UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártica

Verônica Rego de Moraes

Ribeirão Preto

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico
Aspergillus unguis obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Verônica Rego de Moraes

Orientador: Profa. Dra. Hosana Maria Deboni

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 18/07/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

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.

Moraes, Verônica Rego

Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártica. Ribeirão Preto, 2017.

93 p.: il.;

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientadora: Debonsi, Hosana Maria.

1.Fungo endofítico. 2.*Aspergillus unguis*. 3.Antártica. 4.Produtos naturais marinhos.
5.Isolamento

FOLHA DE APROVAÇÃO

Verônica Rego de Moraes

Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico
Aspergillus unguis obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártica

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Hosana Maria Debonisi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho
a minha família,
especialmente meus
pais Rosana e Pedro
que estiveram ao meu
lado nos momentos
bons e ruins.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (FCFRP-USP) pela oportunidade.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS-FCFRP-USP) pelo apoio técnico.

Aos meus colegas do grupo de Química Orgânica do Ambiente Marinho (QOAM), Gabriel, Bianca, Wellington, Lorene, Ezequiane, Thaiz e Mariana pela amizade e aprendizado nesse período.

À Profa. Dra. Hosana Maria Deboni pela orientação e apoio.

Aos especialistas de laboratório José Carlos Tomaz, Izabel Cristina Casanova Turatti e Vinícius Palaretti pela realização das análises cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas essenciais para a conclusão deste trabalho.

A aluna de doutorado Caroline Arruda, pela disponibilidade e parceria no isolamento das minhas substâncias.

A aluna de doutorado Karen Rangel, pela disponibilidade de me ensinar nos experimentos de fotoproteção.

A técnica Daniela Ricardo Engracia Caluz por ser sempre presente e disponível para qualquer problema do laboratório.

Aos meus amigos Maísa, Victor, Júlia, Lívia e meu namorado pela paciência e pelos conselhos nos momentos difíceis.

À CAPES pelo apoio financeiro e/ou bolsa. À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A força se consegue com fracassos e não com os sucessos.”

COCO CHANEL

Resumo

MORAES, V. R. **Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* obtido da alga *Palmaria decipiens* proveniente da Antártica.** 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Organismos marinhos são reconhecidos por apresentarem potencial elevado para a produção de produtos naturais com estruturas moleculares únicas. Neste âmbito marinho, os fungos endofíticos são considerados como uma fonte promissora de substâncias bioativas, apresentando moléculas oriundas do metabolismo secundário mais significativas biologicamente do que aquelas produzidas por seus hospedeiros. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação dos perfis químico e biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* isolado da alga *Palmaria decipiens*, proveniente da Ilha Robert, Antártica. Para análise dos metabólitos secundários produzidos por *A. unguis* foram utilizados métodos cromatográficos como cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como técnicas espectroscópicas e espectrométricas de RMN 1-D e 2-D, CL-EM, CG-EM, inclusive para elucidação estrutural das substâncias isoladas. Todos os dados obtidos foram comparados com aqueles descritos na literatura e/ou com aqueles apresentados no software MarinLit® e o Dicionário de Produtos Naturais. Foram isoladas três substâncias do fungo estudado: Nidulina (DEP-1), pico 4-fração 8 (DEP-2) e pico 6-fração 8 (DEP-3). Todas são moléculas da classe das depsidonas, cuja nidulina já é uma molécula reportada na literatura. As outras duas são estruturas inéditas na literatura até o presente momento, uma vez que ainda não foram encontrados dados possibilitando a comparação com moléculas conhecidas. Concomitantemente, foram realizados experimentos para avaliação da atividade biológica de extratos, frações e substância isolada. As substâncias DEP-2 e DEP-3 foram submetidas para avaliação do potencial leishmanicida. As promastigotas IC_{50} para DEP-2 foram $68,1 \pm 8,1$, com índice de seletividade de 5,7, enquanto para os amastigotas o valor foi de $55,9 \pm 0,6$, com índice de seletividade 6,9, em comparação com os controles Amfotericina B com IC_{50} promastigota $3,5 \pm 0,03$ com índice de seletividade 6,6 e IC_{50} amastigotas $5,3 \pm 0,2$, índice de seletividade 4, 6 e Pentamidina com IC_{50} promastigotas $29,9 \pm 0,08$, índice de seletividade 1,2 e amastigotas IC_{50} $18,2 \pm 0,6$, 1,9. Para DEP-3, o IC_{50} para promastigotas foi de $69,6 \pm 0,7$, com índice de seletividade 1,2. Considerando que a IC_{50} para amastigotas foi de $55,0 \pm 0,2$, com índice de seletividade 1,6, em comparação com os controles Amfotericina B com IC_{50} promastigote $3,48 \pm 0,03$, com índice de seletividade 6,6 e IC_{50} amastigotas $5,3 \pm 0,2$, índice de seletividade 4,6. Pentamidina com promastigotas IC_{50} $29,9 \pm 0,08$, índice de seletividade 1,2 e amastigotas IC_{50} $18,2 \pm 0,6$; índice de seletividade 1,9. O DEP-1 foi submetido para a avaliação da fotoestabilidade e fototoxicidade como considerado foto estável com uma queda na fotoestabilidade inferior a 0,1. E a DEP-2 e a DEP-3 estavam em mistura foram enviadas para análise da atividade microbiana e concluiu-se que há atividade sinérgica contra *S. aureus*, uma vez que o DEP-2 sozinha apresentou CIM de 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e em mistura foi obtido CIM de 6,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Palavras-chave: *Aspergillus unguis*. Fungo endofítico. Produtos naturais marinhos. Antártica, Nidulina.

Abstract

MORAES, V. R. **Chemical prospection and evaluation of the biological potential of the endophytic fungus *Aspergillus unguis* obtained from the algae *Palmaria decipiens* from Antarctica.** 2017. 93 f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Marine organisms are recognized by present high potential for the production of natural products with unique molecular structures. In this context, the endophytic fungi are considered as a promising source of bioactive compounds, showing molecules from the secondary metabolism more biologically meaningful than those produced by their hosts. Within this context, this work had as main objective the evaluation of the chemical and biological profiles of the endophytic fungus *Aspergillus unguis* isolated from the alga *Palmaria decipiens*, from Robert Island, Antarctica. For analysis of secondary metabolites produced by *A. unguis* chromatographic methods were used as thin-layer chromatography (CCD) and high performance liquid chromatography (HPLC), as well as spectroscopic and spectrophotometric techniques such as NMR 1-D and 2-D, LC-MS, GC-MS, including for structural elucidation of isolated substances. All the data obtained were compared with those described in the literature and/or with those presented in the MarinLit ® software and the Dictionary of Natural Products. From the studied fungi, three substances were isolated: Niduline (DEP-1), peak-4 fraction-8 (DEP-2) and peak-6 fraction-8 (DEP-3). All molecules present depsidone skeleton, whose Niduline is the most molecule reported in the literature. The other two are unpublished structures in the literature up to the present time, since until now it has not yet been found enabling data for comparison with known molecules. At the same time, experiments were performed to evaluate the biological activity of extracts, fractions and isolated substance. The substances DEP-2 and DEP-3 were submitted to test to evaluate the leishmanicidal potential. The promastigotes IC_{50} for DEP-2 was 68.1 ± 8.1 , with selectivity index was 5.7; while for amastigotes the value was 55.9 ± 0.6 , with selectivity index 6.9, compared with controls Amphotericin B with IC_{50} promastigote 3.5 ± 0.03 with selectivity index 6.6, and IC_{50} amastigotes 5.3 ± 0.2 ; selectivity index 4.6 and Pentamidine with IC_{50} promastigotes 29.9 ± 0.08 , selectivity index 1.2 and IC_{50} amastigotes 18.2 ± 0.6 , selectivity index 1.9. For DEP-3 the IC_{50} for promastigotes was 69.6 ± 0.7 , with selectivity index 1.2; whereas the IC_{50} for amastigotes was 55.0 ± 0.2 , with selectivity index 1.6, compared with controls Amphotericin B with IC_{50} promastigote 3.48 ± 0.03 , with selectivity index 6.6 and IC_{50} amastigotes 5.3 ± 0.2 , selectivity index 4.6. Pentamidine with IC_{50} promastigotes 29.9 ± 0.08 , selectivity index 1.2 and IC_{50} amastigotes 18.2 ± 0.6 , selectivity index 1.9. DEP-1 was submitted for evaluation of photostability and phototoxicity as considered photostable with a drop in photostability of less than 0.1. Since the compounds DEP-2 and DEP-3 were sent in a mixture for analysis of the microbial activity and it was concluded that there is a synergistic activity against *S. aureus*, since DEP-2 alone had a MIC of 100 $\mu\text{g/mL}$ and in mixture obtained a MIC of 6.25 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: *Aspergillus unguis*. Endophytic fungus. Natural marine products. Antarctica. Niduline.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias isoladas de origem marinha ao longo dos anos.

Figura 2. Metabólitos isolados do fungo endofítico *Aspergillus unguis*.

Figura 3. Macrocultivo do *Aspergillus unguis*.

Figura 4. Microcultivo observado em microscópio eletrônico em aumento de 400x do *A. unguis*

Figura 5. Cultivo do *A. unguis* em meio arroz.

Figura 6. Cultivo do *A. unguis* em meio PDB.

Figura 7a. Cromatograma da eluição em escala analítica do extrato bruto do fungo *Aspergillus unguis* – 28 dias em meio arroz – Branco – linha verde e Extrato Bruto – linha preta.

Figura 7b. Cromatograma da eluição em escala analítica do extrato bruto do fungo *Aspergillus unguis* – 28 dias em meio PDB – Branco – linha verde e Extrato Bruto – linha preta.

Figura 8. Cromatograma da DEP-1 oriunda do extrato bruto de arroz do *A. unguis*.

Figura 9. Perfil químico por HPLC-DAD do DEP-1 do *A. unguis*.

Figura 10. Análise do espectro na região do UV por HPLC-DAD na região do pico 2 isolado a partir do *A. unguis*.

Figura 11a. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-1. Pico em m/z 441,037 corresponde ao aduto $[M - H]^-$.

Figura 11b. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-1, mostrando a frequência isotópica de 3 cloros $[M]$, $[M+2]$, $[M+4]$.

Figura 11c. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância DEP-1.

Figura 12. Cromatograma CG-EM da substância DEP-1.

Figura 13. Espectro de RMN de 1H substância DEP-1, 500 MHz, solvente CD_3OD .

Figura 14. Ampliação da região entre 5,31-5,36 ppm do espectro de RMN 1H da substância DEP-1, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 15. Experimento COSY 1H - 1H da substância DEP-1, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 16. Experimento HMBC da substância DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 17. Experimento HSQC da substância DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 18. Espectro de ¹³C da substância DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 17. Experimento HSQC do isolado DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 18. Espectro de ¹³C do isolado DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 19. Estrutura da Nidulina isolada do pico 2 – fração 21*.

Figura 20. Método analítico da fração 8, F.M. Isocrático 90%MeOH, F.E. C8, do *A. unguis*.

Figura 21a. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-2. Pico em m/z 427,1354 corresponde ao aduto $[M - H]^-$.

Figura 21b. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância DEP-2. Pico em m/z 429,1457 corresponde ao aduto $[M + H]^+$.

Figura 22. Cromatograma obtido via CG-EM da substância DEP-2 do *A. unguis*.

Figura 23. Espectro de RMN de ¹H da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 24. Ampliação da região de dupla (5,4-5,5 ppm) do espectro de RMN ¹H da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 25. Experimento COSY ¹H-¹H da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD..

Figura 26. Experimento HMBC da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 27. Experimento HSQC da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 28. Espectro de ¹³C da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 29. Proposta de estrutura da substância isolada DEP-2, comparada com substância Emeguisina B.

Figura 30. Método analítico, fração 8 do *A. unguis*, F.M. isocrático 90% MeOH, C₈.

Figura 31a. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) a substância DEP-3. Pico em m/z 441,0340 corresponde ao aduto $[M - H]^-$.

Figura 31b. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-3, mostrando a frequência isotópica de 3 cloros $[M]^-$, $[M+2]^-$, $[M+4]^-$.

Figura 31c. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância DEP-3

Figura 32. Cromatograma CG-EM da substância DEP-3 do *A. unguis*.

Figura 33. Espectro de RMN de ^1H da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 34. Ampliação da região dos hidrogênios ligados ao C do grupo etoxílico do espectro de RMN ^1H da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 35. Experimento COSY ^1H - ^1H da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 36. Experimento HMBC da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 37. Experimento HSQC da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 38. Espectro de ^{13}C da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 39. Espectro de ^{13}C DEPT da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 40. Estrutura proposta para base da substância DEP-3.

Figura 41. Varredura de absorção no UV dos extratos brutos de *A. unguis* dos meios de culturas PDB e arroz.

Figura 42. Ensaio de fotodegradação extrato do fungo endofítico *A. unguis* do meio arroz. Soluções em metanol com concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A linha vermelha representa o extrato não irradiado (não irr.) e a linha preta os irradiados (irr).

Figura 43. Ensaio de fotodegradação das frações Fr15, Fr 20 e Fr 21* do fungo *A. unguis*. Soluções em isopropanol à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Frações irradiadas em preto (irr) e não irradiadas em vermelho (não irr).

Figura 44. Fotoestabilidade do DEP-1 do *A. unguis*.

Figura 45. Curva dose-resposta do extrato bruto da *A. unguis* (gráficos gerados pelo *Software Phototox* versão 2.0). Pontos azuis referentes às placas não irradiadas e os amarelos às irradiadas.

Figura 46. Curva dose-resposta do DEP-1 (gráficos gerados pelo *Software Phototox* versão 2.0). Pontos azuis referentes às placas não irradiadas e os amarelos às irradiadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de PDB *A. unguis* em coluna de Sephadex LH 20.

Tabela 2. Picos majoritários observados via análise em CG-MS do extrato bruto do *A. unguis* (cultivo em meio PDB).

Tabela 3. Comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância DEP-1 e da Nidulina.

Tabela 4. Comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da DEP-2 com dados da literatura para *Acarogobiena A* (Rezanka & Guschina, 1999).

Tabela 5. Comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do DEP-3.

Tabela 6. Integral do espectro de absorção da substância isolada DEP-1 na faixa UVA e da UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não a irradiação.

Tabela 7. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das frações do extrato bruto do meio PDB de *A. unguis*.

Tabela 8a. Índices de IC_{50} da amostra do extrato bruto de *A. unguis* usando Anfotericina B e Pentamidina como controle positivos.

