UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Karen de Jesus

**Investigação de Metabólitos Secundários Bioativos de Micro-organismos do
Ambiente Marinho**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos
da Universidade São Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos
2012

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio incondicional dedicado a todas as etapas de minha vida.

E, ao Odílson, pela compreensão e dedicação constante.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela atenção e paciência durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dr. Mirna H. R. Seleghim, pela colaboração e disponibilização do laboratório de microbiologia.

À Dra. Miriam H. Kossuga e ao Dr. Eli F. Pimenta, pelo auxílio em diversas etapas deste trabalho.

À Darci C. D. Javaroti e ao Marcos V. Castro, pelos ensinamentos no trabalho com micro-organismos.

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira (DQ-UFSCar), pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao José C. Tomaz (NPPNS-FCFRP-USP), pela obtenção dos espectros de massas de alta resolução.

À Prof. Dra. Lara D. Sette (CPQBA-UNICAMP), pela identificação da linhagem fúngica estudada.

À Prof. Dr. Cláudia do Ó Pessoa (Laboratório de Oncologia Experimental, UFC), pela realização dos bioensaios de atividade citotóxica.

Ao Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo), pela realização dos bioensaios de atividade anti-Leishmania.

À Dra. Clarice Weis Arns (Laboratório de Virologia, UNICAMP), pela realização dos bioensaios de atividade anti-viral.

Ao Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins (Departamento de Biotecnologia Vegetal de Plantas Medicinais, UNAERP) pela realização dos bioensaios de atividade anti-microbiana.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pela infraestrutura disponibilizada.

À Silvia e à Andréia, da seção de pós-graduação, pela atenção.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Aos amigos e colegas do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais – IQSC: Karin, Fabiana, Eli, Marcos, Messias, Mário, Stela, Raquel, Laura, Julie, Ivan e Lizbeth.

Aos amigos: Miriam, Fábio, Edjane, Sandra, Quésia, Ana, Francisco, Marcelo, Ulisses e Edvan pelo companheirismo e bons momentos vividos ao longo desses anos.

À Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.

Sumário

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	ix
Listas de símbolos e abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1 Introdução	1
1.1 Fungos	1
1.2 O ambiente marinho	5
1.3 A hospedeira: a ascídia <i>Didemnum ligulum</i> e a espécie fúngica associada: <i>Penicillium citrinum</i>	7
1.4 Perspectiva atual da pesquisa em produtos naturais de micro-organismos marinhos	11
1.5 JUSTIFICATIVA	14
2 Objetivos	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3 Materiais e métodos	18
3.1 Generalidades: Equipamentos e protocolo de bioensaios	18
3.1.2 Técnicas cromatográficas	18
3.1.2.1 Cromatografia em coluna por exclusão de tamanho	18
3.1.2.2 Cromatografia em camada delgada	18
3.1.2.3 Cromatografia em coluna pré-empacotada	18
3.1.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência	19
3.1.3 Técnicas espectroscópicas	19
3.1.3.1 Espectrometria de massas e ultravioleta – técnicas hifenadas	19
3.1.3.2 Análises por ressonância magnética nuclear	21
3.1.4 Solventes	21
3.1.5 Protocolo de bioensaios	21
3.1.5.1 Atividade citotóxica	21
3.1.5.2 Atividade anti-Leishmania	22

3.1.5.3 Atividade anti-viral	22
3.1.5.4.1 Titulação viral	23
3.1.5.4.2 Ensaio antiviral	24
3.1.5.4.2.1 BVDV e FCV	24
3.1.5.4.3 Ensaio de MTT	25
3.1.5.4.3.1 aMPV e HBV	25
3.1.5.4.4 Análise dos Resultados	25
3.1.5.4 Atividade antimicrobiana	26
3.2 Reativação das linhagens fúngicas	27
3.2.1 Origem das linhagens reativadas	27
3.2.2 Protocolo de reativação das linhagens fúngicas	27
3.3 Produção dos extratos em pequena escala	29
3.3.1 Preparação dos extratos do meio de cultura das linhagens fúngicas reativadas para avaliação química e biológica	29
3.3.2 Preservação da linhagem fúngica selecionada – DLM2-12	29
3.3.3 Isolamento de citrinina (47) a partir do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 produzido em pequena escala	30
3.4 Produção do extrato bruto do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 em média escala	31
3.4.1 Pré-purificação dos extratos	31
3.4.2 Purificação dos compostos presentes nas frações obtidas	32
3.4.2.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MB	32
3.4.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MB1	32
3.4.2.1.1.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MB1limp	33
3.4.2.1.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MB2	33
3.4.2.1.3 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MB4	33
3.4.2.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MC	33
3.4.2.3.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MC1	34
3.4.2.3.1.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MC1C	34
3.4.2.3.2 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MC24	34
3.4.2.3 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD	34
3.4.2.3.1 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MD2	35
3.4.2.3.1.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2A	35

3.4.2.3.1.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2D	35
3.4.2.3.1.2.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2D6	36
3.4.2.3.1.2.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2D7	36
3.4.2.3.1.3 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2E	36
3.4.2.3.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD36	36
3.4.2.4 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-ME	37
3.4.3 Determinação estrutural dos compostos obtidos	37
4 Resultados e discussão	38
4.1 Reativação e avaliação das linhagens fúngicas	38
4.2 Seleção da linhagem de trabalho	40
4.3 Isolamento de citrinina (47) a partir do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 produzido em pequena escala	44
4.3.1 Identificação estrutural do composto majoritário (Citrinina (47)) isolado do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 produzido em pequena escala	48
4.4 Produção do extrato bruto do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 em média escala	51
4.4.1 Fracionamento da fração DLM2-12-M por cromatografia por exclusão de tamanho – Sephadex-LH20	52
4.4.2 Esquema geral da purificação dos compostos presentes nas frações obtidas por cromatografia por exclusão de tamanho	54
4.4.2.1 Purificação da Fração DLM2-12-MB	60
4.4.2.2 Purificação da Fração DLM2-12-MC	62
4.4.2.3 Purificação da Fração DLM2-12-MD	63
4.4.2.4 Purificação da Fração DLM2-12-ME	66
4.4.3 Identificação estrutural dos compostos isolados a partir do meio de cultura em média escala da linhagem <i>P. citrinum</i> DLM2-12	67
4.4.3.1 Identificação estrutural do composto presente nas frações DLM2-12-MB1L5, DLM2-12-MD2D6A, DLM2-12-MD2E5 e DLM2-12-MC24E (DLM2-12-MBCD-I)	68
4.4.3.2 Identificação estrutural dos compostos presentes nas frações	

DLM2-12-MB1B, DLM2-12-MB1L4, DLM2-12-MB2C, DLM2-12-MD2E4 e DLM2-12-MC24F (DLM2-12-MBCD-II)	76
4.4.3.3 Identificação estrutural do composto presente na fração DLM2-12-MB2B	84
4.4.3.4 Identificação estrutural do composto presente na fração DLM2-12-MB4A	86
4.4.3.5 Identificação estrutural do composto presente na fração DLM2-12-ME2	94
4.4.3.6 Identificação estrutural dos compostos presentes nas frações DLM2-12-ME6	103
4.4.4 Resultados dos bioensaios realizados para os compostos puros citreorseína (57) e emodina (61)	106
4.4.4.1 Atividade citotóxica	106
4.4.4.2 Atividade anti-Leishmania	108
4.4.4.3 Atividade anti-viral	109
4.4.4.4 Atividade antimicrobiana	111
5 Conclusão	112
6 Referências bibliográficas	114
7 Anexos	123

Índice de Figuras

Figura 1 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada em placa (esquerda) e em ampliação de 1000x (direita)	2
Figura 2 - <i>Amanita muscaria</i>	2
Figura 3 - Estruturas reprodutivas de <i>Kionochaeta ramifera</i>	3
Figura 4 - <i>Rhizopus stolonifer</i> cultivado em placa	3
Figura 5 - Esporângio contendo os esporos de <i>Phytophthora infestans</i>	4
Figura 6 - Perfis das curvas de gradiente	20
Figura 7 - Esquema da placa de 96 compartimentos padronizado para o ensaio antiviral	24
Figura 8 - Espectro de absorção no UV dos aminoácidos: – Fenilalanina, --Tirosina, -.-Tryptofano	41
Figura 9 - a) Cromatograma do extrato bruto do meio de cultura da linhagem DLM2-12 (monitorado com comprimento de onda de 262 nm) e b) espectros de UV e c) espectros de massas (ESI) no modo positivo de picos cromatográficos selecionados	42
Figura 10 - Fotografias da linhagem DLM2-12 no 3º dia (a) e 7º dia (b) de incubação	43
Figura 11 - Fotos das placas cromatográficas reveladas com a) ácido fosfomolibdico, b) ninidrina e c) Dragendorff do extrato bruto do meio de cultura da linhagem DLM2-12 comparado com colesterol (45) e timidina (46)	44
Figura 12 - Estruturas químicas: a) do colesterol e b) da timidina	45
Figura 13 - Cromatograma do fracionamento de DLM2-12-1 ($\lambda = 254$ nm)	46
Figura 14 - Cromatograma do fracionamento de DLM2-12-1D ($\lambda = 254$ nm)	46
Figura 15 - Fluxograma de isolamento da citrinina (47) do extrato bruto do meio de cultura de DLM2-12 cultivado em 250 mL do meio	47
Figura 16 - Espectros no UV e de massas da citrinina (47)	48
Figura 17 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e estrutura química da citrinina (47)	49
Figura 18 - Estrutura numerada da citrinina (47)	50
Figura 19 - Cromatograma e espectros de absorção na região do ultravioleta ($\lambda = 268$ nm) da fração DLM2-12-H	51

Figura 20 - Fluxograma de fracionamento por cromatografia em coluna Sephadex da fração DLM2-12-M	52
Figura 21 - Avaliação por CCD das frações obtidas da separação da fração DLM2-12-M por cromatografia em coluna Sephadex LH-20	53
Figura 22 - Cromatograma de a) UV (265 nm) e b) MS (modo positivo) da fração DLM2-12-MB	60
Figura 23 - Cromatograma de separação por HPLC-UV da fração DLM2-12-MB monitorado no comprimento de onda de 270 nm	60
Figura 24 - Cromatograma de a) UV (262 nm) da fração DLM2-12-MC	62
Figura 25 - Estrutura química de a) penicitrinona B (48) e b) penicitrinona A (49)	63
Figura 26 - Cromatograma de a) UV (273 nm) da fração DLM2-12-MD	64
Figura 27 - Cromatograma de separação por HPLC-UV da fração DLM2-12-MD2D monitorado nos comprimentos de onda de A) 254 nm e B) 286 nm	65
Figura 28 - Cromatograma de a) UV (245 nm) e b) MS (modo positivo) da fração DLM2-12-ME	67
Figura 29 - Cromatograma de separação por HPLC-UV da fração DLM2-12-ME monitorado no comprimento de onda de 270 nm	67
Figura 30 : Espectros no a) UV e de massas no modo b) positivo e c) negativo do composto majoritário presente nas frações DLM2-12-MBCD-I	68
Figura 31 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I	69
Figura 32 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I	72
Figura 33 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I	73
Figura 34 - Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I	73
Figura 35 - Estrutura química da Quinolactacina C (50)	75
Figura 36 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II	77
Figura 37 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II	80
Figura 38 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II	81

Figura 39 - Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II	81
Figura 40 - Estrutura química da Quinolactacina E (51)	84
Figura 41 - Espectro de a) UV e b) massas no modo positivo da fração DLM2-12-MB2B	84
Figura 42 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para o composto DLM2-12-MB2B	85
Figura 43 - Estrutura química da quinolactacina B (53)	86
Figura 44 - Espectro de a) UV e massas no modo b) positivo e c) negativo do composto presente na fração DLM2-12-MB4A	87
Figura 45 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100MHz) do composto presente na fração DLM2-12-MB4A solubilizado em CDCl_3	87
Figura 46 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-MB4A	91
Figura 47 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-MB4A	91
Figura 48 - Esquema de correlações observadas no experimento HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A	92
Figura 49 - Estrutura química do Penicilenol A (54)	93
Figura 50 - Espectro de a) UV e massas no modo b) positivo e c) negativo da fração DLM2-12-ME2	95
Figura 51 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100MHz) do composto presente na fração DLM2-12-ME2	95
Figura 52 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-ME2	98
Figura 53 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-ME2	99
Figura 54 - Esquema de correlações observadas para os hidrogênios a) δ 7,23 e δ 6,56 b) δ 7,62 e δ 7,09 c) δ 4,60 no experimento HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-ME2	99
Figura 55 - Estrutura química da Citreoroseína (57)	101
Figura 56 - Espectros de a) UV e massas no modo b) positivo e c) negativo da fração DLM2-12-ME6	104

Figura 57 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100MHz) para o composto presente na fração DLM2-12-ME6	104
Figura 58 - Estrutura química da emodina (61)	105

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica para obtenção dos espectros de massas e de bandas de absorção no UV das amostras	20
Tabela 2 - Escala de intensidade para avaliação do potencial citotóxico	22
Tabela 3 - Vírus e linhagem celular utilizados no estudo	23
Tabela 4 - Meios de cultura utilizados no crescimento das linhagens	28
Tabela 5 - Sistema de solventes em gradiente utilizado no fracionamento do extrato do meio de cultura de DLM2-12 cultivado em 250 mL de meio de crescimento	30
Tabela 6 - Linhagens que produziram extratos que apresentaram atividade citotóxica (na concentração de 50 µg.mL ⁻¹)	38
Tabela 7 - Resultados obtidos no bioensaio de atividade citotóxica para o extrato bruto obtido do meio de cultura da linhagem designada DLM2-12	43
Tabela 8 - Comparação dos valores de RMN de ¹³ C e ¹ H para o composto citrinina (47)	50
Tabela 9 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das frações DLM2-12-MB a DLM2-12-ME, obtidas por cromatografia em coluna Sephadex-LH20, em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL	53
Tabela 10 - Compostos puros obtidos das frações purificadas	57
Tabela 11 - Deslocamentos de RMN de ¹ H e ¹³ C e correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I (Quinolactacina C) (50)	74
Tabela 12 - Estudo comparativos dos valores de RMN de ¹³ C e ¹ H para o composto Quinolactacina C (50) solubilizada em DMSO- <i>d</i> ₆	75
Tabela 13 - Deslocamentos de RMN de ¹ H e ¹³ C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II (Quinolactacina E) (51)	82
Tabela 14 - Comparação dos valores de RMN de ¹³ C e ¹ H para os compostos Quinolactacina E (51) e Quinolactacina A (52) solubilizados em DMSO- <i>d</i> ₆	83
Tabela 15 - Deslocamentos de RMN de ¹ H e ¹³ C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A (Penicilenol A) (54)	92
Tabela 16 - Comparação dos valores de RMN de ¹³ C e ¹ H para o composto Penicilenol A (54)	93
Tabela 17 - Deslocamentos de RMN de ¹ H e ¹³ C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-ME2 (Citreoroseina) (57)	100

Tabela 18 - Estudo comparativos dos valores de RMN de ^{13}C e ^1H para o composto Citreoroseína (57)	101
Tabela 19 - Resultados obtidos no bioensaio de citotoxicidade para o composto citreoroseína (57)	107

Lista de símbolos e abreviaturas

AcOEt – acetato de etila

B.O.D. – biochemical oxygen demand

CCD – cromatografia de camada delgada

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

CE₅₀ – 50% da concentração efetiva

CH₂Cl₂ - diclorometano

COSY - correlation spectroscopy

d – dubleto

DMSO-*d*₆ – dimetilsulfóxido deuterado

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ESI – eletrospray ionization

EtOH – etanol

GQOPN – Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais

HMBC – heteronuclear multiple bond coherence

HPLC – high performance liquid chromatography

HPLC-UV - high performance liquid chromatography – ultraviolet

HPLC-UV-MS - high performance liquid chromatography – ultravioleta – mass spectrometry

HSQC – heteronuclear single quantum coherence

J – constante de acoplamento

m – multiplete

m/z – razão massa carga do íon

MeOH – metanol

MeCN – acetonitrila

P.I. – percentagem de inibição

RMN-¹³C – ressonância magnética nuclear do carbono 13

RMN-¹H – ressonância magnética nuclear do hidrogênio

s – singleto

t – tripleto

TMS - trimetilsilano

u.m.a. – unidade de massa atômica

δ – deslocamento químico

$[\mathbf{M}+\mathbf{H}]^+$ - íon quasi-molecular protonado

$[\mathbf{M}+\mathbf{Na}]^+$ - íon quasi-molecular aduto de sódio

Resumo

Neste trabalho foram reativadas 51 linhagens fúngicas isoladas a partir da ascídia *Didemnum ligulum*. Após a reativação, as linhagens foram cultivadas em meio de cultura líquido (250 mL), a partir dos quais foram obtidos os respectivos extratos brutos. Os extratos foram avaliados em bioensaio de atividade citotóxica, em três linhagens de células tumorais. Observou-se que 14 extratos apresentaram atividade citotóxica. Os extratos foram avaliados por HPLC-UV-MS para determinação do perfil químico. Após esta análise, a linhagem DLM2-12, identificada como *Penicillium citrinum*, foi selecionada para crescimento em meio de cultura líquido em quantidade suficiente para se realizar o isolamento dos metabólitos secundários do extrato de seu meio de cultura. O extrato de 250 mL do meio de cultura de *P. citrinum* foi submetido a diferentes métodos de separação cromatográfica. Estas separações permitiram o isolamento e identificação da citrinina (**47**) como sendo majoritária. Para isolamento de outros compostos presentes no extrato, a linhagem foi cultivada em maior escala (8 L) e obtido o extrato de seu meio de cultura. O novo extrato foi submetido a separações cromatográficas em gel de Sephadex LH-20, sílica gel e sílica gel derivatizada com grupo cianopropila, bem como purificações por HPLC. Estas separações permitiram o isolamento e identificação de três quinolonas, as quinolactacinas C (**50**) e B (**53**) e a quinolactacina E (**51**), inédita na literatura, um ácido tetrâmico, o penicilenol A (**54**) e duas antraquinonas, a citreorseína (**57**) e a emodina (**61**). As antraquinonas citreorseína (**57**) e emodina (**61**) foram submetidas aos bioensaios de atividade antiviral, antimicrobiana, Leishmanicida e citotóxica. A citreorseína (**57**) apresentou atividade contra as linhagens virais BVDV, HSV1 e aMPV e apresentou atividade citotóxica ativa frente à linhagem celular HCT-116 sendo inativa frente às linhagens celulares HL-60, SF295, OVCAR-8, K562, HCT-8, MDA-MB435 e MVF-7. A emodina (**61**) apresentou atividade contra as linhagens virais BVDV, HSV1, aMPV e hepatite C, atividade antimicrobiana, atividade Leishmanicida, atividade citotóxica frente às linhagens celulares HL-60, HCT-116, SF295, OVCAR-8, K562 e HCT-8 sendo inativa frente às linhagens celulares MDA-MB435 e MVF-7.

Abstract

The present investigation describes the isolation of secondary metabolites from the culture medium of a marine-derived strain of the fungus *Penicillium citrinum*. Initially, 51 fungal strains isolated from the ascidian *Didemnum ligulum* and preserved in sterilized sea water were re-activated in Petri dishes. After reactivation, the strains were grown in 250 mL of liquid culture medium. All media were extracted with EtOAc and, after evaporation, aliquots of the extracts were evaluated in a cytotoxicity assay on three tumor cell lines. It was observed that 14 extracts showed cytotoxic activity. These 14 extracts were analyzed by HPLC-UV-MS in order to investigate their corresponding chemical profile. As a result, the DLM2-12 strain, identified as *Penicillium citrinum*, was selected for semi-preparative growth in liquid culture medium in sufficient quantity to accomplish the isolation of secondary metabolites. A first growth in 250 mL of culture medium yielded an extract which was subjected to various chromatographic separations, to give citrinin (42) as the major compound. An additional growth of *P. citrinum* DLM2-12 in a larger volume (8 L) yielded an extract which was subjected to chromatographic separations on Sephadex LH-20, cyanopropyl-bonded silica gel, and by reversed-phase HPLC. These separations gave, after the identification of pure compounds: a) three quinolones, quinolactacins C (51) and B (54) and a new quinolactacin (52), unreported in the literature; b) the tetramic acid penicilenol A (55), and; c) two anthraquinones, citreorosein (57) and emodin (61). The anthraquinones 57 and 61 were evaluated in antiviral, antimicrobial, antileishmanial and cytotoxic assays. Citreorosein (57) displayed activity against the viral strains BVDV, HSV1 and aMPV and showed cytotoxicity against the HCT-116 cell line, being inactive against HL-60, SF295, OVCAR-8, K562, HCT-8, MDA-MB435 and MVF-7 cell lines. Emodin (61) displayed activity against the viral strains BVDV, HSV1, AMPV and hepatitis C, as well as antimicrobial, leishmanicidal, as well as cytotoxic activity against HL-60, HCT-116, SF295, OVCAR-8, K562 and HCT-8 cancer cell lines, being inactive against MDA-MB435 and MVF-7 cell lines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos que utilizam componentes orgânicos como fonte de energia. Em sua maioria são aeróbios, porém são conhecidos também fungos anaeróbios ou facultativos. Podem ser uni ou multinucleares e reproduzem-se assexuada ou sexuadamente. Possuem parede celular rígida, composta principalmente de quitina. São organismos ubíquos, presentes nos mais variados habitats: solo, água, animais, vegetais e detritos em geral. A sua identificação é baseada na sua morfologia macro e microscópica, bem como em caracteres genômicos.

Estes organismos podem se desenvolver em meios de cultura diversos, formando colônias morfológicas de dois tipos: leveduriformes e filamentosas (TRABULSI et al., 2002). As colônias leveduriformes são formadas por organismos unicelulares esféricos ou ovais. Podem ser observadas pela sua aparência pastosa ou cremosa e reproduzem-se assexuadamente por brotamento (TRABULSI et al., 2002). As colônias filamentosas são formadas por organismos multicelulares cuja aparência pode ser pulverulenta, algodonsa ou aveludada. São formadas por hifas: longos filamentos de células conectadas que crescem por extensão apical ou por ramificações. As hifas podem ser asseptadas (cenocíticas) ou septadas. Um conjunto de hifas é chamado de micélio (TRABULSI et al., 2002).

Alguns fungos podem apresentar crescimento dimórfico: unicelular e multicelular. Os fatores que regulam o dimorfismo incluem temperatura, concentração de CO₂ e pH do meio de cultura.

Os fungos são divididos em cinco classes (RAVEN, 2001; TORTORA, 2005):

- Ascomycetos: São fungos de hifas septadas e algumas leveduras. Reproduzem-se sexuada ou assexuadamente. Quando a reprodução é assexuada forma esporos do tipo conídio, quando sexuada forma esporos do tipo ascósporos numa estrutura em forma de saco chamada de asco. Exemplo: *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1)

Figura 1 - *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em placa (esquerda) e em ampliação de 1000x (direita).

Fonte: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm.

- Basidiomicetos: São fungos de hifas septadas e algumas leveduras. Reproduzem-se sexuadamente formando esporos exógenos chamados de basidiósporos. Exemplo: *Amanita muscaria* (Figura 2)

Figura 2 - *Amanita muscaria*.

Fonte: <http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=18872>.

- Deuteromicetos: Conhecidos como fungos imperfeitos por serem formados por hifas septadas que se multiplicam apenas por conídios. Não possuem reprodução sexuada, porém podem apresentar ciclo parassexuado. Exemplo: *Kionochaeta ramifera* (Figura 3)

Figura 3 - Estruturas reprodutivas de *Kionochaeta ramifera*.

Fonte: <http://micologiapanama.blogspot.com.br/2011/05/notas-micologicas-114-observaciones.html>.

- Zigomicetos: São organismos formados por hifas asseptadas. Podem apresentar reprodução sexuada, com formação de zigósporos, ou reprodução assexuada, com formação do esporangiósporo. Exemplo: *Rhizopus stolonifer* (Figura 4)

Figura 4 - *Rhizopus stolonifer* cultivado em placa.

Fonte: http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm

- Mastigomicetos: Predominantemente aquáticos. São organismos formados por hifas asseptadas e esporos flagelados. Exemplo: *Phytophthora infestans* (Figura 5)

Figura 5 - Esporângio contendo os esporos de *Phytophthora infestans*.

Fonte: <http://phys.org/news119626269.html>.

O crescimento dos fungos é determinado por fatores físicos (temperatura, pressão osmótica e pH) e químicos (nutrientes) (KYAW, 2010)¹.

