

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

ERICA DE CARVALHO

**Análise da microbiota associada à ascídia *Didemnum  
granulatum* para a produção de metabólitos secundários  
bioativos**

São Carlos

2010

ERICA DE CARVALHO

**Análise da microbiota associada à ascídia *Didemnum  
granulatum* para a produção de metabólitos secundários  
bioativos**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade  
Federal de São Carlos, para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

*Orientadores: Profa. Dra. Mirna Helena R. Seleglim*

*Prof. Dr. Roberto Gomes S. Berlinck*

São Carlos

2010

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

C331am

Carvalho, Erica de.

Análise da microbiota associada à ascídia *Didemnum granulatum* para a produção de metabólitos secundários bioativos / Erica de Carvalho. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 73 f.

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

1. Biotecnologia. 2. Produtos naturais. 3. Microorganismos. 4. Metabolismo secundário. 5. Metabólitos secundários de fungos. I. Título.

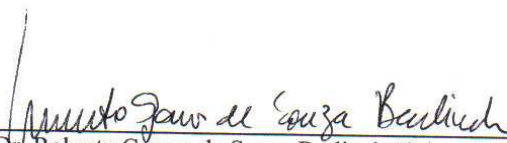
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

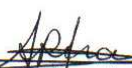
**Erica de Carvalho**

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.

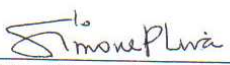
**Aprovado em: 01/06/2010**

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (Orientador)  
DFQ/USP

  
Prof. Dra. Angela Regina Araújo  
Instituto de Química – Unesp/ Araraquara

  
Prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
DMP/ UFSCar

  
Prof. Dra. Simone Possedente de Lira  
Departamento de Ciências Exatas – LCE - ESALQ/ Piracicaba

## Dedicatória

Dedico a todos que de alguma forma contribuíram para  
a realização deste trabalho!

## Agradecimentos

À minha família, especialmente meu esposo Marcio Rosales, pelo carinho e incentivo durante a realização deste projeto.

À Profa. Dra. Mirna Helena R. Seleglim e ao Prof. Dr. Roberto Gomes de S. Berlinck pela orientação.

À Darci da Consolação D. Javaroti pela paciência no ensinamento das técnicas laboratoriais em microbiologia.

À todos os amigos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva – UFSCar: Henrique, Luis Fernando, Bruna, Karina, Mayara, Luciana, Laine, Bruna Bueno e Thais.

À todos os amigos do Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais - IQSC: Raquel, Miriam, Fabiana, Karin, Stela, Marília, Fabio, Eli, Juliana, Carolina e Marcella.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia: Gisele, Moyses, Daniele, Elaine, Karina e Lívia.

Às professoras Ângela Araújo, Simone P. Lira e Cristina Paiva pela grande contribuição na defesa da dissertação.

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

Ao CEBIMar (USP) pelo apoio logístico durante a coleta do material biológico.

À Profa.Dra. Lara D. Sette e Rafaella Costa Bonugli Santos (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – UNICAMP) pela identificação das linhagens de micro-organismos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

## Resumo

Os estudos sobre produtos naturais marinhos, durante os últimos 20 anos de pesquisa, revelaram uma grande variedade de moléculas com estruturas complexas e até então desconhecidas, além de potentes atividades biológicas. Assim, os objetivos deste trabalho foram isolar linhagens de micro-organismos associadas à ascídia *Didemnum granulatum*, sua posterior fermentação para a produção de extratos brutos e a análise destes extratos na busca por metabólitos secundários bioativos. Para o isolamento das linhagens foram utilizados os seguintes meios de cultura preparados com água do mar artificial: extrato de malte 2% e 3%, cenoura/batata, fubá, aveia e GPY. A fermentação das linhagens foi feita em 250 mL dos mesmos meios de cultura sem agar, durante 30 dias. Os extratos brutos foram obtidos por partição com acetato de etila. Estes extratos foram enviados para bioensaio de atividade citotóxica contra células tumorais e analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) em placa de sílica gel (com diferentes reveladores). Dentre os 26 extratos, as amostras DG(M3) 6°C e DG(M3) 5°C apresentaram potente atividade citotóxica, as amostras DG(B)13, DG(M3)1 e DG(G)2B uma atividade moderada. As análises por CCD indicaram a presença de metabólitos secundários nos extratos bioativos. As linhagens bioativas foram identificadas como sendo três fúngicas: DG(M3)6°C (*Penicilium* sp.); DG(M3)5°C (*Cladosporium* sp.); DG(M3)1 (*Aspergillus* sp.) e duas bacterianas: DG(B)13 (*Aurantimonas* sp.); DG(G)2B (*Nocardioopsis* sp.). Estas foram cultivadas em escala maior de meio líquido (500 mL) e extraídas após 7, 14, 21 e 30 dias de incubação. Realizou-se um processo de limpeza destes extratos por extração em fase sólida (SPE) em coluna de sílica-gel derivatizada com C<sub>18</sub> (35 mL dos eluentes: H<sub>2</sub>O 100%, MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 e MeOH 100%). As frações geradas foram analisadas por CLAE-UV-EM buscando-se encontrar perfis característicos de metabólitos secundários. A partir da amostra DG(M3) 6°C (A+B), foi isolado e identificado o composto 13-desoxi-fomenona, previamente obtido por Tirilly *et al.* em 1983. Apesar deste composto não ser inédito, não há relatos na literatura de estudos envolvendo bioensaios citotóxicos contra células tumorais e nem mesmo deste composto ter sido isolado de outras espécies de microrganismos que não seja do fungo *Dicyma pulvinata*.

Palavras – chave: microbiota marinha, *Didemnum granulatum*, metabólitos secundários.

## Abstract

Studies of marine natural products in 20 years of research have revealed a wide variety of molecules with complex structures and hitherto unknown, and potent biological activities. The aims of this study were to isolate microbial strains associated with *Didemnum granulatum*, to fermentate such strains for the production of crude extracts and the screening of these extracts for bioactive secondary metabolites. For the isolation of the strains, six different culture media were prepared with artificial sea water: malt extract 2% and 3%, carrot/potato, corn, oat and GPY. The strains were cultivated for 30 days in 250mL of the same culture media. The crude extracts were obtained by partition with ethyl acetate. The extracts were sent for the cytotoxic activity bioassay and analyzed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plate (with absorption in UV-vis). Among the 26 extracts, samples DG (M3) 6'C and DG (M3) 5'C showed potent cytotoxic activity, samples DG (B) 13, DG (M3) 1 and DG (G) 2B a moderate activity. The analysis by TLC indicated the presence of bioactive secondary metabolites in the extracts. The strains were identified as bioactive three fungal: DG (M 3) 6'C (*Penicillium* sp.) DG (M3) 5'C (*Cladosporium* sp.) DG (M3) 1 (*Aspergillus* sp.) And two bacterial: DG (B) 13 (*Aurantimonas* sp.) DG (G) 2B (*Nocardiopsis* sp.). These were grown on a larger scale of broth (500 mL) and extracted after 7, 14, 21 and 30 days of incubation. We carried out a cleaning process of these extracts by solid phase extraction (SPE) column of silica gel derivatized with C<sub>18</sub> (35 mL of eluent: 100% H<sub>2</sub>O, MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 and MeOH 100%). The fractions generated were analyzed by HPLC-UV-MS trying to find characteristic profiles of secondary metabolites. From the DG sample (M3) 6'C (A + B), was isolated and identified the compound 13-deoxy-fomenona previously obtained by Tirilly *et al.* in 1983. Although this compound is not unheard of, no literature reports of studies involving bioassays cytotoxic against tumor cells and even this compound has been isolated from other species of microorganisms other than the fungus *Dicyma pulvinata*.

Key-words: marine microbiology, *Didemnum granulatum*, secondary metabolites.



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura molecular dos compostos: morfina (1), quinina (2) e estriquinina (3)	16
<b>Figura 2:</b> Distribuição dos metabólitos secundários de origem marinha (Fonte: Blunt <i>et al.</i> 2006).	18
<b>Figura 3:</b> Composto oxepinamidas A-C (4-6) isolado de <i>Acremonium</i> sp	19
<b>Figura 4:</b> Atividade biológica dos metabólitos secundários marinhos isolados em 2004 (Fonte: Blunt, 2004).	19
<b>Figura 5:</b> Compostos isolados da família <i>Didemnidae</i> .	21
<b>Figura 6:</b> Foto da ascídia <i>Didemnum granulatum</i> (Fonte: <a href="http://qopn.iqsc.usp.br/grupo">http://qopn.iqsc.usp.br/grupo</a> ).	22
<b>Figura 7:</b> Taxonomia da ascídia <i>Didemnum granulatum</i> .	22
<b>Figura 8:</b> Compostos isolados do invertebrado marinho <i>Didemnum granulatum</i> .	23
<b>Figura 9.</b> Processo de partição líquido-líquido com acetato de etila realizado com todas as amostras.	30
<b>Figura 10.</b> Procedimento de extração em fase sólida utilizando cartuchos SPE (C <sub>18</sub> ) nas amostras antes da injeção no CLAE-UV-EM.	33
<b>Figura 11.</b> Porcentagem de linhagens de micro-organismos isoladas em diferentes meios de cultura.	36
<b>Figura 12:</b> Penicidonas A (14) e C (16) isoladas de <i>Penicillium</i> sp e aspergillamidas A (17) e B (18) isoladas de <i>Aspergillus</i> sp.	42
<b>Figura 13.</b> Fotos com as cinco amostras bioativas e suas respectivas identificações.	43
<b>Figura 14.</b> Fluxograma das 10 frações obtidas através do processo de limpeza com cartucho SPE (C <sub>18</sub> ) das linhagens bioativas com crescimento de 30 dias.	46
<b>Figura 15.</b> Cromatograma da fração DG(G) 2B H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 (incubação de 30 dias), $\lambda_{\max}$ 256 nm.	47
<b>Figura 16.</b> Espectro de absorção em UV da fração DG(G) 2B H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1, (incubação de 30 dias), $\lambda_{\max}$ 256 nm.	47
<b>Figura 17:</b> Espectro de massas da fração DG(G) 2B H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1, (incubação de 30 dias) $\lambda_{\max}$ 256 nm.	48
<b>Figura 18.</b> Cromatograma de absorção em UV da fração DG(M3) 5°C H <sub>2</sub> O/MeOH, (incubação de 30 dias), $\lambda_{\max}$ 256 nm.	48

- Figura 19.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 5°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias ),  $\lambda_{\max}$  256 nm. 49
- Figura 20:** Espectro de massas da fração DG(M3) 5°C H<sub>2</sub>O/MeOH ( incubação de 30 dias),  $\lambda_{\max}$  256 nm. 49
- Figura 21.** Cromatograma de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias ),  $\lambda_{\max}$  257 nm. 50
- Figura 22.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias ),  $\lambda_{\max}$  257 nm. 50
- Figura 23:** Espectro de massas da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\max}$  257 nm. 51
- Figura 24.** Cromatograma da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (incubação de 7 dias),  $\lambda_{\max}$  254 nm. 53
- Figura 25.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, (incubação de 7 dias ),  $\lambda_{\max}$  254 nm. 53
- Figura 26:** Espectro de massas da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 7 dias ),  $\lambda_{\max}$  254 nm. 54
- Figura 27.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 14(A) e 21(B) dias ),  $\lambda_{\max}$  254 nm. 54
- Figura 28.** Cromatograma da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\max}$  254 nm. 55
- Figura 29:** Três possíveis estruturas moleculares baseadas na massa molecular da amostra DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1. (Fonte: Dictionary of Natural Products). 56
- Figura 30:** Espectro de RMN -<sup>1</sup>H da amostra DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, extração 7 dias em DMSO – d<sub>6</sub> (400 MHz). 58
- Figura 31:** Espectro de RMN -<sup>1</sup>H da amostra DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, extração 14 dias em DMSO – d<sub>6</sub> (400 MHz). 59
- Figura 32:** Espectro de RMN -<sup>1</sup>H da amostra DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, extração 21 dias em DMSO – d<sub>6</sub> (400 MHz). 60
- Figura 33:** Cromatograma do extrato bruto DG(M3) 6°C (A+B). Condições de análise: coluna C<sub>18</sub> Deltapack HPLC Waters 15  $\mu$ m 100 A (dimensões 300 X 7,8 mm), eluição isocrática MeOH/MeCN / H<sub>2</sub>O (75:25) e observado em 254 nm. 61

- Figura 34:** Estrutura molecular do composto isolado da amostra DG(M3) 6°C. 62
- Figura 35:** Cromatograma de absorção em UV (254 nm) do composto isolado da linhagem DG(M3) 6°C ,  $t_r = 12,9$  min. 62
- Figura 36:** Cromatograma de espectro de massa do composto isolado da amostra DG(M3) 6°C . 63
- Figura 37:** Estrutura molecular do composto fomenona. 63

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Atividade citotóxica de extratos brutos resultantes do cultivo das 26 linhagens de fungos associados à ascídia *Didemnum granulatum*, contra 3 linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (mama humano), HCT8 (côlon humano) e HL60 (leucemia) 37
- Tabela 2:** Atividade citotóxica de extratos brutos resultantes do cultivo das 5 linhagens bioativas de fungos associados à ascídia *Didemnum granulatum*, contra 3 linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (mama humano), SF 295 (glioblastoma humano) e HL60 (leucemia) 38
- Tabela 3:** Análise dos extratos brutos das linhagens de microrganismos (cultivo de 30 dias) por CDD comparado com os resultados do bioensaio citotóxico. 45
- Tabela 4:** Frações obtidas através do processo de limpeza com cartucho SPE (C<sub>18</sub>) das linhagens bioativas com crescimento de 7, 14, 21 e 30 dias. 52

## Lista de Abreviações

Av	Aveia
BC	Batata e cenoura
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiplique Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
DMSO	Dimetilsulfóxido
Fub	Fubá
GPY	Glicose, peptona e extrato de levedura
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
M2%	Malte 2%
M3%	Malte 3%
EM	Espectrômetro de massas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
u.m.a	Unidade de massa atômica
SPE	Extração em fase sólida
ASW	Água do mar artificial
MA	Muito ativo
MO	Moderadamente ativo
PA	Pouco ativo
SA	Sem atividade

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Fungos: características gerais e estrutura	14
1.2 Química dos produtos naturais como fonte para produção de fármacos	16
1.3 Produtos naturais de origem marinha	17
1.4 O invertebrado marinho <i>Didemnum granulatum</i>	20
<b>2. OBJETIVOS GERAIS</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivos Específicos	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1 Coleta e isolamento das amostras	25
3.2 Purificação das linhagens de microrganismos isoladas	26
3.3 Caracterização e identificação das linhagens	27
3.4 Preservação das linhagens de microrganismos	28
3.4.1 Preservação em água destilada e glicerol 10%	28
3.5 Cultivo líquido das linhagens de microrganismos para produção de extratos brutos	28
3.6 Procedimento de extração	29
3.7 Bioensaio Citotóxico	30
3.8 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos brutos	31
3.9 Procedimento de limpeza e estudo químico dos extratos brutos produzidos por linhagens de microrganismos	32
3.9.1 Limpeza das amostras	32
3.9.2 Análises cromatográficas das amostras	33
3.9.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear- RMN <sup>1</sup> H	34
3.9.4 Procedimento de purificação da linhagem selecionada	34
3.9.5 Elucidação da estrutura molecular do composto puro da fração selecionada	35
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
4.1 Isolamento das linhagens de microrganismos	36
4.2 Bioensaio Citotóxico	36
4.3 Identificação das linhagens	39
4.4 Análises químicas dos extratos brutos produzidos pelas linhagens microbianas	44

4.5 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de UV e Espectrômetro de Massas–CLAE-UV-EM	45
4.6 Análises de Ressonância Magnética Nuclear – RMN <sup>1</sup> H	56
4.7 Purificação da fração selecionada e elucidação da estrutura molecular	61
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>65</b>
<b>6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 Fungos: características gerais e estrutura**

Durante muito tempo os fungos foram considerados como vegetais. Somente a partir de 1969 foram classificados em um reino à parte, denominado Reino Fungi. Os fungos apresentam um conjunto de características próprias que permitem sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila; não têm celulose na sua parede celular, exceto alguns fungos aquáticos; e não armazenam amido como substância de reserva (Trabulsi, 2008). O sistema de classificação mais utilizado para os organismos do Reino Fungi é o adotado por Alexopoulos *et al.* (1996) que divide os fungos verdadeiros nos grupos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota.

Os fungos são organismos eucarióticos apresentando um só núcleo como as leveduras, ou multinucleados como os fungos filamentosos (fungos macroscópicos). São ubíquos, podendo ser encontrados na água, animais, vegetais, em detritos e no solo. Podem se desenvolver em meios de culturas especiais formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As leveduriformes são pastosas e cremosas, formadas por microrganismos unicelulares que cumprem as funções vegetativas e reprodutivas. As filamentosas podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas e são constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo ou hifas, podendo estas ser contínuas ou cenocíticas e tabicadas ou septadas (Pelczar, 1996).

O conjunto de hifas é denominado de micélio. Ao que se desenvolve dentro do substrato, e participa da função de sustentação e de absorção dos nutrientes, dá-se o nome de micélio vegetativo. O micélio aéreo é aquele que cresce acima do meio de cultivo e ele pode se diferenciar em um micélio reprodutivo, no qual são formados os esporos



(propágulos), podendo ser sexuado ou assexuado e possui importância fundamental na identificação da maioria das espécies (Trabulsi, 2008).

A temperatura para o crescimento fúngico abrange uma ampla faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas. A maioria dos fungos tolera amplas variações de pH, incluindo os fungos filamentosos que podem crescer na faixa de pH entre 1,5 e 11. O crescimento destes microrganismos leva, em média, de 7 a 15 dias de incubação. A necessidade de exposição à radiação luminosa varia de acordo com a espécie: muitas exigem luz para seu desenvolvimento; outras são inibidas (Trabulsi, 2002).

