não para as atividades biológicas pretendidas.

1.5 – Transformações microbianas de lactonas sesquiterpênicas

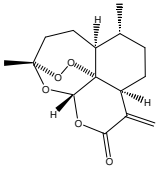
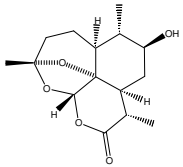
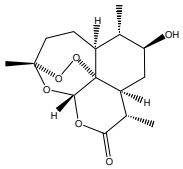
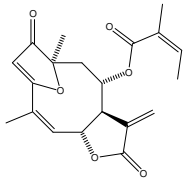
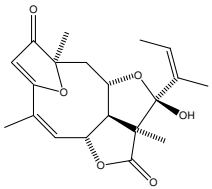
A transformação microbiana das LSTs através de fungos é ainda um segmento muito pouco explorado. Tais processos são realizados geralmente com o intuito de se obter novos derivados, realizar modificações régio e estéreo seletivas, aumentar sua atividade biológica e diminuir a sua toxicidade, além de também tentar desenvolver modelos para a realização dos estudos entre estrutura química e atividade.

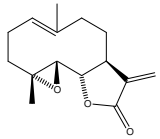
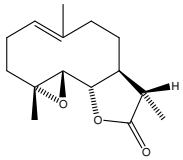
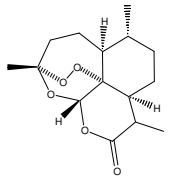
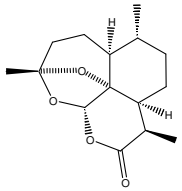
Ao longo dos anos, algumas transformações microbianas de LSTs foram realizadas por fungos do gênero *Aspergillus*. As LSTs utilizadas e as espécies de *Aspergillus* empregadas nos processos de biotransformação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Lactonas sesquiterpênicas e espécies de *Aspergillus* utilizados em processos de biotransformação.

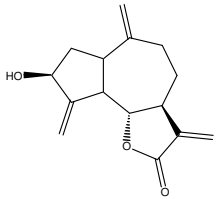
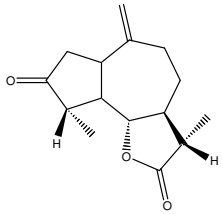
Substrato	Microrganismo	Produto	Estrutura	Referência Bibliográfica
costunolido	*Aspergillus niger* *Cunninghamella echinulata* *Fusarium oxysporum*	1β-hidróxi-arbusculina A		Lamare & Furtoss, 1990
		colartina		
		11,13-diidro-santamarina		
		11,13-diidro-reinosina		
		tetraidro-vulgarina		
desoxivulgarina	*Aspergillus ochraceous* *Rhizopus nigricans*	diidro-douglanina		

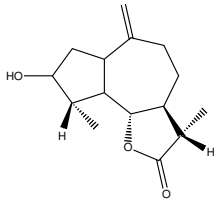
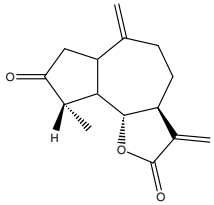
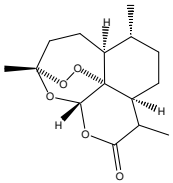
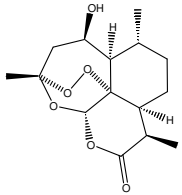
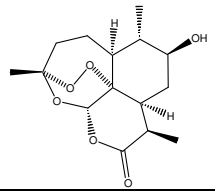
	Aspergillus ochraceous *Rhizopus nigricans*	vulgarina		
esclareolido	*Curvularia lunata* *Aspergillus Níger* *Gibberella fujikuroii*	3-ceto-esclareolido		Rahman, Farooq & Choudhary, 1997
	Curvularia lunata *Aspergillus Níger* *Gibberella fujikuroii*	1β-hidróxi-esclareolido		
	Curvularia lunata *Aspergillus Níger* *Gibberella fujikuroii* *Fusarium lini*	3β-hidróxi-esclareolido		
	Curvularia lunata *Aspergillus Níger* *Gibberella fujikuroii* *Fusarium lini*	1α,3β-diidróxi-esclareolido		
	Curvularia lunata *Aspergillus niger*	1β,3β-diidróxi-esclareolido		
artemisiteno	*Aspergillus niger*	11-epi-artemisinina		Orabi et al., 1999

				
		9β-hidróxi-desóxi-11-epi-artemisinina		
		9β-hidróxi-11-epi-artemisinina		
lichnofolido 	*Cunninghamella echinulata* *Rhizopus oryzae*	16-(1-metil-1-propenil)eremantolido		Barrero et al., 1999
eremantolido C	*Não foi biotranformado*	X	X	

partenolido 	*Streptomyces fulvissimus* *Rhizopus nigricans* *Aspergillus alliaceous* *Aspergillus flaviceps* *Aspergillus niger* *Aspergillus niger* *Aspergillus ochraceous* *Aspergillus ochraceous* *Candida albicans* *Cunninghamella blackesleeana* *Cunninghamella echinulata* *Cunninghamella elegans* *Gymnascella citrina* *Lindera pinnespora* *Penicillium chrysogenum* *Penicillium chrysogenum* *Penicillium purpureus* *Penicillium vermiculatum* *Rhodotorula rubra* *Saccharomyces cerevisae*	11βH-diidro-partenolido		Galal et al., 1999
Artemisinina 	*Mucor polymorphosporus* *Aspergillus niger*	desóxi-artemisinina		Zhan et al., 2002

	Mucor polymorphosporus *Aspergillus niger*	3β-hidróxi-desóxi-artemisinina		
	Aspergillus niger	1α-hidróxi-desóxi-artemisinina		
Zaluzanina D	*Botrytis cinerea* *Fusarium equiseti*	11,13-diidrozaluzanina D		Krishina Kumari et al., 2003
	Botrytis cinerea *Fusarium equiseti* *Curvularia lunata* *Colletotrichum lindemuthianum* *Botryodiplodia theobromae* *Fusarium oxysporum* *Alternaria alternata* *Phyllosticga capsici* *Rhizoctonia solani*	11,13-diidrozaluzanina C		

Sclerotinia sclerotiorum	zaluzanina C	
Rhizoctonia solani	diidroestafiatona	

	Rhizoctonia solani	diidroestafiatol		
	Rhizoctonia solani	estafiatona		
artemisinina 	*Aspergillus niger* *Eurotium amstelodami*	5β-hidróxi-artemisinina		Parshikov et al., 2006
		7β-hidróxi-artemisinina		

De acordo com a tabela 1, as principais reações enzimáticas que os fungos do gênero *Aspergillus* promoveram sobre as LSTs submetidas ao processo de biotransformação foram hidrogenações, hidroxilações, reduções e algumas acetilações.

1.6 - High-Throughput Screening (HTS) ou Triagem de Alta Demanda

Os bioensaios podem ser definidos como testes nos quais as atividades biológicas de um extrato ou composto puro isolado de um organismo são detectadas. A maior característica nos processos de descobrimento de drogas dos últimos 30 anos foi a introdução de testes biológicos *in vitro* em pequena escala, nos quais pode-se testar várias amostras em pequenas quantidade em um curto período de tempo e promover resultados reprodutíveis, permitindo que análises estatísticas sejam realizadas. Este processo é conhecido como triagem para a atividade biológica e os sistemas de ensaios utilizados são freqüentemente baseados em culturas de células, enzimas isoladas ou receptores clonados (HOUGHTON, 2000).

Grupos de pesquisadores, indústrias químicas e farmacêuticas utilizam tais sistemas rotineiramente para testar uma ampla gama de amostras produzidas por química combinatória, coleção de organismos da biosfera e para o fracionamento de extratos naturais. Atualmente a maioria dos bioensaios utiliza uma quantidade muito reduzida do material a ser testado, obtendo-se resultados dentro de poucos dias. Estes tipos de testes são referidos como *High Throughput Screening* (HTS) ou Triagem de Alta Demanda (HOUGHTON, 2000, THOMAS, 2003).

Nos Laboratórios de muitas indústrias, onde os mesmos sistemas de testes são utilizados para um grande número de amostras, este processo é automatizado

e robotizado, excluindo automaticamente os extratos ou compostos puros, quando os resultados não são satisfatórios. Atualmente novas inovações em relação a estes bioensaios têm sido relatadas por companhias farmacêuticas multinacionais, denominando tais tipos de testes como *ultra High Throughtput Screening* (uHTS) ou Ultra Triagem de Alta Demanda. O processo envolve a interação de bioensaios com várias análises químicas, tais como as técnicas hifenadas (CLAE-CG, CLAE-EM, CLAE-RMN), resultando em determinação das atividades biológicas, análise estatísticas e direcionamento da triagem para isolar substâncias, identificação dos compostos químicos e inserção dos compostos puros em bibliotecas (BINDSEIL *et al*. 2001; ELDRIDGE *et al*. 2002).

Estes sistemas de testes, para serem ideais, devem ser simples, rápidos, reprodutíveis e baratos. Se os princípios ativos estão presentes em baixas concentrações em extratos brutos, os bioensaios devem ser sensíveis o suficiente para a sua detecção. Ao mesmo tempo, o número de resultados de falso positivo ou falso negativo deve ser reduzido ao mínimo (HOSTEMANN *et al*., 1996; CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

O uso de células, receptores ou enzimas características detectam em particular e freqüentemente efeitos muito especializados, observando as mudanças de comportamento ou funções dos experimentos os quais têm sido tratados com o composto em questão. Este efeito especializado é determinado através de ligação, de alguma maneira, com as condições clínicas para que a nova droga possa atuar, por exemplo contra microrganismos patogênicos, linhagens celulares cancerígenas ou sistemas de células ou enzimas, sendo crucial nas vias bioquímicas a associação com a etiologia das doenças ou com um patógeno (HOUGHTON, 2000).

1.7 – Citotoxicidade

Alguns experimentos podem ser realizados para determinar a dose do extrato que mata células. Também podem ser desenvolvidos ou para estudar a citotoxicidade ou substâncias puras para medir o efeito protetor de extratos ou substâncias puras contra a dose letal do agente citotóxico. Vários testes são utilizados para avaliar a viabilidade celular, tais como o teste colorimétrico do MTT (metotrexato), que são baseados na atividade mitocondrial (MOSSMAN, 1983), ou o teste da sulforodamina B, que é um indicador de proteínas totais (SKEHAN *et al.*, 1990). Estes testes têm sido utilizados amplamente na descoberta de agentes anticancerígenos. O programa do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos (EUA), em seu programa para a descoberta de novos compostos ativos contra o câncer e o HIV, utilizam 60 linhagens celulares cancerígenas e comparam os resultados obtidos por um extrato, com cada um deles (HOUGHTON, 2000).

2 - Objetivos

Os objetivos do presente trabalho são:

(i) preparar o material vegetal e obter o extrato bruto de lavagem foliar com DCM;

(ii) fracionar através de métodos cromatográficos o extrato de lavagem foliar;

(iii) isolar e purificar o componente majoritário (budleína A) e possíveis derivados;

(iv) realizar as transformações microbianas com as LSTs isoladas;

(v) avaliar a atividade citotóxica da budleína A e dos produtos das biotransformações frente às linhagens tumorais humanas SK-BR-3 (adenocarcinoma de mama) e células leucêmicas JURKAT.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Procedimentos fitoquímicos

3.1.1 – Coleta do vegetal e preparo das exsicatas

A coleta do vegetal foi realizada por N. S. Arakawa em seu habitat natural (Figura 1), nos meses de abril nos anos de 2003 a 2005, durante o período de floração, na região de cerrado localizada entre os municípios de Batatais e Altinópolis – SP, aproximadamente no km 35, à margem direita da rodovia no sentido Altinópolis – Batatais. As plantas foram depositadas no Herbário SPFR do Departamento de Biologia da FFCLRP – USP sob o código SPFR 07155. Alguns indivíduos dessa população foram anteriormente identificados pelo Prof. Dr. Jimi N. Nakashima, taxonomista do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Figura 1: Indivíduo de *Viguiera robusta* em seu habitat natural.

Tabela 2: Eluição do solvente utilizado no fracionamento da fase em DCM.

Solvente utilizado	Concentração	Código das frações
Hex	100 %	LF 1
Hex : AcOEt	9 : 1	LF 2
Hex : AcOEt	4 : 1	LF 3
Hex : AcOEt	7 : 3	LF 4
Hex : AcOEt	3 : 2	LF 5
Hex : AcOEt	1 : 1	LF 6
Hex : AcOEt	3 : 7	LF 7
AcOEt	100 %	LF 8
MeOH	100 %	LF 9

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se um volume de 8 L por coluna realizada. Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através do rotaevaporador sob pressão reduzida.

Todas as frações obtidas e reunidas foram monitoradas por espectroscopia no IV e CCDC. A fração que continha a LST budleína A foi a fração LF 7, sendo que a identificação foi realizada através da comparação por CCDC e CLAE com padrão autêntico. Tal fração foi então submetida à etapa de purificação.

3.1.4.1 – Fração LF 7

Iniciou-se o trabalho de purificação de substâncias com a fração LF 7, uma vez que esta apresentava grande quantidade de material sólido, possuía massa abundante e seu espectro no IV apresentou banda muito intensa na região de 1760 cm^{-1}, típica de estiramento de carbonila de γ-lactonas α,β-insaturadas.

Efetuou-se inicialmente sucessivas lavagens com éter dietílico gelado, levando-se ao isolamento e purificação de cristais (13,8 g) de aspecto amorfo, os

quais foram codificados como **LF7**. O material foi submetido a análises espectroscópicas.

Foram realizadas várias análises através de CCDC com estes cristais, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes e reveladores, sendo possível constatar a presença de apenas uma mancha na placa cromatográfica, indicando a presença de apenas uma substância (CCDC juntamente com padrão autêntico). Esta substância foi então submetida à análises através de técnicas espectroscópicas e também por CLAE.

3.2 – Transformações microbianas de lactonas sesquiterpênicas

O processo de filtração e partição com solvente orgânico também foi mantido de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.4, sendo realizado com $CHCl_3$ e este foi submetido a evaporação através de rotaevaporador sob pressão reduzida. Foram obtidas as seguintes codificações e massas obtidas (Tabela 3).

Tabela 3: Fungos, códigos de seus extratos brutos utilizados no processo de transformação microbiana da budleína A e as massas obtidas em mg.

Fungo	Código	Massa obtida
Aspergillus niger	A1	203
Aspergillus nidulans	A2	671
Aspergillus terreus	A3	370
Aspergillus phoenix	A4	394
Penicillium corylophilum	A5	645
Penicillium waksmanii	A6	706

3.3 – Isolamento e purificação dos produtos de transformações microbianas dos extratos obtidos

A prioridade para o início do processo de isolamento e purificação dos extratos brutos foram definidos a partir dos ajustes das condições de cultivo,

juntamente com os resultados obtidos no *screening* citotóxico dos microextratos frente às células leucêmicas humanas JURKAT (item 3.4.1). Desta forma, a seqüência dos extratos brutos a serem trabalhadas foi: A3, A4, A1, A2, A5 e A6.

3.3.a – Extrato A3 (*Aspergillus terreus*)

O fracionamento do extrato A3 das transformações microbianas foi realizado através de CLV de acordo com o Esquema 4:

O fracionamento do extrato A3 das transformações microbianas originou 10 frações e o sistema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 4.

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se o volume de 500 mL. Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através do rotaevaporador sob pressão reduzida.

As frações a serem investigadas foram definidas através quantidade da massa obtida após a evaporação do solvente, sendo selecionadas: A33, A35, A36, A38.

3.3.a.1 – Fração A33

Iniciou-se o trabalho de isolamento e purificação de constituintes com a fração A33, sendo esta submetida à cromatografia do tipo “flash” (Still *et al.*, 1978). Deste modo, 17 mg da fração A33 foram inseridos em uma coluna de vidro de 20 cm de altura por 5 cm de diâmetro, previamente empacotada com sílica gel 60

(Merck 230 – 400 mesh), empregando-se como fase móvel Hex:AcOEt 4:1 e um fluxo de 5 cm/min. As subfrações obtidas foram analisadas em CCDC, sendo reunidas em subfrações.

As subfrações com melhores perfis cromatográficos, isto é, com poucos constituíntes, foram selecionadas para a purificação utilizando-se CLAE, pois havia muito pouca quantidade de material. As subfrações trabalhadas foram: A333 e A334.

3.3.a.1.1 – Subfração A334

A subfração A334 foi submetida ao processo de isolamento através de CLAE com a fase móvel MeOH:H_2O 1:1, fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 15 min.

As subfrações A3341, A3342 e A3343 não apresentaram massa suficiente para a realização das análises espectroscópicas. Apenas a subfração A3344 foi submetida à análise espectroscópica através de RMN ^{1}H.

3.3.a.2 – Fração A35

A fração A35 (75 mg) foi submetida a cromatografia “flash”, utilizando-se como fase móvel Hex:AcOEt 3:7. As subfrações obtidas foram analisadas em CCDC.

Após a realização da cromatografia “flash”, nas últimas subfrações coletadas observou-se a formação de precipitado branco. Estas subfrações foram submetidas à lavagem com éter dietílico e codificadas como A354, sendo então submetidas às análises espectroscópicas de RMN ^{1}H.

Realizadas as reuniões das subfrações, todas foram injetadas no cromatógrafo líquido. Novamente a fase móvel isocrática empregada foi MeOH:H_2O 55:45, com fluxo de 1 mL/min a 25ºC, detecção no UV a 225 nm e o tempo necessário de análise requerido para cada uma das subfrações. Nesta etapa, os critérios adotados para a purificação dos constituintes das subfrações foram: melhores perfis cromatográficos, presença de poucos constituintes e quantidade adequada de material. As subfrações selecionadas foram A351 e A352.

3.3.a.2.1 – Subfração A351

A subfração A351 foi purificada através de CLAE na fase móvel MeOH:H_2O 45:55, fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 30 min. Foram coletadas 14 subfrações.

De todas as subfrações, foi possível realizar as análises espectroscópicas de RMN ^{1}H apenas com a A3517.