A temperatura pode ser determinante no crescimento dos fungos. O aumento da temperatura pode acelerar reações químicas e enzimáticas na célula, aumentando o crescimento fúngico. No entanto, acima de determinado ponto, pode desnaturar proteínas irreversivelmente causando a morte do organismo. A temperatura ótima de crescimento varia entre as espécies. São chamados psicrofílos organismos que crescem em baixa temperatura, mesófilos os organismos que crescem em temperatura moderada e termófilos os organismos que crescem em temperaturas altas.

A perda de água das células por osmose causa a desidratação e consequente rompimento das células. Apesar disso, algumas espécies são capazes de sobreviver em ambientes salinos, chamadas halófilas. As espécies halófilas são capazes de produzir em seu citoplasma grande quantidade de soluto e assim impede a desidratação.

Os fungos podem ser classificados como acidófilos (toleram pH mais ácido) ou alcalófilos (toleram pH mais básico). Apesar do pH ótimo para o crescimento dos fungos ser entre 5 e 7, muitas espécies são capazes de resistir a amplas variações de pH, por exemplo espécies filamentosas que crescem na faixa de pH entre 0,5 e 11.

O fator nutricional também é muito importante para o desenvolvimento dos fungos. São necessárias fontes de carbono, nitrogênio, minerais e oxigênio. O carbono é fundamental para a síntese dos compostos orgânicos necessários à viabilidade celular e é, por isso, considerado um elemento estrutural. Outros elementos são também considerados essenciais, como o nitrogênio para a síntese dos aminoácidos, o enxofre para síntese de aminoácidos e vitaminas,

¹<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/crescimento/crescimento.html>

o fósforo para síntese de fosfolipídios e ácidos nucleicos, além dos íons co-fatores de enzimas como potássio, magnésio e cálcio.

Quanto à necessidade de oxigênio para seu crescimento, os fungos são classificados como aeróbios (necessitam de oxigênio para seu desenvolvimento), anaeróbios (crescem em ausência de oxigênio), aeróbios facultativos (crescem com ou sem oxigênio) e microaerófilos (requerem baixas concentrações de oxigênio).

Os metabólitos produzidos pelos fungos estão diretamente relacionados com as fases de crescimento: lag, log, estacionária ou de declínio (KYAW, 2010)¹.

- Fase lag: ocorre pouca variação populacional. Neste período ocorre pouca ou nenhuma divisão celular, mas ocorre intensa produção de metabólitos para síntese de DNA e enzimas.

- Fase log: nesta fase inicia-se a divisão celular e conseqüentemente o crescimento é exponencial. Os micro-organismos tornam-se especialmente sensíveis aos fatores ambientais. Apesar da intensa atividade metabólica, a quantidade de produtos finais é pequena já que as células estão absorvendo nutrientes e sintetizando os constituintes necessários ao crescimento.

- Fase estacionária: o número de células em divisão é equivalente ao número de células que morrem, portanto não há variação significativa na taxa populacional. Nesta fase são produzidos os metabólitos secundários.

- Fase de declínio: diminui o número de células viáveis pois a taxa de morte das células é maior que a taxa de divisão.

1.2 O ambiente marinho

O ambiente marinho possui características únicas que influenciam diretamente na adaptação dos micro-organismos e na conseqüente produção de metabólitos. Segundo Raghukumar (2008) “os fatores que influenciam os fungos marinhos são: a) salinidade e pH, b) baixo potencial hídrico, c) altas concentrações de íons de sódio, d) temperatura baixa, e) condições nutricionais oligotróficas e f) alta pressão hidrostática”.

A água do mar tem salinidade média de 33-35 ppt que, em comparação com a água fresca, representa uma diferença de cerca de 0,05% a mais. O ambiente marinho possui baixo potencial hídrico e, por isso, os organismos que nele vivem precisam manter o potencial da água em suas células menor que o potencial da água do mar para que possam absorver a água (RAGHUKUMAR, 2008). Para manter o potencial da água nas células menor, os fungos

¹<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/crescimento/crescimento.html>

marinhos acumulam osmólitos tais como glicerol, manitol, poliol e trealose (BLOMBERG e ADLER, 1992).

O sódio pode ser tóxico para as células e a alta concentração desse íon no ambiente marinho confere propriedades únicas para as células dos organismos que vivem no mar (RAGHUKUMAR, 2008). Segundo Jennings (1983) os fungos marinhos conseguem reduzir a toxicidade dos íons de sódio sequestrando e armazenando-os nos vacúolos das suas células. Quanto ao pH, enquanto os fungos terrestres crescem melhor em pH entre 4,5 e 6, Damare et al. (2006) demonstraram que fungos marinhos crescem e produzem uma série de enzimas extracelulares com pH ótimo entre 7 e 8.

Os níveis de nutrientes orgânicos presentes na água do mar são mais baixos e estacionários se comparados ao ambiente terrestre. No entanto são observados fungos crescendo em colunas de água (RAGHUKUMAR, 2008). Para tal, os fungos formam micro colônias, crescem em sedimentos e associados a animais e vegetais marinhos. Os fungos são encontrados em uma grande diversidade de substratos, como na superfície e interior de algas, invertebrados marinhos, moluscos, corais, manguezais e ainda sedimentos, areia e madeira.

São descritos como fungos e bactérias marinhas “aqueles que são isolados de sedimentos e organismos presentes na água do mar” (FAULKNER, 1997). Estes podem ser marinhos obrigatórios, que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuário, ou marinhos facultativos, que são de água doce ou terrestre, mas podem crescer e até esporular em ambiente marinho (KOHLMAYER, VOLKMANN-KOHLMAYER e ERIKSSON, 1979).

O interesse da pesquisa de novos agentes terapêuticos a partir de micro-organismos marinhos surgiu da suspeita de que um grande número das substâncias isoladas de algas e invertebrados marinhos é, na verdade, produzido por microorganismos associados (KELECOM, 2002). Os micro-organismos de origem marinha tem se mostrado uma fonte importante de novos compostos bioativos com potencial terapêutico (BLUNT, et al., 2005) incluindo metabólitos secundários com atividade citotóxica, antibacteriana, antiviral, antifúngica e anti-inflamatória, como as cefalosporinas C (1) e P₁ (2), com atividade antibiótica, isoladas a partir do fungo *Cephalosporium* sp. cultivado em água do mar (KELECOM, 2002).

1.3 A hospedeira: a ascídia *Didemnum ligulum* e a espécie fúngica associada: *Penicillium citrinum*

A espécie hospedeira a partir da qual foi isolado o fungo utilizado neste projeto pertence ao filo Chordata, classe Ascidiacea, ordem Enterogona, família Didemnidae, gênero *Didemnum* e espécie *Didemnum ligulum*. As ascídias do gênero *Didemnum* são invertebrados exclusivamente marinhos e bentônicos e podem ter formas coloniais ou solitárias (RODRIGUES et al., 1998).

As ascídias do gênero *Didemnum* são comumente produtoras de compostos nitrogenados, derivados de aminoácidos, tais como peptídeos cíclicos e alcaloides (KOSSUGA et al. 2007). Kossuga et al. (2007) relataram o estudo dos extratos hexânico e acetato de etila da ascídia da espécie *Didemnum ligulum* que resultou no isolamento dos compostos asterubina (3), pela primeira vez isolada de uma ascídia, e *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (4) inédito na literatura.

Estudos mostram que muitos dos metabólitos produzidos pelas ascídias também podem ser produzidos por micro-organismos simbiotes associados, como cianobactérias (SINGS e RINEHART, 1996; SCHREIBER et al., 1997; SCHMIDT et al., 2004, 2005; LONG et al., 2005 apud SELEGHIM et al., 2007), bactérias (HILDEBRAND et al., 2004; SALOMON et al., 2004 apud SELEGHIM et al., 2007), ou fungos (BUGNI e IRELAND,

2004). Tal fato deixa em questão: quais metabólitos são produzidos pelas ascídias, pelos micro-organismos associados ou por ambos?

A espécie fúngica *Penicillium citrinum* foi isolada a partir da ascídia *Didemnum ligulum* (KOSSUGA et al., 2012). A espécie fúngica pertence ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales, família Trochocomaceae e gênero *Penicillium*. São fungos de crescimento rápido, de morfologia filamentosa, comumente encontrados no ambiente terrestre, porém, têm sido encontrados também no ambiente marinho.

A espécie *P. citrinum* é tipicamente produtora da citrinina, um metabólito policetídeo, bastante tóxico, isolado pela primeira vez na década de 30. Recentemente, Chen et al. (2011a) relataram o isolamento de três novos derivados da citrinina a partir de *P. citrinum* isolado de sedimentos marinhos: os penicitrinóis C (**5**), D (**6**) e E (**7**). Esses compostos foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica e os penicitrinóis C e D apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem de célula tumoral HL-60 (leucemia).

O penicitrinol A (**8**) foi isolado por Wakana et al. (2006) a partir de *P. citrinum*. No mesmo trabalho, Wakana et al descrevem também o isolamento das penicitrinonas A (**9**) e B (**10**), também derivadas da citrinina. Chen et al. (2011b) relataram também o isolamento dos penicitrinóis F (**11**), G (**12**), H (**13**) e I (**14**).

Lin et al. (2012) relataram o isolamento de uma quinona a partir de *P. citrinum* isolado de sedimentos marinhos, a penicilliumina A (**15**), além dos compostos já conhecidos ergosterol (**16**) e peróxido de ergosterol (**17**). No mesmo trabalho, a penicilliumina A (**15**) foi submetida à avaliação da atividade citotóxica e apresentou atividade moderada frente às linhagens de células tumorais B16 (melanoma), A375 (melanoma maligno) e Hela (colo do útero).

(17)

Sasaki et al. (2005) relataram o isolamento de um novo alcaloide tetracíclico, a perinadina A (**18**) a partir de *P. citrinum* isolado do gastrointestino de um peixe. Tsuda et al. (2005) relataram o isolamento de três novas amidas pirrolidínicas a partir de *P. citrinum* isolado do gastrointestino do mesmo peixe, as escalusamidas A (**19**), B (**20**) e C (**21**). Dentre estes compostos, a escalusamida A apresentou atividade antifúngica (contra *Cryptococcus neorformans*) e bactericida (contra *Micrococcus luteus*). O alcaloide pentacíclico citrinadina A (**22**) foi isolado por Tsuda et al. (2004) a partir de *P. citrinum* isolado da alga vermelha *Actinotrichia fragilis*. Este composto apresentou atividade citotóxica contra as linhagens tumorais humanas L1210 (leucemia) e KB (carcinoma).

(18)

(19)

(20)

(21)

(22)

Estudos realizados no grupo GQOPN com a linhagem fúngica *P. citrinum* permitiram a otimização das condições de cultivo da linhagem fúngica e o isolamento e identificação de dois novos alcaloides indólicos, as citrinalinas A (23) e B (24) (PIMENTA, 2010).

(23)

(24)

O estudo dos metabólitos secundários oriundos de micro-organismos marinhos tem se mostrado relevante, visto que trata-se de um ramo da pesquisa de produtos naturais relativamente novo, que tomou corpo a partir da década de 90 no mundo e surgiu só na última década no Brasil. Apesar da costa brasileira ser a segunda de maior extensão, a pesquisa em produtos naturais de micro-organismos marinhos foi negligenciada nas últimas décadas, tendo se desenvolvido apenas a partir do ano de 2000 (HERNANDEZ et al., 2000).

1.4 Perspectiva atual da pesquisa em produtos naturais de micro-organismos marinhos

Ao contrário da química de produtos naturais de macro-organismos marinhos, que cresceu rapidamente a partir dos anos 70, a química de produtos naturais de micro-organismos marinhos vem se desenvolvendo de maneira crescente somente a partir da década de 90, (KELECOM, 2002). Isso porque as técnicas genômicas e de biologia molecular

proporcionaram o desenvolvimento de ferramentas que possibilitaram uma melhor caracterização dos microrganismos como um todo, e também distinguir entre microrganismos marinhos e terrestres.

A descoberta de novos compostos isolados de micro-organismos marinhos tem resultado, principalmente, em compostos com atividades antitumorais e antimicrobianos, e outros com atividade antiviral e anti-inflamatória. A pesquisa em produtos naturais de microrganismos marinhos é a que mais têm crescido no âmbito da química de produtos naturais marinhos. Isso porque o ambiente marinho influencia nas condições de adaptação dos microrganismos ao meio, fazendo com que estes expressem seu metabolismo secundário de forma diferenciada.

Exemplo de produto natural isolado de micro-organismos do ambiente marinho em fase de ensaio clínico é a salinosporamida A (**25**) cujo primeiro isolamento foi descrito por Williams et al. (2005) a partir do actinomiceto marinho *Salinospora tropica*. Esse composto apresenta atividade citotóxica e mostrou-se capaz de inibir especificamente a atividade proteolítica da subunidade 20S da proteossoma sem afetar qualquer outra propriedade de proteases. A salinosporamida A entrou em fase I de ensaios clínicos como um potente inibidor da divisão de células de melanoma (YASUHARA-BELL; LU, 2010), e teve a sua síntese realizada por Ma et al. (2011).

Outros exemplos recentes de produtos naturais de micro-organismos derivados do ambiente marinho com potencial biológico incluem: a aspergicina (**26**), um alcaloide isolado por Zhu et al. (2011) a partir da co-cultura de duas linhagens de *Aspergillus* sp. isoladas do fruto podre de *Avicennia marina* de mangue. A aspergicina apresentou atividade antibacteriana frente às linhagens de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis e *Bacillus subtilis* e gram-negativas: *Bacillus dysenteriae*, *Bacillus proteus* e *Escherichia coli*.

Huang et al. (2011) isolaram três novas bis-antraquinonas: alterporriol K (**27**), L (**28**) e M (**29**) a partir do fungo *Alternaria* sp. isolado de *Aegiceras corniculatum* de mangue. Os compostos alterporriol K (**27**) e L (**28**) apresentaram moderada atividade citotóxica frente às linhagens tumorais MDA-MB-435 (mama) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama).

Gao et al. (2011) relataram o isolamento de dois novos esteroides polioxigenados: os penicisterois A (**30**) e B (**31**) a partir do fungo *Penicillium chrysogenum* isolado de uma alga vermelha do gênero *Laurencia*. O composto penicisteroide A (**30**) apresentou potente atividade anti-fúngica (contra os fungos patogênicos *Aspergillus niger* e *Alternaria brassicae*) e citotóxica (contra as linhagens tumorais humanas Hela (colo do útero), SW1990 (carcinoma pancreática) e NCI-H460 (pulmão)).

1.5 JUSTIFICATIVA

Em 1999 o grupo de GQOPN-IQSC deu início ao primeiro programa brasileiro de isolamento de substâncias bioativas oriundas de micro-organismos marinhos. Nesse âmbito, foram investigados os meios de cultura de 3 linhagens de actinomicetos. A lactona da N-acetil- γ -hidroxivalina (**32**) foi isolada de *Streptomyces* sp. (Hernandez et al., 2000). As duas outras linhagens de actinomicetos isoladas também foram identificadas como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. A análise dos seus respectivos rDNA 16S pela DSMZ indicou que se tratam das espécies *S. carpaticus* e *S. acrymicini*. Desta última, foram isolados três derivados nitrogenados: a N-acetiltiramina (**33**), o dipeptídeo 3-hidroxiprolil-isoleucina (**34**) e a 6-amino-[1,4]diazonano-2,5-diona (**35**), esta última contendo um sistema cíclico totalmente sem precedentes na natureza (HERNANDEZ et al., 2004).

Posteriormente foi desenvolvida uma metodologia de multi-*screening*, aplicada à avaliação de 114 extratos de microrganismos de origem marinha por HPLC-UV, CCD, e diferentes bioensaios. Dentre os extratos ativos, dois foram selecionados e estudados pela aluna de doutorado Simone Possedente de Lira. Foram isolados 6 derivados de destruxinas, que são potentes toxinas produzidas por diversas linhagens de fungos terrestres. Dentre as 6 destruxinas isoladas por Simone duas foram inéditas, **36** e **37** (LIRA et al., 2006; VITA-MARQUES et al., 2008).

Dentre os resultados mais recentemente obtidos inclui-se o isolamento do policetídeo pirenocina J (**38**) (KOSSUGA et al. 2012) isolado a partir do fungo *Penicillium paxilli* obtido da esponja *Mycale angulosa*.

A descoberta de produtos naturais (metabólitos secundários) de microrganismos de origem marinha, com atividades citotóxica, anti-viral, Leishmanicida e anti-inflamatória ainda é incipiente no Brasil, exceção feita aos estudos realizados pelo grupo do Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (IQSC-USP) e da Prof. Dr. Leticia Veras Costa Lotufo (DFF-UFC).

Trabalhos recentes produzidos pelo grupo da Prof. Dr. Lotufo incluem a busca de compostos citotóxicos obtidos de micro-organismos oriundos do ambiente marinho. Dos 32 micro-organismos isolados de sedimentos intersticiais, 13 foram selecionados para avaliação biológica dos extratos de seus meios de cultura (ARTHAUD et al., 2012).

O extrato AcOEt obtido do meio de cultura uma bactéria Gram-negativa foi fortemente ativos contra linhagens de células cancerosas com os valores de CI_{50} que variam de $0,04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células HL60 (leucemia) a $0,26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para células MDA MB-435 (melanoma). A bactéria foi identificada como sendo um *Pseudoalteromonas* sp.

O fracionamento biomonitorado do extrato ativo levou ao isolamento da prodigiosina (**39**), um conhecido pigmento vermelho com atividades imunossupressoras e citotóxica. A prodigiosina (**39**) foi moderadamente ativo para células HB4a (parental de epitélio de mama humano), com CI_{50} de $4,6 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, e fortemente ativa para células HB4a-C3.6 (expressão moderada), com CI_{50} de $0,04 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e HB4a-C5.2 (expressão alta), com CI_{50} de $0,26 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Os resultados ainda modestos obtidos da investigação do metabolismo secundário de microrganismos marinhos oriundos da costa brasileira indicam que existe um enorme potencial biotecnológico a ser explorado a partir destes microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Isolar metabólitos secundários de extratos de meios de cultura de micro-organismos do ambiente marinho ativos em bioensaios de atividade citotóxica.

2.2. Específicos

- Selecionar linhagens de fungos do ambiente marinho que forneceram extratos ativos em bioensaios de atividade citotóxica;
- Após o crescimento das linhagens selecionadas de microrganismos em meio líquido (sem ágar), serão realizadas avaliações do perfil químico do extrato bruto do meio de cultura por cromatografia líquida acoplada a detectores de arranjo de diodos e massas (HPLC-PDA-MS), para a detecção de metabólitos secundários, utilizando-se técnicas de desreplicação.
- Em função dos resultados obtidos da avaliação dos extratos de microrganismos, nos testes de atividade biológica e nas análises por LC-PDA-MS, serão selecionadas pelo menos uma linhagem para o re-crescimento em maior volume, extração, separação e purificação dos metabólitos secundários bioativos. Tanto quanto possível, o processo de isolamento será biomonitorado.
- As substâncias puras isoladas deverão ser identificadas por técnicas espectroscópicas e avaliadas nos bioensaios em que o extrato original foi ativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Generalidades: Equipamentos e protocolo de bioensaio

3.1.2 Técnicas cromatográficas

3.1.2.1 Cromatografia em coluna por exclusão de tamanho

O fracionamento por cromatografia em coluna de separação por tamanho molecular foi realizado em uma coluna de vidro com dimensões de 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro de largura. A fase estacionária utilizada foi o Sephadex-LH20 (Pharmacia-Biotech[®]) e para eluição utilizou-se MeOH grau P.A. em modo isocrático.

3.1.2.2 Cromatografia em camada delgada

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm (Aldrich). A avaliação por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada usando hexano/AcOEt nas proporções 9:1 e 7:3 e CH₂Cl₂/MeOH nas proporções 9:1 e 7:3 como eluentes. As placas foram observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, sob lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE, e reveladas em ácido fosfomolibdico para detecção de substâncias redutoras, ninidrina para grupos amina e Dragendorff para alcaloides.

Para revelação das cromatofolhas foram utilizadas: a) solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH; b) solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH (a placa cromatográfica foi borrifada com a solução e aquecida por cinco minutos em placa de aquecimento); c) solução de Dragendorff (mistura 1:1 das soluções A e B diluída na proporção de 1 mL da mistura para cada 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água. A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL ácido acético glacial + 40 mL de água. B: 8 g de iodeto de potássio em 20 mL de água) borrifada na placa sem aquecimento.

3.1.2.3 Cromatografia em coluna pré-empacotada

O fracionamento em colunas pré-empacotadas foi realizado utilizando-se colunas de marcas Waters Sep-Pack[®] vac 35 cc e Phenomenex Strata[®] de diferentes dimensões (5 e 10 g)

com as fases estacionárias: sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C_{18}), ou cianopropila, de acordo com a polaridade de cada fração.

3.1.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A purificação das frações para obtenção dos compostos puros foi realizada por HPLC, em sistema Waters®, modelo Alliance 2695, com bombas modelo Pump 600, conectado a um detector eletrofotométrico UV-visível com leitura em dois comprimentos de onda, modelo 2487.

Para as separações foram utilizadas diferentes colunas de sílica gel derivatizadas com grupo C_{18} : Phenomenex® C_{18} (100 Å, 250 x 4,6 mm), Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm), Inertsil ODS-SP (250 x 4,6 mm, 5 µm).

As frações provenientes das cromatografias em fase reversa foram secas em um sistema de centrífuga a vácuo Savant, modelo Speedvac Plus SC 210.

3.1.3 Técnicas espectroscópicas

3.1.3.1 Espectrometria de massas e ultravioleta – técnicas hífenadas

Para obtenção dos espectros de massas e ultravioleta foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência, marca Waters®, modelo Alliance 2695, monitorada com detector de arranjo de fotodiodo com varredura no UV-Vis entre 200 e 800 nm, marca Waters® modelo 2996, e espectrômetro de massa, Waters®, modelo ZQ 2000, com ionização eletrospray e analisador do tipo quadrupolo com varredura entre 200 e 1000 Da. A temperatura utilizada para a fonte foi 100 °C e a temperatura de dessolvatação foi 300 °C, com fluxo de gás no cone de 50 L.h⁻¹.

Para obtenção dos espectros de massas e de absorção na região do ultravioleta as amostras puras foram diluídas para a concentração de 1,5 mg.mL⁻¹ (para compostos puros) e 2,5 mg.mL⁻¹ (para extratos brutos) em 1 mL de MeOH grau cromatográfico e transferidas para frascos específicos (vials) do amostrador.

Foi utilizada coluna de sílica gel derivatizada com grupo C_{18} , Inertsil ODS-SP (250 x 4,6 mm, 5 µm), e um gradiente linear de 10 a 100% de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1 + 0,1% de ácido fórmico) em H₂O + 0,1% de ácido fórmico, durante 30 minutos. Após

esse período, foi utilizada solução de 10% do solvente orgânico acidificado por 10 min para reequilibrar a coluna na condição inicial. (Tabela 1).

Tabela 1 - Gradiente de eluição utilizado na separação cromatográfica para obtenção dos espectros de massas e de bandas de absorção no UV das amostras.

Tempo (min)	Fluxo (mL.min⁻¹)	H₂O (%)	MeOH (%)	MeCN (%)	Curva
-	1	90	5	5	-
1	1	90	5	5	6
22	1	0	50	50	6
30	1	0	50	50	1
31	1	90	5	5	1
40	1	90	5	5	1

As curvas de gradiente disponíveis no equipamento permitem variar a composição do solvente em um espaço de tempo de forma linear ou não-linear. Conforme pode ser exemplificado na Figura 6, a curva 1 leva o gradiente para a condição imediatamente especificada, as curvas de 2 a 5 possuem efeito convexo, 6 é linear, as curvas 7 a 10 possuem efeito côncavo e a curva 11 mantém a condição inicial.

Figura 6 - Perfis das curvas de gradiente.

Fonte: Item Ajuda do equipamento Waters®, modelo Alliance 2695.

3.1.3.2 Análises por ressonância magnética nuclear

As frações purificadas foram submetidas à análise por RMN- ^1H em alíquotas diluídas em dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) ou clorofórmio deuterado (CDCl_3), utilizando trimetilsilano (TMS) como padrão interno. Após diluição em solvente, as amostras foram pipetadas através de algodão e inseridas em tubo de vidro de volume apropriado. Foram também realizadas análises de RMN de ^{13}C , COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$, HSQC e HMBC, quando necessário. As análises foram realizadas em equipamento Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), de 400,35 MHz na frequência do ^1H e de 100,10 MHz na frequência do ^{13}C .

