



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

BÁRBARA SUELLEN FERREIRA RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS CITOTÓXICOS ORIUNDOS
DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DE SEDIMENTOS DO LITORAL CEARENSE**

FORTALEZA-CE

2014

BÁRBARA SUELLEN FERREIRA RODRIGUES

**PROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS CITOTÓXICOS ORIUNDOS
DE FUNGOS MARINHOS ISOLADOS DE SEDIMENTOS DO LITORAL CEARENSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador (a): Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira

FORTALEZA-CE

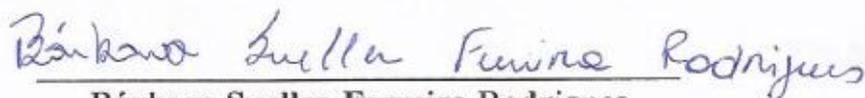
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

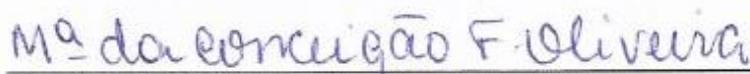
- R611p Rodrigues, Bárbara Suellen Ferreira.
Prospecção de metabólitos secundários citotóxicos oriundos de fungos marinhos isolados de sedimentos do litoral cearense / Bárbara Suellen Ferreira Rodrigues. – 2014.
279 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.
1. fungos marinhos. 2. *Aspergillus terreus*. 3. *Dichotomomyces cejpilii*. 4. atividade citotóxica. 5. acetilgliotoxina G. I. Título.

CDD 540

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central se encontra à disposição dos interessados.

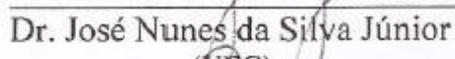

Bárbara Suellen Ferreira Rodrigues

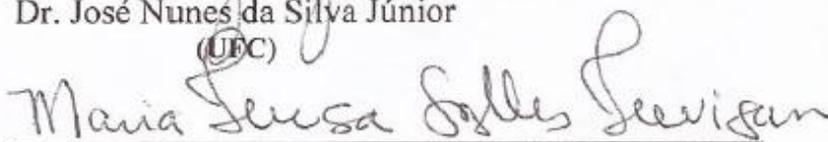
Tese aprovada em: **23/10/2014**


Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
(Orientadora - UFC)


Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi
(UFMG)


Dr. Jairo Kenupp Bastos
(USP)


Dr. José Nunes da Silva Júnior
(UFC)


Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
(UFC)

*A Deus, por me dar a chance de ser melhor,
À Minha mãe, por me criar, educar, e cuidar de mim, da melhor maneira que
poderia ser feito,
À minha irmã, pela ajuda dada na infância e adolescência,
À minha avó (in memorian),
Aos meus filhos, Yasmin e Pedro Lucas, razões do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a oportunidade de viver e ser quem eu sou.

À minha amada mãe e amados irmãos, que sempre estiveram ao meu lado, acreditando e apoiando meu trabalho.

À minha princesa Yasmin, e ao meu príncipe Pedro Lucas, que, ainda no ventre, me acompanharam durante a trajetória do Doutorado.

Ao meu amado esposo, pela paciência e companheirismo ao longo desta trajetória.

À minha querida orientadora, Professora Conceição, pela sábia orientação, conselhos e confiança no meu trabalho.

Ao Professor Jair Mafezoli e Francisco das Chagas, pela ajuda na determinação estrutural.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química.

À Professora Letícia Veras Costa-Lotuffo, pelas coletas dos sedimentos marinhos, bem como a realização dos testes biológicos.

Aos colegas do LABOMAR, Paula Jimenez, Larissa, Bianca e Elton, pela realização dos testes biológicos.

Ao professor Ludwig H. Pfenning e Lucas Magalhães de Abreu, da Universidade Federal de Lavras, pela identificação dos fungos.

Ao CENAUREMN, pela aquisição dos espectros de RMN.

À colega Conceição Menezes Torres, pela realização dos experimentos de Espectrometria de massas.

Às colegas Hozana Patrícia e Elis Cristina, pela aquisição dos espectros de Infravermelho.

Aos alunos de iniciação científica Lívia, Victor, Lucas e Iarina, pela ajuda nas partições cromatográficas e cultivo dos fungos.

À companheira de laboratório Natália Nogueira Saraiva, pelo treinamento para o uso do aparelho de HPLC.

A todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Química.

A todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e FUNCAP.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).

RESUMO

Este trabalho relata a investigação de fungos marinhos como produtores de metabólitos secundários citotóxicos frente à linhagem de células tumorais humanas HCT-116 – cólon. Os fungos investigados neste trabalho foram isoladas de sedimentos do litoral cearense, sendo trinta e cinco obtidos da praia do Mucuripe (**BRF012-BRF046**) e quarenta e oito da praia do Pecém (**BRF047-BRF094**). Todas as linhagens obtidas foram submetidas a cultivo em pequena escala (100 mL de meio batata-dextrose com água marinha sintética) durante quatorze dias. Após o período de cultivo, os meios de cultura foram particionados com acetato de etila (AcOEt) e os extratos orgânicos submetidos a ensaio de atividade citotóxica frente à linhagem de células cancerígenas HCT-116. Os fungos cujos extratos apresentaram o maior percentual de inibição do crescimento celular, **BRF019** (95,5 %), **BRF079** (100,0 %) e **BRF082** (100,0 %), foram selecionados para fracionamento bioguiado dos seus extratos orgânicos. As análises filogenéticas destas linhagens levaram à identificação das mesmas como sendo *Aspergillus terreus* (**BRF019**) e *Dichotomomyces cejpii* (**BRF079** e **BRF082**). **BRF019** (*A. terreus*) foi cultivada duas vezes em grande escala (6 L e 12 L de meio). O fracionamento bioguiado dos extratos AcOEt, provenientes do meio de cultura, levou ao isolamento de cinco substâncias: Terreína, butirolactonas I, II e V e 6-hidroximeleína. Todas essas substâncias já haviam sido relatadas na literatura para *A. terreus* e nenhuma apresentou atividade citotóxica quando ensaiada. **BRF082** (*D. cejpii*) foi cultivada nas mesmas condições (15 L e 20 L de meio) de **BRF019** (*A. terreus*). O fracionamento bioguiado do seu extrato AcOEt, proveniente do meio de cultura, levou ao isolamento da epipolitiodioxopiperazina gliotoxina e quatro análogos: Acetilgliotoxina G, bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina, acetilgliotoxina, 6-acetilbis(metiltio)gliotoxina, além do alcaloide quinazolínico fiscalina B. Tais substâncias foram submetidas a ensaio de atividade citotóxica, cujos resultados obtidos levaram à atribuição da gliotoxina (IC_{50} 1,02) e da acetilgliotoxina G (IC_{50} 2,39) como responsáveis pela citotoxicidade do extrato AcOEt de *D. cejpii*.

Palavras chaves: fungo marinho, *Aspergillus terreus*, *Dichotomomyces cejpii*, atividade citotóxica, terreína, butirolactona I, butirolactona II, butirolactona V, 6-hidroximeleína, gliotoxina, acetilgliotoxina G, bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina, acetilgliotoxina, 6-acetilbis(metiltio)gliotoxina, fiscalina B.

ABSTRACT

This thesis reports the investigation of marine fungi as producers of cytotoxic secondary metabolites against the human tumor cell line HCT-116 (colon). The fungal strains investigated in this study were isolated from sediments collected in Ceará coast, thirty-five of them from Mucuripe beach (**BRF012-BRF046**) and forty-eight from Pecém beach (**BRF047-BRF094**). All strains were subjected to small-scale cultivation (100 mL of potato-dextrose medium with synthetic sea water) during fourteen days. After the cultivation, the culture media were partitioned with ethyl acetate (EtOAc) and the organic extracts subjected to cytotoxic activity against the cancer cell line HCT-116. Strains that showed the highest percentage of cell growth inhibition, **BRF019** (95.5%), **BRF079** (100.0%) and **BRF082** (100.0%), were selected for bioguided fractionation of the organic extracts. Phylogenetic analyses have identified them as *Aspergillus terreus* (**BRF019**) and *Dichotomomyces cejpaii* (**BRF079** and **BRF082**). **BRF019** (*A. terreus*) was cultivated twice in a large scale (6 L and 12 L medium). The bioguided fractionation of EtOAc extracts from the culture medium led to the isolation of five compounds: Terrein, butyrolactone I, II and V, and 6-hydroxymelein. All of them have already been reported in the literature for *A. terreus* and none showed cytotoxic activity when bioassayed. **BRF082** (*D. cejpaii*) was cultivated under the same conditions (15 L and 20 L medium) of **BRF019** (*A. terreus*). The bioguided fractionation of AcOEt extract from the culture medium led to the isolation of an epipolithiodioxopiperazin, gliotoxin, and four analogues: Acetylgliotoxin G, bis(dethio)bis(methylthio)gliotoxin, acetylgliotoxin, 6-acetylbis(methylthio)gliotoxin, besides the quinazolinic alkaloid fiscalin B. These compounds were tested for cytotoxic activity and suggested gliotoxin (IC₅₀ 1.02) and acetylgliotoxin G (IC₅₀ 2.39) as responsible for the cytotoxicity of the EtOAc extract of *D. cejpaii*.

Key-words: marine fungi, *Aspergillus terreus*, *Dichotomomyces cejpaii*, cytotoxic activity, terrein, butyrolactone I, butyrolactone II, butyrolactone V, 6-hydroxymellein, gliotoxin, acetylgliotoxin G, bis(dethio)bis(methylthio)gliotoxin, acetylgliotoxin, 6-acetylbis(methylthio)gliotoxin, fiscalin B.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas da penicilina (1), cefalosporina (2), estreptomicina (3) e vancomicina (4).	25
Figura 2. Estruturas da mevastina (5) e lovastatina (6).....	26
Figura 3. Estruturas da bleomicina (7), doxorubicina (8), estaurosporina (9) e dactinomicina (10).....	26
Figura 4. Estrutura da ciclosporina.	27
Figura 5. Estruturas do ácido micofenólico (38), do ácido fusídico (39), e da griseofulvina (40).....	36
Figura 6. Estrutura da sorbicilactona A	37
Figura 7. Estruturas do ulocladol (42), da halimida (43), da avrainvilamida (44) e do halovir A (45).....	37
Figura 8. Gráfico da distribuição dos compostos bioativos em função da origem do fungo do qual foi isolado.	38
Figura 9. Gráfico da distribuição dos compostos bioativos oriundos de fungos marinhos de acordo com sua suposta origem biogenética.	39
Figura 10. Estruturas genéricas de uma epipolítiodioxopiperazina (1) e uma dicetopiperazina (2).....	41
Figura 11. Estrutura da gliotoxina (46).....	43
Figura 12. Esqueleto básico das epipolítiodioxopiperazinas (47).....	43
Figura 13. Estruturas da acetilgliotoxina (48); bis(detio)bis(metiltio)gliotoxin (49); <i>bis-N-norgliovictin</i> (50); gliovictin (51) e espirogliotoxina (52).....	44
Figura 14. Estruturas das gliotoxinas G (53) e E (54).	44
Figura 15. Estruturas da bis(detio)-10a-metiltio-3a-desoxi-3,3a-didehidrogliotoxina (55) e da 6-desoxi-5a,6-didehidrogliotoxina (56).	45
Figura 16. Estruturas das sirodesminas A (57), B (58), C (59), G/PL (60) e H (61).....	45
Figura 17. Estruturas da hialodendrina (62), bisdetiodi(metiltio)hialodendrina (63) e bisdetiodesidroximetildi (metiltio) hialodendrina (64).	46
Figura 18. Estruturas das esporidesminas A (65), B (66), C (67), D (68), E (69), F (70), G (71), H (72) e J (73). Figura 19. Estruturas da chaetomina (74) e da chaetocina (75).....	47
Figura 20. Estruturas das verticilinas A (76), B, (77), C (78), D (79), E (80), F, (81), G (82) e H (83).	49
Figura 21. Estruturas das leptosinas A-N (84-102).	50
Figura 22. Estruturas da emestrina (103), emestrina B (104), secoemestrina C (105) e secoemestrina D (106).....	54
Figura 23. Estruturas dos ésteres escabrosínicos 1- 5 (107-111).....	55
Figura 24. Estrutura da ditiosilvatina (112).	55
Figura 25. Estruturas das epicorazinas A (113), B (114) e C (115).	56
Figura 26. Estruturas da aranotin (116), acetilaranotin (117), bisdetildi(metiltio)acetilaranotin (118), apoaranotin (119) e bisdetiodi(metiltio)-acetilapoaranotin (120).	57
Figura 27. Estruturas das emethallicinas A-F (121-126)	58
Figura 28. Fotografia da linhagem de <i>Aspergillus terreus</i> em BDA.	63

Figura 29. Fotografia do esfregaço do microcultivo da linhagem de <i>Aspergillus terreus</i> em lâmina.....	63
Figura 30. Estrutura do ácido itacônico (127).....	63
Figura 31. Estruturas da terreína (128) e do ácido terreico (129).....	64
Figura 32. Estruturas das aspulvinonas A (130), B (131), C (132), D (133), E (134), F (135) e G (136).	65
Figura 33. Estruturas das butirolactonas I (137), II (138), III (139), IV (140), V (141), VI (142) e VII (143) e dos aspernolídeos A (144), B (145) e C (146).....	66
Figura 34. Estrutura: Da isoterreulactona A (147); das terreulactonas A (148), B (149), C (150) e D (151); das territrens A (152), B (153) e C (154); e da terreusinona (155).....	67
Figura 35. Fotografia de uma linhagem de <i>D. cejpii</i> em BDA.....	69
Figura 36. Fotografia do esfregaço do microcultivo de <i>D. cejpii</i> em lâmina.....	69
Figura 37. Estruturas das rubratoxinas A (156) e B (157); da xantocilina X monometiléter (158); dos indoloterpernos JBIR-03 (159), emindole SB (160) e emeniveol (161).	70
Figura 38. Fotografia dos fungos BRF012-BRF046 isolados dos sedimentos da praia do Mucuripe (Fortaleza - CE), crescidos em meio BDA por 15 dias.....	72
Figura 39. Fotografia dos fungos BRF047-BRF094 isolados dos sedimentos da praia do Pecém (Pecém-CE), crescidos em meio BDA por 15 dias	75
Figura 40. Fotografia das placas cromatográficas (gel de sílica) oriundas da eluição dos extratos dos fungos BRF012-BRF046 isolados dos sedimentos da praia do Mucuripe. A) Revelação sob lâmpada ultravioleta (365 nm). B) Revelação em solução de vanilina com HClO ₄ /EtOH. Eluente: AcOEt/Hexano 8:2. B =branco (meio de cultura).	80
Figura 41. Fotografia das placas cromatográficas (gel de sílica) oriundas da eluição dos extratos dos fungos BRF047-BRF094 isolados de sedimentos da praia do Pecém. A) Revelação sob lâmpada de ultravioleta (254 nm). B) Revelação em solução de vanilina com HClO ₄ /EtOH. Eluente: AcOEt/hexano 8:2.	81
Figura 42. Árvore gerada para BRF019 pelo método <i>Neighbor Joining</i>	84
Figura 43. Árvore gerada para BRF019 segundo o método de Inferência Filogenética Bayesiana.....	85
Figura 44. Árvore gerada para BRF082 pelo método <i>Neighbor Joining</i>	85
Figura 45. Árvore gerada para BRF082 segundo o método de Inferência Filogenética Bayesiana.....	85
Figura 46. Quantidades de biomassa da linhagem BRF019 (<i>A. terreus</i>) obtidas após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.	86
Figura 47. Fotografia das placas cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento em cartucho de sílica C18 do extrato do cultivo em grande escala de BRF019 (<i>A. terreus</i>). Revelação sob lâmpada de ultravioleta: A) 365 nm; B) 254 nm.. Eluente: AcOEt/hexano 8:2.	88
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) da amostra 5 (MeOH/H ₂ O 7:3).	89
Figura 49. Fragmentos presentes em BRF019-1	91
Figura 50. Proposta estrutural para BRF019-1	91
Figura 51. Estrutura proposta para BRF019-1 após comparação com dados da literatura	92
Figura 52. Cromatograma de CG/EM e espectro de massas obtido por impacto eletrônico de BRF019-1	93

Figura 53. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF019-1	93
Figura 54. Espectro de massas de alta resolução EMAR/IES de BRF019-1	94
Figura 55. Espectro de RMN de ^1H de BRF019-1 (CD_3OD , 300 MHz).....	95
Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C e RMN de ^{13}C - DEPT 135° de BRF019-1 (CD_3OD , 75 MHz).....	96
Figura 57. Mapa de contornos COSY de BRF019-1	97
Figura 58. Mapa de contornos HSQC de BRF019-1	98
Figura 59. Mapa de contornos HMBC de BRF019-1	99
Figura 60. Cromatograma da Fração A.....	100
Figura 61. Subestrutura A de BRF019-2 contendo um grupamento prenila.	101
Figura 62. Fragmentos presentes na estrutura de BRF019-2	102
Figura 63. Subestrutura B proposta para BRF019-2	103
Figura 64. Subestrutura C proposta para BRF019-2	103
Figura 65. Proposta estrutural para BRF019-2	103
Figura 66. Estrutura proposta para BRF019-2 com estereoquímica e dados de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C	104
Figura 67. Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR-IES) de BRF019-2	106
Figura 68. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF019-2	107
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H de BRF019-2 (CD_3OD , 300 MHz).....	108
Figura 70. Espectros de RMN ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) e RMN ^{13}C -DEPT 135° de BRF019-2	109
Figura 71. Mapa de contornos COSY de BRF019-2	110
Figura 72. Mapa de contornos HSQC de BRF019-2 e expansão.....	111
Figura 73. Mapa de contornos HMBC de BRF019-2 e expansão.....	112
Figura 74. Expansões do mapa de contornos HMBC de BRF019-2	113
Figura 75. Cromatograma da Fração C.....	114
Figura 76. Fotografia das placas cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento em cartucho de sílica C18 do extrato do segundo cultivo em grande escala de BRF019 . Revelação sob lâmpada de ultravioleta A) 365 nm; B) 254 nm; C)Revelação em solução de vanilina com $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$. Eluente: $\text{AcOEt}/\text{hexano}$ 8:2.....	116
Figura 77. Cromatograma da fração $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 6:4.....	117
Figura 78. Fragmento sugerido para BRF019-3	118
Figura 79. Subestrutura A para BRF019-3	119
Figura 80. Proposta estrutural para BRF019-3	119
Figura 81. Proposta estrutural com estereoquímica do carbono 3 (obtida por comparação dos dados de deslocamento químico de RMN ^1H e ^{13}C) e dados de deslocamentos químicos de BRF019-3 (162).	120
Figura 82. Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR-IES) de BRF019-3	121
Figura 83. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF019-3	122
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de BRF019-3 e expansões.	123
Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPT 135° de BRF019-3	124
Figura 86. Mapa de contornos COSY de BRF019-3	125
Figura 87. Mapa de contornos HSQC de BRF019-3	126

Figura 88. Mapa de contornos HMBC de BRF019-3	127
Figura 89. Fragmentos propostos para BRF019-4	129
Figura 90. Subestruturas propostas para BRF019-4	130
Figura 91. Proposta estrutural para BRF019-4	130
Figura 92. Proposta estrutural com estereoquímica do carbono 2 e dados de deslocamentos químicos de BRF019-4	131
Figura 93. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF019-4	132
Figura 94. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF019-4	133
Figura 95. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 300 MHz) de BRF019-4	134
Figura 96. Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 75 MHz) e RMN de ¹³ C-DEPT 135° de BRF019-4	135
Figura 97. Mapa de contornos COSY de BRF019-4	136
Figura 98. Mapa de contornos HSQC de BRF019-4 e expansão.....	137
Figura 99. Mapa de contornos HMBC de BRF019-4	138
Figura 100. Expansão do mapa de contornos HMBC de BRF019-4	139
Figura 101. Cromatograma da fração H ₂ O/MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 15, p. 115).....	140
Figura 102. Fragmentos propostos para BRF019-5	142
Figura 103. Subestruturas A e B para BRF019-5	143
Figura 104. Subestrutura C para BRF019-5	144
Figura 105. Proposta estrutural e dados de deslocamento químico para BRF019-5	144
Figura 106. Proposta estrutural com configuração relativa e dados de RMN ¹ H e ¹³ C para BRF019-5	145
Figura 107. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF019-5	147
Figura 108. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF019-5	147
Figura 109. Espectro de RMN de ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) e expansões de BRF019-5	148
Figura 110. Espectro de RMN de ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) e RMN de ¹³ C-DEPT 135 de BRF019-5	149
Figura 111. Mapa de contornos COSY de BRF019-5	150
Figura 112. Mapa de contornos HSQC de BRF019-5	151
Figura 113. Mapa de contornos HMBC de BRF019-5	152
Figura 114. Acoplamentos do mapa de contornos HMBC de BRF019-5	153
Figura 115. Cromatograma da fração MeOH/ H ₂ O 7:3 (amostra 5, Tabela 15, p. 115).....	154
Figura 116. Cromatograma da fração MeOH/ H ₂ O 8:2 (amostra 6, Tabela 15, p. 113).....	155
Figura 117. Massas dos extratos do cultivo de BRF082 , obtidos após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.	156
Figura 118. Inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo de BRF082	157
Figura 119. Cromatograma da subfração MeOH/H ₂ O 7:3 (amostra 5).....	159
Figura 120. Fragmentos presentes na estrutura de BRF082-1	161
Figura 121. Subestrutura A para BRF082-1	161
Figura 122. Subestrutura B para BRF082-1	162
Figura 123. Proposta estrutural para BRF082-1 e dados de deslocamento químico.....	162

Figura 124. Proposta estrutural de BRF082-1 com estereoquímica e dados de deslocamento químico (A) e estrutura apresentada na literatura para a bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina (B).	163
Figura 125. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF082-1 e proposta hipotética de formação de fragmento.....	165
Figura 126. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-1	166
Figura 127. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de BRF082-1	167
Figura 128. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPT 135° de BRF082-1	167
Figura 129. Mapa de contornos COSY de BRF082-1 e correlações.....	168
Figura 130. Mapa de contornos HSQC de BRF082-1	169
Figura 131. Mapa de contornos HMBC de BRF082-1 e correlações.	170
Figura 132. Fragmentos estruturais propostos para BRF082-2	172
Figura 133. Subestruturas de BRF082-2	173
Figura 134. Proposta estrutural de BRF082-2 e deslocamentos químicos.	174
Figura 135. Proposta estrutural de BRF082-2 com estereoquímica e dados de deslocamentos químicos.	175
Figura 136. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF082-2 e proposta mecanística de formação de aduto.	176
Figura 137. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-2	177
Figura 138. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de BRF082-2	178
Figura 139. Espectros de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e RMN ^{13}C -DEPT 135 de BRF082-2	179
Figura 140. Mapa de contornos COSY de BRF082-2	180
Figura 141. Mapa de contornos HSQC de BRF082-2	181
Figura 142. Mapa de contornos HMBC de BRF082-2	182
Figura 143. Fragmentos estruturais propostos para BRF082-3	184
Figura 144. Subestrutura proposta para BRF082-3	185
Figura 145. Proposta estrutural para BRF082-3 e dados de deslocamento químico.....	185
Figura 146. Proposta estrutural para BRF082-3 com estereoquímica e dados de deslocamentos químicos.	186
Figura 147. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF082-3	186
Figura 148. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-3	188
Figura 149. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de BRF082-3 e expansões.	189
Figura 150. Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C DEPT 135° de BRF082-3	190
Figura 151. Mapa de contornos COSY de BRF082-3	191
Figura 152. Mapa de contornos HSQC de BRF082-3	192
Figura 153. Mapa de contornos HMBC de BRF082-3	193
Figura 154. Fotografias das placas cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento em cartucho de sílica C18 do extrato do segundo cultivo em grande escala de BRF082. Revelação em solução de vanilina com $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$. Eluente: $\text{AcOEt}/\text{hexano}$ 8:2.....	195
Figura 155. Cromatograma da fração $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1.....	196

Figura 156. Fragmentos propostos para BRF082-4	199
Figura 157. Subestruturas propostas para BRF082-4	199
Figura 158. Subestrutura C para BRF082-4	200
Figura 159. Proposta estrutural e dados de deslocamentos químicos de BRF082-4	200
Figura 160. Proposta estrutural para BRF082-4 com dados de deslocamentos químicos e estereoquímica.	200
Figura 161. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF082-4	202
Figura 162. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-4	203
Figura 163. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de BRF082-4	204
Figura 164. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e RMN ^{13}C -DEPT 135° de BRF082-4	205
Figura 165. Mapa de contornos COSY de BRF082-4	206
Figura 166. Mapa de contornos HSQC de BRF082-4	207
Figura 167. Mapa de contornos HMBC de BRF082-4	208
Figura 168. Fragmentos propostos para BRF082-5	210
Figura 169. Subestruturas A e B para BRF082-5	211
Figura 170. Subestrutura C para BRF082-5	212
Figura 171. Proposta estrutural e dados de deslocamentos químicos para BRF082-5	212
Figura 172. Proposta estrutural para BRF082-5 e deslocamentos químicos.	213
Figura 173. Espectro de massas de alta resolução de BRF082-5	214
Figura 174. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-5	215
Figura 175. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD), e expansões, de BRF082-5	216
Figura 176. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C -DEPT 135 °de BRF082-5	217
Figura 177. Mapa de contornos COSY de BRF082-5	218
Figura 178. Mapa de contornos HSQC de BRF082-5	219
Figura 179. Mapa de contornos HMBC de BRF082-5	220
Figura 180. Cromatograma da subfração MeOH/ H_2O 7:3 3 (amostra 5, Tabela 32, p. 195). ..	221
Figura 181. Cromatograma da subfração MeOH/ H_2O 8:2 (amostra 6, Tabela 32, p. 195) ...	222
Figura 182. Fragmentos propostos para BRF082-6	223
Figura 183. Subestrutura proposta para BRF082-6	224
Figura 184. Subestruturas propostas para BRF082-6	225
Figura 185. Propostas estruturais para BRF082-6	225
Figura 186. Proposta estrutural com estereoquímica e dados de RMN ^1H e ^{13}C de BRF082-6 (A); e estrutura da Fiscalina B (B) (WONG <i>et al.</i> , 1993).	226
Figura 187. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF082-6	228
Figura 188. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-6	229
Figura 189. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de BRF082-6	230
Figura 190. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e RMN ^{13}C -DEPT 135°de BRF082-6	231
Figura 191. Mapa de contornos COSY de BRF082-6	232
Figura 192. Mapa de contornos HSQC de BRF082-6	233
Figura 193. Mapa de contornos HMBC de BRF082-6 e expansão.....	234

Figura 194. Expansões do mapa de contornos HMBC de BRF082-6	235
Figura 195. Esquema de isolamento de fungos de sedimentos marinhos	239

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura, origem e atividade biológica de alguns metabólitos secundários obtidos de micro-organismos marinhos.	29
Tabela 2 - Massas (mg) dos extratos do meio líquido dos fungos BRF012-BRF046 isolados dos sedimentos da praia do Mucuripe.	79
Tabela 3 - Massas (mg) dos extratos do meio líquido dos fungos BRF047-BRF094 isolados dos sedimentos da praia do Pecém.	80
Tabela 4 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) dos fungos BRF012-BRF046 frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	81
Tabela 5 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) dos fungos BRF047-BRF094 frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	81
Tabela 6 - Determinação da IC_{50} (µg/mL) dos extratos mais ativos dos isolados do Mucuripe frente à linhagem tumoral HCT-116. Os valores de IC_{50} e os respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (<i>Intuitive Software for Science</i> , San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	82
Tabela 7 - Determinação da IC_{50} (µg/mL) dos extratos mais ativos dos isolados do Pecém frente à linhagem tumoral HCT-116. Os valores de IC_{50} e os respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (<i>Intuitive Software for Science</i> , San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	82
Tabela 8 - Massas dos extratos da linhagem BRF019 (<i>A. terreus</i>) obtidos após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.	86
Tabela 9 - Determinação da inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo de BRF019 (<i>Aspergillus terreus</i>) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliada pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	87
Tabela 10 – Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de BRF019 (<i>A. terreus</i>) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	88
Tabela 11 - Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações obtidas da cromatografia em coluna da amostra H ₂ O 100%, do extrato de BRF019 (<i>A. terreus</i>) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	88
Tabela 12. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF019-1 com os da terreína (NAGIA <i>et al.</i> , 2012).	92
Tabela 13. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF019-2 com os da Butirolactona I (CAZAR <i>et al.</i> , 2005).	104
Tabela 14 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL das substâncias isoladas do primeiro cultivo de BRF019 (<i>A. terreus</i>) frente à	

linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.....	114
Tabela 15. Massas e percentual de inibição do crescimento celular em uma concentração única de 50 µg/mL das amostras obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato MeOH 90% do meio líquido de BRF019 frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	115
Tabela 16. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra 3 do cultivo da linhagem BRF019	117
Tabela 17. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF019-3 com os da (R) – 6 - hidroximeleína (SCHLINGMANN <i>et al.</i> , 2002).....	120
Tabela 18. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF019-4 com os da butirolactona II (PARVATKAR, 2011).....	131
Tabela 19. Massas das frações obtidas do fracionamento por CLAE da subfração H ₂ O /MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 15, p. 113).	140
Tabela 20. Comparação dos dados de deslocamentos químicos de BRF019-5 com os da buttirolactona V (HARITAKUN <i>et al.</i> , 2010).....	145
Tabela 21. Massas das frações obtidas do fracionamento por CLAE da subfração MeOH /H ₂ O 7:3 (amostra 5, Tabela 15, p. 113).	154
Tabela 22. Massas das frações obtidas do fracionamento por CLAE da subfração MeOH /H ₂ O 8:2 (amostra 6, Tabela 15, p. 113).	155
Tabela 23 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL das substâncias isoladas do segundo cultivo de BRF019 (<i>A. terreus</i>) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.....	155
Tabela 24 - Massas dos extratos do cultivo de BRF082 obtidos após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.	156
Tabela 25 - Determinação inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo de BRF082 frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	156
Tabela 26 - Massas das subfrações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90%.	158
Tabela 27 – Percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) e <i>IC</i> ₅₀ das subfrações do fracionamento cromatográfico de BRF082 meio líquido MeOH 90 %.frente à linhagem tumoral HCT-116. O percentual de inibição foi avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h e os valores de <i>IC</i> ₅₀ e os respectivos intervalos de confiança (<i>CI</i> 95%) foram obitdos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (<i>Intuitive Software for Science</i> , San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.	158
Tabela 28. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra MeOH /H ₂ O 7:3 do cultivo de BRF082	159
Tabela 29. Comparação dos dados de deslocamento químico de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF082-1 com os dados da bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina (LEE <i>et al.</i> , 2001).....	163
Tabela 30. Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF082-2 com os da 6-acetilbismetiltiogliotoxina (WATTS <i>et al.</i> , 2010).....	173

Tabela 31 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL e IC_{50} das substâncias isoladas do primeiro cultivo de BRF082 (<i>D. cejpii</i>) frente à linhagem tumoral HCT-116. O percentual de inibição foi avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h e os valores de IC_{50} , bem como os respectivos intervalos de confiança (<i>CI</i> 95%), foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (<i>Intuitive Software for Science</i> , San Diego, CA). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.	194
Tabela 32 . - Massas das subfrações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90%	195
Tabela 33 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL das frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90 % - 2 frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.	196
Tabela 34. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da subfração MeOH /H ₂ O 1:1 (amostra 4, Tabela 32, p. 193).	196
Tabela 35 . Comparação dos dados de deslocamentos químicos de BRF082-4 e da gliotoxina (KAOUJJI <i>et al.</i> , 1990).	201
Tabela 36 . Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da subfração MeOH/H ₂ O 7:3 3 (amostra 5, Tabela 32, p. 193)	221
Tabela 37 . Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da subfração MeOH /H ₂ O 7:3 (amostra 6, Tabela 32, p. 193)	222
Tabela 38 . Comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de BRF082-6 com os da Fiscalina B (WONG <i>et al.</i> , 1993).	226
Tabela 39 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL e IC_{50} das substâncias isoladas do segundo cultivo de BRF082 frente à linhagem tumoral HCT-116. O percentual de inibição foi avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h e os valores de IC_{50} , bem como os respectivos intervalos de confiança (<i>CI</i> 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (<i>Intuitive Software for Science</i> , San Diego, CA). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.	236

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
AcOEt	Acetato de etila
AM	Ambiente marinho
BD	Batata-dextrose
BDA	Batata-dextrose-ágar
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CDA	Czapek dox agar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
<i>D. cejpii</i>	<i>Dichotomomyces cejpii</i>
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO – d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EMAR – IES	Espectrometria de massas de alta resolução – Ionização por eletrospray
EtOH	Etanol
ETP	Epipolítiodioxopiperazina
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IDH	Índice de deficiência de hidrogênios
IV	Infravermelho
MEA	Malte extract agar
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio
ODS	Octadecilsilano

PA	Padrão analítico
RMN ¹³ C – BB	Ressonância magnética nuclear de carbono 13 – Broad Band
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
tq	Tripleto de quarteto
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.2	O AMBIENTE MARINHO COMO UMA FONTE POTENCIAL DE NOVAS SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	28
1.3	FUNGOS COMO FONTE DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAMENTE ATIVAS	35
2.	EPIPOLITIODIOXOPIPERAZINAS: LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	41
3.	CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>ASPERGILLUS</i>	61
3.1	<i>ASPERGILLUS TERREUS</i>	62
4.	CONSIDERAÇÕES SOBRE <i>DICHOTOMOMYCES</i>	69
4.1	<i>DICHOTOMOMYCES CEJPII</i>	69
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	ISOLAMENTOS DE FUNGOS DOS SEDIMENTOS DAS PRAIAS DO MUCURIPE E PECÉM - CEARÁ	72
5.2	TESTE PAREADO	78
5.3	CULTIVOS EM PEQUENA ESCALA DOS ISOLADOS BRF012-BRF046 E BRF047-BRF094 E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS EXTRATOS	79
5.4	IDENTIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DAS LINHAGENS MAIS ATIVAS	83
5.5	OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE BRF019 (<i>A. TERREUS</i>) PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE CITOTÓXICA	86
5.5.1	Otimização do período de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética	86
5.5.2	Atividade citotóxica das frações do cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética	87
5.5.3	Primeiro cultivo em grande escala de BRF019 (<i>A. terreus</i>)	87
5.5.3.1	Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de BRF019 (<i>A. terreus</i>)	87
5.5.3.2	Determinação Estrutural de BRF019-1	89
5.5.3.3	Fracionamento da Fração A	100
5.5.3.4	Determinação estrutural de BRF019-2	100
5.5.3.5	Purificação da Fração B	114
5.5.3.6	Fracionamento da Fração C	114
5.5.3.7	Atividades citotóxicas das substâncias isoladas de BRF019 (<i>A. terreus</i>)	114
5.5.4	Segundo cultivo em grande escala da linhagem BRF019 (<i>A. terreus</i>)	115
5.5.4.1	Fracionamento da fração BRF019 meio líquido MeOH 90%	115
5.5.4.2	Fracionamento da subfração H ₂ O/MeOH 6:4 (amostra 3)	116
5.5.4.3	Determinação Estrutural de BRF019-3	117
5.5.4.4	Determinação Estrutural de BRF019-4	128
5.5.4.5	Fracionamento da subfração H ₂ O/MeOH 1:1 (amostra 4)	140
5.5.4.6	Determinação Estrutural de BRF019-5	141
5.5.4.7	Fracionamento da subfração MeOH/H ₂ O 7:3 (amostra 5)	154
5.5.4.8	Fracionamento da subfração MeOH/H ₂ O 8:2 (amostra 6)	154
5.5.5	Atividades citotóxicas das substâncias isoladas do segundo cultivo de BRF019 (<i>A. terreus</i>)	155
5.6	Otimização do cultivo de BRF082 (<i>D. cejpui</i>) para a produção de metabólitos secundários com atividade citotóxica	155
5.6.1	Otimização do período de cultivo	155
5.6.2	Atividades citotóxicas das frações	156
5.6.3	Primeiro cultivo em grande escala de BRF082 (<i>D. cejpui</i>)	157
5.6.3.1	Fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90%	157
5.6.3.2	Atividades citotóxicas da subfrações de BRF082 meio líquido MeOH 90 %	158
5.6.3.3	Fracionamento da subfração MeOH/H ₂ O 7:3 (amostra 5)	158
5.6.3.4	Determinação estrutural de BRF082-1	159

5.6.3.5 Determinação estrutural de BRF082-2.....	171
5.6.3.6 Determinação estrutural de BRF082-3.....	183
5.6.3.7 Atividades citotóxicas das substâncias isoladas do primeiro cultivo de BRF082 (<i>D. cejpii</i>).....	194
5.6.4 Segundo cultivo em grande escala de BRF082 (<i>D. cejpii</i>).....	194
5.6.4.1 Fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90 %-2.....	195
5.6.4.2 Atividades citotóxicas das subfrações da fração BRF082 meio líquido MeOH 90% - 2.....	195
5.6.4.3 Fracionamento da subfração H ₂ O/MeOH 1:1 (amostra 4).....	196
5.6.4.4 Determinação estrutural de BRF082-4.....	197
5.6.4.5 Determinação estrutural de BRF082-5.....	209
5.6.4.6 Fracionamento da subfração MeOH/H ₂ O 7:3 (amostra 5).....	221
5.6.4.7 Fracionamento da subfração MeOH/H ₂ O 8:2 (amostra 6).....	221
5.6.4.8 Determinação estrutural de BRF082-6.....	222
5.6.4.9 Atividades citotóxicas das substâncias isoladas do segundo cultivo de BRF082 (<i>D. cejpii</i>).....	236
6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	238
6.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS DOS SEDIMENTOS DAS PRAIAS DO MUCURIBE E PECÉM-CE.....	238
6.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	240
6.2.1 Cromatografia em camada delgada.....	240
6.2.2 Cromatografia em coluna (CC).....	240
6.2.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	240
6.3 SOLVENTES.....	240
6.4 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS.....	241
6.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE/EM).....	241
6.4.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	241
6.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	241
6.5 ESTERILIZAÇÃO E PREPARAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA.....	241
6.5.1 PREPARAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA.....	242
6.5.2 Meio líquido de caldo de batata.....	242
6.5.3 Água do mar sintética.....	242
6.6 MICRO-ORGANISMOS.....	242
6.6.1 Obtenção e identificação dos fungos.....	242
6.6.2 Preservação dos microrganismos.....	243
6.6.3 Cultivos em pequena escala dos isolados BRF012-BRF046.....	244
6.6.4 Cultivos em pequena escala dos isolados BRF047-BRF094.....	244
6.7 TESTE CITOTÓXICO.....	244
6.8 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DAS LINHAGENS MARINHAS BRF019 (<i>A. TERREUS</i>) E BRF082 (<i>D. CEJPII</i>) PARA A PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	245
6.8.1 Otimização do período de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.....	245
6.9 PRIMEIRO CULTIVO EM GRANDE ESCALA DE BRF019 (<i>A. TERREUS</i>).....	246
6.9.1 Fracionamento cromatográfico do extrato orgânico de BRF019.....	246
6.9.2 Análises cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento do extrato orgânico de BRF019.....	246
6.9.3 Fracionamento da amostra H ₂ O 100% (amostra 1).....	246
6.9.4 Fracionamento da fração A.....	247
6.9.5 Fracionamento da fração B.....	247
6.9.6 Fracionamento da fração C.....	247
6.10 SEGUNDO CULTIVO EM GRANDE ESCALA DE BRF019.....	247
6.10.1 Fracionamento cromatográfico da fração BRF019 meio líquido MeOH 90 %.....	248
6.10.2 Fracionamento da subfração H ₂ O/MeOH 6:4 (amostra 3).....	248
6.10.3 Fracionamento da subfração H ₂ O/MeOH 1:1 (amostra 4).....	248
6.10.4 Fracionamento da subfração MeOH /H ₂ O 7:3 (amostra 5).....	249
6.10.5 Fracionamento da subfração MeOH /H ₂ O 8:2 (amostra 6).....	249

6.11 PRIMEIRO CULTIVO EM GRANDE ESCALA DE BRF082 (<i>D. CEJPII</i>)	250
6.11.2 Análises cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento de BRF082 meio líquido MeOH 90 %	250
6.11.3 Fracionamento da subfração MeOH/H ₂ O 7:3 (amostra 5).....	250
6.12 SEGUNDO CULTIVO EM GRANDE ESCALA DO FUNGO <i>D. CEJPII</i>	251
6.12.1 Fracionamento cromatográfico de BRF082 meio líquido MeOH 90 % - 2	251
6.12.2 Fracionamento da subfração H ₂ O/MeOH 1:1 (amostra 4).....	251
6.12.3 Fracionamento da subfração MeOH /H ₂ O 7:3 (amostra 5).....	252
6.12.4 Fracionamento da subfração MeOH /H ₂ O 8:2 (amostra 6).....	252
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	255
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	258
9. APÊNDICES	2
APÊNDICE 1 – Fotografias dos testes pareados das linhagens isoladas da praia do Mucuripe.....	2
APÊNDICE 2 – Fotografias dos testes pareados das linhagens isoladas da praia do Pecém	5



Introdução

1 Introdução

A natureza é uma fonte abundante de substâncias com potencial terapêutico para diversas doenças. Some-se a isso o fato dos compostos de origem natural terem, na maioria das vezes, afinidade com moléculas-alvo, tornando-os promissores candidatos a fármacos (BHATNAGAR, KIM, 2012).

Os micro-organismos em geral, como bactérias e fungos, são bastante conhecidos como produtores de diversas substâncias biologicamente ativas. São inúmeros os relatos de substâncias oriundas de micro-organismos utilizadas no tratamento de doenças, tais como infecções bacterianas (penicilina, cefalosporina, estreptomicina, vancomicina, **1**, **2**, **3** e **4**, respectivamente, Figura 1), distúrbios coronarianos (mevastatina e lovastatina, **5** e **6**, respectivamente, Figura 2, p. 26), câncer (bleomicina, dactinomicina, doxorubicina e estaurosporina, **7**, **8**, **9** e **10**, respectivamente, Figura 3, p. 26) e em estados pós-transplantes que requerem imunossupressores (ciclosporina, **11**, Figura 4, p. 27) para evitar a rejeição aos órgãos transplantados (BHATNAGAR, KIM, 2010).

Figura 1. Estruturas da penicilina (1), cefalosporina (2), estreptomicina (3) e vancomicina (4).

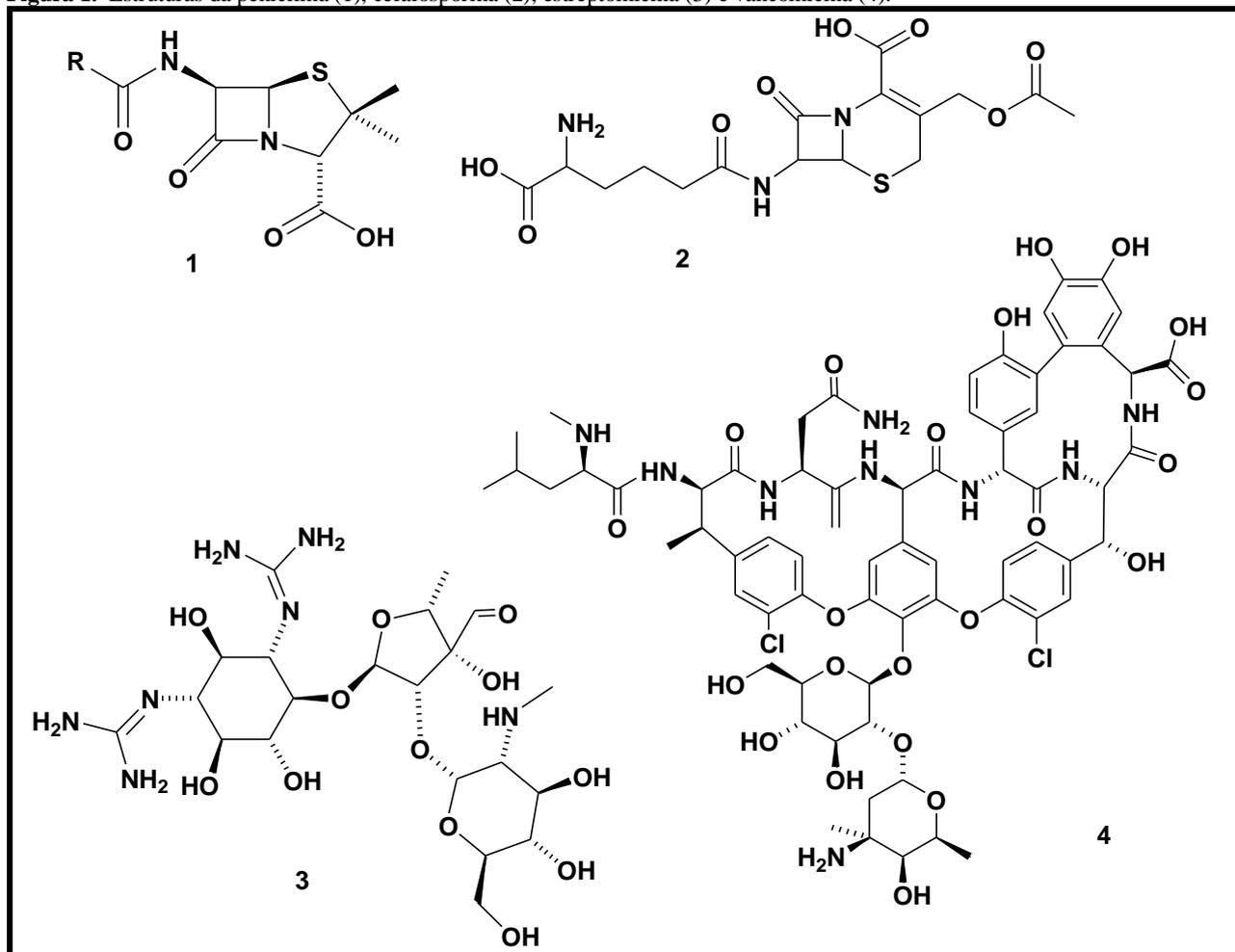


Figura 2. Estruturas da mevastatina (5) e lovastatina (6).

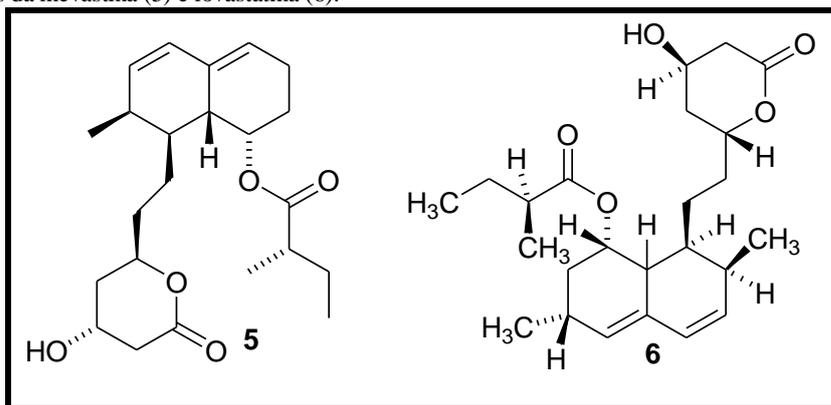


Figura 3. Estruturas da bleomicina (7), doxorubicina (8), estaurosporina (9) e dactinomicina (10).

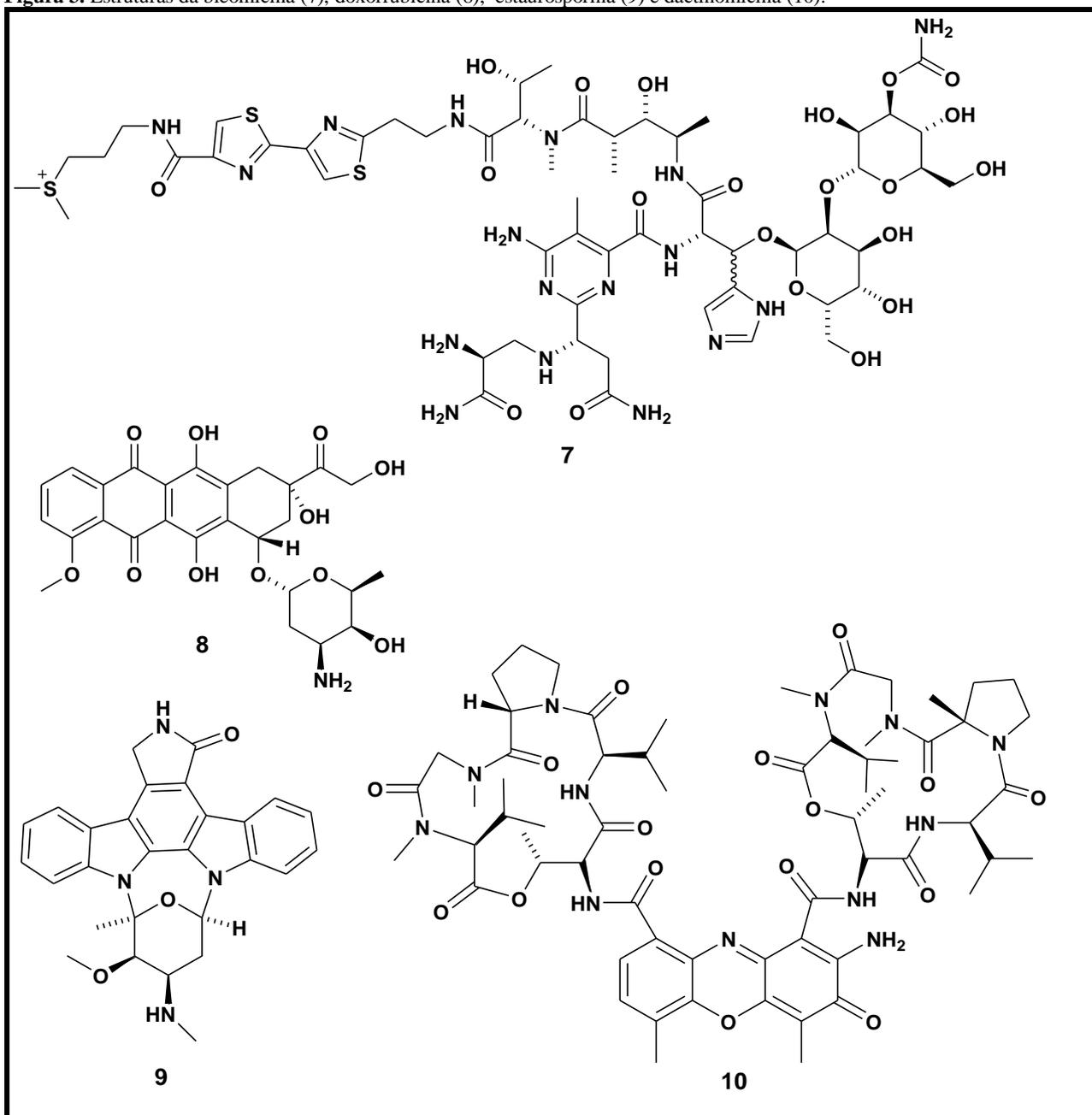
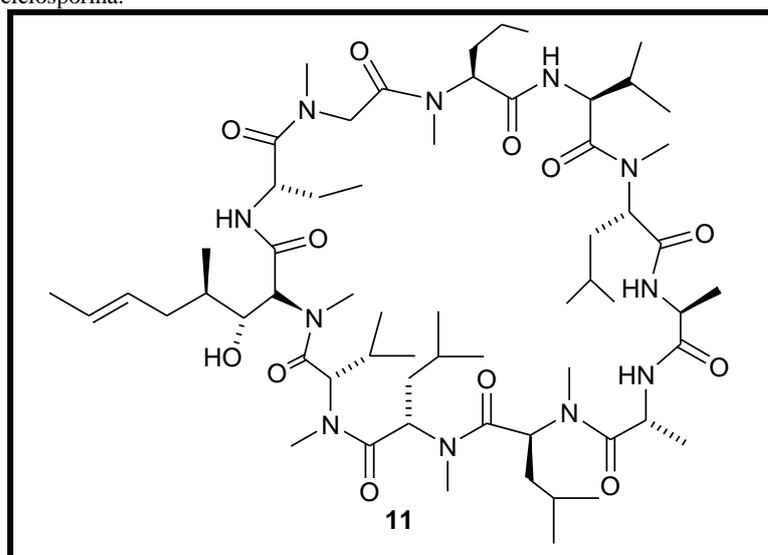


Figura 4. Estrutura da ciclosporina.



A descoberta da penicilina nos anos 20, por Alexander Fleming, a partir de uma linhagem de *Penicillium chrysogenum*, chamou atenção para os micro-organismos do solo, os quais passaram a ser um alvo importante na busca por novos fármacos. Todavia, com o passar dos anos, o isolamento de um grande número de substâncias já conhecidas diminuiu o interesse pela bioprospecção de novos metabólitos secundários em micro-organismos terrestres. Tal fato levou a uma mudança no foco de interesse dos químicos de produtos naturais e farmacologistas, que passaram a buscar ambientes pouco explorados ou inexplorados, como por exemplo, o ambiente marinho. Desta forma, surge o interesse pelos oceanos como fontes profícuas de novas moléculas bioativas (BHATNAGAR, KIM, 2010).

Sabe-se que a hidrosfera compõe a maior parte do planeta Terra. Logo, é de se esperar que as chances de obtenção de novas substâncias sejam maiores no ambiente marinho do que no terrestre. Contudo, as dificuldades de exploração do ambiente marinho fez com que este permanecesse inexplorado durante muito tempo. Com o desenvolvimento de técnicas seguras de mergulho, iniciou-se a bioprospecção de substâncias biologicamente ativas no ambiente marinho. Já no final do século passado, constatou-se um significativo aumento no interesse por produtos naturais marinhos, fato verificado pelo número cada vez maior de trabalhos nessa área (BHATNAGAR, KIM, 2010; FENICAL, JENSEN, 2006; RATEB, EBEL, 2011).

1.2 Objetivos

1.2.2 Objetivo Principal

Prospecção de metabólitos secundários citotóxicos oriundos de fungos filamentosos isolados da costa cerarense.

1.2.3 Objetivos específicos

1. Isolamento de fungos filamentosos de sedimentos marinhos das praias do Mucuripe e Pecém, ambas pertencentes ao litoral cearense;
2. Triagem dos fungos obtidos com relação à citotoxicidade frente à linhagem de células tumorais humanas HCT-116 (côlon);
3. Análise da predominância marinha ou terrestre dos fungos isolados;
4. Seleção e identificação filogenética das linhagens fúngicas mais citotóxicas e estudo do melhor dia de cultivo;
5. Cultivo em grande escala das linhagens fúngica selecionadas, com posterior fracionamento bioguiado dos extratos obtidos em busca de compostos citotóxicos.

1.3 O ambiente marinho como uma fonte potencial de novas substâncias bioativas

O aumento do número de casos de câncer, da resistência bacteriana e das exigências por novas estruturas bioativas motivaram a busca por produtos naturais bioativos em fontes pouco exploradas, visto que os isolados de fontes terrestres têm apresentado cada vez mais estruturas repetidas (BHATNAGAR, KIM, 2010).

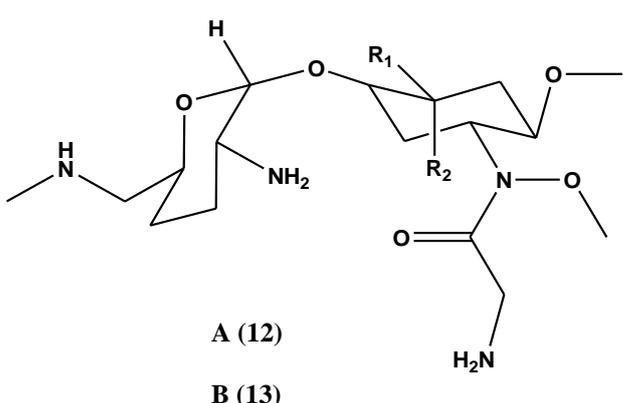
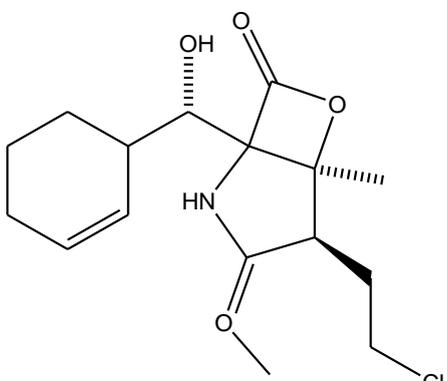
A teoria da origem da vida na Terra, também chamada de teoria da sopa primordial, de Aleksandr Oparin, propõe que a vida em nosso planeta se iniciou em um oceano primitivo, onde os gases atmosféricos se combinaram, pela ação de descargas elétricas e radiação, dando origem aos primeiros aminoácidos e, posteriormente, às formas mais primitivas de vida (HALDANE, 1954). Essa teoria fornece embasamento suficiente para considerarmos os oceanos como um ambiente rico em compostos orgânicos, propício ao crescimento e à evolução da vida. Além disso, os oceanos ocupam 95% da biosfera terrestre, e abrigam diversos *habitats* para várias espécies de organismos, alguns dos quais, adaptados exclusivamente ao ambiente marinho como águas vivas e corais. Sabe-se também que os oceanos possuem uma microbiota complexa, com abundâncias que variam de um milhão/mL na água a um bilhão/mL nos sedimentos (FENICAL, JENSEN, 2006). Apesar disso, o ambiente marinho permaneceu praticamente inexplorado até meados dos anos 60. Isso se deu, principalmente, pelas dificuldades de acesso às profundidades do oceano, fato que foi superado pelo desenvolvimento de técnicas seguras de mergulho como o *aqualung*. Dessa forma, foi somente no início dos anos 90 que se percebeu um considerável aumento do número de

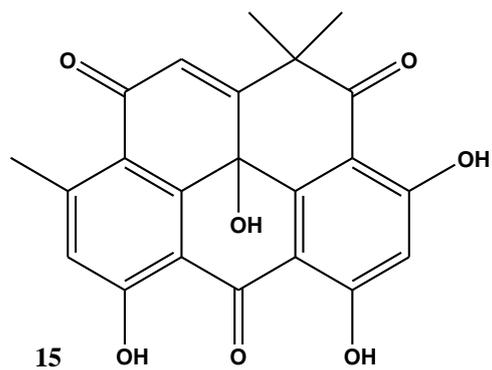
publicações relatando estruturas isoladas de fontes marinhas e essa tendência continua até os dias atuais (FENICAL, JENSEN, 2006; RATEB, EBEL, 2011).

Como resultado, mais de 10.000 metabólitos de origem marinha foram isolados e caracterizados ao longo dos últimos cinquenta anos (BHATNAGAR, KIM, 2010). Os micro-organismos de origem marinha como bactérias, cianobactérias, microalgas e, particularmente os fungos, têm se tornado uma fonte promissora de novos metabólitos biologicamente ativos (BHATNAGAR, KIM, 2010; KJER *et al.*, 2010)

A Tabela 1 mostra a estrutura e a atividade biológica de alguns metabólitos bioativos isolados de micro-organismos marinhos.

Tabela 1. Estrutura, origem e atividade biológica de alguns metabólitos secundários obtidos de micro-organismos marinhos.

Micro-organismo	Substância	Atividade biológica
Actinomicetos		
<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	Istamicinas A ($R_1 = H$; $R_2 = NH_2$) e B ($R_1 = NH_2$; $R_2 = H$) (OKAMI <i>et al.</i> , 1979)	Antibacteriana
	 <p>A (12) B (13)</p>	
<i>Salinospora tropica</i>	Salinosporamida A (FELING <i>et al.</i> , 1996; CHAUHAN <i>et al.</i> , 2005)	Antitumoral
		
<i>Streptomyces chibaensis</i>	Resistoflavina (GORAJANA <i>et al.</i> , 2007) 14	Anticancerígena e antibacteriana

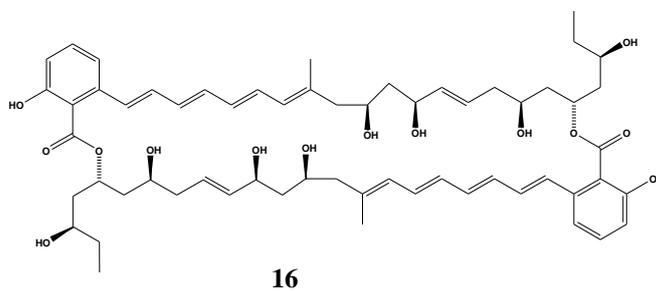


Marinispora sp.

Marinomycin A (KNOW *et al.*, 2006)

Antitumoral
antibiótica

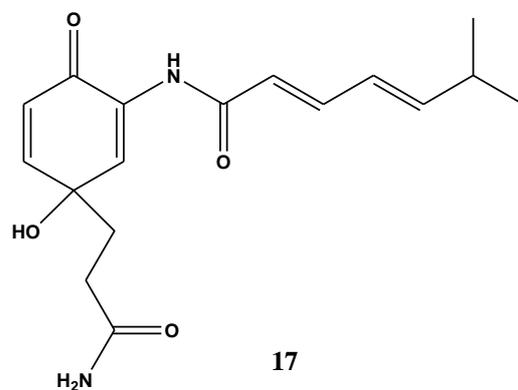
e



Streptomyces sp.

Dariamida C (ASOLKAR *et al.*, 2006)

Antitumoral



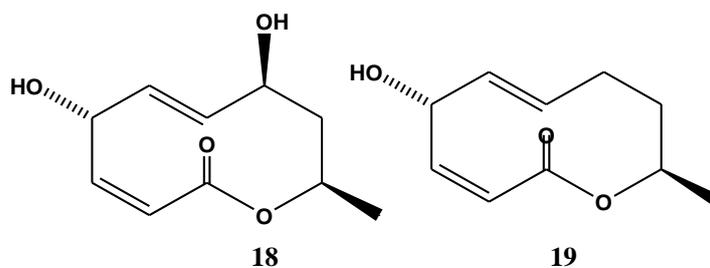
Fungos

Paraphaeosphaeria sp.

Modiolídeos A e B (TSUDA *et al.*, 2003)

Antibacteriana
antifúngica

e

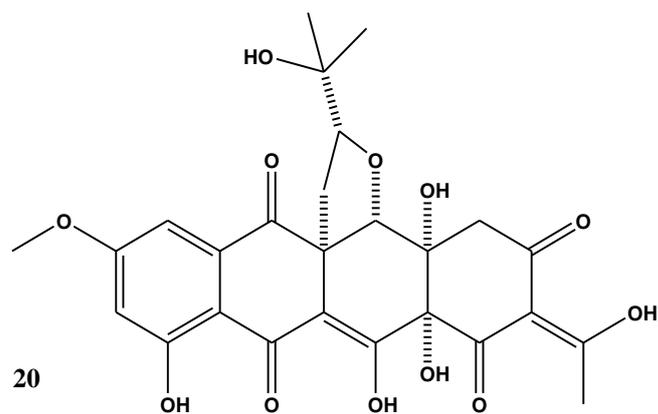


Ciratodictyon

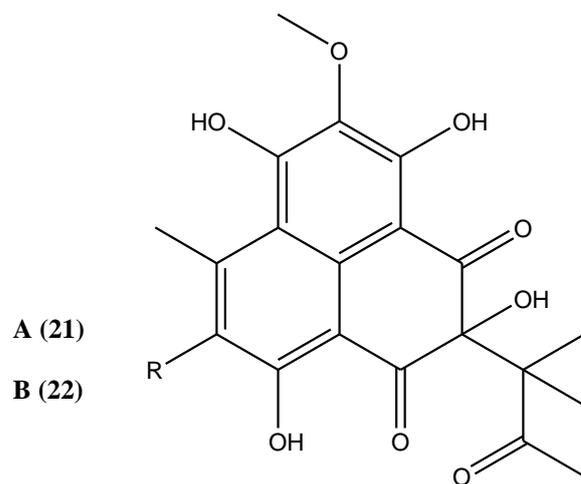
Seregaquinona A (SHIGEMORE *et al.*, 1999; KOMATSU *et al.*,

Antimicrobiana

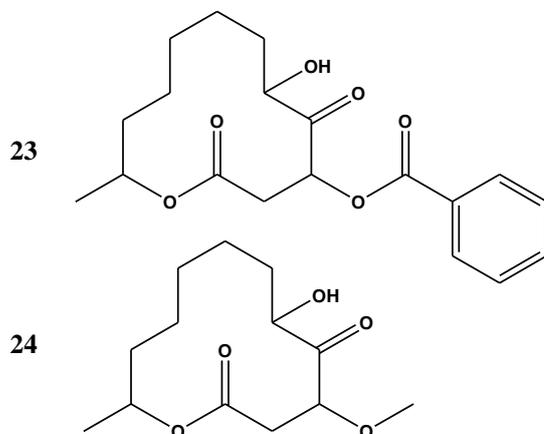
spongiosum 2000)



Penicillium sp. Seleuzononas A (R = H) e B (R= OH) (KOMATSU *et al.*, 2000; PERPELESCU *et al.*, 2002) Antiviral



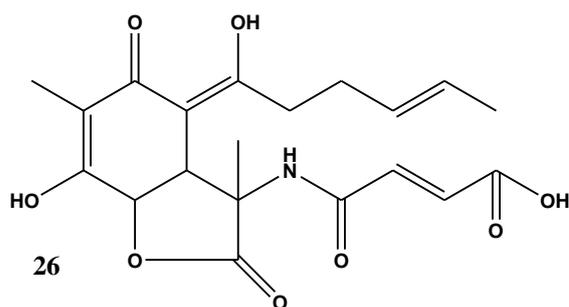
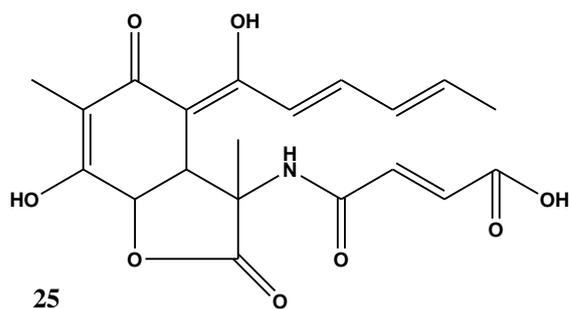
Cladosporium sp. Sporiolídeos A e B (SHIGEMORE *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2000) Antitumoral



Antitumoral

*Penicillium
chrysogenum*

Sorbicilactonas A e B (BRINGMANN *et al.*, 2007)

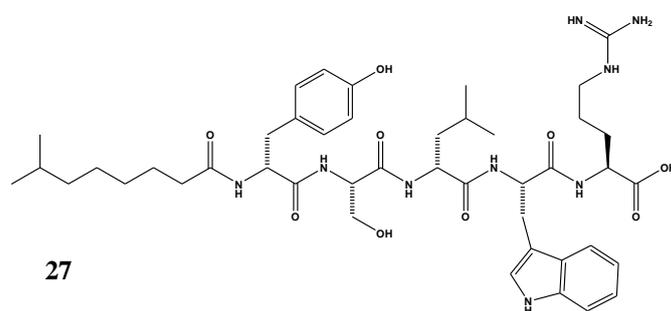


Bactérias

*Brevibacillus
laterosporus*

Tauramamida (DESJARDINE *et al.*, 2007)

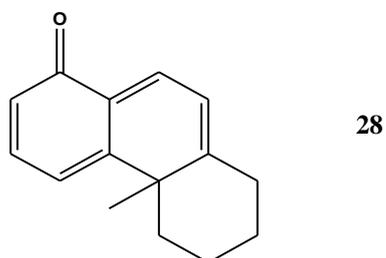
Antimicrobiana



*Pseudomonas
stutzeri*

Zafrin (UZAIR *et al.*, 2008)

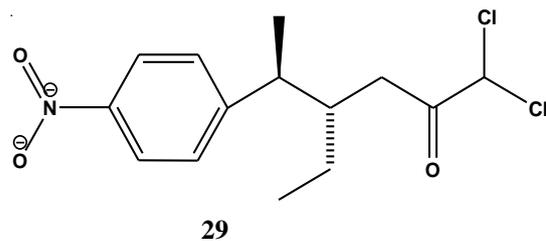
Antimicrobiana



Nocardia sp.

Ayamycin (EL-GENDY *et al.*, 2008)

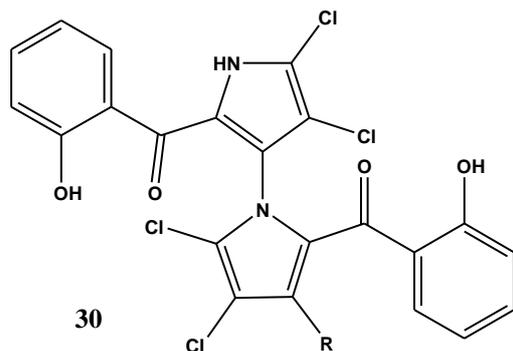
Antifúngico



Streptomyces sannurensis

Marinopyrroles A (R = H) e B (R = Br) (HUGHES *et al.*, 2008)

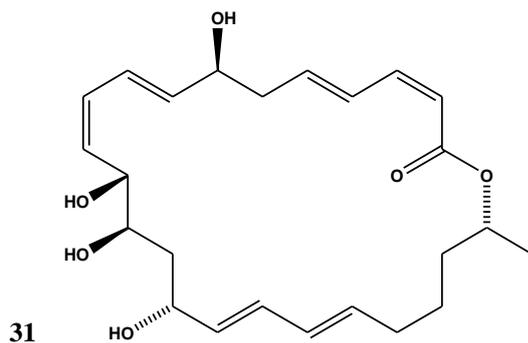
Citotóxico e anti MRSA¹



Bacillus sp.

Macrolactina S (LU *et al.*, 2008)

Antibacteriana

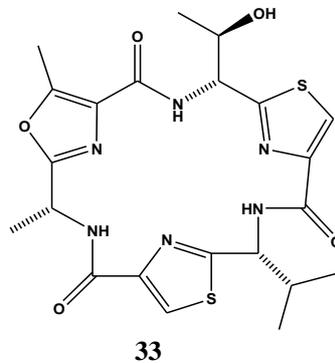
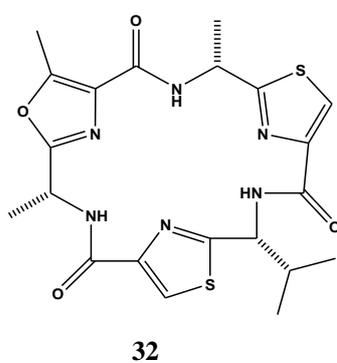


Cianobactérias

Oscillatoria sp.

Venturamidas A e B (LININGTON *et al.*, 2007)

Antimalária

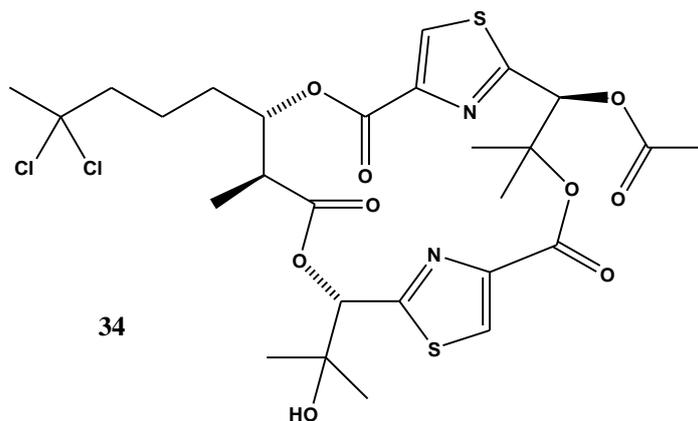


¹ *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é uma bactéria resistente a diversos antibióticos (WATKINS *et al.*, 2012)

*Lyngbya
majuscula*

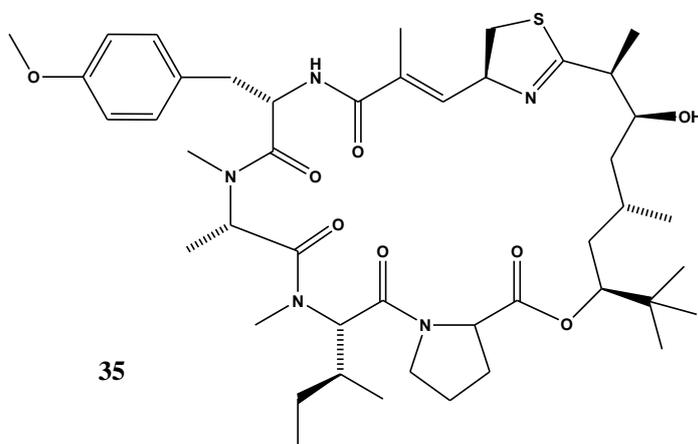
Hectochlorin (RAMAWASMY *et al.*, 2007)

Antitumoral



Apratoxin (EDWARDS *et al.*, 2004)

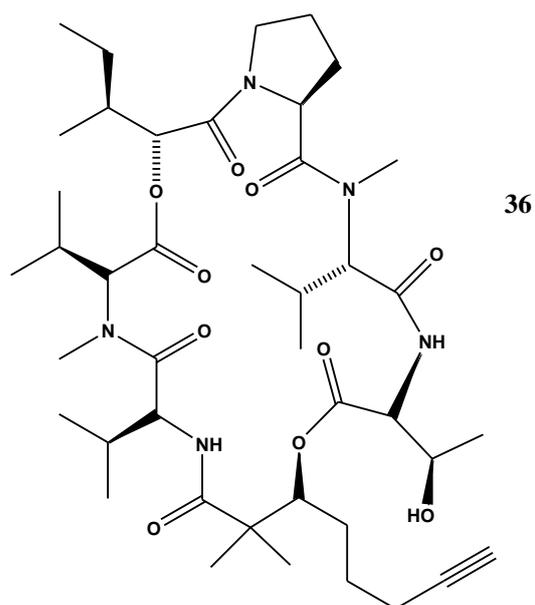
Antitumoral



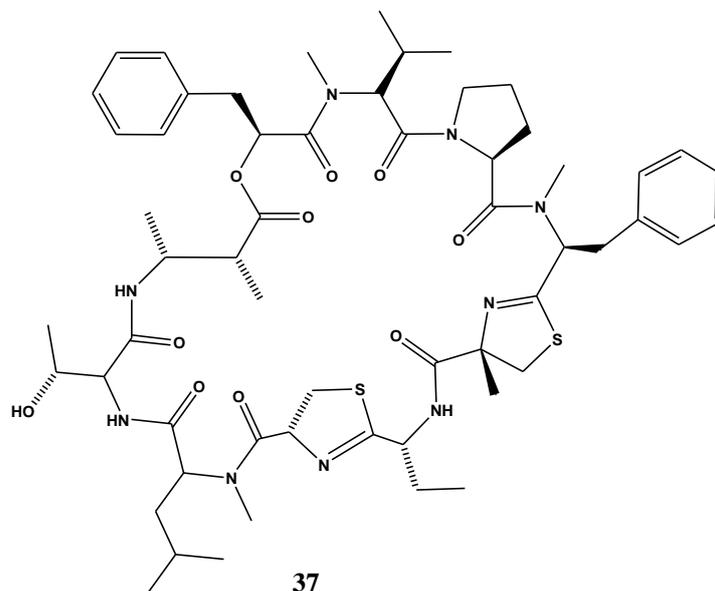
Rivularia sp.

Viequeamida A (BOUDREAU *et al.*, 2012)

Antitumoral



Leptolyngbya sp. Grassypeptolides D 353 (7R, 11R) e E 354 (7S, 11S) Antitumoral
(THORNBURG *et al.*, 2011)

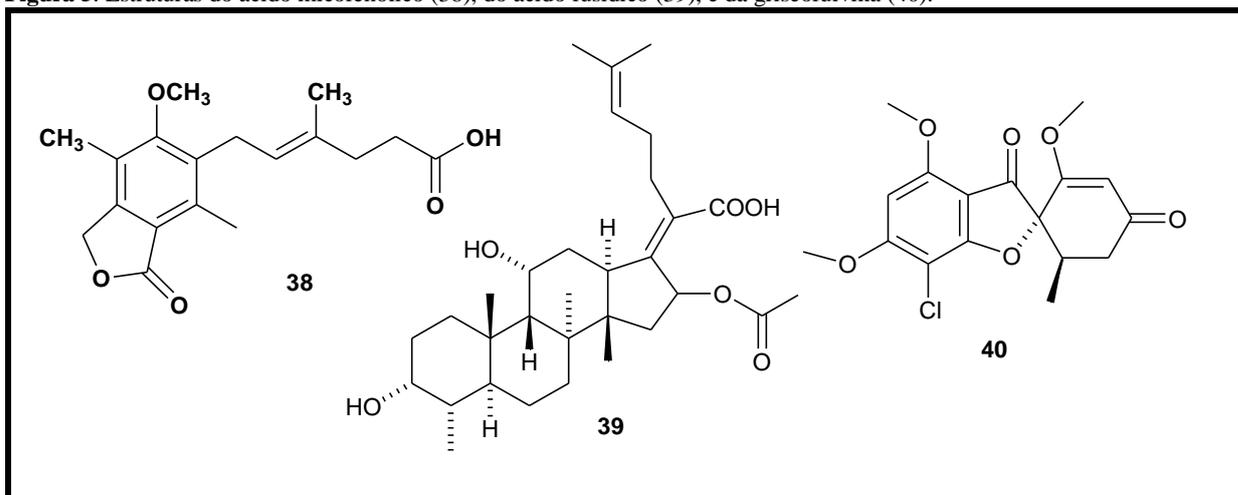


1.3 Fungos como fonte de moléculas biologicamente ativas

Antes que o ambiente marinho se tornasse alvo de bioprospecção de moléculas biologicamente ativas, os fungos terrestres já eram bastante conhecidos como uma fonte rica de produtos naturais bioativos, com diversas substâncias descritas na literatura. No ambiente terrestre, os fungos desempenham a função importante de decompositores, o que, associado aos seus versáteis mecanismos de adaptação, permite-lhes ocupar uma ampla variedade de ambientes (DAMARE *et al.*, 2006).

Em 1896 foi obtido o primeiro metabólito secundário de origem fúngica de que se tem notícia: O ácido micofenólico (**38**, Figura 5, p. 36). Entretanto, foi somente em 1928, com a descoberta da penicilina (**1**, Figura 1, p. 25) que os fungos atraíram maior interesse no campo das pesquisas em produtos naturais. Nos anos seguintes, várias substâncias importantes de origem fúngica foram descobertas, como os agentes antimicrobianos ácido fusídico (**39**, Figura 5, p. 36) e griseofulvina (**40**, Figura 5, p. 36), e a ciclosporina (**11**, Figura 4, p. 27), um agente imunossupressor importante, largamente utilizado no tratamento de doenças auto-imunes e na prevenção de rejeição a órgãos transplantados, e que foi isolado do fungo *Tolypocladium inflatum* em 1971 (KJER *et al.*, 2011).

Figura 5. Estruturas do ácido micofenólico (38), do ácido fusídico (39), e da griseofulvina (40).



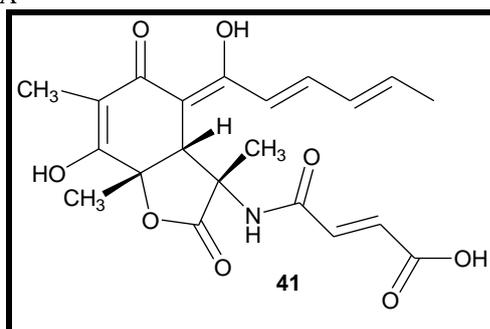
Além de substâncias bioativas, muitos metabólitos secundários de fungos pertencem à classe das estatinas, assim como a mevastatina (5, Figura 2, p. 26) e a lovastatina (6, Figura 2, p. 26) isoladas dos fungos *Penicillium citrinum* e *Aspergillus terreus*, respectivamente. As estatinas reduzem o colesterol sanguíneo e são utilizadas para o tratamento de doenças coronarianas (BUTLER, 2004; DEWICK, 2006).

Sabe-se que oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e possuem uma complexa biodiversidade, com mais de 300 mil espécies de plantas e animais descritas, além de diversos tipos de micro-organismos conhecidos e desconhecidos. O mar profundo constitui um ambiente diversificado, caracterizado por baixa temperatura, alta pressão hidrostática e condições nutricionais do tipo “banquete e fome”. Devido ao estresse ambiental a que se encontram submetidos, os micro-organismos marinhos possuem metabolismo e fisiologia diferenciados, quando comparados aos terrestres. As fontes hidrotermais profundas, os mangues, as esponjas e os corais podem ser citados como exemplos de diferentes *habitats* passíveis de isolamento de micro-organismos. As superfícies e cavidades internas dos macro-organismos marinhos sésseis fornecem um *habitat* único onde grande parte dos micro-organismos vive sob relações simbióticas, mutualísticas ou parasitárias. Tais micro-organismos são extremamente específicos em suas relações com esponjas, corais moles, ascídias e plantas marinhas. Desta forma, os micro-organismos marinhos como bactérias, cianobactérias, microalgas e fungos se tornaram uma promissora fonte de novos metabólitos biologicamente ativos (DAMARE *et al.*, 2006; KJER *et al.*, 2011).

Dentre todos os micro-organismos citados, os fungos marinhos são especialmente promissores como fonte de novas substâncias bioativas devido à grande diversidade química de seus metabólitos secundários (KJER *et al.*, 2011; NEWTON, ABRAHAM, 1955).

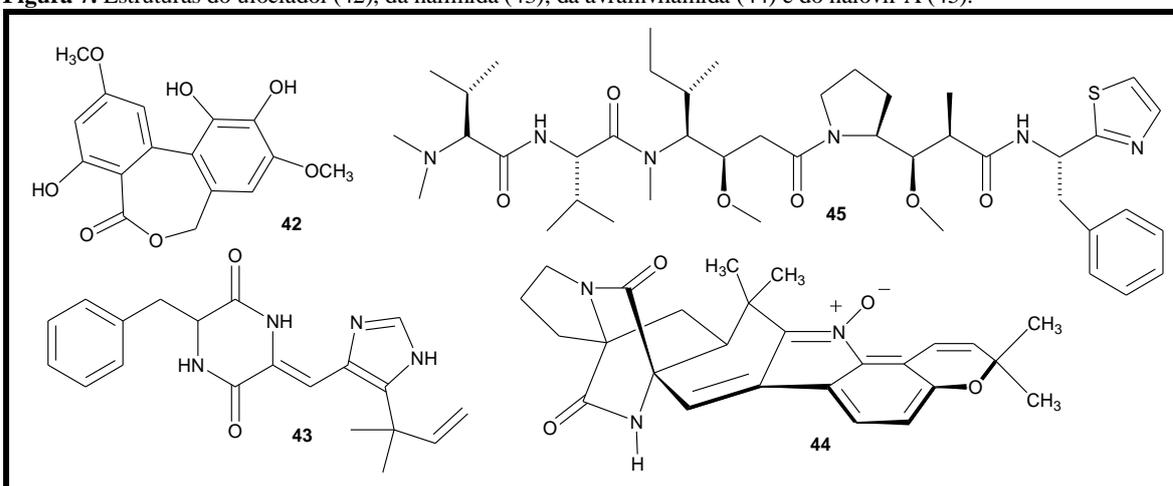
A mais famosa classe de substâncias bioativas proveniente de fungos marinhos é a das cefalosporinas, representada primeiramente pela cefalosporina C (**2**, Figura 1, p. 25), a qual foi isolada por Brotzu, em 1945, de uma linhagem marinha de *Acremonium chrysogenum* (KJER *et al.*, 2011; NEWTON, ABRAHAM, 1955). O alcaloide sorbicilactona A (**41**, Figura 6), obtido do fungo marinho *Penicillium chrysogenum* isolado de uma esponja, demonstrou alta atividade citotóxica frente a células leucêmicas (KJER *et al.*, 2010).

Figura 6. Estrutura da sorbicilactona A



A substância ulocladol (**42**, Figura 7), obtida de uma linhagem de *Botrytis ulocaldium*, isolado da esponja *Myxilla incrustans*, apresentou inibição da enzima tirosina-quinase. A halimida (**43**, Figura 7) isolada de uma linhagem de *Aspergillus sp.*, recuperado da alga *Halimeda copiosa*, destroi os vasos sanguíneos de tumores e sua eficácia está sendo testada em câncer de ovário e mama. A avrainvilamida (**44**, Figura 7), obtida de uma espécie *Aspergillus sp.*, recuperada da alga *Avrainvillea sp.*, também apresentou atividade citotóxica. São também conhecidas substâncias de origem fúngica com propriedades antivirais, como os halovirs A-E, hexapeptídeos produzidos por *Scytalidium sp.*, isolado da planta aquática *Halodule wrightii*. Halovir A (**45** Figura 7) e seus derivados B-E inibem o vírus da herpes tipo 1 (IMHOFF; LABES; WIESE, 2011).

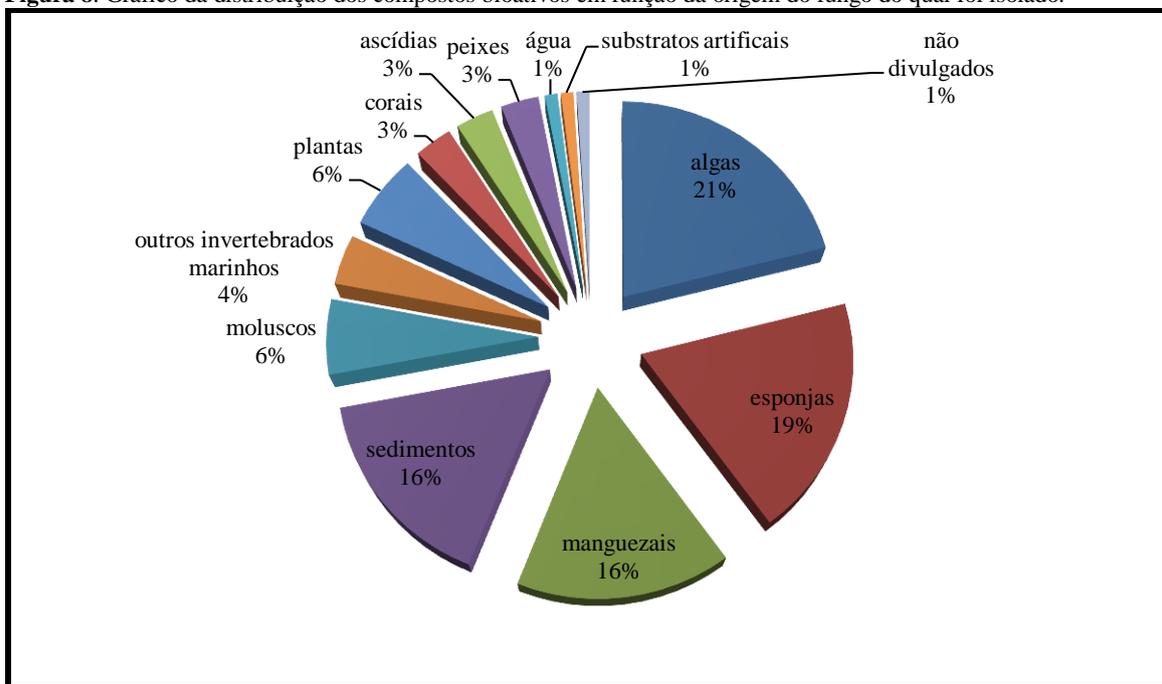
Figura 7. Estruturas do ulocladol (42), da halimida (43), da avrainvilamida (44) e do halovir A (45).



Dados da literatura demonstram que as pesquisas com fungos marinhos levaram à descoberta de mais de 270 novas moléculas bioativas entre os anos de 1990 e 2002, sendo mais de 70% destas oriundas de fungos associados a esponjas e plantas marinhas. Entre os anos de 2002 e 2006, mais de 330 novas substâncias bioativas foram isoladas de fungos marinhos, grande parte delas com esqueletos carbônicos incomuns. Nos anos de 2008 e 2009 foram descritos 2076 novos compostos oriundos de fungos marinhos. O aumento nesses números comprova o crescente interesse por fungos marinhos como fonte de novos metabólitos secundários bioativos (KJER *et al.*, 2011; BLUNT *et al.*, 2014).

Estima-se que aproximadamente dois terços dos compostos oriundos de fungos marinhos são provenientes de linhagens isoladas de organismos vivos enquanto a maioria restante é proveniente de fungos isolados da matéria não viva, principalmente sedimentos (incluindo-se, aqui, os manguezais). As algas são a principal fonte de fungos, seguidas das esponjas e manguezais. Uma interessante fonte que vêm ganhando destaque é mar-profundo, que nas estatísticas encontra-se relatado junto aos sedimentos. Todos esses dados estão explicitados no gráfico da Figura 8.

Figura 8. Gráfico da distribuição dos compostos bioativos em função da origem do fungo do qual foi isolado.

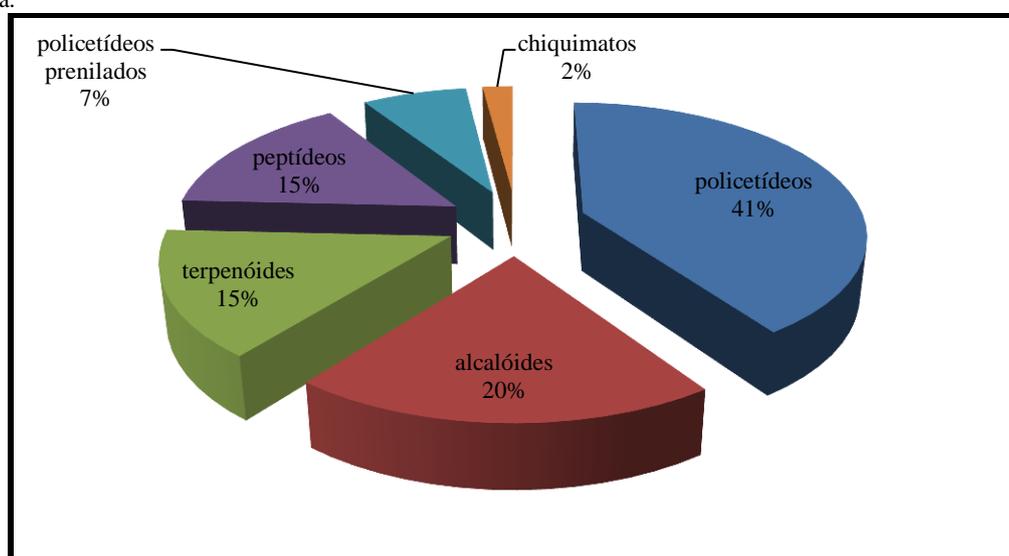


Fonte: RATEB *et al.*, 2011

A Figura 9, p. 39, mostra a divisão dos compostos oriundos de fungos marinhos, relatados até meados de 2010, de acordo com suas “supostas” origens biogenéticas. Na maioria das vezes, a atribuição de uma substância a uma determinada categoria é baseada apenas em

aspectos estruturais, sem levar realmente em consideração a rota biossintética. De fato, classificar as substâncias derivadas de fungos marinhos em uma ou outra categoria biogenética é algo bastante complicado, haja vista uma boa parte destas substâncias possuírem biogênese mista, citando como exemplo as pseurotinas e diversos policetídeos e alcaloides prenilados. Os Policetídeos são os compostos mais isolados dos fungos marinhos, fato também observado para os fungos terrestres. Se agrupássemos os policetídeos prenilados e os policetídeos nitrogenados (listados como alcaloides) juntos aos policetídeos, estes representariam mais de 50% dos compostos obtidos de fungos derivados do ambiente marinho (RATEB *et al.*, 2011).

Figura 9. Gráfico da distribuição dos compostos bioativos oriundos de fungos marinhos de acordo com sua suposta origem biogenética.



Fonte: RATEB *et al.*, 2011

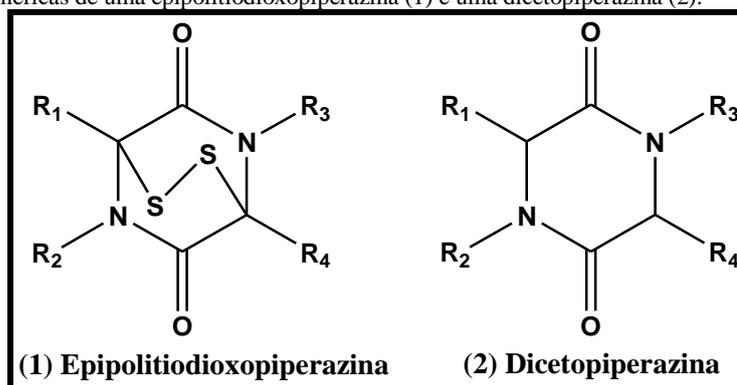


***Levantamento
Bibliográfico***

2. Epipolítiodioxopiperazinas: Levantamento bibliográfico

Epipolítiodioxopiperazinas (ETPs) são dipeptídeos que constituem uma grande e diversificada classe de metabólitos secundários (aproximadamente 120 substâncias), em sua grande maioria tóxicos, e produzidos exclusivamente por fungos. Caracterizam-se estruturalmente pela presença de uma ponte dissulfeto² intramolecular nas posições α, α' de um ciclo-dipeptídico (dicetopiperazina-DKP) (Figura 10) (GARDINER *et al.*, 2005; BOYER *et al.*, 2013).

Figura 10. Estruturas genéricas de uma epipolítiodioxopiperazina (1) e uma dicetopiperazina (2).



Vários gêneros de fungos filamentosos produzem ETPs, dentre os quais podemos citar *Chaetomium*, *Leptosphaeria*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium*, e *Pithomyces*. A acentuada toxicidade exibida pela maioria das ETPs tem atraído atenção para elas como agentes terapêuticos potenciais para diversas doenças, inclusive o câncer. Diversos tipos de atividade biológica foram relatados para essa classe de metabólitos, podendo-se citar as atividades imunossupressora, imunomoduladora, antiviral, anticâncer, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antimalárica, anti-inflamatória, antinematóide, fitotóxica, dentre outras (BOYER *et al.*, 2013).

A toxicidade das ETPs tem sido extensivamente estudada e parece ser associada à ponte dissulfeto, pois a remoção dos átomos de enxofre ou a adição de agentes redutores, elimina a maioria de suas atividades biológicas. Dois mecanismos são propostos para a sua toxicidade. O primeiro considera uma possível conjugação da ponte dissulfeto com grupos tiois residuais das proteínas. O segundo considera a geração de espécies de oxigênio bastante reativas através de um ciclo redox. Todavia, esses mecanismos são apenas proposições e apresentam diversos equívocos e contradições, sendo necessários mais estudos para sua confirmação (GARDINER *et al.*, 2005).

² As ETPs podem ter pontes com um, três, quatro ou mais átomos de enxofres. Porém, o mais comum são as pontes com apenas dois átomos de enxofres.

Na literatura são relatados 14 grupos de ETPs. Estes grupos diferem quanto ao esqueleto básico, havendo pequenas mudanças nas cadeias laterais de seus membros. Há, portanto, uma diversidade estrutural de ETPs, cuja origem pode ser explicada admitindo-se diferentes aminoácidos como precursores das moléculas. Todas as ETPs de ocorrência natural isoladas até o momento possuem pelo menos um aminoácido aromático como precursor. Os 14 grupos de ETPs relatados na literatura são: Gliotoxinas, sirodesminas, hialodendrininas, esporidesminas, chaetominas, chaetocinas, verticilinas, leptosinas, emestrinas, ésteres escabrosínicos, ditiosilvatinas, epicorazinas, arantinas e emetalicinas (GARDINER *et al.*, 2005).

O isolamento de cinco ETPs, bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina (**49**, Figura 13, p. 44), 6-acetilbis(metiltio)gliotoxina (**163**, Figura 135, p. 175), acetilgliotoxina G (**164**, Figura 146, p. 186), gliotoxina (**46**, Figura 11, p. 43) e acetilgliotoxina (**48**, Figura 13, p. 44) de *Dichotomomyces cejpui* (Item 4.1, p. 69), encorajou-nos a realizar um levantamento bibliográfico sobre essa classe de compostos. Através do portal de periódicos da capes, que disponibiliza informações de diversas bases de dados (incluindo a do *Chemical Abstracts*), foi realizada uma pesquisa, sem restrição de período, onde foram empregados os termos *epipolythiodioxopiperazine* e *epipolythiodiketopiperazine* como palavras-chave. Desta forma, foram encontrados 144 resultados, dentre os quais apenas 10 relatavam o isolamento e/ou a caracterização de ETPs.

A primeira ETP relatada na literatura foi a gliotoxina (**46**, Figura 11, p. 43), isolada pela primeira vez em 1936 da espécie *Gliocladium fimbriatum* - hoje *Thricoderma virens*, da qual deriva seu nome (WEINDLING e EMERSON, 1936). Sua estrutura, entretanto, após diversas proposições, só foi corretamente elucidada em 1958 por Bell *et al.*, através de transformações químicas e espectroscopia de absorção no ultravioleta, e a respectiva configuração absoluta foi estabelecida em 1966 por Beecham *et al.*, através de difração de raios X. Sua estrutura consiste em um ciclo-dipeptídeo, biossintetizado a partir dos aminoácidos fenilalanina e serina (SCHARF *et al.*, 2012), contendo uma ponte dissulfeto. O esqueleto inédito 2,5-dicetopiperazina, com uma ponte dissulfeto na posição 1,4 (**47**, Figura 12, p. 43) foi posteriormente observado em diversos outros compostos e passou a ser o esqueleto básico de uma nova classe de metabólitos secundários de origem fúngica: As epipolítiodioxopiperazinas. As cadeias laterais R variam de acordo com os aminoácidos precursores (GARDINER *et al.*, 2005).

Figura 11. Estrutura da gliotoxina (46).

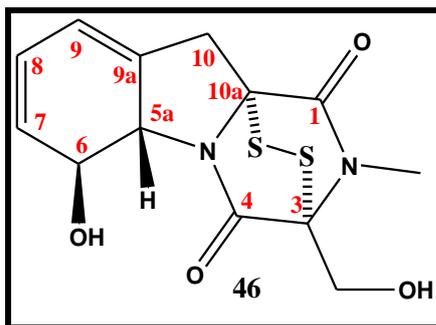
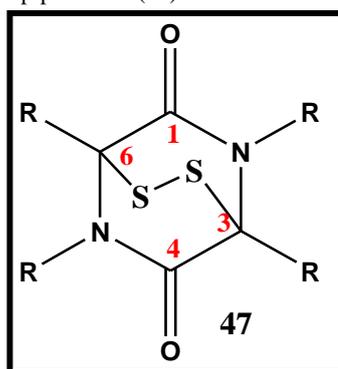


Figura 12. Esqueleto básico das epipolítiodioxopiperazinas (47).



Diversos derivados da gliotoxina foram isolados posteriormente. Em 1945, Mull, Townley e Scholz isolaram, de uma cultura de *Penicillium obscurum* Biourge, a gliotoxina e uma outra substância com propriedades antibióticas, a qual eles chamaram isolado 2. Anos depois, em 1953, Johnson e colaboradores publicaram a elucidação estrutural do isolado 2 e concluíram ser este um derivado monoacetilado da gliotoxina, conhecida hoje como acetilgliotoxina (48, Figura 13, p. 44).

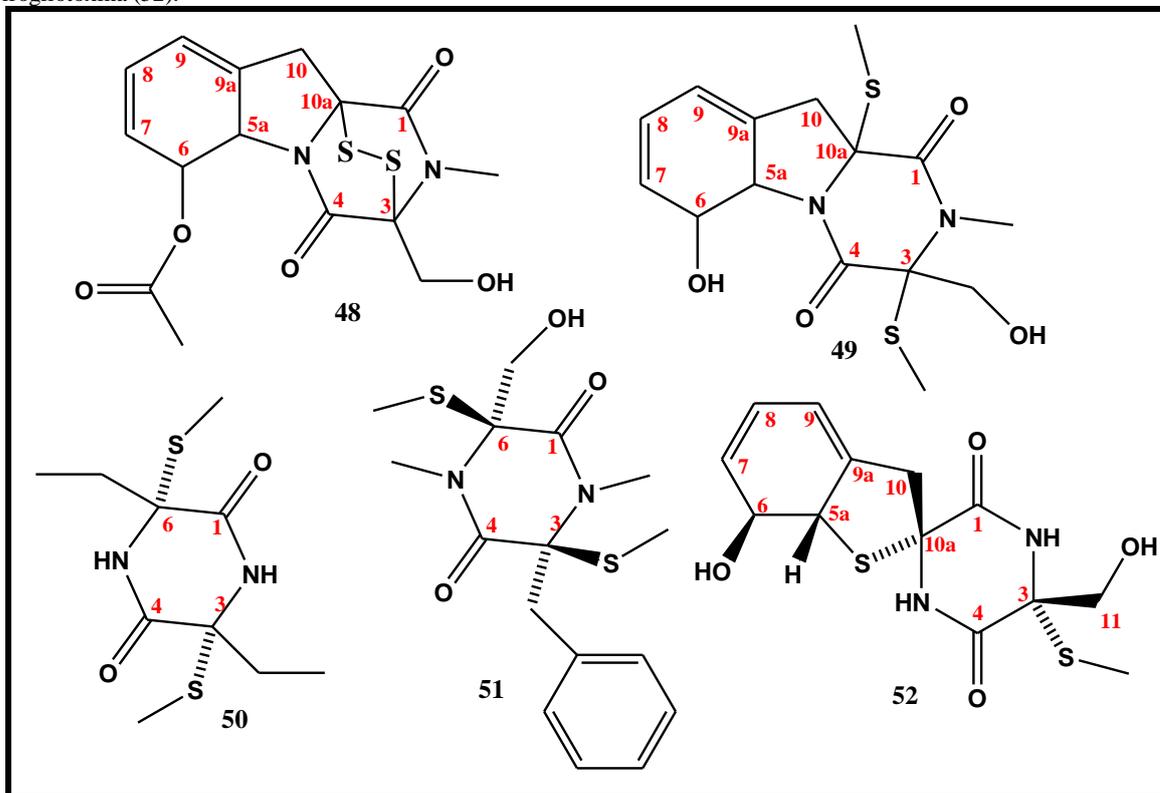
Em 1980, Kirby e colaboradores publicaram o isolamento, elucidação estrutural e biossíntese de um novo metabólito secundário isolado do meio de cultura de uma linhagem de *Gliocladium deliquescens* – a bis(detio)bis(metil)gliotoxina (49, Figura 13, p. 44). A nova substância, segundo o autor, é proveniente de uma redução e metilação irreversíveis da gliotoxina. Anos mais tarde, em 1988, o mesmo autor isolou, da mesma espécie de fungo, uma ETP sem substituintes no nitrogênio. Esta estrutura era até então desconhecida e foi denominada *bis-N-norgliovictin* (50, Figura 13, p. 44). Estrutura semelhante havia sido isolada em 1974, por Dorni e Arigoni, de uma linhagem de *Helminthosporium victoriae*³, um vírus que ataca fungos fitopatogênicos. A substância é a gliovictin (51, Figura 13, p. 44).

Um esqueleto incomum de uma ETP foi descrito por Wang *et al.* em 2012, ao descrever o isolamento da espirogliotoxina (52, Figura 13, p. 44) de uma linhagem de *Aspergillus*

³ Contrariando a definição de ETP – Metabólitos exclusivos de fungos.

