



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

PAULO HENRIQUE FREITAS DA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS E/OU SUBSTÂNCIAS FRENTE À CÉLULAS DE
MELANOMA E PATÓGENOS HUMANOS

MANAUS
2017

PAULO HENRIQUE FREITAS DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS E/OU SUBSTÂNCIAS FRENTE Á CÉLULAS
DE MELANOMA E PATÓGENOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dra. Antonia Queiroz de Lima Souza

Coorientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

**MANAUS
2017**

PAULO HENRIQUE FREITAS DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS CONTRA CÉLULAS DE
MELANOMA E PATÓGENOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Larissa de Souza Kirsch
Universidade do Estado do Amazonas

Profa. Dra. Maria de Fátima Oliveira Almeida
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2017**

S586b Silva, Paulo Henrique Freitas da
Bioprospecção de extratos e/ou substâncias frente à células de
melanoma e patógenos humanos . / Paulo Henrique Freitas da Silva
-- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2017.

V; 66 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2017.

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Queiroz de Lima
Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Hector Henrique F.

*Dedico este trabalho aos meus pais
Amilton Nascimento da Silva e Terezinha Freitas da
Silva, pelo apoio, pelo incentivo, pois devo a vocês todas as minhas conquistas.
Dedico este trabalho também a Sophia Alencar Freitas, pois apesar de muito
pequena, veio ao mundo durante o período de mestrado, hoje além dos meus
pais, é a principal razão das minhas vitórias.*

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não têm conta exata e que rompe a regra da lógica, nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar”.

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, minha família pela oportunidade de crescimento humano e amadurecimento profissional;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA;

Aos meus orientadores, Professora Dra. Antônia Queiroz de Lima Souza e ao Professor Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen, por toda orientação, paciência, ensinamentos, pelo acréscimo profissional, pela amizade, aos dois anos de convivência, meu profundo respeito a vocês;

Destaco o agradecimento a Professora Dra. Antônia Queiroz de Lima Souza, por ter aceitado a orientação deste projeto, e por acreditar no desenvolvimento do trabalho nestes dois anos;

Em especial ao Professor Dr. Héctor Henrique, que devido sua rotina, sempre conseguiu um tempo para ensinar, colaborar, ajudar, acrescentar, auxiliar, e principalmente por mostrar os novos caminhos da química voltada para a área farmacêutica;

Ao Professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pela contribuição com o presente trabalho;

A Professora Dra. Marne da FCF-UFAM, por disponibilizar o espaço para acompanhamento das análises dos testes de citotoxicidade;

A Msc. Ellen, por disponibilizar seu tempo para o desenvolvimento dos testes, bem como ensinar todo o procedimento;

A Professora Dra. Fátima Almeida, por ter auxiliado em momentos essenciais durante a fase laboratorial;

Ao Dr. Elissandro, por ter auxiliado em momentos fundamentais durante a fase laboratorial, como também pela amizade formada;

A Msc. Sarah Silveira pelo auxílio, contribuição e disponibilidade de troca de conhecimento durante todo este processo, como também pela grande pessoa que és, e por ter dado a oportunidade de conhecê-la como pessoa e amiga;

Ao aluno de IC Ruan Moraes por ter contribuído de forma exemplar no desenvolvimento deste trabalho;

Aos membros do LABMICRA - UFAM, pela convivência, amizade, pelo trabalho em equipe e nossas confraternizações: Sarah, Ruan, Rachid, Débora, Ketlen, Fracinaldo, Luan, Adriana, Elissandro, Airi, Weider, Greice, Pingo entre outros;

Aos Membros do Lab. de Espectrometria de Massas, pela convivência e amizade: Elzalina, Richardson, Airi, Weider, Bruna entre outros;

Aos membros do Lab.DeMpSter - MBT/UEA, pela conviuvência, amizade, pelo trabalho em equipe: Débora, Elida, Joyce, Jacqueline, Gigliola, Adriane entre outros;

Aos grandes amigos Luciana, Paulo Alexandre, Gilmar, Jéssica e Paola, pela caminhada nestes dois anos, e apoio durante todo o mestrado;

A todos os colegas que direta ou indiretamente me acompanharam na elaboração e colaboração desse trabalho, meus agradecimentos.

RESUMO

Fungos endofíticos são reconhecidos pela sua relevância ecológica, habilidade para produzir metabólitos secundários com diferentes estruturas químicas e importância biotecnológica. A proposta deste trabalho foi bioprospectar fungos endofíticos de dois gêneros, bem como avaliar suas respectivas atividades contra células de melanoma e patógenos humanos. Os fungos endofíticos para a realização deste estudo, foram reativados da coleção de trabalho do Grupo de Pesquisa LABMICRA-UFAM. Em sequência, foram isolados dos gêneros de fungos *Paecilomyces* e *Talaromyces*, estes cultivados em escala analítica, com a finalidade de obtenção de extratos. Após a obtenção dos extratos estes foram submetidos aos testes de atividades antimicrobiana e de citotoxicidade. As atividades antimicrobianas foram realizadas pelo método de diluições seriadas sendo verificados também os modos de ação (fungicida, fungistática, bactericida ou bacteriostático). Foram observados resultados positivos frente aos patógenos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Escherichia coli*. Das duas linhagens de fungos endofíticos estudadas, observou-se que os extratos brutos não apresentaram atividade antimicrobiana abaixo de 500 µg/mL, o que forçou ao fracionamento dos mesmos. Após as separações cromatográficas, os testes foram novamente realizados, onde observou-se uma moderada atividade fungicida contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, ambas na maior concentração testada (500 µg/mL) e bacteriostática na mesma concentração frente à *E. coli* para a fração Fr.2 do fungo *Talaromyces* sp. Já para o extrato do micélio deste fungo e suas respectivas frações, não foi observada atividade nas concentrações testadas. Já para o fungo *Paecilomyces* sp., apenas suas frações apresentaram atividade com MID de 31,3 µg/mL contra *C. albicans* e 62,5 µg/mL contra *C. tropicalis*. Com isso, as amostras obtidas destes fungos foram submetidas a análise de inibição de células tumorais. No entanto, quando verificada a viabilidade celular, pode-se inferir que nenhum dos extratos, bem como suas respectivas frações apresentaram eficácia contra as células de melanoma testadas neste trabalho. Com isso, as frações obtidas foram comparadas por cromatografia de camada delgada. Na comparação das frações do fungo *Talaromyces* sp., foi observado que as frações Fr.1 e Fr.2 apresentaram, perfis semelhantes. Com a análise dos dados obtidos, permitiu-se elucidar uma nova substância, denominada paecilina D. A molécula foi avaliada quanto seu potencial antimicrobiano, onde foi observado um MID de 15,6 µg/mL, para os patógenos estudados. Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que os fungos endofíticos *Talaromyces* sp. e *Paecilomyces* sp., produzem metabólitos secundários com atividades antimicrobianas, entretanto, sem atividades citotóxicas contra as células testadas. Uma vez que os rendimentos da fração ativa no fungo *Talaromyces* sp. foram superiores, e que esta fração apresentou atividades biológicas moderadas, procedendo-se com seu estudo químico, onde foi verificado a elucidação de uma nova molécula paecilina D, representando uma nova fonte de pesquisa para estudos posteriores.

Palavras-chave: Biotecnologia, policetídeos, ressonância magnética nuclear, *Talaromyces*, paecilina D, xantonas.

ABSTRACT

Endophytic fungi are recognized for their ecological relevance, ability to produce secondary metabolites with different chemical structures and biotechnological importance. The purpose of this work was to bioprospect endophytic fungi of different genera, as well as to evaluate their respective activities against melanoma cells and human pathogens. The endophytic fungi for this study were reactivated from the LABMICRA-UFAM Research Group's collection. In sequence, the genera *Paecilomyces* and *Talaromyces*, which were grown on an analytical scale, were isolated for the extraction of extracts. After obtaining the extracts they were submitted to the tests of antimicrobial activities and of cytotoxicity. The antimicrobial activities were carried out by the serial dilution method and the modes of action (fungicide, fungistatic, bactericidal or bacteriostatic) were also verified. Positive results were observed against the pathogens *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Escherichia coli*. Of the two endophytic fungal strains studied, it was observed that the crude extracts showed no antimicrobial activity below 500 µg / mL, which forced them to fractionate them. After the chromatographic separations, the tests were again carried out, where a moderate fungicidal activity against *C. albicans* and *C. tropicalis* was observed, both in the highest concentration tested (500 µg / mL) and bacteriostatic in the same concentration against *E. coli* for The Fr.2 fraction of the fungus *Talaromyces* sp. However, for the mycelial extract of this fungus and its respective fractions, no activity was observed at the concentrations tested. As for the fungus *Paecilomyces* sp., only its fractions showed activity with MID of 31.3 µg / mL against *C. albicans* and 62.5 µg / mL against *C. tropicalis*. Thus, the samples obtained from these fungi were submitted to analysis of inhibition of tumor cells. However, when cell viability is verified, it can be inferred that none of the extracts, as well as their respective fractions, showed efficacy against the melanoma cells tested in this study. With this, the obtained fractions were compared by thin layer chromatography. In the comparison of the fractions of the fungus *Talaromyces* sp., it was observed that the fractions Fr.1 and Fr.2 presented similar profiles. With the analysis of the obtained data, it was possible to elucidate a new substance, denominated paecilina D. The molecule was evaluated for its antimicrobial potential, where a MID of 15.6 µg / mL was observed for the pathogens studied. In view of the presented results, it can be concluded that the endophytic fungi *Talaromyces* sp. and *Paecilomyces* sp., Produce secondary metabolites with antimicrobial activities, however, without cytotoxic activities against the tested cells. Since the yields of the active fraction in the fungus *Talaromyces* sp. were higher, and that this fraction had moderate biological activities, proceeding with its chemical study, where it was verified the elucidation of a new molecule paecilin D, representing a new source of research for later studies

Key words: Biotechnology, polyketide, nuclear magnetic resonance, *Talaromyces*, paecilin D, xanthones.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resultados dos testes antimicrobianos.....43

Tabela 2. Resultados dos testes citotóxicos frente a cepas de melanoma45

CAPÍTULO II

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância ML.3.15_2 em comparação com os dados Blenolídeo H descritos na literatura (CAI et al, 2014).....56

Tabela 2. Resultados dos testes antimicrobianos.....57

LISTA DE FIGURAS

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1. Microscopia da bactéria gram-negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 2. Microscopia da bactéria gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Figura 3. Microscopia da bactéria gram-negativa <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 4. Tipos de Câncer de Pele: a) Melanoma b) Basocelular c) Espinocelular.	22
Figura 5. Substâncias bioativas que são fármacos ou protótipos para fármacos de origem fúngica. Amoxicilina® (1), Cefalexina® (2), Lipitor® (3) e Fingolimod® (4).	24
Figura 6. Substâncias bioativas e/ou seus derivados semissintéticos em estágios de fase I e II de testes clínicos (5a e 6a) e moléculas bioativas recentemente descobertas (7-12).....	25
Figura 7. Substâncias antitumorais isoladas de plantas e posteriormente descritas em seus respectivos fungos endofíticos.	27
Figura 8. Substâncias bioativas isoladas de diversas espécies de <i>Talaromyces</i>	28
Figura 9. Substâncias bioativas isoladas de diversas espécies de <i>Talaromyces</i>	29

CAPÍTULO I

Figura 1. (A) Cultivo em Larga Escala de <i>Talaromyces</i> . (B) Cultivo em Larga Escala de <i>Paecilomyces</i> . Fonte: da Silva, PHF.....	39
Figura 2. Esquema dos procedimentos adotados para a obtenção dos extratos brutos. Por motivos de contaminação não foi possível obter-se o extrato do micélio do fungo <i>Paecilomyces</i> sp.....	40
Figura 3. Esquema dos procedimentos adotados para a obtenção das frações.....	40
Figura 4. (A) Cromatoplaça revelada a 365 nm. (B) Cromatoplaça revelada a 254 nm. Legenda: Ac = ácido secalônico D, Erg = ergosterol.	46

CAPÍTULO II

Figura 1. Substâncias químicas isoladas de <i>Talaromyces</i> sp.	50
Figura 2. Proposta estrutural inicial do núcleo xantona e correlações observadas para 5-OH (setas azuis), H-7 (setas negras) e H-8 (setas vermelhas).	53
Figura 3. Proposta estrutural inicial do núcleo γ - lactona e correlações observadas para H-9 (setas vermelhas).	53

Figura 4. Proposta estrutural inicial do núcleo γ - lactona e correlações observadas para H-2 (seta preta), H-10 (setas azuis) e H-15 (setas vermelhas).....	54
Figura 5. Paecilina A	54
Figura 6. Proposta estrutural inicial comparados por Cai et al., e El-Elimat et al.	54
Figura 7. Estrutura da paecilina D (2).	55

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura 1S. Espectro de RMN de ^1H da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).	61
Figura 2S. Espectro de RMN de ^{13}C da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).	61
Figura 3S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de δH 11,92 - HMBC da substância ML.3.15_2 em Clorofórmio-d (500 MHz).	62
Figura 4S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de 7H e 8H - COSY da substância ML.3.15_2 em Clorofórmio-d (500 MHz).	62
Figura 5S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C - HSQC da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).	63
Figura 6S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 7,54 e 6,64 - da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).....	63
Figura 7S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 4,81 - HMBC da substância ML.3.15_2 8 em clorofórmio-d ₆ (500 MHz).....	64
Figura 8S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 3,73 - HMBC da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).....	64
Figura 9S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 2,99 e 1,34 - COSY da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).....	65
Figura 10S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 1,34, 2,49, 2,71 e 2,99 - HMBC da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).....	65
Figura 11S. Espectro de NOESY da substância ML.3.15_2.....	66

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	14
2- REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
2.1 - Infecções microbianas	16
2.1.1 – Infecções causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	16
2.1.2 – Infecções causadas por <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i>	19
2.2- Câncer de pele	20
2.3 – Produtos Naturais	24
2.3.1- Produtos naturais de fungos como fontes de fármacos	24
2.4 – Fungos	26
2.4.1 – Fungos Endofíticos	26
2.4.2 – Metabólitos Secundários de <i>Talaromyces</i>	27
3 – OBJETIVOS	30
3.1 – Objetivo Geral	30
3.2 – Objetivos Específicos	30
4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
CAPÍTULO I	35
1 – Introdução	37
2 – Materiais e Métodos	37
2.1 – Reativação dos fungos endofíticos	37
2.2 – Cultivo das linhagens endofíticas	38
2.2.1. Preparo do meio de cultura BDL (<i>Batata + Dextrose + Ext. de levedura</i>).....	38
2.2.2. Preparo do meio de cultura ISP2	38
2.2.3. Inóculo e produção de metabólitos secundários	38
2.3 – Obtenção dos Extratos brutos	39
2.4 – Fracionamento dos extratos	39
2.5 – Análise Cromatográfica	41
2.6 – Ensaio antimicrobianos	41
2.7 – Ensaio citotoxicidade	41
3 – Resultados e discussão	42
3.1 – Ensaio antimicrobianos	42
3.2 – Ensaio citotóxicos	44
3.2 – Avaliação cromatográfica preliminar	45
5 – Referências Bibliográficas	46
CAPÍTULO II	48
1 – Introdução	50
2 – Materiais e Métodos	51
2.1 – Isolamento das moléculas ativas.....	51
2.2 – Equipamentos das análises espectroscópicas	51
2.3 – Verificação de atividade biológica das moléculas.....	51
3 – Resultados e discussão	52
3.1- Caracterização química	52
3.2.1 - <i>Substância 2</i>	52
3.3- Ensaio antimicrobianos.....	56
5- Referências bibliográficas	58
6- Conclusões finais	59

Anexo	60
--------------------	-----------

1-INTRODUÇÃO

A bioprospecção de fungos endofíticos, consiste na investigação a fim de identificar princípios ativos úteis na pesquisa e para a indústria farmacêutica, podendo ser definida como o estudo da diversidade biológica com fins econômicos e sociais. O crescente número de pacientes com câncer, o ressurgimento de infecções que até tempos atrás achava-se ter sido controlados e o preocupante aumento de resistência bacteriana, criaram a necessidade de estudos no sentido de desenvolver novos agentes quimioterápicos e antimicrobianos.

O câncer e as infecções oriundas de patógenos humanos, estão entre as principais causas de óbitos no mundo, estas duas enfermidades estão diretamente relacionadas, os agentes infecciosos, sendo estes derivados de bactérias e fungos, onde estão envolvidos na patogênese do câncer. Na maior parte dos casos, o desenvolvimento de tumor parece ser uma consequência direta de infecções e de suas expressões gênicas o que serve de estímulo para a proliferação celular (ALMEIDA et al., 2005a).

Tanto o câncer quanto a infecção são exacerbados por produção de citocinas, fatores de crescimento, quimiotaxia dos macrófagos no processo de infecção a longo prazo pode ser considerada um fator importante, pois quando não controlado pode vir a desenvolver a carcinogênese (FORTES et al., 2008).

No mundo estima-se que cerca de 18% dos casos de câncer são decorrentes a infecções não tratadas de forma correta, culminando com o aumento a cada ano deste índice. (HELENA; OLIVEIRA, 2011). O termo Câncer pode ser designado a todos os tumores malignos, o conceito de neoplasia pode ser definido como massa de tecido anormal, onde cresce de forma desordenada persistindo mesmo após a interrupção de estímulos que originam tal mudança (KUMAR et al., 2013). Existem vários tipos de câncer podendo-se destacar o câncer de pele, por ser um dos mais incidentes em todo o mundo, apresenta índice de mortalidade menor quando diagnosticado precocemente.

O câncer de pele pode ser dividido em, câncer de pele melanoma (CPM) e câncer de pele não-melanoma (CPNM), este último subdividido em carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular, o CPNM é o de maior frequência no Brasil. Além das características peculiares do câncer de pele, o grande aumento de infecções bacterianas tem se tornado um problema de saúde multissocial, tendo como origem bactérias gram-positivas, gram-negativas e algumas espécies de fungos leveduriformes (ALMEIDA et al., 2005b) .

São vários os agentes causadores de infecções, podendo-se destacar, os *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* entre outros. O patógeno *Staphylococcus aureus* é conhecido por ser uma bactéria gram-positiva, podendo causar diversas doenças tais como: foliculite, gastroenterite estafilococcica, síndrome da pele escaldada estafilococcica, endocardite, osteomielite, pneumonia entre outros. Já o patógeno *Escherichia coli*, apresenta relação direta como indicador de contaminação de alimentos, porém pode ser causa de infecções renais. A *Candida albicans* é considerada um fungo leveduriforme e esta associada a infecções no trato genital de homens e mulheres. Diante disto tem-se procurado substâncias oriundas de produtos naturais por apresentarem, segundo dados, menor toxicidade ao hospedeiro, destacando-se as substâncias oriundas de fungos endofíticos (HOLANDA et al., 2006).

Os fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de produtos naturais com atividades biológicas, destacando-se as atividades antimicrobianas, antineoplásicas entre outras (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013a). Sabe-se, que a indústria farmacêutica comercializa produtos de origem biotecnológicas, porém os níveis de toxicidades ainda são elevados, com isso a busca por melhor eficácia e menor toxicidade ainda continua. Os extratos derivados de produtos naturais têm-se mostrado de grande valia, devido sua baixa toxicidade e diminuição de resistência (KUETE et al., 2011).

Análises recentes indicaram os potenciais de agentes anticâncer como também agentes antimicrobianos, derivados de fungos endofíticos, onde foram estudados vários gêneros, sendo observados atividades promissoras para os extratos de diversas espécies de fungos tais como: *Pestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* (KUETE et al., 2011).

