

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAROLINA MEGUMI MIZUNO**

**ESTUDOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE MICRORGANISMOS  
ASSOCIADOS À ESPONJA MARINHA *DRAGMACIDON RETICULATUM*,  
OBJETIVANDO O ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
BIOATIVOS**

**SÃO CARLOS**  
**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAROLINA MEGUMI MIZUNO**

**ESTUDOS QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE MICRORGANISMOS  
ASSOCIADOS À ESPONJA MARINHA *DRAGMACIDON RETICULATUM*,  
OBJETIVANDO O ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
BIOATIVOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos requisitos para obtenção  
do título de mestre em Biotecnologia.  
*Orientação: Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim*  
*Orientação: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck***

**SÃO CARLOS**  
**2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M685eq

Mizuno, Carolina Megumi.

Estudos químicos e microbiológicos de microrganismos associados à esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*, objetivando o isolamento de metabólitos secundários bioativos / Carolina Megumi Mizuno. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

127 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Biotecnologia. 2. Produtos naturais. 3. Microbiologia aplicada. 4. Ambiente marinho. 5. Metabólitos secundários de fungos. 6. Análise cromatográfica. I. Título.

CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Carolina Megumi Mizuno**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 22/04/2010**

**BANCA EXAMINADORA**



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Mirna Helena Régali Seleglim (Orientadora)  
Universidade Federal de São Carlos - DEB



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Teresa Marques Novo  
Universidade Federal de São Carlos - DGE



\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Niegé Araçari Jacometti Cardoso Furtado  
Universidade de São Paulo - FCFRP

*Dedico este trabalho à minha  
família, em especial ao meu pai,  
pela confiança depositada.*

*E, ao William, por todos os  
momentos de carinho e  
compreensão oferecidos.*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial pai e mãe, pelo apoio e confiança;

À Camila, irmã e amiga, pelos laços fortalecidos;

Ao meu querido William por toda força e incentivo;

Às eternas *roomates* Cintia e Raquel pelas anormalidades;

Aos velhos e novos amigos que persistem ao tempo, desventuras e aventuras;

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo nos inúmeros dias de trabalho;

À Prof. Dra. Mirna Helena Regali-Seleghim e ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck pela orientação;

À Dra Lara Durães Sette pela supervisão no trabalho;

À Rafaella Costa Bonugli-Santos pela ajuda na execução do projeto;

À Darci da Consolação Diniz Javarotti pelo apoio contínuo;

Aos professores Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Clovis Wesley Oliveira de Souza e Flávio Henrique da Silva pelas importantes considerações no exame de qualificação;

Às professoras Maria Teresa Marques Novo e Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado pela avaliação da dissertação;

Ao CEBIMAR (USP) pelo apoio logístico durante a coleta do material biológico;

Ao grupo do professor Reginaldo Gonçalves (Faculdade de Odontologia, UNICAMP) pela realização dos ensaios de atividade antimicrobiana;

Ao grupo da professora Claudia de Ó Pessoa (Universidade Federal do Ceará) pela realização dos ensaios de atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais;

Aos colaboradores David E. Williams e Raymond J. Andersen (University of British Columbia) e Tim Bugni (University of Madison, EUA) pela obtenção dos espectros de RMN;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

## RESUMO

Os fungos são conhecidos como uma das fontes mais promissoras de compostos bioativos inéditos, no entanto, fungos derivados do ambiente marinho ainda são pouco estudados. Estes microrganismos apresentam altas porcentagens de metabólitos ativos e são comumente isolados de invertebrados marinhos. No presente estudo, a esponja marinha *Drarmacidon reticulatum* foi selecionada para ter sua microbiota associada investigada, de maneira a conhecer a diversidade de microrganismos associados a esta esponja e explorar o potencial biotecnológico destas linhagens para a produção de metabólitos secundários bioativos. Fragmentos da esponja *D. reticulatum* foram incubados em placas de Petri contendo diferentes meios de crescimento. Foram isoladas 45 linhagens, das quais 40 apresentaram crescimento satisfatório para preservação e produção de extratos. Destas, 32 foram avaliadas quanto ao seu polimorfismo genético por meio do método ARDRA. Os resultados da avaliação da diversidade genética permitiram identificar 24 ribotipos distintos das linhagens microbianas isoladas. Extratos produzidos a partir do cultivo das 40 linhagens isoladas foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica e/ou antimicrobiana. Destes, 22 apresentaram atividade biológica em pelo menos um dos bioensaios, e tiveram seu perfil químico avaliados em CLAE-UV-EM. Considerando apenas os ribotipos distintos, 20 linhagens foram selecionadas pela atividade biológica de seus extratos e foram submetidas à identificação molecular. Estes isolados foram atribuídos aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Myrmecridium*, *Microphaeropsis*, *Sporidesmium* e *Westerdykella*. Uma das linhagens foi identificada como uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* sp., e teve seu extrato investigado, pois actinobactérias derivadas do ambiente marinho também são fontes potenciais de compostos bioativos. O isolamento da  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina e dos compostos I-6, O-2 e JKL-4 inéditos na literatura, a partir do fungo *Penicillium decaturense*, evidenciou a efetividade da seleção das linhagens como produtoras de metabólitos de interesse biotecnológico e a necessidade de continuidade dos estudos deste isolado e das outras linhagens selecionadas neste estudo (*Streptomyces* sp., *Westerdykella* sp. e *Sporidesmium* sp.). Os resultados confirmam o potencial biotecnológico apresentado por fungos derivados do ambiente marinho.

**Palavras-Chave:** Biotecnologia. Fungos derivados do ambiente marinho. *Drarmacidon reticulatum*. Produtos naturais. *Penicillium decaturense*.

## ABSTRACT

Fungi are known as one of the most promising sources of unprecedented bioactive compounds, however, marine derived fungi are still very poorly studied. These microorganisms present high percentages of active metabolites and they are commonly isolated from marine invertebrates. At this study, the associated microbiota of the marine sponge *Dragmacidon reticulatum* was investigated in order to know the microbial diversity and explore the biotechnological potential of those strains for the production of bioactive secondary metabolites. Fragments from *D. reticulatum* were incubated on Petri dishes with different growth media. Forty five strains were isolated, although only 40 presented satisfactory growth for the preservation and production of extracts. From these, 32 strains were analysed for their genetic polymorphism through the ARDRA method that showed 24 different ribotypes. Extracts produced from the growing media of the 40 strains were evaluated for their cytotoxic and/or antimicrobial activity. From those, 22 presented biological activities in at least one of the bioassays, and had their chemical profiles evaluated in HPLC-UV-MS. Considering only the different ribotypes, 20 strains were selected by the biological activity of their extracts and were submitted to molecular identification. These isolates were attributed to the *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Myrmecridium*, *Microphaeropsis*, *Sporidesmium* and *Westerdykella* genera. One strain was identified as actinobacteria from the *Streptomyces* sp. genus, and had its extract investigated, because the marine derived actinobacteria are also potential sources of bioactive compounds. The isolation of the unprecedented compounds  $\alpha,\beta$ -dehydrocurvularin, the I-6, O-2 and JKL-4, produced by the fungus *Penicillium decaturense*, demonstrated the effectiveness of the screening procedures used in strain selection as producers of metabolites of biotechnical interest, and the need of more studies with this strain and the other strains selected in this study (*Streptomyces* sp., *Westerdykella* sp. and *Sporidesmium* sp.). The results confirmed the biotechnological potential presented by marine derived fungi.

**Key words:** Biotechnology. Marine derived fungi. *Dragmacidon reticulatum*. Natural products. *Penicillium decaturense*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Cluster de genes do DNA ribossomal de fungos, com expansão mostrando os sites de primers mais comuns (Fonte: Bugni & Ireland, 2004). (ITS) Internal Transcribed Spacer; (IGS) Intergenic Spacer; (NTS) Non-transcribed Spacer; (ETS) External Transcribed Spacer; (rDNA) DNA ribossomal. ....	15
<b>Figura 2.</b> Estruturas dos padangolídeos 3 (1) e 4 (2), da lunatina (3), do isociclocitrinol A (4), do 22-acetilisociclocitrinol (5) e da aspernigrina B (6).....	20
<b>Figura 3.</b> Esponja <i>D. reticulatum</i> fotografada em São Sebastião (SP): (A) com tamanho real de aproximadamente 60 x 90 mm (Foto E. Hajdu); (B) mostrando a superfície finamente reticulada e os ósculos elevados e abundantes (Foto F. Moraes) (Fonte: site Porifera Brasil desenvolvido por M. R. Custódio, E. Hajdu e G. Muricy). ....	21
<b>Figura 4.</b> Estruturas dos compostos dragmacidina (7) e dragmacidonaminas A (8) e B (9).....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema da obtenção dos extratos e limpeza da amostra para análise em CLAE-UV-EM. .	30
<b>Figura 6.</b> Fotografias das linhagens purificadas .....	35
<b>Figura 7.</b> Número de linhagens por grupo taxonômico .....	36
<b>Figura 8.</b> Número de linhagens e de ribotipos distintos por grupo taxonômico.....	38
<b>Figura 9.</b> Porcentagem de linhagens bioativas em relação ao número total de linhagens testadas por bioensaio. ....	40
<b>Figura 10.</b> Estruturas da decaturina A (10), 15-deoxi-oxalicina B (11) e norliquexantona (12).....	47
<b>Figura 11.</b> Fotografia da análise microscopia da linhagem DR(M3)2 ( <i>Aspergillus</i> ): (A) Conidióforos; (B) Esporos. ....	48
<b>Figura 12.</b> Estruturas das gelastatinas A (13) e B (14) e ácido dikélico (15). ....	49
<b>Figura 13.</b> Estruturas do pandangolídeo 1A (16), do pandangolídeo 1 (17), do iso-cladospolídeo B (18).....	50
<b>Figura 14.</b> Cromatograma e espectros UV do extrato DR(F)2-F1.....	51
<b>Figura 15.</b> Cromatograma e espectro de massas do extrato DR(F)2-F1.....	52
<b>Figura 16.</b> Esquema de seleção das linhagens considerando a atividade biológica, o perfil químico e os dados taxonômicos (análise dos dados obtidos da literatura a partir da identificação taxonômica).....	53
<b>Figura 17.</b> Esquema da extração e purificação em CLAE-UV do extrato bruto DR(M3)6.....	55

<b>Figura 18.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-F1F2F3.....	55
<b>Figura 19.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-A.....	56
<b>Figura 20.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-B.....	57
<b>Figura 21.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-F4. ....	57
<b>Figura 22.</b> Esquema da extração e purificação em CLAE-UV do extrato bruto DR(M2)4.....	58
<b>Figura 23.</b> Esquema da extração e purificação do extrato bruto da amostra DR(F)2.....	59
<b>Figura 24.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3.....	59
<b>Figura 25.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P3.....	60
<b>Figura 26.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1.....	60
<b>Figura 27.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-JKL.....	61
<b>Figura 28.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5. ....	61
<b>Figura 29.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-M. ....	62
<b>Figura 30.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-O.....	62
<b>Figura 31.</b> Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-I. ....	63
<b>Figura 32.</b> Cromatograma e espectros de UV e massas relativos à fração pura DR(F)2-F2F3-P1-I-6.	63
<b>Figura 33.</b> Estrutura planar dos compostos JKL-9, JKL-5E e I-6 com os respectivos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN mono e bi-dimensionais.....	64
<b>Figura 34.</b> Correlações observadas para o composto JKL-9: (A), (B) e (C) HMBC; (D) COSY. ....	67
<b>Figura 35.</b> Correlações do composto JKL-5E no HMBC: (A) todas as correlações observadas; (B) correlações observadas somente para o JKL-5E (não observadas para o JKL-9). ....	69
<b>Figura 36.</b> Espectros de massas do composto JKL-9: (A) modo positivo; (B) modo negativo.....	70
<b>Figura 37.</b> Correlações observadas no espectro de HMBC para o composto I-6. ....	73
<b>Figura 38.</b> Espectros de massas do composto I-6 em modo positivo. ....	73
<b>Figura 39.</b> Espectros de massas do composto I-6 em modo negativo. ....	74

<b>Figura 40.</b> Estrutura planar dos compostos (19) I-6, (20) oxocurvulina e (21) $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina. .....	74
<b>Figura 41.</b> Estrutura planar das duas hipóteses estruturais do composto O-2, com os respectivos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN mono e bi-dimensionais.....	76
<b>Figura 42.</b> Estrutura planar das duas hipóteses estruturais do composto JKL-4, com os respectivos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN mono e bi-dimensionais. ....	77
<b>Figura 43.</b> Composto O-2: (A) valores de deslocamento químicos dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ; (B) correlações observadas no espectro de HMBC; (C) correlações observadas no espectro de COSY.....	79
<b>Figura 44.</b> Espectros de massas do composto O-2: (A) modo positivo; (B) modo negativo.....	80
<b>Figura 45.</b> Esquema representativo das estruturas do composto O-2 segundo as distintas hipóteses. ..	80
<b>Figura 46.</b> Correlações observadas para o composto O-2: Hipótese 1 - (A) HMBC, (B) COSY; Hipótese 2 - (C) HMBC; (D) COSY.....	81
<b>Figura 47.</b> Comparação entre os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ dos compostos JKL-4 (A) e O-2 (B). ....	83
<b>Figura 48.</b> Comparação entre os espectros de RMN- $^1\text{H}$ dos compostos JKL-4 (A) e O-2 (B). ....	84
<b>Figura 49.</b> Espectros de massas do composto JKL4: (A) modo positivo; (B) modo negativo. ....	85
<b>Figura 50.</b> Esquema representativo das possíveis do composto JKL-4 segundo as distintas hipóteses.	86
<b>Figura 51.</b> Correlações observadas para o composto JKL-4: Hipótese 1 - (A) HMBC, (B) COSY; Hipótese 2 - (C) HMBC; (D) COSY.....	87
<b>Figura 52.</b> Estrutura planar dos compostos (22) O-2 (Hipótese 1), (23) JKL-4 (Hipótese 1) e (24) phomopsina B. ....	88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Escala de intensidade e a respectiva inibição de crescimento das células tumorais .....	27
<b>Tabela 2.</b> Microrganismos de interesse médico e odontológico utilizados no teste antimicrobiano .....	28
<b>Tabela 3.</b> Padrões de restrição das enzimas Hae III, Msp I e Rsa I para a região D1/D2 do DNAr 28S, ribotipo atribuído e caracterização inicial das linhagens por grupo taxonômico.....	39
<b>Tabela 4.</b> Resultado do bioensaio citotóxico para cada isolado, evidenciando os ribotipos distintos ...	42
<b>Tabela 5.</b> Resultado bioensaio antimicrobiano (CIM) .....	43
<b>Tabela 6.</b> Resultado bioensaio antimicrobiano (CBM).....	44
<b>Tabela 7.</b> Identificação das linhagens de acordo com a similaridade da sequência obtida a partir de uma região do DNA ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2 ou D1/D2) com linhagens recuperadas de banco de dados (BLAST). .....	46
<b>Tabela 8.</b> Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos dos compostos JKL-9 e JKL-5E observados nos espectros de RMN- <sup>1</sup> H e RMN- <sup>13</sup> C, com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados.....	65
<b>Tabela 9.</b> Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto JKL-9 com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados e as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY. ....	66
<b>Tabela 10.</b> Dados espectroscópicos do composto JKL-9 em comparação aos dados do composto JKL-5E. ....	68
<b>Tabela 11.</b> Dados espectroscópicos do composto JKL-9 em comparação aos dados da literatura.....	69
<b>Tabela 12.</b> Dados espectroscópicos do composto JKL-9 em comparação aos dados do composto I-6 (RMN- <sup>1</sup> H e RMN- <sup>13</sup> C e DEPT). ....	71
<b>Tabela 13.</b> Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto I-6 com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados e as correlações observadas nos espectros de HMBC.....	72
<b>Tabela 14.</b> Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto O-2 observados nos espectros de RMN- <sup>1</sup> H e RMN- <sup>13</sup> C, com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados. ....	78
<b>Tabela 15.</b> Dados espectroscópicos do composto O-2 em comparação aos dados do composto JKL-4 (RMN- <sup>1</sup> H e RMN- <sup>13</sup> C e DEPT). ....	82

**Tabela 16.** Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto JKL-4 com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados e as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY ..... 86

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Os fungos.....	14
1.2 O potencial biotecnológico dos fungos na indústria farmacêutica .....	16
1.3 Fungos derivados do ambiente marinho .....	17
1.4 Microrganismos derivados do ambiente marinho como fonte de metabólitos biologicamente ativos.....	18
1.5 A esponja marinha <i>Drummacidon reticulatum</i> como fonte de microrganismos.....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 Isolamento, purificação e taxonomia preliminar das linhagens .....	23
3.2 Preservação das linhagens isoladas .....	24
3.2.1 Preservação em água destilada: <i>Castellani</i> .....	24
3.2.2 Preservação em glicerol: <i>Criopreservação</i> .....	25
3.3 Cultivo das linhagens para a obtenção dos extratos brutos.....	25
3.4 Preparação dos extratos brutos.....	25
3.5 Avaliação da diversidade genética das linhagens isoladas.....	26
3.6 Avaliação da atividade biológica dos extratos brutos.....	27
3.6.1 Atividade citotóxica em células tumorais humanas .....	27
3.6.2 Atividade antimicrobiana .....	28
3.7 Identificação dos isolados selecionados pela atividade biológica de seus extratos .....	29
3.8 Avaliação do perfil químico dos extratos .....	30
3.9 Purificação dos compostos dos extratos ativos obtidos a partir do cultivo em maior volume das linhagens selecionadas como produtoras de metabólicos secundários.....	31
3.10 Determinação estrutural dos compostos isolados .....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>34</b>
4.1 Isolamento, purificação, preservação e caracterização das linhagens.....	34
4.2 Avaliação da diversidade genética das linhagens isoladas.....	37
4.3 Avaliação da atividade biológica dos extratos.....	40
4.3.1 Atividade citotóxica em células tumorais humanas .....	41
4.3.2 Atividade antimicrobiana .....	43

<b>4.4 Identificação dos isolados selecionados pela atividade biológica de seus extratos e avaliação do potencial biotecnológico a partir de dados da literatura .....</b>	<b>44</b>
<b>4.5 Avaliação do perfil químico dos extratos .....</b>	<b>51</b>
<b>4.6 Seleção das linhagens produtoras de metabólitos secundários.....</b>	<b>52</b>
<b>4.7 Purificação dos compostos.....</b>	<b>54</b>
4.7.1 <i>Linhagem DR(M3)6: Streptomyces sp.</i> .....	54
4.7.2 <i>Linhagem DR(M2)4: Westerdykella sp.</i> .....	57
4.7.3 <i>Linhagem DR(F)2: Penicillium decaturense</i> .....	58
<b>4.8 Determinação estrutural dos compostos isolados do fungo <i>P. decaturense</i> [DR(F)2] .....</b>	<b>64</b>
4.8.1 <i>Identificação dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9, DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E e DR(F)2-F2F3-P1-I-6</i> .....	64
4.8.2 <i>Identificação dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-O-2 e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4</i> .....	76
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Os fungos

Pertencentes ao Reino Fungi, os fungos são organismos eucariotos, e possuem características particulares que os distinguem dos organismos procariotos, tais como o maior tamanho das células e a presença de núcleo, vacúolo e mitocôndria (MADIGAN *et al.*, 1997). Tipicamente, estes organismos possuem paredes celulares constituídas por quitina (exceto alguns fungos aquáticos); não realizam fotossíntese; alimentam-se por absorção de nutrientes previamente digeridos por enzimas extracelulares; e se reproduzem, sexuada ou assexuadamente, por esporos. Suas células podem apresentar um só núcleo ou serem multinucleadas, possuem vida independente e não se reúnem para formar tecidos verdadeiros. Encontrados na maioria dos ambientes, os fungos podem tolerar amplas faixas de temperatura, pressão e pH e podem se desenvolver em meios com baixo teor de nutrientes, podendo utilizar quase todo o tipo de carbono como fonte de energia (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Estes organismos podem se desenvolver em meios de cultivo especiais, formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As colônias leveduriformes são pastosas ou cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. Os fungos filamentosos são formados por hifas contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas que, em conjunto, formam micélios. Em meio de cultura sólido, os fungos apresentam colônias que podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas. O micélio pode ser denominado vegetativo, aéreo ou reprodutivo de acordo com sua função. Aquele que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e absorção de nutrientes, é chamado de vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o aéreo e quando este se diferencia para sustentar os corpos de frutificação ou propágulos, constitui o micélio reprodutivo (TRABULSI & TOLEDO, 1998).

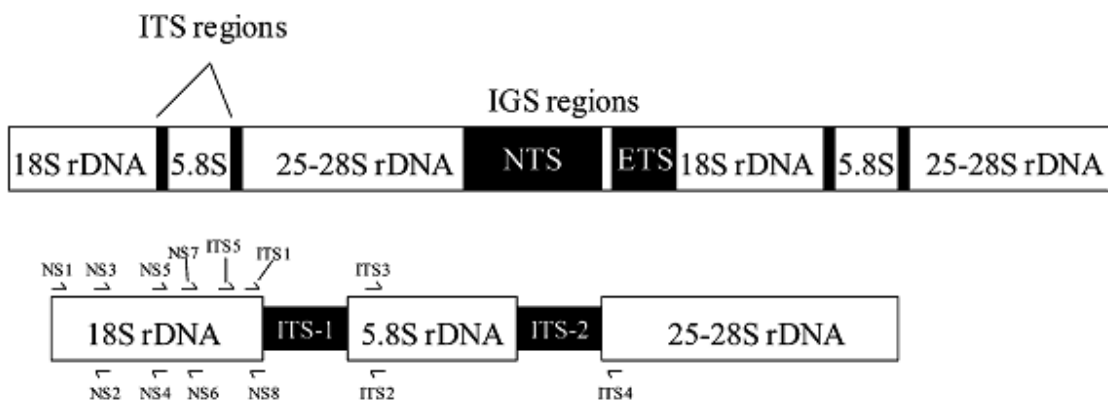
Os fungos que apresentam reprodução sexual são denominados fungos teleomórficos ou fungos meiospóricos. Estes fungos são divididos em quatro diferentes filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota.

Diferentes conceitos de espécie têm sido utilizados pelos micologistas para definir uma espécie fúngica. Além do conceito morfológico, clássica abordagem utilizada, há o conceito



ecológico (bastante utilizado para fungos fitopatogênicos) e o conceito biológico, que enfatiza o intercâmbio de genes dentro de cada espécie e a presença de barreiras que impedem o cruzamento entre espécies distintas, sendo aplicado apenas aos fungos sexuais. Após a incorporação de técnicas de biologia molecular e o uso da abordagem filogenética para classificação dos fungos, houve significativa mudança no conceito tradicional de sistemática. O conceito filogenético de espécies tornou-se bastante apropriado por abranger o grupo de fungos que não apresentam reprodução sexuada e que são definidos como anamórficos ou mitospóricos e são agrupados em um táxon artificial denominado Deuteromycetes (GUARRO *et al.*, 1999).

As técnicas de biologia molecular comumente utilizam as seqüências de DNA ribossomal (DNAr) na identificação de fungos e estudos filogenéticos. O *cluster* de genes ribossomais (Figura 1) é composto por três regiões de codificação para os genes 5,8S, 18S e 28S do RNA ribossomal (RNAr). As regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) são bastante divergentes e podem variar entre as espécies dentro de um mesmo gênero. Para obtenção das informações taxonômicas, os *primers* ITS1 e ITS4 são comumente utilizados para a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 (~ 550 pares de bases), que é posteriormente seqüenciada e comparada às seqüências do GenBank. Embora a seqüência ITS1-5.8S-ITS2 seja comumente usada como uma ferramenta taxonômica, a região IGS (*Intergenic Spacer*) é a mais divergente e pode ser útil para a identificação de espécies próximas que tenham seqüências da região ITS idênticas ou quase idênticas (BUGNI & IRELAND, 2004).



**Figura 1.** Cluster de genes do DNA ribossomal de fungos, com expansão mostrando os sites de *primers* mais comuns (Fonte: Bugni & Ireland, 2004). (ITS) *Internal Transcribed Spacer*; (IGS) *Intergenic Spacer*; (NTS) *Non-transcribed Spacer*; (ETS) *External Transcribed Spacer*; (rDNA) DNA ribossomal.

Estima-se que o número de espécies de fungos descritas representa apenas uma pequena fração do total de espécies existentes, já que poucos habitats e regiões foram

intensivamente estudados. Alguns autores indicam que menos de 20% dos fungos marinhos e terrestres foram descobertos, sendo que, em média, 1200 novas espécies são descritas anualmente (GUARRO *et al.*, 1999). Neste sentido, é evidenciada a necessidade de estudos dos ecossistemas visando sua preservação e a descoberta de novas substâncias de alto valor agregado e com potencial uso biotecnológico.

## 1.2 O potencial biotecnológico dos fungos na indústria farmacêutica

Os fungos produzem metabólitos secundários para sua sobrevivência em resposta à competição e ao *stress* encontrados no ambiente em que vivem (KNIGHT *et al.*, 2003). Devido à grande diversidade de metabólitos secundários e enzimas extracelulares que produzem, estes microrganismos apresentam grande potencial de utilização biotecnológica. Muitas das substâncias produzidas possuem atividade biológica significativa e apresentam importância farmacológica como antibióticos, antitumorais e imunossuppressores (STROBEL & DAISY, 2003).

O marco na descoberta de compostos fúngicos com atividade antimicrobiana aconteceu em 1929 com a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming, a qual foi consolidada apenas na década de 40 com seu uso da penicilina em humanos (BUGNI & IRELAND, 2004). No decorrer dos anos, muitos compostos, a princípio estudados por sua atividade antimicrobiana, foram comercializados ou potencialmente úteis como antitumorais, imunossuppressores, antiparasitas, entre outros. (DEMAIN, 1999) A ciclosporina A e a ergotamina são exemplos de compostos fúngicos que atualmente são comercializados como fármacos, mas que inicialmente foram estudados com outros propósitos. A ciclosporina A, comercializada como imunossupressor em transplantes de órgãos, foi inicialmente isolada a partir do fungo *Tolyocladium inflatum* por sua atividade antifúngica. Já a ergotamina, usada no tratamento de enxaquecas, foi obtida a partir de fungos do gênero *Claviceps*, sendo descrita também como uma micotoxina causadora do ergotismo em humanos e animais (DEMAIN, 1999).

Apesar dos interessantes compostos obtidos a partir de fungos, que chegaram a ser comercializados como fármacos ou serviram de modelo para síntese química, o aumento do interesse das indústrias farmacêuticas por moléculas bioativas produzidas por esses microrganismos ocorreu nas últimas décadas com a descoberta das estatinas, substâncias capazes

de controlar as taxas de colesterol plasmático (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006). A compactina (mevastatina) foi isolada em 1975 a partir do fungo *Penicillium brevicompactum* e despertou o interesse dos pesquisadores visto à possibilidade de inibição da produção de colesterol, pois mimetiza um intermediário envolvido em sua biossíntese, inibindo competitivamente a enzima envolvida no processo. Com a continuidade dos estudos, um homólogo da compactina, a lovastatina (Mevacor®), foi isolada a partir de culturas de *Monascus ruber* e de *Aspergillus terreus*. Posteriormente, foi sintetizado um análogo da lovastatina, a simvastatina (Zocor®), que ingressou no mercado como o primeiro fármaco antilipêmico (ou anticolesterolêmico) sintético. Em 1993, a Pfizer lançou a atorvastatina (Lipitor®) e, em 2003, a FDA aprovou a rosuvastatina (Crestor®), outro fármaco da classe das estatinas (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006). Segundo Bastos (2005), liderando a lista dos dez medicamentos mais vendidos no mundo no ano de 2004, os quais totalizaram vendas superiores a 50 bilhões de dólares estão os redutores de colesterol Lipitor®, com 12 bilhões de dólares em vendas, e o Zocor®, com cerca de 6 bilhões de dólares em vendas. Esse sucesso remete a importância econômica do setor farmacêutico e a potencialidade do desenvolvimento de fármacos a partir de novos compostos bioativos isolados de fungos ou outras fontes de produtos naturais.

### **1.3 Fungos derivados do ambiente marinho**

Segundo Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) os fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam apenas em ambiente marinho, enquanto os facultativos são aqueles que crescem e esporulam nesses ambientes, mas que também são encontrados nos terrestres e aquáticos. Devido à dificuldade na diferenciação entre organismos marinhos obrigatórios e facultativos, tem sido muito difundido o uso do termo “fungos derivados do ambiente marinho”.

A ecologia dos fungos marinhos ainda é pouco conhecida, em comparação com o papel ecológico dos fungos terrestres. No entanto, sabe-se que estes microrganismos de origem marinha possuem importância na reciclagem de nutrientes, em relações de mutualismo com outros organismos marinhos e como patógenos (BUGNI & IRELAND, 2004).

Muitos estudos envolvendo a ecologia de fungos marinhos foram iniciados devido à patogenicidade de algumas espécies, como por exemplo, as do gênero *Aspergillus*. Os fungos desse gênero são considerados patógenos de corais (*Gorgonia* spp.), e a aspergilose, doença que

pode acarretar a morte de uma colônia inteira desses invertebrados. Em 2009, Ein-Gil e colaboradores isolaram de uma esponja sadia da espécie *Spongia obscura*, uma linhagem de *A. sydowii*. Neste trabalho, os autores sugeriram que estas esponjas, assim como outras, podem servir como reservatório desses patógenos de corais visto à capacidade desses invertebrados em manter conídios viáveis de *A. sydowii* sem adoecer e pelo fato da linhagem isolada ser tão patogênica quanto à isolada de corais doentes.

Os fungos podem participar também de relações de mutualismo no ambiente marinho, como é o caso do fungo *Turgidosculum ulvae*, que causa o escurecimento de algumas partes das algas verdes da espécie *Blidingia mínima*, que não são predadas por outros organismos. Outro exemplo é o caso da alga *Ascophyllum nodosum* e do fungo endossimbionte *Mycosphaerella ascophylli*, que aparentemente dependem um do outro para sobreviver, visto que não são encontrados separadamente na natureza (BUGNI, IRELAND, 2004).

#### **1.4 Microrganismos derivados do ambiente marinho como fonte de metabólitos biologicamente ativos**

Após o sucesso da penicilina, em 1945, Giuseppe Brotzu começou a investigar amostras marinhas em busca de novos antibióticos, isolando a cefalosporina C a partir do fungo *Cephalosporium acremonium* (*Acremonium chrysogenum*). Apesar da descoberta, o interesse no estudo de fungos marinhos só foi estimulado após a descoberta da cefalosporina A, isolada do fungo *Tolypocladium inflatum* em 1976 e aprovada para uso clínico como imunossupressor em 1983. Entretanto, foi na década de 90 que houve um crescimento significativo nos estudos desses organismos como produtores de metabólitos secundários bioativos (BUGNI & IRELAND, 2004).

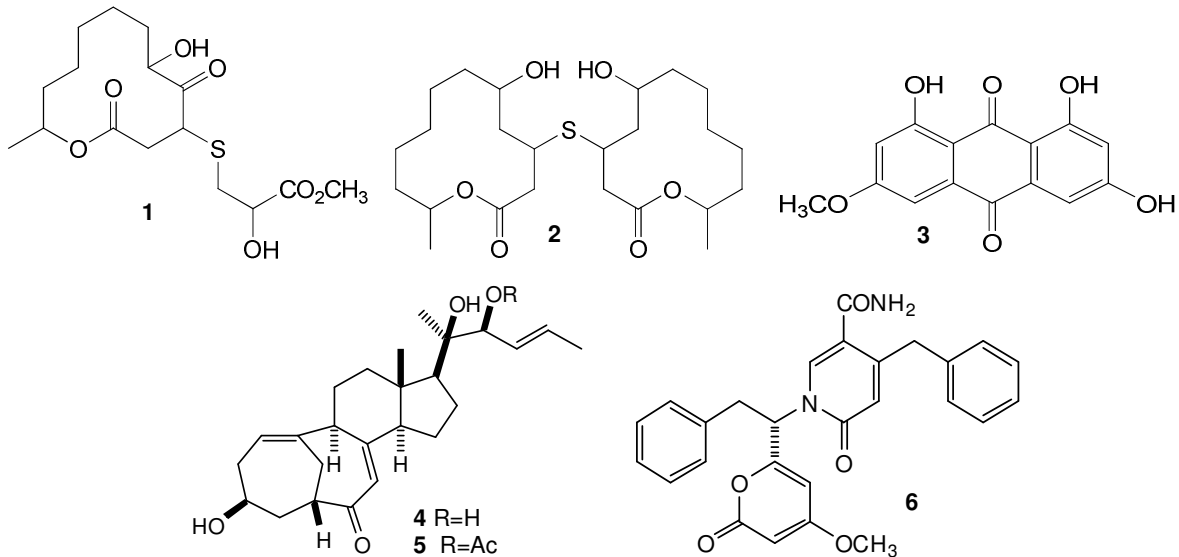
Em revisão sobre produtos naturais marinhos, Blunt e colaboradores (2009) observaram que a média de trabalhos publicados por ano com microrganismos aumentou 600% quando comparados o período de 1965-2005 com o ano de 2007. Neste trabalho, os autores relataram 948 citações referentes a compostos isolados de microrganismos marinhos, fitoplâncton, algas verdes, algas marrons, algas vermelhas, esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados, equinodermas e plantas de pântano, dos quais 961 novos compostos foram descritos.

Em seu trabalho, Kelecom (2002) observou que os estudos de metabólitos secundários de microrganismos derivados do ambiente marinho têm focado bactérias e fungos isolados da água do mar, sedimentos, peixes, algas, e principalmente, de invertebrados marinhos como esponjas, moluscos, tunicados, celenterados e crustáceos. O autor observou ainda, que nos trabalhos analisados a escolha da fonte de microrganismos segue duas abordagens distintas: (1) abordagem aleatória, que usa qualquer material disponível para o isolamento de microrganismos (água do mar, sedimentos, conteúdo gastrintestinal de peixes ou até mesmo pedaços de madeira flutuante); (2) abordagem com propósitos bem definidos, tais como a obtenção de metabólitos alvo ou o estudo da química envolvida, na qual os microrganismos são obtidos de algas, invertebrados e peixes.

Em 2004, Bugni & Ireland discutiram as estratégias para o isolamento, o crescimento e a produção de metabólitos secundários a partir de fungos marinhos obrigatórios ou facultativos. Neste trabalho, os autores observaram que entre as publicações que apresentavam a investigação química de fungos derivados do ambiente marinho, cerca de 45% dos isolados foram obtidos de invertebrados, sendo 33% de esponjas, enquanto que o restante ficou entre moluscos (5%), tunicados (5%), celenterados (2%) e crustáceos (2%). Foi observado também que as esponjas se destacaram por serem os organismos marinhos que mais fornecem isolados de fungos, os quais geram o maior número de metabólitos, inclusive novos na literatura.

Exemplos de metabólitos oriundos de fungos obtidos a partir de amostras de esponjas marinhas incluem (Figura 2): os padangolídeos 3 (1) e 4 (2) isolados do fungo *Cladosporium herbarum* obtido a partir da esponja *Callyspongia aeriuza*, que apresentaram atividade antibiótica contra *B. subtilis* e *S. aureus* (JADULCO *et al.*, 2001); a lunatina (3) isolada do fungo *Curvularia lunata* obtido a partir da esponja *Niphates olemda* (JADULCO *et al.*, 2002), que apresentou atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*; derivados esteroidais modificados moderadamente ativos contra *S. epidermidis* e *Enterococcus durans*, denominados isociclocitrinol A (4) e 22-acetilisociclocitrinol (5) foram isolados do fungo *Penicillium citrinum* a partir de uma esponja do gênero *Axinella* (AMAGATA *et al.*, 2003); por fim, uma série de derivados policetílicos nitrogenados obtidos de fungo *Aspergillus niger* isolado da esponja *Axinella damicornis*, dos quais o mais incomum é a aspernigrina B (6), que apresentou potente atividade neuroprotetiva, diminuindo significativamente a liberação de íons  $Ca^{2+}$  intracelular (HIORT *et al.*, 2004). A predominância

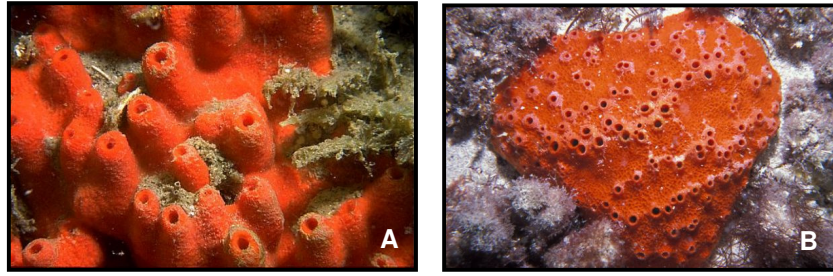
de derivados da rota dos policetídeos sugere que vários derivados de policetídeos isolados de esponjas possam ser biossintetizados por fungos.



**Figura 2.** Estruturas dos padangolídeos 3 (1) e 4 (2), da lunatina (3), do isociclocitrinol A (4), do 22-acetilisociclocitrinol (5) e da aspernigrina B (6).

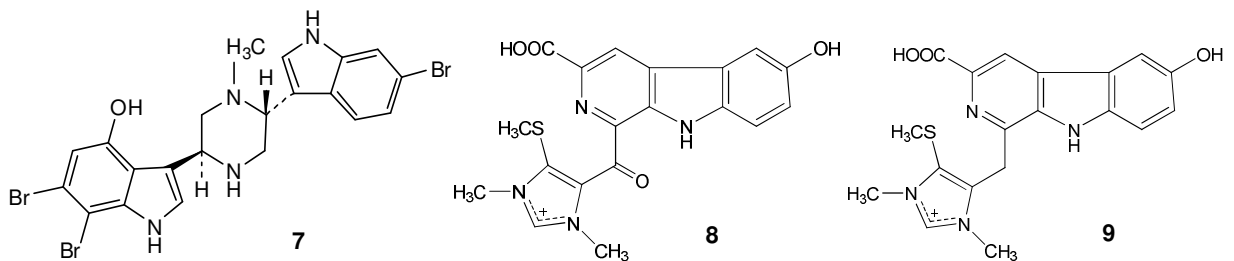
### 1.5 A esponja marinha *Drumacidon reticulatum* como fonte de microrganismos

Até recentemente, a esponja marinha *Drumacidon reticulatum* (RIDLEY & DENDY, 1886), pertencente à família Axinellidae (CARTER, 1875), foi citada erroneamente para o Brasil como *Pseudaxinella lunaecharta* e como *Pseudaxinella reticulata*, possuindo também as sinonímias *Axinella reticulata* e *Axinella lunaecharta* (MOTHES *et al.*, 2004). Essa esponja possui cor vermelha viva, alaranjada ou amarronzada, com forma maciça, irregular ou lobada (Figura 3). No Brasil, foi relatada nos estados do Amapá, ao largo da desembocadura do Rio Amazonas (COLLETTE; RÜTZLER, 1977); Maranhão (novo registro); Pernambuco (HECHTEL, 1976); Atol das Rocas, Rio Grande do Norte (MORAES *et al.*, 2003); Bahia (RIDLEY & DENDY, 1886); Espírito Santo (SOLÉ-CAVA *et al.*, 1981); Rio de Janeiro (MURICY *et al.*, 1991); e Santa Catarina (M.-DE-MORAES, 1987; LERNER, 1996). Tendo sido relatada também no Atlântico ocidental: Carolina do Norte, Carolina do Sul, Geórgia, Flórida, Bermuda, Golfo do México, Belize, Nicarágua, Porto Rico, Ilhas Virgens, Curaçao, Tobago, Venezuela (ALVAREZ *et al.*, 1998). (MOTHES, *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Esponja *D. reticulatum* fotografada em São Sebastião (SP): (A) com tamanho real de aproximadamente 60 x 90 mm (Foto E. Hajdu); (B) mostrando a superfície finamente reticulada e os ósculos elevados e abundantes (Foto F. Moraes) (Fonte: site Porifera Brasil desenvolvido por M. R. Custódio, E. Hajdu e G. Muricy).

Estudos com extratos brutos gerados a partir de esponjas do gênero *Drarmacidon* forneceram novos compostos como a dragmacidina (**7**) (KOHMOTO *et al.*, 1988) e as dragmacidonaminas A (**8**) e B (**9**) (PEDPRADAB *et al.*, 2004) (Figura 4). Para a espécie *D. reticulatum*, um trabalho foi encontrado relatando atividade anti-fúngica de seu extrato bruto contra *Candida albicans* (CRISTANCHO *et al.*, 2008). No trabalho de Monks *et al.*, 2002, a espécie *D. reticulatum* foi relatada como *Pseudaxinella reticulatum*, a qual teve seu extrato aquoso com significativo resultado na inibição da migração de leucócitos polimorfonucleares em um teste quimiotático. Em 1996, Barnathan e colaboradores estudaram o extrato dessa mesma espécie, sob o nome de *Pseudaxinella lunaecharta*, a fim de isolar lipídios insaturados de cadeia longa, e, em 1981, Sjöstrand e colaboradores isolaram dois novos esteróides da mesma esponja.



**Figura 4.** Estruturas dos compostos dragmacidina (**7**) e dragmacidonaminas A (**8**) e B (**9**)

Menezes e colaboradores (2009) isolaram, em São Sebastião, 43 linhagens fúngicas distintas a partir da esponja marinha *Drarmacidon reticulata*. A avaliação da diversidade genética dessas linhagens mostrou alguns gêneros de fungos comumente descritos em associações com invertebrados marinhos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. No entanto, alguns Ascomycota isolados não são comumente encontrados em esponjas

marinhas, como é o caso do dematiaceo *Botryosphaeria* sp., reportado na literatura em associação com corais coletados na Nova Papua Guiné. Foram isolados também representantes do filo Basidiomycota, raramente obtidos a partir de amostras marinhas. Estes dados evidenciam o interesse no estudo dos microrganismos associados à esponja *D. reticulatum*, visto a diversidade de microrganismos encontrada e que podem fornecer compostos inéditos na literatura.

## 2. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a diversidade genética dos fungos isolados da esponja marinha *Drasmodon reticulatum* e identificar as distintas linhagens, selecionadas pela atividade biológica de seus extratos;
- ✓ Isolar e identificar os metabólitos secundários bioativos a partir do cultivo das linhagens, selecionadas como produtoras de metabólitos secundários, por análises químicas e biológicas.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento, purificação e taxonomia preliminar das linhagens

Amostras da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum* foram coletadas por mergulho autônomo na região de São Sebastião (litoral sul do estado de São Paulo, Brasil). O material foi coletado com estilete e bisturi esterilizados e colocado em sacos plásticos contendo água do mar esterilizada. Durante o transporte até o laboratório do CEBIMAR-USP (São Sebastião), o material foi mantido a 4 °C. No laboratório, a esponja foi submetida à desinfecção superficial por meio de lavagem com solução de 0,001 g/L de HgCl<sub>2</sub> em etanol a 5% por um minuto, seguida de três lavagens com água estéril (NEWELL, 1976).

Posteriormente, a esponja foi cortada com bisturi estéril em pequenas porções de 1 cm<sup>2</sup> que foram inoculadas sobre placas de Petri com seis diferentes meios de cultura: ágar de aveia, ágar de batata e cenoura, (GPY), ágar de fubá, ágar de malte 2% e ágar de malte 3% (APÊNDICE A), todos contendo o antibiótico rifampicina na concentração de 300 mg/L. O uso de diferentes meios de cultura teve como objetivo aumentar a diversidade de espécies recuperadas das amostras de esponja.

Após incubação das placas por sete dias em modo estático e temperatura ambiente (25 °C), as colônias foram purificadas. As linhagens resultantes foram fotografadas para facilitar a identificação, evitar o re-isolamento e garantir que o fungo manuseado era o fungo de interesse.

Todas as linhagens isoladas foram identificadas por códigos de acordo com o nome do invertebrado de origem, sendo o código das linhagens isoladas da esponja *Dragmacidon reticulatum* iniciado com DR. O meio no qual a linhagem foi isolada compõe o código com a abreviação deste entre parênteses, como pode ser observado a seguir: ágar aveia (A), ágar batata e cenoura (B), ágar GPY (G), ágar fubá (F), ágar malte 2% (M2) e ágar malte 3% (M3). O último componente do código refere-se ao número atribuído às linhagens que cresceram nas placas da coleta. Como exemplo, a linhagem isolada da esponja *Dragmacidon reticulatum* no ágar fubá, a qual teve o número 2 estipulado na placa de coleta, recebeu o código DR(F)2.

A caracterização taxonômica preliminar das linhagens foi realizada por meio de taxonomia convencional, sob supervisão da Dra. Lara Durães Sette na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP. A morfologia das colônias isoladas foi examinada em

microscópio estereoscópio (Leica MZ6) e análises microscópicas foram feitas em microscópio ótico (Leica DMLS) à partir de lâminas preparadas com lactofenol azul de algodão. Com base nestas observações e seguindo métodos e critérios morfológicos determinados pela literatura pertinente (DOMSCH *et al.*, 1980; ELLIS, 1971, 1976; KLICH & PITT, 1988; PITT, 1979, 1985; RAPER & FENNELL, 1965; SAMSON *et al.*, 2002), os microrganismos foram preliminarmente classificados em grupos, tais como: dematiaceos, *Aspergillus*, *Penicillium*, actinobactérias e não identificados (aqueles que não apresentaram estruturas reprodutivas).

### **3.2 Preservação das linhagens isoladas**

Para garantir a estabilidade genética e a pureza das linhagens, que podem ser perdidas após sucessivos repiques, foram utilizadas as seguintes técnicas de preservação: Castellani (água destilada a 4 °C) e criopreservação a -20 °C (glicerol 10%). A escolha de duas técnicas diferentes teve como intuito ampliar as possibilidades de recuperação das linhagens após a preservação.

#### **3.2.1 Preservação em água destilada: Castellani**

A metodologia utilizada foi baseada na técnica de Castellani (1967). Foram colocados de 1 a 2 mL de água destilada em tubos para centrífuga com tampa de rosca e estes foram esterilizados em autoclave. As linhagens foram repicadas em placas de Petri contendo os meios de cultura nos quais foram inicialmente isoladas. Após sete dias de incubação a 25 °C, quatro discos de micélio aéreo da superfície da colônia (de preferência com esporos e de distintas regiões) foram removidos usando uma seringa estéril de 1 mL com a ponta cortada e transferidos para os tubos, tomando-se o cuidado para não extrair meio de cultura.

Os tubos, devidamente etiquetados, foram armazenados em refrigerador no escuro. A reativação da cultura armazenada foi realizada com a remoção asséptica dos discos de micélio e transferência destes para um meio de cultura adequado.

### **3.2.2 Preservação em glicerol: Criopreservação**

Foram colocados de 1 a 2 mL de glicerol 10% em tubos para centrífuga com tampa de rosca e estes foram esterilizados em autoclave. As linhagens foram repicadas em placas de Petri contendo os meios de cultura nos quais foram inicialmente isoladas. Após sete dias de incubação a 25 °C, quatro discos de micélio aéreo da superfície da colônia (de preferência com esporos e de distintas regiões) foram removidos usando uma seringa estéril de 1 mL com a ponta cortada e transferidos para os tubos, tomando-se o cuidado para não extrair meio de cultura.

Os tubos, devidamente etiquetados, foram colocados em geladeira por 30 minutos e depois estocados em congelador (-20 °C). A reativação foi realizada com a remoção asséptica dos discos de micélio e transferência destes para o meio de cultura adequado.

### **3.3 Cultivo das linhagens para a obtenção dos extratos brutos**

As linhagens foram inoculadas em frascos de cultivo com tampa de rosca contendo 250 mL de meio líquido (sem ágar) no qual os microrganismos foram isolados. Esse meio foi preparado sem o antibiótico, que foi utilizado apenas no momento da coleta. Os frascos, com meios de cultura inoculados, foram incubados à temperatura ambiente em condições estáticas. Após um mês de crescimento foram adicionados 250 mL de acetato de etila para a extração dos metabólitos liberados pelo fungo.

### **3.4 Preparação dos extratos brutos**

Os frascos de cultivo com acetato de etila foram mantidos na câmara incubadora refrigerada a 25 °C com agitação orbital durante 12 horas a 120 rpm, para melhorar a eficiência da extração dos metabólitos.

A primeira etapa da separação foi a filtração a vácuo da amostra, usando papel de filtro e uma camada com aproximadamente 0,5 cm de celite, em funil de Büchner. Após a filtração, foi feita a partição da amostra em funil de separação, no qual a parte aquosa foi separada da fração acetato de etila. A fração aquosa foi descartada e a fração acetato de etila

coletada em um balão. O extrato foi seco em evaporador rotativo e quando necessário, um sistema de centrífuga a vácuo Savant, modelo Speedvac Plus SC 210, foi utilizado. Os extratos secos de cada amostra foram transferidos para frascos de vidro, previamente pesados e etiquetados, para a avaliação de suas respectivas massas em balança analítica.

### 3.5 Avaliação da diversidade genética das linhagens isoladas

A análise da diversidade genética foi realizada pelo método de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) na *Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP sob supervisão da Dra. Lara Durães Sette e da Doutoranda Rafaella Costa Bonugli-Santos*.

