UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MARÍLIA CARDOSO MILANETTO

**Investigação da origem metabólica de derivados da esculetina ativos
contra o vírus da SARS**

São Carlos

2008

MARÍLIA CARDOSO MILANETTO

**Investigação da origem metabólica de derivados da esculetina
ativos contra o vírus da SARS**

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

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.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva
responsabilidade do autor.

São Carlos, 10/02/2009.

Marília Cardoso Milanetto

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dimas (*in memoriam*) e Maria Tereza, por todo o apoio e por tudo que sempre fizeram por mim; e ao meu marido, André, por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela orientação e por todo o apoio, a paciência, a amizade e pelos ensinamentos que adquiri no desenvolvimento desse projeto.
- ❖ À Prof^a. Dr^a. Mirna Helena R. Seleglim, pela orientação, por tudo que me ensinou, e também pela amizade, apoio e incentivo.
- ❖ À Darci, pela linda amizade e por todas as coisas que me ensinou, não apenas no âmbito do laboratório.
- ❖ Às pessoas sem as quais eu não seria ninguém: minha família. Ao meu pai e minha mãe, por todo o apoio e incentivo, pelo amor e por todos os ensinamentos que levarei comigo para o resto da vida. Por tudo de tão importante que vocês sempre fizeram por mim.
- ❖ Ao meu marido, André, que sempre foi muito mais do que amigo, confidente, companheiro. Por toda a paciência, o apoio e por tudo que passamos juntos.
- ❖ Aos meus sogros, Gêisa e Peret, por todo o carinho e apoio.
- ❖ Aos meus amigos, sempre presentes em todos os momentos.
- ❖ Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e pelo auxílio: Eli, Raquel, Stela, Fábio, Miriam, Simone, Michelli, Richele, Suzi, Érica, Carol, Luiz Fernando, Vinícius, Camila, Milene, Juliana e Marina.

- ❖ Ao Centro de Biologia Marinha (CEBIMar-USP) pelo apoio logístico durante a coleta do material biológico.
- ❖ Ao grupo do Prof. Reginaldo B. Gonçalves (Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP) pela realização dos ensaios de atividade antibiótica contra patógenos bucais.
- ❖ Ao grupo do Prof. Célio Lopes Silva (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP) pela realização dos ensaios de atividade anti-tuberculose contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- ❖ Ao grupo da Prof^a. Claudia do Ó Pessoa (Universidade Federal do Ceará) pela realização dos ensaios de atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais.
- ❖ À Dr^a. Lara Durães Sette (CPQBA-UNICAMP), pela identificação do fungo *Penicillium raistrickii*.
- ❖ À FAPESP, pelo apoio financeiro.
- ❖ A todas as pessoas que de alguma forma participam ou participaram da minha trajetória, me incentivando e apoiando. Muito obrigada a todos!!

RESUMO

MILANETTO, M. C. **Investigação da origem metabólica de derivados da esculetina ativos contra o vírus da SARS.** 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Recentemente foram isolados da esponja marinha *Axinella* cf. *corrugata* dois compostos derivados da esculetina: o éster metílico do ácido 4-esculetínico e o éster etílico do ácido 4-esculetínico. Este último apresentou importante atividade contra o vírus da SARS. Este projeto teve como meta isolar e cultivar as linhagens de fungos associadas à esponja *Axinella* cf. *corrugata*, bem como analisar seus extratos por HPLC-PDA-MS, objetivando a possível detecção desses compostos (ou derivados) nesses extratos. Avaliações preliminares levaram à obtenção de 11 amostras potencialmente relacionadas a esses compostos. Dentre elas, uma apresentou espectros no UV e de massas muito similares aos obtidos para o aduto de sódio do éster metílico do ácido 4-esculetínico. No entanto análises espectroscópicas mais detalhadas por RMN – ^1H , RMN – ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY da amostra purificada permitiram identificar o composto isolado, a 1,3,6-trihidroxi-8-metil-9*H*-xanten-9-ona. Simultaneamente às análises químicas, os extratos obtidos a partir das linhagens fúngicas isoladas da esponja *Axinella* cf. *corrugata* tiveram suas atividades biológicas avaliadas frente a microrganismos e células tumorais humanas, resultando em mais de 20% dos extratos com alguma atividade biológica.

Palavras-chave: fungos marinhos; metabólitos secundários; SARS.

ABSTRACT

MILANETTO, M. C. **Investigation of the metabolic origin of esculetin derivatives active against the SARS virus.** 2008. 104 f. Dissertation (Masters) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

Recently two compounds derived from esculetin have been isolated from the marine sponge *Axinella* cf. *corrugata*: the methyl ester of esculetin-4-carboxylic acid and the ethyl ester of esculetin-4-carboxylic acid. The latter displayed antiviral activity against the SARS virus. This project aimed the isolation and the growth of fungal strains associated to the sponge *Axinella* cf. *corrugata*, and the subsequent analysis of the fungal extracts by HPLC-PDA-MS, aiming the possible detection of the esculetin compounds (or derivatives) in those extracts. Preliminary analysis yielded 11 samples potentially related to these compounds. Among these extracts, one presented UV and MS spectra very similar to the spectra obtained for the sodium adduct of the methyl ester of esculetin-4-carboxylic acid. However, a detailed spectroscopic analysis of a pure compound isolated by RMN – ^1H , RMN – ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY allowed the identification of the compound, which is 1,3,6-trihydroxy-8-methyl-9H-xanthen-9-one. Simultaneously to the chemical analysis of the fungal crude extracts, the biological activities of the obtained extracts were evaluated against microorganisms and human tumoral cell lines. More than 20% of the extracts displayed some biological activity.

Keywords: marine fungi; secondary metabolites; SARS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição de produtos naturais isolados de diferentes grupos de organismos marinhos (Blunt et al., 2003).	14
Figura 2: Distribuição das atividades biológicas de produtos naturais isolados a partir de microrganismos marinhos (Kelecom, 2002).	15
Figura 3: Fotos de algumas das linhagens de fungos isoladas a partir da esponja <i>Axinella</i> cf. <i>corrugata</i> : (A) AC(A)6; (B) AC(M2)3 e (C) AC(M2)19.	24
Figura 4: Esquema da metodologia utilizada na obtenção dos extratos e frações das linhagens de fungos.	25
Figura 5: Esquema das principais correlações observadas nos espectros de RMN bidimensionais COSY e HMBC da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3.	44
Figura 6: Estrutura da 1,3,6-trihidroxi-8-metil-9H-xanten-9-ona.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios utilizados no crescimento dos fungos marinhos	22
Tabela 2. Dados de deslocamentos químicos de RMN- ¹ H e ¹³ C e correlações a longa distância da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3, em DMSO deuterado.	43
Tabela 3. CIM (em µg/mL) das amostras com atividade antimicrobiana.....	48
Tabela 4. CBM (µg/mL) das amostras com atividade antimicrobiana que inibiram 100% do crescimento microbiano.....	49
Tabela 5. Inibição de crescimento de células tumorais humanas pelo extrato AC2(B)4.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Fungos: definições e generalidades	10
1.2. Fungos e os produtos de seu metabolismo secundário.....	11
1.3. SARS	16
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Coleta da esponja marinha <i>Axinella</i> cf. <i>corrugata</i>	21
3.2. Isolamento e cultivo das linhagens de fungos associadas à esponja	23
3.3. Crescimento das linhagens fúngicas e obtenção dos extratos	24
3.4. Técnicas de análise dos extratos e frações	27
3.4.1. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	27
3.4.2. <i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	28
3.5. Solventes	28
3.6. Análise das atividades biológicas das amostras	29
3.6.1. <i>Atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos ao trato bucal</i>	29
3.6.2. <i>Atividade antimicobacteriana contra <u>Mycobacterium tuberculosis</u> H37Rv</i>	30
3.6.3. <i>Atividade citotóxica em células tumorais humanas</i>	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 – Análise dos extratos e frações por HPLC-PDA-MS	33
4.1.1. <i>Determinação estrutural do composto isolado a partir da amostra</i> <i>AC(M2)14A-Fr3-P3</i>	42
4.2 – Avaliação da atividade biológica dos extratos	47
4.2.1. <i>Atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos ao trato bucal</i>	47
4.2.2. <i>Atividade antimicobacteriana contra <u>Mycobacterium tuberculosis</u> H37Rv</i>	51
4.2.3. <i>Atividade citotóxica em células tumorais humanas</i>	51
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO A- Cromatogramas, espectros no ultra-violeta, espectros de massas e espectros de RMN.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos: definições e generalidades

Os fungos são organismos eucariontes pertencentes ao Reino Fungi. Constituem um grande grupo de organismos que são considerados onipresentes na maioria dos ambientes com vida e podem utilizar substâncias simples para o crescimento, além de possuírem uma notável habilidade para utilizar quase todos os tipos de fontes de carbono orgânico para o seu desenvolvimento (Alexopoulos, 1996). Além disso, podem tolerar condições ambientais extremas, como baixo teor de água e alta pressão osmótica, amplas faixas de temperatura e pH, e desenvolvem-se em ambientes com baixo teor de nutrientes. Esses microrganismos também desempenham um importante papel como decompositores, devolvendo nutrientes ao ecossistema. Podem ser patogênicos, bem como realizar interações mutualísticas com outros organismos (Bugni; Ireland, 2004; Colwell, 1997).

Atualmente considera-se que o número total de espécies de fungos descritas seja de aproximadamente 72.000. Não existe, no entanto, um catálogo mundial das espécies de fungos já descritas. Dessa forma, considera-se que tal número possa alcançar 150.000, o que corresponderia a aproximadamente 10% de um número estimado de espécies de fungos, cerca de 1.500.000 (Bull; Ward; Goodfellow, 2000; Colwell, 1997).

O ecossistema marinho compreende uma enorme diversidade de espécies de microrganismos. Os fungos encontrados nesses ambientes não são necessariamente marinhos; podem ser fungos terrestres que encontram-se dormentes na forma de

esporos e desenvolvem-se quando as condições de crescimento tornam-se propícias. De acordo com Bugni e Ireland (2004), os fungos marinhos obrigatórios são aqueles que desenvolvem-se e esporulam exclusivamente no ambiente marinho, enquanto os fungos marinhos facultativos são oriundos de habitats terrestres ou de água doce, no entanto podem também desenvolver-se nesses ambientes. Dessa forma os fungos isolados de ambientes marinhos são comumente denominados de “fungos derivados do meio marinho”.