Tabela 8b. Índices de IC_{50} das frações do *A. unguis* usando Anfotericina B e Pentamidina como controle positivos.

Tabela 9. Índices de IC_{50} do DEP-3, usando Anfotericina B e Pentamidina como controle positivos.

Tabela 10. Índices de IC_{50} da DEP-2, usando Anfotericina B e Pentamidina como controle positivos.

Tabela 11. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da amostra de extrato bruto do *A. unguis* testada frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabela 12. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das frações obtidas do extrato bruto *A. unguis*.

Tabela 13. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do DEP-2.

Tabela 14. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do DEP-2 e DEP-3.

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1. Peso dos extratos brutos do meio arroz e PDB do fungo *A. unguis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC American Type Culture Collection

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

B.O.D. Câmara Incubadora

C₈ Octil silano

CBM Concentração Bactericida Mínima

CCDC Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CD₃OD Metanol deuterado

CG-EM Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CH₂Cl₂ Diclorometano

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

COSY¹H Espectroscopia de correlação de hidrogênio (Correlation Spectroscopy)

DMEM Meio Dulbecco MEM

DMSO Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DPBS A solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EM/EM Espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas

ESI-TOF Ionização por electrospray com detector por tempo de voo (Electrospray ionization-Time of Flight)

FCFRP Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FDA Administração de Comida e Remédios

HMBC Correlação de ligação múltipla heteronuclear

HSQC Heteronuclear Single Quantum Coherence

IC₅₀ Concentração inibitória máxima metade

CC₅₀/CI₅₀ Índice de seletividade

ICN Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Plantas e Fungos

IK Índice de retenção de Kovats

IQ Instituto de Química

ITS Espaçador transcrito interno

KBr Brometo de Potássio

KI Iodeto de Potássio

KF Fluoreto de Potássio

LQOAM Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho

m/z Relação massa/carga

MeOH Metanol

MPE Fotoefeito médio

NCBI Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

NCCLS Comitê Nacional de Padrões de Laboratório Clínico

NPPNS Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos

OECD Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PCR Reação de polimerase em cadeia

PDA Agar Dextrose Batata

PDB Caldo Dextrose Batata

PIF Fator de fotoirradiação

RMN Ressonância magnética nuclear

TE Tris+EDTA

TIC corrente iônica total

TMS Tetrametilsilano

USP Universidade de São Paulo

UV Ultravioleta

WoRMS Registro Mundial de Espécies Marinhas

YPD Extrato de levedura a 1%, peptona a 2% e glicose a 2%

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Ambiente marinho e Produtos Naturais.....	20
1.2 Produtos naturais marinhos: retrospectiva e perspectivas futuras.....	22
1.3 Evolução da pesquisa com produtos naturais marinhos.....	26
1.4 <i>Aspergillus unguis</i> e seus metabólitos.....	28
2. OBJETIVO GERAL.....	33
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Material e solventes utilizados.....	34
3.1.1 Solventes.....	34
3.1.2 Meio de cultura.....	34
3.1.3 Cromatografia em Camada Delgada.....	34
3.1.4 Cromatografia Líquida.....	34
3.1.5 Equipamentos.....	35
3.2 COLETA E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	35
3.2.1 Coleta.....	35
3.2.2 Identificação taxonômica dos fungos.....	35
3.2.3 Verificação da viabilidade e da pureza do fungo isolado.....	35
3.2.4 Extração do DNA genômico.....	35
3.3 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO ISOLADO.....	36
3.3.1 Identificação clássica.....	36
3.3.2 Identificação molecular do fungo.....	37
3.4 ESTABELECIMENTO DOS CULTIVOS E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	38
3.4.1 Cultivo em meio sólido.....	38

3.4.2 Cultivo em meio líquido.....	38
3.5 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO, TRIAGEM QUÍMICA PRELIMINAR DOS METABÓLITOS.....	39
3.5.1 Extração, fracionamento e triagem química preliminar.....	39
3.6 ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ISOLADOS QUÍMICOS.....	39
3.6.1 Isolamento.....	39
3.6.2 Isolamento e elucidação estrutural DEP-2.....	40
3.6.3 Isolamento e elucidação estrutural DEP-3.....	40
3.6.4 Isolamento e elucidação estrutural DEP-1.....	41
3.6.5 Análise em CG-EM.....	41
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E ISOLADOS.....	42
3.7.1 Ensaio da Atividade Bacteriana.....	42
3.7.2 Ensaio da Atividade Biológica Leishmanicida.....	43
3.7.2.1 Determinação do IC ₅₀ em formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	43
3.7.2.2 Determinação do IC ₅₀ em formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e citotoxicidade em macrófagos mucarinos CC ₅₀	44
3.7.3 Determinação do Espectro de Absorção no UV e da Fotodegradação dos compostos.....	45
3.7.4 Avaliação da Fototoxicidade em Cultura de Fibroblastos em Monocamadas (3T3 NRU).....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1 Estabelecimento do meio de cultivo e confirmação espécie do fungo.....	48
4.2 Fracionamento do extrato bruto do meio PDB do <i>A. unguis</i> : triagem química fração hexânica, isolamento e identificação das substâncias.....	50
4.2.1 Isolamento e elucidação estrutural da DEP-1.....	53
4.2.2 Isolamento e elucidação estrutural da DEP-2.....	62

4.2.3 Isolamento e elucidação estrutural da DEP-3.....	69
4.3 Determinação do espectro de Absorção no UV e da Fotodegradação.....	79
4.4 Avaliação da fototoxicidade em Cultura de Fibroblastos em Monocamadas (3T3 NRU).....	81
4.5. Avaliação da Atividade Biológica Leishmanicida.....	83
4.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima.....	84
5. CONCLUSÃO.....	87
6. REFERÊNCIA.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ambiente marinho e Produtos Naturais

A natureza, desde a pré-história é vista para o homem como um provedor de alimentos e medicamentos naturais. Com o passar dos anos concomitante com o avanço da Ciência foi percebido que o chá utilizado pelos nossos ancestrais para uma determinada enfermidade surtia, cientificamente, devido à presença de substâncias biologicamente ativas. Isso fez com que a natureza se tornasse fundamental para a produção de novos fármacos naturais, ou inspiração para desenvolvimentos de protótipos de moléculas sintéticas.

O ecossistema marinho se faz importante dentro do conceito da natureza, pois totaliza 95% da biosfera da Terra. Inserido nessa porcentagem, existe uma abundância de organismos com mais de 300 mil espécies, sendo ainda um ecossistema muito pouco estudado e assim, podendo haver uma diversidade maior de organismos, tanto macro como de microrganismos (GOGINENI et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Os oceanos, devido a fatores físicos e sua dimensão faz com que o ecossistema marinho se torne um ambiente singular com uma vasta diversidade química (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

O universo marinho tem se revelado uma fonte diversa e rica de novos e bioativos produtos naturais, culminando em um aumento no número de novas pesquisas voltadas para esta área. No Catálogo da vida são descritos 60 filos como oriundos do ambiente marinho, em um total de mais de 76 filos dos eucariotos (BLUNT; BUCKINGHAM; MUNRO, 2012) e que até nos dias de hoje foram reconhecidas no Registro Mundial de Espécies Marinhas cerca de 242.745 espécies (WORMS, 2016). Dentro dessa variada biodiversidade, foram avaliados diversos organismos marinhos como, corais moles, esponjas, lesmas do mar, tunicados entre outros; visando a busca de metabólitos naturais bioativos (HUSSEIN & MOHAMED, 2015).

Gogineni et al., (2015) descreveram que 60% dos fármacos que possuem atividade antitumoral são oriundos de fontes naturais. Os organismos marinhos produzem as substâncias com vários propósitos, como feromônios de atração sexual, metabólitos para mecanismos de defesa, competição por espaço e nutrientes dentre outros, para que estes possam coexistir em ambientes com restrição ecológica e assim perpetuar sua espécie. Isso resulta em uma evolução da espécie que se torna capaz de mediar interações ecológicas e faz com que haja um aumento da sobrevivência, quando comparada caso o organismo não produzisse estes metabólitos secundários (NÚÑEZ-PONS; ÁVILA, 2015; BLUNT et al., 2016). Consequentemente, a presença desses metabólitos bioativos está relacionada à existência de estímulos externos (CHEN et al., 2014). Em razão disso, o conjunto de condições ambientais

exclusivos dos mares e oceanos como acidez ou alcalinidade das águas, salinidade, concentração de oxigênio, clima, pressão, incidência de radiação ultravioleta e disponibilidade de nutrientes, caracterizam um importante fator na complexidade na produção das substâncias químicas (CRAGG & NEWMAN, 2013; FELCZYKOWSKA et al., 2012).

Esses fatores resultam em compostos isolados que apresentam um grau de complexidade superior quando comparados a compostos isolados do ambiente terrestre. A complexidade dessas substâncias dá-se pela sua forma espacial, presença de heteroátomos e halogênios (HUSSEIN & MOHAMED, 2015; GRIBBLE, 2015; GERWICK & MOORE, 2012). Por isso, Mohamed et al., (2015) consideram-se que o ambiente marinho possui quantitativamente um número maior de substâncias biologicamente ativas que o ambiente terrestre.

Geralmente, substâncias naturais isoladas do ambiente marinho expressam maior bioatividade quando comparadas com ambiente terrestre, como foi observado em ensaios de citotoxicidade, quando aproximadamente 1% das amostras marinhas testadas apresentaram potencial antitumoral contra 0,1% das amostras terrestres testadas (LI et al., 2015, MUNRO et al., 1999). Com isso, a descoberta dessas novas estruturas químicas, que possuem especificidade por receptores proporcionara o desenvolvimento de novas drogas para as mais diversificadas utilizações terapêuticas, porém com foco principal no tratamento do câncer, sendo esta financiada pelo Instituto Nacional do Câncer do governo Americano (RANGEL & FALKENBERG, 2015; CRAGG; NEWMAN, 2009; GERWICK; MOORE, 2012; GERWICK; FENNER, 2013; TADESSE et al., 2014; BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016).

Devido essa grande variedade percebeu-se que o ambiente marinho não apenas colabora com a produção de novos fármacos, mas também de fornecer outros tipos de produtos como por exemplo para o mercado alimentício, cosmético, agroquímicos, meios de cultura entre outros (MOGHADAMTOUSI et al., 2015; BLUNT et al., 2016; CHEUNG et al 2015; GOGINENI et al., 2015; GRIBBLE, 2015; HONG et al., 2015; HUSSEIN & MOHAMED, 2015; RANGEL & FALKENBERG, 2015).

Estudos onde se tem como ponto de partida organismos marinhos brasileiros têm levado a descoberta de uma grande gama de classe de compostos como alcaloides, peptídeos e policetídeos. Estes metabólitos demonstraram potencial biológico expressivo, em estudos de atividades anticancerígenas, antimicrobiana, antifúngica (IÓCA; ALLARD; BERLINCK, 2014). O potencial de microrganismos marinhos taxonomicamente variados fica bastante claro em revisões publicadas recentemente, que descrevem principalmente as atividades

antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica e antiviral de seus metabólitos (BLUNT et al 2016; CHEUNG et al., 2016; CHEUNG et al., 2015; GOGINENI et al., 2015; GRIBBLE, 2015; HABBU et al., 2016; HONG et al., 2015; HOU et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; SATO, 2015; SWAIN et al., 2015). Levando em consideração que uma fração menor que 0,1% das espécies microbianas existentes nos oceanos são devidamente conhecidas, há um interesse na investigação desta fonte de metabólitos secundários para um maior entendimento dentro do ecossistema em que está inserido, assim como, descobertas de novos metabólitos para o uso em patologias humanas (HOU et al., 2015; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Por isso, atualmente existem diversos grupos de pesquisas voltados para o estudo de fungos marinhos e cianobactérias, com o objetivo de identificar produtos bioativos (GERWICK & MOORE, 2012). Enfim, pode-se esperar, no futuro, um aumento de medicamentos oriundos do ambiente marinho resultado de crescente pesquisa que vem sendo realizadas nesses últimos anos (ZHANG et al., 2016; RANGEL & FALKENBERG, 2015).

1.2 Produtos naturais marinhos: retrospectiva e perspectivas futuras

As primeiras substâncias naturais bioativas relatadas na literatura que serviram como protótipos para medicamentos foram descobertas na metade do século passado (BERGMANN & FEENEY, 1951). Modificações estruturais das moléculas naturais através de sínteses resultaram em drogas antivirais e antileucêmicas desenvolvidas nos anos 70, incluindo o primeiro tratamento efetivo contra infecção por HIV (RANGEL & FALKENBERG, 2015; GOGINENI et al., 2015).

Atualmente, dos diversos medicamentos aprovados pela FDA, nove são de origem marinha (Food and Drug Administration – EUA) e pelo menos 13 fármacos estão em fase de estudos avançados visando diversas aplicações, desde anti-inflamatórios até medicamentos para o tratamento de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer e a esquizofrenia (CHEUNG et al 2016; ZHANG et al., 2016; RANGEL & FALKENBERG, 2015; BOURGUET-KONDRACK & KORNPORST, 2014; GERWICK & FENNER, 2013; NEWMAN & CRAGG, 2016).

Ao contrário das plantas terrestres, que desde muito tempo são utilizadas na medicina, o uso de metabolitos ativos de origem marinha é recente, teve início a pouco mais de 50 anos e vem ganhando um grande reconhecimento nos últimos anos (HUSSEIN & MOHAMED, 2015). Segundo Blunt et al., (2016) entre 1965 a 2014, foram descritos

aproximadamente 25700 novos compostos, da qual 1378 substâncias foram descritas no último ano. Apesar de que, para apenas 25% destas substâncias são reportados estudos de bioatividade, muitas já apresentaram potencial biológico interessante (BLUNT et al., 2016; HOU et al., 2015). Consequentemente, o uso de produtos naturais ou derivados destes constituem cerca de 48% do total de fármacos oferecidos para uso terapêutico entre os anos de 1981 e 2014 (NEWMAN & CRAGG, 2016; DAVID et al., 2015). Consequentemente, o uso de produtos naturais ou derivados destes constitui cerca de 48 % do total de fármacos oferecidos para uso terapêutico entre os anos de 1981 e 2014 (NEWMAN & CRAGG, 2016; DAVID et al., 2015).