3.3.a.2.2 – Subfração A352

A subfração A352 foi submetida a CLAE, com a fase móvel MeOH:H_2O 2:3, fluxo de 1,0 mL/min e tempo de eluição de 30 min. A partir deste procedimento, foram obtidas 14 subfrações.

As subfrações A3522, A3526, A3528, A35213 e A35214 não apresentaram massa suficiente para a realização de análises espectroscópicas em RMN. As subfrações A3523, A3529, A35210, A35211 e A35212, com massas em torno de 2 mg, quando analisadas por CLAE, demonstraram possuir misturas complexas de substâncias, enquanto que as subfrações A3524 e A3525 apresentaram teor de

pureza satisfatório e então foram submetidas à análise espectroscópica em RMN ^{1}H.

3.3.a.3 – Fração A36

Realizou-se inicialmente uma CCDC com a fração A36 e uma amostra de budleína A, pois suspeitava-se da presença do substrato nesta fração. Após a realização da cromatografia, foi constatado que o componente majoritário desta fração era mesmo a budleína A. Deste modo, os trabalhos de purificação sobre esta fração foram suspensos.

3.3.a.4 – Fração A38

Parte da fração A38 (33 mg) foi submetida à cromatografia "flash" com a fase móvel AcOEt:Acetona:MeOH 8:1:1 obtendo-se seis subfrações.

Após as reuniões, as subfrações foram injetadas no cromatógrafo líquido e a subfração submetida ao processo de purificação foi a A382.

3.3.a.4.1 – Subfração A382

A subfração A382 foi submetida ao CLAE, com a fase móvel CH_3CN:H_2O 15:85, fluxo de 1,3 mL/min e tempo de eluição de 20 min. A partir deste procedimento, foram obtidas quatro subfrações.

As subfrações A3821, A3822 e A3824 não apresentaram massa suficiente para a realização de análises espectroscópicas. A subfração A3823, quando analisada por CLAE, demonstrou possuir uma mistura complexa de substâncias, não sendo realizada sua análise de RMN ^{1}H.

3.3.b – Extrato A4 (*Aspergillus phoenix*)

O fracionamento do extrato A4 (394 mg) das transformações microbianas foi realizado através de CLV, de acordo com o Esquema 5.

O fracionamento do extrato A4 das transformações microbianas originou 10 frações e o sistema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 5.

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se o volume de 500 mL.

Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através do rotaevaporador sob pressão reduzida.

As frações a serem investigadas foram definidas através quantidade de massa obtida após a evaporação do solvente, sendo selecionadas a A47 e a A410.

3.3.b.1 – Fração A47

A fração A47 (30,5 mg) foi submetida ao fracionamento através de CLAE. utilizando a seguinte fase móvel: MeOH:H_2O 55:45, fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 25 min. A partir deste procedimento, foram obtidas dez subfrações.

Após o processo de isolamento, todas as subfrações obtidas foram analisadas em CLAE. Nas subfrações A471 a A477 foram observadas misturas complexas de substâncias. As subfrações A478 e A479 não foram obtidas em quantidade suficiente para as análises espectroscópicas. A subfração A4710 foi submetida à análise através de RMN ^{1}H.

3.3.b.2 – Fração A410

A fração A410 (70,3 mg) foi analisada através de CLAE e uma alíquota da 30 mg foi submetida ao processo de isolamento sob a fase móvel MeOH:H_2O 75:25, fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 25 min. A partir deste procedimento, foram obtidas oito subfrações.

Após o processo de isolamento, todas as subfrações obtidas foram analisadas através de CLAE. Nas subfrações A4101, A4103 a A4106 foram observadas misturas complexas de substâncias. As subfrações A4107 e A4108 não foram obtidas com massa suficiente para as análises espectroscópicas. A subfração A4102 foi submetida à análise de RMN ^{1}H.

3.3.c – Extrato A1 (*Aspergillus niger*)

O fracionamento do extrato A1 (203 mg) das transformações microbianas foi realizado através de Cromatografia Clássica (CC), originando-se 17 frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCDC. O sistema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 6.

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se o volume de 200 mL.

Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através de ar comprimido e foram submetidas à CCDC.

As frações a serem investigadas foram definidas através da quantidade de massa obtida após a evaporação do solvente e com a apresentação do melhor perfil cromatográfico, visando-se a baixa complexidade das frações. Deste modo foram selecionadas as frações: A1152 e A1273.

3.3.c.1 – Fração A1152

A fração A1152 (~30 mg) foi analisada através de CLAE e observou-se que o perfil cromatográfico era adequado para o processo de isolamento de seu componente majoritário. Deste modo utilizou-se a fase móvel MeOH:H_2O 3:2 fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 25 min. A partir deste procedimento, foram obtidas quatro subfrações: A11521, A11522, A11523 e A11524.

Após o processo de isolamento, todas as subfrações obtidas foram analisadas novamente em CLAE, sendo a subfração A11524 submetida à análise espectrométrica através de RMN ^{1}H e ^{13}C.

3.3.c.2 – Fração A1273

A fração A1273 (~25 mg) foi submetida ao isolamento em CLAE, utilizando-se fase móvel MeOH:H_2O 3:2 fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 15 min. A partir deste procedimento, foram obtidas três subfrações A12731, A12732 e A12733.

Após a análise em CLAE das subfrações obtidas através do processo de isolamento, as subfrações A12732 e A12733 foram submetidas à análise espectrométrica de RMN ^{1}H.

3.3.c.3 – Fração A1350

A fração A1350 (~20) foi submetida ao isolamento em CLAE, utilizando-se a fase móvel MeOH:H_2O (2:3) fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 15 min. A partir deste procedimento, foram obtidas cinco subfrações.

Após a análise em CLAE das subfrações obtidas, a subfração A13505 foi submetida à análise espectrométrica de RMN ^{1}H.

3.3.d – Extrato A2 (*Aspergillus nidulans*)

O fracionamento do extrato A2 (671 mg) das transformações microbianas foi realizado através de CC, originando-se nove frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCDC, o sistema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 7.

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se o volume de 400 mL.

Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através de ar comprimido e foram submetidas à CCDC.

A fração investigada foi definida através da quantidade de massa obtida após a evaporação do solvente e com a apresentação do melhor perfil cromatográfico, visando-se a baixa complexidade das frações, sendo deste modo selecionada a fração A2210.

3.3.d.1 – Fração A2210

A fração A2210 (85 mg) foi submetida a cromatografia “flash”, utilizando-se como fase móvel Hex:AcOEt 3:7. As subfrações obtidas foram analisadas em CCDC.

Após a realização da cromatografia “flash”, as subsfrações foram reunidas e analisadas em CLAE. A fase móvel isocrática empregada foi MeOH:H_2O 55:45, fluxo de 1 mL/min, detecção no UV a 225 nm e o tempo necessário de análise requerido para cada uma das subfrações. A subfração selecionada foi A22102.

3.3.d.1.1 – Subfração A22102

A subfração A22102 foi submetida ao isolamento através de CLAE na fase móvel MeOH:H_2O 35:65, fluxo de 1 mL/min e 20 minutos de análise, sendo obtidas 14 subfrações. Após este procedimento, as subfrações A221029 e A2210210, A2210212 e A2210213 foram enviadas para a realização de análises espectroscópicas de RMN ^{1}H.

3.3.e – Extrato A5 (*Penicillium corylophylum*)

O fracionamento do extrato A5 (645 mg) das transformações microbianas foi realizado através de CC, originando-se 21 frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCDC, o sistema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 8.

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se o volume de 400 mL.

Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através de ar comprimido e foram submetidas à CCDC.

A fração investigada foi definida através da quantidade de massa obtida após a evaporação do solvente e com a apresentação do melhor perfil cromatográfico, visando-se a baixa complexidade das frações. Deste modo, foi selecionada a fração A5177.

3.3.e.1 – Fração A5177

A fração A5177 (120 mg) foi submetida a CCDP, utilizando-se como fase móvel Hex:AcOEt 3:7. No total, cinco manchas foram separadas e posteriormente analisadas em CCDC.

Após a análise em CCDC constatou-se que duas substâncias estavam puras, sendo codificadas como A5177P e A51772. Tais subfrações foram analisadas através de CLAE. A fase móvel isocrática empregada foi MeOH:H_2O 55:45, fluxo de 1 mL/min, detecção no UV a 225 nm e o tempo necessário de análise requerido para cada uma das subfrações, que foram posteriormente submetidas a análise de RMN ^{1}H.

3.3.f – Extrato A6 (*Penicillium waksmanii*)

O fracionamento do extrato A6 (706 mg) das transformações microbianas foi realizado através de CC, originando-se 22 frações reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCDC. O sistema de eluição (gradiente crescente de polaridade) utilizado está descrito na Tabela 9.

Para todos os sistemas de solventes empregados na coleta das frações utilizou-se o volume de 500 mL.

Após o fracionamento, todas as frações tiveram o solvente evaporado através de ar comprimido e foram submetidas à CCDC.

A fração a ser investigada foi definida através da quantidade de massa obtida após a evaporação do solvente e apresentação do melhor perfil cromatográfico, visando-se a baixa complexidade das frações. Deste modo, foi selecionada a fração A6171.

3.3.f.1 – Fração A6171

A fração A6171 foi analisada através de CLAE e observou-se que o perfil cromatográfico era ideal para o processo de isolamento de alguns de seus constituintes. Deste modo utilizou-se a fase móvel MeOH:H_2O 1:1, fluxo de 1,0

mL/min e tempo de análise de 20 min. A partir deste procedimento, foram obtidas cinco subfrações.

Após o processo de isolamento, todas as subfrações obtidas foram analisadas em CLAE, sendo as subfraões A61714 e A61715 submetidas à análise espectrométrica de RMN ^{1}H.

3.4 – Atividade citotóxica

O teste de atividade citotóxica foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob supervisão do Prof. Dr. Auro Nomizo.

3.4.1 – Ensaio de atividade citotóxica "in vitro"

3.4.1.a – Meios de cultura

Para a manutenção das linhagens tumorais humanas, para a dissolução das amostras-teste e para a realização dos ensaios de atividade anti-tumoral, empregou-se o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20 mM de L-glutamina, 7,5% de $NaHCO_3$ e 10 μg/mL de gentamicina (meio completo). Este meio foi preparado no momento do uso, como é preconizado, e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 μm.

3.4.1.b – Linhagens celulares utilizadas

Foi utilizada a linhagem tumoral humana denominada SK-BR–3: (adenocarcinoma de mama) e as células leucêmicas JURKAT. As linhagens foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, Rockville, MD, USA), que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. J. A. B. Marzagão, do Laboratório de Imunologia de Tumores, do Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

Estas linhagens foram mantidas em criopreservação em nitrogênio líquido em solução de congelamento que consiste em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de DMSO e 50% de soro bovino fetal.

Para realizar-se o ensaio de atividade citotóxica, essas células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular em meio completo (15 mL por frasco), a temperatura de 37 °C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2.

3.4.1.c – Preparação dos microextratos e da budleína A para o teste de atividade citotóxica

As amostras de budleína A e os microextratos foram pesados e dissolvidos em DMSO, na concentração de 100 mg/mL em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal na concentração de 50 mg/mL. Posteriormente, foram submetidas ao misturador (Vortex) para dissolução completa e, em seguida, centrifugadas a 14.000 rpm para remoção de qualquer produto insolúvel ou precipitado. Por fim, o material foi esterilizado por filtração em membranas de 0,22μm.

3.4.1.d – Ensaio da atividade citotóxica dos microextratos e da budleína A

Para o ensaio da atividade citotóxica dos microextratos e da budleína A, as linhagens tumorais em crescimento logarítmico foram removidas dos frascos de cultura celular pela adição de 1 mL de tripsina 0,5%, em solução tampão fosfato a 0,01 M (PBS). Os frascos foram então mantidos sob agitação manual por aproximadamente 60 segundos. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio completo para neutralizar a tripsina. As linhagens foram então transferidas para tubos plásticos de 50 mL, lavadas três vezes através da centrifugação a 1.000 rpm por 10 min em meio completo, contadas em câmara de Neubauer e ressuspendidas à concentração final de 10^6 células/mL em meio completo.

As células foram posteriormente plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações apropriadas (10^2 -10^5 células/poço), na presença ou na ausência dos microextratos, da budleína A, gentcitabina ou metotrexato (MTT, 10 e 1 mg/mL) como controles. Finalmente, as células tumorais foram incubadas por 24 h a 37 °C em estufa umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar.

Para avaliar a atividade citotóxica da substância e dos microextratos, adaptou-se um método utilizado para avaliar-se a atividade citotóxica de citocinas e células do sistema imune, descrito por MOSMANN (1983). Este método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células estão vivas, as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium, levando à quebra desta molécula e à sua redução, formando assim o azul de formazan. Portanto, quanto mais células vivas houver em uma determinada amostra, mais azul de formazan é formado. O azul de formazan

é solubilizado em SDS ou isopropanol em meio ácido. A leitura da quantidade de azul de formazan formado é medida através do espectrofotômetro utilizando-se filtro de interferência de 540 nm.

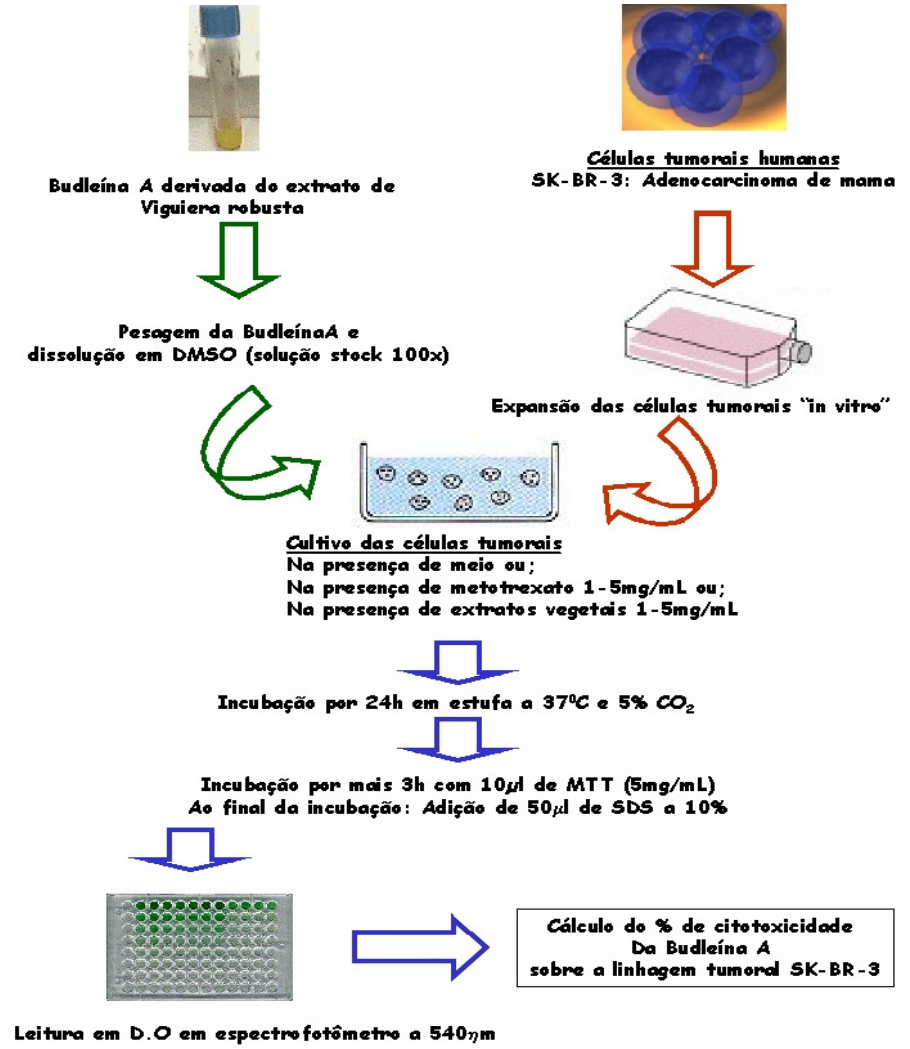
Ao fim da incubação por 2 h das linhagens celulares com os microextratos e com a budleína A, foram então adicionados aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT na concentração de 5 mg/mL. A placa foi incubada por mais três horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO_2 a 37 °C.

Após este período, foram acrescentados 100 µL de solução a 10% de SDS/HCl 0,01 N para dissolver os sais de formazan. As placas de cultivo celular foram incubadas por uma noite a 37 °C. A quantificação da densidade óptica foi medida em espectrofotômetro (leitora para ELISA) utilizando-se o filtro de interferência de 540 nm. O cálculo da percentagem de citotoxicidade tumoral das amostras foram obtidas conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de crescimento} = \frac{[\text{D.O. tumor (na presença das amostras)} - \text{D.O. basal MTT/SDS}] \times 100}{[\text{D.O. tumor (controle/meio de cultura)} - \text{D.O. basal MTT/SDS}]}$$

% de citotoxicidade dos extratos = 100 – % de crescimento celular

Esquema 6: Ensaio da atividade Citotóxica



4 – Resultados e Discussão

4.1 - Dados cromatográficos e caracterização da substância isolada

4.1.1 - LF 7

A substância isolada (aproximadamente 13 g) foi submetida à análise através de CLAE, nas condições padronizadas no laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP: O tempo de retenção relativo (trr) é a correlação entre a análise do tempo de retenção de um padrão interno (2,5-dimetilfenol) e da amostra a ser determinada em um método cromatográfico, esta correlação é amplamente utilizada para a determinação indireta de compostos conhecidos depositados em bancos de padrões. A análise de LSTs no Laboratório de Farmacognosia é realizada de acordo em duas condições no CLAE, sendo elas: a) trr1, MeOH:H_2O 45:55, fluxo de 1mL/min e b) trr2, CH_3CN:H_2O 35:65, fluxo de 1,3 mL/min, juntamente com o padrão interno 2,5-dimetilfenol (DMF). Também foi utilizado o parâmetro $A_{225/265}$, que é a razão entre as áreas dos picos da mesma substância nos comprimentos de onda de 225 e 265 nm no cromatograma. Obteve-se o cromatograma desta substância que está apresentado na Figura 2.