Após sete dias do cultivo de cada linhagem a 28 °C e 150rpm em *Sabouraud Dextrose Broth* (Oxoid Brasil LTDA), o DNA genômico foi extraído segundo o método apresentado por Raeder e Broda (1985), adaptado (APÊNDICE B). Os resultados das extrações foram visualizados após eletroforese em géis de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo (1 µL/100 mL) e fotodocumentados pelo sistema EpiChemi 3 Darkroom (UVP, BioImaging System). As concentrações de DNA foram estimadas pela comparação com padrões de concentração de DNA (fago λ). Os DNAs foram estocados em freezer a -20 °C.

A amplificação da região D1/D2 (DNA 28S) foi feita pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído das amostras, com a utilização de *primers* homólogos a regiões conservadas do *cluster* ribossomal: NL-1m (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3') e NL-4m (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG 3') (O'DONNELL, 1993). (APÊNDICE C).

Os produtos amplificados foram digeridos pelas enzimas de restrição *Hae* III, *Msp* I, *Rsa* I. O tampão de cada enzima, a água e a albumina bovina (BSA) foram adicionados à reação, a qual foi mantida a 37 °C por 2 horas. Os produtos da digestão enzimática foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/mL). Os perfis de bandas (ribotipos) dos isolados foram visualizados em transluminador UV e documentados. Os ribotipos gerados pelas digestões enzimáticas foram utilizados para diferenciar geneticamente os isolados de fungos filamentosos.

### 3.6 Avaliação da atividade biológica dos extratos brutos

Alíquotas de 3 a 5 mg dos extratos brutos foram enviadas para os bioensaios de atividade citotóxica e antimicrobiana, realizados pelo grupo dos pesquisadores colaboradores do projeto, respectivamente: *Dra. Claudia do Ó Pessoa do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.*

#### 3.6.1 Atividade citotóxica em células tumorais humanas

A citotoxicidade das amostras foi avaliada pelo método do MTT (MOSMAN, 1983). As linhagens utilizadas, MDA-MB435 (mama humano), HCT-8 (côlon humano), SF295 (sistema nervoso humano) e HL-60 (leucemia humana), foram cedidas pelo Mercy Children's Hospital, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab), suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os extratos foram dissolvidos em DMSO na concentração estoque de 20 mg/mL. As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: 0,7 x 10<sup>5</sup> (HCT8), 0,6 x 10<sup>5</sup> (SF295), 0,1 x 10<sup>6</sup> (MDA-MB435) e 0,7 x 10<sup>5</sup> (HCT8). Os extratos foram incubados durante 72 horas em uma única concentração (100 µg/mL). As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa a 550 nm. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism. Cada extrato foi testado em triplicata em dois experimentos independentes. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Escala de intensidade e a respectiva inibição de crescimento das células tumorais

<b>Intensidade da atividade</b>	<b>Inibição de crescimento</b>
Sem atividade (SA)	0
Pouca atividade (PA)	1 a 50%
Atividade moderada (MO)	50 a 75%
Muita atividade (MA)	75 a 100%

### 3.6.2 Atividade antimicrobiana

Para os experimentos de avaliação antimicrobiana foram utilizadas cepas padrões de interesse médico e odontológico (Tabela 2) e um isolado clínico de *Streptococcus mutans*.

**Tabela 2.** Microrganismos de interesse médico e odontológico utilizados no teste antimicrobiano

MICROORGANISMO	ORIGEM
<i>Escherichia coli</i>	NTCC 861
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 14506
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 15300
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC 27607
<i>Streptococcus mutans</i>	UA 159
<i>Candida albicans</i> sorotipo A	ATCC 36801

As amostras foram caracterizadas quanto ao espectro de atividade inibitória contra diferentes espécies bacterianas e uma levedura através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs foram obtidas seguindo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o protocolo de Oliveira *et al.*, (2006), com algumas modificações. Os extratos, na concentração de 400-500 µg/mL, foram diluídos serialmente em DMSO (1%). Suspensões de cultura inoculada no dia anterior provenientes de cepas padrão (Tabela 2) ou isolado clínico crescido em BHI (*Brain Heart Infusion*), foram diluídos até a concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Os testes foram realizados em microplacas estéreis com 96 poços de fundo chato, sendo que cada poço continha volume total de 100 µL (40 µL de meio de cultura + 20 µL de inóculo + 40 µL da substância diluída em água). As placas foram incubadas por 24 horas, à temperatura de 37 °C em microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>) e o crescimento microbiano, determinado pelas absorbâncias mensuradas antes e após incubação, a 550-560 nm em leitor automático de microplacas (Molecular Devices, Programa Versa Max). A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu de 50 a 100 % do crescimento em relação ao controle. O uso de um antibiótico comercial de amplo espectro de ação contra bactérias doxícilina (Sigma-Aldrich®, USA) foi necessário como padrão para validar os valores de CIM. O controle negativo foi realizado com a cultura microbiana sem adição do extrato.

Para os extratos que inibiram 100% do crescimento celular (em relação ao padrão), a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada, sendo esta definida como a menor concentração do antimicrobiano que teve capacidade de matar todas as células bacterianas presentes no inoculo inicial. Após incubação e leitura de absorbância em leitor de microplacas, alíquotas de 50 µL foram removidas dos poços das placas de microtitulação que não mostraram nenhuma turbidez. Estas alíquotas foram diluídas serialmente em salina estéril (NaCl 0,9%) e plaqueadas em meio de cultura propício para o crescimento. Após 24 horas em 10% CO<sub>2</sub>, foram realizadas a contagem de células viáveis e a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), sendo esta definida como a menor concentração do antimicrobiano que teve capacidade de matar todas as células bacterianas presentes no inóculo inicial.

### **3.7 Identificação dos isolados selecionados pela atividade biológica de seus extratos**

Os isolados selecionados pela atividade antimicrobiana e/ou citotóxica que apresentaram ribotipos distintos pelo método de ARDRA foram submetidos ao seqüenciamento de DNA para identificação das linhagens. *Esta etapa foi realizada na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP sob supervisão da Dra. Lara Durães Sette e da Doutoranda Rafaella Costa Bonugli-Santos.*

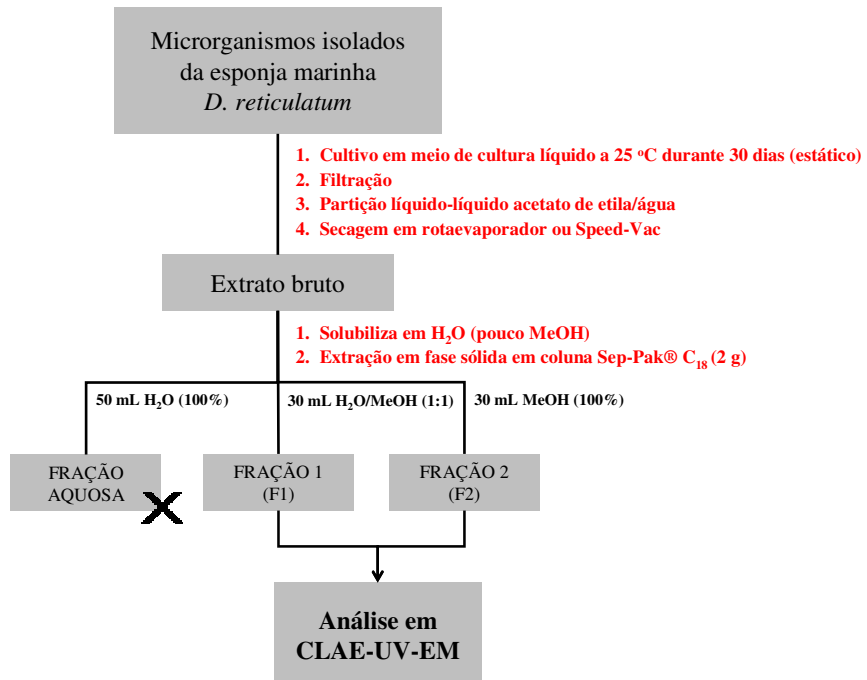
A caracterização molecular foi baseada na análise de seqüências de DNA da região ITS1-5,8S-ITS2 e/ou 28S (região D1/D2) do *cluster* ribossomal e 16S (para a actinobactéria). O DNA extraído no item 3.5 foi amplificado nas mesmas condições utilizadas para a análise de diversidade genética (APÊNDICE B), utilizando-se os *primers* adequados a cada região de interesse. NL-1m e NL-4m para a região do rDNA 28S D1/D2 (O'DONNELL, 1993), ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3') para a região ITS1-5,8S-ITS2 (WHITE *et al.*, 1990) e 27F (5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG3') (LANE, 1991) e 1401R (5'CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG3') (HEUER *et al.*, 1997) para a região 16S.

Os produtos de amplificação foram purificados em mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e seqüenciados em seqüenciador automático (MegaBace, GE Healthcare). Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o *kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Healthcare). As

sequências obtidas foram comparadas com as sequências de genes de microrganismos representados na base de dados do Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) e do CBS ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)). Nos casos em que a identificação molecular não apresentou resultados consistentes, esta foi complementada com dados de taxonomia convencional (DOMSCH *et al.*, 1980; ELLIS, 1971, 1976; KLICH & PITT, 1988; PITT, 1979, 1985; RAPER & FENNELL, 1965; SAMSON *et al.*, 2002)

### 3.8 Avaliação do perfil químico dos extratos

Para a realização das análises químicas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta-visível com arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massas (CLAE-UV-EM), os extratos brutos que apresentaram atividade nos ensaios biológicos foram submetidos a uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® de sílica gel derivatizada com octadecilsilano (C<sub>18</sub>) gerando duas frações. A fração 1 (F1) foi eluída com uma solução de metanol (MeOH) e água (H<sub>2</sub>O) na proporção 1:1 e a fração 2 (F2) com 100% MeOH. Com a finalidade de realizar a limpeza da amostra, 50 mL de H<sub>2</sub>O 100% foi eluído na coluna e descartado (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema da obtenção dos extratos e limpeza da amostra para análise em CLAE-UV-EM.



As frações F1 e F2 obtidas a partir dos extratos brutos foram avaliadas em CLAE-UV-EM. O sistema é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters®, modelo Alliance 2695, acoplado a um detector espectrofotométrico UV-Vísivel, marca Waters® modelo 2996 e a um espectrômetro de massas da marca Waters®, modelo ZQ 2000, com ionização no modo *electrospray* e analisador do tipo quadrupolo. As análises foram realizadas em coluna e condições definidas de acordo com os extratos de interesse.

Para análise do perfil químico por CLAE-UV-EM, as amostras foram submetidas à cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupo C<sub>18</sub> Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm) utilizando um gradiente de eluição de 100% H<sub>2</sub>O até 100% MeOH durante 30 minutos, monitorando com detector de arranjo de diodos com varredura no UV-Vis entre 200 e 800 nm. A varredura por EM foi realizada entre 200 e 1000 Da, de maneira a se cobrir a faixa mais ampla possível de massa de metabólitos secundários. A temperatura utilizada para a fonte foi 100 °C e a temperatura de dessolvatação foi 300 °C, com fluxo de gás no cone de 50 L/h.

A análise do perfil químico foi realizada para as linhagens selecionadas após a avaliação da atividade biológica, de acordo com critérios utilizados com êxito no grupo de pesquisas do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck. Os critérios de seleção química utilizados foram:

- a) Presença de compostos com relação massa/carga superior a 200 Da (compostos com  $m/z$  inferior a 200 Da, são típicos do metabolismo primário);
- b) Presença de compostos com espectros de UV com absorção atípica a compostos do metabolismo primário (como exemplo, absorbâncias próximas a 260 nm são típicas de aminoácidos);
- c) Cromatogramas mais simples (com poucos picos) para facilitar o isolamento dos compostos.

### **3.9 Purificação dos compostos dos extratos ativos obtidos a partir do cultivo em maior volume das linhagens selecionadas como produtoras de metabólitos secundários**

As linhagens selecionadas como prioridade para o isolamento de compostos foram cultivadas por 30 dias em 8 frascos contendo 250 mL do meio líquido (sem ágar) no qual foram isoladas inicialmente. Os extratos foram preparados utilizando o mesmo procedimento descrito para a produção dos extratos brutos enviados aos bioensaios.

As técnicas cromatográficas utilizadas na purificação dos extratos foram definidas de acordo com as características da amostra em análise. Para a cromatografia em coluna pré-empacotada foram utilizadas colunas da marca Waters Sep-Pak® vac 20cc ou da marca Phenomenex® Strata™ de diferentes dimensões (2 g, 5 g ou 10 g) e com diferentes fases estacionárias, tais como: sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C<sub>18</sub>) ou cianopropila (CN).

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizadas para avaliação das separações cromatográficas e como critério de reunião das frações obtidas, foram realizadas com misturas dos solventes hexano (HEX), acetato de etila (AcoEt), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e metanol (MeOH), nas proporções: HEX:AcoEt (7:3) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1). Após observação sob luz UV (254 e 365 nm), as placas de sílica foram reveladas com solução de ácido fosfomolibdico em etanol (revelador oxidante que indica a presença de compostos como terpenos, esteróis, ácidos graxos, acetogeninas e compostos correlatos) e Dragendorff (revelador de alcalóides). Nas placas eluídas com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH, o padrão utilizado foi a timidina, sendo o colesterol utilizado como padrão para as análises das placas eluídas em HEX:AcoEt e reveladas com ácido fosfomolibdico.

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

Para purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizados dois sistemas Waters®, modelo Alliance 2695, com bombas modelo Pump 600, conectado a detector eletrofotométrico UV-visível com leitura em dois comprimentos de onda, modelo 2487. Para as separações foram utilizadas diferentes colunas de sílica gel derivatizada com grupo C<sub>18</sub>: Inertsil ODS-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm), CSC-Inertsil ODS-2 150 A (25 x 0,94 cm, 5 µm), Delta Pak WAT011798 100 A (300 x 7,8 mm, 15 µm), X-Terra MS WATERS (50 x 2,1 mm, 3,5 µm).

Para obtenção dos espectros de massas, foi utilizado um sistema composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Waters®, modelo Alliance 2695, utilizado como injetor de amostras, acoplado ao espectrômetro de massas da marca Waters®, modelo ZQ 2000. A ionização pode ser realizada no modo *electrospray* com analisador do tipo quadrupolo. Além do espectrômetro de massas, dois detectores estão acoplados ao cromatógrafo: um detector

espectrofotométrico UV-Vísivel, marca Waters® modelo 2996, de arranjo de fotodiodos e um de espalhamento de luz evaporativo, marca Waters®, modelo 2424.

As avaliações de pureza das amostras por CLAE-UV-EM foram realizadas em coluna de sílica gel derivatizada com grupo C<sub>18</sub> X-Terra MS (50 x 2,1 mm, 3,5 µm) utilizando um gradiente de eluição de 90% H<sub>2</sub>O até 50% MeOH e 50% acetonitrila (MeCN) durante 20 minutos, monitorando com detector de arranjo de diodos com varredura no UV-Vis entre 200 e 800 nm. A varredura por EM foi realizada entre 200 e 1000 Da, de maneira a se cobrir a faixa mais ampla possível de massa de metabólitos secundários. A temperatura utilizada para a fonte foi 100 °C e a temperatura de dessolvatação 300 °C.

### 3.10 Determinação estrutural dos compostos isolados

Uma vez puros, os compostos foram identificados pela análise de seus dados espectroscópicos e espectrométricos por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM). Para as análises, foram obtidos espectros de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) e de carbono (RMN-<sup>13</sup>C), além dos bidimensionais: *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC), *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (HMBC) e *Correlation spectroscopy* (COSY).

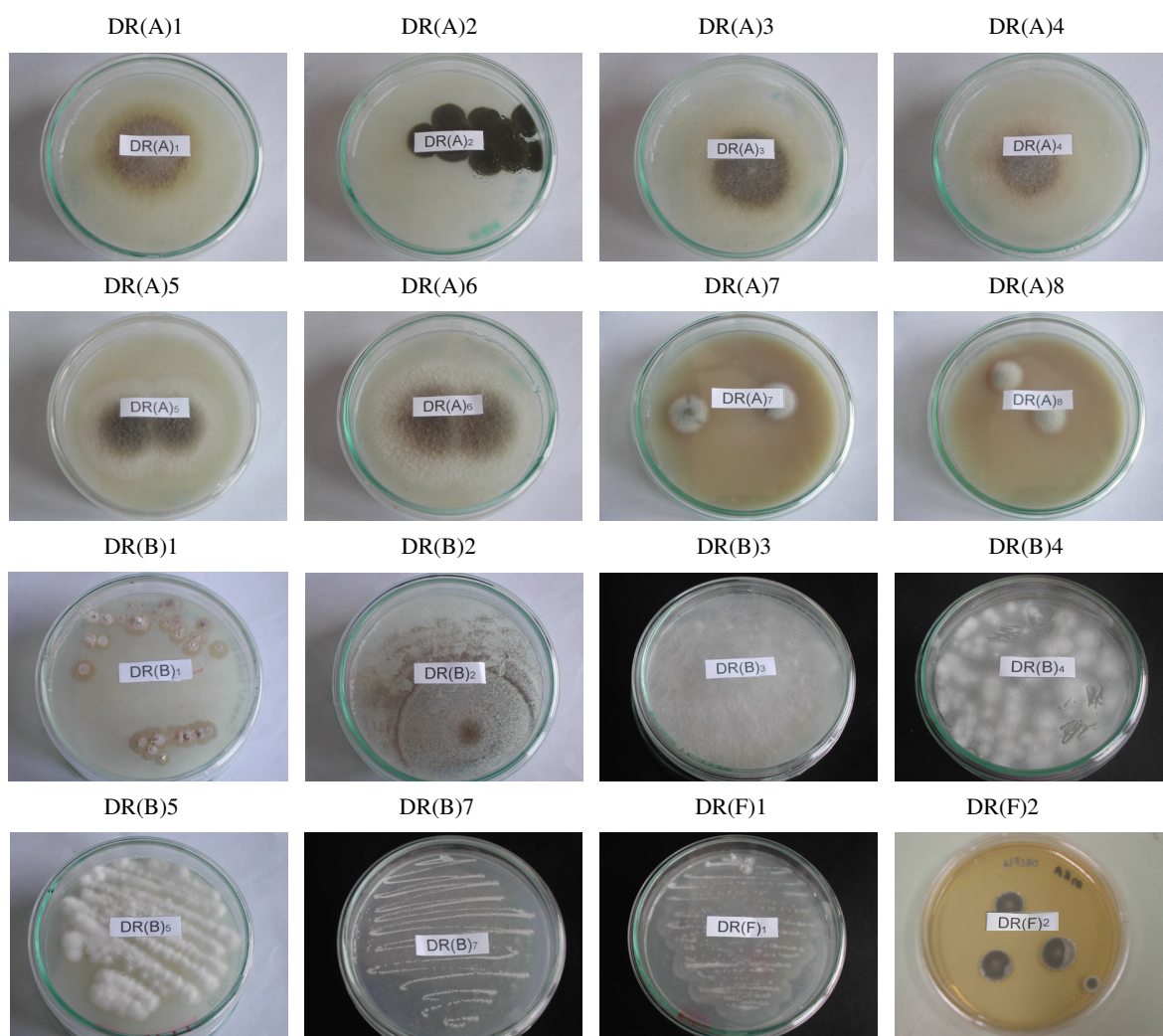
Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se o aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (<sup>1</sup>H) e a 100,1 MHz na frequência do Carbono (<sup>13</sup>C) no DQ-UFSCar. As amostras foram preparadas utilizando o solvente deuterado (Cambridge *Isotopes*) dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>). O padrão usado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

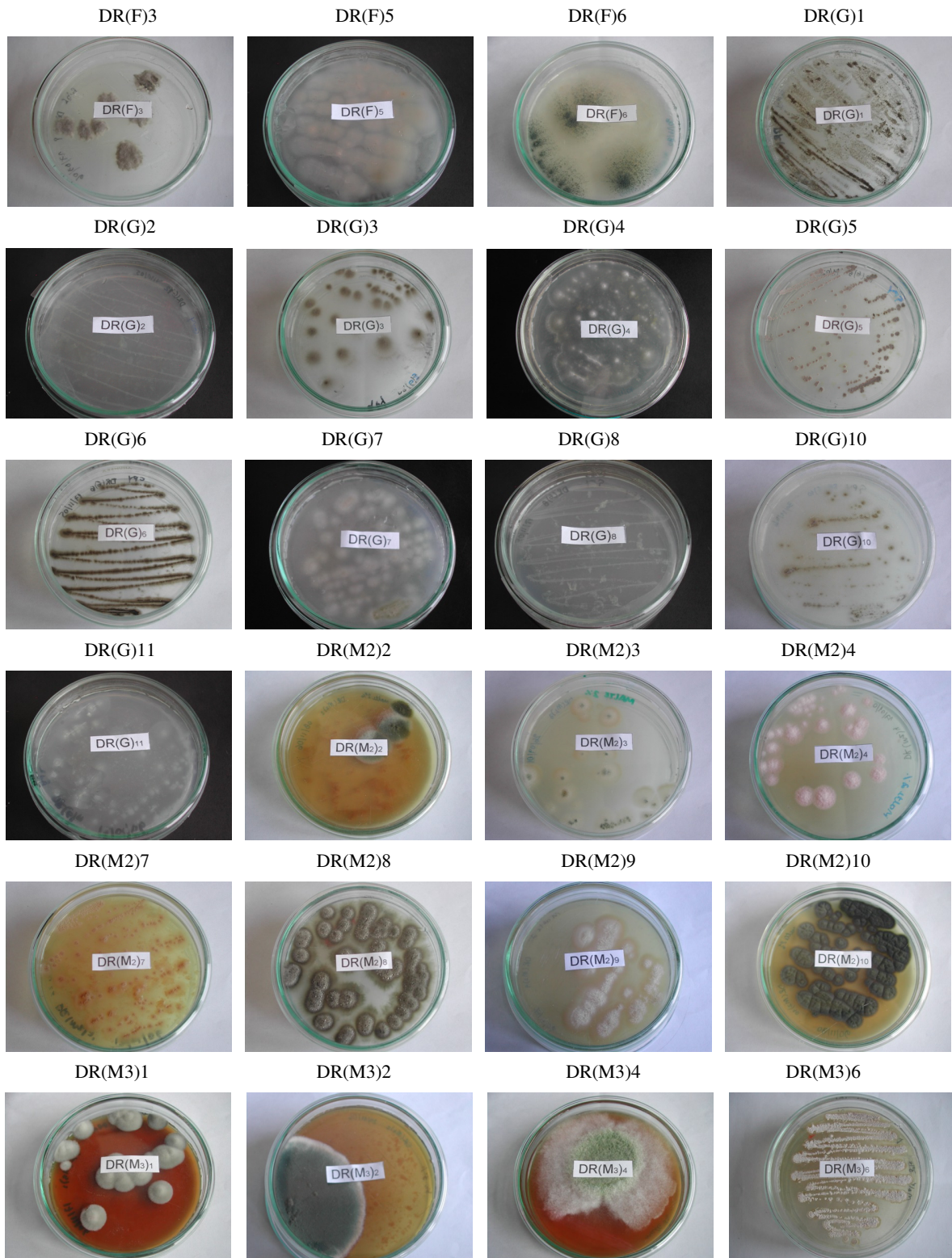
Alguns espectros de RMN e de massas foram realizados pelos colaboradores David E. Williams e Raymond J. Andersen do Departamento de Ciências da Terra e dos Oceanos, University of British Columbia, Vancouver, Canadá. Os espectros de RMN foram obtidos em um aparelho da marca Bruker AV-600 com uma criossonda 5 mm CPTCI, 600 MHz (<sup>1</sup>H) e 150 MHz (<sup>13</sup>C); e os espectros de massas de baixa resolução nos espectrômetros Bruker-Hewlett Packard 1100 Esquire.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento, purificação, preservação e caracterização das linhagens

Do total de 45 colônias isoladas da esponja marinha *Drummacidon reticulatum* nos diferentes meios de cultura, 40 linhagens foram purificadas, fotografadas (Figura 6) e preservadas em água destilada (4 °C) e glicerol 10% (-20 °C).

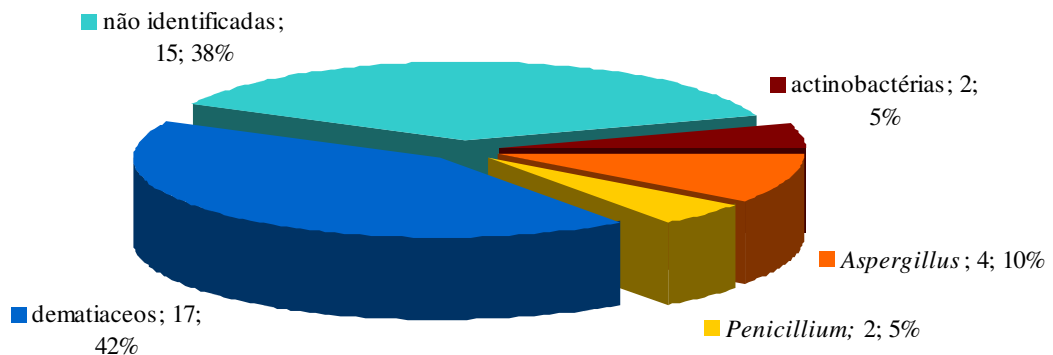




**Figura 6.** Fotografias das linhagens purificadas



Após avaliação macro e micromorfológica, 17 linhagens foram definidas como pertencentes ao grupo dos dematiaceos [DR(A)1, DR(A)2, DR(A)3, DR(A)4, DR(A)5, DR(A)6, DR(A)7, DR(A)8, DR(F)3, DR(G)3, DR(G)6, DR(G)7, DR(G)10, DR(M2)2, DR(M2)8, DR(M2)10 e DR(M3)1], quatro como *Aspergillus* [DR(F)6, DR(G)1, DR(M2)3, DR(M3)2], duas como *Penicillium* [DR(B)2, DR(F)2], duas como actinobactérias [DR(B)7 e DR(M3)6] e 15 não puderam ser identificadas por não apresentarem estruturas reprodutivas [DR(B)1, DR(B)3, DR(B)4, DR(B)5, DR(F)1, DR(F)5, DR(G)2, DR(G)4, DR(G)5, DR(G)8, DR(G)11, DR(M2)4, DR(M2)7, DR(M2)9 e DR(M3)4] (Figura 7).



**Figura 7.** Número de linhagens por grupo taxonômico

Os fungos dematiaceos são caracterizados pela presença de hifas e conídios fortemente pigmentados, tendo como principais gêneros pertencentes a esse grupo: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Epicoccum*, *Nigrospora*, *Scopulariopsis* e *Stachybotrys*. (DOMSCH *et al.*, 1980; ELLIS, 1971, 1976). Do total de 40 linhagens, 17 (45 %) foram identificadas como sendo desse grupo taxonômico, das quais quatro [DR(A)2, DR(G)6, DR(M2)2 e DR(M2)10] foram atribuídas ao gênero *Cladosporium*.

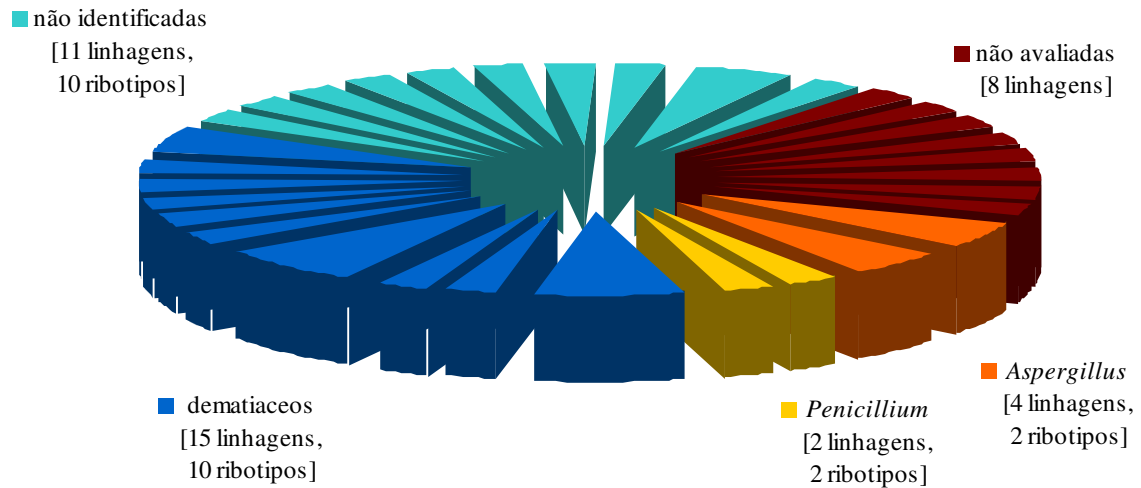
Dos 40 isolados, 15 (38 %) não puderam ser identificados por meio das análises convencionais devido à dificuldade de se fazer a identificação morfológica de fungos filamentosos com pouca ou nenhuma esporulação, evidenciando a importância e a necessidade do uso de técnicas moleculares para uma identificação mais completa e acurada. É importante ressaltar que, apesar de pertencerem ao filo Actinobacteria, as linhagens DR(M3)6 e DR(B)7 continuaram a ser estudadas devido a existência de referências na literatura que indicam que actinobactérias marinhas são fontes promissoras de metabólitos secundários bioativos (BULL *et al.*, 2005; BULL & STACH, 2007; FENICAL & JENSEN, 2006; LAM, 2006).

As actinobactérias são bactérias gram-positivas filamentosas, geralmente aeróbias, caracterizadas pela alta porcentagem (maior que 50%) de resíduos de guanidina e citosina em seu DNA. O gênero mais conhecido é o *Streptomyces*, que contém cerca de 500 espécies, todas com um conteúdo GC caracteristicamente elevada (69%-73%). Estes microrganismos são freqüentemente encontrados no solo, sendo capazes de degradar uma grande variedade de substâncias orgânicas por meio de enzimas extracelulares. As actinobactérias possuem também importante papel na indústria como produtoras de antibióticos, como streptomicina, eritromicina e tetraciclina (HOGG, 2005).

Embora mais de 50% dos antibióticos de origem microbiana tenha sido obtida de actinobactérias, a maioria deles foi isolada a partir de poucos representantes de solo, pertencentes principalmente aos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora* (FENICAL & JENSEN, 2006). No entanto, novos metabólitos secundários com atividade antibiótica e anticâncer, como as abissomicinas, caprolactonas e himalomicinas, foram isolados de actinobactérias marinhas, evidenciando o potencial destes microrganismos na descoberta de novos fármacos (LAM, 2006).

#### **4.2 Avaliação da diversidade genética das linhagens isoladas**

Das 40 linhagens purificadas, 32 foram submetidas à análise da diversidade genética pelo método de ARDRA, o qual resultou em 24 ribotipos distintos: dez ribotipos para o grupo dos dematiaceos; dois para o grupo dos *Aspergillus*; dois para os *Penicillium* e dez referentes às linhagens não identificadas. As outras oito linhagens não foram avaliadas, visto que duas eram actinobactérias [DR(B)7 e DR(M3)6] e seis não apresentaram crescimento satisfatório para extração do DNA [DR(B)1, DR(G)2, DR(G)5, DR(M2)2, DR(M2)7 e DR(M2)10] (Figura 8).



**Figura 8.** Número de linhagens e de ribotipos distintos por grupo taxonômico.

Os ribotipos gerados pelas digestões enzimáticas com as enzimas de restrição *Hae* III, *Msp* I, *Rsa* I (APÊNDICE D, APÊNDICE E e APÊNDICE F) permitiram diferenciar os isolados de fungos filamentosos dentro dos diferentes grupos taxonômicos (Tabela 3). Apesar dos isolados DR(A)7 e DR(A)8 terem apresentado o mesmo padrão de restrição (para as enzimas *Hae* III e *Msp* I) dos isolados DR(A)2, DR(G)6 e DR(M2)8, eles foram considerados um ribotipo distinto devido à sua morfologia. (Figura 6)

Segundo Guarro e colaboradores (1999) o ARDRA é um método rápido e adequado para a realização de estudos taxonômicos em fungos. Como as regiões não-codificadoras, como ITS e D1/D2, são mais variáveis que as regiões codificadoras e são facilmente acessadas por *primers* universais de fungos, estas tem sido utilizadas com êxito em comparações inter- e intra-específicas para muitos grupos de fungos.

Os resultados obtidos pelo ARDRA permitiram a caracterização do perfil da comunidade fúngica da esponja *D. reticulatum* e a determinação das linhagens semelhantes, evitando a realização de seqüenciamentos desnecessários. Apesar desta abordagem ser adequada para a caracterização taxonômica, para o isolamento de compostos não é possível ser aplicada, visto que linhagens diferentes de uma mesma espécie podem produzir metabólitos distintos (VITA-MARQUES *et al.*, 2008).



**Tabela 3.** Padrões de restrição das enzimas *Hae* III, *Msp* I e *Rsa* I para a região D1/D2 do DNAr 28S, ribotipo atribuído e caracterização inicial das linhagens por grupo taxonômico.

Enzimas						
	Códigos	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Rsa</i> I	Ribotipos	Caracterização inicial
1	<b>DR(A)1</b>	B	B	B	1	dematiaceos
2	<b>DR(A)3</b>	B	B	-	1	dematiaceos
3	<b>DR(A)4</b>	B	B	B	1	dematiaceos
4	<b>DR(A)5</b>	C	C	D	2	dematiaceos
5	<b>DR(A)6</b>	C	C	C	3	dematiaceos
6	<b>DR(A)2</b>	G	A	-	4	<i>Cladosporium</i>
7	<b>DR(G)6</b>	G	A	-	4	<i>Cladosporium</i>
8	<b>DR(M2)8</b>	G	A	-	4	dematiaceos
9	<b>DR(A)7</b>	G	A	-	5	dematiaceos
10	<b>DR(A)8</b>	G	A	-	5	dematiaceos
11	<b>DR(F)3</b>	M	L	F	6	dematiaceos
12	<b>DR(G)3</b>	I	I	C	7	dematiaceos
13	<b>DR(G)7</b>	P	R	D	8	dematiaceos
14	<b>DR(G)10</b>	J	O	C	9	dematiaceos
15	<b>DR(M3)1</b>	R	S	C	10	dematiaceos
16	<b>DR(B)2</b>	E	F	C	11	<i>Penicillium</i>
17	<b>DR(F)2</b>	N	K	C	12	<i>Penicillium</i>
18	<b>DR(F)6</b>	D	E	C	13	<i>Aspergillus</i>
19	<b>DR(M2)3</b>	D	E	C	13	<i>Aspergillus</i>
20	<b>DR(G)1</b>	D	E	C	13	<i>Aspergillus</i>
21	<b>DR(M3)2</b>	-	E	D	14	<i>Aspergillus</i>
22	<b>DR(B)3</b>	K	J	C	15	NI
23	<b>DR(B)4</b>	J	M	G	16	NI
24	<b>DR(B)5</b>	J	M	G	16	NI
25	<b>DR(F)1</b>	R	M	H	17	NI
26	<b>DR(F)5</b>	S	N	H	18	NI
27	<b>DR(G)4</b>	J	F	-	19	NI
28	<b>DR(G)8</b>	H	H	-	20	NI
29	<b>DR(G)11</b>	L	K	C	21	NI
30	<b>DR(M2)4</b>	J	P	I	22	NI
31	<b>DR(M2)9</b>	F	G	C	23	NI
32	<b>DR(M3)4</b>	A	A	A	24	NI

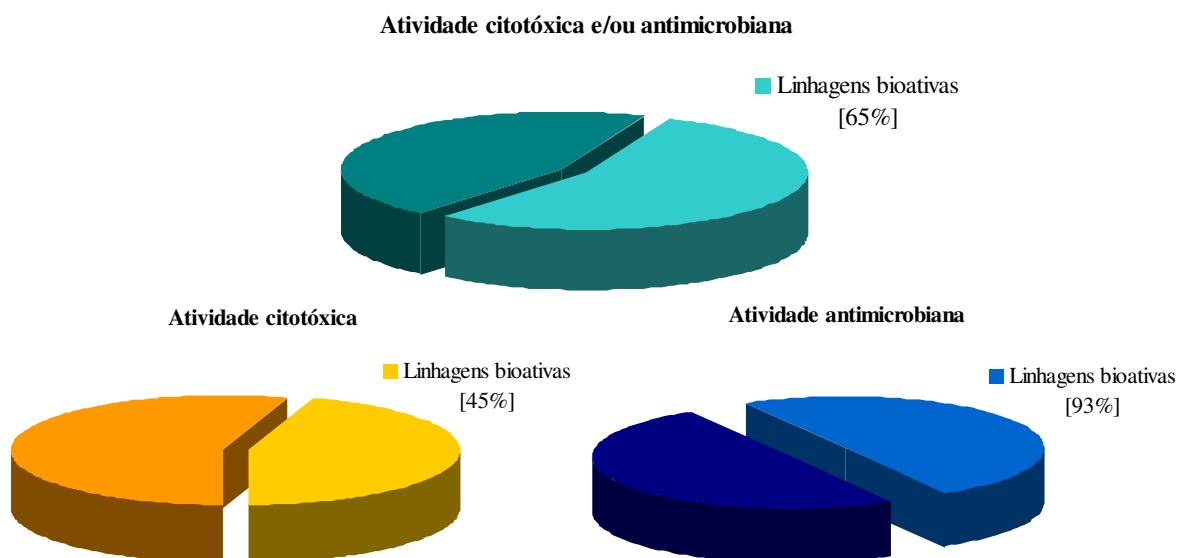
**Legenda:** (NI) não identificados; (letras A-S) código atribuído ao padrão de restrição da enzima ; (-) não definido. (APÊNDICE D, APÊNDICE E e APÊNDICE F)

Além disso, os resultados revelaram uma maior diversidade genética de fungos filamentosos isolados da esponja marinha *D. reticulatum* frente aos dados encontrados nos

estudos realizados por Menezes e colaboradores (2009), no qual 181 linhagens fúngicas isoladas de três diferentes esponjas marinhas coletadas na região de São Sebastião (*Amphimenon viridis*, *Mycale laxissima* e *Dragmacidon reticulatum*) resultaram em 121 ribotipos distintos, ou seja, cerca de 65% do total de linhagens eram pertencentes a diferentes táxons. Considerando apenas os dados obtidos da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum*, foram isoladas 66 linhagens de fungos, das quais 43 ribotipos distintos foram identificados (65%). No presente estudo, das 32 linhagens avaliadas 24 ribotipos foram identificados (75%).

### 4.3 Avaliação da atividade biológica dos extratos

Dos 40 extratos testados, 22 apresentaram resultado positivo em pelo menos um dos ensaios biológicos em que foram avaliados. No entanto, apenas 14 das 40 linhagens tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada, das quais sete apresentaram atividade antimicrobiana à pelo menos um dos microrganismos testados. Das 40 linhagens testadas para atividade citotóxica, 18 apresentaram inibição das células tumorais de moderada a alta (Figura 9).



**Figura 9.** Porcentagem de linhagens bioativas em relação ao número total de linhagens testadas por bioensaio.

A diferença de atividade biológica observada para os distintos isolados de um mesmo ribotipo pode ser explicada não apenas pelo fato de que diferentes linhagens pertencentes

a uma mesma espécie podem apresentar diferenças em seu metabolismo secundário, mas também pelas distintas condições de cultivo a que estas linhagens foram submetidas para a produção dos extratos (KNIGHT *et al.*, 2003).

Como se tratam de extratos brutos, a ação sinérgica entre os compostos pode resultar em uma alta bioatividade, mascarando a real atividade de cada composto. Sendo assim, os compostos puros podem apresentar atividade biológica interessante quando isolados, ou até mesmo deixarem de ser ativos (ZHANG, L. *et al.*, 2007). Nesse sentido, para ambos os bioensaios, o fato do extrato apresentar algum tipo de atividade constitui uma maneira de seleção, mesmo que não seja a atividade real de um composto específico. Este procedimento é frequentemente utilizado no grupo de pesquisas do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck com sucesso. É importante ressaltar ainda, que a confirmação só é feita após o isolamento dos compostos e da submissão dos compostos puros a um novo teste de bioatividade.

#### **4.3.1 Atividade citotóxica em células tumorais humanas**

Dos 40 extratos enviados e testados, 18 apresentaram atividade de inibição moderada ou alta contra pelo menos um dos tipos de células tumorais (Tabela 4). A alta atividade apresentada pelos extratos DR(G)1 e DR(M2)10 apenas para um tipo celular testado, se contrapõe a alguns extratos como DR(A)6, DR(F)1, DR(F)2, DR(F)3, DR(G)4, DR(G)6, DR(G)8, DR(G)10, DR(M2)4 e DR(M3)6 que apresentaram atividade significativa para os três tipos celulares tumorais.

Os extratos DR(F)5, DR(F)6 e DR(M3)1 apresentaram atividade moderada a alta para as células tumorais de cólon e sistema nervoso humano e o extrato DR(B)3 apresentou atividade interessante para células de mama e sistema nervoso. O extrato DR(A)4 apresentou atividade moderada de cerca de 55% apenas para células tumorais de sistema nervoso e o extrato DR(M2)2 apenas para células tumorais de cólon humano. Os extratos DR(A)1, DR(A)2, DR(A)3, DR(A)5, DR(A)7, DR(A)8, DR(B)1, DR(B)2, DR(B)4, DR(B)5, DR(B)7, DR(G)2, DR(G)3, DR(G)5, DR(G)7, DR(G)11, DR(M2)3, DR(M2)7, DR(M2)8, DR(M2)9, DR(M3)2 e DR(M3)4 não apresentaram atividades significativas para nenhuma das células tumorais testadas.

**Tabela 4.** Resultado do bioensaio citotóxico para cada isolado, evidenciando os ribotipos distintos

<b>Linhagens celulares</b>					
Rib	Códigos	cólon humano (HCT8)	mama humano (MDA-MB435)	sistema nervoso (SF295)	leucemia humana (HL-60)
1	DR(A)1	PA	SA	SA	-
1	DR(A)3	PA	SA	SA	-
1	DR(A)4	PA	PA	MO (55,36%)	-
2	DR(A)5	SA	SA	SA	-
3	DR(A)6	MA (97,59%)	MO (73,40%)	MA (95,95%)	-
4	DR(A)2	PA	SA	SA	-
4	DR(G)6	MA (77,13%)	MA (90,69%)	-	MA (96,81%)
4	DR(M2)8	PA (21,05%)	PA (24,83%)	-	PA (15,84%)
5	DR(A)7	PA	SA	SA	-
5	DR(A)8	PA	SA	PA (41,00%)	-
6	DR(F)3	MA (86,68%)	MA (90,81%)	-	MA (87,30%)
7	DR(G)3	PA (21,30%)	PA (15,76%)	-	SA
8	DR (G)7	PA (36,19%)	PA (34,68%)	-	PA (13,80%)
9	DR(G)10	MA (99,59%)	MA (97,43%)	-	MA (100%)
-	DR(M2)2	MO (58,97%)	PA (49,54%)	-	PA (9,67%)
-	DR(M2)10	MA (99,26%)	SA	PA (23,55%)	-
10	DR(M3)1	MA (99,44%)	SA	MO (64,87%)	-
11	DR(B)2	PA	PA	PA	-
12	DR(F)2	MA (97,28%)	MA (94,68%)	MA (99,61%)	-
13	DR(F)6	MA (95,92%)	SA	MO (55,69%)	-
13	DR(M2)3	PA	PA	PA	-
13	DR(G)1	PA (43,59%)	MA (83,77%)	-	PA (46,02%)
14	DR(M3)2	PA	SA	SA	-
-	DR(B)1	PA (30,52%)	PA (14,27%)	-	PA (29,40%)
15	DR(B)3	PA (39,85%)	MO (61,58%)	PA (39,09%)	-
16	DR(B)4	PA (27,17%)	PA (14,06%)	-	SA
16	DR(B)5	PA (44,95%)	PA (33,60%)	-	PA (3,86%)
17	DR(F)1	MO (57,15%)	MA (100%)	MA (99,61%)	-
18	DR(F)5	MA (96,48%)	PA	MA (99,72%)	-
-	DR(G)2	PA (10,50%)	PA (5,12%)	-	PA (15,33%)
19	DR(G)4	MA (90,53%)	MO (60,51%)	-	MA (84,18%)
-	DR(G)5	SA	SA	SA	-
20	DR(G)8	MA (96,11%)	MA (97,97%)	-	MA (99,27%)
21	DR(G)11	PA (17,33%)	PA (36,09%)	-	PA (8,94%)
22	DR(M2)4	MA (79,53%)	MA (100%)	MA (99,61%)	-
-	DR(M2)7	PA (5,00%)	PA (18,24%)	-	SA
23	DR(M2)9	PA	PA	PA	-
24	DR(M3)4	PA (33,54%)	PA (30,87%)	-	SA
-	DR(B)7	PA (7,57%)	SA	-	PA (15,91%)
-	DR(M3)6	MA (92,27%)	MA (100%)	MA (99,94%)	-

Legenda: (Rib) número atribuído ao ribotipo na análise por ARDRA; (SA) sem atividade; (PA) pouca atividade; (MO) atividade moderada; (MA) muita atividade; (-) não testado.

Considerando as distintas espécies de um mesmo ribotipo (indicadas na tabela pelos números da coluna “Rib” e evidenciadas pelas linhas de mesma cor) foi possível observar que o uso de diferentes meios de cultura é significativo para a obtenção de distintas atividades biológicas. No caso das linhagens DR(A)1, DR(A)3 e DR(A)4, todos cultivados em caldo aveia, os resultados de atividade biológica foram semelhantes. No entanto, para as linhagens DR(F)6, DR(M2)3 e DR(G)1, cada uma cultivada em um meio de cultura distinto, não apenas os valores de atividade biológica variaram, como cada isolado apresentou atividade biológica para um tipo celular diferente, o que pode ser atribuído ao uso de diferentes meios de cultura. No entanto, não é possível afirmar nada em relação à semelhança destas linhagens do ponto de vista metabólico.

#### 4.3.2 Atividade antimicrobiana

Dos 14 extratos testados, sete apresentaram CIM que inibiu 100% do crescimento dos microrganismos, sendo considerados ativos (Tabela 5). Todos os extratos das linhagens fúngicas isoladas da esponja *D. reticulatum* considerados ativos apresentaram atividade inibitória contra *Streptococcus mutans* e *S. sanguinis*. O extrato DR(M3)6 foi o único que também apresentou atividade antimicrobiana para as linhagens *S. sanguinis*, *S. sobrinus* e *C. albicans*.

**Tabela 5.** Resultado bioensaio antimicrobiano (CIM)

Rib	Códigos	Microrganismos							
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans 2</i>	<i>C. albicans</i>
1	DR(A)1	SA	SA	SA	125 µg/mL	SA	SA	250 µg/mL	SA
1	DR(A)3	SA	SA	SA	125 µg/mL	SA	SA	500 µg/mL	SA
1	DR(A)4	SA	SA	SA	125 µg/mL	SA	SA	250 µg/mL	SA
2	DR(A)5	SA	SA	SA	250 µg/mL	SA	250 µg/mL	250 µg/mL	SA
4	DR(A)2	SA	SA	SA	125 µg/mL	SA	250 µg/mL	500 µg/mL	SA
5	DR(A)7	SA	SA	SA	SA	SA	250 µg/mL	250 µg/mL	SA
11	DR(B)2	SA	SA	SA	125 µg/mL	SA	SA	250 µg/mL	SA
13	DR(F)6*	SA	SA	SA	SA	SA	500 µg/mL	500 µg/mL	SA
13	DR(M2)3	SA	SA	SA	250 µg/mL	SA	SA	SA	SA
14	DR(M3)2*	SA	SA	SA	SA	500 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	SA
15	DR(B)3	250 µg/mL	SA	SA	SA	SA	500 µg/mL	125 µg/mL	SA
22	DR(M2)4*	SA	SA	SA	250 µg/mL	SA	500 µg/mL	500 µg/mL	SA
23	DR(M2)9	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
-	DR(M3)6*	SA	SA	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL	125 µg/mL

**Legenda:** (Rib) número atribuído ao ribotipo na análise por ARDRA; (Valores em azul e itálico) CIM que inibiu 50% do crescimento dos microrganismos; (Valores em vermelho e negrito) CIM que inibiu 100% do crescimento dos microrganismos; (SA) sem atividade; (\*) extratos que foram testados para CBM.

Para os extratos DR(F)6, DR(M2)4, DR(M3)6 e DR(M3)2, o teste de concentração bactericida mínima (CBM) foi realizado a fim de definir a concentração mínima em que o extrato torna-se bactericida (Tabela 6). Apenas o extrato DR(M3)6 apresentou resultado satisfatório, com CBM de 62,5 µg/mL para a linhagem *S. mutans*.

**Tabela 6.** Resultado bioensaio antimicrobiano (CBM)

Rib	Códigos	Microrganismos							
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans 2</i>	<i>C. albicans</i>
13	DR(F)6	-	-	-	-	-	>500µg/ml	-	-
14	DR(M3)2	-	-	-	-	-	>250µg/ml	-	-
22	DR(M2)4	-	-	-	-	-	>500µg/ml	-	-
-	DR(M3)6	>125µg/ml	>125µg/ml	>125µg/ml	>125µg/ml	>125µg/ml	<b>62,5 µg/ml</b>	>125µg/ml	>125µg/ml

**Legenda:** (Rib) número atribuído ao ribotipo na análise por ARDRA.

Em relação às linhagens distintas pertencentes ao mesmo ribotipo (indicadas na tabela pelos números da coluna “Rib” e evidenciadas pelas linhas de mesma cor), os resultados de atividade antimicrobiana corroboram com os dados encontrados para os resultados de atividade citotóxica, evidenciando a influência das diferentes condições de cultivo na produção de metabólitos secundários.