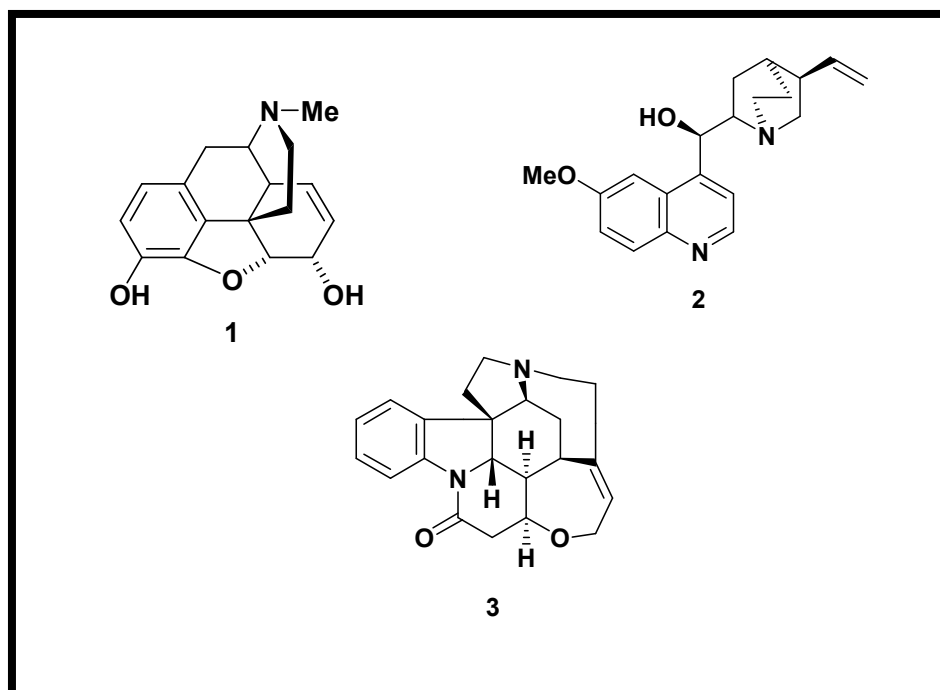
Como não podem sintetizar moléculas orgânicas a partir de moléculas inorgânicas como fazem as plantas, os fungos são heterotróficos e obtém energia degradando material orgânico depositado na natureza. Podem também parasitar plantas, animais (incluindo o ser humano) e ainda outros fungos. Esses organismos secretam enzimas no substrato onde se encontram e absorvem as moléculas resultantes da ação dessas enzimas. Com isso, além de obterem nutrientes para seu crescimento também disponibilizam os produtos resultantes da degradação para ação de outros microrganismos, participando ativamente nos ciclos de carbono, nitrogênio e fósforo além de outros nutrientes (Silva & Coelho, 2006).

O metabolismo dos fungos é geralmente dividido em metabolismo primário e secundário. Os metabólitos primários são utilizados no crescimento, desenvolvimento ou reprodução dos organismos, e os secundários geralmente estão relacionados com a formação de pigmentos, toxinas ou odores, suas fórmulas químicas estruturais variam de moléculas simples a compostos complexos, derivando em sua maioria das vias do metabolismo primário (Putzke, 2002). Antibióticos, anti-tumorais e imunossupressores são alguns dos exemplos de atividades biológicas observadas para metabólitos secundários de fungos (Strobel & Daisy, 2003).

## 1.2 Química dos produtos naturais como fonte para produção de fármacos

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais e a busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização destas substâncias. (Viegas Jr *et al.* 2006). Há registros de utilização de plantas como a *Papaver somniferum* (papoula), da qual seu princípio ativo é a morfina (**1**), desde 5000 a.C.

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começou a acontecer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracteriza-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. É desta época o isolamento da morfina (**1**) (1806), quinina (**2**) e estriquinina (**3**) (1820) (Pinto, 2002).



**Figura 1:** Estrutura molecular dos compostos: morfina (**1**), quinina (**2**) e estriquinina (**3**).

Os produtos naturais têm desempenhando um importante papel como uma das principais fontes de novos fármacos (Sticher, 2008). A crescente necessidade de medicamentos capazes de controlar doenças novas ou cepas de microrganismos resistentes a antibióticos estimulou a pesquisa por fontes não convencionais de produtos naturais bioativos (Kelecon, 2002).

### **1.3 Produtos naturais de origem marinha**

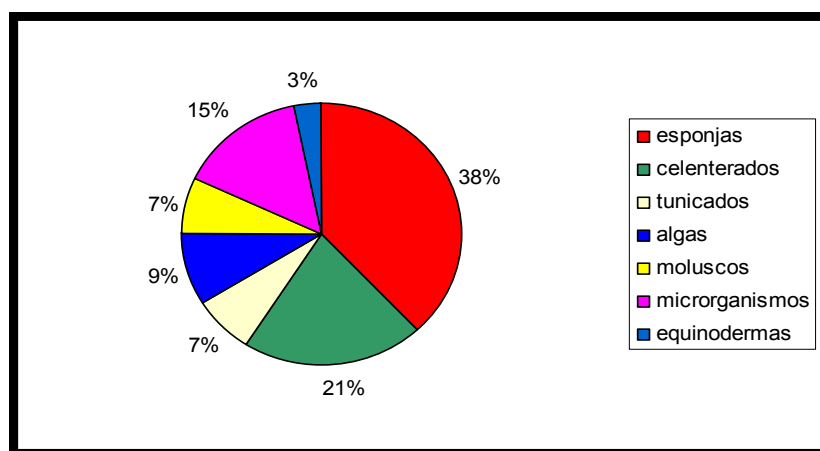
Os organismos vivos produzem uma quantidade imensa de compostos orgânicos cuja grande maioria parece não participar diretamente do seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, a apreciação crescente dos diversos efeitos biológicos produzidos por estas substâncias, tem incitado uma reavaliação dos seus possíveis papéis, especialmente no contexto das interações ecológicas (Macedo Jr., 2007). Por esses motivos, a química de produtos naturais tornou-se alvo de intensas pesquisas nas últimas décadas, na busca por novos fármacos, antibióticos, inseticidas e herbicidas (Macedo Jr., 2007).

Embora o litoral brasileiro seja o segundo mais extenso depois da Austrália, o desenvolvimento da química de produtos naturais de organismos marinhos foi negligenciado por muitos anos, porque o principal foco da química de produtos naturais brasileira foi direcionado ao estudo de plantas (Kossuga *et al.*, 2007). Recentemente, pesquisas sobre a química de microrganismos marinhos tiveram excepcional aumento devido à necessidade da busca de novos compostos com aplicações farmacológicas economicamente viáveis. Dentre esses compostos podemos destacar os compostos nitrogenados como alcalóides e peptídeos, comumente isolados de várias cepas de fungos marinhos, muitos com potente atividade biológica (Saleem *et al.*, 2006).

Os estudos de produtos naturais marinhos em 20 anos de pesquisa revelaram uma grande variedade de moléculas com estruturas complexas e até então desconhecidas, além

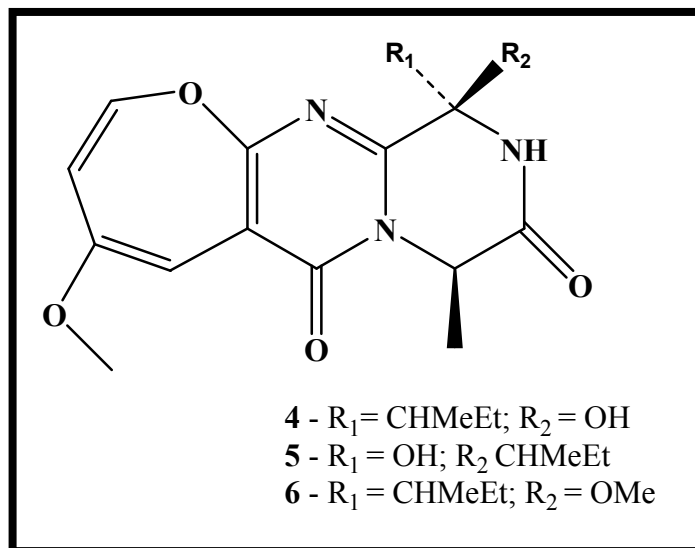
de potentes atividades biológicas e interações com alvos celulares (Costa-Lotufo *et al.*, 2009). Segundo Granato *et al* (2005) são conhecidas mais de 10.000 substâncias de invertebrados e microrganismos marinhos.

Segundo Blunt *et al.* (2006), a maioria dos metabólitos secundários de origem marinha são isolados de esponjas (38%), celenterados (21%), microrganismos (15%), tunicados (7%) e moluscos (7%), como ilustrado na **Figura 1**.



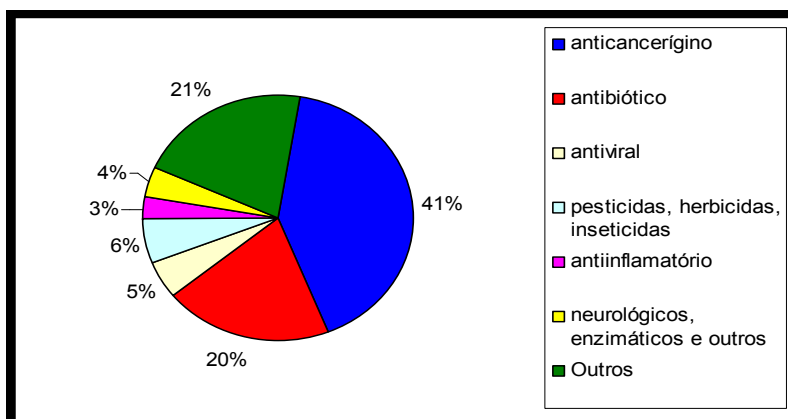
**Figura 2:** Distribuição dos metabólitos secundários de origem marinha (Fonte: Blunt *et al.* 2006).

Embora o número de pesquisas sobre produtos naturais isolados de microrganismos, principalmente de fungos associados aos tunicados, seja baixo, os metabólitos isolados apresentam alto índice de atividades biológicas. Podem-se citar como exemplo, as oxepinamidas A–C (4-6), extraídas do fungo *Acremonium sp.* isolado da ascídia *Ecteinascidia turbinata*. A oxepinamida A (4) mostrou considerável atividade anti-inflamatória em bioensaio utilizando-se orelhas de ratos com edema (Bugni *et al.* 2004).



**Figura 3:** Composto oxepinamidas A-C (4-6) isolado de *Acremonium* sp.

Segundo Blunt *et al.* (2006), muitos dos metabólitos secundários isolados do ambiente marinho (invertebrados, algas, microrganismos), apresentam algum tipo de atividade biológica como: anticancerígena, antifúngica, antimalárica, antiinflamatória, dentre outras, como observado na **Figura 4**.



**Figura 4:** Atividade biológica dos metabólitos secundários marinhos isolados em 2004 (Fonte: Blunt *et al.*, 2006).

O Brasil é um país em crescimento, mas que possui muitas dificuldades no que diz respeito à saúde, tanto no âmbito hospitalar quanto na renda econômica para aquisição de

medicamentos. Devido a esses fatores, pesquisas sobre isolamento de compostos biologicamente ativos, seus mecanismos de ação, sínteses e meios economicamente viáveis para produção de fármacos, tornam-se cada vez mais necessárias (Lira, 2007).

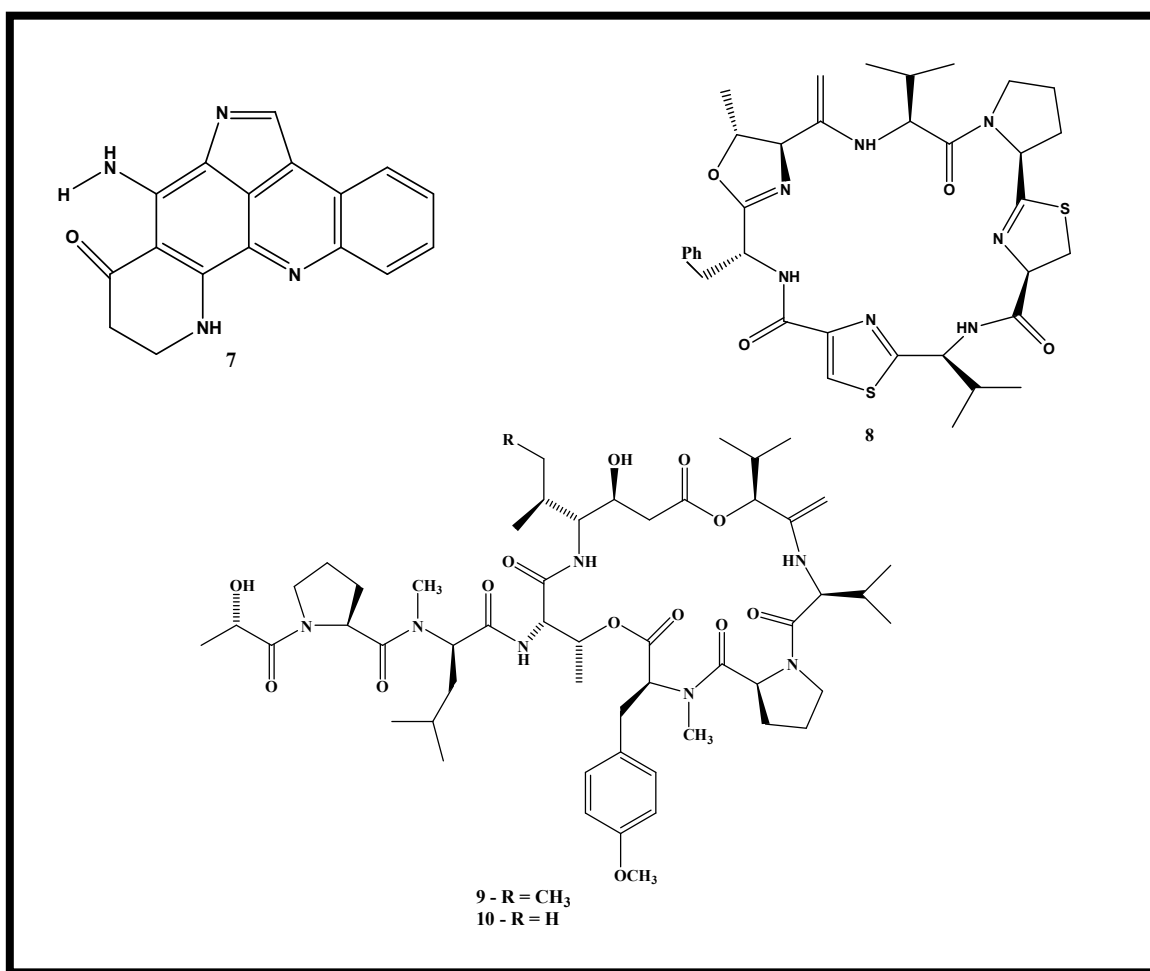
#### **1.4 O invertebrado marinho *Didemnum granulatum***

Os urocordados, comumente denominados de tunicados, são animais marinhos comuns que pouco se aparentam com os cordados. Os tunicados abrangem três classes: Ascidiacea, Thaliacea e Larvacea (Barnes, 1996). As ascídias são organismos dominantes em muitas comunidades marinhas (Seed & O'Connor, 1981; Schmidt & Warner, 1986; Todd & Turner, 1988; Teo & Ryland, 1994), podendo ser solitárias ou viver em colônias e encontram-se sempre fixas ao substrato (Barnes, 1996). A maioria das ascídias é encontrada em águas rasas (fixas em rochas, estacas, e fundos dos navios), mas podem ser encontradas até 200 m de profundidade (Barnes, 1996).

Estes invertebrados possuem um evoluído mecanismo de defesa química contra seus predadores (Matthew & Joullié, 2002). Muitos autores explicam seu sucesso ecológico segundo a habilidade destes animais em sintetizar metabólitos secundários, que possuem papel importante na defesa contra predação. (Seed *et al.*, 1981; Schmidt *et al.*, 1986; Todd *et al.*, 1988; Teo *et al.*, 1994 *apud* Jimenez *et al.*, 2003).

*Didemnidae* é a maior família de ascídias em termos de número de espécies. É considerada uma das melhores fontes de produtos naturais com diversidade química e potente atividade biológica. Várias espécies do gênero *Didemnum* já foram investigadas do ponto de vista químico, e observou-se predominância de alcalóides, muitos deles com atividade biológica (Segraves *et al.*, 2003; Ham & Kang *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2005 *apud* Takeara *et al.*, 2007).

Como exemplos desta diversidade de compostos isolados de ascídias da família *Didemnidae* podemos citar o alcalóide plakinidina D (**7**) da *Didemnum rubem* (Ford *et al.*, 1997); o tiazol ciclodedimnamida B (**8**), extraído de *Didemnum molle*, que exibiu moderada atividade contra células de câncer do cólon humano e foi posteriormente sintetizado (Pattenden *et al.*, 1999) e dois polipeptídeos (tamandarinas A (**9**) e B(**10**)) isolados de uma espécie desconhecida de ascídia com potente atividade citotóxica (Fenical *et al.* 2000).



**Figura 5:** Compostos isolados da família *Didemnidae*.



**Figura 6:** Foto da ascídia *Didemnum granulatum* (Fonte: <http://qopn.iqsc.usp.br/grupo>).

**Reino Animalia**

**Filo: Chordata**

**Subfilo: Urochordata**

**Classe: Ascidacea**

**Família: *Didemnidae***

**Gênero: *Didemnum***

**Espécie: *Didemnum granulatum***

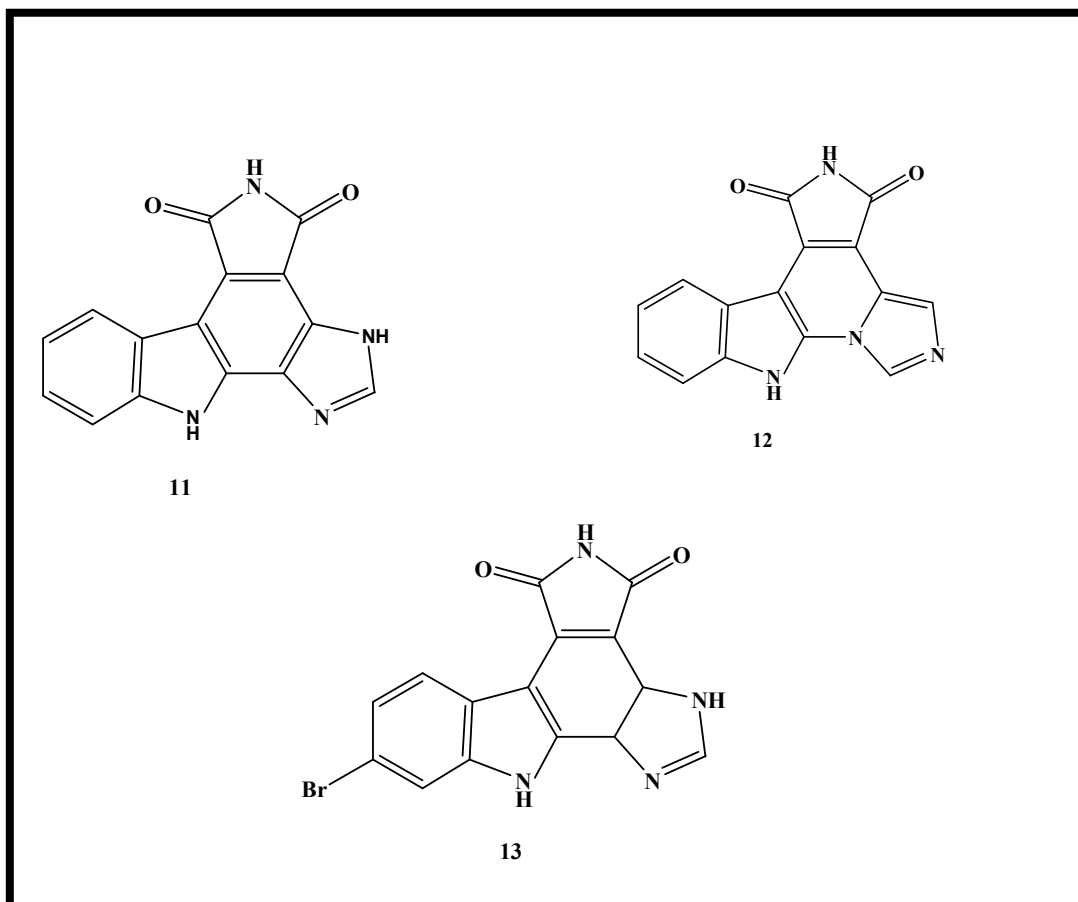
**Figura 7:** Taxonomia da ascídia *Didemnum granulatum*.

