

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**ANA CAROLINA JORDÃO**

**Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e  
imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga  
*Phaeurus antarcticus***

Ribeirão Preto  
2020

**ANA CAROLINA JORDÃO**

**Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e  
imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga  
*Phaeurus antarcticus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hosana Maria Debonsi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 29/06/2020. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2020

JORDÃO, A.C.	<b>Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e imunomodulador do fungo endofítico <i>Arthrimum</i> sp. isolado da alga <i>Phaeurus antarcticus</i></b>		MESTRADO FCFRPUSP 2020
-----------------	--	--	------------------------------

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

Jordão, Ana Carolina

Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga *Phaeurus antarcticus*. Ribeirão Preto, 2020.

113 p.: il.; 30cm.

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

Orientador: Debonisi, Hosana Maria

1. Produtos naturais marinhos, 2. Continente Antártico, 3. Fungos endofíticos, 4. Atividade biológica, 5. *Arthrinium* sp.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolina Jordão

Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga *Phaeurus antarcticus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho em especial à minha mãe, que por toda a vida foi meu exemplo. Também por todo o carinho, amor, educação e amparo concedidos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Senhor Bom Jesus da Lapa, por serem meu auxílio em momentos de sofrimento e por me conceder calma e sabedoria quando pedido em orações.

À minha mãe, minha avó e a toda minha família, por acreditarem e torcerem por mim, assim como por todo o carinho.

Ao meu namorado Matheus e à minha amiga Narriman, pela calma transmitida e pelos ouvidos sempre dispostos a me ouvir e braços a me amparar.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Hosana Maria Deboni, pela oportunidade da realização deste trabalho, pelo acolhimento, carinho e pelos ensinamentos não somente acadêmicos, mas também de vida.

Aos meus amigos do laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho: Gustavo Souza dos Santos, Marcia Gracielle de Oliveira Lopes e Thaiz Rodrigues Teixeira, por me ensinar e me ajudar pacientemente e pela amizade desenvolvida.

Ao Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), por todo o conhecimento compartilhado.

Aos técnicos José Carlos Tomaz, Daniela Ricardo Engracia Caluz, Vinícius Pararetti, Karina de Castro Pereira e Isabel Cristina Turatti, por toda a ajuda cedida.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro e Dr<sup>a</sup>. Cleni Mara Marzocchi Machado, pela colaboração nos ensaios biológicos.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação Dr<sup>a</sup>. Adriana Aparecida Lopes, Dr. André Gonzaga dos Santos e Dr. Jairo Kenupp Bastos pelas correções e ensinamentos valiosos.

A todos os docentes da FCFRP – USP que contribuíram para a formação dos meus conhecimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, por me permitir a realização deste curso de Mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.*

*(Marcel Proust)*

## RESUMO

JORDÃO, A.C. **Prospecção química e estudo do potencial fotoprotetor e imunomodulador do fungo endofítico *Arthrinium* sp. isolado da alga *Phaeurus antarcticus***. 2020. 113f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O ambiente marinho é vasto e apresenta uma enorme biodiversidade, onde organismos se adaptaram de forma excelente à situação extrema do ecossistema. Essa biodiversidade adaptada às condições inóspitas resultou em compostos químicos diferenciados e de grande importância para a medicina humana. Vários fármacos de origem marinha já se encontram no mercado farmacêutico, e muitos candidatos se encontram em testes clínicos e pré-clínicos. O continente Antártico também é um ambiente extremo inóspito. O interesse aos organismos antárticos em particular vem crescendo devido às suas habilidades de sobreviver neste ambiente severo. Em virtude disso, o presente trabalho teve como objeto de estudo o fungo *Arthrinium* sp. endofítico da alga antártica *Phaeurus antarcticus*, com o objetivo de isolar e identificar metabólitos secundários e avaliá-los quanto ao potencial fotoprotetor e de modulação de produção de ERO por neutrófilos. Cinco substâncias foram isoladas, entre elas três xantonas já relatadas como sendo produzidas por espécies de *Arthrinium*: a 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona, a 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona e a 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona; e outras duas substâncias com relato inédito nesta espécie de fungo: o álcool 3-hidroxibenzílico e a 6,8-diidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocumarina. As substâncias E.p5 e F.p8 mostraram um efeito de absorção na faixa do UV potencial, assim como o extrato e algumas frações. Com isso, conclui-se que o fungo *Arthrinium* sp. é uma ótima fonte de novos produtos naturais, e estudos mais aprofundados são necessários para descoberta de metabólitos novos e bioativos, não descartando o seu potencial efeito fotoprotetor e de modulação na produção de ERO.

**Palavras-chave:** Produtos naturais marinhos, Continente Antártico, Fungos endofíticos, Atividade biológica, *Arthrinium* sp.

## ABSTRACT

JORDÃO, A.C. **Chemical prospecting and study of the photoprotective and immunomodulatory potential of the endophytic fungus *Arthrinium* sp. isolated from the seaweed *Phaeurus antarcticus*.** 2020. 113s. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The marine environment is wide and has an enormous biodiversity, where organisms have excellently adapted to the extreme circumstances of the ecosystem. This biodiversity adapted to inhospitable conditions that resulted in distinct chemical compounds and of great importance for human medicine. Several drugs from marine origin are already in the pharmaceutical market, and many candidates are in clinical and pre-clinical tests. The Antarctic continent is also an extreme and inhospitable environment. Interest in Antarctic organisms in particular, has been growing due to their ability to survive in this severe environment. Due to the exposed, the present study had as object the fungus *Arthrinium* sp. endophytic of the Antarctic seaweed *Phaeurus antarcticus*, with the objective of isolating and identifying secondary metabolites and evaluating them for the photoprotective potential and modulation of ROS production by neutrophils. Five substances were isolated, including three xanthenes already reported to be produced by species of *Arthrinium*: 2,3,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone, 2,3,4,6,8-pentahydroxy-1-methylxanthone and 3,6,8-trihydroxy-1-methylxanthone; and two other substances with unprecedented reports in this species of fungus: 3-hydroxybenzyl alcohol and 6,8-dihydroxy-3- (2-hydroxypropyl) isocoumarin. The substances E.p5 and F.p8 showed a potential UV absorption effect, as well as the extract and some fractions. Thus, it is concluded that the fungus *Arthrinium* sp. is a great source of new natural products, and further studies are needed to discover new and bioactive metabolites, not discarding its potential photoprotective and modulation of the production of ROS effects.

**Keywords:** Marine natural products, Antarctic Continent, Endophytic fungi, Biological activity, *Arthrinium* sp.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Linha do tempo de fármacos aprovados provindos de organismos marinhos. Adaptado de LIANG et al., 2019.....	2
<b>Figura 2:</b> As paisagens do Continente gelado, a Antártica, e a pesquisa desenvolvida durante a OPERANTAR XXXVI, 2017. Fotos por: Gustavo Souza dos Santos.....	4
<b>Figura 3:</b> Espectro eletromagnético emitido pelo sol. Disponível em: <a href="https://pt.khanacademy.org/science/9-ano/materia-e-energia-9-ano/ondas-eletromagneticas/a/o-espectro-eletromagnetico">https://pt.khanacademy.org/science/9-ano/materia-e-energia-9-ano/ondas-eletromagneticas/a/o-espectro-eletromagnetico</a> . Acesso em 17 de fevereiro de 2020.....	6
<b>Figura 4:</b> Ativos orgânicos utilizados em formulações fotoprotetoras. ....	8
<b>Figura 5:</b> Substâncias fotoprotetoras isoladas de organismos marinhos. Adaptado de PALLELA et al., 2010.....	9
<b>Figura 6:</b> Imagens mostrando o branqueamento do coral <i>Acropora divaricata</i> causado por fotoprotetores após 24 horas de exposição. As imagens correspondem, na ordem da esquerda para a direita, ao controle, ao coral exposto a fotoprotetores incubado a 28° C e ao coral incubado a 30° C, também com exposição às formulações. Fonte: DANOVARO et al., 2008. ....	10
<b>Figura 7:</b> Esquema da primeira etapa da extração do fungo <i>Arthrinium</i> sp.....	16
<b>Figura 8:</b> Esquema da segunda etapa da extração do fungo <i>Arthrinium</i> sp. ....	17
<b>Figura 9:</b> Fluxograma do isolamento da fração F do extrato do fungo <i>Arthrinium</i> sp. empregando-se CCDP. ....	21
<b>Figura 10:</b> Fluxograma do isolamento das frações E e F do extrato do fungo <i>Arthrinium</i> sp. empregando-se CLAE-DAD. ....	22
<b>Figura 11:</b> Desenho esquemático do experimento de fotoestabilidade, onde há triplicatas expostas e triplicatas protegidas da luz UVA.....	24
<b>Figura 12:</b> Espectro de absorvância na região do UV dos extratos (acetato) obtidos do fungo <i>Arthrinium</i> sp. em meio arroz (A) e em meio CBD (B), ambos em uma concentração de 100 µg/mL. ....	26
<b>Figura 13:</b> Espectros de absorção na região do UV dos extratos acetato de etila e metanol em uma concentração de 100 µg/mL, obtidos após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo do fungo <i>Arthrinium</i> sp.....	27
<b>Figura 14:</b> Comparativo da absorvância dos extratos do fungo <i>Arthrinium</i> sp. em todos os períodos de cultivo. ....	28

<b>Figura 15:</b> Análise das frações E-I do fungo <i>Arthrinium</i> sp. por CCDC. Condições cromatográficas: sílica gel de fase normal e sistema de solventes 6:4 hexano:acetato. Revelação por luz UV a 254 e 366 nm (A e B) e por iodo ressublimado (C).....	32
<b>Figura 16:</b> Cromatograma do extrato controle do meio CBD com ausência do fungo <i>Arthrinium</i> sp. Método 1 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm. ....	33
<b>Figura 17:</b> Cromatograma da fração E do extrato fracionado do fungo <i>Arthrinium</i> sp. Método 3 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm. ....	33
<b>Figura 18:</b> Cromatograma da fração F do extrato fracionado do fungo <i>Arthrinium</i> sp. Método 3 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm. ....	34
<b>Figura 19:</b> Cromatograma da fração G do extrato fracionado do fungo <i>Arthrinium</i> sp. Método 2 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm. ....	34
<b>Figura 20:</b> Cromatograma da fração H do extrato fracionado do fungo <i>Arthrinium</i> sp. Método 2 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm. ....	35
<b>Figura 21:</b> Cromatograma da fração I do extrato fracionado do fungo <i>Arthrinium</i> sp. Método 1 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 254 nm. ....	35
<b>Figura 22:</b> Cromatograma obtido visando o isolamento de substâncias da fração E do fungo <i>Arthrinium</i> sp.....	36
<b>Figura 23:</b> Fluxograma do fracionamento e isolamento de substâncias por CCDP a partir da fração CLV F do fungo <i>Arthrinium</i> sp. ....	38
<b>Figura 24:</b> Cromatograma da amostra F3.1, obtido a partir da fração CLV F do fungo <i>Arthrinium</i> sp. por CCDP. Método 1 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm. ....	38
<b>Figura 25:</b> Cromatograma obtido visando o isolamento de substâncias da fração F do fungo <i>Arthrinium</i> sp. e respectivos picos selecionados para coleta.....	39
<b>Figura 26:</b> Substâncias isoladas e identificadas das frações CLV E e F do fungo <i>Arthrinium</i> sp.....	40
<b>Figura 27:</b> Proposta estrutural para a amostra E.p1: álcool 3-hidroxi benzílico (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ). ....	41
<b>Figura 28:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância E.p1, CDCl <sub>3</sub> 500 MHz.....	42
<b>Figura 29:</b> Expansões no espectro de <sup>1</sup> H da substância E.p1 e atribuições.....	43
<b>Figura 30:</b> Correlações observadas por meio da análise de HMBC da substância E.p1.....	45
<b>Figura 31:</b> Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C) da substância E.p1, CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz. ....	45
<b>Figura 32:</b> Mapa de correlação heteronuclear HSQC (expansão) da substância E.p1.....	46

<b>Figura 33:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ ) da substância E.p1, $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz. ....	46
<b>Figura 34:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC (expansão) da substância E.p1. ....	47
<b>Figura 35:</b> Espectro de massas da amostra E.p1, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo. ....	48
<b>Figura 36:</b> Proposta estrutural para a amostra E.p4: 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ). ....	49
<b>Figura 37:</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ da amostra E.p4, $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz. ....	50
<b>Figura 38:</b> Expansões dos sinais do espectro de $^1\text{H}$ da substância E.p4 e atribuições. ....	51
<b>Figura 39:</b> Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ ) da amostra E.p4 e expansões, $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz. ....	53
<b>Figura 40:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ ) da substância E.p4, $\text{CD}_3\text{OD}$ 500 MHz. ....	54
<b>Figura 41:</b> Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ ) da substância E.p4 (expansão). ....	54
<b>Figura 42:</b> Espectro de massas da amostra E.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo. ....	55
<b>Figura 43:</b> Espectro de massas da amostra E.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo. ....	56
<b>Figura 44:</b> Proposta estrutural para a amostra F.p4: 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ). ....	57
<b>Figura 45:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da amostra F.p4, $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz. ....	58
<b>Figura 46:</b> Expansões dos sinais do espectro de $^1\text{H}$ da substância F.p4 e atribuições. ....	58
<b>Figura 47:</b> Espectro de massas da amostra F.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo. ....	60
<b>Figura 48:</b> Espectro de massas da amostra F.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo. ....	60
<b>Figura 49:</b> Proposta estrutural para a amostra F.p5: 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ). ....	61
<b>Figura 50:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ completo da amostra F.p5, $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz. ....	62
<b>Figura 51:</b> Expansões dos sinais do espectro de $^1\text{H}$ da substância F.p5 e atribuições. ....	63
<b>Figura 52:</b> Espectro de massas da amostra F.p5, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo. ....	64

<b>Figura 53:</b> Espectro de massas da amostra F.p5, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo. ....	64
<b>Figura 54:</b> Proposta estrutural para a amostra F.p3: 6,8-diidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocumarina (C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> ). ....	65
<b>Figura 55:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H completo da amostra F.p3, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 500 MHz. ....	67
<b>Figura 56:</b> Expansões dos sinais do espectro de <sup>1</sup> H da substância F.p3 e atribuições. ....	67
<b>Figura 57:</b> Espectro de massas da amostra F.p3, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo. ....	69
<b>Figura 58:</b> Espectro de massas da amostra F.p3, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo. ....	69
<b>Figura 59:</b> Espectro de absorbância no UV do extrato do fungo <i>Arthrinium</i> sp. após período de crescimento de 14 dias. ....	70
<b>Figura 60:</b> Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) do extrato após 14 dias de cultivo. Linha contínua = amostra não irradiada, linha pontilhada = amostra irradiada. ....	71
<b>Figura 61:</b> Espectro de absorbância no UV das frações CLV D-I do fungo <i>Arthrinium</i> sp....	73
<b>Figura 62:</b> Gráfico de absorbância x comprimento de onda das frações CLV C-I do fungo <i>Arthrinium</i> sp. ....	74
<b>Figura 63:</b> Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) da fração CLV F. Linha contínua = amostra não irradiada, linha pontilhada = amostra irradiada. ....	74
<b>Figura 64:</b> Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) da fração CLV G. ....	75
<b>Figura 65:</b> Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) da fração CLV H. ....	76
<b>Figura 66:</b> Espectros de absorbância no UV de substâncias isoladas mais promissoras. ....	78
<b>Figura 67:</b> Resultados da influência dos extratos na produção de ERO pelos neutrófilos. ....	79
<b>Figura 68:</b> Resultados da influência das frações CLV E-H na produção de ERO. ....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de substâncias em fase clínica derivadas de organismos marinhos.....	3
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de substâncias bioativas isoladas de fungos do gênero <i>Arthrinium</i> . .....	5
<b>Tabela 3:</b> Componentes e suas respectivas concentrações da água do mar artificial SWBG. 15	
<b>Tabela 4:</b> Sistema de solventes utilizado na metodologia de fracionamento por CLV.....	18
<b>Tabela 5:</b> Métodos utilizados nas análises por CLAE-DAD.....	19
<b>Tabela 6:</b> Dados das frações obtidas pelo fracionamento em CLV do extrato do fungo <i>Arthrinium</i> sp.....	29
<b>Tabela 7:</b> Identificação por CG-EM de substâncias das frações apolares do fungo <i>Arthrinium</i> sp.: A, B, C e D.....	30
<b>Tabela 8:</b> Dados das substâncias obtidas através do isolamento por CLAE-DAD da fração E do fungo <i>Arthrinium</i> sp. ....	37
<b>Tabela 9:</b> Dados das substâncias obtidas através do isolamento por CLAE-DAD da fração F do fungo <i>Arthrinium</i> sp. ....	39
<b>Tabela 10:</b> Comparação de $\delta^1\text{H}$ e $\delta^{13}\text{C}$ obtidos da E.p1 com os dados de literatura publicada. ....	41
<b>Tabela 11:</b> Dados obtidos dos mapas de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) e HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da substância E.p1. ....	44
<b>Tabela 12:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ da substância E.p4 e da 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona descrita na literatura. ....	49
<b>Tabela 13:</b> Dados obtidos dos mapas de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) e HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da substância substância E.p4. ....	52
<b>Tabela 14:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da substância F.p4 e da 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona descrita na literatura. ....	57
<b>Tabela 15:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da substância F.p5 e da 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona descrita na literatura. ....	62
<b>Tabela 16:</b> Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ da substância F.p3 e da 6,8-diidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocumarina descrita na literatura. ....	66
<b>Tabela 17:</b> Valores da área sob a curva das amostras do extrato após 14 dias de cultivo, em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.....	71
<b>Tabela 18:</b> Valores da área sob a curva da fração CLV F em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.....	75



<b>Tabela 19:</b> Valores da área sob a curva da fração CLV G em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.....	76
<b>Tabela 20:</b> Valores da área sob a curva da fração CLV H em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.....	77
<b>Tabela 21:</b> Viabilidade da fração CLV E em diferentes concentrações. ....	80
<b>Tabela 22:</b> Viabilidade da fração CLV F em diferentes concentrações. ....	81
<b>Tabela 24:</b> Viabilidade da fração CLV H em diferentes concentrações. ....	82

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ABD	gar Batata Dextrose
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CBD	Caldo Batata Dextrose
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
CEP	Comitê de tica em Pesquisa
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
cm <sup>2</sup>	Centímetros Quadrados
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos
CLV	Cromatografia Líquida  Vácuo
cpm	Fótons por Minuto
d	Dupleto
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
dd	Duplo Dupleto
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido Deuterado
DNA	cido Desoxirribonucleico
EI	Ionizao por Impacto de Elétrons
EM	Espectrometria de Massas
EM-ESI-TOF	Espectrometria de Massas com Ionizao por Elétron Spray e Deteco por Tempo de Vo
EPIs	Equipamentos de Proteo Individual
ERO	Espécies Reativas de Oxignio
ESI	Ionizao por Elétron-Spray
eV	Elétrons-Volt

g	Gramas
g/L	Gramas por Litro
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovats
IS	Índice de Similaridade
J	Joules
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LDH	Lactato Desidrogenase
LQOAM	Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho
m	Multiplete
MAAs	Aminoácidos tipo Micosporinas
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mW	Megawatts
<i>m/z</i>	Razão Massa-Carga
nm	Nanômetros
NPPNS	Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
PMA	Acetato Miristato de Forbol
PNMs	Produtos Naturais Marinhos
ppm	Partes por Milhão
QL	Quimiluminescência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
sl	Simpleto Largo
t	Triplete
tR	Tempo de Retenção

UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A (320-400 nm)
UVB	Ultravioleta B (280-320 nm)
UVC	Ultravioleta C (200-280 nm)
UVR	Radiação Ultravioleta
v/v	Volume/Volume
μg	Microgramas
μL	Microlitros
δ	Deslocamento Químico
λ <sub>máx</sub>	Lambda Máximo
®	Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	1
1.1. Produtos naturais marinhos .....	1
1.2. Fungos associados a algas marinhas antárticas .....	3
1.3. O gênero <i>Arthrinium</i> .....	5
1.4. A radiação UV e fotoproteção .....	6
1.5. Produtos naturais como fotoprotetores .....	8
1.6. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
2.1. Objetivos Específicos .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1. Material e instrumentos utilizados.....	13
3.2. Métodos .....	14
3.2.1. Isolamento e cultivo de fungos endofíticos .....	14
3.2.2. Obtenção de extratos e fracionamento.....	16
3.2.2.1. Obtenção dos extratos.....	16
3.2.2.2. Fracionamento do extrato obtido do cultivo em escala ampliada .....	17
3.2.3. Análise química de extratos e frações .....	18
3.2.4. Análise das frações apolares por CG-EM .....	19
3.2.5. Isolamento e caracterização estrutural.....	20
3.2.5.1. Isolamento por CCDP.....	20
3.2.5.2. Isolamento por CLAE-DAD.....	21
3.2.5.3. Caracterização estrutural de substâncias isoladas .....	22
3.2.6. Ensaio de atividades biológicas .....	22
3.2.6.1. Espectro de absorção na região ultravioleta .....	22
3.2.6.2. Fotoestabilidade.....	23
3.2.6.3. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos .....	24

<b>4. RESULTADOS</b> .....	26
4.1. Seleção bioguiada do meio e tempo de cultivo .....	26
4.2. Fracionamento do extrato .....	28
4.3. Análise das frações apolares por CG-EM.....	29
4.4. Análises químicas .....	32
4.5. Isolamento de metabólitos secundários do fungo <i>Arthrinium</i> sp. ....	36
4.5.1. CLV E.....	36
4.5.2. CLV F.....	37
4.6. Caracterização estrutural .....	40
4.6.1. E.p1.....	40
4.6.2. E.p4.....	48
4.6.3. F.p4.....	56
4.6.4. F.p5 .....	61
4.6.5. F.p3.....	65
4.7. Atividades Biológicas.....	70
4.7.1. Ensaio de fotoproteção e fotoestabilidade .....	70
4.7.2. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos .....	78
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	85
<b>ANEXO I</b> .....	91

## 1. INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

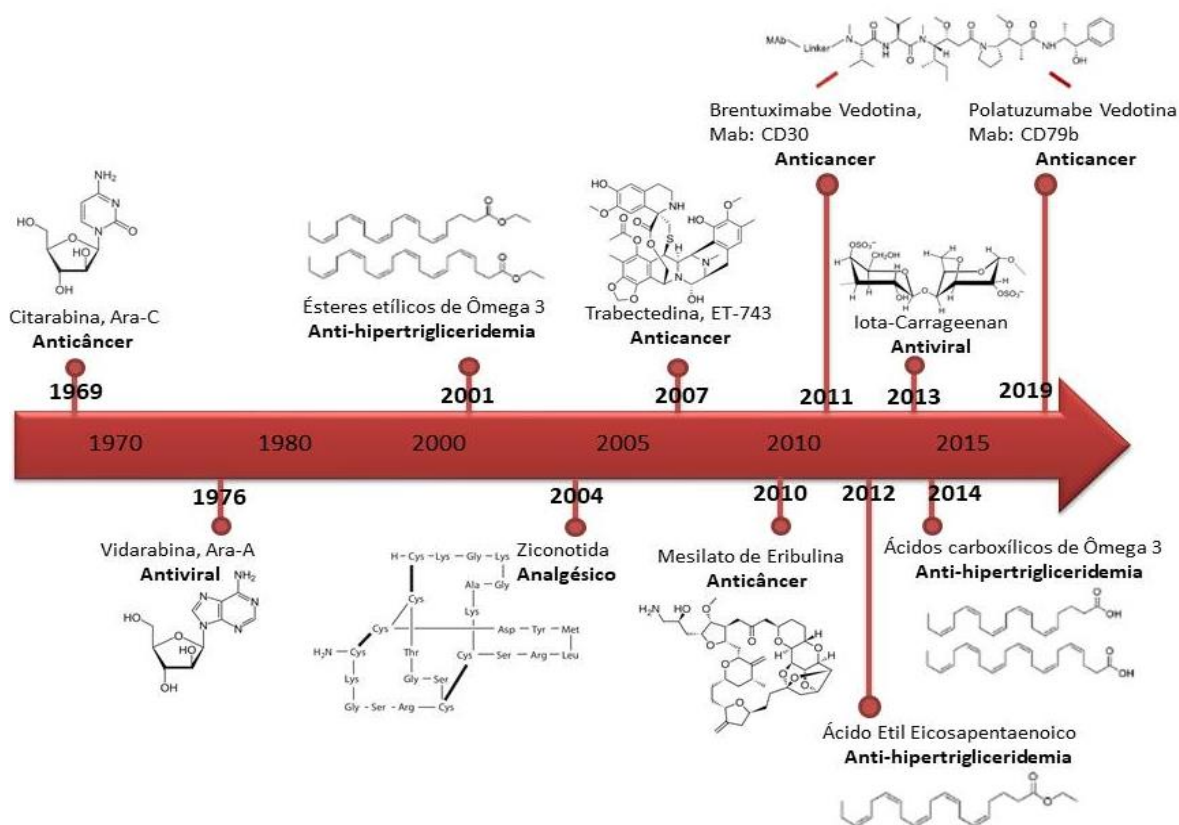
### 1.1. Produtos naturais marinhos

Os mares e oceanos recobrem mais de 70% da superfície terrestre e representam uma fonte de grande biodiversidade (PANGESTUTI et al., 2018). No entanto, menos de 5% dos oceanos foi explorado. Os ecossistemas marinhos proporcionam um ambiente severo, caracterizado por alta pressão, alta salinidade, baixos níveis de nutrientes e condições de alta ou baixa temperatura e alta ou baixa luz natural (LI et al., 2020; NEWMAN e CRAGG, 2016). Para se adaptarem a estas condições, os organismos marinhos deram origem a metabólitos secundários com grande diversidade química, tornando os oceanos uma importante fonte de produtos naturais com bioatividades de grande interesse para a descoberta de novos medicamentos. Uma peculiaridade do ambiente marinho é, também, a presença de organismos sésseis, ou seja, que não possuem mecanismos de locomoção, como algas, esponjas e cnidários, desenvolvendo, portanto, um sistema de defesa químico. Tudo isso, então, culminou em uma diversidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários de vários tipos de classes, que despertam o interesse de muitos pesquisadores de produtos naturais (LI et al., 2020).

Olhando através de uma perspectiva histórica, o “Púrpura Tíria”, um corante retirado de um molusco mediterrâneo que fora utilizado nos tempos romanos, apresentou uma atividade significativa contra células cancerígenas, sendo assim utilizado para tratamento de leucemia na medicina chinesa tradicional. Além deste, um dos primeiros relatos de metabólitos secundários originados de invertebrados marinhos é a toxina conhecida como nereistoxina provinda do verme marinho *Lumbrineris brevicirra*. Pescadores japoneses já conheciam há anos a propriedade inseticida do verme (NEWMAN e CRAGG, 2016). Em 1934, Nitta isolou este ativo e a estrutura foi proposta por Okaichi e Hashimoto em 1962. Em 1965 foi reportada a síntese total do composto por Hagiwara e colaboradores (HAGIWARA et al., 1965; NEWMAN e CRAGG, 2016). A substância mostrou-se uma antagonista da acetilcolina. Nos anos seguintes sua estrutura foi utilizada como base para o desenvolvimento do análogo Padan®, comercializado pela empresa Takeda (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Deve ser mencionado ainda outro relato importante, que é a identificação feita por Bergmann, em 1950, dos nucleosídeos bioativos contendo arabinose espongotimidina e espongouridina ambos isolados da esponja proveniente do Caribe *Tethya crypta*. Esta identificação é diretamente relacionada ao desenvolvimento do fármaco Ara-C, pois sem o relato da arabinose substituindo a ribose ou a desoxirribose, a substância seria um componente comum dos ácidos nucleicos. O fármaco antiviral Ara-A, sintetizado e comercializado pela

Glaxo SmithKline, também está relacionado com esta descoberta, pois também foi baseado na substituição por arabinose. A substância adenosina arabinose (Ara-A) foi, mais tarde, isolada do coral mediterrâneo *Eunicella cavolini* (NEWMAN e CRAGG, 2016). Através de décadas de estudos em instituições de pesquisa e em indústrias farmacêuticas, vários fármacos derivados de organismos marinhos alcançaram com sucesso o mercado, exemplos são mostrados na figura 1. Entre os exemplos, cinco são utilizados no tratamento do câncer (LIANG et al., 2019).

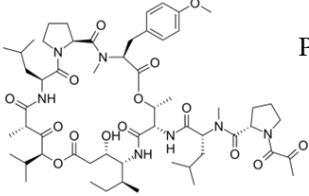
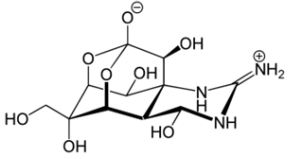
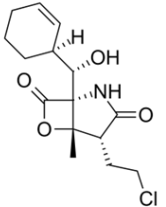


**Figura 1:** Linha do tempo de fármacos aprovados provindos de organismos marinhos. Adaptado de LIANG et al., 2019.

Mais de vinte Produtos Naturais Marinhos (PNMs) candidatos a se tornarem fármacos aprovados estão sob investigações em diferentes fases de testes clínicos, alguns exemplos se encontram na tabela 1. Além disso, há uma abundância de substâncias em avaliações pré-clínicas com a finalidade de desenvolvimentos para várias aplicações (LIANG et al., 2019).



**Tabela 1:** Exemplos de substâncias em fase clínica derivadas de organismos marinhos.

Substância	Fase Clínica	Origem	Atividade
 Plitdepsina	Fase III	Tunicado <i>Aplidium albicans</i>	Anticâncer
 Tetrodotoxina	Fase III	Peixes da família Tetraodontidae	Analgésico contra dores relacionadas ao câncer
 Salinosporamida A	Fase II	Bactérias do gênero <i>Salinispora</i>	Anticâncer

Fonte: (LIANG et al., 2019).

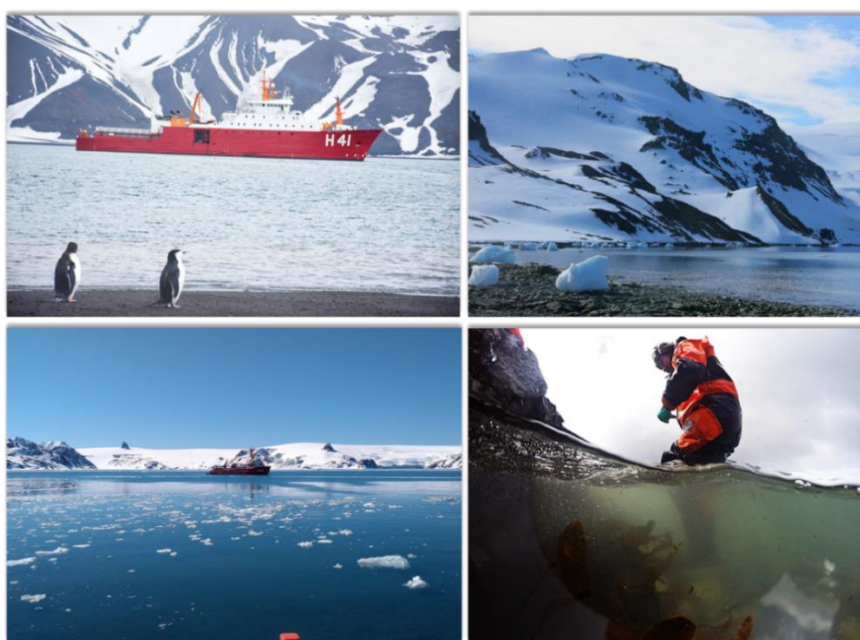
## 1.2. Fungos associados a algas marinhas antárticas

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, através de um fungo do gênero *Penicillium*, é um dos acontecimentos mais marcantes da história da ciência, da medicina e da farmácia do século XX. Essa descoberta abriu o caminho a novos investimentos científicos e, conseqüentemente, à descoberta de novos fármacos, estimulou a investigação de substâncias dessa fonte, os fungos e, acima de tudo, proporcionou a cura de patologias infecciosas para as quais não havia qualquer terapêutica medicamentosa eficaz (PEREIRA, 2005).

A Antártica, figura 2, possui um dos ecossistemas mais primitivos e severos do planeta. Isso se deve às baixas temperaturas, baixos níveis de nutrientes orgânicos, baixa disponibilidade de água, ventos fortes e alta incidência de raios UV. Porém, mesmo sob as condições mencionadas, comunidades de algas e de microrganismos prosperam. As algas marinhas são as principais produtoras primárias do litoral e do infralitoral da Antártica. Elas cobrem aproximadamente 30% da superfície inferior dos mares. Essas comunidades são caracterizadas por um alto grau de endemismo e pela presença de espécies adaptadas ao frio, sendo mais comuns neste ambiente as algas pardas e vermelhas (OGAKI et al., 2019).

Numerosas espécies de fungos foram descritas em associação com as algas marinhas podendo ter relações parasíticas, saprofíticas ou endofíticas. Esses organismos são conhecidos coletivamente como “fungos algícolas” e são relativamente inexplorados, porém com grande potencial metabólico. O interesse aos fungos antárticos em particular vem crescendo devido à capacidade de sobrevivência no ambiente severo da antártica, o que sugere presença de rotas biossintéticas incomuns e promissoras, que poderia conduzir a novos compostos bioativos (OGAKI et al., 2019).

No estudo de Godinho e colaboradores (2013) foram reportadas duas espécies distintas do gênero *Penicillium* isoladas de macroalgas antárticas. De acordo com os autores, os extratos apresentaram uma atividade antifúngica alta e seletiva contra o fungo patógeno de plantas *Cladosporium sphaerospermum* e atividade tripanocida contra *Trypanosoma cruzi*, o causador etiológico da doença de Chagas. O espectro de RMN sugeriu presença de compostos aromáticos altamente funcionalizados (GODINHO et al., 2013; OGAKI et al., 2019). O trabalho de Furbino e colaboradores (2014) também relatou fungos algícolas capazes de produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica seletiva contra *Candida albicans*, *Candida krusei* e *C. sphaerospermum*. Além disso, o estudo demonstrou a capacidade do fungo *Penicillium steckii* isolado da alga *Monostroma hariotii* em produzir substâncias antivirais que inibiram a proliferação do vírus causador da febre amarela (FURBINO et al., 2014; OGAKI et al., 2019).



**Figura 2:** As paisagens do Continente gelado, a Antártica, e a pesquisa desenvolvida durante a OPERANTAR XXXVI, 2017. Fotos por: Gustavo Souza dos Santos.

### 1.3. O gênero *Arthrinium*

O gênero *Arthrinium* foi reportado como sendo cosmopolita, ocorrendo em vários habitats e em ambos ambientes terrestre e marinho. O fungo *Arthrinium* sp. marinho é mais comumente citado como endofítico de algas marinhas, especialmente algas pardas (HEO et al, 2018). Fungos endofíticos são membros funcionais e essenciais de uma planta ou alga, fazendo parte de sua microbiota e não causando nenhum dano visível ou sintomas de doenças. Esta interação é classificada como uma simbiose. As plantas e algas habitadas por fungos endofíticos apresentam um vigor vegetativo aumentado, melhores defesas contra fungos invasivos e contra vários patógenos. Em troca, os endófitos residentes ganham um nicho ecológico específico, acesso a nutrientes e proteção contra estresses e dessecação (FURTADO et al., 2019)

Atualmente, 98 espécies do gênero *Arthrinium* foram relatados no Mycobank (2020). O gênero já foi reportado como produtor de muitos compostos naturais, como, por exemplo, arthronas, arthrichitinas, terpestacina, norlichexantona, mirocinas, libertellenonas, spiroarthrinols e griseofulvina. Entretanto, um número limitado de substâncias bioativas (tabela 2) foram relatadas, devido a número reduzido de estudos. Com isso, sugere-se que o fungo *Arthrinium* sp. possui grande potencial para produzir vários compostos bioativos, muitos dos quais ainda não foram descritos (HEO et al, 2018).