#### 4.4 Identificação dos isolados selecionados pela atividade biológica de seus extratos e avaliação do potencial biotecnológico a partir de dados da literatura

Considerando apenas os ribotipos distintos, os 20 isolados que apresentaram atividade biológica (citotóxica e/ou antimicrobiana) foram selecionados para o seqüenciamento de DNA e identificação taxonômica. Apesar das linhagens DR(A)7, DR(B)3, DR(F)3, DR(G)4, DR(G)8, DR(G)10 e DR(M2)2 terem apresentado resultados interessantes, não puderam ser seqüenciadas pois não apresentaram crescimento satisfatório para extração de DNA. Sendo assim, foram seqüenciadas apenas as linhagens: DR(A)1, DR(A)2, DR(A)5, DR(A)6, DR(B)2, DR(F)1, DR(F)2, DR(F)5, DR(F)6, DR(M2)4, DR(M2)10, DR(M3)1, DR(M3)2 e DR(M3)6. Em adição, foi realizado também a identificação do isolado DR(B)2, caracterizado inicialmente como *Penicillium* sp.. (Tabela 7)

Todas as linhagens foram inicialmente seqüenciadas na região ITS1-5.8S-ITS2, no entanto, os isolados DR(F)2, DR(M2)4, DR(M3)1, DR(F)1 e DR(F)5 foram também submetidos

ao seqüenciamento da região D1/D2 (28S) por apresentarem seqüências de baixa qualidade e/ou mostrarem alta similaridade com seqüências de fungos não identificados ou baixa similaridade com as seqüências recuperadas do banco de dados.

A partir dos resultados obtidos foi possível constatar que todos os fungos selecionados como produtores de metabólitos secundários pertencem ao filo Ascomycota e estão distribuídos em quatro diferentes ordens: Eurotiales [DR(B)2, DR(F)2, DR(F)6, DR(G)1, DR(M2)3 e DR(M3)2], Hypocreales [DR(F)1], Pleosporales [DR(A)1, DR(A)3, DR(A)4, DR(A)5, DR(A)6 e DR(M2)4] e Capnodiales [DR(A)2, DR(G)6, DR(M2)2, DR(M2)8 e DR(M2)10] e fungos mitospóricos [DR(F)5 e DR(M3)1].

Fungos isolados a partir de esponjas representam uma fonte promissora de metabólitos secundários e, neste sentido, há um crescente interesse na determinação da diversidade desses microrganismos em esponjas marinhas e na elucidação da natureza dessa associação. O avanço das técnicas moleculares permitiu uma identificação mais acurada das espécies fúngicas e a determinação da diversidade dos fungos associados a estes invertebrados (WANG, G. 2006), no entanto, as análises morfológicas ainda possuem papel importante na definição dessas espécies (GUARRO *et al.*, 1999).

O primeiro trabalho sobre a diversidade filogenética de fungos associados à esponjas marinhas foi o de WANG e colaboradores (2008), que utilizou a região ITS do DNA ribossomal para a análise dos isolados das esponjas *Suberites zeteki* e *Mycale armata* com base nas análises da região ITS do DNA ribossomal, contribuindo para o entendimento da ecologia dos fungos nas esponjas marinhas e para a exploração de seu potencial biotecnológico.

Em 2009, Baker e colaboradores estudaram a diversidade genética de fungos associados à esponja marinha *Haliclona simulans*, a partir da região 18S do RNA ribossomal, e a atividade antibimicrobiana de seus extratos contra *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus* e *Candida glabrata*. Dos 80 isolados, todos afiliados ao filo Ascomycota, houve predominância de fungos pertencentes às ordens Pleosporales, Hypocreales e Eurotiales, que representam ordens geralmente encontradas no ambiente marinho. A recorrência do isolamento de fungos do filo Ascomycota tem como hipótese principal a adaptação dos esporos ao ambiente aquático, que pode facilitar a sua flutuabilidade na coluna d'água e a aderência aos substratos, atribuindo aos fungos desse filo uma alta recuperação em técnicas dependentes de cultura (MENEZES *et al.*, 2009).

**Tabela 7.** Identificação das linhagens de acordo com a similaridade da sequência obtida a partir de uma região do DNA ribossomal (ITS1-5.8S-ITS2 ou D1/D2) com linhagens recuperadas de banco de dados (BLAST).

Rib	Códigos	Região sequenciada	Similaridade de sequência (BLAST)	Identificação
1	DR(A)1 DR(A)3 DR(A)4	ITS1-5.8S-ITS2	94% <i>Microsphaeropsis arundinis</i> AMMRL 159.03	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
2	DR(A)5	ITS1-5.8S-ITS2	99% <i>Microsphaeropsis arundinis</i> AMMRL 159.03 99% <i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i>	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
3	DR(A)6	ITS1-5.8S-ITS2	99% <i>Microsphaeropsis arundinis</i> AMMRL 159.03	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
4	DR(A)2 DR(G)6 DR(M2)8	ITS1-5.8S-ITS2	100% <i>Cladosporium</i> sp. CBS 280.49 100% <i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 64726	<i>Cladosporium</i> sp.
5	DR(A)7 DR(A)8	-	-	-
6	DR(F)3	-	-	-
9	DR(G)10	-	-	-
10	DR(M3)1	ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2	95% <i>Sporidesmium obclavatulum</i> HKUCC 10834 93% <i>Arthopyrenia salicis</i> CBS 368.94 99% <i>Penicillium raistrickii</i> NRRL 2039	<i>Sporidesmium</i> sp.*
11	DR(B)2	ITS1-5.8S-ITS2	99% <i>Penicillium lanosum</i> NRRL 2009 99% <i>Penicillium steckii</i> CBS 260.55	<i>Penicillium raistrickii</i> *
12	DR(F)2	ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2	100% <i>Penicillium decaturense</i> NRRL 35636 99% <i>Penicillium rivolii</i> NRRL 906 99% <i>Penicillium waksmanii</i> NRRL 777	<i>Penicillium decaturense</i> *
13	DR(F)6 DR(M2)3 DR(G)1	ITS1-5.8S-ITS2	99% <i>Aspergillus versicolor</i> SUMS 0194 99% <i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 4768	<i>Aspergillus sydowii</i> *
14	DR(M3)2	ITS1-5.8S-ITS2	99% <i>Aspergillus versicolor</i> SUMS 0194 99% <i>Aspergillus sydowii</i> NRRL 4768	<i>Aspergillus sydowii</i> *
15	DR(B)3	-	-	-
17	DR(F)1	ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2	99% <i>Acremonium persicinum</i> AFTOL-ID 1391 97% <i>Hydropisphaera erubescens</i> ATCC 36092 99% <i>Cordyceps memorabilis</i> ATCC 36743 (AJ488276)	<i>Acremonium</i> sp.*
18	DR(F)5	ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2	99% <i>Myrmecridium schulzeri</i> CBS 642.76 98% <i>Myrmecridium schulzeri</i> CBS 325.74	<i>Myrmecridium</i> sp.
19	DR(G)4	-	-	-
20	DR(G)8	-	-	-
22	DR(M2)4	ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2	98% <i>Westerdykella purpurea</i> CBS 297.75 96% <i>Westerdykella multisporea</i> CBS 391.51 96% <i>Westerdykella dispersa</i> CBS 71271	<i>Westerdykella</i> sp.
-	DR(M2)2	-	-	<i>Cladosporium</i> sp.*
-	DR(M2)10	ITS1-5.8S-ITS2	99% <i>Cladosporium cladosporioides</i> ATCC 34668 99% <i>Cladosporium tenuissimum</i> ATCC 38027	<i>Cladosporium</i> sp.
-	DR(M3)6	16S	99% <i>Streptomyces cinnamonensis</i> NBRC 15873 <sup>T</sup> (AB184707) 99% <i>Streptomyces californicus</i> NBRC 3386 <sup>T</sup> (AB184755) 99% <i>Streptomyces floridae</i> NBRC 15405 <sup>T</sup> (AB184656)	<i>Streptomyces</i> sp.

**Legenda:** (\*) identificação confirmada por análise morfológica; (-) sem resultado; (Rib) número atribuído ao ribotipo na análise por ARDRA.



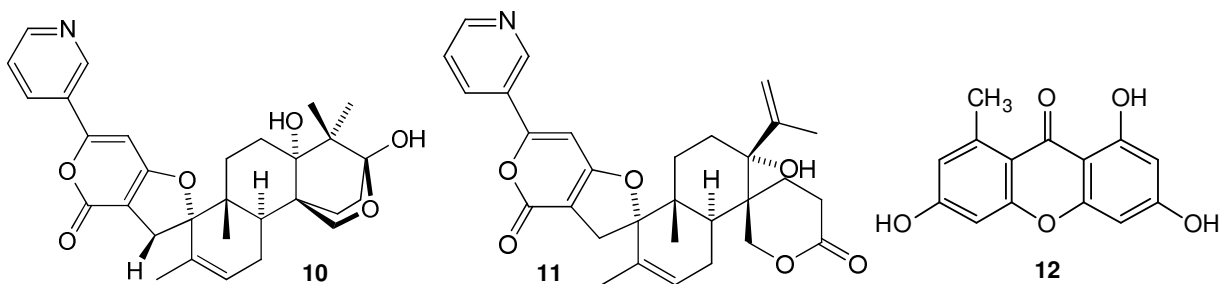
Fungos dos gêneros *Cladosporium* e *Microsphaeropsis* já foram encontrados pelo grupo de pesquisa da Dra. Lara D. Sette em amostras derivadas de ambiente marinho, assim como fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, os quais são conhecidos como esponjas-generalistas devido à frequência de isolamento em amostras de esponjas marinhas (DA SILVA *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2009). Além desses gêneros mais comuns, no presente estudo foram isolados fungos de gêneros pouco estudados, tanto do ponto de vista químico quanto biológico, como é o caso das linhagens DR(F)5 e DR(M2)4, pertencentes aos gêneros *Myrmecridium* e *Westerdykella*, não isolados a partir do ambiente marinho até o momento.

A ordem Eurotiales está representada por quatro isolados, sendo dois deles do gênero *Penicillium* [DR(B)2 e DR(F)2] e quatro do gênero *Aspergillus* [DR(F)6, DR(G)1, DR(M2)3 e DR(M3)2].

Fungos do gênero *Penicillium* são ubíquos tanto no meio terrestre como no meio marinho. E, apesar de serem historicamente os mais investigados quanto ao seu metabolismo secundário, ainda são considerados interessantes por fornecer moléculas inéditas e bioativas. (BRINGMANN *et al.*, 2004; DE SILVA *et al.*, 2009; PROKSCH *et al.*, 2008; SASAKI *et al.*, 2005).

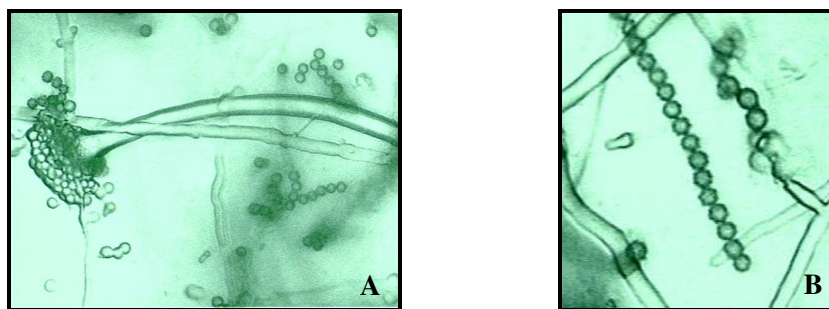
O fungo *Penicillium decaturense* [identificação atribuída à linhagem DR(F)2], isolado de fungos degradadores de madeira, foi descrito em 2004 por Peterson e colaboradores. Apenas dois compostos inéditos, a decaturina A (**10**) e a 15-deoxi-oxalicina B (**11**) (Figura 10), foram isolados por Zhang, Y. *et al.* (2003) a partir deste microrganismo. Ambos compostos apresentaram potente atividade contra a lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

Em relação ao isolado DR(B)2 (*Penicillium raistrickii*), no trabalho de Milanetto (2008) essa espécie foi obtida a partir da esponja *Axinella corrugata*, resultando no isolamento do composto conhecido norliquexantona (**12**), isolado a partir do cultivo do fungo em malte 2%. (Figura 10)



**Figura 10.** Estruturas da decaturina A (**10**), 15-deoxi-oxalicina B (**11**) e norliquexantona (**12**).

Apesar da análise por ARDRA ter diferenciado os *Aspergillus* DR(F)6 e DR(M3)2 como pertencentes a distintos ribotipos, ambos foram identificados como *A. sydowii* [DR(F)6, DR(G)1, DR(M2)3 e DR(M3)2]. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a análise por ARDRA, assim como as análises filogenéticas, dificilmente consegue diferenciar espécies que possuem regiões muito conservadas geneticamente, com é o caso das regiões D1/D2 e ITS para estes microrganismos, evidenciando assim a necessidade das análises morfológicas para a definição de espécie (Figura 11).



**Figura 11.** Fotografia da análise microscopia da linhagem DR(M3)2 (*Aspergillus*): (A) Conidióforos; (B) Esporos.

*A. sydowii* é um fungo que foi bastante estudado tanto pela produção de xilanas para usos industriais (GHOSH & NANDA, 1994) como para elucidação dos metabólitos envolvidos em sua patogenicidade em corais (aspergilose) (KIM *et al.*, 2000). No entanto, em 2006, Teuscher e colaboradores isolaram dois novos ciclopentanoídeos do fungo *A. sydowii* associado à alga marinha *Acanthophora spicifera*.

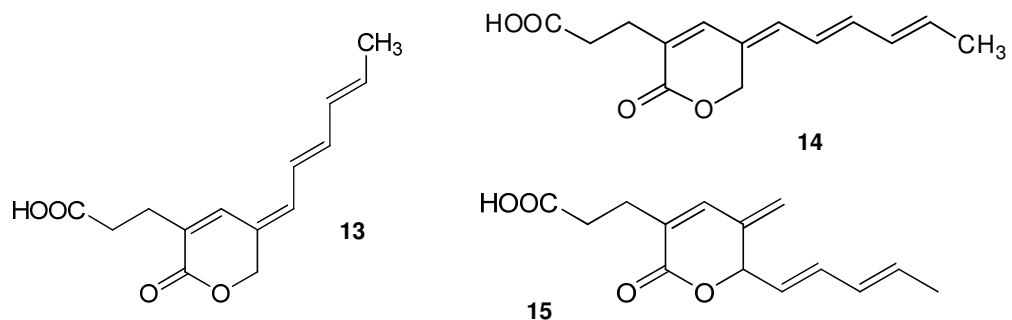
O isolado DR(F)1 pertencente à ordem Hypocreales, após análise morfológica, foi identificado como *Acremonium* após análise morfológica. Este fungo também foi isolado a partir da esponja *D. reticulatum* por Menezes e colaboradores (2009), não tendo sido encontrado em associação com as outras esponjas e a ascídia estudadas por esses autores, podendo indicar algum tipo de relação ecológica entre fungos desse gênero e essa esponja. Fungos desse gênero também não foram encontrados em associação às esponjas marinhas *Suberites zeteki*, *Mycale armata* e *Haliclona simulans* (WANG, G. *et al.*, 2008; BAKER *et al.*, 2009), no entanto, a confirmação das relações ecológicas entre estas espécies só poderá ser confirmada mediante estudos mais aprofundados da ecologia desses fungos.

O isolado DR(F)5 foi identificado como pertencente ao gênero *Myrmecridium* (anamórfico) descrito em 2007 por Arzanlou e colaboradores, do qual não foram encontrados na

literatura referências de ocorrência em ambiente marinho, nem de isolamento de compostos do metabolismo secundário. No Brasil, este fungo foi descrito para o bioma da Caatinga (CRUZ & GUSMÃO, 2009). Também pertencente aos fungos mitosporicos, o isolado DR(M3)1 foi identificado como *Sporidesmium* sp.. Deste gênero, a espécie *S. sclerotivorum* (mais conhecida atualmente por seu sinônimo *Teratosperma sclerotivorum*) é descrita como importante agente no controle biológico do fungo fitopatogênico *Sclerotinia minor* (ADAMS, 1987).

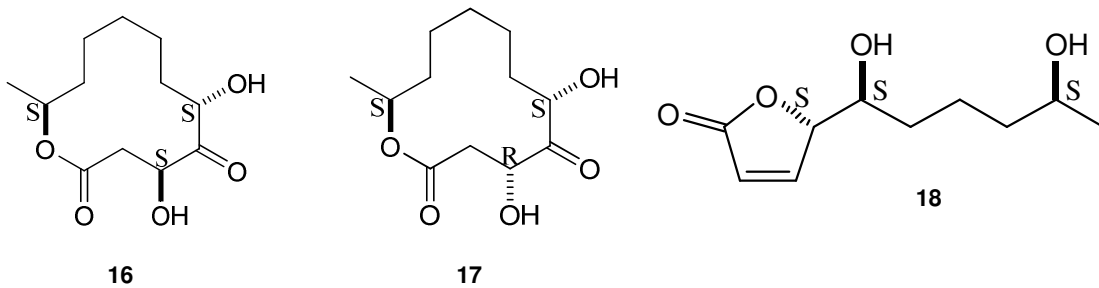
A ordem Pleosporales está representada pelas linhagens: DR(A)1, DR(A)3, DR(A)4, DR(A)5, DR(A)6 e DR(M2)4. As linhagens DR(A)1 [DR(A)3 e DR(A)4], DR(A)5, e DR(A)6 apresentaram alta similaridade com um isolado de *Microsphaeropsis arundinis* (EF094553) e por análises adicionais foram identificadas como pertencentes ao gênero *Microsphaeropsis* sp.. Muitos compostos já foram isolados de fungos deste gênero, inclusive obtidos a partir do ambiente marinho (BRAUERS *et al.*, 2000; HÖLLER *et al.*, 1999; KEUSGEN *et al.*, 1996; WANG, C-Y. *et al.*, 2002).

A linhagem DR(M2)4 foi identificada como *Westerdykella* sp. por apresentar alta similaridade de seqüência com fungos do gênero *Westerdykella* para ambas as regiões: ITS e D1/D2. Deste gênero, as linhagens da espécie *Westerdykella multispora* foram bastante estudadas como produtoras das gelastatinas A (**13**) e B (**14**), inibidoras da gelastinase A, que está implicada na invasão de células tumorais e metástase, assim como angiogênese e outras doenças ligadas aos tecidos (LEE, H-J. *et al.*, 1997). Além das gelastatinas, este fungo é produtor do ácido dikélico (**15**), sugerido como importante agente anti-câncer (HEO *et al.*, 2006; LEE, H-J. *et al.*, 1999, LEE, S-H. *et al.*, 2003) (Figura 12). Este gênero só foi descrito como fungo terrestre (EGOROVA, 2003; BETTUCCI *et al.*, 2002), não tendo sido encontradas referências na literatura da ocorrência destes microrganismos em ambiente marinho. A linhagem DR(M2)4 foi identificada como pertencente ao gênero *Westerdykella*, com fortes indícios que seja da espécie *W. purpurea*, de qual não há estudos de isolamento de compostos.



**Figura 12.** Estruturas das gelastatinas A (**13**) e B (**14**) e ácido dikélico (**15**).

Os isolados DR(M2)10 e DR(A)2 [DR(G)6, DR(M2)2 e DR(M2)8] pertencentes à ordem Capnodiales foram classificados como *Cladosporium* sp. por apresentarem alta similaridade com diferentes espécies deste gênero. A linhagem DR(M2)2 também foi identificada como *Cladosporium* sp. frente às análises morfológicas realizadas previamente. Os fungos deste gênero são freqüentemente isolados de invertebrados marinhos (DA SILVA *et al.*, 2008; PROKSCH, *et al.*, 2008), tendo compostos como o pandangolídeo 1A (**16**), pandangolídeo 1 (**17**) e iso-cladospolídeo B (**18**) (GESNER *et al.*, 2005) isolados a partir do cultivo destas linhagens. (Figura 13)



**Figura 13.** Estruturas do pandangolídeo 1A (16), do pandangolídeo 1 (17), do iso-cladospolídeo B (18).

Em adição, a linhagem DR(M3)6, classificada morfológicamente como actinobactéria, mostrou alta similaridade de seqüência (99%) com diversas espécies tipo de *Streptomyces*, como *S. floridae*, *S. californicus* e *S. cinnamonensis*, e foi identificada como *Streptomyces* sp. Microrganismos deste gênero, derivados do ambiente marinho, apresentam grande potencial como produtores de metabólitos secundários bioativos. (DHARMARAJ & SUMANTHA, 2009; GANDHIMATHI *et al.*, 2008)

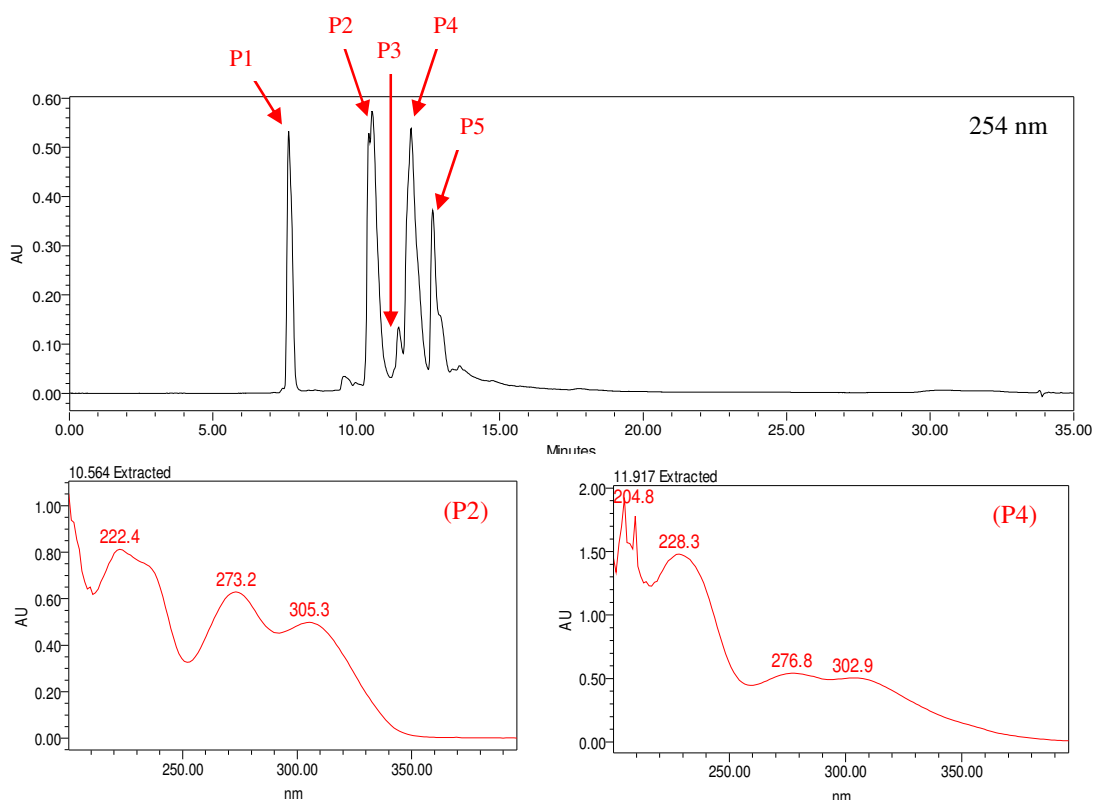
A partir da análise dos dados obtidos da literatura foi possível indicar os isolados mais interessantes do ponto de vista biotecnológico. Linhagens pertencentes a gêneros que não tenham sido estudados para o isolamento de metabólitos secundários anteriormente ou por apresentarem espécies já descritas como produtoras de compostos com significativa atividade biológica foram consideradas prioridade, assim como àquelas pertencentes a gêneros descritos recentemente ou que possam pertencer a novos táxons. Considerando estes critérios, os fungos DR(F)2 (*Penicillium dacaturense*), DR(M2)4 (*Westerdykella* sp.), DR(M3)1 (*Sporidesmium* sp.), DR(F)5 (*Myrmecridium* sp.) e a actinobactéria DR(M3)6 (*Streptomyces* sp.) foram priorizadas para o isolamento de compostos.

#### 4.5 Avaliação do perfil químico dos extratos

Os 22 extratos produzidos a partir das linhagens selecionadas por sua atividade biológica foram analisados em CLAE-UV-EM com a finalidade de avaliar, segundo os critérios previamente definidos (absorção no ultravioleta, intervalo de massa e facilidade no isolamento dos compostos), o perfil químico desses extratos. Em adição foram analisados também os extratos dos isolados DR(A)1, DR(A)3, DR(B)2 e D(M2)3.

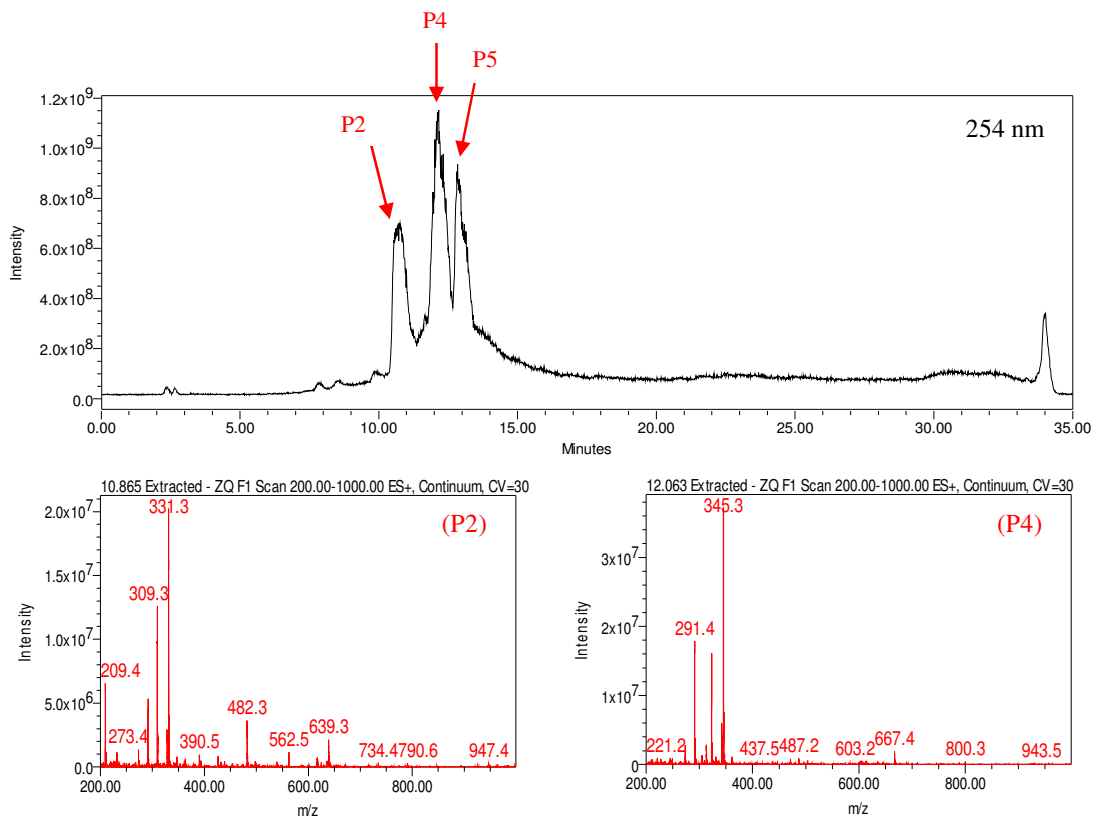
A partir dos dados obtidos, sete extratos foram priorizados por apresentar maior probabilidade de isolamento de compostos bioativos: DR(M3)2, DR(A)4, DR(M2)3, DR(A)2, DR(F)2, DR(M3)1 e DR(M2)4.

Como exemplo, o cromatograma obtido a partir da fração 1 da linhagem DR(F)2 e os espectros de UV do pico 2 (P2) e do pico 4 (P4) indicam a presença de compostos interessantes (Figura 14). Em ambos os espectros, as bandas de UV próximas a 270 e 300 nm, indicam absorções incomuns a compostos do metabolismo primário.



**Figura 14.** Cromatograma e espectros UV do extrato DR(F)2-F1.

O cromatograma e os espectros de massas dos picos 2 e 4 (Figura 15) também indicam que os compostos relacionados pertencem ao metabolismo secundário. No espectro de massas do pico 2 (P2) é possível verificar a presença da molécula protonada  $[M+H]^+$  com relação  $m/z$  igual a 309,3 Da e do aduto de sódio  $[M+Na]^+$  com relação  $m/z$  igual a 331,3 Da, sugerindo que o íon molecular possui  $m/z$  igual a 308 Da. Em relação ao P4, não foi possível definir o íon molecular, nem a molécula protonada com  $H^+$  ou formando o aduto de sódio.



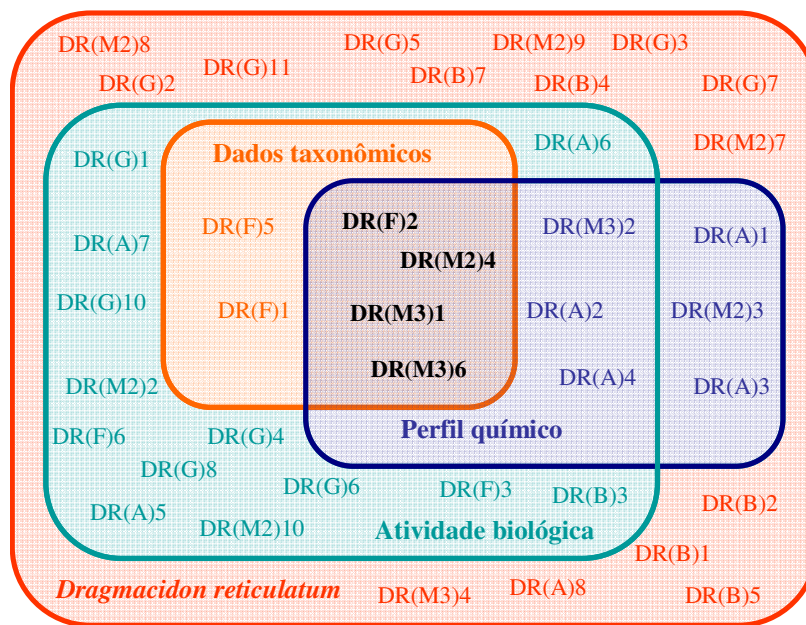
**Figura 15.** Cromatograma e espectro de massas do extrato DR(F)2-F1.

#### 4.6 Seleção das linhagens produtoras de metabólitos secundários

Levando em consideração os resultados dos bioensaios e da análise por ARDRA, do total de 24 ribotipos distintos, 21 apresentaram resultados satisfatórios nas avaliações biológicas de citotoxicidade e/ou atividade antimicrobiana e foram consideradas interessantes como produtoras de metabólitos secundários bioativos. A análise taxonômica foi realizada para as linhagens selecionadas pela bioatividade e, com base na literatura disponível, as linhagens

DR(F)1, DR(F)2, DR(F)5, DR(M2)4, DR(M3)1 e DR(M3)6 foram priorizadas para o isolamento de compostos, devido à maior probabilidade de isolamento de compostos inéditos. Considerando apenas os critérios relacionados à avaliação química, as linhagens selecionadas foram: DR(M3)2, DR(A)4, DR(M2)3, DR(A)2, DR(F)2, DR(M3)1 e DR(M2)4.

A partir destes dados, quatro das 40 linhagens isoladas a partir da esponja marinha *Drumacidon reticulatum* foram priorizadas para o isolamento de metabólitos secundários de interesse biotecnológico: DR(F)2, DR(M2)4, DR(M3)6 e DR(M3)1 (Figura 16).



**Figura 16.** Esquema de seleção das linhagens considerando a atividade biológica, o perfil químico e os dados taxonômicos (análise dos dados obtidos da literatura a partir da identificação taxonômica).

Dentre essas, a linhagem DR(F)2 (*Penicillium decaturense*) foi selecionada por apresentar todas as características desejáveis em relação ao seu perfil químico (análise por CLAE-UV-EM) e de atividade biológica (citotóxica). *P. decaturense* foi recentemente descrito como fungo terrestre, a partir do qual foram isolados metabólitos secundários bioativos (PETERSON *et al.*, 2004; ZHANG, Y. *et al.*, 2003). A linhagem DR(M2)4 (*Westerdykella* sp.), que também apresentou perfil químico distinto e foi selecionada levando em conta estudos de linhagens terrestres desse mesmo gênero, das quais foram isoladas substâncias com importante atividade anti-câncer (HEO *et al.*, 2006; LEE, H-J. *et al.*, 1997, 1999; LEE, S-H. *et al.*, 2003).

A linhagem DR(M3)1 (*Sporisdemium* sp.) foi selecionada devido à importância que espécies deste gênero apresentam como agente de controle biológico em fungos fitopatogênicos, além de fornecer extrato com perfil químico interessante. A linhagem DR(M3)6 (*Streptomyces* sp.) foi selecionada para o isolamento dos compostos, visto a potente bioatividade de seus extratos em ambos bioensaios e por pertencer ao gênero *Streptomyces* sp., o qual possui importantes representantes produtores de metabólitos secundários, inclusive isolados a partir de esponjas marinhas, além de inúmeros fármacos comercialmente utilizados (DEMAIN, 1999; DHARMARAJ & SUMANTHA, 2009; GANDHIMATHI *et al.*, 2008; NA *et al.*, 2008; SALEEM *et al.*, 2007).

A linhagem DR(F)5 foi selecionada em 2ª ordem de prioridade, pois possui grande potencial no isolamento de novos compostos por ter sido descrita em 2007 e não apresentar relato de isolamento a partir do ambiente marinho, nem de estudos de metabólitos secundário (Figura 16).

#### **4.7 Purificação dos compostos**

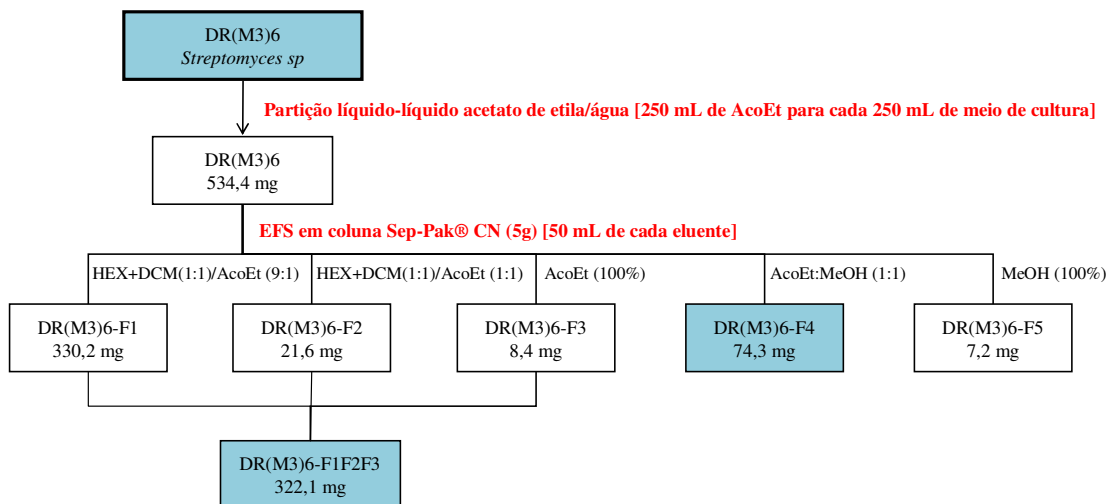
Para possibilitar a purificação dos compostos interessantes, as linhagens selecionadas DR(F)2 (*Penicillium decaturense*), DR(M2)4 (*Westerdykella* sp.) e DR(M3)6 (*Streptomyces* sp.) foram cultivadas para obtenção de maior quantidade de extratos. O cultivo da linhagem DR(M3)1 (*Sporidesmium* sp.) e a purificação dos compostos de interesse da linhagem DR(M2)4 não foram realizados.

##### **4.7.1 Linhagem DR(M3)6: *Streptomyces* sp.**

Do cultivo em 2,75 L de meio de cultura do *Streptomyces* sp. DR(M3)6 foi gerado um extrato bruto com massa seca igual a 534,4 mg. Este foi submetido a uma separação em coluna pré-empacotada Sep-Pak® de sílica gel derivatizada com grupo cianopropila (CN), eluída com hexano, diclorometano e acetato de etila, nas seguintes proporções: [HEX+CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1)/AcoEt] (9:1), [HEX+CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1)/AcoEt] (1:1), AcoEt (100%), AcoEt:MeOH (1:1) e

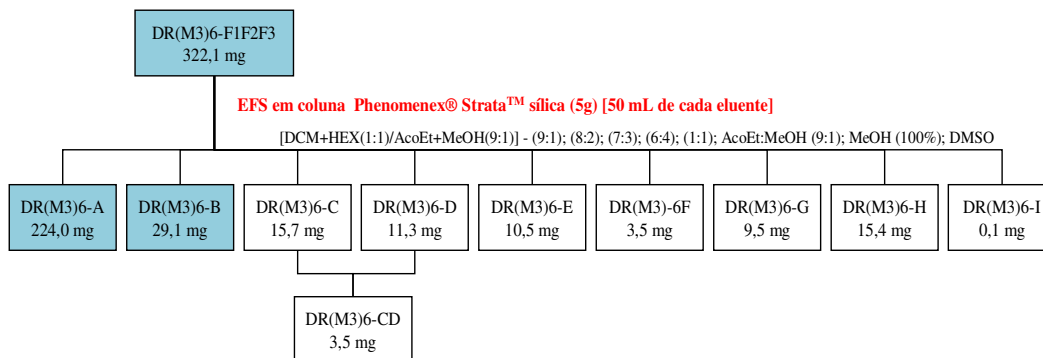


MeOH (100%). As frações DR(M3)6-F1, DR(M3)6-F2 e DR(M3)6-F3 foram avaliadas em CCD, reunidas por afinidade cromatográfica e submetidas a uma nova cromatografia (Figura 17).



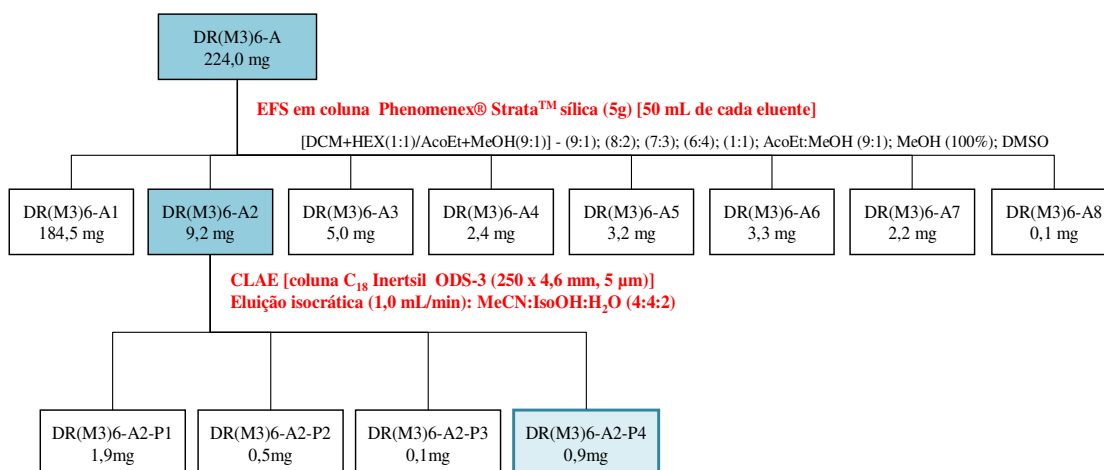
**Figura 17.** Esquema da extração e purificação em CLAE-UV do extrato bruto DR(M3)6.

A fração DR(M3)6-F1F2F3 foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica gel do tipo “Flash”, utilizando um gradiente de hexano, diclorometano e acetato de etila, nas seguintes proporções: [HEX+CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1)/AcoEt+MeOH (9:1)] (9:1), (8:2), (7:3), (6:4) e (1:1), AcoEt:MeOH (9:1), MeOH (100%) e DMSO. As frações obtidas foram analisadas por CCD usando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1) e HEX:AcoEt (7:3) e como revelador: UV e ácido fosfomolibdico. As frações foram reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica, resultando em nove frações. As frações foram analisadas em CLAE-UV-EM e das frações DR(M3)6-C e DR(M3)6-D foram reunidas pela similaridade (Figura 18).



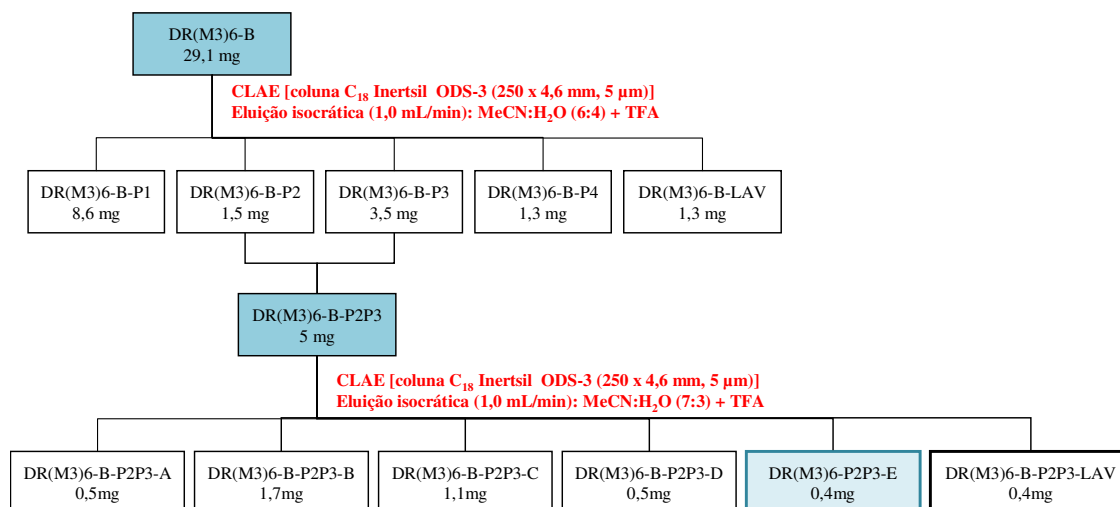
**Figura 18.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-F1F2F3.

Foi realizada uma nova cromatografia com a fração DR(M3)6-A. Esta foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica gel do tipo “Flash”, utilizando um gradiente de hexano, diclorometano e acetato de etila, nas seguintes proporções: [HEX+CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1)/AcoEt+MeOH (9:1)] (9:1), (8:2), (7:3), (6:4) e (1:1), AcoEt:MeOH (9:1), MeOH (100%) e DMSO. As frações obtidas foram analisadas por CCD usando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (9:1) e HEX:AcoEt (7:3) e como revelador UV e ácido fosfomolibdico. Estas foram reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica, resultando em oito frações. Todas as frações geradas foram analisadas em CLAE-UV-EM. A fração DR(M3)6-A2 foi selecionada como interessante para purificação em CLAE-UV, gerando quatro frações. Pela análise em CLAE-UV-EM, apenas a fração DR(M3)6-A2-P4 foi considerada interessante e enviada para análise espectroscópica por RMN. A análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H permitiu a identificação do composto como um ácido graxo (Figura 19).



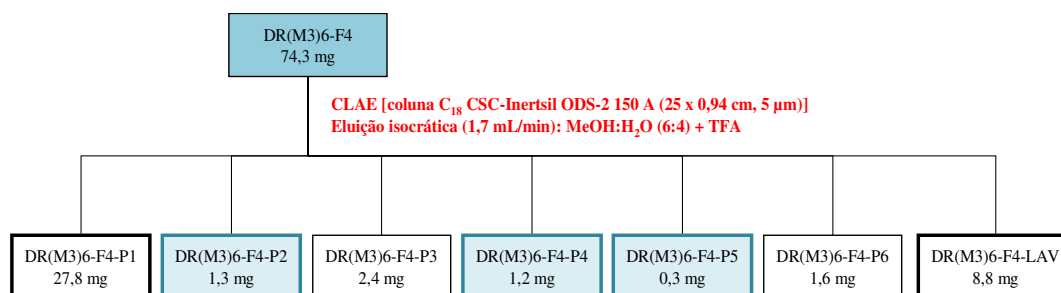
**Figura 19.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-A.

A partir das análises realizadas em CLAE-UV-EM, a fração DR(M3)6-B foi indicada para separação em CLAE-UV. Foram geradas quatro frações, que foram analisadas em CLAE-UV-EM. As frações DR(M3)6-B-P2 e P3 foram reunidas e submetidas a uma nova separação em CLAE-UV. Das cinco frações geradas e analisadas em CLAE-UV-EM, a fração DR(M3)6-P2P3-E foi considerada pura e enviada para análise por RMN. A determinação da estrutura não foi concluída, pois o composto não apresentou massa suficiente (Figura 20).



**Figura 20.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-B.

Em paralelo à purificação das outras frações, o extrato da fração DR(M3)6-F4 foi enviado para avaliação de sua atividade citotóxica. Por ter apresentado resultado positivo, esta fração foi submetida à separação em CLAE-UV com o objetivo de isolar os compostos bioativos (Figura 21). A separação não foi concluída, no entanto as frações foram analisadas por RMN para avaliar a continuidade da separação. Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H foram considerados interessantes para as amostras DR(M3)6-F4-P2, 4 e 5, no entanto suas estruturas não foram elucidadas devido à impureza da amostra e à quantidade insuficiente de massa.

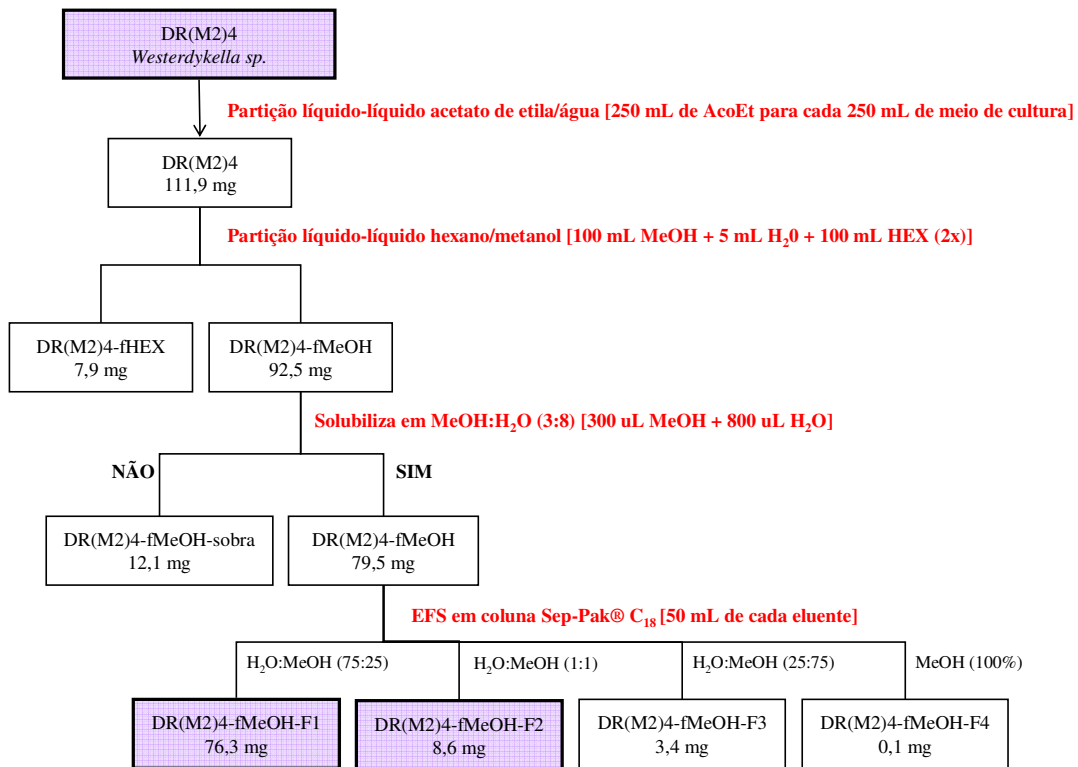


**Figura 21.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(M3)6-F4.

#### 4.7.2 Linhagem DR(M2)4: *Westerdykella* sp.

O extrato obtido do cultivo do fungo *Westerdykella* sp. DR(M2)4 em 2 L de meio de cultura foi submetido a uma partição com hexano e metanol, gerando duas frações. A fração

metanólica DR(M2)4-fMeOH foi solubilizada em MeOH:H<sub>2</sub>O (3:8). A parte solubilizada foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica gel derivatizada com C<sub>18</sub> e eluída com água e metanol nas seguintes proporções: H<sub>2</sub>O:MeOH (75:25), H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1), H<sub>2</sub>O:MeOH (25:75) e MeOH (100%) (Figura 22).