Neste sentido desde 2008 o LABMICRA, têm isolado microrganismos endofíticos, produzindo metabólitos secundários em escala analítica e já avaliaram mais de 400 extratos contra cinco tipos de células tumorais leucemia promielocítica (HL-60), cólon-humano (HCT-116), sistema nervoso central (SF-295), MDA-MB 435 (melanoma) que foram cedidas pelo Instituto Nacional do CA (USA), em conjunto ao grupo do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Destes ensaios mais de 40 extratos mostraram-se promissores com valores de inibição entre 70 a 100%. Por esse motivo duas linhagens foram reativadas e seus extratos avaliados contra células de melanoma (SK-MELL-19 e SK-MELL 103) e contra patógenos humanos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*), afim de verificar suas possíveis atividades.

2- REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 - Infecções microbianas

Muitas bactérias e microrganismos são benéficos ao homem, atuando em defesa contra patógenos e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças, estes respondem de forma consistente as mudanças do ambiente, ressalta-se que esta resposta pode desencadear o desequilíbrio homeostático, sendo um fator para o aparecimento de enfermidades. Vários são os fatores que influenciam o desenvolvimento de infecções oriundas de microrganismos, tais como: sistema imunológico debilitado, saneamento básico, alimentos contaminados, uso irracional de antibióticos entre outros, levando ao desenvolvimento de várias doenças (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Dentre as inúmeras patologias que afetam a saúde pública, destaca-se as de origem fúngica e bacteriana, estudos demonstram que os patógenos mais incidentes são os dos gêneros *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

2.1.1 – Infecções causadas por *P.aeruginosa*, *S.aureus* e *E.coli*.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa, baciliforme e aeróbia, sendo considerada uma bactéria oportunista, pois, explora eventuais fraquezas no organismo para estabelecer uma infecção. Esta bactéria pertence a família Pseudomonadaceae e apresenta-se na forma de bastonetes. A microscopia revela as células de forma isolada, aos pares ou em cadeias curtas (COELHO; BARETTA; OKAWA, 2007) (Figura 1).

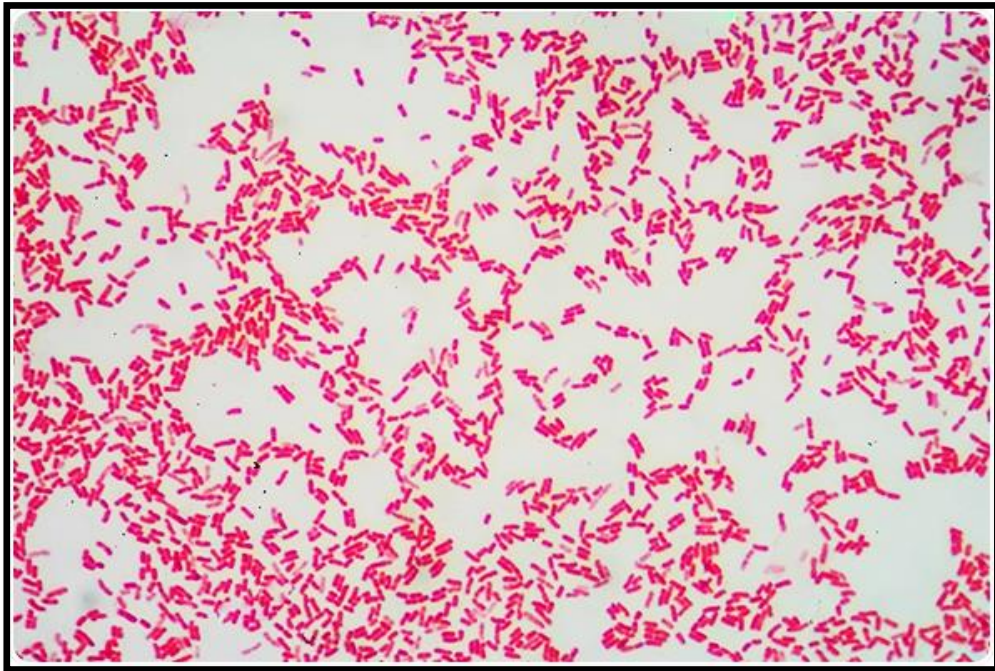


Figura 1. Microscopia da bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: <http://www.news-medical.net/whitepaper/Pseudomonas-aeruginosa-an-overview.aspx>

A *Pseudomonas aeruginosa* pode colonizar vários tecidos e órgãos, seu formato facilita a adsorção na mucosa normal, permitindo a formação de microcolônias, denominadas de biofilme, que são recobertos por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas (EMERSON et al., 2012). A *P.aeruginosa* é uma das principais bactérias causadoras de infecções em pacientes hospitalizados, destacando-se a fibrose cística, peritonites, infecções renais, pneumonias sendo a principal causa de óbitos quando associados a outras doenças, geralmente tratadas com antibióticos de amplo espectro o que a longo prazo aumenta a resistência. As infecções causadas por esta bactéria, em ambientes fora aos hospitalares são geralmente associados a contaminação de água, resultando em foliculites e otites (SANTOS, 2004).

A disseminação de *P. aeruginosa* é facilitada devido esta ser facilmente encontrada em diferentes ambientes, a prevenção e o controle deste patógeno exige cuidados básicos tais como: higienização das mãos e a utilização racional de medicamentos antimicrobianos (VIRGÍNIA et al., 2002).

O *S.aureus* (Figura 2), é um bactéria gram-positiva frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis, entretanto pode causar simples infecções ou até mesmo infecções graves (NETTO et al., 2001).

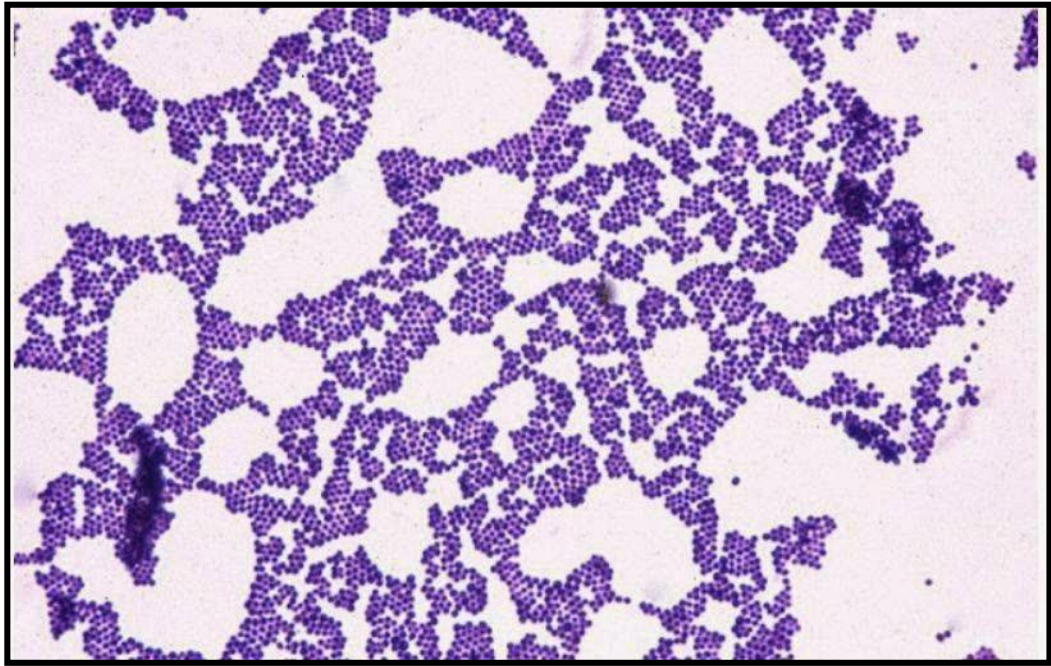


Figura 2. Microscopia da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*.
Fonte: <http://antomascazzini.blogspot.com.br/staphylococcus-aureus.html>

O *S.aureus*, pode tornar-se patogênica quebrando a barreira de proteção cutânea, diminuindo a imunidade, causando diretamente infecções cutâneas. *S. aureus* podem comprometer o organismo humano com infecções sistêmicas, endocardites, osteomielite, pneumonia, gastroenterite, foliculite entre outros (GELATTI et al., 2009).

A osteomielite é iniciada com uma infecção bacteriana dos espaços medulares que, posteriormente, compromete o sistema circulatório haversiano e eventualmente abrange a cortical e o periósteo. Pode ser originada por um foco contínuo de infecção ou por disseminação hematogênica, principalmente em crianças (FERNANDES, 2012). Os sinais e sintomas incluem dor, exposição óssea, aumento de volume, drenagem de pus, febre e mal-estar. Na maioria das infecções ósseas, são encontrados microrganismos como o *S.aureus*, em menor escala que os estreptococos, em casos raros outros microrganismos como pneumococos, gonococos colibacilos, *Haemophilus influenzae* e Bacilo de Koch, em portadores de tuberculose (SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005).

Em relação as enfermidades do trato gástrico, como a gastroenterite é uma inflamação aguda que compromete os órgãos do sistema gastrointestinal. O problema é mais comum no verão e em locais sem tratamento de água, rede de esgoto, água encanada e destino adequado (RATTI; SOUSA, 2009).

A *E.coli* (Figura 3), é uma bactéria gram-negativa que se encontra geralmente no trato gastrointestinal de organismos de sangue quente (endotérmicos), sendo a maioria das estirpes

de *E. coli* é inofensiva, porém alguns sorotipos podem causar graves intoxicações nos seres humanos. A infecção do trato urinário é causada por várias bactérias, tendo como destaque a família Enterobacteriaceae, estima-se que a bactéria gram-negativa *E.coli* é responsável por 85 a 90% de casos de infecção urinária, sendo mais frequentes em mulheres (LIMA et al., 2015).

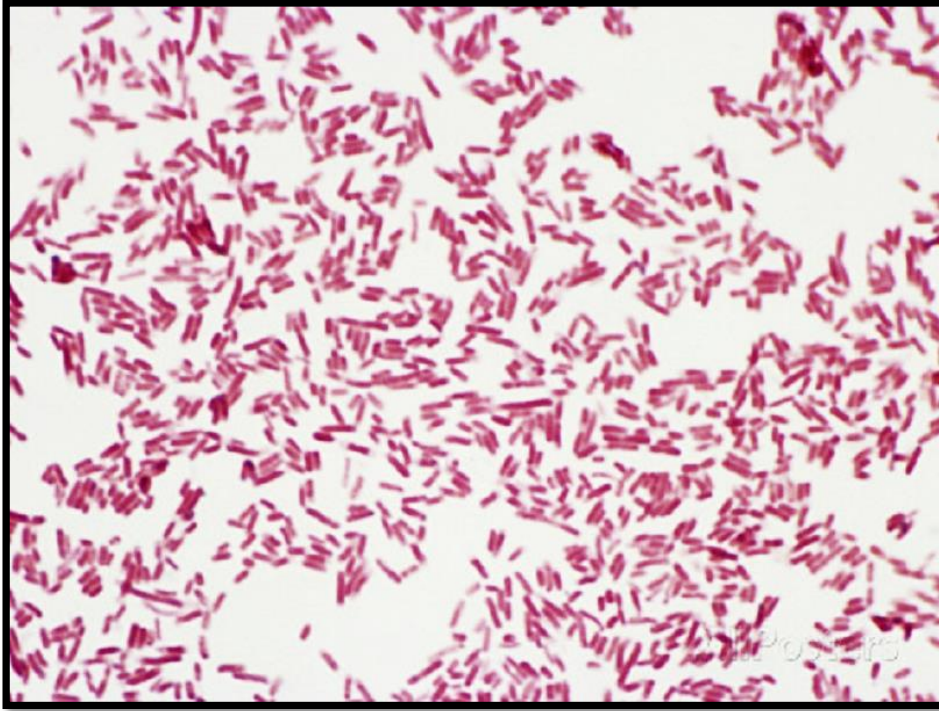


Figura 3. Microscopia da bactéria gram-negativa *Escherichia coli*.

Fonte: <http://www.luciacangussu.bio.br/wp-content/uploads/atlas-e-coli-gram.jpg>

2.1.2 – Infecções causadas por *C.albicans* e *C.tropicalis*

Nos últimos anos têm-se observado o aumento de espécies dos fungos leveduriformes *Candida*, podendo-se destacar *C.tropicalis*, *C.glabatra*, *C.parapsilosis*, *C.stellatoídea*, *C.krusei*, *C.guilliermondi* e *C.albicans*. As infecções causadas por este tipo de patógeno afetam principalmente cavidades genitais e orais (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção da vulva e da vagina, causada por várias espécies de *Candida*, fungos comensais da mucosa vaginal, que podem tornar-se patogênicos quando condições fisiológicas da mucosa vaginal são alteradas. A CVV e a candidíase oral, são as duas formas mais comuns de infecções causadas por este fungo oportunista. Estudos indicam que a *Candida albicans* é mais frequente do que as outras espécies demonstrando a aproximadamente 90% dos casos relatados (HOLANDA et al., 2006).

A CVV se caracteriza clinicamente pela ocorrência de prurido vulvar intenso, leucorréia, dispareunia, disúria, edema e eritema. Em alguns casos, é possível observar a presença de lesões satélites vulvares, como escoriações. A ausência de sintomas parece apresentar uma associação importante com espécies emergentes que não sejam *C. albicans*.

Os fatores relacionados ao desenvolvimento de candidíase, podem estar ligados ao desequilíbrio do organismo, oscilações de temperatura corpórea, utilização irracional de antibióticos, presença de ciclos menstruais regulares, contraceptivos orais, reposição hormonal, aumento de níveis de glicogênio associados ao hiperestrogenismo, o que favorece a nutrição fúngica e o desenvolvimento desta infecção (ROSA; RUMEL, 2004).

As associações de candidíase com outras doenças são cada vez mais notáveis na medicina, estudos apontam que o *Diabetes mellitus* é um dos fatores de surgimento de colonização e infecção por *Candida*, sendo o controle glicêmico associado a mudanças comportamentais para a redução da infecção.

A utilização de antibióticos de forma irracional pode contribuir com o desenvolvimento de infecção por este patógeno, devido a modificação de pH no trato genito urinário, bem como a destruição da microbiota, diminuindo a competição por nutrientes de microrganismos benéficos ao hospedeiro (SILVA, 2009).

Esta infecção acomete milhões de mulheres em todo o mundo anualmente, causando grande desconforto, porém, sabe-se que não somente as mulheres sofrem deste problema, os homens estão sendo infecionados por este patógenos, a doença no homem é denominada candidíase peniana, atingindo principalmente a glândula ou o prepúcio, sendo menos frequente quando comparados com as mulheres, hoje a infecção por *Candida*, assim como outras doenças, como por exemplo o câncer são consideradas um problema de saúde pública.

2.2- Câncer de pele

O Câncer é uma doença que causa temor na sociedade, pois se tornou um estigma de mortalidade e dor. A palavra câncer tem sua origem latina, e apresenta como significado caranguejo, se fazendo referência devido às características infiltrantes deste crustáceo, porém cientificamente o termo mais adequado, devido principalmente ao conceito é, neoplasia, o que diz respeito ao crescimento desordenado de células anormais no hospedeiro (ALMEIDA et al., 2005b). O Câncer é uma doença na qual as células sofrem alterações genéticas, fazendo com que estas cresçam de forma anormal, migrando para outros tecidos e órgãos.

A neoplasia, mesmo após a interrupção de estímulos que originaram tal mudança (KUMAR et al., 2013). O ciclo celular é dividido em fases: G1, S, G2 e M e apresenta como uma de suas principais funções garantir a replicação de DNA, para que cópias idênticas de cromossomos sejam distribuídas de forma idênticas as células filhas (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

No Câncer as células respondem a estímulos que controlam a transição de G1 para S, e por isso permanecem dentro do ciclo celular, no momento de saída do ciclo ocorre a diferenciação e maturação celular, a cada passagem do ponto G1 têm-se o início de um novo ciclo (BOGO; GRANDE, 2012). Existem duas classes de genes conhecidos como proto-oncogenes e genes supressores que estão ligados a regulação do ciclo celular, o primeiro está diretamente ligado a produção de proteínas que atuam estimulando o ciclo celular e o segundo atua na produção de proteínas que inibe o ciclo. A célula cancerígena pode ser caracterizada pela proliferação incontrolada e potencial de invasividade de tecidos adjacentes, e a carcinogênese inicia-se de forma espontânea devido à ação direta de carcinógenos, com isso o câncer se desenvolve a partir de mudanças que ocorrem no genoma celular, o acúmulo de mudanças intrínsecas provoca anormalidades que se torna o principal fator de progressão neoplásica (GUERRA et al, 2005).

Atualmente estimativas apontam que até o ano de 2030 sugerirão aproximadamente 27 milhões de novos casos, destes 17 milhões de óbitos, incidindo diretamente em países de baixa e média renda, pode-se observar dados representativos destas possíveis prevalências (HELENA; OLIVEIRA, 2011). A incidência do câncer no Brasil nos últimos anos teve um aumento considerável, apresentando como tumores mais frequentes para o sexo masculino: próstata, pulmão, estômago, cólon e reto, nas mulheres, destaca-se, mama, colo uterino, cólon e reto, pulmão, estômago e câncer de pele (ROSAS et al., 2013).

Dados de 2014, apontaram pelo registro de 98.420 novos casos de câncer de pele, destacando-se o não – melanoma sendo o mais incidente no Brasil, devido a vários fatores, tais como: irradiação solar, estilo de vida entre outros, apresentamos dados estimativos para 2017, segundo estudos realizados pelo Instituto Nacional de Câncer (HELENA; OLIVEIRA, 2011). O câncer de pele pode ser dividido em, Câncer de Pele Melanoma (CPM) e Câncer de Pele Não – Melanoma (CPNM), este último sendo subdividido em Carcinoma Basocelular e o Carcinoma Espinocular (Figura 4) (FERREIRA; NASCIMENTO; ROTTA, 2011).

No câncer de pele os melanócitos em sua grande maioria se encontram na pele, onde tem-se início ao melanoma cutâneo, no entanto pode-se encontrar estas células também em outras partes do corpo tais como: olhos, meninge, trato digestivo, linfonodos e em outros

locais. O crescimento ocorre no sentido vertical ou horizontal, podendo também ser denominado como crescimento radial (CR), onde a neoplasia invade a epiderme atingindo ou não a derme, o crescimento no sentido vertical (CV) ocorre de forma acelerada através da derme formando nódulos visíveis e palpáveis podendo desenvolver lesões com capacidade invasiva (ELISA; MUTTI; MENEZES, 2004).

Pesquisas demonstram que, existe uma relação entre a cópia do fator p53 mutado e câncer de pele, apresentando com isso estas variantes de CPM e CPNM. O p53 é um gene que estimula a supressão tumoral, em determinados tumores malignos e benignos este gene pode ser encontrado, devido apresentar como principal função, a manutenção das células em estado de repouso após dano ao DNA (POPIM; CORRENTE, 2004). O Carcinoma Basocelular (CB) e o Carcinoma Espinocelular (CE), são os tipos mais frequentes no Brasil.