1.2. Fungos e os produtos de seu metabolismo secundário

Os fungos filamentosos apresentam grande potencial de utilização biotecnológica em virtude de sua capacidade de produzir uma alta diversidade de metabólitos secundários e enzimas extracelulares com aplicação potencial nas indústrias alimentícia (na fermentação de pães, queijos, vinhos, na produção de corantes alimentícios [Mapari et al., 2005], entre outros), agroquímica e farmacêutica. Compostos com atividade anti-inflamatória, antibiótica, antifúngica, anticancerígena e inibitória de enzimas, além de agroquímicos (herbicidas, fungicidas, pesticidas), são exemplos de substâncias que foram isoladas a partir de fungos (Demain, 2000; Pinto et al., 2002; Strobel; Daisy, 2003). Alguns desses compostos têm aplicação direta na indústria farmacêutica; outros, por sua vez, servem como ponto de partida para o planejamento, desenvolvimento e síntese laboratorial de novas drogas (Demain, 2000).

A penicilina G (**1**), produzida a partir de *Penicillium notatum*, foi descoberta por Alexander Fleming em 1928, sendo o primeiro antibiótico isolado a partir de uma linhagem fúngica. Sua descoberta foi revolucionária no tratamento de infecções

bacterianas e impulsionou as pesquisas em busca de outros antibióticos derivados de microrganismos.

A busca por novos compostos terapêuticos é crescente devido ao surgimento de novas doenças e à resistência adquirida pelos microrganismos aos antibióticos já existentes (Bernan; Greenstein; Maiese, 1997; Demain, 2000; Kelecom, 2002).

Nos últimos anos renasceu o interesse no isolamento de produtos naturais bioativos isolados a partir de fungos. Isso se deve aos seguintes fatos: a grande diversidade de linhagens obtidas com um pequeno esforço de coleta, além da variedade de substâncias isoladas a partir delas; a possibilidade e facilidade do cultivo dos fungos *in vitro*; a possível geração de espécies melhor adaptadas, a partir de alterações fisiológicas no cultivo das linhagens, ou pela indução de estresse no fungo.

As condições de desenvolvimento dos microrganismos têm importância fundamental na biossíntese de seus metabólitos secundários (Knight et al., 2003). Alguns estudos têm sido realizados com o objetivo de se avaliar o metabolismo secundário de fungos em função de alterações nas condições de crescimento dos microrganismos. Pequenas mudanças realizadas em alguns parâmetros do cultivo (como composição do meio, aeração, tempo de crescimento, frascos de cultura, etc.) acarretam a biossíntese de maiores quantidades de algumas substâncias, além da

detecção de novos metabólitos produzidos a partir da mesma linhagem (Bode et al., 2002; Demain, 2000;).

O ambiente marinho tornou-se um campo muito atrativo na busca por fontes não-convencionais de substâncias com atividades biológicas. Fungos marinhos, em particular, têm sido objeto de investigações mais recentes, e demonstram ser uma fonte nova e muito promissora de produtos naturais biologicamente ativos (Bugni; Ireland, 2004; Fenical; Jensen, 2002; Höller et al., 2000; Kelecom, 2002; König et al., 2006). A diversidade de espécies de fungos encontrada nesses ambientes é grande, e pode ser afetada por alguns fatores, como a disponibilidade de habitats, a natureza do substrato, a competição entre organismos, temperatura e salinidade da água (Jones, 2000).

Em ambientes como o oceano existem, além da grande diversidade de fungos, várias espécies de bactérias, o que torna o ambiente ainda mais competitivo. A escassez de nutrientes e as condições extremas de desenvolvimento contribuem para que seja ainda maior a expressão do potencial metabólico desses microrganismos. Dessa forma, alguns deles produzem metabólitos secundários que têm como objetivo inibir o crescimento de organismos competidores (Pivkin; Afiyatullo; Elyakov, 1999). Além disso, fungos e bactérias marinhos são considerados uma das últimas fontes praticamente inexploradas de moléculas com atividade biológica (Kelecom, 2002).

Há que se considerar também as associações que ocorrem entre micro e macrorganismos marinhos. Frequentemente observam-se fungos e bactérias associados a algas, ou a invertebrados (esponjas, corais, etc). Embora a natureza dessas associações não seja totalmente compreendida, certamente trata-se de um importante aspecto na biossíntese de produtos naturais marinhos. Diversos compostos

isolados a partir de extratos de macrorganismos posteriormente tiveram sua biossíntese associada a microrganismos. Esse fato levanta a hipótese de que muitos metabólitos obtidos a partir de algas e invertebrados marinhos podem, na verdade, ser biossintetizados por microrganismos associados (Belarbi, 2003; Kelecom, 2002; König et al., 2006; Wang, 2006).

Segundo Bugni e Ireland (2004), estudos levaram à descoberta e isolamento de 272 novos produtos naturais de fungos derivados do meio marinho até o ano de 2002, sendo que vários apresentaram esqueletos de carbono inéditos, o que prova que esses microrganismos têm grande potencial como precursores de importantes fármacos. Além disso, muitas substâncias com importantes atividades farmacológicas têm sido isoladas a partir de fungos marinhos. Atualmente cerca de 15% de todos os produtos naturais isolados de organismos marinhos são na verdade oriundos de microrganismos marinhos (Blunt et al., 2003), conforme mostra a Figura 1.

Figura 1: Distribuição de produtos naturais isolados de diferentes grupos de organismos marinhos (Blunt et al., 2003).

Segundo Kelecom (2002), a maior parte dos produtos naturais isolados de microrganismos marinhos até 2002 apresentou atividade antitumoral. Demais compostos apresentaram atividades antibacteriana, antifúngica, inibitória de enzima, antiviral, anti-inflamatória, entre outras, de acordo com a Figura 2.

Figura 2: Distribuição das atividades biológicas de produtos naturais isolados a partir de microrganismos marinhos (Kelecom, 2002).

Alguns exemplos de produtos naturais novos e/ou com atividade biológica isolados a partir de microrganismos marinhos são: a sicaína (**2**), que foi o primeiro antibiótico isolado a partir de um fungo marinho obrigatório (Kupka et al, 1981); dois novos derivados de isocumarinas, as haloroselinas A (**3**) e B (**4**); a fenil lactona 3-acetil-7-hidroxi-5-metoxi-3,4-dimetil-3*H*-isobenzofuran-1-ona (**5**), que apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (CIM = 200 µg/mL) (Chinworrungsee et al, 2002).

A peribisina F (**6**), produzida pelo fungo *Periconia byssoides* associado à lebre-do-mar *Aplysia kurodai*, inibiu a adesão de células de leucemia humana HL-60 às células do cordão umbilical ($IC_{50} = 20,7 \mu M$) (Yamada et al., 2005). A tricodermamida B (**7**) foi obtida a partir do extrato do fungo *Trichoderma virens*, derivado da ascídia *Didemnum molle*, e apresentou citotoxicidade *in vitro* contra células de carcinoma de cólon humano HCT-116 ($IC_{50} = 0,32 \mu g/mL$). Além disso apresentou atividade antimicrobiana moderada contra linhagens resistentes de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* (Garó et al., 2003).

A literatura apresenta muitos outros exemplos de produtos naturais isolados a partir de fungos derivados do meio marinho (Saleem, 2007) e de outros organismos marinhos (Mayer, 2007, 2008), com importantes atividades biológicas. Esses exemplos ilustram o potencial de produção de metabólitos secundários bioativos por parte de microrganismos derivados do ambiente marinho, bem como a importância da exploração desse ambiente em busca de novos produtos naturais com atividades biológicas.

1.3. SARS

Os vírus são os agentes causadores de muitas das doenças que acometem os seres humanos, desde as mais simples (como gripes, catapora, sarampo, entre outras)

até as mais sérias (como febre amarela, hepatite e AIDS). Algumas dessas doenças podem ser prevenidas com a aplicação de vacinas. Os tratamentos mais comuns incluem o uso de fármacos específicos que atuam impedindo a replicação viral ou, em alguns casos, visam apenas amenizar os sintomas.

Produtos naturais têm sido alvo de busca por novos compostos bioativos, que sejam mais eficazes no tratamento de doenças virais e causem menos efeitos colaterais. Em recente revisão, Singh, Bharate e Bhutani (2005) apresentam um levantamento de diversos produtos naturais com atividade inibitória do vírus HIV, dentre eles diversos flavonóides, alcalóides, cumarinas e outros compostos isolados de plantas, e também alguns produtos naturais de origem marinha e microbiana. Embora ainda não estejam em uso clínico, alguns desses produtos naturais encontram-se em fase de testes pré-clínicos e são potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da AIDS.

A síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*), também conhecida como pneumonia asiática ou pneumonia atípica, é uma doença viral do sistema respiratório que caracteriza-se por uma inflamação anormal dos pulmões. Os sintomas clínicos são similares aos da pneumonia, como: febre alta, dores de cabeça e pelo corpo, tosse seca, e hipoxemia. (Drosten et al., 2003; American Red Cross, 2003).

Em 2003 houve uma epidemia de SARS em várias regiões da Ásia e no Canadá, que rapidamente se espalhou para outros países. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*), entre 01/11/2002 e 31/07/2003 foram relatados 8096 casos de infecção em todo o mundo, sendo 774 casos fatais, ou seja, 9,6% (World Health Organization, 2008).

O tratamento clínico com vacinas, esteróides e com terapias utilizadas no tratamento de outras doenças virais mostrou-se relativamente ineficaz, uma vez que o vírus da SARS era até então desconhecido. Atualmente os corticosteróides são mais comumente utilizados no tratamento da SARS, embora seu uso ainda seja controverso (Stockman; Bellamy; Garner, 2006).

Estudos identificaram que o agente causador da SARS é um novo coronavírus, que foi denominado SARS-CoV (Marra et al., 2003; Rota et al., 2003). Este coronavírus sintetiza a protease viral 3CL^{PRO}, enzima responsável pela degradação de polipeptídeos em proteínas menores, que são a chave para a replicação viral. Dessa forma a 3CL^{PRO} tornou-se o alvo do desenvolvimento de drogas para o tratamento da SARS e têm-se realizado estudos que buscam por inibidores desta enzima (Anand et al., 2003; Hamill et al., 2006).

Recentemente alguns produtos naturais obtidos a partir de plantas apresentaram atividade inibitória do SARS-CoV *in vitro*. A substância responsável pela maior inibição ($IC_{50} = 886,6 \mu\text{g/mL}$) foi isolada e trata-se da licorina (**8**), obtida a partir de *Lycoris radiata* (Li et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

No Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos, sob a coordenação do Prof. Dr. Roberto Berlinck, foram isolados da esponja *Axinella* cf. *corrugata*, coletada em São Sebastião, dois derivados da esculetina: o éster metílico do ácido 4-esculetínico (**9**) e o éster etílico do ácido 4-esculetínico (**10**). O derivado **10** apresentou atividade antiviral contra o vírus da SARS, em bioensaio desenvolvido por um colaborador do Prof. Raymond J. Andersen, na University of British Columbia (Vancouver, Canadá) (Hamill et al., 2006; Lira et al., 2007;).