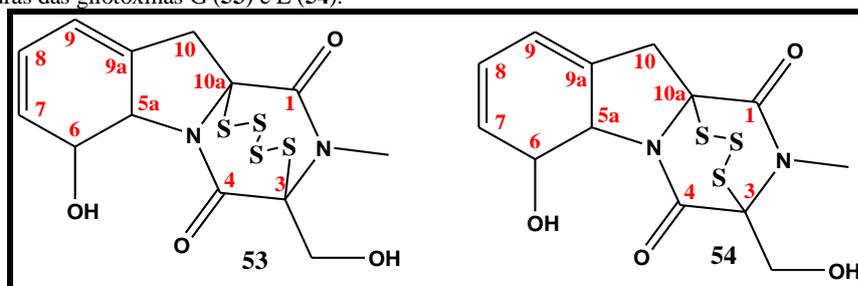
fumigatus. Nesta substância, os carbonos 5a e 10a encontram-se conectados através de um átomo de enxofre, formando um anel espiro, até então inédito para essa classe de compostos.

Figura 13. Estruturas da acetilgliotoxina (48); bis(detio)bis(metiltio)gliotoxin (49); bis-N-norgliovictin (50); gliovictin (51) e espirogliotoxina (52).



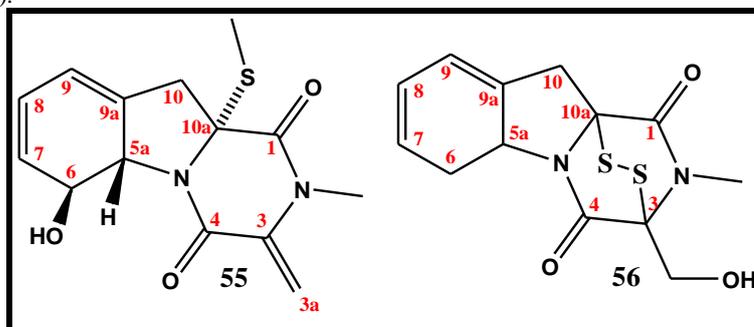
Também menos comuns do que as epiditiodioxopiperazinas (ETPs com ponte dissulfeto), são as epimono, tri e tetratiodioxopiperazinas. Em 1986, Waring e colaboradores isolaram, do meio de cultura de *Aspergillus fumigatus*, uma epitetratiodioxopiperazina análoga à gliotoxina: A gliotoxina G (**53**, figura 14). O mesmo autor obteve, no ano seguinte, uma epitritiodioxopiperazina de uma linhagem de *Penicillium terliskowky*, a gliotoxina E (**54**, Figura 14).

Figura 14. Estruturas das gliotoxinas G (**53**) e E (**54**).



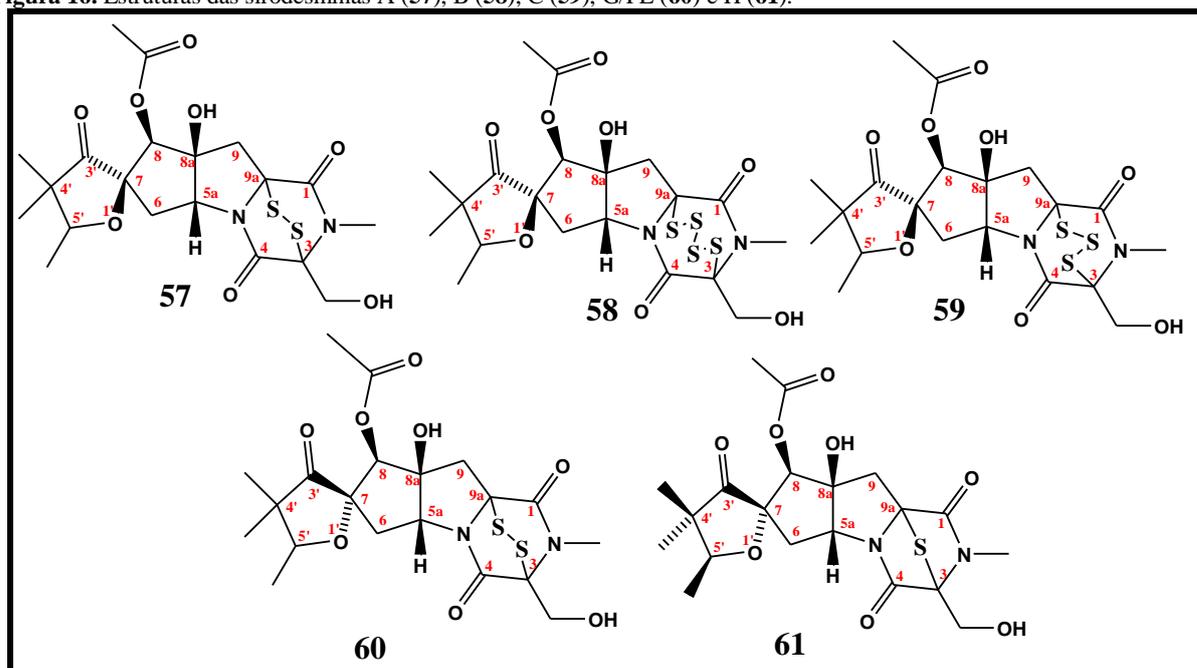
A partir do cultivo de uma linhagem de *Penicillium* sp. de origem marinha por Sun *et al.* em 2012, obtiveram-se dois novos análogos da gliotoxina: Bis(detio)-10a-metiltio-3a-desoxi-3,3a-didehidrogliotoxina (**55**, Figura 15) e 6-desoxi-5a,6-didehidrogliotoxina (**56**, Figura 15).

Figura 15. Estruturas da bis(detio)-10a-metiltio-3a-desoxi-3,3a-didehidrogliotoxina (**55**) e da 6-desoxi-5a,6-didehidrogliotoxina (**56**).



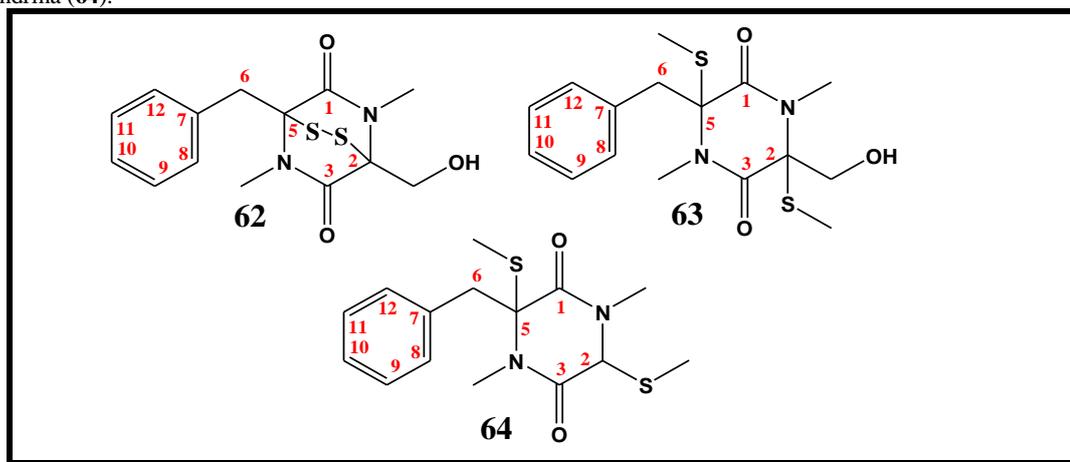
Os primeiros representantes das sirodesminas foram isolados em 1977 por Curtis e colaboradores. As sirodesminas A, B e C (**57**, **58** e **59**, Figura 16) foram os metabólitos majoritários obtidos da cultura do fungo *Sirodesmium diversum*, enquanto a sirodesmina G (**60**, Figura 16) foi um dos obtidos em menores quantidades. Já em 1988, Pedras e Abrams relataram o isolamento, a partir do fungo *Phoma lingam*, da primeira epimontiodioxopiperazina de ocorrência natural – a sirodesmina H (**61**, Figura 16). Interessante observar que as sirodesminas A (**57**, Figura 16) e G (**60**, Figura 16) são epímeros, diferindo apenas na configuração do carbono 7.

Figura 16. Estruturas das sirodesminas A (**57**), B (**58**), C (**59**), G/PL (**60**) e H (**61**).



As hialodendrininas foram descobertas através isolamento da 3-benzil-6-hidroxi-1,4-dimetil-3,6-epiditiopiperazina-2,5-diona, conhecida por hialodendrina (**62**, Figura 17), da cultura do fungo imperfeito *Hyalodendron* sp. (STRUNZ *et al.*, 1973). Dois derivados da hialodendrina foram isolados em 1994, por Savard *et al.*, de uma linhagem de *Penicillium bilaii*: A bisditiol(metil)hialodendrina (**63**, Figura 17) e o seu análogo e provável produto de decomposição, a bisditiodesidroximetildi(metil)hialodendrina (**64**, Figura 17).

Figura 17. Estruturas da hialodendrina (**62**), bisditiol(metil)hialodendrina (**63**) e bisditiodesidroximetildi(metil)hialodendrina (**64**).



As esporidesminas constituem um grupo de micotoxinas relacionadas, produzidas pelo fungo de pastagens *Pithomyces chartarum*, antes chamado de *Sporidesmium bakeri*. Foram descobertas por Syngé e White em 1959, através do isolamento da esporidesmina A de uma linhagem de *P. chartarum*. São bastante conhecidas como agentes causadores de danos hepáticos e eczema facial em bovinos (SMITH *et al.*, 2001). A esporidesmina A (**65**, Figura 18, p. 47) é o principal representante deste grupo, representando mais de 90% dos isolados do mesmo. Os outros 10% são representados pelos seus derivados, esporidesminas, B, C, D, E, F, G, H e J (**66-73**, respectivamente, Figura 18, p. 47), além de derivados sintéticos destas (MORTIMER, RONALDSON, 1983).

A chaetomina (**74**, Figura 19, p. 48) foi primeiramente isolada por Waksman e Bugie, 1944, da cultura de uma linhagem de *Chaetomium cochliodes*. Trata-se de uma substância antibiótica, ativa principalmente contra bactérias Gram-positivas. Sua estrutura só foi elucidada em 1972, por Safe e Taylor. Isolada de uma linhagem do mesmo gênero, *Chaetomium minutum* (HAUSER *et al.*, 1970), a chaetocina (**75**, Figura 19, p. 48) possui atividades antibiótica, citostática e anti-melanoma. Sua estrutura molecular e configuração absoluta foram determinadas em 1970 por Hauser *et al.*, através de métodos químicos e difração de raios-X.

Figura 18. Estruturas das esporideminas A (65), B (66), C (67), D (68), E (69), F (70), G (71), H (72) e J (73).

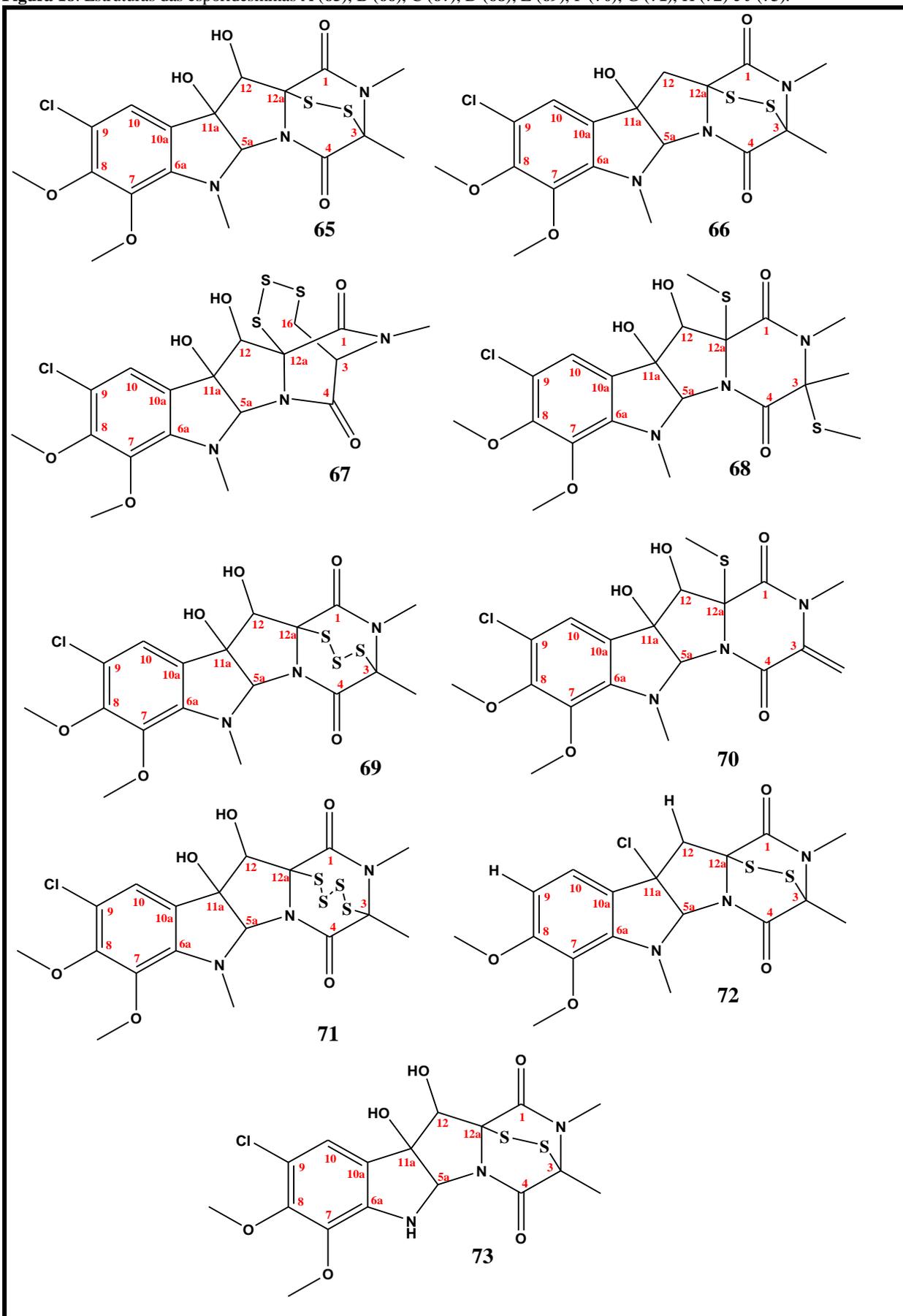
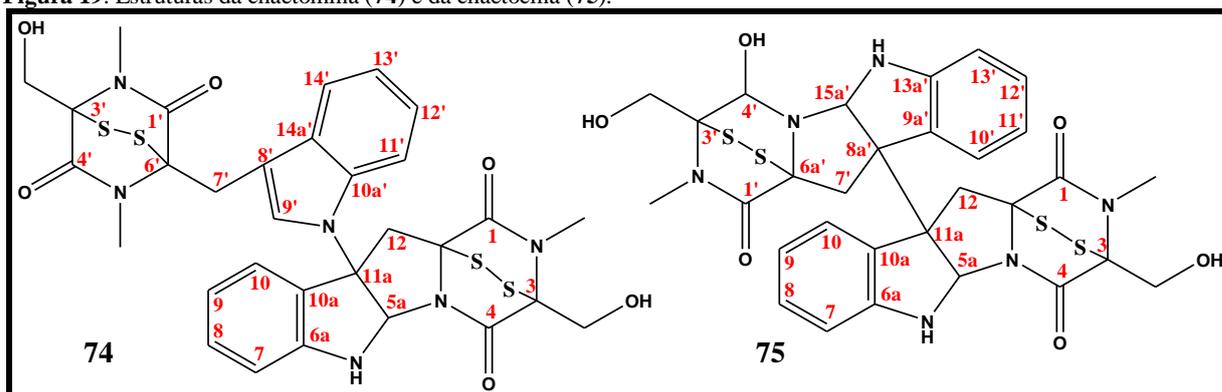


Figura 19. Estruturas da chaetomina (74) e da chaetocina (75).



A verticilina A (**76**, Figura 20, p. 49) foi obtida pela primeira vez em 1970, de uma linhagem de *Verticillium* sp., um fungo imperfeito isolado do basidiocarpo de outra espécie de fungo, *Coltricia cinnamomea*. Trata-se de uma substância ativa contra bactérias Gram-positivas, micobactérias e contra a linhagem de células cancerígenas HeLa. Sua estrutura foi elucidada através de espectroscopia de RMN, IV e UV (KATAGIRI *et al.*, 1970; PÉREZ-BALADO *et al.*, 2009). Alguns anos depois, em 1973, Minato e colaboradores isolaram, da mesma linhagem, as verticilinas B e C (**77** e **78**, respectivamente, da Figura 20, p. 49), as quais apresentaram as mesmas propriedades biológicas da verticilina A (MINATO *et al.*, 1973). Em 1999, o estudo do fungo *Gliocladium catenulatum*, um micoparasita de *Aspergillus flavus*, levou ao isolamento das verticilinas D, E e F (**79**, **80** e **81**, respectivamente, da Figura 20, p. 49) (JOSHI *et al.*, 1999). Em 2007, Zheng e colaboradores obtiveram a verticilina G (**82**, Figura 20, p. 49) de uma linhagem de *Bionectra byssicola*. Os mesmos autores constataram atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*. Em 2011, uma nova ETP da classe das verticilinas foi isolada de uma linhagem de fungo da Família Bionectriaceae, a verticilina H (**83**, Figura 20, p. 49), a qual apresentou atividade citotóxica contra as linhagens de células cancerígenas MCF-7 (câncer de mama), H460 (câncer de pulmão de grandes células), SF-268 (astrocitoma, câncer de cérebro), HT-29 (cólon) e MDA-MB-435 (melanoma) (FIGUEROA *et al.*, 2011).

As leptosinas constituem o último grupo de ETPs diméricas, assim como as chaetominas, chaetocinas e verticilinas. Foram obtidas de uma linhagem de *Leptosphaeria* sp., um fungo isolado da alga marinha *Sargassum tortile*. Ao todo, foram obtidas 19 leptosinas, denominadas Leptosinas A-N (**84-102**, respectivamente, Figura 21, p. 50). Todas apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens de células cancerígenas P388 (leucemia) e algumas também contra o tumor ascítico sarcoma 180.

Figura 20. Estruturas das verticilinas A (76), B (77), C (78), D (79), E (80), F (81), G (82) e H (83).

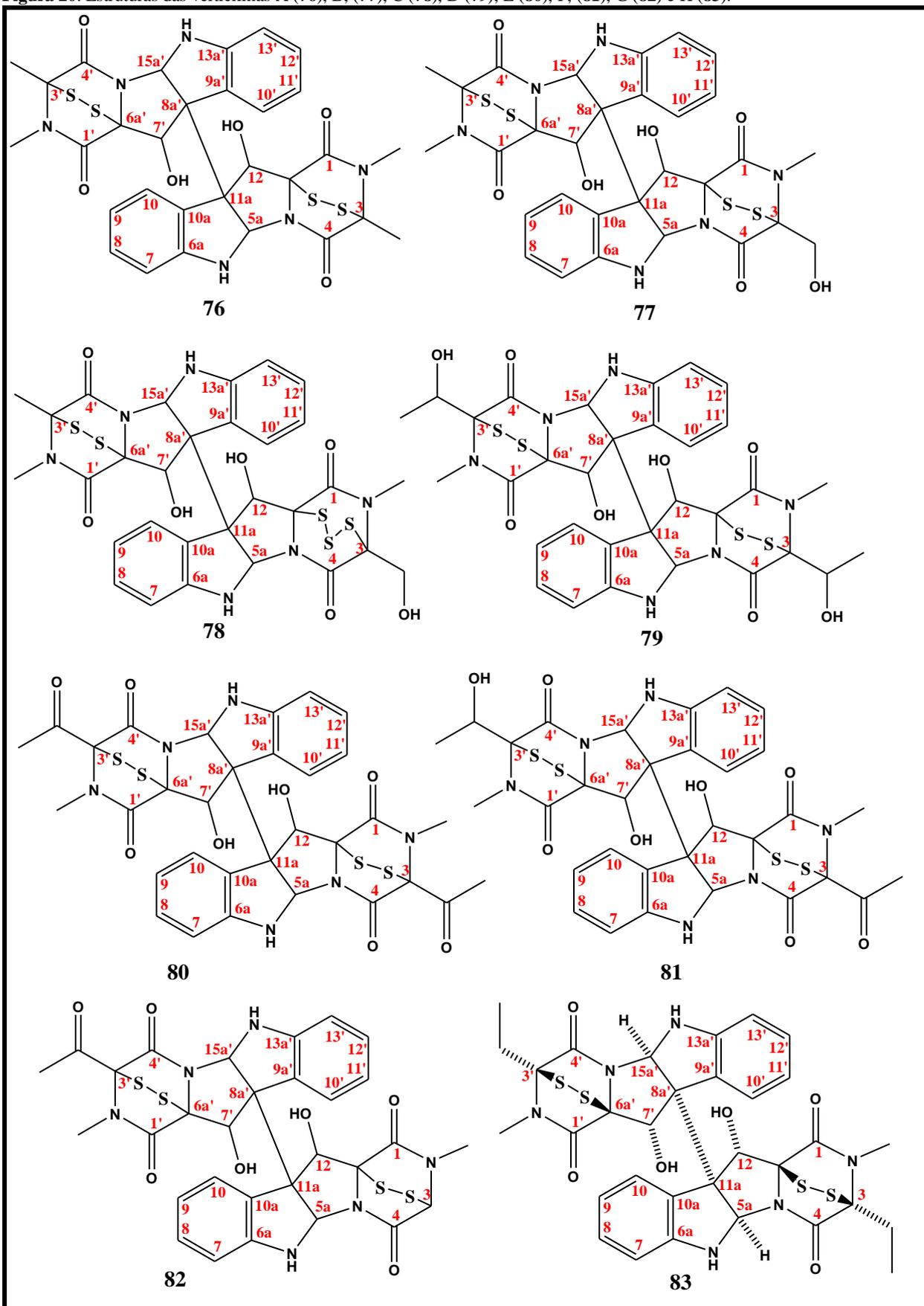
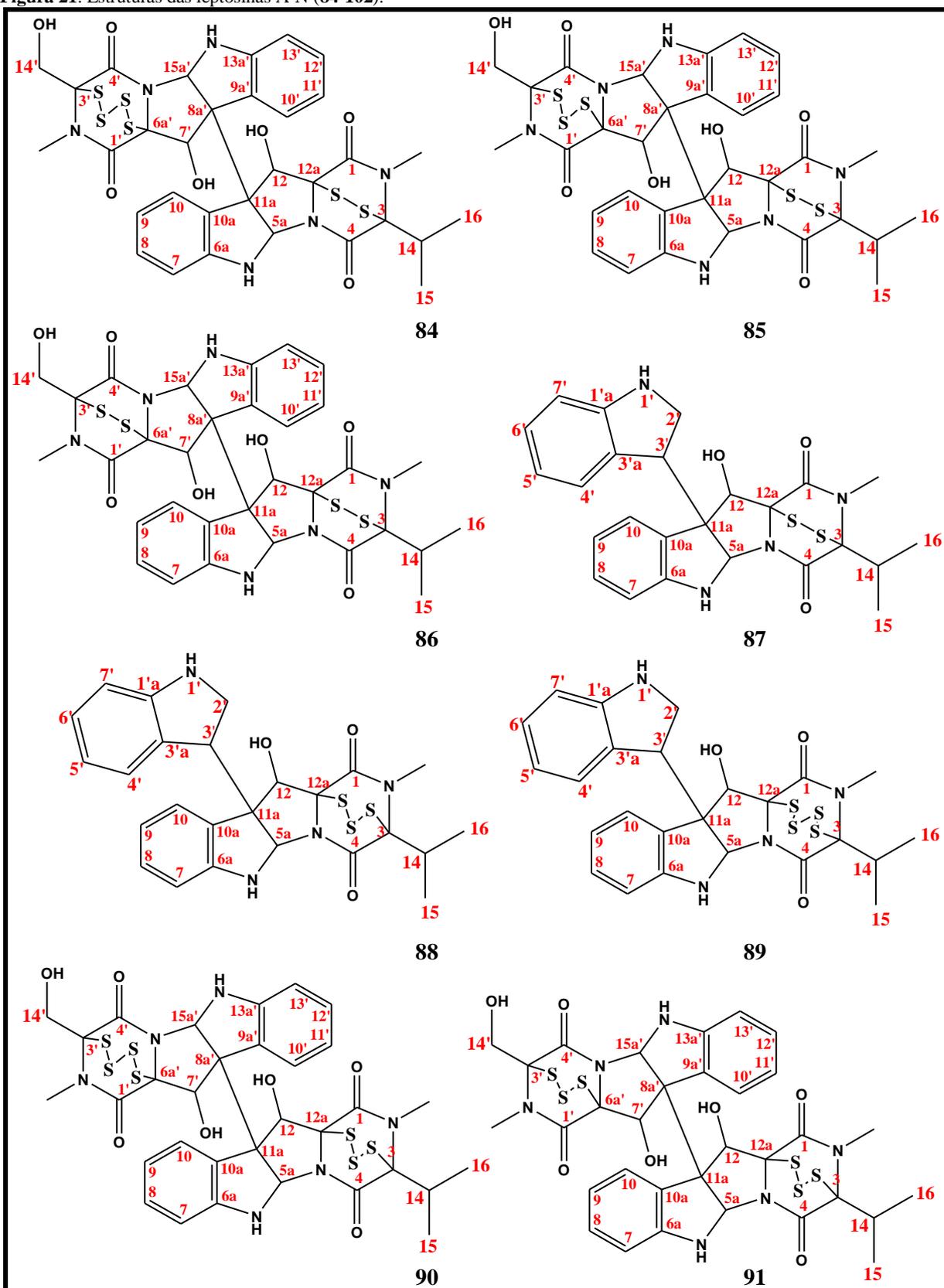
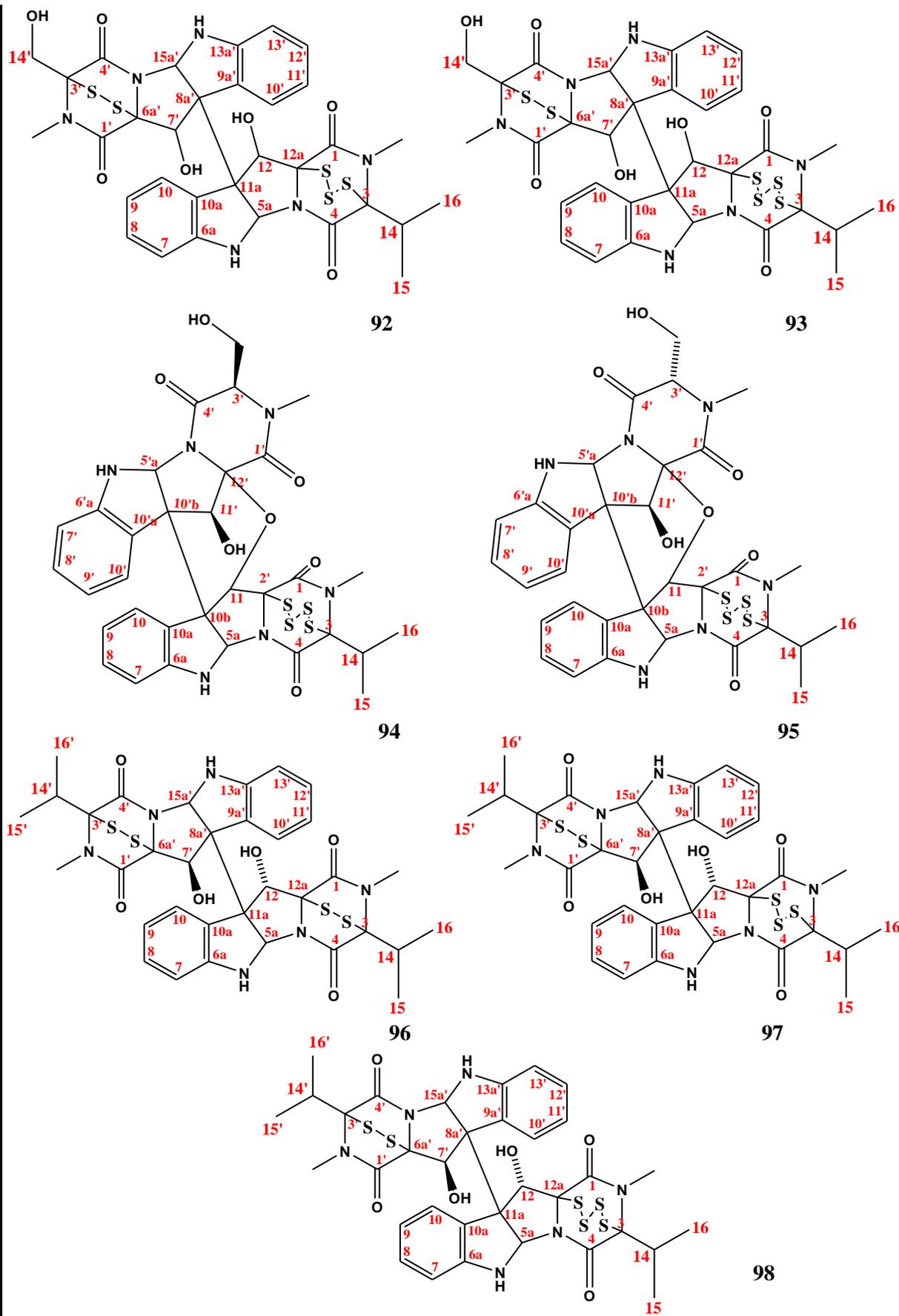
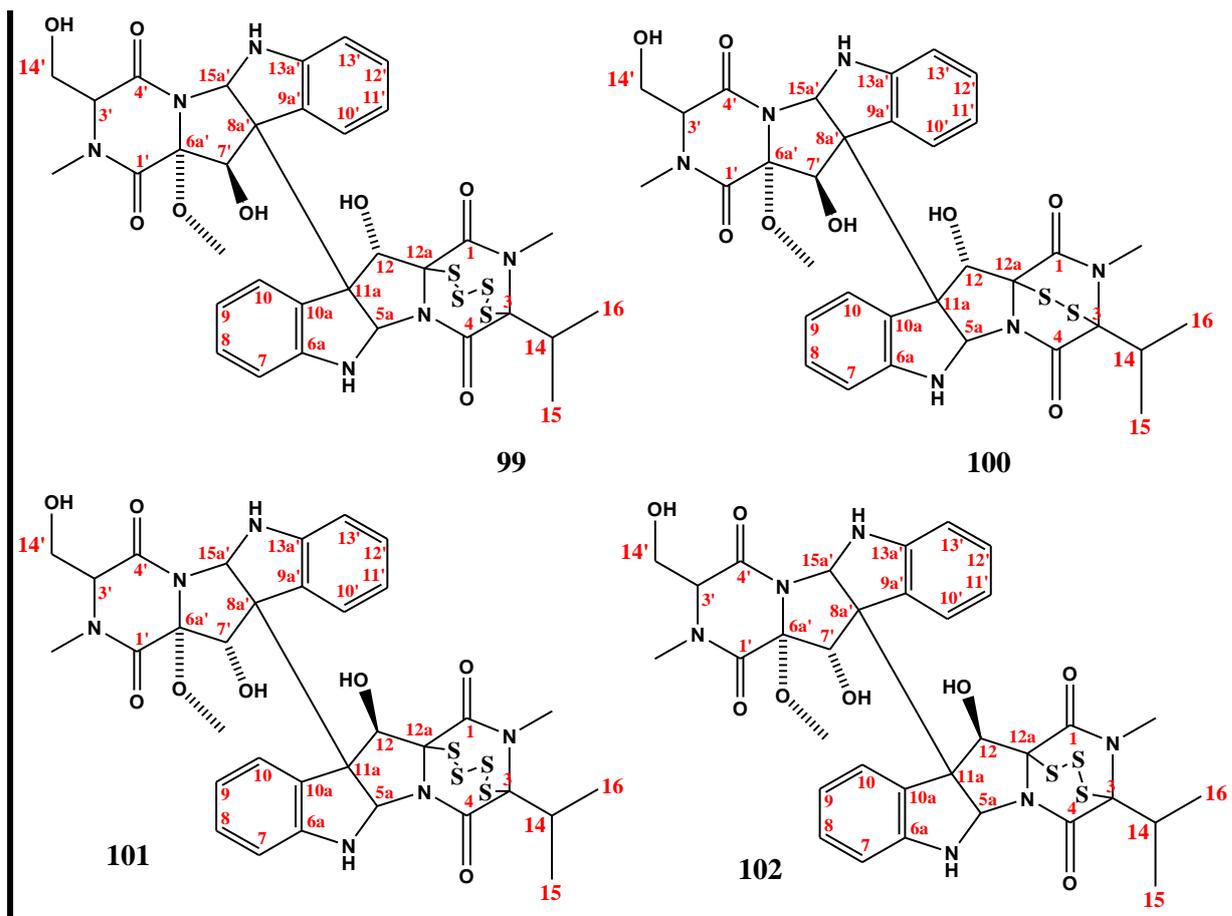


Figura 21. Estruturas das leptosinas A-N (84-102).







A emestrina (**103**, Figura 22, p. 54), uma epipolítiodioxopiperazina com anel macrocíclico, foi obtida pela primeira vez do extrato acetônico de *Emericella striata*, um fungo termotolerante isolado do cominho (*Cuminum cyminum* L.), coletado no Nepal. Sua estrutura é biogeneticamente derivada da combinação de uma molécula de ácido benzoico com uma epiditiodioxopiperazina, formada a partir de duas moléculas de fenilalanina. Seu esqueleto envolve um anel de 15 membros e é o primeiro exemplo de um derivado dioxopiperazínico com anel macrocíclico. Sua estrutura foi elucidada através de métodos químicos, espectroscópicos e cristalografia de raios-X. A emestrina exibiu forte atividade fungicida, testada contra as linhagens de *Gibberella zeae* e *Penicillium expansum* (HIDEYUKI *et al.*, 1986). Apresentou também atividade anticâncer, testada frente às linhagens celulares T47D (câncer de mama), HepG2 (câncer de fígado), C28 (câncer de cólon), HeLa (câncer de colo de útero) (NURSID *et al.*, 2011).

Nos ano seguinte, em 1987, a epitritiodioxopiperazina emestrina B (**104**, Figura 22, p. 54) foi isolada também do extrato acetônico de *E. striata*. Apresentou atividade inibitória *in vitro* frente aos fungos dermatófitos *Tricophyllum* spp. e *Mycrosporium* spp. (NOZAWA *et al.*, 1987).

Em 1996, a epitetratiodioxopiperazina *secoemestrina* C (**105**, Figura 22, p. 54) foi isolada do meio de cultura do estado de crescimento precoce da linhagem fúngica *Emericella foveolata*. Sua estrutura foi estabelecida a partir de métodos espectroscópicos e investigação química (OOIKE *et al.*, 1996).

Uma nova epitetratiodioxopiperazina relacionada à emestrina, foi descoberta em 2013. Trata-se da *secoemestrina* D (**106**, Figura 22, p. 54) obtida de uma linhagem do fungo endofítico *Emericella* sp. AST0036, isolado de um tecido foliar saudável da leguminosa *Astragalus lentiginosus*. A *secoemestrina* D exibiu forte atividade citotóxica contra as linhagens de células cancerígenas NCI-H460 (câncer de pulmão de células não-pequenas), MCF-7 (câncer de mama), PC-3 M (adenocarcinoma da próstata metastático), CHP-100 (neuroblastoma), SF-268 (câncer do SNC; glioma) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma da mama), sendo observada uma moderada seletividade para as duas últimas (XU *et al.*, 2013).

Os ésteres escabrosínicos foram os primeiros ETPs isolados de líquens. Tais ésteres foram inicialmente descritos na literatura em 1978 por Begg e colaboradores, tendo sido isolados do líquen *Xanthoparmelia scabrosa*, originário da Austrália. As estruturas propostas por estes autores foram revisadas e corrigidas, em 1999, por Ernest-Russell e colaboradores, os quais estabeleceram a presença de um anel dicetopiperazínico com uma ponte dissulfeto, caracterizando-os como ETPs. Os ésteres escabrosínicos são moléculas simétricas que possuem duas hidroxilas de álcoois esterificadas e dois anéis epóxidos. Cinco ésteres escabrosínicos (**107-111**, Figura 23, p. 55) foram isolados, os quais diferem entre si apenas no comprimento das cadeias laterais esterificadas. Duas moléculas de ésteres escabrosínicos foram obtidas em 1998, por Williams e colaboradores, do fracionamento bioguiado do extrato do líquen *Usnea* sp., coletado no Sri Lanka. Na ocasião, porém, os nomes dados a tais substâncias foram “ambewelamidas” A e B (as quais correspondem aos ésteres escabrosínicos 2 e 4, respectivamente), visto que as estruturas dos ésteres escabrosínicos isolados por Begg e colaboradores ainda não haviam sido corretamente elucidadas. Alguns membros da família exibiram atividade citotóxica contra as células cancerígenas mastocitoma P815 (câncer de pele) e células leucêmicas P388 (BEGG *et al.*, 1978; WILLAMS *et al.*, 1998; ERNST-RUSSEL *et al.*, 1999; MOERMAN *et al.*, 2003; CHAI *et al.*, 2004).

Figura 22. Estruturas da emestrina (103), emestrina B (104), secoemestrina C (105) e secoemestrina D (106).

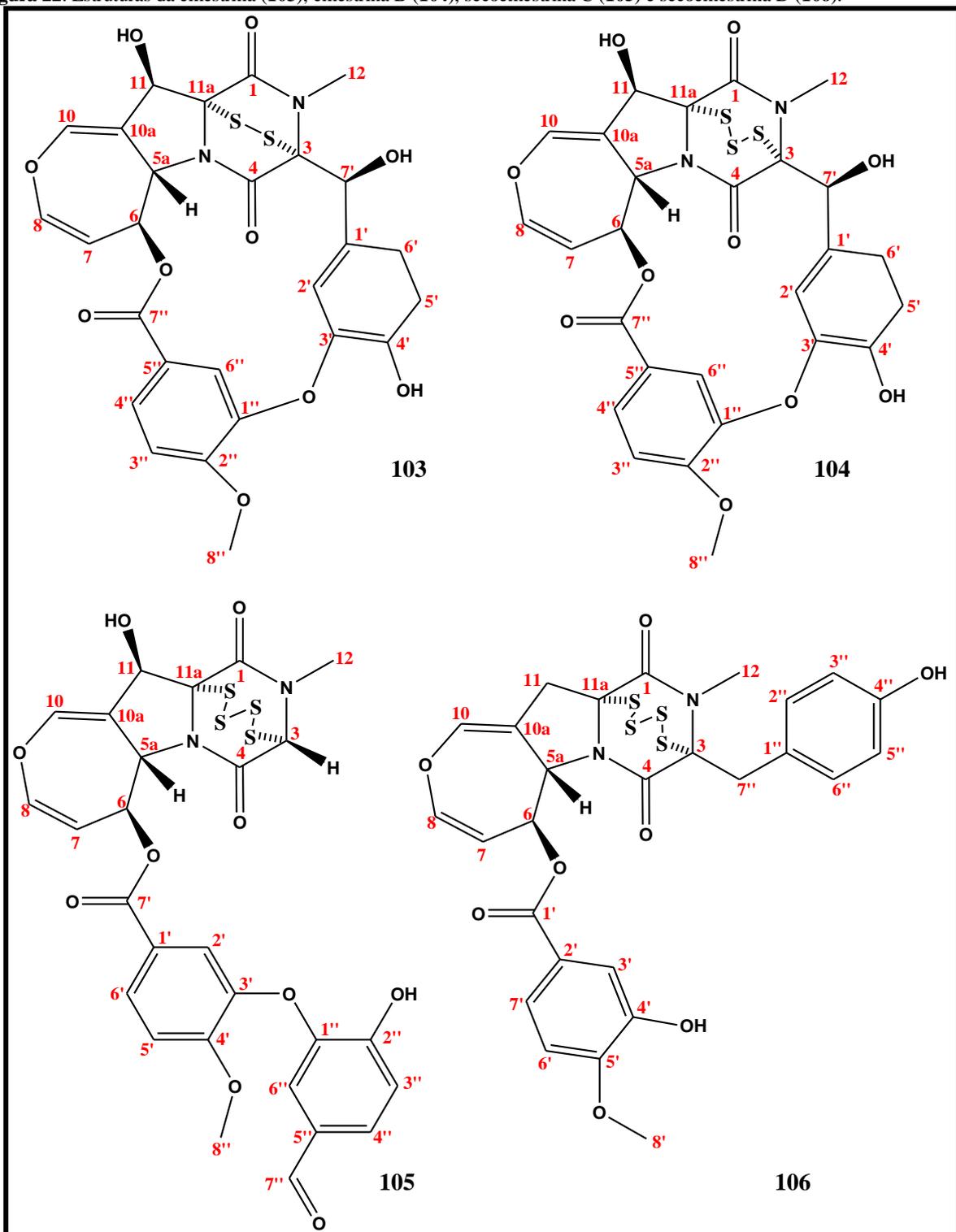
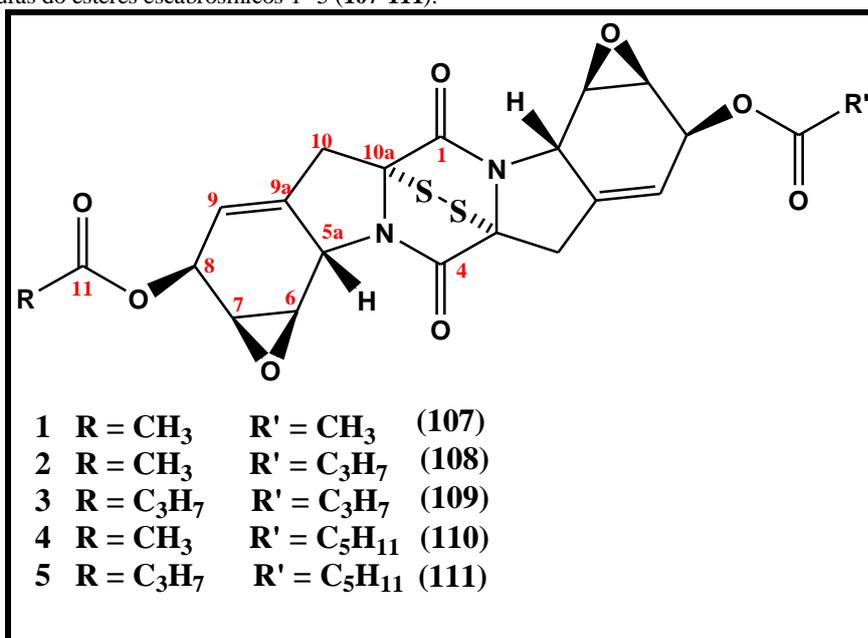
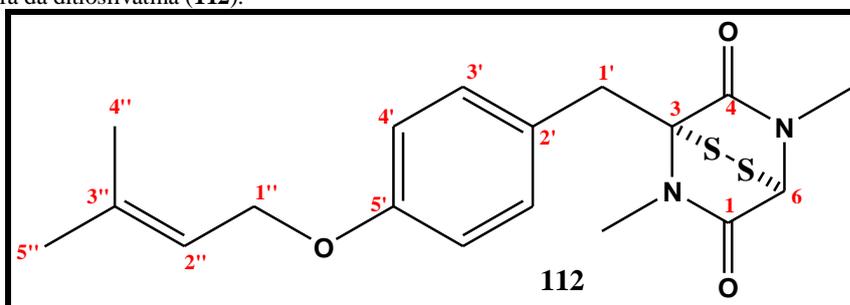


Figura 23. Estruturas do ésteres escabrosínicos 1- 5 (107-111).



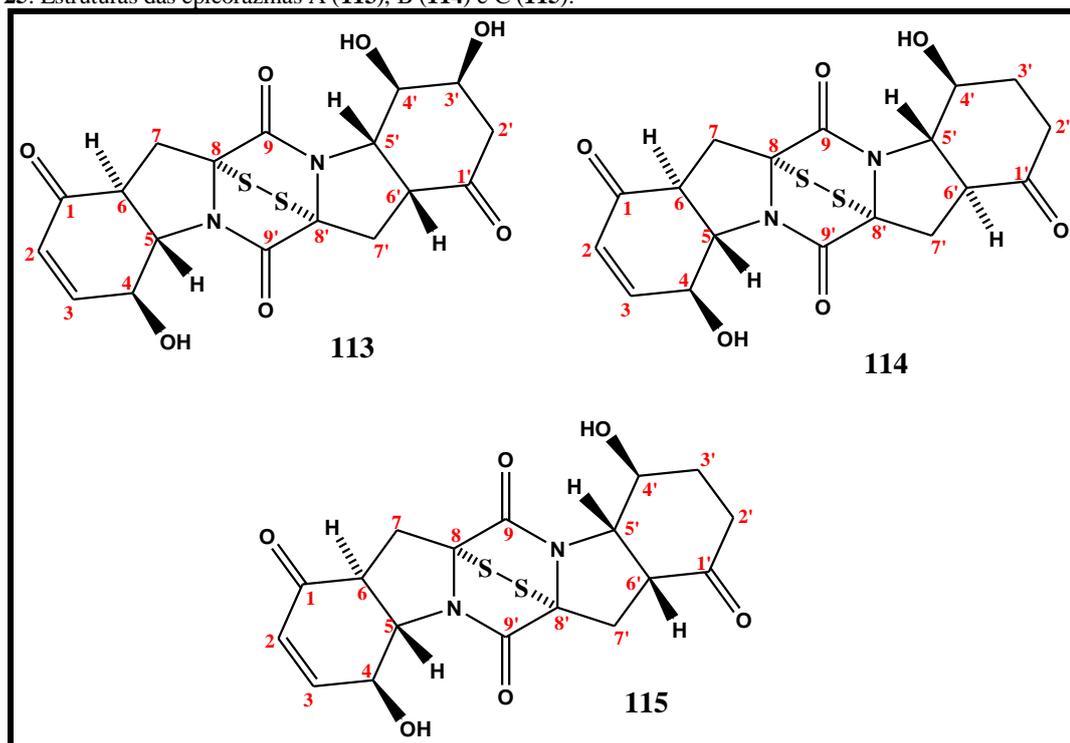
A ditiosilvatina (**112**, Figura 24) foi isolada em 1987 de uma linhagem de *Aspergillus silvaticus* e constitui um raro exemplo de uma ETP biossintetizada, provavelmente, a partir do aminoácido glicina (KAWAHARA *et al.*, 1987).

Figura 24. Estrutura da ditiosilvatina (**112**).



As epicorazinas A (**113**, Figura 25, p. 56) e B (**114**, Figura 25, p. 56), duas ETPs com propriedades antibióticas, foram relatadas na literatura em 1978 por Baute e colaboradores, tendo sido isoladas de uma linhagem de *Epicoccum nigrum*. A outra substância da série, a epicorazina C (**115**, Figura 25, p. 56), também com atividade anti-bacteriana, foi obtida de uma linhagem do basidiomiceto *Stereum hirsutum* em 2001. Suas estruturas foram determinadas por métodos espectroscópicos e difração de raios X (BAUTE, *et al.*, 1978; DEFFIEUX *et al.*, 1978; KLEINWACHTER *et al.*, 2001).

Figura 25. Estruturas das epicorazinas A (113), B (114) e C (115).



Os compostos aranotin, acetilaranotin e bisdetildi(metil)acetilaranotin (**116**, **117** e **118**, respectivamente, Figura 26, p. 57) foram isolados em 1968 de uma linhagem de *Arachniotus aureus*, um fungo com atividade antiviral. Um segundo cultivo deste fungo, no mesmo ano, levou ao isolamento dos análogos apoaranotin e bisdetiodi(metil)acetilapoaranotin (**119** e **120**, respectivamente, Figura 26, p. 57). Suas estruturas foram elucidadas através de métodos espectroscópicos e químicos (NAGARAJAN, *et al.*, 1968; NEUSS *et al.*, 1968).

As emethallicinas A-F (**121-126**, respectivamente, Figura 27, p. 58) foram isoladas do fungo heterotático *Emericella heterothallica* (Kwon *et al.*)⁴ Malloch & Cain, (anamórfico: *Aspergillus heterothallicus* (Kwon *et al.*) e suas configurações absolutas foram estabelecidas por Kawi e colaboradores. As emethallicinas A, B, C, E e F exibiram potente atividade citotóxica frente ao composto 48/80⁵, com valores de IC_{50} iguais a 0,03, 0,08, 1,0 e 0,2 μ M, respectivamente (KAWARA *et al.*, 1989a; KAWARA *et al.*, 1989b; KAWARA *et al.*, 1990a; KAWARA *et al.*, 1990b).

⁴ Autores da classificação taxonômica de *Emericella heterothallica* e *Aspergillus heterothallicus*

⁵ (*p*-metoxy-*N*-metilfenetilamina). Induz a liberação de histamina pelos mastócitos.

Figura 26. Estruturas da arantoin (**116**), acetilarantoin (**117**), bisdetildi(metil)acetilarantoin (**118**), apoarantoin (**119**) e bisdetiodi(metil)acetilapoarantoin (**120**).

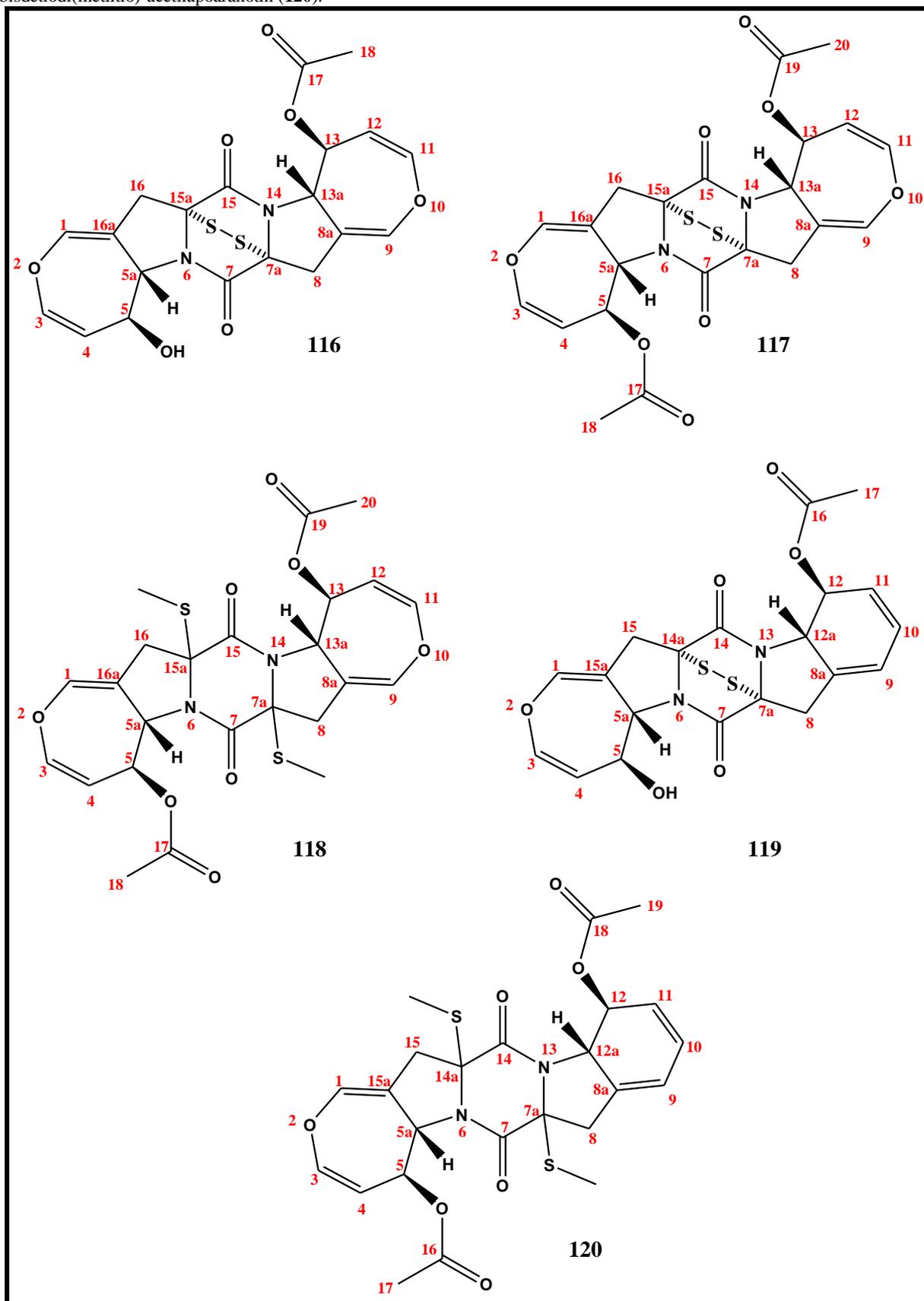
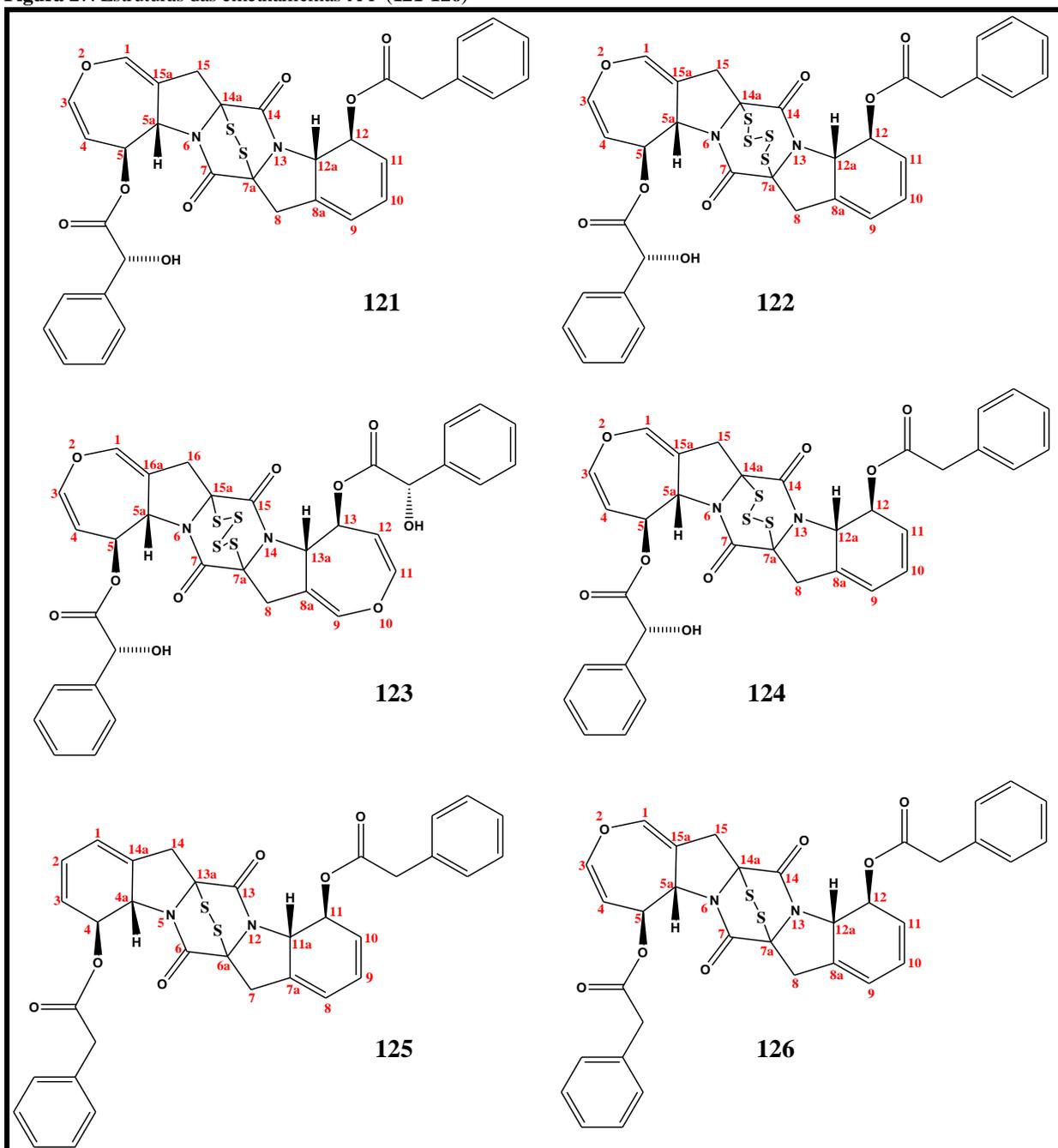


Figura 27. Estruturas das emethallicinas A-F (121-126)



Desde a descoberta da gliotoxina em 1936, mais de uma centena de ETPs foram isoladas, a grande maioria delas exibindo uma extensa variedade de atividades biológicas. A origem dessas atividades biológicas vem sendo sistematicamente estudadas e as observações da relação estrutura-atividade sugerem que a ponte polissulfeto exerce papel fundamental nas bioatividades. Tais conhecimentos são de extrema importância para a formulação e síntese de novos fármacos anticancerígenos. As pesquisas relacionadas à biossíntese das ETPs levou a hipótese de que estas são derivadas de aminoácidos e dipeptídios cíclicos (GARDINER, 2005).

Todavia, a tendência mais plausível é a de que um mecanismo confiável da biossíntese desta classe de compostos só poderá ser proposto quando da identificação do cluster gênico responsável por esse processo. A contínua demanda por novas substâncias com atividade biológica faz com que as pesquisas relacionadas à biossíntese e ao mecanismo de atividade das ETPs ganhem cada vez mais espaço e notoriedade.

A microscopic image showing the branching structure of Aspergillus terreus hyphae. The image is in grayscale and has a soft, semi-transparent appearance. The hyphae are thin, filamentous structures that branch out from a central point. The background is a light, textured gray.

Considerações sobre
Aspergillus terreus

3. Considerações sobre *Aspergillus*

Aspergillus é um dos gêneros mais antigos de fungos de que se tem notícia e recebeu esse nome de Micheli, um padre e biólogo italiano, em 1729. A origem do nome *Aspergillus* remete a um objeto utilizado pela igreja católica romana, durante suas celebrações, para borrifar água benta, chamado “asperges”. Micheli, ao observar o fungo ao microscópio, achou sua morfologia semelhante a tal objeto, e o nomeou de *aspergillum*. Em 1926, Tom e Church publicaram um manuscrito grande e detalhado sobre o gênero *Aspergillus*. Desde então, este se tornou um dos gênero de fungo mais conhecidos e estudados (BENNETT, 2010).

Os fungos do gênero *Aspergillus* crescem abundantemente como saprofitos sobre a matéria orgânica e ocupam uma grande variedade de ambientes. São capazes de se dispersar através das correntes aéreas e de crescer em qualquer lugar, desde que haja disponibilidade de água e nutrientes. Desta forma, este gênero é considerado ubíquo, sendo os fungos pertencentes a ele comumente isolados do solo, restos de plantas, ambientes fechados e úmidos, e também de *habitats* marinhos (PITT, 1994). Este último se deve à particularidade dos fungos deste gênero de tolerarem altas concentrações salinas, sendo, portanto, considerados fungos marinhos facultativos, similares aos isolados do ambiente terrestre. No entanto, as linhagens oriundas do ambiente marinho podem produzir metabólitos secundários incomuns, como consequência da adaptação ao estresse do ambiente marinho (GEISER, 2008).

Esporos de *Aspergillus* são transportados pelas correntes aéreas e estão por toda parte. Logo, estamos sob constante exposição a esses fungos, sem que sejam observados maiores danos à saúde. Todavia, há registros de diversos casos de malefícios causados por *Aspergillus*. Este gênero compreende mais de 250 espécies, sendo em torno de 40 delas patógenas aos seres humanos. Os danos causados por *Aspergillus* se dão por basicamente três vias: Liberação de micotoxinas; respostas alérgicas e infecções (BENNETT, 2010; KLICH, 2006). As micotoxinas são substâncias tóxicas aos animais e plantas e atuam quase sempre através da ruptura de estruturas celulares, com consequente colapso do funcionamento normal do organismo. Dentre as micotoxinas produzidas por *Aspergillus* podemos citar as aflatoxinas, produzidas por *A. flavus* e *A. parasiticus*; ochratoxinas, produzidas por *A. ochraceus*; e gliotoxinas, produzida por *A. fumigatus* e outros gêneros. As infecções por *Aspergillus* são conhecidas como aspergiloses e ocorrem quase sempre em pacientes imunocomprometidos. A via de entrada é aérea e são ocasionadas, basicamente, por apenas uma espécie: *A. fumigatus* (BENNETT, 2010; LATGE, 1999; LATGE, STEINBACH, 2009).

Revisões da literatura mostram que fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* constituem um dos maiores produtores de metabólitos secundários bioativos (LEE *et al.*, 2013). O principal exemplo de metabólito secundário oriundo de uma espécie de *Aspergillus* utilizado na medicina é a lovastatina (6, Figura 2, p. 26), vendida pelo nome comercial MevacorTM. A lovastatina foi isolada de uma linhagem de *Aspergillus terreus* (ALBERTS, 1998) por um grupo de pesquisadores da Merck e foi amplamente utilizada no tratamento de desordens coronarianas (SHU, 1998).

3.1 *Aspergillus terreus*

Um das espécies mais conhecidas do gênero *Aspergillus* é a *A. terreus*. Trata-se de um fungo filamentosos, saprofítico, usualmente encontrado no solo e em regiões tropicais e subtropicais. Assim como outras espécies do gênero, *A. terreus* é um fungos cosmopolita, havendo diversos relatos de seu isolamento a partir de sedimentos e animais marinhos (WANG *et al.*, 2011; PARVATKAR *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2003;) e manguezais (SHEN *et al.*, 2012).

A primeira descrição morfológica desta espécie foi realizada por Tom e Church (1918). *A. terreus* designava linhagens que apresentavam uma série de características morfológicas em comum, mas que poderiam, ocasionalmente, exibir variações nas cores e formas do halo de crescimento. As colônias costumam apresentar aparência aveludada e coloração com tons marrons, que escurecem com o passar do tempo. Há variedades cujas colorações dos halos podem variar do marrom para o amarelado, e deste para o branco, do centro para as bordas (Figuras 28 e 29, p. 63) (TOM, CHURCH, 1918).

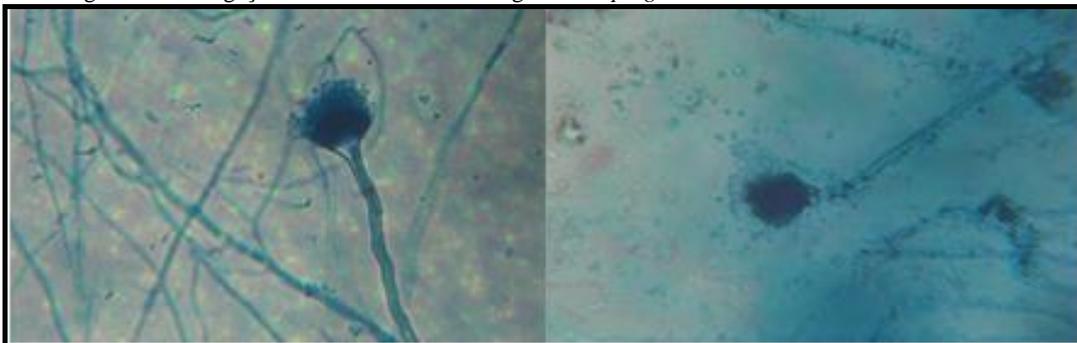
A. terreus é, ocasionalmente, um patógeno humano relativamente resistente à anfotericina B⁶, podendo causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, formar colônias no canal auditivo externo humano e causar infecção cerebral, embora haja poucos relatos deste último (WALSH *et al.*, 2003; TRITZ e WOODS, 1993; TIWARI *et al.*, 1995; DAMEK *et al.*, 2008).

⁶ Fármaco amplamente utilizado como antifúngico (WU, 1994; DISMUKES, 2000).

Figura 28. Fotografia da linhagem de *Aspergillus terreus* em BDA.

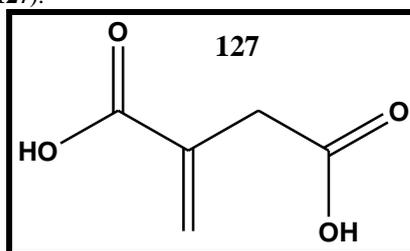


Figura 29. Fotografia do esfregaço do microcultivo da linhagem de *Aspergillus terreus* em lâmina.



A. terreus é um fungo de importância farmacêutica e industrial. Foi a partir dele que se obteve pela primeira vez a lovastatina (6, Figura 2, p. 26), substância capaz de inibir a biossíntese do colesterol, e que é amplamente comercializada para o tratamento de doenças coronarianas e arteriosclerose sob o nome MevacorTM (ALBERTS, 1998; SHU, 1998). Esta espécie também é bastante utilizada industrialmente para a produção do ácido itacônico⁷ (127, Figura 30) e da enzima xilanase⁸ (KOCABAS *et al.*, 2014).

Figura 30. Estrutura do ácido itacônico (127).



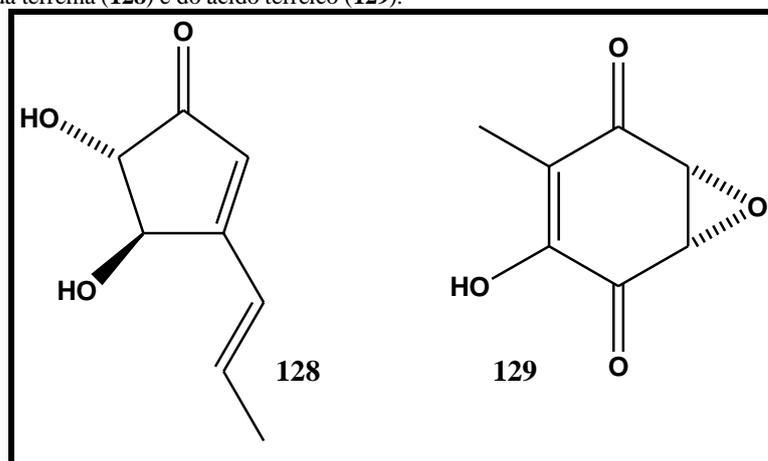
A primeira substância relatada como sendo obtida de *A. terreus* foi a terreína (128, Figura 31, p. 64), em 1934 (RAISTRICK, SMITH, 1935). Desde então, a bioprospecção de

⁷Usado principalmente como co-mônômero na produção de estireno-butadieno-acrilonitrila látex e do acrilato. Possui aplicações na indústria do papel e revestimento de arquitetura (KOCABAS *et al.*, 2014).

⁸Degrada o polissacarídeo linear beta-1,4-xilano em xilose, o que leva à decomposição da hemicelulose, principal componente da parede celular dos vegetais (DASHEK, 1997). Utilizada nas indústrias de papel e têxtil, na manufatura de sucos de frutas e bebidas, na produção de alimentos para animais, dentre outras (GMO Database).

metabólitos secundários nesta espécie não parou. Já em 1949, foi obtido um metabólito com propriedades antibióticas, o qual foi denominado ácido terreico (**129**, Figura 32, p. 65) (ABRAHAM, FLOREY, 1949). Uma classe de compostos bastante relatados na literatura como obtidos de *A. terreus* são os butenolídeos: Aspulvinonas A-G (**130-136**, respectivamente, Figura 32, p. 65) e derivados; butirolactonas I-VII (**137-143**, respectivamente, Figura 33, p. 66) e derivados; e os aspernolídeos A-D⁹ (**144-146**, respectivamente, Figura 33, p. 66) e derivados. Esses butenolídeos são derivados de fenilpropanoides¹⁰ (C6-C5), e alguns deles apresentam diversas atividades, como anticâncer, antiplasmodial e antioxidante (PARVATKAR *et al.*, 2009). Outras substâncias com atividade biológica foram ainda obtidas deste fungo. Os monoterpênicos isoterreulactona A (**147**, Figura 34, p. 67) e terreulactonas A-D (**148-151**, respectivamente, Figura 34, p. 67) apresentaram inibição da acetilcolinesterase com valores de IC_{50} variando de 0,06 a 2,5 μM (KIM *et al.*, 2003; YOO *et al.*, 2005). Da mesma maneira, as territrens A, B e C (**152-154**, respectivamente, Figura 34, p. 67) apresentaram inibição da acetilcolinesterase com valores de IC_{50} variando de 6,8 a 7,6 μM (KUNO *et al.*, 1996). A terreusinona (**155**, Figura 34, p. 67), isolada de uma linhagem marinha de *A. terreus*, apresentou capacidade de absorção da radiação UV-A com valores de ED_{50} de 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LEE *et al.*, 2003).

Figura 31. Estruturas da terreína (**128**) e do ácido terreico (**129**).



⁹ Aspernolídeo C é idêntico à butirolactona VI. Ambos foram relatados em artigos diferentes, no mesmo período, como metabólitos secundários obtidos de *A. terreus* (NUCLEAR *et al.*, 2010).

¹⁰ Compostos orgânicos sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina, os quais contém um anel aromático ligado a uma cadeia lateral propila (VOGT, 2010).

Figura 32. Estruturas das aspulvinonas A (130), B (131), C (132), D (133), E (134), F (135) e G (136).

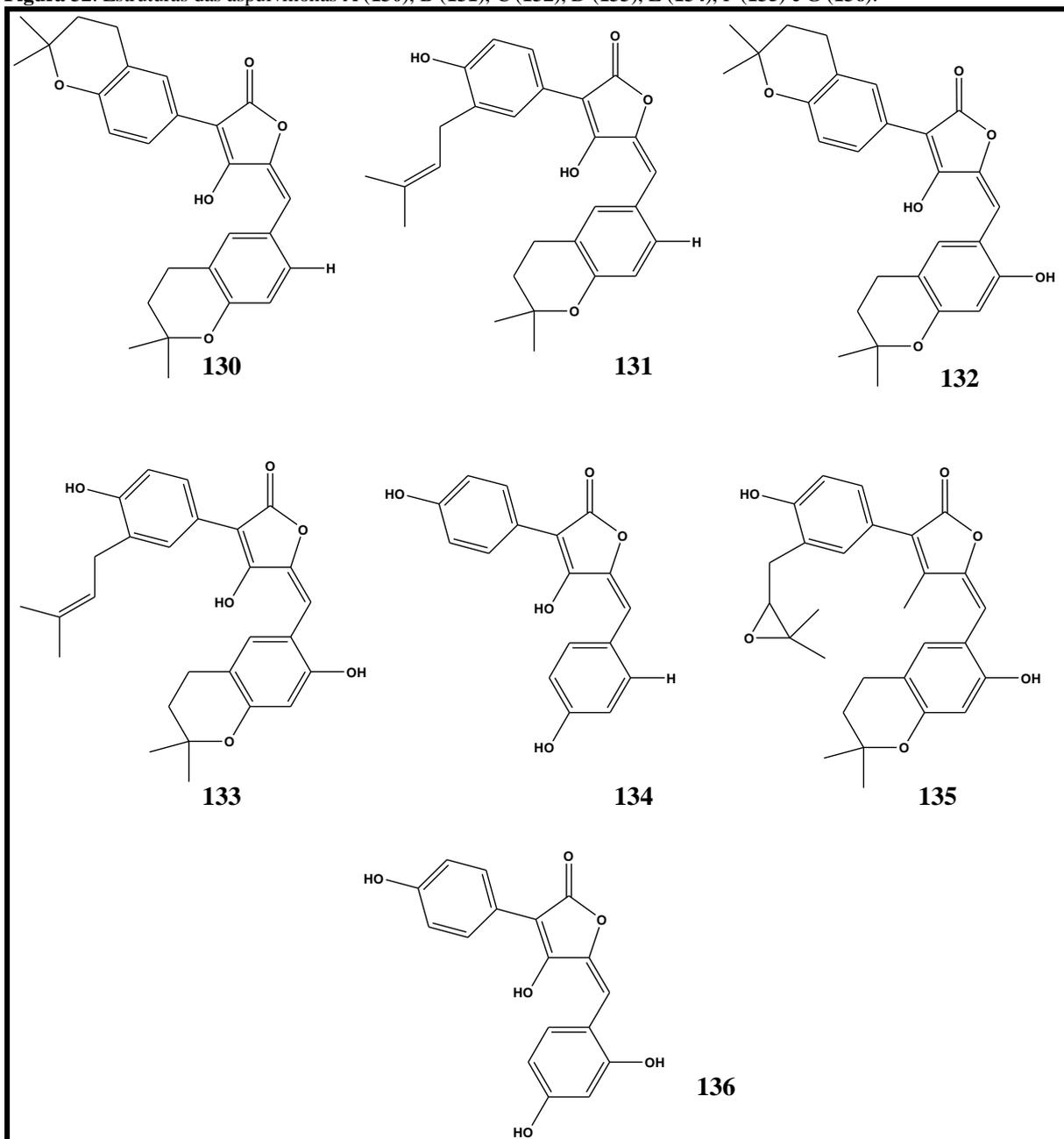


Figura 33. Estruturas das butirolactonas I (137), II (138), III (139), IV (140), V (141), VI (142) e VII (143) e dos aspernolídeos A (144), B (145) e C (146).

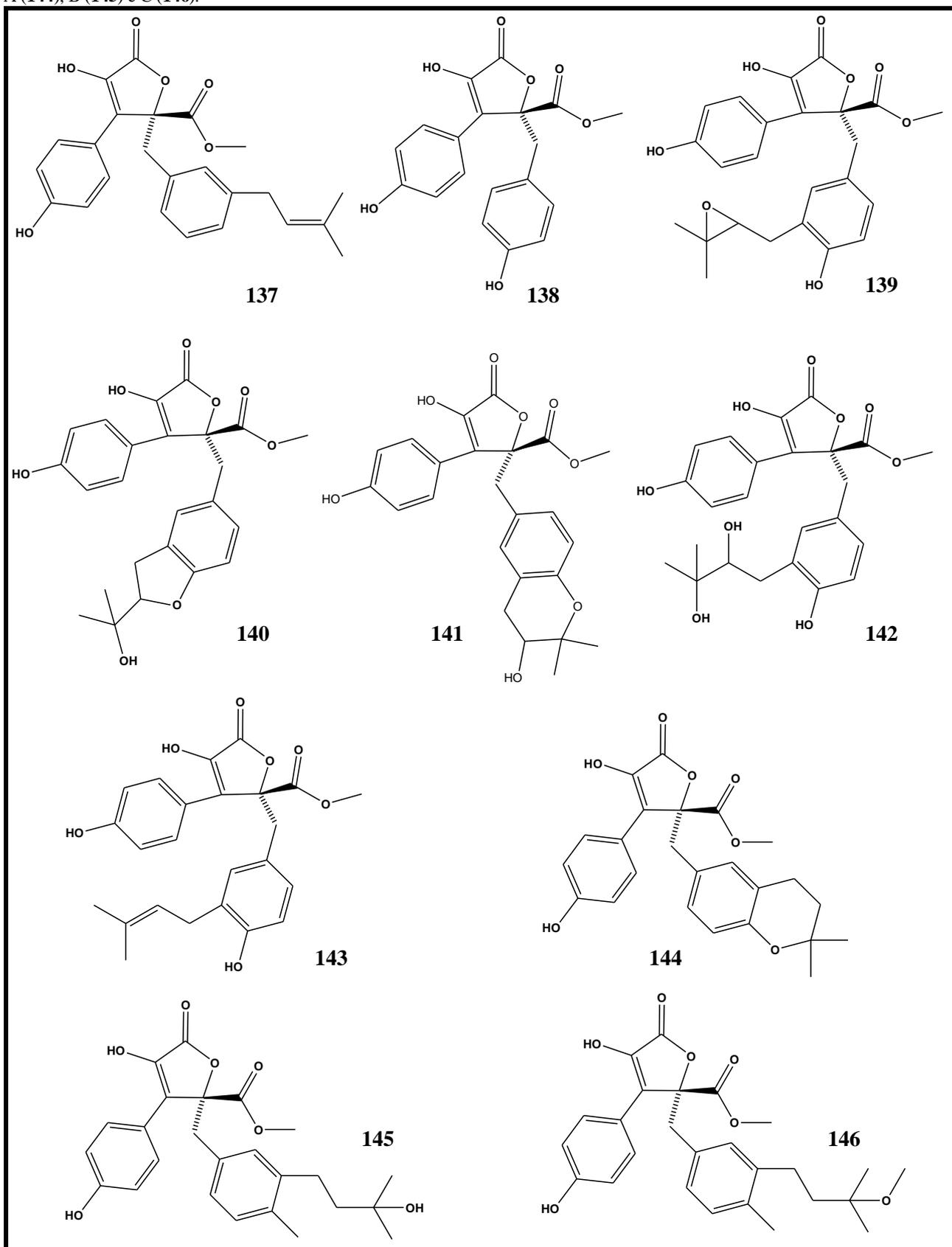
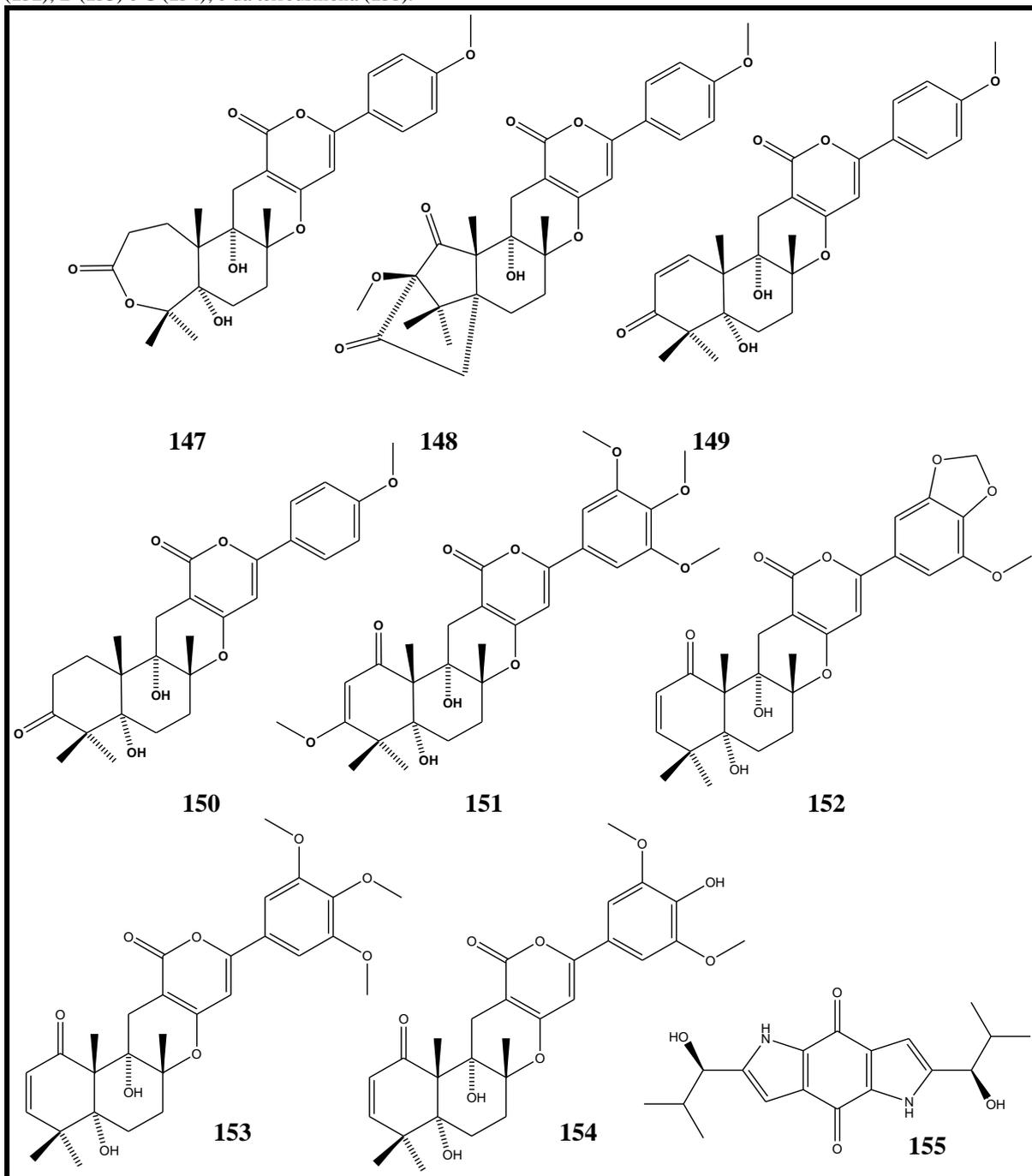
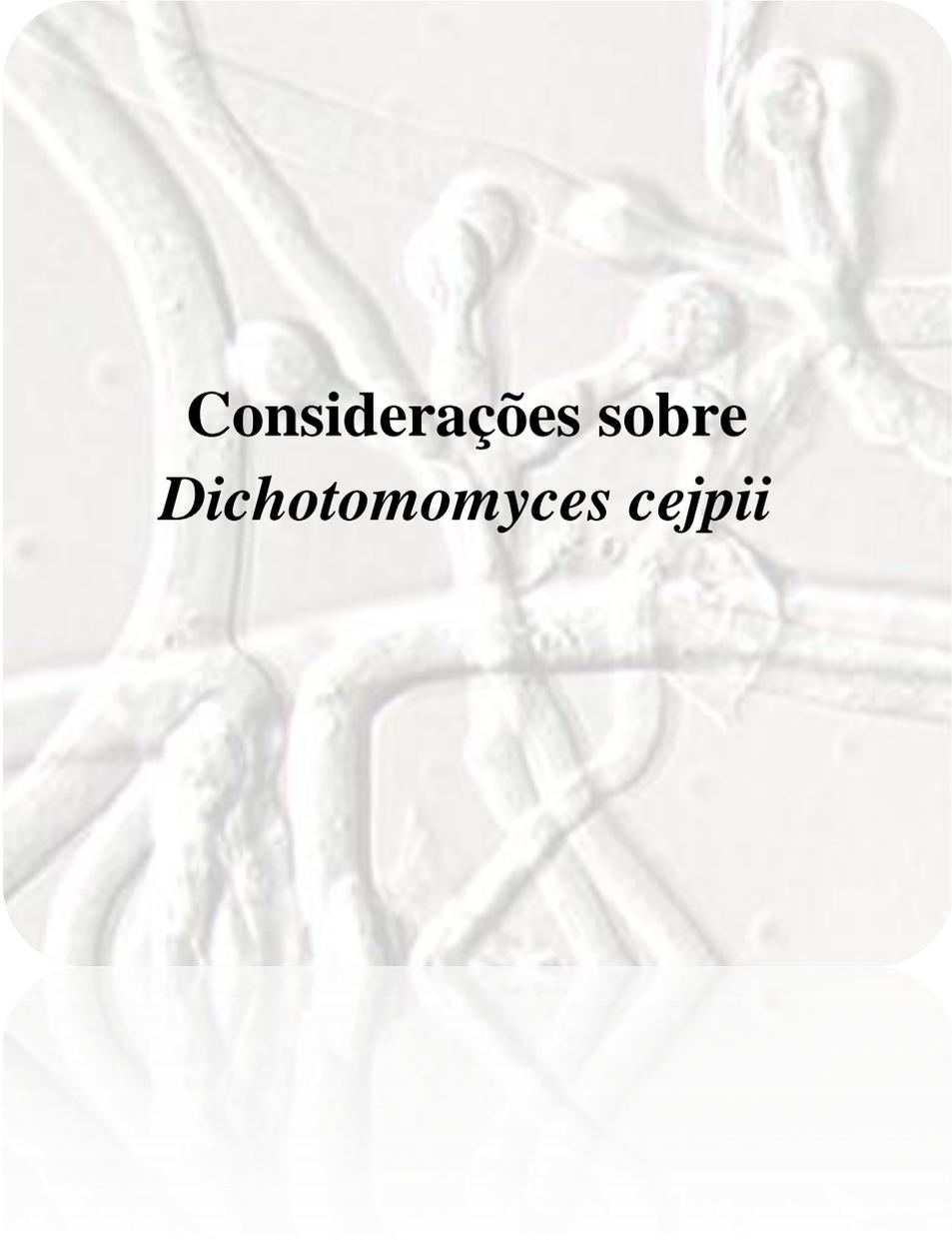


Figura 34. Estrutura: Da isoterreulactona A (**147**); das terreulactonas A (**148**), B (**149**), C (**150**) e D (**151**); das territrens A (**152**), B (**153**) e C (**154**); e da terreusinona (**155**).



A microscopic image showing the branching structure of the fungus *Dichotomomyces cejpui*. The hyphae are thick and exhibit a characteristic dichotomous branching pattern. The image is presented in a light, semi-transparent style with rounded corners, serving as a background for the title text.

Considerações sobre
Dichotomomyces cejpui

4. Considerações sobre *Dichotomomyces*

O gênero *Dichotomomyces* só abrange uma espécie, *D. cejpai* (Figuras 35 e 36), e foi descrito em 1949 por Saito, no Japão, sob o nome *D. albus* (SAITO, 1949). Este gênero é um teleomorfo¹¹ do gênero *Aspergillus*, subgênero *Fumigati*, seção *Clavati* (SAMSON, VARGA, 2010), havendo poucos trabalhos relatados na literatura a respeito desta espécie.

Figura 35. Fotografia de uma linhagem de *D. cejpai* em BDA.

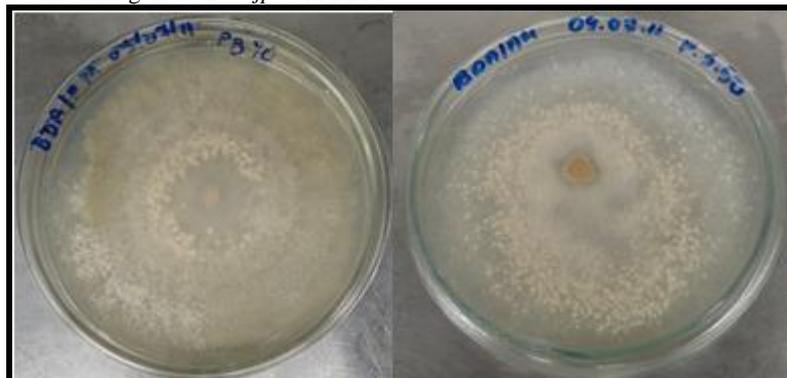
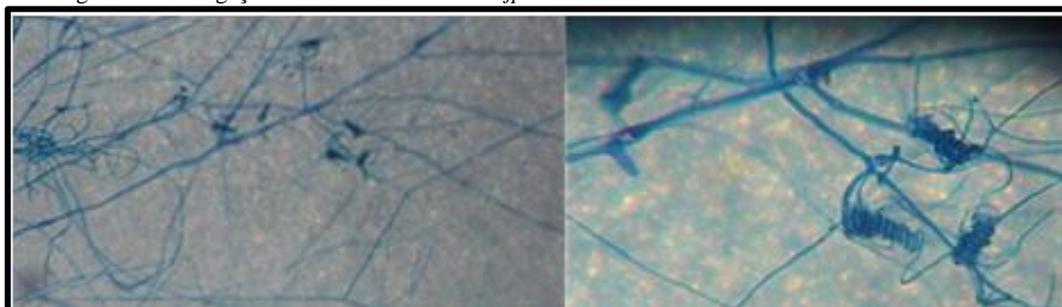


Figura 36. Fotografia do esfregaço do microcultivo de *D. cejpai* em lâmina.



4.1 *Dichotomomyces cejpai*

Como mencionado anteriormente, a espécie *D. cejpai* foi inicialmente denominada *D. albus* (SAITO, 1949). Porém, esse nome não era de origem latina, contrariando as regras de nomenclatura das espécies. Em 1964, na Rússia, Mil'ko também descreveu a mesma espécie, porém, interpretou erroneamente suas estruturas morfológicas, levando a uma atribuição equivocada ao gênero *Talaromyces*, espécie *Talaromyces cejpai* (MIL'KO, 1964). Em 1970, Scott descreveu detalhadamente a espécie e validou seu nome como *D. cejpai* (SCOTT, 1970).

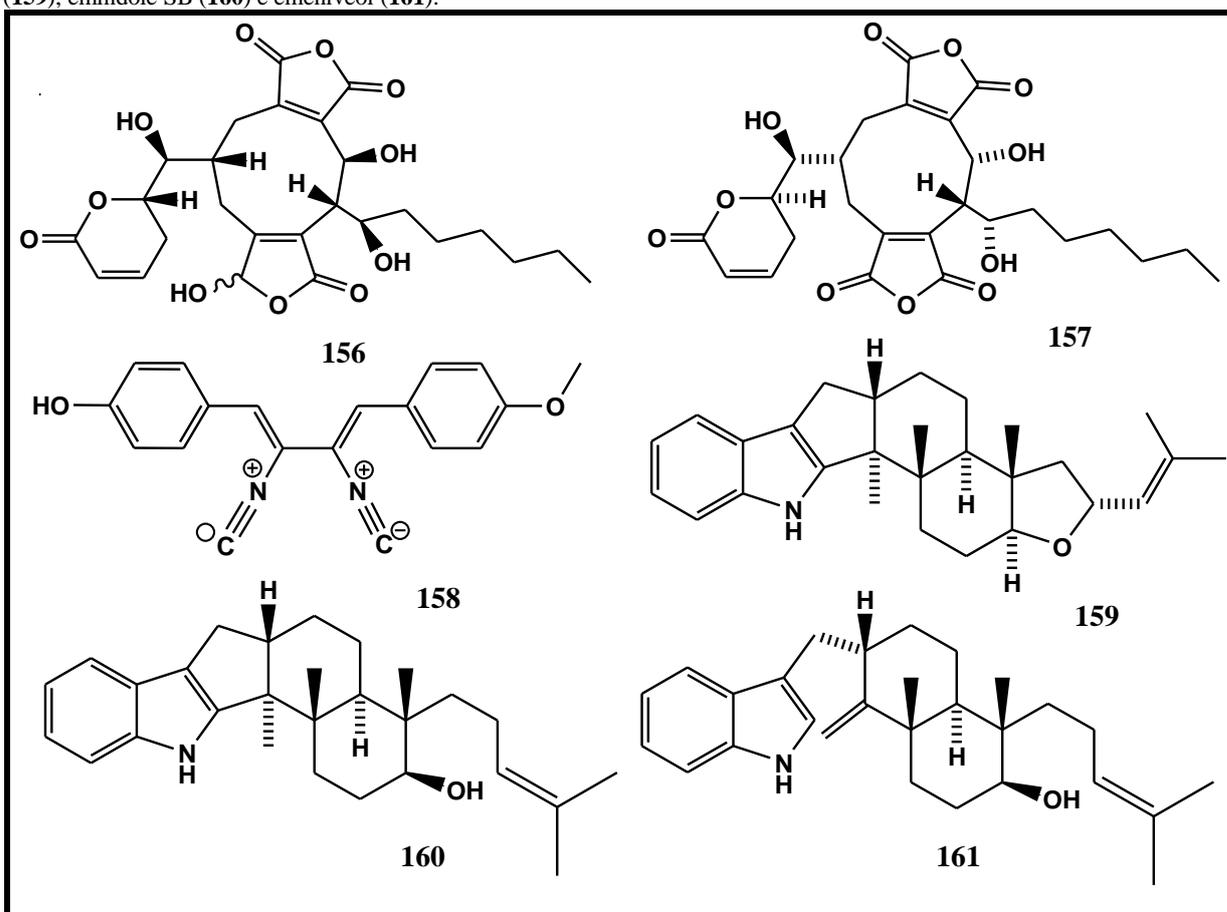
D. cejpai pertence à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, e caracteriza-se pela presença de aleuroconídios em conidióforos curtos e ramificados e também por ascósporos em cleistotécio. Esta espécie é bastante resistente ao aquecimento e pode ser encontrada em todo o mundo no solo e no ambiente marinho. Quando crescido nos meios extrato de malte-ágar ou

¹¹ Teleomorfo ou estado meiospórico é o nome dado à forma de um fungo capaz de se reproduzir sexuadamente (GARRO *et al.*, 1999).

batata-dextrose-ágar, seu micélio possui um aspecto que varia do flocoso ao granuloso, com coloração que varia do branco ao creme (SCOTT, 1970; VARGA *et al.*, 2007).

Foi relatada a obtenção de metabólitos secundários bioativos de *D. cejpii*, como a gliotoxina (46, Figura 11, p. 43), uma micotoxina com propriedades antitumorais; as rubratoxinas A e B (156 e 157, Figura 37), uma micotoxina hepatotóxica; a xantocilina X monometiléter (158, Figura 37), uma substância com amplo espectro de atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica; os indoloditerpenos JBIR-03, emindole SB e emeniveol (159-161, Figura 37), considerados micotoxinas tremorgênicas¹²; além de diversos outros metabólitos com propriedades antibióticas e ciliostáticas (SEIGLE-MURANDI *et al.*, 1990; VARGA *et al.*, 2007; KITAHARA, ENDO, 1981; QIAO *et al.*, 2010; PIECKOVÁ, ROEIJMANS, 2000).

Figura 37. Estruturas das rubratoxinas A (156) e B (157); da xantocilina X monometiléter (158); dos indoloditerpenos JBIR-03 (159), emindole SB (160) e emeniveol (161).



¹² Neurotoxinas que produzem diferentes graus de tremores ou convulsões que podem durar horas ou dias (SCHELL, 2000).



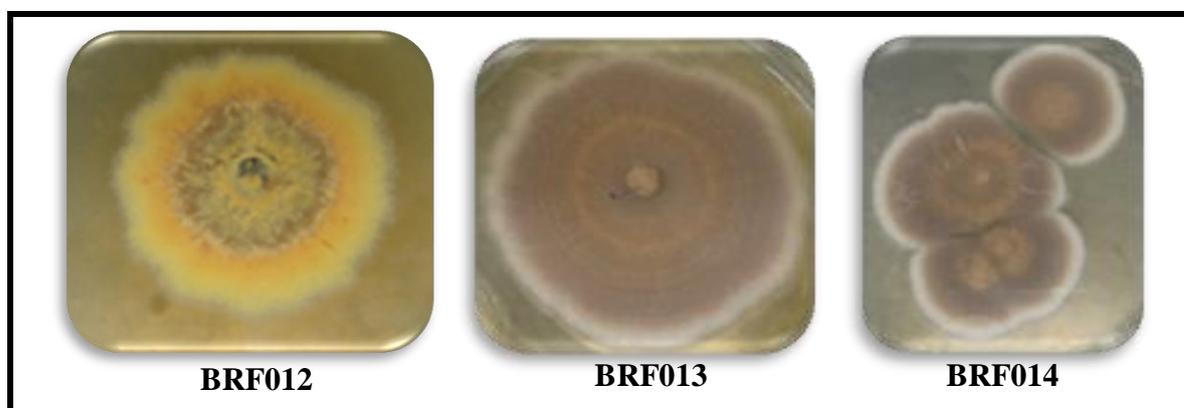
5. Resultados e discussão

5.1 Isolamentos de fungos dos sedimentos das praias do Mucuripe e Pecém - Ceará

Sedimentos marinhos constituem uma importante fonte de fungos produtores de metabólitos secundários bioativos (RATEB *et al.*, 2011). Baseando-se nisso, realizou-se uma bioprospecção de metabólitos secundários bioativos oriundos de fungos isolados de sedimentos do litoral cearense. As amostras de sedimentos marinhos foram coletadas das praias do Mucuripe e Pecém – Ceará, por mergulho autônomo¹³, pelo grupo de Ecotoxicologia Marinha da Universidade Federal do Ceará.

Este trabalho levou ao isolamento de trinta e cinco linhagens de fungos dos sedimentos da praia do Mucuripe (3°43'17,70''S; 38°29'23,84''O - Fortaleza-CE) (**BRF012-BRF046**, Figura 38) e quarenta e oito da praia do Pecém (3°32'2''S; 38°47'58''O - Pecém-CE) (**BRF047-BRF094**, Figura 39, p. 75), conforme metodologia descrita no item 6.1 p. 238, do Procedimento Experimental. A diferenciação das linhagens foi realizada, inicialmente, com base nas distinções morfológicas das mesmas, crescidas em meio semi-sólido batata-dextrose-ágar (BDA) com água do mar sintética (Itens, 6.5.1.1 e 6.5.1.3, p. 242). Devido ao custo do processo de identificação das espécies, resolveu-se submeter a este procedimento apenas aquelas que apresentassem extratos com atividade citotóxica considerável (> 70%) (Tabelas 4 e 5, p. 81). Desta forma, cada linhagem isolada foi cultivada em meio líquido BD com água do mar sintética e os respectivos extratos orgânicos (AcOEt) foram testados frente à linhagem de células cancerígenas HCT-116 (colón) (Item 5.3, p. 79).

Figura 38. Fotografia dos fungos **BRF012-BRF046** isolados dos sedimentos da praia do Mucuripe (Fortaleza - CE), crescidos em meio BDA por 15 dias.



¹³ Técnica de mergulho que consiste na submersão total ou parcial na água, utilizando-se de equipamento autônomo de respiração, o equipamento de mergulho (WIKIPÉDIA, 2014).