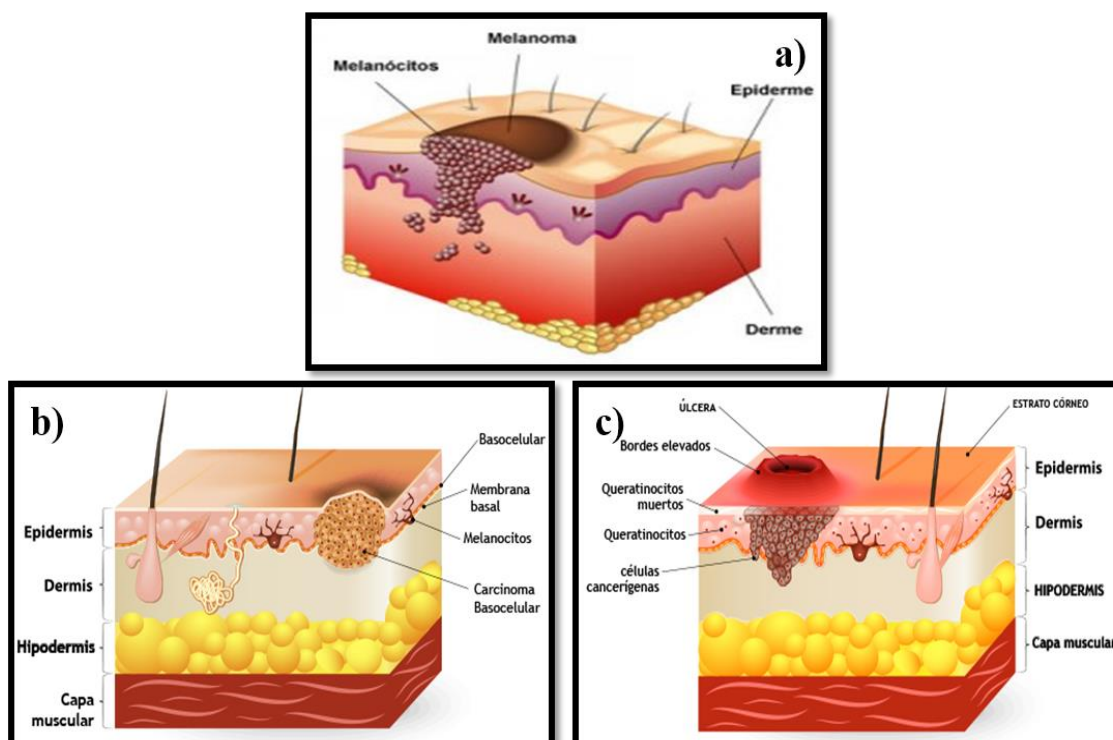


Figura 4. Tipos de Câncer de Pele: a) Melanoma b) Basocelular c) Espinocelular.

Fonte: <http://www.saudemedicina.com/melanoma-cancer-de-pele-maligno-benigno/>

A radiação ultravioleta solar pode ser considerada como um carcinógeno ao corpo humano, a exposição a essa radiação causa vários risco a saúde, conhecido por melanoma cutâneo, apesar dos grandes avanços tecnológicos, este tipo de CA ainda apresenta um número considerável de letalidade (SOUZA; FISCHER, 2004).

Os raios ultravioletas emitidos são de três tipos: Raios UVA, UVB e UVC, dentre os três aumenta-se a preocupação da emissão de raios UVA e UVB, devido estes estimularem a

síntese de melanina, desregulando a síntese de DNA celular (CASTILHO et al., 2010; SOUZA; FISCHER, 2004).

Nos últimos anos, foi verificado a introdução de novos anticancerígenos, sendo avaliados aproximadamente cerca de 600 mil substâncias que resultaram na grande maioria dos fármacos hoje utilizados na farmacologia anticâncer, hoje estes medicamentos podem ser divididos em dois grupos, o primeiro grupo é aquele considerado por inibir a iniciação do processo carcinogênico e o segundo, conhecido por inibir a proliferação celular durante as fases de promoção até a progressão do câncer (BRANDÃO; DAVID, 2010). Os principais medicamentos utilizados no tratamento do câncer de pele, são os de origem biotecnológica destacando o Interferon, Dacarbazina, Temozolomida, Fotomustina, Nivolumab, Vemurafenib, Trametinib, Pembrolizumab, Ipilimumab, Dabrafenib.

As principais reações adversas apresentadas por estes fármacos são: prurido, erupção cutânea, constipação, diminuição do apetite, diarreia, náusea, artralgia, tosse e fadiga, eritrodermatite, insuficiência adrenal, hipofisite, anemia grau 3 ou 4, anemia hemolítica, hepatite, pancreatite, síndrome de Lambert- Eaton, alopecia, síndrome de mão-pé entre outros (NETO, 2013). Diante destas reações esperadas busca-se cada vez mais a busca por novos fármacos com menor toxicidade, os mais estudados na atualidade são os derivados de produtos biotecnológicos.

Os microrganismos além das funções ambientais, desempenham grande potencial biotecnológico, principalmente na produção de novos fármacos tais como antibióticos e antineoplásico, entre outras substâncias (GOI; SOUZA, 2006). Substâncias de origem orgânica derivadas de produtos naturais, são há muito tempo utilizadas para inúmeras enfermidades nos seres humanos, grande parte dos medicamentos são derivados direta ou indiretamente de microrganismos, vegetais, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados (BRANDÃO; DAVID, 2010).

Mais da metade dos medicamentos lançados a partir de 2012 são derivados de produtos naturais, ressaltando a importância em estudo no desenvolvimento de novos fármacos. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus*, conhecida também como Vinca, que é utilizada para o tratamento de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcalóides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO; DAVID, 2010).

Por muito tempo, a utilização de medicamentos está relacionado a produtos naturais, estudos químicos e farmacológicos de medicamentos derivados de plantas foram a base para grandes descobertas (FORMARIZ et al., 2004).

2.3 – Produtos Naturais

2.3.1- Produtos naturais de fungos como fontes de fármacos

Desde o descobrimento da penicilina (1) por Alexander Fleming no final da década de 20, e posterior aplicação como droga antibacteriana, os produtos naturais oriundos de fungos ganharam atenção como promissoras fontes de novos fármacos (KJER, et al., 2010). Desde a Segunda Guerra, medicamentos que tiveram como origem uma molécula natural de fungo foram aprovados para aplicação humana. Pode-se mencionar as descobertas dos antibióticos β -lactâmicos, penicilinas (*Penicillium* spp.), e cefalosporinas (*Acremonium* spp.), estatinas (*Aspergillus terreus*) para a redução do colesterol e miriocina (*Isaria sinclairii*) (Figura 5) para o tratamento de esclerose múltipla, dentre outros (BUTLER et al, 2014).

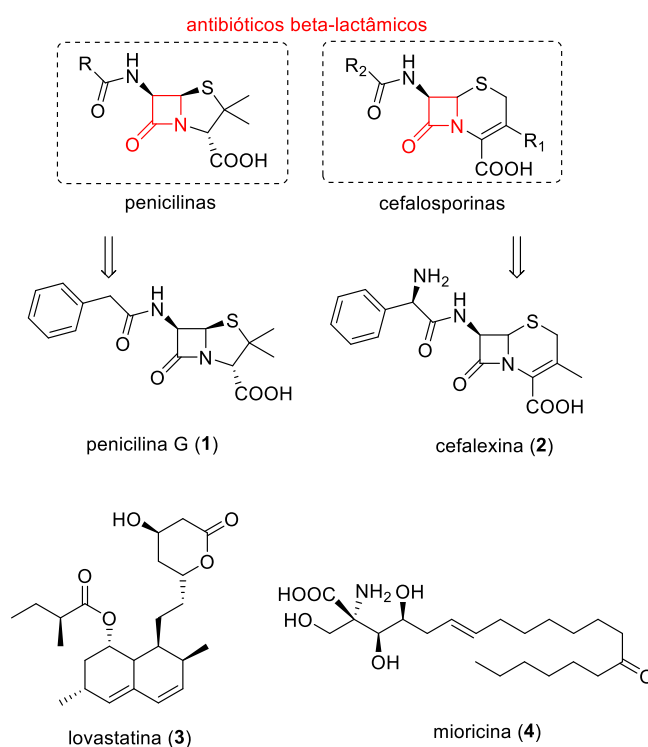


Figura 5. Substâncias bioativas que são fármacos ou protótipos para fármacos de origem fúngica. Amoxicilina® (1), Cefalexina® (2), Lipitor® (3) e Fingolimod® (4).

Desta forma, tanto os fungos encontrados no solo, água e aqueles envolvidos em algum tipo de relação com plantas e animais representam promissoras fontes de moléculas

bioativas, ainda pouco exploradas tendo em vista o número de espécies conhecidas seiscentos e onze mil (MORA, 2011). Como exemplo disso, moléculas de origem fúngica e seus derivados encontram-se em testes clínicos antibacterianos (pleuromutilina **5**), e anticancerígenos (wortmannina **6**) (Figura 6) (BLUTER et al, 2014). A medida que as doenças evoluem, aumenta a pressão para o desenvolvimento de novos fármacos, e neste contexto fungos são parte da estratégia da indústria farmacêutica. Pesquisas na área de química de produtos naturais mostram sua relevância nos dias de hoje, uma vez que a área continua a contribuir com a descrição de moléculas com potencialidades biológicas. As recentes descobertas das flavipesolidas de *Aspergillus flavipes* de uma linhagem isolada de sedimento marinho (**7-9**), a bacilispiorina H de *Talaromyces stipitatus* um fungo de solo (**10**) e cloropreussomerinas de uma linhagem endofítica de *Lasiodiplodia theobromae* (**11-12**) reforçam as potencialidades dos fungos de modo geral.

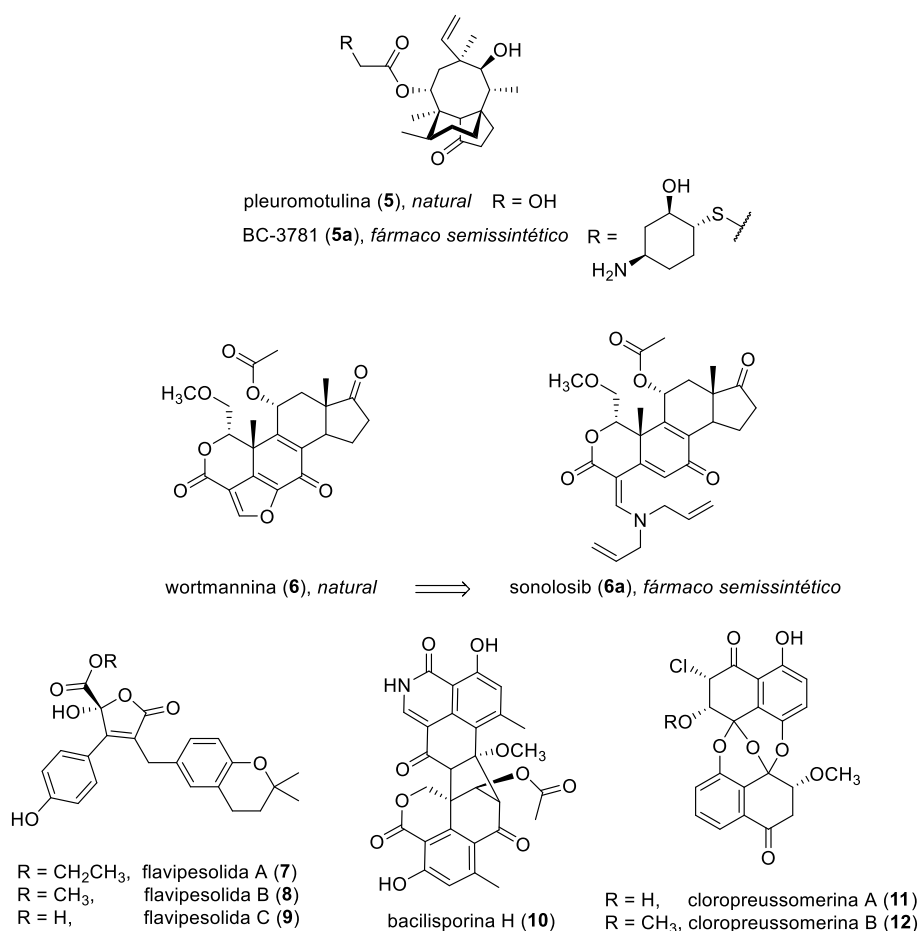


Figura 6. Substâncias bioativas e/ou seus derivados semissintéticos em estágios de fase I e II de testes clínicos (5a e 6a) e moléculas bioativas recentemente descobertas (7-12).

2.4 – Fungos

2.4.1 – Fungos Endofíticos

Uma grande parcela de microrganismos, especialmente bactérias e fungos habitam no interior de plantas sem causar danos aparentes, estes fungos são conhecidos como fungos endofíticos (QUEIROZ et al., 2004).

Os fungos endofíticos fazem parte de um grupo diversificado de ascomicetos, encontrados internamente nos tecidos vegetais habitando plantas de quaisquer ambientes. Centenas de endófitos são isolados de uma única espécie de planta, caracterizando pelo menos uma especificidade para cada planta hospedeira (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Os fungos endofíticos frequentemente produzem substâncias com grande capacidade de defesa, tanto para si como para o hospedeiro. Desta forma, diversos estudos são conduzidos com o objetivo de se conhecerem suas potencialidades. (SUPAPHON et al., 2013). Os fungos endofíticos são produtores de um amplo espectro de produtos naturais com diferentes atividades biológicas, dentre estas pode-se destacar atividades: antimicrobianas, antiparasitárias, antioxidantes, antidiabéticas, imunossupressoras, antineoplásicas, citotóxicas dentre outras (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013b).

Sobre gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Xylaria*, *Talaromyces* e *Pestalotiopsis*, um estudo conduzido por Kharwar e colaboradores (2011), demonstrou a atividade antitumoral destes endofíticos, com isso, ressalta-se cada vez mais a importância para estudos conduzidos na descoberta de novas substâncias de grande interesse industrial.

Um fenômeno tem chamado a atenção de pesquisadores do mundo todo nos últimos anos, no qual é descrito que diversos fungos endofíticos passaram a produzir metabólitos antes apenas produzidos por plantas ou vice e versa (HOEKSTRA, 2004). Este fenômeno é conhecido como “transmissão gênica horizontal” aonde um fragmento do material genético da planta é incorporado ao material genético do fungo endofítico de modo que este muda suas rotas biossintéticas e passa a produzir metabólitos, até então exclusivos da hospedeira (HOEKSTRA, 2004). Como aplicações práticas deste fenômeno, buscaram-se linhagens de fungos endofíticos que possam produzir as moléculas de suas hospedeiras em maiores rendimentos. Exemplos de moléculas consagradas no combate ao câncer, tais como vimblastina, vincristina, paclitaxel e camptotecina (Figura 7).

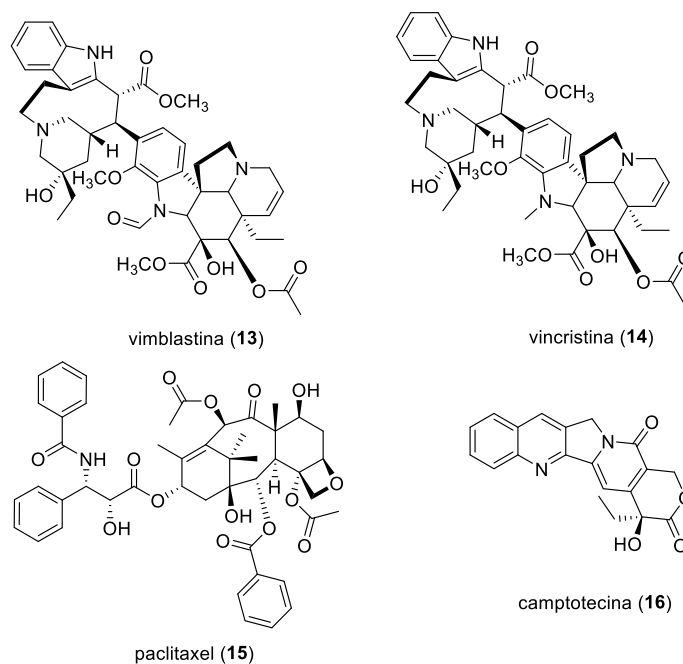


Figura 7. Substâncias antitumorais isoladas de plantas e posteriormente descritas em seus respectivos fungos endofíticos.

2.4.2 – *Metabólitos Secundários de Talaromyces.*

Os fungos do gênero *Talaromyces* são conhecidos pela suas atividades biológicas e seus compostos químicos (KOOLEN et al., 2013). Os metabólitos secundários de *Talaromyces*, incluem principalmente alcalóides, peptídeos, policetídeos, ésteres, quinonas, esteróides e terpenóides, entre outros (JIE et al., 2016).

Fungos do gênero *Talaromyces* têm sido relatados como produtores de diversos compostos bioativos. Podem-se citar os exemplos das cumarinas citotóxicas e antimicrobianas talocumarina A (**18**) e talocumarina B (**19**), (HE et al., 2014), das citotóxicas wortsmannilactonas (**20**, **21**), as potentes nematocidas termolidas A (**22**) e B (**23**), além da potente molécula antifúngica talaroconvolutina B (**24**) (Figura 8).

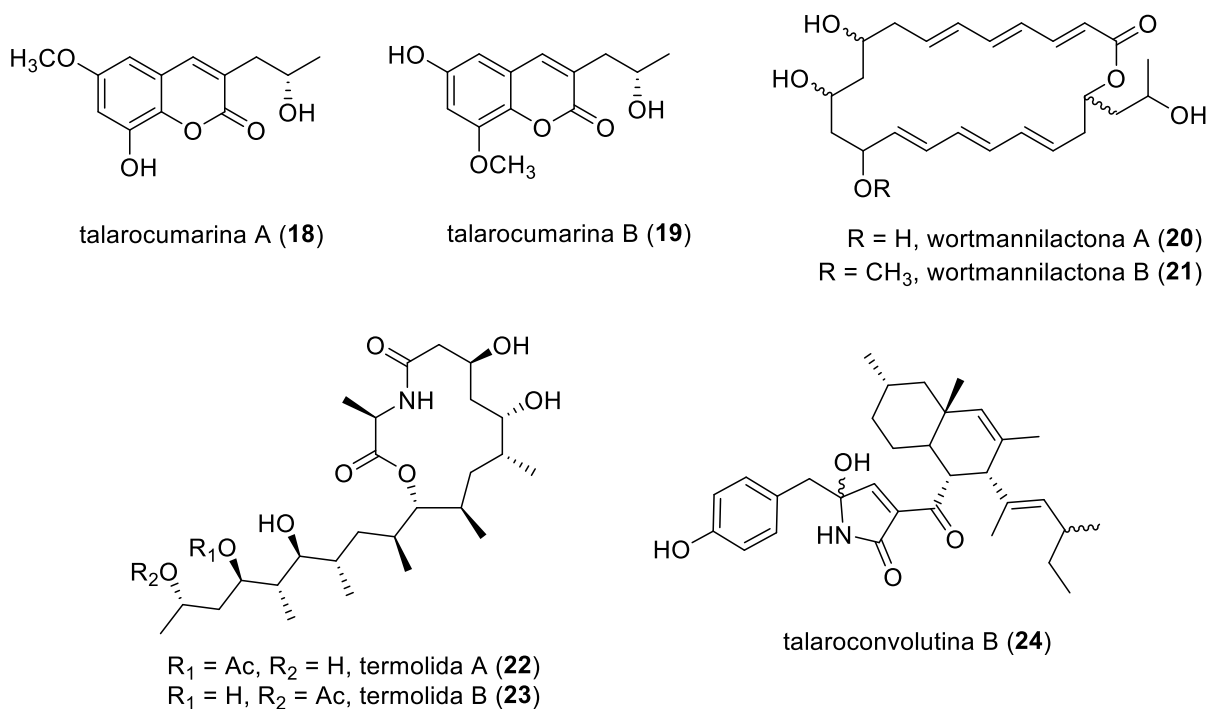
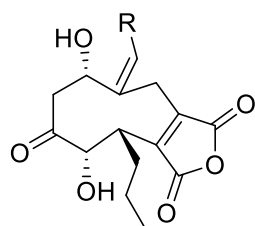


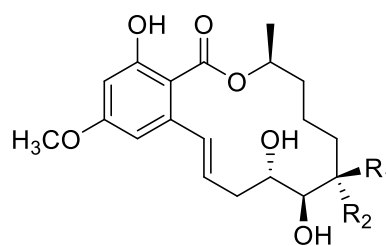
Figura 8. Substâncias bioativas isoladas de diversas espécies de *Talaromyces*.