Ambos os compostos **9** e **10** foram isolados em rendimento muito baixo ($2,0 \cdot 10^{-4} \%$ e $2,2 \cdot 10^{-4} \%$, respectivamente), e além disso foram observados vários compostos correlatos minoritários nas análises por HPLC com detector de arranjo de diodos. Tendo em vista a atividade biológica apresentada pelo composto **10** e o baixo rendimento de isolamento, considerou-se ser de alta prioridade o estudo da micoflora associada à esponja *Axinella* cf. *corrugata* objetivando a possível descoberta de uma linhagem responsável pela biossíntese dos metabólitos **9** e **10**.

Sendo assim, no âmbito do projeto “Estabelecimento de Condições para o Isolamento e Crescimento de Linhagens de Fungos Marinhos para a Produção de

Metabólitos Secundários” (processo FAPESP 03/08899-0, em término) e do projeto “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados” (projeto temático FAPESP 05/60175-2), estabeleceram-se para o presente projeto os seguintes objetivos:

- Isolar e cultivar as linhagens de fungos associadas à esponja *Axinella cf. corrugata*;
- Analisar os extratos obtidos do cultivo dessas linhagens em busca de derivados do ácido 4-esculetínico;
- Detectada a presença destes metabólitos, realizar seu isolamento e identificação, de maneira a confirmar sua estrutura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta da esponja marinha *Axinella* cf. *corrugata*

Foram realizadas duas coletas da esponja *Axinella* cf. *corrugata*, na Ilha de Toque-Toque, em São Sebastião (SP), em Setembro/2005 e em Janeiro/2007. As esponjas foram coletadas por mergulho autônomo, entre 5 e 10 m de profundidade.

Na primeira coleta, após esterilização externa dos exemplares feita com solução de cloreto de mercúrio II (HgCl_2) a 1%, fragmentos da parte interna das esponjas foram cortados com estiletes estéreis e espalhados sobre a superfície de placas de Petri com seis diferentes meios de cultura: aveia, batata e cenoura, fubá, GPY, malte 2% e malte 3% (Tabela 1).

Na segunda coleta, após a esterilização externa com solução de HgCl_2 e lavagem em água estéril, pequenos fragmentos da parte interna da esponja foram inoculados em placas de Petri, contendo oito diferentes meios de cultura (todos os seis já utilizados e mais os meios de celulose e Tubaki) (Tabela 1). Paralelamente, alguns fragmentos internos foram triturados em água destilada esterilizada e diluídos. Estas suspensões também foram inoculadas nas placas, contendo os mesmos meios. No preparo dos meios de cultura para as duas coletas utilizou-se também o antibiótico rifampicina, para evitar o crescimento bacteriano nas placas.

Todos os meios de cultura foram preparados com água do mar artificial (*Artificial Sea Water*, ASW), que contém: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,36 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 9,68 g/L; KCl 0,61 g/L; NaCl 30 g/L; NaH_2PO_4 0,14 mg/L; Na_2SO_4 3,47 g/L; NaHCO_3 170 mg/L; KBr 100 mg/L; $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40 mg/L; ácido bórico 30 mg/L e 1 L de água destilada.

Tabela 1. Meios utilizados no crescimento dos fungos marinhos

Meio de cultura	Componentes (para 1 L de meio)
Ágar aveia (A)	30 g aveia 20 g ágar 1 L ASW
Ágar cenoura e batata [Potato carrot agar (KM)] (B)	20 g batatas cozidas e esmagadas 20 g cenouras cozidas e esmagadas 20 g ágar 1 L ASW
Ágar celulose (C)	10 g celulose 1 g extrato de levedura 15 g ágar 1 L ASW
Ágar fubá (F)	42 g de fubá são agitados em 500 mL de água destilada a 60°C por 12h, filtrados e o filtrado diluído com água até 1 L. Adicionam-se 15 g de ágar e sais para 1 L de ASW.
Ágar de extrato de levedura, peptona e glicose [Glucose peptone yeast extract agar (GPY)] (G)	1 g glicose 0,5 g peptona de carne de soja 0,1 g extrato de levedura 15 g ágar 1 L ASW
Ágar extrato de malte 2% (M2)	20 g extrato de malte 15 g ágar 1 L ASW
Ágar extrato de malte 3% (M3)	30 g extrato de malte 5 g peptona micológica 15 g ágar 1 L ASW
Ágar de Tubaki (T)	30 g glicose 0,5 g extrato de levedura 1 g peptona 1 g de K_2HPO_4 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 15 g ágar 1 L ASW

O pH dos meios de cultura para o crescimento dos fungos foi ajustado para 8,0. Esse pH foi escolhido por ser próximo daquele encontrado no ambiente marinho, na tentativa de se selecionar microrganismos de origem marinha.

Após o preparo, os meios de cultura foram autoclavados. Todo o material utilizado nos procedimentos que envolveram os fungos foi esterilizado em estufa ou autoclave, e a manipulação foi inteiramente realizada em fluxo laminar ou em sala asséptica.

3.2. Isolamento e cultivo das linhagens de fungos associadas à esponja

Após o crescimento inicial dos fungos associados à esponja *Axinella* cf. *corrugata* em placas de Petri, procedeu-se ao isolamento e purificação dos mesmos. Cada colônia foi repicada através do método de estrias para nova placa de Petri, com o mesmo meio de cultivo, até que estivesse pura. As linhagens então puras foram preservadas, de forma a serem mantidas sem sucessivas repicagens. De um total de 111 linhagens de fungos associadas à esponja *Axinella* cf. *corrugata*, 87 foram isoladas com sucesso, preservadas e submetidas aos experimentos para obtenção de seus extratos brutos.

Os microrganismos foram preservados em água destilada (a 4°C), em tubos inclinados contendo meio sólido (a 4°C) e em glicerol a 10% (a -20°C) (Figueiredo, 2001).

Para denominar as linhagens obtidas utilizou-se uma codificação simples, que contém: as iniciais do invertebrado marinho a partir do qual os fungos são provenientes (*Axinella* cf. *corrugata* = AC); o meio de cultura no qual aquele fungo se desenvolveu

(abreviação em destaque na Tabela 1); e o número atribuído àquela linhagem, aleatório. Exemplo: AC(G)1 = A linhagem número 1 que cresceu no meio GPY. As linhagens oriundas da segunda coleta de *Axinella* cf. *corrugata* apresentam o número 2 após o prefixo AC. A Figura 3 mostra fotos de algumas das linhagens fúngicas obtidas.

Figura 3: Fotos de algumas das linhagens de fungos isoladas a partir da esponja *Axinella* cf. *corrugata*: (A) AC(A)6; (B) AC(M2)3 e (C) AC(M2)19.

3.3. Crescimento das linhagens fúngicas e obtenção dos extratos

As 87 linhagens isoladas foram submetidas ao crescimento em meio líquido após sua purificação, conforme ilustra a Figura 4. Discos de 5 mm de diâmetro de cada colônia foram inoculados em 250 mL do mesmo meio em que cresceram (porém sem o ágar).

Após o período de crescimento de 14 dias (ou 28 dias, para fungos de crescimento lento), à temperatura ambiente e sem agitação, as amostras de linhagens que cresceram nos meios de cultura GPY, Malte 2%, Malte 3% e Tubaki foram filtradas em Celite (terra de diatomáceas) e separou-se o micélio do meio de cultura (extrato aquoso), contendo os metabólitos produzidos pelos microrganismos.

Ao micélio, adicionou-se 10 mL de metanol (MeOH) e a suspensão foi levada ao Ultrassom por 1 minuto. Filtrou-se novamente, obtendo-se o extrato metanólico do micélio (ExMeOH). Este procedimento está sumarizado na Figura 4.

Figura 4: Esquema da metodologia utilizada na obtenção dos extratos e frações das linhagens de fungos.

O meio de cultura obtido da filtração dos meios G, M2, M3 e T foi submetido à extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE), utilizando-se coluna pré-empacotada Sep-Pak[®] de 5 g, com fase estacionária de sílica derivatizada com grupos C₁₈ (Bernan; Greenstein; Maiese, 1997). Inicialmente utilizou-se cinco eluentes: H₂O 100% (fração descartada), MeOH/H₂O 1:3 (Fração 1:3); MeOH/H₂O 1:1 (Fração 1:1); MeOH/H₂O 3:1 (Fração 3:1) e 100% MeOH (Fração MeOH). Posteriormente, passou-se a utilizar apenas três eluentes: H₂O 100% (fração descartada), MeOH/H₂O 1:1

(Fração 1:1) e 100% MeOH (Fração MeOH), de forma a não se gerar um número excessivo de frações para as análises químicas e de atividades biológicas.

O procedimento para os demais meios de cultura (Aveia, Batata e cenoura, Celulose e Fubá) foi diferente pelo fato destes meios de cultura serem muito viscosos, o que dificultaria sua filtração. Após o período de 14 ou 28 dias de crescimento das linhagens nestes meios, adicionou-se 250 mL de acetato de etila (AcOEt) aos frascos de cultivo com o micélio e a suspensão foi agitada por 12 horas para sua extração. Após essa etapa a suspensão foi filtrada em Celite, separando-se o micélio da mistura de meio líquido misturado com o solvente orgânico (AcOEt). A fração líquida foi transferida para um funil de separação, separando-se a fase aquosa (que foi descartada) da fase AcOEt. Esta última foi separada e evaporada em rota-evaporador, obtendo-se os extratos brutos AcOEt de todas as linhagens crescidas em meio de cultura de aveia, batata e cenoura, celulose e de fubá.

Seguindo as metodologias descritas, obteve-se um total de 235 extratos, sendo 211 correspondentes às frações oriundas da SPE e extratos metanólicos e 24 extratos de acetato de etila.

A denominação dada aos extratos metanólicos e às frações de SPE utiliza o código da linhagem (conforme explicado no item **3.2**) seguido do número da fração correspondente (de acordo com o eluente utilizado, conforme explicado anteriormente), ou de “MeOH”, no caso do extrato metanólico do micélio. Exemplo: AC2(M2)1 – Fr.MeOH = A fração 100% MeOH obtida a partir do extrato de AC(M2)1, da segunda coleta da esponja. Como o extrato proveniente da partição com AcOEt é único, a denominação é simplesmente o código daquele fungo. Exemplo: AC2(A)1.

3.4. Técnicas de análise dos extratos e frações

3.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

O perfil químico das amostras foi inicialmente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Para a análise inicial dos compostos presentes nas amostras utilizou-se um sistema cromatográfico Waters® composto de: um sistema de bombeamento quaternário, um módulo de separação Waters Alliance® modelo 2695, um detector de arranjo de fotodiodos (*Photodiode Array Detector*, PDA) modelo 2996, e um detector de espectrômetro de massas, modelo Micromass ZQ. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL.