BRF015



BRF016



BRF017



BRF018



BRF019



BRF020



BRF021



BRF022



BRF023



BRF024



BRF025



BRF026



BRF027



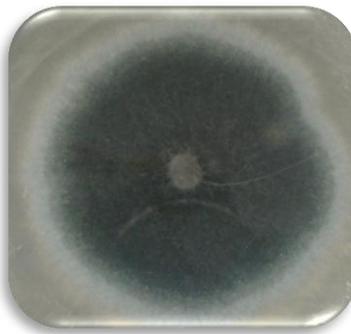
BRF028



BRF029



BRF030



BRF031



BRF032



BRF033



BRF034



BRF035



BRF036



BRF037



BRF038



BRF039



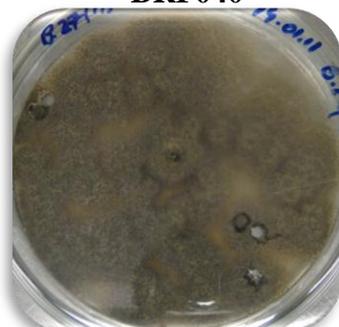
BRF040



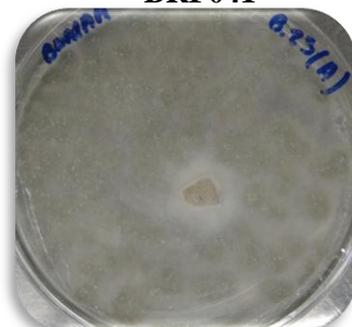
BRF041



BRF042



BRF043



BRF044

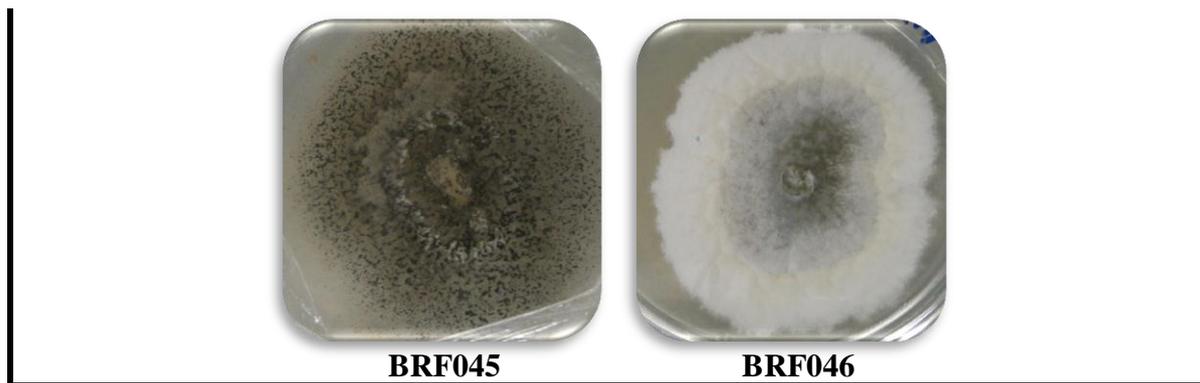
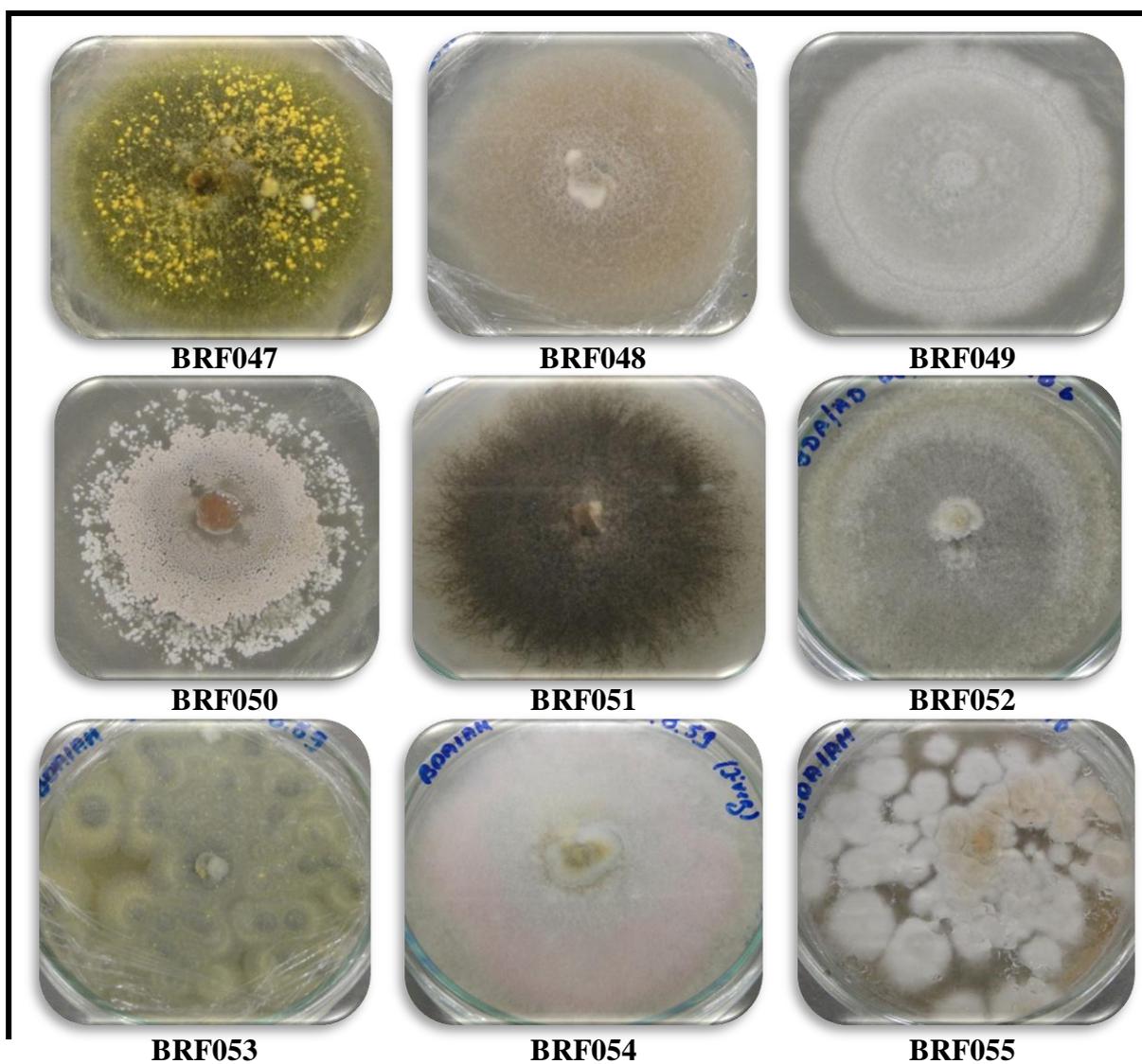


Figura 39. Fotografia dos fungos **BRF047-*BRF094*** isolados dos sedimentos da praia do Pecém (Pecém-CE), crescidos em meio BDA por 15 dias





BRF056



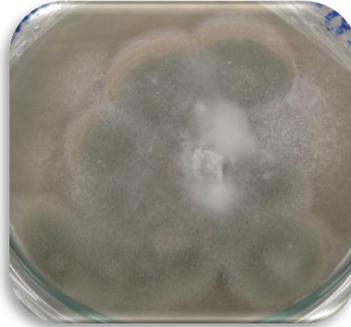
BRF057



BRF058



BRF059



BRF060



BRF061



BRF062



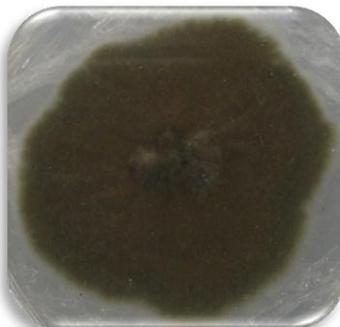
BRF063



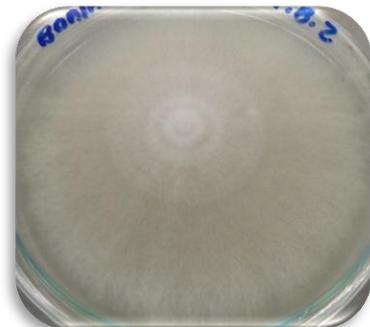
BRF064



BRF065



BRF066



BRF067



BRF068



BRF069



BRF070



BRF071



BRF072



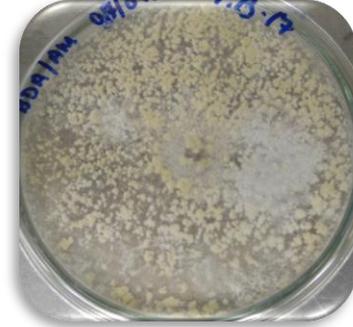
BRF073



BRF074



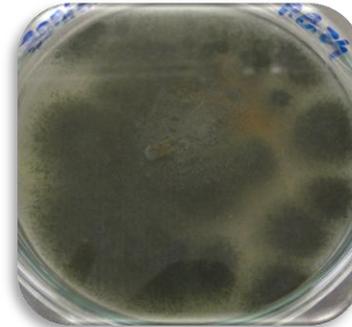
BRF075



BRF076



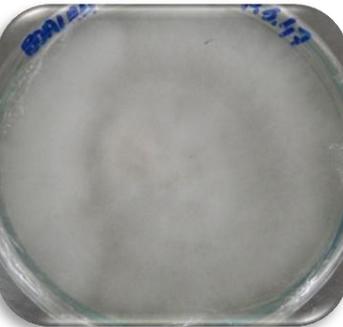
BRF077



BRF078



BRF079



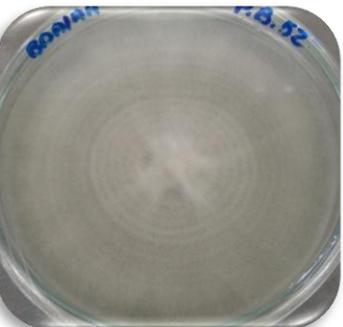
BRF080



BRF081



BRF082



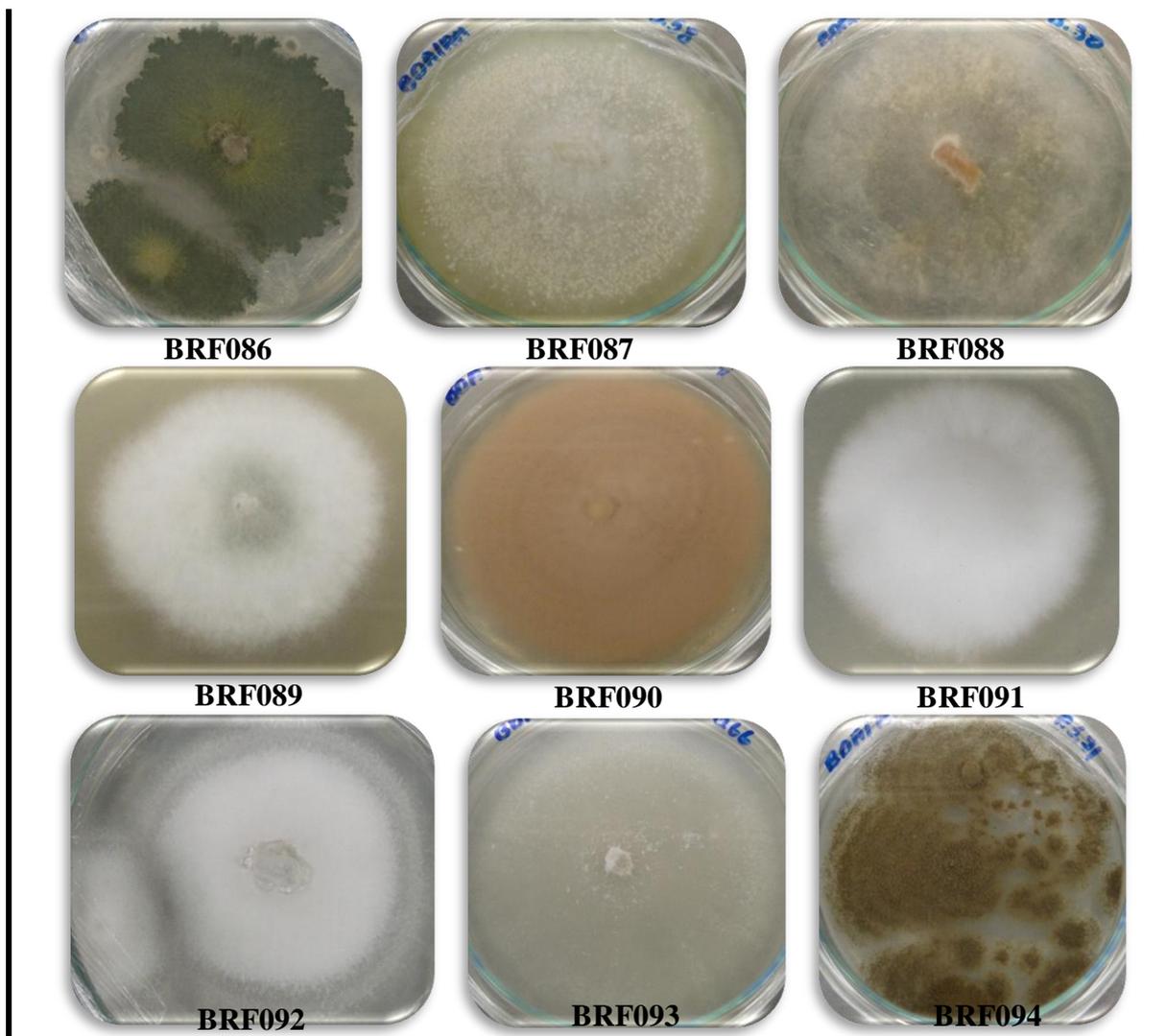
BRF083



BRF084



BRF085



5.2 Teste Pareado

Os fungos marinhos constituem um grupo definido pela morfologia e adaptações ao ambiente marinho. A classificação de uma espécie fúngica como sendo marinha baseia-se em critérios ecológicos e taxonômicos, não podendo levar em consideração aspectos nutricionais ou fisiológicos. Os fungos derivados do ambiente marinho podem ser exclusivos ou facultativos. Fungos marinhos exclusivos são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente no ambiente marinho ou estuarino, ocupando *habitats* constantemente submersos. Já as espécies marinhas facultativas são capazes de crescer e esporular nos ambientes marinho, terrestre e de água doce (KOHLMEYER *et al.*, 1979).

Desta forma, com o objetivo de classificar os fungos isolados como marinhos exclusivos ou facultativos, os mesmos foram submetidos a um teste pareado (Item 6.13, p. 252).

O resultado dos testes (Apêndices 1 e 2) mostrou que a maioria das linhagens apresentou diferenças morfológicas e de coloração do meio, visíveis a olho nu, nos ambientes com e sem salinidade, podendo levar a sugerir uma mudança no metabolismo desses micro-organismos quando cultivados nos meios supracitados. A linhagem **BRF024**, isolada dos sedimentos da praia do Mucuripe, não apresentou crescimento quando cultivada em meio sem salinidade, sugerindo, desta forma, que a mesma constitua uma espécie de fungo marinho exclusivo. As linhagens **BRF025** e **BRF039**, também isoladas de sedimentos da praia do Mucuripe, não apresentaram crescimento aparente quando cultivadas em meio sem salinidade, sendo observados apenas crescimentos de colônias aparentemente contaminantes. Tal fato pode ser considerado um forte indício de que estas linhagens também sejam de fungos marinhos exclusivos.

Dentre as linhagens isoladas dos sedimentos da praia do Pecém, observou-se que a **BRF059** não apresentou crescimento em meio sem salinidade, sugerindo tratar-se de uma espécie marinha exclusiva. Assim como foi observado para as linhagens isolada dos sedimentos da praia do Mucuripe, diversas linhagens isoladas dos sedimentos da praia do Pecém apresentaram diferenças morfológicas e de coloração do meio, visíveis a olho nu, nos ambientes com e sem salinidade, podendo, igualmente, levar a sugerir uma mudança no metabolismo desses micro-organismos quando cultivados nos meios supracitados.

5.3 Cultivos em pequena escala dos isolados **BRF012-BRF046** e **BRF047-BRF094** e avaliação da atividade citotóxica dos extratos

Os isolados fúngicos **BRF012-BRF046** e **BRF047-BRF094** foram, separadamente, cultivados por 14 dias em meio BD com água do mar sintética em pequena escala (100 mL de meio), conforme descrito nos Itens 6.6.3 e 6.6.4, p. 244.

Para cada fungo foram obtidos os extratos AcOEt do meio líquido (Itens 6.6.3 e 6.6.4, p. 244), cujas massas são apresentadas na Tabela 2 e na Tabela 3, p. 80.

Tabela 2 - Massas (mg) dos extratos do meio líquido dos fungos **BRF012-BRF046** isolados dos sedimentos da praia do Mucuripe.

Linhagem	Massa								
m		m		m		m		m	
BRF012	5,0	BRF019	85,3	BRF026	5,0	BRF033	5,0	BRF040	71,3
BRF013	76,2	BRF020	119,0	BRF027	6,8	BRF034	8,4	BRF041	103,3
BRF014	51,6	BRF021	85,5	BRF028	6,8	BRF035	31,7	BRF042	92,6
BRF015	82,1	BRF022	34,6	BRF029	67,8	BRF036	14,4	BRF043	79,0
BRF016	29,9	BRF023	16,6	BRF030	27,9	BRF037	61,9	BRF044	288,4
BRF017	147,4	BRF024	5,0	BRF031	28,1	BRF038	63,6	BRF045	117,4
BRF018	94,3	BRF025	5,0	BRF032	8,0	BRF039	62,1	BRF046	62,0

Tabela 3 - Massas (mg) dos extratos do meio líquido dos fungos **BRF047-BRF094** isolados dos sedimentos da praia do Pecém.

Linhagem	Massa								
BRF047	4,80	BRF057	14,40	BRF067	2,80	BRF077	2,10	BRF087	53,40
BRF048	17,1	BRF058	14,50	BRF068	3,50	BRF078	21,40	BRF088	20,20
BRF049	80,5	BRF059	45,30	BRF069	15,70	BRF079	37,60	BRF089	61,60
BRF050	5,10	BRF060	39,60	BRF070	5,00	BRF080	18,60	BRF090	70,00
BRF051	53,20	BRF061	19,20	BRF071	28,80	BRF081	10,80	BRF091	14,10
BRF052	75,90	BRF062	50,10	BRF072	6,00	BRF082	33,20	BRF092	74,30
BRF053	74,5	BRF063	3,50	BRF073	7,00	BRF083	2,30	BRF093	22,80
BRF054	5,00	BRF064	6,20	BRF074	38,80	BRF084	18,00	BRF094	13,00
BRF055	47,60	BRF065	5,40	BRF075	4,50	BRF085	11,30		
BRF056	33,20	BRF066	4,10	BRF076	6,30	BRF086	1,50		

Todos os extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (Figura 40 e Figura 41, p. 81), empregando-se luz ultravioleta (254 e/ou 365 nm) como visualizador e solução de vanilina com HClO₄/EtOH como revelador.

Figura 40. Fotografia das placas cromatográficas (gel de sílica) oriundas da eluição dos extratos dos fungos **BRF012-BRF046** isolados dos sedimentos da praia do Mucuriipe. A) Revelação sob lâmpada ultravioleta (365 nm). B) Revelação em solução de vanilina com HClO₄/EtOH. Eluente: AcOEt/Hexano 8:2. B =branco (meio de cultura).

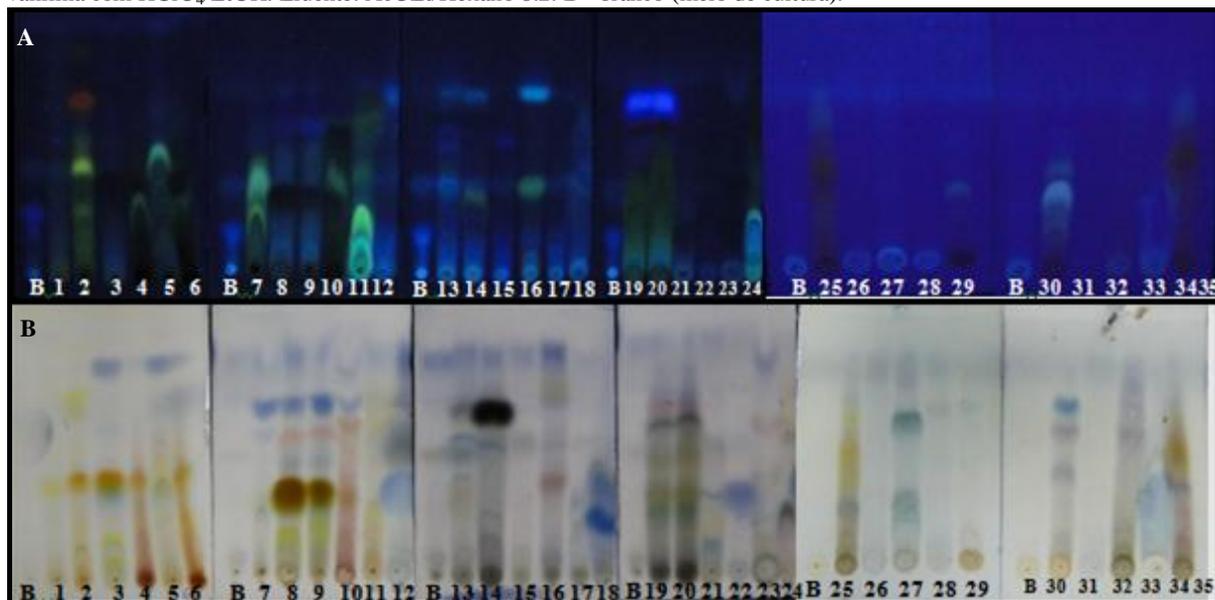
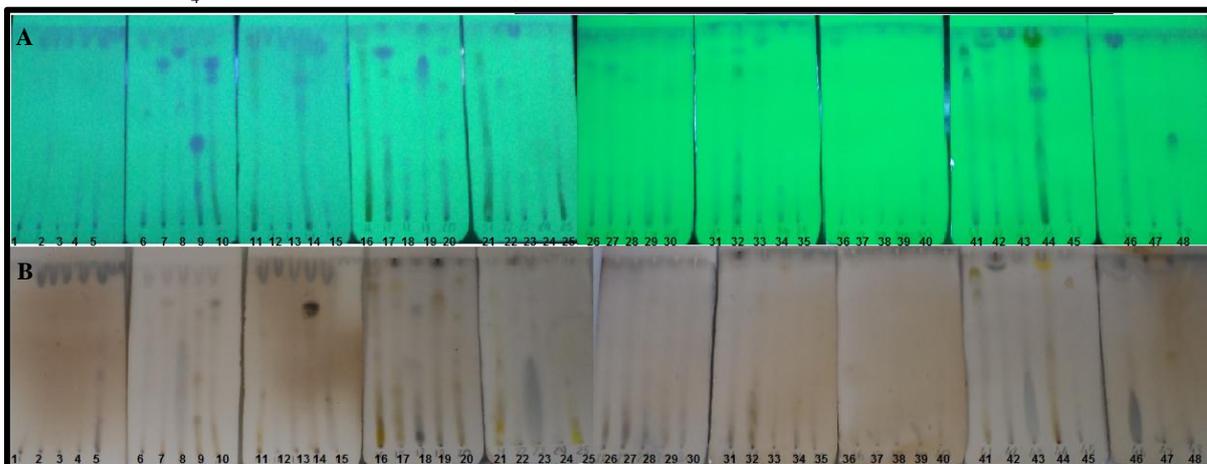


Figura 41. Fotografia das placas cromatográficas (gel de sílica) oriundas da eluição dos extratos dos fungos **BRF047-BRF094** isolados de sedimentos da praia do Pecém. A) Revelação sob lâmpada de ultravioleta (254 nm). B) Revelação em solução de vanilina com HClO₄/EtOH. Eluente: AcOEt/hexano 8:2.



A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada *in vitro* frente à linhagem de células cancerígenas HCT-116 (côlon) (Item 6.7, p. 244) e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) dos fungos **BRF012-BRF046** frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

Amostra	% Inibição	Amostra	% Inibição	Amostra	% Inibição
BRF012	16,46	BRF024	21,78	BRF036	1,16
BRF013	82,49	BRF025	7,17	BRF037	5,64
BRF014	78,55	BRF026	8,81	BRF038	12,03
BRF015	37,02	BRF027	27,11	BRF039	15,73
BRF016	33,53	BRF028	0,00	BRF040	22,18
BRF017	33,47	BRF029	4,15	BRF041	1,85
BRF018	18,47	BRF030	95,15	BRF042	22,17
BRF019	95,48	BRF031	96,37	BRF043	43,05
BRF020	0,00	BRF032	6,57	BRF044	0,00
BRF021	0,00	BRF033	0,10	BRF045	0,00
BRF022	7,38	BRF034	13,91	BRF046	12,20
BRF023	3,88	BRF035	6,67	Branco	12,32
Doxorrubicina	100,00				

Tabela 5 - Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) dos fungos **BRF047-BRF094** frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

Amostra	% Inibição	Amostra	% Inibição	Amostra	% Inibição
BRF047	30,43	BRF064	26,47	BRF081	45,53
BRF048	52,73	BRF065	55,80	BRF082	100,00
BRF049	16,55	BRF066	41,34	BRF083	77,19
BRF050	23,09	BRF067	93,37	BRF084	30,32
BRF051	47,44	BRF068	96,44	BRF085	55,02
BRF052	82,82	BRF069	38,27	BRF086	45,45
BRF053	92,43	BRF070	85,89	BRF087	97,89
BRF054	31,77	BRF071	75,25	BRF088	100,00
BRF055	94,97	BRF072	50,42	BRF089	28,18
BRF056	95,77	BRF073	84,15	BRF090	46,15
BRF057	90,88	BRF074	77,21	BRF091	33,53

BRF058	30,39	BRF075	82,55	BRF092	25,12
BRF059	59,99	BRF076	44,94	BRF093	16,54
BRF060	99,87	BRF077	98,18	BRF094	51,96
BRF061	100,00	BRF078	59,45	BRANCO	12,32
BRF062	51,53	BRF079	100,00	Doxorrubicina	100,00
BRF063	98,98	BRF080	36,37		

Para os extratos dos fungos do Mucuripe, as linhagens **BRF013**, **BRF014**, **BRF019**, **BRF030** e **BRF031** apresentaram valores de inibição > 75 %. Dentre os isolados do Pecém, vinte e uma linhagens apresentaram valores de inibição > 75%: **BRF052**, **BRF053**, **BRF055**, **BRF056**, **BRF057**, **BRF060**, **BRF061**, **BRF063**, **BRF067**, **BRF068**, **BRF070**, **BRF071**, **BRF073**, **BRF074**, **BRF075**, **BRF077**, **BRF079**, **BRF082**, **BRF083**, **BRF087** e **BRF088**. As linhagens **BRF079** e **BRF082** apresentaram semelhança quanto ao perfil cromatográfico (Figura 41, p. 81) e quanto à morfologia (Figura 39, p. 75), o que, associado à semelhança dos valores de inibição, constitui um indicativo de que as duas linhagens sejam da mesma espécie. Tal fato foi posteriormente confirmado pela identificação filogenética destas linhagens como pertencendo à mesma espécie de fungo (Item 5.4, p. 83).

Os extratos com altos valores de inibição (> 75 %), foram bioensaiados frente à mesma linhagem de células tumorais (HCT-116) para a determinação da concentração inibitória média (IC_{50} - 50 μ g/mL). Os resultados estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Determinação da IC_{50} (μ g/mL) dos extratos mais ativos dos isolados do Mucuripe frente à linhagem tumoral HCT-116. Os valores de IC_{50} e os respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (*Intuitive Software for Science*, San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Amostra	IC_{50} (CI 95%)
BRF013	33,89 (26,26 – 43,74)
BRF019	8,04 (6,86 – 9,43)
BRF030	23,32 (9,48 – 57,34)
BRF031	22,55 (15,99 – 31,80)
Doxorrubicina	0,47 (0,15 – 1,44)

Tabela 7 - Determinação da IC_{50} (μ g/mL) dos extratos mais ativos dos isolados do Pecém frente à linhagem tumoral HCT-116. Os valores de IC_{50} e os respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (*Intuitive Software for Science*, San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Amostra	IC_{50} (CI 95%)	Amostra	IC_{50} (CI 95%)
BRF052	33,05 (24,46 – 44,66)	BRF071	7,90 (6,46 – 9,66)
BRF053	11,28 (6,88 – 18,48)	BRF073	0,67 (0,45 – 0,99)
BRF055	16,67 (13,90 – 20,00)	BRF074	0,95 (0,60 – 1,52)
BRF056	7,83 (5,91 – 10,37)	BRF075	29,11 (22,02 – 38,48)
BRF057	> 50,0	BRF077	24,01 (18,89 – 30,51)
BRF060	16,71 (11,05 – 25,25)	BRF079	0,06 (0,05 – 0,08)
BRF061	1,467 (1,13 – 1,89)	BRF082	0,42 (0,32 – 0,53)
BRF063	14,85 (12,06 – 18,30)	BRF083	35,52 (26,62 – 47,40)
BRF067	15,39 (11,29 – 20,98)	BRF087	4,71 (3,83 – 5,80)

BRF068	18,31 (13,35 – 25,12)	BRF088	4,89 (3,47 – 6,89)
BRF070	1,33 (0,77 – 2,27)	Doxorrubicina	0,47 (0,15 – 1,44)

Como se pode observar, dentre os isolados do Mucuripe, o extrato de **BRF019** foi o mais ativo ($IC_{50} = 8,04 \mu\text{g/mL}$), seguido dos extratos de **BRF030** e **BRF031**, que apresentaram valores de IC_{50} semelhantes (23,32 e 22,55 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), e do extrato de **BRF013** ($IC_{50} = 33,89 \mu\text{g/mL}$). A partir desses resultados, as linhagens **BRF019** e **BRF030** foram selecionadas para crescimento em grande escala e fracionamento bioguiado dos extratos, sendo esta última relatada por Saraiva *et al.*, 2014. Posteriormente, uma identificação morfológica sugeriu que **BRF013** e **BRF019** pertenceriam à espécie *Aspergillus terreus*, enquanto uma identificação molecular classificou a linhagem **BRF030** como pertencente à espécie *Penicillium rubens*¹⁴ e confirmou **BRF019** como *A. terreus* (Item 5.4, p. 83).

Dentre os isolados do Pecém, a linhagem mais ativa foi a **BRF079** ($IC_{50} = 0,07$), seguida da **BRF082** ($IC_{50} = 0,42$). Corroborando os indícios de semelhança entre estas duas linhagens (Item 5.3, p. 79), a identificação filogenética das mesmas concluiu que as duas pertencem à mesma espécie, *Dichotomomyces cejpii* (Item 5.4, p. 83). A partir desses resultados, a linhagem **BRF082** (mesma espécie de **BRF079**) foi selecionada para crescimento em grande escala e fracionamento bioguiado de seus extratos. A escolha de **BRF082** em detrimento de **BRF079** se justifica devido à pequena quantidade de extrato bruto (400,00 mg) obtida do cultivo desta última em grande escala (15 L), inviabilizando o processo de isolamento de metabólitos secundários. Outras linhagens oriundas dos sedimentos do Pecém apresentaram altos valores de IC_{50} , e estão sendo estudadas. Tais linhagens já foram submetidas à identificação morfológica, sendo elas **BRF053** (*Paecilomyces sp.*; $IC_{50} = 11,28$), **BRF056** (*Penicillium rugulosum*; $IC_{50} = 7,83$), **BRF061** (*Acremonium strictum*; $IC_{50} = 1,47$), **BRF070** (*Penicillium expansum*; $IC_{50} = 1,33$), **BRF073** (*Pseudallescheria boydii*; $IC_{50} = 0,67$), **BRF074** (*Aspergillus niger*; $IC_{50} = 0,96$), **BRF087** (Não identificado; $IC_{50} = 4,72$) e **BRF088** (*Penicillium citrinum*; $IC_{50} = 4,90$).

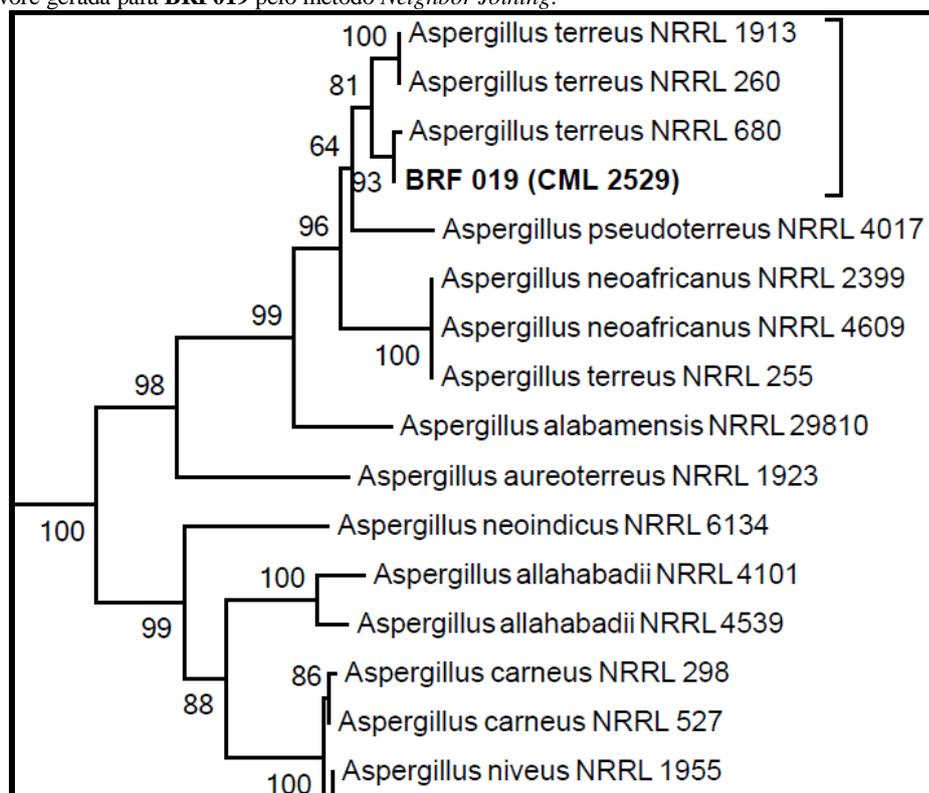
5.4 Identificação filogenética das linhagens mais ativas

As linhagens de fungos submetidas a fracionamento bioguiado de seus extratos, **BRF019** e **BRF082**, e também **BRF079**, foram submetidas à identificação morfológica seguida

¹⁴ A identificação filogenética leva à classificação inequívoca da espécie, ao passo que a identificação morfológica não apresenta total confiabilidade, levando muitas vezes apenas ao gênero (WANG *et al.*, 2008).

de identificação filogenética¹⁵. A identificação morfológica levou à identificação destas linhagens como sendo *Aspergillus* cf. *terreus* (**BRF019**) e cf. *Eurotium* sp¹⁶. (**BRF079** e **BRF082**) (KLICH, 2002). Posteriormente, foi realizada a análise filogenética segundo os métodos *Neighbor Joining* e de Inferência Filogenética Bayesiana (Item 6.6.1, p. 242). Para os dois métodos, as árvores geradas agruparam **BRF019** aos isolados de referência de *Aspergillus terreus* (Figura 42 e Figura 43, p. 85), e **BRF079** e **BRF082** (Figuras 44 e 45, p. 85), aos isolados de referência de *Dichotomomyces cejpii*.

Figura 42. Árvore gerada para **BRF019** pelo método *Neighbor Joining*.



¹⁵ A prévia identificação morfológica facilita o processo de identificação filogenética. O primeiro fornece um resultado de menor confiabilidade para a espécie, mas que serve, todavia, como norteador, no momento de comparação da sequência genética da espécie que se quer determinar com as sequências genéticas de outras espécies de referência (WIESE *et al.*, 2011).

¹⁶ Fase sexuada de alguma espécie de *Aspergillus* (VARGA *et al.*, 2007).

Figura 43. Árvore gerada para **BRF019** segundo o método de Inferência Filogenética Bayesiana.

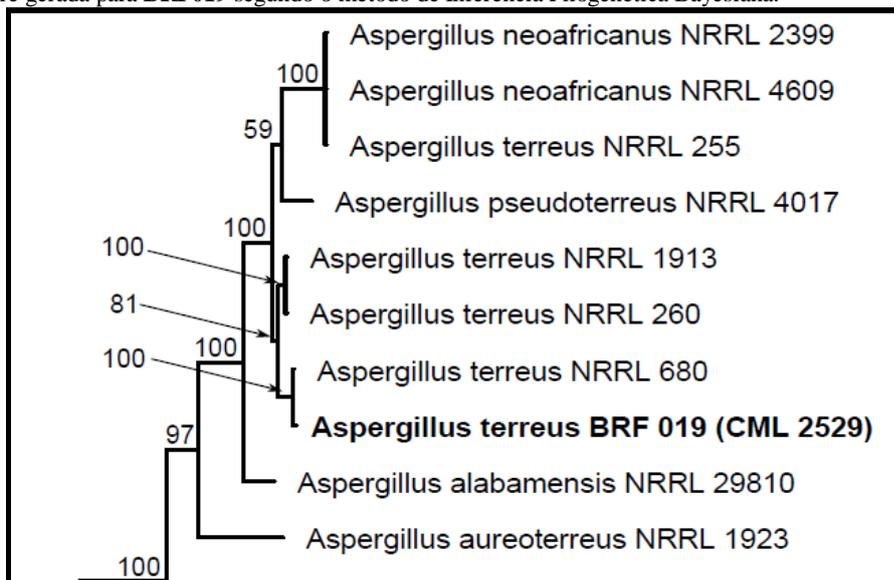


Figura 44. Árvore gerada para **BRF082** pelo método Neighbor Joining.

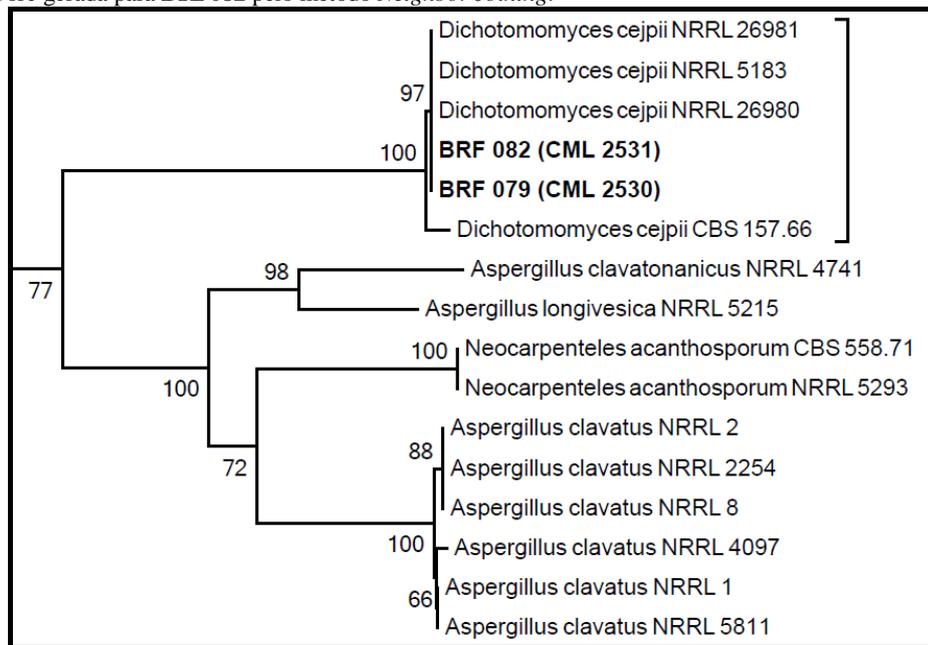
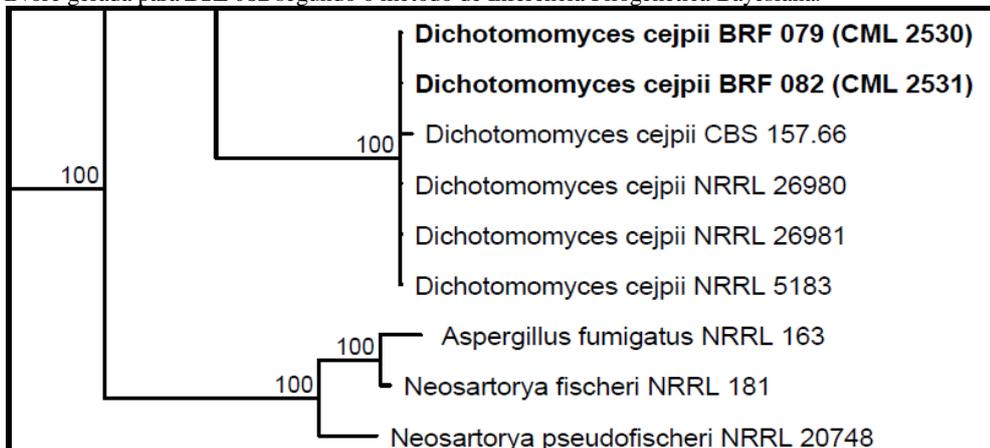


Figura 45. Árvore gerada para **BRF082** segundo o método de Inferência Filogenética Bayesiana.



5.5 Otimização do cultivo de BRF019 (*A. terreus*) para a produção de metabólitos secundários com atividade citotóxica

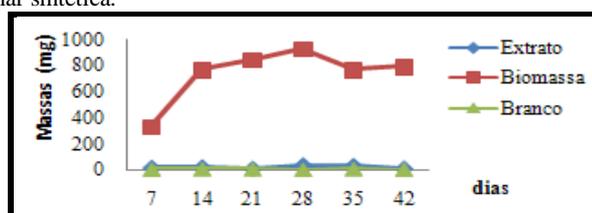
5.5.1 Otimização do período de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética

A linhagem **BRF019** (*A. terreus*), isolada de sedimentos da praia do Mucuripe, foi cultivada em meio líquido BD com água do mar sintética por 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias, sob condição estática (Item 6.8.1, p. 245). Ao final de cada período de cultivo, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo, seco em estufa, pesado e descartado. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. As massas dos extratos e da biomassa, extraídos a cada sete dias, estão demonstradas na Tabela 8. O gráfico da Figura 46 mostra a variação das quantidades de biomassa obtidas ao longo deste estudo.

Tabela 8 - Massas dos extratos da linhagem **BRF019** (*A. terreus*) obtidos após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.

Período de cultivo (dias)	Massa do extrato do meio líquido (mg)	Biomassa (mg)	Massa do Branco (mg)
7	20,2	336,5	5,2
14	24,2	769,2	7,1
21	13,4	845,5	6,8
28	38,2	928,2	2,7
35	34,5	770,9	7,7
42	15,2	793,2	4,6

Figura 46. Quantidades de biomassa da linhagem **BRF019** (*A. terreus*) obtidas após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.



Pelas massas dos extratos preparados em diferentes dias de cultivo, pôde-se observar que o fungo manteve uma taxa crescente de aumento até o 28^o dia, após o qual, observa-se um decréscimo da massa do extrato. Esse padrão se repete em relação à biomassa. Essa variação pode ser explicada admitindo-se que nos primeiros dias de cultivo há uma abundância de nutrientes no meio de cultura, o que leva à uma elevada taxa de crescimento. Com o passar do tempo, a disponibilidade de nutrientes diminui, fazendo com que a taxa de crescimento diminua. Geralmente, é nesse momento que ocorre a maior produção de metabólitos secundários, devido ao estresse a que o micro-organismo é submetido (RUIZ *et al.*, 2010).

5.5.2 Atividade citotóxica das frações do cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética

As frações do cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética por 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas frente à linhagem de célula tumoral HCT-116 (cólón) (Item 6.7, p. 244), e os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Determinação da inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo de **BRF019** (*Aspergillus terreus*) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliada pelo ensaio do MTT, 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Tempo (dias)	% Inibição
7	63,28
14	88,50
21	9,82
28	95,28
35	59,16
42	41,69
Doxorrubicina	100,00

Foi possível observar que a atividade citotóxica aumenta com o tempo de cultivo até o 28 ° dia e depois decai no 35 ° dia. Assim, a fração mais ativa foi aquela obtida no cultivo por 28 dias.

Apesar de se ter observado a maior atividade citotóxica no 28 ° dia de cultivo, foi pequena a diferença entre o 14 ° e 28 ° dias. Desta forma, o 14 ° dia foi considerado o mais viável para o cultivo em grande escala.

5.5.3 Primeiro cultivo em grande escala de BRF019 (*A. terreus*)

A linhagem **BRF019** (*A. terreus*) foi cultivada em meio líquido BD com água do mar sintética em grande escala (6 litros) sob condição estática (Item 6.9, p. 246). Ao final de 14 dias de cultivo, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo em ambiente estéril. O micélio foi descartado e o meio líquido submetido à partição líquido-líquido com AcOEt, obtendo-se 5,64 g de extrato bruto do meio líquido. Este foi submetido a teste citotóxico frente à linhagem de célula tumoral HCT-116 (cólón) e apresentou percentual de inibição de crescimento em uma concentração única de 50 µg/mL de 68,00%, valor divergente do obtido para o ensaio preliminar (95,48%).

5.5.3.1 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de BRF019 (*A. terreus*)

O extrato bruto de **BRF019** (*A. terreus*) foi submetido à purificação em coluna C18 empregando-se como eluentes H₂O/100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas frações estão descritas na Tabela 10, p. 88.

Tabela 10 – Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de **BRF019** (*A. terreus*) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)	% Inibição
H₂O 100%	1	2290,0	40,60	97,50
H₂O/MeOH 8:2	2	25,7	0,46	99,00
H₂O/MeOH 6:4	3	24,2	0,42	60,80
H₂O/MeOH 1:1	4	12,2	0,20	92,50
MeOH/H₂O 7:3	5	104,7	0,22	32,25
MeOH/H₂O 8:2	6	59,1	1,85	96,00
MeOH/H₂O 9:1	7	72,2	1,28	100,00
MeOH 100%	8	174,9	3,10	100,00
Doxorrubicina	-	-	-	100,00

As frações com maiores atividades citotóxicas correspondem às amostras 1, 2, 4, 6, 7 e 8. Dentre estas, as amostras 1 (H₂O 100%) e 8 (MeOH 100%) foram as que apresentaram massa suficiente para fracionamento cromatográfico bioguiado. Entretanto, a análise da amostra 8 em CLAE analítico mostrou uma mistura complexa de sinais não resolvíveis. Dessa forma, somente a amostra 1 foi fracionada.

Todas as amostras foram analisadas por CCDA e visualizadas com luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. A amostra 1 (H₂O 100%) apresentou três manchas com R_fs bastante distintos, denominadas A, B e C (Figura 47). Desta forma, esta amostra foi submetida à cromatografia em coluna (Item 6.9.1, p. 246), obtendo-se três frações, correspondentes às manchas A, B e C, cujas massas e atividades citotóxicas estão na Tabela 11.

Figura 47. Fotografia das placas cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento em cartucho de sílica C18 do extrato do cultivo em grande escala de **BRF019** (*A. terreus*). Revelação sob lâmpada de ultravioleta: A) 365 nm; B) 254 nm.. Eluente: AcOEt/hexano 8:2.

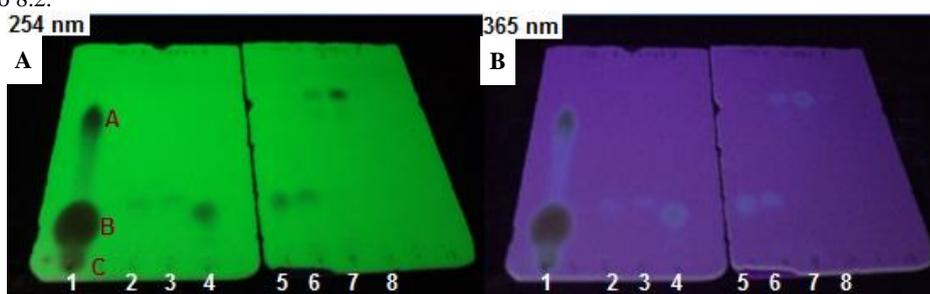


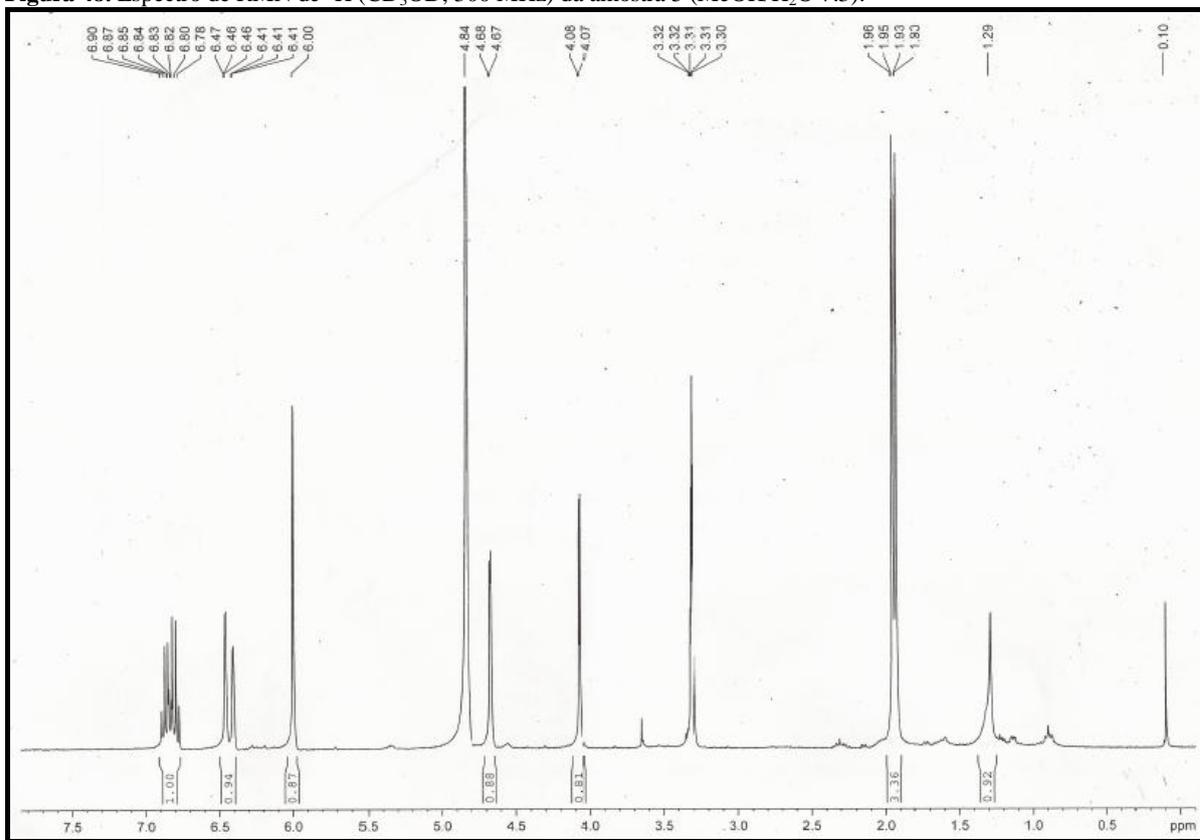
Tabela 11 - Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações obtidas da cromatografia em coluna da amostra H₂O 100%, do extrato de **BRF019** (*A. terreus*) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

Fração	Massas (mg)	Rendimento (%)	% Inibição
A	266,4	11,6	59,50
B	1113,0	48,6	95,00
C	524,7	22,9	100,00
Doxorrubicina	-	-	100,00

A fração A, embora não tenha apresentado atividade citotóxica relevante (> 75%), apresentou boa massa e e picos bem resolvidos no cromatograma obtido por CLAE analítico. Sendo assim, esta foi submetida à fracionamento por CLAE (Item 6.9.4, p. 247).

A fração B constituía-se praticamente de uma única substância, a qual foi chamada de **BRF019-1**, tendo sido apenas purificada por meio de cromatografia em coluna de gel de sílica. Esta substância também foi identificada por RMN ^1H (Figura 48) como sendo o constituinte majoritário da amostra 5 (MeOH/H₂O 7:3, Tabela 10, p. 88).

Figura 48. Espectro de RMN de ^1H (CD₃OD, 300 MHz) da amostra 5 (MeOH/H₂O 7:3).



A fração C foi analisada e cromatografada por meio de CLAE, porém, nenhuma tentativa de separação foi bem-sucedida (Item 6.9.6, p. 247).

5.5.3.2 Determinação estrutural de BRF019-1

BRF019-1 foi obtida como um sólido branco cristalino em forma de agulhas, solúvel em metanol. Seu espectro de massas, obtido por impacto eletrônico (Figura 52, p. 93), apresentou pico do íon molecular com m/z igual a 154 Daltons. O espectro de massas de alta resolução EMAR-IES deste composto (Figura 54, p. 94), no modo positivo, exibiu os íons correspondentes à molécula com aduto de hidrogênio $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 155,0706 (m/z

calculado 155,0703, erro = 1,93 ppm), e com aduto de sódio $[M + Na]^+$ em m/z 177,0517 (m/z calculado 177,0522, erro = -2,82 ppm), os quais apontaram a fórmula molecular $C_8H_{10}O_3$ (IDH 4).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 53, p. 93) conduziu à identificação dos seguintes grupos funcionais: Duas hidroxilas, sendo uma livre em 3391 cm^{-1} , e uma com ligação de hidrogênio inter ou intramolecular devido à banda um pouco mais larga em 3188 cm^{-1} ; carbonila conjugada, evidenciada pela absorção em 1630 cm^{-1} ; grupo vinila *trans* – dissubstituído, evidenciado pela absorção em $1081,36\text{ cm}^{-1}$, devido às vibrações de deformação angular fora do plano.

O espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 300MHz) (Figura 55, p. 95) de **BRF019-1** apresentou oito sinais. Destes, três foram correspondentes a hidrogênios olefínicos em δ 6,00 (s, 1H), δ 6,44 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H) e δ 6,83 (Dq, $J = 17,0$ e 6,0 Hz, 1H), sendo estes dois últimos em posição *trans* um em relação ao outro ($J_{trans} = 17$ Hz). Observou-se também sinal referente a hidrogênios de grupo metila em δ 1,93 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H) o que pode-se sugerir que estejam sob efeito de desblindagem. No mapa de contornos de correlação homonuclear 1H - 1H COSY (Figura 57, p. 97), observou-se acoplamento entre o sinal em δ 1,93 (d, $J = 6,0$ Hz, 3H) e os sinais em δ 6,44 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H) e δ 6,83 (Dq, $J = 17,0$ e 6,0 Hz, 1H). Foram observados dois sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados em δ 4,08 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H) e δ 4,68 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H). O mesmo valor de J desses dois sinais sugere que os mesmos estejam acoplando entre si, fato confirmado pelo espectro COSY. Estes sinais mostram que a substância possui um sistema AMX e sugerem, claramente, a presença dos fragmentos A e B mostrados na Figura 49, p. 91. O hidrogênio olefínico em δ 6,00 encontra-se isolado, não sendo observado nenhum acoplamento dele no espectro de RMN de 1H .

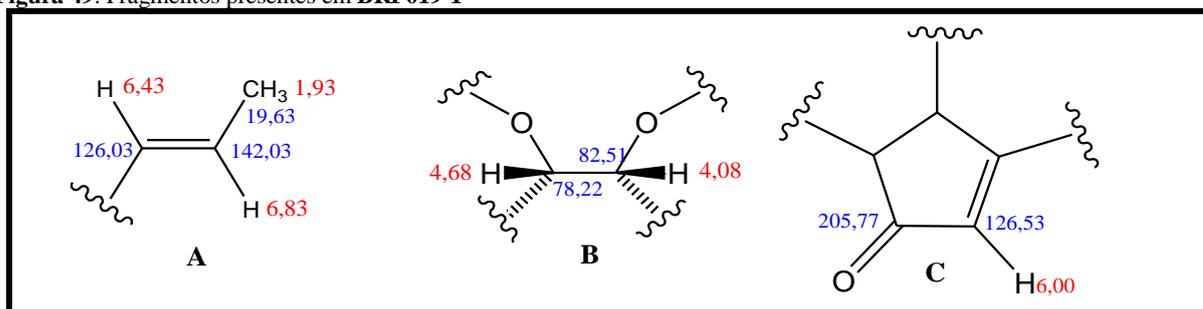
O espectro de RMN de ^{13}C -BB (CD_3OD , 75MHz) (Figura 56, p. 96) de **BRF019-1** apresentou oito linhas espectrais. Sua análise juntamente com o espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (Figura 56, p. 96) permitiu atribuir os sinais em δ 126,03, δ 126,53 e δ 142,03 a carbonos sp^2 , e as absorções em δ 78,22 e δ 82,51 a carbonos sp^3 oxigenados. Os sinais em δ 171,00 e δ 205,77 foram atribuídos a um carbono sp^2 quaternário e a uma carbonila de cetona α,β – insaturada, respectivamente. O sinal em δ 19,63 foi atribuído a um carbono metílico ligado a carbono sp^2 .

O experimento bidimensional de correlação heteronuclear 1H - ^{13}C , HSQC (Figura 58, p. 98) de **BRF019-1** permitiu correlacionar os sinais dos carbonos em δ 19,63, δ 78,22, δ 82,51, δ

126,03, δ 126,53 e δ 142,03 aos seus respectivos átomos de hidrogênio em δ 1,93, δ 4,68, δ 4,08, δ 6,00, δ 6,43 e δ 6,83.

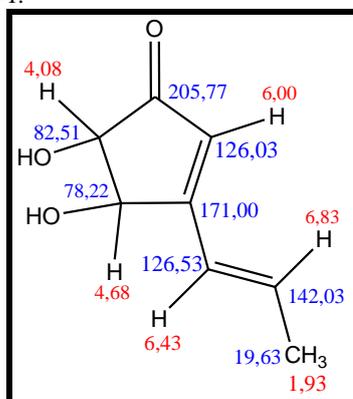
A substância em questão possui três carbonos sp^2 o que sugere a presença de duas ligações duplas, além da carbonila relativa ao sinal em 205,77, totalizando três duplas ligações. O IDH 4 leva a sugerir em **BRF019-1** a presença de um ciclo, compatível com um anel de cinco membros com uma insaturação e uma carbonila ligada a ele, conforme mostra o fragmento C (Figura 49).

Figura 49. Fragmentos presentes em **BRF019-1**



O experimento bidimensional de correlação heterocuclear à longa distância, HMBC (Figura 59, p. 99) permitiu verificar correlações heteronucleares à longa distância ($^nJ_{C,H}$, $n \geq 2$). Os acoplamentos observados entre o sinal do hidrogênio em δ 6,00 e os sinais de carbono em δ 78,22, δ 82,51, δ 126,03, δ 126,53 e δ 205,77, evidenciaram a ligação entre os fragmentos A, B e C (Figura 49). Supondo-se maior probabilidade de ocorrência de acoplamentos do tipo 2J e 3J , o acoplamento entre o hidrogênio em δ 6,00 e o carbono em δ 126,03 leva à conexão dos fragmentos A e C através do carbono vizinho ao carbono em δ 126,53. A correlação entre o hidrogênio em δ 4,68 e o carbono em δ 126,03, permite estabelecer a posição de conexão entre os fragmentos B e C. Com esses dados, foi possível propor uma estrutura para **BRF019-1** (Figura 50).

Figura 50. Proposta estrutural para **BRF019-1**.

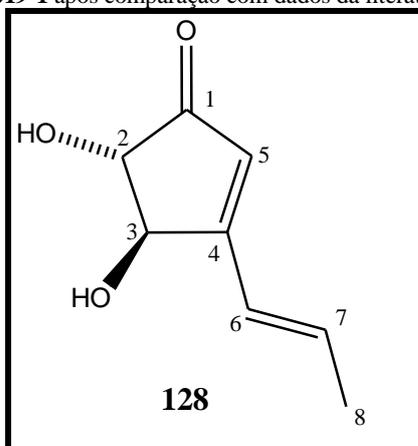


Os dados espectroscópicos discutidos são compatíveis com a estrutura da *trans*-2(*R*),3(*S*)-dihidroxi -4 -propenilciclopent-4-enona, conhecida como terreína (**128**, Figura 31, p. 64). A terreína é um conhecido metabólito fúngico e foi obtida pela primeira vez em 1935, da espécie *A. terreus* (RAISTRICK *et al.*, 1935). A comparação dos dados espectroscópicos de RMN¹H e ¹³C de **BRF019-1** com os relatados na literatura para a terreína (NAGIA *et al.*, 2012) (Tabela 12) corroboram a estrutura proposta anteriormente e permitem propor a estrutura final mostrada na Figura 51.

Tabela 12. Comparação dos dados de RMN de ¹H e de ¹³C de **BRF019-1** com os da terreína (NAGIA *et al.*, 2012).

BRF019-1 (CD ₃ OD, 300 MHz)			Terreína (CD ₃ OD, 300 MHz) (NAGIA <i>et al.</i> , 2012)		
C	RMN δ		¹³ C	RMN δ	
	¹³ C	¹ H		¹ H	
1	205,77		205,6		
2	82,51	4,08 (d, <i>J</i> = 3,0 Hz, 1H, H-2)	82,4	4,67 (d, <i>J</i> = 2,4 Hz, 1H, H-2),	
3	78,22	4,68 (d, <i>J</i> = 3,0 Hz, 1H, H-3)	78,1	4,07 (d, <i>J</i> = 2,7 Hz, 1H, H-3)	
4	171,00		170,8		
5	126,03	6,00 (s, 1H, H-5)	126,4	5,99 (s, 1H, H-5)	
6	126,53	6,43 (d, <i>J</i> = 17,0 Hz, 1H, H-6)	125,9	6,42 (dd, <i>J</i> = 15,8, 1,1 Hz, 1H, H-6)	
7	142,03	6,83 (dq, <i>J</i> = 17,0 e 6,0 Hz, 1H, H-7)	141,8	6,82 (ddd, <i>J</i> = 13,7, 8,9, 6,8 Hz, 1H, H-7)	
8	19,63	1,93 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 3H, 8-CH ₃)	19,5	1,97 (dd, <i>J</i> = 6,8, 1,4 Hz, 3H, 8-CH ₃)	

Figura 51. Estrutura proposta para **BRF019-1** após comparação com dados da literatura



A terreína já foi obtida dos gêneros fúngicos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma* e *Pestalotiopsis* (Al TRABOLSY *et al.*, 2014) e há relatos de diversas atividades biológicas atribuídas à mesma. Podemos destacar as atividades antimicrobiana (DEMASI *et al.*, 2010), antiproliferativa (ARAKAWA *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010; LIAO *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2004), inibitória do crescimento de plantas (PHATTANAWASIN *et al.*, 2007) e antioxidante (Al TRABOLSY *et al.*, 2014).

Figura 52. Cromatograma de CG/EM e espectro de massas obtido por impacto eletrônico de **BRF019-1**.

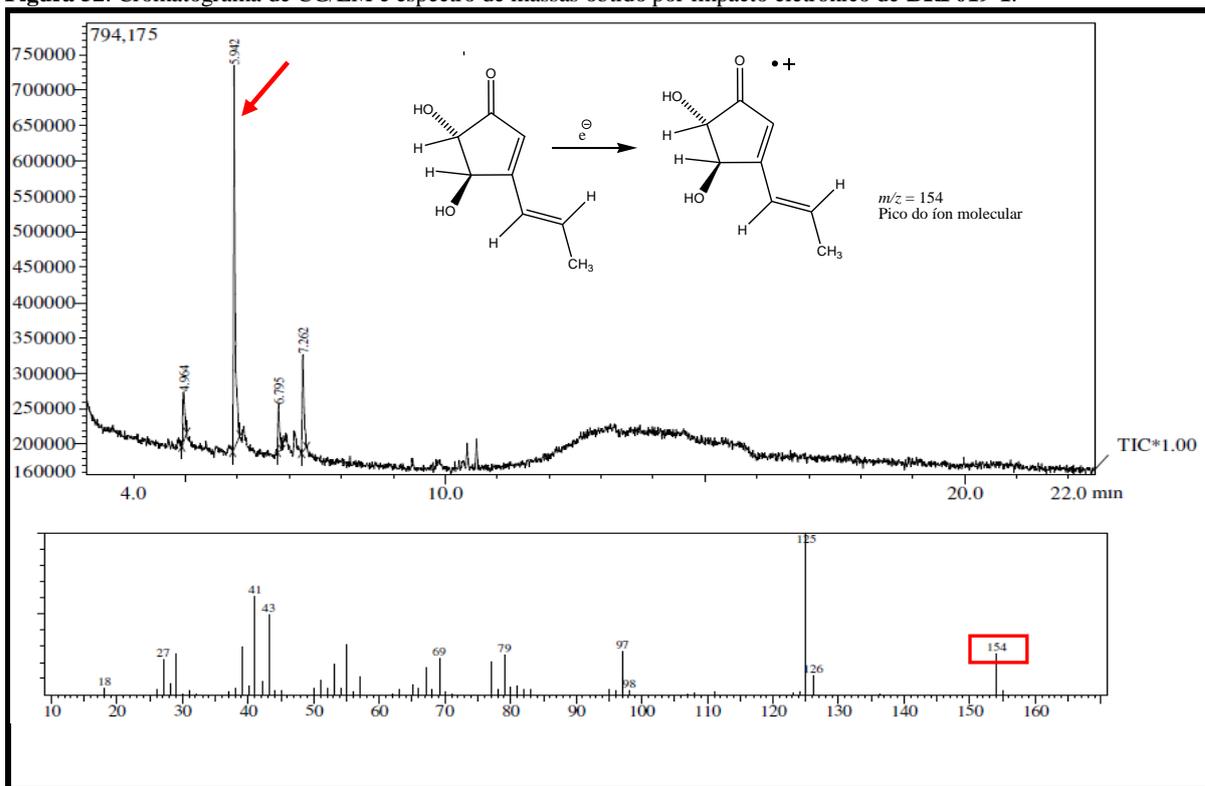


Figura 53. Espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF019-1**.

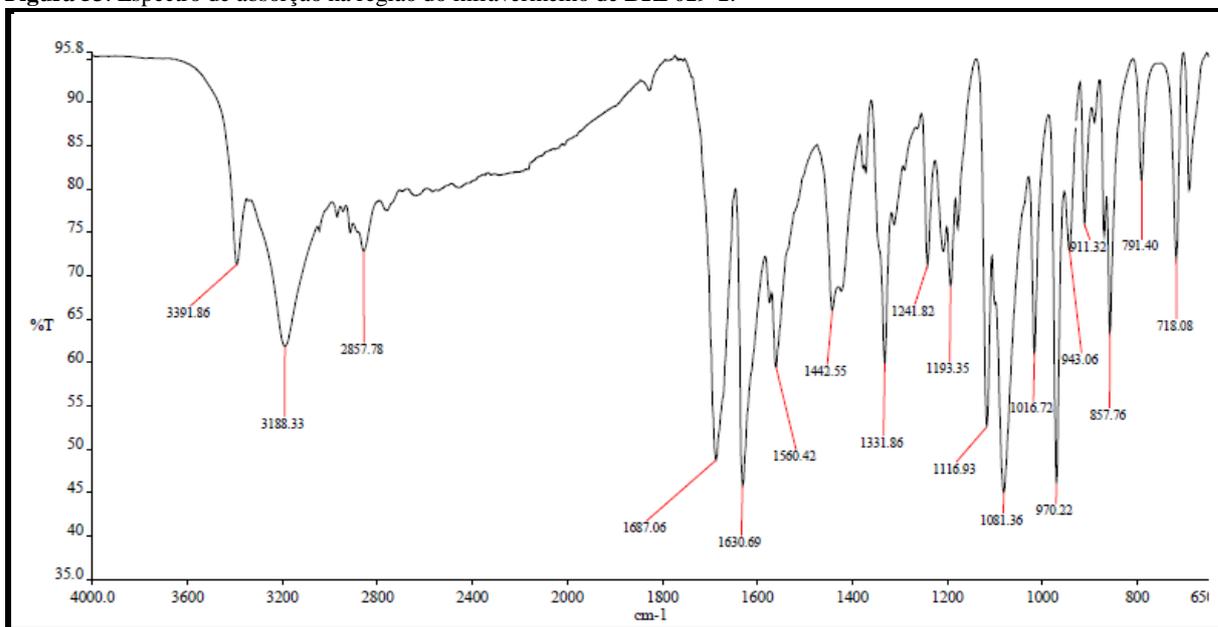


Figura 54. Espectro de massas de alta resolução EMAR/IES de **BRF019-1**.

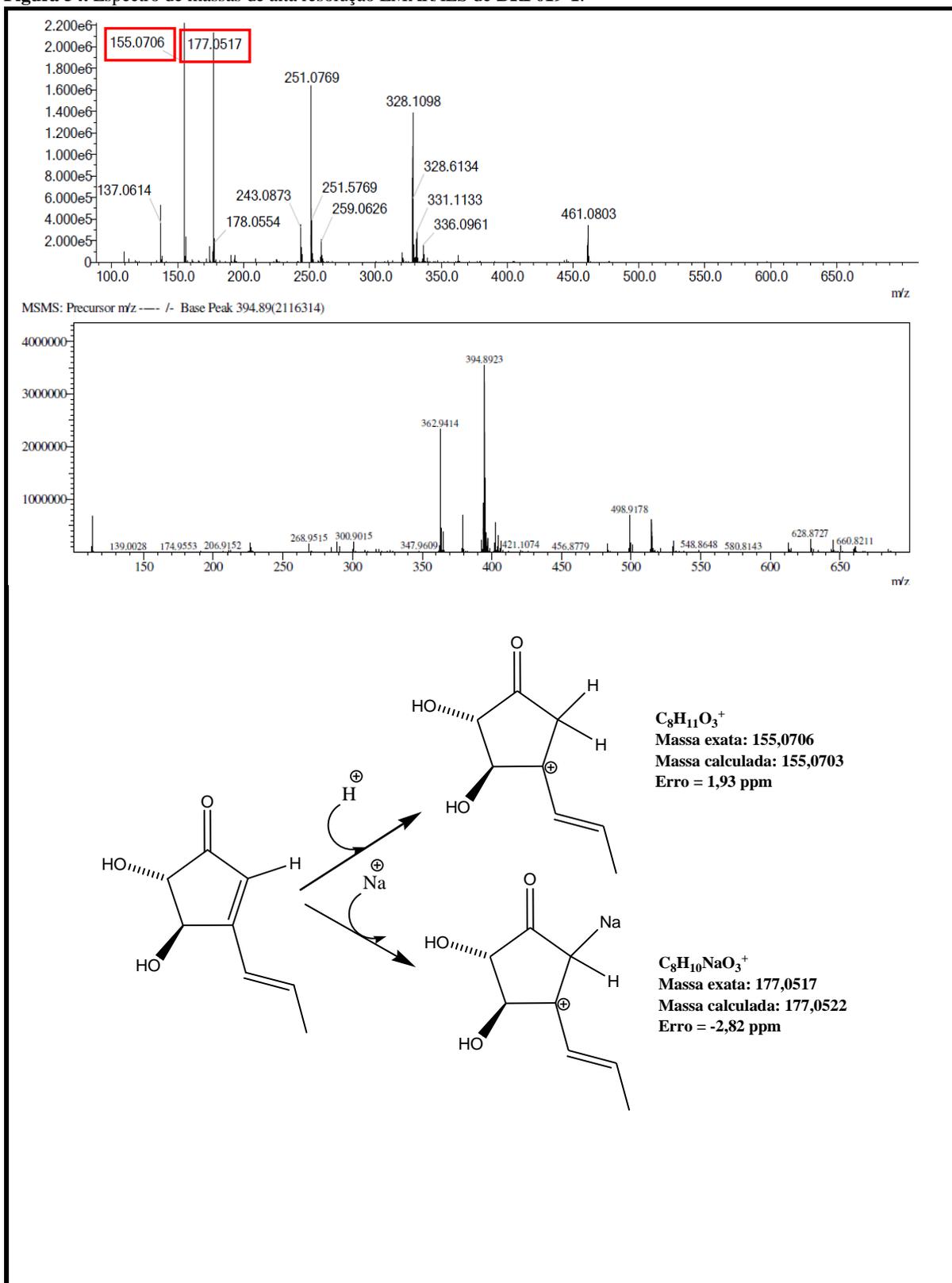


Figura 55. Espectro de RMN de de ^1H de **BRF019-1** (CD_3OD , 300 MHz).

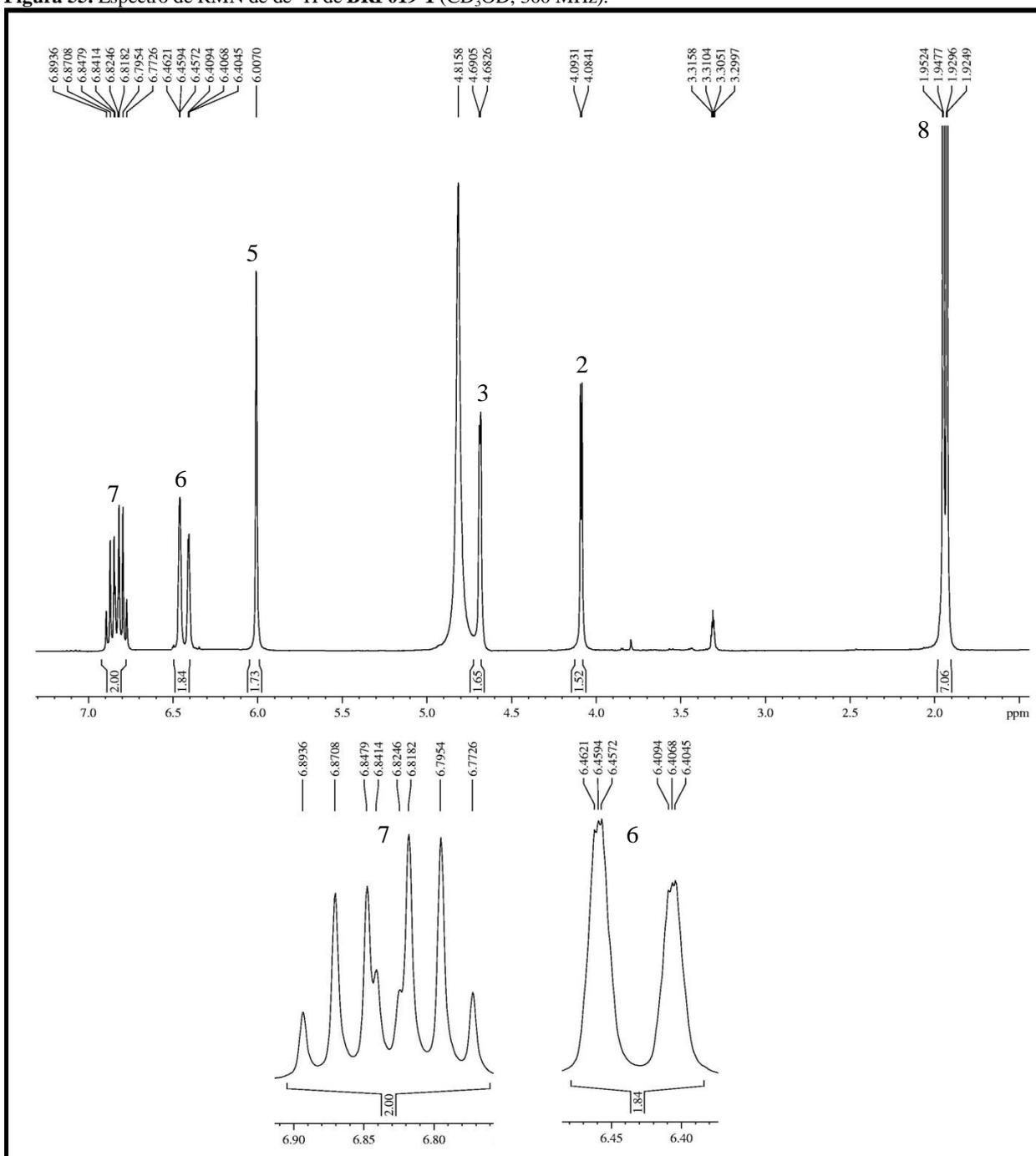


Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C e RMN de ^{13}C -DEPT 135° de **BRF019-1** (CD_3OD , 75 MHz)..

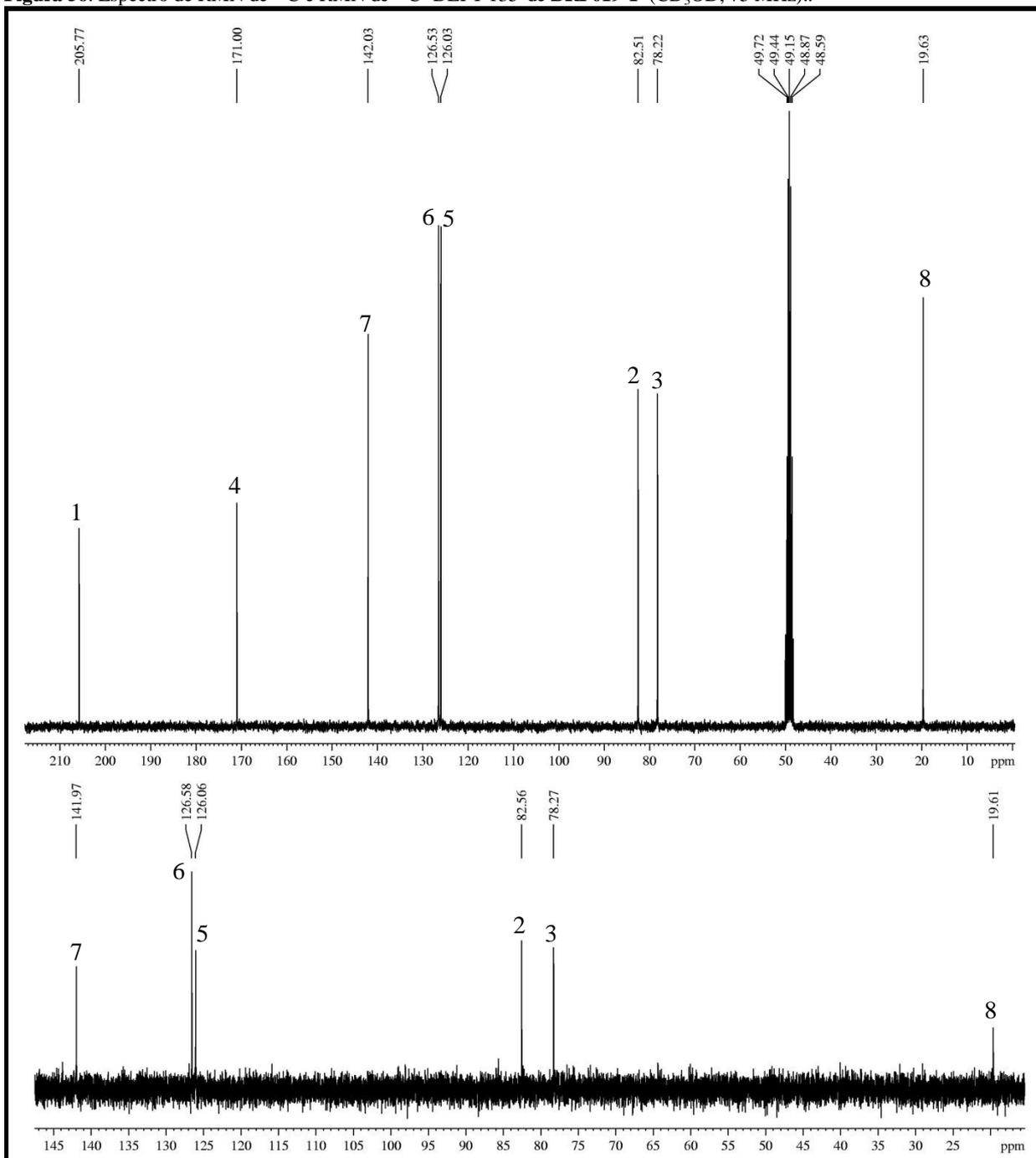


Figura 57. Mapa de contornos COSY de BRF019-1.

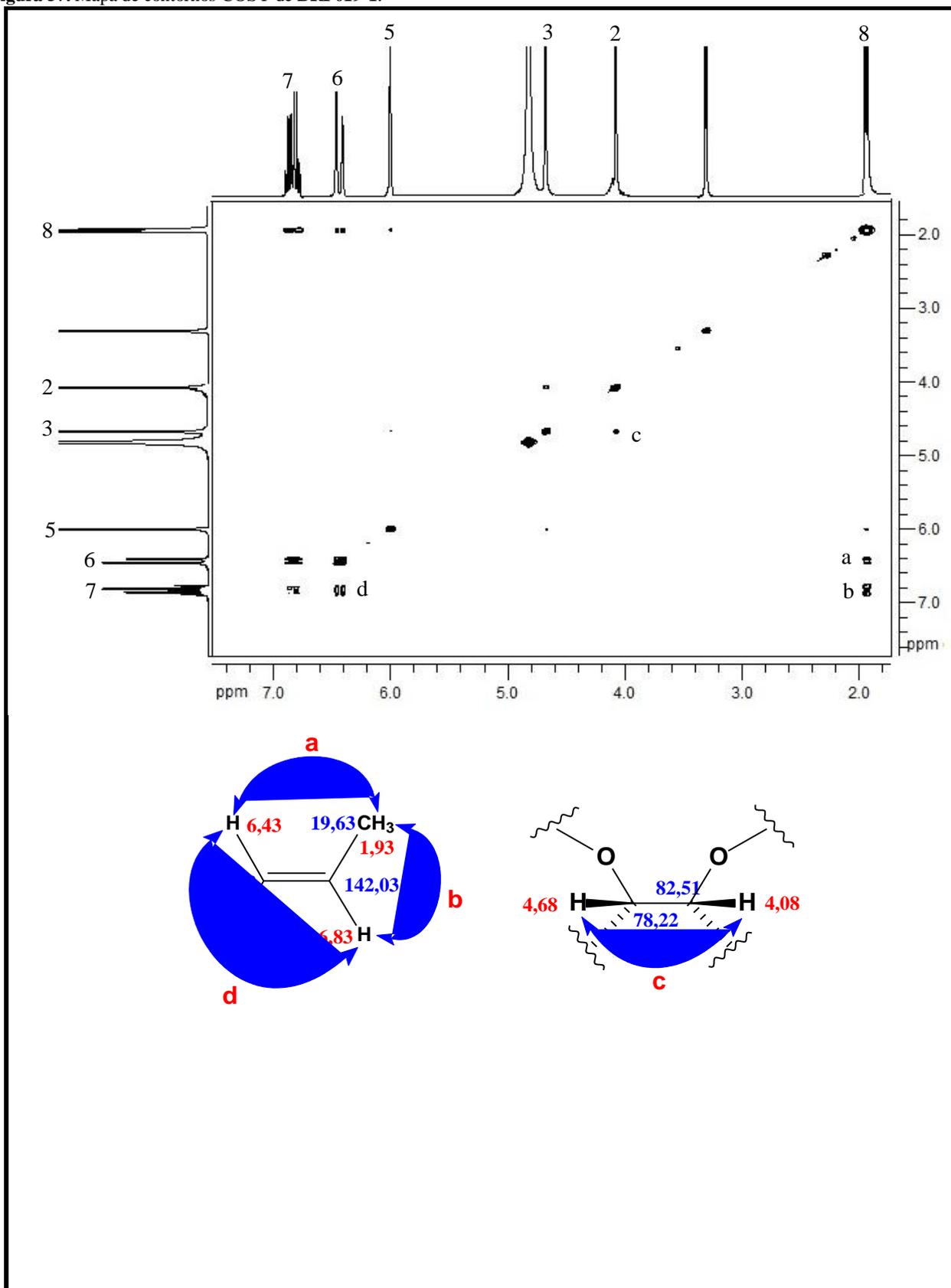


Figura 58. Mapa de contornos HSQC de BRF019-1.

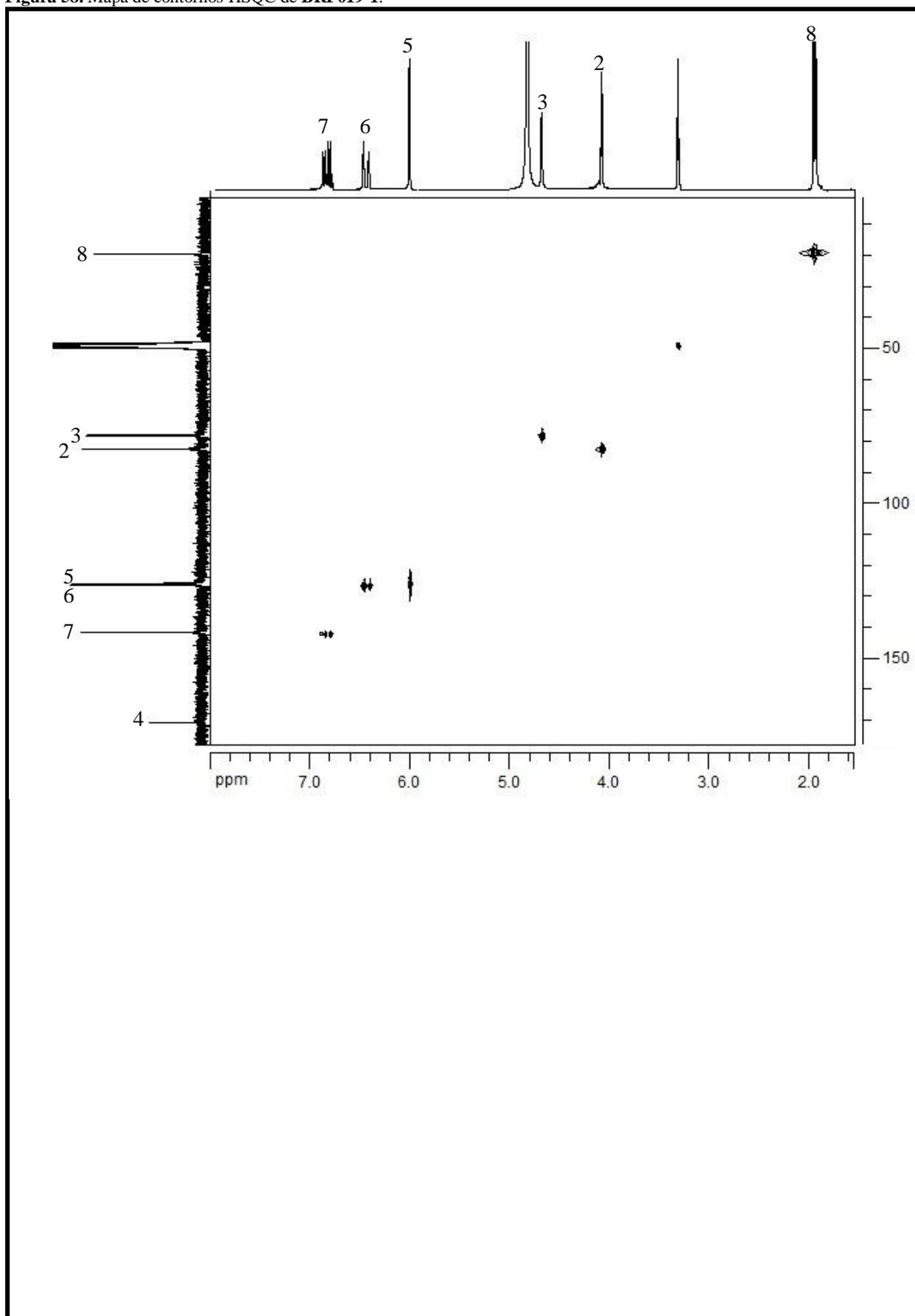
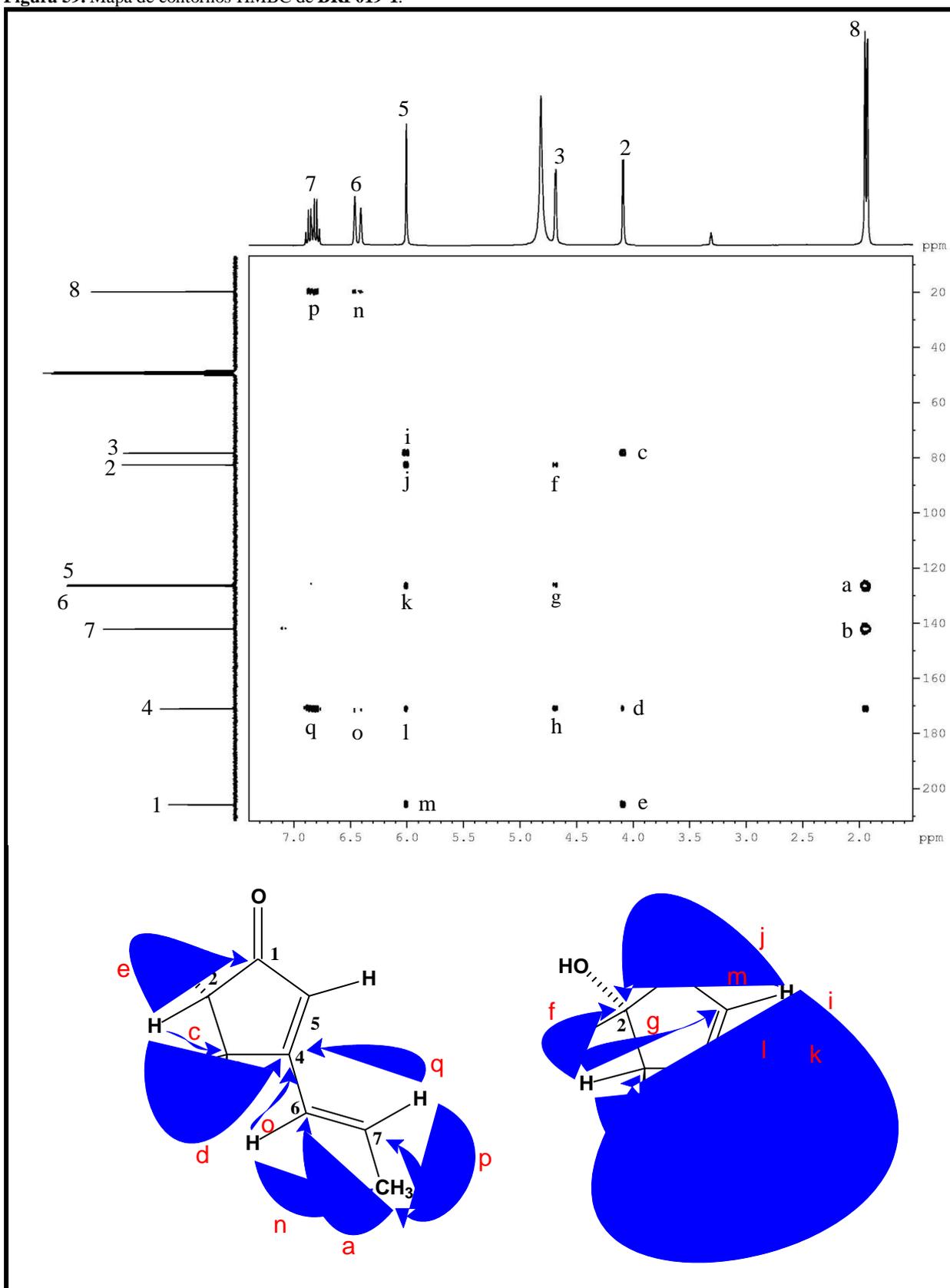


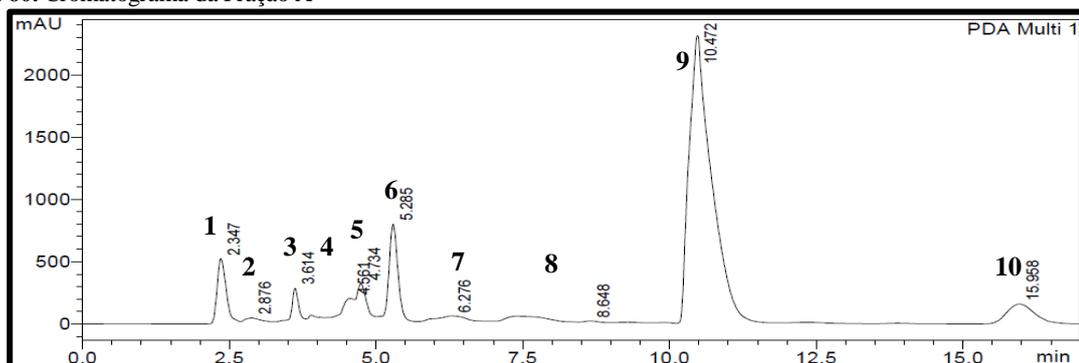
Figura 59. Mapa de contornos HMBC de BRF019-1.



5.5.3.3 Fracionamento da Fração A

A fração A (266,4 mg) (Tabela 11, p. 88) foi submetida à fracionamento cromatográfico através de CLAE. Foram coletadas dez frações, correspondentes aos picos apresentados no cromatograma da Figura 60. Dentre estes, apenas o correspondente ao composto com tempo de retenção 10,47 minutos (pico 9) apresentou-se como uma substância pura (101,9 mg, 38,52 %), e foi codificado como **BRF019-2**. Essa amostra foi submetida a experimentos de RMN uni e bidimensionais, EMAR-IES e IV para a sua elucidação estrutural.

Figura 60. Cromatograma da Fração A



5.5.3.4 Determinação estrutural de BRF019-2

BRF019-2 foi obtido como um sólido amarelo amorfo e solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução (Figura 67, p. 106) no modo positivo, exibiu o íon correspondente à molécula com aduto de sódio $[M + Na]^+$, em m/z 447,1408 (m/z calculado 447,1414, erro -1,34 ppm), o qual apontou a fórmula molecular $C_{24}H_{24}O_7$ (IDH 13).

A análise do seu espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 68, p. 107) permitiu observar uma banda larga em 3309 cm^{-1} , relativa a estiramento de hidroxila com ligação de hidrogênio inter- ou intramolecular. A banda em 1729 cm^{-1} foi atribuída a uma carbonila de éster conjugada. As absorções em 1608 , 1517 e 1436 cm^{-1} são devidas às estiramentos $C=C$ de aromático. As bandas em 1251 e em 1178 cm^{-1} correspondem a estiramentos $C-O$. As absorções em 1034 e 836 cm^{-1} se devem a dobramentos $C-H$ fora do plano de alcenos trissubstituídos.

O espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 300MHz) (Figura 69, p. 108) apresentou sinais para vinte e um hidrogênios. Os sinais em δ 6,87 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, 2H) e δ 7,59 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, 2H) foram atribuídos a um sistema aromático *para*-substituído do tipo A_2B_2 . Os sinais em δ 6,42 (d, $J = 3,0\text{ Hz}$, 1H), δ 6,50 (d, $J = 9,0\text{ Hz}$, 1H) e δ 6,55 (dd, $J = 9,0\text{ Hz}$ e $6,0\text{ Hz}$, 1H) foram atribuídos a um outro sistema aromático, do tipo ABM, *orto*-di-substituído. O sinal em δ 5,07

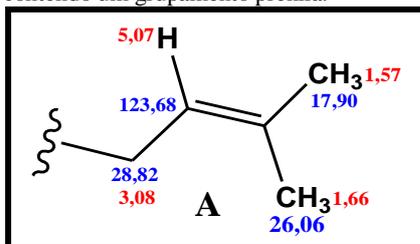
(t, $J = 6,0$ Hz, 1H), foi atribuído a um hidrogênio vinílico vizinho a um metileno, cujo sinal foi atribuído como sendo o duplete em δ 3,08 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H). O simpleto em δ 3,77 (3H) foi atribuído a uma metoxila. Os dois dupletos parcialmente sobrepostos, um em δ 3,41 ($J = 15,0$ Hz, 1H) e o outro em δ 3,47 ($J = 15,0$ Hz, 1H), foram atribuídos a dois hidrogênios geminais quimicamente diferentes. Os dois simpletos em δ 1,57 (3H) e δ 1,66 (3H) foram atribuídos a duas metilas ligadas a carbono sp^2 .

O espectro de RMN de ^{13}C - BB (CD_3OD , 75 MHz) (Figura 70, p. 109) apresentou vinte e duas linhas espectrais. Sua análise comparativa com o espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (Figura 70, p. 109) revelou a presença de duas metilas em δ 17,90 e δ 26,06; uma metoxila em δ 53,98; dois carbonos sp^3 metilênicos em δ 28,82 e δ 39,76; oito carbonos metínicos sp^2 em δ 115,60, δ 116,76 (dois sinais sobrepostos), δ 123,68, δ 129,90, δ 130,53 (dois sinais sobrepostos) e δ 132,80; onze carbonos quaternários, sendo: Um oxigenado e sp^3 em δ 87,00; oito sp^2 em δ 123,30, δ 125,24, δ 128,61 e δ 129,41, δ 133,14 (sendo estes cinco alquilados), δ 139,88, δ 155,17, δ 159,41 (sendo estes dois últimos fenólicos); e dois carbonílicos em δ 170,54 e δ 171,75. Desta forma, um dos sistemas aromáticos é um anel fenólico *para*-substituído, enquanto o outro é um anel fenólico trissubstituído, assimétrico.

O experimento bidimensional HSQC (Figura 72, p. 111) de **BRF019-2** permitiu observar as seguintes correlações entre pares de carbono e hidrogênio: δ_{C} 17,90 e δ_{H} 1,57; δ_{C} 26,06 e δ_{H} 1,66; δ_{C} 28,82 e δ_{H} 3,08; δ_{C} 39,76 e δ_{H} 3,43; δ_{C} 53,98 e δ_{H} 3,77; δ_{C} 115,23 e δ_{H} 6,50; δ_{C} 116,76 e δ_{H} 6,87; δ_{C} 123,68 e δ_{H} 5,07; δ_{C} 129,90 e δ_{H} 6,55; δ_{C} 130,53 e δ_{H} 7,59; δ_{C} 132,55 e δ_{H} 6,42.

No mapa de contornos COSY (Figura 71, p. 110), as principais correlações observadas foram entre o sinal de hidrogênio em δ 3,08 e os sinais de metilas em δ 1,57 e δ 1,66, e o sinal de hidrogênio olefínico em δ 5,07, e entre este e os sinais de metila em δ 1,57 e δ 1,66. Essas correlações confirmam a presença de um grupamento prenila na estrutura de **BRF019-2**, mostrado na Figura 61.

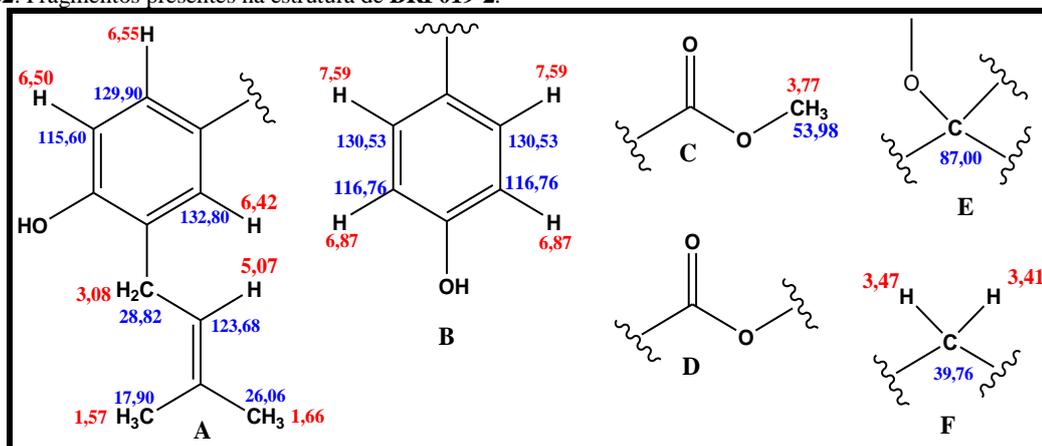
Figura 61. Subestrutura A de **BRF019-2** contendo um grupamento prenila.



Observou-se também o acoplamento entre sinal de hidrogênio aromático na posição meta em δ 6,42 e o sinal de hidrogênio metilênico do grupo prenila em δ 3,08, confirmando,

desta maneira, a posição do grupo prenila no anel aromático. O acoplamento entre os dupletos em δ 7,59 e δ 6,87 ($J = 9$ Hz) confirmam o padrão para-substituído do outro anel aromático. Os dados espectroscópicos discutidos permitem propor a presença dos seguintes fragmentos (Figura 62) na estrutura de **BRF019-2**:

Figura 62. Fragmentos presentes na estrutura de **BRF019-2**.



O valor de IDH (13), associado à quantidade de sinais de carbono sp^2 no espectro de RMN de ^{13}C , sugere que haja mais um ciclo e mais uma dupla ligação na estrutura de **BRF019-2**. A existência de um carbono sp^3 oxigenado quaternário também corrobora a suposição de mais um ciclo na estrutura citada.

O experimento bidimensional HMBC (Figuras 73 e 74, p. 112 e 113) permitiu verificar correlações heteronucleares à longa distância (2J e 3J). As correlações entre os hidrogênios em δ 3,08 e o carbono em δ 123,68 e entre os hidrogênios metílicos em δ 1,57 e δ 1,66 e o carbono olefínico em δ 133,14 confirmam a presença de um grupo prenila e permitem localizar, na estrutura de **BRF019-2**, este último carbono. A correlação entre os hidrogênios da metoxila em δ 3,77 e o carbono carbonílico em δ 171,75 corrobora a presença da função de éster e indicam a localização deste carbono. Observou-se também a correlação entre os hidrogênios geminais sp^3 em δ 3,41 e δ 3,47, com os carbonos em δ 87,00, δ 132,80, δ 171,75, δ 125,24 e δ 128,61 (sendo estes dois últimos quaternários) o que permite conectar o fragmento F aos fragmentos A e E, e este ao fragmento C, levando à subestrutura B (Figura 63, p. 103). O acoplamento observado entre os hidrogênios em δ 7,59 e o carbono em δ 128,61 permite determinar as posições deste e do carbono em δ 125,24, além de conectar o fragmento B à subestrutura B (Figura 63, p. 103), transformando-a em subestrutura C (Figura 64, p. 103). Os acoplamentos entre o hidrogênio em δ 6,42 e o carbono em δ 129,41, assim como o acoplamento entre os hidrogênios em δ 6,82 e o carbono em δ 123,30 permitem determinar a posição destes carbonos na subestrutura C. Os acoplamentos entre os hidrogênios em δ 6,42, δ 6,50, δ 6,55 e o carbono

carboxilato de metila. Trata-se do butenolídeo conhecido por butirolactona I (**137**) (Figura 33, p. 66), o qual foi isolado pela primeira vez em 1977 da espécie fúngica *Aspergillus terreus* (KIRIYAMA *et al.*, 1977). A comparação dos dados espectroscópicos de RMN¹H e ¹³C de **BRF019-2** com os relatados na literatura para a butirolactona I (CAZAR *et al.*, 2005) (Tabela 13), corroboram a estrutura proposta para **BRF019-2** (Figura 66).

Figura 66. Estrutura proposta para **BRF019-2** com estereoquímica e dados de deslocamentos químicos de RMN¹H e ¹³C.

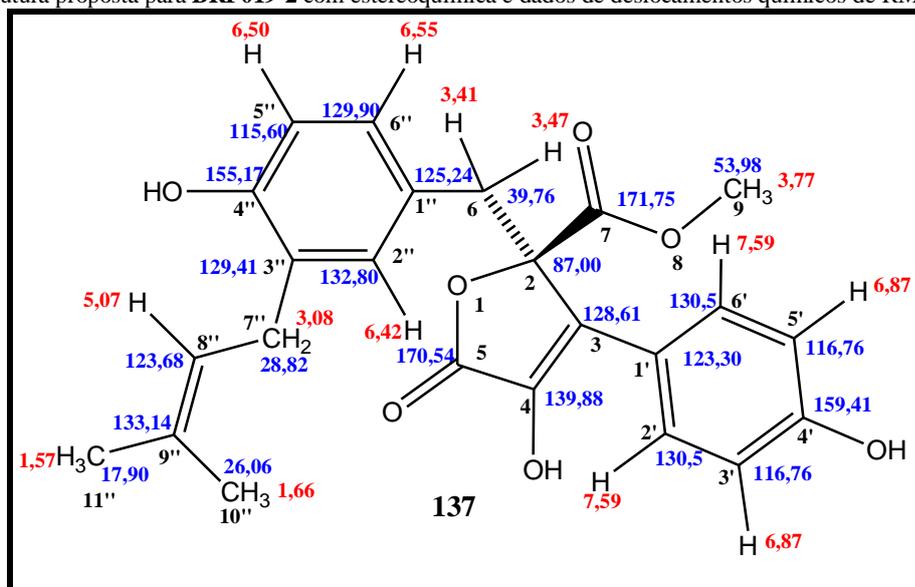


Tabela 13. Comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C de **BRF019-2** com os da Butirolactona I (CAZAR *et al.*, 2005).

C	BRF019-2 (CD ₃ OD, 300 MHz)		Butirolactona I (CDCl ₃ , 400 MHz) (CAZAR <i>et al.</i> , 2005)	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
2	87,00		86,21	
3	128,61		128,51	
4	139,88		137,37	
5	170,54		169,55	
6	39,76	3,47 (d, <i>J</i> = 15,0 Hz, 1H); 3,41 (d, <i>J</i> = 15,0 Hz, 1H)	38,67	3,58 (d, <i>J</i> = 14,7 Hz, 1H); 3,52 (d, <i>J</i> = 14,2 Hz, 1H)
7	171,75		169,91	
9	53,98	3,77 (s, 3H)	53,60	3,80 (s, 3H)
1'	123,30		122,06	
2'	130,50	7,59 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2H)	129,16	7,65 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)
3'	116,76	6,87 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2H)	116,09	6,90 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)
4'	159,41		156,98	
5'	116,76	6,87 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2H)	116,09	6,90 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)
6'	130,50	7,59 (d, <i>J</i> = 9,0 Hz, 2H)	129,16	7,65 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H)
1''	125,24		124,60	
2''	132,80	6,42 (d, <i>J</i> = 3,0 Hz, 1H)	131,85	6,51 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H)

3''	129,41		126,82
4''	155,17		153,16
5''	115,60	6,50 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H)	115,12 6,52 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H)
6''	129,90	6,55 (dd, $J = 9,0$ e 6,0 Hz, 1H)	129,61 6,58 (dd, $J = 7,8$ e 2,0 Hz, 1H)
7''	28,82	3,08 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H)	28,86 3,12 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H)
8''	123,68	5,07 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H)	121,63 5,08 (tl, $J = 7,3$ Hz, 1H)
9''	133,14		134,10
10''	26,06	1,66 (s, 3H)	25,68 1,65 (s, 3H)
11''	17,90	1,57 (s, 3H)	17,17 1,70 (s, 3H)

A butirolactona I é relatada na literatura como agente antilipêmico (HAN *et al.*, 2009; NUCLEAR *et al.*, 2010), e com atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais, tais quais cólon (PARVATKAR *et al.*, 2009), câncer de pâncreas (WADA *et al.*, 1998), câncer de próstata (SUZUKI *et al.*, 1999) e câncer de pulmão (NISHIO *et al.*, 1996).

Figura 67. Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR-IES) de **BRF019-2**.

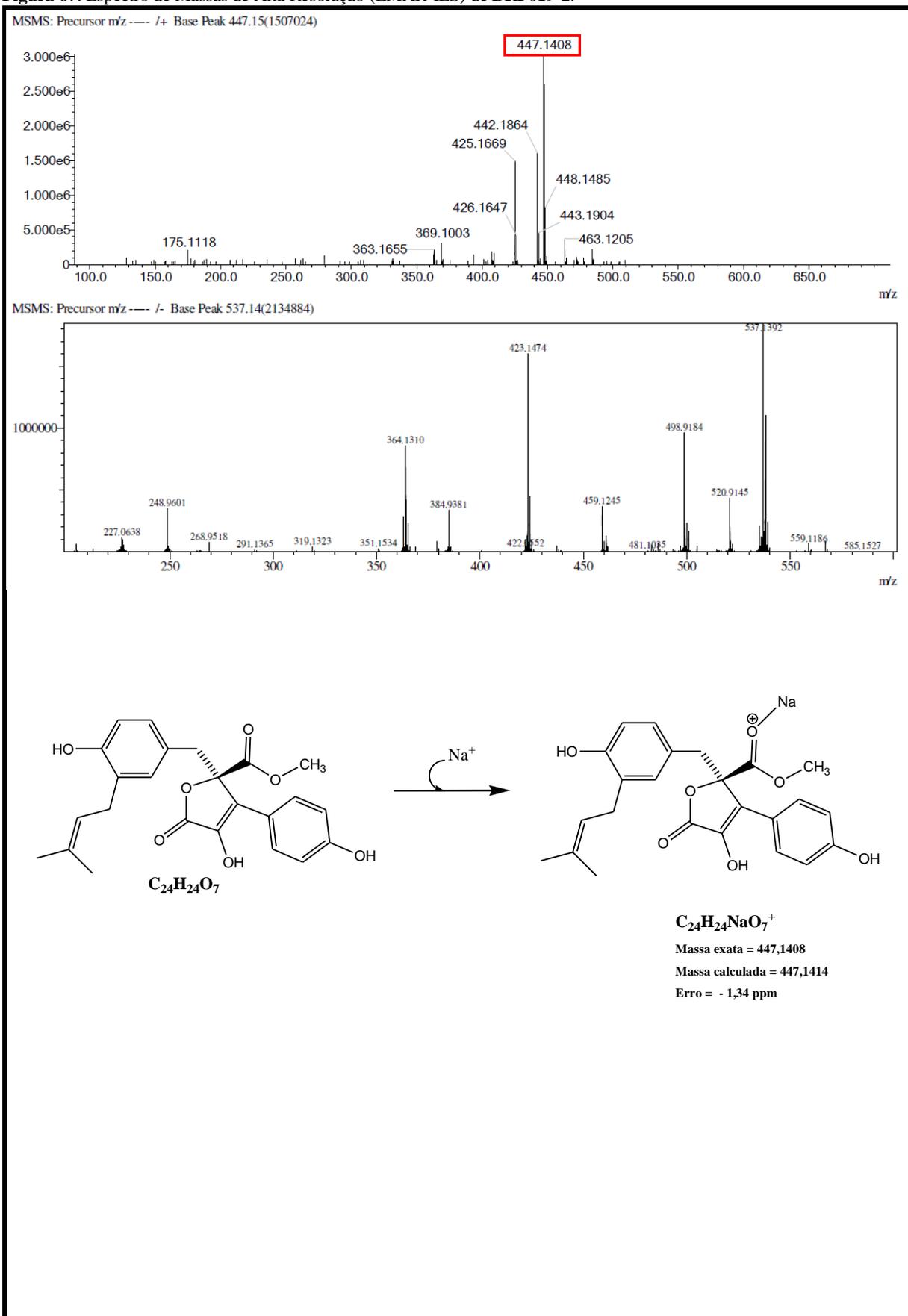


Figura 68. Espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF019-2**.