3.1.4 Solventes

Os solventes utilizados na produção dos extratos, em CCD, cromatografia por exclusão de tamanho e pré-empacotadas foram de grau analítico assim como na cromatografia líquida de alta eficiência, J. T Baker, Mallinckrodt e Panreac. A água utilizada em todas as cromatografias foi purificada em um Sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

3.1.5 Protocolo de bioensaios

3.1.5.1 Atividade citotóxica

O bioensaio de atividade citotóxica foi realizado pelo grupo da Dra. Claudia do Ó Pessoa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

Para tal, foram utilizadas as linhagens: HL-60 e K562 (leucemia), MDA-MB435 e MVF-7 (mama humano), HCT-8 e HCT-116 (cólon humano), SF295 (glioblastoma humano), OVCAR-8 (ovário) cedidas pelo Mercy Children's Hospital, cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, e mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . As amostras testadas neste bioensaio foram diluídas em DMSO na concentração estoque de 10 mg.mL^{-1} .

A citotoxicidade da amostra foi avaliada pelo método do MTT (MOSMAN, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: $0,1 \times 10^6$ (MDA-MB435 e SF295) e $0,7 \times 10^5$ (HCT-8). As amostras foram testadas em uma única

concentração ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicata em dois experimentos independentes. As absorbâncias foram medidas utilizando-se um espectofotômetro de placa a 595 nm.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Escala de intensidade para avaliação do potencial citotóxico.

Sem atividade (SA)	-
Pouca atividade (PA)	Inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%
Atividade moderada (Mo)	Inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%
Muita atividade (MA)	Inibição de crescimento variando de 75 a 100%

3.1.5.2 Atividade anti-Leishmania

O bioensaio de atividade anti-Leishmania foi realizado pelo grupo do Prof. Dr. André Tempone do Laboratório de Toxinologia Aplicada, Departamento de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

A concentração efetiva 50% (CE_{50}) dos diferentes compostos foi determinada utilizando-se promastigotas de *Leishmania chagasi*, que foram aplicados a 10^6 /poço em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos, utilizando-se meio M-199 como meio de desenvolvimento do parasita.

Após 24 horas, foi verificada a viabilidade dos promastigotas observando-se a atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio de MTT (Tada et al., 1986) a 570 nm. Foi utilizado o fármaco pentamidina como controle positivo do ensaio.

3.1.5.3 Atividade anti-viral

O bioensaio de atividade anti-viral foi realizado pelo grupo da Prof. Dr. Profa. Clarice Weis Arns, do Laboratório de Virologia, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Para avaliar a atividade antiviral destes extratos foram eleitos os seguintes vírus: Herpes Vírus Bovino Tipos 1 (HBV-1); Herpes Vírus Simplex tipo 1 (HSV-1) cepa Kos, Metapneumovirus aviário (aMPV); e Calicivírus felino (FCV). Para os ensaios antivirais foram utilizadas 04 diferentes linhagens celulares (Tabela 3). O extrato foi considerado ativo

quando diminuiu o título viral em 1,5 log em relação ao título viral controle ou com porcentagem de inibição (PI) viral de 98%.

Tabela 3 - Vírus e linhagem celular utilizados no estudo.

Vírus	Linhagem viral	Linhagem celular	Vírus Humano
Calicivírus felino	FCV	MDBK	Doenças gastrointestinais ou doenças sistêmicas
Metapneumovírus aviário	aMPV (SHS/BR121)	CER (Chicken Embryo Related)	Sarampo, Caxumba e Influenza
Vírus da diarreia viral bovina	BVDV	MDBK (Madin-Darby bovine kidney).	Modelo para substituir o uso do vírus da hepatite C doença severa das mucosas em gado
Herpes vírus simplex tipo 1 resistente ao aciclovir	HSV 1 cepa KOS	VERO (fibroblastos de rins do macaco verde)	Herpes labial em humanos

Todas as amostras foram avaliadas a uma concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a três gêneros de vírus animais que contenham as principais características morfológicas. Foram selecionados os seguintes vírus: Herpesvírus Bovino tipo 1 (vírus DNA envelopado), Metapneumovírus Aviário e BVDV (vírus RNA, envelopado), Calicivirus felino (vírus DNA não envelopado).

3.1.5.4.1 Titulação viral

Para a titulação viral, foram preparadas placas de 96 orifícios com monocamada de célula de até 24 hs, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Foram feitas diluições das alíquotas virais de 10^{-1} a 10^{-7} . Essas diluições foram adicionadas sobre a monocamada celular em quadruplicata ($50 \mu\text{L}$ por orifício), deixando-se uma linha da placa sem inóculo, representando o controle celular. As visualizações foram feitas diariamente em microscópio invertido para a observação do efeito citopático e, após 96 horas, foi realizada a última leitura

seguida pelo cálculo do título viral. O título foi calculado através da fórmula de Reed e Muench (1938).

3.1.5.4.2 Ensaio antiviral

3.1.5.4.2.1 BVDV e FCV

Para o ensaio antiviral foram preparadas placas de 96 poços com uma diluição das células MDBK de 1:3. Essas placas permaneceram em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por no máximo 24 hs. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o ensaio foi montado da seguinte forma (Figura 7):

BR	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE6	CE7	CE8	CE9	CE10	CE11
BR	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am10	Am11
CC	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am10	Am11
CC	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am10	Am11
CC	Am12	Am13	Am14	Am15	Am16	Am17	Am18	Am19	Am20	Am21	Am22
CV	Am12	Am13	Am14	Am15	Am16	Am17	Am18	Am19	Am20	Am21	Am22
CV	Am12	Am13	Am14	Am15	Am16	Am17	Am18	Am19	Am20	Am21	Am22
CV	CE12	CE13	CE14	CE15	CE16	CE17	CE18	CE19	CE20	CE21	CE22

Figura 7 - Esquema da placa de 96 compartimentos padronizado para o ensaio antiviral.

Sendo: BR=branco; CC=controle celular; CV=controle viral; CE=controle de extrato; e Am=amostra.

Para os ensaios, foram utilizados 50 µg.mL⁻¹ dos extratos e 100 TCID₅₀.mL⁻¹ de vírus. Essas placas foram acompanhadas diariamente para verificação do aparecimento de efeito citopático e grau de destruição da monocamada celular. Após 72 horas foi realizada a leitura final do efeito citopático ao microscópio óptico, seguida por ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) para a quantificação da viabilidade celular e, indiretamente, quantificação da proteção celular do extrato frente ao vírus.

Simultaneamente, foram preparadas placas de 24 poços nas quais os extratos foram testados em duplicata, usando sempre um controle dos extratos testados. Após 72 hs, com

visualizações diárias das placas, o sobrenadante foi descartado e as placas foram coradas com cristal violeta para a visualização da destruição da monocamada celular através da comparação com o controle, cuja monocamada permanecia intacta. (Obs.: como os resultados apresentados através desta metodologia foram bem semelhantes aos apresentados pelo ensaio em placa de 96 poços seguido pelo MTT, e considerando-se que um número maior de extratos poderiam ser testados simultaneamente na placa de 96 poços, a primeira metodologia foi padronizada para o prosseguimento dos ensaios).

3.1.5.4.3 Ensaio de MTT

Inicialmente, adicionou-se 20 μL da solução de MTT (a uma concentração de 5 mg.mL^{-1}) em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 durante 4 horas. Essa etapa do ensaio permite a redução do MTT por células metabolicamente ativas a cristais de formazan. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Então, o sobrenadante de cada poço foi retirado cuidadosamente, seguindo-se à adição de 150 μL de DMSO para a dissolução dos cristais formados, o que permite a posterior leitura da absorbância. A taxa de redução do tetrazólio corresponde à taxa de células viáveis, metabolicamente ativas. As placas foram colocadas em agitação por 10 minutos e, por fim, foi feita a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (GERLIER; THOMASSET, 1986).

3.1.5.4.3.1 aMPV e HBV

Para determinar a atividade antiviral foi realizada a titulação dos vírus de acordo com metodologias usuais, ou seja, 50 μL de células com uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/compartimento na presença dos extratos nas respectivas CMNT em quadruplicata e a adição do vírus em diluições sequenciais na base 10. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C com 5% de CO_2 . A leitura foi realizada em busca do ECP característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (LORENZ; BÖGEL, 1973).

3.1.5.4.4 Análise dos Resultados

O efeito antiviral foi calculado pelo método de Spearman & Karber (LORENZ; BÖGEL, 1973) que é amplamente utilizado por ser um método simples e rápido. A avaliação

é visual através da observação em microscópio dos orifícios à procura da ocorrência do Efeito Citopático (ECP). Considerando-se resultado negativo a ocorrência de ECP e positivo quando não apresentar o ECP isto é, o extrato inibiu a ação viral sobre a célula.

O índice de inibição viral (IIV) para cada concentração da substância foi calculado através da diferença entre o log do título do controle (C) e o log do título do tratado. Considerando como positivo se o IIV for igual ou acima de 1,5 log.

A porcentagem de inibição é calculada através da formula:

$$(PI) = (1 - T/C) \times 100$$

onde T é o antilog dos títulos virais tratados (com extrato) e C é o antilog do título viral controle (sem extrato). Foi considerado positivo PI igual ou acima de 9,8%.

3.1.5.4 Atividade antimicrobiana

O bioensaio de atividade antimicrobiana foi realizado pelo grupo do Prof. Dr. Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins, do Departamento de Biotecnologia Vegetal de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto.

As células (10^4 - 10^5) foram semeadas em placas de fundo chato com 96 poços e incubadas para aderirem à placa por um período mínimo de 18-24 h. Após este período foram adicionadas as amostras, seguindo-se a incubação por períodos que variam de 72, 48 ou 24 h. As doses inicialmente aplicadas foram de 10, 25 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a partir de uma solução estoque preparada com DMSO. A concentração final de DMSO nos tratamentos não excederam 0,5%.

O teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi aplicado para avaliar a viabilidade celular após tratamento com as substâncias. Este teste baseia-se na conversão do substrato (MTT) em cristais de formazan, em uma reação catalizada por desidrogenases mitocondriais de células viáveis. Três horas antes do término do tempo de exposição, o meio contendo a substância foi substituído por uma solução de MTT (Sigma-Alrich) diluído em meio de cultura sem suplementação a uma concentração final de 1 mg.mL^{-1} . Ao final das três horas foram adicionados 100 μL do tampão de lise (SDS 20%, Dimetil formamida 50% , pH 4,7). As placas foram mantidas por 12 h a uma temperatura de 37° C para a completa dissolução dos cristais de formazan. A leitura do teste foi realizada em espectrofotômetro para placas de Elisa, em um comprimento de onda de 550 nm. Cada teste foi realizado em triplicata e os resultados apresentados como a porcentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao controle.

3.2 Reativação das linhagens fúngicas

3.2.1 Origem das linhagens reativadas

As linhagens utilizadas nesse trabalho foram isoladas a partir de organismos marinhos obtidos em mergulho autônomo na região de São Sebastião – São Paulo – Brasil. Cepas das linhagens utilizadas neste trabalho foram depositadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) no Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

As linhagens cujos códigos iniciam-se com as letras “Db” foram isoladas da ascídia *Didemnum sp. (branca)*, “DR” foram isoladas da esponja *Dragmacidon reticulatum* e “DL” foram isoladas da ascídia *Didemnum ligulum*.

Compõem também os códigos das linhagens o código do meio de cultura em que foram cultivadas. Foram utilizadas as siglas: “GPY” para ágar de extrato de levedura, peptona e glicose [Glucose peptone yeast extract agar]; “M2” para ágar de malte 2%; “M3” para ágar de malte 3%; “A” para aveia; “F” para fubá e “c/b” para cenoura e batata. O último número refere-se à ordem de isolamento das linhagens.

Por exemplo: amostra DLM2-12 representa a 12ª linhagem isolada da ascídia *Didemnum ligulum*, cultivada em meio de Malte 2%.

3.2.2 Protocolo de reativação das linhagens fúngicas

Foram reativadas 51 linhagens de fungos. Em trabalhos anteriores, estas linhagens foram crescidas em meios de cultura, os quais foram extraídos com AcOEt. Os extratos destas linhagens apresentaram resultados positivos em bioensaios de atividade citotóxica, anti-Leishmania, antimicrobiano e anti-inflamatória (KOSSUGA et al., 2012). Para tal, as linhagens, preservadas em geladeira de acordo com o método de Castellani (1967), foram inoculadas em placa de Petri contendo os meios de cultura, preparados com água do mar artificial (Tabela 4). As mesmas linhagens foram incubadas a temperatura de 25 °C, em incubadora tipo BOD.

Após crescimento em placa, as linhagens foram fotografadas. Foram inoculados discos de cerca de 0,5 cm, obtidos de cada linhagem crescida em placas de Petri, em frascos do tipo

Schott de 500 mL, contendo 250 mL dos respectivos meios de cultura (sem ágar) e incubadas a temperatura de 25 °C em modo estático durante 21 dias.

Tabela 4 - Meios de cultura utilizados no crescimento das linhagens.

MEIO DE CULTURA	COMPONENTES
Agar de extrato de levedura, peptona e glicose [Glucose peptone yeast extract agar (GPY)]	1 g.L ⁻¹ Glicose x H ₂ O, 0,5 g.L ⁻¹ Peptona de soja, 0,1 g.L ⁻¹ Extrato de levedura, 15 g.L ⁻¹ Agar, completa para 1L com ASW (Água do Mar Artificial – Artificial Sea Water).
Agar de malte 2% (M2)	20 g Extrato de malte, 15 g Agar, completa para 1 L com ASW.
Agar de malte 3% (M3)	30 g Extrato de malte, 15 g Agar, 30 g Peptona de soja, completa para 1 L com ASW.
Aveia (A)	30 g.L ⁻¹ Flocos de aveia 20 g.L ⁻¹ Agar completa para 1 L com ASW
Fubá (F)	42 g.L ⁻¹ Fubá 15 g.L ⁻¹ Agar completa para 1 L com ASW
Cenoura e Batata (c/b)	20 g.L ⁻¹ Batatas cozidas e esmagadas, 20 g.L ⁻¹ Cenouras cozidas e esmagadas, 20 g.L ⁻¹ Agar, completa para 1 L com ASW.
Água do mar (ASW)	CaCl ₂ .2H ₂ O 1,36 g.L ⁻¹ ; MgCl ₂ .6H ₂ O 9,68 g.L ⁻¹ ; KCl 0,61 g.L ⁻¹ ; NaCl 30 g.L ⁻¹ ; NaH ₂ PO ₄ 0,14 mg.L ⁻¹ ; Na ₂ SO ₄ 3,47 g.L ⁻¹ ; NaHCO ₃ 170 mg.L ⁻¹ ; KBr 100 mg.L ⁻¹ ; SrCl ₂ .6H ₂ O 40 mg.L ⁻¹ ; ácido bórico 30 mg.L ⁻¹ e completa para 1 L com água destilada

3.3 Produção dos extratos em pequena escala

Foram obtidos extratos das 51 linhagens fúngicas reativadas para avaliação de suas atividades biológicas e do seu respectivo perfil químico.

Para a preparação dos extratos, adicionou-se 250 mL de AcOEt nos frascos do tipo Schott com o meio de cultura, ao final do período de crescimento. A mistura foi agitada periodicamente durante 48 horas. Em seguida, a mistura foi filtrada utilizando-se funil de Buchner, através de papel de filtro coberto por uma camada de cerca de 2 cm de celite. A mistura resultante foi separada por partição líquido-líquido.

As frações aquosas destas partições foram descartadas. As frações orgânicas evaporadas em evaporador rotativo, transferidas para frascos previamente pesados e etiquetados para determinação de suas massas.

3.3.1 Preparação dos extratos do meio de cultura das linhagens fúngicas reativadas para avaliação química e biológica

Os extratos brutos obtidos foram submetidos a um processo de limpeza preliminar. Para tal, foram adicionados cerca de 2 mL de MeCN ao frasco contendo cada extrato seco e a suspensão em MeCN foi filtrada com uma pipeta de Pasteur, com a ponta enrolada em algodão.

Os extratos muito oleosos foram particionados com cerca de 2 mL de hexano/MeCN 1:1 em tubo de ensaio. A fração hexânica foi transferida para um tubo etiquetado como fração lipofílica. As frações em MeCN foram secas em evaporador rotativo e transferidas para frascos de vidro, previamente pesados e etiquetados, para determinação de suas massas.

Dos extratos do meio de cultura das linhagens fúngicas obtidos foram retiradas alíquotas de 3 a 5 mg para realização do bioensaio de atividade citotóxica.

As alíquotas restantes foram ressuspensas em MeOH e diluídas a uma concentração final de 2,5% (m/v) em 1 mL. A solução foi submetida à análise por HPLC-UV-MS. Foi utilizada coluna de sílica gel derivatizada com grupo, C₁₈ Inertsil ODS-SP.

3.3.2 Preservação da linhagem fúngica selecionada – DLM2-12

A linhagem selecionada de acordo com os resultados dos bioensaios e perfil químico foi preservada em água do mar esterilizada. Para tal, foram esterilizados tubos Eppendorf

contendo alíquotas de cerca de 1 mL de água do mar artificial. Foram transferidos para os tubos de Eppendorf discos obtidos do meio de cultura contendo a linhagem crescida em placa de Petri. As alíquotas foram estocadas em temperatura aproximada de 4 °C.

3.3.3 Isolamento de citrinina (47) a partir do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 produzido em pequena escala

O extrato bruto obtido após a reativação da linhagem DLM212-12 foi submetido à avaliação por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Para tal, alíquotas do extrato foram aplicadas em cromatofolhas de sílica-gel, eluídas com as misturas de Hexano:AcOEt 9:1, Hexano:AcOEt 7:3, CH₂Cl₂:MeOH 9:1 e CH₂Cl₂:MeOH 7:3, reveladas com ninidrina, Dragendorff, ácido fosfomolibdico e observadas sob luz ultra-violeta (254 nm).

O extrato do meio de cultura (333 mg) foi solubilizado em 2 mL em mistura de MeOH:H₂O 1:1 e transferido para uma coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizada com C₁₈ (10 g), previamente condicionada com uma mistura de MeOH/H₂O 1:1. A coluna foi eluída com um gradiente de MeOH em H₂O nas proporções de 50% a 100% de MeOH (Tabela 5). Foram obtidas 9 frações, designadas de DLM2-12-1 a DLM2-12-9. As frações foram evaporadas em centrífuga a vácuo Speed-Vac.

Tabela 5 - Sistema de solventes em gradiente utilizado no fracionamento do extrato do meio de cultura de DLM2-12 cultivado em 250 mL de meio de crescimento.

Frações obtidas	Eluente (%) (MeOH:H ₂ O)	Volume coletado (mL)
DLM2-12-1	50:50	40
DLM2-12-2	50:50	40
DLM2-12-3	60:40	40
DLM2-12-4	70:30	30
DLM2-12-5	70:30	40
DLM2-12-6	80:20	20
DLM2-12-7	80:20	40
DLM2-12-8	100:0	40
DLM2-12-9	100:0	40

A fração DLM2-12-1 (19,6 mg) foi submetida à separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Phenomenex C₁₈, em sistema de HPLC com detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 245 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo

isocrático e uma mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 50:25:25 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 4 frações, designadas de DLM2-12-1A a DLM2-12-1D.

A fração DLM2-12-1D (5,6 mg) foi submetida a uma nova separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 245 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e uma mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 44:28:28 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 9 frações, designadas de DLM2-12-1D1 a DLM2-12-1D9.

Após análise por HPLC-UV-MS, verificou-se que a citrinina (**47**) estava presente nas frações DLM2-12-1D4, DLM2-12-1D5 e DLM2-12-2. Estas frações foram reunidas para análises por RMN.

3.4 Produção do extrato bruto do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 em média escala

A linhagem de fungo selecionada (DLM2-12) foi inoculada em placas de Petri para crescimento de suas colônias. Em seguida, discos do meio de cultura sólido contendo a linhagem foram transferidos para 32 frascos do tipo Schott contendo 250 mL do meio de cultura, totalizando um volume de 8 L do meio de cultura inoculados com a linhagem selecionada.

A inoculação nos frascos foi realizada usando pontas de seringas de 10 mL para retirada cerca de 5 discos de cada colônia para transferência aos frascos. Os frascos contendo as linhagens de fungos foram incubados em temperatura ambiente durante 21 dias, de modo a reproduzir o crescimento anterior.

Para preparação do extrato, após 21 dias foram adicionados 250 mL de AcOEt a cada um dos frascos e estes foram periodicamente agitados. A mistura resultante foi filtrada em funil de Buchner, através de papel filtro coberto com cerca de 2 cm de celite. A solução filtrada foi posteriormente separada por partição líquido-líquido, a fração aquosa foi descartada e a fração orgânica seca em evaporador rotativo e transferida para frascos previamente pesados e etiquetados para determinação de sua massa.

3.4.1 Pré-purificação dos extratos

O extrato total seco (2 g) foi ressuspenso em 500 mL de MeOH, transferido para funil de separação e particionado com 500 mL de hexano dividido em três partes. A fração

hexânica foi evaporada, e a fração metanólica foi transferida para um frasco previamente pesado para determinação da massa resultante.

A fração metanólica (1,5 g) foi dividida em partes de 0,5 g e fracionadas por cromatografia em coluna de separação por tamanho das partículas – Sephadex LH20 – eluída com MeOH grau analítico.

Foram coletadas frações de aproximadamente 8 mL em tubos de ensaio pequenos. As frações foram posteriormente analisadas por CCD, utilizando-se os eluentes e reveladores que se mostraram mais adequados, de acordo com os testes anteriores, avaliadas quanto ao seu grau de similaridade e as frações semelhantes foram reunidas.

As frações semelhantes foram transferidas para frascos previamente pesados e etiquetados para determinação de suas massas. Alíquotas de 3 a 5 mg foram retiradas para reavaliação nos bioensaios.

3.4.2 Purificação dos compostos presentes nas frações obtidas.

3.4.2.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MB

A fração DLM2-12-MB (122,4 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 270 e 340 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 30:35:35 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 5 frações, designadas de DLM2-12-MB1 a DLM2-12-MB5.

3.4.2.1.1 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MB1

A fração DLM2-12-MB1 (26,6 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 271 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 60:20:20 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 3 frações, designadas de DLM2-12-MB1A, DLM2-12-MB1B e DLM2-12-MB1limp. A fração DLM2-12-MB1limp foi recolhida entre os picos principais observados no cromatograma.

3.4.2.1.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MB1limp

A fração DLM2-12-MB1limp (10,9 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 270 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 66:17:17 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 5 frações, designadas de DLM2-12-MB1L1 a DLM2-12-MB1L5.

3.4.2.1.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MB2

A fração DLM2-12-MB2 (35 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 270 e 340 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 50:25:25 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 4 frações, designadas de DLM2-12-MB2A, DLM2-12-MB2B, DLM2-12-MB2C e DLM2-12-MB2limp. A fração DLM2-12-MB2limp foi recolhida entre os picos principais.

3.4.2.1.3 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MB4

A fração DLM2-12-MB4 (9 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 270 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 30:35:35 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 2 frações, designadas de DLM2-12-MB4A, DLM2-12-MB4limp. A fração DLM2-12-MB1limp foi recolhida antes e depois do pico principal.

3.4.2.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MC

A fração DLM2-12-MC (552,5 mg) foi solubilizada em 2 mL em uma mistura de CH₂Cl₂/AcOEt 7:3 e transferido para uma coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila (10 g), previamente condicionado com a mistura de CH₂Cl₂/AcOEt 8:2. A coluna foi eluída com CH₂Cl₂/AcOEt 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 1:1 e MeOH 100%, 70 mL de cada mistura eluente. Após análise por CCD,

foram obtidas 5 frações, designadas de DLM2-12-MC1 a DLM2-12-MC5. As frações DLM2-12-MC2 a DLM2-12-MC4 foram, posteriormente, reunidas por similaridade.

3.4.2.3.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MC1

A fração DLM2-12-MC1 (449,1 mg) foi solubilizada em 2 mL em mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 7:3 e transferida para uma coluna pré-empacotada com sílica-gel (10 g), previamente condicionada com a mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2. A coluna foi eluída com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 e MeOH 100%. Após análise por CCD, foram obtidas 6 frações, designadas de DLM2-12-MC1A a DLM2-12-MC1F.

3.4.2.3.1.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MC1C

A fração DLM2-12-MC1C (45,6 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 270 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo isocrático e mistura eluente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{MeOH}$ 34:33:33 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 8 frações, designadas de DLM2-12-MC1C1 a DLM2-12-MC1C7 e DLM2-12-MC1Cerle. A fração DLM2-12-MC1Cerle foi recolhida entre os picos principais.