Para a purificação das amostras utilizou-se um segundo equipamento Waters®, contendo um sistema de bombeamento quaternário, um degaseificador Degasser em linha, um sistema de controle Controller 600, e um detector espectrofotométrico na região do UV-visível com leitura em dois comprimentos de onda, modelo 2487.

A coluna utilizada nos procedimentos cromatográficos contém, como fase estacionária, sílica-gel derivatizada com grupos fenila. Para a análise das primeiras amostras utilizou-se uma coluna da Waters®, µBondapak, com 125 Å de diâmetro da fase estacionária e de dimensões 300 x 7,8 mm. Posteriormente passou-se a utilizar a coluna Inertsil® 5µm Fenil, com 150Å de diâmetro de fase estacionária e de dimensões 250 x 4,6 mm. Como eluente utilizou-se um gradiente de MeOH/H₂O (água contendo 0,1% de ácido trifluoroacético, TFA, ou ácido fórmico), a um fluxo de 1 mL/min.

As condições utilizadas para a detecção dos compostos em questão foram as seguintes: no detector de arranjo de fotodiodos foi feita uma varredura de todos os

comprimentos de onda entre 200 e 800 nm. No espectrômetro de massas utilizou-se a ionização por eletrospray em modo positivo, e foi feita uma varredura de todos os compostos que apresentassem sinais de m/z entre 100 e 1200. Os valores procurados para o sinal m/z variaram de acordo com a estrutura do composto, sua ionização e fragmentação, sendo que foram feitas várias suposições desses valores para diferentes derivados dos compostos **9** e **10**.

3.4.2. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises por RMN foram realizadas em um aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (^{13}C), pertencente ao DQ-UFSCar.

O preparo das amostras para análise por RMN foi feito utilizando-se MeOH deuterado ou dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado e, como padrão interno, tetrametilsilano (TMS), todos da Cambridge Isotopes[®].

3.5. Solventes

Os solventes utilizados na extração em fase sólida e na partição (MeOH e AcOEt) foram de grau analítico (Quimex[®]). O MeOH utilizado nas análises cromatográficas era de grau cromatográfico (J. T. Baker[®]). A água utilizada na extração em fase sólida e nas análises cromatográficas foi destilada e purificada em um sistema Milli-Q, da Millipore[®].

3.6. Análise das atividades biológicas das amostras

Dentre todos os 235 extratos e frações, 107 foram obtidos em quantidade suficiente (25 mg ou mais) para a avaliação de suas atividades biológicas. Desta forma, foram submetidos aos seguintes bioensaios:

- atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos ao trato bucal (realizado por pesquisadores do grupo do Professor Reginaldo B. Gonçalves, do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas);
- atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (realizado por pesquisadores do grupo do Professor Célio Lopes Silva, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo);
- atividade citotóxica em células tumorais humanas (realizado pela Professora Claudia do Ó Pessoa e colaboradores, no Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará).

O protocolo de cada bioensaio é apresentado a seguir.

3.6.1. Atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos ao trato bucal

Testes de atividade antimicrobiana foram realizados com microrganismos orais de importância significativa na área odontológica: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, isolado clínico 2 *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Os ensaios realizados foram:

- determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). As amostras que inibiram 100% do crescimento bacteriano foram testadas também quanto à CBM. Para as frações e extratos que inibiram apenas 50% do crescimento bacteriano, considera-se que o valor da CBM é o mesmo que da CIM;
- avaliação do potencial antimicrobiano sobre a formação de biofilme e sobre a síntese de ácidos por espécies cariogênicas;
- avaliação da atividade inibitória das frações sobre espécies cariogênicas em diferentes pHs (utilizando saliva artificial tamponada com pH variando de 5,5 a 8).

A análise da atividade inibitória sobre microrganismos periodontopatógenos foi realizada pelo método de difusão em ágar, utilizando discos de papel embebidos com os extratos em anaerobiose e pH básico, testando-se assim a ação antimicrobiana das frações nas condições ambientais nas quais tais microrganismos são potencialmente virulentos. Os halos de inibição foram então mensurados. Os testes foram realizados em duplicata, utilizando-se penicilina e DMSO como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.6.2. Atividade antibacteriana contra Mycobacterium tuberculosis H37Rv

O efeito antimicobacteriano das amostras foi avaliado sobre *M. tuberculosis* H37Rv para determinação da CIM.

A técnica utilizada foi a da microdiluição em placa, utilizando como revelador o corante Alamar Blue. As amostras foram dissolvidas em DMSO e diluídas em meio líquido de Middlebrook 7H9 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 a 37°C por três semanas e subcultivada em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco) a 37°C por 10 dias. A suspensão de micobactérias foi ajustada para 4×10^5 micobactérias/mL usando a escala padrão de McFarland, e 100 µL da suspensão foram adicionados à microplaca contendo 100 µL de meio de cultura e diferentes concentrações das amostras. Como controles foram utilizados meio de cultura (controle negativo), meio de cultura e micobactérias (controle positivo). Como droga controle foi utilizada a Rifampicina nas concentrações de 0,015 a 25 µmol/L.

A microplaca foi incubada a 37°C e após 6 dias foram adicionados 25 µL de uma mistura 1:1 de Tween 80 a 10% e Alamar Blue às cavidades da microplaca. A microplaca foi re-incubada a 37°C e após 24 horas foi realizada a leitura macroscópica 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 indica a ausência de crescimento micobacteriano e o desenvolvimento da cor rósea indica a presença de crescimento micobacteriano.

3.6.3. Atividade citotóxica em células tumorais humanas

A citotoxicidade *in vitro* dos extratos e frações de SPE obtidos a partir de cada linhagem fúngica foi testada em três linhagens de células tumorais humanas: MDA-

MB435 (mama), HCT-8 (cólon) e HL-60 (leucemia), que foram cedidas pelo Mercy Children's Hospital dos Estados Unidos. Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Os extratos foram diluídos em DMSO na concentração estoque de 20 mg/mL.

O procedimento consiste em um microensaio no qual as células foram colocadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: $0,7 \cdot 10^5$ células/mL (HCT-8), $0,3 \cdot 10^6$ células/mL (HL-60) e $0,1 \cdot 10^6$ células/mL (MDA-MB435). Os extratos foram adicionados às culturas na concentração de 100 µg/mL, e então as células foram incubadas durante 72 horas. Utilizou-se uma solução de 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) para finalizar o tempo de incubação. A sobrevivência das células é avaliada por espectrofotômetro de varredura multicanal 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.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise dos extratos e frações por HPLC-PDA-MS

Todos os 235 extratos obtidos a partir dos meios de cultura dos fungos isolados a partir da esponja *Axinella* cf. *corrugata* foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PDA), de acordo com o procedimento descrito no item 3.4.1. Os derivados do ácido 4-esculetínico procurados apresentam espectro no UV com bandas de absorção em 4 comprimentos de onda: 207, 239, 271 e 375 nm (Lira et al., 2007). Desta forma, dentre todos os extratos e frações obtidos e analisados, apenas aqueles que apresentaram esse perfil de absorção no UV foram selecionados para futuras investigações.

Nessas primeiras análises detectaram-se 11 frações de 9 diferentes linhagens fúngicas com um perfil de absorção no UV bastante similar ao dos compostos **9** e **10**, ou seja, que apresentaram bandas de absorção no UV nas regiões de 207, 239, 271 e 375 nm. Essas amostras foram analisadas por HPLC-PDA-MS, para a obtenção de mais informações sobre os componentes químicos destas amostras: AC(M2)6 – Fração 3:1 (MeOH/H₂O 3:1); AC(M2)19 – Frações 1:1 (MeOH/H₂O 1:1) e 3:1 (MeOH/H₂O 3:1); AC(M3)7 – Fração MeOH (100% MeOH); AC2(G)4 - Fração MeOH (100% MeOH); AC2(M2)2 - Fração MeOH (100% MeOH); AC2(M2)3 - Fração MeOH (100% MeOH); AC2(M2)4 - Fração MeOH (100% MeOH); AC2(C)2; AC(M2)14 – Frações 3:1 (MeOH/H₂O 3:1) e MeOH (100% MeOH). Todos os cromatogramas, espectros no UV e espectros de massas dos sinais observados nos cromatogramas destas amostras são discutidos a seguir.

No espectro no UV da amostra AC(M2)6 – Fração 3:1 (MeOH/H₂O 3:1) (Anexo A, Figuras A1 e A1.1), observa-se que o pico identificado por P1 no cromatograma apresenta absorção nas regiões de 233,6, 302,3 e 359,1 nm, ao passo que o pico 2 apresenta absorção nas regiões de 241,8, 280,9 e 347,6 nm. No entanto os sinais de *m/z* observados (em 454,3 e 454,4) não correspondem aos compostos **9** e **10** ou derivados.

O cromatograma da amostra AC(M2)19 – Fração 1:1 (MeOH/H₂O 1:1) (Anexo A, Figuras A2 e A2.1) apresenta 3 picos principais, cada um com absorção em 2 comprimentos de onda (266,7 e 380,9 nm; 244,2 e 368,9 nm; 263,1 e 380,9 nm, respectivamente). Entretanto o valor de *m/z* de 335,5 nos espectros de massas desses 3 sinais também não corresponde aos compostos procurados.

A amostra AC(M2)19 – Fração 3:1 (MeOH/H₂O 3:1) (Anexo A, Figuras A3 e A3.1) apresentou um cromatograma com um único pico, o qual tem absorções no UV em 261,9, 344, 377,3 e 390,5 nm. Observa-se novamente no espectro de massas um íon de *m/z* 335,5, que não corresponde a nenhum dos dois derivados da esculetina.

Nos espectros no UV dos picos 1 e 2 observados no cromatograma da amostra AC(M3)7 – Fração MeOH (100% MeOH) (Anexo A, Figuras A4 e A4.1), notam-se duas bandas de absorção: a primeira na região de 239,5 ou 240,7 nm; a segunda em 323,7 ou 326,1 nm. O íon de *m/z* 310,9 observado no espectro de massas do sinal 1 também não corresponde aos compostos **9** e **10**, e o espectro de massas do sinal 2 apresenta um íon com *m/z* 598, de baixa intensidade.

A amostra AC2(G)4 - Fração MeOH (100% MeOH) (Anexo A, Figuras A5 e A5.1) apresenta 2 picos no seu cromatograma. Embora essa amostra tenha apresentado cromatograma com picos de absorção nas regiões dos comprimentos de onda

procurados, notou-se que os valores máximos de absorção no UV desses 2 picos não correspondem exatamente aos comprimentos de onda procurados, nas regiões de 246,6, 292,8 ou 294 e 386,9 ou 388,1 nm. Os espectros de massas também não apresentam valores de m/z relacionados aos compostos em questão.