Como exemplo de medicamentos oriundos do ambiente marinho temos o nucleosídeo vidarabina (arabinofuranosiladenina ou Ara-A, Vira-A[®]) (Figura 1), desenvolvido por semi-síntese a partir do nucleosídeo espongouridina e então produzido via fermentativa pelo fungo *Streptomyces antibioticus*, sendo utilizado para o tratamento de infecções virais por herpes, vaccinia e varicella-zoster desde 1976 (WHITLEY et al., 1980). Dentre outros medicamentos desenvolvidos a partir do nucleosídeo original espongouridina, temos os antivirais aciclovir (Zovirax[®]) (Figura 1), indicado para o tratamento de infecções por herpes simplex, zoster e varicela (SNOECK et al., 1999); e zidovudina (Retrovir[®]), lançado em 1987 para o tratamento de pacientes infectados pelo vírus HIV (MITSUYA et al., 1985).

A seguir serão apresentados alguns fármacos obtidos a partir do ambiente terrestre. O ziconotídeo é um peptídeo analgésico, que atende pelo nome comercial Prialt[®], acessível no mercado desde 2004, indicado para o tratamento de dor neuropática e crônica. Ele foi inicialmente isolado do veneno do mexilhão *Conus magus* e então sintetizado (MCGIVERN, 2007). O alcalóide tetrodotoxina, isolado de peixes, algas e bactérias, está sendo empregado em testes clínicos para o tratamento de dor neuropática e periférica associadas ao câncer (BANE et al., 2014). Para o tratamento da hipertrigliceridemia também há um medicamento oriundo do ambiente marinho. Este é composto por dois ésteres etílicos do ácido ômega-3 de peixes, comercializados pelo nome de Lovaza[®] (Figura 1), lançado em 2004 (KOSKI, 2008). Os produtos naturais marinhos não se encontram somente em medicamentos. A nereistoxina foi um produto natural marinho que se sobressaiu na agroindústria. Ela foi extraída da poliqueta marinha *Lumbrinereis* sp. e foi protótipo para a síntese do inseticida Cartap (Padan[®]) (4) que é comumente utilizado para o controle de pragas em plantações de laranja e outras culturas (FREITAS, 1990).

De forma geral, a principal atividade biológica utilizada como fonte de pesquisa foi para o tratamento do câncer, onde há atualmente quatro medicamentos disponíveis no mercado: o nucleosídeo sintético citarabina (arabinofuranosilcitidina ou Ara-C, Cytosar-U ®) ilustrado na figura 1 indicada para o tratamento das leucemias não-linfocítica aguda, mielocítica crônica e meníngea desde 1972 (MCCONNELL et al., 1994).

O mesilato de eribulina (Halaven®) aprovado em 2010 para o tratamento de câncer de mama metastático, análogo simplificado da halicondrina B, um poliéter macrocíclico produzido por esponjas marinhas (LIU et al., 2012); o alcalóide semisintético trabectedina (Yondelis®) (figura 1), originalmente produzido pelo tunicado *Ecteinascidia turbinata*, aprovado em 2007 e utilizado como antitumoral de amplo espectro (GALMARINI et al., 2014).

O brentuximab vedotina (Adcetris®), que consiste de um derivado sintético da dolastatina 10 conjugado a um anticorpo (DORONINA et al., 2003), lançado no mercado em 2011 para o tratamento de linfomas (RANGEL & FALKENBERG, 2015).

No âmbito do ambiente marinho, dos 2500 produtos naturais que foram caracterizados em 2013, apenas um torna-se um medicamento aprovado (GERWICK & FENNER, 2013). No período de 2005-2007 foi constatado de que 13 produtos naturais e derivados aprovados para o uso terapêutico, dois são de origem de organismos marinhos (Hussein; Mohamed, 2015).

Uma pesquisa feita anualmente na Nova Zelândia mostrou que o número de novas substâncias marinhas vem sofrendo um aumento considerável. Foi descrito que no período de 2011 a 2014, foram descritos 226 novos produtos de origem marinha. Esses dados são relevantes quando comparados com os números de produtos naturais marinhos descritos na primeira edição em 1984, quando o número de novas substâncias não chegava a 400 (BLUNT et al., 2013; BLUNT et al., 2014; BLUNT et al., 2015; BLUNT et al., 2016). Com o passar dos anos é tido como uma tendência à pesquisa em microrganismos marinhos e estudos recentes vem demonstrando isso através do surgimento de novas substâncias isoladas e com importantes atividades biológicas (BLUNT et al., 2016). Pode-se citar como exemplo de novas substâncias biologicamente ativas as mangromicinas A e B isoladas do actinomiceto *Lechevalieria aerocolonigenes* com atividade antitripanomicida (NAKASHIMA et al., 2014; BLUNT et al., 2016), a substância bastimolida A (Figura 1), um novo macrolídeo que possui uma forte atividade antimalária e foi isolado da cianobactéria marinha *Okeania hirsuta*, identificada como um novo gênero (SHAO et al., 2015). Do fungo marinho *Aspergillus* sp.

XS- 20090B15 foi isolado um agente antiviral, 22-*O*-(*N*-Me-*L*-valil)-21-epi-aflaquinolona B, demonstrado na figura 1 (CHEN et al. 2014; BLUNT et al., 2016).

Figura 1. Substâncias isoladas de origem marinha ao longo dos anos.

Vira-A®

Zovirax®

Ésteres etílicos do ácido ômega-3 de peixes (Lovaza®)

Padan®

Cytosar-U®

1.3 Evolução da pesquisa com produtos naturais marinhos

O número de produtos naturais marinhos caracterizados tem experimentado um crescimento expressivo a partir dos anos 90 (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016). Hussein et al., (2015), descreveram que em um período de 3 anos (2000-2003) foram descritos 2450 novos produtos naturais de origem marinha, uma vez que, no período de 1965 a 1970, foram descritos somente 100. Este aumento no número de produtos naturais descritos deve-se a avanços nos métodos científicos, que engloba desde a coleta e extração dos organismos produtores, um aprimoramento em técnicas elucidção estrutural, síntese química e por fim ensaios biológicos que validam estas substâncias como bioativas (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016; RANGEL & FALKENBERG, 2015; LI et al., 2015).

Para uso em amostragem e para a realização de coleta em ambientes extremos, como o solo antártico, técnicas e equipamentos sofisticados, tem permitido um acesso abrangente a uma fonte inexplorada de biodiversidade (LI et al., 2015). Mesmo assim, estima-se que menos de 0,1% dos microrganismos marinhos são reportados e que uma pequena quantidade deles estão à disposição para serem cultivados em laboratório. Assim, técnicas de

cultivo incluindo modificações no meio de cultura como o uso de meios baseados em água do mar, adição de substâncias modificadoras e outros recursos têm sido empregados para aumentar linhagens de microrganismos com potencial metabólico único (ZHANG et al., 2016). Para determinação e/ou elucidação estrutural com maior precisão são empregadas diversas técnicas de separação em alta resolução (CLAE), juntamente com outros sistemas que fornecem uma grande variedade de informações.

Combinações de diferentes instrumentações na forma de dispositivos hifenados como EC-EM (eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas), CLAE-EM (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas) ou CLAE-RMN (cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ressonância magnética nuclear) são bastante utilizados nas pesquisas atuais em produtos naturais (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016; LI et al., 2015). Deve-se levar em consideração a necessidade de levantamentos bibliográficos frequentes e específicos para a área, para que haja um maior êxito no estudo de desreplicação. Scifinder, Dicionário de Produtos Naturais, PubChem, ChemSpider, Antibase, são exemplos de bancos de dados de produtos naturais disponíveis para a realização de pesquisas. O Antimarin e o Marinlit, já são considerados como sites usados para pesquisas específicas de produtos naturais do ambiente marinho (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016).

Técnicas de cromatografia analítica e semipreparativa são utilizadas para fracionar o extrato bruto com o objetivo de obter a fração e consequentemente ter o isolamento da substância de interesse e assim alcançar o acesso a sua bioatividade e elucidação da sua estrutura (PÉREZ-VICTORIA et al., 2016). Apesar da evolução das técnicas utilizadas para a elucidação, as técnicas de espectrometria de massas, a espectroscopia de RMN permanece como carro chefe para a elucidação estrutural de analitos orgânicos, já que juntos obtêm uma grande quantidade de informações estruturais (PÉREZ-VICTORIA et al. 2016; LI et al., 2015).

1.4 *Aspergillus unguis* e seus metabólitos

Fungos marinhos tem a capacidade de produzirem uma gama diversificada e altamente complexa de substâncias, tanto quimicamente quanto biologicamente. O fungo *Aspergillus unguis*, isolado do ambiente marinho é conhecido pela sua capacidade de produzir novos compostos bioativos como, por exemplo, a Nidulina (BUGNI & IRELAND, 2004). O fungo *Aspergillus unguis* foi primeiramente isolado por Émile-Weil & L. Gaudin em 1935.

Ele pertence ao Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichocomaceae e a sua forma anamorfa (assexuada) denomina-se *Emericella unguis*. (Catalogue of Life, 2017). *Aspergillus unguis* situa-se principalmente em locais tropicais e subtropicais, porém já foi reportado na literatura sua presença em ambiente marinho. Sua morfologia se caracteriza por ser um fungo filamentosos, colônias que crescem de maneira ótima em uma temperatura de 30 ° C.

É um fungo altamente adaptável, podendo utilizar-se vários meios de culturas como, ágar Sabouraud maltose, ágar Czapek, para realização de seu crescimento (Mycobank, 2015). As colônias desse fungo configuram-se por ser primeiramente na coloração branca, sendo que posteriormente tornam-se esverdeadas. Com o passar do tempo de cultivo, elas podem chegar a coloração marrom.

Os conidióforos do *A. unguis* são denominados como não-septado, apresentando paredes lisas e com o tamanho de 45-65 µm de comprimento. As cabeças esporuladas maduras têm 250-300 µm de diâmetro. Os conidióforos terminam em vesículas hemisféricas de 9-12 µm de largura. Os conídios têm o formato esférico e medem cerca de 3 µm de diâmetro. As hifas espiculares são asseptadas e atingem um comprimento de 1000 µm ou maior (RAPER., K.B., FENNELL., D.J., 1965).

A classe de metabólitos que esse fungo, assim como seu anamorfo, mais produzem são as depsídonas cloradas e ftálicas, que desde 1987 são relatadas na literatura e continuam sendo isoladas novas moléculas dessas classes. As depsídonas apresentam, além da ligação éster entre duas unidades fenólicas, uma ligação éter. Também são conhecidas pelo potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus* e citotóxico (SULTANA & AFOLAYAN., 2011; KOKUBUN et al., 2007), atividade antimalária (KHUMKOMKHET et al., 2009), inibidor de aromatase e atividade antioxidante (CHAMCHEON et al., 2009), atividade antiviral (HIV) (VLIETINCK et al., 1998) e antifúngica (ABDOU et al., 2010).

Atualmente pesquisas mostraram como atividades biológicas da depsidona a inibição da enzima Rab geranilgeranil transferase (BANNAWARTH et al., 2012). Concluindo assim, que a depsidona possui uma gama variada de atividades biológicas que podem ser importantes para o desenvolvimento de drogas.

Kawara et al. (1987) descreveram a descoberta de uma nova depsidona relacionada à nidulina, que foi denominada como 2-clorounguínol, mostrando sua estrutura molecular na figura 2, e uma nova ftálica, 3-etil-5,7-diidroxi-3,6-dimetilftálica, isoladas juntamente com três outras substâncias já conhecidas: nidulina, nornidulina e unguínol, todas representadas na figura 2.

Na figura 2 pode-se observar a folipastatina, que foi isolada a partir do caldo de cultivo do *A. unguis*, uma nova depsidona que teve uma atividade biológica comprovada contra a inibição da fosfolipase A2 (HAMANO et al., 1992). Em 1998, Kawara et al., relataram na literatura a elucidação estrutural de outras 3 novas moléculas de depsidonas isoladas da *Emericella unguis*. Uma nova classe metabólica, depsida, foi encontrada no anamorfo do *A. unguis* com um potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, que ficou nomeada como guisinol, ilustrada na figura 2.

Sureram et al., (2012), isolaram a partir de um isolado de *A. unguis* do ambiente marinho da Tailândia três novas depsidonas: Aspergilussidona A, B, e C, um novo diaril éter: Aspergilussieter, uma pirona que já era conhecida sinteticamente (20), descritas sua estrutura molecular na figura 2. Além das 3 substâncias conhecidas: nidulina, nornidulina e 2-clorounguinol.

Sabe-se que enzimas, como FADH-2 halogenase dependente e haloperoxidases são responsáveis pela halogenação dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos, e que aqueles podem incorporar outros halogênios em seus produtos naturais formados. A introdução do cloro nas depsidonas é o resultado da atividade desta enzima. O cultivo do fungo *A. unguis* no meio PDB contendo diferentes sais halogenados, como KBr, KI e KF, faz com que as enzimas utilizem estes sais como substrato, ao invés do cloro. Consequentemente, houve-se a descoberta de uma nova substância derivada de depsidona bromada, ao invés de clorada. Com isso, pode-se observar a presença de novos produtos naturais direcionados por biossíntese através da biohalogenação (Sureram, 2013).

No meio PDB contendo o sal KBr, houve o isolamento de 3 novas depsidonas bromadas denominadas aspergillusidona D, E, F; dois derivados de orcinol: aspergillusfenol A e B; um éster bromado e duas moléculas já conhecidas: unguinol e 3-etil-5,7-diidrox-3,6-dimetiltalida. No meio PDB contendo o sal KI, houve o isolamento de uma nova depsidona: 2,4-diclorounguinol, agonodepsida A e quatro moléculas previamente já relatadas na literatura: unguinol, nidulina, nornidulina, 2-clorounguinol também descritas na figura 2. No meio contendo o sal KF observou-se uma toxicidade que impediu o crescimento do fungo (SURERAM et al., 2013).

Figura 2. Metabólitos isolados do fungo endofítico *Aspergillus unguis*.