3.4.2.3.2 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MC24

A fração DLM2-12-MC24 (83,7 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 280 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo isocrático e mistura eluente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{MeOH}$ 70:15:15 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 7 frações, designadas de DLM2-12-MC24A a DLM2-12-MC24F e DLM2-12-MC24erle. A fração DLM2-12-MC24erle foi recolhida entre os picos principais.

3.4.2.3 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD

A fração DLM2-12-MD (595,2 mg) foi solubilizada em 2 mL em mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 7:3 e transferida para uma coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizada

com grupo cianopropila (10 g), previamente condicionada com a mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2. A coluna foi eluída com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 1:1 e MeOH 100%. Após análise por CCD, foram 7 frações, designadas de DLM2-12-MD1 a DLM2-12-MD7. As frações DLM2-12-MD3 a DLM2-12-MD6 foram, posteriormente, reunidas por similaridade.

3.4.2.3.1 Fracionamento cromatográfico da fração DLM2-12-MD2

A fração DLM2-12-MD2 (413,8 mg) foi solubilizada em 2 mL em mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2 e transferida para uma coluna pré-empacotada com sílica-gel (10 g), previamente condicionada com a mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 9:1. A coluna foi eluída com $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 e MeOH 100%. Após análise por CCD, foram obtidas 6 frações, designadas de DLM2-12-MD2A a DLM2-12-MD2F.

3.4.2.3.1.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2A

A fração DLM2-12-MD2A (5,7 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 292 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo isocrático e mistura eluente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{MeOH}$ 20:40:40 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 3 frações, designadas de DLM2-12-MD2A1 a DLM2-12-MD2A3.

3.4.2.3.1.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2D

A fração DLM2-12-MD2D (74,9 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 286 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo gradiente linear de 10 a 100% de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1 + 0,1% de ácido fórmico) em H_2O + 0,1% de ácido fórmico, durante 30 minutos. Após esse período, foi utilizada solução de 10% do solvente orgânico acidificado por 10 min para reequilibrar a coluna na condição inicial. Foram obtidas 9 frações, designadas de DLM2-12-MD2D1 a DLM2-12-MD2D8 e DLM2-12-MD2Derle. A fração DLM2-12-MD2Derle foi recolhida entre os picos principais.

3.4.2.3.1.2.1 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2D6

A fração DLM2-12-MD2D6 (167,5 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 286 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo isocrático e mistura eluente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{MeOH}$ 60:20:20 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 2 frações, designadas de DLM2-12-MD2D6A e DLM2-12-MD2D6erle. A fração DLM2-12-MD2D6erle foi recolhida antes e depois do pico principal.

3.4.2.3.1.2.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2D7

A fração DLM2-12-MD2D7 (2,6 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 286 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo isocrático e mistura eluente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{MeOH}$ 34:33:33 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 3 frações, designadas de DLM2-12-MD2D7A, DLM2-12-MD2D7B e DLM2-12-MD2D7erle. A fração DLM2-12-MD2D7erle foi recolhida entre os picos principais.

3.4.2.3.1.3 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD2E

A fração DLM2-12-MD2E (72 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-3, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 286 nm, com fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, em modo gradiente linear de 10 a 100% de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1 + 0,1% de ácido fórmico) em H_2O + 0,1% de ácido fórmico, durante 30 minutos. Após esse período, foi utilizada solução de 10% do solvente orgânico acidificado por 10 min para reequilibrar a coluna na condição inicial. Foram obtidas 10 frações, designadas de DLM2-12-MD2E1 a DLM2-12-MD2E9 e DLM2-12-MD2Eerle. A fração DLM2-12-MD2Eerle foi recolhida entre os picos principais.

3.4.2.3.2 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-MD36

Foram preparadas 3 misturas de solventes: A – $\text{Hex}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 1:1, B - $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 9:1 e C - $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1. A fração DLM2-12-MD36 (167,5 mg) foi solubilizada em 2 mL em mistura A/B 8:2 e transferida para uma coluna pré-empacotada com sílica-gel (5 g),

previamente condicionada com a mistura de A/B 9:1. O cartucho foi eluído com A/B 9:1 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1, A/C 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1 e MeOH 100%. Após análise por CCD, foram obtidas 7 frações, designadas de DLM2-12-MD36A a DLM2-12-MD36G.

3.4.2.4 Separação cromatográfica da fração DLM2-12-ME

A fração DLM2-12-ME (66,8 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se para esta separação uma coluna Inertsil ODS-SP, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 270 e 340 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹, em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeCN/MeOH 30:35:35 + ácido fórmico 0,1%. Foram obtidas 7 frações, designadas de DLM2-12-ME1 a DLM2-12-ME7.

3.4.3 Determinação estrutural dos compostos obtidos

A identificação dos compostos puros foi realizada através de dados espectroscópicos de massas (MS), ultravioleta (UV), ressonância magnética de hidrogênio e carbono (RMN-¹H) e (RMN-¹³C) e técnicas de RMN bidimensionais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Reativação e avaliação das linhagens fúngicas

A seleção da linhagem de trabalho foi realizada após a reativação de 51 linhagens as quais, em trabalho anterior, levaram à obtenção de extratos que apresentaram atividade biológica em bioensaios de atividade citotóxica, anti-Leishmania, antimicrobiano e anti-inflamatória (KOSSUGA et al., 2012).

A Tabela 6 apresenta a comparação dos resultados obtidos da avaliação dos extratos nos bioensaios de atividades biológicas realizados entre os anos 2006 e 2007 e os resultados obtidos após a reativação das linhagens, neste trabalho.

Tabela 6 - Linhagens que produziram extratos que apresentaram atividade citotóxica (na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

	Códigos	Citotóxico (trabalho anterior)	Citotóxico (atual)
1	DRA-4	X	-
2	DRA-5	#2	-
3	DRA-6	X	-
4	DRA-2	#2	-
5	DRA-7	#2	-
6	DRG-6	X	-
7	DRM2-8	X	X
8	DRF-3	X	-
9	DRG-10	X	-
10	DRM2-2	X	-
11	DRM2-10	X	-
12	DRM3-1	X	X
13	DRF-2	X	X
14	DRF-6	X	-
15	DRG-1	X	-
16	DRM3-2	#2	-
17	DRc/b-3	X	*
18	DRF-1	X	-
19	DRF-5	X	-
20	DRG-4	X	*
21	DRG-8	X	*
22	DRM2-4	X	X
23	DRM3-6	X	X
24	DLM3-14	X	-
25	DLM3-9	X	X

26	DLM3-1	X	-
27	DLM3-13	X	-
28	DLM3-8	X	X
29	DLM3-3	X	X
30	DLM3-7	X	*
31	DLM3-6	X	-
32	DLM3-15	X	X
33	DLM2-15	X	-
34	DLM2-4	X	-
35	DLM2-6	X	X
36	DLM2-16	X	-
37	DLM2-18	X	X
38	DLM2-12	X	X
39	DLG-12	X	*
40	Dbc/b-1	X	-
41	Dbc/b-4	#1, #3	*
42	Dbc/b-5	X	-
43	DbM2-1	#1	*
44	DbM3-1	X	X
45	DbM2-7	X	*
46	DbM3-2	X	X
47	DbA-1	X	-
48	DbF-2	X	-
49	Dbc/b-12	X	-
50	Dbc/b-19	X	-
51	Dbc/b-20	X	-

Linhagens cujos resultados apresentam o símbolo (X) foram ativas no bioensaio citotóxico, (-) foram inativas no bioensaio citotóxico. Foram inativas no bioensaio citotóxico mas foram ativas em pelo menos um dos bioensaios realizados em trabalhos anteriores: (#1) anti-Leishmania, (#2) antimicrobiano e (#3) anti-inflamatória. Linhagens com símbolo (*) não foram enviadas para o teste de citotoxicidade por não fornecerem extratos em quantidade suficiente.

A análise da Tabela 6 permite observar que, enquanto 45 dos extratos do meio de cultura das linhagens testadas anteriormente apresentaram atividade citotóxica, apenas 14 mantiveram a atividade após a nova reativação. As primeiras avaliações no bioensaio de atividade citotóxica foram realizadas logo após o isolamento das linhagens, enquanto a análise aqui apresentada foi realizada três anos depois.

Considerando-se que as linhagens ficaram preservadas em geladeira, sem o estresse do ambiente marinho tais como defesa, comunicação, inibição do desenvolvimento de competidores, nutrientes, possivelmente estas linhagens apresentaram perda de sua

viabilidade metabólica, uma vez que não havia mais necessidade/estímulo para produção de certos metabólitos.

As linhagens designadas como DRG1M2 e DRG10M3 foram isoladas de macro-organismo marinho em meio de glicose e posteriormente cultivada em meio de malte 2% e malte 3%, respectivamente. Ambas as linhagens forneceram extratos ativos no bioensaio de atividade citotóxica na primeira avaliação, porém após a reativação as linhagens cultivadas em meio de glicose não mantiveram o potencial citotóxico. As mesmas linhagens cultivadas em meio de malte readquiriram o potencial citotóxico.

4.2 Seleção da linhagem de trabalho

Foram pré-selecionadas as linhagens fúngicas que produziram extratos com potente atividade citotóxica nesta nova avaliação (75 a 100% de inibição do desenvolvimento das linhagens celulares tumorais). São elas: DbM3-1, DbM3-2, DLM2-12, DLM2-18, DLM2-6, DLM3-15, DLM3-3, DLM3-8, DLM3-9, DRF-2, DRG-10-M3, DRG-1-M2, DRM2-4, DRM2-8, DRM3-1 e DRM3-6.

Os extratos brutos foram obtidos a partir do cultivo de cada linhagem em 250 mL de meio de cultura líquido. Após 21 dias de cultura, foram adicionados 250 mL de AcOEt ao meio de cultura. A mistura foi mantida por 2 dias com agitação periódica. O meio de cultura com AcOEt foi filtrado e particionado, a fase aquosa foi descartada e a fase orgânica foi seca em evaporador rotativo. Do extrato seco foram preparadas soluções em MeOH com concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ para análise do seu perfil químico.

Os perfis químicos dos extratos brutos que apresentaram atividade citotóxica foram estabelecidos por HPLC-UV-MS. Após estas análises, o extrato do meio de cultura da linhagem DLM2-12 foi selecionado de acordo com critérios utilizados com êxito no grupo do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, são eles: apresentar picos cromatográficos com espectros de massas (ESI) com relação m/z acima de 200 u.m.a. e espectros de UV com absorções em comprimentos de onda distintos de metabólitos primários.

Os metabólitos produzidos pelo metabolismo primário, como os aminoácidos, açúcares e nucleosídeos, comumente apresentam massa molecular abaixo de 200 u.m.a.. O maior aminoácido, o triptofano (**42**), tem massa de 204 u.m.a.. Além disso, esses metabólitos apresentam uma ou duas absorções no UV, e geralmente em baixos comprimentos de onda. Os aminoácidos tirosina (**40**), fenilalanina (**41**) e triptofano (**42**) apresentam espectros de UV com absorções máximas entre 200 e 230 nm e 250 e 290 nm (BELITZ; GROSH;

SCHIEBERLE, 2009) (Figura 8) e os nucleotídeos purina (**43**) e pirimidina (**44**) apresentam espectros de UV com absorção máxima por volta de 260 nm.

Figura 8 - Espectro de absorção no UV dos aminoácidos: – Fenilalanina, --Tirosina, ···Triptofano.

Fonte: BELITZ; GROSH; SCHIEBERLE, 2009, p. 17.

A Figura 9 exemplifica um cromatograma com substâncias com características de metabólitos secundários.

Figura 9 - a) Cromatograma do extrato bruto do meio de cultura da linhagem DLM2-12 (monitorado com comprimento de onda de 262 nm) e b) espectros de UV e c) espectros de massas (ESI) no modo positivo de picos cromatográficos selecionados.

O extrato bruto obtido a partir do meio de cultura da linhagem designada como DLM2-12 também mostrou-se ativo no bioensaio de atividade citotóxica frente às 3 linhagens celulares, de mama (MDA-MB435), de glioblastoma (SF295) e cólon humano (HCT-8) (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados obtidos no bioensaio de atividade citotóxica para o extrato bruto obtido do meio de cultura da linhagem designada DLM2-12.

Linhagens celulares		
HCT-8 (Cólon humano)	MDA-MB435 (Mama humano)	SF295 (Glioblastoma humano)
MA (95,44%)	MA (97,76%)	MA (100%)

Legenda: MA = muito alta

A cultura em meio sólido da linhagem denominada DLM2-12 foi fotografada nos 3º e 7º dias de incubação (Figura 10) com o objetivo de preservar informações acerca da morfologia da colônia e facilitar a identificação e determinação da pureza das colônias em culturas posteriores.

Figura 10 - Fotografias da linhagem DLM2-12 no 3º dia (a) e 7º dia (b) de incubação.

A linhagem analisada apresentou colônia característica de fungos filamentosos, coloração verde escura, com esporos visíveis dispersos sobre a área crescida e crescimento rápido. Este fungo foi posteriormente identificado como sendo *Penicillium citrinum* pelo grupo da Prof. Dra. Lara Durães Sette na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP.

4.3 Isolamento de citrinina (47) a partir do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 produzido em pequena escala

O extrato bruto do meio de cultura da linhagem DLM2-12 (333 mg) crescida em 250 mL foi analisado por cromatografia em camada delgada.

A avaliação por CCD (Figura 11) indicou que o extrato apresentava compostos com polaridades intermediárias entre o colesterol (45) (muito apolar) e a timidina (46) (muito polar) (Figura 12). Compostos muito apolares geralmente são lipídeos e outras graxas, enquanto compostos muito polares geralmente são açúcares, nucleosídeos, aminoácidos e eventualmente outros componentes do meio de cultura.

Hex/AcOEt 9:1 Hex/AcOEt 7:3 CH₂Cl₂/MeOH 9:1 CH₂Cl₂/MeOH 7:3

a) Ácido fosfomolíbdico

b) Ninidrina

c) Dragendorff

Figura 11 - Fotos das placas cromatográficas reveladas com a) ácido fosfomolibdico, b) ninidrina e c) Dragendorff do extrato bruto do meio de cultura da linhagem DLM2-12 comparado com colesterol (45) e timidina (46).

Sendo: EB = Extrato Bruto C = colesterol T = timidina

Figura 12 - Estruturas químicas: a) do colesterol e b) da timidina.

A análise por CCD mostrou que o extrato apresenta substâncias redutoras, observadas ao serem reveladas com o ácido fosfomolibdico. O extrato (333 mg) foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica gel derivatizada com grupo C₁₈, utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O. Foram coletadas frações de 40 mL ou de acordo com as manchas separadas que ficaram mais visíveis na coluna, caso das frações 4 e 6.

Foram obtidas 9 frações, designadas de DLM2-12-1 a DLM2-12-9. As frações foram analisadas por HPLC-UV-MS. A fração DLM2-12-2 apresentou um bom grau de pureza e foi enviada para análises por RMN de ¹H e ¹³C.

A fração DLM2-12-1 foi submetida a uma separação por HPLC utilizando-se coluna Phenomenex C₁₈. Desta separação foi obtido um grupo de 4 frações (Figura 13), designadas de DLM2-12-1A a DLM2-12-1D.

Figura 13 - Cromatograma do fracionamento de DLM2-12-1 ($\lambda = 254$ nm)

A fração DLM2-12-1D foi novamente fracionada por HPLC, utilizando-se uma coluna Inertsil ODS-3, e forneceu um grupo de 9 frações (Figura 14), designadas de DLM2-12-1D1 a DLM2-12-1D9. As frações foram avaliadas por HPLC-UV-MS.

Figura 14 - Cromatograma do fracionamento de DLM2-12-1D ($\lambda = 254$ nm)

Verificou-se que o mesmo composto isolado na fração DLM2-12-2, oriunda da separação por HPLC utilizando coluna Phenomenex C₁₈, estava presente nas frações DLM2-12-1D4 e DLM2-12-1D5 (Figura 15). A reunião destas frações permitiu a obtenção de 4,7 mg do composto (**47**) puro.

Legenda: ■ - Frações com grau de pureza suficiente para identificação estrutural.

Figura 15 - Fluxograma de isolamento da citrinina (**47**) do extrato bruto do meio de cultura de DLM2-12 cultivado em 250 mL do meio.

Condições da separação 1: Coluna Phenomenex C₁₈, detector de UV = 254 nm, fluxo de 1 mL.min⁻¹ composto da mistura de solventes H₂O/MeCN/MeOH na proporção 50:25:25 e ácido fórmico 0,1%.; condições da separação 2: Coluna Inertsil ODS-3, detector de UV = 254 nm, fluxo de 1 mL.min⁻¹ composto da mistura de solventes H₂O/MeCN/MeOH na proporção 44:28:28 e ácido fórmico 0,1%.

Como pode ser observado no esquema de isolamento (Figura 15), a primeira separação foi realizada em coluna de fase reversa utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O tendo um rendimento de apenas cerca de 43%. A baixa eficiência dessa separação pode estar relacionada com a grande quantidade de compostos de menor polaridade presentes no extrato, os quais foram eluídos tardiamente.

4.3.1 Identificação estrutural do composto majoritário (Citrinina (47)) isolado do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 produzido em pequena escala

A análise dos dados espectroscópicos do composto presente nas frações DLM2-12-2, DLM2-12-1D4 e DLM2-12-1D5 indicou tratar-se da citrinina (47), já mencionada na literatura como metabólito encontrado em espécies fúngicas dos gêneros *Penicillium*.

O espectro de massas em modo ESI (Figura 16) apresenta o íon $[M+H]^+$ em $m/z = 251$ e o íon $[M+Na]^+$ em $m/z = 273$ o que indica que a massa do composto é 250 u.m.a.. No espectro de UV (Figura 16) observa-se a presença de três bandas de absorção nos comprimentos de onda 213, 251 e 317.

Figura 16 - Espectros no UV e de massas da citrinina (47).

A identidade do composto isolado foi confirmada como sendo a citrinina (47) após a análise de seus dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C (Figura 17) comparados aos dados publicados na literatura por Devi et al. (2009) e por Hajjaj et al. (1999).

49

Tabela 8 - Comparação dos valores de RMN de ^{13}C e ^1H para o composto citrinina (**47**).

Carbono	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	$^1\text{H}^{\text{c}}$	$^1\text{H}^{\text{d}}$
1	162,8	162,9	8,23 (s, 1H)	8,18 (s, 1H)
2	81,8	81,8	4,77 (m, 3H)	4,72 (m, 3H)
4	34,5	34,7	2,98 (m, 1H)	2,92 (m, 1H)
4 a	139,0	139,2	-	-
5	123,1	123,2	-	-
6	183,8	183,9	-	-
7	100,4	100,4	-	-
8	177,2	177,3	-	-
8 a	107,5	107,5	-	-
9	18,4	18,3	1,34 (d, $J = 6,72$ Hz, 3H)	1,29 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H)
10	9,5	9,6	2,02 (s, 3H)	1,96 (s, 3H)
11	18,5	18,4	1,23 (d, $J = 7,08$ Hz, 3H)	1,17 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H)
12	174,5	174,7	-	15,86 (s, 1H)

^a100 MHz, CDCl_3 ; ^b400 MHz, CDCl_3 ; ^c100 MHz, CDCl_3 ; ^d400 MHz, CDCl_3

^bHajjaj et al. (1999), ^dDevi et al. (2009)

Figura 18 - Estrutura numerada da citrinina (**47**)

A citrinina (**47**) é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monascus* (VIVAN, 2002). Foi isolada pela primeira vez em 1931 a partir da espécie *Penicillium citrinum* e estudada com o propósito de ser empregada como antibiótico. Entretanto, a citrinina (**47**) apresentou atividade nefrotóxica.

4.4 Produção do extrato bruto do meio de cultura da linhagem fúngica DLM2-12 em média escala

O cultivo em maior volume da linhagem DLM2-12 foi realizado em 32 frascos do tipo Schott, contendo cada um deles 250 mL do meio de cultura. Após o crescimento, o meio de cultura foi extraído com igual quantidade de AcOEt. A extração do meio de cultura, seguida de filtração e partição líquido-líquido, resultou na obtenção de 2,01 g do extrato bruto seco.

Para uma limpeza preliminar da amostra foi realizada uma partição em Hexano/MeOH 1:1, que resultou na obtenção da fração hexânica (0,3 g), designada como DLM2-12-H, e na fração metanólica (1,50 g), designada como DLM2-12-M.

A análise da fração DLM2-12-H por HPLC-UV-MS mostrou tratar-se de uma mistura essencialmente lipofílica, com sinais de tempo de retenção acima de 20 min (Figura 19), constituída de compostos com poucas e semelhantes absorções na região do ultravioleta, embora com tempos de retenção diferentes. Essa fração foi reservada e deu-se prioridade à investigação da fração DLM2-12-M.

Figura 19 - Cromatograma e espectros de absorção na região do ultravioleta ($\lambda = 268$ nm) da fração DLM2-12-H

4.4.1 Fracionamento da fração DLM2-12-M por cromatografia por exclusão de tamanho – Sephadex-LH20

A fração DLM2-12-M foi submetida à separação por cromatografia por exclusão de tamanho em coluna Sephadex-LH20 eluída com MeOH. Foram coletadas frações de cerca de 8 mL. Após a avaliação destas frações por CCD e reunião das frações semelhantes, foram obtidas seis novas frações designadas de DLM2-12-MA a DLM2-12-MF (Figura 20). Obteve-se rendimento de 88%, o que evidenciou que este tipo de cromatografia é eficiente para a separação do extrato do meio de cultura de DLM2-12 do que a cromatografia em fase reversa realizada no cultivo de pequena escala.

As frações resultantes foram avaliadas por CCD (Figura 21), utilizando-se cromatofolhas de sílica-gel, sistema eluente composto da mistura de CH₂Cl₂/MeOH na proporção 9:1 e revelada com ácido fosfomolibdico e luz ultravioleta (254 nm).

Figura 20 - Fluxograma de fracionamento por cromatografia em coluna Sephadex da fração DLM2-12-M

Figura 21 - Avaliação por CCD das frações obtidas da separação da fração DLM2-12-M por cromatografia em coluna Sephadex LH-20.

Eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1, revelada com ácido fosfomolibdico e luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

As frações DLM2-12-MA e DLM2-12-MF apresentaram pouca massa e foram reservadas. Deu-se prioridade ao estudo das demais frações.

As frações de DLM2-12-MB a DLM2-12-ME foram reavaliadas em bioensaios de atividade citotóxica (Tabela 9). Observou-se que a fração DLM2-12-ME apresentou o melhor resultado, com potente atividade na inibição do crescimento celular da linhagem tumoral de cólon humano e atividade moderada para glioblastoma humano.

Devido a tais resultados, essa fração teve prioridade para separação, purificação e identificação de seus compostos. As outras frações, fracamente ativas, também foram separadas e algumas purificadas de acordo com a disponibilidade de tempo e disponibilidade de massa das frações obtidas.

Tabela 9 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das frações DLM2-12-MB a DLM2-12-ME, obtidas por cromatografia em coluna Sephadex-LH20, em três linhagens tumorais testadas na concentração de 50 µg/mL.

Amostras	Linhagens celulares		
	HCT-8 cólon humano	MDA-MB435 mama humano	SF295 glioblastoma humano
DLM2-12-MB	PA (44,67%)	PA (49,07%)	PA (31,22%)
DLM2-12-MC	PA (24,17%)	PA (3,71%)	PA (34,64%)
DLM2-12-MD	Mo (52,22%)	Mo (50,81%)	PA (37,20%)
DLM2-12-ME	MA (82,24%)	PA (14,04%)	Mo (73,76%)

Legenda: PA – Pouca atividade, Mo – Moderada, MA – Muita Atividade.

4.4.2 Esquema geral da purificação dos compostos presentes nas frações obtidas por cromatografia por exclusão de tamanho

As frações obtidas da separação em coluna Sephadex LH-20 foram purificadas através uma ou mais etapas cromatográficas, utilizando-se colunas pré-empacotadas de sílica-gel e sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila ou por HPLC-UV utilizando-se colunas de sílica-gel derivatizada comm grupo C₁₈.

A tabela 10 relaciona as frações purificadas aos compostos puros obtidos, bem como os tempos de retenção, a massa molecular e absorções no UV obtidos da análise por HPLC-UV-MS, a estrutura química, a quantidade em massa de cada um deles e os resultados obtidos nos bioensaios de atividade biológica para a emodina e citreorseína.

Tabela 10 - Compostos puros obtidos das frações purificadas.