2.4.3 – Metabólitos Secundários de *Paecilomyces*.

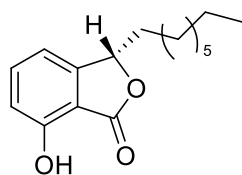
Fungos do gênero *Paecilomyces* são pouco explorados do ponto de vista químico quando comparados com fungos mais recorrentes em amostras de solo e plantas, tais como *Penicillium* e *Aspergillus*. Entretanto, os poucos relatos de estudo químicos indicam que espécies deste gênero fúngico são promissoras quanto a produção de metabólitos secundários. Dentre algumas moléculas previamente descritas neste gênero, encontram-se as cornexistinas (**25**, **26**), as paecilomicinas E (**27**) e F (**28**) que são potentes agentes antiprotozoários, o agente antibacteriano paecilocin A (**29**) e o antitumoral paecilosetina (**30**) (Figura 9).



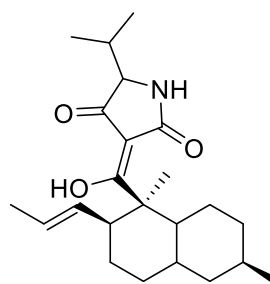
R = CH₃, cornexistina (**25**)
 R = CH₂OH, hidroxicornexistina (**26**)



R₁ = H, R₂ = OH, paecilomicina E (**27**)
 R₁ = OH, R₂ = H, paecilomicina F (**28**)



paecilocin A (**29**)



paecilosetina (**30**)

Figura 9. Substâncias bioativas isoladas de diversas espécies de *Paecilomyces*.

3 – OBJETIVOS

3.1 – *Objetivo Geral*

Bioprospectar extratos e/ou moléculas de fungos endofíticos *Paecilomyces* e *Talaromyces* isolados de plantas da Amazônicas visando o tratamento em melanomas e patógenos humanos.

3.2 – *Objetivos Específicos*

- ✓ - Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e/ou moléculas de fungos endofíticos contra microrganismos de interesse médico;
- ✓ - Avaliar a atividade antitumoral *in vitro* de extratos e/ou moléculas de fungos endofíticos contra células UACC-62 (melanoma) e células B16F10 (melanoma murino);
- ✓ - Caracterizar os extratos quanto sua composição aproximada (caracterização química de seus principais constituintes);
- ✓ - Caracterizar por métodos cromatográficos e espectroscópicos clássicos moléculas isoladas dos fungos endofíticos estudados.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. L. DE et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, Carlos Alberto Montanari e Claudio Luis Donnici*. **Quim.Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005a.

ALMEIDA, V. LUCIA DE et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, Carlos Alberto Montanari e Claudio Luis Donnici*. **Quim.Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005b.

BOGO, D.; GRANDE, C. **Avaliação da atividade antitumoral in vitro e in vivo de compostos de líquens**. [s.l: s.n.].

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos derivados de Plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trial. **Natural Product Reports**, v. 0, p. 1–50, 2014.

CASTILHO, I. G. et al. Fotoexposição e fatores de risco para câncer da pele : uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários knowledge among university students. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 2, p. 173–178, 2010.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013a.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Artigo Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais Endophytic Fungi : An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products Resumo Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Susten. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013b.

COELHO, J. C. U.; BARETTA, G. A. P.; OKAWA, L. Seleção e uso de Antibióticos em Infecções intra-abdominais. **Arq. Gastroenterol**, v. 44, n. 1, p. 85–91, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria : uma abordagem clínica e terapêutica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332–337, 2007.

- DA, D. et al. Distribuição da procedência de pacientes operados de câncer de pele não-melanoma no hospital aristides maltez e sua relação com mapeamento populacional no estado da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 227–241, 2004.
- EMERSON, R. et al. Review article Antibiotics produced by Streptomyces. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 466–471, 2012.
- FERNANDES, V. C. S. **Osteomielite crônica com periostite proliferativa: revisão de literatura**. [s.l: s.n.].
- FERREIRA, F. R.; NASCIMENTO, L. F. C.; ROTTA, O. Fatores de risco para câncer da pele não melanoma em Taubaté , SP : um estudo caso-controle. **Elsevier Editora**, p. 431–437, 2011.
- FORMARIZ, T. P. et al. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 16, n. 1–2, p. 1–4, 2004.
- FORTES, R. C. et al. Alterações Lipídicas em Pacientes com Câncer Colorretal em Fase Pós-Operatória : Ensaio Clínico Randomizado e Duplo-Cego com Fungos Agaricus sylvaticus Lipidic Alterations in Patients with Colorectal Cancer in Post-Surgery Phase : A Randomized and Double-. 2008.
- GELATTI, L. C. et al. Sepsis por Staphylococcus aureus resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 458–460, 2009.
- GOI, S. R.; SOUZA, F. A. DE. Diversidade de microrganismos do solo. **Acta amazonica**, v. 13, n. 2, p. 46–65, 2006.
- GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil : tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227–234, 2005.
- HE, J. et al. Two New Coumarins from Talaromyces flavus. **Molecules**, v. 2, n. 19, p. 20880–20887, 2014.
- HELENA, M.; OLIVEIRA, R. **Instituto Nacional de Câncer (INCA)**. [s.l: s.n.].
- HOLANDA, A. A. R. DE et al. Candidíase vulvovaginal : sintomatologia , fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira Ginecol. Obstet.**, v. 29, n. 1, p. 3–9, 2006.
- JIE, M. Z. et al. The Bioactive Secondary Metabolites from Talaromyces species. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2016.
- KIKUCHI, H. et al. Structures of the Dimeric and Monomeric Chromanones , Gonytolides A - C , Isolated from the Fungus Gonytrichum sp . and Their Promoting Activities of Innate

- Immune Responses. **American Chemical Society**, v. 13, n. 17, p. 2006–2009, 2011.
- KOOLEN, H. H. F. et al. Talaroxanthone, a Novel Xanthone Dimer from the Endophytic Fungus *Talaromyces* sp. Associated with *Duguetia stelechantha* (Diels) R. E. Fries. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 5, p. 880–883, 2013.
- KUETE, V. et al. Anticancer Activities of Six Selected Natural Compounds of Some Cameroonian Medicinal Plants. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 4–10, 2011.
- KUMAR, A. et al. Isolation , Purification and Characterization of Vinblastine and Vincristine from Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Catharanthus roseus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–10, 2013.
- LIMA, M. F. P. et al. Staphylococcus aureus E AS INFECÇÕES HOSPITALARES – REVISÃO DE LITERATURA Staphylococcus aureus AND NOSOCOMIAL INFECTIONS - LITERATURE REVIEW. **Revista Brasileira de Farmácia review**, v. 21, n. 1, p. 32–39, 2015.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.
- MUTTI, A. E. C. et al. Distribuição da Procedência de Pacientes Operados de Câncer de Pele Não-Melanoma no Hospital Aristides Maltez e sua Relação com mapeamento populacional no estado da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 28, n. 2, p. 227–241, 2004.
- NETO, M. . **Guia de Protocolos e Medicamentos para Tratamento em Oncologia e Hematologia 2013**. [s.l: s.n.].
- NETTO, M. Z. et al. Staphylococcus aureus : incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 709–712, 2001.
- POPIM, R. C.; CORRENTE, J. E. Câncer de pele : uso de medidas preventivas e perfil demográfico de um grupo de risco na cidade de Botucatu * Skin cancer : use of preventive measures and demographic profile of a risk group in the city of Botucatu. **Ciência e Saúde coletiva**, v. 13, n. 4, p. 1331–1336, 2004.
- QUEIROZ, A. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia : *Palicourea longiflora* (aubl .) rich e *Strychnos cogens bentham* . **Acta amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.
- RATTI, R. .; SOUSA, C. . Staphylococcus aureus metilicina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e aplicada**, v. 30, n. 2, p. 9–16, 2009.
- ROSA, M. I. DA; RUMEL, D. Fatores Associados à Candidíase Vulvovaginal : Estudo Exploratório Pacientes e Métodos. **RBGO**, v. 26, n. 1, p. 65–70, 2004.

- ROSAS, M. S. . et al. Incidência do Câncer no Brasil e o Potencial Uso dos Derivados de Isatinas na Cancerologia Experimental. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, p. 22, 2013.
- SANTOS, N. DE Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Contexto Enferm**, v. 13, p. 64–70, 2004.
- SILVA, M. S. **FUNGOS ENDOFÍTICOS : FONTES PROMISSORAS DE NOVAS SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIVIRAL**. [s.l: s.n.].
- SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. REVISÃO SOBRE A AQUISIÇÃO GRADUAL DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 62, p. 27–36, 2005.
- SOUZA, S. R. P. DE; FISCHER, F. M. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura Suntanning and risk of cutaneous melanoma : a literature review. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 4, p. 1–11, 2004.
- SUPAPHON, P. et al. Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi Derived from Three Seagrass Species : *Cymodocea serrulata* , *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.
- SUZUKI, S. et al. Antifungal Substances Against Pathogenic Fungi , Talaroconvolutins , from *Talaromyces convolutus*. **J.Nat.Prod**, v. 63, n. 2, p. 768–772, 2000.
- VIRGÍNIA, F. et al. **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS PRODUZIDOS PELO FUNGO**. [s.l: s.n.].
- YILMAZ, N. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia**, v. 29, p. 39–54, 2012.

CAPÍTULO I

Investigação das potencialidades biológicas de extratos de fungos endofíticos frente a diferentes células melanômicas e patógenos humanos

Investigação das potencialidades biológicas de extratos de fungos endofíticos frente a diferentes células melanômicas e patógenos humanos.

Silva P.H.F., Koolen H.H.F., de Souza A.Q.L.

Programa de pós graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Resumo

Os fungos endofíticos apresentam grande importância no equilíbrio do ecossistema. O reino fungi apresenta determinadas espécies e gêneros com grandes potenciais biológicos, podendo-se destacar os gêneros *Paecilomyces* e *Talaromyces* por apresentarem em algumas espécies atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas. Portanto, o presente estudo teve como avaliar a atividade dos extratos de fungos endofíticos frente à célula de linhagens melanômicas e patógenos humanos. Os fungos foram cultivados em meio BDL (19 dias) e ISP₂ (28 dias) sob temperatura de 28 °C, respectivamente. Após o cultivo, obteve-se o extrato bruto que em seguida foi fracionado em coluna de sílica gel usando eluição gradiente. Após análises cromatográficas, foram obtidas 10 frações do meio fermentado e micélico de *Talaromyces sp.*; e 06 frações do meio líquido de *Paecilomyces*. Estas frações e seus respectivos extratos foram submetidos a análise de MID e MTT, em busca das suas respectivas atividades biológicas. Conclui-se que, os fungos endofíticos *Talaromyces sp.* e *Paecilomyces sp.*, produzem metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e pouca atividade citotóxicas contra as células testadas. Porém, o isolamento e caracterização dessas frações podem conduzir a descoberta de novos compostos de interesse farmacêutico, em especial infecções causadas por fungos e bactérias.

Abstract

Endophytic fungi are of great importance in the balance of the ecosystem. The fungi kingdom presents certain species and genera with great biological potentials, being able to emphasize the genera *Paecilomyces* and *Talaromyces* for presenting in some species antimicrobial, antiparasitary and antineoplastic activities. Therefore, the present study evaluated the activity of endophytic fungi extracts against melanomic and human pathogenic cells. The fungi were grown in BDL (19 days) and ISP₂ (28 days) medium under 28 ° C, respectively. After cultivation, the crude extract was obtained which was then fractionated on a silica gel column using gradient elution. After chromatographic analysis, 10 fractions of the fermented and mycelic medium of *Talaromyces sp.*, And 06 fractions of the liquid medium of *Paecilomyces*. These fractions and their extracts were submitted to analysis of MID and MTT, in search of their respective biological activities. It is concluded that the endophytic fungi *Talaromyces sp.* and *Paecilomyces sp.*, Produce secondary metabolites with antimicrobial activity and low cytotoxic activity against the cells tested. However, the isolation and characterization of these fractions may lead to the discovery of new compounds of pharmaceutical interest, especially infections caused by fungi and bacteria.

1 – Introdução

Os endofíticos são organismos que na maior parte do seu ciclo colonizam os meios inter e intracelulares, órgãos e tecidos de plantas, dentre eles, destacam-se; bactérias, actinobactérias e os fungos (MOLINA et al., 2012). Fungos endofíticos apresentam grande importância no equilíbrio do ecossistema. Estes são capazes de produzir metabólitos secundários, que beneficiam seus hospedeiros de diversas maneiras (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

Metabólitos secundários são substâncias produzidas por diversos organismos e que possuem diversas potencialidades biológicas, e desde a descoberta da penicilina são alvos de pesquisas, principalmente aquelas voltadas para a indústria farmacêutica (SPECIAN et al., 2014). Após o advento da penicilina, outras espécies fungos foram estudados, incluindo os endofíticos, destacando-se representantes dos gêneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Xylaria*, *Pestalotiopsis*, *Xylaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Talaromyces* por apresentarem diversas atividades, principalmente, antimicrobianas e antitumorais (CHEN et al., 2014). Os fungos endofíticos constituem uma promissora fonte de novas moléculas bioativas e que estão em constante avaliação de suas potencialidades, o que visa atender a crescente necessidade da indústria farmacêutica.

Com isso, o presente estudo teve como objetivo, avaliar as potencialidades dos extratos e frações de duas linhagens de fungos endofíticos da coleção de endofíticos do LABMICRA-UFAM frente a células de linhagens melanômicas e patógenos humanos. Este capítulo descreve a avaliação das atividades antimicrobianas e antineoplásicas de extratos e frações dos fungos do gênero *Paecilomyces* sp. e *Talaromyces* sp.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Reativação dos fungos endofíticos

Os fungos selecionados para a realização deste trabalho fazem parte da coleção de trabalho do Grupo de Pesquisa LABMICRA-UFAM, estes foram reativados em meio cultura BDA (batata, dextrose e ágar) suplementados com os antibióticos ampicilina e tetraciclina (50 µg/mL), tendo como finalidade a medida profilática de não crescimento ou desenvolvimento bacteriano no cultivo de reativação das cepas. Em sequência, foram retirados fragmentos de ágar contendo hifas dos fungos previamente armazenados pela metodologia de Castellani (TERAMOTO, 2011). Estes foram plaqueados no formato tripontual em duplicata e

incubados durante 24 a 72 h à 28 °C em BOD para as linhagens *Talaromyces* sp. (DgCr22.1b) e *Paecilomyces* sp. (Dfga212.I+AT).

2.2 – Cultivo das linhagens endofíticas

2.2.1. Preparo do meio de cultura BDL (Batata + Dextrose + Ext. de levedura)

Foram cozidas 200 g de batatas para cada litro de meio de cultura em aparelho de forno de micro-ondas utilizando água destilada durante 20 min na potência 70%. O caldo foi filtrado e o volume completado com água destilada. Ao final, foram acrescentados 20 g de dextrose e 2 g de extrato de levedura, seguido pela esterilização em autoclave a 121 °C por 15 min.

2.2.2. Preparo do meio de cultura ISP2

Foram pesados 10 g de amido de milho, 4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte e 15 g de dextrose para cada litro de meio de cultura. Em seguida o meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 15 minutos para sua esterilização.

2.2.3. Inóculo e produção de metabólitos secundários

Os fungos reativados tiveram seus esporos removidos por raspagem com alça de platina e adicionados a uma solução 10% de glicerol. Cerca de 20 µL desta solução de esporos foram inoculados em cada frasco Erlenmeyer (1000 mL de capacidade) contendo 300 mL dos meios específicos (Total 200 frascos). As duas cepas foram cultivadas em modo estático à 28 °C nos meios previamente citados (BDL para *Paecilomyces* e ISP2 para *Talaromyces*) (Figura 1). Para o fungo *Talaromyces* sp. (DgCr22.1b), após 28 dias de cultivo, os 100 frascos renderam 30 L de meio líquido. O fungo *Paecilomyces* sp. (Dfga212.I+AT) apresentou uma contaminação por leveduras, restando no final de 19 dias de cultivo, apenas 48 frascos viáveis, o que totalizou 14,6 L. As células dos fungos (micélio) foram separadas do líquido fermentado por meio de filtração a vácuo.



Figura 1. (A) Cultivo em Larga Escala de *Talaromyces*. (B) Cultivo em Larga Escala de *Paecilomyces*. **Fonte:** da Silva, PHF.

2.3 – Obtenção dos Extratos brutos

Após a separação dos micélios e os meios fermentados, foi realizada a extração por meio de procedimento de partição líquido-líquido do meio fermentado (aquoso) de cada microrganismo com acetato de etila 100%. Para cada 1 L de meio foram utilizados 50 mL de solvente em triplicata. Para o micélio, foi realizada a maceração com uma mistura de acetato de etila/metanol (1:1/v:v) (Figura 2). Os extratos foram reduzidos por destilação rotoevaporativa sob pressão reduzida e os extratos secos em dessecadores de vidro contendo sílica gel azul. O detalhamento do procedimento, bem como os rendimentos dos extratos estão designados na Figura 2.

2.4 – Fracionamento dos extratos

Os fungos estudados, tiveram seus respectivos extratos brutos fracionados em coluna filtrante sob pressão reduzida em gel de sílica. Foram utilizados gradientes crescentes de polaridade utilizando como eluentes os solventes hexano, acetato de etila, acetona e metanol) fornecendo suas respectivas frações. A Figura 3 detalha os procedimentos do fracionamento, bem como os rendimentos obtidos para cada fração em relação aos seus extratos brutos.

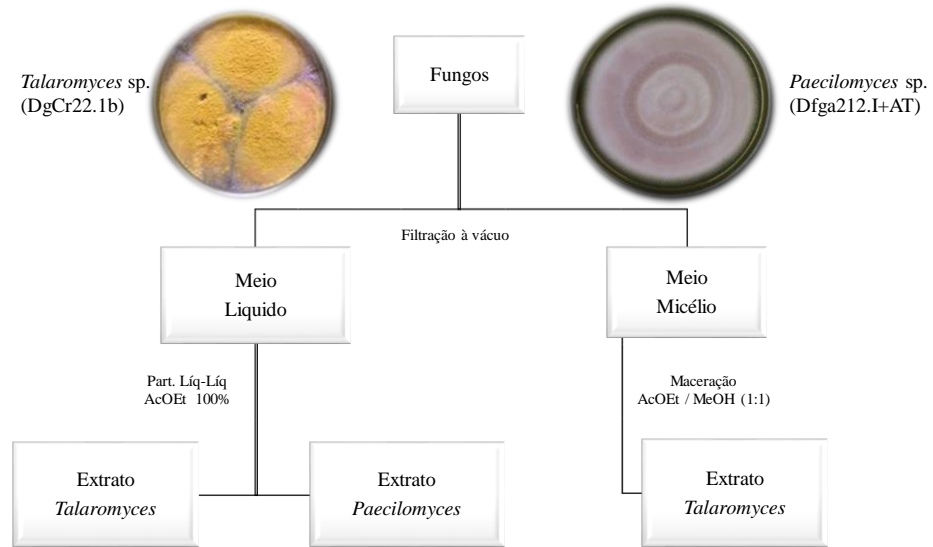


Figura 2. Esquema dos procedimentos adotados para a obtenção dos extratos brutos.