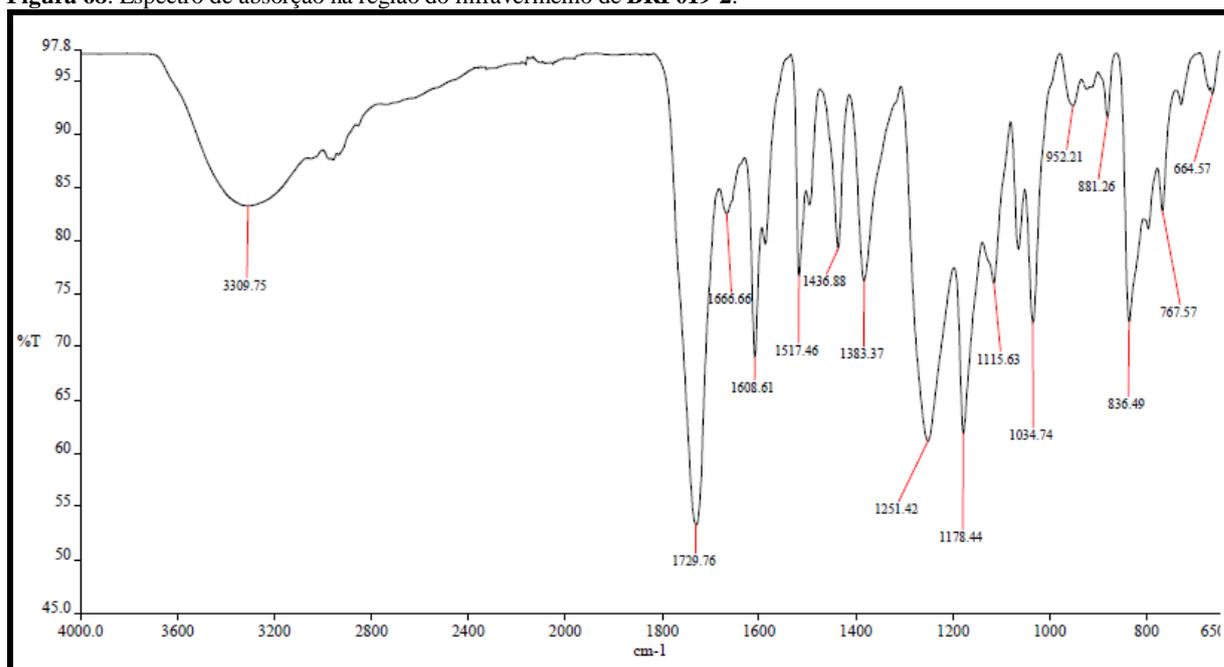


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H de BRF019-2 (CD_3OD , 300 MHz).

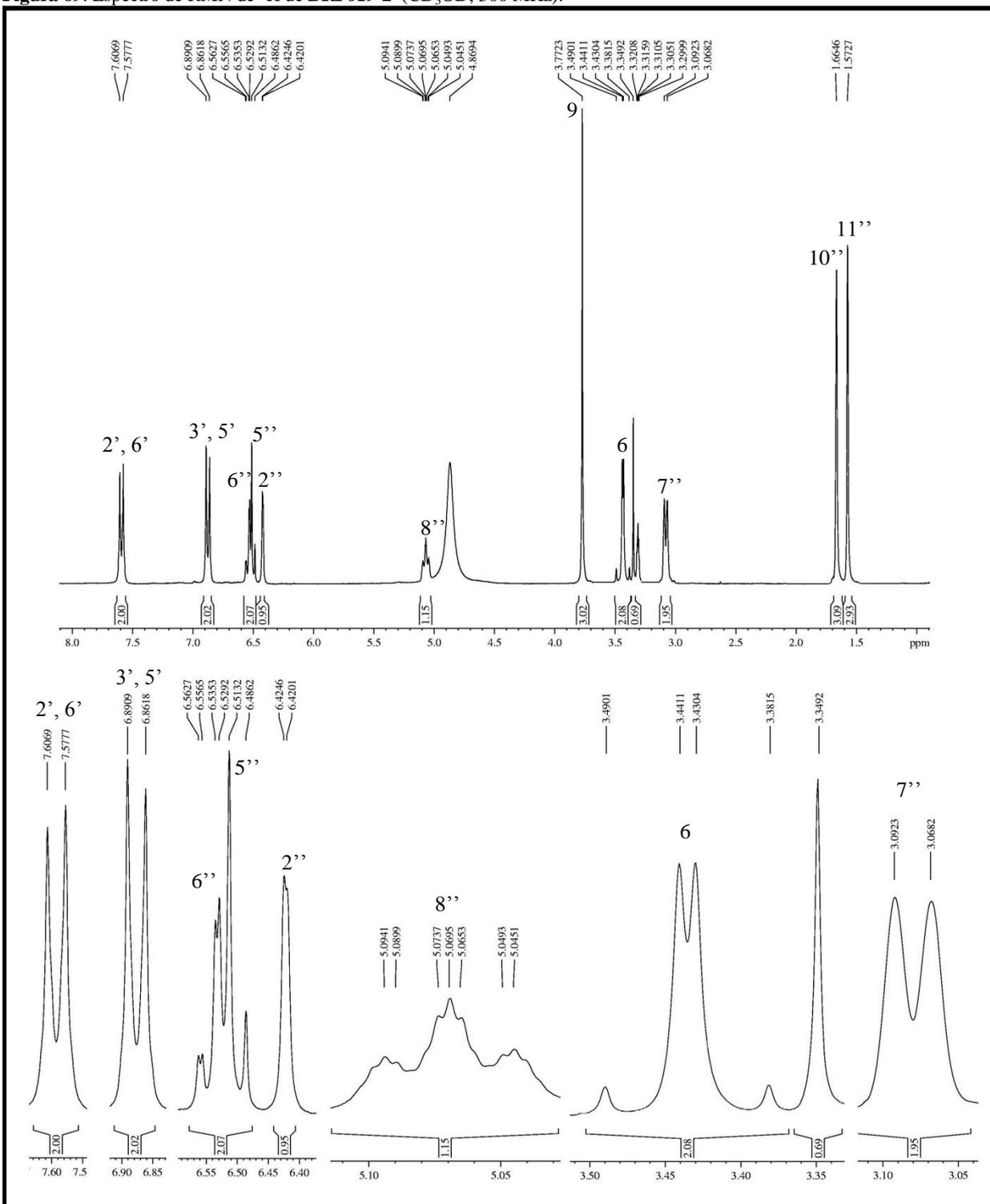


Figura 70. Espectros de RMN¹³C (CD₃OD, 75 MHz) e RMN¹³C-DEPT 135° de BRF019-2.

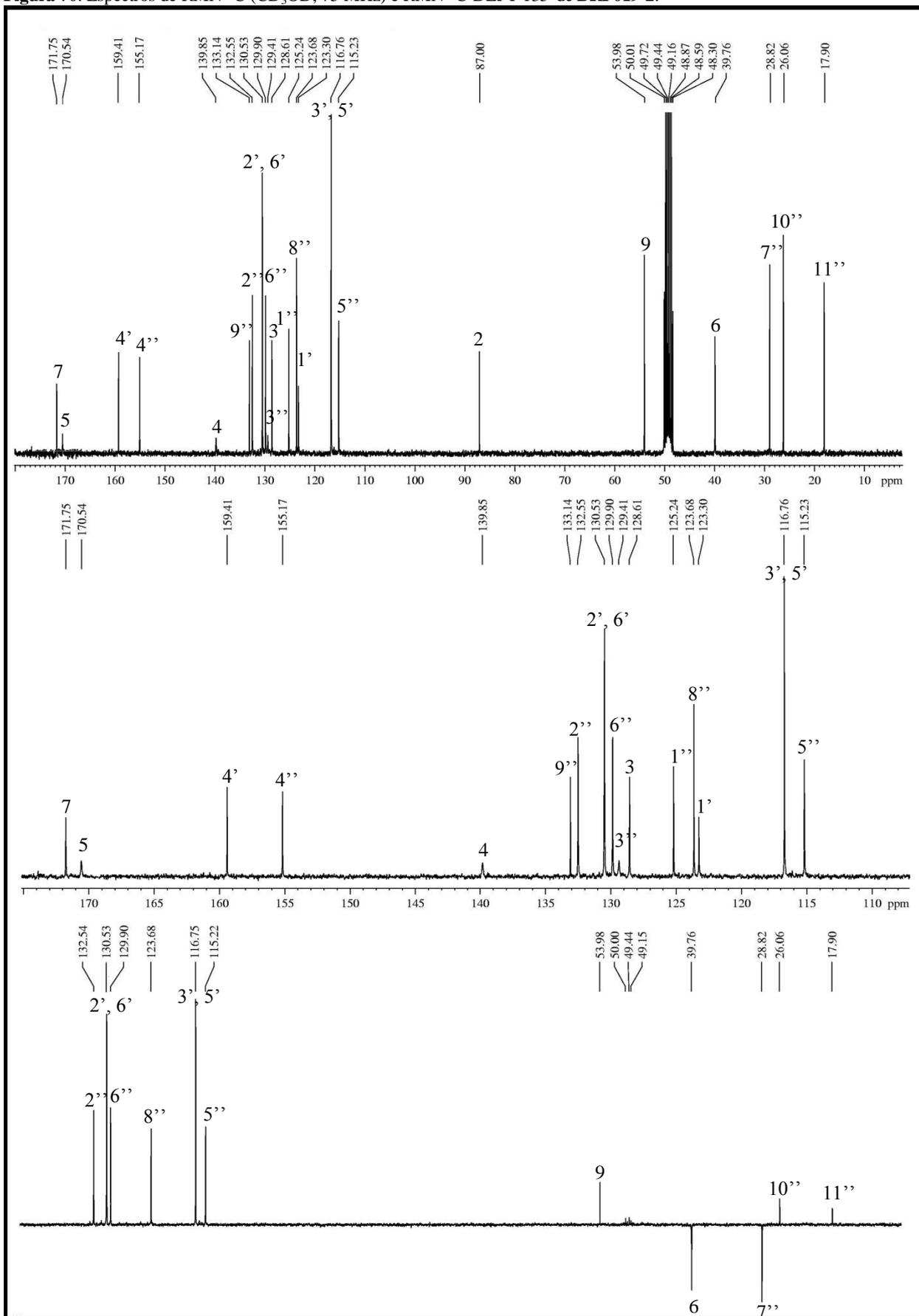


Figura 71. Mapa de contornos COSY de BRF019-2.

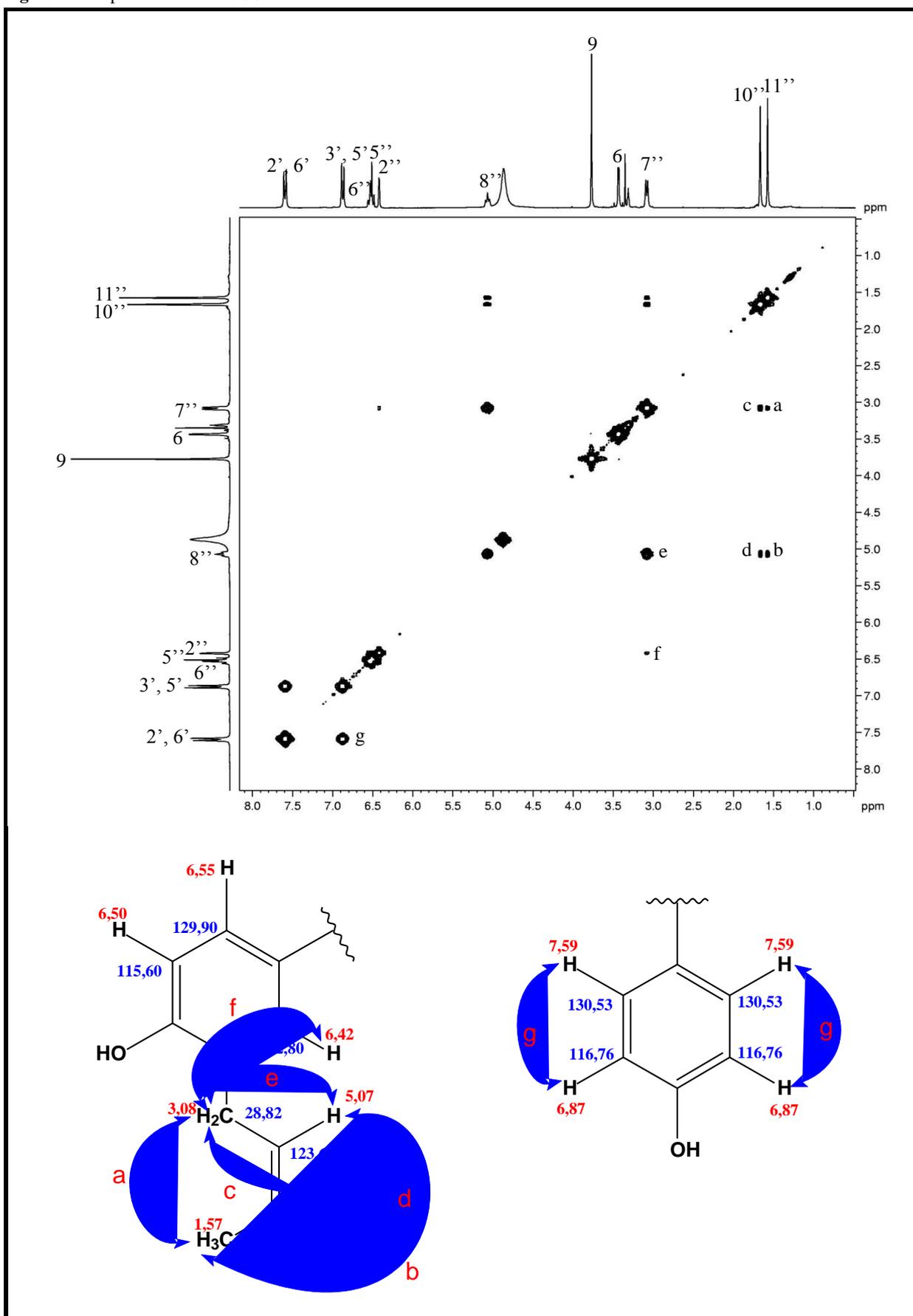


Figura 72. Mapa de contornos HSQC de BRF019-2 e expansão.

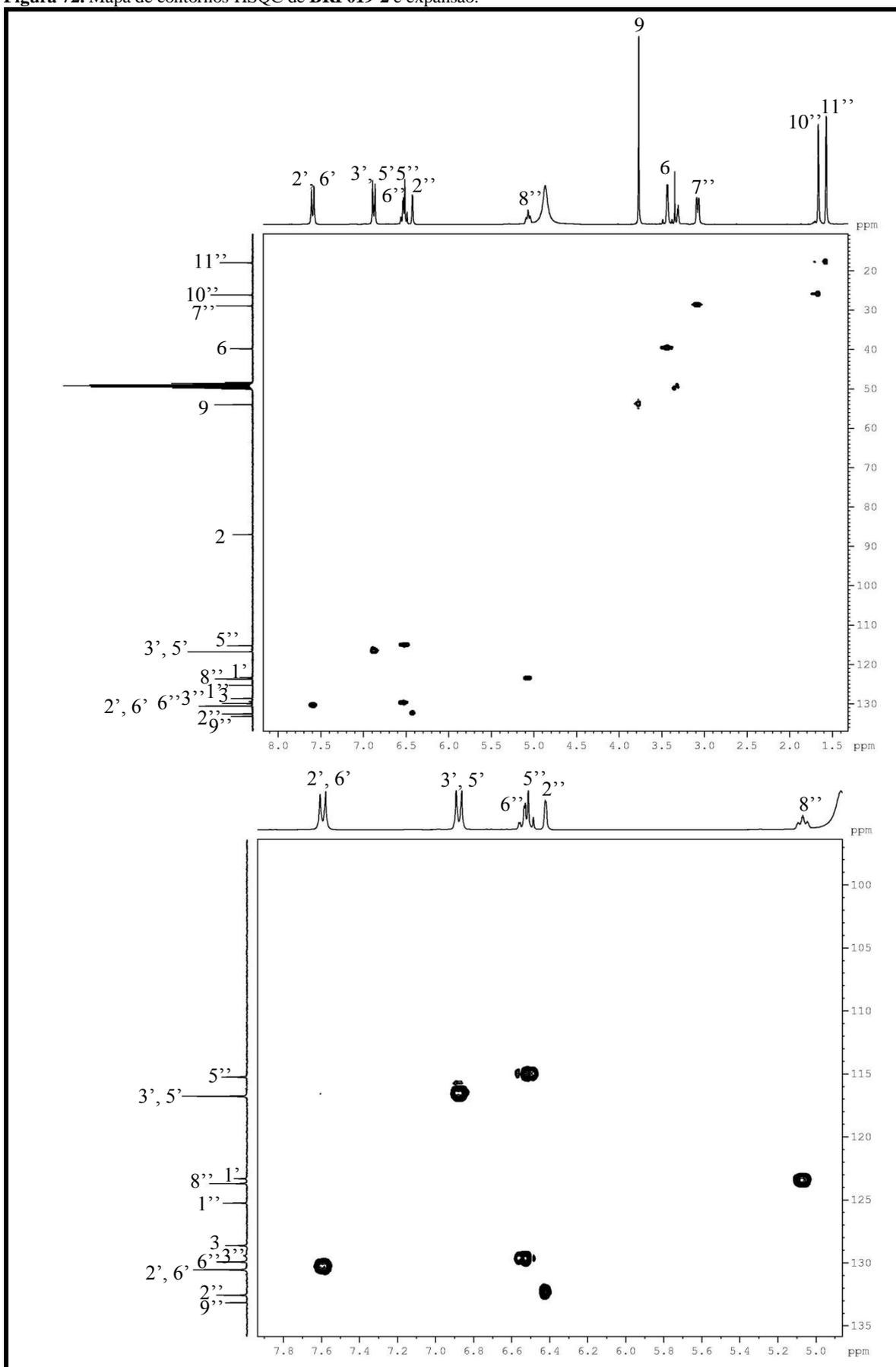


Figura 73. Mapa de contornos HMBC de BRF019-2 e expansão.

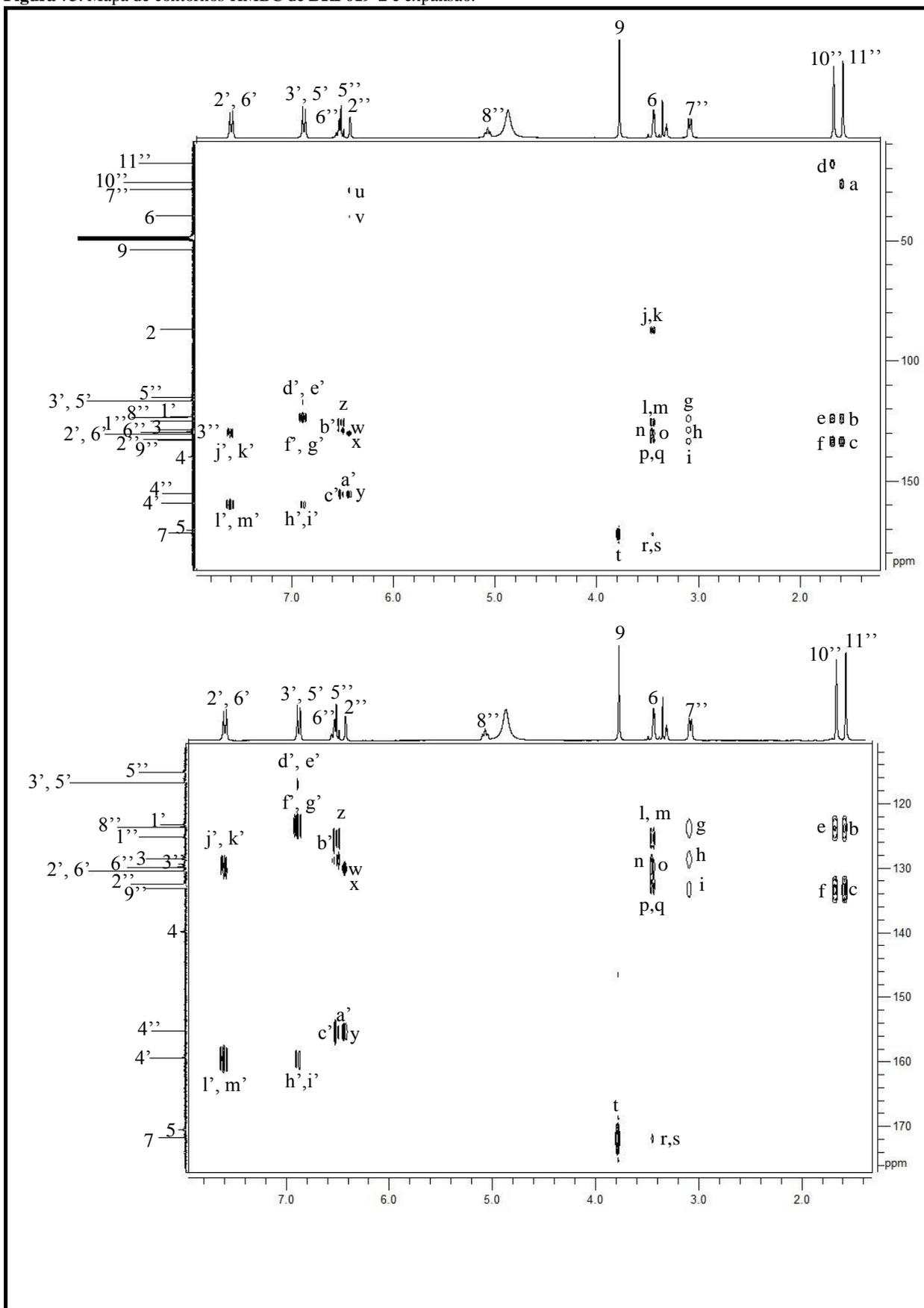
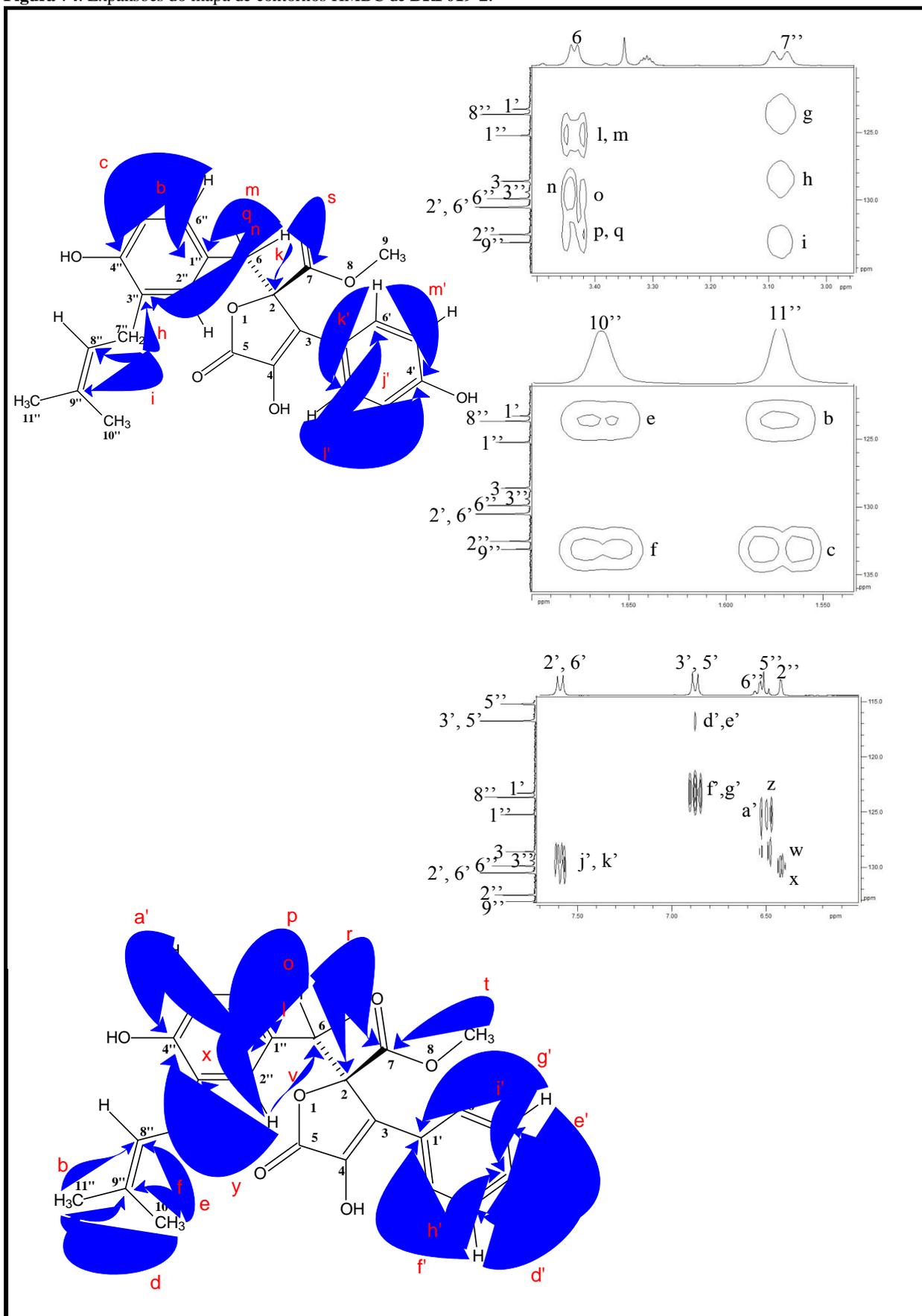


Figura 74. Expansões do mapa de contornos HMBC de **BRF019-2**.



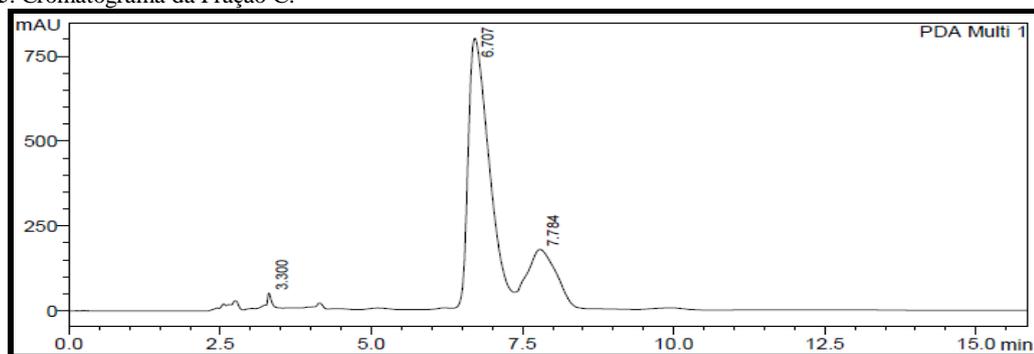
5.5.3.5 Purificação da Fração B

A fração B (1,11 g) (Tabela 11, p. 88) foi purificada por cromatografia em coluna de gel de sílica, conforme procedimento descrito no item 6.9.5, p. 247, fornecendo a substância **BRF019-1** (1,00 g).

5.5.3.6 Fracionamento da Fração C

A fração C (524,7 mg) (Tabela 11, p. 88) foi submetida à separação cromatográfica por CLAE, conforme mostra o cromatograma da Figura 75. Dentre os picos observados, os correspondentes aos tempos de retenção 6,70 e 7,78 minutos foram coletados e submetidos à análise por ressonância magnética nuclear (RMN), tendo-se constatado que tais frações não se tratavam de substâncias puras.

Figura 75. Cromatograma da Fração C.



5.5.3.7 Atividades citotóxicas das substâncias isoladas de BRF019 (*A. terreus*)

As substâncias isoladas do primeiro cultivo de **BRF019** (*A. terreus*) foram submetidas a ensaio de atividade citotóxica frente à linhagem de célula tumoral HCT-116 (côlon). Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL das substâncias isoladas do primeiro cultivo de **BRF019** (*A. terreus*) frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Substâncias	Inibição (%)
BRF019-1 (terreína)	29,95
BRF019-2 (butirolactona I)	17,14
Doxorrubicina	100,00

O percentual de inibição observado para a terreína, 29,95%, é bem menor do que aquele observado para a sua amostra de origem, a fração B (95,00%). Desta forma, pode-se sugerir que a fração B possui, além da terreína, um ou mais componentes, em menor quantidade, responsáveis pela atividade citotóxica desta amostra. Vale salientar também que o valor

deinibição da terreína é bastante próximo daquele observado para a amostra 5 (32,25%), constituída de terreína, mostrada na tabela 10, p. 88.

5.5.4 Segundo cultivo em grande escala da linhagem BRF019 (*A. terreus*)

A Fração A da amostra 1 apresentou cromatograma obtido por CLAE analítico com picos bem resolvidos, além de boa atividade citotóxica. Todavia, só foi possível isolar um constituinte. A fração B, assim como as amostras 2-6, apresentou atividade citotóxica. No entanto, as frações supracitadas forneceram apenas uma substância, a qual não foi ativa. Desta forma, o a linhagem **BRF019** (*A. terreus*) foi cultivada uma segunda vez, em grande escala, objetivando-se a obtenção de uma maior quantidade de extrato e um possível isolamento de outras substâncias.

BRF019 foi cultivada em 12 L de meio líquido BD com água do mar sintética sob condição estática (Item 6.10, p. 247). Ao final de 14 dias de cultivo, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Obteve-se então o extrato bruto do meio líquido de *A. terreus*, o qual forneceu 1,5 g de material. O referido extrato bruto foi submetido a uma partição líquido-líquido com MeOH 90% e hexano (KJER *et al.*, 2010) para um processo de desengorduramento da amostra. Desse modo, obteve-se duas frações: BRF019 meio líquido MeOH 90% (1,5 g) e BRF019 meio líquido hexano (3,0 mg). A fração BRF019 meio líquido MeOH 90% foi submetida a teste citotóxico frente à linhagem de células tumorais HCT-116 para confirmar reprodutibilidade de resultado com a correspondente fração da primeira grande escala. A mesma apresentou percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50 µg/mL de 57,94 %, valor bastante próximo do primeiro resultado.

5.5.4.1 Fracionamento da fração BRF019 meio líquido MeOH 90%

Uma alíquota de 1,5 g da fração BRF019 meio líquido MeOH 90% foi submetida à purificação em cartucho C18 empregando-se como eluentes H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas frações estão descritas na Tabela 15.

Tabela 15. Massas e percentual de inibição do crescimento celular em uma concentração única de 50 µg/mL das amostras obtidas do fracionamento cromatográfico do extrato MeOH 90% do meio líquido de **BRF019** frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

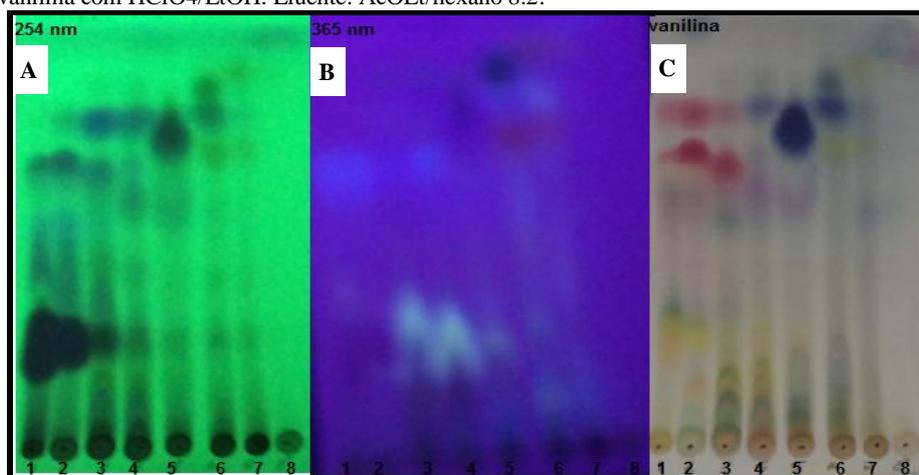
Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)	Inibição (%)
H ₂ O 100%	1	317,6	21,9	88,00
H ₂ O/MeOH 8:2	2	142,3	9,8	90,79
H ₂ O/MeOH 6:4	3	179,0	12,3	17,20
H ₂ O/MeOH 1:1	4	185,1	12,8	9,00

MeOH/H ₂ O 7:3	5	356,1	24,5	55,24
MeOH/H ₂ O 8:2	6	97,7	6,73	0,00
MeOH/H ₂ O 9:1	7	24,7	1,70	74,48
MeOH 100%	8	20,6	1,42	71,12
Doxorrubicina	-	-	-	100,00

As frações com maiores atividades citotóxicas foram as amostras 1 e 2, tendo sido estas, portanto, prontamente escolhidas para uma bioprospecção de metabólitos secundários. Contudo, não foi possível criar um método cromatográfico com uma boa resolução dos picos, inviabilizando o fracionamento das referidas amostras. Em contrapartida, devido à considerável massa obtida nas amostras 3, 4, 5 e 6, resolveu-se proceder a uma investigação química destas frações.

Todas as amostras foram analisadas por CCDA e visualizadas com luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm e reveladas com solução de vanilina em HClO₄/EtOH (Figura 76).

Figura 76. Fotografia das placas cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento em cartucho de sílica C18 do extrato do segundo cultivo em grande escala de **BRF019**. Revelação sob lâmpada de ultravioleta A) 365 nm; B) 254 nm; C) Revelação em solução de vanilina com HClO₄/EtOH. Eluente: AcOEt/hexano 8:2.



A maior parte das frações obtidas apresentou maiores quantidades de massa quando comparadas às obtidas no primeiro cultivo. Observou-se também uma melhor “distribuição” das massas entre as frações. Tal fato pôde ser atribuído a uma melhor separação cromatográfica obtida em cartucho de C18 comercial, utilizado neste segundo cultivo em grande escala, em detrimento da coluna empacotada com sílica C18 utilizada no primeiro cultivo.

5.5.4.2 Fracionamento da subfração H₂O/MeOH 6:4 (amostra 3)

Foram submetidos 179,0 mg da subfração H₂O/MeOH 6:4 (amostra 3, Tabela 15, p. 115) à separação cromatográfica por meio de CLAE. Foram coletados 8 picos apresentados no cromatograma da Figura 77, p. 117 e cujas massas estão na Tabela 16, p. 117. Dentre estes,

apresentaram-se como substâncias isoladas os correspondentes aos compostos com tempo de retenção 16,35 minutos (pico **7**) (7,0 mg, 3,9 %), codificado como **BRF019-3** e 20,81 minutos (pico **8**) (6,60 mg, 3,7%), codificado como **BRF019-4**. Ambas as amostras foram submetidas à análise por RMN, EMAR-IES e IV para a determinação de suas estruturas.

Figura 77. Cromatograma da fração H₂O/MeOH 6:4

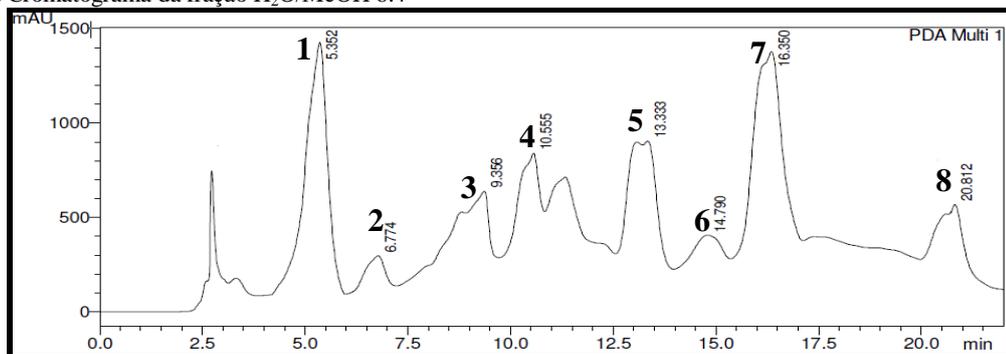


Tabela 16. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra 3 do cultivo da linhagem **BRF019**.

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	3,30	1,84
2	2	2,50	1,39
3	3	4,20	2,34
4	4	33,20	18,55
5	5	2,40	1,34
6	6	5,30	2,97
7	7	7,00	3,91
8	8	6,60	3,69

5.5.4.3 Determinação Estrutural de **BRF019-3**

BRF019-3 foi obtida como um sólido branco amorfo e solúvel em metanol. O espectro de massas de alta resolução dessa molécula (Figura 82, p. 121), no modo positivo, exibiu o íon correspondente a molécula com aduto de hidrogênio $[M + H]^+$ em m/z 195,0647 (m/z calculado 195,0652, erro = -2,56 ppm), e também o íon correspondente à molécula com aduto de sódio $[M + Na]^+$ em m/z 217,0468 (m/z calculado 217,0471, erro = -1,38 ppm), os quais apontaram a fórmula molecular C₁₀H₁₀O₄, IDH 6.

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 83, p. 122) permitiu observar uma banda larga, porém, pouco intensa em 3206 cm⁻¹, relativa a estiramento de hidroxila com ligação de hidrogênio intramolecular. A banda em 1630 cm⁻¹ é compatível com carbonila de β-ceto-éster em que pode ocorrer enolização. As absorções em 1587 e 1477cm⁻¹ são devidas às estiramentos C=C de aromático. A banda em 1383 cm⁻¹ é característica de deformação angular simétrica de metila. A absorção intensa em 1255 cm⁻¹ é

compatível com deformação axial de C-O de éster ou lactona (estiramento C-C(=O)-O), assim como a absorção em 1168 cm⁻¹(estiramento O-C-C).

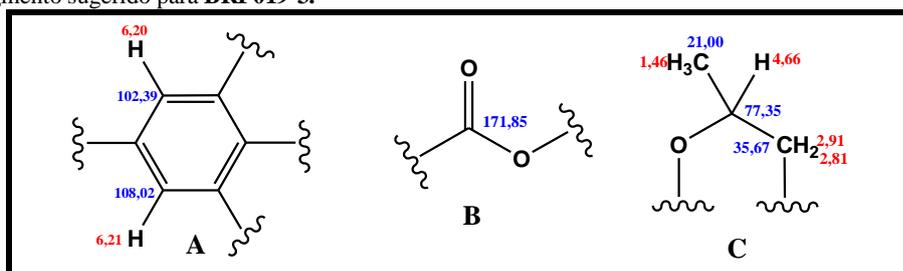
O espectro de RMN de ¹H (CD₃OD, 300MHz) (Figura 84, p. 123) apresentou sinais para oito hidrogênios. Os sinais em δ 6,21 (s, 1H) e δ 6,20 (s, 1H) foram atribuídos a um sistema aromático 1,3,4,5 – tetrassubstituído. O sinal em δ 4,66 (tq, *J* = 5,5 e 6,2 Hz, 1H) foi atribuído a um hidrogênio ligado a carbono *sp*³ oxigenado. Os sinais em δ 2,91 (dd, *J* = 3,75 e 16,40 Hz, 1H) δ 2,81 (dd, *J* = 10,89 e 16,31 Hz, 1H) foram atribuídos a um par de hidrogênios metilênicos com efeito de desblindagem. O sinal em δ 1,46 (d, *J* = 6,3 Hz, 3H) foi atribuído a uma metila.

A análise dos espectros de RMN ¹³C-BB (CD₃OD, 75 MHz) e de RMN ¹³C DEPT 135 (Figura 85, p. 124) de **BRF019-3** permitiu a verificação, naquele, de 10 linhas espectrais. A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 87, p. 126) permitiu atribuir o sinal em δ 171,85 a uma carbonila de éster; os sinais em δ 166,40 e δ 165,78 a carbonos aromáticos oxigenados; os sinais em δ 143,67 e δ 101,62 a carbonos aromáticos não hidrogenados; os sinais em δ 108,02 e δ 102,23 a carbonos aromáticos; o sinal em δ 77,35 a carbono metínico *sp*³ oxigenado; o sinal em δ 35,67 a carbono *sp*³ metilênico; e o sinal em δ 21,00 a carbono metílico.

No mapa de contornos COSY (Figura 86, p. 125), foram observadas correlações entre os sinais de hidrogênios em δ 1,46 e δ 4,65 e entre este e o sinal em δ 2,86.

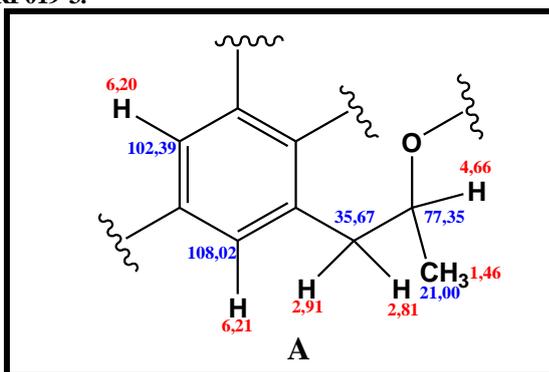
Os dados espectroscópicos até então discutidos permitem propor, para **BRF019-3**, os fragmentos mostrados na Figura 78.

Figura 78. Fragmento sugerido para **BRF019-3**.



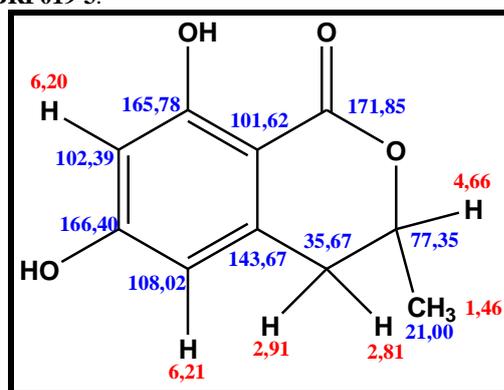
O mapa de contornos HMBC (Figura 88, p. 127) permitiu verificar correlações heteronucleares à longa distância (²*J* e ³*J*). As correlações entre o sinal de hidrogênios metílicos em δ 1,46 e os sinais de carbono em δ 35,67 e δ 77,35 corroboram a proposição do fragmento C (Figura 78). Os acoplamentos entre os sinais de hidrogênios em δ 2,81 e δ 2,91 e os sinais de carbono em δ 101,62, δ 108,02 e δ 143,67 sugerem uma conexão entre os fragmentos A e C, levando à proposição da subestrutura A, mostrada na Figura 79, p. 119.

Figura 79. Subestrutura A para **BRF019-3**.



A fórmula molecular provável apontada pelo espectro de massas de altas resolução (Figura 82, p. 121), $C_{10}H_{10}O_4$, indica a presença de quatro oxigênios na estrutura de **BRF019-3**, assim como absorções características de hidroxila são vistas no seu espectro de absorção na região do infravermelho. O valor de IDH 6 permite fechar o ciclo da subestrutura A (Figura 79), formando um anel lactônico. Há também dois carbonos na região de aromáticos, δ 166,40 e δ 165,78, altamente desprotegidos e não hidrogenados, característicos de ligação com oxigênio. O acoplamento observado no mapa de contornos HMBC entre o hidrogênio em δ 6,20 e o carbono aromático não hidrogenado em δ 101,62, permite assinalar a posição deste e do outro carbono aromático não hidrogenado (δ 143,67). Tais dados permitem propor, para **BRF019-3**, a estrutura mostrada na Figura 80.

Figura 80. Proposta estrutural para **BRF019-3**.



A comparação dos dados espectroscópicos de RMN^1H e ^{13}C de **BRF019-3** com os relatados na literatura para a (*R*) - 6-hidroximeleína (SCHLINGMANN *et al.*, 2002) (Tabela 17, p. 120), corroboram a estrutura proposta para **BRF019-3** (Figura 80) e nos permitem assinalar a configuração relativa no carbono 3 (Figura 81, p. 120). Trata-se, portanto, da isocumarina (*R*)- 3,4-dihidro-6,8-dihidroxi-3-metilisocromen-1-ona, conhecida como (*R*)-6-hidroximeleína, já descrita na literatura desde 1968, quando foi obtida da cultura do fungo

fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* (CURTIS, 1968). Já foi obtida também do fungo *A. terreus* (SHIMADA *et al.*, 2002).

Figura 81. Proposta estrutural com estereoquímica do carbono 3 (obtida por comparação dos dados de deslocamento químico de RMN¹H e ¹³C) e dados de deslocamentos químicos de **BRF019-3 (162)**.

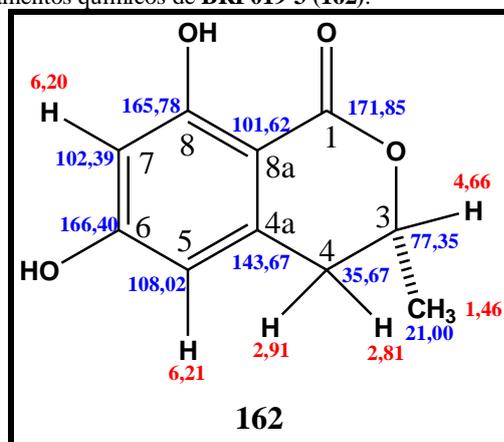


Tabela 17. Comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C de **BRF019-3** com os da (*R*) – 6 - hidroximeleína (SCHLINGMANN *et al.*, 2002).

C	BRF019-3 (CD ₃ OD, 300 MHz)		(<i>R</i>) – 6 - hidroximeleína (CD ₃ OD, 400 MHz) (SCHLINGMANN <i>et al.</i> , 2002)	
	¹³ C	RMN δ ¹ H	¹³ C	RMN δ ¹ H
1	171,85		171,69	
3	77,35	4,66 (tq, <i>J</i> = 5,5 e 6,2 Hz, 1H)	77,18	4,64 (m, <i>J</i> = 3,5, 10,9 e 6,3 Hz, 1H)
4	35,67	2,91 (dd, <i>J</i> = 3,75 e 16,40 Hz, 1H); 2,81 (dd, <i>J</i> = 10,89 e 16,31 Hz, 1H)	35,51	2,90 (dd, <i>J</i> = 3,5, 16,4 Hz, 1H); 2,81 (dd, <i>J</i> = 10,9 e 16,4 Hz, 1H)
4a	143,67		143,50	
5	108,02	6,21 (s, 1H)	107,85	6,21 (s, 1H)
6	166,40		166,26	
7	102,39	6,20 (s, 1H)	102,17	6,19 (s, 1H)
8'	165,78		165,63	
8a	101,62		101,47	
3-CH ₃	21,00	1,46 (d, <i>J</i> = 6,3 Hz, 3H)	20,83	1,45 (d, <i>J</i> = 6,3 Hz, 3H)

Figura 82. Espectro de Massas de Alta Resolução (EMAR-IES) de BRF019-3.

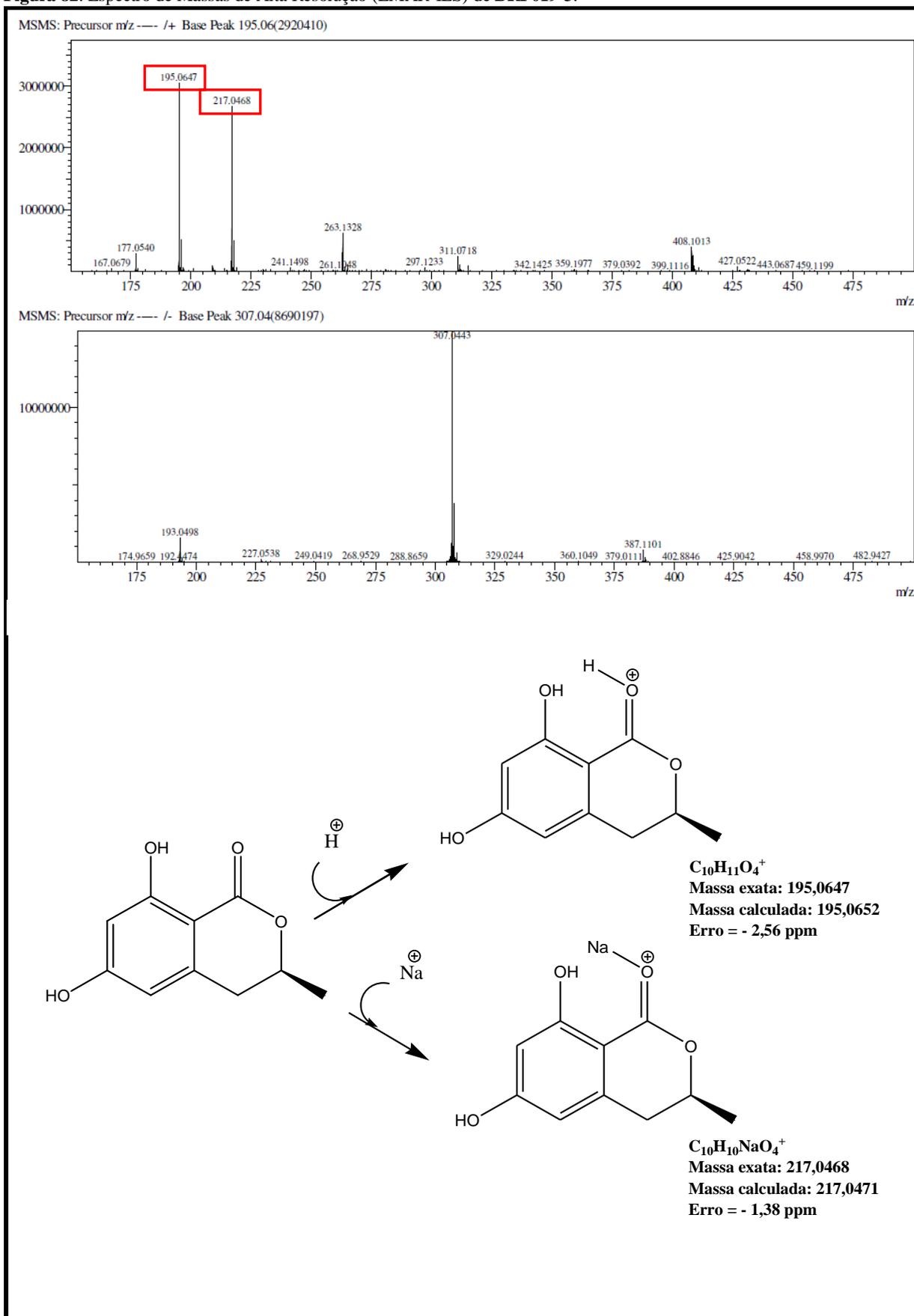


Figura 83. Espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF019-3**.

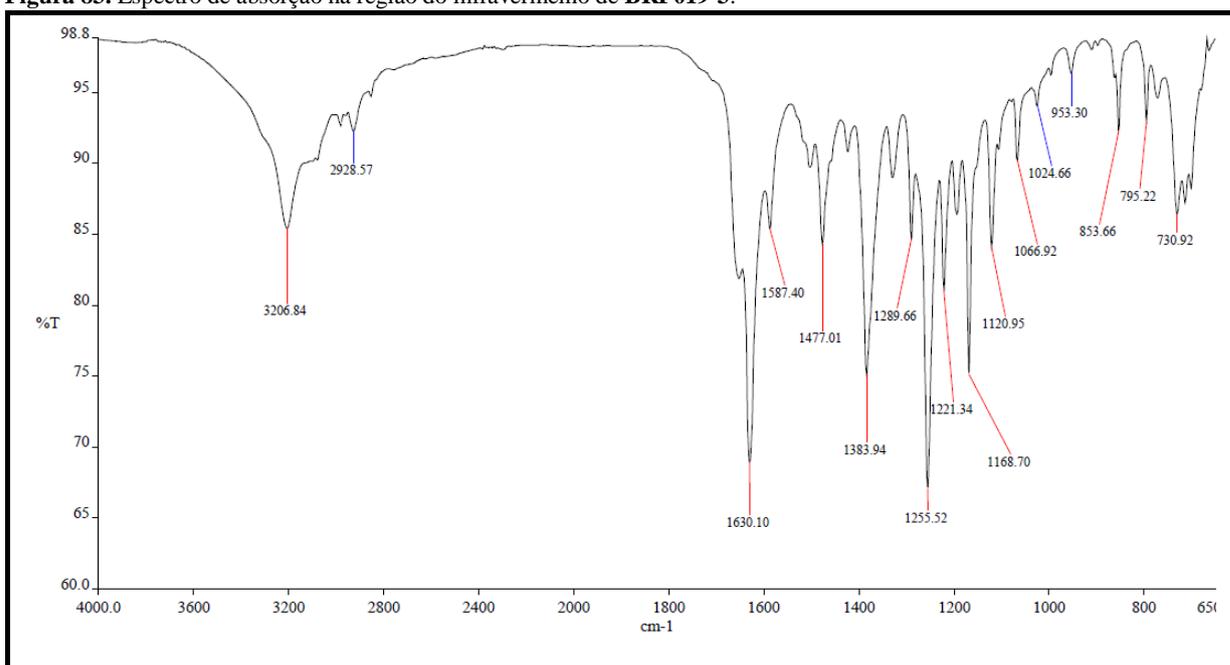


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de **BRF019-3** e expansões.

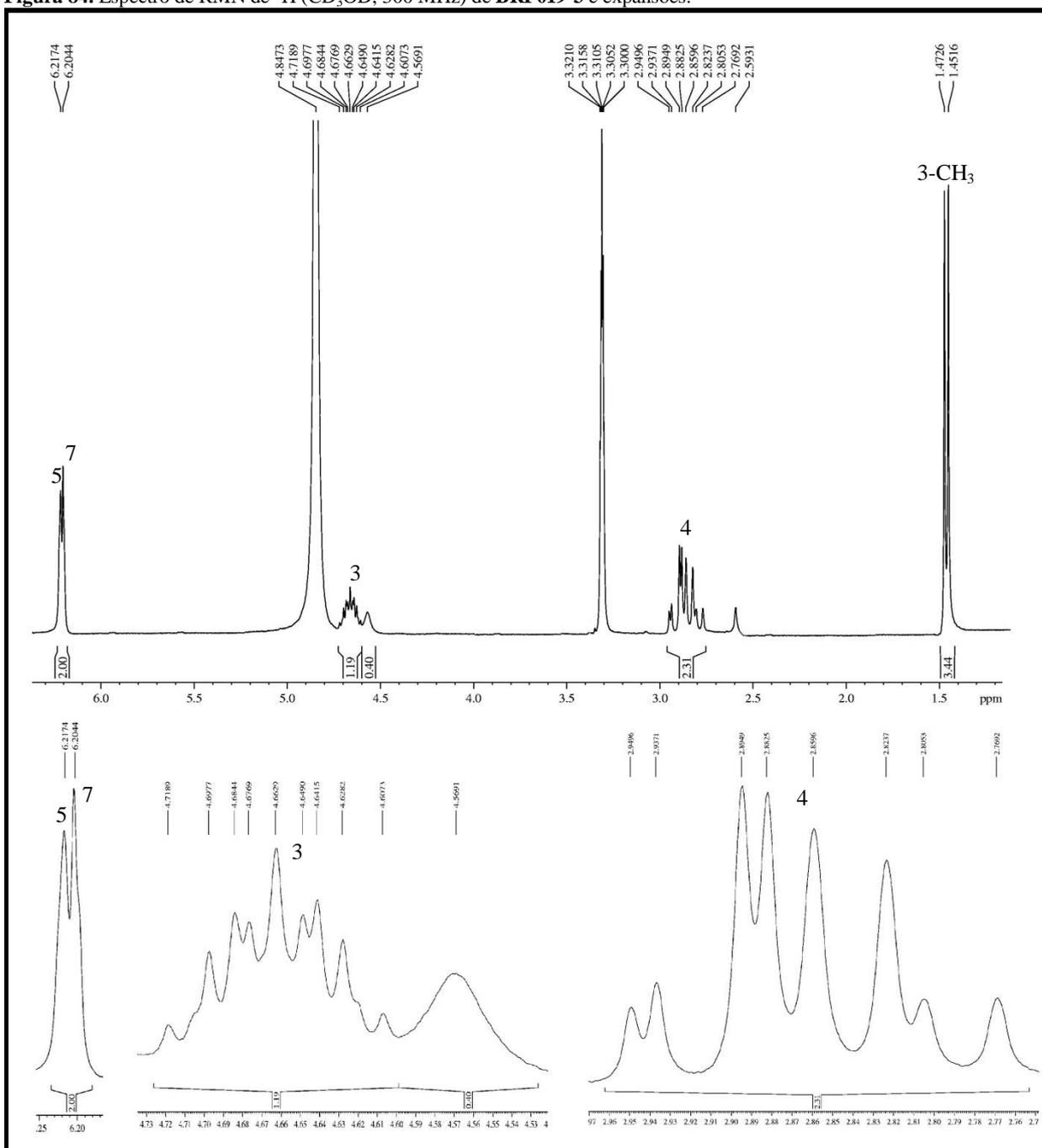


Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPT 135° de BRF019-3.

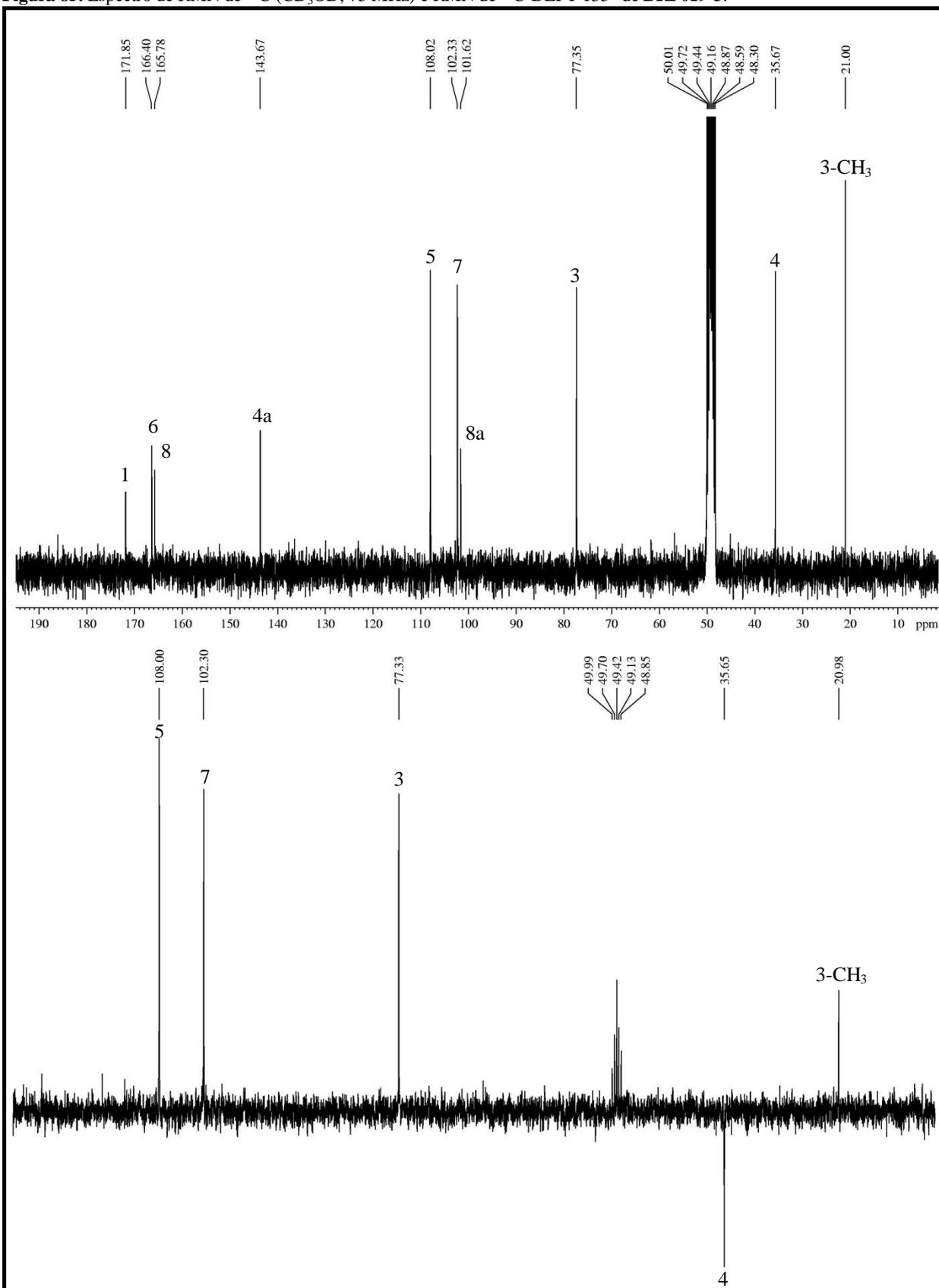


Figura 86. Mapa de contornos COSY de BRF019-3.

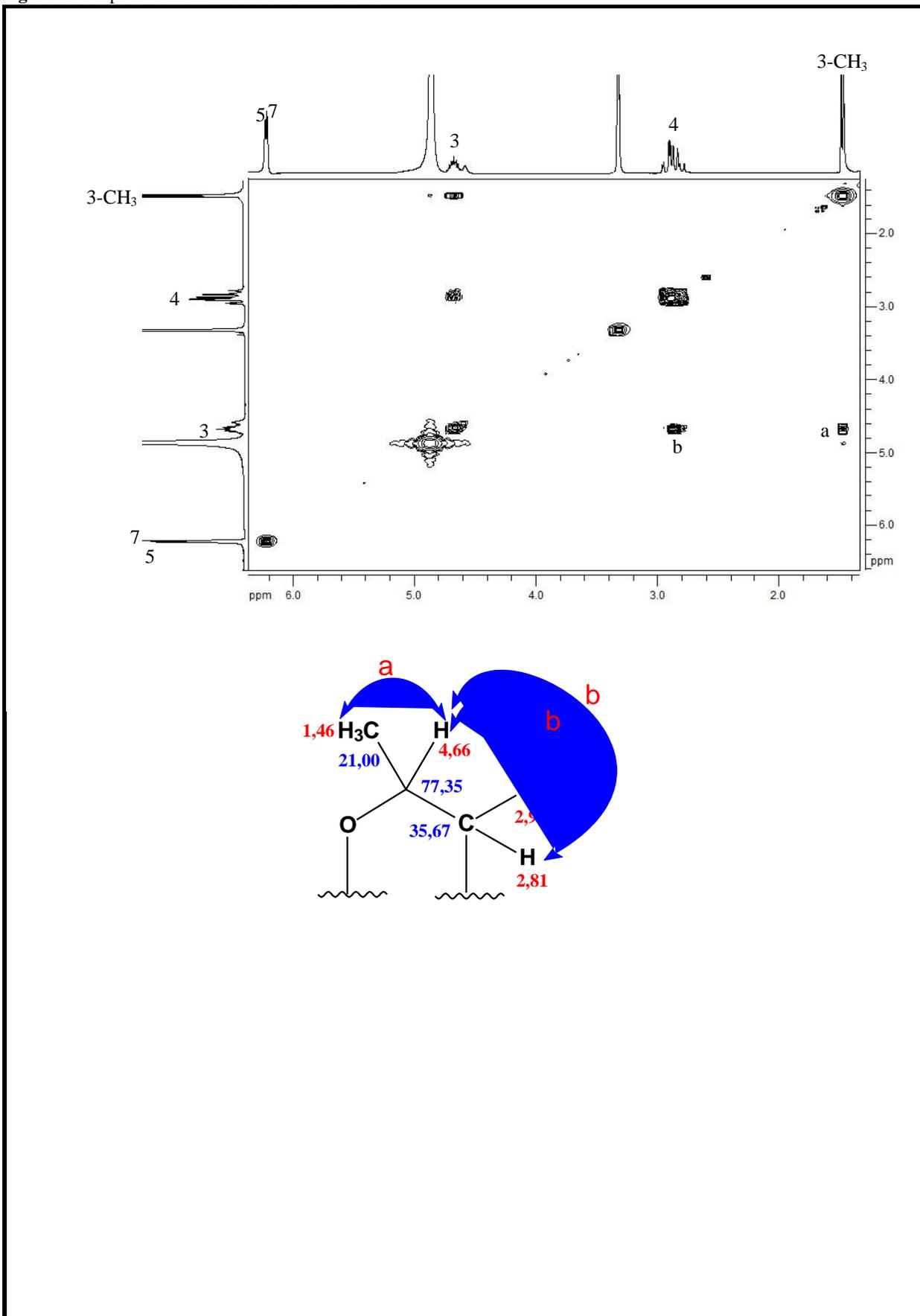


Figura 87. Mapa de contornos HSQC de BRF019-3.

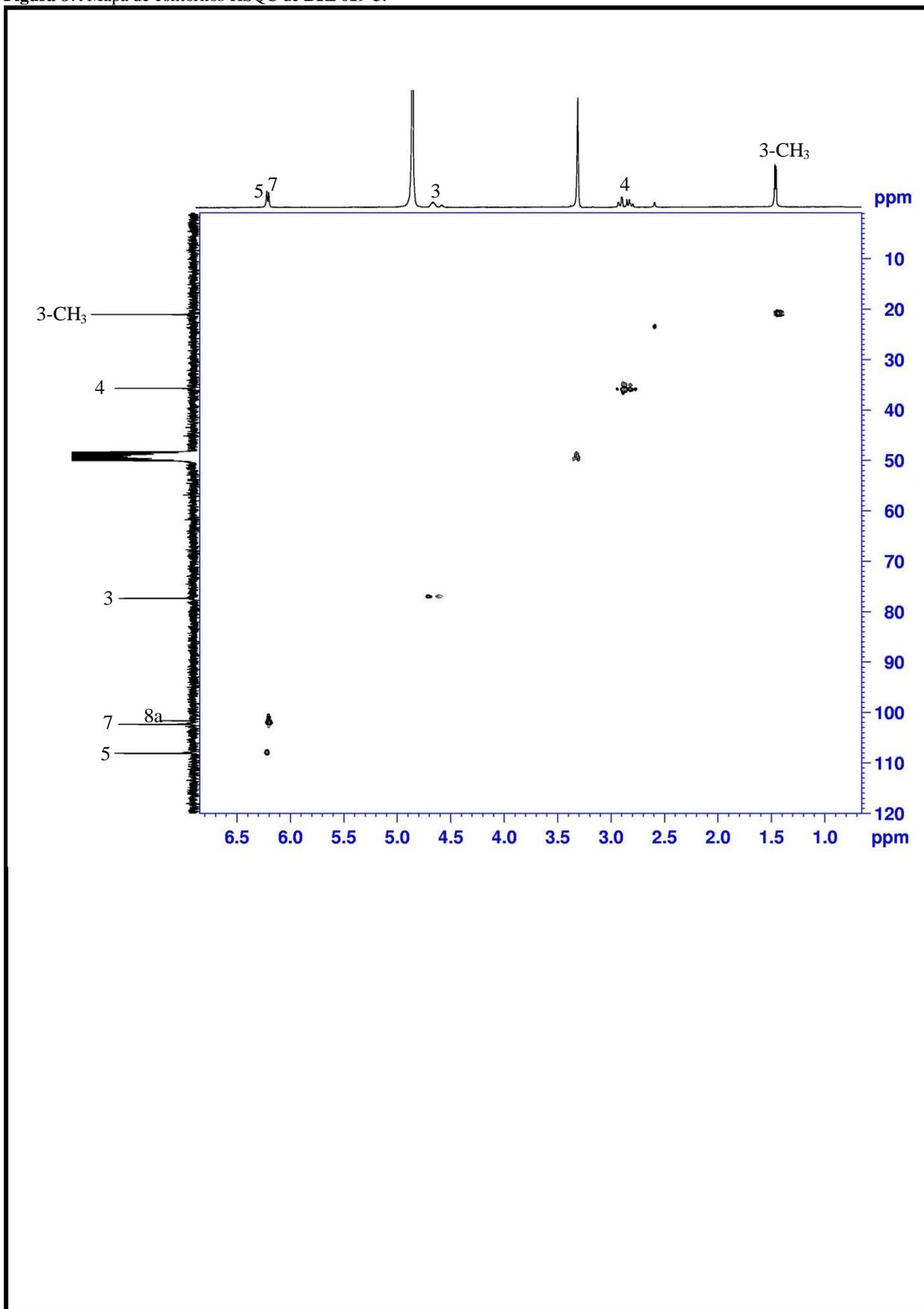
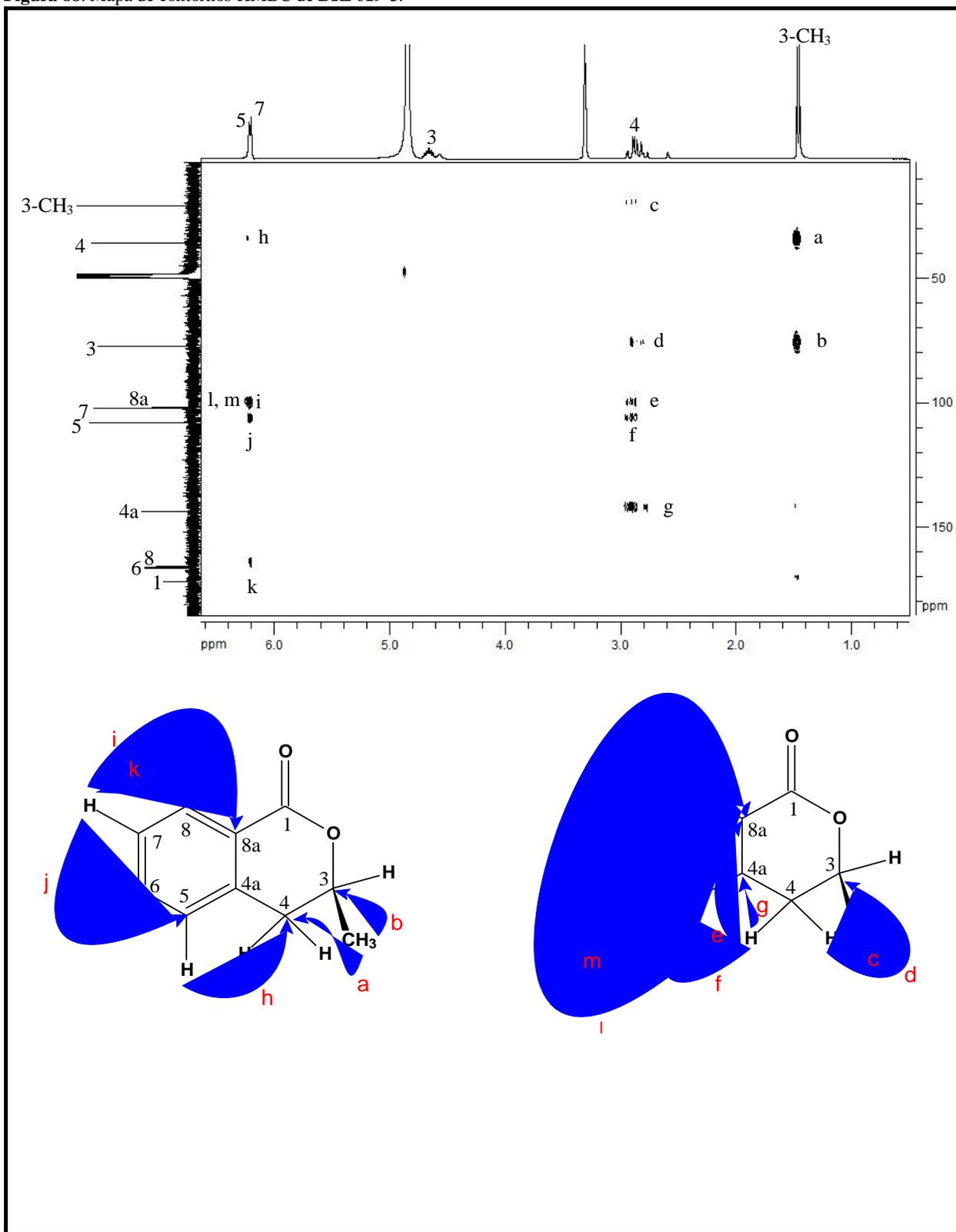


Figura 88. Mapa de contornos HMBC de BRF019-3.



5.5.4.4 Determinação Estrutural de BRF019-4

BRF019-4 foi obtido como um sólido amorfo branco-amarelado, solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução EMAR-IES (Figura 93, p. 132), no modo positivo, exibiu os íons correspondentes à molécula com aduto de hidrogênio $[M + H]^+$ em m/z 357,0986 (m/z calculado 357,0969, erro = 4,76 ppm) e com aduto de sódio $[M + Na]^+$ em m/z 379,0800 (m/z calculado 379,0788, erro = 3,16 ppm). No modo negativo, exibiu o íon correspondente à molécula com aduto de cloro $[M + Cl]^-$ em m/z 391,0590 (m/z calculado 391,0590, erro = 0,00 ppm). Tais dados apontaram a fórmula molecular $C_{19}H_{16}O_7$, IDH 12.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 94, p. 133) apresentou uma banda larga em 3242 cm^{-1} relativa à hidroxila. A banda em 1733 cm^{-1} foi atribuída à uma cetona de éster conjugada. As bandas em 1608, 1515 e 1437 cm^{-1} são devidas às estiramentos $C=C$ de aromático. As bandas em 1251 e em 1176 cm^{-1} correspondem a estiramentos $C-O$.

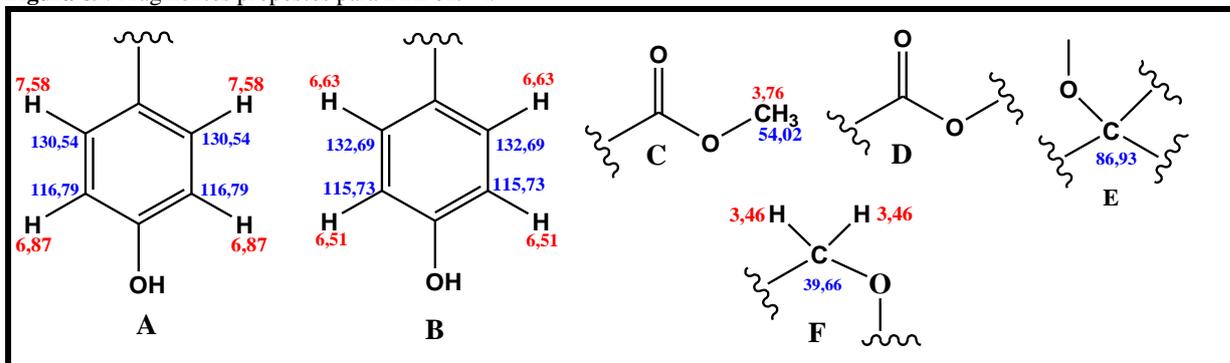
O espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 300MHz) (Figura 95, p. 134) apresentou sinais para quinze hidrogênios. Os sinais em δ 7,58 (d, $J = 8,9\text{ Hz}$, 2H) e δ 6,87 (d, $J = 8,9\text{ Hz}$, 2H) foram atribuídos a um sistema aromático *para*-substituído do tipo A_2B_2 . Os sinais em δ 6,63 (d, $J = 8,5\text{ Hz}$, 2H) e δ 6,51 (d, $J = 8,5\text{ Hz}$, 2H) foram atribuídos a outro sistema aromático, também *para*-substituído do tipo A_2B_2 . O sinal em δ 3,76 (s, 3H), foi atribuído a uma metoxila. O simpleto em δ 3,46 (2H) foi atribuído a um par de hidrogênios metilênicos sob grande efeito de desproteção.

O espectro de RMN de ^{13}C - BB (CD_3OD , 75 MHz) (Figura 96, p. 135) apresentou quinze linhas espectrais. Sua análise comparativa com o espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (Figura 96, p. 135), e juntamente com o mapa de contornos HSQC (Figura 98, p. 137), revelou a presença de nove carbonos não-hidrogenados. Os sinais em δ 170,44 e δ 171,40 foram atribuídos à carbonila de éster. Os sinais em δ 159,54, δ 157,69 e δ 139,90 foram atribuídos a dois carbonos aromáticos fenólicos e a um carbono sp^2 oxigenado e não-hidrogenado, respectivamente. Os sinais em δ 124,07, δ 125,38 e δ 129,40 foram atribuídos a carbonos sp^2 não hidrogenados. Os sinais em δ 132,69, δ 130,54, δ 116,79 e δ 115,73 foram atribuídos a oito carbonos aromáticos hidrogenados, pertencentes a dois sistemas aromáticos *para*-substituídos. Os sinais em δ 86,93, δ 54,02 e δ 39,66 foram atribuídos a carbonos sp^3 sendo uma metoxila, um carbono quaternário oxigenado, e um carbono metilênico, respectivamente.

No mapa de contornos COSY (Figura 97, p. 136), as principais correlações observadas foram entre os sinais em δ 7,58 e δ 6,87 e entre os sinais em δ 6,63 e δ 6,51. Essas correlações

corroboram o padrão de substituição A_2B_2 nos anéis aromáticos. Os dados espectroscópicos já discutidos permitem propor os fragmentos mostrados na Figura 89.

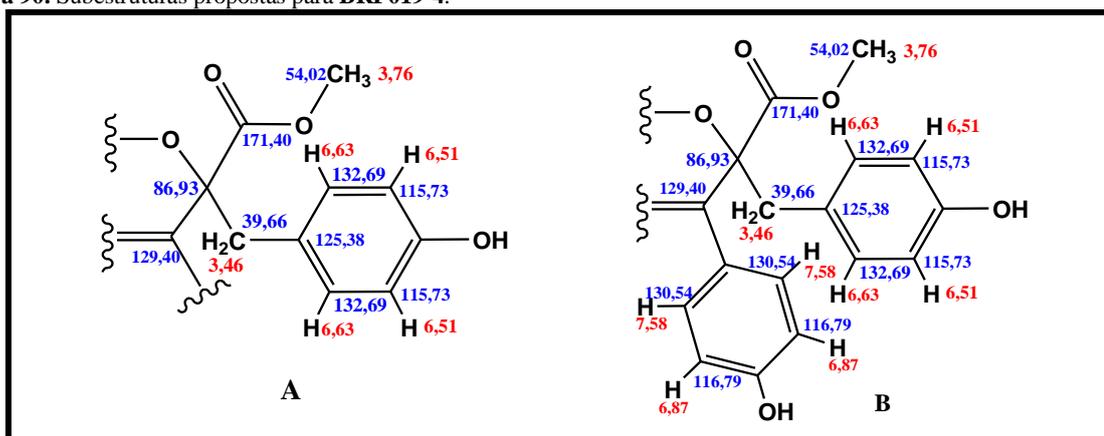
Figura 89. Fragmentos propostos para **BRF019-4**.



Observou-se uma semelhança entre os espectros e os fragmentos de **BRF019-4** e **BRF019-2**. A diferença entre a massa molecular de **BRF019-4** e **BRF019-2** foi de 68 unidades, o que corresponde à massa de uma unidade prenila, sugerindo que **BRF019-4** tenha a estrutura de **BRF019-2** com a cadeia prenila substituída por um hidrogênio. A ausência da cadeia prenila na estrutura de **BRF019-4** foi corroborada através da comparação dos espectros de RMN¹H e ¹³C das substâncias em questão. Observou-se, nos espectros de **BRF019-4**, a ausência dos sinais referentes a duas metilas, ao metileno alílico e ao metino olefínico, todos presentes nos espectros de **BRF019-2**, além da presença, nos espectros de **BRF019-4**, de um outro sistema aromático *para*-substituído, ao invés do sistema assimétrico trissubstituído, presente em **BRF019-2**.

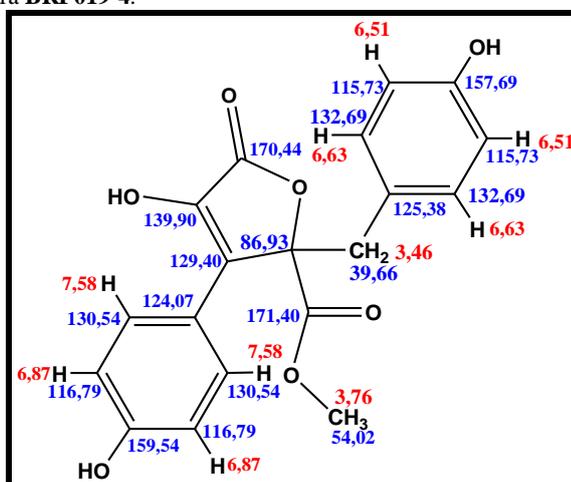
O experimento bidimensional HMBC (Figuras 99 e 100, p. 138 e 139, respectivamente) permitiu verificar correlações à longa distância (²J e ³J) e confirmar as suposições anteriores. A correlação entre o sinal de metoxila em δ 3,76 e o sinal de carbonila em δ 171,40 confirma a presença do fragmento C (Figura 89). As correlações entre o sinal de hidrogênios metilênicos em δ 3,46 e os sinais de carbonos aromáticos em δ 125,38 (não-hidrogenado) e δ 132,69, sugerem um anel aromático ligado a um grupo metileno, permitindo conectar os fragmentos F e B assinalar a posição do carbono em δ 125,38. O sinal em δ 3,46 acopla também com os sinais de carbonos em δ 86,93, δ 129,40 (*sp*² não hidrogenado) e δ 171,40, ligando o fragmento F, através de um átomo de oxigênio, ao fragmento E e levando à proposição da subestrutura A (Figura 90, p. 130). O acoplamento entre os hidrogênios em δ 7,58 e o carbono em δ 129,40, permite a conexão entre o fragmento A (Figura 89) e a subestrutura A (Figura 90, p. 130), transformando esta em subestrutura B (Figura 90, p. 130).

Figura 90. Subestruturas propostas para **BRF019-4**.



O valor de IDH 12 associado à existência de mais um sinal de carbonila, permite propor a presença de um anel lactônico, através da conexão do fragmento D (Figura 89, p. 129) à subestrutura B (Figura 90). Os acoplamentos entre o sinal em δ 6,87 e δ 124,07, permite assinalar a posição deste carbono. Os acoplamentos entre os hidrogênios em δ 6,87 e δ 7,58 e o carbono em δ 159,54, assim como os acoplamentos entre os hidrogênios em δ 6,51 e δ 6,63 e o carbono em 157,69, permitem atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos fenólicos. Os dados anteriores permitem propor, para **BRF019-4**, a estrutura mostrada na Figura 91.

Figura 91. Proposta estrutural para **BRF019-4**.



Os dados espectroscópicos apresentados são compatíveis com a estrutura da (2*R*)- 4-hidroxifenil)-2,5-dihidro-4-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-5-oxofuran-2- carboxilato de metila. Trata-se do butenolídeo conhecido por butirolactona II (**138**) (Figura 33, p. 66), reportado pela primeira vez em 1983 por Arai e colaboradores (ARAI *et al.*, 1983). A comparação dos dados espectroscópicos de RMN¹H e ¹³C de **BRF019-4** com os relatados na literatura para a butirolactona II (PARVATKAR, 2011) (Tabela 18, p. 131), corroboram a estrutura proposta para **BRF019-4** e permitem assinalar sua estereoquímica (Figura 92, p. 131).

Figura 92. Proposta estrutural com estereoquímica do carbono 2 e dados de deslocamentos químicos de BRF019-4.

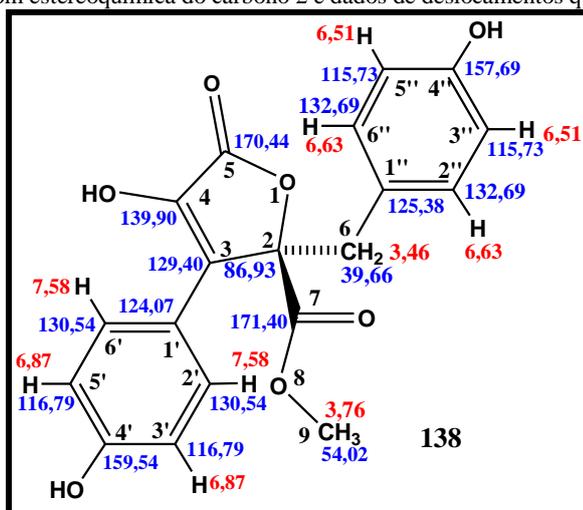


Tabela 18. Comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C de BRF019-4 com os da butirolactona II (PARVATKAR, 2011).

C	BRF019-4 (CD ₃ OD, 300 MHz)		Butirolactona II (CDCl ₃ , 400 MHz) (PARVATKAR, 2011)	
	¹³ C	RMN δ ¹ H	¹³ C	RMN δ ¹ H
2	86,93		85,7	
3	129,40		128,3	
4	139,90		137,8	
5	170,4		169,4	
6	39,66	3,46 (s, 2H)	38,4	3,47 (d, J = 15,0 Hz, 1H); 3,54 (d, J = 14,4 Hz, 1H)
7	171,40		170,0	
9	54,02	3,76 (s, 3H)	53,4	3,80 (s, 3H)
1'	124,07		124,0	
2'	130,54	7,58 (d, J = 8,9 Hz, 2H)	131,4	7,61 (d, J = 8,7 Hz, 2H)
3'	116,79	6,87 (d, J = 8,9 Hz, 2H)	115,8	6,90 (d, J = 8,7 Hz, 2H)
4'	159,54		157,3	
5'	116,79	6,87(d, J = 8,9 Hz, 2H)	115,8	6,90 (d, J = 8,7 Hz, 2H)
6'	130,54	7,58 (d, J = 8,9 Hz, 2H)	131,4	7,61 (d, J = 8,7 Hz, 2H)
1''	125,38		121,7	
2''	132,69	6,63 (d, J = 8,5 Hz, 2H)	129,3	6,68 (d, J = 8,4 Hz, 2H)
3''	115,73	6,51(d, J = 8,5 Hz, 2H)	114,7	6,57 (d, J = 8,4 Hz, 2H)
4''	157,69		155,9	
5''	115,73	6,51 (d, J = 8,5 Hz, 2H)	114,7	6,57 (d, J = 8,4 Hz, 2H)
6''	132,69	6,63 (d, J = 8,5 Hz, 2H)	129,3	6,68 (d, J = 8,4 Hz, 2H)

Há relatos de atividade antioxidante (DEWI *et al.*, 2014) e antibacteriana (RAO *et al.*, 1999) para a butirolactona II.

Figura 93. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF019-4.

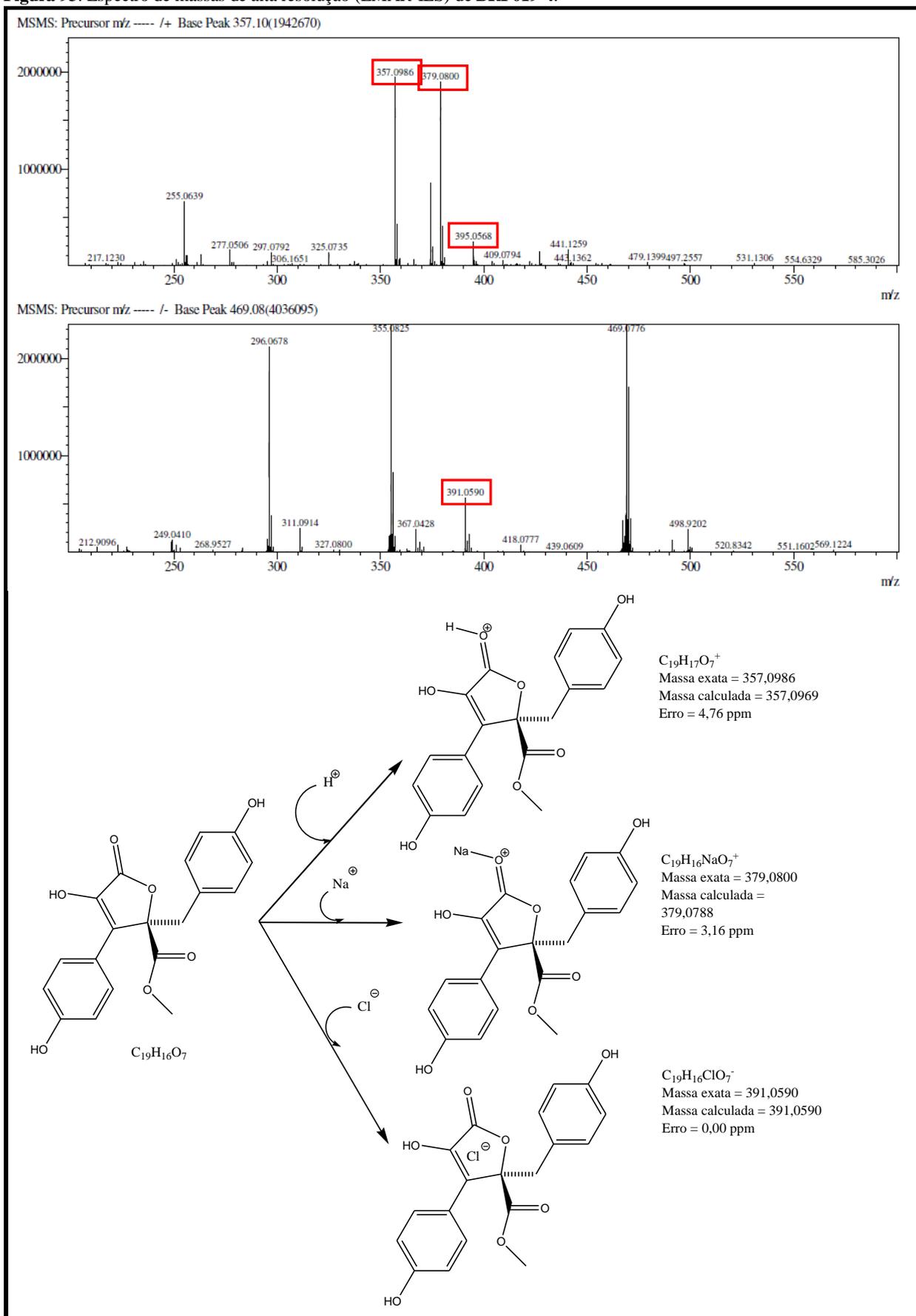


Figura 94. Espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF019-4**.

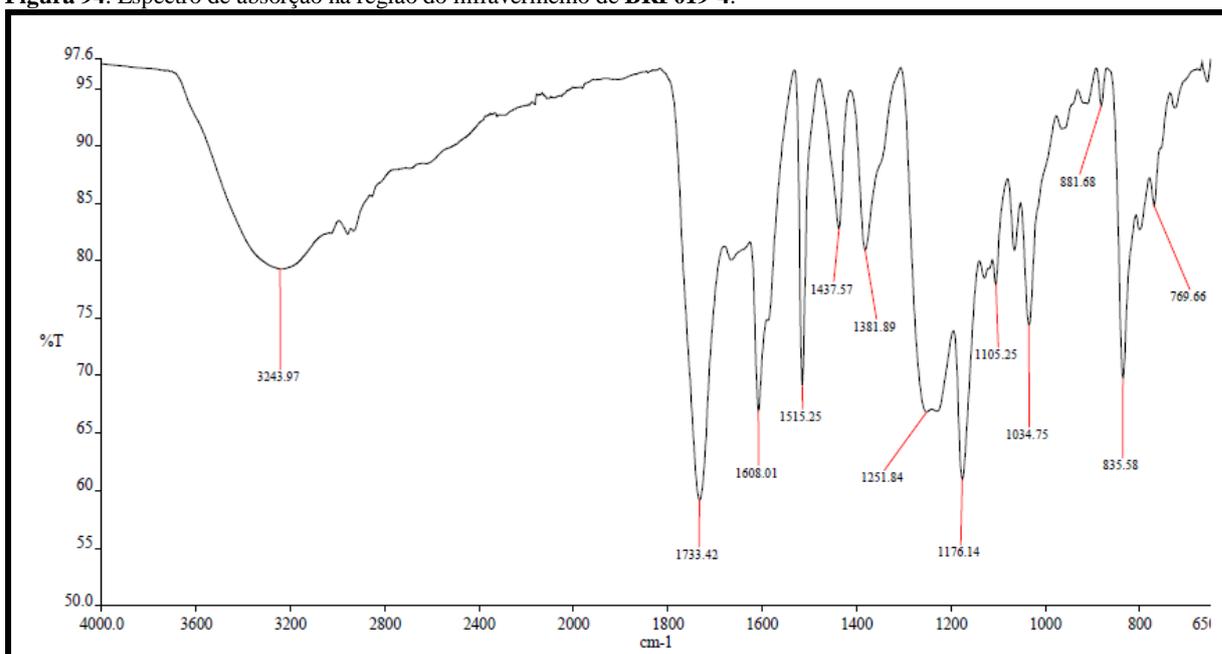


Figura 95. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) de **BRF019-4**.

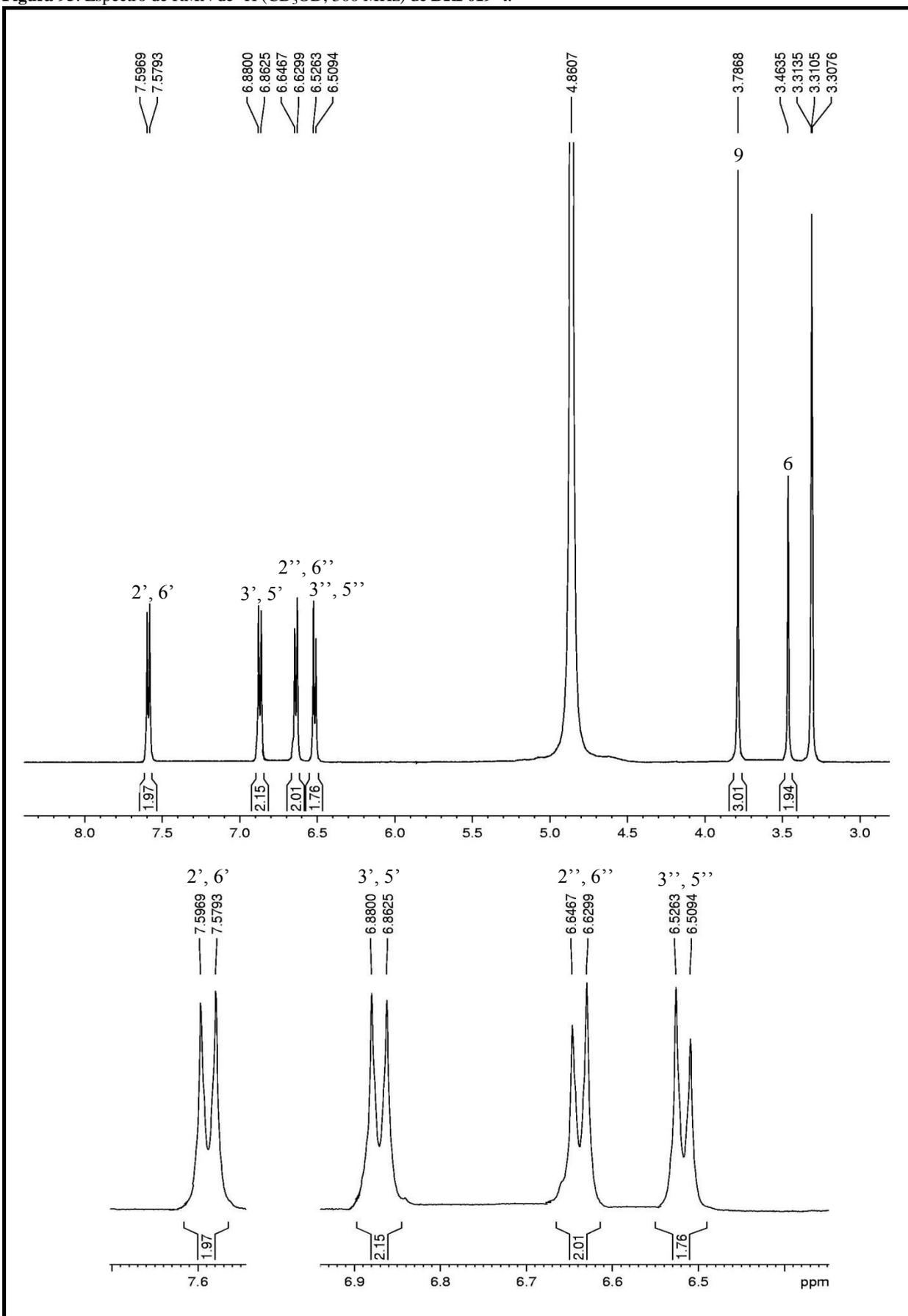


Figura 96. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPT 135° de BRF019-4.

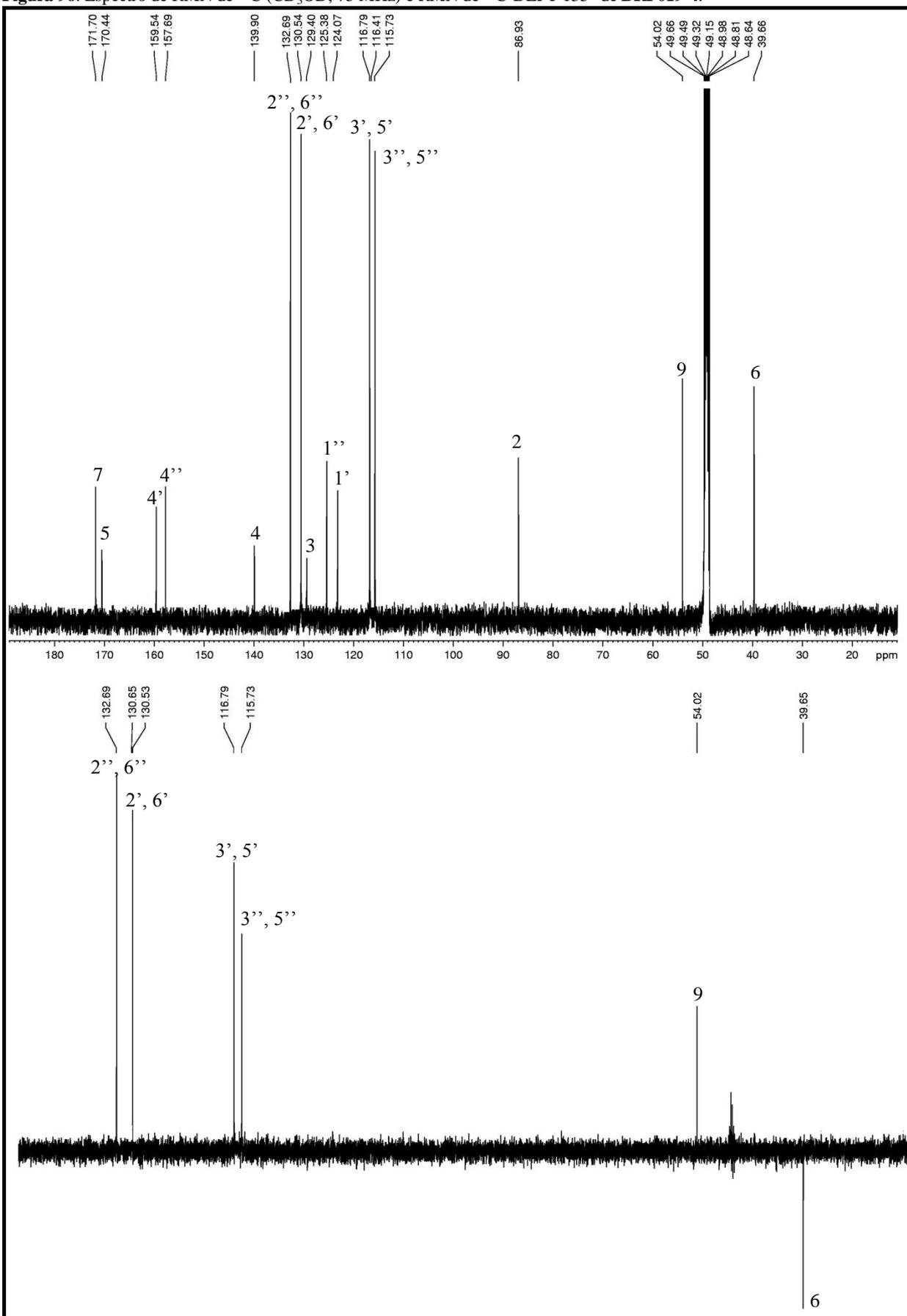


Figura 97. Mapa de contornos COSY de BRF019-4.

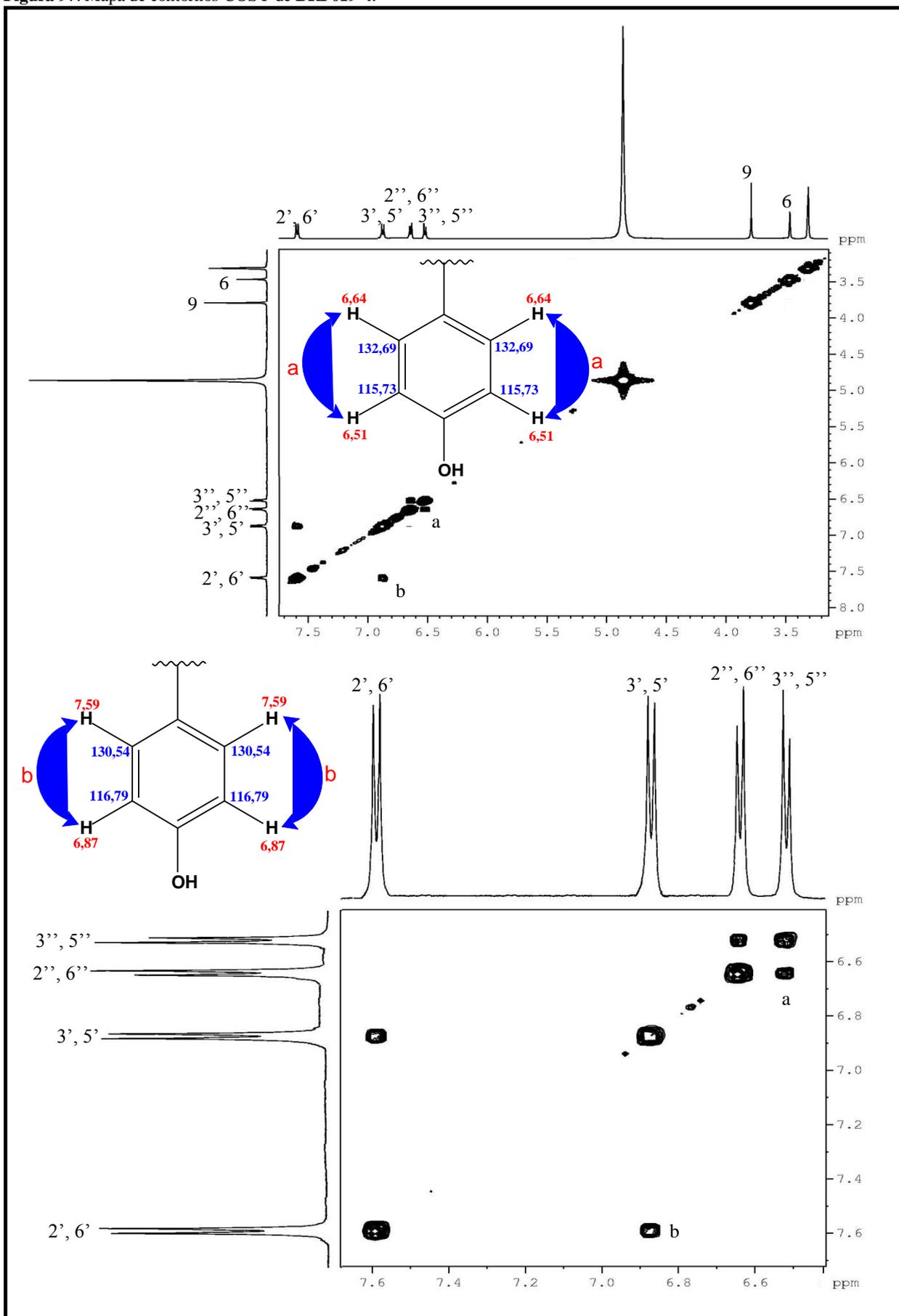


Figura 98. Mapa de contornos HSQC de BRF019-4 e expansão.