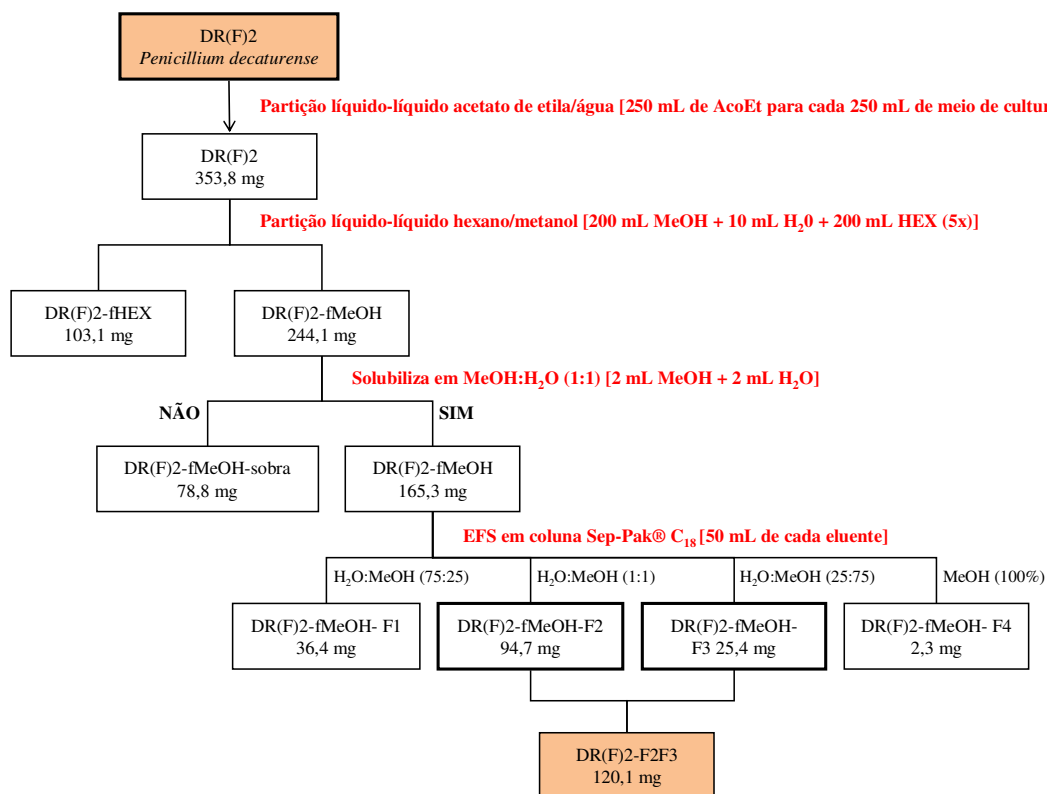
**Figura 22.** Esquema da extração e purificação em CLAE-UV do extrato bruto DR(M2)4.

As frações foram avaliadas em CLAE-UV-EM e em espectroscopia por RMN, indicando a presença de metabólitos interessantes nas frações DR(M2)4-fMeOH-F1 e DR(M2)4-fMeOH-F2. O isolamento dos compostos não foi realizado.

#### 4.7.3 Linhagem DR(F)2: *Penicillium decaturense*

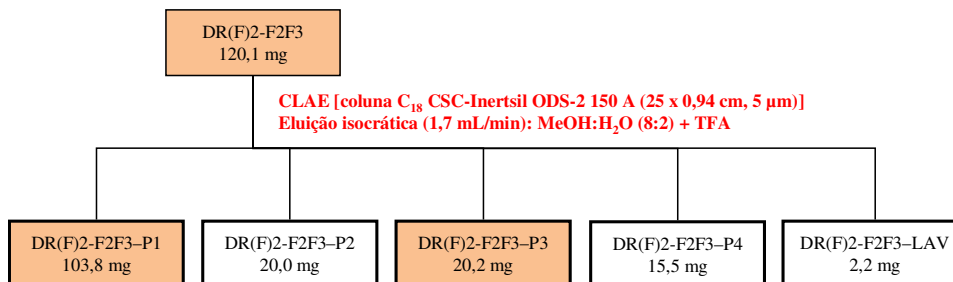
O extrato do fungo *Penicillium decaturense* DR(F)2, com massa seca 353,8 mg, foi submetido a uma partição líquido-líquido entre hexano e metanol. A fração metanólica (244,1 mg) foi solubilizada em uma solução de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), gerando 2 frações. A fração solúvel em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak®

de sílica gel derivatizada com  $C_{18}$  utilizando um gradiente de  $H_2O:MeOH$ . As frações foram analisadas em CLAE-UV-EM e reunidas de acordo com sua similaridade (Figura 23).



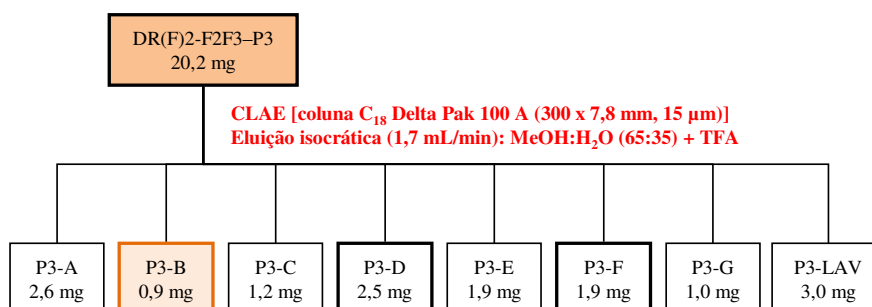
**Figura 23.** Esquema da extração e purificação do extrato bruto da amostra DR(F)2.

A fração DR(F)2-F2F3 foi selecionada como prioritária para purificação de compostos e submetida à separação cromatográfica em CLAE-UV, de qual foram obtidas quatro frações (Figura 24). Estas foram avaliadas em espectroscopia por RMN e as frações DR(F)2-F2F3-P1 e DR(F)2-F2F3-P3, priorizadas por não apresentarem sinais de metabólitos primários nos espectros de RMN- $^1H$ .



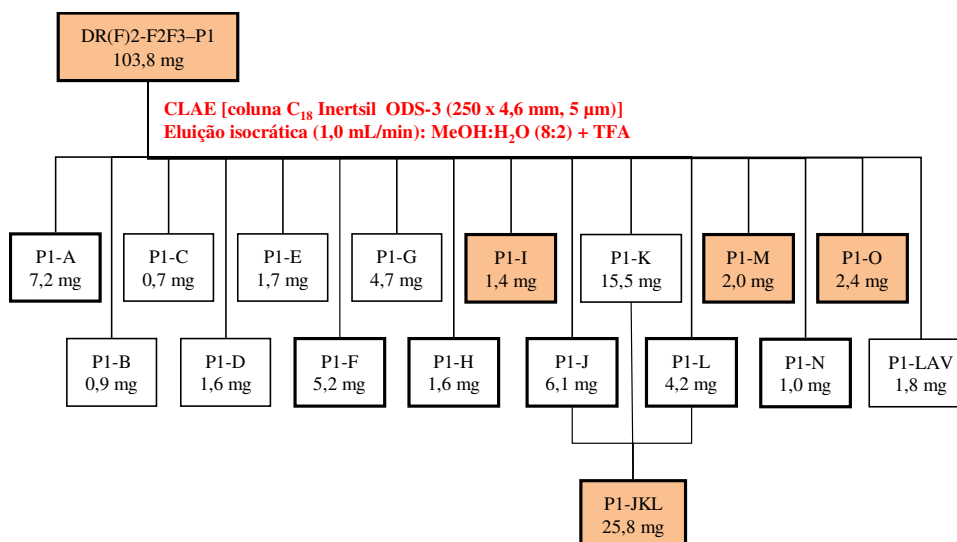
**Figura 24.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3.

A separação da fração DR(F)2-F2F3-P3 foi realizada por CLAE-UV. As sete frações geradas foram analisadas em CLAE-UV-EM e as frações DR(F)2-F2F3-P3-B, D e F enviadas para análises espectroscópicas por RMN (Figura 25). As frações DR(F)2-F2F3-P3-D e DR(F)2-F2F3-P3-F apresentaram espectros interessantes, porém não estavam puros. A fração DR(F)2-F2F3-P3-B foi considerada pura, no entanto sua estrutura não foi elucidada.



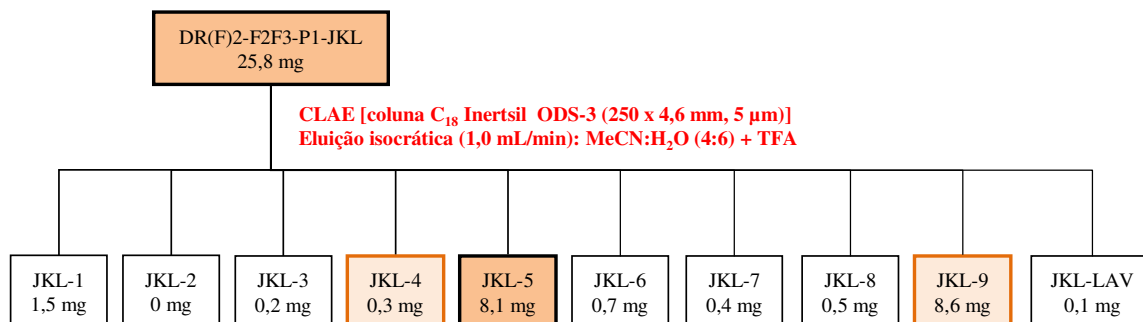
**Figura 25.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P3.

A fração DR(F)2-F2F3-P1 foi submetida à separação por CLAE-UV, gerando 15 frações (Figura 26). Todas as frações foram avaliadas em CLAE-UV-EM. As frações DR(F)2-F2F3-P1-A, F, H, I, J, L, M, N e O foram submetidas a análises espectroscópicas por RMN, confirmando as frações DR(F)2-F2F3-P1-J, K e L (reunidas) como interessantes, além das frações DR(F)2-F2F3-P1-I, M e O. Todas foram re-purificadas em CLAE-UV.



**Figura 26.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1.

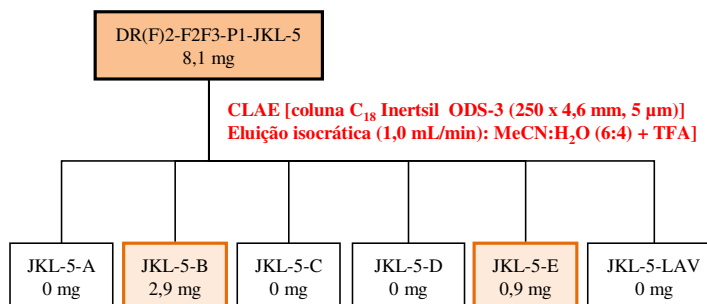
A fração DR(F)2-F2F3-P1-JKL (m= 25,8 mg) foi re-purificada em CLAE-UV. Foram geradas nove frações, as quais foram analisadas em CLAE-UV-EM para avaliação da pureza (Figura 27). As frações DR(F)2-F2F3-P1-JKL-1, 4, 5, 6, 8 e 9 foram analisadas em CLAE-UV-EM. As frações DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4 e 9 apresentaram pureza significativa e foram enviadas para análise por RMN a fim de elucidar suas estruturas.



**Figura 27.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-JKL.

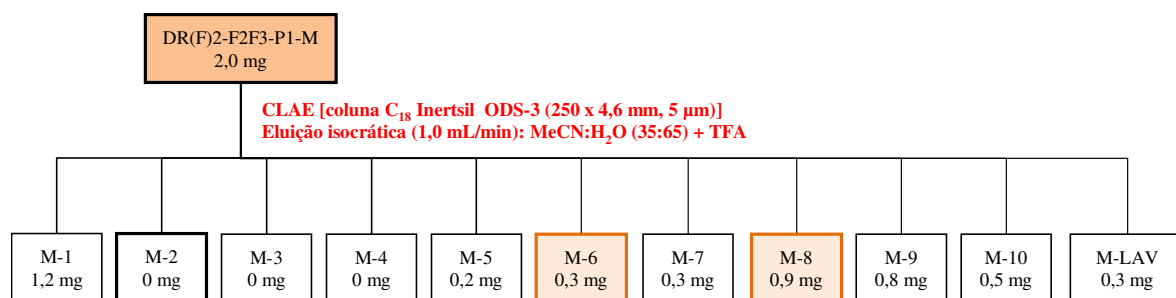
A estrutura do composto puro DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4 não foi confirmada, porém as duas hipóteses possíveis são inéditas na literatura (Página 76). O composto DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 foi identificado como  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina (Página 64).

A fração DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5 foi submetida a uma última purificação em CLAE-UV (Figura 28). Das cinco frações geradas, apenas as frações DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-B e E apresentaram massa significativa, tendo sido enviada para análise por RMN-<sup>1</sup>H. A pureza da fração DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-B não foi confirmada, inviabilizando a determinação estrutural do composto. No entanto, a partir da fração DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E foi isolado o composto  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina (o mesmo isolado a partir da fração DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9) (página 64).



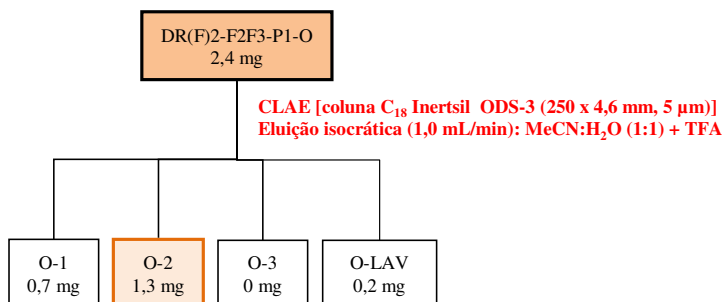
**Figura 28.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5.

O isolamento dos compostos da fração DR(F)2-F2F3-P1-M foi realizada em CLAE-UV, resultando em 10 frações (Figura 29). Dessas, apenas seis foram selecionadas para análise de pureza em CLAE-UV-EM. As frações DR(F)2-F2F3-P1-M-2, 6 e 8 apresentaram um pureza significativa e foram enviadas para análise espectroscópica por RMN para determinação estrutural. No entanto, suas estruturas não foram confirmadas devido à insuficiência de massa para obtenção dos espectros.



**Figura 29.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-M.

A fração DR(F)2-F2F3-P1-O foi re-purificada em CLAE-UV gerando 3 frações (Figura 30). As frações DR(F)2-F2F3-P1-O-1 e DR(F)2-F2F3-P1-O-2 foram analisadas em CLAE-UV-EM e apenas a fração DR(F)2-F2F3-P1-O-2 enviada para RMN.



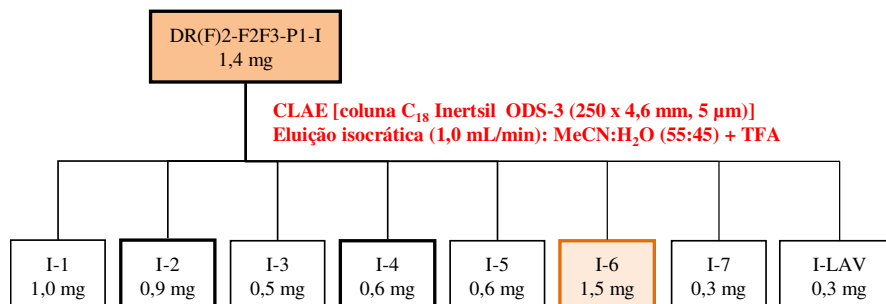
**Figura 30.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-O.

Assim como o composto DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4, o composto puro isolado a partir da fração DR(F)2-F2F3-P1-O-2 não foi identificado, tendo duas hipóteses estruturais inéditas na literatura (Página 76).

Da separação cromatográfica por CLAE-UV, a fração DR(F)2-F2F3-P1-I gerou sete frações (Figura 31). As frações DR(F)2-F2F3-P1-I-2, 4, 5 e 6 foram analisadas em CLAE-

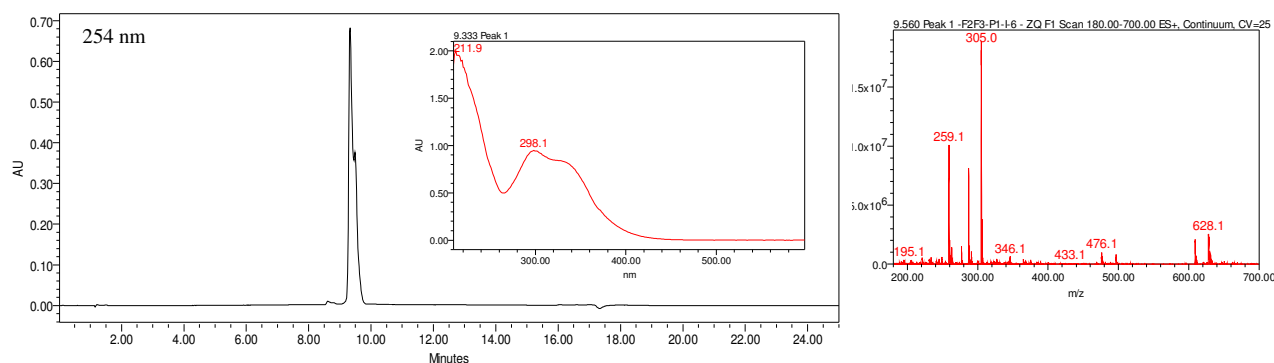


UV-EM e as frações DR(F)2-F2F3-P1-I-2, 4 e 6 enviadas para análise por RMN, devido à sua pureza.



**Figura 31.** Esquema da purificação em CLAE-UV da amostra DR(F)2-F2F3-P1-I.

O cromatograma obtido a partir da fração DR(F)2-F2F3-P1-I-6 e os espectros de UV e massas (Figura 32) indicaram que o composto isolado apresenta banda de UV próxima a 300 nm, absorção incomum a compostos do metabolismo primário. No espectro de massas não foi possível definir o íon molecular. As demais amostras [DR(F)2-F2F3-P1-I-2 e 4] não apresentaram massa suficiente para determinação estrutural. A determinação da estrutura do composto presente na fração DR(F)2-F2F3-P1-I-6 indicou ser um composto inédito na literatura (Página 64), que apresenta estrutura similar ao composto oxocurvularina e  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina (Figura 40).



**Figura 32.** Cromatograma e espectros de UV e massas relativos à fração pura DR(F)2-F2F3-P1-I-6.

#### 4.8 Determinação estrutural dos compostos isolados do fungo *P. decaturensis* [DR(F)2]

##### 4.8.1 Identificação dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9, DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E e DR(F)2-F2F3-P1-I-6

A elucidação estrutural dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 (JKL-9), DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E (JKL-5E) e DR(F)2-F2F3-P1-I-6 (I-6) foi discutida conjuntamente devido à sua similaridade estrutural (Figura 33). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos seus dados espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY, por espectrometria de massas e por comparação aos dados existentes na literatura.

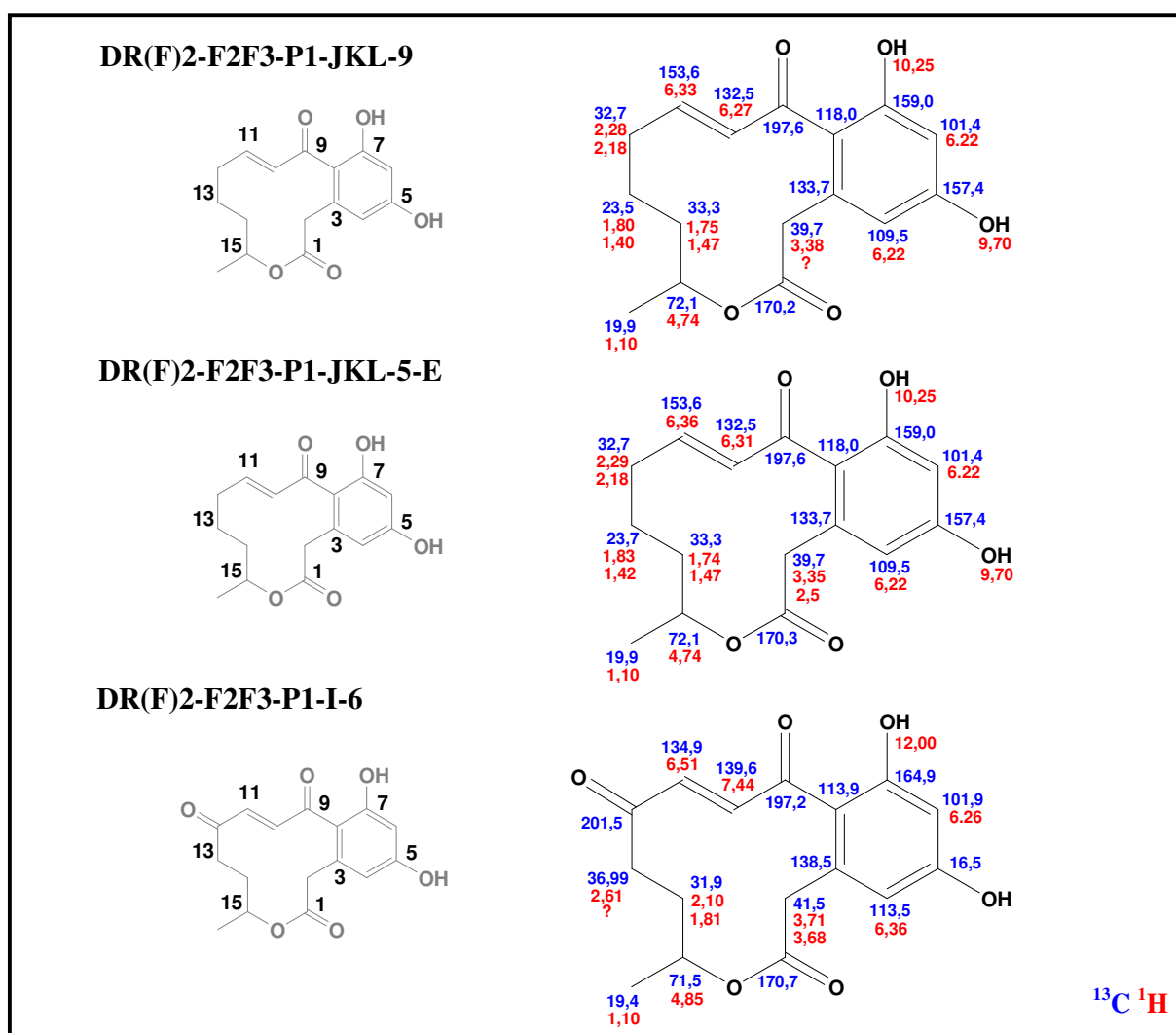


Figura 33. Estrutura planar dos compostos JKL-9, JKL-5E e I-6 com os respectivos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN mono e bi-dimensionais.

Ambos compostos DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E apresentaram no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (ANEXO A e ANEXO F) quatro sinais de hidrogênios com deslocamentos químicos característicos de sistemas insaturados ou aromáticos, com valores de  $\delta$  <sup>1</sup>H entre 6,22 e 6,36. O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (ANEXO B e ANEXO G) apresentou sinais de oito carbonos quaternários (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-10 e C-11), dos quais dois apresentam sinais com deslocamento químico típico de carbono ligado à oxigênio [C-5 ( $\delta$  ~157) e C-7 ( $\delta$  ~159)]. Ambos compostos apresentaram sinais nos espectros de RMN-<sup>13</sup>C com deslocamento químico típico de carbono funcionalizado com cetona ou aldeído insaturado [C-9 ( $\delta$  ~197)], de carbono típico de ácido carboxílico ou éster [C-1 ( $\delta$  ~170)], de carbono substituído por heteroátomo [C-15 ( $\delta$  ~72)], do grupo metila [C-16 ( $\delta$  ~19)] e de grupos metileno [C-2 ( $\delta$  ~39), C-12 ( $\delta$  ~32), C-13 ( $\delta$  ~23) e C-14 ( $\delta$  ~33)] (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos dos compostos JKL-9 e JKL-5E observados nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C, com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados.

Posição	DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9			DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5E		
	$\delta$ <sup>13</sup> C	DEPT	$\delta$ <sup>1</sup> H (mult, J/Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	DEPT	$\delta$ <sup>1</sup> H (mult, J/Hz)
<b>1</b>	170,28		-	170,30		-
<b>2</b>	39,79	CH <sub>2</sub>	(a) 3,38 (m); (b) ?	39,70	CH <sub>2</sub>	(a) 3,35; (b) 2,5
<b>3</b>	133,79		-	133,78		-
<b>4</b>	109,54	CH	6,22 (m)	109,55	CH	6,22 (m)
<b>5</b>	157,46		-	157,44		-
<b>6</b>	101,46	CH	6,22 (m)	101,48	CH	6,22 (m)
<b>7</b>	159,09		-	159,08		-
<b>8</b>	118,00		-	118,05		-
<b>9</b>	197,61		-	197,64		-
<b>10</b>	132,54	CH	6,27 (m)	132,55	CH	6,31 (m)
<b>11</b>	153,63	CH	6,33 (m)	153,68	CH	6,36 (m)
<b>12</b>	32,73	CH <sub>2</sub>	(a) 2,28 (m); (b) 2,18 (m)	32,75	CH <sub>2</sub>	(a) 2,29 (m); (b) 2,18 (m)
<b>13</b>	23,78	CH <sub>2</sub>	(a) 1,80 (m); (b) 1,40 (m)	23,79	CH <sub>2</sub>	(a) 1,83 (m); (b) 1,42 (m)
<b>14</b>	33,35	CH <sub>2</sub>	(a) 1,75 (m); (b) 1,47 (m)	33,37	CH <sub>2</sub>	(a) 1,74 (m); (b) 1,47 (dd, 6,36/7,92)
<b>15</b>	72,13	CH	4,74 (m)	72,16	CH	4,74 (m)
<b>16</b>	19,90	CH <sub>3</sub>	1,10 (d, 6,36)	19,96	CH <sub>3</sub>	1,10 (d, 6,36)
<b>5-OH</b>	-	-	9,85 (s)	-	-	9,89 (s)
<b>7-OH</b>	-	-	10,25 (s)	-	-	10,2 (s)

Legenda: (\*) correlação fraca.

As análises dos espectros bidimensionais HSQC (ANEXO C), HMBC (ANEXO D) e COSY (ANEXO E) permitiram a construção da Tabela 9 e o estabelecimento das relações entre os diferentes carbonos e hidrogênios do composto JKL-9.

**Tabela 9.** Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto JKL-9 com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados e as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY.

DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	HMBC	COSY
1	170,28	-	2a, 6, 15	-
2	39,79	(a) 3,38 (m); (b) ?	6	-
3	133,79	-	2a	-
4	109,54	6,22 (m)	2a, 6	-
5	157,46	-	7	-
6	101,46	6,22 (m)	7	-
7	159,09	-	-	-
8	118,00	-	2a, 7, 10, 11	-
9	197,61	-	6, 10, 11	-
10	132,54	6,27 (m)	12a, 12b	12a
11	153,63	6,33 (m)	10, 12a, 12b, 13a	12a
12	32,73	(a) 2,28 (m); (b) 2,18 (m)	10, 11, 14a, 14b	(a) 10, 11, 13a; (b) 13b
13	23,78	(a) 1,80 (m); (b) 1,40 (m)	11, 14a, 14b, 15	(a) 12a, 13b; (b) 12b, 13a, 16*
14	33,35	(a) 1,75 (m); (b) 1,47 (m)	15, 16	(a) 15; (b) 15
15	72,13	4,74 (m)	14a*, 14b, 16	14a, 14b, 16
16	19,90	1,10 (d, 6,36)	14a, 14b*, 15	13b*, 15
5-OH	-	9,85 (s)	-	-
7-OH	-	10,25 (s)	5, 6, 8	-

Legenda: (\*) correlação fraca.

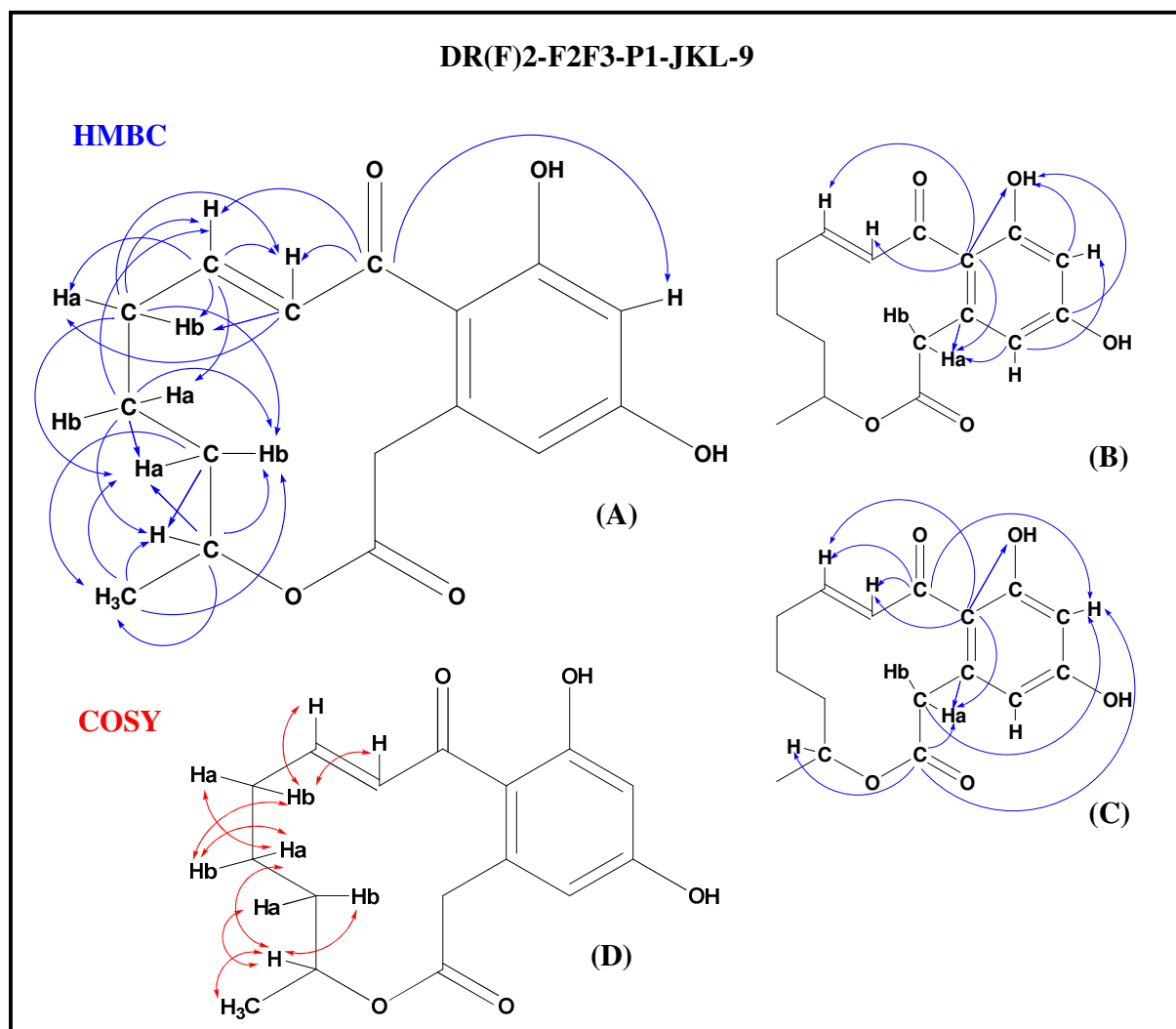
A análise do espectro de HMBC do composto JKL-9 indicou correlações à longa distância de C-16 ( $\delta$  19,90) com H-14a ( $\delta$  1,75), H-14b ( $\delta$  1,47) (fraca) e H-15 ( $\delta$  4,74); C-15 ( $\delta$  72,13) com H-14a ( $\delta$  1,75) (fraca), H-14b ( $\delta$  1,47) e H-16 ( $\delta$  1,10); C-14 ( $\delta$  33,35) com H-15 ( $\delta$  4,74) e H-16 ( $\delta$  1,10); C-13 ( $\delta$  23,78) com H-11 ( $\delta$  6,33), H-14a ( $\delta$  1,75), H-14b ( $\delta$  1,47) e H-15 ( $\delta$  4,74), C-12 ( $\delta$  32,73) com H-10 ( $\delta$  6,27), H-11 ( $\delta$  6,33), H-14a ( $\delta$  1,75) e H-14b ( $\delta$  1,47); C-11 (153,63) com H-10 ( $\delta$  6,27), H-12a ( $\delta$  2,28), H-12b ( $\delta$  2,18) e H-13a ( $\delta$  1,8); C-10 ( $\delta$  132,54) com H-12a ( $\delta$  2,28) e H-12b ( $\delta$  2,18) e C-9 ( $\delta$  197,61) com H-6 ( $\delta$  6,22), H-10 ( $\delta$  6,27) e H-11 ( $\delta$  6,33) indicando a presença de uma cadeia de oito carbonos (Figura 34 – A).

As correlações observadas entre C-9 ( $\delta$  197,61) com H-6 ( $\delta$  6,22), H-10 ( $\delta$  6,27) e H-11 ( $\delta$  6,33), entre C-8 ( $\delta$  118,00) com H-2a ( $\delta$  3,38), 7-OH ( $\delta$  10,25), H-10 ( $\delta$  6,27) e H-11 ( $\delta$  6,33), entre C-1 ( $\delta$  170,28) com H-2a ( $\delta$  3,38), H-6 ( $\delta$  6,22) e H-15 ( $\delta$  4,74) e entre C-2 ( $\delta$  39,79) com H-6 ( $\delta$  101,46) indicam que esta cadeia carbônica está ligada ao anel aromático, formando uma estrutura bicíclica (Figura 34 – B).

Foram observadas ainda, correlações de C-8 ( $\delta$  118,00) com H-2a ( $\delta$  3,38), 7-OH ( $\delta$  10,25), H-10 ( $\delta$  6,27) e H-11 ( $\delta$  6,33); de C-6 ( $\delta$  101,46) com 7-OH ( $\delta$  10,25); de C-5 ( $\delta$  157,46) com 7-OH ( $\delta$  10,25); de C-4 ( $\delta$  109,54) com H-2a ( $\delta$  3,38) e H-6 ( $\delta$  6,22) e C-3 ( $\delta$

133,79) com H-2a ( $\delta$  3,38) indicando C-8 e C-3 como pontos de conexão entre a cadeia carbônica e o anel aromático, havendo ligação C-C entre (C-8 e C-9) e (C-3 e C-2) (Figura 34 – C).

As correlações observadas no espectro de COSY [H-16 ( $\delta$  1,10) com H-13b ( $\delta$  1,70) (fraca) e H-15 ( $\delta$  4,74); H-15 ( $\delta$  4,74) com H-14a ( $\delta$  1,75), H-14b ( $\delta$  1,47) e H-16 ( $\delta$  1,10); H-14a ( $\delta$  1,75) com H-15 ( $\delta$  4,74); H-14b ( $\delta$  1,47) com H-15 ( $\delta$  4,74); H-13a ( $\delta$  1,80) com H-12a ( $\delta$  2,28) e H-13b ( $\delta$  1,40); H-13b ( $\delta$  1,40) com H-12b ( $\delta$  2,18), H-13a ( $\delta$  1,80) e H-16 ( $\delta$  1,10) (fraca); H-12a ( $\delta$  2,28) com H-10 ( $\delta$  6,27), H-11 ( $\delta$  6,33) e H-13a ( $\delta$  1,80); H-12b ( $\delta$  2,18) com H-13b ( $\delta$  1,40) e H-11 ( $\delta$  6,33) e H-10 ( $\delta$  6,27) com H-12a ( $\delta$  2,28)] confirmaram as relações indicadas entre os carbonos da cadeia carbônica de C-9 a C-16 (Figura 34 – D).



**Figura 34.** Correlações observadas para o composto JKL-9: (A), (B) e (C) HMBC; (D) COSY.

As análises dos espectros bidimensionais HSQC (ANEXO H) e HMBC (ANEXO I) permitiram a construção da Tabela 10 e o estabelecimento das correlações entre os diferentes carbonos e hidrogênios do composto JKL-5E e, conseqüentemente, a comparação com as correlações observadas para o composto JKL-9.

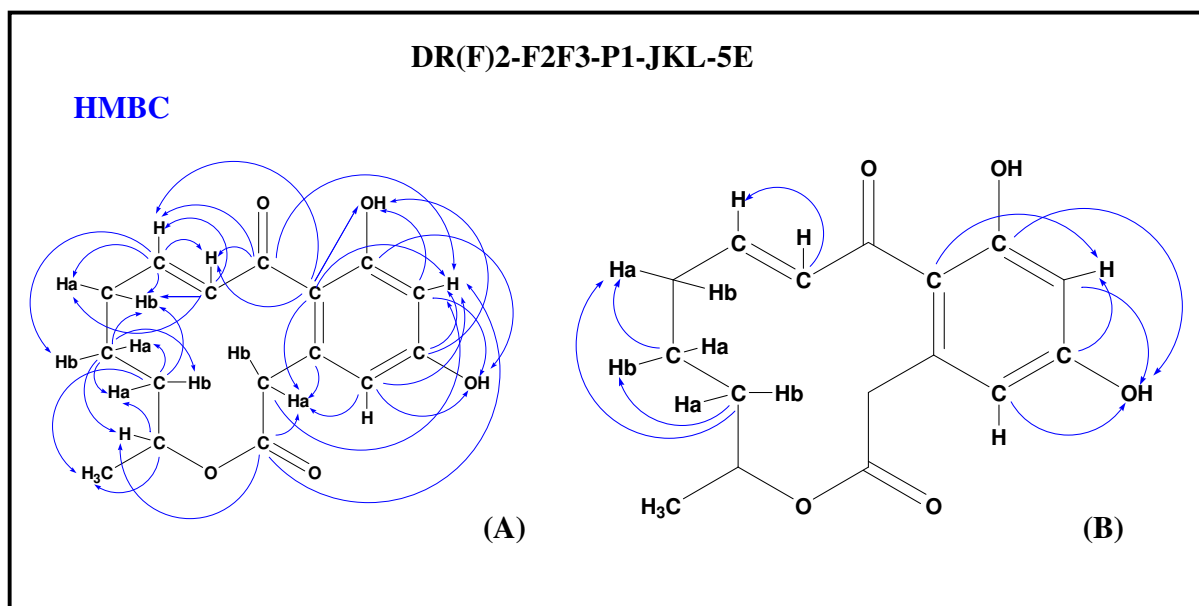
**Tabela 10.** Dados espectroscópicos do composto JKL-9 em comparação aos dados do composto JKL-5E.

Posição	DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9			DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5E		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	HMBC	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	HMBC
1	170,28	-	2a, 6, 15	170,30	-	2a, 6, 15
2	39,79	(a) 3,38 (m); (b) ?	6	39,70	(a) 3,35; (b) 2,5	6
3	133,79	-	2a	133,78	-	2a
4	109,54	6,22 (m)	2a, 6	109,55	6,22 (m)	2a, 5, 6
5	157,46	-	7	157,44	-	6, 7
6	101,46	6,22 (m)	7	101,48	6,22 (m)	5, 7
7	159,09	-	-	159,08	-	5
8	118,00	-	2a, 7, 10, 11	118,05	-	2a, 6, 7, 10, 11
9	197,61	-	6, 10, 11	197,64	-	6, 10, 11
10	132,54	6,27 (m)	12a, 12b	132,55	6,31 (m)	11, 12a, 12b
11	153,63	6,33 (m)	10, 12a, 12b, 13a	153,68	6,36 (m)	10, 12a, 12b, 13a
12	32,73	(a) 2,28 (m); (b) 2,18 (m)	10, 11, 14a, 14b	32,75	(a) 2,29 (m); (b) 2,18 (m)	-
13	23,78	(a) 1,80 (m); (b) 1,40 (m)	11, 14a, 14b, 15	23,79	(a) 1,83 (m); (b) 1,42 (m)	12a, 14a, 14b, 15
14	33,35	(a) 1,75 (m); (b) 1,47 (m)	15, 16	33,37	(a) 1,74 (m); (b) 1,47 (dd)	12a, 13b, 16
15	72,13	4,74 (m)	14a*, 14b, 16	72,16	4,74 (m)	14b, 16
16	19,90	1,10 (d, 6,36)	14a, 14b*, 15	19,96	1,10 (d, 6,36)	-
5-OH	-	9,85 (s)	-	-	9,89 (s)	-
7-OH	-	10,25 (s)	5, 6, 8	-	10,2 (s)	5, 6, 8

Legenda: (\*) correlação fraca.

Para o composto JKL-5E foi possível observar correlações no espectro de HMBC (Figura 35 – A) semelhantes às observadas para o composto DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 (Tabela 1).

As correlações entre o carbono C-4 e o hidrogênio H-5; os carbonos C-5 e C-8 e o hidrogênio H-6; os carbonos C-6 e C-7 e o hidrogênio H-5; o carbono C-10 e o hidrogênio H-11; o carbono 13 e o hidrogênio H-12a e o carbono C-14 e os hidrogênios H-12a e H-13b foram observadas somente no espectro de HMBC do composto JKL-5-E (Figura 35 – B), indicando que ambos compostos apresentam a mesma estrutura planar e confirmando a estrutura elucidada para os dois compostos.



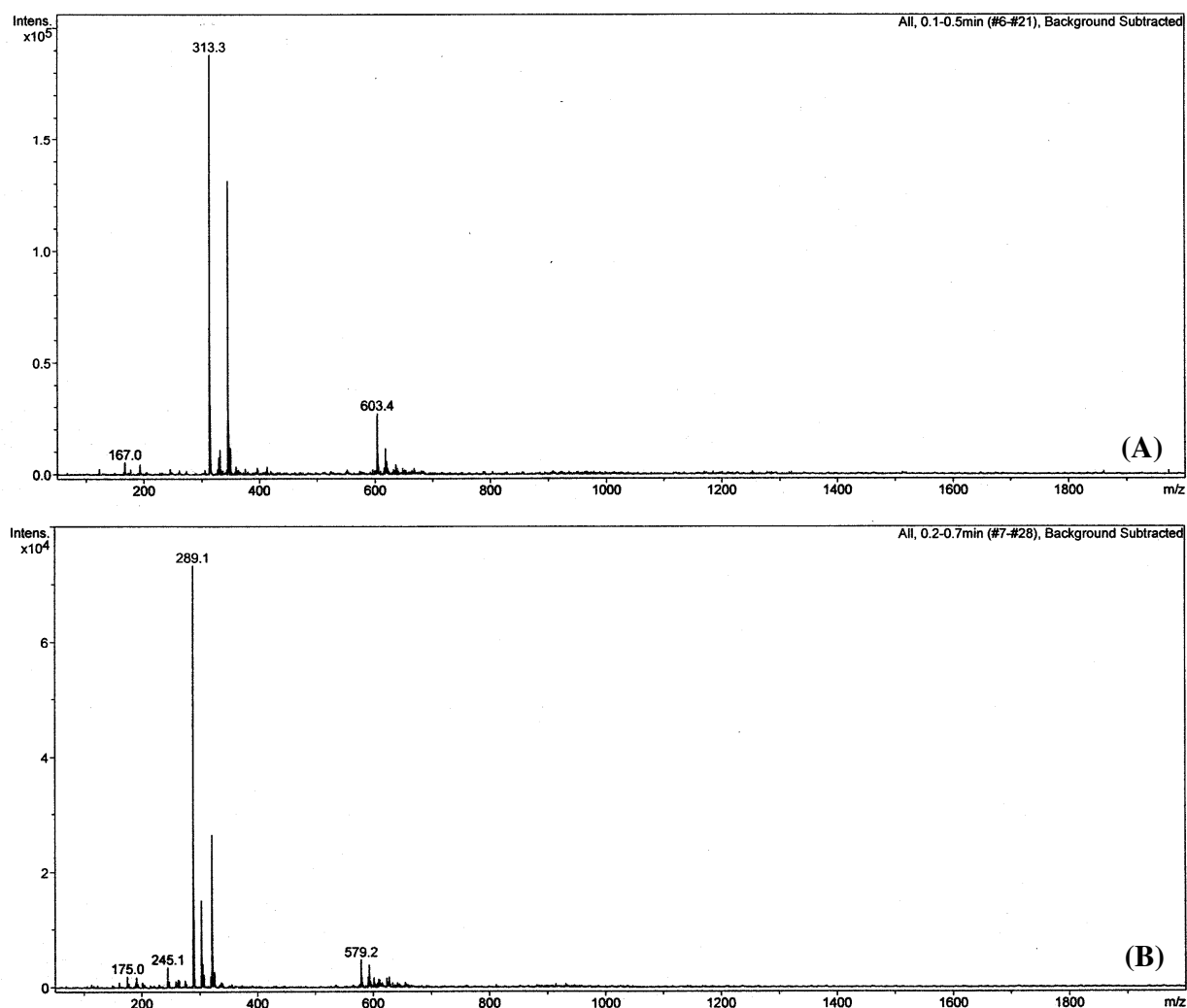
**Figura 35.** Correlações do composto JKL-5E no HMBC: (A) todas as correlações observadas; (B) correlações observadas somente para o JKL-5E (não observadas para o JKL-9).

Sendo assim, de acordo com os dados obtidos e da literatura, foi possível identificar os compostos DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E como  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina (JIANG *et al.*, 2008) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Dados espectroscópicos do composto JKL-9 em comparação aos dados da literatura.

Posição	DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 DMSO- <i>d</i> 6		$\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina (JIANG <i>et al.</i> , 2008) DMSO- <i>d</i> 6	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)
1	170,28	-	170,43	
2	39,79	(a) 3,38 (m); (b) ?	39,94	(a) 3.39 (d, 15,57); (b) 3.36 (d, 15,57)
3	133,79	-	133,95	
4	109,54	6,22 (m)	109,71	6.23 (s)
5	157,46	-	157,62	
6	101,46	6,22 (m)	101,62	6.23 (s)
7	159,09	-	159,25	
8	118,00	-	118,18	
9	197,61	-	197,75	
10	132,54	6,27 (m)	132,72	6.3 (d, 15,74)
11	153,63	6,33 (m)	153,75	6.38 (m)
12	32,73	(a) 2,28 (m); (b) 2,18 (m)	32,90	(a)2.28 (m); (b) 2.19 (m)
13	23,78	(a) 1,80 (m); (b) 1,40 (m)	23,94	(a) 1.82 (m); (b) 1.46 (m)
14	33,35	(a) 1,75 (m); (b) 1,47 (m)	33,53	(a) 1.75 (m); (b) 1.48 (m)
15	72,13	4,74 (m)	72,28	4.74 (m)
16	19,90	1,10 (d, 6,36)	20,11	1.11 (d, 6,42)

O espectro de massas do composto JKL-9 *eletrospray* apresentou, em modo positivo, o pico do aduto de sódio  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  313,3 Da e, em modo negativo, o pico de  $[M-H]^-$  em  $m/z$  289,1 Da, ambos compatíveis com a massa molar calculada com a fórmula do composto  $C_{16}H_{18}O_5$  ( $m=290$  Da), dado que corrobora com a estrutura elucidada e com os dados da literatura (Figura 36).



**Figura 36.** Espectros de massas do composto JKL-9: (A) modo positivo; (B) modo negativo.

O composto DR(F)2-F2F3-P1-I-6, apesar de possuir estrutura bastante similar à dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E, apresenta sinais nos espectros de RMN- $^1H$  e RMN- $^{13}C$  com valores de deslocamentos químicos consideravelmente distintos, devido à presença de uma cetona em substituição a um hidrogênio no carbono C-12. O



composto apresentou em seu espectro de RMN de hidrogênio (ANEXO J) quatro sinais de hidrogênios com deslocamentos químicos característicos de sistemas insaturados ou aromáticos, com valores de  $\delta^1\text{H}$  entre 6,24 e 7,44. No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (ANEXO K) foi possível observar sinais referentes a oito carbonos quaternários [C-3 ( $\delta$  138,5), C-4 ( $\delta$  113,58), C-5 ( $\delta$  163,51), C-6 ( $\delta$  101,9), C-7 ( $\delta$  164,95), C-8 ( $\delta$  113,92), C-10 ( $\delta$  139,68) e C-11 ( $\delta$  134,98)], dos quais os carbonos [C-5 ( $\delta$  163,51) e C-7 ( $\delta$  164,95)] apresentam sinais com deslocamento químico típico de carbono ligado à oxigênio. O composto apresentou também sinais nos espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  com deslocamento químico típico de carbono funcionalizado com cetona ou aldeído insaturado [C-9 ( $\delta$  197,21) e C-12 ( $\delta$  201,51)], de carbono típico de ácido carboxílico ou éster [C-1 (170,73)], de carbono substituído por heteroátomo [C-15 ( $\delta$  71,07)], do grupo metila [C-16 ( $\delta$  19,42)] e do grupo metileno [C-2 ( $\delta$  41,56), C-13 ( $\delta$  36,99) e C-14 ( $\delta$  31,99)] (Tabela 12).

**Tabela 12.** Dados espectroscópicos do composto JKL-9 em comparação aos dados do composto I-6 (RMN- $^1\text{H}$  e RMN- $^{13}\text{C}$  e DEPT).

DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9				DR(F)2-F2F3-P1-I-6		
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)
1	170,28		-	170,73		-
2	39,79	CH <sub>2</sub>	(a) 3,38 (m); (b) ?	41,56	CH <sub>2</sub>	(a) 3,714 (d, 17,2); (b) 3,68 (d, 17,2)
3	133,79		-	138,50		-
4	109,54	CH	6,22 (m)	113,58	CH	6,36 (d, 2,36)
5	157,46		-	163,51		-
6	101,46	CH	6,22 (m)	101,90	CH	6,26 (d, 2,6)
7	159,09		-	164,95		-
8	118,00		-	113,92		-
9	197,61		-	197,21		-
10	132,54	CH	6,27 (m)	139,68	CH	7,44 (d, 16,4)
11	153,63	CH	6,33 (m)	134,98	CH	6,51 (d, 16,36)
12	32,73	CH <sub>2</sub>	(a) 2,28 (m); (b) 2,18 (m)	201,51		-
13	23,78	CH <sub>2</sub>	(a) 1,80 (m); (b) 1,40 (m)	36,99	CH <sub>2</sub>	2,61 (m)
14	33,35	CH <sub>2</sub>	(a) 1,75 (m); (b) 1,47 (m)	31,99	CH <sub>2</sub>	(a) 1,81 (m); (b) 2,1 (m)
15	72,13	CH	4,74 (m)	71,07	CH	4,85 (tt, 6,36/2,64)
16	19,90	CH <sub>3</sub>	1,10 (d, 6,36)	19,42	CH <sub>3</sub>	1,17 (d)
5-OH	-	-	9,85 (s)	-	-	-
7-OH	-	-	10,25 (s)	-	-	12,1 (s)

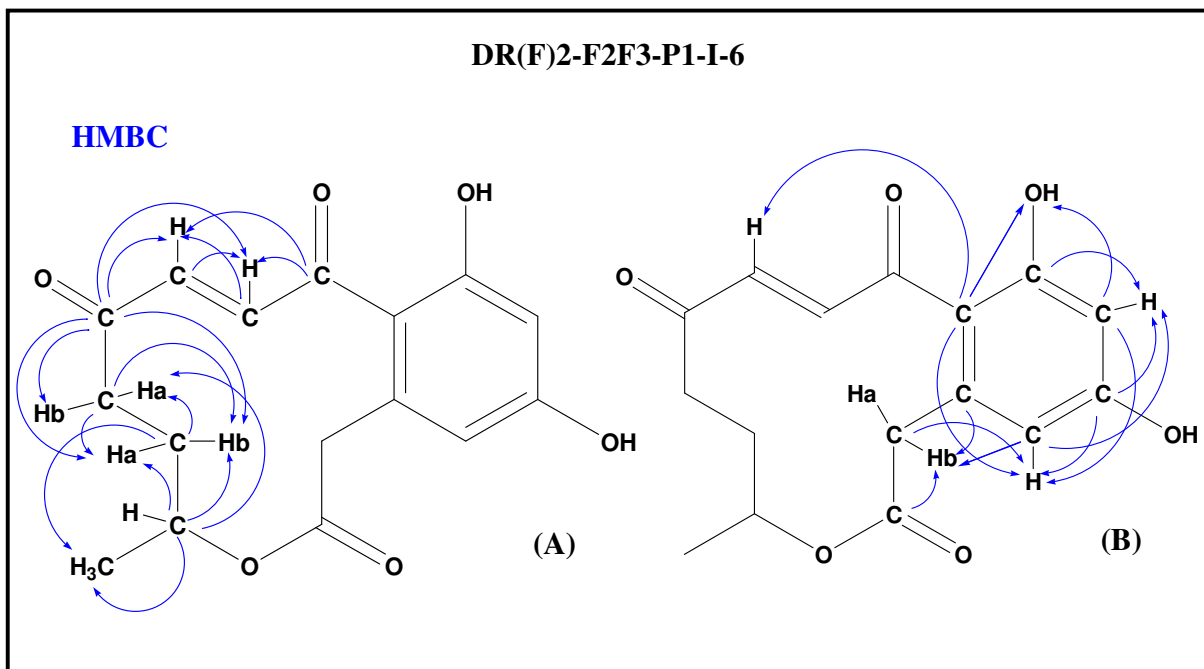
A Tabela 13 foi construída a partir das análises dos espectros bidimensionais HSQC (ANEXO L) e HMBC (ANEXO M), que permitiram o estabelecimento das relações entre os diferentes carbonos e hidrogênios do composto I-6.

**Tabela 13.** Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto I-6 com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados e as correlações observadas nos espectros de HMBC.

DR(F)2-F2F3-P1-I-6				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	HMBC
1	170,73		-	2a
2	41,56	CH <sub>2</sub>	(a) 3,714 (d, 17,2); (b) 3,68 (d, 17,2)	4
3	138,50		-	2a
4	113,58	CH	6,36 (d, 2,36)	2a, 6
5	163,51		-	4, 6
6	101,90	CH	6,26 (d, 2,6)	4, 7
7	164,95		-	6
8	113,92		-	4, 7, 11*
9	197,21		-	10, 11
10	139,68	CH	7,44 (d, 16,4)	11
11	134,98	CH	6,51 (d, 16,36)	10
12	201,51		-	10, 11, 13a, 14a, 14b
13	36,99	CH <sub>2</sub>	2,61 (m)	14a, 14b
14	31,99	CH <sub>2</sub>	(a) 2,10 (m); (b) 1,81 (m)	13a, 16
15	71,07	CH	4,85 (tt, 6,36/2,64)	13a, 14a, 14b, 16
16	19,42	CH <sub>3</sub>	1,17 (d)	-
5-OH	-	-	-	-
7-OH	-	-	12,1 (s)	6, 8

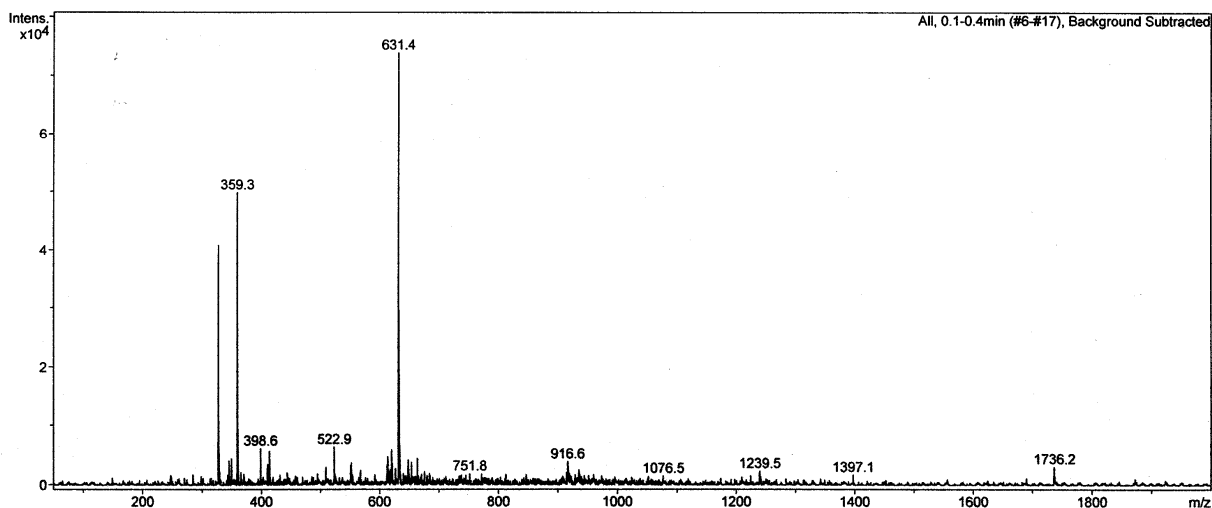
A análise do espectro de HMBC do composto I-6 possibilitou estabelecer as correlações à longa distância existentes entre o carbono C-15 ( $\delta$  71,07) e os hidrogênios H-13a ( $\delta$  2,61), H-14a ( $\delta$  2,10), H-14b ( $\delta$  1,81) e H-16 ( $\delta$  1,17); entre C-14 ( $\delta$  31,99) e os H-13a ( $\delta$  2,61) e H-16 ( $\delta$  1,17); C-13 ( $\delta$  36,99) e H-14a ( $\delta$  2,10) e H-14b ( $\delta$  1,81); C-12 ( $\delta$  201,51) e H-10 ( $\delta$  7,44), H-11 ( $\delta$  6,51), H-13a ( $\delta$  2,61), H-14a ( $\delta$  2,10) e H-14b ( $\delta$  1,81); C-11 ( $\delta$  134,98) e H-10 ( $\delta$  7,44); C-9 ( $\delta$  197,21) e H-10 ( $\delta$  7,44) e H-11 ( $\delta$  6,51) indicando a presença de uma cadeia carbônica de oito carbonos (Figura 37 – A).

As correlações observadas entre C-1 ( $\delta$  170,73) e H-2a ( $\delta$  3,71); C-2 ( $\delta$  41,56) e H-4 ( $\delta$  6,36); C-3 ( $\delta$  138,50) e H-2a ( $\delta$  3,71); C-4 ( $\delta$  113,58) e H-2a ( $\delta$  3,71) e H-6 ( $\delta$  6,26); C-5 ( $\delta$  163,51) e H-4 ( $\delta$  6,36) e H-6 ( $\delta$  6,26); C-6 ( $\delta$  101,90) e H-4 ( $\delta$  6,36) e 7-OH ( $\delta$  12,0); C-7 ( $\delta$  164,95) e H-6 ( $\delta$  6,26); C-8 ( $\delta$  113,92) e H-4 ( $\delta$  6,36), 7-OH ( $\delta$  12,0) e H-11 ( $\delta$  134,98); C-9 ( $\delta$  197,21) e H-10 ( $\delta$  7,44) e H-11 ( $\delta$  6,51) indicam que a cadeia carbônica de oito carbonos está ligada ao anel aromático pelo carbono C8 e que houve substituição de um hidrogênio do carbono C3 pela cadeia lateral formada pelo carbono C2 ( $\delta$  41,56) ligado ao carbono C-1 ( $\delta$  170,73) (Figura 37 – B).

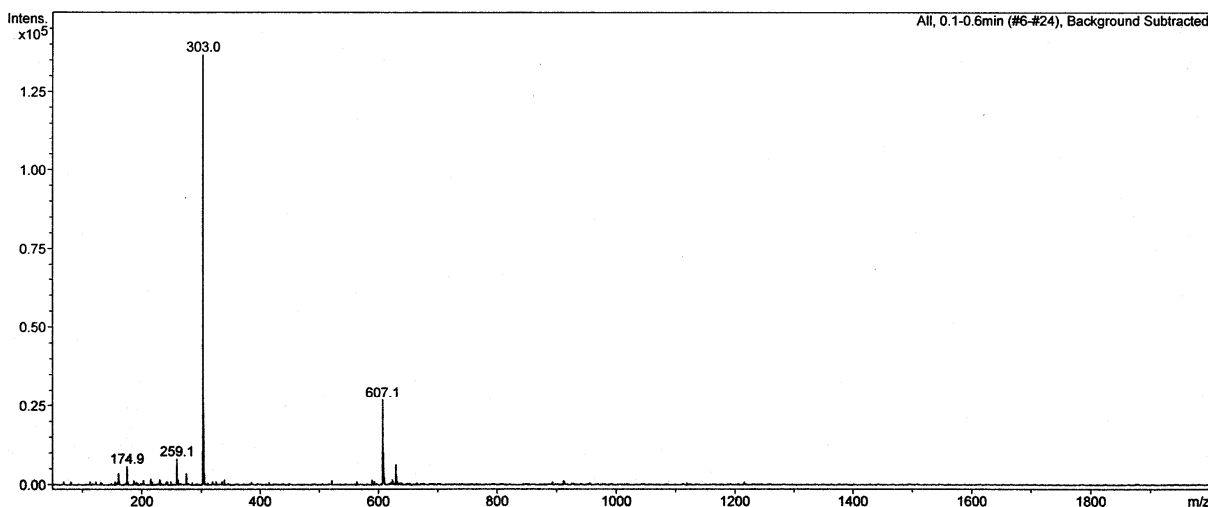


**Figura 37.** Correlações observadas no espectro de HMBC para o composto I-6.

O espectro de massas em modo *eletrospray*, em modo positivo, indicou o pico do dímero do composto, formando o aduto de sódio  $[M+Na]^+$ , em  $m/z$  631,4 Da (Figura 38), e, em modo negativo, o pico de  $[M-H]^-$  em  $m/z$  303,0 Da (Figura 39), ambos compatíveis com a massa molar de  $m=304$  Da e com a fórmula do composto  $C_{16}H_{16}O_6$ .



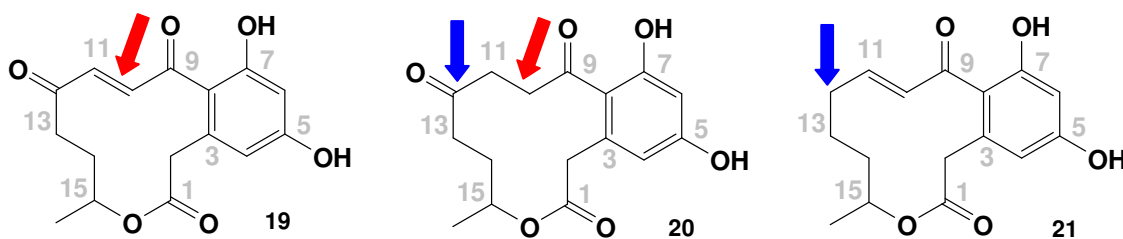
**Figura 38.** Espectros de massas do composto I-6 em modo positivo.



**Figura 39.** Espectros de massas do composto I-6 em modo negativo.

A correlação entre o carbono C-1 ( $\delta$  170,73) e o hidrogênio H-15 ( $\delta$  4,85) confirmando a presença de uma estrutura cíclica não foi observada. No entanto, a partir da massa do composto e de sua fórmula molecular, é possível inferir que essa a estrutura é bicíclica, já que no caso de se tratar de uma cadeia aberta, a massa do composto seria 306 e sua fórmula  $C_6H_{18}O_6$ .

A partir desses dados, a estrutura planar do composto DR(F)2-F2F3-P1-I-6, inédito na literatura, foi elucidada. Este composto possui estrutura similar à oxocurvularina, tendo como diferença apenas a presença de uma ligação dupla entre C-10 e C-11 (Figura 40). Kusano e colaboradores (2003) testaram a atividade nematicida deste composto contra *Pratylenchus penetrans*, causador de lesões radiculares em diferentes tipos de cultivos, o qual não apresentou resultados significativos em relação aos outros compostos testados. Neste mesmo trabalho, a  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina, composto isolado como DR(F)2-F2F3-P1-JKL-9 e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-5-E, que também possui estrutura similar (Figura 40), teve sua atividade testada e, diferentemente da oxocurvularina, apresentou a maior atividade nematicida dentre os compostos testados.



**Figura 40.** Estrutura planar dos compostos (19) I-6, (20) oxocurvularina e (21)  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina.

A  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina foi isolada pela primeira vez em 1976 por Munro e colaboradores a partir de uma espécie de *Curvularia* sp., de qual já havia sido isolada a curvularina ( $C_{16}H_{20}O_5$ ), composto de estrutura semelhante. Posteriormente este composto foi isolado de fungos dos gêneros *Alternaria*, *Stemphylium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium* e *Nectria*. (CAPUTO & VIOLA, 1977; GREVE *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2004; XIE *et al.*, 2009)

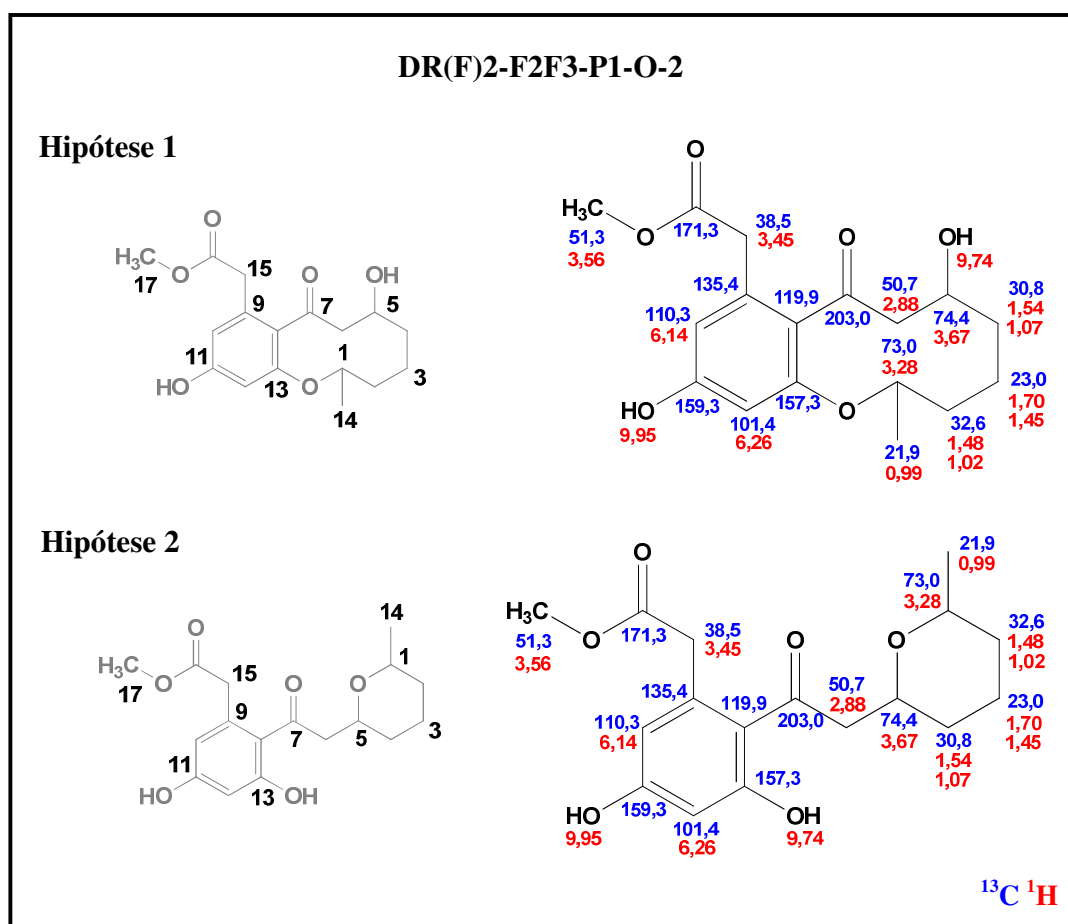
No trabalho de Jiang e colaboradores, a fitotoxicidade da  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina foi testada como herbicida em *Digitaria sanguinali*. Este mesmo composto foi isolado como fitotoxina a partir do fungo fitopatógeno *Nectria galligena*, principal agente causador de cancro em árvores de madeira de lei, sendo encontrado também em árvores de cultivos de maçã. Neste trabalho, a  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina teve sua atividade antimicrobiana testada contra *Pseudomonas syringae*, apresentando atividade de  $IC_{50}=14,2 \mu\text{g/mL}$ , comparável aos valores de  $IC_{50}$  de estreptomicina ( $IC_{50}=11 \mu\text{g/mL}$ ) e penicilina G ( $IC_{50}=15 \mu\text{g/mL}$ ). Além disso, o composto apresentou atividade citotóxica em fibroblastos de pulmão humano com  $IC_{50}=12 \mu\text{g/mL}$  (GUTIERREZ *et al.*, 2005).

Xie e colaboradores (2009) isolaram a  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina de um fungo do gênero *Eupenicillium* isolado a partir da esponja marinha *Axinella* sp.. A  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*. No trabalho de Greve *et al.*, 2008, uma linhagem de *Curvularia* sp. foi isolada da alga marinha *Acanthophora spicifera* de qual foram isoladas diversas curvularinas. Neste trabalho foi testada a citotoxicidade dos compostos, incluindo a  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina, para 36 células tumorais humanas. O composto em questão apresentou atividade significativa contra células tumorais de mama, próstata, melanona, pulmão, entre outras. Estes dados de citotoxicidade corroboram com os obtidos em 2004 por He e colaboradores.

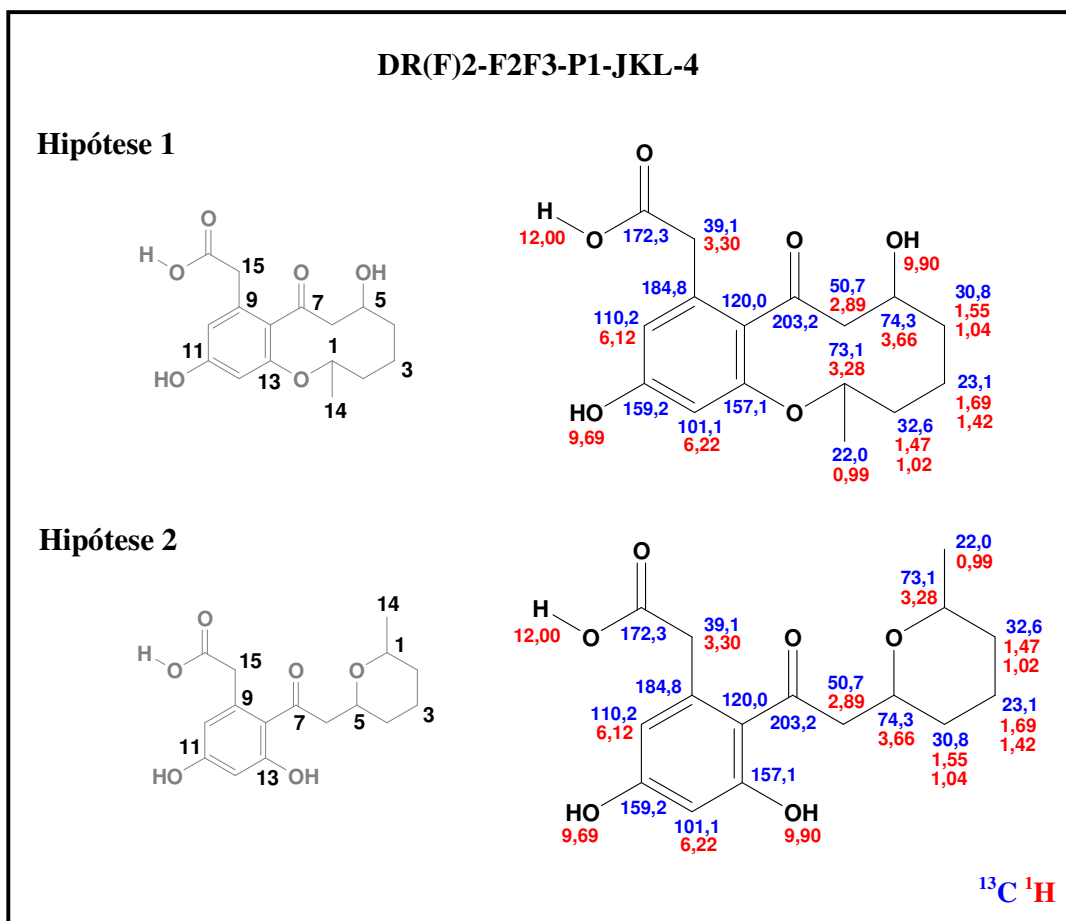
A partir dos dados da literatura foi possível verificar o grande potencial biotecnológico do composto  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina, o qual foi inclusive patenteado por Agatsuma (2004). Frente à similaridade estrutural, é possível sugerir que o composto DR(F)2-F2F3-P1-I-6 também possui grande potencial para aplicações biotecnológicas, inclusive como fármaco. E, apesar da oxocurvularina não ter apresentado resultados de atividade biológica, a presença da dupla ligação entre os carbonos C-10 e C-11 no composto DR(F)2-F2F3-P1-I-6 pode ser decisiva em relação à sua bioatividade, como é discutido no trabalho de Xie e colaboradores (2009).

#### 4.8.2 Identificação dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-O-2 e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4

A identificação das possíveis estruturas dos compostos DR(F)2-F2F3-P1-O-2 (O-2) e DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4 (JKL-4) foi realizada pela análise dos seus dados espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C (Figura 41 e Figura 42), HSQC, HMBC, COSY e por espectrometria de massas. A estrutura planar destes compostos não foi confirmada, tendo sido indicadas duas possíveis hipóteses estruturais para cada um dos compostos JKL-4 e O-2, visto à ausência de correlações à longa distância que permitiriam estabelecer tais estruturas sem ambigüidade. A discussão de O-2 e JKL-4 foi realizada em paralelo devido à sua similaridade.



**Figura 41.** Estrutura planar das duas hipóteses estruturais do composto O-2, com os respectivos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN mono e bi-dimensionais.



**Figura 42.** Estrutura planar das duas hipóteses estruturais do composto JKL-4, com os respectivos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN mono e bi-dimensionais.

O composto DR(F)2-F2F3-P1-O-2 apresentou no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (ANEXO N) dois sinais de hidrogênios com deslocamentos químicos característicos de anel aromático ( $\delta$  6,12 e  $\delta$  6,22). O espectro de RMN-<sup>13</sup>C (ANEXO O) apresentou sinais de seis carbonos quaternários com deslocamento químico entre 101,41 e 159,34 ( $\delta$  101,41,  $\delta$  110,36,  $\delta$  119,90,  $\delta$  135,44,  $\delta$  157,34 e  $\delta$  159,34), um carbono com deslocamento químico típico de carbono funcionalizado com cetona ou aldeído insaturado ( $\delta$  203,09), um carbono com deslocamento típico de ácido carboxílico ou éster ( $\delta$  171,34), dois carbonos substituídos por oxigênio ( $\delta$  73,00 e  $\delta$  74,44), dois carbono do tipo CH<sub>3</sub> ( $\delta$  21,93 e  $\delta$  51,33)] e cinco carbonos do tipo CH<sub>2</sub> ( $\delta$  23,06,  $\delta$  30,81,  $\delta$  32,62,  $\delta$  38,50 e  $\delta$  50,79).

As análises dos espectros bidimensionais HSQC (ANEXO P), HMBC (ANEXO Q) e COSY (ANEXO R) permitiram a construção da Tabela 14 e o estabelecimento das relações entre os diferentes carbonos e hidrogênios do composto O-2.

**Tabela 14.** Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto O-2 observados nos espectros de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C, com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados.

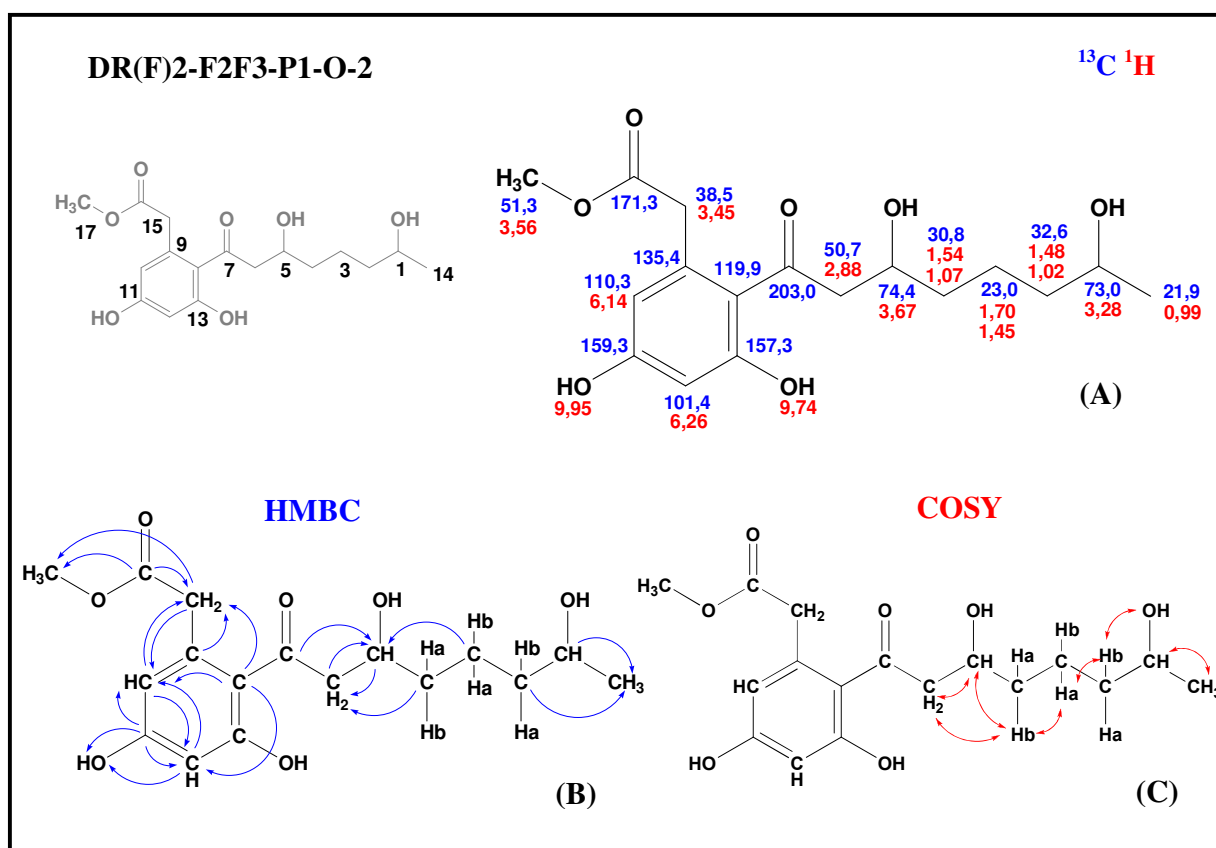
DR(F)2-F2F3-P1-O-2					
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	HMBC	COSY
1	73,00	CH	3,28 (m)	14	2b, 14
2	32,62	CH <sub>2</sub>	(a) 1,48 (d, 14,28); (b) 1,02 (m)	14	(b) 1, 3a
3	23,06	CH <sub>2</sub>	(a) 1,70 (d, 12,72); (b) 1,45 (m)	5	(a) 2b, 4b
4	30,81	CH <sub>2</sub>	(a) 1,54 (d, 12,56); (b) 1,07 (m)	6	(a) 4b; (b) 3a, 4a, 5
5	74,44	CH	3,67 (m)	6	4b, 6
6	50,79	CH <sub>2</sub>	2,88 (m)	5	-
7	203,09	-	-	5, 7	-
8	119,90	-	-	10, 12, 15	-
9	135,44	-	-	15	-
10	110,36	CH	6,14 (d, 2,12)	12, 15	-
11	159,34	-	-	10, 11-OH, 12	-
12	101,41	CH	6,26 (d, 2,12)	10, 11-OH	-
13	157,34	-	-	12	-
14	21,93	CH <sub>3</sub>	0,99 (d, 6,16)	-	-
15	38,50	CH <sub>2</sub>	3,45 (m)	10, 17	-
16	171,34	-	-	15, 17	-
17	51,33	CH <sub>3</sub>	3,56 (s)	-	-
11-OH	-	-	9,95 (s)	11, 12	-
C-OH	-	-	9,74 (s)	-	-

A análise do espectro de HMBC do composto O-2 indicou correlações à longa distância de C-7 ( $\delta$  203,09) com H-5 ( $\delta$  3,67) e H-7 ( $\delta$  3,67); C-6 ( $\delta$  50,79) com H-5 ( $\delta$  3,67); C-5 ( $\delta$  74,44) e C-4 ( $\delta$  30,81) com H-6 ( $\delta$  2,88); C-3 ( $\delta$  23,06) com H-5 ( $\delta$  3,67); C-2 ( $\delta$  32,62) com H-14 ( $\delta$  0,99) e C-1 ( $\delta$  73,00) com H-14 ( $\delta$  0,99) indicando a presença de uma cadeia de oito carbonos (Figura 43 – B; Figura 46 – A e C).

Foram observadas ainda, correlações de C-8 ( $\delta$  119,90) com H-10 ( $\delta$  6,14), H-12 ( $\delta$  6,26) e H-15 ( $\delta$  3,45); de C-9 ( $\delta$  135,44) com H-15 ( $\delta$  3,45); de C-10 ( $\delta$  110,36) com H-12 ( $\delta$  6,26) e H-15 ( $\delta$  3,45); de C-11 ( $\delta$  159,34) com H-10 ( $\delta$  6,14), 11-OH ( $\delta$  9,95) e H-12 ( $\delta$  6,26); de C-12 ( $\delta$  101,41) com H-10 ( $\delta$  6,14) e 11-OH ( $\delta$  9,95), de C-13 ( $\delta$  157,34) com H-12 ( $\delta$  6,26) e de C-15 ( $\delta$  38,50) com H-15 ( $\delta$  3,45) e H-17 ( $\delta$  3,56) indicando a presença de um anel aromático substituído na posição C-9 com uma cadeia de três carbonos contendo um éster (Figura 43 - B; Figura 46 – A e C).



As correlações observadas no espectro de COSY [H-1 ( $\delta$  3,28) com H-2b ( $\delta$  1,02) e H-14 ( $\delta$  0,99); H-2b ( $\delta$  1,02) com H-1 ( $\delta$  0,99) e H-3a ( $\delta$  1,7); H-3a ( $\delta$  1,7) com H-2b ( $\delta$  1,02) e H-4b ( $\delta$  1,07); H-4a ( $\delta$  1,54) com H-4b ( $\delta$  1,07); H-4b ( $\delta$  1,07) com H-3a ( $\delta$  1,7), H-4a ( $\delta$  1,54) e H-5 ( $\delta$  3,67) e H-5 ( $\delta$  3,67) com H-4b ( $\delta$  1,07) e H-6 ( $\delta$  2,88) confirmaram as relações indicadas entre os carbonos da cadeia carbônica (Figura 43 – C; Figura 46 – B e D).



**Figura 43.** Composto O-2: (A) valores de deslocamento químicos dos hidrogênios e carbonos observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ; (B) correlações observadas no espectro de HMBC; (C) correlações observadas no espectro de COSY.

No entanto, o espectro de massas do composto DR(F)2-F2F3-P1-JKL-O2 (Figura 44) em modo *eletrospray* apresentou, em modo positivo, o pico do aduto de sódio  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  em  $m/z$  345,2 Da e, em modo negativo, o pico de  $[\text{M}-\text{H}]^-$  em  $m/z$  321,1 Da, ambos compatíveis com a massa ( $m = 322$  Da), a partir de qual foi determinada a fórmula molecular do composto ( $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$ ), que indicou uma estrutura bicíclica para o composto O-2, segundo duas hipóteses (H1 e H2) (Figura 45).

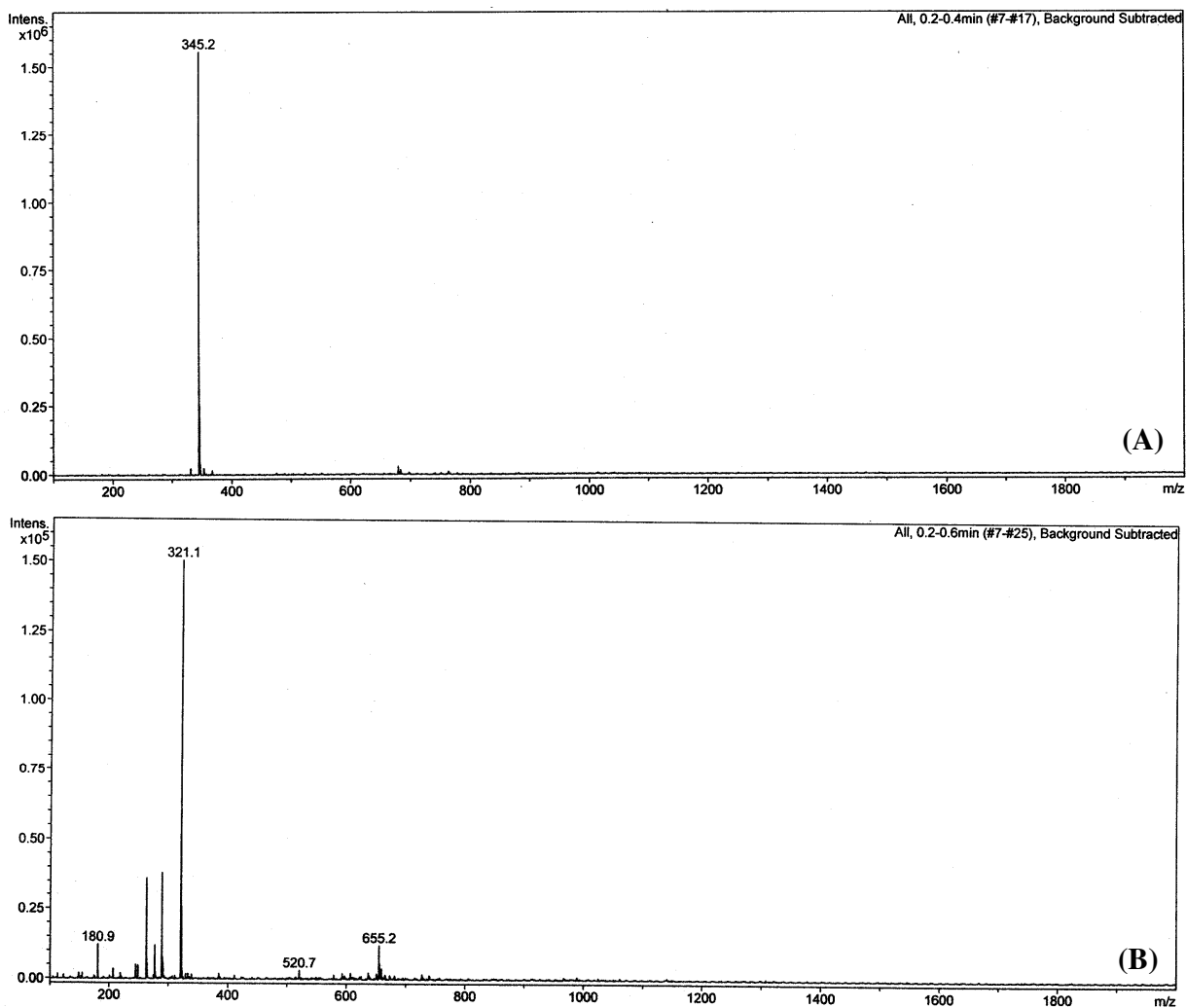


Figura 44. Espectros de massas do composto O-2: (A) modo positivo; (B) modo negativo.

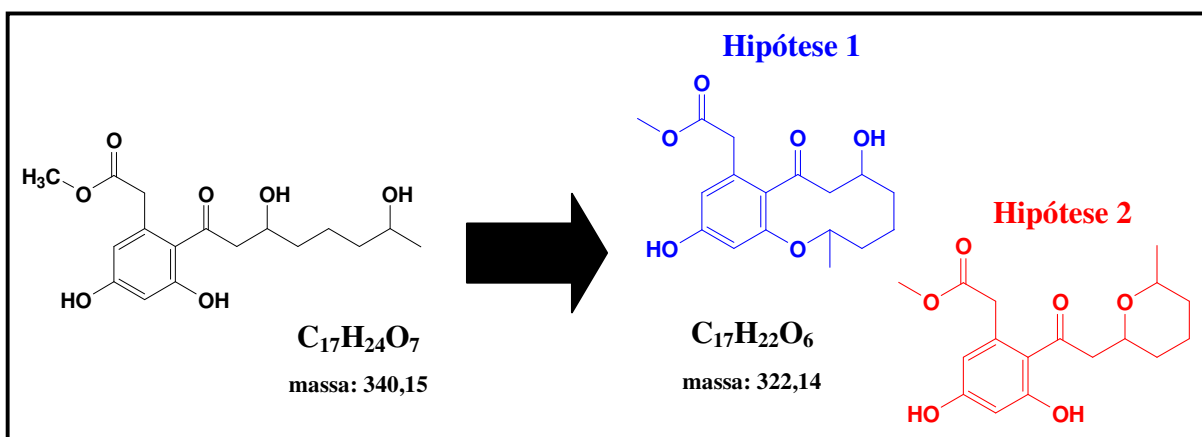
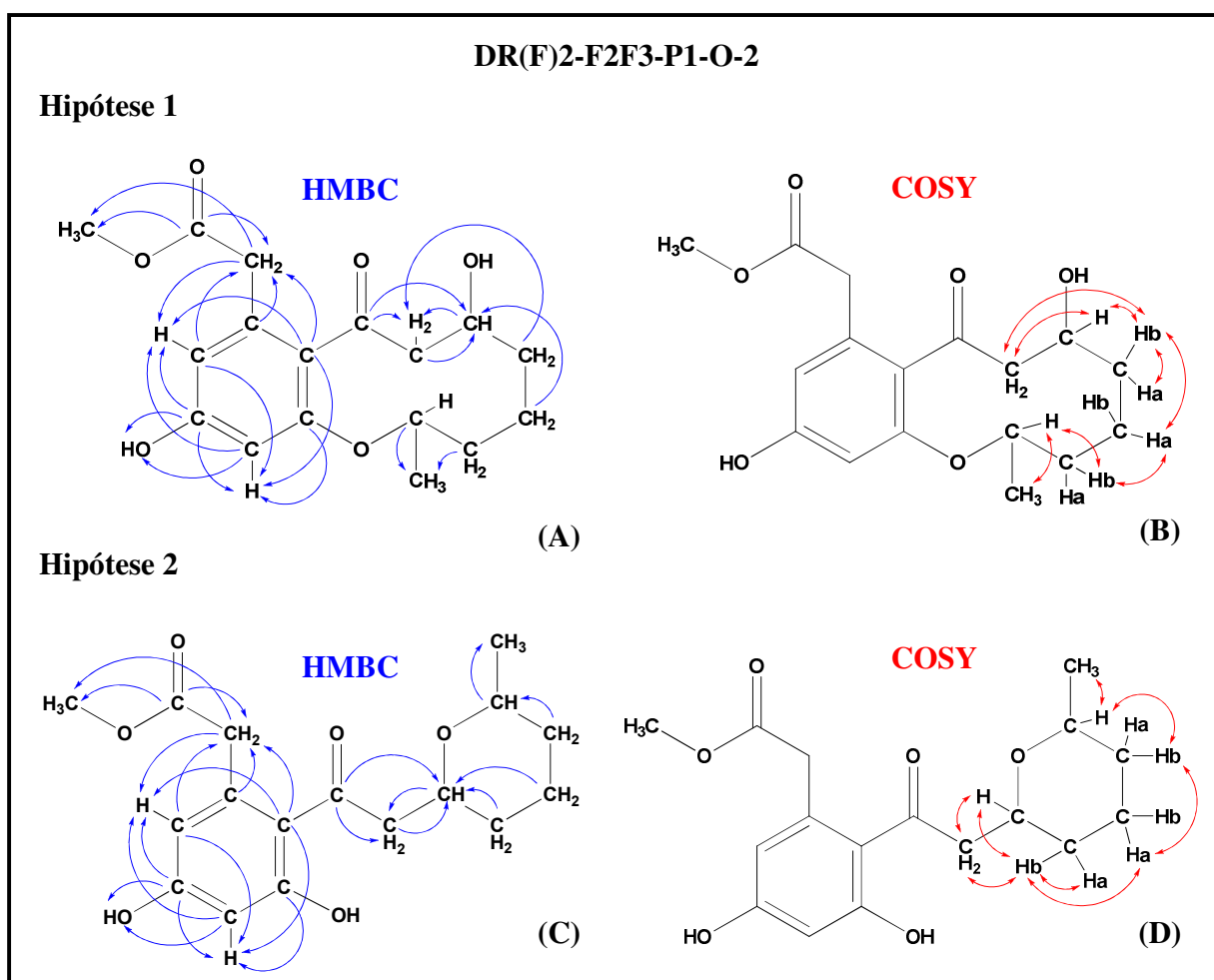


Figura 45. Esquema representativo das estruturas do composto O-2 segundo as distintas hipóteses.

A partir destes dados foi possível indicar as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY para as duas hipóteses estruturais do composto O-2 (Figura 46). No entanto, em ambos os casos não foram observadas correlações que possam confirmar a estrutura do composto O-2, sendo necessária a obtenção de espectros de RMN com outras condições, como mudança do solvente deuterado em que a amostra foi diluída e realização do experimento de HMBC com outra constante de acoplamento.



**Figura 46.** Correlações observadas para o composto O-2: Hipótese 1 - (A) HMBC, (B) COSY; Hipótese 2 - (C) HMBC; (D) COSY.

Os sinais observados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ANEXO N e ANEXO O) para o composto DR(F)2-F2F3-P1-O-2 foram semelhantes aos obtidos para o composto DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4 (ANEXO S e ANEXO T), indicando que são compostos de estrutura similar (Tabela 15).

**Tabela 15.** Dados espectroscópicos do composto O-2 em comparação aos dados do composto JKL-4 (RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C e DEPT).

DR(F)2-F2F3-P1-O-2				DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4		
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	DEPT	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	Integral	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)
1	73,00	CH	3,28 (m)	73,10	-	3,30 (m)
2	32,62	CH <sub>2</sub>	(a) 1,48 (d, 14,28); (b) 1,02 (m)	32,67	2H	(a) 1,47 (d, 13,74); (b) 1,02 (?)
3	23,06	CH <sub>2</sub>	(a) 1,70 (d, 12,72); (b) 1,45 (m)	23,10	2H	(a) 1,69 (tt, 6,5); (b) 1,42 (tt, 12,84/3,72)
4	30,81	CH <sub>2</sub>	(a) 1,54 (d, 12,56); (b) 1,07 (m)	30,84	2H	(a) 1,55 (d, 12,12); (b) 1,04 (?)
5	74,44	CH	3,67 (m)	74,35	1H	3,66 (m)
6	50,79	CH <sub>2</sub>	2,88 (m)	50,77	2H	2,89 (m)
7	203,09	-	-	203,90	-	-
8	119,90	-	-	120,07	-	-
9	135,44	-	-	184,85	-	-
10	110,36	CH	6,14 (d, 2,12)	110,21	1H	6,12 (s)
11	159,34	-	-	159,20	-	-
12	101,41	CH	6,26 (d, 2,12)	101,13	1H	6,22 (s)
13	157,34	-	-	157,17	-	-
14	21,93	CH <sub>3</sub>	0,99 (d, 6,16)	22,01	3H	0,99 (d, 6,06)
15	38,50	CH <sub>2</sub>	3,45 (m)	39,10	-	3,36 (s)
16	171,34	-	-	172,39	-	-
17	51,33	CH <sub>3</sub>	3,56 (s)	-	-	-
11-OH	-	-	9,95 (s)	-	-	9,69 (s)
C-OH	-	-	9,74 (s)	-	-	9,9 (s)
16-OH	-	-	-	-	-	12 (s)

A diferença nas estruturas de ambos compostos está na presença/ausência de uma metila ligada ao grupo do ácido carboxílico, que pode ser observada a partir da comparação entre os espectros de <sup>13</sup>C, no qual é possível observar a presença do sinal de um carbono de metila com deslocamento químico  $\delta$  51,3 no espectro do composto O-2, ausente no espectro do composto JKL-4 (Figura 47).

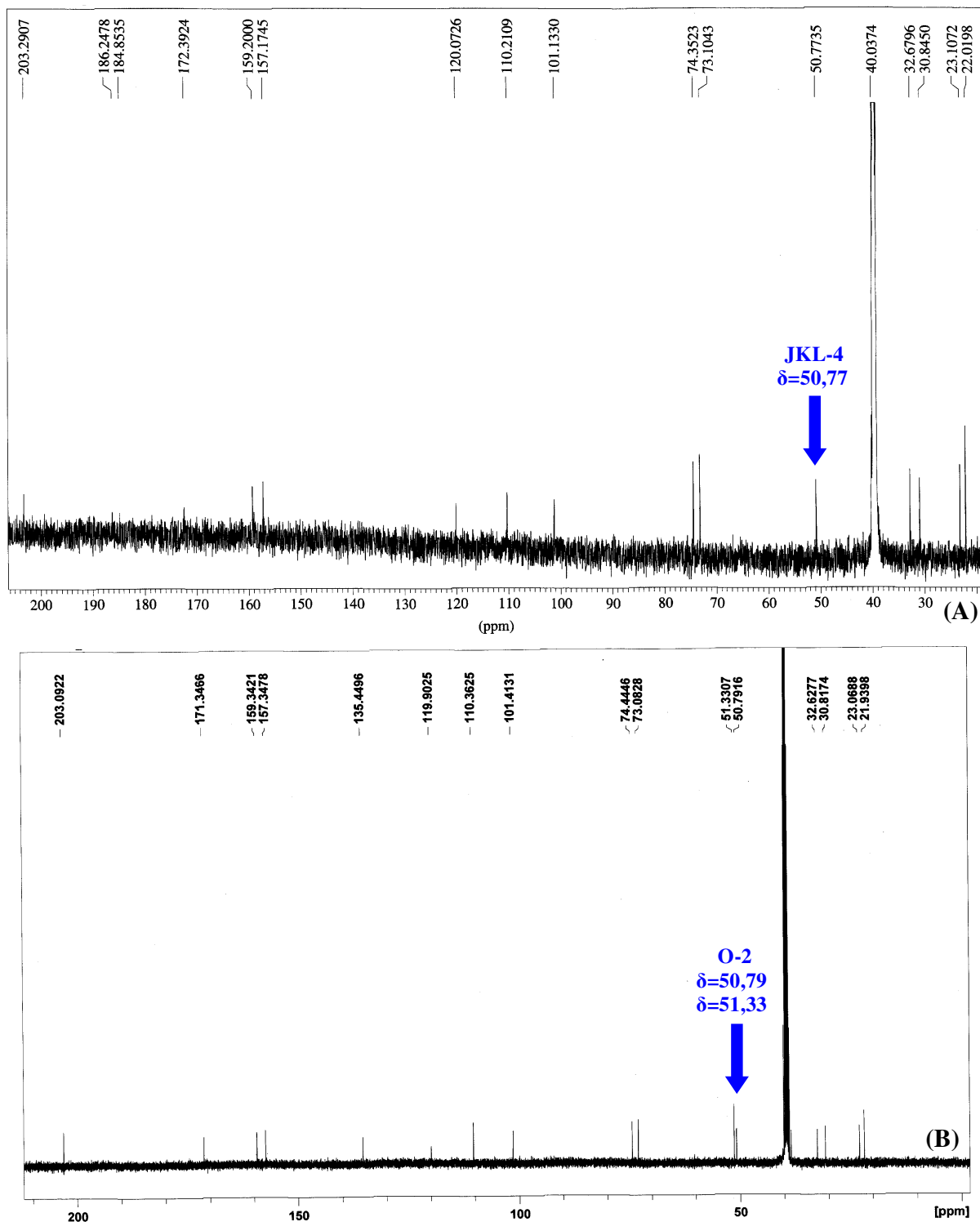


Figura 47. Comparação entre os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  dos compostos JKL-4 (A) e O-2 (B).