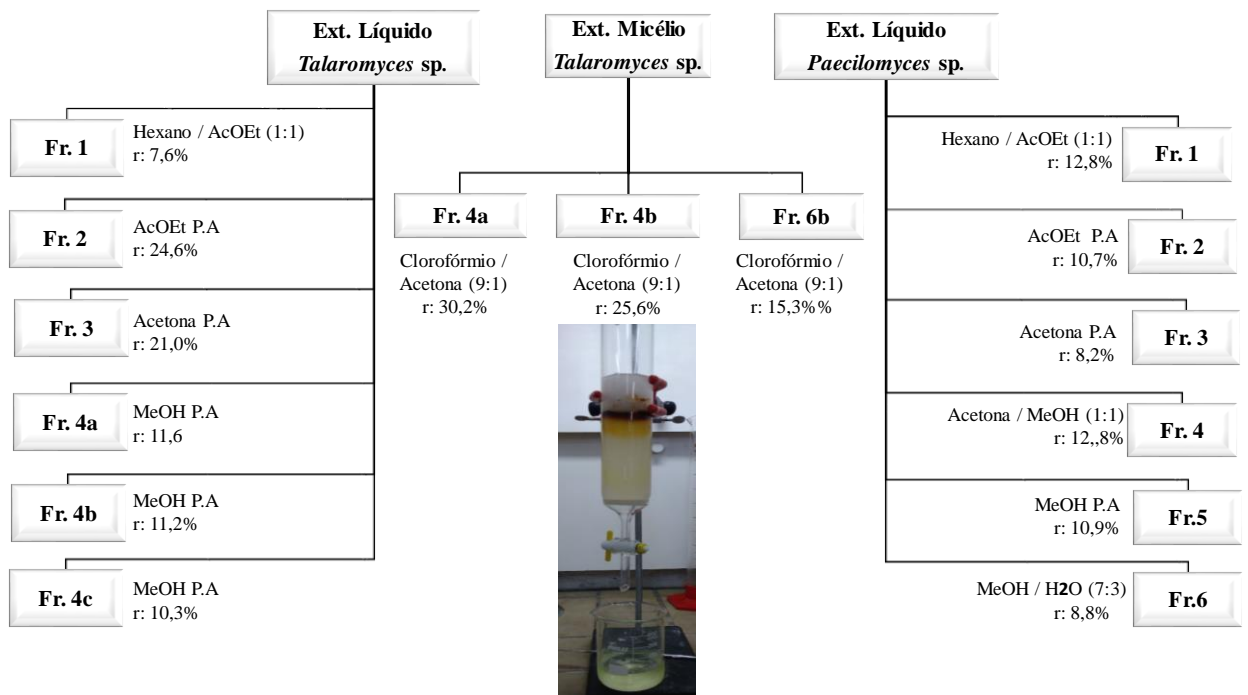


Figura 3. Esquema dos procedimentos adotados para a obtenção das frações.

2.5 – Análise Cromatográfica

Após a obtenção das frações em coluna filtrante, estas foram submetidas a análise e cromatografia de camada delgada, afim de se obter um perfil preliminar, bem como comparar as frações obtidas em termos de complexidade. Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel fase normal cortadas em tamanhos variáveis. A detecção das manchas reveladoras dos compostos presentes foi realizada mediante exposição à luz UV e sob revelação com vanilina sulfúrica e reagente de Dragendorff.

2.6 – Ensaios antimicrobianos

Os microrganismos utilizados para o teste de atividade antimicrobiana foram: *Candida albicans* (CC 001), *Candida tropicalis* (CC 002), *Escherichia coli* (E 004), *Staphylococcus aureus* (S 007) e *Pseudomonas aeruginosa* (P 004). Os patógenos foram reativados nos meios de cultura correspondentes, para bactérias BHI e para fungos Sabouraud. Uma vez que os patógenos estavam liofilizados, estes foram reativados por suspensão em tubos de ensaios e cultivados em BOD por 24 h a 37 °C. A concentração das colônias utilizadas no teste foi correspondente ao número 0,5 na escala de Mc Farland, na concentração de $1,5 \times 10^2$ formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹). As amostras foram preparadas na concentração inicial de 2 mg/mL e solubilizadas em 10 % de DMSO. Em sequência, para os testes foram colocados 100 µL de meio de cultura, posteriormente 100 µL da solução de cada amostra teste e por último 10 µL da suspensão de células do patógeno, sendo testadas diversas concentrações das amostras. Para os controles positivos foram utilizados antifúngicos e antibióticos na mesma concentração das amostras testes. Com o preenchimento das placas de elisa, estas foram incubadas em BOD à 37 °C por 24 h, após este período foram adicionados os reagentes reveladores, para bactérias utilizou-se o cloreto trifenil tetrazólio (CTT) a 1 % e para os fungos utilizou-se cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT) a 1 %, após passados 24hs foram realizadas as análises qualitativas da formação de coloração.

2.7 – Ensaios citotoxicidade

Para os testes de citotoxicidade foram utilizadas culturas neoplásicas das linhagens tumorais utilizadas, SKMELL-19 (melanoma – humano) e SKMELL-103 (melanoma). Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram realizados na UFAM, no laboratório de cultura de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. As linhagens foram cedidas pelo próprio laboratório, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro

fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina - estreptomicina), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril. Substâncias puras foram testadas na concentração única de 5 µg/mL, os extratos na concentração de 50 µg/mL e as frações na concentração de 25 µg/mL. A análise da citotoxicidade foi realizada pelo método MTT (Mosman, 1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3- (4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ células/mL para as linhagens. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa à 595 nm. Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*. Somente as frações ou substâncias que apresentarem valores de inibição ≥ 90% em pelo menos duas linhagens tumorais (elevado potencial citotóxico) foram consideradas.

3 – Resultados e discussão

3.1 – Ensaios antimicrobianos

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de diluições seriadas sendo verificados também os modos de ação (fungicida, fungistática, bactericida ou bacteriostático). Foram observados resultados positivos frente aos patógenos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Escherichia coli*. Os resultados para todas as amostras avaliadas estão na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes antimicrobianos frente aos patógenos humanos.

Amostras	<i>Candida albicans</i> (CC 001)	<i>Candida tropicalis</i> (CC 002)	<i>Escherichia coli</i> (E 004)	<i>Staphylococcus aureus</i> (S 007)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P 004)
Ext. Bruto <i>Talaromyces</i>	> 500 µg/mL (Ft)	> 500 µg/mL (Ft)	-	-	-
Tal Fr.1	> 500 µg/mL (Ft)	> 500 µg/mL (Ft)	-	-	-
Tal Fr.2	500 µg/mL (Fd)	500 µg/mL (Fd)	500 µg/mL (Ft)	-	-
Tal Fr.3	> 500 µg/mL (Ft)	> 500 µg/mL (Ft)	-	-	-
Tal Fr.4a	> 500 µg/mL (Ft)	> 500 µg/mL (Ft)	-	-	-
Tal Fr.4b	> 500 µg/mL (Ft)	> 500 µg/mL (Ft)	-	-	-
Tal Fr.4c	> 500 µg/mL (Ft)	> 500 µg/mL (Ft)	-	-	-
Extr. Micélico <i>Talaromyces</i>	1000 µg/mL (Ft)	-	1000 µg/mL (Bt)	-	-
Talmic 4a	1000 µg/mL (Ft)	-	-	-	-
Talmic 5b	-	1000 µg/mL	-	-	-
Talmic 6b	-	-	1000 µg/mL (Bt)	-	-
Extr. Bruto <i>Paecilomyces</i>	> 500 µg/mL (Fd)	-	-	-	-
Pae Fr.1	> 500 µg/mL (Fd)	-	-	-	-
Pae Fr.2	> 500 µg/mL (Fd)	-	-	-	-
Pae Fr.3	> 500 µg/mL (Fd)	-	-	-	-
Pae Fr.4	31,3 µg/mL (Ft)	62,5 µg/mL (Ft)	-	-	-
Pae Fr.5	15,6 µg/mL (Ft)	-	-	-	-
Pae Fr.6	> 500 µg/mL (Fd)	-	-	-	-
Fluconazol	4 µg/mL	4 µg/mL			
Tetraciclina			4 µg/mL		4 µg/mL
Ampicilina				4 µg/mL	
DMSO	-	-	-	-	-

Bt: Bacteriostático, Bd: Bactericida, Ft: Fungistático e Fd: Fungicida; (-) Não apresentou atividade

Das duas linhagens de fungos endofíticos estudadas, pôde-se observar que os extratos brutos não apresentaram atividade antimicrobiana abaixo de 500 µg/mL, o que forçou ao fracionamento dos mesmos. Após as separações cromatográficas, os testes foram novamente realizados, onde observou-se uma moderada atividade fungicida contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, ambas na maior concentração testada (500 µg/mL) e bacteriostática na mesma concentração frente à *E. coli* para a fração Fr.2 do fungo *Talaromyces* sp. Já para o extrato do micélio deste fungo e suas respectivas frações, não foi observada atividade nas concentrações testadas. Já para o fungo *Paecilomyces* sp., apenas suas frações apresentaram atividade. Percebe-se que o fracionamento de certa forma enriqueceu os compostos com atividade fungicida na fração Fr.4 apresentando MID de 31,3 µg/mL contra *C. albicans* e 62,5 µg/mL

contra *C. tropicalis*. A fração Fr.5 apresentou o maior potencial fungicida de todas as amostras, entretanto, apenas contra *C. albicans* (15,6 µg/mL).

Fungos do gênero *Talaromyces* são conhecidos por produzirem compostos com diferentes atividades biológicas, destacando-se as atividades antimicrobianas (WEZEMAN; BRASE; MASTERS, 2014). Segundo o estudo realizado por Jie et al (2015), a espécie *Talaromyces flavus* produziu metabólitos capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* em concentrações (300 µg/mL) inferiores a encontrada no presente estudo, com tudo, quando comparada a atividade frente à espécie *C. tropicalis*, observa-se o um MID de 500 µg/mL, dado ainda não reportado na literatura.

A fração Fr.2 foi a única que apresentou atividade frente à bactéria gram-negativa *E.coli*, este resultado corrobora com o apresentado por Jie et al (2016), onde demonstra que a espécie *Talaromyces pinophilus* apresenta atividade contra este mesmo patógeno, porém, os valores de MID não citados neste estudo prévio. Para o trabalho realizado por Romano et al. (2012), a espécie *Talaromyces verruculosus*, apresentou potente atividade bactericida com o MID de 5,0 µg/mL, quando comparado com o presente estudo observa-se a discrepância de valores, o que pode ser justificado pela espécie estudada. Quando observado a diferença nas formas de obtenção dos extratos e frações, pode-se inferir que o fungo do gênero *Talaromyces* sp., apresenta atividade antimicrobiana à frente de fungos leveduriformes e bactérias, podendo assim, contribuir com pesquisas posteriores. Outro gênero estudado no presente trabalho foi o gênero *Paecilomyces* sp. O gênero *Paecilomyces*, também é conhecido por suas espécies produtoras de diversos metabólitos biologicamente ativos (PENG et al., 2012).

Quando verificado a ação do extrato meio líquido de *Paecilomyces* frente à *E.coli*, este não apresentou ação, diferenciando da atividade apresentada pela fração Fr.2 de *Talaromyces*. Entretanto o fracionamento permitiu que as substâncias ativas fossem enriquecidas em algumas amostras, evitando desta forma efeitos de antagonismo. De acordo com os dados obtidos, sugere-se que o fungo *Paecilomyces* além de apresentar atividade nematicida, como mencionado por Cristina et al (2006), apresenta potencial atividades fungicidas com baixos valores de MID. Estes resultados ressaltam o potencial dos fungos endofíticos como novas fontes de moléculas bioativas.

3.2 – Ensaios citotóxicos

Mediante os resultados obtidos sobre inibição microbiana e interesse em confirmação da atividade contra células de melanoma, as amostras obtidas destes fungos foram submetidas a análise de inibição de células tumorais. O método MTT indica a viabilidade de maiores

estudos quando a inibição superior à 90% ocorre em linhagens celulares. Desta forma, foram inseridos na Tabela 2 os valores de viabilidade celular das frações obtidas o extrato fúngico de *Paecilomyces*, pois foi o gênero que apresentou os valores mais próximos estabelecidos pelo protocolo internacional. No entanto, quando verificada a viabilidade celular, pode-se inferir que nenhum dos extratos, bem como suas respectivas frações, não apresentaram eficácia contra as células de melanoma testadas neste trabalho.

Tabela 2. Resultados dos testes citotóxicos frente a cepas de melanoma

Amostra	Descrição da Amostra	Skmel - 103	Skmel - 19
Ext. Bruto <i>Talaromyces</i>	Extrato	100	79,30
Tal Fr1	Frações	100	84,22
Tal Fr2	Frações	100	88,88
Tal Fr3	Frações	100	83,83
Tal Fr4a	Frações	93,11	79,81
Tal Fr4b	Frações	100	89,30
Tal Fr4c	Frações	100	82,58
Extr. Micélico <i>Talaromyces</i>	Frações	85,28	64,54
Talmic4a	Frações	100	75,99
Talmic5b	Frações	82,50	76,48
Talmic6b	Frações	75,45	46,42
Extr. Bruto <i>Paecilomyces</i>	Extrato	87,00	96,61
Pae Fr1	Frações	100	19,50
Pae Fr2	Frações	100	26,05
Pae Fr3	Frações	100	66,69
Pae Fr4	Frações	26,48	61,96
Pae Fr5	Frações	35,33	91,60
Pae Fr6	Frações	93,15	87,61
DGM	Controles	100	72,05
DGMC	Controles	100	93,88
DGL	Controles	100	70,46

3.3 – Avaliação cromatográfica preliminar

As frações obtidas foram comparadas por cromatografia de camada delgada. Na comparação das frações do fungo *Talaromyces* sp., foi observado que as frações Fr.1 e Fr.2 apresentaram, perfis semelhantes. Ao comparar-se o fator de retenção dos padrões; ácido secalônico D e ergosterol com as frações, percebeu-se bandas cromatográficas com fatores de retenção semelhantes (Figura 4). As frações mais polares e menos ativas mostraram um

comportamento mais retensivo nas cromatoplacas. Baseando-se no perfil de polaridade das frações, bem como nas atividades antimicrobianas observadas escolheu-se a fração Fr.2 do extrato do meio fermentado do fungo *Talaromyces* sp. para os posteriores estudos químicos. O estudo químico do fungo *Paecilomyces* sp. foi descontinuado, uma vez que os rendimentos de obtenção do extrato do meio líquido, bem como os percalços com o extrato do micélio. O estudo químico desta cepa será retomado em algum trabalho posterior do grupo.

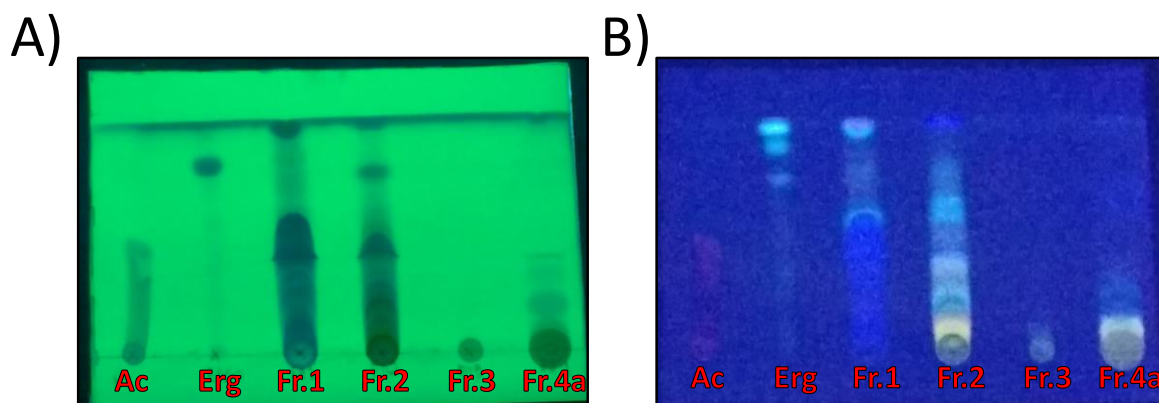


Figura 4. (A) Cromatoplaca revelada a 365 nm. (B) Cromatoplaca revelada a 254 nm. Legenda: Ac = ácido secalônico D, Erg = ergosterol.

5 – Referências Bibliográficas

ABREU, JÉSSICA ALINE SOARES DE; ROVIDA, AMANDA FLÁVIA DA SILVA; PAMPHILE, JOÃO ALENCAR. FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS FUNGI OF INTEREST : BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS. v. 21, p. 55–59, 2015.

CHEN, L. et al. Endophytic fungi with antitumor activities : Their occurrence and anticancer compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 0, n. 0, p. 1–20, 2014.

CRISTINA, D. et al. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom .) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. v. 36, n. 4, p. 1055–1064, 2006.

JIE, M. Z. et al. The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2016.

MOLINA, G. et al. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 289–294, 2012.

PENG, G. et al. Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus* Thermolides , Potent Nematocidal PKS-NRPS Hybrid Metabo- lites from Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*. **Journal of the American Chemical Society**, p. 1–5, 2012.

ROMANO, L. H. **Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico.** [s.l: s.n.].

SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. **Ciência e Biologia da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345–352, 2014.

TERAMOTO, A.; MARTINS, M. C.; CUNHA, M. G. Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassiicola*. **Pesq.Agrop.Goiânia**, v. 41, n. 2, p. 296–298, 2011.

WEZEMAN, T.; BRASE, S.; MASTERS, K.-S. Xanthone dimers: a compound family which is both common and privileged. **Nat.Prod.Rep.**, p. 1–23, 2014.

CAPÍTULO II

**Estudo químico guiado por atividade biológica do
fungo *Talaromyces* sp.**

Estudo químico guiado por atividade biológica do fungo *Talaromyces* sp.

Silva P.H.F., de Souza A.Q.L., Koolen H.H.F.

Programa de pós graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Resumo

Hoje são conhecidas pelo menos 75 espécies de *Talaromyces*, e devido a este número de espécies tem-se aumentado o interesse em estudos químicos e biotecnológicos. Os principais metabólitos secundários produzidos por indivíduos deste gênero são derivados de alcaloides, peptídeos e principalmente policetídeos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo bioprospectar extratos e/ou moléculas produzidas pelo fungo *Talaromyces* sp. (DgCr22.1b) um endófito isolado de *Duguetia stelachantha* frente a células melanômicas e patógenos humanos. O fungo foi cultivado em meio ISP₂ por 28 dias sob temperatura de 28 °C. Após o cultivo, obteve-se o extrato bruto que em seguida foi fracionado em coluna de sílica gel usando eluição gradiente. Após análises cromatográficas, a fração 03 apresentou características compatíveis com policetídeos (fator de retenção e coloração da revelação). Esta fração foi submetida a CCD preparativa levando ao isolamento de uma substância pura. Após análise em por RMN e MS foi possível identificar a substância isolada como paecilina D. Conclui-se que a substância isolada apresenta atividade em diferentes concentrações contra os patógenos humanos *Candida albicans* e *tropicalis*, já contra as células melanômicas esta molécula não apresentou atividade citotóxica necessária para a avaliação de IC₅₀.