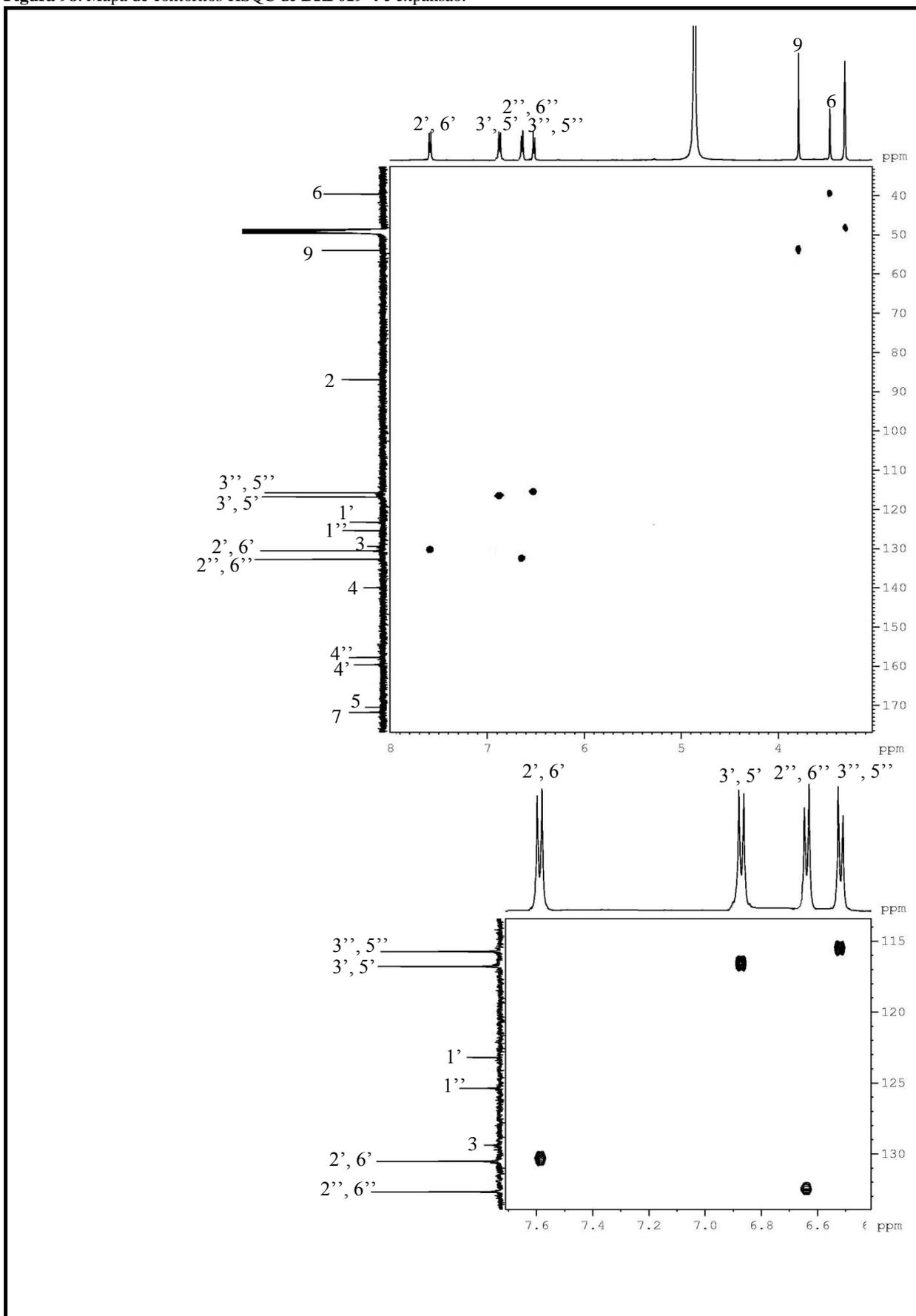


Figura 99. Mapa de contornos HMBC de BRF019-4.

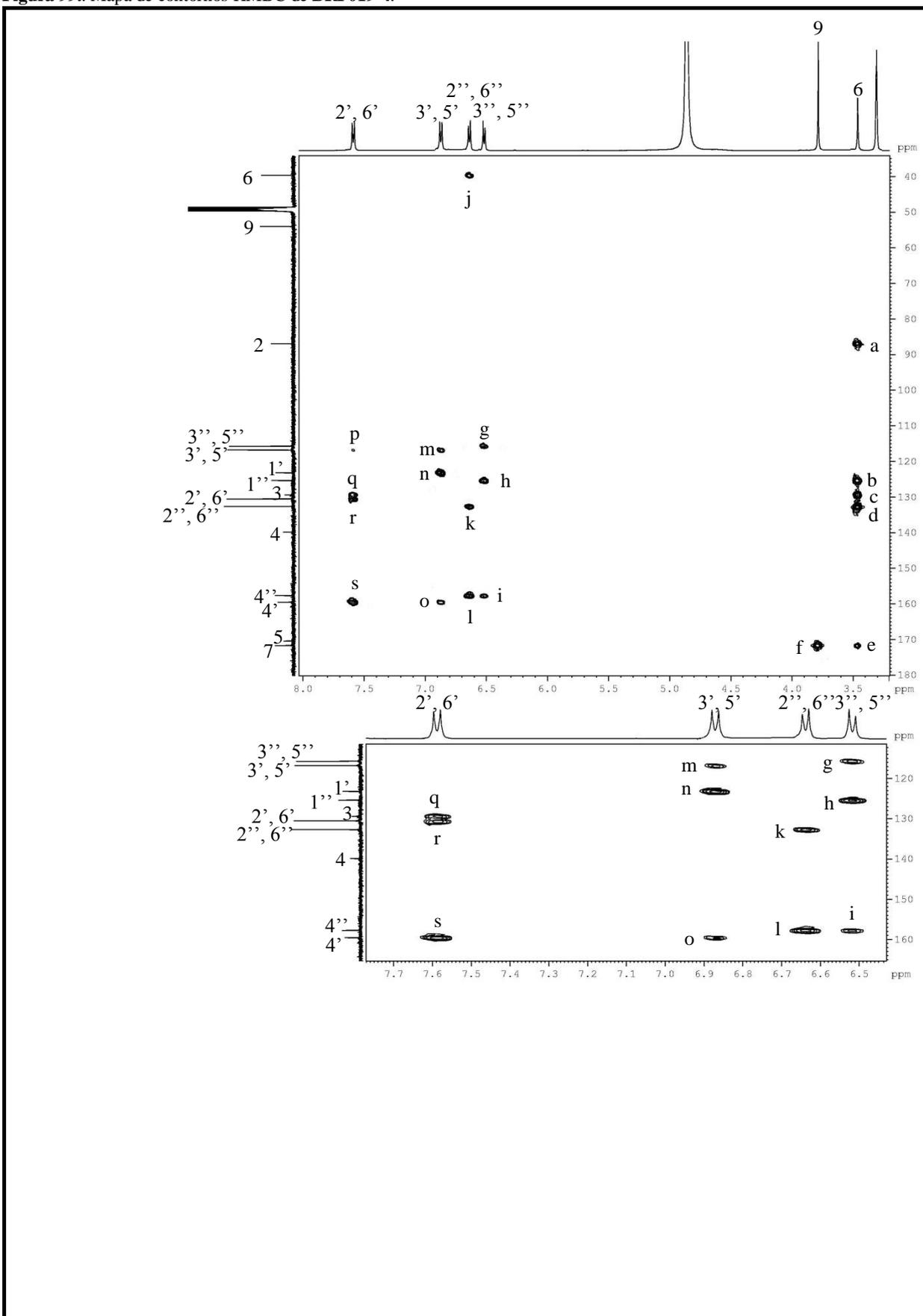
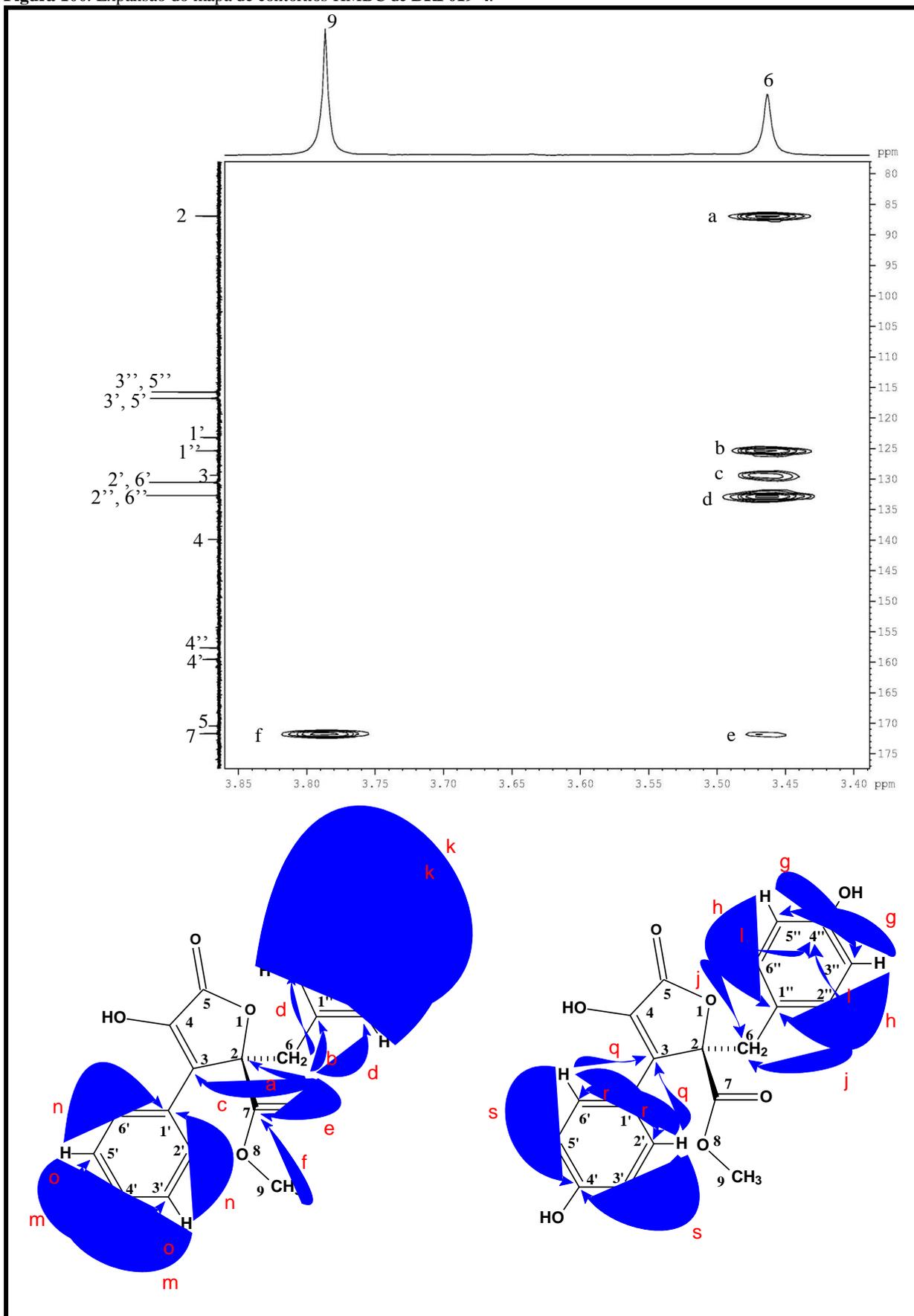


Figura 100. Expansão do mapa de contornos HMBC de BRF019-4.



5.5.4.5 Fracionamento da subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4)

A subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 15, p. 115) (185,10 mg) foi submetida à separação cromatográfica por CLAE, conforme mostra o cromatograma da Figura 101. O composto correspondente ao pico com tempo de retenção 16,38 minutos (pico **9**) foi isolado (5,10 mg, 2,76%). Essa amostra foi submetida às análises de RMN e EMAR-IES e foi determinada como sendo também a (*R*) -6-hidroximeleína (**BRF019-3**). O composto correspondente ao pico com tempo de retenção 29,17 minutos (pico **17**) foi isolado (12,8 mg, 6,91 %) e codificado como **BRF019-5**. Essa amostra foi submetida à análise por RMN, EMAR-IES e espectroscopia por absorção no infravermelho para a elucidação de sua estrutura. O composto correspondente ao pico com tempo de retenção 34,17 minutos (pico **21**) foi isolado (6,3 mg, 3,4 %). Essa amostra foi submetida à análise por RMN, EMAR-IES, e foi determinada como sendo a já isolada butirolactona I (**BRF019-2**). As massas dos picos coletados estão demonstradas na Tabela 19.

Figura 101. Cromatograma da fração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 15, p. 115).

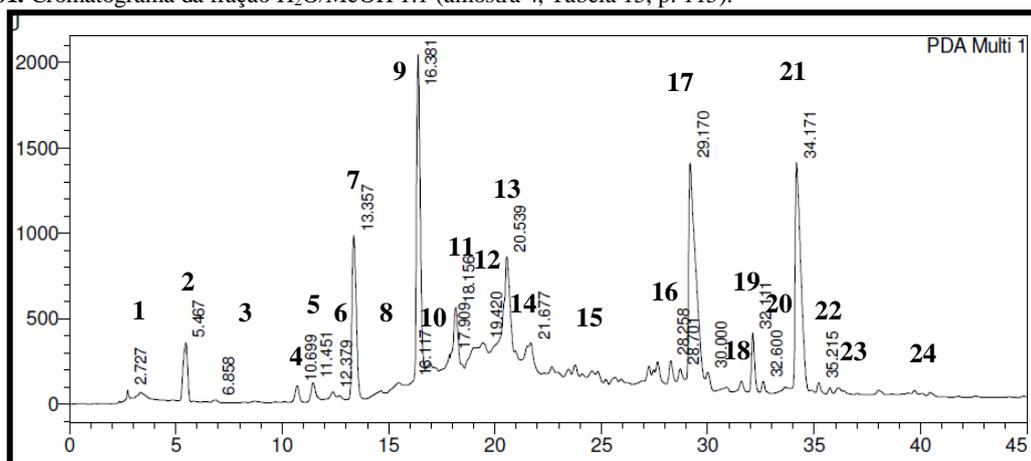


Tabela 19. Massas das frações obtidas do fracionamento por CLAE da subfração H₂O /MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 15, p. 115).

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	2,00	1,08
2	2	1,00	0,54
3	3	0,70	0,38
4	4	0,80	0,43
5	5	1,20	0,65
6	6	1,30	0,70
7	7	7,40	3,99
8	8	2,00	1,08
9	9	5,10	2,75
10	10	1,50	0,81
11	11	1,40	0,75
12	12	6,90	3,72
13	13	8,20	4,43
14	14	0,02	0,01
15	15	3,70	1,99

16	16	0,70	0,37
17	17	12,80	6,91
18	18	2,60	1,40
19	19	0,00	0,00
20	20	5,00	2,70
21	21	6,30	0,00
22	22	0,00	3,40
23	23	0,00	0,00
24	24	1,40	0,75

5.5.4.6 Determinação Estrutural de BRF019-5

BRF019-5 foi obtida como um sólido branco amorfo e solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução EMAR-IES (Figura 107, p. 147) exibiu, no modo negativo, o íon correspondente à molécula com aduto de cloro $[M + Cl]^-$ em m/z 475,1177 (m/z calculado 475,1165, erro 2,52 ppm). Tal dado, levou à fórmula molecular $C_{24}H_{24}O_8$, com IDH 13.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 108, p. 147) apresentou uma banda larga em 3255 cm^{-1} relativa à hidroxila. A banda em 1734 cm^{-1} foi atribuída à uma carbonila de lactona conjugada. As bandas em 1608, 1517 e 1436 cm^{-1} são devidas às estiramentos C=C de aromático. As bandas em 1241 e em 1178 cm^{-1} correspondem a estiramentos C-O.

O espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500MHz) (Figura 109, p. 148) apresentou sinais para vinte e dois hidrogênios. Os sinais em δ 7,56 (d, $J = 8,7\text{ Hz}$, 2H) e δ 6,84 (d, $J = 8,7\text{ Hz}$, 2H) foram atribuídos a um sistema aromático *para*-substituído do tipo A_2B_2 . O multipletto em δ 6,50 (3H) foi atribuído a um sistema aromático assimétrico trissubstituído. O simpleto em δ 3,79 foi atribuído a uma metoxila. O duplo dupletto em δ 3,66 ($J = 5,4$ e $7,3\text{ Hz}$, 1H) foi atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oxigenado e acoplado aos sinais em δ 2,79 (ddd, $J = 5,4, 13,8$ e $19,0\text{ Hz}$, 1H) e δ 2,51 (ddd, $J = 5,43, 13,84$ e $19,05\text{ Hz}$, 1H). A desblindagem destes últimos pode ser explicadas se os atribuirmos a um par de hidrogênios metilênicos quimicamente diferentes, vizinhos a um anel aromático. O simpleto em 3,44 (2H), por sua vez, também foi atribuído a um par de hidrogênios metilênicos quimicamente iguais, sob grande efeito de desproteção. Os simpletos em δ 1,26 e δ 1,17 foram atribuídos a duas metilas.

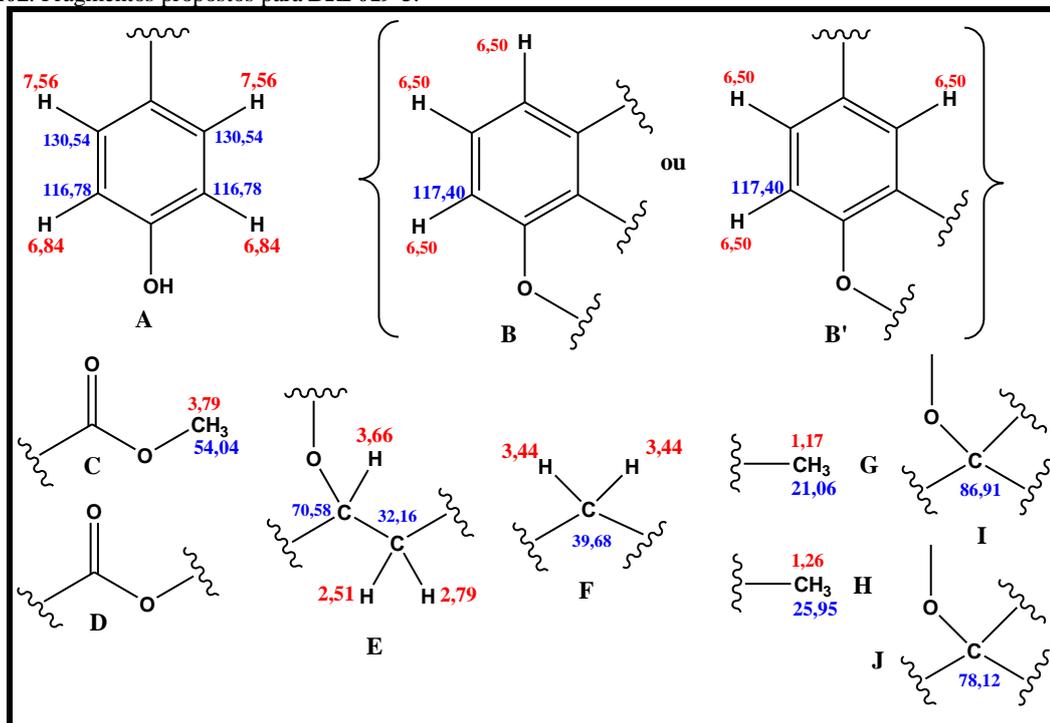
O espectro de RMN de ^{13}C -BB (CD_3OD , 125 MHz) (Figura 110, p. 149) de **BRF019-5** apresentou vinte e uma linhas espectrais. Sua análise comparativa com os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 110, p. 149) e HSQC (Figura 112, p. 151) permitiu realizar os seguintes assinalamentos: Os sinais em δ 171,66 e δ 170,47 foram atribuídos a duas carbonilas de éster; os sinais em δ 159,55, δ 153,58 e δ 139,94 foram atribuídos a carbonos sp^2 oxigenados, sendo

os dois primeiros aromáticos e o último olefínico; os sinais em δ 133,08, δ 130,54, δ 117,39 e δ 116,76 foram atribuídos a carbonos aromáticos hidrogenados, sendo os sinais em δ 130,54 e δ 116,76 referentes a 3 e 2 carbonos, respectivamente; os sinais em δ 129,48, δ 126,27, δ 123,25 e δ 120,74 foram atribuídos a carbonos sp^2 não-hidrogenados; os sinais em δ 86,91, δ 78,12, δ 70,58 foram associados a carbonos sp^3 oxigenados, sendo os dois primeiros quaternários e o último mono-hidrogenado; o sinal em δ 54,04 foi atribuído a uma metoxila; os sinais em δ 39,68 e δ 32,16 foram atribuídos a carbonos metilênicos sp^3 ; e os sinais em δ 25,95 e δ 21,06 foram associados a duas metilas.

No mapa de contornos COSY (Figura 111, p. 150) foram observadas correlações entre o par de hidrogênios em δ 7,56 e δ 6,84, confirmando a presença de um sistema aromático *para*-substituído. Foram também observadas correlações entre o sinal em 3,66 e os sinais de hidrogênios geminais em δ 2,79 e δ 2,51, e destes entre si.

Os dados espectroscópicos já discutidos permitem propor os fragmentos mostrados na Figura 102:

Figura 102. Fragmentos propostos para **BRF019-5**.

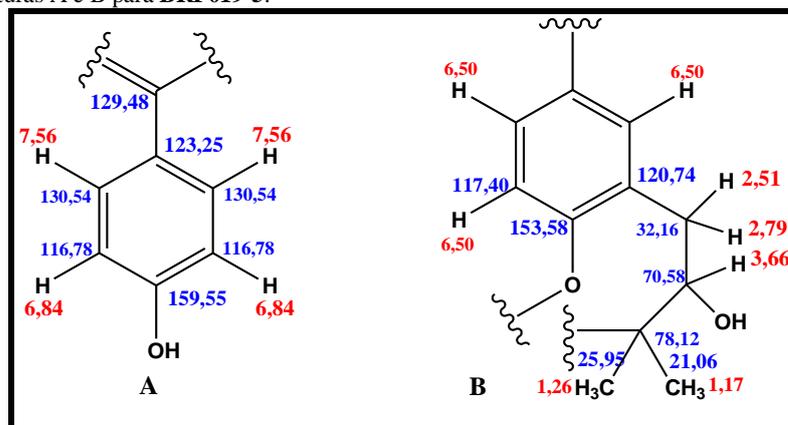


Observou-se uma semelhança entre os espectros e os fragmentos de **BRF019-5** e os de **BRF019-2** e **BRF019-4**. Os fragmentos A, C, D, F e I (Figura 102), estão também presentes nas estruturas de **BRF019-2** e **BRF019-4** e, assim como nestas duas substâncias, há sinais característicos de carbonos olefínicos, δ 139,94 e δ 129,48, pertencentes ao anel lactônico das mesmas. O valor de IDH de **BRF019-5**, todavia, é 13, sugerindo, portanto, além do anel

lactônico com uma dupla ligação, a existência de mais um anel em sua estrutura, haja vista a ausência de sinais para mais uma dupla ligação.

O experimento bidimensional HMBC (Figura 113, p. 152) permitiu verificar correlações à longa distância (2J e 3J) e corroborou as suposições anteriores. A correlação entre o simpleto em δ 3,79 e o carbono em δ 171,66 confirmam a presença do fragmento C e permite assinalar os deslocamentos químicos das carbonilas dos fragmentos C e D como δ 171,66 e δ 170,47, respectivamente. Os acoplamentos entre o sinal de hidrogênios aromáticos em δ 6,84 e os sinais de carbonos em δ 116,78, δ 123,25 e δ 159,55, permitem assinalar a posição destes últimos no fragmento A. O acoplamento entre o sinal de δ 7,56 e os sinais em δ 130,54 e δ 129,48, confirmam a ligação do fragmento A a um carbono olefínico, permitindo a proposição da subestrutura A (Figura 103). A correlação entre o sinal de hidrogênios metílicos em δ 1,17 e o sinal de carbono metílico em δ 25,95, bem como a do sinal dos também hidrogênios metílicos em δ 1,26 e o sinal de carbono metílico em δ 21,06 sugerem a ligação de duas metilas geminais ao mesmo carbono quaternário. Os mesmos sinais de hidrogênios metílicos em δ 1,17 e δ 1,26 apresentaram correlação com os carbonos sp^3 oxigenados em δ 70,58 e δ 78,12 (este quaternário), permitindo a conexão dos fragmentos G e H ao fragmento J, e deste ao fragmento E, através do carbono em δ 70,59. As correlações entre os sinais de hidrogênios metilênicos em δ 2,51 e δ 2,79 e os carbonos em δ 70,58, δ 78,12, δ 120,74 e δ 153,58 permitem a conexão entre os fragmentos E e B' através do carbono em δ 32,16, além de confirmar a presença do fragmento B' ao invés de B, e permitir o assinalamento dos carbonos em δ 120,74 e δ 153,58 no fragmento B'. Tais acoplamentos levam à proposição da subestrutura B (Figura 103).

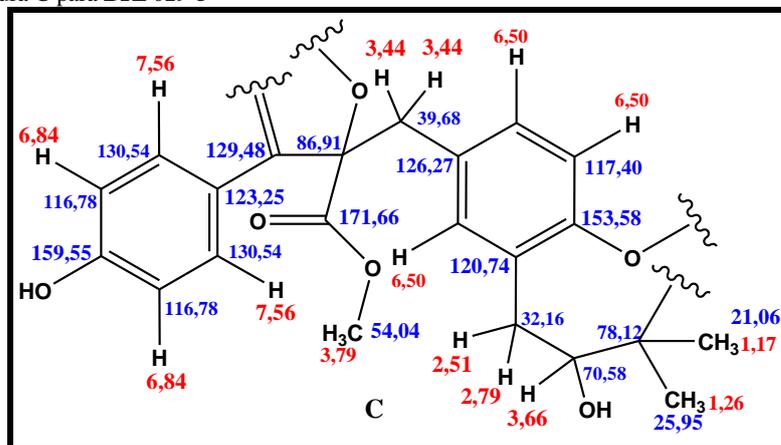
Figura 103. Subestruturas A e B para BRF019-5.



O acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em δ 3,44 e os carbonos em δ 171,66, δ 133,08, δ 129,48, δ 126,27 e δ 86,91, permitem a conexão do fragmento F (Figura 102, p. 142) à subestrutura B (Figura 102, p. 142) e ao fragmento I (Figura 102, p. 142), e este à subestrutura

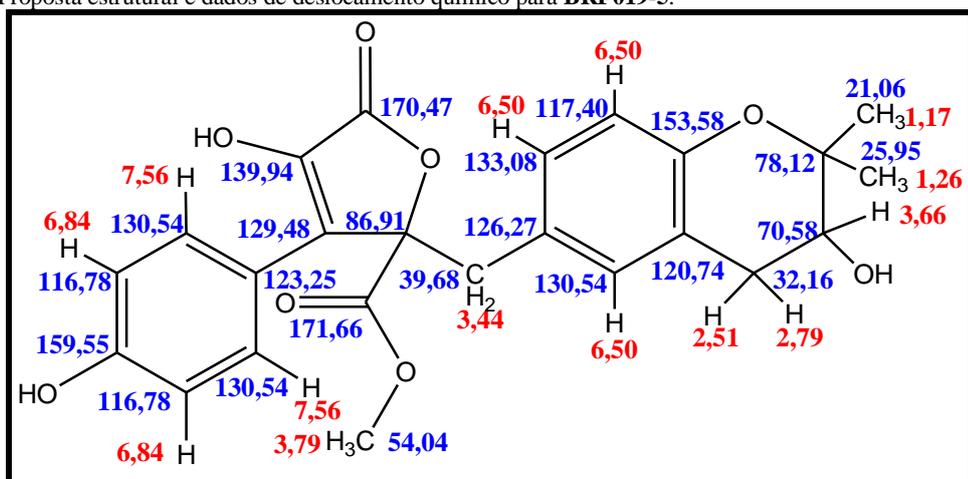
A (Figura 104), além de localizar a posição do fragmento C (Figura 102, p. 142) e determinar a localização do carbono em δ 126,27. Estes últimos acoplamentos são compatíveis com a subestrutura C (Figura 104).

Figura 104. Subestrutura C para **BRF019-5**



Diante da subestrutura C, das semelhanças com **BRF019-2** e **BRF019-4**, do valor de IDH 13, e da existência de mais um oxigênio e de um sinal característico de carbono olefínico oxigenado (δ 139,94), a estrutura de **BRF019-5** é compatível com a presença de um anel lactônico, pela conexão do fragmento D (Figura 102, p. 142) ao carbono olefínico vizinho ao carbono em δ 129,48 (provavelmente δ 139,94) e ao oxigênio ligado ao carbono em δ 86,91, e de um anel de 6 membros, através de ligação entre o carbono em δ 78,12 e o oxigênio ligado ao carbono em δ 153,58 (subestrutura C, Figura 104). Desta forma, chega-se à proposta estrutural mostrada na Figura 105.

Figura 105. Proposta estrutural e dados de deslocamento químico para **BRF019-5**.



Os dados espectroscópicos discutidos são compatíveis com a estrutura da (2*R*, 5''*S*) 2,5 – dihidro-2-[(3,4-dihidro-3-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromen-6-il)-metil]-4-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-5-oxofuran-2-carboxilato de metila, conhecida como butirolactona V (**141**,

2a''	120,74		119,7	
3''	32,16	2,79 (ddd, $J = 5,4, 13,8$ e $19,0$ Hz, 1H); 2,51 (ddd, $J = 5,4, 13,8$ e $19,0$ Hz, 1H)	31,2	2,74 (dd, $J = 16,5$ e $5,5$ Hz, 1H); 2,52 (dd, $J = 16,5$ e $8,4$ Hz, 1H)
4''	70,58	3,66 (dd, $J = 5,4$ e $7,3$ Hz, 1H)	69,0	3,69 (dd, $J = 5,5$ e $8,4$ Hz, 1H)
5''	78,12		76,9	
6a''	153,58		152,3	
7''	117,40	6,50 (m, 3H)	116,0	6,60 (dd, $J = 8,3$ e $2,0$ Hz, 1H)
8''	133,08	6,50 (m, 3H)	129,2	6,49 (dd, $J = 8,3$ e $2,0$ Hz, 1H)
9''	21,06	1,17 (s, 3H)	25,3	1,14 (s, 3H)
10''	25,95	1,26 (s, 3H)	19,3	1,29 (s, 3H)

A butirolactona V é relatada na literatura como um moderado agente antimalarial, com atividade protozoaricida contra o parasita *Plasmodium falciparum* (HARITAKUN *et al.*, 2010).

Figura 107. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de **BRF019-5**.

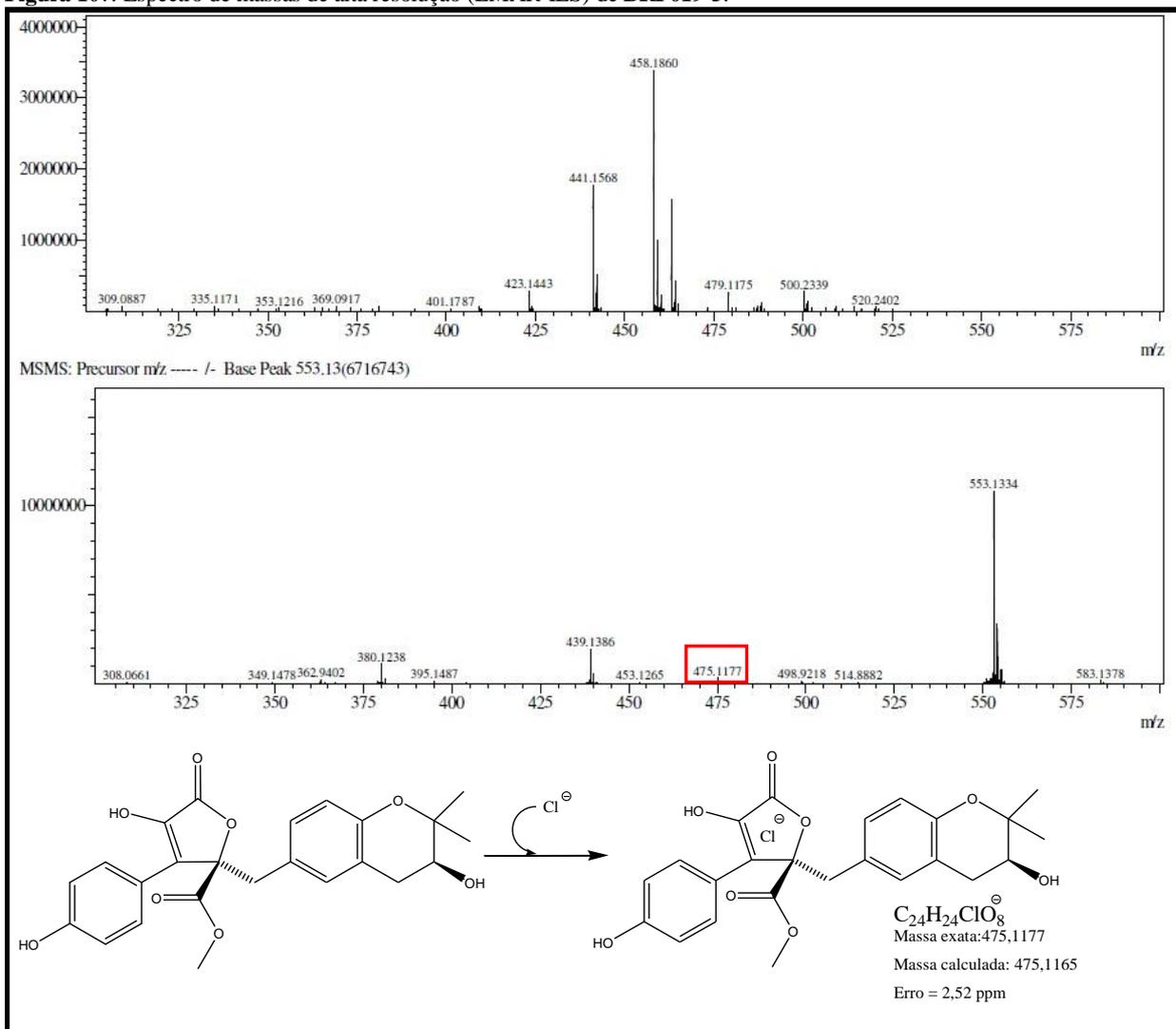


Figura 108. Espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF019-5**.

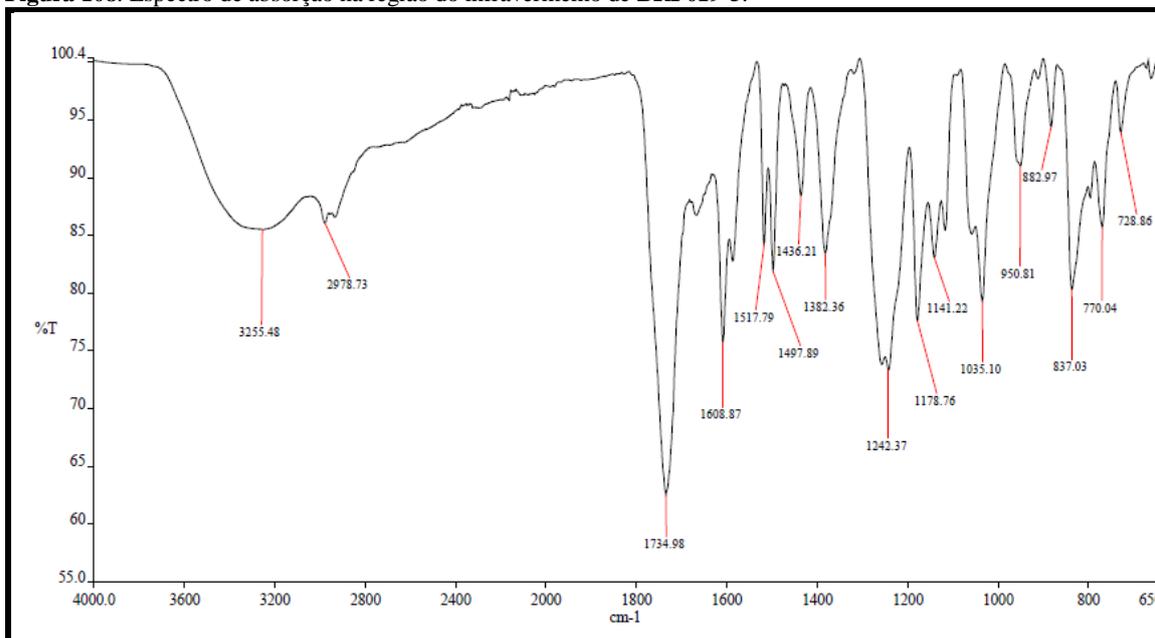


Figura 109. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e expansões de **BRF019-5**.

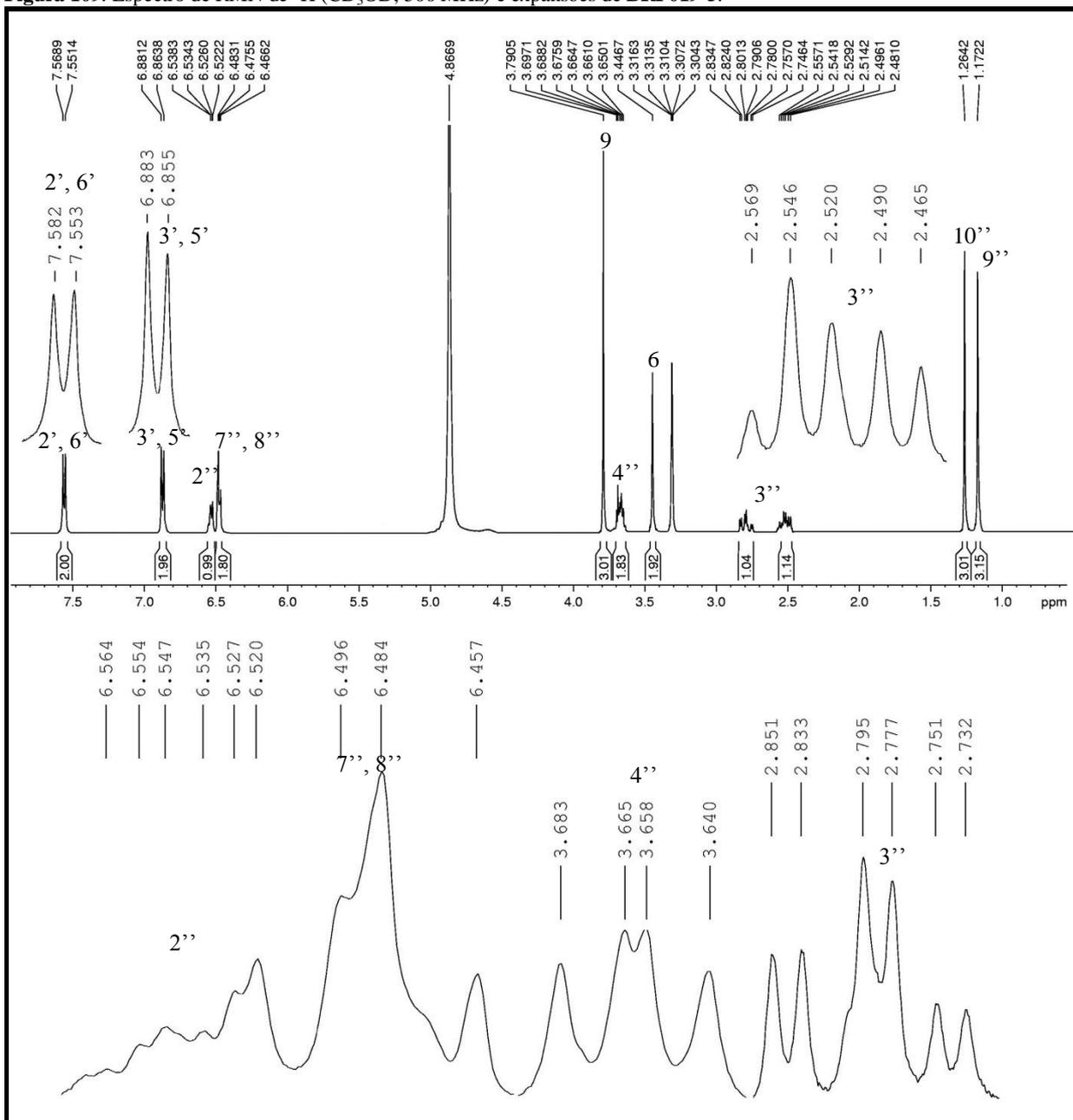


Figura 110. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPT 135 de **BRF019-5**.

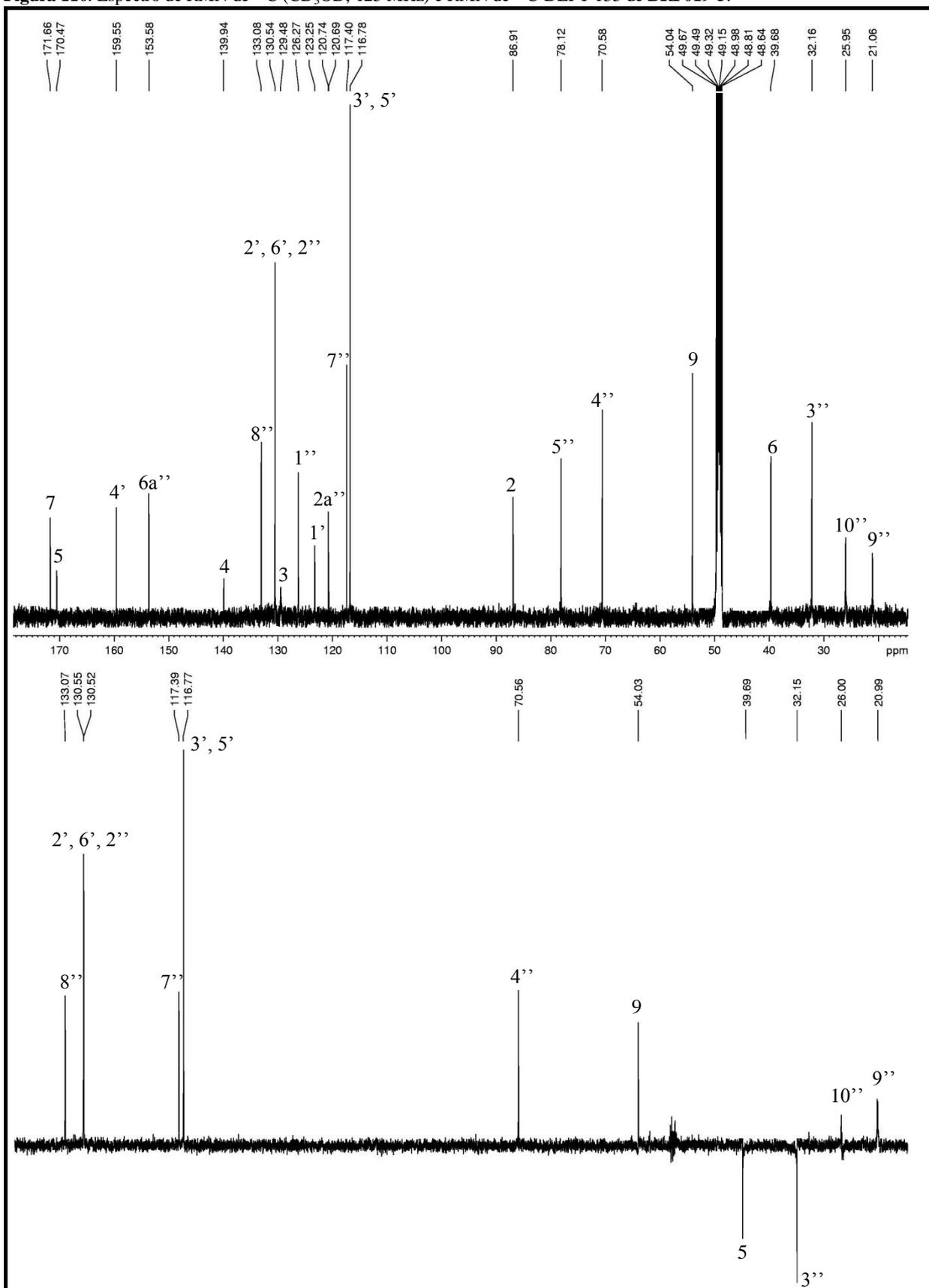


Figura 111. Mapa de contornos COSY de BRF019-5.

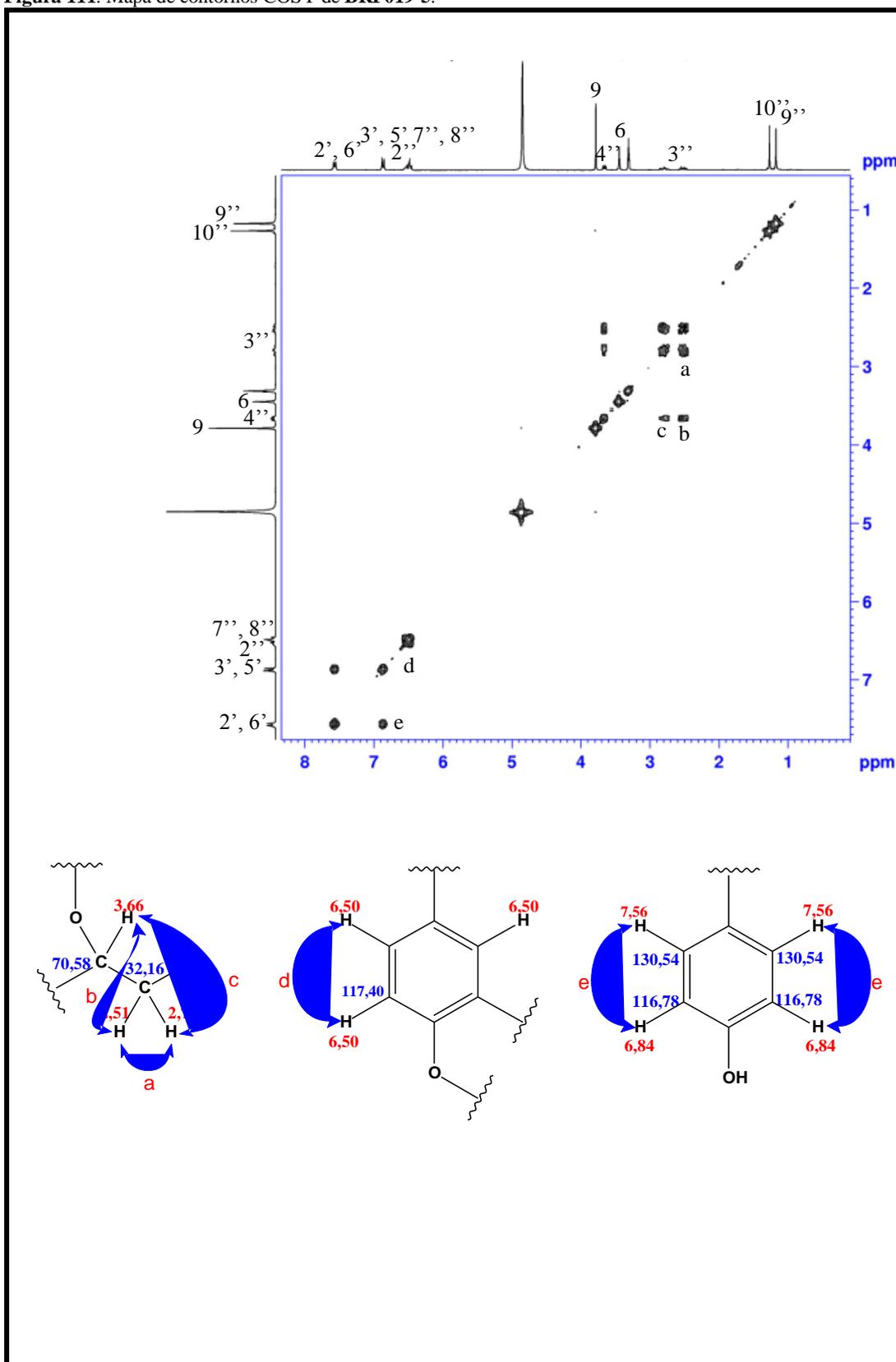


Figura 112. Mapa de contornos HSQC de BRF019-5.

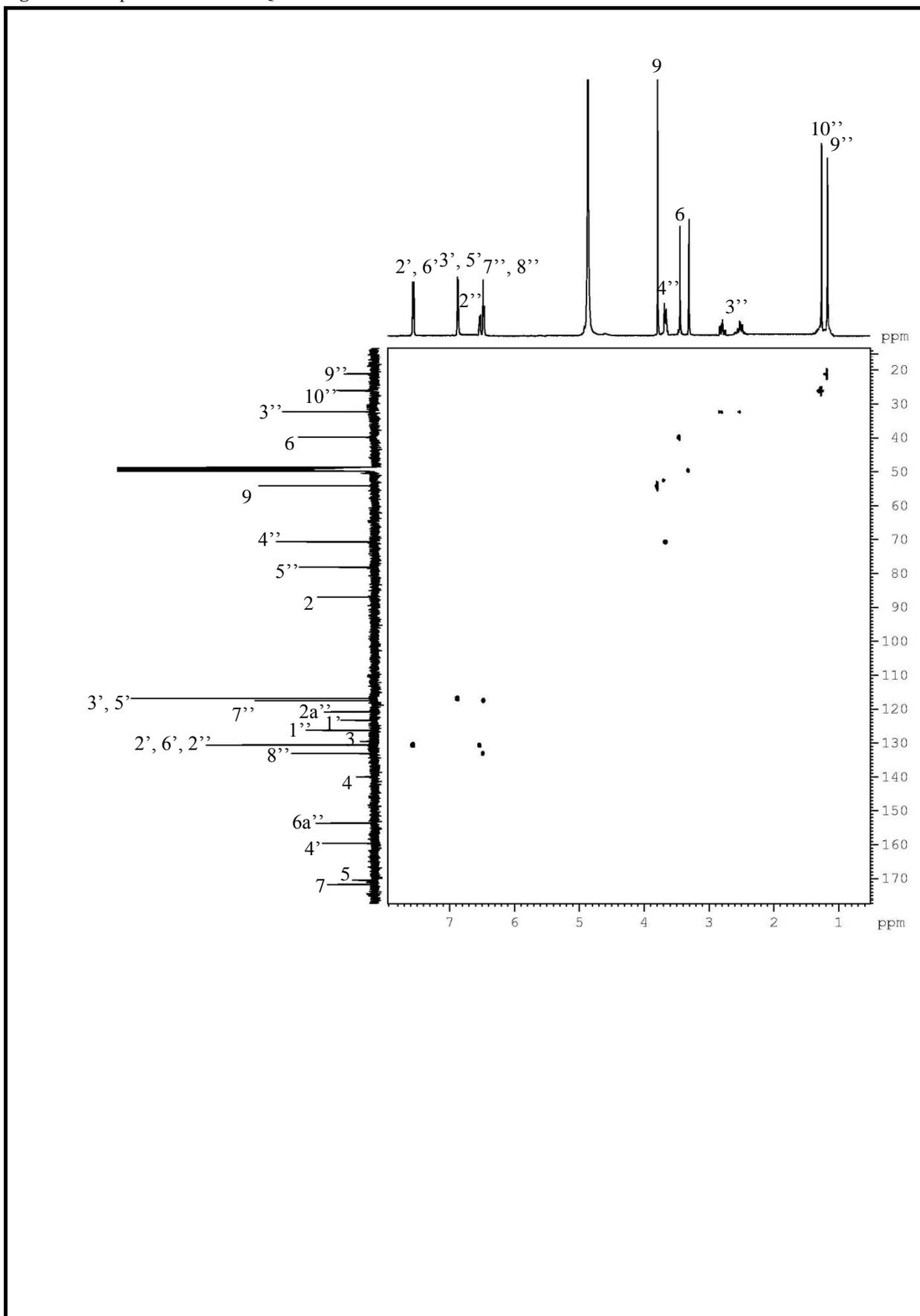


Figura 113. Mapa de contornos HMBC de BRF019-5.

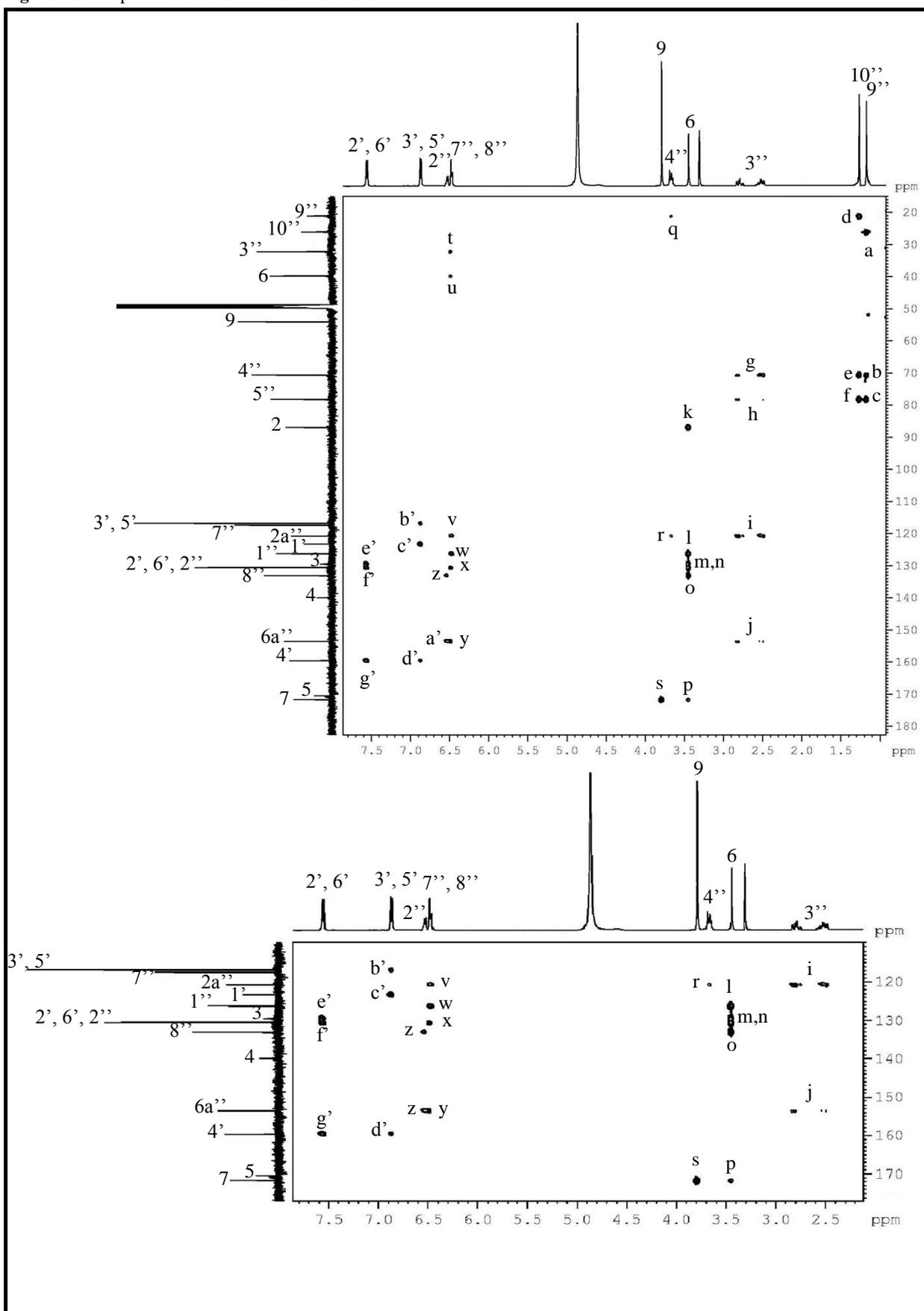
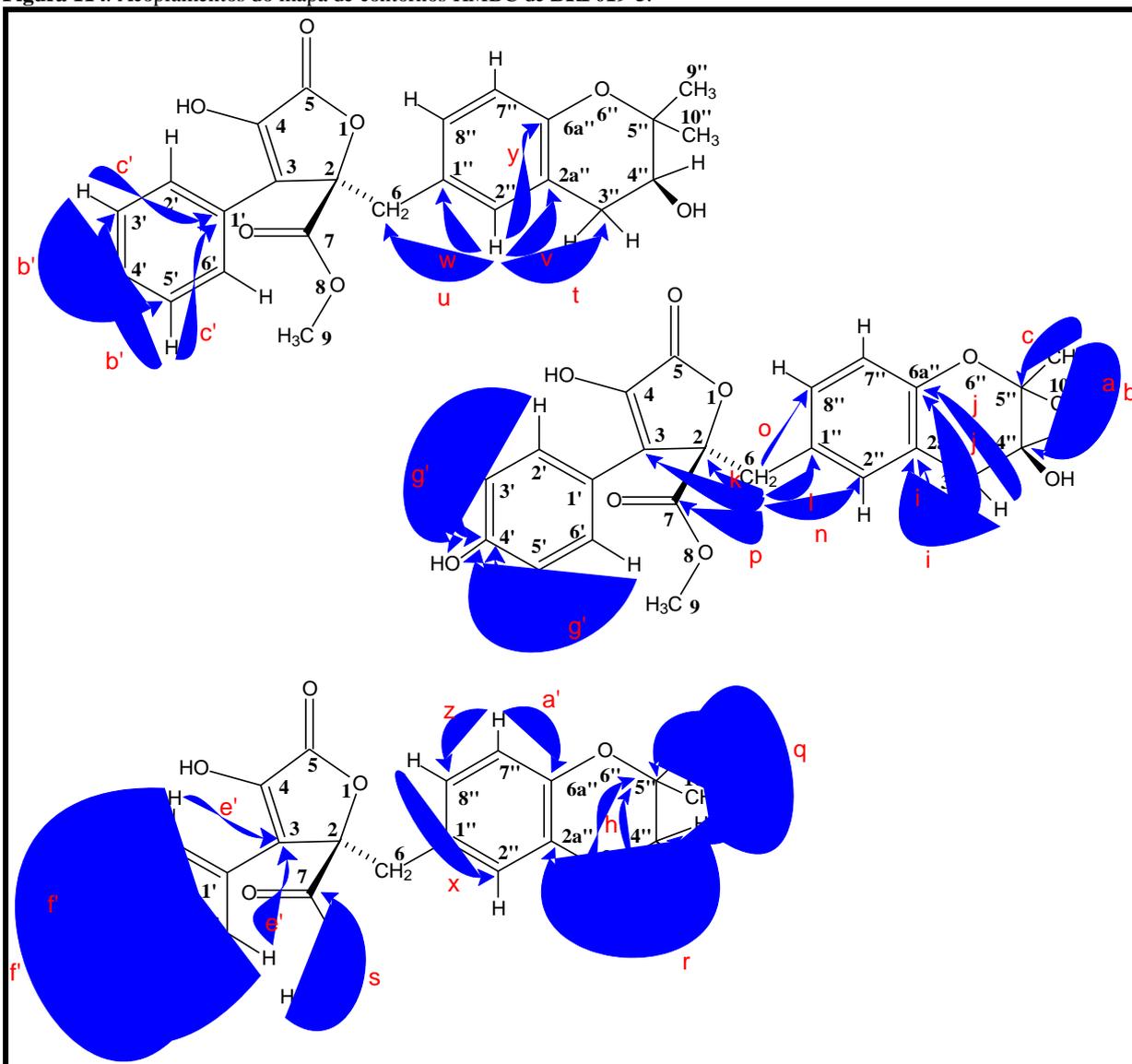


Figura 114. Acoplamentos do mapa de contornos HMBC de BRF019-5.



5.5.4.7 Fracionamento da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5)

A subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 15, p. 115) (365,1 mg) foi submetida à separação cromatográfica por meio de CLAE, conforme mostra o cromatograma da Figura 115. O pico correspondente ao composto com tempo de retenção 25,30 minutos (pico 9) foi isolado (98,2 mg, 27,58 %). Essa amostra foi submetida às análises por RMN e EMAR-IES. Sua elucidação estrutural levou à estrutura do composto já isolado e identificado **BRF019-2** (butirolactona I). As massas das frações coletadas estão na Tabela 21.

Figura 115. Cromatograma da fração MeOH/ H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 15, p. 115).

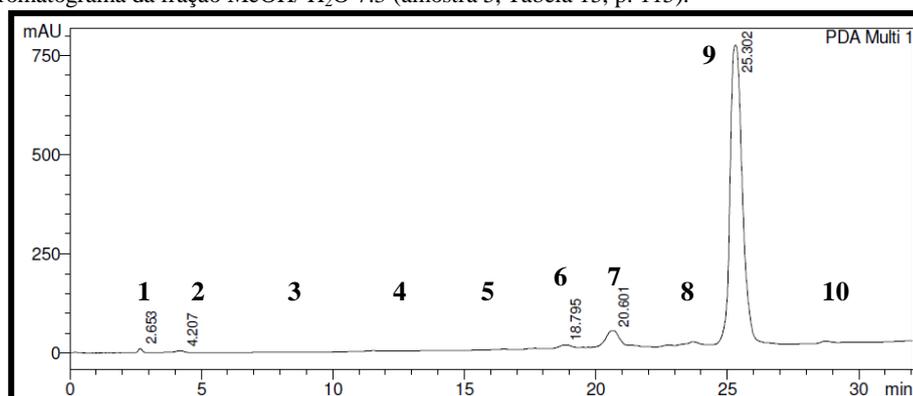


Tabela 21. Massas das frações obtidas do fracionamento por CLAE da subfração MeOH /H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 15, p. 115).

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	1,30	0,36
2	2	0,00	0,00
3	3	10,90	3,06
4	4	2,60	0,73
5	5	5,00	1,40
6	6	11,00	3,08
7	7	1,20	0,33
8	8	1,50	0,42
9	9	98,20	27,58
10	10	0,60	0,17

5.5.4.8 Fracionamento da subfração MeOH/H₂O 8:2 (amostra 6)

A subfração MeOH/H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 15, p. 115) (97,7 mg) foi submetida à separação cromatográfica por meio de CLAE, conforme mostra o cromatograma da Figura 116, p. 155. O pico correspondente ao composto com tempo de retenção 25,00 minutos (pico 4) foi isolado (10,4 mg, 10,64 %). Essa amostra foi submetida às análises por RMN e EMAR-IES. Sua elucidação estrutural levou, também, à estrutura do composto já isolado e identificado **BRF019-2** (butirolactona I). As massas dos picos coletados estão na Tabela 22, p. 155.

Figura 116. Cromatograma da fração MeOH/ H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 15, p. 113).

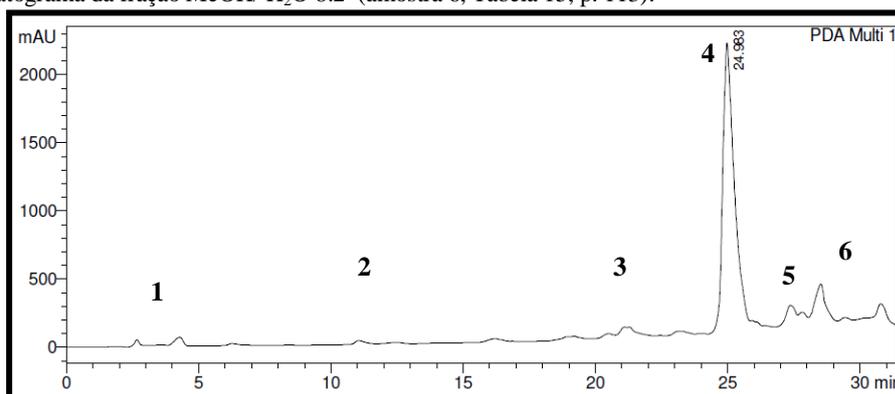


Tabela 22. Massas das frações obtidas do fracionamento por CLAE da subfração MeOH/ H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 15, p. 115).

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	0,00	0,00
2	2	0,00	0,00
3	3	0,00	0,00
4	4	10,40	10,65
5	5	7,10	7,26
6	6	0,40	0,40

5.5.5 Atividades citotóxicas das substâncias isoladas do segundo cultivo de *BRF019 (A. terreus)*

As substâncias isoladas dos extratos orgânicos do segundo cultivo de **BRF019** foram submetidas a ensaio de atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais HCT-116. Os resultados estão apresentados na Tabela 23. Conforme era esperado, nenhuma delas apresentou citotoxicidade frente às células testadas.

Tabela 23 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL das substâncias isoladas do segundo cultivo de **BRF019 (A. terreus)** frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Substância	Inibição (%)
BRF019-3 (6-hidroximeleína)	3,47
BRF019-4 (butirolactona II)	24,29
BRF019-5 (butirolactona V)	25,68
Doxorrubicina	100,00

5.6 Otimização do cultivo de *BRF082 (D. cejpii)* para a produção de metabólitos secundários com atividade citotóxica

5.6.1 Otimização do período de cultivo

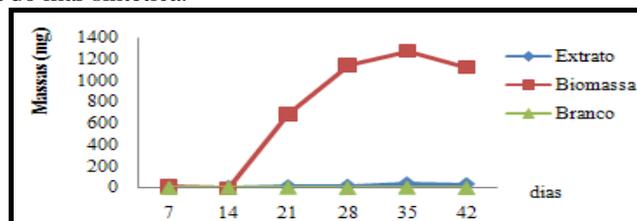
A linhagem **BRF082 (D. cejpii)**, isolada de sedimentos da praia do Pecém, foi cultivada em meio líquido BD com água do mar sintética por 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias, sob condição estática (Item 6.8.1, p. 245). Ao final de cada período de cultivo, o micélio foi separado do

meio de cultura por filtração à vácuo, seco em estufa, pesado e descartado. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. As massas das frações obtidas e da biomassa, a cada dia de extração desse cultivo, estão demonstradas na Tabela 24. O gráfico da Figura 117, mostra a variação das massas dos extratos obtidos ao longo do período de cultivo.

Tabela 24 - Massas dos extratos do cultivo de **BRF082** obtidos após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.

Período de cultivo (dias)	Massa do extrato do meio líquido (mg)	Biomassa (mg)	Massa do Branco (mg)
7	6,40	14,40	5,2
14	10,30	240,30	7,1
21	15,30	688,50	6,8
28	19,70	1140,00	2,7
35	42,00	1272,40	7,7
42	34,50	1123,50	4,6

Figura 117. Massas dos extratos do cultivo de **BRF082**, obtidos após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética.



Pelas massas dos extratos dos diferentes dias de cultivo, pôde-se observar que o fungo manteve uma taxa crescente de crescimento até o 35 ° dia, após o qual, observa-se um decréscimo da massa do extrato. Este comportamento é semelhante ao anteriormente descrito na otimização do tempo de cultivo de **BRF019** (Item 5.5.1, p. 86).

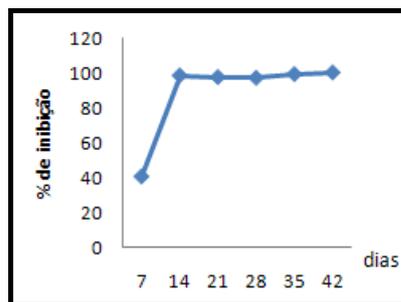
5.6.2 Atividades citotóxicas das frações

As frações do cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética por 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas frente à linhagem de célula tumoral HCT-116 (Item 6.8, p. 245), e os resultados estão apresentados na Tabela 25 e no gráfico da Figura 118, p. 157.

Tabela 25 - Determinação inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo de **BRF082** frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

Tempo (dias)	% Inibição
7	41,10
14	98,28
21	97,39
28	96,97
35	99,08
42	99,99
Doxorrubicina	100,00

Figura 118. Inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo de **BRF082**.



Foi possível observar que a atividade citotóxica aumenta bastante do 7^o para o 14^o dia, vindo a se manter praticamente estável nos períodos seguintes. Desta forma, embora a melhor atividade citotóxica tenha sido observada no 42^o dia de cultivo, foi pequena a diferença entre este e os demais dias, com exceção do 7^o. Assim, o 14^o dia se tornou o mais viável para o cultivo em grande escala, por ser o menor tempo com atividade praticamente igual à dos dias de análise subsequentes.

5.6.3 Primeiro cultivo em grande escala de **BRF082** (*D.cejpii*)

A linhagem **BRF082** foi cultivada em 15 L de meio líquido BD com água do mar sintética sob condição estática (Item 6.11, p. 250). Ao final de 14 dias de cultivo, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Obteve-se então 1,67 g de extrato bruto do meio líquido de *D.cejpii*, o qual foi novamente particionado com água destilada e AcOEt para a remoção de sais constituintes do meio de cultura. A fração AcOEt foi concentrada, obtendo-se 1,16 g de extrato dessalificado, o qual foi submetido a uma partição líquido-líquido com MeOH 90% e hexano para um processo de desengorduramento da amostra (KJER *et al.*, 2010). Desse modo, obteve-se duas frações: BRF082 meio líquido MeOH 90% (1,14 g) e BRF082 meio líquido hexano (21,8 mg). A fração BRF082 meio líquido MeOH 90% foi submetida a teste citotóxico frente à linhagem de células tumorais HCT-116. A mesma apresentou percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50 µg/mL de 74,99 %.

5.6.3.1 Fracionamento cromatográfico da fração **BRF082** meio líquido MeOH 90%.

A fração BRF082 meio líquido MeOH 90% foi submetida à purificação em coluna C18 empregando-se 50 mL de cada um dos eluentes a seguir: H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas frações estão descritas na Tabela 26, p. 158.

Tabela 26 - Massas das subfrações obtidas do fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90%.

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
H ₂ O 100%	1	40,30	3,55
H ₂ O/MeOH 8:2	2	44,10	3,89
H ₂ O/MeOH 6:4	3	82,80	7,30
H ₂ O/MeOH 1:1	4	59,60	5,25
MeOH/H ₂ O 7:3	5	165,30	14,57
MeOH/H ₂ O 8:2	6	20,50	1,80
MeOH/H ₂ O 9:1	7	15,70	1,38
MeOH 100%	8	219,40	19,33

5.6.3.2 Atividades citotóxicas da subfrações de BRF082 meio líquido MeOH 90 %.

As subfrações obtidas da purificação da fração **BRF082** meio líquido MeOH 90% em coluna C18 (Tabela 26) foram submetidas a teste citotóxico frente à linhagem de células tumorais HCT-116. Os resultados estão descritos na Tabela 27.

Tabela 27 – Percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) e IC_{50} das subfrações do fracionamento cromatográfico de BRF082 meio líquido MeOH 90 % frente à linhagem tumoral HCT-116. O percentual de inibição foi avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h e os valores de IC_{50} e os respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (*Intuitive Software for Science*, San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Siglas	Amostras	% Inibição	IC_{50}
H ₂ O 100%	1	100,00	1,47
H ₂ O/MeOH 8:2	2	64,10	8,530e – 006
H ₂ O/MeOH 6:4	3	100,00	2,22
H ₂ O/MeOH 1:1	4	100,00	0,23
MeOH/H ₂ O 7:3	5	100,00	0,27
MeOH/H ₂ O 8:2	6	100,00	1,71
MeOH/H ₂ O 9:1	7	100,00	13,77
MeOH 100%	8	100,00	3767
Doxorrubicina	-	100,00	0,47 (0,15 – 1,44)

Observando-se o percentual de inibição e a IC_{50} das amostras apresentadas na Tabela 27, pode-se concluir que as amostras 4 e 5 são as mais ativas e, portanto, as mais promissoras para isolamento de metabólitos secundários. Devido à menor quantidade da amostra 4 (59,60 mg), resolveu-se fracionar, através de CLAE, apenas a amostra 5 (165,30 mg).

5.6.3.3 Fracionamento da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5)

Submeteu-se 165,30 mg da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 26) à CLAE. Dentre os picos apresentados no cromatograma da Figura 119, p. 159, os correspondente aos compostos com tempos de retenção 9,15 minutos (pico **4**), 10,77 minutos (pico **7**) e 18,76 minutos (pico **14**) foram isolados e codificados como **BRF082-1** (5,9 mg, 3,57 %), **BRF082-2** (17,0 mg, 10,28 %) e **BRF082-3** (6,7 mg, 4,0), respectivamente. Essas amostras foram submetidas as análises de RMN e EMAR-IES e IV para a elucidação de suas estruturas. O pico

3, com tempo de retenção 8,16 minutos (24,9 mg, 15,06 %), embora aparentasse corresponder a uma substância isolada, mostrou-se impuro na análise por RMN. As massas dos picos coletados estão mostradas na Tabela 28.

Figura 119. Cromatograma da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5).

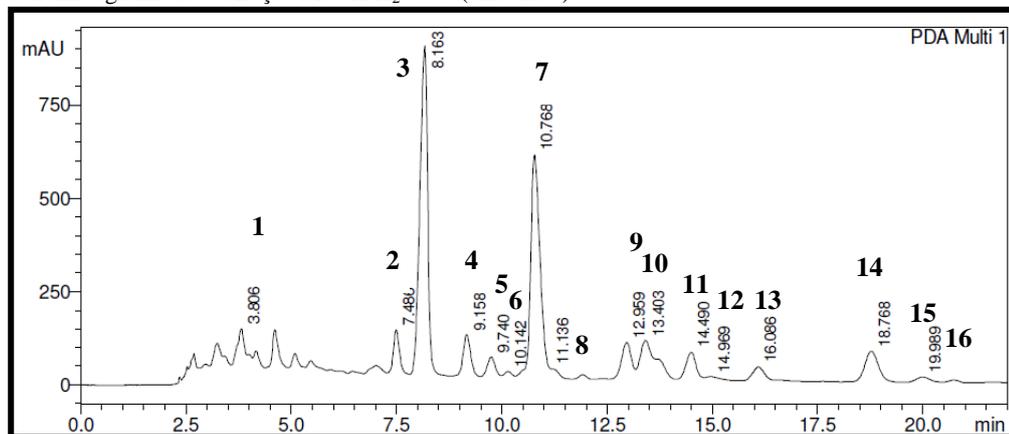


Tabela 28. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra MeOH /H₂O 7:3 do cultivo de **BRF082**

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	41,9	25,35
2	2	2,4	1,45
3	3	24,9	15,06
4	4	5,9	3,57
5	5	8,1	4,90
6	6	1,5	0,91
7	7	17,0	10,28
8	8	6,2	3,75
9	9	5,7	3,45
10	10	9,5	5,75
11	11	3,8	2,30
12	12	2,0	1,21
13	13	4,8	2,90
14	14	6,7	4,05
15	15	2,9	1,75
16	16	4,4	2,66

5.6.3.4 Determinação estrutural de **BRF082-1**.

BRF082-1 foi obtida como um sólido amarelo, amorfo e solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução, EMAR-IES, (Figura 125, p. 165) exibiu, no modo negativo, o íon correspondente à molécula com aduto de cloro $[M + Cl]^-$, em m/z 391,0577 (m/z calculado 391,0558, erro 4,85 ppm), o qual apontou a fórmula molecular $C_{15}H_{20}N_2O_4S_2$, IDH = 7.

O espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF082-1** (Figura 126, p. 166) apresentou uma banda larga e forte em 3438 cm^{-1} , compatível com deformação axial de O-H

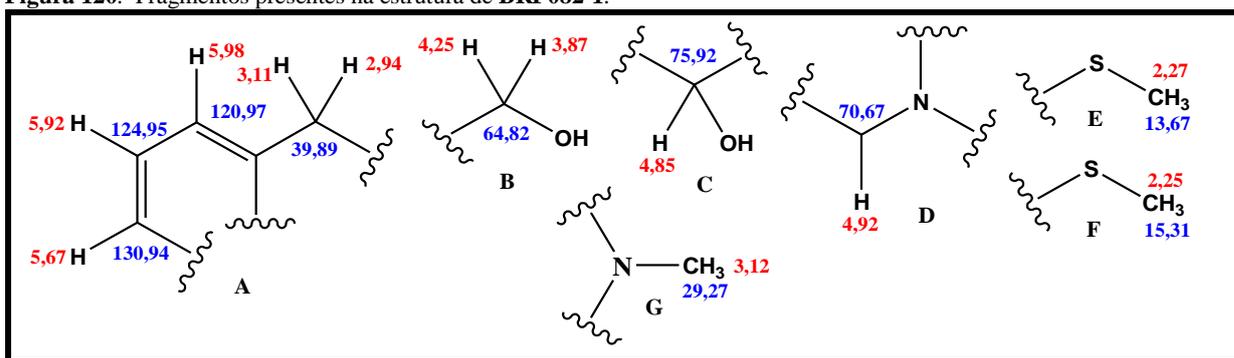
em ligação de hidrogênio. As bandas em 2920 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} foram atribuídas a deformações axiais de C-H assimétrica e simétrica, respectivamente, de grupos metileno. A banda em 1652 cm^{-1} é compatível com uma deformação axial de C=O de lactama com anel de seis ou mais átomos. As bandas em 1426 cm^{-1} e 1389 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação angular no plano de O-H, acopladas com vibrações de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A banda em 1051 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C-O de álcool.

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **BRF082-1** (Figura 127, p. 167) apresentou treze sinais. Os simpletos em δ 2,25 (3H), δ 2,27 (3H) e δ 3,12 (3H), foram atribuídos a três metilas com efeito de desproteção. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (Figura 130, p. 169), os sinais em δ 2,94 (*d*, $J = 16,4\text{ Hz}$, 1H) e 3,11 (*d*, $J = 16,4\text{ Hz}$, 1H), foram atribuídos, a dois hidrogênios metilênicos com algum efeito de desproteção, assim como os sinais em δ 3,87 (*d*, $J = 11,5\text{ Hz}$, 1H) e δ 4,25 (*d*, $J = 11,5\text{ Hz}$, 1H), sendo estes últimos ligados a um carbono oxigenado. O simpleto largo em δ 4,57 (1H) foi atribuído a um hidrogênio de hidroxila. Com auxílio do mapa de contornos COSY (Figura 129, p. 168), os sinais em δ 5,67 (dl, $J = 9,7\text{ Hz}$, 1H) e δ 5,92 (ddl, $J = 2,3$ e $9,7\text{ Hz}$, 1H) foram atribuídos a dois hidrogênios vicinais olefínicos em posição *cis*, ao passo que este último foi atribuído como também vicinal ao hidrogênio olefínico em δ 5,98 (dl, $J = 2,3\text{ Hz}$, 1H). O mapa de contornos HSQC permitiu ainda a visualização dos sinais em δ 4,85 e δ 4,92. Tais sinais foram atribuídos, com o auxílio dos espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C – DEPT 135 (Figura 128, p. 167) a dois hidrogênios metínicos com efeito de desproteção.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 128, p. 167) apresentou treze linhas espectrais. Sua análise, juntamente com os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 128, p. 167) e HSQC, permitiu realizar os seguintes assinalamentos: Os sinais em δ 13,67, δ 15,31 e δ 29,27 foram atribuídos a três carbonos metílicos, sendo os dois primeiros ligados a enxofre e o último ligado a oxigênio ou nitrogênio. Os sinais em δ 39,89 e δ 64,82 foram atribuídos a dois carbonos metilênicos, sendo este último admitido como oxigenado. Os sinais em δ 70,67 e δ 75,92 foram atribuídos a dois carbonos metínicos, nitrogenados e/ou oxigenados, ambos com efeito desprotetor. Os sinais em δ 73,33, δ 74,58 foram atribuídos a dois carbonos não hidrogenados ligados a enxofre. Os sinais em δ 120,97, δ 124,95, δ 130,94 e δ 134,22 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo os três primeiros metínicos e o último não hidrogenado.

Os dados anteriores sugerem a presença dos fragmentos mostrados na Figura 120, p. 161.

Figura 120. Fragmentos presentes na estrutura de **BRF082-1**.

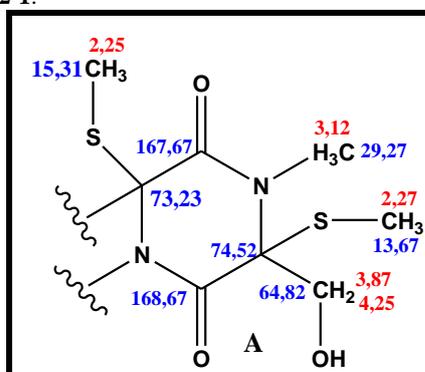


A análise do experimento bidimensional HMBC (Figura 131, p. 170), levou à visualização de dois sinais de carbono não vistos nos espectro de RMN de ^{13}C e RMN de ^{13}C DEPT 135°: δ 167,77 e δ 168,67, os quais foram atribuídos a grupamentos $-\text{C}=\text{O}$ de amida.

A presença de duas ligações duplas, duas carbonilas e a ausência de indícios de anel aromático, associado ao valor de IDH 7, leva à proposição da existência de três anéis na estrutura de **BRF082-1**.

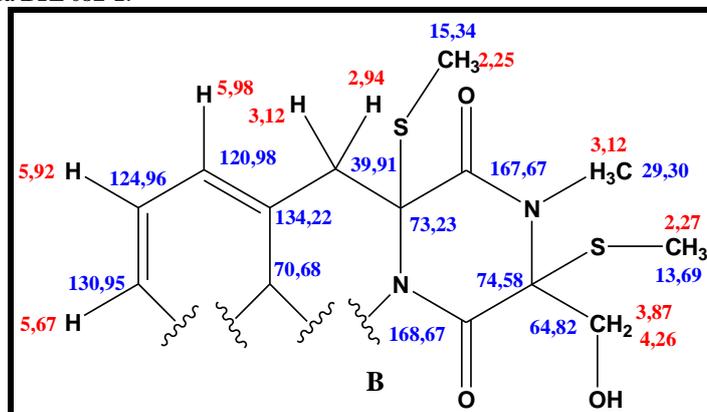
As correlações entre o sinal de hidrogênio em δ 4,25 e o sinal de carbono δ 168,67 e entre o sinal de hidrogênio em δ 3,87 e os sinais de carbono em δ 168,67 e δ 74,52 permitem conectar o fragmento B (Figura 120) à carbonila em δ 168,67, através do carbonbo em δ 74,52. O acoplamento entre os hidrogênios metílicos em δ 2,27 e o carbono em δ 74,52 conecta a este o fragmento E. As correlações entre o sinal de hidrogênios metílicos em δ 3,12 e os sinais de carbono em δ 167,67 e δ 74,52 permitem a ligação do fragmento G (Figura 120) a este último carbono. Por fim, a correlação entre os hidrogênios metílico em δ 2,25 à carbonila em δ 167,67 e o carbono quaternário em δ 73,23, permitem assinalar a posição deste carbono como vizinho a esta carbonila. Todos esses acoplamentos permitem propor, para **BRF082-1**, a subestrutura A mostrada na Figura 121.

Figura 121. Subestrutura A para **BRF082-1**.



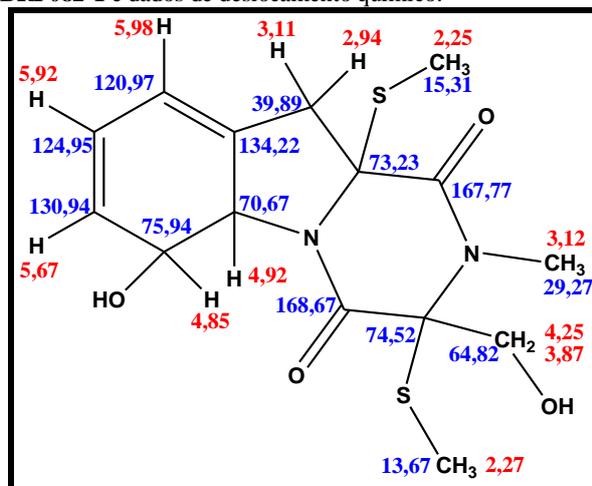
As correlações dos hidrogênios metilênicos em δ 3,11 e δ 2,94 com os carbonos em δ 70,67, δ 120,97, δ 134,22 e δ 167,77 permitem unir o fragmento A (Figura 120, p. 161) à subestrutura A (Figura 121, p. 161), gerando a subestrutura B (Figura 122).

Figura 122. Subestrutura B para **BRF082-1**.



Diante da subestrutura B e da fórmula molecular e IDH apontados pelo espectro de massas, só resta a proposição da estrutura mostrada na Figura 123.

Figura 123. Proposta estrutural para **BRF082-1** e dados de deslocamento químico.



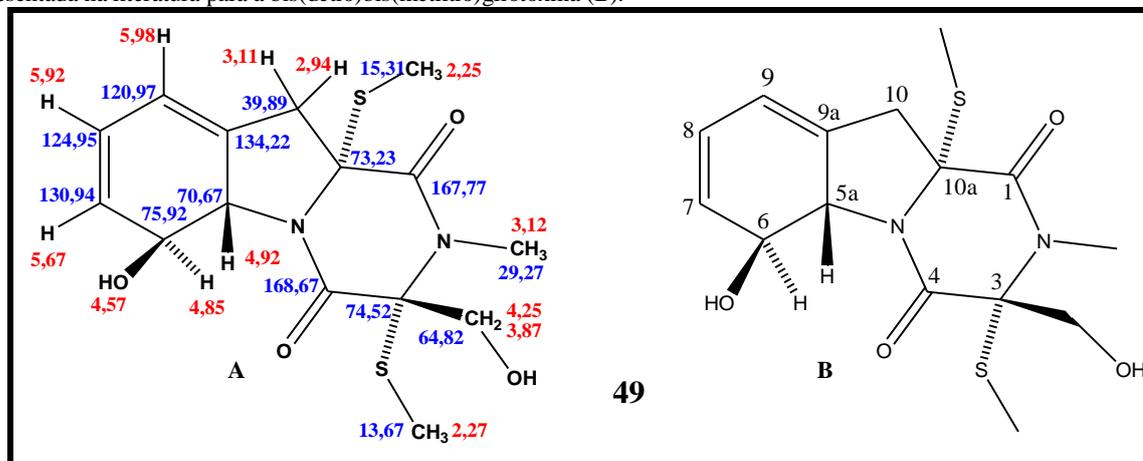
A comparação dos dados espectroscópicos de **BRF082-1** com dados reportados na literatura (Tabela 29, p. 163) corroboram a estrutura proposta, revelando tratar-se da bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina (**49**, Figura 13, p. 44), uma micotoxina já isolada de outras espécies de fungos (KIRBY *et al.*, 1980; LEE *et al.*, 2001). Segundo Kirby e colaboradores (1980), a bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina é sintetizada no fungo pela redução e metilação irreversíveis da gliotoxina (**46**, Figura 11, p. 43) e ambos os autores citados atribuem àquela igual estereoquímica da gliotoxina obtida do mesmo extrato. Neste trabalho, a gliotoxina também foi isolada (**BRF082-4**, Item 5.6.4.4, p. 197), do extrato do mesmo fungo do qual

BRF082-1 foi obtida. Seguindo o raciocínio dos autores citados, atribuímos à **BRF082-1**, a mesma configuração relativa da gliotoxina isolada (Figura 124).

Tabela 29. Comparação dos dados de deslocamento químico de RMN¹H e ¹³C de **BRF082-1** com os dados da bis(detio)bis(metilto)gliotoxina (LEE *et al.*, 2001).

C	BRF082-1 (CD ₃ OD, 500 MHz)		Bis(detio)bis(metilto)gliotoxina (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz)	
	¹³ C	RMN δ ¹ H	¹³ C	RMN δ ¹ H
1	167,77		165,2	
3	74,52		72,8	
4	168,67		166,3	
5a	70,67	4,92 (1H)	69,0	4,83 (d, <i>J</i> = 13,7 Hz, 1H)
6	75,92	4,85 (s, 1H)	73,8	4,72 (d, <i>J</i> = 13,7 Hz, 1H)
7	130,94	5,67 (dl, <i>J</i> = 9,7 Hz, 1H)	130,6	5,64 (d, <i>J</i> = 9,8 Hz, 1H)
8	124,95	5,92 (ddl, <i>J</i> = 2,3 e 9,7 Hz, 1H)	123,5	5,91 (dd, <i>J</i> = 9,8 e 3,0 Hz, 1H)
9	120,97	5,98 (dl, <i>J</i> = 2,3 Hz, 1H)	119,3	6,00 (dl, <i>J</i> = 3,0 Hz, 1H)
9a	134,22		133,1	
10	39,89	2,94 (d, <i>J</i> = 16,4 Hz, 1H); 3,11 (d, <i>J</i> = 16,4 Hz, 1H)	38,4	2,80 (dl, <i>J</i> = 15,6 Hz, 1H); 3,11 (d, <i>J</i> = 15,6 Hz, 1H)
10a	73,23		71,8	
1-NCH ₃	29,27	3,12 (s, 3H)	28,3	2,99 (s, 3H)
3-CH ₂ OH	64,82	4,25 (d, <i>J</i> = 11,5 Hz, 1H); 3,87 (d, <i>J</i> = 11,5 Hz, 1H)	63,0	4,06 (dd, <i>J</i> = 11,3 e 5,6 Hz, 1H); 3,72 (dd, <i>J</i> = 11,3 e 5,6 Hz, 1H)
3-SCH ₃	13,67	2,27 (s, 3H)	12,8	2,19 (s, 3H)
10a-SCH ₃	15,31	2,25 (s, 3H)	14,7	2,20 (s, 3H)
6-OH		4,57 (s, 1H)		5,48 (s, 1H)

Figura 124. Proposta estrutural de **BRF082-1** com estereoquímica e dados de deslocamento químico (A) e estrutura apresentada na literatura para a bis(detio)bis(metilto)gliotoxina (B).



A literatura relata, para a bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina, atividades antibacteriana (LI *et al.*, 2006), antitubercular (SHAABAN *et al.*, 2012), antitumoral (SUN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012), anti-angiogênica (LEE *et al.*, 2001), antioxidante e antidiabetes (DEWI *et al.*, 2014), dentre outras.

Figura 125. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de **BRF082-1** e proposta hipotética de formação de fragmento.

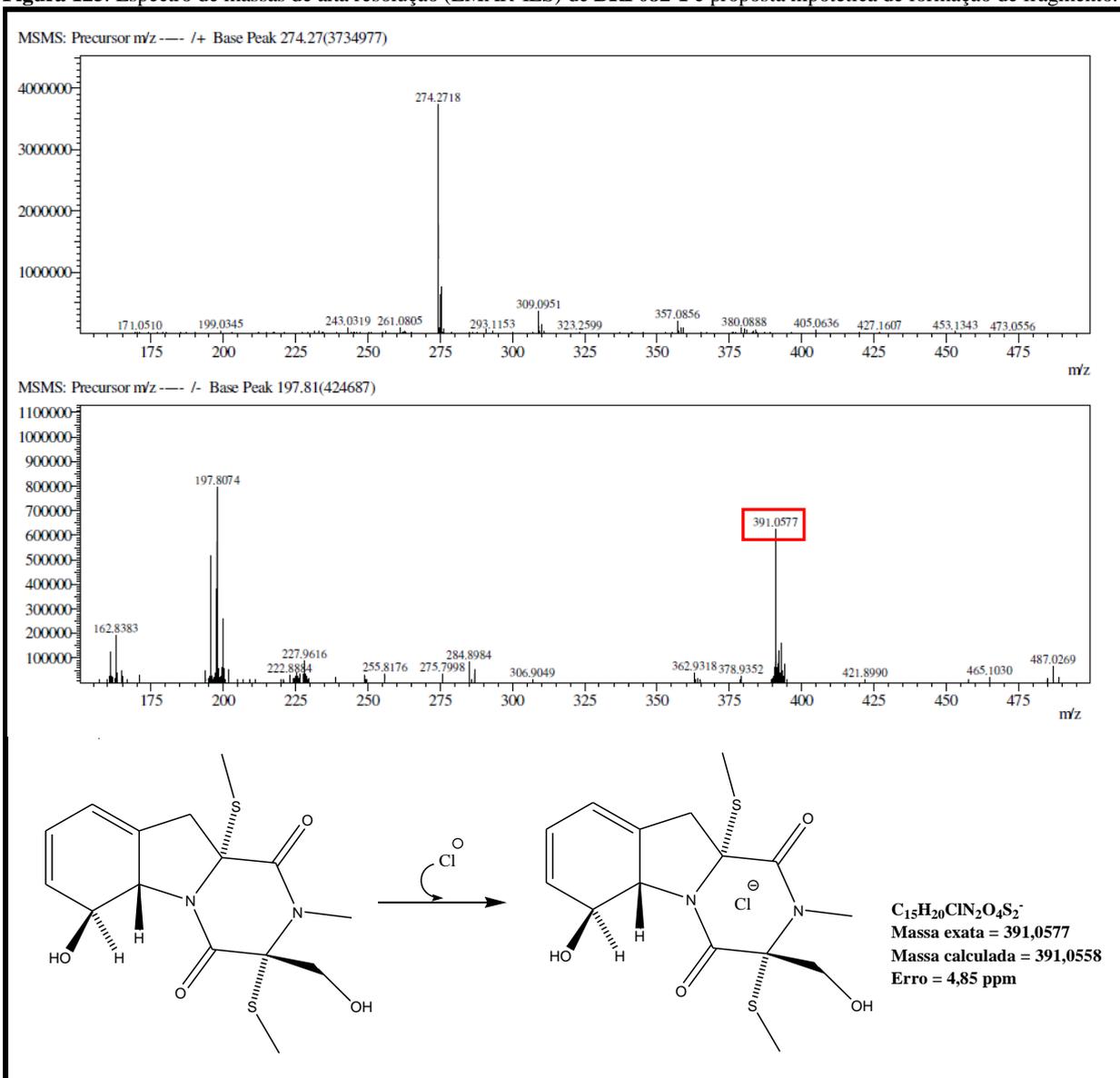


Figura 126. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-1.

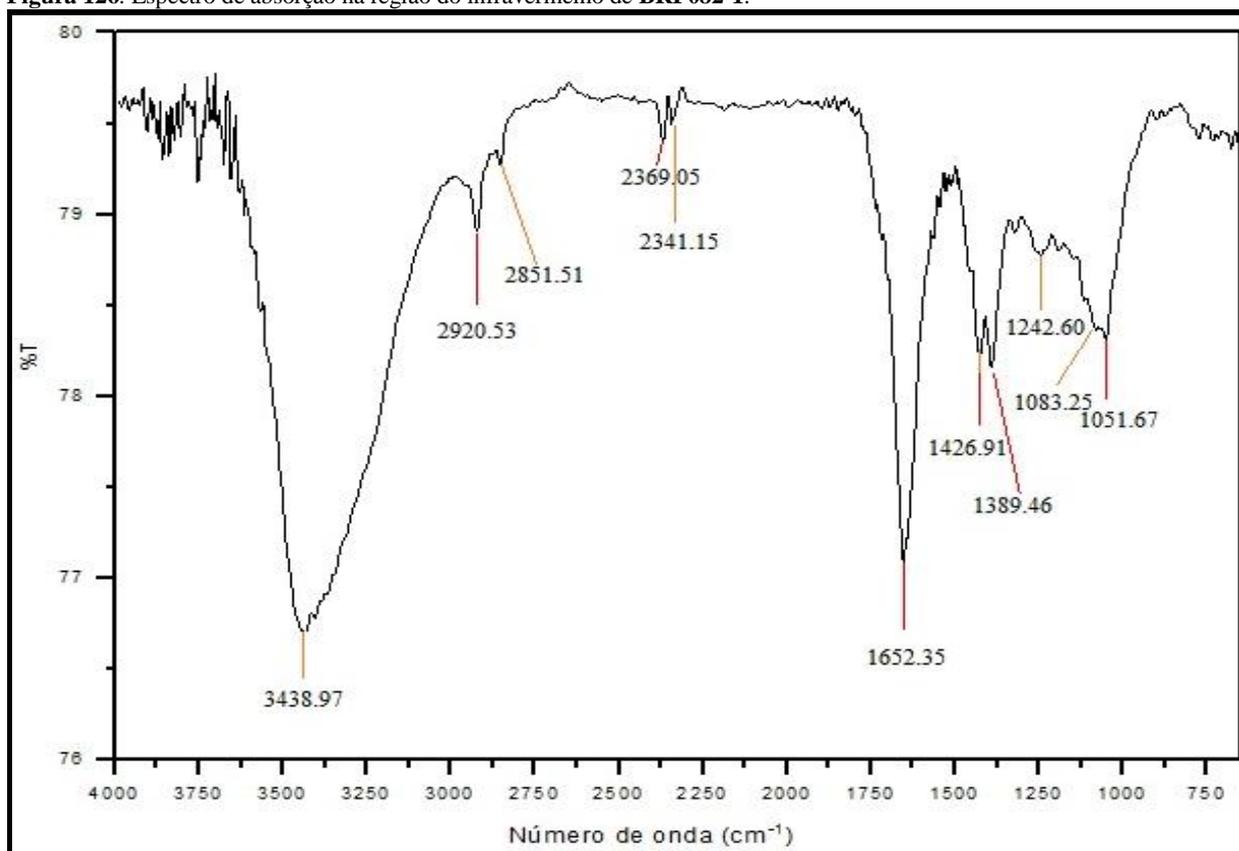


Figura 127. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de **BRF082-1**.

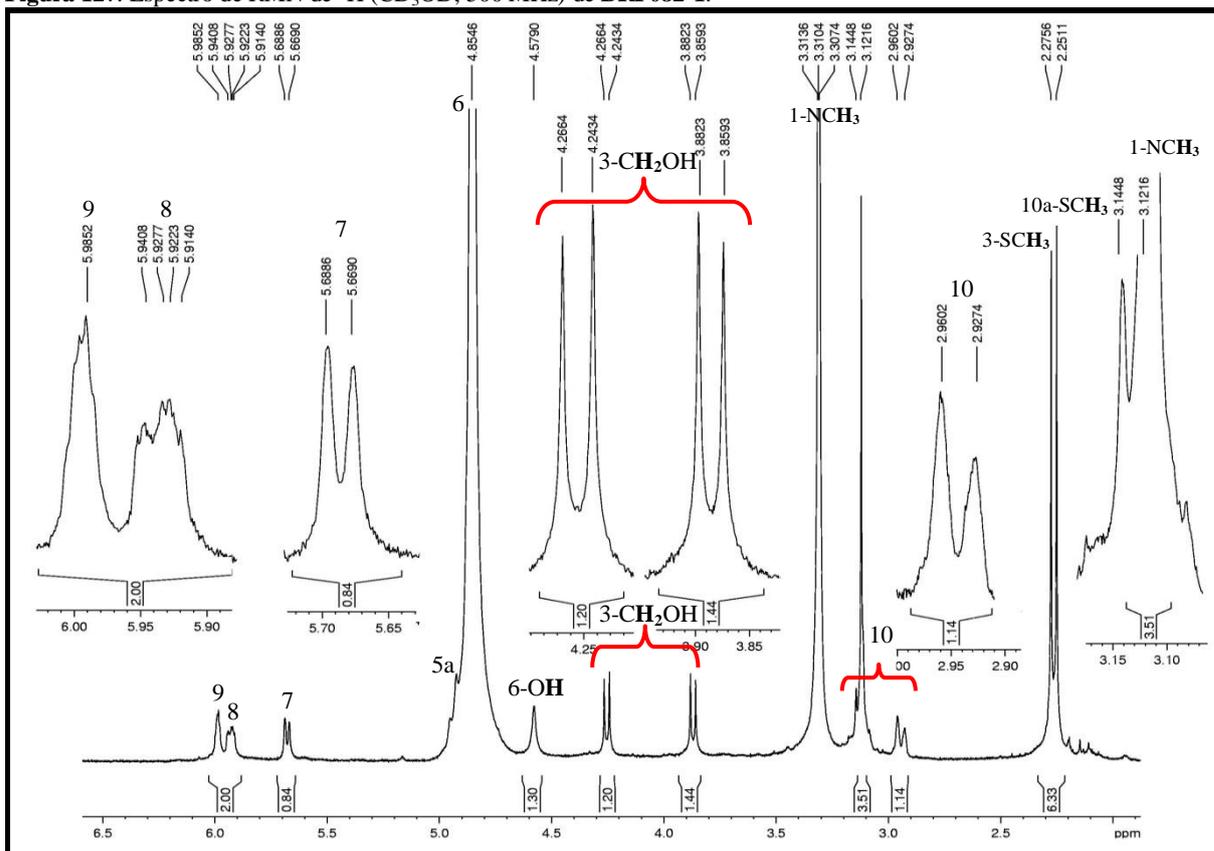


Figura 128. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e RMN de ^{13}C -DEPT 135° de **BRF082-1**.

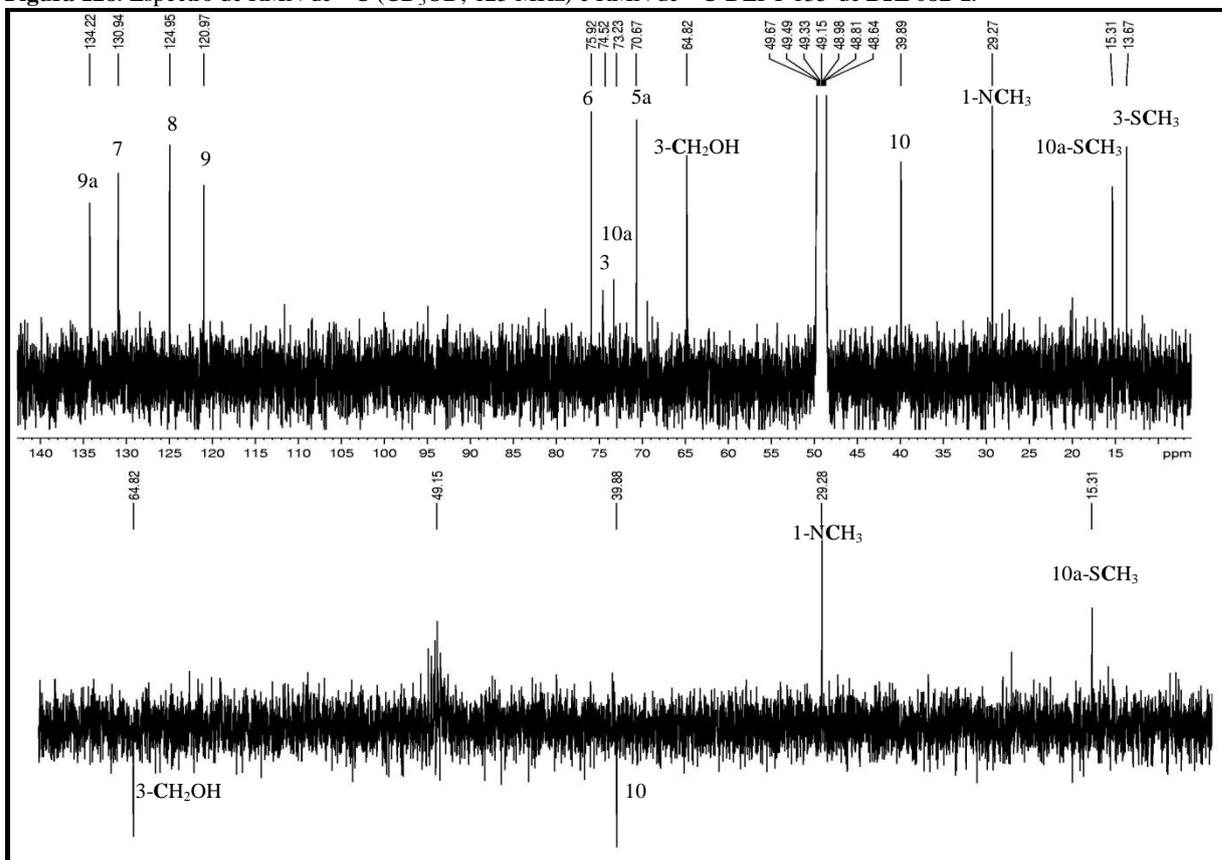


Figura 129. Mapa de contornos COSY de BRF082-1 e correlações.