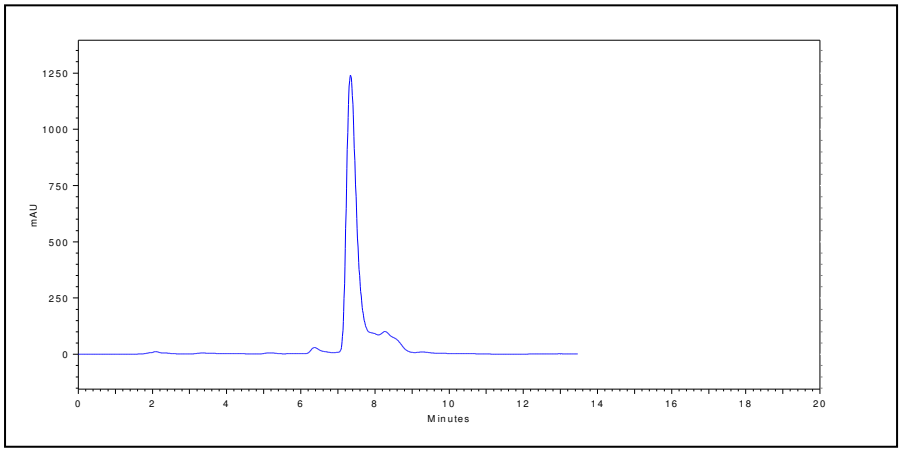


Figura 2: Cromatograma da substância LF 7 (7,33 nmin) em MeOH:H_2O 45:55, fluxo de 1,0 mL a 225 nm.

Os cromatogramas da budleína A nas condições trr1 e trr2 encontram-se respectivamente nas Figuras 3 e 4, além do espectro no UV apresentado na Figura 5.

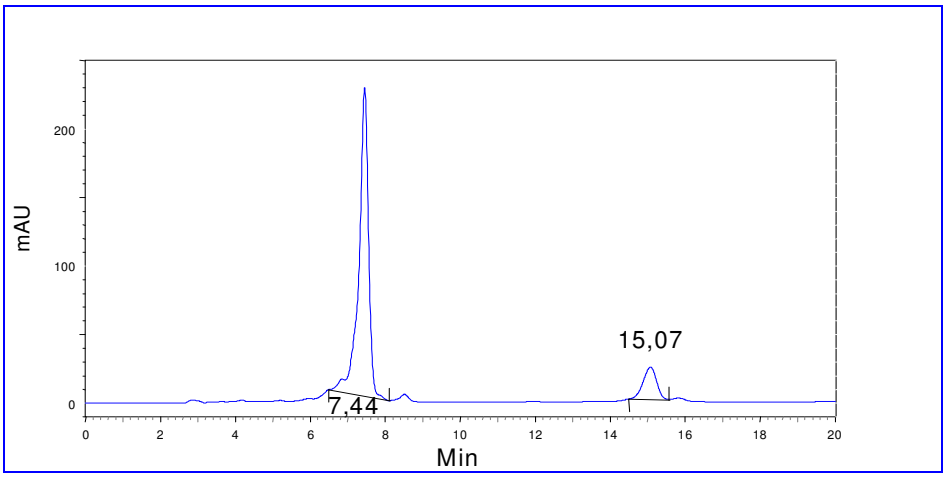


Figura 3: Cromatograma da budleína A (7.44 min) em MeOH:H_2O 45:55, fluxo de 1,0 mL/min a 225 nm e DMP (15,07 min).

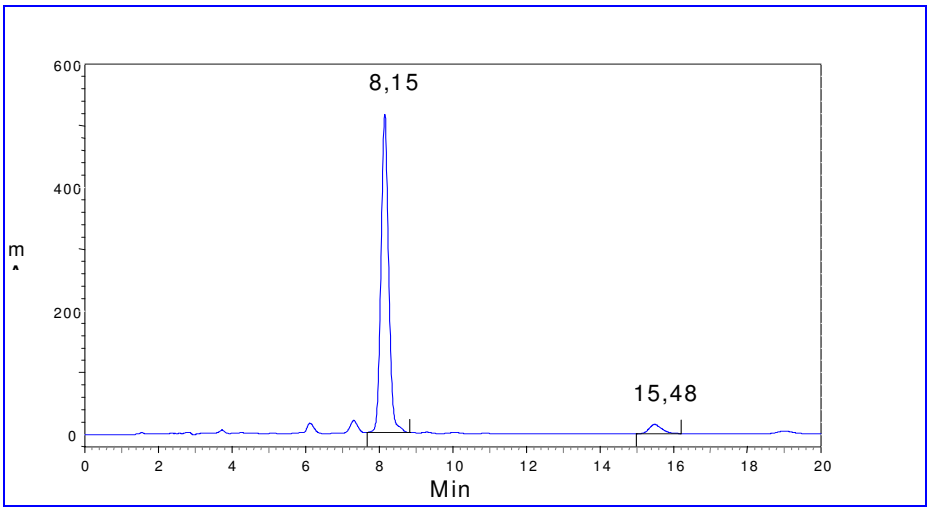


Figura 4: Cromatograma da budleína A (8,15 min) em CH_3CN:H_2O 35:65, fluxo de 1,3 mL/min a 225 nm e DMP (15,48 min).

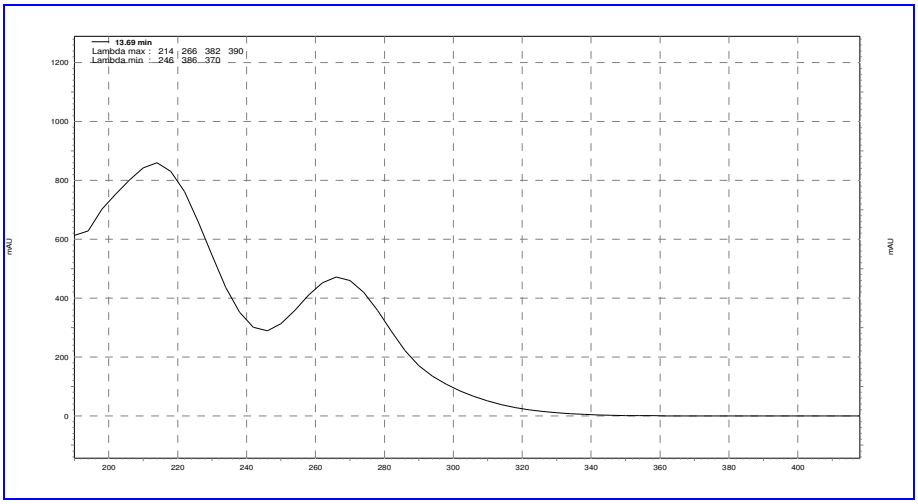


Figura 5: Espectro no UV da budleína A em MeOH:H_2O 45:55.

A substância LF 7 possui trr1= 0,49 e trr2= 0,53 e $A_{225/265}$= 1,8. Estes valores foram calculados com relação ao padrão interno o DMP. Comparando-se estes dados com aqueles da biblioteca de substâncias puras do laboratório (trr1 A = 0,49 e trr2= 0,53 e $A_{225/265}$= 1,6), pode-se concluir que a substância LF 7 trata-se da LST budleína A. As diferenças entre os valores de $A_{225/265}$ pode ser explicada devido às variações das intensidades de absorção, o que pode ocorrer dependendo do grau de pureza da amostra, mas que não prejudica os resultados das análises.

4.2 – Elucidação estrutural da substância isolada de *Viguiera robusta*

4.2.1.a – Substância LF 7

Mesmo tendo sido previamente caracterizada através de CLAE, decidiu-se obter o espectro de RMN ^{1}H da substância LF7. Através das análises dos espectros, foram observados dois *d* em δ 6,37 e 5,71 (LF 7) com *J* 2,9 e 2,6 Hz, indicando respectivamente os sinais referentes aos H13a e H13b, típicos de LST com grupamento metileno exocíclico conjugado à carbonila. O sinal em δ 5,27 *m*

(LF 7) foi atribuído ao H8, indicando que em C8 há um grupamento éster. Em δ 5,68 foi observado um *s* atribuído ao H2, indicativo da presença do sistema furan-3-ona (Apêndice 2**,** pág.107).

Este conjunto de sinais permitiu propor que a substância tratava-se de uma LST do tipo furanoeliangolido, de ocorrência típica em espécies de *Viguiera*.

Observa-se também um *dq* em δ 6,12 (1H)*,* um *s* em δ 1,93 (3H) e um *s* em δ 1,79 (3H), referentes respectivamente aos H-3', H-4' e H-5' pertencentes a um grupamento angelato, onde as metilas ligadas ao sistema insaturado do referido estér possuem configuração na posição *E* (*trans*). Deste modo, foi possível confirmar para LF 7 a estrutura referente à LST budleína A, apresentada na Figura 6.

Os dados de RMN ^{1}H de LF 7 encontram-se na Tabela 10, juntamente com os dados da literatura, sendo o espectro apresentado no Apêndice 1, pág. 106.

4.3 – Condições para a obtenção das transformações microbianas e selecionamento citotóxico das micro-extrações

4.3.1 – Fungos testados

Todos os fungos testados foram passíveis de transformações microbianas. Os processos de transformações microbianas e seus respectivos controles serão discutidos de acordo com a peculiaridade de cada fungo testado e os cromatogramas serão apresentados nos seus respectivos apêndices.

4.3.1.1 – *Aspergillus niger* (A1)

Realizando-se a análise dos cromatogramas do controle no apêndice 5 (pag. 110), pode-se notar que logo após as primeiras 24 h aparecem os primeiros metabólitos secundários produzidos pelo fungo, que persistem por mais 48 h, quando começam a desaparecer, havendo a ocorrência de várias substâncias após 120 h de cultivo, observando-se posteriormente níveis basais para estes metabólitos secundários.

Sobre o selecionamento citotóxico, pode-se observar que no microextrato contendo a budleína A ocorreu uma diminuição dos efeitos citotóxicos frente as células leucêmicas JURKAT, se comparados com ambos os controles positivos, ou seja, os microextratos contendo apenas o meio de cultura inoculado com *Aspergillus niger* e os meios de cultura inoculados com o fungo e com o solvente DMSO. De um modo geral, observa-se diminuição da atividade citotóxica e o melhor tempo de biotransformação foi 120 h de cultivo. O inóculo com o solvente DMSO demonstrou uma atividade citotóxica um pouco maior se comparado com o

inóculo suplementado com a budleína A. Este resultado pode indicar uma pequena influência do possível sinergismo entre os compostos obtidos através das fermentações e os compostos obtidos sobre a suplementação com DMSO (Figura 7).

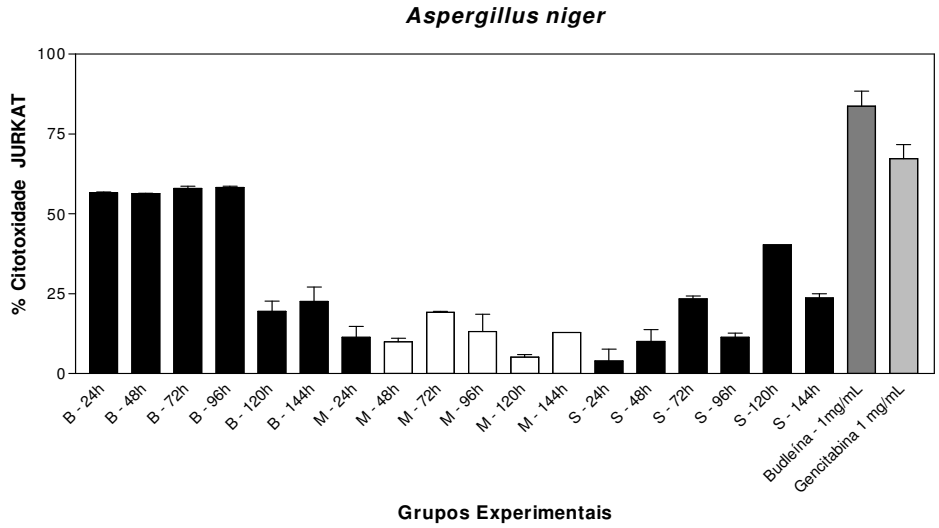


Figura 7: Atividade citotóxica dos microextratos frente ás células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus niger*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO.

4.3.1.2 – *Aspergillus nidulans* (A2)

O selecionamento citotóxico dos microextratos de *Aspergillus nidulans* demonstra uma diminuição da atividade citotóxica quando comparados com os controles positivos. Nestes experimentos não ocorre uma interferência marcante nos microextratos da suplementação com o solvente DMSO, mas observam-se atividades citotóxicas similares entre os meios suplementados com e sem a budleína A. Portanto, neste experimento pode-se supor que substâncias produzidas pelo processo de fermentação do *A. nidulans* possa promover atividade citotóxica, independente da adição de budleína A, indicando deste modo que

haverá grande possibilidade de interferência dos metabólitos dos fungos sobre a atividade citotóxica dos microextratos a serem futuramente fracionados (Figura 8).

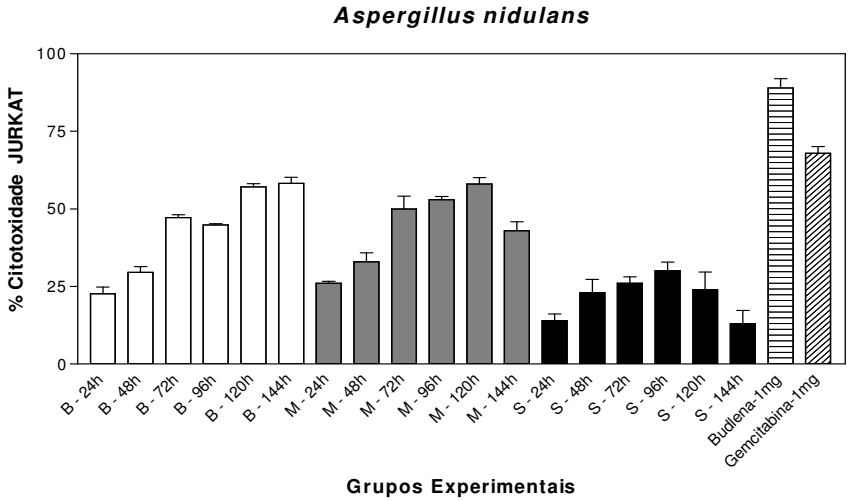


Figura 8: Atividade citotóxica dos microextratos frente ás células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus nidulans*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO.

4.3.1.3 – *Aspergillus terreus* (A3)

A análise da atividade citotóxica apresentou resultados interessantes. Para os microextratos da cultura que continham budleína A, observa-se aumento da atividade citotóxica. Este aumento ocorreu nas culturas mesmo em tempos iniciais de incubação até que toda a budleína A fosse biotransformada (Figura 9). Comparando-se com os outros dois grupos, pode-se observar que a interferência sobre as atividades citotóxicas são menores que os resultados obtidos com os microextratos com budleína A. Este resultado pode indicar que os produtos da biotransformação da budleína A possuem atividade citotóxica, não sendo totalmente dependentes de interações entre os compostos dos fungos e de influências do DMSO como solvente. Tal fato indica a prioridade de se pesquisar inicialmente este extrato.

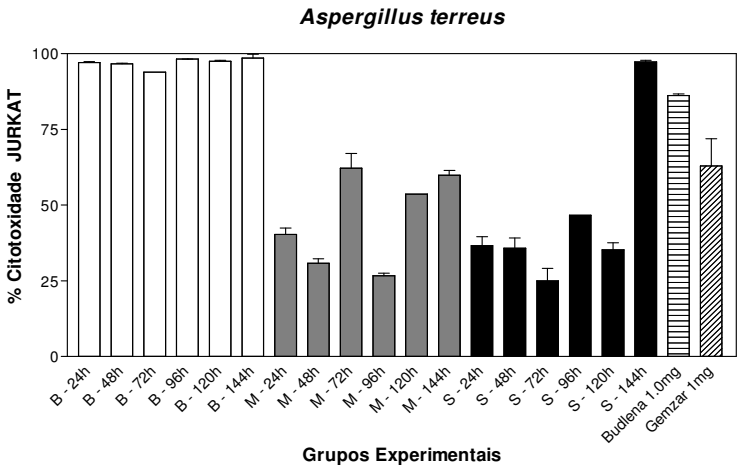


Figura 9: Atividade citotóxica dos microextratos frente ás células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus terreus*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO.

4.3.1.4 – *Aspergillus phoenix* (A4)

O selecionamento citotóxico apresenta uma significativa diminuição da atividade biológica a partir do momento em que toda a budleína A foi biotransformada. Comparado com os controles positivos, ambos os inóculos não interferiram no resultado da diminuição da atividade citotóxica, pois no tempo de incubação de 120 h, eles mantiveram as suas baixas atividades, não se comportando como o microextrato de 120 h com o substrato budleína A, principalmente devido à concentração em que tais compostos estão presentes neste microextrato (Figura 10).

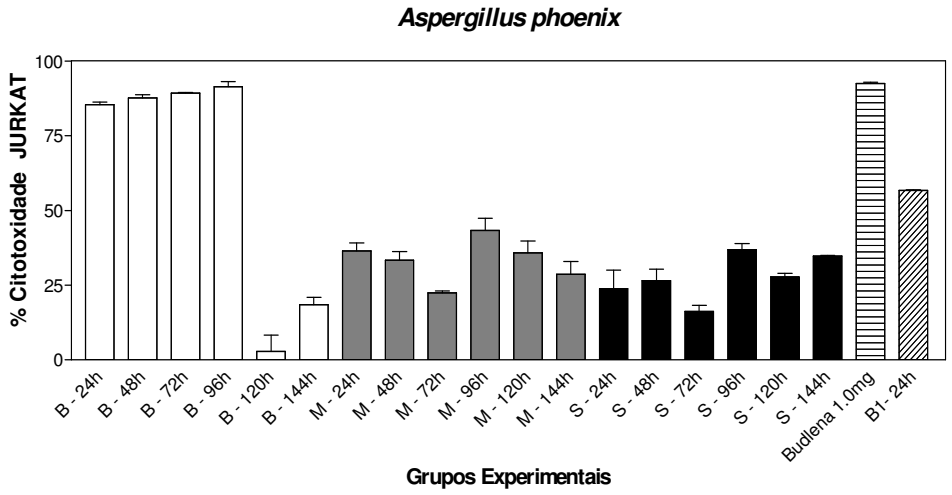


Figura 10: Atividade citotóxica dos microextratos frente ás células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Aspergillus phoenix*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO.