Segundo Rocha *et al.* (2005), a ascídia *Didemnum granulatum* pode ser encontrada em alguns dos estados da costa litorânea brasileira (SC, PR, SP, BA, RN e CE). Berlinck *et al.* (1998) investigaram extratos desta ascídia coletada no litoral de São Sebastião (SP) e isolaram dois alcalóides aromáticos granulativimida (11) e isogranulativimida (12).

Posteriormente em 2001 Berlinck e colaboradores continuaram os estudos destes compostos extraídos da *Didemnum granulatum* e isolaram o alcalóide granulativimida (11) e a 6-bromogranulativimida (13), que foram identificados por análises de dados



espectroscópicos. O isolamento destes compostos corroborou nas suposições que a granulitimida (11) seja um composto que ocorre naturalmente no metabolismo da ascídia.



**Figura 8:** Compostos isolados do invertebrado marinho *Didemnum granulatum*.

Diante da falta de estudos de compostos isolados de micro-organismos associados à invertebrados da família *Didemnidae* principalmente da ascídia *Didemnum granulatum*, é de suma importância buscar compostos inéditos em fontes que ainda não foram exploradas.

## 2. Objetivo geral

O objetivo principal foi isolar linhagens de fungos marinhos associadas a ascídia *Didemnum granulatum*, objetivando seu crescimento para a produção de extratos com compostos bioativos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar linhagens fúngicas associadas da ascídia *Didemnum granulatum*.
- Cultivar por 30 dias para a produção de extratos brutos e selecionar linhagens fúngicas com perfil para produção de metabólitos secundários, por meio de análises químicas (CCD e CLAE-UV-EM) e de atividade biológica dos extratos brutos do cultivo dessas linhagens.
- Realizar cultivo líquido das linhagens selecionadas com extração em intervalos de 7, 14, 21 e 30 dias, para avaliar e analisar suas atividades biológicas e características químicas ao longo do tempo de cultivo.
- Verificar a possível produção pelos micro-organismos isolados dos produtos naturais didemnida A, B, D e E, granulatimida e isogranulatimida isolados da ascídia *Didemnum granulatum*.
- Isolar e identificar por técnicas espectroscópicas de uso corrente (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensional, UV e EM) os compostos presentes em pelo menos uma das linhagens que apresentaram atividade biológica e perfil químico interessante.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Coleta e isolamento das amostras.

As amostras da ascídia *Didemnum granulatum* foram coletadas em setembro de 2005 na região de São Sebastião – SP, por mergulho autônomo entre 2 e 6 m de profundidade na ilha Toque-Toque (temperatura da água aproximadamente 22°C), utilizando-se sacos plásticos contendo água do mar para acondicionar as amostras.

Após a coleta, as amostras foram colocadas em frascos esterilizados e mantidas a 4°C. No laboratório, a ascídia foi submetida a uma desinfecção superficial através de sucessivas lavagens com solução de 0,001 g/L de HgCl<sub>2</sub> em etanol a 5 % por 1 minuto, seguida de três lavagens com água estéril (Newel, 1976). Posteriormente, a ascídia foi cortada de forma asséptica, com bisturi estéril, em pequenas porções de 1 cm<sup>2</sup> que foram inoculadas sobre placas de Petri com diferentes meios de cultura contendo o antibiótico rifampicina (para evitar crescimento bacteriano) na concentração de 300 mg/L. Após a inoculação, as placas foram incubadas à temperatura de 25 a 28°C durante 7 dias.

Todas as placas foram levadas ao Laboratório de Microbiologia no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em São Carlos - SP, onde foi feita a purificação das linhagens e a caracterização macroscópica inicial das mesmas.

Os meios de cultura que foram utilizados são descritos a seguir, todos com pH = 8,00:

- Agar Malte 2% – 20 g/L Biomalt, 15 g/L ágar, 1L ASW\* (Água do mar artificial).
- Agar Malte 3% – 30 g/L Biomalt, 15 g/L ágar, 1L ASW.
- Ágar de extrato de levedura, peptona e glicose [Glucose peptone yeast extract Agar (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; 1L ASW.

- Ágar de cenoura e batata [Potato carrot Agar (KM)] – 20 g/L batatas cozidas e esmagadas, 20 g/L cenouras cozidas e esmagadas, 20g/L ágar, 1L ASW.
- Ágar Fubá – 42g de fubá são agitadas em 500 mL de água destilada a 60°C por 12h, filtrada, e o filtrado é diluído com água até 1L. São adicionados 15g de ágar e sais de 800 mL/L ASW.
- Ágar Aveia – 30g de flocos de aveia (oatflakes) 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 1L. Posteriormente são dissolvidos os sais para 1L de ASW. Por último 20g de ágar.

\*ASW -:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 1,36 g/L;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 9,68 g/L; KCl – 0,61 g/L; NaCl – 30 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0,14 g/L;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – 3,47 g/L;  $\text{NaHCO}_3$  – 0,17 g/L; KBr – 0,1 g/L;  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,04 g/L; Ácido bórico – 3 g/L.

### 3.2 Purificação das linhagens de micro-organismos isoladas

Após incubação das placas à temperatura de 25 a 28°C durante 7 dias, as colônias de fungos foram purificadas pelo método das estrias utilizando-se alça ou agulha de inoculação e pela técnica da diluição em tubos. Para a organização das linhagens isoladas, foram identificadas por códigos de acordo com o nome do invertebrado de origem, sendo o código das linhagens isoladas da ascídia *Didemnum granulatum* iniciado com DG. 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 ascídia *Didemnum granulatum* em malte 3%, a qual teve o número 6 estipulado na placa de coleta, recebeu o código DG (M3) 6. Posteriormente as

linhagens bioativas que foram cultivadas e os meios extraídos novamente em intervalos de 7, 14, 21 e 30 dias foram recodificadas acrescentando uma letra no final do código para ilustrar o tempo de extração ( A = 7 dias; B = 14 dias; C = 21 dias e D = 30 dias).

### **3.3 Caracterização e identificação das linhagens**

Posteriormente ao isolamento das linhagens, foi realizada uma descrição das mesmas com base nas características macroscópicas das colônias (aspecto, cor, consistência, presença/ausência de micélio aéreo) e nas características microscópicas do fungo (hifa septada/não septada, tipo de esporos). Esta descrição inicial teve a finalidade de evitar o isolamento de linhagens fúngicas repetidas (da mesma espécie) no mesmo meio de cultura e de facilitar o reconhecimento e a purificação das linhagens. Para facilitar a descrição, as colônias foram fotografadas nessa etapa do trabalho. As fotos foram feitas no laboratório de microbiologia no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva-UFSCar, foi utilizada uma máquina fotográfica modelo Cyber-Shot 6.0 mega pixels 2.4 monitor LCD da marca Sony.

A caracterização taxonômica preliminar das linhagens ativas no bioensaio citotóxico foi realizada na Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA – UNICAMP pela doutoranda Rafaella Costa Bonugli-Santos sob a orientação da Profa. Dra. Lara Durães Sette. A morfologia das colônias isoladas foi examinada em microscópio estereoscópio (Leica MZ6) e análises microscópicas foram realizadas em microscópio óptico (Leica DMLS) à partir de lâminas preparadas com lactofenol azul de algodão. Com base nestas observações e seguindo protocolos morfológicos determinados pela literatura (DOMSCH, *et al.*, 1980; ELLIS, 1971, 1976; KLICH & PITT, 1988; PITT, 1979, 1985; RAPPER & FENNELL, 1965; SAMSON *et al.*, 2002), as linhagens de microrganismos foram

identificadas como: *Penicilium* sp. (DG(M3) 6°C), *Cladosporium* sp. (DG(M3) 5°C), *Aspergillus* sp. (DG(M3) 1), *Nocardiosis* sp. (DG(B) 13 e *Aurantimonas* sp. (DG(G) 2B).

### **3.4 Preservação das linhagens de micro-organismos**

Para garantir a estabilidade genética das linhagens, que pode ser perdida após sucessivos repiques, estas foram preservadas antes do início dos experimentos de crescimento para a produção dos extratos brutos. Foram utilizadas duas diferentes técnicas (água destilada e glicerol 10%) adaptadas de Deshmukh (2003). A escolha de duas técnicas diferentes amplia as possibilidades de recuperação das linhagens após a estocagem. Como há a possibilidade de alguma linhagem fúngica não se adequar aos procedimentos de preservação adotados, foram também estocadas em geladeira após crescimento em tubos de ensaio com ágar inclinado.

#### **3.4.1 Preservação em água destilada e glicerol 10%**

Para a preservação em água destilada, foram colocados 1 ml de água destilada em 4 tubos para centrífuga (Eppendorf) para cada linhagem. Os tubos foram etiquetados e esterilizados em autoclave a uma temperatura de 120°C por 20 min. Foram retirados 3 discos de micélio de cada linhagem (de preferência com esporos) com o auxílio de uma seringa plástica e transferidos para os tubos, os quais foram posteriormente armazenados na geladeira. Na preservação em glicerol 10%, realizou-se o mesmo protocolo da preservação em água destilada, diferindo no armazenamento que se sucedeu em acondicionamento por 30 minutos na geladeira e, após, este período, armazenamento em congelador a temperatura de -20°C.

### **3.5 Cultivo líquido das linhagens de micro-organismos para obtenção de extratos brutos**

Nos experimentos de cultivo líquido para a produção de extratos brutos, as linhagens purificadas e preservadas foram reativadas em placa de Petri com o mesmo meio de cultura em que foram isoladas. Após sete dias de incubação, um disco de micélio foi inserido em um frasco contendo o respectivo meio de cultura de cada linhagem, mas em condição para cultivo líquido (250 mL). Os cultivos foram feitos sem agitação e, no final de 30 dias de incubação a 25°C, foi realizada a extração para a obtenção dos extratos brutos.

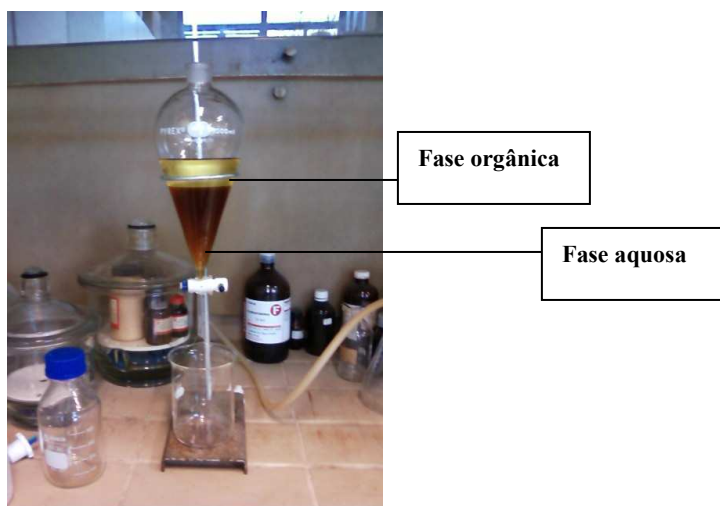
As linhagens que forneceram extratos com atividade citotóxica de moderada a alta [DG(M3) 6°C; DG(M3) 5°C; DG(B)13; DG(G) 2B e DG(M3)1], foram cultivadas novamente em maior volume (500 mL) de meio de cultura líquido (Cenoura/batata; malte 3% GPY) e extraídas após 7, 14, 21 e 30 dias de incubação. O extrato da linhagem DG(G) 2B, foi extraído somente após 30 dias de crescimento.

### **3.6 Procedimento de extração**

O procedimento de extração dos meios de cultura foi realizado com acetato de etila. Após o período de incubação (30 dias) em meio líquido, foram adicionados 250 mL de AcoEt aos frascos sob agitação por 5 minutos. O material foi homogeneizado com o auxílio de um liquidificador industrial de aço inoxidável. Posteriormente as amostras foram levadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais, localizado no Instituto de Química – USP em São Carlos, para realização das análises químicas.

Na primeira etapa da extração dos meios de cultura realizou-se uma filtração a vácuo 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 (**Figura 4**), da qual a parte aquosa foi separada da fração acetato de etila. A fração aquosa foi descartada (por conter muita quantidade de componentes do meio de cultura e sais da

água do mar). A fração acetato de etila coletada em um balão, e posteriormente seca em um rota-evaporador, obtendo-se o extrato bruto da linhagem.



**Figura 9.** Processo de partição líquido-líquido com acetato de etila realizado com todas as amostras.

Os extratos secos de cada amostra foram transferidos para frascos de vidro, previamente pesados e etiquetados, para a avaliação de suas respectivas massas. As amostras foram colocadas em um sistema de centrifuga a vácuo Savant modelo Speedvac Plus SC 210 para garantir que estavam totalmente secas antes da pesagem.

### **3.7 Bioensaio Citotóxico**

Foram enviados cerca de 3 a 5 mg de cada extrato bruto para o bioensaio de atividade citotóxica em células tumorais. A atividade citotóxica foi testada utilizando-se células tumorais no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, pelos pesquisadores Prof. Manoel O. Moraes, Profa. Dra. Claudia de Ó Pessoa e Bruno Coelho Cavalcanti.

A atividade citotóxica das amostras foi avaliada utilizando-se o protocolo descrito por Mosman *et al.* (1983). Neste bioensaio no qual foram enviadas todos os extratos, utilizaram-se as linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (mama humano), HCT-8



(c6lon humano) e HL60 (leucemia) e SF295 (glioblastoma humano) cedidas pelo Mercy Children's Hospital, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibi6ticos, mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Os extratos foram dissolvidos em DMSO na concentra76o estoque de 20 mg/mL. As c6lulas foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: 0,7 x 10<sup>5</sup> (HCT8), 0,1 x 10<sup>6</sup> (HL60) e 0,1 x 10<sup>6</sup> (MDA-MB435). Os extratos foram incubados durante 72 horas em uma 6nica concentra76o (100 µg/mL). As absorv6ncias foram obtidas com o aux6lio de um espectrof6t6metro de placa a 550 nm. Os experimentos foram analisados segundo suas m6dias e respectivos intervalos de confian7a a partir da regress6o n6o linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em triplicata em dois experimentos independentes.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citot6xico das amostras testadas. Amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibi76o de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibi76o de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibi76o de crescimento variando de 75 a 100%).

### **3.8 An6lise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos brutos**

A an6lise dos extratos brutos por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada retirando-se uma al6quota destes extratos. A al6quota foi solubilizada em MeOH na concentra76o de aproximadamente 1 mg/mL. Para estas an6lises foram usadas cromatofolhas (20 X 20 cm) de s6lica gel 60 sobre poli6ster com indicador de UV F<sub>254</sub> (Aldrich). Os padr6es timidina e colesterol foram aplicados ao lado das amostras, as placas

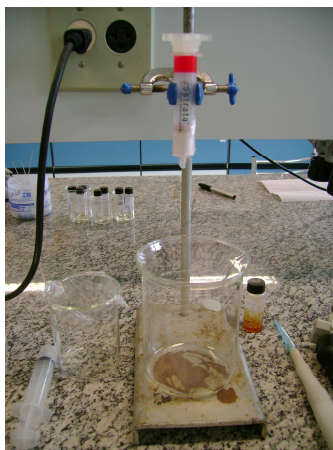
cromatográficas foram inseridas em uma cuba contendo 20 mL da fase móvel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1

Posteriormente à eluição, as placas foram observadas sob luz UV com lâmpada Spectroline com comprimento de onda de 254 e 365 nm e borrifadas com três reveladores: ácido fosfomolibdico em EtOH (revelador oxidante que indica a presença de compostos como terpenos, esteróis, ácidos graxos, acetogeninas e compostos correlatos), Dragendorff (revelador de alcalóides) e ninidrina (indicadora da presença de aminas primárias e aminoácidos). As placas com timidina foram reveladas com ninidrina, as com colesterol com ácido fosfomolibdico na qual foram expostas em placa aquecedora para posterior observação.

### **3.9 Procedimentos de limpeza e estudo químico dos extratos brutos produzidos por linhagens fúngicas**

#### **3.9.1 Limpezas das amostras**

As amostras que apresentaram atividade citotóxica passaram por um processo de limpeza (retirada de sais e componentes do meio de cultura) por extração em fase sólida (SPE) em coluna  $\text{C}_{18}$  (eluente: 100%  $\text{H}_2\text{O}$ ; 100%  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  1:1 e 100%  $\text{MeOH}$ ) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Procedimento de extração em fase sólida utilizando cartuchos SPE ( $C_{18}$ ) nas amostras antes da injeção no CLAE-UV-EM.

