

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

STELAMAR ROMMINGER

**Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados  
de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum***

São Carlos

2008

STELAMAR ROMMINGER

**Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química  
de São Carlos da Universidade de São Paulo  
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2008

## DEDICATÓRIA

À minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck pela orientação.

Aos colegas de laboratório.

À Prof. Mirna Helena Selegim e à Darci da Consolação Diniz Javarotti.

Ao CEBIMar (USP) pelo apoio logístico durante a coleta do material biológico.

Ao grupo do professor Reginaldo Gonçalves (Faculdade de Odontologia, UNICAMP) pela realização dos ensaios de atividade antibiótica contra patógenos bucais.

Ao grupo do professor Célio Lopes Silva (FMRP, USP) pela realização dos ensaios de atividade anti-tuberculose contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Ao grupo da professora Claudia do Ó Pessoa (Universidade Federal do Ceará) pela realização dos ensaios de atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais.

Ao pelo grupo do professor Glaucius Oliva (IFSC, USP) pela realização dos ensaios de atividade de inibição enzimática.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

ROMMINGER, S. **Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum***. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Os fungos são microrganismos amplamente dispersos, podendo ser encontrados em vegetais, animais, solo e ambientes aquáticos, participando do ciclo de elementos na natureza. Embora muitos papéis ecológicos tenham sido estudados e descritos para os fungos terrestres, a ecologia de fungos marinhos ainda é pouco conhecida. Assim, os oceanos, que representam aproximadamente metade da biodiversidade global, são uma fonte enorme e virtualmente inexplorada de microrganismos produtores de novos produtos naturais. O objetivo deste trabalho foi isolar linhagens de fungos derivados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum*, visando à avaliação do seu potencial para a produção de metabólitos secundários bioativos. Ao todo foram isoladas 58 linhagens, das quais 52 foram crescidas em meio de cultura líquido e, após a extração com solventes orgânicos, deram origem a 99 extratos. Tais extratos foram avaliados por ensaios de atividade biológica, cromatografia em camada delgada (CCD), ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos, espalhamento de luz evaporativo e espectrômetro de massas (LC – PDA – ELSD – MS). A avaliação pelo ensaio antibiótico foi o que resultou no maior número de extratos ativos (n = 13), seguido dos ensaios enzimático (n = 8), citotóxico (n = 3) e anti-tuberculose (n = 1). O extrato AS Fub 39, que apresentou atividade antibiótica, foi selecionado para estudos adicionais. Este extrato foi purificado por HPLC, e o seu composto majoritário identificado como sendo o 8–metóxi–3,5–dimetilisocroman–6–ol. Posteriormente, a linhagem AS Fub 39 foi taxonomicamente identificada como pertencendo à espécie *Penicillium steckii*.

**Palavras-chave:** *Sargassum* sp., fungos marinhos, CCD, bioensaios, RMN, LC – PDA – ELSD – MS.

## ABSTRACT

ROMMINGER, S. **Evaluation of the metabolic potential of fungal lineages isolated from a species of marine algae of the *Sargassum* genus.** 2008. 69 f. Dissertation (Masters) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Fungi are widely dispersed microorganisms, typically associated with plants, animals, soil and aquatic environments (fresh and sea water), participating in the elements cycling. Although many ecological roles have been described for terrestrial fungi, ecological studies of marine derived fungi are still scarce. Therefore, oceans, which represent approximately half of the global biodiversity, are a huge and virtually unexplored source of microorganisms producers of interesting metabolites. The aim of this study was to isolate fungal strains derived from a marine algae of the *Sargassum* genus, and the evaluation of their metabolical potential for the production of secondary metabolites. Overall, 58 strains were isolated, of which 52 were grown in liquid culture media and extracted with organic solvents, originating 99 crude extracts. These extracts were analyzed by bioassays, thin layer chromatography (TLC), nuclear magnetic resonance (NMR) and liquid chromatography coupled with a photo diode array, an evaporative light scattering, and a mass spectrometry detectors (LC – PDA – ELSD – MS). The evaluation with the antibiotic assay resulted in the largest number of active extracts (n = 13), followed by the enzymatic (n = 8), the cytotoxic (n = 3) and the anti-tuberculosis (n = 1) assays. The crude extract AS Fub 39, which presented antibiotic activity, was selected for additional studies. This extract was purified by HPLC, and its major compound identified as the 8-methoxy-3,5-dimethylisocroman-6-ol. Later, the AS Fub 39 strain was taxonomically identified as *Penicillium steckii*.

**Keywords:** *Sargassum* sp., fungal strains, bioassay, TLC, NMR, LC – PDA – ELSD – MS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> (A): Total de metabólitos descritos na literatura para fungos marinhos; (B): Total de metabólitos inéditos descritos na literatura para fungos marinhos	<b>13</b>
<b>Figura 2:</b> Metabólitos secundários ativos de fungos isolados a partir de algas marinhas	<b>20</b>
<b>Figura 3:</b> Nomenclatura das linhagens de fungos isoladas a partir de uma alga marinha do gênero <i>Sargassum</i>	<b>25</b>
<b>Figura 4:</b> Linhagem AS Fub 39 ( <i>Penicillium steckii</i> )	<b>38</b>
<b>Figura 5:</b> Linhagem AS Tub 14	<b>39</b>
<b>Figura 6:</b> Linhagem AS Tub 16	<b>39</b>
<b>Figura 7:</b> Linhagem AS GPY 41	<b>39</b>
<b>Figura 8:</b> Linhagem AS GPY -2 T	<b>39</b>
<b>Figura 9:</b> Linhagem AS GPY S/D F	<b>40</b>
<b>Figura 10:</b> Linhagem AS M2% 8	<b>40</b>
<b>Figura 11:</b> Linhagem AS M2% 58	<b>40</b>
<b>Figura 12:</b> Linhagem AS M2% C	<b>40</b>
<b>Figura 13:</b> Linhagem AS M2% S/D H	<b>41</b>
<b>Figura 14:</b> Linhagem AS M2% -2 O	<b>41</b>
<b>Figura 15:</b> Linhagem AS Av -2 R	<b>41</b>
<b>Figura 16:</b> Linhagem AS BC 47	<b>41</b>
<b>Figura 17:</b> Linhagem AS BC S/D B	<b>42</b>
<b>Figura 18:</b> Resultado dos ensaios de atividade biológica	<b>47</b>
<b>Figura 19:</b> Cromatogramas de MS. (A): Fração de SPE MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) do branco do meio de cultura Tub; (B): Fração de SPE MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) do meio de cultura da linhagem AS Tub 14	<b>49</b>

<b>Figura 20:</b> Espectros de MS. (A): Branco do meio de cultura Av; (B): Extrato metanólico do micélio da linhagem AS GPY 41	<b>49</b>
<b>Figura 21:</b> Espectros de MS. (A): Extrato bruto AcOEt da linhagem AS Cel 34; (B): Extrato metanólico do micélio da linhagem AS M2% 8	<b>50</b>
<b>Figura 22:</b> Espectro de RMN – $^1\text{H}$ do extrato bruto AS Fub 39, em DMSO- $d_6$ (400 MHz)	<b>52</b>
<b>Figura 23:</b> Cromatograma do extrato bruto AS Fub 39. Condições de análise: coluna C <sub>18</sub> Inertsil ODS – 3 (dimensões 4,6 x 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), fase móvel MeOH/H <sub>2</sub> O (75:25), fluxo de 1 mL/min e observado em 280 nm	<b>53</b>
<b>Figura 24:</b> Espectro de infravermelho da amostra AS Fub 39 (P3)	<b>54</b>
<b>Figura 25:</b> Espectro de ultravioleta da amostra AS Fub 39 (P3)	<b>54</b>
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN – $^1\text{H}$ da amostra AS Fub 39 (P3), em DMSO- $d_6$ (400 MHz)	<b>56</b>
<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN – $^{13}\text{C}$ da amostra AS Fub 39 (P3), em DMSO- $d_6$ (100 MHz)	<b>57</b>
<b>Figura 28:</b> Espectro COSY $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$ da amostra AS Fub 39 (P3) (400 MHz)	<b>58</b>
<b>Figura 29:</b> Espectro HSQC $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ da amostra AS Fub 39 (P3) (400 MHz)	<b>59</b>
<b>Figura 30:</b> Atribuições dos sinais de RMN- $^1\text{H}$ e de RMN- $^{13}\text{C}$ do composto <b>17</b>	<b>61</b>
<b>Figura 31:</b> Espectro de massas da amostra AS Fub 39 (P3)	<b>62</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Meios de cultura para o isolamento de fungos marinhos	<b>23</b>
<b>Tabela 2:</b> Relação de cepas padrões e isolados clínicos selecionadas para o rastreamento de extratos marinhos com atividade antimicrobiana	<b>29</b>
<b>Tabela 3:</b> Correlação meio de cultura x linhagens	<b>37</b>
<b>Tabela 4:</b> Massas dos extratos brutos de AcOEt	<b>43</b>
<b>Tabela 5:</b> Massas dos extratos brutos metanólicos dos micélios	<b>43</b>
<b>Tabela 6:</b> Massas das frações H <sub>2</sub> O / MeOH (1:1) de SPE	<b>45</b>
<b>Tabela 7:</b> Massas das frações MeOH de SPE	<b>45</b>
<b>Tabela 8:</b> Análise da presença de metabólitos secundários (CCD) e atividade biológica observada para os extratos bioativos das linhagens de fungos isoladas da alga <i>Sargassum</i> sp	<b>46</b>
<b>Tabela 9:</b> Estudo comparativo dos deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do 8-metóxi-3,5-dimetilisocroman-6-ol ( <b>17</b> )	<b>60</b>

## LISTA DE SIGLAS

Av	Aveia
BC	Batata e Cenoura
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Cel	Celulose
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
ELSD	<i>Electron Spray Light Scattering Detector</i> (Detector de Espalhamento de Luz Evaporativo)
Fub	Fubá
GPY	<i>Glucose, Peptone and Yeast extract</i> (Glicose, Peptona e Extrato de Levedura)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida)
M2%	Malte 2%
M3%	Malte 3%
MS	<i>Mass Spectrometer</i> (Espectrômetro de Massas)
PDA	<i>Photo Diode Array Deterctor</i> (Detector de Arranjo de Diodos)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TMS	Tetrametilsilano
Tub	Tubaki
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 Fungos: características gerais	14
1.2 Fungos marinhos: particularidades	15
1.3 Algas	17
1.4 Interações entre algas marinhas e fungos filamentosos	17
1.5 Metabólitos secundários de fungos marinhos associados à algas	18
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>22</b>
3.1 Coleta das amostras	22
3.2 Isolamento, purificação e caracterização das linhagens	24
3.3 Preservação	26
3.4 Cultivo em pequena escala	26
3.5 Obtenção dos extratos bruto	27
3.6 Ensaio de atividade biológica	28
3.6.1 Avaliação do potencial antibiótico	28
3.6.2 Inibição da enzima APRT de <i>Leishmania tarentolae</i> e da enzima GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
3.6.3 Efeito antimicobacteriano	30
3.6.4 Atividade citotóxica em células tumorais humanas	32
3.7 Técnicas Cromatográficas	33
3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	33
3.7.2 Espectrometria de Massas	34
3.7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	34

3.8 Técnicas Espectroscópicas	35
3.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
3.8.2 Ultravioleta – Visível (UV–Vis)	35
3.8.3 Infravermelho (IV)	36
3.9 Rotação Específica ( $[\alpha]_D$ )	36
<b>4. RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
4.1 Isolamento e caracterização das linhagens fúngicas	37
4.2 Análise dos extratos brutos e frações	42
4.3 Ensaio de atividade biológica	46
4.4 Análises por LC – PDA – ELSD – MS	48
4.5 Separação cromatográfica do extrato bruto AS Fub 39 e determinação estrutural do composto majoritário	51
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Microorganismos — procariontes, vírus, fungos, microalgas e protozoários — consistem no maior grupo de organismos individuais da Terra. Entretanto, os cientistas conseguiram descrever apenas uma pequena fração destes organismos, cerca de 1%. Já os oceanos, que aparentam ser os únicos habitats que ainda preservam a maioria de suas características naturais, representam aproximadamente metade da biodiversidade global. Sob estes aspectos, os oceanos podem ser considerados como uma fonte enorme e virtualmente inexplorada de microrganismos produtores de novos produtos naturais (COLWELL, 1997; COOPER, 2004).

Fungos derivados de esponjas e algas são responsáveis pela maioria dos produtos naturais já descritos a partir fungos marinhos. Os fungos derivados de esponjas vêm em primeiro lugar, tanto para o número total de compostos, quanto para o número de metabólitos inéditos. Entretanto, mesmo em segundo lugar, os fungos derivados de algas apresentam uma taxa maior de compostos inéditos em relação a compostos já conhecidos (JENSEN; FENICAL, 2002; WANG, 2006).

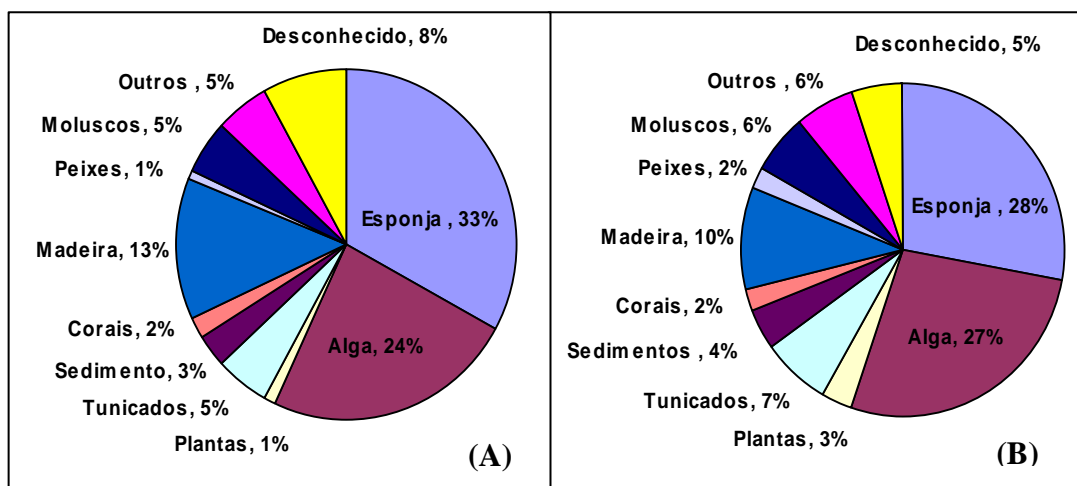


Figura 1: (A): Total de metabólitos descritos na literatura para fungos marinhos; (B): Total de metabólitos inéditos descritos na literatura para fungos marinhos (BUGNI; IRELAND, 2004).

Tais metabólitos, quando bioativos, podem ser utilizados como matéria prima pela indústria bioquímica, agroquímica e farmacêutica. Os estudos feitos a respeito de suas atividades biológicas se concentram nas áreas voltadas para propriedades antibióticas e anticarcinogênicas, além de outras atividades mais seletivas, como a inibição enzimática e a inibição do ciclo celular. Mais recentemente, a busca por atividades biológicas passou a incluir a atividade antiviral (HIV) e imunomodulatória (KELECOM, 2002).

### **1.1 Fungos: características gerais**

Os fungos são microrganismos amplamente dispersos, podendo ser encontrados em vegetais, animais (inclusive no homem), em ambientes aquáticos e no solo, participando do ciclo de elementos na natureza.

Até 1969 os fungos eram considerados vegetais, quando passaram a ser classificados em seu próprio Reino, denominado Reino *Fungi*. Existem várias características que nos permitem apreciar as diferenças entre os vegetais e os fungos, como o fato destes não possuírem celulose em sua parede celular (à exceção de alguns fungos aquáticos), serem heterotróficos, não sintetizando nenhum tipo de pigmento fotossintético e não armazenarem amido como substância de reserva. A nutrição dos fungos se dá por absorção, processo no qual atuam enzimas específicas que hidrolisam macromoléculas, tornando-as assimiláveis (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; TRABULSI *et al.*, 2002).

Os fungos, quando em meio de cultura, podem formar colônias de dois tipos: leveduriforme ou filamentosa. As colônias leveduriformes são unicelulares e possuem aspecto pastoso. Já as colônias filamentosas, características dos bolores, são multicelulares e podem ter aspecto algodinoso ou pulverulento (TRABULSI *et al.*, 2002).

As colônias filamentosas são constituídas por estruturas multicelulares, em forma de tubo, denominadas hifas. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio do interior

do substrato, que funciona como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado de micélio vegetativo. O micélio da superfície, que cresce acima do meio de cultivo, é o micélio aéreo. Durante a reprodução, o micélio aéreo se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos. (TRABULSI *et al.*, 2002).