4.3.1.5 – *Penicillium corylophilum* (A5)

A análise da atividade citotóxica dos microextratos de *Penicillium corylophilum* mostra que há atividade citotóxica tanto nos microextratos com como naqueles sem a budleína A ou DMSO, pois todos eles apresentaram similaridade. Deste modo, pode-se supor que tanto os produtos da biotransformação como os compostos do metabolismo fúngico podem estar produzindo atividade citotóxica. (Figura 11).

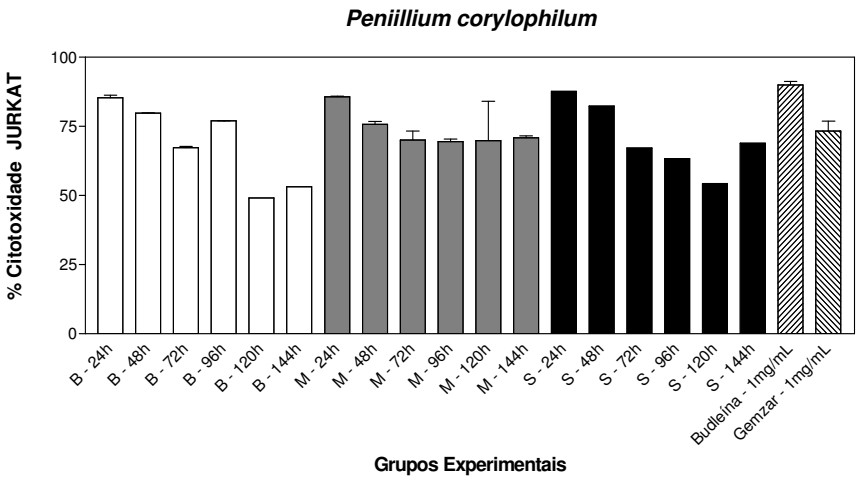


Figura 11: Avaliação Atividade citotóxica dos microextratos frente ás células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Penicillium corylophylum*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO.

4.3.1.6 – *Penicillium waksmanii* (A6)

A análise da atividade citotóxica demonstra um leve decréscimo na atividade citotóxica do microextrato com a budleína A no período de cultivo de 120 h, mas os microextratos sem a budleína A, e com o DMSO apresentaram atividade citotóxica. Ta comportamento pode indicar uma possível atividade citotóxica dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos sem a adição da budleína A. Talvez os compostos biotransformados pelo fungo possam ter diminuído sua atividade citotóxica e este resultado indica que a atividade citotóxica foi influenciada pelos metabólitos secundários fúngicos (Figura 12).

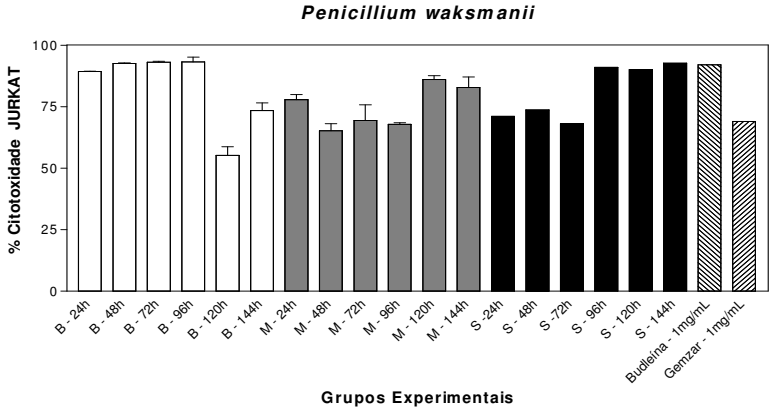


Figura 12: Atividade citotóxica dos micro-extratos frente ás células leucêmicas JURKAT do caldo de cultura de *Penicillium waksmanii*. (B) cultura com budleína A dissolvida em DMSO; (M) sem budleína A (controle); (S) sem budleína A, mas com DMSO.

4.3.2 – Interferência dos solventes na viabilidade celular

O experimento sobre a interferência dos solventes na viabilidade celular é importante pois durante o processo de transformação microbiana, é desejável que ocorra a menor quantidade possível de interferentes. Isto é para que não se prejudique o processo de biotransformação e que posteriormente essa interferência não dificulte o processo de isolamento dos compostos.

4.3.2.1 – Interferência do tetrahidrofurano (THF), dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona na viabilidade celular sobre o fungo *Aspergillus phoenix*

Durante os primeiros dias, todos os solventes se comportaram de maneira uniforme. Somente durante a retirada do ponto de 120 h é que pode-se notar diferenças entre os cromatogramas, tendo em vista que os solventes THF e acetona podem ter provocado a indução da produção metabólitos secundários fúngicos, onde evidencia-se a permanência da produção destes metabólitos. Quando o DMSO estava presente no meio de cultivo, a produção dos metabólitos

secundários inicia-se após 144 h de incubação. Como observado no ítem 4.3.1, a maioria das transformações microbianas da budleína A acontece durante as 120 h de incubação. Deste modo, ocorre a interrupção do processo de biotransformação, não promovendo grandes interferências no referido processo.

4.4 – Elucidação estrutural das substâncias isoladas dos processos de biotransformações.

4.4.1 – Substâncias oriundas do extrato A3 (*Aspergillus terreus*)

4.4.1.a A3334

De acordo com a análise do espectro de RMN ^{1}H (Apêndice 19, pag. 124), pode-se observar apenas três sinais: um *s* em δ 10,00 (1H), atribuído ao H de um grupamento aldeído, um *d* (*J* = 8,5 Hz) em δ 7,96 (2H) e outro (*J* = 8,9 Hz) em δ 7,25 (2H), típicos de H aromáticos de anel benzênico com substituição na posição *para*.

No espectro de RMN ^{13}C (Apêndice 20, pag. 125), observa-se que os sinais dos carbonos estão concentrados na região dos aromáticos. Um sinal em δ 133,0 foi atribuído ao C2 e ao C6, um em δ 117,1 atribuído ao C3 e C5, e outro em δ 129,6 atribuído ao C1. Um outro sinal em δ 191,1 foi atribuído ao carbono da carbonila do aldeído o sinal referente ao C4 não foi observado.

Deste modo, através da análise dos espectros de RMN e comparação com dados da literatura (Umeyama, Nagai & Nogami, 1971), foi possível confirmar que esta substância trata-se do 4-hidróxi-benzaldeído (Figura 13). Os dados do espectro de RMN ^{1}H e de ^{13}C estão apresentados na Tabela 11.

TABELA 11: Dados do espectro de RMN ^{1}H e de ^{13}C da substância A3334 [RMN ^{1}H, 500 MHz; RMN ^{13}C, 125 MHz; pyr-D; δ em ppm; (*multiplicidade; J* em Hz)] e dados da literatura.

Posição	**A3334**		**UMEYAMA et al., 1971**	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	129,6	-	129,3
2	7,96 (*d*; 8,5)	133,0	7,64 (*d*; 8,6)	131,1
3	7,26 (*d*; 8,9)	117,1	6,92 (*d*; 8,6)	116,2
4	-	-	-	163,1
5	7,26 (*d*; 8,9)	117,1	6,92 (*d*; 8,7)	116,2
6	7,96 (*d*; 8,5)	133,0	7,64 (*d*; 8,7)	131,1
aldeído	10,0 (*s*)	191,1	9,87 (*s*)	190,0
OH	-	-	5,00	-

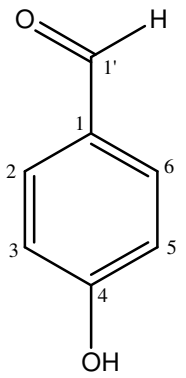


Figura 13: Estrutura do 4-hidróxi-benzaldeído (substância A3334).

Tal substância não é oriunda da biotransformação da budleína A, sendo possivelmente proveniente do metabolismo de *Aspergillus terreus*.

4.4.1.b – A3517

Após a análise dos espectros de RMN ^{1}H da substância A3517, concluiu-se que se tratava da LST budleína A, ou seja, a substância não havia sido totalmente biotransformado.

4.4.1.c – A3525

De acordo com a análise do espectro de RMN ^{1}H da substância A3525 (Apêndice 21, pag. 125), foi observado um *dq* em δ 6,17 (1H), um *sl* em δ 2,00 (3H) e um *s* em δ 1,85 (3H), todos referentes respectivamente aos H3', H4', H5',

pertencentes ao éster angelato, cujas metilas possuem configuração *E* (*trans*). Comparando-se estes sinais aos do espectro da budleína A, verifica-se que o éster não foi modificado pelo fungo, levando a crer que tal substância era um produto de biotransformação.

Um *sl* (1H) em δ 5,91 foi atribuído ao H5, indicando que este hidrogênio está sobre carbono sp^2. Quando analisa-se o espectro de COSY $^1H–^1H$ (Apêndice 24, pag. 129), este sinal apresenta correlação com o H6 e também com os dois hidrogênios de um sistema $–CH_2–O–$ que se apresentam como dois *d* em δ 4,42 e 4,30 (*J* = 14,3), indicando sua posição geminal. Estes dois *d* são atribuídos aos dois H15, da mesma forma que na budleína A.

Até o momento, havia sido possível atribuir a maioria dos sinais referentes aos H presentes no éster angelato e no esqueleto carbocíclico de uma LST derivada da budleína A. Entretanto, foram observadas algumas diferenças, o que levou à proposição da estrutura parcial a seguir (Figura 15a), cujos dados encontra-se na tabela 12.

Figura 15a: Estrutura parcial proposta para a substância A3525.

A análise conjunta dos espectros de RMN ^{13}C (Apêndice 22, pag. 127), DEPT 135° (Apêndice 23, pag. 128), gHMQC (Apêndice 25, pag. 130) e gHMBC (Apêndice 26, pag. 131), indicou a presença de 16 átomos de carbono em A3525, sendo que o C1' referente ao éster angelato (δ de 167,0) foi visualizado apenas no espectro de HMBC, totalizando assim 17C nesta molécula. Isto indica que deve ter ocorrido uma degradação da molécula pelo fungo resultando na perda de 3C, o que pode confirmar a ausência dos sinais referentes ao anel lactônico (C11, C12 e C13)

ao se comparar os espectros de RMN ^{1}H e de ^{13}C de A3525 (Apêndices 21 e 22, pags. 126 e 127) com os da budleína A (Apêndices 1 e 2, pags. 106 e 107).

No espectro de RMN ^{13}C foram observados 3 sinais de $–CH_3$ referentes aos C14, C4' e C5', dado confirmado pela análise dos dados dos espectros DEPT 135º e gHMQC, este último evidenciando as correlações dos sinais destes três carbono com seus respectivos sinais de ^{1}H em δ 15,8, 19,7 e 20,2, respectivamente. Em δ 212,9 foi observado um sinal referente a carbono de carbonila de cetona não conjugada, o qual justifica o sinal de $C–CH_2–C$ em δ 42,36, atribuído ao C2, cuja correlação foi observada no espectro gHMBC. Esta carbonila ocorre em C1, da mesma forma que na budleína A. Além deste sinal, foram observados mais dois sinais metilênicos, sendo atribuídos ao C9 (δ 39,1) e ao carbono hidroximetilênico C15 (δ 58,2), o que já havia sido observado no espectro de RMN ^{1}H. Foram observados apenas quatro sinais de carbono sp^2: um do tipo =C– (quaternário) em δ 145,1 e outro =C–H em δ 131,4, os quais foram atribuídos ao C4 e ao C5, respectivamente; dois outros sinais, um em δ 141,4 (=C–H) e outro em δ 126,6 (=C–), foram atribuídos aos C3' e C2' do éster angelato. Os sinais referentes ao C6 e C8 (–CH–O–) estão em δ 71,0 e 65,7, respectivamente, e o C10, por estar ligado ao oxigênio do anel furano, possui δ 83,3.

químico mais desblindado (ao redor de δ 105), como ocorre em derivados da budleína A descritos na literatura (Pereira et al., 1997). Porém, a partir do valor observado, há indicativos de uma ligação com um outro átomo de carbono.

Com relação ao C7, de acordo com as correlações estabelecidas pelo gHMBC, haviam indicativos de que este carbono pudesse estar ligado ao C3, pois foram observadas correlações (através do espetro de gHMBC) do C7 com átomos

de carbono distantes na molécula, como por exemplo C1, C2 e C3. Afim de sanar estas dúvidas e propor uma molécula definitiva, foram solicitadas novas análises de RMN em diferentes condições, como por exemplo um gHMBC com *J* de 4,0 e 12,0 Hz, ao contrário do espectro aqui discutido (8,0 Hz). Assim, foi possível confirmar as correlações observadas anteriormente e propor a ligação entre C3 e C7.

Com a obtenção do espectro de massas de alta resolução e o peso molecular da substância (Apêndices 28 e 29, pags.132 e 133) foi possível confirmar a estrutura proposta. Deste modo, comprovou-se a ausência dos átomos de carbono referentes ao anel lactônico, sendo este realmente degradado pelo fungo e ocorrendo uma ciclização entre os átomos do C3 e C7. Os dados dos espectros de RMN ^{1}H e ^{13}C mono e bidimensionais estão na Tabela 12.

Com base nas observações dos dados dos espectros de RMN, de suas correlações e análises dos dados de espectrometria massas e UV foi possível propor para o composto A3525 a figura apresentada na Figura 15b.

Na Figura 14 apresentamos o espectro no UV do composto A3525. Através deste espectro, observa-se sua diferença com aquele apresentado no item 4.1.1 (pag. 50) referente a budleína A. Observa-se a ausência da banda de absorção nos dois comprimentos de onda 225 e 265 nm, indicando deste modo a ausência de ambos os grupos cromóforos contidas na budleína A, ou seja, a conjugação entre a carbonila C1–C5 e C12–C11–C13 (anel lactônico). Restou na molécula o cromóforo presente no éster angelato, o que é indicado pela absorção residual no espectro.

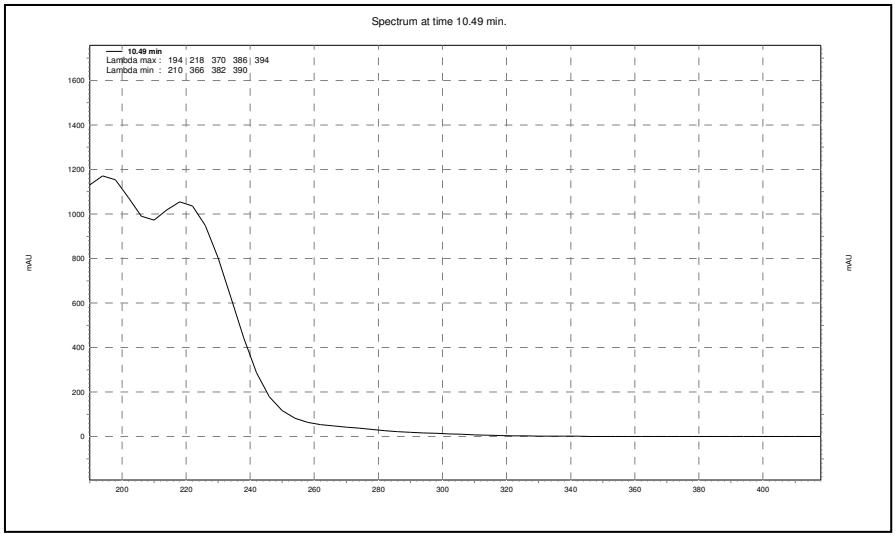


Figura 14: Espectro no UV do composto A3525.

4.4.1.d – A3524

A análise do espectro de RMN ^{1}H (Apêndice 27, pag. 134) da substância A3524 mostra que quase a totalidade dos sinais são muito similares aos do espectro da substância A3525 discutida anteriormente. A única diferença entre os espectros é em relação ao éster da cadeia lateral em C8, ocorrendo um *dq* (1H) em δ 6,86 e os dois sinais em δ 1,84 *sl* (3H) e em δ 1,80 *m* (3H). Este conjunto de sinais refere-se ao éster tiglato, onde suas metilas possuem configuração *Z* (*cis*), ao contrário daquelas do angelato, que são *E* (*trans*). Comparando-se este espectro com o da budleína A, verifica-se que a ligação dupla do éster foi isomerizada pelo fungo, juntamente com as mesmas modificações ocorridas na substância A3525, cujos dados espectrais estão apresentados na Tabela 13. O espectro no UV desta substância é praticamente o mesmo obtido para a substância anterior (figura 14).

De acordo com os dados obtidos através dos espectros de RMN uni, bidimensionais e de massas de alta resolução (Apêndice 30, pag. 135), foi possível propor a seguinte estrutura para o composto A3524 presente na Figura 17.

Na Figura 16 apresentamos o espectro de UV do composto A3524, apresentando-se um espectro semelhante ao da substância A3525.