### 3.9.2 Análises cromatográficas das amostras

No processo de limpeza das amostras foram geradas 10 frações (linhagens incubadas por 30 dias) e 17 frações (linhagens incubadas por 7, 14, 21 e 30 dias) que foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a detectores de UV com arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massas (CLAE-UV-EM). Este sistema, da marca Waters<sup>®</sup>, é composto por cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Alliance 2695, acoplado a dois detectores: espectrofotômetro UV-vis, com arranjo de fotodiodos, modelo 2996, e um espectrômetro de massas, modelo ZQ 2000, gerenciados pelo sistema Empower.

O procedimento adotado antes da injeção foi de diluir as amostras em MeOH grau HPLC na concentração de 1 mg/mL em pequenos frascos que foram inseridos no amostrador automático. As análises cromatográficas foram realizadas durante 40 minutos, utilizando-se como solventes acetonitrila, metanol e água miliQ<sup>®</sup> com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição se iniciou com 80% de água miliQ<sup>®</sup> ultra-pura, 10% de metanol e 10% de acetonitrila e terminou com 50% de metanol e 50% de acetonitrila, com vazão de 1 mL/min. Foi utilizada uma coluna de sílica derivatizada com grupos  $C_{18}$  fase

reversa, da marca Phenomenex<sup>®</sup>, Sinergy 4  $\mu$  Fusion – RP80 (dimensões 250 X 4,60 mm, 4  $\mu$ m).

### **3.9.3 Análises de Ressonância Magnética Nuclear - RMN**

Após análises dos cromatogramas obtidos, as amostras bioativas que foram obtidas a partir do crescimento dos fungos em maior volume (500 mL), foram novamente injetadas para análise cromatográfica (CLAE-UV-EM), seguindo o mesmo procedimento de análise utilizado anteriormente. Os extratos brutos das frações DG (M3) 6°C (A) H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, DG (M3) 6°C (B) H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, DG (M3) 6°C (C) H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, DG (M3) 6°C (D) H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, foram submetidos à análise por RMN – <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C para a obtenção de dados adicionais sobre sua composição química. Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram solubilizados em 400  $\mu$ L de DMSO deuterado, sendo adicionado TMS (tetrametilsilano) como referência interna. O aparelho utilizado foi um Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (<sup>1</sup>H) e a 100,10 MHz na frequência de <sup>13</sup>C no Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos.

### **3.9.4 Procedimento de purificação da linhagem selecionada**

Para a realização do processo de purificação, as amostras DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (extração de 7 dias) e DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (extração de 14 dias), foram reunidas para a separação de seus constituintes. Foi utilizado um aparelho Waters constituído por W-600 Controller acoplado ao detector de UV W-2487 (Dual  $\lambda$  Absorbance Detector) nos comprimentos de onda 254 nm e 270 nm. As amostras foram separadas em modo fase reversa, com eluição isocrática na condição de MeOH/MeCN 1:1 e H<sub>2</sub>O na proporção de 75% de solventes orgânicos e 25% de água MiliQ<sup>®</sup> com 0,1% de ácido trifluoracético-TFA. Utilizou-se uma coluna Deltapack HLPC Walters Wato 11798 C<sub>18</sub> 15  $\mu$ m, 100 A (dimensões 300 X 7,8 mm).

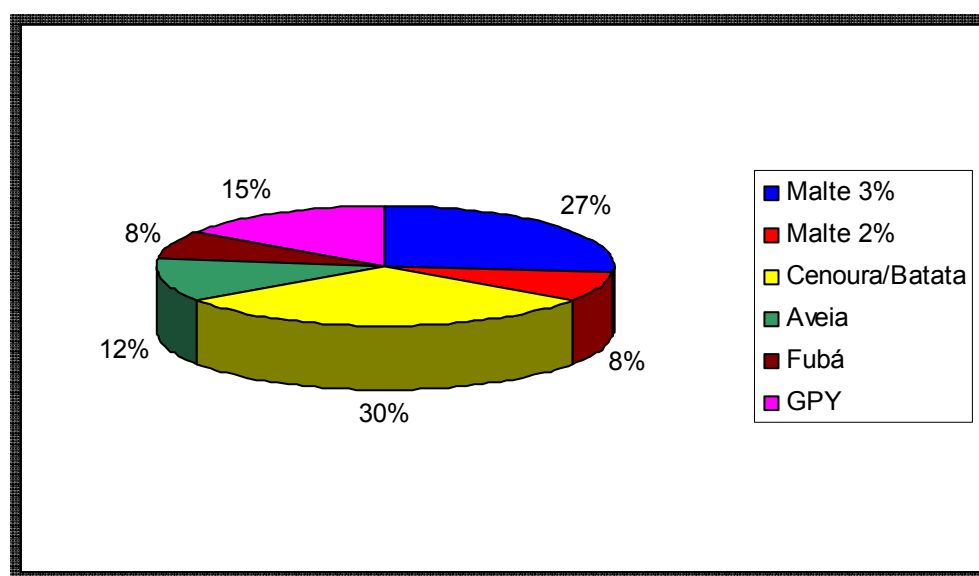
### **3.9.5 Elucidação da estrutura molecular do composto puro da fração selecionada**

Após o processo de purificação a fração P2 da amostra DG(M3) 6°C (A+B) foi enviada novamente para análises de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais. A elucidação da estrutura molecular foi realizada pelo Prof. Dr. Roberto Gomes de S. Berlinck.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Isolamento das linhagens de microrganismos

Um total de 26 linhagens de microrganismos foram isoladas da ascídia *Didemnum granulatum*. Destas, 8 foram isoladas em ágar de cenoura/batata, 7 em ágar de malte 3%, 4 em ágar de GPY, 3 em ágar de aveia, 2 em ágar de malte 2% e 2 em meio ágar de fubá (Figura 11).



**Figura 11.** Porcentagem de linhagens de micro-organismos isoladas em diferentes meios de cultura.

As 26 linhagens isoladas forneceram extratos brutos acima de 20 mg. Uma alíquota de cada um destes extratos foi enviada para serem analisados em bioensaio de atividade citotóxica no Laboratório de Oncologia na Universidade Federal do Ceará.

### 4.2 Bioensaio citotóxico

Dentre os 26 extratos brutos avaliados no bioensaio de atividade citotóxica, 20 mostraram atividade biológica. A potência da atividade foi expressa de pouca (PA) a muita

atividade (MA). As amostras DG(M3) 5°C e DG(M3) 6°C (destaque em azul) apresentaram elevado potencial citotóxico em pelo menos uma das três linhagens de células tumorais empregadas no bioensaio. Os extratos das linhagens DG(M3) 1; DG(B)13 e DG(G) 2B (destaque em rosa) apresentaram moderada atividade citotóxica em pelo menos uma das três linhagens empregadas, como podemos observar na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Atividade citotóxica de extratos brutos das linhagens microbianas isoladas (incubação de 30 dias) associadas à ascídia *Didemnum granulatum*, contra três linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (mama humano), HCT8 (cólon humano) e HL60 (leucemia).

<b>Amostras</b>	<b>MDA-MB435</b>	<b>HCT8</b>	<b>HL60</b>
DG(M3) 5	PA	PA	PA
DG(B) 13	PA	MO	SA
DG(B) 1	SA	SA	PA
DG(A) 5	SA	SA	SA
DG(M3) 5 B	SA	SA	SA
DG(M3) 1	MO	PA	MO
DG(B) 10	SA	SA	PA
DG(B) 8	SA	PA	PA
DG(M3) 4	SA	SA	SA
DG(M3) 6	SA	SA	PA
DG(G) 3	SA	SA	PA
DG(M2) 1	SA	SA	PA
DG(G) 4	SA	PA	PA
DG(B) 2	SA	SA	PA
DG(M2) 2	SA	SA	SA
DG(B) 12	SA	PA	PA
DG(G) 2B	SA	MO	PA
DG(F) 3	SA	SA	SA
DG(A) 2	SA	PA	PA
DG(G) 2	SA	PA	PA
DG(A) 4	SA	SA	SA
DG(M3) 5°C	PA	MA	MA
DG(M3) 6°C	PA	MA	MO
DG(B) 3	SA	PA	PA
DG(B) 7	PA	SA	SA
DG(F) 4	PA	SA	SA

SA = sem atividade, PA = pouco ativo, MO = moderadamente ativo e MA = muito ativo.

A **Tabela 2** mostra resultados de atividade biológica das amostras que foram ativas na primeira avaliação e que foram subsequentemente cultivadas em intervalos de tempo de

7 (A), 14 (B), 21 (C) e 30 dias (D). Pode-se observar que somente o extrato da linhagem DG(B) 13 (A) não apresentou nenhuma atividade biológica (destaque em vermelho). Os resultados desta segunda avaliação dos extratos brutos confirmaram a avaliação anterior no mesmo bioensaio.

**Tabela 2.** Atividade citotóxica de extratos brutos resultantes do cultivo das cinco linhagens bioativas de fungos associados a ascídia *Didemnum granulatum*, contra três linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (mama humano), SF 295 (glioblastoma humano) e HL60 (leucemia).

Amostras	HL60	MDA-MB435	SF295
DG (M3) 5°C (A)	MA	PA	PA
DG (M3) 5°C (B)	SA	PA	PA
DG(M3) 5°C (C)	MO	PA	PA
DG(M3) 5°C (D)	MA	PA	PA
DG (M3) 6°C (A)	MO	MO	MO
DG (M3) 6°C (B)	MA	MA	MO
DG(M3) 6°C (C)	MA	MO	MA
DG(M3) 6°C (D)	MO	PA	MO
DG (M3) 1 (A)	MA	MA	MA
DG (M3) 1 (B)	MA	MA	MA
DG (M3) 1(C)	MA	MA	MA
DG(M3) 1 (D)	MO	MO	MO
DG(B) 13 (A)	SA	SA	SA
DG(B) 13 (B)	PA	Mo	PA
DG(B) 13 (C)	MA	MA	MO
DG(B) 13 (D)	SA	PA	MO
DG(G) 2B (D)	PA	SA	PA

SA = sem atividade, PA = pouca atividade, MO = moderadamente ativo e MA = muito ativo. Extrações: (A) = 7 dias; (B) = 14 dias; (C) = 21 dias e (D) = 30 dias de cultivo.

Na literatura foram relatadas várias pesquisas relacionadas à investigação do potencial biológico de extratos brutos extraídos de microrganismos oriundos de invertebrados e plantas marinhas. Entretanto, não foi encontrado nenhum estudo de atividade citotóxica de extratos brutos isolados de microrganismos associados à ascídia *Didemnum granulatum*.



### 4.3 Identificações das linhagens

Dentre as linhagens isoladas, aquelas que originaram extratos brutos com resultados positivos nos ensaios de atividade biológica foram enviadas a Profa. Dra. Lara Durães Sette, da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA-UNICAMP, para a identificação taxonômica das espécies. De acordo com a identificação a linhagem DG(M3) 6°C pertence ao gênero *Penicillium*, a DG(M3) 5°C ao gênero *Cladosporium*, a DG(M3) 1 ao gênero *Aspergillus*, a DG(B) 13 ao gênero *Nocardioopsis* e a linhagem DG(G) 2B ao gênero *Aurantimonas*. Os códigos e as fotos das linhagens identificadas estão mostrados na **Figura 13**.

Observou-se que duas das linhagens identificadas foram atribuídas às bactérias dos gêneros *Nocardioopsis* e *Aurantimonas*. O gênero *Nocardioopsis* é um dos que compõem o grupo das bactérias *Gram-positivas* aeróbias (filo Ascomycota), por frequentemente crescerem produzindo ramificações, filamentos na forma de micélios, mas que se separam ou fragmentam-se em cocos ou bastonetes. Por produzirem esporos assexuais (conídios) crescimento filamentoso e ramificado apresentando hifas, até pouco tempo, eram classificadas como fungos (eumicetos). Diferentemente dos fungos que possuem organização celular eucariótica, essas bactérias, as nocardioformes e os actinomicetos aeróbios, não apresentam núcleo, mitocôndrias diferenciadas ou outras organelas intracelulares (Trabulsi, 2008).

Segundo a Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA, as bactérias deste gênero podem ser encontradas no solo, água, ar e animais, principalmente no homem (em pacientes com imunocomprometimento grave), no qual se observa a doença nocardiose, uma enfermidade crônica que se origina nos pulmões, podendo disseminar pelas vias sanguíneas afetando o cérebro e outros órgãos vitais.

Segundo Denner e colaboradores (2003), o gênero *Aurantimonas* gen.nov. (família da Aurantimonadaceae) foi proposto em 2003, após pesquisas envolvendo a espécie *Aurantimonas coralicida* sp. nov. com a doença conhecida como praga branca do tipo II em corais do Caribe. O gênero *Aurantimonas* pertence ao grupo *Rhizobiales*, classe das Alfa-proteobactérias, (Denner *et al.*, 2003), no qual encontram-se também bactérias fixadoras de nitrogênio (Roesch *et al.*, 2007).

Luong *et al.* (2008) isolaram a espécie *Aurantimonas altamirensis* (*Aurantimonas* sp) de pacientes canadenses com infecção ocular, mas como não há relatos na literatura sobre este gênero infectar seres humanos, concluíram que pode ter ocorrido alguma contaminação no manuseio de instrumentos oculares.

Como exemplo de bactérias pertencentes ao filo das proteobactérias, podem-se destacar as bactérias *Gram-negativas* do qual encontram-se gêneros patogênicos como a *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Heliobacter* e *Campylobacter*, gêneros que estabelecem simbiose com plantas como *Rhizobium*, *Rhodobacter*, dentre outros.

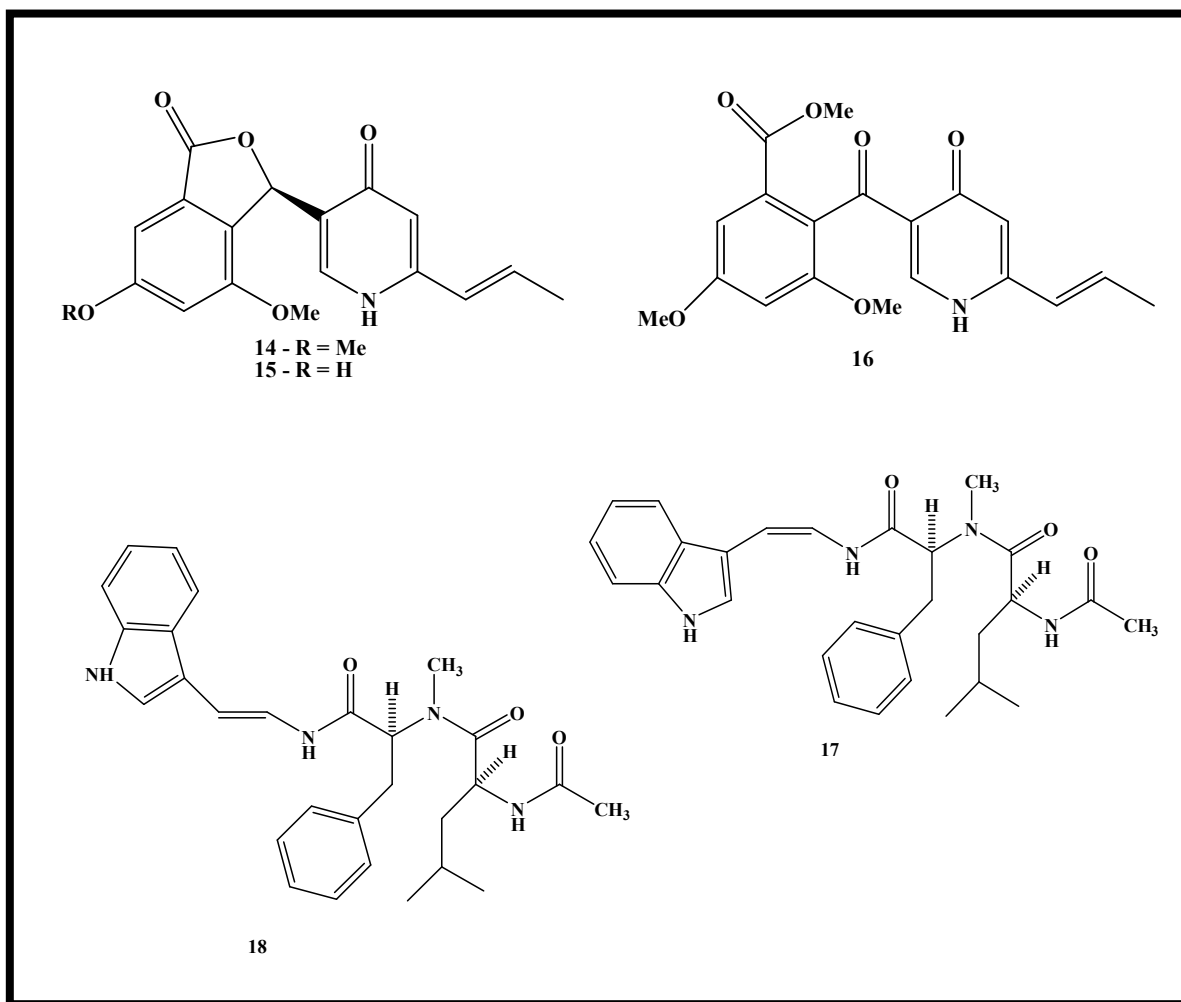
As outras três linhagens identificadas (**Figura 13**) são fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, ambos pertencentes ao filo Ascomycota, e *Cladosporium*, pertencente ao filo Deuteromycota (Trabulsi, 2008). Os fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, conhecidos por sua ubiquidade e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos, são amplamente estudados, principalmente os terrestres associados a plantas.

Os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* são os maiores produtores de metabólitos secundários estudados (Turque *et al.*, 2008). Como exemplo as penicidonas A (**14**) e C(**16**), novos alcalóides estudados por Ren Xiang Tan *et al.* (2008), foram isoladas de *Penicillium* sp. e apresentaram atividade citotóxica (contra células de câncer do cólon

humano, leucemia, carcinoma cervical humano e tumor na nasofaringe humana). Munro *et al.* (2009) encontraram três alcalóides produzidos por *Penicillium* sp. isolados da alga marrom *Xiphophora gladiat* no mar da Nova Zelândia.