Palavras-chave: Biotecnologia, policetídeos, ressonância magnética nuclear, *Talaromyces*, paecilina D, xantonas.

Abstract

Today, at least 75 species of *Talaromyces* are known, and due to this number of species the interest in chemical and biotechnological studies has increased. The main secondary metabolites produced by individuals of this genus are derived from alkaloids, peptides and mainly polyketides. Therefore, the present study had the objective of bioprospecting extracts and / or molecules produced by the fungus *Talaromyces* sp. (DgCr22.1b) an endophyte isolated from *Duguetia stelachantha* against melanomic cells and human pathogens. The fungus was cultivated in ISP₂ medium for 28 days under a temperature of 28 ° C. After cultivation, the crude extract was obtained which was then fractionated on a silica gel column using gradient elution. After chromatographic analysis, fraction 03 presented characteristics compatible with polyketides (retention factor and development color). This fraction was subjected to preparative CCD leading to the isolation of a pure substance. After analysis by NMR and MS it was possible to identify the isolated substance as paecilin D. It is concluded that the isolated substance presents activity in different concentrations against the human pathogens *Candida albicans* and *tropicalis*, already against the melanomic cells this molecule did not present necessary cytotoxic activity For the evaluation of IC₅₀

Key words: Biotechnology, polyketide, nuclear magnetic resonance, *Talaromyces*, paecilin D, xanthonas.

1 – Introdução

O reino Fungi pode ser entendido como um grupo de três sub-reinos com 11 filos destacando-se: Zygomycota, Ascomycota e o Basidiomycota (AHIMSA-MÜLLER et al., 2007). Além disso, algumas espécies de fungos são capazes de produzir metabólitos biologicamente ativos. O gênero *Talaromyces* pertencente a família *Trichocomaceae* é um estado teleomórfico de *Penicillium* (JIE et al., 2016) e que compreende aproximadamente 75 espécies. Fungos pertencentes a este gênero foram inicialmente isolados de amostras de solo, sendo em seguida descritos em alimentos, algas e mais recentemente como endofíticos (MIAO et al., 2012). Segundo Oliveira (2013), fungos endofíticos constituem uma promissora fonte de substâncias que estão em constante avaliação de suas potencialidades biológicas, o que visa atender a crescente necessidade da indústria farmacêutica.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo bioprospectar extratos e/ou moléculas produzidas pelo fungo *Talaromyces* sp. (DgCr22.1b), um endófito isolado de *Duguetia stelachantha* e que apresentou potenciais antimicrobianos em avaliações preliminares do nosso programa de triagem de atividades biológicas. Este trabalho descreve a investigação química de *Talaromyces* sp. guiada por atividade biológica resultando na identificação de cinco substâncias (Figura 1), uma delas um novo derivado denominado paecilina D (**2**).

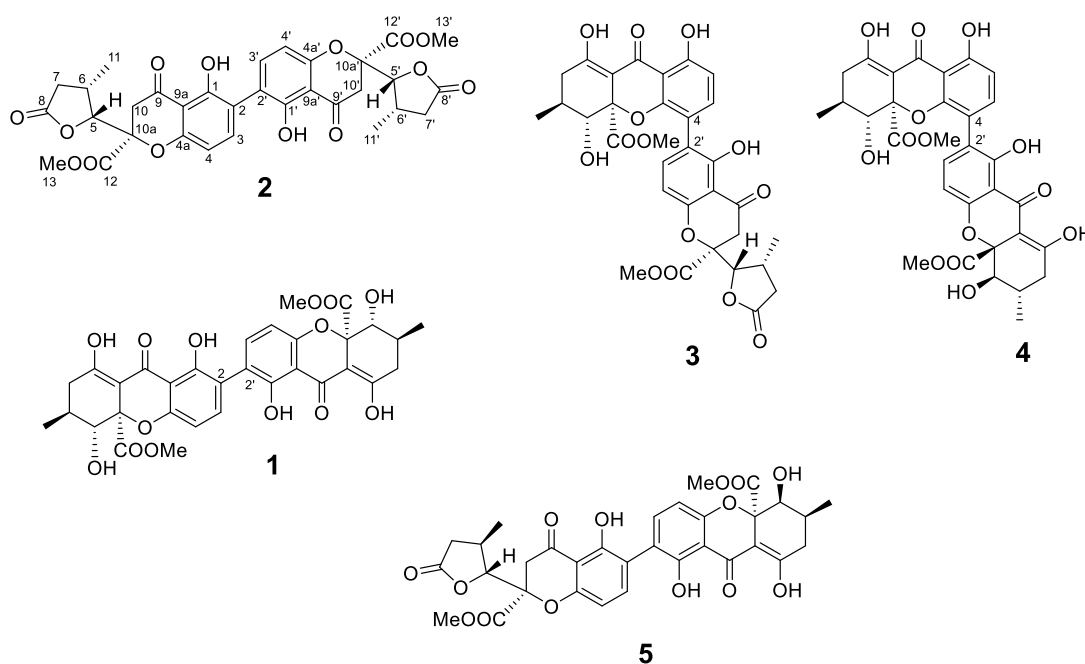


Figura 1. Substâncias químicas isoladas de *Talaromyces* sp.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – *Isolamento das moléculas ativas*

A fração Fr.2, obtida na etapa anterior deste trabalho foi novamente submetida a um fracionamento em cromatografia líquida em coluna ($h = 30$ cm e $\phi = 3,0$ cm) utilizando-se como eluentes os solventes diclorometano, acetato de etila e metanol. Foi utilizada uma eluição gradiente que resultou em cinco frações majoritárias. A fração H2, eluída com diclorometano/acetato de etila 3:7 (v:v) apresentou elevada atividade antimicrobiana. Desta forma, esta sub-fração foi submetida a fracionamento em cromatografia de camada delgada preparativa. Foram carregados 85 mg na cromatoplaça, sendo obtidas 9 bandas cromatográficas que foram extraídas e submetidas às análises espectroscópicas e espectrométricas.

2.2 – *Equipamentos das análises espectroscópicas*

As rotações óticas foram obtidas em polarímetro Perkin-Elmer 341 usando-se clorofórmio com solvente. Os experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e NOESY) foram realizados em clorofórmio- d e/ou metanol- d_4 em um espectrômetro Bruker ASCEND 500, operando a 500 MHz para o núcleo de ^1H e 125 MHz para o núcleo de ^{13}C . Os espectros de massas foram obtidos em equipamento Synapt HDMS (Waters). As análises foram no modo eletrospray negativo.

2.3 – *Verificação de atividade biológica das moléculas*

Os mesmos procedimentos mencionados no capítulo anterior foram repetidos nesta etapa do trabalho, de modo a avaliar as potencialidades das moléculas isoladas.

3 – Resultados e discussão

3.1- Caracterização química

3.2.1 - Substância 2

A fração H2 foi submetida a fracionamento por meio de cromatografia em camada delgada preparativa. O fracionamento desta amostra resultou no isolamento de 9 bandas cromatográficas (ML.3.15_1 a ML.3.15_9) que foram submetidas a análises espectroscópicas e espectrométricas.

A substância **2**, apresentou-se com aparência de um sólido amorfo amarelo. A rotação específica para esta substância foi levo-rotatória ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65,2^\circ$). No espectro de RMN de ^1H , se observou a presença de 9 sinais, dentre estes destacam-se: sinais típicos de hidroxila fenólica $\delta_{\text{H}} 11,92$ (s, 5-OH), hidrogênios metílicos, metilênicos, carbinólicos e aromáticos. No espectro de RMN de ^{13}C , foi evidenciada a presença de 16 sinais, sendo eles sinais referentes a carbonilas de cetona α , β -insaturada e éster ($\delta_{\text{C}} 194,1$ e $169,0$), carbonos aromáticos, carbinólicos, metínicos, metilênicos e metílicos. Um singleto em $\delta_{\text{H}} 11,92$ (s, 5-OH) com característica de hidrogênio de hidroxila fenólica e em interação por ligação de hidrogênio com um grupo carbonila β posicionado em relação ao carbono hidroxilado foi observado, indicando tratar-se de uma substância fenólica. O hidrogênio fenólico proposto apresentou correlação direta com os carbonos $\delta_{\text{C}} 107,5$, $\delta_{\text{C}} 117,6$, $\delta_{\text{C}} 159,2$ (C-4a, C-6 e C-5, respectivamente), como evidenciado no experimento de HMBC. Os sinais referentes aos hidrogênios em $\delta_{\text{H}} 7,54$ (d, $J = 8,5$ Hz, H-7) e $\delta_{\text{H}} 6,64$ (d, $J = 8,5$ Hz, H-8), apresentaram constante de acoplamento característica de anel aromático tetrassubstituído no qual estes estão orientação *orto* (ELIMAT, 2014). A confirmação desta proposta estrutural deu-se por meio do experimento de COSY, onde é evidenciada a correlação entre os sinais citados. Os hidrogênios H-7 e H-8 apresentaram correlação direta com os carbonos $\delta_{\text{C}} 141,2$ e $\delta_{\text{C}} 107,4$ (C-7 e C-8, respectivamente) como evidenciado no experimento de HSQC. No experimento de HMBC, H-7 apresentou correlações com os carbonos $\delta_{\text{C}} 107,5$, $117,6$ e $158,4$, já H-8, apresentou correlações com $\delta_{\text{C}} 117,6$, $158,4$, $194,1$. Baseando-se nas correlações observadas, propõe-se que esta amostra também se trata de uma xantona (WEZEMAN; BRASE; MASTERS, 2014). Através das correlações chave do H-5 com o carbono fenólico em $\delta_{\text{C}} 159,2$ (C-5) e de H-4 com o outro carbono de deslocamento próximo, $\delta_{\text{C}} 158,4$ (C-8a) e a fraca correlação (J^4) com o carbono em $\delta_{\text{C}} 194,1$ (C-4) confirmaram a proposta do núcleo xantona (Figura 2).

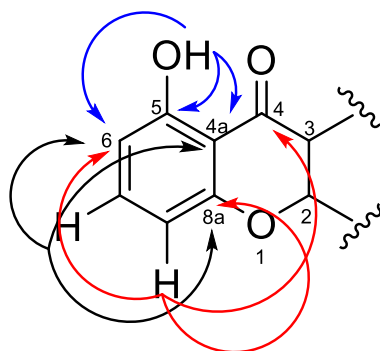


Figura 2. Proposta estrutural inicial do núcleo xantona e correlações observadas para 5-OH (setas azuis), H-7 (setas negras) e H-8 (setas vermelhas).

O sinal típico de hidrogênio carbinólico em δ_{H} 4,81 (d, $J = 7,0$ Hz, H-9), apresentou correlação de HMBC com os sinais δ_{C} 14,8, 33,5, 36,6, 39,7, 169,0 e 174,8. O deslocamento mais desblindado deste sinal e suas correlações, são característicos de um núcleo γ -lactona, incomum em produtos naturais, e apenas previamente descrito em certas xantonas fúngicas (CAI et al, 2014). Isto fica evidente através das correlações de H-9 com o carbono carbonílico de grupamento éster (C-14), com o carbono carbinólico em δ_{C} 84,4 (C-2) e com os carbonos sp e sp³ δ_{C} 39,7(C-3) e 14,8 (C-13), respectivamente (Figura 3).

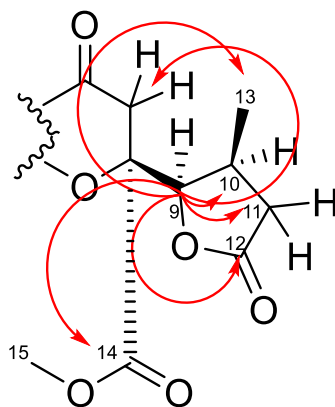


Figura 3. Proposta estrutural inicial do núcleo γ - lactona e correlações observadas para H-9 (setas vermelhas).

A presença de um grupo éster foi confirmada através do deslocamento típico para metoxilas (δ_{H} 3,78, s, H-15), em conjunto com sua correlação de HMBC com δ_{C} 169,0 (C-14) (Figura 52). Adicionalmente, as correlações de COSY entre o hidrogênio em δ_{H} 2,99 (q, $J = 7,35$ Hz, H-10) e entre δ_{H} 1,34 (d, $J = 7$ Hz, H-13), em conjunto com as correlações de HMBC de H-10 com C-10, δ_{C} 14,8 (C-13), 36,6 (C-11), 84,4 (C-2) e δ_{C} 174,8 (C-12) e dos hidrogênios geminais δ_{H} 2,49 (dd, $J = 7,95$ e 17,1 Hz, H-11) e δ_{H} 2,71 (dd, $J = 8,2$ e 17,05 Hz, H-7) confirmaram a proposta inicial da presença de uma porção γ -lactona (Figura 4) (CAI et al, 2014).

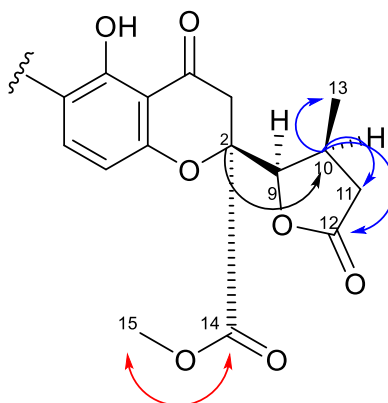


Figura 4. Proposta estrutural inicial do núcleo γ - lactona e correlações observadas para H-2 (seta preta), H-10 (setas azuis) e H-15 (setas vermelhas).

O espectro de massas desta substância indicou tratar-se de uma molécula dimérica (m/z 637). Isto foi confirmado por meio pela observação do deslocamento químico do carbono típico de bifenilas (δ_c 117,6), bem como as correlações de HMBC observadas. Desta forma, propôs-se uma estrutura análoga à da paecilina A (Figura 5) (PENG et al., 2012), porém, com a conexão do dímero nas posições 2-2'. Uma busca na literatura indicou que a amostra ML.3.15_2 é correlata à estrutura da molécula denominada blenolideo H (CAI et al., 2014), com pequenas diferenças. Entretanto, em 2015 El-Elimat e colaboradores descreveram um monômero de ergocromona com o mesmo nome trivial de blenolídeo H (Figura 6).

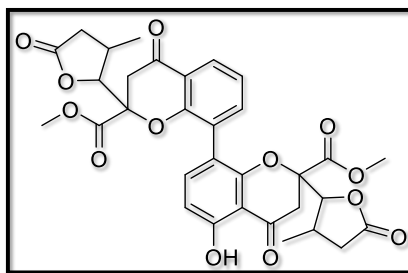


Figura 5. paecilina A

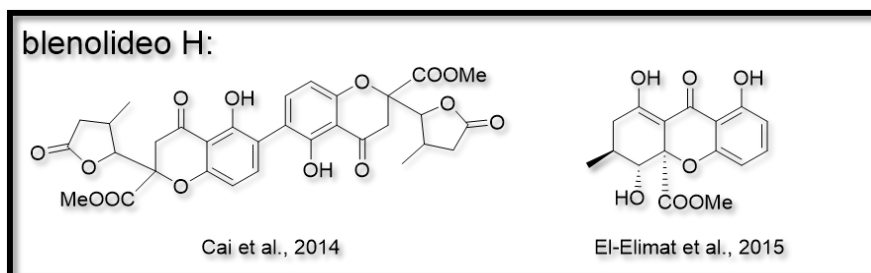


Figura 6. Proposta estrutural inicial comparados por Cai et al., e El-Elimat et al.

A molécula isolada neste trabalho apresentou diversos sinais correlatos ao composto isolado por CAI et al. (2014). Entretanto, a estereoquímica das posições C-9 e C-9' apresentaram valores de deslocamento químico e de constante de acoplamento diferentes. Desta forma, a estereoquímica relativa da substância ML.3.15_2 foi deduzida através das observações dos deslocamentos, bem como por experimentos de NOESY. Foi proposta a orientação de H-9 como sendo na orientação β , isto evidenciado através do típico deslocamento químico em torno de δ_H 4,81 (mais blindado) e através da constante de acoplamento típica ($J = 7,0$ Hz) para sistemas em orientação *cis*, para os hidrogênios H-9 e H-10 (Wu et al., 2015). No experimento de NOESY, a irradiação do H-10/H-10' causou um intenso efeito Overhauser no hidrogênio H-9/H-9', confirmando que estes hidrogênios estão na mesma orientação, fato observado e confirmado por Wu et al. (2015) através de experimentos de RMN, dicroísmo circular e difração de raios-X.

A análise dos dados obtidos, em conjunto com a comparação de dados previamente publicados na literatura (CAI et al., 2014) (Tabela 1), permitiu a elucidação da substância ML.3.15_2 como sendo uma nova substância, denominada paecilina D (Figura 7). No trabalho descrito por CAI et al. (2014), a investigação estereoquímica não foi realizada por parte dos autores, uma vez que os mesmos indicaram que a molécula degrada com facilidade, o que torna o derivado deste trabalho inédito. Uma vez que existe esta ambiguidade na literatura em relação a nomenclatura, optou-se pela nomenclatura dos primeiros derivados (paecilinas A e B) (Zhang et al., 2008).

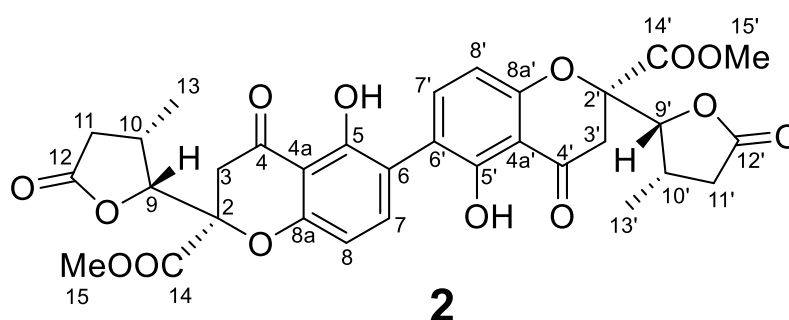


Figura 7. Estrutura da paecilina D (2).