De forma análoga, a partir da presença do sinal de hidrogênio com deslocamento químico  $\delta$  12 no espectro do JKL-4 e do sinal dos hidrogênios com deslocamento químico  $\delta$  3,56 que acoplam com o C-17 ( $\delta$  51,33) no espectro do composto O-2 (Figura 48).

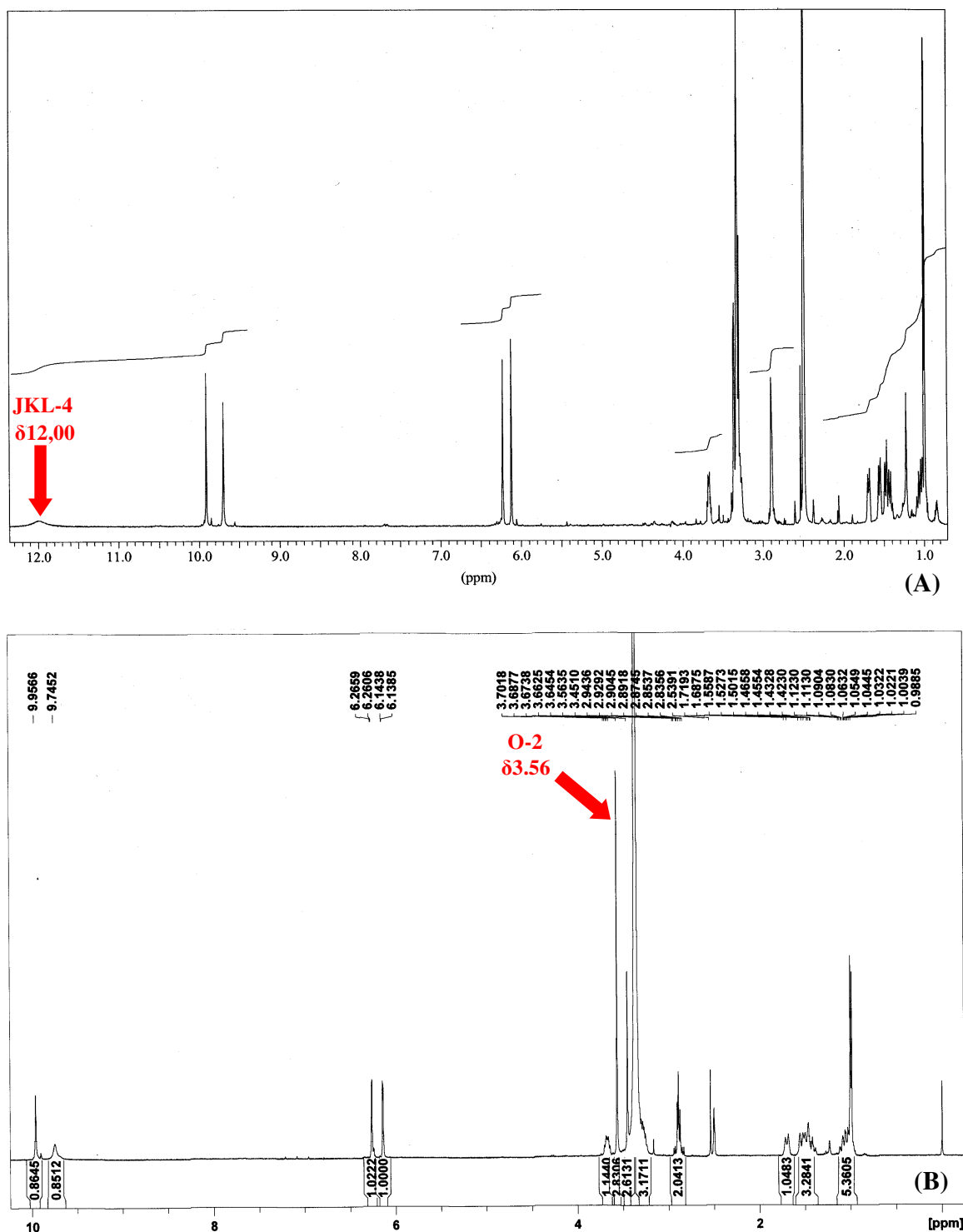
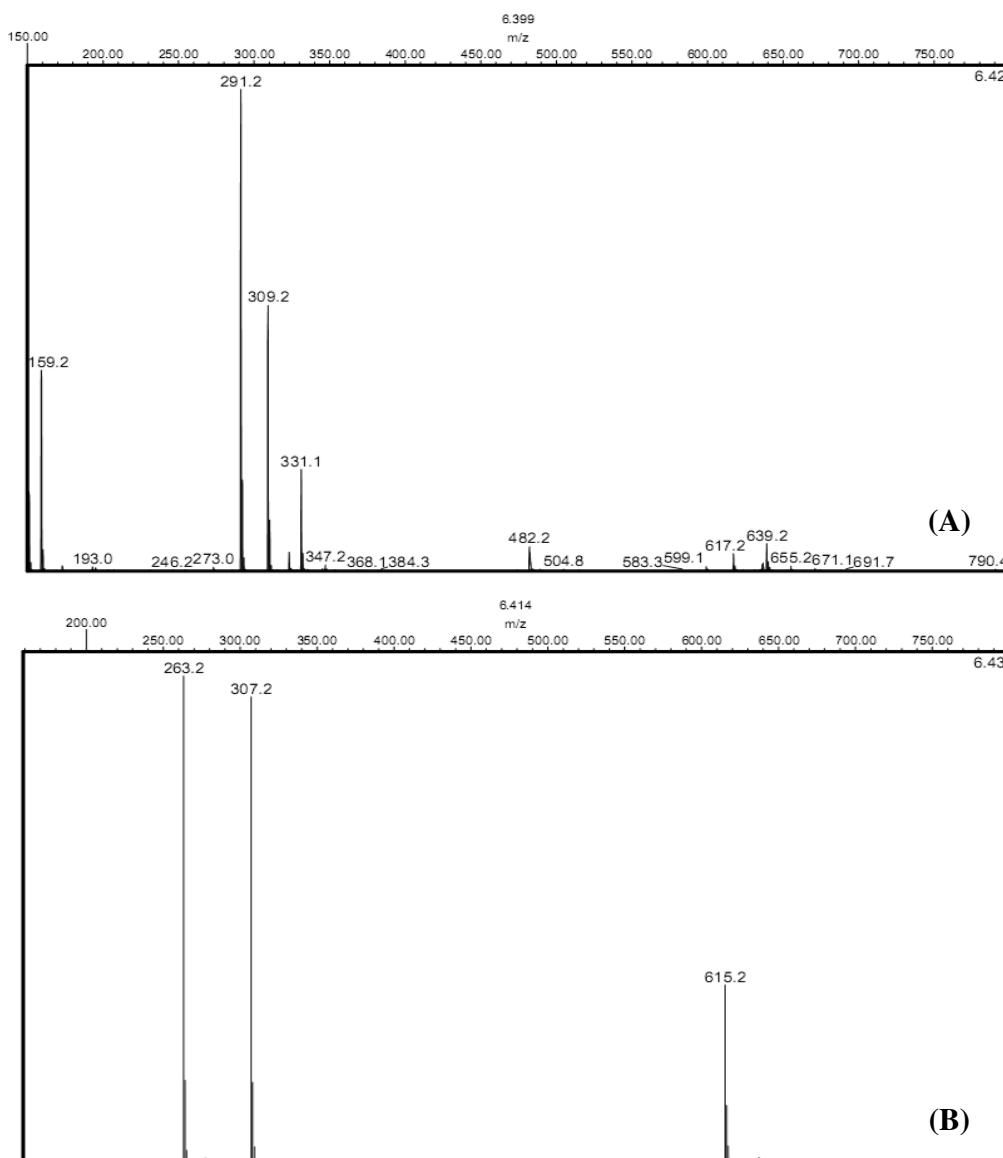


Figura 48. Comparação entre os espectros de RMN- $^1\text{H}$  dos compostos JKL-4 (A) e O-2 (B).

A partir dos dados obtidos por espectrometria de massas em modo *eletrospray* foi observado, em modo positivo, o pico do aduto de sódio  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  309,2 Da e o dímero do composto, também formando o aduto de sódio, com  $m/z$  639,2 Da. E, em modo negativo foi observado o pico de  $[M-H]^-$  em  $m/z$  307,2 Da, sendo possível concluir que a massa do composto é  $m=308$  Da (Figura 49).



**Figura 49.** Espectros de massas do composto JKL4: (A) modo positivo; (B) modo negativo.

O valor da massa ( $m=308$  Da) indica uma estrutura bicíclica de fórmula molecular  $C_{16}H_{20}O_6$  para o composto JKL-4. E, de forma similar ao O-2, existem duas hipóteses estruturais (H1 e H2) não solucionadas para a estrutura deste composto. (Figura 50)

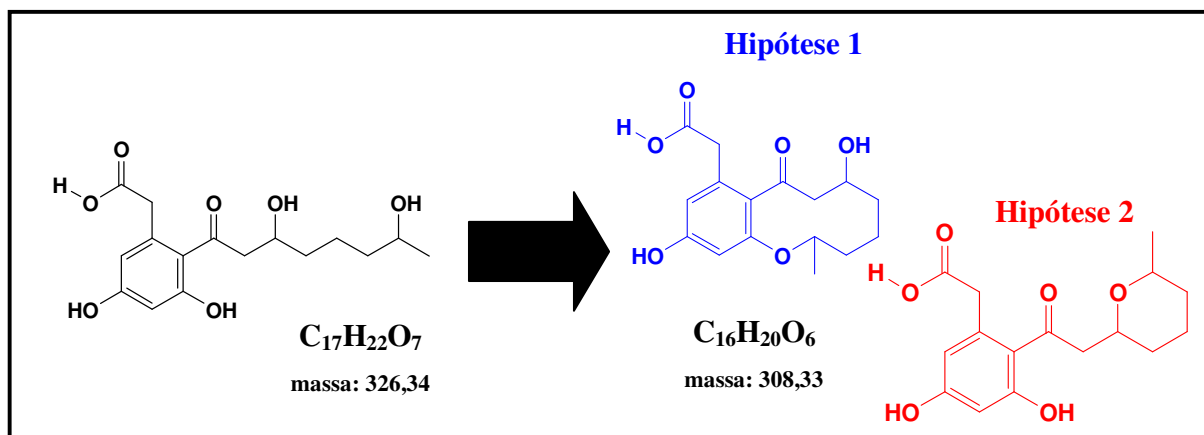


Figura 50. Esquema representativo das possíveis do composto JKL-4 segundo as distintas hipóteses.

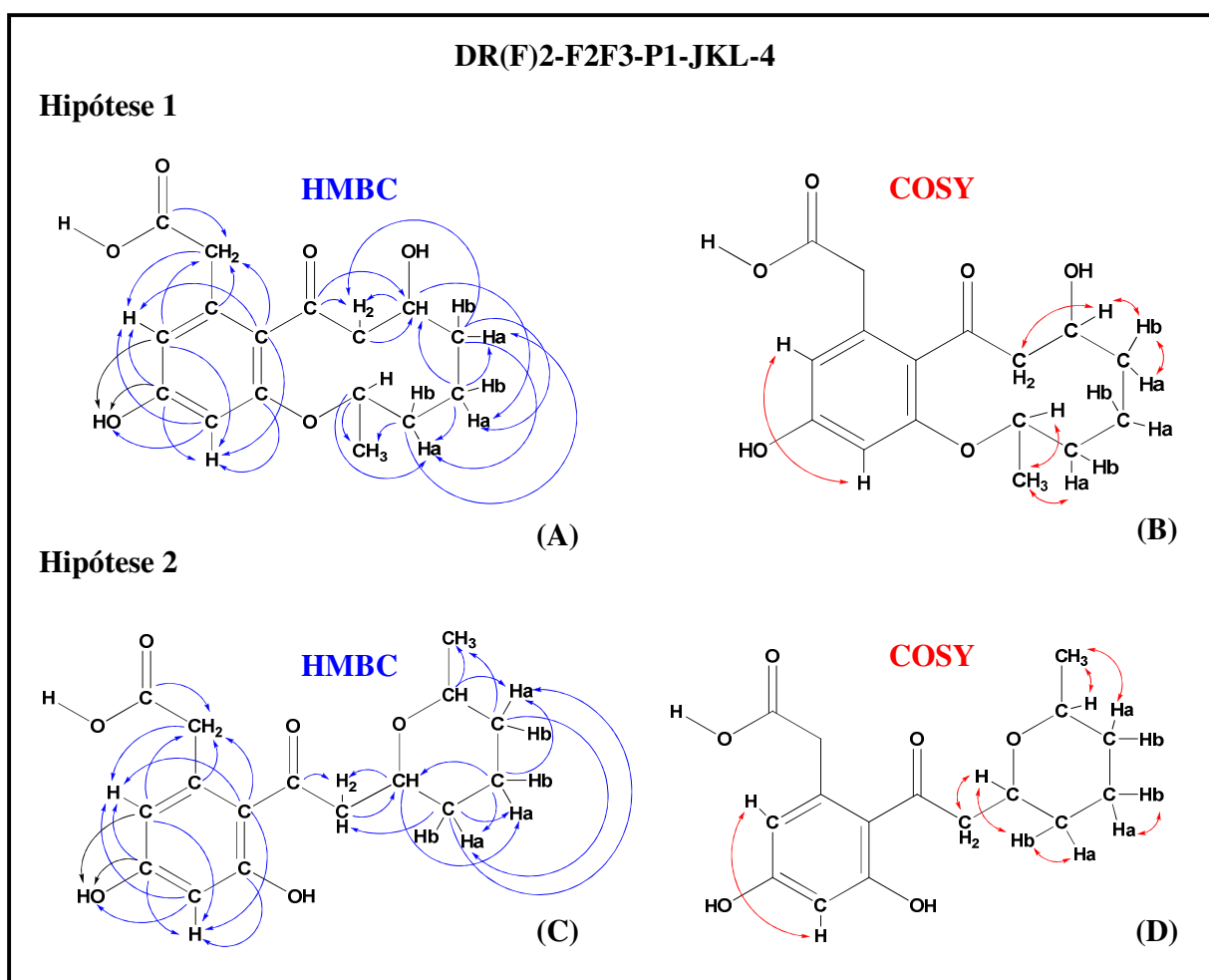
Adicionalmente, as análises dos espectros bidimensionais HSQC (ANEXO U), HMBC (ANEXO V) e COSY (ANEXO W) permitiram a construção da Tabela 16 e o estabelecimento das relações entre os diferentes carbonos e hidrogênios do composto DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4.

**Tabela 16.** Valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos do composto JKL-4 com os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz) e a multiplicidade dos sinais observados e as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY

DR(F)2-F2F3-P1-JKL-4					
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	Integral	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz)	HMBC	COSY
1	73,10	-	3,30 (m)	14	14
2	32,67	2H	(a) 1,47 (d, 13,74); (b) 1,02 (?)	4a, 14	(a) 14
3	23,10	2H	(a) 1,69 (tt, 6,5); (b) 1,42 (tt, 12,84/3,72)	2a, 4a, 4b, 5	(a) 4b; (b) 4a, 5
4	30,84	2H	(a) 1,55 (d, 12,12); (b) 1,04 (?)	2a, 3a, 6	4b, 6
5	74,35	1H	3,66 (m)	3a, 6	5
6	50,77	2H	2,89 (m)	5	-
7	203,90	-	-	5, 6	-
8	120,07	-	-	10, 12, 15	-
9	184,85	-	-	-	-
10	110,21	1H	6,12 (s)	11-OH, 12, 15	12
11	159,20	-	-	10, 11-OH, 12	-
12	101,13	1H	6,22 (s)	10, 11-OH, C-OH	10
13	157,17	-	-	12, C-OH	-
14	22,01	3H	0,99 (d, 6,06)	-	1, 2a
15	39,10	-	3,36 (s)	10	-
16	172,39	-	-	15	-
11-OH	-	-	9,69 (s)	10, 11, 12	-
16-OH	-	-	12 (s)	-	-
C-OH	-	-	9,9 (s)	12, 13	-



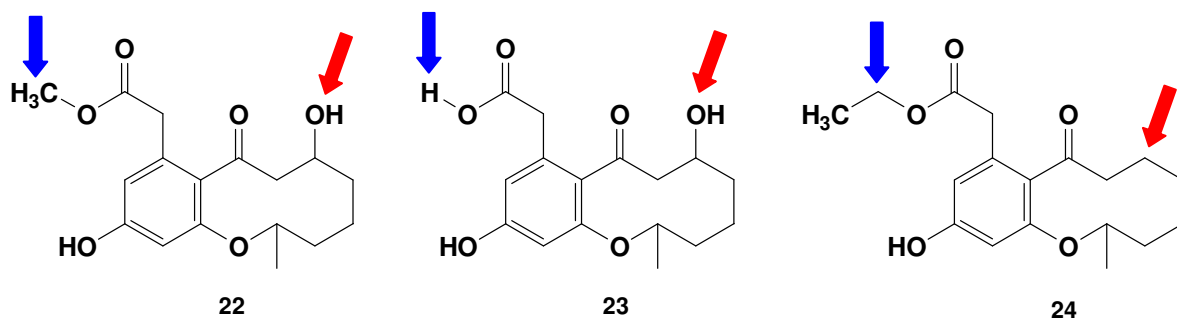
A partir destes dados foi possível indicar as correlações observadas nos espectros de HMBC e COSY para as duas hipóteses estruturais do composto JKL-4 (Figura 51). No entanto, assim como o composto O-2, em ambos os casos não foram observadas correlações que possam confirmar a estrutura do composto, sendo necessários experimentos adicionais semelhantes aos indicados para o composto O-2, com a finalidade de confirmar sua estrutura.



**Figura 51.** Correlações observadas para o composto JKL-4: Hipótese 1 - (A) HMBC, (B) COSY; Hipótese 2 - (C) HMBC; (D) COSY.

Considerando as duas hipóteses estruturais para ambos os compostos, foi possível verificar que os compostos O-2 e JKL-4 são inéditos na literatura. A estrutura mais similar encontrada para a Hipótese 1 de ambos os compostos foi a da phomopsina B (Figura 52), isolada a partir do fungo endofítico de mangue *Phomopsis* sp., a qual apresentou baixa atividade

antimicrobiana (CIM >128  $\mu\text{g/mL}$ ) contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 271754), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Fusarium oxysporum*, quando comparada aos controles positivos gentamicina e nistatina, que apresentaram CIM entre 2 e 4  $\mu\text{g/mL}$  (HUANG *et al.*, 2008). Para a hipótese 2 de ambos compostos, não foi encontrada estrutura similar passível de comparação.



**Figura 52.** Estrutura planar dos compostos (22) O-2 (Hipótese 1), (23) JKL-4 (Hipótese 1) e (24) phomopsina B.

## 5. CONCLUSÕES

O método utilizado para isolamento de fungos a partir de amostras de esponjas marinhas foi aplicado com sucesso, tendo em vista a obtenção de uma alta diversidade de fungos filamentosos (24 ribotipos distintos de 32 isolados avaliados) obtidos a partir da esponja *Drasmodon reticulatum*. O isolamento de fungos pertencentes a gêneros não descritos na literatura para o ambiente marinho, como *Myrmecridium* e *Westerdykella*, e de fungos descritos recentemente como novas espécies, como é o caso do *Penicillium decaturense* e do próprio *Myrmecridium* sp., reafirmam a adequação do método utilizado. Do ponto de vista biotecnológico, as linhagens isoladas se mostraram interessantes pelo fato de não terem sido estudadas para o isolamento de metabólitos secundários anteriormente ou por apresentarem espécies já descritas como produtoras de compostos com significativa atividade biológica, como é o caso dos gêneros *Westerdykella* e *Sporisdesmium*.

As informações taxonômicas obtidas foram relevantes no processo de seleção das linhagens a serem submetidas à purificação de compostos, pois permitiram a consulta à literatura disponível e a verificação das linhagens mais promissoras para o isolamento de compostos bioativos inéditos. Dentre os 40 isolados obtidos, 65% (26) apresentaram resultados interessantes de atividade citotóxica e/ou antimicrobiana, demonstrando o potencial biotecnológico que os fungos derivados do ambiente marinho possuem, em especial isolados a partir de esponjas. O depósito destes isolados na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) permitirá que estudos envolvendo outras aplicações biotecnológicas possam ser realizados.

O estudo do perfil químico dos extratos produzidos a partir das linhagens previamente selecionadas pela atividade biológica foi efetivo e possibilitou o isolamento e a determinação estrutural de quatro compostos, dos quais três inéditos na literatura, indicando que a abordagem de seleção utilizada foi eficiente na priorização de linhagens para produção e isolamento de metabólitos secundários.

A semelhança estrutural do composto I-6 com a oxocurvularina e a  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina, conhecidos por sua atividade nematocida, fitotóxica e citotóxica, indica que o composto isolado pode apresentar atividade relacionada, evidenciando seu interesse biotecnológico, não apenas como possível fármaco. A hipótese estrutural 1 de ambos compostos

JKL-4 e O-2 possuem estrutura similar ao composto phomopsina B, isolado a partir do fungo *Phomopsis* sp., no entanto, não foram encontradas estruturas passíveis de comparação para a estrutura indicada na hipótese 2.

A confirmação do potencial biotecnológico dos compostos isolados a partir do fungo *Penicillium decaturense* evidencia a efetividade da seleção das linhagens como produtoras de metabólitos de interesse biotecnológico e a necessidade de continuidade dos estudos deste isolado e das linhagens *Streptomyces* sp. DR(M3)6, *Westerdykella* sp. DR(M2)4, e *Sporidesmium* sp. DR(M3)1, também selecionadas no presente estudo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADAMS, P. B. Comparison of isolates of *Sporidesmium sclerotivorum* in vitro and in soil for potencial as active agents in microbial pesticides, **Phytopathology**, v. 77, p. 575-578, 1987.
- AGATSUMA, T.; KANDA, Y.; ONODERA, H.; MATSUSHITA, N.; OGAWA, T.; AKINAGA, S.; SOGA, S. International Patent No. WO 2004/024141, 2004.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. New York: John Wiley. 1996. 869 p.
- AMAGATA, T.; AMAGATA, A.; TENNEY, K.; VALERIOTE, F. A.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; CREWS, P. Unusual C25 steroids produced by a sponge-derived *Penicillium citrinum*, **Organic Letters**, v. 5, p. 4393-4396, 2003.
- ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J. Z.; GAMS, W.; BRAUN, U.; SHIN, H-D.; CROUS, P. W. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of Ramichloridium and allied genera, **Studies in Micology**, v. 58, p. 57-93, 2007.
- BAKER, P. W.; KENNEDY, J.; DOBSON, A. D. W.; MARCHESI, J. R. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona simulans* isolated from Irish Coastal Waters, **Marine Biotechnology**, v. 11, p. 540-547, 2009.
- BARNATHAN, G.; KORNPORST, J-M.; DOUMENQ, P.; MIRALLES, J. New unsaturated long-chain fatty acids in the phospholipids from the Axinellida sponges *Trikentrion ioeve* and *Pseudaxinella* cf. *lunaecharta*, **Lipids**, v. 31, n. 2, p. 193-200, 1996.
- BASTOS, V. Inovação farmacêutica: padrão setorial e perspectivas para o caso brasileiro, **BNDES Setorial**, n. 22, p. 271-296, 2005.
- BETTUCCI, L.; MALOVAREZ, I.; DUPONT, J.; BURY, E.; ROQUEBERT, M-F. Paraná river delta wetlands soil microfungi, **Pedobiologia**, v. 46, p. 606-623, 2002.
- BRAUERS, G.; EDRADA, R. U.; EBEL, R.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; BERG, A.; GRÄFE, U.; SCHÄCHTELE, C.; TOTZKE, F.; FINKENZELLER, G.; MARME, D.; KRAUS, J.; MÜNCHBACH, M.; MICHEL, M.; BRINGMANN, G.; SCHAUMANN, K. Anthraquinones and Betaenone Derivatives from the Sponge-Associated Fungus *Microsphaeropsis* Species: Novel Inhibitors of Protein Kinases, **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 6, 2000.
- BRINGMANN, G.; LANG, G.; STEFFENS, S.; SCHAUMANN, K. Petrosifungins A and B, novel cyclodepsipeptides from a sponge-derived strain of *Penicillium brevicompactum*, **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 312-315, 2004.
- BLUNT, J. W.; COPP, B.R.; HU, W-P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE P.T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products, **Natural Products Reports**, v. 26, p. 170-244, 2009.

- BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms, **Natural Products Reports**, v. 21, p. 143-163, 2004.
- BULL, A. T.; STACH, E. M.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions, **Antonie van Leeuwenhoek**, n. 87, p. 65-79, 2005.
- BULL, A. T.; STACH, J. E. M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery, **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 491-499, 2007.
- CAPUTO, O.; VIOLA, F. Isolation of a  $\alpha,\beta$ -dehidrocurvularina from *Aspergillus aureofulgens*. **Planta Medica**, v. 31, 1977.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in man in sterile distilled water, Further researches, **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.
- CRISTANCHO, J. A. M.; UMBREIT, F. N.; SANTOS-ACEVEDO, M.; NIEVES, J. S. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas, **Revista Española de Quimioterapia**, v. 21, n. 3, p. 174-179, 2008.
- CRUZ, A. C. R.; GUSMÃO, L. F. P. Fungos conidiais na Caatinga: espécies associadas ao folheto, **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 4, p. 999-1012, 2009.
- DA SILVA, M.; PASSARINI, M. R. Z.; BONUGLI, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening, **Environmental Technology**, v. 29, n. 12, p. 1331-1339, 2008.
- DE SILVA, E. D.; GEIERMANN, A.-S.; MITOVA, M. I.; KUEGLER, P.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species, **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 477-479, 2009.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.
- DHARMARAJ, S.; SUMANTHA, A. Bioactive potential of *Streptomyces* associated with marine sponges, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1971-1979, 2009.
- DOMSCH, K. K.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. New York: Academic Press. 1980.
- EGOROVA, L. N. Soil ascomycetes of the Russian Far East, **Mikologiya i Fitopatologiya**, v. 37, n. 2, p. 13-21, 2003.
- EIN-GIL, N.; ILAN, M.; CARMELI, S.; SMITH, G.; PAWLIK, J. R.; YARDEN, O. Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*, **The ISME Journal**, v. 3, n. 6, p. 752-755, 2009.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. England: Commonwealth Mycological Institute. 1971. 608 p.

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. England: Commonwealth Mycological Institute. 1976. 507 p.

FENICAL, W.; JENSEN, P. R. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria, **Nature Chemical Biology**, v. 2, n 12, p. 666-673, 2006

GANDHIMATHI, R.; ARUNKUMAR, M.; SELVIN, J.; THANGAVELU, T.; SVARAMAKRISHNAN, S.; KIRAN, G. S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes, **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 16-22, 2008.

GESNER, S.; COHEN, N.; ILAN, M.; YARDEN, O.; CARMELI, S. Pandangolide 1a, a metabolite of the sponge-associated fungus *Cladosporium* sp., and the absolute stereochemistry of pandangolide 1 and iso-cladospolide B, **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1350-1353, 2005.

GHOSH, M.; NANDA, G. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.12, p. 4620-4623, 1994.

GREVE, H.; SCHUPP, P. J.; EGUEREVA, E.; KEHRAUS, S.; KELTER, G.; MAIER, A.; FIEBIG, H-H.; KÖNIG, G. M. Apralactone A and a new stereochemical class of curvularins from the marine fungus *Curvularia* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 5085-5092, 2008

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUTIERREZ, G.; THEODULOZ, C.; RODRIGUEZ, J.; LOLAS, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Bioactive metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main apple canker agent in Chile, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 53, p. 7701-7708, 2005.

HE, J.; KITHSIRI WIJERATNE, E. M.; BASHYAL, B. P.; ZHAN, J.; SELIGA, C. J.; LIU, M. X.; PIERSON, E. E.; PIERSON, L. S.; VANETTEN, H. D.; LESLIE GUNATILAKA, A. A. Cytotoxic and Other Metabolites of *Aspergillus* Inhabiting the Rhizosphere of Sonoran Desert Plants. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 1985-1991, 2004.

HEO, J-C.; PARK, J-Y.; WOO, S-U.; RHO, J-R.; LEE, H-J.; KIM, S-U.; KHO, Y-H.; LEE, S-H. Dykellic acid inhibits cell migration and tube formation by RhoA-GTP expression, **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2256-2259, 2006.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HIORT, J.; MAKSIMENKA, K.; REICHERT, M.; PEROVIC-OTTSTADT, S.; LIN, W.H.; WRAY, V.; STEUBE, K.; SCHAUMANN, K.; WEBER, H.; PROKSCH, P.; EBEL, R.; MULLER, W.E.G.; BRINGMANN, G. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*, **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1532-1543, 2004.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Three New Metabolites from Marine-Derived Fungi of the Genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 114-118, 1999.

HOGG, S. **Essential Microbiology**. New York: John Wiley. 2005. 468 p.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1604-1608, 2008.

JADULCO, R.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; SUDARSONO; BERG, A.; GRAFE, U. New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*, **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 527-530, 2001.

JADULCO, R.; BRAUERS, G.; EDRADA, R. A.; EBEL, R.; WRAY, V.; SUDARSONO; PROKSCH, P. New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*, **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 730-733, 2002.

LAM, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, **Current opinion in Microbiology**, v. 9, p. 245-251, 2006.

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

KEUSGEN, M.; YU, C-M, CURTIS, J. M.; BREWER, D.; AYER, S. W. A Cerebroside from the Marine Fungus *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Höhn. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 5, p. 465-468, 1996.

KIM, K.; KIM, P. D.; ALKER, A. P.; HARVELL, C. D. Chemical resistance of gorgonian corals against fungal infections, **Marine Biology**, v. 137, p. 393-401, 2000.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1988. 115 p.

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

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine Mycology: The Higher Fungi**. New York, San Francisco & London: Academic Press. 1979. 690 p.

KOHMOTO, S.; KASHMAN, Y.; MCCONNELL, O. J.; RINEHART JR., K. L.; WRIGHT, A.; KOEHN, F. Dragmacidin, a new cytotoxic bis(indole) alkaloid from a deep water marine sponge, *Dragmacidon* sp. **Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 3116-3118. 1988.

KUSANO, M.; NAKAGAMI, K.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T.; SHIMADA, A.; KIMURA, Y.  $\beta\gamma$ -dehydrocurvularin and related compounds as nematocides of *Pratylenchus penetrans* from the fungus *Aspergillus* sp. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 6, p. 1413-1416, 2003.



- JIANG, S-J.; QIANG, S.; ZHU, Y-Z.; DONG, Y-F. Isolation and phytotoxicity of a metabolite from *Curvularia eragrostidis* and characterisation of its modes of action. **Annals of Applied Biology**, n. 152, p. 103-111, 2008.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: GOODFELLOW, M.; STACKEBRANDT, E.; editors. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons. 1991. p. 115-147.
- LEE, H-J.; CHUNG, M-C.; LEE, C-H.; Y, B-S.; CHUN, H-K. Gelastatins A and B, new inhibitors of gelatinase A from *Westerdykella multisporea* F50733, **Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 4, p. 357-359, 1997.
- LEE, H-J.; LEE, C-H.; CHUNG, M-C.; CHUN, H-K.; RHEE, J-S.; KHO, Y-H. Dykelllic acid, a novel apoptosis inhibitor from *Westerdykella multisporea* F50733, **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 6949-6950, 1999.
- LEE, S-H.; YOUK, E-S.; LEE, H-J.; KHO, Y-H.; KIM, H-M.; KIM, S-U. Dykelllic acid inhibits drug-induced caspase-3-like protease activation, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, p. 539-544, 2003.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbial evolution, systematics and taxonomy. In: **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall. 1997. 986 p.
- MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil, **Microbiological Research** 2006, 2009. doi:10.1016/j.micres.2009.09.005.
- MILANETTO, M. C. **Investigação da origem metabólica de derivados da esculetina ativos contra o vírus da SARS**. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Físico-química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil, **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 281, p. 1-12, 2002.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOTHE, B.; DE CAMPOS, M. A.; LERNER, C. B.; FERREIRA-CORREIA, M. M. Esponjas (Demospongiae, Halichondrida) da costa do Maranhão, Brasil, **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, n. 2, p. 149-154, 2004.

MUNRO, H. D.; MUSGRAVE, C. O.; TEMPLETON, R. Curvularin. Part V. The compound C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>,  $\alpha,\beta$ -dehydrocurvularin. *Journal of the Chemical Society C - Organic*, v. 10, p. 947-948, 1976.

NA, M.; MEUJO, D. A. F.; KEVIN, D., HAMANN, M. T.; ANDERSON, M.; HILL, R. T. A new antimalarial polyether from a marine *Streptomyces* sp. H668, **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 6282–6285, 2008.

NEWELL, S. Y. Mangrove fungi: the succession in mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings. In: E. B. G. Jones. **Recent Advances in Aquatic Mycology**. London: Elek Science. 1976. p. 51-91.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W.; editors. **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. Wallingford, CT: CAB International. 1993. p. 225-233.

PEDPRADAB, S.; EDRADA, R.; EBEL, R.; WRAY, V.; PROKSCH P. New  $\beta$ -carboline alkaloids from the Andaman Sea sponge *Dracmacidon* sp, **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2113-2116, 2004.

PETERSON, S. W.; BAYER, E. B.; WICKLOW, D. T. *Penicillium thiersii*, *Penicillium angulare* and *Penicillium decaturense*, new species isolated from wood-decay fungi in North America and their phylogenetic placement from multilocus DNA sequence analysis, **Mycologia**, v. 96, p. 1280-1293, 2004.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its telemorphics states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press. 1979. 635 p.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1985. 182 p.

PROKSCH, P.; EBEL, R.; EDRADA, R.; RIEBE, F.; LIU, H.; DIESEL, A.; BAYER, M.; LI, X.; LIN, W. H.; GREBENYUK, V.; MÜLLER, W. E. G.; DRAEGER, S.; ZUCCARO, A.; SCHULZ, B. Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. **Botanica Marina**, v. 51, p. 209-218, 2008.

RAEDER, J.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**. v. 1, p. 17-20, 1985.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkinson. 1965. 686 p.

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

SAMSOM, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi**. 6. ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 2002. 389 p.

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

SJÖSTRAND, U.; KORNPÖBST, J. M.; DJERASSI, C. Minor and trace sterols from marine invertebrates 29. (22E)-ergosta-5,22,25-trien-3 $\beta$ -ol and (22E,24R)-24,26-dimethylcholesta-5,22,25(27)-trien-3 $\beta$ -ol. Two new marine sterols from the sponge *Pseudaxinella lunacharta*, **Steroids**, v. 38, n. 3, p. 355-364, 1981. Abstract.

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

TEUSCHER, F.; LIN, W.; WRAY, V.; EDRADA, R.; PADMAKUMAR, K.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Two new cyclopentanoids from the endophytic fungus *Aspergillus sydowii* associated with the marine alga *Acanthophora spicifera*, **Natural Product Communications**, v. 1, n. 11, p. 927-933, 2006. Abstract.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**, 2. ed. São Paulo, SP: Ed. Atheneu. 1998.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. da S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VITA-MARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; DE SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*, **Química Nova**, v. 31, p. 1-5, 2008.

WANG, C-Y.; WANG, B-G.; BRAUERS, G.; GUAN, H-S.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Microsphaerones A and B, two novel  $\gamma$ -pyrone derivatives from the sponge-derived fungus *Microsphaeropsis sp.*, **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 5, p. 772-775, 2002.

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

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.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (ed.). **PCR protocols**. New York, N.Y: Academic Press. 1990. p. 315-322.

XIE, L. W.; OUYANG, Y. C.; ZOU, K.; WANG, G. H.; CHEN, M. J.; SUN, H. M.; DAI, S. K.; LI, X. Isolation and difference in anti-*Staphylococcus aureus* bioactivity of curvularin derivatives from fungus *Eupenicillium sp.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 159, p. 284-293, 2009.

ZHANG, L.; YAN, K.; ZHANG, Y.; HUANG, R.; BIAN, J.; ZHENG, C.; SUN, H.; CHEN, Z.; SUN, N.; NA, R.; MIN, F.; ZHAO, W.; ZHUO, Y.; YOU, J.; SONG, Y.; YU, Z.; LIU, Z.; YANG, K.; GAO, H.; DAI, H.; ZHANG, X.; WANG, J.; FU, C.; PEI, G.; LIU, J.; ZHANG, S.; GOODFELLOW, M.; JIANG, Y.; KUAI, J.; ZHOU, G.; CHEN, X. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4606-4611, 2007.

ZHANG, Y.; LI, C.; SWENSON, D. C.; GLOER, J. B.; WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. Novel antiinsectan oxalicine alkaloids from two undescribed fungicolous *Penicillium* spp, **Organic Letters**, v. 5, p. 773-776, 2003.

**APÊNDICE A - Ingredientes dos meios de cultura utilizados para o cultivo dos isolados**

<b>MEIO DE CULTURA</b>	<b>INGREDIENTES</b>
Ágar malte 2% (M2)	20 g/L de malte, 15 g/L ágar, 1 L ASW*.
Ágar malte 3% (M3)	30 g/L de malte, 15 g/L ágar, 1 L ASW*.
Ágar de extrato de levedura, peptona e glicose (GPY)	1 g/L glicose x H <sub>2</sub> O, 0.5 g/L peptona de carne de soja, 0.1 g/L extrato de levedura, 15 g/L ágar, 1 L ASW*.
Ágar de cenoura e batata (B)	20 g/L batatas cozidas e amassadas, 20 g/L cenouras cozidas e amassadas, 20 g/L ágar, 1 L ASW*.
Ágar fubá (F)	42 g de fubá são agitados em 500 mL de água destilada a 60 °C por 12 horas, filtrado, e o filtrado é diluído com água até 1 L. Foram adicionados 15 g de ágar e sais para 1 L de ASW*.
Ágar aveia (A)	30 g de flocos de aveia em água destilada são aquecidos até a fervura e mantidos fervendo por 1 hora. O líquido é filtrado e o volume obtido é completado com água destilada até 1 L. Posteriormente foram dissolvidos os sais para 1 L de ASW*. Por último 20 g de ágar adicionados.
* Água do mar artificial (ASW)	Pesar os sais a seguir e dissolver em água destilada: CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O – 1,36 g/L; MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O – 9,68 g/L; KCl – 0,61 g/L; NaCl – 30 g/L; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 0,14 g/L; Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – 3,47 g/L; NaHCO <sub>3</sub> – 0,17 g/L; KBr – 0,1 g/L; SrCl <sub>2</sub> .6H – 0,04 g/L; Ácido bórico – 3 g/L.

**APÊNDICE B - Protocolo de extração de DNA adaptado de Raeder e Broda (1985)**

---

**Protocolo Raeder e Broda (1985)**

---

1. Crescer os isolados purificados oriundos do isolamento a 28 °C, em 10ml de SDB (Sabourad Dextrose Caldo).
  2. Após o crescimento, lavar a suspensão fúngica (2 a 3 vezes) com água MiliQ autoclavada no eppendorf de 1,5ml e centrifugado, descartando o sobrenadante.
  3. Adicionar 50ml do tampão de extração (1% de SDS, 25 mM de EDTA, 250 mM de NaCl e 200 mM de Tris-HCl pH 8,0).
  4. Triturar a suspensão fúngica com um bastão de plástico;
  5. Transferir o conteúdo do tubo para um tubo de 2,0 mL com rosca (se necessário, cortar a ponta da ponteira).
  6. Adicionar mais 950 ml do tampão de extração e incubar a 65 °C por 20 minutos.
  7. Após centrifugação (14000 RPM por 10 minutos a 4 °C), transferir 800 ml do sobrenadante para um novo tubo de 2 mL mais 1 volume de fenol. Homogeneizar e centrifugar a 14000 RPM por 5 minutos a 4 °C.
  8. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL mais 1 volume de fenol/ clorofórmio (1:1), homogeneizar e centrifugar (14000 RPM por 5 minutos a 4 °C)..
  9. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2ml mais um volume de clorofórmio, homogeneizar e centrifugar (14000 RPM por 5 minutos a 4 °C). .
  10. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 0,6 volume de isopropanol, homogeneizar e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
  11. Centrifugar (14000 RPM por 5 minutos a 4 °C) e descartar o sobrenadante.
  12. (Alternativa): lavar o DNA com 50ml de etanol 70%.
  13. Secar o pellet a 37 °C (BOD). Ressuspender o pellet com 50 ml de água MiliQ autoclavada ou água de injeção.
  14. Adicionar 1 ml de RNase 10 mg/ mL e incubar por 1 hora a 37 °C para digerir o RNA .
  15. Quantificar o DNA em gel de agarose 0.8% com quantidades conhecidas de DNA  $\lambda$  como padrão.
  16. Estocar o DNA a -20 °C.
-

### APÊNDICE C - Protocolo para realização da PCR

O volume total do mix por PCR foi definido de acordo com o número (n) de amostras de DNA que serão amplificadas. Para cada amostra, um volume de 50 µL do *mix* foi adicionado ao DNA.

#### MIX para a amplificação:

Reagentes	[estoque]	[na reação]	Volume por amostra (µL)	Volume por PCR (µL)
Tampão Invitrogen	10	1	5	5 x n
dNTP's [µM]	25	0,2	0,4	0,4 x n
Cloreto de magnésio	50	0	1,5	1,5 x n
Primer forward [µM]	<b>20</b>	1	1	1 x n
Primer reverse [µM]	<b>20</b>	1	1	1 x n
DNA	x	50 -100 ng	<b>5</b>	<b>5 x n</b>
Taq Invitrogen [U/µL]	5	2	0,4	0,4 x n
Água	-	-	35,7	35,7 x n
<b>Total</b>			<b>50</b>	<b>50 x n</b>

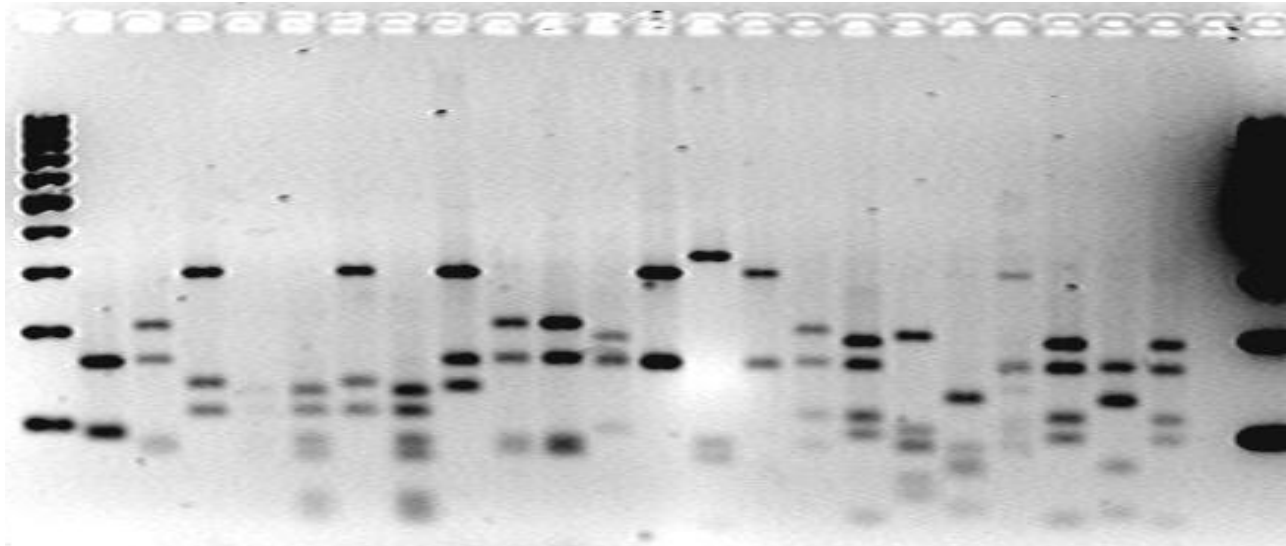
As amostras foram colocadas no termociclador, sob programa de amplificação com desnaturação inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de repetição de 30 ciclos com a permanência de 1 minuto a 94 °C para a desnaturação, 1 minuto a 55 °C para a hidridização dos *primers* e 3 minutos a 72 °C para a extensão. Para a extensão final do DNA, a temperatura foi mantida a 72 °C por 3 minutos e, para manter as amostras conservadas até o momento da estocagem, foi programado um *hold* de 4 °C.