O cromatograma da amostra AC2(M2)2 - Fração MeOH (100% MeOH) (Anexo A, Figuras A6 e A6.1) apresenta 2 picos principais. O primeiro deles apresenta absorção em apenas uma das regiões procuradas, 240,7 nm. Já o pico em 15,04 min mostra bandas com máximos de absorção em 248,9, 279,7 e 366,5 nm, que mais uma vez não correspondem às bandas procuradas. Novamente os espectros de massas desses sinais não apresentam valores de m/z que possam ser atribuídos aos compostos **9** e **10**.

Resultados similares foram observados para os cromatogramas dos extratos das amostras AC2(M2)3 - Fração MeOH (100% MeOH) (Anexo A, Figuras A7 e A7.1) e AC2(M2)4 - Fração MeOH (100% MeOH) (Anexo A, Figuras A8 e A8.1). Os máximos de absorção no UV dos sinais detectados nos cromatogramas não estão de acordo com os valores procurados, e os espectros de massas desses sinais não apresentam nenhum íon relacionado aos compostos em questão.

Os resultados indicaram claramente que a análise das frações e extratos realizada apenas por HPLC-PDA foi insuficiente para que se possa confirmar a presença de compostos relacionados a **9** e **10** nestas frações e extratos. No entanto, a utilização dessa técnica em conjunto com a de espectrometria de massas nos fornece maiores informações sobre a estrutura dos compostos em questão. Embora as amostras acima analisadas tivessem um perfil relativamente semelhante no UV, apresentando cromatogramas com absorção em comprimentos de onda muito próximos

e que em princípio eram esperados para os compostos **9** e **10**, foi possível observar que apresentam substâncias distintas entre si, uma vez que as massas dos compostos detectados são diferentes.

Com o auxílio da espectrometria de massas, descartou-se a hipótese de que essas amostras, que em princípio poderiam conter substâncias relacionadas aos derivados de esculetina procurados, de fato contivessem os compostos **9** e **10** ou derivados.

O extrato de acetato de etila da amostra AC2(C)2 (Anexo A, Figuras A9 e A9.1) apresentou em seu cromatograma um único pico, em 14,82 min, com absorção no UV nas 3 regiões de interesse. O espectro no UV deste pico mostra máximos de absorção em 266,7 e 316,6 nm, e observa-se no espectro de massas desta amostra um sinal em m/z 276,4, com uma unidade de massa a mais do que a esperada para o aduto de potássio de **9**, cuja estrutura (**11**) está apresentada a seguir. Julgou-se esse resultado interessante e a amostra foi analisada por RMN – ^1H (Anexo A, Figura A10).

Pode-se observar que a amostra é constituída de uma mistura complexa. Além disso, seu espectro de RMN - ^1H não apresenta os valores de deslocamento químico de hidrogênio observados no espectro dos compostos **9** e **10** (Lira et al., 2007), que originalmente aparecem em δ 10,44, 9,60, 7,46, 6,80, 6,60 e 3,92. Dessa forma, concluímos que as substâncias presentes no extrato da linhagem AC2(C)2 também não estão relacionadas aos compostos **9** e **10**.

A amostra AC(M2)14 – Fração 3:1 (MeOH/H₂O 3:1) (Anexo A, Figuras A11 e A11.1) apresentou picos no cromatograma com bandas de absorção no UV nos 3 comprimentos de onda procurados. É possível observar os espectros no UV e de massas do pico 1 do cromatograma dessa fração, que aparece em 14,07 minutos neste cromatograma. Nota-se que a substância é majoritária, e apresenta um íon de m/z 275,3. Considerou-se que este fosse o valor de massa correspondente ao aduto de potássio $[M+K]^+$ do composto **9** (11).

A Figura A12 (Anexo A) mostra o cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14. Observando-se os espectros no UV e de massas do pico 1 do cromatograma desta amostra (figuras A12.1/A e A12.1/B [Anexo A]), que aparece em 14,9 minutos neste cromatograma, nota-se que a substância que dá origem ao pico 1 do cromatograma apresenta um sinal de m/z 259,3, que poderia corresponder ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ do composto **9** (12).

No entanto ambas as amostras foram obtidas em pequena quantidade, insuficiente para que fossem realizadas outras análises. Desta forma, a linhagem AC(M2)14 foi novamente crescida em meio líquido (1 L), com o objetivo de se obter maiores quantidades das frações 3 e 4. O crescimento foi feito em duplicata, gerando as amostras AC(M2)14A e AC(M2)14B. Apesar do crescimento ter sido realizado em maior volume, as quantidades obtidas das frações 3:1 e MeOH de AC(M2)14A e

AC(M2)14B foram muito pequenas (poucos miligramas). Essas frações foram analisadas por HPLC-PDA-MS e os resultados são discutidos a seguir.

Para cada uma das amostras, AC(M2)14A – Fração 3:1 (Anexo A, Figuras A13 e A13.1) e AC(M2)14B – Fração 3:1 (Anexo A, Figuras A14 e A14.1), existem 3 picos no cromatograma que apresentam absorção na região do UV que poderia corresponder a derivados do ácido esculetínico. Nestes casos, são ilustrados os espectros no UV e de massas dos sinais cromatográficos correspondentes a potenciais derivados do ácido esculetínico observados nestas frações.

Avaliando-se o perfil químico de cada uma dessas amostras, pode-se notar grande similaridade entre os cromatogramas, os espectros no UV e de massas dos respectivos sinais destacados das 2 amostras, AC(M2)14A-Fração 3:1 e AC(M2)14B-Fração 3:1, o que indica que certamente tratam-se das mesmas substâncias, que foram produzidas pela mesma linhagem crescida em duplicata [AC(M2)14A e AC(M2)14B].

Em ambas as amostras existe uma substância representada pelo pico 3 nos cromatogramas (Anexo A, Figuras A13.1/D e A14.1/D), com íon de m/z 275,0 (AC(M2)14A) ou 275,1 (AC(M2)14B), a qual inicialmente supôs-se tratar-se do aduto de potássio $[M+K]^+$ do composto **9** (**11**). Outra substância, minoritária, representada pelo pico 4 nos cromatogramas (Anexo A, Figuras A13.1/F e A14.1/F) apresenta um sinal de m/z 259,0 (AC(M2)14A) ou 259,1 (AC(M2)14B), que poderia corresponder ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ do composto **9** (**12**). Dessa forma, essas duas amostras foram selecionadas para futura purificação por HPLC de cada um dos picos 1-4 observados nos cromatogramas.

As frações 100% MeOH das amostras AC(M2)14A e AC(M2)14B também foram analisadas por HPLC-PDA-MS. Nas figuras A15 e A15.1 (Anexo A) pode-se observar

que a substância AC(M2)14A - Fração MeOH está praticamente pura, pois apresenta apenas um pico. Em seu espectro no UV (Anexo A, Figura A15.1/A) observam-se bandas de absorção com máximos em 240,1 e 310 nm e seu espectro de massas (Anexo A, Figura A15.1/B) apresenta um íon de m/z 273,0. Comparando-se o espectro de massas deste pico (Anexo A, Figura A15.1/B) com aquele obtido na primeira análise da amostra AC(M2)14 – Fração MeOH (Anexo A, Figura A12.1/B), nota-se um fato interessante: o sinal observado no espectro de massas da primeira amostra apresenta m/z 259,3, o que levou à suspeita da presença do aduto de sódio do composto **9** detectado na primeira análise e do aduto de potássio do composto **10** detectado nesta segunda análise.

Já a amostra AC(M2)14B - Fração MeOH (Anexo A, Figuras A16 e A16.1) demonstra ser uma mistura complexa. Ainda assim, o espectro de massas do pico 1 apresenta novamente o íon com m/z 273,0.

Ambas as frações 100% MeOH obtidas a partir das duas duplicatas do crescimento em 1 L da linhagem AC(M2)14 foram obtidas em quantidade muito pequena (0,4 mg), insuficiente para purificação. Os picos nos cromatogramas de HPLC destas amostras apresentavam intensidades muito baixas. Dessa forma não foi possível purificar essas amostras.

Após essa avaliação inicial, procedeu-se à purificação por HPLC dos compostos que dão origem aos picos selecionados das amostras AC(M2)14A – Fração 3:1 e AC(M2)14B – Fração 3:1, numerados de 1 a 4 nos cromatogramas (Anexo A, Figuras A13 e A14). A separação em escala semi-preparativa foi feita utilizando-se a mesma coluna [Inertsil 5 µm Phenyl (150 Å, 4.6 x 250 mm)] e eluição isocrática com MeOH/H₂O

(7:3 ou 6:4, dependendo da fração). As oito frações isoladas foram novamente analisadas por HPLC-PDA-MS.

Após separados por HPLC, apenas 3 das oito frações apresentaram absorções características no espectro de UV e sinais no seus espectros de massas com m/z em 259,0 ou 275,0. Essas amostras são: os picos 3 e 4 da amostra AC(M2)14A – Fração 3:1, identificados na Figura A13 (Anexo A), e o pico 4 da amostra AC(M2)14B – Fração 3:1, identificado na Figura A14 (Anexo A). Essas amostras foram nomeadas respectivamente: AC(M2)14A-Fr3-P3, AC(M2)14A-Fr3-P4 e AC(M2)14B-Fr3-P4. Os cromatogramas e espectros das amostras obtidas após a separação semi-preparativa são discutidos a seguir.

Na Figura A17 (Anexo A) observa-se o cromatograma da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3, que apresenta apenas uma banda de absorção no UV. Nota-se em seu espectro no UV (Anexo A, Figura A17.1/A) um máximo de absorção em 241,3 nm e outro em 311,2 nm. Seu espectro de massas apresenta sinal de m/z em 259,2.

A amostra AC(M2)14A-Fr3-P4 (Anexo A, Figura A18) apresentou 2 picos em seu cromatograma, mas apenas o segundo apresentou absorção nas regiões características do UV, por isso apenas seus espectros no UV e de massas são mostrados (Anexo A, Figura A18.1). Observam-se absorções no UV em 217,7, 262,6 e 369,5 nm e um sinal de m/z no espectro de massas em 275,2.

No cromatograma da amostra AC(M2)14B-Fr3-P4 (Anexo A, Figura A19) observam-se 2 picos, mas novamente apenas o segundo apresentou perfil relevante e teve seus espectros no UV e de massas apresentados (Figura A19.1). O espectro no UV apresenta absorções em 217,7, 264,9 e 368,3 nm, e o de massas apresenta um íon de m/z 275,2. Há que se notar a grande semelhança entre o cromatograma dessa

amostra e o da amostra AC(M2)14A-Fr3-P4 (Anexo A, Figura A18), além da semelhança entre os espectros no UV e de massas do pico 2 de cada um dos dois cromatogramas.