2-clorounguinol

3-etil-5,7-diidroxi-3,6-dimetilftalida

Nidulina

Nornidulina

Unguinol

Folipastatina

Guisinol

Aspergillusidona B

Aspergilussidona A

Aspergillusidona C

Aspergillusieter

Pirona

Aspergillusidona D

Aspergillusidona E

Aspergillusidona F

Aspergillusfenol A

Aspergillusfenol B

3,5-Dibromo-2,4-dihidroxi-6-metil-ac. benzoico éster metil

2,4-Diclorounguinol

Agonodepsida A

2. OBJETIVO GERAL

Este projeto tem como objetivo geral, a busca por metabólitos biologicamente ativos em uma linhagem de fungo endofítico, cujo código PdMIII 1 pdba, isolado da macroalga *Palmaria decipiens*, a qual foi coletada na Antártica dentro do Programa Antártico Brasileiro – PROANTAR, coordenado pelo professor Pio Colepicolo Neto do Instituto de Química da USP – São Paulo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização morfológica e molecular da linhagem de fungo endofítico associado a macroalga, codificado como PdMIII 1 pdba, isolado da alga *Palmaria decipiens*
- Triagem química (CCDC, CLAE, CL-EM e RMN de ^1H), de extratos e frações obtidos da cultura isolada de microrganismo;
- Realizar o isolamento e elucidação estrutural dos constituintes majoritários das frações mais ativas;
- Avaliação das atividades antibacteriana através do CIM e leishmanicida, por meio de experimentos realizados em colaboração com pesquisadores das respectivas áreas;
- Avaliação do potencial fotoprotetor e de fototoxicidade, através determinação do espectro de absorção no ultravioleta e da fotodegradação dos compostos e avaliação da fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU), por meio de experimentos realizados em colaboração com pesquisadora da área.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e solventes utilizados

3.1.1 Solventes

Solventes para extração, fracionamento e isolamento: solventes orgânicos grau técnico (purificados por destilação fracionada) e de grau analítico da marca Synth;

Solventes deuterados: metanol-D₄ (D 99,8%) e Clorofórmio deuterado 99,9%, ambos sem TMS, da marca Sigma-Aldrich®.

Solventes grau cromatográfico: Metanol e Acetonitrila da marca Merck® e J. T. Baker®.

3.1.2 Meio de cultivo

Meio PDB (Potato Dextrose Broth): (Infusão de batata (200,0 g/L), dextrose (20,0 g/L) – Acumedia®, água do mar natural;

Meio Arroz: 90g de arroz parboilizado esterilizado em autoclave (120 °C, 40 minutos). Ambos meios preparados em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL previamente lavados e autoclavados.

3.1.3 Cromatografia em camada delgada

Placas cromatográficas comparativas (CCDC) de alumínio impregnadas com sílica gel F (254 nm), com 0,25 mm de espessura da marca Fluka Analytical®;

Reveladores: solução comercial de iodo-cloro-platinado da marca Sigma-Aldrich®, iodo ressublimado e luz UV 254 nm.

3.1.4 Cromatografia Líquida

Coluna cromatográfica de vidro com 60 cm de comprimento por 3,5 de diâmetro.

Fase estacionária Sephadex LH-20.

Coluna Synergi Polar-RP 250x10mm, 4 µm.

Coluna Supelco (LC-8 6 x 250 mm; 25 cm).

Coluna Phenomenex (LC-8 1,5 x 250 mm; 25 cm).

3.1.5 Equipamentos

Evaporador rotativo da marca Buchi®, modelo R-210; cromatógrafo da marca Shimadzu®, modelo SCL-10AVP, com detector de arranjo de diodos modelo SDP-M10AVP; Íon-Trap BRUKER-daltonics, Shimadzu®, com bombas, modelo LC-20AD, amostrador SIL-20AHT, detector de arranjo de diodos DAD, modelo SPM-20A, comunicador CBM-20A; espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo micrOTOF II com fonte de ionização em (ESI), com analisador do tipo tempo de voo (TOF), Calibrante: NaTFA (Departamento de Física e Química, FCFRP-USP); Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, equipamento de RMN da marca Bruker, modelo DRX 500 (500 MHz), Departamento de Química-FFCLRP-USP.

3.2 COLETA E ISOLAMENTO DO FUNGO ENDOFÍTICO

3.2.1 Coleta

A alga *Palmaria decipiens* foi coletada na Ilha Robert - Antártica no dia 22/12/2013, pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto sendo coletada uma massa total de 50g. A partir dessa massa de alga congelada foi realizado o isolamento e posterior o cultivo de seus fungos endofíticos, realizado pela técnica do laboratório Daniela Ricardo Engracia Caluz, do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho – NPPNS, FCFRP-USP.

3.2.2 Identificação taxonômica do fungo

Todo o procedimento de purificação e identificação do fungo foi realizado em colaboração com a Profa Dra. Márcia R. V. Z. Kress, da FCFRP-USP. O procedimento experimental total está descrito nos itens 3.2.3 a 3.3.2.

3.2.3 Verificação da viabilidade e da pureza do fungo isolado

O isolado fúngico foi repicado consecutivamente em meio e cultura YPD e incubado a 28° C por cinco dias com o objetivo de obter produto da reprodução assexual do fungo.

3.2.4 Extração de DNA genômico

Aproximadamente 5×10^7 de células fúngicas foram inoculados em 50 mL de meio de cultura YG e incubados a 28°C por 24 horas a 150 rpm para a produção de micélio. Este

micélio foi coletado por filtração e congelado em nitrogênio líquido e triturado com o auxílio de cadinho e pistilo. Para cada 40 mg de micélio triturado foi acrescentado 480 uL de Tampão de Extração de DNA (Tris-HCl pH 8,5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5% (p/v)). Foi adicionado em cada amostra, um volume igual de Fenol-Clorofórmio (1:1) e agitado vigorosamente por 10 minutos para precipitar as proteínas e quebrar as membranas e paredes das células. Para sedimentar as proteínas precipitadas, as amostras foram centrifugadas a 20000 g por 15 minutos. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga e adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 20000 g por 5 minutos, e a fase aquosa superior foi transferida novamente para outro tubo de microcentrífuga onde foi adicionado 0,54 volume de isopropanol para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 20000 g por 1 minuto e o sobrenadante em seguida foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 20000 g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol evaporado a temperatura ambiente por 30 minutos. O sedimento foi suspenso em água estéril ou TE e estocado a 4°C. O RNA foi eliminado de cada amostra pelo tratamento com RNase e o DNA genômico quantificado por espectrofotometria e a qualidade do DNA foi observado em eletroforese de gel de agarose a 1%.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO ISOLADO

3.3.1 Identificação clássica

Foi realizado no LQOAM (NPPNS, FCFRP – USP) a análise macromorfológica de cada isolado clínico pela inoculação de 5 uL de uma suspensão de 10^7 célula fúngica/ml em meio de cultura ASD e incubação a 28°C por 5 dias. Foram avaliados a textura, topografia, cor frente e verso da colônia e bordas. A análise micromorfológica foi realizada pela inoculação da célula fúngica em um bloco de ágar batata ou ágar fubá com uma lamínula estéril na superfície acima do inóculo. Cada bloco foi incubado a 28°C por cinco dias. Após, o material crescido em cada lamínula foi observado em microscopia de campo claro com objetiva de 40x onde foram analisadas as características micromorfológicas do desenvolvimento vegetativo e estrutura de reprodução assexual do fungo.

3.3.2 Identificação molecular do fungo

A identificação molecular do fungo deu-se pela amplificação por PCR e sequenciamento das regiões Internal Transcribed Sequence (ITS1) e ITS2 do DNA ribossomal de cada fungo. Para a PCR foram utilizados 0,5 µM de cada *primer* descritos na tabela 1, 0,2 mM de dNTP, 1X de tampão apropriado para enzima (buffer GC), 100 ng de DNA genômico e 1 U de enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) em um volume final de 20 µL de reação. Em seguida, o produto de todos os PCR foi fracionado em eletroforese de agarose 1%. Cada banda contendo o produto da PCR foi excisada do gel e purificada com o kit de purificação de DNA de gel de agarose, *Gel Band*, de acordo com as normas do fabricante (Promega, EUA). Em seguida cada amostra foi quantificada por espectrofotometria e a integridade observada em eletroforese de gel de agarose 1%.

A reação de sequenciamento do DNA de cada isolado fúngico foi realizada a partir da amplificação por PCR das regiões de interesse utilizando os *primers* descritos na tabela 1. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP - Campus SP) com o aparelho ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro® Software (ChromasPro 1.7.6, Technelysium Pty Ltd, Tewantin QLD, Australia) e comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information - NCBI”.

Nome do gene/região	Primer	Sequencia (5'→3')
ITS1 e 2	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Os primers foram retirados da referência abaixo:

White TJB, T.D.; Lee, S.; Taylor, T.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. . In: Michael A. Innis DHG, John J. Sninsky, Thomas J. White (ed) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y.: Academic Press, INC Harcourt Brace Jovanovich, 1990: 482

3.4 ESTABELECIMENTO DOS CULTIVOS E OBTENÇÃO DE EXTRATOS

Foram separadas duas placas de Petri com meio sólido PDA para a obtenção de cultivo em pequena escala para que pudesse ser selecionado o melhor meio para realizar o escalonamento. Uma vez que as placas foram inoculadas, estas foram mantidas em B.O.D. a

30°C durante 7 dias.

3.4.1 Cultivo em meio sólido

Decorridos os 7 dias de crescimento em placas de Petri, foram transferidos cerca de 10 discos de cada linhagem para um frasco tipo Erlenmeyer com capacidade de 500 ml, contendo 90g de arroz parboilizado e 90mL de água do mar, esterilizado por autoclavagem. Os frascos foram mantidos a 25°C durante 28 dias. Ainda, foi realizado um controle contendo somente arroz parboilizado (acrescido de água do mar) esterilizado.

Após 28 dias, foram então acrescentados 150 mL do sistema de solvente CH_2Cl_2 : MeOH (2:1) para a extração. O material foi submetido à maceração durante 24 horas e filtrado a vácuo utilizando-se filtros de papel. Uma nova alíquota de 150 mL de solvente foi acrescentada para uma segunda extração (24 horas). O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo para obtenção do extrato orgânico.

3.4.2 Cultivo em meio líquido

Foram transferidos cerca de 10 discos de cada linhagem para frascos tipo Erlenmeyer com capacidade de 500 mL, contendo 200 ml de caldo de batata-dextrose (PDB), preparado segundo instruções do fabricante, ou seja, 24 g por litro de água do mar filtrada. Os frascos foram mantidos a 25°C durante 21 dias. Após 21 dias, foram adicionados 150 mL do sistema de solvente CH_2Cl_2 :MeOH (2:1) para a extração. Após 24 horas, este material foi colocado em um balão de separação e separou-se a fração Diclorometano e a hidroalcoólica. A fração hidroalcoólica foi vertida para o frasco tipo Erlenmeyer para uma nova extração do mesmo sistema de solvente com as mesmas proporções de solvente, enquanto a fração CH_2Cl_2 foi colocada em outro frasco tipo Erlenmeyer. A segunda extração foi semelhante a primeira, quando separados a fase hidroalcoólica e a de CH_2Cl_2 , uniu-se a fase CH_2Cl_2 que foi concentrada em evaporador rotativo para obtenção do extrato orgânico e a outra fase foi devidamente descartada.

3.5 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E TRIAGEM QUÍMICA PRELIMINAR DOS METABÓLITOS

3.5.1 Extração, fracionamento e triagem química preliminar.

O cultivo escalonado foi realizado com base nos dados obtidos pela escala piloto, onde foi possível selecionar o melhor meio de cultivo para este fungo. Depois de selecionar o meio mais favorável para produção de metabólitos, foi realizado novamente o cultivo, desta vez escalonada para um total de 50 frascos do tipo Erlenmeyers. Após os 21 dias de cultivo, foi realizado a extração conforme descrito no item 3.4.2 onde foi adquirida uma massa de 4,00 gramas de extrato bruto. Este extrato bruto foi fracionado por meio de cromatografia em coluna utilizando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 conforme descrito por Sanya Sureram et al, 2012.

A resina Sephadex LH 20 previamente acondicionada em Metanol e foi adicionada a coluna que também foi empacotada com o mesmo solvente. Foi preenchida com 75% em altura com fase estacionária Sephadex e posteriormente utilizado MeOH como fase móvel. Uma pasta de extrato bruto foi preparada com o mesmo solvente e adicionada à coluna.

Ao total foram adquiridas 26 frações com cerca de 20 mL em cada frasco. A partir de uma parte do extrato bruto foi obtida a fração hexânica que foi analisada através de CG-EM. As frações (grupadas) foram enviadas para avaliação das atividades biológicas, já que o extrato bruto obteve resultado nas mesmas.

3.6 ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

3.6.1 Isolamento

Após a obtenção das frações descritas no item 3.5.1, as mesmas foram analisadas via cromatografia em camada delgada (CCDC) e aquelas mais promissoras foram analisadas por HPLC-DAD nas mesmas condições exploratórias dos extratos brutos, sendo possível a mudança do método afim de que houvesse uma melhor resolução dos picos observados com o propósito de realizar o isolamento por coluna semi-preparativa em HPLC. As substâncias isoladas foram denominadas como DEP, por pertencerem a classe das depsidonas.

3.6.2 Isolamento e elucidação estrutural DEP-2

Para a análise do DEP-2, que foi isolada da fração 8-pico 4, foram realizadas cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando o revelador físico UV $\lambda = 254$ nm e iodo ressublimado.

Foi realizada uma injeção da amostra em HPLC-DAD com coluna Supelco (LC-8 1,5 x 250 mm; 25 μ m), modo analítico. Fase móvel isocrático 90% metanol, com o tempo de análise de 15 min. e vazão de 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma separação em escala semi-preparativa em coluna Phenomenex (LC-8 6 x 250 mm; 25 μ m), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica. Realizadas 15 injeções de 5mg/100 μ L com vazão de 4,6 mL/min, resultando em 5 picos majoritários, sendo o pico 4 selecionado e analisado.

Em seguida a amostra foi submetida a análises espectroscópicas por RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais; e espectrométricas por espectrometria de massas em alta resolução por ionização em *electrospray* (EM-IES-AR) modos positivo e negativo, bem como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas CG-EM.

3.6.3 Isolamento e elucidação estrutural DEP-3

Para a análise do DEP-3 que foi isolada da fração 8-pico 6, foram realizadas cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando o revelador físico UV $\lambda = 254$ nm e iodo ressublimado.

Foi realizada uma injeção da amostra em HPLC-DAD com coluna Supelco (LC-8 25 x 4,6 mm ; 5 μ m), modo analítico. Fase móvel isocrático 90% metanol, com o tempo de análise de 15 min. e vazão de 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma separação em escala semi-preparativa em coluna Phenomenex (LC-8 25 x 10 mm; 10 μ m), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica. Realizadas 15 injeções de 5mg/100 μ L com vazão de 4,6 mL/min, resultando em 5 picos majoritários, sendo o pico 6 selecionado e analisado.

Em seguida a amostra foi submetida a análises espectroscópicas por RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais; e espectrométricas por espectrometria de massas em alta resolução por ionização em *electrospray* (EM-IES-AR) modos positivo e negativo, bem como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas CG-EM.