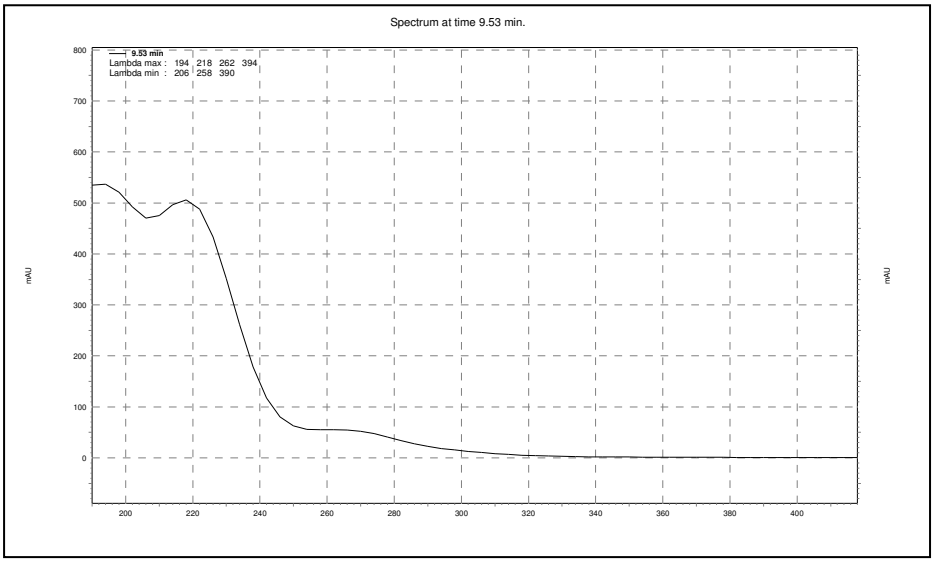


Figura 16: Espectro no UV do composto A3525.

4.4.2 – Substância oriunda do extrato A1 (*Aspergillus niger*)

4.4.2.a – A11524

O espectro de RMN ^{13}C (Apêndice 32, pág. 137) apresenta 30 átomos de C, sendo que a molécula da budleína A possui 20. Os 10 átomos de C adicionais da substância em questão são atribuídos a seis átomos de C de um anel aromático (o qual apresenta apenas um =C-H em δ 131,1) e outros quatro C que poderiam ou não estar diretamente ligados a este anel. Destes quatro, um refere-se a uma carbonila de cetona em δ 203,1, dois são de duas metilas (uma em δ 16,1 e outra em δ 26,1) e o último trata-se de um C quaternário (Tabela 14).

A análise conjunta dos espectros de RMN uni e bidimensionais (COSY, DEPT 135°, HMQC e HMBC, Apêndices 33-36, pags. 138-141) revela um sinal referente a 1H δ 7,43, *s*, sinal típico de H ligado a anel aromático, o qual no HMQC correlaciona-se diretamente ao =C-H em δ 131,1 (Tabela 14). Observou-se no espectro de RMN ^{1}H dois singletos de hidrogênio de grupamentos hidroxila, um em δ 9,72 e outro em δ 13,55, os quais de acordo com o HMBC correlacionam-se com

sinais de carbonos quaternários aromáticos e da carbonila da cetona em δ 203,1. Os sinais em δ 2,22 e δ 2,55, integrados para 3H no RMN ^{1}H, pelo HMQC correlacionam-se com os sinais de metila (δ 16,1 e δ 26,1, respectivamente) e sinais de C aromáticos quaternários (Tabela 14).

O espectro no UV desta substância está apresentado na Figura 18, o qual mostra uma fraca absorção em região de aromático próximo a 270 nm e uma banda mais intensa em torno de 220 nm.

De acordo com os dados obtidos através dos espectros de RMN uni e bidimensionais, foi possível propor os fragmentos para a substância A1524 que são apresentados na Figura 19.

O espectro de massas está em fase de obtenção para auxiliar na elucidação da estrutura aqui proposta.

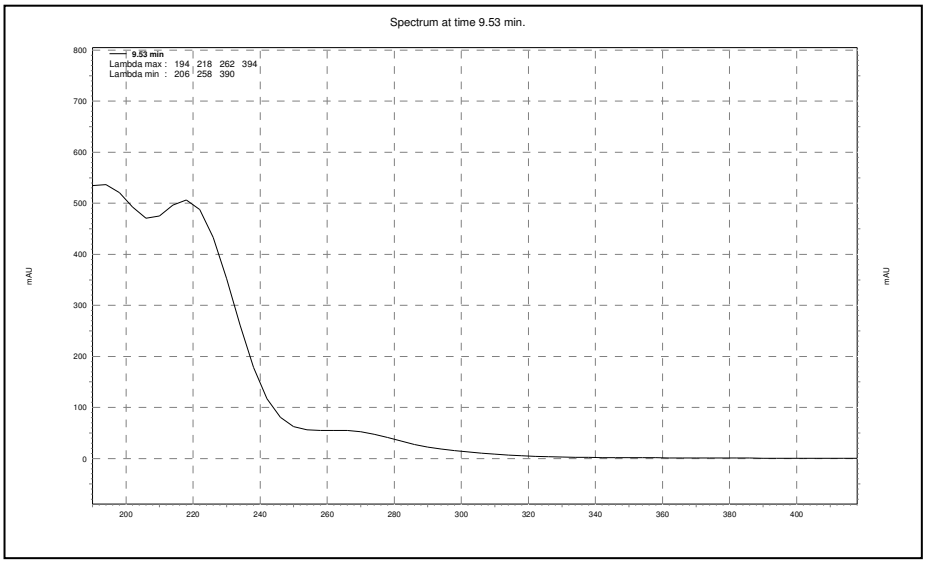


Figura 18: Espectro no UV da substância A11524.

4.5 – Compostos isolados ainda sem os dados de RMN

4.5.1 – Substâncias oriundas do extrato A4 (*Aspergillus phoenix*)

Devido à pequena quantidade de amostra e a quebras e manutenção do aparelho de RMN de alto campo, além de outros problemas, ainda não foi possível obter dados de RMN para tais substâncias, as quais serão futuramente identificadas.

4.5.1.a – A4710

A substância A4710 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise ao CLAE (Figuras 20 e 21).

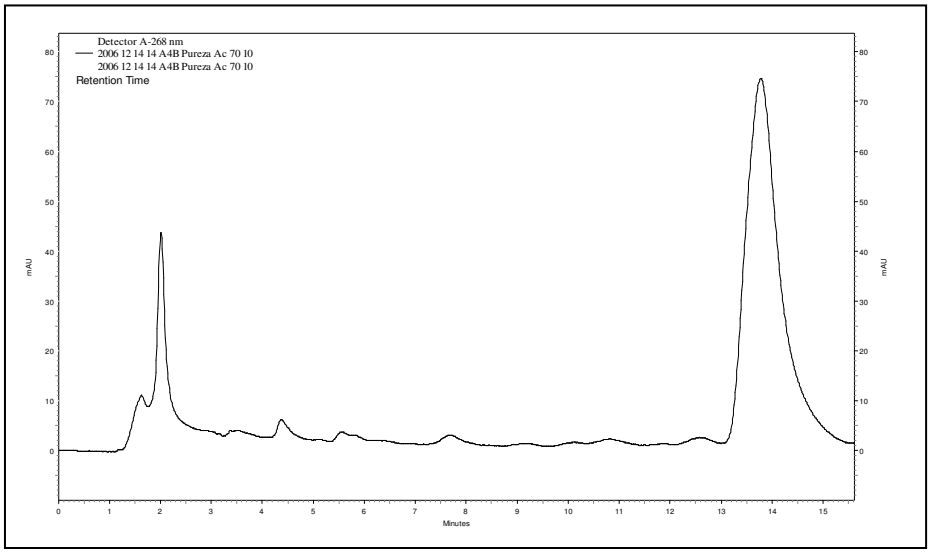


Figura 20: Cromatograma da substância A4710 em MeOH:H_2O 45:55 a 268 nm.

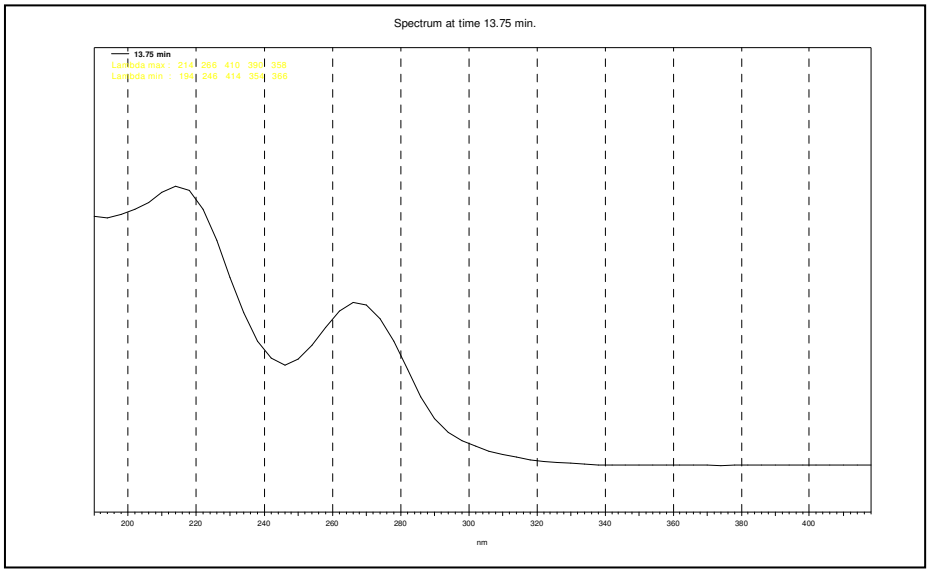


Figura 21: Espectro no UV da substância A4710.

4.5.1.b – A4102

A substância A4102 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 22 e 23).

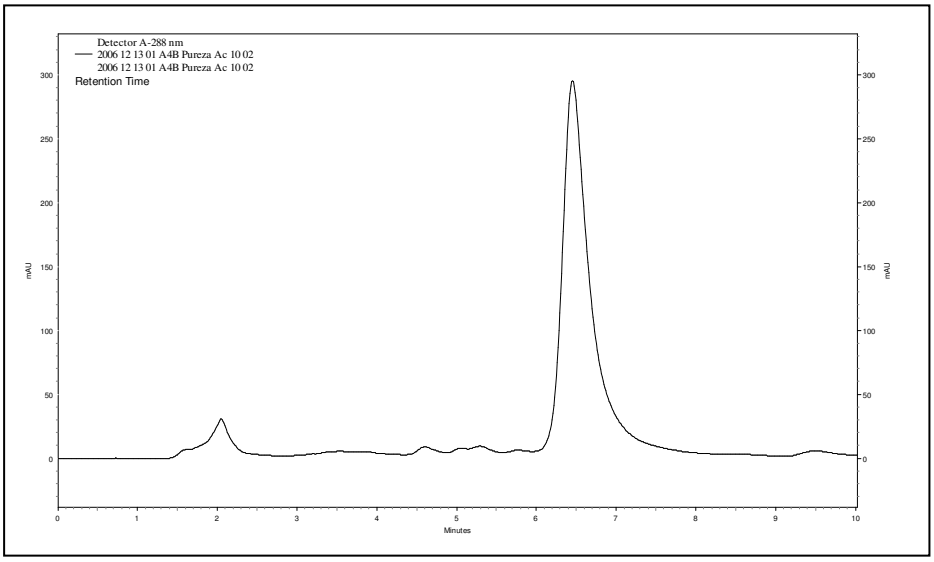


Figura 22: Cromatograma da substância A4102 em MeOH:H_2O 45:55 a 288 nm.

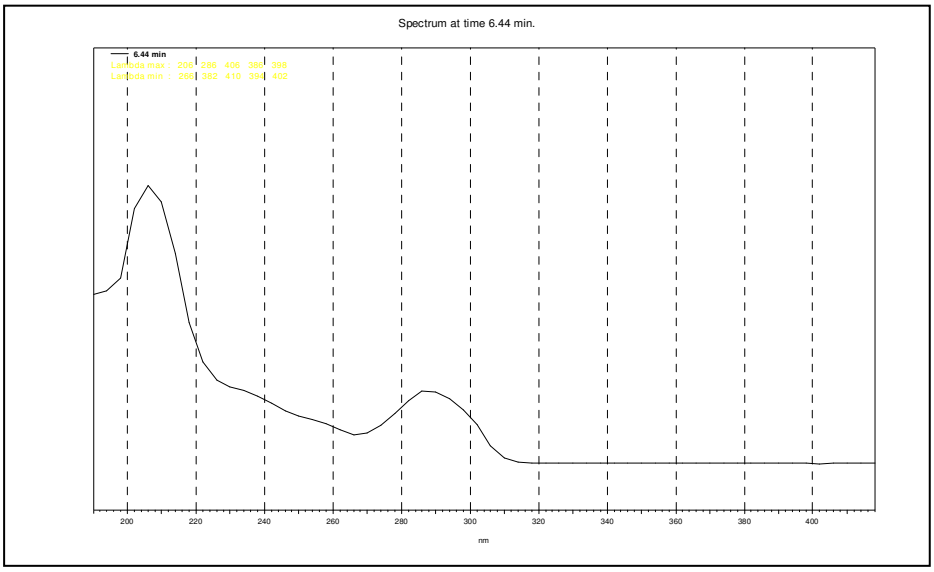


Figura 23: Espectro no UV da substância A4102.

4.5.2 – Substâncias oriundas do extrato A1 (*Aspergillus niger*)

4.5.2.a – A12732

A substância A12732 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 24 e 25).

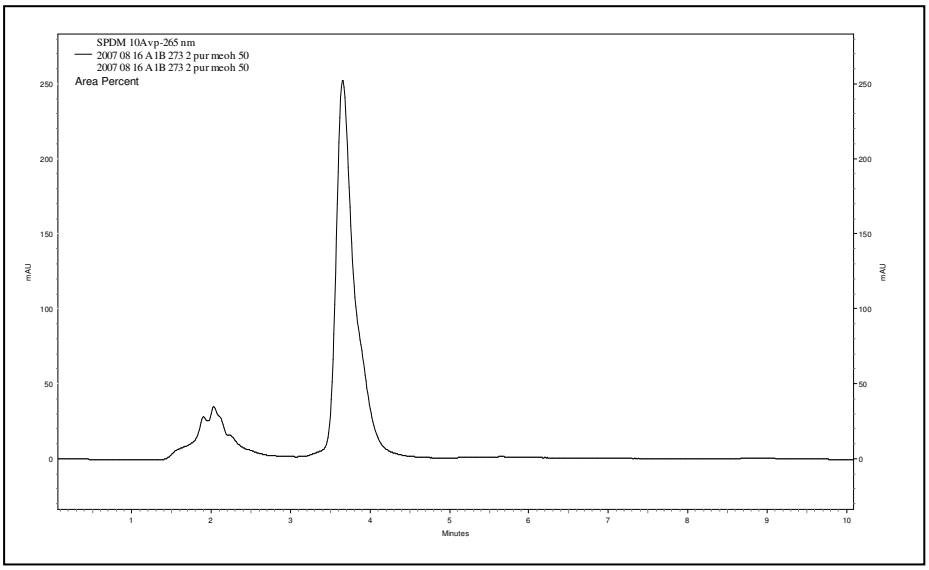


Figura 24: Cromatograma da substância A12732 em MeOH:H_2O 45:55 a 265 nm.

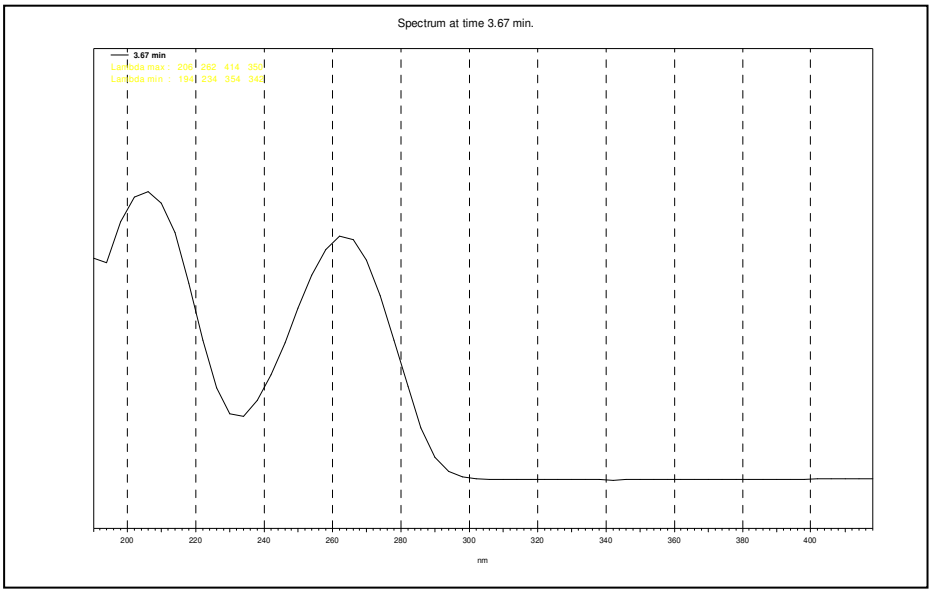


Figura 25: Espectro no UV da substância A12732.

4.5.2.b – A12733

A substância A12733 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 26 e 27).

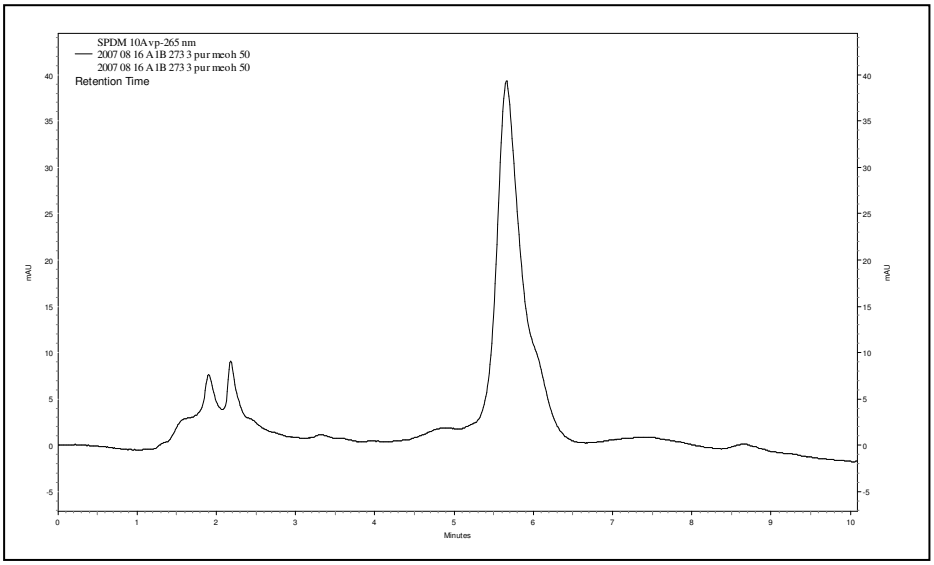


Figura 26: Cromatograma da substância A12733 em MeOH:H_2O 45:55 a 288 nm.

