



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EMANUELA XIMENES FARIAS

ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS ISOLADOS DO FUNGO MARINHO *Paecilomyces lilacinus*
RECUPERADO DE SEDIMENTOS DA COSTA CEARENSE

FORTALEZA

2014

EMANUELA XIMENES FARIAS

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS ISOLADOS DO FUNGO MARINHO *Paecilomyces lilacinus*
RECUPERADO DE SEDIMENTOS DA COSTA CEARENSE**

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Química, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Área de concentração: Química
Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da
Conceição Ferreira de Oliveira

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F288e Farias, Emanuela Ximenes.
 Estudo do potencial citotóxico dos metabólitos secundários isolados do fungo *Paecilomyces lilacinus* recuperado de sedimentos da costa cearense. / Emanuela Ximenes Farias. – 2014.
 75 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Mestrado em Química, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Química Orgânica.
 Orientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira.
- 1.Esteróides. 2. Paecilomyces. 3. Metabólitos. I. Título.

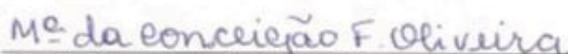
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



Emanuela Ximenes Farias

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 05/02/2014

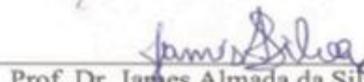
EXAMINADORES:



Prof. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. James Almada da Silva
Universidade Federal de Sergipe – UFSe

“Que teu coração deposite toda a sua confiança no Senhor! Não te firmes em tua própria sabedoria! Sejam quais forem os teus caminhos, pensa nele, e ele aplainará tuas sendas”

Provérbios 3:5-6

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, que é a minha força maior.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo amor e por sempre estarem ao meu lado me apoiando.

À professora Maria da Conceição Ferreira de Oliveira pela orientação e que mesmo estando um período distante esteve comigo sempre que precisei.

À Profa. Mary Anne Sousa Lima, à Profa. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, ao Prof. Marcos Carlos de Mattos e ao Prof. Francisco Geraldo Barbosa, que durante o período de ausência da professora sempre me ajudaram no que eu precisei.

À Profa. Letícia Lotufo pela coleta dos sedimentos marinhos, bem como os testes biológicos.

Aos meus colegas do LABOMAR: Larissa, Karine, Elton, Paula e Diego pelos testes realizados e pelo carinho.

Ao CENAURENM pela aquisição dos espectros de RMN, ao Prof. James e ao Ricardo pela realização de alguns experimentos.

Ao LEMANOR pelo uso do LC-MS e utilização do banco de dados.

Aos meus companheiros de laboratório: Carol, Dani, Tiago, Bruna, Reinaldo, Bárbara, Lis, Vanessa, Ricardo, Régis, Ingrid, Aline, Rayane, Alysson, Gledson, Onassis, Leandro, Aquino e Jefferson.

À Natália Nogueira Saraiva pela ajuda, apoio e amizade.

Aos meus grandes amigos Edângelo Macêdo pela ajuda e apoio, Jeison Rios e Edilane Gomes pelo apoio e amizade.

Aos alunos da Profa. Telma, Profa. Mary Anne Sousa Lima, Profa. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, Prof. Jair Mafezoli e Prof. Francisco Geraldo Barbosa, que sempre que precisei me ajudaram.

À Profa. Angélica Lucchese e ao Iván Sergio Colás que durante o período que estiveram aqui foram maravilhosos.

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

Aos funcionários Lana, Célia e Orlando pela amizade e colaboração.

Ao Programa Sisbiota Brasil (CNPq/ FAPESP), coordenado pelo Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (DQ – UFSCar) pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado concedida.

Aos pesquisadores Ludwig H. Pfenning e Lucas M. Abreu (Departamento de Fitopatologia – UFLA) pela identificação do fungo.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e FUNCAP.

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

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo de bioprospecção de metabólitos secundários citotóxicos do Pecém-CE. Inicialmente, foi realizado o estudo cinético da produção de metabólitos secundários por *P. lilacinus* cultivado no meio de batata-dextrose (BD) durante 7, 14 21 e 28 dias. Através da análise cromatográfica dos extratos, bem como dos resultados de atividade citotóxica dos mesmos, frente à linhagem de célula tumoral HCT-116 (câncer de cólon), foi possível selecionar o extrato oriundo do crescimento do fungo por 14 dias (inibição de crescimento: 85,7 %) como o mais citotóxico. O fracionamento bioguiado do extrato orgânico do fungo cultivado por 14 dias em grande escala levou ao isolamento dos esteróides wortimanina e 11-deacetoxiwortimanina, ambos inéditos no gênero *Paecilomyces*. Os metabólitos secundários foram isolados através de métodos cromatográficos usuais e CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência). A caracterização estrutural foi realizada através do uso de métodos espectrométricos, especialmente espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) e infravermelho, além de comparação de dados da literatura. Também foi realizado um estudo de desreplicação do extrato, o qual sugeriu a presença dos compostos ciclosinefungina, estatana A, virescensideo-D, (+)-esclerotiorina, 2'-Amino-2'-deoxiguanosina, fumaramidimicina e deoxinivalenol, todos inéditos no gênero *Paecilomyces* produzidos por *Paecilomyces lilacinus* (cepa BRF053) recuperado de sedimentos da praia.

Palavras chaves: Fungo marinho, *Paecilomyces lilacinus*, Wortimanina, 11-deacetoxiwortimanina e Desreplicação.

ABSTRACT

The bioprospection of cytotoxic secondary metabolites produced by *Paecilomyces lilacinus* (fungal strain BRF053) recovered from sediments collected at Pecém beach, Ceará state, was investigated. First, the production of compounds by the fungal strain was performed by culturing the microorganism in potato-dextrose broth (PDB) for 7, 14, 21 and 28 days. Both HPLC analysis and cytotoxic activity (tumor cell line HCT-116) of the extracts from each period of culture revealed 14 days as the optimum time for producing cytotoxic compounds (growth inhibition 85.7 %). Bioguided fractionation of the organic extract from the fungus cultured in large scale under the same conditions (14 days) allowed the isolation of the steroids wortimannin and 11-deacetoxywortimannin, both new compounds in *Paecilomyces*. These compounds were isolated by chromatography column and HPLC, and their structures were elucidated by spectrometric methods (HRMS, ¹H, ¹³C NMR, and IR) besides comparison with literature data. Dereplication of the extract by LC-MS suggested the presence of cyclospirofungin, stanna A, virescenoside-D, (+)-esclerotiorin, 2'-Amino-2'-deoxyguanosine, fumaramidimicin e deoxynivalenol, all of the new compounds in *Paecilomyces*.

Keywords: Marine fungus, *Paecilomyces lilacinus*, wortimannin, 11-deacetoxywortimannin and dereplication.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da cefalosporina.....	15
Figura 2 - Gráfico da distribuição dos compostos bioativos em função da origem do fungo do qual foi isolado.....	16
Figura 3 - Gráfico da distribuição das classes de produtos naturais produzidos por fungos marinhos.....	17
Figura 4 - Foto de <i>Paecilomyces lilacinus</i> crescido em BDA.....	19
Figura 5 - Foto da ceratite (inflamação da córnea) em paciente causada por <i>Paecilomyces lilacinus</i>	20
Figura 6 – Ciclo-hexanonas e α -pironas isoladas de <i>P. lilacinus</i>	22
Figura 7 - Estrutura da Leucinostatina A.	24
Figura 8 - Estruturas das paecilotoxinas A, B, C, D, H e K.....	25
Figura 9 – Cromatogramas da análise por CLAE correspondente a 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo do fungo <i>P. lilacinus</i>	29
Figura 10 - Cultivo de BRF053 em meio de BD.	31
Figura 11 - Cromatogramas referentes as amostras 1 à 4 analisadas em coluna analítica de fase reversa.....	32
Figura 12 – Cromatogramas referentes às amostras 5 à 8 analisadas em coluna analítica de fase reversa.....	33
Figura 13 - Cromatogramas referentes às amostras 2 à 6 analisadas em coluna analítica de fase reversa.....	35
Figura 15 - Cromatograma da fração H ₂ O/MeOH 1:1. Injeção de 200 μ L de amostra, coluna semipreparativa de fase reversa, eluente MeOH/H ₂ O (45:55), tempo de corrida de 19min, fluxo de 4,72 mL/min.	37
Figura 16 - Cromatograma da fração Hex/AcOEt (1:1). Injeção de 200 μ L de amostra, coluna semipreparativa de fase reversa, eluente MeOH/H ₂ O (1:1), tempo de corrida de 15min, fluxo de 4,72 mL/min.	38

Figura 17 - Cromatograma da fração AcOEt 100%. Injeção de 200 µL de amostra, coluna semipreparativa de fase reversa, eluente MeOH:H ₂ O (42:58), tempo de corrida de 17,5min, fluxo de 4,72mL/min.	39
Figura 18 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 2.....	41
Figura 19 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 2.....	42
Figura 20 - Espectro de RMN ¹³ C DEPT (125 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 2.	42
Figura 21 - Espectro de RMN 2-D HSQC (125 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 2.....	43
Figura 22 – Fragmentos de BRF053 –2 determinados a partir do espectro de correlação heteronuclear a longa distância ¹ H x ¹³ C – HMBC.	44
Figura 23 - Espectro de RMN 2-D HMBC (125 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 2.....	45
Figura 24 - Espectro de absorção na região de infravermelho de BRF053- 2.	46
Figura 25 - Espectro de massas de BRF053 – 2 de alta resolução EM/IES.....	46
Figura 26 - Estrutura da Wortimanina (BRF053-2).....	47
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 1.....	51
Figura 28 - Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de BRF053 – 1.....	52
Figura 29 - Espectro de massas de BRF053 – 1 de alta resolução EM/IES.....	52
Figura 30 - Estrutura da 11-desacetoxiwortimanina (BRF053-1).....	53
Figura 31 – Metabólitos identificados através do AntiMarin data bank.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica do <i>Paelilomyces lilacinus</i>	20
Tabela 2. Massas dos extratos AcOEt do meio líquido do fungo <i>P. lilacinus</i> cultivado por 7, 14, 21, 28 dias em BD com água do mar sintética.....	28
Tabela 3 – Resultado da atividade de inibição do crescimento celular dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo do fungo <i>P. lilacinus</i>	30
Tabela 4 – Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>P. lilacinus</i> (fracionamento método 1) frente à linhagem tumoral HCT-116.....	31
Tabela 5 – Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>P. lilacinus</i> (Fracionamento método 2) frente à linhagem tumoral HCT-116.....	34
Tabela 6 - Dados espectrométricos de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) de BRF053 - 2.	48
Tabela 7 – Comparação dos dados de BRF053-2 com os dados da literatura	49
Tabela 8 - Dados espectrométricos de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) de BRF053 – 1.....	54
Tabela 9 – Identificação de metabólitos secundários do fungo <i>Paecilomyces lilacinus</i> através de desreplicação por LC-MS.	56
Tabela 10 - Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra H2O/ MeOH 1:1(Fracionamento método 1) do cultivo do fungo <i>Paecilomyces lilacinus</i>	67
Tabela 11 - Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra Hex/ AcOEt 1:1 (Fracionamento método 2) do cultivo do fungo <i>P. lilacinus</i>	68
Tabela 12 - Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra AcOEt 100% (Fracionamento método 2) do cultivo do fungo <i>P. lilacinus</i>	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BD - Meio de Cultura Batata- Dextrose

BDA - Meio de Cultura Batata- Dextrose Ágar

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CENAURENM – Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DEPT 135° - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°*

EM – Espectrometria de Massa

EM-IES – Espectrometria de Massa com Ionização por *Eletrospray*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

LC-MS – Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massa

LEMANOR – Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste

p.f. - Ponto de fusão

RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio - 1

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
2. Considerações Taxonômicas	19
2.1 <i>Paecilomyces lilacinus</i>	19
3. Levantamento Bibliográfico	22
3.1 Metabólitos secundários de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	22
4. Resultados e Discussão	28
4.1 Seleção do fungo	28
4.2 Cultivo de <i>P.lilacinus</i> para a produção de metabólitos secundários com atividade citotóxica	28
4.2.1 Estudo cinético em meio líquido BD com água do mar sintético	28
4.2.2 Atividade citotóxica dos extratos do cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética	30
4.2.3 Cultivo em grande escala do fungo <i>P. lilacinus</i>	30
4.2.4 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>P.lilacinus</i>	31
4.2.5 Determinação Estrutural	40
4.3 Estudo de desreplicação dos extratos	55
5. Procedimento Experimental	60
5.1 Métodos de Análise	60
5.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica	60
5.1.2 Cromatografia por adsorção em fase reversa	60
5.1.3 Cromatografia por adsorção em fase normal	60
5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	60
5.1.5 Rotação óptica (α) e Rotação específica ($[\alpha]_{Dt}$)	61
5.1.6 Ponto de fusão (p. f)	61
5.2 Solventes.....	61

5.3 Métodos espectrométricos	61
5.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a Espectrometria de massas (CLAE/EM)	61
5.3.2 Espectrometria de Ressonância magnética nuclear (RMN).....	62
5.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	62
5.4 Esterilização e preparação de meios de cultura	62
5.5 Preparações dos meios de cultura	63
5.5.1 Meio líquido de caldo de batata	63
5.5.2 Água do mar sintética	63
5.6 Micro-organismos	63
5.6.1 Obtenção e identificação dos fungos	63
5.6.2 Preservação do fungo.....	64
5.7 Teste citotóxico	64
5.8 Otimização do cultivo do fungo marinho <i>P. lilacinus</i> para a produção de metabólitos secundários	65
5.8.1 Estudo cinético em meio líquido BD com água do mar sintética	65
5.9 Cultivo em grande escala do fungo <i>P.lilacinus</i>	65
5.9.1 Fracionamento cromatográfico do extrato de <i>P.lilacinus</i>	66
5.9.2 Análises cromatográficas das amostras obtidas dos fracionamentos do extrato de <i>P.lilacinus</i>	66
5.9.3 Fracionamento da Fração H ₂ O/MeOH 1:1 (Fracionamento método 1).....	66
5.9.4 Fracionamento da Fração Hex/AcOEt 1:1 (Fracionamento método 2).....	67
5.9.5 Fracionamento da Fração AcOEt 100% (Fracionamento método 2)	68
6. Considerações Finais.....	70
7. Referências Bibliográficas.....	72

INTRODUÇÃO

1. Introdução

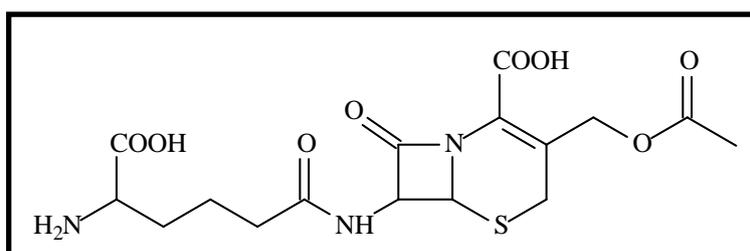
A natureza é uma fonte importante de produtos naturais biotivos a serem explorados. Mesmo na “era sintética” a maioria dos produtos farmacêuticos são oriundos de fontes naturais. Nos últimos anos, os metabólitos secundários obtidos a partir de micro-organismos, em especial de fungos, têm ganhado considerável atenção, por serem estruturalmente únicos se possuírem interessantes atividades biológicas (FOLMER *et al*, 2010).

Os fungos representam o segundo maior grupo de organismos no mundo. Uma estimativa sugere que existem em torno de 1,5 bilhões de espécies diferentes de fungos, com aproximadamente 70.000 identificadas. Eles se encontram entre os organismos mais importantes na produção de compostos bioativos, mas apenas uma pequena parcela deles já foi investigada como fonte de novos metabólitos secundários (RAVEN 2001; SURYANARAYANAN *et al*, 2009).

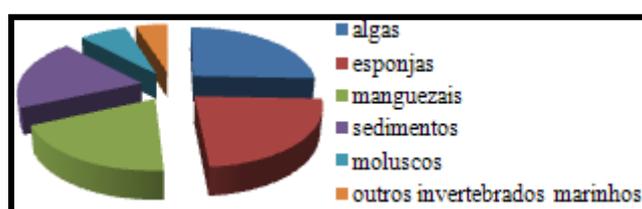
Nos últimos anos, os químicos de produtos naturais e farmacologistas tem voltado a atenção para fungos associados a ambientes pouco explorados (ex. ambiente marinho), uma vez que estes são fontes de substâncias bioativas com esqueletos pouco comuns. Os fungos marinhos possuem um sistema imunológico muito primitivo e convivem em ecossistemas muito povoados, por isso, produzem metabólitos secundários bioativos como mecanismo de defesa (YAMADA *et al*, 2010). Como exemplos, fungos marinhos associados a macro-organismos como algas, esponjas, corais e ascídias são uma fonte rica de substâncias biologicamente ativas (ZHANG *et al*, 2008; KJER *et al*, 2011).

Uma importante vantagem do estudo de fungos (marinhos e terrestres) em relação as demais fontes de produtos naturais é o fato destes micro-organismos poderem ser cultivados em grande escala, não causando prejuízos ao ecossistema. Além do uso sustentável da biodiversidade, o cultivo dos mesmos *in vitro* reduz os custos de repetidas coletas (SURYANARAYANAN *et al*, 2009; LIRA *et al*, 2007).

A classe de substâncias bioativas mais conhecida oriundas de fungos marinhos é a das cefalosporinas, com a cefalosporina C, Figura 1 (p.16), um antibiótico potente isolado pela primeira vez por Brotzuemem 1945 da cepa do fungo marinho *Acremonium chrysogenum* (KJER *et al*, 2011).

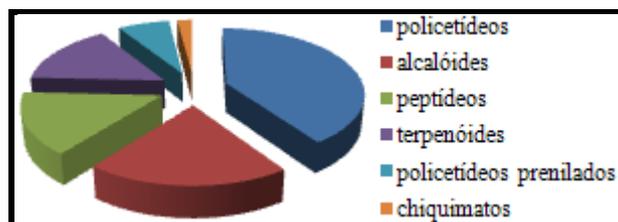
Figura 1 - Estrutura da cefalosporina C.

A partir do número de compostos publicados anualmente, torna-se evidente que a quantidade de produtos naturais bioativos oriundos de fungos marinhos está crescendo rapidamente, e ainda não chegou ao seu ponto mais alto (KJER *et al*, 2011). Estima-se que aproximadamente dois terços dos compostos oriundos de fungos marinhos são provenientes de cepas isoladas de organismos vivos, enquanto a maioria restante é proveniente de fungos isolados da matéria não viva (sedimentos). As algas são a principal fonte de fungos, seguidas das esponjas e dos manguezais. Uma interessante fonte que vêm ganhando destaque é o mar profundo, que nas estatísticas encontra-se relatado junto aos sedimentos. Todos esses dados estão explicitados no gráfico da Figura 2 (RATEBAB, *et al* 2011).

Figura 2 - Gráfico da distribuição dos compostos bioativos em função da origem do fungo do qual foi isolado.