Tendo em vista as absorções no UV dos picos dos cromatogramas das amostras purificadas e os valores de m/z observados para os compostos purificados, julgou-se essencial analisar estas 3 substâncias por RMN - ^1H . As 3 amostras foram solubilizadas em DMSO deuterado.

Pela análise de seu espectro de RMN - ^1H (Anexo A, Figura A20), pôde-se observar que a amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3 encontra-se perfeitamente pura. Os sinais de hidrogênio com deslocamento químico entre δ 6,10 e δ 6,63 provavelmente estão relacionados a hidrogênios aromáticos, embora os valores dos deslocamentos destes hidrogênios não sejam equivalentes àqueles observados nos espectros de RMN - ^1H dos compostos **9** e **10** (em δ 6,60, 6,80 e 7,46). A amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3 apresenta também um sinal de hidrogênio em δ 13,43, que pode ser fenólico ou de ácido carboxílico, mas que também não tem equivalente nos espectros de **9** e **10**.

Os espectros de RMN - ^1H de ambas as amostras AC(M2)14A-Fr3-P4 (Anexo A, Figura A21) e AC(M2)14B-Fr3-P4 (Anexo A, Figura A22) mostram que, além de terem sido obtidas em quantidade muito pequena (0,1 mg e 0,7 mg, respectivamente), essas amostras são constituídas por misturas complexas. Os sinais de hidrogênio das duas amostras não são equivalentes a nenhum dos sinais encontrados nos espectros de RMN - ^1H dos compostos **9** e **10**. Logo, deduziu-se que as frações AC(M2)14A-Fr3-P4 e AC(M2)14B-Fr3-P4 também não apresentam derivados do ácido esculetínico.

4.1.1. Determinação estrutural do composto isolado a partir da amostra

AC(M2)14A-Fr3-P3

A amostra AC(M2)14A-Fr3-P3 foi a única dentre todas as analisadas que apresentou perfil cromatográfico característico e espectro de massas com íon de m/z 259,2, o qual pôde ser relacionado ao aduto de sódio do composto **9** (**12**). Todavia, apesar da amostra estar pura, a análise de seu espectro de RMN - ^1H mostra claramente que ela não corresponde a um derivado do ácido esculetínico.

Uma análise mais detalhada de seu espectro de RMN - ^1H (Anexo A, Figura A20) permitiu observar os seguintes sinais:

- um sinal (singlete) de hidrogênio fenólico em δ 13,43, atribuído a um grupo O-H;
- dois sinais (singletes) de hidrogênios aromáticos, em δ 6,63 e 6,62;
- dois sinais (dubletes) de hidrogênios aromáticos, em δ 6,25 e 6,10;
- um sinal (singlete) referente aos hidrogênios de um grupo metila, em δ 2,71;
- dois sinais (singletes) de hidrogênios fenólicos, em δ 3,39 e 2,55.

Seu espectro de RMN - ^{13}C (Anexo A, Figura A23) apresentou os seguintes sinais:

- nove sinais de carbonos sp^2 quaternários em δ 181,2, 164,8, 163,1, 162,9, 158,7, 156,4, 142,6, 110,5 e 101,9;
- quatro sinais de carbonos sp^2 do tipo CH em δ 116,2, 100,4, 97,7 e 93,1;
- um sinal de carbono sp^3 do tipo metila em δ 22,9.

Os dados observados em seus espectros de RMN - ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC e COSY estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados de deslocamentos químicos de RMN- ^1H e ^{13}C e correlações a longa distância da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3, em DMSO deuterado.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, integral, J em Hz)	COSY	HMBC
1	163,1			
2	97,7	6,10 (d, 1H, 1,9 Hz)		101,9 e 163,1
3	164,8			
4	93,1	6,25 (d, 1H, 1,96 Hz)		97,7; 101,9; 156,4 e 164,8
4a	156,4			
4b	158,7			
5	100,4	6,63 (s, 1H)		110,5; 116,2; 158,7; 162,9 e 181,2
6	162,9			
7	116,2	6,62 (s, 1H)	2,71	22,9; 100,4; 110,5 e 162,9
8	142,6			
8a	110,5			
9	181,2			
9a	101,9			
10	22,9	2,71 (s, 3H)	6,62	110,5; 116,2; 142,6 e 181,2
Hidroxilas				
1		13,43 (s, 1H)		
3		2,55 ou 3,39 (s, 1H)		
6		3,39 ou 2,55 (s, 1H)		

O espectro de RMN - HSQC (Anexo A, Figura A24) apresenta correlações entre carbonos e hidrogênios diretamente ligados entre si (1J). Pode-se observar que o carbono em δ 116,2 liga-se ao hidrogênio em δ 6,62. O carbono em δ 100,4 está ligado ao hidrogênio em δ 6,63. Já o carbono em δ 97,7 liga-se ao hidrogênio em δ 6,10. O

carbono em δ 93,1 está ligado ao hidrogênio em δ 6,25. Finalmente, o carbono em δ 22,9 liga-se ao hidrogênio com sinal em δ 2,71.

A análise do espectro de RMN - HMBC (Anexo A, Figura A25) permite visualizar as correlações a longa distância entre ^1H e ^{13}C , 2J e 3J . O hidrogênio em δ 6,63 apresentou correlações com os carbonos em δ 110,5, 116,2, 158,7, 162,9 e 181,2 (esta última, muito fraca).

Já o hidrogênio em δ 6,62 apresentou correlações a longa distância com os carbonos em δ 22,9, 100,4, 110,5 e 162,9. O hidrogênio em δ 6,25 apresentou correlação com os carbonos em δ 97,7, 101,9, 156,4 e 164,8.

Observam-se também correlações entre o hidrogênio em δ 6,10 e os carbonos em δ 101,9 e 163,1. Finalmente, o hidrogênio em δ 2,71 apresentou correlações com os carbonos em δ 110,5, 116,2, 142,6 e 181,2.

O espectro de RMN - COSY (Anexo A, Figura A26) apresentou uma única correlação entre os hidrogênios em δ 6,62 e δ 2,71.

A análise dos espectros de RMN bidimensionais HSQC, HMBC e COSY permitiu estabelecer a estrutura do composto isolado (Figuras 5 e 6) como sendo o 1,3,6-trihidroxi-8-metil-9*H*-xanten-9-ona ou norliquesantona:

Figura 5: Esquema das principais correlações observadas nos espectros de RMN bidimensionais COSY e HMBC da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3.

Figura 6: Estrutura da 1,3,6-trihidroxi-8-metil-9H-xanten-9-ona.

A norliquexantona é comumente encontrada em líquens e plantas, juntamente com outras xantonas, e foi isolada pela primeira vez em 1968 a partir de *Lecanora reuteri* (Santesson, 1968). Também foi obtida a partir de uma linhagem mutante de *Penicillium patulum* e apresentou atividade antibacteriana (Broadbent; Mabelis; Spencer, 1975). Posteriormente foi isolada de *Alternaria alternata* (Thomas, 2000), de *Aspergillus aculeatus* (Abu-Seidah, 2003) e de dois fungos do gênero *Penicillium*: *Penicillium clavigerum* (Frisvad et al., 2004) e *Penicillium ribium* (Frisvad et al., 2006).

Nilsen e Smedsgaard (2003) realizaram um levantamento de 474 metabólitos secundários de fungos e apresentaram alguns dados espectroscópicos dessas substâncias (bandas de absorção no UV e valores de m/z observados no espectro de massas). Segundo esse trabalho, a norliquexantona apresenta 5 bandas de absorção no UV, em 204, 242, 267, 312 e 346 nm, além de um íon de m/z 259 no espectro de massas, que corresponde ao íon pseudo-molecular ($[M+H]^+$) da norliquexantona. Esses resultados estão de acordo com o resultado obtido em nossas análises.

Sundholm (1978a e 1978b) reuniu os dados de RMN – ^1H e RMN – ^{13}C de diversas xantonas obtidas a partir de líquens. Os valores de deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio da norliquexantona apresentados por ele também estão perfeitamente de acordo com os resultados obtidos nessas análises.

A linhagem AC(M2)14A foi identificada taxonomicamente pela Dra. Lara Durães Sette, do Laboratório de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP. A Dra. Sette identificou esta linhagem por análise morfológica e genômica, como sendo *Penicillium raistrickii*. Portanto, o composto 1,3,6-trihidroxi-8-metil-9H-xanten-9-ona foi isolado pela primeira vez a partir desta espécie de fungo terrestre adaptado ao ambiente marinho.

Estudos realizados anteriormente mostram a produção de paclitaxel (**13**) (Niedens et al., 1999), griseofulvina (**14**) e 1,3,5,6-tetrahidroxi-8-metilxantona (**15**) (Belofsky et al., 1998) por parte de *P. raistrickii*, o que demonstra o potencial de produção de metabólitos secundários por esta espécie de fungo.

4.2 – Avaliação da atividade biológica dos extratos

4.2.1. Atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos ao trato bucal

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das amostras dos extratos brutos foram determinadas frente a 8 diferentes microrganismos patogênicos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, isolado clínico 2 *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

A Tabela 3 reúne as amostras que apresentaram atividade biológica neste bioensaio. Os valores mostrados em azul indicam a CIM, em µg/mL, que inibiu 50% de crescimento dos microrganismos. Os valores em vermelho indicam a CIM, em µg/mL, que inibiu 100% do crescimento dos microrganismos.

Tabela 3. CIM (em µg/mL) das amostras com atividade antimicrobiana.

Amostra	Microrganismos							
	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	Isolado clínico 2 <i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>
AC(M3)1 - ExMeOH	-	-	-	15	-	-	-	-
AC(M3)3 - Fr.1:1	-	-	-	250	-	-	-	-
AC(M3)3 - ExMeOH	-	-	-	-	-	125	-	-
AC(M3)7 - Fr.1:1	-	-	-	250	-	-	-	-
AC(M3)7A - Fr.1:1	-	-	-	-	250	-	-	-
AC2(A)1	-	-	-	-	500	-	-	-
AC2(A)6	-	-	-	-	500	-	-	-
AC2(A)1SD	-	-	-	-	250	-	-	-
AC2(B)3	-	-	-	-	175	-	-	-
AC2(F)2	-	-	-	-	125	-	-	-
AC2(G)1 - ExMeOH	-	31	-	-	-	-	-	-
AC2(G)3 - ExMeOH	-	31	-	-	-	-	-	-
AC2(G)4 - ExMeOH	15	15	125	62	15	15	15	31
AC2(M2)1D - Fr.1:1	-	15	-	125	-	-	-	-
AC2(M3)1 - Fr.1:1	-	15	-	62	-	-	-	-
AC2(M3)4 - ExMeOH	-	-	-	-	-	15	-	-
AC2(M3)1SD - ExMeOH	-	-	-	-	-	-	-	500
AC2(M3)3SD - ExMeOH	-	-	-	-	-	-	500	-
AC2(M3)1D - ExMeOH	-	-	-	-	-	-	-	500
AC2(T)9 - Fr.1:1	-	-	-	500	-	-	-	-
AC2(T)1SD - Fr.1:1	-	-	-	-	15	15	-	-

Tabela 4. CBM ($\mu\text{g/mL}$) das amostras com atividade antimicrobiana que inibiram 100% do crescimento microbiano.