3.6.4 Isolamento e elucidação estrutural DEP-1

Para a análise da DEP-1, que foi isolada da fração 21*-pico 2, foram realizadas cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando o revelador físico UV $\lambda = 254$ nm e iodo ressublimado.

Foi realizada uma injeção da amostra em HPLC-DAD com coluna Synergies Polar-RP (150 x 4,6 mm) da Phenomenex, modo analítico. Fase móvel isocrático 70% metanol, com o tempo de corrida de 15 min. e vazão de 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma semi-preparativa em coluna Phenomenex (Polar-RP), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica. Realizadas 5 injeções de 5mg/100uL com uma vazão de 4,6 mL/min, resultando em 3 picos majoritários, sendo o pico 2 selecionado e analisado.

Em seguida a amostra foi submetida a análises espectroscópicas por RMN ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais; e espectrométricas por espectrometria de massas em alta resolução por ionização em *electrospray* (EM-IES-AR) modos positivo e negativo, bem como cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas CG-EM.

3.6.5 Análises em CG-EM

A fração n-hexano do extrato bruto do meio PDB e os compostos isolados a partir da cromatografia em coluna com Sephadex LH 20 foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas e os picos majoritários foram identificados e calculado o Índice de Kovats, seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{IR} = 100a + 100 \times [t_R(b) - t_R(a)] / [t_R(z) - t_R(b)]$$

No qual a (seria o do controle) é o alcano com número de carbonos igual ao da substância b que se deseja obter o índice; z (seria o do controle) é o alcano com 1 carbono a mais que o a .

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES E ISOLADOS

3.7.1 Ensaio da Atividade Antibacteriana

Os experimentos de atividade antibacteriana foram realizados no laboratório de Farmacognosia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP), com nossa participação e colaboração da técnica Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti sob supervisão da Profa. Dra. Niede A.J.C. Furtado.

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Os microrganismos ensaiados foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*. Como controles positivos tivemos os padrões dos antibióticos Penicilina G (para *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *S. Saprophyticus*) e Estreptomicina (para *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. Mirabilis*) em diluição seriada nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,1562; 0,0781; 0,0391; 0,0195; 0,0098; 0,0049 µg de antibiótico por mL de meio em cada poço. Para o preparo das amostras, foi feita uma diluição seriada em meio MH caldo de modo a obter as concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,9062; 1,9531; 0,9766; 0,4883; 0,2441 µg de amostra por mL de meio em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 hs. Após o tempo de incubação foi adicionado em cada poço 20 µL de Resazurina 0,02% preparado em água. Após 15 a 30 minutos observou-se a mudança de coloração de cada poço. Em caso de crescimento bacteriano, ocorreu mudança de azul para o rosa devido a uma reação de oxirredução.

Foi realizado também um teste para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), em que, antes de revelar a placa com Resazurina 0,02%, foi retirada amostra dos pocinhos de amostra e de controle positivo com uma haste autoclavada e transferida para Placas de Petri contendo Meio Ágar MH. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e foi realizada à leitura visual. O resultado da leitura é baseado em crescimento ou ausência de crescimento.

3.7.2 Ensaio da Atividade Biológica Leishmanicida

Os experimentos de atividade leishmanicida foram realizados no laboratório Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, em colaboração com o Mestrando Leandro Clementino e a supervisão da Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha

3.7.2.1 Determinação de IC₅₀ em formas promastigota de *Leishmania amazonensis*.

Meio de Cultura: LIT (Liver Infusion Tryptose): 5,0 g de Liver Infusion Broth (BD 226920) - 5,0 g de triptose (BD 211713) – 4,0 g de NaCl (85,55 mM) - 8,0 g de Na₂HPO₄ (7,04 mM) – 0,4 g de KCl (107,3 mM) - 2,0 g de glicose (22,2 mM) — 0,025 g de hemina (0,15 mM), água milli-Q q.s.p - 1L, pH ajustado para 7,2, com solução de HCl 0,1 M. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, após resfriar acrescentou-se, assepticamente, 100 mL de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

Cepa de leishmania: *L. amazonensis*, linhagem MPRO/BR/1972/M1841-LV-79, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Beatriz Stoff da Universidade de São Paulo – USP.

Procedimento: Cepas de leishmania foi incubada em meio LIT durante ~5 dias à 28°C até atingir a fase logarítmica tardia de crescimento, em seguida o experimento foi montado em placa de 96 poços (TPP®), onde o parasito e o controle foram incubados. Após a montagem das placas, estas foram incubadas em estufa BOD, à 28°C durante 72 horas, após isso adicionou-se 10 µL de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio)/PMS (metossulfato de fenazina) e procedeu-se nova incubação por 75 minutos. Em seguida adicionou-se SDS 10%/HCl 1M para solubilizar os cristais de formazana, e após 30 minutos de incubação foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível a 595 nm (leitor de Elisa – Readwell Touch/robonik). O cálculo do IC₅₀ foi realizado por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat®. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para determinação dos desvios padrão.

3.7.2.2 Determinação de CI_{50} em formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em macrófagos murinos CC_{50} .

Meio de cultura para a leishmania: *LIT* (*Liver Infusion Tryptose*): 5,0 g de Liver Infusion Broth (BD 226920) - 5,0 g de triptose (BD 211713) – 4,0 g de NaCl (85,55 mM) - 8,0 g de Na_2HPO_4 (7,04 mM) – 0,4 g de KCl (107,3 mM) - 2,0 g de glicose (22,2 mM) — 0,025 g de hemina (0,15 mM), água milli-Q q.s.p - 1L, pH ajustado para 7,2, com solução de HCl 0,1 M. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C, após resfriar acrescentou-se, assepticamente, 100 mL de soro fetal bovino (SFB), estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

Meio de cultura para os macrófagos: *RPMI* (*Roswell Park Memorial Institute medium*)(Gibco®): Para um litro de meio utilizou-se, uma ampola de meio RPMI 1640 em pó (Gibco®), 900,0 mL de água destilada, mantida sob agitação constante. Adicionou-se 2,0 g de bicarbonato de sódio (23,8 mM) e 2,38 g de tampão Hepes (9,9 mM). Acertou-se o pH para 7,2 e em seguida o meio foi filtrado utilizando filtro com membrana de 0,22 μ m (Kasvi®). Por fim, adicionou-se 100 mL de SFB e os antibióticos estreptomicina (100 mg/mL) e penicilina (100 mU/mL).

Cepa de leishmania: *L. amazonensis*, linhagem MPRO/BR/1972/M1841-LV-79, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Beatriz Stoff da Universidade de São Paulo – USP.

Procedimento amastigota e citotoxicidade: Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos Swiss, após exposição à solução de tioglicolato de sódio 3%, por meio de lavagem com tampão fosfato estéril (pH 7,2). Estas células foram cultivadas em meio RPMI completo e mantidas à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO_2 , na concentração de 5×10^5 cels/mL. Para os ensaios de citotoxicidade os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços, deixados durante 4 horas para aderência, seguida de renovação do meio e inóculo do composto em diferentes concentrações (100 ug/mL a 1,56 ug/mL), em seguida incubadas por 24 horas e a leitura realizada pelo ensaio do MTT e espectrofotômetro a 540 nm, a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi realizada no software Bioestat. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para o ensaio em formas amastigota, os macrófagos foram inseridos em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares e deixados 4 horas para aderência, na mesma concentração do ensaio anterior. Em seguida o meio foi renovado e foram inseridas formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5:1 (5 promastigotas para 1 macrófago) e incubados por mais 4 horas para diferenciação das promastigotas a amastigotas e

internalização destas pelos macrófagos. Após este período, o sobrenadante foi descartado, renovado o meio e foi adicionado o composto nas concentrações de 40, 20, 10, 5 e 2,5 ug/mL e incubados por 24 horas, em seguida o sobrenadante foi descartado, adicionado metanol para fixação das células, as lamínulas foram coradas com giemsa e após secar foi realizada a leitura das lâminas através da contagem das amastigotas em microscópio óptico e o cálculo do CI_{50} foi realizado no software Bioestat. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Índice de seletividade indica a eficácia do composto em estudo. Segundo o DNDI, índices maiores que 10 indicam que a substância em questão é segura, sendo mais seletiva ao parasito neste caso.

3.7.3 Determinação do espectro de absorção no ultravioleta e da fotodegradação dos compostos do *A. unguis*

A fotodegradação dos metabólitos isolados das frações do *A. unguis* foi determinada pela análise do espectro de absorção de suas soluções (100mg/mL), em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200 a 400 nm, as quais foram submetidas a uma dose de radiação UVA de 4 mW/cm² emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) por 115 minutos, o que fornece uma dose total de 27,6 kJ/cm² (WHITEHEAD; HEDGES, 2005; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

3.7.4 Avaliação da fototoxicidade em cultura de fibroblastos em monocamadas (3T3 NRU)

O teste de fototoxicidade foi realizado com as frações e posteriormente com as substâncias fotoestáveis que apresentaram maior potencial para candidatos a filtros solares, ou seja, obtiveram alta e ampla absorção no UVB e UVA e baixa fotodegradação. O teste foi realizado em cultura de fibroblastos por determinação da viabilidade celular, na presença e ausência da radiação UV, por meio da determinação da captação do corante vital vermelho neutro, conforme protocolo INVITTOX n° 78 (LIEBSCH; SPIELMANN, 1998). Para tal, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de camundongo Balb/C 3T3 clone 31 ATCC (American Type Culture Collection), a qual foi utilizada no estudo de validação do método realizado pela comunidade europeia (SPIELMANN et al., 1998). As células foram cultivadas em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dubelcco) suplementado com soro de bezerro,

glutamina, e mix de penicilina e estreptomicina e incubadas a 37°C, em estufa de CO₂ com controle de umidade (Thermo Eletron Corporation).

Todos os procedimentos para a avaliação da fototoxicidade foram realizados em Cabine de Segurança Biológica classe II tipo A1 (Pachane). Após a avaliação da sensibilidade das células à radiação, foram utilizadas 2 microplacas de 96 poços para cada série de diferentes concentrações de cada amostra em estudo. Para tal, foi preparada uma suspensão dos fibroblastos no meio de cultura (1 x 10⁵ células/mL) e, a seguir, foram inoculados 100µL dessa suspensão em 60 poços centrais de cada microplaca. Os 36 poços laterais das microplacas foram utilizados como branco. Uma microplaca foi utilizada para a determinação da citotoxicidade (na ausência de UVA) e a outra para a determinação da fototoxicidade (na presença de UVA). As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO₂, para a formação de uma monocamada semiconfluente. A seguir as células foram decantadas, separadas do meio de cultura e cada poço foi lavado com DPBS (Solução tamponada salina-fosfato segundo Dubelcco).

Após esse procedimento, foram adicionados em sextuplicata, 100µL de 8 diferentes concentrações de cada amostra, diluídos em DMSO ou DPBS, sendo que para cada experimento foram utilizados 20 mg de cada fração em estudo. Dessa forma foram utilizados 60 mg de cada substância para a realização dos experimentos em triplicata. As 2 microplacas foram incubadas e, a seguir, uma delas foi submetida a dose de radiação UVA de 9 J/cm², emitida por um simulador solar Dr. Hönle tipo SOL- 500 (Planegg, Alemanha), para a determinação da fototoxicidade. A outra microplaca foi mantida em uma caixa escura e foi utilizada como um controle para a determinação da citotoxicidade. A medida da intensidade da radiação UVA e UVB foi realizada por sensores UVA e UVB acoplados ao UV meter (Dr. Hönle).

Após a irradiação, os poços foram lavados com DPBS, o meio de cultura foi repostado e as microplacas incubadas a 37°C por 20h. Os referidos modelos do simulador solar e do UV meter foram padronizados e validados por um estudo mundial realizado por várias multinacionais e órgãos governamentais como o ZEBET e ECVAM, e, portanto são os recomendados para a realização dos testes propostos. A seguir, uma solução de corante vital vermelho neutro em DMEM foi adicionada em cada poço e as células incubadas por 3 h a 37°C. Após o período de incubação, o excesso de corante de cada poço fora removido e uma solução de dessorção do vermelho neutro composta por água / etanol / ácido acético foi acrescentada em cada poço. Após a extração do corante das células, foi calculada a viabilidade celular relativa.

Para tal, foi realizada a leitura das soluções resultantes das microplacas, submetidas ou não à radiação UVA, a 540 nm e os dados analisados por meio do Software Phototox versão 2.0 (obtido pelo ZEBET, Alemanha) para o cálculo do PIF (“photo irritation factor” - fator de fotoirritação) - e do MPE (“mean photo effect” - fotoefeito médio), para posterior previsão do potencial fototóxico. Uma substância que apresenta PIF entre 2 e 5 ou MPE entre 0,1 e 0,15 pode ser classificada como “provavelmente fototóxica” e valores de PIF maiores que 5 ou MPE maiores que 0,15 classificam a substância como fototóxica.

4. RESULTADOS

4.1 Estabelecimento do meio de cultivo e confirmação espécie fungo

Após a comprovação através do meio clássico (Figura 3), por microcultivo (Figura 4) e por sequenciamento que o fungo estudado trata-se do *Aspergillus unguis*. O rendimento do extrato cultivado em escala piloto utilizando o meio PDB (Figura 5) e arroz (Figura 6) pode ser observado no fluxograma 1. Apesar de o meio arroz ter dado uma maior massa, com relação às atividades biológicas o meio PDB foi o que forneceu resultados mais promissores. Foi realizada uma análise comparativa por meio de cromatografia líquida dos meios de cultura em arroz e PDB, com seus respectivos brancos (Figuras 7a e b) para avaliar a presença de substâncias provenientes de metabolismo secundário.

Fluxograma 1. Peso dos extratos brutos do meio arroz e PDB do *A. unguis*.

Figura 3. Macrocultivo do *Aspergillus unguis*

Figura 4. Microcultivo observado em microscópio eletrônico em aumento de 400x do *A. unguis*

Figura 5. Cultivo do *A. unguis* em meio arroz

Figura 6. Cultivo do *A. unguis* em meio PDB

Figura 7a. Cromatograma da eluição em escala analítica do extrato bruto do fungo *Aspergillus unguis* – 28 dias em meio arroz – Branco – linha verde e Extrato Bruto – linha preta.

Figura 7b. Cromatograma da eluição em escala analítica do extrato bruto do fungo *Aspergillus unguis* – 28 dias em meio PDB – Branco – linha verde e Extrato Bruto – linha preta.