Fração	t _R	m/z^+ ; m/z^-	UV	Composto	Estrutura	Massa	Bioensaios
DLM2-12-ME2	18,331	287; 285	221,3; 287,4(largo)	Citreorseína (57)		14,7 mg	<p>Citotóxico (CI₅₀ - µg.mL⁻¹) HCT-116 – 19,14</p> <p>Anti-Leishmania Morte de 50% do parasita em concentração de 150 µg.ml⁻¹</p> <p>Anti-viral (% de inibição) BVDV – 39 % HSV1 – 44 % aMPV – 44 %</p>

DLM2-12-ME6	22,134	271; 269	221,3; 287,4(largo)	Emodina (61)		15,4 mg	Citotóxico (CI ₅₀ - µg.mL ⁻¹) HL-60 – 5,62 HCT-116 – 6,50 SF295 – 24,22 OVCAR-8 – 18,22 K562 – 8,47 HCT-8 – 9,71 Anti-viral (% de inibição) BVDV – 42 % HSV1 – 44 % aMPV – 68 % Hepatite C
DLM2-12-MB4A	21,906	298; 296	223,6; 282,7	Penicilenol A (54)		2,3 mg	
DLM2-12-MB1L5 DLM2-12-MD2E5 DLM2-12-MD2D6A DLM2-12-MC24E (DLM2-12-MBCD-I)	14,041	287; 285	217,7; 249,6; 316,0	Quinolactacina C (50)		2,0 mg 1,1 mg 1 mg 2 mg Total = 6,1 mg	

DLM2-12-MB1L4 DLM2-12-MD2E4 DLM2-12-MB2C DLM2-12-MC24F DLM2-12-MB1B (DLM2-12-MBCD-II)	13,730	271; 269	235,4(largo); 313,6(largo)	Quinolactacina E (51) + Quinolactacina B (53)		1,3 mg 1,5 mg 8,0 mg 1,3 mg 6,1 mg Total = 18,2 mg	
DLM2-12-MD2A2	21,453	253; 285	248,4(largo) 291,0(largo) 355,4(largo)	Não identificado (pouca massa)		0,8 mg	
DLM2-12-MD2E7	16,495	293; 291	216,6; 367,1	Grau de pureza insuficiente		2,8 mg	
DLM2-12-MD2D7A	21,315	269; 299	228,1; 262,6; 294,6; 285,1	Não identificado (pouca massa)		0,5 mg	
DLM2-12-MB2B	12,515	257; 255 (baixo)	213,0; 255,5; 314,8	Quinolactacina B (53)		1,0 mg	

4.4.2.1 Purificação da Fração DLM2-12-MB

A fração DLM2-12-MB obtida da separação por cromatografia em coluna Sephadex-LH20 foi analisada por HPLC-UV-MS. Por apresentar cromatograma com poucos picos (Figura 22) foi submetida à separação por HPLC acoplado a detector de UV. Desta separação (Figura 23) obteve-se 5 frações denominadas de DLM2-12-MB1 a DLM2-12-MB5, com rendimento em massa de 85,2% em massa.

Figura 22 - Cromatograma de a) UV (265 nm) e b) MS (modo positivo) da fração DLM2-12-MB

Figura 23 - Cromatograma de separação por HPLC-UV da fração DLM2-12-MB monitorado no comprimento de onda de 270 nm.

Condições da separação: Coluna Inertsil ODS-SP, detector de UV = 270 e 340 nm, fluxo de 1 mL.min⁻¹, eluentes H₂O:MeCN:MeOH na proporção 30:35:35 + ácido fórmico 0,1%.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações DLM2-12-MB1, DLM2-12-MB2 e DLM2-12-MB4 precisavam ser repurificadas, pois não apresentavam grau de pureza suficiente para a identificação estrutural. As frações DLM2-12-MB3 e DLM2-12-MB5 foram

reservadas pois apresentaram cromatogramas complexos (muitos picos) e pouca quantidade de massa.

As frações DLM2-12-MB1, DLM2-12-MB2 e DLM2-12-MB4 foram purificadas por HPLC acoplado a um detector de UV, utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupo C₁₈. Para tal, alterou-se a composição do solvente de forma a obter maior polaridade na eluição, para menor retenção dos picos na coluna e consequente melhora da separação dos picos.

Da fração DLM2-12-MB1 obteve-se 3 novas frações denominadas DLM2-12-MB1A, DLM2-12-MB1B e DLM2-12-MB1limpeza, esta última recolhida nos intervalos dos picos majoritários, com rendimento em massa de 67,7%.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que a fração DLM2-12-MB1A, mesmo depois de repurificada, apresentou grau de pureza insuficiente para identificação estrutural. Por apresentar massa de apenas 1 mg tornou-se inviável uma nova purificação. A fração DLM2-12-MB1B apresentou um bom grau de pureza e pôde ser analisada por RMN.

A fração de limpeza foi analisada por HPLC-UV-MS e apresentou picos interessantes. Esta fração foi novamente purificada por HPLC-UV e obteve-se 5 novas frações denominadas de DLM2-12-MB1L1 a DLM2-12-MB1L5, com rendimento em massa de 37,6%. A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações DLM2-12-MB1L4 e DLM2-12-MB1L5 apresentaram um bom grau de pureza. Estas frações foram analisadas por RMN para identificação de suas estruturas químicas.

Da fração DLM2-12-MB2 obteve-se 4 novas frações denominadas DLM2-12-MB2A, DLM2-12-MB2B, DLM2-12-MB2C e DLM2-12-MB2limpeza, esta última recolhida nos intervalos dos picos majoritários. A separação apresentou rendimento em massa de 70,8%.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que a fração DLM2-12-MB2A apresentou alta complexidade (muitos picos) e não era viável uma nova purificação desta fração. As frações DLM2-12-MB2B e DLM2-12-MB2C apresentaram bom grau de pureza e foram analisadas por RMN para identificação de suas estruturas químicas.

Da fração DLM2-12-MB4 obteve-se 2 novas frações denominadas DLM2-12-MB4A e DLM2-12-MB4limpeza, esta última recolhida nos intervalos anterior e posterior ao pico majoritário. O rendimento em massa da separação foi de 66,7%.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que a fração DLM2-12-MB4A apresentou bom grau de pureza. Esta fração foi analisada por RMN para identificação de sua estrutura química.

4.4.2.2 Purificação da Fração DLM2-12-MC

A fração DLM2-12-MC foi analisada por HPLC-UV-MS e, por apresentar um cromatograma complexo (Figura 24), com compostos de polaridades variadas, foi submetido a fracionamento em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila.

Este fracionamento teve como objetivo a separação entre compostos mais polares e compostos menos polares, já que a coluna utilizada tem fase estacionária de polaridade intermediária.

Figura 24 - Cromatograma de a) UV (262 nm) da fração DLM2-12-MC.

Desta separação obteve-se 5 frações denominadas de DLM2-12-MC1 a DLM2-12-MC5, com rendimento em massa de 97,3%. As frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-MS. A fração DLM2-12-MC1 apresentou-se ainda bastante complexa e foi submetida a uma nova separação em coluna pré-empacotada com sílica-gel. As frações DLM2-12-MC2 a DLM2-12-MC4 apresentaram perfil químico semelhante e, por este motivo, foram reunidas. A fração resultante desta reunião foi submetida a uma nova separação por HPLC-UV, utilizando coluna de sílica-gel derivatizada C₁₈. A fração DLM2-12-MC5 foi reservada por apresentar pouca massa.

Da fração DLM2-12-MC1 obteve-se 6 novas frações denominadas de DLM2-12-MC1A a DLM2-12-MC1F. A separação teve rendimento em massa de 95,4%. As frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-MS. Os espectros de UV obtidos a partir da fração DLM2-12-MC1C apresentaram picos com absorção em vários comprimentos de onda, característicos de compostos com mais de um grupo conjugado, e os espectros de massas (ESI) no modo positivo apresentaram compostos com relação m/z 378 e 380. As demais frações foram reservadas, porém não houve tempo suficiente para continuidade de seus fracionamentos.

Em busca realizada na base de dados Dictionary of Natural Products (DNP), disponível no endereço <http://dnpc.chemnetbase.com>, verificou-se que os valores de m/z 378 e 380 são atribuídos aos compostos penicitrinona B (**48**) e A (**49**) (Figura 25), respectivamente, isolados a partir do gênero *P. citrinum*. Com o objetivo de isolar e confirmar a presença de tais compostos, a fração DLM2-12-MC1C foi submetida à separação por HPLC.

Figura 25 - Estrutura química de a) penicitrinona B (**48**) e b) penicitrinona A (**49**).

Da fração DLM2-12-MC1C obteve-se 8 novas frações denominadas DLM2-12-MC1C1 a DLM2-12-MC1C7 e DLM2-12-MC1Cerle, esta última recolhida nos intervalos anterior e posterior ao pico majoritário, com rendimento em massa de 60,7%.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações resultantes não apresentavam grau de pureza suficiente para identificação estrutural de seus constituintes. A quantidade de massa reduzida das frações obtidas inviabilizou uma nova purificação das frações.

Da fração DLM2-12-MC24 obteve-se 7 novas frações denominadas DLM2-12-M24A a DLM2-12-MC24F e DLM2-12-MC24erle, esta última recolhida nos intervalos anterior e posterior ao pico majoritário, com rendimento em massa da separação foi de 95 %.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações resultantes não apresentavam grau de pureza suficiente para identificação estrutural de seus constituintes. Não foi possível repurificar as frações por motivo de tempo.

4.4.2.3 Purificação da Fração DLM2-12-MD

A fração DLM2-12-MD foi analisada por HPLC-UV-MS e, por apresentar um cromatograma complexo (Figura 26), com compostos de polaridades variadas, foi submetido a fracionamento em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupo cianopropila.

Desta separação obteve-se 7 frações denominadas de DLM2-12-MD1 a DLM2-12-MD7, com rendimento em massa de 98,8%.

Figura 26 - Cromatograma de a) UV (273 nm) da fração DLM2-12-MD.

As frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-MS. A fração DLM2-12-MD2 apresentou cromatograma de UV ainda complexo, com picos de polaridades variadas e por tal motivo foi submetida a uma nova separação em coluna pré-empacotada de sílica-gel. As frações DLM2-12-MD3 a DLM2-12MD6 foram reunidas por apresentarem similaridade e submetida a fracionamento em coluna pré-empacotada de sílica-gel.

Da fração DLM2-12-MD2 obteve-se 6 frações denominadas de DLM2-12-MD2A a DLM2-12-MD2F, com rendimento em massa de 97,8%. Estas frações foram analisadas por HPLC-UV-MS. O cromatograma no UV obtido para a fração DLM2-12-MD2A apresentou picos bem definidos e fáceis de serem purificados. A fração foi submetida à uma nova purificação por HPLC-UV, utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada C₁₈.

As frações DLM2-12-MD2D e DLM2-12MD2E apresentaram cromatogramas não tão simples, mas, por apresentarem massa suficiente para uma nova separação, ambos também foram submetidos à separação por HPLC. A fração DLM2-12-MD2B apresentou um bom rendimento em massa, porém seu cromatograma apresentou elevado número de picos. Essa fração foi reservada, mas não houve tempo suficiente para continuar seu fracionamento. As demais frações apresentaram pouca massa e cromatogramas complexos, portanto foram reservadas.

Da fração DLM2-12-MD2A obteve-se 3 novas frações denominadas DLM2-12-MD2A1 a DLM2-12-MD2A3, com rendimento em massa de 56 %. A análise por HPLC-UV-MS mostrou que a fração DLM2-12-MD2A2 apresentou grau de pureza suficiente para identificação estrutural. A fração foi submetida à análise por RMN.

Da fração DLM2-12-MD2D obteve-se 9 novas frações denominadas DLM2-12-MD2D1 a DLM2-12-MD2D8 e DLM2-12-MD2Derle, esta última recolhida entre os picos principais, com rendimento em massa de 56,7 %.

A fração DLM2-12-MD2D apresentou cromatograma complexo. A separação desta forneceu as frações DLM2-12-MD2D1 a DLM2-12-MD2D8 monitoradas em diferentes comprimentos de onda para uma melhor detecção de seus constituintes (Figura 27).

Figura 27 - Cromatograma de separação por HPLC-UV da fração DLM2-12-MD2D monitorado nos comprimentos de onda de A) 254 nm e B) 286 nm.

Condições da separação: Coluna Inertsil ODS-3, detector de UV = 254 e 286 nm, fluxo de 1 mL.min⁻¹, gradiente linear de 10 a 100% de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1 + 0,1% de ácido fórmico) em H₂O + 0,1% de ácido fórmico, durante 30 minutos + solução de 10% do solvente orgânico acidificado por 10 min para reequilibrar a coluna na condição inicial.

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações DLM2-12-MD2D6 e DLM2-12-MD2D7 apresentavam picos fáceis de serem purificados. As frações foram submetidas à nova

purificação por HPLC-UV utilizando coluna de sílica-gel derivatizada com C₁₈. As demais frações não apresentaram massa suficiente para uma nova purificação.

Da fração DLM2-12-MD2D6 obteve-se 2 novas frações denominadas DLM2-12-MD2D6A e DLM2-12-MD2D6erle, a última recolhida antes e depois do pico principal, com rendimento em massa de 95 %. A análise por HPLC-UV-MS mostrou que a fração DLM2-12-MD2D6A apresentou grau de pureza suficiente para identificação estrutural. A fração foi submetida à análises por RMN.

Da fração DLM2-12-MD2D7 obteve-se 3 novas frações denominadas DLM2-12-MD2D7A, DLM2-12-MD2D7B e DLM2-12-MD2D7erle, a última recolhida entre os picos principais, com rendimento em massa 88,5 %. A análise por HPLC-UV-MS mostrou que a fração DLM2-12-MD2D7A apresentou grau de pureza suficiente para identificação estrutural. A fração foi submetida à análises por RMN.

Da fração DLM2-12-MD2E obteve-se 10 novas frações denominadas DLM2-12-MD2E1 a DLM2-12-MD2E9 e DLM2-12-MD2Eerle, a última recolhida entre os picos principais, com rendimento em massa de 98,9 %. A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações DLM2-12-MD2E4, DLM2-12-MD2E5 e DLM2-12-MD2E7 apresentaram grau de pureza suficiente para identificação estrutural. As frações foram submetidas à análises por RMN.

Da fração DLM2-12-MD36 obteve-se 7 novas frações denominadas de DLM2-12-MD36A a DLM2-12-MD36G, com rendimento em massa de 94,7 %. A análise das frações obtidas por HPLC-UV-MS mostrou que as frações ainda apresentavam cromatogramas complexos. Não houve tempo suficiente para novas separações.

4.4.2.4 Purificação da Fração DLM2-12-ME

A fração DLM2-12-ME foi analisada por HPLC-UV-MS e, por apresentar cromatograma com poucos picos (Figura 28), foi submetida à separação por HPLC acoplado a detector de UV. Desta separação (Figura 29) obteve-se 7 novas frações denominadas de DLM2-12-ME1 a DLM2-12-ME7, com rendimento em massa de 80,4%

Figura 28 - Cromatograma de a) UV (245 nm) e b) MS (modo positivo) da fração DLM2-12-ME

Figura 29 - Cromatograma de separação por HPLC-UV da fração DLM2-12-ME monitorado no comprimento de onda de 270 nm.

Coluna Inertsil ODS-SP, detector de UV = 270 e 340 nm, fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, eluentes $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{MeOH}$ na proporção 30:35:35 + ácido fórmico 0,1%.

A análise por HPLC-UV-MS das frações DLM2-12-ME2 e DLM2-12-ME6 mostrou que após a separação por HPLC estas frações apresentaram grau de pureza suficiente para identificação de suas estruturas químicas.

4.4.3 Identificação estrutural dos compostos isolados a partir do meio de cultura em média escala da linhagem *P. citrinum* DLM2-12

4.4.3.1 Identificação estrutural do composto presente nas frações DLM2-12-MB1L5, DLM2-12-MD2D6A, DLM2-12-MD2E5 e DLM2-12-MC24E (DLM2-12-MBCD-I)

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações DLM2-12-MB1L5, DLM2-12-MD2D6A, DLM2-12-MD2E5 e DLM2-12-MC24E apresentavam pico de um único composto majoritário, com espectro de absorção na região do UV praticamente idênticos e tempos de retenção muito próximos com um mesmo sinal de íon quasi-molecular. Por tais motivos essas frações foram reunidas e analisadas em conjunto. A fração reunida será doravante designada como DLM2-12-MBCD-I.

O espectro no UV (Figura 30) indicou absorções nos comprimentos de onda com $\lambda_{\max}$ em 217,7, 249,6 e 316,0 nm. O espectro de massas no modo ESI apresentou íon $[M+H]^+$ em $m/z = 287$ (no modo positivo) e íon $[M-H]^-$ em $m/z = 285$ (no modo negativo), o que nos permitiu identificar a massa do composto como sendo igual a 286 u.m.a.

Figura 30: Espectros no a) UV e de massas no modo b) positivo e c) negativo do composto majoritário presente nas frações DLM2-12-MBCD-I.

Foram analisados os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 31).

Figura 31 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I.

O espectro de RMN de ^1H da fração DLM2-12-MBCD-I apresentou sinais multipletos atribuídos a hidrogênios em carbonos sp^2 em δ 8,27 (sobrepuesto ao sinal em δ 8,22), δ 7,87 e δ 7,83 (sobrepostos) e um sinal triplete em δ 7,51. Um sinal singlete em δ 8,22, característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de amida, pode ser observado sobreposto ao sinal em δ 8,27. Um sinal singlete largo é observado em δ 6,98, característico de hidrogênio de hidroxila, e sinal singlete em δ 4,05 característico de hidrogênio de metila ligada a átomos muito eletronegativos, como o nitrogênio ou oxigênio.

São observados ainda sinais de hidrogênios característicos de cadeia alquila, são eles: sinal dubleto em δ 1,13 ($J = 6,6$ Hz) atribuído a hidrogênios de metila vizinha a grupo metino, sinal em δ 2,26 atribuído a hidrogênio metínico, sinais multipletos em δ 0,89 e em δ 0,84 atribuídos a hidrogênios metilênicos e um sinal triplete em δ 0,74 ($J = 7,6$ Hz) atribuído a hidrogênios de metila vizinha a um grupo metilênico.

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C e HSQC (**Figura 4**, anexo) permitiu observar sinais em δ 171,8 e em δ 166,6 característicos de carbonila de ácido carboxílico ou amida, sinal em δ 88,7 típico de carbono ligado a hidroxila; quatro sinais atribuídos a carbonos quaternários do tipo sp^2 δ 109,1, δ 128,7, δ 141,6 e δ 163,6; quatro sinais atribuídos a carbonos metínicos com hibridização sp^2 de anel aromático em δ 117,4, δ 124,9, δ 126,0 e δ 133,0; quatro sinais atribuídos a carbonos com hibridização sp^3 externos aos anéis fusionados em δ 11,6 (metila), δ 12,6 (metila), δ 23,5 (metileno) e δ 40,9 (metino).

Então foi possível verificar que o composto possui 16 átomos de carbono, 18 átomos de hidrogênio, 2 átomos de N (um ligado à metila e o outro ligado ao hidrogênio em δ 8,22) e 3 átomos de oxigênio (um ligado ao hidrogênio em δ 6,98 e dois de carbonilas). A fórmula molecular pôde ser determinada como sendo $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$ de acordo com a massa de 286 u.m.a..

A análise do espectro COSY (**Figura 3**, anexo) mostra correlações entre os hidrogênios metínicos em δ 8,27 e δ 7,51 e entre os hidrogênios metínicos em δ 7,51 e δ 7,83, o que indica tratar-se de hidrogênios vizinhos. Levando-se em conta que estes hidrogênios devem ser de carbonos sp^2 de um anel aromático, tais dados indicam a presença de um anel benzênico 1,2-dissubstituído.

A análise do espectro HMBC (**Figura 5**, anexo) permite observar correlações entre os carbonos em δ 128,7 e δ 117,4 e o hidrogênio em δ 7,51, entre os carbonos em δ 126,0 e δ 141,6 e o hidrogênio em δ 7,83, entre os carbonos em δ 128,7 e δ 124,9 e o hidrogênio em δ 7,87 e entre o carbono em δ 133,0 e o hidrogênio em δ 8,27. Tais observações sugerem a seguinte semi-estrutura:

A análise do espectro de HMBC permite ainda observar correlações entre os carbonos em δ 163,6, δ 109,1 e δ 171,8 e o hidrogênio em δ 8,27. Há também correlações entre os carbonos em δ 163,6 e δ 141,6 e o hidrogênio da metila em δ 4,05. A posição dos carbonos

em δ 128,7 e em δ 141,6 foi sugerida levando em consideração a proximidade entre carbonos blindados e desblindados, assim o carbono em δ 117,4 deve ficar próximo do carbono em δ 141,6, esta posição pode ser confirmada pela presença do nitrogênio que torna os carbonos próximos mais desblindados. Estas correlações sugerem a seguinte semi-estrutura:

Observa-se também correlações no espectro COSY entre os hidrogênios com δ 0,74 e δ 0,84 e 0,89, entre os hidrogênios δ 0,84 e 0,89 e os hidrogênios em δ 1,13 e em δ 2,26 e entre o hidrogênio em δ 1,13 e o hidrogênio em δ 2,26 o que indica outro sistema de spins.

As correlações observadas no espectro HMBC entre o carbono em δ 40,9 e os hidrogênios em δ 0,74, δ 1,13, δ 0,84 e 0,89, entre o carbono em δ 23,5 e os hidrogênios em δ 0,74 e δ 1,13, entre o carbono em δ 12,6 e os hidrogênios em δ 0,84 e 0,89 e entre o carbono em δ 88,7 e o hidrogênio em δ 1,13 sugerem a presença da cadeia carbônica indicada a seguir.

Os deslocamentos químicos dos carbonos em δ 88,7, δ 163,6 e δ 109,1 sugerem que o último ciclo da estrutura fecha-se através do grupo amida. Então, a estrutura final e as atribuições de seus sinais de ¹H e ¹³C pôde ser determinada (Figura 32).

Figura 32 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I.

A Tabela 11 e as Figuras 33 e 34 apresentam os deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e os esquemas de correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I.

Figura 33 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I.

Figura 34 - Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I.

Tabela 11 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-I (Quinolactacina C) (**50**).

	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ (HSQC)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ (mult, J/Hz, integral)	COSY ^c	HMBC ^d
1	166,6	-	-	-
2	-	8,22 (s, 1H)	-	-
3	88,7	-	-	H1'-Me
3-OH	-	6,98 (s, 1H)	-	-
3 a	163,6	-	-	H8, H4-Me
4-Me	34,9	4,06 (s, 3H)	-	-
4 a	141,6	-	-	H8, H4-Me, H6
5	117,4	7,87 (m, 1H)	-	H7
6	133,0	7,83 (m, 1H)	H7	H8
7	124,9	7,51 (m, 1H)	H6, H8	H5
8	126,0	8,27 (m, 1H)	H7	H6
8 a	128,7	-	-	H5, H7
9	171,8	-	-	H8
9 a	109,1	-	-	H8
1'	40,9	2,26 (s, 1H)	-	H3', H1'-Me, H2'
1'-Me	12,6	1,13 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	H2'	H2'
2'	23,5	0,89 (m, 1H) e 0,84 (m, 1H)	H3', H1'-Me	H3', H1'-Me
3'	11,6	0,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H)	H2'	-

^a100 MHz, DMSO- d_6 ; ^b400 MHz, DMSO- d_6 ; ^{c,d}DMSO- d_6

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, comparados aos dados já publicados por Takahashi et al. (2000b) (Tabela 12) e a massa molecular já determinada permitiram identificar o composto presente nas frações DLM2-12-MB1L5, DLM2-12-MD2D6A, DLM2-12-MD2E5 e DLM2-12-MC24E como sendo a quinolactacina C (**50**) (Figura 35).

Tabela 12 - Estudo comparativos dos valores de RMN de ^{13}C e ^1H para o composto Quinolactacina C (**50**) solubilizada em $\text{DMSO}-d_6$.