## 1.2 Fungos marinhos: particularidades

Fungos marinhos são melhor considerados um grupo ecológico do que uma classe taxonômica. A melhor definição já feita para fungos marinhos foi proposta por Kohlmeyer e Kohlmeyer (1979): *“fungos marinhos obrigatórios são aqueles que se desenvolvem e esporulam exclusivamente em um habitat marinho ou de estuário; fungos marinhos facultativos são aqueles provenientes de ambiente de água doce ou terrestres e que são capazes de crescer e até mesmo esporular no ambiente marinho.”* (PIETRA, 1997; PANG; MITCHELL, 2005).

Visto que os fungos marinhos não são definidos por suas características fisiológicas, o isolamento de fungos filamentosos a partir de amostras marinhas não implica na comprovação de que estes organismos sejam ativos no ambiente marinho. Considerando que várias espécies terrestres exibem um alto grau de tolerância ao sal e crescem rapidamente em ágar, é possível isolar um fungo terrestre como contaminante. Ainda, o fungo isolado poderia estar dormente na forma de esporos ou fragmentos de hifas, até que as condições de cultivo em laboratório tornem-se favoráveis para o seu desenvolvimento (JENSEN; FENICAL, 2002).

De fato, muitos fungos isolados de amostras marinhas não foram comprovadamente identificados como sendo fungos marinhos obrigatórios ou facultativos e uma revisão da literatura indica que apenas uma pequena parte dos compostos descritos de fungos marinhos pertencem a fungos marinhos obrigatórios (JENSEN; FENICAL, 2002).

Ainda, os fungos marinhos facultativos, que eram originalmente terrestres, podem ter se adaptado às condições marinhas de forma que afetasse seu metabolismo secundário. Esta adaptação do metabolismo explicaria o fato de que aproximadamente 30% dos fungos marinhos que tiveram novos compostos descritos pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (JENSEN; FENICAL, 2002).

Acredita-se também que existam dois grandes grupos de fungos marinhos, os temperados e os tropicais. Nas regiões entre os trópicos e subtropicais a composição da microbiota depende da temperatura da água, e não da temperatura atmosférica. As correntes marinhas que frequentemente cruzam estas fronteiras, influenciam e também transportam a microbiota, portanto existem poucas evidências de que as espécies estejam restritas a países ou continentes (HYDE *et al.*, 1998).

Estes fungos podem crescer em uma ampla variedade de substratos, como madeira, sedimentos, areia, manguezais, corais, conchas de moluscos, invertebrados marinhos e, finalmente, na superfície e no interior das algas. Embora muitos papéis ecológicos tenham sido estudados e descritos para os fungos terrestres, a ecologia de fungos marinhos tem sido mais difícil de investigar. Ainda assim, os fungos são de grande importância para o equilíbrio do ecossistema marinho. Por exemplo, os fungos são importantes intermediários do fluxo de energia, entre detritos e níveis tróficos superiores, desempenhando o papel de reciclagem de nutrientes como decompositores. Ademais, enquanto que alguns fungos marinhos causam doenças em animais e plantas, outros desenvolvem relações mutualísticas com tais organismos (HYDE *et al.*, 1998; WANG, 2006).



### 1.3 Algas

As algas, em sua totalidade, são organismos eucarióticos e fotossintetizantes. Entretanto, outras características como os pigmentos fotossintetizantes, a composição da parede celular e a substância de reserva, variam amplamente entre as Divisões. As algas podem ainda ser unicelulares (Divisões Euglenophyta, Chrysophyta ou Pyrrophyta) ou multicelulares (Divisões Chlorophyta, Rhodophyta, Xanthophyta ou Phaeophyta) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

As algas pardas (Phaeophyta) são as que apresentam tamanho e diferenciação tissular mais elaborado, aproximando-se das plantas vasculares. Estas algas formam grandes maciços que, quando ancorados fora da costa, oferecem abrigo para uma extensa diversidade de microrganismos, peixes e invertebrados. Dentre as espécies de algas pardas que são mais frequentemente colonizadas tem-se: *Fucus* sp., *Laminaria* sp., *Cystoseira* sp. e *Sargassum* sp. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

### 1.4 Interações entre algas marinhas e fungos filamentosos

Fungos associados a algas são um grupo taxonomicamente diverso que inclui espécies simbiotes, mutualistas, saprófitas, parasitas e patógenas de interesse evolutivo, ecológico e comercial.

Os fungos filamentosos podem colonizar uma grande variedade de algas marinhas, mas são as feofíceas e as rodofíceas que apresentam a maior diversidade de fungos associados. Já as clorofíceas, em contraste, são apenas raramente associadas a fungos filamentosos. Por serem frágeis e possuírem um ciclo de vida curto, as clorofíceas não oferecem o tempo necessário para que se estabeleça a colonização por ascomicetos de crescimento lento. Entretanto, em alguns casos podem ser observadas simbioeses entre clorofíceas e fungos, formando líquens (KOHLMEYER; KOHLMEYER, 1979).

A parte externa das algas oferece uma área protegida em um ambiente continuamente exposto a fatores de estresse como a baixa concentração de nutrientes, o dessecamento, a salinidade e a radiação solar. Algas saudáveis liberam parte do carbono fixado durante a fotossíntese na forma de uma secreção chamada mucilagem. Esta mucilagem, um substrato rico em carboidratos, lipídeos e peptídeos, age como um fator atrativo para os microrganismos colonizadores (ZUCCARO; MITCHELL, 2005).

É neste ambiente que as interações entre fungos e algas têm início, a partir da ligação dos esporos e da invasão das hifas, levando à colonização da alga. A invasão das hifas ocorre principalmente pela formação de hifas especializadas, com extremidades bifurcadas que seriam capazes de penetrar na alga: através da degradação enzimática da parede celular, ou exercendo pressão no ponto de contato. Um outro ponto de entrada de hifas inclui partes danificadas pela ação de animais epifíticos como anelídeos e poliquetos (ZUCCARO; MITCHELL, 2005).

### **1.5 Metabólitos secundários de fungos marinhos associados à algas**

Fungos derivados do ambiente marinho tem sido objeto de investigações recentes e demonstram ser uma nova e importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos (HOLLER *et al.*, 2000; FENICAL; JENSEN, 2002).

Bugni e Ireland (2004) discutem as estratégias para o isolamento, o crescimento e a produção de metabólitos secundários por parte destes fungos, enfatizando que a produção dos metabólitos é altamente variável em função das condições de crescimento, especialmente a salinidade do meio, mas que nem sempre a utilização de meio salino é necessária para a produção de metabólitos. Por fim, destacam as diversas classes de metabólitos isolados (ao todo 273 compostos) e suas atividades biológicas, como:

a) a helimecina A, **(1)** isolada do fungo *Acremonium* sp. obtido a partir da alga *Halymenia dilatata* (CHEN *et al.*, 1996). A helimecina A apresentou atividade “antialgal”, inibindo o crescimento da alga *Skeletonema costatum*;

b) a dicetopiperazina modificada mactanamida **(2)**, isolada do fungo *Aspergillus* sp. obtido a partir da alga *Sargassum* sp., que apresentou atividade fungistática (LORENZ *et al.*, 1998);

c) o 9, 10 – diidro – (6*R*, 11*S*, 12*R*, 14*R*) – coletodiol **(3)** e o 9, 10 – diidro – (6*R*, 11*R*, 12*R*, 14*R*) – coletodiol **(4)**, isolados do fungo *Varicosporina ramulosa* obtido da alga *Cytoseira* sp., que apresentaram atividade antifúngica (HOLLER *et al.*, 1999);

d) as ascosalipirrolidinonas A **(5)** e B **(6)**, isoladas do fungo *Ascochyta salicorniae* obtido a partir da alga *Ulva* sp., das quais o composto **5** apresentou atividade anti-malária contra *Plasmodium falciparum*, atividade antimicrobiana e inibiu a quinase da tirosina p516ck (OSTERHAGE *et al.*, 2000);

e) a pestalona **(7)**, produzida pelo fungo *Pestalotia* sp., obtido a partir da alga *Rosenvingea* sp. e crescido na presença de um antagonista bacteriano. O composto **7** apresentou potente atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, com MIC de 37 ng/mL, e também contra *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina com MIC de 78 ng/mL (CUETO *et al.*, 2001);

f) o fungo endofítico *Drechslera dematioidea*, obtido da alga vermelha *Liagora viscida*, que forneceu dezesseis compostos dos quais nove são sesquiterpenos inéditos **(8 – 16)**, e dois **(13 e 15)** apresentaram atividade anti-malária (OSTERHAGE *et al.*, 2002).

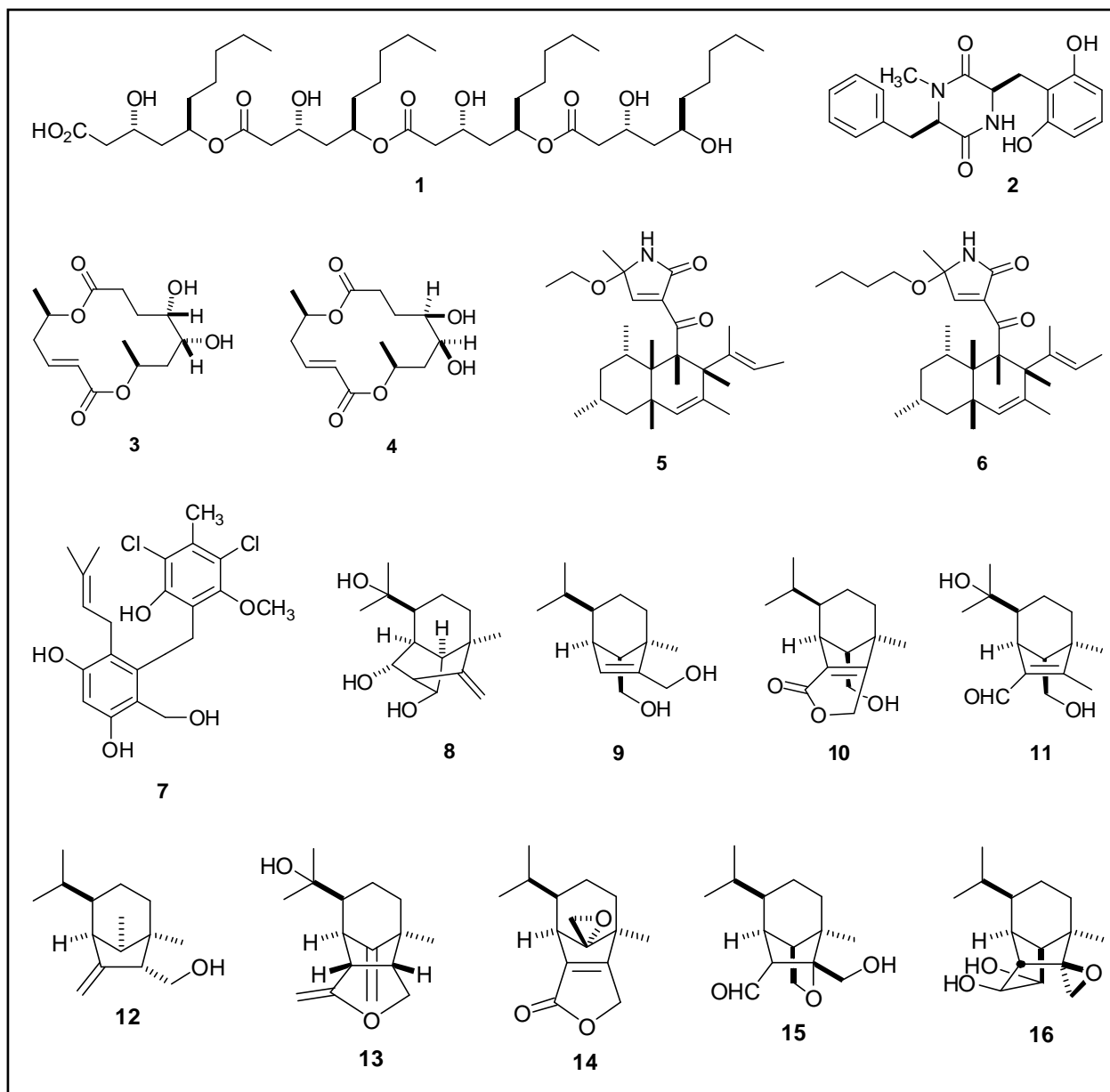


Figura 2: Metabólitos secundários ativos de fungos isolados a partir de algas marinhas.

Estes poucos exemplos ilustram a diversidade metabólica de fungos associados à algas. Vários outros exemplos podem ser encontrados na literatura (BUGNI; IRELAND, 2004; SALEEM *et al.*, 2007).

**2. OBJETIVOS**

Os objetivos deste trabalho foram:

1. O isolamento de fungos associados a uma alga marinha do gênero *Sargassum*;
2. O crescimento das linhagens isoladas em 8 diferentes meios de cultura para a geração de extratos a partir de cada uma das linhagens de fungos isoladas;
3. A avaliação dos extratos brutos obtidos em diferentes bioensaios;
4. A análise do perfil químico dos extratos obtidos.
5. Com base nos resultados coletados, estabelecer critérios para a avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isoladas de um macrorganismo marinho.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta das amostras

O material biológico (alga *Sargassum* sp.) utilizado foi coletado em São Sebastião/SP em janeiro de 2007. Este material foi colocado em sacolas de plástico esterilizadas, as quais foram imediatamente transportadas para o laboratório de apoio nas dependências do CEBIMar (USP).

Os talos das algas foram submetidos à esterilização superficial através de sucessivas lavagens com solução de 0,001 g/L de HgCl<sub>2</sub> em 5% de etanol por 1 minuto, seguido de três lavagens com água estéril (NEWEL, 1976).

Após a esterilização superficial foram realizados três procedimentos diferentes de inóculo. O primeiro consistiu apenas em transferir fragmentos (~ 1 cm<sup>2</sup>) da alga para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura agarizados. O segundo procedimento consistiu no inóculo, em placas de Petri, de um extrato aquoso obtido triturando-se a alga em água destilada estéril. Este extrato aquoso foi inoculado tanto sem diluição, como diluído para 10<sup>-2</sup>. O último procedimento realizado foi o de esfregaço. As placas de Petri foram inoculadas esfregando-se os fragmentos de alga na superfície do meio de cultura.

Todos os meios de cultura (Tabela 1) foram preparados com água do mar artificial (ASW – Artificial Sea Water), que consiste de: 1,36 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 9,68 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 0,61 g de KCl; 30 g de NaCl; 0,14 mg de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,47 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 170 mg de NaHCO<sub>3</sub>; 100 mg de KBr; 40 mg de SrCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 30 mg de ácido bórico e 1 L de água destilada. O antibiótico rifampicina também foi utilizado na preparação dos meios para inibir o crescimento bacteriano (HOLLER *et al.*, 2000).

Tabela 1: Meios de cultura para o isolamento de fungos marinhos

Meios de Cultura	Componentes
Ágar de Glicose, Peptona e Extrato de Levedura (GPY)	1 g de Glicose, 0,5 g de Peptona de carne de soja, 0,1 g de Extrato de levedura, 15 g de Ágar e 1 L de ASW.
Ágar de Batata e Cenoura (BC)	20 g de Batatas cozidas e esmagadas, 20 g de Cenouras cozidas e esmagadas, 20 g de Ágar e 1 L de ASW.
Ágar de Malte 2% (M2%)	20 g de Extrato de malte, 15 g de Ágar e 1 L de ASW.
Ágar de Malte 3% (M3%)	30 g de Extrato de malte, 5 g de Peptona micológica, 15 g de Ágar e 1 L de ASW.
Ágar de Fubá (Fub)	42 g de fubá foram agitados em 500 mL de água destilada a 60°C por 12h, filtrados e o filtrado diluído com ASW até 1 L. 15 g de Ágar.
Ágar de Aveia (Av)	30 g de flocos de aveia foram fervidos em 500 mL de água destilada por 1h, filtrados e o filtrado diluído com ASW até 1 L., 20 g de Ágar.
Ágar Tubaki (Tub)	30 g de Glicose, 0,5 g de Extrato de levedura, 1 g de Peptona, 1 g de Fosfato de potássio dibásico, 0,5 g de Sulfato de magnésio heptahidratado, 0,01 g de Sulfato de ferro heptahidratado, 15 g de Ágar e 1 L de ASW.
Ágar Celulose (Cel)	10 g de Celulose, 1 g de Extrato de levedura, 15 g de Ágar e 1 L de ASW.