Analisando os resultados obtidos nos experimentos biológicos, juntamente com a massa gerada de extratos a partir de cada meio de cultura utilizado e revisão da literatura (Sureram, 2012; Sureram, 2013), foi possível determinar que o meio PDB seria o mais apropriado para fazer o cultivo escalonado. Mantiveram-se as mesmas condições de cultivo utilizadas na escala piloto.

4.2 Fracionamento do extrato bruto do meio PDB do *A. unguis*: triagem química fração hexânica, isolamento e identificação das substâncias.

Através do fracionamento do extrato bruto do fungo *Aspergillus unguis* cultivado em meio PDB, usando Sephadex LH 20, foram obtidas 26 frações descritas na Tabela 1. Foram utilizadas também placas de sílica para CCDC, a fim de analisar seu perfil químico. Entretanto, algumas frações se apresentavam com massa reduzida e possuindo um grande número de spots, o que inviabilizaria o isolamento de alguma substância pura. Foram então selecionadas para a realização de experimentos para avaliação da atividade biológica e consequentemente isolamento de substâncias apenas as frações com maior massa.

As frações que estão com * formaram precipitado quando colocado solvente, sendo estes então separados do sobrenadante e analisados por placa CCDC para comparar se possuíam perfis químicos diferentes.

Tabela 1. Frações obtidas do fracionamento do extrato bruto de PDB *A. unguis* em coluna de Sephadex LH 20.

Fração	Característica	Massa (mg)
1	Precipitado marrom	20,0
2	Precipitado marrom	69,3
3	Precipitado marrom	590,2
4	Precipitado marrom	208,8
5	Precipitado amarelo	256,4
6	Precipitado amarelo	311,2
7	Precipitado amarelado	114,1
8	Precipitado amarelado	183,0
9*	*	*
10	Precipitado marfim	369,1
11	Precipitado amarelo e marfim	65,1
12	Prec. branco e pontos marrons	61,4
13	Prec. Branco e pontos marrons	17,8
15/16/17	Precipitado caramelo	
18	Precipitado bege	5,0
19*	*	*
20	Prec. branco com pontos marrons	13,4
21*	Marfim	*
22	Precipitado bege	2,2
23	Precipitado bege	21,1
24	Prec. branco com pontos marrons	20,6
25	Prec. branco com pontos marrons	7,3
26	Precipitado branco	2,1

A fração hexânica do extrato bruto oriundo do PDB foi submetida à análise por CG-EM, juntamente com os controles. Na análise foi observado um total de 44 picos. Na tabela 2 estão descritos os componentes majoritários com seus respectivos Índice de Retenção (Índice de Kovats) calculados segundo a fórmula e comparando-os com o da literatura (Adams, 1989; Adams, 1995).

Tabela 2. Estrutura das substâncias obtidas via análise em CG-MS do extrato bruto do *A. unguis* (cultivo em meio PDB).

Porcentagem da área do pico	Estrutura/Nome	Índice de Retenção	Similaridade	Índice de Retenção literatura
20.33	<p>Ác. Linoléico</p>	2130,2	93	2084
15.04	<p>Ác. Palmítico</p>	1949,7	97	1964
13.27	<p>Cis- Ácido Vacênico</p>	2134,5	91	-
7.87	<p>Linoleato de Metila</p>	2086,1	97	2092
5.77	<p>Diisopentilftalato</p>	2050,7	95	-

4.2.1 Isolamento e elucidação estrutural da DEP-1

Uma análise em HPLC em escala analítica foi realizada buscando obter o melhor método para separação dos picos desta amostra. Porém, ao transpor as condições para a escala semi-preparativa os cromatogramas do analítico e do semi-preparativo não foram fidedignos

entre si. Os picos observados foram coletados, quando utilizada a coluna Polar RP, utilizando sistema de eluição em 0-14 min 70% de MeOH e depois até 20 min com 100% MeOH, com uma análise total de 20 minutos. Na figura 8 é apresentado o cromatograma obtido durante o isolamento da substância DEP-1.

Figura 8. Cromatograma da DEP-1 oriunda do extrato bruto de arroz do *A. unguis*.

Após o isolamento da DEP-1, foi realizada uma análise em HPLC-DAD para verificação do perfil químico e do grau de sua pureza, que pode ser observado na figura 9. Mesmo apresentando um pico largo quando conferida a sua absorção de UV (figura 10) todos os pontos do pico no cromatograma foram exatamente iguais, confirmando assim, que se tratava de uma única substância.

Figura 9. Perfil químico por HPLC-DAD da DEP-1 do *A. unguis*.

Figura 10. Análise do espectro na região do UV por HPLC-DAD na região do pico 2 isolado a partir do *A. unguis*.

Desta forma, a substância isolada referente ao pico isolado (2) foi submetida a análises de RMN de ^1H , incluindo experimentos bidimensionais. Esta substância também analisada em EM-IES e CG-EM, visando sua determinação estrutural.

Na análise em alta resolução da amostra, o íon observado foi $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 441,0377 em modo negativo (figura 11a). Na figura 11b o espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) DEP-1, mostrando a frequência isotópica de 3 cloros $[\text{M}]^-$, $[\text{M}]^-+2$, $[\text{M}]^-+4$ e na Figura 11c, o espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da DEP-1.

Figura 11a. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-1. Pico em m/z 441,0377 corresponde ao aduto $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Figura 11b. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-1, mostrando a frequência isotópica de 3 cloros $[M]^-$, $[M+2.]^-$, $[M+4.]^-$.

Figura 11c. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância DEP-1.

A análise em CG-EM mostrou que a fração não se encontrava totalmente pura possuindo outros 4 picos menores (figura 12). Contudo, o pico de interesse apresentou uma área de 72,6%. Não foi encontrada nenhuma similaridade de grande significância pelo banco de dados do equipamento utilizado. O pico da substância DEP-1 tem o tempo de retenção em 44,012, as outras substâncias detectadas nos outros tempos de retenção foram consideradas impurezas, não averiguadas no trabalho.

Figura 12. Cromatograma CG-EM da substância DEP-1.

Com bases dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e juntamente com dados obtidos por meio de pesquisas utilizando o software Marinlit® e o Dicionário de Produtos Naturais Marinhos foi possível identificar a substância isolada como a Nidulina (Kawahara et al., 1987). Esta substância trata-se de uma depsidona comumente encontrada no fungo *A. unguis* e em seu anamorfo *Emericella unguis*. As depsidonas são conhecidas por apresentarem potencial antimicrobiano e citotóxico (Sultana & Afolayan., 2011).

A nidulina é uma molécula muito conhecida e estuda do *A. unguis* e da *E. unguis*. Foi possível caracterizar a substância isolada DEP-1 como sendo a molécula Nidulina através de dados de RMN ^1H e de ^{13}C da literatura.

Para realizar a elucidação estrutural foi realizada uma busca bibliográfica de todas as substâncias isoladas do *A. unguis*. Todas as moléculas encontradas foram analisadas segundo com seus respectivos deslocamentos de ^1H e de ^{13}C . Os dados da DEP-1, assim como as outras duas moléculas que também foram elucidadas, foram analisados por comparação, por meio de tabela demonstrando os valores dos sinais de RMN ^1H e de ^{13}C , além de analisar a massa da substância e a possível formação de dímeros, com ou sem a presença de sódio/potássio. Uma vez tendo a tabela e a massa, este resultado foi comparado com as tabelas das substâncias previamente descritas na literatura. Por meio de manipulação dos espectros de

massas, foi possível observar a frequência isotópica com a presença de 3 cloros, em todas as moléculas que foram isoladas. Para o DEP-1 foi possível observar carbono da carbonila, os carbonos na região de ligações duplas (5,31-5,36 ppm), o carbono ligado a um grupo hidroxílico e também a visualização de um carbono metoxílico em 3,77 ppm.

Figura 13. Espectro de RMN de ^1H substância DEP-1, 500 MHz, solvente CD_3OD .

Figura 14. Ampliação da região entre 5,31-5,36 ppm do espectro de RMN ^1H da substância DEP-1, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 15. Experimento COSY ^1H - ^1H da substância DEP-1, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 16. Experimento HMBC da substância DEP-1, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 17. Experimento HSQC da substância DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 18. Espectro de ¹³C da substância DEP-1, 500 MHz, CD₃OD.

Os dados espectroscópicos obtidos foram comparados com os dados da literatura para metabólitos pertencentes à classe das depsidonas (Sureram et al., 2012).

Tabela 3. Comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância DEP-1 e da Nidulina.

Posição	DEP-1 ^1H	DEP-1 ^{13}C	Nidulina (Sureram,2012) – ^1H	Nidulina (Sureram, 2012) – ^{13}C
	δH (mult. J em Hz) (CD_3OD), 500 MHz	δC (CD_3OD), 125 MHz	δH (mult. J em Hz) (acetona- d_6), 600 MHz	δC (acetona- d_6), 150 MHz
1 ^a	-	139,9	-	138,6
2	-	125,4	-	123,1
3	-	166,5	-	162,5
4	-	113,2	-	111,4
4 ^a	-	147,3	-	146,2
5 ^a	-	159,8	-	158,5
6	-	135,8	-	135,9
7	-	128,3	-	123,9
8	-	153,3	-	152,2
9	-	124,1	-	123,3
9 ^a	-	144,2	-	143,4
11	-	165,4	-	164,9
11 ^a	-	104,9	-	103,1
1-Me	2,39 s	19,5	2,33 s	18,8
9-Me	2,30 s	10,3	2,27 s	9,7
8-OMe	3,77 s	60,9	3,75 s	60,1
1'	-	137,3	-	139,0
2'	5,35 dq (6,7 e 0,9)	127,4	5,33 dq (6,7 e 1,1)	127,3
3'	1,81 dd (6,7 e 0,9)	14,3	1,72 d (6,7)	13,6
4'	1,94 s	17,8	1,87 s	17,2

Figura 19. Estrutura da Nidulina (DEP-1).

4.2.2 Isolamento e elucidação estrutural da DEP-2

Foi realizada uma injeção da amostra em HPLC-DAD com coluna Supelco (LC-8 25 x 4,6 mm ; 5 µm), modo analítico. Fase móvel isocrático 90% metanol, com o tempo de análise de 15 min. e vazão de 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma separação em escala semi-preparativa em coluna Phenomenex (LC-8 25 x 10 mm; 10 µm), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica. Realizadas injeções de 5mg/100µL com fluxo de 4,6 mL/min.

Figura 20. Método analítico da fração 8, F.M. Isocrático 90%MeOH, F.E. C₈, do *A. unguis*.

Desta forma, o pico isolado, identificado pela seta azul, foi submetido a análises de RMN uni e bidimensionais. A amostra também foi analisada por massas por Electrospray e CG-EM para que fosse possível fazer sua determinação estrutural.

Na análise em alta resolução da amostra, o íon observado foi $[M-H]^-$ m/z 427,1354 em modo negativo (figura 21a). Na figura 21b observa-se o espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) DEP-2. Pico em m/z 429,1457 corresponde ao aduto $[M+H]^+$.

Figura 21a. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-2. Pico em m/z 427,1354 corresponde ao aduto $[M-H]^-$.

Figura 21b. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância DEP-2. Pico em m/z 429,1457 corresponde ao aduto $[M+H]^+$.

A análise em CG-EM mostrou que a fração não se encontrava totalmente pura possuindo outros picos menores (figura 22), porém o pico de interesse que possui o tempo de retenção em 44,791 é o majoritário, com uma porcentagem de área de 88,2%. Não foi encontrada nenhuma similaridade de grande significância pelo banco de dados do equipamento utilizado. As outras substâncias detectadas nos outros tempos de retenção foram consideradas impurezas, não foram averiguadas no trabalho.

Figura 22. Cromatograma obtido via CG-EM da substância DEP-2 do *A. unguis*.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da substância DEP-2, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 24. Ampliação da região de dupla (5,4-5,5 ppm) do espectro de RMN ^1H da substância DEP-2, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 25. Experimento COSY ^1H - ^1H da substância DEP-2, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 26. Experimento HMBC da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 27. Experimento HSQC da substância DEP-2, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 28. Espectro de ^{13}C da substância DEP-2, 500 MHz, CD_3OD . **Tabela 4.** Comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da DEP-2 com dados da literatura da Emeguisina B de Kawara et al. 1988.

Posição	DEP-2 ^1H	DEP-2 ^{13}C	Emeguisina B ^1H	Emeguisina B ^{13}C
	δH (mult. J em Hz) (CD_3OD), 500 MHz	δC (CD_3OD), 125 MHz	δH (mult. J em Hz) (CDCl_3)	δC (CDCl_3),
1	-	131,7	-	136,6
2	6,67 s	111,4	6,49	107,6
3	-	no	-	161,7
4	-	116,6	-	115,7
4 ^a	-	151,3	-	161,1
5 ^a	-	150,2	-	143,4
6	-	121,1	-	130,1
7-Cl	-	108,8	-	115,0
8	-	151,4	-	149,6
9	-	118,0	-	115,9
9 ^a	-	143,7	-	143,0
11	-	162,7	-	163,9
11 ^a	-	121,1	-	112,8
3-OMe	3,88 s	56,6	3,85	57,9
4-Me	2,23 s	10,1	2,30	8,8

9-Me	2,15 s	9,3	2,21	9,9
1'	-	136,0	-	134,3
2'	5,44 dq (6,8 e 1,4)	128,6	5,22	127,9
3'	1,71 dd (6,8 e 1,0)	14,3	1,72 d (6,4)	13,9
4'	1,91	17,7	1,89 sl	17,4
1''	-	137,8	-	147,3
2''	5,39 dq (6,8 e 1,4)	126,8	5,49 qq (6,7; 1,0)	125,0
3''	1,81 dd (6,8; 1,0)	14,0	1,83 dd (6,9 e 1,0)	14,3
4''	1,94 d (1,0)	17,5	1,94 s	17,9

no = não observado

Figura 29. Proposta de estrutura da substância isolada DEP-2, comparada com substância Emeguisina B.

Para realizar a elucidação estrutural foi realizada uma busca bibliográfica de todas as substâncias isoladas do *A. unguis*. Todas as moléculas encontradas foram desenhadas com seus respectivos deslocamentos de ^1H e de ^{13}C , assim como também foi confeccionada uma tabela com estes dados.