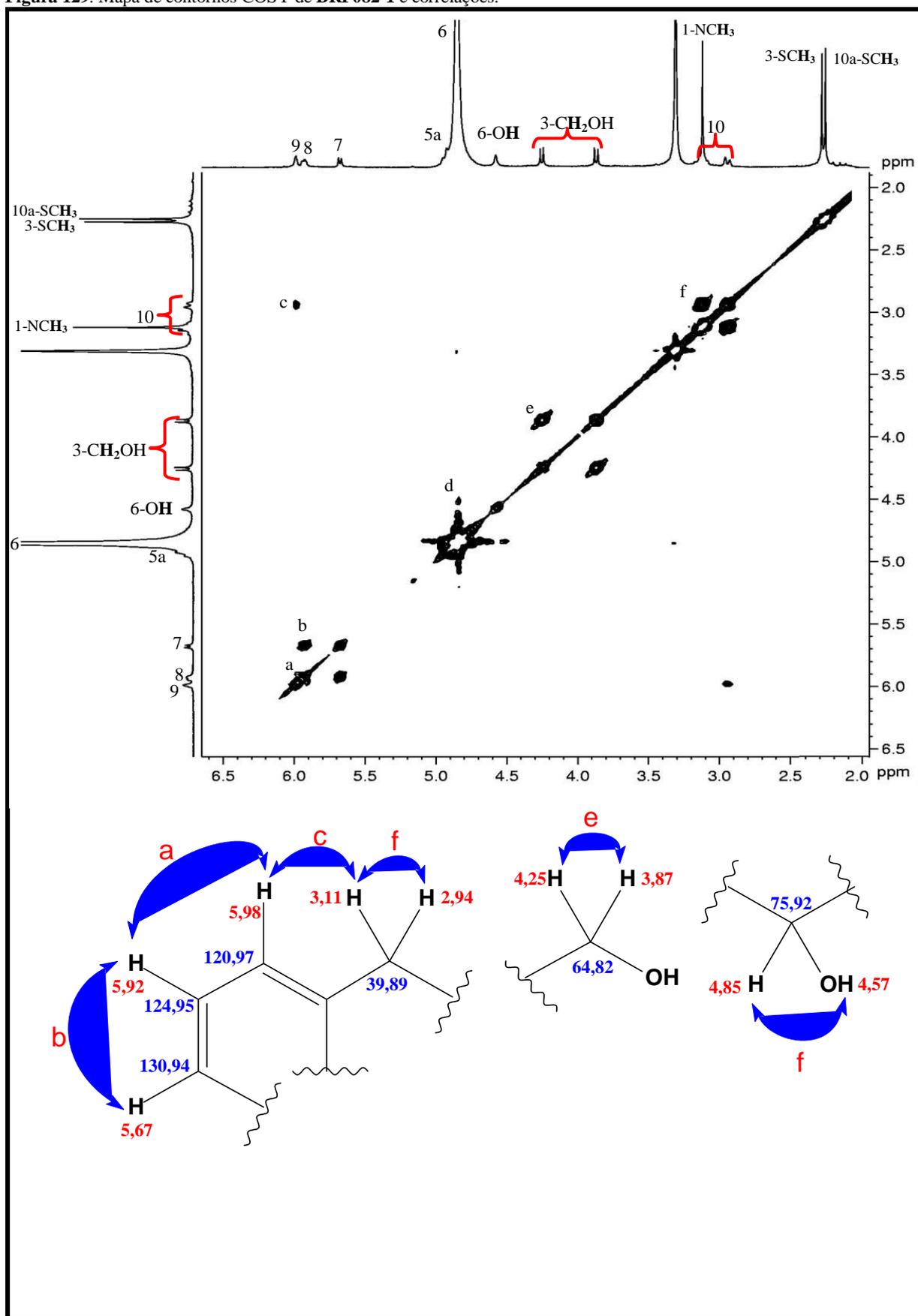


Figura 130. Mapa de contornos HSQC de BRF082-1.

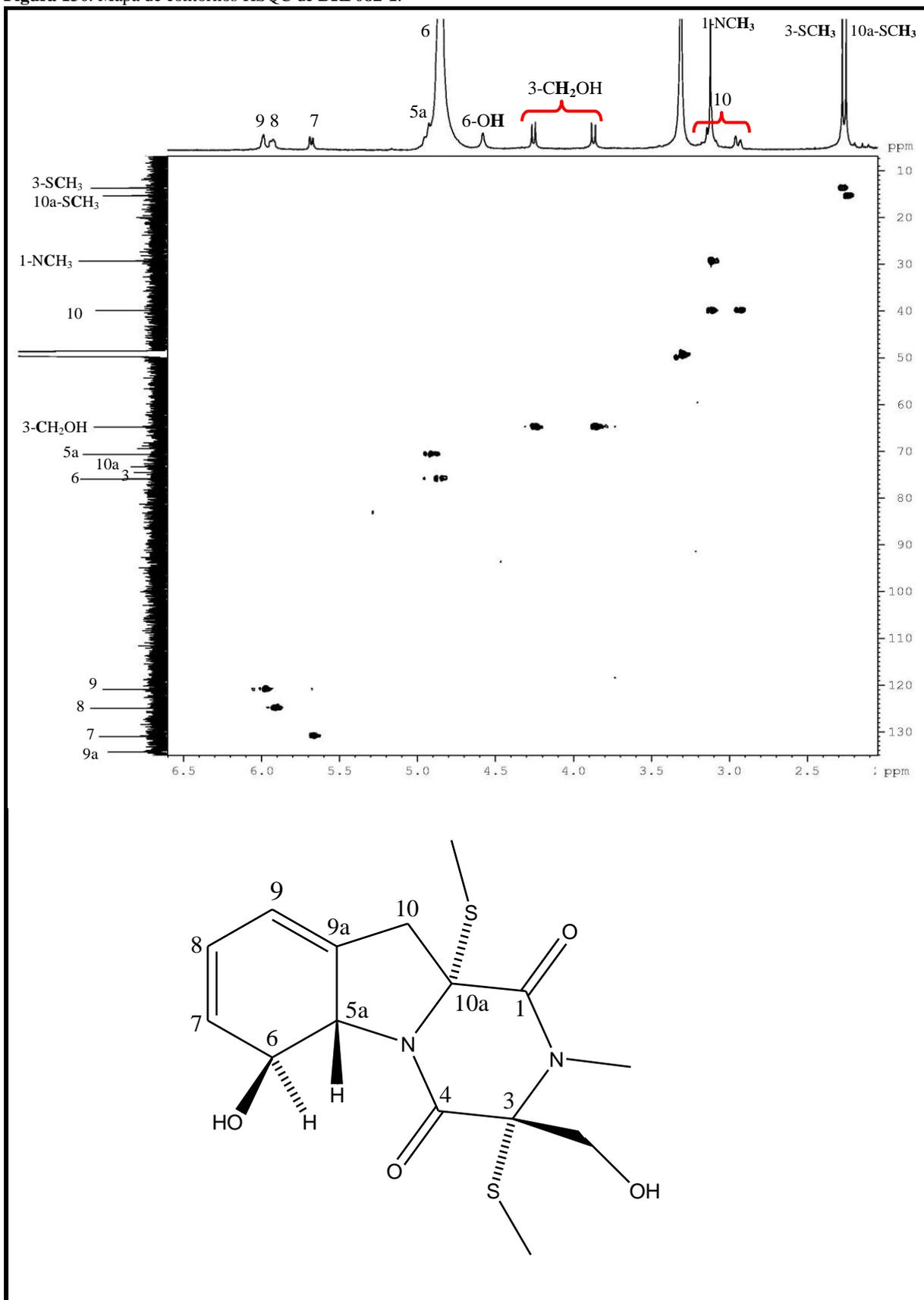
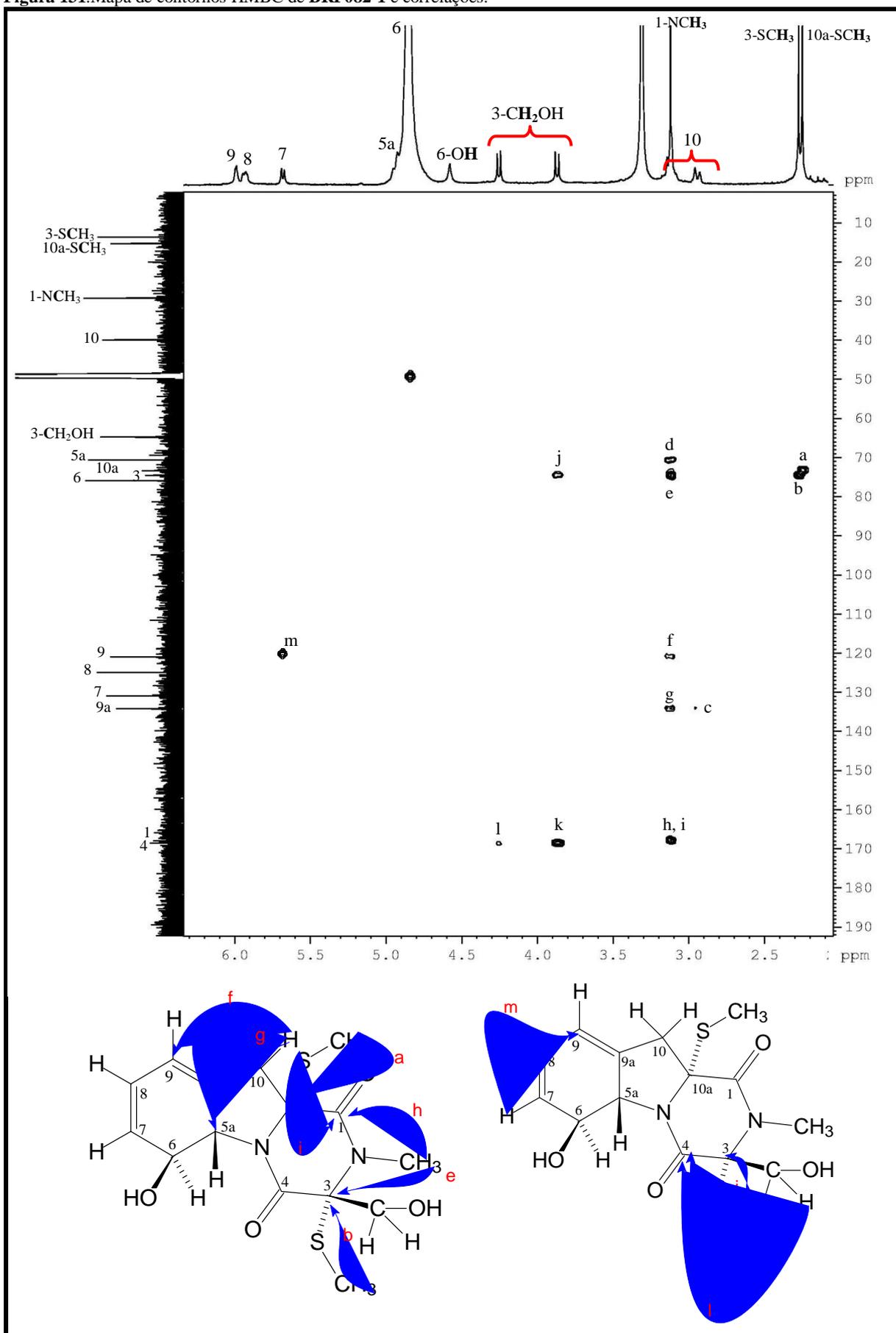


Figura 131. Mapa de contornos HMBC de **BRF082-1** e correlações.



5.6.3.5 Determinação estrutural de BRF082-2.

BRF082-2 foi obtido como um sólido cristalino amarelado em formato de agulhas e solúvel em metanol. O espectro de massas de alta resolução EMAR-IES desta amostra (Figura 136, p. 176) exibiu, no modo negativo, exibiu o íon correspondente à molécula com aduto de cloro $[M + Cl]^-$, em m/z 433,0678 (m/z calculado 433,0664, erro 3,23 ppm), o qual levou à fórmula molecular $C_{17}H_{22}N_2O_5S_2$, IDH 8.

O espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF082-2** (Figura 137, p. 177) apresentou uma banda larga e de intensidade média em 3414 cm^{-1} , a qual é compatível com uma deformação axial de O-H. As bandas em 2957 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} foram associadas a vibrações de deformações axiais assimétricas de C-H de grupos metila e metileno, respectivamente. As bandas em 1740 cm^{-1} e 1661 cm^{-1} são compatíveis com vibrações de deformação axial de C=O de éster e de lactama com anel de seis ou mais átomos, respectivamente. As bandas em 1418 cm^{-1} e 1379 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação angular no plano de O-H, acopladas com vibrações de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A banda em 1235 cm^{-1} foi associada à vibração de deformação axial assimétrica de C-O de éster (C-C(=O)-O) - acetato. A banda em 1188 cm^{-1} foi atribuída a uma deformação axial assimétrica de O-C-C de éster de álcool. A banda em 1051 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C-O de álcool.

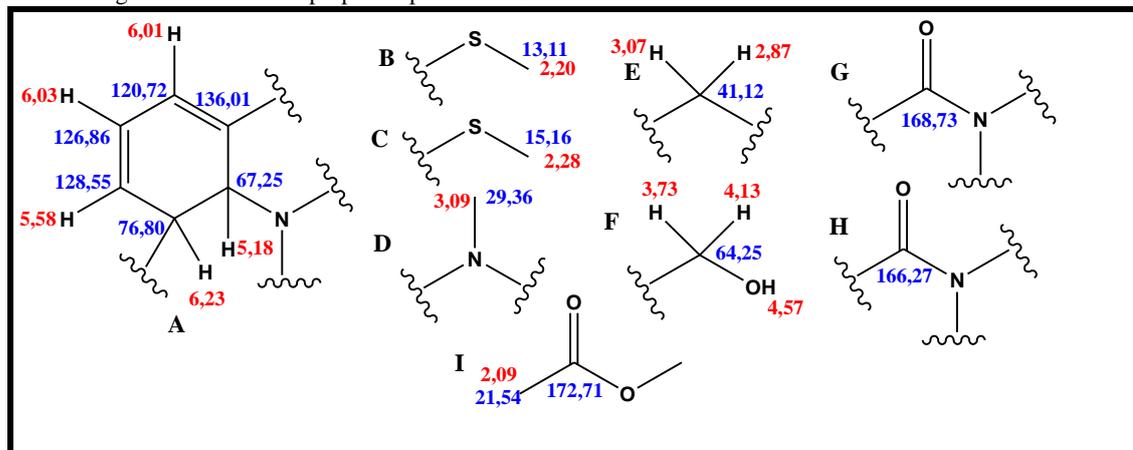
O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **BRF082-2** (Figura 138, p. 178) apresentou sinais para vinte e um hidrogênios. Os simpletos em δ 2,09 (3H), δ 2,20 (3H), δ 2,28 (3H) e δ 3,09 (3H), foram atribuídos a quatro metilas com efeito de desproteção. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (Figura 141, p. 181), os sinais em δ 2,87 (*ddl*, $J = 1,5$ e $15,6$ Hz, 1H) e δ 3,07 (*ddl*, $J = 1,5$ e $15,6$ Hz, 1H) foram atribuídos a dois hidrogênios metilênicos, assim como os sinais em δ 3,73 (*d*, $J = 11,2$ Hz, 1H) e δ 4,13 (*d*, $J = 11,2$ Hz, 1H), sendo estes últimos ligados a um carbono oxigenado. O simpleto largo em δ 4,57 (1H) foi atribuído a um hidrogênio de hidroxila. Com auxílio do mapa de contornos COSY (Figura 140, p. 180), pôde-se atribuir os sinais em δ 5,58 (*dd*, $J = 2,0$ e $9,0$ Hz, 1H) e δ 6,03 (*dd*, $J = 2,3$ e $9,0$ Hz, 1H) a dois hidrogênios vicinais olefínicos em posição *cis*, ao passo que este último foi atribuído como também vicinal ao hidrogênio olefínico em δ 6,01 (*dl*, $J = 2,3$ Hz, 1H). O experimento COSY permitiu visualizar também acoplamentos entre os sinais em δ 5,58 (*dd*, $J = 2,0$ e $9,0$ Hz, 1H) e δ 6,23 (*dd*, $J = 2,0$ e $15,0$ Hz, 1H) e entre este e o sinal em δ 5,18 (*ddl*, $J = 1,3$ e $15,0$ Hz, 1H).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **BRF082-2** (Figura 139, p. 179) apresentou dezessete linhas espectrais. Sua análise, juntamente com os espectros de RMN ^{13}C -

DEPT 135° (Figura 139, p. 179) e HSQC, permitiu realizar os seguintes assinalamentos: Os sinais em δ 13,11, δ 15,16, δ 21,54 e δ 29,36 foram atribuídos a quatro carbonos metílicos. Pode-se sugerir que os sinais em δ 13,11, δ 15,16 sejam de carbonos ligados a enxofre; o sinal em δ 21,54 seja de carbono ligado a carbonila; e o sinal em δ 29,36 pertença a carbono nitrogenado. Os sinais em δ 41,12 e em δ 64,74 foram atribuídos a dois carbonos metilênicos, sendo este último admitido como oxigenado. Os sinais em δ 74,60 e δ 75,54 foram atribuídos a dois carbonos não hydrogenados, nitrogenados e/ou sulfurados, ambos com efeito desprotetor. O sinal em δ 76,80 foi atribuído a um carbono metínico oxigenado, e o sinal em δ 67,25 foi atribuído a um carbono também metínico, nitrogenado. Os sinais em δ 120,72, δ 126,86, δ 128,55 e δ 136,01 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo os três primeiros metínicos e o último não hydrogenado. Os sinais em δ 166,27 e δ 168,73 foram associados a grupamentos C=O de amida, e o sinal em δ 172,71 foi associado a um grupamento C=O de éster.

Os dados anteriores permitem propor a presença dos seguintes fragmentos na estrutura de **BRF082-2** (Figura 132):

Figura 132. Fragmentos estruturais propostos para **BRF082-2**.

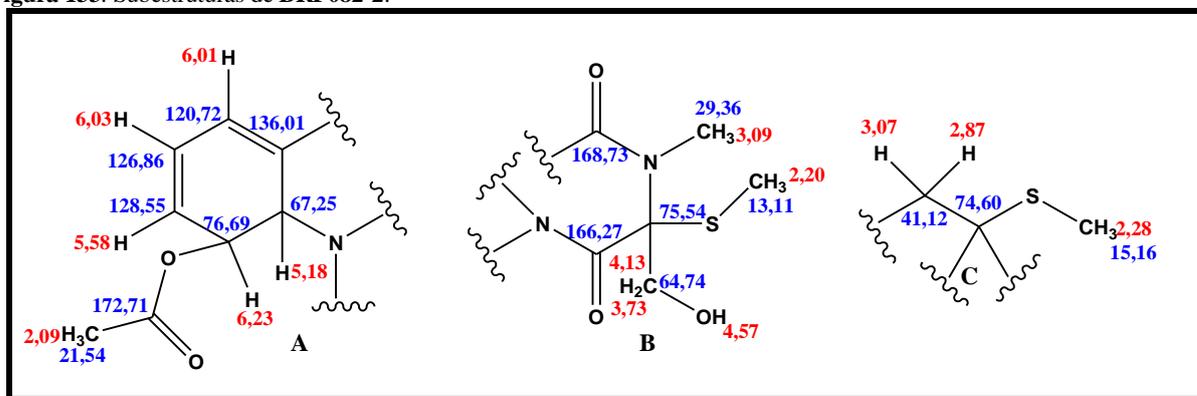


As semelhanças observadas, tanto entre os fragmentos como entre os espectros de RMN¹H e ¹³C de **BRF082-2** e **BRF082-1**, sugerem uma semelhança estrutural entre as duas substâncias. **BRF082-2** apresenta uma carbonila e uma metila a mais do que **BRF082-1**, fato corroborado pelo valor de IDH igual a 8, uma unidade maior do que o valor para **BRF082-1**. A diferença entre as massas das duas substâncias, 42 unidades, é indicativo da substituição de um hidrogênio por um grupamento acetila (CH₃-C(=O)-), mostrando que **BRF082-2** possa ser resultado de uma acetilação em uma das hidroxilas de **BRF082-1**.

O mapa de contornos HMBC (Figura 142, p. 182), foi suficiente para esclarecer essas suposições. As correlações observadas entre o sinal de hidrogênio em δ 6,23 e os sinais de carbono em δ 67,25, δ 128,55 e δ 172,71, assim como entre o sinal de hidrogênio em δ 2,09 e o

sinal de carbono em δ 172,71, permitiram unir os fragmentos A e I (Figura 132, p. 172), originando a subestrutura A (Figura 133). As correlações observadas entre os sinais de hidrogênios metilênicos em δ 4,13 e δ 3,73 e entre os sinais de carbono em δ 166,27 e δ 75,54, assim como as correlações entre os sinais de hidrogênio metílicos em δ 2,20 e o carbono em δ 75,54 permitiram unir os fragmentos H, B e F. As correlações entre o sinal em δ 3,09 e os sinais em δ 75,54 e δ 168,73 permitiu unir os fragmentos D e G ao fragmento H, originando a subestrutura B (Figura 133). A correlação entre os sinais em δ 3,07 e δ 2,28 e o sinal de carbono quaternário em δ 74,60 permitiu unir os fragmentos C e E através deste carbono (Figura 132, p. 172) originando a subestrutura C (Figura 133).

Figura 133. Subestruturas de **BRF082-2**.



Por fim, as correlações entre os sinais de hidrogênio em δ 3,07 e δ 2,87 e os sinais de carbono em δ 67,25, δ 120,72, δ 136,01, δ 74,60 e δ 168,73 foram suficientes para propor a estrutura mostrada na Figura 134, p. 174. A comparação com dados da literatura (WATTS *et al.*, 2010), mostrada na Tabela 30, revelaram tratar-se da 6-acetilbismetiltioglutoxina (**163**, Figura 135, p. 175), um metabólito já obtido sinteticamente a partir da redução da acetilgliotoxina (VAN DER PYL *et al.*, 1992) e da bismetiltioglutoxina (WATTS *et al.*, 2010). Assim como **BRF082-1**, a estereoquímica de **BRF082-2** foi estabelecida como sendo a mesma da gliotoxina (**46**, Figura 11, p. 43) conforme mostrado na Figura 135, p. 175.

Tabela 30. Comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C de **BRF082-2** com os da 6-acetilbismetiltioglutoxina (WATTS *et al.*, 2010).

C	BRF082-1 (CD ₃ OD, 500 MHz)		6-acetilbismetiltioglutoxina (CDCl ₃ , 600 MHz)	
	¹³ C	RMN δ ¹ H	¹³ C	RMN δ ¹ H
1	168,73		166,4	
3	75,54		71,8	
4	166,27		164,1	

Figura 136. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de **BRF082-2** e proposta mecânica de formação de aduto.

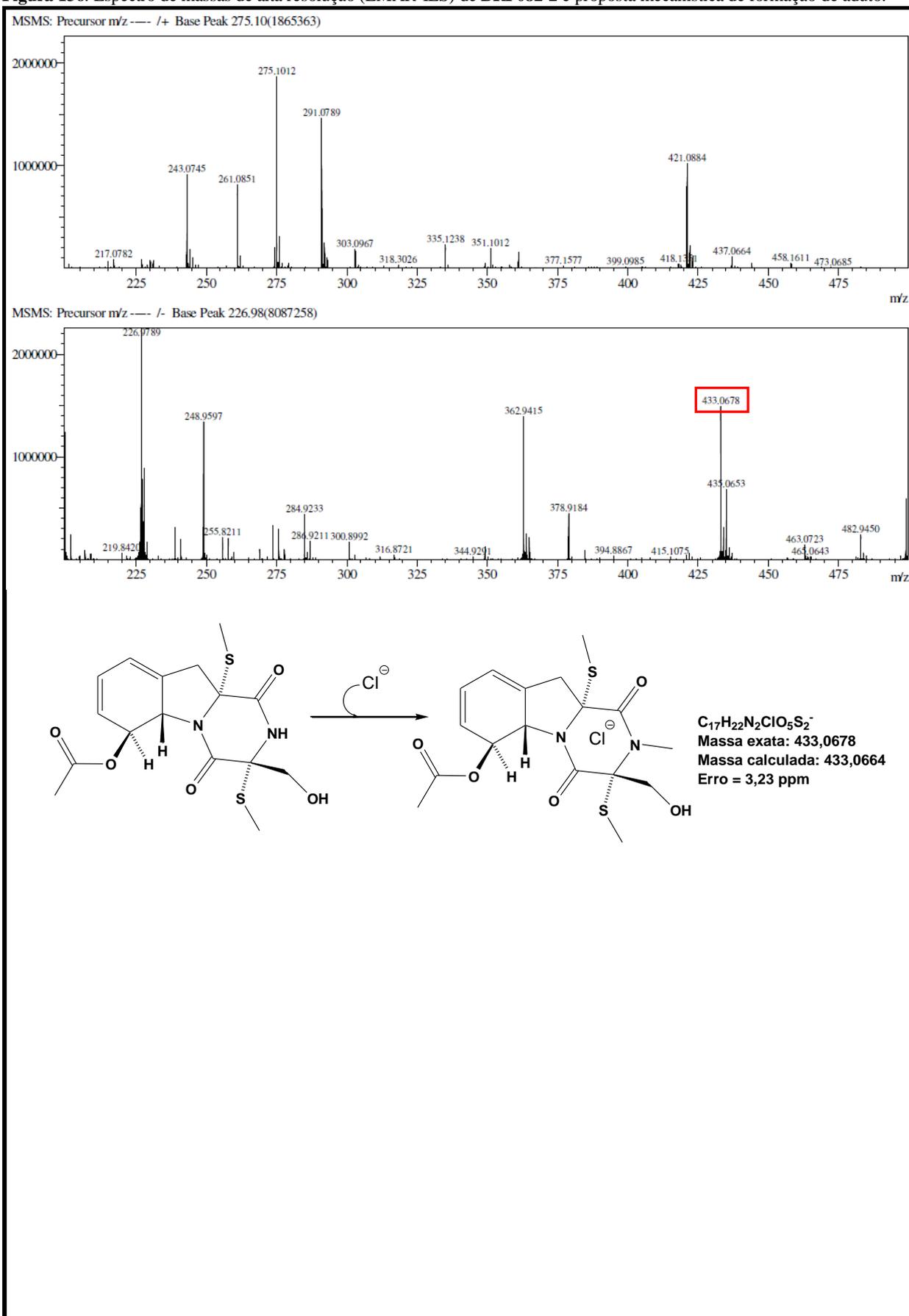


Figura 137. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-2.

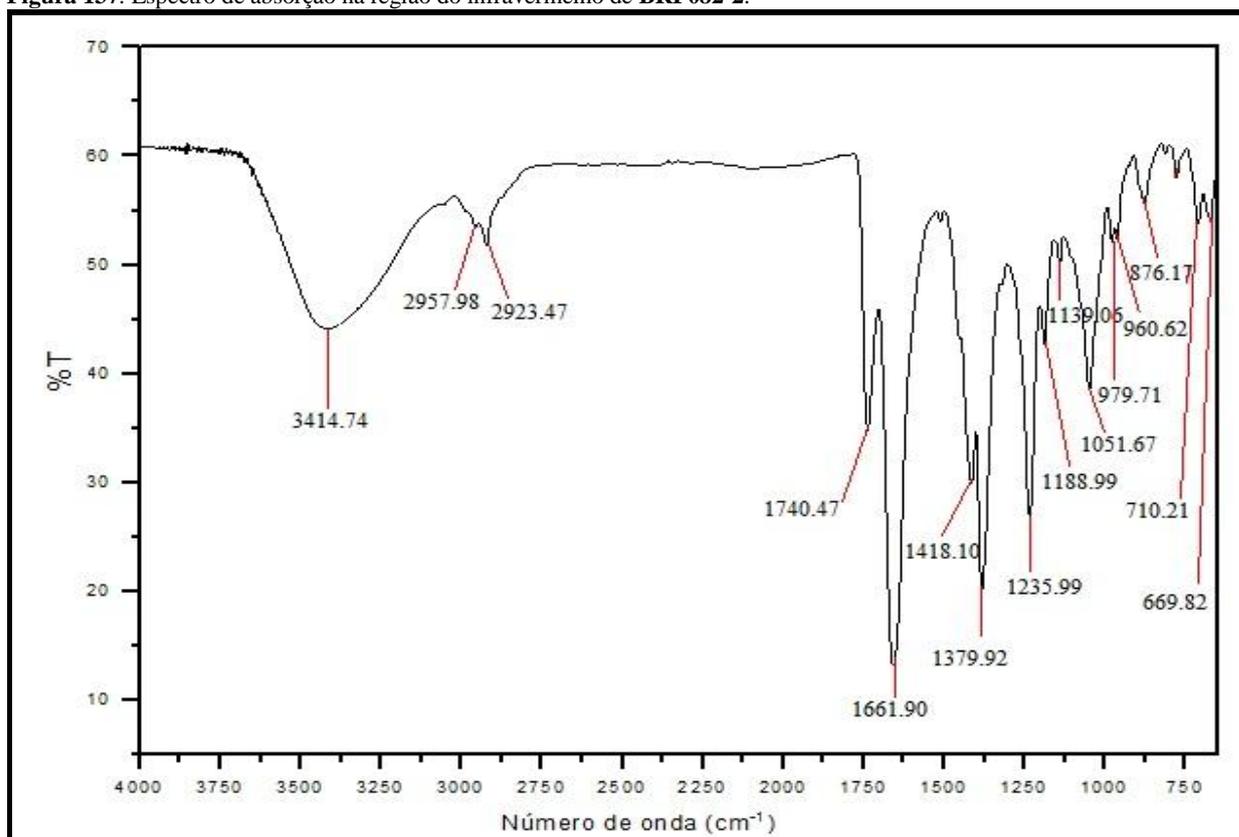


Figura 138. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de BRF082-2.

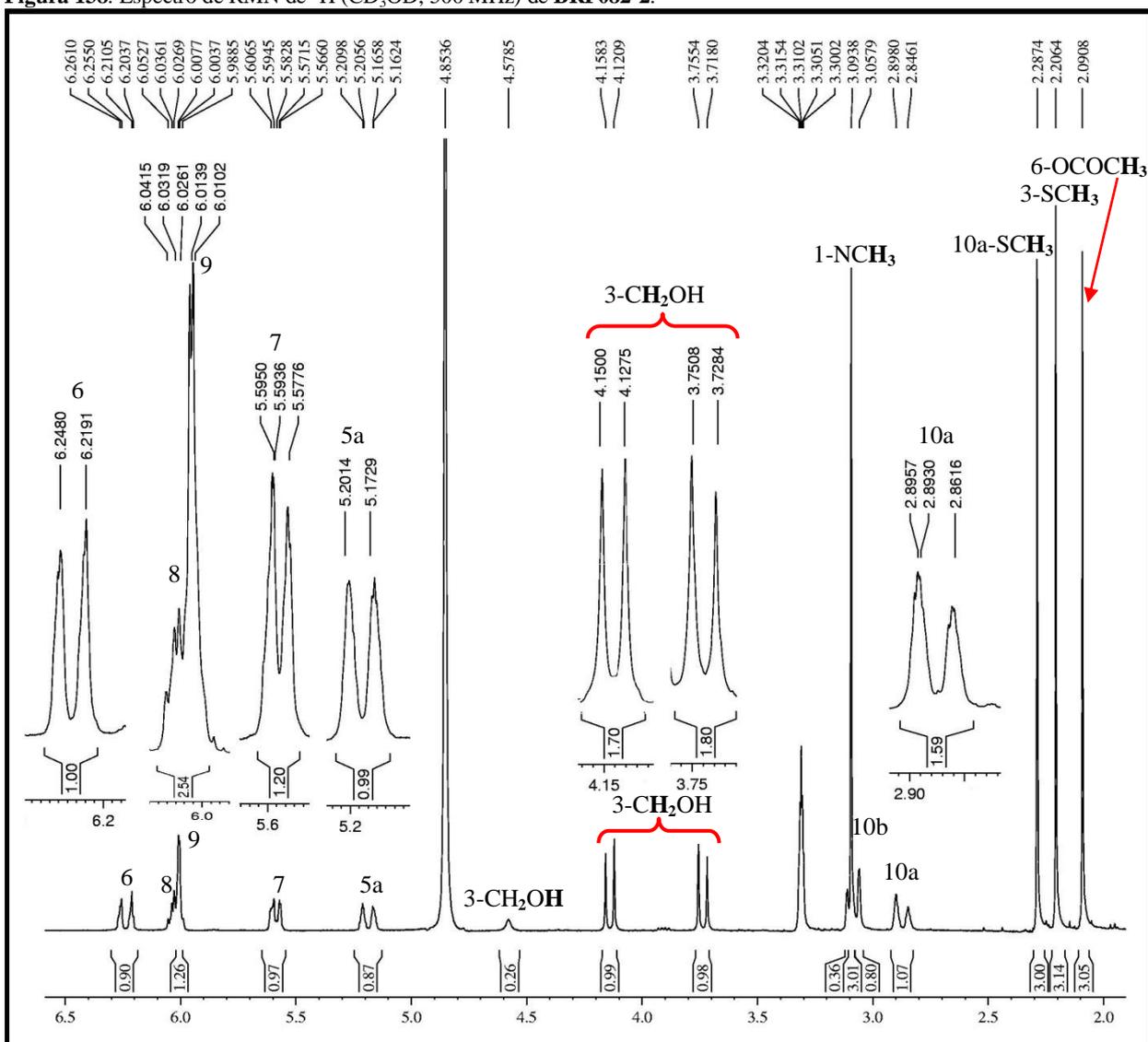


Figura 139. Espectros de RMN¹³C (CD₃OD, 125 MHz) e RMN¹³C-DEPT 135 de **BRF082-2**.

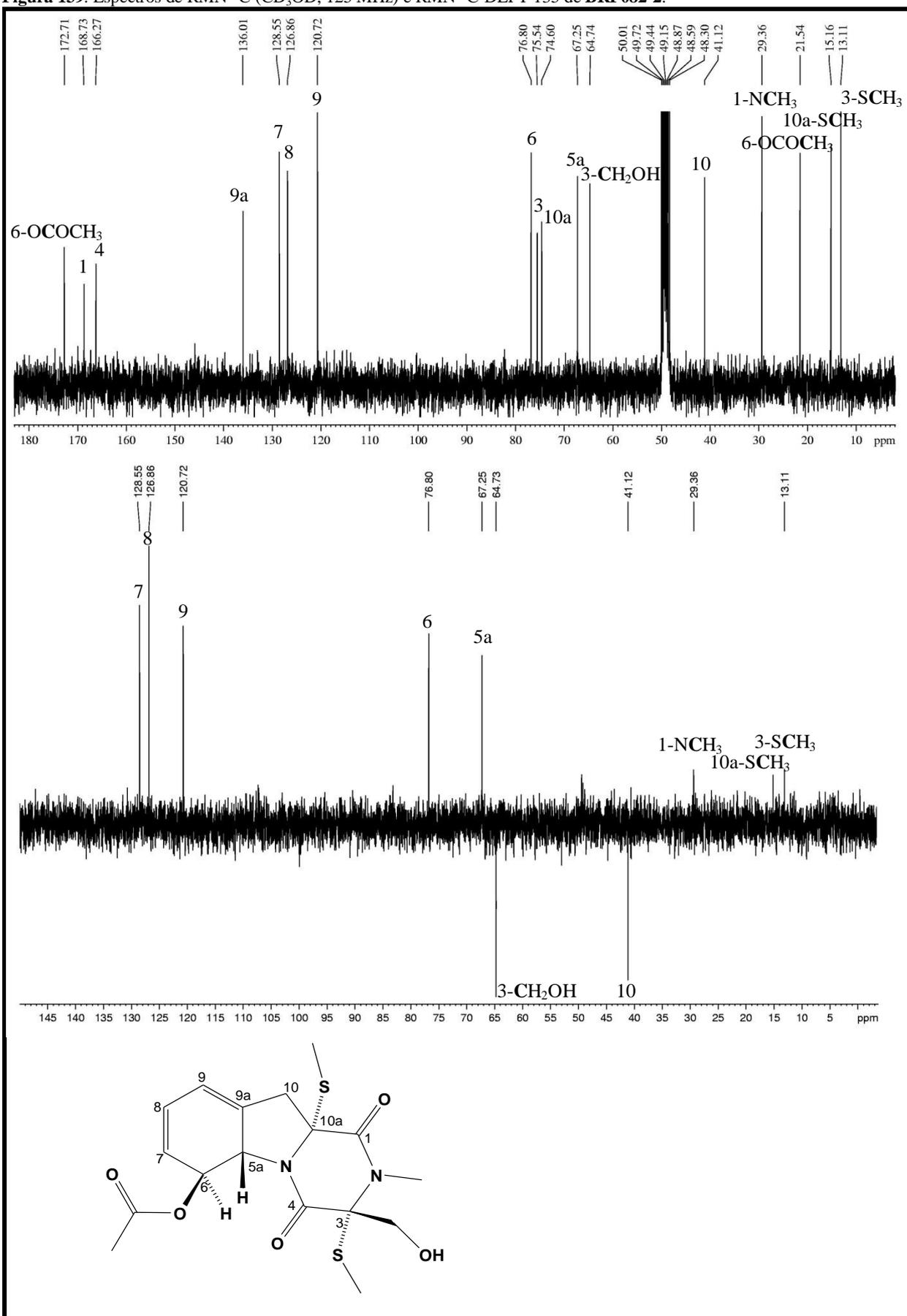


Figura 140. Mapa de contornos COSY de BRF082-2.

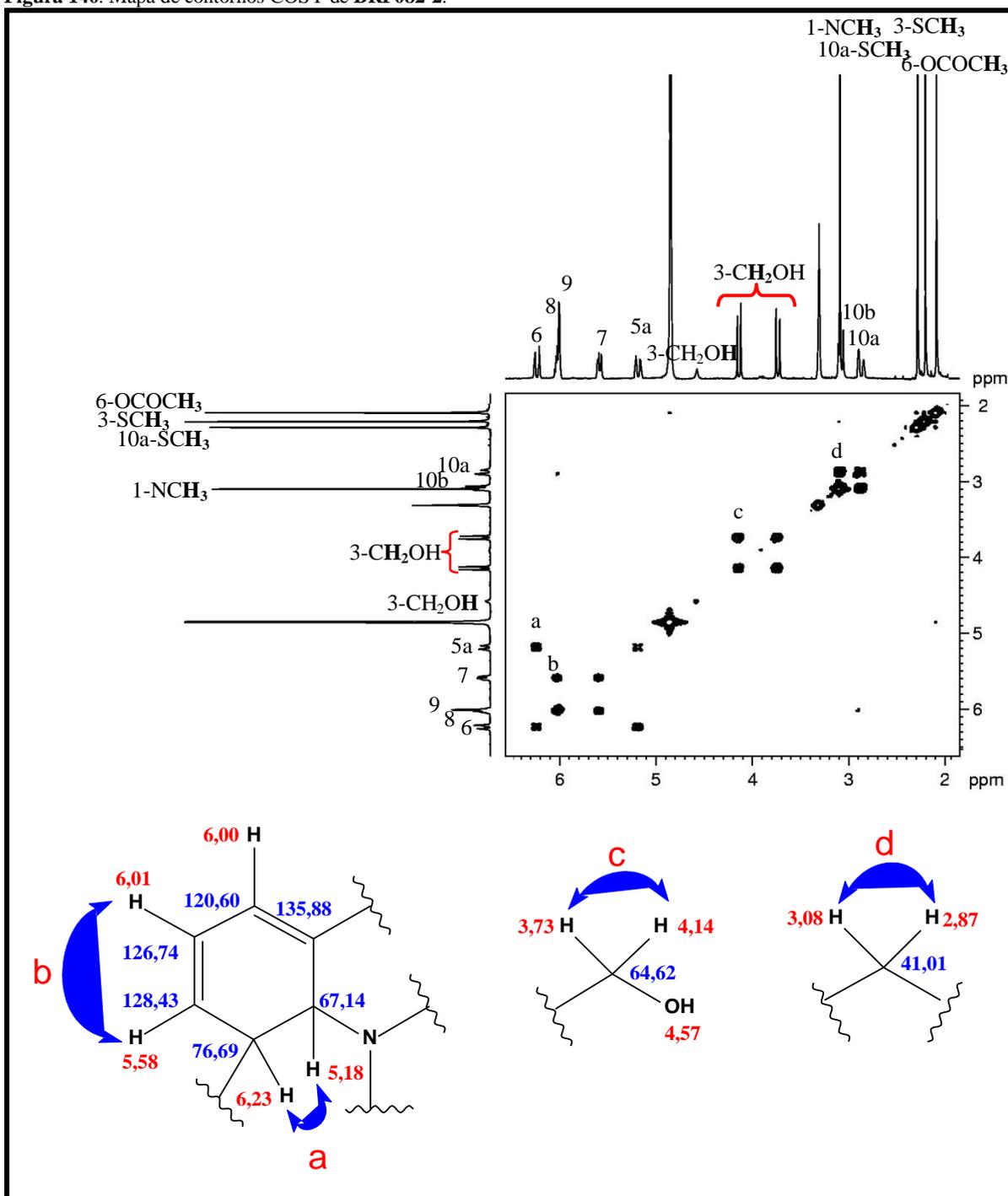


Figura 141. Mapa de contornos HSQC de BRF082-2.

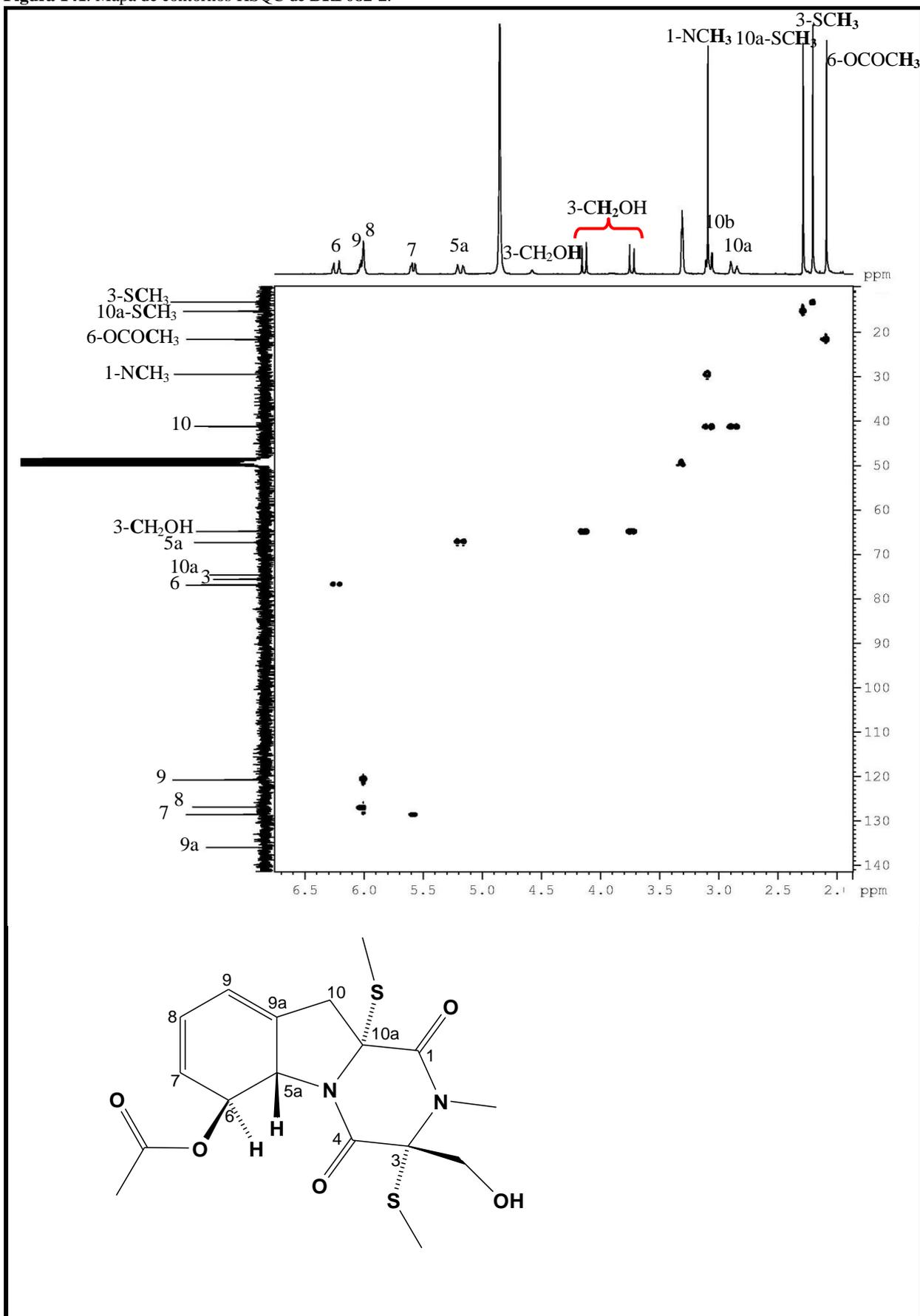
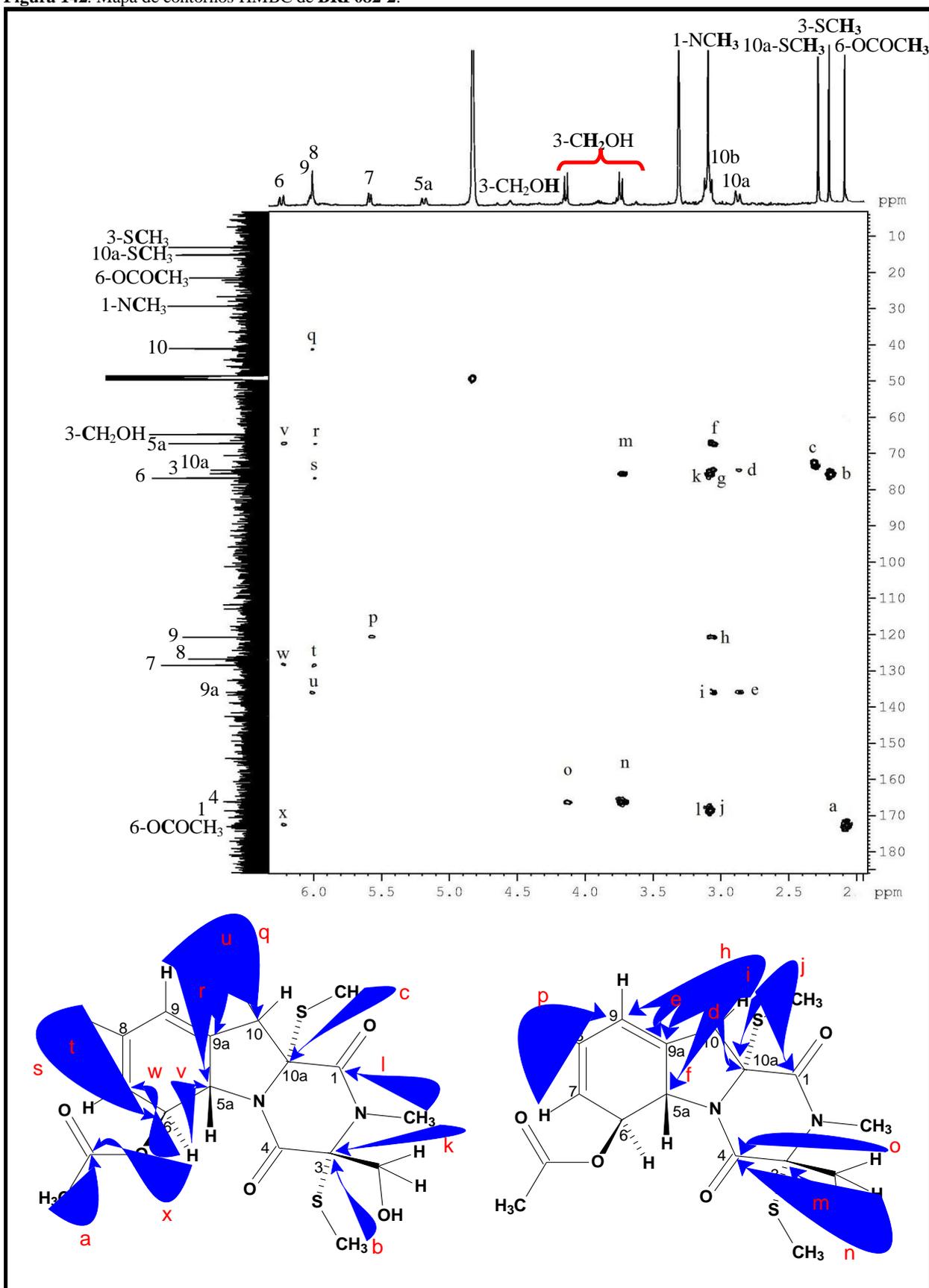


Figura 142. Mapa de contornos HMBC de BRF082-2.



5.6.3.6 Determinação estrutural de BRF082-3

BRF082-3 foi obtida como um sólido amarelo amorfo solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução EMAR-IES (Figura 147, p. 187) exibiu, no modo negativo, o íon correspondente à molécula com aduto de cloro $[M + Cl]^-$ em m/z 466,9641 (m/z calculado 466,9636, erro 1,07 ppm). Tal resultado apontou a provável fórmula molecular $C_{15}H_{16}N_2O_5S_4$, cujo IDH foi 9.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 148, p. 188), apresentou uma banda larga e de intensidade média em 3372 cm^{-1} , a qual foi atribuída a uma deformação axial de O-H. As bandas em 2955 cm^{-1} e 2923 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformações axiais assimétricas de C-H de grupos metila e metileno, respectivamente. A banda em 2854 cm^{-1} foi atribuída a uma deformação axial simétrica de C-H de grupo metileno. As bandas em 1724 cm^{-1} e 1674 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação axial de C=O de éster e de lactama com anel de seis ou mais átomos, respectivamente. As bandas em 1411 cm^{-1} e 1374 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação angular no plano de O-H, acopladas com vibrações de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A banda em 1235 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial assimétrica de C-O de éster (C-C(=O)-O) - acetato. A banda em 1051 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C-O de álcool.

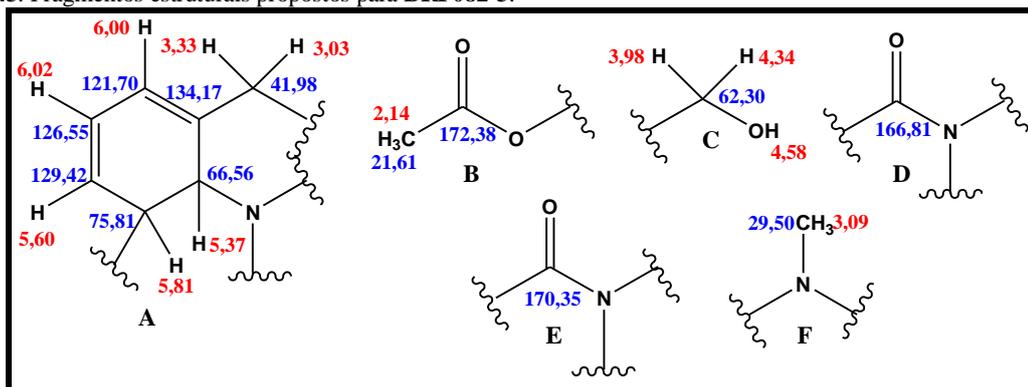
O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **BRF082-3** (Figura 149, p. 189) apresentou sinais para dezesseis hidrogênios. Os simpletos em δ 2,14 (3H) e δ 3,09 (3H), foram atribuídos a duas metilas com efeito de desproteção. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (Figura 152, p. 192), os sinais em δ 3,03 (*dl*, $J = 116,4\text{ Hz}$, 1H) e 3,33 (*dl*, $J = 16,4\text{ Hz}$, 1H), foram atribuídos a dois hidrogênios metilênicos, assim como os sinais em δ 3,98 (*d*, $J = 11,7\text{ Hz}$, 1H) e δ 4,34 (*d*, $J = 11,7\text{ Hz}$, 1H), sendo estes dois últimos ligados a um carbono oxigenado. O simpleto largo em δ 4,58 (1H) foi atribuído a um hidrogênio de hidroxila. Com auxílio do mapa de contornos COSY (Figura 151, p. 191), pôde-se atribuir os sinais em δ 5,60 (*dd*, $J = 1,5$ e $8,0\text{ Hz}$, 1H) e δ 6,02 (*d*, $J = 1,5$ e $8,0\text{ Hz}$, 1H) a dois hidrogênios vicinais olefínicos em posição *cis*, ao passo que este último foi atribuído como também vicinal ao hidrogênio olefínico em δ 6,00 (*quint.* 1, $J = 1,5\text{ Hz}$, 1H). O experimento COSY permitiu visualizar também acoplamentos entre os sinais em δ 5,81 (*d*, $J = 14,5\text{ Hz}$, 1H) e δ 5,37 (*dt*, $J = 1,0$ e $14,5\text{ Hz}$, 1H).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **BRF082-3** (Figura 150, p. 190) apresentou quinze linhas espectrais. Sua análise, juntamente com os espectros de RMN ^{13}C -

DEPT 135° (Figura 150, p. 190) e HSQC, permitiu realizar os seguintes assinalamentos: Os sinais em δ 21,61 e δ 29,50 foram atribuídos a dois carbonos metílicos. Pode-se sugerir que o primeiro seja de carbono ligado a carbonila, e o segundo pertença a carbono nitrogenado. Os sinais em δ 41,98 e em δ 62,30 foram atribuídos a dois carbonos metilênicos, sendo este último admitido como oxigenado. Os sinais em δ 66,56 e δ 75,83 foram atribuídos a dois carbonos não hidrogenados, nitrogenados e/ou oxigenados, ambos com efeito desprotetor. Os sinais em δ 79,58 δ 80,16 foram atribuídos a dois carbonos não-hidrogenados e ligados a enxofre. Os sinais em δ 121,70 δ 126,55, δ 129,42 e δ 134,17 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo os três primeiros metínicos e o último não hidrogenado. Os sinais em δ 166,81 e δ 170,35 foram associados a grupamentos C=O de amida, e o sinal em δ 172,38 foi associado a um grupamento C=O de éster.

Os dados anteriores permitem propor a presença dos seguintes fragmentos na estrutura de **BRF082-3** (Figura 143):

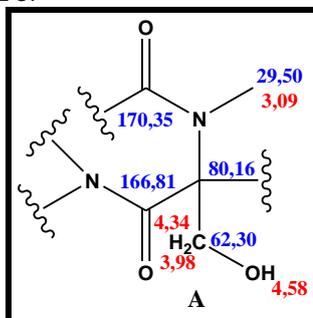
Figura 143. Fragmentos estruturais propostos para **BRF082-3**.



Os fragmentos propostos e a semelhança entre espectros de RMN¹H e ¹³C de **BRF082-2** e **BRF082-3**, sugerem uma similaridade estrutural entre as duas substâncias. A ausência dos sinais de duas metilas em **BRF082-3**, presentes em **BRF082-2**, bem como a diferença entre as massas das citadas substâncias (33 unidades), mostram que é possível que **BRF082-3** possua uma ponte tetrassulfeto entre os carbonos 3 e 10a. O mapa de contornos de correlação heteronuclear à longa distância (J^2 e J^3), HMBC, corroborou as suposições anteriores. A correlação observada entre o sinal de hidrogênio em δ 2,14 e o sinal de carbono em δ 172,38 corrobora a existência do fragmento B. O acoplamento entre o sinal de hidrogênio em δ 6,00 e o sinal de carbono em δ 134,17, assim como entre o sinal de hidrogênio em δ 5,37 e os sinais de carbono em δ 75,83 e 134,17 confirmam a existência do fragmento A (Figura 143). As correlações observadas entre os sinais de hidrogênios metilênicos em δ 4,34 e δ 3,98 e os sinais de carbono em δ 166,81 e δ 80,16 permitiram ligar os fragmentos C e D através do carbono em

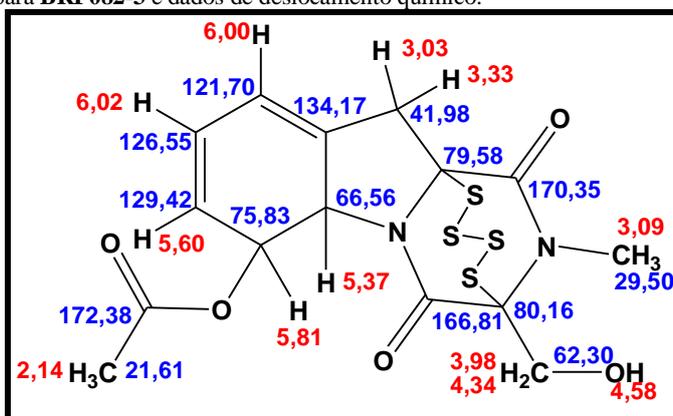
δ 80,16. A correlação entre o sinal de hidrogênios metílicos em δ 3,09 e os sinais de carbono em δ 80,16 e δ 170,35 permitiu unir o fragmento F aos fragmentos E e D, levando à proposição da subestrutura A (Figura 144).

Figura 144. Subestrutura proposta para **BRF082-3**.



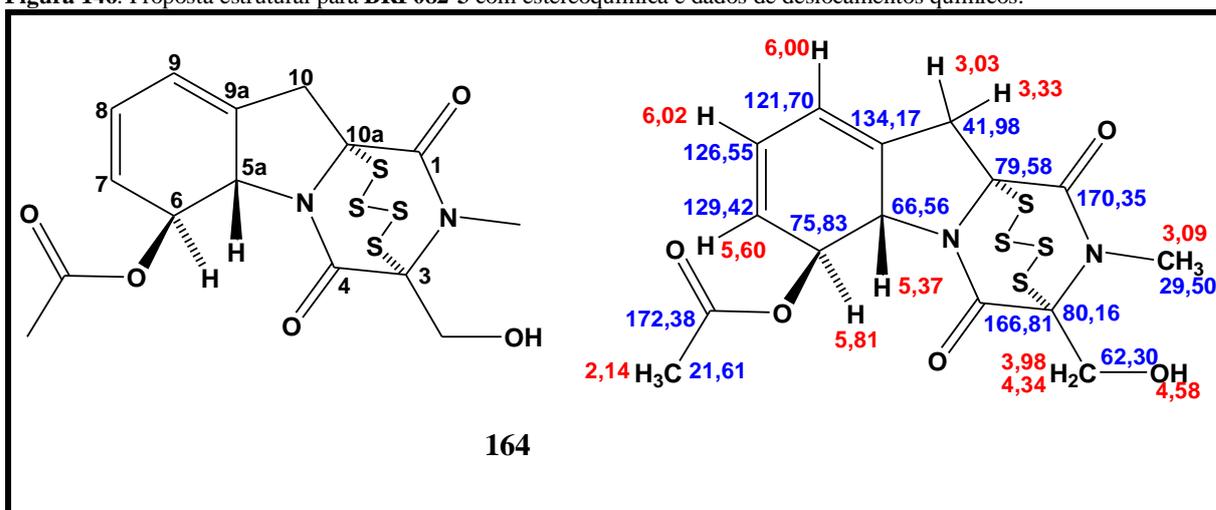
Os acoplamentos observados entre os sinais de hidrogênios metilênicos em δ 3,03 e δ 3,33 e os sinais de carbonos em δ 66,56, δ 79,58, δ 121,70, δ 134,17 e δ 170,35 permitiram unir o fragmento C ao fragmento A e à subestrutura A. Os dados apresentados foram suficientes para a proposição da estrutura apresentada na Figura 145.

Figura 145. Proposta estrutural para **BRF082-3** e dados de deslocamento químico.



Trata-se da acetilgliotoxina G (**164**, Figura 146, p. 186), substância já obtida sinteticamente a partir da reação da acetilgliotoxina com excesso de enxofre (MURDOCK, ANGIER, 1970). Assim como para **BRF082-1** e **BRF082-2**, a estereoquímica de **BRF082-3** foi estabelecida como sendo a mesma da gliotoxina (**46**, Figura 11, p. 43) conforme mostrado na Figura 146, p. 186.

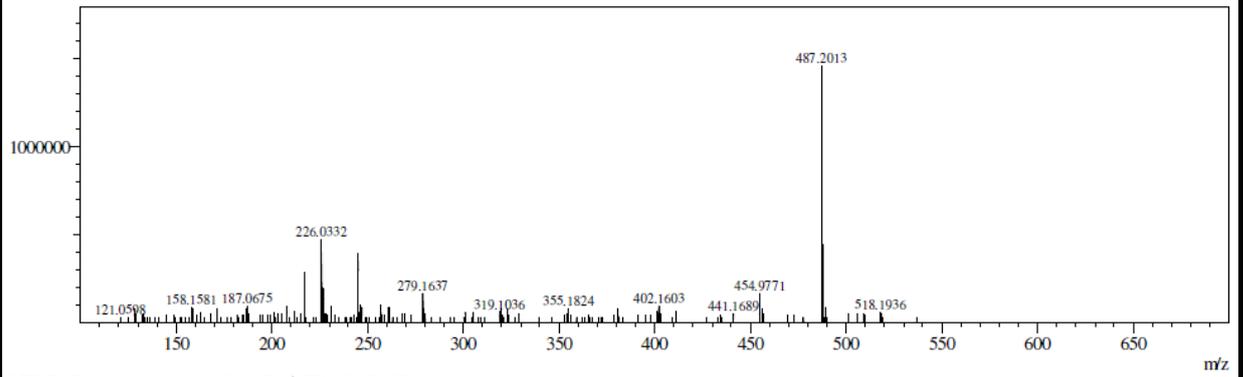
Figura 146. Proposta estrutural para BRF082-3 com estereoquímica e dados de deslocamentos químicos.



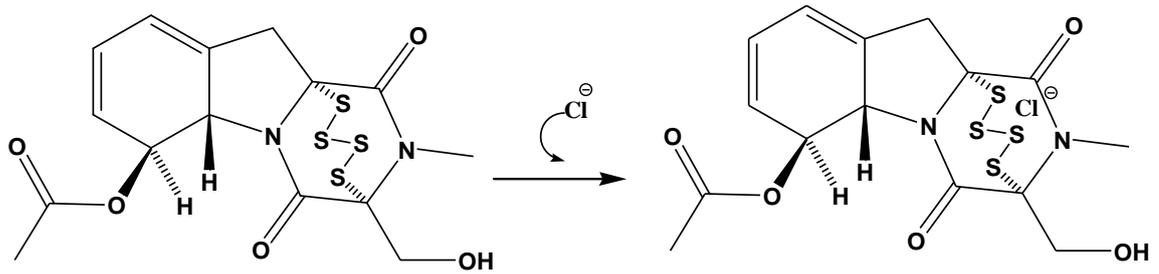
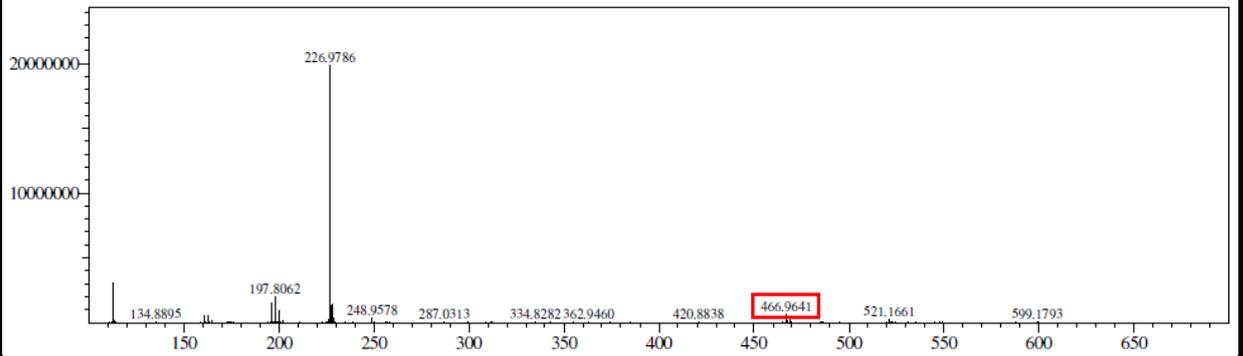
O único relato na literatura para a acetilgliotoxina G cita que esta apresenta atividade antiviral *in vitro* (MURDOCK, ANGIER, 1970).

Figura 147. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de BRF082-3.

MSMS: Precursor m/z ---- +/- Base Peak 487.20(1458153)



MSMS: Precursor m/z ---- +/- Base Peak 226.98(12490284)



$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{ClS}_4^-$
Massa exata: 466,9641
Massa calculada: 466,9636
Erro = 1,07 ppm

Figura 148. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-3.

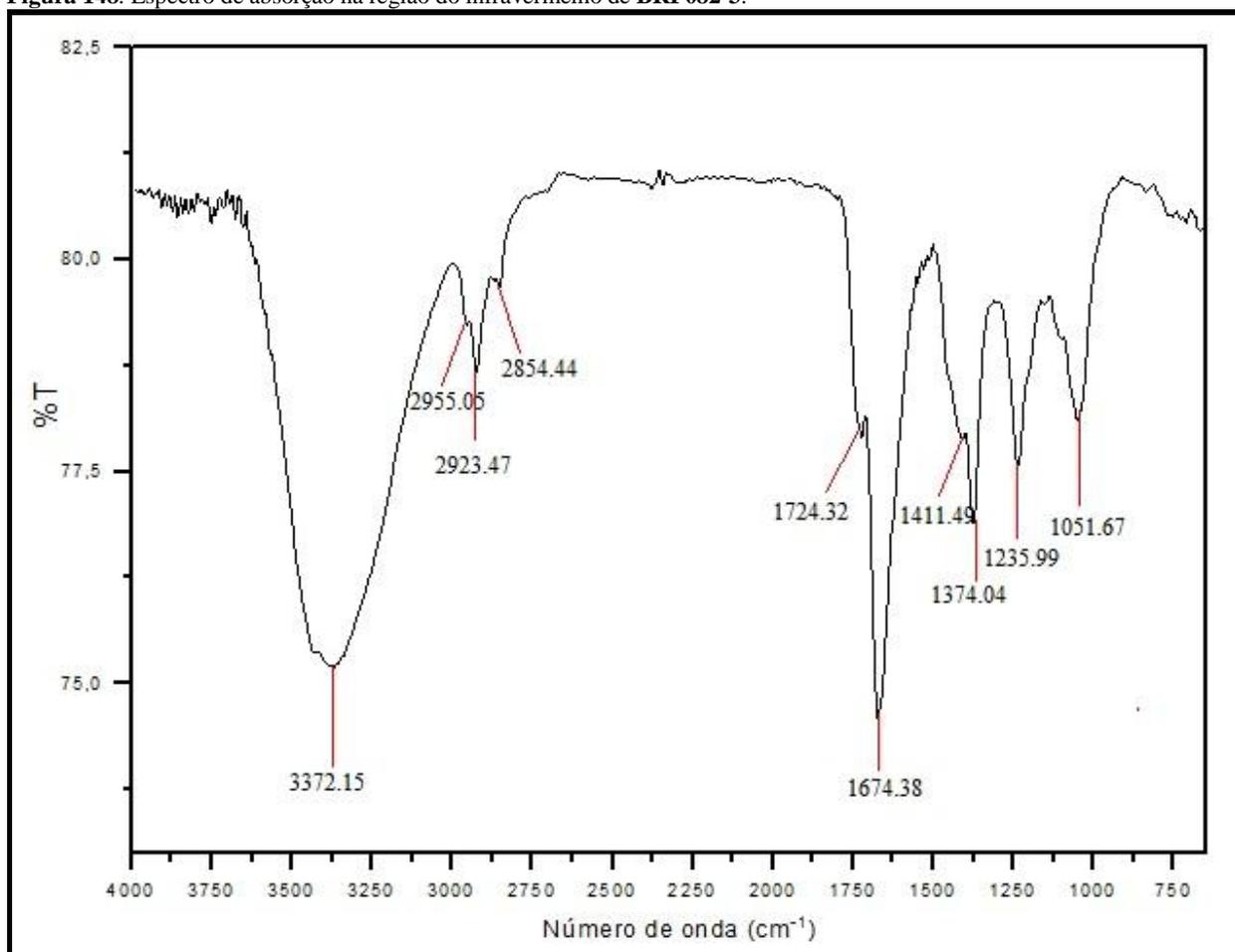


Figura 149. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **BRF082-3** e expansões.

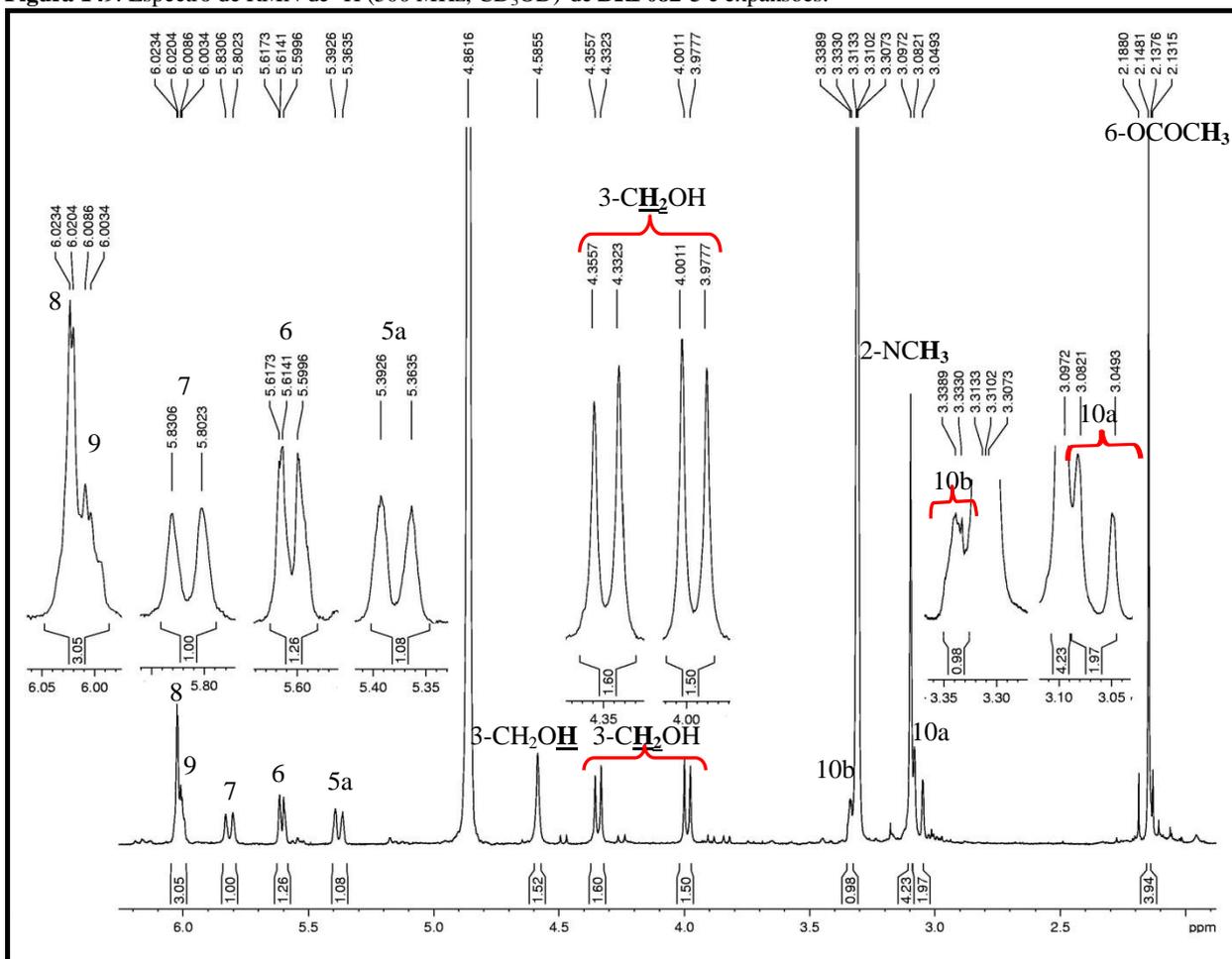


Figura 150. Espectros de RMN¹³C (125 MHz, CD₃OD) e RMN¹³C DEPT 135° de BRF082-3.

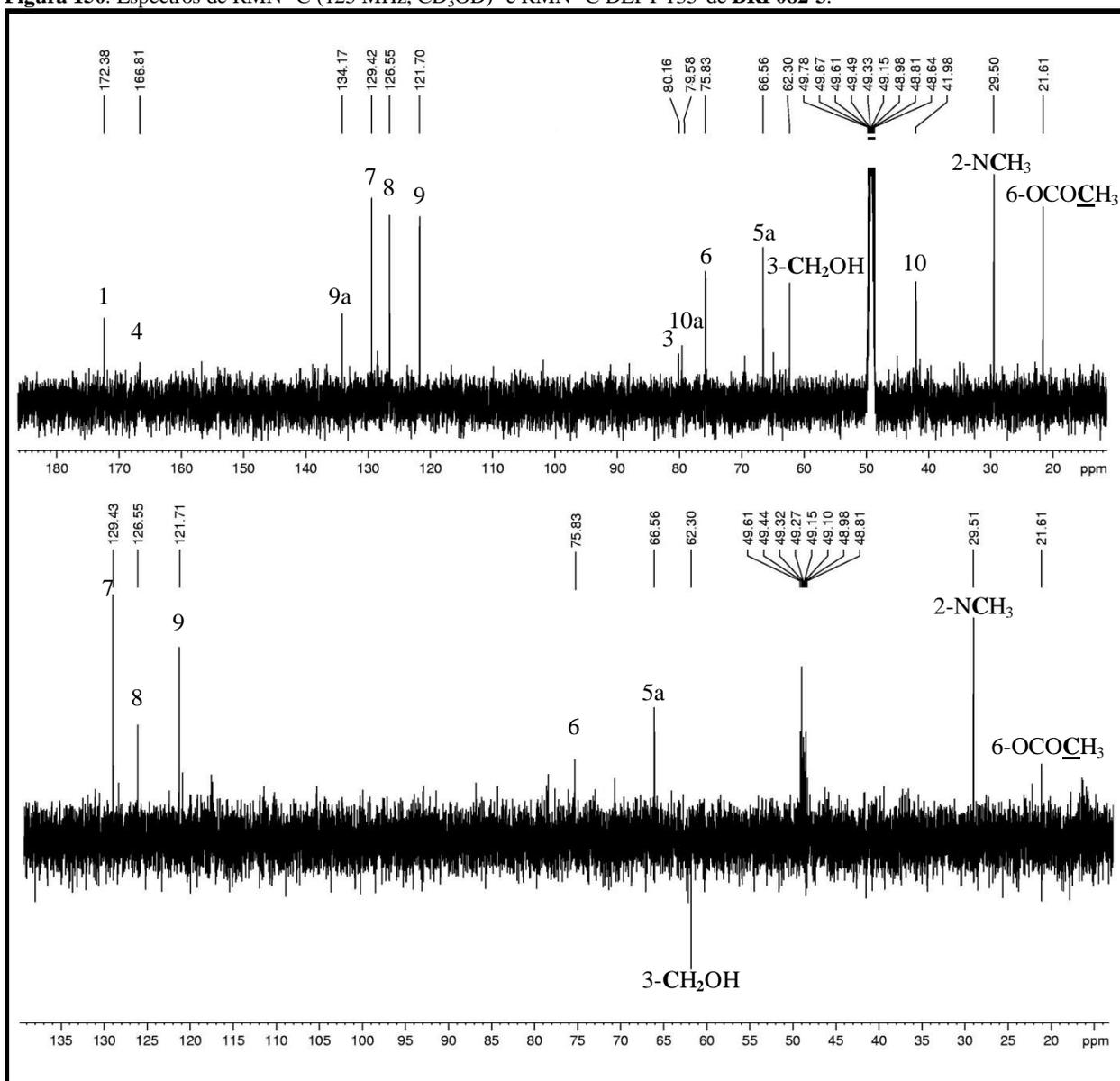


Figura 151. Mapa de contornos COSY de BRF082-3.

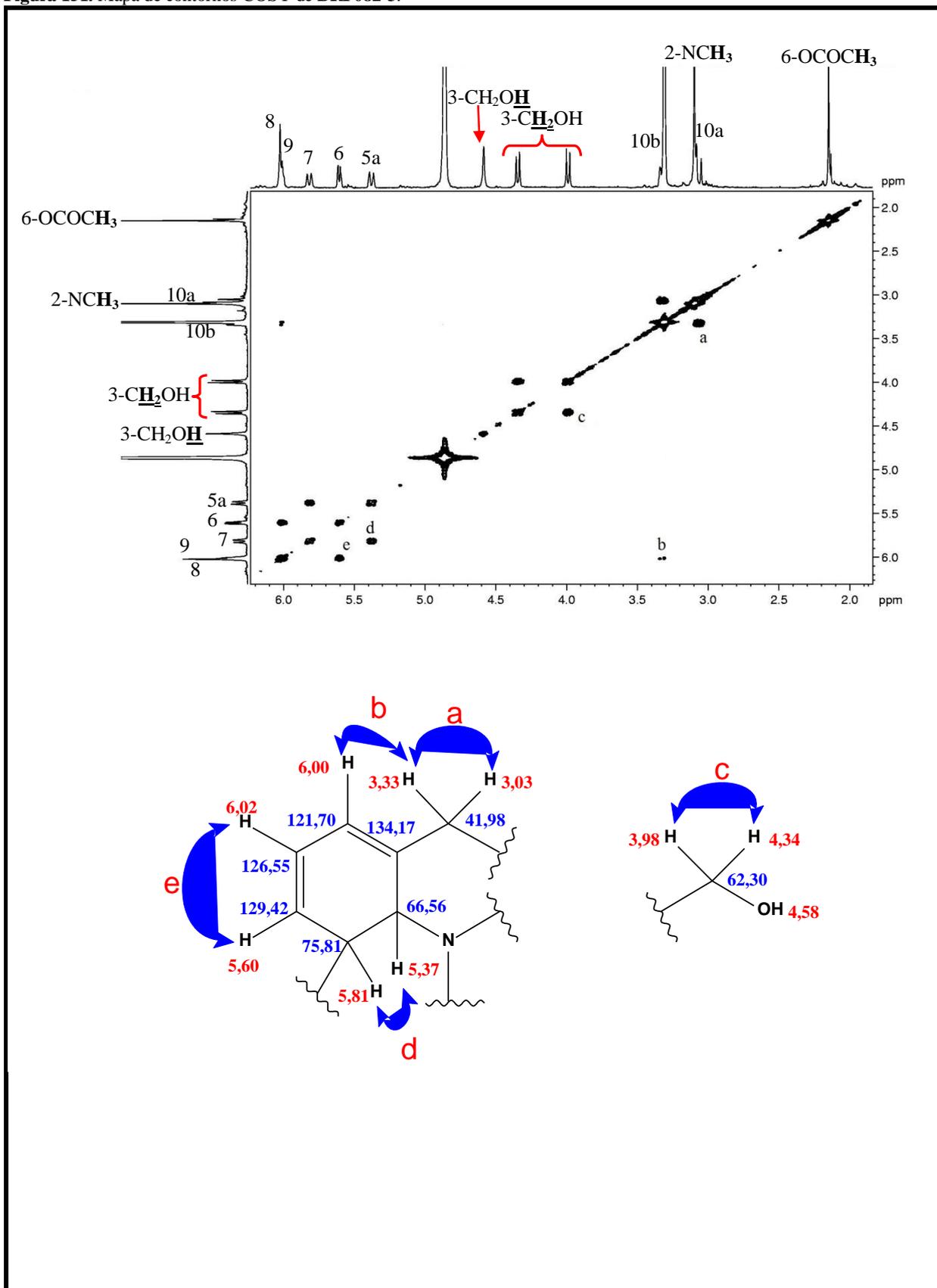
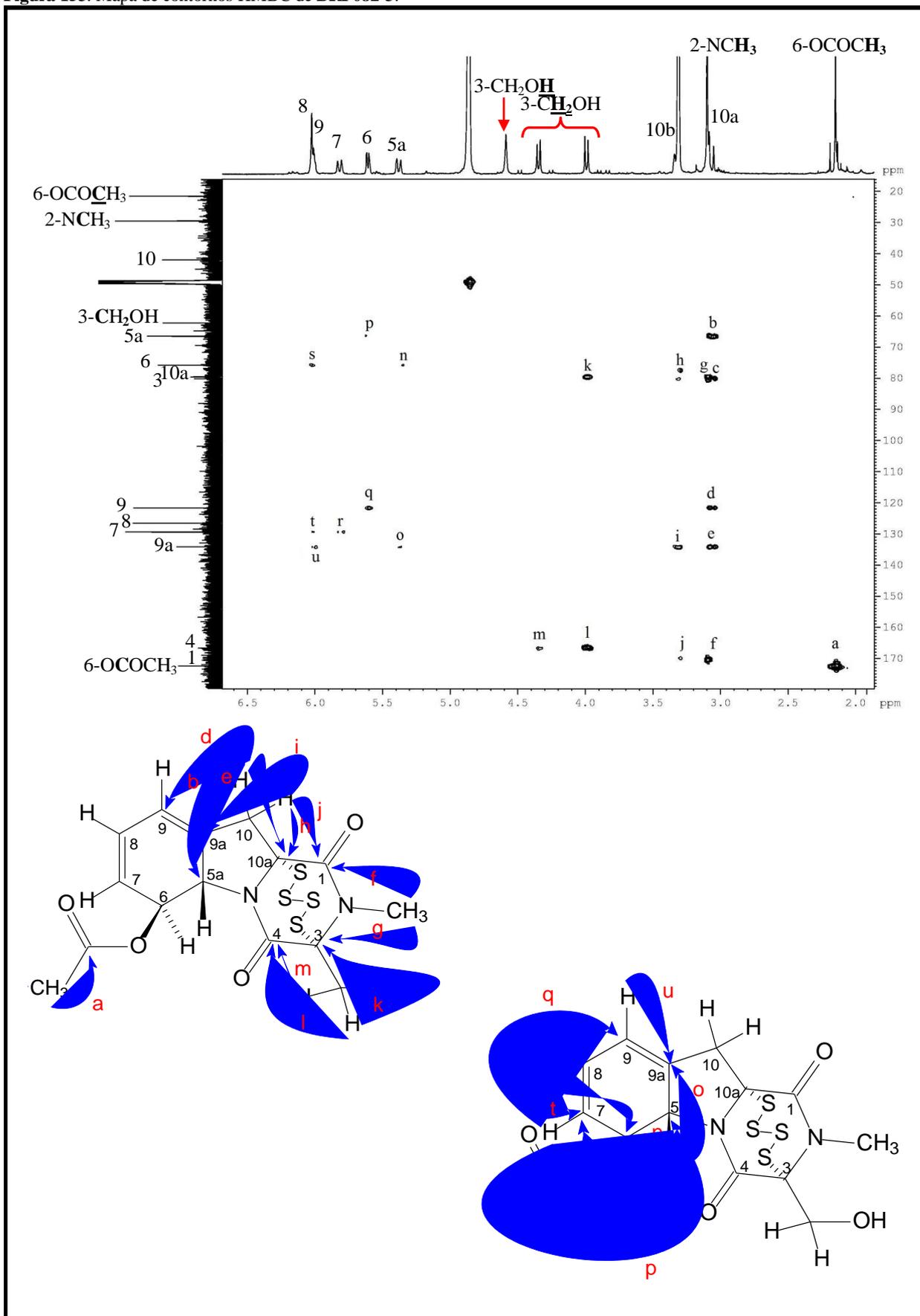


Figura 153. Mapa de contornos HMBC de **BRF082-3**.



5.6.3.7 Atividades citotóxicas das substâncias isoladas do primeiro cultivo de BRF082 (*D. cejpii*)

As substâncias isoladas do primeiro cultivo de **BRF082** foram submetidas a ensaio de atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais HCT-116. Os resultados estão apresentados na Tabela 31. Os valores de inibição e IC_{50} mostraram que as substâncias **BRF082-1** e **BRF082-3** apresentaram moderada e alta atividades citotóxicas, respectivamente, contra a linhagem de células testada.

Tabela 31 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL e IC_{50} das substâncias isoladas do primeiro cultivo de **BRF082** (*D. cejpii*) frente à linhagem tumoral HCT-116. O percentual de inibição foi avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h e os valores de IC_{50} , bem como os respectivos intervalos de confiança (CI 95%), foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (*Intuitive Software for Science*, San Diego, CA). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo.

Substância	Inibição (%)	IC_{50} (CI 95%)
BRF082-1 – bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina	97,06	23,56 (12,13 – 45,74)
BRF082-2 – 6-acetilbismetiltiogliotoxina	67,77	35,97 (3,92 – 330,3)
BRF082-3 – acetilgliotoxina G	98,90	1,06 (0,51 – 2,20)
Doxorrubicina	100,00	0,47 (0,15 – 1,44)

5.6.4 Segundo cultivo em grande escala de BRF082 (*D. cejpii*)

As amostras 4 e 5 (Tabela 26, p. 158), obtidas do fracionamento, em cartucho de sílica C18, da fração BRF082 meio líquido MeOH 90%, oriunda do extrato bruto do cultivo em grande escala de **BRF082** apresentaram boa atividade citotóxica (Tabela 27, p. 158) e, esta última, um perfil cromatográfico com picos bem resolvidos. Entretanto, a pequena massa da amostra 4 (Tabela 26, p. 158) inviabilizou o isolamento de metabólitos secundários desta. Já da amostra 5, foi possível isolar somente três constituintes. Assim, a linhagem **BRF082** foi cultivada uma segunda vez, em grande escala, objetivando-se a obtenção de maiores massas destas frações e o possível isolamento de outros metabólitos secundários bioativos.

O segundo cultivo em grande escala foi realizado em 20 L de meio líquido BD com água do mar sintética sob condição estática (Item 6.12, p. 251). Ao final de 14 dias de cultivo, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Obteve-se então o extrato bruto do meio líquido de **BRF082**, o qual foi novamente particionado com água destilada e AcOEt para a remoção de sais constituintes do meio de cultura. A fração AcOEt foi concentrada, obtendo-se o extrato dessalificado, o qual foi submetido a uma partição líquido-líquido com MeOH 90% e hexano (KJER *et al.*, 2010) para um processo de desengorduramento da amostra. No entanto, não foi possível a separação das fases hexânica e metanólica devido à formação de emulsão. Desta forma, não foi possível fazer um desengorduramento do extrato de **BRF082** (1,7 g), o

qual foi submetido a teste citotóxico frente à linhagem de células tumorais HCT-116 para confirmar a reprodutibilidade do resultado com a correspondente fração da primeira grande escala. A mesma apresentou percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50 µg/mL de 99,27 %. A maior atividade deste extrato em comparação com o da primeira grande escala pode ser explicada pela presença de gorduras, que, normalmente, fornecem uma falsa atividade citotóxica positiva.

5.6.4.1 Fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90 %-2

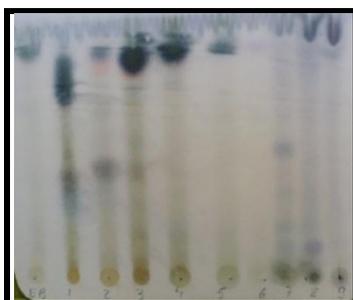
A fração BRF082 meio líquido MeOH 90 % -2 foi submetida à purificação em coluna C18 empregando-se 50 mL de cada um dos eluentes a seguir: H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas subfrações estão descritas na Tabela 32.

Tabela 32. - Massas das subfrações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90%

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
H ₂ O 100%	1	539,80	31,95
H ₂ O/MeOH 8:2	2	62,30	3,69
H ₂ O/MeOH 6:4	3	142,50	8,43
H ₂ O/MeOH 1:1	4	197,60	11,70
MeOH/H ₂ O 7:3	5	195,10	11,55
MeOH/H ₂ O 8:2	6	47,30	2,80
MeOH/H ₂ O 9:1	7	18,30	1,10
MeOH 100%	8	39,60	2,34

Todas as amostras foram analisadas por CCDA e reveladas com solução de vanilina (Figura 154).

Figura 154. Fotografias das placas cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento em cartucho de sílica C18 do extrato do segundo cultivo em grande escala de BRF082. Revelação em solução de vanilina com HClO₄/EtOH. Eluente: AcOEt/hexano 8:2.



5.6.4.2 Atividades citotóxicas das subfrações da fração BRF082 meio líquido MeOH 90% - 2

As frações obtidas da purificação da fração BRF082 meio líquido MeOH 90 %-2 em coluna C18 foram submetidas a teste citotóxico frente à linhagem de células tumorais HCT-116. Os resultados estão descritos na Tabela 33, p. 196.

Tabela 33 - Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50µg/mL das frações obtidas no fracionamento cromatográfico da fração BRF082 meio líquido MeOH 90 % - 2 frente à linhagem tumoral HCT-116, avaliado pelo ensaio do MTT, 72h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Siglas	Amostras	% Inibição
H ₂ O 100%	1	99,52
H ₂ O/MeOH 8:2	2	97,75
H ₂ O/MeOH 6:4	3	97,22
H ₂ O/MeOH 1:1	4	99,54
MeOH/H ₂ O 7:3	5	100,19
MeOH/H ₂ O 8:2	6	78,48
MeOH/H ₂ O 9:1	7	81,29
MeOH 100%	8	85,79
Doxorrubicina	-	100,00

Observando-se o percentual de inibição das amostras apresentadas na Tabela 33, pode-se concluir que todas são ativas e, portanto, promissoras para isolamento de metabólitos secundários. Entretanto, o isolamento de metabólitos secundários através de CLAE só teve viabilidade para as amostras 1, 3, 4 e 5, devido à maior massa destas frações.

5.6.4.3 Fracionamento da subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4)

Foram submetidos 197,60 mg da subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 32, p. 195) à fracionamento por CLAE. Dentre os picos apresentados no cromatograma da Figura 155, os correspondentes aos compostos com tempos de retenção 10,70 minutos (pico 6) e 13,67 minutos (pico 8) foram isolados e codificados como **BRF082-4** (26,5 mg, 13,41 %), **BRF082-5** (48,9 mg, 24,75 %). Essas amostras foram submetidas às análises por RMN, EMAR-IES e IV para a elucidação de suas estruturas. As massas dos picos coletados estão na Tabela 34.

Figura 155. Cromatograma da fração MeOH/H₂O 1:1

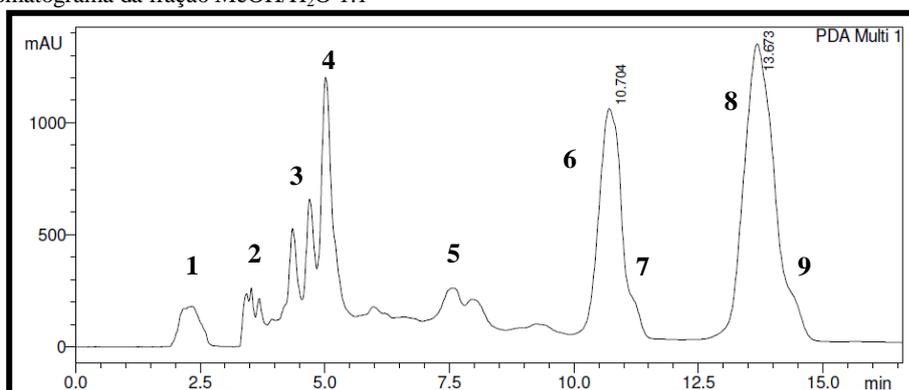


Tabela 34. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da subfração MeOH/H₂O 1:1 (amostra 4, Tabela 32, p. 195).

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	20,50	10,37
2	2	3,00	1,52
3	3	8,30	4,20
4	4	16,20	8,20

5	5	26,20	13,26
6	6	26,50	13,41
7	7	3,80	1,92
8	8	48,90	24,75
9	9	4,10	2,07

5.6.4.4 Determinação estrutural de BRF082-4.

BRF082-4 foi obtida como um sólido cristalino branco em forma de agulhas, solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução (Figura 161, p. 202) exibiu, no modo positivo, os íons correspondentes à molécula com aduto de hidrogênio $[M + H]^+$, em m/z 327,0472 (m/z calculado 327,0468, erro 1,22 ppm) e com aduto de sódio $[M + Na]^+$, em m/z 349,0289 (m/z calculado 349,0287, erro 0,5 ppm), os quais apontaram a fórmula molecular $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$, IDH igual a 8.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 162, p. 203) apresentou uma banda larga e de média intensidade em 3337 cm^{-1} , a qual foi atribuída a uma deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular. A banda em 2927 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial assimétrica de C-H de grupo metileno. A banda em 1655 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C=O de lactama com anel de seis ou mais átomos. As bandas em 1415 cm^{-1} e 1364 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação angular no plano de O-H, acopladas com vibrações de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A banda em 1059 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C-O de álcool.

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **BRF082-4** (Figura 163, p. 204) apresentou sinais para quatorze hidrogênios. O simpleto em δ 3,21 (3H) foi atribuído a uma metila com efeito de desproteção. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (Figura 166, p. 207), os sinais em δ 2,95 (d , $J = 17,5\text{ Hz}$, 1H) e δ 3,74 (dd , $J = 2,3$ e $17,5\text{ Hz}$, 1H), foram atribuídos a dois hidrogênios metilênicos, assim como os sinais em δ 4,24 (dd , $J = 9,7$ e $12,8\text{ Hz}$, 1H) e δ 4,43 (dd , $J = 5,8$ e $12,8\text{ Hz}$, 1H), sendo estes últimos ligados a um carbono com hidroxila. O sinal em δ 3,91 (dd , $J = 5,8$ e $9,7\text{ Hz}$, 1H), foi atribuído como sendo o hidrogênio da hidroxila citada anteriormente devido à ausência de acoplamento no mapa de contornos HSQC, às correlações observadas no mapa de contornos COSY (Figura 165, p. 206) com os sinais em δ 4,24 (dd , $J = 9,7$ e $12,8\text{ Hz}$, 1H) e δ 4,43 (dd , $J = 5,8$ e $12,8\text{ Hz}$, 1H), e aos valores de constante de acoplamento. Da mesma forma, também não foi visualizado nenhum acoplamento no espectro HSQC para o simpleto em δ 5,79 (1H), o qual também foi atribuído a uma hidroxila. O simpleto em δ 4,81 (2H) apresentou correlações com dois carbonos no HSQC

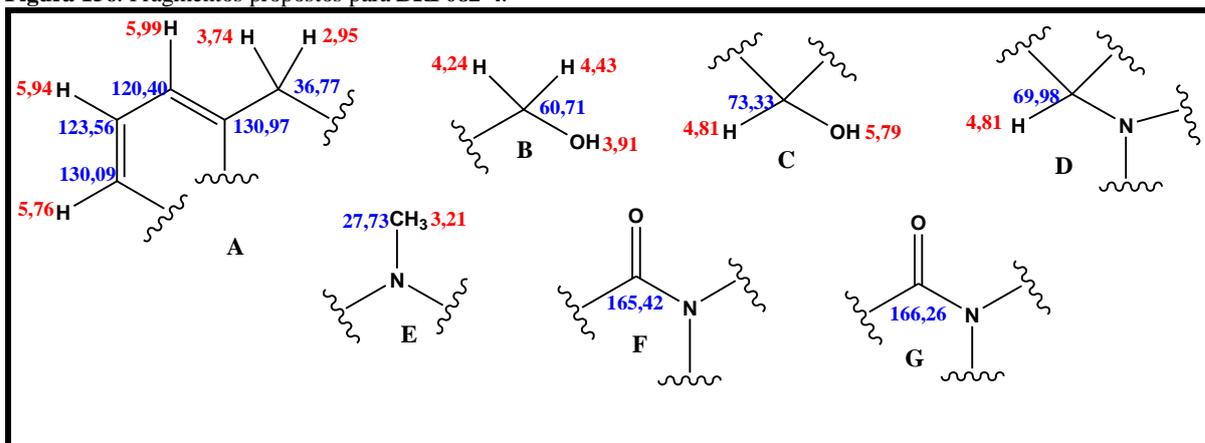
e foi, portanto, atribuído a dois hidrogênios ligados a carbonos nitrogenados e/ou oxigenados. Os sinais em δ 5,79 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H) e δ 5,94 (dd, $J = 4,5$ e $8,6$ Hz, 1H) foram atribuídos a dois hidrogênios vicinais olefínicos em posição *cis*, ao passo que este último foi atribuído como também vicinal ao hidrogênio olefínico em δ 5,99 (*sl*, 1H), fato confirmado pelo mapa de contornos COSY (Figura 165, p. 206).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Figura 164, p. 205) apresentou doze linhas espectrais. Todavia, no espectro de correlação heteronuclear a longa distância, HMBC (Figura 167, p. 208), foi possível visualizar mais um sinal não visto nos espectros anteriormente mencionados: em δ 77,26. A análise do espectro de RMN de ^{13}C , juntamente com os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 164, p. 205) e HSQC, permitiu realizar os seguintes assinalamentos: O sinal em δ 27,73 foi atribuído a uma metila ligada a nitrogênio; os sinais em δ 36,77 e δ 60,71 foram atribuídos a dois carbonos metilênicos, sendo este último admitido como oxigenado; os sinais em δ 69,98 e δ 73,33 foram atribuídos a dois carbonos metínicos, nitrogenados e/ou oxigenados, ambos com efeito desprotetor; os sinais em δ 75,84 e δ 77,26 foram atribuídos a dois carbonos não hidrogenados ligados a enxofre. Os sinais em δ 120,40, δ 123,56, δ 130,09 e δ 130,97 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo os três primeiros metínicos e o último não hidrogenado. Os sinais em δ 165,42 e δ 166,26 foram associados a grupamentos C=O de amida.

O mapa de contornos de correlação homonuclear COSY (Figura 165, p. 206), apresentou acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em δ 2,95 (d, $J = 17,5$ Hz, 1H) e δ 3,74 (dd, $J = 2,3$ e $17,5$ Hz, 1H), e entre este e o hidrogênio olefínico em δ 5,99 (*sl*, 1H). Também foram observados acoplamentos entre o par de hidrogênios metilênicos em δ 4,24 (dd, $J = 9,7$ e $12,8$ Hz, 1H) e δ 4,43 (dd, $J = 5,8$ e $12,8$ Hz, 1H), e entre ambos e o sinal de hidrogênio de hidroxila em δ 3,91 (dd, $J = 5,8$ e $9,7$ Hz, 1H). Por último, observou-se correlação entre os sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,76 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H) e δ 5,94 (dd, $J = 4,5$ e $8,6$ Hz, 1H) e entre este e o sinal em 5,99 (*sl*, 1H).

Os dados anteriores permitem propor a presença dos seguintes fragmentos na estrutura de **BRF082-4** (Figura 156, p. 199):

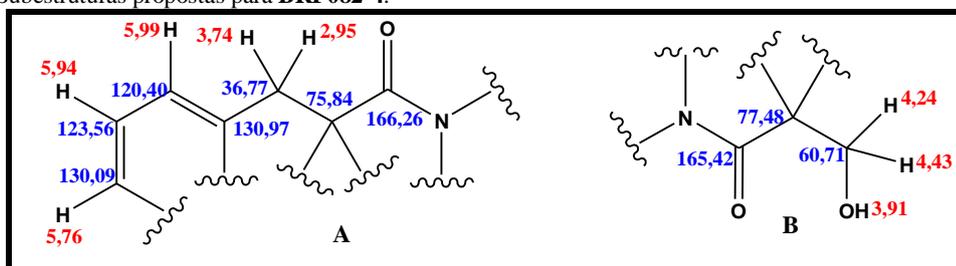
Figura 156. Fragmentos propostos para **BRF082-4**.



Os fragmentos propostos são semelhantes aos propostos para **BRF082-1**, **BRF082-2** e **BRF082-3**, e sugerem uma similaridade estrutural entre **BRF082-4** e essas substâncias. Comparando os espectros de RMN¹H, RMN¹³C e RMN¹³C- DEPT 135° de **BRF082-4** com os das demais substâncias isoladas de *D. cejpii*, pôde-se observar a presença de apenas uma metila e a ausência de acetila. A massa de **BRF082-4** (326,0392) e a fórmula molecular apontada pelo espectro de massas (C₁₃H₁₄N₂O₄S₂) são compatíveis com a existência de uma ponte dissulfeto entre os carbonos 3 e 10a, da mesma forma que há uma ponte tetrassulfeto entre os mesmos carbonos de **BRF082-3**.

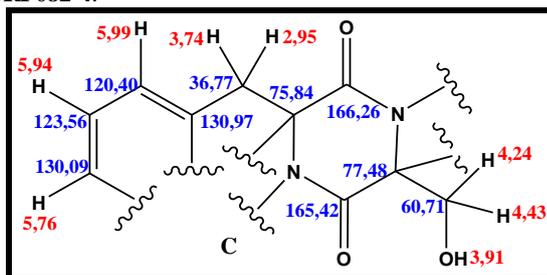
O mapa de contornos HMBC, auxiliou na proposição da estrutura final de **BRF082-4**. As correlações observadas entre os hidrogênios metilênicos em δ 2,95 e δ 3,74 e os carbonos em δ 69,98, δ 75,84, δ 120,40, δ 130,97 e δ 166,26 permitiram unir os fragmentos A e G, levando à proposição da subestrutura A (Figura 157). As correlações entre os hidrogênios metilênicos em δ 4,24 e δ 4,43 com os carbonos em δ 165,42 e δ 77,48 permitem unir os fragmentos B e F, levando à proposição da subestrutura B (Figura 157).

Figura 157. Subestruturas propostas para **BRF082-4**.



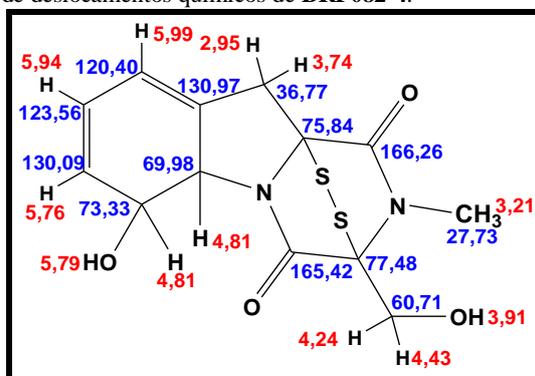
O espectro HMBC exibiu também acoplamento entre os hidrogênios metílicos em δ 3,21 e os carbonos em δ 77,48 e δ 166,26, os quais permitiram unir as subestruturas A e B através do fragmento E, gerando a subestrutura C (Figura 158, p. 200).