Após a inoculação das placas de Petri no laboratório do CEBIMar (USP), estas placas foram levadas para o laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), e incubadas em uma estufa (~ 25°C) por uma semana.

### **3.2 Isolamento, purificação e caracterização das linhagens**

As placas foram examinadas a intervalos regulares para facilitar o isolamento das linhagens de fungos que cresceram a partir dos fragmentos e extratos da alga. A purificação das linhagens isoladas foi realizada pelo método de esgotamento por estrias em placas de Petri contendo meio agarizado, e por sucessivos repiques até se obter colônias puras.

Estas colônias foram caracterizadas de acordo com suas principais características macroscópicas: **a)** coloração da colônia; **b)** aspecto (algodonoso, pulvulento); e, **c)** presença de micélio aéreo. Em seguida, as colônias foram nomeadas de acordo com 4 critérios: **a)** organismo a partir do qual as linhagens foram isoladas; **b)** meio de cultura original do isolamento; **c)** método de isolamento; e **d)** linhagem. Assim, todas as linhagens apresentam variações do código a seguir (Figura 3).



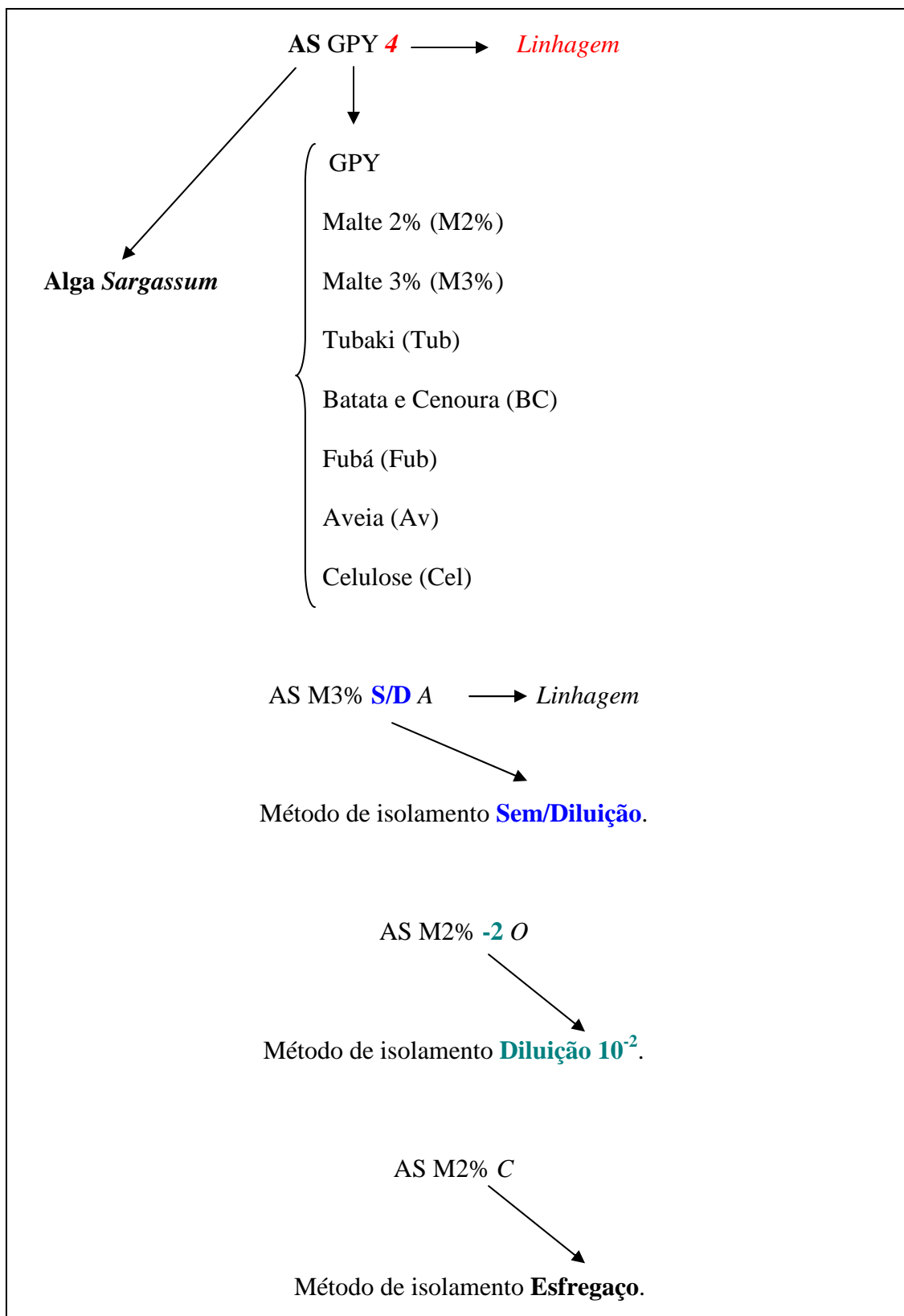


Figura 3: Nomenclatura das linhagens de fungos isoladas a partir de uma alga marinha do gênero *Sargassum*.

### **3.3 Preservação**

Todas as linhagens purificadas foram preservadas de acordo com três metodologias distintas: glicerol 10% e água destilada, ambas adaptadas de Deshmukh (2003), e por repique contínuo.

Para a preservação em glicerol 10% os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio agarizado. Após o devido tempo de crescimento, com o auxílio de uma seringa plástica foram cortados três círculos superficiais de ágar contendo o fungo em vários estados de envelhecimento. Tais círculos foram imersos em um Eppendorf etiquetado contendo glicerol 10%, previamente esterilizado. As preservações foram feitas em triplicata e estocadas em refrigeradores.

Para a preservação em água destilada os fungos foram repicados em placas de Petri contendo meio agarizado. Após o devido tempo de crescimento, com o auxílio de uma seringa plástica foram cortados três círculos superficiais de ágar contendo o fungo em vários estados de envelhecimento. Tais círculos foram imersos em um Eppendorf etiquetado contendo água destilada, previamente esterilizada. As preservações foram feitas em triplicata e estocadas em refrigeradores.

Para a preservação por repique contínuo, as linhagens fúngicas foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura agarizado.

### **3.4 Cultivo em pequena escala**

As linhagens fúngicas foram primeiramente crescidas em placas de Petri. Após o crescimento, círculos superficiais de ágar contendo o micélio foram retirados das colônias com o auxílio de uma seringa plástica e imersos em frascos com tampa contendo 250 mL do meio de cultura original líquido (sem ágar) no qual o fungo se desenvolveu. Os frascos foram deixados para fermentar por 28 dias, em temperatura ambiente, aerados e sem agitação.

### 3.5 Obtenção dos extratos brutos

Após o período de fermentação os meios foram divididos em duas categorias: clarificados (GPY, M2%, M3% e Tub) e não clarificados (BC, Fub, Av, Cel).

Para os meios clarificados, primeiramente o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo, utilizando-se um funil sinterizado acoplado a um kitassato. Como filtro utilizou-se papel de filtro recoberto com uma camada de celite. O micélio foi então imerso em 10 mL de MeOH, extraído durante um minuto em um banho de ultrassom e filtrado, dando origem ao extrato metanólico do micélio.

Os meios de cultura livres de micélio foram submetidos a uma extração em fase sólida de sílica gel derivatizada com C<sub>18</sub> e posteriormente eluída com:

1. 25 mL de H<sub>2</sub>O, para a retirada de sais, açúcares, aminoácidos, etc.;
2. 25 mL de MeOH / H<sub>2</sub>O (1:1);
3. 25 mL de MeOH.

A fração 1 foi descartada e as frações 2 e 3 foram coletadas em tubos de ensaio de 50 mL e secas em um speedvac. Depois de seco, o conteúdo dos tubos foi rediluído e transferido para frascos etiquetados e pesados. Os frascos foram então colocados em um speedvac para a total evaporação do solvente, originando as frações do meio de cultura.

Aos meios não clarificados foram adicionados 250 mL de AcOEt e deixados para extrair por uma noite, sob agitação. Após o período de extração, a mistura meio de cultura + micélio + solvente foi filtrada à vácuo, utilizando-se um funil de Büchner acoplado a um kitassato. Como filtro utilizou-se papel de filtro recoberto com uma camada de celite.

Após a filtração foi realizada uma partição líquido-líquido para a separação da fase orgânica (AcOEt) e da fase aquosa (meio de cultura já extraído). A fase aquosa foi descartada

e a fase orgânica transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL. O balão foi então acoplado a um rotaevaporador e o solvente, evaporado.

O conteúdo do balão foi então rediluído e transferido para um frasco etiquetado e pesado. O frasco foi também acoplado ao rotaevaporador para a total evaporação do solvente, originando o extrato bruto AcOEt.

Os mesmos procedimentos de extração foram realizados com os meios de cultura puros (estéreis), originando os extratos e frações tidos como branco dos meios de cultura.

Os solventes utilizados foram da marca Qhemis, grau de pureza P.A.

### 3.6 Ensaios de atividade biológica

Todos os extratos e frações que apresentaram massa suficiente (superior a 20 mg) foram rediluídos e pequenas alíquotas (~ 5 mg), transferidas para novos frascos, secas e enviadas aos colaboradores para a realização dos respectivos ensaios de atividade biológica.

#### 3.6.1 Avaliação do potencial antibiótico

Para os ensaios de atividade antibiótica utilizou-se o protocolo adaptado a partir de Oliveira *et al.* (2006). Assim, os extratos e frações na concentração de 400 – 500 µg/mL foram diluídos serialmente em DMSO (1%). Suspensões bacterianas de cultura *overnight* de determinada cepa padrão ou isolados clínicos (Tabela 2) crescidos em BHI (*Brain Heart Infusion*) foram diluídos até a concentração de  $10^6$  UFC/mL.

Os testes foram realizados em microplacas estéreis com 96 poços de fundo chato, sendo que cada poço teve volume final total de 100 µL (40 µL de meio de cultura + 20 µL de inóculo + 40 µL da amostra diluída em água). As placas foram incubadas por 24 h, à 37 °C

em microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) e o crescimento microbiano determinado pelas absorvâncias mensuradas antes e após a incubação, a 550 – 560 nm em leitor automático de microplacas (Molecular Devices, Programa Versa Max). A CIM foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento microbiano. Os experimentos foram realizados em triplicatas e tiveram como controle negativo a cultura microbiana sem adição do extrato / fração.

Tabela 2: Relação de cepas padrões e isolados clínicos selecionadas para o rastreamento de extratos marinhos com atividade antimicrobiana

<b>Microrganismos</b>	<b>Origem</b>
<i>Escherichia coli</i>	NTCC861
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC14506
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC15300
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC27607
<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolado clínico 2.M7/4
<i>Candida albicans</i>	ATCC36801 (sorotipo A)

Este ensaio foi realizado pelo grupo do professor Reginaldo Gonçalves (Faculdade de Odontologia, UNICAMP).

### 3.6.2 Inibição da enzima APRT de *Leishmania tarentolae* e da enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi*

Para o ensaio de inibição enzimática da enzima APRT foi realizada uma medida da cinética de formação do AMP (adenosina monofosfato), seguindo a reação:



uma vez que a enzima APRT catalisa a reação da adenina com o PRPP (fosforribosil pirofosfato), formando o AMP.

Esta reação é realizada em um tampão Tris – HCl (pH 7,4) com a presença de íons magnésio  $Mg^{2+}$  (disponíveis pela adição de  $MgCl_2$ ) na solução. Os testes são realizados em cubetas de quartzo de 500  $\mu$ L ou em placas de Elisa de 96 poços. A concentração final da enzima é de 6  $\mu$ g/mL. O ensaio é acompanhado em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 249 nm.

Para o ensaio de inibição enzimática da enzima GAPDH foi realizada uma medida da cinética de formação do NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida), seguindo a reação:



uma vez que a enzima GAPDH catalisa a reação do  $NAD^+$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo forma oxidada) com o G3P (gliceraldeído 3 – fosfato) formando o NADH.

Esta reação é realizada em um tampão Trietanolamida (pH 7,5) com a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol (inibidor de pontes de sulfeto), arseniato de sódio e EDTA (ácido etilenodiamino tetra – acético). Os testes são realizados em cubetas de quartzo de 500  $\mu$ L ou em placas de Elisa de 96 poços. A concentração final da enzima é de 0,75  $\mu$ g/mL. A reação foi acompanhada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm.

Este ensaio foi realizado pelo grupo do professor Glaucius Oliva (IFSC, USP).

### 3.6.3 Efeito antimicobacteriano

O efeito antimicobacteriano das amostras em teste foi avaliado sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para a determinação da CIM, e em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv para a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC).

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em placa, utilizando como revelador o corante Alamar Blue. As amostras foram dissolvidas em DMSO e diluídas em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco) em várias concentrações. A concentração de DMSO nas diluições foi inferior a 1%. A cepa *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 foi cultivada em meio de cultura Lowenstein – Jensen à 37 °C por três semanas e subcultivadas em meio líquido de Middlebrook 7H9 à 37 °C por 10 dias. A suspensão de micobactérias foi ajustada para  $4 \times 10^5$  micobactérias/mL usando a escala padrão de McFarland, e 100 µL foram adicionados a microplaca contendo 100 µL de meio de cultura e diferentes concentrações das amostras. Como controles foram usados meio de cultura (controle negativo) e meio de cultura e micobactérias (controle positivo). Como droga controle foi utilizada a rifampicina nas concentrações de 0,015 a 25 µmolL<sup>-1</sup>.

A microplaca foi incubada à 37 °C e após 6 dias, foi adicionado 25 µL de uma mistura de Tween 80 à 10% e Alamar Blue (1:1) às cavidades da microplaca. A microplaca foi reincubada à 37 °C e após 24 horas a leitura macroscópica foi realizada para determinação da CIM, definida pela menor concentração da droga capaz de impedir a alteração da cor azul para rósea. A permanência da cor azul nas cavidades indicou a ausência de crescimento micobacteriano e o desenvolvimento da cor rósea indicou a presença de crescimento micobacteriano.

Para a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC), macrófagos J774 em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2,5% de soro fetal bovino foram plaqueados na concentração de  $5 \times 10^5$  cél/cavidade, em placas para cultura de células, contendo 24 cavidades. Após 12 horas de incubação a 37 °C, uma suspensão contendo o *M. tuberculosis* foi adicionada aos macrófagos, de maneira a ocorrer a infecção na proporção de 10 micobactérias/célula. As células foram infectadas por 3 – 4 horas e em seguida lavadas com salina tampão fosfato (PBS) para a remoção das micobactérias extracelulares.

As células infectadas foram suplementadas com meio de cultura e incubadas com diferentes concentrações das amostras. Após 72 horas, as células foram lavadas com meio de cultura para a remoção de micobactérias extracelulares e lisadas pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,25%. O lisado foi diluído em série e alíquotas de 100 µL foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar 7H11. Após uma incubação a 37 °C por 3 – 4 semanas, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas.

Este ensaio foi realizado grupo do professor Célio Lopes Silva (FMRP, USP).

### 3.6.4 Atividade citotóxica em células tumorais humanas

Para a determinação da atividade citotóxica em células tumorais humanas foram utilizadas células de câncer de mama (MDA – MB435), de cólon (HCT – 8) e de sistema nervoso (SF295), cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Os extratos e frações a serem testados foram diluídos em DMSO na concentração estoque de 20 mg/mL e a sua citotoxicidade avaliada pelo método MTT. Este método consiste em um microensaio, onde as células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes densidades: 0,7 x 10<sup>5</sup> (HCT – 8), 0,6 x 10<sup>5</sup> (SF295) e 0,1 x 10<sup>6</sup> (MDA – MB435), e incubadas durante 72 horas com as amostras (100 µg/mL). Utilizou-se uma solução de MTT para finalizar o tempo de incubação.

As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectofotômetro de placa a 550 nm. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Este ensaio foi realizado grupo da professora Claudia do Ó Pessoa (Universidade Federal do Ceará).



### 3.7 Técnicas Cromatográficas

#### 3.7.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todos os extratos brutos e frações foram analisados por CCD. Para estas análises foram utilizadas cromatofolhas (20 x 20 cm) de sílica gel 60 sobre poliéster com indicador de UV F<sub>254</sub> (Aldrich) e solventes grau P.A (Qhemis).

Após a aplicação das amostras, as cromatofolhas foram colocadas em uma cuba contendo 20 mL de fase móvel: **a)** hexano / AcOEt (7:3), quando utilizado o padrão colesterol; ou **b)** diclorometano / MeOH (9:1), quando utilizado o padrão timidina.