Carbono	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^1\text{H}^c$	$^1\text{H}^d$
1	166,6	166,3	-	-
2	-	-	8,22 (s, 1H)	8,19 (s, 1H)
3	88,7	88,4	-	-
3-OH	-	-	6,98 (s, 1H)	6,93 (s, 1H)
3 a	163,6	163,3	-	-
4-Me	34,9	34,6	4,06 (s, 3H)	4,05 (s, 3H)
4 a	141,6	141,4	-	141,4
5	117,4	117,2	7,87 (m, 1H)	7,87 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)
6	133,0	132,7	7,83 (m, 1H)	7,82 (dd, $J = 8,4; 6,8$ Hz, 1H)
7	124,9	124,6	7,51 (m, 1H)	7,50 (dd, $J = 7,2; 6,8$, 1H)
8	126,0	125,7	8,27 (m, 1H)	8,26 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H)
8 a	128,7	128,5	-	128,5
9	171,8	171,4	-	171,4
9 a	109,1	108,8	-	108,8
1'	40,9	40,7	2,26 (s, 1H)	2,25 (m, 1H)
1'-Me	12,6	12,2	1,13 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H)	1,13 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H)
2'	23,5	23,3	0,89 (m, 1H) e 0,84 (m, 1H)	0,83 (m, 1H) e 0,89 (m, 1H)
3'	11,6	11,3	0,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H)	0,72 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H)

^a100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; ^b100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; ^c400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; ^d400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$

^{b,d}Takahashi et al. (2000b)

Figura 35 - Estrutura química da Quinolactacina C (**50**).

No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar que os sinais atribuídos aos carbonos da cadeia ligada aos anéis fusionados apresentam-se duplicados com sinais de valores muito próximos. Tal observação leva a crer que há uma mistura composta de diastereoisômeros da quinolactacina C com centros estereogênicos nos carbonos quirais δ 88,7 e δ 40,9.

Takahashi et al (2000a) isolaram a quinolactacina C (**50**) a partir do fungo *Penicillium* sp. obtido de larvas da mariposa *Margaronia pyloalis* Welker e avaliaram a atividade biológica do composto em ensaio antimicrobiano com resultado positivo, pelo método de diluição, contra *Aspergillus niger* ATCC 9642. Clark et al (2006) isolaram a quinolactacina C (**50**) a partir da fermentação de uma linhagem de *Penicillium citrinum* obtido de uma amostra de solo.

4.4.3.2 Identificação estrutural do composto presente nas frações DLM2-12-MB1B, DLM2-12-MB1L4, DLM2-12-MB2C, DLM2-12-MD2E4 e DLM2-12-MC24F (DLM2-12-MBCD-II)

A análise por HPLC-UV-MS mostrou que as frações DLM2-12-MB1B, DLM2-12-MB1L4, DLM2-12-MB2C, DLM2-12-MD2E4 e DLM2-12-MC24F apresentavam pico de um único composto majoritário, com espectro de absorção na região do UV praticamente idênticos e um mesmo sinal de íon quasi-molecular. Por tais motivos essas frações foram reunidas e analisadas em conjunto. A fração reunida será doravante designada como DLM2-12-MBCD-II.

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais obtidos para a fração DLM2-12-MBCD-II mostrou tratar-se de uma mistura de quinolactacinas. O composto majoritário, a quinolactacina B (**53**), nesta fração também estava presente na fração DLM2-12-MB2B e sua identificação estrutural será discutida no próximo sub-item (4.4.3.3). O composto minoritário, a quinolactacina E (**51**), é inédito na literatura.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 36) apresentam os sinais atribuídos à quinolactacina B (**53**) (●) e à quinolactacina E (**51**) (■).

Figura 36 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II.

No espectro de RMN de ^1H é possível observar sinais com deslocamentos químicos em δ 8,26 (dubleto, $J = 8,16$ Hz), em δ 7,82 (multiplete) e em δ 7,48 (multiplete) atribuídos aos hidrogênios de anel aromático. O sinal em δ 8,13 (singleto) pode ser atribuído a um hidrogênio de grupo amida e o sinal em δ 4,82 e em δ 3,84 (singleto) foram atribuídos a hidrogênios próximos a átomos muito eletronegativo, tal como nitrogênio ou oxigênio.

Outro conjunto de sinais observados em δ 0,65 (triplete, $J = 7,2$ Hz e 7,68 Hz), em δ 0,87 e 0,83 (multipletos sobrepostos), em δ 1,20 (triplete, $J = 7,2$ Hz e 7,68 Hz), em δ 1,40 e em δ 1,60 (multipletos) e em 2,18 (multiplete) é atribuído a hidrogênios de cadeia carbônica saturada.

No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar sinais em δ 171 e em δ 168,6 atribuídos a carbonos de carbonilas. Observa-se sinais em δ 164,4 e em δ 141,4 atribuídos a carbonos CH olefínicos próximos a átomos muito eletronegativos; sinais em δ 132,7, em

δ 128,2, em δ 126,1, em δ 124,5, em δ 117,3 e em δ 110,5 atribuídos a carbonos olefínicos de anel aromático.

Os sinais em δ 59,1 e em δ 36 podem ser atribuídos a carbonos saturados (sp^3) próximos a átomo muito eletronegativos. Os sinais da cadeia carbônica saturada são observados em δ 27,5, em δ 21,0, em δ 12,1 e em δ 11,7.

O espectro de HSQC (**Figura 9**, anexo) permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 0,65 e em δ 1,20 aos carbonos sobrepostos em δ 11-12, os hidrogênios em δ 0,83-0,87, em δ 1,40 e 1,60, em δ 2,18, em δ 3,84, em δ 7,48, em δ 7,82 e em δ 8,26 podem ser correlacionados aos carbonos em δ 21,0, em δ 27,5, em δ 36,3, em δ 36,0, em δ 124,5, em δ 117,3 e 124,5 e em δ 126,1, respectivamente.

De acordo com as análises realizadas foi possível verificar que o composto possui 17 átomos de carbono, 20 átomos de hidrogênio, 2 átomos de nitrogênio (um ligado ao carbono metílico em δ 36,0 e outro ligado ao hidrogênio em δ 8,13) e 2 átomos de oxigênio de carbonilas. A fórmula molecular pôde ser determinada como sendo $C_{17}H_{20}N_2O_2$.

A análise dos espectros bidimensionais foram realizadas apenas para a cadeia lateral, visto que a análise dos anéis fusionados de quinolactacina foi realizada no sub-item anterior (4.4.3.1), para a quinolactacina C (**50**), e se repete para a quinolactacina E (**51**).

A análise do espectro COSY (**Figura 8**, anexo) mostrou correlações entre os hidrogênios metínicos em δ 4,82 e em δ 2,18, que sugere a seguinte semi-estrutura ligada aos anéis fusionados:

As correlações entre o hidrogênio metínico em δ 2,18 e os hidrogênios metilênicos em δ 0,83-0,87 e em δ 1,40 e 1,60, sugerem a semi-estrutura:

Por fim, a correlação observada entre os hidrogênios metilênicos em δ 1,40 e 1,60 e a metila em δ 1,20 permite sugerir a posição desta metila conforme a semi-estrutura:

A análise do espectro de HMBC (**Figura 10**, anexo) permitiu observar correlações entre os carbonos em δ 59,1 e o hidrogênio em δ 8,13, entre o carbono em δ 36,3 e os hidrogênios em δ 1,40 e 1,60 e em δ 1,20 e entre o carbono em 27,5 e os hidrogênios em δ 2,18 e em δ 1,20. Tais correlações observadas confirmam a semi-estrutura sugerida acima.

A análise do espectro de HMBC permitiu ainda observar correlações entre os carbonos em δ 36,3 e em δ 21,0 e os hidrogênios em δ 0,65 e entre o carbono em δ 11,7 e os

hidrogênios em δ 0,83-0,87 e em δ 2,18. Tais observações permitem sugerir a posição da outra metila do composto e a estrutura final (Figura 37).

Figura 37 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II.

A Tabela 13 e as Figuras 38 e 39 apresentam os deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e os esquemas de correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II.

Figura 38 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II.

Figura 39 - Correlações ^{13}C - ^1H à longa distância observadas no espectro HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II.

Tabela 13 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MBCD-II (Quinolactacina E) (**51**).

	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ (HSQC)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ (mult, J/Hz, integral)	COSY ^c	HMBC ^d
1	168,6	-	-	-
2	-	8,13 (s, 1H)	-	-
3	59,1	4,82	H1'	H2, H2''
3 a	164,4	-	-	H3, H4-Me
4-Me	36,0	3,84 (s, 3H)	-	-
4 a	141,4	-	-	H8, H4-Me, H6
5	117,3	7,82 (m, 1H)	-	H7
6	132,7	7,82 (m, 1H)	H7	H8
7	124,5	7,48 (m, 1H)	H6, H8	H5
8	126,1	8,26 (d, $J = 8,16$ Hz, 1H)	H7	H6
8 a	128,2	-	-	H5, H6
9	171,7	-	-	H8
9 a	110,5	-	-	H2
1'	36,3	2,18 (m, 1H)	H3, H2', H1''	H3', H1'', H2''
2'	21,0	0,83 (m, 1H) e 0,87 (m, 1H)	H1'	H3'
3'	11,7	0,65 (t, $J = 7,2$ e $7,68$ Hz, 3H)	-	H3, H2'
1''	27,5	1,40 (m, 1H) e 1,60 (m, 1H)	H1', H2''	H1', H2''
2''	12,1	1,20 (t, $J = 7,2$ e $7,68$ Hz, 3H)	H1''	

^a100 MHz, DMSO- d_6 ; ^b400 MHz, DMSO- d_6 ; ^{c,d}DMSO- d_6

Os dados de RMN obtidos para a quinolactacina E (**51**) puderam ser comparados aos dados já publicados por Takahashi et al. (2000b) (Tabela 14) para a quinolactacina A (**52**). As duas estruturas são muito semelhantes, exceto pela presença do grupo etila da cadeia lateral que está presente na quinolactacina E (**51**) e ausente na quinolactacina A (**52**).

(51)

(52)

Tabela 14 - Comparação dos valores de RMN de ^{13}C e ^1H para os compostos Quinolactacina E (51) e Quinolactacina A (52) solubilizados em $\text{DMSO}-d_6$.

Carbono	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^1\text{H}^c$	$^1\text{H}^d$
1	168,6	168,3	-	-
2	-	-	8,13 (s, 1H)	8,17 (s, 1H)
3	59,1	58,9	4,82 (s, 1H)	4,84 (s, 1H)
3 a	164,4	164,0	-	-
4-Me	36,0	36,0	3,84 (s, 3H)	3,86 (s, 3H)
4 a	141,4	141,2	-	-
5	117,3	117,0	7,82 (m, 1H)	7,83 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H)
6	132,7	132,4	7,82 (m, 1H)	7,81 (dd, $J = 6,8; 8,4$ Hz, 1H)
7	124,5	124,2	7,48 (m, 1H)	7,48 (dd, $J = 6,8; 7,2$ Hz, 1H))
8	126,1	125,8	8,26 (d, $J = 8,16$ Hz, 1H)	8,26 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H)
8 a	128,2	128,0	-	-
9	171,7	171,5	-	-
9 a	110,5	110,3	-	-
1'	36,3	35,7	2,18 (m, 1H)	2,19 (m, 1H)
2'	21,0	20,8	0,83 (m, 1H) e 0,87 (m, 1H)	0,83 (m, 1H) e 0,88 (m, 1H)
3'	11,7	11,4	0,65 (t, $J = 7,2; 7,68$ Hz, 3H)	0,65 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H)
1'-Me	-	17,5	-	1,14 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H)
1''	27,5	-	1,40 (m, 1H) e 1,60 (m, 1H)	-
2''	12,1	-	1,20 (t, $J = 7,2; 7,68$ Hz, 3H)	-

^a100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ (51); ^b100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ (52); ^c400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ (51); ^d400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ (52)

^{b,d}Takahashi et al. (2000b)

(51)

Figura 40 - Estrutura química da Quinolactacina E (51).

Não foi possível o isolamento da quinolactacina E (51) com maior pureza durante o período do mestrado por questão de tempo. Posteriormente pretende-se separar este composto com grau de pureza suficiente para confirmação da estrutura e realização de ensaios de atividade biológica.

4.4.3.3 Identificação estrutural do composto presente na fração DLM2-12-MB2B

A avaliação dos espectros no UV e de massas do composto majoritário presente na fração DLM2-12-MB2B (Figura 41) mostrou que este composto apresenta absorção na região do ultravioleta nos comprimentos de onda com λ_{max} de 213, 255 e 315 nm. Seu espectro de massas em modo ESI positivo apresenta a íon $[M+H]^+$ em $m/z = 257$ e $[M-H]^-$ $m/z = 255$ no modo negativo. A observação destes dados permitiu a identificação da massa molecular do composto presente na fração DLM2-12-MB2B como sendo 256 u.m.a., com 30 u.m.a. a menos do que a quinolactacina C (50).

Figura 41 - Espectro de a) UV e b) massas no modo positivo da fração DLM2-12-MB2B.

Foram analisados os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 42).

Figura 42 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para o composto DLM2-12-MB2B.

A estrutura química da quinolactacina B (**53**) é semelhante à da quinolactacina C (**50**). A análise dos espectros de RMN dos dois compostos mostra que há diferenças nos sistemas de spins das cadeias alifáticas. O carbono em δ 58,4 tem seu deslocamento químico reduzido. Isto porque com a perda do grupo OH este carbono se torna menos desblindado. O mesmo ocorre com o carbono em δ 13,6 que tem seu deslocamento reduzido pela perda do grupo metila.

Não foram realizados experimentos bidimensionais para estrutura uma vez que é muito semelhante à estrutura descrita para a fração DLM2-12-MBCD-I.

A comparação dos dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C com dados já publicados na literatura por Takahashi et al. (2000b) e da massa já determinada permitiram confirmar a estrutura do composto presente na fração DLM2-12-MB2B como sendo a quinolactacina B (**53**) (Figura 43).

Figura 43 - Estrutura química da quinolactacina B (53).

A quinolactacina B (53) foi isolada pela primeira vez por Takahashi et al. (2000b) a partir do fungo *Penicillium* sp. obtido de larvas da mariposa *Margaronia pyloalis* Welker e posteriormente sintetizada enantioseletivamente por Zhang, Jiang & Sui (2003). Clark et al (2006) isolaram a quinolactacina B (53) a partir da fermentação de uma linhagem de *Penicillium citrinum* obtido de uma amostra de solo.

Takahashi et al (2000a) avaliaram a atividade biológica da quinolactacina B (53) em ensaio antimicrobiano com resultado positivo contra *Aspergillus niger* ATCC 9642 pelo método de diluição.

4.4.3.4 Identificação estrutural do composto presente na fração DLM2-12-MB4A

A análise dos espectros de UV e MS (Figura 44) indicaram absorções nos comprimentos de onda de 223,6 e 282,7 nm. Os espectros de massas no modo ESI apresentam íon $[M+H]^+$ em $m/z = 298$ (no modo positivo) e o íon $[M-H]^-$ em $m/z = 296$ (no modo negativo), o que nos permite identificar a massa do composto como sendo igual a 297 u.m.a.

Figura 44 - Espectro de a) UV e massas no modo b) positivo e c) negativo do composto presente na fração DLM2-12-MB4A.

Figura 45 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100MHz) do composto presente na fração DLM2-12-MB4A solubilizado em CDCl_3 .

No espectro de RMN de ^1H é possível observar a presença de duas metilas com deslocamentos químicos em δ 1,18 (dubleto, $J = 6,56$ Hz) e em δ 0,86 (triplete, $J = 7,0$ Hz), quatro sinais com deslocamentos químicos δ 2,99 (singlete), δ 3,56 (multiplete), δ 3,81 (dubleto, $J = 4,8$ Hz) e δ 4,19 (multiplete) característicos de hidrogênios próximos a átomos mais eletronegativos como oxigênio e nitrogênio.

São observados ainda sinais característicos de cadeia carbônica, são eles: sinais multipletos em δ 1,69 e em δ 1,45, sinal dubleto em δ 1,14 ($J = 6,56$ Hz) e sinal largo em δ 1,25 característico de sobreposição dos sinais de grupos metilênicos (CH_2) vizinhos.

No espectro de RMN de ^{13}C é observado sinal em δ 193,3 característico de carbono sp^2 ligado a oxigênio. Sinais de carbonos de cadeia alquila são observados em δ 36,6, δ 33,6, δ 31,7, δ 29,2, δ 27,2, δ 27,1, δ 22,6, δ 17,8, δ 17,2 e δ 14,0.

O espectro de HSQC (**Figura 15**, anexo) permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 4,19, δ 3,81, δ 3,56, δ 2,99, δ 1,68 e 1,45, δ 2,25, δ 1,18 e δ 0,86 aos carbonos δ 66,7, 70,9 (estes dois sinais de carbono não aparecem no espectro de carbono, porém há correlações no espectro de HSQC), δ 36,5, δ 27,2, δ 33,6, δ 31,7, 29,2, 27,1 e 22,6, δ 17,2 e 14,0 respectivamente.

Então é possível sugerir, a partir destes valores de deslocamento de carbono e hidrogênio, que o composto possui 12 átomos de carbono (dois apareceram apenas em correlações no espectro HSQC), 26 átomos de hidrogênio, 3 átomos de nitrogênio e/ou oxigênio. De acordo com a massa pré-determinada (297 u.m.a.) é possível prever que há número ímpar de átomos de nitrogênio.

A somatória das massas dos átomos previstos até então não confere com o valor determinado pelo espectro de massas, o que sugere que alguns átomos não puderam ser vistos nas análises de RMN realizadas, provavelmente não foram observados sinais de átomos de carbonos quaternários, que comumente produzem sinais com intensidades mais fracas, já que possuem tempos de relaxação mais longos.

A análise do espectro COSY (**Figura 14**, anexo) mostra que há correlações entre os hidrogênios com deslocamentos químicos em δ 3,56 e δ 1,69, 1,45 e 1,18 que sugere que o hidrogênio metínico (δ 3,56) está posicionado entre os hidrogênios metilênicos (δ 1,69 e 1,45) e a metila em δ 1,18. No espectro HSQC é possível ainda observar correlação entre os hidrogênios δ 1,69 e δ 1,45 com um mesmo carbono em δ 33,6 que confirma a presença dos dois hidrogênios em um mesmo átomo de carbono. A correlação observada entre os hidrogênios δ 0,86 e δ 1,25 sugere que a cadeia de hidrogênios metilênicos (sinais sobrepostos em δ 1,25) finaliza com a metila em δ 0,86.

A análise do espectro de HMBC (**Figura 16**, anexo) permite observar correlações entre os carbonos em δ 22,6 e δ 31,7 e o hidrogênio em δ 0,87 e entre o carbono em δ 14,0 e os hidrogênios em δ 1,25. Tais observações sugerem a seguinte semi-estrutura:

Os sinais sobrepostos em δ 1,25 representam quatro grupos metilênicos, de acordo com as observações já descritas para os espectros de COSY e HSQC, o que sugere a semi-estrutura:

O espectro de HMBC mostra correlações entre o carbono em δ 22,6 e o hidrogênio em δ 1,45 e entre o carbono em δ 27,1 e o hidrogênio em δ 1,69, que sugerem a semi-estrutura:

As observações já descritas para o espectro de COSY mostram que o hidrogênio metínico em δ 3,56 está posicionado entre os hidrogênios metilênicos (δ 1,69 e 1,45) e a metila (δ 1,18). Essa observação sugere a semi-estrutura:

Em busca realizada na base de dados Dictionary of Natural Products (DNP), disponível no endereço <http://dnp.chemnetbase.com>, verificou-se que o composto penicilenol A (**54**) apresenta o valor de massa de 297 u.m.a. e absorções no UV semelhantes às obtidas para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A, próximas a 223 e 282 nm.

O composto penicilenol A (**54**) apresenta em sua estrutura a semi-estrutura encontrada através das análises de RMN uni e bidimensionais para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A, com valores de deslocamentos de RMN de ^{13}C e ^1H muito próximos, de acordo com dados da literatura (LIN et al, 2008). Verificou-se que, como esperado, os sinais ausentes nos espectros de RMN realizados tratam-se de carbonos quaternários.

A estrutura final pôde então ser determinada, o composto presente na fração DLM2-12-MB4A trata-se do penicilenol A (**54**) (Figura 46).

Figura 46 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-MB4A.

A Tabela 15 e as Figuras 47 e 48 apresentam os deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e os esquemas de correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A.

Figura 47 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-MB4A.

Figura 48 - Esquema de correlações observadas no experimento HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A.

Tabela 15 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-MB4A (Penicilenol A) (**54**).

	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ (HSQC)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ (mult, J/Hz, integral)	COSY ^c	HMBC ^d
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	70,9	3,81 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H)	-	-
6	66,7	4,19 (m, 1H)	-	-
7	17,8	1,14 (d, $J = 6,56$ Hz, 3H)	-	-
8	193,3	-	-	-
9	36,6	3,56 (m, 1H)	H10a, H10b, H16	-
10	33,6	1,69 (m, 1H) e 1,45 (m, 1H)	H9, H10b e H9, H10a	-
11	27,1	1,25	H15	H10a
12	29,2	1,25	H15	-
13	22,6	1,25	H15	H10b, H15
14	31,7	1,25	H15	H15
15	14,0	0,86 (t, $J = 4,36; 7,0$ Hz, 3H)	H11, H12, H13, H14	H11, H12, H13, H14
16	17,2	1,18 (d, $J = 6,56$ Hz, 3H)	H9	-
17	27,2	2,99 (s, 3H)	-	-

^a100 MHz, CDCl_3 ; ^b400 MHz, CDCl_3 ; ^c $\text{DMSO}-d_6$; ^d $\text{DMSO}-d_6$

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, comparados aos dados já publicados por Lin et al. (2008) (Tabela 16) e a massa molecular já determinada permitiram identificar o composto presente na fração DLM2-12-MB4A como sendo o ácido tetrâmico penicilenol A (**54**) (Figura 49).

Tabela 16 - Comparação dos valores de RMN de ^{13}C e ^1H para o composto Penicilenol A (**54**).

Carbono	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	$^1\text{H}^{\text{c}}$	$^1\text{H}^{\text{d}}$
2	-	174,1	-	-
3	-	100,9	-	-
4	-	194,6	-	-
5	70,9	68,7	3,81 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H)	3,80 (d, $J = 4,2$ Hz, 1H)
6	66,7	66,6	4,19 (m, 1H)	4,20 (m, 1H)
7	17,8	17,8	1,14 (d, $J = 6,56$ Hz, 3H)	1,15 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H)
8	193,3	192,6	-	-
9	36,6	36,6	3,56 (m, 1H)	3,56 (m, 1H)
10 a	33,6	33,4	1,69 (m, 1H)	1,69 (m, 1H)
10 b	33,6	33,4	1,45 (m, 1H)	1,47 (m, 1H)
11	27,1	27,1	1,25	1,21-1,32 (m)
12	29,2	29,1	1,25	
13	22,6	22,4	1,25	
14	31,7	31,5	1,25	
15	14,0	13,9	0,87 (t, $J = 4,36; 7,0$ Hz, 3H)	0,86 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H)
16	17,2	17,0	1,18 (d, $J = 6,56$ Hz, 3H)	1,18 (d, $J = 6,8$ Hz)
17	27,2	27,2	2,99 (s, 3H)	3,00 (s, 3H)

^a100 MHz, CDCl_3 ; ^b100 MHz, CDCl_3 ; ^c400 MHz, CDCl_3 ; ^d400 MHz, CDCl_3

^{b,d}Lin et al. (2008)

(**54**)

Figura 49 - Estrutura química do Penicilenol A (**54**).

Os penicilenóis A₁ (**55**) e A₂ (**56**) (epímeros em C-5) foram isolados pela primeira vez por Lin et al. (2008) a partir do fungo *Penicillium* sp. endofítico da planta de mangue *Aegicera corniculatum*. Lin et al. (2008) avaliaram a atividade biológica do composto penicilenol A₁ (**55**) e A₂ (**56**) em ensaio citotóxico. O penicilenol A₁ (**55**) apresentou atividade citotóxica contra as linhagens celulares A-549 (carcinoma humano basal do epitélio alveolar) com CI₅₀ de 23,8 µM, BEL-7402 (carcinoma hepatocelular) com CI₅₀ de 13,03 µM, P388 (leucemia) com CI₅₀ de 8.85 µM, HL-60 (leucemia) com CI₅₀ de 0,76 µM enquanto o penicilenol A₂ (**56**) apresentou atividade apenas contra a linhagem celular HL-60 (leucemia) com CI₅₀ de 16,26 µM. Como os dois compostos diferem apenas na configuração do carbono 5 e a atividade citotóxica foi notavelmente superior para o penicilenol A₁ (**55**), supõe-se que o grupo 1-hidroxetil com configuração 5S é essencial para esta atividade.

A primeira síntese estereoseletiva do penicilenol A₁ (**55**) foi realizada por Sengoku et al. (2010) em nove etapas a partir da L-treonina.