**Tabela 2:** Exemplos de substâncias bioativas isoladas de fungos do gênero *Arthrinium*.

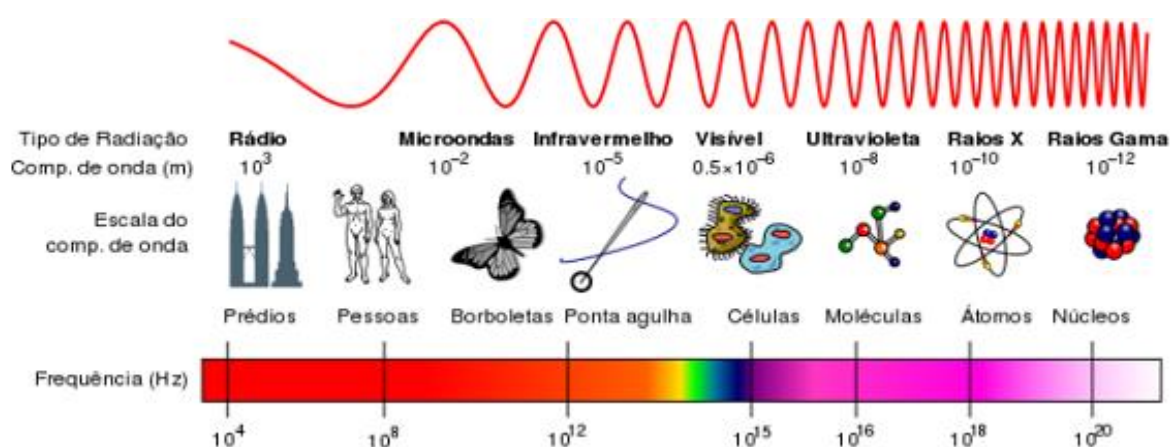
<b>METABÓLITO(S)</b>	<b>ESPÉCIE</b>	<b>BIOATIVIDADE(S)</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Arthpironas (F-I) Apiosporamida	<i>Arthrinium</i> sp.	Antibacteriana	BAO et al., 2018
Arthpironas (A-C)	<i>Arthrinium arundinis</i>	Citotóxica Inibição de acetilcolinesterase	WANG et al., 2015
Arthrininas (A-D)	<i>Arthrinium</i> sp.	Antitumoral Antiproliferativa	EBADA et al., 2011
Decarboxiidroxicitrinona Mirocina A Libertellenona C	<i>Arthrinium</i> sp.	Antiangiogênica	BAO et al., 2018

Meleina <i>Cis</i> -(3R,4R)- hidroximeleina	<i>Arthrinium</i> sp.	Esquistossomicida	RAMOS et al., 2013
Arthona C 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1- metilxantona	<i>Arthrinium</i> sp.	Antioxidante (DPPH, ABTS)	BAO et al., 2018

Em virtude das informações citadas anteriormente, o fungo *Arthrinium* sp., isolado da alga marinha *Phaeurus antarcticus*, coletada na ilha Greenwich - Antártica; foi objeto de nossos estudos visando a busca por metabólitos bioativos. Inicialmente, outro fungo foi também estudado juntamente com o fungo *Arthrinium* sp.: o *Epicoccum dendrobii*, também isolado da alga *Phaeurus antarcticus*.

#### 1.4. A radiação UV e fotoproteção

O sol emite um espectro eletromagnético amplo em comprimentos de onda (figura 3), que compreendem entre 10-12 nm (raios- $\gamma$ ) a 104 nm (ondas de rádio) (BENEVENUTO, 2012). Entre todos, a luz ultravioleta é a mais prejudicial para a pele. A radiação ultravioleta (UVR) é dividida em três categorias dependentes dos comprimentos de onda: curtos ou UVC (200-280 nm), médios ou UVB (280-320 nm) e longos ou UVA (320-400 nm) (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013).



**Figura 3:** Espectro eletromagnético emitido pelo sol. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/9-ano/materia-e-energia-9-ano/ondas-eletromagneticas/a/o-espectro-eletromagnetico>. Acesso em 17 de fevereiro de 2020.

A radiação UVC é completamente absorvida na atmosfera terrestre pelas moléculas de oxigênio e ozônio. Os raios UVB compreendem apenas a 4-5% da radiação ultravioleta que atinge a terra e, por apresentarem um comprimento de onda menor, possuem maior frequência e maior energia. Isso faz com que os raios UVB sejam capazes de penetrar apenas nas camadas mais superficiais da pele, sendo responsáveis por causar queimaduras solares, câncer de pele e fotoenvelhecimento (BENEVENUTO, 2012). A radiação UVA representa mais de 90% dos raios UV totais a atingir a superfície do planeta, tendo capacidade de penetrar mais profundamente na pele humana, alcançando a epiderme e a derme, além de aumentar a geração de espécies reativas do oxigênio (ERO). Exposição crônica aos raios UVA pode danificar as estruturas da derme, ocasionando em fotoenvelhecimento prematuro da pele causando flacidez e rugas (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015). Pode também produzir danos estruturais ao DNA, prejudicar o sistema imunológico e levar ao câncer (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013).

A quantidade de radiação ultravioleta (UV) atingindo a superfície da Terra aumentou acentuadamente nos últimos anos (SAEWAN e JIMTAISONG, 2013). Este fenômeno, adicionalmente ao excesso de exposição à radiação UV da luz solar, vem contribuindo ao aumento constante de distúrbios relacionados à pele humana (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

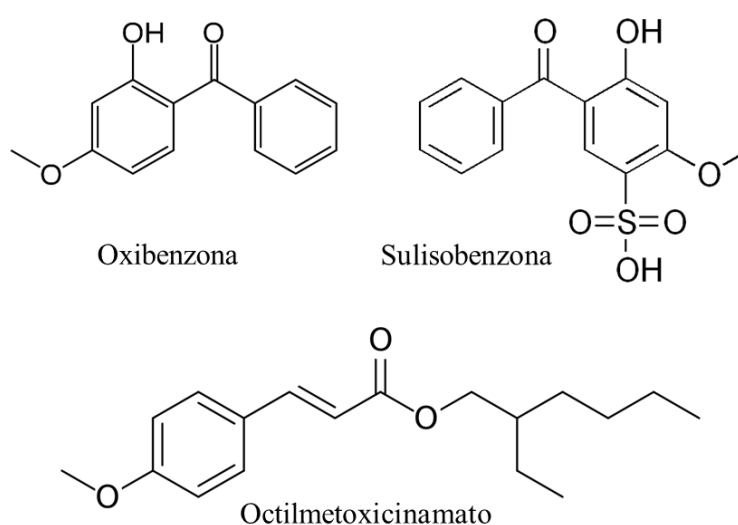
Para prevenir estes efeitos nocivos que os raios solares podem causar, a Academia Americana de Dermatologia recomenda o uso de chapéus/bonés, camisetas, óculos de sol, barracas, aplicação uniforme de protetores solares e evitar a exposição ao sol por longos períodos, principalmente entre 10-16 horas (MACIEL, 2016). A aplicação tópica de protetores solares é uma forma eficiente de proteção para a pele frente aos efeitos nocivos da radiação UV emitida pelo sol (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

A depleção da camada de ozônio levou à níveis aumentados de radiação ultravioleta a atingir toda a superfície terrestre, porém este fenômeno é mais pronunciado na Antártica principalmente na primavera, onde houve um aumento da radiação UV de 130% desde 1980 (RUHLAND et al., 2005). Os organismos habitantes dessa região, portanto, necessitam de algum tipo de fotoproteção para a sobrevivência (AVILA et al., 2015).

Sendo assim, é promissora e justificada a procura de substâncias fotoprotetoras em organismos de origem Antártica.

### 1.5. Produtos naturais como fotoprotetores

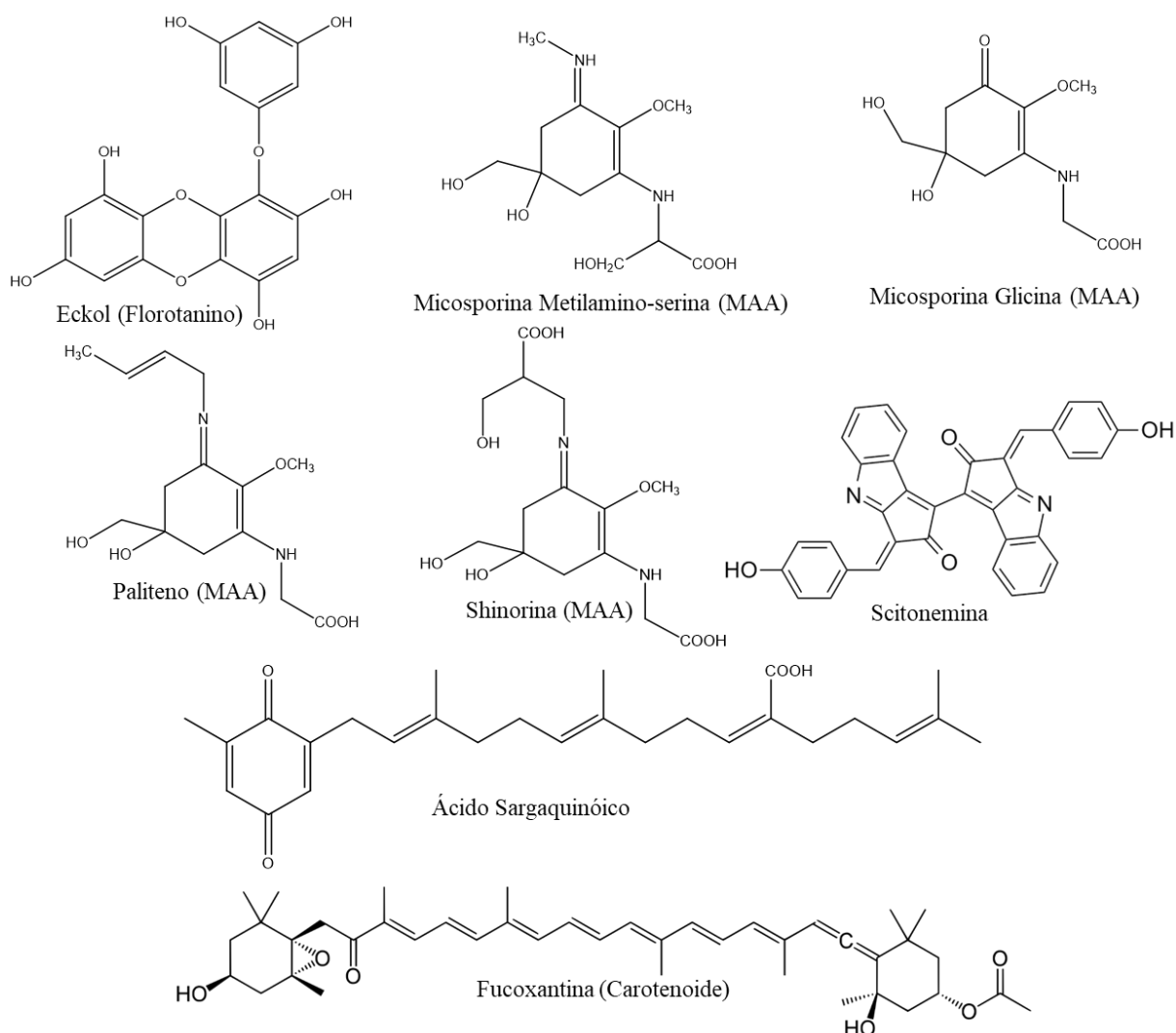
Os ativos fotoprotetores são classificados em duas categorias amplas baseado em seu mecanismo de ação: inorgânicos e orgânicos. Agentes inorgânicos são partículas inertes que refletem os fótons de ambos raios UVA e UVB da superfície da pele. Porém, essas partículas são comumente visíveis, o que causa um efeito visual cosmeticamente indesejável. São tipicamente presentes em protetores solares inorgânicos o óxido de zinco e o dióxido de titânio. Os ativos orgânicos são comumente compostos aromáticos conjugados com um grupamento carbonílico, o que permite que a molécula absorva os raios UV. Exemplos de fotoprotetores comercializados são oxibenzona, sulisobenzona e octilmetoxicinamato, mostrados na figura 4. Essas moléculas, entretanto, podem ser ativadas pela radiação UV, resultando em produtos fotossensibilizantes que podem causar efeitos adversos na pele como alergias e inflamações (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).



**Figura 4:** Ativos orgânicos utilizados em formulações fotoprotetoras.

Diversos organismos, especialmente aqueles expostos a radiações UV intensas, desenvolveram vários mecanismos fotoadaptativos incluindo produção de metabólitos antioxidantes e capazes de absorver raios UV (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015). Essas substâncias naturais receberam uma atenção considerável a fim de seu uso para fotoproteção e redução do dano causado pelos raios solares. Exemplos desses produtos são as scitoneminas, exclusivas de cianobactérias; micosporinas, encontradas em fungos; aminoácidos tipo micosporinas (MAAs), encontrados em cianobactérias, algas e animais e os fenilpropanóides e

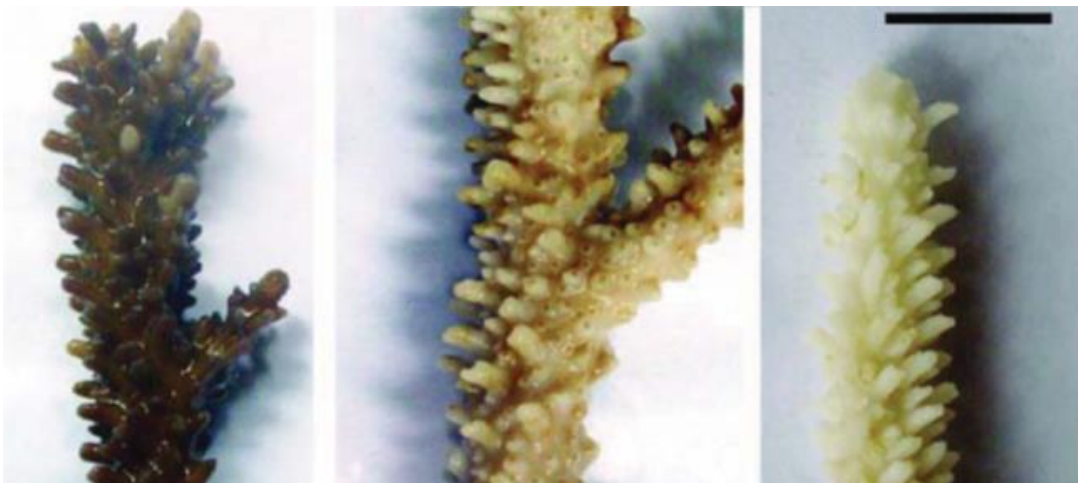
flavonoides, facilmente encontrados em plantas complexas (PALLELA et al., 2010). Alguns ativos fotoprotetores importantes derivados de organismos marinhos são mostrados na figura 5. Um estudo realizado em colaboração com nosso grupo de pesquisa, demonstra a utilização tópica da fucoxantina, um carotenoide comum em algas marinhas, utilizando-se de métodos *in vitro* para avaliar o seu potencial fotoprotetor e sua capacidade fototóxica, mostrando que a substância aumenta a capacidade de absorção da luz UV de protetores solares em 72%, além de diminuir a produção de ERO (TAVARES et al., 2020).



**Figura 5:** Substâncias fotoprotetoras isoladas de organismos marinhos. Adaptado de PALLELA et al., 2010.

A busca por novas substâncias com capacidade fotoprotetora, principalmente as de origem natural, é importante devido a demonstrações em estudos científicos de alguns problemas ocasionados pelas substâncias utilizadas atualmente em formulações de protetores solares. Preocupações sobre a segurança da oxibenzona, um dos ativos mais utilizados em

produtos fotoprotetores, surgiram após relatos de casos de dermatites de contato causadas por alergia e fotoalergia referente ao composto. A oxibenzona também mostrou ser um contaminante ambiental potente, pois estudos demonstraram que a substância não é totalmente eliminada durante o tratamento de água. O produto e seus metabólitos foram detectados em peixes, que demonstraram efeitos antiandrogênicos e antiestrogênicos (LIM et al., 2017). Além disso, como mostrado no estudo de Danovaro et al. (2008), os fotoprotetores orgânicos estão danificando recifes de corais, causando branqueamentos (figura 6), liberação de zooxantelas e infecções virais. O impacto causado pelos fotoprotetores pode ser crucial no habitat de recifes de corais com baixa renovação de água e alta taxa de visitação de turistas (DANOVARO et al., 2008) e, por isso, os arquipélagos Havaí (EUA) e Palau decretaram recentemente leis proibindo o uso de formulações fotoprotetoras contendo substâncias químicas que podem ser prejudiciais à vida marinha local (RAFFA et al., 2018; G1, 2020).



**Figura 6:** Imagens mostrando o branqueamento do coral *Acropora divaricata* causado por fotoprotetores após 24 horas de exposição. As imagens correspondem, na ordem da esquerda para a direita, ao controle, ao coral exposto a fotoprotetores incubado a 28° C e ao coral incubado a 30° C, também com exposição às formulações. Fonte: DANOVARO et al., 2008.

### 1.6. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos

Os neutrófilos são amplamente reconhecidos por desempenhar um papel importante nas respostas inflamatórias agudas, além de demonstrarem um papel na modulação inflamatória crônica e doenças autoimunes (CHEN et al., 2016). São os primeiros leucócitos a serem recrutados para um tecido lesionado ou infectado. Estas células têm um potencial para gerar moléculas com atividades microbicida e oxidante, que são importantes para a eliminação dos patógenos. Adicionalmente, os neutrófilos sintetizam e secretam mediadores inflamatórios,



para amplificar e regular a resposta inflamatória. Estas propriedades fazem dos neutrófilos as principais células do processo inflamatório agudo. A fagocitose, a degranulação, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a liberação de redes formadas por DNA, proteínas e enzimas digestivas (NETs, armadilhas extracelulares dos neutrófilos) são as principais atividades biológicas dos neutrófilos responsáveis pela eliminação dos patógenos (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; DINAUER, 2019).

Em particular, a produção de ERO resulta do metabolismo oxidativo do neutrófilos, que é mediado pelo complexo enzimático NADPH oxidase e pelas enzimas dos grânulos citoplasmáticos. Normalmente o arsenal tóxico produzido pelos neutrófilos é liberado no ambiente intracelular no fagolisossomo sobre o alvo internalizado. A importância do neutrófilo em controlar a infecção na fase inicial é evidente em pacientes com neutropenia (diminuição do número de neutrófilos), que resulta na dificuldade de conter a disseminação do patógeno, podendo desenvolver sepse, bem como em pacientes com deficiência da atividade da NADPH oxidase, os quais são mais suscetíveis às infecções causadas por microrganismos. Ao contrário, em processos inflamatórios crônicos, a ativação exacerbada dos neutrófilos pode resultar em exposição dos tecidos do hospedeiro às moléculas oxidantes e enzimas proteolíticas, levando à lesão tecidual mediada pela resposta imune. Desta forma, a ativação inadequada ou excessiva de neutrófilos resulta em danos ao hospedeiro (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; DINAUER, 2019). Assim, o recrutamento e a ativação dos neutrófilos podem ser alvos terapêuticos para diferentes condições clínicas, nas quais o papel anti-inflamatório dos neutrófilos possa ser controlado de modo a restringir os efeitos deletérios de uma resposta excessiva sem prejudicar sua função para a eficiência da resposta imune.

## 2. OBJETIVOS

Otimizar o cultivo do fungo *Arthrinium* sp., isolar e realizar a identificação de seus metabólitos secundários e avaliar o potencial biológico de extratos, frações e substâncias.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Realizar o cultivo e obter os extratos dos fungos *Arthrinium* sp. e *Epicoccum dendrobii* isolados da alga marinha antártica *Phaeurus antarcticus*, obter o perfil químico e avaliar o potencial biológico de cada um, selecionando, assim, o mais promissor;
- Selecionar as condições mais promissoras para o crescimento do fungo *Arthrinium* sp. para realização do cultivo em escala ampliada;
- Fracionar o extrato do fungo *Arthrinium* sp. com a finalidade de isolar e identificar as estruturas dos constituintes majoritários das frações mais ativas;
- Avaliação do potencial biológico de extrato, frações e substâncias em ensaios para avaliar o potencial fotoprotetor e de modulação da produção de ERO.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material e instrumentos utilizados

Os instrumentos utilizados foram: balança semi-analítica (modelo FA2204CI-BI, Bioscale); espectrômetro de RMN (modelo DRX 500, Bruker, Billerica - Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP); Cromatógrafo (modelo LC-6AD, Shimadzu) com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (modelo SPD-M10A, Shimadzu - Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – LQOAM-NPPNS-USP); Espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo microTOF Q II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI) (Laboratório de Química Orgânica – NPPNS-FCFRP-USP); Cromatógrafo (modelo QP 2010, Shimadzu) acoplado à espectrômetro de massas com ionizador por impacto de elétrons (EI) com energia de colisão de 70 eV e com injetor split (250 °C) (Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO) do Departamento de Ciências Biomoleculares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.); espectrofotômetro Agilent 8453.

Os equipamentos de uso geral utilizados foram: capela de fluxo laminar (Pachane); sistema ultrapurificador de água Milli-Q (Millipore, Bedford); autoclave vertical (Phoenix); evaporador rotativo (IKA, modelo RV 10 control); bomba a vácuo e ultrassom.

Os demais materiais utilizados foram: coluna analítica C-8 (25 cm x 4,6mm, 5µm– Shimadzu Shim-pack); coluna semi-preparativa C-8 (25cm x 10mm, 10µm - Shimadzu Shim-pack), coluna CG: DB-5 MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent); solvente de grau CLAE metanol (JT Baker); solventes deuterados: metanol (CD<sub>3</sub>OD), dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich); solventes de grau analítico: metanol, acetato de etila, hexano, etanol e acetona. Placas cromatográficas (Xtra SIL G/UV<sub>254</sub>) Macherey-Nagel®, utilizando-se como reveladores irradiação UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, câmara saturada com iodo ressublimado, vanilina sulfúrica e reagente de Dragendorff. O meio de cultura utilizado para o crescimento dos fungos foi o caldo de batata dextrose (CBD) e o Ágar Batata Dextrose (ABD).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Isolamento e cultivo de fungos endofíticos

O fungo *Arthrinium* sp., endofítico da alga *Phaeurus antarcticus*, já havia sido isolado utilizando-se do método I de esterilização: imersão da superfície algal em etanol 70% (v/v em água destilada) por 15 segundos, seguido de enxágue em água destilada autoclavada (ERBERT et al., 2012). O fungo se encontrava conservado em solução de água destilada contendo seus conídeos. Alguns mililitros desta solução foram transferidos para placa de petri contendo meio sólido Ágar Batata Dextrose (ABD), com finalidade da reativação do crescimento do fungo. Inoculadas as placas, estas foram mantidas na temperatura de 25° C ao abrigo da luz durante 7 dias.

Decorridos os 7 dias, os fungos foram cultivados nos meios de cultivo líquido CBD e sólido arroz parboilizado em uma escala reduzida, visando a escolha do melhor meio de cultivo para produção qualitativa de metabólitos pelo fungo, realizada de forma bio guiada. Os meios foram preparados em frascos do tipo Erlenmeyer de volume 500 mL da seguinte forma:

- 5,4 g do meio autoclavado CBD dissolvidos em 200 mL de água do mar artificial SWBG-11 (tabela 3) preparada no laboratório;
- 90 g de arroz parboilizado e 90 mL de água do mar natural, seguido de autoclavagem.

Após preparo dos meios, foram transferidos plugs do meio ABD da placa de petri contendo os fungos para os frascos Erlenmeyer contendo meio de cultivo. Em alguns destes frascos não foram inoculados os fungos, a fim de se obter o extrato controle. Todos os cultivos foram mantidos a 25° C em modo estático durante 30 dias. Esses procedimentos foram aplicados também no cultivo do fungo *Epicoccum dendrobii*, enquanto analisado.

**Tabela 3:** Componentes e suas respectivas concentrações da água do mar artificial SWBG.

Componente	Concentração final no meio (g/L)
NaCl	12,500
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,000
KCl	0,250
NaNO <sub>3</sub>	1,500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,040
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
Ácido Cítrico	0,006
Citrato de Amônio Férrico	0,006
Na <sub>2</sub> EDTA	0,001
Carbonato de Sódio	0,020
Solução de micronutrientes <sup>1</sup>	1 mL *

**Legenda:** \* Valor absoluto adicionado à cada 1 litro de meio de cultura preparado. <sup>1</sup> A solução de micronutrientes compreende uma mistura de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2,860 g/L), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (1,810 g/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,222 g/L), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,390 g/L), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,079 g/L), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,049 g/L) (SILVA, 2016).

Após extração e análise dos cultivos citados anteriormente, foi avaliada, ainda, a produção qualitativa dos metabólitos do fungo *Arthrimum* sp. em períodos de crescimento distintos: 7, 14, 21 e 28 dias utilizando-se o meio CBD e mantidos nas mesmas condições já citadas.

A partir do momento que foi determinado o melhor meio de cultivo e tempo de crescimento para produção de metabólitos secundários pelo fungo *Arthrimum* sp., o escalonamento do cultivo foi realizado a fim de obter maior biomassa para realização dos demais experimentos. Foram utilizados 50 frascos tipo Erlenmeyer volume 500 mL contendo 5,4 g do meio autoclavado CBD dissolvidos em 200 mL de água do mar artificial, onde foram

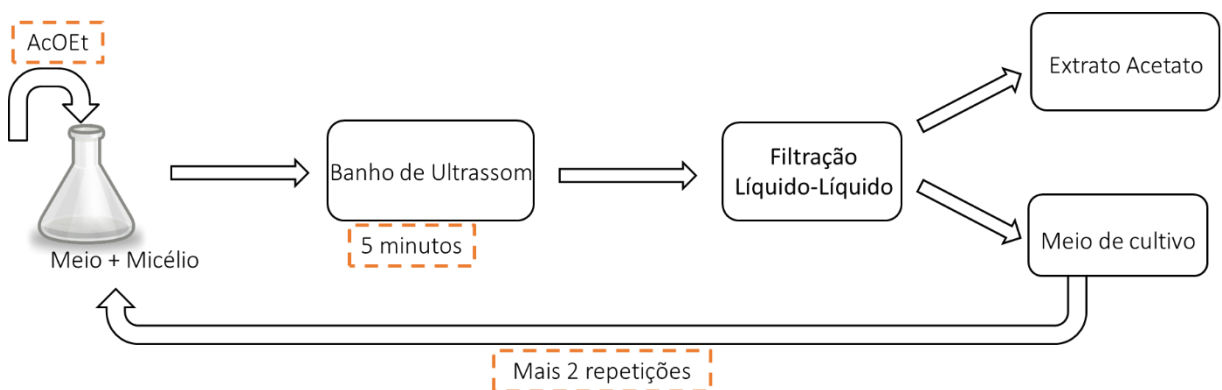
inoculados os plugs de meio ABD contendo os fungos. Para obtenção do controle, 3 frascos Erlenmeyer contendo meio CBD foram deixados sem os inóculos dos fungos. Novamente os frascos foram mantidos estáticos, à temperatura de 25° C.

Todos os experimentos de isolamento e cultivo de fungos endofíticos foram realizados em condições assépticas na capela de fluxo laminar e utilizando-se de materiais previamente esterilizados e EPIs.

### 3.2.2. Obtenção de extratos e fracionamento

#### 3.2.2.1. Obtenção dos extratos

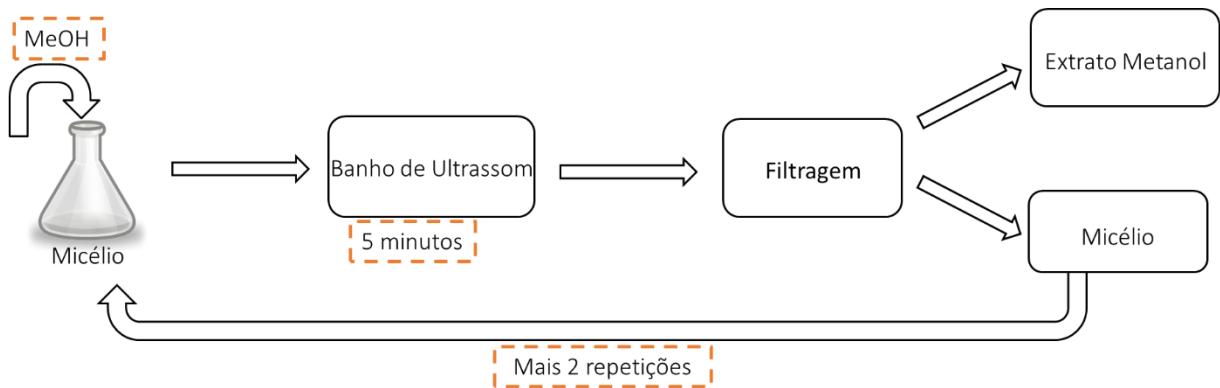
Para a obtenção dos extratos, foram utilizados os solventes acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). A primeira etapa de extração, mostrada na figura 7, consiste na adição de acetato de etila ao cultivo (meio e micélio) seguido de trituração do micélio, a fim de aumentar a superfície de contato do mesmo com o solvente. O cultivo contendo solvente, então, permanece em banho de ultrassom por 5 minutos. Decorrido o tempo, o líquido é filtrado e, no caso de extração do meio líquido CBD, transferido para um funil de separação. O meio de cultivo aquoso e o acetato de etila são imiscíveis, resultando em formação de duas fases, separando-se, assim, o extrato acetato de etila do meio de cultivo, sendo que o último retorna ao frasco inicial contendo o micélio para realização deste procedimento mais duas vezes. No caso de extração de cultivo em meio sólido arroz o método é semelhante, não sendo, porém, necessário realizar o procedimento de filtração por partição.



**Figura 7:** Esquema da primeira etapa da extração do fungo *Arthrinium* sp.

Finalizada a primeira etapa de extração o material passa pela segunda etapa de extração, figura 8, que consiste na adição de metanol seguido de 5 minutos em banho de ultrassom e

filtração do extrato. O mesmo procedimento é realizado mais duas vezes. No caso de extração do meio líquido (CBD) o meio de cultivo é separado do micélio, antes da adição do metanol, e é descartado após exposição à água sanitária de um dia para o outro. Apenas o micélio fúngico passa pela segunda etapa. O metanol é um solvente polar e é, portanto, miscível ao meio de cultivo aquoso, sendo utilizado em extrações após o uso do acetato de etila para garantir que se extraia os componentes mais polares que o acetato de etila não foi capaz de extrair.



**Figura 8:** Esquema da segunda etapa da extração do fungo *Arthrinium sp.*

Terminados os procedimentos de extração, os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida e calor, não ultrapassando a temperatura de 30° C para que não houvesse degradação de seus componentes.

### 3.2.2.2. Fracionamento do extrato obtido do cultivo em escala ampliada

Após obtido o extrato do cultivo em escala ampliada do fungo *Arthrinium sp.*, este foi submetido a um fracionamento utilizando-se o método de cromatografia líquida a vácuo (CLV). Neste procedimento foi empregada uma coluna de 200 mL contendo sílica gel de fase normal como fase estacionária, e como fase móvel foi utilizado um sistema de solventes em gradiente de polaridade. Os solventes utilizados foram n-hexano, acetato de etila e metanol, todos em grau analítico, resultando em 9 frações. O sistema de solventes utilizado nesta metodologia encontra-se melhor descrito na tabela 4.

**Tabela 4:** Sistema de solventes utilizado na metodologia de fracionamento por CLV.

<b>Fração</b>	<b>Sistema de Solventes</b>
CLV A	100 % Hexano
CLV B	90% Hexano 10% Acetato de etila
CLV C	80% Hexano 20% Acetato de etila
CLV D	60% Hexano 40% Acetato de etila
CLV E	40% Hexano 60% Acetato de etila
CLV F	20% Hexano 80% Acetato de etila
CLV G	100% Acetato de etila
CLV H	75% Acetato de etila 25% Metanol
CLV I	100% Metanol

É importante ressaltar que não foi utilizado todo o extrato bruto no fracionamento, sendo uma pouca quantidade armazenada, além daquela destinada aos experimentos de avaliação de atividade biológica, caso houvesse necessidade de realizar análises complementares do extrato. As frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e calor.

### 3.2.3. Análise química de extratos e frações

O extrato e as frações obtidas foram analisados via técnicas cromatográficas. Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio contendo sílica gel de fase normal Macherey-Nagel®, utilizando-se como reveladores irradiação de luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, câmara saturada com iodo ressublimado, vanilina sulfúrica e reagente de Dragendorff. Como fase móvel foram utilizados os solventes orgânicos hexano e acetato de etila grau analítico e gotas de ácido acético. Foi empregada também para análises químicas a cromatografia líquida de alta



eficiência acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) em fase reversa utilizando-se uma coluna analítica C-8 (25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m - Shimadzu Shim-pack). Foram utilizados para as análises três diferentes métodos de gradiente de solventes orgânicos (todos grau CLAE) e água deionizada, mostrados na tabela 5:

**Tabela 5:** Métodos utilizados nas análises por CLAE-DAD

<b>Método</b>	<b>Tempo de Análise</b>	<b>% Solvente orgânico</b>
1	0 minutos	15% MeOH
	20 minutos	100% MeOH
	22 minutos	100% MeOH
	23 minutos	15% MeOH
	25 minutos	15% MeOH
2	0 minutos	15% ACN
	20 minutos	100% ACN
	22 minutos	100% ACN
	23 minutos	15% ACN
	25 minutos	15% ACN
3	0 minutos	15% MeOH
	3 minutos	15% MeOH
	30 minutos	100% MeOH
	35 minutos	100% MeOH
	36 minutos	15% MeOH
	40 minutos	15% MeOH

Em todos os métodos utilizados o fluxo de solventes foi mantido a 1mL/minuto e o volume de injeção automática foi de 20  $\mu$ L.

#### 3.2.4. Análise das frações apolares por CG-EM

As frações mais apolares resultantes do fracionamento por CLV, ou seja, as frações em que foi utilizado uma maior porcentagem de hexano na fase móvel (A, B, C e D) foram submetidas a análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas da Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO) do Departamento de Ciências Biomoleculares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

As amostras foram analisadas por um cromatógrafo gasoso Shimadzu QP-2010 (Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a detector de espectrometria de massas com analisador de impacto de elétrons (EI) com energia de colisão de 70 eV, utilizando-se como fase estacionária uma coluna capilar DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) e como gás carreador o hélio (99,999%). O aquecimento foi programado para a temperatura de 70-330° C. A identificação individual dos componentes das frações foi realizada comparando espectros de fragmentação obtidos com os espectros fornecidos pelos bancos de dados Wiley 7 e NIST 11. Adicionalmente, foi calculado os índices de retenção, determinados pelo índice de Kovats (IK) de acordo com a fórmula (DE FELÍCIO, 2010):

$$IK = 100a + 100 [tR(b) - tR(a)] / [tR(z) - tR(a)]$$

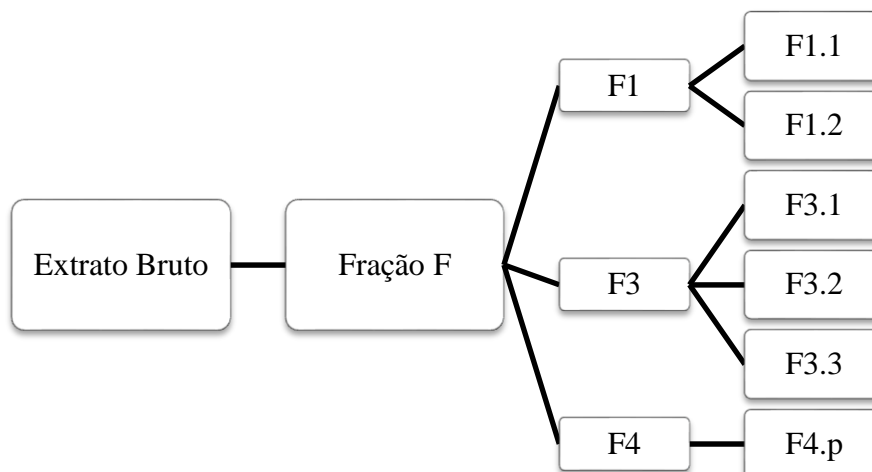
Onde: **tR** = tempo de retenção; **a** = alcano com n° de carbonos igual ao da substância; **b** = substância que se deseja obter o índice; **z** = alcano com n° de carbonos igual ao a+1.