As placas foram observadas em luz UV com lâmpada Spectroline (254 e 365 nm) e, após a inspeção na câmara de UV, borrifadas com os três reveladores distintos: ácido fosfomolibdico, ninidrina e Dragendorff.

O ácido fosfomolibdico revela substâncias redutoras e foi preparado a uma concentração de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH.

A ninidrina, que revela aminas primárias e aminoácidos, foi preparada a uma concentração de 0,1% de ninidrina em EtOH.

O reagente Dragendorff, que revela alcalóides, foi preparado a partir da mistura de duas soluções. A solução **A** consiste de 0,85 g de nitrato básico de Bismuto (III) em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de H<sub>2</sub>O, enquanto que a solução **B** consiste de 8 g de Iodeto de Potássio em 20 mL H<sub>2</sub>O. As soluções **A** e **B** são misturadas em um volume de 1:1 e, para ser utilizada, 1 mL da mistura **AB** é diluída em 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de H<sub>2</sub>O.

Depois de reveladas, as placas foram analisadas por comparação com os padrões. Assim, as amostras que apresentaram bandas abaixo da marca do padrão colesterol e acima da marca do padrão timidina, ou seja, bandas indicativas de metabólitos de polaridade intermediária, foram consideradas como de interesse.

### **3.7.2 Espectrometria de Massas**

Os brancos dos meios de cultura, os extratos e frações que apresentaram resultados positivos nos ensaios de atividade biológica e os extratos e frações que apresentaram perfil interessante na CCD foram analisados por cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos, espalhamento de luz evaporativo e espectrômetro de massas (LC – PDA – ELSD – MS).

Este sistema é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters<sup>®</sup>, modelo Alliance 2695, acoplado a três detectores: um espectrofotométrico UV – Visível, marca Waters<sup>®</sup>, modelo 2996 de arranjo de fotodiodos (Photodiode Array Detector), um de espalhamento de luz evaporativo (Evaporative Light Scattering Detector), marca Waters<sup>®</sup>, modelo 2424 e um espectrômetro de massas, marca Waters<sup>®</sup>, modelo ZQ 2000. Todos gerenciados por um sistema MassLynx.

Cerca de 1 mg de cada amostra foi diluída em 1 mL de MeOH grau HPLC (JT Baker) e transferida para os vials do amostrador. Foram realizadas análises de 25 minutos, utilizando um gradiente de eluição (100% H<sub>2</sub>O durante 1 minuto, seguido de curva número 4 de gradiente convexo durante 20 minutos até 100% MeOH, permanecendo neste último por 5 minutos) com fluxo de 1 mL/min. Utilizou-se uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Waters<sup>®</sup> Symmetry (dimensões 4,6 x 75 mm, 3,5 µm).

### **3.7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O extrato bruto AS Fub 39 foi separado por cromatografia líquida de alta eficiência associada a um detector de ultravioleta. Este sistema cromatográfico é composto por uma bomba para gradiente quaternário Waters<sup>®</sup> 600 e um detector UV 2996, gerenciado por um sistema Waters<sup>®</sup> Millennium 32.

Para a separação foi utilizada uma coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub> Inertsil / ODS – 3 (dimensões 4,6 x 250 mm, 5 µm); fase móvel MeOH / H<sub>2</sub>O (75:25) e monitorada nos comprimentos de onda 230 e 280 nm.

### **3.8 Técnicas Espectroscópicas**

#### **3.8.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os extratos brutos e frações que apresentaram resultados positivos nos bioensaios foram submetidos à análise por RMN – <sup>1</sup>H para a obtenção de dados adicionais sobre sua composição química. Para tanto, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram diluídos em 600 µL de DMSO deuterado, utilizando-se TMS como padrão de referência interna.

As frações obtidas a partir da purificação do extrato bruto AS Fub 39 foram ainda analisadas por RMN – <sup>13</sup>C e RMN uni e bidimensional para a análise do composto majoritário e sua determinação estrutural.

O equipamento utilizado foi um Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (<sup>1</sup>H) e a 100,10 MHz na frequência do Carbono (<sup>13</sup>C) no DQ – UFSCar.

#### **3.8.2 Ultravioleta – Visível (UV–Vis)**

O espectro na região do ultravioleta – visível (UV–Vis) foi obtido com um espectrofotômetro Hitachi, modelo U – 3210 na região de 200 a 400 nm (IQSC – USP). A amostra foi preparada a uma concentração de 20% em MeOH grau espectroscópico (99,9% A.C.S. Sigma – Aldrich).

### **3.8.3 Infravermelho (IV)**

O espectro na região do infravermelho (IV) foi obtido em um espectrofotômetro FTIR Bomem modelo MB – 102 (IQSC – USP). A amostra foi diluída em 1 mL de MeOH grau espectroscópico (99,9% A.C.S. Sigma – Aldrich) e aplicada com o auxílio de um capilar sobre um disco de silício. Após a aplicação, o solvente foi completamente evaporando com ar comprimido e a amostra foi seca em um dessecador de vácuo contínuo.

### **3.9 Rotação Específica ( $[\alpha]_D$ )**

A medida de rotação específica foi obtida em um Polarímetro Perkin – Elmer 341, à 20 °C, em um comprimento de onda de 589 nm. Para tanto, a amostra foi diluída em MeOH a uma concentração de 1 mg/mL.

#### 4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

##### 4.1 Isolamento e caracterização das linhagens fúngicas.

A metodologia de fragmentação da alga *Sargassum* sp. foi a que mais favoreceu a purificação das linhagens, uma vez que as colônias dos fungos cresceram em pontos distintos da placa, ainda que estivessem próximas. Já as metodologias de diluição e esfregaço dificultaram o trabalho inicial de isolamento, pois o processo de esfregaço dos extratos aquosos (sem diluição e diluição  $10^{-2}$ ) e dos fragmentos de alga nas placas fez com que as colônias crescessem dispersas, misturadas e em replicata.

Ao todo, foram isoladas e purificadas 58 linhagens de fungos a partir dos diversos meios de cultura utilizados, sendo o meio de cultura M2% o que melhor favoreceu o crescimento e isolamento de linhagens (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação meio de cultura x linhagens

Meio de cultura	Linhagens Isoladas
GPY	08
<b>Malte 2%</b>	<b>12</b>
Malte 3%	05
Tubaki	05
Batata e cenoura	10
Fubá	04
Aveia	07
Celulose	07

Após o procedimento inicial de preservação das linhagens em glicerol 10% observou-se uma grande dificuldade na recuperação destas linhagens. Para que não houvesse perda dos microrganismos, empregou-se também os métodos de preservação em água destilada e em tubos inclinados. Estes últimos dois métodos de preservação se mostraram mais eficientes do que o utilizado originalmente.

Todas as linhagens foram preservadas em glicerol 10%. Deste total, 25 foram ainda preservadas em água destilada e 32 estão sendo mantidas em tubos de ensaio contendo meio de cultura. Das linhagens puras e preservadas, 52 foram reativadas com sucesso e inoculadas em meio líquido, para a obtenção dos extratos brutos.

Dentre as linhagens isoladas, aquelas que originaram extratos brutos ou frações com resultados positivos nos ensaios de atividade biológica foram enviadas à Dra. Lara Durães Sette, da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA (UNICAMP), para a identificação taxonômica das espécies. A primeira linhagem a ser identificada foi a AS Fub 39 (Figura 4), como pertencendo à espécie *Penicillium steckii*. As demais ainda não foram identificadas.

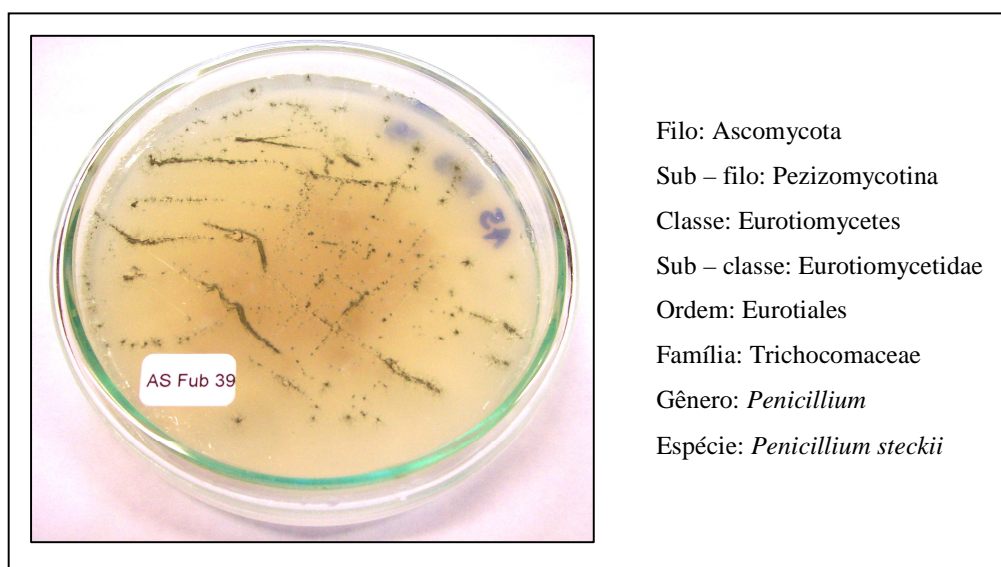


Figura 4: Linhagem AS Fub 39 (*Penicillium steckii*).

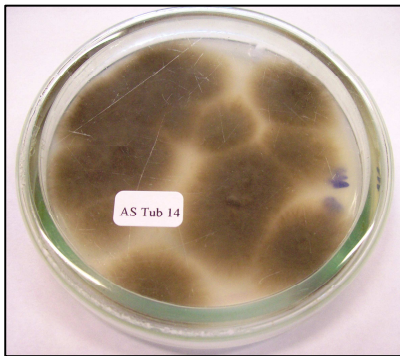


Figura 5: Linhagem AS Tub 14.

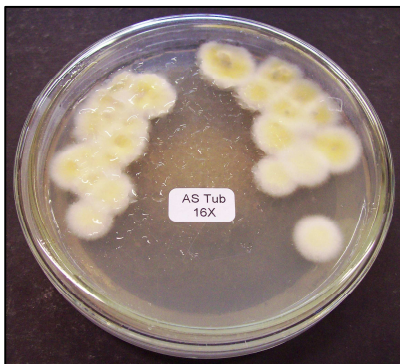


Figura 6: Linhagem AS Tub 16.

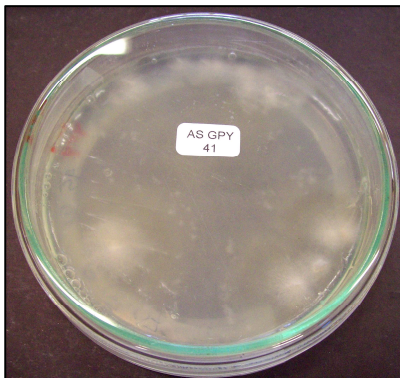


Figura 7: Linhagem AS GPY 41.



Figura 8: Linhagem AS GPY -2 T.

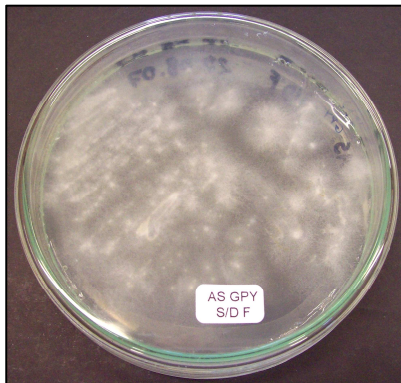


Figura 9: Linhagem AS GPY S/D F.

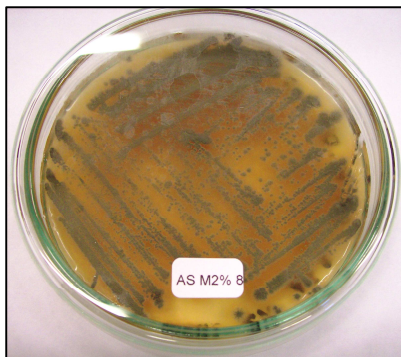


Figura 10: Linhagem AS M2% 8.



Figura 11: Linhagem AS M2% 58.



Figura 12: Linhagem AS M2% C.





Figura 13: Linhagem AS M2% S/D H.



Figura 14: Linhagem AS M2% -2 O.

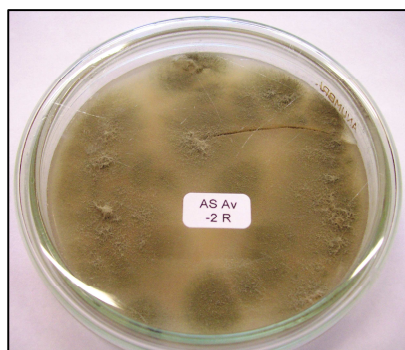


Figura 15: Linhagem AS Av -2 R.



Figura 16: Linhagem AS BC 47.



Figura 17: Linhagem AS BC S/D B.

#### 4.2 Análise dos extratos brutos e frações

A partir das 52 linhagens crescidas em meio líquido obteve-se 99 extratos, de 4 tipos diferentes: 27 extratos de AcOEt, 24 extratos metanólicos do micélio, 24 frações MeOH / H<sub>2</sub>O (1:1) e 24 frações MeOH.

Por serem extremamente viscosos, os meios de cultura não clarificados (BC, Fub, Av e Cel) foram extraídos com AcOEt.

Tanto os extratos AcOEt (Tabela 4), quanto os extratos metanólicos do micélio (Tabela 5), quando re-diluídos em solvente orgânico para o início das análises, apresentaram uma grande quantidade de sal precipitado. Estes extratos tiveram que ser novamente filtrados para a retirada dos sais. A precipitação dos sais e sua retirada por filtração causaram uma perda considerável de massa, mas possibilitaram uma limpeza inicial dos extratos brutos, impedindo que os sais do meio de cultura influenciassem nos ensaios de atividade biológica.

Tabela 4: Massas dos extratos brutos de AcOEt

Extr. AcOEt	Massa (mg)
AS Av 28	109,1
AS Av 29	260
AS Av 48	147,8
AS Cel 32	16,7
AS Cel 33	7,5
AS Cel 34	9,5
AS Cel 35	11
AS Cel 63	15,8
AS Cel 64	10,9
AS BC 23	13,6
AS BC 26	16,7
AS BC 44	16,9
AS BC 45	13,3
AS BC 47	25,7
AS BC 47x	15,9
AS Fub 39	57,3
AS Fub 50	13,6
Bat/Cen J	16,2
Bat/Cen K	11,7
Bat/Cen S/D B	25,6
AS Cel S/D D	13,4
AS Av S/D I	198,9
Bat/Cen -2 B	15,2
AS Fub -2M	56,1
AS Av -2 P	72,5
AS Av -2 Q	87,5
AS Av -2 R	132,1

[AS] = Alga *Sargassum*; [GPY, M2%, M3%, Tub, Av, BC, Fub, Cel] = meios de cultura; [S/D, 10<sup>-2</sup>] = diluição; [número, letra] = linhagem.

Tabela 5: Massas dos extratos brutos metanólicos dos micélios

Extr. MeOH	Massa (mg)
AS GPY 1	58,5
AS GPY 2	43,7
AS GPY 4	105,8
AS GPY 5	102
AS GPY 41	42,6
AS GPY 42	32,2
AS Tub 14	62,6
AS Tub 16x	85,3
AS Tub 52	121,4
AS Tub 53	82,3
AS M2% 6	69,4
AS M2% 8	176,1
AS M2% 9	62,5
AS M2% 55	170,8
AS M2% 56	97,1
AS M2% 58	111,1
AS M2% 58x	56,2
AS M2% C	94,4
AS M3% H	168,2
AS M3% S/D A	201,2
AS GPY S/D F	121,7
AS M2% S/D H	122,2
AS M2% -2 O	154,3
AS GPY -2 T	72,2

[AS] = Alga *Sargassum*; [GPY, M2%, M3%, Tub, Av, BC, Fub, Cel] = meios de cultura; [S/D, 10<sup>-2</sup>] = diluição; [número, letra] = linhagem.

---

As frações MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) (Tabela 6) e MeOH (Tabela 7) obtidas das SPEs dos meios de cultura clarificados não apresentaram o mesmo problema dos extratos AcOEt e extratos metanólicos do micélio com o alto teor de sais, uma vez que a primeira fração (H<sub>2</sub>O) coletada durante a SPE eliminou os sais e açúcares do meio de cultura do adsorvente (C<sub>18</sub>) presente no cartucho. Em contrapartida, as frações MeOH das SPEs apresentaram um rendimento baixo, e apenas uma apresentou massa suficiente para ser enviada aos ensaios de atividade biológica utilizados nesta investigação.