#### Programa para a amplificação:

Ciclos	temperatura/tempo
<b>1</b>	95 °C/ 2 min
<b>2 (30X)</b>	94 °C/ 1 min
<b>3 (30X)</b>	55 °C/ 1 min
<b>4 (30X)</b>	72 °C/ 3 min
<b>5</b>	72 °C/ 3 min
<b>6</b>	4 °C

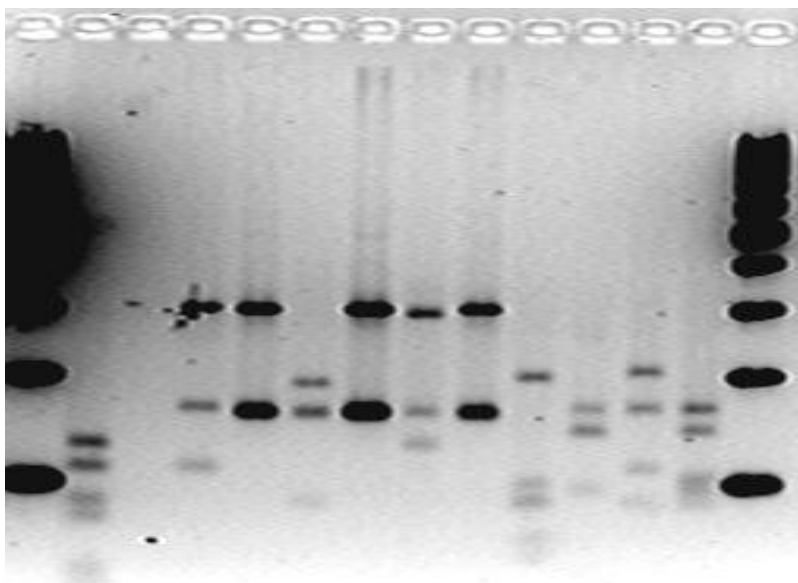
**APÊNDICE D - Resultado da digestão com a enzima de restrição enzima *Hae* III**

100pb (M3)4 (A)1 (A)6 (M3)2 (F)6 (A)5 (G)1 (B)2 (A)4 (A)3 (M2)9 (A)8 (G)8 (G)6 (G)3 G(4) (B)3 (G)11 (F)3 (B)5 (F)2 (B)4 100pb



Ribotipos: A B C - D C D E B B F G H G I J K L M J N J

100 pb (M2)3 (M2)2 (G)7 (M2)8 (F)1 (A)2 (F)5 (A)7 - (G)10 (M3)1 (M2)4 100pb

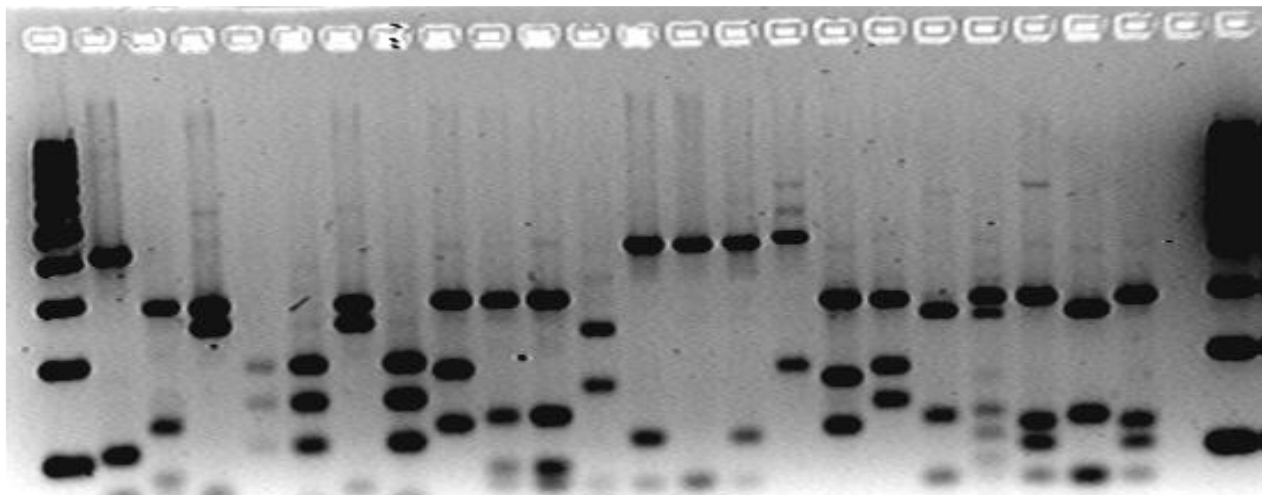


Ribotipos: D - P G R G S G - J R J



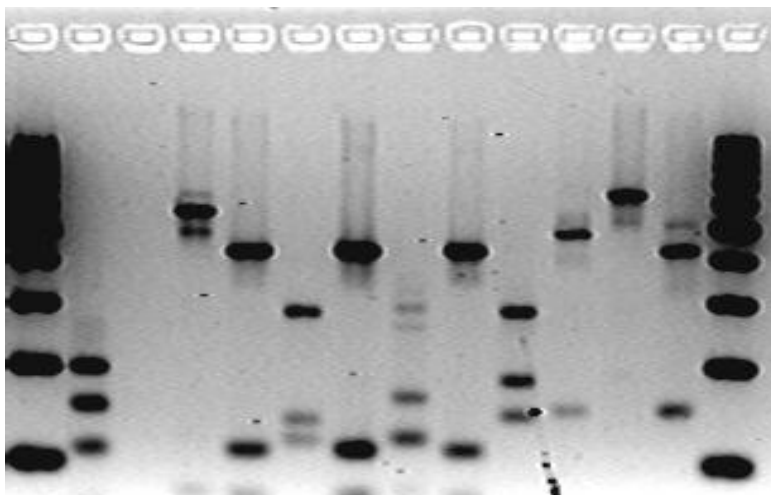
### APÊNDICE E - Resultado da digestão com a enzima de restrição enzima *Msp* I

100pb (M3)4 (A)1 (A)6 (M3)2 (F)6 (A)5 (G)1 (B)2 (A)4 (A)3 (M2)9 (A)8 (G)8 (G)6 (G) 3 G(4) (B)3 (G)11 (F)3 (B)5 (F)2 (B)4 100pb



Ribotipos: A B C E E C E F B B G A H A I F J K L M K M

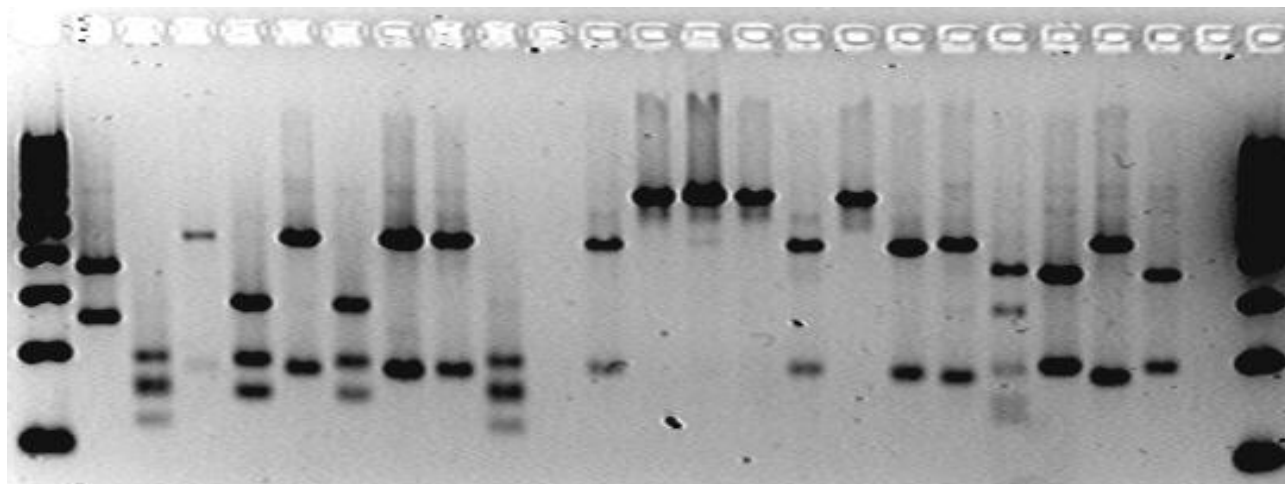
100 pb (M2)3 (M2)2 (G)7 (M2)8 (F)1 (A)2 (F)5 (A)7 — (G)10 (M3)1 (M2)4 100pb



Ribotipos: E — R A M A N A — O S P

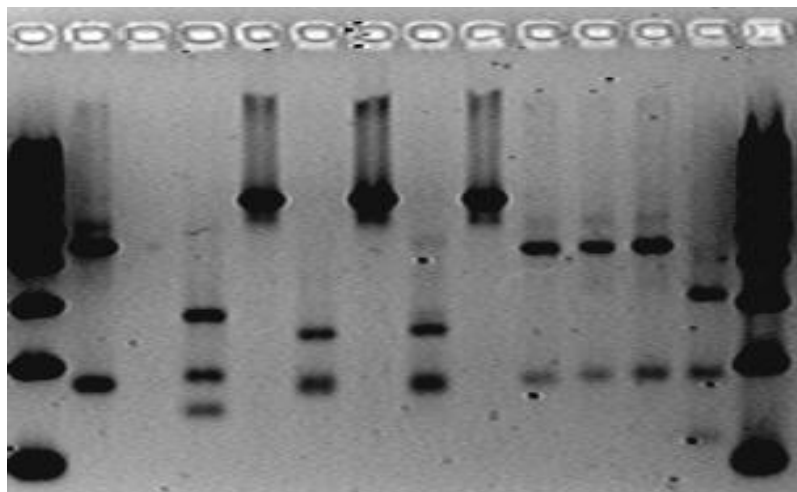
**APÊNDICE F - Resultado da digestão com a enzima de restrição enzima *Rsa* I**

100pb (M3)4 (A)1 (A)6 (M3)2 (F)6 (A)5 (G)1 (B)2 (A)4 (A)3 (M2)9 (A)8 (G)8 (G)6 (G) 3 G(4) (B)3 (G)11 (F)3 (B)5 (F)2 (B)4 100pb



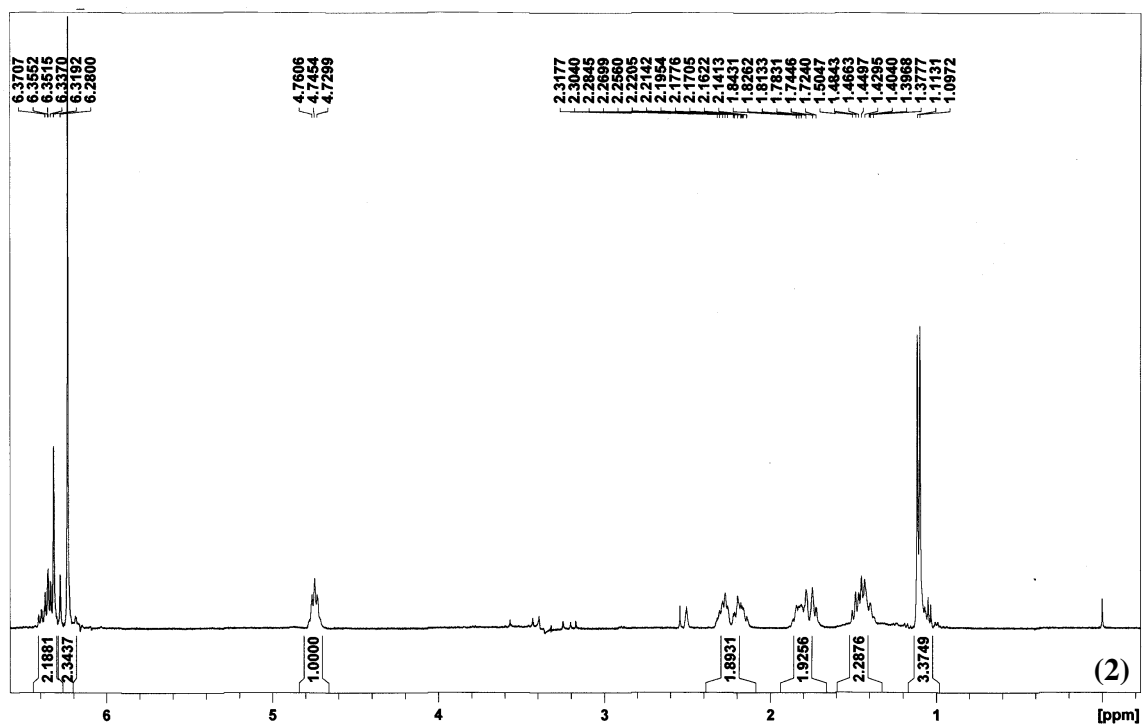
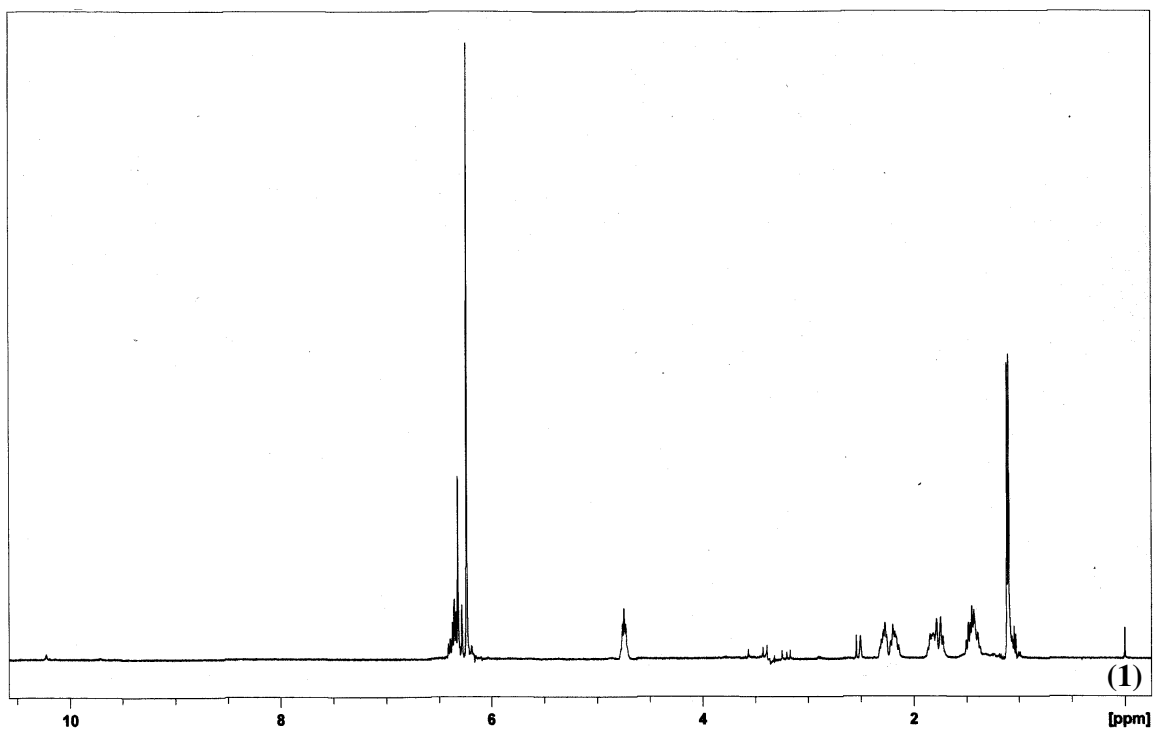
Ribotipos: A B C D C D C C B - C - - - C - C C F G C G

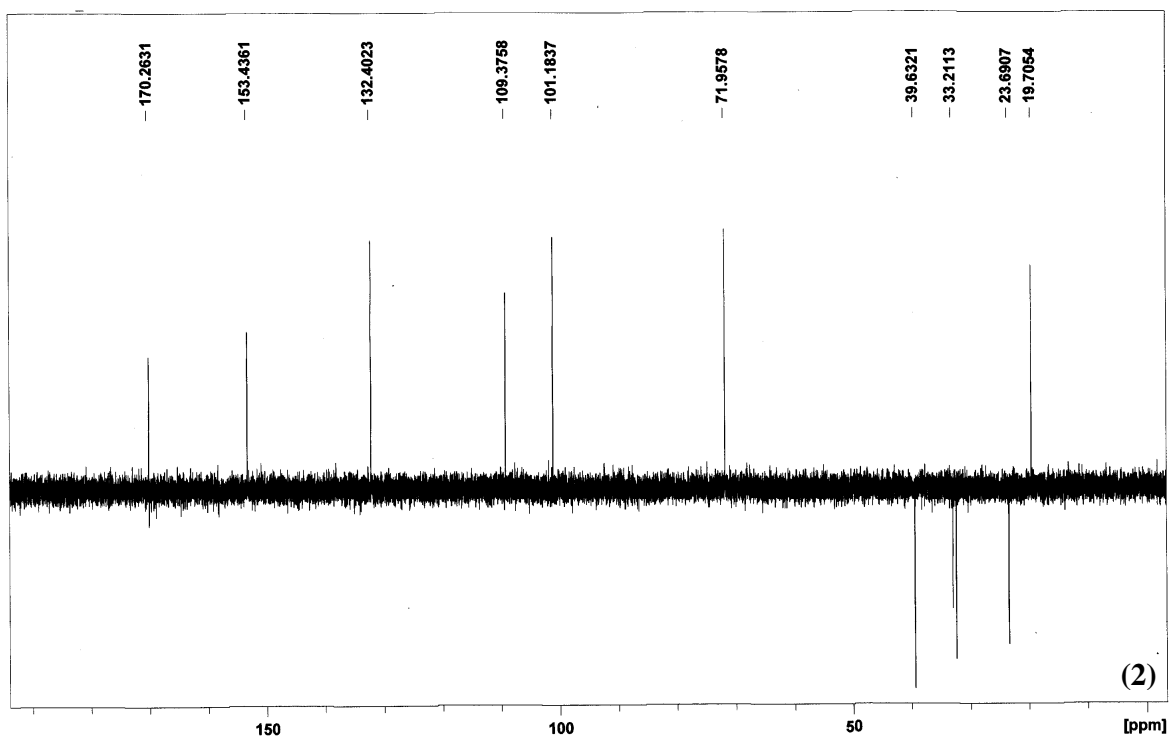
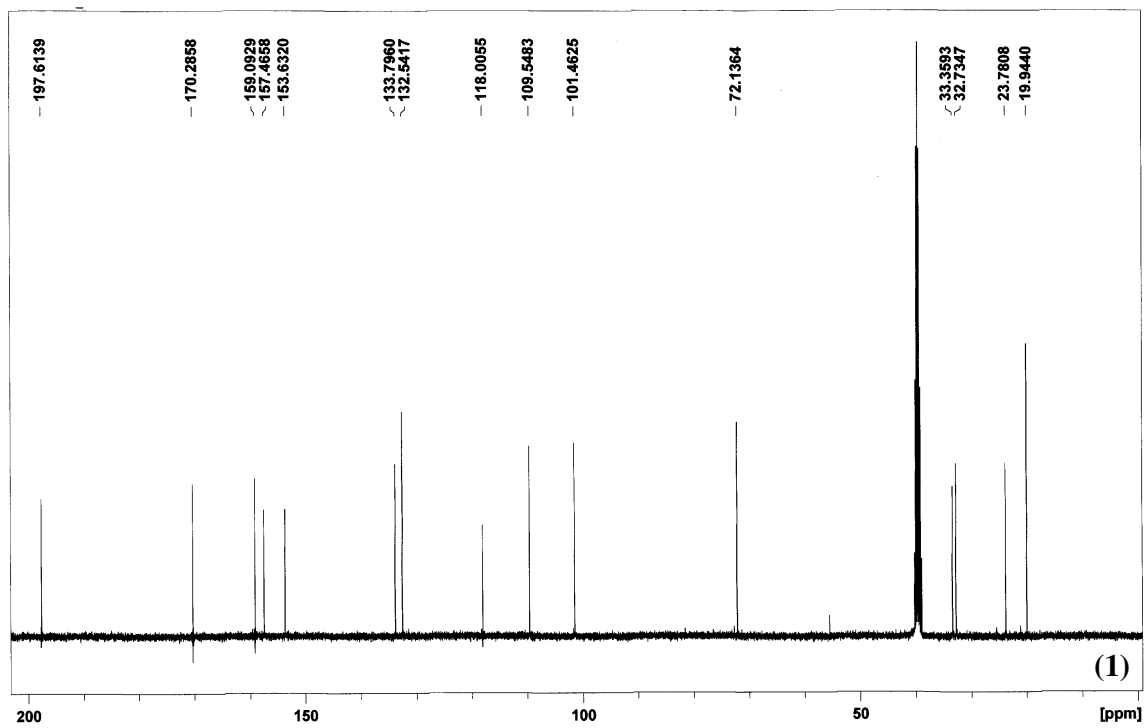
100 pb (M2)3 (M2)2 (G)7 (M2)8 (F)1 (A)2 (F)5 (A)7 - (G)10 (M3)1 (M2)4 100pb



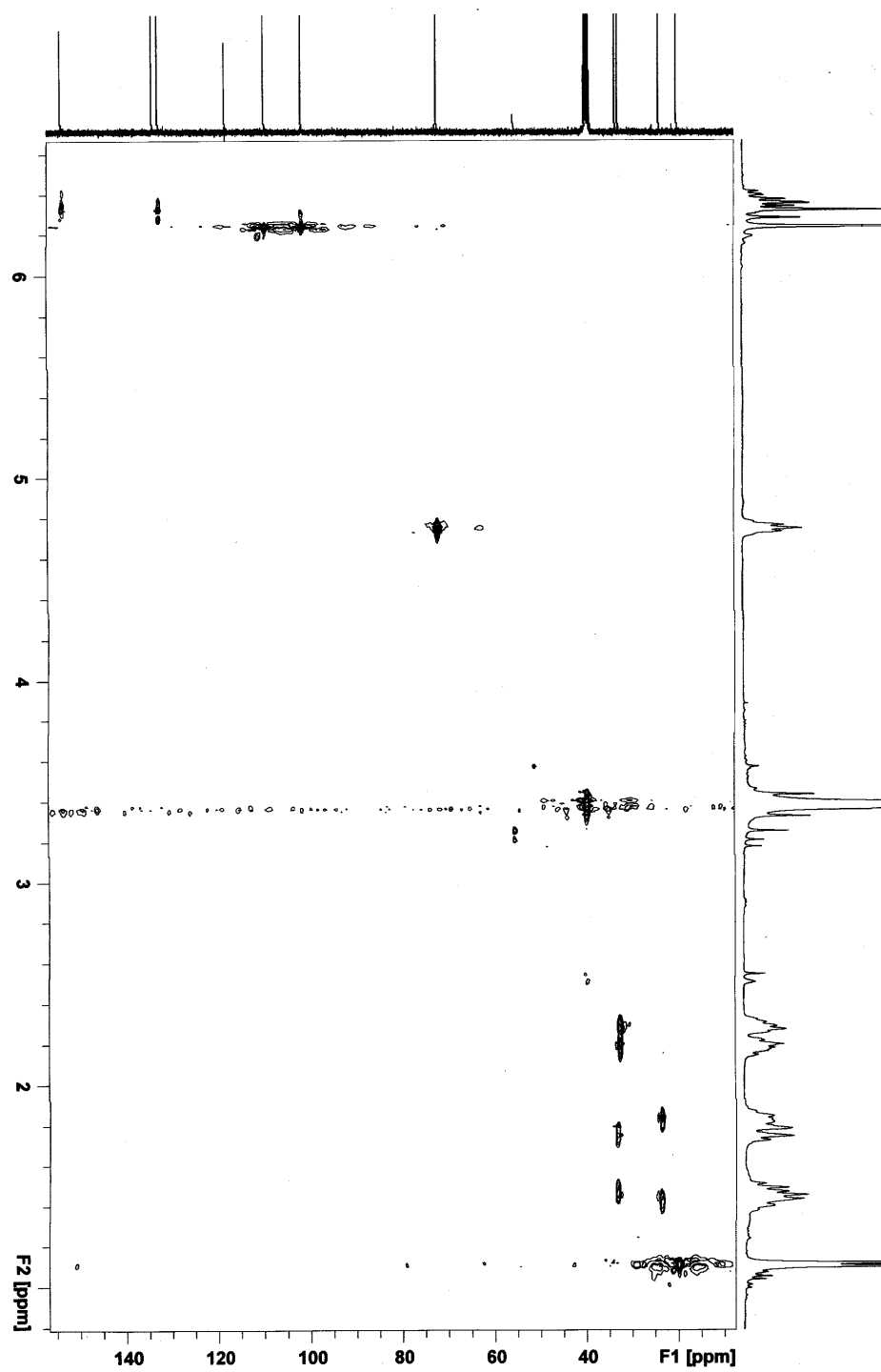
Ribotipos: C - D - H - H - - C C I

ANEXO A - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto JKL-9: (1) normal; (2) expansão com os valores dos deslocamentos químicos

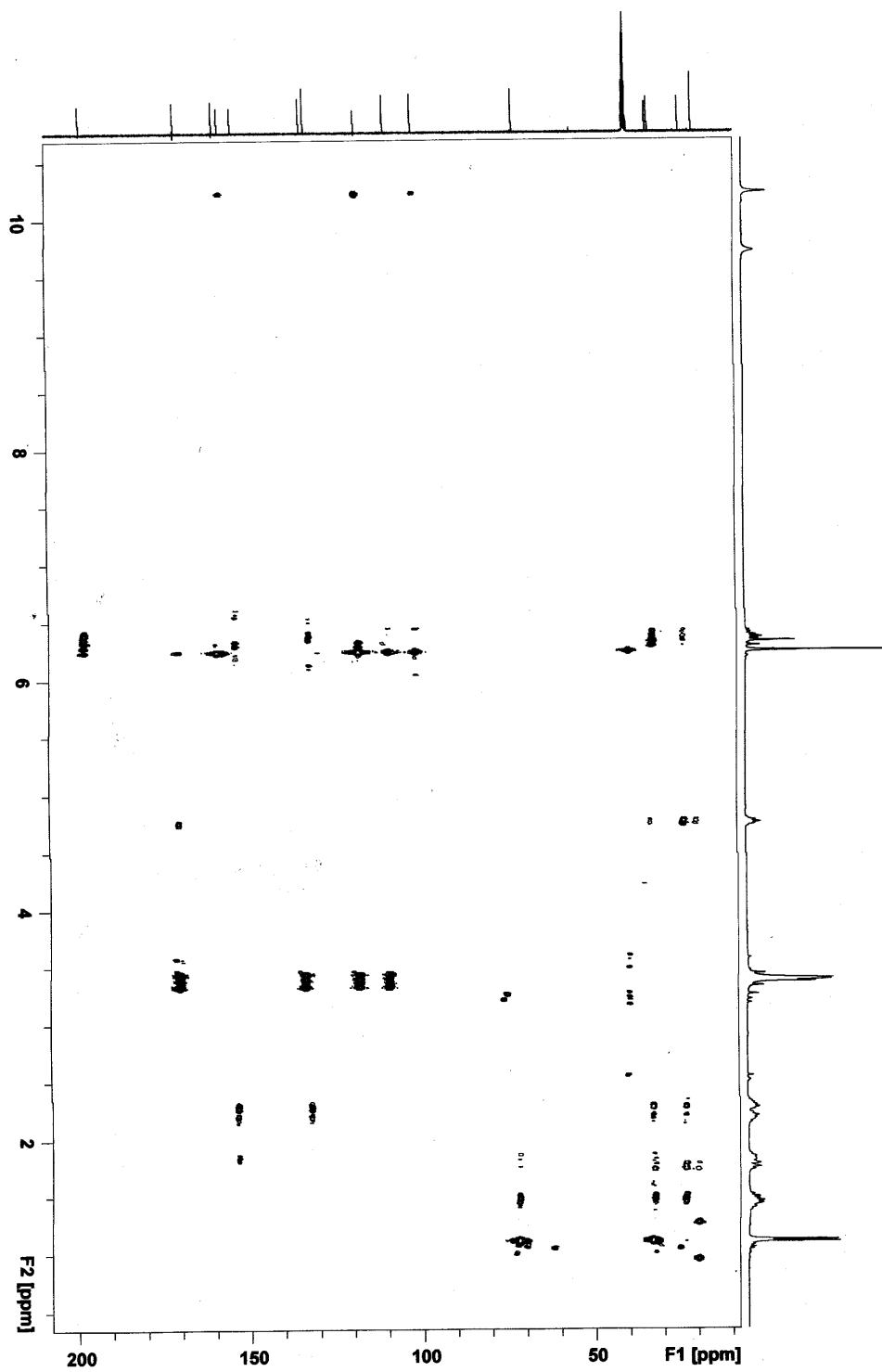


ANEXO B - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (1) e DEPT (2) do composto JKL-9

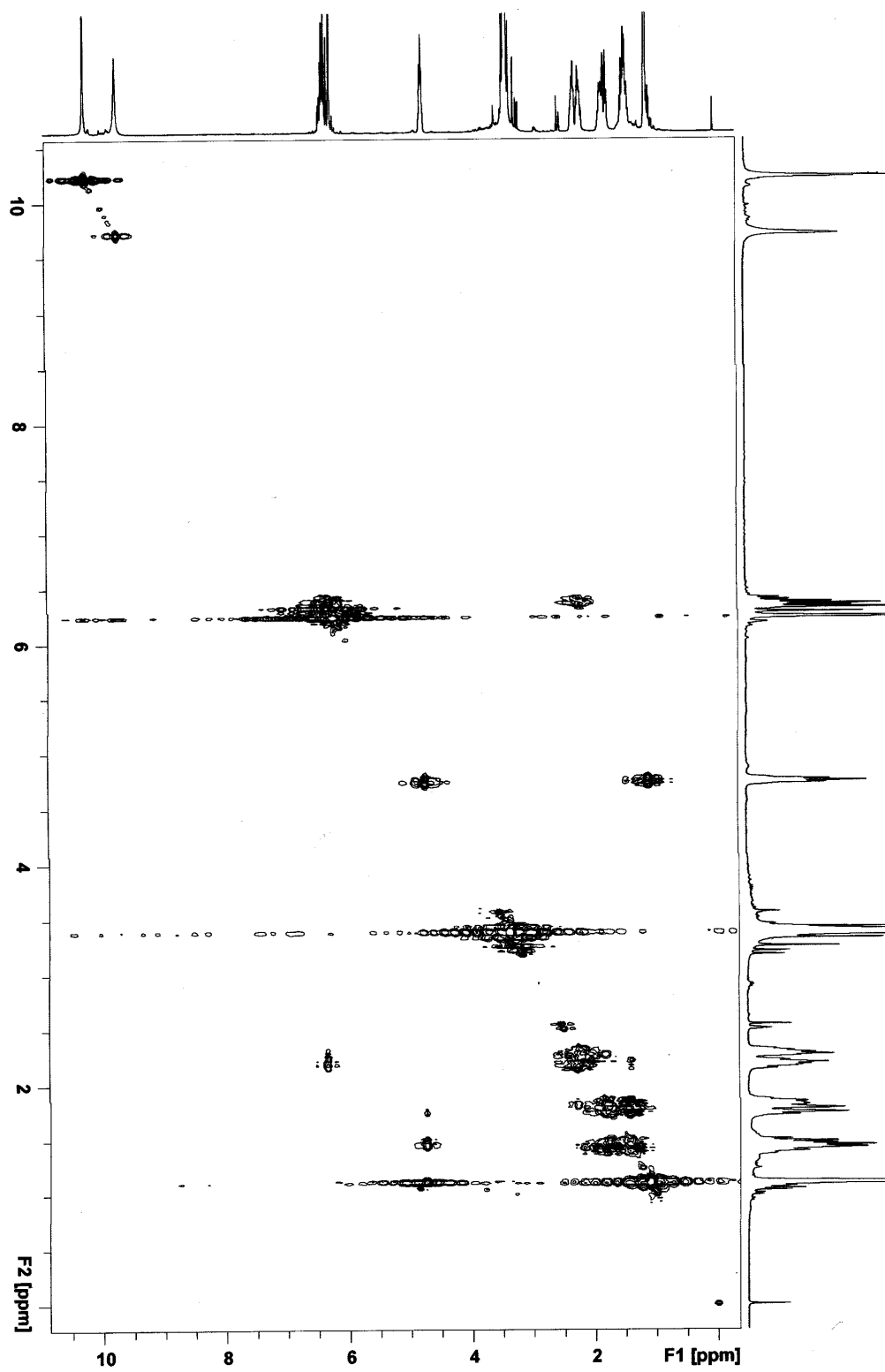
## ANEXO C - Espectro bidimensional de HSQC do composto JKL-9

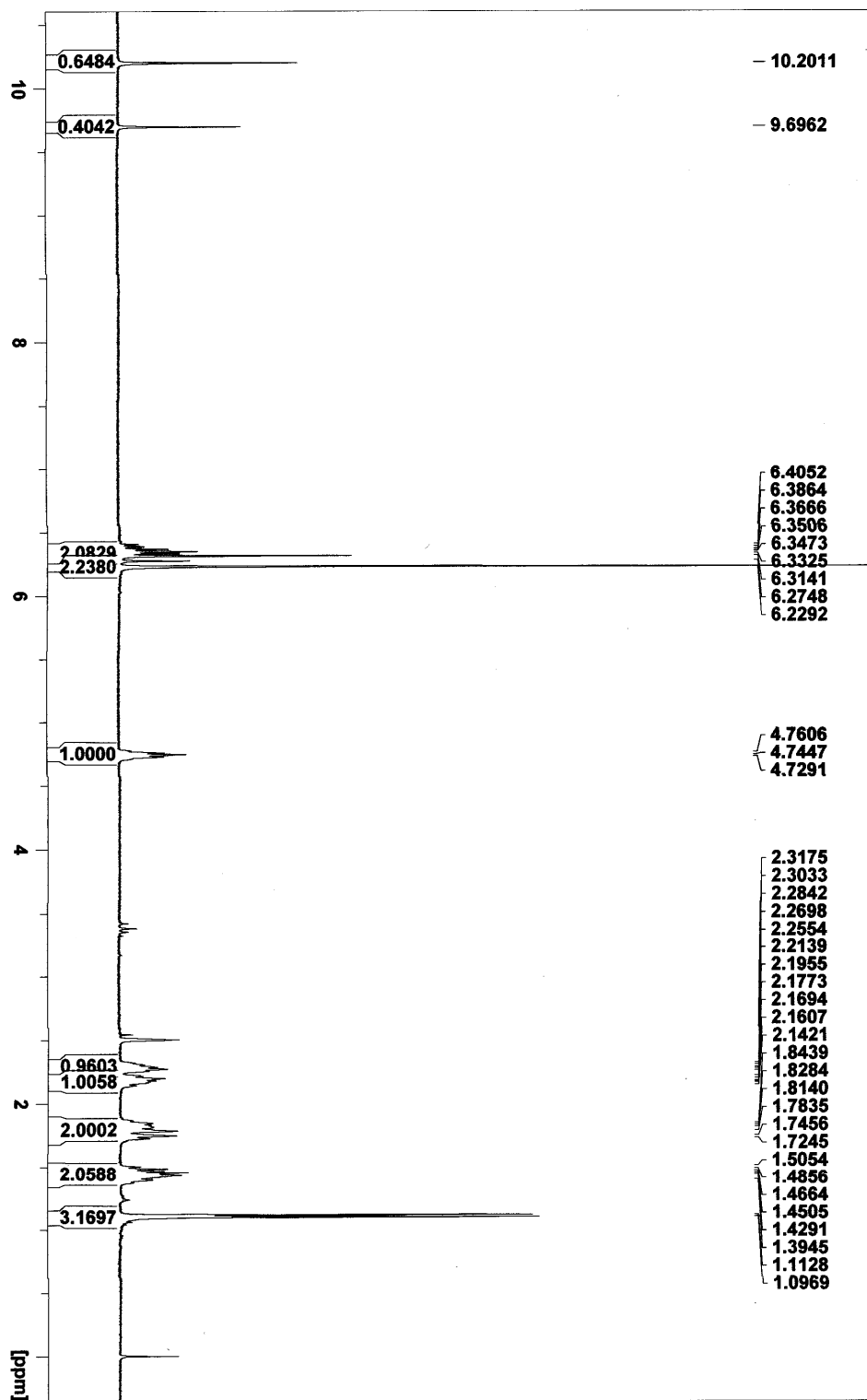


## ANEXO D - Espectro bidimensional de HMBC do composto JKL-9

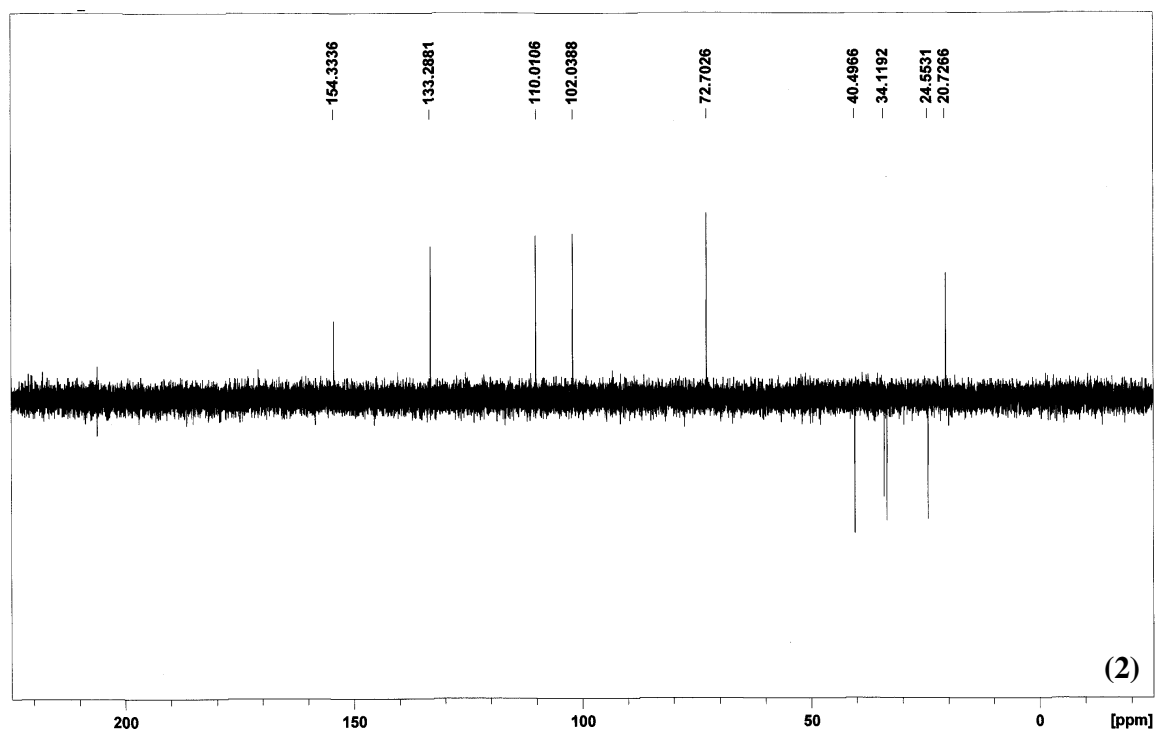
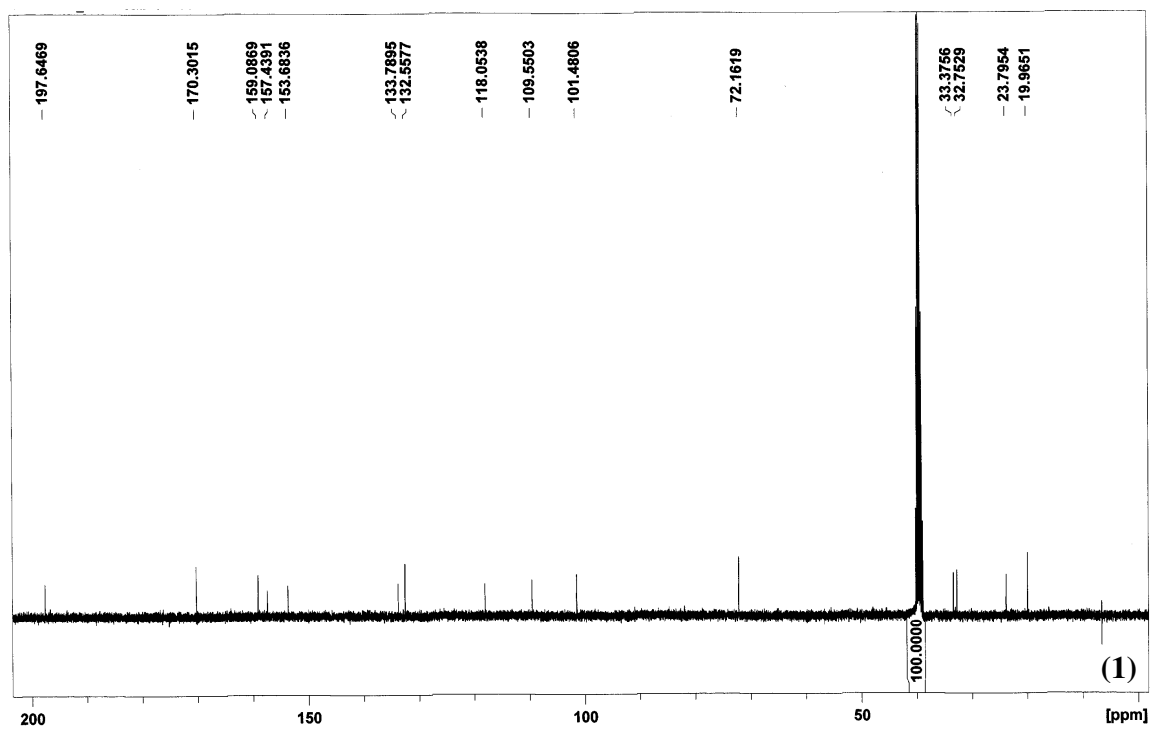


## ANEXO E - Espectro bidimensional de COSY do composto JKL-9

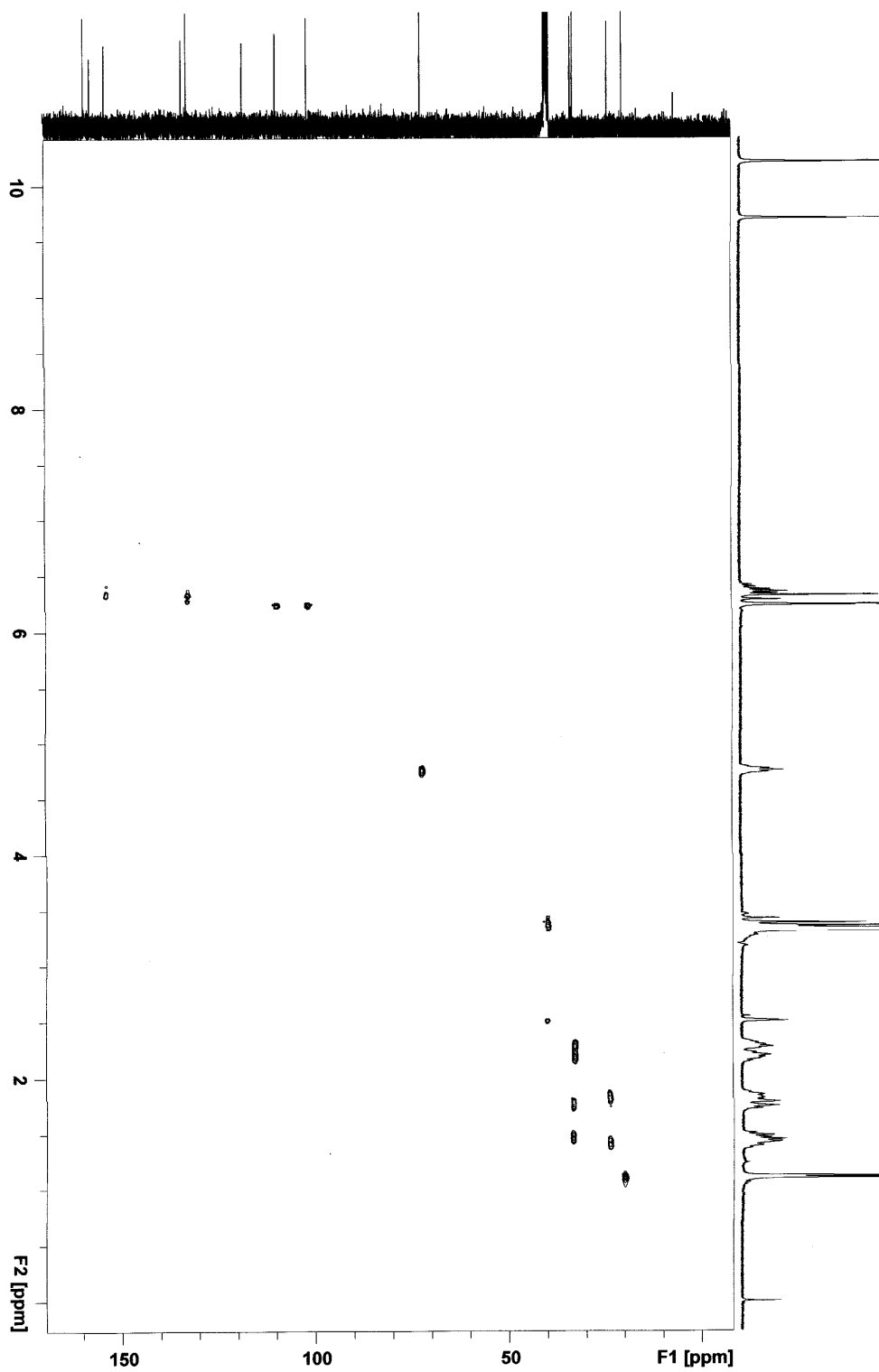


ANEXO F - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto JKL-5E

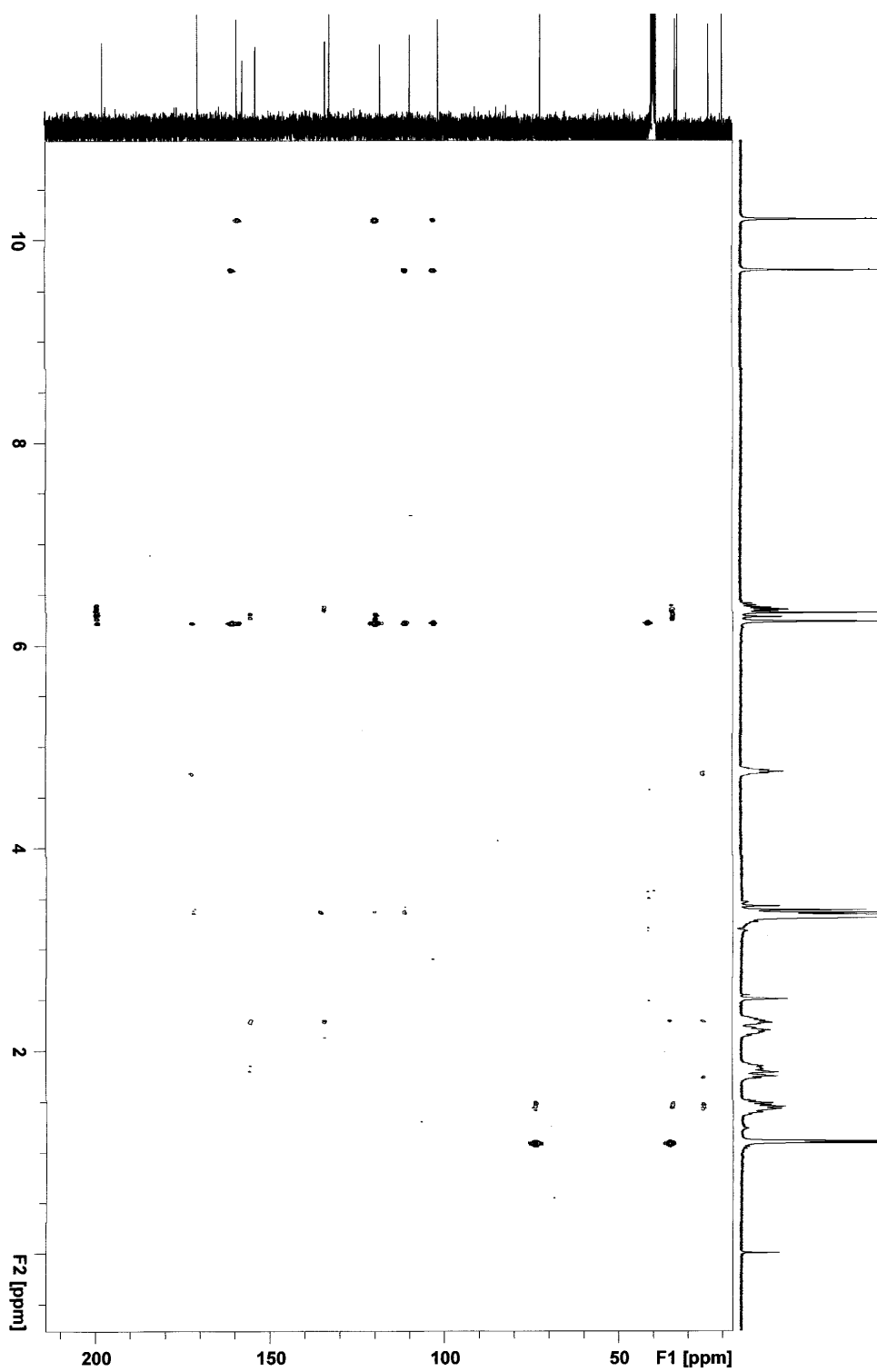


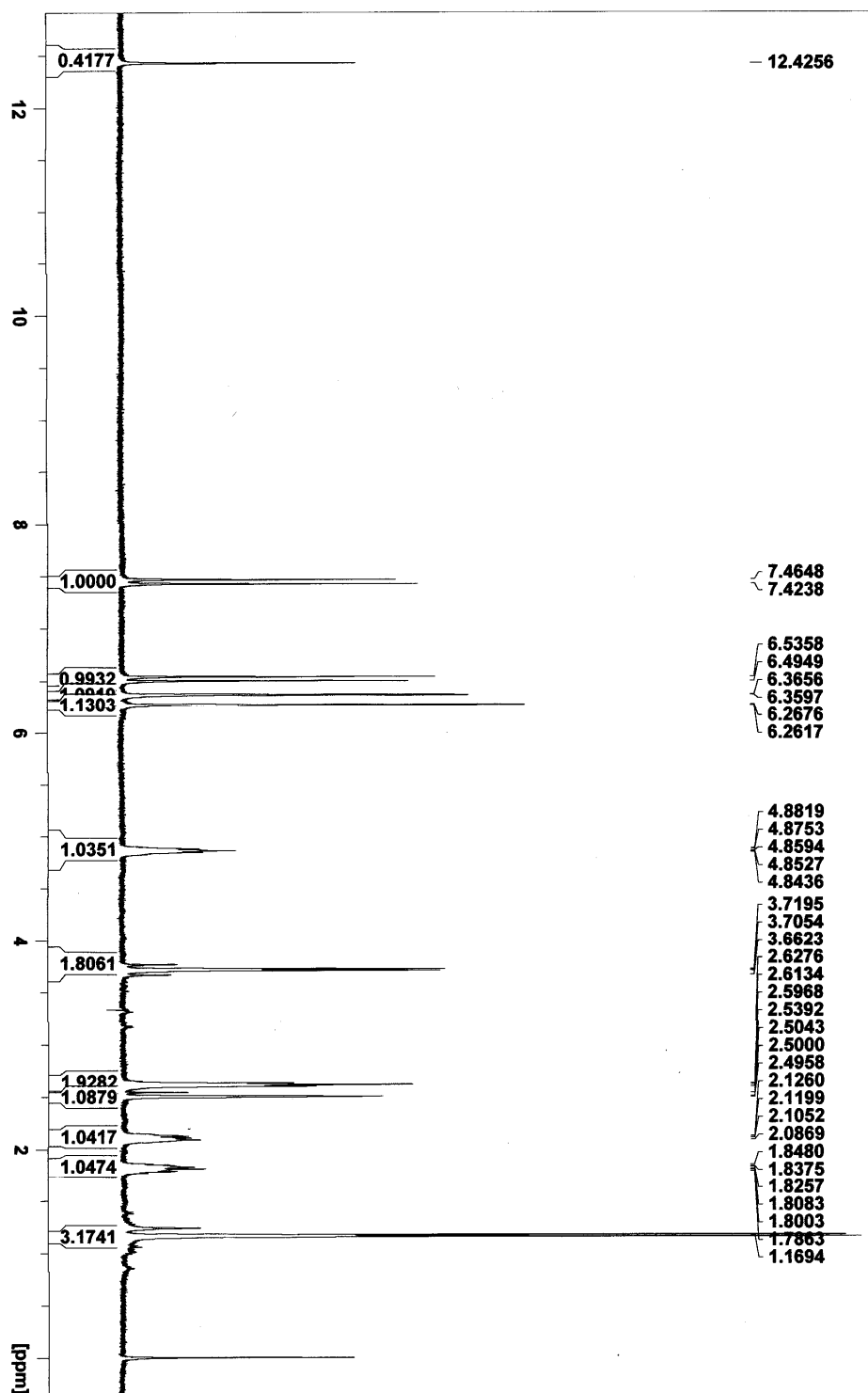
ANEXO G - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (1) e DEPT (2) do composto JKL-5E