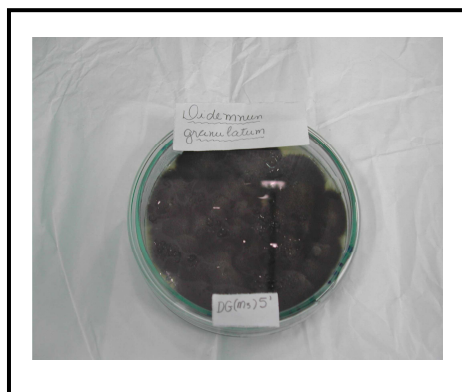
Apesar de *Aspergillus* sp. habitar o ambiente terrestre, este gênero tolera ambientes com alta concentração salina. Fenical *et al.* (1998) descreveu o isolamento, elucidação estrutural e a atividade biológica de aspergillamidas A e B, dois peptídeos produzidos por um *Aspergillus* sp. isolado de uma amostra de sedimento coletada de um lago salgado, nas Bahamas. A aspergillamida A exibiu modesta citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais do cólon humano. Parvatkar e seus colaboradores (2009) também isolaram compostos, já conhecidos, produzidos por *Aspergillus terreus* isolado do coral mole *Sinularia kavarattiensis* na Índia.

De acordo com literatura, o gênero *Cladosporium* geralmente produz metabólitos secundários marinhos associados a esponjas marinhas. Segundo Jadulco *et al.* (2002), duas cepas da espécie *Cladosporium herbarum*, uma isolada da esponja *Aplysina aerophoba* (coletada no Mar Mediterrâneo) e outra da *Callyspongia aerizusa* (coletada na Indonésia), produziram dois metabólitos secundários inéditos pertencentes ao grupo das  $\alpha$ -pironas.



**Figura 12:** Penicidonas A (14) e C (16) isoladas de *Penicillium* sp e aspergillamidas A (17) e B (18) isoladas de *Aspergillus* sp.

DG(M3) 5°C



*Cladosporium* sp.

DG(G) 2B



*Nocardioopsis* sp.

DG(M3) 6°C



*Penicillium* sp.

DG(M3) 1



*Aspergillus* sp.

DG(B)13



*Aurantimonas* sp.

**Figura 13.** Fotos com as cinco amostras bioativas e suas respectivas identificações.

#### **4.4 Análises químicas dos extratos brutos produzidos pelas linhagens de microrganismos.**

Os resultados das análises por CCD foram relacionados com os resultados de atividade citotóxica, e são mostrados na **Tabela 3**. Nesta relação não foram considerados os resultados com o reagente Dragendorff (revelador de alcalóides), pois todas as amostras apresentaram resultados negativos com este revelador.

Pode-se observar que as linhagens que tiveram atividade biológica também demonstraram perfil químico indicativo de metabólitos secundários. As análises por CCD indicaram a presença de uma grande quantidade de compostos que absorvem a luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm, os quais possuem sistemas denominados cromóforos (grupos funcionais que absorvem radiação eletromagnética na faixa de trabalho utilizada).

**Tabela 3:** Análise dos extratos brutos das linhagens de microrganismos (cultivo de 30 dias) por CDD comparado com os resultados do bioensaio citotóxico.

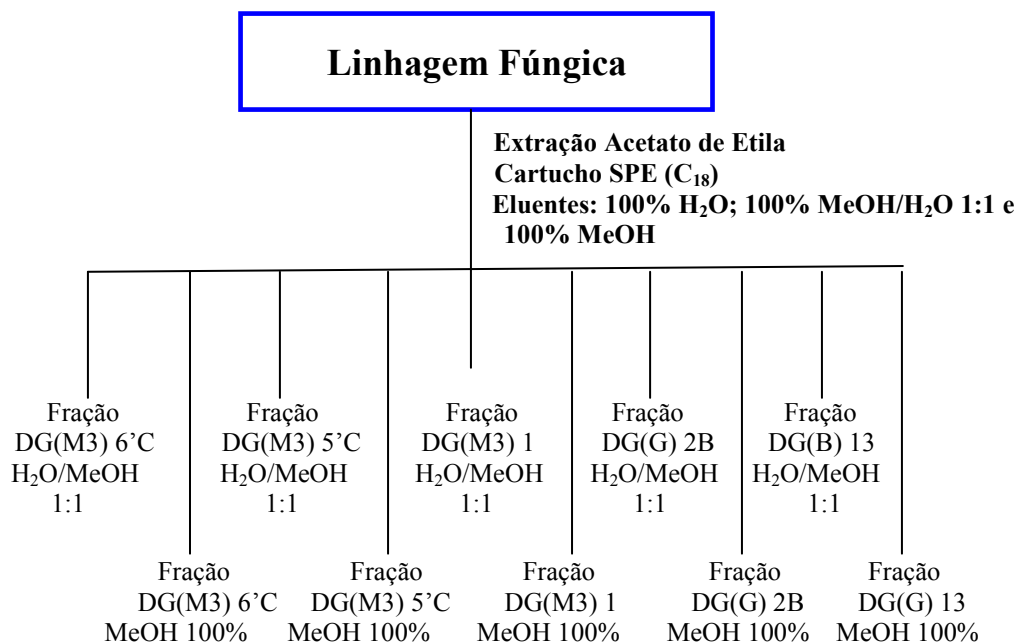
<b>Amostras</b>	<b>MDA-MB435</b>	<b>HCT8</b>	<b>HL60</b>	<b>CCD</b>
DG(M3) 5	PA	PA	PA	<b>X</b>
DG(B) 13	PA	MO	SA	<b>X</b>
DG(B) 1	SA	SA	PA	
DG(A) 5	SA	SA	SA	
DG(M3) 5 B	SA	SA	SA	<b>X</b>
DG(M3) 1	MO	MA	MA	<b>X</b>
DG(B) 10	SA	SA	PA	
DG(B) 8	SA	PA	PA	
DG(M3) 4	SA	SA	SA	<b>X</b>
DG(M3) 6	SA	SA	PA	<b>X</b>
DG(G) 3	SA	SA	PA	
DG(M2) 1	SA	SA	PA	<b>X</b>
DG(G) 4	SA	PA	PA	
DG(B) 2	SA	SA	PA	
DG(M2) 2	SA	SA	SA	<b>X</b>
DG(B) 12	SA	PA	PA	
DG(G) 2B	SA	MO	PA	<b>X</b>
DG(F) 3	SA	SA	SA	<b>X</b>
DG(A) 2	SA	PA	PA	<b>X</b>
DG(G) 2	SA	PA	PA	
DG(A) 4	SA	SA	SA	<b>X</b>
DG(M3) 5°C	PA	MA	MA	<b>X</b>
DG(M3)6°C	PA	MA	MO	<b>X</b>
DG(B) 3	SA	PA	PA	
DG(B) 7	PA	SA	SA	
DG(F) 4	PA	SA	SA	

SA = sem atividade, PA = pouca atividade, MO = moderadamente ativo e MA = muito ativo.

#### **4.5 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de UV e Espectrômetro de Massas – CLAE-UV-EM**

As amostras cultivadas por 30 dias e que foram bioativas no primeiro envio para bioensaio citotóxico (DG(M3) 6°C; DG(M3) 5°C; DG(B) 13; DG(M3) 1 e DG(G) 2B), passaram por um processo de limpeza (**Figura 14**), para retirada de substâncias que poderiam interferir nas análises por CLAE-UV-EM, como sais da água do mar e possíveis resquícios do meio de cultura. Foi utilizado um cartucho SPE (C<sub>18</sub>), e as amostras foram eluídas com um gradiente de MeOH em H<sub>2</sub>O, gerando 3 frações cada, na qual a fração 100% H<sub>2</sub>O foi descartada. Estas foram analisadas por cromatografia líquida de alto

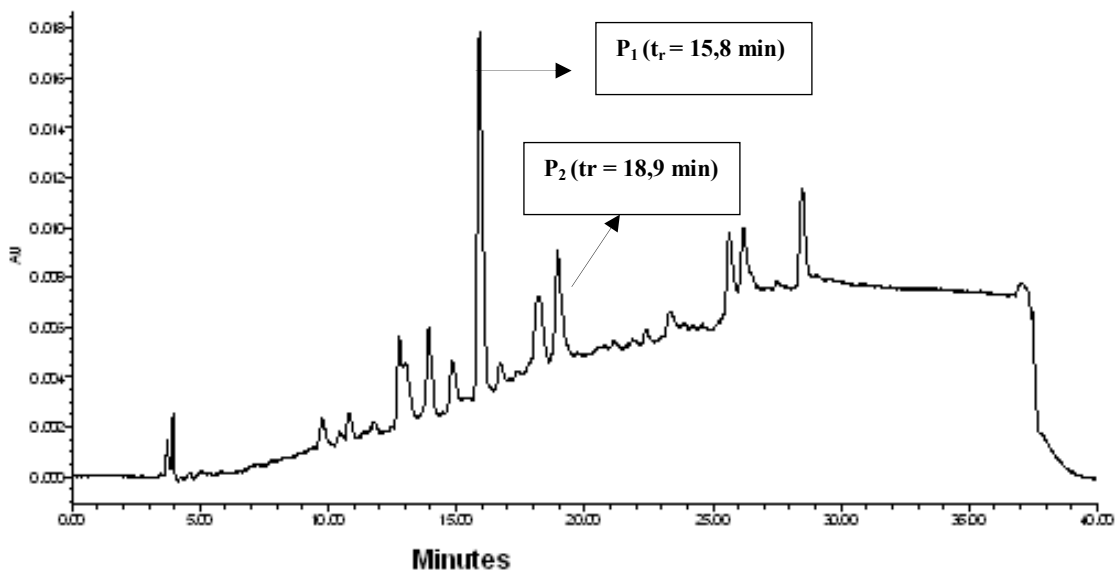
desempenho acoplada a um detector de UV com arranjo de fotodiodo e espectrômetro de massas (CLAE-UV-EM).



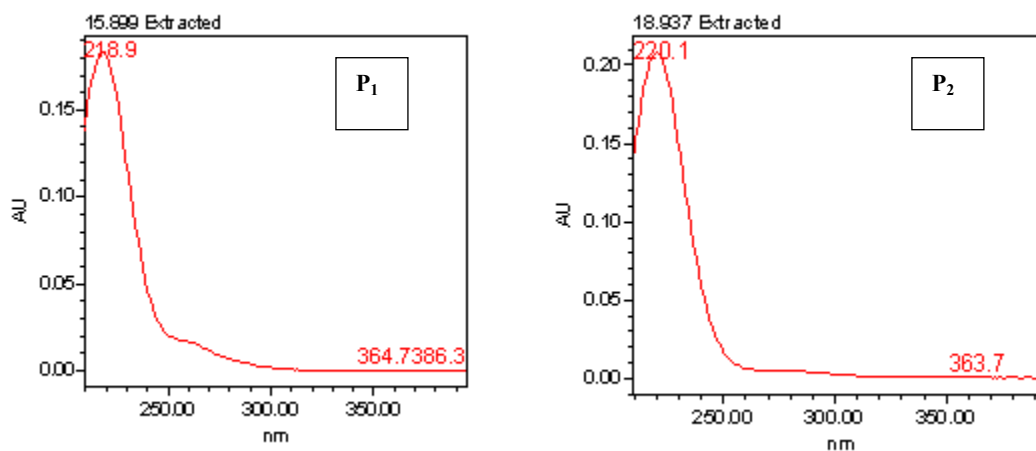
**Figura 14.** Fluxograma das 10 frações obtidas através do processo de limpeza com cartucho SPE (C<sub>18</sub>) das linhagens bioativas com crescimento de 30 dias.

Analisando os dados das frações gerados por CLAE-UV-EM verificou-se que das dez frações geradas, três [DG(G) 2B H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, DG(M3) 5°C H<sub>2</sub>O/MeOH e DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1] exibiram cromatogramas com picos no intervalo de tempo entre 5 a 20 minutos (**Figura 15, 18 e 21**). Ao observar seus espectros de absorção em UV (**Figuras 16, 19 e 22**), no qual a absorção ficou abaixo de 300 nm e de massas (**Figuras 17, 20 e 23**) (massa superior a 200 u.m.a.), verificou-se que estes picos (P<sub>1</sub> e P<sub>2</sub>) fornecem evidências de serem metabólitos secundários e, portanto foram considerados de interesse para serem isolados.

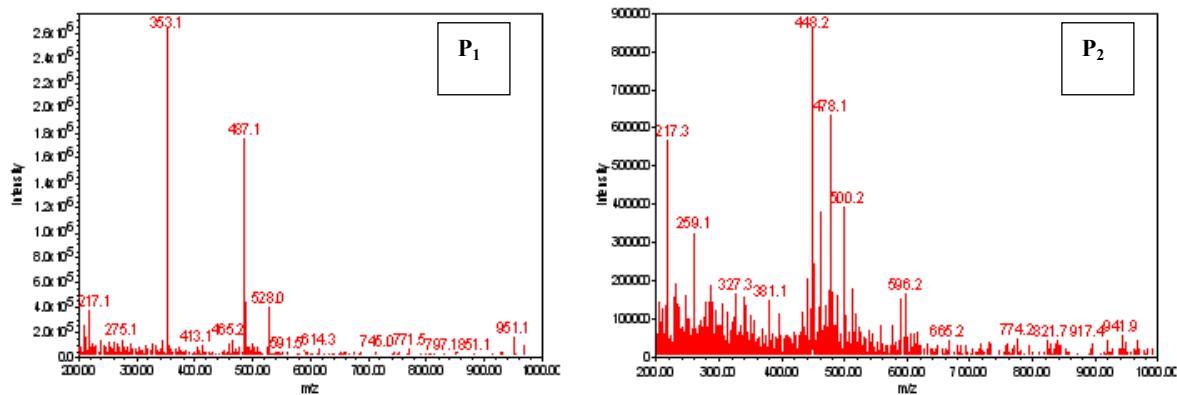




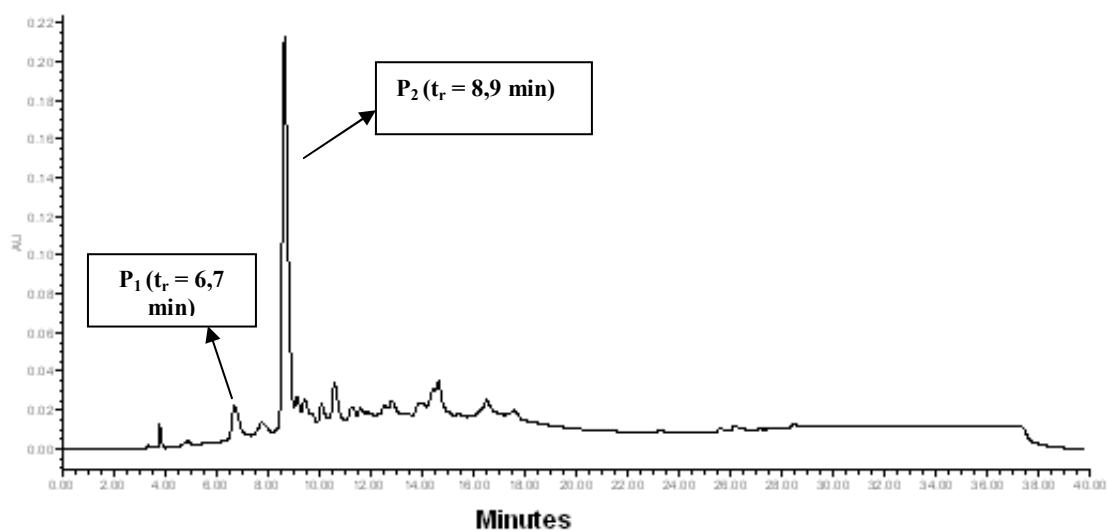
**Figura 15.** Cromatograma da fração DG(G) 2B H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  256 nm.



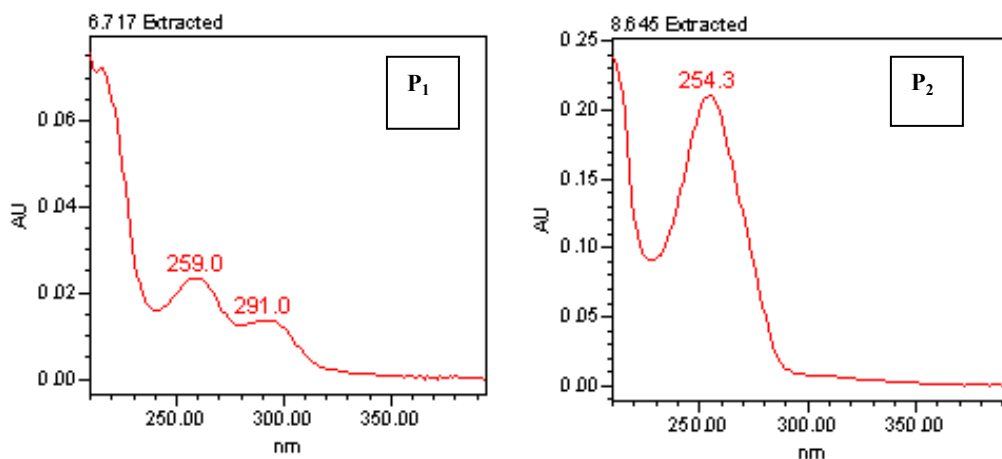
**Figura 16.** Espectro de absorção em UV da fração DG(G) 2B H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  256 nm.



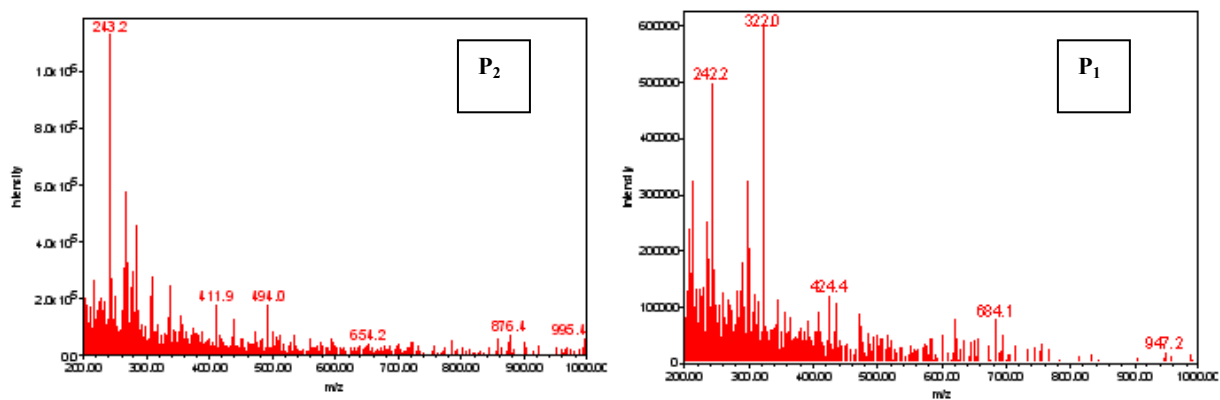
**Figura 17:** Espectro de massas da fração DG(G) 2B H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, (incubação de 30 dias)  $\lambda_{\text{max}}$  256 nm.