A Figura 3 (p.17) mostra as principais classes de produtos naturais isoladas de fungos marinhos. É possível observar que os policetídeos e os alcalóides são os principais compostos identificados (RATEBAB *et al*, 2011).

Figura 3 - Gráfico da distribuição das classes de produtos naturais produzidos por fungos marinhos.



Frente aos 7.408Km de litoral brasileiro, ainda são poucas as informações documentadas em artigos científicos sobre a investigação de fungos marinhos como fonte de compostos bioativos (BERLINCK *et al*, 2004). Esse dado revela o grande potencial para a pesquisa nessa área no Brasil.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico de metabólitos secundários produzidos por *Paecilomyces lilacinus*, recuperado de sedimentos coletados na costa cearense. O estudo foi realizado através do fracionamento bioguiado dos extratos obtidos do cultivo do fungo sob condições otimizadas.

CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS

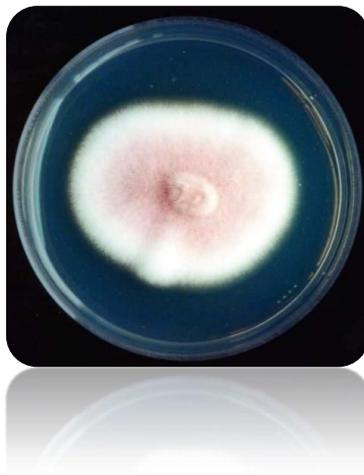
2. Considerações Taxonômicas

2.1 *Paecilomyces lilacinus*

Revisões da literatura mostram que *Paecilomyces* é um gênero que foi identificado pela primeira vez em 1974 e compreende uma vasta variedade de espécies, dentre elas está *P. lilacinus*. Esta espécie foi isolada a partir de uma ampla variedade de *habitats*, incluindo solos, florestas, pastagens, desertos e lodos de esgoto, bem como de ovos de nematóides. Além disso, tem sido frequentemente isolado a partir da rizosfera de diversas culturas. Este fungo foi também isolado a partir de uma fonte marinha, mais precisamente intestino de tainha (ELBANDY *et al*, 2009). No entanto, pouco se sabe sobre seus padrões de variação genética por meio de seu amplo contexto geográfico e ecológico. Até o momento não há relato na literatura de *P. lilacinus* isolado de sedimentos marinhos.

As colônias de *P. lilacinus* costumam apresentar, inicialmente, coloração branca, mas quando em esporulação passam a exibir um tom de rosa a vinho, Figura 4.

Figura 4 - Foto de *Paecilomyces lilacinus* crescido em BDA.

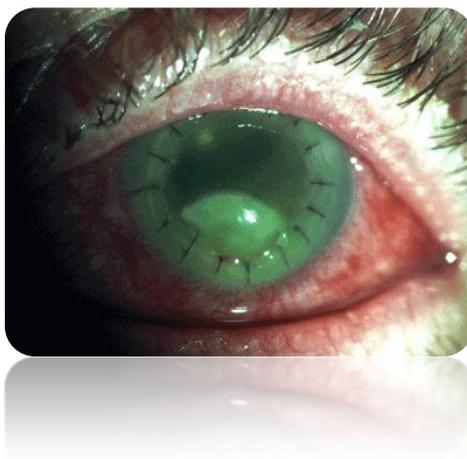


Fonte: www1a.biotec.or.th (2013)

A espécie *P. lilacinus* pode desenvolver-se num amplo intervalo de temperatura (8-38 °C) em alguns isolados, com ótimo crescimento no intervalo de 26-30°C. Tem também uma grande tolerância ao pH e pode crescer sobre uma grande variedade de substratos. *P. lilacinus* mostrou resultados promissores como agente de

controle biológico de nematoides parasitas de plantas. Pode causar ceratite, Figura 5 (p.20), mas é causa pouco frequente de doenças humanas, onde a maioria dos casos envolve pacientes com sistema imunológico comprometido, introdução de corpos estranhos, ou implantes de lentes intra-oculares (ELBANDY *et al*, 2009).

Figura 5 - Foto da ceratite (inflamação da córnea) em paciente causada por *Paecilomyces lilacinus*.



Fonte: biologiafungos-biologia.blogspot.com (2013)

A classificação taxonômica do fungo *Paecilomyces lilacinus* encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonômica do fungo *Paecilomyces lilacinus*.

Classificação Taxonômica	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordem	Eurotiales
Família	Trichocomaceae
Gênero	<i>Paecilomyces</i>
Espécie	<i>P. lilacinus</i>

Fonte: <http://naturdata.com/Paecilomyces-lilacinus-12154.htm> (2013)

LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3. Levantamento Bibliográfico

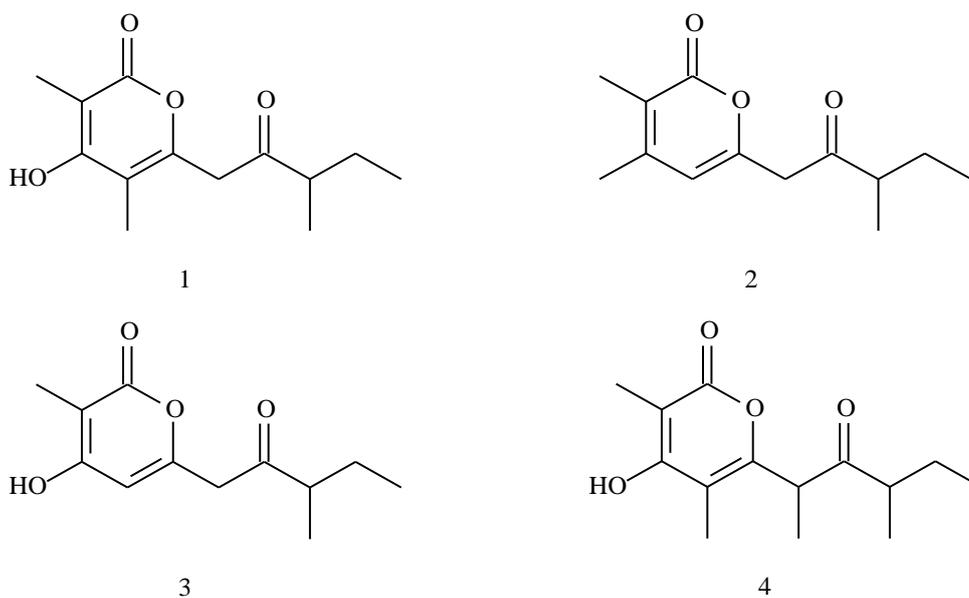
3.1 Metabólitos secundários de *Paecilomyces lilacinus*

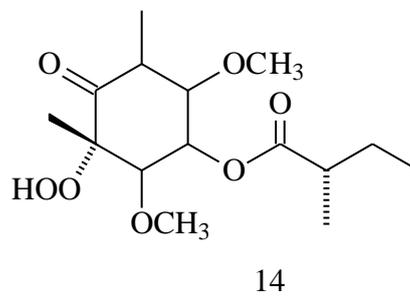
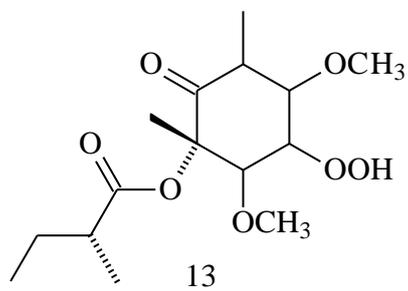
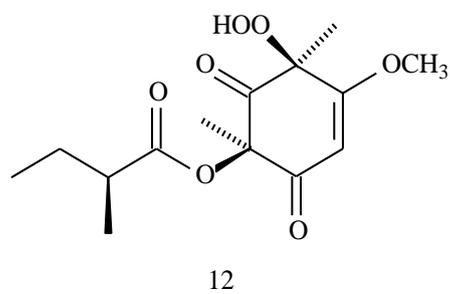
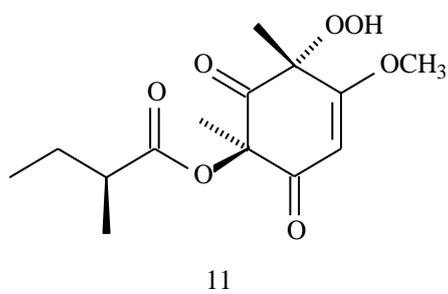
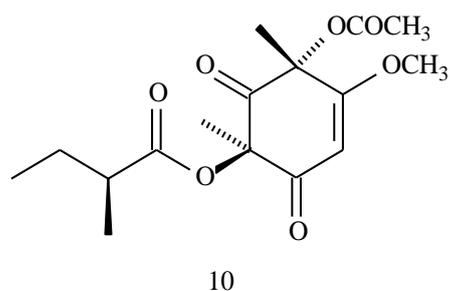
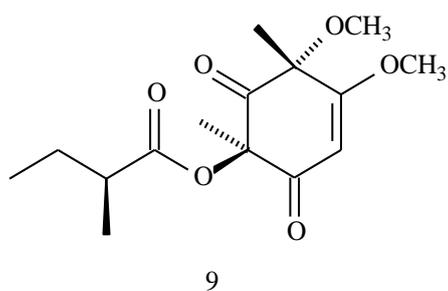
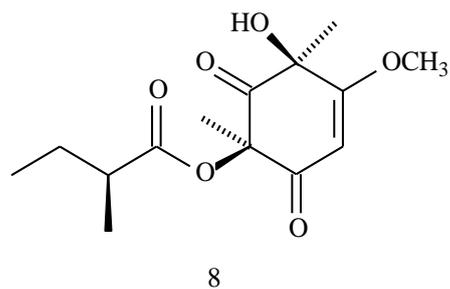
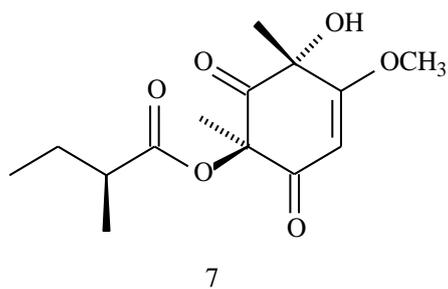
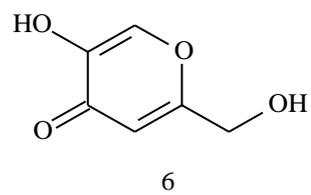
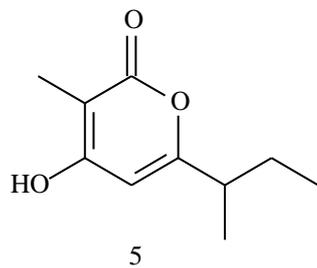
O levantamento bibliográfico dos metabólitos secundários produzidos por *P. lilacinus* foi realizado através de pesquisa (sem restrição de período) no *software Scifinder*, que disponibiliza informações da base de dados do *Chemical Abstracts*. O termo *Paecilomyces lilacinus* foi empregado como palavra-chave, seguido de refinamento com o termo *secondary metabolites*.

Espécies do gênero *Paecilomyces* são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários de diferentes classes químicas, tais como: xantonas, peptídeos, alcaloides, policetídeos, α -pironas, e com variadas atividades biológicas (citotóxica, antibacteriana e imunoestimulantes) (ELBANDY *et al*, 2009; TELES *et al*, 2013).

Elbandy e colaboradores descreveram o isolamento de ciclo-hexanonas e α -pironas (Figura 6) de *P. Lilacinus* isolado de uma esponja marinha. O fungo foi cultivado em meio de peptona, extrato de malte e glicose. Dentre os metabólitos secundários produzidos, os compostos 6,7 e 9 (Figura 6) foram avaliados quanto à citotoxicidade contra linhagens celulares de tumores sólidos humanos, tendo resultado insignificante até uma concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ (ELBANDY *et al*, 2009).

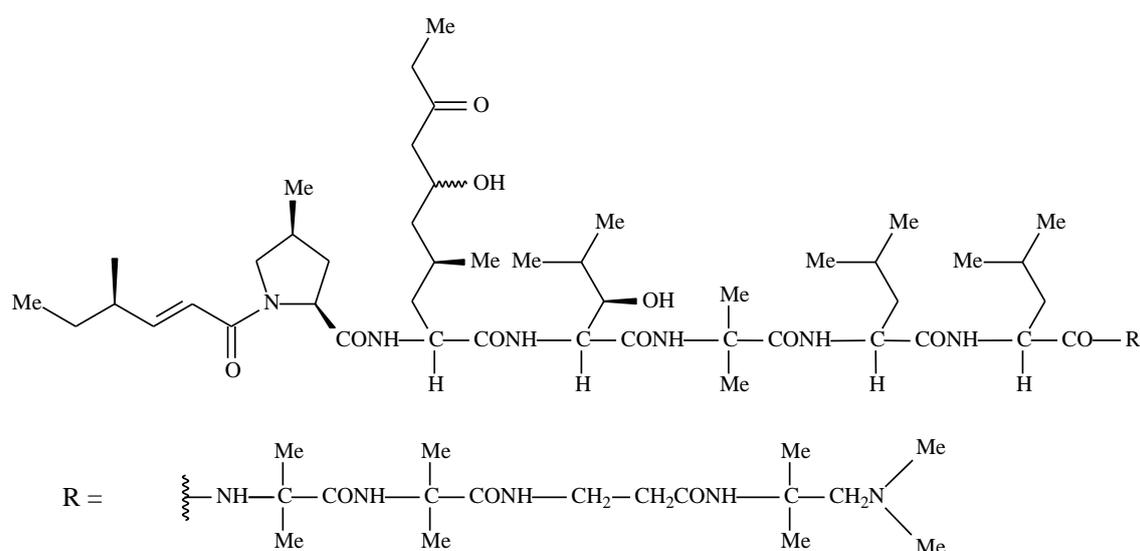
Figura 6 – Ciclo-hexanonas e α -pironas isoladas de *P. lilacinus*.



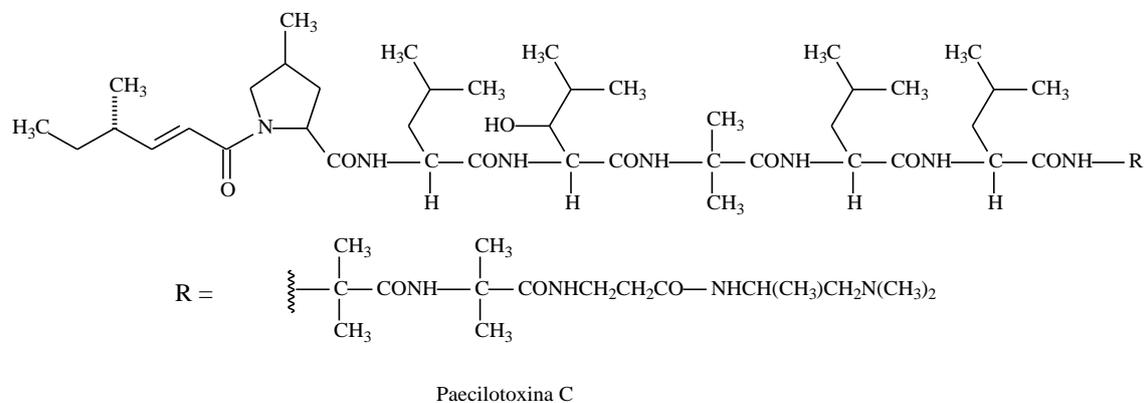
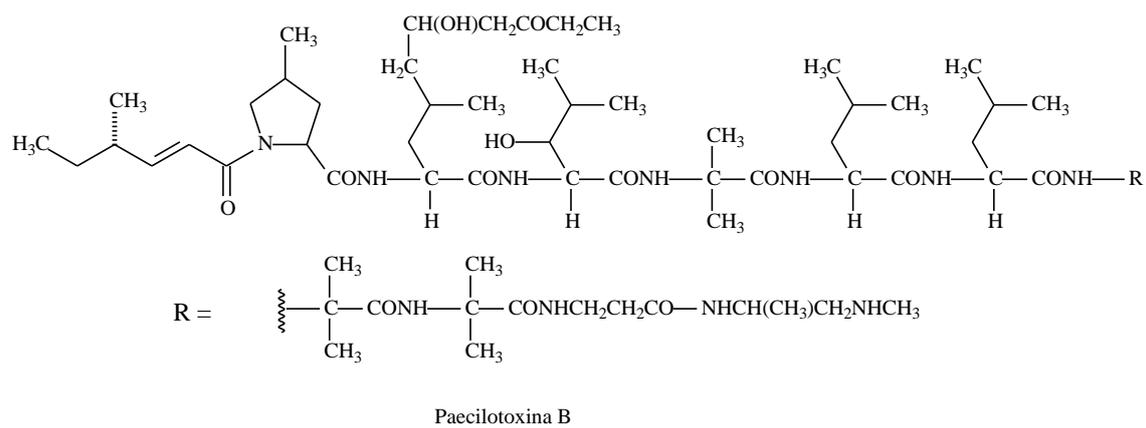
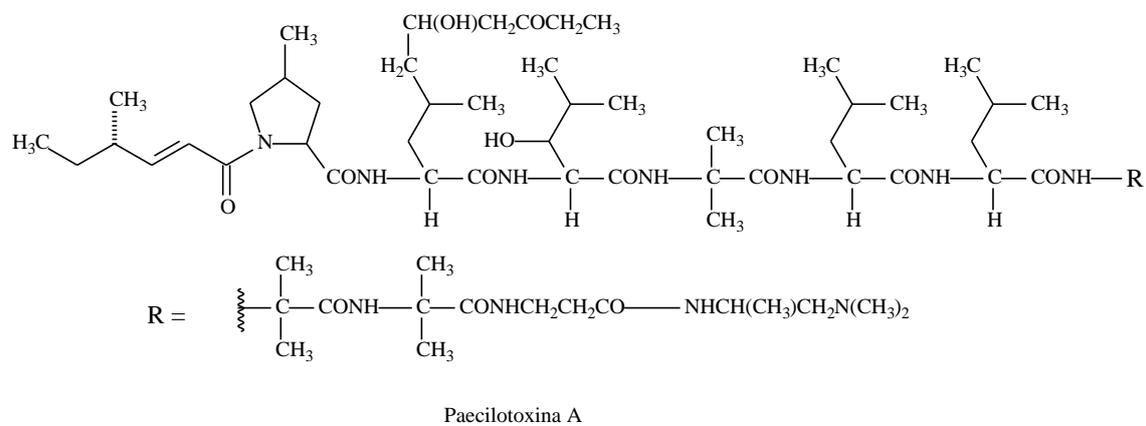


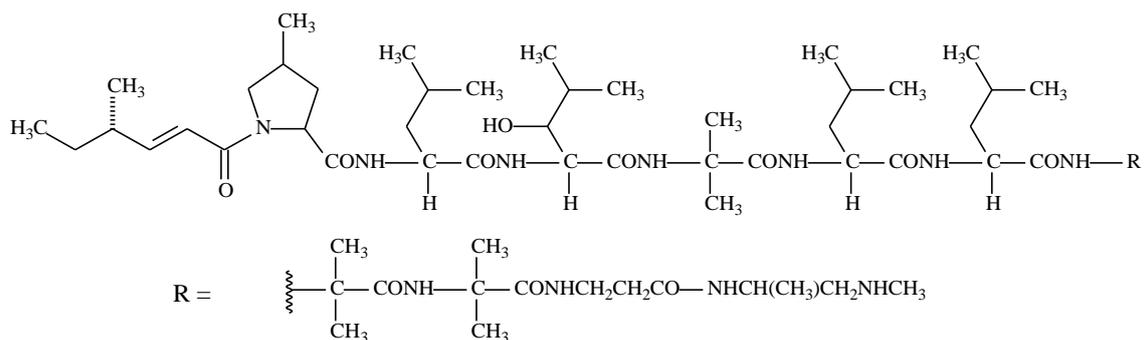
O peptídeo leucinostatina A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{13}$), Figura 7, foi obtido a partir de um filtrado de *P. lilacinus* e sua estrutura foi elucidada por espectrometria de massa e métodos de degradação. Este antibiótico despertou há um tempo atrás grande interesse devido à sua atividade antitumoral em carcinoma sólido Ehrlich e atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas e uma ampla variedade de fungos (MORI *et al*, 1982).