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância ML.3.15_2 em comparação com os dados Blenolídeo H descritos na literatura (CAI et al, 2014).

paecilina D			blenolídeo H (CAI et al, 2014)		
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ mult. (J in Hz)	Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ mult. (J in Hz)
2	84,4		2	84,9	
3	39,7	3,24, m	3	39,3	3,60, d (17,2) 3,11, d (17,2)
4	194,1		4	196,1	
4 ^a	107,5		4a	107,5	
5	159,2		5	158,7	
6	117,6		6	117,5	
7	141,2	7,54, d (8,5)	7	141,0	7,49, d (8,5)
8	107,4	6,64, d (8,5)	8	107,7	6,67, d (8,5)
8 ^a	158,4		8a	159,1	
9	82,6	4,81, d (7,0)	9	87,0	4,60, d (4,0)
10	33,5	2,99, m	10	29,8	2,89, m
11	36,6	2,49, dd, (17,1, 7,95) 2,71, dd, (17,0, 8,2)	11	36,1	2,87, dd (21,6, 9,1) 2,28, dd (21,6, 9,1)
12	174,8		12	176,1	
13	14,8	1,34, d (7,0)	13	20,4	1,17, d (6,5)
14	169,0		14	169,3	
15	53,7	3,78, s	15	53,9	3,70, s
5-OH		11,92, s	5-OH		11,82, s
2 [`]	84,4		2 [`]	84,9	
3 [`]	39,7	3,24, m	3 [`]	39,3	3,60, d (17,2) 3,11, d (17,2)
4 [`]	194,1		4 [`]	196,1	
5 [`]	107,5		5 [`]	107,5	
6 [`]	159,2		6 [`]	158,7	
7 [`]	117,6	7,54, d (8,5)	7 [`]	117,5	7,49, d (8,5)
8 [`]	141,2	6,64, d (8,5)	8 [`]	141,0	6,67, d (8,5)
8a [`]	107,4		8a [`]	107,7	
9 [`]	158,4	4,81, d (7,0)	9 [`]	159,1	4,60, d (4,0)
10 [`]	82,6	2,99, m	10 [`]	87,0	2,89, m
11 [`]	33,5	2,49, dd, (17,1, 7,95) 36,6 2,71, dd, (17,0, 8,2)	11 [`]	29,8	2,87, dd (21,6, 9,1) 2,28, dd (21,6, 9,1)
12 [`]	174,8		12 [`]	176,1	
13 [`]	14,8	1,34, d (7,0)	13 [`]	20,4	1,17, d (6,5)
14 [`]	169,0		14 [`]	169,3	
15 [`]	53,7	3,78, s	15 [`]	53,9	3,70, s
5 [`] -OH		11,92, s	5 [`] -OH		11,82, s

3.3- Ensaios antimicrobianos

Os fungos endofíticos são frequentemente produtores de substâncias naturais que podem apresentar atividades antibióticas, inibindo ou matando uma variedade de microrganismos patogênicos (SPECIAN, 2014). Os testes de atividade antimicrobianos foram

realizados pelo método de diluição usando placa de Elisa, de modo a verificar a atividade fungicida, fungistática, bactericida ou bacteriostático das substâncias isoladas usando como controle negativo DMSO 10% e controles positivos; fluconazol, tetraciclina e ampicilina correspondentes a cada tipo de patógeno. Os resultados positivos foram obtidos frente aos patógenos *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Após o fracionamento de Fr.2 proveniente da coluna filtrante, realizou-se um novo fracionamento que rendeu oito novas frações (H1-H8). Estas foram avaliadas quanto sua atividade antimicrobiana, sendo observada atividade apenas na fração H2 (Tabela 2). Foi observado um aumento drástico no MID (15,6 µg/mL) contra *C. albicans* e *C. tropicalis*. Isto motivou a busca por moléculas nesta fração ativa, e após procedimentos cromatográficos obtiveram-se nove substâncias. Cinco delas foram passivas de serem analisadas quanto suas estruturas e duas delas foram avaliadas quanto a seu potencial antimicrobiano (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos testes antimicrobianos

Amostras	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	(CC 001)	(CC 002)	(E 004)	(S 007)	(P 004)
H1	-	-	-	-	-
H2	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL
	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	-	-	-
	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	-	-	-
	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	-	-	-
	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	-	-	-
	> 15,6 µg/mL	> 15,6 µg/mL	-	-	-
	15,6 µg /mL	15,6 µg /mL	-	-	-
H3	-	-	-	-	-
H4	-	-	-	-	-
H5	-	-	-	-	-
H6	-	-	-	-	-
H7	-	-	-	-	-
H8	-	-	-	-	-
paecilina D	> 31,3 µg /mL	> 15,6 µg /mL	-	-	-
	> 31,3 µg /mL	> 15,6 µg /mL	-	-	-
	31,3 µg /mL	> 15,6 µg /mL	-	-	-
	-	15,6 µg /mL	-	-	-
versixantona A	-	> 31,3 µg/mL	-	-	-
	-	> 31,3 µg/mL	-	-	-
	-	31,3 µg /mL	-	-	-
Fluconazol	4µg/mL	4µg/mL			
Tetraciclina			4µg/mL		4µg/mL
Ampicilina				4µg/mL	

As moléculas avaliadas quanto seu potencial antimicrobiano foram os dímeros de xantonas versixantona A e paecilina D. Para a primeira foi observado um MID de 31,3 µg/mL

e para a segunda de 15,6 µg/mL, para ambos os patógenos. Estes resultados corroboram com o estudo conduzido por Zhang e colaboradores (2008), onde verificou-se a atividade antifúngica do ácido secalônico D e de alguns derivados de blenolídeos frente a *Microbrotryum violaceum*.

5- Referências bibliográficas

- AHIMSA-MÜLLER, M. A. et al. Clavicipitaceous fungi associated with ergoline alkaloid-containing convolvulaceae. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1955–1960, 2007.
- CAI, S. et al. Bioactive Sulfur-Containing Sulochrin Dimers and Other Metabolites from an *Alternaria* sp. Isolate from a Hawaiian Soil Sample. **Journal of Natural Products**, p. 1–8, 2014.
- EL-ELIMAT, T. et al. Biosynthetically distinct cytotoxic polyketides from *setophoma terrestris*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2015, n. 1, p. 109–121, 2015.
- JIE, M. Z. et al. The Bioactive Secondary Metabolites from *Talaromyces* species. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2016.
- MIAO, F. et al. Isolation, Identification and Antimicrobial Activities of Two Secondary Metabolites of *Talaromyces verruculosus*. **Molecules**, v. 17, p. 14091–14098, 2012.
- OLIVEIRA, J. GOMES DE SOUZA. **Estudo da biodiversidade de fungos endofíticos, potencial citotóxico e antimicrobianos**. [s.l: s.n.].
- PENG, G. et al. Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus* Thermolides, Potent Nematocidal PKS-NRPS Hybrid Metabolites from Thermophilic Fungus *Talaromyces thermophilus*. **Journal of the American Chemical Society**, p. 1–5, 2012.
- SPECIAN, V. et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. **Ciência e Biologia da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345–352, 2014.
- WEZEMAN, T.; BRASE, S.; MASTERS, K.-S. Xanthone dimers: a compound family which is both common and privileged. **Nat.Prod.Rep.**, p. 1–23, 2014.
- WU, G. et al. Versixanthonones A – F, Cytotoxic Xanthone – Chromanone Dimers from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* HDN1009. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p. 1–8, 2015.
- ZHANG, J. et al. Secalonic Acid D induced leukemia cell apoptosis and cell cycle arrest of G1 with involvement of GSK-3β/β-catenin/c-Myc pathway. **Cell Cycle**, v. 8, n. 15, p. 1–8, 2009.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que os fungos endofíticos *Talaromyces* sp. e *Paecilomyces* sp., produzem metabólitos secundários com atividades antimicrobianas, entretanto, sem atividades citotóxica contra as células testadas. Uma vez que os rendimentos da fração ativa no fungo *Talaromyces* sp. foram superiores, e que esta fração apresentou atividades biológicas moderadas, procedendo-se com seu estudo químico, onde foi verificado a elucidação de uma nova molécula paecilina D, representando uma nova fonte de pesquisa para estudos posteriores.

Anexo**Material suplementar**

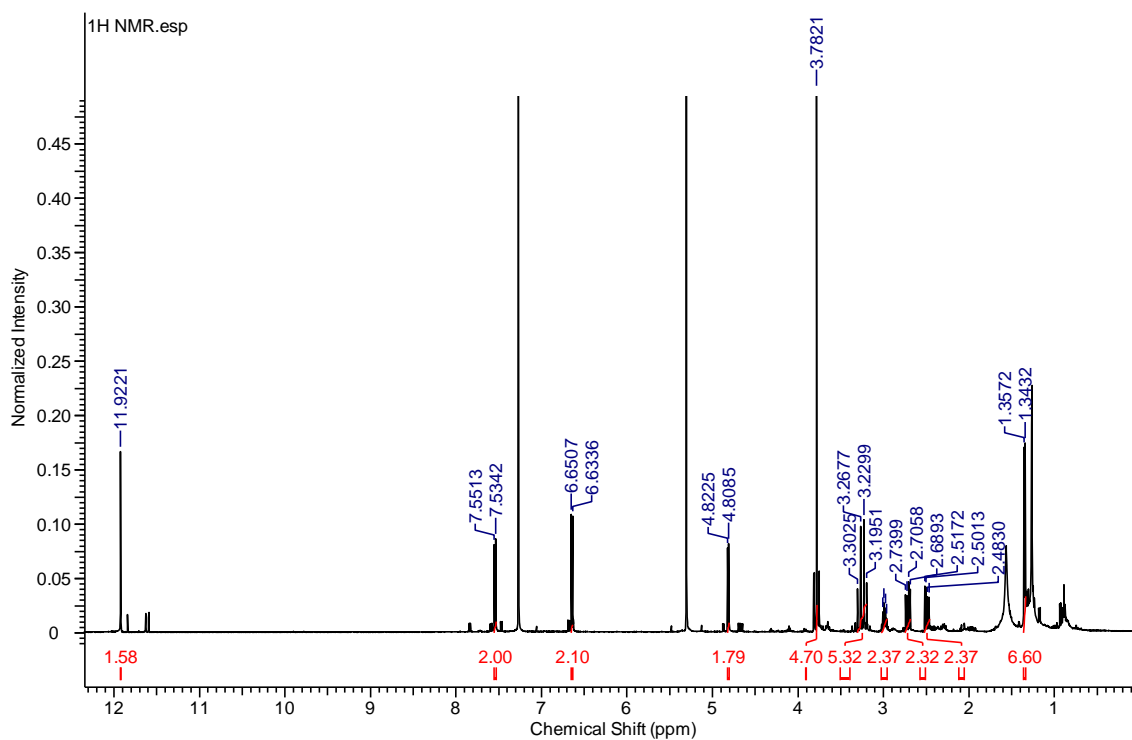


Figura 1S. Espectro de RMN de ^1H da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).

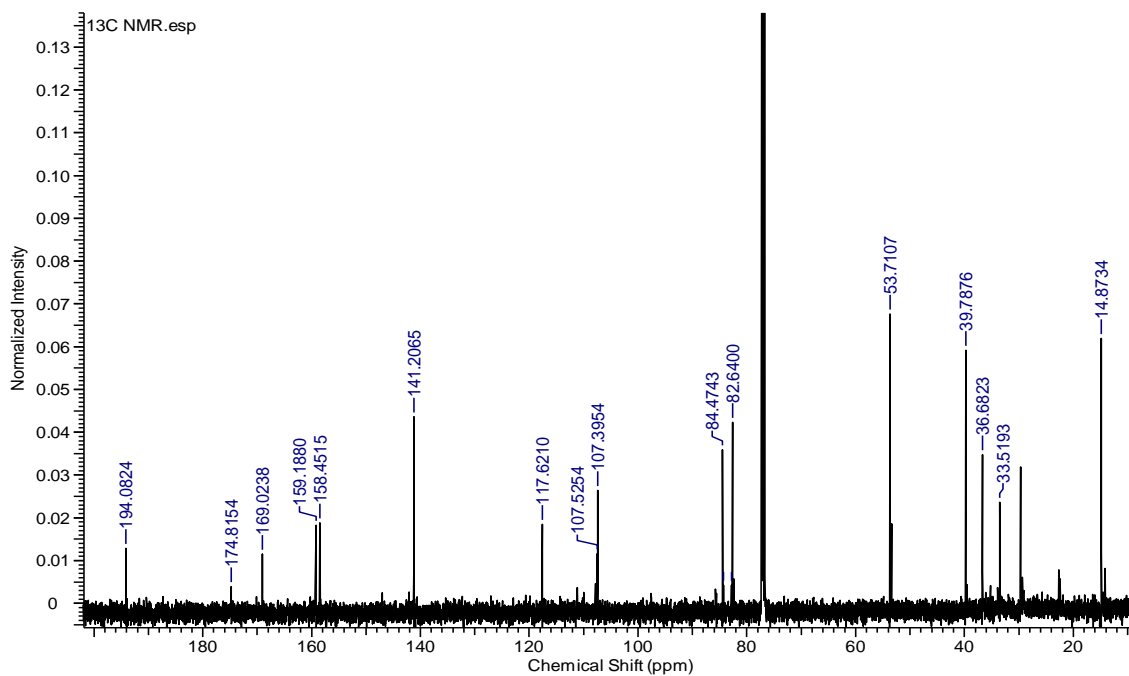


Figura 2S. Espectro de RMN de ^{13}C da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).

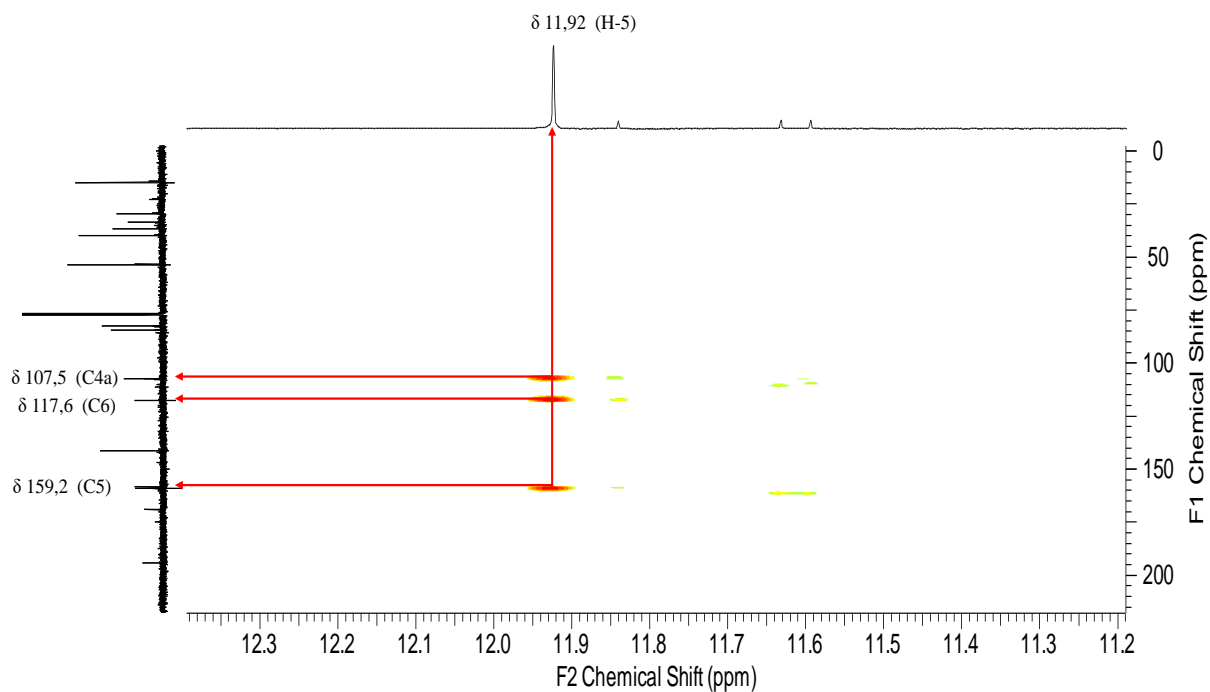


Figura 3S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de δ H 11,92 - HMBC da substância ML.3.15_2 em Clorofórmio-d (500 MHz).

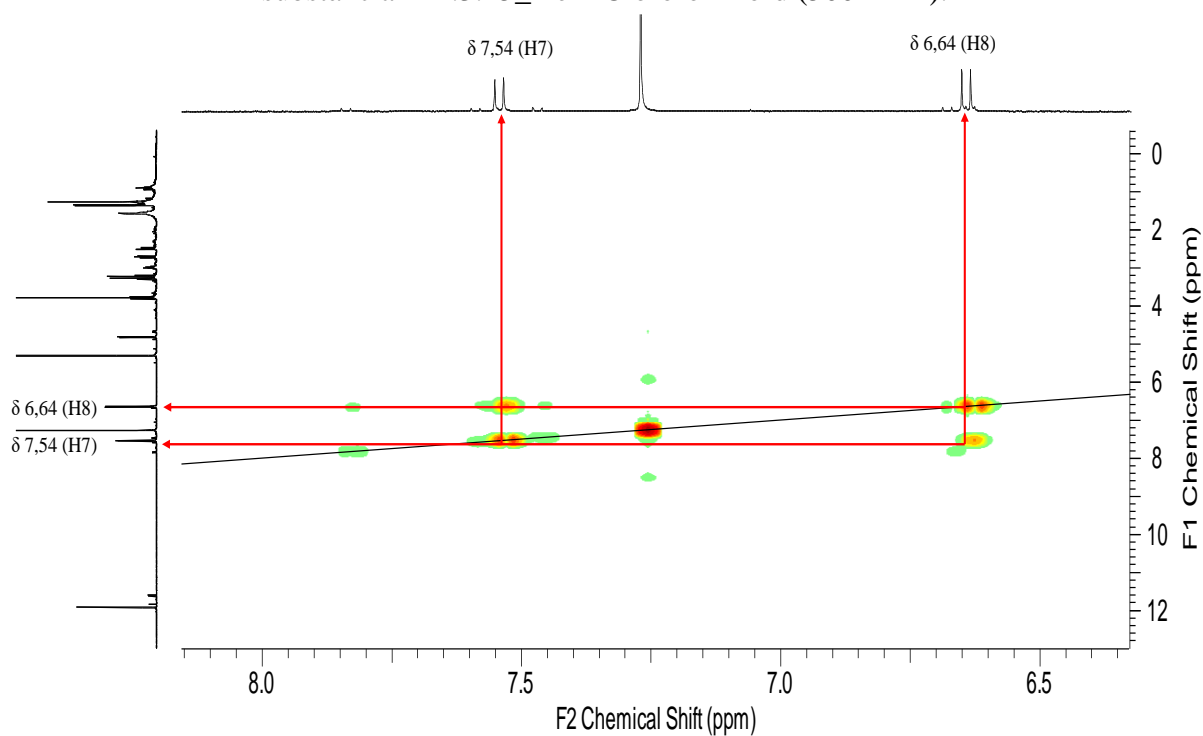


Figura 4S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de 7H e 8H - COSY da substância ML.3.15_2 em Clorofórmio-d (500 MHz).