Para execução do cálculo, realizou-se a análise sob mesmas condições cromatográficas dos padrões de hidrocarbonetos (alcanos C<sub>9</sub>-C<sub>40</sub>). O IK calculado foi comparado com índices relatados na literatura para as substâncias identificadas. Para apresentação dos resultados foram consideradas apenas substâncias majoritárias (porcentagem de área do pico maior ou igual a 2%) que apresentaram índice de similaridade (IS) com os espectros de fragmentação de massas fornecido pelo banco de dados superior a 80% e que obtiveram um índice de Kovats próximo ao descrito na literatura.

### **3.2.5. Isolamento e caracterização estrutural**

#### **3.2.5.1. Isolamento por CCDP**

Para este procedimento de isolamento de substâncias foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio recobertas por sílica gel de fase normal, e como fase móvel, após testes para determinar o melhor sistema de solventes para separação dos constituintes da fração CLV F, foi utilizado o hexano e o acetato de etila em uma proporção de 1:1 com adição de 10 gotas de ácido acético. Neste método, a fração é aplicada como uma faixa contínua na base da placa e após eluída na fase móvel, as substâncias se separam por faixas de acordo com os diferentes tempos de retenção. Essas faixas são, então, recortadas e as novas frações/substâncias são extraídas da sílica utilizando-se acetato de etila. Na figura 9 encontra-se o fluxograma do fracionamento e isolamento de substâncias da fração CLV F a partir do método de CCDP.

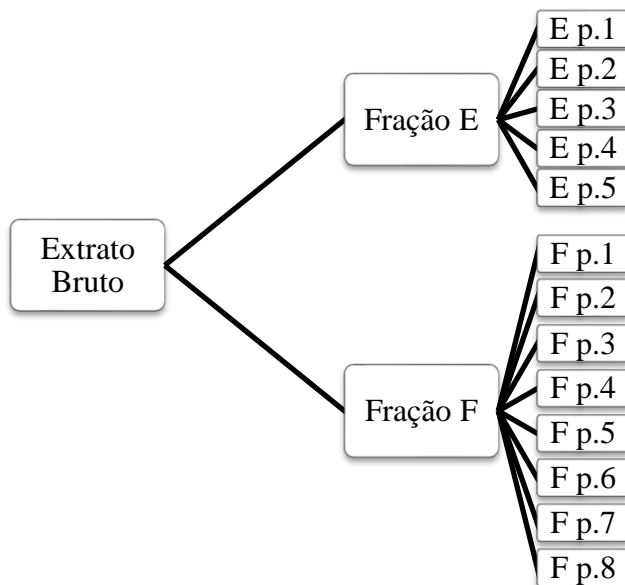


**Figura 9:** Fluxograma do isolamento da fração F do extrato do fungo *Arthrinium* sp. empregando-se CCDP.

### 3.2.5.2. Isolamento por CLAE-DAD

Após isolamentos por CCDP seguido de análises químicas e de espectroscopia de RMN, foi concluído que seria necessária a purificação das substâncias utilizando CLAE-DAD semi-preparativa em fase reversa. Foi utilizada coluna semi-preparativa C-8 Ascentis Express (25 cm x 10 mm, 10  $\mu$ m - Sigma-Aldrich) e sistema de eluição em gradiente utilizando MeOH grau CLAE e água deionizada. Passaram por esse processo de isolamentos as frações CLV E e CLV F. Na figura 10 encontra-se o fluxograma do fracionamento e isolamento de substâncias a partir do método de CLAE-DAD.

O método utilizado nos procedimentos de isolamento, previamente testado em CLAE-DAD analítica, foi: 0 minutos - 30% MeOH, 3 minutos - 30% MeOH, 25 minutos - 100% MeOH, 30 minutos - 100% MeOH, 31 minutos - 30% MeOH, finalizando em 35 minutos com 30% de MeOH. A injeção foi manual e o volume foi de 500  $\mu$ L. O fluxo dos solventes foi mantido a 3 mL/minuto.



**Figura 10:** Fluxograma do isolamento das frações E e F do extrato do fungo *Arthrimum* sp. empregando-se CLAE-DAD.

### 3.2.5.3. Caracterização estrutural de substâncias isoladas

Para caracterização estrutural das substâncias isoladas foi utilizada a espectrometria de massas, a partir de um espectrômetro de massas da marca Bruker, modelo microTOF Q II com fonte de ionização em elétron-spray (ESI) e com analisador do tipo tempo de voo (TOF) do Laboratório de Química Orgânica (NPPNS-FCFRP-USP) e a espectroscopia de RMN unidimensional ( $^1\text{H}$ ) e bidimensional (HMBC e HSQC), utilizando-se um espectrômetro de RMN modelo DRX 500, Bruker, Billerica do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. Para solubilização das amostras analisadas por RMN foram utilizados solventes deuterados da Sigma-Aldrich: metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ). Os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura para confirmação da identidade das substâncias isoladas.

### 3.2.6. Ensaios de atividades biológicas

#### 3.2.6.1. Espectro de absorção na região do ultravioleta

Estes ensaios, assim como os de fotoestabilidade, foram realizados pela própria mestranda no laboratório de Tecnologia de Cosméticos da FCFRP-USP sob supervisão da Profa. Dra. Lorena R. Gaspar Cordeiro. Os espectros de absorção na região ultravioleta das amostras foram determinados pela análise de suas soluções em metanol a uma concentração de

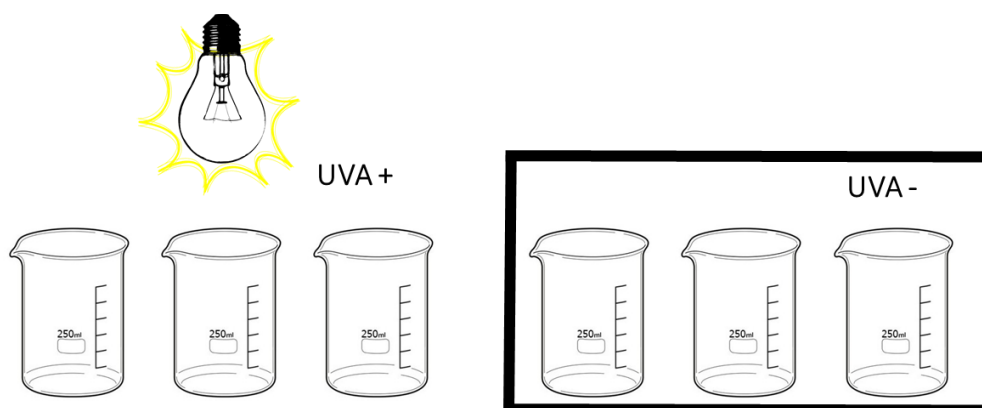
100 µg/mL, em espectrofotômetro Agilent 8453 na faixa de 200-400 nm e os gráficos de absorvância x comprimento de onda foram feitos no software OriginPro 8 (OriginLab Corporation).

A varredura para determinação do espectro de absorção na região ultravioleta de extratos, frações e substâncias é realizada para avaliar se a amostra tem capacidade de absorver a radiação UV provinda dos raios solares e em qual comprimento de onda. Caso o resultado seja promissor, a amostra é submetida ao ensaio de fotoestabilidade.

Os espectros de absorção na região do UV de substâncias puras foram obtidos diretamente pelo software Class VP CLAE software (Shimadzu) do instrumento de CLAE-DAD, visto que o detector por arranjo de diodos (DAD) realiza uma varredura na faixa de 190-400 nm de cada substância que passa por análise a fim de detectá-las.

### **3.2.6.2. Fotoestabilidade**

As soluções das amostras a serem testadas (também a 100 µg/mL), foram feitas em triplicatas. 1 mL das soluções foram adicionados em béqueres de vidro e submetidos à evaporação do solvente para a formação de um filme seco, das quais 3 amostras foram mantidas em abrigo da luz, e 3 foram submetidas a uma dose de radiação UVA, figura 11, de 4 mW/cm<sup>2</sup> emitida por uma lâmpada Philips UVA Actinic BL/10 (Eindhoven Netherlands) por 115 minutos, fornecendo uma dose total de 27,6 J/cm<sup>2</sup>. Decorrido o tempo, as amostras foram ressuspendidas e analisadas via espectrofotômetro como já descrito no item 3.2.6.1. Para determinar a fotoestabilidade das amostras utilizou-se a área sob a curva (integral do espectro de absorção, fornecido pelo software OriginPro) das amostras na faixa do UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm) para calcular a redução percentual da integral entre os pares irradiados e não irradiados (100%) (GASPAR e MAIA CAMPOS, 2006).



**Figura 11:** Desenho esquemático do experimento de fotoestabilidade, onde há triplicatas expostas e triplicatas protegidas da luz UVA.

### 3.2.6.3. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos

Os ensaios para a avaliação da modulação da produção de ERO pelos neutrófilos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Citologia dos Fluidos Biológicos com participação da mestranda sob supervisão da Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP).

A produção das ERO é medida por quimiluminescência (QL) dependente de luminol, baseando-se nos ensaios descritos por Alves e colaboradores (2003). Os neutrófilos humanos foram tratados com o composto em questão (extrato, frações ou substâncias isoladas do fungo *Arthrimum* sp.). As condições (concentrações dos neutrófilos, das frações e extratos, de estímulos, tempo de exposição dos neutrófilos às amostras) foram previamente determinadas. As padronizações são determinadas por ensaios de avaliação da toxicidade (viabilidade) das amostras para os neutrófilos pelo ensaio de exclusão do corante azul de Tripán e pela medida da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada, utilizando-se o kit reagente LDH Labtest Diagnóstica (ALVES et al., 2003).

Uma vez padronizadas as condições, os neutrófilos são estimulados por Zimosan (Z4250 Sigma-Aldrich®) opsonizado com proteínas do sistema do complemento do soro humano normal (Zi/SHN) e acetato miristato de forbol (PMA, acetato miristato de forbol, P8139 Sigma-Aldrich®). O ensaio consistiu na mistura de neutrófilos incubada com os diferentes estímulos em um volume final de reação de 500  $\mu$ L em solução de Hanks/gelatina 0,1% pH 7,2, na presença de luminol (A8511 Sigma-Aldrich®)  $10^{-4}$ M. A produção de quimiluminescência (QL) é, então, acompanhada em luminômetro (Berthold, AutoLumat Plus,

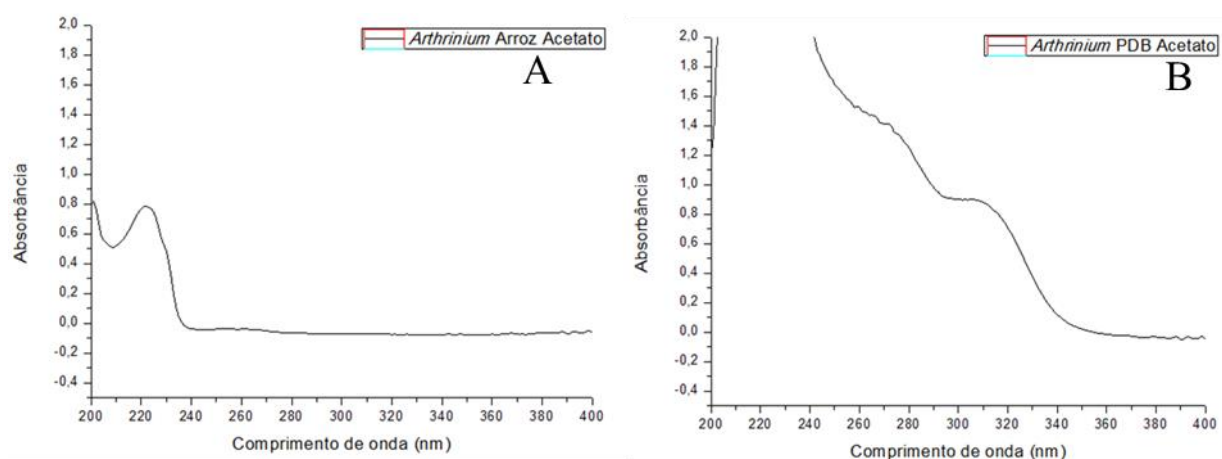
Alemanha), a 37°C por 20min e registrada em contagem de fótons por minuto (cpm). Os controles de QL espontânea consistem em incubar os neutrófilos e luminol na ausência dos estímulos. Os resultados são expressos como a área integrada sob o perfil de QL registrado (ALVES et al., 2003).

Por se tratar de uma metodologia que utiliza material biológico (sangue) humano, o projeto do presente trabalho foi submetido para aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP) da FCFRP-USP. O ofício de aprovação se encontra no anexo I.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Seleção bioguiada de cultivos dos microrganismos

Ensaio preliminares com os extratos dos cultivos em escala reduzida foram realizados anteriormente ao cultivo em escala ampliada com a finalidade de otimizar a produção de metabólitos secundários, obtendo, assim, um extrato mais ativo. A bioatividade em foco nesses ensaios foi a fotoproteção, utilizando-se da metodologia descrita no item 3.2.6.1 para determinar o potencial fotoprotetor dos extratos. Para isso, foram testados diferentes meios e tempos de cultivo, como já descrito no item 3.1.2. Primeiramente foram testados os extratos brutos dos fungos *Arthrinium* sp. e *Epicoccum dendrobii* cultivados nos diferentes meios: arroz e CBD. Os melhores resultados foram obtidos a partir do extrato do fungo *Arthrinium* sp., figura 12.



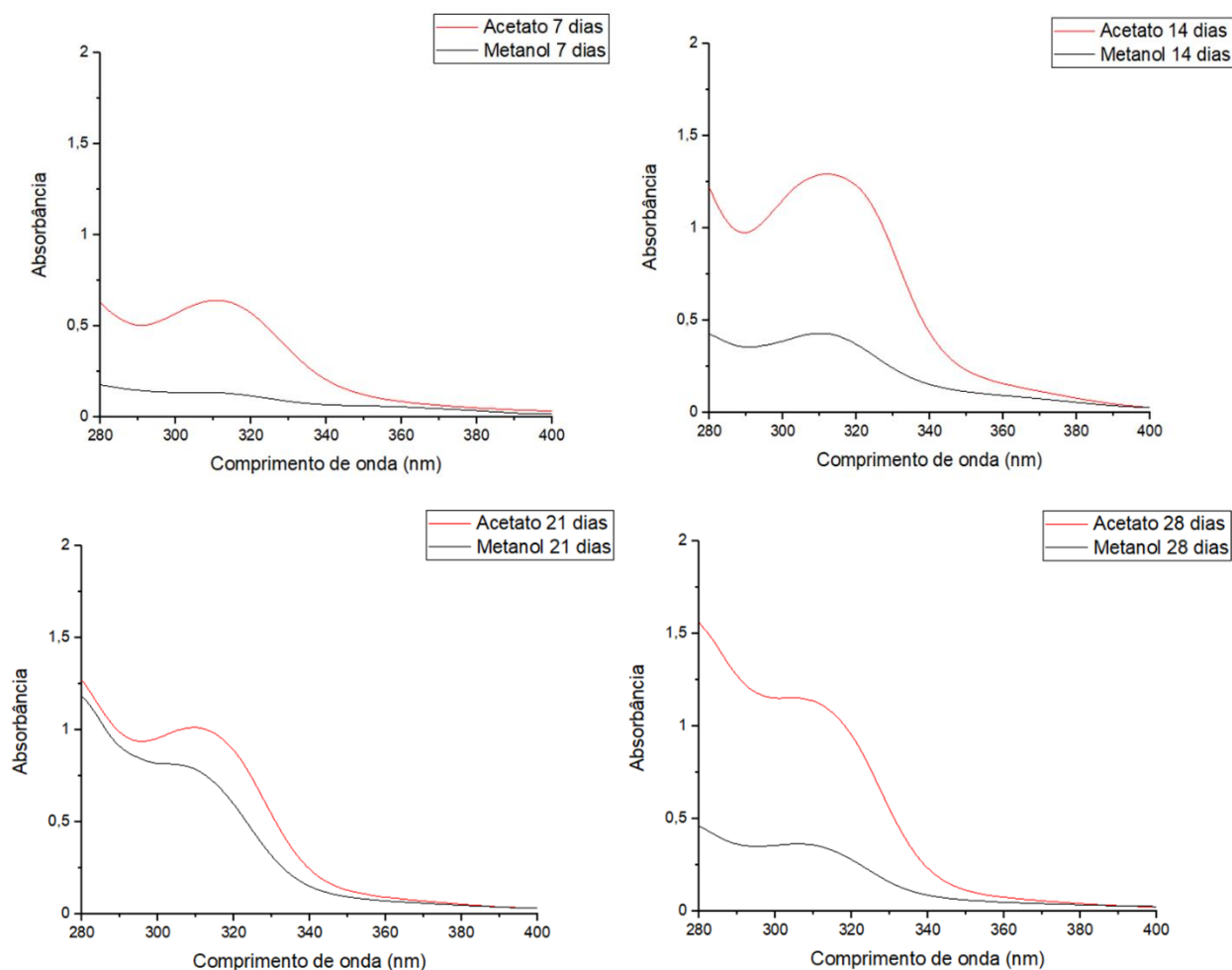
**Figura 12:** Espectro de absorvância na região do UV dos extratos (acetato) obtidos do fungo *Arthrinium* sp. em meio arroz (A) e em meio CBD (B), ambos em uma concentração de 100 µg/mL.

Observa-se na figura 12 a ausência de absorvância de raios UV na faixa de interesse do UVA e UVB (280 a 400 nm) do extrato obtido do cultivo em meio arroz, enquanto é observada uma alta absorvância referente ao extrato adquirido a partir do cultivo em meio CBD. Por este motivo, o meio CBD foi selecionado para realização dos cultivos seguintes, e a possibilidade de se trabalhar com cultivo em meio arroz foi descartada.

Após selecionado o meio CBD como o melhor para produção de metabólitos secundários pelo fungo *Arthrinium* sp., foi realizado um novo cultivo para avaliar a produção qualitativa dos metabólitos do fungo em períodos de crescimento distintos. A seleção foi novamente feita de forma bioguiada. Na figura 13, são mostrados os resultados da varredura de absorvância no UV dos extratos obtidos nos 4 períodos distintos e mostra, adicionalmente,

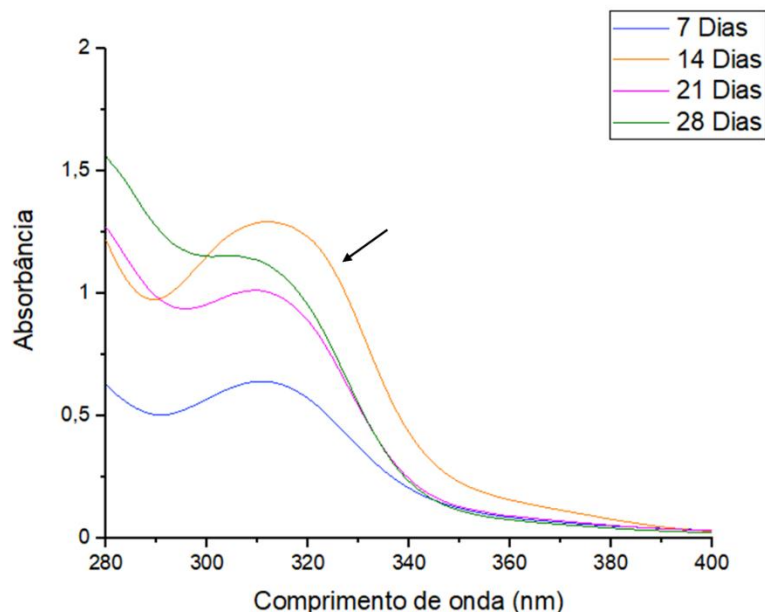


uma comparação da absorbância do extrato feito com acetato (em vermelho) com a absorbância do extrato feito com metanol (em preto).



**Figura 13:** Espectros de absorção na região do UV dos extratos acetato de etila e metanol em uma concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , obtidos após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo do fungo *Arthriniium* sp.

Observa-se na figura 13 uma superior absorbância na região UV dos extratos acetato de etila em relação ao extrato em que se utilizou metanol como solvente extrator. Para uma melhor visualização do tempo de cultivo mais promissor quanto ao potencial fotoprotetor, foi plotado um novo gráfico com todas as curvas de absorbância obtidas a partir da análise dos extratos adquiridos em acetato de etila. Este gráfico se encontra na figura 14, em que se observa uma maior absorbância na faixa de interesse do UV (280-400 nm) do extrato conseguido após um período de 14 dias de cultivo.



**Figura 14:** Comparativo da absorvância dos extratos do fungo *Arthriniium sp.* em todos os períodos de cultivo.

Após analisados os resultados obtidos a partir desses ensaios preliminares, determinou-se para o cultivo em escala ampliada a utilização do meio PDB e o período de crescimento de 14 dias, seguido de extração com acetato de etila. Todos os cultivos foram feitos seguindo a metodologia descrita em 3.1.2.

## 4.2. Fracionamento do extrato

### 4.2. Fracionamento do extrato acetato de etila do fungo *Arthriniium sp.*

Após cultivo do fungo *Arthriniium sp.* em escala ampliada, o extrato foi fracionado por CLV, método descrito no item 3.1.3.2. Neste procedimento foi utilizado 2g do extrato bruto. Os dados de coloração e quantidades das 9 frações resultantes se encontram na tabela 5. As frações com maiores rendimentos foram as frações E, H e I e o rendimento total do procedimento foi de 68,20%.

**Tabela 6:** Dados das frações obtidas pelo fracionamento em CLV do extrato do fungo *Arthrinium* sp.

Fração	Coloração	Quantidade obtida (mg)	(%)
A	Incolor	87	4,35
B	Amarelo fraco	143	7,15
C	Amarelo fraco	71	3,55
D	Amarelo	140	7,00
E	Amarelo forte	180	9,00
F	Amarelo fluorescente	141	7,05
G	Amarelo	72	3,60
H	Laranja forte	370	18,50
I	Laranja fraco	155	7,75

### 4.3. Análise das frações apolares por CG-EM

As frações mais apolares resultantes do fracionamento por CLV, foram analisadas por CG-EM com a finalidade de identificar as substâncias majoritárias (área  $\geq 2\%$ ) de cada fração, utilizando-se de comparação dos espectros de massas obtidos com espectros dos bancos de dados NIST 11 e WILEY 7 (IS) e comparação do índice de retenção de Kovats (IK) também com índices da literatura em que foi utilizada as mesmas condições de análise (coluna, temperatura, entre outros). Alguns componentes majoritários, principalmente da fração CLV D, não puderam ser identificados por não apresentar espectro de massas semelhante a nenhuma outra substância dos bancos de dados. Os resultados obtidos dessa análise se encontram na tabela 6, separados por fração.

Algumas substâncias foram identificadas sem o cálculo do IS por não serem os 3 primeiros “HITS” sugeridos pelo software, porém, os espectros de massas foram comparados para confirmação da identidade. Já algumas foram identificadas apenas utilizando a EM, e o IK não foi comparado por não haver este dado na literatura, ou como no caso do Álcool fenético ( $C_8H_{10}O$ ), por não ser possível ser realizado o cálculo do índice devido à ausência do tempo de

retenção de seu alcano correspondente, já que a análise de padrões de alcanos é realizada apenas com aqueles que possuem número de carbonos de 9 a 40.

**Tabela 7:** Identificação por CG-EM de substâncias das frações apolares do fungo *Arthrimum* sp.: A, B, C e D.

#### FRAÇÃO CLV A

tR (min)	Substância	Área (%)	IK	IK (literatura)	IS (%)
25,231	1- Hexadeceno (Ceteno)	14,17	1592,0	1592 (Nogueira, 2001)	97
29,680	1- Octadeceno	23,48	1792,8	1793 (Nogueira, 2001)	97
33,711	1- Eicoseno	20,29	1993,5	1992 (Nogueira, 2001)	-
37,389	1- Docoseno	14,07	2194,0	2194 (Nogueira, 2001)	-
40,771	1- Tetracoseno	8,57	2394,8	2396 (Zaikin, 2002)	-
43,898	n- Hexacoseno	5,02	2594,8	2596* (Radulovic, 2010)	-
46,806	n- Tetracosanol	2,81	2774,8	2745 (Teixeira, 2019)	-
49,516	n- Heptacosanol	2,19	2986,0	2948 (ChemSpider)	-

#### FRAÇÃO CLV B

tR (min)	Substância	Área (%)	IK	IK (literatura)	IS (%)
23,176	2,4-di-tert-butilfenol	5,19	1506,0	1512 (Nogueira, 2001)	97
25,229	1- Hexadeceno (Ceteno)	5,05	1591,9	1592 (Nogueira, 2001)	97
29,676	1- Octadeceno	10,32	1792,6	1793 (Nogueira, 2001)	97
33,706	1- Eicoseno	9,92	1993,2	1992 (Nogueira, 2001)	-
37,878	n- Nonadecanol	7,62	2181,5	2181 (Palmeira, 2004)	-
40,768	1- Tetracoseno	4,95	2394,0	2396 (Zaikin, 2002)	-
42,874	Bis(2-etilhexil) ftalato	2,00	2527,0	2507* (Ramsey, 1980)	96

43,901	n- Hexacoseno	3,12	2594,8	2596* (Radulovic, 2010)	-
46,804	n- Tetracosanol	2,05	2774,8	2745 (Teixeira, 2019)	-
49,518	n- Heptacosanol	2,00	2986,3	2948 (ChemSpider)	94
56,682	Éster do ácido benzenopropanóico, 3,5- bis(1,1-dimetiletil)-4- hidroxi-, octadecila	12,4	3786,7	-	89

#### FRAÇÃO CLV C

tR (min)	Substância	Área (%)	IK	IK (literatura)	IS (%)
23,179	2,4-di-tert-butilfenol	13,62	1506,0	1512 (Nogueira, 2001)	97
25,231	1- Hexadeceno (Ceteno)	3,42	1592,0	1592 (Nogueira, 2001)	95
29,677	1- Octadeceno	6,05	1792,0	1793 (Nogueira, 2001)	96
33,707	n- Heptadecanol	5,65	1980,0	1986 (Palmeira, 2004)	-
37,389	n- Nonadecanol	4,32	2181,0	2181 (Palmeira, 2004)	-
40,773	N.I.	2,81	-	-	-
42,876	Bis(2-etilhexil) ftalato	4,19	2527,0	2507* (Ramsey, 1980)	96
53,379	$\beta$ -Sitosterol	2,15	3286,0	3336 (Teixeira, 2019)	85
56,367	N.I.	36,56	-	-	-
56,683	Éster do ácido benzenopropanóico, 3,5- bis(1,1-dimetiletil)-4- hidroxi-, octadecila	9,33	3594,7	-	88

#### FRAÇÃO CLV D

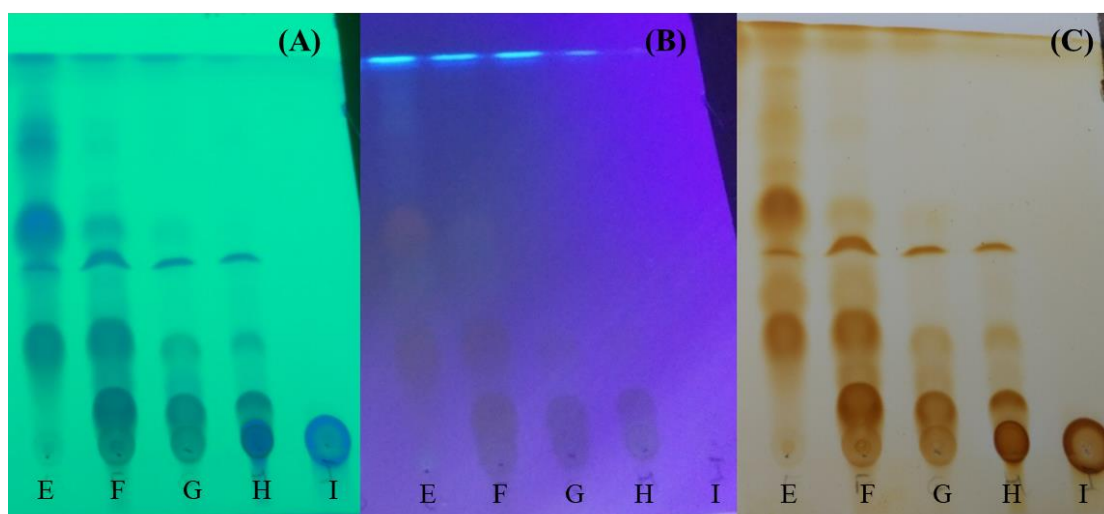
tR (min)	Substância	Área (%)	IK	IK (literatura)	IS (%)
12,405	Álcool fenetílico	26,41	-	-	98
29,435	N.I.	18,06	-	-	< 80
29,876	N.I.	3,13	-	-	< 80
30,261	N.I.	14,52	-	-	< 80

31,916	N.I.	4,25	-	-	< 80
32,353	N.I.	3,51	-	-	< 80
33,086	Ácido Hexadecanóico (Palmítico)	2,00	1938,6	1960 (Maia, 2000)	94
56,372	N.I.	4,24	-	-	< 80

**Legenda:** \*= resultados obtidos em outra coluna. N.I.= não identificado devido à falta de dados de EM e de IK ou ao índice de similaridade abaixo de 80%.

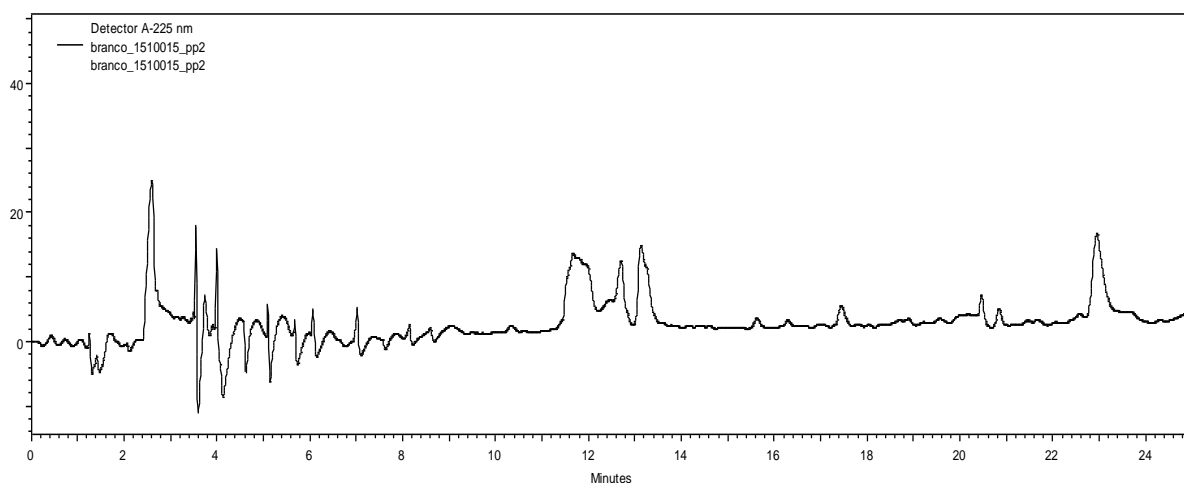
#### 4.4. Análises químicas

Para um estudo inicial das demais frações do extrato do fungo *Arthrinium* sp. foram realizadas análises cromatográficas em CCDC e CLAE-DAD, as metodologias detalhadas e especificações estão descritas no item 3.2.3. Na figura 15 encontra-se imagens das análises por CCDC, em que foi utilizada como fase estacionária placa de sílica gel de fase normal e como fase móvel os solventes hexano e acetato de etila em uma proporção de 6:4, respectivamente, com adição de 10 gotas de ácido acético. A placa cromatográfica foi revelada por luz UV em comprimento de onda de 264 nm (imagem 15A) e de 366 nm (imagem 15B), onde se observa nas frações analisadas presença de substâncias que absorvem a luz UV nestes determinados comprimentos de onda. Houve, também, revelação da placa através de iodo ressublimado (imagem 15C) indicando adicionalmente presença de substâncias contendo ligações insaturadas (duplas ou triplas).

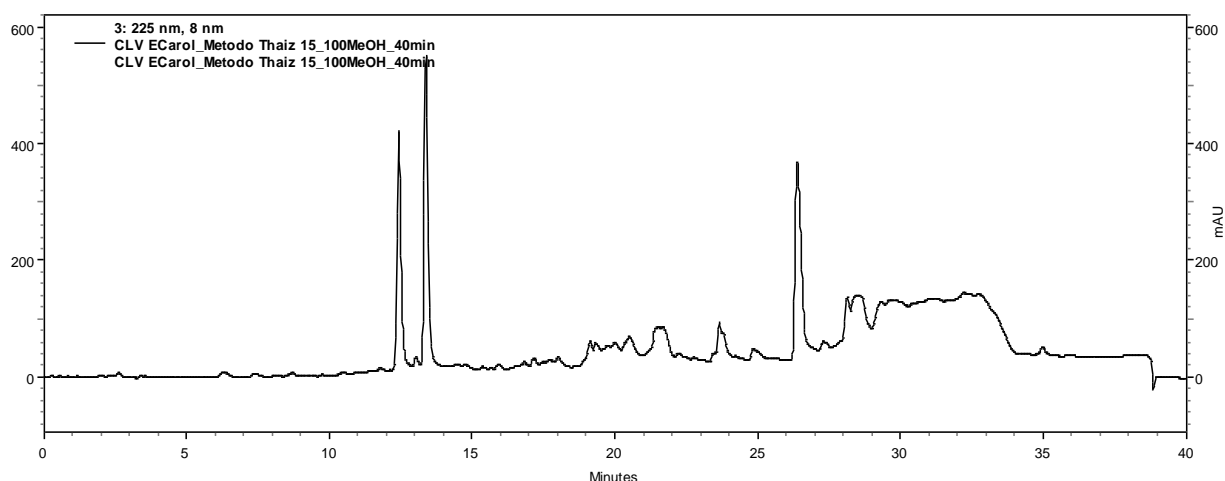


**Figura 15:** Análise das frações E-I do fungo *Arthrinium* sp. por CCDC. Condições cromatográficas: sílica gel de fase normal e sistema de solventes 6:4 hexano:acetato. Revelação por luz UV a 254 e 366 nm (A e B) e por iodo ressublimado (C).