Tabela 6: Massas das frações H<sub>2</sub>O / MeOH (1:1) de SPE

Fração H <sub>2</sub> O/MeOH	Massa (mg)
AS GPY 1	4,5
AS GPY 2	17,9
AS GPY 4	6,1
AS GPY 5	9,6
AS GPY 41	15
AS GPY 42	25,7
AS Tub 14	102,8
AS Tub 16x	10,8
AS Tub 52	5,1
AS Tub 53	28,9
AS M2% 6	101,6
AS M2% 8	118,4
AS M2% 9	85,4
AS M2% 55	76
AS M2% 56	115,1
AS M2% 58	78,8
AS M2% 58x	77,3
AS M2% C	82,4
AS M3% H	147,6
AS M3% S/D A	133,9
AS GPY S/D F	11,6
AS M2% S/D H	130,2
AS M2% -2 O	146,7
AS GPY -2 T	51

[AS] = Alga *Sargassum*; [GPY, M2%, M3%, Tub, Av, BC, Fub, Cel] = meios de cultura; [S/D, 10<sup>-2</sup>] = diluição; [número, letra] = linhagem.

Tabela 7: Massas das frações MeOH de SPE

Fração MeOH	Massa (mg)
AS GPY 1	0,5
AS GPY 2	6,6
AS GPY 4	0,6
AS GPY 5	0,4
AS GPY 41	0,7
AS GPY 42	0,1
AS Tub 14	2,9
AS Tub 16x	4
AS Tub 52	0,7
AS Tub 53	0,7
AS M2% 6	2,6
AS M2% 8	8,1
AS M2% 9	9,9
AS M2% 55	3
AS M2% 56	1,7
AS M2% 58	0,9
AS M2% 58x	1,6
AS M2% C	18,5
AS M3% H	5,5
AS M3% S/D A	10,4
AS GPY S/D F	1
AS M2% S/D H	8,6
AS M2% -2 O	7,1
AS GPY -2 T	1,2

[AS] = Alga *Sargassum*; [GPY, M2%, M3%, Tub, Av, BC, Fub, Cel] = meios de cultura; [S/D, 10<sup>-2</sup>] = diluição; [número, letra] = linhagem.

### 4.3 Ensaio de atividade biológica

Do total de 99 amostras, apenas 52 (destacadas nas Tabelas 4, 5, 6 e 7) apresentaram massa suficiente para serem enviadas aos ensaios de atividade biológica. Ao todo, 21 amostras foram ativas, dentre as quais 9 apresentaram um perfil químico indicativo da presença de metabólitos secundários quando analisados por CCD, e 12 não (Tabela 8).

Tabela 8: Análise da presença de metabólitos secundários (CCD) e atividade biológica observada para os extratos bioativos das linhagens de fungos isoladas da alga *Sargassum* sp.

Linhagem	CCD	Antibiótico	Tuberculose	Citotóxico	APRT	GAPDH
AS AV -2 R	X					X
AS BC 47	X					X
AS M3% S/D A						X
AS GPY 4					X	
AS GPY 41	X				X	
AS GPY S/D F					X	
AS GPY -2 T <sub>F1</sub>					X	
AS TUB 14		X				
AS TUB 16X		X				
AS M2% 6		X				
AS M2% 8		X				
AS M2% 9		X				
AS M2% 55		X				
AS M2% 56		X				
AS M2% 58		X				
AS M2% -2 O	X	X				
AS FUB 39	X	X				
AS M2% S/D H	X	X				
AS M2% C <sub>F2</sub>	X	X		X	X	
AS BC S/D B	X	X	X	X		
AS M2% -2 O <sub>F1</sub>	X			X		
<b>Total</b>	<b>09</b>	<b>13</b>	<b>01</b>	<b>03</b>	<b>05</b>	<b>03</b>

[F1] = Fração MeOH / H<sub>2</sub>O (1:1) SPE; [F2] = Fração MeOH SPE.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 8 pode-se observar que, para os meios clarificados (GPY, M2%, M3% e Tub), os extratos metanólicos dos micélios obtiveram um maior índice de atividade do que as frações dos meios de cultura. Além disso, as atividades biológicas diferem, para uma mesma linhagem, se o extrato é proveniente do micélio ou do meio de cultura. Isto sugere que os metabólitos extraídos dos micélios e aqueles secretados e extraídos dos meios de cultura divergem significativamente, seja em natureza ou em concentração, pois a maioria das linhagens que apresentaram extratos metanólicos do micélio ativos não demonstrou a mesma atividade para a fração extraída por SPE do meio de cultura.

Ainda, de acordo com os resultados apresentados na Figura 18, o maior número de amostras bioativas em um determinado bioensaio apresentou atividade antibiótica (13).

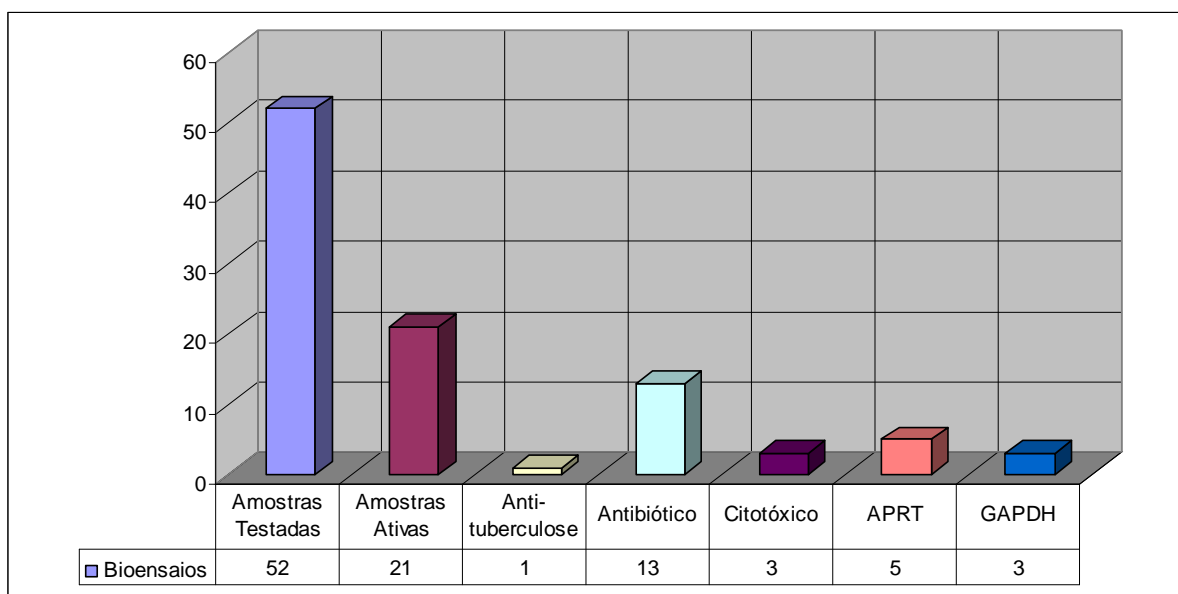


Figura 18: Resultado dos ensaios de atividade biológica.

O alto índice de atividade antibiótica pode ser facilmente explicado pelo fenômeno da alelopatia. A alelopatia é o processo através do qual os organismos produzem compostos químicos que, quando liberados no ambiente, influenciam de forma favorável ou desfavorável

o desenvolvimento de outras espécies. Considerando que fungos e bactérias são competidores naturais, espera-se que os compostos produzidos pelos fungos irão influenciar de forma desfavorável o desenvolvimento de espécies microbianas (outros fungos e bactérias), o que de fato ocorreu.

Os resultados para os ensaios de atividade citotóxica (n = 3) e anti-tuberculose (n = 1) também se encontram dentro do esperado (VITA – MARQUES *et al.*, 2008).

Já os resultados para os ensaios de inibição enzimática [APRT + GAPDH] (n = 8) extrapolaram as expectativas. Vita-Marques *et al.* (2008) isolou 57 linhagens de fungos derivados do ambiente marinho, os quais deram origem a 114 extratos brutos. Nenhum destes extratos apresentou atividade inibitória de APRT. No trabalho de Selegim *et al.* (2007), 349 extratos brutos obtidos a partir de vários invertebrados marinhos foram testados no ensaio inibição de APRT, e apenas 9 apresentaram atividade. Ambos os estudos citados não corroboram os resultados conseguidos neste trabalho e, pela suspeita de terem sido obtidos resultados falsos positivos, os extratos e frações foram novamente enviados aos colaboradores para que fossem refeitos os ensaios de inibição das enzimas APRT e GAPDH.

#### 4.4 Análises por LC – PDA – ELSD – MS

Os brancos do meio de cultura, os extratos e frações com perfil químico significativo nas análises por CCD, bem como os extratos e frações com atividade biológica foram analisados por LC – PDA – ELSD – MS. Entretanto, estas análises foram consideradas inconclusivas, pois todas as amostras apresentaram perfis semelhantes, com espectros de UV e de massas praticamente idênticos. Possivelmente, a alta concentração dos componentes do meio de cultura mascararam os metabólitos secundários presentes nas amostras.



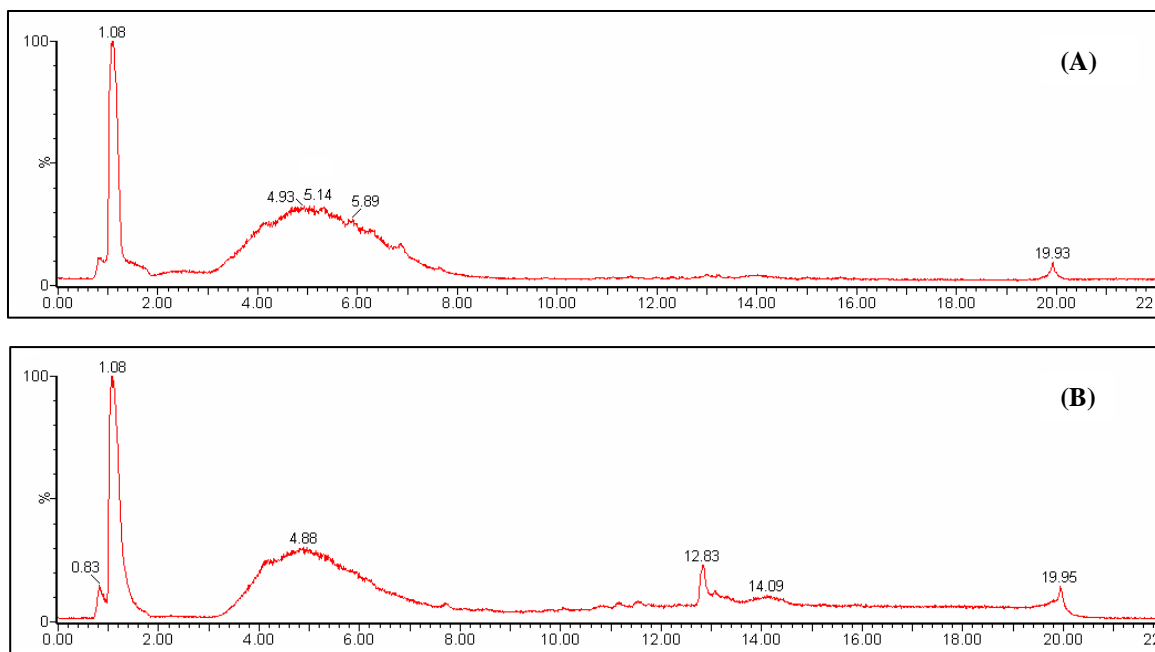


Figura 19: Cromatogramas de MS. (A): Fração de SPE MeOH / H<sub>2</sub>O (1:1) do branco do meio de cultura Tub; (B): Fração de SPE MeOH / H<sub>2</sub>O (1:1) do meio de cultura da linhagem AS Tub 14.

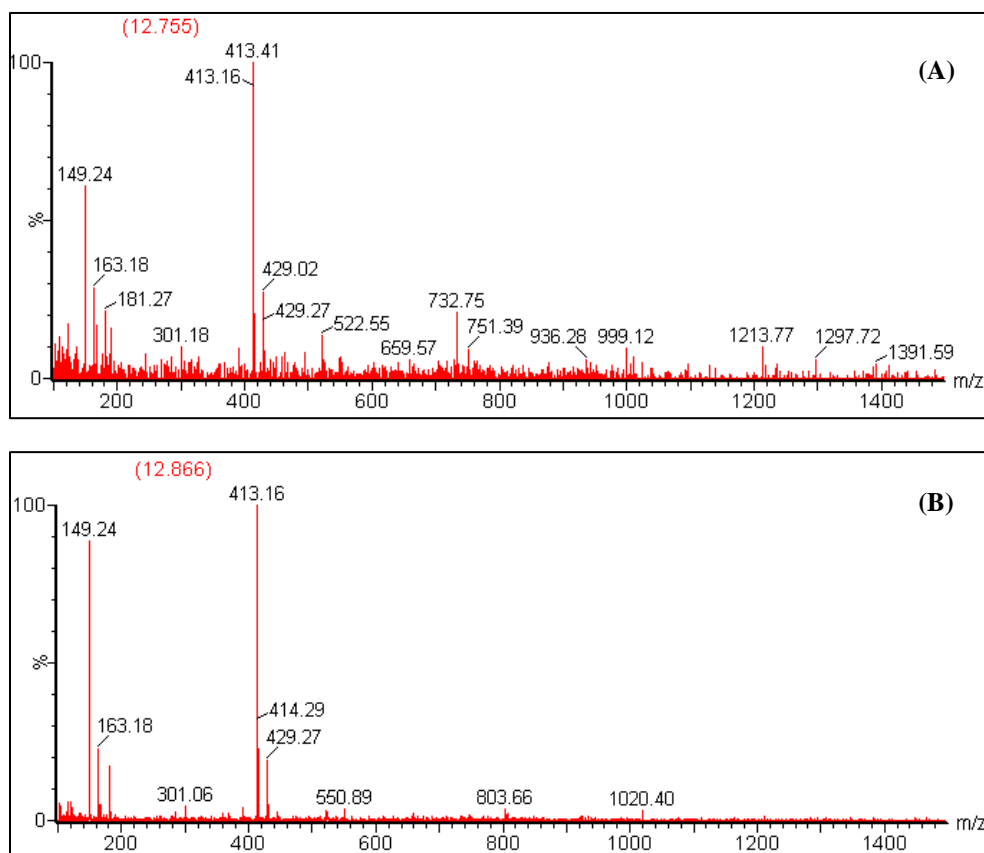


Figura 20: Espectros de MS. (A): Branco do meio de cultura Av; (B): Extrato metanólico do micélio da linhagem AS GPY 41.

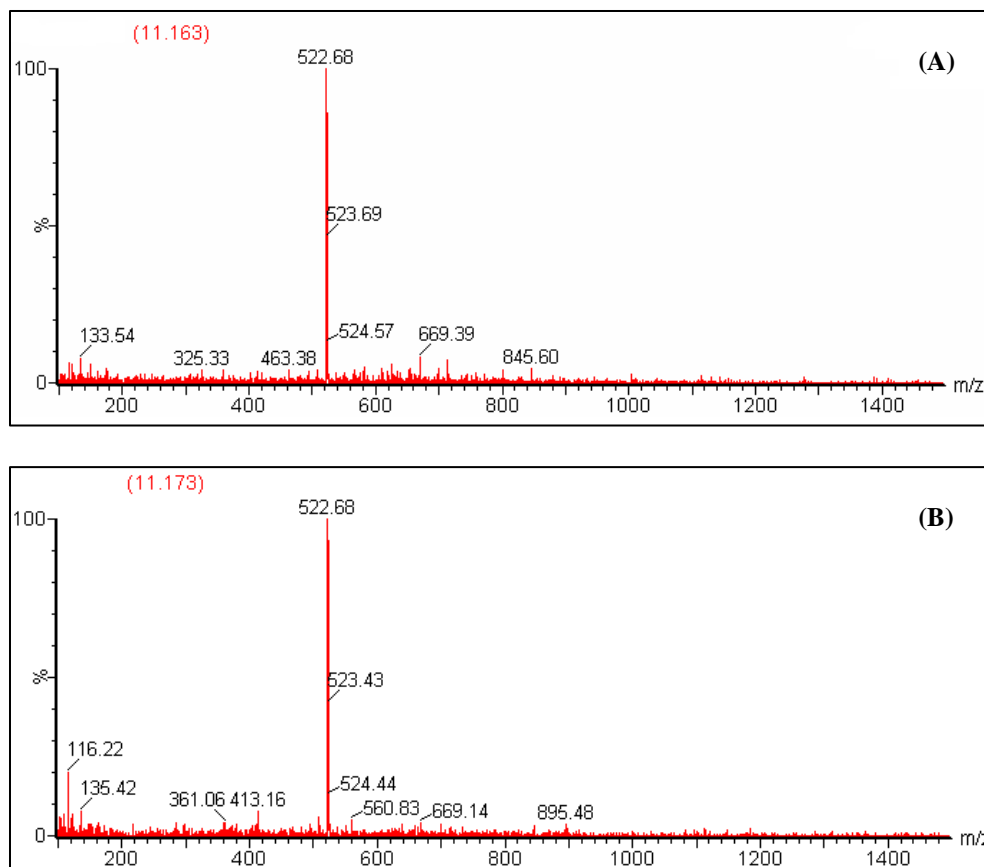


Figura 21: Espectros de MS. (A): Extrato bruto AcOEt da linhagem AS Cel 34; (B): Extrato metanólico do micélio da linhagem AS M2% 8.