Em busca na literatura, através do aplicativo disponível no endereço: <http://scifinder.cas.org>, não foram encontrados outros registros, além dos trabalhos supracitados, para o penicilenol A (**54**).

4.4.3.5 Identificação estrutural do composto presente na fração DLM2-12-ME2

A avaliação dos espectros no UV e de massas do composto majoritário da fração DLM2-12-ME2 (Figura 50) mostrou que este composto apresenta absorções na região do ultravioleta nos comprimentos de onda com λ_{max} de 221 e 287 nm. Seu espectro de massas ESI mostra a presença do íon $[M+H]^+$ em $m/z = 287$ no modo positivo e $[M-H]^-$ $m/z = 285$ no modo negativo. A observação destes dados permitiu a identificação da massa molecular do composto presente na fração DLM2-12-ME2 como sendo 286 u.m.a.

Figura 50 - Espectro de a) UV e massas no modo b) positivo e c) negativo da fração DLM2-12-ME2

Figura 51 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100MHz) do composto presente na fração DLM2-12-ME2.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 51) é possível observar dois sinais dubletos em δ 6,56 ($J = 2,4$ Hz) e δ 7,09 ($J = 2,4$ Hz) e outros dois sinais dubletos em δ 7,23 ($J = 1,4$ Hz) e δ 7,62 ($J = 1,4$ Hz) atribuídos a hidrogênios metínicos aromáticos (CH). Observa-se também um sinal singlete em δ 4,60 atribuído a hidrogênio metilênico (CH_2) típico de grupo carbinólico.

No espectro de ^{13}C (Figura 51) é possível observar sinais em δ 189,5 e δ 181,3 atribuídos à carbonilas, sinais atribuídos a carbonos sp^2 ligados ao oxigênio em δ 152,7, δ 161,4, δ 165,8, e δ 164,4, bem como sinais atribuídos aos carbonos quaternários em δ 135, δ 117, δ 132,8 e δ 114.

O espectro de HSQC (**Figura 20**, anexo) permitiu correlacionar os hidrogênios em δ 6,56, δ 7,09, δ 7,65, δ 7,23 e δ 4,60 aos carbonos em δ 108,7, δ 108,9, δ 120,7, δ 107,8 e δ 68,4, respectivamente.

Assim pode-se sugerir que há na estrutura: 6 hidrogênios, 15 carbonos, 2 oxigênios pertencentes às carbonilas e 1 oxigênio ligado ao carbono oximetilênico. Esses dados, junto com a análise dos deslocamentos químicos dos carbonos indica a presença de 3 hidroxilas adicionais. Então a fórmula molecular deste composto é $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ com massa molecular de 286 u.

A análise do espectro COSY (**Figura 19**, anexo) mostra correlações (Figura 53) entre os hidrogênios metínicos em δ 6,56 e δ 7,09, entre os hidrogênios metínicos em δ 7,62 e δ 7,23 e entre estes dois e os hidrogênios metilênicos em δ 4,60. No entanto não são observadas correlações entre o primeiro e o segundo grupo de hidrogênios vizinhos descritos anteriormente, fato que evidencia 2 sistemas de spins separados.

A análise do espectro HMBC (**Figura 21**, anexo) apresenta correlações (Figura 54a) do hidrogênio em δ 7,23 com os carbonos em δ 189,5, δ 161,4, δ 152,7, δ 114 e δ 68,4, correlações (Figura 54b) do hidrogênio em δ 7,62 com os carbonos em δ 189,5, δ 181,3, δ 161,4, δ 152,7, δ 114 e δ 68,4. E ainda é possível observar correlações (Figura 54c) entre os hidrogênios em δ 4,60 e os carbonos em δ 161,4, δ 132,8, δ 120,7, δ 114 e δ 107,8. As correlações observadas para esse grupo de hidrogênios, e a análise dos deslocamentos químicos dos sinais de ^{13}C sugerem a seguinte semi-estrutura:

Para o outro grupo de hidrogênios é possível observar no espectro de HMBC correlações (Figura 54a) entre o hidrogênio em δ 6,56 e os carbonos em δ 189,5, δ 164,4 e δ 108,9 e correlações (Figura 54b) entre o hidrogênio em δ 7,09 e os carbonos em δ 189,5, δ 181,3, δ 164,4, δ 135 e δ 108,7. As correlações observadas para esse grupo de hidrogênios vizinhos sugerem a seguinte semi-estrutura:

Então, a estrutura final e as atribuições de seus sinais de ^1H e ^{13}C pôde ser determinada (Figura 52)

Figura 52 - Estrutura final e atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente na fração DLM2-12-ME2

A Tabela 17 apresenta os deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-ME2.

Figura 53 - Esquema das correlações observadas no espectro COSY do composto presente na fração DLM2-12-ME2.

Figura 54 - Esquema de correlações observadas para os hidrogênios a) δ 7,23 e δ 6,56 b) δ 7,62 e δ 7,09 c) δ 4,60 no experimento HMBC para o composto presente na fração DLM2-12-ME2.

Tabela 17 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para o composto presente na fração DLM2-12-ME2 (Citroseína) (**57**).

	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ (HSQC)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ (mult, J/Hz, integral)	COSY ^c	HMBC ^d
1	165,8	-	-	-
2	108,7	6,56 (d, 2,4 Hz, 1H)	H4	H4
3	164,4	-	-	H2, H4
4	108,9	7,09 (d, 2,4 Hz, 1H)	H2	H2
4 a	135,0	-	-	H4
5	120,7	7,62 (d, 1,4 Hz, 1H)	H7, H11	H11
6	152,7	-	-	H5, H7
7	107,8	7,23 (d, 1,4 Hz, 1H)	H5, H11	H11
8	161,4	-	-	H5, H7, H11
8 a	114,0	-	-	H5, H7, H11
9	189,5	-	-	H2, H4, H5, H7
9 a	117,0	-	-	-
10	181,3	-	-	H4, H5
10 a	132,8	-	-	H11
11	68,4	4,60 (s, 2H)	H5, H7	H5, H11

^a100 MHz, DMSO- d_6 ; ^b400 MHz, DMSO- d_6 ; ^cDMSO- d_6 ; ^dDMSO- d_6

A análise dos dados espectroscópicos de RMN, comparados aos dados já publicados na literatura (REN et al. 2006) (Tabela 18) e a massa molecular já determinada permitiram identificar o composto presente na fração DLM2-12-ME2 como sendo a citroseína (**57**) (Figura 55), uma antraquinona cuja fórmula molecular é $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$.

Tabela 18 - Estudo comparativos dos valores de RMN de ^{13}C e ^1H para o composto Citreoroseína (**57**).

Carbono	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	$^1\text{H}^{\text{c}}$	$^1\text{H}^{\text{d}}$
1	165,8	165,6	-	-
2	108,7	107,0	6,56 (d, 2,4 Hz, 1H)	6,60 (d, $J = 2,58$ Hz, 1H)
3	164,4	161,5	-	-
4	108,9	108,8	7,09 (d, 2,4 Hz, 1H)	7,12 (d, $J = 2,58$ Hz, 1H)
4 a	135,0	132,9	-	-
5	120,7	120,8	7,62 (d, 1,4 Hz, 1H)	7,63 (d, $J = 1,50$ Hz, 1H)
6	152,7	152,9	-	-
7	107,8	107,1	7,23 (d, 1,4 Hz, 1H)	7,25 (d, $J = 1,50$ Hz, 1 H)
8	161,4	164,5	-	-
8 a	114,0	109,0	-	-
9	189,5	189,7	-	-
9 a	117,0	114,1	-	-
10	181,3	181,4	-	-
10 a	132,8	135,2	-	-
11	68,4	62,0	4,60 (s, 2H)	4,61 (d, $J = 2,46$ Hz, 2H)

^a100 MHz, DMSO- d_6 ; ^b100 MHz, DMSO- d_6 ; ^c400 MHz, DMSO- d_6 ; ^d400 MHz, DMSO- d_6

^{b,d}Ren et al. (2006)

Figura 55 - Estrutura química da Citreoroseína (**57**).

Em levantamento realizado no banco de dados SciFinder utilizando-se como palavra de busca: “citreorosein”, seguidos dos refinamentos de busca: “penicillium” e “citrinum”, foi possível observar a existência de registros do composto e citreoroseína (**57**) como produto de isolamento a partir de fungos do gênero *Penicillium*. Porém, para o composto citreoroseína (**57**), não há qualquer registro que relacione à espécie *P. citrinum* em estudo.

O composto citreorseína (**57**) foi isolado por Isaka e colaboradores (2008) a partir do fungo terrestre *Hamigera avellanea*. Ayo (2010) relatou o isolamento da citreorseína (**57**) a partir da planta *Cassia nigricans* e Krohn e colaboradores (2009) relatou o isolamento deste composto a partir do fungo *Microsphaeropsis sp.* endofítico da planta *Lycium intricatum*.

Outros compostos naturais foram isolados inicialmente a partir de plantas, como a podofilotoxina (**58**), o taxol (**59**) e a camptotecina (**60**), foram posteriormente isolados de fungos endofíticos. Os fungos endofíticos são considerados fontes promissoras de metabólitos secundários pois exibem interações específicas e adaptadas ao ambiente em que vivem, além disso é uma fonte de produtos naturais ainda pouco explorada.

A podofilotoxina, um antitumoral, foi primeiramente isolada da planta *Podophyllum emodi* Wall. Ex Royle. No entanto a destruição da população desta espécie e a dificuldade de síntese total do composto levaram à pesquisa de novas fontes para obtenção da podofilotoxina (**58**), que teve seu isolamento reportado a partir de espécies fúngicas endofíticas de *P. emodi*. Recentemente a podofilotoxina teve seu isolamento relatado a partir de duas linhagens fúngicas (PPE5 e PPE7) de *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox obtidas da planta *Podophyllum peltatum* (EYBERGER; DONDAPATI; PORTER, 2006).

O taxol (**59**), que também tem propriedades anticancerígenas, foi isolado inicialmente a partir da casca da árvore *Taxus brevifolia* (WANI et al. 1971). No entanto, por ser uma árvore rara e de crescimento lento foi necessária a pesquisa de novas fontes para este composto. Strobel (2003) relatou o isolamento do taxol (**59**) a partir do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, porém com baixo rendimento. Já são conhecidos cerca de 19 gêneros de fungos endofíticos com capacidade de produção do taxol (**59**) e seus análogos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrydiplodia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Ectostroma*, *Fusarium*, *Metarhizium*, *Monochaetia*, *Mucor*, *Ozonium*, *Papulaspora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Pithomyces*, *Taxomyces* e *Tubercularia* (ZHAO et al., 2010).

A camptotecina (**60**), um potente agente antineoplásico, foi isolado inicialmente por Wall et al. (1966) a partir da madeira da planta *Camptotheca acuminata* Decaisne e foi relatada também a partir da planta *Nothapodytes foetida* (Govindachari; Viswanathan, 1972). Puri et al. (2005) relataram o isolamento da camptotecina (**60**) a partir de um fungo endofítico (RJMEF001) da planta *Nothapodytes foetida* e Kusari, Zühlke e Spiteller (2009) relataram o isolamento deste composto a partir do fungo endofítico *Fusarium solani* da planta *Camptotheca acuminata*.

Tais exemplos remontam à discussão de que muitos dos metabólitos hoje conhecidos possam ser verdadeiramente produzidos por micro-organismos associados ainda não estudados, ou por ambas as espécies, hospedeira e associada.

(58)

(59)

(60)

4.4.3.6 Identificação estrutural dos compostos presentes nas frações DLM2-12-ME6

A análise dos espectros de UV e massas do composto presente na fração DLM2-12-ME6 (Figura 56) permitiram observar que o composto possui absorções na região do ultravioleta nos comprimentos de onda de 221 e 287 nm, absorções semelhantes às observadas para a citreorseína (57), características de antraquinonas, o que leva a supor tratar-se de estruturas parecidas. O espectro de massas ESI no modo positivo indicou a presença do íon $[M+H]^+$ em $m/z = 271$ e no modo negativo o íon $[M-H]^-$ em $m/z = 269$, o que nos permite identificar a massa do composto como sendo 270 u.m.a., 16 unidades de massa a menos do que a citreorseína (57).

Figura 56 - Espectros de a) UV e massas no modo b) positivo e c) negativo da fração DLM2-12-ME6.

Foram analisados os sinais observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 57).

Figura 57 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100MHz) para o composto presente na fração DLM2-12-ME6.

A estrutura química da emodina (**61**) é semelhante à da citreoroseína (**57**). A avaliação dos espectros de RMN mostra que a diferença entre elas está no carbono (metila) com deslocamento químico δ 21,4 ligado aos hidrogênios da metila em δ 2,38. Este carbono tem seu deslocamento químico alterado em relação ao mesmo carbono na citreoroseína (**57**) por causa da ausência do grupo OH, que também justifica a diferença de massa entre os dois compostos $[286 - 270] = 16$.

Não foram realizados, desta forma os experimentos de RMN bidimensionais.

A comparação dos dados obtidos a partir dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C com dados já publicados na literatura (REN et al. 2006) e da massa já determinada permitiram identificar o composto presente na fração DLM2-12-ME6 como sendo a emodina (**61**) (Figura 58).

Figura 58 - Estrutura química da emodina (**61**).

Em levantamento realizado no banco de dados SciFinder utilizando-se como palavras de busca: “emodin” e “citreorosein”, seguidos dos refinamentos de busca: “penicillium” e “citrinun”, foi possível observar a existência de registros dos compostos emodina (**61**) e citreoroseína (**57**) como produtos de isolamento a partir de fungos do gênero *Penicillium*, porém há registros somente do composto emodina (**61**) como sendo obtido a partir da espécie *P. citrinun* (2 artigos).

A emodina (**61**) foi isolada por Isaka e colaboradores (2008) a partir do fungo terrestre *Hamigera avellanea*. Ayo (2010) relatou o isolamento da emodina (**61**) a partir da planta *Cassia nigricans*, Krohn e colaboradores (2009) relatou o isolamento a partir do fungo *Microsphaeropsis sp.* endofítico da planta *Lycium intricatum* e Marinho e colaboradores (2005) relataram o isolamento deste composto a partir do fungo *Penicillium janthinellum* endofítico dos frutos da planta *Melia azedarach*.

Ayo (2010) relatou atividade larvicida (contra a mosca branca *Bemisia tabaci*) para a emodina (**61**) isolada da planta *Cassia nigricans*. O ensaio foi realizado com tempo de 24 h e concentrações de 25, 12,5 e 6,25 µg.L⁻¹ e apresentaram mortalidade da mosca branca de 83, 79 e 51%, respectivamente.

4.4.4 Resultados dos bioensaios realizados para os compostos puros citreorseína (57) e emodina (61)

4.4.4.1 Atividade citotóxica

Câncer é o nome dado a mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células anormais em órgãos e tecidos e pode se espalhar (metástase) para diversas regiões do corpo (BROWN; ATTARDI, 2005). Segundo Gutiérrez e Salsamendi (2001, *apud* MEIRA, 2011), os estudos epidemiológicos da incidência do câncer demonstram que o risco de desenvolvê-lo varia entre grupos populacionais e está associado com o estilo de vida e hábitos dos indivíduos.

As recentes estatísticas, anunciadas pela *World Health Organization* (WHO) (2010a), apontam que cerca de 7,6 milhões de mortes por ano são causadas pelo câncer, em todo o planeta.

Segundo Meira (2011) o câncer de pulmão é o grande vilão, pois mata mais a cada ano do que qualquer outro tipo de câncer. Alguns tipos são mais comuns em países desenvolvidos, como o câncer de mama, cólon e próstata, enquanto são mais comuns em países em desenvolvimento o câncer de fígado, cérvix e estômago (WHO, 2010a).

Na busca por compostos naturais capazes de inibir a proliferação celular, a citreorseína (**57**) e a emodina (**61**) foram avaliadas no bioensaio de atividade citotóxica, no qual o extrato do meio de cultura da linhagem DLM2-12 foi originalmente ativo.

A citreorseína (**57**) mostrou-se ativa frente à linhagem celular HCT-116 e inativa frente às linhagens celulares HL-60 (leucemia), SF295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovário), K562 (leucemia), HCT-8 (cólon), MDA-MB435 (mama) e MVF-7 (mama). A emodina (**61**) mostrou-se ativa frente às linhagens celulares HL-60 (leucemia), HCT-116 (cólon), SF295 (glioblastoma), OVCAR-8 (ovário), K562 (leucemia) e HCT-8 (cólon) e inativa frente às linhagens celulares MDA-MB435 (mama) e MVF-7 (mama). Os valores de CI₅₀ (µg.mL⁻¹) são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados obtidos no bioensaio de citotoxicidade para o composto citreoroseína (**57**) e emodina (**61**).

Linhagens celulares								
CI ₅₀ - µg/mL								
Composto	HL-60	HCT-116	SF295	OVCAR-8	K562	HCT-8	MDA-MB435	MVF-7
Citreoroseína (57)	>25	19,14	>25	>25	>25	>25	>25	>25
Emodina (61)	5,62	6,50	24,22	18,22	8,47	9,71	>25	>25

O fato destes compostos terem sido ativos contra algumas linhagens, mas inativos contra outras, pode ser considerado um indício de que estes compostos são seletivos contra determinadas linhagens de células tumorais.

As antraquinonas, entre elas a emodina (**61**) e citreoroseína (**57**), são uma família que possui vários compostos com propriedades biológicas diversas, como citotóxica. Segundo Srinivas et al. (2007), os primeiros relatos da emodina (**61**) como agente citotóxico ocorreu contra linhagens de leucemia linfocítica e murina, mais tarde foi encontrado efeito citotóxico contra células de carcinoma mamário, em concentrações de 1 a 10 µg.mL⁻¹.

Em trabalho realizado por Isaka e colaboradores (2008) o composto emodina (**61**) apresentou atividade citotóxica contra as linhagens tumorais KB (carcinoma epidermóide oral humana) com CI₅₀ de 0,88 µg.mL⁻¹, MCF7 (câncer de mama humano) com CI₅₀ de 2,8 µg.mL⁻¹ e NCI-H187 (câncer de pulmão de pequenas células) com CI₅₀ de 11 µg.mL⁻¹.

No mesmo trabalho a citreoroseína (**57**) apresentou atividade citotóxica contra as linhagens tumorais KB (carcinoma epidermóide oral humana) com CI₅₀ de 4,5 µg.mL⁻¹, MCF7 (câncer de mama humano) com CI₅₀ de 22 µg.mL⁻¹ e NCI-H187 (câncer de pulmão de pequenas células) com CI₅₀ de 39 µg.mL⁻¹.

Segundo Srinivas et al. (2007), como as antraquinonas são excelentes transportadoras de elétrons o possível local de ação pode ser no sítio da quinona. Além disso, a emodina é uma forte inibidora da proteína tirosina-quinase (p56lck). Apesar dos estudos realizados, a razão para a inibição da proliferação de células de carcinomas ainda é desconhecido.

4.4.4.2 Atividade anti-Leishmania

A leishmaniose é uma das doenças consideradas como negligenciadas, enfermidades que acometem países menos desenvolvidos (PADMA; KHOSA; SAHAI, 1995). A Leishmaniose foi identificada na era cristã na Ásia Central, e é causada por um protozoário da família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* que se distribui amplamente pela Ásia, África, América e Europa (PETERS; KILLICK-KENDRICK, 1987, *apud* CARDOSO, 1999).

As doenças negligenciadas possuem características comuns em relação ao contexto em que ocorrem, como as condições precárias de higiene e uso de fármacos tóxicos e muitas vezes ineficazes (OSORIO; ROBLEDO; BASTIDA, 2008, *apud* SIQUEIRA, 2010). O investimento na pesquisa de novos fármacos são insuficientes em programas governamentais de combate às doenças, enquanto empresas multinacionais também não tem interesse no desenvolvimento dos novos fármacos, pois demandam grandes investimentos e apresentam pouco retorno financeiro (WHO, 2010b).

Neste trabalho foi realizada a avaliação da atividade frente *Leishmania chagasi*, em formas promastigotas, para a emodina (**61**) em concentração de $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A emodina (**61**) apresentou-se fracamente ativa, com morte de 50% do parasita.

Schnur et al. (1983) relataram o efeito anti-Leishmania de seis derivados sintéticos de antraquinonas (**62-67**), sendo que pelo menos dois deles apresentou redução significativa no número de amastigotas viáveis intracelulares sem afetar o hospedeiro. Especula-se que o modo de ação pode estar relacionado à estrutura cíclica das antraquinonas, já que acridinas, como a quinacrina (**68**), também possuem atividade anti-Leishmania.

4.4.4.3 Atividade anti-viral

Os vírus são seres com características próprias, capazes de comandar sua própria replicação desde que estejam no interior de uma célula viva. Por não apresentarem metabolismo, utilizam a maquinaria celular para se replicarem (CONDIT, 2001, *apud* CHRESTANI, 2009).

Os vírus são responsáveis por uma série de doenças infecciosas que acometem animais e plantas. O modo de transmissão ocorre pela via fecal-oral por meio da água, alimentos contaminados, pelo contato pessoa-pessoa e fômites e secreções respiratórias (CHRESTANI, 2009).

Entre os vírus causadores de doenças, neste trabalho estudou-se as linhagens BVDV (vírus da diarréia viral bovina), HSV1 (Herpes virus simplex tipo 1 resistente ao aciclovir), aMPV (Metapneumovirus aviário), FCV (Calicivírus felino) e hepatite C.

O BVDV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Pestivirus*, e é responsável por grandes perdas econômicas em rebanhos de corte e leite por se tratar de um agente infeccioso de bovinos (HEUER; HEALY; ZERBINI, 2007).

Doenças causadas pelo HSV (família *Herpesviridae* e gênero *Simplexvirus*) incluem infecções de membranas mucosas, como a gengivoestomatite, herpes labial e genital, ceratoconjuntivite, infecção neonatal, encefalite e infecções viscerais (FONSECA, 1999). O tipo 1 do HSV é associado a infecções não-genitais. O tratamento contra o HSV1 é

comumente realizado pela administração do aciclovir, no entanto algumas cepas podem adquirir resistência inutilizando o tratamento.

O aMPV pertence a família *Paramyxoviridae* e gênero *Metapneumovirus* e causa grandes perdas econômicas na produção avícola associado a síndrome da cabeça inchada (SCI). O prejuízo econômico decorre principalmente da diminuição da conversão alimentar, custo dos medicamentos, diminuição do ganho de peso e aumento da mortalidade aviária (GAMA et al., 2006, *apud* SALES et al., 2010).

O FCV pertence à família *Caliciviridae* e gênero *Vesivirus*, é considerado responsável por doenças do trato respiratório superior e ulcerações em gatos (THUMFART; MEYERS, 2002).

O vírus causador da hepatite C pertence à família *Flaviridae* e gênero *Hepacivirus*. Esta doença tem como principal via de transmissão através de sangue contaminado (ARNONE, 2008). São considerados fatores de risco para o contágio: transfusão de sangue, uso de drogas injetáveis, transmissão vertical de mãe para filho, transplante de órgãos, tatuagens e piercings e transmissão sexual. Segundo Bonkovsky & Mehta (2001) a gravidade da doença crônica está relacionada a fatores que incluem variação genotípica do vírus, via de contágio e a resposta imune do hospedeiro.

A citreorseína (**57**) e a emodina (**61**) foram testadas em concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, contra linhagens de vírus BVDV, HSV1, FCV, aMPV e hepatite C. O bioensaio indicou que a citreorseína (**57**) foi moderadamente ativa contra linhagens de vírus BVDV (39%), HSV1 (44%) e aMPV (44%). Enquanto a emodina (**61**) apresentou moderada atividade contra as linhagens virais BVDV (42%), HSV1 (44%) e aMPV (68%) e também contra linhagens do vírus da hepatite C.

Xiong et al. (2011) avaliaram o potencial anti-viral da emodina (**61**), em concentrações variáveis de 5 a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, contra as linhagens de HSV do tipo 1 e 2. A emodina apresentou atividade maior para a HSV2 do que para HSV1 e que a atividade anti-viral é dose-dependente, iniciando em 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para HSV1 e em 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para HSV2.

Segundo Battistutta et al. (2000) estudos demonstram que a emodina inibe a caseína-quinase II (CK2) que envolvem a fosforilação das proteínas virais essenciais ao ciclo de vida dos vírus. Outra explicação para a atividade antiviral da emodina pode estar na capacidade de perturbar a bicamada lipídica que resulta na inativação eficaz do envelope viral (ALVES, et al., 2004).