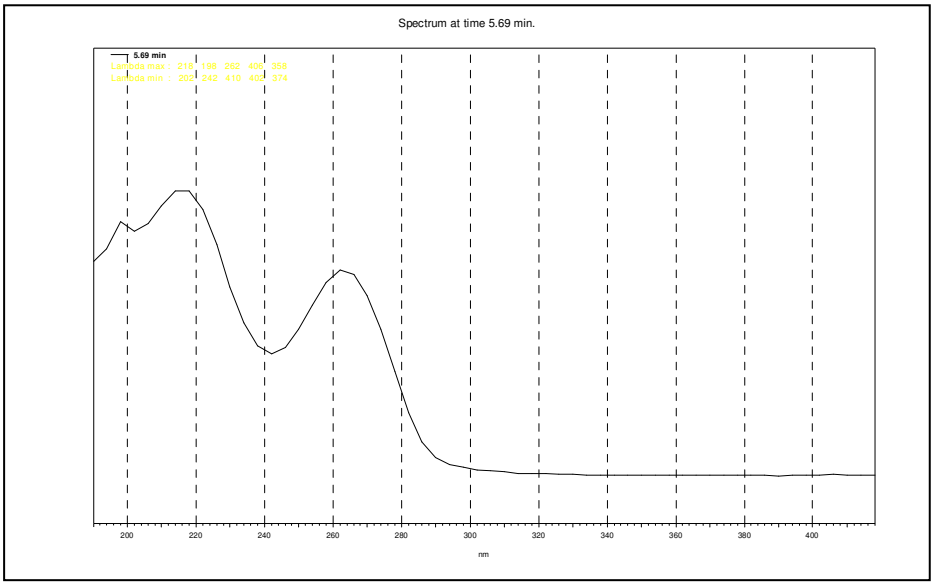


Figura 27: Espectro no UV da substância A12733.

4.5.2.c – A13505

A substância A13505 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 28 e 29).

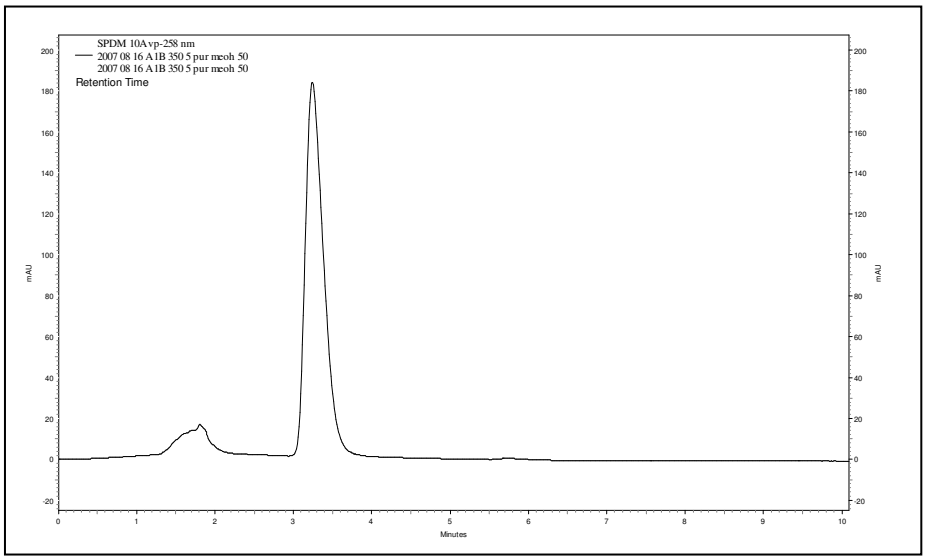


Figura 28: Cromatograma da substância A13505 em MeOH:H_2O 45:55 a 258 nm.

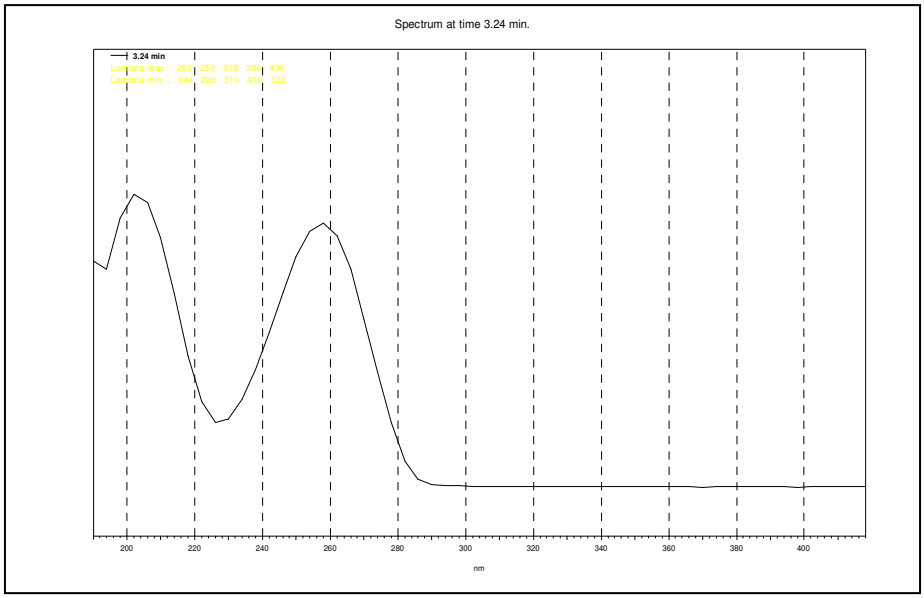


Figura 29: Espectro no UV da substância A13505.

4.5.3 – Substâncias oriundas do extrato A2 (*Aspergillus nidulans*)

4.5.3.a – A221029

A substância A221029 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 30 e 31).

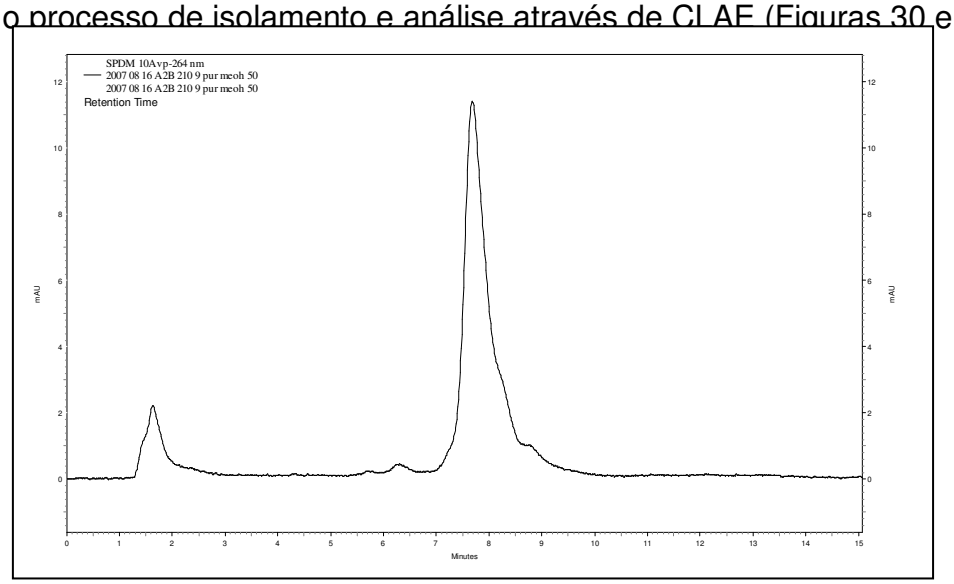


Figura 30: Cromatograma da substância A221029 em MeOH:H_2O 45:55 a 254 nm.

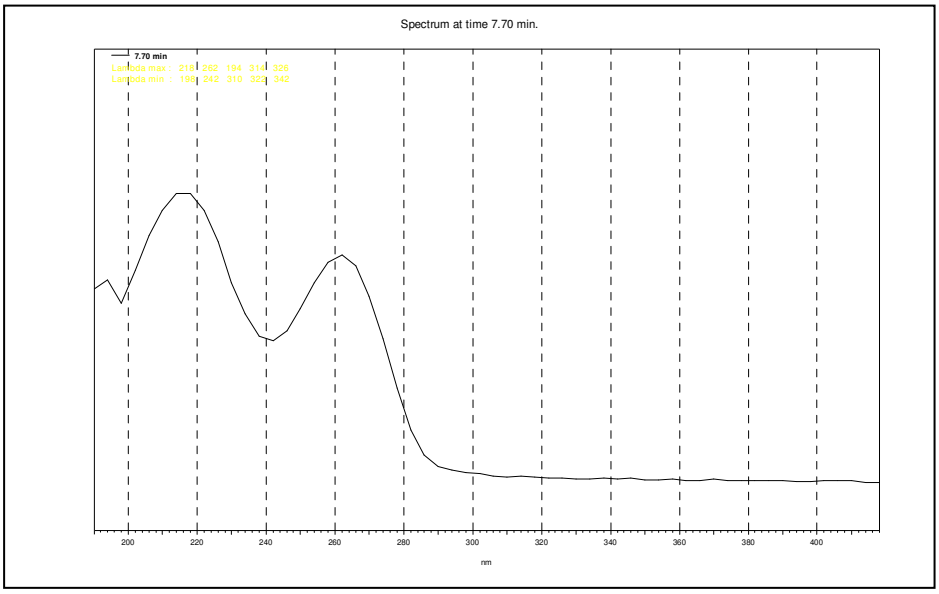


Figura 31: Espectro no UV da substância A221029.

4.5.3.b – A2210210

A substância A2210210 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 32 e 33).

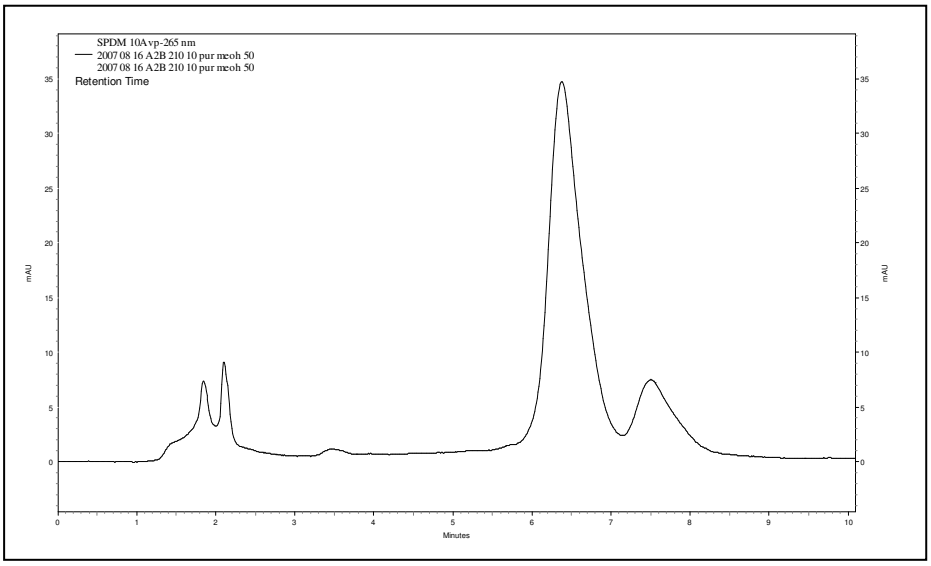


Figura 32: Cromatograma da substância A2210210 em MeOH:H_2O 45:55 a 265 nm.

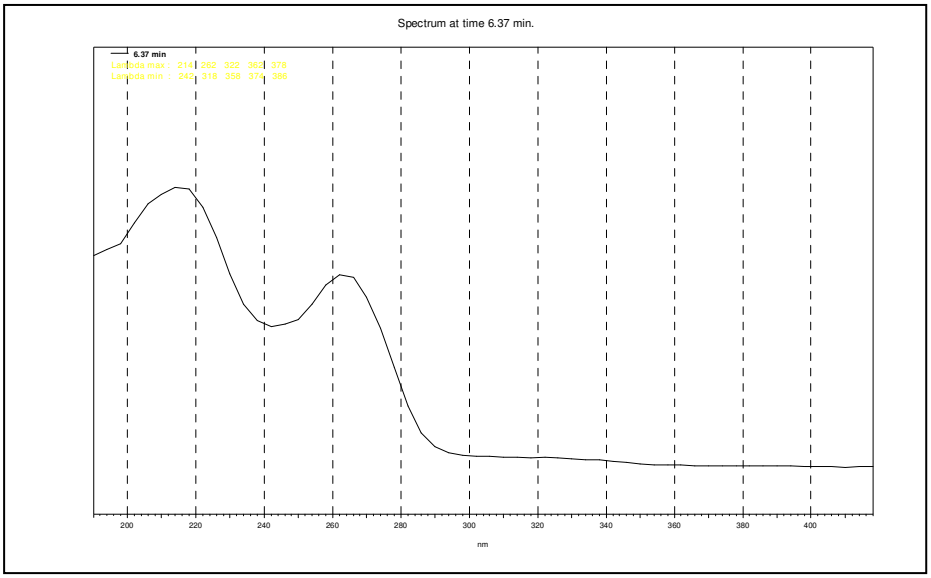


Figura 33: Espectro no UV da substância A2210210.

4.5.3.c – A2210212

A substância A2210212 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figura 34 e 35).

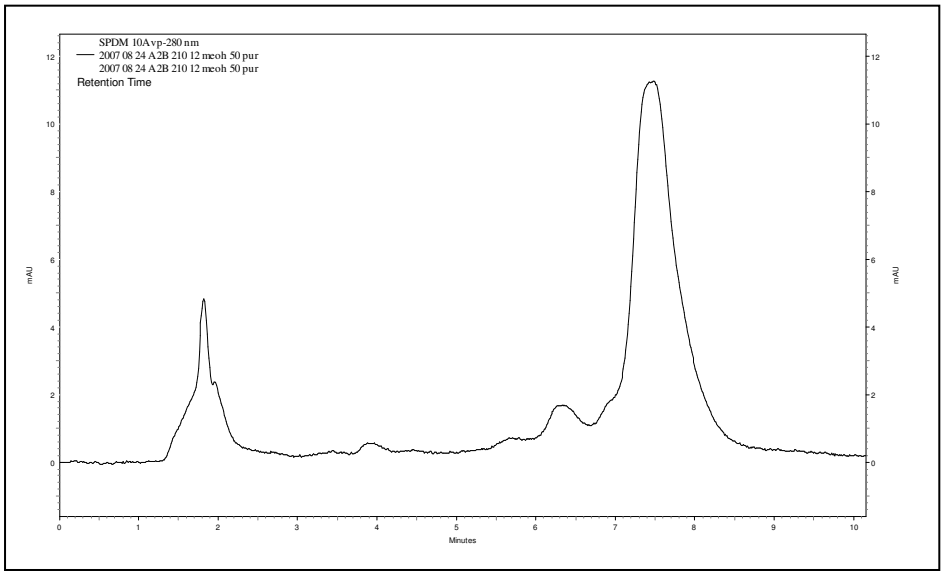


Figura 34: Cromatograma da substância A2210212 em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm.

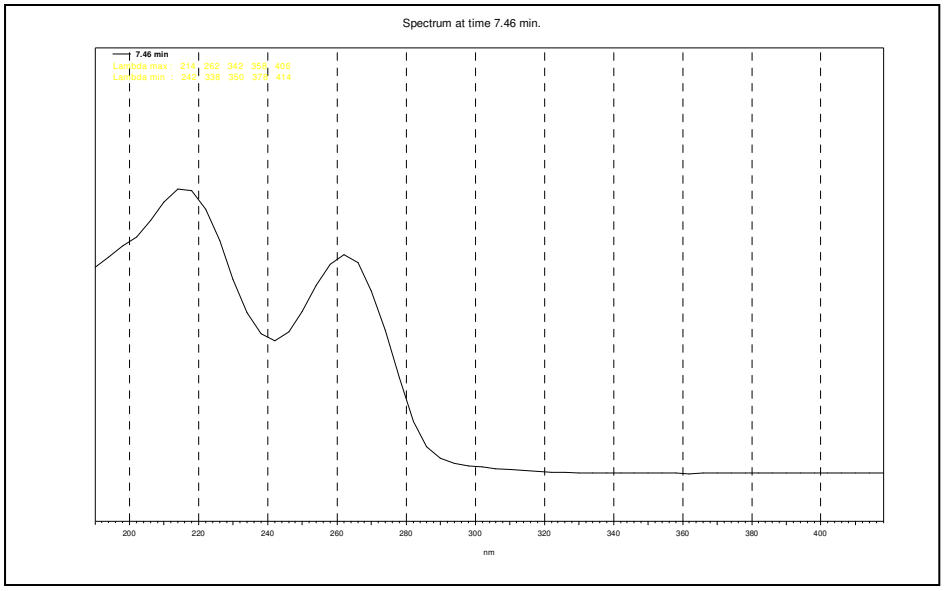


Figura 35: Espectro no UV da substância A2210212.

4.5.3.d – A2210213

A substância A2210213 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 36 e 37).