Figura 158. Subestrutura C para **BRF082-4**.



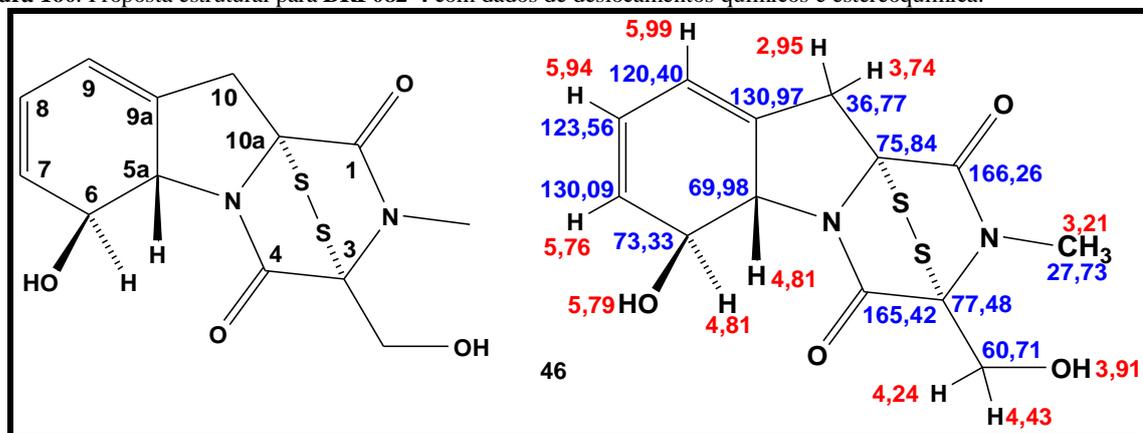
Por fim, os acoplamentos entre os hidrogênios em δ 4,81 e os carbonos em δ 69,98, δ 75,84, δ 123,56, δ 130,09 e δ 130,97, permitem unir os fragmentos D e C à subestrutura C, obtendo-se, a estrutura mostrada na Figura 159.

Figura 159. Proposta estrutural e dados de deslocamentos químicos de **BRF082-4**.



Trata-se da gliotoxina (**46**, Figura 11, p. 43), uma micotoxina conhecida desde 1936, tendo sido obtida do fungo *Gliocladium fimbriatum* (ou *G. virens*, agora, *Trichoderma virens*) por Weindling e Emerson (WEINDLING e EMERSON, 1936). A comparação dos dados de RMN¹H e RMN¹³C obtidos para **BRF082-4** com os dados reportados na literatura para a gliotoxina (KAOUADJI *et al.*, 1990) encontram-se na Tabela 35, p. 201, e corroboram a estrutura proposta, além de permitir estabelecer a estereoquímica da molécula (Figura 160)¹⁷.

Figura 160. Proposta estrutural para **BRF082-4** com dados de deslocamentos químicos e estereoquímica.



¹⁷ a, b O autor afirma que os assinalamentos com a mesma sobrescrição podem estar invertidos.

Tabela 35. Comparação dos dados de deslocamentos químicos de **BRF082-4** e da gliotoxina (KAOUJJI *et al.*, 1990).

C	BRF082-4 (CDCl ₃ , 500 MHz)		Gliotoxina (CDCl ₃ , 300 MHz)	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	166,26		166,0 ^a	
3	77,26		75,6 ^b	
4	165,42		165,3 ^a	
5a	69,98	4,81 (s, 1H)	69,7	4,82 (s, 1H)
6	73,33	4,81 (s, 1H)	73,1	4,82 (s, 1H)
7	130,09	5,77 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1H)	130,1	5,99 (dl, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H)
8	123,56	5,94 (dd, <i>J</i> = 4,5 e 8,6 Hz, 1H)	123,3	5,95 (dl, <i>J</i> = 10,1 e 5,1 Hz, 1H)
9	120,40	5,99 (sl, 1H)	120,2	5,79 (dl, <i>J</i> = 10,1 Hz, 1H)
9a	130,97		130,8	
10	36,77	2,95 (d, <i>J</i> = 17,5 Hz, 1H); 3,74 (dd, <i>J</i> = 2,3 e 17,5 Hz, 1H)	36,6	2,96 (dl, <i>J</i> = 18,0 Hz, 1H); 3,76 (dl, <i>J</i> = 18,0 Hz, 1H)
10a	75,84		77,2 ^b	
1-NCH ₃	27,73	3,21 (s, 3H)	27,5	3,21 (s, 3H)
3-CH ₂ OH	60,71	4,24 (dd, <i>J</i> = 9,7 e 12,8 Hz, 1H); 4,43 (dd, <i>J</i> = 5,8 e 12,8 Hz, 1H)	60,7	4,26 (dd, <i>J</i> = 12,7 e 9,5; Hz, 1H); 4,43 (dd, <i>J</i> = 12,7 e 6,1 Hz, 1H)
3-CH ₂ OH		3,91 (dd, <i>J</i> = 5,8 e 9,7 Hz, 1H)		3,55 (dd, <i>J</i> = 9,5 e 6,1 Hz, 1H)
6-OH		5,78 (s, 1H)		5,81 (s, 1H)

A gliotoxina (**46**, Figura 160, p. 200) é uma micotoxina, sendo a primeira representante do grupo de epiditiodioxopiperazinas (ETPs). Modula a resposta imunológica e induz diversos tipos de células à apoptose. Sua citotoxicidade é atribuída à sua incomum ponte dissulfeto intramolecular, que é a principal característica das ETPs (SCHARF *et al.*, 2012). Já foi obtida das espécies *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*, e parece ser o principal fator de mortalidade em aspergiloses (HUBMANN *et al.*, 2009). Há relatos de diversas atividades biológicas para a gliotoxina, como fungicida (HERRICK, 1945), bactericida (WEINDLING, EMERSON, 1936), antiviral (RIGHTSEL *et al.*, 1964; McDOUGALL, 1968), citotóxica (WANG *et al.*, 2012; MAIS *et al.*, 2013), dentre outras.

Figura 161. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de **BRF082-4**.

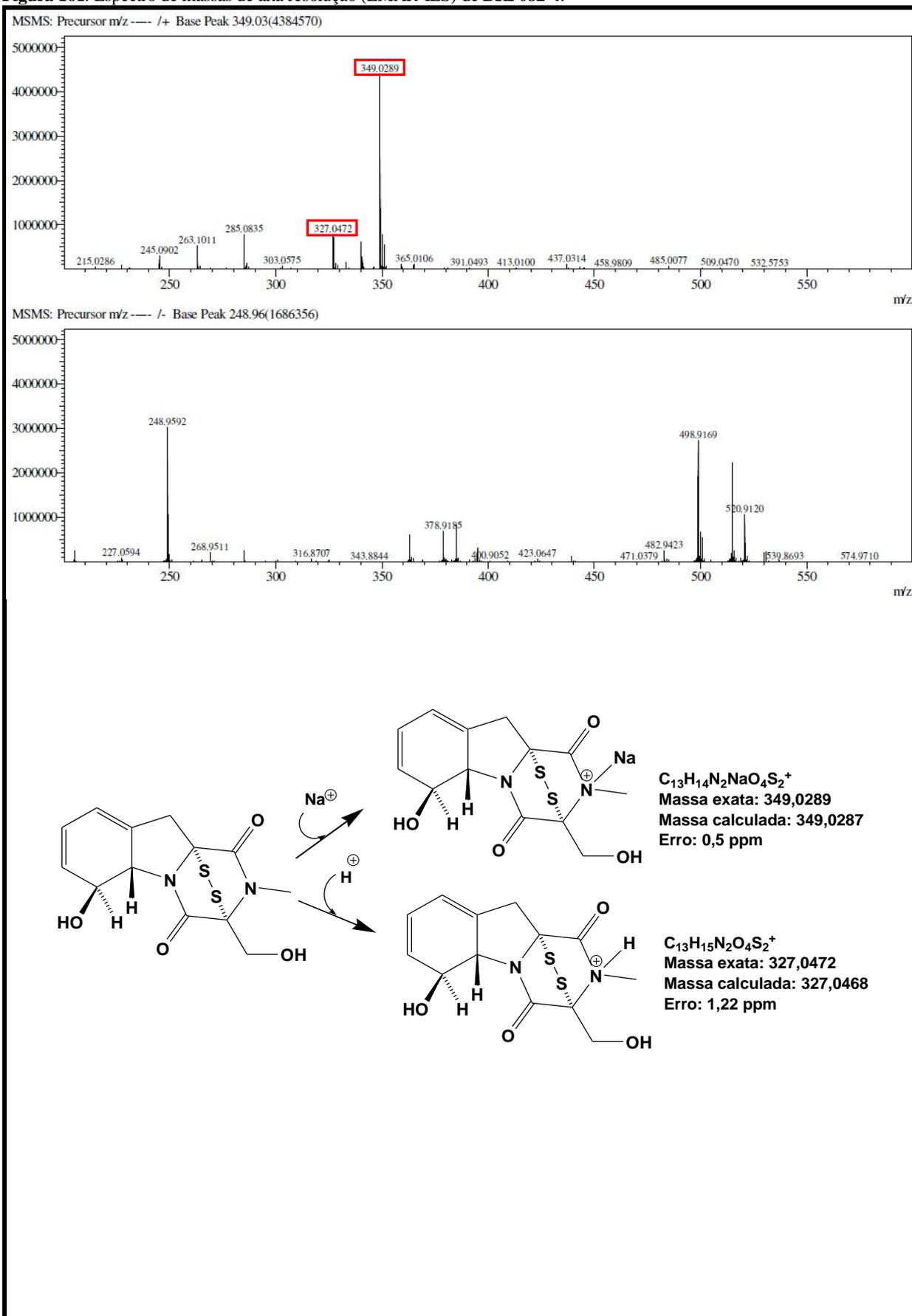


Figura 162. Espectro de absorção na região do infravermelho de **BRF082-4**.

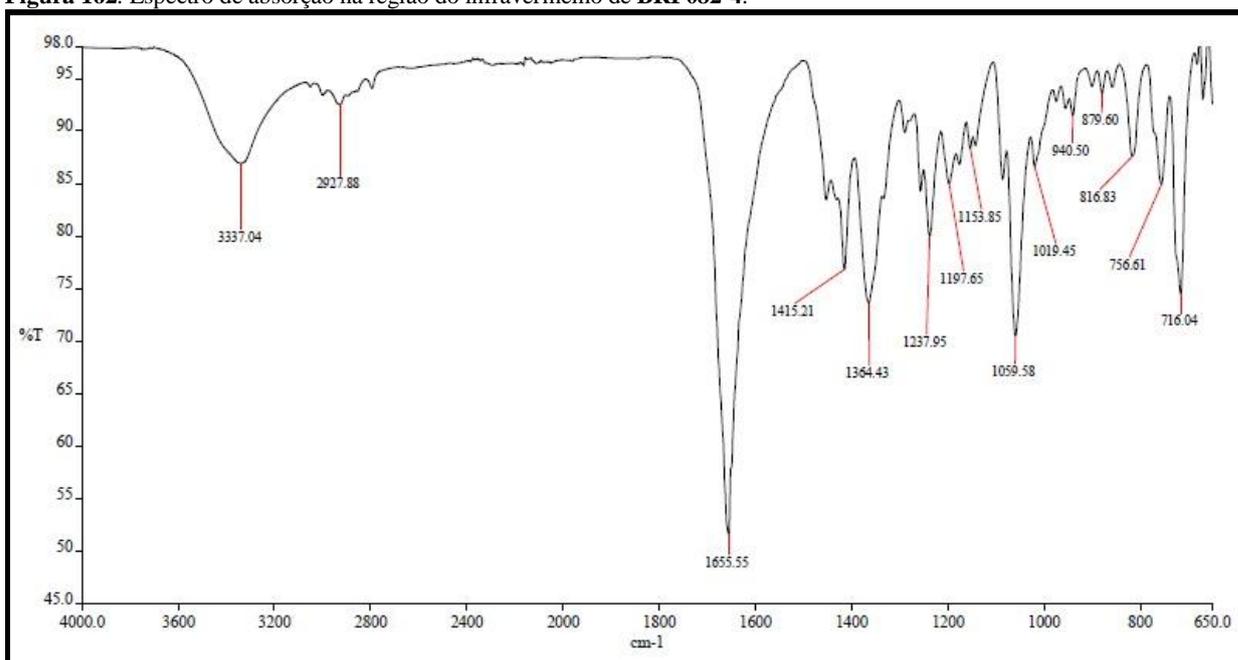


Figura 163. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de BRF082-4.

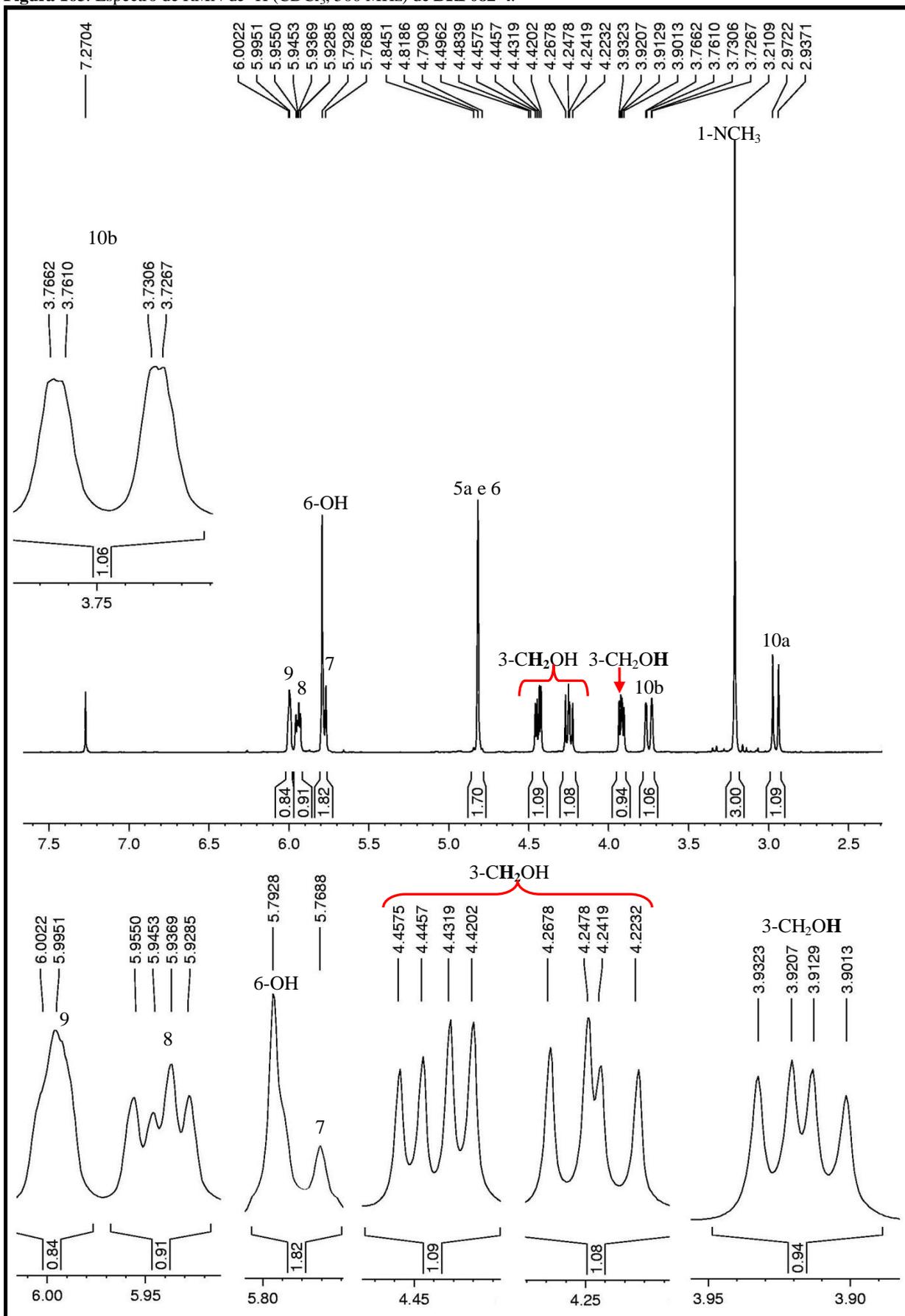


Figura 164. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e RMN ^{13}C -DEPT 135° de **BRF082-4**.

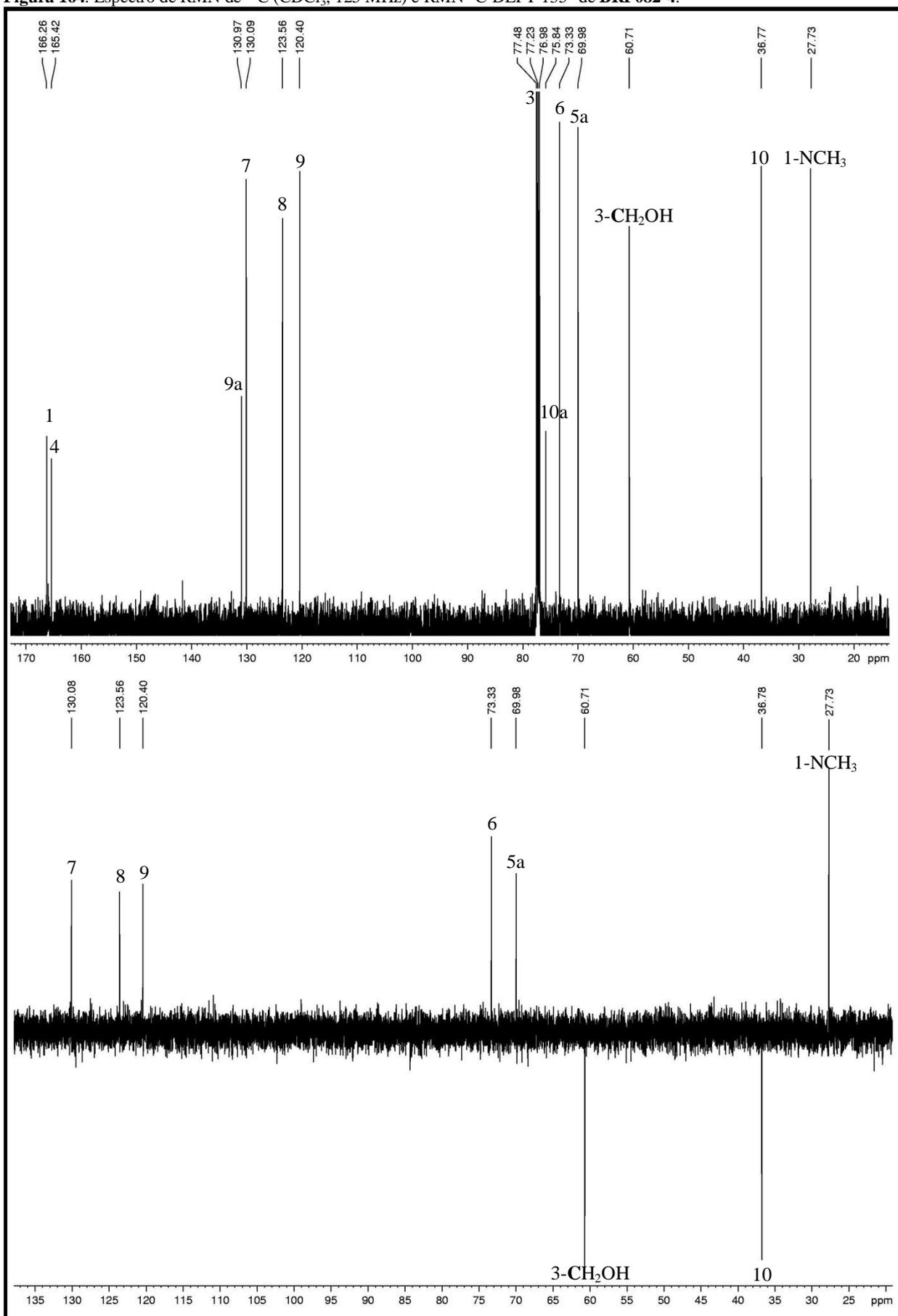


Figura 165. Mapa de contornos COSY de BRF082-4.

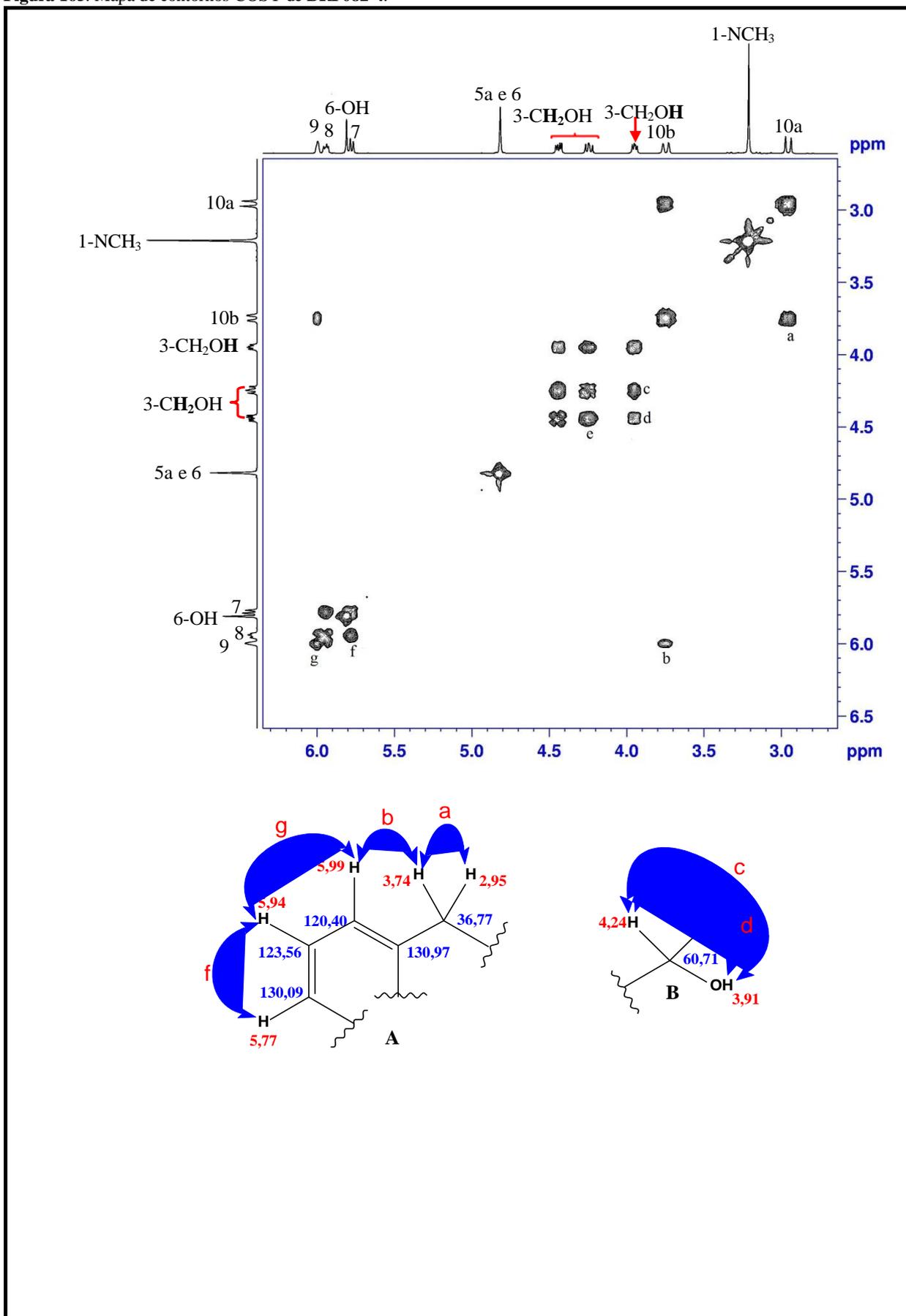


Figura 166. Mapa de contornos HSQC de BRF082-4.

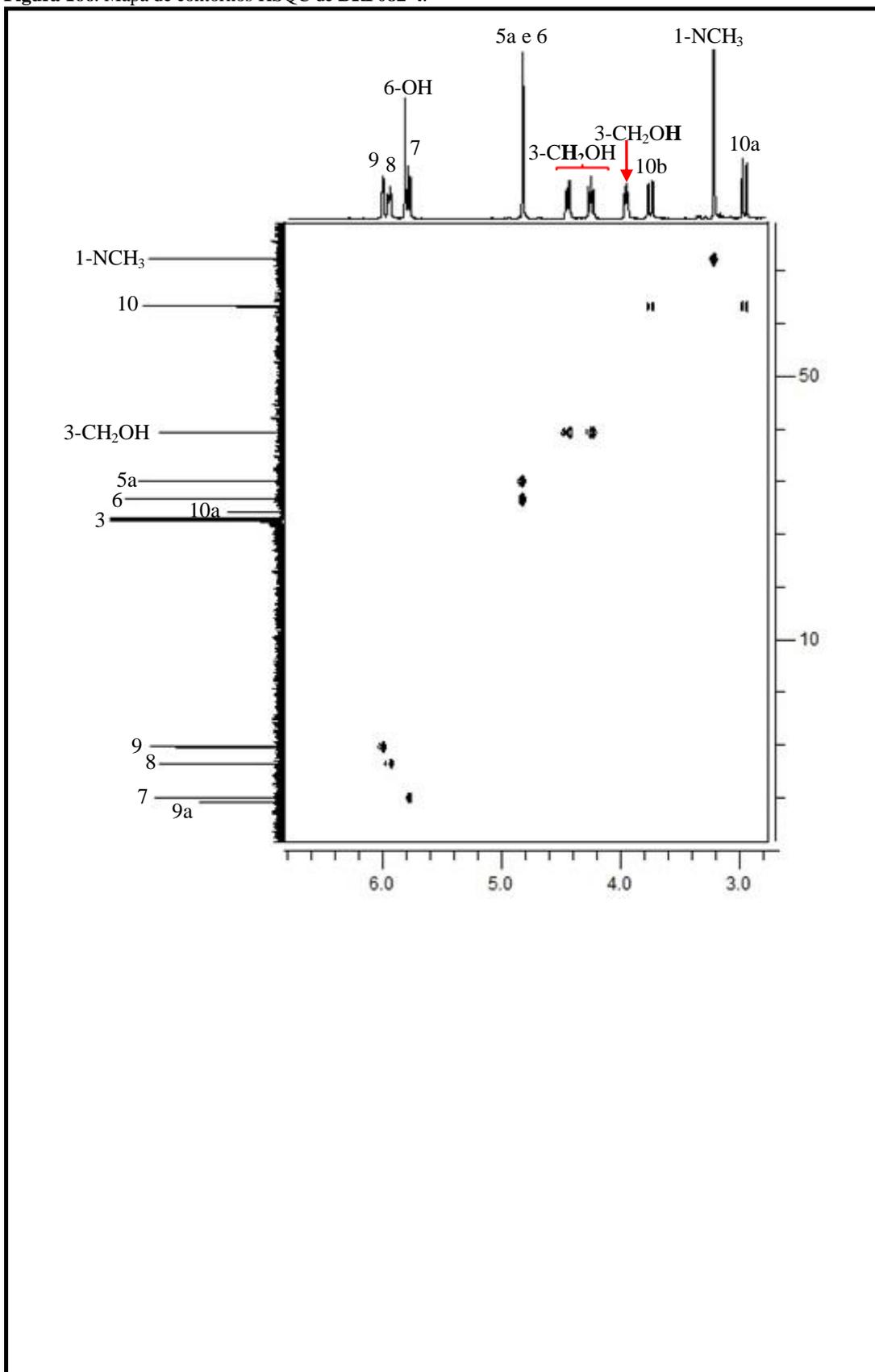
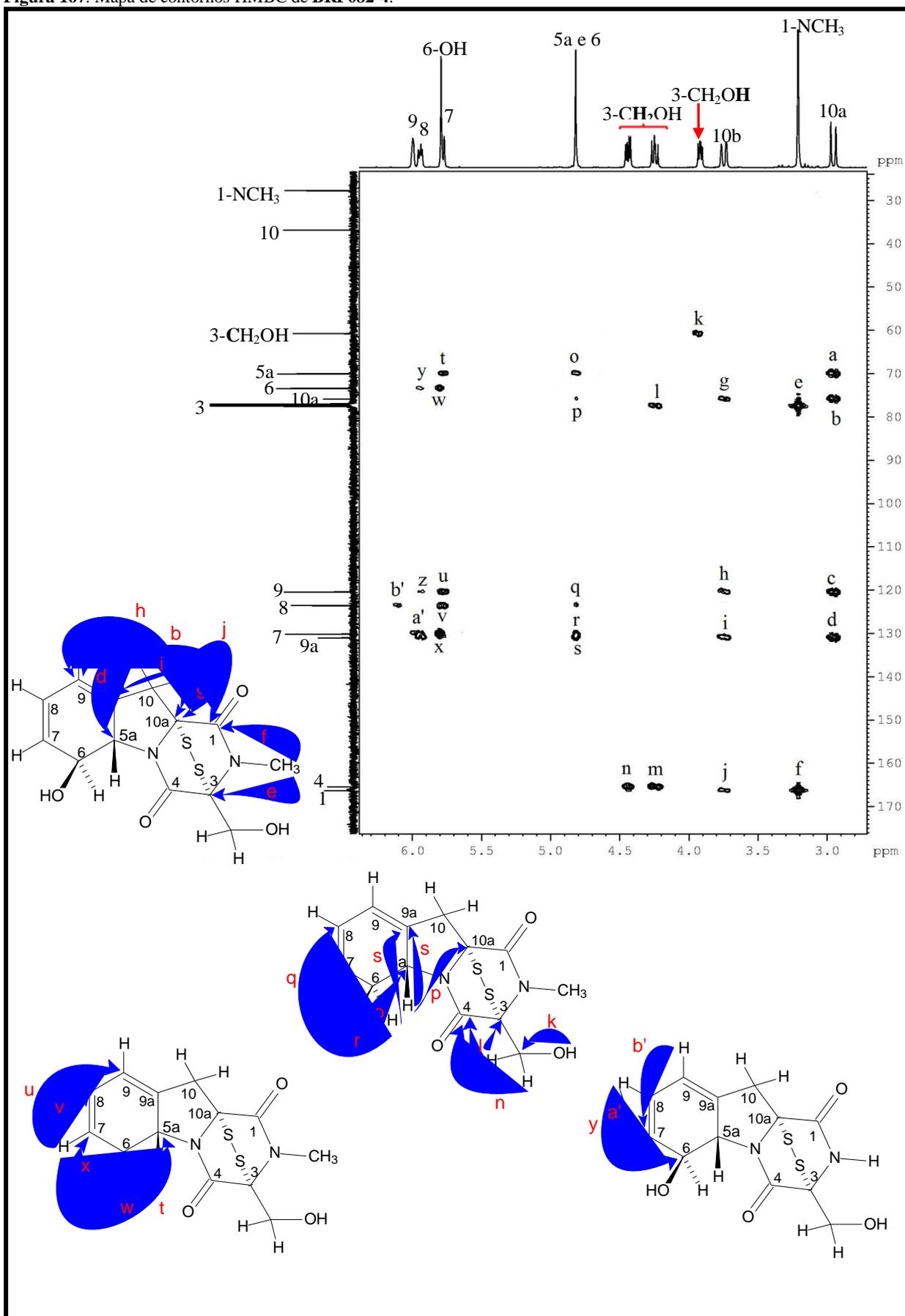


Figura 167. Mapa de contornos HMBC de BRF082-4.



5.6.4.5 Determinação estrutural de BRF082-5.

BRF082-5 foi obtido como um sólido cristalino amarelo solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução EMAR-IES (Figura 173, p. 214) exibiu, no modo positivo, os íons correspondentes à molécula com aduto de sódio hidrogênio $[M + H]^+$, em m/z 369,0586 (m/z calculado 369,0573, erro 3,52 ppm); com aduto de sódio $[M + Na]^+$, em m/z 391,0397 (m/z calculado 391,0393, erro 1,02 ppm); e com aduto de potássio $[M + K]^+$, em m/z 407,0139 (m/z calculado 407,0132, erro 1,71 ppm), os quais apontaram a fórmula molecular $C_{15}H_{16}N_2O_5S_2$, IDH igual a 9.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 174, p. 215) apresentou uma banda larga e de média intensidade em 3384 cm^{-1} , a qual foi atribuída a uma deformação axial de O-H em ligação de hidrogênio intermolecular. A banda em 2934 cm^{-1} foi atribuída a vibração de deformação axial assimétrica de C-H de grupo metileno. As bandas em 1733 cm^{-1} e 1667 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação axial de C=O de éster e de lactama com anel de seis ou mais átomos, respectivamente. As bandas em 1416 cm^{-1} e 1366 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de deformação angular no plano de O-H, acopladas com vibrações de deformação angular simétrica fora do plano de C-H. A banda em 1229 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial assimétrica de C-O de éster (C-C(=O)-O) - acetato. A banda em 1050 cm^{-1} foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C-O de álcool.

O espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **BRF082-5** (Figura 175, p. 216) apresentou sinais para quinze hidrogênios. Os simpletos em δ 3,17 (3H) e δ 2,10 foram atribuídos a duas metilas com efeito de desproteção. Com auxílio do mapa de contornos HSQC (Figura 178, p. 219), os sinais em δ 3,02 (*dl*, $J = 17,5\text{ Hz}$, 1H) e δ 3,72 (*dd*, $J = 1,0$ e $17,5\text{ Hz}$, 1H), foram atribuídos, a dois hidrogênios metilênicos, assim como os sinais em δ 4,24 (*d*, $J = 12,8\text{ Hz}$, 1H) e δ 4,33 (*d*, $J = 12,8\text{ Hz}$, 1H), sendo estes últimos ligados a um carbono com hidroxila. Os sinais em δ 5,09 (*dl*, $J = 13,1\text{ Hz}$, 1H) e δ 5,91 (*dl*, $J = 13,1\text{ Hz}$, 1H) apresentaram correlações, no HSQC, com os carbonos em δ 65,78 e δ 75,76, respectivamente. Foram, portanto, atribuídos a dois hidrogênios ligados a carbonos metínicos nitrogenado e oxigenado, respectivamente. Os sinais em δ 5,52 (*dd*, $J = 0,8$ e $9,5\text{ Hz}$, 1H) e δ 6,01 (*dd*, $J = 2,0$ e $5,0\text{ Hz}$, 1H) foram atribuídos a dois hidrogênios vicinais olefínicos em posição *cis*, ao passo que este último foi atribuído como também vicinal ao hidrogênio olefínico em δ 6,05 (*m*, 1H), fato confirmado pelo mapa de contornos COSY (Figura 177, p. 218).

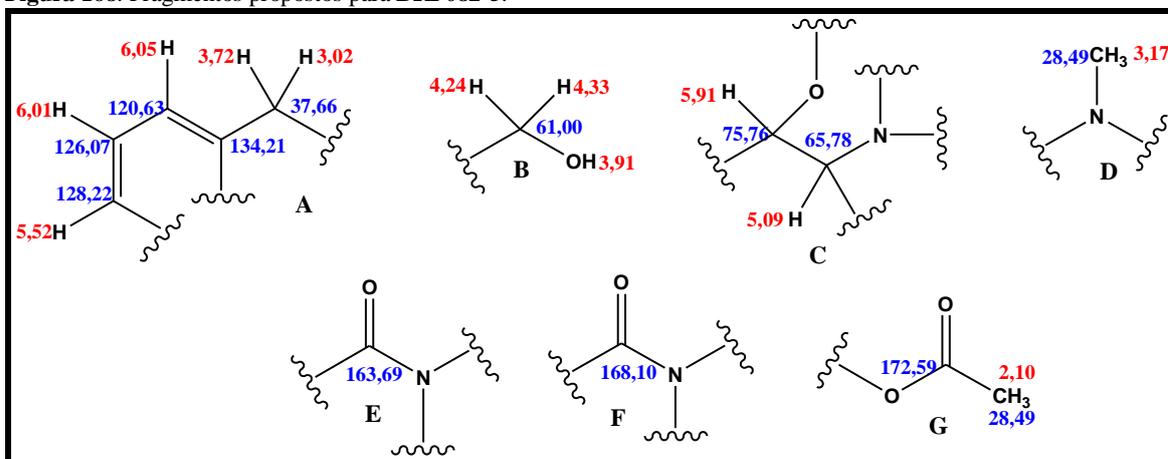
Seu espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (Figura 176, p. 217) apresentou quinze linhas espectrais. Sua análise, juntamente com os espectros de RMN ^{13}C -DEPT 135°

(Figura 176, p. 217) e HSQC, permitiu realizar os seguintes assinalamentos: Os sinais em δ 21,58 e δ 28,49 foram atribuídos a duas metilas ligadas à carbonila e a nitrogênio, respectivamente. Os sinais em δ 37,66 e δ 61,00 foram atribuídos a dois carbonos metilênicos, sendo este último admitido como oxigenado. Os sinais em δ 65,78 e δ 75,76 foram atribuídos a dois carbonos metínicos, nitrogenados e/ou oxigenados, ambos com efeito de desproteção. Os sinais em δ 77,50 e δ 79,43 foram atribuídos a dois carbonos não hidrogenados ligados a enxofre. Os sinais em δ 120,63, δ 126,07, δ 128,22 e δ 134,21 foram atribuídos a carbonos olefínicos, sendo os três primeiros metínicos e o último não hidrogenado. Os sinais em δ 163,69 e δ 168,10 foram associados a grupamentos C=O de amida e o sinal em δ 172,59 foi atribuído a uma carbonila de éster.

No mapa de contornos COSY (Figura 177, p. 218), foram visualizados acoplamentos entre os sinais em δ 3,02 (*dl*, $J = 17,5$ Hz, 1H) e δ 3,72 (*dd*, $J = 1,0$ e $17,5$ Hz, 1H) e entre os sinais em δ 4,24 (*d*, $J = 12,8$ Hz, 1H) e δ 4,33 (*d*, $J = 12,8$ Hz, 1H), corroborando a proposição de que se tratam de hidrogênios metilênicos, fato já confirmado pelo espectro HSQC. Os acoplamentos observados entre os sinais na região de hidrogênios olefínicos em δ 5,52 (*dd*, $J = 0,8$ e $9,5$ Hz, 1H) e δ 6,02 (*dd*, $J = 2,0$ e $5,0$ Hz, 1H), confirmam a posição vicinal destes. Os acoplamentos entre os sinais em δ 5,09 (*dl*, $J = 13,1$ Hz, 1H) e δ 5,91 (*dl*, $J = 13,1$ Hz, 1H) também demonstram uma relação de vizinhança. Por fim, o acoplamento mais fraco observado entre o sinal de hidrogênio metilênico em δ 3,72 (*dd*, $J = 1,0$ e $17,5$ Hz, 1H) e o sinal de hidrogênio olefínico em δ 6,05 (*m*, 1H), demonstra um acoplamento “em W”.

Os dados anteriores permitem propor a presença, na estrutura de **BRF082-5**, dos fragmentos mostrados na Figura 168.

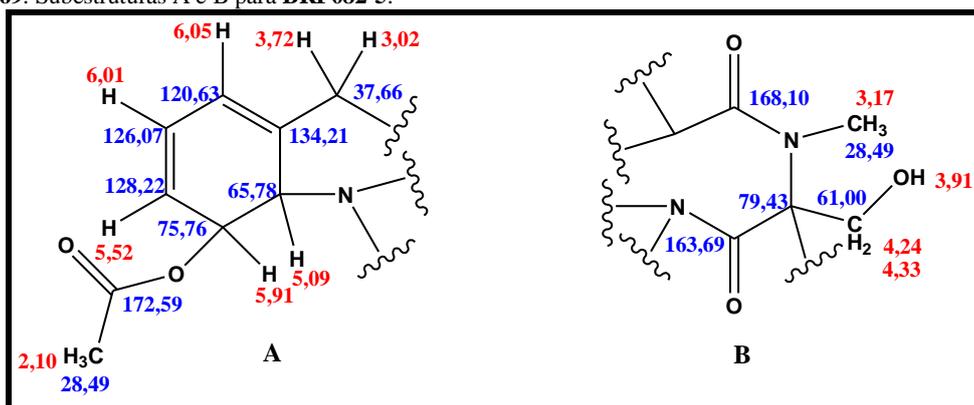
Figura 168. Fragmentos propostos para **BRF082-5**.



Os fragmentos propostos para **BRF082-5** (Figura 168) apresentam grande semelhança com os fragmentos propostos para **BRF082-1** (Figura 120, p. 161), **BRF082-2** (Figura 132, p.

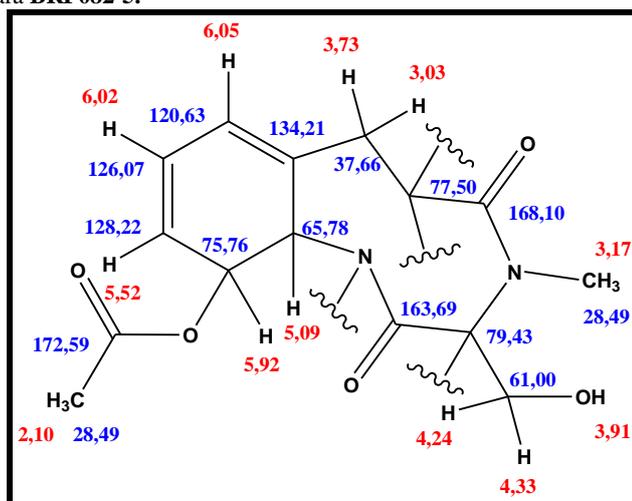
172), **BRF082-3** (Figura 143 p. 184) e **BRF082-4** (Figura 156, p. 199), sugerindo, uma semelhança estrutural destas com **BRF082-5**. A diferença entre as massas obtidas para **BRF082-4** e **BRF082-5**, assim como a proposição do fragmento G (Figura 168) para esta, sugerem que a mesma seja resultado de uma acetilação da hidroxila ligada ao C6 de **BRF082-4**. Tais suposições foram corroboradas com a análise do mapa de contornos HMBC (Figura 179, p. 220). Neste experimento, foram visualizadas correlações entre os hidrogênios metílicos em δ 2,10 e o carbono carbonílico em δ 172,59, confirmando a existência do fragmento H. O acoplamento entre o hidrogênio em δ 5,91 e o carbono em δ 172,59 permite ligar os fragmentos C e G. O acoplamento entre os sinais em δ 5,91 e em δ 128,22, assim como entre δ 5,09 e δ 134,21, permite conectar os fragmentos A e C sem, contudo, definir a posição dos dois carbonos citados. Tais posições são, contudo, definidas pelo acoplamento entre o hidrogênio metilênico em δ 3,02 e o carbono em δ 65,78. Tais correlações são suficientes para a proposição da subestrutura A (Figura 169). Os acoplamentos entre os hidrogênios metilênicos em δ 4,24 e δ 4,33 e os carbonos em δ 163,99 e δ 79,43, permite a conexão entre os fragmentos B e E através deste último carbono. O acoplamento entre o sinal de hidrogênios metílicos em δ 3,17 e os sinais de carbonos em δ 79,43 e δ 168,10 permite conectar o fragmento D ao fragmento F e ao fragmento resultante da conexão entre B e E, citada anteriormente. Estes últimos acoplamentos permitem a proposição da subestrutura B (Figura 169).

Figura 169. Subestruturas A e B para **BRF082-5**.



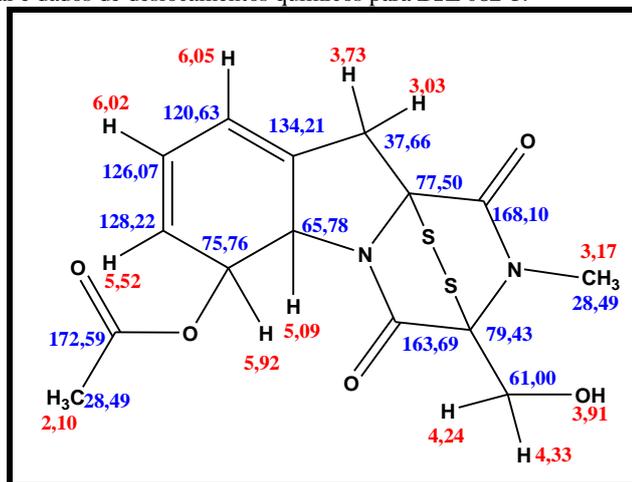
O HMBC exibiu também acoplamento entre os hidrogênios metilênicos em δ 4,24 e δ 4,33 e os carbonos em δ 168,10 e δ 77,50, o que permite a conexão entre as subestruturas A e B através deste, levando à subestrutura C (Figura 170, p. 212).

Figura 170. Subestrutura C para **BRF082-5**.



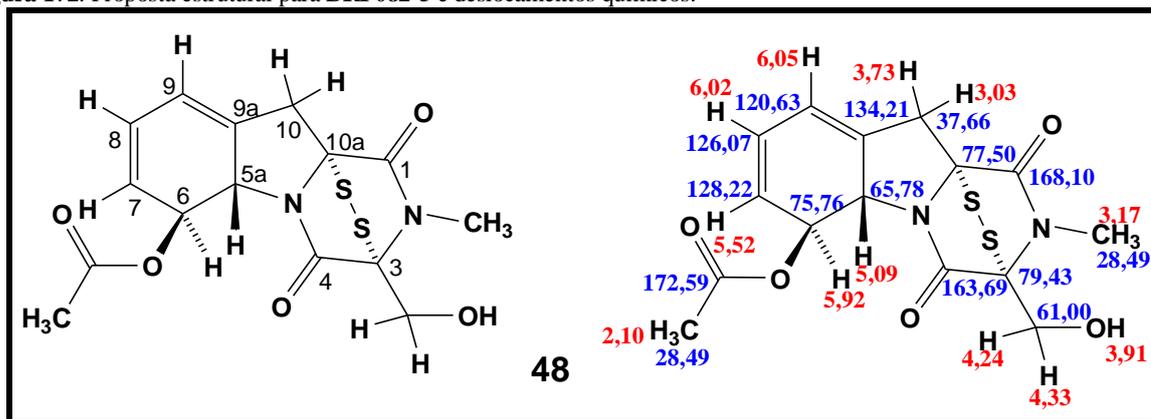
A fórmula molecular indicada no espectro de massas ($C_{15}H_{16}N_2O_5S_2$) indica a existência de dois enxofres. Tal fato, associado ao valor de IDH 9 e à ausência de outros sinais de carbonos aromáticos e/ou olefínicos, permite propor uma ligação entre o carbono em δ 77,50 e o nitrogênio conectado ao carbono em δ 163,60, formando mais um ciclo na estrutura. Além disso, propõe-se a conexão dos enxofres em ponte, entre os carbonos em δ 77,50 e δ 79,43, tal qual ocorre em **BRF082-4**, corroborando com a fórmula molecular e com o IDH calculado. Diante disso, tem-se a proposta estrutural mostrada na Figura 171.

Figura 171. Proposta estrutural e dados de deslocamentos químicos para **BRF082-5**.



Trata-se da acetilgliotoxina (**48**, Figura 13, p. 44), uma forma acetilada da gliotoxina (Figura 160, p. 200), relatada na literatura desde 1952, tendo sido obtida, pela primeira vez, do fungo *Penicillium terlikowski* Zaleski (JOHNSON *et al.*, 1952). Assim como para **BRF082-1**, **BRF082-2**, e **BRF082-3** a estereoquímica de **BRF082-5** foi estabelecida como sendo a mesma da gliotoxina (Figura 172, p. 213).

Figura 172. Proposta estrutural para **BRF082-5** e deslocamentos químicos.



Há registro de patente relatando atividade anticâncer contra diversos tipos de células cancerígenas (MUKAI *et al.*, 1999).

Figura 173. Espectro de massas de alta resolução de **BRF082-5**.

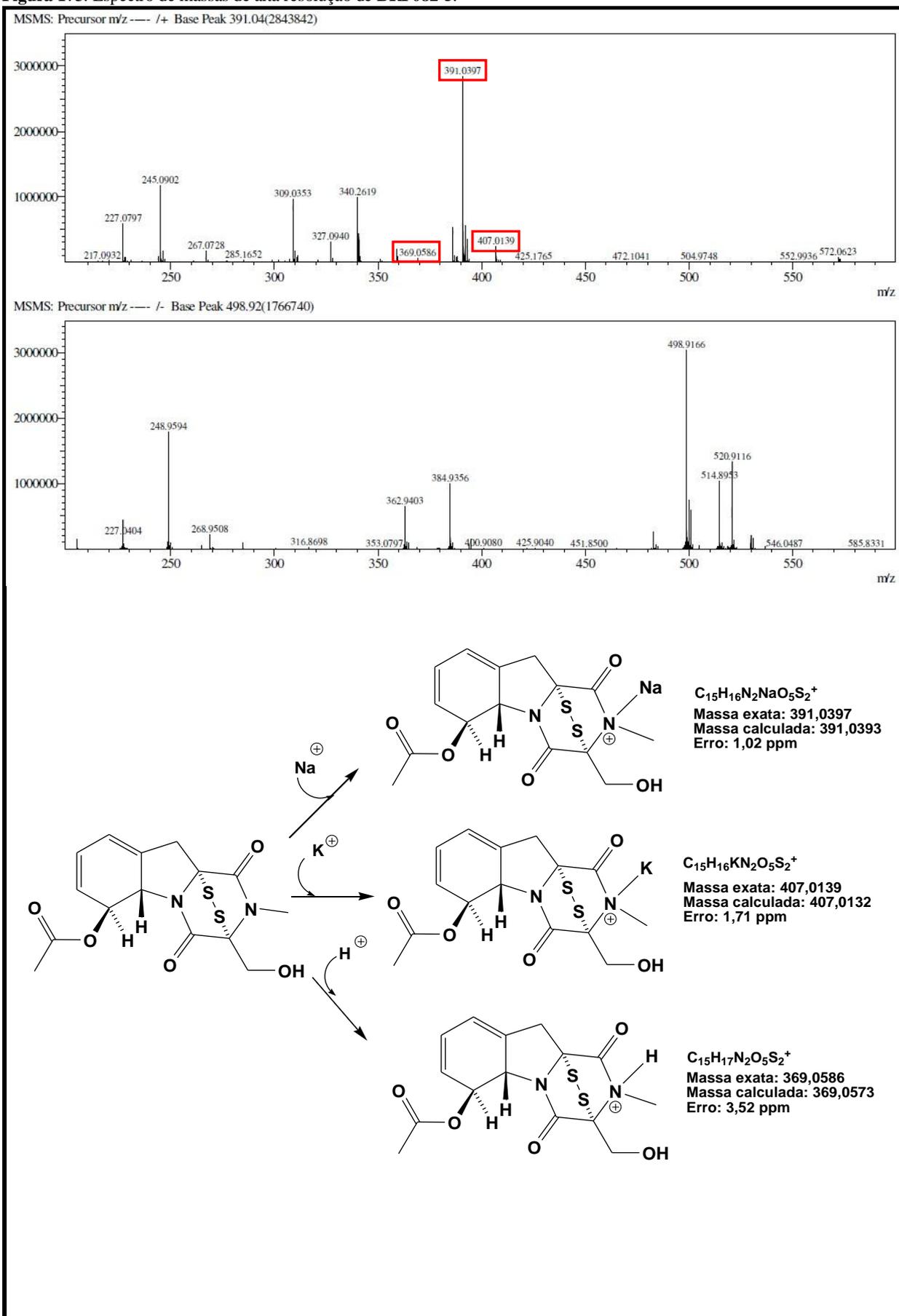


Figura 174. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-5.

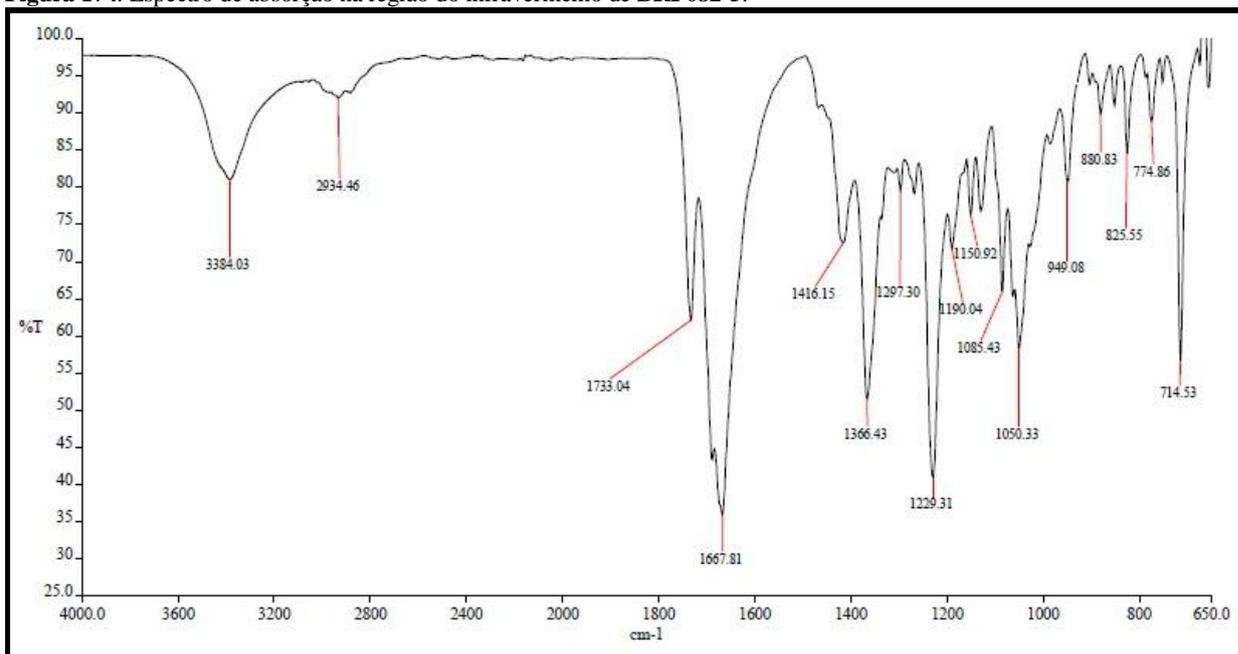


Figura 175. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD), e expansões, de **BRF082-5**.

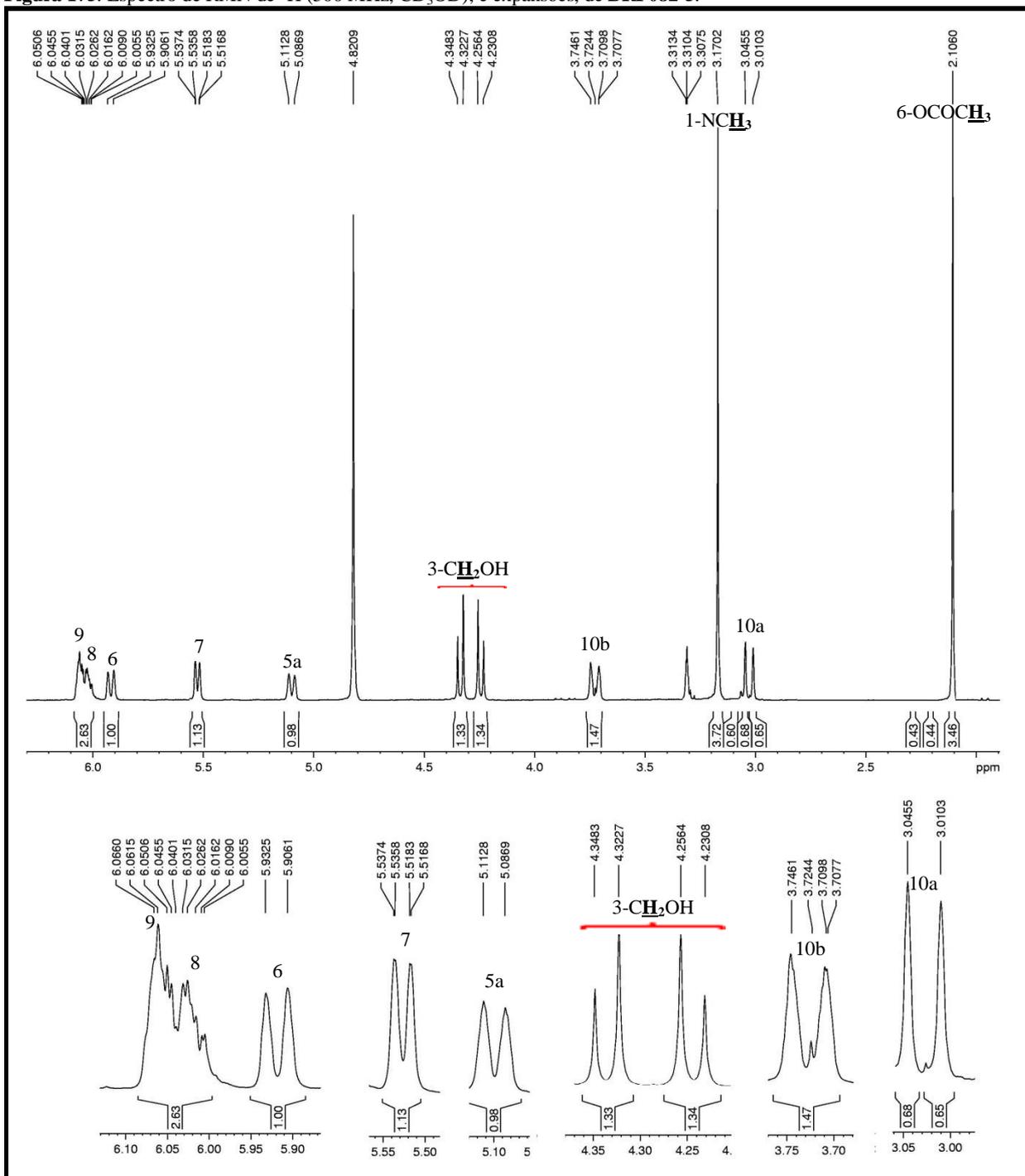


Figura 176. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) e RMN^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ de **BRF082-5**.

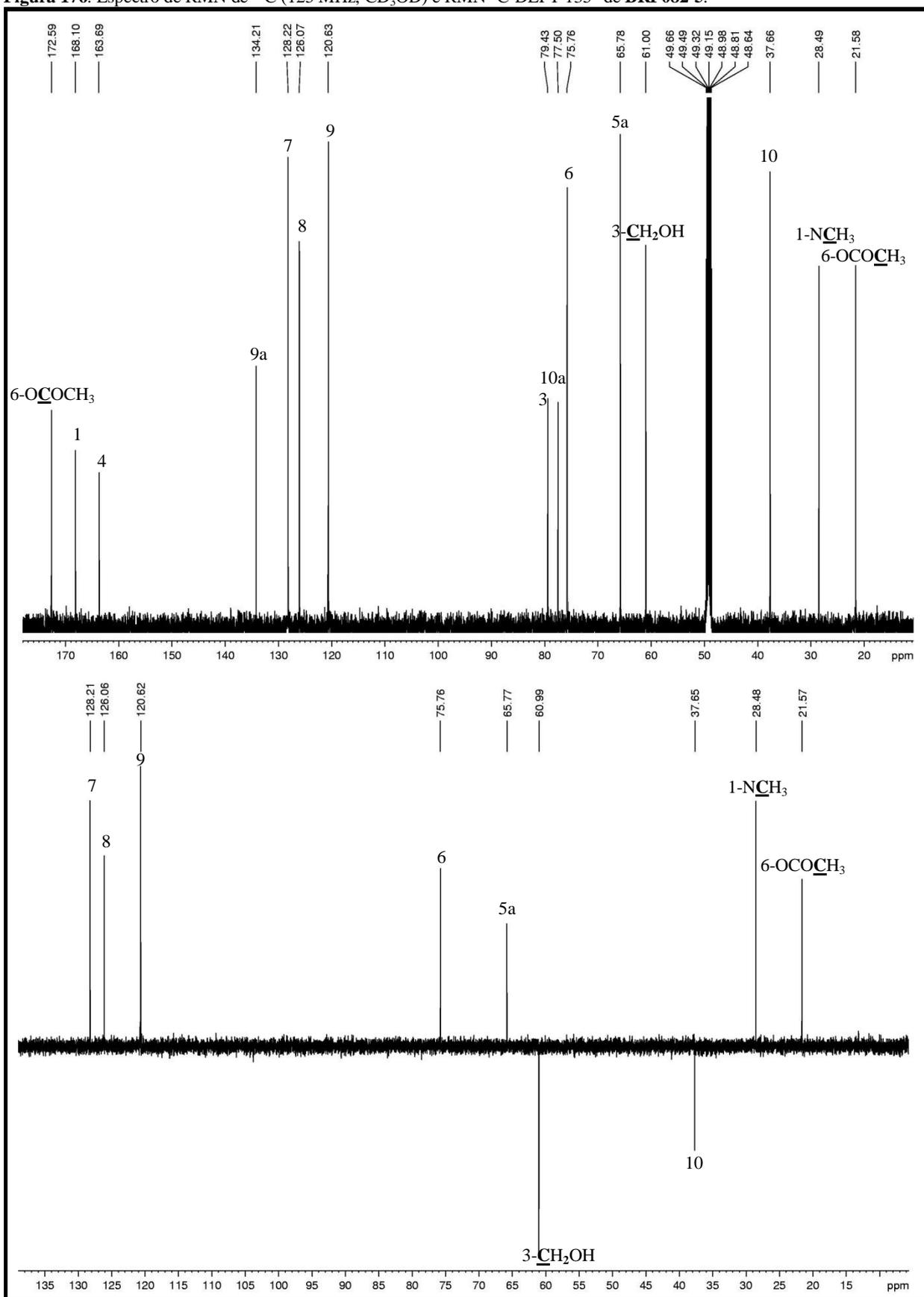


Figura 177. Mapa de contornos COSY de BRF082-5.

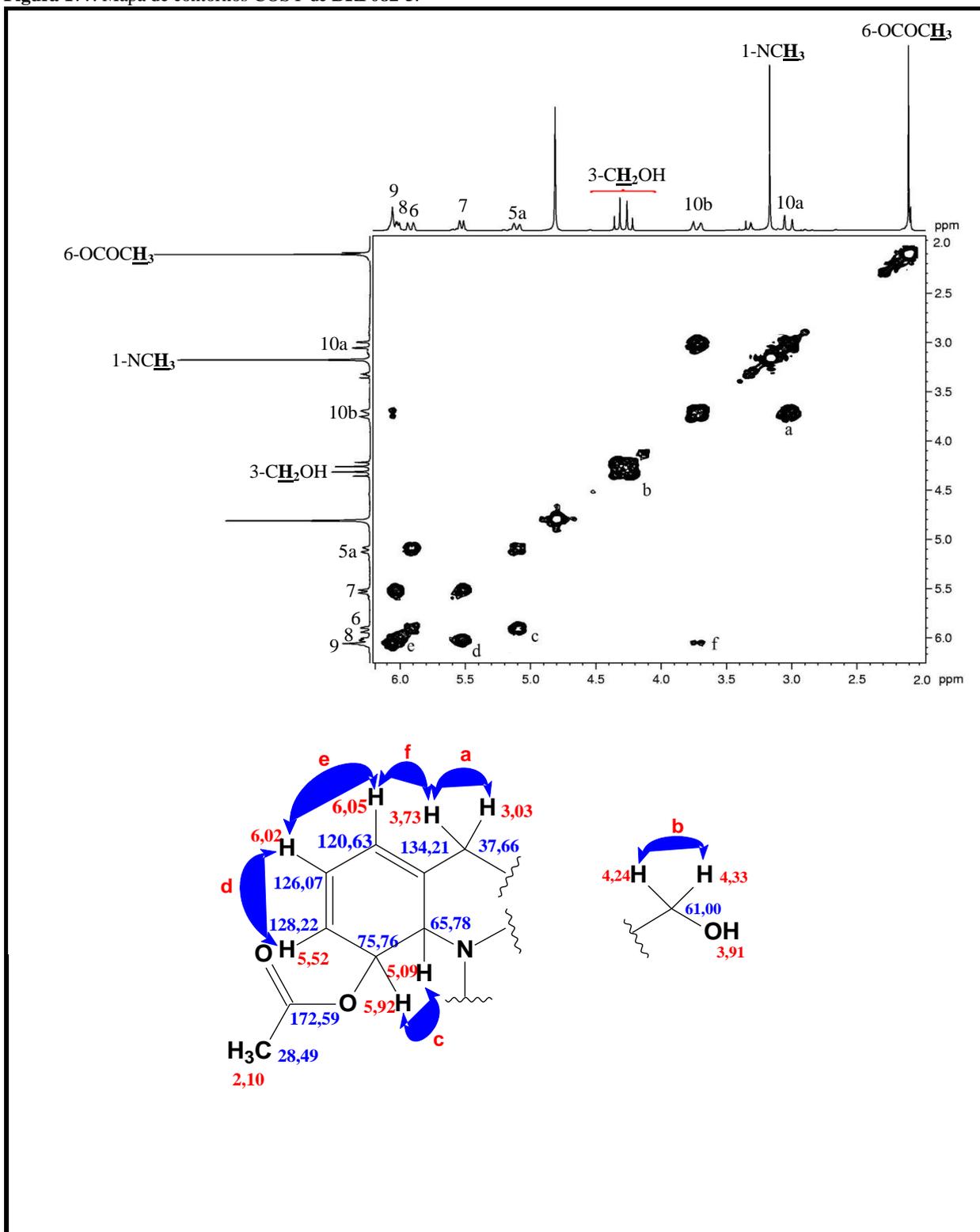


Figura 178. Mapa de contornos HSQC de BRF082-5.

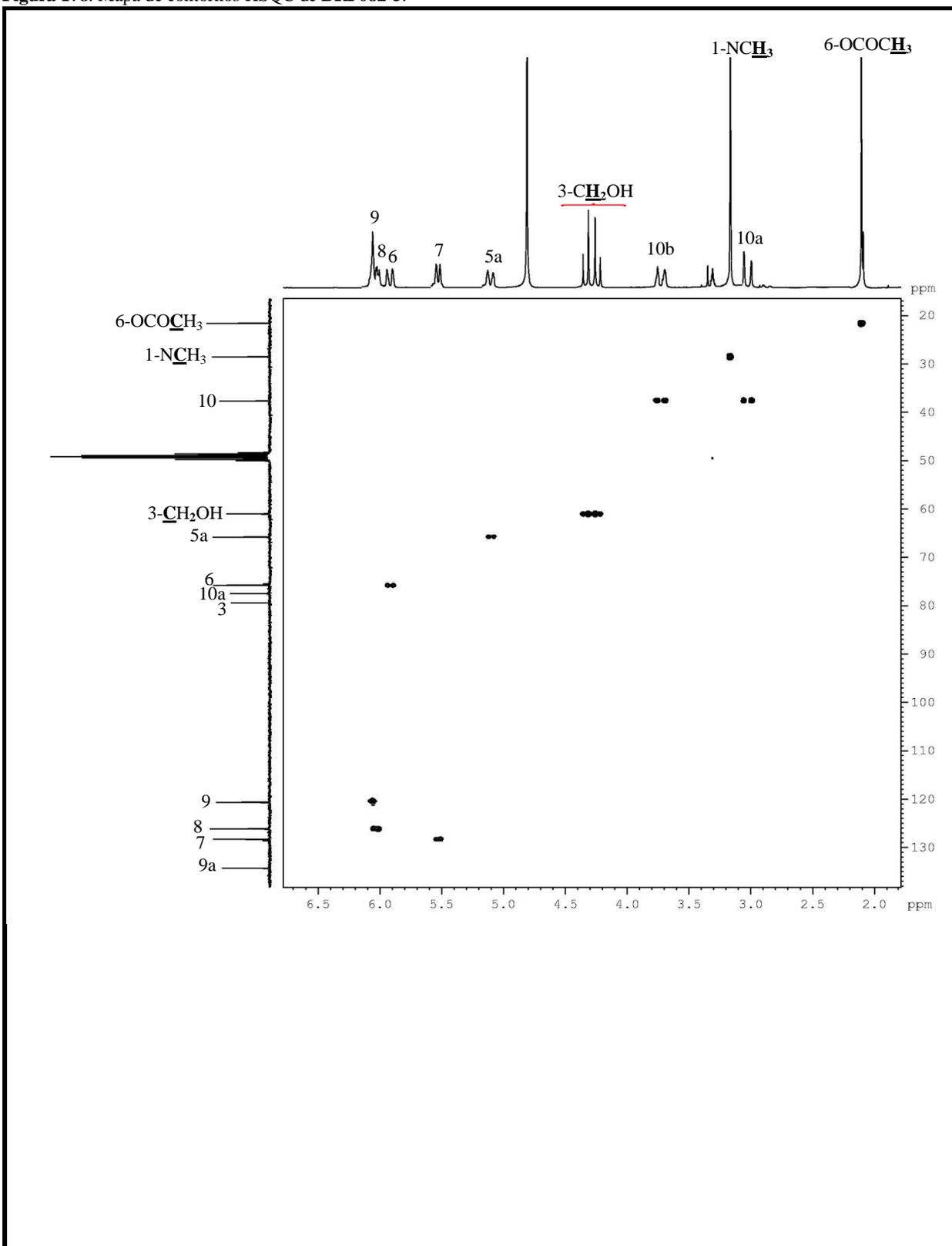
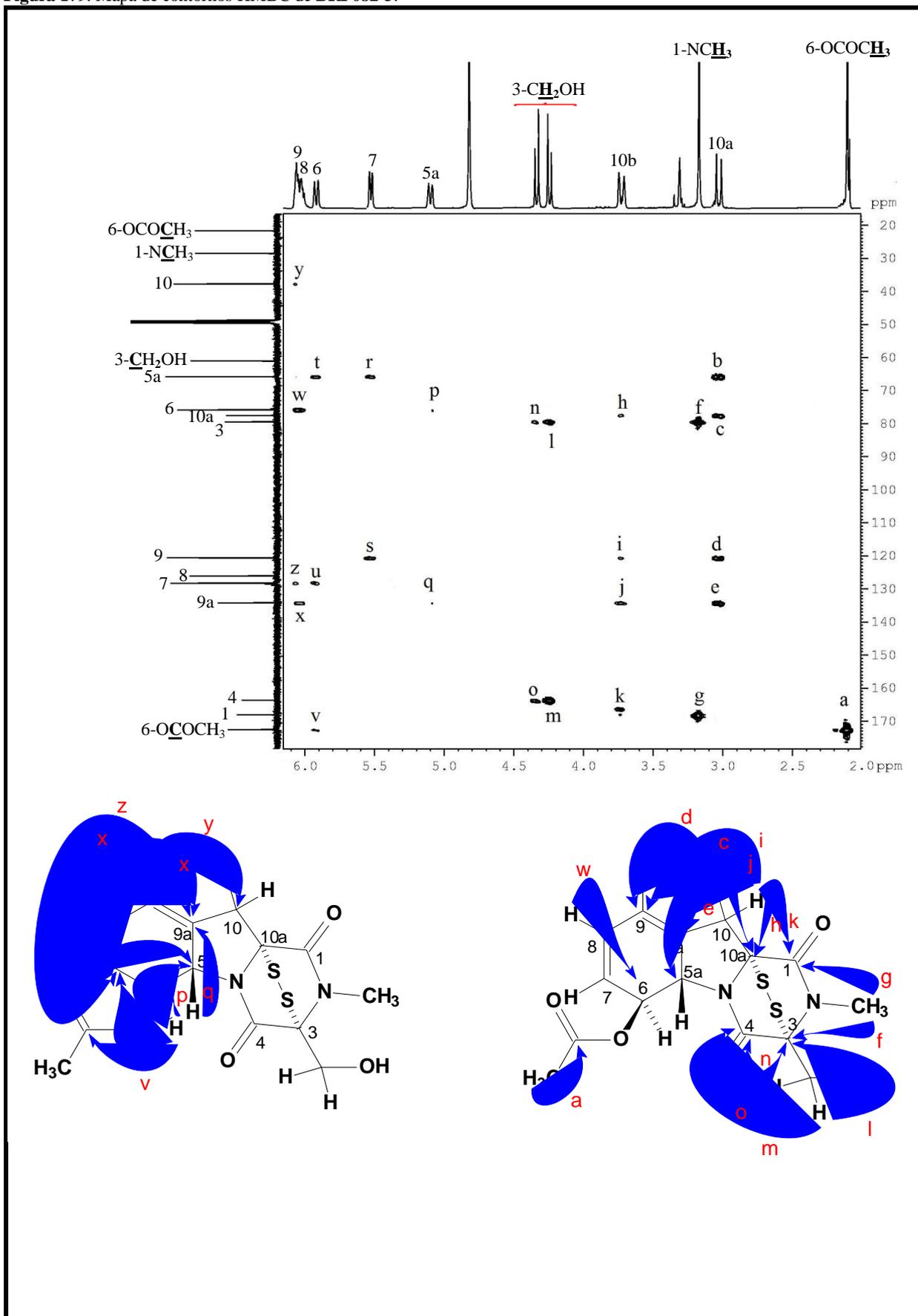


Figura 179. Mapa de contornos HMBC de BRF082-5.



5.6.4.6 Fracionamento da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5)

Foram submetidos 195,10 mg da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 32, p. 195) à fracionamento por CLAE. Dentre os picos apresentados no cromatograma da Figura 180, os correspondentes aos compostos com tempos de retenção 10,67 minutos (pico 3) e 19,24 minutos (pico 7) foram isolados. Essas amostras foram submetidas às análises por RMN, EMAR-IES e IR e foram identificadas como sendo as substâncias já isoladas **BRF082-2** (13,2 mg, 6,76 %) e **BRF082-3** (6,0 mg, 3,07 %), respectivamente. O pico 2, com tempo de retenção 8,16 minutos (60,80 mg, 31,17 %), embora aparente corresponder a uma substância isolada, mostrou-se, através de análise por RMN, como uma mistura binária das substâncias já isoladas **BRF082-4** e **BRF082-5**. As massas dos picos coletados estão na Tabela 36.

Figura 180. Cromatograma da subfração MeOH/H₂O 7:3 3 (amostra 5, Tabela 32, p. 195).

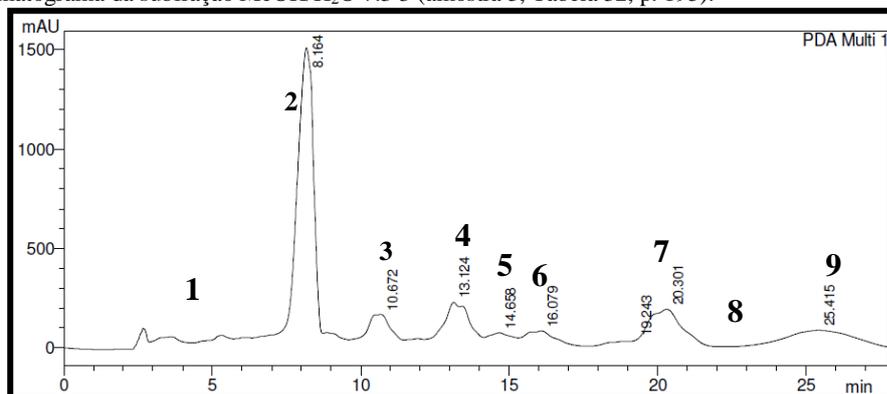


Tabela 36. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da subfração MeOH/H₂O 7:3 3 (amostra 5, Tabela 32, p. 195)

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	18,20	9,33
2	2	60,80	31,16
3	3	13,20	6,76
4	4	12,50	6,40
5	5	8,10	4,15
6	6	5,10	2,61
7	7	6,00	3,07
8	8	6,10	3,12
9	9	6,60	3,38

5.6.4.7 Fracionamento da subfração MeOH/H₂O 8:2 (amostra 6)

Embora a subfração MeOH/H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 32, p. 195) tenha sido obtida em pequena quantidade (47,30 mg), o seu perfil cromatográfico apresentou praticamente apenas dois picos bem resolvidos (Figura 181, p. 222). O pico correspondente ao composto com tempo de retenção 19,95 minutos (pico 2) foi coletado e codificado como **BRF082-6** (4,6

mg, 2,36 %). Essa amostra foi submetida à análise por RMN, EMAR-IES e IV para sua elucidação estrutural. As massas dos picos coletados estão demonstradas na Tabela 37.

Figura 181. Cromatograma da subfração MeOH/H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 32, p. 195) .

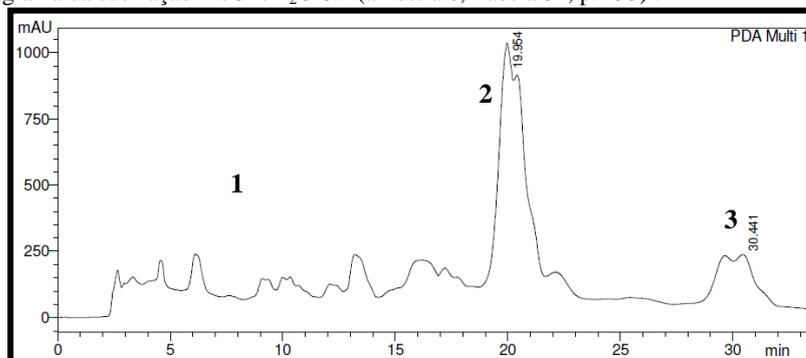


Tabela 37. Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da subfração MeOH /H₂O 7:3 (amostra 6, Tabela 32, p. 195) .

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	1	13,80	29,18
2	2	4,60	9,73
3	3	4,10	8,67

5.6.4.8 Determinação estrutural de BRF082-6.

BRF082-6 foi obtido como um sólido amarelo amorfo e solúvel em metanol. Seu espectro de massas de alta resolução EMAR-IES (Figura 187, p. 228) no modo positivo exibiu os íons correspondentes à molécula com aduto de hidrogênio $[M + H]^+$ em m/z 387,1823 (calculado m/z 387,1816, erro 1,80 ppm), e com aduto de potássio $[M + K]^+$ em m/z 425,1369 (calculado m/z 425,1374, erro -1,17 ppm), os quais apontaram a fórmula molecular C₂₃H₂₂N₄O₂, IDH 15.

Seu espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 188, p. 229) apresentou uma banda larga em 3366 cm⁻¹, a qual foi atribuída a um estiramento N-H de amina secundária aromática. As bandas em 2965 cm⁻¹ e 2928 cm⁻¹ foram atribuídas a vibrações de deformações axiais assimétricas de C-H de grupos metila e metileno, respectivamente. A banda em 2874 cm⁻¹ foi atribuída a uma deformação axial simétrica de C-H de grupo metileno. A banda em 1676 cm⁻¹ foi atribuída a uma vibração de deformação axial de C=O de lactama com anel de seis ou mais átomos. As absorções entre 1597 e 1390 cm⁻¹ foram atribuídas a estiramentos C=C de aromáticos.

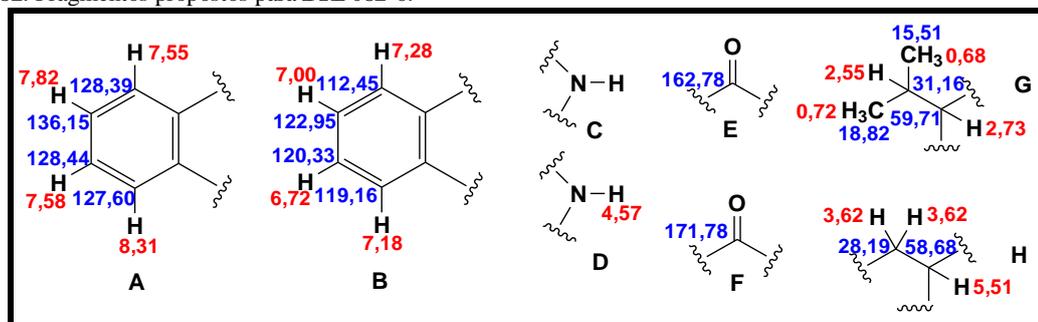
O espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) de **BRF082-6** (Figura 189, p. 230) apresentou sinais para vinte hidrogênios. Os sinais de hidrogênios *sp*² em δ 6,72 (ddd, *J* = 1,0, 7,1 e 8,2 Hz, 1H), δ 7,00 (ddd, *J* = 1,0, 7,1 e 8,2 Hz, 1H), δ 7,18 (dl, *J* = 8,2 Hz, 1H) e δ 7,28

(dl, $J = 8,2$ Hz, 1H) foram caracterizados como pertencendo a um anel aromático ortodissubstituído, da mesma forma que os sinais em δ 7,55 (dl, $J = 8,2$ Hz, 1H), δ 7,58 (ddd, $J = 1,0, 7,5$ e $8,2$ Hz, 1H), δ 7,82 (ddd, $J = 1,5, 7,5$ e $8,2$ Hz, 1H) e δ 8,31 (ddl, $J = 1,5$ e $8,2$ Hz, 1H). Um sinal de hidrogênio sp^2 isolado foi observado em δ 6,70 (s, 1H). Com auxílio dos espectros bidimensionais COSY (Figura 191, p. 232) e HSQC (Figura 192, p. 233), o sinal em δ 3,62 (ddl, $J = 3, e 5,0$ Hz, 2H) foi atribuído a um par de hidrogênios metilênicos adjacentes ao hidrogênio metínico em δ 5,51 (dd, $J = 3,5$ e $5,0$ Hz, 1H). Ainda com o auxílio dos espectros bidimensionais COSY e HSQC, os sinais em δ 0,68 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) e δ 0,72 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H) foram atribuídos a duas metilas de um sistema isopropila, cujo hidrogênio metínico foi associado ao sinal em δ 2,55 (qd, $J = 6,6$ e $2,0$ Hz, 1H). Este último, encontra-se adjacente ao também hidrogênio metínico representado pelo sinal em δ 2,73 (dl, $J = 2,0$ Hz, 1H).

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) (Figura 190, p. 231) apresentou vinte e três sinais. Sua análise juntamente com o espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) (Figura 190, p. 231) e o mapa de contornos HSQC, permitiu a realização dos seguintes assinalamentos: Os sinais em δ 15,51, δ 18,82, δ 28,19, δ 31,16, δ 58,68 e δ 59,71 foram atribuídos a carbonos sp^3 , sendo os dois primeiros metílicos, o terceiro metilênico, e os demais metínicos; os sinais em δ 109,33, δ 121,44, δ 128,87, δ 138,07, δ 148,69 e δ 152,10 foram atribuídos a carbonos sp^2 não-hidrogenados, enquanto os sinais em δ 112,45, δ 119,16, δ 120,33, δ 122,95, δ 125,42, δ 127,60, δ 128,39, δ 128,44 e δ 136,15, foram atribuídos a carbonos sp^2 metínicos; por fim, os sinais em δ 162,78 e δ 171,78, foram atribuídos a duas carbonilas. A presença de duas carbonilas, e a fórmula molecular provável indicada no EM/IES ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$) sugere a presença de dois prótons trocáveis em ligação $-\text{N}-\text{H}$. O simpleto largo em δ 4,57 (1H) visualizado no espectro de RMN de ^1H , pode ser atribuído a um deles.

A análise dos dados anteriores permite prever, na estrutura de **BRF082-6**, a presença dos seguintes fragmentos:

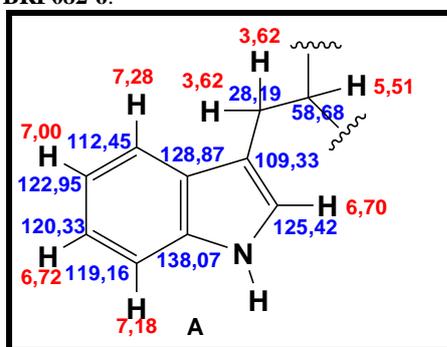
Figura 182. Fragmentos propostos para **BRF082-6**.



As correlações heteronucleares à longa distância observadas no mapa de contornos HMBC (Figura 193, p. 234 e Figura 194, p. 235) esclareceram mais aspectos acerca da

estrutura de **BRF082-6**. Os sinais de hidrogênios em δ 7,18 (dl, $J = 8,2$ Hz, 1H) e δ 7,28 (dl, $J = 8,2$ Hz, 1H), pertencentes ao sistema aromático dissustituído representado pelo fragmento B (Figura 182, p. 223), apresentaram correlações com os sinais de carbonos não hidrogenados em δ 138,07 e δ 128,87, respectivamente, assim como o sinal de hidrogênio sp^2 isolado em δ 6,70 (s, 1H). Este hidrogênio, além de acoplar com os já citados carbonos, também acoplou com o carbono não-hidrogenado em δ 109,33, assim como os hidrogênios metilênicos em δ 3,62 (ddl, $J = 3$, e 5,0 Hz, 2H). Tais acoplamentos, associados aos valores de deslocamentos observados para os respectivos hidrogênios e carbonos, podem ser associados a um sistema indólico, derivado do aminoácido triptofano (SILVERSTEIN, 2007), como mostrado na subestrutura A da Figura 183.

Figura 183. Subestrutura proposta para **BRF082-6**.



Os hidrogênios metilênicos em δ 3,62 (ddl, $J = 3$, e 5,0 Hz, 2H) apresentaram também correlações com o carbono metínico em δ 58,68, com o carbono carbonílico em δ 171,78 e com carbonos do já mencionado sistema indólico em δ 125,42 e δ 128,87. Desta forma, pôde-se unir o fragmento F à subestrutura A, transformando-a em subestrutura B (Figura 184, p. 225). Os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,28 (dl, $J = 8,2$ Hz, 1H) e δ 8,31 (ddl, $J = 1,5$ e 8,2 Hz, 1H), pertencentes ao fragmento A (Figura 182, p. 223), apresentaram acoplamentos com o carbono não-hidrogenado em δ 148,69. O hidrogênio em δ 8,31 (ddl, $J = 1,5$ e 8,2 Hz, 1H) acoplou também com o sinal de carbonila em δ 162,78. O sinal em δ 7,55 (dl, $J = 8,2$ Hz, 1H), também do fragmento A, acoplou com dois carbonos não hidrogenados: em δ 148,69 e em δ 121,44. Com este último, acoplou também o hidrogênio em δ 7,58 (ddd, $J = 1,0$, 7,5 e 8,2 Hz, 1H). Desta forma, pôde-se unir os fragmentos A e E, levando à proposição da subestrutura C (Figura 184, p. 225). As correlações do sinal de hidrogênio em δ 2,73, (dl, $J = 2,0$ Hz, 1H) com os sinais de carbonos sp^3 em δ 15,51, δ 31,16 e com o sinal de carbono sp^2 em δ 152,10, transformou o fragmento G na subestrutura D (Figura 184, p. 225).

Figura 186. Proposta estrutural com estereoquímica e dados de RMN¹H e ¹³C de **BRF082-6** (A); e estrutura da Fiscalina B (B) (WONG *et al.*, 1993).

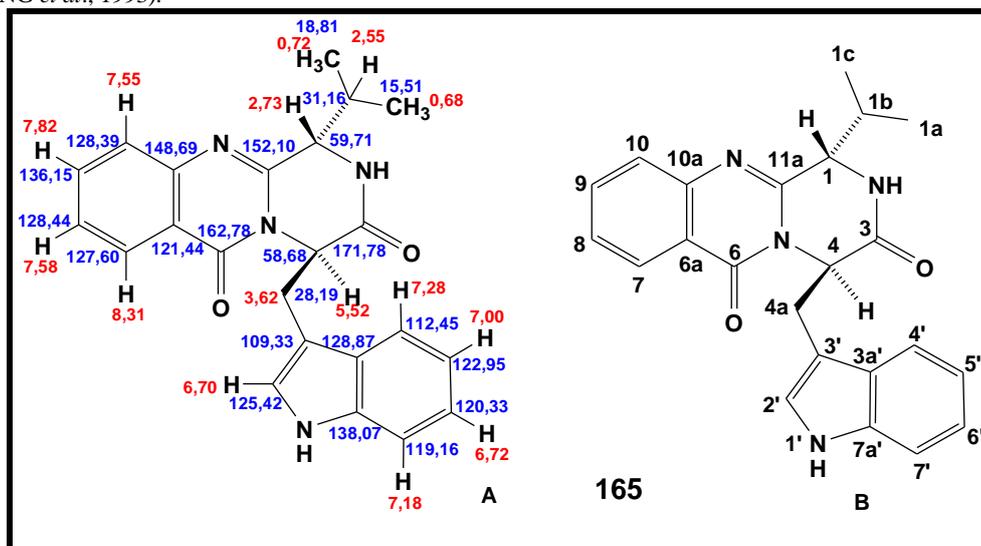


Tabela 38. Comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C de **BRF082-6** com os da Fiscalina B (WONG *et al.*, 1993).

C	BRF082-6 (CD ₃ OD, 500 MHz)		Fiscalina B (CDCl ₃ , 300 MHz)	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	59.71	2.74	58.4	2.70
2				5.97
3	171.78		170.2	
4	58.68	5.52	57.1	5.63
4a	28.09	3.62	27.6	3.69
		3.62		3.59
6	162.78		161.6	
6a	121.44		120.7	
7	127.60	8.31	127.4	8.33
8	128.44	7.58	127.7	7.49
9	136.15	7.82	135.3	7.74
10	128.39	7.55	127.7	7.53
10a	148.69		147.7	
11a	152.10		151.0	
1'				8.21
2'	125.42	6.70	124.2	6.57
3'	109.33		109.7	
3a'	128.77		136.6 ^b	
4'	112.45	7.28	116.6	7.25
5'	122.95	7.00	123.1	7.08
6'	120.33	6.72	120.5	6.88

7'	119.16	7.18	119.2	7.38
7a'	138,07		127,8 ^b	
1a	15.51	0.68	19.0 ^a	0.61
1b	31.16	2.55	29.8	2.60
1c	18.81	0.72	14.9 ^a	0.62

¹⁸

A literatura relata, para a Fiscalina B, uma moderada atividade de inibitória da ligação da substância P (SP) com a neurokinina 1(NK-1)¹⁹ (WONG *et al.*, 1993).

^{18 a,b} Os dados de deslocamento químico assinalados com a mesma sobrescrição, se invertidos, apresentam valores semelhantes aos dados correspondentes de **BRF082-6**.

¹⁹ Inibidores da SP podem ser potenciais anti-inflamatórios e analgésicos (WONG *et al.*, 1993).

Figura 187. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-IES) de **BRF082-6**.

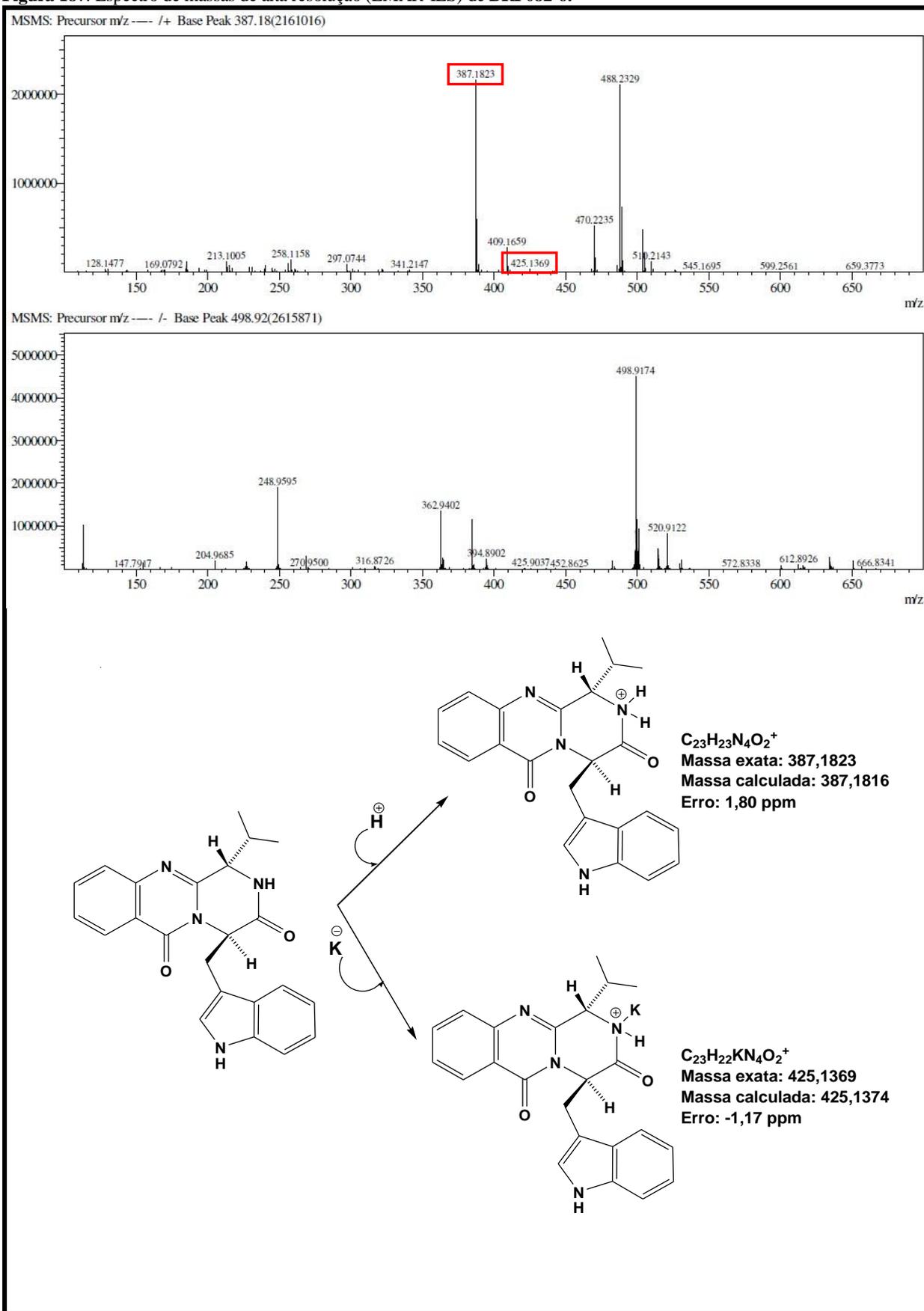


Figura 188. Espectro de absorção na região do infravermelho de BRF082-6.

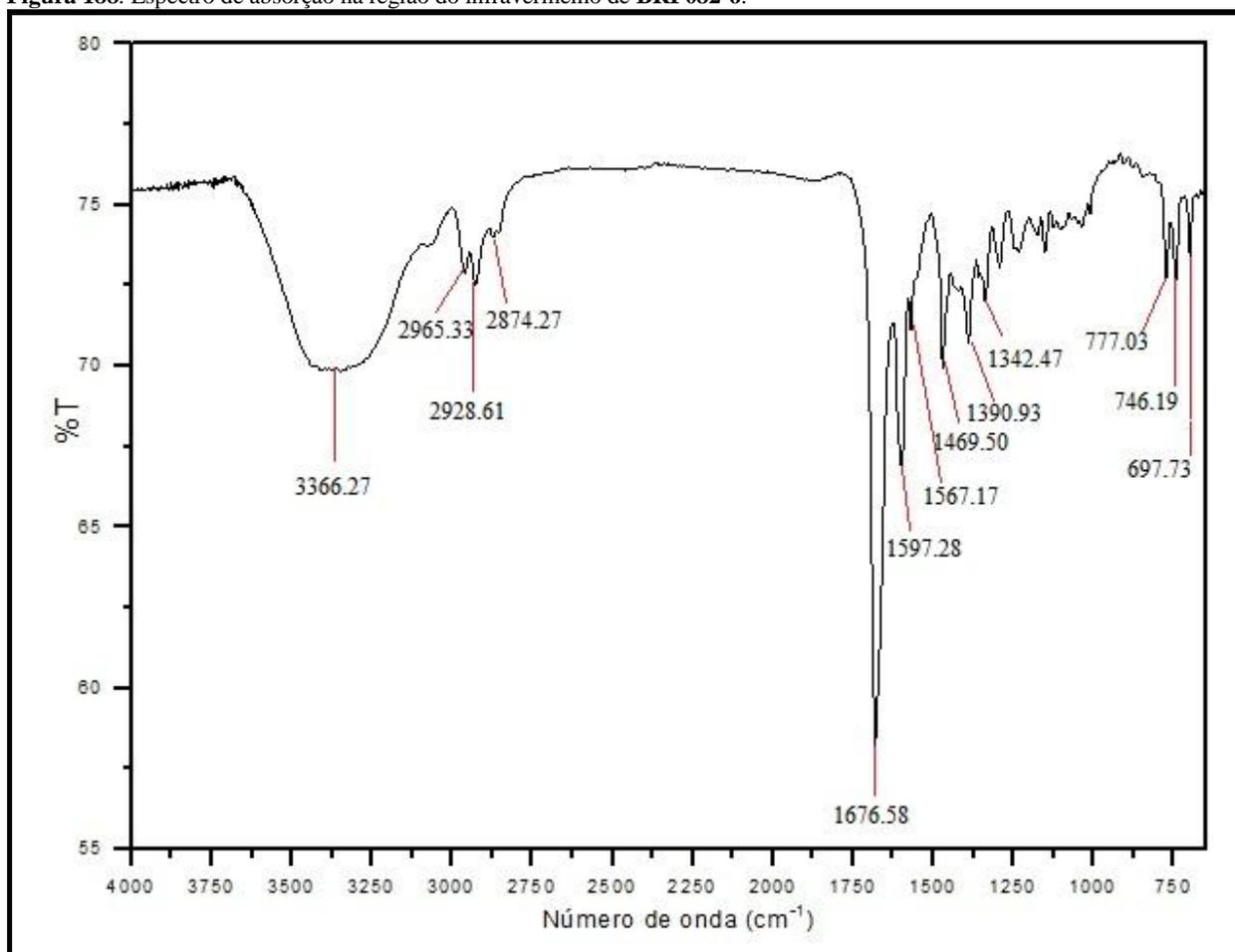


Figura 189. Espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de BRF082-6.

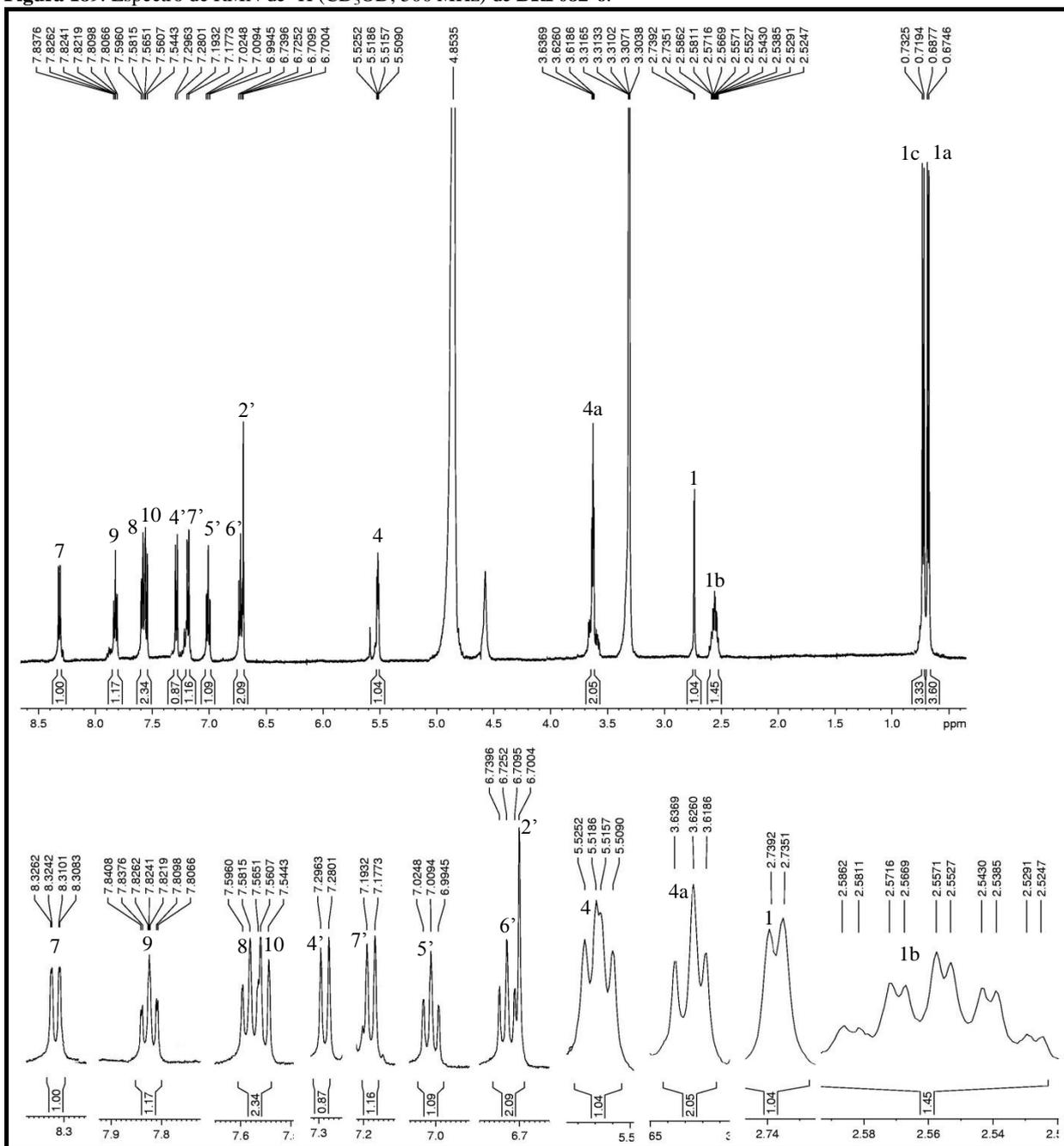


Figura 190. Espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e RMN^{13}C -DEPT 135° de **BRF082-6**.

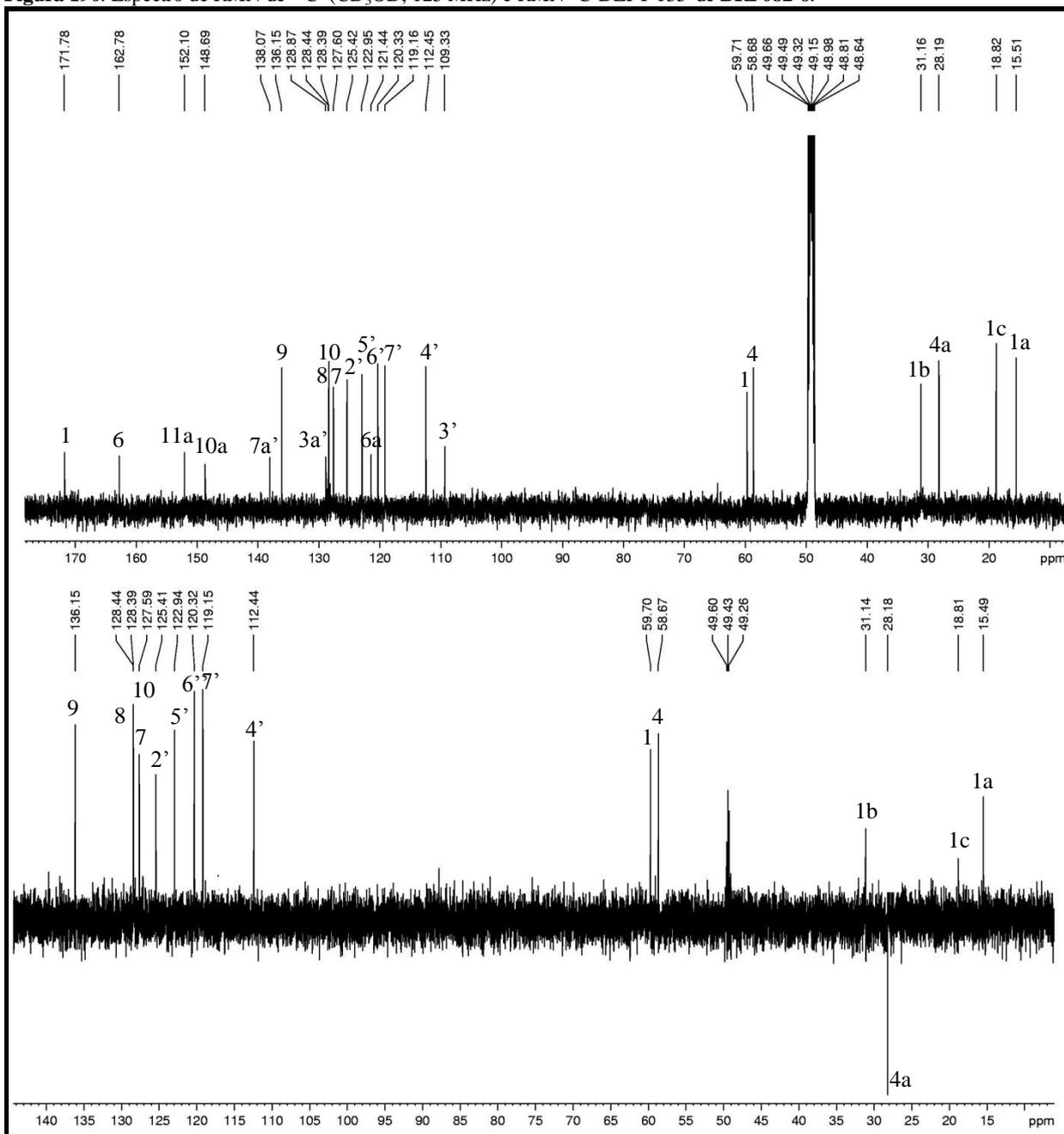


Figura 191. Mapa de contornos COSY de BRF082-6.