4.4.4.4 Atividade antimicrobiana

O surgimento de novas linhagens resistentes a antibióticos é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Os novos antibióticos devem ser continuamente produzidos já que possuem tempo de vida útil curto, devido aos micro-organismos desenvolverem resistência aos medicamentos em uso. Além disso, a aprovação comercial de um medicamento possui alto custo por causa dos testes clínicos necessários. Apenas quatro novas classes de antibióticos foram lançados nos últimos 40 anos (MATTHEW; COOPER; SHLAES, 2011).

O bioensaio de atividade antimicrobiana foi realizado em concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e tempo de tratamento de 24 horas, contra *Aspergillus flavus*. A citreorseína (**57**) e a emodina (**61**) não apresentaram resultados significativos, com $\text{CI}_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em trabalho realizado por Isaka e colaboradores (2008), os compostos citreorseína (**57**) e emodina (**61**), isolados a partir do fungo terrestre *Hamigera avellanea*, foram avaliados em ensaio de atividade antituberculose contra (*Mycobacterium tuberculosis*) e antifúngica (contra *Candida albicans*). A citreorseína (**57**) apresentou resultado antitubercular com CI_{50} de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a emodina (**61**) apresentou atividade antitubercular com CI_{50} de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e antifúngica com CI_{50} de $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Krohn e colaboradores (2009) relataram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* e *Chlorella fusca* para o composto citreorseína (**57**) isolado a partir do fungo *Microsphaeropsis sp.* endofítico da planta *Lycium intricatum*. Neste bioensaio, citreorseína (**57**) ($50 \text{ mL a } 1 \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$) foi inoculada em placa de Petri na presença da cepa microbiana. Após crescimento microbiano observou-se zona de inibição de 9 mm para *Escherichia coli*, 10 mm para *Bacillus megaterium*, 0 para *Microbotryum violaceum* e 12 mm para *Chlorella fusca*.

Marinho e colaboradores (2005) relataram ainda a atividade da emodina (**61**) contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* isolada do fungo *Penicillium janthinellum* endofítico dos frutos da planta *Melia azedarach*.

5 CONCLUSÃO

Foram isoladas 51 linhagens fúngicas a partir de macro-organismos marinhos em trabalho anterior (KOSSUGA et al., 2012). Após o isolamento, as linhagens foram avaliadas em bioensaio de atividade citotóxica e preservadas em geladeira de acordo com o método descrito por Castellani (1967). No presente trabalho, as linhagens fúngicas foram reativadas e reavaliadas no bioensaio de atividade citotóxica.

Observou-se que 45 extratos obtidos do meio de cultura das linhagens fúngicas reativadas apresentaram potencial citotóxico na primeira avaliação e apenas 14 mantiveram o potencial na segunda avaliação. Tal fato evidencia que o método de preservação das linhagens não é o mais adequado para a manutenção das linhagens fúngicas, já que as linhagens não mantêm o seu potencial metabólico para a produção de metabólitos secundários.

O método utilizado para seleção das linhagens de interesse mostrou-se eficiente, foi possível selecionar 16 linhagens com atividade biológica e perfil químico que evidenciou a presença de metabólitos secundários nos extratos ativos. Por questão de tempo, deu-se continuidade do trabalho com apenas uma das linhagens selecionadas.

Os métodos de fermentação, extração e purificação empregados neste trabalho mostraram ser adequados para o isolamento de sete diferentes compostos, sendo um inédito. Foram identificados:

- ✓ um derivado policetídeo, a citrinina (**47**);
- ✓ três quinolonas, as quinolactacina C (**50**) e B (**53**) e a inédita quinolactacina E (**51**);
- ✓ um ácido tetrâmico, o penicilenol A (**54**);
- ✓ duas antraquinonas, a citreoroseína (**57**) e a emodina (**61**).

Por questão de tempo, apenas as antraquinonas puderam ser avaliadas nos ensaios de atividade biológica. Estes compostos apresentam atividade significativa em ensaios de grande relevância.

A citreoroseína (**57**) apresentou atividade moderada contra as linhagens virais BVDV (diarreia viral bovina), HSV1 (herpes simplex vírus tipo 1) e aMPV (metapneumovírus aviário). A emodina (**61**) apresentou atividade moderada contra as linhagens virais BVDV, HSV1, aMPV e linhagem do vírus da hepatite C e fraca atividade Leishmanicida.

O ensaio de atividade citotóxica apresentou resultado interessante para ambos os compostos, com CI_{50} de 19,14 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral HCT-116 para a

citreoroseína (**57**) e com CI_{50} de 5,62 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral HL-60, 6,50 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral HCT-116, 24,22 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral SF295, 18,22 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral OVCAR-8, 8,47 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral K562 e 9,71 $\mu\text{g/mL}$ frente a linhagem tumoral HCT-8 para o composto emodina (**61**).

O fato de terem sido ativos contra algumas linhagens tumorais, mas inativos contra outras, pode ser considerado um indício de que estes compostos são seletivos contra as linhagens tumorais.

O presente trabalho foi de grande importância para desenvolvimento de metodologias que permitam a produção e isolamentos de produtos naturais de origem fúngica com potencial biológico.

Entre as perspectivas futuras, pretende-se isolar metabólitos presentes nas frações não estudadas do extrato bruto do meio de cultura da linhagem DLM2-12 obtido em média escala e avaliar os compostos puros em bioensaios de atividade biológica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNONE, Marcelo. **Avaliação da soroprevalência do vírus da hepatite C em portadores de doenças sexualmente transmissíveis na cidade de São Paulo**. 2008. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

ARTHAUD, I. D. B.; RODRIGUES, F. A. R.; JIMENEZ, P. C.; MONTENEGRO, R. C.; ANGELIM, A. L.; MACIEL, V. M. M.; SILVEIRA, E. R.; FREITAS, H. P. S.; SOUSA, T. S.; PESSOA, O. D. L.; LOTUFO, T. M. C.; LOTUFO, L. V. C. Studies on the secondary metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. isolated from sediments collected at the northeastern coast of Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, p. 418-427, 2012.

ALVES, D. S.; PEREZ-FONS, L.; ESTEPA, A.; MICOL, V. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 549-561, 2004.

AYO, R. G. Phytochemical constituents and bioactivities of the extracts of *Cassia nigricans* Vahl: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 14, p. 1339-1348, 2010.

BATTISTUTTA, R.; SARNO, S.; DE MOLINER, E.; PAPINUTTO, E.; ZANOTTI, G.; PINNA, L. A. The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodina induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 29618-29622, 2000.

BELITZ, H. D.; GROSH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4 ed. Leipzig: Editora Springer, 2009. p. 15.

BERLINCK, R. G. S. New destruxins from the marine-derived fungus *Beauveria feline*. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, p. 553-563, 2006

BLOMBERG, A; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, v 33, p. 145-212, 1992.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 1, p. 15-61, 2005.

BONKOVSKY, H. L.; MEHTA, S. Hepatite C: a review and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 159-182, 2001.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Natural Review Cancer**, v. 5, n. 3, p. 231-237, 2005.

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

CARDOSO, André Gustavo Tempone. **Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de ⁶⁰CO, em *Leishmania* spp.** 1999. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CHEN, L.; LIU, W.; HU, X.; HUANG, K.; WU, J.; ZHANG, Q. Citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 515-517, 2011a.

CHEN, L.; LIU, W.; HU, X.; HUANG, K.; WU, J.; ZHANG, Q. Penicitrinols F-I, new citrinin derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Heterocycles**, v. 83, n. 8, p. 1853-1858, 2011b.

CHRESTANI, Francieli. **Determinação da atividade antiviral *in vitro* de galactomananas sulfatadas contra o rotavírus símio AS-11**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CLARK, B; CAPON, R. J.; LACEY, E.; TENNANT, S.; GILL, J. H. Quinolactacins revisited: from lactams to imide and beyond. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, p. 1512-1519, 2006.

MATTHEW A. COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v. 472, p. 32, 2011.

DAMARE, S.; RAGHUKUMAR, C.; MURALEEDHRAN, U.; RAGHUKUMAR, S. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 172-181, 2006.

DEVI, P.; D'SOUZA, L; KAMAT, T; RODRIGUES, C; NAIK, C. G. Batch culture fermentation of *Penicillium chrysogenum* and a report on the isolation, purification, identification and antibiotic activity of citrinin. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 38, n. 1, p. 38-44, 2009.

ESQUIVEL, E. A. **Notas micológicas**, 2011. Disponível em: <<http://micologiapanama.blogspot.com.br/2011/05/notas-micologicas-114-observaciones.html>>. Acesso em 07 julho 2012.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**. Auckland, v. 14, n. 13, 1997.

FONSECA, B. A. L. Clínica e tratamento das infecções pelo vírus *Herpes simplex* tipo 1 e 2. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 32, p. 147-153, 1999.

- GAO, S.; LI, X.; LI, C.; PROKSCH, P.; WANG, B. Penicisteroids A and B, antifungal and cytotoxic polyoxygenated steroids from the marine alga-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2894-2897, 2011.
- GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, p. 57-63, 1986.
- GOVINDACHARI, T. R. ; VISWANATHAN, N. Alkaloids of *Mappia foetida*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 12, p. 3529-3531, 1972.
- HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; LORET, M. O.; GOMA, G.; BLANC, P. G.; FRANCOIS, J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 311-314, 1999.
- HERNANDEZ, I. L. C.; GODINHO, M. J. L.; MAGALHÃES, A. B. S.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. N-acetyl-γ-hydroxyvaline lactone, an Unusual Amino Acid Derivative from a Marine Streptomyces. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 1, p. 664-665, 2000.
- HERNANDEZ, I. L. C.; MACEDO, M. L.; BERLINCK, R. G. S.; FERREIRA, A. G.; GODINHO, M. J. L. Dipeptide metabolites from the marine derived bacterium Streptomyces acrymicini. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 441-444, 2004.
- HEUER, C.; HEALY, A.; ZERBINI, C. Economic effects of exposure to bovine viral diarrhea virus on dairy herds in New Zealand. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5428-5438, 2007.
- HILDEBRAND, M.; WAGGONER, L. E.; LIM, G. E.; SHARP, K. H.; RIDLEY, C. P.; HAYGOOD, M. G. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 122-142, 2004.
- HUANG, C.; PAN, J.; CHEN, B.; YU, M.; HUANG, H.; ZHU, X.; LU, Y.; SHE, Z.; LIN, Y. Three bianthraquinone derivatives from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. ZJ9-6B from the south china sea. **Marine Drugs**, v. 9, p. 832-843, 2011.
- ISAKA, M.; CHINTHANOM, P.; VEERANONDHA, S.; SUPOTHINA, S.; LUANGSA-ARD, J. J. Novel cyclopropyl diketones and 14-membered macrolides from the soil fungus *Hamigera avellanea* BCC 17816. **Tetrahedron**, v. 64, p. 11028-11033, 2008.
- JENNINGS, D. H. Some aspects of the physiology and biochemistry of marine fungi. **Biological Review**, v. 58, p. 423-459, 1983.
- KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 151-170, 2002.
- KOHLMEYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; ERIKSSON, O. E. (1997) Fungi on *Juncus roemerianus* 9. New obligate and facultative marine ascomycotina. **Botanica Marina**, v. 40, n. 4, p. 291-300, 1997.

KOSSUGA, M. H.; DE LIRA, S. P.; NASCIMENTO, A. M.; GAMBARDELLA, M. T. G.; BERLINCK, R. G. S.; TORRES, Y. R.; PIMENTA, E. F.; SILVA, M.; THIEMANN, O. T.; OLIVA, G.; TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R. M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1194-1202, 2007

KOSSUGA, M. H. ROMMINGER, S. XAVIER, C.; MILANETTO, M. C.; DO VALE, M. Z.; PIMENTA, E. F.; MORAIS, R. P.; DE CARVALHO, E. MIZUNO, C. M.; CORADELLO, L. F. C.; BARROSO, V. D.; VACONDIO, B.; JAVAROTI, D. C. D.; SELEGHIM, M. H. R.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LIMA, B. A.; GONCALVES, R.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D.; BERLINCK, R. G. S. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 257-267, 2012.

KROHN, K.; KOUAM, S. F.; KUIGOUA, G. M.; HUSSAIN, H.; CLUDIUS-BRANDT, S.; FLORKE, U.; KURTAN, T.; PESCIPELLI, G.; DI BARI, L.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Xanthones and oxepino[2,3-*b*]chromones from three endophytic fungi. **Chemistry European Journal**, v. 15, p. 12121-12132, 2009.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural products**, v. 72, p. 2-7, 2009.

KYAW, C. M. **Crescimento microbiano**, 2010. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/crescimento/crescimento.html>>. Acesso em: 11 maio 2012.

LANE, J. E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C. C.; BOGITSH, B. J.; JONES, M. M.; SINGH, P. K.; CARTER, C. E. In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **American Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 263-266, 1996.

LIN, Z.; LU, Z.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. Penicillenols from *Penicillium* sp. GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras corniculatum*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 217-221, 2008.

LIN, X.; ZHOU, X.; WANG, F.; LIU, K.; YANG, B.; YANG, X.; PENG, Y.; LIU, J.; REN, Z.; LIU, Y. A new cytotoxic sesquiterpene quinone produced by *Penicillium* sp. F00120 isolated from a deep sea sediment sample. **Marine Drugs**, v. 10, p. 106-115, 2012.

LIRA, S. P.; VITA-MARQUES, A. M.; SELEGHIM, M. H. R.; BUGNI, T. S.; LABARBERA, D.; SETTE, L. D.; SPONCHIADO, S. R. P.; IRLELAND, C. M.; LONG, P. F.; DUNLAP, W. C.; BATTERSHILL, C. N.; JASPARS, M. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. **ChemBioChem**, v. 6, p. 1760-1765, 2005

LORENZ, R. J.; BÖGEL, K. Methods of calculation. In: KAPLAN, M. M.; KOPROWSKY, H. (Ed). **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Health Organization, 1973. p. 321-335.

MA, W.; QU, L.; LIU, Z.; YANG, Z.; ZHANG, L. Synthesis of salinosporamide A and its analogs as 20S proteasome inhibitors and SAR summarization. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 23, p. 2906-2922, 2011.

MARINHO, A. M. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 2, p. 280-283, 2005.

MEIRA, Assuero Silva. **Estudo do potencial citotóxico de novos ésteres sintéticos derivados da mistura triterpenoidica α -/ β - amirina em modelos experimentais *in vitro***, 2011. 124 f. Dissertação (mestrado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2011.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

PADMA, P.; KHOSA, R. L.; SAHAI, M. Alkaloids from genus *Annona*: a review. **Indian Journal Natural Products**, v. 11, n. 2, p. 3-15, 1995.

PIMENTA, Eli Fernando. **Investigação das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos marinhos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum***. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

PURI, S. C.; VERMA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural products**, v. 68, n. 12, p. 1717-1719, 2005.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: na ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19-35, 2008.

RAVEN, P. **Biologia Vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 277-312.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

REN, H.; TIAN, L.; GU, Q.; ZHU, W. Secalonic acid D; A citotoxic constituent form marine lichen-derived fungus *Gliocladium* sp. T31. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 1, p. 59-63, 2006.

RIBEIRO, S. M. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. effects on the homeostasis of reactive oxygen species. **Cell Biochemistry and Function**, v. 15, p. 203-209, 1997.

ROCHA, M. S. **Fungos e a produção de alimentos**. 2010. Disponível em: <<http://portaldoprofessor.mec.gov.br/fichaTecnicaAula.html?aula=18872>>. Acesso em: 07 jul. 2012.

RODRIGUES, S. A.; ROCHA, R. M.; LOTUFO, T. M. C. Guia Ilustrado para identificação das Ascídias do Estado de São Paulo. IBUSP/FAPESP, 1998.

SALES, T. S.; HERVAL, E. F. G.; SILVA, P. S.; LIMA, J. M.; RAMOS, I.; FERNANDEZ, L. M. B. Frequência de anticorpos contra metapneumovírus aviário em criações industriais e de galinhas de quintal no polo avícola da Bahia. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 718-723, 2010.

SALOMON, C. E.; MAGARVEY, N. A.; SHERMAN, D. H. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 21, p. 105–121, 2004.

SASAKI, M.; TSUDA, M.; SEKIGUCHI, M.; MIKAMI, M.; KOBAYASHI, J. Perinadine A, a novel tetracyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 7, n. 19, p. 4261-4264, 2005.

SCHMALE, D. **Scientists to study high-risk plant pathogen using small, unmanned aircraft**. 2008. Disponível em: <<http://phys.org/news119626269.html>>. Acesso em: 07 jul. 2012.

SCHMIDT, E. W.; SUDDEK, S.; HAYGOOD, M. G. Genetic evidence supports secondary metabolic diversity in *Prochloron* spp., the cyanobacterial symbiont of a tropical ascidian. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1341–1345, 2004

SCHMIDT, E. W.; NELSON, J. T.; RASKO, D. A.; SUDEK, S.; EISEN, J. A.; HAYGOOD, M. G.; RAVEL, J. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 7315–7320, 2005.

SCHNUR, L.; BACHRACH, U.; BAR-AD, G.; HARAN, M.; TASHMA, Z.; TALMI, M.; KATZHENDLER, J. The effect of diaminoalkyl-anthraquinone derivatives on the growth of the promastigotes of *Leishmania tropica minor*, *L. t. major*, *L. donovani* and *L. aethiopica*. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 11, p. 1729-1732, 1983.

SCHREIBER, U.; GADEMANN, R.; RALPH, P. J.; LARKUM, A. W. D. Assessment of photosynthetic performance of *Prochloron* in *Lissoclinum patella* in hospite by chlorophyll fluorescence measurements. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 945–951, 1997.

SELEGHIM, M. H. R.; LIRA, S. P.; CAMPANA, P. T.; BERLINCK, R. G. S.; CUSTÓDIO, M. R. Localization of granulatimide alkaloids in the tissues of the ascidian *Didemnum granulatum*. **Marine Biology**, v. 150, p. 967-975, 2007.

SENGOKU, T.; WIERZEJSKA, J.; TAKAHASHI, M.; YODA, H. First stereoselective synthesis of penicillenol A₁ via novel *O*- to *C*-acyl rearrangement of *O*-acyltetramic acid. **Letter**, n. 19, p. 2944-2946, 2010.

SINGS, H. L.; RINEHART, K. L. Compounds produced from potential tunicate-blue-green algal symbiosis: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 385–396, 1996.

SIQUEIRA, Carlos Alberto Theodoro. **Aspectos químicos e atividade antiprotozoária in vitro de *Annona coriácea* Mart. (Annonaceae)**. 2010. 178 f. Dissertação (Mestre) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SRINIVAS, G.; BABYKUTTY, S.; SATHIADEVANP. P.; SRINIVAS, P. Molecular mechanisms of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. **Medicinal Research Review**, v. 27, n. 5, p. 591-608, 2007.

STAUBER, L. A. Host resistance to the klartoun strain of *L. donovani*. **Rince Institute Pamphlet**, v. 45, p. 80-96, 1958.

STROBEL, G. A.; Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect**, v. 5, p. 535-544, 2003.

TADA, H.; SHIHO, O; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin-2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157–165, 1986.

TAKAHASHI, S.; KAKINUMA, N.; IWAI, H.; YANAGISAWA, T. NAGAI, K.; SUZUKI, K.; TOKUNAGA, T.; NAKAGAWA, A. Quinolactacins A, B and C: Novel quinolone compounds from *Penicillium* sp. EPF-6 I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 11, p. 1247-1251, 2000a.

TAKAHASHI, S.; KAKINUMA, N.; IWAI, H.; YANAGISAWA, T. NAGAI, K.; SUZUKI, K.; TOKUNAGA, T.; NAKAGAWA, A. Quinolactacins A, B and C: Novel quinolone compounds from *Penicillium* sp. EPF-6 II. Physico-chemical properties and structure elucidation. **The Journal of Antibiotics**, v. 53, n. 11, p. 1252-1256, 2000b.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A. L.; MORTARA, R. A.; DE ANDRADE, H. F. Targeting Leishmania (L.) chagasi amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 60–68, 2004.

THUMFART, J. O.; MEYERS, G. Feline calicivirus: recovery of wild-type and recombinant viruses after transfection of cRNA or cDNA constructs. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 6398-6407, 2002.

TORTORA G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Editora ArtMed. 2005. p. 204-256.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. p. 81-98.

TSUDA, M.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Citrinadin A, a novel pentacyclic alkaloid from marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Organic Letters**, v. 6, n. 18, p. 3087-3089, 2004.

TSUDA, M.; SASAKI, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Scalusamides A-C, new pyrrolidine alkaloids from the marine-derived fungus *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 273-276, 2005.

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.; COELHO, B.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; MINARINI, P. R. R.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 2008.

VIVAN, Juliana. **Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium* spp.** 2002. 43 f. Tese ("Magister Scientiae") - Programa de pós-graduação em microbiologia agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

OLIVEIRA, C. M.; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; FLAUSINO Jr, O.; LOPEZ, S. N.; ABISSI, B. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; RODRIGUES, A.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Xylarenones C – D from an endophytic fungus isolated from *Alibertia macrophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1353-1357, 2011.

WAKANA, D.; HOSOE, T.; ITABASHI, T.; OKADA, K.; TABAKI, G. M. C.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K.; KAWAI, K. New citrinina derivatives isolated from *Penicillium citrinum*. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p. 279-289, 2006.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of American Chemistry Society**, v. 88, p. 3888-3890, 1966.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of American Chemical Society**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WATSON, R. **Fungi procedure**. 2012. Disponível em: <http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm>. Acesso em: 07 maio 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Up to 40% of cancer cases could be prevent**, 2010a. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/en/>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Access to medicines**. 2010b. Disponível em <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

WILLIAMS, P. G.; BUCHANAN, G. O.; FELING, R. H.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. New cytotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 6196-6203, 2005.

XIONG, H. R.; LUO, J.; HOU, W.; XIAO, H.; YANG, Z. Q. The effect of emodina, an anthraquinone derivative extracted from the roots of *Rheum tanguticum*, against herpes simplex virus *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 718-723, 2011.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Research**, n. 86, p. 231-240, 2010.

ZHANG, X; JIANG, W; SUI, Z. Concise enantioselective syntheses of quinolactacins A and B through alternative winterfeldt oxidation. **Journal Organic Chemistry**, v.68, n. 11, p. 4523-4526, 2003.

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. **Current Research, Techonology and Education Topies in Appllied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Disponível em: <<http://www.formatex.info/microbiology2/567-576.pdf>>. Acesso em: 12 jul. 2012.

ZHU, F.; CHEN, G.; CHEN, X.; HUANG, M.; WAN, X. Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 5, p. 767-769, 2011.

7 ANEXOS

Fração DLM2-12-MBCD-I

Figura 1 - Espectro RMN de ^1H da fração DLM2-12-MBCD-I, em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz)

Figura 2 - Espectro RMN de ^{13}C da fração DLM2-12-MBCD-I, em $\text{DMSO-}d_6$ (100 MHz)

Figura 3 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DLM2-12-MBCD-I, em $\text{DMSO}-d_6$

Figura 4 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-MBCD-I, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 5 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-MBCD-I, em $\text{DMSO-}d_6$

Fração DLM2-12-MBCD-II

Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H da fração DLM2-12-MBCD-II, em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz)

Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração DLM2-12-MBCD-II, em $\text{DMSO}-d_6$ (100 MHz)

Figura 8 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DLM2-12-MBCD-II, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 9 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-MBCD-II, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 10 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-MBCD-II, em $\text{DMSO-}d_6$

Fração DLM2-12-MB4A

Figura 11 - Espectro RMN de ^1H da fração DLM2-12-MB4A, em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz)

Figura 12 - Espectro RMN de ^{13}C da fração DLM2-12-MB4A, em $\text{DMSO}-d_6$ (100 MHz)

Figura 13 - Espectro RMN de ^{13}C da fração DLM2-12-MB4A, em CDCl_3 (100 MHz)

Berlinck_Karen_22

Figura 14 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DLM2-12-MB4A, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 15 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-MB4A, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 16 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-MB4A, em $\text{DMSO}-d_6$

Fração DLM2-12-ME2

Figura 17 - Espectro RMN de ^1H da fração DLM2-12-ME2, em $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz)

Figura 18 - Espectro RMN de ^{13}C da fração DLM2-12-ME2, em $\text{DMSO-}d_6$ (100 MHz)

Figura 19 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DLM2-12-ME2, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 20 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-ME2, em $\text{DMSO-}d_6$

Figura 21 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-ME2, em $\text{DMSO}-d_6$ (3J)

Figura 22 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DLM2-12-ME2, em $\text{DMSO-}d_6(^4J)$