Quando analisados os dados de RMN uni e bidimensional, juntamente com a análise do EM-IES pode-se observar que o padrão da depsidona encontra-se presente nesta estrutura novamente. Ela possui os deslocamentos do carbono carbonílico, ligado a hidroxila e

o carbono de grupo metoxílico. Diferentemente da Nidulina, a DEP-2 apresenta dois deslocamentos de hidrogênios na região de ligações duplas em 5,40 e 5,45 ppm. No RMN de ^1H pode-se observar também a presença de um H aromático com deslocamento de 6,67 ppm. Já no espectro de EM-IES não foi encontrado a frequência isotópica de 3 cloros, como na Nidulina, porém foi encontrado a presença de um cloro na molécula. Os dados foram comparados à substância Emeguisina B, já descrita na literatura, isolada do fungo *Emericella unguis* (Kawara et al. 1988).

4.2.3 Isolamento e elucidação estrutural da DEP-3

Foi realizada uma injeção da amostra em HPLC-DAD com coluna Supelco (LC-8 25 x 4,6 mm ; 5 μm), modo analítico. Fase móvel isocrático 90% metanol, com o tempo de análise de 15 min. e vazão de 1 mL/min. Em seguida, foi realizada uma separação em escala semi-preparativa em coluna Phenomenex (LC-8 25 x 10 mm; 10 μm), utilizando as mesmas condições de fase móvel e gradiente da injeção analítica. A separação em escala semi-preparativa foi realizadas por meio de injeções de 5mg/100uL com vazão de 4,6 mL/min.

Figura 30. Método analítico, fração 8 do *A. unguis*, F.M. isocrático 90% MeOH, C_8 .

Desta forma, o pico isolado, identificado pela seta azul, foi submetido a análises de RMN uni e bidimensionais. A amostra também foi analisada por massas por Electrospray e CG-EM para que fosse possível fazer sua determinação estrutural.

Na análise em alta resolução da amostra, o íon observado foi $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 441,0340 em modo negativo (figura 31a). Na figura 31b pode-se perceber a frequência isotópica mostrando a presença de 3 moléculas de cloro na substância isolada e na figura 31c observa-se o espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) DEP-3.

Figura 31a. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) a substância DEP-3. Pico em m/z 441,0340 corresponde ao aduto $[M - H]^-$.

Figura 31b. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo negativo) da substância DEP-3, mostrando a frequência isotópica de 3 cloros $[M]^-$, $[M+2]^-$, $[M+4]^-$.

Figura 31c. Espectro de massas de alta resolução (EM-IES modo positivo) da substância DEP-3.

A análise em CG-EM mostrou que a fração não se encontrava totalmente pura possuindo outros picos menores (figura 32), porém o pico de interesse que possui o tempo de retenção em 45,274 é o majoritário, com uma porcentagem de área de 97,0%. Não foi encontrada nenhuma similaridade de grande significância pelo banco de dados do equipamento utilizado. As outras substâncias detectadas nos outros tempos de retenção foram consideradas impurezas, não foram averiguadas no trabalho.

Figura 32. Cromatograma CG-EM da substância DEP-3 do *A. unguis*.

Figura 33. Espectro de RMN de ^1H da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 34. Ampliação da região de hidrogênios ligados ao C do grupo etoxílico do espectro de RMN ^1H da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 35. Experimento COSY ^1H ^1H da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 36. Experimento HMBC da substância DEP-3, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 37. Experimento HSQC da substância DEP-3, 500 MHz, CD₃OD.

Figura 38. Espectro de ^{13}C da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Figura 39. Espectro de ^{13}C DEPT da substância DEP-3, 500 MHz, CD_3OD .

Tabela 5. Comparação entre os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do DEP-3.

DEP-3 ^1H	DEP-3 ^{13}C	HMBC	HSQC
δH (mult. J em Hz) (CD_3OD), 500 MHz	δC (CD_3OD), 125 MHz	δC (CD_3OD), 150 MHz	δC (CD_3OD), 125 MHz
	163,3		
	158,7		
	155,9		
	146,7		
	143,3		
	141,2		
	137,3		
	130,9		
5,36 dq (6,8 e 1,39)	129,1	5,36 -> 137,4	129,1
	125,2		
	124,7		
	122,0		
	115,1		
	111,9		
3,76 s – CH_3	60,9	3,75 -> 154,0	60,9
3,59 q (7,05) – CH_2	58,3		58,2
2,44 s – CH_3	19,1	2,42 ->115,1;122,0;141,3	19,0
1,17 t (7,05) – CH_3	18,4	1,15 -> 58,3	18,3
1,94 s	17,8	1,92 -> 129,1;130,9;137,4	17,7
1,80 dd (6,8;0,98)	14,2	1,79 -> 129,1;130,9	14,1
2,30 s	10,3	2,28 -> 124,8;143,4;154,0	10,3

Figura 40. Estrutura proposta para base da substância DEP-3.

Para realizar a elucidação estrutural foi realizada uma busca bibliográfica de todas as substâncias isoladas do *A. unguis*. Todas as moléculas encontradas foram desenhadas com seus respectivos deslocamentos de ^1H e de ^{13}C , assim como também foi feito uma tabela com estes dados. Analisando os dados da espectroscopia de RMN juntamente com as informações obtidas pelo EM, sabe-se que a estrutura base da molécula isolada DEP-3 é de uma depsidona, igual às outras duas moléculas também isoladas. Os sinais da carbonila, e dos carbonos aromáticos ligados ao cloro, em conjunto com a frequência isotópica que demonstra a presença de 3 cloros mostra que a base da molécula é a mesma que a da fração 21*-pico 2, nidulina (DEP-1).

Outros sinais característicos da depsidona também são os sinais da dupla ligada ao anel. Porém é possível observar no RMN uni e bidimensional, a presença de um sinal em 3,59 ppm indicando a presença de um OCH_2CH_3 desblindado devido a presença de um oxigênio, sendo que o CH_2 que acopla (J 7,05) com um CH_3 em 1,17 com um tripleto mostrando que se trata de um sinal característico de grupamento exílico. Não é possível ver a correlação do hidrogênio do CH_2 com seu respectivo carbono do anel do qual ele estaria ligando por intermédio do oxigênio, porém a falta dessa correlação não descarta a possibilidade deste grupamento fazer parte da molécula.

É possível ver a correlação do hidrogênio do CH_2 com seu respectivo carbono ao qual ele estaria ligando por intermédio do oxigênio. Ainda, de acordo com os experimentos para avaliação biológica realizada, foi observado um potencial diferente para as frações que levaram ao isolamento de DEP-1 e DEP-3, além do fato de que foram isoladas de frações bem distintas. Sabe-se na literatura, Nielsen et al., (1999) que existem substâncias com este padrão de depsidona mas, onde o anel central se encontra aberto, portanto, seria uma possibilidade de termos isolado uma estrutura semelhante a DEP-1 mas sem a ciclização do anel central.

Portanto, propusemos a estrutura da Figura 4 e estaremos realizando experimentos adicionais a fim de comprovar este esqueleto estrutural.

4.3 Determinação do Espectro de Absorção no UV e da Fotodegradação

O extrato bruto submetido à cromatografia clássica usando Sephadex LH 20 originou 26 frações que foram avaliadas quanto a sua absorção na região do UV como critério para a avaliação da atividade fotoprotetora. O extrato bruto oriundo fungo *A. unguis* foi analisado com uma varredura na região do UV para avaliar sua absorção tanto na região do UVB (280 – 320 nm) quanto no UVA (320 – 400 nm), foram então analisados os extratos obtidos com o cultivo no meio a base de arroz e no PDB como mostra a Figura 41. O extrato bruto do *A. unguis*, obtido em meio PDB possuiu uma alta absorção, principalmente na região do UVA curto, sendo assim o mais adequado para dar continuidade aos ensaios de fotoestabilidade e fototoxicidade. Na Figura 42 podemos analisar que o extrato bruto do meio PDB foi considerado fotoestável, cujo teste foi realizado em triplicata. Além do extrato bruto, outras 3 frações obtiveram absorção satisfatória na região no UV e foram avaliados quanto a sua fotoestabilidade. A figura 43 mostra o ensaio feito em triplicata da fotoestabilidade das frações Fr15/16/17, Fr 20 e Fr 21*.

Figura 41. Varredura de absorção no UV dos extratos brutos de *A.unguis* dos meios de culturas PDB e arroz.

Figura 42. Ensaio de fotodegradação extrato do fungo endofítico *A. unguis* do meio PDB. Soluções em metanol com concentração 100 µg/ mL. A linha vermelha representa o extrato não irradiado (não irr.) e a linha preta os irradiados (irr).

Figura 43. Ensaio de fotodegradação das frações Fr15, Fr 20 e Fr 21* do fungo *A. unguis*. Soluções em isopropanol à 100 µg/ mL. Frações irradiadas em preto (irr) e não irradiadas em vermelho (não irr).

A fração 21* da qual foi ponto de partida para a molécula isolada (DEP-1) a partir do pico 2 também foi testada quando a sua fotoestabilidade.

Pode-se observar na Figura 44 que a molécula isolada DEP-1 manteve seu padrão de absorção mesmo após ser irradiada, dessa forma conclui-se que ela pode ser considerada fotoestável, assim como sua fração também era. Na Tabela 6 estão descritos os resultados

sobre a absorção da DEP-1 na faixa UVA e UVB e a queda dessa absorção após a exposição a irradiação.

Figura 44. Fotoestabilidade do DEP-1 do *A. unguis*.

Tabela 6. Integral do espectro de absorção da substância isolada DEP-1 na faixa UVA e da UVB e razão UVA/UVB quando submetidas ou não a irradiação.

Nº experimento	UVA		UVB		Razão UVA/UVB		Queda na razão UVA/UVB	UVA	UVB
	NI	IRR	NI	IRR	NI	IRR			
1	11,59	10,64	20,37	18,88	0,56	0,56	0	91,79	92,70
2	14,37	11,22	22,55	19,75	0,63	0,56	0,11	78,05	87,57
3	12,17	11,68	21,03	20,55	0,57	0,56	0,01	96,00	97,71

4.4 Avaliação da fototoxicidade

O teste de fototoxicidade/citotoxicidade foi realizado pela mestrandia Marcela Scarpin, do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos da Professora Lorena Rigo Gaspar Cordeiro da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP.

O controle positivo norfloxacinol está dentro da faixa recomendada pela OECD (2004) (Tabela 7). O extrato bruto do meio PDB foi considerado fototóxico e citotóxico pelo teste 3T3 observado na Figura 45 e Tabela 7, com um MPE de 0,190 e um IC₅₀ –UV de 11,87 µg/mL. As frações 20 e 21* apesar de serem consideradas fotoestáveis no ensaio anterior também foram consideradas fototóxicas, com um MPE de 0,203 e 0,211, respectivamente. A fração 15/16/17, apesar de não ter sido considerada fototóxica, apresentou alto potencial citotóxico IC₅₀ –UV de 2,99 µg/mL como descrito na Tabela 7.

A substância isolada a partir da fração 21 não foi considerada fototóxica (MPE; 0,084) mas foi considerada citotóxica (IC₅₀ –UV 2,931 µg/mL) (Figura 46 e Tabela 7).

Figura 45. Curva dose-resposta do extrato bruto da *A. unguis* (gráficos gerados pelo *Software Phototox* versão 2.0). Pontos azuis referentes às placas não irradiadas e os amarelos às irradiadas.

Tabela 7. Resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade das frações do extrato bruto do meio PDB de *A. unguis*.

Amostra	PIF	IC50 -UV ($\mu\text{g/mL}$)	IC50 +UV ($\mu\text{g/mL}$)	MPE	Resultado
Extrato bruto	3,078	11,869	3,909	0,190	Fototóxico
Fr.15/16/17	1.066	2,991	2,811	0.016	Não fototóxico
Fr.20	1.694	15,147	8,954	0.203	Fototóxico
Fr.21*	2.470	8,172	3,516	0.211	Fototóxico
DEP-1	0,930	2,931	3,260	-0,084	Não fototóxico
Norfloxacina	12,440	ND	8,076	0,715	Fototóxico

Figura 46. Curva dose-resposta do DEP-1 (gráficos gerados pelo *Software Phototox* versão 2.0). Pontos azuis referentes às placas não irradiadas e os amarelos às irradiadas.

Uma vez que o ensaio descrito no guia OECD 432 (2004) é realizado em cultura de fibroblastos 3T3 em monocamadas, ele é considerado muito sensível para a detecção de substâncias fototóxicas. Normalmente é o único teste realizado quando o resultado é negativo. Entretanto, quando o resultado é positivo, a recomendação internacional para a avaliação da fototoxicidade conta com um segundo passo que seria a avaliação da fototoxicidade em modelo de pele tridimensional que, por possuir epiderme diferenciada com estrato córneo, leva em consideração a penetração cutânea e a biodisponibilidade para a predição do potencial fototóxico de uma substância (ICH, 2013). A estratégia elimina os resultados falsos positivos gerados no primeiro teste, pois moléculas de alta massa molecular, maior que 500 Dalton, não apresentará alta penetração cutânea e consequentemente, não serão fototóxicas.

Dessa forma, estudos posteriores envolvendo modelos de pele tridimensional serão realizados para confirmar a fototoxicidade dessa substância e avaliar seu potencial para utilização em produtos cosméticos.

4.5 Avaliação da Atividade leishmanicida

Os extratos brutos foram analisados pelo mestrando Leandro Clementino do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara quando ao seu potencial leishmanicida e verificada a capacidade do extrato matar formas de promastigota de *Leishmania amazonensis*. Na Tabela 8a podem-se observar os resultados obtidos a partir do extrato bruto de ambos os meios e na Tabela 8b consta os resultados obtidos quando analisados as frações obtidas do fracionamento do extrato bruto PDB.

Tabela 8a. Índices de IC₅₀ da amostra do extrato bruto de *A. unguis* usando Anfotericina B e Pentamidina como controles positivos.

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato bruto PDB	433
Extrato bruto Arroz	>500
Anfotericina B	1,45 ±0,07
Pentamidina	3,22 ±0,13

Tabela 8b. Índices de IC₅₀ das frações do *A. unguis* usando Anfotericina B e Pentamidina como controles positivos.

Fração	IC ₅₀ (µg/mL)
8	60±0,85
9	50±0,62
10*	100±1,45
15	2,29+-0,04 ug/Ml
Anfotericina B	1,45±0,07
Pentamidina	3,22±0,13

Ao se analisar o resultado obtido pelo extrato bruto do meio PDB pode-se perceber que o mesmo já possuía uma discreta atividade leishmanicida, esta que não está presente no extrato bruto do meio arroz cujo seu IC₅₀ foi maior do que deveria para ser considerado com algum efeito terapêutico biológico considerável. Esta atividade que foi comprovada quando se obteve os resultados das frações obtidas no fracionamento do extrato, onde das quatro frações submetidas à análise todas obtiveram resultados satisfatório.