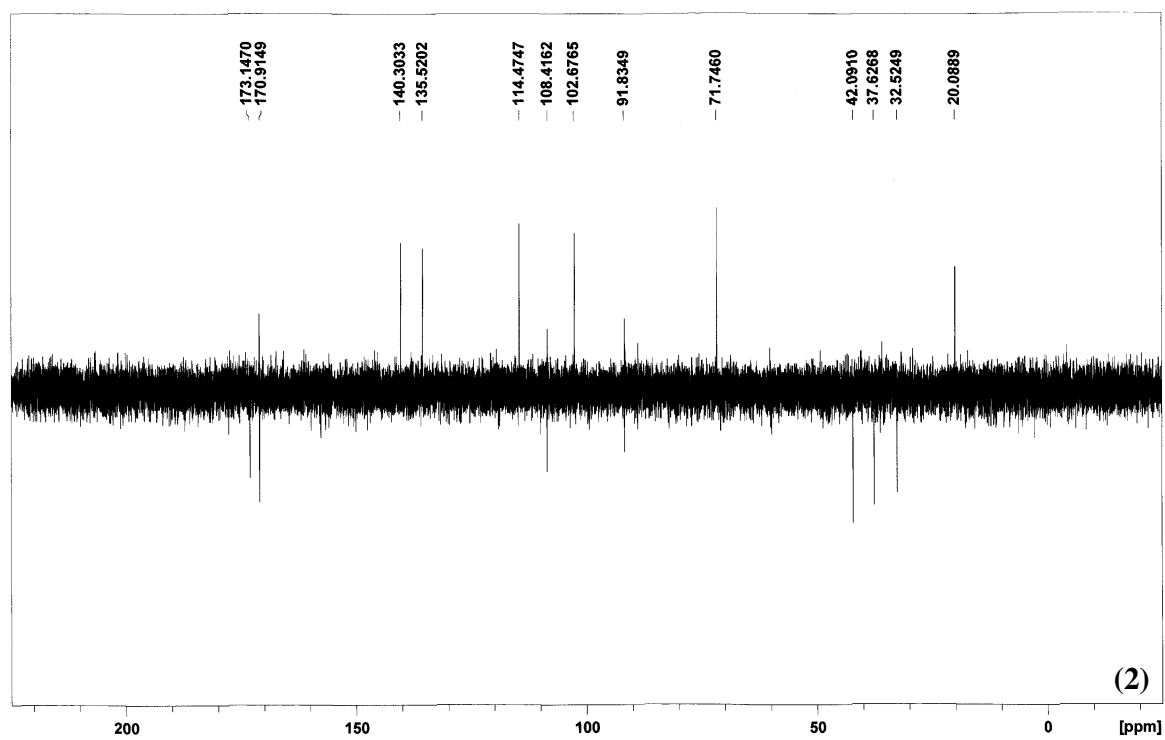
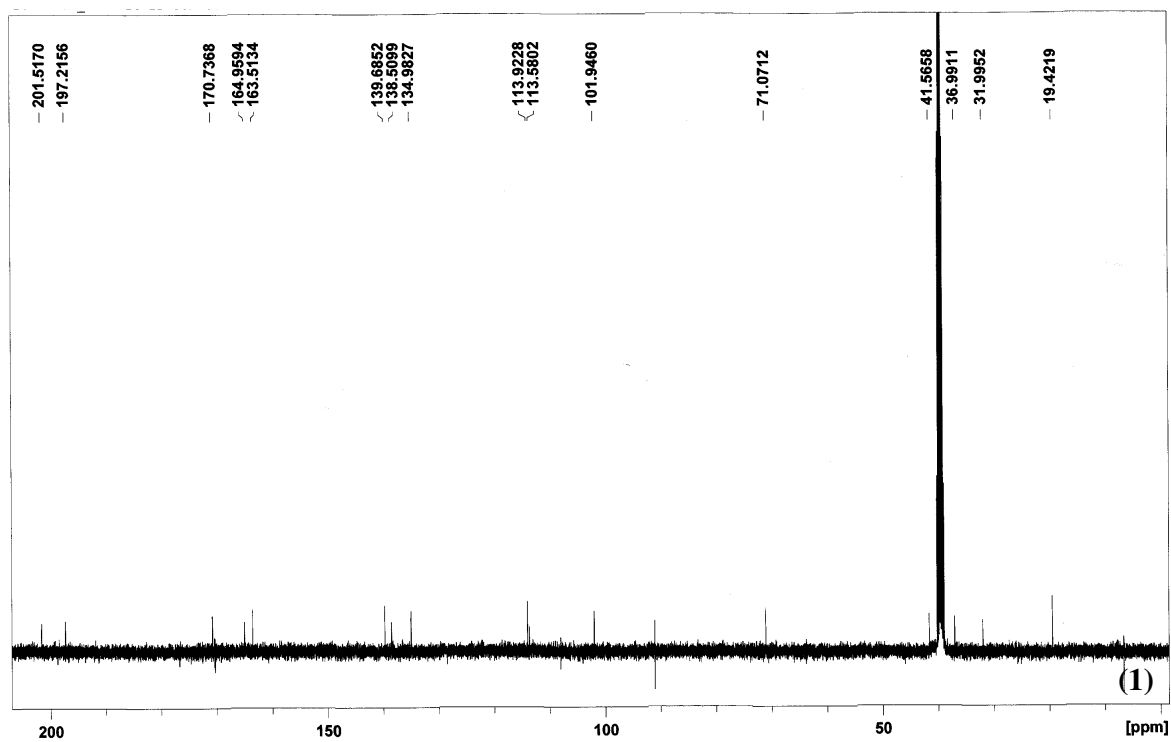
## ANEXO H - Espectro bidimensional de HSQC do composto JKL-5E



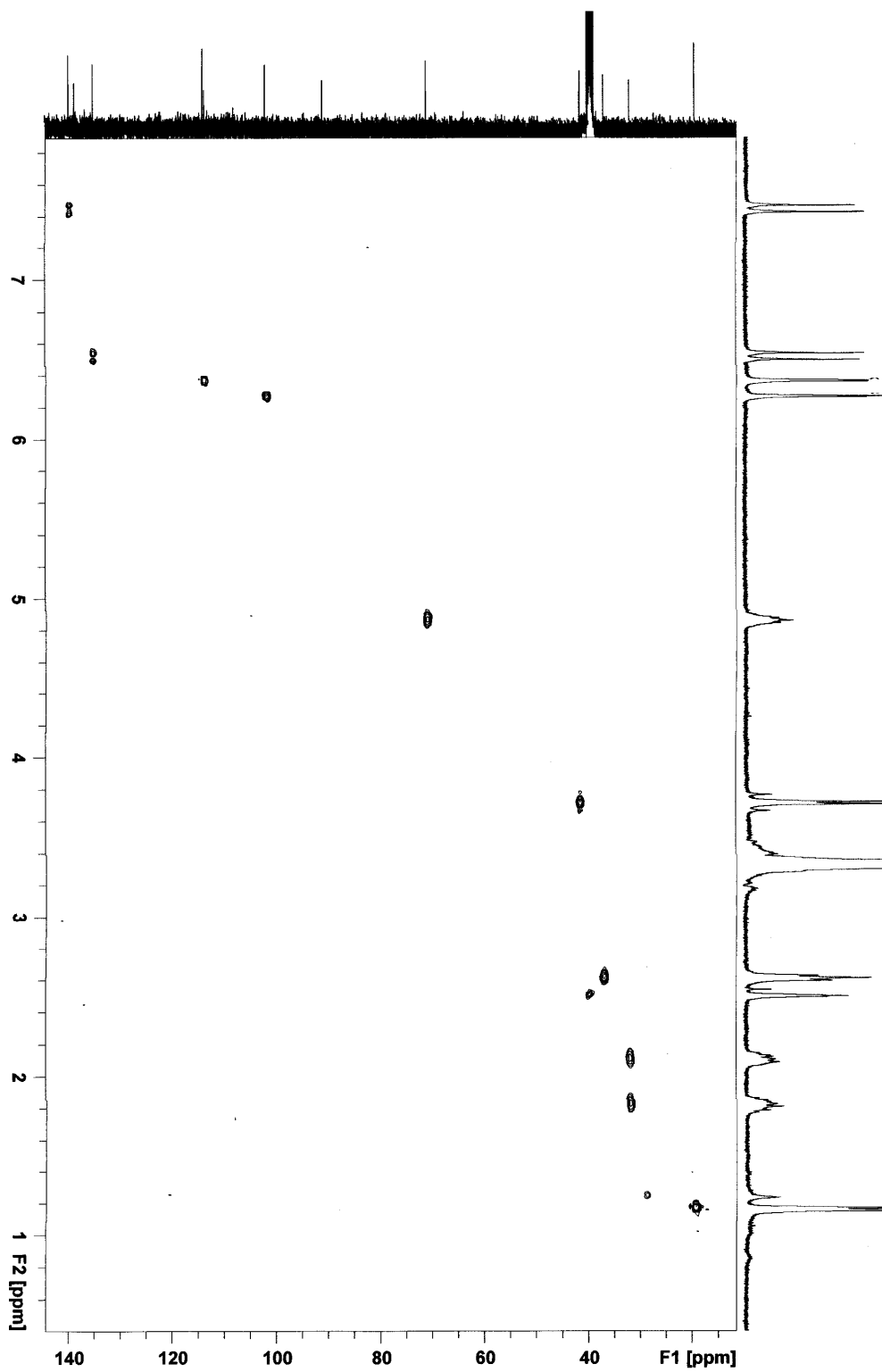
## ANEXO I - Espectro bidimensional de HMBC do composto JKL-5E



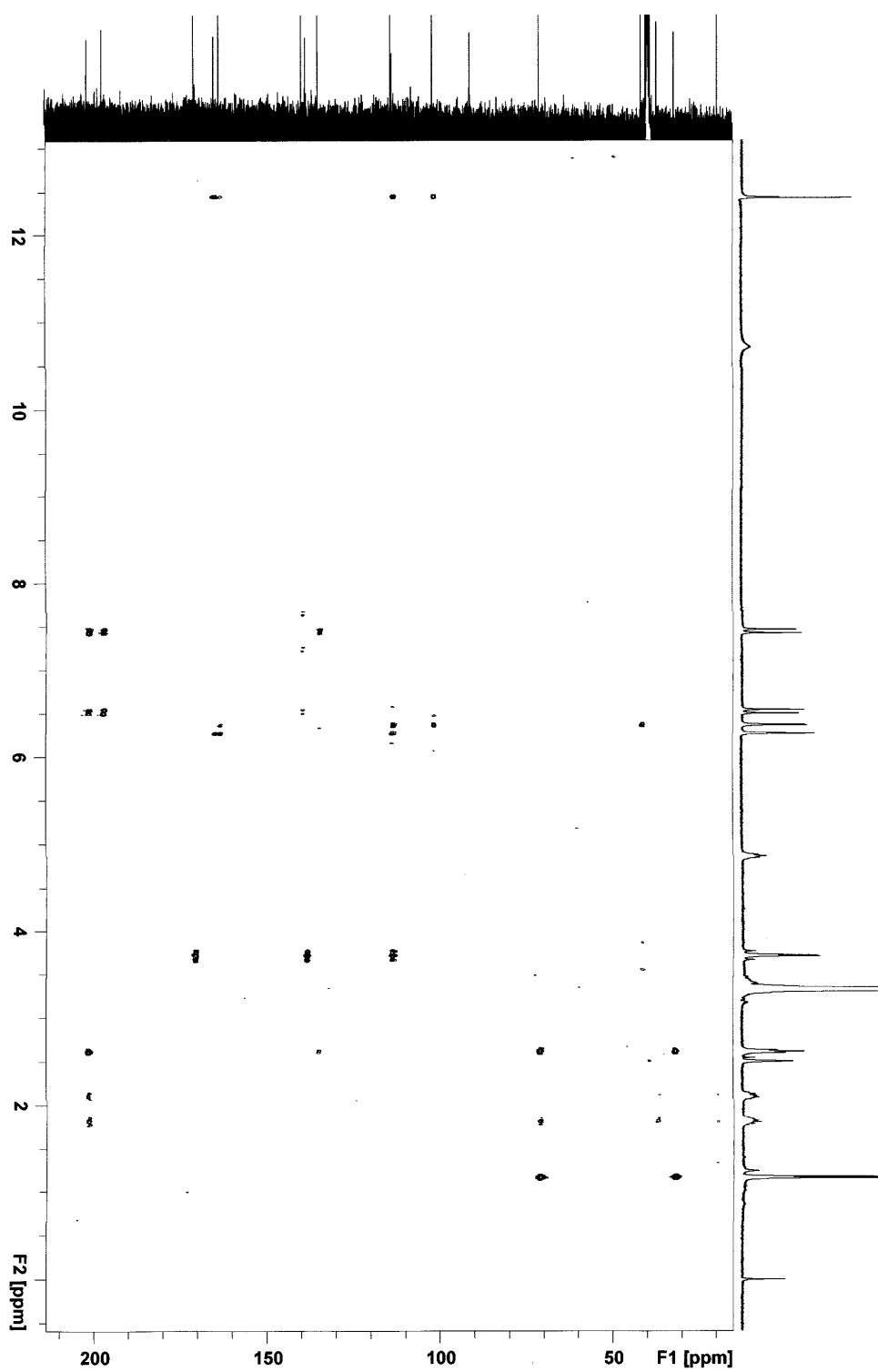
ANEXO J - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto I-6

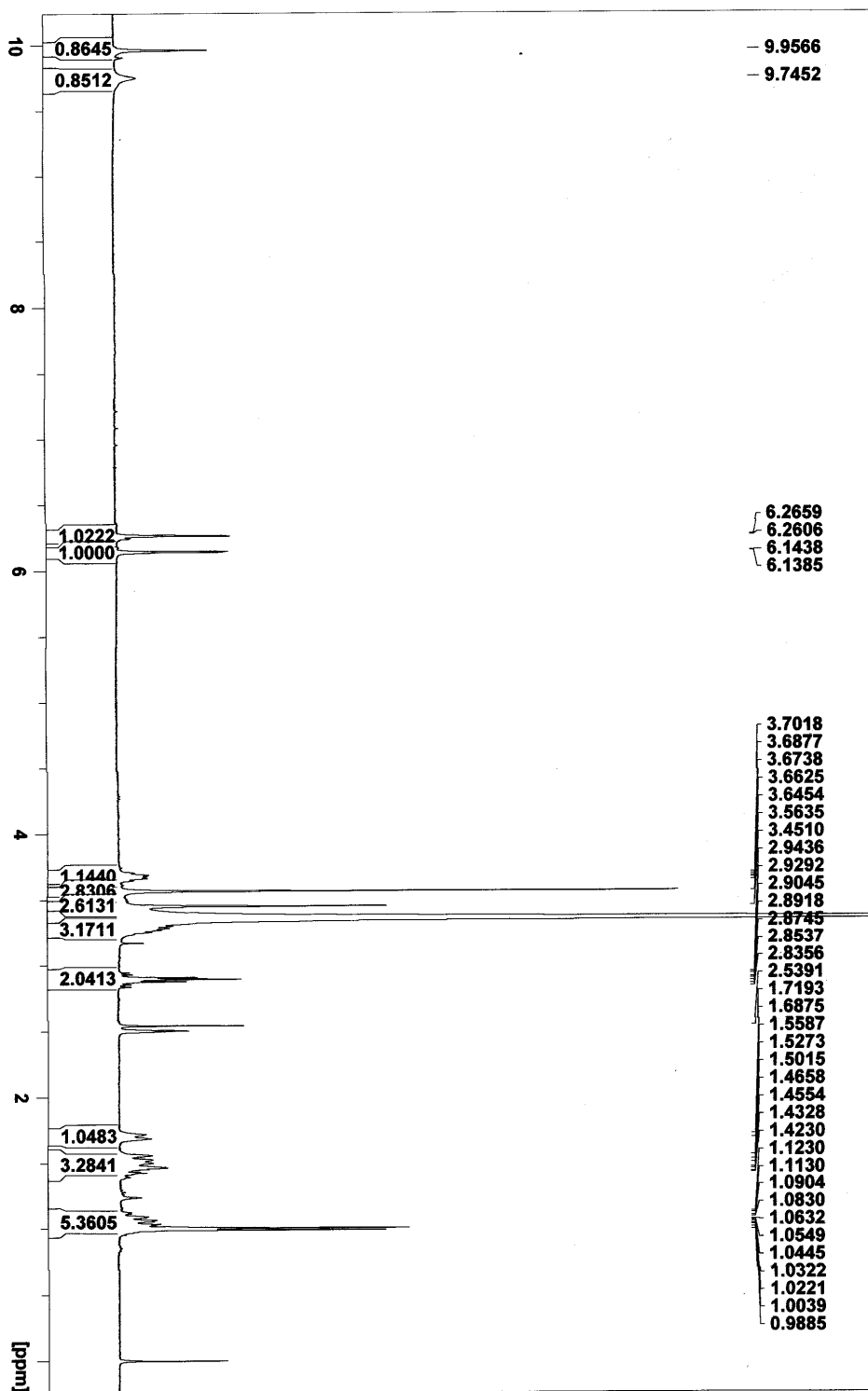
ANEXO K - Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (1) e DEPT (2) do composto I-6

## ANEXO L - Espectro bidimensional de HSQC do composto I-6

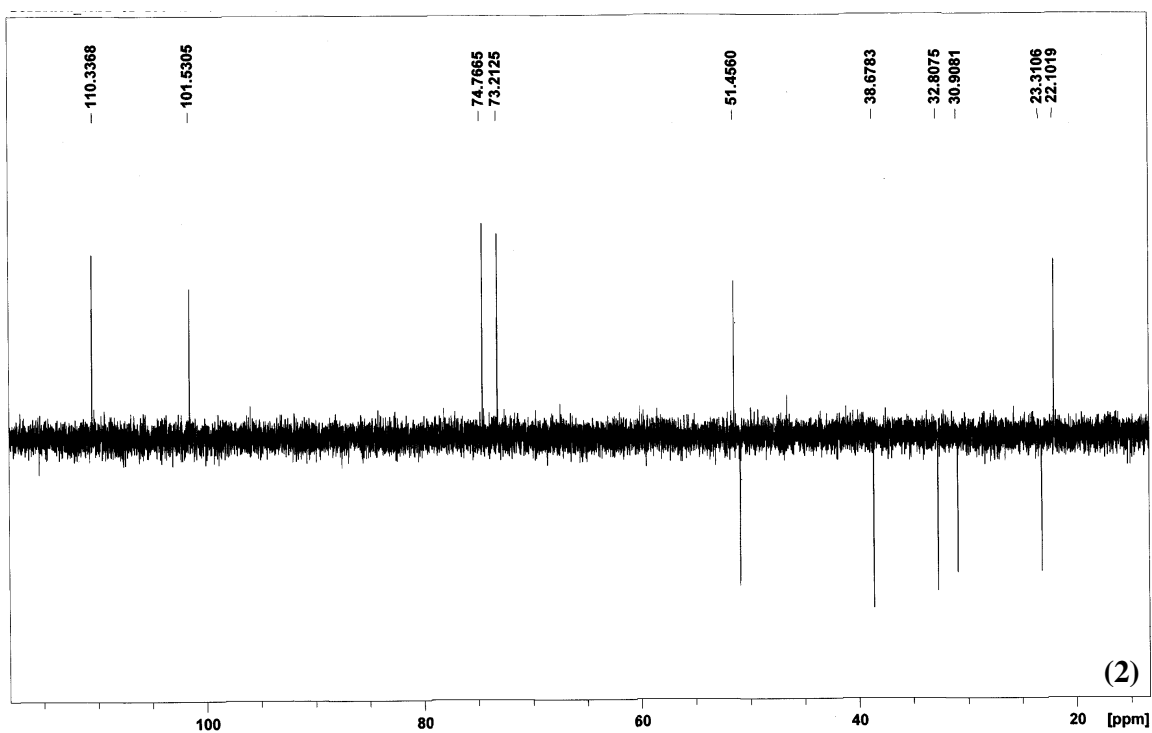
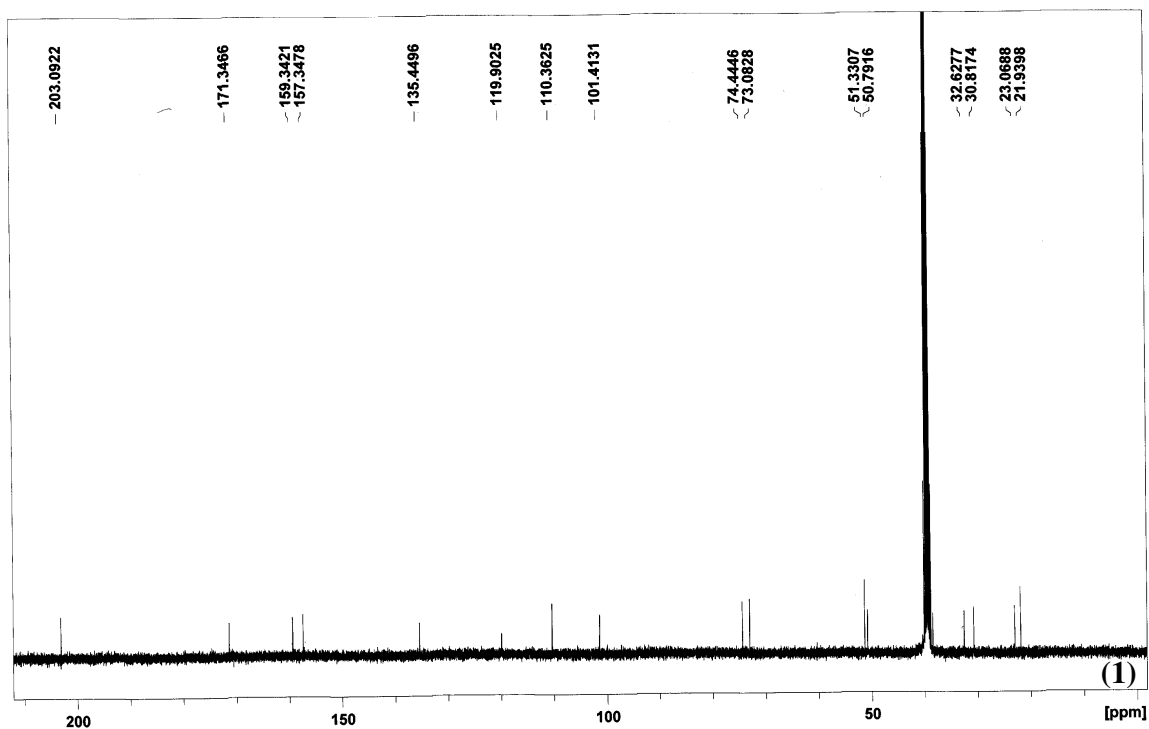


## ANEXO M - Espectro bidimensional de HMBC do composto I-6

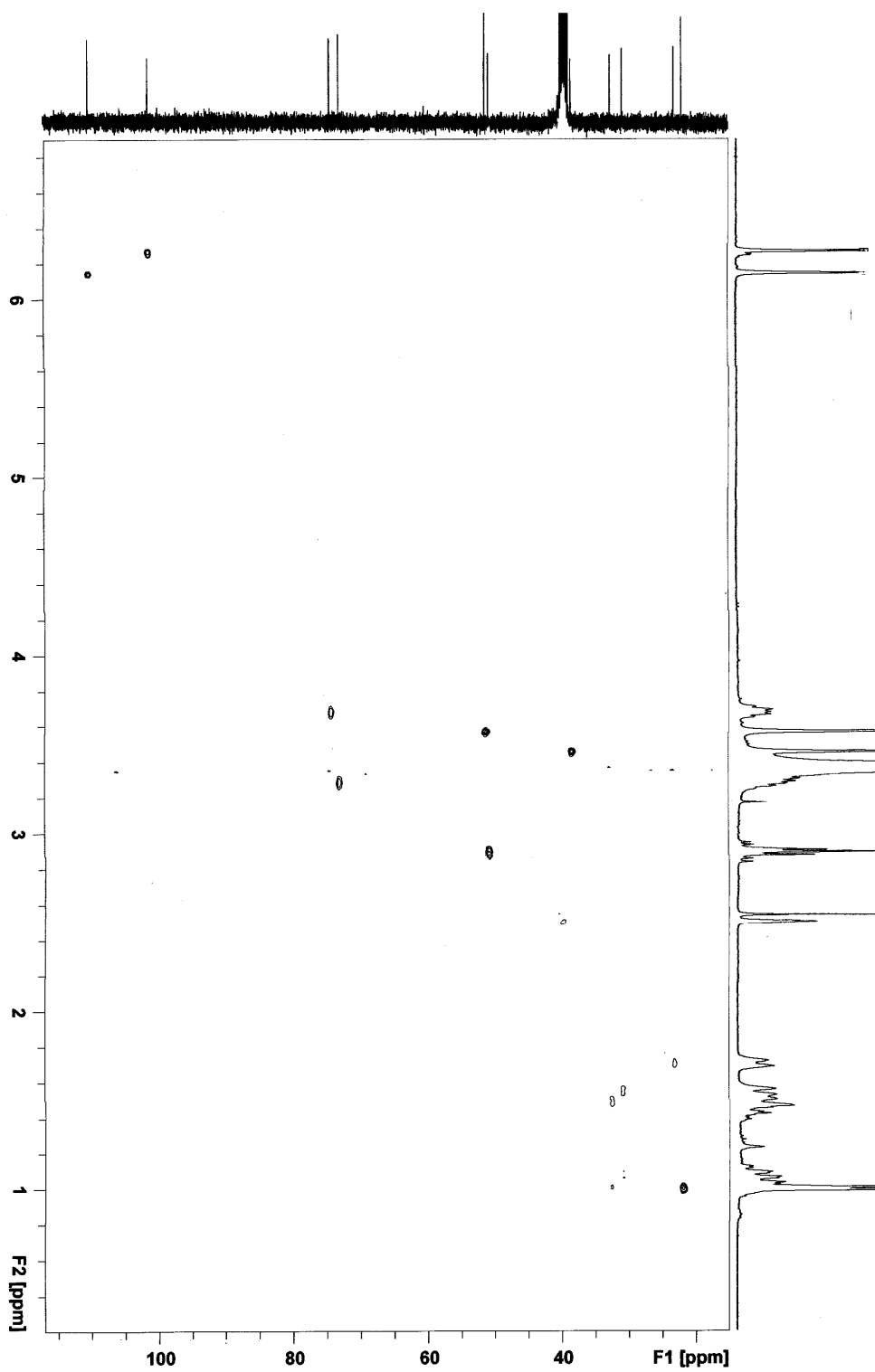


ANEXO N - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto O-2

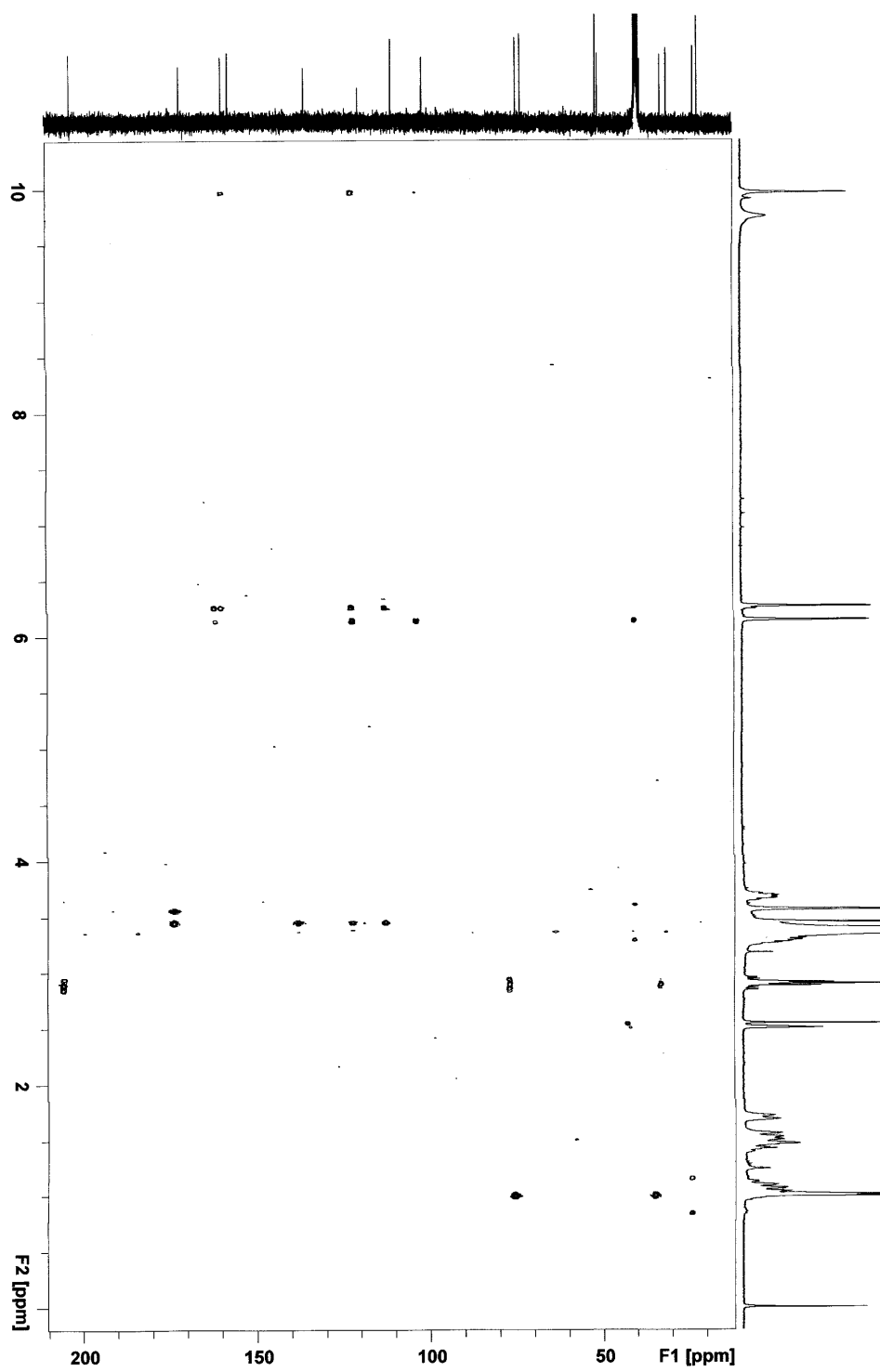


ANEXO O - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (1) e DEPT (2) do composto O-2

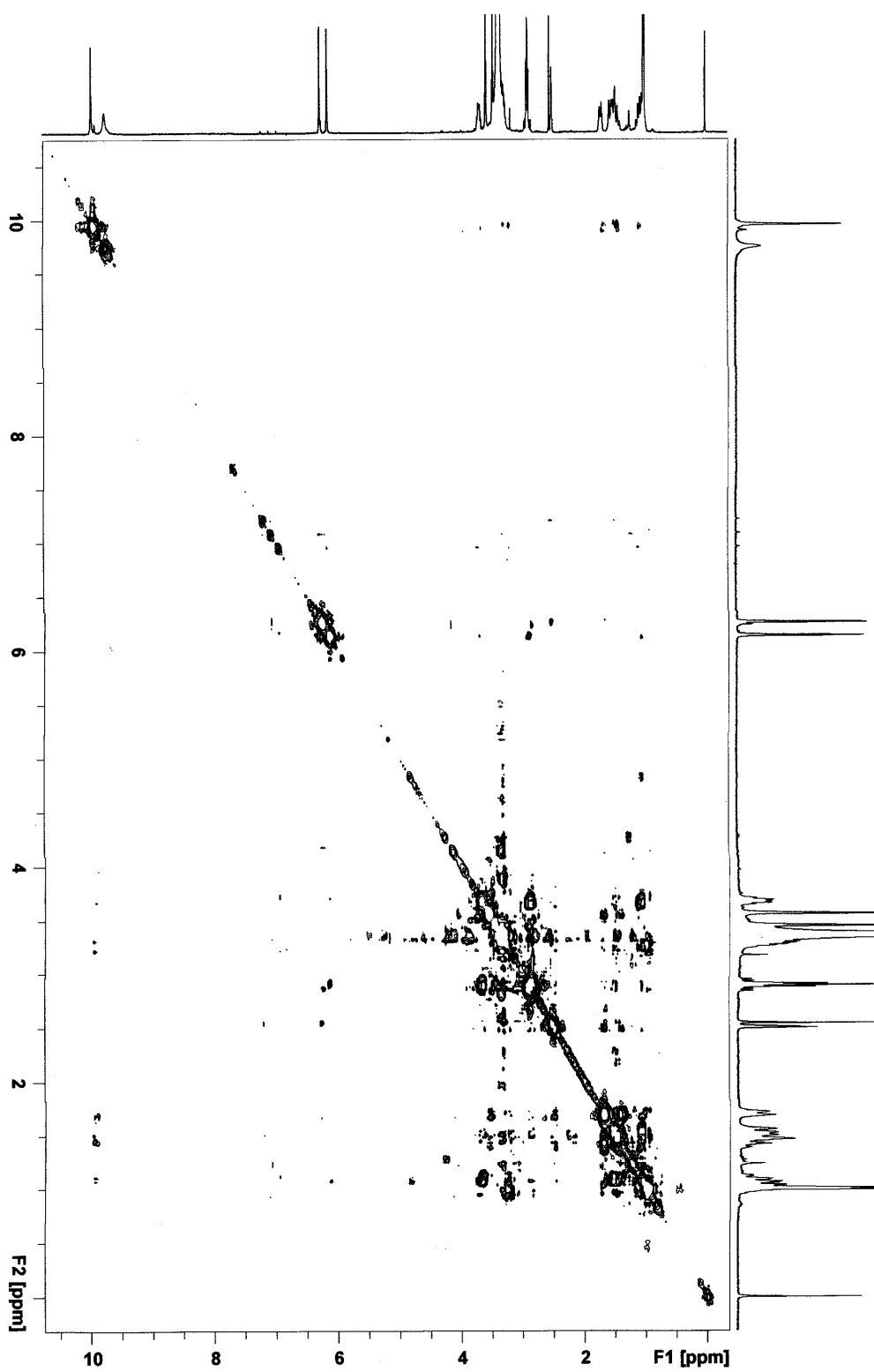
## ANEXO P - Espectro bidimensional de HSQC do composto O-2

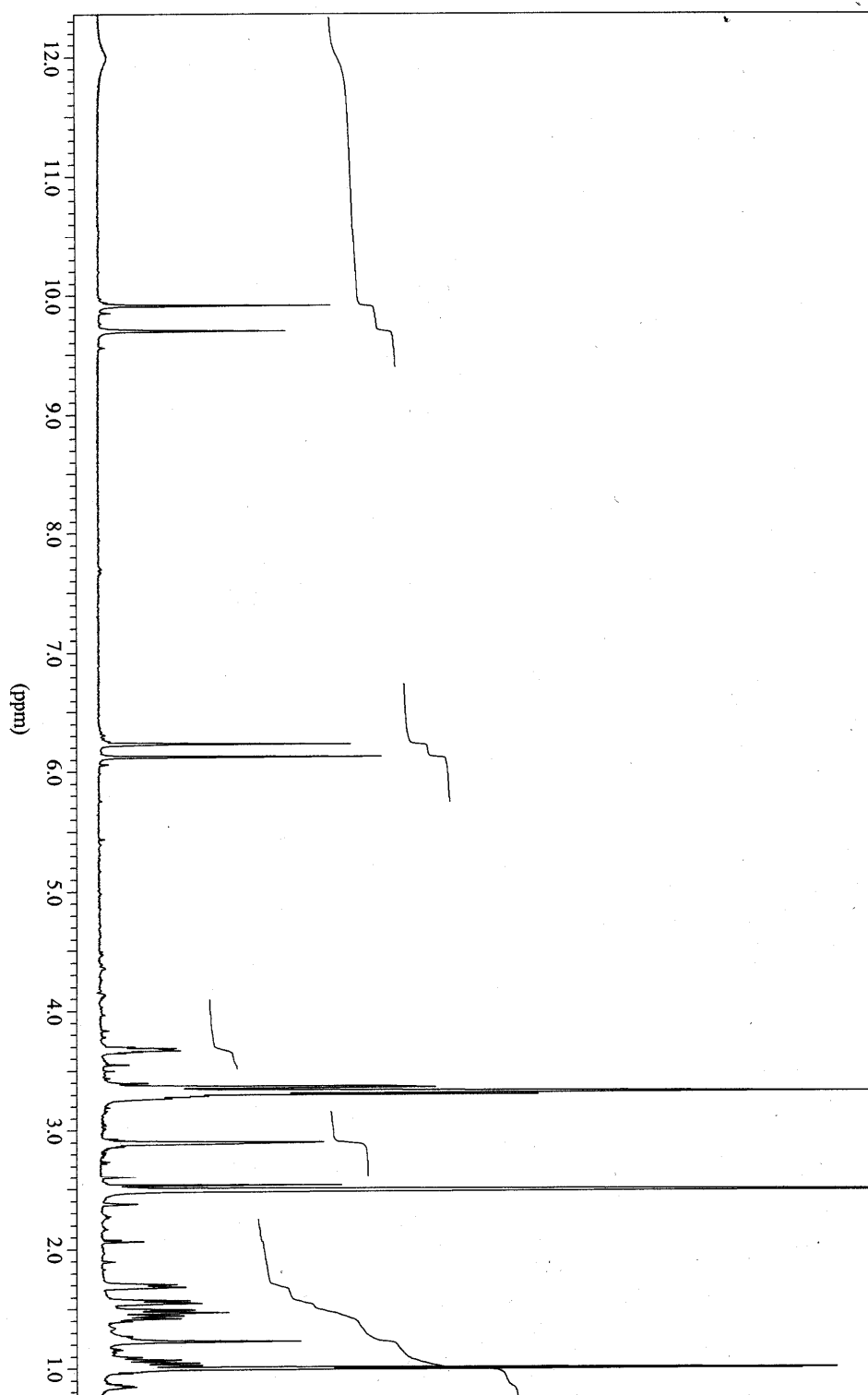


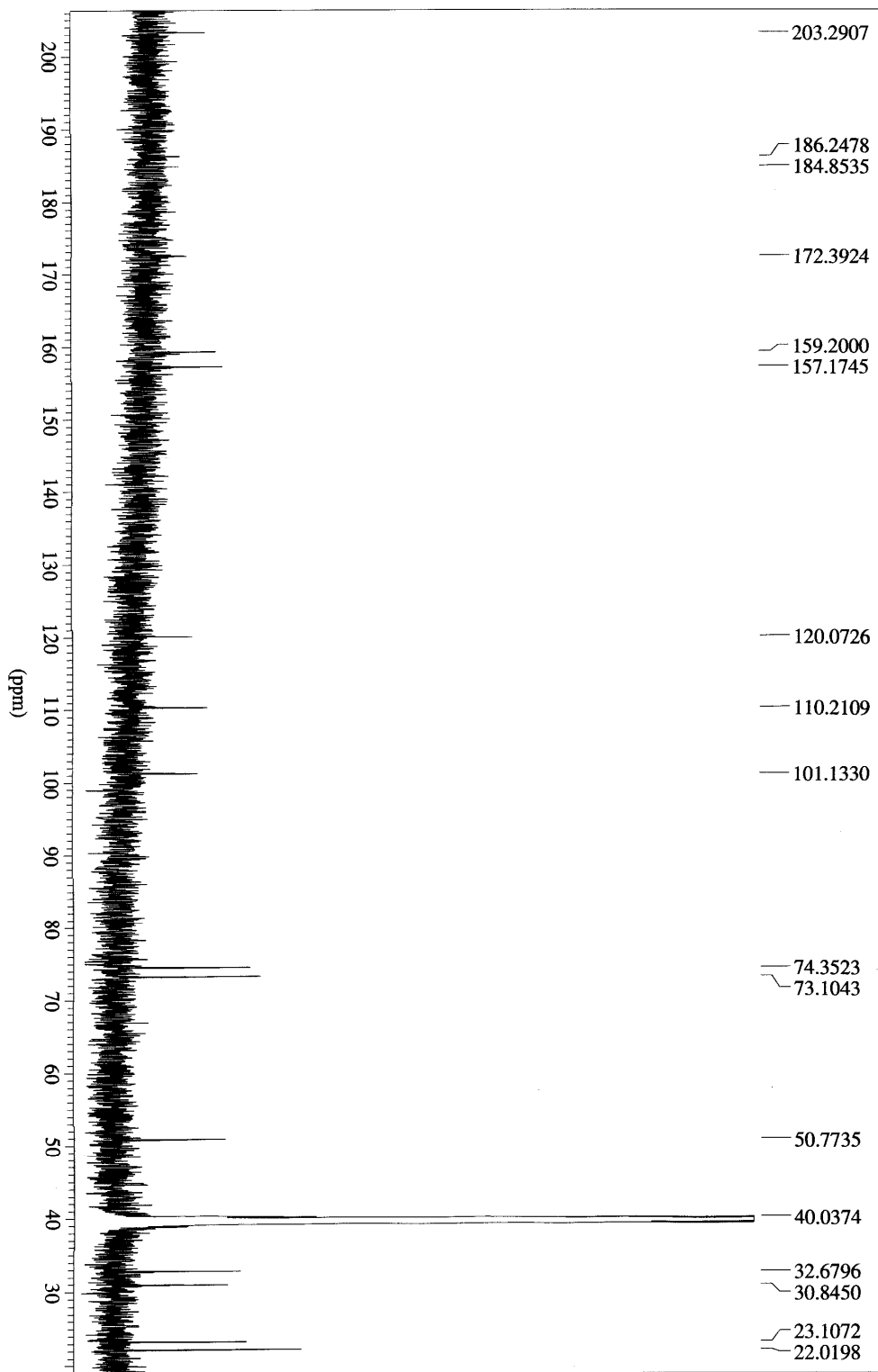
## ANEXO Q - Espectro bidimensional de HMBC do composto 0-2



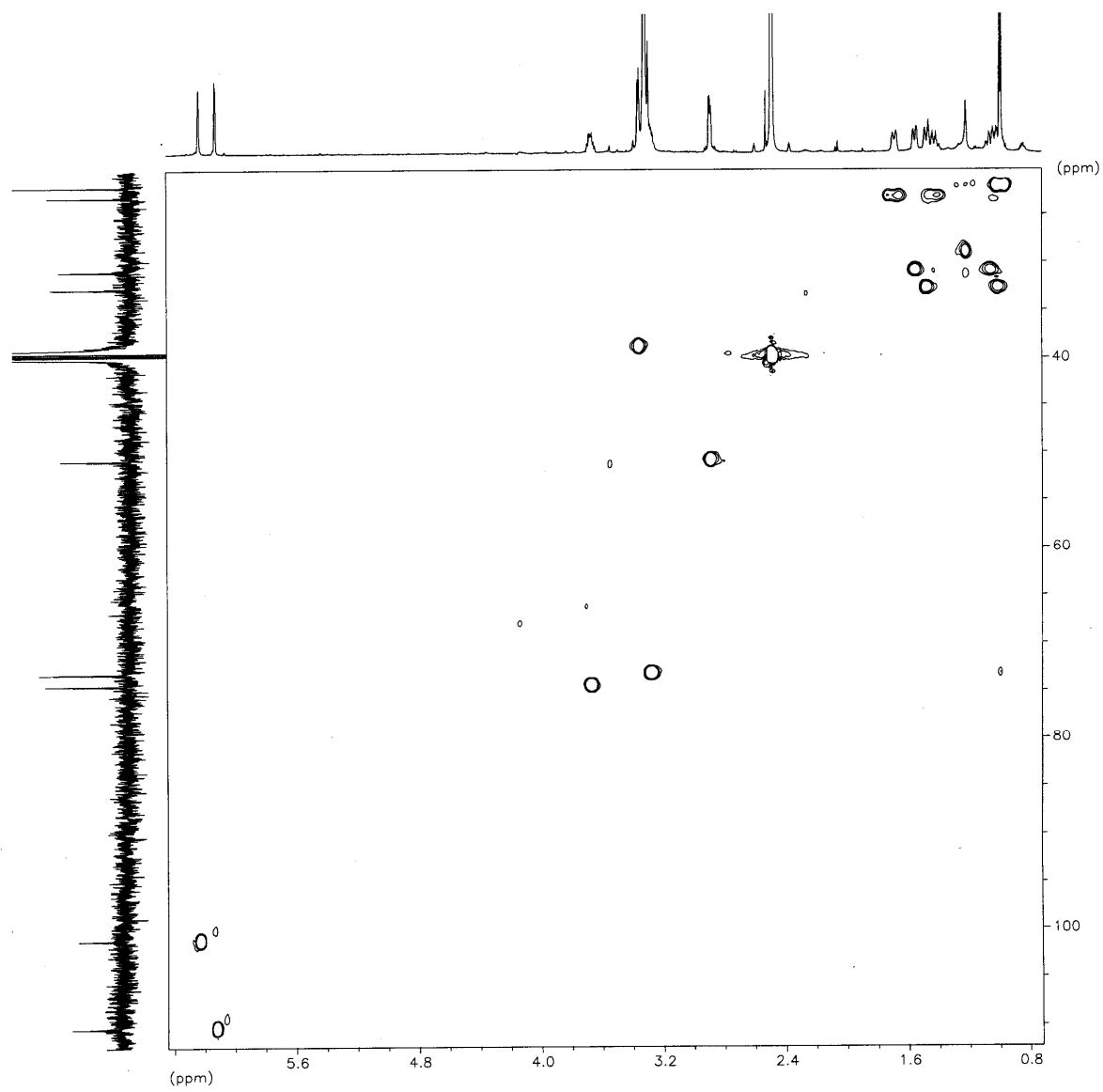
## ANEXO R - Espectro bidimensional de COSY do composto O-2



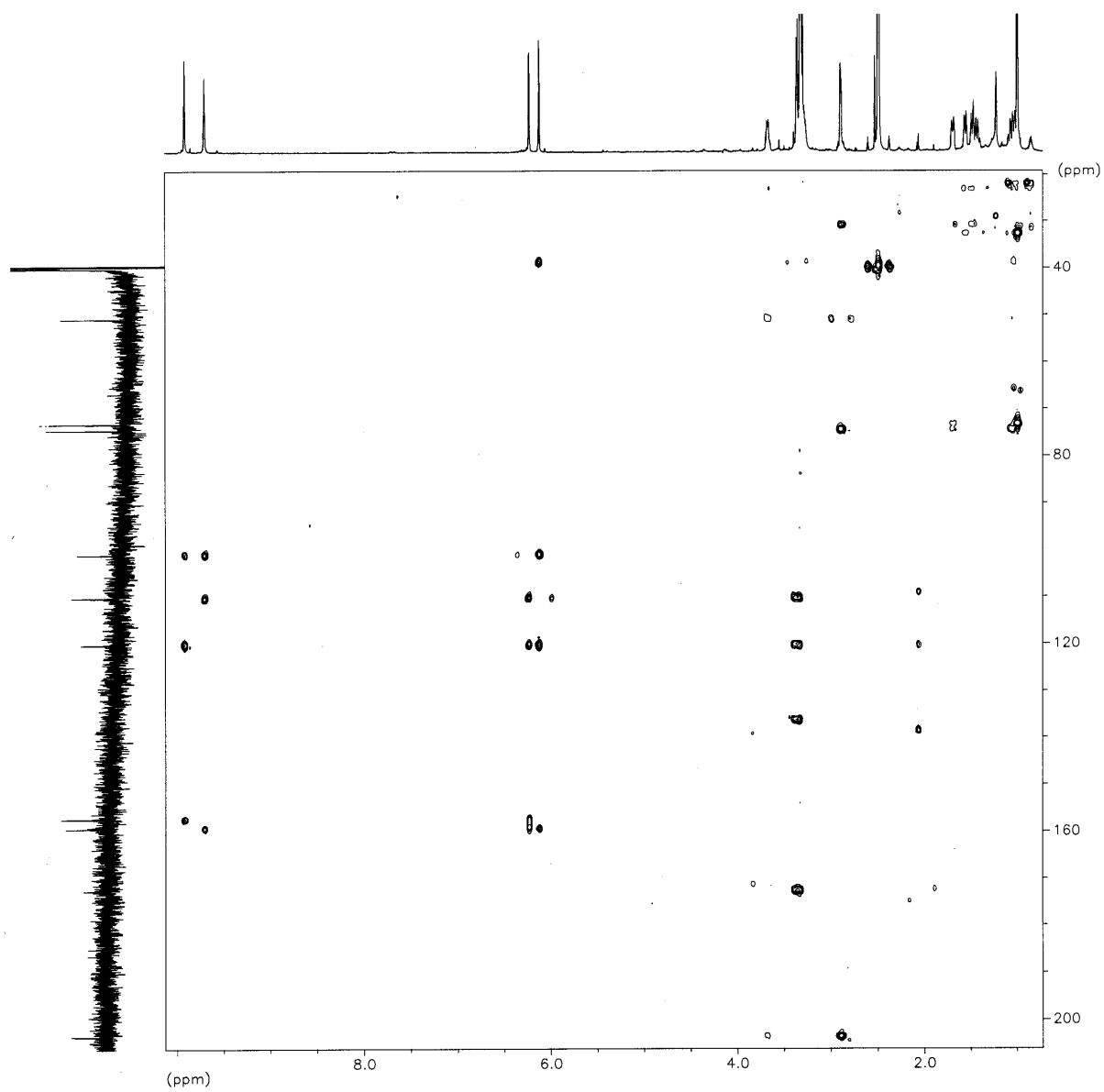
**ANEXO S - Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto JKL-4**

ANEXO T - Espectro de RMN-<sup>13</sup>C do composto JKL-4

## ANEXO U - Espectro bidimensional de HSQC do composto JKL-4



## ANEXO V - Espectro bidimensional de HMBC do composto JKL-4





## ANEXO W - Espectro bidimensional de COSY do composto JKL-4