Apesar de terem sido inconclusivos para a presente investigação, os resultados das análises por LC – PDA – ELSD – MS dos extratos e frações das linhagens fúngicas isoladas da alga *Sargassum* sp. serviram como ponto de partida para uma mudança nos procedimentos de análise realizados por outros pesquisadores do nosso grupo que também trabalham com extratos de fungos marinhos. Atualmente, todos os extratos obtidos a partir de meios de cultura de fungos marinhos são previamente submetidos a uma “limpeza” (“clean-up”) por extração em fase sólida antes de serem analisados por LC – PDA – ELSD – MS. Os resultados atuais, obtidos por estes pesquisadores, apresentam melhor qualidade, e indicam claramente a presença de metabólitos secundários.

#### **4.5 Separação cromatográfica do extrato bruto AS Fub 39 e determinação estrutural do composto majoritário**

Por ter apresentado atividade antibiótica contra as linhagens de microrganismos patogênicos *Streptococcus mutans* (UA159) e *Candida albicans* (ATCC36801 – Sorotipo A), um perfil químico de interesse na CCD e um espectro de RMN –  $^1\text{H}$  relativamente simples (Figura 22), o extrato AS Fub 39 foi selecionado para estudos adicionais.

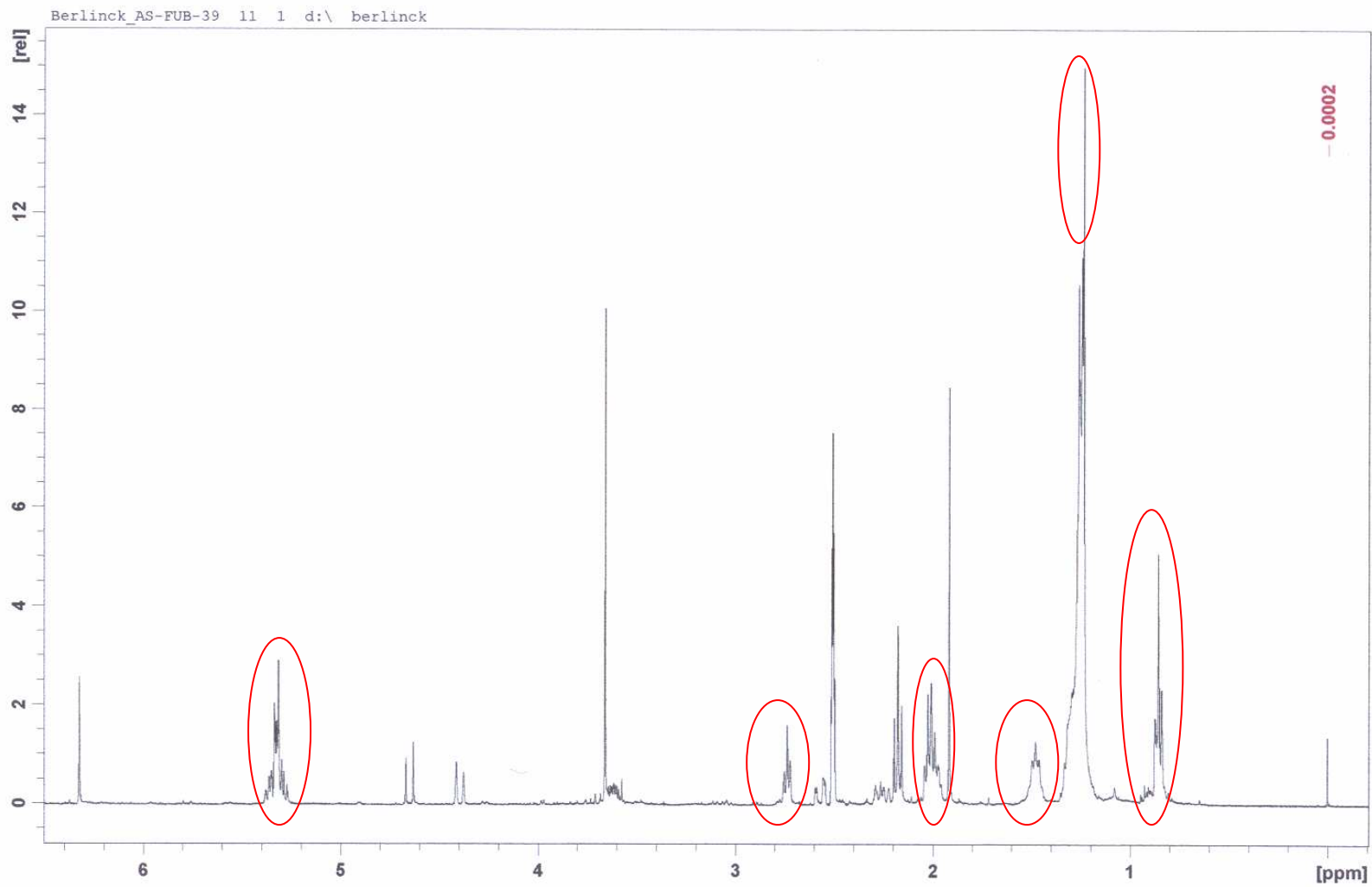


Figura 22: Espectro de RMN –  $^1\text{H}$  do extrato bruto AS Fub 39, em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz). Assinaladas em vermelho, possíveis impurezas derivadas de ácidos graxos.

Este extrato foi purificado por HPLC, originando três frações. Estas frações foram novamente avaliadas por RMN –  $^1\text{H}$ , que indicou o Pico 3 como sendo de interesse.

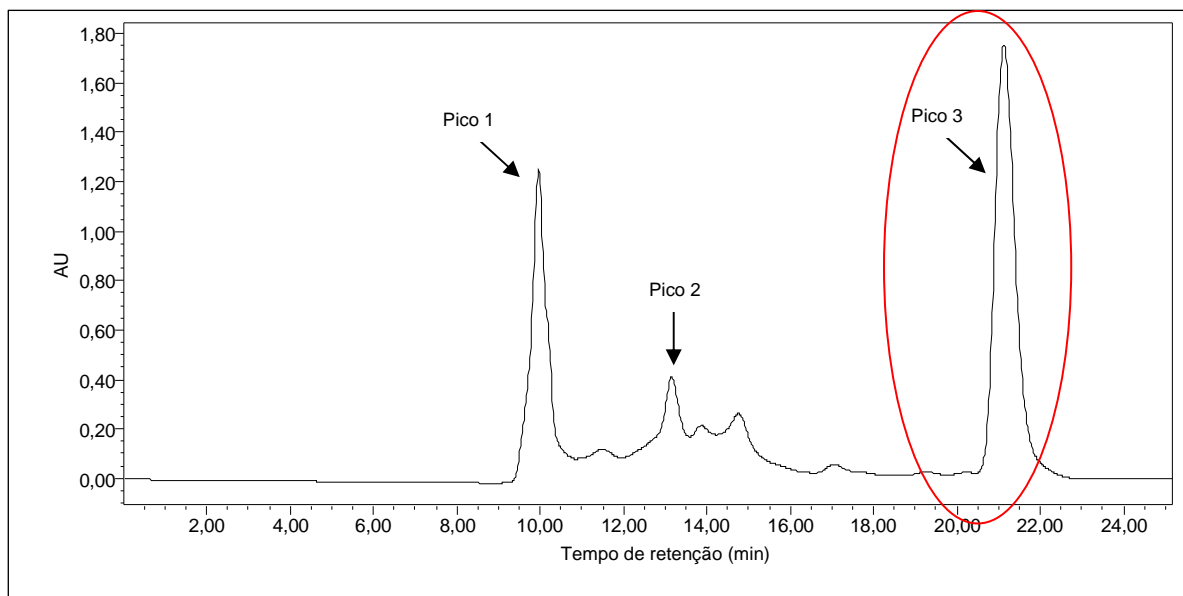


Figura 23: Cromatograma do extrato bruto AS Fub 39. Condições de análise: coluna  $\text{C}_{18}$  Inertsil ODS – 3 (dimensões 4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), fase móvel MeOH /  $\text{H}_2\text{O}$  (75:25), fluxo de 1 mL/min e observado em 280 nm.

O composto presente na fração 3 foi obtido como um sólido amorfo amarelado e teve sua estrutura determinada por técnicas espectroscópicas de infravermelho, ultravioleta, RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , bidimensionais, e por espectrometria de massas.

A fração AS Fub 39 (P3) apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) as seguintes bandas (Figura 24):

1. 3348,0  $\text{cm}^{-1}$ , larga atribuídas aos grupos **O – H**;
2. 2967,2; 2923,0; 2849,2  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às ligações **C – H**;
3. 1603,6  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às ligações **C = C**;
4. 1121,4; 1073,2  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas às ligações **C – O**,

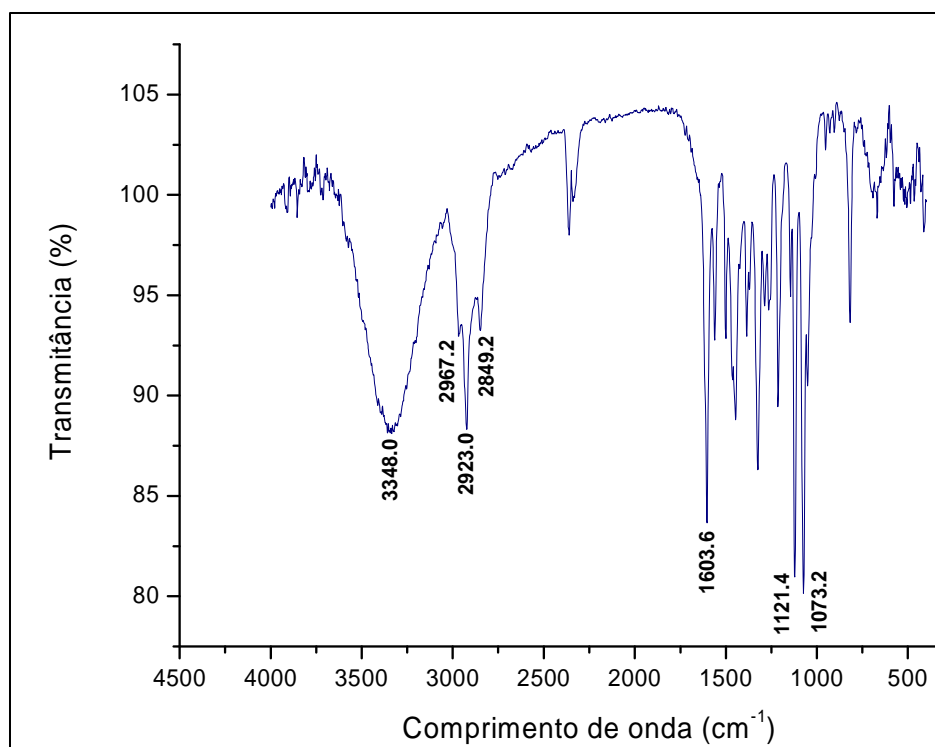


Figura 24: Espectro de infravermelho da amostra AS Fub 39 (P3).

O seu espectro de absorção no ultravioleta (Figura 25) em MeOH apresentou absorção em  $\lambda_{\text{max}}$  282 nm ( $\log \epsilon = 3,7$ ), tipicamente atribuída a um anel aromático.

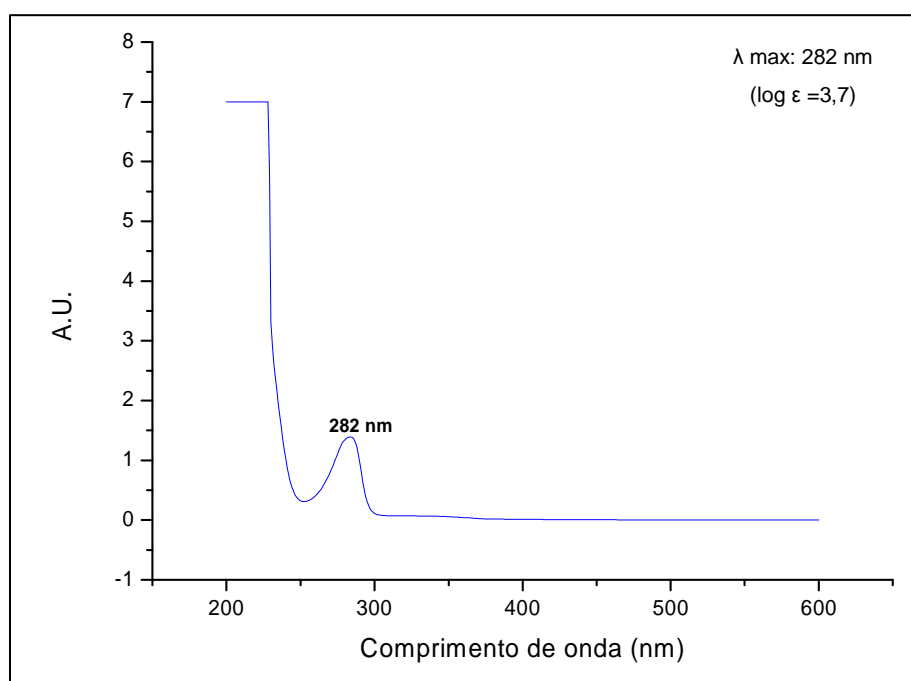


Figura 25: Espectro de ultravioleta da amostra AS Fub 39 (P3).

No espectro de RMN –  $^1\text{H}$  (Figura 26) foi observado um singleto característico de hidrogênio aromático em  $\delta_{\text{H}}$  6,32, integrando para um único hidrogênio. A ausência de outros sinais aromáticos sugeriu a existência de um anel pentassubstituído.

Observou-se ainda a presença de dois sinais, um em  $\delta_{\text{H}}$  4,64 (d,  $J = 14,8$  Hz) e um em  $\delta_{\text{H}}$  4,39 (d,  $J = 14,8$  Hz), ambos integrando para um hidrogênio cada, constituindo um sistema de spin AB.

Foi possível observar um singleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,65, integrando para três hidrogênios, característico de metoxila. Em  $\delta_{\text{H}}$  3,61 observou-se um multiplete integrando para um único hidrogênio.

A presença de dois sinais na região de  $\delta_{\text{H}}$  2,5, ambos integrando para um hidrogênio cada, sugeriu a presença de hidrogênios próximos a um grupo funcional. O primeiro sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,58 (dd,  $J = 16,5$  e  $2,2$  Hz) e o segundo em 2,25 (dd,  $J = 16,5$  e  $2,2$  Hz), ambos acoplando entre si.

O singleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,91 integrando para três hidrogênios, foi atribuído a uma metila. Foi observado ainda um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,25 ( $J = 6,12$  Hz), integrando para um hidrogênio.

O espectro de RMN –  $^{13}\text{C}$  (Figura 27) apresentou doze sinais referentes a carbonos. As multiplicidades destes carbonos foram atribuídas via experimento de DEPT 135.

Verificou-se ainda a presença de dois carbonos aromáticos substituídos por oxigênio ( $\delta_{\text{C}}$  154,8 e 153,1), dois carbonos carbinólicos ( $\delta_{\text{C}}$  69,9 e 63,7) e dois carbonos metilênicos ( $\delta_{\text{C}}$  63,7 e 33,5). A metoxila foi confirmada pela presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  54,8.

A análise conjunta dos dados dos espectros de COSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) (Figura 28) e HSQC (Figura 29), permitiu-nos atribuir todos os carbonos e hidrogênios da molécula (Tabela 9).