	Microrganismos							
Amostra	<i>C. albicans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	Isolado clínico 2 <i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>
AC2(B)3	-	-	-	-	> 125	-	-	-
AC2(F)2	-	-	-	-	≥ 500	-	-	-
AC2(M3)1SD - ExMeOH	-	-	-	-	> 500	-	-	-
AC2(M3)1D - ExMeOH	-	-	-	-	> 500	-	-	-

Resultados e discussão

Após a análise da Tabela 3, pode-se observar a semelhança entre as atividades das frações AC(M3)3 – Fr. 1:1 e AC(M3)7 – Fr. 1:1; AC2(A)1 e AC2(A)6; AC2(G)1 – ExMeOH e AC2(G)3 – ExMeOH; AC2(M3)1SD – ExMeOH e AC2(M3)1D – ExMeOH.

Pode-se observar também o grande potencial inibitório exibido pelo extrato AC2(G)4 – ExMeOH, que foi o único ativo contra todas as linhagens testadas, em concentrações baixas. Além disso, este extrato e AC2(T)1SD - Fr. 1:1 apresentaram uma grande inibição de *S. mutans* e do isolado clínico 2 de *S. mutans*, com CIM de 15µg/mL. Sabe-se que *S. mutans* é o principal responsável pelo aparecimento da cárie humana, portanto esses resultados são muito importantes e promissores. Futuros estudos deveriam ser realizados com essas amostras, incluindo testes de citotoxicidade e mutagenicidade.

A concentração bactericida mínima (CBM) de quatro amostras que inibiram 100% do crescimento bacteriano foi estabelecida contra os mesmos oito microrganismos. Dentre eles, o único que apresentou sensibilidade às amostras testadas foi *S. mutans*. A Tabela 4 apresenta as CBMs, em µg/mL, dessas quatro amostras contra os microrganismos testados.

De acordo com os resultados apresentados, 20% dos extratos analisados apresentaram potencial de inibição do crescimento microbiano, ou seja, 21 amostras. Destas, 4 (4% do total) inibiram 100% do crescimento e 17 (16% do total) inibiram apenas 50% do crescimento microbiano.

Dentre as 21 amostras com atividade, observa-se também que 17 apresentaram atividade frente a uma única linhagem bacteriana, enquanto 3 amostras inibiram o crescimento de duas linhagens e, finalmente, o extrato metanólico de AC2(G)4 foi ativo em todas as culturas testadas. Então pode-se concluir que este extrato apresenta

Resultados e discussão

grande potencial de atividade antimicrobiana, sendo, no entanto, pouco seletivo. Além disso, este extrato foi responsável pela inibição de apenas 50% do crescimento bacteriano em cada linhagem testada.

4.2.2. Atividade antibacteriana contra Mycobacterium tuberculosis H37Rv

No teste de atividade anti-tuberculose, duas amostras apresentaram atividade: o extrato AC2(B)4 (CIM = 125 µg/mL) e a fração AC2(T)2 – Fr.1:1 (CIM = 125 µg/mL).

Esses são resultados ótimos, pois mostram que aproximadamente 2% dos extratos obtidos e testados apresentaram atividade anti-tuberculose. O surgimento de novas linhagens resistentes de *M. tuberculosis* requer a descoberta de novas drogas mais potentes para o tratamento da tuberculose. Em duas revisões da literatura, Copp (2003) e Copp e Pearce (2007) realizaram um levantamento dos produtos naturais com atividade anti-tuberculose. Segundo esses dados, até dezembro de 2005 haviam sido isolados mais de 350 compostos capazes de inibir o crescimento de diferentes linhagens de *M. tuberculosis*, o que representa um grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de tuberculoses.

4.2.3. Atividade citotóxica em células tumorais humanas

Neste bioensaio apenas o extrato acetato de etila da linhagem AC2(B)4 apresentou elevado potencial citotóxico frente às três linhagens tumorais testadas. As porcentagens de inibição de crescimento celular estão apresentadas na Tabela 5.

Resultados e discussão

Tabela 5. Inibição de crescimento de células tumorais humanas pelo extrato AC2(B)4

Linhagem celular	Inibição de crescimento celular (%)
HCT-8 (cólon humano)	96,16 %
MDA-MB435 (mama humano)	99,66%
HL-60 (leucemia humana)	100%

Observa-se que o extrato AC2(B)4 é muito potente na inibição do crescimento das células tumorais, mas muito pouco seletivo. Todos os demais extratos e frações apresentaram pouca ou nenhuma atividade citotóxica.

A avaliação da atividade biológica dos extratos obtidos a partir das linhagens de fungos isolados da esponja *Axinella* cf. *corrugata* mostrou que 23 dos 107 extratos analisados apresentaram alguma atividade biológica, ou seja, 21% do total dos extratos testados. O extrato AC2(B)4 mostrou-se bastante citotóxico e pouco seletivo, exibindo atividade frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e a 3 linhagens de células tumorais humanas. Curiosamente, ele não inibiu o crescimento de nenhuma linhagem de microrganismos patogênicos ao trato bucal.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do desenvolvimento deste projeto permitem concluir que a metodologia utilizada na obtenção e purificação dos extratos obtidos a partir das linhagens fúngicas em busca dos compostos **9** e **10** é comprovadamente eficiente, pois, embora não tenham sido encontrados os compostos em questão, a substância isolada apresentou perfil químico de UV e de massas semelhante aos de **9** e **10**. O composto 1,3,6-trihidroxi-8-metil-9H-xanten-9-ona isolado foi purificado por cromatografia nas mesmas condições em que esperava-se obter os derivados **9** e **10** do ácido 4-esculetínico, e apresentou perfil de absorção no UV muito similar ao destes compostos, que por sinal é bem atípico.

O fato de os compostos **9** e **10** não terem sido encontrados pode ser explicado por 3 razões:

1) esses metabólitos (**9** e **10**) são biossintetizados pela esponja marinha *Axinella* cf. *corrugata*, e não por microrganismos a ela associados; ou

2) a origem desses compostos é microbiana, no entanto os microrganismos responsáveis por sua biossíntese não foram isolados por nós a partir de *Axinella* cf. *corrugata*;

3) a origem desses compostos é microbiana, no entanto eles são metabolizados pelo fungo quando associado à esponja, ou seja, a produção ocorre devido à interação entre esses organismos. Então talvez o isolamento e as condições de crescimento desta linhagem no laboratório não tenham favorecido a produção desses compostos.

Além disso, foi possível constatar que várias substâncias distintas podem apresentar perfis de absorção no UV muito semelhantes entre si, o que torna a análise

pelo perfil de absorção no UV inconclusiva. No entanto, a análise por HPLC-PDA foi extremamente útil na pré-seleção de amostras para outras análises. A espectrometria de massas oferece maiores informações sobre os compostos analisados, mas ainda é insuficiente para a completa elucidação estrutural de uma substância. Para tanto, torna-se necessária uma série de outras análises, incluindo RMN ^1H , ^{13}C e RMN bidimensionais, tais como HSQC, HMBC e COSY.

A análise das atividades biológicas dos extratos obtidos dos fungos isolados de *Axinella* cf. *corrugata* mostrou que 21% das amostras apresentaram inibição de crescimento microbiano ou citotoxicidade. É uma porcentagem alta, que demonstra a importância do isolamento de metabólitos secundários de fungos derivados do meio marinho e do estudo de suas atividades.

Finalmente, o presente estudo constitui uma contribuição adicional ao desenvolvimento da pesquisa de metabólitos secundários de fungos de origem marinha, área de pesquisa ainda muito incipiente no Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SEIDAH, A. A. Secondary metabolites as co-markers in the taxonomy of *Aspergilli*. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 52, n. 1, p. 15-23, 2003.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory micology**. New York: John Wiley, 1996. 869p.

AMERICAN RED CROSS. Questions about severe acute respiratory syndrome. 2003. Disponível em: <<http://www.redcross.org/news/hs/030402sars.html>>. Acesso em: 15 set. 2008.

ANAND, K.; ZIEBUHR, J.; WADHWANI, P.; MESTERS, J. R.; HILGENFELD, R. Coronavirus main proteinase (3CL^{pro}) structure: basis for design of anti-SARS drugs. **Science**, v. 300, p. 1763-1767, 2003.

BELARBI, E. H.; GÓMEZ, A. C.; CHISTI, Y.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. Producing drugs from marine sponges. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 585-598, 2003.

BELOFSKY, G. N.; GLOER, K. B.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. New *p*-terphenyl and polyketide metabolites from the sclerotia of *Penicillium raistrickii*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 9, p. 1115-1119, 1998.

BERNAN, V. S.; GREENSTEIN, M.; MAIESE, W. M. Marine microorganisms as a source of new natural products. **Advances in Applied Microbiology**, v. 43, p. 57-90, 1997.

BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBioChem**, v. 3, p. 619-627, 2002.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 1-48, 2003.

BROADBENT, D.; MABELIS, R. P.; SPENCER, H. 3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone – an antibacterial metabolite from *Penicillium patulum*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2082-2083, 1975.

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

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

CHINWORRUNGSEE, M.; KITTA KOOP, P.; ISAKA, M.; CHANPHEN, R.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Halorosellins A and B, unique isocoumarin glucosides from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, v. 22, p. 2473 – 2476, 2002.

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 302-307, 1997.

COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 535–557, 2003.

COPP, B. R.; PEARCE, N. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 278–297, 2007.

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

DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1967–1976, 2003.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. (Ed.). **Fungi in Marine Environments**. Hong Kong: Fungal Diversity Research Series, 2002. cap. 7, p. 293-315.

FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos patogênicos. **Biológico**, v. 63, n. 1/2, p. 73-82, 2001.

FRISVAD, J. C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T.O.; SAMSON, R. A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies In Mycology**, v. 49, p. 201-241, 2004.

FRISVAD, J. C.; LARSEN, T.O.; DALSGAARD, P. W.; SEIFERT, K. A.; LOUIS-SEIZE, G.; LYHNE, E. K.; JARVIS, B. B.; FETTINGER, J. C.; OVERY, D. P. Four psychrotolerant species with high chemical diversity consistently producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp. nov., *Penicillium soppii* and *Penicillium lanosum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1427-1437, 2006.

GARO, E.; STARKS, C. M.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 423-426, 2003.