Figura 7 - Estrutura da Leucinostatina A.

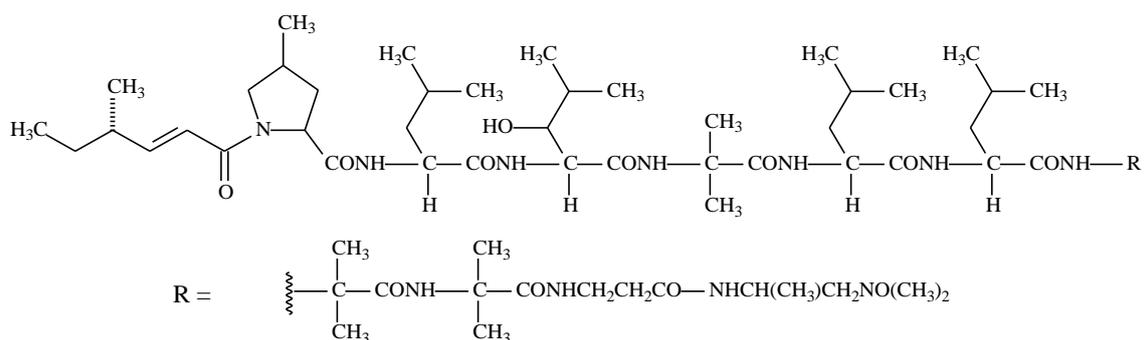


Outros peptídeos também foram isolados de *P. lilacinus*, os peptídeos denominados de paecilotoxinas. Os peptídeos denominados de paecilotoxinas foram produzidos por vários isolados de *P. lilacinus* cultivados em três meios diferentes, foi estudada por cromatografia líquida de alta eficiência (meio 1: pH entre 4,2 e 4,8; meio 2: pH entre 8,2 e 8,9; meio 3: pH entre 6,5 e 7,2). O meio alcalino mostrou-se o mais adequado na produção de toxinas, e das 20 cepas testadas, 19 produziram essa classe de compostos. Os padrões de produção de paecilotoxinas, Figura 8 (p.25), foram muito semelhantes em cada cepa, porém as principais toxinas foram paecilotoxina A e paecilotoxina B (MIKAMI *et al*, 1989).

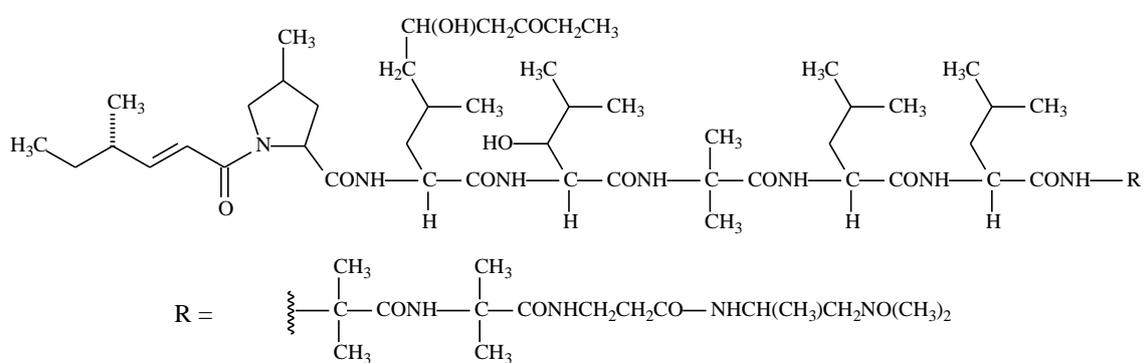
Figura 8 - Estruturas das paecilotoxinas A, B, C, D, H e K.



Paecilotoxina D



Paecilotoxina H



Paecilotoxina K

O estudo biológico das toxinas mostrou que elas apresentam forte atividade contra desacoplamento mitocondrial de fígado de rato, bem como atividade antimicrobiana (MIKAMI *et al*, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1 Seleção do fungo

Um total de 48 cepas de fungos foi previamente recuperado dos sedimentos da praia do Pecém, litoral do Ceará, baseando-se nas diferenças morfológicas parciais das mesmas quando crescidas em meio semi-sólido batata dextrose ágar (BDA) com água do mar sintética. Todas as cepas foram cultivadas em meio líquido BD com água do mar sintética e os respectivos extratos orgânicos (acetato de etila) foram testados frente à linhagem de células cancerígenas HCT-116 (colón) (RODRIGUES, 2011).

Dentre os fungos que apresentaram extratos com atividade citotóxica maior que 70%, a cepa BRF053 foi uma das que apresentou maior atividade (92,43%). Esta foi selecionada para o fracionamento e isolamento dos metabólitos secundários citotóxicos e foi identificada como *Paecilomyces lilacinus*, Item 5.6.1 (p. 63).

4.2 Cultivo de *P. lilacinus* para a produção de metabólitos secundários com atividade citotóxica

4.2.1 Estudo cinético em meio líquido BD com água do mar sintético

P.lilacinus (BRF053) foi cultivado em meio líquido BD com água do mar sintética por 7, 14, 21 e 28 dias sob condição estática (sem agitação), Item 5.8.1 (p.65). Ao final de cada período de cultivo, o micélio foi descartado e o meio líquido foi submetido à partição com AcOEt. As massas dos extratos orgânicos de cada período de cultivo se encontram na Tabela

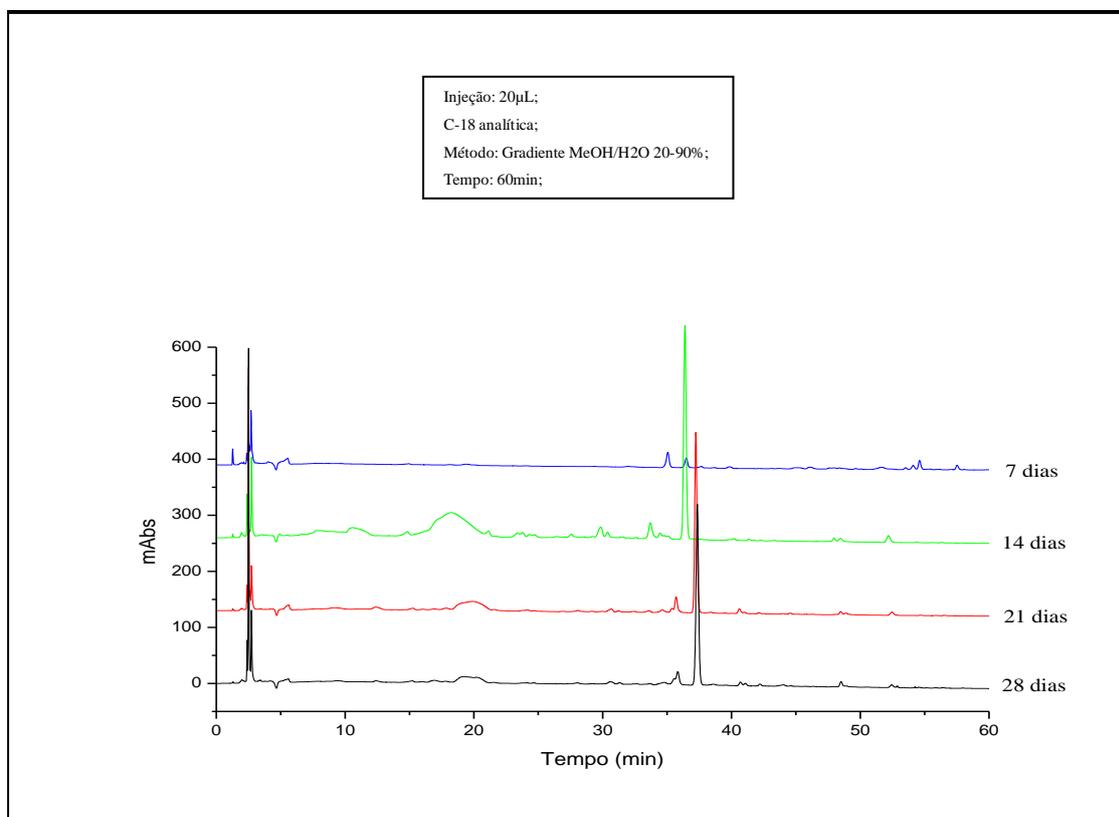
Tabela 2 - Massas dos extratos AcOEt do meio líquido do fungo *P.lilacinus* cultivado por 7, 14, 21, 28 dias em BD com água do mar sintética.

Tempo de cultivo (dias)	Massa do extrato (mg)
7	13,6
14	17,8
21	15,5
28	14,6

Pelas massas dos extratos dos diferentes dias de cultivo, pôde-se observar que o fungo manteve uma taxa crescente de aumento de massa até o 14º dia. Após este período, observa-se um pequeno decréscimo da massa do extrato. Isto pode ser explicado pelo fato de que nos primeiros dias de cultivo há uma abundância de nutrientes no meio de cultura, o que leva a uma elevada taxa de crescimento. Com o passar do tempo, acontece a diminuição da disponibilidade de nutrientes, 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 (SERRANO-CARREON *et al*, 1992).

Os extratos referentes aos diferentes dias de cultivo foram submetidos à análise por CLAE a fim de avaliar a produção de metabólitos secundários através do perfil dos cromatogramas. Os cromatogramas com seus respectivos métodos estão apresentados na Figura 9 (p.29).

Figura 9 – Cromatogramas da análise por CLAE correspondente a 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo do fungo *P. lilacinus*.



Foi possível observar uma grande similaridade entre os cromatogramas, principalmente entre os referentes ao 14^o, 21^o e 28^o dias de cultivo.

4.2.2 Atividade citotóxica dos extratos do cultivo em meio líquido BD com água do mar sintética

As frações do cultivo obtidas no estudo cinético (7, 14, 21 e 28 dias) tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas frente à linhagem de célula tumoral HCT-116 (cólon), Item 5.7 (p.64), e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da atividade de inibição do crescimento celular (célula tumoral HCT-116) dos extratos (50 µg/mL) de 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo do fungo *P.lilacinus*.

Tempo (dias)	% inibição
7	82,5
14	85,7
21	70,7
28	55,7

Foi possível observar que a atividade citotóxica teve um aumento muito pequeno com o tempo de cultivo até o 14^o dia e em seguida um decaimento a partir do 21^o dia. Desta forma, através da análise das massas, do percentual de inibição e da análise dos cromatogramas, o tempo de 14 dias de cultivo foi escolhido para a produção do fungo em grande escala.

4.2.3 Cultivo em grande escala do fungo *P. lilacinus*

Com base nos resultados do estudo cinético, a cepa de *P. lilacinus* (BRF053), foi cultivada em meio líquido BD com água do mar sintética, Figura 10 (p. 31), em grande escala (10 litros de meio) por 14 dias, Item 5.9 (p.65). Ao final desse período, separou-se o micélio do meio líquido por filtração a vácuo. O micélio foi descartado e o meio líquido submetido à partição líquido-líquido com AcOEt, obtendo-se 1,2 g de extrato bruto. Este foi submetido a teste citotóxico frente a uma linhagem de célula tumoral HCT-116 (cólon) e apresentou percentual de inibição de crescimento em uma

concentração única de 50 µg/mL de 89,3%, atividade coerente com a anteriormente observada no estudo cinético, Item 4.2.1 (p.28).

Figura 10 - Cultivo de BRF053 em meio de BD.



4.2.4 Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *P.lilacinus*

O extrato AcOEt (519,0 mg) de *P.lilacinus* foi submetido à purificação em coluna C18 de bancada no modo gradiente (fracionamento método 1), Item 5.9.1 (p.66), empregando-se como eluentes H₂O100%; 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%. Todas as frações foram submetidas à avaliação de atividade citotóxica. As massas das frações e os respectivos resultados da atividade biológica estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *P.lilacinus* (fracionamento método 1) frente à linhagem tumoral HCT-116.

Eluente	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)	% inibição
H ₂ O 100%	1	31,5	6,06	26,1
H ₂ O/MeOH 8:2	2	59,1	11,3	35,0
H ₂ O/MeOH 6:4	3	75,8	14,6	39,5
H ₂ O/MeOH1:1	4	92,9	17,8	94,0
MeOH/H ₂ O 7:3	5	152,1	29,3	100,0
MeOH/H ₂ O 8:2	6	13,0	2,5	96,1
MeOH/H ₂ O 9:1	7	14,8	2,8	99,8
MeOH 100%	8	31,0	5,9	100,0
TOTAL		470,2	90,6	

As frações com maiores atividades citotóxicas correspondem às amostras 4, 5, 6, 7 e 8. Contudo, através da análise do binômio atividade citotóxica/massa de extrato, observa-se que apenas as amostras 4 e 5 são viáveis para fracionamento bioguiado. Todas as oito frações foram submetidas à análise por CLAE, Figuras 11 e 12 (p. 32 e 33), a fim de verificar se havia semelhança entre as mesmas.

Figura 11 - Cromatogramas referentes as amostras 1 à 4 analisadas em coluna analítica de fase reversa.

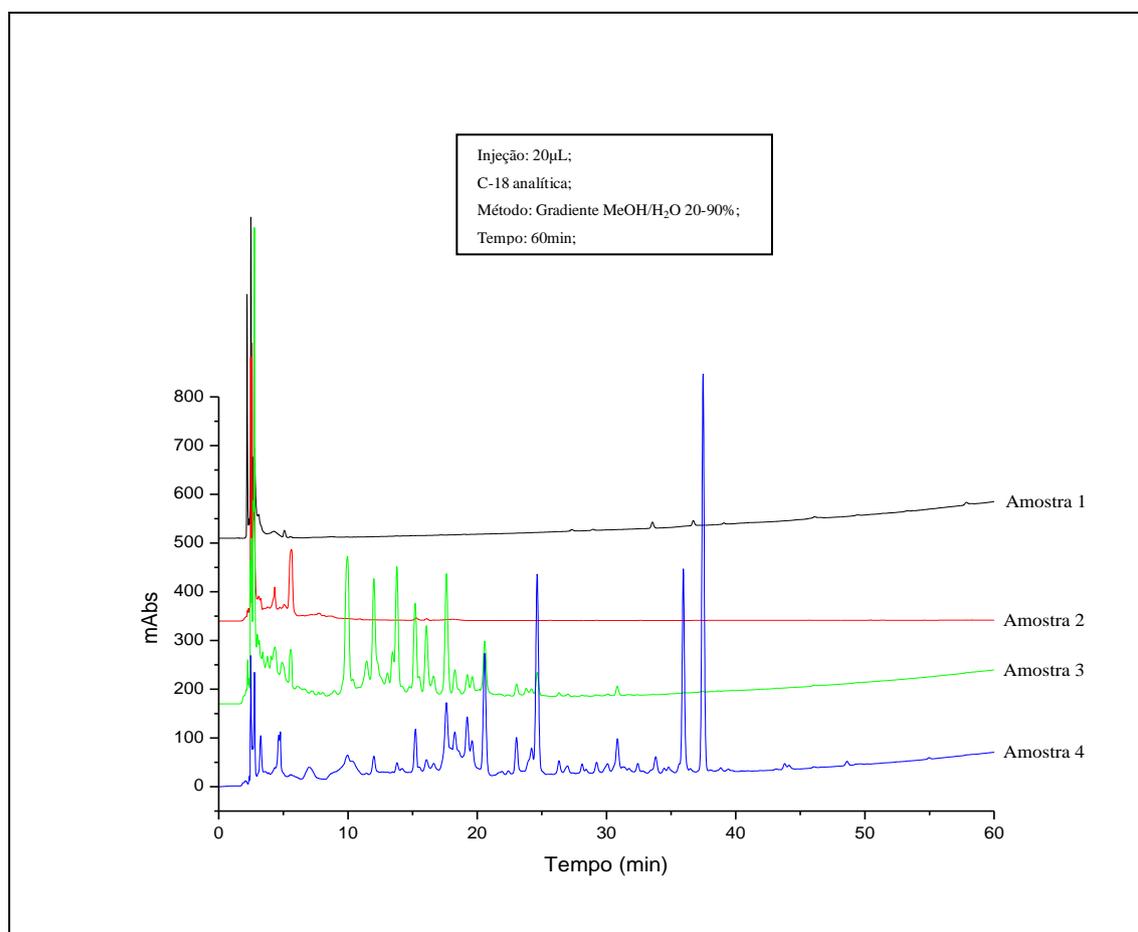
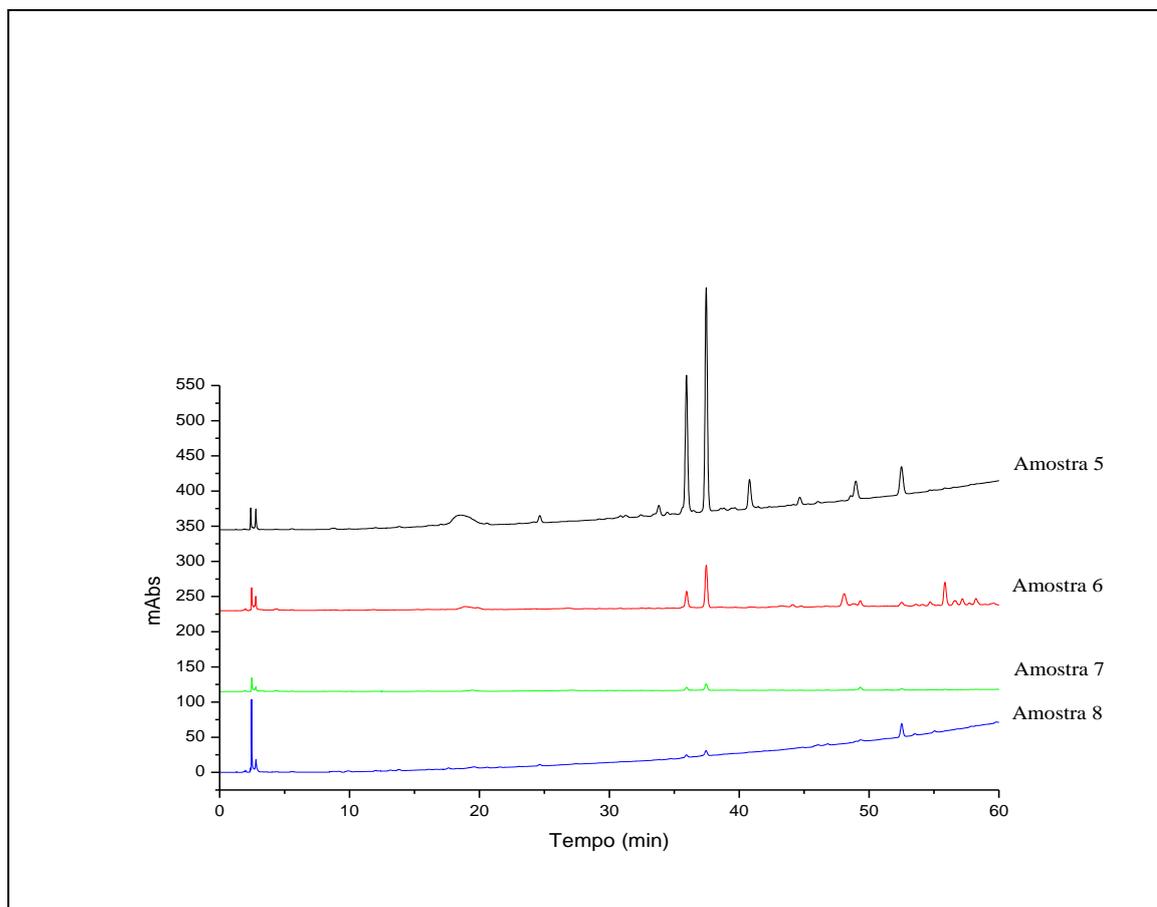


Figura 12 – Cromatogramas referentes às amostras 5 à 8 analisadas em coluna analítica de fase reversa.