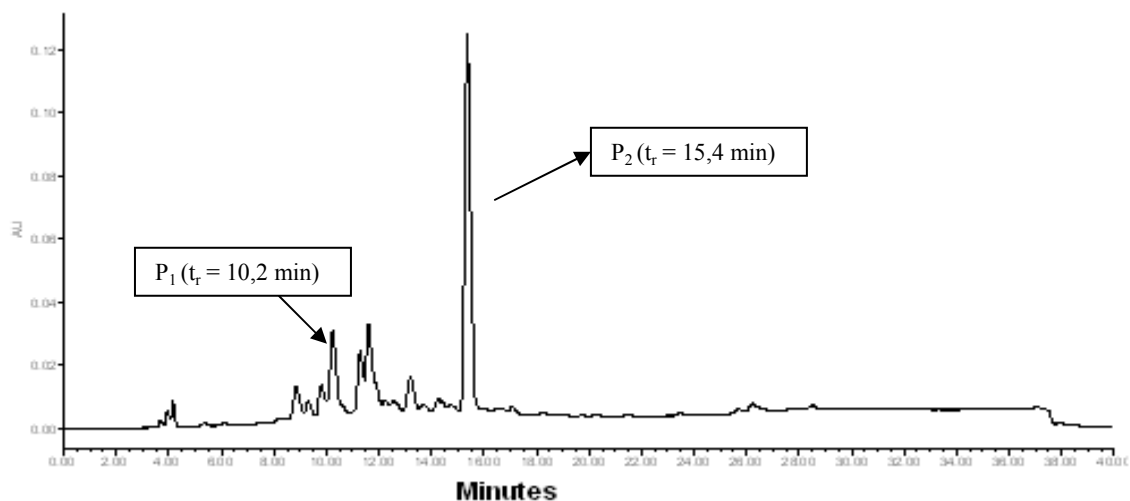
**Figura 18.** Cromatograma de absorção em UV da fração DG(M3) 5°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  256 nm.



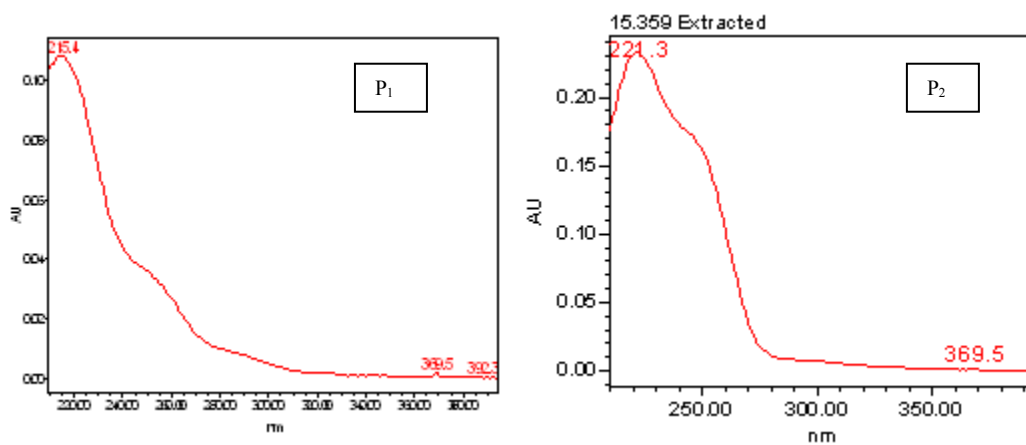
**Figura 19.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 5°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\max}$  256 nm.



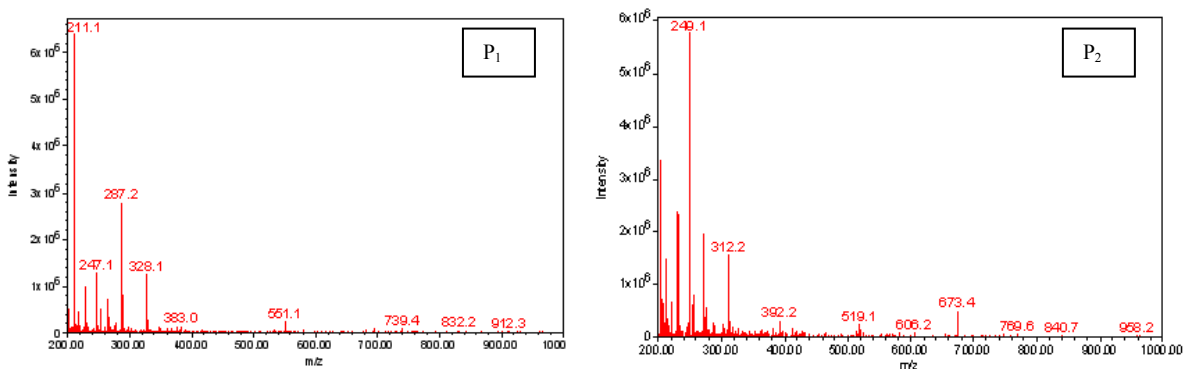
**Figura 20:** Espectro de massas da fração DG(M3) 5°C H<sub>2</sub>O/MeOH ( incubação de 30 dias),  $\lambda_{\max}$  256 nm.



**Figura 21.** Cromatograma de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  257 nm.



**Figura 22.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  257 nm.



**Figura 23:** Espectro de massas da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  257 nm.

Após essas análises, as mesmas linhagens bioativas DG (M3) 6°C; DG(M3) 5°C; DG(M3) 1; DG(B) 13 e DG(G) 2B foram crescidas novamente em um volume maior (500mL) e extraídas nos intervalos de 7, 14, 21 e 30 dias, com o objetivo de analisar a produção destes compostos. A linhagem DG(G) 2B, por apresentar crescimento somente a partir do 21º dia de incubação, foi cultivada por 30 dias. Essas amostras foram extraídas e submetidas ao mesmo protocolo de limpeza mencionado no item 3.9.1 da parte de materiais e métodos, como se pode observar na **Tabela 4**.

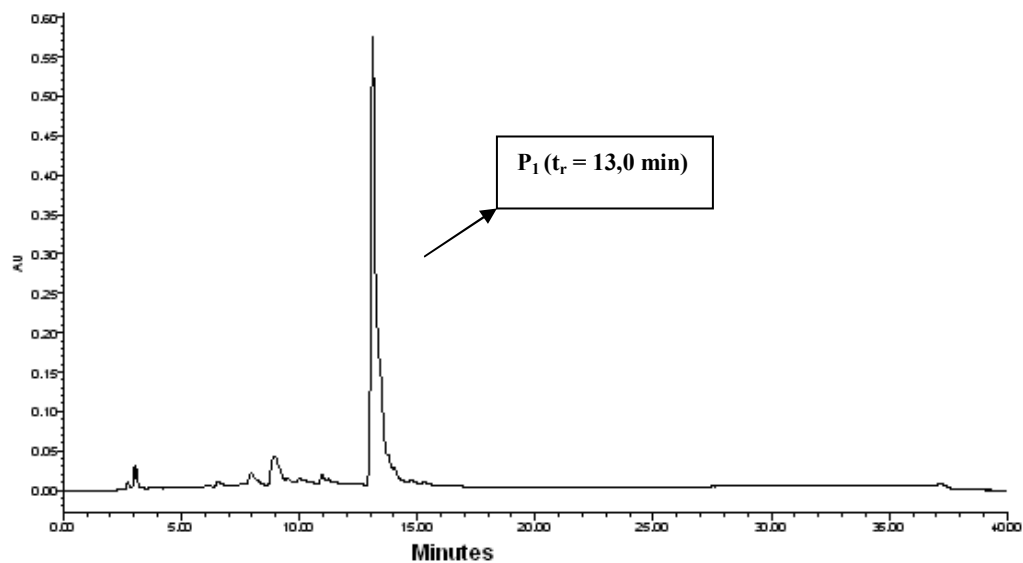
**Tabela 4:** Frações obtidas através do processo de limpeza com cartucho SPE (C<sub>18</sub>) das linhagens bioativas com crescimento de 7, 14, 21 e 30 dias.

Amostras	Frações obtidas da SPE
DG(M3) 5°C (A)	DG(M3)5°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 6°C (A)	DG(M3)6°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 1 (A)	DG(M3) 1 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(B) 13 (A)	DG(B) 13 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 5°C (B)	DG(M3) 5°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 6°C (B)	DG(M3) 6°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 1 (B)	DG(M3) 1 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(B) 13 (B)	DG(B) 13 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 5°C (C)	DG(M3) 5°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 6°C (C)	DG(M3) 6°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 1 (C)	DG(M3) 1 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(B) 13 (C)	DG(B) 13 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 5°C (D)	DG(M3) 5°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 6°C (D)	DG(M3) 6°C H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(M3) 1 (D)	DG(M3) 1 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(B) 13 (D)	DG(B) 13 H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%
DG(G) 2B (D)	DG(G) 2B H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 e MeOH 100%

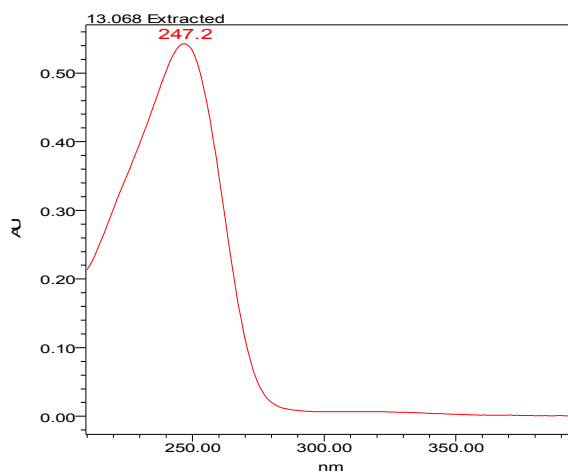
(A) = extração 7 dias; (B) = extração de 14 dias; (C) = extração de 21 dias e (D) = extração de 30 dias

Analisando os dados do cromatograma e espectro de absorção em UV e massas (**Figura 24, 25 e 26**) da fração DG (M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 extraída em 7 dias, nota-se um cromatograma bem simples com um pico (P<sub>1</sub>) majoritário com t<sub>r</sub> de 13,0 min. Ao compararmos este cromatograma com os de extração de 14 e 21 dias, observamos também um pico majoritário no mesmo t<sub>r</sub> = 13,1 min (**Figura 27**), possivelmente se tratando do mesmo composto. Para esclarecer esta dúvida, estas frações foram enviadas para análises de RMN <sup>1</sup>H.

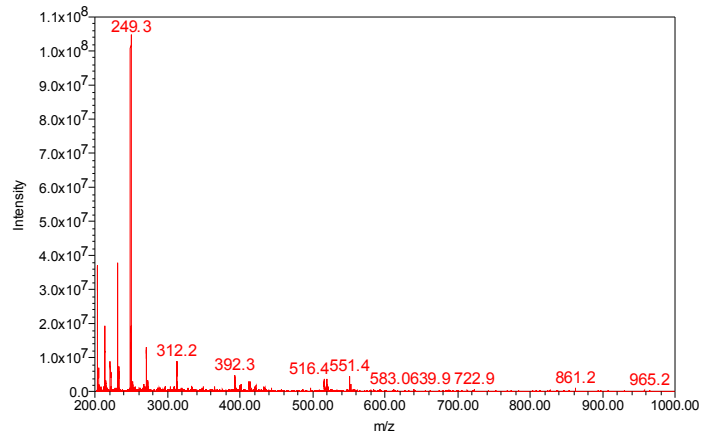
Já no cromatograma (**Figura 28**) da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (incubação de 30 dias) observa-se um número maior de compostos, no intervalo de tempo de 2 a 15 min, sendo estes não observados quando a extração desta linhagem aconteceu em 7, 14 e 21 dias (**Figuras 24 e 27**).



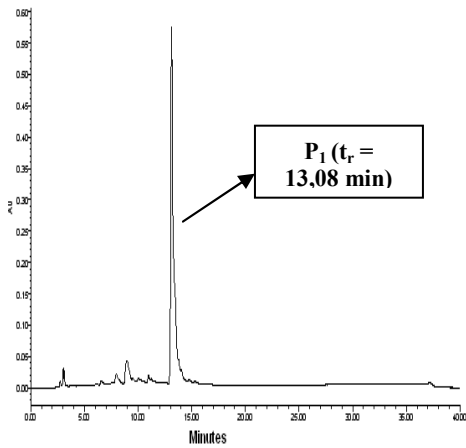
**Figura 24.** Cromatograma da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (incubação de 7 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  254 nm.



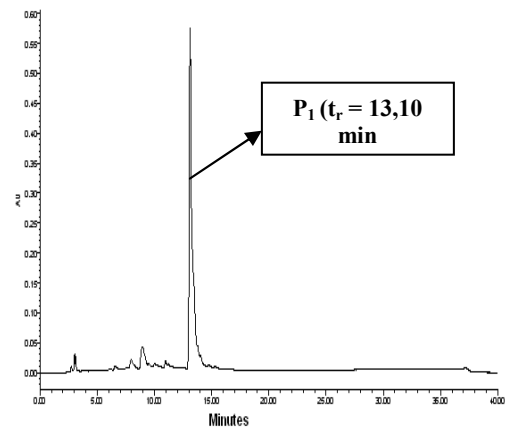
**Figura 25.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, (incubação de 7 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  254 nm.



**Figura 26:** Espectro de massas da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 7 dias),  $\lambda_{\max}$  254 nm.



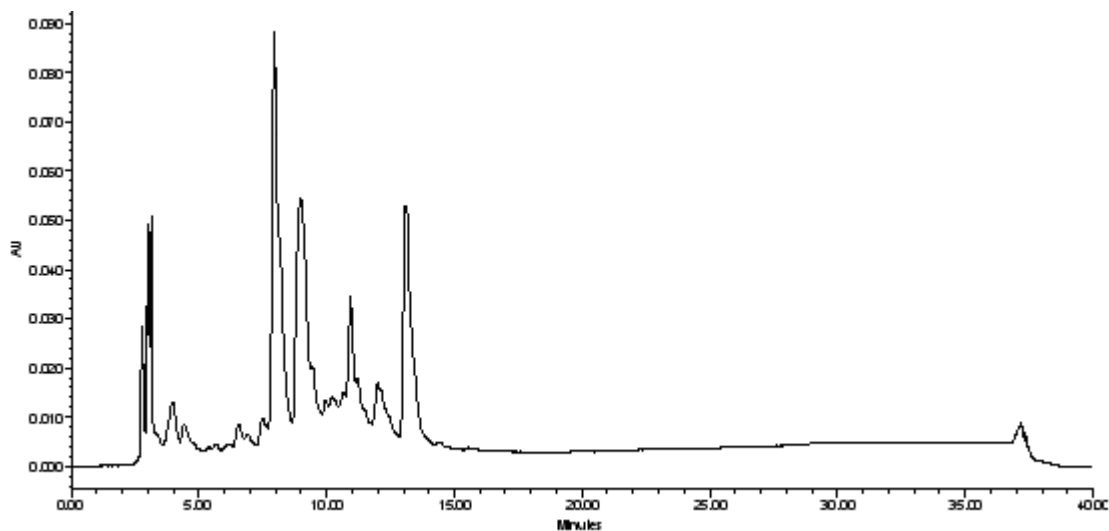
(A)



(B)

**Figura 27.** Espectro de absorção em UV da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH, (incubação de 14(A) e 21(B) dias),  $\lambda_{\max}$  254 nm.



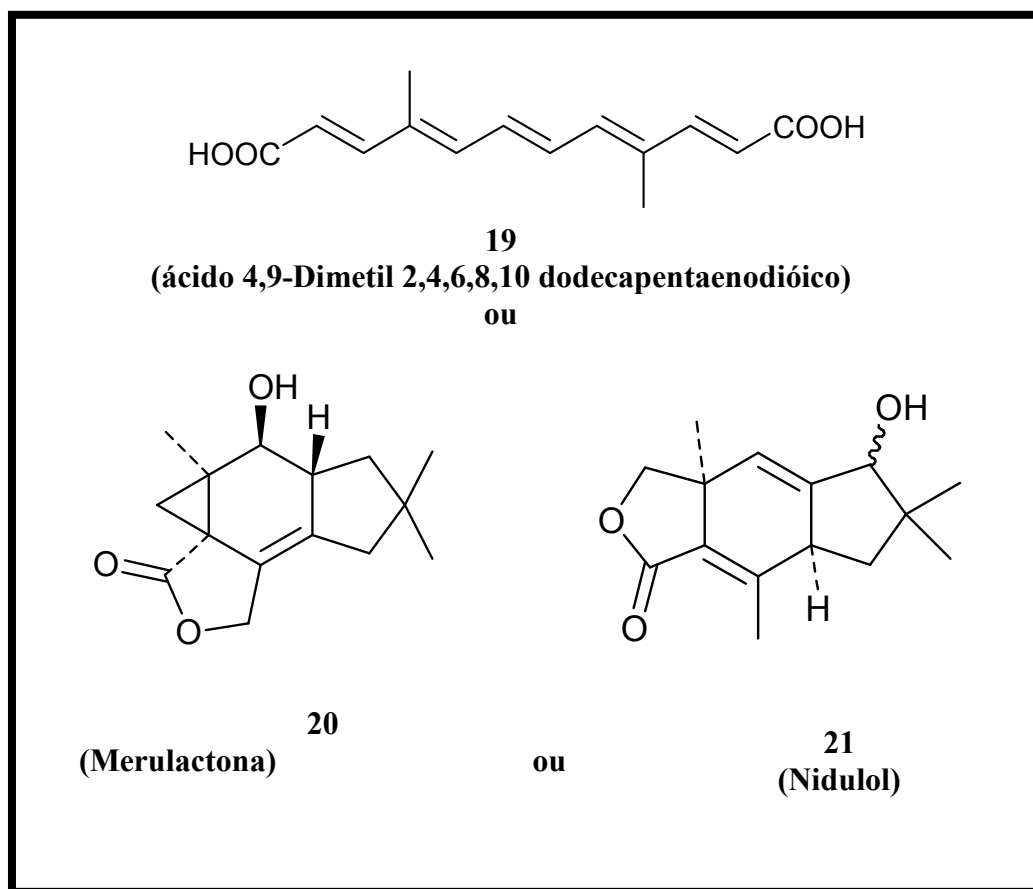


**Figura 28.** Cromatograma da fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 (incubação de 30 dias),  $\lambda_{\text{max}}$  254 nm.