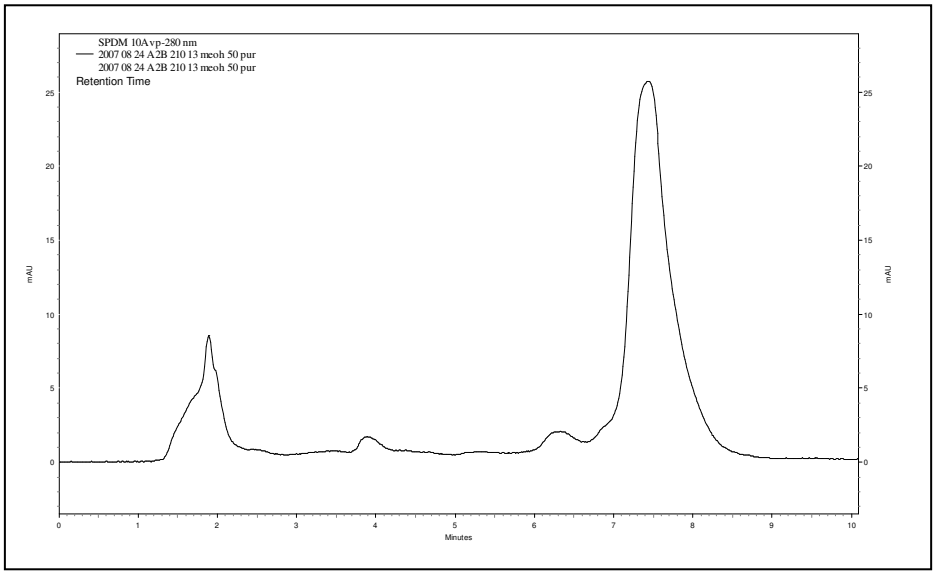


Figura 36: Cromatograma da substância A2210213 em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm.

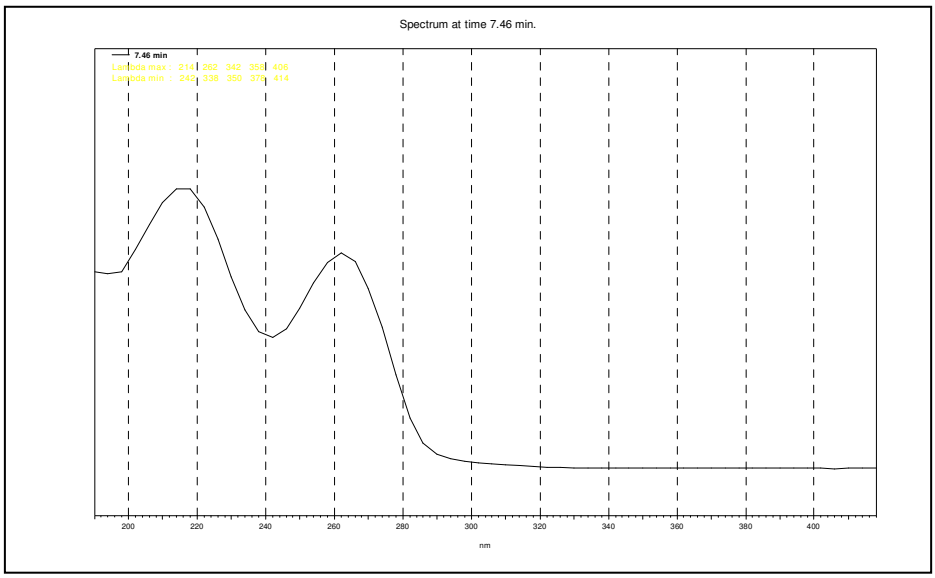


Figura 37: Espectro no UV da substância A2210213.

4.5.4 – Substâncias oriundas do extrato A5 (*Penicillium corylophilum*)

4.5.4.a – A5177P

A substância A5177P apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 38 e 39).

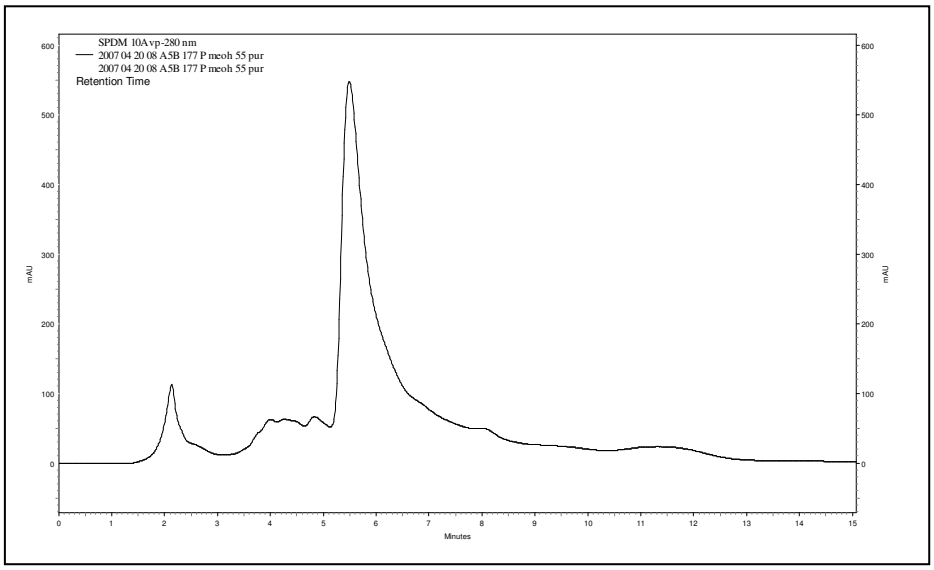


Figura 38: Cromatograma da substância A5177P em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm.

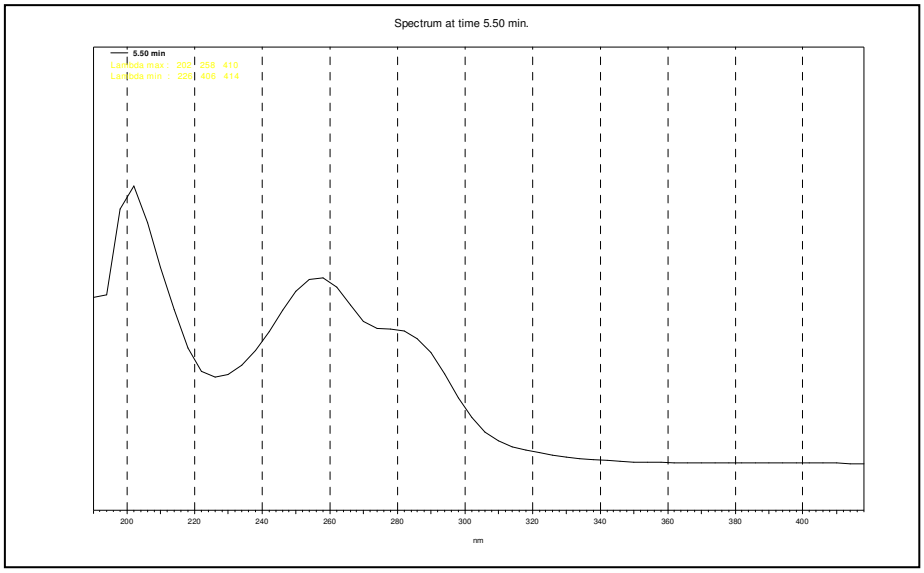


Figura 39: Espectro no UV da substância A5177P.

4.5.4.b – A51772

A substância A51772 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 40 e 41).

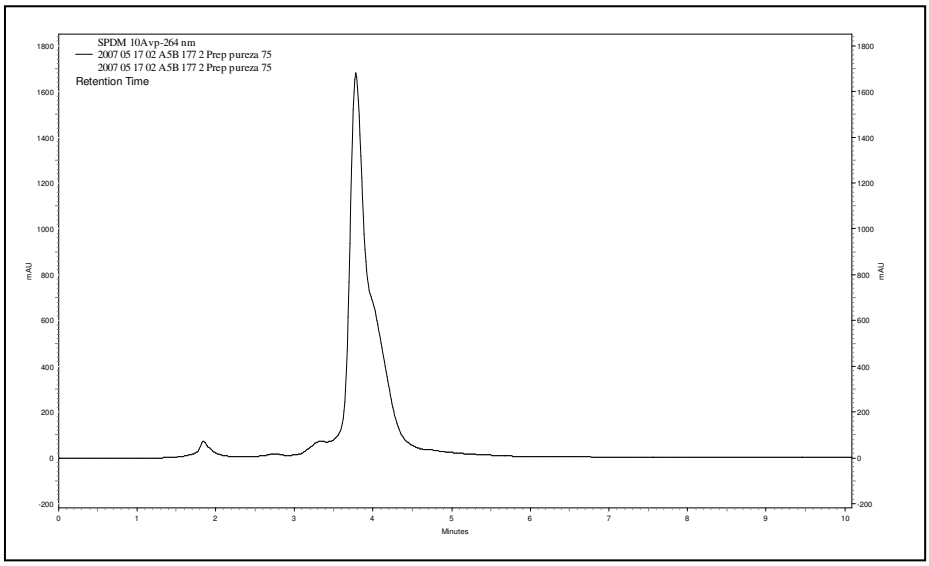


Figura 40: Cromatograma da substância A51772 em MeOH:H_2O 45:55 a 264 nm.

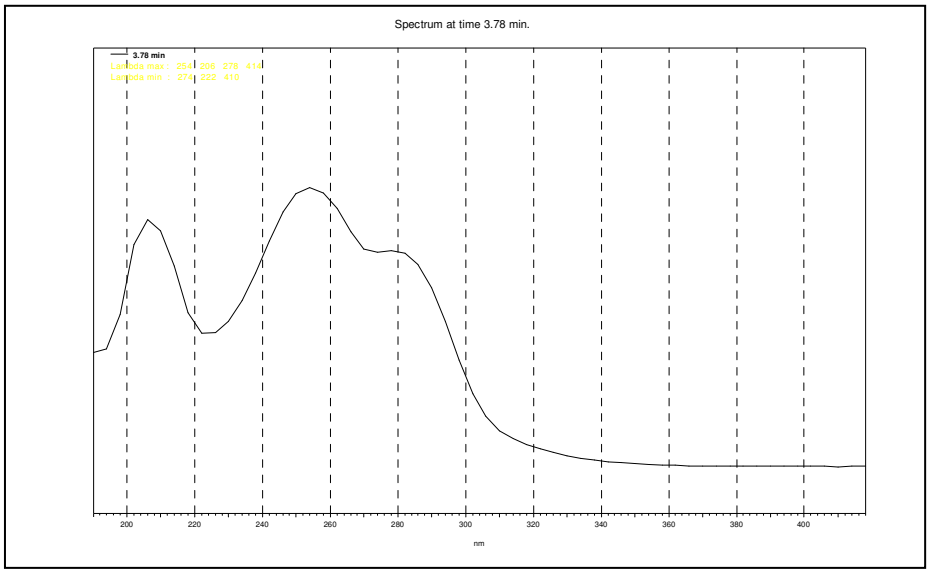


Figura 41: Espectro no UV da substância A51772.

4.5.5 – Substâncias oriundas do extrato A6 (*Penicillium waksmanii*)

4.5.5.a – A61714

A substância A61714 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 42 e 43).

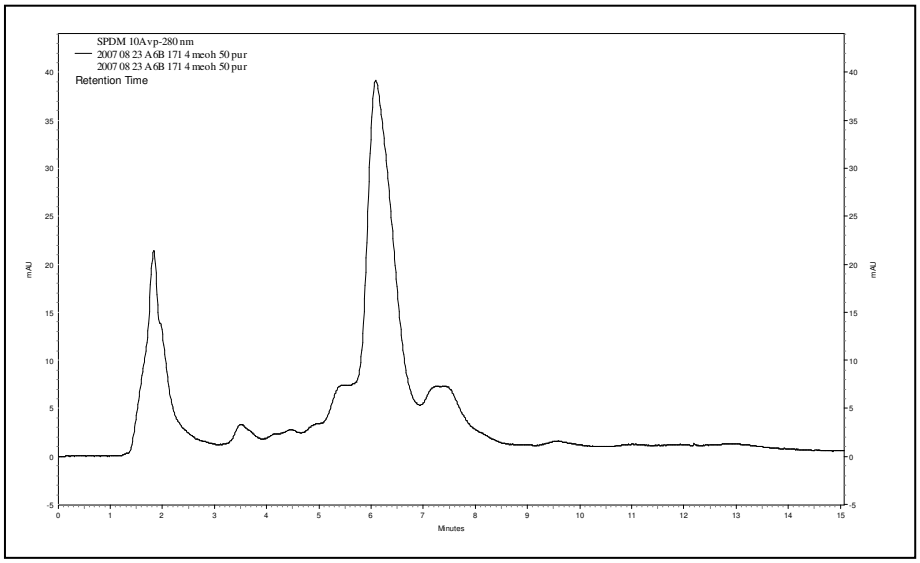


Figura 42: Cromatograma da substância A61714 em MeOH:H_2O 45:55 a 280 nm.

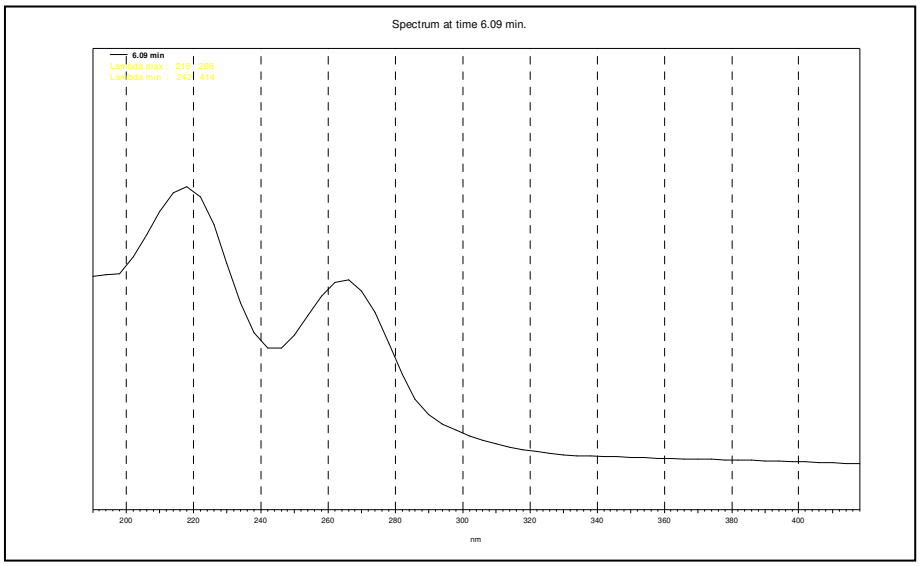


Figura 43: Espectro no UV da substância A61714.

4.5.5.b – A61715

A substância A61715 apresentou o seguinte cromatograma e espectro de UV, após o processo de isolamento e análise através de CLAE (Figuras 44 e 45).

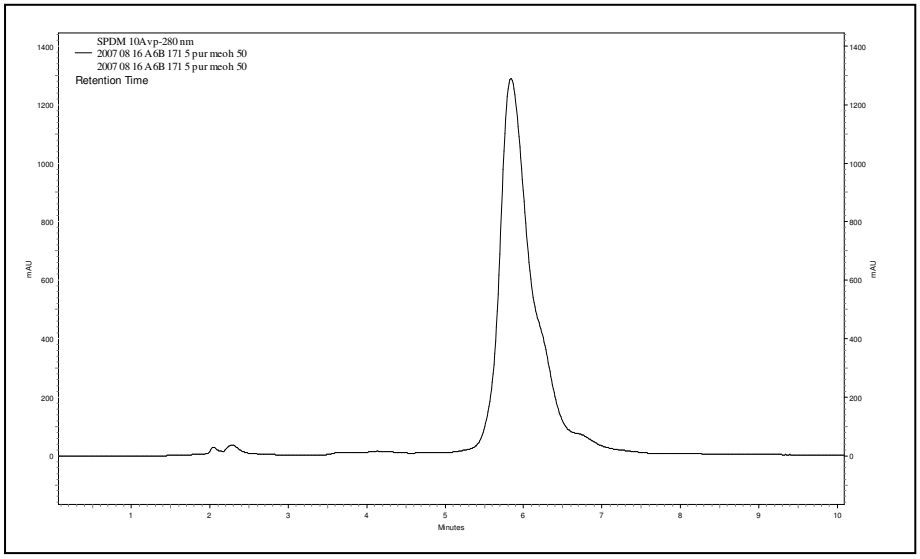


Figura 44: Cromatograma da substância A61715 em MeOH:H_2O 45:55 a 268 nm.

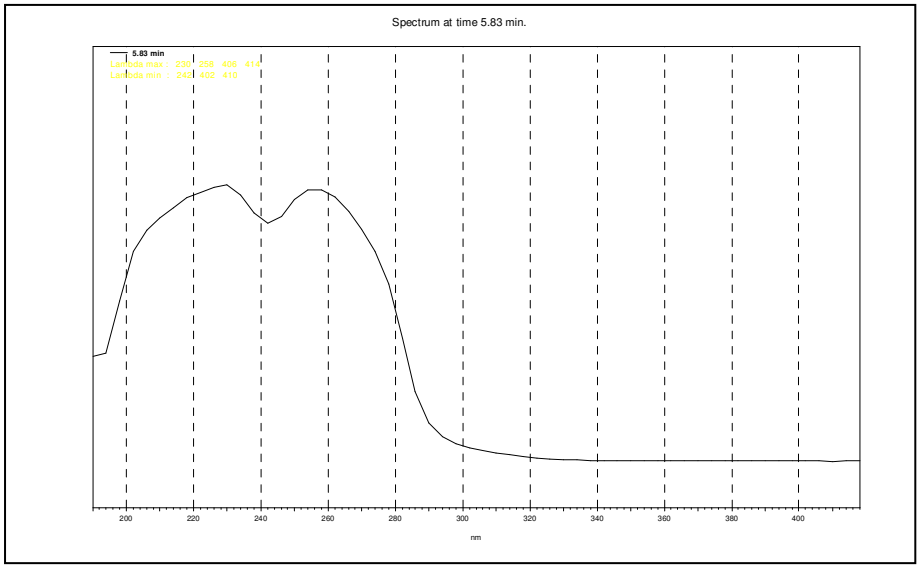


Figura 45: Espectro no UV da substância A61715.