A análise dos cromatogramas nos mostrou que os picos relativos aos metabólitos secundários produzidos pelo fungo só ficaram evidentes nas amostras 3 a 6. Nas demais frações, praticamente só são observados os picos referentes ao meio de cultura. Contudo, através da análise do binômio atividade citotóxica/cromatogramas CLAE, observa-se que apenas as amostras 4, 5 e 6 são viáveis para fracionamento bioguiado.

O extrato AcOEt (500,0mg) de *P.lilacinus* também foi submetido a fracionamento, desta vez, em coluna filtrante modo gradiente (fracionamento método 2), Item 5.9.1 (p. 66), empregando-se como eluentes: Hexano 100%; Hexano/AcOEt 2:1; Hexano/AcOEt 1:1; AcOEt 100%; AcOEt/Metanol 3:1; AcOEt/Metanol 2:1; AcOEt/Metanol 1:1; Metanol 100%; Metanol/H₂O 3:1; Metanol/H₂O 1:1 e H₂O 100%. Todas as frações foram bioensaiadas frente à linhagem tumoral HCT-116. As massas das frações e os respectivos resultados da atividade biológica estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 – Massas e percentual de inibição do crescimento celular (50 µg/mL) das frações oriundas do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *P.lilacinus*(Fracionamento método 2) frente à linhagem tumoral HCT-116.

Siglas	Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)	% Inibição
Hex 100%	1	13,6	2,7	22,8
Hex/AcOEt 2:1	2	37,9	7,5	7,8
Hex/AcOEt 1:1	3	129,7	25,9	90,3
AcOEt 100%	4	76,0	15,2	86,8
AcOEt/MeOH 3:1	5	144,4	28,8	36,7
AcOEt/MeOH 2:1	6	20,0	4,0	65,6
AcOEt/MeOH 1:1	7	14,3	2,9	9,7
MeOH 100%	8	14,3	2,9	29,5
MeOH/H₂O 3:1	9	16,6	3,3	12,4
MeOH/H₂O 1:1	10	7,4	1,4	24,4
H₂O 100%	11	6,2	1,2	----
TOTAL		480,7	96,1	

As frações com maiores atividades citotóxicas correspondem às frações 3 e 4, as quais também apresentam massas suficientes para fracionamento cromatográfico bio guiado.

As frações correspondentes as amostras 2-10 foram submetidas à análise por CLAE e os cromatogramas encontram-se apresentados nas Figuras 13 e 14 (p. 35).

Figura 13 - Cromatogramas referentes às amostras 2 à 6 analisadas em coluna analítica de fase reversa.

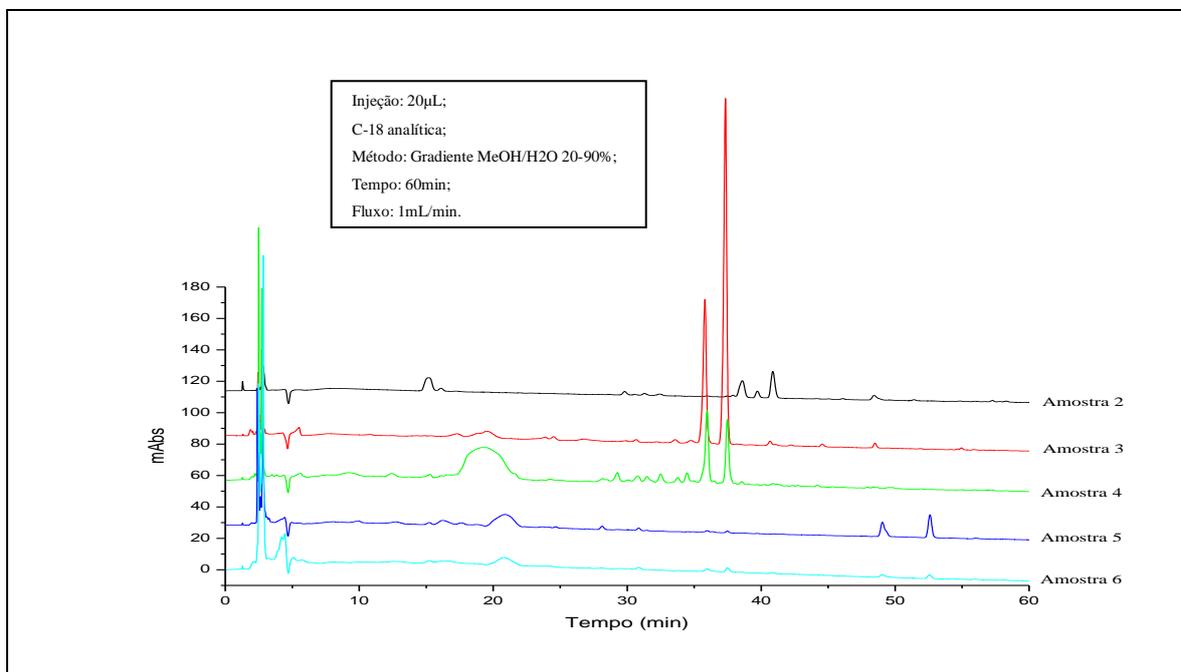
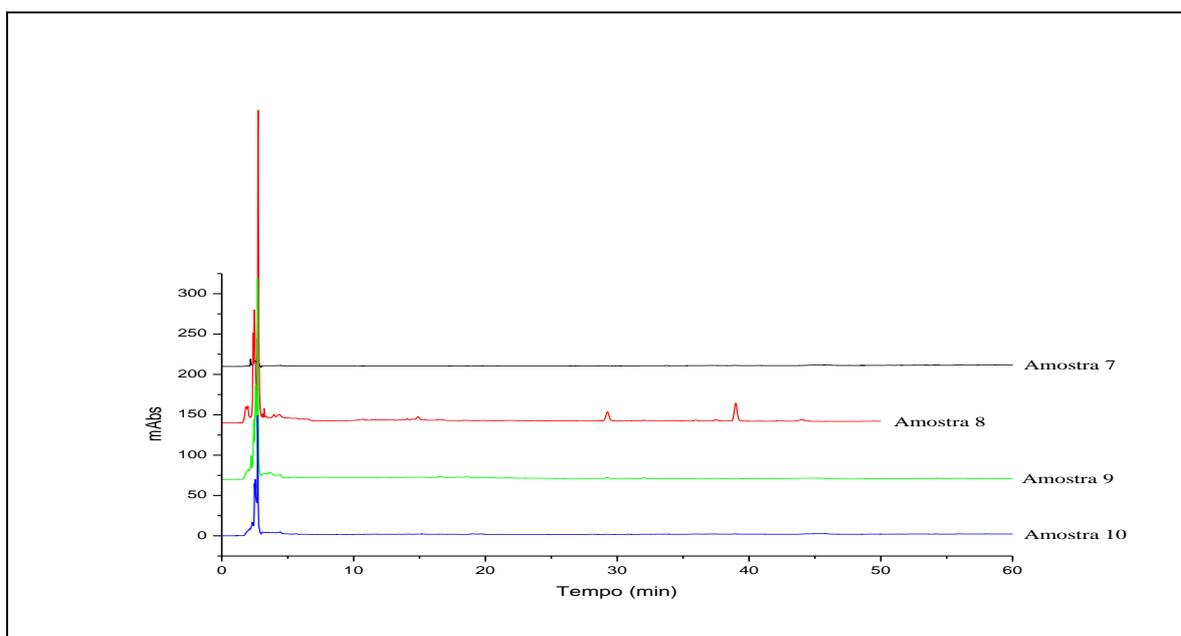


Figura 14 - Cromatogramas referentes às amostras 7 à 10 analisadas em coluna analítica de fase reversa.



A análise dos cromatogramas referentes ao fracionamento método 2 nos mostra que os picos relativos aos metabólitos secundários produzidos pelo fungo só ficaram evidentes nas frações 3, 4 e 5, Figura 13 (p.35). Nas demais frações, praticamente só são observados os picos referentes ao meio de cultura. Contudo, através da análise do binômio atividade citotóxica/cromatogramas CLAE, observa-se que apenas as amostras 3 e 4 são viáveis para fracionamento bioguiado.

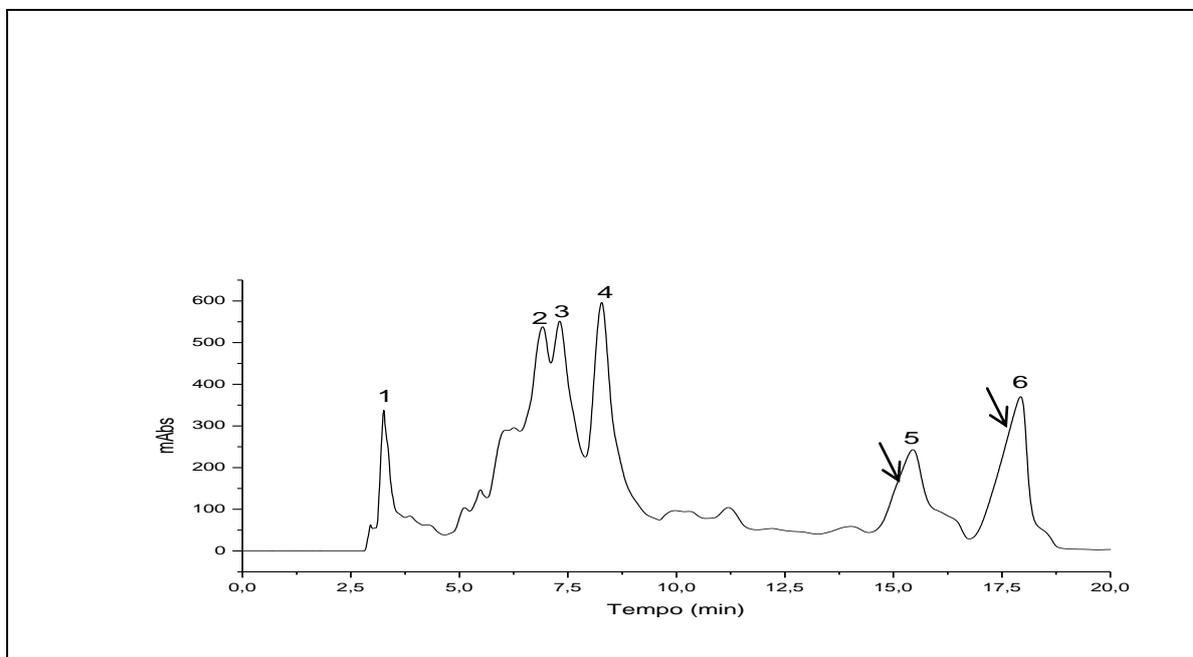
A comparação dos resultados discutidos para os dois métodos de fracionamento (método 1 e método 2), revelou que no fracionamento em coluna de fase reversa (método 1) a atividade citotóxica foi elevada em pelo menos cinco das oito frações obtidas. Já no fracionamento pelo método 2 os valores de atividade citotóxica só foram elevados em apenas duas das onze frações, o que mostra um resultado mais promissor no fracionamento pelo método 1.

Ainda comparando os dois métodos de fracionamento através dos respectivos cromatogramas obtidos por CLAE, foi possível observar que no fracionamento pelo método 1, das oito amostras, apenas os cromatogramas de quatro apresentaram evidentemente a presença de metabólitos em seu perfil, já no fracionamento pelo método 2, das onze amostras, apenas os cromatogramas de três apresentaram evidentemente a presença de metabólitos em seu perfil, desta forma, o fracionamento pelo método 1 se mostrou mais viável por apresentar uma melhor separação dos picos relativos aos metabólitos secundários produzidos.

4.2.4.1 Fracionamento da Fração H₂O/MeOH 1:1 (Amostra 4), fracionamento método 1

A fração H₂O/MeOH 1:1 (92,9 mg) foi cromatografada por CLAE e o cromatograma encontra-se apresentado na Figura 15 (p.37). Buscando encontrar um melhor perfil para separação e consequente isolamento dos metabólitos, foram utilizadas outras fases móveis, porém, a fase móvel citada se apresentou como melhor opção. Baseado nisso, foi possível isolar os compostos correspondentes aos picos com tempo de retenção 15,44 (**pico 5**: 2,0 mg, 2,2%) e 17,92 (**pico 6**: 1,5 mg, 1,6%) minutos

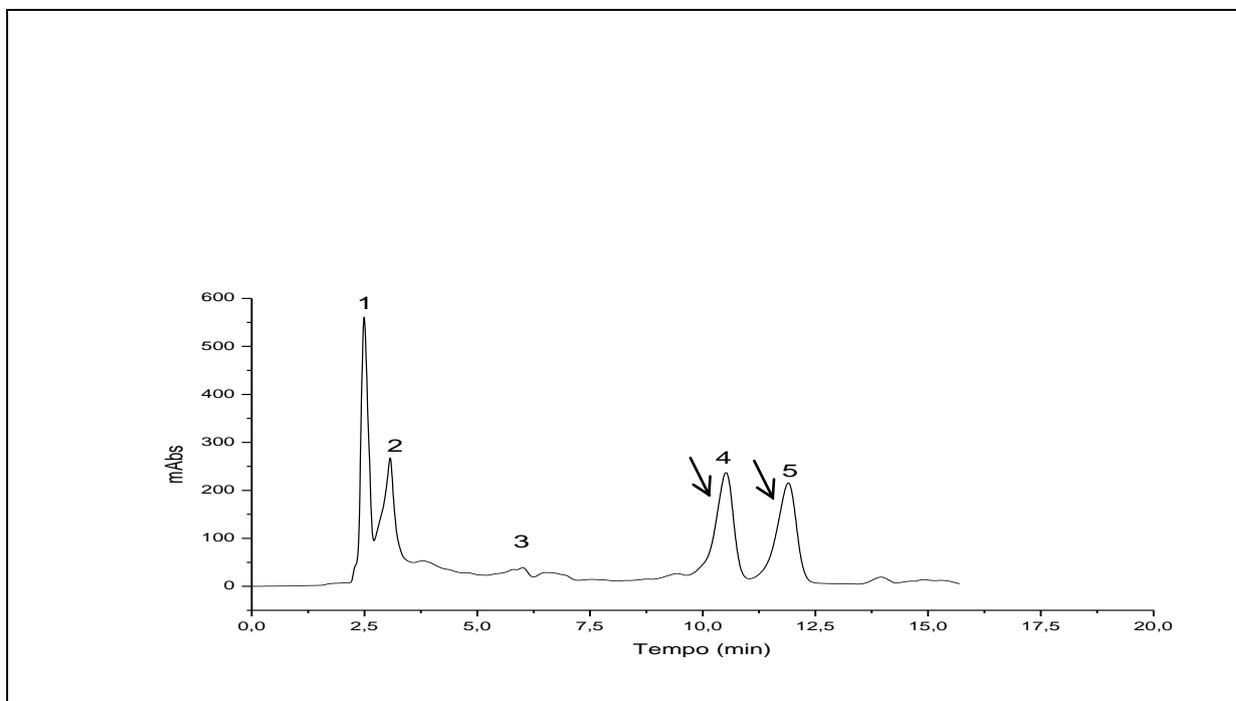
Figura 15 - Cromatograma da fração H₂O/MeOH 1:1. Injeção de 200 µL de amostra, coluna semipreparativa de fase reversa, eluente MeOH/H₂O (45:55), tempo de corrida de 19min, fluxo de 4,72 mL/min.