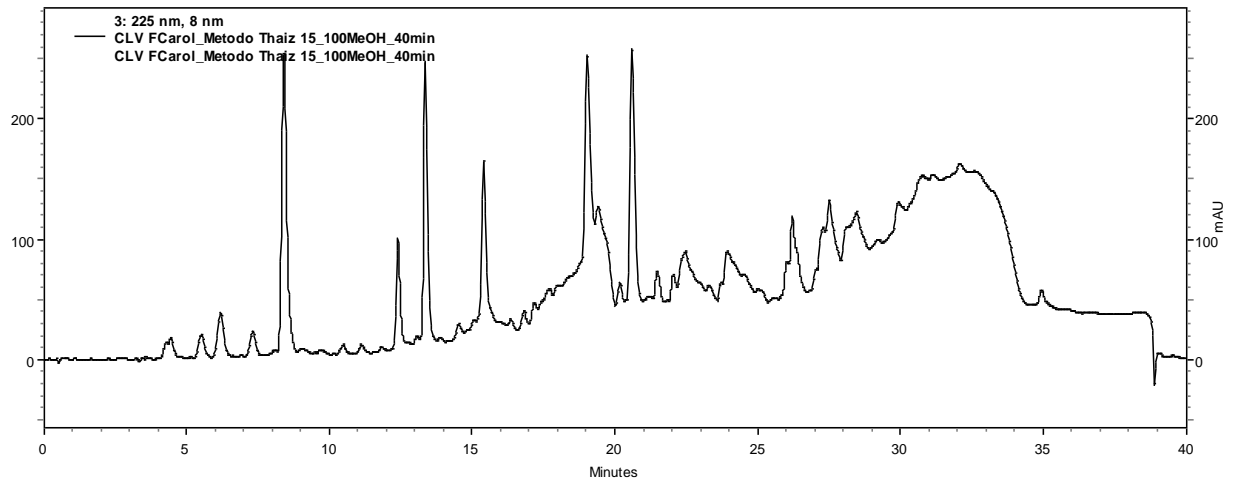
Nas figuras de 16 a 21 encontram-se as análises por CLAE-DAD das frações E-I obtidas por CLV, assim como análise do extrato controle, ou seja, extrato do meio de cultivo em que não houve inoculação e crescimento de microrganismos. Foi utilizada para todas as análises uma coluna de fase reversa C8 e métodos exploratórios utilizando-se gradientes de concentrações de MeOH ou ACN em água. Todas as amostras foram analisadas pelo detector DAD na faixa espectral de 190 a 400 nm, porém nas imagens é mostrada a análise com detecção no comprimento de onda em que o cromatograma resultante apresenta maior número de picos.



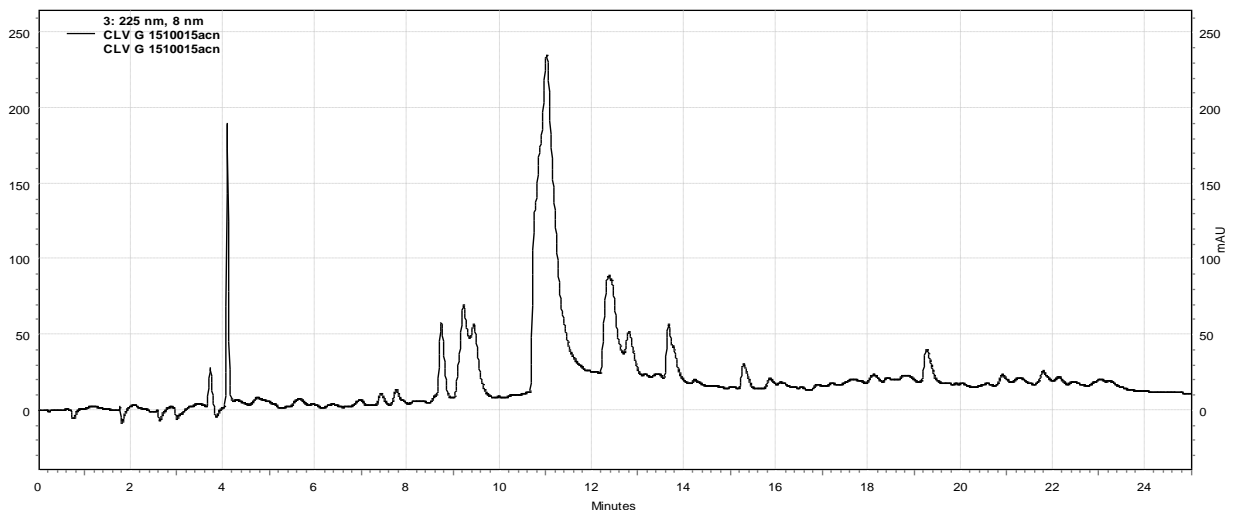
**Figura 16:** Cromatograma do extrato controle do meio CBD com ausência do fungo *Arthrinium* sp. Método 1 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm.



**Figura 17:** Cromatograma da fração E do extrato fracionado do fungo *Arthrinium* sp. Método 3 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm.

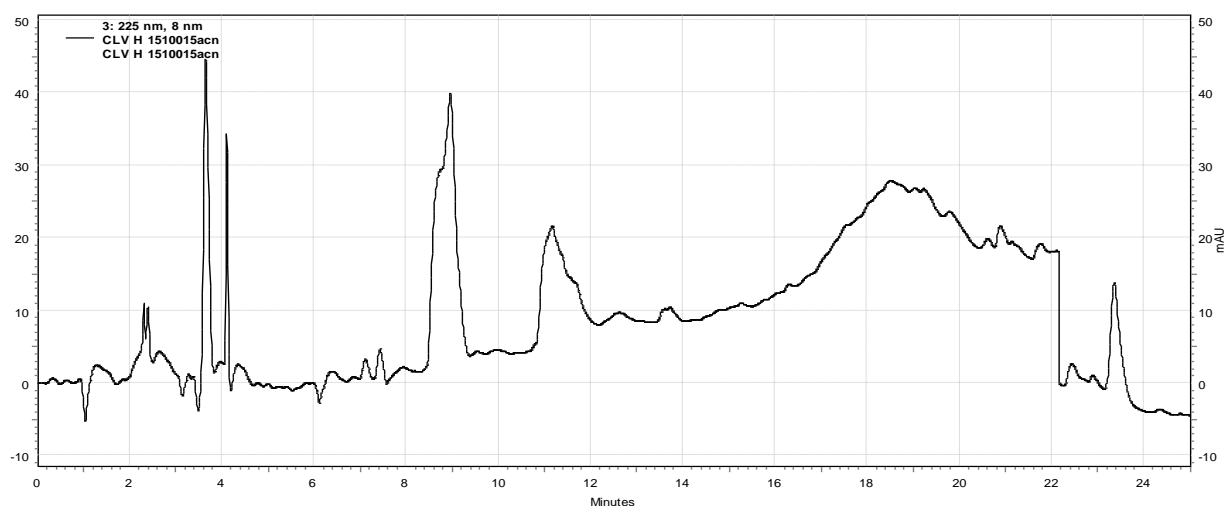


**Figura 18:** Cromatograma da fração F do extrato fracionado do fungo *Arthrinium* sp. Método 3 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm.

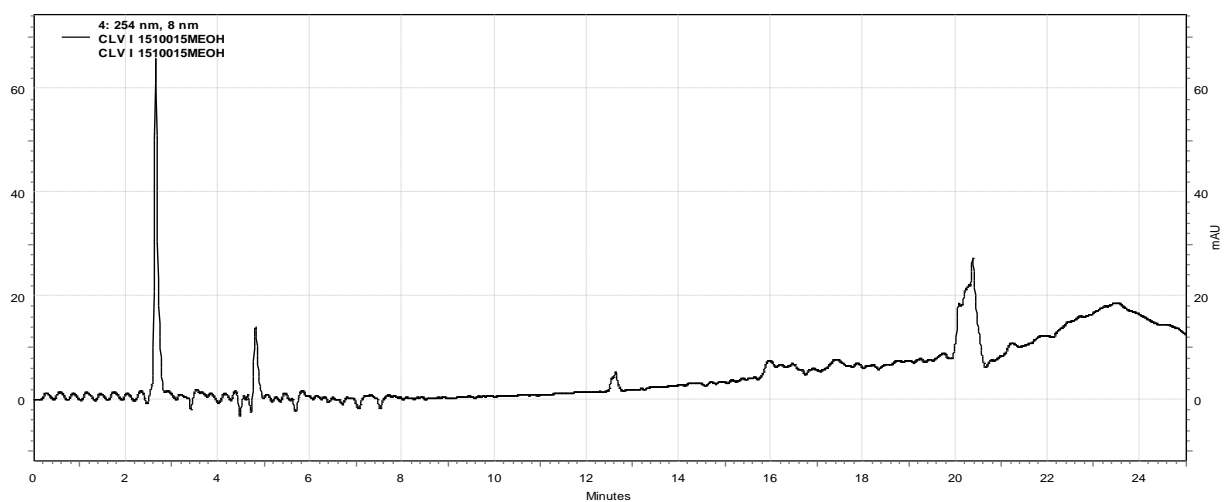


**Figura 19:** Cromatograma da fração G do extrato fracionado do fungo *Arthrinium* sp. Método 2 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm.





**Figura 20:** Cromatograma da fração H do extrato fracionado do fungo *Arthrinium* sp. Método 2 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm.



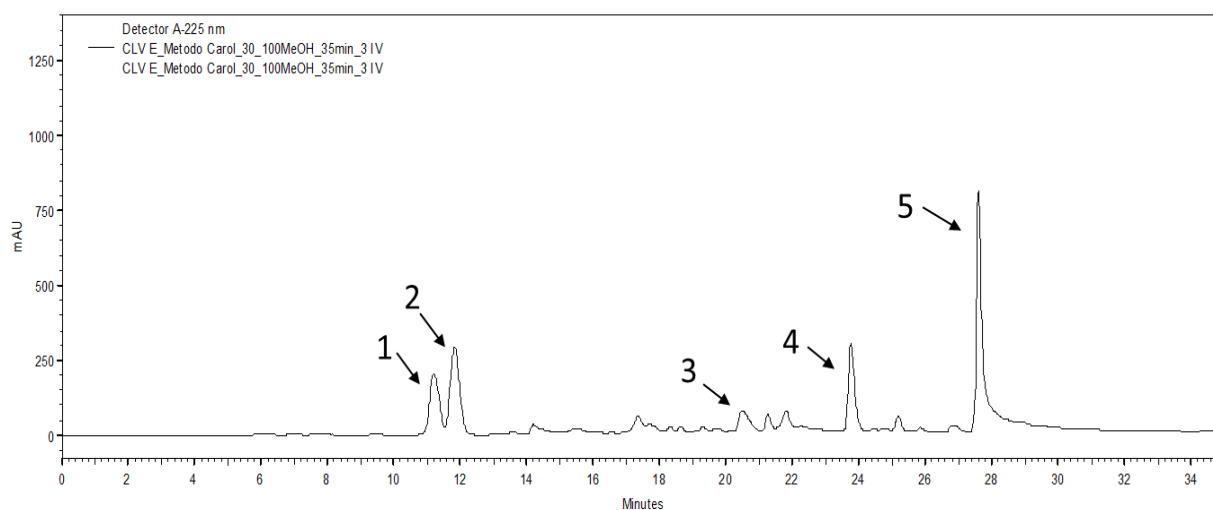
**Figura 21:** Cromatograma da fração I do extrato fracionado do fungo *Arthrinium* sp. Método 1 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 254 nm.

A partir destas análises, a fração E foi selecionada dar prosseguimento as etapas de purificação devido a sua melhor resolução de picos e menor complexidade da mistura de substâncias.

## 4.5. Isolamento de metabólitos secundários do fungo *Arthrinium* sp.

### 4.5.1. CLV E

Selecionada a fração para purificação, foram feitos testes em escala analítica para determinação do melhor método de separação em CLAE-DAD visando isolamento dos seus constituintes. Foi utilizada neste procedimento coluna semi-preparativa C8, e o método de gradiente de solventes desenvolvido está descrito no item 3.2.5.2. A partir do cromatograma obtido (figura 22), foram selecionados picos para serem coletados isoladamente, estes foram numerados de acordo com o tempo de retenção. 5 amostras foram, então, adquiridas após o procedimento realizado com a fração CLV E e foram codificadas como E.px, sendo x o número do pico no cromatograma. Os detalhes sobre os resultados do processo de isolamento de substâncias a partir da fração CLV E se encontram na tabela 7. As amostras foram analisadas por CCDC, seguido de espectrometria de massas e RMN com o objetivo de caracterizar e identificar as substâncias obtidas.



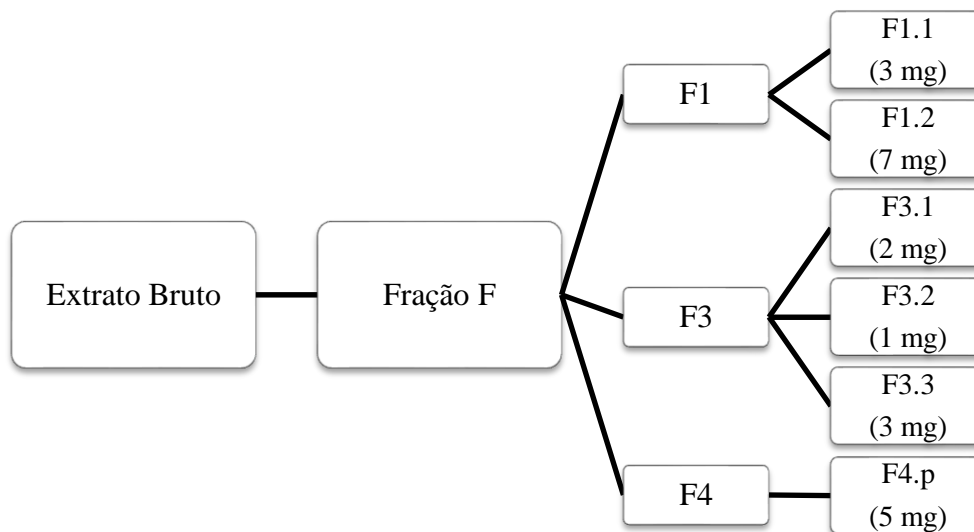
**Figura 22:** Cromatograma obtido visando o isolamento de substâncias da fração E do fungo *Arthrinium* sp.

**Tabela 8:** Dados das substâncias obtidas através do isolamento por CLAE-DAD da fração E do fungo *Arthrinium* sp.

<b>Substância (código)</b>	<b>Tempo de Retenção (minutos)</b>	<b>UV (<math>\lambda_{\text{máx}}</math>)</b>	<b>Massa aproximada (mg)</b>
E.p1	11,29	273, 488, 324	2,0
E.p2	11,88	222, 276, 314	3,0
E.p3	20,59	224, 320, 488, 583	2,0
E.p4	23,97	241, 311, 399, 407	4,0
E.p5	27,69	216, 277, 373, 380	3,0

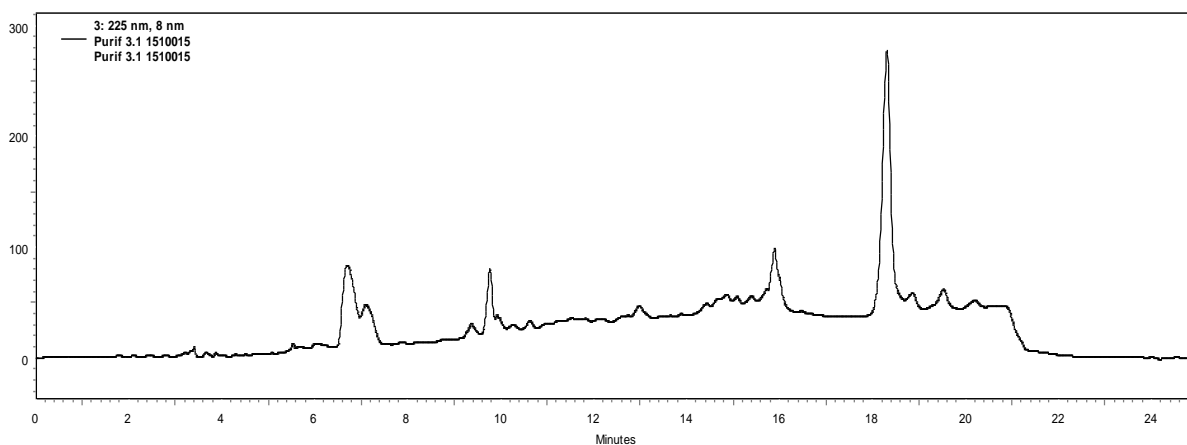
#### 4.5.2. CLV F

A fração CLV F foi selecionada para o isolamento de metabólitos secundários pois apresentou resultados promissores quanto ao potencial fotoprotetor, como mostrado no item 4.7.1, foi empregada a metodologia de CCDP, descrita no item 3.2.5.1, utilizando-se de placas cromatográficas contendo sílica gel de fase normal e foi utilizado o hexano e o acetato de etila em uma proporção de 1:1 com adição de 10 gotas de ácido acético, resultando em 6 novas frações (F1-F6). Destas, as amostras F1, F3 e F4 foram purificadas por CCD preparativa. Para melhor visualização do procedimento, na figura 23 encontra-se novamente o fluxograma do procedimento, assim como as massas obtidas das substâncias finais. As amostras passaram por análises de CCDC, CLAE-DAD e espectroscopia de RMN.



**Figura 23:** Fluxograma do fracionamento e isolamento de substâncias por CCDP a partir da fração CLV F do fungo *Arthrinium* sp.

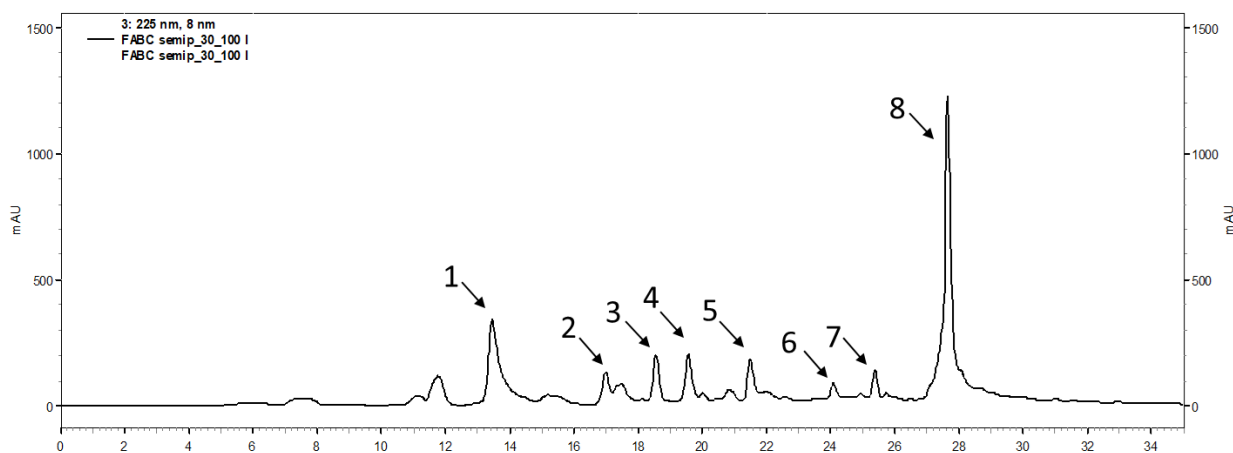
O método, entretanto, não apresentou alta eficiência, resultando em amostras com impurezas ou em mistura. Devido ao baixo grau de pureza utilizou-se CLAE-DAD para purificações posteriores. Como exemplo temos a purificação da amostra F3.1 (figura 24).



**Figura 24:** Cromatograma da amostra F3.1, obtido a partir da fração CLV F do fungo *Arthrinium* sp. por CCDP. Método 1 de gradiente de solventes utilizado, descrito no item 3.2.3. Detecção em 225 nm.

A fração CLV F foi novamente submetida a separação cromatográfica, mas via CLAE-DAD visando isolamento de substâncias com maior grau de pureza, empregando-se a metodologia descrita no item 3.2.5.2. Foram selecionados 8 picos para serem coletados isoladamente. Após coleta, recebendo codificação de F.px, sendo x o número de classificação

de acordo com o tempo de retenção da amostra no cromatograma, mostrado na figura 25. Detalhes dos resultados do procedimento e massas obtidas se encontram na tabela 8.



**Figura 25:** Cromatograma obtido visando o isolamento de substâncias da fração F do fungo *Arthrinium* sp. e respectivos picos selecionados para coleta.

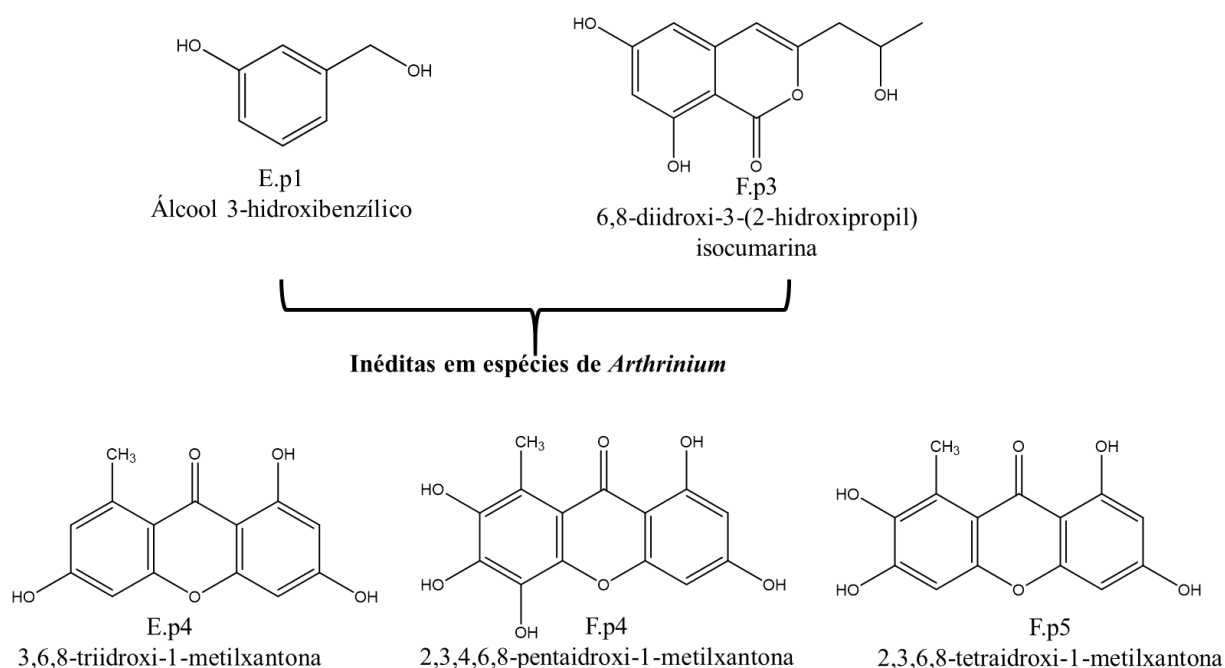
**Tabela 9:** Dados das substâncias obtidas através do isolamento por CLAE-DAD da fração F do fungo *Arthrinium* sp.

Substância (código)	Tempo de Retenção (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (UV)	Massa (mg)
F.p1	13,46	206, 282, 427, 429	0,7
F.p2	17,46	217, 296, 374, 382	0,5
F.p3	18,57	244, 238, 277, 326, 288	0,3
F.p4	19,59	258, 207, 327	0,8
F.p5	21,54	254, 239, 313, 359	2,0
F.p6	24,04	240, 311, 398, 409	0,3
F.p7	25,37	212, 281, 362, 370	0,5
F.p8	27,63	217, 277, 420, 427	2,5

As amostras obtidas foram analisadas por CCDC, espectrometria de massas e espectroscopia de RMN. A F.p2 apresentou 2 manchas na análise por CCDC, não sendo então submetida a análises seguintes (EM e RMN). Devido a massa resultante ser baixa, as amostras de F.p1 a F.p7 passaram apenas por análises de EM e RMN de  $^1\text{H}$ , não sendo realizados RMNs 2D e de  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.6. Caracterização estrutural

Das substâncias isoladas, 5 foram identificadas. Na figura 26 se encontram as estruturas destas substâncias assim como a nomenclatura.

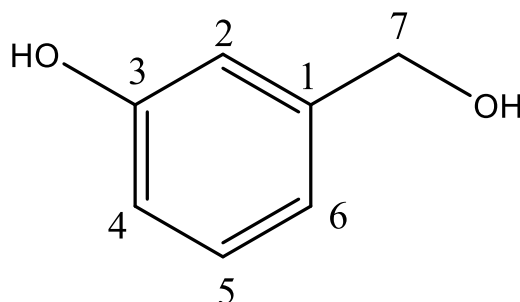


**Figura 26:** Substâncias isoladas e identificadas das frações CLV E e F do fungo *Arthrinium* sp.

##### 4.6.1. E.p1

A substância isolada E.p1 (2,0 mg) foi obtida a partir da fração CLV E utilizando-se do método de CLAE-DAD e se apresentou como um líquido incolor. A amostra foi submetida a análise via espectrômetro de massas (EM-ESI-TOF), por meio de injeção direta e a análises de espectroscopia de RMN unidimensionais ( $^1\text{H}$ ) e bidimensionais (HMBC, HSQC), em espectrômetro de RMN (modelo DRX 500), na frequência de 500 MHz. A amostra foi dissolvida em MeOH grau CLAE para a obtenção dos espectros de massas e em solventes deuterados clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) para a obtenção dos dados de RMN.

Devido à pouca quantidade de amostra, os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram extrapolados a partir do experimento de HMBC. Após análises dos dados obtidos e comparação com os dados da literatura, concluiu-se que a amostra E.p1 se tratava do álcool 3-hidroxi benzílico (figura 27).



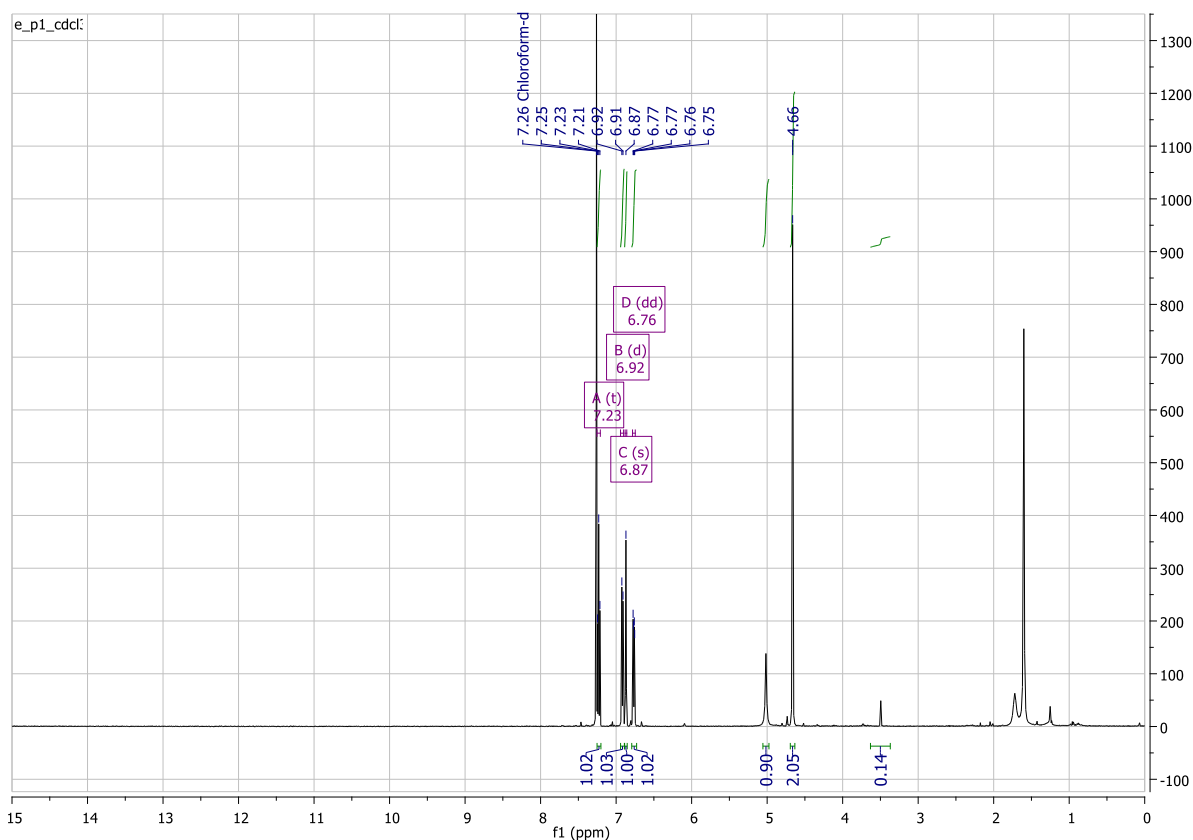
**Figura 27:** Proposta estrutural para a amostra E.p1: álcool 3-hidroxi benzílico ( $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$ ).

Na tabela 9 encontra-se os valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) obtidos a partir das análises de RMN comparados com resultados relatados na literatura (ALFARO et al., 2003). Nas figuras seguintes são mostrados os espectros de  $^1\text{H}$  adquiridos: completo (figura 28) e com expansões (figura 29), estando a última também relacionando os picos com os hidrogênios da estrutura.

**Tabela 10:** Comparação de  $\delta^1\text{H}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  obtidos da E.p1 com os dados de literatura publicada.

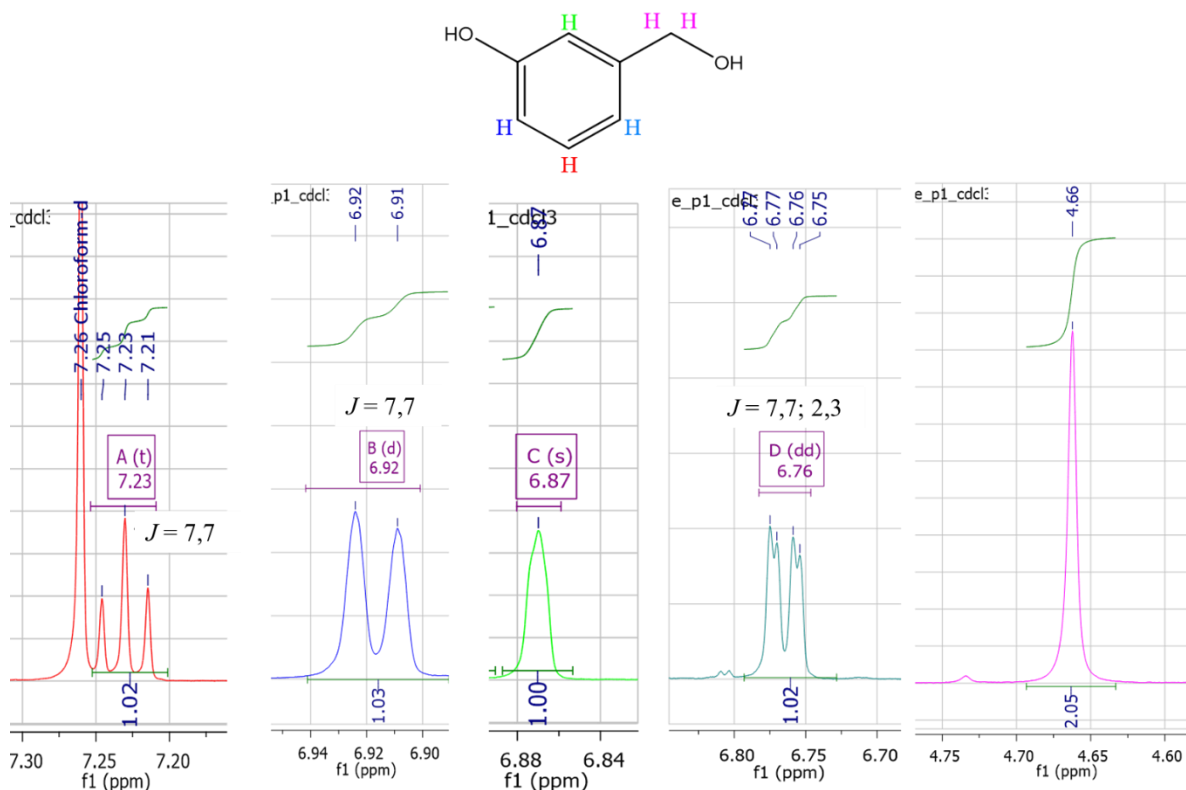
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (mult., $J$ em Hz) $\text{CDCl}_3$ 500 MHz	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (mult., $J$ em Hz) (ALFARO et al., 2003)	$\delta^{13}\text{C}$ (HMBC) $\text{CD}_3\text{OD}$ 500 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ (ALFARO et al., 2003)
1	-	-	142,7	145,5
2	6,87 (sl)	6,89 (sl)	113,4	114,6
3	-	-	157,1	158,7
4	6,92 (d, $J=7,7$ )	6,82 (d, $J=7,8$ )	114,0	114,9
5	7,23 (t, $J=7,7$ )	7,15 (t, $J=7,8$ )	128,8	130,4

6	6,76 (dd, $J=7,7; 2,3$ )	6,72 (dd, $J=7,8; 3,0$ )	117,4	118,8
7	4,66 (2H, s)	4,58 (2H, s)	63,5	65,01
7-OH	4,40 (HMBC)	4,20 (sl)	-	-



**Figura 28:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância E.p1,  $\text{CDCl}_3$  500 MHz.





**Figura 29:** Expansões no espectro de  $^1\text{H}$  da substância E.p1 e atribuições.

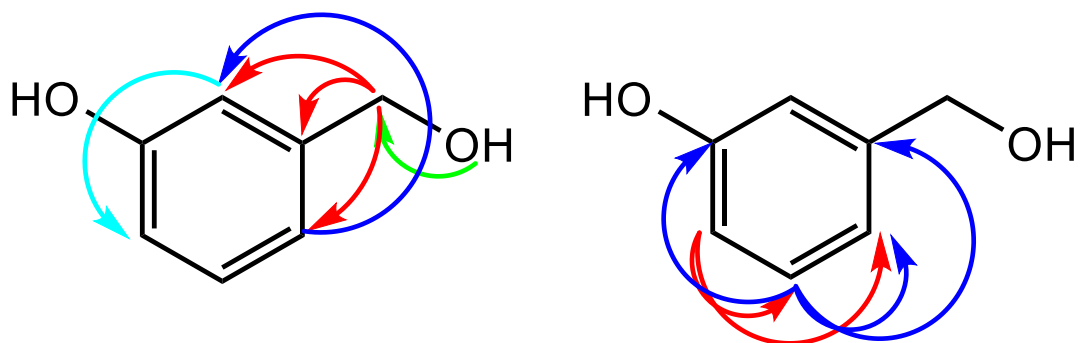
Observa-se no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a presença de sinais na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos, sendo eles: um tripleto em 7,23 ppm que integra para 1H e possui uma constante de acoplamento de 7,7 Hz característico de acoplamento com outros dois hidrogênios em *orto*; um duplete em 6,92 ppm que integra para 1H e sua constante de acoplamento é de 7,7 Hz, correspondendo também a um acoplamento em *orto*; um duplo-duplete em 6,76 ppm integrando também para 1H e apresentando acoplamento com outros dois hidrogênios: um em *orto* e um em *meta*, justificado pelas constantes de acoplamento ( $J$ ) de 7,7 e 2,3 Hz; e, por fim, um simpleto largo em 6,87 ppm integrando para 1H que corresponde ao H da posição 2. Além dos deslocamentos característicos de hidrogênios aromáticos, observa-se também no espectro um sinal em 4,66 ppm apresentando-se como um simpleto e integrando para 2H. Este sinal corresponde aos dois hidrogênios metilênicos ligado ao carbono  $\text{sp}^3$ , vizinhos a um grupo hidroxílico.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$ , obtidos a partir da análise de HMBC, são também condizentes à estrutura proposta. Os deslocamentos químicos em 113,4 ppm, 114,0 ppm, 117,4 ppm, 128,8 ppm, 142,7 ppm e 157,1 ppm correspondem aos carbonos presentes no anel aromático e o sinal em 63,5 ppm corresponde ao carbono metilênico ligado ao grupo hidroxílico.