HAMILL, P.; HUDSON, D.; KAO, R. Y.; CHOW, P.; RAJ, M.; XU, H.; RICHER, M. J.; JEAN, F. Development of a red-shifted fluorescence-based assay for SARS-coronavirus 3CL protease: identification of a novel class of anti-SARS agents from the tropical marine sponge *Axinella corrugata*. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 1063-1074, 2006.

HÖLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHÉE, G. F.; KONIG, G. M.; DRAEGER, S.; AUST, H. J.; SCHULZ, B. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 104, n. 11, p. 1354-1365, 2000.

JONES, E. B. G. Marine fungi: some factors influencing biodiversity. **Fungal Diversity**, v. 4, p. 53-73, 2000.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n.1, p. 151-170, 2002.

KNIGHT, V.; SANGIER, J.-J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 446-458, 2003.

KÖNIG, G. M.; KEHRAUS, S.; SEIBERT, S. F.; ABDEL-LATEFF, A.; MÜLLER, D. Natural products from marine organisms and their associated microbes. **ChemBioChem**, v. 7, p. 229 – 238, 2006.

KUPKA, J.; ANKE, T.; STEGLICH, W.; ZECHLIN, L. Antibiotics from basidiomycetes. XI. The biological activity of siccayne, isolated from the marine fungus *Halocyphina villosa* J. & E. Kohlmeyer. **Journal of antibiotics**, v. 34, n. 3, p. 298-304, 1981.

LI, S.; CHEN, C.; ZHANG, H.; GUO, H.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA, S.; YU, J.; XIAO, P.; LI, R.; TAN, X. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, v. 67, p. 18-23, 2005.

LIRA, S. P.; SELEGHIM, M. H. R.; WILLIAMS, D. E.; MARION, F.; HAMILL, P.; JEAN, F.; ANDERSEN, R. J.; HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. S. A SARS-Coronavirus 3CL protease inhibitor isolated from the marine sponge *Axinella cf. corrugata*: structure elucidation and synthesis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 2, p. 440-443, 2007.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MARRA, M. A.; JONES, S. J. M.; ASTELL, C. R.; HOLT, R. A.; BROOKS-WILSON, A.; BUTTERFIELD, Y. S. N.; KHATTRA, J.; ASANO, J. K.; BARBER, S. A.; CHAN, S. Y.; CLOUTIER, A.; COUGHLIN, S. M.; FREEMAN, D.; GIRN, N.; GRIFFITH, O. L.; LEACH,

S. R.; MAYO, M.; MCDONALD, H.; MONTGOMERY, S. B.; PANDOH, P. K.; PETRESCU, A. S.; ROBERTSON, A. G.; SCHEIN, J. E.; SIDDIQUI, A.; SMAILUS, D. E.; STOTT, J. M.; YANG, G. S.; PLUMMER, F.; ANDONOV, A.; ARTSOB, H.; BASTIEN, N.; BERNARD, K.; BOOTH, T. F.; BOWNESS, D.; CZUB, M.; DREBOT, M.; FERNANDO, L.; FLICK, R.; GARBUTT, M.; GRAY, M.; GROLLA, A.; JONES, S.; FELDMANN, H.; MEYERS, A.; KABANI, A.; LI, Y.; NORMAND, S.; STROHER, U.; TIPPLES, G. A.; TYLER, S.; VOGRIG, R.; WARD, D.; WATSON, B.; BRUNHAM, R. C.; KRAJDEN, M.; PETRIC, M.; SKOWRONSKI, D. M.; UPTON, C.; ROPER, R. L. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. **Science**, v. 300, p. 1399-1404, 2003.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 145, p. 553–581, 2007.

MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2005–2006: antitumour and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer**, 2008. In press.

NIEDENS, B. R.; PARKER, S. R.; STIERLE, D. B.; STIERLE, A. A. First fungal aromatic L-amino acid decarboxylase from a paclitaxel-producing *Penicillium raistrickii*. **Mycologia**, v. 91, n. 4, p. 619-626, 1999.

NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111–136, 2003.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIVKIN, M. V.; AFIYATULLOV, Sh. Sh.; ELYAKOV, G. B. Biodiversity of marine fungi and new biologically active substances from them. In: CHOU, C. H.; WALLER, G. R.; REINHARDT, C. (Eds.). **Biodiversity and allelopathy: from organisms to ecosystems in the pacific**. Taipei: Academia Sinica, 1999. p. 91-99.

ROTA, P. A. et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **Science**, v. 300, p. 1394-1399, 2003.

SALEEM, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A.; ASHRAF, M.; LEE, Y. S. Marine natural products of fungal origin. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1142–1152, 2007.

SANTESSON, J. Chemical studies on lichens 12. A new lichen xantone from *Lecanora reuteri*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 22, n. 5, p. 1698-1699, 1968.

SINGH, I. P.; BHARATE, S. B.; BHUTANI, K. K. Anti-HIV natural products. **Current Science**, v. 89, n. 2, p. 269-290, 2005.

STOCKMAN, L. J.; BELLAMY, R.; GARNER, P. SARS: systematic review of treatment effects. 2006. Disponível em: <<http://medicine.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pmed.0030343>>. Acesso em: 15 set. 2008.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUNDHOLM, E. G. Total syntheses of lichen xantones. Revision of structures. **Tetrahedron**, v. 34, p. 577-586, 1978a.

SUNDHOLM, E. G. ^{13}C NMR spectra of lichen xanthones. Temperature dependent collapse of long-range couplings to hydrogen-bonded hydroxyl protons. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 32, p. 177-181, 1978b.

THOMAS, R. Fused ring aromatic polyketides are formed by different cyclisation pathways in fungi and streptomycetes. In: WRIGLEY, S. K.; HAYES, M. A.; THOMAS, R.; CHRYSTAL, E. J. T.; NICHOLSON, N. (Eds.). **Biodiversity: new leads for the pharmaceutical and agrochemical industries**. Bodmin: MPG Books Ltd, 2000. cap. 5, p. 249-276.

WANG, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, p. 545-551, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2008. Disponível em: <http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html>. Acesso em: 15 set. 2008.

YAMADA, T.; DOI, M.; MIURA, A.; HARADA, W.; HIRAMURA, M.; MINOURA, K.; TANAKA, R.; NUMATA, A. Absolute stereostructures of cell-adhesion inhibitors, Peribysins A, E, F and G, produced by a sea hare-derived *Periconia* sp. **Journal of Antibiotics**, v. 58, n.3, p. 185-191, 2005.

ANEXO A

**Cromatogramas, espectros
no ultra-violeta, espectros de massas
e espectros de RMN**

Figura A1: Cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)6, observado em 374,2 nm.

Figura A1.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)6: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (15,66 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (15,9min).

Figura A2: Cromatograma da Fração 1:1 (50% H₂O/50% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)19, observado em 374,6 nm.

Figura A2.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração 1:1 (50% H₂O/50% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)19: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (13,15 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (13,61 min); (E) espectro no UV e (F) espectro de massas do sinal 3 (14,37 min).

Figura A3: Cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)19, observado em 271,3 nm.

Figura A3.1: Espectros no UV e de massas do sinal do cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)19: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,37 min).

Figura A4: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M3)7, observado em 239,7 nm.

Figura A4.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M3)7: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,54 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (20,34 min).

Figura A5: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(G)4, observado em 374,6 nm.

Figura A5.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(G)4: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (15,89 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (16,11 min).

Figura A6: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(M2)2, observado em 375,2 nm.

Figura A6.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(M2)2: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,13 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (15,04 min).

Figura A7: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(M2)3, observado em 375,2 nm.

Figura A7.1: Espectros no UV e de massas do sinal do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(M2)3: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (13,96 min).

Figura A8: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(M2)4, observado em 239,7 nm.

Figura A8.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC2(M2)4: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (13,68 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (14,07 min); (E) espectro no UV e (F) espectro de massas do sinal 3 (14,44 min).

Figura A9: Cromatograma do extrato acetato de etila da linhagem AC2(C)2, observado em 270,9 nm.

Figura A9.1: Espectros no UV e de massas do sinal do cromatograma do extrato acetato de etila da linhagem AC2(C)2: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,82 min).

Figura A10: Espectro de RMN - ^1H da amostra AC2(C)2.

Figura A11: Cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14, observado em 374,6 nm.

Figura A11.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,07 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (15,36 min); (E) espectro no UV e (F) espectro de massas do sinal 3 (16,2 min).

Figura A12: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14, observado em 271,3 nm.

Figura A12.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,90 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 2 (17,42 min); (E) espectro no UV e (F) espectro de massas do sinal 3 (19,09 min).

Figura A13: Cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14A, observado em 374,6 nm.

Figura A13.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14A: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (17,04 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 3 (17,53 min); (E) espectro no UV e (F) espectro de massas do sinal 4 (18,03 min).

Figura A14: Cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14B, observado em 374,6 nm.

Figura A14.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração 3:1 (25% H₂O/75% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14B: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (15,30 min); (C) espectro no UV e (D) espectro de massas do sinal 3 (16,12 min); (E) espectro no UV e (F) espectro de massas do sinal 4 (16,53 min).

Figura A15: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14A, observado em 271,3 nm.

Figura A15.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14A: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (17,94 min).

Figura A16: Cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14B, observado em 271,3 nm.

Figura A16.1: Espectros no UV e de massas dos sinais do cromatograma da Fração MeOH (100% MeOH) do extrato bruto da linhagem AC(M2)14B: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (17,94 min).

Figura A17: Cromatograma da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3, observado em 239 nm.

Figura A17.1: Espectros no UV e de massas do sinal do cromatograma da amostra AC(M2)14A-Fr3-P3: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 1 (14,62 min).

Figura A18: Cromatograma da amostra AC(M2)14A-Fr3-P4, observado em 270,9 nm.

Figura A18.1: Espectros no UV e de massas do sinal do cromatograma da amostra AC(M2)14A-Fr3-P4: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do sinal 2 (15,61 min).

Figura A19: Cromatograma da amostra AC(M2)14B-Fr3-P4, observado em 239 nm.

Figura A19.1: Espectros no UV e de massas do sinal do cromatograma da amostra AC(M2)14B-Fr3-P4: (A) espectro no UV e (B) espectro de massas do pico 2 (15,611 min).

Figura A20: Espectro de RMN - ^1H da amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3.

Figura A21: Espectro de RMN - ^1H da amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P4.

Figura A22: Espectro de RMN - ^1H da amostra AC(M2)14B – Fr.3 – P4.

Figura A23: Espectro de RMN - ^{13}C da amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3.

Figura A24: Espectro de RMN - HSQC da amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3.

Figura A25: Espectro de RMN - HMBC da amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3.

Figura A26: Espectro de RMN - COSY da amostra AC(M2)14A – Fr.3 – P3.