4.2.4.2 Fracionamento da Fração Hex/AcOEt 1:1 (Amostra 3), fracionamento método 2

A Fração Hex/AcOEt 1:1 (129,7mg) foi cromatografada por CLAE e o cromatograma relativo a esta fração encontra-se na Figura 16 (p.38). Foram isolados os compostos associados aos picos com tempo de retenção 10,51 (**pico 4**: 6,20 mg, 4,8%) e 11,89 (**pico 5**: 13,50 mg, 10,4%) minutos

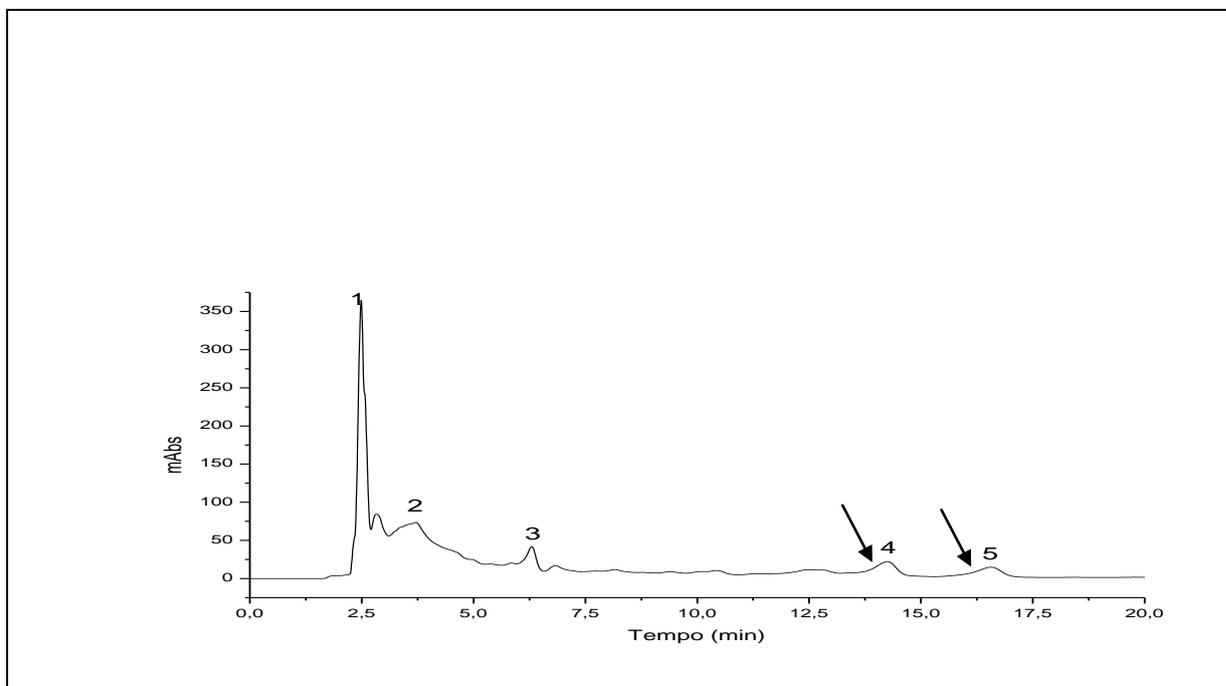
Figura 16 - Cromatograma da fração Hex/AcOEt (1:1). Injeção de 200 μ L de amostra, coluna semipreparativa de fase reversa, eluente MeOH/H₂O (1:1), tempo de corrida de 15min, fluxo de 4,72 mL/min.



4.2.4.3 Fracionamento da Fração AcOEt 100% (Amostra 4), fracionamento método 2

A fração AcOEt 100% (76,0 mg) foi cromatografada por CLAE, cujo cromatograma encontra-se apresentado na Figura 17 (p.39). Foi possível isolar os compostos correspondentes aos picos com tempo de retenção 14,24 (**pico 4**: 7,0 mg, 9,2%) e 16,56 (**pico 5**: 5,8 mg, 7,6%) minutos.

Figura 17 - Cromatograma da fração AcOEt 100%. Injeção de 200 μ L de amostra, coluna semipreparativa de fase reversa, eluente MeOH:H₂O (42:58), tempo de corrida de 17,5min, fluxo de 4,72mL/min.



Através da análise de todos os compostos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ¹H e ¹³C), e espectrometria de massas (EM), foi possível concluir que os dois compostos isolados da fração H₂O/MeOH 1:1 (Fracionamento método 1) eram iguais aos posteriormente isolados das frações Hex/AcOEt 1:1 e AcOEt100% (Fracionamento método 2). Estes dois compostos foram denominados BRF053-1 e BRF053-2, e a determinação estrutural dos mesmos encontram-se discutidas nos Itens 4.2.5.1 e 4.2.5.2 (p. 40 e 50).

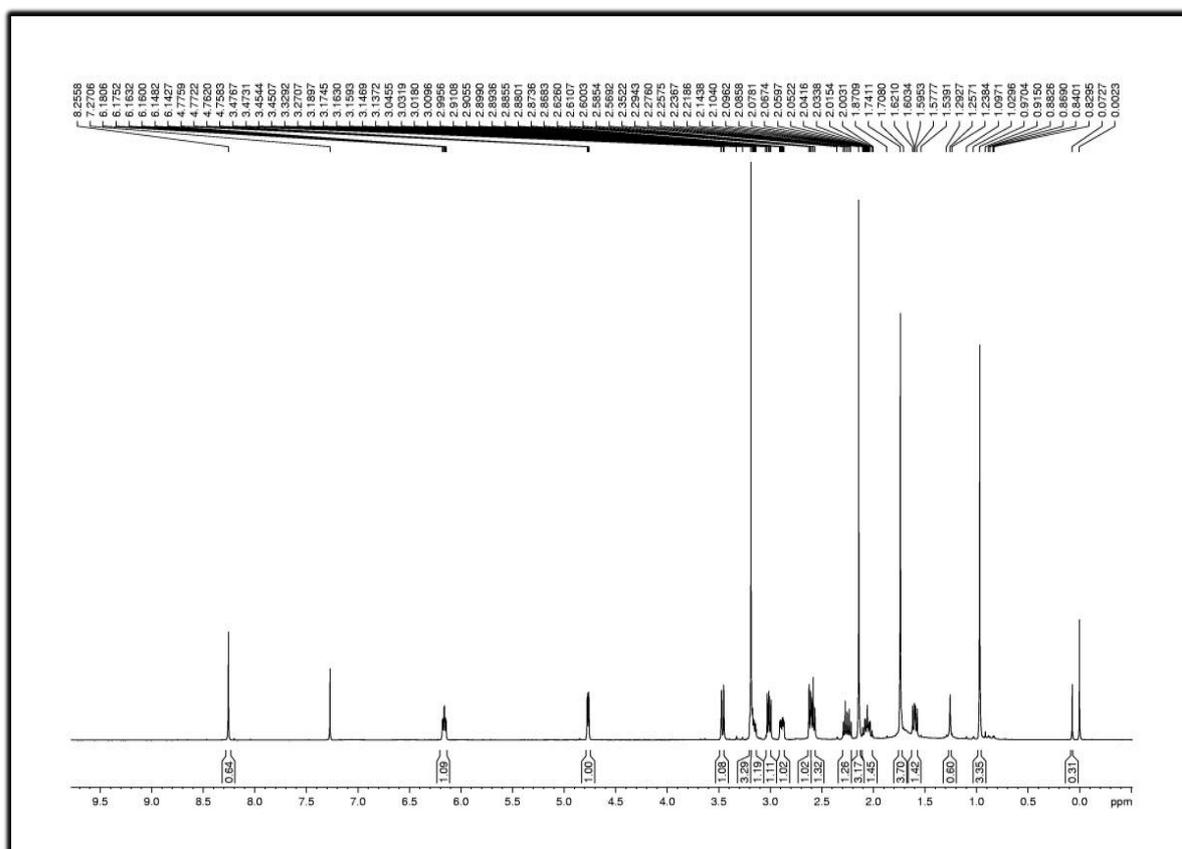
A atividade citotóxica de BRF053-1 e BRF053-2 foi testada frente à célula tumoral HCT-116 (côlon) e os resultados de IC₅₀ foram >25 μ g/mL e 5,098 μ g/mL, respectivamente. Desta forma, foi possível sugerir que a atividade citotóxica das frações deve-se, principalmente, à presença de BRF053-2 nas mesmas.

4.2.5 Determinação Estrutural

4.2.5.1 Determinação Estrutural de BRF053-2

BRF053-2 apresentou-se como sólido amarelo com P.f.: 238,5- 238,9 °C e $[\alpha]_D^{26} = + 89$ °C ($c=1,1$ g/ 100 mL; CHCl_3), dados idênticos aos obtidos na literatura, (MACMILLAN, et al 1972) . O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3), Figura 18 (p. 41), apresentou quatro singletos em δ 0,97 (3H, s, H-20); δ 1,70 (3H, s, H-19), δ 2,17 (3H, s, H-23) e δ 3,18 (3H, s, H-18) referentes a quatro grupos metílicos. O sinal em δ 2,17 está de acordo com um grupo metílico α -carbonílico, possivelmente de um grupo acetila. O sinal em δ 3,18 confirmou a presença de uma metila ligada a oxigênio, conferindo a identificação de um grupo metoxila na molécula. Os sinais de hidrogênios em δ 2,00 – 2,01 (1H, m, H-15), δ 3,13 – 3,18 (1H, m, H-15), δ 2,25 (1H, dt, $J = 19,6$ e $7,7$ Hz, H-16), δ 2,58 (1H, t, $J = 19,6$ Hz, H-16), δ 1,60 (1H, dd, $J = 12,8$ e $8,7$ Hz, H-12), δ 2,61 (1H, d, $J = 12,8$ Hz, H-12), δ 3,02 (1H, dd, $J = 11,1$ e $6,9$ Hz, H-18) e δ 3,46 (1H, dd, $J = 11,1$ e $1,8$ Hz, H-18) sugerem a presença de quatro grupos metilênicos heterotópicos. Foi também observado um hidrogênio metínico em δ 2,88 (1H, m, H-14), dois hidrogênios oximetínicos em δ 4,77 (1H, dd, $J = 6,9$ e $1,8$ Hz, H-1) e δ 6,16 (1H, dd, $J = 8,7$ e $2,7$ Hz, H-11), além de um sinal em δ 8,25 (1H, s, H-21) associado a um hidrogênio ligado a um carbono olefínico oxigenado.

Figura 18 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de BRF053 – 2.



O espectro de RMN ^{13}C - CPD (125 MHz, CDCl_3), Figura 19 (p. 42), apresentou 23 linhas espectrais. A análise comparativa dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° , Figuras 19 e 20 (p.42), possibilitou definir o padrão de hidrogenação dos átomos de carbono. Com base nos deslocamentos químicos (SILVERSTEIN et al, 2007), os sinais com deslocamento em δ 14,8; 21,3 e 26,7 estão de acordo com carbonos metílicos, enquanto que o sinal em δ 59,7 é condizente com uma metoxila. Foram também observados os sinais em δ 23,2; 35,9; 36,4 e 73,1 de carbonos metilênicos, sendo este último referente a um carbono oxigenado. Além de quatro sinais em δ 44,3, 70,3, 88,7 e 150,2, os quais se referem a carbonos metínicos, sendo este último associado a carbono olefínico oxigenado. Os sinais em δ 41,0; 49,4; 114,5; 140,6; 143,1; 145,0; 149,8; 157,8; 169,7; 172,8 e 216,4 foram atribuídos a carbonos não hidrogenados. Destes, os sinais em δ 157,8; 169,7; 172,8 e 216,4 foram correlacionados a carbonos carbonílicos.

Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de BRF053 – 2.

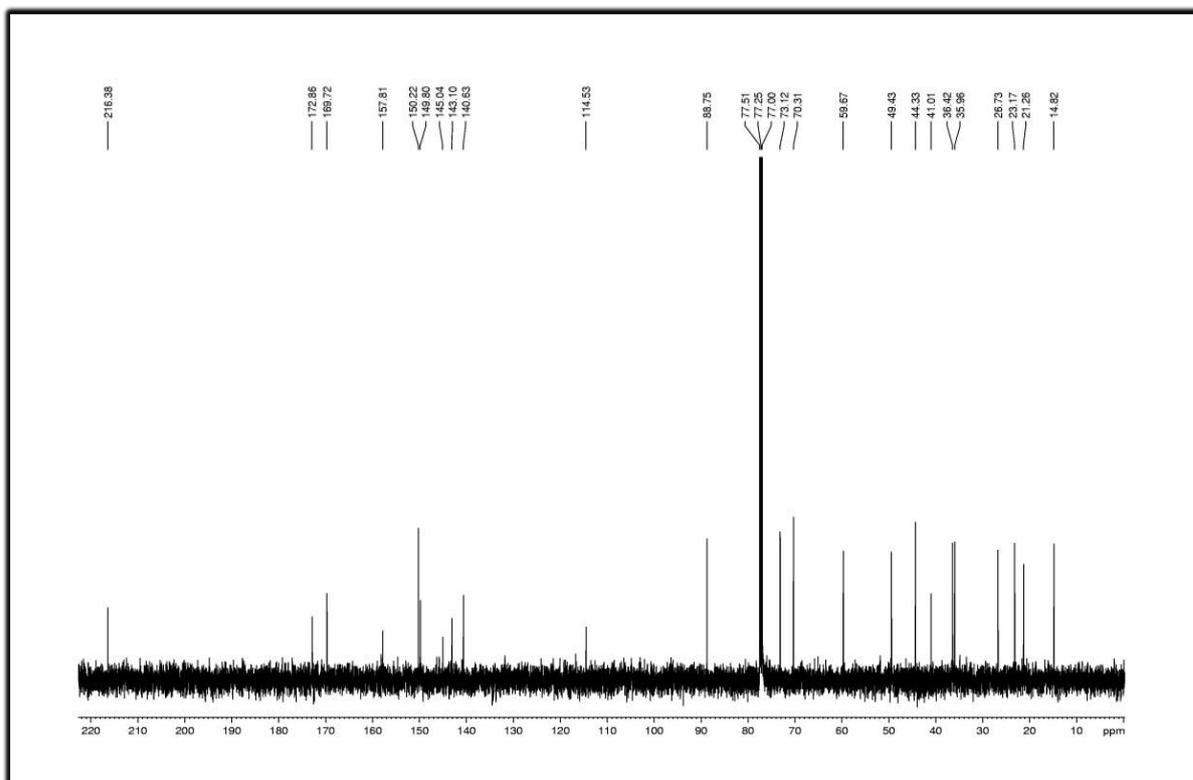
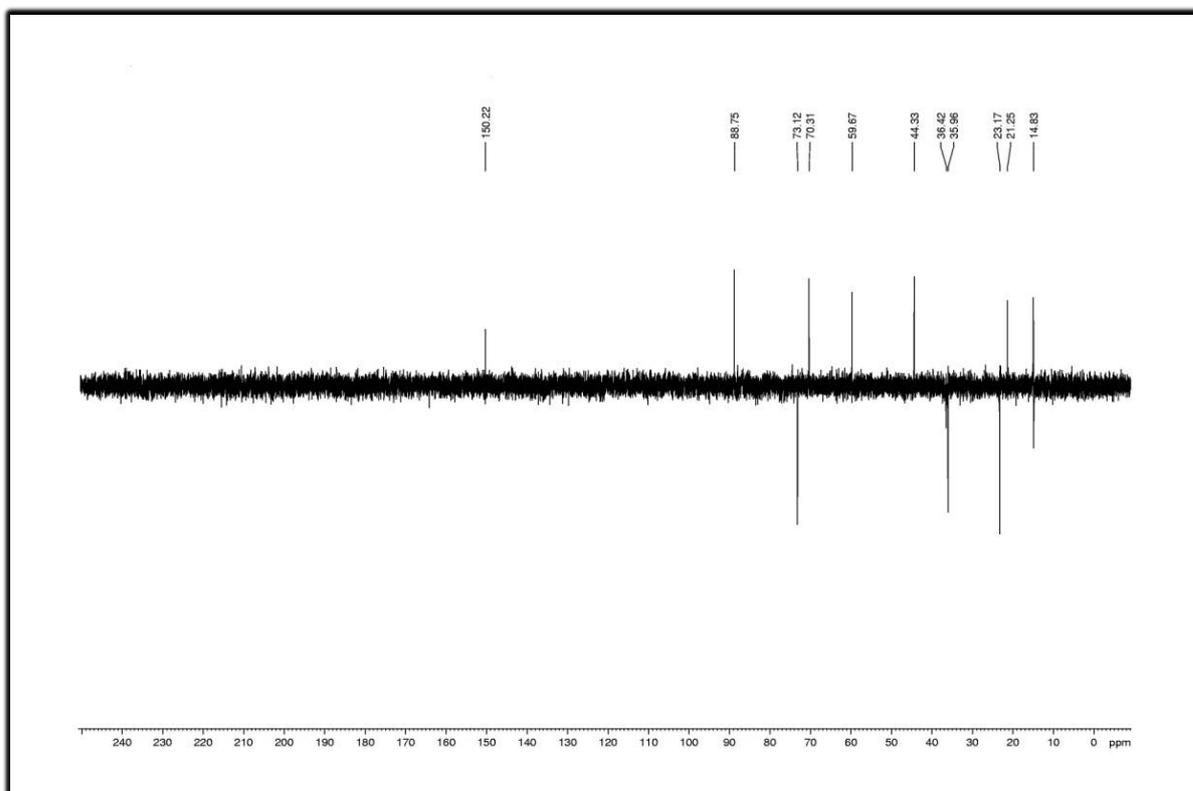
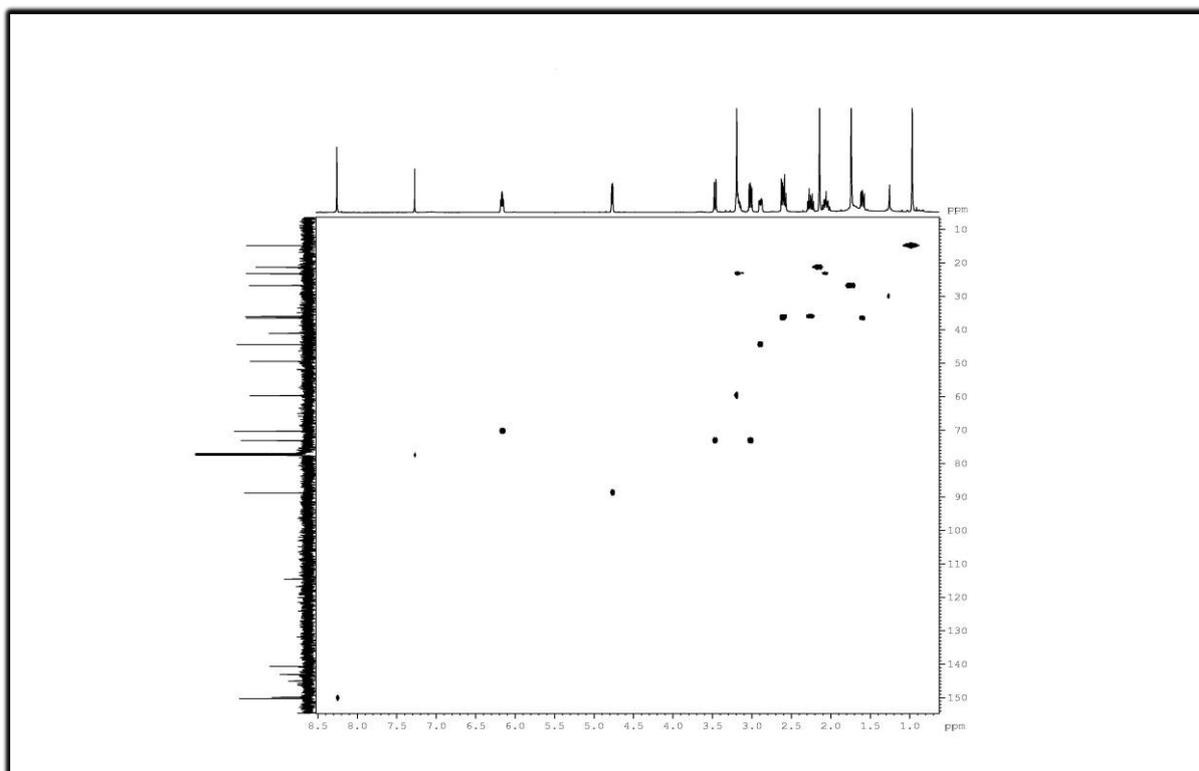


Figura 20 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT (125 MHz, CDCl_3) de BRF053 – 2.