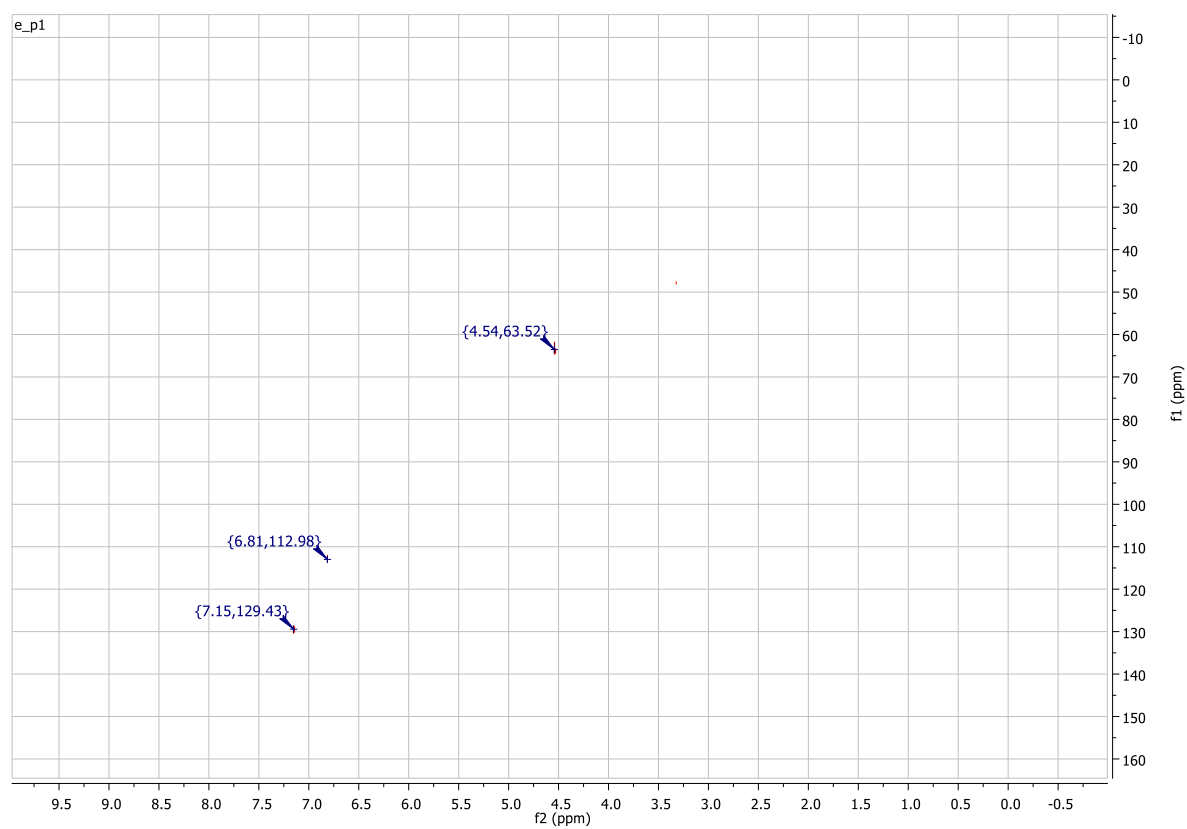
Para confirmação da estrutura foram obtidos os espectros de RMN bidimensionais HSQC e HMBC. Na análise de HSQC (Figuras 31 e 32, Tabela 10) foi possível observar a ligação dos hidrogênios presentes no anel aromático H-2 ( $\delta$  6,87), H-5 ( $\delta$  7,23) e H-7 ( $\delta$  4,66) com os carbonos C-2 ( $\delta$  113,4), C-5 ( $\delta$  128,8) e C-7 ( $\delta$  63,5), respectivamente. Com relação a análise de HMBC (Figuras 33 e 34, Tabela 10) observou-se correlações entre: o hidrogênio da hidroxila ( $\delta$ 4,40) com o C-7 ( $\delta$  63,5); o H-7 ( $\delta$  4,66) se correlacionando com C-2 ( $\delta$  113,4), C-6 ( $\delta$  117,4) e com o C-1 ( $\delta$  142,7); o hidrogênio 6 ( $\delta$  6,76) se correlacionando com C-2 ( $\delta$  113,4); H-5 ( $\delta$ 7,23) se correlacionando com C-6 ( $\delta$  117,4), C-1 ( $\delta$  142,7) e C-3 ( $\delta$  157,1); H-4 ( $\delta$  6,92) com C-6 ( $\delta$  117,4) e C-5 ( $\delta$  128,8); e, por fim, o H-2 ( $\delta$  6,87) se correlacionando com C-4 ( $\delta$  114,0). As correlações observadas na análise de HMBC estão esquematizadas na Figura 3. Os valores de  $\delta^1\text{H}$  da tabela 10 estão com uma pequena diferença dos valores citados na tabela 9 devido a diferença do solvente deuterado utilizado nas análises: para a análise unidimensional foi utilizado o clorofórmio, enquanto para as análises bidimensionais foi utilizado o MeOH.

**Tabela 11:** Dados obtidos dos mapas de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) e HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da substância E.p1.

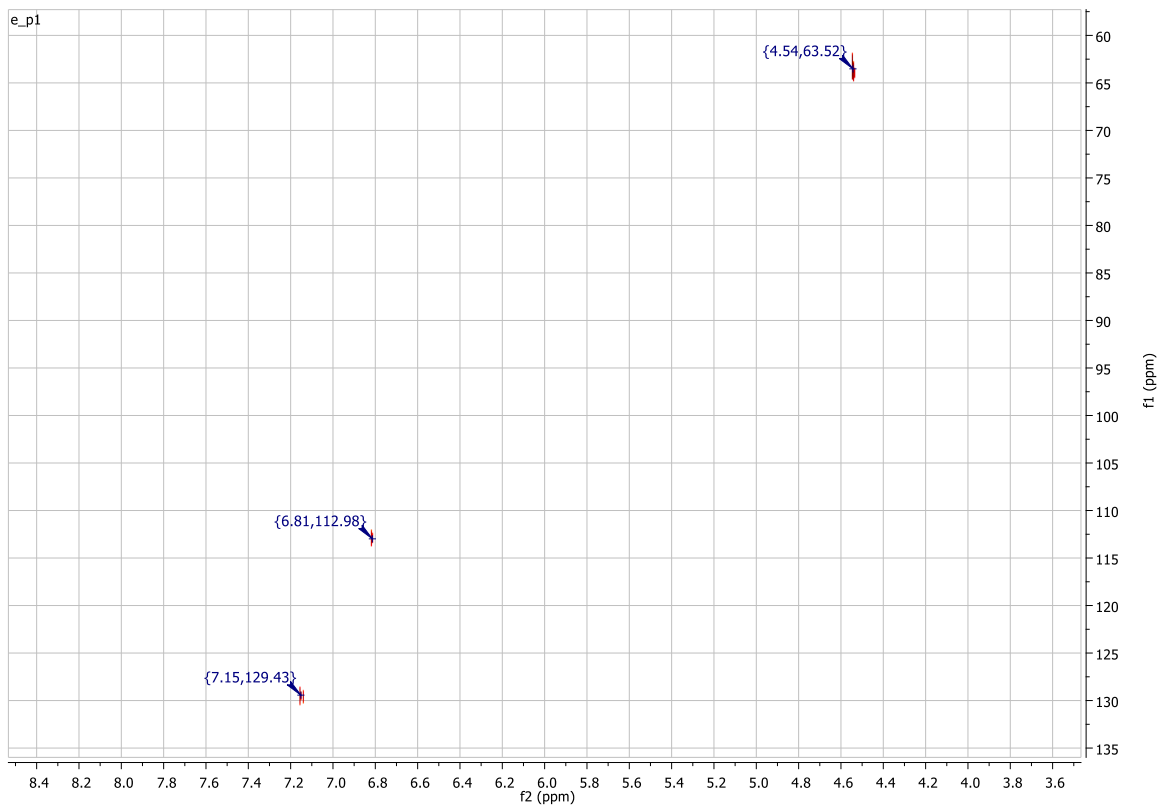
$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ HSQC	$\delta^{13}\text{C}$ HMBC
H-2 ( $\delta$ 6,87)	C-2 ( $\delta$ 113,4)	C-4 ( $\delta$ 114,0); C-2 ( $\delta$ 113,4)
H-4 ( $\delta$ 6,92)	-	C-6 ( $\delta$ 117,4); C-5 ( $\delta$ 128,8)
H-5 ( $\delta$ 7,23)	C-5 ( $\delta$ 128,8)	C-6 ( $\delta$ 117,4); C-1 ( $\delta$ 142,7); C-3 ( $\delta$ 157,1); C-5 ( $\delta$ 128,8)
H-6 ( $\delta$ 6,76)	-	C-2 ( $\delta$ 113,4); C-6 ( $\delta$ 117,4)
H-7 ( $\delta$ 4,66)	C-7 ( $\delta$ 63,5)	C-2 ( $\delta$ 113,4); C-6 ( $\delta$ 117,4); C-1 ( $\delta$ 142,7)
7-OH ( $\delta$ 4,40)	-	C-7 ( $\delta$ 63,5)



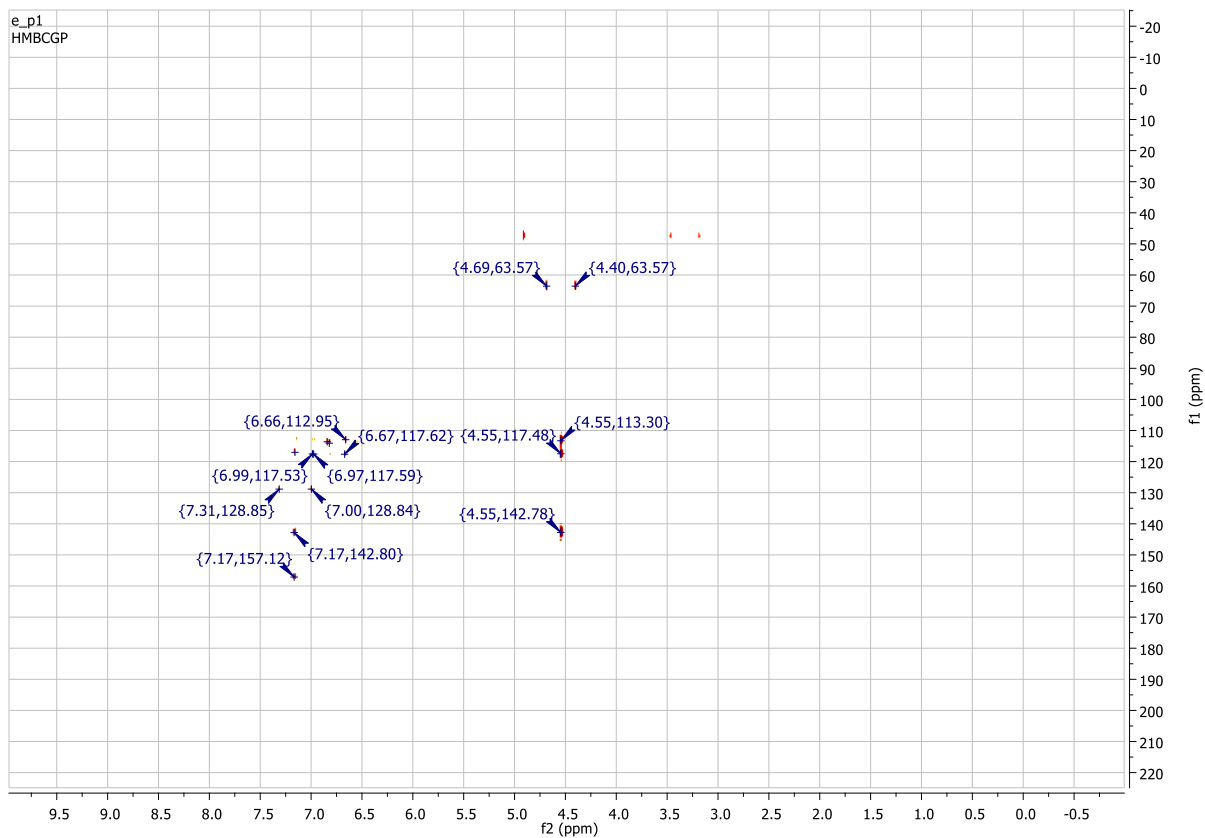
**Figura 30:** Correlações observadas por meio da análise de HMBC da substância E.p1. Cores diferentes de setas representam posições diferentes.



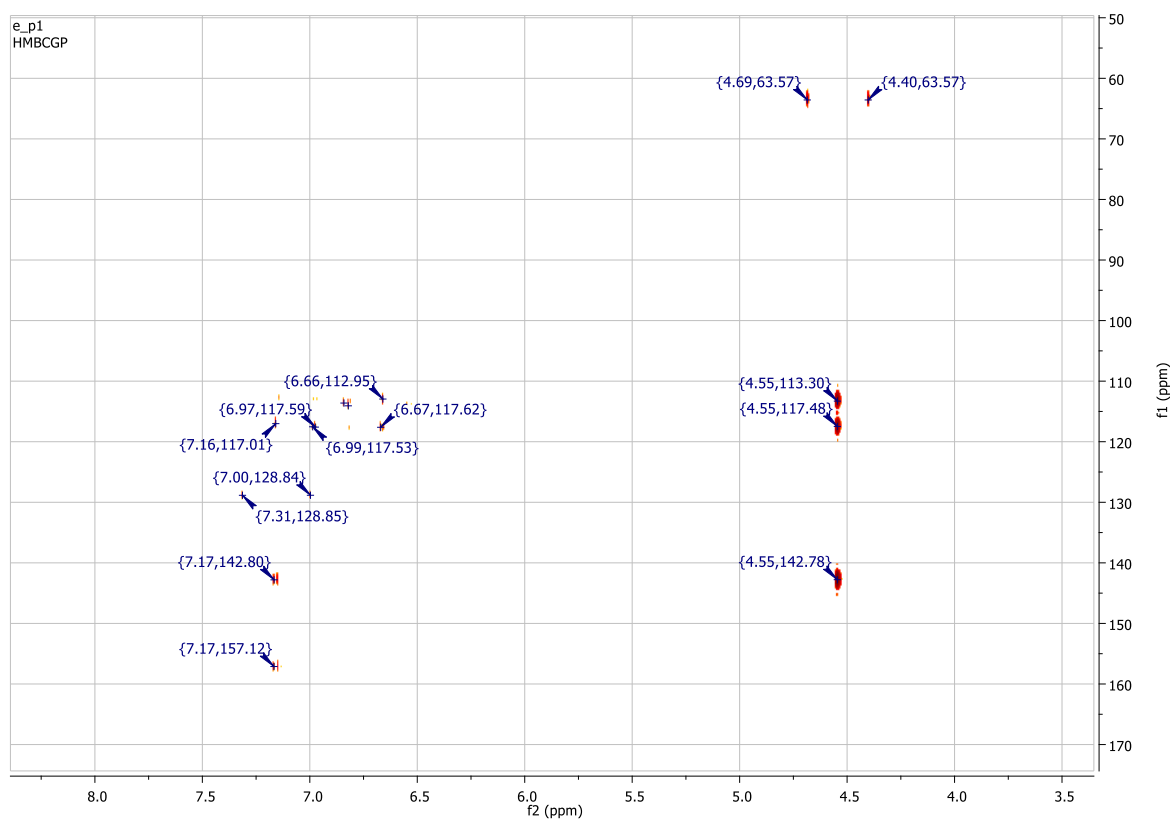
**Figura 31:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da substância E.p1,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz.



**Figura 32:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC (expansão) da substância E.p1.

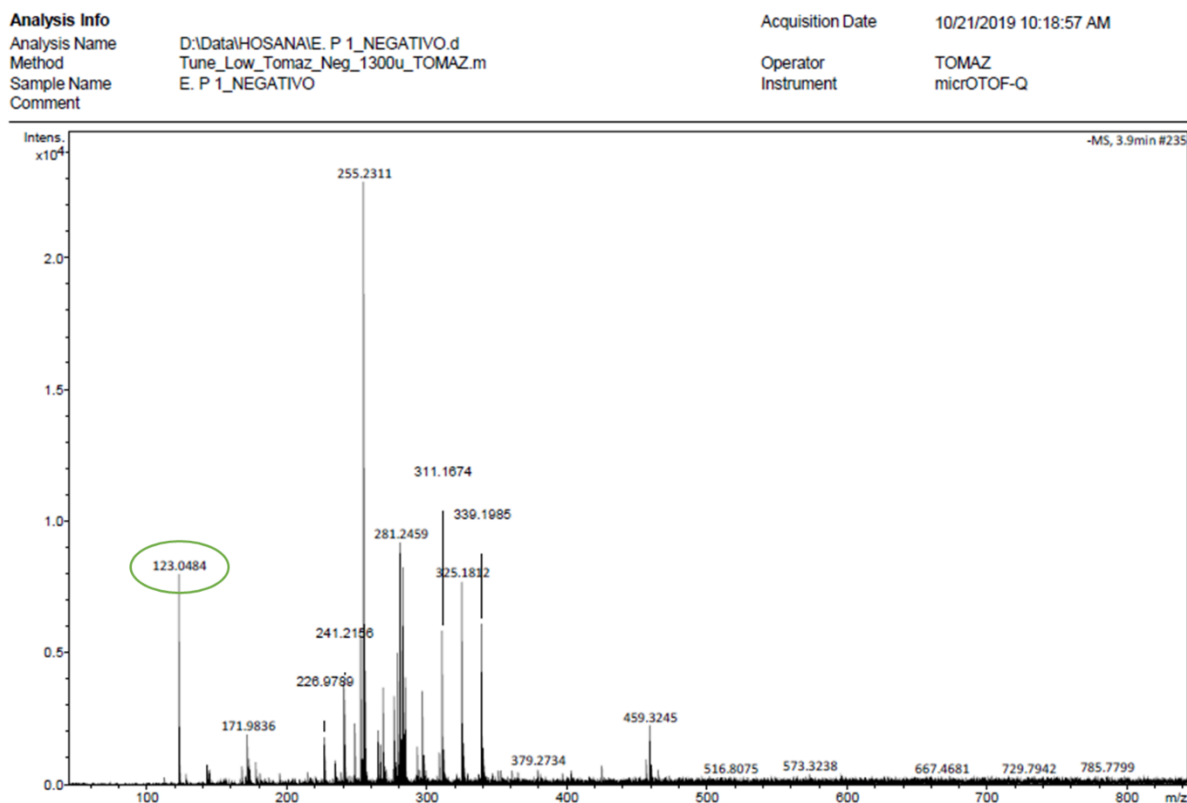


**Figura 33:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da substância E.p1,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz.



**Figura 34:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC (expansão) da substância E.p1.

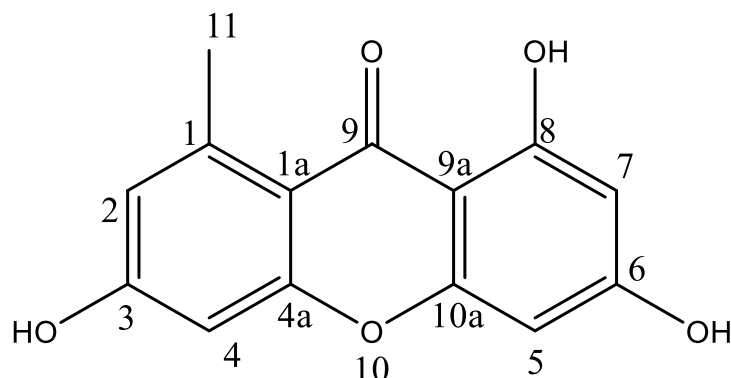
Além das análises por espectroscopia de RMN, foi obtido também um espectro de massas (injeção direta), visando apenas a detecção da massa molecular da amostra. No espectro resultante (figura 35) não foi obtido apenas um pico majoritário, porém a análise realizada em modo negativo apresentou um pico correspondente à estrutura proposta em  $m/z$  123,0484  $[M-H]^-$ , visto que o álcool 3-hidroxi benzílico possui uma massa molecular de  $m/z$  124,14 e fórmula molecular  $C_7H_8O_2$ .



**Figura 35:** Espectro de massas da amostra E.p1, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo.

#### 4.6.2. E.p4

A substância E.p4, um sólido amorfo que quando solubilizado apresenta coloração levemente amarelada, foi isolada a partir da fração CLV E utilizando-se CLAE-DAD. A amostra foi analisada via espectrômetro de massas (EM-ESI-TOF), por meio de injeção direta e via espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H, HMBC e HSQC (modelo DRX 500), na frequência de 500 MHz. Para a análise de EM a amostra foi dissolvida em MeOH grau CLAE e para realização de análises por RMN a dissolução foi realizada utilizando o solvente deuterado metanol (CD<sub>3</sub>OD). Devido à pouca quantidade de amostra, os dados de RMN <sup>13</sup>C foram obtidos por meio das análises extrapolada do espectro bidimensional (HMBC). Após análises dos dados obtidos e comparação com dados da literatura, a amostra E.p4 foi identificada como a 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona (figura 36).



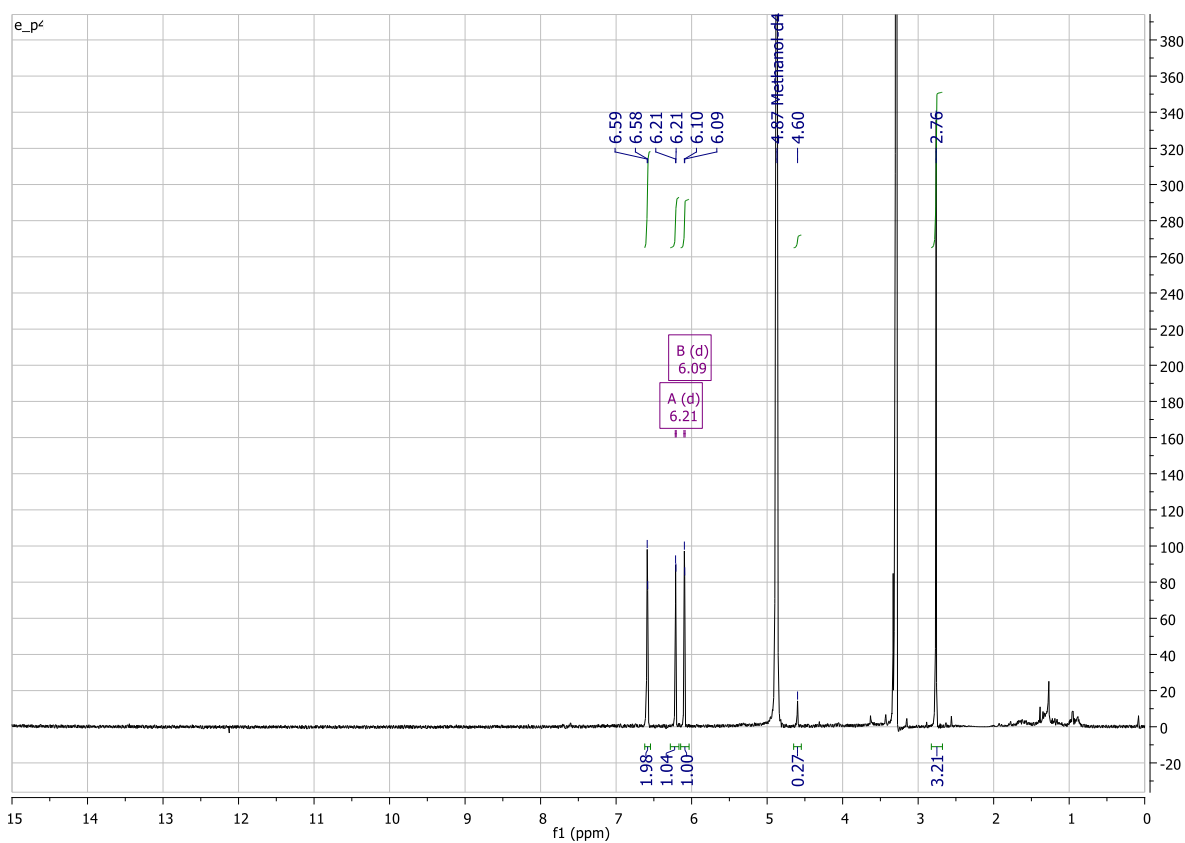
**Figura 36:** Proposta estrutural para a amostra E.p4: 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>).

Os  $\delta^1\text{H}$  e  $\delta^{13}\text{C}$  obtidos das análises estão apresentados na tabela 11, assim como comparação com dados da literatura (ABDEL-LATEFF et al., 2002). Nas figuras seguintes se encontram imagens dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da substância E.p4 (figura 37) e de suas expansões (figura 38).

**Tabela 12:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da substância E.p4 e da 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona descrita na literatura.

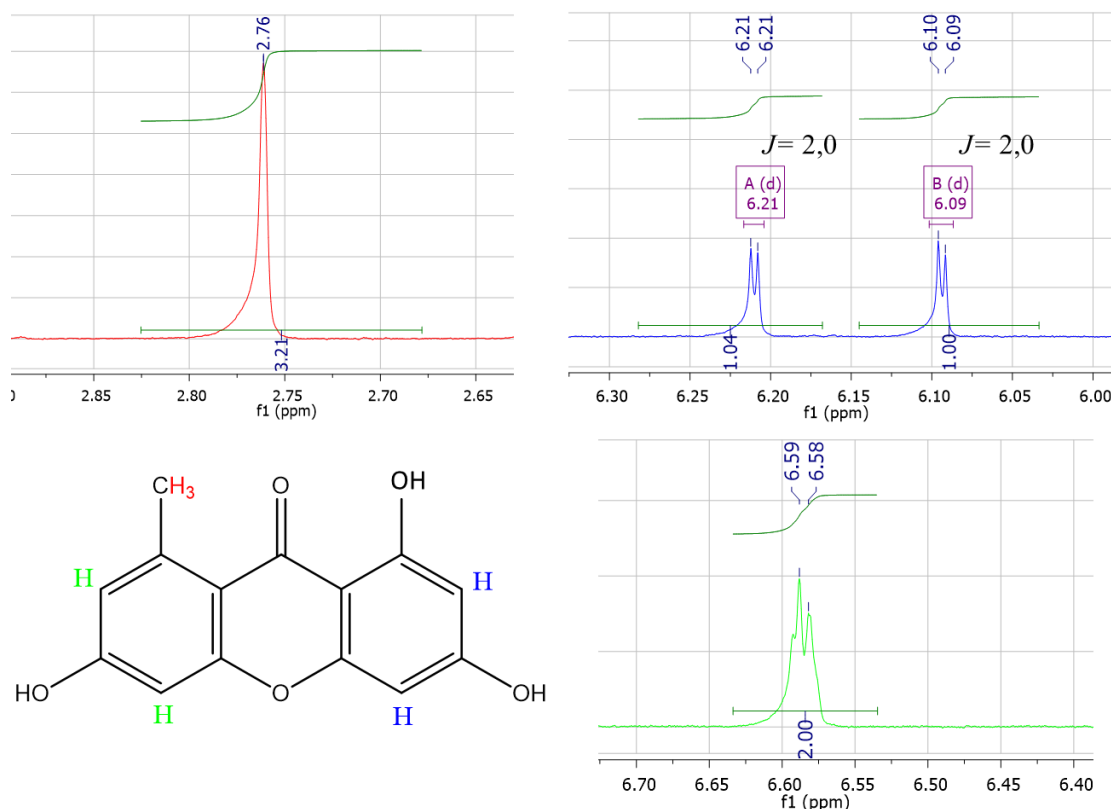
Posição	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (mult., <i>J</i> em Hz) CD <sub>3</sub> OD 500 MHz	$\delta^1\text{H}$ (ppm) (mult., <i>J</i> em Hz) (ABDEL-LATEFF et al., 2002)	$\delta^{13}\text{C}$ (HMBC) CD <sub>3</sub> OD 500 MHz	$\delta^{13}\text{C}$ (ABDEL- LATEFF et al., 2002)
1	-	-	143,2	144,4
1a	-	-	111,3	113,0
2	6,58 (sl)	6,70 (sl)	115,5	116,9
3	-	-	157,1	158,1
4	6,59 (sl)	6,71 (sl)	100,1	101,5
4a	-	-	159,7	160,3
5	6,21 (d, <i>J</i> = 2,0)	6,31 (d, <i>J</i> = 1,8)	96,9	94,0
6	-	-	164,2	164,9

7	6,09 (d, $J= 2,0$ )	6,17 (d, $J= 1,8$ )	97,4	98,7
8	-	-	162,7	163,6
9	-	-	-	183,0
9a	-	-	102,3	103,8
10a	-	-	164,6	165,5
11	2,76 (3H, s)	2,77 (3H, s)	23,1	23,4



**Figura 37:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da amostra E.p4,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz.





**Figura 38:** Expansões dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  da substância E.p4 e atribuições.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância E.p4, pode ser observado 4 sinais na faixa de  $\delta$  de hidrogênios aromáticos: um par de dupletos em 6,09 ppm e 6,21 ppm, integrando para 1H cada e apresentando constante de acoplamento ( $J$ ) de 2,0 Hz característica de acoplamento de hidrogênios aromáticos com relação em *meta*; e dois simpletos largos sobrepostos em 6,58 ppm e 6,59 ppm que, juntos, integram para 2H. Há também no espectro um simpleto em 2,76 ppm integrando para 3H que corresponde ao grupamento metílico ligado ao anel aromático na posição 1 do anel.

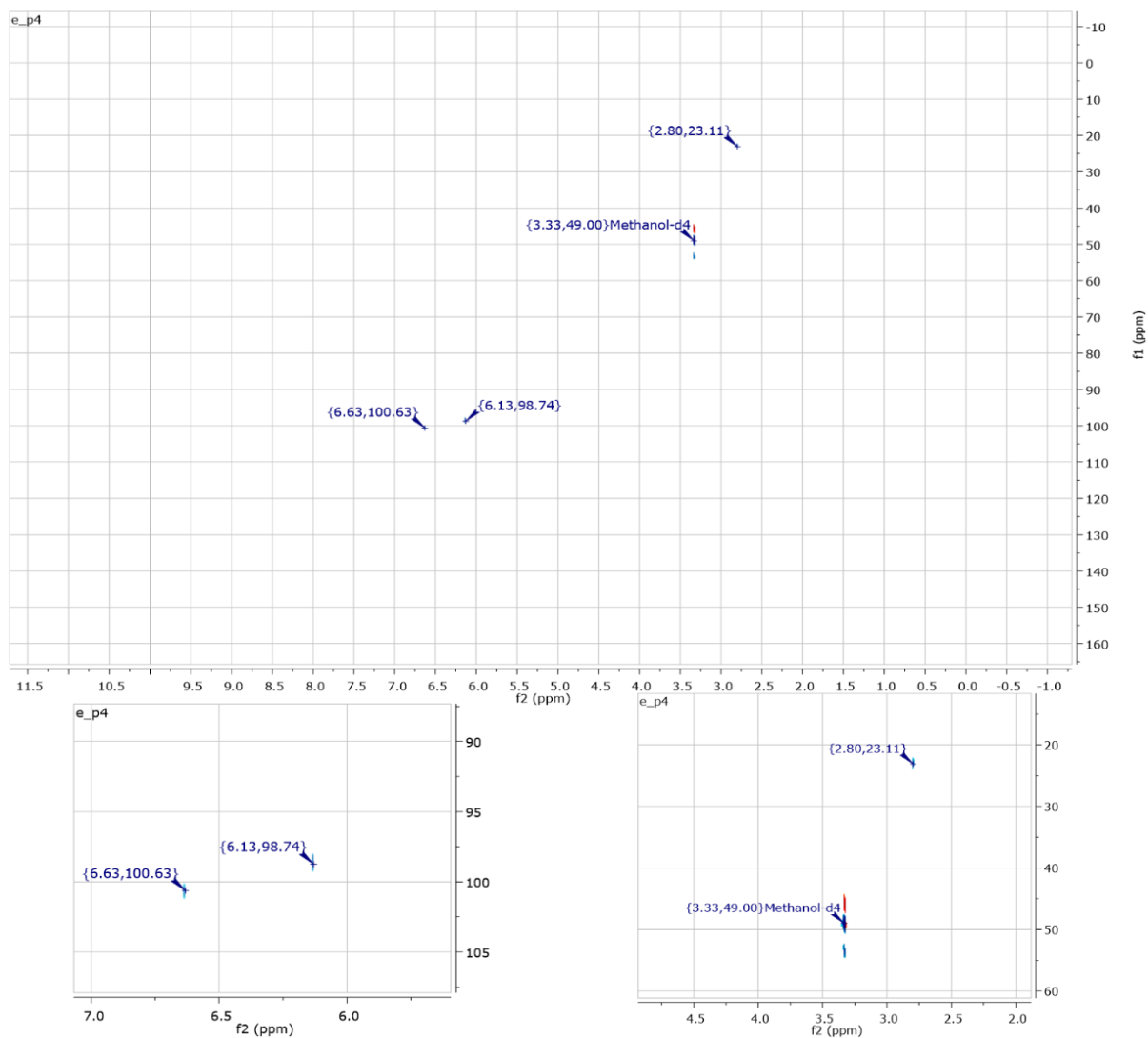
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido através da análise de HMBC condiz com a estrutura proposta, apresentando 12 sinais de deslocamentos químicos na faixa que caracteriza carbonos de anel aromático ( $\delta$  110 – 175 ppm) e um sinal que corresponde ao grupo metílico presente no anel aromático ( $\delta$  23,12 ppm).

Para confirmação da estrutura foram obtidos os espectros de RMN bidimensionais HSQC e HMBC. Na análise de HSQC (Figura 39, Tabela 12) foi possível observar a ligação dos hidrogênios presentes no anel aromático H-4 ( $\delta$  6,59), H-7 ( $\delta$  6,09) e H-11 ( $\delta$  2,76) com os carbonos C-4 ( $\delta$  100,1), C-7 ( $\delta$  97,4) e C-11 ( $\delta$  23,1), respectivamente. Analisando os dados obtidos no espectro bidimensional HMBC (Figuras 40 e 41, Tabela 12), observou-se correlações entre: o hidrogênio H-11 ( $\delta$  2,76) com o C-1 ( $\delta$  143,2), C-1a ( $\delta$  111,3) e o C-2 ( $\delta$

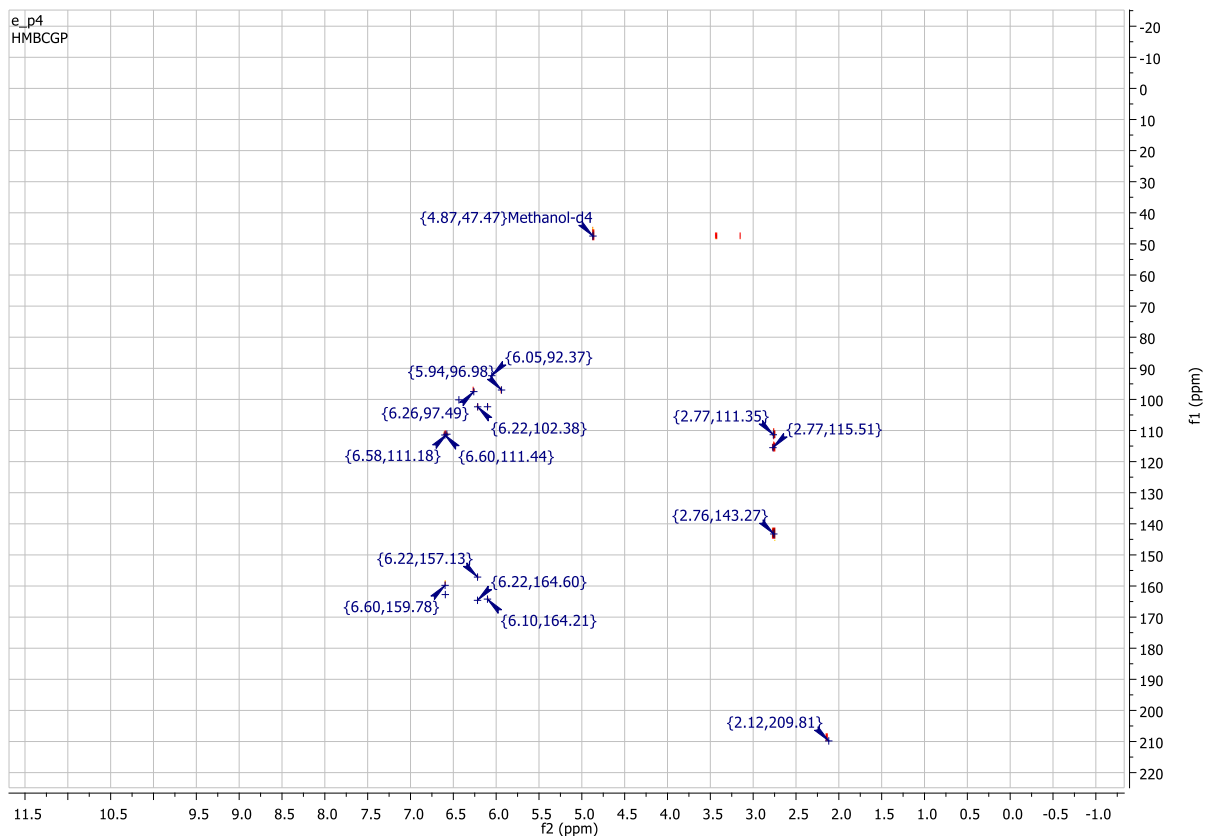
115,5); o H-7 ( $\delta$  6,09) se correlacionando com C-5 ( $\delta$  96,9), C-9a ( $\delta$  102,3) e C-6 ( $\delta$  164,2); o hidrogênio 5 ( $\delta$  6,21) se correlacionando com C-9a ( $\delta$  102,3), C-3 ( $\delta$  157,1), C-10a ( $\delta$  164,6) e C-7 ( $\delta$  97,4); H-4 ( $\delta$  6,59) se correlacionando com C-8 ( $\delta$  162,7), C-4a ( $\delta$  159,7) e C-1a ( $\delta$  111,3); e o H-2 ( $\delta$  6,58), por fim, se correlacionando com C-4 ( $\delta$  100,1) e C-1a ( $\delta$  111,3).