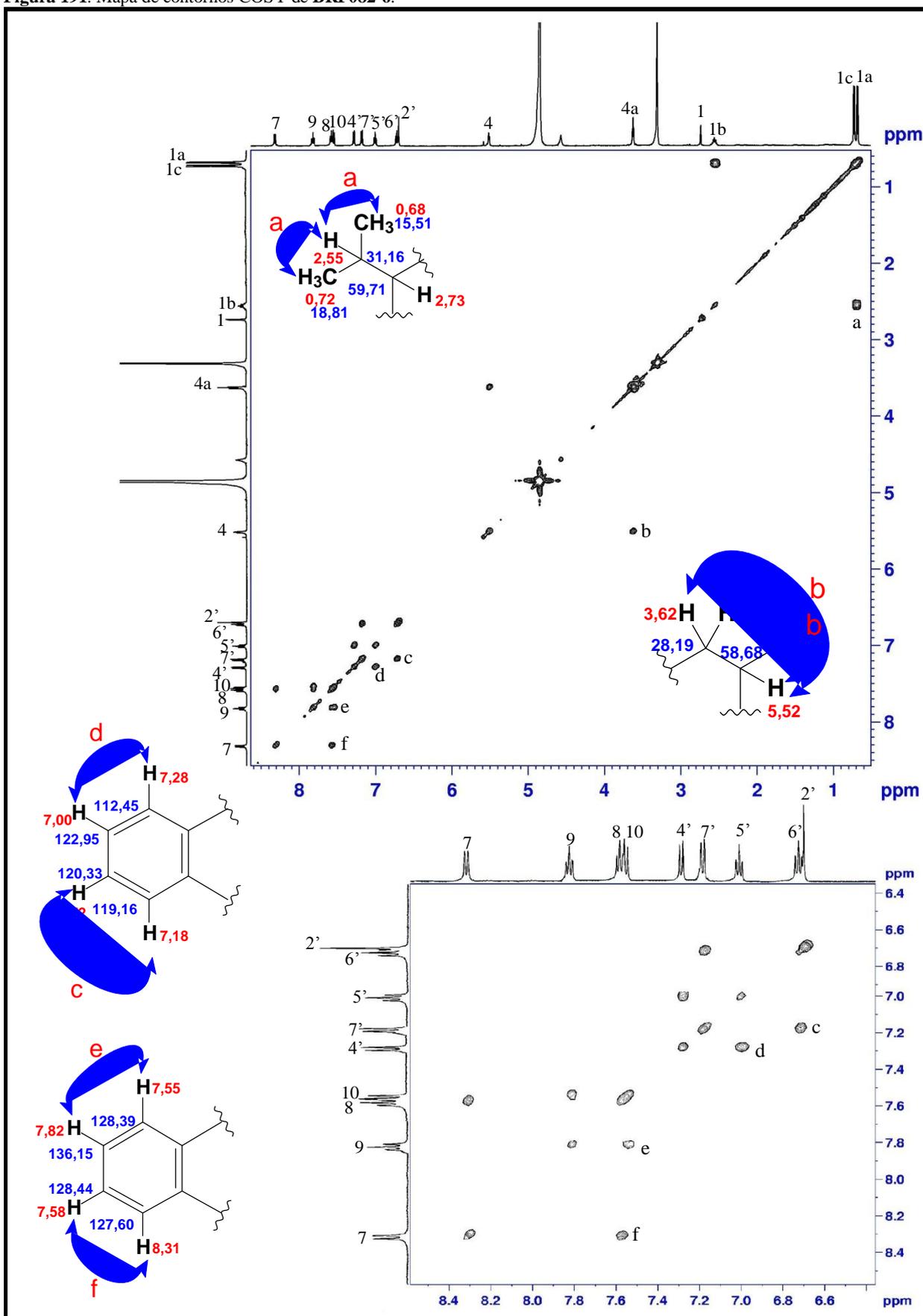


Figura 192. Mapa de contornos HSQC de BRF082-6.

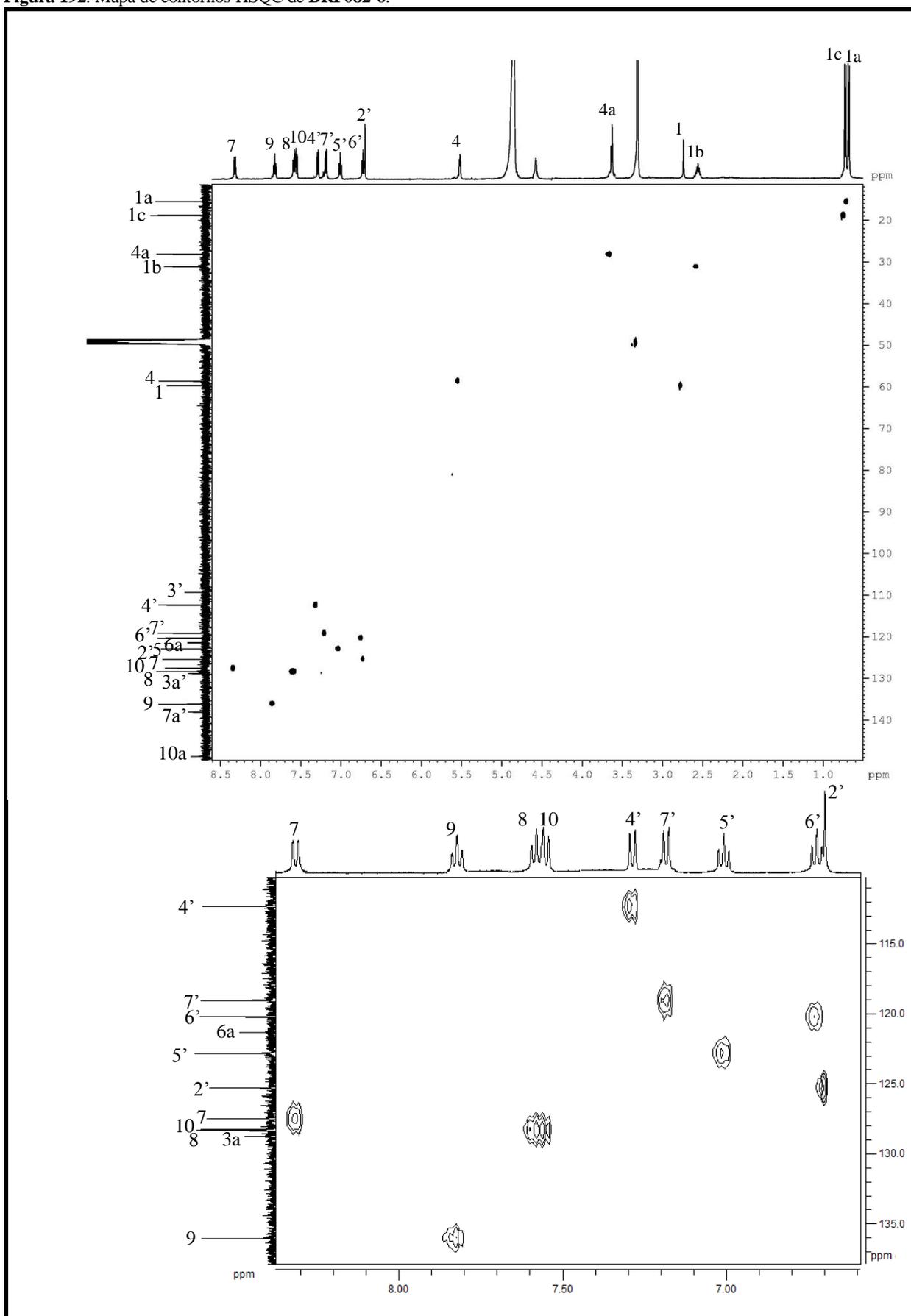


Figura 193. Mapa de contornos HMBC de **BRF082-6** e expansão.

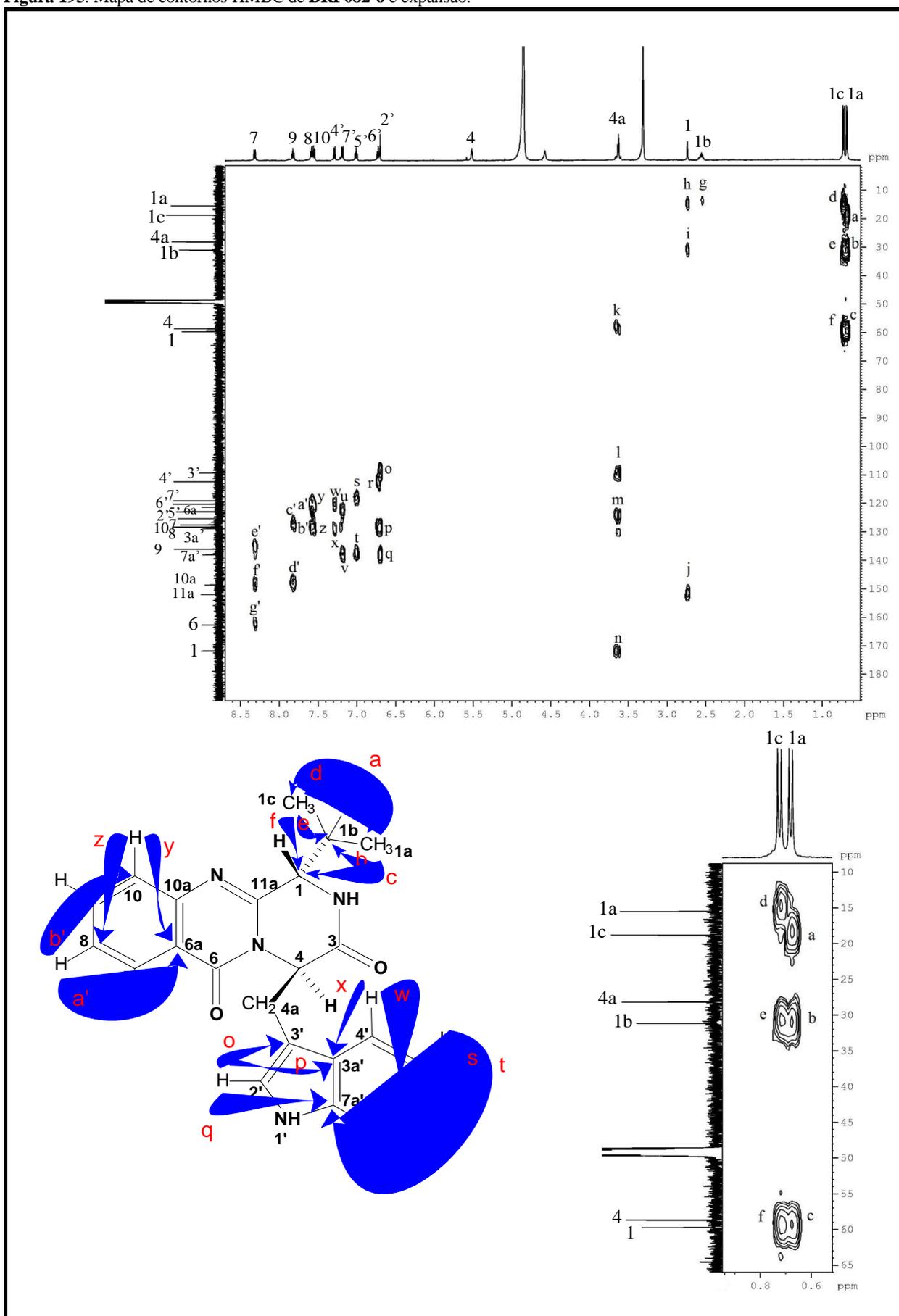
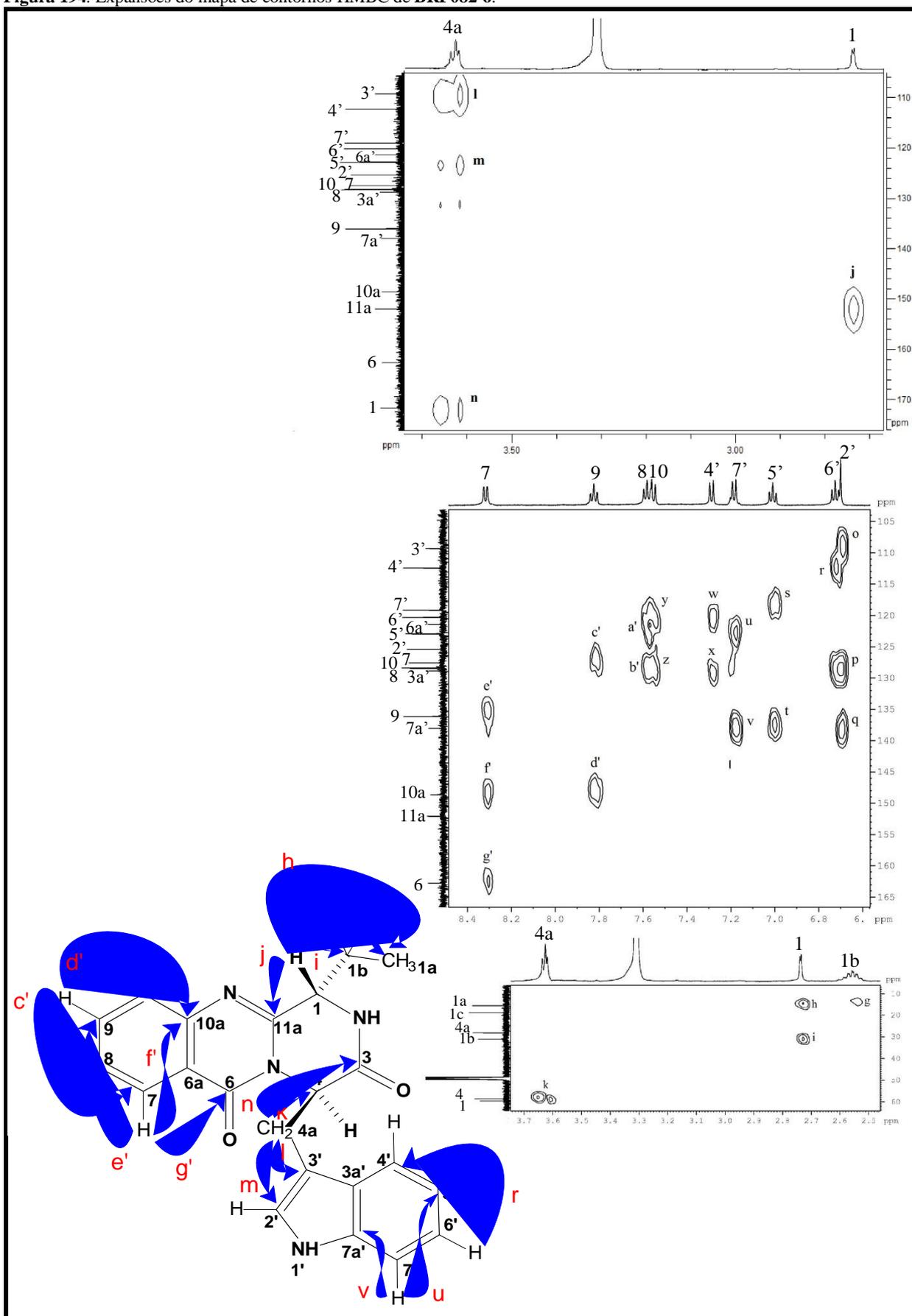


Figura 194. Expansões do mapa de contornos HMBC de BRF082-6.



5.6.4.9 Atividades citotóxicas das substâncias isoladas do segundo cultivo de BRF082 (*D. cejpii*).

As substâncias isoladas do segundo cultivo de **BRF082** foram submetidas a ensaio de atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais HCT-116 e os resultados estão apresentados na Tabela 39. A análise dos valores de inibição e de IC_{50} levou à conclusão de que a substância **BRF082-4** apresenta alta atividade citotóxica contra a referida linhagem celular.

Tabela 39- Percentual de inibição de crescimento celular em uma concentração única de 50 μ g/mL e IC_{50} das substâncias isoladas do segundo cultivo de **BRF082** frente à linhagem tumoral HCT-116. O percentual de inibição foi avaliado pelo ensaio do MTT, 72 h e os valores de IC_{50} , bem como os respectivos intervalos de confiança (CI 95%) foram obtidos por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (*Intuitive Software for Science*, San Diego, CA). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Substância	Inibição (%)	IC_{50} (CI 95%)
BRF082-4 - gliotoxina	99,85	0,41 (0,21 – 0,81)
BRF082-5 - acetilgliotoxina	0,07	> 50
BRF082-6 – fiscalina B	70,23	33,51 (26,20 – 42,87)
Doxorrubicina	100,00	0,47 (0,15-1,44)



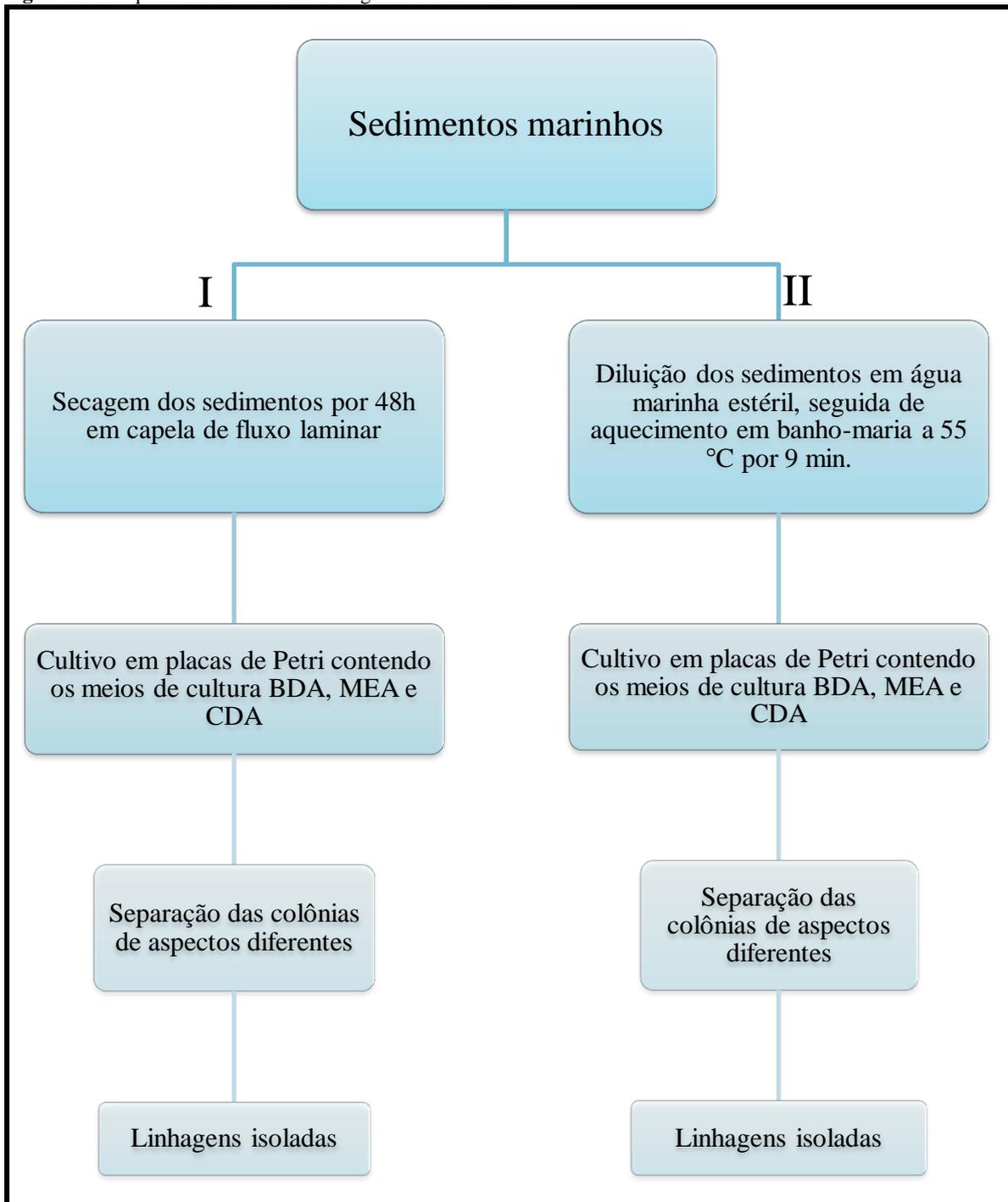
6 Procedimento Experimental

6.1 Isolamento de fungos dos sedimentos das praias do Mucuripe e Pecém-CE

Os sedimentos coletados foram submetidos a dois tratamentos distintos com o objetivo de selecionar as linhagens de fungos mais resistentes e eliminar outros micro-organismos (Figura 195, p. 239). Na primeira metodologia (**I**, Figura 195, p. 239), os sedimentos previamente decantados foram espalhados em uma placa de Petri em uma quantidade suficiente para formar uma fina camada sobre esta. A placa de Petri contendo os sedimentos foi mantida em capela de fluxo laminar por 48h com somente o fluxo ligado. Após esse período, com o auxílio de uma esponja, "carimbou-se" 15 placas de Petri contendo os meios de cultura BDA (5), CDA (5) e MEA (5), preparados com água do mar sintética e antibiótico (penicilina 10000 Units/ml e streptomicina 10000 µg/mL) na concentração de 1% (v/v) para inibir o crescimento de bactérias. Todo o material utilizado, com exceção dos sedimentos, foram previamente esterilizados. Essa metodologia visou selecionar as linhagens de fungos mais resistentes à desidratação. Na segunda metodologia (**II**, Figura 195, p. 239), os sedimentos, previamente decantados foram diluídos em água do mar sintética na proporção de 1 g/10 mL. Essa solução foi aquecida em banho maria a 55 °C por 9 min. Após essa etapa, com o auxílio de uma pequena espátula, estriou-se 15 placas de Petri contendo os meios de cultura BDA (5), CDA (5) e MEA (5), preparados com água do mar sintética e antibiótico (penicilina 10000 Units/ml e streptomicina 10000 µg/mL) na concentração de 1% (v/v) para inibir o crescimento de bactérias. Todo o material utilizado, com exceção dos sedimentos, foram previamente esterilizados. Essa segunda metodologia objetivou selecionar as linhagens de fungos mais resistentes ao aquecimento.

Nos dias que se seguiram, foi possível observar o surgimento de várias colônias, diferenciadas pelo aspecto morfológico a olho nú. Após 15-20 dias de cultivo, estas colônias foram transferidas, isoladamente e em triplicata, para placas de Petri contendo meio BDA preparado com água do mar sintética. Foi possível isolar colônias dos sedimentos da praia do Mucuripe e do Pecém, a maioria delas aparentemente puras. Essas colônias foram devidamente codificadas, as quais foram repicadas mais duas vezes, para o mesmo tipo de meio de cultura (BDA/AM), com o objetivo de torná-las ainda mais puras e mais adaptadas ao ambiente de cultivo. Todo esse processo está esquematizado na figura 195, p. 239.

Figura 195. Esquema de isolamento de fungos de sedimentos marinhos



6.2 Métodos Cromatográficos

6.2.1 Cromatografia em camada delgada

A análise cromatográfica em camada delgada analítica (CCDA) foi feita sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F₂₅₄ – Merck[®] (espessura de 0,2 mm).

A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através de exposição à lâmpada ultravioleta UVSL – 25 da Mineral Light[®], em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) ou pulverização ou imersão com solução de vanilina (C₈H₈O₃) e ácido perclórico (HClO₄) em etanol (C₂H₆O).

6.2.2 Cromatografia em coluna (CC)

Para os procedimentos de cromatografia em coluna de fase reversa foram utilizados cartuchos de sílica C18 (ODS) em dois tamanhos diferentes. Para análises com pouca quantidade (< 20 mg) de extrato foi usado um cartucho ODS Varian Bond Elut lcr de 1 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro. Para os com maior quantidade (> 20 mg) de extrato foi usado um cartucho ODS Strata Phenomenex de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro. Para os procedimentos de cromatografia em coluna de fase normal, foi empregado gel de sílica 60 (Φ μm 63-200) da Merck. Os comprimentos das colunas para cromatografia de fase normal variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas.

6.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em um sistema Shimadzu UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A. Foi utilizada coluna analítica de fase reversa Phenomenex[®] (4,6 x 250 mm, 5 μm) e uma coluna semipreparativa de fase reversa Phenomenex[®] (10,0 x 250 mm, 5 μm).

6.3 Solventes

Os solventes utilizados nas extrações, assim como nas análises cromatográficas foram de procedência PA - Sinth[®] e Vetec[®]. As análises por CLAE foram feitas com solventes graus CLAE -Tedia[®] e foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 μm. As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 μm.

6.4 Métodos espectrométricos

6.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE/EM)

No Laboratório de Espectrometria em Massas do Nordeste (LEMANOR) na Universidade Federal do Ceará (UFC), foram realizadas as análises de CLAE-EM. Foi utilizado um sistema de Cromatografia líquida de alta eficiência modelo Shimadzu UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A, acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução massa modelo LCMS-IT-TOF (Shimadzu) com ionização por *electrospray* (EMAR-IES). Estes espectros foram registrados num espectrômetro sendo os *scans* adquiridos no modo positivo e negativo. Condições: voltagens do *end plate* 3500 V e do capilar 4000 V, temperatura e fluxo de gás seco: 150 °C e 150 µL/h. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizador. As separações foram feitas usando uma coluna de fase reversa octadecilsilano Phenomenex[®] (2,0 x 150 mm, 5µm).

6.4.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) foram realizados em espectrômetros Bruker[®]DPX 300 e DRX 500, do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) na UFC.

6.4.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), em espectrômetro PERKIM - ELMER[®] modelo FT – IR SPECTRUM 1000 utilizando pastilhas de KBr para as amostras sólidas e filmes em NaCl para as amostras líquidas e/ou sóluveis em clorofórmio.

6.5 Esterilização e preparação de meios de cultura

A esterilização de vidrarias e meios de culturas foi realizada no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) – UFC. Os procedimentos de esterilização foram realizados em autoclave vertical Phoenix[®] AV 75 e a repicagem nos meios de cultura em capelas de fluxo laminar Labconco[®] MOD # 8089000.

6.5.1 Preparações dos meios de cultura

No isolamento e estudo químico das linhagens **BRF019** (*Aspergillus terreus*) e **BRF082** (*Dichotomomyces cejpui*) foram utilizados os meios semi-sólido (BDA) e líquido (caldo de batata), com água do mar sintética, preparados conforme procedimentos descritos a seguir.

6.5.1.1 Meio semi-sólido BDA

Utilizou-se o meio semi-sólido BDA da marca Himedia[®], na proporção de 36 g para cada litro de água marinha sintética (Item 6.5.1.3). O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos, e vertido em placas de Petri, ainda quente, em capela de fluxo laminar previamente esterilizada por radiação UV. O pH do meio foi de 6,5.

6.5.1.2 Meio líquido de caldo de batata

Utilizou-se o meio caldo de batata da marca Himedia[®], na proporção de 24 g para cada litro de água do mar sintética (Item 6.5.1.3). O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C, por 15 minutos, após serem distribuídos em frascos de Erlenmeyer. O pH do meio foi de 6,5.

6.5.1.3 Água do mar sintética

A água do mar sintética foi preparada utilizando NaCl (15,153 g/L), MgCl₂. 6H₂O (3,13 g/L), MgSO₃. 7H₂O (3,87 g/L), CaCl₂. 2H₂O (9,88 g/L), KCl (0,414 g/L) e NaHCO₃ (0,116 g/L).

6.6 Micro-organismos

6.6.1 Obtenção e identificação dos fungos

A coleta de sedimentos nas praias do Mucuripe (3°43'17,70''S; 38°29', 23,84''O – Fortaleza-CE) e Pecém (3°32'2''S; 38°47'58''O – Pecém-CE), realizada através de mergulho autônomo pelo grupo de Ecotoxicologia Marinha da UFC, resultou na obtenção de 35 linhagens dos sedimentos do Mucuripe e de 48 linhagens dos sedimentos do Pecém, no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) da UFC conforme procedimento descrito no Item 6.1, p. 238.

Dentre os fungos obtidos, são objeto de estudo deste trabalho os de siglas **BRF019** e **BRF082**, posteriormente identificados como *Aspergillus terreus* e *Dichotomomyces cejprii* (Item 5.4, p. 83), respectivamente. Tais linhagens foram submetidas à prévia identificação morfológica, seguida de posterior identificação filogenética, no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, no Departamento de Fitopatologia, pelo Dr Lucas Magalhães de Abreu e pelo Dr. Ludwig Heinrich Pfenning, na UFLA (Universidade Federal de Lavras).

A identificação filogenética foi realizada através de extração do DNA, seguida de amplificação (PCR)²⁰ e sequenciamento de um fragmento do gene codificador da segunda maior subunidade da RNA polimerase (RPB2). As sequências obtidas foram alinhadas com 147 sequências de isolados de referência de espécies de *Aspergillus*²¹ (HOUBRAKEN e SAMSON 2011; PETERSON, 2008) e submetidas à análise filogenética pelo método *Neighbor Joining*. Tal alinhamento resultou na árvore da Figura 42, p. 84 para **BRF019**, e na árvore da Figura 44, p. 85 para **BRF082** (Item 5.4, p. 83).

Uma segunda análise foi realizada segundo o método de Inferência Filogenética Bayesiana, utilizando sequências de referência de espécies próximas a *Aspergillus terreus* (SAMSON *et al.*, 2011) e *Dichotomomyces cejprii* (VARGA *et al.*, 2007). Foram geradas, para **BRF019** e **BRF082**, as árvores das Figuras 43 e 45, p. 85 (Item 5.4, p. 83).

6.6.2 Preservação dos microrganismos

Os fungos foram inicialmente incubados em meio de cultura semi-sólido batata-dextrose-ágar (BDA) por 15 dias e, em seguida, preservados em óleo mineral para evitar a desidratação dos mesmos, isolando-os do contato com o ar, e reduzindo ao mínimo seus metabolismos (MENEZES, 1993). O procedimento de conservação em óleo mineral encontra-se descrito a seguir:

- Cada fungo foi repicado em tubo de ensaio contendo cerca de 5 mL (metade do volume do tubo de ensaio) do meio cultura BDA solidificados com inclinação.
- A cultura fúngica foi incubada a temperatura ambiente por 15 dias.
- O ágar inclinado, contendo as estruturas do fungo, foi coberto com óleo mineral Nujol[®] (previamente autoclavado a 121 °C por 15 min) e estocado a temperatura ambiente.

²⁰ Do inglês *Polimerase chain reaction* ou Reação em cadeia da polimerase (BARTLETT, STIRLING, 2003).

²¹ O gênero *Aspergillus* foi utilizado devido à prévia identificação morfológica das espécies como *Aspergillus terreus* e *Eurotium sp.* – esta última, uma fase sexuada de alguma espécie *Aspergillus* (Item 5.4, p. 83).

As culturas fúngicas preservadas através dessa metodologia descrita serviram de matriz para todos os estudos realizados nesse trabalho.

6.6.3 Cultivos em pequena escala dos isolados BRF012-BRF046

Foram utilizados 37 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (batata-dextrose) com água do mar sintética (Item 6.5.1.3 p. 242). Em cada frasco de Erlenmeyer, foi colocado um disco ($\phi = 6\text{mm}$) de cada cultura fúngica dos isolados do Mucuripe. Em dois frascos de Erlenmeyer não foi adicionado inóculo, os quais serviram como controle.

As extrações foram realizadas após 14 dias de crescimento. O micélio foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Os extratos do meio líquido foram concentrados por destilação do solvente a pressão reduzida e analisados por CCDA. Os 35 extratos obtidos, juntamente com os extratos dos controles, foram submetidos a teste citotóxico descrito no Item 6.7.

6.6.4 Cultivos em pequena escala dos isolados BRF047-BRF094

Foram utilizados 50 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (batata-dextrose) com água do mar sintética (Item 6.5.1.3 p. 242). Em cada frasco de Erlenmeyer, foi colocado um disco ($\phi = 6\text{mm}$) de cada cultura fúngica dos isolados do Pecém. Em dois frascos de Erlenmeyer não foi adicionado inóculo, os quais serviram como controle.

As extrações foram realizadas após 14 dias de crescimento. O micélio foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Os extratos do meio líquido foram concentrados por destilação do solvente sob pressão reduzida e analisados por CCDA. Os 48 extratos obtidos, juntamente com os extratos dos controles, foram submetidos a teste citotóxico descrito no Item 6.7.

6.7 Teste citotóxico

A atividade citotóxica de extratos, frações e substâncias isoladas foi avaliada no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da UFC, sob a coordenação da Profa. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.

Os ensaios para os extratos dos isolados do Mucuripe e Pecém e para os extratos, frações e substâncias puras dos fungos *Aspergillus terreus* (**BRF019**) e *Dichotomomyces cejprii* (**BRF082**) foram realizados com a linhagem tumoral humana HCT-116, a qual foi cedida pelo

Instituto Nacional do Câncer (EUA), cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantida em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras a serem testadas foram diluídas em DMSO puro estéril para uma concentração final de 50 µg/ml. As células foram plaqueadas na concentração de 0,7 x 10⁵ cél/mL. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução do sal de tetrazolium MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm. O experimento quantitativo, para cálculo da IC₅₀, é realizado do mesmo modo, sendo que, em vez de uma única concentração de amostra (50 µg/ml), é utilizada uma curva de diluições seriadas e são testadas nove concentrações entre 0,2 - 50 µg/ml.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

6.8 Otimização do cultivo das linhagens marinhas BRF019 (*A. terreus*) e BRF082 (*D. cejpii*) para a produção de metabólitos secundários

6.8.1 Otimização do período de cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética

Foram utilizados 12 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (batata-dextrose) para a otimização do cultivo de cada linhagem (Itens 5.5.1, p. 86 e 5.6.1, p. 155) com água do mar sintética. A cada frasco de Erlenmeyer foi colocado um disco ($\phi = 6$ mm) da cultura fúngica em BDA também com água do mar sintética. Em seis frascos de Erlenmeyer não foi adicionado inóculo, os quais serviram como controle.

Foram realizadas extrações a cada sete dias de crescimento, 2 frascos de Erlenmeyer (um com o fungo e o outro o branco) foram sacrificados para extração com solvente orgânico. O micélio foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo, seco em estufa a 40°C durante 30 min e pesado. O meio líquido foi submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Os extratos obtidos foram concentrados por destilação do solvente a pressão reduzida e analisados por CCDA. Assim, ao final de 42 dias de crescimento, foram realizadas 6 extrações (dias: 7, 14, 21, 28, 35 e 42). As massas das frações obtidas a cada dia de extração desse cultivo estão demonstradas nas Tabelas 8 e 24, p. 86 e 156.

6.9 Primeiro cultivo em grande escala de BRF019 (*A. terreus*)

Foram empregados 32 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio BD em cada, dos quais 2 foram utilizados como controle. Após 14 dias de crescimento, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido extraído com 3 x 200 mL de AcOEt, o qual foi concentrado obtendo-se 5,64 g de extrato bruto de **BRF019**

6.9.1 Fracionamento cromatográfico do extrato orgânico de BRF019

Uma quantidade de 5,64 g do extrato orgânico de **BRF019** foi submetida à purificação em cartucho de C18 (Strata Phenomenex) de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes (50 mL) H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas frações estão descritas na Tabela 10, p. 88.

6.9.2 Análises cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento do extrato orgânico de BRF019

Todas as amostras obtidas do fracionamento do extrato orgânico de **BRF019** em cartucho de C18 foram submetidas à CLAE. Para a obtenção dos perfis cromatográficos e posterior desenvolvimento de método de isolamento, usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH/H₂O variando a concentração de MeOH de 10 a 90% por 80 min com fluxo de 0,5 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL.

6.9.3 Fracionamento da amostra H₂O 100% (amostra 1)

A amostra H₂O 100% (amostra 1, Tabela 10, p. 88) obtida do fracionamento do extrato orgânico de **BRF019** em cartucho de C18, foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica, com 30 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes 10 mL de Hexano/AcOEt 7:3, 70 mL de Hexano/AcOEt 6:4, 70 mL de Hexano/AcOEt 1:1, 30 mL de AcOEt/Hexano 6:4, 30 mL de AcOEt/Hexano 7:3, 30 mL de AcOEt/Hexano 8:2, 60 mL de AcOEt/Hexano 9:1, 50 mL de AcOEt 100% e 100 mL de MeOH 100%. As frações Hexano/AcOEt 1:1 e AcOEt/Hexano 6:4 foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida, fornecendo um extrato denominado Fração A. A fração AcOEt/Hexano 9:1 forneceu um sólido

cristalino incolor em forma de agulhas e passou a ser chamada de fração B. As frações seguintes foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida, fornecendo um extrato denominado Fração C. As massas das frações A, B e C estão apresentadas na Tabela 11, p. 88.

6.9.4 Fracionamento da fração A

A fração A (Tabela 11, p. 88) foi submetida à CLAE. Para o desenvolvimento cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente ACN:H₂O variando-se a concentração de ACN de 2,5 a 90% por 80 min com um fluxo de 0,5 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático ACN:H₂O (1:1) em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240) com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/1 mL. O tempo de corrida foi de 17 minutos.

6.9.5 Fracionamento da fração B

A fração B (Tabela 11, p. 88) foi obtida através de cromatografia em coluna, conforme descrito no Item 5.5.3.1, p. 87. A CCDA desta fração mostrou que a mesma estava impura, tendo sido então submetida à cromatografia em coluna de sílica gel, com 30 cm de altura e 2,4 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes 50 mL de Hexano/AcOEt 1:1, 50 mL de AcOEt/Hexano 8:2, 50 mL de AcOEt 100% e 100 mL de MeOH 100%. A fração AcOEt/Hexano 8:2 foi concentrada sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido cristalino incolor em forma de agulhas, denominado **BRF019-1**.

6.9.6 Fracionamento da fração C

A fração C (Tabela 11, p. 88) foi submetida à CLAE. Para o desenvolvimento cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente ACN:H₂O variando-se a concentração de ACN de 2,5 a 90% por 80 min com um fluxo de 0,5 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático ACN:H₂O (2,5:97,5) em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240) com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/1 mL.

6.10 Segundo cultivo em grande escala de BRF019

Foram empregados 62 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio BD em cada, dos quais 2 foram utilizados como controle. Após 14 dias de crescimento, separou-se

o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido extraído com 3 x 200 mL de AcOEt, o qual foi concentrado obtendo-se o extrato bruto. Este foi submetido a uma partição líquido-líquido com 400 mL de AcOEt:H₂O 1:1 para retirada de sais do extrato, os quais saem na fase aquosa. A fase aquosa foi particionada com 4 x 400 mL de AcOEt. As duas frações AcOEt foram então concentradas, obtendo-se o extrato dessalificado. Esse extrato foi então submetido a um processo de desengorduramento através de partição líquido-líquido com MeOH:H₂O 9:1, obtendo-se 1,45 g de extrato dessalificado e desengordurado de **BRF019**, o qual foi chamado de fração **BRF019** meio líquido MeOH 90 %.

6.10.1 Fracionamento cromatográfico da fração BRF019 meio líquido MeOH 90 %

Uma quantidade de 1,45 g da fração **BRF019** meio líquido MeOH 90 % foi submetida à purificação em cartucho de C18 (Strata Phenomenex) de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes (50 mL) H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas subfrações estão descritas na Tabela 15, p. 115.

6.10.2 Fracionamento da subfração H₂O/MeOH 6:4 (amostra 3)

A subfração H₂O/MeOH 6:4 (amostra 3, Tabela 15, p. 115) (179,0 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.10.1 foi submetida à CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método também gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 60 min em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 8 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 16, p. 117. O cromatograma está apresentado na Figura 77, p. 117.

6.10.3 Fracionamento da subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4)

A subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4, Tabela 15, p. 115) (185,1 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.10.1, foi submetida à CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 80 min com fluxo

de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método também gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 60 min em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 23 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 19, p. 140. O cromatograma está apresentado na Figura 101, p. 140.

6.10.4 Fracionamento da subfração MeOH /H₂O 7:3 (amostra 5)

A subfração MeOH /H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 15, p. 115) (356,1 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.10.1, p. 248, foi submetida à CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método também gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 40 a 100% por 50 min em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 10 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 21, p. 154. O cromatograma está apresentado na Figura 115, p. 154.

6.10.5 Fracionamento da subfração MeOH /H₂O 8:2 (amostra 6)

A subfração MeOH /H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 15, p. 115) (97,7 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.10.1, p. 248, foi submetida à CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 40 a 100% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método também gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 40 a 100% por 50 min em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 6 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 22, p. 155. O cromatograma está apresentado na Figura 116, p. 155.

6.11 Primeiro cultivo em grande escala de BRF082 (*D. cejpii*)

Foram empregados 77 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio BD em cada, dos quais 2 foram utilizados como controle. Após 14 dias de crescimento, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido extraído com 3 x 200 mL de AcOEt, o qual foi concentrado obtendo-se 1,36 g de extrato bruto. Este foi submetido a uma partição líquido-líquido com 400 mL de AcOEt:H₂O 1:1 para retirada de sais do extrato, obtendo-se 1,11 g de fração AcOEt. A fase aquosa foi particionada com 4 x 400 mL de AcOEt, obtendo-se 47,0 mg de fração AcOEt. As duas frações AcOEt foram então concentradas, obtendo-se 1,16 g de extrato dessalificado. Esse extrato foi então submetido a um processo de desengorduramento através de partição líquido-líquido com MeOH:H₂O 9:1, obtendo-se 1,39 g de extrato dessalificado e desengordurado de **BRF082**, chamado de **BRF082** meio líquido MeOH 90 %.

6.11.1 Fracionamento cromatográfico de BRF082 meio líquido MeOH 90 %

Uma quantidade de 1,39 g de BRF082 meio líquido MeOH 90 % foi submetida à purificação em cartucho de C18 (Strata Phenomenex) de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes (50 mL) H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas subfrações estão descritas na Tabela 26, p. 158.

6.11.2 Análises cromatográficas das amostras obtidas do fracionamento de BRF082 meio líquido MeOH 90 %

Todas as amostras obtidas do fracionamento de **BRF082** meio líquido MeOH 90 % em cartucho de C18 foram analisadas por CLAE. Para a obtenção dos perfis cromatográficos e posterior desenvolvimento de método de isolamento, usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH/H₂O variando a concentração de MeOH de 10 a 90% por 80 min com fluxo de 0,5 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL.

6.11.3 Fracionamento da subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5)

A subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 26, p. 158) (165,3 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.11.1, foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 80 min

com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático MeOH:H₂O 55:45, por 22 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3 p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 16 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 28, p. 159. O cromatograma está apresentado na Figura 119, p. 159.

6.12 Segundo cultivo em grande escala do fungo *D. cejpii*.

Foram empregados 102 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio BD em cada, dos quais 2 foram utilizados como controle. Após 14 dias de crescimento, separou-se o micélio do meio líquido por filtração à vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido extraído com 3 x 200 mL de AcOEt, o qual foi concentrado obtendo-se o extrato bruto. Este foi submetido a uma partição líquido-líquido com 400 mL de AcOEt:H₂O 1:1 para retirada de sais do extrato, os quais saem na fase aquosa. A fase aquosa foi particionada com 4 x 400 mL de AcOEt. As duas frações AcOEt foram então concentradas, obtendo-se o extrato dessalificado. Esse extrato foi então submetido a um processo de desengorduramento através de partição líquido-líquido com MeOH:H₂O 9:1, obtendo-se 1,67 g de extrato dessalificado e desengordurado de *D. cejpii*, chamado de BRF082 meio líquido MeOH 90 % - 2.

6.12.1 Fracionamento cromatográfico de BRF082 meio líquido MeOH 90 % - 2

Uma quantidade de 1,45 g do extrato de **BRF082** meio líquido MeOH 90 % foi submetida à purificação em cartucho de C18 (Strata Phenomenex) de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes (50 mL) H₂O 100%; H₂O/MeOH 8:2; H₂O/MeOH 6:4; H₂O/MeOH 1:1; MeOH/H₂O 7:3; MeOH/H₂O 8:2; MeOH/H₂O 9:1 e MeOH 100%. As massas dessas frações estão descritas na Tabela 32, p. 195.

6.12.2 Fracionamento da subfração H₂O/MeOH 1:1 (amostra 4)

A subfração MeOH/H₂O 1:1 (amostra 4, Tabela 32, p. 195) (197,6 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.12.1, foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente ACN:H₂O variando a concentração de ACN de 30 a 100% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em ACN 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a

um método isocrático ACN:H₂O 32:68, por 15 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 9 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 37, p. 222. O cromatograma está apresentado na Figura 155, p. 196.

6.12.3 Fracionamento da subfração MeOH /H₂O 7:3 (amostra 5)

A subfração MeOH/H₂O 7:3 (amostra 5, Tabela 32, p. 195) (195,1 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.12.1, p. 251, foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático MeOH:H₂O 55:45, por 30 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 9 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 36, p. 221. O cromatograma está apresentado na Figura 180, p. 221.

6.12.4 Fracionamento da subfração MeOH /H₂O 8:2 (amostra 6)

A subfração MeOH/H₂O 8:2 (amostra 6, Tabela 32, p. 195) (47,3 mg), obtida do tratamento descrito no Item 6.12.1, p. 251, foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica (Item 6.2.3, p. 240) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 30 a 100% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min e permanecendo em MeOH 100% durante 20 minutos. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/1 mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático MeOH:H₂O 60:40, por 32 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa (Item 6.2.3, p. 240), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/ mL. Foram coletadas 3 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 37, p. 222. O cromatograma está apresentado na Figura 181, p. 222.

6.13 Teste pareado

Cada linhagem foi incubada, paralelamente, em duas placas de Petri, uma contendo o meio BDA (Item 6.5.1.1, p. 242) preparado com água destilada, e outra contendo o meio BDA

preparado com água marinha sintética (tem 6.5.1.1, p. 242). Após 14 dias de crescimento, as linhagens eram fotografadas, e as diferenças morfológicas visíveis a olho nu, observadas (Apêndices 1 e 2).



7. CONCLUSÃO

O objetivo geral deste trabalho foi prospectar metabólitos secundários produzidos por fungos marinhos isolados da costa cearense. O trabalho foi realizado, inicialmente, através do isolamento de cepas de sedimentos coletados nas praias do Mucuripe e do Pecém, num total de 35 e 48 cepas, respectivamente. Esta etapa do trabalho contribuiu para o conhecimento e recuperação da biodiversidade de microrganismos marinhos do Ceará. Dos fungos isolados, **BRF024** (Praia do Mucuripe) e **BRF059** (Praia do Pecém) não cresceram em meio sem salinidade, o que sugeriu serem espécies marinhas obrigatórias. Ainda sobre os isolados fúngicos, as cepas **BRF019** e **BRF082** foram identificadas como *Aspergillus terreus* e *Dichotomomyces cejpui*, respectivamente, por análise molecular. Vale ressaltar, que ambas já haviam sido isoladas de fontes marinhas e terrestres, corroborando a ampla adaptação de fungos filamentosos em diferentes *habitats*.

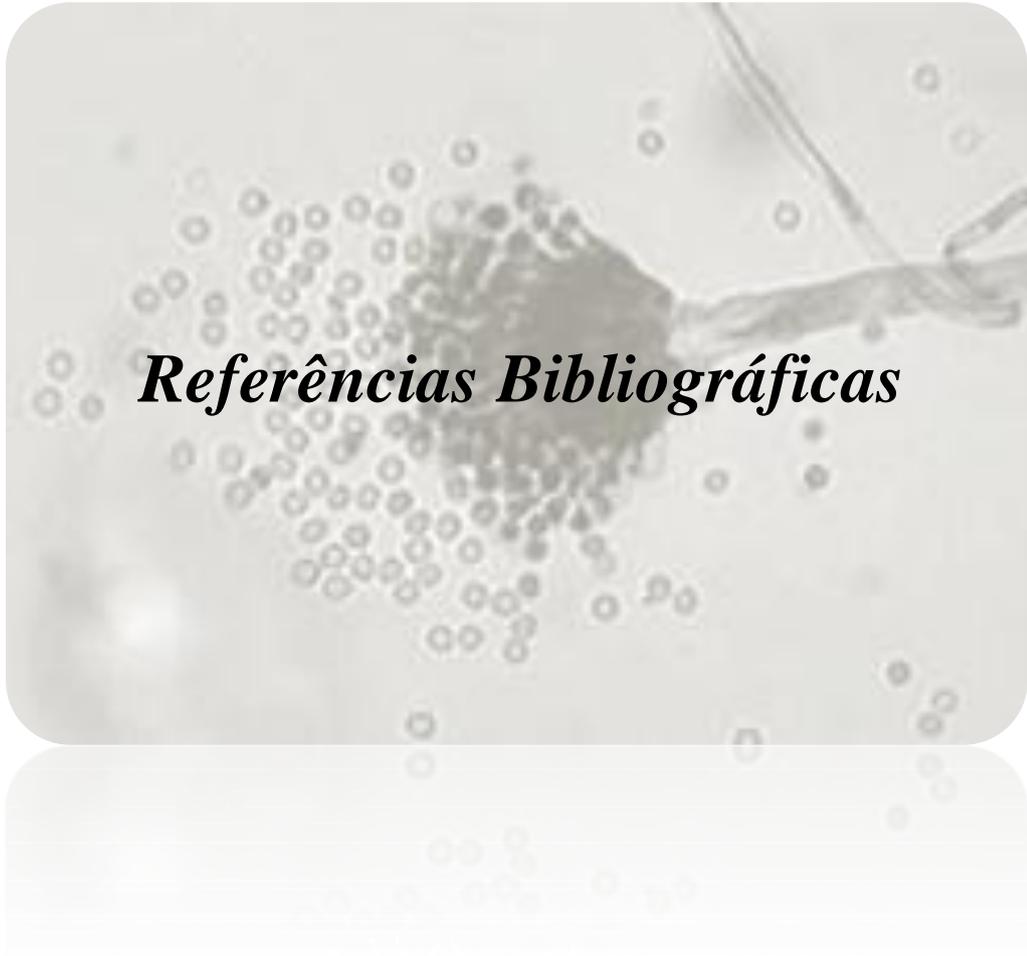
Extratos dos 83 fungos isolados foram bioensaiados frente às células tumorais humanas HCT-116, o que resultou na identificação de 26 fungos (31%) com potencial citotóxico (inibição >75%). Este resultado corroborou a importância da biodiversidade microbiana marinha do Ceará na identificação de fungos promissores para estudo de bioprospecção.

As cepas cujos extratos foram os mais citotóxicos, **BRF019** (95,48%) e **BRF082** (100,00%), foram selecionados para cultivo em grande escala e fracionamento bioguiado. O estudo com **BRF019** resultou no isolamento e caracterização estrutural dos seguintes compostos: Terreína, 6-hidroximeleína, butirólactonas I, II e V. Entretanto, nenhum destes foi identificado como responsável pela atividade citotóxica do extrato inicial. Este resultado sugeriu que a atividade poderia estar associada a constituintes minoritários que não foram isolados.

Do estudo com o fungo **BRF082**, foi possível isolar os compostos gliotoxina, acetilgliotoxina, acetilgliotoxina G, 6-acetilbismetiltiogliotoxina, bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina e fiscalina B. Destes, gliotoxina e acetilgliotoxina G apresentaram IC_{50} 0,41 e 1,06, respectivamente, que estão em concordância com a atividade observada no extrato inicial (100,00%). Assim, foi possível sugerir que estes dois compostos são os princípios ativos do extrato.

Dentre os compostos isolados, somente a acetilgliotoxina G foi descrita pela primeira vez como produto natural. Embora já descritos na literatura, os compostos acetilgliotoxina, acetilgliotoxina G, 6-acetilbismetiltiogliotoxina, bis(detio)bis(metiltio)gliotoxina e fiscalina B

foram identificados pela primeira vez como metabólitos secundários de *Dichotomomyces cejpii*.

A grayscale microscopic image showing a large, dense cluster of small, circular cells. The cells are arranged in a roughly spherical pattern, with some individual cells visible around the periphery. The background is light and slightly out of focus. The text "Referências Bibliográficas" is overlaid in the center of the image.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, W.; ARFMANN, H. 12,13-dihidroxy-fumitremorgin C from *Aspergillus fumigatus*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1025-1026, 1990.
- ABRAHAM, E. P.; FLOREY, H. W. Substances produced by Fungi Imperfecti and Ascomycetes, p. 273, em FLOREY, H. W.; CHAIN, E.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; SANDERS, A G.; ABRAHAM, E. P.; FLOREY, M. E. ed. **Antibiotics**, vol. 1. Oxford University Press, London, 1949.
- ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *The American Journal of Cardiology*, v. 62 (15), p. 10-15, 1998.
- AL TRABOLSY, Z. B. K.; ANOUAR, El H.; ZAKARIA N. S. S.; SHIDA, N. S.; ZULKEFLEE, B.; HASAN, M. H.; ZIN, M. M.; AHMAD, R.; SULTAN, S.; WEBER, J-F, F. Antioxidant activity, NMR, X-ray, ECD and UV/vis spectra of (+)-terrein: Experimental and theoretical approaches. **Journal of Molecular Structure**, v. 1060, p. 102–110, 2014.
- ARAI, K.; YOSHIMURA, T.; ITATANI, Y.; YAMAMOTO, Y. Metabolic products of *Aspergillus terreus*. VIII. Astepyrone: A novel metabolite of the strain IFO 4100. **Chem. Pharm. Bull.**, vol. 31, p. 925–933, 1983.
- ARAKAWA, M.; SOMENO, T.; KAWADA, M.; IKEDA, D. A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. **Journal of Antibiotics**, v. 61, p. 442–448, 2008.
- ARTHAUD, I. D. B.; RODRIGUES, F. A. R.; JIMENEZ, P. C.; MONTENEGRO, R. C.; ANGELIM, A. L.; MACIEL, V. M. M.; SILVEIRA, E. R.; FREITAS, H. P. S.; SOUSA, T. S.; PESSOA, O. D. L.; LOTUFO, T. M. C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Studies on the Secondary Metabolites of a *Pseudoalteromonas* sp. Isolated from Sediments Collected at the Northeastern Coast of Brazil. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, p. 418-427, 2012.
- ASHA, K. N.; CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Steroids and polyketides from *Uvaria hamiltonii* stem bark. **Acta Pharmaceutica**, v. 54, p. 57, 2004.
- ASOLKAR, R. N.; JENSEN, P. R.; KAUFFMAN, C. A.; FENICAL, W. Daryamides A-C, Weakly Cytotoxic Polyketides from a Marine-Derived Actinomycete of the Genus *Streptomyces* Strain CNQ-085. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1756-1759, 2006.
- BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. **PCR Protocols**, v. 226, p. 3–6, 2003.
- BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A.; New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. I. Fermentation, isolation and antibacterial properties, **Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 1099-1101, 1978.
- BEECHAM A. F., FRIDRICHSONS J., MATHIESON A. The structure and absolute configuration of gliotoxin and sporidesmin. **Tetrahedron Letters**, p. 3131-3183, 1966.

BELL, J.J. The Functional Roles of Marine Sponges, Review. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, p. 341-353, 2008.

BELL, M. R., J. R. JOHNSON, B. S. WILDI, e R. B. WOODWARD: **J. Amer. chem. Soc.** 80, 1001, 1958

BENNETT, J. W. An overview of the genus *Aspergillus*. **Molecular Biology and Genomics**, ISBN: 978-904455-53-0, Ed. Caister, p. 238, 2010, LIVRO.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K.; Marine antitumor drugs: Status, shortfalls and strategies. **Marine Drugs**, vol. 8, p. 2702-2720, 2010.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K.; Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, p. 631-643, 2012.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G. Marine Natural Products. **Natural Products Report**, vol. 30, p. 237-323.

BOUDREAU, P. D.; BRUM, Y T.; LIU, W. T.; DORRESTEIN, P. C.; GERWICK, W. H. Viequeamide A, a cytotoxic member of the kulolide superfamily of cyclic depsipeptides from a marine button cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1560-1570, 2012.

BOYER, N.; MORRISON, K. C.; KIM, J.; HERGENROTHER, P. J.; MOVASSAGHI, M. Synthesis and anticancer activity of epipolythiodiketopiperazines alkaloids. **Chemical Science**, v. 4, p. 1646, 2013.

BRINGMANN, G.; GULDER, T.; LANG, G.; SCHMITT, S.; STOHR, R.; WIESE, J.; NAGEL, K.; IMHOFF, J. F.; Large-Scale Biotechnological Production of the Antileukemic Marine Natural Product Sorbicillactone A. **Marine Drugs**, v. 5, p. 23-30, 2007.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN. N. Yeast diversity in hypersaline habitats, **FEMS Microbiology, Letters**, 2005

BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CAZAR, M. E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ASTUDILLO, L. Antimicrobial butyrolactone I derivatives from the Ecuadorian soil fungus *Aspergillus terreus* Thorn. var *terreus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1067–1075, 2005.

CHAUHAN, D.; CATLEY, L.; LI, G.; PODAR, K.; HIDESHIMA, T.; VELANKAR, M.; MITSIADES, C.; MITSIADES, N.; YASUI, H.; LETAI, A.; OVAA, H.; BERKERS, C.; NICHOLSON, B.; CHAO, T-H.; NEUTEBOOM, S. T. C.; RICHARDSON, P.; PALLADINO, M. A.; ANDERSON, K. C. A Novel Orally Active Proteasome Inhibitor Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells with Mechanisms Distinct from Bortezomib. **Cancer Cell**, v. 8, p. 407–419, 2005.

- CURTIS, P. J.; GREATBANKS, D.; HESP, B.; CAMERON, A. F.; FREER, A. A. Sirodesmins A, B, C e G, Antiviral Epipolythiopiperazine-2,5-diones of Fungal Origin: X-Ray Analysis of Sirodesmin A Diacetate. **Journal of Chemical Society Perkin I**, p. 180-189, 1977.
- CURTIS, R. F. 6-Methoxymellein as a phytoalexin. **Experientia**, v. 24, p. 1187-1188, 1968.
- DAMARE, S.; RAGHUKUMAR, C.; RAGHUKUMAR, S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. **Deep-sea Research I**, v. 53, p.14-27, 2006.
- DAMEK, D. M.; LILLEHEI, K. O.; KLEINSCHMIDT-DeMASTERS B. K. *Aspergillus terreus* brain abscess mimicking tumor progression in a patient with treated glioblastoma multiforme. *Clinical Neuropathology*, v. 27 (6), p. 400-4007, 2008.
- DASHEK, W. V. *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Ed. CRC Press, ISBN 0-8493-9480-5, p. 313, 1997.
- DEFFIEUX, G.; BAUTE, M. A.; BAUTE, R.; FIELLEAU, M. –J. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. II. Epicorazine A: Structure elucidation and absolute configuration, **Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 1102-1105, 1978.
- DEFFIEUX, G.; FIELLEAU, M. –J.; BAUTE, R. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. III. Epicorazine B: Structure elucidation and absolute configuration, **Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 1106-1109, 1978.
- DEMASI, M.; FELICIO, A.L.; PACHECO, A.O.; LEITE, H.G.; LIMA, C.; ANDRADE, L.H. Studies on terrein as a new class of proteasome inhibitors. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 299–305, 2010.
- DESJARDINE, K.; PEREIRA, A.; WRIGHT, H.; MATAINAHU, T.; KELLY, M.; ANDERSEN, R. J. Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1850–1853, 2007.
- DEWI, R. T.; TACHIBANA, S.; DARMAWAN, A. Effect on α -glucosidase inhibition and antioxidant activities of butyrolactone derivatives from *Aspergillus terreus* MC751. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 454-460, 2014.
- DEWICK, P.M. Makrolides and polyethers. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach**, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2006.
- DISMUKES, W. E. Introduction to antifungal drugs. *Clinical Infectious Diseases*, v. 30, p. 653-657, 2000
- DORN, F.; ARIGONI, D. Gliovictin, ein neuer Metabolit von *Helminthosporium victoriae*. **Experientia** 1974, 30, 134–135.
- EDWARDS, D. J.; MARQUEZ, B. L.; NOGLE, L. M.; McPHAIL, K.; GOEGER, D. E.; ROBERTS, M. A.; GERWICK, W. H. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chemical Biology*, v. 11, p. 817-833, 2004.

EL-GENDY, M. M. A.; HAWAS, U. W.; JASPARS, M. Novel Bioactive Metabolites from a Marine-Derived Bacterium *Nocardia* sp. **ChemInform**, v. 39, 2008.

FELING, R. H.; BUCHANAM, G. O.; MINCER, T. J.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Salinosporamide A: A Highly Cytotoxic Proteasome Inhibitor from a Novel Microbial Source, a Marine Bacterium of the New Genus *Salinospora*. Ed. *Angewandte Chemie International*, 42^o edição, 1996.

FENICAL, W. JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. **Nature chemical biology**, v. 2(12), p. 666-673, 2006.

FIGUEROA, M.; GRAF, T. N.; AYERS, S.; ADCOCK, A. F.; SWANSON, S. M.; KROLL, D. J.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Cytotoxic Epipolythiodioxopiperazine Alkaloids From Fungi of the Bionectriaceae (Strains MSX64546 and MSX70751). **52nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy**, San Diego, CA, July 30-August 3, 2011. (Poster).

FUKUSHI, H.; INUBUSHI, Y. Synthetic studies of fungi. Part 3; Some Metabolites of *Ceratocystis minor* on *dl*-aspterric acid, a carotane-type sesquiterpene. **J. Chem.** p. 65, 1987.

GEISER, D. M., **Med. Mycol.** v. 46, suppl 1, p. S1-S6, 2008.

GARDINER, D. M.; WARING, P.; HOWLETT, B. J. The epipolythiodioxopiperazines (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. **Microbiology**, v. 151, p. 1021-1032, 2005.

GORAJANA, A.; VENKATESAN, M.; VINJAMURI, S.; KURADA, V. V. S. N. B.; PEELA, S.; JANGAM, P.; POLURI, E.; ZEECK, A.; Resistoflavine, cytotoxic compound from a marine actinomycete, *Streptomyces chibaensis* AUBN1/7. **Microbiology Research**, v. 162, p. 322-327, 2007.

GUARRO, J.; GENÉJ; STCHIGEL, AM. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12 (3), p. 454–500, ISSN 0893-8512, 1999.

GMO Database <<http://www.gmo-compass.org/eng/database/enzymes/96.xylanase.html>> Acesso em 26/04/2014.

HALDANE, J.B.S. The origin of life. **New Biology**, 16: 12, 1954.

HAN, X.; LIN, Z.; TAO, H.; LIU, P.; WANG, Y.; ZHU, W. Cytotoxic metabolites from symbiotic fungus *Penicillium* sp. HK13-8 with *Rhizophora stylosa*. **Zhongguo Haiyang Yaowu**, v. 28, p. 11–16, 2009.

HARITAKUN, R.; RACHTAWEE, P.; CHANTHAKET, R.; BOONYUEN, N.; ISAKA, M. Butyrolactones from the fungus *Aspergillus terreus* BCC 4651. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, p. 1545–1548, 2010.

HAUSER, D.; WEBER, H. P.; SIGG, H. P. Isolation and configuration of Chaetocin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 53, p. 1061–1073, 1970.

HERRICK, J. A.; Effects of Gliotoxin on *Trichophyton Gypseum*, **The Ohio Journal Science**, v. 45, (2), p. 45-46, 1945.

HIDEYUKI, S.; KOOHEI, N.; SHOICHI, N.; KEN-ICHI, K.; SHUN-ICHI. Studies on Fungal Products. Part 8. Isolation and Structure of Emestrin, a Novel Antifungal Macrocyclic Epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata*. X-Ray Molecular Structure of Emestrin. **J. Chem. Soc. Perkin Trans. I**, p. 109-116, 1986.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 1-51, 2011.

HUBMANN, R.; SIEGHART, W. Tumor Treatment with Gliotoxin Derivatives, IPC8 Class: AA61K31547FI, USPC Class: 5142228, Class name: Hetero ring is six-membered and includes at least nitrogen and sulfur as ring members three or more ring hetero atoms in the six-membered hetero ring polycyclo ring system having the six-membered hetero ring as one of the cyclos. Patente n° 20090029974, 2009. Disponível em <http://www.faqs.org/patents/app/20090029974>, acesso em 26/11/2013.

HUGGES, C. C.; PIETRO-DAVO, A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. The Marinopyrroles, Antibiotics of an Unprecedented Structure Class from a Marine *Streptomyces* sp. **Organic Letters**, v. 10, p. 629-631, 2008.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29 p. 468–482, 2011.

JOHSON, R. A.; KIDWAI, A. R.; WARNER, J. S. Gliotoxin. XI. A related antibiotic from *Penicillium terlikowski*: Gliotoxin monoacetate. *Jornal of American Chemical Society*, v. 75 (9), p. 2110-2112, **1953**

JOSHI, B. K.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T. New Verticillin and Glisoprenin Analogues from *Gliocladium catenulatum*, a Mycoparasite of *Aspergillus flavus* Sclerotia. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 730-733, 1999.

KANG, S.W.; KIM, S.W. New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 695–698, 2004.

KANOKMEDKHAKUL, K.; KANOKMEDKHAKUL, S.; SUWANNATRAIR.; SOYTONG K.; PRABPAI, S KONGSAERE, P.; Bioactive meroterpenoids and alkaloids from the fungus *Eurotium chevalieri*, **TETRAHEDROM**, v. 67, p. 5461e5468, 2011.

KAOUADJI, M.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; KRIVOBOK, S.; SAGE, L. Gliotoxin: Uncommon ¹H couplings and revised ¹H- and ¹³C- NMR assignments. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 717-719, 1990.

KATAGIRI, K.; SATO, K.; HAYAKAWA, S.; MATSUSHIMA, T.; MINATO, H. Verticillin A, a new antibiotic from *Verticillium* sp. **The Journal of Antibiotics**, p. 420-422, 1970.

KAWARA, N.; NAKAJIMA, S.; YAMAZAKI, M.; KAWAI, K.-I. Structure of a novel epidithiodioxopiperazine, emethallicin A, a potent inhibitor of histamine release, from *Emericella heterothallica*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 37, p. 2592-2595, 1989.

KAWARA, N.; NOZAKA, K.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K.-I.; YAMAZAKI, M. Novel epitetrathiodioxopiperazine, emethallicins B and C, as potent inhibitor of compound 48/80-induced histamine release, from *Emericella heterothallica*. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.** p. 951-952, 1989.

KAWARA, N.; NOZAKA, K.; YAMAZAKI, M.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K.-I. Structures of novel epipolythiodioxopiperazine, emethallicins B, C, and D, potent inhibitors of histamine release, from *Emericella heterothallica*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 38, p. 73-78, 1990.

KAWARA, N.; NOZAKA, K.; YAMAZAKI, M.; NAKAJIMA, S.; KAWAI, K.-I. Structures of novel epidithiodioxopiperazine, emethallicins E and F, from *Emericella heterothallica*. **Heterocycles.** v. 30, p. 507-515, 1990.

KIM, W. G.; CHO, K. M.; LEE, C. K.; YOO, I. D. Terreulactones A, B, C, and D: novel acetylcholinesterase inhibitors produced by *Aspergillus terreus*. **Journal of antibiotics (Tokyo)**, v. 56, p. 351-357, 2003.

KIMURA, Y.; NAKAHARA, S.; FUJIOKA, S., Aspyrone, a nematocidal compound isolated from the fungus, *Aspergillus melleus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.60, p. 1375, 1996.

KIRBY, G. W.; RAO, G. V.; ROBINS, D. J. New co-metabolites of gliotoxin in *Gliocladium virens*. **J. Chem. Soc. Perkin Trans I**, p. 301-304, 1988.

KIRBY, G. W.; ROBINS, D. J. SEFTON, M. A.; TALEKAR, R. R. Biosynthesis of Bisdethiobis(methylthio)gliotoxin, a new metabolite of *Gliocladium delinquescens*. **J. Chem. Soc. Perkin Trans I**, p. 119-121, 1980.

KITAHARA, N.; ENDO, A. Xanthocillin X monomethyl ether, a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 34, p. 1556–1561, 1981

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v.5 n 3, 2010.

KLEINWACHTER, P.; DAHSE, H. -M.; LUHMANN, U.; SCHLEGEL, B.; DORNBERGER, K. Epicorazine C, an antimicrobial metabolite from *Stereum hirsutum* HKI0195, **Journal of Antibiotics**, v. 54, p. 521-525, 2001.

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. **Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht**, p. 116, 2002..

KLICH, M. A. Identification of clinically relevant aspergilli. **Medical Mycology**, v. 44, p. 127-131, 2006.

KNOW, H. C.; KAUFFMAN, C. A.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently

discovered genus “Marinospora”. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 1622-1632, 2006.

KOCABAS, A.; OGEL, Z. B.; BAKIR, U. Xylanase and itaconic acid production by *Aspergillus terreus* NRRL 1960 within a biorefinery concept. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 75-84, 2014.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E., *Marine mycology. The higher fungi*, **Academic Press, New York**, San Francisco, London, 1979.

KOMATSU, K.; SHIGEMORE, H.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J.; Seulezonones A and B, Two Metabolites Possessing a Phenalenone-Dione Skeleton from a Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 408-409, 2000.

KOMATSU, K.; SHIGEMORI, H.; SHIRO, M.; KOBAYASHI, J. Revised Stereochemistry and Biosynthesis of Seragakinone A. **Tetrahedron**, v. 56, p. 8841-8844, 2000.

KOZAKIEWICZ, Z. (1989) *Aspergillus* species on stored products. **Mycological Papers**. v. 161. CABInternational Mycological Institute: Wallingford.

KUNO, F.; OTOGURO, K.; SHIOMI, K.; YWARA, Y.; OMURA, S. Arisugacin A and B, novel and selective acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium* sp. FO 4259. I. Screening, taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 49, p. 742-746, 1996.

KWON-CHUNG, F.; RAPER. *Emericella heterothallica* Malloch & Cain. **Canadian Journal of Botany**, v. 50 (1), p. 62, 1972.

LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12(2), p. 310–350, 1999.

LATGE, J. P.; STEINBACH, W. J. *Aspergillus Fumigatus* and Aspergillosis. Ed. ASM Press, Washington DC, p. 549-558, 2009.

LEE, H. J., LEE, J. H.; HWANG, B. Y.; KIM, H. S.; LEE, J. J. Anti-angiogenic activities of gliotoxin and its methylthioderivative, fungal metabolites. **Archives of Pharmal Research.**, v. 24 (5), p. 397-401, 2001.

LEE, S. M.; LI, X. F.; JIANG, H. L.; CHENG, J. G.; SEONG, S.; CHOI, H. D.; SON, B. W.; Terreusinone, a novel UV-A protecting dipyrroloquinone from the marine algicolous fungus *Aspergillus terreus*. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 7707–7710, 2003.

LEE, Y. M.; KIM, M. J.; LI, H.; ZHANG, P.; BAO, B.; LEE, K. J.; JUNG, J. H. Marine derived *Aspergillus* species as a source of bioactive secondary metabolites. **Marine Biotechnology**, v. 15, p. 499-519, 2013.

LEE, Y. H.; LEE, N.H.; BHATTARAI, G.; OH, Y.T.; YU, M.K.; YOO, I.D.; JHEE, E.C.; YI, H.K. Enhancement of osteoblast biocompatibility on titanium surface with Terrein treatment. **Cell Biochemistry and Function**. v. 28, p. 678–685, 2010.

LI, X.; KIM, S. K.; NAM, K. W.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 59 (4), p. 248-250, 2006.

LIAO, W.Y.; SHEN, C.N.; LIN, L.H.; YANG, Y.L.; HAN, H.Y.; CHEN, J.W.; KUO, S.C.; WU, S.H.; LIAW, C.C. Asperjinone, a nor-neolignan, and terrein, a suppressor of ABCG2-expressing breast cancer cells, from thermophilic *Aspergillus terreus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 630–635, 2012.

LIN, T.; LU, C.; SHE, Y. Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. F1, a commensal fungal strain of *Trewia nudiflora*. **Nat Prod Res**, v. 23, p. 77–85, 2009.

LININGTON, R. G.; GONZALEZ, J.; UREÑA, L. D.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; GERWICK, W. H. Venturamides A and B: antimalarial constituents of the panamanian marine Cyanobacterium *Oscillatoria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 397-401, 2007.

LIU, D.; LI, X.; MENG L.; LI, C.; GAO, S.; SHANG, Z.; PROKSCH, P.; HUANG, C.; WANG, B. Nigerapyrones A-H, alfa-Pyrone derivatives from the marinemangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1787–1791, 2011.

LU, X. L.; XU, Q. Zh.; SHEN, Y. H.; LIU, X. Y.; JIAO, B. H.; ZHANG, W. D.; NI, K. Y. Macrolactin S, a novel macrolactin antibiotic from marine *Bacillus* sp. **Natural Products Research**, v. 22, p. 342-347, 2008.

MAIS, M.; ANDOLFI, A.; MATHIEU, V.; BOARI, A.; CIMMINO, A.; MORENO Y BANULS, L.; VURRO, M.; KORNIENKO, A.; KISS, R.; EVIDENTE, A. Fischerindoline, a pyrroloindole sesquiterpenoid isolated from *Neosartorya pseudofischeri*, with in vitro growth inhibitory activity in human cancer cell lines. **Tetrahedron**, v 69 (35), p. 7466–7470, 2013.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 77-84, 1999.

MEENUPRIYA, J.; THANGARAJ, M. Isolation and molecular characterization of bioactive secondary metabolites from *Callyspongia* spp. associated fungi. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 738-740, 2010.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos**. Recife: Imprensa Universitária, 1993.

Mergulho autônomo. In: WIKIPÉDIA: a enciclopédia livre. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Mergulho_aut%C3%B4nomo>. Acesso em: 03 abr. 2014

MILKO, A. A. De specie nova e genere *Talaromyces Benjamin*. **Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenii**, v. 1, p. 208-210, 1964.

MINATO, H.; MATSUMOTO, M.; KATAYAMA, T. Studies on the Metabolites of *Verticillium* sp. Structures of Verticillins A, B, and C. **J. Chem. Soc. Perk. Trans.** **1**, v. 17, p. 1819-1825, 1973.

MORTIMER, P. H.; RONALDSON, J. W. **Handbook of Natural Products**, vol. **1**, chapter 11: Fungal Toxin-Induced Photosensitization, p. 362-406, CRC Press, ISBN 0-8247-1893-3, New York, EUA, 1983.

MUKAI, C.; OHSUMI, K.; NAKAGAWA, R.; KANAYAMA, Y.; OBAYASHI, Y.; SUGA, Y.; MURATA, M. Gliotoxin derivatives and anticancer agents comprising the same. Patente n° 0926242, 1999.

NAGIA, M. M. S.; EL-METWALLY, M. M.; SHAABAN, M.; EL-ZALABANI, S. M.; HANNA, A. G.; Four butyrolactones and diverse bioactive secondary metabolites from terrestrial *Aspergillus flavipes* MM2: isolation and structure determination. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n° 9, p. 1-8, 2012.

NEWTON, G.G.F. & ABRAHAM, E.P. Cephalosporine C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid. **Nature** 175, 548, 1955.

NISHIO, K.; ISHIDA, T.; ARIOKA, H.; KUROKAWA, H.; FUKUOKA, K. Antitumor effects of butyrolactone I, a selective cdc2 kinase inhibitor, on human lung cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 16(6B), p. 3387-3395, 1996.

NOZAKA, K.; SHUN-ICHI, U.; SHOICHI, N.; KAWAI, K.. Studies on Fungal Products. XIV.1) Emestrin B, a New Epitrithiodioxopiperazine, from *Emericella striata*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n° 8, p. 3460-3463, 1987.

NUCLEAR, P.; SOMMIT, D.; BOONYUEN, N.; PUDHOM, K. Butenolide and furandione from an endophytic *Aspergillus terreus*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 58, p. 1221-1223, 2010.

NURSID, M.; CHASANA, E.; MURWANTOKO; WAHYUONO, S. Isolation and Identification of Emestrin from *Emericella nidulans* and Investigation of Its Anticancer Properties. **Microbiology Indonesia**, v. 5, n° 4, p. 160-169, 2011.

OKAMI, Y.; HOTTA, K.; YOSHIDA, M.; IKEDA, D.; KONDO, S.; UMEEZAWA, H. New Aminoglycoside Antibiotics, Istamycins A and B. **Journal of Antibiotics**, v. 32, p. 964-966, 1979.

OOIKE, M.; NOZAKA, K.; KAWAI, K. An Epitrithiodioxopiperazine Related to Emestrin from *Emericella foveolata*. **Phytochemistry**, v. 46, n° 1, p. 123-126, 1997.

PARK, S.H.; KIM, D.S.; KIM, W.G.; RYOO, I.J.; LEE, D.H.; HUH, C.H.; YOUN, S.W.; YOO, I.D.; and PARK, K.C. Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 2878-2885, 2004.

PARVATKAR, R. R.; D'SOUZA, C.; TRIPATHI, A.; NAIK, C. G. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 128-132, 2009.

PARVATKAR, R. R. Studies on some important secondary metabolites from marine organisms. Tese, p. 56, Department of Chemistry, Goa Univesity, India, 2011.

PEDRAS, M. S. C.; ABRAMS, S. R. Isolation of the first naturally occurring epimonotheiodioxopiperazine, a fungal toxin produced by *Phoma, lingam*. **Tetrahedron Letters**, v. 29, p. 3471-3474, 1988.

PÉREZ-BALADO, C.; RODRÍGUEZ-GRAÑA, P.; DE LERA, A. R. Stereocontrolled and Versatile Total Synthesis of Bispyrrolidinoindoline Diketopiperazine Alkaloids: Structural Revision of the Fungal Isolate (+)-Asperdimin. **Chemistry Euroepan Journal**, p. 1-11, 2009.

PERPELESCU, M.; KOBAYASHI, J.; FURUTA, M.; ITO, Y.; IZUTA, S.; TAKEMURA, M.; Novel Phenalenone Derivatives from a Marine-Derived Fungus Exhibit Distinct Inhibition Spectrum Against Eukaryotic DNA Polymerase. **Biochemistry**, v. 41, p. 7610-7616, 2002.

PHATTANAWASIN, P.; POJCHANAKOM, K.; SOTANAPHUN, U.; PIYAPOLRUNGROJ, N.; ZUNGSONTIPORN, S. Weed growth inhibitors from *Aspergillus fischeri* TISTR 3272. **Natural Products Research**, v. 21, p. 1286–1291, 2007

PIECKOVÁ, E.; ROEIJMANS, H. Antibiotic secondary metabolites of *Dichotomomyces cejpii*. **Mycopathologia**, v. 146, p. 121–126, 1999.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health, **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, n. 1, p. 17-32, 1994.

RAISTRICK, H.; SMITH, G. **Biochem, J**, vol. 29, p. 606, 1935.

QIAO, M-F.; JI, N-Y.; LIU, X-H.; LI, K.; ZHU, Q-M.; XUE, Q-Z. Indoloditerpenes from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 5677–5680, 2010.

RAISTRICK, H.; SMITH, G. Studies in the biochemistry of micro-organisms: The metabolic products of *Aspergillus terreus* Thom. A new mould metabolic product-terrein. **Biochemical Journal**, v. 29 (3), p. 606–611, 1935.

RAMASWAMY, A. V.; SORRELS, C. M.; GERWICK, W. H. Cloning and biochemical characterization of the hectochlorin biosynthetic gene cluster from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1977-1986, 2007.

RAO, K. V.; SADHUKHAN, A. K.; VEERENDER, M.; RAVIKUMAR, V.; MOHAN, E. V. S.; DHANVANTRI, S. D.; SITARAMKUMAR, M.; MOSES BABU, J.; VYAS, K.; REDDY, G. O. M. Butyrolactones from *Aspergillus terreus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48 (4), p. 559-562, 2000.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 290, 2011.

RIGHTSEL W. A.; SCHNEIDER H.G.; SLOAN B. J.; GRAF P. R.; MILLER F. A.; BARTZ O. R.; EHRLICH J.; DIXON G. J. Antiviral activity of gliotoxin and gliotoxin acetate. **Nature**, v. 204, p. 1333-1334, 1964.

RODRIGUES E. F.; SANTOS, R. M. G. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 907-912, 2002.

RUIZ, B.; CHÁVEZ, A.; FORERO, A.; GARCÍA-HUANTE, Y.; ROMERO, A.; SÁNCHEZ, B.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R.; SÁNCHEZ, S.; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36(2), p. 146–167, 2010.

SAFE, S.; TAYLOR, A. Sporidesmins XIII. Ovine ill-thrift in Nova Scotia. III. The characterization of chetomin, a toxic metabolite of *Chaetomium cochlidis* and *Chaetomium globosum*, **J. Chem. Soc. Perkin. Trans.**, **1**, p. 472, 1972.

SAITO, K. Studies on the fungi in the Orient, **Journal of Fermentation Technology**, v. 27, p. 120–122, 1949.

SAMSON, R. A.; PETERSON, S. W.; FRISVAD, J. C.; Varga, J. New species in *Aspergillus* section *Terrei*. **Studies in mycology**, v. 69, p. 39-55, 2011.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. Molecular Systematics of *Aspergillus* and its Teleomorphs, chapter 2, p. 19-40. **Aspergillus: Molecular Biology and Genomics**, editado por MACHIDA, M. e GOMI, K. Caister Academic Press, Norfolk, UK, ISBN: 978-1-904455-53-0, 2010.

SARAIVA, N. S. **Estudo químico do fungo antagonista *Trichoderma harzianum***. 2009. 127 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

SAVARD, M. E.; MILLER, J. D.; BLAIS, L. A.; SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. **Mycopathologia**, v. 127, p. 19-27, 1994.

SCHARF, D. H., HEINEKAMP, T., REMME, N., HORTSCHANSKY, P., BRAKHAGE, A. A., HERTWECK, C. Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 93, p. 467-472, 2012.

SCHELL, M. M. Tremorgenic mycotoxin intoxication. **Veterinary Medicine**, v. 95, p. 283-286, 2000.

SHAABAN, M.; NASR, H.; HASSAN, A. Z.; ASKER, M. S. Bioactive secondary metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus*: Structural elucidation and bioactivity studies. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 41, p. 50-60.

SHIMADA, A.; KUSANO, M.; TAKEUCHI, S.; FUJIOKA, S.; INOKUSHI, T.; KIMURA, Y. Aspterric Acid and 6-Hydroxymellein, Inhibitors of Pollen Development in *Arabidopsis thaliana*, Produced by *Aspergillus terreus*. **Journal of Biosciences**, v. 57, p. 459-464, 2002.

SCOTT, D. B. *Dichotomomyces cejpii* (Milko) comb. nov. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 55, p.313–316, 1970.

SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT, Y.; BENSOUSSAN, M. Lipid accumulation in *Trichoderma* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, n. 2, p. 181-187, 1992.

SEIGLE-MURANDI, F.; KRIVOBOK, S.; STEIMAN, R.; MARZIN, D. Production, mutagenicity, and immunotoxicity of gliotoxin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1854–1856, 1990.

SHEN, Y.; ZOU, J.; XIE, D.; GE, H.; CAO, X.; DAI, J. Butyrolactone and cycloheptanetrione from mangrove-associated fungus *Aspergillus terreus*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 60 (11), p. 1437-1441, 2012.

SHIGEMORE, H.; KASAI, Y.; KOMATSU, K.; TSUDA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Sporiolides A and B, Two New Twelve-Membered Macrolides from a Marine- Derived Fungus *Cladosporium* sp. **Marine Drugs**, v. 2, p. 164-169, 2004.

SHIGEMORE, H.; KOMATSU, K.; MIKAMI, Y.; SEREGAKINONE, A.; KOBAYASHI, J. A New Pentacyclic Metabolite from a Marine-Derived Fungus. **Tetrahedron**, v. 55, p. 14925-14930, 1999.

SCHLINGMANN, G.; MILNE, L.; CARTER, G. T. Isolation and identification of antifungal polyesters from the marine fungus *Hypoxylon oceanicum* LL-15G256. **Tetrahedron**, v. 58, p. 6825–6835, 2002.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053–1071, 1998.

SMITH, C. J.; ABBANAT, D.; BERNAN, V. S.; MAIESE, W. M.; GREENSTEIN, M.; JOMPA, J.; TAHIR, A.; IRELAND, C. M. Novel Polyketide Metabolites from Species of Marine Fungi. **Natural Products**, v. 63, p. 142-145, 2000.

SMITH, B. L.; BRIGGS, L. R.; EMBLING, P. P.; TOWERS, N. R. **Toxic Plants and others Toxicants**, chapter 106: Factor Influencing Urinary Excretion of Immunoreactive Sporidesmin Metabolites in Sheep Dosed with Sporidesmin, p.543-550, ISBN 0851992633, CABI International, 2001.

SUN, Y.; TAKADA, K.; TAKEMOTO, Y.; YOSHIDA, M.; NOGI, Y.; OKADA, S.; MATSUNAGA, S. Gliotoxin Analogues from a Marine-Derived Fungus, *Penicillium* sp., and Their Cytotoxic and Histone Methyltransferase Inhibitory Activities. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 111-114, 2012.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9 – 19, 2009.

SUZUKI, M.; HOSAKA, Y.; MATSUSHIMA, H.; GOTO, T.; KITAMURA, T.; KAWEBE, K. Butyrolactone I induces cyclin B1 and causes G2/M arrest and skipping of mitosis in human prostate cell lines. **Cancer Letters**, v. 138, p. 121–130, 1999.

THORNBURG, C. C.; THIMMAIAH, M.; SHAALA, L. A.; HAU, A. M.; MALMO, J. M.; ISHMAEL, J. E.; YOUSSEF, D. T. A.; McPHAIL, K. L. Cyclic depsipeptides, grassypeptolides D and E and Ibu-epidemethoxylyngbyastatin 3, from a Red Sea *Leptolyngbya* cyanobacterium. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1677–1685, 2011.

TIWARI, S.; SINGH, S. M.; JAIN, S. Chronic bilateral suppurative otitis media caused by *Aspergillus terreus*. **Mycoses**, v. 38, p. 297, 300, 2005.

TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; Modiolides A and B, Two New 10-Membered Macrolides from a Marine-Derived Fungus. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1395-1399, 2003.

VARGA, J.; DUE, M. FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomic revision of *Aspergillus* section *Clavati* based on molecular, morphological and physiological data. **Studies in Micology**, v. 59, p. 89-106, 2007.

WADA, M.; HOSOTANI, R.; LEE, J. U.; DOI, R.; KOSHIBA, T.; FUJIMOTO, K.; MIYAMOTO, Y.; TSUJI, S.; NAKAJIMA, S.; OKUYAMA, A.; IMAMURA, M. An exogenous cdk inhibitor, butyrolactone-I, induces apoptosis with increased Bax/Bcl-2 ratio in p53-mutated pancreatic cancer cells. **Anticancer Research**, v. 18, p. 2559–2566, 1998.

WANG, G.; LI, Q.; ZHU, P. Phylogenetic diversity of culturable fungi associated with the Hawaiian Sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, p. 163-174, 2008.

WANG, Y.; LIA, Z-L.; BAIA, J.; ZHANGA, L-M.; WU, X.; PEIA, L. Z. Y-H.; JINGD, Y-K.; HU, H-M. 2,5-Diketopiperazines from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus*; **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 385-393, 2012.

WANG, Y.; ZHENG, J.; LIU, P.; WANG, W.; ZHU, W. Three New Compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 Grown in a High Salt Medium. **Marine Drugs**, v. 11, p. 1368-1378, 2011.

WALSH T. J.; PETRAITS, V.; PETRAITIENE, R.; FIELD-RIDLEY, A.; SUTTON, D.; GHANNOUM, M.; SEIN, T.; SCHAUFELE, R.; PETER, J.; BACHER, J.; CASLER, H.; ARMSTRONG, D.; ESPINNEL-INGROFF, A.; RINALDI, M. G.; LYMAN, C. A.; Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: Pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188(2), p. 305-319, 2003.

WATKINS, R. R.; DAVID, M. Z.; SALATA, R. A. Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Med Microbiol**, v. 61, p. 1179-1193, 2012.

WATTS, K. R.; RATNAM, J.; ANG, K-H.; TENNEY, K.; COMPTON, J. E.; McKERROW, J.; CREWS, P. Assessing the trypanocidal potential of natural and semi-synthetic

diketopiperazines from two deep water marine-derived fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 2566–2574, 2010.

WEINDLING, R.; EMERSON, O. H. The isolation of a toxic substance from the culture filtrate of *Trichoderma*. **Phytopathology**, v. 26, p. 1068–1070, 1936.

WIESE, J.; OHLENDORF, B.; BLUMEL, M.; SCHMALJOHANN, R.; IMHOFF, F. Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites. **Marine Drugs**, v. 9(4), p. 561-585, 2011.

WONG, S. M.; MUSZA, L. L.; KYDD, G. C.; KULLNIG, R.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Fiscalins: New substance p. inhibitors produced by fungus *Neosartorya fischeri*. **Journal of Antibiotics**, v. 46 (4), p. 545-553, 1993.

WU, T. C. On the development of antifungal agents: Perspective of the U.S. Food and Drug Administration. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. 54-58, 1994

XU, Y.; ESPINOSA-ARTILES, P.; LIU, M. X.; ARNOLD, A. E.; GUNATILAKA, A. A. L. Secoemestrin D, a Cytotoxic Epitetrahydrodioxopiperazine, and Emericellenes A–E, Five Sesterterpenoids from *Emericella* sp. AST0036, a Fungal Endophyte of *Astragalus lentiginosus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 2330-2336, 2013.

YAMADA, K.; OJIKI, M.; KIGOSHI, H.; SUENAGA, K. Cytotoxic substances from two species of Japanese sea hares: Chemistry and bioactivity. **Proceedings of the Japan. Academy**, v. 86, p. 176-189, 2010.

YANG, J. X.; CHEN, Y.; HUANG, C.; SHE, Z.; LIN, Y. A new isochroman derivative from the marine fungus *Phomopsis* sp. (No. ZH-111). **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, p.13-16, 2011.

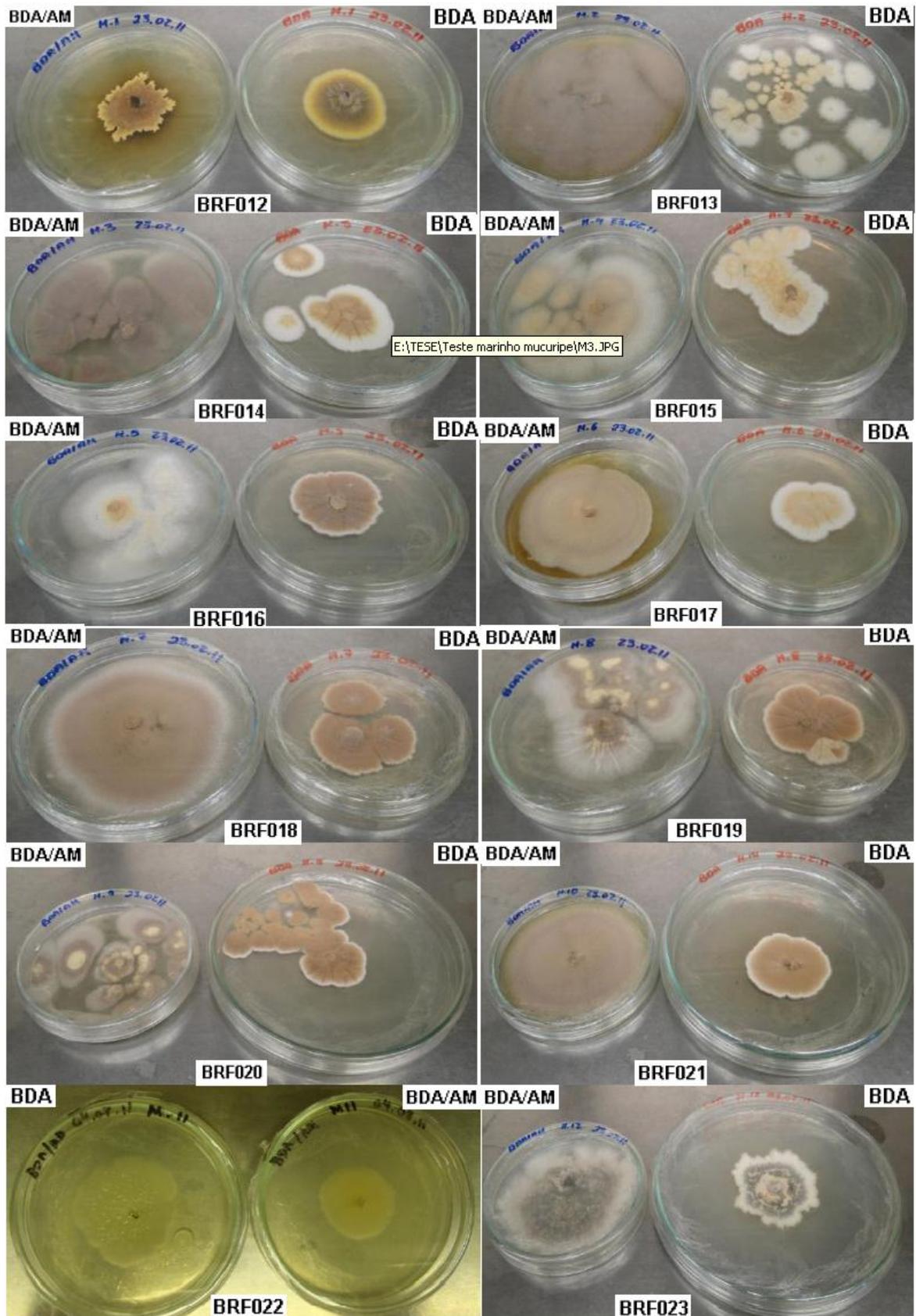
YOO, I. D.; CHO, K. M.; LEE, C. K.; KIM, W. G. Isoterreulactone A, a novel meroterpenoid with anti-acetylcholinesterase activity produced by *Aspergillus terreus*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 353–356, 2005.

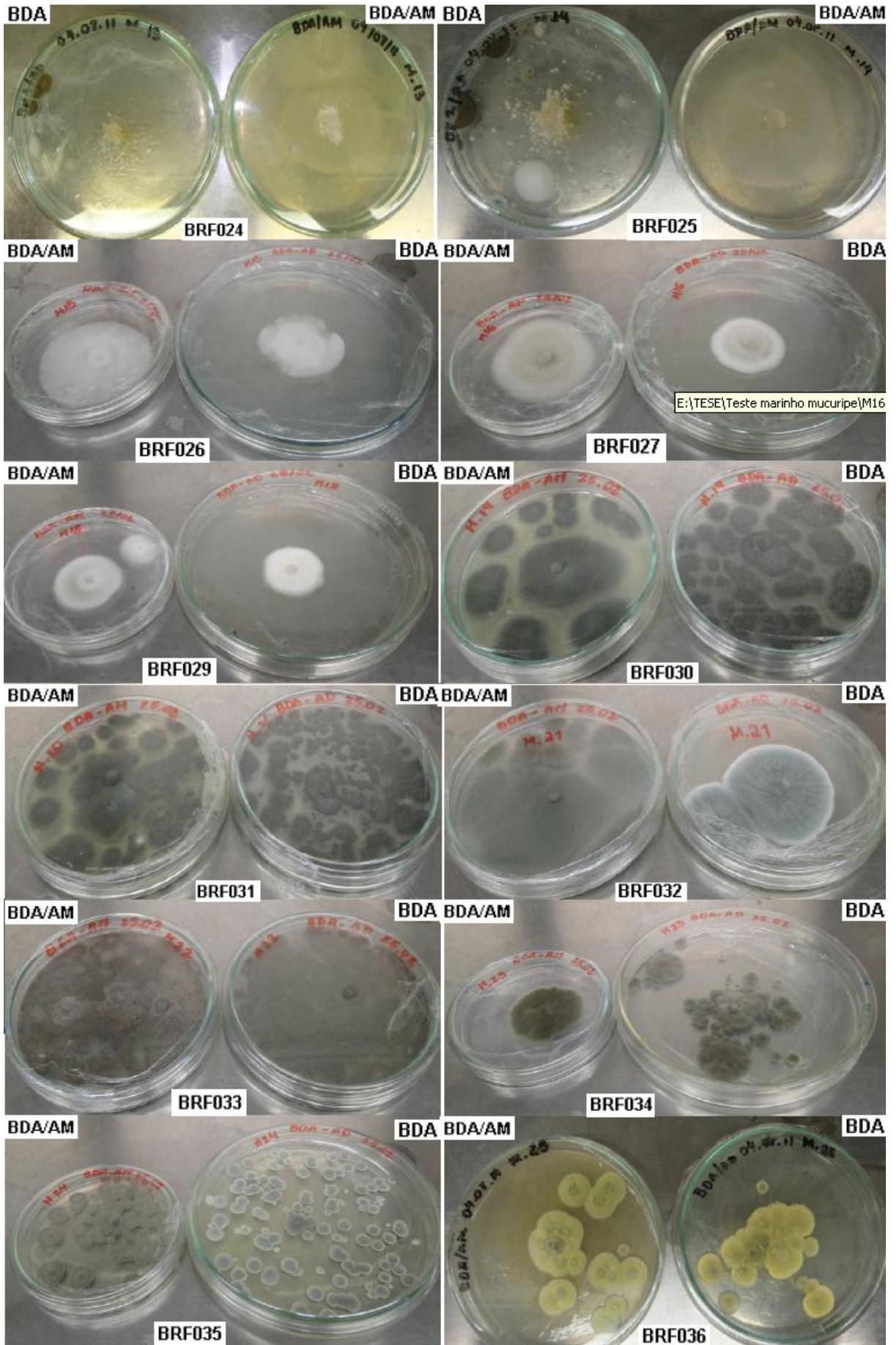
ZHENG, C. J.; PARK, S. H.; KOSHINO, H.; KIM, Y. H.; KIM, W. G. Verticillin G, a New Antibacterial Compound from *Bionectra byssicola*. **The Journal of Antibiotics**, v. 60 (1), p. 61-64, 2007.

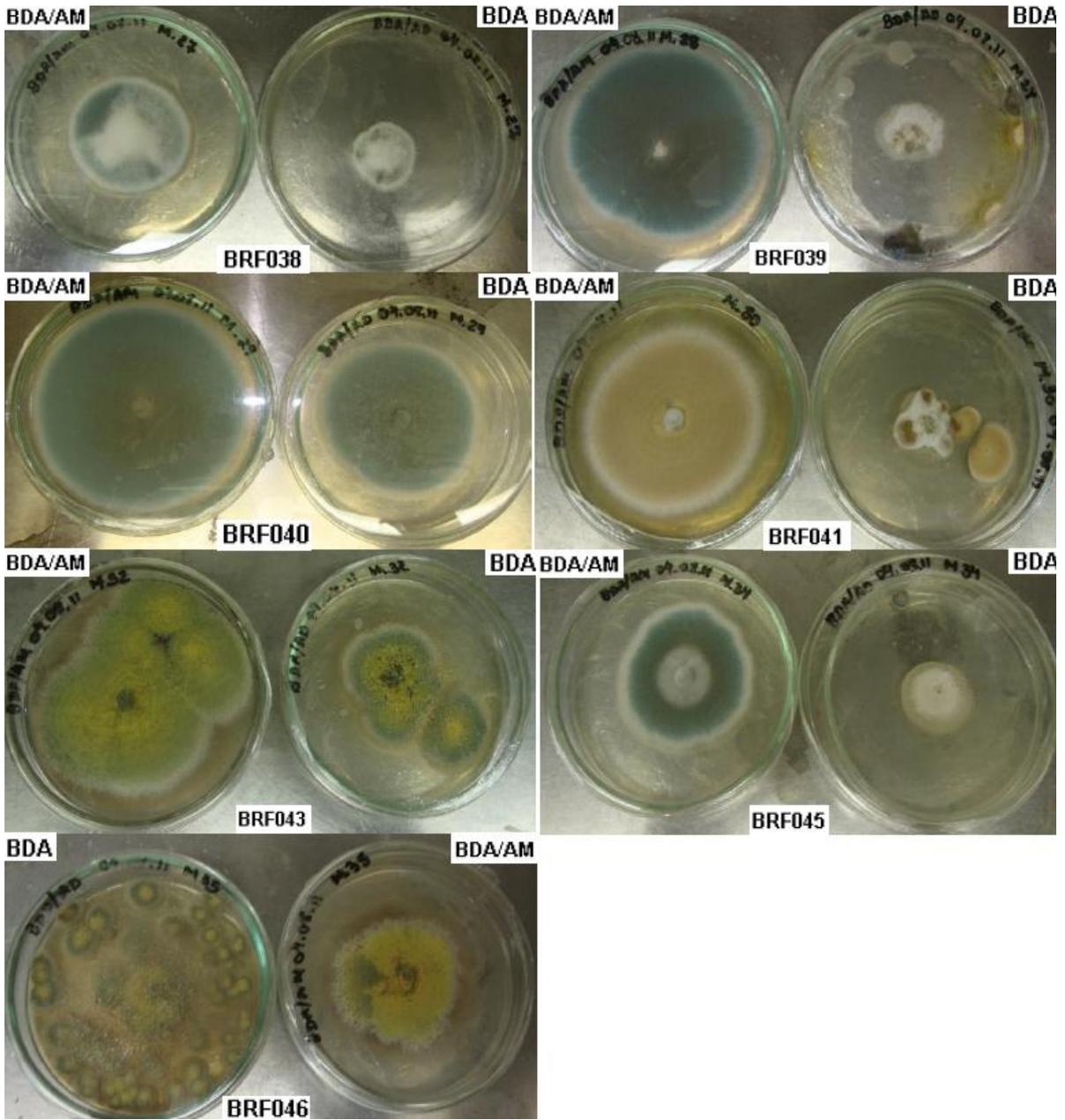


9. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Fotografias dos testes pareados das linhagens isoladas da praia do Mucuripe







APÊNDICE 2 – Fotografias dos testes pareados das linhagens isoladas da praia do Pecém