Os dados destas frações foram comparados os padrões dos produtos naturais didemnimida A, didemnimida B, didemnimida D, didemnimida E, granulatomida e isogranulatomida isolados pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck (1998), para observar se os mesmos seriam produzidos por alguma linhagem microbiana ou apenas pelo invertebrado marinho (*Didemnum granulatum*).

Com base nos resultados obtidos das análises químicas das amostras [íon molecular da molécula protonada  $[M+H^+]$  ( $m/z$ ) e tempo de retenção ( $t_r$ )] e na literatura (Berlinck *et al.*, 1998 e 2001) observou-se estes compostos não foram produzidos por nenhuma linhagem microbiana isoladas da ascídia *Didemnum granulatum*.

Observando-se os resultados dos cromatogramas de espectro de massas dos extratos brutos das frações, realizou-se uma busca no banco de dados Dictionary of Natural Products. Foram obtidas três estruturas moleculares que poderiam ser do composto (pico com  $t_r$  de 13,1 min e massa  $[M + H^+] = 249,0$ ) encontrado na fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, estruturas (19), (20) e (21).



**Figura 29:** Três possíveis estruturas moleculares baseadas na massa molecular da amostra DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1. (Fonte: Banco de dados Dictionary of Natural Products).

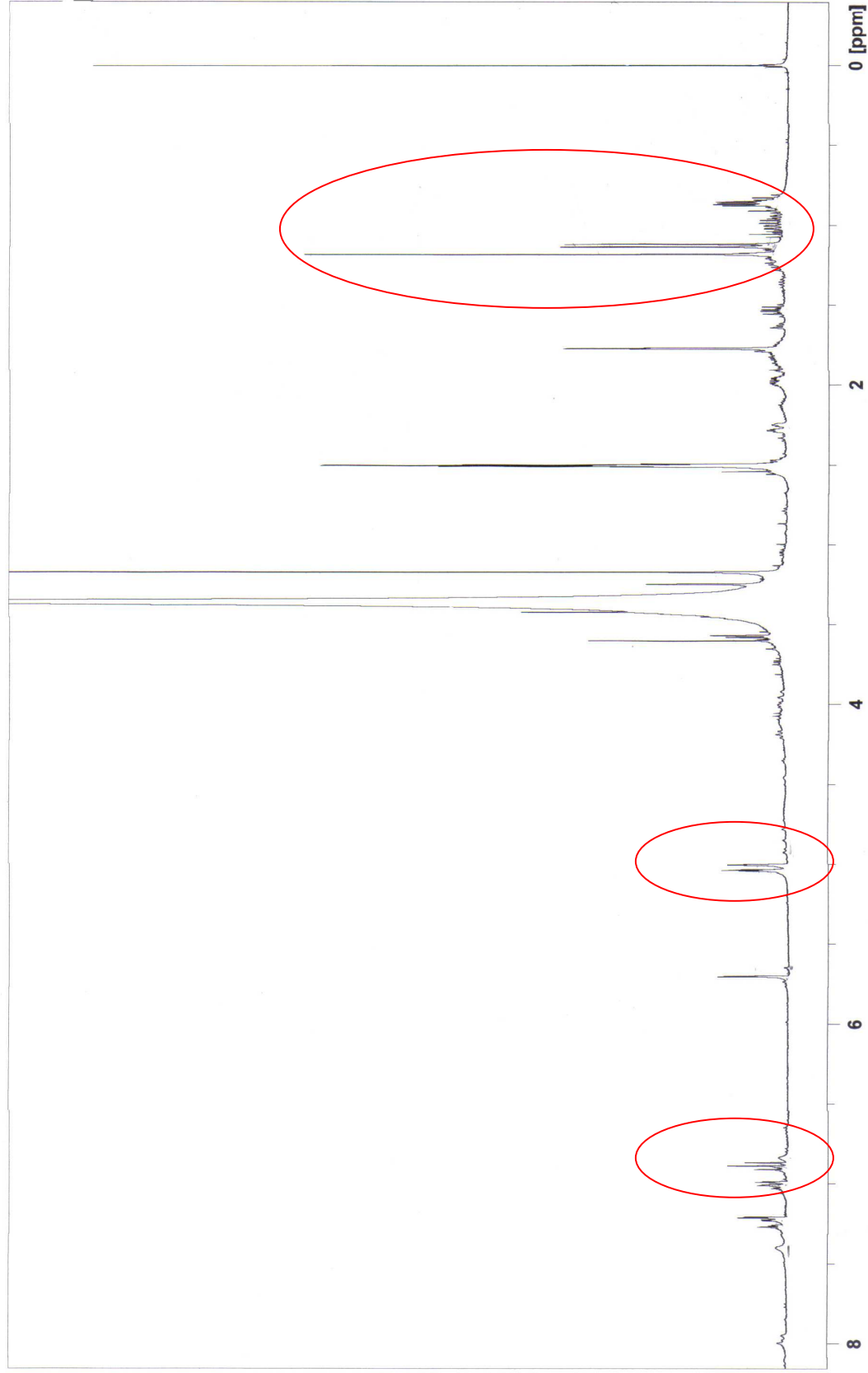
#### 4.6 Análises de Ressonância Magnética Nuclear – RMN <sup>1</sup>H

Para a confirmação dos resultados obtidos da busca no banco de dados e das análises dos cromatogramas das frações que apresentaram picos com mesmo perfil químico ( $t_r$ , espectros de absorção no UV e espectros de massas), prosseguiu-se nos estudos químicos, enviando alíquotas dos extratos brutos das frações DG(M3) 6°C (A) H<sub>2</sub>O/MeOH ; DG(M3) 6°C (B) H<sub>2</sub>O/MeOH; DG(M3) 6°C (C) H<sub>2</sub>O/MeOH para análises de RMN <sup>1</sup>H . Os resultados destas análises podem ser visualizados nas **Figuras 30, 31 e 32**, no qual verificam-se sinais iguais no deslocamento químico (destaque em vermelho).

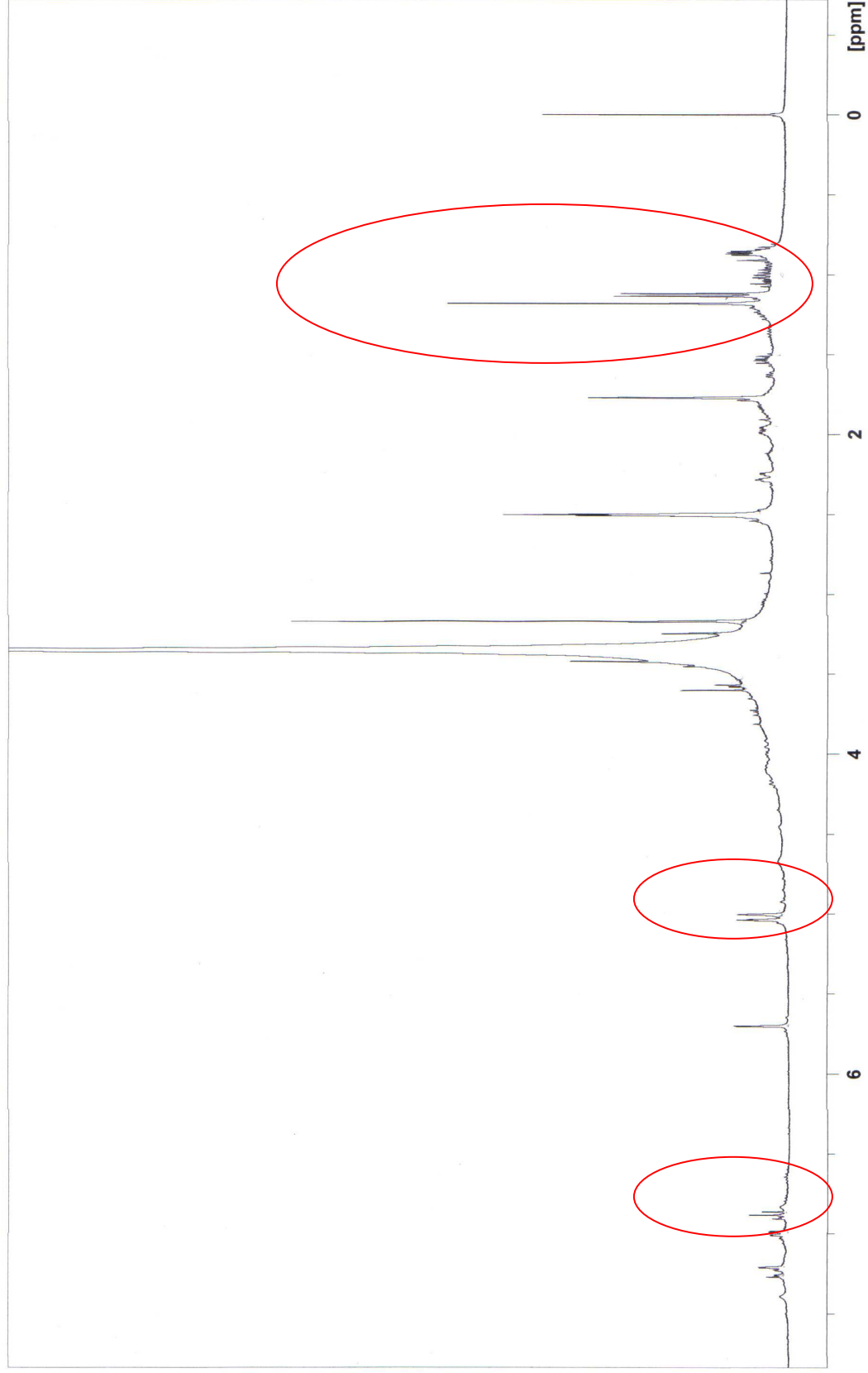
Observando-se os resultados obtidos ( $t_r$ , absorção em UV, espectro de massas e RMN  $^1\text{H}$ ), verificou-se que as frações DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH extraídas em 7 e 14 dias, produziram o mesmo composto. Assim decidiu-se reunir estas duas frações e prosseguir com as análises químicas. A fração foi recodificada para facilitar a compreensão dos resultados para DG(M3) 6°C (A+B).

Já a fração DG(M3) 6°C H<sub>2</sub>O/MeOH extraída em 21 dias, que também apresentou um perfil químico ( $t_r$ , espectro de absorção em UV e espectro de massas) semelhante aos das frações extraídas em 7 e 14 dias, não forneceu um espectro de RMN  $^1\text{H}$  similar, pois os observados apresentaram deslocamentos químicos diferentes (**Figura 33** destaque em azul).

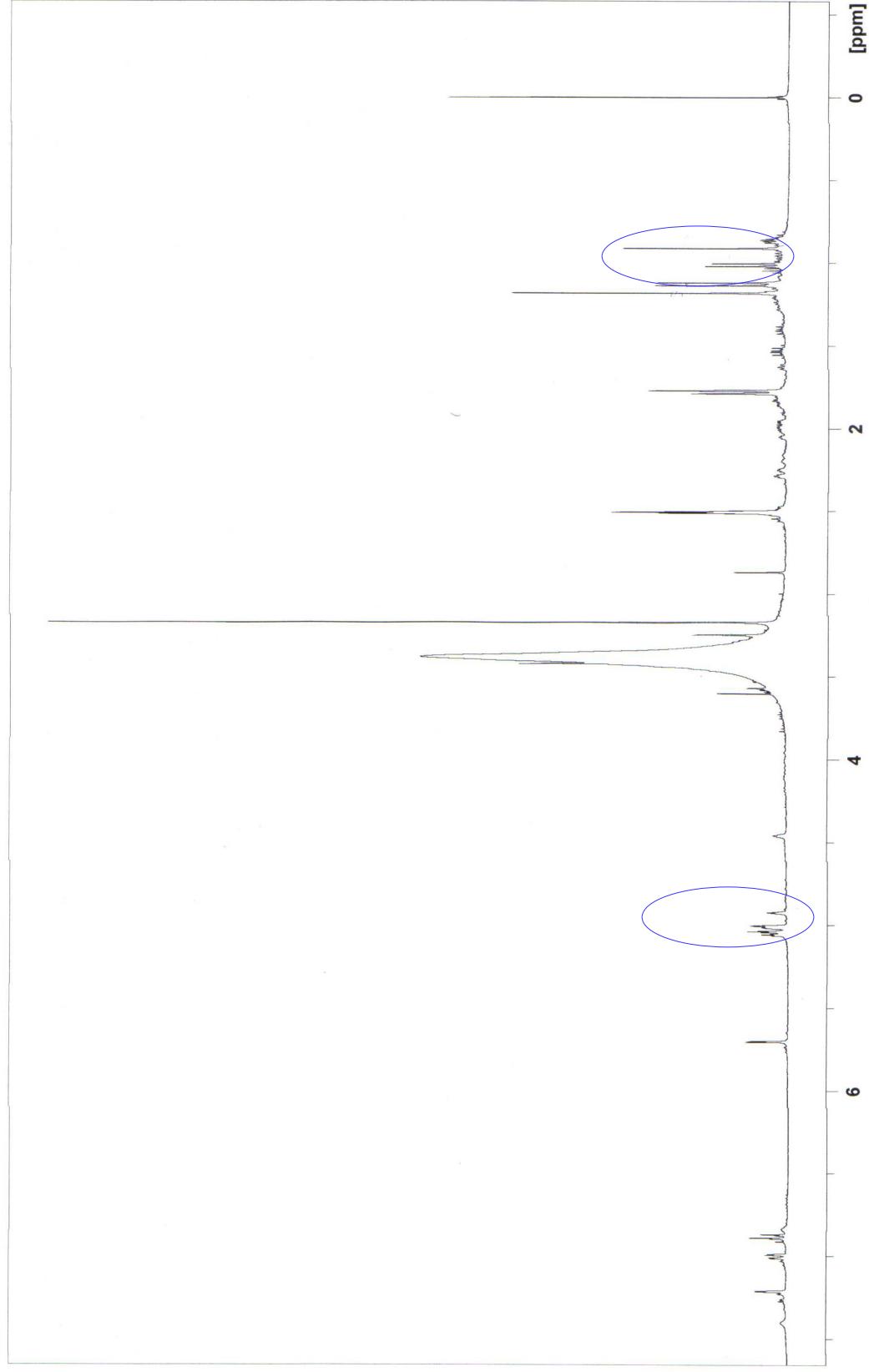
As análises de RMN  $^1\text{H}$ , além de fornecer dados para elucidar estruturas moleculares, foram de fundamental importância para auxiliar no esclarecimento de possíveis dúvidas na observação e interpretação dos cromatogramas.



**Figura 30.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da amostra DG(M3)6C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, extração 7 dias em DMSO-*d*<sub>6</sub> (400 MHz).



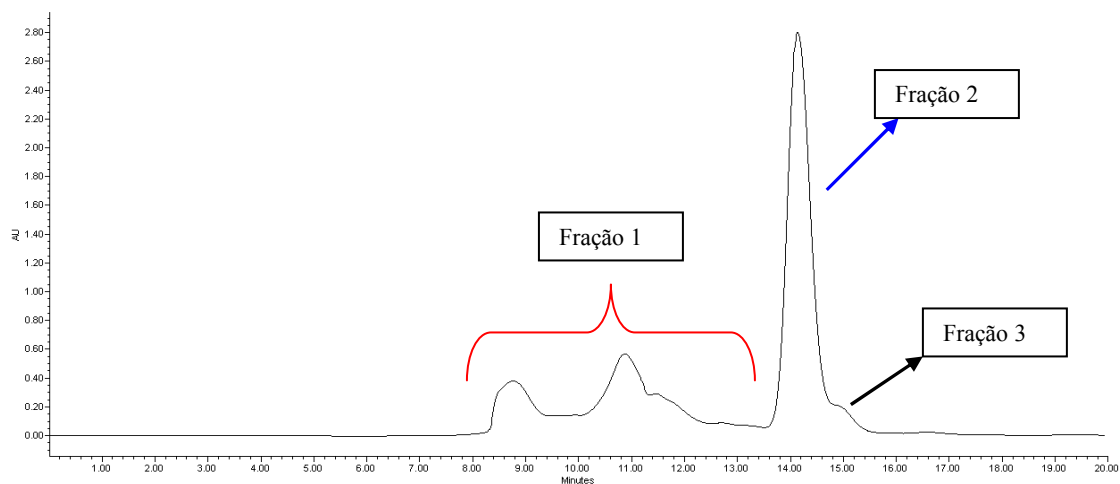
**Figura 31:** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da amostra DG(M3)6C H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1, extração 14 dias em DMSO-*d*<sub>6</sub> (400 MHz).



**Figura 32:** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  da amostra DG(M3)6' C  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1, extração 21 dias em  $\text{DMSO-}d_6$  (400 MHz).

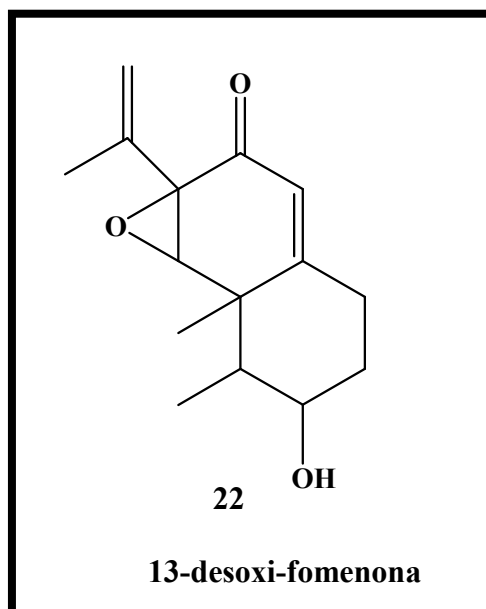
#### 4.7 Purificação da fração selecionada e elucidação da estrutura molecular

Após as análises do perfil químico, atividade biológica e RMN  $^1\text{H}$ , decidiu-se fracionar a fração DG(M3) 6'C (A+B) em com análises adicionais. Esta fração foi purificada por CLAE-UV, originado 3 novas frações, como observado na **Figura 33**.