Com base no espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear (HSQC), Figura 21 (p.43), foi estabelecida a correlação do hidrogênio olefínico H-21 (δ 8,25) ao seu respectivo carbono C-21 (δ 150,2), bem como a confirmação da presença de oito hidrogênios heterotópicos aos seus respectivos carbonos (δ 2,00 e 3,13; 2,25 e 2,58; 1,60 e 2,61; 3,02 e 3,46) aos seus carbonos correspondentes em (δ 23,2; 35,9; 36,4 e 73,1), Tabela 6 (p. 48).

Figura 21 - Espectro de RMN 2-D HSQC (125 MHz, CDCl_3) de BRF053 – 2.



As posições dos grupos acetila e metoxila foram confirmadas pelos acoplamentos observados no espectro de correlação heteronuclear a longa distância (HMBC), através das correlações do hidrogênio H-11 (δ 6,16) com o carbono C-22 (δ 169,7) (Fragmento **A**, Figura 22, p.44), e dos hidrogênios H-18a (δ 3,02) e H-18b (δ 3,46) a três ligações com o carbono metoxílico J^3 (δ 59,7) (Fragmento **B**, Figura 22, p.44). A posição dos carbonos olefínicos foi confirmada pelas correlações dos hidrogênios H-21 (δ 8,25) com o carbono C-4 J^2 (δ 114,5) (Fragmento **C**, Figura 22, p.44) e H-11 (δ 6,16) a duas ligações com o carbono C-9 J^2 (δ 149,8) (Fragmento **D**, Figura 22, p.44). As correlações dos hidrogênios H-1 (δ 4,77) com o carbono C-3 (δ 157,8) (Fragmento **E**, Figura 22, p.44), dos hidrogênios H-15a (δ 2,00) e H-12a (δ 1,60) e H-12b (δ 2,61) com o carbono

C-17 $J^3(\delta 216,4)$ (Fragmento **D**, Figura 22, p.44), $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC, Figura 23 (p. 45), possibilitaram a construção dos fragmentos apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Fragmentos de BRF053 –2 determinados a partir do espectro de correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ – HMBC.

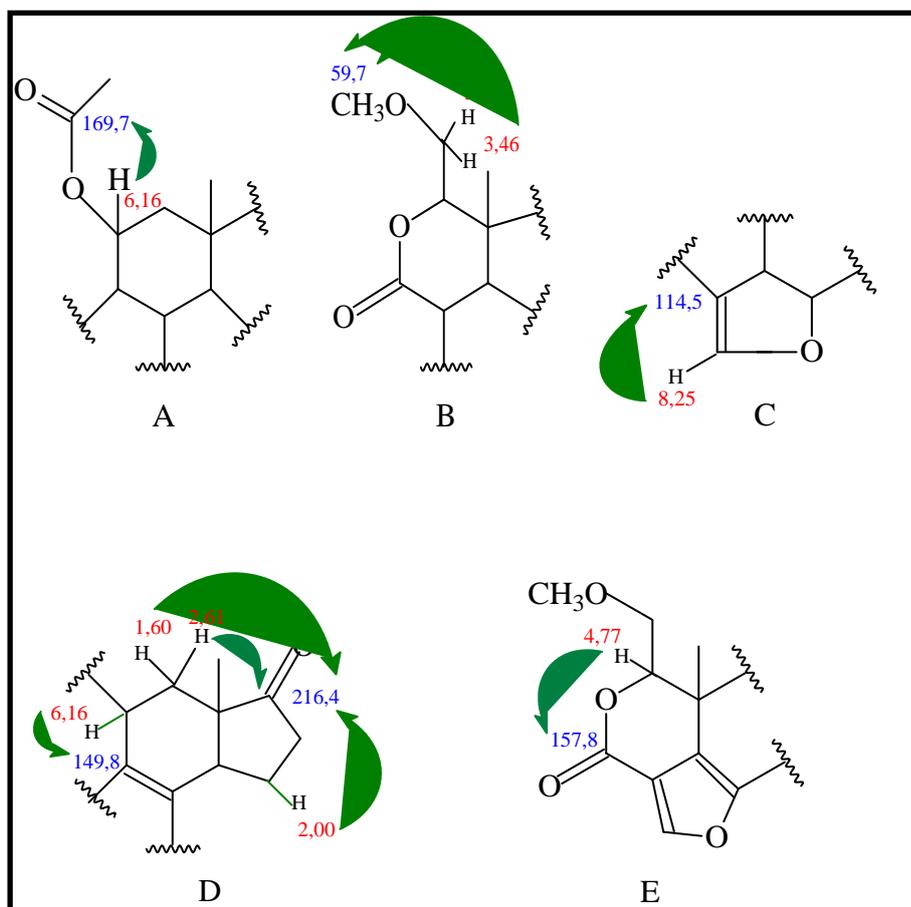
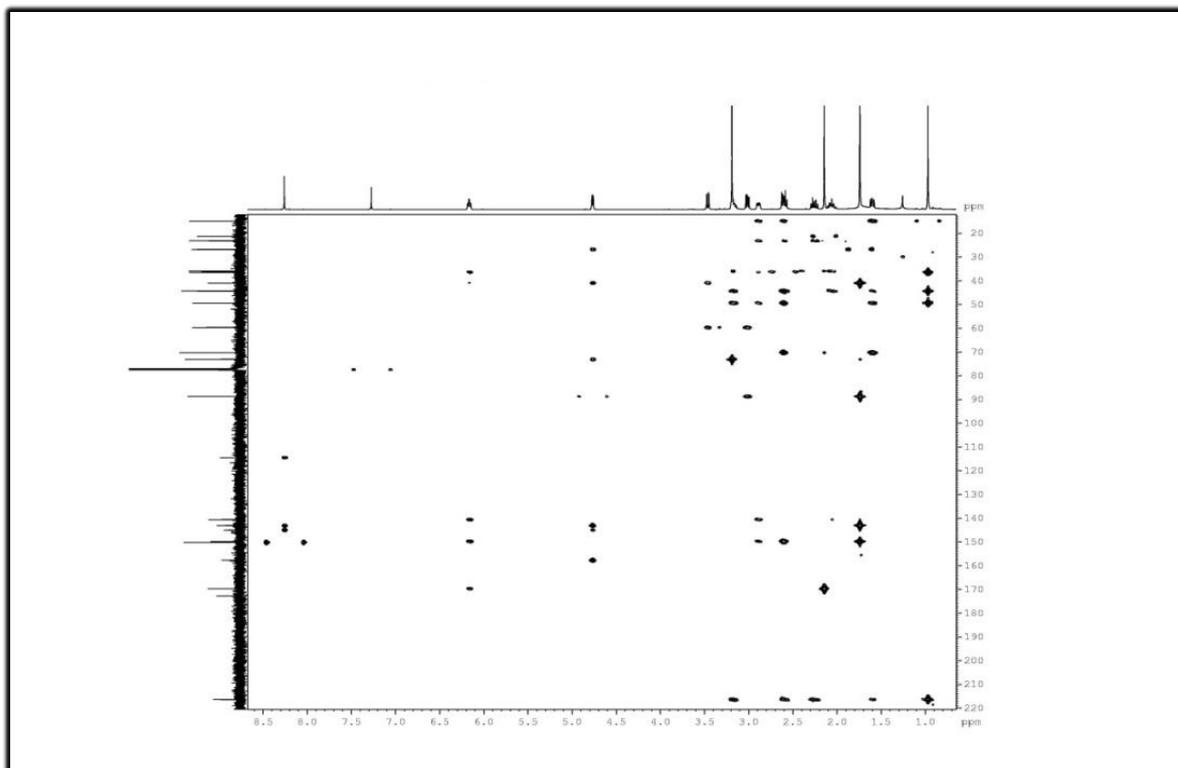
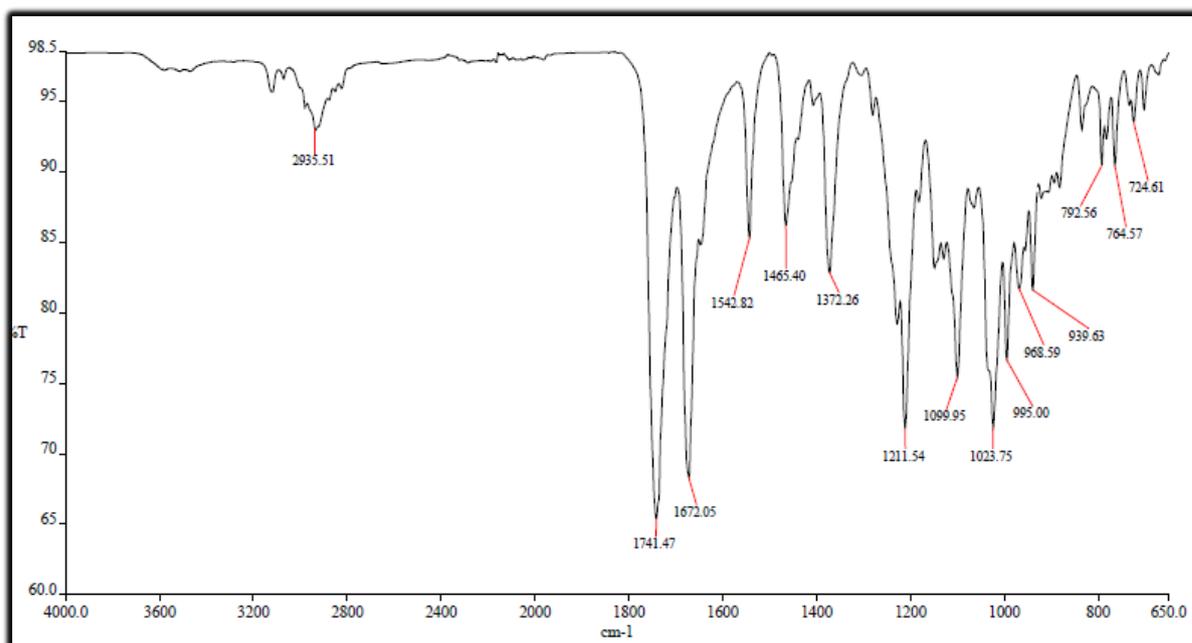


Figura 23 - Espectro de RMN 2-D HMBC (125 MHz, CDCl₃) de BRF053 – 2.



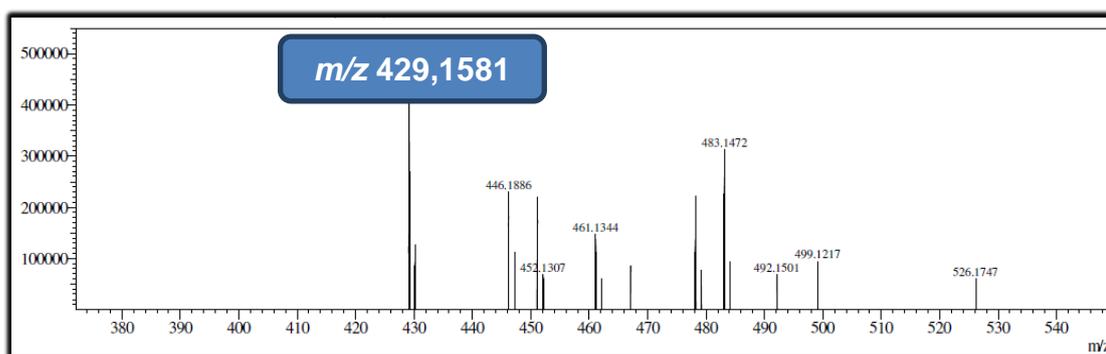
O espectro de absorção na região do infravermelho, Figura 24 (p. 46), apresentou uma absorção em 1542 cm^{-1} , associada a presença de um anel furânico na molécula. Também demonstrou a presença de uma ciclo-hexadienona a partir da observação característica da banda com absorção em 1672 cm^{-1} e presença de um anel de cinco membros com cetona a partir da banda de absorção 1741 cm^{-1} . A banda de absorção em 2935 cm^{-1} é característica de estiramento C-H sp^3 (MACMILLAN *et al*, 1972).

Figura 24 - Espectro de absorção na região de infravermelho de BRF053- 2.



O espectro de massas de alta resolução EM/ IESde BRF053 – 2 (Figura 25) no modo positivo exibiu o pico do íon quasi-molecular $[M + H]^+$ em m/z 429,1581 o qual apontou a fórmula molecular $C_{23}H_{24}O_8$ (m/z calculado: 429,1544; erro: 8,59 ppm).

Figura 25 - Espectro de massas de BRF053 – 2 de alta resolução EM/IES.



Com base nos dados discutidos anteriormente e comparação com os dados da literatura, Tabela 7 (p. 49), o composto BRF053-2 foi identificado como sendo o esteroide [(1S-(1a,6ba,9ab,11a,11bb)]-11-(acetoxi)-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-octahidro-1-(metoximetil)-9a,11b-dimetil-3H-furo[4,3,2-de]indeno[4,5-h]-2-benzopirano-3,6,9triona, conhecido como **Wortimanina**, Figura 26 (p.47), (NIGGLI *et al*,1997).

A wortimanina é um metabólito secundário microbiano, encontrado em várias espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Myrothecium*., no entanto, está sendo descrito pela primeira vez para o gênero *Paecilomyces*. Este composto já foi previamente relatado como um inibidor de enzimas e potente agente inflamatório. Devido a sua alta toxicidade o mesmo é impróprio para uso clínico (POWIS *et al*, 1994 ; BROKA *et al*, 1992).

Figura 26 - Estrutura da Wortimanina (BRF053-2).

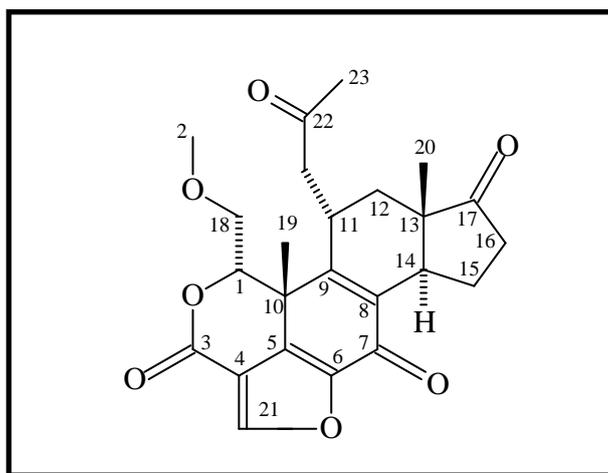


Tabela 6 - Dados espectrométricos de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) de BRF053 - 2.

	HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	J^2CH	J^3CH
C				
17	216,4	-	Ha-16; Hb-16	Ha-15; H-14; Ha-12; Hb-12; 3H-20
7	172,8	-		
22	169,7	-	3H-22	H-11
3	157,8	-		H-1
9	149,8	-	H-11	Ha-12; 3H-19; H-14
6	145,0	-		H-21
5	143,1	-		H-1; 3H-19
8	140,6	-	H-14	Hb-15; H-11
4	114,5	-	H-21	
13	49,4	-	Ha-12; Hb-12; H-14; 3H-20	Ha-15
10	41,0	-	H-1; 3H-19	H-11; Ha-18
CH				
21	150,2	8,25 (s)		
1	88,7	4,77 (dd, 6,95; 1,8 Hz)	Hb-18	3H-19
11	70,3	6,16 (td, 8,70; 2,7 Hz)	Ha-11; Hb-12	
14	44,3	2,88 (m)	Ha-15; Hb-15	Ha-12; Hb-12; Ha-16; 3H-20
CH₂				
18	73,1	3,46 (dd, 11,15; 1,8 Hz) 3,02 (dd, 11,15; 6,95 Hz)	H-1; MeO-18	
12	36,4	2,61 (d, 12,85 Hz) 1,60 (dd, 12,83; 8,69 Hz)	H-11	H-14; 3H-20
16	35,9	2,58 (t, 19,60 Hz) 2,25 (dt, 19,63; 7,65 Hz)	Ha-15; Hb-15	
15	23,2	3,15 (m) 2,01 (m)	H-14; Ha-16; Hb-16	
CH₃				
19	26,7	1,70 (s)	H-1	
23	21,3	2,17 (s)		
20	148	0,97 (s)		H-14; Ha-12; Hb-12
MeO-18	59,7	3,18 (s)	Ha-18; Hb-18	

Tabela 7 – Comparação dos dados de BRF053-2 com os dados da literatura.

		BRF053-2	Literatura
C	δC	δH	δC
17	216,4	-	216,1
7	172,8	-	172,7
22	169,7	-	169,5
3	157,8	-	157,6
9	149,8	-	149,6
6	145,0	-	144,9
5	143,1	-	142,9
8	140,6	-	140,5
4	114,5	-	114,4
13	49,4	-	49,3
10	41,0	-	40,8
CH			
21	150,2	8,25 (s)	150,0
1	88,7	4,77 (dd, 6,95; 1,8 Hz)	88,6
11	70,3	6,16 (td, 8,70; 2,7Hz)	70,1
14	44,3	2,88 (m)	44,2
CH₂			
18	73,1	3,46 (dd, 11,15; 1,8 Hz) 3,02 (dd, 11,15; 6,95 Hz)	72,9
12	36,4	2,61 (d, 12,85 Hz) 1,60 (dd, 12,83; 8,69 Hz)	36,3
16	35,9	2,58 (t, 19,60 Hz) 2,25 (dt, 19,63; 7,65 Hz)	35,8
15	23,2	3,13 (m) 2,01 (m)	23,0
CH₃			
19	26,7	1,70 (s)	26,5
23	21,3	2,17 (s)	21,1
20	14,8	0,97 (s)	14,6
MeO-18	59,7	3,18 (s)	59,5

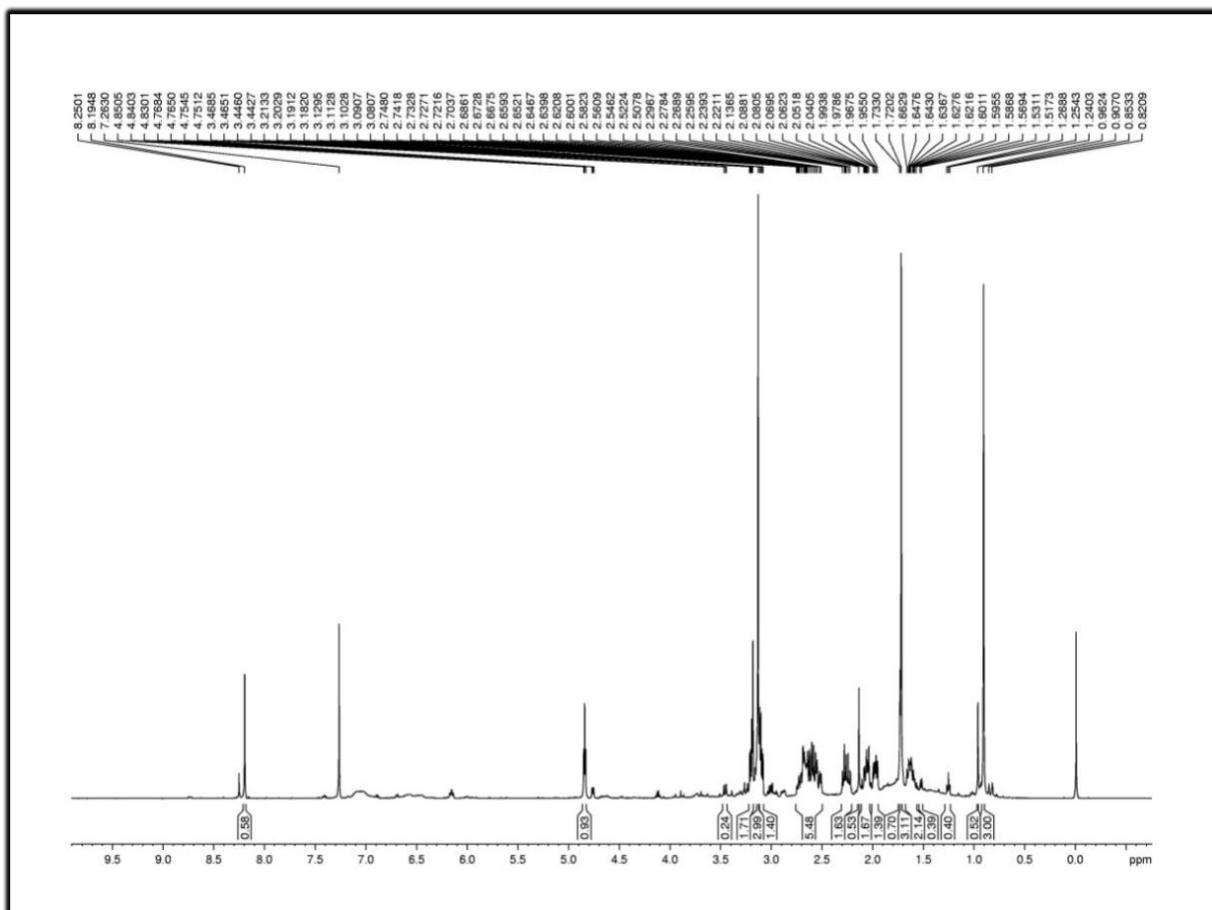
Fonte: NAKANISHIe (1992).