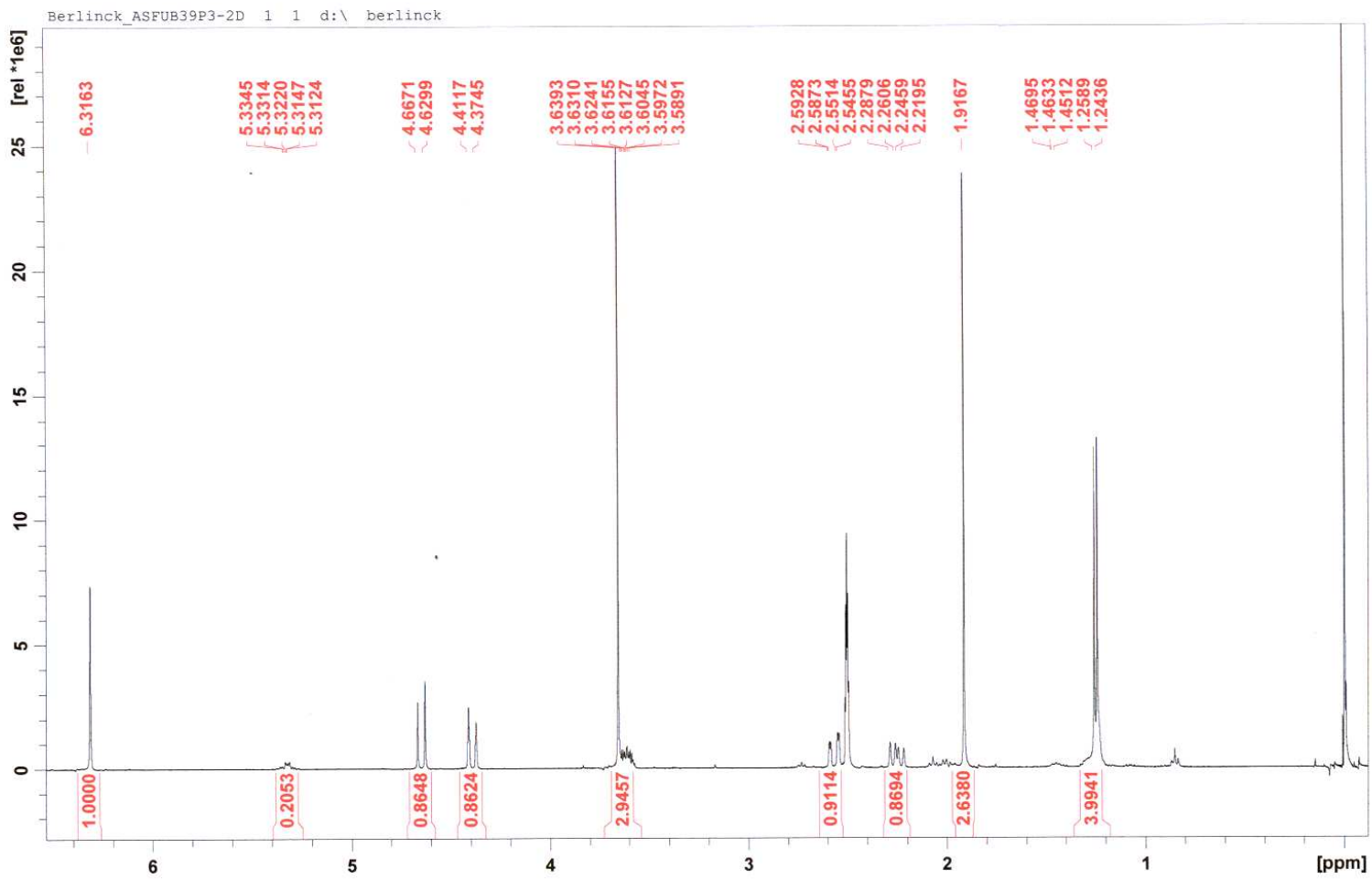


Figura 26: Espectro de RMN –  $^1\text{H}$  da amostra AS Fub 39 (P3), em  $\text{DMSO}-d_6$  (400 MHz).



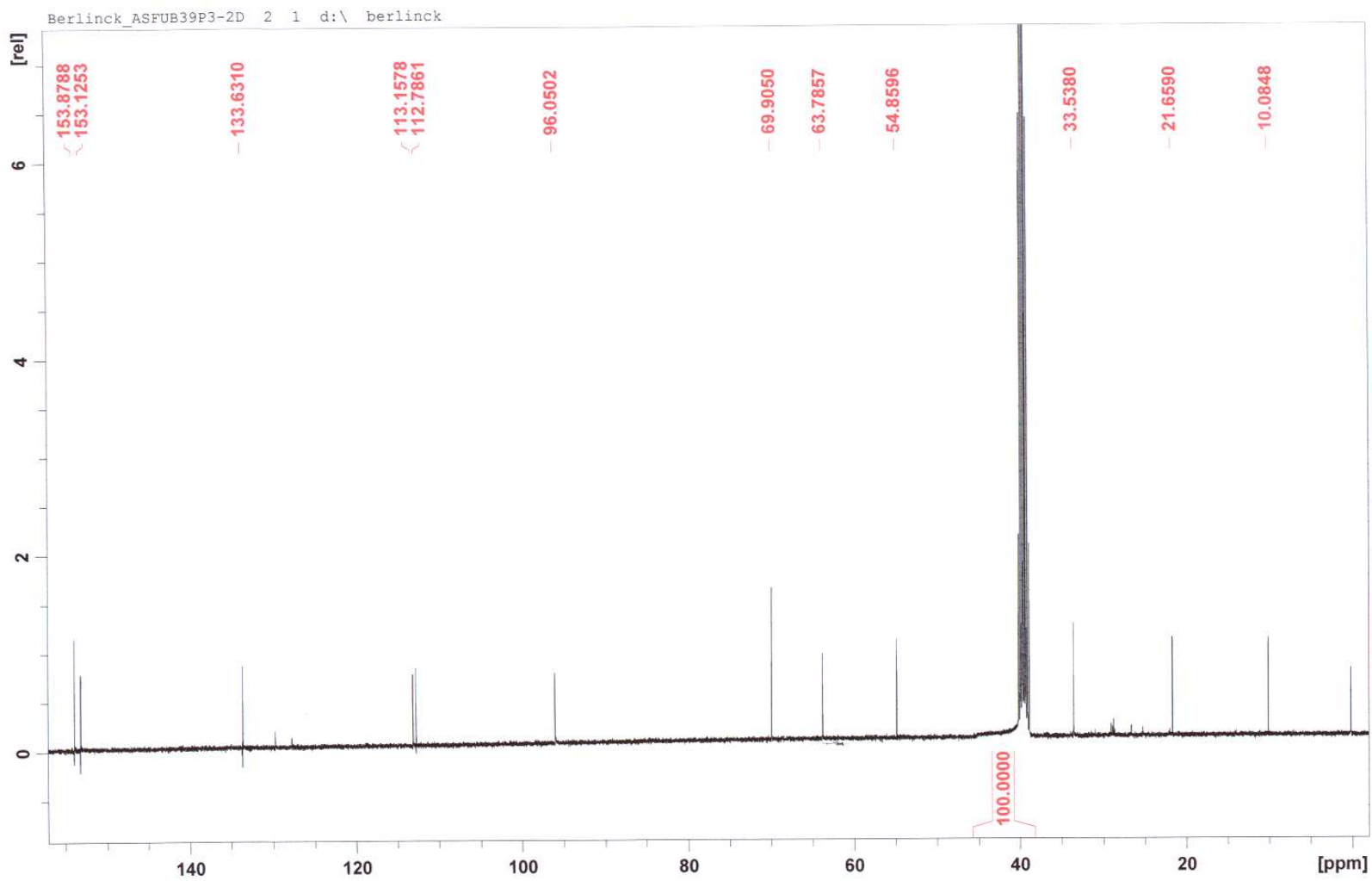


Figura 27: Espectro de RMN –  $^{13}\text{C}$  da amostra AS Fub 39 (P3), em  $\text{DMSO-}d_6$  (100 MHz).

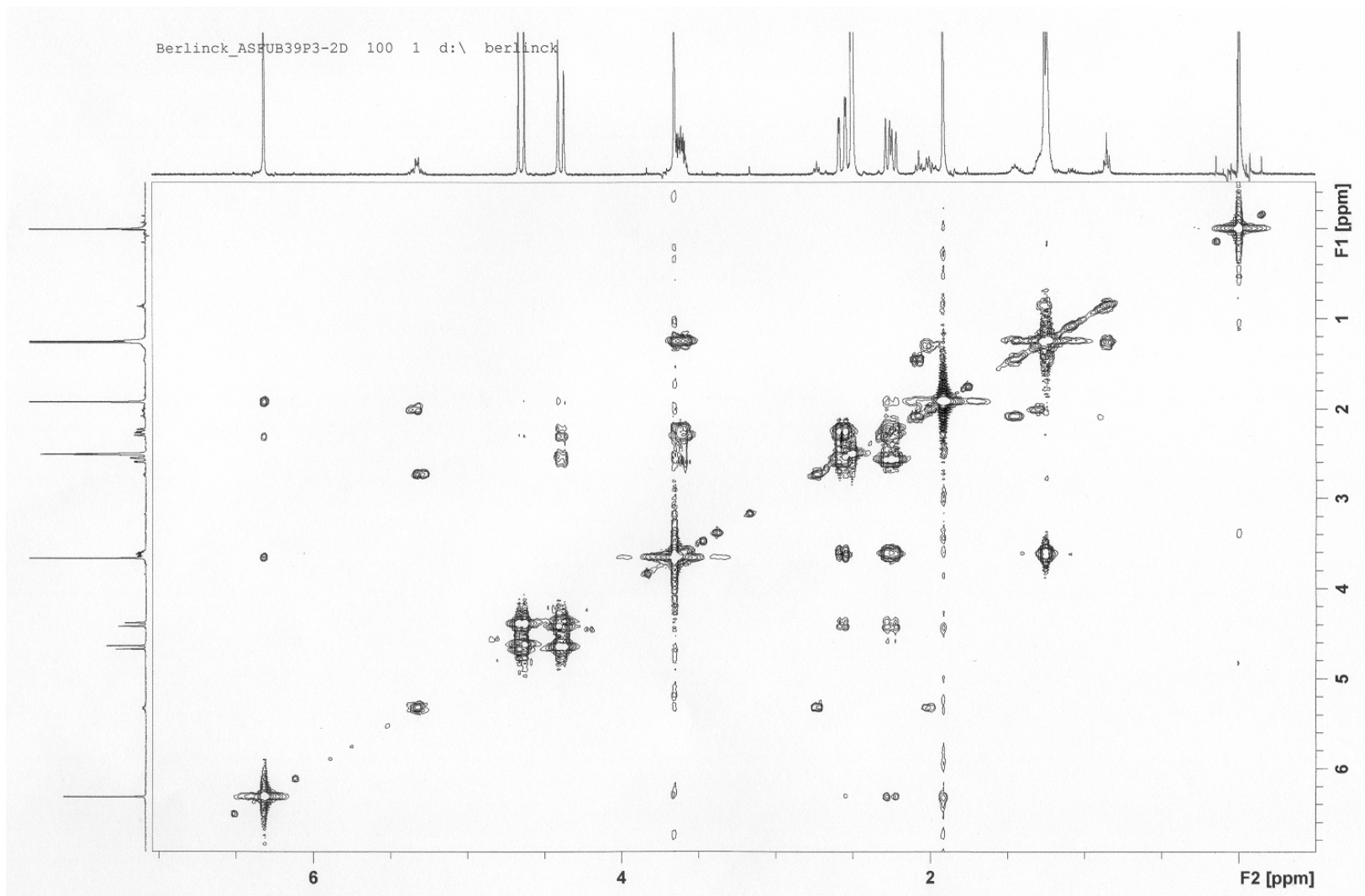


Figura 28: Espectro COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  da amostra AS Fub 39 (P3) (400 MHz).

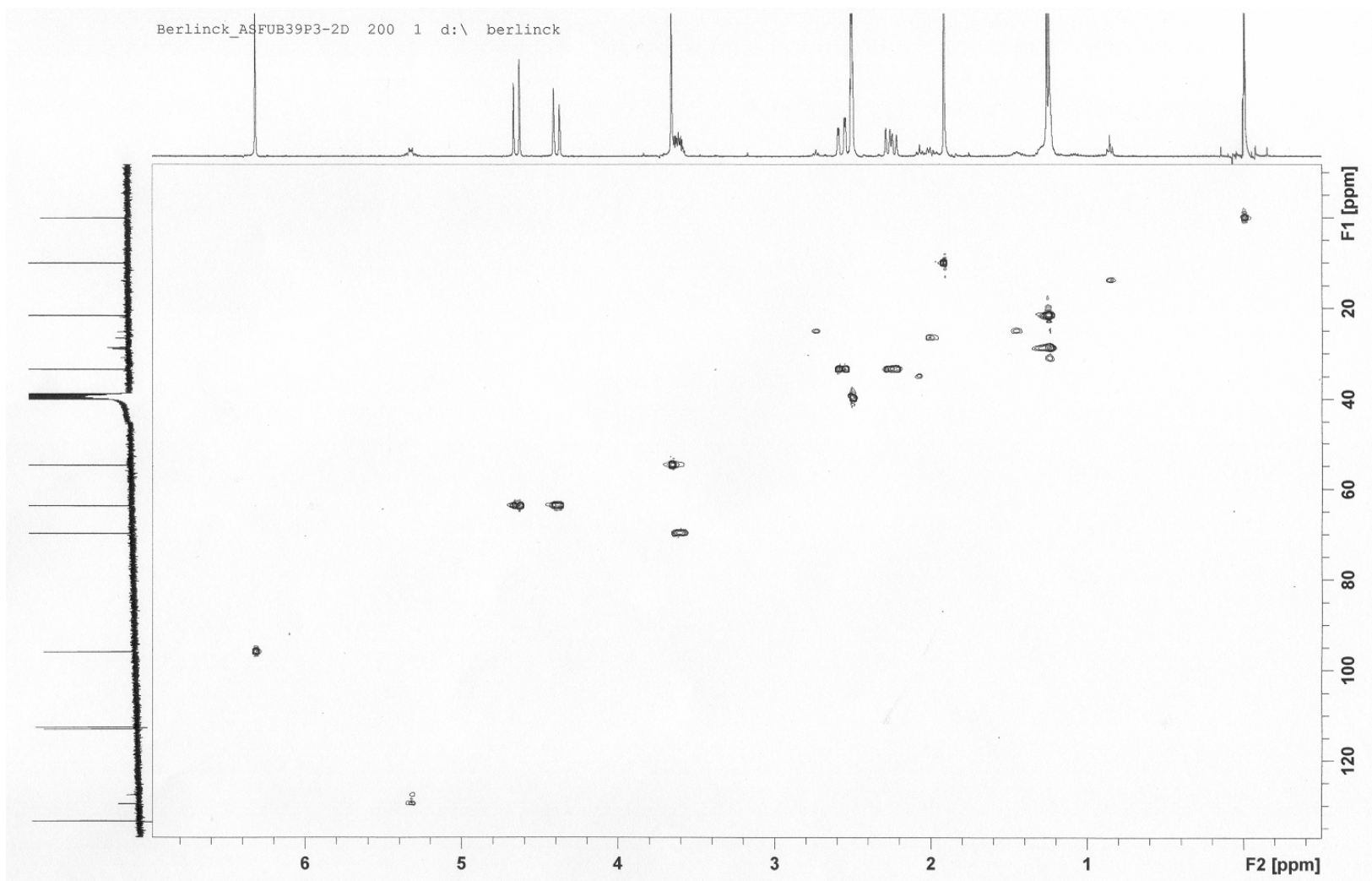


Figura 29: Espectro HSQC  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  da amostra AS Fub 39 (P3) (400 MHz)

Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , associados com aqueles obtidos das análises dos espectros bidimensionais (COSY e HSQC) e comparação com os dados da literatura (LAI *et al.* em 1990, MASUMA *et al.* em 1994, e HE *et al.* em 2004) (Tabela 9), possibilitou identificar o composto como sendo o 8 – metoxi – 3,5 – dimetilisocroman – 6 – ol (**17**).