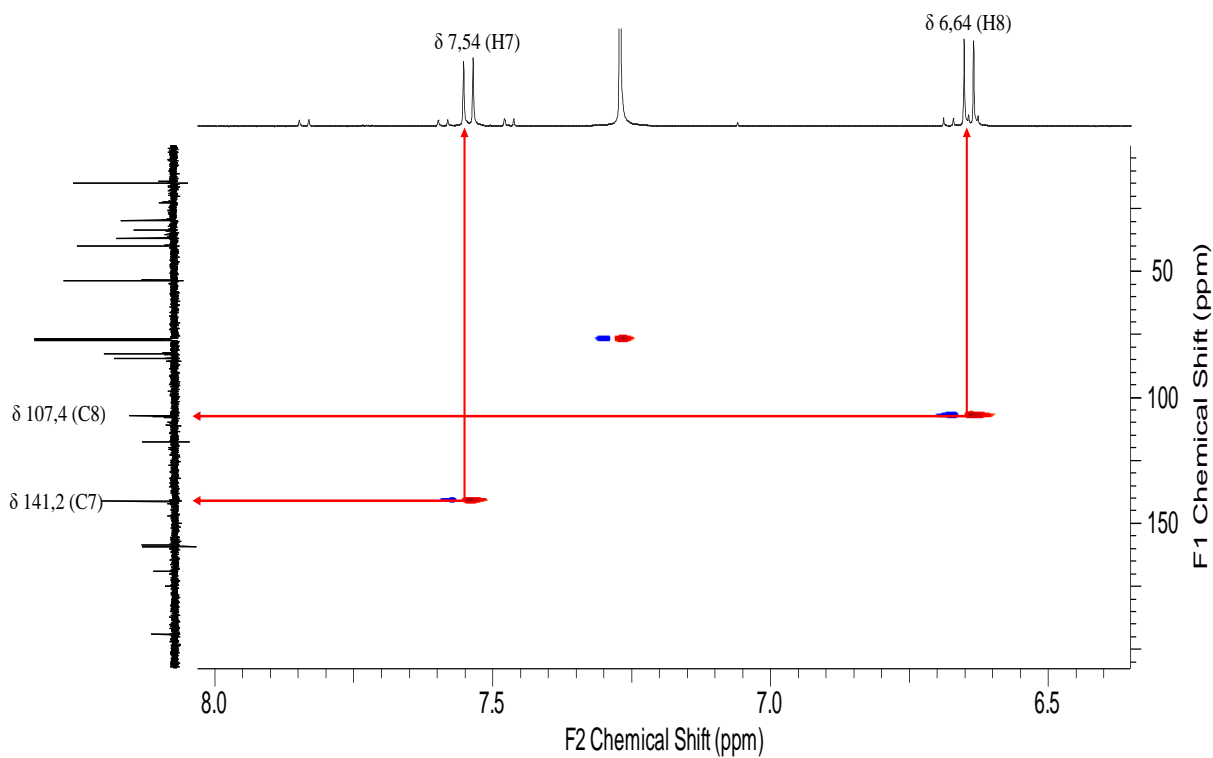


Figura 5S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C - HSQC da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).

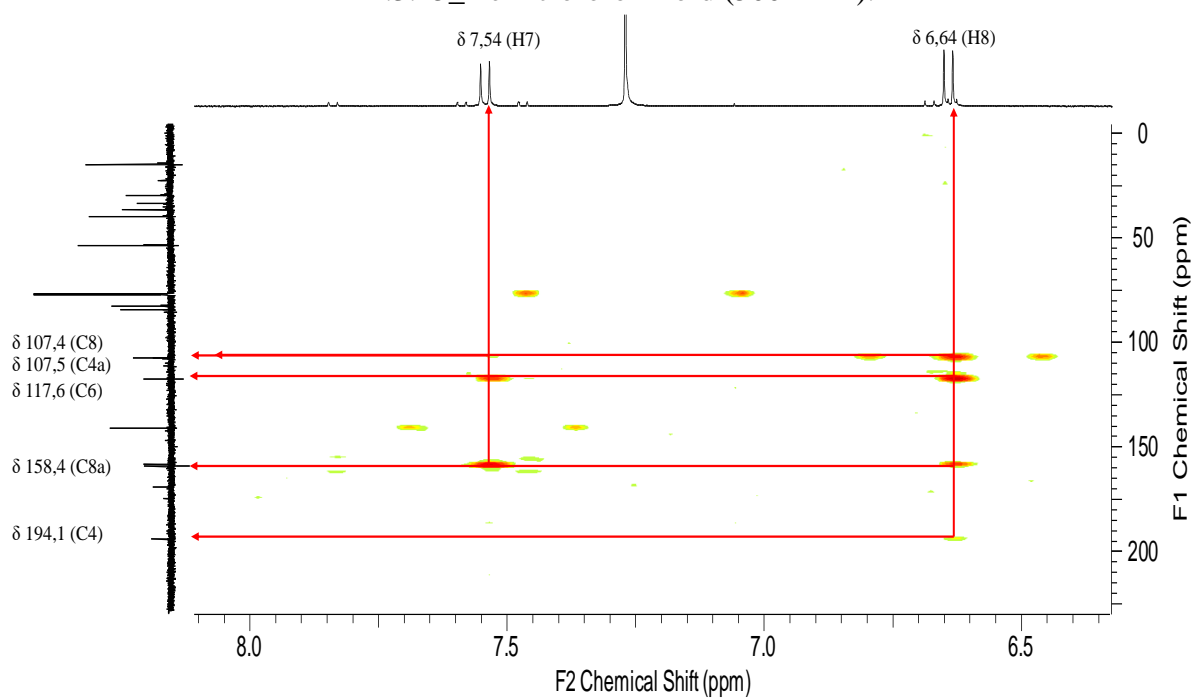


Figura 6S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 7,54 e 6,64 - da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).

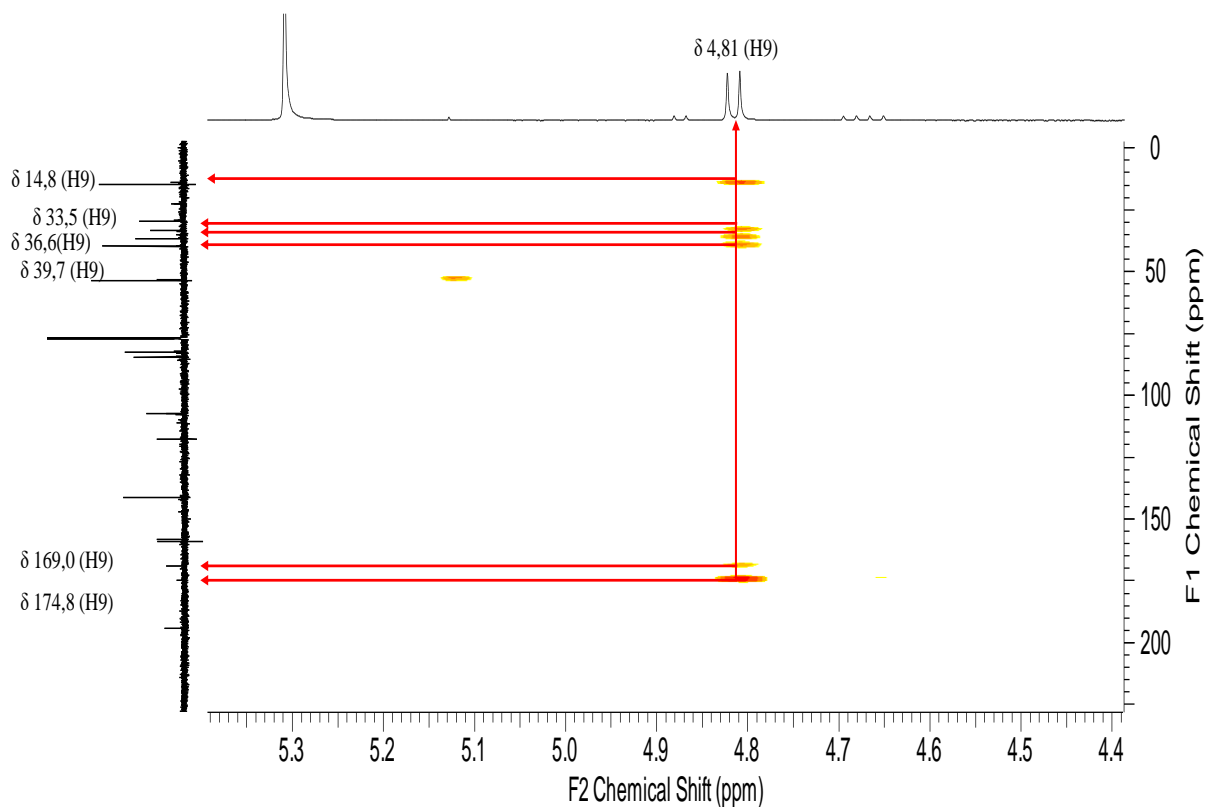


Figura 7S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 4,81 - HMBC da substância ML.3.15_2 8 em clorofórmio- d_6 (500 MHz).

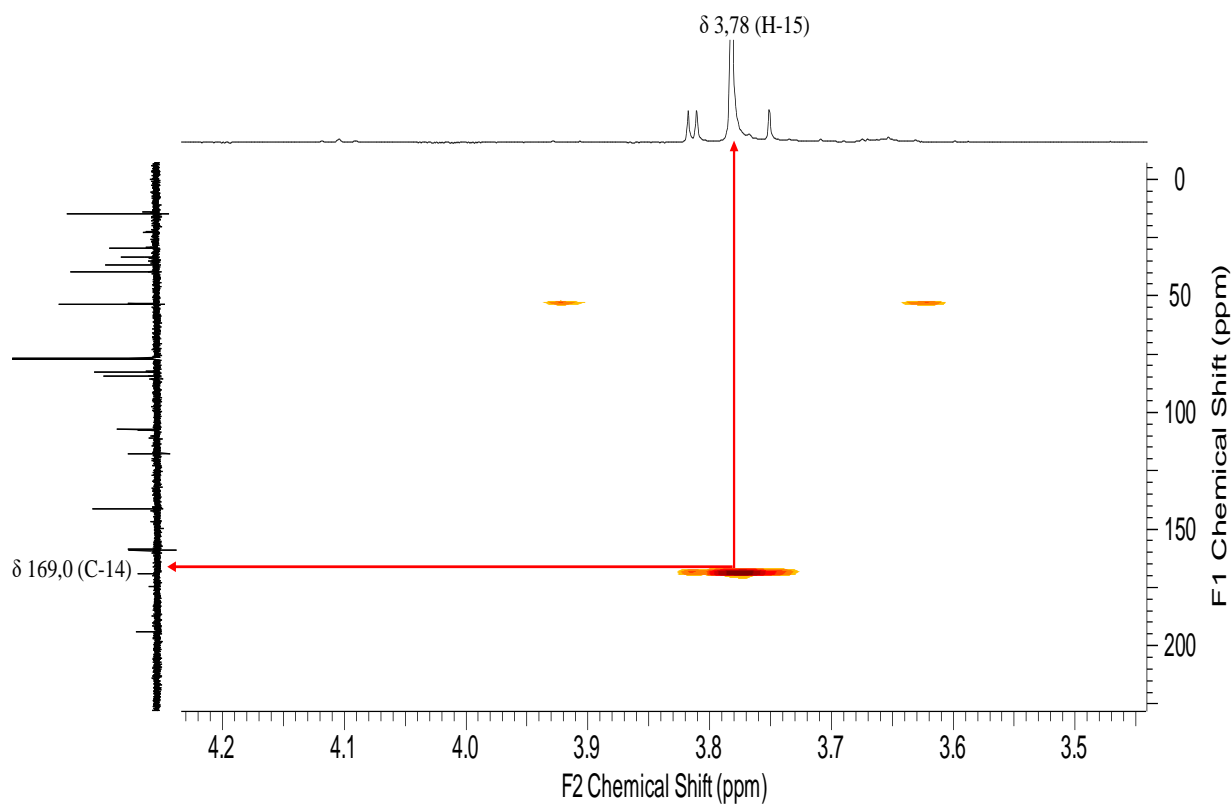


Figura 8S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ^1H e ^{13}C do sinal δ 3,73 - HMBC da substância ML.3.15_2 em clorofórmio- d (500 MHz).

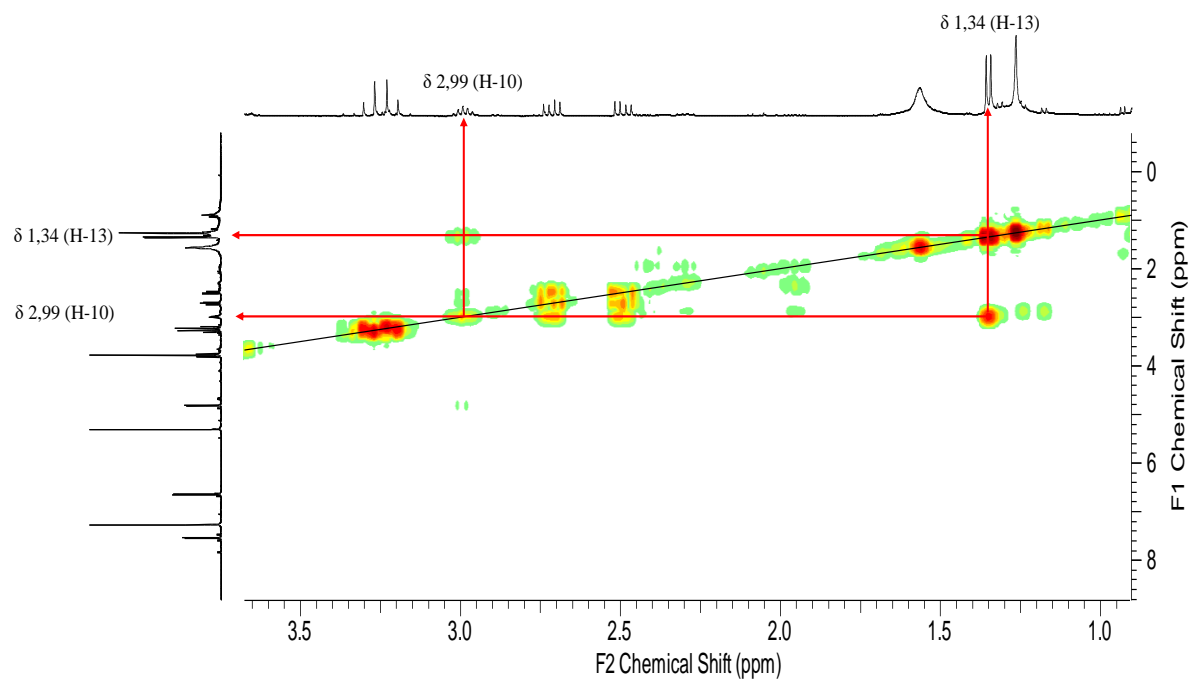


Figura 9S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ¹H e ¹³C do sinal δ 2,99 e 1,34 - COSY da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).

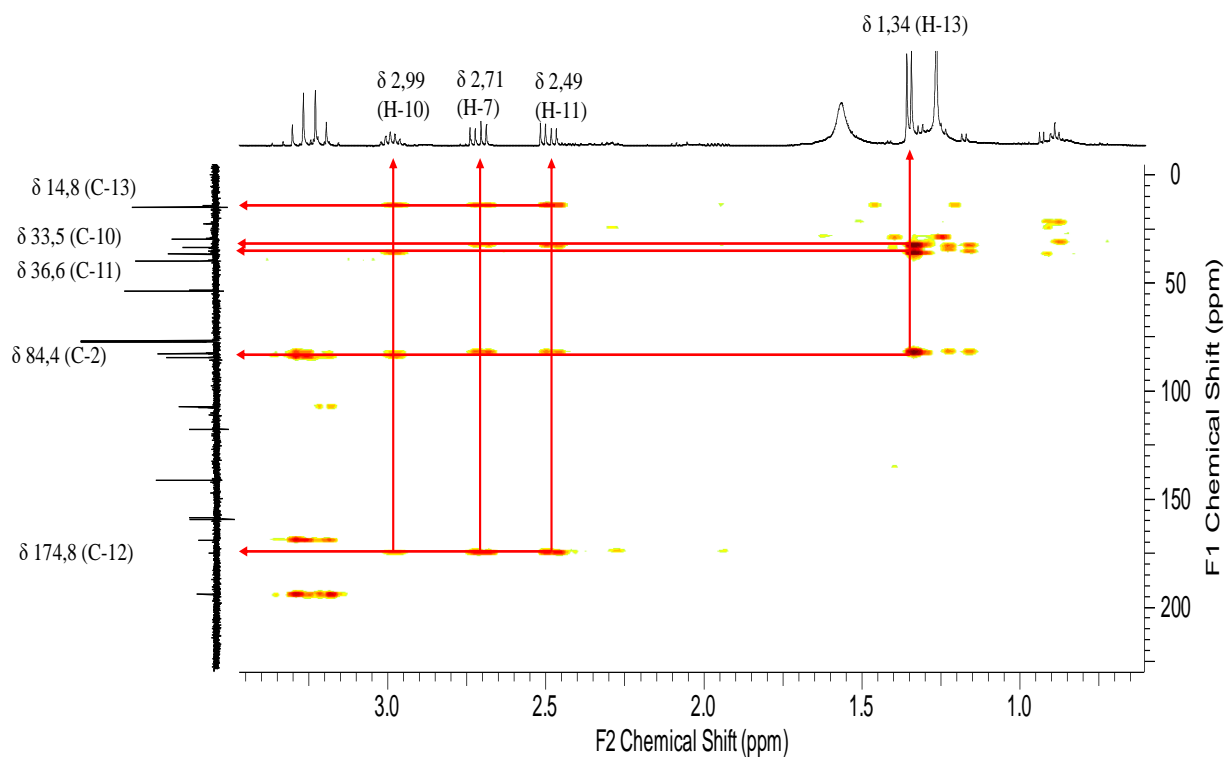


Figura 10S. Ampliação do mapa de correlação homonuclear de ¹H e ¹³C do sinal δ 1,34, 2,49, 2,71 e 2,99 - HMBC da substância ML.3.15_2 em clorofórmio-d (500 MHz).

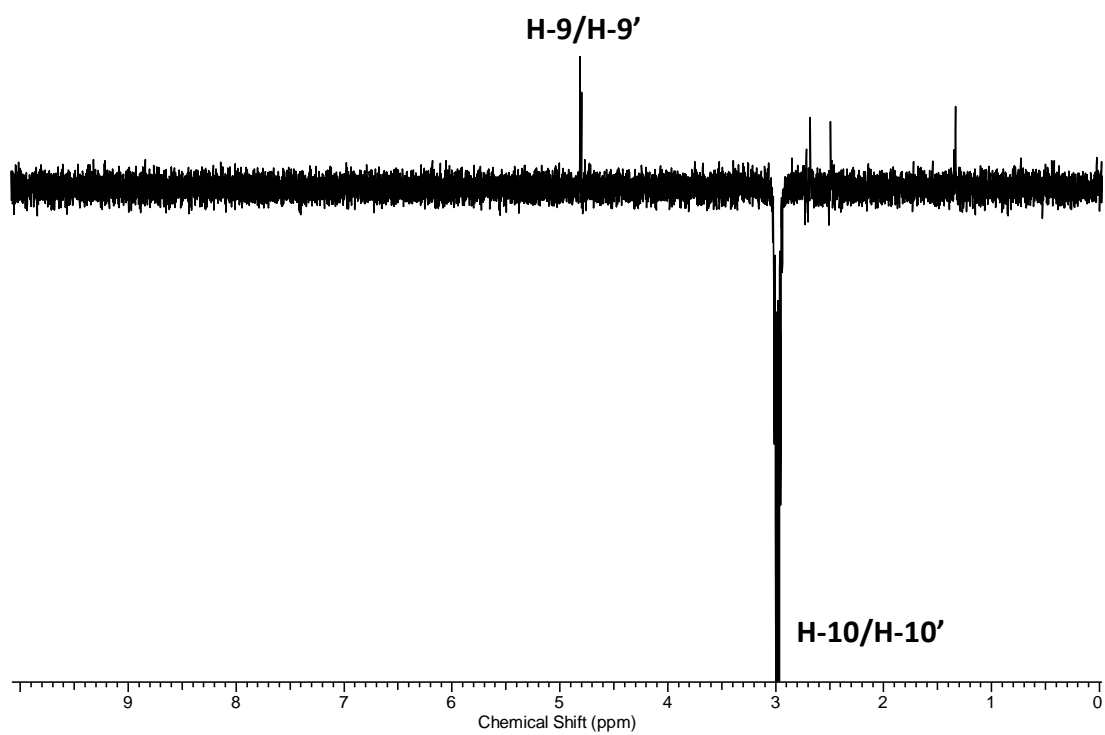


Figura 11S. Espectro de NOESY da substância ML.3.15_2.