4.2.5.2 Determinação Estrutural de BRF053 – 1

BRF053 – 1 apresentou-se como sólido amarelo com p.f.: 223,2- 223,5°C. Os espectros de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) do composto BRF053-1 foram muito semelhantes ao do composto BRF053-2, sugerindo que ambos pertenciam a mesma classe de produto natural.

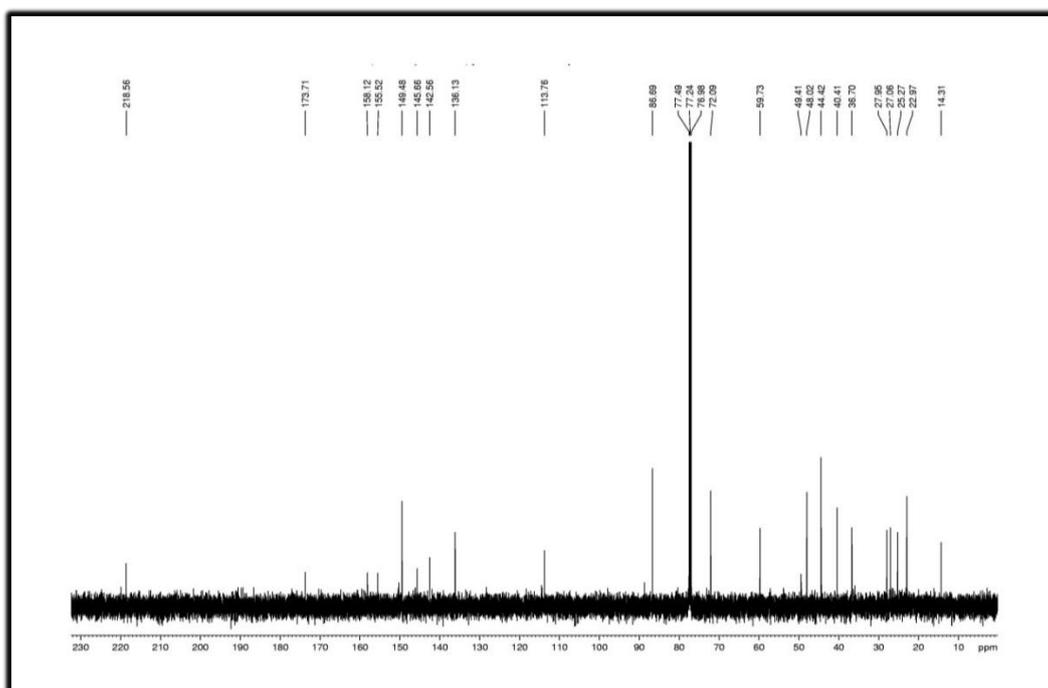
O espectro de RMN ^1H de BRF053-1, Figura 27 (p.51), apresentou três singletos em δ 0,90 (3H, s, H-20); δ 1,72 (3H, s, H-19) e δ 3,12 (3H, s, H-18) referentes a três grupos metílicos. O sinal com deslocamento δ 3,12 está de acordo com a presença de um grupamento metoxílico. Os sinais de hidrogênios metilênicos em δ 1,56 – 1,64 (1H, m, H-11), δ 2,04 – 2,08 (2H, m, H-11 e H-15), δ 3,10 (2H, dd, $J = 11,0$ e $5,0$ Hz, H-15 e H-18), δ 2,25 (2H, dt, $J = 19,5$ e $9,1$ Hz, H-12 e H-16), δ 2,58 (1H, t, $J = 9,2$ Hz, H-12), δ 2,61 (1H, dt, $J = 19,5$ e $9,1$ Hz, H-16) e δ 3,20 (1H, dd, $J = 11,0$ e $4,6$ Hz, H-18) sugerem a presença de dez hidrogênios heterotópicos. Apresentou ainda um hidrogênio metínico com sinal em δ 2,64 – 2,70 (1H, m, H-14) e dois hidrogênios oximetínicos com sinais em δ 4,84 (1H, t, $J = 5,1$ Hz, H-1) e δ 8,19 (1H, s, H-11). O sinal em δ 8,19 (1H, s, H-21) se refere a um hidrogênio pertencente a um carbono olefínico oxigenado. A comparação dos dados de RMN ^1H deste composto com os de BRF053-2 permitiu observar para BRF053-1 a ausência do sinal com deslocamento em δ 2,17. Este foi substituído por um par de hidrogênios heterotópicos em δ 1,56 – 1,64 (1H, m, H-11) e 2,04 – 2,08 (2H, m, H-11 e H-15), ambos ausentes no espectro de BRF053-2. Dessa forma, foi possível sugerir que BRF053-1 não apresenta o grupamento acetila na sua estrutura.

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de BRF053 – 1.



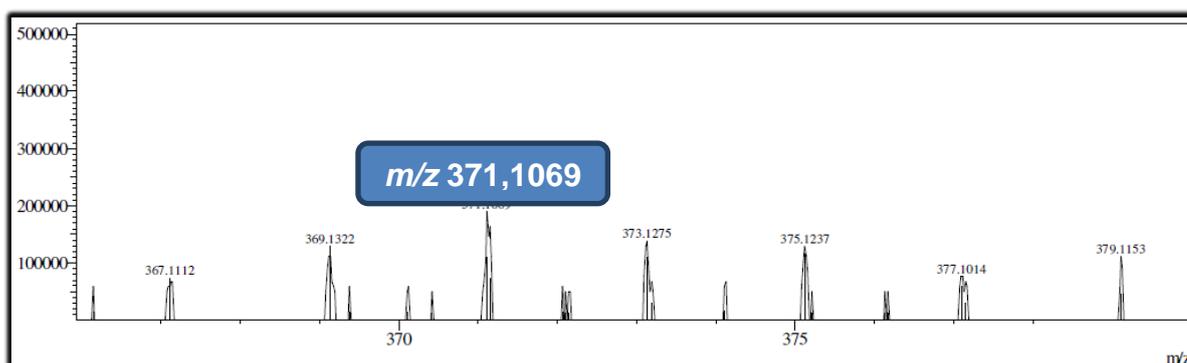
O espectro de RMN ^{13}C -CPD, Figura 28 (p.52), apresentou 21 linhas espectrais. Os três sinais observados em δ 14,3; 27,0 e 59,7 estão de acordo com carbonos metílicos. O sinal em δ 59,7 diz respeito a uma metoxila. Os sinais em δ 22,9; 25,3; 27,9; 36,7 e 72,1 estão de acordo com carbonos metilênicos, sendo este último referente a um carbono oxigenado. Os três sinais em δ 44,4; 86,7 e 149,5 se referem a carbonos metínicos, sendo o sinal em δ 149,5 referente a carbono olefínico oxigenado. Os sinais em δ 40,4; 48,0; 113,8; 136,6; 142,6; 145,7; 155,5; 158,1; 173,7 e 218,6 estão de acordo com carbonos não hidrogenados. Destes, os sinais em δ 158,1; 173,7 e 218,6 são referentes a carbonos carbonílicos. O espectro de RMN ^{13}C -CPD de BRF053-1 apresentou duas linhas espectrais a menos que o espectro de BRF053-2 (δ 14,8 e 169,7), as quais eram referentes ao grupo acetila na molécula. Este fato confirma a ausência do grupo acetila sugerido pelo espectro de RMN ^1H .

Figura 28 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de BRF053 – 1.



O espectro de massas de alta resolução EM/ IESde BRF053-1 (Figura 29) no modo positivo exibiu o pico do íon quase-molecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 371,1069 o qual apontou a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (m/z calculado: 371,1069; erro: 0,0 ppm).

Figura 29 - Espectro de massas de BRF053 – 1 de alta resolução EM/IES.



Com base no exposto acima, o composto BRF053-1 foi identificado como sendo o esteróide[(1*S*-(1a, 6ba,9ab,11a,11bb))-1,6b,7,8,9a,10,11,11b-octahidro-1-(metoximetil)-9a,11b-dimetil-3*H*-furo[4,3,2-de]indeno[4,5-h]-2-benzopiran-3,6,9-triona, conhecido como **11-desacetoxiwortimanina**, Figura 30 (p.53), (NIGGLI, *et al*,1997).

A 11-desacetoxiwortimanina é um antifúngico derivado da wortimanina, isolado de culturas de várias espécies de fungos, mas inédita no gênero *Paecilomyces*. Este metabólito secundário apresenta atividades anti-inflamatória e citotóxica quando testada em cérebro bovino (BROKA *et al* 1992).

Figura 30 - Estrutura da 11-desacetoxiwortimanina (BRF053-1)

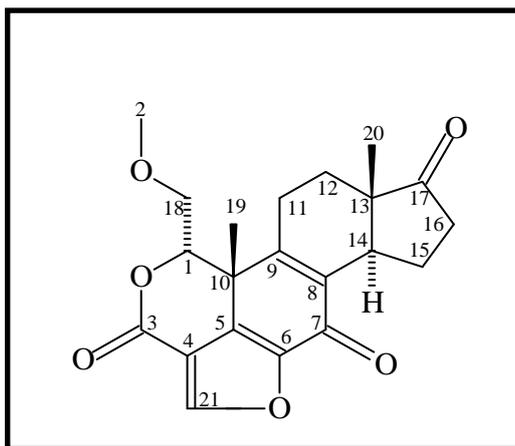


Tabela 8 - Dados espectrométricos de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) de BRF053 – 1

	HSQC		HMBC	
	δC	δH	$J^2\text{CH}$	$J^3\text{CH}$
C			Há- 16; Hb-16	3H-20; Ha-15
17	218,6	-		
7	173,7	-		
3	158,1	-		H-1
9	155,5	-	Há-11; Hb-11	3H-19; Hb-12;3H-19
6	145,7	-		H-21
5	142,6	-		H-1; H-21; 3H-19
8	136,6	-		Ha-11; Hb-11
4	113,8	-	H-21	
13	48	-	Ha-12; Hb-12; 3H-20	Ha-15; Hb-11
10	40,4	-	H-1; 3H-19	Ha-18; Hb-18
CH				
21	149,5	8,19 (s)		
1	86,7	4,84 (t, 5,1 Hz)	Ha-18; 3H-19	
14	44,4	2,64-2,70 (m)	Ha-15	Ha-16; Ha- 12; 3H-20
CH₂				
18	72,1	3,20 (dd, 11,05; 4,6 Hz) 3,10 (dd, 11,05; 5,0 Hz)	H-1; MeO-18	
16	36,7	2,61 (dd, 19,55; 8,9Hz) 2,25 (dt, 19,55; 9,1 Hz)	Ha-15, Hb-15	
12	27,9	2,58 (t, 9,17 Hz) 2,25 (dt, 19,62; 9,15 Hz)		3H-20
11	25,3	2,04-2,08 (m) 1,56-1,64 (m)	Ha-12; Hb-12	
15	22,9	3,10 (dd, 11,05; 5,0 Hz) 2,04-2,08 (m)	Há-16; Hb-16	
CH₃				
19	27,0	1,72 (s)		H-1
20	14,3	0,90 (s)		Ha-12; Hb-12
MeO-18	59,7	3,12 (s)		Ha-18; Hb-18

4.3 Estudo de desreplicação dos extratos

Técnica introduzida nos anos 90, a desreplicação trata do processo de triagem (*screening*) de extratos brutos, de modo a identificar, com o auxílio de padrões, substâncias presentes nestes extratos, ou de negativar a presença destes padrões. As técnicas de desreplicação estão sendo continuamente desenvolvidas visando encontrar substâncias bioativas estruturalmente inéditas ou estabelecer marcadores químicos para espécies ou gêneros (STAERK *et al*, 2009).

As metodologias utilizadas nesta técnica incluem as várias modalidades de cromatografia acoplada, as quais são importantes ferramentas para a análise preliminar de extratos, notadamente cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM). Bancos de dados *in house* ou comerciais são incorporados às metodologias cromatográficas para a obtenção de perfis dos metabólitos moleculares. O uso de sistemas multi hifenados, tais como LC-PDA-MS, LC-SPE-NMR, LC-MS/MS, HPLC-PDA-MS-SPE-NMR também são utilizados (STAERK *et al*, 2009; LANG *et al*, 2008).

Uma vez que as duas substâncias ativas isoladas de *P. lilacinus* (wortmanina – BRF053 – 2 e desacetoxiwortmanina – BRF053 – 1) já se encontravam descritas na literatura, a desreplicação foi aplicada neste trabalho na busca de outros compostos, preferencialmente inéditos. Para tal, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução com ionização por eletrospray (EM-IES). Como parâmetro de identificação foi utilizado a razão m/z ionizado, tanto no modo positivo $[M + H]^+$ quanto no negativo $[M - H]^-$. Os valores de massa das amostras foram comparados com uma biblioteca de padrões fornecido pelo programa *AntiMarine Data Bank*. As amostras obtidas nos fracionamentos pelos métodos 1 e 2, descritos no Item 5.9.1 (p. 66), foram empregadas nas análises. Os resultados foram resumidos na Tabela 9 (p. 56).

Através desse estudo foi possível sugerir a presença dos compostos: ciclosinefungina, estatana A, virescenosideo-D, (+)-esclerotiorina, 2'-amino-2'-deoxiguanosina, fumaramidimicina e deoxinivaleno, Figura 31 (p. 57), todos inéditos para o gênero *Paecilomyces*.

Tabela 9 – Identificação de metabólitos secundários do fungo *Paecilomyces lilacinus* através de desreplicação por LC-MS.

íon	<i>m/z</i> (teórico)	<i>m/z</i> (medido)	UV-vis	Composto	Amostras obtidas pelo método 2 de fracionamento
[M + H] ⁺	364,173	364,1726	200; 259	Ciclosinefungina (1)	2
[M + H] ⁺	301,143	301,1425	222; 229; 290	Estatana A (2)	2
[M + H] ⁺	447,274	447,2734	258	Virescenosideo-D (3)	2
[M – H] ⁻	389,116	389,1160	275, 370	(+)-Esclerotiorina (4)	4
[M + H] ⁺	283,115	283,1153	253	2'-Amino-2'-deoxiguanosina (5)	4
[M + H] ⁺	233,092	233,0923	225	Fumaramidimicina (6)	5
[M + H] ⁺	297,133	297,1328	218	Deoxinivalenol (7)	5

Figura 31 – Metabólitos identificados através do *AntiMarin data bank*.

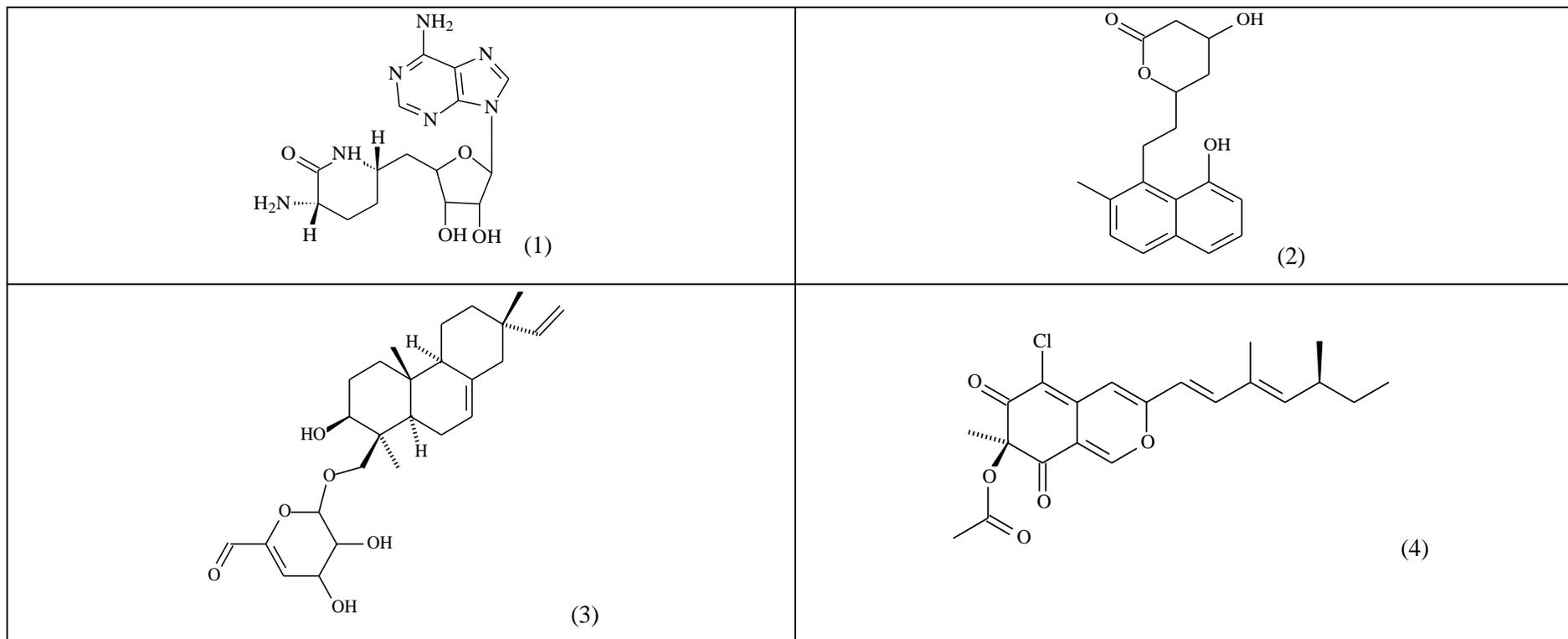
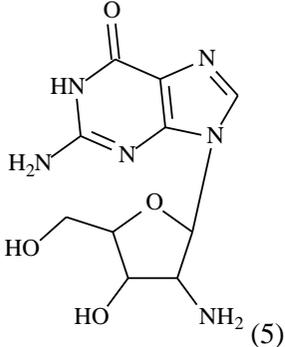
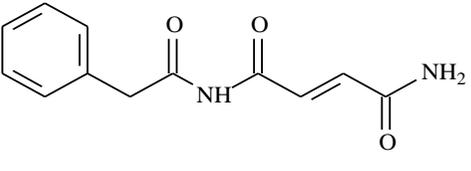
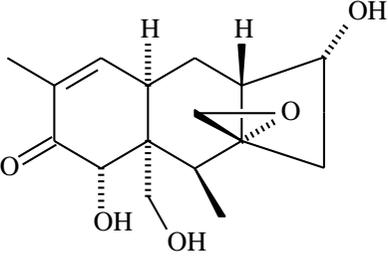


Figura 31 – Metabólitos identificados através do *AntiMarin data bank*. (Continuação)

 <p>(5)</p>	 <p>(6)</p>
 <p>(7)</p>	

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5. Procedimento Experimental

5.1 Métodos de Análise

5.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica

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 em HClO₄/EtOH.