Devido ao resultado promissor da fração 8, foi enviado para a avaliação biológica o DEP-3, que foi isolado desta fração.

Tabela 9. Índices de IC₅₀ da DEP-3, usando Anfotericina B e Pentamidina como controle positivos.

Amostra	Massa Molecular	CI ₅₀ PRO(μM)(IS)	CI ₅₀ AMA(μM)(IS)	CC ₅₀ (μM)
DEP-3	442,0349	71,7 ± 0,7 (1,2)	56,6 (1,6)	89,7 ± 1,2
Anfotericina b	924,1	3,48 ± 0,03 (6,6)	5,3 ± 0.2 (4,6)	23,1 ± 2,5
Pentamidina	340,4	29,9 ± 0,08 (1,2)	18,2 ± 0.6 (1,9)	35,7 ± 6,8

Tabela 10. Índices de IC₅₀ da DEP-2, usando Anfotericina B e Pentamidina como controle positivos.

Amostra	Massa Molecular	CI ₅₀ PRO (μM)(IS)	CI ₅₀ AMA (μM)(IS)	CC ₅₀ (μM)
DEP-2	428,9	68,1 ± 8,1 (5,7)	55,9 ± 0,6 (6,9)	390,5 ± 0,2
Anfotericina b	924,1	3,5 ± 0,03 (6,6)	5,3 ± 0.2 (4,6)	23,1 ± 2,5
Pentamidina	340,4	29,9 ± 0,08 (1,2)	18,2 ± 0.6 (1,9)	35,7 ± 6,8

Podemos observar nas Tabelas 9 e 10 que ambas as moléculas apresentaram um potencial leishmanicida, sendo a DEP-2 um potencial maior com um índice de seletividade maior do que a DEP-3 apresentou. É uma atividade que não foi descrita na literatura e de grande relevância. As moléculas apresentaram certa citotoxicidade contra os macrófagos, porém essa citotoxicidade pode ser revertida com mudanças estruturais na molécula fazendo que com sua atividade biológica continue igual ou seja melhorada e a toxicidade diminuída.

4.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

O extrato bruto do fungo foi analisado em triplicata, quanto ao seu potencial antibacteriano e cujos resultados estão descritos na Tabela 10. Foram enviadas para análise antimicrobiana 8 frações das 26 obtidas pela Sephadex, Os resultados estão descritos na tabela 11 apenas os microrganismos que tiveram resultados promissores com as frações e extrato testado.

Tabela 11. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da amostra de extrato bruto do *A. unguis* testada frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Amostra	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Ext. bruto (triplicata)	400	≥ 400
Antibiótico	2,95	2,95

Tabela 12. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das frações obtidas do extrato bruto *A. unguis*.

Micro-organismos	Amostras	CIM (µg/mL) 11/08/2016	CBM (µg/mL) 12/08/2016	CIM (µg/mL) 18/08/2016	CBM (µg/mL) 19/08/2016
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Fr.3	400	≥ 400		
	Fr.4	200	400	400	400
	Fr.5	100	400	200	400
	Fr.8	3,125	6,25	12,5	25,0
	Antibiótico	0,023	0,046	0,011	0,046 a 0,023
	Fr9	3,125	3,125	6,125	25,0
	F.10*	12,5	400	25,0	25,0
	Antibiótico	0,011	0,011	0,011	0,011
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	Fr.3	≥ 400	≥ 400		
	Fr.4	≥ 400	≥ 400		
	Fr.5	≥ 400	≥ 400		
	Fr.8	≥ 400	≥ 400		
	Antibiótico	5,90	5,90		
	Fr9	≥ 400	≥ 400		
	F.10*	≥ 400	≥ 400		
	Antibiótico	5,90	5,90	5,90	5,90
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Fr.3	≥ 400	≥ 400		
	Fr.4	≥ 400	≥ 400		
	Fr.5	≥ 400	≥ 400		
	Fr.8	≥ 400	≥ 400		
	Antibiótico	2,30	2,30		
	Fr9	≥ 400	≥ 400		
	F.10*	≥ 400	≥ 400		
	Antibiótico	2,30	4,60	4,60	9,21875
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Fr.3	≥ 400	≥ 400		
	Fr.4	≥ 400	≥ 400		
	Fr.5	≥ 400	≥ 400		
	Fr.8	≥ 400	≥ 400		
	Antibiótico	1,15	2,30		
	Fr9	≥ 400	≥ 400		
	F.10*	≥ 400	≥ 400		
	Antibiótico	0,576	0,576	9,21875	9,21875

<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	Fr.3			≥ 400	≥ 400
	Fr.4			≥ 400	≥ 400
	Fr.5			≥ 400	≥ 400
	Fr.8			≥ 400	≥ 400
	Fr9			≥ 400	≥ 400
	F.10*			≥ 400	≥ 400
	Antibiótico			0,36875	0,36875

As depsidonas estão descritas na literatura como moléculas bioativas contra *Staphylococcus aureus* (Kokubun et al., 2007), então foi enviado para análise a molécula isolada DEP-2. Porém, a molécula foi caracterizada como não tendo ação contra este microrganismo, uma vez que, não foi possível observar mudança na alteração da cor nas placas de 96 poços.

Tabela 13. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do DEP-2.

Amostra	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
DEP-2	100	100

Tabela 14. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do DEP-2 e DEP-3.

Amostra	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
DEP-2/DEP-3	6,25	100
Antibiótico	0,115	0,115

5. CONCLUSÃO

O fungo codificado PDMIII1 pdba foi identificado como sendo *Aspergillus unguis*, um fungo que já foi relatado na literatura tanto em meio marinho quando em meio terrestre. Foi encontrado ftalato, no meio arroz, por meio de análise de CG-EM, que pode ser considerado oriundo do fungo, uma vez que, foi encontrado apenas em um dos extratos e também, o fato que já está descrito na literatura a comprovação que fungos podem produzir ftalatos.

Foi possível identificar 4 tipos de ftalato no extrato bruto de arroz, além de 2 picos sem nenhuma compatibilidade no banco de dados. Enquanto no extrato bruto de PDB picos não foram encontrados nenhuma compatibilidade no banco de dados.

Ao realizar a comparação dos dois meios de cultura através de ensaios bioguiados foi considerado que o meio de cultivo mais promissor para a produção de metabólitos secundários foi o PDB. Foram isoladas 3 substâncias, oriundas de 2 frações, sendo dentro elas 2 conhecidas e uma inédita, ainda está em processo de elucidação.

Dentre as atividades biológicas testadas houve atividade antimicrobiano contra *S. aureus* sinérgica entre DEP-2 e DEP-3, sendo estas também moléculas que apresentaram um resultado promissor contra atividade leishmanicida, que nunca foi reportado na literatura. Os procedimentos futuros para ambas moléculas é a realização de mudanças estruturais na estrutura molecular para que possa haver uma diminuição na sua citotoxicidade, sem que isso interfira na atividade leishmanicida observada, principalmente pela DEP-2.

Já a DEP-1, Nidulina, foi considerável fotoestável, da qual é uma atividade inédita para esta molécula bem reportada na literatura, porém foi considerada fototóxica. Então a próxima etapa para a Nidulina é realizar o experimento com a pele artificial 3D para analisarmos mais profundamente a existência dessa fototoxicidade, uma vez, que o 3T3 é um experimento da qual não considera a permeação cutânea.

6. REFERÊNCIAS

ABDOU R, SCHERLACH K, DAHSE HM, SATTLER I, HERTWECK C. Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* 71: 110 – 116, 2010.

ALMEIDA, M., HUMANES, M., SILVA, J. A., MELO, R., AND FRAUSTO DA SILVA, J. J. R. in *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., and Greppin, H., eds) pp. 146–152, University of Geneve, Geneve, Switzerland, 1996.

ANDERSON, J.L., S. K. CHAPMAN, S. K., *Mol. BioSyst.: Molecular mechanisms of enzyme-catalysed halogenation*, 2, 350–357, 2006.

“*Asperguillus unguis*”. www.mycobank.org . Recuperado 2015-11-16.

BANNWARTH L, GOLDBERG AB, CHEN C, TURK BE: Identification of exosite-targeting inhibitors of anthrax lethal factor by high-throughput screening. *Chem Biol.* 2012 Jul 27. PMID: 22840775

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *Journal of Organic Chemistry*, v. 16, p. 981-987, 1951.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, v. 33, p. 382-431, 2016.

BRANDT, ME; WARNOCK, DW (Novembro de 2003). "Epidemiologia, manifestações clínicas e terapia de infecções causadas por fungos dematiáceos". *Jornal de quimioterapia* (Florença, Itália) . 15 Supl 2: 36-47. Doi : 10.1179 / joc.2003.15.supplement-2.36 . PMID 14708965 .

C. WAGNER, M. EL OMARI AND G. M. KO'NIG, J. *Nat. Products: Biohalogenation: nature's way to synthesize halogenated metabolites*, 72, 540–553, 2009.

CHEN, P.; JEANNOTTE, R.; WEIMER, B. C. Exploring bacterial epigenomics in the nextgeneration sequencing era: a new approach for an emerging frontier. *Trends in Microbiology*, v. 22, p. 292-300, 2014.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H. Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Marine Drugs*, v. 13, p. 4006-4043, 2015.

CHOMCHEON P, WIYAKRUTTA S, SRIUBOLMAS N, NGAMROJANAVANICH N, KENGTONG S, MAHIDOL C, RUCHIRAWAT S, KITTA KOOP P. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry*; 70: 407–413, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug lead. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DAVID. B.; WOLFENDER J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, v. 14, p. 299-315, 2015.

FELCZYKOWSKA, A.; BLOCH, S. K.; NEJMAN-FALENCZYK, B.; BARANSKA, S. Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. *Acta Bichimica Polonica*, v. 59, p. 501-505, 2012.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, v. 19, p. 85-98, 2012.

GOGINENI, V.; SCHINAZI, R. F.; HAMANN, M. T. Role of marine natural products in the genesis of antiviral agents. *Chemical Reviews*, v. 115, p. 9655-9706, 2015.

GRIBBLE, G. W. Biological Activity of Recently Discovered Halogenated Marine Natural Products. *Marine Drugs*, v.13, p. 4044-4136, 2015.

HOU, X. M.; XU, R. F.; GU, Y. C.; WANG, c. Y.; SHAO, C. L. Biological and Chemical Diversity of Coral-Derived Microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, v. 22, p. 3707-3762, 2015.

HUSSIEN, T. A.; MOHAMED, T. A. The Bioactive Natural Products and Biological Activities of the Red Sea Soft Coral *Sarcophyton*: A Review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 6, p. 1301-1319, 2015.

KAWAHARA, N.; NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S.. Isolation and Structures of Novel Fungal Depsidones from *Emericella unguis*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, Japão, v. -, n. -, p.2611-2614, jan. 1988.

KHUMKOMKHET P, KANOKMEDHAKUL S, KANOKMEDHAKUL K, HAHNVAJANAWONG C, SOYTONG K. Antimalarial and cytotoxic depsidones from the fungus *Chaetomium brasiliense*. *J Nat Prod*; 72: 1487 – 1491, 2009.

KOKUBUN T, SHIU WK, GIBBONS S. Inhibitory activities of lichen-derived compounds against methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Med*; 73: 176 – 179, 2007.

LI, K.; CHUNG-DAVIDSON, Y. W.; BUSSY, U.; LI, W. Recent Advances and Applications of Experimental Technologies in Marine Natural Product Research. *Marine Drugs*, v. 13, p. 2694-2713, 2015.

MALLOCH, DAVID; CAIN, RF (1972-01-01). "Novas espécies e combinações de *Ascomycetes cleistothecial*". *Jornal canadense da Botânica* . 50 (1): 61-72. Doi : 10.1139 / b72-011 . ISSN 0008-4026.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; NIKZAD, S.; KADIR, H. A.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Potential antiviral agents from marine fungi: An overview. *Marine Drugs*, v. 13, p. 4520-4538, 2015.

MOTTI, C.A.; BOURNE, D.G .; BURNELL, J.N .; DOYLE, J.R .; HAINES, D.S.; LIPROT, C.H .; LLEWELLYN, L.E .; LUDKE, S.; MUIRHEAD, A.(2007-03-15). "Seleção de fungos marinhos para inibidores da enzima de plantas C4 Piruvato Fosfato Dikinase: Unguinol como um potente romance Herbicida Candidato". *Microbiologia Aplicada e Ambiental* . 73 (6): 1921-1927. Doi : 10.1128 / AEM.02479-06 . ISSN 0099-2240 . PMC 18288163 . PMID 17220253

MURPHY C.D. Recent developments in enzymatic chlorination. *Nat. Prod. Rep.* ;23:147–152. 2006 doi: 10.1039/b516588c.

NÚÑEZ-PONS, L.; AVILA, C. Natural products mediating ecological interactions in Antarctic benthic communities: a mini-review of the known molecules. *Nat. Prod. Rep.* v. 32, p. 1114-1130, 2015.

RANGEL, M.; FALKENBERG, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *Journal of Coastal Life Medicine*, v. 3, p. 421-428, 2015.

Raper¹ Fennell², KB¹, ED² (1965). O gênero *Aspergillus* . Williams e Wilkins. P. 686.

ŘEZANKA, T.; GUSCHINA, I. A.. Brominated Depsidones from *Acarospora gobiensis*, a Lichen of Central Asia. *Journal Of Natural Products*, [s.l.], v. 62, n. 12, p.1675-1677, dez. 1999. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np990114s>.

STIGTER, A., WETZEL, S., CHOIDAS, A., ALEXANDROV, K., WALDMANN, H., R. S. GOODY AND Y. W. WU, Psoromic acid is a selective and covalent Rab-prenylation inhibitor targeting autoinhibited RabGGTase. *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 7384–7391, 2012

SURERAM, S.; WIYAKRUTTA, S.; NGAMROJANAVANICH, N. Depsidones, Aromatase Inhibitors and Radical Scavenging Agents from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus unguis* CRI282-03. *Planta Med*, Nova York, v. 78, n. -, p.582-588, jan. 2012.

VLIETINCK AJ, DE BRUYNE T, APERS S, PIETERS LA. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med*; 64: 97–109. 1998

YUAN T, YANG SP, ZHANG HY, LIAO SG, WANG W, WU Y, TANG XC, YUE JM. Phenolic compounds with cell protective activity from the fruits of *Livistona chinensis*. *J Asian Nat Prod Res*, 11: 243 – 249, 2009