**Tabela 13:** Dados obtidos dos mapas de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) e HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da substância substância E.p4.

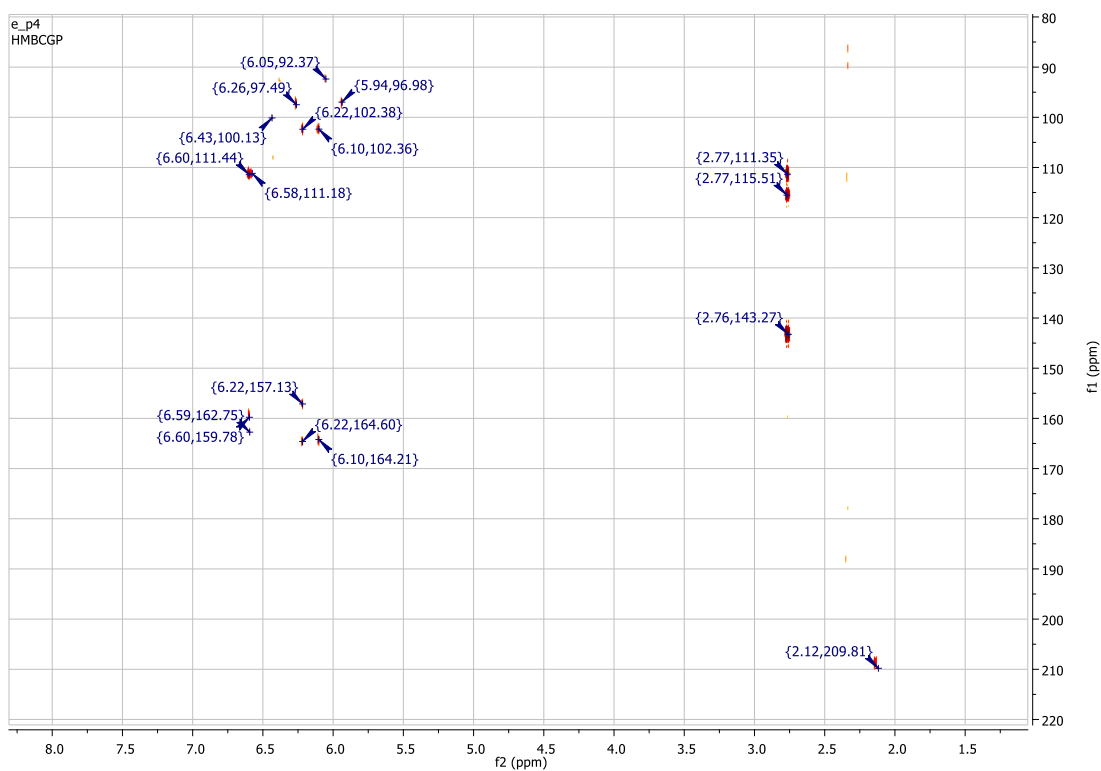
$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$ HSQC	$\delta^{13}\text{C}$ HMBC
H-2 ( $\delta$ 6,58)	-	C-4 ( $\delta$ 100,1); C-1a ( $\delta$ 111,3)
H-4 ( $\delta$ 6,59)	C-4 ( $\delta$ 100,1)	C-8 ( $\delta$ 162,7); C-4a ( $\delta$ 159,7); C-1a ( $\delta$ 111,3)
H-5 ( $\delta$ 6,21)	-	C-9a ( $\delta$ 102,3); C-3 ( $\delta$ 157,1); C-10a ( $\delta$ 164,6); C-7 ( $\delta$ 97,4)
H-7 ( $\delta$ 6,09)	C-7 ( $\delta$ 97,4)	C-5 ( $\delta$ 96,9); C-9a ( $\delta$ 102,3); C-6 ( $\delta$ 164,2)
H-11 ( $\delta$ 2,76)	C-11 ( $\delta$ 23,1)	C-1 ( $\delta$ 143,2); C-1a ( $\delta$ 111,3); C-2 ( $\delta$ 115,5)



**Figura 39:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) da amostra E.p4 e expansões,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz.



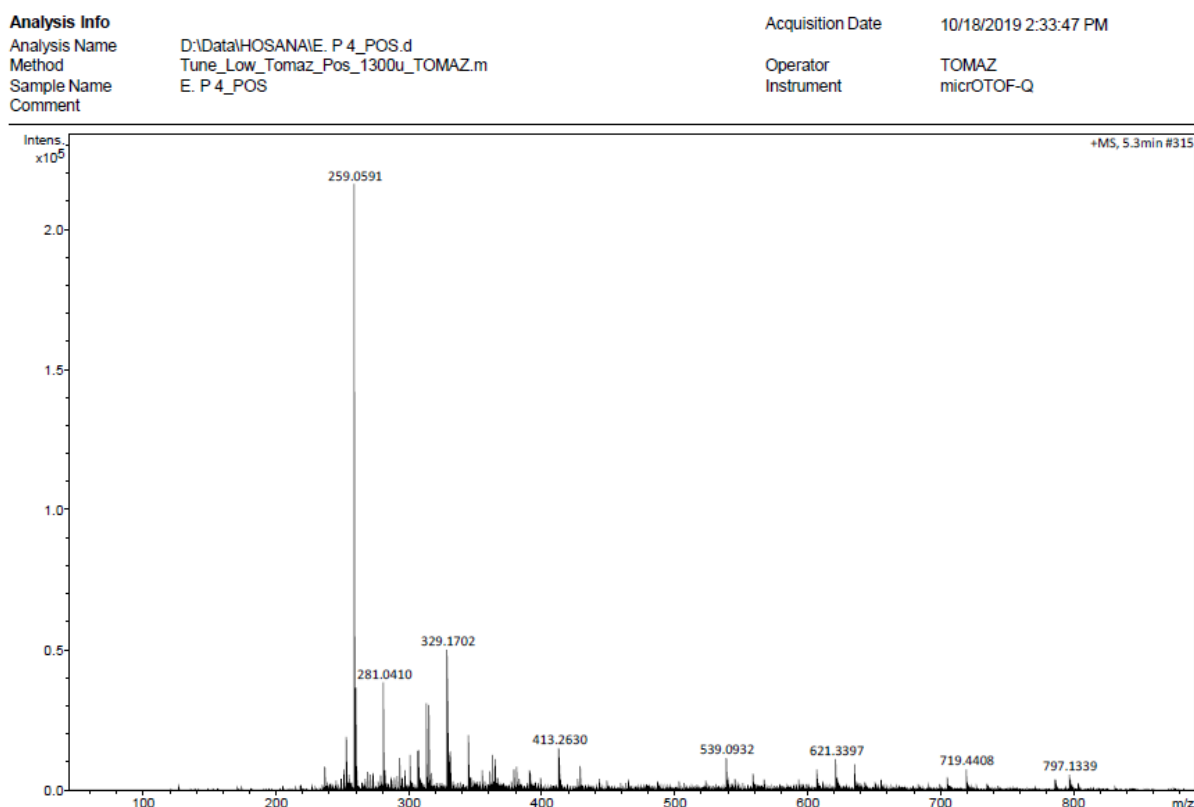
**Figura 40:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC (<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C) da substância E.p4, CD<sub>3</sub>OD 500 MHz.



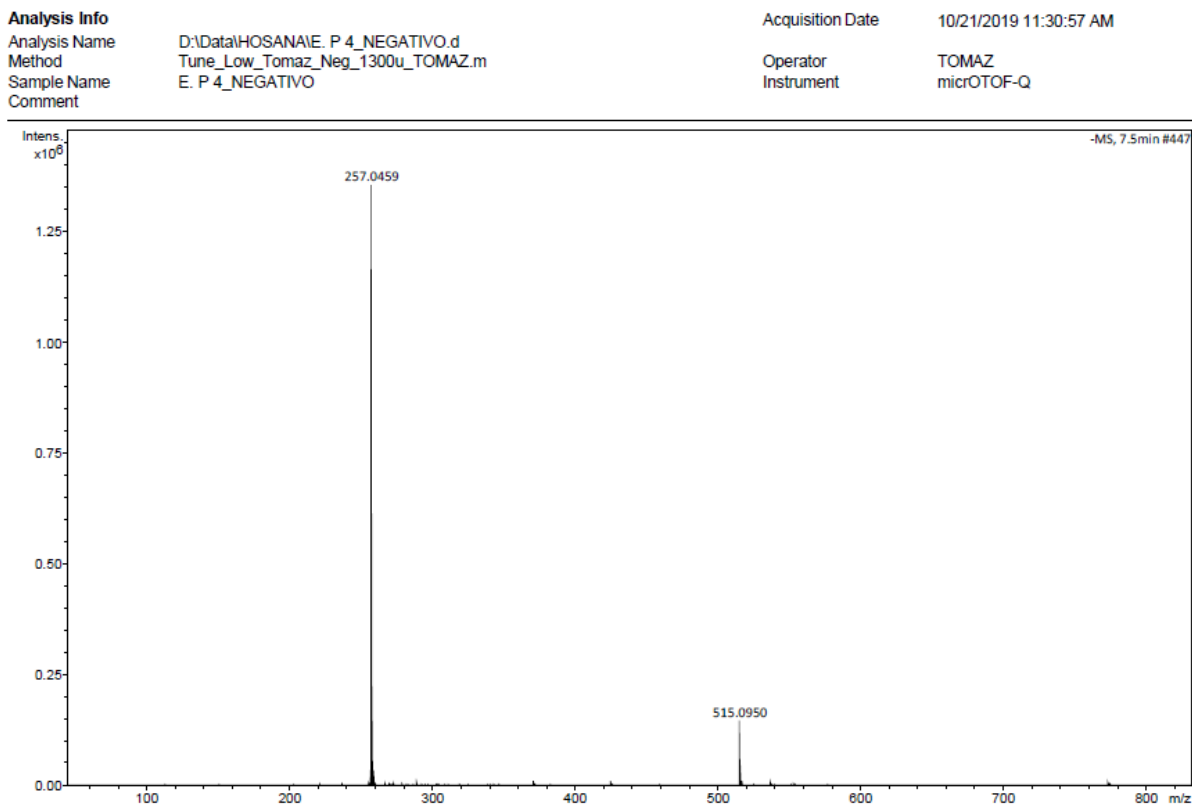
**Figura 41:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC (<sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C) da substância E.p4 (expansão).

Foi realizada também análises de espectrometria de massas (EM-ESI-TOF) da amostra, por injeção direta em modo positivo e negativo, com finalidade de se obter a massa molecular da substância. Em ambos os modos, a análise resultou em um pico majoritário que corresponde à massa molecular de  $m/z$  258,0528 da 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona; substância de fórmula molecular  $C_{14}H_{10}O_5$  (ABDEL-LATEFF et al., 2003). No modo positivo (figura 42), o valor da massa do pico majoritário foi de  $m/z$  259,0591  $[M+H]^+$ ; enquanto no modo negativo (figura 43), a massa do sinal majoritário foi de  $m/z$  257,0459  $[M-H]^-$ ; ambos condizentes com o valor de massa molecular da substância proposta. Na análise em modo negativo podemos observar também a presença de um pico em  $m/z$  515,0950  $[M-H]^-$ , que corresponde a duas vezes o valor da massa molecular  $[2M-H]^-$ .

Além disso, através do detector DAD utilizado nas análises de CLAE, obteve-se o espectro de absorção no UV da substância, o qual forneceu os valores  $\lambda_{\text{máx}}$  que foram: 241, 311, 399 e 407 nm. Os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  da substância proposta é de 238 e 310 nm (ABDEL-LATEFF et al., 2003), que também condizem com valores obtidos da amostra E.p4.



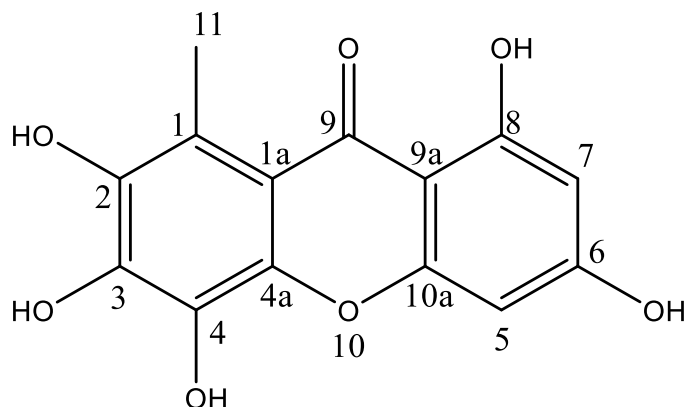
**Figura 42:** Espectro de massas da amostra E.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo.



**Figura 43:** Espectro de massas da amostra E.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo.

#### 4.6.3. F.p4

Isolada da fração CLV F por CLAE-DAD, a substância F.p4 apresentou aparência de um pó amorfo amarelado. Após análises dos dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H e espectrométricos EM (injeção direta), a substância foi identificada como sendo 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona (figura 44), também em concordância com os dados da literatura (ABDEL-LATEFF et al., 2002). Para a obtenção do espectro de massas, a amostra foi solubilizada em MeOH grau CLAE e para análises de RMN em DMSO deuterado. O RMN <sup>1</sup>H foi realizado a uma frequência de 500 MHz.

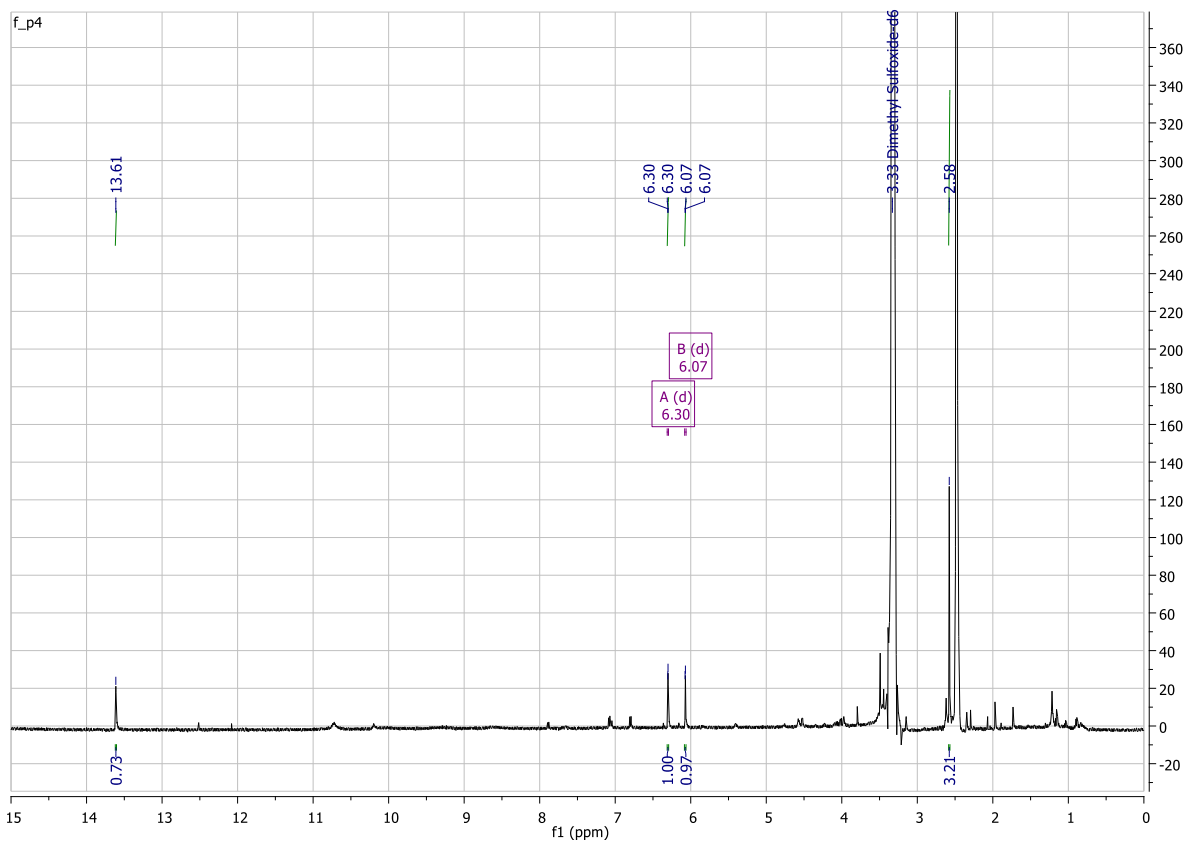


**Figura 44:** Proposta estrutural para a amostra F.p4: 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona ( $C_{14}H_{10}O_7$ ).

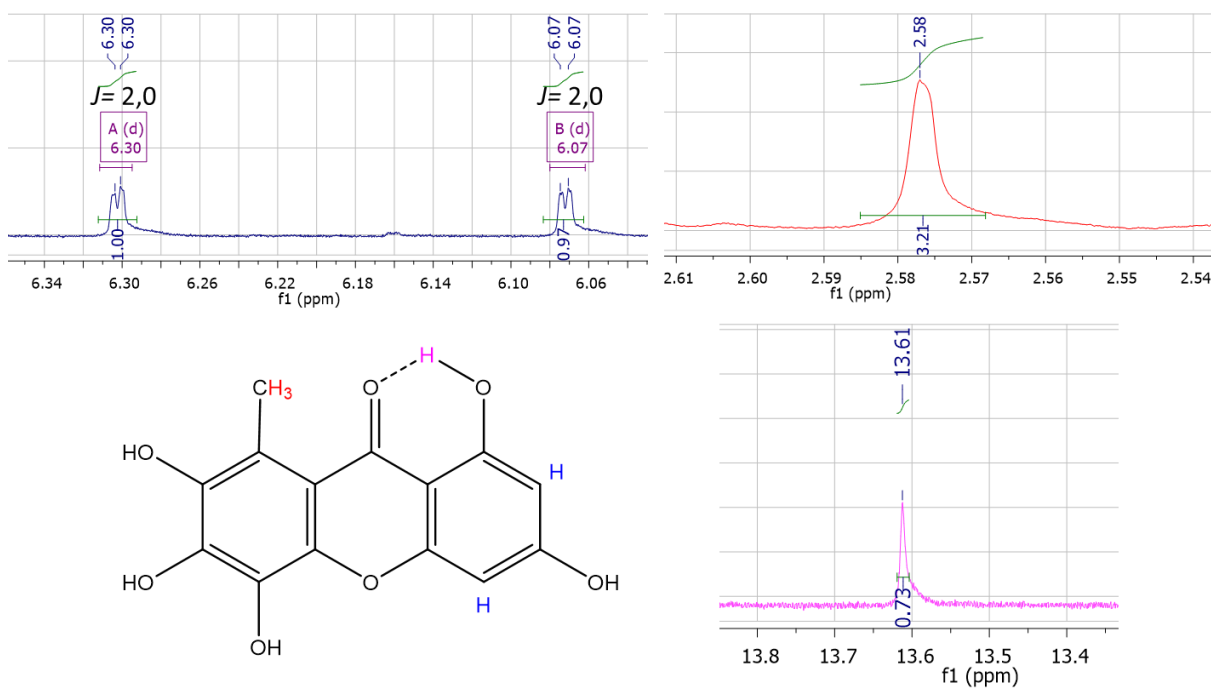
Na tabela 13 encontra-se os resultados de  $\delta$   $^1H$  observados no espectro de RMN da amostra F.p4 comparados com dados da substância proposta, obtidos a partir de literatura publicada por Abdel-Lateff e colaboradores, 2002. O espectro de RMN de  $^1H$  bem como suas regiões expandidas podem ser observadas nas figuras 45 e 46. Na figura 46 encontra-se as atribuições dos picos aos seus respectivos hidrogênios.

**Tabela 14:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1H$  da substância F.p4 e da 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona descrita na literatura.

Posição	$\delta$ $^1H$ (ppm) (mult., <i>J</i> em Hz) DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> 500 MHz	$\delta$ $^1H$ (ppm) (mult., <i>J</i> em Hz) (ABDEL-LATEFF et al., 2002)
5	6,30 (d, <i>J</i> = 2,0)	6,31 (d, <i>J</i> = 2,1)
7	6,07 (d, <i>J</i> = 2,0)	6,16 (d, <i>J</i> = 2,1)
11	2,58 (3H, s)	2,70 (3H, s)
8-OH	13,61 (s)	13,62 (s)



**Figura 45:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da amostra F.p4,  $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz.



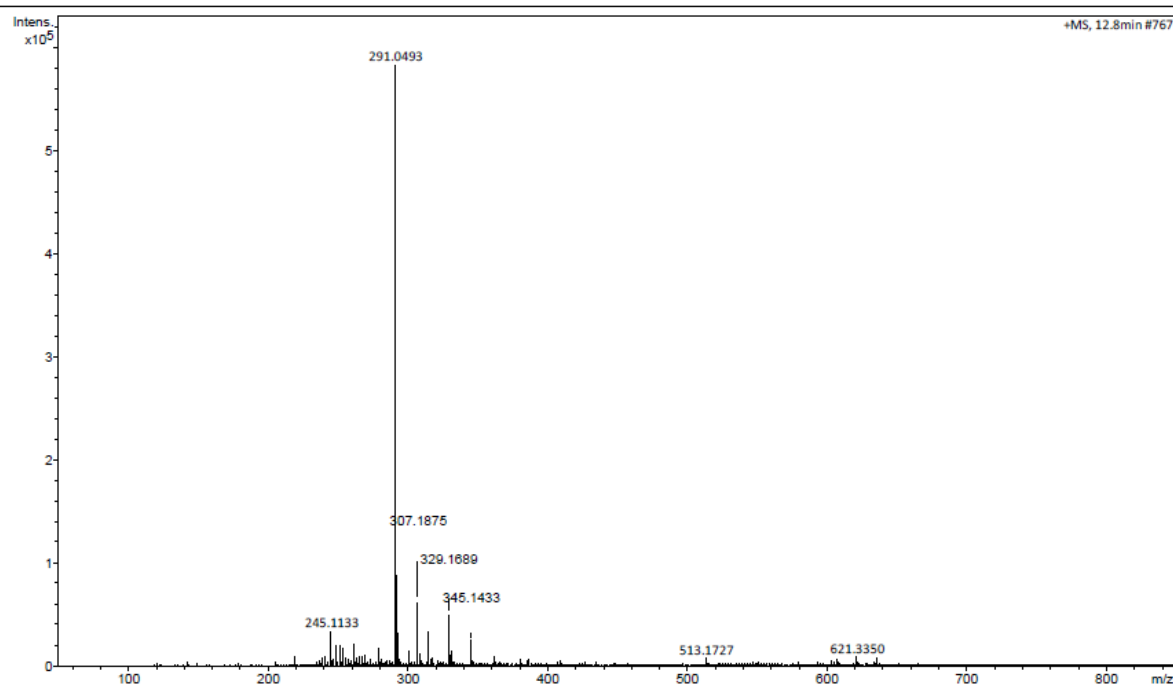
**Figura 46:** Expansões dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  da substância F.p4 e atribuições.



Na análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F.p4, são observados 2 sinais de deslocamento químico com valores típicos de hidrogênios aromáticos, sendo eles um par de dupletos em 6,30 e 6,07 ppm ambos integrando para 1H. Os dupletos apresentam constante de acoplamento ( $J$ ) de 2,0 Hz, indicando acoplamento de hidrogênios aromáticos em posição *meta*. Os outros sinais de hidrogênios aromáticos que apareciam no espectro da substância E.p4, item 4.6.2, não se encontram nesta mesma análise da substância F.p4, indicando a presença de substituintes nas posições onde se encontravam os hidrogênios. No espectro observa-se também um simpleto integrando para 3H com  $\delta$  2,58, indicando metila ligada à anel aromático, correspondente à metila da posição 11, e um outro simpleto em 13,61 ppm integrando para 1H. Este sinal é característico de hidrogênios de hidroxilas, altamente desblindados devido à formação de ligações de hidrogênio com oxigênios de carbonila espacialmente próximos (figura 45). Hidrogênios sob este efeito são denominados hidrogênios quelados.

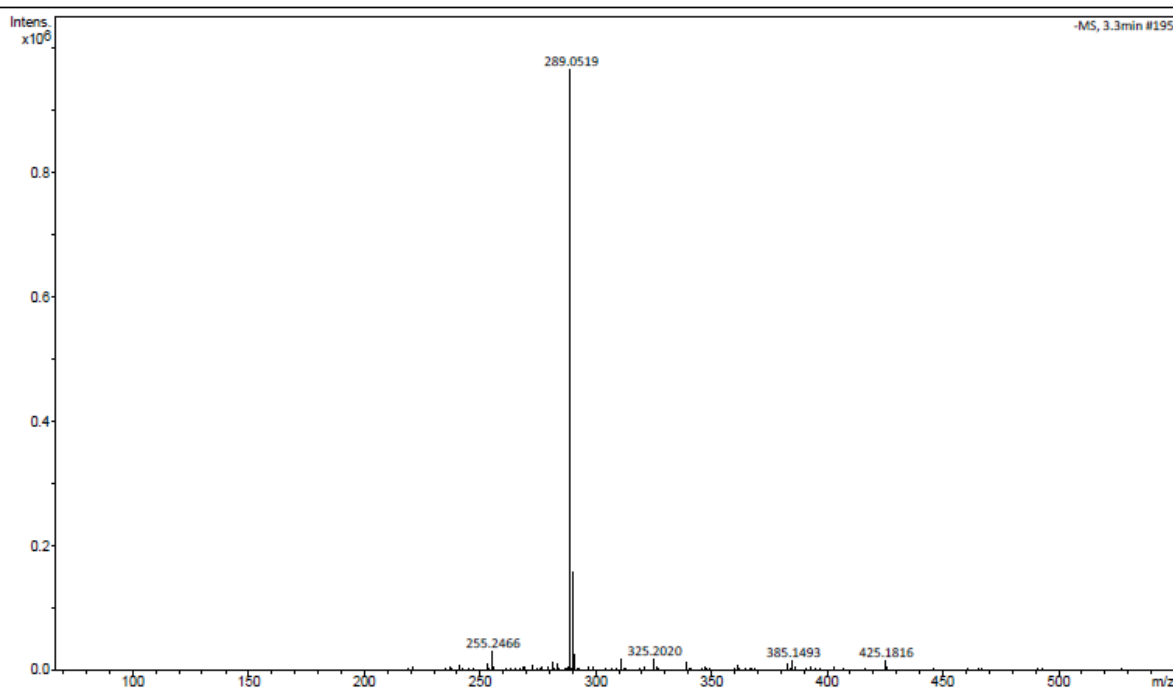
A amostra F.p4 também foi analisada por espectrometria de massas (EM-ESI-TOF) com o intento de determinar a massa molecular da substância. Realizou-se análises nos dois modos distintos, positivo e negativo e os resultados foram condizentes com a estrutura proposta. No modo positivo (figura 47) foi observado o pico referente a massa  $m/z$  291,0493  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , enquanto que no modo negativo (figura 48) resultou em um pico majoritário com massa molecular de  $m/z$  289,0519  $[\text{M}-\text{H}]^-$ . A massa molecular da 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona é de 290,0422 e sua fórmula molecular é  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_7$  (ABDEL-LATEFF et al., 2002), confirmando assim a identificação da amostra F.p4.

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	12/9/2019 9:38:32 AM
Analysis Name	D:\Data\HOSANA\Fe p 4_POS.d	Operator	TOMAZ
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_TOMAZ.m	Instrument	micrOTOF-Q
Sample Name	Fe p 4_POS		
Comment			



**Figura 47:** Espectro de massas da amostra F.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo.

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	12/9/2019 12:11:44 PM
Analysis Name	D:\Data\HOSANA\Fe p 4_NEG1.d	Operator	TOMAZ
Method	Tune_Low_Tomaz_Neg_1300u_TOMAZ.m	Instrument	micrOTOF-Q
Sample Name	Fe p 4_NEG1		
Comment			

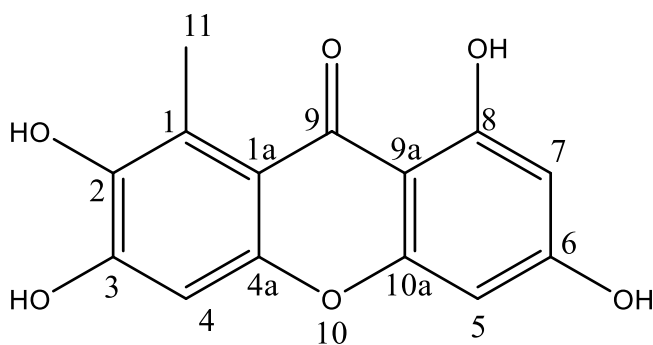


**Figura 48:** Espectro de massas da amostra F.p4, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo.

Além das análises já mencionadas, o espectro de absorção na região do UV adquirido durante as análises por CLAE-DAD forneceu os seguintes valores de  $\lambda_{\text{máx}}$ : 258 e 327 nm. Os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  da 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona citados por ADBEL-LATEFF e colaboradores foram de 258 e 327 nm, fornecendo outro fator de comparação que confirma esta proposta.

#### 4.6.4. F.p5

Esta substância, após isolada da fração CLV F utilizando o método cromatográfico CLAE-DAD, apresentou-se como um cristal amorfo incolor que quando solubilizado assumia coloração amarelada. A amostra foi submetida a análises para a realização da identificação estrutural: espectrometria de massas (EM-ESI-TOF) estando solubilizada em MeOH grau CLAE, e espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  utilizando-se do  $\text{DMSO-}d_6$  como solvente deuterado para realização da análise. Após comparação de dados obtidos através das análises citadas com literatura publicada (ABDEL-LATEFF et al., 2002), a F.p5 foi identificada como a 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona (figura 49).

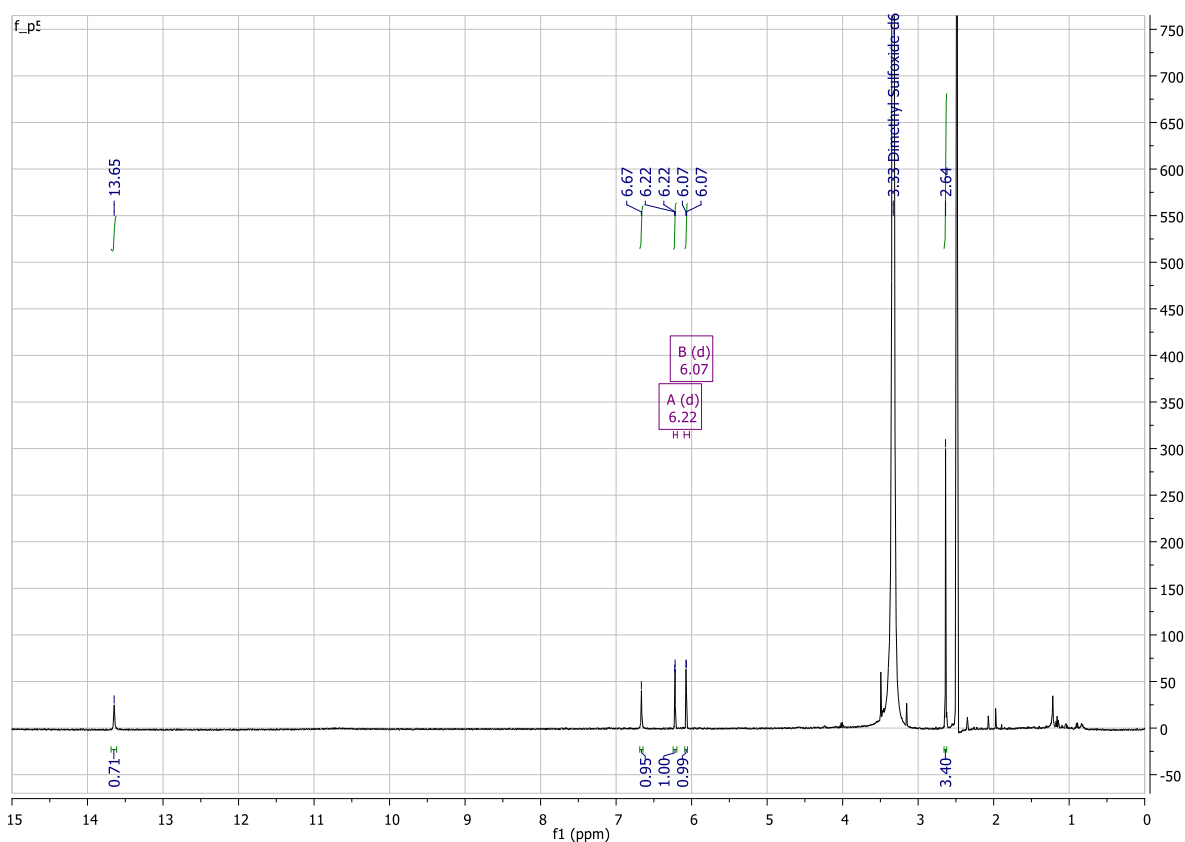


**Figura 49:** Proposta estrutural para a amostra F.p5: 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona ( $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$ ).