5.1.2 Cromatografia por adsorção em fase reversa

Para os procedimentos de cromatografia de fase reversa foram utilizados cartuchos de sílica C18 (ODS) da marca Strata Phenomenex[®] de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro.

5.1.3 Cromatografia por adsorção em fase normal

Para os procedimentos de cromatografia de fase normal em coluna foi utilizada uma coluna de 15 cm de altura e 3 cm de diâmetro da marca Vidrolabor. Também foram utilizadas Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) (70 – 230 mesh) para cromatografia em coluna (SiO₂) e Sílica gel 60G para cromatografia em camada fina (SiO₂), ambas da marca Vetec[®].

5.1.4 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).

5.1.5 Rotação óptica (α) e Rotação específica ($[\alpha]_D^t$)

As rotações ópticas foram determinadas em polarímetro Perkin-Elmer, modelo P-2000, localizado no DQOI/UFC. As medidas foram realizadas a 589 nm, à 26 °C, à uma concentração de 1,1 em CHCl₃.

5.1.6 Ponto de fusão (p. f)

Os pontos de fusão foram obtidos em equipamento automático da Mettler Toledo, modelo FP62 pertencente ao LABS/UFC.

5.2 Solventes

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

5.3 Métodos espectrométricos

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

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria em Massas do Nordeste (LEMANOR), na Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modelo ShimadzuUFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A acoplado ao espectrômetro de massas IT-TOF (Shimadzu, Japan) com ionização por eletrospray (ESI) operado no modo positivo e negativo. O espectro foi obtido numa faixa de m/z 100-1000 Da, usando um potencial do capilar de 4,0kV, na desolvatação foi usado

o nitrogênio e o gás de colisão foi o hélio. O sistema foi controlado pelo software LC-solution, que foi também utilizado na análise das amostras.

Uma alíquota (5 µL) de cada amostra com uma concentração de 1mg/mL foi injetada na coluna de fase reversa (C18, 150 × 2,0 nm, Shimadzu), que foi mantida a 35°C. A fase móvel consistia num gradiente binário de CH₃CN e H₂O com fluxo linear 0,2 mL/min: 5 à 95% CH₃CN até 30 min. No final desta sequência a coluna foi equilibrada sob condições iniciais por 10 min. O efluente da coluna foi transferido diretamente para a interface ESI sem *splitting*.

5.3.2 Espectrometria de Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) foram realizados em espectrômetros Bruker®DPX 300 Hz e DRX 500 Hz, utilizando como solvente clorofórmio deuterado (CDCl₃) do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) na UFC.

5.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos a partir de amostras dispersas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) e discos de cloreto de sódio (NaCl), utilizando espectrômetros, Perkin Elmer, modelo FT-IR Spectrum 100 do LEMANOR (DQOI/UFC).

5.4 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 capela de fluxo laminar Labconco® MOD # 8089000.

5.5 Preparações dos meios de cultura

No estudo químico do fungo *P.lilacinus* foi utilizado o meio líquido caldo de batata com água do mar sintética preparada conforme procedimentos descritos a seguir.

5.5.1 Meio líquido de caldo de batata

O meio de caldo de batata utilizado foi o sintético da marca Himedia[®]. A proporção utilizada foi 24 g do caldo para cada litro de água do mar sintética (Item 5.5.2, p.63). O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, após serem distribuídos em frascos de Erlenmeyer. O meio apresentou o pH = 6,5.

5.5.2 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).

5.6 Micro-organismos

5.6.1 Obtenção e identificação dos fungos

Foram coletadas amostras de sedimentos da praia do Pecém – Ceará (3°32'2"S; 38°47'58"O), em parceria com o grupo de Ecotoxicologia Marinha da UFC, litoral oeste do estado do Ceará. Um total de 48 cepas de fungos foram previamente isoladas no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica (LABS) na UFC, dentre as quais a cepaBRF053 foi selecionada para estudo.

O fungo BRF053 foi submetido à identificação por análise morfológica e identificado como sendo do gênero *Paecilomyces lilacinus* pelo Dr. Lucas Magalhães de Abreu, no Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

5.6.2 Preservação do fungo

O fungo foi inicialmente incubado em meio de cultura semi-sólido batata-dextrose-ágar (BDA) por 15 dias em seguida preservados em óleo mineral para evitar a desidratação do mesmo, isolando-o do contato com o ar, e reduzindo ao mínimo seu metabolismo (MENEZES, *et al* 1993). O procedimento de conservação em óleo mineral encontra-se descrito a seguir:

- O 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.

A cultura fúngica preservada através dessa metodologia descrita serviu de matriz para todo o estudo realizado nesse trabalho.

5.7 Teste citotóxico

A atividade citotóxica de extratos, frações e substâncias isoladas do fungo *P.lilacinus* (BRF053) foi avaliada no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da UFC, sob a coordenação da Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

O bioensaio foi realizado frente 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 foram diluídas em DMSO puro estéril para uma concentração final de 50 µg/ml. As células foram plaqueadas na concentração de $0,7 \times 10^5$ 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 de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. 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, foi realizado do mesmo modo, sendo que, em vez de uma única concentração de amostra (50

$\mu\text{g/ml}$), utilizou-se uma curva de diluições seriadas (nove concentrações entre 0,2 - 50 $\mu\text{g/ml}$).

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

5.8 Otimização do cultivo do fungo marinho *P. lilacinus* para a produção de metabólitos secundários

5.8.1 Estudo cinético em meio líquido BD com água do mar sintética

Foram utilizados 16 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD (batata-dextrose) 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 e mantido estático. Em quatro frascos de Erlenmeyer não foram adicionados inóculos, os quais serviram como controle.

A cada sete dias de crescimento, 4 frascos de Erlenmeyer (3 contendo o fungo - triplicata e 1 experimento controle) eram utilizados para análise. Nos frascos contendo fungo, o micélio foi separado do meio líquido e descartado. O meio líquido dos quatro frascos foi, separadamente, submetido à partição líquido-líquido com AcOEt. Os extratos obtidos foram concentrados por destilação do solvente a pressão reduzida e analisados por CCDA. Ao final de 28 dias de crescimento, foram realizadas quatro extrações (dias: 7, 14, 21, 28). As massas das frações obtidas a cada dia de cultivo encontram-se na Tabela 2 (p.28).

5.9 Cultivo em grande escala do fungo *P.lilacinus*

Foram empregados 41 frascos de Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio BD em cada, dos quais um foi utilizado 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 3 vezes com 200 mL de AcOEt. A fração orgânica foi concentrada obtendo-se 1,2 g de extrato bruto.

5.9.1 Fracionamento cromatográfico do extrato de *P.lilacinus*

Método 1: Uma alíquota de 519 mg do extrato AcOEt de *P.lilacinus* foi submetida à fracionamento em cartucho de C18 (Strata Phenomenex[®]) de 7 cm de altura e 3 cm de diâmetro, empregando-se como eluentes (100mL cada): 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% (Fracionamento método 1). As massas dessas frações estão descritas na Tabela 4 (p.31).

Método 2: Uma segunda alíquota de 500 mg do extrato AcOEt de *P. lilacinus* foi submetida a purificação utilizando cromatografia por adsorção em fase normal, utilizando dois tipos de sílica em um sistema montado com um filtro de membrana porosa de 50 mL da marca Vidrolabor[®] e um kitassato de 250 mL para filtração à vácuo. Uma pequena quantidade (50 g) de sílica gel 60 para cromatografia em coluna foi colocada na parte inferior do funil de membrana porosa. Na parte superior adicionou-se sílica gel 60G (100 g) para cromatografia em camada fina. Para este procedimento foram utilizados os seguintes eluentes: Hex 100%, Hex/AcOEt 2:1, Hex/AcOEt 1:1, AcOEt 100%, AcOEt/MeOH 3:1, AcOEt/MeOH 2:1, AcOEt/MeOH 1:1, MeOH 100%, MeOH/H₂O 3:1, MeOH/H₂O 1:1 e H₂O 100% (Fracionamento método 2). As massas dessas frações estão descritas na Tabela 5 (p.34).

5.9.2 Análises cromatográficas das amostras obtidas dos fracionamentos do extrato de *P.lilacinus*

Todas as amostras obtidas dos fracionamentos (métodos 1 e 2) do extrato de *P. lilacinus* foram analisadas por CLAE, empregando-se uma coluna ODS analítica, Item 5.1.4 (p.60) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 10 a 90% por 80 min com fluxo de 1,0 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/ mL. Os cromatogramas estão demonstrados nas Figuras 11 e 12 (p.32 e 33) e 13 e 14 (p.35).

5.9.3 Fracionamento da Fração H₂O/MeOH 1:1 (Fracionamento método 1)

A fração H₂O/MeOH 1:1 (92,9 mg), obtida do fracionamento descrito no Item 5.9.1 (p.66), foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método

cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica, Item 5.1.4 (p.60) em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 20 a 80% por 60 min com fluxo de 1,0 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/ mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático MeOH:H₂O 50:50, por 19 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa, Item 4.2.4.1 (p.36), com fluxo de 4,72 mL/min. Foram injetados 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/mL. Foram coletadas 6 frações, onde suas massas estão descritas na Tabela 10 e o cromatograma está apresentado na Figura 15 (p.37).

Tabela 10 - Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra H₂O/MeOH 1:1 (Fracionamento método 1) do cultivo do fungo *P. lilacinus*.

Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	20,1	21,6
2	11,7	12,6
3	10,8	11,6
4	12,5	13,4
5	2,0	2,1
6	1,5	1,6
TOTAL	58,6	62,7

As amostras 5 e 6 foram submetidas à análise por RMN e apresentaram-se como substâncias puras.

5.9.4 Fracionamento da Fração Hex/AcOEt 1:1 (Fracionamento método 2)

A fração Hex/AcOEt 1:1(129,7 mg), obtida do fracionamento descrito no Item 5.9.1 (p.66), foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica, Item 5.1.4 (p.60), em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 20 a 80% por 60 min com fluxo de 1,0 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 MeOH:H₂O 50:50, por 15 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa, Item 4.2.4.2 (p.37), com fluxo de 4,72 mL/min. Foi injetado 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/mL. Foram coletadas 5 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 11. O cromatograma está apresentado na Figura 16 (p.38).

Tabela 11 - Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra Hex/AcOEt 1:1 (Fracionamento método 2) do cultivo do fungo *P. lilacinus*.

Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	28,0	21,5
2	12,4	9,5
3	7,8	6,0
4	6,2	4,7
5	13,5	10,4
TOTAL	67,9	52,3

As amostras 4 e 5 foram submetidas à análise por RMN e apresentaram-se como substâncias puras.

5.9.5 Fracionamento da Fração AcOEt 100% (Fracionamento método 2)

A fração Acetato de Etila100% (76,0 mg), obtida do tratamento descrito no Item 5.9.1 (p. 60), foi submetida à análise por CLAE. Para o desenvolvimento do método cromatográfico usou-se uma coluna ODS analítica Item 5.1.4 (p.60), em um método gradiente MeOH:H₂O variando a concentração de MeOH de 20 a 80% por 60 min com fluxo de 1,0 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra em uma concentração de 1 mg/mL. A partir dessa análise, foi possível se chegar a um método isocrático MeOH:H₂O 42:58, por 17,5 minutos, em uma coluna ODS semipreparativa, Item 4.2.4.3 (p.38), com fluxo de 4,72 mL/min. Foram injetados 200 µL da amostra em uma concentração de 20 mg/mL. Foram coletadas 5 frações, onde suas massas estão demonstradas na Tabela 12. O cromatograma está apresentado na Figura 17 (p.39).

Tabela 12 - Massas das frações coletadas do fracionamento em CLAE da amostra AcOEt 100% (Fracionamento método 2) do cultivo do fungo *P. lilacinus*.

Amostras	Massas (mg)	Rendimento (%)
1	14,1	18,5
2	12,7	16,7
3	6,0	7,8
4	7,0	9,2
5	5,8	7,6
TOTAL	46,1	60,6

As amostras 4 e 5 foram submetidas à análise por RMN e apresentaram-se como substâncias puras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. Considerações Finais

A bioprospecção do fungo marinho *P. lilacinus*, recuperado de sedimentos da praia do Pecém – CE foi realizada na busca por compostos com atividade citotóxica.

Através do estudo cinético da produção de metabólitos secundários pelo fungo foi possível estabelecer o tempo de 14 dias de cultivo como o que apresentou o melhor resultado de produção de metabólitos secundários e atividade citotóxica. Dessa forma, o fungo foi cultivado em grande escala por 14 dias e o fracionamento bioguiado do extrato AcOEt do meio líquido levou ao isolamento da 11-desacetoxiwortimanina e wortimanina. Destas, somente a wortimanina apresentou elevada atividade citotóxica (IC₅₀ 5,098 µg/mL). Vale ressaltar que 10 mg da wortimanina é comercializado pela Sigma- Aldrich® no valor de R\$ 3.051,00, o que pode também justificar o emprego da cepa BRF053 na produção desse composto. Não foi encontrado na literatura nenhum relato de 11-desacetoxiwortimanina e wortimanina sendo isoladas de fungos do gênero *Paecilomyces*.

Um estudo de desreplicação das frações de *Paecilomyces* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (LC/MS) também foi realizado permitindo sugerir a presença dos compostos: ciclosinefungina, estatana A, virescenosideo-D, (+)-esclerotiorina, 2'-amino-2'-deoxiguanosina, fumaramidimicina e deoxinivalenol, todos conhecidos na literatura, porém inéditos para o gênero *Paecilomyces*. Com o estudo da desreplicação foi possível evitar gastos de tempo e material no isolamento de compostos já conhecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; da ROCHA, R. M.; DE OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNÁNDEZ, I. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANTO, A. C.; de ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 510–522, 2004.

BROKA, C. A.; RUHLAND, B. Synthetic studies on wortmannin and 11-deacetoxywortmannin. **Journal Organic Chemical**, v. 57, p. 4888-4894, 1992.

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

ELBANDY, M.; SHINDE, P. B.; HONG, J.; BAE, K. S.; KIM, M. A.; LEE, S. M.; JUNG, J. H. α -Pyrones and Yellow Pigments from the Sponge-Derived Fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Bull. Korean Chemical Society**, v.30, p. 188, 2009.

FOLMER, F.; JASPARS, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Photosynthetic marine organisms as a source of anticancer compounds. **Phytochemistry**, v.9, p. 557 – 579, 2010.

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

LIRA, S. P. **Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos Isolados de Esponjas Marinhas e do fungo *Beauveria felina* de Origem Marinha**. Tese. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2007.

MACMILLAN, J.; VANSTONE, A. E.; YEBOAH, S. K. Fungal products. Part III. Structure of wortmannin and some hydrolysis products. **Journal Chemical Society**, v.1, p. 2898-2903, 1972

MORI, Y.; TSUBOI, M.; MAKOTO, S.; FAKUSHIMA, K.; ARAI, T. Structure of Leustatin A, new peptide antibiotic from *Paecilomyces lilacinus* A-267. **Journal Chemical Society**, v.10, p. 94-96, 1982.

MIKAMI, Y.; YAZAWA, K.; FAKUSHIMA, K.; ARAI, T.; UDAGAWA, S.; SAMSON, R. A. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. **Mycopathologia**, v.108, p. 195-199, 1989.

NIGGLI, V.; KELLER, H. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin markedly reduces chemotactic peptide-induced locomotion and increases in cytoskeletal actin in human neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 335, p.43-52, 1997.

POWIS, G.; BONJOUKLIAN, R.; BERGGREN, M. M. Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. **Cancer Research**, v. 54, p. 2419-2423, 1994.

RATEBAB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v.28, p. 290, 2011.

RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**. São Paulo: Guanabara, p. 297, 2001. LIVRO

RODRIGUES, B. S. F. **Estudo do Potencial citotóxico de Metabólitos secundários produzidos por fungos marinhos**. Tese (Doutorado em Andamento) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T. C; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 5ª ed., Guanabara Koogan, RJ, 1994.

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.

SATOSHI,N.; SHINGO,K.; TAKAHASHI, I.; KIYOTAKA, K.; TSUKUDA, E.;SANOS, T.; YAMADAS, K.; YOSHIDA, M.; KASES, H.; MATSUDA, Y.Wortmannin, a Microbial Product Inhibitor of Myosin Light Chain Kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.4, p. 2157-2163, 1992.

SERRANO-CARREON, L.; HATHOUT, Y.; BENSOUSSAN, M. Lipid accumulation in *Trichoderma species*. **FEMS Microbiology Letters**, v.93, n.2, p. 181 – 187, 1992.

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.

TELES, A. C.; TAKAHASHI, J. A. Paecilomyde, a new acetyl cholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. **Microbiological Research**, v.164, p. 204-210, 2013.

ZHANG, M.; FANG, Y.;ZHU, T.; GU, Q.; ZHU, W. Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 985-989, 2008.