Tabela 9: Estudo comparativo dos deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do 8–metóxi–3,5–dimetilisocroman–6–ol (**17**)

H/C	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ *DMSO- $d_6$	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$	DEPT 135	Masuma <i>et al.</i> (1994) *CDCl $_3$	
<b>1</b>	4,39 (d, 1H, $J = 14,8$ Hz) 4,64 (d, 1H, $J = 14,8$ Hz)	63,7	CH $_2$	4,57 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz) 4,89 (d, 1H, $J = 15,2$ Hz)	64,6
<b>3</b>	3,61 (m, 1H)	69,9	CH	3,74 (m, 1H)	70,6
<b>3'</b>	1,25 (sl)	21,6	CH $_3$	1,38 (d, 3H, $J = 6,3$ Hz)	21,7
<b>4</b>	2,25 (dd, 1H, $J = 16,5; 10,9$ Hz) 2,58 (dd, 1H, $J = 16,5; 2,2$ Hz)	33,5	CH $_2$	2,42 (dd, 1H, $J = 16,5; 10,6$ Hz) 2,61 (dd, 1H, $J = 16,5; 2,3$ Hz)	34,0
<b>4a</b>	-	133,6	C	-	134,1
<b>5</b>	-	112,7	C	-	112,9
<b>5'</b>	1,91 (s, 3H)	10,0	CH $_3$	2,04 (s, 3H)	10,0
<b>6</b>	-	153,1	C	-	152,7
<b>7</b>	6,32 (s, 1H)	96,0	CH	6,23 (s, 1H)	96,2
<b>8</b>	-	153,8	C	-	153,9
<b>8'</b>	3,65 (s, 3H)	54,8	OCH $_3$	3,68 (s, 3H)	55,0
<b>8a</b>	-	113,1	C	-	115,2

\* Solventes utilizados no preparo das amostras.

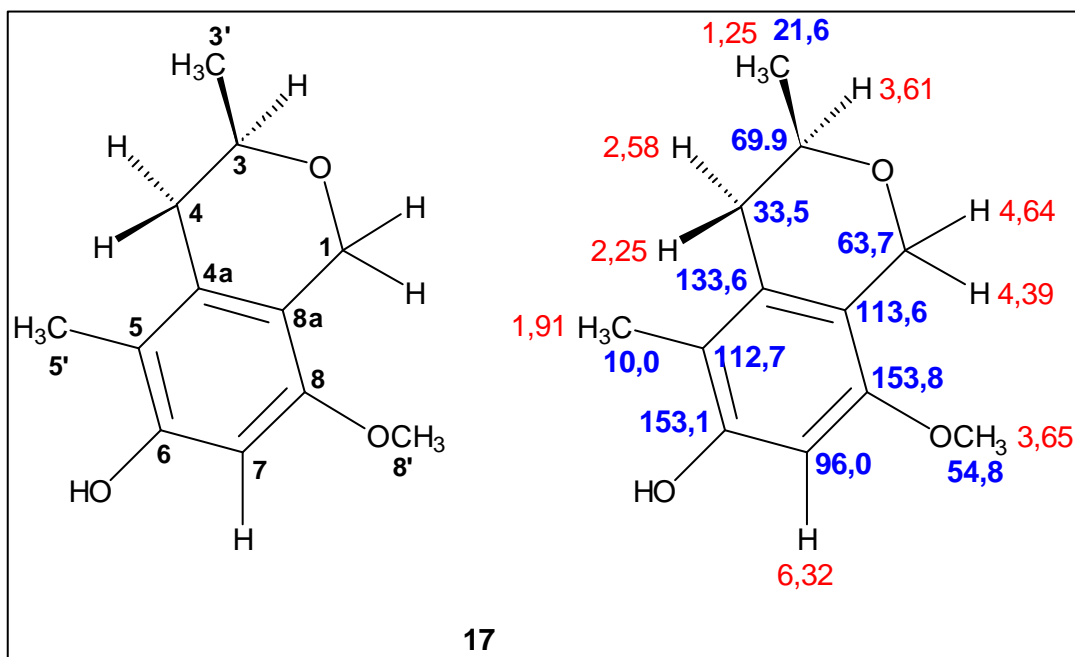


Figura 30: Atribuições dos sinais de RMN –  $^1\text{H}$  e de RMN –  $^{13}\text{C}$  do composto **17**.

As análises por medida de rotação específica indicaram um valor de  $[\alpha]_{\text{D}} = +142^\circ$  ( $c = 0.1$ , MeOH). Kerti *et al.* (2007) também encontrou um valor positivo de  $[\alpha]_{\text{D}}$  para um composto similar de configuração (3*S*). Assim, o composto **17** também possui configuração (3*S*).

As análises por MS/MS indicaram a massa molecular do aduto de sódio  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  em  $m/z$  231,10 ( $[208,10 + 23]^+$ ).

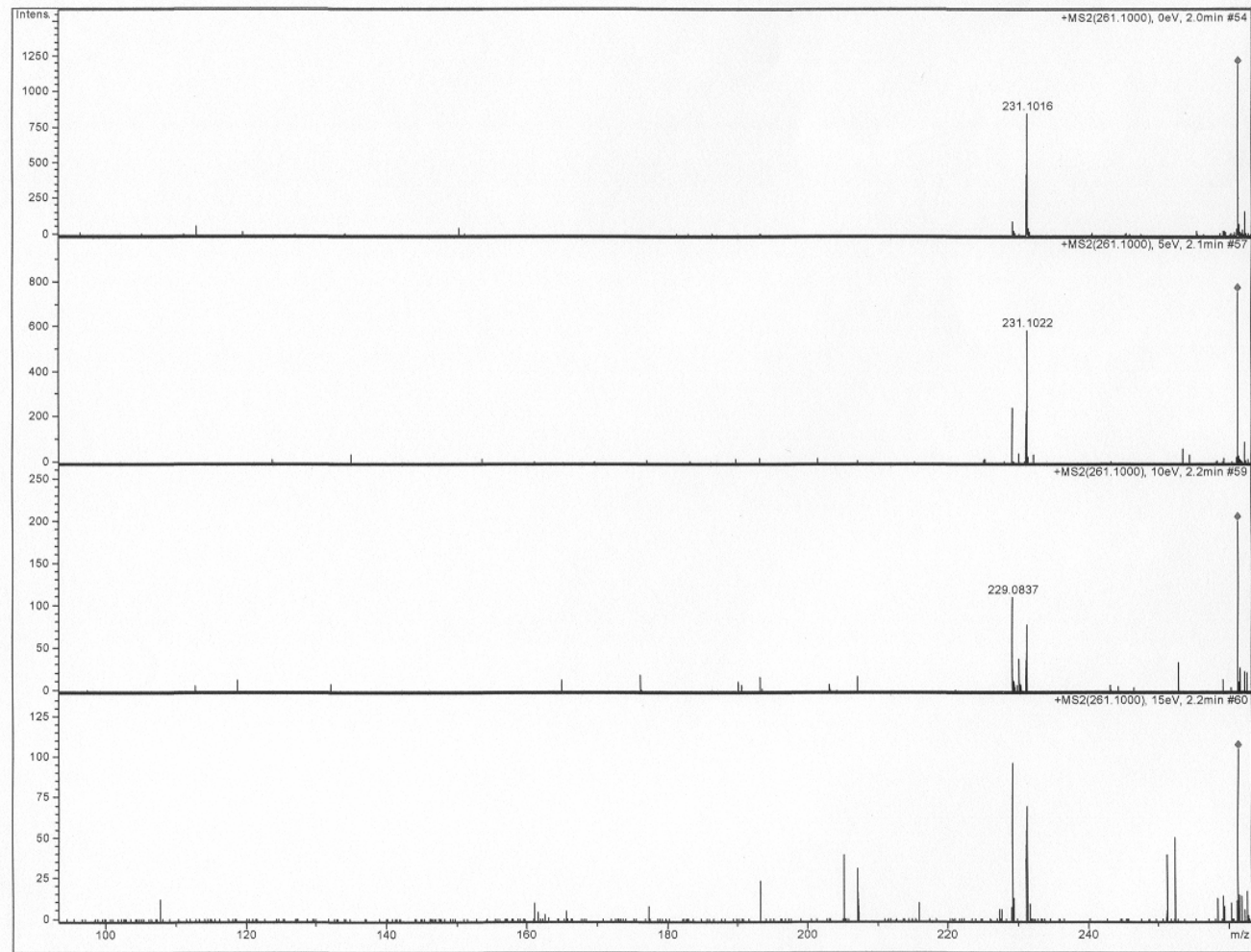


Figura 31: Espectro de massas da amostra AS Fub 39 (P3).

---

Após identificarmos o composto majoritário obtido a partir do estrato bruto AS Fub 39, esta linhagem foi novamente crescida em 250 mL de meio de cultura líquido, e quantidades adicionais do composto (~ 2 mg) foram obtidas e purificadas para que fosse enviado para a realização dos testes de atividade antibiótica com o composto puro. Os testes estão em andamento.

## 5. CONCLUSÕES

Durante este trabalho foram isoladas 58 linhagens de fungos a partir de uma alga marinha do gênero *Sargassum*. Dentre os meios de cultura e métodos de isolamento utilizados, os que se mostraram mais eficientes foram o meio de cultura Malte 2% e o método de isolamento por fragmentação. Para que não houvesse perda das linhagens isoladas, estas foram preservadas em glicerol 10%, água destilada e ainda por repique contínuo.

Dentre as 58 linhagens de fungos isoladas, 52 foram reativadas, crescidas em meio de cultura líquido e extraídas, dando origem a 99 extratos. Estas amostras foram avaliadas por ensaios de atividade biológica, cromatografia em camada delgada, ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos, espalhamento de luz evaporativo e espectrômetro de massas (LC – PDA – ELSD – MS).

A avaliação pelo ensaio antibiótico foi a que resultou no maior número de amostras ativas, seguida dos ensaios enzimático, citotóxico e anti-tuberculose. O alto índice de resultados positivos nos ensaios enzimáticos excedeu o esperado, portanto as amostras foram novamente enviadas aos colaboradores para que fossem refeitos os testes e eliminados possíveis falsos positivos.

Nas análises por LC – PDA – ELSD – MS observou-se que a grande maioria das amostras apresentou os mesmos picos de íons moleculares. Acredita-se que estes picos representem os componentes dos meios de cultura. Sendo assim, é necessária uma limpeza prévia das amostras a serem analisadas por estas técnicas, bem como uma otimização das condições de análise, para que possam ser obtidos dados fidedignos a partir das análises por LC – PDA – ELSD – MS.

O extrato AS Fub 39, que apresentou atividade antibiótica, foi purificado por HPLC, e o seu composto majoritário foi identificado como sendo o 8-metóxi-3,5-dimetilisocroman-



6-ol. Posteriormente, a linhagem AS Fub 39 foi taxonomicamente identificada como pertencendo à espécie *Penicillium steckii*.

A realização deste estudo permitiu observar o bom potencial de fungos marinhos para a produção de metabólitos secundários bioativos, visto o alto índice de resultados positivos obtidos para as amostras avaliadas nos ensaios de atividade biológica.

Ademais, o isolamento do 8-metóxi-3,5-dimetilisocroman-6-ol a partir do *Penicillium steckii* validou os métodos de fermentação, extração e purificação que foram empregados durante a realização deste projeto. Tendo em vista que a exploração de fungos marinhos como fonte de moléculas bioativas ainda é incipiente, o desenvolvimento deste projeto permitiu a aplicação de uma metodologia simples, embora bastante ampla, para o isolamento de diferentes linhagens fúngicas, utilizando diferentes meios de cultura. A metodologia também inclui a aplicação de diferentes técnicas de triagem biológica e química, as quais, em conjunto, servem como excelente indicativo para o isolamento de produtos naturais bioativos produzidos por linhagens fúngicas em condições artificiais de cultivo.

## 6. REFERÊNCIAS

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Nat. Prod. Rep.**, v. 21, p. 143 – 163, 2004.

CUETO, M.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1444 – 1446, 2001.

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 302 – 307, 1997.

COOPER, E. L. Commentary on Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II – The Benefits by Werner E.G. Müller, Heinz C. Schröder, Matthias Wiens, Sanja Perović-Ottstadt, Renato Batel and Isabel M. Müller. **eCAM**, v. 1, n. 2, p. 207 – 209, 2004.

DESHMUKH, S. K. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. **Mycoses**, v. 46, p. 203 – 207, 2003.

HE, G.; MATSUURA, H.; TAKUSHI, T.; KAWANO, S.; YOSHIHARA, T. A new antifungal metabolite from *Penicillium expansum*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1084 – 1087, 2004.

HOLLER, U; KONIG G.; WRIGHT A. D. A new tyrosine kinase inhibitor from a marine isolate of *Ulocladium botrytis* and new metabolites from the marine fungi *Asteromyces cruciatus* and *Varicosporina ramulosa*. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 2949 – 2955, 1999.

HOLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHEE, G. F.; KONIG, G. M.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycol. Res.**, v. 104, p. 1354 – 1365, 2000.

HYDE, K. D.; JONES, E. B. G.; LEANO, E.; POINTING, S. B.; POONYTH, A. D.; VRIJMOED, L. L. P. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodivers. Conserv.**, v. 7, p. 1147 – 1161, 1998.

JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Secondary metabolites from marine fungi. *In*: HYDE, K. D. **Fungi in marine environments**. Fungal Diversity Research Series, v. 7, p. 293 – 315, 2002.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 151 – 170, 2002.

KERTI, G.; KURTÁN, T.; ILLYÉS, T.; KÖVÉR, K. E.; SÓLYOM, S.; PESCIPELLI, G.; FUJIOKA, N.; BEROVA, N.; ANTUS, S. Enantioselective synthesis of 3 – methylisochromans and determination of their absolute configurations by circular dichroism. **Eur. J. Org. Chem.**, p. 296 – 305, 2007.

KOHLMEYER, J. Fungi from marine algae. **Bot. Mar.**, v. 16, n. 4, p. 201. – 215, 1973.

LAI, S.; SHIZURI, Y.; YAMAMURA, S.; KAWAI, K.; TERADA, Y.; FURUKAWA, H. New metabolites of two hybrid strains ME 0004 and ME 0005 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. **Chem. Lett.**, p. 589 – 592, 1990.

LORENZ, P.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Mactanamide, a new fungistatic diketopiperazine produced by a marine *Aspergillus* sp. **Nat. Prod. Lett.**, p. 55 – 60, 1998.

MASUMA, R.; TABATA, N.; TOMODA, H.; HANEDA, K.; IWAI, Y.; OMURA, S. Arohynapenes A and B, new anticoccidial agents produced by *Penicillium* sp. Taxonomy, fermentation, and structure elucidation. **J. Antibiotics**, v. 47, p. 46 – 53, 1994.

- NEWEL, S. Y. Mangrove Fungi: The succession in the mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). In: JONES, E. B. G. (Ed.). **Recent advances in aquatic mycology**. UK: Paul Elek Scientific Books, 1976. p. 51 – 91.
- OLIVEIRA, J. H.; SELEGHIM, M. H.; TIMM, C.; GRUBE, A.; KOCK, M.; NASCIMENTO, G. G.; MARTINS, A. C.; SILVA, E. G.; SOUZA, A. O.; MINARINI, P. R.; GALETTI, F. C.; SILVA, C. L.; HADJU, E.; BERLINCK, R. G. Antimicrobial and antimycobacterial activity of cyclostelletamine alkaloids from sponge *Pachychalina* sp. **Mar. Drugs**, v. 4, p. 1 – 8, 2006.
- OSTERHAGE, C.; KAMINSKY, R.; KOENIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 6412 – 6417, 2000.
- OSTERHAGE, C.; KONIG, G. M.; HOLLER, U.; WRIGHT, A. D. Rare sesquiterpenes from the algicolous fungus *Drechslera dematioidea*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p. 306 – 313, 2002.
- PANG, K. L.; MITCHELL, J. I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Bot. Mar.**, v. 48, p. 332 – 347, 2005.
- PIETRA, F. Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. **Nat. Prod. Rep.**, p. 453 – 464, 1997.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996. 724 p.
- SALEEM, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, S. C.; JABBAR, A.; ASHRAF, M. D.; LEE, Y. S. Marine natural products of fungal origin. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 1142 – 1152, 2007.

- SELEGHIM, M. H. R.; LIRA, S. P.; KOSSUGA, M. H.; BATISTA, T.; BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; MURICY, G.; ROCHA, R. M.; NASCIMENTO, G. G. F.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SOUZA, A. O.; PEIXINHO, S. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.3, 287 – 318, 2007.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.
- VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria feline*. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, 1099 – 1103, 2008.
- WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 545 – 551, 2006.
- ZUCARO, A.; MITCHELL, J. I. Fungal communities of seaweeds. *In*: DIGHTON, J.; WHITE, J. F.; OUDEMANS, P. **The Fungal Community**: its organization and role in the ecosystem. Boca Raton: CRC, 2005. 936 p.