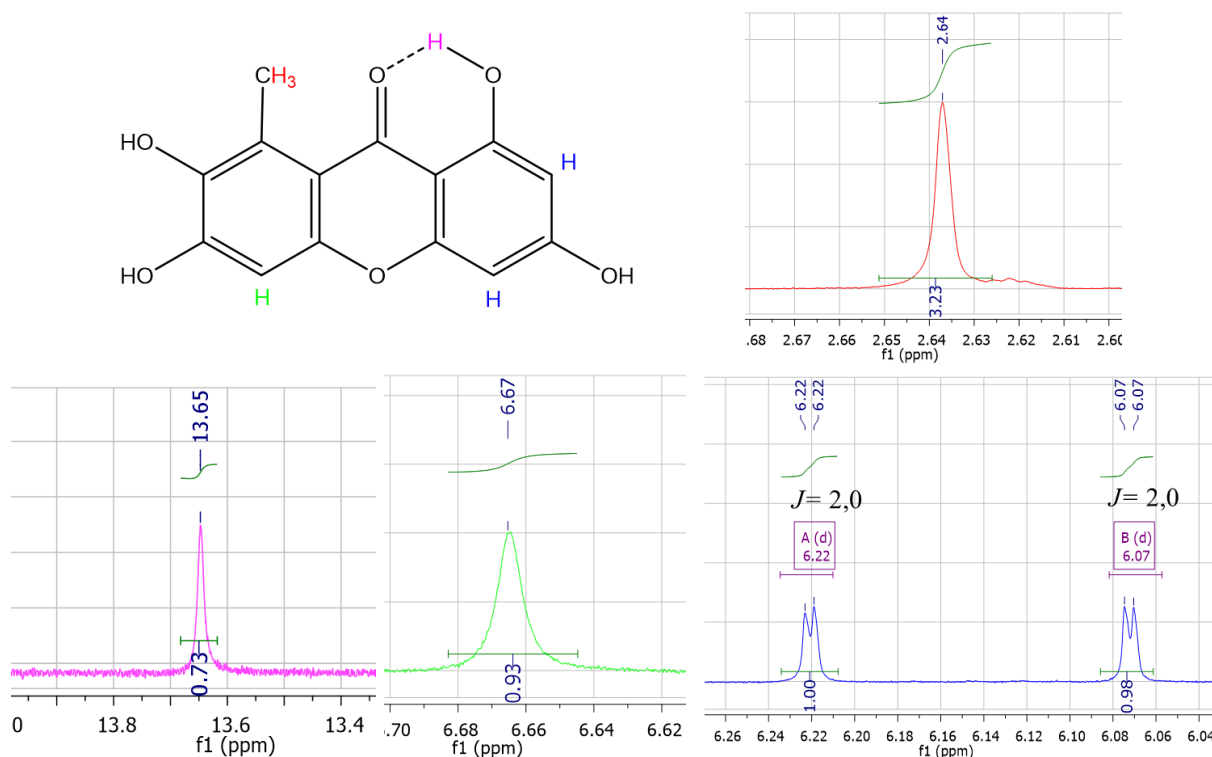
As informações obtidas a partir da análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se encontram na tabela 14, juntamente com comparações de dados encontrados na literatura. Nas figuras 50 e 51, são mostrados o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e suas expansões, com respectivas atribuições.

**Tabela 15:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F.p5 e da 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona descrita na literatura.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) (mult., $J$ em Hz) DMSO- $d_6$ 500 MHz	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) (mult., $J$ em Hz) (ABDEL-LATEFF et al., 2002)
4	6,67 (s)	6,78 (s)
5	6,22 (d, $J= 2,0$ )	6,26 (d, $J= 2,2$ )
7	6,07 (d, $J= 2,0$ )	6,15 (d, $J= 2,2$ )
11	2,64 (3H, s)	2,76 (3H, s)
8-OH	13,65 (s)	13,58 (s)



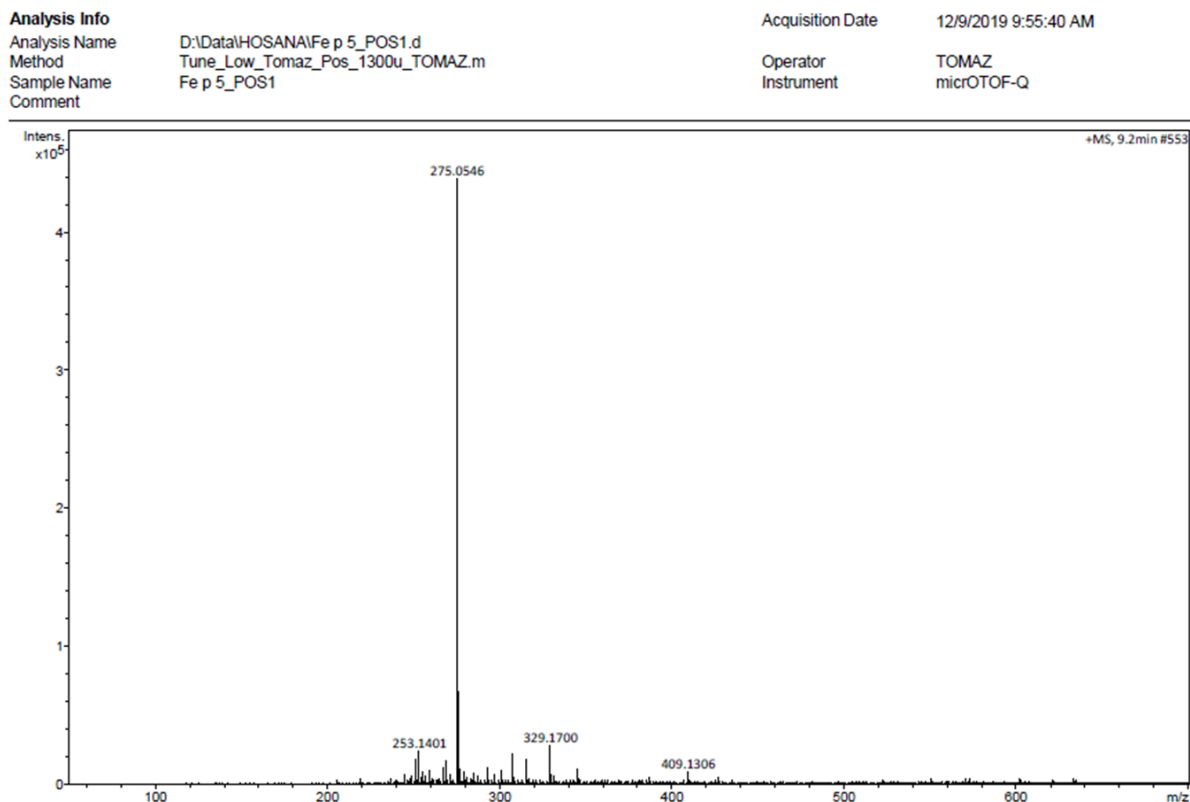
**Figura 50:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  completo da amostra F.p5, DMSO- $d_6$ , 500 MHz.



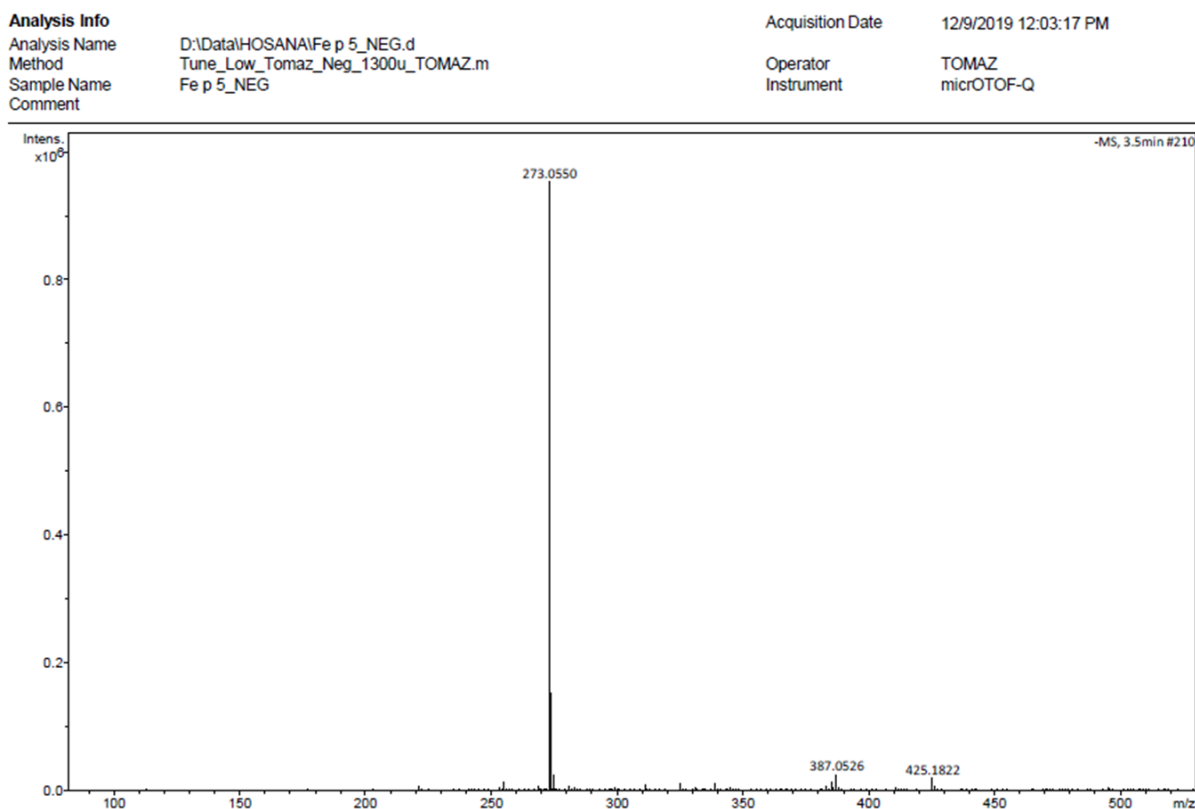
**Figura 51:** Expansões dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  da substância F.p5 e atribuições.

Observa-se que os valores de  $\delta^1\text{H}$  obtidos, assim como o espectro, são semelhantes aqueles citados e estudados anteriormente nos itens 4.6.2 e 4.6.3. Isso se deve ao fato de as substâncias serem oriundas de uma mesma rota biossintética (via do acetato) e diferirem apenas na quantidade de substituintes hidroxílicos ligados aos anéis aromáticos. Neste espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , há a presença de 3 sinais de  $\delta^1\text{H}$  característicos de aromáticos, sendo eles um simpleto em 6,67 ppm integrando para 1H e um par de dupletos em 6,07 e 6,22 ppm correspondentes a hidrogênios que acoplam entre si por estarem em posição *meta*, fato justificado pela constante de acoplamento de 2,0 Hz. Além dos deslocamentos de hidrogênios aromáticos, observa-se também mais dois simpletos: um com  $\delta$  2,64 integrando para 3H, que corresponde ao grupo metílico ligado na posição 1 do anel aromático; e o outro em 13,65 ppm indicando o hidrogênio altamente deslocado do substituinte hidroxílico que forma uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonílico (hidrogênio quelado).

Os resultados da análise de EM-ESI-TOF também foram condizentes com a estrutura proposta, visto que a 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona possui massa molecular de 274,0465 e fórmula molecular  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$  (ABDEL-LATEFF et al., 2002), e os resultados de massa obtidos da F.p5 foram: no modo positivo de 275,0546  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (figura 52) e no modo negativo de 273,0550  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (figura 53).



**Figura 52:** Espectro de massas da amostra F.p5, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo.

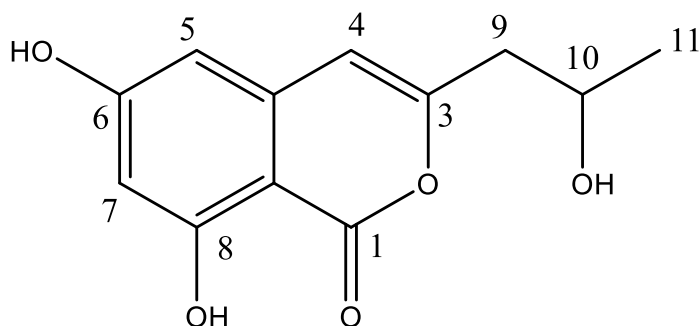


**Figura 53:** Espectro de massas da amostra F.p5, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo.

Como última comparação para determinar a identidade da F.p5, foram conferidos os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  obtidos a partir do detector DAD nas análises de CLAE-DAD. Os valores resultantes de  $\lambda_{\text{máx}}$  da amostra F.p5 foram 239, 254, 313 e 359 nm, enquanto os da 2,3,6,8-tetraidroxil-1-metilxantona são 234, 258, 311 e 358 nm (ABDEL-LATEFF et al., 2002), valores muito próximos aos encontrados para a F.p5.

#### 4.6.5. F.p3

A substância F.p3 obteve aparência de um pó amorfo branco após ser isolada da fração CLV F via CLAE-DAD. Foi adquirido desta amostra apenas 0,3 mg e por este motivo foi submetida apenas a análises de EM e RMN de  $^1\text{H}$ , este último foi realizado a uma frequência de 500 MHz e para solubilização da amostra foi utilizado como solvente o  $\text{DMSO-}d_6$ . Os resultados da análise foram comparados com dados de literatura publicada, sendo assim identificada a substância F.p3 como a 6,8-diidroxil-3-(2-hidroxi-propil) isocumarina (figura 54), substância ainda não relatada na literatura como metabólito secundário produzido por espécies de fungo do gênero *Arthrinium*.



**Figura 54:** Proposta estrutural para a amostra F.p3: 6,8-diidroxil-3-(2-hidroxi-propil) isocumarina ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ ).

A comparação dos dados de  $\delta$   $^1\text{H}$  da amostra F.p3 com aqueles descritos na literatura por Gremaud e colaboradores se encontra na tabela 15 e os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , incluindo expansões, podem ser visualizados nas figuras 55 e 56.

**Tabela 16:** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da substância F.p3 e da 6,8-diidroxí-3-(2-hidroxipropil) isocumarina descrita na literatura.

Posição	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) (mult., <i>J</i> em Hz) DMSO- $d_6$ 500 MHz	$\delta$ $^1\text{H}$ (ppm) (mult., <i>J</i> em Hz) (GREMAUD et al., 1994)
	4	6,47 (s)
5	6,29 (d, <i>J</i> = 2,0)	6,49 (d, <i>J</i> = 1,8)
7	6,35 (d, <i>J</i> = 2,0)	6,53 (d, <i>J</i> = 1,8)
9	2,59 (t, <i>J</i> = 6,2)	2,72 (2H, m)
	(CD <sub>3</sub> OD)	
10	3,96 (m)	4,28 (m)
11	1,12 (d, <i>J</i> = 6,2)	1,35 (3H, d, <i>J</i> = 6,18)
8-OH	10,98 (s)	11,2 (sl)
10-OH	4,80 (d, <i>J</i> = 4,9)	4,77 (ChemDraw Pro)



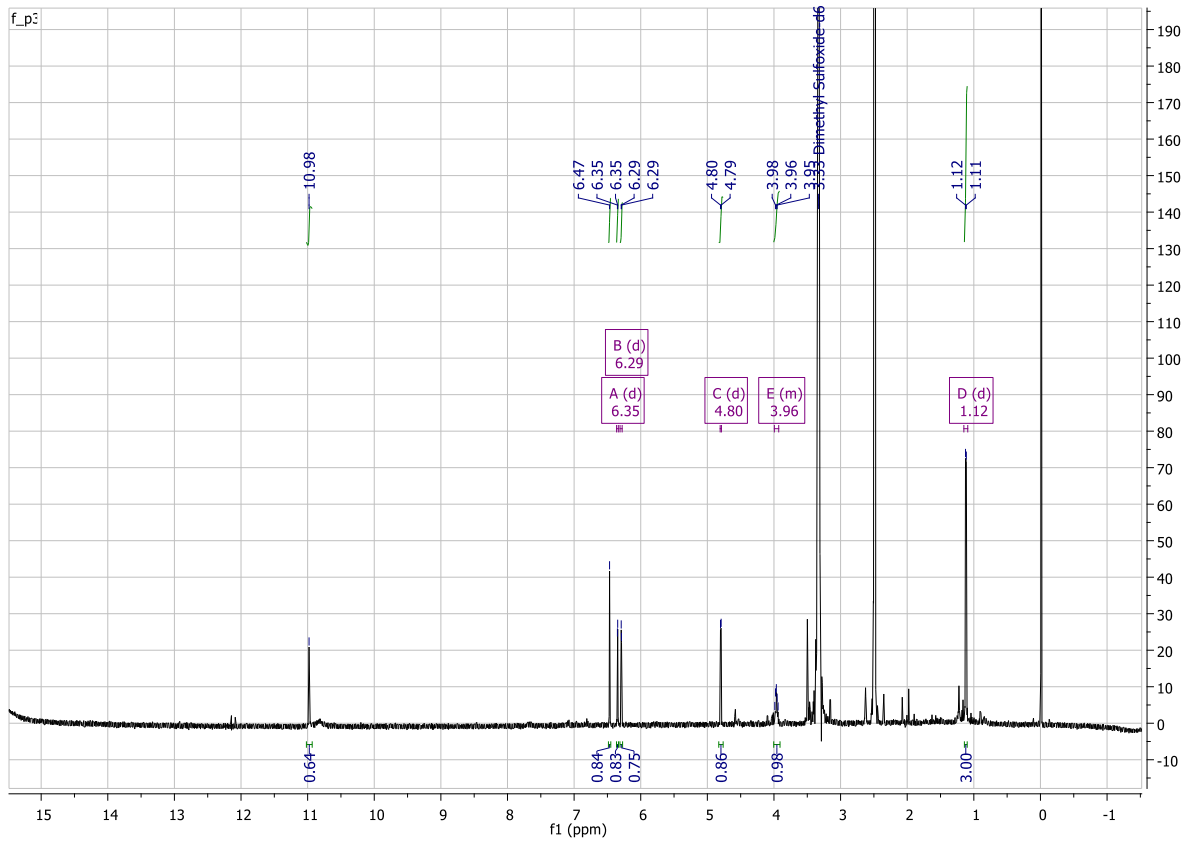


Figura 55: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  completo da amostra F.p3, DMSO- $d_6$ , 500 MHz.

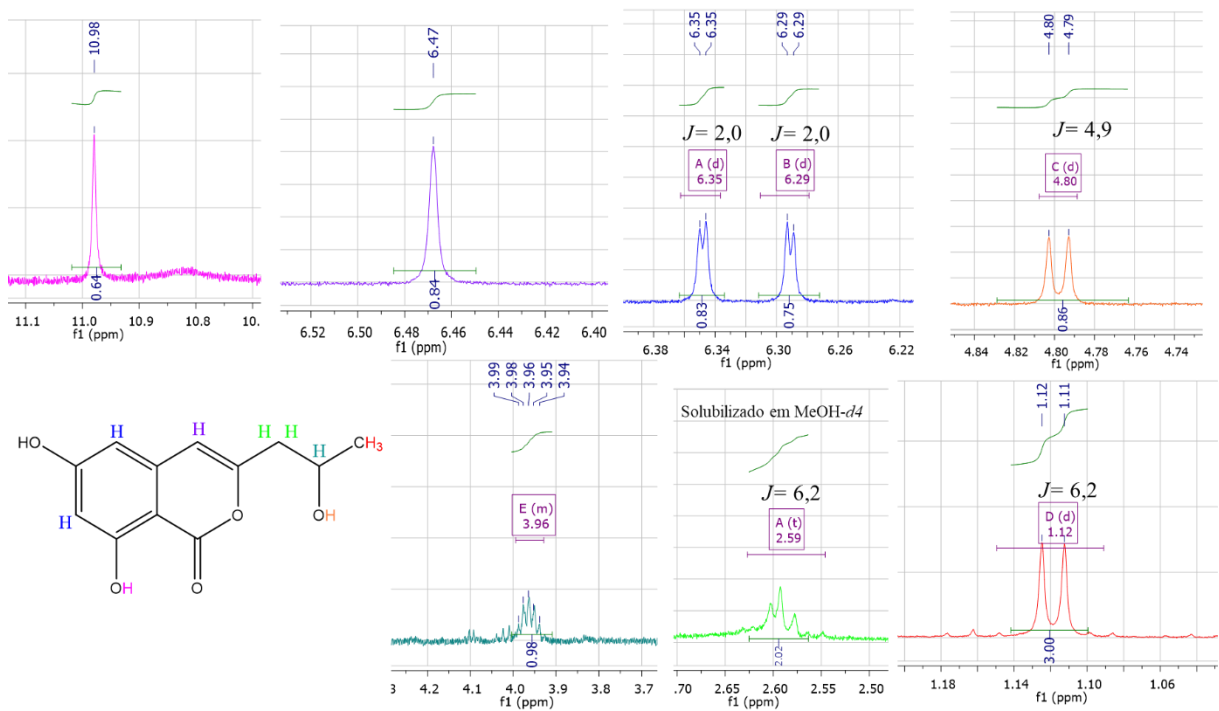
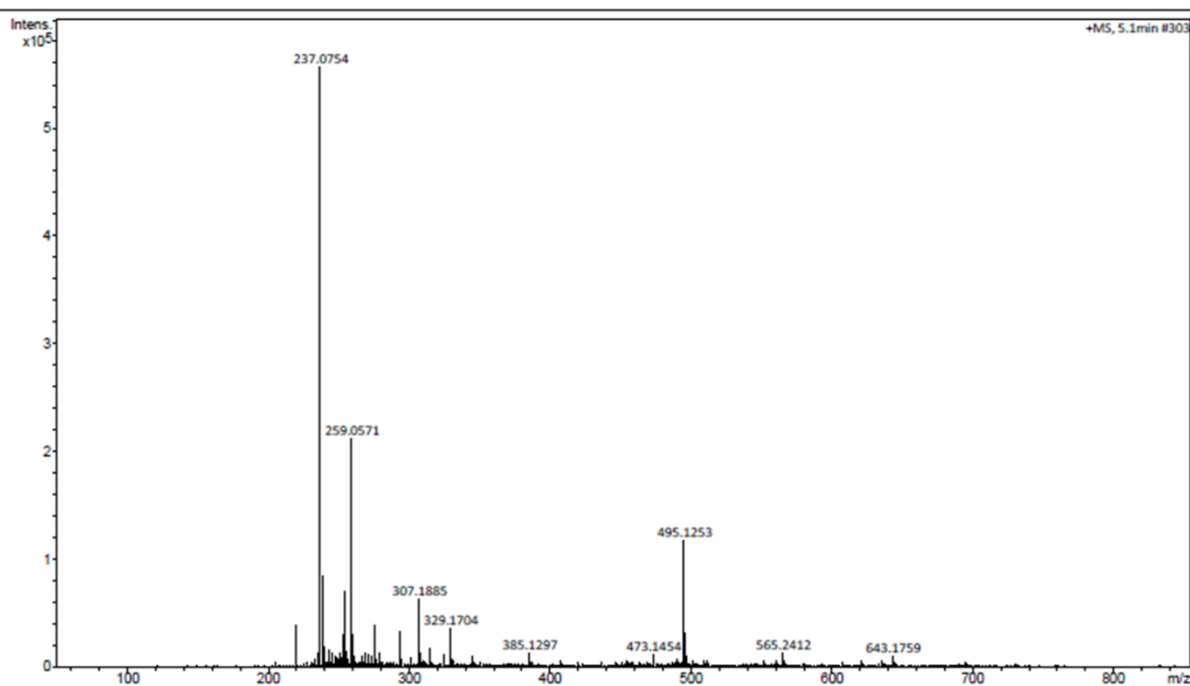


Figura 56: Expansões dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  da substância F.p3 e atribuições.

O espectro apresenta 3 sinais de hidrogênios aromáticos, sendo um singlete de  $\delta$  6,47 ppm e um par de dupletos com  $\delta$  6,29 e  $\delta$  6,35 ppm que acoplam entre si com uma constante ( $J$ ) de 2,0 Hz indicando hidrogênios em posição *meta*. O hidrogênio quelado de um dos grupos hidroxílicos do anel também foi detectado em  $\delta$  10,98 ppm como um simpleto. Quanto aos hidrogênios da cadeia lateral 2-hidroxiopropil, podemos observar um duplete em  $\delta$  1,12 ppm integrando para 3H e com uma constante de acoplamento ( $J$ ) de 6,2 Hz, que representa o grupo metílico terminal da cadeia e um multiplete em 3,96 ppm que condiz com o hidrogênio metínico na posição 10 da estrutura. O sinal do CH<sub>2</sub> em  $\delta$  2,59 ppm foi observado com nitidez apenas quando a substância analisada foi solubilizada em MeOH-*d*<sub>4</sub>, pois quando o espectro era obtido em DMSO-*d*<sub>6</sub> ocorria a sobreposição com os sinais de hidrogênios deste solvente (porcentagem não deuterada que aparece em torno de 2,5 ppm), dificultando a determinação estrutural. Este sinal mostrou-se como um tripleto com constante de acoplamento de 6,2 Hz, integrando para 2H. Em  $\delta$  4,80 foi observado um duplete não mencionado no artigo utilizado para comparação de dados, porém quando utilizado o software “ChemDraw Pro” para predição do espectro de RMN de <sup>1</sup>H, este sinal foi atribuído ao grupo hidroxílico na posição 10 da estrutura, o qual acopla com o hidrogênio metínico em C-10 com  $J= 4,9$  Hz.

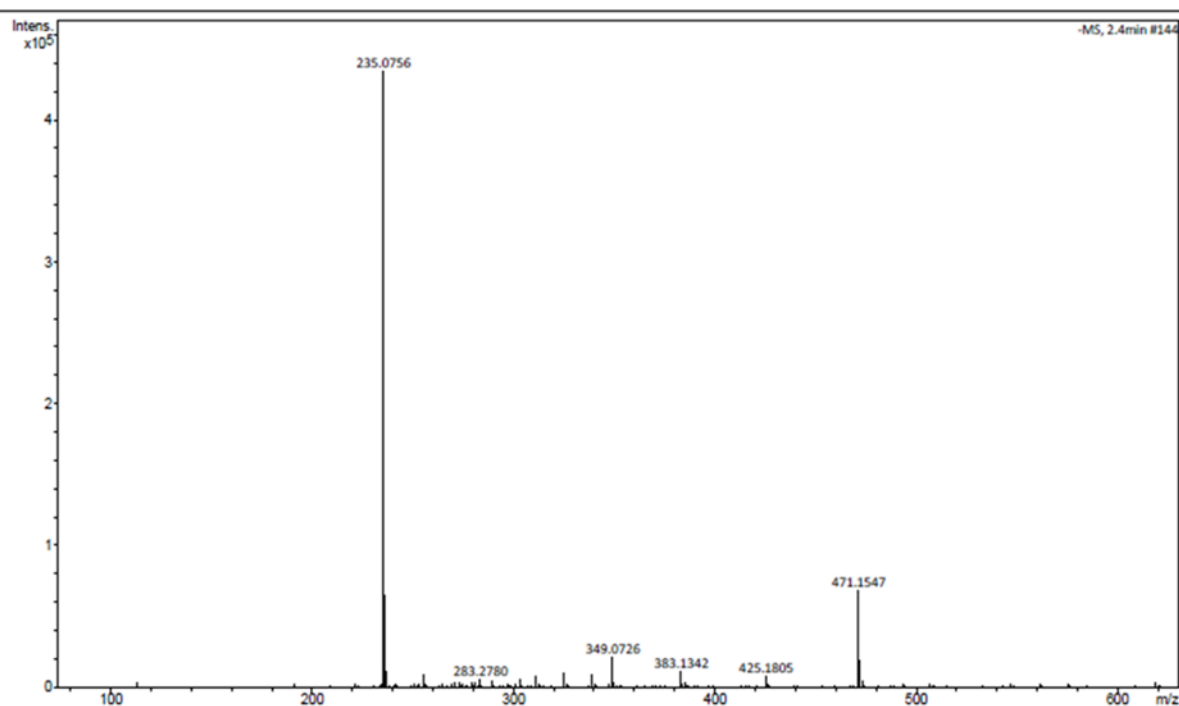
A amostra também foi analisada via EM-ESI-TOF (injeção direta) em modo positivo e negativo, com finalidade de se obter a massa molecular da substância. Em ambos os modos, a análise resultou em um pico majoritário que corresponde à massa molecular de  $m/z$  236,0690 da 6,8-diidroxí-3-(2-hidroxiopropil) isocumarina; substância de fórmula molecular C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> (HALLOCK et al., 1988). No modo positivo (figura 57), o valor da massa do pico majoritário foi de  $m/z$  237,0754 [M+H]<sup>+</sup>; enquanto no modo negativo (figura 58), a massa do sinal majoritário foi de  $m/z$  235,0756 [M-H]<sup>-</sup>; ambos condizendo com o valor de massa molecular da substância proposta. Na análise em modo negativo podemos observar também a presença de um pico em  $m/z$  471,1547 [M-H]<sup>-</sup>, que corresponde a duas vezes o valor da massa molecular [2M-H]<sup>-</sup>.

<b>Analysis Info</b>		<b>Acquisition Date</b>	12/9/2019 9:29:18 AM
Analysis Name	D:\Data\HOSANA\Fep3_POS.d	Operator	TOMAZ
Method	Tune_Low_Tomaz_Pos_1300u_TOMAZ.m	Instrument	micrOTOF-Q
Sample Name	Fe p3_POS		
Comment			



**Figura 57:** Espectro de massas da amostra F.p3, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo positivo.

<b>Analysis Info</b>		<b>Acquisition Date</b>	12/9/2019 12:19:22 PM
Analysis Name	D:\Data\HOSANA\Fep3_NEG1.d	Operator	TOMAZ
Method	Tune_Low_Tomaz_Neg_1300u_TOMAZ.m	Instrument	micrOTOF-Q
Sample Name	Fe p3_NEG1		
Comment			



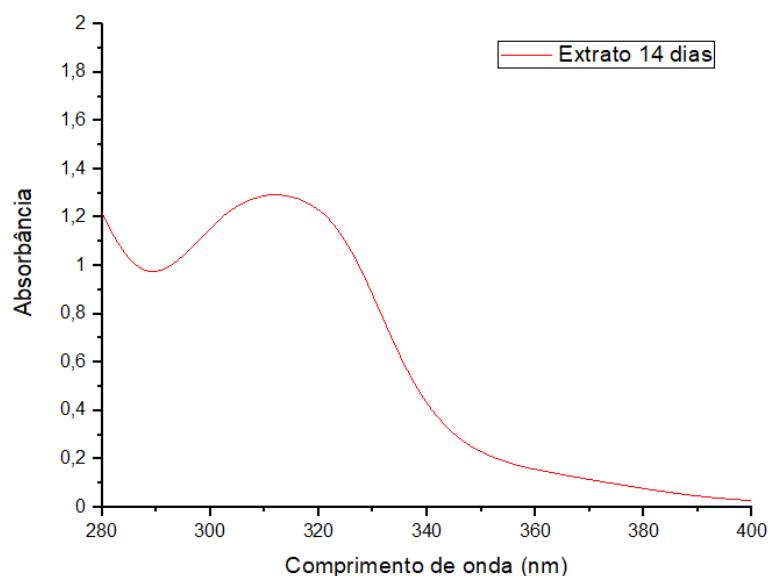
**Figura 58:** Espectro de massas da amostra F.p3, injeção direta, EM-ESI-TOF em modo negativo.

Os dados observados no espectro de absorção na região do UV, adquirido pelo detector DAD acoplado ao sistema de CLAE, também foi utilizado para confirmação da estrutura proposta. A F.p3 apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  nos comprimentos de onda 238, 244, 277, 288 e 326 nm, enquanto que a cumarina em questão apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  em 237, 246, 275, 289 e 326 nm (HALLOCK et al., 1988), corroborando com a estrutura proposta para F.p3.

## 4.7. Atividades Biológicas

### 4.7.1. Ensaios de fotoproteção e fotoestabilidade

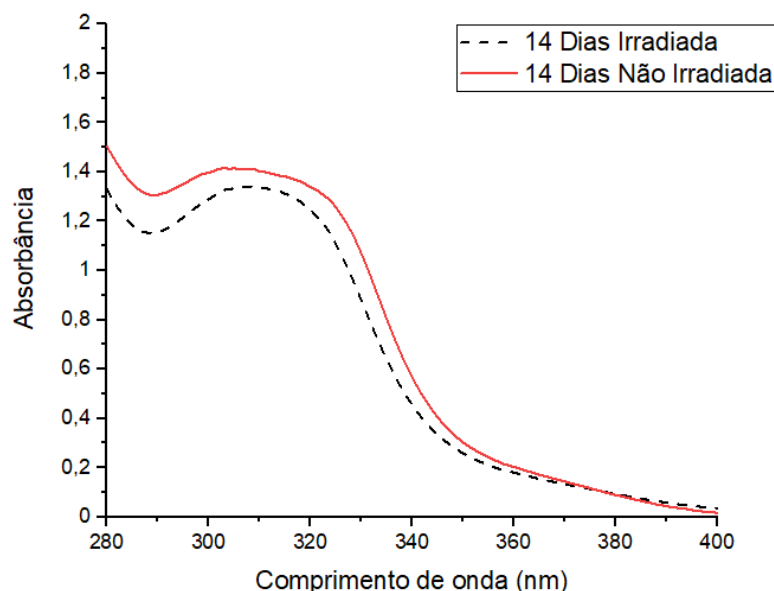
Neste item serão relatados apenas resultados de absorção na região do UV pós cultivo em escala ampliada, realizado em meio e tempo de cultivo já selecionado. Os resultados obtidos com finalidade de se realizar esta seleção, assim como discussão dos mesmos, se encontram no item 4.1, onde conclui-se que o extrato obtido utilizando o acetato de etila como solvente extrator após período de cultivo de 14 dias do fungo *Arthrimum* sp., foi mais ativo quanto à absorção de raios UVA e UVB, na faixa de interesse para o estudo (280-400 nm). Este espectro de absorção se encontra na figura 59.



**Figura 59:** Espectro de absorbância no UV do extrato do fungo *Arthrimum* sp. após período de crescimento de 14 dias.

Entretanto, deve ser destacado que não é o bastante apenas absorver os raios UV irradiados na amostra. Esta deve também ser fotoestável, ou seja, não se degradar após uma longa exposição à radiação UV, o que pode diminuir o seu potencial fotoprotetor. Com a finalidade de medir a capacidade de fotoestabilidade da amostra foram realizados os ensaios

descritos no item 3.2.6.2, gerando um gráfico de redução da absorção (figura 60) e valores de área sob a curva (integral do espectro de absorção) nas faixas de UVA e UVB separadamente, das amostras irradiadas e não irradiadas. Estes valores são adquiridos por meio do software OriginPro e se encontram na tabela 16.



**Figura 60:** Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) do extrato após 14 dias de cultivo. Linha contínua = amostra não irradiada, linha pontilhada = amostra irradiada.

**Tabela 17:** Valores da área sob a curva das amostras do extrato após 14 dias de cultivo, em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.