4.6 – Proposta de biotransformação enzimática dos compostos isolados

Os possíveis processos enzimáticos ocorridos na biotransformação da budleína A para gerar as substâncias A3524 e A3525 estão demonstrados na Figura 46.

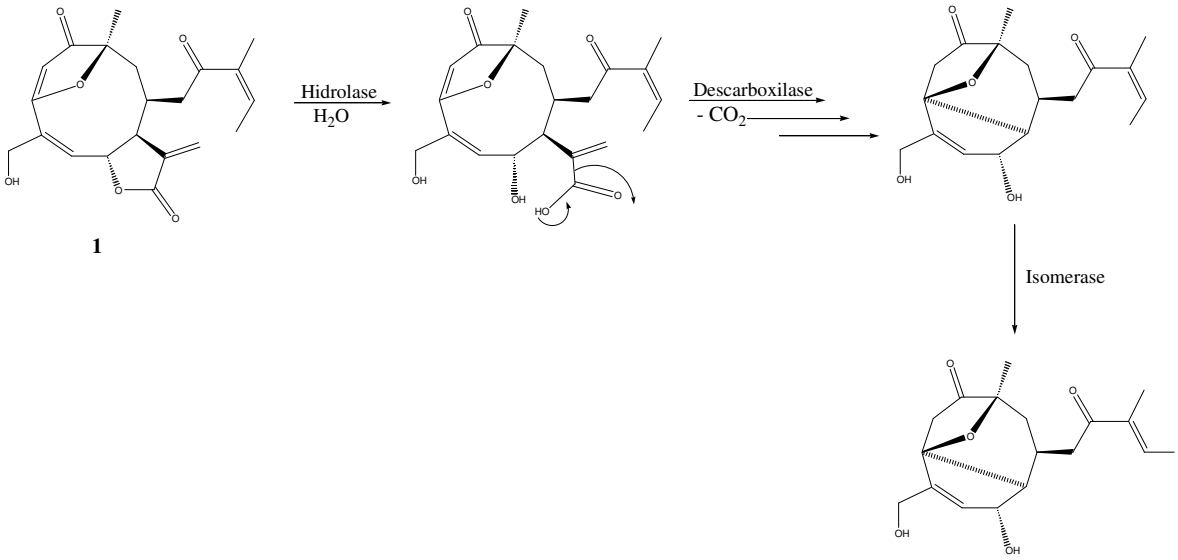


Figura 46: Proposta de biotransformação das substâncias A3524 e A3525.

Observa-se nesta proposta que as possíveis enzimas atuando durante a obtenção das duas substâncias biotransformadas a partir da budleína A: hidrolase, descarboxilase, epoxidase, hidroxilase, redutase e ligase para o núcleo carbônico e uma isomerase que atuou no éster angelato originando o tiglato. Obviamente as ordens das reações podem sofrer alterações.

5 - Conclusão

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

1) Os processos de obtenção da budleína A a partir do material vegetal foram efetivos, rendendo aproximadamente 13 g do composto/42,5 kg de folhas de *V. robusta*. Rendimento semelhante foi observado em pesquisas anteriores, mostrando que esta etapa foi bem conduzida e o processo de identificação indireta da referida substância através de CLAE foi eficaz, dispensando a análise de RMN ^{1}H, a qual foi mantida aqui meramente por motivos didáticos.

2) Na análise da interferência dos solventes utilizados na solubilização da budleína A nos experimentos, pode-se concluir que os solventes THF e acetona promoveram uma relativa interferência sobre a viabilidade celular dos fungos (Apêndices 16 e 18), enquanto que o DMSO promoveu indução significativa da produção de metabólitos secundários fúngicos, mas somente após 120 horas. Assim, o DMSO é o solvente ideal a ser utilizado na solubilização da budleína A para a realização dos experimentos.

3) No que diz respeito à seleção pela atividade citotóxica frente a linhagens tumorais humanas, pode-se concluir pelos resultados obtidos até o momento que o fungo *Aspergillus terreus* biotransformou a budleína A em um composto com aproximadamente 14% a mais de atividade citotóxica quando comparada com a da substância original. Os fungos *A. niger e A. phoenix* apresentaram em seus micro-extratos um decréscimo na atividade citotóxica de aproximadamente 77 e 97 %, respectivamente. Os fungos *A. nidulans, Penicillium corylophilum e P. waksmanii* apresentaram os micro-extratos com a atividade citotóxica diminuída, mas ocorreram interferências nos controles dos micro-extratos sem a suplementação da budleína A, podendo ser indicativo de que outros compostos produzidos por esses

fungos podem também estar promovendo atividade citotóxica, havendo necessidade de se pesquisar os extratos de ambas as culturas.

5) A partir do processo de biotransformação da budleína A pelo fungo *Aspergillus terreus* (A3) foram isoladas quatro substâncias. Duas delas são produtos de seu próprio metabolismo, como o 4-hidróxi-benzaldeído, além de uma segunda molécula a qual está em processo de identificação. Outras duas substâncias são produtos da transformação microbiana da budleína A.

6) Uma das possíveis explicações é que o fungo tenha tentado remover da molécula grupos funcionais que pudessem causar-lhe algum tipo de toxicidade. Tal proposta é corroborada por dados da literatura os quais, por exemplo, atribuem a causa da toxicidade das LSTs ao grupo α,β-insaturado do anel lactônico, pois este promove a alquilação de grupamentos sulfidrila de aminoácidos presentes em enzimas de vários organismos. Daí surge a hipótese das LSTs protegerem as plantas que as contém de organismos predadores. Observação semelhante pode ser extendida ao produto da transformação realizada pelo fungo *A. niger*, onde se observou a adição de um fragmento de 10 átomos de C à molécula do substrato, de modo a destruir um grupamento cromóforo α,β-insaturado que possivelmente constitui um dos sítios ativos da molécula.

As constatações aqui observadas têm conseqüências importantes para pesquisas envolvendo a ação biológica e/ou citotóxica de LSTs. Por exemplo, pode-se tentar avaliar quais os mecanismos que envolvem a detoxificação deste tipo de substância por outros organismos através de processos de metabolização. Além disto, pode-se estabelecer novos critérios para a obtenção de LSTs com menor toxicidade ou maior ação biológica. É claro que investigações adicionais devem ser realizadas posteriormente, sendo que o primeiro passo seria a obtenção

destes derivados em maior quantidade com vistas à realização de diferentes bioensaios. Sabe-se que além da citotoxicidade, a budleína A possui ação antiinflamatória “in vitro” e “in vivo”. Etapas posteriores deste estudo ainda poderia envolver o isolamento das enzimas responsáveis por tais reações de modo a se compreender as transformações envolvidas com maiores detalhes.

Em suma, este trabalho, o qual ainda não foi concluído em sua íntegra, trouxe importantes conclusões acerca dos processos de transformações microbianas de uma importante classe de produtos naturais com importância ecológica e farmacológica.

6 – Referências Bibliográficas

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; ACCENSI, F.; CABAÑES, F.J.: Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Ver. Iberoam. Micol.*, v. 17, S63 – 68, 2000.

ABARCA, M.L.; ACCENSI, F.; CANO, J.; CABAÑES, F.J.: Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoeck*, v. 86, 33 – 49, 2004.

ALVIANO, C.S.; FARBIARZ, S.R.; TRAVASSOS, L.R.; ANGLUSTER, J.; SOUZA, W.: Effect of environmental factors on *Fonsecaea pedrosoi* morphogenesis with emphasis on sclerotic cells induced by propranolol. *Mycopathology*, v. 119, 17 – 23, 1992.

ARAKAWA, N.S. *Viguiera robusta* Gardn.(Asteraceae): investigação fitoquímica do extrato bruto de lavagem foliar e ensaios biológicos. 103p. Dissertação Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

BARRERO, A.F.; OLTRA, J.E.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.. Microbial transformation of sesquiterpene lactones by the fungi *Cunninghamella echinulata* and *Rhizopus oryzae. J. Nat. Prod.,* v. 62, 726 – 729, 1999.

BLAKE, S.F. A revision of the genus *Viguiera*. *Contrib. Gray Herb.*, v. 54, 1 – 205, 1918.

BINDESEIL, K.U.; JAKUPOVIC, J.; WOLF, D.; LAVAYRE, J.; LEBOUL, J.; PYL, D.V.D.: Pure compound libraries: a new perspective for natural product based drug discovery, *DDT*, v. 6, no.16, 840 – 847, 2001.

BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B.: Basic biotechnology, 2nd ed. Academic Press, 228, 1987.

BUCHANAN, B. et al. Natural products (secondary metabolites), biochemistry & molecular biology of plants, American Society of Plants Physiologists, cap. 24, 1250 – 1319, 2000.

CANNELL, R.J.P.: Natural products isolation. Ed. Humana Press Inc., 441, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.: Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, v. 21, 99 – 103, 1998.

COMERIO, R.M.: Nefrotoxinas y especies nefrotóxicas del género *Penicillium* Link. *Ver. Iberoam. Micol.*, v. 7, 82-89, 2000.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A.: Biotecnolgia, manual de microbiologia industrial, Ed. Acribia S.A., 331-352,1993.

DA COSTA, F.B.; SCHORR, K.; ARAKAWA, N.S.; SCHILLING, E.E.; SPRING, O.: Infraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae: Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 12, São Paulo, 403 – 407, 2002.

ELDRIDGE, G. R.; VERVOORT, H.C.; LEE, C.M.; CREMIN, P.A.; WILLIANS, C.T.; HART, S.M.; GOERING, M.G.; O´NEIL-JOHNSON, M.; ZENG, L.: High-throughput method for the production and analysis of large natural products libraries for drug discovery. *Anal. Chem.*, v. 74, 3963 – 3971, 2002.

FREITAS, T.P.S.; FURTADO, N.A.J.C.; BASTOS, J.K.; SAID, S.: Active substances against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and microorganisms are produced in sequence by *Talaromyces flavus*. *Microbiol. Res.*, v. 157, 201 – 206, 2002.

FISHER, F.; COOK, N.B.: Micologia. Fundamentos e diagnósticos, Ed. Livraria e Ed. Revinter, v. 10, 44 – 55, 76 – 79, 2001.

GALAL, A.M.; IBRAHIM, A.S.; MOSSA, J.S.; EL-FERALY, F.S. Microbial transformation of parthenolide. *Phytochemistry*, v. 51, 761 – 765, 1999.

GEISER, D.M.; TIMBERLAKE, W.E.; ARNOLD, M.L.: Loss of meiosis in *Aspergillus*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 13, 96, 809 – 817, 1996.

GIRI, A.; DHINGRA, V.; GIRI, C.C.; SINGH, A.; WARD, O.P.; NARASU, M.L.: Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzymes systems: current trends and future prospects. *Biotechnol. Adv.,* v. 19, 175 – 199, 2001.

GODFREY, T.; WEST, S.: Industrial enzymology. 2nd ed., Ed. Macmillan Press LTD, 155 – 175, 265 – 272, 1996.

GRIFFIN, D.H.: Fungal physiology, 2nd ed., Ed. Wiley-Liss, 1994.

GUILLET, G.; CHAURET, D.; ARNASIN, J.T.: Phototoxic polyacetylenes from *Viguiera annua* e adaptations of a Chrysomelid beetle, *Zygogramma continua*, feeding on this plant. *Phytochemistry*, v. 45, no. 4, 695 – 699, 1997.

HERZ, W.; KUMAR, N. Heliangolides from *Helianthus maximiliani*. *Phytochemistry*, v. 20, 93 – 98, 1981.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S.: Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Med.*, v. 63, 2 – 10, 1997.

HOUGHTON, P.J.: Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytother. Res.*, v. 14, 419 – 423, 2000.

KIESEL, W.; ZIELINSKA, K. Guaianolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, v. 47, 523 – 527, 2001.

KRISHNA KUMARI, G.N.; MASILAMANI, S.; GANESH, M.R.; ARAVIND, S.. Microbial transformation of zaluzanin-D. *Phytochemistry,* v. 62, 1101 – 1104, 2003.

LAMARE, V.; FURTOSS, R. Bioconversion of sesquiterpenes. *Tetrahedron,* v. 46, no. 12, 4109 – 4132, 1990.

LIMA, N.; MOTA, M.: Biotecnologia. Fundamentos e aplicações, Ed. Lidel, 157, 2003.

LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.: Biotecnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos, vol. 3., 1ª ed., Ed. Edgard Blücher LTDA, 179 – 197 e 518, 2001.

LUCKNER, M. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals, Alemanha, Ed. Springer-Verlag, 1990.

MAGNOLI, C.; DALCERO, A.M.; CHIACCHIERA, S.M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M.A.: Enumeration and Identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathology*, v. 142, no. 1, 27 – 32, 1998.

MANSILLA, H.; PALENZUELA, J.A.: Minor eudesmanolides from *Artemisia canariensis*, *Phytochemistry*, v. 51, 995 – 997, 1999.

MERAGELMAN, K.M.; ESPINAR L.A.; SOSA, V.E.; URIBURU, M.L.; FUENTE, J.R.: Terpenoids constituents of *Viguiera tucumanensis*. *Phytochemistry*, v. 41, no. 2, 499 – 502, 1996.

MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, 55 – 63, 1983.

OHNO, N.; MABRY, T.J.: Sesquiterpene lactones and diterpene carboxylic acids in *Helianthus niveus* subspecies *canescens*. *Phytochemistry*, v. 19, 609 – 614, 1981.

ORABI, K.Y.; GALAL, A.M.; IBRAHIM, A.S.; EL-FERALY, F.S.; KHALIFA, S.I; EL-SOHLY, H.N. Microbial metabolism of artemisitene. *Phytochemistry*, v. 51, 257 – 261, 1999.

PARSHIKOV, I.A.; MIRIYALA, B.; MURALEEDHARAN, K.M.; AVERY, M.A.; WILLIAMSON, J.S. Microbial transformation of artemisinin to 5-hydroxyartemisinin by *Eurotium amstelodami* and *Aspergillus niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 33, 349 – 352, 2006.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R: Microbiologia. Conceitos e aplicações. Vol. 1, 2ª ed., Ed. Pearson Makron Books, 1997.

PEREIRA, P.S.; DIAS, D.A.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A.M.T.T., HERZ, W.: Sesquiterpene lactones from Brazilian *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry*, v. 45, no. 7, 1445 – 1448, 1997.

PETIT, K.E.; MONDEGUER, F.; ROQUEBERT, M.F.; BIARD, J.F.; POUCHUS, Y.F.: Detection of griseofulvin in a marine strain of *Penicillium waksmanii* by ion trap mass spectrometry. *J. Microbiol. Meth.*, v. 58, 59 – 65, 2004.

PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 14, no. 3, 255 – 281, 1986.

RAHMAN, A.; FAROOQ, A.; CHOUDHARY, M.I. Microbial transformation of sclareolide. *J. Nat. Prod.*, v. 60, 1038 – 1040, 1997.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry,* v. 15, 1573 – 1580, 1976.

ROMO DE VIVAR, A.; GUERREIRO, C.; DÍAZ, E.; BRATOEFF, E. A.; JIMÉNEZ, L. The germacranolides of *Viguiera buddleiaeformis*: structures of budlein-A and –B. *Phytochemistry,* v. 15*,* 525 – 527, 1976.

ROSE, A.H.: Microbial enzymes and bioconversions. Economic microbiology, v. 5, Academic Press Inc., 01 – 46, 1980.

SCHILLING, E.E.; DA COSTA, F.B.; LOPES, N.P.; HEISE, P.J.: Brazilian species of *Viguiera* (Asteraceae) Exhibit low levels of ITS sequence variation. *Ebinb. J. Bot.,* v. 57, 323 – 332, 2000.

SCHMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. *Curr. Org. Chem.*, v. 3, 577 – 608, 1999.

SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A.J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I.; DA COSTA, F.B.: Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF-κB. *Phytochemistry*, v. 60, 733 – 740, 2002.

SCHUSTER A.; STOKES, S.; PAPASTERGIOU, F.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; JAKUPOVIC, J. Sesquiterpene lactones from two *Tithonia* species. *Phytochemistry*, v. 31, no. 9, 3139 – 3141, 1992.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6ª ed., Editora LTC, 2000.

SKEHAN, P. STORENG, R. SCUDIERO, D. A new colorimetric cytotoxic assay for anticancer drug screening, *J. Nat. Cancer*, v. 82, 1107 – 1112, 1990.

SPRING, O.; BUSCHMANN, H.; VOGLER, B.; SCHILLING, E.E.; SPRAUL, M.; HOFFMANN, M.. Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from on-line LC-NMR measurements. *Phytochemistry,* v. 39, no.3, 609 – 612, 1995.

SPRING, O.: Microsampling: an alternative approach using sesquiterpene lactones for systematics. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 17, no. 7/8, 509 – 517, 1989.

STEFANI, R.; EBERLIN, M.N.; TOMAZELA, D.M.; DA COSTA, F.B.: Eudesmanolides from *Dimerostemma vestitum*, *J. Nat. Prod.*, v. 66, 401 – 403, 2002.

STILL, W.C., KAHN, M., MITRA, A.: Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, v. 43, no. 14, 1978.

THOMAS, G.: Química medicinal. Ed. Guanabara Koogan, São Paulo, 2003.

UMEYAMA, H., NAGAI, T., NOGAMI, H. *Chem. Pharm. Bull*, v. 19, 1714, 1971.

YOKOYAMA, K.; WANG, L.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.: Identification of the *Aspergillus* section *Nigri*, inferred from mitochondrial cytochrome *b* gene. *FEBS Microbiol. Lett.*, v. 200, 241 – 246, 2001.

ZHAN, J.; ZHANG, Y.; GUO, H.; HAN, J.; NING,L.; GUO, D. Microbial metabolism of artemisinin by *Mucor polymorphosposrus* and *Aspergillus niger*. *J. Nat. Prod.*, v. 65, 1693 – 1695, 2002.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the *Compositae*, seen with the eyes of a chemist. *Pl. System. Evol.* v. 171, 1 – 14, 1990.