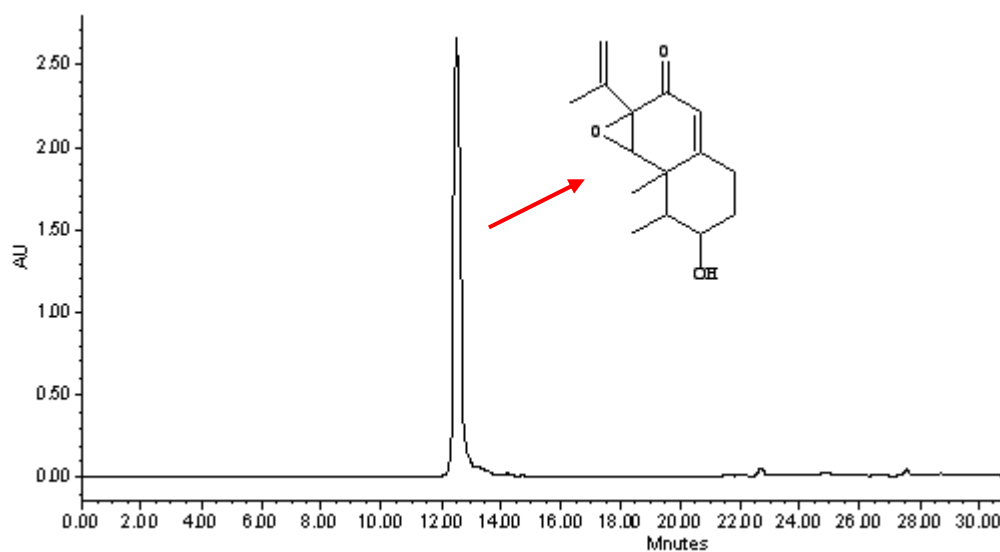


**Figura 33:** Cromatograma do extrato bruto DG(M3) 6'C (A+B). Condições de análise: coluna  $\text{C}_{18}$  Deltapack HPLC Waters 15  $\mu\text{m}$  100 A (dimensões 300 X 7,8 mm), eluição isocrática MeOH/MeCN /  $\text{H}_2\text{O}$  (75:25) e observado em 254 nm.

A fração 2 da amostra DG(M3) 6'C (A+B) foi selecionada e enviada para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os resultados obtidos destas análises juntamente com os bidimensionais (COSY e HSQC) e comparação com a literatura (Tirilly *et al.*, 1983), forneceram dados para a elucidação da estrutura molecular do composto, a qual foi realizada pelo Prof. Dr. Roberto Gomes de S. Berlinck do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (15). A **Figura 35** mostra o cromatograma de absorção em UV, o espectro de massas a estrutura molecular da fração 2 da linhagem DG(M3) 6'C.

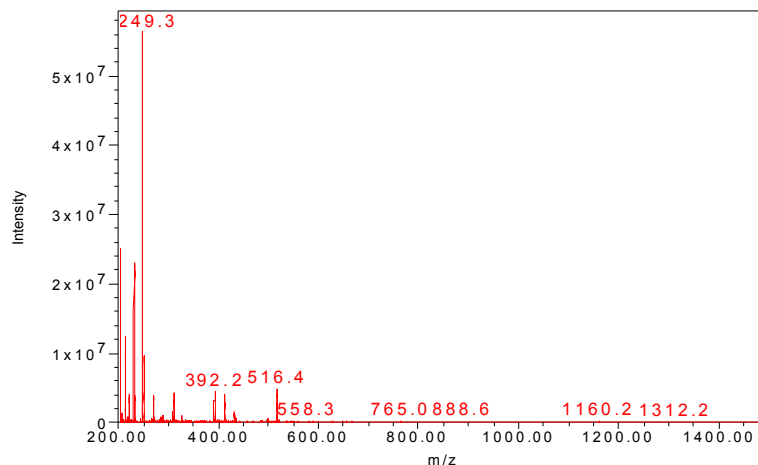


**Figura 34:** Estrutura molecular do composto isolado da amostra DG(M3) 6°C



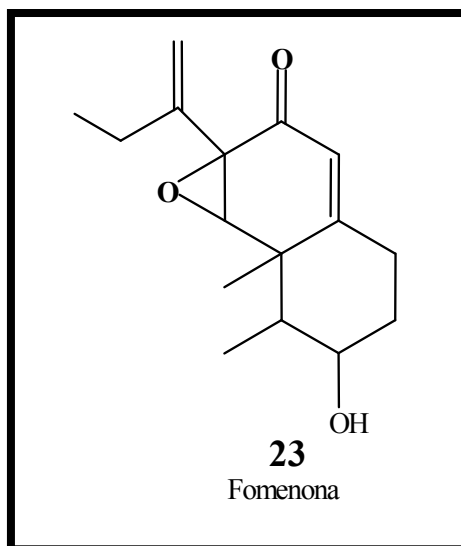
**Figura 35:** Cromatograma de absorção em UV (254 nm) do composto isolado da amostra DG(M3) 6°C ,  $t_r = 12,9$  min.





**Figura 36:** Cromatograma de espectro de massa do composto isolado da amostra DG(M3) 6°C .

A **Figura 34** mostra o metabólito secundário 13-desoxi-fomenona (**22**) no qual foi primeiramente descrito em 1983 por Tirilly e colaboradores, isolado do fungo hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx (syn. *Hansfordia pulvinata*). Este composto pertence ao grupo dos sesquiterpenos e é análogo do composto fomenona (**23**), possui atividade fungicida contra o fungo *Cladosporium fulvum* Cooke (syn. *Fulvia fulva*), agente causador do mofo foliar do tomate.



**Figura 37:** Estrutura molecular do composto fomenona.

De acordo com a literatura (Mello *et al.* 2003, 2006 e 2009; Delmadi *et al.* 2009) o fungo *Dicyma pulvinata* pertence ao filo Deuteromycota e é muito utilizado como biocontrole em plantações de seringueiras contra *Microcyclus ulei*, agente causador da doença conhecida como “mal das folhas”.

Não há relatos na literatura deste composto ter sido isolado de outras espécies de fungos ou de invertebrados marinhos. Também não consta nenhuma pesquisa relatando outra atividade biológica, a não ser ação fungicida em plantações de tomate e seringueiras, portanto este projeto é o primeiro a estudar este composto em ambiente marinho.

## 5. Conclusões

A técnica empregada no isolamento de micro-organismos da ascídia *Didemnum granulatum* se mostrou adequada com os objetivos do estudo, visto que foram isoladas 26 linhagens, das quais 77 % apresentaram algum tipo de atividade biológica.

As amostras DG(M3) 6°C, DG(M3) 5°C, DG(M3) 1, DG(B) 13 e DG(G) 2B, que apresentaram extratos com atividade citotóxica de moderada à alta foram cultivadas novamente e extraídas em intervalos de 7, 14, 21 e 30 dias. Foram reenviadas para o mesmo bioensaio, no qual foram comprovadas as suas atividades citotóxicas e a produção de compostos bioativos ao longo do tempo de incubação.

Pode se concluir por meio das análises químicas por cromatografia CLAE-UV-EM dos extratos brutos bioativos, observando-se o tempo de retenção e íon do pico molecular, que nenhuma linhagem de micro-organismo deste estudo, produziu os produtos naturais didemnida A, B, D e E, granulatimida e isogranulatimida, isolados da ascídia *Didemnum granulatum* pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck.

A linhagem DG(M3) 6°C identificada como *Penicillium* sp forneceu um extrato com alta atividade citotóxica, que juntamente com os estudos de seu perfil químico possibilitou o isolamento de um composto identificado como 13-desoxi-fomenona.

As análises químicas por cromatografia em camada delgada (CCD) e CLAE-UV-EM, juntamente com as de atividade citotóxica, mostraram-se eficazes na triagem de extratos brutos interessantes para o estudo de produtos naturais.

Apesar deste composto não ser inédito, este é o primeiro estudo feito com micro-organismos isolados do invertebrado marinho *Didemnum granulatum*, sendo assim não há relatos na literatura de estudos envolvendo bioensaios citotóxicos contra células tumorais e nem mesmo deste composto ter sido isolado de outras espécies de micro-organismos que

não seja do fungo *Dicyma pulvinata*, podendo-se concluir que este estudo foi de grande importância para colaborar com pesquisas futuras na busca de novas fontes produtoras de metabólitos secundários.

## 6. Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. New York: John Wiley. 1996, 869p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Modulo V. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Acesso em 14 de maio de 2010. Disponível em [www.anvisa.gov.br/saude/servico](http://www.anvisa.gov.br/saude/servico).

BARNES, R.D.; RUPPERT, E.E. **Zoologia dos invertebrados**. 6 ed. São Paulo: Roca, 1996, 1029 p.

BERLINCK, R. G. S.; BRITTON, R.; PIERS, E.; LIM, L.ROBERGE, M.; ROCHA, R. M.; ANDERSEN, R. J. Granulatimide and Isogranulatimide, Aromatic Alkaloids with G2 Checkpoint Inhibition Activity Isolated from the Brazilian Ascidian *Didemnum granulatum*: Structure Elucidation and Synthesis. **Journal Organic Chemistry (63)**. p. 9850-9856, 1998.

BERLINCK, R.G.S.; BRITTON, R.; OLIVEIRA, J.H.L.; ANDERSEN, R.J. Granulatimide and 6-Bromogranulatimide, Minor Alkaloids of the Brazilian Ascidian *Didemnum granulatum*. **Journal Natural Products, American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy**, v. 64, n.2, p. 254-255, 2001.

BLUNT, J.W.; COPP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTICOTI, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, **23** (1): 26-78, 2006.

BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. **Natural Products Reports**, **21** (1), 143-163, 2004.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n 3,p. 703-716, 2009.

DEMAIN, A.L. Metabolites, primary and secondary. In:Flickinger MC, Drew SC (eds) **Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation**. Wiley, New York, pp 1713–1732, 1999.

DEMALDI, L.C.; NETO, D.C.; ROCHA, V.F. Avaliação do potencial de uso do hiperparasita *Dicyma pulvinata* (Berk. & M. A. Curtis) no controle biológico do mal-das-folhas [*Microcyclus ulei* (Henn.) Arx] de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex A. Juss.) Muell. Arg.] em São José do Rio Claro, MT. **Ciência Florestal**, v. 19, n. 2, p.183-193, 2009.

DENNER, E. B. M.; SMITH, G. W.; BUSSE, H. J.; SCHUMANN, P.; NARTZ, T.; SCHAWN, W. P.; LUBITZ, W.; RICHARDSON, L. L. *Aurantimonas corallicida* gen. Nov., sp.nov., the causative agent of the plague type II on Caribbean scleractinian corals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, p. 1115-1122, 2003.

DESHMUKH, S. K. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. **Mycoses**, v. 46, p. 203 – 207, 2003.

DOMSCH, K. K.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. New York:Academic Press. 1980.

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.

FAULKNER,D.J. Marine natural products: metabolites of marine invertebrates. **Natural Product Reports**, 1: 551-598,1984.

FENICAL,W.; TOSKE,S.G.; JENSEN,P.R.; KAUFFMAN,C.A. Aspergillamides A and B: modified cytotoxic tripeptides produced by a marine fungus of the genus *Aspergillus*. **Tetrahedron**, 54, p. 13459-13466,1998.

FENICAL, W.; VERVOORT, H.; EPIFANIO, R. A. Tamandarins A and B: New Cytotoxic Depsipeptides from a Brazilian Ascidian of the Family Didemnidae. **Journal Organic Chemistry**, 65: 782-792, 2000.

FORD, P.N.; DAVIDSON, B.S. Plakinidine D, a new pyrroloacridine alkaloids from the ascidians *Didemnum rubeum*. **Journal of Natural Products**, 60, p. 1051-1053,1997.

GRANATO, A.C.; OLIVEIRA, J.H.H.; SELEGHIM, M.H.R.; BERLINCK, R.G.S.; MACEDO, M.L.; FERREIRA, A.G.; ROCHA, R.M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.O.; MORAES, C. O.; CAVALCANTI, B. C. Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**. v.28, n. 2, p. 192-198,2005.

HAM, J.; KANG, H. A novel cytotoxic alkaloid of Lamellarin Class from a marine ascidian *Didemnum* sp. **Bulletim of the Korean Chemical Society**, vol. 23, n. 1, 163-166,2002.

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

JIMENEZ, P. C., *et al.* Biological activity in extracts of ascidians from the northeastern

Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n. 1, p. 93-10, 2003.

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

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.

KJER, J.; DEBBAB, A.; AMAL, H.ALY; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v.5, n.3, p.479-490, 2010.

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

LIRA, S. P. **Metabólitos secundários biologicamente ativos isolados de esponjas marinhas e do fungo *Beauveria felina* de origem marinha**. Tese. Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos. 168 p., 2007.

LUONG, ME-LINH; BEKAL, S.; VINH, D.C.; LAUZON, D.; LEUNG, V.; AL-RAWAHI, G.N.; Ng, B.; BURDZ, T.; BERNARD, K. First report of isolation and characterization of *Aurantimonas altamirensis* from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n. 7, p. 2435-2437, 2008.

MACEDO JUNIOR, F.C. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**. v. 30, n.1, p.116-124. 2007.

MATTHEW, V.D.; JOULLIÉ, M. M. Natural products as probes of cell biology: 20 years of Didemnin research. **Medicinal Research Reviews**, v.22, n. 2, p. 102-145, 2002.

MELLO, S.S., SANTOS, M.F.; GANGANA, F.; KOSOSKI, R. Isolados de *Dicyma pulvinata* obtidos em levantamento realizado em seringais brasileiros. **Embrapa Comunicado Técnico 81**, 2003. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot081.pdf>. Acesso em 18 de abril de 2010.

MELLO, S. C. M.; SANTOS, M.F. SILVA, J.B.T. Isolados de *Dicyma pulvinata* em estromas de *Microcyclus ulei* em seringueira. **Pesquisas Agropecuárias Brasileira**, v.41, n.2, p.359-363, 2006.

MELLO, S.C.M.; MELO D.F. Ideal culture conditions for *Dicyma pulvinata* conidia mass production. **Pesquisas Agropecuárias Brasileira**, v.44, n.10, p.1232-1238, 2009.

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.

MUNRO, M.H.G.; SILVA, E.D.; GEIERMANN, A.; MITOVA, M.I.; KUEGEIR, P.; BLUNT, J.W.; COLE, A.L.J.. Isolation of 2-pyridone alkaloids from a New Zealand marine-derived *Penicillium* species. **Journal of Natural Products**, 72, p. 477-479, 2009.

NEWEL, S. Y. **Mangrove Fungi: The succession in the mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.)**. In: Recent Advances in Aquatic Mycology (E. B. G. Jones Ed.), Paul Elek Scientific Books, UK, p. 51 – 91, 1976.

PARVATKAR, R.R.; D'SOUZA, C.; TRIPATHI, A.; NAIK, C.G. Aspernolides A and B, butenolides from a marine-derived fungus *Aspergillus terreus*. **Phytochemistry**, 70, p. 128-132, 2009.

PELCZAR, J.; MICHAEL, J.; CHAN, E. S. C.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Sueli Fumie Yamada (Trad.). 2 ed. Pearson/Makron Books, São Paulo, v.1, 524p, 1996.

PATTENDEN, G.; BONDEN, C.D.J.; NORLEY, M. Total synthesis and assignment of configuration of the thiazoline-based cyclopeptide cyclodidemnamide isolated from the sea squirt *Didemnum molle*. **Journal of the Chemical Society**, 1, p. 883-888, 1999.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.D.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.D. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**, 25, 45-61, Suppl. 1, 2002.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic 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.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul EDUNISC, 2002, 829 p.

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



REN XIANG TAN; HUI MING GE; YAO SHEN; CHUN HUA ZHEI; SHU HUA TAN; HUI DING; YONG CHUN SONG. Penicidone A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of an endophytic *Penicillium sp.* **Phytochemistry**, 69, p. 571-576, 2008.

ROCHA, R.M.; KREMER, L.P. Introduced ascidians in Paranaguá bay, Paraná, southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22 (4), p. 1170-1184, 2005.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v 31, p. 1367-1380, 2007.

RUDI, A.; AKNIN, M.; GAYDOU, E.M.; KASMAN, Y. Four new cytotoxic cyclic hexa- and heptapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. **Tetrahedron**, vol 54 (43), 13203- 13210, 1998.

SALEEM, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, S. C.; JABBAR, A.; ASHRAF, M. D.; 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.

SCHIMIDT, G. H.; WARNER, G. F. Spatial competition between colonial ascidians : the importance of stand-off. **Marine Ecology Progress Series**, 31, 101-104, 1986.

SEED, R.; O'CONNOR, R. J. Community organization in marine algal epifaunas. **Annual Review Ecology Systematics** 12: 49-74, 1981.

SEGRAVES N.L; LOPEZ S; JOHNSON T.A; SAID S.A; FU X; SCHMITZ F.J; PIETRASZKIEWICZ H; VALERIOTE F.A; CREWS P. Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla-*Fascaplysinopsis* sponges and *Didemnum tunicates*. **Tetrahedron Letters**, 44:3471–3475, 2003.

SELEGHIM, M. H. R.; LIRA, S. P.; KOSSUGA, M. H.; BATISTA, T.; BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; MURICY, G.; ROCHA, R. M.; NASCIMENTO, G. G. F.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SOUZA, A. O.; PEIXINHO, S. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, 287 – 318. 2007.

SILVA, R.; COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica. 2006. Disponível em [www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/). Acesso em 18 de novembro de 2009.

STICHER, O. Natural products isolation. **Natural Products Reports** v.25, n.3,p. 517-554, 2008.

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

TAKEARA, R. *et al.* Constituintes químicos da ascídia. *Didemnum psammatoedes* (SLUITER, 1895) Coletada na Costa cearense. **Química Nova**, vol. 30, n. 5, 1179-1181, 2007.

TEO, S. L. M.; RYLAND, J. S. Toxicity and palatability of some British ascidians. **Marine Biology**, **120**: 297-303, 1994.

TIRILLY, Y.; KLOOSTERNAN, J.; SIPMA, G.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J.J. A fungitoxic sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. **Phytochemistry**, v.22, n. 9, p. 2082-2083, 1983.

TODD, C. D.; TURNER, S. J. Ecology of intertidal and sublittoral cryptic epifaunal assemblages: II. Nonlethal overgrowth of encrusting bryozoans by colonial ascidians. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, **115**: 113-126, 1988.

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

TRABULSI, L.R.; TOLEDO, M. R. F.; LEMOS, A. P. S. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008, 760p.

TURQUE, A. S.; SILVEIRA, C. B.; VIEIRA, R. P.; MURICY, G.; CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. M.; MARTINS, O. B. (2008). Micro-organismos associados a poríferos. **Biotecnologia Ciências & Desenvolvimento**, ano X, v. 37, p. 64-69, 2008.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, **29** (2): 326-337, 2006.