Amostra	UVA		UVB	
	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado
A 1	26,90	30,96	50,56	55,10
A 2	27,42	30,43	51,58	54,72
A 3	25,99	29,97	49,67	54,27
<b>Média</b>	<b>26,77</b>	<b>30,45</b>	<b>50,60</b>	<b>54,69</b>

Como o ensaio de fotoproteção é realizado em triplicatas, foi calculada a média dos valores, que foi utilizada para o cálculo da redução percentual da área sob a curva. Este cálculo foi realizado para UVA e UVB separadamente, utilizando como 100% a média das amostras não irradiadas:

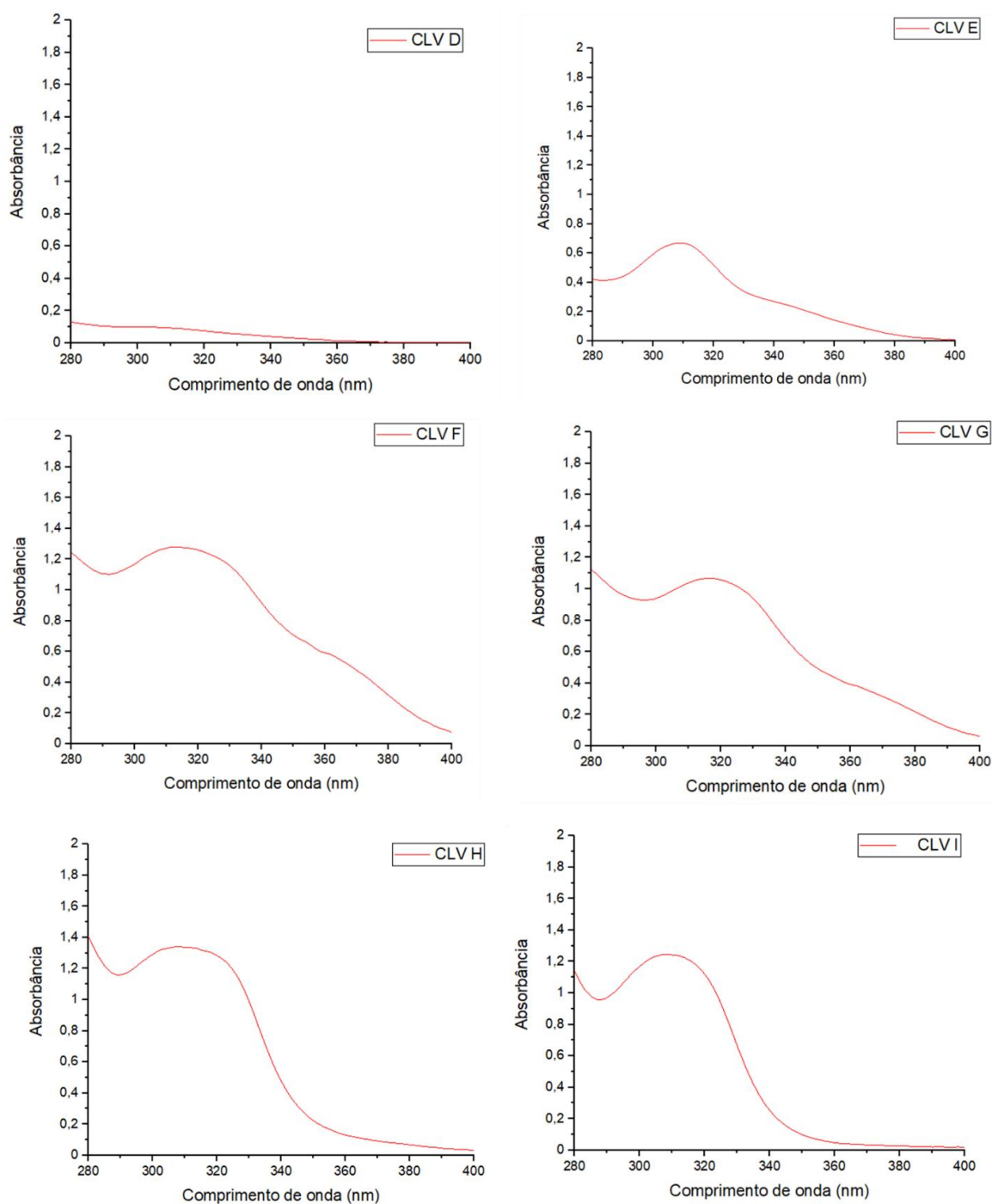
Média amostra não irradiada \_\_\_\_\_ 100%

Media amostra irradiada \_\_\_\_\_ X

Onde, 100% - X= percentual de redução da absorção no UV

A redução percentual da absorção de raios UV do extrato acetato obtido após 14 dias de crescimento do fungo *Arthrimum* sp. após exposição prolongada à radiação UVA foi, portanto, de 12,08% na faixa do UVA e 7,48% do UVB. A redução foi considerada baixa, visto que a amostra não perdeu nem 15% de sua capacidade potencial de fotoproteção. Estudos mostram que a Avobenzona, uma substância amplamente utilizada na formulação de fotoprotetores, reduz sua capacidade de fotoproteção em 50-60% após uma hora de exposição ao sol (ANDRADE, 2016; KULLAVANIJAYA, 2005), apresentando, portanto, maior fotodegradação que a observada no extrato do fungo *Arthrimum* sp..

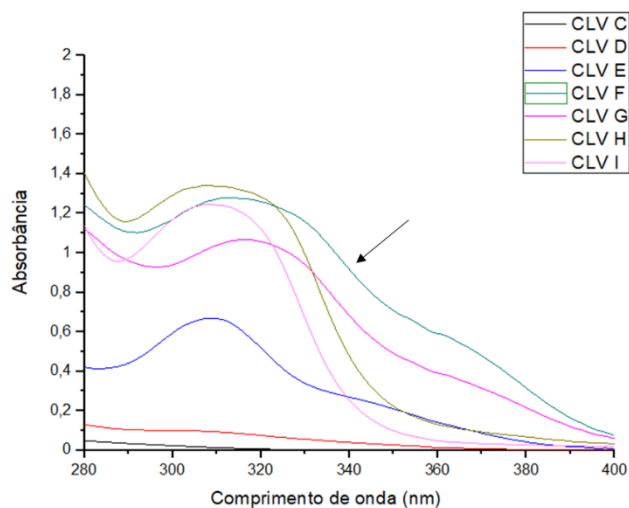
As frações obtidas após fracionamento por CLV também foram submetidas para constatação do potencial fotoprotetor. Os resultados se encontram na figura 61. Os resultados de absorbância das frações CLV A, CLV B e CLV C não estão presentes na figura pois não apresentaram resultados significativos, com valores de absorbância muito próximos a 0,0.



**Figura 61:** Espectro de absorbância no UV das frações CLV D-I do fungo *Arthrinium* sp.

Para melhor visualização das frações que melhor absorveram na faixa do UV, foi preparado um gráfico contendo juntamente as curvas de absorbância de todas as frações (figura 62). Neste gráfico podemos observar uma curva mais ampla, indicada por uma seta, correspondente à fração CLV F, que apresentou boa absorbância tanto na faixa do UVB (280-320 nm) quanto na faixa do UVA (320-400 nm). Por este motivo, a fração CLV F foi selecionada para passar pelo processo de isolamento de substâncias, relatado no item 4.5.2. As frações CLV G e CLV H também apresentaram um resultado potencial à fotoproteção aos raios

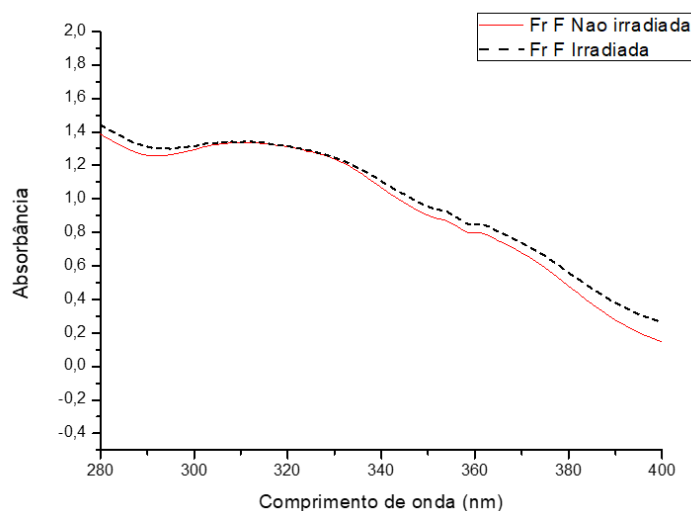
UVA e UVB. A fração CLV I apresentou boa absorbância na faixa do UVB, porém não promissora quanto à absorção de raios UVA quando se comparada com as anteriores.



**Figura 62:** Gráfico de absorbância x comprimento de onda das frações CLV C-I do fungo *Arthrinium* sp.

As frações que apresentaram melhor absorbância resultante na faixa do UVA e do UVB, ou seja, as frações CLV F, CLV G e CLV H, foram submetidas ao ensaio de fotoestabilidade.

A fração CLV F foi considerada fotoestável, pois não houve diminuição do seu potencial fotoprotetor após exposição aos raios UVA (figura 63). Inclusive, de acordo com o cálculo do percentual de redução utilizando-se as médias das áreas sob a curva das amostras irradiadas e não irradiadas (tabela 17), houve um aumento de absorbância de 3,58% no UVA e 0,88% no UVB.



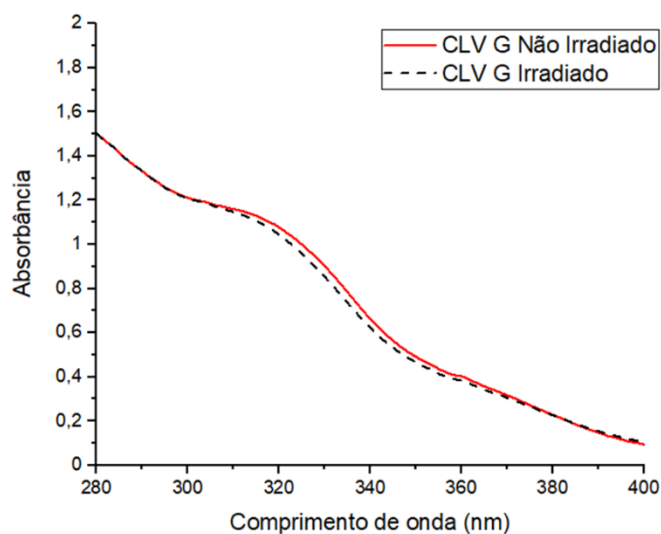
**Figura 63:** Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) da fração CLV F. Linha contínua = amostra não irradiada, linha pontilhada = amostra irradiada.



**Tabela 18:** Valores da área sob a curva da fração CLV F em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.

Amostra	UVA		UVB	
	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado
A 1	66,35	60,50	53,40	55,33
A 2	64,28	61,85	53,21	52,16
A 3	63,87	62,43	52,52	53,24
<b>Média</b>	<b>64,84</b>	<b>61,60</b>	<b>53,04</b>	<b>52,58</b>

A fração CLV G também apresentou excelente fotoestabilidade (figura 64), observando-se uma diminuição de apenas 1,5% da absorbância na faixa do UVA e um aumento de 1% na faixa do UVB, de acordo com cálculo utilizando os valores médios da área sob a curva (tabela 18), considerando como 100% a média das amostras não irradiadas.

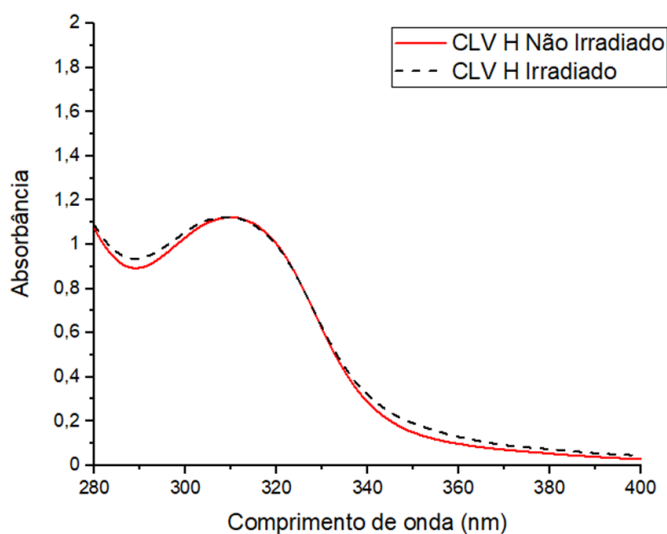


**Figura 64:** Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) da fração CLV G.

**Tabela 19:** Valores da área sob a curva da fração CLV G em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.

Amostra	UVA		UVB	
	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado
A 1	35,25	34,87	49,04	47,85
A 2	35,74	37,26	49,59	49,91
A 3	37,03	37,53	50,62	50,00
<b>Média</b>	<b>36,01</b>	<b>36,55</b>	<b>49,75</b>	<b>49,25</b>

Adicionalmente, a fração CLV H também foi considerada fotoestável de acordo com seu gráfico de fotoestabilidade (figura 65) e com o cálculo da redução percentual da área sob a curva do gráfico de absorbância, que resultou em um aumento de 21% na faixa UVA e de 3,2% na faixa UVB. Os valores médios utilizados se encontram na tabela 19.

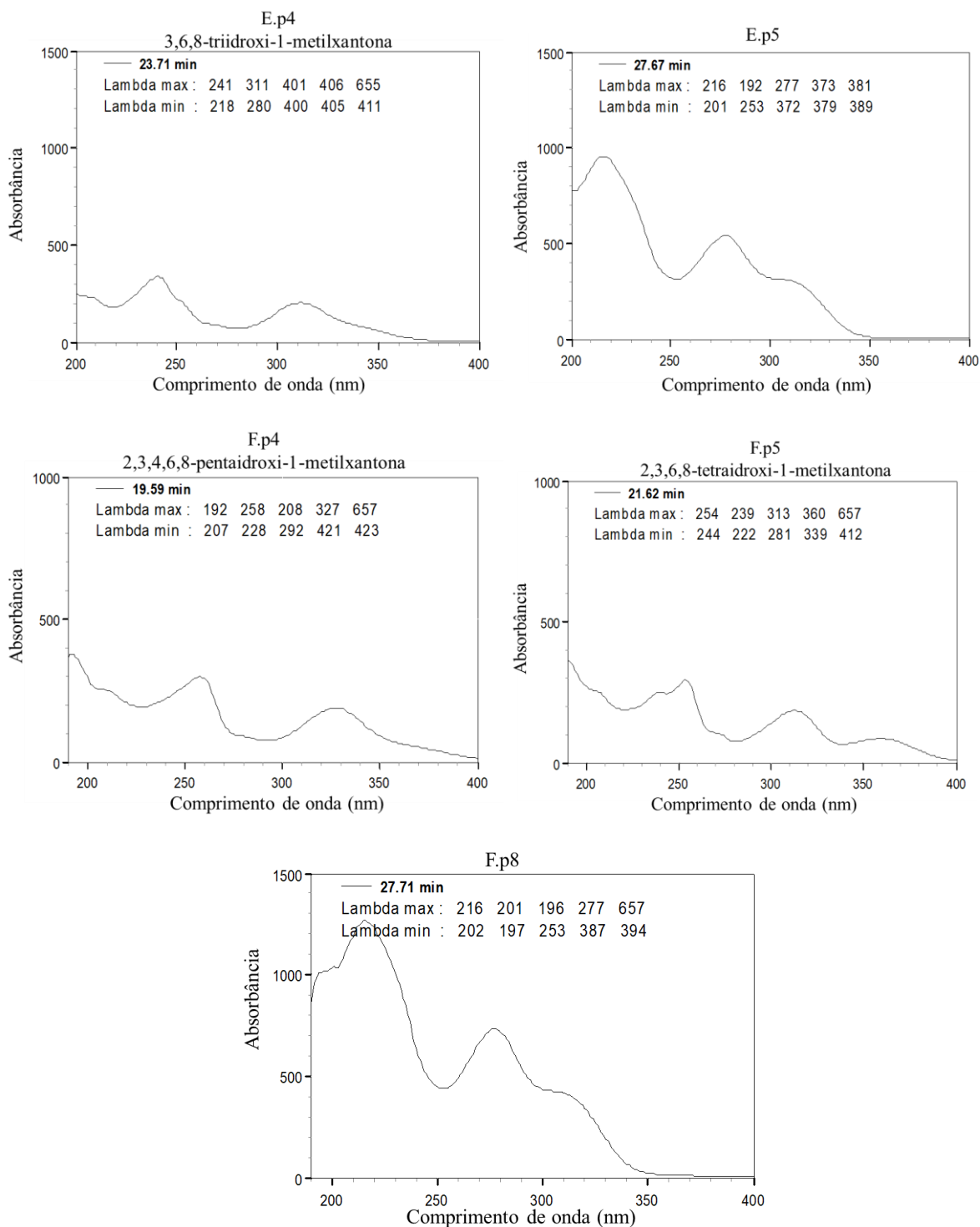


**Figura 65:** Gráfico de redução da absorção UV (fotoestabilidade) da fração CLV H.

**Tabela 20:** Valores da área sob a curva da fração CLV H em triplicatas irradiadas e não irradiadas, nas faixas UVA e UVB.

Amostra	UVA		UVB	
	Irradiado	Não Irradiado	Irradiado	Não Irradiado
A 1	28,39	19,68	42,50	39,10
A 2	18,85	17,69	39,86	40,18
A 3	19,86	18,11	41,50	40,74
<b>Média</b>	<b>22,37</b>	<b>18,49</b>	<b>41,29</b>	<b>40,01</b>

A partir dos dados interessantes obtidos das frações analisadas, algumas foram selecionadas e conduziram ao isolamento/purificação de algumas substâncias, as quais também foram submetidas a avaliação do potencial fotoprotetor. As substâncias isoladas via CLAE-DAD que melhor absorveram na faixa do UV foram E.p4 (identificada como 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona), E.p5 (não identificada), F.p4, F.p5 (identificadas como “2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona e 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona, respectivamente) e F.p8 (não identificada). O espectro de absorbância destas amostras (figura 66) foram obtidos a partir das análises de CLAE-DAD, pois o detector por arranjo de diodos (DAD) efetua uma varredura na faixa de 190-400 nm de cada substância que ele detecta. As substâncias isoladas, porém, não apresentaram uma absorbância tão boa quanto a fração F sem passar por procedimentos de isolamento. Uma teoria da razão deste acontecimento é o sinergismo: as substâncias quando em misturas apresentam uma atividade biológica melhor do que quando isoladas, exibindo atividade potencializada.



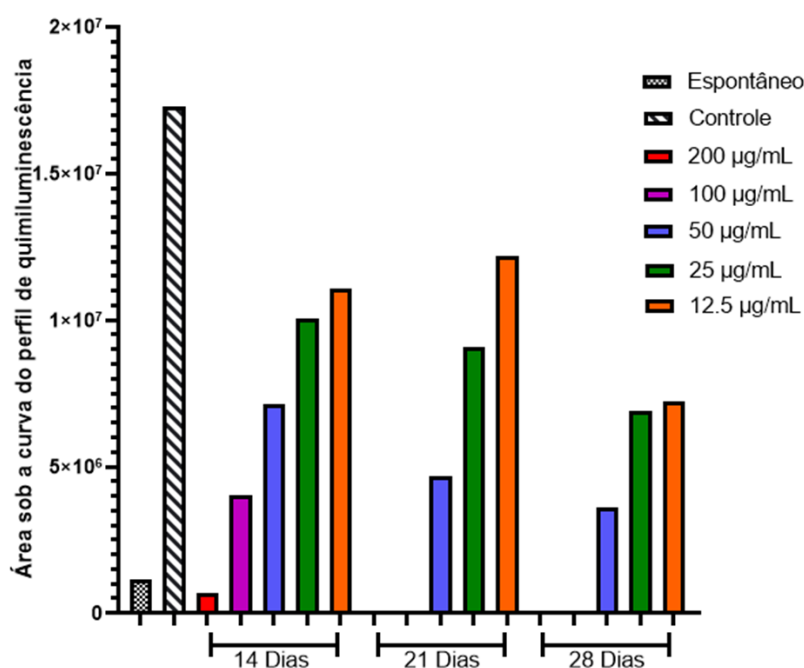
**Figura 66:** Espectros de absorvância no UV de substâncias isoladas mais promissoras.

#### 4.7.2. Modulação da produção de ERO pelos neutrófilos

De acordo com a fundamentação teórica realizada no item 1.6 deste trabalho, é importante a busca por substâncias que modulem e ajudem a controlar atividades excessivas do neutrófilo, porém a substância deve ser viável quanto à sua toxicidade, ou seja, não matar essas

células, e não inibir sua atividade completamente visto que desempenham papéis imunológicos importantes. Um bom resultado dessa atividade consiste, portanto, em valores que mais se aproximam do controle espontâneo, pois este controle mimetiza um organismo saudável, onde os neutrófilos não são estimulados para produção exacerbada de ERO.

Os extratos do fungo *Arthrinium* sp. obtidos após tempos de cultivo de 14, 21 e 28 dias foram testados de acordo com a metodologia descrita em 3.2.6.4. Os resultados se encontram na figura 67.

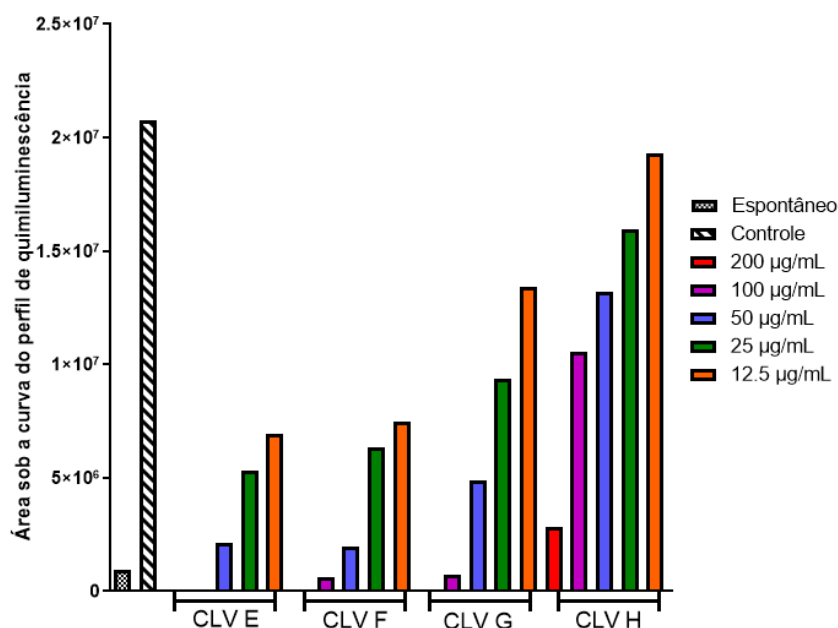


**Figura 67:** Resultados da influência dos extratos na produção de ERO pelos neutrófilos.

Observando o gráfico da figura 66, observa-se que apresentou melhor resultado quanto à modulação da produção de ERO o extrato de 14 dias em uma concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , visto que foi a amostra que obteve um resultado mais próximo ao do espontâneo. Ressaltando que o “controle” mostrado no gráfico é de um valor de área sob a curva do perfil de QL de neutrófilos estimulados com PMA, para maior produção de ERO, sem a aplicação da amostra em estudo.

O extrato de tempo de cultivo 14 dias, também foi o único que obteve uma ótima viabilidade ( $\geq 90\%$  de neutrófilos vivos), inclusive na maior concentração (200  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto os outros extratos apresentaram viabilidade  $< 85\%$ , inclusive na concentração mais baixa (12,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Algumas frações adquiridas pós fracionamento via CLV também passaram por esse ensaio e os resultados se encontram na figura 68.



**Figura 68:** Resultados da influência das frações CLV E-H na produção de ERO.

Observa-se melhores resultados das amostras: CLV E a 50 µg/mL, CLV F a 100 e 50 µg/mL e CLV G a 200 µg/mL. As viabilidades das amostras resultantes do fracionamento via CLV testadas se encontram nas tabelas de 20 a 23, estão em destaque nas tabelas as amostras que obtiveram uma viabilidade  $\geq 90\%$ .

**Tabela 21:** Viabilidade da fração CLV E em diferentes concentrações.

Amostra	Células Vivas (Média)	Células Mortas (Média)	Viabilidade (%)
Controle	194	6	97,0
E 200 µg/mL	38	162	19,0
E 100 µg/mL	166	34	83,0
E 50 µg/mL	193	7	<b>96,5</b>
E 25 µg/mL	193	7	<b>96,5</b>
E 12,5 µg/mL	197	3	<b>98,5</b>

**Tabela 22:** Viabilidade da fração CLV F em diferentes concentrações.

<b>Amostra</b>	<b>Células Vivas (Média)</b>	<b>Células Mortas (Média)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
Controle	194	6	97,0
F 200 µg/mL	173	27	86,5
F 100 µg/mL	193	7	<b>96,5</b>
F 50 µg/mL	197	3	<b>98,5</b>
F 25 µg/mL	189	11	<b>94,5</b>
F 12.5 µg/mL	197	3	<b>98,5</b>

**Tabela 23:** Viabilidade da fração CLV G em diferentes concentrações.

<b>Amostra</b>	<b>Células Vivas (Média)</b>	<b>Células Mortas (Média)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
Controle	194	6	97,0
G 200 µg/mL	154	46	77,0
G 100 µg/mL	191	9	<b>95,5</b>
G 50 µg/mL	194	6	<b>97,0</b>
G 25 µg/mL	196	4	<b>98,0</b>
G 12.5 µg/mL	196	4	<b>98,0</b>

**Tabela 24:** Viabilidade da fração CLV H em diferentes concentrações.

<b>Amostra</b>	<b>Células Vivas (Média)</b>	<b>Células Mortas (Média)</b>	<b>Viabilidade (%)</b>
Controle	194	6	97,0
H 200 µg/mL	147	53	73,5
H 100 µg/mL	196	4	<b>98,0</b>
H 50 µg/mL	197	3	<b>98,5</b>
H 25 µg/mL	194	6	<b>97,0</b>
H 12.5 µg/mL	194	6	<b>97,0</b>

As substâncias isoladas não foram testadas neste ensaio devido à baixa quantidade de amostra obtida. Contudo, estes resultados nos impulsionam a dar prosseguimento a estes estudos por meio da busca pelas substâncias bioativas em cada fração que apresentou potencial imunomodulador.



## 5. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo inicial o estudo do potencial químico e biológico de dois fungos: *Epicoccum dendrobii* e *Arthrinium* sp., ambos isolados a partir da alga Antártica *Phaeurus antarcticus*. A partir destes dados, o fungo *Arthrinium* sp. foi selecionado para o prosseguimento do projeto de pesquisa. Assim, efetivou-se o isolamento e identificação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo e também avaliação do efeito fotoprotetor e de modulação da produção de ERO por neutrófilos do extrato, frações e substâncias isoladas. Foram realizados experimentos preliminares com o objetivo de determinar melhores condições para produção qualitativa de metabólitos secundários do fungo *Arthrinium* sp. Com isso, pôde-se concluir que um melhor potencial fotoprotetor do extrato foi obtido com crescimento do fungo realizado em meio CBD em um período de cultivo de 14 dias.

O fungo *Arthrinium* sp. já havia se mostrado como sendo uma fonte promissora de metabólitos com uma diversidade de atividades biológicas (vide item 1.3). Neste estudo foram isoladas 3 xantonas já relatadas como sendo produzidas por espécies de *Arthrinium* e consideradas bioativas, principalmente como antioxidantes (ABDEL-LATEFF et al., 2002): a 2,3,6,8-tetraidroxi-1-metilxantona, a 2,3,4,6,8-pentaidroxi-1-metilxantona e a 3,6,8-triidroxi-1-metilxantona. As xantonas apresentaram fraca atividade quanto à fotoproteção, foco deste trabalho.

Além das xantonas, outras duas substâncias foram isoladas do extrato de *Arthrinium* sp., com relato inédito nesta espécie de fungo: o álcool 3-hidroxibenzílico, encontrado em outras espécies de fungo como o *Penicillium novae-zeelandiae* (ALFARO et al., 2003) e o *Aspergillus nidulans* (KUMAR et al., 2017); e a isocumarina 6,8-diidroxi-3-(2-hidroxipropil) isocumarina, relatada como sendo produzida pelos fungos *Ceratocystis fimbriata coffea* (GREMAUD et al., 1994) e *Drechslera siccans* (HALLOCK et al., 1988). Estas substâncias não apresentaram atividade potencial para fotoproteção.

Embora as substâncias isoladas e identificadas apresentaram uma absorvância fraca na faixa de interesse do UV, o fungo *Arthrinium* sp. não deve ser descartado como um possível produtor de substâncias para a finalidade de fotoproteção, visto que o extrato e frações apresentaram boa atividade e algumas substâncias isoladas também mostraram um potencial efeito fotoprotetor (E.p5 e F.p8), porém estas ainda estão em processo de identificação. As frações também mostraram boa atividade quanto à modulação da produção de ERO por neutrófilos, porém as substâncias isoladas ainda não foram testadas devido à baixa quantidade de amostra obtida.

Com isso, conclui-se que o fungo estudado *Arthrimum* sp. é uma fonte rica de metabólitos secundários e mais estudos são necessários para descoberta de substâncias novas e promissoras para atividades biológicas, tendo o fungo se mostrado um potencial produtor de metabólitos secundários ativos nos ensaios de fotoproteção e de modulação da produção de ERO.

## 6. REFERÊNCIAS

ABDEL-LATEFF A., et al. Two New Xanthone Derivatives from the Algicolous Marine Fungus *Wardomyces anomalus*. **Journal of Natural Products** 2002; 66: 706.

ALFARO C., et al. Screening for metabolites from *Penicillium novae-zeelandiae* displaying radical-scavenging activity and oxidative mutagenicity: isolation of gentisyl alcohol. **Mutation Research** 2003; 539: 187.

ALVES C. M. O. S., et al. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fc $\gamma$  and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta** 2003; 60: 601.

ANDRADE M. Método simples e rápido para seleção de fungos filamentosos produtores de compostos absorvedores de radiação UV para aplicação em protetores solares. 63p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

AVILA C., NUNEZ P. L. Natural products mediating ecological interactions in Antarctic benthic communities: A Mini-Review of the Known Molecules. **Natural Products Reports** 2015; 32: 1114.

BAO J., et al. Bioactive pyridone alkaloids from a deep-sea-derived fungus *Arthrimum* sp. Ujnmf0008. **Marine Drugs** 2018; 16: 174.

BAO J., et al. New chromones from a marine-derived fungus *Arthrimum* sp., and their biological activity. **Molecules** 2018, 23: 1982.

BENEVENUTO C. G. Avaliação da fotoestabilidade e da fototoxicidade de fotoprotetores contendo associação de filtros solares e vitamina A. 108p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2012.

CHEMSPIDER. Disponível em: [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com), acesso em: 01/06/2020.

CHEN C-Y., et al. Marine Natural Product Inhibitors of Neutrophil-Associated Inflammation. **Marine drugs** 2016; 14: 141.

DANOVARO R., et al. Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. **Environmental Health Perspective** 2008; 116: 441.

DE FELÍCIO R. Produtos naturais marinhos: identificação de metabólitos fenólicos halogenados na macroalga *Bostrychia tenella* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) e potencial biológico de micro-organismos endofíticos associados. 207 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

DINAUER M. C. Inflammatory consequences of inherited disorders affecting neutrophil function. **Blood Epub** 2019;133(20): 2130.

EBADA S. S., et al. Arthrinins a–d: Novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrinium* sp. **Bioorganic Medicinal Chemistry** 2011; 19: 4644.

ERBERT, C., et al. Antibacterial compound from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from the tropical red seaweed *Bostrychia radicans*. **Botanica Marina** 2012; 55: 435.

FURBINO, L., et al. Isolation of fungi associated with macroalgae from maritime Antarctica and their production of agarolytic and carrageenolytic activities. **Polar Biology** 2018; 41: 527.

FURTADO B. U., SZYMAŃSKA S., HRYNKIEWICZ K. A window into fungal endophytism in *Salicornia europaea*: deciphering fungal characteristics as plant growth promoting agentes. **Plant Soil** 2019; 445: 577.

G1, BBC. Por que um país inteiro proibiu protetores solares. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/natureza/noticia/2020/01/01/por-que-um-pais-inteiro-proibiu-protetores-solares.ghtml>. Acesso em: 28/05/2020.

GASPAR L. R., MAIA CAMPOS P. M. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics** 2006; 307(2): 123.

GREMAUD G. e TABACCHI R. Isocoumarins of the Fungus *Ceratocystis fimbriata* coffea. **Natural Product Letters** 1994; 5: 95.

GODINHO V. M., et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **ISME** 2013; 7: 77.

HAGIWARA H., et al. Synthesis of nereistoxin and related compounds. **Chem Pharm Bull** 1965; 13: 253.

HALLOCK Y. F., et al. De-o-methyldiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*. **Phytochemistry** 1988; 27(10): 3123.

HEO Y. M., et al. Diversity and Ecology of Marine Algicolous *Arthrinium* Species as a Source of Bioactive Natural Products. **Marine Drugs** 2018; 16(12): 508.

KOLACZKOWSKA E., KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology** 2013; 13(3): 159.

KULLAVANIJAYA P. e LIM H. W. Photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2005; 52(6): 937.

KUMAR C. G., et al. Biological evaluation of 3-hydroxybenzyl alcohol, an extrolite produced by *Aspergillus nidulans* strain KZR-132. **Journal of Applied Microbiology** 2017; 122(6): 1518.

LI G., DICKSCHAT J. S., GUO Y-W. Diving into the world of marine 2,11-cyclized cembranoids: a summary of new compounds and their biological activities. **Natural Products Reports** 2020; Advance Article.

LIANG X., DANMENG L., HENDRIK L. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. **Pharmacological Research** 2019; 147: 104373.

LIM H. W., et al. Current challenges in photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology** 2017; 76(3, 1): 91.

MACIEL O. M. C. Avaliação do potencial fotoprotetor e identificação de metabólitos secundários do fungo endofítico *Annulohyphoxylon stygium* associado à alga marinha *Bostrychia radicans*. 88p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

MAIA J. G. S., ANDRADE E. H. A., ZOGHBI M. G. B. Volatile constituents of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis** 2000; 13(3): 227.

Mycobank Database. <http://www.mycobank.org/>. Acesso em 17/02/2020.

NEWMAN D. J., CRAGG G. M. Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play". **Planta Medica** 2016; 82(09/10): 775.

NOGUEIRA P. C. de L., et al. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry** 2001; 56(5): 443.

OGAKI M. B., et al. Marine Fungi Associated with Antarctic Macroalgae. In: Castro-Sowinski S. (eds) 6The Ecological Role of Micro-organisms in the Antarctic Environment. **Springer Polar Sciences** 2019; Springer, Cham.

PALLELA R., NA-YOUNG Y., KIM S-K. Anti-photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms. **Marine Drugs** 2010; 8: 1189.

PALMEIRA Jr S. F., et al. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. **Flavour and Fragrance Journal** 2004; 19: 69.

PANGESTUTI R., SIAHAAN E. A., KIM S-K. Photoprotective Substances Derived from Marine Algae. **Marine Drugs** 2018; 16(11): 399.

PEREIRA A. L., PITA J.R. ALEXANDER FLEMING (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras, HISTÓRIA** 2005. 6: 129.

RADULOVIC N., BLAGOJEVIC P., PALIC R., Comparative study of the leaf volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae). **Molecules** 2010; 15(9): 6168.

RAFFA R. B., et al. Sunscreen bans: Coral reefs and skin cancer. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics** 2019; 44:134.

RAMOS H. P. Obtenção e identificação de metabólitos secundários com atividade antiparasitária produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. 117p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2013.

RAMSEY J. D., et al. Gas-liquid chromatographic retention indices of 296 non-drug substances on SE-30 or OV-1 likely to be encountered in toxicological analyses. **Journal of Chromatography** 1980; 184(2): 185.

RUHLAND C. T., et al. The Influence of Ultraviolet-B Radiation on Growth, Hydroxycinnamic Acids and Flavonoids of *Deschampsia antarctica* during Springtime Ozone Depletion in Antarctica. **Photochemistry and Photobiology** 2005; 81: 1086.

SAEWAN N. and JIMTAISONG A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 2013; 3(09): 129.

SAEWAN N. and JIMTAISONG A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology** 2015; 14: 47.

SILVA, E. M. Estudo químico de cianobactérias marinhas e do cultivo misto entre a linhagem *Geitlerinema* sp CENA556 e o fungo *Trichoderma atroviride*, endófito da alga

marinha *Bostrychia tenella*. 148p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2016.

TAVARES R. S. N. Fucoxanthin for Topical Administration, a Phototoxic vs Photoprotective Potential in a Tiered Strategy Assessed by in vitro. **Antioxidants** 2020 9(4): 328.

TEIXEIRA T. R., et al. Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Polar Biology** 2019; 42: 1431.

WANG J., et al. Arthopyrones A–C, Pyridone Alkaloids from a Sponge-Derived Fungus *Arthrinium arundinis* ZSDS1-F3. **Organic Letters** 2015; 17: 656.

ZAIKIN V. G. e BORISOV R. S. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fishcer-Tropsch synthesis products. **Journal of Analytical Chemistry USSR** (English Translation) 2002; 57(6): 544.



## ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 014/2020  
kms

Ribeirão Preto, 1º de junho de 2020.

À pesquisadora  
**Ana Carolina Jordão**  
FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o protocolo de pesquisa intitulado “**Avaliação química e biológica dos fungos antárticos *Epicoccum dendrobii* e *Arthrimum sp.* associados à alga *Antártica Phaeurus antarcticus*”** (CAAE: 31758619.5.0000.5403 – Protocolo CEP/FCFRP nº 541), foi aprovado “ad referendum” do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP na presente data, conforme Parecer Consubstanciado nº 4.062.127.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo  
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP